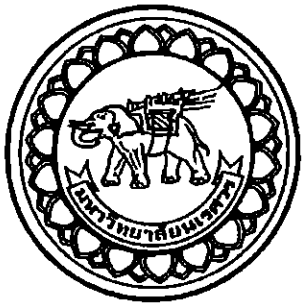


กระบวนการการกำจัดเซลล์ของหลอดลมสุกร
ด้วยเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วงร่วมกับการใช้เอนไซม์

DEVELOPMENT OF ACELLULAR PORCINE TRACHEA USING ENZYME TREATMENT INCORPORATED WITH PERIODIC PRESSURIZED TECHNIQUE

นางสาวเดือนเพ็ญ คำภู รหัส 53364727

นางสาวภรณี ศรีหิรัญ รหัส 53364819

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ

คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ปีการศึกษา 2556

ห้องสมุดคณะวิศวกรรมศาสตร์
วันที่รับ 20 ก.ค. 2558
เลขทะเบียน 168976229
เลขเรียกหนังสือ มร.
มหาวิทยาลัยนเรศวร 09 ธ.ค. 2556

ใบรับรองปริญญานิพนธ์

ชื่อหัวข้อโครงงาน กระบวนการการกำจัดเซลล์ของหลอดลมสุกรด้วยเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วงร่วมกับการใช้เอนไซม์

ผู้ดำเนินโครงงาน นางสาวเดือนเพ็ญ คำภู รหัส 53364727

นางสาวภรณี ศรีหิรัญ รหัส 53364819

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	กระบวนการการกำจัดเซลล์ของหลอดลมสุกรด้วยเทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วงร่วมกับการใช้เอนไซม์
ผู้ดำเนินโครงงาน	นางสาวเดือนเพ็ญ คำภู รหัส 53364727
	นางสาวภรณี ศรีหิรัญ รหัส 53364819
ที่ปรึกษาโครงงาน	ดร.อิศราวุธ ประเสริฐสังข์
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
ภาควิชา	วิศวกรรมอุตสาหการ
ปีการศึกษา	2556

.....

บทคัดย่อ

ในโครงงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการพัฒนากำจัดเซลล์ออกจากหลอดลมสุกร **โดยใช้กระบวนการอัดคลาย**แรงดันแบบเป็นช่วงร่วมกับการใช้เอนไซม์ โดยตัวแปรที่ศึกษา คือ **จำนวนรอบของกระบวน**การอัดคลายแรงดันและระยะเวลาที่ใช้ในการกำจัดเซลล์ โดยใช้เอนไซม์**ทริปซินความเข้มข้น**ร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 6 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่า**การประยุกต์ใช้การอัดค**ลายแรงดันที่ 6 รอบต่อชั่วโมง และ 12 รอบต่อชั่วโมง ส่งผลทำให้สา**มารถกำจัดเซลล์ออก**จากหลอดลมของสุกรได้**ดีขึ้น** เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการกำจัดเซลล์แบบการปั่น**กวน เนื่องจากการประยุกต์ใช้**การอัดคลายแรงดันสามารถช่วยทำให้การแทรกซึมของเอนไซม์เข้าไป**ในหลอดลมสุกรที่มีความซับ**ซ้อนได้มากขึ้น จากการวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยกล้องจุลทรรศน์อิ**เล็กตรอนแบบส่อง**กราด (SEM) พบว่าโครงสร้างของหลอดลมที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ด้วยปั่น**กวนร่วมกับการอัดคลายแรง**แบบช่วงยังมีความแข็งแรง ความความยืดหยุ่น และยังรักษาโครงสร้า**งไว้ได้อย่างสมบูรณ์ เนื่องจา**กพบเส้นใยคอลลาเจนและเส้นใยอีลาสตินอยู่เป็นจำนวนมาก แต่ไม่ปรา**กฏของเซลล์ที่อยู่ภายในหลอดลม**แสดงให้เห็นว่าสามารถกำจัดเซลล์ออกจากหลอดลมของสุกรได้**ดีขึ้น ซึ่งในส่วนของการตรวจสอบโครงสร้างของหลอดลมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) เป็นการศึกษาข้อมูลเชิงคุณภาพของงานวิจัยในครั้งนี้ ส่วนการตรวจสอบปริมาณเซลล์ที่ถูกจำกัดไปของลอดลมนั้นเป็นการศึกษาเชิงปริมาณของงานวิจัยครั้งนี้ ซึ่งในการทำการศึกษานั้นไม่ว่าจะเป็นทางคุณภาพและทางปริมาณให้ผลเป็นที่น่าพอใจเพราะในทางคุณภาพนั้นสามารถรักษาโครงสร้างของหลอดลมไว้ได้ส่วนทางด้านปริมาณนั้นก็ได้มีเซลล์ที่ได้ถูกกำจัดออกจากหลอดลม แม้ว่าปริมาณที่เซลล์ได้ถูกกำจัดไม่ได้สูงมาก แต่ก็สามารถใช้เป็นแนวทางในการศึกษาต่อยอดงานวิจัยนี้ต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลือของหลายๆ ฝ่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ดร.อิศราวุธ ประเสริฐสังข์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน ที่ได้ให้คำแนะนำ คำปรึกษา แนะนำวิธีแก้ปัญหารวมถึงข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนความดูแลเอาใจใส่ ติดตามการดำเนินโครงงานมาโดยตลอด และขอขอบคุณคณะอาจารย์ประจำสาขาวิชาวิศวกรรมเคมี มหาวิทยาลัยนเรศวรทุกท่าน ที่ได้ให้วิชาความรู้ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้

นอกจากนี้ ยังต้องขอขอบคุณ ศูนย์ปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร คุณนภดล ยิ้มน้อย และบริษัท dosem24hr ที่ให้ความรู้และให้ความช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ผล เพื่อใช้ในการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นอย่างดีมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ผู้ดำเนินโครงงานใคร่ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่ได้ให้การดูแล อบรมสั่งสอน และให้กำลังใจด้วยดีเสมอมาตลอดการดำเนินโครงงานจนสำเร็จการศึกษา

ผู้ดำเนินโครงงาน
นางสาวเดือนเพ็ญ คำภู
นางสาวภรณี ศรีหิรัญ

ธันวาคม 2556

สารบัญ

หน้า

ใบรับรองปริญญานิพนธ์.....ก
บทคัดย่อ.....ข
กิตติกรรมประกาศ.....ค
สารบัญ.....ง
สารบัญตาราง.....ฉ
สารบัญรูป.....ช

บทที่ 1 บทนำ.....1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงาน.....2
1.3 ขอบเขตการดำเนินโครงงาน.....2
1.4 สถานที่ในการดำเนินโครงงาน.....2
1.5 ระยะเวลาในการดำเนินโครงงาน.....2
1.6 ขั้นตอนและแผนการดำเนินโครงงาน.....3

บทที่ 2 หลักการและทฤษฎีเบื้องต้น.....4
2.1 หลอดลมและองค์ประกอบของหลอดลม.....4
2.2 ลักษณะทางกายวิภาคของหลอดลม.....4
2.3 ลักษณะจุลกายวิภาคของหลอดลม.....6
2.4 หลอดลมสุกร.....9
2.5 หลอดลมเทียม.....10
2.6 เทคนิคการกำจัดเซลล์.....11
2.7 หลักการทำงานของเอนไซม์.....14
2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์.....15
2.9 เทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง.....17
2.10 เทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง (Periodic Pressurized Technique).....19
2.11 การวิเคราะห์หาปริมาณการกำจัดเซลล์ของหลอดลมสุกรด้วยเทคนิค DNA.....20
2.12 หลักการทำงานของเครื่อง Fluorescence Spectrophotometer.....20
2.13 หลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM).....21
2.14 หลักการทำงานของเครื่อง Fourier Transform Infrared (FTIR) 21

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 2 หลักการและทฤษฎีเบื้องต้น....4

2.15 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง....24

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย....28

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี....28

3.2 วิธีการทดลอง....28

3.3 การวิเคราะห์คุณสมบัติ....31

บทที่ 4 ผลการทดลองและการวิเคราะห์....34

4.1 การวิเคราะห์ลักษณะสัณฐานของหลอดลมหมูด้วยเทคนิคการการส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM)....34

4.2 การวิเคราะห์สมบัติทางด้านเคมีของคอลลาเจน....38

4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณการกำจัดเซลล์ของหลอดลมหมูด้วยเทคนิค DNA 40

บทที่ 5 บทสรุปและข้อเสนอแนะ....40

5.1 บทสรุป....43

5.2 ข้อเสนอแนะ....43

เอกสารอ้างอิง....44

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1.1 ขั้นตอนและแผนการดำเนินการวิจัย....3

2.1 แสดงอุณหภูมิจุดสมดุลสถานะ (Triple Point) 18

2.2 ความถี่ของการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของหมู่ฟังก์ชันต่างๆ....22

4.1 แสดงภาพที่ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 50 เท่า 36

4.2 แสดงภาพที่ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 200 เท่า 37

4.3 องค์ประกอบของ FTIR สเปกตรัมของคอลลาเจนมาตรฐาน.... 39

4.4 แสดงสภาวะในการทดลอง....40

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 กายวิภาคของหลอดลม....5

2.2 แสดงลักษณะจุลกายวิภาคของหลอดลม....7

2.3 แผนภาพ Phase Diagram....17

2.4 ตัวอย่างการอัดคลายแรงดันที่ 4 บาร์ ที่จำนวน 6 รอบต่อชั่วโมง....19

3.1 แผนภาพขั้นตอนการทดลอง....29

3.2 ขั้นตอนการเตรียมหลอดลมสุกร....30

3.3 เครื่องอัดคลายแรงดันแบบช่วง....30

3.4 ตัวอย่างการอัดคลายแรงดันแบบช่วงที่ 4 บาร์ จำนวน 6 รอบต่อชั่วโมง....31

3.5 ก) หลอดลมที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ ข) หลอดลมที่ผ่านการทำแห้ง....31

3.6 ก) หลอดลมที่เตรียมไว้เพื่อนำไปพ่นเคลือบด้วยทองคำ

ข) หลอดลมที่ผ่านการพ่นเคลือบด้วยทองคำ....32

3.7 แสดงบริเวณที่ทำการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด....32

4.1 FTIR สเปกตรัมของคอลลาเจนมาตรฐาน....38

4.2 FTIR สเปกตรัมของหลอดลม....39

4.3 แสดงแผนภูมิเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่พบในหลอดลมสุกรของแต่ละสภาวะ....41

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

หลอดลม (Trachea) เป็นส่วนหนึ่งของระบบทางเดินหายใจได้มีหน้าที่หลัก คือ การนำส่งอากาศจากภายนอกร่างกายเข้าสู่ปอดเพื่อทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนก๊าซออกซิเจนเข้าสู่เลือดและนำก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากร่างกาย [1] หลอดลมมีชื่อเรียกที่แตกต่างกันตามขนาดและตำแหน่งซึ่งได้แก่ หลอดลมใหญ่ (Trachea) เป็นส่วนที่อยู่ต่อจากกล่องเสียงยาวลงไปจนถึงจุดที่แยกเข้าสู่ปอดด้านซ้ายและด้านขวา หลอดลมของปอด (Bronchus) เป็นแขนงของหลอดลมใหญ่ ซึ่งอยู่ในแต่ละข้างของปอด เริ่มต้นต่อจากหลอดลมใหญ่ลึกเข้าไปในเนื้อปอด หลอดลมเหล่านี้เมื่ออยู่ลึกเข้าไป ก็จะมีการแตกแขนงแยกย่อยลงไปอีกตามตำแหน่งของเนื้อปอด เช่น หลอดลมของปอดกลีบบน (Upper Lobe Bronchus) หลอดลมของปอดกลีบล่าง (Lower Lobe Bronchus) รวมถึงหลอดลมแขนง (Segmental Bronchus) เป็นต้น หลอดลมฝอย (Bronchiole) เป็นแขนงย่อยของหลอดลมของปอด หลอดลมฝอยเหล่านี้บางส่วนนอกจากจะสามารถนำก๊าซเข้าสู่ปอดได้แล้วยังสามารถทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนก๊าซได้ด้วย แต่ไม่เป็นหน้าที่หลักเหมือนถุงลมเนื่องจากหลอดลมมีหน้าที่สำคัญในระบบทางเดินหายใจ ดังนั้นหากเกิดความผิดปกติของหลอดลมจะส่งผลทำให้ระบบการระบายก๊าซของร่างกายเสียไปด้วย [2] โรคของหลอดลมที่พบได้บ่อย ได้แก่ โรคหืด (Asthma) และโรคหลอดลมอุดกั้นเรื้อรัง (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) เป็นต้น ปัญหาที่ทำให้เกิดโรคเกิดได้จากสาเหตุต่างๆ อาทิเช่น เกิดจากเชื้อไวรัสเหมือนไข้หวัดหรือเกิดจากการได้รับสิ่งแวดล้อมที่เป็นพิษ เช่น ควันบุหรี่ กลิ่นสี สารเคมี ฝุ่น เป็นต้น [3, 5]

การรักษาในปัจจุบันมีหลายวิธี ได้แก่ การขยายหลอดลม โดยการใส่อุปกรณ์ถ่ายหลอดลมหรือการใช้ยา อาทิเช่น ยาประเภทสเตอรอยด์ แต่มีข้อเสีย คือ เมื่อใช้ยานี้ในปริมาณสูง (เกินกว่า 1,000 ไมโครกรัมของบิวดีโซไนด์หรือเทียบเท่าต่อวัน) และเป็นระยะเวลานานอาจจะทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนได้ เช่น ต้อกระจก ต้อหิน ภาวะกระดูกบาง การเติบโตของเด็กช้ากว่าปกติ เสียงแหบ เป็นต้น การตัดหลอดลมส่วนที่ตีบออก แต่มีข้อจำกัด คือ ไม่สามารถตัดออกได้ยาวนักเพราะจะมีผลกระทบต่อระบบการหายใจ [4] ปัจจุบันมีรายงานในต่างประเทศเกี่ยวกับรูปแบบการรักษา โดยการใช้หลอดลมจากผู้บริจาคมาเชื่อมต่อแทนหลอดลมส่วนที่ตีบซึ่งต้องตัดออก โดยหลอดลมจากผู้บริจาคอาจนำมาใช้โดยตรงหรือนำไปผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์และภูมิคุ้มกันบางส่วนออกเพื่อลดโอกาสการเกิดการต่อต้านทางภูมิคุ้มกันในผู้ป่วย [6]

กระบวนการการรักษาด้วยการทดแทนหลอดลมอันเก่าที่เสียไป โดยการใช้หลอดลมเทียม ซึ่งหลอดลมที่นิยมในการนำมาแทนอันเก่าที่เสียไป ในปัจจุบันนั้นเป็นหลอดลมที่ได้มาจากมนุษย์ที่ได้รับจากการบริจาค ซึ่งในการทำหลอดลมเทียมจากหลอดลมมนุษย์นั้นจะนำเอาหลอดลมผ่านกระบวนการทำให้ปราศจากเซลล์และใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเซลล์ของผู้ป่วยในหลอดลมที่

ปราศจากเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อใช้ในการเตรียมก่อนการปลูกถ่ายหลอดลมดังกล่าวในผู้ป่วย การใช้หลอดลมมนุษย์มีข้อจำกัด คือ ยอดในการบริจาคของหลอดลมในแต่ละปีนั้นมีไม่เพียงพอต่อจำนวนผู้ป่วย [6] ดังนั้นในการศึกษาวิจัยนี้จึงมีความสนใจพัฒนาการผลิตหลอดลมเทียมจากหลอดลมสุกร โดยใช้วิธีการอัดคลายแรงดันซึ่งเป็นวิธีทางวิศวกรรมร่วมกับการใช้เอนไซม์ทริปซินในกระบวนการกำจัดเซลล์เพื่อลดระยะเวลาในการกำจัดเซลล์ให้น้อยลงและใช้หลอดลมสุกรในการเตรียม เนื่องจากสุกรถือว่าเป็นสัตว์ที่ถูกนำมาใช้ในการปลูกถ่ายอวัยวะในมนุษย์มากที่สุดและมีความเหมาะสมของอวัยวะและเนื้อเยื่อรวมถึงลักษณะเฉพาะทางกายวิภาคและการทำงานของระบบในร่างกายคล้ายกับของมนุษย์เป็นอย่างมาก นอกจากนี้ยังช่วยทดแทนหลอดลมมนุษย์ที่ขาดแคลนให้มีจำนวนเพียงพอต่อผู้ป่วย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการกำจัดเซลล์ออกจากหลอดลมสุกร โดยใช้กระบวนการอัดคลายแรงดันแบบเป็นช่วงร่วมกับการใช้เอนไซม์

1.3 ขอบเขตการดำเนินการวิจัย

1.3.1 ตัวแปรที่ใช้ในการศึกษา

1.3.1.1 จำนวนรอบในการอัดคลายแรงดัน (6 และ 12 รอบต่อชั่วโมง)

1.3.1.2 ระยะเวลาในการกำจัดเซลล์ (0-24 ชั่วโมง)

1.3.2 ตัวแปรควบคุม

1.3.2.1 ขนาดของหลอดลมสุกรเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร และมีความยาว 2 เซนติเมตร จากหมูในช่วงอายุ 3-4 เดือน

1.3.2.2 ชนิดและความเข้มข้นของสารละลาย

1.3.2.3 ความดันภายในถังอัดคลายแรงดัน 4 บาร์

1.3.2.4 จำนวนครั้งในการเปลี่ยนสาร (4 ครั้งต่อ 24 ชั่วโมง)

1.4 สถานที่ในการดำเนินการวิจัย

อาคารปฏิบัติการวิศวกรรมอุตสาหการ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

1.5 ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

ตั้งแต่เดือนเมษายน พ.ศ. 2556 ถึง เดือนธันวาคม พ.ศ. 2556

1.6 ขั้นตอนและแผนการดำเนินการวิจัย

ตารางที่ 1.1 ขั้นตอนและแผนการดำเนินการวิจัย

	การดำเนินโครงงาน	ช่วงเวลา								
		เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.
1.6.1	รวบรวมข้อมูล	←	→							
1.6.2	วางแผนดำเนินงาน		←	→						
1.6.3	หาเครื่องมือและวัตถุดิบเพื่อทำการทดลอง			←	→					
1.6.4	ทำการทดลอง				←	→				
1.6.5	วิเคราะห์ผลการทดลอง						←	→		
1.6.6	สรุปผลการทดลองและทำรายงานวิจัย								←	→

บทที่ 2
หลักการและทฤษฎีเบื้องต้น

2.1 หลอดลมและองค์ประกอบของหลอดลม

หลอดลมหรือ Trachea เป็นท่อทางเดินหายใจส่วนล่าง (Lower Respiratory Tract) ที่อยู่ระหว่างกล่องเสียง (Larynx) และแขนงของหลอดลม (Main Bronchus หรือ Primary Bronchus) [2] โดยมีผนังด้านหลังแบนติดกับหลอดอาหารยาวประมาณ 4.5 นิ้ว กว้างประมาณ 1 นิ้ว หลอดลมเป็นส่วนที่ต่อจากกล่องเสียง บริเวณที่เริ่มต้นของหลอดลมจะอยู่ในระดับกระดูกสันหลังตอนคอท่อนที่ 6 ปลายล่างแยกออกเป็นขั้วปอด (Bronchus) 2 ข้าง ที่ระดับกระดูกสันหลังตอนนอกท่อนที่ 5 ของหลอดลมประกอบด้วยกระดูกอ่อนชนิด Hyaline Cartilage ที่มีรูปร่างคล้ายตัว C (ด้านหลังไม่ติดต่อกัน) เรียงต่อกันประมาณ 16-20 ชั้น ทำให้หลอดลมไม่แบน ซึ่งในกระดูกอ่อนแต่ละชิ้นจะถูกยึดด้วย Fibrous Tissue และ Elastic Tissue ผนังภายในบุด้วย Mucous Membrane มีเยื่อบุผิวอยู่ข้างบนและมีขนอ่อน (Cilia) ด้วย ผนังด้านในมี Goblet Cells ซึ่งทำหน้าที่ผลิตน้ำเมือกเหนียวๆ ออกมาเพื่อคอยดักฝุ่นละออง ขนอ่อนจะพยายามโบกพัดฝุ่นละอองออกมาข้างนอก โดยปัดขึ้นไปข้างบนอยู่เสมอ ผนังด้านนอกสุดเป็น Fibrous Membrane และจะมีกล้ามเนื้อเรียบแทรกอยู่ด้วยในบริเวณที่ไม่มีกระดูกอ่อน [7]

2.2 ลักษณะทางกายวิภาคของหลอดลม [8]

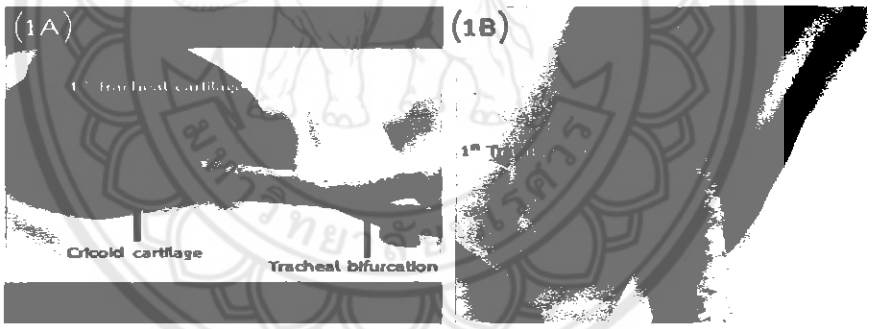
หลอดลมเป็นท่อทางผ่านเข้าออกของอากาศระหว่างกล่องเสียงและปอด จุดเริ่มต้นของหลอดลมนั้นจะเริ่มจากขอบล่างของกระดูกอ่อน Cricoid Cartilage จนถึง Apex ของ Tracheal Bifurcation ลักษณะเป็นรูปร่างทรงกระบอกที่ยืดหยุ่นได้ประกอบด้วยกระดูกอ่อนรูปตัวซี Hyaline cartilage มาเรียงต่อกันเป็นท่อที่ไม่สมบูรณ์ ในทางด้านหลังของท่อจะถูกปิดด้วย Fibromuscular Membrane ถ้าตัดตามขวางของหลอดลมจะมีลักษณะรูปคล้ายอักษร D

จุดเริ่มของหลอดลมตรงกับกระดูกสันหลังส่วนคอที่แตกต่างกันในแต่ละช่วง เช่น อายุเด็กแรกเกิดนั้นจะตรงกับกระดูกสันหลังระดับคอชิ้นที่ 2 อายุ 5 ปี ตรงกับกระดูกสันหลังระดับคอชิ้นที่ 5 และเมื่ออายุ 15 ปี จะตรงกับกระดูกสันหลังระดับคอชิ้นที่ 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 อัน ในบางคนอาจมีมากถึง 26 อัน ความกว้างของ Cartilage อยู่ระหว่าง 3-5 มิลลิเมตร ความหนาอยู่ที่ 2 มิลลิเมตร ซึ่งจะคล้ายกับการศึกษาของ Grillo ในปี ค.ศ. 2004 ที่ได้มีการศึกษาถึงลักษณะโดยทั่วไปของหลอดลม พบว่าหลอดลมไม่มีความแตกต่างกันระหว่าง

เด็กและผู้ใหญ่ ยกเว้นขนาดของหลอดลม โดยในผู้ใหญ่จะมีขนาดที่เพิ่มขึ้น ลักษณะของ Tracheal Cartilage ชิ้นแรกและชิ้นสุดท้ายจะแตกต่างจาก Tracheal Cartilage ในส่วนอื่นๆ โดยจะพบว่า Tracheal Cartilage ชิ้นแรกมีขนาดกว้างที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชิ้นอื่นๆ ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดลมประมาณ 1.5-2 เซนติเมตร ส่วน Tracheal Cartilage ชิ้นสุดท้ายจะมีขนาดค่อนข้างหนาและกว้าง นอกจากนี้ยังพบ Triangular Process ใน Tracheal Cartilage ชิ้นสุดท้ายที่มีลักษณะยื่นลงล่างเยื้องไปด้านหลัง

นอกจากนี้ในการศึกษาของ Grillo ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Naidich และคณะ ในปี ค.ศ. 1999 ซึ่งระบุว่าขนาดของ Tracheal Lumen ขึ้นอยู่กับเพศ อายุ ความสูงของแต่ละบุคคล ผู้ชายจะกว้างกว่าผู้หญิงทั้งการวัดในแนว Coronal Plane และ Sagittal Plane (ผู้ชาย Tracheal Diameter แนว Coronal Plane ยาว 13-25 มิลลิเมตร Sagittal Plane ยาว 13-27 มิลลิเมตร ส่วนผู้หญิง Coronal Plane ยาว 10-21 มิลลิเมตร Sagittal Plane ยาว 10-23 มิลลิเมตร) และได้กล่าวไว้ว่ารูปร่างของ Tracheal Lumen จะเปลี่ยนแปลงตามการเพิ่มขึ้นของอายุจากรูปร่างกลมไปเป็นรูปไข่ นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ Tracheal Lumen ยังขึ้นอยู่กับ Respiratory Cycle อีกด้วย กล่าวคือ ขณะหายใจเข้าหลอดลมส่วนคอจะแคบ แต่หลอดลมส่วนทรวงอกจะกว้าง ในทางตรงกันข้ามขณะหายใจออกหลอดลมส่วนคอจะกว้างแต่หลอดลมส่วนทรวงอกจะแคบ



รูปที่ 2.1 กายวิภาคของหลอดลม ตั้งแต่ขอบล่างของ Cricoid Cartilage จนถึง Tracheal Bifurcation ประกอบด้วย Tracheal Cartilage ประมาณ 15-20 อัน ท่อหลอดลมส่วนบนจะกว้าง ส่วนล่างจะแคบลง

ที่มา: Anatomical Review of Human Trachea จาก วารสารนิติเวชศาสตร์ ปีที่ 5 ฉบับที่ 1 เดือนมกราคม-เมษายน 2556

ความยาวของหลอดลมวัดจากขอบล่างของ Cricoid Cartilage จนถึง Apex ของ Tracheal Bifurcation จากรูปที่ 2.1 (1A) นั้นจะมีความแตกต่างกันตามช่วงอายุ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Langova ในปี ค.ศ. 1946 ได้มีการศึกษาความยาวของหลอดลมในร่างอาจารย์ใหญ่ 390 ร่าง ในช่วงอายุ 6 เดือน จนถึง 20 ปี พบว่าความยาวของหลอดลมในเด็กแรกเกิด มีความยาว 3.1 เซนติเมตร อายุ 5 ปี ยาว 6 เซนติเมตร อายุ 10 ปี ยาว 7 เซนติเมตร อายุ 15 ปี ยาว 8.5 เซนติเมตร ผู้ใหญ่มี

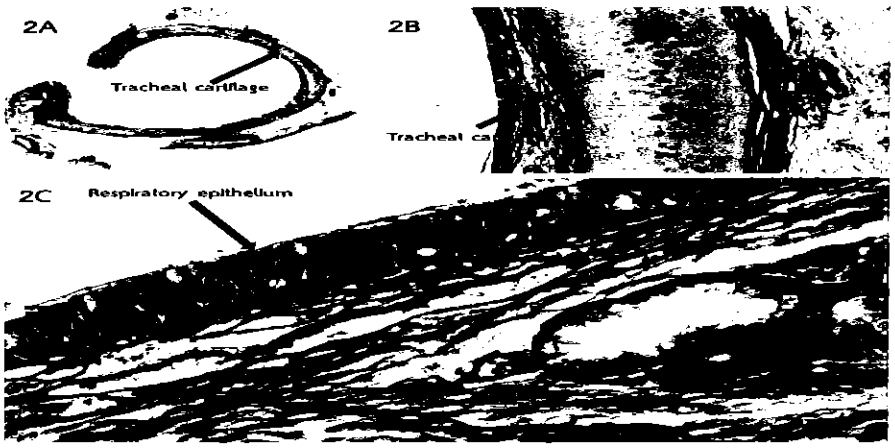
ความยาวของหลอดลมอยู่ระหว่าง 8.5–15 เซนติเมตร ในส่วนการศึกษาของ Tehmina และคณะ ในปี ค.ศ. 2009 ศึกษาความยาวของหลอดลมในผู้ใหญ่เพศชายช่วงอายุระหว่าง 20-58 ปี พบว่าค่าเฉลี่ยความยาวของหลอดลมมีความแตกต่างกันในแต่ละช่วงอายุ โดยพบว่าอายุระหว่าง 20-29 ปี ค่าเฉลี่ยความยาวของหลอดลมเท่ากับ 8.73±0.21 เซนติเมตร อายุระหว่าง 30-39 ปี ค่าเฉลี่ยความยาวของหลอดลม เท่ากับ 9.53±0.46 เซนติเมตร อายุระหว่าง 40-49 ปี ค่าเฉลี่ยความยาวของหลอดลมเท่ากับ 9.63±0.23 เซนติเมตร อายุระหว่าง 50-59 ปี ค่าเฉลี่ยความยาวของหลอดลมเท่ากับ 9.76±0.39 เซนติเมตร สรุปค่าเฉลี่ยโดยรวมของความยาวของหลอดลมในผู้ชายยาว 11 เซนติเมตร ในหญิงยาว 10 เซนติเมตร

หลอดลมแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ หลอดลมส่วนคอ (Cervical Part) และหลอดลมส่วนทรวงอก (Thoracic Part) โดยใช้ Superior Thoracic Aperture เป็นตัวแบ่งหลอดลมส่วนทรวงอกในเด็กจะสั้นกว่าหลอดลมส่วนคอ ตรงกันข้ามในผู้ใหญ่หลอดลมส่วนทรวงอกจะยาว 2 ใน 3 ของความยาวหลอดลมทั้งหมด

การวางตัวของหลอดลมใต้ผิวหนังมีระยะห่างเพิ่มขึ้นในส่วนท้ายๆ ของหลอดลม โดยหลอดลมส่วนบนๆ จะอยู่ชิดผิวหนังมากสุดมีระยะห่างจากผิวหนังเพียง 1-2 เซนติเมตร หลอดลมตรงระดับ Thoracic Inlet อยู่ห่างจากผิวหนังประมาณ 3-4 เซนติเมตร และหลอดลมในบริเวณ Bifurcation จะอยู่ห่างจากผิวหนังประมาณ 6-12 เซนติเมตร ทั้งนี้ระยะห่างระหว่างหลอดลมและผิวหนังนั้นยังขึ้นอยู่กับต่อมไทรอยด์ (Thyroid Gland) รวมถึงความหนาของเนื้อเยื่อไขมันอีกด้วย

2.3 ลักษณะจุลกายวิภาคของหลอดลม

ผนังของหลอดลมด้านในจะถูกบุด้วย Pseudostratified Columnar Epithelium มี Goblet Mucous Cell และ Small Subepithelial Gland แทรกระหว่าง Ciliated Columnar Cell โดยมี Tight Junction ยึดอยู่ระหว่างเซลล์ มีกระดูกอ่อนที่ประกอบกันเป็นหลอดลมเป็นชนิด Hyaline Cartilage และลักษณะเป็นรูปตัวอักษรซี C มีเยื่อหุ้มกระดูกอ่อน (Perichondrium) คลุมด้านนอกของแท่งกระดูกอ่อน ในเยื่อหุ้มกระดูกอ่อนจะประกอบไปด้วย Collagen Fiber เป็นส่วนใหญ่และมี Elastic Fiber เป็นส่วนน้อย มีกล้ามเนื้อเรียบอยู่ด้านหลังของ Tracheal Cartilage โดยยึดที่ส่วนปลายของ Tracheal Cartilage ทำหน้าที่ป้องกันการขยายที่มากเกินไปของหลอดลม ดังที่แสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะจุลกายวิภาคของหลอดลมประกอบด้วยกระดูกอ่อนชนิด Hyaline Cartilage (2A, 2B) ภายในผนังของหลอดลมถูกบุด้วย Pseudostratified Columnar Epithelium ที่มี Goblet Mucous Cell เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Respiratory Epithelium (2C)

ที่มา: สำนักการแพทย์ กรุงเทพมหานคร

2.3.1 หลอดเลือดและเส้นประสาทที่มีหน้าที่หล่อเลี้ยงหลอดลม

หลอดลมนั้นจะถูกหล่อเลี้ยงด้วยเส้นประสาทอัตโนมัติทั้ง Sympathetic Fiber และ Parasympathetic Fiber โดยที่ Sympathetic Fiber นั้นจะเป็น Postganglionic Fiber ในส่วนของ Parasympathetic Fiber เป็น Preganglionic Fiber ซึ่งจะเชื่อมกับเซลล์ประสาทที่ปมประสาทในผนังของหลอดลมที่เป็น Postganglionic Fiberm กับ Sympathetic Fiber และรวมไปถึง Parasympathetic Fiber จากนั้นส่งไปเลี้ยงที่ Seromucous Gland กล้ามเนื้อเรียบและหลอดเลือดต่างๆ นอกจากนี้ยังมี Recurrent Laryngeal Nerve เป็น Sensory Afferent วางตัวอยู่ในส่วนของ Tracheoesophageal Groove จะแทงทะลุเข้าไปในหลอดลมทำหน้าที่รับความรู้สึกบริเวณด้านในของหลอดลม

หลอดเลือดแดงที่เลี้ยงหลอดลมจะมาจากแขนงของ Inferior Thyroid Artery และ Bronchial Artery โดยที่ Inferior Thyroid Artery จะให้แขนงเลี้ยงในส่วนบนของหลอดลมและ Bronchial Artery ให้แขนงเลี้ยงในส่วนล่างของหลอดลม เลือดที่เข้ามาเลี้ยง Tracheal Cartilage จะผ่านมาทางเยื่อบุผิวที่ไม่มี Capillary Network ที่บริเวณผิวนอกของหลอดลม ดังนั้นหากมีการกดทับของ Tracheal Mucosa จะเกิด Necrosis ที่ Tracheal Cartilage นั้นได้ Bronchial Artery เลี้ยงส่วนปลายของหลอดลมและ Carina ส่วนหลอดเลือดแดงอื่นๆ ที่จะเข้ามาเลี้ยงในส่วนบนๆ ของหลอดลมส่วนทรวงอก ซึ่งมาจาก Innominatesubclavian System เช่น Supreme Intercostal Artery Subclavian Artery Mammary Artery และ Innominate Artery หลอดเลือดดำ Inferior Thyroid Venous Plexus ทำหน้าที่รับเลือดเสียจากหลอดลมเข้าไปที่ระบบไหลเวียนเลือดต่อไป

2.3.2 การไหลเวียนของระบบน้ำเหลือง (Lymphatic Drainage)

ต่อมน้ำเหลือง (Lymph Node) ส่วนใหญ่จะวางอยู่บริเวณ Carinal Region ซึ่งได้แก่ Inferior Tracheobronchial Node และ Superior Bronchial Node ทั้งซ้ายและขวา โดยที่ต่อมน้ำเหลืองกลุ่มที่อยู่ส่วนบนจะยาว 2 ใน 3 ของความยาวหลอดลม จะเข้าไปที่ Pretracheal Lymph Node และ Paratracheal Lymph Node จากนั้นจะลำเลียงไปที่ Lower Jugular Node ก่อนเข้าที่ระบบไหลเวียนเลือดต่อไป

2.3.3 เซลล์และองค์ประกอบจุลภาคที่พบภายในหลอดลม [9]

2.3.3.1 Goblet Cell มีลักษณะคล้ายแก้วไวน์ ส่วนที่ฐานแก้วจะเป็นที่อยู่ของนิวเคลียส ส่วนโครงสร้างทรงกลมสองอันที่ทับอยู่บน Apical Cytoplasm ของเซลล์ คือ เซลล์เม็ดเลือดขาวที่เคลื่อนผ่านเนื้อผิวออกมามีขนาดความยาวของเซลล์ประมาณ 50 ไมครอน และจะมีความกว้างของเซลล์ 5-10 ไมครอน อยู่กระจายทั่วไปในชั้นของเนื้อเยื่อนี้เพื่อทำหน้าที่หลั่งเมือก โดยด้านบนของเซลล์อาจพบส่วนที่ยื่นออกมาคล้ายเส้นขนขนาดเล็กเรียกว่า ไมโครวิลไล (Microvilli) ทำหน้าที่ช่วยเพิ่มพื้นที่การดูดซึม

2.3.3.2 Lymphocyte เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีนิวเคลียสใหญ่เกือบเต็มเซลล์ที่มีขนาดประมาณ 6-12 ไมครอน สามารถที่จะสร้างแอนติบอดีขึ้นมาต่อต้านสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคได้ ลิมโฟไซต์มีประมาณร้อยละ 20-25 ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด ลิมโฟไซต์แบ่งออกเป็นหลายชนิด คือ ลิมโฟไซต์ชนิดบีหรือเซลล์บี ซึ่งเจริญพัฒนาที่ไขกระดูกหรือไปเจริญพัฒนาที่เนื้อเยื่อน้ำเหลืองบริเวณลำไส้ ส่วนอีกชนิดหนึ่งเรียกว่า ลิมโฟไซต์ชนิดทีหรือเซลล์ที ซึ่งจะเจริญและพัฒนาที่ต่อมไทมัส

2.3.3.3 Epithelial Cell จะเป็นกลุ่มของเซลล์ที่มีรูปร่างคล้ายคลึงกันเรียงตัวและยึดติดกัน ซึ่งจะมีขนาดที่ประมาณ 7 ไมครอน มีนิวเคลียสกลมโตขอบชัดเกือบเต็มเซลล์และเยื่อบุจะอยู่ตามพื้นผิวภายนอกหรือภายในร่างกายอวัยวะที่เป็นท่อและช่องว่างของร่างกาย โดยทั่วไปแล้วเยื่อบุจะอยู่บนสุดของเนื้อเยื่อชนิดอื่น ซึ่งบริเวณด้านบนของเยื่อบุจึงเป็นด้านที่อิสระ ส่วนด้านล่างเป็นด้านที่ติดกับเนื้อเยื่อประสาทโดยมีเยื่อเบสเมนท์เป็นตัวกั้นแยก

2.3.3.4 Chondrocyte เป็นเซลล์กระดูกอ่อนที่จะมีขนาดของเซลล์ประมาณ 20 ไมครอน ถ้าหากที่อยู่ในบริเวณขอบของกระดูกอ่อนจะมีลักษณะเป็นทรงรีและจะมีลักษณะเป็นทรงกลม แต่หากอยู่บริเวณกลางกระดูกอ่อน ซึ่งมีปริมาณเฉลี่ยประมาณร้อยละ 5 ของปริมาณเนื้อกระดูกอ่อนทั้งหมดอาศัยอยู่ในช่องว่างที่เรียกว่า Lacuna ซึ่งเป็นร่างแหคอลลาเจนขนาดเล็กที่เบียดตัวอย่างแน่นหนาภายในโครงสร้างนอกเซลล์ ในส่วนของกระดูกอ่อนผิวข้อซึ่งจัดเป็นกระดูกอ่อนไฮอะลีน เซลล์กระดูกอ่อนจะทำหน้าที่สร้างสารชีวโมเลกุลต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญของกระดูกอ่อน มีรูปร่างเป็นรูปไข่หรือทรงกลม บริเวณผิวของเซลล์จะมีลักษณะไม่เรียบมากหรือน้อยไปตามกระบวนการที่จะพัฒนาเจริญเติบโตของเซลล์และตำแหน่งที่เซลล์อาศัยอยู่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของสารต่างๆ ที่อยู่ในเมทริกซ์ ในส่วนของขบวนการการสร้างเซลล์มีหน้าที่สร้างสารชีวโมเลกุลต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน เช่น คอลลาเจน โปรตีนโอกลัย-

แคน ไฮยาลูโรแนน และโปรตีนเชื่อมต่อออกจากเซลล์มาสู่เมทริกซ์และในส่วนของกระบวนการสลายเซลล์กระดูกอ่อน สร้างเอนไซม์ต่างๆ เช่น เอนไซม์โปรติเอสทำหน้าที่สลายโปรตีน เอนไซม์คอลลาจีเนสทำหน้าที่สลายเส้นใยคอลลาเจน และเอนไซม์ในกลุ่มแมทริกซ์เมททาโลโปรติเนสจะทำหน้าที่ส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส เป็นต้น

2.3.3.5 Lysosome เป็นออร์แกเนลล์ที่มียูนิตเมมเบรนเป็นเยื่อหุ้มชั้นเดียวโดยพบเฉพาะในเซลล์สัตว์เท่านั้นและในโพทิสต์บางชนิดจะมีรูปร่างเป็นทรงกลมขนาดประมาณ 0.1-1.2 ไมครอน ภายในประกอบด้วยน้ำย่อยหลายชนิดซึ่งสามารถย่อยสลายโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และกรดนิวคลีอิกได้ ดังนั้นเยื่อหุ้มของไลโซโซมจะต้องมีความทนต่อปฏิกิริยาการย่อยและไม่ยอมให้เอนไซม์ภายในถุงแพร่ผ่านออกไปข้างนอกได้ โดยไลโซโซมมีหน้าที่ คือ ย่อยสลายอนุภาคและโมเลกุลของสารอาหารภายในเซลล์ รวมทั้งยังสามารถย่อยหรือทำลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมต่างๆ ที่เข้าสู่ร่างกายหรือเซลล์ เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาวจะกินและย่อยสลายเซลล์ของแบคทีเรีย ทำลายเซลล์ที่ตายแล้วหรือเซลล์ที่มีอายุมาก โดยเยื่อของไลโซโซมจะฉีกขาดได้ง่ายแล้วปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยสลายเซลล์ดังกล่าว นอกจากนี้หน้าที่ของไลโซโซมยังสามารถย่อยสลายโครงสร้างต่างๆ ของเซลล์ ในระยะที่เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงและมีเมตามอร์โฟซีส

2.3.3.6 Collagen Fiber นั้นเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่เป็นสายยาวโดยที่มีขนาด 0.1-8 ไมครอน ที่พบได้ในเนื้อเยื่อได้หลายชนิดสามารถผลิตโดยเซลล์หลายชนิด เช่น ไฟโบบลาสท์ ออสทีโอบลาสท์ คอนโดรบลาสท์ ซึ่งระหว่างมัดของเส้นใยคอลลาเจนจะมีเซลล์ไฟโบรบลาสท์สอดแทรกอยู่ ซึ่งคอลลาเจนจะมีลักษณะเป็นสายเกลียวที่มีหน่วยโมเลกุลเกี่ยวพันกันมากมาย นอกจากนี้คอลลาเจนยังทำหน้าที่สร้างความแข็งแรง มีความยืดหยุ่น และมีส่วนช่วยในการสร้างเนื้อเยื่อใหม่

2.3.3.7 Elastin Fiber นั้นจะเป็นเส้นใยอีลาสตินที่จะแทรกตัวอยู่ภายในระหว่าง Collagen Bundles โดยที่จะมีหน้าที่สำคัญ คือ มีความยืดหยุ่นของผิวมากกว่าคอลลาเจน เมื่อเกิดความยืดหยุ่นแล้วสามารถกลับสู่สภาพเดิมได้ เส้นใยอีลาสตินนี้จะมีส่วนประกอบหลักเป็น Fibrillin โดยจะมีการเจริญเติบโตของเส้นใยอีลาสตินอยู่หลายระยะและพบในผิวหนังชั้นในทุกระยะ โดยที่ระยะแรกสุด คือ Oxytalan จะสามารถพบอยู่บริเวณ DEJ Papillary Dermis และด้านบนสุดใน Reticulardermis เส้นใยอีลาสตินที่เจริญถัดมานั้นเรียกว่า Elaunin ซึ่งพบใน Reticular Dermis ส่วนกลางและส่วนล่างเส้นใยอีลาสตินที่เจริญเต็มที่ที่สุดไม่มีชื่อเรียก แต่พบอยู่ชั้นล่างสุดของ Reticular Dermis

2.4 หลอดลมสุกร [10]

สุกรมีหลอดลมขนาดสั้นและเล็กกว่ากล่องเสียงประกอบด้วยวงแหวนกระดูกอ่อน 32–35 อัน หุ้มอยู่ด้านบนของหลอดลม หลอดลมจะแยกให้ Bronchus ไปยัง Apical Lobe ของปอดขวาก่อนที่จะถึงปลายสุด ส่วนปลายหลอดลมก็เป็น Bronchus ซึ่งจะแยกแขนงออกจากซ้ายขวาไปยัง Cardiac Lobe และต่อเลยไปเข้าไป Diaphragmatic Lobe ทางด้านขวาและยังมีแขนงไปยัง Intermediate

Lobe ด้วยและทางด้านซ้ายก็มีแขนงไปยัง Apical Lobe ซ้าย ในส่วนแขนงของ Bronchus นั้นแขนงที่จะแตกแขนงออกไปจะมีขนาดที่เล็กลงมาตามลำดับโดยที่จะมีดังนี้ Bronchioles Intralobular Bronchioles Terminal Bronchioles Respiratory Bronchioles และ Alveolar Ducts ซึ่งสิ้นสุดที่ Alveolar Sac อันประกอบด้วย Alveoli จำนวนมาก ลักษณะการจัดเรียงของ Alveoli คล้ายวงองุ่นโดย Alveoli เปรียบเหมือนผลองุ่นและท่อทางเดินอาหารก็เปรียบเหมือนกิ่งก้านขององุ่น ส่วนเส้นเลือดฝอยซึ่งเชื่อมต่อระหว่างแขนงที่เล็กที่สุดของ Pulmonary Arteries และ Veins จะสัมพันธ์กับ Alveolar Walls ดังนั้นเลือดจึงถูกนำไปใกล้พอที่จะแลกเปลี่ยนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในเลือดกับก๊าซออกซิเจนในอากาศที่หายใจเข้าไป [8]

2.5 หลอดลมเทียม [10]

ปัจจุบันได้มีการนิยมใช้การรักษาด้วยการทดแทนหลอดลมอันเก่าที่เสียไป โดยการใช้หลอดลมเทียม ซึ่งทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อของผิวหนังและการกำจัดเซลล์ออกจากผิวหนังชั้นในได้เล็งเห็นถึงความสำคัญของการพัฒนาหลอดลมบริจาคที่ปราศจากเซลล์ เพื่อใช้ในการรักษาโรคหลอดลมตีบ เป็นการพัฒนาเทคโนโลยีด้านสุขภาพและการแพทย์ เพื่อคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้นของประชากร ซึ่งหลอดลมที่นิยมใช้ในการรักษาที่ได้รับผลที่ดีมี 2 ประเภทดังนี้

2.5.1 หลอดลมเทียมจากมนุษย์

อวัยวะเทียม จะถูกสร้างขึ้นจากเนื้อเยื่อและเซลล์ที่ทำงานร่วมกันกับอวัยวะที่เราจะทำการเปลี่ยนอวัยวะนั้น เนื่องจากในการทำงานภายในร่างกายมนุษย์จะดำเนินการเฉพาะของอวัยวะในส่วนใดส่วนหนึ่งของร่างกาย [1] สำหรับการฟื้นฟูข้อบกพร่องของหลอดลมที่นิยมใช้เซลล์เยื่อบุผิวทางเดินหายใจในการรักษานั้น ในการใช้เยื่อบุผิวอาจจะทำให้เกิดการรวมตัวกันของเซลล์จนเกิดเซลล์ Fibroblasts จำเป็นที่จะต้องมีการวิเคราะห์ถึงสาเหตุไม่ว่าจะเป็นการเกิดจากการเจริญเติบโตของ Fibroblasts เองหรือที่จะเป็นการเกิดจากกระบวนการในการกำจัดเซลล์ ปัจจัยโดยทั่วไปที่มีผลต่อ Extracellular คือ Mesenchymal Fibroblasts และการเกิดปฏิกิริยาระหว่างของเหลวและอากาศภายในระบบ สำหรับการเพิ่มขึ้นและความแตกต่างของเซลล์เยื่อบุผิวจะขึ้นอยู่กับการเจริญเติบโตของ Fibroblasts คือ ถ้าเกิดมีการเจริญเติบโตของ Fibroblasts เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจะทำให้เพิ่มจำนวนในการเจริญเติบโตของเซลล์เยื่อบุผิวได้รวดเร็วยิ่งขึ้น แต่ผลที่ได้นี้ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของ Fibroblasts เพราะฉะนั้นเยื่อบุผิวที่ถูกกระตุ้นด้วย Fibroblasts ของหลอดลมจะหน้าที่ของเยื่อบุผิวของหลอดลม แต่ถ้าเราใช้ Fibroblasts ของจมูกและผิวหนังก็จะทำหน้าที่แทนหลอดลมไม่ได้

2.5.2 หลอดลมเทียมจากสุกร

ในปัจจุบันสุกรจะถือว่าเป็นสัตว์ที่นิยมนำมาใช้ในการปลูกถ่ายอวัยวะในมนุษย์ที่มากที่สุดและมีความเหมาะสมของอวัยวะหรือเนื้อเยื่อ รวมถึงลักษณะเฉพาะทางกายวิภาค ในการทำงานของ-

ระบบของร่างกายจะคล้ายกับระบบการทำงานของมนุษย์เป็นอย่างมาก [8] การปลูกถ่ายอวัยวะหรือเซลล์เนื้อเยื่อมาจากอวัยวะจากที่หนึ่งไปยังอีกสายพันธุ์ (จากสุกรไปยังมนุษย์) ซึ่งมีการรักษาที่มีศักยภาพมาก สำหรับการปลูกถ่ายอวัยวะนี้ได้ช่วยเหลือคนป่วยที่รอการบริจาคอวัยวะได้หลายพันคน โดยที่การปลูกถ่ายอวัยวะแบบนี้จะใช้อวัยวะจากสุกรที่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่มียีนของมนุษย์โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม เทคนิคเหล่านี้เป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปว่าเป็นเทคโนโลยี Recombinant DNA ซึ่งจะใช้โมเลกุล DNA จากแหล่งที่มาแตกต่างกันซึ่งรวมกันเป็นหนึ่งโมเลกุลในการสร้างยีนใหม่เพื่อลดการปฏิเสธภายในร่างกายของมนุษย์ [10]

2.6 เทคนิคการกำจัดเซลล์ [11]

ในกระบวนการกำจัดเซลล์ของเนื้อเยื่อและอวัยวะจะมีประสิทธิภาพมากที่สุดจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น เซลล์ของเนื้อเยื่อ ความหนาแน่นของผิวหนัง และไขมัน ซึ่งกระบวนการกำจัดเซลล์นี้จะเป็นการเปลี่ยนองค์ประกอบของ ECM จะทำลายโครงสร้างพิเศษบางอย่างภายในเซลล์ เพื่อลดผลกระทบที่ไม่พึงประสงค์สำหรับการนำไปใช้ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ในกระบวนการกำจัดเซลล์นั้นมีหลากหลายวิธีในการปฏิบัติ เช่น กระบวนการกำจัดเซลล์โดยใช้สารเคมี กระบวนการกำจัดเซลล์โดยใช้เอนไซม์ และกระบวนการกำจัดเซลล์โดยใช้สมบัติทางกายภาพ

2.6.1 กระบวนการกำจัดเซลล์โดยใช้สารเคมี

2.6.1.1 กรดและเบส จะทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นในการย่อยสลายของสารชีวโมเลกุล โดยที่กรดจะเป็นสารที่ใช้ในการฆ่าเชื้อในกระบวนการกำจัดเซลล์ เช่น กรดนิวคลีอิกจะทำหน้าที่ในการกำจัดองค์ประกอบและโครงสร้าง ECM และสำหรับกรดอะซิติกจะขจัดคอลลาเจนและลดความแข็งแรงของโครงสร้าง ECM แต่ก็จะไม่ส่งผลกระทบต่อ Sulfated Glycosaminoglycans (SGAG) สำหรับเบสจะมีความรุนแรงมากใช้ในการกำจัดขนจากผิวหนังแท้ ในขั้นตอนเริ่มต้นของกระบวนการกำจัดเซลล์เรานั้นจะใช้เบสเพื่อกำจัดการเจริญเติบโตของโครงสร้างและสมบัติเชิงกลของ ECM เช่น โซดาไฟจะลดสมบัติทางกล คือ การแตกแยกของโครงสร้างคอลลาเจนและยับยั้งการเจริญเติบโตของโครงสร้างคอลลาเจน

2.6.1.2 สารละลายไฮโพโทนิกและไฮเพอโทนิก โดยสาร Hypertonic Saline นั้นจะเป็นการแยกโปรตีนออกจาก DNA โดยที่ Hypotonic Solutions จะก่อให้เกิดการสลายเซลล์โดยการออสโมติก ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของโครงสร้าง วิธีการนี้จะต้องมีการแช่ Hypotonic And Hypertonic Solutions สลับกันเพื่อที่จะทำให้เกิดประสิทธิภาพที่ดีขึ้น แต่ทำให้ใช้เวลานานและถ้าใช้ Hypotonic And Hypertonic Solutions สลับกันนั้นยังจะช่วยล้างสารตกค้างจากภายในเซลล์และสลายเนื้อเยื่อเซลล์

2.6.1.3 แอลกอฮอล์ นี้จะสามารถกำจัดไขมันออกจากเนื้อเยื่อได้ดีกว่าการใช้เอนไซม์ในบางชนิด เช่น เอทานอลและเมทานอลจะสามารถช่วยในการตกตะกอนของโปรตีนนั้นอาจจะทำให้

โครงสร้างของ ECM เกิดการสลายได้ แต่ข้อควรระวังในวิธีการนี้ คือ จะใช้ในการรักษาเนื้อเยื่อที่มีแอลกอฮอล์

2.6.1.4 สารซักฟอก จะทำหน้าที่ในการสลายเยื่อหุ้มเซลล์และยังแยก DNA ออกจากโปรตีน สารเหล่านี้ยังจะทำลายและยังตัดขาดสายโปรตีนในโครงสร้าง ECM อย่างเช่น Triton X-100 จะมีประสิทธิภาพสามารถขจัดสิ่งสกปรกตกค้างจากเซลล์พร้อมทั้งลดการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในร่างกายที่ไม่พึงประสงค์ได้ นอกจากนี้ Detergents ยังสามารถสร้างความแตกต่างระหว่างการกำจัดเซลล์ที่สมบูรณ์และไม่สมบูรณ์ของนิวเคลียสได้ แต่มีข้อเสียเปรียบที่เกี่ยวกับการเจริญเติบโตของโครงสร้างเฉพาะจะหยุดชะงัก

2.6.2 กระบวนการกำจัดเซลล์โดยใช้เอนไซม์ [8]

2.6.2.1 เอนไซม์ นั้นมักจะถูกนำมาใช้กับงานวิจัยกระบวนการกำจัดเซลล์ในเนื้อเยื่อได้อย่างกว้างขวางจะประกอบไปด้วยนิวคลีเอส ทริปซิน ไลเปซ คอลลาจีเนซ ดิสเปซ เทอร์มอไลซิน และเบต้ากาแลกโทสิเดส เนื่องจากเอนไซม์สามารถกำจัดสิ่งตกค้างหรือองค์ประกอบที่ไม่ต้องการในเซลล์ได้ดี แต่อย่างไรก็ตามการใช้เอนไซม์ในการกำจัดเซลล์เพียงอย่างเดียวนั้นไม่สามารถกำจัดเซลล์ได้อย่างสมบูรณ์ เนื่องจากเอนไซม์จะเกิดการเสื่อมสภาพเมื่อเวลาผ่านไป ซึ่งเป็นผลจากสิ่งตกค้างในเซลล์ที่เอนไซม์เข้าไปกำจัด

นิวคลีเอสจะเข้าไปจับกับลำดับของกรดนิวคลีอิกจึงสามารถช่วยในการกำจัดนิวคลีโอไทด์ภายหลังการสลายเซลล์ในเนื้อเยื่อเอนโดนิวคลีเอส อย่างเช่น เบนโซเนสอาจมีประสิทธิภาพมากกว่าเอกโซนิวคลีเอส เนื่องจากจะเข้าไปจับกันอยู่บริเวณกลางลำดับของนิวคลีโอไทด์และมีประสิทธิภาพในการกำจัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มากกว่า ในทำนองเดียวกันในการใช้ปริมาณเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอสในปริมาณที่มากขึ้นจะทำให้มีประสิทธิภาพในการกำจัด DNA ได้มากยิ่งขึ้น

ทริปซินเป็นน้ำย่อยโปรตีนที่ใช้กันโดยทั่วไปของกระบวนการกำจัดเซลล์แต่อย่างไรก็ตามโปรตีนในองค์ประกอบภายนอกเซลล์ เช่น คอลลาเจนจะมีความต้านทานต่อแรงดึงของทริปซินที่จำกัดและทริปซินมีอันตรายต่อเนื้อเยื่อจึงควรใช้อย่างระมัดระวังเมื่อเปรียบเทียบกับสารซักฟอก ทริปซินจะทำลายอีลาสตินและคอลลาเจนได้มากกว่าแต่กำจัดเซลล์ได้ช้ากว่าและสามารถรักษาองค์ประกอบ GAG ไว้ได้ดีกว่า โดยที่ความสามารถในการกำจัดเซลล์และองค์ประกอบภายนอกเซลล์โดยใช้ทริปซินจะขึ้นอยู่กับเวลาและความสมบูรณ์ของกระบวนการกำจัดเซลล์ ในการใช้ทริปซินอย่างเดียวในการกำจัดเซลล์เนื้อเยื่อบางๆ อาจต้องใช้เวลานาน ทริปซินสามารถทำลายโครงสร้างขนาดเล็กภายในเนื้อเยื่อได้และยังช่วยส่งเสริมการทำงานของตัวกระทำชนิดอื่นๆ ได้ดี ดังนั้นในการใช้ทริปซินในขั้นตอนแรกของกระบวนการกำจัดเซลล์อาจทำให้ได้ผลลัพธ์ที่น่าพอใจ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเนื้อเยื่อที่มีความหนาแน่นมากที่ต้องการกำจัดเซลล์นิวคลีออย่างสมบูรณ์

คอลลาจีเนส อาจถูกใช้ในระหว่างกระบวนการกำจัดเซลล์ แต่สามารถที่จะกำจัดได้เพียงโครงสร้างเล็กๆ และมีความสามารถในการเก็บรักษาคอลลาเจนได้สูงสุด ไม่สามารถนำมา

ประยุกต์ใช้ในทางคลินิกได้ กระบวนการการกำจัดไขมันโดยเอนไซม์ไลเปส โดยทั่วไปจะไม่เพียงพอที่จะกำจัดกำจัดไขมันทั้งหมดออกได้เมื่อใช้เพียงอย่างเดียว

หลังจากกำจัดไขมันบนผิวหนังชั้นหนังแท้ออกนั้นได้มีการเปรียบเทียบระหว่าง Trypsin กับ Dispase พบว่า Dispase มีการกำจัดเซลล์ที่ดีกว่าและมีการหยุดชะงักของ ECM ที่เพิ่มขึ้น การศึกษาเดียวกันยังแสดงให้เห็นการแทรกซึมของเซลล์มากขึ้นในเนื้อเยื่อที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ด้วย Dispase หลังปลูกถ่ายลงใต้ผิวหนัง 4 สัปดาห์ Dispase และ Trypsin หากใช้ร่วมกับผงซักฟอกและมีการทำซ้ำสามารถนำมาใช้ได้ในการปรับปรุงการกำจัดเซลล์จากเนื้อเยื่อหนา เช่น ผิวหนังแท้ ถ้ามีการใช้เอนไซม์ Dispase หรือ Thermolysin เป็นตัวกระทำเพียงอย่างเดียวสามารถกำจัดเซลล์บนพื้นผิวของเนื้อเยื่อได้ แต่ยังต้องการแรงทางกลเพื่อช่วยในการเคลื่อนที่และสัมผัสกับองค์ประกอบของวัสดุมากขึ้นเพื่อการกำจัดเซลล์อย่างสมบูรณ์จะเห็นว่าเอนไซม์ Dispase กำจัดเซลล์ภายใต้เยื่อหุ้มเบสเมนต์ของ ECM ได้มากกว่า Thermolysin

เนื้อเยื่อที่ได้ผ่านการกำจัดเซลล์ชนิด Xenogeneic สามารถเก็บรักษาด้วย α-Galactose เพื่อลดเซลล์ภูมิคุ้มกันแอนติเจนพื้นผิว Galactose-α-(1,3) Galactos (Gal Epitope) แม้ว่าภูมิคุ้มกันผลของ Gal Epitope นั้นจะไม่มีการส่งผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงภายในร่างกายของ Xenogeneic ECM

2.6.2.2 ตัวกระบวนการทางชีวภาพที่ไม่ใช่เอนไซม์ มีดังนี้

ตัวกระทำคีเลตนั้นจะประกอบไปด้วย Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA) และ Ethylene Glycol Tetraacetic Acid (EGTA) ที่ส่งผลต่อการแยกตัวของเซลล์จากโปรตีนของเซลล์ ECM โดยที่จะไปจับกับไอออนของโลหะ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าตัวกระทำคีเลตนั้นมีส่วนในการทำลายโครงสร้างโปรตีนด้วยวิธีการที่เหมือนกัน ซึ่งตัวกระทำคีเลตเพียงตัวเดียวนั้นไม่เพียงพอสำหรับการกำจัดเซลล์ผิวถึงแม้จะมีการปั่นกวน ดังนั้นจึงมีการใช้งานร่วมกับเอนไซม์ เช่น ทริปซิน หรือสารซักฟอก

สารพิษ เช่น Latrunculin จะไปช่วยให้ในการตรวจสอบเป็นประโยชน์สำหรับวัสดุกัมมันตรังสีตามธรรมชาติที่เป็นสารพิษต่อที่ส่งผลต่อเซลล์ ดังนั้นจึงมีวัตถุประสงค์ในการต้องการกำจัดเซลล์ Gillies และคณะ แสดงให้เห็นถึงการกำจัดของดีเอ็นเอและโปรตีนภายในเซลล์จากเนื้อเยื่อที่หนาแน่น ในส่วนของกล้ามเนื้อ Tibialis Anterior นั้นสามารถใช้ได้เพียงแค่ Latrunculin B สารละลายไฮโพโทนิก สารละลายไฮเพอโทนิกและ Dnase Treatments เท่านั้น ซึ่งวิธีเหล่านี้จะได้ผลลัพธ์ในการกำจัด DNA และการเก็บรักษาของ GAG ได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับวิธีการใช้เอนไซม์ในการกำจัดเซลล์กับสารซักฟอกและการทดสอบความทนต่อแรงทางกลของโครงสร้าง ECM และเนื้อเยื่อต้นแบบที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกัน

ในการใช้เชรั่มร่วมกับกรดนิวคลีอิก เพื่อช่วยในกระบวนการกำจัดเซลล์นั้นจะสามารถกำจัดเซลล์เนื้อเยื่อได้เป็นอย่างดี แต่ในเซลล์เนื้อเยื่อของระบบภูมิคุ้มกันถูกกำจัดได้เพียงเล็ก-

น้อย ซึ่งข้อเสียที่ได้จากการผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ โดยใช้เซรั่มร่วมกับกรดนิวคลีอิก นั้นคือ ต้องคำนึงถึงจำนวนเซรั่มที่มีผลต่อโครงสร้างของสุกรหรือจะใช้เซรั่มรวมกับน้ำย่อยโปรตีน เช่น ฟลูออไรด์ Phenylmethylsulfonyl (PMSF) Aprotonin และ Leupeptin จะทำการป้องกันความเสียหายที่ไม่พึงประสงค์ต่อ ECM โดยที่อาจจะเป็นผลมาจากการออกโปรตีเอสภายในเซลล์ในระหว่างการสลาย Sodium Azide และ Antimycotics อาทิเช่น Penicillin Streptomycin Amphotericin B และ Sodium Azide อาจนำมาใช้เพื่อลดการปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการกำจัดเซลล์ แต่ยังมีอุปสรรคทางด้านกฎหมายทางชีววิทยาคลินิก

2.6.3 กระบวนการกำจัดเซลล์โดยใช้สมบัติทางกายภาพ

2.6.3.1 อุณหภูมิ ในกระบวนการกำจัดเซลล์โดยการแช่แข็งเนื้อเยื่อและอวัยวะอาจจะส่งผลทำให้เนื้อเยื่อภายในเซลล์เยื่อบุผิวถูกกำจัดออกไป โดยการแช่งเข็งนั้นมีหลายแบบ เช่น การแช่-แข็งรอบเดียวจะสามารถลดการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันที่ไม่พึงประสงค์ เช่น การแทรกซึมของเม็ด-เลือดขาวในเส้นเลือดภายในโครงสร้าง ECM แต่ถ้าสำหรับในการแช่แข็งหลายรอบอาจจะทำให้เกิดการขจัดโปรตีนออกจากโครงสร้าง ECM และยังทำให้การเจริญเติบโตของโครงสร้าง ECM หยุดชะงักเล็กน้อย

2.6.3.2 แรงและความดัน จะทำให้เซลล์บนพื้นผิวของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะจะสามารถกำจัดออกได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยการเสียดสีมากๆ ในการทำงานรวมกับเอนไซม์ Hypertonic Saline หรือ Chelating Agents ทั้งหมดนี้จะช่วยในกระบวนการกำจัดเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น ในการเพิ่มความดันเข้าไปในกระบวนการกำจัดเซลล์จะทำให้กำจัดเซลล์ออกจากเนื้อเยื่อได้ดีขึ้นและใช้เวลาได้น้อยลงแม้ว่าจะส่งผลต่อโครงสร้าง ECM

2.6.3.3 ไฟฟ้า ในกระบวนการกำจัดเซลล์โดยใช้ไฟฟ้านั้นจะเป็นการให้กระแสไฟฟ้าชนิด Non-Thermal Irreversible Electroporation (NTIRE) โดยจะเป็นการกำจัดเซลล์โดยใช้คลื่นไฟฟ้า โดยที่คลื่นไฟฟ้าจะถูกนำไปใช้ทั่วเนื้อเยื่อและเซลล์ทำให้เกิดการก่อตัวของ Micropores ที่ภายในเยื่อหุ้มเซลล์ การปรากฏตัวของ Micropores ทำให้เกิดการสูญเสียสมดุลของเซลล์และนำไปสู่การตายของเซลล์ทำให้โครงสร้างของเซลล์ถูกขจัดออกจากเนื้อเยื่อ

2.7 หลักการทำงานของเอนไซม์ [3]

การใช้เอนไซม์ในการกำจัดเซลล์ร่วมกับแรงดันเนื่องจากชีวิตทั้งหมดในโลกนี้ดำรงอยู่ด้วยการเกิดปฏิกิริยาเคมีของโมเลกุลต่างๆ ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ซึ่งปฏิกิริยาในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดนี้มีตัวเร่งปฏิกิริยากระบวนการในเมแทบอลิซึม (Metabolism) หรือไม่อาจจะเป็นแคทาบอลิซึม (Catabolism) ซึ่งเป็นกระบวนการสลายเพื่อที่จะให้ได้พลังงานและหน่วยการสร้าง (Building Block) หรือว่าเป็นแอนาบอลิซึม (Anabolism) คือ การนำเอาหน่วยของการสร้างมาเชื่อมต่อกันให้ยาวออกกลายเป็นโพลีเมอร์ของชีวโมเลกุลโดยมีพลังงานเข้าช่วยจากโมเลกุลทางพลังงานแล้วประกอบกันเป็น

ส่วนประกอบของออร์แกเนลล์ (Organelle) ภายในเซลล์เนื้อเยื่อหรืออวัยวะ ซึ่งในปฏิกิริยาเคมีในกระบวนการเหล่านี้ล้วนต้องการตัวเร่ง ซึ่งตัวเร่งดังที่ว่านี้เรียกว่า เอนไซม์ (Enzyme) โดยที่เอนไซม์ทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้รวดเร็วกว่าที่ไม่มีเอนไซม์นับเป็นหลายพันเท่าเมื่อเทียบกับสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ โดยที่โมเลกุลหรือโครงสร้างของตัวมันเองแทบไม่มีการเปลี่ยนแปลงในร่างกายของสิ่งมีชีวิต แม้แต่ปฏิกิริยาที่คาดว่าจะเกิดขึ้นได้โดยไม่ยากนักก็ยังต้องมีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง เช่น การละลายเอาก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ลงไปในน้ำจำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์ที่มีชื่อว่า คาร์บอนิกแอนไฮเดรส (Carbonic Anhydrase) ช่วยเร่งให้มีการละลายของก๊าซลงไปในน้ำเลือดได้มากพอที่จะถูกขนส่งไปด้วยฮีโมโกลบิน ซึ่งพบว่าการมีเอนไซม์ทำให้ความเร็วในการส่งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้าออกจากเซลล์ผ่านระบบเลือดเร็วขึ้นถึง 107 เท่าของระบบที่ไม่มีเอนไซม์ ปัจจุบัน มีการนำเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ มากมาย เช่น ในการใช้เอนไซม์ในการรักษาทางการแพทย์จะใช้เอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินเป็นเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนสามารถใช้ในการกำจัดเนื้อเยื่อที่ตายแล้วในบริเวณแผลฝี หนอง ช่วยลดการอักเสบและบวมได้ นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ที่ช่วยย่อยต่างๆ เช่น อะไมเลส (Amylase) แลคเตส (Lactase) ไลเปส (Lipase) ถูกนำมาเป็นส่วนประกอบในยาช่วยย่อยต่างๆ สำหรับผู้ที่มีระบบการย่อยอาหารในทางเดินอาหารไม่สมบูรณ์หรือไม่ปกติ โดยการประยุกต์ใช้เอนไซม์ในทางการเกษตรจะใช้เอนไซม์กลูคาเนส (Glucanase) ไซลาเนส (Xylanase) นำมาผสมในอาหารสัตว์ใช้เพื่อลดความหนืดของอาหารทำให้อาหารอ่อนนุ่มลงและย่อยสลายง่ายขึ้น รวมถึงการประยุกต์ใช้เอนไซม์ในทางอุตสาหกรรมจะใช้เอนไซม์อะไมเลส (Amylase) ซึ่งในกระบวนการทำแอลกอฮอล์สำหรับการผลิตแก๊สโซฮอลล์ (Gasohol) และการใช้เอนไซม์ไลโซไซม์ (Lysozyme) ในอุตสาหกรรมทำไวน์ เป็นต้น

2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ [3]

2.8.1 ความเข้มข้นของซับสเตรท

เมื่อความเข้มข้นของซับสเตรทเพิ่มขึ้นอัตราเร็วของปฏิกิริยาก็จะเพิ่มขึ้นจนถึงจุดที่มีความเร็วสูงสุด ในกรณีที่มีซับสเตรทเพียงชนิดเดียวและความเข้มข้นของเอนไซม์คงที่ หลังจากนั้นแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรทอัตราเร็วของปฏิกิริยาก็ไม่เพิ่มขึ้น ในบางกรณีความเข้มข้นของซับสเตรทที่สูงเกินไปอาจยับยั้งปฏิกิริยาทำให้อัตราเร็วการเกิดปฏิกิริยาลดลงได้

2.8.2 ความเข้มข้นของเอนไซม์

อัตราเร็วของปฏิกิริยามักจะแปรผันโดยตรงกับค่าความเข้มข้นของเอนไซม์เมื่อมีปัจจัยอื่นๆ เช่น ความเข้มข้นของซับสเตรท ค่าพีเอช และอุณหภูมิคงที่ ยกเว้นในกรณีต่างๆ ดังนี้ คือ อัตราการละลายของซับสเตรทมีขีดจำกัด เช่น การละลายของออกซิเจนในระบบที่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและการผันแปรสมบัติของซับสเตรทหรือผลิตภัณฑ์ที่จะทำให้เกิดการยับยั้งในการทำงานของเอนไซม์ หรือการเกิดโคแฟคเตอร์ที่จำเป็นสำหรับเอนไซม์ในแตกตัวออกจากเอนไซม์ เป็นต้น

2.8.3 ค่า pH

เอนไซม์ส่วนใหญ่จะเร่งปฏิกิริยาได้อยู่ในช่วงพีเอชระหว่าง 4-10 ถ้าพีเอชต่ำกว่า 4 หรือสูงกว่า 10 จะทำให้เอนไซม์ถูกยับยั้งอย่างถาวร ยกเว้น เพปซิน เรนนิน และอัลคาไลน์ฟอสฟาเทส ทั้งนี้เพราะเอนไซม์ทุกชนิดเป็นโปรตีนการเปลี่ยนแปลงพีเอชมีผลต่อประจุบนโมเลกุลของโปรตีนจึงมีผลต่อการทำงานที่บริเวณเร่ง (Active Site) ของเอนไซม์และจะมีผลสูงสุดเมื่อมีค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนหรือไฮดรอกซิลไอออนมากจนถึงจุดพีไอ ซึ่งในโครงสร้างโมเลกุลแบบตติยภูมิของโปรตีนถูกทำลายจึงทำให้เกิดการรวมตัวของเอนไซม์กับซับสเตรทที่บริเวณเร่งไม่สามารถเกิดขึ้นได้ เอนไซม์แต่ละชนิดมีค่าพีเอชที่เหมาะสม

2.8.4 อุณหภูมิ

การเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้สารที่ทำปฏิกิริยามีพลังงานมากพอที่จะทำให้สารนั้นกลายเป็นสารที่ถูกกระตุ้นแล้วมีพลังงานสูงอยู่ในสภาพที่จะเปลี่ยนไปเป็นผลิตผลอย่างรวดเร็ว การเพิ่มอุณหภูมิจึงทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น แต่การเพิ่มอุณหภูมิทำให้โปรตีนซึ่งมีโครงรูปสามมิติที่ต้องจัดเรียงตัวของหมู่ต่างๆ ในโมเลกุลโดยเฉพาะบริเวณเร่งให้พอเหมาะแก่การจับกับซับสเตรทแล้วเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นผลผลิตได้เมื่อมีอุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้โปรตีนแปลงสภาพจากธรรมชาติจึงทำให้เอนไซม์มีสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาลดลงหรือเสียไป

2.8.5 แอกติวิตีของน้ำ

การทำงานของเอนไซม์ โดยทั่วไปนั้นจะเกิดได้ดีเมื่ออยู่ในภาวะที่เป็นสารละลายในน้ำ ยกเว้นเอนไซม์บางชนิด เช่น ไรโบนิวเคลียเอสและไลโซโซม เนื่องจากน้ำเป็นตัวทำละลายทั้งเอนไซม์และซับสเตรทจึงทำให้มีการการชนกันของโมเลกุลทั้ง 2 ชนิด จนสามารถจับตัวกันได้โดยเฉพาะเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส นอกจากนั้นน้ำยังทำหน้าที่เป็นซับสเตรทด้วยจึงทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้ดีเมื่อมีค่าแอกติวิตีของน้ำค่อนข้างสูง

2.8.6 โคแฟคเตอร์ของเอนไซม์

เอนไซม์จำนวนมากนั้นจะเร่งปฏิกิริยาได้นั้นจำเป็นจะต้องมีโคแฟคเตอร์ที่ร่วมทำงานด้วย เช่น พอลิฟีนอลออกซิเดสต้องมีไอออนของทองแดง แอลฟาอะไมเลสจะต้องมีไอออนของแคลเซียม เป็นต้น หากขาดโคแฟคเตอร์ก็จะทำให้เอนไซม์ทำงานไม่ได้

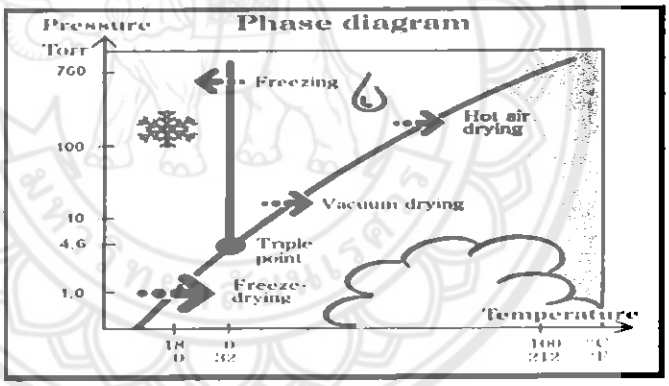
2.8.7 สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เป็นสารที่มีผลทำให้ความเร็วของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาลดลง เช่น ทริปซินอินฮิบิเตอร์ที่พบในถั่วเหลือง ซึ่งจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน

2.9 เทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง [13]

เทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze Drying) เป็นเทคนิคการทำสารให้เข้มข้นและทำให้อยู่ในรูปผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายในลักษณะแห้ง โดยอาศัยหลักการแช่แข็ง (Freezing) จะเพื่อเปลี่ยนสถานะของตัวอย่างจากสถานะของเหลวมาเป็นของแข็ง จากนั้นจึงกระตุ้นให้เกิดการระเหิดของน้ำกลายเป็นไอโดยตรง โดยอาศัยหลักการปรับความดันไอของน้ำให้มีค่าลดต่ำลงกว่าจุด Triple Point ของน้ำทำให้สามารถลดปริมาณน้ำในตัวอย่างลงได้จนกระทั่งอยู่ในระดับที่สามารถเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ได้นานโดยที่มีการเสื่อมคุณภาพน้อยที่สุด โดยทั่วไปสารที่นิยมใช้เทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง นิยมใช้กับสารที่มีการสลายตัวด้วยความร้อนได้ง่ายทำให้ไม่สามารถใช้การอบแห้งหรือการทำแห้งโดยวิธีการนำหรือพาความร้อนได้โดยตรง เช่น เอนไซม์ ยาปฏิชีวนะ และฮอร์โมนต่างๆ เป็นต้น

การทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze Dehydration) หมายถึง การทำแห้ง (Dehydration) ด้วยการการเยือกแข็ง (Freezing) ทำให้น้ำเปลี่ยนสถานะเป็นผลึกน้ำแข็งก่อนแล้วจึงลดความดันเพื่อให้ผลึกน้ำแข็งระเหิด (Sublimation) กลายเป็นไอด้วยการลดความดันให้ต่ำกว่าบรรยากาศขณะควบคุมให้อุณหภูมิต่ำ (ที่อุณหภูมิเท่ากับหรือต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียสและน้ำแข็งจะระเหิดที่ความดันเท่ากับ 4.7 มิลลิเมตรปรอทหรือต่ำกว่า) ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 แผนภาพ Phase Diagram

ที่มา: วารสารสมาคมเครื่องทำความเย็นไทย Keep Kool เทคโนโลยีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

2.9.1 ขั้นตอนการทำแห้งเยือกแข็ง

ขั้นตอนเบื้องต้นสำหรับวิธีการทำแห้งเยือกแข็งนั้น คือ เริ่มจากขั้นตอนในการเตรียมวัตถุดิบให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสม จากนั้นจึงเข้าสู่กระบวนการหลักซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

2.9.1.1 การแช่เยือกแข็ง (Freezing) นั้นจะเป็นการลดอุณหภูมิให้ต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (Freezing Point) เพื่อที่จะให้เกิดเป็นผลึกน้ำแข็ง (Ice Crystal Formation) ภายในอัตราเร็วของการแช่เยือกแข็ง (Freezing Rate) ควรจะเป็นการแช่แข็งแบบเร็ว เพื่อที่จะให้ผลึกที่เกิดขึ้นนั้นมีขนาดเล็ก การแช่เยือกแข็งแบบเร็วที่นิยมใช้กันมีอยู่หลายวิธี อาทิเช่น การแช่เยือกแข็งแบบใช้ลมเย็นเป่า (Air Blast Freezing) การแช่เยือกแข็งแบบไครโอเจน (Cryogenic Freezing) และการแช่เยือก-

แข็งชนิดแบบจุ่มในของเหลวเย็นจัด (Immersion Freezing) เป็นต้น

2.9.1.2 การระเหิด (Sublimation หรือ Primary Drying) หลังจากการแช่แข็งจนกระทั่งทำให้ลักษณะตัวอย่างเป็นผลึกน้ำแข็งแล้ว ในสถานะของแข็งนี้พบว่าค่าความดันไอของน้ำมีค่าลดลงจนกระทั่งต่ำกว่าจุดสมดุลสถานะ (Triple Point) ทำให้ลักษณะการเปลี่ยนแปลงบนเส้นสมดุลสถานะเกิดขึ้นได้เพียงสองสถานะ คือ จากสถานะของแข็งสามารถเปลี่ยนสถานะเป็นไอน้ำได้โดยตรงโดยไม่ต้องเกิดการหลอมตัวเป็นของเหลวก่อนเรียกปรากฏการณ์ดังกล่าวว่า การระเหิด ซึ่งต้องอาศัยพลังงานจากภายนอกสูงถึง 2800 กิโลจูลต่อกิโลกรัมของน้ำ โดยที่พลังงานดังกล่าวนั้นจะเป็นตัวพา (Convection) ความร้อนเข้าสู่ชั้นของสารแช่แข็งเพื่อระเหิดน้ำในรูปอิสระออกมาจากโครงผลึกสารตัวอย่าง แหล่งพลังงานข้างต้นสามารถกระทำได้ โดยการใช้ปั๊มสุญญากาศเป็นตัวกำเนิดพลังงาน ซึ่งจะอาศัยผลต่างของความดันในสารตัวอย่างกับภายในเครื่องมือเป็นตัวพาไอน้ำออกมาความแตกต่างของความดันดังกล่าวต้องสูงกว่า 10^{-2} มิลลิบาร์ หรืออาจกล่าวได้ว่าเมื่อทำการปรับสภาพความดันไอของน้ำให้ต่ำกว่า 6 มิลลิบาร์ (4.6 มิลลิเมตรปรอท) ทำให้น้ำเข้าสู่จุดสมดุลสถานะ (Triple Point)

2.9.1.3 การทำแห้งขั้นที่สอง (Secondary Drying) เมื่อการทำแห้งขั้นต้นเสร็จสมบูรณ์ น้ำแข็งจะละลายไปหมด จะมีความชื้นหลงเหลืออยู่ จึงต้องมีการทำแห้งด้วยการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น เพื่อดึงเอาความชื้นที่เหลืออยู่ออกถึงระดับความชื้นที่ปลอดภัยสำหรับการเก็บรักษา ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงอุณหภูมิจุดสมดุลสถานะ (Triple Point)

Substance	T [K]	P [kPa]
Acetic acid	289.8	1.27
Acetylene	192.4	120
Butane	134.6	7×10^{-4}
Chloroform	175.43	0.870
Iodine	386.65	12.07
Nitric oxide	109.50	21.92
Nitrogen	182.34	12.6
Oxygen	54.3584	0.152
Sulfur dioxide	197.64	1.67
Titanium	1941	5.3×10^{-3}
Water	273.16	0.61

ที่มา: วารสารสมาคมเครื่องทำความเย็นไทย Keep Kool เทคโนโลยีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

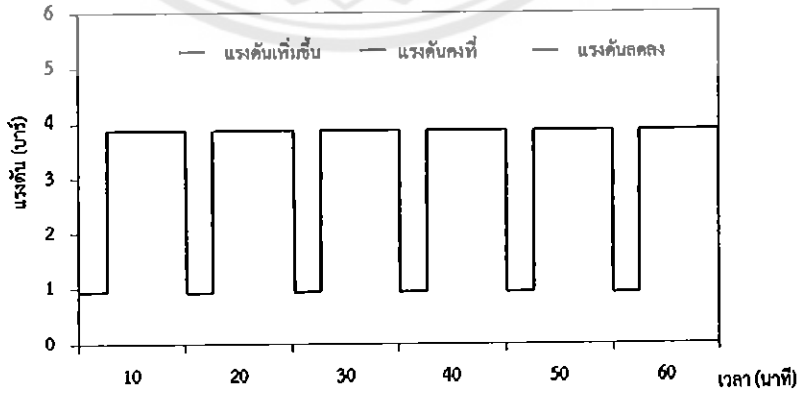
2.9.2 ข้อดีการทำแห้งเยือกแข็ง

การทำแห้งแบบเยือกแข็งเป็นการทำแห้งขณะที่มีอุณหภูมิต่ำจึงลดการสูญเสีย เนื่องจาก

ความร้อนจะลดการทำลายเนื้อเยื่อและโครงสร้างของเนื้อเยื่อจากการทำให้แห้ง รวมถึงมีการคืนตัว (Rehydration) ที่ดีทำให้สามารถเก็บผลิตภัณฑ์ได้นานขึ้นและยังคงรักษาคุณสมบัติตามธรรมชาติได้ดี และยังคงรักษาโครงสร้างที่ดี ซึ่งทำได้ผลดีในการตรวจสอบคุณภาพและลักษณะเฉพาะของหลอดลมที่นำไปตรวจสอบ ทำให้ได้ผลในการตรวจสอบที่มีความผิดพลาดลดน้อยลงหรือให้ได้ผลที่แม่นยำ

2.10 เทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วง (Periodic Pressurized Technique)

จากการประยุกต์ใช้การอัดคลายแรงดันแบบช่วงในการกำจัดเซลล์จำเป็นที่ต้องทราบว่าเพราะเหตุใดการใช้วิธีนี้จึงช่วยในการกำจัดเซลล์ได้มากขึ้นหรือมีความแตกต่างกับการกำจัดเซลล์แบบธรรมดา เนื่องจากหลอดลมสุกรจะประกอบไปด้วยเซลล์ชั้นนอกซึ่งจะเป็นตัวต้านทานการแทรกซึมของเอนไซม์ที่ใช้ในการกำจัดเซลล์ ดังนั้นในกระบวนการกำจัดเซลล์จึงมีการประยุกต์การใช้เทคนิคการอัดคลายแรงดันร่วมกับการปั่นกวนในการกำจัดเซลล์ เนื่องจากการอัดคลายแรงดันแบบช่วงจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการช่วยทำให้เอนไซม์สามารถแทรกซึมเข้าไปยังหลอดลมสุกรได้มากขึ้นและเมื่อลดแรงดันจะทำให้เอนไซม์ที่ใช้ในการกำจัดเซลล์ออกมาจากหลอดลมสุกรได้มากขึ้นและเมื่อมีการเพิ่มแรงดันอีกครั้งก็จะสามารถทำให้เอนไซม์ที่อยู่รอบๆ ของหลอดลมสุกรสามารถแทรกซึมเข้าไปในหลอดลมสุกรได้อีกครั้ง ซึ่งเหมือนเป็นการวนสารที่ใช้ในการกำจัดเซลล์ออกมากขึ้น โดยการอัดคลาย-แรงดันแบบช่วงจะกำหนดแรงดันที่ใช้ในการอัดคลายและจำนวนรอบของการอัดคลายแรงดันเป็นรอบต่อชั่วโมง ยกตัวอย่างเช่น แรงดันที่ใช้ในการอัดคลายแรงดันที่ 4 บาร์ การอัดคลายแรงดันที่จำนวน 3 รอบต่อชั่วโมง (1 รอบต่อ 10 นาที) โดยเมื่อให้แรงดันแก่ระบบแรงดันจะเข้าสู่ภายในระบบจนถึง 4 บาร์ จึงจะหยุดแรงดันให้คงที่อยู่ที่ 4 บาร์ เป็นเวลา 10 นาที หรือ 1 รอบ จากนั้นจะทำการปล่อยแรงดันออกจากระบบอย่างรวดเร็วแล้วทำการเพิ่มแรงดันเข้าสู่ระบบที่ 4 บาร์ อีกครั้งจนกว่าจะครบ 3 รอบ หรือจำนวนรอบที่ต้องการ โดยสามารถดูภาพประกอบได้ ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 ตัวอย่างการอัดคลายแรงดันที่ 4 บาร์ ที่จำนวน 6 รอบต่อชั่วโมง

2.11 การวิเคราะห์หาปริมาณการกำจัดเซลล์ของหลอดลมสุกรด้วยเทคนิค DNA Assay [20]

วิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ในหลอดลมสุกรด้วยวิธีวิเคราะห์ปริมาณ DNA เพื่อที่จะประเมินร้อยละความสามารถในการกำจัดเซลล์ ในกระบวนการนี้จะนำหลอดลมสุกรที่ผ่านกระบวนการไปบดให้ละเอียดในโกร่ง (Mortar) ด้วยไนโตรเจนเหลว หลังจากนั้นนำหลอดลมสุกรที่บดแล้วใส่ในหลอดไมโครเซ็นตริฟูกอล (Microcentrifugal Tube) ที่มีขนาด 100 มิลลิกรัม พร้อมกับสารละลาย SDS ใน Saline–Sodium Citrate (SSC) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.02 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณ 1 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำสารผสมที่บ่มไว้นี้ใส่ลงบน Black 96-Well Plates และก็ทำการย้อมด้วยสารเรืองแสง Hoechst 33258 แล้วจากนั้นนำไปตรวจสอบความเข้มของการเรืองแสงด้วยเครื่อง Fluorescence Spectrophotometer ที่มีการกระตุ้นด้วยความยาวคลื่นในช่วงที่ความยาวคลื่น 355 นาโนเมตร และการแผ่รังสีความยาวคลื่นในช่วง 460 นาโนเมตร ต่อจากนั้นจะทำการตรวจวัดตัวอย่าง 3 ครั้ง โดยใช้หลอดลมสุกรที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์เป็นตัวอย่างอ้างอิงและใช้ Calibration Curve ของค่าการเรืองแสงกับค่าปริมาณเซลล์ด้วยเซลล์ Fibroblast ของหนูทดลองเพื่อนำมาทำการเทียบปริมาณเซลล์ของหลอดลมสุกร สำหรับร้อยละการกำจัดเซลล์สามารถคำนวณได้ดังสมการ

$$Cell\ Removal\ (\%) = \left(\frac{S_1 - S_2}{S_1}\right) \times 100 \qquad (2.1)$$

โดยที่ Cell Removal (%) คือ ร้อยละการกำจัดเซลล์

S_1 คือ ปริมาณของเซลล์ของหลอดลมสุกรสด

S_2 คือ ปริมาณของเซลล์หลอดลมสุกรที่ผ่านการกำจัดเซลล์

2.12 หลักการทำงานของเครื่อง Fluorescence Spectrophotometer [26]

เครื่องฟลูออเรสเซนต์สเปคโตรสโคปี (Fluorescence Spectroscopy) เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์คุณสมบัติของสาร โดยการอาศัยการดูดกลืนรังสียูวีที่ส่งผลให้โมเลกุลถูกกระตุ้นและมีการสั่นภายในโมเลกุลจากระดับขั้นพลังงานสถานะพื้น (Ground State) ไปสู่ระดับขั้นพลังงานที่สูงขึ้น (Excited State) เรียกว่า การดูดพลังงาน (Excite Energy) โมเลกุลที่มีการเคลื่อนที่ไปอยู่ในระดับของชั้นพลังงานที่สูงจะไม่มีความเสถียรจึงมีการปลดปล่อยพลังงานและตกลงมาในชั้นระดับพลังงานที่ต่ำกว่าพลังงานที่โมเลกุลปลดปล่อยจากระดับชั้นพลังงานกระตุ้นชั้นที่หนึ่งสู่ระดับชั้นพลังงานสถานะพื้นที่จะทำให้เกิดการคายโฟตอน (Emission Of Photon) ทำให้เกิดสเปกตรัมในช่วงฟลูออเรสเซนต์ ณ ค่าพลังงานที่กระตุ้นที่จำเพาะของสารแต่ละชนิด

2.13 หลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM) [26]

หลักการทำงานของเครื่อง SEM จะประกอบด้วยแหล่งกำเนิดอิเล็กตรอน ซึ่งทำหน้าที่ผลิตอิเล็กตรอนเพื่อป้อนให้กับระบบ โดยกลุ่มอิเล็กตรอนที่ได้จากแหล่งกำเนิดจะถูกเร่งด้วยสนามไฟฟ้า จากนั้นกลุ่มอิเล็กตรอนจะผ่านเลนส์รวบรวมรังสี (Condenser Lens) เพื่อที่ทำให้กลุ่มอิเล็กตรอนกลายเป็นลำอิเล็กตรอน ซึ่งสามารถปรับให้ขนาดของลำอิเล็กตรอนใหญ่หรือเล็กได้ตามต้องการ หากต้องการภาพที่มีความคมชัดจะปรับให้ลำอิเล็กตรอนมีขนาดเล็ก หลังจากนั้นลำอิเล็กตรอนจะถูกปรับระยะโฟกัสโดยเลนส์ใกล้วัตถุ (Objective Lens) ลงไปบนผิวชิ้นงานที่ต้องการศึกษา หลังจากนั้นลำอิเล็กตรอนถูกกราดลงบนชิ้นงานจะทำให้เกิดลำอิเล็กตรอนทุติยภูมิ (Secondary Electron) ขึ้นซึ่งสัญญาณจากอิเล็กตรอนทุติยภูมินี้จะถูกบันทึกและแปลงไปเป็นสัญญาณทางอิเล็กทรอนิกส์ จากนั้นจะถูกนำไปสร้างเป็นภาพบนจอโทรทัศน์ต่อไปและสามารถบันทึกภาพจากหน้าจอโทรทัศน์

2.14 หลักการทำงานของเครื่อง Fourier Transform Infrared (FTIR) [27]

Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy เป็นหนึ่งในเทคนิคทางด้าน Infrared Spectroscopic ที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกประเภทของสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ และพันธะเคมีในโมเลกุลรวมถึงสามารถบอกถึงปริมาณองค์ประกอบที่มีอยู่ในโมเลกุลของสารผสมตัวอย่างที่ไม่ทราบชนิด เทคนิค FTIR นี้มีความไวมาก

โดยทั่วไปรังสีจากแหล่งกำเนิดจะผ่านตัวอย่างและถูกกระจายออกในช่วงความถี่ต่างๆ ด้วยโมโนโครเมเตอร์ หลังจากนั้นลำรังสีจะตกลงบนเครื่องตรวจวัด ซึ่งจะทำให้เกิดเป็นสัญญาณไฟฟ้า แล้วทำการบันทึกผลสัญญาณนั้น

IR Spectrometer แบบนี้จะมีลำแสงทั้งชนิดที่เป็นลำแสงเดี่ยว (Single Beam) และลำแสงคู่ (Double Beam) แต่โดยส่วนมากที่พบเห็นจะเป็นแบบลำแสงคู่เพราะ Background ที่เกิดจากก๊าซในบรรยากาศ เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และไอน้ำที่จะหมดปัญหาไป ในการทำงานของเครื่องแบบนี้ลำแสงสองลำจะผ่านไปยัง Chamber ตัวอย่างและอ้างอิงจากนั้นใช้ตัวตัดแสง

2.14.1 หลักการทำงานของเครื่อง

เครื่องมือหลักๆ จะถูกออกแบบมาอย่างง่ายๆ รังสีอินฟราเรดจากแหล่งกำเนิดจะถูกฉายไปยัง Interferometer ซึ่งตัวที่นิยมใช้ คือ Michelson Interferometer ซึ่งประกอบด้วยกระจกที่สามารถเคลื่อนที่ได้ กระจกที่ตรึงอยู่กับที่ โดยทั้งสองตั้งฉากซึ่งกันและตัวแยกแสงซึ่งเป็นอุปกรณ์กึ่งสะท้อนแสง โดยส่วนใหญ่ทำมาจากการนำฟิล์มบางของเจอร์มาเนียมวางลงบน KBr

ที่ตัวแยกแสงลำรังสีครึ่งหนึ่งจะทะลุผ่านไปยังกระจกที่ตรึงอยู่กับที่และอีกครึ่งหนึ่งจะสะท้อนไปยังกระจกที่สามารถเคลื่อนที่ได้ หลังจากนั้นลำรังสีก็จะสะท้อนจากกระจกกลับมารวมกันที่ตัวแยกแสงเกิดการแทรกสอดขึ้น หลังจากนั้นลำรังสีก็จะผ่านไปยังตัวอย่างและในที่สุดก็จะตกลงบนเครื่องตรวจวัด

Path Difference ระหว่างลำรังสีที่ถูกแยกออกเกิดขึ้นจากระยะทางสัมพัทธ์ระหว่างกระจกทั้งสอง ถ้าแขนยึดกระจกทั้งสองข้างของ Interferometer ยาวเท่ากัน โดยที่ลำรังสีทั้งสองก็จะเดินทางด้วยระยะทางที่เท่ากัน มีเฟสตรงกันจะทำให้สัญญาณที่ไปถึงเครื่องตรวจวัดมีค่ามากที่สุด เมื่อกระจกเคลื่อนที่เป็นระยะทาง λ ต่อ 4 ระยะทางเดินของรังสีจะเปลี่ยนเป็น λ ต่อ 2 รังสีทั้งสองมีเฟสต่างกัน 180 องศา การแทรกสอดจะอยู่ในตำแหน่งหักล้าง เมื่อเคลื่อนกระจกเป็นระยะทางอีก λ ต่อ 4 ระยะทางเดินของรังสีจะเปลี่ยนเป็น λ รังสีทั้งสองลำจะกลับมามีเฟสตรงกัน

เมื่อกระจกเคลื่อนที่ด้วยความเร็วคงที่ ความเข้มของสัญญาณที่เครื่องตรวจวัดวัดได้จะมีลักษณะของ Interferogram นั้นจะเป็นรูปคลื่น Sine โดยกราฟจะพล็อตระหว่างการตอบสนองที่เครื่องตรวจวัดบันทึกได้และเวลาที่กระจกมีการเคลื่อนที่ ถ้าตัวอย่างเกิดการดูดกลืนรังสีที่ค่าความถี่นี้ขนาดของแอมพลิจูดจะลดลง โดยที่จะสัมพันธ์กับปริมาณของตัวอย่าง หลังจากนั้นใช้ Fourier Transform ซึ่งเป็นฟังก์ชันทางคณิตศาสตร์ในการแปลงผลที่ได้ (ขึ้นกับเวลา) ให้กลายเป็นค่าความเข้มกับความถี่

2.14.2 การวิเคราะห์ IR สเปคตรัม [28]

IR สเปคตรัมมีประโยชน์ในการหาหมู่ฟังก์ชั่นของโมเลกุล แต่เนื่องจากมีพีคจำนวนมากใน IR สเปคตรัม เราคงไม่สามารถคาดหวังว่าจะรู้ทุกพีคใน IR สเปคตรัม ขั้นตอนต่อไปนี้อาจเป็นแนวทางเริ่มต้นในการแปรข้อมูลจาก IR สเปคตรัมได้ซึ่งได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ความถี่ของการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของหมู่ฟังก์ชันต่างๆ

ซม$^{-1}$	หมู่ฟังก์ชัน	รายละเอียด
3600-3400	O–H Stetching	3650-3590 cm^{-1} (sh, w) แอลกอฮอล์อิสระ 3400-3200 cm^{-1} (b) แอลกอฮอล์ที่เกิดพันธะไฮโดรเจน 3400-2400 cm^{-1} (vs, vb) กรดคาร์บอกซิลิก
3500-3200	N–H Stretching	3200-3400 cm^{-1} (m) 1° เอมีนและเอมีด มี 2 แถบ 3200-3400 cm^{-1} (w) 2° เอมีนและเอมีด มี 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

ตารางที่ 2.2 (ต่อ) ความถี่ของการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของหมู่ฟังก์ชันต่างๆ

ซม$^{-1}$	หมู่ฟังก์ชัน	รายละเอียด
2250-2225	C=N Stretching	ไนทริล (m)
2260-2100	C=C Stretching	อัลไคน์ (w) โมเลกุลที่สมมาตรจะไม่มีแถบนี้ปรากฏ
1820-1760 (s)	C=O Stretching	แอนไฮไดรด์ (s) มี 2 แถบ
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
2250-2225	C=N Stretching	ไนทริล (m)
2260-2100	C=C Stretching	อัลไคน์ (w) ถ้าเป็นโมเลกุลที่สมมาตรจะไม่มีแถบนี้ปรากฏ
1600, 1580	C=C stretching	เบนซีนและเบนซีนที่มีหมู่แทนที่ ความเข้มไม่แน่นอน
1500 และ1450		อาจมี 2 3 หรือมีทั้ง 4 แถบ
1520 (s) และ 1350 (s)	NO_2 bending	สารประกอบไนโตร
1465-1450	C–H bending	หมู่ CH_2
1450-1375	C–H bending	หมู่ CH_3

คำย่อ : s = ความเข้มสูง vs = ความเข้มสูงมาก m = ความเข้มปานกลาง w = ความเข้มต่ำ vw = ความเข้มต่ำมาก sh = แหลมคม b = กว้าง vb = กว้างมาก OOP = out–of–plane (การสั่นออกนอกระนาบ)

ที่มา: บทที่ 10 อินฟราเรด สเปคโตรสโคป (Infrared Spectroscopy) มหาวิทยาลัยรามคำแหง

2.15 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี ค.ศ. 1998 A. Bader และคณะ [14] ได้ศึกษาเกี่ยวกับการรักษาหลอดเลือดหัวใจ โดยที่จะมีการใช้ Glutaraldehyde ที่ต่อเนื้อเยื่อหลอดเลือด ซึ่งปัญหาที่พบส่วนใหญ่มักเกิดในเด็กเล็ก สำหรับขั้นตอนในการกำจัดเซลล์มีผลทำให้การกำจัดเซลล์ดั้งเดิมเกือบจะสมบูรณ์ในขณะที่โครงสร้าง 3D จะหลวมในบริเวณ Interfibrillar แต่การจัดเรียงเส้นใยของโครงสร้าง 3D จะได้รับการเก็บรักษาไว้อย่างดีไม่มีการลดโครงสร้างเฉพาะของเซลล์ แต่ก็มีการขยายตัวของเซลล์ Endothelial ในมนุษย์ หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้เซลล์ที่เพาะได้เกิดการผสานกันจะเห็นว่าหลอดเลือดจากสุกรจะถูกกำจัดเซลล์เกือบจะสมบูรณ์ โดยไม่ต้องนำหนังไปฟอกในขั้นตอนการทำความสะอาดอีก และโครงสร้าง Xenogenic ที่ถูกนำไปเพาะในเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดของมนุษย์ วิธีการนี้อาจจะนำไปสู่งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เช่น การปลูกถ่ายลิ้นหัวใจกับเซลล์ Autologous ของผู้ป่วยเอง

ในปี ค.ศ. 2003 R.N. Chen และคณะ [15] ได้ทำการศึกษาถึงกระบวนการกำจัดเซลล์หนังชั้นนอกของหนังสุกรและยังคงการรักษาสภาพของผิวหนังแท้ สำหรับการนำไปใช้ในทางการแพทย์ โดยใช้ Trypsin ร้อยละ 0.25 และ Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) ร้อยละ 0.1 ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งจะเป็นประโยชน์สำหรับการรักษาโครงสร้างผิวหนัง หลังจากผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์จะเห็นว่าผิวหนังชั้นนอกของหนังสุกรถูกกำจัดเซลล์ออกอย่างมีประสิทธิภาพเหลือแต่โครงสร้างของผิวหนัง จากผลการตรวจสอบทางเนื้อเยื่อวิทยา พบว่าเซลล์ผิวหนังชั้นนอกและเซลล์ผิวหนังได้ถูกกำจัดได้อย่างสมบูรณ์ และไม่ทำให้โครงสร้างผิวหนังพื้นฐานของการรวมกลุ่มของคอลลาเจนเสียสภาพ ซึ่งการตรวจสอบโดย TEM แสดงให้เห็นว่าลักษณะของเส้นใยคอลลาเจนใน ADM ได้ถูกรักษาไว้เป็นอย่างสมบูรณ์

ในปี ค.ศ. 2004 C.E. Schmidt และ J.M. Baier [16] ได้ทำการศึกษาถึงกระบวนการการกำจัดเซลล์ โดยใช้วิธี Glutaraldehyde วิธี Polyepoxide Crosslinking และวิธี Dyemediated Photooxidation ว่ามีผลกระทบต่อคุณสมบัติทางชีวภาพและคุณสมบัติทางเคมีของเนื้อเยื่อหรือไม่ โดยเฉพาะความเป็นพิษของเซลล์ภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและระบบภูมิคุ้มกัน จากการศึกษาได้แสดงให้เห็นว่าวิธี Glutaraldehyde เป็นวิธีที่ได้รับการรักษาอย่างแพร่หลาย เนื่องจากจะทำให้เกิดการเชื่อมโยงกันระหว่างเนื้อเยื่อได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ก็จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางชีวภาพและคุณสมบัติทางเคมีของเนื้อเยื่อ รวมถึงความเป็นพิษของเซลล์ภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน แต่วิธี Polyepoxide Crosslinking และวิธี Dyemediated Photooxidation จะแสดงให้เห็นว่ามีการรักษาคุณสมบัติทางชีวภาพและเคมีของเนื้อเยื่อได้เป็นอย่างดี

ในปี ค.ศ. 2004 E. Rieder และคณะ [17] ได้ทำการศึกษาถึงกระบวนการการกำจัดเซลล์ที่แตกต่างกันในลิ้นหัวใจสุกร โดยใช้ Trypsin ร้อยละ 0.1 Sodiumdodecyl-Sulphate ร้อยละ 0.1 และ Tert-Octylphenyl-Polyoxyethylen (Triton X-100, BioRad) ร้อยละ 0.25 ร่วมกับการใช้ Sodium-Deoxycholate ร้อยละ 0.25 ว่ามีประสิทธิภาพในการกำจัดเซลล์สมบูรณ์และมีศักยภาพพอสำหรับการนำไปใช้ในการปลูกถ่ายอวัยวะหรือไม่ จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าหลังจากที่ผ่าน

กระบวนการกำจัดเซลล์โดยใช้ Trypsin ร้อยละ 0.1 และ Tert-octylphenyl-Polyoxyethylen (Triton X-100, BioRad) ร้อยละ 0.25 ร่วมกับ Sodium-Deoxycholate ร้อยละ 0.25 มีการผสานกันระหว่างเซลล์เยื่อบุผิวของผนังหลอดเลือดและยังคงรักษาสภาพเซลล์ Xenogenic ไว้ได้อย่างสมบูรณ์สามารถที่จะนำไปใช้ในการปลูกถ่ายได้ต่อไป แต่ในกระบวนการกำจัดเซลล์ที่ใช้ Sodiumdodecyl-Sulphate ร้อยละ 0.1 จะเกิดการสูญเสียของเซลล์เยื่อบุผิวของผนังหลอดเลือดเป็นอย่างมากเป็นผลมาจากอิออนที่เป็นพิษของสารผงซักฟอก

ในปี ค.ศ. 2008 B.P. Chan และ K.W. Leong [18] ได้ทำการศึกษาการทำงานภายในของโครงสร้างเซลล์และพิจารณาเกี่ยวกับโครงสร้างเซลล์ที่มีลักษณะเฉพาะ โดยกระบวนการ Acellular ECM การกำจัดโครงสร้าง Allogenic ของเซลล์หรือแอนติเจนจากเนื้อเยื่อ ซึ่งเป็นแหล่งที่มาสำหรับการต่อต้านทางภูมิคุ้มกันและรักษาส่วนประกอบของโครงสร้าง ECM สำหรับเทคนิคนี้การกำจัดเซลล์เป็นการกำจัดองค์ประกอบของเซลล์มักจะทำได้โดยการรวมกันของสารเคมีทางกายภาพและวิธีการทำงานของเอนไซม์ โดยที่มีการใช้เอนไซม์ Trypsin หรือ EDTA เข้าไปในกระบวนการการกำจัดเซลล์นิวเคลียสและส่วนประกอบของนิวเคลียสใน Cellular จะถูกทำลายและกำจัดออก ซึ่งวิธีการนี้จะมีการรักษาสภาพโครงสร้างของเซลล์ที่สมบูรณ์

ในปี ค.ศ. 2008 I. Prasertsung และคณะ [19] ได้ทำการทดลองเพื่อศึกษาวิธีการกำจัดเซลล์แบบใหม่ โดยวิธีการใช้เอนไซม์ร่วมกับเทคนิคอัดคลายแรงดันแบบช่วง จากการศึกษา พบว่าเมื่อใช้แรงดันเข้าร่วมจะทำให้เวลาในการกำจัดเซลล์สั้นลงเพราะเอนไซม์สามารถแทรกซึมเข้าไปในชั้นผิวหนังได้ดีขึ้น โดยตรวจวัดได้จากการทดสอบ DNA และวิธีการย้อมสี H&E ซึ่งการกำจัดเซลล์ร่วมกับการให้ความดันนอกจากจะใช้เวลาน้อยแล้วยังเป็นการป้องกันการทำลายโครงสร้างของชั้นผิวหนังส่งผลให้เซลล์ถูกกำจัดได้มากขึ้น จากการศึกษาผลของชนิดของเอนไซม์ พบว่าการอัดคลายแรงดันร่วมกับเอนไซม์ Dispase II สามารถกำจัดเซลล์ได้ดีกว่าเอนไซม์ Tripsin แสดงให้เห็นว่าการใช้เทคนิคอัดคลายแรงดันร่วมกับเอนไซม์นั้นมีศักยภาพสูงในการเตรียมผิวหนังชั้นในปราศจากเซลล์จากหนังสุกรเพื่อนำไปใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

ในปี ค.ศ. 2010 N.T. Remlinger และคณะ [20] ได้ทำการศึกษา โดยการใช้ Hydrated Xenogeneic กำจัดเซลล์ในหลอดลมสุกร จากการศึกษา พบว่า Hydrated Xenogeneic สามารถกำจัดเซลล์ชั้นนอกและชั้นในหลอดลมหมูได้สมบูรณ์รวมทั้ง HDTM ที่ได้รักษาลักษณะโครงสร้างที่จำเป็นของหลอดลมและหลังจากการปลูกถ่ายได้มีการแสดงการตอบสนองต่อกับพัฒนาของเซลล์ผิวคอลลัมนาร์ (เซลล์บุชนิดซูโดสตราติไฟด์คอลัมนาร์) และเห็นว่ามีแนวโน้มที่ดีที่เยื่อบุผิว แต่อย่างไรก็ตามโครงสร้างของกระดูกอ่อนมีการสลายและจำกัดการสร้างกระดูกอ่อนใหม่ จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าโครงสร้างหลอดลม ECM มีการตอบสนองที่ดีต่อเยื่อบุผิว Site-Specific และโครงสร้างมีความแข็งแรงสมบูรณ์เพียงพอที่จะสามารถนำไปให้ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

ในปี ค.ศ. 2011 P.M. Crapo และคณะ [21] ศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างของ Extracellular Matrix (ECM) ในกระบวนการกำจัดเซลล์ของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะ จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า

วิธีการกำจัดเซลล์จะส่งผลให้การเจริญเติบโตของโครงสร้างเกิดการหยุดชะงักและเกิดการสูญเสียโครงสร้างของพื้นผิว ซึ่งในกระบวนการกำจัดเซลล์เป็นวิธีการที่มีการเก็บรักษาของ ECM นั้นได้อย่างสมบูรณ์ โดยจะมีปัจจัยต่างๆ เป็นตัวควบคุม เช่น ความหนาแน่นของเนื้อเยื่อ รูปร่างลักษณะทางกายภาพและคุณสมบัติทางชีววิทยาที่ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

ในปี ค.ศ. 2011 Y. Zou และ Y. Zhang [22] ได้ทำการศึกษาถึงผลกระทบเชิงกลและโครงสร้างของ ECM ในหลอดเลือดสุกที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ที่แตกต่างกันโดยใช้ Sodium Dodecyl Sulfate ร้อยละ 0.1 Trypsin ร้อยละ 0.5 และ Triton X-100 ร้อยละ 1 จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าทั้ง 3 กระบวนการกำจัดเซลล์สามารถกำจัดเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพและโครงสร้าง ECM ที่สำคัญสามารถเก็บรักษาไว้ได้อย่างดีภายใต้ Sodium Dodecyl Sulfate ร้อยละ 0.1 และ Triton X-100 ร้อยละ 1 จะแสดงถึงคุณสมบัติความยืดหยุ่น ซึ่งคล้ายกับหลอดเลือดไม่เปลี่ยนแปลงแต่ในโครงสร้าง ECM ที่ได้ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์โดยใช้ Trypsin ร้อยละ 0.5 มีการผสานกันระหว่างเซลล์ได้ไม่ค่อยแข็งแรง แต่ถือได้ว่าเป็นวัสดุที่มีศักยภาพสำหรับการนำไปใช้ในด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

ในปี ค.ศ. 2012 M. Zang และคณะ [23] ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการกำจัดเซลล์ของหลอดลม โดยใช้เอนไซม์ Sodium Deoxycholate ร้อยละ 4 ในการกำจัดเซลล์ การศึกษาครั้งนี้มีการประเมินถึงผลกระทบเกี่ยวกับความสมบูรณ์ของโครงสร้างภายนอกเซลล์ของหลอดลม สำหรับในกระบวนการกำจัดเซลล์ได้นำหลอดลมของหนูนอร์เวย์สีน้ำตาลมากำจัดเซลล์ โดยใช้เอนไซม์ในการกำจัดเซลล์พร้อมทั้งจะมีการตรวจสอบโครงสร้างของเซลล์ และแอนติเจนในระหว่างกระบวนการไปด้วย จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าแอนติเจนถูกกำจัดได้อย่างสมบูรณ์ แต่มีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของโครงสร้างหลอดลมเล็กน้อยและมีการเก็บรักษาโครงสร้างที่สำคัญไว้เพียงพอที่จะนำไปใช้ในการปลูกถ่ายอวัยวะ

ในปี ค.ศ. 2013 B.D. Elder และคณะ [24] ได้ทำการศึกษาเพื่อที่จะประเมินผลกระทบของกระบวนการกำจัดเซลล์ที่แตกต่างกันในการสร้างกระดูกอ่อน โดยใช้วิธี Scaffoldless ที่ SDS ร้อยละ 1 SDS ร้อยละ 2 Tributyl Phosphate ร้อยละ 2 Triton X-100 ร้อยละ 2 และสารละลาย Hypotonic จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าที่ SDS ร้อยละ 2 จะส่งผลให้กระบวนการกำจัดเซลล์ที่สมบูรณ์มากที่สุดและยังรักษาประสิทธิภาพของโครงสร้างเซลล์ได้เป็นอย่างดี ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เป็นที่น่าสนใจที่พวกเขาแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของการสร้างกระดูกอ่อนในทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

ในปี ค.ศ. 2013 D.W. Youngstrom และคณะ [25] ได้ทำการศึกษาถึงกระบวนการกำจัดเซลล์ที่แตกต่างกันในเนื้อเยื่อเอ็นม้าว่ามีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงภายในองค์ประกอบของโครงสร้างเซลล์หรือไม่ โดยใช้สารฟอกขาวและเอนไซม์ จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าโครงสร้างเซลล์ต้นกำเนิด Mesenchymal Stem Cell (MSC) และโครงสร้างเซลล์พื้นฐานได้รับการรักษาไว้อย่าง

สมบูรณ์ และสามารถกำจัดเซลล์เนื้อเยื่อที่เป็นพิษออกได้อย่างมีประสิทธิภาพเหมาะสมสำหรับการใช้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อที่ซับซ้อนได้เป็นอย่างดี

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

3.1.1 หลอดลมสุกรสดจากสุกรช่วงอายุ 3-4 เดือน

3.1.2 เอนไซม์ Trypsin (จากกระเพาะของสุกร) ยี่ห้อ Fluka Biochemika

3.1.3 น้ำกลั่น

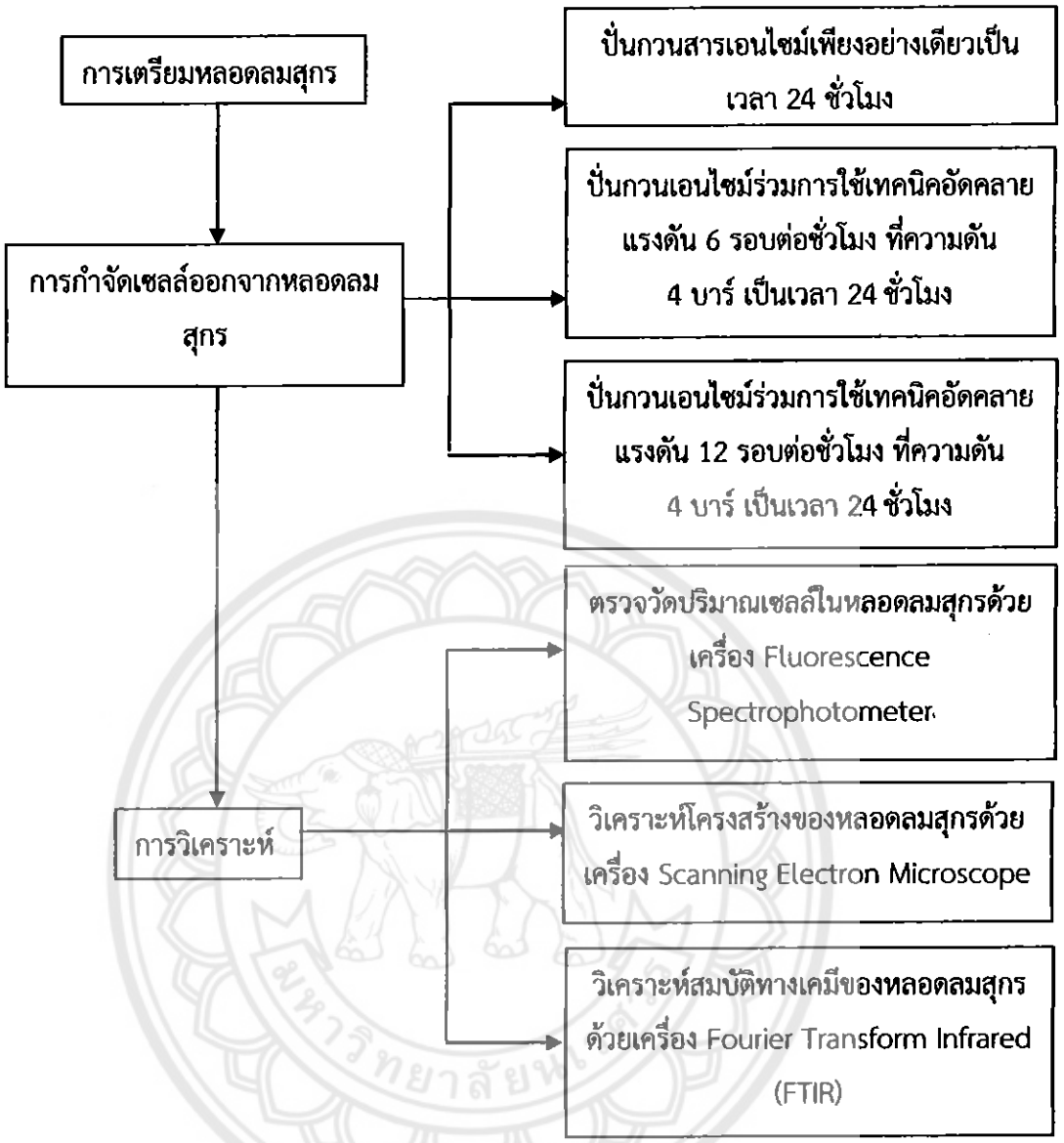
3.1.4 เครื่องอัดคลายแรงดันแบบช่วง (Periodic Pressurized)

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

3.1.6 เครื่องปั่นกวนสารรุ่น RW 20 Digital ยี่ห้อ IKA

3.2 วิธีการทดลอง

ในการศึกษาการพัฒนาเทคโนโลยีการกำจัดเซลล์ออกจากหลอดลมสุกรด้วยกระบวนการปั่นกวนด้วยเอนไซม์และกระบวนการอัดคลายแรงดันแบบเป็นช่วงร่วมกับการใช้เอนไซม์ ดำเนินการโดยนำหลอดลมสุกรสดจากสุกรที่มีอายุอยู่ในช่วง 3-4 เดือน มาผ่านกระบวนการการกำจัดเซลล์ ซึ่งมีขั้นตอนการดำเนินการ ดังแสดงในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แผนภาพขั้นตอนการทดลอง

3.2.1 การเตรียมหลอดลมสุกร

3.2.1.1 นำหลอดลมสุกรขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร จากสุกรที่มีอายุในช่วง 3-4 เดือน เนื่องจากสุกรในช่วงนี้จะมีความเจริญเติบโตเต็มที่ร่วมกับการทำความสะอาด โดยการล้างด้วยน้ำสะอาดแล้วนำไปกำจัดพังผืดไขมันที่ติดอยู่กับหลอดลมสุกรออก โดยการเฉือนด้วยมีดสะอาด หลังจากนั้นนำหลอดลมสุกรที่ได้ตัดแบ่งให้ได้ขนาดประมาณ 2-3 เซนติเมตร ดังรูปที่ 3.2

รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการเตรียมหลอดลมสุกร

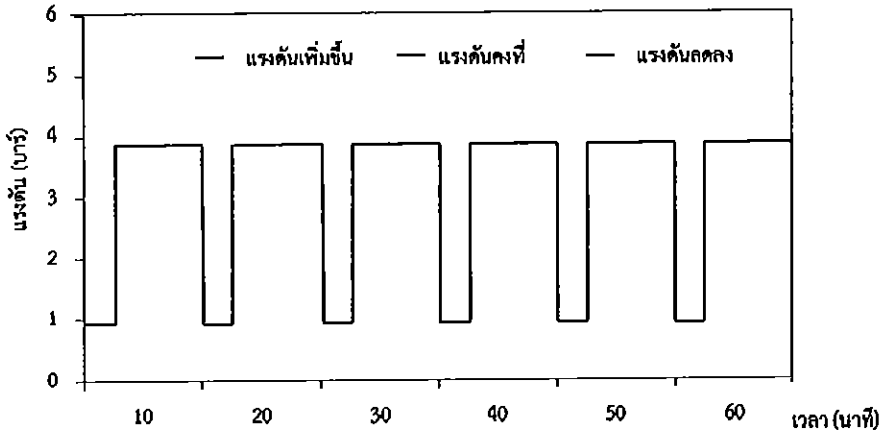
3.2.2 การกำจัดเซลล์ในหลอดลมสุกร

ในส่วนของกระบวนการกำจัดเซลล์มีการแบ่งกลุ่มตัวอย่างเป็น 3 กลุ่ม ดังต่อไปนี้

3.2.2.1 การกำจัดเซลล์โดยนำหลอดลมสุกรมาปั่นกวนในเอนไซม์ทริปซินร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร โดยมีเปลี่ยนสารละลายใหม่ทุกๆ 6 ชั่วโมง และควบคุมอุณหภูมิที่ 4-14 องศาเซสเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.2.2 การกำจัดเซลล์โดยมีประยุกต์ใช้เครื่องอัดคลายแรงดันร่วมกับเอนไซม์ทริปซิน โดยนำหลอดลมสุกรมาแช่ในเอนไซม์ทริปซินร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ในถังอัดแรงดันและมีการเปลี่ยนสารละลายใหม่ทุกๆ 6 ชั่วโมง ในการอัดคลายแรงดันใช้จำนวนรอบในการอัดคลายแรงดัน 6 และ 12 รอบต่อชั่วโมง ที่ความดัน 4 บาร์ ควบคุมอุณหภูมิที่ 4-14 องศาเซสเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นอกจากนั้นแล้วในระหว่างอัดคลายแรงดันยังมีการปั่นกวนสารด้วยเครื่องปั่นกวน โดยเครื่องอัดคลายแรงดันแสดงให้เห็น ดังรูปที่ 3.3 โดยแต่ละรอบของการอัดคลายแรงดันสามารถดูได้ ดังรูปที่ 3.4

รูปที่ 3.3 เครื่องอัดคลายแรงดันแบบช่วง



รูปที่ 3.4 ตัวอย่างการอัดคลายแรงดันแบบช่วงที่ 4 บาร์ จำนวน 6 รอบต่อชั่วโมง

3.3 การวิเคราะห์คุณสมบัติ

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM)

การวิเคราะห์ลักษณะของหลอดลมสุกรนั้นสามารถทำได้ โดยนำหลอดลมสุกรที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ จากนั้นทำแห้งด้วยวิธีเทคนิคการทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze Drying) และพ่นเคลือบด้วยทองคำแล้วจึงนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่อง (Scanning Electron Microscope: SEM)

3.3.1.1 นำเอาหลอดลมที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ทั้ง 3 กลุ่มมาทำแห้งด้วยเทคนิคการทำแห้งเยือกแข็ง ดังรูปที่ 3.5

ก) ข)

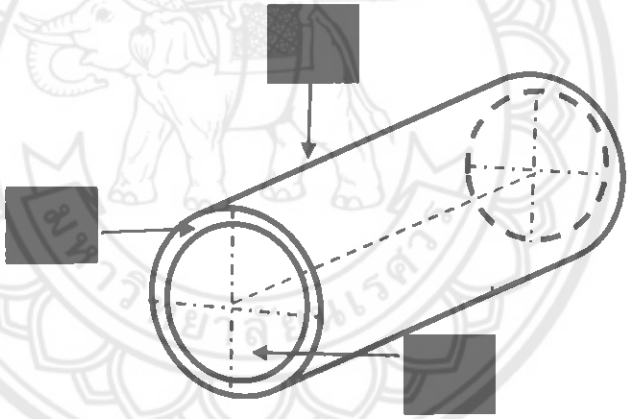
รูปที่ 3.5 ก) หลอดลมที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ ข) หลดลมที่ผ่านการทำแห้ง

3.3.1.2 นำเอาหลอดลมที่ผ่านการทำให้แห้งด้วยวิธีเทคนิคการทำแห้งเยือกแข็งทั้ง 3 กลุ่มตัวอย่าง นำหลอดลมมาตัดเพื่อให้ได้ขนาดพอดีกับสตับ เพื่อนำไปใช้ในการพ่นเคลือบด้วยทองคำ และนำไปใช้ในการส่อง SEM ดังรูปที่ 3.6

ก) ข)

รูปที่ 3.6 ก) หลอดลมที่เตรียมไว้เพื่อนำไปพ่นเคลือบด้วยทองคำ
ข) หลอดลมที่ผ่านการพ่นเคลือบด้วยทองคำ

3.3.1.3 **ขั้นตอนในการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด** (Scanning Electron Microscope: SEM) เมื่อผ่านการฉาบเคลือบทองแล้วนำเข้าเครื่องและใช้โหมดมีความเป็นสุญญากาศสูง (High Vacuum Mode, HV SEM) โดยกำหนดกำลังขยายที่ 50 และ 200 เท่า บริเวณที่จะทำการตรวจสอบมีทั้งหมด 3 ด้าน คือ ด้านนอก (S1) ด้านใน (S2) และด้านข้าง (S3) ดังแสดงในรูปที่ 3.7



รูปที่ 3.7 แสดงบริเวณที่ทำการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

3.3.2 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของหลอดลมสุกร

การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของหลอดลมสุกรเพื่อศึกษาสมบัติทางเคมีต่างๆ ที่อยู่ภายในหลอดลมสุกร โดยใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared (FTIR) โดยจะทำการศึกษาสมบัติทางเคมีของคอลลาเจนที่อยู่ภายในหลอดลมสุกร ในการเตรียมตัวอย่างทำได้ โดยการนำหลอดลมสุกรที่ผ่านการทำแห้งด้วยเทคนิคการทำแห้งเยือกแข็ง (Freeze Drying) จากนั้นนำไปวัดด้วยเครื่อง FTIR และนำไปตรวจวัดด้วย Attenuated Total Reflectance (ATR) Accessories ที่ Resolution 8 ซม$^{-1}$

3.3.3 วิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ในหลอดลมสุกร

วิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ในหลอดลมสุกรนำหลอดลมของสุกรไปบดให้ละเอียดและใช้วิธีวิเคราะห์ปริมาณ DNA เพื่อประเมินร้อยละความสามารถในการกำจัดเซลล์ หลอดลมสุกรที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์จะถูกบดให้ละเอียดด้วยโกร่ง (Mortar) ภายใต้ไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำชิ้นส่วนหลอดลมสุกรที่ถูกฝังไว้นี้ไปใส่ในหลอดไมโครเซ็นตริฟูกอล (Microcentrifugal Tube) 100 มิลลิกรัม พร้อมกับสารละลาย SDS ใน Saline-Sodium Citrate (SSC) ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณ 1 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำสารผสมที่บ่มไว้นี้ใส่ลงบน Black 96-Well Plates และทำการย้อมด้วยสารเรืองแสง Hoechst 33258 จากนั้นนำไปตรวจสอบความเข้มของการเรืองแสงด้วยเครื่อง Fluorescence Spectrophotometer ที่มีการกระตุ้นในช่วงความยาวคลื่น 355 นาโนเมตร และการดูดกลืนรังสีในช่วงความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร ทำการวัดตัวอย่างละ 3 ครั้ง โดยใช้หลอดลมสุกรที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์เป็นตัวอย่างอ้างอิงและใช้กราฟมาตรฐานของค่าการเรืองแสงกับค่าปริมาณเซลล์ Fibroblast ของหนูในการเทียบปริมาณเซลล์ของหลอดลมสุกร สำหรับร้อยละการกำจัดเซลล์คำนวณได้จากสมการที่ 2.1

บทที่ 4
ผลการทดลองและการวิเคราะห์

ในการศึกษานี้จะแบ่งกลุ่มตัวอย่างเป็น 3 กลุ่มตัวอย่าง คือ การกำจัดเซลล์โดยการปั่นกวนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง การกำจัดเซลล์โดยการปั่นกวนร่วมกับการอัดคลายแรงดันที่แรงดัน 4 บาร์ อัด-คลายแรงดันทุกๆ 6 รอบต่อชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และการกำจัดเซลล์โดยการอัดคลายแรงดันที่แรงดัน 4 บาร์อัดคลายแรงดันทุกๆ 12 รอบต่อชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งวิธีในการวิเคราะห์ผลมี 3 วิธีด้วยกัน คือ การวิเคราะห์ลักษณะสัณฐานของหลอดลมสุกรด้วยเทคนิคการส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM) การวิเคราะห์หาปริมาณการกำจัดเซลล์ของหลอดลมสุกรด้วยเทคนิค DNA และการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของหลอดลมสุกรด้วยเทคนิค FTIR ซึ่งจะมีรายละเอียดผลการทดลอง ดังนี้

4.1 การวิเคราะห์ลักษณะสัณฐานของหลอดลมสุกรและเซลล์ด้วยเทคนิคการการส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM)

จากการถ่ายภาพด้วยกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) เมื่อพิจารณาโครงสร้างของตัวอย่างของหลอดลมที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ที่กำลังขยาย 200 เท่า ลักษณะโครงสร้างของพื้นผิวด้านนอกของหลอดลม (P1-A) นั้นพบว่าพื้นผิวด้านนอกของหลอดลมนั้นมีการปกคลุมด้วยเยื่อหุ้มที่มีลักษณะของพื้นผิวที่เรียบและในส่วนบนของเนื้อเยื่อที่มีการปกคลุมนั้นจะมีพื้นผิวที่ขรุขระ ซึ่งอาจเกิดจากการกำจัดพังพืดออกไม่หมดในกระบวนการเตรียมหลอดลม นอกจากนี้ยังพบว่าภายใต้เนื้อเยื่อที่มีการปกคลุมพื้นผิวนั้นประกอบด้วยเส้นใยคอลลาเจนและเส้นใยอีลาสติน ซึ่งเส้นใยทั้งสองนั้นเป็นองค์ประกอบหลักของโครงสร้างของผนังหลอดลมที่มีหน้าที่สร้างความแข็งแรงและสร้างความยืดหยุ่นให้กับชั้นเนื้อเยื่อของหลอดลม นอกจากนี้ลักษณะโครงสร้างของพื้นผิวด้านใน (P2-A) เมื่อพิจารณาที่กำลังขยาย 200 เท่า พบว่าลักษณะโครงสร้างของพื้นผิวด้านในของหลอดลมมีลักษณะมีเนื้อเยื่อปกคลุมพื้นผิวราบเรียบและภายใต้เนื้อเยื่อนั้นมีการแสดงลักษณะของเส้นใยอยู่เป็นจำนวนมากและในส่วนในของลักษณะโครงสร้างของพื้นหน้าตัดของหลอดลม (P3-A) พบว่าองค์ประกอบภายในของหลอดลมประกอบไปด้วยชั้นต่างๆ ซึ่งแกนกลางของหลอดลมจะสังเกตเห็นได้ว่าเป็นชั้นกระดูกอ่อนซึ่งในแต่ละชั้นเนื้อเยื่อของหลอดลมจะมีเส้นใยที่เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ทำหน้าที่เชื่อมแต่ละชั้นของหลอดลมไว้ด้วยกัน

จากการถ่ายภาพด้วยกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) เมื่อพิจารณาโครงสร้างของตัวอย่างของหลอดลมที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์โดยการปั่นกวนในเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นที่ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่กำลังขยาย 200 เท่า ลักษณะโครงสร้างของพื้นที่ผิวด้านนอกของหลอดลม (P1-B) พบว่ามีการปรากฏเส้นใยคอลลาเจนและเส้นใยอีลาสตินที่ชัดเจนมากขึ้น นอกจากนี้ยังตรวจ

พบการเกาะกันอย่างหนาแน่นของทั้งสองเส้นใย นอกจากนี้ที่ลักษณะโครงสร้างของพื้นผิวด้านใน (P2-B) ที่จะแสดงลักษณะโครงสร้างภายในซึ่งประกอบไปด้วยเส้นใยจำนวนมากที่รวบตัวกันอยู่อย่างหนาแน่นและลักษณะโครงสร้างของพื้นผิวหน้าตัด (P3-B) จะมีลักษณะโครงสร้างพื้นผิวหน้าตัดที่การเชื่อมต่อของแต่ละชั้นของโครงสร้างหลอดลมจะเชื่อมต่อกันด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เส้นใยคอลลาเจนและเส้นใยอีลาสติน

จากการถ่ายภาพด้วยกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) เมื่อพิจารณาที่โครงสร้างของตัวอย่างของหลอดลมที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์โดยการปั่นกวนในเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นที่ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ร่วมกับใช้เทคนิคอัดคลายแรงดันแบบช่วงที่กำลังขยาย 200 เท่า ลักษณะโครงสร้างของพื้นที่ผิวด้านนอกของหลอดลม (P1-C) พบว่ามีการปรากฏเส้นใยคอลลาเจนและเส้นใยอีลาสตินที่ชัดเจนมากขึ้นมีการเกาะกันอย่างหนาแน่นของทั้งสองเส้นใยและโครงสร้างของหลอดลมมีความเป็นรูพรุนมากขึ้น ซึ่งเป็นคุณสมบัติของการเป็นวัสดุที่ใช้ทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ที่ลักษณะโครงสร้างของพื้นผิวด้านใน (P2-C) มีลักษณะพื้นที่ผิวที่ราบเรียบและมีการรวมตัวกันของเส้นใยเป็นจำนวนมากซึ่งเส้นใยที่พบส่วนมากจะเส้นใยอีลาสตินและเส้นใยคอลลาเจน แต่ในลักษณะโครงสร้างของพื้นที่ผิวด้านข้าง (P3-C) จากรูปพบว่าโครงสร้างพื้นที่ด้านข้างของหลอดลมนั้นเห็นเป็นเส้นใยคอลลาเจนและเส้นใยอีลาสตินที่มีการเชื่อมกันของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและเห็นลักษณะเป็นเส้นใยได้ชันเจนว่าทุกกลุ่มตัวอย่างที่ผ่านมา

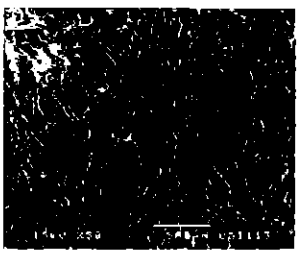
จากการถ่ายภาพด้วยกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ที่เมื่อพิจารณาของเซลล์หลอดลมที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ที่กำลังขยาย 200 เท่า ในส่วนของบริเวณพื้นผิวด้านในของหลอดลมนั้น (P2-B) พบว่ามีกลุ่มเซลล์ที่กระจายอยู่ตามบริเวณพื้นผิวของหลอดลมเป็นจำนวนมากซึ่งเซลล์ที่อยู่ภายในของหลอดลมซึ่งประเภทของเซลล์สามารถแบ่งได้ตามขนาดของเซลล์ จากรูปแล้วเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ที่ปรากฏในรูปนั้น คือ Goblet Cell และเซลล์ที่มีขนาดเล็กๆ ที่กระจายอยู่ทั่วหลอดลมนั้น คือ เซลล์ Lymphocyte และเซลล์ Epithelial Cell ซึ่งเซลล์เหล่านี้จะถูกพบโดยทั่วไปอยู่ในชั้น Mucosa ของพื้นผิวหลอดลมด้านใน ในส่วนของเซลล์ที่พื้นที่หน้าตัดของหลอดลม (P3-B) บริเวณแกนกลางของบริเวณของด้านข้างนั้นมีการพบเซลล์เป็นจำนวนมากอยู่ตามชั้นต่างๆ ของหลอดลม

จากการถ่ายภาพด้วยกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) เมื่อพิจารณาที่ปริมาณเซลล์ของหลอดลมที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ โดยวิธีการปั่นกวนโดยเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่กำลังขยาย 200 เท่า ในพื้นผิวด้านในของหลอดลมจะเห็นได้ว่าปริมาณเซลล์มีการลดลงอย่างมากจากหลอดลมที่ไม่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ ซึ่งที่ยังเหลืออยู่นั้นเป็นเซลล์ที่มีขนาดประมาณ 10 ไมครอน ซึ่งอาจเป็นเซลล์ Lymphocyte เป็นเซลล์ที่พบมากในเนื้อเยื่อที่อยู่ด้านในของหลอดลม ในส่วนของพื้นที่ผิวหน้าตัด (P3-C) จะพบเซลล์ขนาดเล็กเป็นจำนวนมากที่บริเวณที่กระดูกอ่อนทำให้ทราบได้ว่าเซลล์ที่อยู่ในบริเวณส่วนนั้นเป็นเซลล์กระดูกอ่อนและพบเซลล์เยื่อบุผิวที่บริเวณติดกับกระดูกอ่อน จากการถ่ายภาพด้วยกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) เมื่อพิจารณาปริมาณเซลล์ตัวอย่างของหลอดลมที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ โดยการปั่นกวนในเอนไซม์ที่มีความ

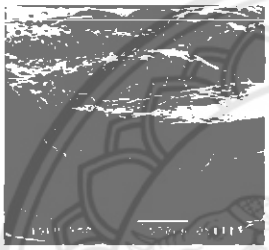
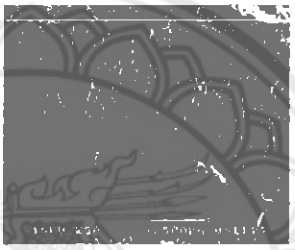
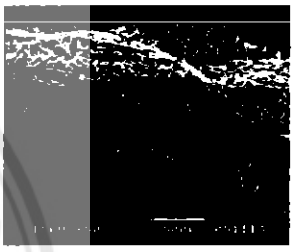
เข้มข้นที่ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ร่วมกับเทคนิคอัดคลายแรงดันแบบช่วงที่กำลังขยาย 200 เท่า ในส่วนของพื้นที่ผิวด้านในของหลอดลมพบว่าไม่ปรากฏเซลล์ใดๆ หลงเหลืออยู่เช่นเดียวกับที่บริเวณหน้าตัดแสดงเห็นว่าสามารถรักษาสภาพของโครงสร้างภายในหลอดลมได้เป็นอย่างดี แม้ว่าจะมีการเพิ่มเทคนิคในการอัดคลายแรงดันเข้าร่วมก็ยังสามารถรักษาสภาพของโครงสร้างไว้ได้และในส่วนของปริมาณเซลล์ในหลอดจะพบว่าเมื่อหลอดลมที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์แล้วปริมาณเซลล์มีการลดลงอย่างเห็นได้ชัดและไม่พบปริมาณเซลล์ใดๆ เลยในกลุ่มตัวอย่างที่มีการอัดคลายแรงดันเข้าร่วม

จากผลการวิเคราะห์ข้างต้นพบว่าหลอดลมที่ผ่านกระบวนการการกำจัดเซลล์แล้วจะมีการรักษาสภาพของโครงสร้างไว้เป็นอย่างดี เมื่อเทียบกับหลอดลมที่ยังไม่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ว่ามีโครงสร้างที่ไม่เปลี่ยนแปลงและพบว่าโครงสร้างของหลอดลมที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์นั้นมีความเป็นรูพรุนมากขึ้น ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีของวัสดุทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เนื่องจากคุณสมบัติของเอนไซม์ทริปซินนั้นมีความสามารถในการทำลายโปรตีนที่เป็นเนื้อเยื่อพังพืดหรือเนื้อเยื่อที่ปกคลุมเท่านั้น แต่ที่ไม่สามารถทำลายเส้นใยคอลลาเจนที่เป็นโครงหลักได้เพราะความเข้มข้นที่ใช้นั้นมีความเข้มข้นที่ไม่สูงพอในการทำลายเส้นใยคอลลาเจนได้ นอกจากนี้ยังสามารถกำจัดเซลล์ที่อยู่ภายในหลอดลมได้ดีทั้งยังสามารถรักษาสภาพของโครงสร้างทางกายภาพได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้หลอดลมที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์แล้วจะเห็นได้ชัดว่าปริมาณเซลล์ในหลอดลมมีปริมาณที่ลดลงอย่างเห็นได้ชัดและพบว่าปริมาณเซลล์หายไปจนแทบไม่สามารถมองเห็นได้ที่กระบวนการกำจัดเซลล์โดยการปั่นกวนในเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นที่ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ร่วมกับเทคนิคอัดคลายแรงดันแบบช่วงที่ 12 รอบต่อชั่วโมง

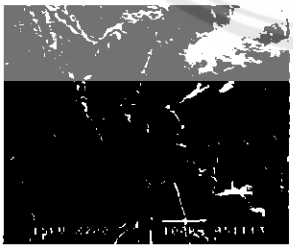
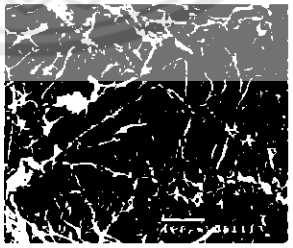
ตารางที่ 4.1 แสดงภาพที่ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 50 เท่า

กำลังขยาย 50	หลอดลมที่ไม่ผ่านการกำจัดเซลล์ (A)	หลอดลมที่ผ่านการกำจัดเซลล์โดยการปั่นกวน (B)	หลอดลมที่ผ่านการกำจัดเซลล์โดยการปั่นกวนร่วมกับอัดคลายแรงดัน (C)
E1			

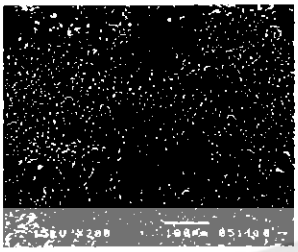
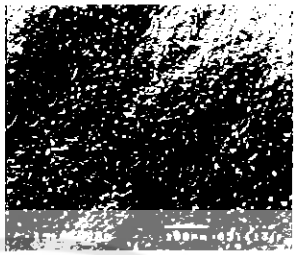
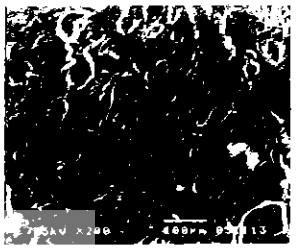
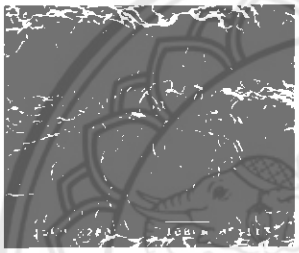
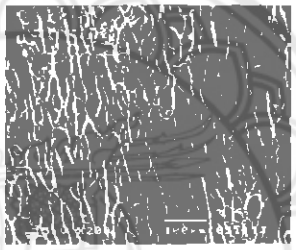
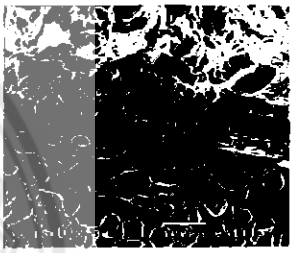
ตารางที่ 4.1 (ต่อ) แสดงภาพที่ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 50 เท่า

กำลังขยาย 50	หลอดลมที่ไม่ผ่านการกำจัดเซลล์ (A)	หลอดลมที่ผ่านการกำจัดเซลล์โดยการปั่นกวน (B)	หลอดลมที่ผ่านการกำจัดเซลล์โดยการปั่นกวนร่วมกับอัดคลายแรงดัน (C)
E2			
E3			

ตารางที่ 4.2 แสดงภาพที่ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 200 เท่า

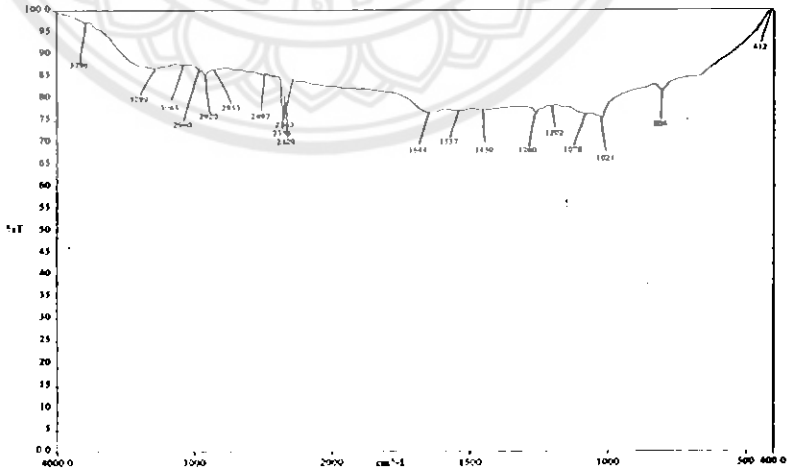
กำลังขยาย 200	หลอดลมที่ไม่ผ่านการกำจัดเซลล์ (A)	หลอดลมที่ผ่านการกำจัดเซลล์โดยการปั่นกวน (B)	หลอดลมที่ผ่านการกำจัดเซลล์โดยการปั่นกวนร่วมกับอัดคลายแรงดัน (C)
P1			

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) แสดงภาพที่ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 200 เท่า

กำลังขยาย 200	หลอดลมที่ไม่ผ่านการกำจัดเซลล์ (A)	หลอดลมที่ผ่านการกำจัดเซลล์โดยการปั่นกวน (B)	หลอดลมที่ผ่านการกำจัดเซลล์โดยการปั่นกวนร่วมกับอัดคลายแรงดัน (C)
P2			
P3			

4.2 การวิเคราะห์สมบัติทางด้านเคมีของคอลลาเจน

4.2.1 ลักษณะของ FTIR สเปกตรัมของคอลลาเจนมาตรฐาน



รูปที่ 4.1 FTIR สเปกตรัมของคอลลาเจนมาตรฐาน

ที่มา: Detergent-Decellularized Equine Tendon Extracellular Matrix For Tissue Engineering Applications

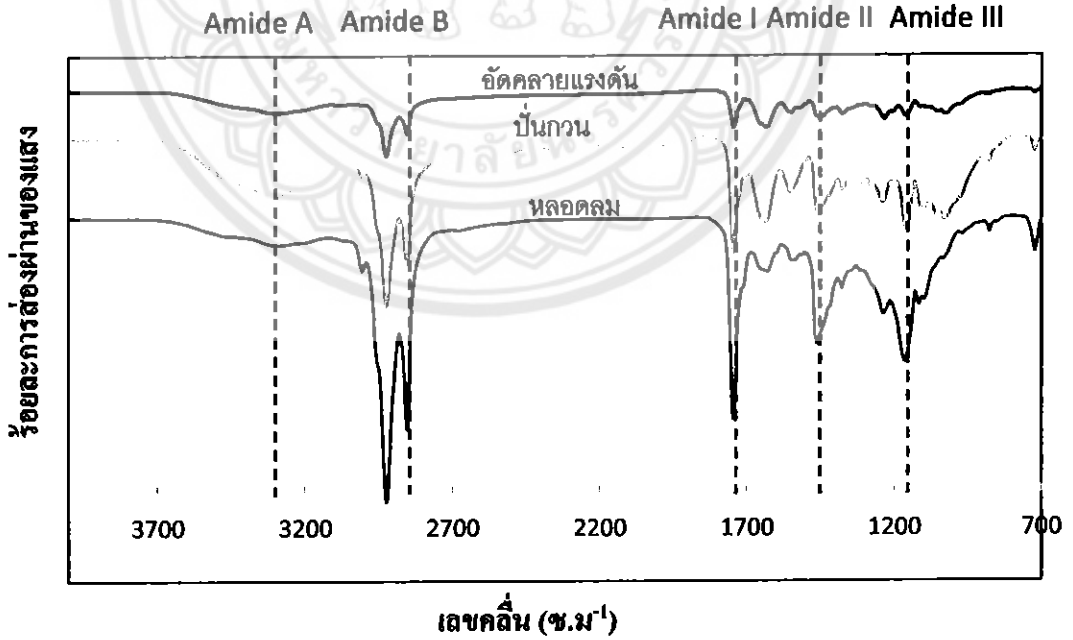
จากรูปที่ 4.1 แสดงถึง FTIR สเปกตรัมของคอลลาเจนมาตรฐาน โดยทั่วไปแล้วคอลลาเจน Type I ที่สกัดได้จากหนังหมูจะแสดงลักษณะของการดูดกลืนคลื่นแสงที่ตำแหน่ง 3298 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide A ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ NH Stretch คู่กับ Hydrogen Bond ที่ตำแหน่ง 2920 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide B ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ CH_2 Asymmetrical Stretch ที่ตำแหน่ง 1644 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide I ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ C=O Stretch ที่ตำแหน่ง 1450 ซม$^{-1}$ แสดงถึง Amide II ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ CH_2 Bend และที่ตำแหน่ง 1078 ซม$^{-1}$ จะแสดงถึง Amide III ซึ่งจะเป็นหมู่ฟังก์ชันของ C-O Stretch ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 องค์ประกอบของ FTIR สเปกตรัมของคอลลาเจนมาตรฐาน

ซม$^{-1}$	หมู่ฟังค์ชัน	รายละเอียด
3000-2800	C–H stretching	หมู่ CH_3 CH_2 และ CH ของอัลเคน
1650-1600 (w)	C=C Stretching	อัลคีน
1465-1450	C–H Bending	หมู่ CH_2
1300-1150	CH_2–X	สารประกอบเฮโลเจน

ที่มา: บทที่ 10 อินฟราเรดสเปคโตรสโคป (Infrared Spectroscopy) มหาวิทยาลัยรามคำแหง

4.2.2 ลักษณะของ FTIR สเปกตรัมของหลอดลมสุกรที่ได้



รูปที่ 4.2 FTIR สเปกตรัมของหลอดลม (S1) หลอดลมที่ไม่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ (S2) หลอดลมที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์โดยการปั่นกวน (S3) หลอดลมที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์โดยการปั่นกวนร่วมกับการอัดคลายแรงดัน

จากรูปที่ 4.2 จะแสดงถึง FTIR สเปกตรัมของหลอดลมที่ไม่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์และหลอดลมที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ โดยการปั่นกวนหรือการปั่นกวนร่วมกับการอัดคลายแรงดัน จากการวิเคราะห์พบว่าคอลลาเจนของหลอดลมที่ไม่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ แสดงการดูดกลืนคลื่นแสงที่ตำแหน่ง 3318 ซม$^{-1}$ จะแสดงถึงหมู่ของ Amide A ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของเอมีน แสดงการดูดกลืนคลื่นแสงที่ตำแหน่ง 2854 ซม$^{-1}$ แสดงถึงหมู่ของ Amide B ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของแอลดีไฮด์ ที่ตำแหน่ง 1631 ซม$^{-1}$ แสดงถึงหมู่ของ Amide I ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของอัลคีน ที่ตำแหน่ง 1452 ซม$^{-1}$ จะแสดงถึงหมู่ของ Amide II ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของหมู่ CH_2 และที่ตำแหน่ง 1164 ซม$^{-1}$ แสดงถึงหมู่ของ Amide III ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของสารประกอบเฮโลเจน

คอลลาเจนของหลอดลมที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ โดยการปั่นกวน แสดงการดูดกลืนคลื่นแสงที่ตำแหน่ง 3295 ซม$^{-1}$ แสดงถึงหมู่ของ Amide A ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของเอมีน แสดงการดูดกลืนคลื่นแสงที่ตำแหน่ง 2854 ซม$^{-1}$ จะแสดงถึงหมู่ของ Amide B ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของแอลดีไฮด์ ที่ตำแหน่ง 1636 ซม$^{-1}$ แสดงถึงหมู่ของ Amide I ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของอัลคีน ที่ตำแหน่ง 1455 ซม$^{-1}$ แสดงถึงหมู่ของ Amide II ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของหมู่ CH_2 และที่ตำแหน่ง 1164 ซม$^{-1}$ แสดงถึงหมู่ของ Amide III ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของสารประกอบเฮโลเจน

คอลลาเจนของหลอดลมที่ผ่านการกระบวนการกำจัดเซลล์ โดยการปั่นกวนร่วมกับการอัดคลายแรงดัน แสดงการดูดกลืนคลื่นแสงที่ตำแหน่ง 3295 ซม$^{-1}$ จะแสดงถึงหมู่ของ Amide A ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของเอมีน แสดงการดูดกลืนคลื่นแสงที่ตำแหน่ง 2854 ซม$^{-1}$ จะแสดงถึงหมู่ของ Amide B ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของแอลดีไฮด์ ที่ตำแหน่ง 1636 ซม$^{-1}$ แสดงถึงหมู่ของ Amide I ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของอัลคีน ที่ตำแหน่ง 1452 ซม$^{-1}$ แสดงถึงหมู่ของ Amide II ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของหมู่ CH_2 และที่ตำแหน่ง 1160 ซม$^{-1}$ แสดงถึงหมู่ของ Amide III ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของสารประกอบเฮโลเจน

จากการวิเคราะห์พบว่าลักษณะการดูดกลืนแสงของคอลลาเจนที่พบภายในเนื้อเยื่อหลอดลมสุกรทั้ง 3 ตัวอย่างแสดงตำแหน่งที่สอดคล้องกับลักษณะการดูดกลืนแสงของคอลลาเจนมาตรฐานซึ่งชี้ให้เห็นว่ากระบวนการกำจัดเซลล์หลอดลมสุกรด้วยการปั่นกวนในเอนไซม์ร่วมกับการอัดคลายแรงดันไม่ชักนำให้เกิดการเสื่อมสภาพของคอลลาเจนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในหลอดลมของสุกร

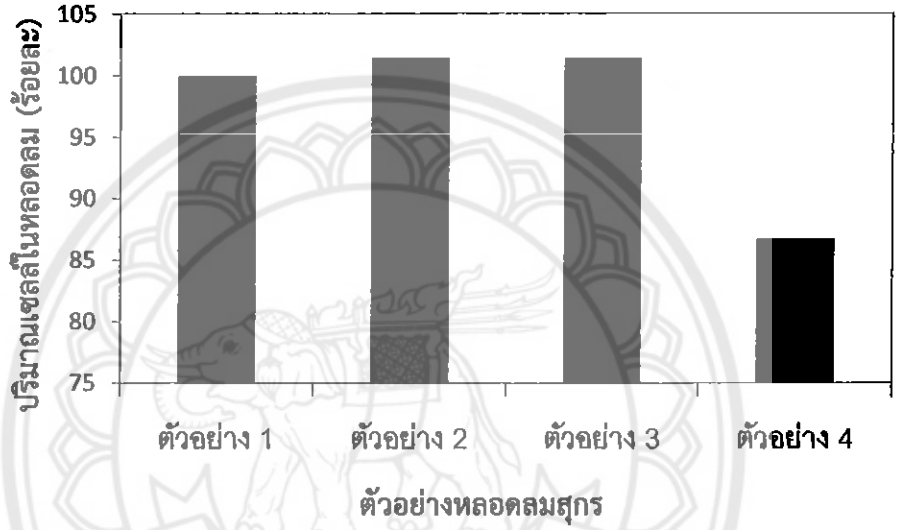
4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณการกำจัดเซลล์ของหลอดลมสุกรด้วยเทคนิค DNA

ตารางที่ 4.4 แสดงตัวอย่างในการทดลอง

ตัวอย่างที่ 1	หลอดลมที่ไม่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์
ตัวอย่างที่ 2	หลอดลมที่ผ่านกระบวนการปั่นกวนในเอนไซม์ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เปลี่ยนสารทุก 6 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) แสดงตัวอย่างในการทดลอง

ตัวอย่างที่ 3	หลอดลมที่ผ่านกระบวนการปั่นกวนในเอนไซม์ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ร่วมกับการอัดคลายแรงดันแบบช่วงที่จำนวนรอบ 6 รอบต่อชั่วโมง เปลี่ยนสารทุก 6 ชั่วโมง
ตัวอย่างที่ 4	หลอดลมที่ผ่านกระบวนการปั่นกวนในเอนไซม์ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ร่วมกับการอัดคลายแรงดันแบบช่วงที่จำนวนรอบ 12 รอบต่อชั่วโมง เปลี่ยนสารทุก 6 ชั่วโมง



รูปที่ 4.3 แสดงแผนภูมิร้อยละของเซลล์ที่พบในหลอดลมสุกรของแต่ละสภาวะ

จากผลการวิเคราะห์ของ DNA เพื่อหาปริมาณเซลล์ที่อยู่ภายในหลอดลมสุกรพบว่าที่หลอดลมสุกรที่ไม่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ (ตัวอย่างที่ 1) มีจำนวนเซลล์ 1,200,975 เซลล์ ซึ่งหลอดลมที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ด้วยการปั่นกวนในเอนไซม์ทริปซินร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ตัวอย่างที่ 2) มีจำนวนเซลล์ 1,203,551 เซลล์ ซึ่งมีปริมาณเซลล์ใกล้เคียงกับเซลล์ของหลอดลมที่ไม่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ ส่วนหลอดลมสุกรที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ด้วยการปั่นกวนในเอนไซม์ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ร่วมด้วยกับการอัดคลายแรงดันแบบช่วงที่จำนวนรอบ 6 รอบต่อชั่วโมง (ตัวอย่างที่ 3) มีจำนวนเซลล์ 1,241,858 เซลล์ ซึ่งมีปริมาณเซลล์ใกล้เคียงกับเซลล์ของหลอดลมที่ไม่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์และหลอดลมสุกรที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ด้วยการปั่นกวนในเอนไซม์ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ร่วมด้วยกับการอัดคลายแรงดันแบบช่วงที่จำนวนรอบ 12 รอบต่อชั่วโมง (ตัวอย่างที่ 4) มีจำนวนเซลล์อยู่ 1,087,898 เซลล์ ซึ่งในตัวอย่างนี้มีเซลล์ลดลงจากหลอดลมสุกรที่ไม่ผ่านกระบวนกำจัดเซลล์ร้อยละ 14 จากผลการวิเคราะห์ปริมานเซลล์ทำให้ทราบว่าที่กระบวนการกำจัดเซลล์ด้วยการปั่นกวนในเอนไซม์ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ไม่สามารถกำจัด

เซลล์ที่อยู่ภายในหลอดลมได้ เนื่องจากเซลล์นั้นสามารถสัมผัสกับเอนไซม์ได้น้อยจึงเป็นผลให้ในการกำจัดเซลล์ในหลอดลมนั้นไม่มีผลของเซลล์ที่ลดลง แต่จากผลการวิเคราะห์ปริมานเซลล์ของกระบวนการกำจัดเซลล์ด้วยการปั่นกวนในเอนไซม์ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ร่วมด้วยกับการอัดคลายแรงดันแบบช่วงที่จำนวนรอบ 12 รอบต่อชั่วโมง (ตัวอย่างที่ 4) พบเซลล์มีปริมาณลดลงจากหลอดลมที่ไม่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลล์ร้อยละ 14 เนื่องจากการประยุกต์เทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วงเข้าร่วมสามารถช่วยทำให้เอนไซม์นั้นสามารถแทรกซึมโครงสร้างของหลอดลมมากขึ้นและเพิ่มประสิทธิภาพให้เอนไซม์นั้นสามารถสัมผัสกับเซลล์ได้มากขึ้นและด้วยคุณสมบัติของเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยโปรตีนซึ่งเซลล์ที่อยู่ภายในหลอดลมนั้นส่วนใหญ่เป็นโปรตีน โดยเอนไซม์จะทำหน้าที่ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ที่เป็นโปรตีนนั้นแตกสลายทำให้เซลล์ตายและเอนไซม์จะทำการย่อยสลายเซลล์ที่ตายแล้วออกจากหลอดลมจึงทำให้ปริมาณของเซลล์นั้นมีการลดลง แต่จะสังเกตเห็นได้ว่าปริมาณของเซลล์มีการลดลงเพียงเล็กน้อย เนื่องจากองค์ประกอบส่วนใหญ่ของหลอดลมเป็นกระดูกอ่อน ซึ่งในส่วนนี้มีความหนาแน่นมากจึงเป็นไปได้ยากในการกำจัดเซลล์จากกระดูกอ่อนแม้จะมีการอัดคลายแรงอัดแบบช่วงเข้าร่วมด้วย

บทที่ 5

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 บทสรุป

กระบวนการกำจัดเซลล์ด้วยเอนไซม์มีการแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่มตัวอย่าง คือ กลุ่มตัวอย่างที่ 1 การกำจัดเซลล์โดยการปั่นกวนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กลุ่มตัวอย่างที่ 2 การกำจัดเซลล์โดยการปั่นกวนร่วมกับการอัดคลายแรงดันที่แรงดัน 4 บาร์ อัดคลายแรงดันทุกๆ 6 รอบต่อชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กลุ่มตัวอย่างที่ 3 การกำจัดเซลล์โดยการปั่นกวนร่วมกับการอัดคลายแรงดันที่แรงดัน 4 บาร์ อัดคลายแรงดันทุกๆ 12 รอบต่อชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าการประยุกต์ใช้การอัดคลายแรงดันแบบช่วงส่งผลให้ปริมาณในการกำจัดเซลล์เพิ่มสูงขึ้นและไม่มีการสูญเสียของโครงสร้าง เมื่อดูจากผลการวิเคราะห์ลักษณะสัณฐานของหลอดลมสุกรด้วยเทคนิคการส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM) ซึ่งจะพบว่าเมื่อนำผลจากกลุ่มตัวอย่างที่ 1 มาเปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอย่างที่ 2 จะเห็นได้ว่าปริมาณเซลล์ที่อยู่ภายในหลอดลมมีการลดลงอย่างชัดเจนและไม่มีการสูญเสียของโครงสร้างของหลอดลม นอกจากนี้การเพิ่มจำนวนรอบในการอัดคลายแรงดันแบบช่วงยังส่งผลที่น่าพึงพอใจเมื่อเปรียบเทียบกลุ่มตัวอย่างที่ 2 กับกลุ่มตัวอย่างที่ 3 จะเห็นได้ว่าที่จำนวนรอบในการอัดคลายแรงดันแบบช่วงที่ 12 รอบต่อชั่วโมงนั้นมีปริมาณเซลล์ที่ถูกกำจัดมากกกว่ากลุ่มตัวอย่างที่ 2 และไม่มีการสูญเสียของโครงสร้างของหลอดลม

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ในกระบวนการกำจัดเซลล์โดยใช้เทคนิคการอัดคลายแรงดันแบบช่วงเข้าร่วมควรมีการเพิ่มแรงดันในการอัดคลายแรงดัน เช่น การอัดคลายแรงดันที่ 6 และ 8 บาร์ ซึ่งอาจจะส่งผลให้ได้ปริมาณในการกำจัดเซลล์ที่เพิ่มสูงขึ้น

5.2.2 ในกระบวนการการวิเคราะห์หาปริมาณการกำจัดเซลล์ของหลอดลมสุกรด้วยเทคนิค DNA ควรมีการตรวจวัดใหม่เนื่องจากผลที่ได้มีความคลาดเคลื่อนสูง

เอกสารอ้างอิง

[1] สมศักดิ์ บุญสนอง. (3 เมษายน 2550). **หลอดลม.** สืบค้นเมื่อ 5 พฤษภาคม 2556, จาก http://www.thaigoodview.com/library/sema/sukhothai/somsak_b/organ/organ-4p1-4.html.

[2] วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. (17 กุมภาพันธ์ 2553). **หลอดลม.** สืบค้นเมื่อ 5 พฤษภาคม 2556, จาก http://th.wikipedia.org/wiki/%E0%B8%AB%E0%B8%A5%E0%B8%AD%E0%-B8%94%E0%B8%A5%E0%B8%A1.

[3] ผศ.นพ.ปารยะ อาศนะเสน. (8 มกราคม 2554). **โรคหลอดลมอักเสบเกิดจากสาเหตุใด.** สืบค้นเมื่อ 18 พฤศจิกายน 2556, จาก http://www.manager.co.th/dhamma/viewnews.aspx?NewsID=95500-00108815.

[4] ดร.สมชาย แสงอำนาจเดช. (19 สิงหาคม 2549). **โรคหอบหืด (Asthma).** สืบค้นเมื่อ 18 พฤศจิกายน 2556, จาก http://www.msdbangkok.go.th/healthconnerasthma.htm.

[5] ขนิษฐา มินวงษ์. (18 มีนาคม 2555). **คู่มือสุขภาพคนไทยในภาวะวิกฤตเศรษฐกิจ.** สืบค้นเมื่อ 18 พฤศจิกายน 2556, จาก http://www.hss.kmutt.ac.th/news.php?-tasnews&id=23.

[6] รศ.นพ.ประดิษฐ์ ปัญจวีเนิน. (29 กันยายน 2555). **ศูนย์เด็ก SiPH มาตรฐานการรักษาระดับสากล.** สืบค้นเมื่อ 18 พฤศจิกายน 2556, จาก http://www.msdbangkok.go.th/healthconner_asthma.htm.

[7] รศ.ดร.ศักดา ดาดวง. (5 พฤษภาคม 2550). **เอนไซม์.** สืบค้นเมื่อ 21 สิงหาคม 2556, จาก http://www.champa.kku.ac.th/biochem/sakda%20webpage/PDF_source/.

8] นพ.ธัชชัย ศรีเสน. (2 กุมภาพันธ์ 2556). **Anatomical Review of Human Trachea.** สืบค้นเมื่อ 5 พฤษภาคม 2556, จาก http://www.forensicchula.net/FMJ/journal/topic/13-03.pdf.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

[9] A. Robert, Jr. Freitas. (1999). Cytometrics: Nanomedicine. **South Church Street Bioscience**, Vol. 1, pp. 247.

[10] วีระศักดิ์ วงศ์ศรีแก้ว. (2526). **สรีรวิทยาของสัตว์เลี้ยง**. กรุงเทพมหานคร: คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

[11] Australian Government. (2003). Animal-to-human transplantation research: A guide for the community. **Commonwealth of Australia.** Biomaterials, Vol. 4, pp. 1-43.

[12] P.M. Crapo, T.W. Gilbert And S.F. Badylak. (2011). An overview of tis sue and Whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, Vol. 32, pp. 3233-3243.

[13] ปัณณธร ภัทรสถาพรกุล. (2547). **เทคโนโลยีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง**. กรุงเทพมหานคร: ทรินิตี้.

[14] A. Bader, T. Schilling, O.E. Teebken, G. Brandes, T. Herden, G. Steinhoff And A. Haverich. (1998) Tissue engineering of heart valves – human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves. **Eur J of Cardio-thoracic Surg**, Vol. 14, pp. 279–284.

[15] R.N. Chen, H.O. Ho, Y.T. Tsai And M.T. Sheu. (2004). Process development of an acellular dermal matrix(ADM) for biomedical applications. **Biomaterials,** Vol. 25, pp. 2679–2686.

[16] C.E. Schmidt And J.M. Baie. (2000). Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue Repair and tissue engineering. **Biomaterials,** Vol. 21, pp. 2215-2231.

[17] E. Rieder, M.T. Kasimir, G. Silberhumer, G. Seebacher, E. Wolner, P. Simon And G. Weigel. (2004). Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. **Biomaterials**, Vol. 127, pp. 399-405.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

[18] B.P. Chan And K.W. Leong. (2008). Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. **Eur Spine J**, Vol. 17, pp. S467–S479.

[19] I. Prasertsung, S. Kanokpanont, T. Bunaprasert, V. Thanakit And S. Damrongsakkul. (2008). Development of Acellular Dermis From Porcine Skin Using Periodic Pressurized Technique. Wiley Periodicals, Inc. J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater, Vol. 85, pp. 210–219.

[20] N.T. Remlinger, C.A. Czajka, M.E. Juhas, D.A. Vorp, D.B. Stolz, S.F. Badylak, S. Gilbert And T.W. Gilbert. (2010). Hydrated xenogeneic decellularized tracheal matrix as a scaffold for tracheal reconstruction. **Biomaterials**, Vol. 31, pp. 3520–3526.

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

[22] Y. Zou And Y. Zhang. (2012). Mechanical Evaluation of Decellularized Porcine Thoracic Aorta. **Journal of Surgical Research**, Vol. 175, pp. 359–368.

[23] M. Zang, Q. Zhang, E.I. Chang, A.B. Mathur And P. Yu. (2012). Decellularized Tracheal Matrix Scaffold for Tissue Engineering. Plast. Reconstr. **Surg**, Vol. 130, pp. 532.

[24] B. D. Elder, S. V. Eleswarapu And K. A. Athanasiou. (2009). Extraction techniques for the decellularization of tissue engineered articular cartilage constructs. **Biomaterials**, Vol. 30, pp. 3749–3756.

[25] D.W. Youngstrom, J.G. Barrett, R.R. Jose And D.L. Kaplan. (2010). Functional Characterization of Detergent-Decellularized Equine Tendon Extracellular Matrix for Tissue Engineering Applications. **Biomaterials**, Vol. 8, pp. 64151.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

[26] ร.ศ.แม้น อมรสิทธิ์. (2534). **หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ.** กรุงเทพมหานคร: ชวนพิมพ์.

[27] เล้าะ ดาวี. (2 มากราคม 2550). **FTIR เครื่องมือวิเคราะห์สารด้วยอินฟราเรด.** สืบค้นเมื่อ 14 พฤศจิกายน 2556, จาก http://encyclopedia.thefreedictionary.com/FTIR.

[28] **รศ. ปรีชา พหลเทพ. (17 มีนาคม 2552). บทที่ 10 อินฟราเรด สเปคโตรสโคป (Infrared Spectroscopy).** สืบค้นเมื่อ 14 พฤศจิกายน 2556, จาก http://e-book.ram.edu/e-book/c/CM328/CM328-10.pdf.

[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.