



พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตความยาวสายโซ่ระดับกลาง
สำหรับโครงสร้างเส้นเอ็นคอมโพสิต



วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมชีวการแพทย์
วิทยาลัยวิศวกรรมชีวการแพทย์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยรังสิต
ปีการศึกษา 2565



**MEDIUM CHAIN LENGTH POLYHYDROXYALKANOATE
FOR COMPOSITE TENDON SCAFFOLD**

BY

ANUCHAN PANAKSRI

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF ENGINEERING IN BIOMEDICAL
ENGINEERING
COLLEGE OF BIOMEDICAL ENGINEERING**

GRADUATE SCHOOL, RANGSIT UNIVERSITY

ACADEMIC YEAR 2022

วิทยานิพนธ์เรื่อง

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตความยาวสายโซ่ระดับกลาง
สำหรับโครงสร้างเส้นเอ็นคอมโพลิต

โดย

อนุชาญ พนักศรี

ได้รับการพิจารณาให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมชีวการแพทย์

มหาวิทยาลัยรังสิต

ปีการศึกษา 2565

รศ.ดร.นพ. ตุลยพฤษณ์ ถาวรสวัสดิ์รักษ์
ประธานกรรมการสอบ

รศ. นันทชัย ทองเป็น
กรรมการ

รศ.ดร. ณัฐพล ถนัดช่างแสง
กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา

ผศ.ดร.ศนิ บุญญกุล
กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(ผศ.ร.ต.หญิง ดร.วรรณี สุขสาตร)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

5 มิถุนายน 2566

Thesis entitled

**MEDIUM CHAIN LENGTH POLYHYDROXYALKANOATE
FOR COMPOSITE TENDON SCAFFOLD**

by

ANCHAN PANAKSRI

was submitted in partial fulfillment of the requirements
for the degree of Master of Engineering in Biomedical Engineering

Rangsit University
Academic Year 2022

Assoc.Prof.Tulyapruet Tawonsawatruk, Ph.D.
Examination Committee Chairperson

Assoc.Prof. Nuntachai Thongpance
Member

Assoc.Prof.Nuttapol Tanadchangaeng, D.Eng.
Member and Advisor

Asst.Prof.Sani Boonyagul, Ph.D.
Member and Co-Advisor

Approved by Graduate School

(Asst.Prof.Plt.Off. Vanee Sooksatra, D.Eng.)

Dean of Graduate School

June 5, 2023

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์นี้ จะไม่สามารถประสบความสำเร็จได้โดยหากไม่ได้รับการช่วยเหลือจาก รศ.ดร.ณัฐพล ถนัดช่างแสง และผศ.ดร.ศนิ บุญญกุล ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้ให้คำแนะนำ และจัดหาอุปกรณ์ต่างๆ ทำให้การทำวิทยานิพนธ์ลุล่วงไปด้วยดี ผู้จัดทำวิทยานิพนธ์ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.นพ.ศุภยพฤกษ์ ถาวรสวัสดิ์รักษ์ ที่ให้เกียรติมาเป็นประธานกรรมการสอบ และได้ให้คำแนะนำเกี่ยวกับข้อมูลทางการแพทย์ที่เกี่ยวข้องกับวิทยานิพนธ์นี้ และสนับสนุนอุปกรณ์ที่จำเป็นต่อการทำวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร.สุกัญญา เพ็งพานิชย์ ที่ช่วยให้คำแนะนำเกี่ยวกับเทคนิคในการทำการทดลองต่าง ๆ เพื่อไม่ให้เกิดความผิดพลาดและสำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร. พิษณุสิณี สุวรรณแพทย์ ที่ให้การช่วยเหลือและให้คำแนะนำเกี่ยวกับการใช้อุปกรณ์ที่จำเป็นต่อการทำวิจัยให้สำเร็จและช่วยเหลือแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นจนผ่านพ้นมาได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ผู้จัดทำขอขอบวิทยานิพนธ์นี้เพื่อเป็นความรู้และแนวทางในการใช้ประโยชน์การนำไปศึกษาต่อไปในอนาคตและขอขอบพระคุณผู้มีส่วนเกี่ยวข้องกับการช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์นี้สมบูรณ์

อนุชาญ พนักศรี

ผู้วิจัย

6305267 : อนุชาญ พนักศรี
 ชื่อวิทยานิพนธ์ : พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตความยาวสายโซ่ระดับกลาง
 สำหรับ โครงร่างเส้นเอ็นคอมโพสิต
 หลักสูตร : วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมชีวการแพทย์
 อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.ดร.ณัฐพล ถนัดช่างแสง
 อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร.ศนิ บุญญกุล

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาโครงร่างเส้นเอ็นคอมโพสิตจากพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตความยาวสายโซ่ระดับกลาง (MCL-PHA) เพื่อเป็นแนวทางในการรักษาเส้นเอ็นที่ฉีกขาดด้วยหลักการทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อแทนการรักษาแบบที่ผ่าตัดเส้นเอ็นบริเวณอื่นมาเชื่อมต่อกับเส้นเอ็นที่เสียหาย ซึ่งเสี่ยงต่อการติดเชื้อและมีปัญหาบาดเจ็บซ้ำซ้อน เริ่มจากการตรวจสอบความเข้ากันได้กับเซลล์ของ MCL-PHA ที่ผลิตขึ้นเพื่อนำมาพัฒนาเป็นโครงร่างเส้นเอ็น จากการทดสอบกับเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์พบว่า มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่ 100% โดยที่เซลล์สามารถยึดเกาะบนพื้นผิวของวัสดุได้ รวมทั้งวัสดุไม่มีผลต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ หลังจากนั้นนำ MCL-PHA ไปขึ้นรูปโครงร่างเส้นเอ็น 2 รูปแบบ คือรูปทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้าและทรงกระบอก โดยมีการทดสอบแรงดึงของโครงร่างเส้นเอ็นทั้งในรูปแบบโครงร่างทรงตันและโครงร่างที่ร้อยด้วยเส้นเอ็นมนุษย์ ซึ่งปรากฏว่าโครงร่างทรงกระบอกที่ร้อยด้วยเส้นเอ็นแบบ 3 รู มีค่าความเค้นสูงสุดประมาณ 56 MPa ซึ่งใกล้เคียงกับความต้านทานแรงดึงของเส้นเอ็นมีมนุษย์มากที่สุด โดยผลการทดสอบแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการยึดตัวที่ลดลงและค่ามอดุลัสที่เพิ่มขึ้นเมื่อวัสดุถูกร้อยกับเส้นเอ็น จากนั้นทำการทดสอบการยึดเกาะของเซลล์บนโครงร่างเส้นเอ็นที่แสดงให้เห็นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ย้อมติดสีบนพื้นผิวของวัสดุ โครงร่าง MCL-PHA ได้และเมื่อมีการสกัดคอลลาเจนจากเซลล์บนพื้นผิวของโครงร่าง MCL-PHA สามารถตรวจพบปริมาณคอลลาเจนชนิดที่ 1 เป็นสองเท่าของปริมาณคอลลาเจนที่สกัดจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในสถานะทั่วไป นอกจากนี้จากการผลิต MCL-PHA ในระดับนำร่องและการทำการแยกส่วน MCL-PHA พบว่าทำให้เกิดสัดส่วนองค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติทางกายภาพที่แตกต่างจาก MCL-PHA ดั้งเดิม ซึ่งก่อให้เกิดการพัฒนาคุณสมบัติเชิงกลสูงมากกว่าเดิมหลายเท่า

(วิทยานิพนธ์มีจำนวนทั้งสิ้น 75 หน้า)

คำสำคัญ: พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต, โครงร่างเส้นเอ็นคอมโพสิต, วิศวกรรมเนื้อเยื่อ

ลายมือชื่อนักศึกษา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

6305267 : Anuchan Panaksri
 Thesis Title : Medium Chain Length Polyhydroxyalkanoate for Composite Tendon Scaffold
 Program : Master of Engineering in Biomedical Engineering
 Thesis Advisor : Assoc. Prof. Nuttapol Tanadchangsang, D.Eng.
 Thesis Co-Advisor : Asst. Prof. Sani Boonyagul, Ph.D.

Abstract

This research aimed to develop a medium-chain-length polyhydroxyalkanoate (MCL-PHA) as a tool for tissue engineering for the treatment of ruptured tendon instead of the employment of the traditional surgical method which increased the risk of infection and complications of trauma. A compatibility test of MCL-PHA with mesenchymal stem cells (MSCs) was conducted. The result of the test revealed that the composite structure of tendons has a survival rate of 100% and the cells could attach to the surface of the material. In addition, the material did not affect the increase of cell volumes. The, MCL-PHA was used to form two tendon structures: square and cylindrical. Tensile testing was carried out for the solid structure and the human tendon structure. It was found that the cylindrical structure using three-hole tendons displayed the highest stress (about 56 MPa) closest to the tensile strength of human tendons. The result also showed that, when the material was tied with tendons, elongation reduced and the modulus increased. Cell adhesion testing was also conducted, and it was found that dyed fibroblast cells were stained well on the surface of MCL-PHA. Collagen extracted from the cells was type I of which amount was twice of that extracted from fibroblast cells in general conditions. The pilot production and separation of MCL-PHA revealed that, with its extremely high mechanical properties, its chemical compounds and physical properties were different.

(Total 75 pages)

Keywords: Polyhydroxyalkanoate, Composite structure of tendons, Tissue engineering

Student's Signature Thesis Advisor's Signature
 Thesis Co-Advisor's Signature

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ณ
บทที่ 1	
บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของ โครงการงาน	2
1.3 สมมติฐานการทำโครงการงาน	3
1.4 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.5 กรอบแนวคิดการวิจัย	4
1.6 นิยามศัพท์	4
บทที่ 2	
ทบทวนเอกสาร	6
2.1 พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต	6
2.1.1 ชนิดของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต	7
2.1.1.1 โฮโมพอลิเมอร์	8
2.1.1.2 โคพอลิเมอร์	8
2.1.2 ประเภทของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต	8
2.1.2.1 พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่ระดับสั้น	8
2.1.2.2 พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่ระดับกลาง	8
2.1.3 คุณสมบัติทางกายภาพและความยืดหยุ่นของ MCL-PHA	8
2.1.3.1 โครงสร้างทางเคมี	8
2.1.3.2 คุณสมบัติของ MCL-PHA เปรียบเทียบกับ SCL-PHA และปีโตรพลาสติกชนิดอื่น	9

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.2 การแยกองค์ประกอบของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต	11
2.3 วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue Engineering)	11
2.3.1 องค์ประกอบของวิศวกรรมเนื้อเยื่อ	12
2.3.1.1 เซลล์	12
2.3.1.2 โครงเลี้ยงเซลล์	12
2.3.1.3 โมเลกุลให้สัญญาณ หรือสารกระตุ้นชีวภาพ	13
2.4 ทฤษฎีทางการแพทย์ของเส้นเอ็น	13
2.4.1 สรีระของเส้นเอ็น	13
2.4.2 การฉีกขาดของเส้นเอ็น	14
2.5 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับการทดสอบคุณสมบัติเชิงกล	15
2.5.1 สภาพยืดหยุ่นของของแข็ง	15
2.5.2 ความเค้นและความเครียด	16
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	17
บทที่ 3 ระเบียบวิธีการวิจัย	19
3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	19
3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	19
3.1.2 สารเคมี	20
3.2 กระบวนการดำเนินงานวิจัย	21
3.2.1 การสังเคราะห์ MCL-PHA ในระดับห้องปฏิบัติการ	21
3.2.2 การสังเคราะห์ MCL-PHA ในระดับโรงงานต้นแบบ 300 L	22
3.2.3 การตรวจสอบคุณสมบัติเชิงกลของ MCL-PHA	25
3.2.4 การตรวจสอบคุณสมบัติเชิงความร้อน ความเสถียรทางความร้อน ความเป็นผลึกและสัดส่วนมอโนเมอร์ของ MCL-PHA	25
3.2.5 การทดสอบความเข้ากันได้กับเซลล์ของวัสดุ MCL-PHA	26
3.2.6 การขึ้นรูปโครงสร้างเส้นเอ็น MCL-PHA	29
3.2.7 การทดสอบแรงดึงของโครงสร้างเส้นเอ็น MCL-PHA ที่ขึ้นรูป	32

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.8 การทดสอบโครงร่างเส้นเอ็น MCL-PHA เพื่อดูความสามารถในการยึดเกาะบนโครงร่างของเส้นเอ็นที่ทำการขึ้นรูปและการสร้างคอลลาเจนของเซลล์	34
3.2.9 การแยกส่วน MCL-PHA	36
บทที่ 4 ผลการวิจัย	37
4.1 ผลการผลิต MCL-PHA	37
4.1.1 ผลการติดตามการสังเคราะห์ MCL-PHA	37
4.1.2 ผลผลิต MCL-PHA ที่ได้จากการสกัด	38
4.2 ผลการตรวจสอบคุณสมบัติทั่วไปของ MCL-PHA ที่ได้จากการสังเคราะห์	39
4.2.1 การตรวจสอบคุณสมบัติเชิงความร้อนของ MCL-PHA ที่ได้จากการสังเคราะห์	39
4.2.2 ผลการตรวจสอบความเสถียรทางความร้อนของ MCL-PHA	40
4.2.3 ผลการตรวจสอบความเป็นผลึกของ MCL-PHA	41
4.2.4 ผลการตรวจสอบชนิด และสัดส่วนของมอนอเมอร์ MCL-PHA	41
4.3 ผลการทดสอบความเข้ากันได้กับเซลล์ของ MCL-PHA	44
4.3.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	44
4.3.2 ผลการทดสอบการยึดเกาะของเซลล์	46
4.3.3 ผลทดสอบการเพิ่มจำนวนของเซลล์	47
4.4 ผลการทดสอบแรงดึงของวัสดุที่ร้อยกับเส้นเอ็นมนุษย์	48
4.5 ผลการทดสอบการยึดเกาะของเซลล์	49
4.6 ผลการวัดการสร้างคอลลาเจนของเซลล์บนโครงร่าง MCL-PHA	54
4.7 การแยกส่วน MCL-PHA	56
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการจัดทำโครงการ	59

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5.1 สรุปและอภิปรายผลงานวิจัย	59
5.2 ข้อเสนอแนะ	62
บรรณานุกรม	63
ภาคผนวก การทดสอบเพิ่มเติมเกี่ยวกับการแยกส่วน MCL-PHA	66
ประวัติผู้วิจัย	75



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 เปรียบเทียบคุณสมบัติทางกายภาพของ PHA แต่ละชนิดกับพอลิเมอร์ฐานชีวภาพ	10
2.2 ขนาดเส้นเอ็นมือของเพศชายและเพศหญิง	14
3.1 รูปที่ใช้ในการขึ้นรูปโครงสร้างเส้นเอ็น MCL-PHA สำหรับการทดสอบคุณสมบัติเชิงกล	30
4.1 ผลผลิตของ MCL-PHA ที่สังเคราะห์ได้จากถังหมัก 300 ลิตร เทียบกับ 5 ลิตร	39
4.2 ผลสรุปคุณสมบัติต่าง ๆ ของ MCL-PHA 300 ลิตรเปรียบเทียบกับ MCL-PHA 5 ลิตร	44
4.3 ผลการทดสอบคุณสมบัติเชิงกลของแต่ละสภาวะการทดสอบโครงสร้าง MCL-PHA	48
4.4 สัดส่วนของ MCL-PHA ที่ได้จากแยกส่วนที่ความเข้มข้นเมทานอลที่แตกต่างกัน	56
4.5 ผลคุณสมบัติเชิงกลจากการทดสอบแรงดึงของฟิล์ม MCL-PHA ที่แยกส่วนเทียบกับ MCL-PHA ดั้งเดิมที่สังเคราะห์ได้	57

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 แผนภาพกรอบแนวคิดการวิจัย	4
2.1 เซลล์และ PHA ภายในเซลล์	6
2.2 สูตรโครงสร้างทางเคมีของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต	7
2.3 ลักษณะการแยกองค์ประกอบของ PHA	11
2.4 การสร้างเนื้อเยื่อกระดูกทดแทน โดยอาศัยหลักการวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ซึ่งอาศัยองค์ประกอบ 3 ส่วน คือ เซลล์ โครงสร้างเซลล์และโมเลกุลให้สัญญาณ	12
2.5 สรีระเส้นเอ็นข้อมือ	14
2.6 Ligament and Tendon: Mechanical Properties	15
2.7 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแรงดึงและระยะยืดของวัสดุ	16
2.8 รูปแบบของความเค้น	17
3.1 ถังหมักชีวภาพขนาด 300 L และเครื่องปั่นเหวี่ยงทรงกระบอกแบบต่อเนื่อง	24
3.2 ตะกอนที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงของเชื้อที่หมักในถังหมัก	24
3.3 ตะกอน MCL-PHA ที่ได้จากการสกัด	24
3.4 ภาพจากกล้อง Inverted Microscope ของเซลล์ Human Mesenchymal Stem Cells	27
3.5 สารละลายสีม่วงจากการละลายผลึกจากการทำปฏิกิริยาของสาร MTT	27
3.6 รูปแบบโครงร่างเส้นเอ็นสำหรับการทดสอบเชิงกล	30
3.7 ลักษณะของแม่พิมพ์โครงร่างเส้นเอ็นแบบสี่เหลี่ยมผืนผ้า	31
3.8 ลักษณะแม่พิมพ์โครงร่างเส้นเอ็นแบบทรงกระบอก	31
3.9 ชิ้นงาน MCL-PHA ที่ได้จากแม่พิมพ์แบบสี่เหลี่ยมผืนผ้า	32
3.10 ชิ้นงาน MCL-PHA ที่ได้จากแม่พิมพ์ทรงกระบอก	32
3.11 เส้นเอ็นมนุษย์ส่วนที่ถูกตัดออกจากการผ่าตัด (waste sample)	33
3.12 ลักษณะโครงร่างเส้นเอ็นแบบแบนที่ร้อยเข้ากับเส้นเอ็น	33

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
3.13 ลักษณะโครงสร้างเส้นเอ็นแบบทรงกระบอกที่ร้อยเข้ากับเส้นเอ็น (ก) แบบ 2 รู (ข) แบบ 3 รู	34
4.1 ผลการติดตามช่วงเวลาในการสังเคราะห์ MCL-PHA ในถังหมักขนาด 300 ลิตร	37
4.2 ผลคุณสมบัติเชิงความร้อนของ MCL-PHA ที่วัดจากเครื่อง DSC	39
4.3 ผลความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นและน้ำหนัก MCL-PHA	40
4.4 ผลการสแกน XRD ของ MCL-PHA	41
4.5 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ MCL-PHA (Polyhydroxyhexanoate-co- Hydroxyoctanoate-co-Hydroxydecanoate; P(3HHx-co-3HO-co-3HD))	42
4.6 NMR สเปกตรานชนิด ¹ H ของ (P(3HHx-co-3HO-co-3HD)) *(3HHx, 3-Hydroxyhexanoate; 3HO, 3-Hydroxyoctanoate; 3HD, 3- Hydroxydecanoate)	42
4.7 NMR สเปกตรานชนิด ¹³ C ของ (P(3HHx-co-3HO-co-3HD))	43
4.8 NMR สเปกตรานชนิด ¹³ C ของ (P(3HHx-co-3HO-co-3HD)) ที่ตำแหน่ง กลุ่มเทอร์มินอลคาร์บอน (CH ₃) ของ 3HD, 3HO และ 3HHx	43
4.9 ลักษณะของเซลล์ MSCs ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่แช่ MCL-PHA ที่ ความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม	45
4.10 ค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ MSCs ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่แช่ MCL-PHAs ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม	45
4.11 ลักษณะของเซลล์ MSCs บนฟิล์ม MCL-PHA ผ่านกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10 เท่า (ก) ภาพก่อนย้อมคริสตัลไวโอเลต (ข) ภาพหลังย้อม คริสตัลไวโอเลต	46
4.12 ลักษณะของเซลล์ที่ได้รับการเลี้ยงโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสม ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่แช่วัสดุพอลิเมอร์ MCL-PHA ที่ความเข้มข้นและ เวลาต่าง ๆ	47

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.13 ผลการนับจำนวนเซลล์ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ	47
4.14 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเค้นและเปอร์เซ็นต์การยึดตัวของโครงร่างเส้นเอ็นทุกสภาวะการทดสอบ	49
4.15 เซลล์ไฟโบรบลาสต์วันที่ 1 ที่เลี้ยงร่วมกับวัสดุ (สีดำ)	50
4.16 เซลล์ไฟโบรบลาสต์วันที่ 7 ที่เลี้ยงร่วมกับวัสดุ	50
4.17 เซลล์ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับวัสดุย้อม DAPI ผ่าน Confocal Microscope	51
4.18 ผิววัสดุ MCL-PHA ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ย้อม DAPI ผ่าน Confocal Microscope	51
4.19 วัสดุ MCL-PHA ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับเซลล์ Confocal Microscope	51
4.20 รูป 3 มิติของวัสดุ MCL-PHA ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ย้อมด้วย DAPI ภายใต้อุปกรณ์ Inverted Confocal Laser Scanning Microscope	52
4.21 เซลล์ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับวัสดุย้อม TO-PRO3 ผ่าน Confocal Microscope	52
4.22 ผิววัสดุ MCL-PHA ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ย้อม TO-PRO3 ผ่าน Confocal Microscope	53
4.23 วัสดุ MCL-PHA ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับเซลล์ย้อมสี TO-PRO3 ผ่าน Confocal Microscope	44
4.24 รูป 3 มิติของวัสดุ MCL-PHA ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ย้อมด้วย TO-PRO3 ภายใต้อุปกรณ์ Inverted Confocal Laser Scanning Microscope	45
4.25 รูป 3 มิติของวัสดุ MCL-PHA ที่ไม่มีเซลล์ภายใต้อุปกรณ์ Inverted Confocal Laser Scanning Microscope	45
4.26 ปริมาณคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่สกัดจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์เปรียบเทียบกับระหว่างคอลลาเจนที่สกัดจากพื้นผิวของโครงร่าง MCL-PHA กับคอลลาเจนที่ได้จากเซลล์ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับ MCL-PHA	55
4.27 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเค้นและเปอร์เซ็นต์การยึดตัวของ MCL-PHA ที่ทำการแยกส่วน	57

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เส้นเอ็นประกอบด้วยชั้นเส้นใยคอลลาเจนที่จัดเรียงตัวกันเป็นสายเนื้อเยื่อแข็งที่เชื่อมกล้ามเนื้อเข้ากับกระดูก ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งของการส่งเสริมการเคลื่อนไหวของอวัยวะต่าง ๆ เส้นเอ็นบริเวณมือแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือเส้นเอ็นเอกซ์เทนเซอร์ (Extensor Tendon) เป็นเส้นเอ็นที่พาดจากปลายแขนไปจนถึงหลังมือจนถึงนิ้วมือทำให้สามารถขยับนิ้วเหยียดตรงได้ และเส้นเอ็นเฟล็กเซอร์ (Flexor Tendon) เป็นเส้นเอ็นที่พาดจากปลายแขนผ่านข้อมือไปจนถึงฝ่ามือทำให้สามารถงอนิ้วได้ เนื่องจากเป็นส่วนที่มีการเคลื่อนไหวเป็นประจำจึงมีโอกาสได้รับความเสียหายหรือฉีกขาดได้ง่าย ซึ่งมักเกิดจากอุบัติเหตุต่าง ๆ ทั้งการบาดเจ็บจากการเล่นกีฬา และโรคข้อต่อรูมาตอยด์ ซึ่งทำให้เส้นเอ็นเกิดการอักเสบ เป็นต้น ปัจจุบันเส้นเอ็นมือมีแนวทางการรักษาโดยการผ่าตัดซึ่งจากข้อมูลสถิติของการเข้ารับการผ่าตัดเฉพาะแผนกจักษุศาสตร์ทางมือในสหรัฐอเมริกาพบถึง 150,000 รายต่อปี โดยคิดเป็นการผ่าตัดแบบปลูกถ่ายเส้นเอ็นถึง 65 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ของการผ่าตัดเส้นเอ็นทั้งหมด (Rios-Diaz et al., 2016) ลักษณะของการผ่าตัดเส้นเอ็นโดยทั่วไปคือการเย็บปลายของเส้นเอ็นที่ฉีกขาดให้เชื่อมต่อกันอีกครั้ง ซึ่งใช้เวลา 2 ถึง 3 เดือนในการที่เส้นเอ็นจะกลับคืนสู่สภาพสมบูรณ์อีกครั้ง

อย่างไรก็ตามการรักษาเส้นเอ็นที่ได้รับความเสียหายอย่างหนักอาจมีข้อจำกัดในการผ่าตัดด้วยวิธีข้างต้น ซึ่งปัจจุบันใช้การผ่าตัดด้วยการปลูกถ่ายเส้นเอ็นกล้ามเนื้อที่ผ่าตัดจากบริเวณอื่นมาต่อแทนส่งผลให้เกิดปัญหาการบาดเจ็บซ้ำซ้อน (Repetitive Strain Injury; RSI) และอาจนำไปสู่ภาวะแทรกซ้อนต่าง ๆ เช่น การติดเชื้อ การฉีกขาดของเส้นเอ็นที่ต่อ หรือเส้นเอ็นติดกับเนื้อเยื่อข้างเคียงจนทำให้ต้องมีการผ่าตัดเพื่อแก้ไขข้อผิดพลาด (Momeni, Grauel, & Chang, 2010; O'Neil, Forsythe, & Stanish, 2001) ปัจจุบันมีการศึกษาในด้านเทคนิคทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อเพื่อเป็นแนวทางในการรักษาอีกรูปแบบหนึ่งด้วยการสร้างเนื้อเยื่อเส้นเอ็นขึ้นมาใหม่ทดแทนเส้นเอ็นที่เสียหาย เทคนิคการสร้างเนื้อเยื่อด้วยเทคนิคดังกล่าวโดยทั่วไปจะมีการสร้างโครงร่างสำหรับให้เพาะเลี้ยง

เซลล์เพื่อให้เซลล์ยึดเกาะและเจริญไปเป็นเนื้อเยื่อที่ต้องการ ซึ่งวัสดุที่นำมาสร้างเป็นโครงร่างสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์จะต้องมีคุณสมบัติเข้ากันได้กับเซลล์และควรมีคุณสมบัติย่อยสลายได้ทางชีวภาพภายในร่างกายเพื่อกำจัดวัสดุออกจากร่างกายเมื่อเนื้อเยื่อสมบูรณ์เต็มที่ ในการสร้างโครงร่างสำหรับเส้นเอ็น วัสดุที่ใช้จะมีคุณสมบัติที่ต้องพิจารณาเพิ่มเติมคือคุณสมบัติเชิงกลที่คล้ายคลึงกันกับเส้นเอ็น ซึ่งมีความสำคัญกับอวัยวะที่ต้องรองรับแรงที่เกิดขึ้นจากการทำกิจกรรมต่าง ๆ ด้วย

เส้นเอ็นมีคุณสมบัติเชิงกลแบบไม่เป็นเชิงเส้น หรือเป็นไฮเปอร์อีลาสติก (Hyperelastic) (Robi, Jakob, Matevz, Matjaz, & Medicine, 2013) ซึ่งเมื่อพิจารณาวัสดุที่มีลักษณะเชิงกลแบบเดียวกันจะต้องเป็นวัสดุที่มีลักษณะคล้ายยางหรืออีลาสโตเมอร์ (Elastomer) ปัจจุบันมีวัสดุที่ถูกนำมาใช้ศึกษาเป็นโครงร่างเส้นเอ็นน้อยมาก เนื่องจากเป็นไปได้ยากที่วัสดุชนิดหนึ่งจะมีคุณสมบัติเป็นไปตามที่ต้องการ ในงานวิจัยครั้งนี้มีการศึกษาวัสดุพอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติที่มีความเป็นไปได้ในการสร้างโครงร่างเส้นเอ็นคือ พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตความยาวสายโซ่ระดับกลาง (Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate; MCL-PHA) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ผลิตและสะสมได้ในจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Pseudomonas* โดย MCL-PHA จัดอยู่ในกลุ่มของพอลิเมอร์ที่มีความเป็นอีลาสโตเมอร์ ซึ่งมีคุณสมบัติเชิงกลแบบไม่เป็นเชิงเส้นแบบเดียวกับเส้นเอ็น และมีข้อมูลการศึกษาว่ามีความเข้ากันได้กับเซลล์และมีความสามารถในการย่อยสลายได้ในร่างกาย ในการศึกษานี้จะทำการผลิต MCL-PHA เพื่อสร้างโครงร่างเส้นเอ็นคอมโพสิตกับเส้นเอ็นมีส่วนที่เสียหายเพื่อซ่อมแซมเส้นเอ็นให้กลับมามีสภาพเดิม โดยขึ้นรูปโครงร่างเส้นเอ็นด้วยวิธีการหล่อ (Molding) ในรูปแบบของรูปทรงและลักษณะการเจาะรูที่แตกต่างกัน และพิจารณาคุณสมบัติเชิงกลของโครงร่างเส้นหลังจากคอมโพสิตด้วยเส้นเอ็นมนุษย์เพื่อให้เกิดสถานะที่ใกล้เคียงกับเส้นเอ็นมือในสภาพที่สมบูรณ์มากที่สุด นอกเหนือจากนั้นยังทำการทดสอบการยึดเกาะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และการสร้างคอลลาเจนบนพื้นผิวของโครงร่างเส้นเอ็นที่เลี้ยงร่วมกับไฟโบรบลาสต์เพื่อวิเคราะห์แนวโน้มในการนำไปใช้งานจริงในการรักษาต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1) สังเคราะห์และตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีของวัสดุพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตความยาวสายโซ่ระดับกลาง (MCL-PHA)

- 2) ขึ้นรูปโครงสร้างเส้นเอ็น MCL-PHA สำหรับร้อยกับเส้นเอ็นมนุษย์เพื่อศึกษาคุณสมบัติเชิงกลของรูปแบบ โครงสร้างเส้นเอ็นที่แตกต่างกันและพิสูจน์ว่าโครงสร้างเส้นเอ็น MCL-PHA สามารถช่วยเสริมแรงให้กับเส้นเอ็นที่ร้อยเพื่อให้ได้ความแข็งแรงใกล้เคียงกับเส้นเอ็นปกติมากที่สุด
- 3) เพื่อศึกษาการยึดเกาะและการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเส้นเอ็นมนุษย์บน โครงสร้างเส้นเอ็น MCL-PHA
- 4) แยกส่วน MCL-PHA เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติของ MCL-PHA ให้มีความหลากหลายมากขึ้นสำหรับเป็นตัวเลือกในการต่อยอด โครงสร้างเส้นเอ็นที่มีความแข็งแรงมากขึ้น

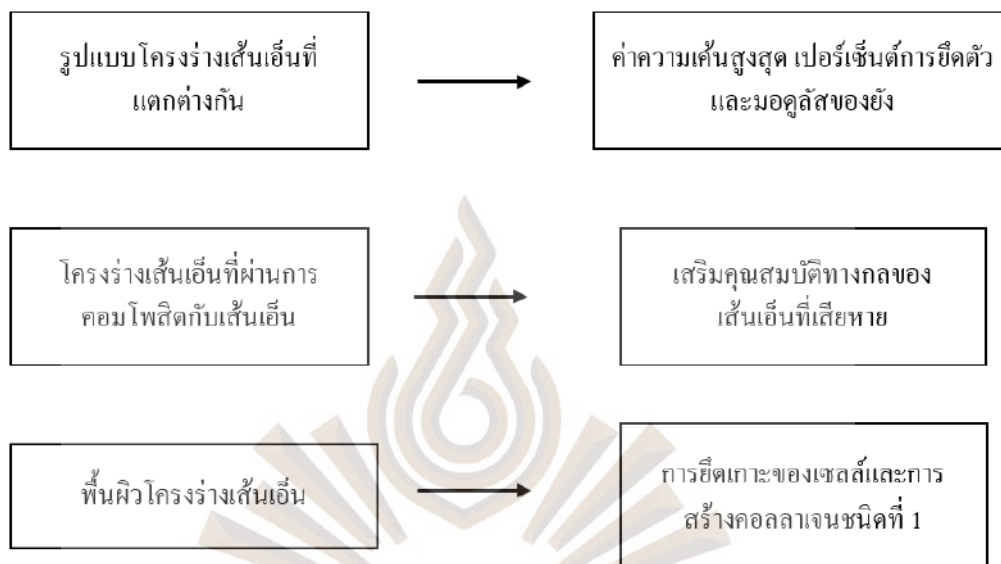
1.3 สมมติฐานของการวิจัย

- 1) รูปแบบโครงสร้างเส้นเอ็น MCL-PHA ที่แตกต่างกันให้คุณสมบัติเชิงกลที่ต่างกัน
- 2) โครงสร้างเส้นเอ็น MCL-PHA ช่วยเสริมแรงของเส้นเอ็นเมื่อทำการคอมโพสิตและมีลักษณะทางกลใกล้เคียงกับเส้นเอ็นมือปกติของมนุษย์และมีค่าความเค้นสูงสุดเข้าใกล้ 50 – 100 MPa
- 3) เซลล์ไฟโบรบลาสต์สามารถยึดเกาะบนพื้นผิวเส้นเอ็นและสามารถสร้างคอลลาเจนบนพื้นผิวของเส้นเอ็นได้
- 4) การแยกส่วน MCL-PHA ทำให้ได้ MCL-PHA ที่มีคุณสมบัติที่ต่างกัน

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1) MCL-PHA ที่ใช้ในการสร้างโครงสร้างเส้นเอ็นสังเคราะห์โดยใช้จุลชีพ *Pseudomonas Putida* ATCC 47054 ซึ่งใช้กรีเซอร์ออลเป็นแหล่งคาร์บอนโดยดำเนินการด้วยวิธีการหมักในถังหมักขนาด 300 L
- 2) การขึ้นรูปโครงสร้างเส้นเอ็นใช้วิธีการหล่อโดยใช้สารละลายคอลลอยด์โรพอร์มเป็นตัวทำละลาย MCL-PHA
- 3) มีการเจาะรูเพื่อร้อยเส้นเอ็นคอมโพสิตเข้ากับโครงสร้างเส้นเอ็น โดยขนาดและระยะของการเจาะรูอ้างอิงจากการสร้างแบบจำลองเพื่อวิเคราะห์รูปแบบที่ส่งผลกระทบต่อการศึกษาของโครงสร้างเส้นเอ็นน้อยที่สุด
- 4) เส้นเอ็นที่นำมาใช้คอมโพสิตเพื่อศึกษาคุณสมบัติเชิงกลคือ Plantaris Tendon ซึ่งเป็น Waste Sample จากการผ่าตัด

1.5 กรอบแนวคิดการวิจัย



รูปที่ 1.1 แผนภาพกรอบแนวคิดการวิจัย

1.6 นิยามศัพท์

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates: PHA) คือพอลิเอสเทอร์ชีวภาพ (Biopolyester) ที่มีการสังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์สิ่งมีชีวิตพบมากในจุลินทรีย์จำพวกแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียจะสังเคราะห์ PHA เพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารและพลังงานสำรองสะสมในรูปของเม็ดแกรนูล (Granule) อยู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย

การย่อยสลายทางชีวภาพ (Biodegradable) หรือการสลายตัวทางชีวภาพ คือสารเคมีที่สลายตัวของวัสดุจากเชื้อแบคทีเรียหรือทางชีวภาพอื่น ๆ โดยมีความสัมพันธ์กับระบบนิเวศ การจัดการขยะ ชีวการแพทย์ และสภาพแวดล้อมทางชีวภาพ ซึ่งเกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมที่สามารถย่อยสลายกลับไปเป็นธาตุตามธรรมชาติ สารอินทรีย์จะถูกย่อยสลายด้วยออกซิเจน หรือไม่ใช้ออกซิเจน

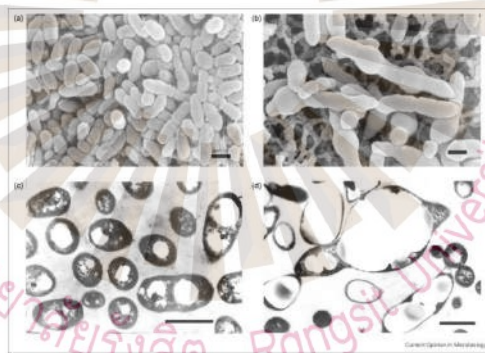
ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility) คือคุณสมบัติทางชีวภาพของการเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อร่างกาย หรือการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพนั้นเป็นส่วนสำคัญของกระบวนการอนุมัติกฎระเบียบสำหรับอุปกรณ์ทางการแพทย์เนื่องจากแม้แต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้รับการออกแบบที่ดีที่สุดก็สามารถสร้างภาวะแทรกซ้อนที่ไม่ตั้งใจได้ หากวัสดุที่ใช้ก่อให้เกิดปฏิกิริยาทางชีวภาพในผู้ป่วย วัสดุที่มีลักษณะเฉพาะที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาที่ไม่คาดคิดได้หากผ่านกระบวนการที่นำไปสู่การปนเปื้อน การย่อยสลายหรือการชะล้างสารพิษเข้าสู่ผู้ป่วย การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพนั้นมีหลายลักษณะดังต่อไปนี้ การทดสอบคุณสมบัติทางเคมี ได้แก่ ทดสอบสารสกัดและสารชะล้าง ทดสอบผลิตภัณฑ์ย่อยสลาย และเอทิลีนออกไซด์ที่ตกค้าง พิษวิทยา ได้แก่ การประเมินความเสี่ยงทางพิษวิทยา ทดสอบพิษวิทยาทางพันธุกรรม และทดสอบพิษวิทยาทางเลือก การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพในระดับหลอดทดลอง (In Vitro) ได้แก่ ทดสอบเป็นพิษต่อเซลล์ การยึดเกาะของเซลล์ การเพิ่มจำนวนของเซลล์ ความเข้ากันได้กับเลือด และความเป็นพิษต่อพัฒนาการและการสืบพันธุ์ การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพสัตว์ทดลอง (In Vivo) ได้แก่ ความเข้ากันได้กับเลือด ทดสอบพันธุกรรม ทดสอบความเป็นพิษกึ่งเรื้อรัง ทดสอบความเป็นพิษต่อระบบในร่างกาย การฝัง ทดสอบความเป็นพิษต่อพัฒนาการและการสืบพันธุ์ ทดสอบอาการแพ้ และการระคายเคือง

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

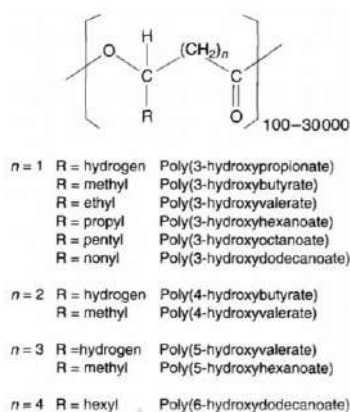
พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจัดเป็นพอลิเอสเทอร์ที่สะสมภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ได้หลายชนิดในรูปของเม็ดแกรนูล ลักษณะของ PHA ดังรูปที่ 2.1 นั้นจะประกอบด้วยโมโนเมอร์ของ 3-Hydroxy-Acid (HA) เช่น เป็น Poly(3-Hydroxybutyric Acid) หรือ PHB เมื่อ R เป็นหมู่ CH₃ พอลิเมอร์ที่เกิดขึ้นเพื่อเป็นพลังงานสำรองสำหรับแบคทีเรีย และยังพบอีกว่ามีสาร HAs มากกว่า 80 ชนิด เป็นสารประกอบของ PHA ซึ่งสารเทอร์โมออร์พลาสติกเหล่านี้จะมีคุณสมบัติเชิงกลต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับการรวมตัวของหน่วยย่อยของโมโนเมอร์ (Lee, 1996)



รูปที่ 2.1 เซลล์และ PHA ภายในเซลล์

ที่มา : Luengo, García, Sandoval, Carrasco, & Olivera, 2003

สารประกอบพอลิเอสเทอร์ในกลุ่มของ PHA เป็นสารประกอบพอลิเมอร์ที่มีจุลินทรีย์ผลิตขึ้น โดยมีโครงสร้างหลักเป็น 3-Hydroxyalkanoic แต่มีความแตกต่างกันของหมู่ฟังก์ชัน R ที่ C-3 ทำให้เป็น PHA ชนิดต่าง ๆ ถ้าหมู่ R มีหลายแบบเรียกว่าโคพอลิเมอร์ แต่หากมีแบบเดียวเรียกว่า โฮโมพอลิเมอร์ หมู่ R ที่มีจำนวน C ต่างกันจะมีคุณสมบัติต่างกัน โดย C ยิ่งมากจะทำให้มีความยืดหยุ่น ขึ้นรูปได้ดี โดยมีโครงสร้างทั่วไป ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 สูตร โครงสร้างทางเคมีของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ที่มา : Lee, 1996

2.1.1 ชนิดของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

แบ่ง PHA ตามลักษณะการเชื่อมต่อกันของโมโนเมอร์ ได้เป็น 2 แบบ คือ

2.1.1.1 โฮโมพอลิเมอร์ เป็นพอลิเมอร์ที่มีองค์ประกอบของโมโนเมอร์เพียงชนิดเดียวต่อรวมกัน โดยจะทำการยกตัวอย่างของการเชื่อมต่อกันของ β -Hydroxy Fatty Acid ชนิด β -Hydroxybutyrate และจะมีการเชื่อมต่อกับ โมโนเมอร์ของไฮดรอกซีบิวทีเรต โควาเลนต์มีคุณสมบัติคล้ายกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ คือ พอลิโพรพิลีน

2.1.1.2 โคพอลิเมอร์ เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบเป็นหน่วยย่อยของโมโนเมอร์หลายชนิดมาต่อรวมกัน ในกรณีของโคพอลิเมอร์ของสารพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตนอกจากโมโนเมอร์ที่เป็น β -Hydroxybutyrate แล้วมีการเชื่อมต่อกับ โมโนเมอร์ของไฮดรอกซีวารีเรตทำให้เกิดเป็นโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV)

2.1.2 ประเภทของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

โดยการจำแนกจะเทียบจากขนาดความยาวของจำนวนคาร์บอนกรดไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Lee et al., 2000) ซึ่ง PHA ถูกจำแนกออกเป็น 2 ประเภท ดังนี้

2.1.2.1 พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่ระดับสั้น ประกอบด้วยจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 3 ถึง 5 อะตอม เช่น P(3HB) หรือ PHB โดย PHB เป็นสารในกลุ่ม PHA ชนิดแรกที่ถูกนำมาศึกษากันอย่างกว้างขวาง

2.1.2.2 พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่ระดับกลาง ประกอบด้วยจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 6 ถึง 16 อะตอม พอลิเมอร์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ P(3HHx) หรือ poly(3-hydroxyhexanoates) และ P(3HO) หรือ poly(3-hydroxyoctanoates)

2.1.3 คุณสมบัติทางกายภาพและความยืดหยุ่นของ MCL-PHA

2.1.3.1 โครงสร้างทางเคมี

คุณสมบัติทางกายภาพของ PHA ขึ้นอยู่กับจากองค์ประกอบของมอนอเมอร์ และโครงสร้างทางเคมี ชนิดของมอนอเมอร์ที่มีการพัฒนาเป็นสายโซ่พอลิเมอร์จากการได้รับผลกระทบจากจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับสภาวะการเพาะเลี้ยงและแหล่งคาร์บอนที่ให้ ตัวอย่างของ P(3HB-co-3HHX) จากการสร้างของสายพันธุ์ *Aeromonas* และ P(3HO) จากการสร้างของสายพันธุ์ *Pseudomonas* เช่น *Pseudomonas Oleovorans*, และ *Pseudomonas Putida* เป็นต้น ให้ได้มากกว่า 150 หน่วยของ MCL-PHA มอนอเมอร์ต่อวัน (Rai et al., 2011)

MCL-PHA มีโครงสร้างที่หลากหลายนอกเหนือจาก SCL-PHA หมู่ 'R' มีความหลากหลายจากโพรพิลถึงไตรเดซิล เช่น 3-hydroxyhexanoate และอาจประกอบด้วยหมู่เอะโรมาติก เช่น MCL-PHA มีลักษณะเป็นพาราเมทิลฟีน็อกซี หรือหมู่เมตาเมทิลฟีน็อกซี และหมู่ฮัยดรอกซีที่เป็นแอลคิล ซึ่งเป็นโครงสร้างแบบอิมิตัว เช่น 3-Hydroxyoctanoate และ โครงสร้างแบบไม้อิมิตัว เช่น 4-hexenoic, 3-hydroxy-8-nonynoate และ 3-hydroxy-10-undecynoate

ประเภทของ MCL-PHA แบ่งออกเป็น

- 1) Saturated Aliphatic MCL-PHA ไม่มีหมู่ฟังก์ชันที่ทำปฏิกิริยา เช่น P(3HO), P(3HHx) และ P(3HN)
- 2) Unsaturated MCL-PHA ประกอบด้วย C=C และ C=C และมี Terminal Group ที่สามารถทำปฏิกิริยาได้

3) MCL-PHA ที่ประกอบไปด้วยหมู่ฮาโลเจนที่สามารถทำปฏิกิริยาได้ เช่น โบรมีน คลอรีน และฟลูออรีน

4) MCL-PHA ที่ประกอบไปด้วยหมู่ห้อยที่เป็นอะโซมาติกขนาดใหญ่ เช่น MCL-PHA Copolymers ประกอบไปด้วย Nitrophenyl Group, P-Nitrophenyl Group, Phenoxy Substituents เช่น Poly(3-Hydroxy-5-Phenylvalerate) และหมู่อีพอกซี

5) MCL-PHA ที่ประกอบไปด้วยมอนอเมอร์ ที่เป็นกิ่งก้าน MCL-PHA บางตัวมีการค้นพบว่าประกอบไปด้วยหมู่ไฮดรอกซิลในตำแหน่ง C-2, C-4, C-5 และ C-6 ตัวอย่างเช่น *Pseudomonas Aeruginosa* มีการสะสมพอลิเมอร์ซึ่งประกอบไปด้วย 2-hydroxydodecanoate และ 3-hydroxyoctanoate เป็นมอนอเมอร์ที่เจริญเติบโตจากการเลี้ยงด้วยออกตะโนเอต

เนื่องจาก MCL-PHA มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำเช่นเดียวกับ PHA ชนิดอื่นๆ ด้วยเหตุนี้จึงมีหมู่ฟังก์ชัน เช่น หมู่ฮาโลเจน คาร์บอกซิล ไฮดรอกซิล อีพอกซี ฟีน็อกซี ไฮยาโนฟีน็อกซี และไนโตรฟีน็อกซี ซึ่งมีความสำคัญอย่างหนึ่งเมื่อมีการปรับเปลี่ยนการให้สารเคมี ขั้นตอนเหล่านี้นำไปสู่การผลิต PHA ที่สามารถนำไปใช้เป็นวัสดุทางการแพทย์ตามความต้องการ หมู่ฟังก์ชัน ดังกล่าวยังสามารถที่จะพัฒนาเป็นส่วนประกอบของยาสำหรับการรักษาได้จากความหลากหลายของคุณสมบัติ MCL-PHA ที่สามารถปรับเปลี่ยนคุณสมบัติของมอนอเมอร์ เพื่อให้มีคุณสมบัติการทำงานได้ดียิ่งขึ้นหรือปรับแต่งให้มีความเหมาะสมในการใช้งาน เช่น เป็นวัสดุทางการแพทย์เนื่องจาก MCL-PHA มีคุณสมบัติเข้ากันได้กับร่างกายอีกทั้งยังสลายได้ง่าย จึงเป็นวัสดุที่น่าสนใจที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการรักษาทางการแพทย์

2.1.3.2 คุณสมบัติของ MCL-PHA เปรียบเทียบกับ SCL-PHA และปีโตรพลาสติคชนิดอื่น

SCL-PHA คือ เทอร์โมพลาสติคอีลาสโตเมอร์ที่มีจุดหลอมเหลวอยู่ในช่วง 40°C ถึง 60°C และอุณหภูมิที่เปลี่ยนสถานะอยู่ในช่วง -50 °C ถึง -25 °C ส่วน MCL-PHA ที่มีคุณสมบัติในการยืดหยุ่นได้ดีแตกหักยากและมีการอ่อนตัวได้ดีกว่าจะมีอุณหภูมิคงที่ที่สูงกว่า SCL-PHA โดยความยืดหยุ่นจะขึ้นอยู่กับความยาวของสายโซ่ด้านข้างพลาสติคที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ไม่ละลายน้ำ และสามารถเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อมนุษย์ได้ดีนั้นต่างก็เหมาะสมในการนำมาเป็นอุปกรณ์ทางการแพทย์จำพวกอวัยวะเทียมอย่างมาก เช่น โครงสร้างสังเคราะห์ของหลอดเลือดและ

ปลายประสาท โดยตาราง 2.1 จะอธิบายเกี่ยวกับคุณสมบัติทางกายภาพของ PHA และวิธีการใช้ทั่วไปของพลาสติกสังเคราะห์ ส่วนความเปราะและความยืดหยุ่นของ P(3HB) ที่จะคล้ายกับคุณสมบัติของพอลิพรอไพลีน แม้ว่าความสามารถในการยืดหยุ่นของ P(3HB) จะต่ำกว่าพอลิพรอไพลีนแบบมีนัยสำคัญ ในทางตรงกันข้ามได้มีการทำลองตัวอย่างของ P(3HO) ในเรื่องความเปราะและความยืดหยุ่น เทียบกับพรอไพลีนซึ่งผลที่ได้ก็แตกต่างจากพรอไพลีนทั้งในเรื่องความเปราะและความยืดหยุ่น ส่วนโคโพลิเมอร์ของ SCL-MCL PHA จะมีคุณสมบัติที่ใกล้เคียงกับทั้ง SCL-PHA และ MCL-PHA ในปัจจุบันการศึกษาส่วนใหญ่จะเน้นที่การพัฒนาทางด้านการสร้างผลิตภัณฑ์ของโคโพลิเมอร์ที่แตกต่างกันโดยจะใช้ส่วนประกอบที่ต่างกันขึ้นอยู่กับนำไปใช้ตัวอย่าง เช่น P(3HB-co-3HV) ที่เป็นโคโพลิเมอร์ที่นิยมนำมาใช้อย่างมาก เพราะมีคุณสมบัติในด้านความยืดหยุ่นและสามารถทำให้เป็นแผ่นบาง ๆ ได้มากกว่า P(3HB) โดยจะขึ้นอยู่กับจำนวนของหมู่ 3HV นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่า จำนวนของ 3HV ที่เพิ่มมากขึ้นยังส่งผลต่อ จุดหลอมเหลว, ความเปราะ และความแข็งให้ต่ำลง แต่จะเพิ่มความยืดหยุ่น ความทนทานให้กับวัสดุนี้ จึงเป็นเหตุผลที่ทำให้ PHA เหมาะสมกับการใช้งานที่หลากหลาย และเป็นความหวังใหม่ให้กับอุปกรณ์ชีวภาพและอุตสาหกรรมพลาสติก

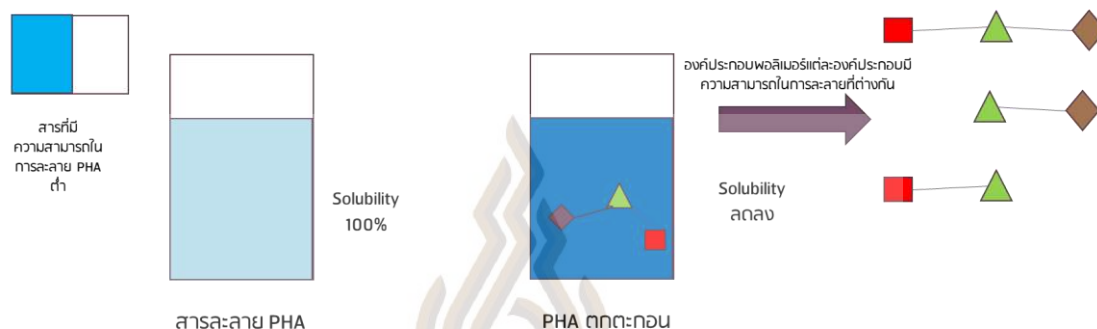
ตารางที่ 2.1 การเปรียบเทียบคุณสมบัติทางกายภาพของ PHA แต่ละชนิดกับพอลิเมอร์ฐานชีวภาพ

Property	T_m^a (°C)	T_g^a (°C)	Crystallinity ^b (%)	Young's modulus (GPa)	Tensile strength (MPa)	Elongation at break (%)
Bio-based polymers:						
P(3HB)	175–180	4	70	3.5	43	3–8
UHMW-P(3HB)	182	4	80	0.97	175	104
P(3HB-co-10% 3HV)	162	-1	59	0.8	20	50
P(3HB-co-20% 3HV)	135	-2	58	1.2	32	50–100
P(3HB-co-16% 4HB)	152	-8	45	NA ^d	26	444
P(3HB-co-10% 3HHx)	127	-1	34	0.52	21	400
P(3HB-co-14% 3H4MV)	136	-2	32	0.55	17	230
mcl-PHA	43	-44	NA ^d	0.001	4.7	335
PLLA	152	58	0-1	2.05	NA ^d	9
PBS	114	-28	41	0.25	45	470
PCL	65	-61	67	0.19	14	500

ที่มา : Tanadchangsang, 2014

2.2 การแยกองค์ประกอบของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

การแยกองค์ประกอบพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตอาศัยความสามารถในการละลายขององค์ประกอบของมอนอเมอร์ที่แตกต่างกัน



รูปที่ 2.3 ลักษณะการแยกองค์ประกอบของ PHA

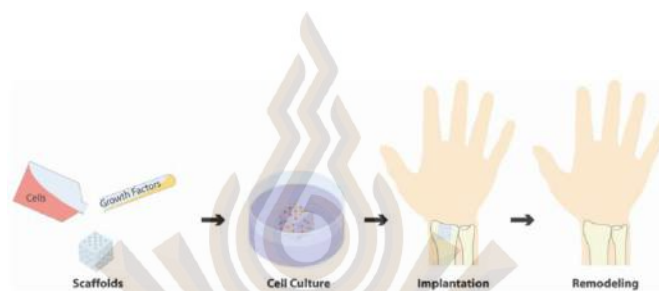
จากรูปที่ 2.3 แสดงให้เห็นว่าการแยกองค์ประกอบเป็นเทคนิคที่คล้ายคลึงกับการสกัดซึ่งใช้ตัวทำละลายที่สามารถละลาย PHA ได้เช่น คลอโรฟอร์มหรือไดคลอโรมีเทน ในการแยกอนุภาคของ PHA กลไกการละลายจะเกิดจากการแพร่กระจายของสารเข้าสู่อนุภาค โดยตัวทำละลายที่มีขั้วจะสามารถละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วเช่นเดียวกันได้ แต่จะไม่สามารถละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วได้ เช่นเดียวกับตัวทำละลายที่มีความแรงขั้วน้อยหรือไม่มีขั้ว จะละลายในสารที่ไม่มีขั้วซึ่งเป็นลักษณะการละลายระหว่าง PHA กับคลอโรฟอร์ม เมื่อทำการใส่ตัวทำละลายที่มีความแรงขั้วมากลงไปคลอโรฟอร์มจะเกิดการแยกชั้นซึ่งทำให้องค์ประกอบของ PHA บางส่วนตกตะกอน ซึ่งองค์ประกอบแต่ละส่วนจะมีการแตกต่างกัน (Chen et al., 2009)

2.3 วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue Engineering)

หลักการของวิศวกรรมเนื้อเยื่อ คือ การซ่อมแซมแทนที่เนื้อเยื่อหรืออวัยวะจำเพาะที่สูญเสียไป โดยอาศัยหลักการทางด้านวิศวกรรมชีวการแพทย์ และชีววิทยาของเซลล์ (Muschler, Nakamoto, & Griffith, 2004) หรือกล่าวได้อีกนัยหนึ่งว่า วิศวกรรมเนื้อเยื่อคือความพยายามที่จะสร้างหรือเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อจำเพาะในตำแหน่งที่จำเพาะโดยอาศัยการ

คัดเลือกและจัดการที่เหมาะสมกับเซลล์ โครงเลี้ยงเซลล์และโมเลกุลให้สัญญาณ (Muschler, Midura, & Research®, 2002)

หลักการของวิศวกรรมเนื้อเยื่อจึงเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบสำคัญ 3 ส่วน คือ เซลล์ โครงเลี้ยงเซลล์และ โมเลกุลให้สัญญาณ ดังรูปที่ 2.4 การสร้างเนื้อเยื่อจำเป็นต้องใช้องค์ประกอบเหล่านี้ โดยการเลือกใช้จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับอวัยวะ หรือเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ต้องการจะสร้าง ซึ่งจะต้องมีคุณสมบัติที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อที่ต้องการ



รูปที่ 2.4 การสร้างเนื้อเยื่อกระดูกทดแทนโดยอาศัยหลักการวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ซึ่งอาศัยองค์ประกอบ 3 ส่วน คือ เซลล์ โครงเลี้ยงเซลล์และ โมเลกุลให้สัญญาณ

ที่มา : Drosse et al., 2008

2.3.1 องค์ประกอบของวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

2.3.1.1 เซลล์

ในการสร้างเนื้อเยื่อขึ้นมาใหม่ เพื่อนำมาทดแทนเซลล์ที่สูญเสียไป เซลล์ที่ศึกษาและนำมาใช้ส่วนใหญ่คือ เซลล์ต้นกำเนิดเนื่องจากมีความสามารถในการแบ่งตัวโดยไม่มีขีดจำกัด โดยเนื้อเยื่อที่จะสร้างขึ้นอยู่กับประเภทของเซลล์ต้นกำเนิดที่มีสมบัติในการเปลี่ยนไปเป็นอวัยวะหรือเนื้อเยื่อนั้น ซึ่งจะต้องเลือกให้ตรงกับเนื้อเยื่อที่ต้องการ

2.3.1.2 โครงเลี้ยงเซลล์

การที่จะสร้างเนื้อเยื่อที่มีรูปร่างและสมบัติตามที่ต้องการจะต้องอาศัย โครงเลี้ยงเซลล์ที่เปลี่ยนเสมือนนั่งร้านให้เซลล์ยึดเกาะ ซึ่งจะต้องมีคุณสมบัติที่สอดคล้องกับเนื้อเยื่อ

ที่ต้องการ เช่น ทำหน้าที่เป็นตัวรองรับทางกายภาพในตำแหน่งที่เกิดการสมานแผลเพื่อไม่ให้เนื้อเยื่อข้างเคียงฟูบเข้ามาในตำแหน่งที่มีบาดแผล เป็นสิ่งกีดขวางเพื่อจำกัดขยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ เป็นโครงยึดเกาะชั่วคราวหรือเมทริกซ์นอกเซลล์เทียม เป็นต้น โดยวัสดุที่นำมาใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์คือ ชีววัสดุ ซึ่งจำเป็นต้องมีความเข้ากันได้กับร่างกาย โดยแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มคือ เซรามิก โลหะ คอมพอสิต และพอลิเมอร์ ซึ่งจะทำการประเมินในโครงการงานนี้

2.3.1.3 โมเลกุลให้สัญญาณ หรือสารกระตุ้นชีวภาพ

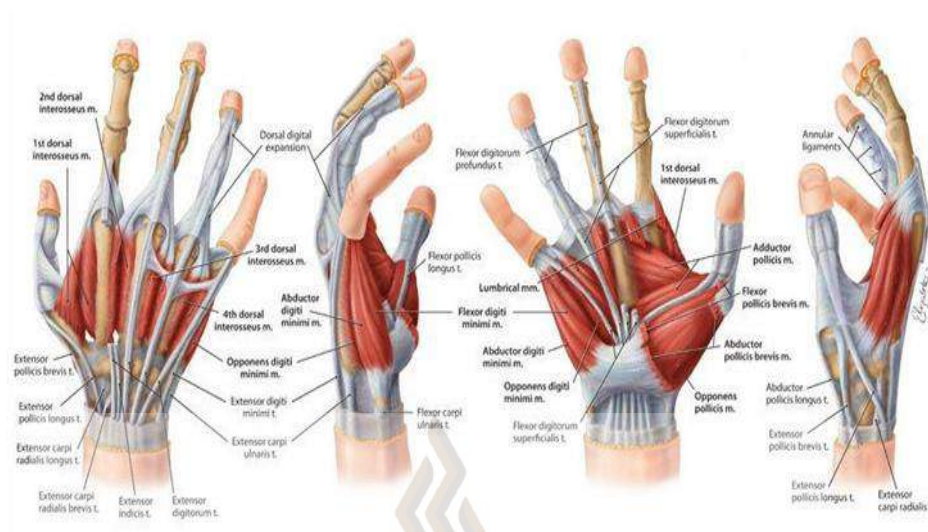
ในการสร้างเนื้อเยื่อบางอย่างจำเป็นต้องสารกระตุ้นเพื่อให้เซลล์นั้นทำหน้าที่ตามที่ต้องการเช่นการเปลี่ยนสภาพของเนื้อเยื่อ การกระตุ้นการเจริญเติบโต และการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างสารบางอย่างเพื่อให้เนื้อเยื่อนั้นมีสมบัติเป็นไปตามที่ต้องการซึ่งจำเป็นต้องอาศัยองค์ความรู้ทางด้านชีววิทยาเกี่ยวกับเซลล์และชีวเคมีเพื่อศึกษา สารที่มีผลเกี่ยวกับกับพฤติกรรมของเซลล์ที่ต้องการจะสร้างเป็นเนื้อเยื่อที่ต้องการ ซึ่งอาจจะทำให้สามารถเร่งระยะเวลาในการสร้างเนื้อเยื่อหรือเกิดประโยชน์ในด้านอื่นได้

2.4 ทฤษฎีทางการแพทย์ของเส้นเอ็น

2.4.1 สรีระของเส้นเอ็น

เส้นเอ็นเกิดจากการรวมกันของกลุ่มเส้นใยคอลลาเจนชนิดที่ 1 (Type I) ที่ถูกห่อหุ้มด้วยไฟโบรบลาสต์ (Fibroblast) ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดหนึ่งที่พบโดยทั่วไปในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective Tissue) โดยคอลลาเจนเกิดจากยีนส์ชนิด Col-1a และ Col-2a ประกอบกันเป็นสายพอลิเพปไทด์ (Polypeptide) รหัสอัลฟาวัน ($\alpha 1$) และอัลฟาทู ($\alpha 2$) ซึ่งเซลล์เส้นเอ็นนั้นรู้จักกันในชื่อ เทนโนไซต์ (Tenocytes) คิดเป็นร้อยละ 90 – 95% ของเซลล์ภายในเส้นเอ็นทั้งหมด

เส้นเอ็นมือ (Rotator Cuff Tendon) มีอยู่ 2 กลุ่มคือ เอ็กซ์เทนเซอร์ ซึ่งพาดจากปลายแขนไปจนถึงหลังมือไปยังนิ้วมือและหัวแม่โป้ง ทำให้สามารถชี้นิ้วตรง ๆ ได้ และเฟลกเซอร์ ซึ่งพาดจากปลายแขนผ่านข้อมือ ข้ามฝ่ามือ ทำให้สามารถงอนิ้วต่างๆได้ ซึ่งการผ่าตัดที่เกิดขึ้นมักจะมีขึ้นเพื่อแก้ไขความเสียหายของเส้นเอ็นสองชนิดนี้ดังรูป 2.5



รูปที่ 2.5 สรีระเส้นเอ็นข้อมือ

ที่มา : Hands Structure, Function, Bones, Muscles & Anatomy, 2022

ตารางที่ 2.2 ขนาดเส้นเอ็นมือของเพศชายและเพศหญิง

เพศ	ความกว้าง (มม.)	ความสามารถในการยืดขยาย (มม.)
ชาย	1.2 – 5.5	1.0 – 1.9
หญิง	1.0 – 4.4	0.8 – 1.5

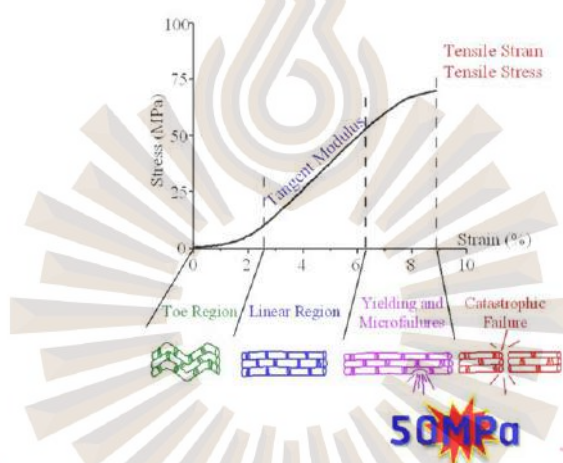
ที่มา : Palatty, Raveendranath, & Manjunath, 2015

2.4.2 การฉีกขาดของเส้นเอ็น

เมื่อมีเส้นเอ็นฉีกขาดส่วนใหญ่มักจะฉีกขาดบริเวณตำแหน่งที่เส้นเอ็นเกาะกับกระดูกส่วนหัว (Humerus) ซึ่งอาจฉีกเส้นเดียวหรือหลายเส้นก็ได้ การฉีกขาดอาจเริ่มจากการถลอกบริเวณด้านบนของเส้นเอ็นซึ่งเกิดจากการเสียดสีของหินปูนบริเวณกระดูกด้านบน (Acromion) กับตัวเส้นเอ็น หรืออาจเกิดจากภาวะเสื่อม (Degeneration) ของตัวเส้นเอ็นเองหรือเกิดจากการใช้งานหรืออุบัติเหตุ ทั้งหมดนี้ทำให้เกิดเส้นเอ็นมือฉีกขาด ช่วงแรกอาจฉีกเป็นบางส่วนแล้วมากขึ้นจนฉีกขาดตลอดความหนาของเส้นเอ็น เราจึงนิยมแบ่งเป็นชนิดต่างๆคือแบ่งตามลักษณะของการฉีกขาดคือ เส้นเอ็นฉีกขาดบางส่วน (Partial Rotator Cuff Tear) เส้นเอ็นฉีกขาดตลอดความหนา (Full Thickness Rotator Cuff Tear) และเส้นเอ็นฉีกขาดขนาดใหญ่ (Massive Rotator Cuff Tear) มักจะมี

การหดรัดของตัวกล้ามเนื้อและปลายเส้นเอ็นที่นิกขาดไปไกลจากตำแหน่งเกาะเดิม การแบ่งตามสาเหตุ แบ่งเป็น 2 สาเหตุใหญ่ ๆ คือ จากอุบัติเหตุ เช่น ล้มลงขณะที่แขนเหยียดเท้าพื้นหรือไหล่แขนกระแทกแล้วมีการหดตัวของกล้ามเนื้อและเส้นเอ็นอย่างรุนแรงหรืออุบัติเหตุที่เกิดจากเครื่องจักรในโรงงานอุตสาหกรรม และแบ่งจากภาวะเสื่อม กลุ่มนี้พบได้บ่อยกว่าเกิดจากการใช้งานมานาน ๆ และอายุที่มากขึ้น ซึ่งเส้นเอ็นจริงของมนุษย์ที่มีค่ามอดูลัสยืดหยุ่น (Young's modulus) และเปอร์เซ็นต์การยืดตัว (% Elongation) เท่ากับ 1 – 2 GPa และ 4 – 10% ตามลำดับ สามารถทนแรงสูงสุดได้ที่ 50 MPa ก่อนเริ่มนิกขาด (Maganaris & Narici, 2005)

Ligament and Tendon: Mechanical Properties



รูปที่ 2.6 Ligament and Tendon: Mechanical Properties

ที่มา : Maganaris & Narici, 2005

2.5 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับการทดสอบคุณสมบัติเชิงกล

2.5.1 สภาพยืดหยุ่นของของแข็ง

เป็นสมบัติของของแข็งที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเมื่อมีแรงกระทำ แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ 1) สภาพยืดหยุ่น คือสมบัติของวัสดุที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เมื่อมีแรงกระทำและสามารถคืนตัวกลับสู่รูปร่างเดิมเมื่อหยุดออกแรงกระทำ 2) สภาพพลาสติก (Plasticity) คือกรณีวัสดุเปลี่ยนรูปร่างไปอย่างถาวร โดยที่วัสดุไม่มีการนิกขาดหรือแตกหักจากการดึงวัสดุชนิดหนึ่งให้ยืดออก พบว่ากราฟความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของแรงดึงกับความยาวที่วัสดุยืดออกจะมี

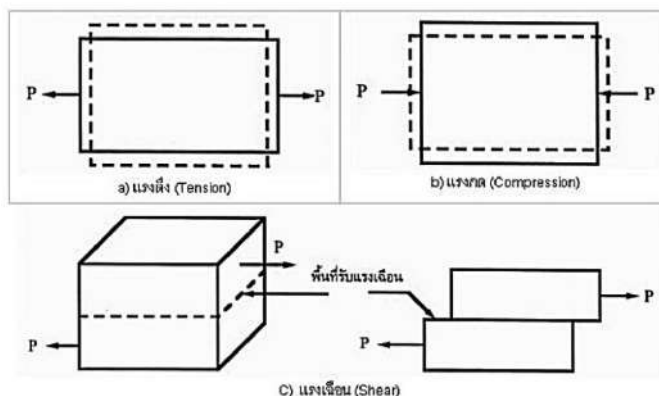
ลักษณะดังรูป 2.7 จุด A คือขีดจำกัดการแปรผันตรง (Proportional limit) ซึ่งเป็นตำแหน่งสุดท้ายที่ความยาววัสดุยืดออก ซึ่งแปรผันตรงกับขนาดของแรงดึง จุด B คือขีดจำกัดสภาพยืดหยุ่น (Elastic Limit) ซึ่งเป็นตำแหน่งสุดท้ายที่วัสดุยืดออกแล้วกลับสู่สภาพเดิม แต่แรงดึงไม่แปรผันตรงกับระยะยืดจุด C คือสภาพพลาสติก (Plastic) ของวัสดุ วัสดุจะไม่หด



รูปที่ 2.7 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแรงดึงและระยะยืดของวัสดุ
ที่มา : Physicbaansuan, 2016

2.5.2 ความเค้นและความเครียด

ความเค้น (Stress) หมายถึงแรงต้านทานภายในเนื้อวัสดุที่มีต่อแรงภายนอกที่มากระทำต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ แต่เนื่องจากความไม่เหมาะสมทางปฏิบัติ และความยากในการวัดหาค่านี้ เราจึงมักจะพูดถึงความเค้นในรูปของแรงภายนอกที่มากระทำต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ ด้วยเหตุผลที่ว่าแรงกระทำภายนอกมีความสมดุลกับแรงต้านทานภายในโดยทั่วไปความเค้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด ตามลักษณะของแรงที่มากระทำคือ ความเค้นแรงดึง (Tensile Stress) เป็นแรงที่พยายามแยกวัตถุออกจากกันในแนวตั้งฉากกับพื้นที่หน้าตัด ความเค้นแรงอัด หรือแรงกด (Compressive Stress) แรงที่ถูกดันเข้าหาวัตถุในแนวตั้งฉากกับพื้นที่หน้าตัด ความเค้นแรงเฉือน (Shear Stress) แรงที่เกิดจากวัตถุเคลื่อนที่เสียดสีหรือผ่านกันไปในแนวขนานกับพื้นที่หน้าตัดของวัตถุในทางปฏิบัติความเค้นที่เกิดขึ้นจะมีทั้ง 3 แบบนี้พร้อม ๆ กัน



รูปที่ 2.8 รูปแบบของความเค้น

ที่มา : Physicbaansuan, 2016

ความเครียด (Strain) หมายถึงอัตราส่วนระหว่างรูปร่างที่เปลี่ยนไปต่อรูปร่างเดิม มีหน่วยเป็นเท่าหรือไม่มีหน่วย เป็นความเครียดที่ปรากฏภายใต้แรงที่มากระทำต่อเนื้อของวัสดุจนวัสดุเกิดรับแรงนั้นไว้ไม่ไหวทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขนาดและรูปร่างไปในทิศทางของแรงที่มากระทำ เช่น เกิดการยืดตัวออก (Elongation) หรือหดตัวเข้า (Contraction)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Kawakami และคณะ (Kawakami et al., 2021) ได้ทำการศึกษาและสร้างเส้นเอ็นเทียมสำหรับเอ็นไขว้หน้าข้อเข่า (Anterior Cruciate Ligament; ACL) โดยใช้วัสดุพอลิ(เอสเทอร์ยูรีเทน) ยูเรีย (Poly(Ester Urethane) Urea; PEUU) ซึ่งเป็นอวัยวะที่ย่อยสลายได้อีกทั้งยังมีคุณสมบัติเป็นอีลาสโตเมอร์ที่มีความยืดหยุ่นสูง โดยการสร้างเอ็นเทียม PEUU ได้ขึ้นรูปด้วยวิธีอิเล็กโทรสปินนิง ซึ่งมีการฉีดสารละลายวัสดุร่วมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนจะนำไปปลูกถ่ายในหนู ผลการทดสอบคุณสมบัติเชิงกลของ PEUU ที่ได้รับการปลูกถ่ายเทียบกับ ACL จากศพมนุษย์พบว่า PEUU ที่ปลูกถ่ายเป็นเวลา 8 สัปดาห์มีค่าการทนต่อแรงดึงเพิ่มขึ้นจะก่อนปลูกถ่ายและมีค่ามากกว่า ACL จากศพเซลล์มีการเจริญเข้าไปในเส้นเอ็นเทียมและมีการอักเสบน้อยกว่าพอลิเมอร์ชนิดอื่นที่นำมาทดสอบร่วมด้วย เนื้อเยื่อที่ตรวจสอบจากการผ่าตัดเอ็นเทียม PEUU ที่ปลูกถ่ายมีค่าใกล้เคียงกับเนื้อเยื่อ ACL

Kuncharin และคณะ (Kuncharin, Boonyagul, Tanadchangsang, & Tawonsawatruk, 2019) ได้ทำการสร้างแบบจำลองของเส้นเอ็นเทียมอีลาสโตเมอร์และทำการขึ้นรูปด้วยเทคนิคการพิมพ์ชีวภาพ 3 มิติ โดยมีแนวคิดในการสร้างเส้นเอ็นเทียมคอมโพสิตร่วมกับเส้นเอ็นจริงที่เกิดการ

ชนิดขาดเพื่อช่วยให้การฟื้นฟูเส้นเอ็นหลังการผ่าตัดได้ดีขึ้น โดยได้มีการออกแบบเส้นเอ็นเทียมจำลองโดยใช้โปรแกรม Solid Work ตามรูปที่ได้รับการแนะนำจากศัลยแพทย์ โดยออกแบบให้มีรูสำหรับร้อยเส้นเอ็นที่เกิดการฉีกเข้าไป ซึ่งได้ทำการศึกษาผลของคุณสมบัติเชิงกลที่ส่งผลกระทบต่อรูปแบบที่ทำการออกแบบและวิเคราะห์รูปแบบที่มีความเหมาะสมที่สุดโดยพิจารณาจากความเค้นที่ส่งผลกระทบต่อตำแหน่งของรูแต่ละรูของเส้นเอ็นน้อยที่สุด ซึ่งปรากฏว่าที่ขนาดรู 1 mm ความกว้างของเส้น 4 mm มีความเหมาะสมในการสร้างเป็นเส้นเอ็นคอมโพสิตมากที่สุด



บทที่ 3

ระเบียบวิธีการวิจัย

บทนี้จะอธิบายถึงกระบวนการผลิต MCL-PHA การตรวจสอบคุณสมบัติของ MCL-PHA ที่ผลิตได้ ตลอดจนไปถึงการขึ้นรูปโครงสร้างเส้นเอ็น การตรวจสอบการคอมโพสิต การปรับปรุงคุณสมบัติ และการทดสอบร่วมกับเซลล์

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 3.1.1.1 Incubator/Shaking Incubator (HYSC/Korea)
- 3.1.1.2 Autoclave (Hirayama/Japan)
- 3.1.1.3 ตู้เย็น
- 3.1.1.4 Laminar Flow Cabinet
- 3.1.1.5 Centrifuge (Germany)
- 3.1.1.6 Magnetic Stirrers
- 3.1.1.7 Heat Box (Mettler Toledo/Switzerland)
- 3.1.1.8 Vortex (Genie/USA)
- 3.1.1.9 Freeze Dryer (BFFT-101-B)
- 3.1.1.10 Confocal Laser Scanning Microscope (OLYMPUS FV1000)
- 3.1.1.11 ถังหมักชีวภาพ (MDFT-N-/B.E.Marubishi/Thailand)
- 3.1.1.12 เครื่องทดสอบความต้านแรงดึง
- 3.1.1.13 ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์
- 3.1.1.14 เครื่องวัดการดูดกลืนแสงของสารละลาย
- 3.1.1.15 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) (BRUKRE)
- 3.1.1.16 เครื่องวัดค่าความต่างความร้อนของสาร (DSC) (Mettler Toledo)
- 3.1.1.17 เครื่องวิเคราะห์การเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ (XRD) (D8 Advance)

- 3.1.1.18 เครื่องชั่งแบบหยาบ
- 3.1.1.19 เครื่องชั่งแบบละเอียด
- 3.1.1.20 เครื่องวัดความหนา
- 3.1.1.21 Inverted Microscope
- 3.1.1.22 เครื่องแก้ว (Pyrex/USA)
- 3.1.1.23 Centrifuge Tube
- 3.1.1.24 Parafilm
- 3.1.1.25 Syringe
- 3.1.1.26 Auto Pipette (BOECO/Germany)
- 3.1.1.27. ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.1.1.28 Eppendoff
- 3.1.1.29 Megnatic Bar
- 3.1.1.30 Dropper
- 3.1.1.31 Hemocytometer
- 3.1.1.32 Well-plate
- 3.1.1.33 กระจกยทราย
- 3.1.1.34 Forceps

3.1.2 สารเคมี

- 3.1.2.1 น้ำกลั่น
- 3.1.2.2 ทรอโรฟอร์ม
- 3.1.2.3 75% Glycerol
- 3.1.2.4 Sulfuric Acid
- 3.1.2.5 Benzoic Acid (BA)
- 3.1.2.6 Methanol
- 3.1.2.7 Deionized (DI) Water
- 3.1.2.8 Magnesium Sulfate ($MgSO_4$)
- 3.1.2.9 Ammonium Sulphate ($(NH_4)_2SO_4$)
- 3.1.2.10 Nutrient Broth

- 3.1.2.11 Ammonia
- 3.1.2.12 Hydrochloric Acid
- 3.1.2.13 Anti-Foam
- 3.1.2.14 Disodium Hydrogen Phosphate
- 3.1.2.15 Potassium Dihydrogen Phosphate
- 3.1.2.16 Amonium Chloride
- 3.1.2.17 Magesium Sulfate Heptahydrate
- 3.1.2.18 Sodium Octanoate
- 3.1.2.19 Mineral salts (MS)
- 3.1.2.20 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
- 3.1.2.21 Fetal bovine serum (FBS)
- 3.1.2.22 PenStrep
- 3.1.2.23 Dimethyl Sulfoxide (DMSO)
- 3.1.2.24 Phosphate Buffered Saline (PBS)

3.2 กระบวนการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การสังเคราะห์ MCL-PHA ในระดับห้องปฏิบัติการ

ขั้นตอนในการผลิตเริ่มจากการนำเชื้อ *Pseudomonas Putida* ATCC 47054 ที่ถูกบ่มในกลีเซอรอล 45 % ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสมาขยายเพิ่มจำนวนโดยนำเชื้อใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (Nutrient Broths) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และนำไปบ่มด้วยตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วในการเขย่า 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เชื้อที่ได้จากการบ่ม 5 มิลลิลิตรถูกขยายเพิ่มจำนวนต่อในฟลาस्कที่มีสารละลายกลีเซอรอล (ประกอบด้วย NaH_2PO_4 1.2 g/L MgSO_4 0.5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L และ K_2HPO_4 7.34 g/L) 200 มิลลิลิตร โดยมีการเติมสารละลายกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตรและโซเดียมออกตาโนเอต 1 กรัมต่อลิตรทำการบ่มด้วยตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วในการเขย่า 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36-48 ชั่วโมง เตรียมถังหมักชีวภาพที่ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสโดยถังหมักขนาด 5 ลิตร บรรจุสารละลายกลีเซอรอล 2.5 ลิตร และควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ถังหมักมีการติดตั้งหัววัดความเป็นกรดเบส หัววัดเปอร์เซ็นต์ออกซิเจนในถังหมัก และหัวตรวจจับฟอง โดยมีการบ่ม

อากาศเข้าสู่ถังหมักด้วยแรงดัน 1.5 บาร์ นำเชื้อ 200 มิลลิลิตรที่บ่มไว้เติมลงในถังหมักชีวภาพ ที่มีไบโอฟิล์มบนกวนด้วยความเร็ว 200 ถึง 450 รอบต่อนาที โดยมีการเติมกลีเซอรอลเข้าไป 15 กรัมต่อลิตร และออกตาโนเอต 5 กรัมต่อลิตรเป็นสารอาหารเริ่มต้น โดยถังหมักจะต้องมีการควบคุมค่าความเป็นกรดเบสไม่ให้ต่ำกว่า 6.8 โดยมีการตั้งค่าเครื่องปั๊มสารอัตโนมัติให้เติมสารละลายแอมโมเนียเมื่อหัววัดอ่านค่าได้ต่ำกว่า 6.8 โดยในช่วง 0 ถึง 36 ชั่วโมงแรกจะใช้สารละลายแอมโมเนียและหลังจากนั้นจะถูกเป็นโซเดียมไฮดรอกไซด์แทน การบ่มเชื้อในถังหมักจะใช้เวลาบ่มเป็นระยะเวลา 60 ชั่วโมงนับจากเติมเชื้อลงในถังหมักโดยในช่วงหลังจากครบ 24 ชั่วโมงแรกของการบ่มจะมีการเติมกลีเซอรอลผสมโซเดียมออกตาโนเอตในอัตราส่วน 7:3 โดยเติม 20 กรัมต่อลิตร ในทุกๆ 6 ชั่วโมงไปจนถึง ชั่วโมงที่ 36 หรือ 48 หลังจากนั้นจะไม่มีการเติมสารใดๆลงไปอีกจนครบ 60 ชั่วโมง ทำการนำน้ำหมักที่บ่มไว้ไปปั่นตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนเชื้อที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปเก็บไว้ ณ อุณหภูมิ -80 องศา สำหรับรอทำแห้ง นำเชื้อที่ -80 องศาเซลเซียสไปเข้าเครื่องแช่แข็งอบแห้ง (Freeze-Drying) เป็นเวลา 3 วัน จะได้เชื้อแห้งสำหรับการสกัด MCL-PHA นำเชื้อแห้งมาละลายในคลอโรฟอร์มโดยใช้เชื้อแห้ง 1 กรัมต่อปริมาตร คลอโรฟอร์ม 100 มิลลิลิตรนำไปปั่นกวนด้วยเครื่องปั่นกวนด้วยแม่เหล็กเป็นเวลา 24 ถึง 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นำสารละลายเชื้อแห้งมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 ให้สารละลายหยดลงในเมทานอลที่ผ่านแก๊สเย็นที่อุณหภูมิ 4 องศา 3 ถึง 5 ชั่วโมง ปริมาตร 2 ถึง 4 เท่าของปริมาตรคลอโรฟอร์ม โดยมีการปั่นกวนตลอดเวลาด้วยเครื่องปั่นกวนแบบแม่เหล็ก จะได้ตะกอนสีขาวติดที่แม่เหล็กที่ปั่นกวน และบริเวณขวดคือ MCL-PHA ที่สกัดได้ ในระหว่างขั้นตอนการหมักในถังหมักเป็นระยะเวลา 60 ชั่วโมงนั้นมีการเก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 15 มิลลิลิตรทุกๆ 6 ชั่วโมงสำหรับการวัดความหนาแน่นของแสงของน้ำหมักและปั่นตกตะกอนน้ำหมักเพื่อไปชั่งน้ำหนักเชื้อและติดตามแนวโน้มในการผลิต MCL-PHA ของเชื้อจุลินทรีย์ที่สัมพันธ์กับเวลาและแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เติมเข้าไปถังหมักชีวภาพ นอกเหนือจากนั้นในขั้นตอนของการสกัดยังสามารถบ่งบอกได้ถึงปริมาณ MCL-PHA ที่สกัดได้จากเซลล์แบคทีเรียให้จากการผลิต MCL-PHA ด้วยกรรมวิธีดังกล่าว

3.2.2 การสังเคราะห์ MCL-PHA ในระดับโรงงานต้นแบบ 300 L

การสังเคราะห์ MCL-PHA จะดำเนินการคล้ายกับการสังเคราะห์ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยนำ เชื้อ *Pseudomonas Putida* ATCC 47054 ใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (Nutrient Broths) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และนำไปบ่มด้วยตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30

องศาเซลเซียส ความเร็วในการเขย่า 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เชื้อที่ได้จากการบ่ม 5 มิลลิลิตรถูกขยายเพิ่มจำนวนต่อในฟลาस्कที่มีสารละลายเกลือแร่ (ประกอบด้วย NaH_2PO_4 1.2 กรัมต่อลิตร MgSO_4 0.5 กรัมต่อลิตร $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 กรัมต่อลิตร และ K_2HPO_4 7.34 กรัมต่อลิตร) 200 มิลลิลิตร โดยมีการเติมสารละลายกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตรและโซเดียมออกตาโนเอต 1 กรัมต่อลิตรทำการบ่มด้วยตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วในการเขย่า 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36-48 ชั่วโมง จากนั้นเชื้อที่บ่มไว้มาบ่มต่อในสารละลายเกลือแร่ให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 7.5 ลิตรบ่มด้วยเครื่องเขย่า 180 รอบต่อนาทีเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง การสังเคราะห์ MCL-PHA จะเริ่มด้วยปริมาตรเริ่มต้น 150 ลิตรในถังหมักชีวภาพ 300 ลิตร (รูปที่ 3.1) โดยเป็นเชื้อที่บ่มไว้ 7.5 ลิตร และสารละลายเกลือแร่ 142.5 ลิตร ก่อนเติมเชื้อที่บ่มสารละลายเกลือแร่ในถังหมักจะมีการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อลงเชื้อในถังหมักจะมีการควบคุมอุณหภูมิเช่นเดียวกับการหมักในระดับห้องปฏิบัติการ 30 องศาเซลเซียส ถังหมักมีการติดตั้งหัววัดความเป็นกรดเบส หัววัดเปอร์เซ็นต์ออกซิเจนในถังหมัก และหัวตรวจจับฟอง โดยมีการป้อนอากาศเข้าสู่ถังหมักด้วยแรงดัน 1.5 บาร์ ความเร็วรอบในการปั่นกวนสารละลายอยู่ที่ 200 รอบต่อนาที มีการเติมกลีเซอรอลเข้าไป 20 กรัมต่อลิตรเป็นสารอาหารเริ่มต้น โดยถังหมักจะต้องมีการควบคุมค่าความเป็นกรดเบสไม่ให้ต่ำกว่า 6.8 โดยมีการตั้งค่าเครื่องป้อนสารอัตโนมัติให้เติมสารละลายแอมโมเนียเมื่อหัววัดอ่านค่าได้ต่ำกว่า 6.8 โดยในช่วง 0 ถึง 36 ชั่วโมงแรกจะใช้สารละลายแอมโมเนียและหลังจากนั้นจะถูกเป็น โซเดียมไฮดรอกไซด์แทน การบ่มเชื้อในถังหมักจะใช้เวลาบ่มเป็นระยะเวลา 60 ชั่วโมงนับจากเติมเชื้อลงในถังหมักโดยในช่วงหลังจากครบ 24 ชั่วโมงแรกของการบ่มจะมีการเติมกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร ในทุกๆ 6 ชั่วโมงไปจนถึง ชั่วโมงที่ 36 หรือ 48 หลังจากนั้นจะไม่มีการเติมสารใดๆลงไปอีกจนครบ 60 ชั่วโมงซึ่งเป็นวิธีการหมักแบบกึ่งกะ (Tanadchangsaeng & Yu, 2012) เมื่อครบ 60 ชั่วโมงแล้วจะทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบต่อเนื่อง (รูปที่ 3.1) เพื่อเอาตะกอนของเชื้อออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 3.2) จากนั้นทำแห้งเชื้อที่ตกตะกอนด้วยเครื่อง Freeze Dryer เมื่อเซลล์ของเชื้อแห้งแล้วจะนำมาบดเป็นผงและนำไปสกัดเพื่อนำ MCL-PHA ออกจากเซลล์โดยการทำละลายเซลล์แห้งในคลอโรฟอร์มที่อัตราส่วน 1 % ของปริมาณเชื้อแห้งนำไปปั่นกวนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรองให้ส่วนที่กรองตกลงในเมทานอลที่ปริมาตร 2.5 เท่าของสารละลายเชื้อแห้งจะได้ตะกอนของ MCL-PHA ดังรูปที่ 3.3 ซึ่งจะนำไปใช้ในการดำเนินงานวิจัยในขั้นตอนถัดไป



รูปที่ 3.1 ถังหมักชีวภาพขนาด 300 L และเครื่องปั่นเหวี่ยงทรงกระบอกแบบต่อเนื่อง



รูปที่ 3.2 ตะกอนที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงของเชื้อที่หมักในถังหมัก



รูปที่ 3.3 ตะกอน MCL-PHA ที่ได้จากการสกัด

3.2.3 การตรวจสอบคุณสมบัติเชิงกลของ MCL-PHA

ชิ้นรูปฟิล์ม MCL-PHA โดยนำ MCL-PHA มาละลายในคลอโรฟอร์มและเทในภาชนะทรงกลมที่ความเข้มข้นและปริมาตรเท่ากันรองคลอโรฟอร์มระเหย 24 ถึง 48 ชั่วโมงจะได้แผ่นฟิล์ม MCL-PHA ที่ใช้สำหรับทดสอบคุณสมบัติเชิงกล โดยการทดสอบจะเป็นการทดสอบการทนต่อแรงดึงโดยตัดชิ้นงานที่ทำการขึ้นรูปเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาด 5 x 30 mm ติดกระดาษทรายขนาด 20 x 50 mm ที่ปลายทั้งสองด้านของชิ้นงานให้ได้ลักษณะเป็นรูปคัมเบล (Dumbbell Shape) ทำการวัดค่าพารามิเตอร์ของชิ้นงานเพื่อนำไปตั้งค่าเครื่องทดสอบความเค้นแรงดึง นำชิ้นงานที่เตรียมไว้ยึดเข้ากับปากจับชิ้นงานของเครื่องทดสอบความเค้นแรงดึง ตั้งค่าความเร็วของการดึงเท่ากับ 10 mm/min และตั้งค่าพารามิเตอร์แล้วทำการเริ่มทดสอบ เครื่องทดสอบจะทำการแสดงค่าที่ต้องการและแสดงกราฟระหว่างความเค้นและความเครียด บันทึกค่าความเค้นสูงสุด ความเครียดจากการยืดตัว และโมดูลัสของยัง เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

3.2.4 การตรวจสอบคุณสมบัติเชิงความร้อน ความเสถียรทางความร้อน ความเป็นผลึก และสัดส่วนมอนอเมอร์ของ MCL-PHA

การตรวจสอบเชิงความร้อนของ MCL-PHA ถูกทดสอบโดยเครื่องวัดค่าความแตกต่างความร้อนของสาร (DSC) โดยนำตัวอย่างฟิล์ม MCL-PHA ไปสแกนผ่านเครื่อง DSC ที่อัตราการไหลของไนโตรเจน 50 mL/min สแกนจากอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสถึง 200 องศาเซลเซียส ที่อัตราการทำความร้อน 10 °C/min จะได้กราฟอุณหภูมิสำหรับนำไปวิเคราะห์อุณหภูมิในการหลอมเหลวและอุณหภูมิในการเปลี่ยนสถานะแก้วต่อไป การวัดความเสถียรทางความร้อนถูกทดสอบด้วยวิธีที่คล้ายกับการทดสอบเชิงความร้อน โดยนำตัวอย่าง MCL-PHA มาสแกนผ่านเครื่อง DSC และบันทึกค่าความเปลี่ยนแปลงของน้ำหนัก MCL-PHA ในแต่ละช่วงอุณหภูมิโดยอัตราการไหลของไนโตรเจนเท่ากับ 30 mL/min สแกนอุณหภูมิจาก 30 องศาเซลเซียสถึง 600 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นผลึกหาได้จากการนำฟิล์ม MCL-PHA ไปตรวจสอบผ่านเครื่องวิเคราะห์การเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ (XRD) โดยทำการตรวจสอบในช่วงระยะเวลา 2 ชั่วโมง ที่มุมสแกนตั้ง 4 องศา ถึง 60 องศา ที่ความการสแกน 2 องศาต่อนาที จะได้กราฟการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์บนพื้นผิวของวัสดุซึ่งสามารถนำไปวิเคราะห์สัดส่วนความเป็นผลึกและออสันฐานของ MCL-PHA ได้ การหาสัดส่วนมอนอเมอร์ของ MCL-PHA สามารถตรวจสอบได้ด้วย นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) ชนิด ^{13}C และ ^1H โดยใช้ MCL-PHA ละลายใน CDCl_3 ซึ่งเป็นทั้งตัวทำละลายและเป็นสารอ้างอิง การหา

สัดส่วนมอนอเมอร์จะอิงจากตำแหน่งของ NMR สเปกตราซึ่งใช้ระบุชนิดของมอนอเมอร์และการอินดิเกรตพื้นที่ได้กราฟจะทำให้ทราบถึงสัดส่วนของมอนอเมอร์แต่ละชนิด

3.2.5 การทดสอบความเข้ากันได้กับเซลล์ของวัสดุ MCL-PHA

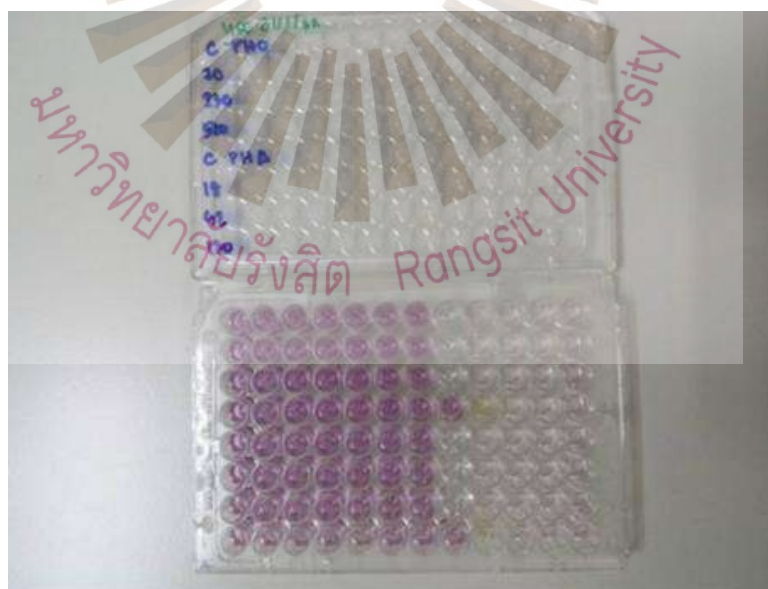
MCL-PHA ที่นำมาใช้ในการพัฒนาโครงร่างเส้นเอ็นคอมโพสิตที่ผลิตขึ้นจากรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ดังที่ได้อ้างอิงในขอบเขตการวิจัย ซึ่ง MCL-PHA ที่นำมาใช้จำเป็นจะต้องมีการตรวจสอบความเข้ากันได้กับเซลล์เบื้องต้นเพื่อยืนยันว่าวัสดุสามารถนำมาขึ้นรูปเป็นโครงร่างเส้นเอ็นที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์เส้นเอ็นในการนำไปใช้งานจริง โดยการทดสอบความเข้ากันได้กับเซลล์จะดำเนินการกับ MCL-PHA ที่ถูกขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มบางประมาณ 0.5 มิลลิเมตร โดยการทดสอบจะแบ่งออกเป็น 3 การทดสอบดังนี้

3.2.5.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

ทำการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT Assay โดยใช้ MSCs (รูปที่ 3.4) จำนวน 1×10^4 เซลล์/หลุม ในถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุมและเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออกแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่แช่แผ่นวัสดุ MCL-PHA ไว้เป็นเวลา 3 วัน ปริมาตร 100 μL ที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 mg/mL เทียบกับกลุ่มควบคุมอาหารเลี้ยงที่ไม่ได้แช่ MCL-PHAs จากนั้นเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในวันถัดมานำอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วแทนที่ด้วย 2.5 mg/mL ของสาร 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazolium Bromide (MTT) ที่ละลายใน PBS: Medium อัตราส่วน 50:50 แล้วบ่มไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเท MTT ทิ้งแล้วตาก Plate ให้แห้ง 2 – 3 นาที จึงเติม DMSO 100 μL จะได้สารละลายสีม่วงถ้าเซลล์มีการหายใจ ดังรูปที่ 3.5 และนำไปวัดผลด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ OD 570 nm, Ref 630 nm ค่าที่ได้จากการวัดการดูดกลืนแสงจะนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตรอด โดยเทียบจากกลุ่มควบคุมหรือเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อปกติ ทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง (n=3) ข้อมูลเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิตรอดมาสร้างกราฟโดยใช้โปรแกรม Prism 5 และวิเคราะห์สมมติฐานโดยใช้ One-Way ANOVA ในการวิเคราะห์ความแปรปรวนของตัวแปรเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดและความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ระดับนัยสำคัญน้อยกว่า 0.05 ซึ่งมี 4 กลุ่มตัวอย่าง มีการกระจายแบบปกติ



รูปที่ 3.4 ภาพจากกล้อง Inverted Microscope ของเซลล์ Human Mesenchymal Stem Cells



รูปที่ 3.5 สารละลายสีม่วงจากการละลายผลึกจากการทำปฏิกิริยาของสาร MTT

3.2.5.2 การทดสอบการยึดเกาะของเซลล์

การทดสอบการยึดเกาะของเซลล์เป็นการศึกษาพฤติกรรมของเซลล์ที่มีต่อพื้นผิวของวัสดุซึ่งการที่เซลล์ที่นำมาทดสอบคือ MSCs เป็นแบบเดียวกับที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษของเซลล์ เซลล์ (MSCs) เป็นเซลล์ชนิดเกาะซึ่งการที่จะทำให้เซลล์ชนิดนี้สามารถดำรงชีวิตต่อไปได้วัสดุจะต้องมีคุณสมบัติในการทำให้เซลล์ยึดเกาะได้ ซึ่งมีขั้นตอนในการทดสอบดังต่อไปนี้

การเตรียมวัสดุพอลิเมอร์ MCL-PHA ขึ้นรูปแผ่น MCL-PHA ด้วยวิธีเดียวกันกับการขึ้นรูปที่ใช้ในการทดสอบคุณสมบัติเชิงกล จากนั้นนำมาตัดเป็นวงกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มม. นำมาแช่ใน 70% แอลกอฮอล์ เป็นเวลา 5 นาที และล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ตากให้แห้งในตู้ Biosafety Cabinet จากนั้น UV แผ่นทั้งด้านหน้าและด้านหลัง เป็นเวลา 40 นาที ก่อนนำมาทดสอบ

การเตรียมสื่อเลี้ยง สารละลายคริสตัลไวโอเล็ต 0.5 % นำคริสตัลไวโอเล็ต 0.05 g มาผสมกับ 100% เมทานอล 2.5 mL และ Distilled Water 7.5 mL ปริมาตรรวม 10 mL นำมากรองด้วย Syringe Filter ขนาด 0.45 μm

ทดสอบคุณสมบัติต่อการยึดเกาะของเซลล์ นำแผ่น MCL-PHA ที่ทำการทำให้ปราศจากเชื้อ (Sterile) แล้ววางใน 24 ถาดเลี้ยงเซลล์ จากนั้นใส่เซลล์ MSCs จำนวน 3×10^4 Cells/Well และ บ่มในตู้ 5% CO_2 , 37 °C เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นทำการ Fix เซลล์ด้วย 100% เมทานอลเย็นแล้วล้างด้วยคริสตัลไวโอเล็ต แล้วล้างสีด้วยน้ำ Distilled Water จนไม่มีสีหลุดออกมาทำการตากแผ่นให้แห้งและนำมาถ่ายภาพด้วยกล้อง Inverted Microscope (ทำซ้ำ 3 ครั้ง)

3.2.5.3 ทดสอบการเพิ่มจำนวนของเซลล์

การเตรียมวัสดุพอลิเมอร์ MCL-PHA นำวัสดุพอลิเมอร์ MCL-PHA มาทำให้ปราศจากเชื้อ (Sterilization) โดยนำมาแช่ใน 70% แอลกอฮอล์ เป็นเวลา 5 นาที และล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ตากให้แห้งในตู้ Biosafety Cabinet จากนั้น UV แผ่นทั้งด้านหน้าและด้านหลัง เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นตัดให้เป็นชิ้นขนาดเล็ก แล้วนำไปชั่งที่น้ำหนัก 1 g จากนั้นนำไปแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจาก FBS เป็นเวลา 3 วัน ก่อนการทดสอบการเพิ่มจำนวนของเซลล์

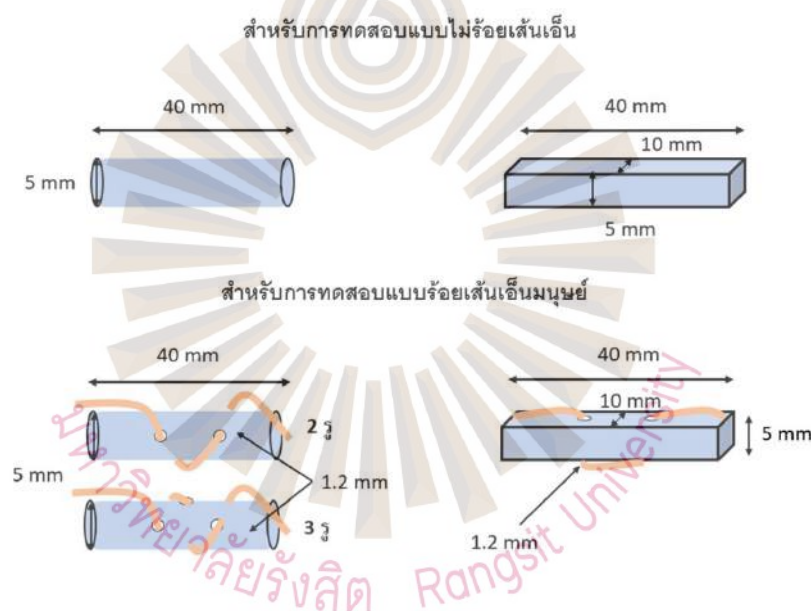
ทดสอบการเพิ่มจำนวนเซลล์ เตรียม MSCs จำนวน 1×10^3 เซลล์/หลุม ใน ถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุมจำนวน 3 plate เพื่อทำการทดสอบที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เซลล์ MSCs นำมาผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% FBS และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการแช่วัสดุพอลิเมอร์ MCL-PHAs ซึ่งความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1, 10 และ 100 mg/mL แล้วนำไปบ่มในตู้ 5% CO₂, 37 °C ตามเวลาที่กำหนด จากนั้นทำการถ่ายภาพแต่ละความเข้มข้นและนับเซลล์โดยการใช้ Trypsin เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากพื้นผิวพลาสติกที่เกาะอยู่ จากนั้นย้อมเซลล์ด้วย Trypan Blue และนับเซลล์ด้วยเครื่อง Hemacytometer ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (n=3) นำมาคำนวณผลและพลอตกราฟจำนวนเซลล์ในแต่ละความเข้มข้นของ MCL-PHA ที่แช่อาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละช่วงเวลาโดยใช้โปรแกรม Prism 5 และใช้ Two Way ANOVA ในการวิเคราะห์ตัวแปร จำนวนเซลล์ ความเข้มข้นของ MCL-PHA และเวลา เนื่องจากมีตัวแปรมากกว่า 2 ตัวแปรและกลุ่มตัวอย่างเท่ากับ 3 กลุ่มใหญ่ และ 4 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มใหญ่คือตัวแปรเวลากลุ่มย่อยคือตัวแปรความเข้มข้นในแต่ละช่วงเวลา มีการกระจายแบบปกติ

3.2.6 การขึ้นรูปโครงสร้างเส้นเอ็น MCL-PHA

การขึ้นรูปเส้นเอ็นจะใช้วิธีการหล่อ MCL-PHA ลงในแม่พิมพ์โดยรูปแบบการหล่อขึ้นงานแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือการหล่อโครงร่างเส้นเอ็นแบบแบนทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้าและการหล่อโครงร่างเส้นเอ็นแบบทรงกระบอก อีกทั้งยังแบ่งการทดสอบออกเป็น 2 รูปแบบคือการทดสอบแบบทรงตันที่ไม่มีการร้อยเส้นเอ็น และการทดสอบแบบมีรูร้อยเส้นเอ็น การขึ้นรูปโครงร่างเส้นเอ็นทั้ง 2 รูปใช้ความยาวเท่ากัน โดยจะขึ้นรูปเป็นเส้นตรงยาว และตัดแบ่งให้ได้ความยาวที่เพียงพอต่อการนำไปทดสอบแรงดึงและการทดสอบเพื่อดูการยึดเกาะของเซลล์ โดยทรงกระบอกจะใช้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร แบบทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้าแบนใช้ความหนา 5 มิลลิเมตร และความกว้าง 10 มิลลิเมตร โดยทั้ง 2 รูปแบบจะมีรูขนาด 1.25 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นขนาดรูที่มีการศึกษาว่ามีความเค้นที่เกิดขึ้นบริเวณรูน้อยที่สุด (Kuncharin, Boonyagul, Tanadchangsang, & Tawonsawatruk, 2019) ในรูปแบบทรงกระบอก จะมีการขึ้นรูปโครงร่างเส้นเอ็นสำหรับร้อยเป็น 2 ลักษณะคือ เจาะรู 2 รูในด้านเดียวกันและเจาะรูสลับกัน 3 รู (ด้านบน 2 ด้านข้าง 1) รูปแบบทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้าแบนจะอ้างอิงจำนวนรูได้บนจำนวน 2 รู เนื่องจากบริเวณได้ข้างไม่สามารถเจาะรูได้ โดยตัวอย่างที่จะขึ้นรูปทั้งหมดแสดงไว้ดังตารางที่ 3.1 และรูปที่ 3.6

ตารางที่ 3.1 รูปแบบที่ใช้ในการขึ้นรูปโครงร่างเส้นเอ็น MCL-PHA สำหรับการทดสอบคุณสมบัติเชิงกล

สถานะของโครงร่างเส้นเอ็น	ขนาดของโครงร่างเส้นเอ็น (mm)	จำนวนรู
ทรงกระบอก	40 x Ø5	0
		2
		3
ทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้า	40 x 10 x 5	0
		2



รูปที่ 3.6 รูปแบบโครงร่างเส้นเอ็นสำหรับการทดสอบเชิงกล

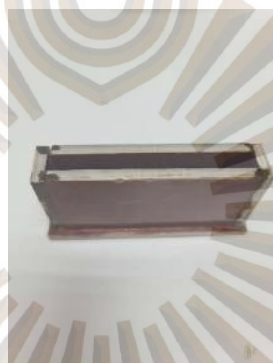
การขึ้นรูปโครงร่างเส้นเอ็นแบบแบนใช้แม่พิมพ์เบกกาไลต์ ประกอบเป็นช่องสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาดกว้าง 10 มิลลิเมตรยาว 12 มิลลิเมตร สูง 50 มิลลิเมตรดังรูปที่ 3.7 การขึ้นรูปโครงร่างเส้นเอ็นทรงกระบอกจะใช้แม่พิมพ์เป็นท่อวงซิติโคนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 5 มิลลิเมตรยาว 30 เซนติเมตรดังรูปที่ 3.8 โคมมีการอุดปลายท่อด้านล่าง การขึ้นรูปใช้วิธีการหล่อวัสดุลงในแม่พิมพ์โดยใช้สารละลายคลอโรฟอร์มละลายวัสดุ MCL-PHA ปริมาณที่ใช้จะแตกต่างกันไปตามความสูงของแม่พิมพ์ที่เพื่อไว้โดยสำหรับแม่พิมพ์สำหรับโครงร่างเส้นเอ็นทั้ง 2 รูปแบบจะใช้สารละลายคลอโรฟอร์ม 5 มิลลิตร ปริมาณ MCL-PHA ที่ใช้ในการหล่อขึ้นอยู่กับ

ขนาดของชิ้นงานที่ต้องการโดยคำนวณได้จากสมการที่ 1 โดยนำ MCL-PHA ที่คำนวณได้มาละลายในคลอโรฟอร์มและนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสจนสารละลายกลายเป็นเนื้อเดียวกันเทสารละลายลงในแม่พิมพ์ที่เตรียมไว้จากนั้นทิ้งให้คลอโรฟอร์มระเหยออกจนหมดโดยใช้เวลาประมาณ 4 ถึง 5 วันจึงทำการทำลายแม่พิมพ์เพื่อนำชิ้นงานออกมาจะได้ลักษณะชิ้นงานดังรูปที่ 3.9 และ 3.10

$$\text{ปริมาณ } MCL - PHA \text{ สำหรับหล่อ} = (V \times d) + 10\% \quad (3-1)$$

V คือ ปริมาตรของชิ้นงานที่ต้องการ

D คือ ความหนาแน่นของวัสดุ (MCL-PHA = 1.25 g/cm³)



รูปที่ 3.7 ลักษณะของแม่พิมพ์โครงร่างเส้นเอ็นแบบสี่เหลี่ยมผืนผ้า



รูปที่ 3.8 ลักษณะแม่พิมพ์โครงร่างเส้นเอ็นแบบทรงกระบอก



รูปที่ 3.9 ชิ้นงาน MCL-PHA ที่ได้จากแม่พิมพ์แบบสี่เหลี่ยมผืนผ้า



รูปที่ 3.10 ชิ้นงาน MCL-PHA ที่ได้จากแม่พิมพ์ทรงกระบอก

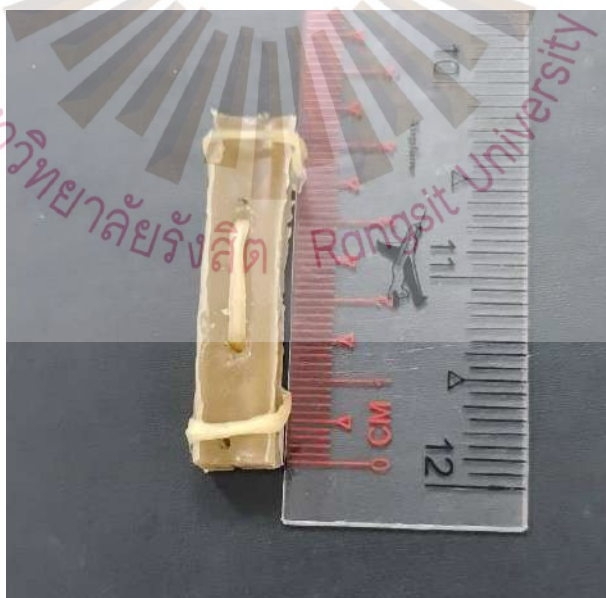
3.2.7 การทดสอบแรงดึงของโครงร่างเส้นเอ็น MCL-PHA ที่ขึ้นรูป

การทดสอบแรงดึงของโครงร่างเส้นเอ็นทั้ง 2 รูปแบบจะแบ่งออกเป็นการดึงวัสดุที่ไม่ผ่านการร้อยเส้นเอ็นและวัสดุที่ถูกเจาะรูเพื่อร้อยเส้นเอ็น โดยในกรณีของการร้อยเส้นเอ็นแบบทรงกระบอกจะมี 2 สภาวะคือแบบเจาะ 2 รู และแบบเจาะ 3 รู ซึ่งจะเจาะบริเวณด้านบนและด้านข้างสลับกัน โครงร่างเส้นเอ็นแบบสี่เหลี่ยมแบนจะทดสอบแบบ 2 รูด้านบนเท่านั้น การเตรียมตัวอย่างโครงร่างเส้นเอ็นทั้ง 2 รูปแบบจะถูกตัดแบ่งความยาวให้ได้เท่ากับ 40 มิลลิเมตรและระยะของรูจะห่างกัน 12.5 มิลลิเมตร สำหรับการเจาะแบบ 2 รู การเจาะแบบ 3 รูทรงกระบอกจะมีรูที่ 3 อยู่ตรงกึ่งกลางของโครงร่างเส้นเอ็นด้านข้าง เตรียมเส้นเอ็นสำหรับร้อยเข้ากับโครงร่างโดยใช้เส้นเอ็นมีมมนุษย์ซึ่งเป็นเส้นเอ็นส่วนที่เหลือจากการผ่าตัด (รูปที่ 3.11) ได้รับจากแพทย์ผู้เชี่ยวชาญด้านศัลยศาสตร์ออร์โทพีดิกส์ โรงพยาบาลรามารับดี โดยทำการแยกเส้นเอ็นดังกล่าวให้ได้ขนาด

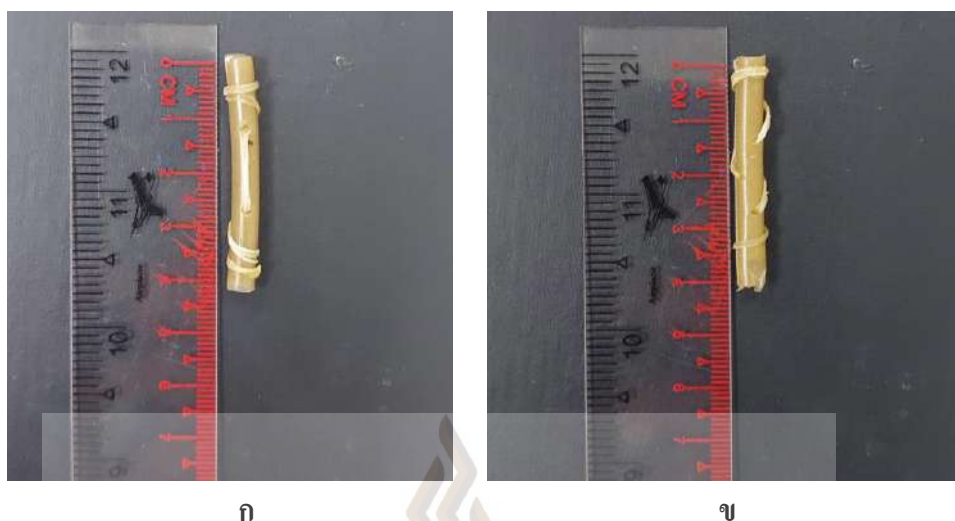
เส้นผ่านศูนย์กลางกลาง 1.2 มิลลิเมตรเพื่อร้อยเข้ากับโครงร่างเส้นเอ็นลักษณะของโครงร่างเส้นเอ็น MCL-PHA ที่ร้อยแสดงดังรูปที่ 3.12 และ 3.13



รูปที่ 3.11 เส้นเอ็นมนุษย์ส่วนที่ถูกตัดออกจากการผ่าตัด (waste sample)



รูปที่ 3.12 ลักษณะโครงร่างเส้นเอ็นแบบแบนที่ร้อยเข้ากับเส้นเอ็น



รูปที่ 3.13 ลักษณะ โครงร่างเส้นเอ็นแบบทรงกระบอกที่ร้อยเข้ากับเส้นเอ็น (ก) แบบ 2 รู
(ข) แบบ 3 รู

หลังจากการเตรียมตัวอย่างนำตัวอย่างทดสอบกับเครื่องทดสอบคุณสมบัติเชิงกลของวัสดุโดยติดตั้งจุดจับยึดในรูปแบบของการทดสอบแรงดึงและทำการจับยึดชิ้นงานเข้ากับจุดจับยึดโดยให้ระยะห่างระหว่างจุดจับยึดเท่ากับ 20 มิลลิเมตร ตั้งค่าขนาดและรูปร่างของชิ้นงานที่ทำการดึง ตั้งค่าความเร็วในการดึงที่ 100 มิลลิเมตรต่อนาที บันทึกผลค่าความเค้นสูงสุด เปอร์เซ็นต์การยืดตัว และค่ายังมอดุลัส ทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง เปรียบเทียบค่าที่ได้จากโครงร่างเส้นเอ็นที่มีรูปแบบและสภาวะการร้อยเส้นเอ็นที่แตกต่างกันวิเคราะห์ค่าความเค้นสูงสุดที่ได้เทียบกับค่าความสูงสุดของเส้นเอ็นมีมนุษย์

3.2.8 การทดสอบโครงร่างเส้นเอ็น MCL-PHA เพื่อดูความสามารถในการยึดเกาะบนโครงร่างของเส้นเอ็นที่ทำการขึ้นรูปและการสร้างคอลลาเจนของเซลล์

เตรียมตัวอย่างโครงร่างเส้นเอ็นโดยทำการตัดผิวด้านบนของโครงร่างเส้นเอ็น MCL-PHA มาใช้ในการเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์ โดยตัดหนาประมาณ 0.5 มิลลิเมตรกว้าง 5 มิลลิเมตร ก่อนนำเส้นเอ็นมาใช้งานจะทำให้วัสดุปราศจากเชื้อโดยการแช่ในแอลกอฮอล์ 70% เป็นระยะเวลา 15 นาทีแล้วทำการล้างสารละลายด้วย PBS ประมาณ 5 นาทีจากนั้นนำไปตากให้แห้งแล้วฆ่าเชื้อด้วยแสง UV ด้านละ 40 นาที นำตัวอย่างที่ทำให้ปราศจากเชื้อแล้วมาแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 3 วันก่อนนำไปใช้งาน เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบเป็รไฟโบรบลาสต์ปฐมภูมิโดยเลี้ยงเซลล์

ลงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับตัวอย่างที่เตรียมไว้ใช้เซลล์จำนวน 2 ล้านเซลล์ต่อ 1 จานเพาะเลี้ยงอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้คือ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ชนิดกลูโคสสูง ร่วมกับ Fetal Bovine Serum (FBS) และ Penicillin Streptomycin 1% โดยทำการเพาะเลี้ยงในตู้ Incubator CO₂ 5 % การเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับตัวอย่างจะทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 2 วัน โดยจะทำการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน การเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ร่วมกับตัวอย่างถูกเตรียมไว้สำหรับการทดสอบ 2 ลักษณะคือการทดสอบการยึดเกาะของเซลล์และการวัดปริมาณคอลลาเจนที่ถูกสังเคราะห์เมื่อเลี้ยงเซลล์ร่วมกับตัวอย่าง โครงร่างเส้นเอ็น การเตรียมตัวอย่างสำหรับตรวจสอบการยึดเกาะของเซลล์ซึ่งจะมีการ Fixation เซลล์ที่เกาะอยู่บนวัสดุเพื่อนำไปย้อมสีสำหรับส่องกล้อง Inverted Confocal Laser Scanning Microscope และแบ่งไว้สำหรับส่องกล้อง Scanning Electron Microscope (SEM) เริ่มจากการนำ ตัวอย่างที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์มาแช่ใน พาราฟอร์มมาดีไฮด์ความเข้มข้น 4 % เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมงจากนั้นนำไปย้อมด้วยสีย้อม DAPI และ TOPO3 สำหรับส่องดูเซลล์ที่ย้อมติดสีบนวัสดุผ่านกล้อง Inverted Confocal Laser Scanning Microscope สำหรับการส่องพื้นผิวด้วยกล้อง SEM เมื่อผ่านขั้นตอน Fixation แล้วจะต้องนำมาทำแห้งเพื่อไล่น้ำออกให้หมดโดยการแช่แอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 50, 70, 80, 90, และ 100% ตามลำดับความเข้มข้นละ 10 นาทีก่อนนำไปเตรียมตัวอย่างสำหรับส่อง SEM ต่อไป

การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวัดปริมาณคอลลาเจนชนิดที่ 1 เริ่มจากการสกัดโปรตีนจากเซลล์ที่เลี้ยงร่วมกับเส้นเอ็น โดยทำการล้างเซลล์ด้วย PBS Buffer อุณหภูมิปกติ 1 ครั้ง จากนั้นล้างเซลล์อีกครั้ง PBS Buffer ที่อุณหภูมิ 4 องศาแล้วเท PBS Buffer ที่เติมสาร RIPA Lysis buffer อุณหภูมิ 4 องศาปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงบนจานเพาะเลี้ยงที่มีเซลล์อยู่ แล้วทำการเคาะจานเพาะเลี้ยงเบาๆบนน้ำแข็งเป็นระยะเวลา 15 นาที จากนั้นทำการขูดเซลล์ด้วย pipette tip ขูดเซลล์ใส่ในหลอด Microcentrifuge Tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตรแล้วนำไปบ่มในน้ำแข็งอีก 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาทีที่ 4 องศา ด้วยของเหลวที่แยกชั้นเก็บในหลอด Microcentrifuge Tube อันใหม่แล้วทิ้งตะกอนไป นำของเหลวที่ได้ไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยชุดตรวจโปรตีนจากนั้นทำการตรวจปริมาณ Collagen ชนิดที่ 1 ด้วยชุดตรวจ Collagen ชนิดที่ 1 (ELISA Kit) โดยวัดปริมาณความหนาแน่นของแสงหลังหยดสารที่ติดแอนติบอดี Collagen ชนิดที่ 1 ที่ชุดตรวจให้มาเพิ่มสารที่ทำปฏิกิริยาทางแสงกับตัวอย่างล้างตัวอย่างแล้วเติมตัวหยุดปฏิกิริยาหลังจากตัวอย่างเปลี่ยนสีโดยวัดที่ความยาวคลื่น 450 nm จะได้ปริมาณที่นำไปเทียบค่า Collagen ชนิดที่ 1 ที่เซลล์สร้างขึ้น

3.2.9 การแยกส่วน MCL-PHA

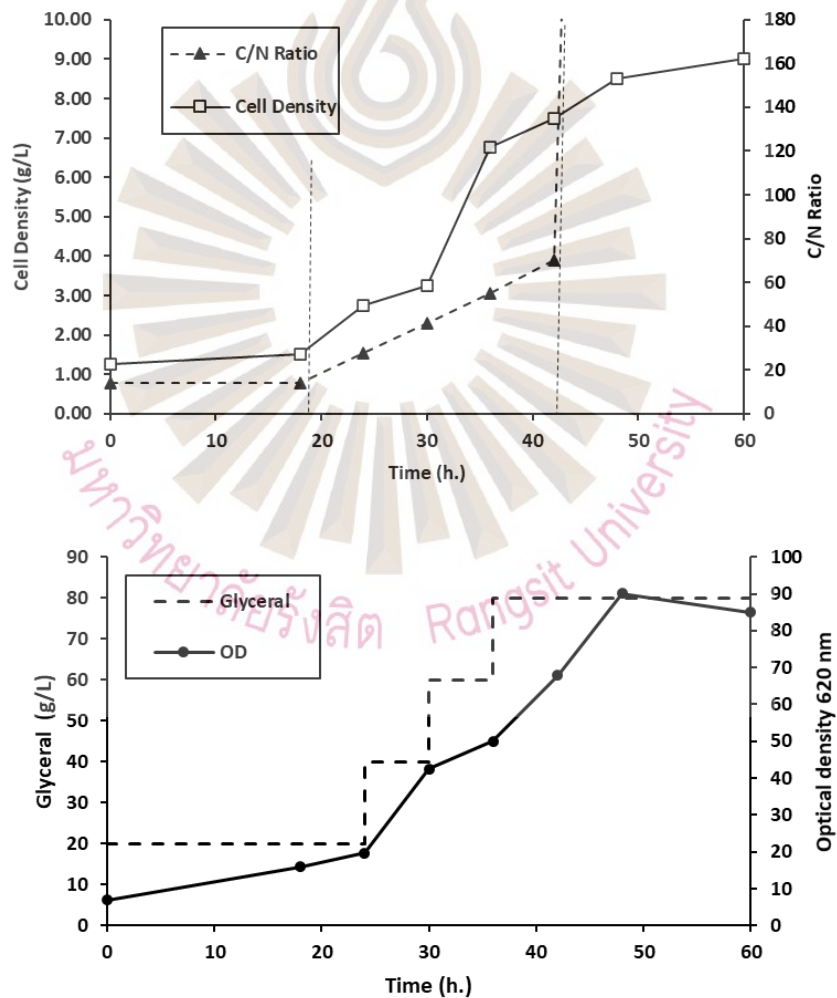
MCL-PHA ที่ผลิตขึ้นใช้ในการสร้างโครงร่างเส้นเอ็นซึ่งคาดว่าเมื่อคอมโพสิตเข้ากับเส้นเอ็นมนุษย์แล้วจะได้คุณสมบัติเชิงกลที่ต้องการ แต่หากเมื่อทดสอบแล้วคุณสมบัติเชิงกลอาจไม่เป็นไปตามสมมติฐานที่ตั้งไว้ มีกรรมวิธีในการปรับปรุงคุณสมบัติของ MCL-PHA ซึ่งอาจช่วยแก้ปัญหาในกรณีดังกล่าวได้คือ การแยกส่วน MCL-PHA ซึ่งจะทำได้ MCL-PHA ที่มีคุณสมบัติแตกต่างไปจากเดิมหลาย ๆ ช่วงทำให้สามารถเลือกไปประยุกต์ใช้งานได้โดยการแยกส่วนเริ่มจากนำ MCL-PHA ที่สกัดได้มาละลายในคลอโรฟอร์มโดยใช้ปริมาณ 10 g/L ทำการปั่นกวนสารละลาย MCL-PHA จนละลายเป็นเนื้อเดียวกับคลอโรฟอร์มจากนั้นค่อย ๆ เติมนีเมทานอลลงในสารละลายคลอโรฟอร์มที่ละลาย MCL-PHA ที่ปั่นกวนอยู่ตลอดเวลา สังเกตว่าภายในภาชนะที่ปั่นกวนในระหว่างเติมนีเมทานอลมีตะกอนเกิดขึ้นหรือไม่ เมื่อมีตะกอนเกิดขึ้นให้ทำการจลัดส่วนความเข้มข้นของเมทานอลที่อยู่ในคลอโรฟอร์มแล้วนำสารละลายผสมที่เกิดตะกอนดังกล่าวไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำตะกอนออกไปอบที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงจะได้ส่วนของมอนอเมอร์ที่แยกออกมาจาก MCL-PHA นำสารละลายผสมที่นำตะกอนออกไปปั่นกวนและเติมนีเมทานอลให้ความเข้มข้นของเมทานอลเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนเกิดตะกอนทำแบบเดิมซ้ำ ๆ จนไม่สามารถแยกตะกอนออกจากสารละลายได้อีก ตะกอนที่ได้ในแต่ละความเข้มข้นของเมทานอลคือ MCL-PHA แต่ละส่วนที่ถูกแยกออกซึ่งจะนำไปตรวจสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ต่อไป

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการผลิต MCL-PHA

4.1.1 ผลการติดตามการสังเคราะห์ MCL-PHA



รูปที่ 4.1 ผลการติดตามช่วงเวลาในการสังเคราะห์ MCL-PHA ในถังหมักขนาด 300 ลิตร

รูปที่ 4.1 แสดงการผลิต MCL-PHA ในถังหมัก 300 ลิตร โดยจะบ่งบอกถึงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการสังเคราะห์กับค่าความหนาแน่นของเซลล์ ความหนาแน่นของแสง และปริมาณสารอาหารที่ถูกป้อนเข้าสู่ถังหมักในช่วง 60 ชั่วโมงที่ทำการสังเคราะห์ ความหนาแน่นของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละช่วงเวลาและค่า OD ที่เพิ่มขึ้นในช่วง 18 ถึง 42 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียมีการสังเคราะห์ MCL-PHA และเพิ่มจำนวนขึ้นซึ่งสัมพันธ์กับระยะเวลาในการป้อนแหล่งคาร์บอนเข้าสู่ถังหมัก C/N Ratio คือค่าของปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ถูกป้อนเข้าสู่ระบบซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มตามแหล่งคาร์บอนอย่างกลีเซอรอลที่ป้อนเข้าสู่ถังหมัก

4.1.2 ผลผลิต MCL-PHA ที่ได้จากการสกัด

MCL-PHA ที่จะนำไปใช้ในการขึ้นรูปโครงสร้างเส้นเอ็นจะสังเคราะห์ในถังหมักชีวภาพขนาด 300 ลิตร เพื่อที่จะให้เพียงพอต่อการใช้งาน ซึ่งได้ทำการสกัด MCL-PHA ออกมาจากเซลล์แบคทีเรียแห้งทั้งหมด ในหัวข้อนี้จะแสดงผลผลิต MCL-PHA ที่สกัดออกมาได้โดยเทียบกับกรรมวิธีการการสังเคราะห์ในถังหมักชีวภาพในห้องปฏิบัติการขนาด 5 L โดยชุดข้อมูลแสดงดังตารางที่ 4.1 และค่าผลผลิตต่าง ๆ สามารถคำนวณได้จากสมการดังต่อไปนี้

$$\% \text{ MCL-PHA} = \frac{\text{น้ำหนัก MCL-PHA (g)} \times 100}{\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง}} \quad (4-1)$$

$$\text{ปริมาณ MCL-PHA ทั้งหมด (g)} = \frac{\% \text{ MCL-PHA} \times \text{ความหนาแน่นของเซลล์ (g)}}{100} \quad (4-2)$$

$$\text{ผลผลิต MCL-PHA} = \frac{\text{ปริมาณ MCL-PHA ทั้งหมด (g)}}{\text{ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ใช้ (g)}} \quad (4-3)$$

$$\text{Productivity (g/L·Hr)} = \frac{\% \text{ MCL-PHA} \times \text{ความหนาแน่นของเซลล์ (g/L)}}{100 \times \text{ระยะเวลาในการหมัก (Hr)}} \quad (4-4)$$

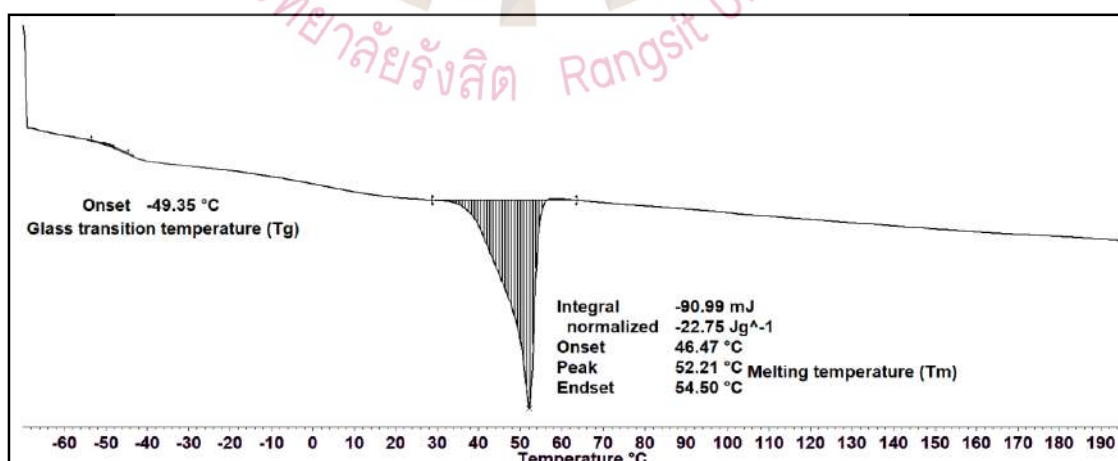
ตารางที่ 4.1 ผลผลิตของ MCL-PHA ที่สังเคราะห์ได้จากถังหมัก 300 ลิตร เทียบกับ 5 ลิตร

ระดับการเลี้ยง	ความหนาแน่นของเซลล์ (g/L)	% MCL-PHA ต่อเซลล์แห้ง	% ผลผลิต	Productivity (g/L·Hr)	ปริมาณ MCL-PHA ทั้งหมด (g)
ถังหมักขนาด 5 L	15	27	5	0.067	12.55
ถังหมักขนาด 300 L	9	23	2.5	0.034	79.1

จากตารางที่ 4.1 การเปรียบเทียบผลผลิตที่ได้จากการหมักด้วยถังหมักขนาด 5 ลิตร และ 300 ลิตร มีสัดส่วน MCL-PHA ที่แตกต่างกันเล็กน้อยโดย MCL-PHA ที่สะสมในเซลล์แบคทีเรียที่สังเคราะห์จากระดับห้องปฏิบัติการมีมากกว่าในระดับโรงงานต้นแบบ แต่อย่างไรก็ตาม การสังเคราะห์ในระดับโรงงานต้นแบบสามารถผลิต MCL-PHA ได้มากกว่าในระดับห้องปฏิบัติการเมื่อเทียบปริมาณที่สกัดได้ทั้งหมดซึ่งเพียงพอต่อการนำไปใช้ในการขึ้นรูปเส้นเอ็นต่อไป

4.2 ผลการตรวจสอบคุณสมบัติทั่วไปของ MCL-PHA ที่ได้จากการสังเคราะห์

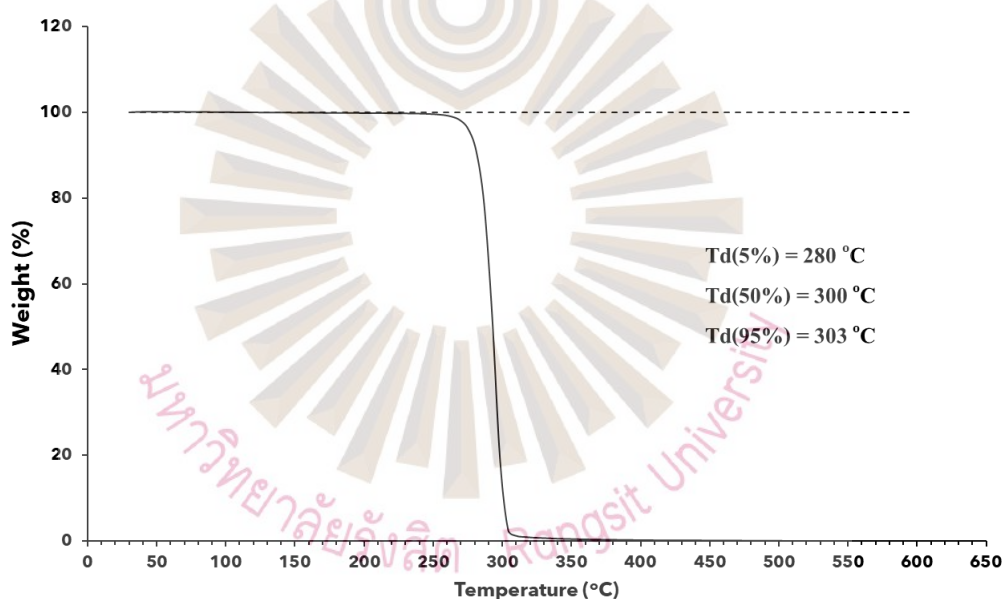
4.2.1 การตรวจสอบคุณสมบัติเชิงความร้อนของ MCL-PHA ที่ได้จากการสังเคราะห์



รูปที่ 4.2 ผลคุณสมบัติเชิงความร้อนของ MCL-PHA ที่วัดจากเครื่อง DSC

รูปที่ 4.2 แสดงคุณสมบัติเชิงความร้อนของ MCL-PHA โดยกราฟบ่งบอกถึงค่าที่อุณหภูมิที่ทำให้วัสดุหลอมเหลวอยู่ที่ช่วง 52.21 องศาเซลเซียส (T_m) และอุณหภูมิที่ทำให้วัสดุเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้วอยู่ที่ -49.35 องศาเซลเซียส (T_g) พลังงานความร้อนที่ทำให้วัสดุเกิดการหลอมเหลว (ΔH_m) เท่ากับพื้นที่ใต้กราฟคือ 22.75 J/g ค่าดังกล่าวสามารถคำนวณความเป็นผลึกของวัสดุได้ซึ่งเท่ากับ พลังงานความร้อนที่ทำให้วัสดุเกิดการหลอมเหลวของ MCL-PHA หารด้วยพลังงานความร้อนที่ทำให้วัสดุเกิดการหลอมเหลวของ PHA ที่เป็นผลึก 100 % ซึ่งเท่ากับ 146 J/g (Debuissy, Pollet, & Avérous, 2017) จะได้อัตราส่วนค่าความเป็นผลึกของ MCL-PHA เท่ากับ 15.6%

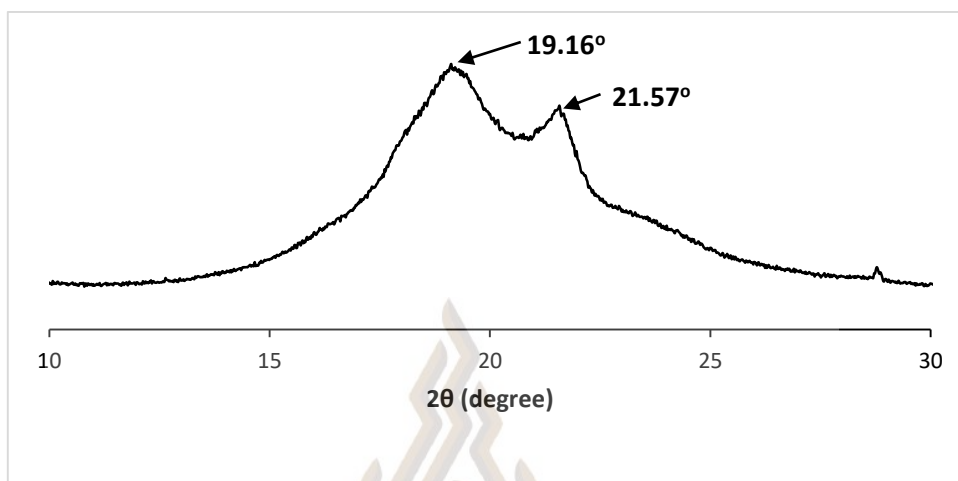
4.2.2 ผลการตรวจสอบความเสถียรทางความร้อนของ MCL-PHA



รูปที่ 4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นและน้ำหนัก MCL-PHA

รูปที่ 4.3 แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนัก MCL-PHA ที่ลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึงค่าการสลายตัวของ MCL-PHA ซึ่งอุณหภูมิที่ทำให้น้ำหนัก MCL-PHA เริ่มลดลงอยู่ที่ 280 องศาเซลเซียส ($T_{d5\%}$) และอุณหภูมิที่ทำให้น้ำหนัก MCL-PHA ลดลงเหลือ 50% คือ 300 องศาเซลเซียส ($T_{d50\%}$) และอุณหภูมิที่ทำให้วัสดุเกิดการสลายตัว 95% คือ 303 องศาเซลเซียส

4.2.3 ผลการตรวจสอบความเป็นผลึกของ MCL-PHA

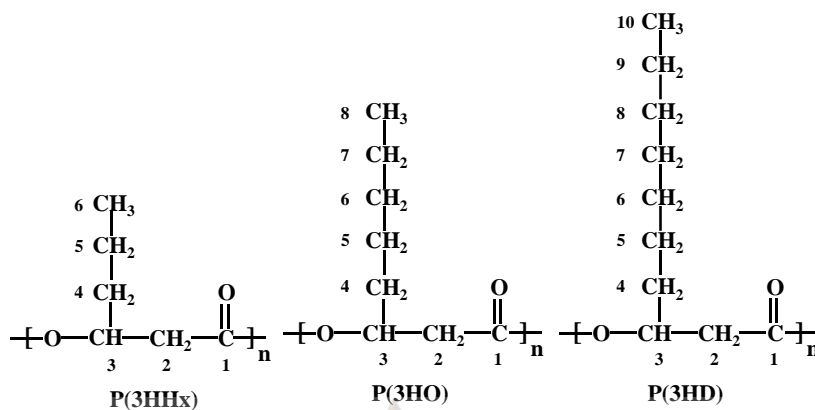


รูปที่ 4.4 ผลการสแกน XRD ของ MCL-PHA

จากการสแกน XRD ทำให้ได้กราฟที่บอกถึงลักษณะความเป็นอสัณฐานและความเป็นผลึกของ MCL-PHA ซึ่งสามารถคำนวณได้จากส่วนของพื้นที่ใต้กราฟโดยจากกราฟดังกล่าวสามารถคำนวณสัดส่วนของอสัณฐานของ MCL-PHA ได้ 84.5% และค่าความเป็นผลึกเท่ากับ 15.5%

4.2.4 ผลการตรวจสอบชนิด และสัดส่วนของมอนอเมอร์ MCL-PHA

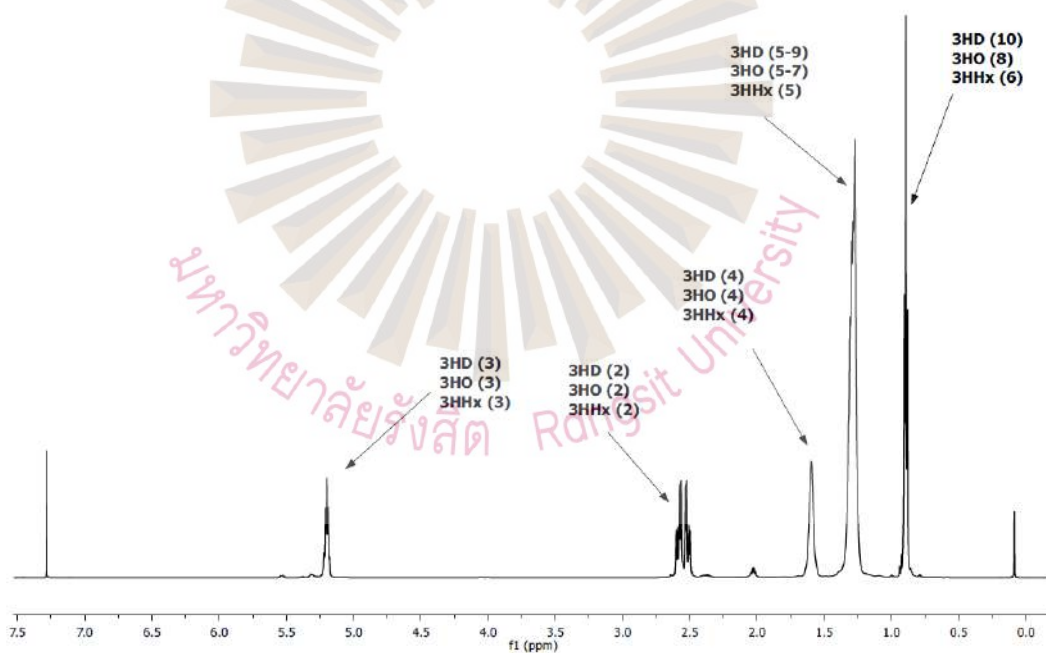
การตรวจสอบเพื่อระบุชนิดของ MCL-PHA สามารถตรวจสอบได้จากการวัด NMR ^1H และ ^{13}C ซึ่งป็นสแกนทางองค์ประกอบภายในของสารที่ทำการทดสอบซึ่งทำให้รู้ว่า MCL-PHA ที่สังเคราะห์ได้นั้นเป็นชนิด (Polyhydroxyhexanoate-co-Hydroxyoctanoate-co-Hydroxydecanoate; P(3HHx-co-3HO-co-3HD)) ซึ่งประกอบไปด้วย มอนอเมอร์ 3 ชนิด มีโครงสร้างทางเคมีแสดงดังรูปที่ 4.5 และสามารถระบุองค์ประกอบทางเคมีได้จากสเปกตราของ NMR ทั้ง 2 รูปแบบโดยแสดงไว้ดังรูป 4.6 และ 4.7 นอกจากนี้ NMR สเปกตรา ยังสามารถคำนวณหาสัดส่วนมอนอเมอร์ในแต่ละองค์ประกอบได้ดังรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.5 สูตร โครงสร้างทางเคมีของ MCL-PHA

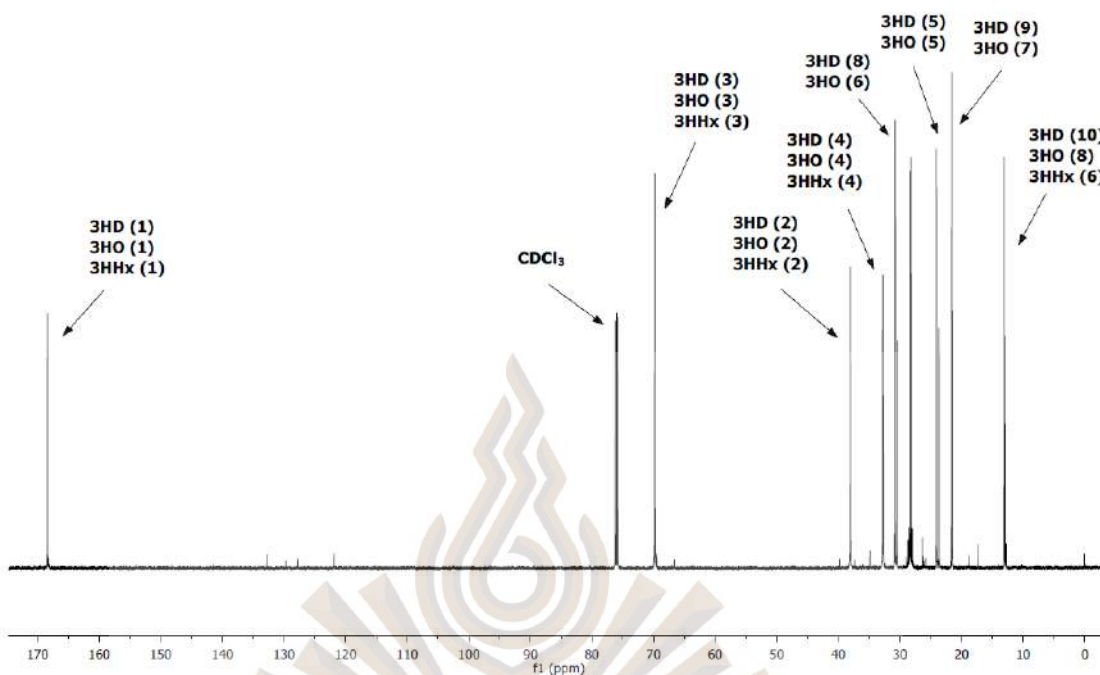
(Polyhydroxyhexanoate-*co*-Hydroxyoctanoate-*co*-Hydroxydecanoate;

P(3HHx-*co*-3HO-*co*-3HD))

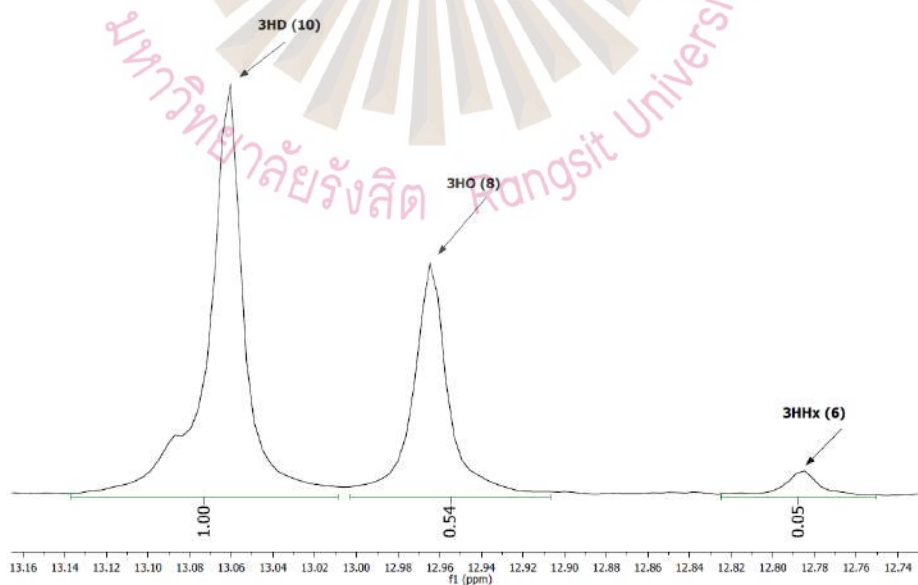


รูปที่ 4.6 NMR สเปกตรานชนิด ^1H ของ (P(3HHx-*co*-3HO-*co*-3HD))

*(3HHx, 3-Hydroxyhexanoate; 3HO, 3-Hydroxyoctanoate; 3HD, 3-Hydroxydecanoate)



รูปที่ 4.7 NMR สเปกตรานชนิด ^{13}C ของ (P(3HHx-co-3HO-co-3HD))
 *(CDCl_3 , Deuterated Chloroform)



รูปที่ 4.8 NMR สเปกตรานชนิด ^{13}C ของ (P(3HHx-co-3HO-co-3HD)) ที่ตำแหน่งกลุ่มเทอร์มินอล
 คาร์บอน (CH_3) ของ 3HD, 3HO และ 3HHx

สำหรับสูตรการคำนวณสัดส่วนของมอนอเมอร์สามารถคำนวณได้จากสมการ
ดังต่อไปนี้

$$\% 3HHx = A_{3HHx} / A_{3HHx} + A_{3HO} + A_{3HD} \quad (4-5)$$

$$\% 3HO = A_{3HO} / A_{3HHx} + A_{3HO} + A_{3HD} \quad (4-6)$$

$$\% 3HD = A_{3HD} / A_{3HHx} + A_{3HO} + A_{3HD} \quad (4-7)$$

โดย % 3HHx คือ เปอร์เซ็นต์ของ 3HHx

% 3HO คือ เปอร์เซ็นต์ของ 3HO

% 3HD คือ เปอร์เซ็นต์ของ 3HD

A_n คือ ค่าที่ได้จากการอินทิเกรตพื้นที่ใต้กราฟ

n คือ 3HHx, 3HO และ 3HD

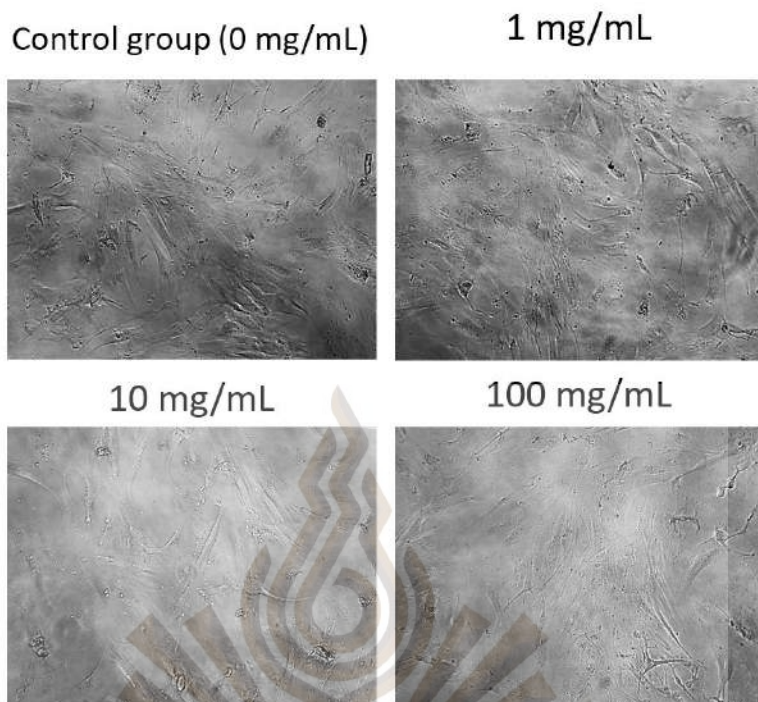
ตารางที่ 4.2 ผลสรุปคุณสมบัติต่าง ๆ ของ MCL-PHA 300 ลิตรเปรียบเทียบกับ MCL-PHA 5 ลิตร

PHA	% PHA monomer			Thermal properties			Crystallinity
	3HHx	3HO	3HD	T_m (°C)	T_g (°C)	ΔH_m (J/g)	X_c (%)
5L	3.3%	32.2%	64.5%	51.77	-49.53	25.04	15.7
300L	3%	34%	63%	52.21	-49.35	22.75	15.5

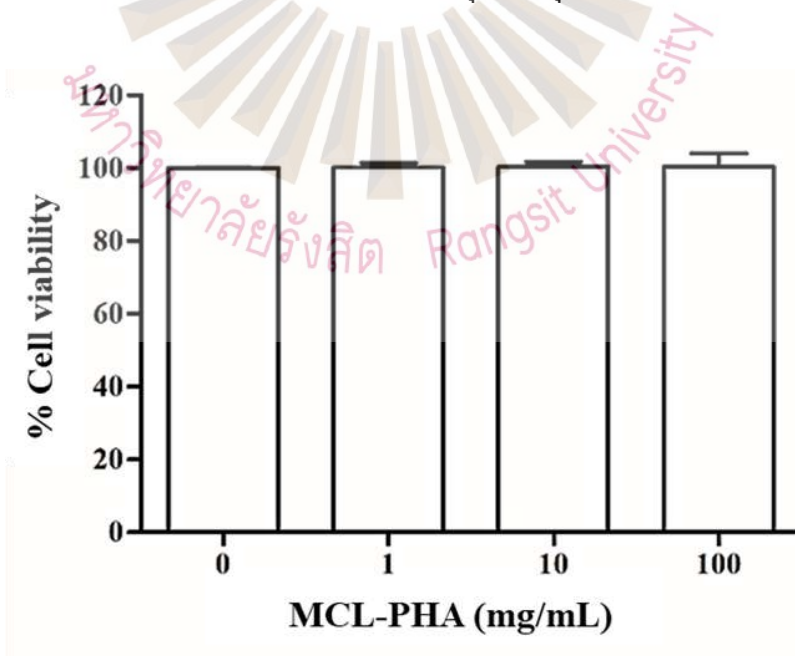
จากตารางที่ 4.2 แสดงให้เห็นสัดส่วนของมอนอเมอร์ของ MCL-PHA ซึ่งส่วนใหญ่เป็นมอนอเมอร์ 3HD อย่างไรก็ตามเมื่อเทียบการสังเคราะห์ในระดับห้องปฏิบัติการกับการสังเคราะห์จากถังหมักชีวภาพ 300 ลิตรแล้วได้ MCL-PHA ที่มีคุณสมบัติต่าง ๆ คล้ายคลึงกัน

4.3 ผลการทดสอบความเข้ากันได้กับเซลล์ของ MCL-PHA

4.3.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์



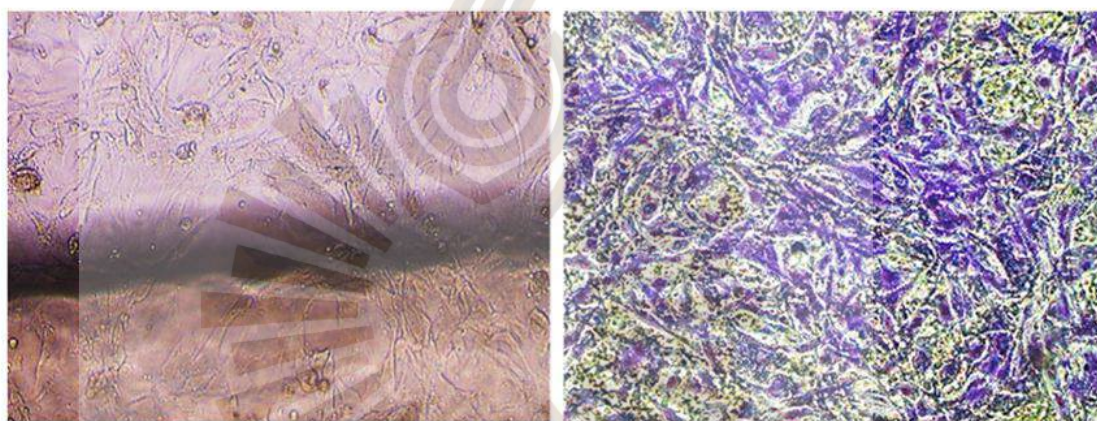
รูปที่ 4.9 ลักษณะของเซลล์ MSCs ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่แช่ MCL-PHA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 4.10 ค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ MSCs ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่แช่ MCL-PHAs ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (n=3, ns = Not Significant)

จากรูปที่ 4.9 และ 4.10 แสดงให้อัตราการรอดชีวิตแสดงให้เห็นในระดับความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่แช่ MCL-PHAs เป็นเวลา 3 วันก่อนเอามาทดสอบกับเซลล์ เซลล์ที่เอามาทดสอบมีอัตราการรอดชีวิตอยู่ที่ 100 % เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย One-Way ANOVA ค่า F ที่ได้มีค่าน้อยกว่า F-Critical จึงสรุปว่า เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ ไม่มีความแตกต่างกัน และความเข้มข้น MCL-PHAs ไม่มีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ซึ่งเซลล์ยังคงมีชีวิตรอด 100 %

4.3.2 ผลการทดสอบการยึดเกาะของเซลล์



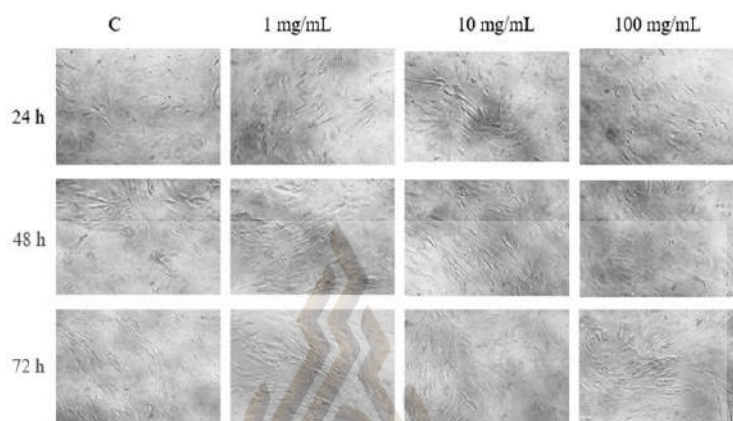
ก

ข

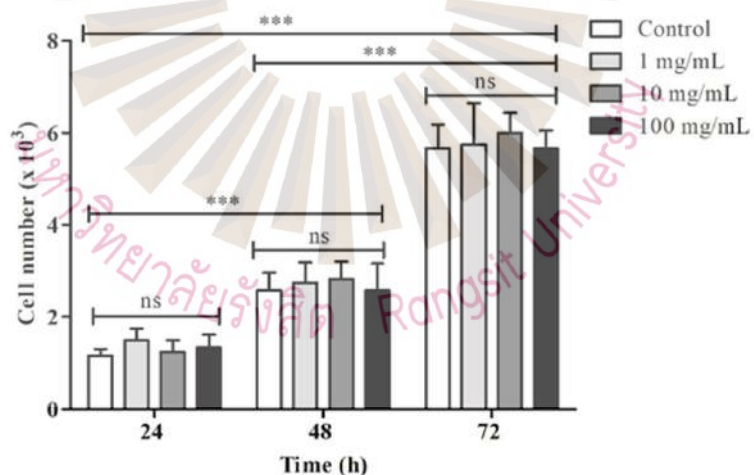
รูปที่ 4.11 ลักษณะของเซลล์ MSCs บนฟิล์ม MCL-PHA ผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า
(ก) ภาพก่อนย้อมคริสตัล ไวโอเลต (ข) ภาพหลังย้อมคริสตัล ไวโอเลต

รูปที่ 4.11 แสดงให้เห็นว่าเซลล์ MSCs สามารถยึดเกาะบนแผ่นฟิล์ม MCL-PHA ได้โดยรูปที่ 4.11 (ก) จะสามารถเห็นเซลล์เกาะอยู่บนแผ่นฟิล์ม โดยมีเส้นสีดำกั้นซึ่งเป็นบริเวณขอบขอบแผ่นฟิล์ม โดยบริเวณขอบแผ่นฟิล์มไม่มีเซลล์เกาะซึ่งบ่งบอกว่าพื้นผิวที่เซลล์ MSCs ยึดเกาะนั้นแตกต่างกันคือมีเซลล์บางส่วนเกาะบริเวณจานเลี้ยงเซลล์และอีกส่วนหนึ่งยึดเกาะบนแผ่นฟิล์ม MCL-PHA ในขณะที่รูป 4.11 (ข) แสดงการย้อมสีเซลล์ด้วยคริสตัล ไวโอเลตซึ่งสามารถบอกได้ถึงขอบเขตที่เซลล์ยึดเกาะซึ่งรูปแสดงให้เห็นว่าเซลล์สามารถเพิ่มจำนวนและกระจายเต็มแผ่นฟิล์ม MCL-PHA

4.3.3 ผลทดสอบการเพิ่มจำนวนของเซลล์



รูปที่ 4.12 ลักษณะของเซลล์ที่ได้รับการเลี้ยงโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่แฉ่ววัสดุพอลิเมอร์ MCL-PHA ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ



รูปที่ 4.13 ผลการนับจำนวนเซลล์ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ โดยความเข้มข้นของวัสดุพอลิเมอร์ MCL-PHA ไม่มีผลต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ ในขณะที่เซลล์มีการเพิ่มจำนวนตามเวลาที่เพิ่มขึ้นตามลำดับ (n=3, ns=Not Significant, *** = p < 0.001)

วัสดุพอลิเมอร์ MCL-PHA นำมาศึกษาผลกระทบต่อ การเพิ่มจำนวนของเซลล์ โดยใช้ความเข้มข้นสูง กลาง และต่ำ (1, 10, 100 มก/มล) ที่อ้างอิงมาจากการทดสอบความเป็นพิษ

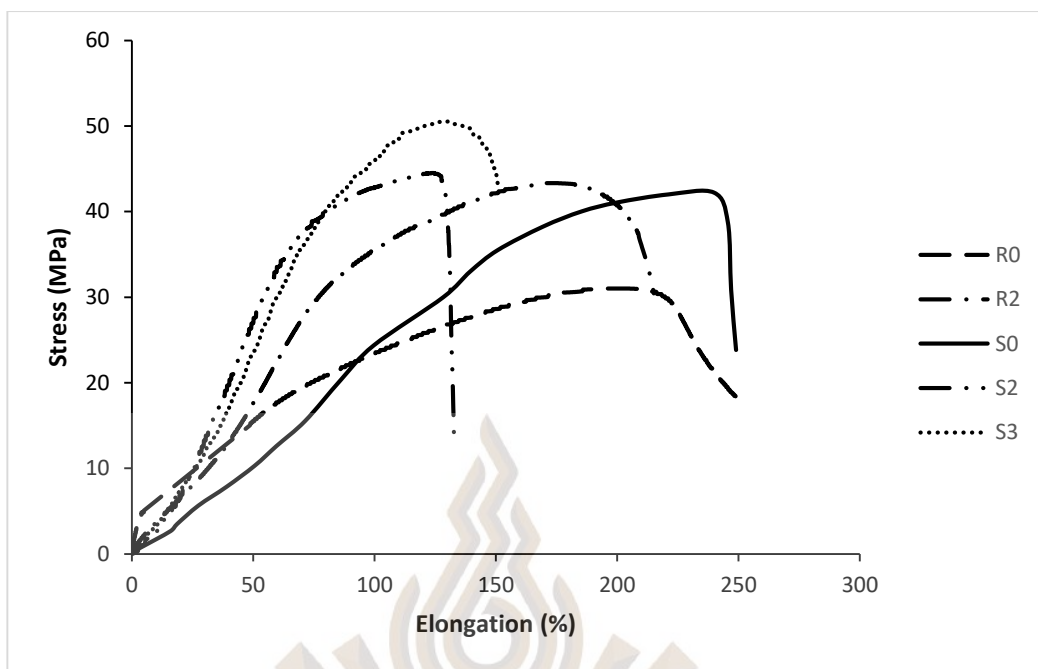
ของวัสดุพอลิเมอร์ MCL-PHA ต่อเซลล์ โดยทำการทดสอบที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อทำ
 นับจำนวนเซลล์และนำมาวิเคราะห์ด้วย Two-Way ANOVA พบว่าตัวแปรต้นในส่วนของความ
 เข้มข้นของ MCL-PHA ไม่มีความแตกต่างของจำนวนเซลล์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Not
 Significant) สรุปได้ว่าความเข้มข้นของ MCL-PHA ไม่มีผลต่อจำนวนของเซลล์ที่เพิ่มขึ้น เมื่อ
 พิจารณาตัวแปรเวลาพบว่าผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์เนื่องจากมีค่า F จากการคำนวณของ
 โปรแกรมที่มากกว่าค่า F-Critical ซึ่งสามารถบอกได้ว่ามีจำนวนเซลล์อย่างน้อย 2 กลุ่มในอย่างน้อย
 2 ช่วงเวลาที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เลขนัยสำคัญน้อยกว่า 0.001 ซึ่งสามารถบอกได้
 ว่าเซลล์มีการเพิ่มจำนวนขึ้นเมื่อระยะเวลาเปลี่ยนไปทำให้สามารถสรุปได้ว่า MCL-PHA ไม่มีผลต่อ
 การเพิ่มจำนวนของเซลล์ รูปที่ 4.12 และ 4.13

4.4 ผลการทดสอบแรงดึงของวัสดุที่ร้อยกับเส้นเอ็นมนุษย์

ผลการทดสอบคุณสมบัติเชิงกลของโครงร่างเส้นเอ็นแสดงค่ามอดุลัสของยัง เเปอร์เซ็นต์
 การยืดตัวและความเค้นสูงสุดของวัสดุในทุกสภาวะการทดสอบ โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ยของการ
 ทดสอบ 3 ตัวอย่างในแต่ละการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบคุณสมบัติเชิงกลของแต่ละสภาวะการทดสอบโครงร่าง MCL-PHA

รูปแบบการทดสอบ	คุณสมบัติเชิงกล			
	โครงร่างเส้นเอ็น	มอดุลัสของยัง (MPa)	เปอร์เซ็นต์ การยืดตัว (%)	ความเค้น สูงสุด (MPa)
สี่เหลี่ยมแบนทรงตัน (R0)		36.46±5.36	176.80±14.05	30.04±0.61
สี่เหลี่ยมแบนร้อยเส้นเอ็น (R2)		36.66±5.98	154.91±36.50	47.26±1.83
ทรงกระบอกทรงตัน (S0)		29.05±4.08	215.02±16.64	40.50±1.73
ทรงกระบอกร้อยเส้นเอ็น (2 รู) (S2)		27.46±2.68	132.27±16.18	47.10±0.24
ทรงกระบอกร้อยเส้นเอ็น (3 รู) (S3)		64.91±4.02	153.00±13.11	55.83±3.16
เส้นเอ็นผ่าเท้า		198.74	50.74	20.69



รูปที่ 4.14 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเค้นและเปอร์เซ็นต์การยืดตัวของโครงร่างเส้นเอ็นทุกสภาวะการทดสอบ

การทดสอบคุณสมบัติเชิงกลของโครงร่างเส้นเอ็นแต่ละสภาวะการทดสอบบ่งบอกถึงลักษณะของแรงที่แตกต่างกัน โดยตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.14 แสดงให้เห็นว่า MCL-PHA ที่มีรูปทรงสี่เหลี่ยมแบนตันมีค่าความเค้นสูงสุดน้อยที่สุดตามด้วยทรงกระบอกตันและจะสังเกตได้ว่าเมื่อร้อยเส้นเอ็นเข้าไปในโครงร่างความเค้นสูงสุดจะเพิ่มขึ้นแต่เปอร์เซ็นต์ในการยืดตัวน้อยลง ในโครงร่างเส้นเอ็นทรงกระบอกที่มีรู 3 รูได้ค่าความเค้นสูงสุดที่มากที่สุดที่ 55.83 ± 10.16 MPa อีกทั้งค่ายังมอดุลัสยังสูงที่สุดที่ 64.91 ± 4.02 MPa โดยคาดว่าอาจจะเป็นเพราะเส้นเอ็นและโครงร่างช่วยเสริมซึ่งกันและกันเมื่อร้อยให้เส้นเอ็นสัมผัสกับผิวชิ้นงานมากที่สุด

4.5 ผลการทดสอบการยึดเกาะของเซลล์

ภาพถ่ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เลี้ยงร่วมกับโครงร่างเส้นเอ็นผ่านกล้อง Inverted Microscope ที่กำลังขยาย 4 เท่า โดยรูปที่ 4.15 จะเป็นรูปเซลล์วันแรกที่เลี้ยงร่วมกับวัสดุ และรูปที่ 4.16 จะเป็นภาพวันที่ 7 ที่เลี้ยงเซลล์ร่วมกับวัสดุ

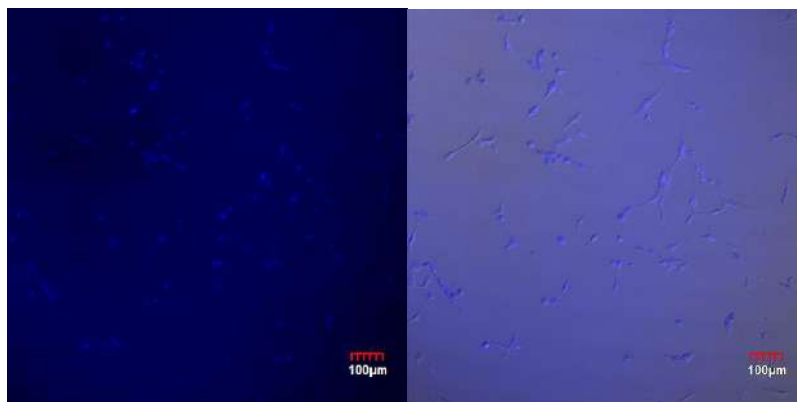


รูปที่ 4.15 เซลล์ไฟโบรบลาสต์วันที่ 1 ที่เลี้ยงร่วมกับวัสดุ (สีดำ)

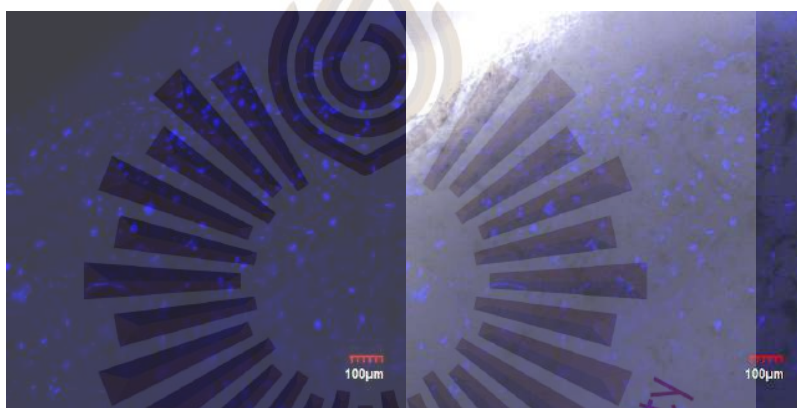


รูปที่ 4.16 เซลล์ไฟโบรบลาสต์วันที่ 7 ที่เลี้ยงร่วมกับวัสดุ

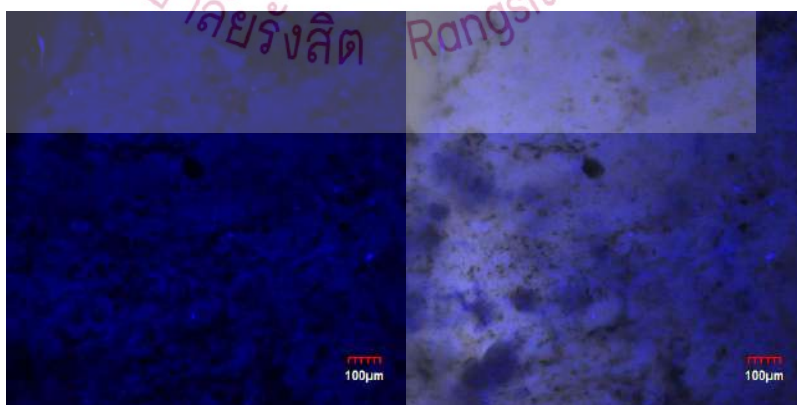
เมื่อเลี้ยงเซลล์ครบ 7 วันจึงนำโครงร่างเส้นเอ็นที่ผ่านการ fixation ไปย้อมสีเพื่อส่องผ่านกล้อง Inverted Confocal Laser Scanning Microscope โดยใช้สีย้อมคือ DAPI และ TO-PRO3 สำหรับการดูผ่านกล้องดังกล่าวจะทำการเปรียบเทียบเซลล์ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับโครงร่างเส้นเอ็นและวัสดุที่ไม่ผ่านการเลี้ยงเซลล์ด้วย



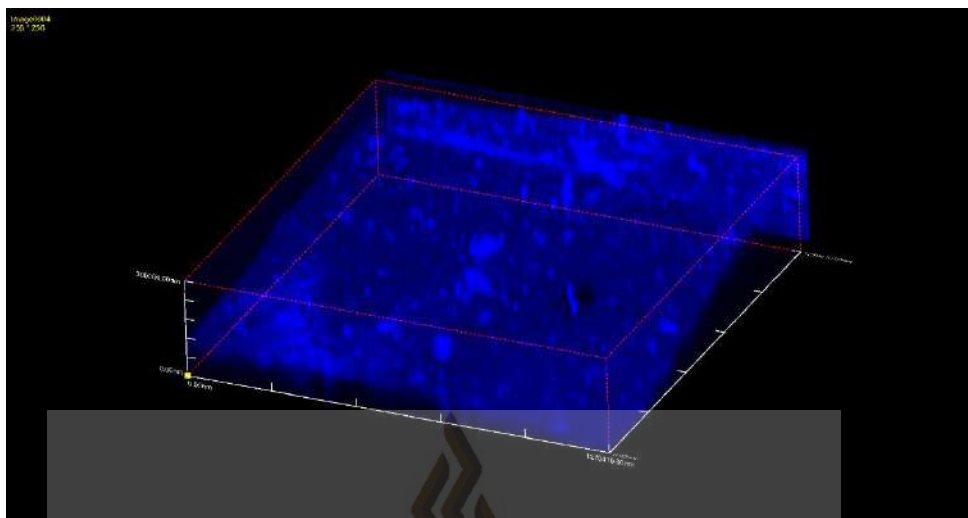
รูปที่ 4.17 เซลล์ที่ไม่ได้เล็งร่วมกับวัสดุย้อม DAPI ผ่าน Confocal Microscope



รูปที่ 4.18 อนุภาค MCL-PHA ที่เล็งร่วมกับเซลล์ย้อม DAPI ผ่าน Confocal Microscope

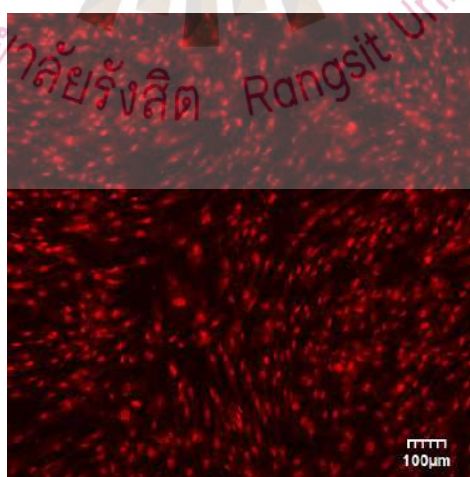


รูปที่ 4.19 วัสดุ MCL-PHA ที่ไม่ได้เล็งร่วมกับเซลล์ Confocal Microscope

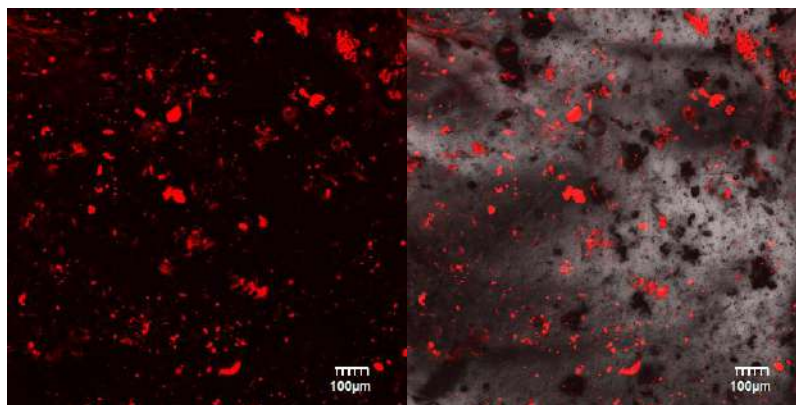


รูปที่ 4.20 รูป 3 มิติของวัสดุ MCL-PHA ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ย้อมด้วย DAPI ภายใต้กล้อง
Inverted Confocal Laser Scanning Microscope

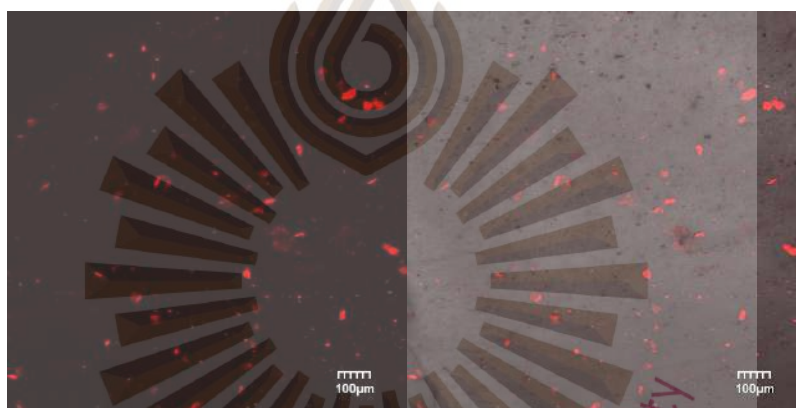
จากรูป 4.17 ถึง 4.20 เป็นภาพของวัสดุที่ใช้เลี้ยงเซลล์ วัสดุที่ไม่ได้ใช้เลี้ยงเซลล์และไฟโบรบลาสต์เซลล์ที่ย้อมด้วย DAPI ซึ่งจะย้อมติดนิวเคลียสของเซลล์จากรูป โครงเลี้ยงเซลล์ที่เลี้ยงร่วมกับเส้นเอ็นจะเห็นว่ามียูคิตีน้ำเงินเข้มปริมาณมากเมื่อเทียบกับวัสดุเปล่าที่ไม่มีเซลล์ และเมื่อสังเกตรูป 3 มิติของผิววัสดุจะเห็นว่ามียูคิตีน้ำเงินเข้มอยู่บนผิวของวัสดุซึ่งคาดว่าจะเป็เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน



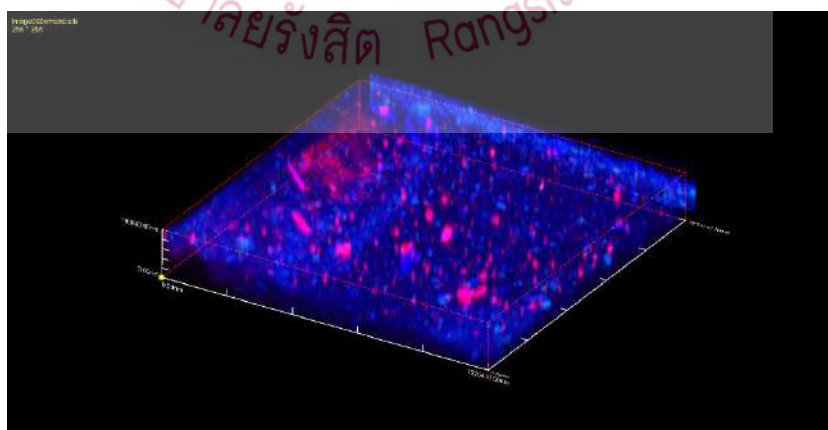
รูปที่ 4.21 เซลล์ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับวัสดุย้อม TO-PRO3 ผ่าน Confocal Microscope



รูปที่ 4.22 ภาพวัสดุ MCL-PHA ที่เรืองร่วมกับเซลล์ย้อม TO-PRO3 ผ่าน Confocal Microscope

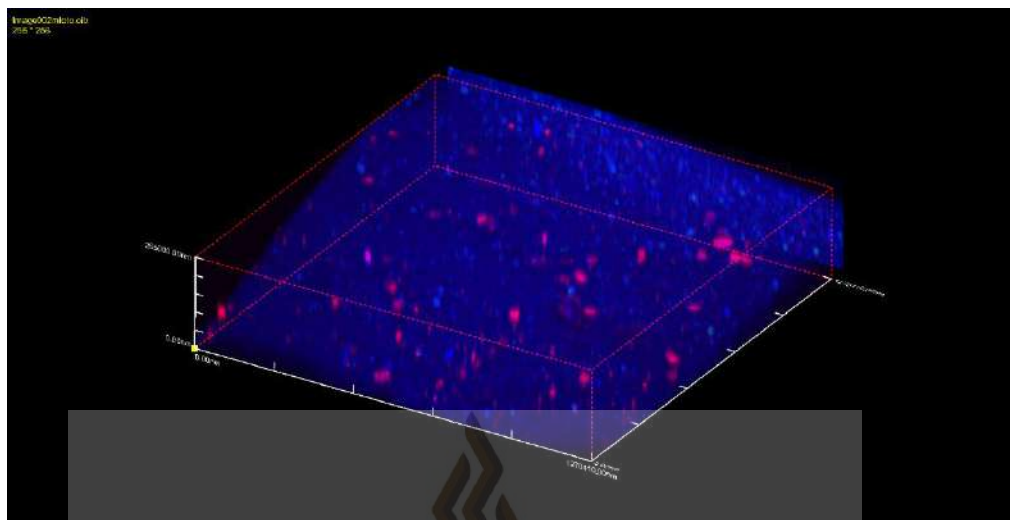


รูปที่ 4.23 ภาพวัสดุ MCL-PHA ที่ไม่ได้เรืองร่วมกับเซลล์ย้อม TO-PRO3 ผ่าน Confocal Microscope



รูปที่ 4.24 รูป 3 มิติของวัสดุ MCL-PHA ที่เรืองร่วมกับเซลล์ย้อมด้วย TO-PRO3 ภายใต้กล้อง

Inverted Confocal Laser Scanning Microscope



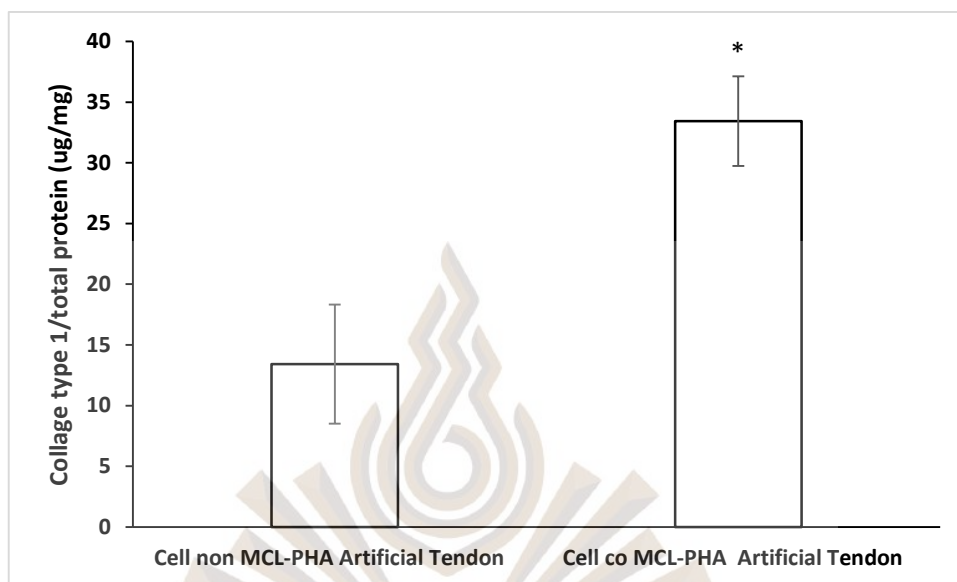
รูปที่ 4.25 รูป 3 มิติของวัสดุ MCL-PHA ที่ไม่มีเซลล์ภายใต้กล้อง
Inverted Confocal Laser Scanning Microscope

จากผลการย้อมด้วย DAPI และส่องผ่านกล้อง Inverted Confocal Laser Scanning Microscope จะสังเกตเห็นว่าผิวของวัสดุนั้นสามารถเรืองแสงสีน้ำเงินได้จึงอาจทำให้ยากต่อการแยกเซลล์ที่อยู่บนวัสดุจึงมีการย้อมด้วยสี TO-PRO3 ซึ่งจะเป็สีแดงที่ย้อมติดนิวเคลียสของเซลล์ โดยภาพที่ 4.21 ถึง 4.23 เป็นภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับโครงร่างเส้นเอ็น โครงร่างเส้นเอ็นที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์และโครงร่างเส้นเอ็นที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับเซลล์ที่ย้อมด้วย TO-PRO3 จะเห็นว่ารูปโครงร่างเส้นเอ็นที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์มีสีแดงติดอยู่เช่นเดียวกับเซลล์ปกติ แต่ในโครงร่างเส้นเอ็นที่ไม่มีเซลล์ก็มีสีแดงติดด้วยเช่นกัน อาจเกิดมาจากการเรืองแสงสีแดงของวัสดุหรือสีย้อมทำปฏิกิริยากับสารบางชนิด อย่างไรก็ตามเมื่อสังเกตรูปที่ 4.24 และ 4.25 ซึ่งเปรียบเทียบระหว่างรูป 3 มิติของโครงร่างเส้นเอ็นที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์และโครงร่างเส้นเอ็นที่ไม่มีเซลล์จะเห็นว่าโครงร่างเส้นเอ็นที่ไม่มีเซลล์ที่ไม่มีเซลล์มีสีแดงติดน้อยกว่า จากการทดสอบดังกล่าว อาจจะต้องมีการทดสอบยืนยันว่ามีเซลล์ยึดเกาะอยู่บนผิววัสดุจริงหรือไม่

4.6 ผลการวัดการสร้างคอลลาเจนของเซลล์บนโครงร่าง MCL-PHA

การตรวจสอบปริมาณของคอลลาเจนชนิดที่ 1 ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของการฟื้นฟูเส้นเอ็น ได้มีการเปรียบเทียบระหว่างการวัดเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่

สกัดจากพื้นผิวของโครงร่างเส้นเอ็น MCL-PHA กับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ถูกเลี้ยงในงานเพาะเซลล์ตามปกติ



รูปที่ 4.26 ปริมาณคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่สกัดจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์เปรียบเทียบระหว่างคอลลาเจนที่สกัดจากพื้นผิวของโครงร่าง MCL-PHA กับคอลลาเจนที่ได้จากเซลล์ที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับ MCL-PHA (n=3,p<0.05,*=significant).

รูปที่ 4.26 แสดงให้เห็นความแตกต่างของปริมาณคอลลาเจนที่สกัดได้จากทั้ง 2 สภาวะ โดยอัตราปริมาณคอลลาเจน 1 ไมโครกรัมต่อโปรตีน 1 มิลลิกรัม เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่สกัดจากพื้นผิวโครงร่างเส้นเอ็น MCL-PHA มีปริมาณที่สูงกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ผลที่ได้บ่งบอกว่าโครงร่างเส้นเอ็นที่ขึ้นรูปด้วย MCL-PHA ไม่มีผลต่อการยับยั้งการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 อีกทั้งยังมีอัตราการสร้างคอลลาเจนที่สูงกว่าการสร้างคอลลาเจนของเซลล์ในสภาวะปกติซึ่ง อาจเกิดขึ้นเพราะพื้นผิวของวัสดุที่ไม่ใช่โปรตีนทำให้การเคลื่อนที่ของเซลล์มีอัตราที่ต่างจากการเลี้ยงเซลล์บนงานเพาะเซลล์ที่มีการเคลือบโปรตีนบนพื้นผิวซึ่งทำเซลล์มีการเคลื่อนที่ได้ดีกว่า MCL-PHA คอลลาเจนที่ถูกสร้างขึ้นบน MCL-PHA อาจเกิดขึ้นจากการที่เซลล์พยายามเคลื่อนที่บนพื้นผิวของ MCL-PHA ทำให้สร้างคอลลาเจนขึ้นในปริมาณที่มากกว่า (Salvatore et al., 2020) การที่คอลลาเจนชนิดที่ 1 ถูกสร้างขึ้นในปริมาณมากจะช่วยส่งเสริมการฟื้นฟูเนื้อเยื่อเส้นเอ็นให้กลับมาสมบูรณ์ได้เร็วยิ่งขึ้น

4.7 การแยกส่วน MCL-PHA

คุณสมบัติเชิงกลของ MCL-PHA ที่ขึ้นรูปเป็น โครงร่างเส้นเอ็นเป็นสิ่งที่สำคัญต่อการนำไปคอมโพสิตกับเส้นเอ็นเพื่อใช้งานได้จริง ซึ่งจะต้องมีคุณสมบัติเชิงกลใกล้เคียงกับเส้นเอ็นมือ ความเครียดที่ไม่เป็นเชิงเส้นเช่นเดียวกับเส้นเอ็นแต่การควบคุมให้คุณสมบัติเชิงกลเข้าใกล้กับคุณสมบัติที่ต้องการตั้งแต่ขั้นตอนการผลิตนั้นเป็นเรื่องที่ยาก MCL-PHA ที่ผลิตและขึ้นรูปอาจจะมีคุณสมบัติที่ไม่สอดคล้องกับเส้นเอ็นมือต้องการจะคอมโพสิต จึงต้องมีการปรับปรุงคุณสมบัติของ MCL-PHA ให้มีความหลากหลายเพื่อตัวเลือกในการนำไปใช้งานในกรณีที่เกิดปัญหาดังกล่าว โดยการปรับปรุงคุณสมบัติ MCL-PHA ที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือการแยกส่วน MCL-PHA ดังวิธีที่ได้กล่าวในบทที่ 3 ของงานวิจัยนี้ โดยได้ผลการแยกส่วน MCL-PHA ดังตารางที่ 4.4

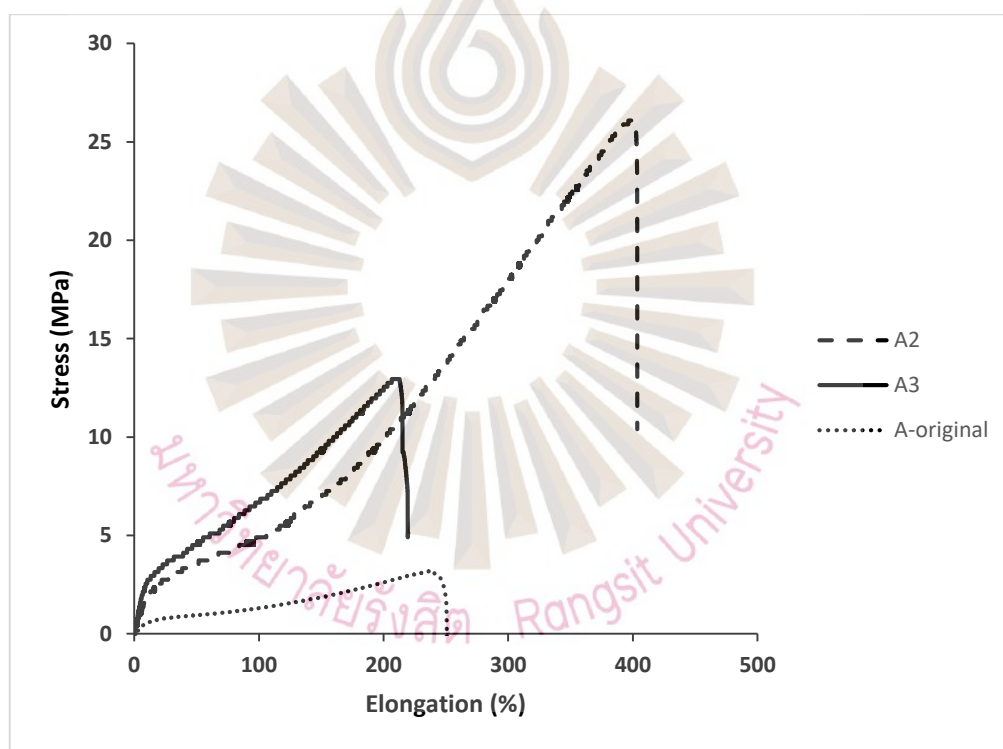
ตารางที่ 4.4 สัดส่วนของ MCL-PHA ที่ได้จากการแยกส่วนที่ความเข้มข้นเมทานอลที่แตกต่างกัน

Fraction	ความเข้มข้นของเมทานอล	น้ำหนัก	ปริมาณ
MCL-PHA	(%)	MCL-PHA (g)	MCL-PHA (%)
A- original	-	2.5 g	100
A1	47.5	0.084	3.36
A2	50.0	0.96	38.40
A3	55	0.86	34.4
A4	62.5	0.596	23.84

ตารางที่ 4.4 แสดงปริมาณของ MCL-PHA ที่ได้จากการแยกส่วน MCL-PHA 2.5 g โดยมีตะกอนที่ถูกแยกออกมาจากการเปลี่ยนระดับความเข้มข้นของเมทานอลที่ใช้รองรับสารละลาย MCL-PHA ที่ละลายในคลอโรฟอร์มได้ MCL-PHA จากการแยกส่วน 4 ส่วนตั้งชื่อเป็นรหัส A1 ถึง A4 โดยปริมาณ MCL-PHA ที่แยกออกมาได้มากที่สุดคือความเข้มข้นเมทานอล 50% ตามด้วย 55% 62.5% และ 47% ตามลำดับ MCL-PHA ที่แยกออกมาจะได้รับการตรวจสอบเพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของคุณสมบัติต่าง ๆ ตามลำดับ

ตารางที่ 4.5 ผลคุณสมบัติเชิงกลจากการทดสอบแรงดึงของฟิล์ม MCL-PHA ที่แยกส่วนเทียบกับ MCL-PHA ดั้งเดิมที่สังเคราะห์ได้

ฟิล์ม MCL-PHA	คุณสมบัติเชิงกล		
	มอดุลัสของยัง (MPa)	เปอร์เซ็นต์การยืดตัว (%)	ความเค้นสูงสุด (MPa)
A-original	20.07±3.64	217.85±28.82	6.05±1.33
A2	21.01± 1.91	391.79±80.04	28.83±5.45
A3	26.35± 2.56	132.27±16.18	13.53±10.20



รูปที่ 4.27 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเค้นและเปอร์เซ็นต์การยืดตัวของ MCL-PHA ที่ทำการแยกส่วน

ตารางที่ 4.5 แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติเชิงกลของ MCL-PHA ที่สังเคราะห์ได้ (A-original) กับ MCL-PHA ที่ทำการแยกส่วนซึ่งทดสอบได้แค่ A2 และ A3 เนื่องจากปริมาณของ MCL-PHA ที่แยกส่วนได้ไม่เพียงพอต่อการทดสอบแรงดึง เมื่อพิจารณาค่าที่ได้จากการทดสอบบ่งบอกว่า

คุณสมบัติเชิงกลของแต่ละส่วนที่ถูกแยกกับ MCL-PHA ดังเดิมมีความแตกต่างกัน โดยค่าความเค้นสูงสุดของฟิล์ม MCL-PHA A2 มีค่าสูงที่สุด อีกทั้งยังมีเปอร์เซ็นต์ยึดตัวที่มากกว่า โดยส่วนของ MCL-PHA มีลักษณะของความสัมพันธ์ของความเค้นและความเครียดที่ไม่เป็นเชิงเส้นเหมือนกับ MCL-PHA ดังเดิมสังเกตได้จากรูปที่ 4.27



บทที่ 5

สรุปผลงานวิจัย

5.1 สรุปและอภิปรายผลงานวิจัย

การผลิต MCL-PHA สำหรับการขึ้นรูป โดยทำการสังเคราะห์เชื้อแบคทีเรียในถังหมักชีวภาพขนาด 300 ลิตร โดยการผลิตได้มีการเปรียบเทียบผลการผลิตกับการสังเคราะห์กับถังหมักในห้องปฏิบัติการขนาด 5 ลิตร ซึ่งใช้กรรมวิธีการผลิตรูปแบบเดียวกันแตกต่างกันแค่แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในระดับ 5 ลิตรจะใช้กลีเซอรอลผสมกับโซเดียมออกทานาเอตแต่การผลิตในระดับ 300 ลิตรจะใช้แค่กลีเซอรอลเพียงอย่างเดียว จากผลการติดตามเก็บตัวอย่างในระหว่างการสังเคราะห์ซึ่งได้มีการนำมาตรวจสอบความหนาแน่นของเชื้อแบคทีเรียในถังหมักรวมทั้งวัดค่าความหนาแน่นของแสงของแสงเพื่อคาดการณ์การผลิต MCL-PHA จากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของพารามิเตอร์ดังกล่าวซึ่งบ่งบอกว่าแบคทีเรียสามารถแบ่งจำนวนเพื่อผลิต MCL-PHA ได้มากยิ่งขึ้น กราฟความสัมพันธ์ของเวลาในการสังเคราะห์กับความหนาแน่นของเซลล์และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนซึ่งเป็นรูปแบบการสังเคราะห์แบบกึ่งกะ (Tanadchangsang & Yu, 2012) แสดงเฟสที่แบคทีเรียเติบโตแบบปกติ เมื่อเปรียบเทียบผลการผลิตพบว่า MCL-PHA ที่สกัดจากถังหมักชีวภาพ 300 ลิตรมีปริมาณใกล้เคียงกับถังหมักในห้องปฏิบัติการ โดยมีสัดส่วนของ MCL-PHA น้อยกว่าเล็กน้อยแต่เมื่อเทียบปริมาณที่ได้จากการผลิตทั้งหมด การสังเคราะห์ในระดับโรงงานต้นแบบให้ผลผลิตที่มากเพียงพอต่อการนำไปใช้ในการขึ้นรูปโครงสร้างเส้นเอ็น

การตรวจสอบคุณสมบัติเชิงความร้อนของ MCL-PHA ที่สกัดได้พบว่ามีอุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะแก้วอยู่ที่ -49 องศาเซลเซียส ซึ่งจะแข็งและเปราะในอุณหภูมิที่ต่ำมาก อุณหภูมิในการหลอมอยู่ในช่วง 50 ถึง 55 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิการหลอมที่ค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับพลาสติกทั่วไปซึ่งอาจจะทำให้ง่ายต่อการขึ้นรูปด้วยการหลอมเหลวทั้งแบบหล่อและการพิมพ์ 3 มิติ เพื่อตรวจสอบให้แน่ใจถึงช่วงอุณหภูมิที่ใช้งานได้โดยวัสดุไม่เกิดการสลายตัวทางความร้อน จึงได้ทำการตรวจวัดความเสถียรทางความร้อนซึ่งอุณหภูมิที่ทำให้น้ำหนักของพอลิเมอร์ MCL-PHA เริ่มลดลงคือ 263 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิที่สูงกว่าช่วงการใช้งานซึ่งอยู่ในช่วง 130 ถึง 140

องศาเซลเซียสสำหรับการพิมพ์ชีวภาพ 3 มิติ (Panaksri & Tanadchangsang, 2021) เนื่องด้วย MCL-PHA มีคุณสมบัติเป็นอีลาสโตเมอร์จึงมีค่าความเป็นผลึกที่ต่ำ จากการทดสอบ XRD มีค่าความเป็นผลึกเพียง 15.5% ชนิดของ MCL-PHA ที่ผลิตได้จากการนำไปตรวจสอบ NMR คือ (P(3HHx-co-3HO-co-3HD)) ประกอบไปด้วยมอนอเมอร์ที่มีความยาวสายโซ่ระดับกลาง 3 ชนิด 3HHx, 3HO, และ 3HD โดย 3HD เป็นชนิดที่ยาวที่สุดและเป็นองค์ประกอบหลักของ MCL-PHA ที่ผลิตได้ การตรวจสอบความเข้ากันได้กับเซลล์ของ MCL-PHA ที่ถูกผลิตขึ้น เพื่อยืนยันว่าวัสดุชนิดนี้สามารถนำไปสร้างเป็นโครงร่างเส้นเอ็นไม่มีอันตรายต่อเซลล์ ซึ่งผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า MCL-PHA ไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการรอดและเพิ่มจำนวนของเซลล์ MSCs อีกทั้งเซลล์ยังสามารถยึดเกาะบนพื้นผิวผิวของ MCL-PHA ฟิล์มที่ใช้ในการทดสอบได้

การขึ้นรูปโครงร่างเส้นเอ็นใช้วิธีการหล่อด้วยสารระเหยโดยเมื่อนำโครงร่างเส้นเอ็นที่ขึ้นรูปมาทดสอบคุณสมบัติเชิงกลใน โหมบของการทดสอบแรงดึง ลักษณะค่าคุณสมบัติเชิงกลของแต่ละสถานะมีการเกาะกลุ่มดังนี้ กลุ่มของโครงร่างเส้นเอ็นทรงตันทั้งทรงกลมและทรงกระบอกมีค่าความเค้นสูงสุดที่สัมพันธ์กันคือน้อยกว่าโครงร่างที่ถูกร้อยด้วยเส้นเอ็นมนุษย์อยู่ที่ 30.04 ± 0.61 และ 40.50 ± 1.73 ตามลำดับ โครงร่างเส้นเอ็นทรงสี่เหลี่ยมแบนที่ร้อยเส้นเอ็นมีค่าความเค้นใกล้เคียงกับโครงร่างเส้นเอ็นแบบทรงกระบอก 2 รู เท่ากับ 47.26 ± 1.83 และ 47.10 ± 0.24 MPa ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาในแง่ของเปอร์เซ็นต์การยึดตัวพบว่ามีค่าที่น้อยลง ซึ่งอาจเกิดจากการขาดบริเวณร้อยเส้นเอ็นซึ่งมีพื้นที่หน้าตัดที่ไม่สม่ำเสมอ อย่างไรก็ตามการร้อยเส้นเอ็นคอมโพสิตเข้ากับโครงร่างเส้นเอ็นสามารถยืนยันได้ว่าทำให้ความเค้นเพิ่มขึ้นซึ่งเมื่อทดสอบการร้อยเส้นเอ็นแบบ 3 รู ทำให้ค่าข้มอดูลัสเพิ่มขึ้นอีกทั้งค่าความเค้นสูงสุดมีค่ามากขึ้นเป็น 55.83 ± 10.16 MPa ทั้งที่จำนวนของรูเพิ่มขึ้น ซึ่งคาดว่า การเพิ่มจุดร้อยเส้นเอ็นส่งผลต่อการกระจายของแรงไปยังบริเวณอื่นได้มากขึ้นซึ่งทำให้โครงร่างเส้นเอ็นมีค่าความเค้นสูงสุดเพิ่มขึ้น การทดสอบแรงดึงของโครงร่างเส้นเอ็นที่ร้อยเส้นเอ็นมีค่าใกล้เคียงกับเส้นเอ็นมีมนุษย์ปกติทั้ง 3 รูปแบบที่ความเค้นสูงสุด 50 ถึง 100 MPa อีกทั้งจากกราฟความสัมพันธ์ของความเค้นและเปอร์เซ็นต์การยึดตัวมีลักษณะแบบไม่เป็นเชิงเส้นหรือไฮเปอร์อีลาสติกเช่นเดียวกับเส้นเอ็น (Robi et al., 2013) โดยถ้าจะพิจารณาในเชิงของรูปทรงการทดสอบโครงร่างเส้นเอ็นทรงกระบอกจะมีแนวโน้มที่ดีกว่าเนื่องจากใช้ปริมาณสารในการขึ้นรูปที่น้อยกว่า การทดสอบดังกล่าวยังแสดงให้เห็นว่าเส้นเอ็นที่ร้อยเข้ากับโครงร่าง MCL-PHA ที่ผลิตขึ้นมีการแบ่งภาระของแรงร่วมกัน ซึ่งสังเกตได้จากความเค้นสูงสุดหรือความแข็งแรงของเส้นเอ็นที่นำมาร้อยมีค่าน้อยกว่าเส้นเอ็นมีปกติและโครงร่างเส้นเอ็นแต่เมื่อคอมโพสิตร่วมกันกลับให้ค่าความแข็งแรงที่เพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามคุณสมบัติเชิงกลของเส้นเอ็นมนุษย์อาจ

เปลี่ยนแปลงไปได้เนื่องจากเส้นเอ็นมีคุณสมบัติยืดหยุ่นหนืดซึ่งเป็นผลมาจากปฏิกิริยาของคอลลาเจนและโปรตีโอไกลเคนภายในร่างกาย (Wang, Guo, & Li, 2012) ซึ่งอาจจะต้องตรวจสอบต่อไป

การยึดเกาะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์บนโครงร่างเส้นเอ็นได้ทำการตรวจสอบโดยส่งผ่านกล้อง Inverted Confocal Laser Scanning Microscope โดยย้อม DAPI เทียบลักษณะของเซลล์ปกติกับเซลล์บนผิววัสดุ และวัสดุที่ไม่มีเซลล์เกาะ ผลการย้อมแสดงให้เห็นจุดสีน้ำเงินเข้มบนผิววัสดุที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์เช่นเดียวกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่นำมาเปรียบเทียบกับซึ่งคาดว่าจะย้อมติดนิวเคลียสของเซลล์ที่ถูก fixation บนเส้นเอ็นอย่างไรก็ตามวัสดุที่ไม่มีเซลล์ติดก็มีแสงสีน้ำเงินเป็นจุดเล็ก ๆ ขึ้นบางส่วนจึงคิดว่าวัสดุจะเรืองแสงเมื่อดูผ่านกล้องส่งผลให้ไม่สามารถระบุแน่ชัดได้ 100% ว่าเป็นเซลล์ที่ก่อนอยู่บนผิววัสดุ จึงทำการย้อมด้วยสีย้อมที่่านการสแกนไม่ทำให้วัสดุเรืองแสงโดยย้อมด้วย TO-PRO3 ซึ่งเป็นสีย้อมที่ย้อมติดสีแดงและย้อมติดที่นิวเคลียสของเซลล์ (Bink et al., 2001) เช่นเดียวกับ DAPI (Tarnowski, Spinale, & Nicholson, 1991) ผลการย้อมแสดงจุดสีแดงบนผิววัสดุ MCL-PHA ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์แต่สีย้อมยังย้อมติดสีแดงในวัสดุที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับเซลล์ซึ่งคาดว่าจะมีการทำปฏิกิริยากับสารจำพวก โปรตีนบนผิววัสดุซึ่งอาจมาจากการสัมผัสในขั้นตอนการย้อม อย่างไรก็ตามการเปรียบเทียบในเชิงของรูป 3 มิติจะสังเกตเห็นสีแดงบนวัสดุที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับเซลล์เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

ในแง่ของการตรวจสอบปริมาณคอลลาเจนบนพื้นผิวของโครงร่างเส้นเอ็น MCL-PHA พบว่าปริมาณของคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่สกัดได้มีค่าสูงเป็น 2 เท่าของปริมาณคอลลาเจนที่ถูกสร้างขึ้นจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ปกติซึ่งแสดงให้เห็นว่าโครงร่างที่ขึ้นรูปจาก MCL-PHA ไม่มีผลต่อการยับยั้งการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 อีกทั้งยังกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 อีกด้วย ซึ่งอาจเป็นกระตุ้นเชิงกายภาพที่เกิดขึ้นจากการพยายามเคลื่อนที่บนพื้นผิวที่ไม่ใช่โปรตีนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ส่งผลให้เซลล์สร้างคอลลาเจนออกมาในปริมาณที่สูงกว่าสภาวะโดยทั่วไปของเซลล์ การสร้างคอลลาเจนที่เพิ่มขึ้นเป็นส่วนสำคัญต่อการฟื้นฟูและสร้างเนื้อเยื่อเส้นเอ็นขึ้นมาใหม่การศึกษาในครั้งนี้แสดงแนวทางในการฟื้นฟูเส้นเอ็นโดยใช้หลักการทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อแทนการปลูกที่เส้นเอ็นจากบริเวณข้างเคียงของคนไข้ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาบาดเจ็บซ้ำซ้อน โดยนำวัสดุ MCL-PHA ที่มีความยืดหยุ่นสูง มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ และมีความสามารถในการย่อยสลายในร่างกายมาประยุกต์ใช้งานซึ่งสามารถส่งเสริมความสามารถในการรับแรงทางกลและส่งเสริมการฟื้นฟูเส้นเอ็นขึ้นมาใหม่เหมาะสำหรับการนำไปพัฒนาต่อยอดในระดับสัตว์ทดลองและการทดลองในคนไข้ต่อไป

การแยกส่วน MCL-PHA เพื่อศึกษาคุณสมบัติของ MCL-PHA ที่แตกต่างออกไปเพื่อเป็นตัวเลือกในการนำไปใช้งาน โดยแยกส่วนพอลิเมอร์ 2.5 กรัมได้ผลจากการแยกส่วน MCL-PHA 4 ส่วนซึ่งเป็นมาจากความเข้มข้นของเมทานอลที่ใช้ในการเปลี่ยนความสามารถในการละลายของ MCL-PHA แต่ละส่วนให้ลดลงและค่อยๆ ตกตะกอนออกมาทีละส่วน (Chen et al., 2009) ปริมาณของ MCL-PHA ที่แยกออกมาได้มากที่สุดอยู่ที่ความเข้มข้นของเมทานอล 50% ตามด้วย 55% 62.5% และ 47.5% ตามลำดับ จากผลการทดลองจะเห็นว่าปริมาณ MCL-PHA ที่ได้ไม่ได้มีความสัมพันธ์กันตามความเข้มข้นของ MCL-PHA ที่เพิ่มขึ้น ผลการทดสอบคุณสมบัติเชิงกลของ MCL-PHA ที่ถูกแยกส่วนเทียบกับ MCL-PHA ดั้งเดิมแสดงให้เห็นว่าคุณสมบัติมีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม MCL-PHA ที่ความเข้มข้นเมทานอล 50% (A2) มีค่าความเค้นสูงกว่า MCL-PHA ดั้งเดิมที่สังเคราะห์ถึง 5 เท่า อีกทั้งความสามารถในการยืดตัวยังเพิ่มขึ้นถึง 2 แต่มีค่ามอดูลัสของยังที่ใกล้เคียงกัน ในขณะที่ MCL-PHA ที่แยกได้จากความเข้มข้น 55% (A3) มีค่าความเค้นสูงสุดที่มากกว่า MCL-PHA ดั้งเดิมแต่มีค่าน้อยกว่า MCL-PHA A2 และมีค่าเปอร์เซ็นต์การยืดตัวที่น้อยกว่า ทั้ง MCL-PHA แบบดั้งเดิมและ MCL-PHA A2 จะสังเกตเห็นได้ว่าคุณสมบัติที่ได้มีความแตกต่างกันอีกทั้งการเปลี่ยนความเข้มข้นในการแยกส่วนเพียงเล็กน้อยส่งผลต่อคุณสมบัติที่ต่างกันอย่างไม่มีสัมพันธ์ต่อกัน ซึ่งบ่งบอกถึงความสำคัญในการแยกส่วน MCL-PHA ที่เป็นวัสดุที่มีการกระจายของคุณสมบัติในช่วงที่กว้าง (Tanadchangsang, Tsuge, & Abe, 2010) ซึ่งกรรมวิธีดังกล่าวทำให้สามารถระบุถึงคุณสมบัติของ MCL-PHA ในช่วงที่แคบลงมาและสามารถนำไปประยุกต์ในงานด้านต่าง ๆ ได้หลากหลายยิ่งขึ้น ยกตัวอย่างเช่น MCL-PHA ที่แยกส่วนได้มีค่าความเค้นสูงสุดที่มากกว่า MCL-PHA ที่ใช้ทำโครงร่างเส้นเอ็นหลายเท่าในกรณีที่มีความแข็งแรงของวัสดุไม่เพียงพอยังสามารถใช้วัสดุดังกล่าวเป็นตัวเลือกได้หรืออาจประยุกต์ใช้กับเส้นเอ็นในตำแหน่งอื่นที่ต้องการความแข็งแรงเพิ่มขึ้นต่อไปได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองได้สรุปว่าโครงร่างเส้นที่คอมโพสิตกับเส้นเอ็นมนุษย์สามารถให้ค่าความแข็งแรงหรือความเค้นสูงที่ใกล้เคียงเส้นเอ็นมนุษย์มากที่สุด อย่างไรก็ตามเส้นเอ็นมีคุณสมบัติการยืดหยุ่นหนืดซึ่งมีปัจจัยเกี่ยวกับเหลวในร่างกายเข้ามาเกี่ยวข้องซึ่งอาจจะต้องทำการทดสอบคุณสมบัติเชิงกลในแง่ของการร้อยเส้นเอ็นและเลี้ยงร่วมกับเซลล์เพื่อให้เซลล์สร้างคอลลาเจนและสารที่เกี่ยวข้องออกมาซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติเชิงกลของวัสดุและอาจมีค่าแตกต่างไปจากเดิมได้

บรรณานุกรม

- Bink, K., Walch, A., Feuchtinger, A., Eisenmann, H., Hutzler, P., Höfler, H., & Werner, M. (2001). TO-PRO-3 is an optimal fluorescent dye for nuclear counterstaining in dual-colour FISH on paraffin sections. *Histochem Cell Biol*, 115(4), 293-299.
- Chen, S., Liu, Q., Wang, H., Zhu, B., Yu, F., Chen, G.-Q., & Inoue, Y. (2009). Polymorphic crystallization of fractionated microbial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates. *Polymer*, 50(18), 4378-4388.
- Chobchuenchom, W., & Tanadchangsang, N. (2019). *Production of Medium Chain Length Polyhydroxyalkanoates by Pseudomonas putida ATCC 47054 using glycerol and sodium octanoate as substrates*. Paper presented at the RSU International Research, Pathum Thani, Thailand.
- Debuissy, T., Pollet, E., & Avérous, L. (2017). Synthesis and characterization of block poly (ester-ether-urethane)s from bacterial poly (3-hydroxybutyrate) oligomers. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 55(11), 1949-1961.
- Drosse, I., Volkmer, E., Capanna, R., Biase, P. D., Mutschler, W., & Schieker, M. (2008). Tissue engineering for bone defect healing: An update on a multi-component approach. *Injury*, 39, S9-S20.
- Hands structure, function, bones, muscles & anatomy*. (2022). Retrieved October 26, 2022, from <https://www.online-sciences.com/medicine/hands-structure-function-bones-nerves-muscles-anatomy/>
- Kawakami, Y., Nonaka, K., Fukase, N., Amore, A. D., Murata, Y., Quinn, P., Huard, J. (2021). A Cell-free Biodegradable Synthetic Artificial Ligament for the Reconstruction of Anterior Cruciate Ligament in a Rat Model. *Acta Biomaterialia*, 121, 275-287.
- Kuncharin, P., Boonyagul, S., Tanadchangsang, N., & Tawonsawatruk, T. (2019, 19-22 Nov. 2019). *Design Simulation and Fabrication of 3D Bioprinting Artificial Tendon from Elastomer for Soft Tissue Composite*. Paper presented at the 2019 12th Biomedical Engineering International Conference (BMEiCON).

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Lee, S. H., Oh, D. H., Ahn, W. S., Lee, Y., Choi, J.-i., & Lee, S. Y. (2000). Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by high-cell-density cultivation of *Aeromonas hydrophila*. *Biotechnology and Bioengineering*, 67(2), 240-244.
- Lee, S. Y. (1996). Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*, 49, 1-14.
- Luengo, J., García, B., Sandoval, A., Carrasco, G., & Olivera, E. (2003). Bioplastics from microorganisms. *Current opinion in microbiology*, 6, 251-260.
- Maganaris, C.N., Narici, M.V. (2005). Mechanical Properties of Tendons. In: Maffulli, N., Renström, P., & Leadbetter, W.B. (eds), *Tendon Injuries*. London : Springer.
- Momeni, A., Grauel, E., & Chang, J. (2010). Complications After Flexor Tendon Injuries. *Hand Clinics*, 26(2), 179-189.
- Muschler, G. F., & Midura, R. J. (2002). Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, 395, 66-80.
- Muschler, G. F., Nakamoto, C., & Griffith, L. G. (2004). Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am*, 86(7), 1541-1558.
- O'Neil, B. A., Forsythe, M. E., & Stanish, W. D. (2001). Chronic occupational repetitive strain injury. *Canadian Family Physician*, 47(2), 311-316.
- Palatty, B. U., Raveendranath, V., & Manjunath, K. Y. (2015). Anatomical study of extensor tendons of medial four fingers in adults and fetuses-a cadaveric study. *People's Journal of Scientific Research*, 8(1), 1-13.
- Panaksri, A., & Tanadchangsaeng, N. (2021). Evaluation of 3D-Printing Scaffold Fabrication on Biosynthetic Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate Terpolyester as Biomaterial-Ink. *Polymers*, 13(14), 2222.
- Physicbaansuan*. (2016). Retrieved October 24, 2022, from <https://sites.google.com/a/spm18.go.th/physicbaansuan1/6-sphaph-smdul-laea-sphaph-yudhyun/6-4-sphaph-yudhyun>

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Rai, R., Yunus, D. M., Boccaccini, A. R., Knowles, J. C., Barker, I. A., Howdle, S. M., & Roy, I. (2011). Poly-3-hydroxyoctanoate P(3HO), a Medium Chain Length Polyhydroxyalkanoate Homopolymer from *Pseudomonas mendocina*. *Biomacromolecules*, *12*(6), 2126-2136.
- Rios-Diaz, A. J., Metcalfe, D., Singh, M., Zogg, C. K., Olufajo, O. A., Ramos, M. S., & Talbot, S. G. (2016). Inequalities in Specialist Hand Surgeon Distribution across the United States. *Plast Reconstr Surg*, *137*(5), 1516-1522
- Robi, K., Jakob, N., Matevz, K., & Matjaz, V. (2013). The physiology of sports injuries and repair processes. *Current issues in sports and exercise medicine*, 43-86.
- Tanadchangsang, N. (2014). Structure, chemomechanical properties and degradability of polyhydroxyalkanoates: A review. *Bull. Health Sci. Technol*, *12*, 9-21.
- Tanadchangsang, N., Tsuge, T., & Abe, H. (2010). Comonomer Compositional Distribution, Physical Properties, and Enzymatic Degradability of Bacterial Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy-4-methylvalerate) Copolyesters. *Biomacromolecules*, *11*(6), 1615-1622.
- Tanadchangsang, N., & Yu, J. (2012). Microbial synthesis of polyhydroxybutyrate from glycerol: Gluconeogenesis, molecular weight and material properties of biopolyester. *Biotechnology and Bioengineering*, *109*(11), 2808-2818.
- Tarnowski, B. I., Spinale, F. G., & Nicholson, J. H. (1991). DAPI as a useful stain for nuclear quantitation. *Biotech Histochem*, *66*(6), 297-302.
- Wang, J. H., Guo, Q., & Li, B. (2012). Tendon biomechanics and mechanobiology—a minireview of basic concepts and recent advancements. *Journal of hand therapy*, *25*(2), 133-141.

ภาคผนวก

การทดสอบเพิ่มเติมเกี่ยวกับการแยกส่วน MCL-PHA



การทดสอบเพิ่มเติมเกี่ยวกับการแยกส่วน MCL-PHA

วิทยานิพนธ์นี้ได้กล่าวถึงการแยกส่วน MCL-PHA ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งในการปรับปรุงคุณสมบัติของโครงร่างเส้นเอ็นให้มีคุณสมบัติเชิงกลที่เหมาะสมกับการนำไปใช้มากที่สุด ซึ่งได้กล่าวถึงผลการแยกส่วน MCL-PHA ได้เป็น 4 ส่วนที่มีปริมาณ MCL-PHA ต่างกันตามความเข้มข้นของเมทานอลที่ใช้ในการแยกส่วน อีกทั้งยังกล่าวถึงความสัมพันธ์ระหว่างความเค้นและความเครียดของ MCL-PHA ที่ถูกแยกส่วนในบางตัวอย่างซึ่งแสดงให้เห็นถึงความแข็งแรงและระยะการยืดตัวที่แตกต่างกันออกไป ในภาคผนวกนี้จะแสดงข้อมูลเพิ่มเติมของคุณสมบัติ MCL-PHA ที่ทำการแยกส่วนเพื่อเป็นข้อมูลประกอบการศึกษา

ผลการศึกษาค่าประกอบและน้ำหนักโมเลกุลของ MCL-PHA ที่ทำการแยกส่วน

Fraction of MCL-PHA	Mass fraction (wt%)	% PHA monomer (mol %) ^b			Molecular weight ^c	
		3HHx	3HO	3HD	M _w (kDa)	M _w /M _n
A-0 ^a	100	3%	34%	63%	79	2.3
A-1	3	0.7%	24.3%	75%	224	1.8
A-2	38	0.9%	28%	71.1%	97	1.5
A-3	35	2.5%	30.5%	67%	62	1.6
A-4	24	1%	32%	67%	39	1.6

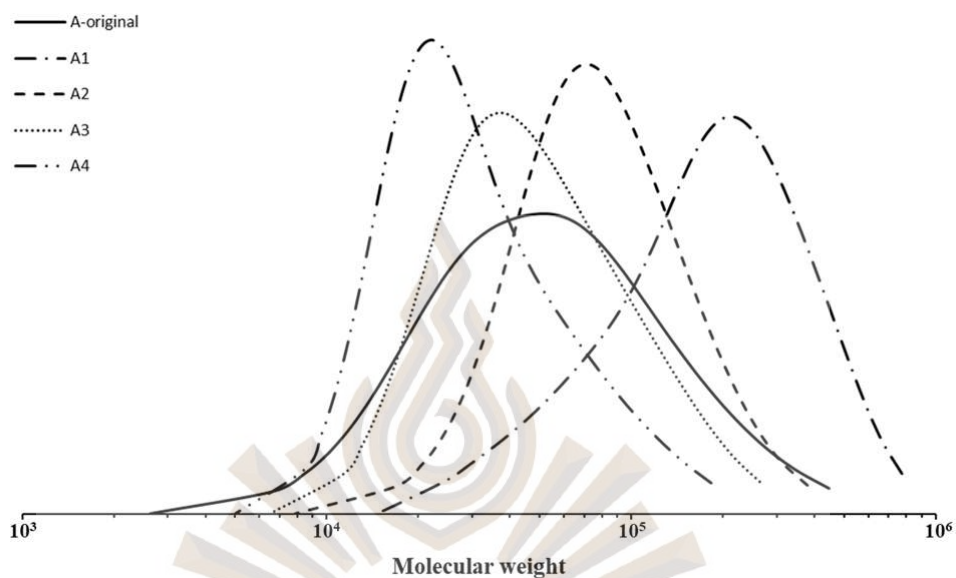
a As-produced MCL-PHA (2.5 g) or A-original.

b Determined by ¹³C NMR.

c Determined by GPC.

ตารางข้างต้นแสดงให้เห็นองค์ประกอบมอนอเมอร์ของ MCL-PHA ที่ผลิตได้และ MCL-PHA ที่ถูกแยกส่วนทั้ง 4 ส่วน โดย MCL-PHA ทั้งหมดประกอบด้วยมอนอเมอร์ 3HHx 3HO และ 3HD ซึ่งมีปริมาณแตกต่างกันตามลำดับของการแยกส่วน น้ำหนักโมเลกุลของ MCL-PHA ที่แยกส่วนมีความแตกต่างกันโดยส่วนของ MCL-PHA ที่ถูกแยกออกมาก่อน (A1) จะมีน้ำหนักโมเลกุลมากที่สุดและส่วน MCL-PHA อื่นๆ จะมีน้ำหนักโมเลกุลลดลงตามลำดับ ในขณะที่ดัชนีการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลมีค่าลดลง สามารถสังเกตได้จากกราฟการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลซึ่ง

MCL-PHA ที่ผลิตได้มีช่วงของกราฟการกระจายที่กว้างและจะแคบลงตามลำดับของส่วน MCL-PHA ที่ถูกแยกออกมา

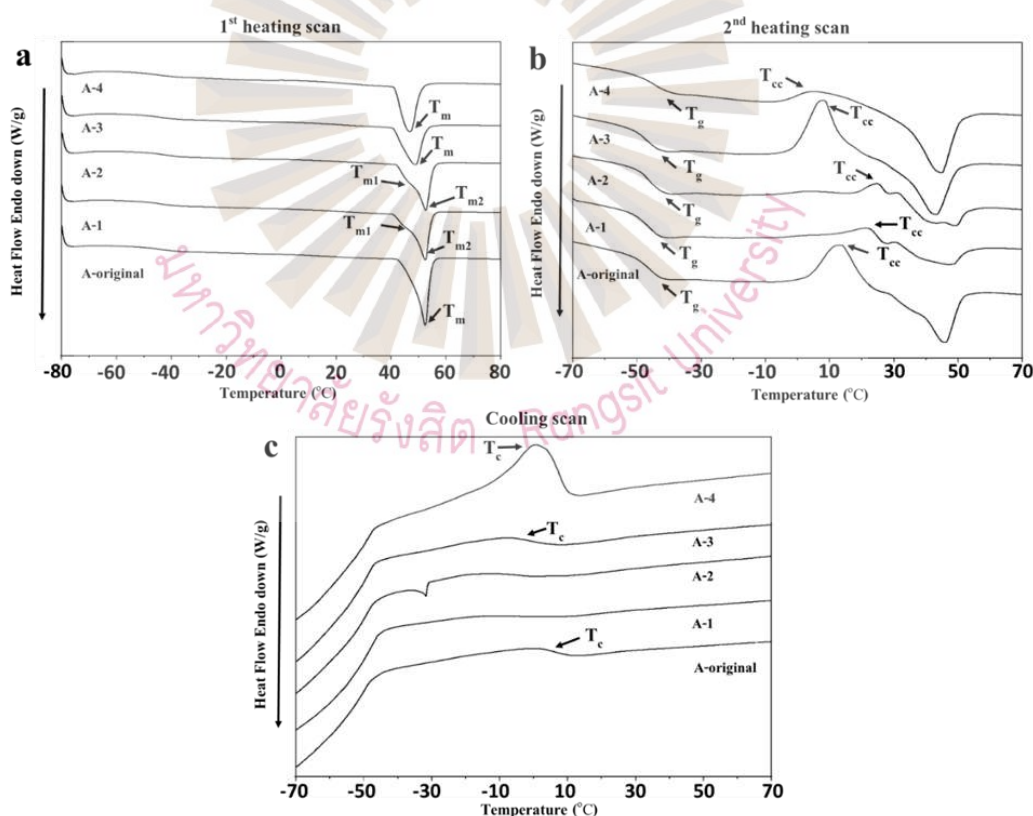


กราฟการกระจายตัวน้ำหนักโมเลกุลของ MCL-PHA ที่ผลิตได้ (A-0) เทียบกับ MCL-PHA ที่แยกส่วน (A1-A4)

ผลการตรวจสอบคุณสมบัติเชิงความร้อนและความเป็นผลึกของ MCL-PHA ที่ถูกแยกส่วน

คุณสมบัติทางความร้อนของตัวอย่างถูกประเมินร่วมกับองค์ประกอบโคมอนอเมอร์ ของ MCL-PHA ที่แยกส่วน ค่าเอนทัลปีที่ลดลงของ MCL-PHA ที่แยกส่วนบ่งบอกถึงพลังงานความร้อนที่ถูกใช้ในการเปลี่ยนสถานะวัสดุที่ลดลง อัตราส่วนของผลึกภายในโครงสร้างของวัสดุมีผลต่อการใช้พลังงานความร้อน อย่างไรก็ตามสัดส่วนผลึกของ MCL-PHA ที่แยกส่วนไม่ได้มีความแตกต่างกับ MCL-PHA ที่ผลิต เอนทัลปีของ MCL-PHA ที่ผลิตได้อาจเกิดขึ้นจากการดูดพลังงานของ MCL-PHA ผสมซึ่งมีองค์ประกอบของส่วน MCL หลายองค์ประกอบแตกต่างจากส่วนของ MCL-PHA ที่ถูกแยกออกมา พฤติกรรมการหลอมละลายแบบคู่ถูกพบในการแยกส่วน (A1 และ A2) ซึ่งแตกต่างจาก MCL-PHA ที่ผลิต ส่วน MCL-PHA A3 และ A4 อุณหภูมิการหลอมละลายเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของผลึกภายในโครงสร้างพอลิเมอร์ การเกิดฟิซของการหลอมละลายสองตำแหน่งจึงบ่งบอกถึงการเคลื่อนที่ของผลึกมากกว่าหนึ่งเฟสในโครงสร้าง เฟสของผลึกที่กล่าวถึงสัมพันธ์กับองค์ประกอบของ 3HD ที่เพิ่มขึ้นซึ่งจะกล่าวถึงภายหลัง MCL-PHA ที่ผลิตได้และ MCL-PHA ที่แยก

ส่วนมีค่า glass transition temperature (T_g) คงที่ ซึ่งบ่งชี้ว่าองค์ประกอบของ MCL-PHA โคมอนอเมอร์ไม่ส่งผลต่อ T_g พฤติกรรมการเกิดผลึกของ MCL-PHA ที่ผลิต และ MCL-PHA ที่แยกส่วนถูกสังเกตผ่านอุณหภูมิการก่อผลึก (T_c) ถูกตรวจสอบด้วย cooling scan $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ซึ่งพบฟีด การคายความร้อนใน MCL-PHA ที่ผลิต, A3 และ A4 fraction. A1 และ A2 fraction ไม่พบฟีดของการก่อผลึกใน cooling scan $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ซึ่งสัญญาณว่า semi crystalline พอลิเมอร์ ทั้ง 2 ส่วนมีอัตราการก่อผลึกที่ช้ากว่า MCL-PHA อื่น การพิจารณา cold crystallization (T_{cc}) ถูกตรวจสอบด้วย second heating scan ที่ $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ T_{cc} ถูกพบใน MCL-PHA ทุกตัวอย่างแต่เกิดในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน fraction A1 และ A2 มี T_{cc} ที่ใกล้เคียงกันในช่วงอุณหภูมิห้อง ในขณะที่ fraction A3 และ A4 มี T_{cc} ที่ใกล้เคียงกับ MCL-PHA ที่ผลิต พฤติกรรม cold crystallization ของ semi crystalline พอลิเมอร์ทั่วไปเกิดขึ้นที่อุณหภูมิสูงแต่ในกรณีของ MCL-PHA เกิดขึ้นที่อุณหภูมิต่ำหรือต่ำกว่าเพราะพฤติกรรมที่แตกต่างของ MCL-PHA พอลิเมอร์เกิดขึ้นจากคุณสมบัติออสโตเมอร์ซึ่งส่งผลให้เป็นพอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติคล้ายขางที่มี T_{cc} อยู่ที่อุณหภูมิต่ำหรือต่ำกว่า



กราฟความสัมพันธ์เชิงความร้อนของ MCL-PHA ที่ผลิตและ MCL-PHA ที่แยกส่วน (a) first heating scan (b) second heating scan และ (c) cooling scan

ตารางคุณสมบัติเชิงความร้อนและความเป็นผลึกของ MCL-PHA ที่แยกส่วน

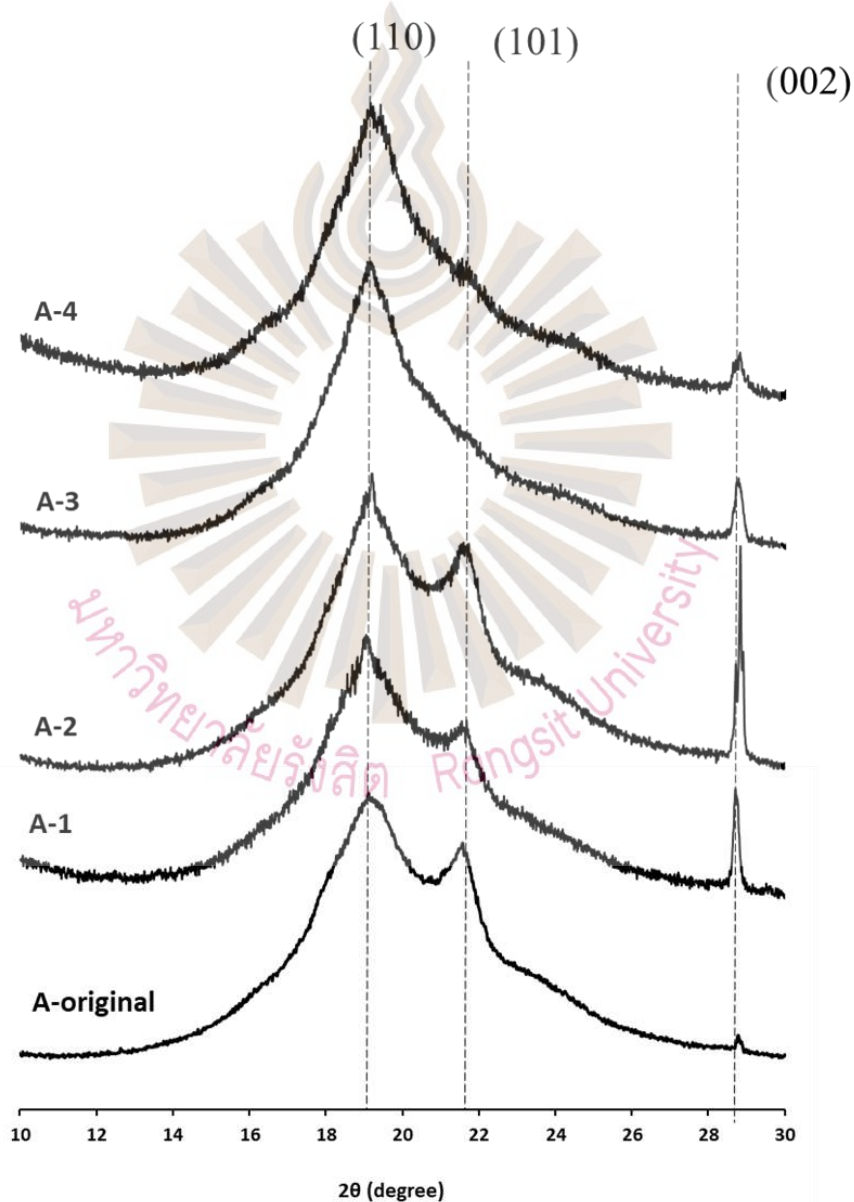
Fraction of MCL-PHA	% PHA monomer ^a			Thermal properties ^b					Crystallinity ^c
	3HHx	3HO	3HD	T _m (°C)	T _g (°C)	T _{cc} (°C)	T _c (°C)	ΔH _m (J/g)	X _c (%)
A-original	3.0%	34%	63%	52.3	-46.2	13.3	-4.8	25.3	17.3
A-1	0.7%	24.3%	75%	49.6, 52.5	-46.2	22.3	-	23.5	16.0
A-2	0.9%	28%	71.1%	48.7, 52.5	-47	24.6	-	22.8	15.6
A-3	2.5%	30.5%	67%	48.9	-47.7	8	-10.8	20.4	14.0
A-4	1.0%	32%	67%	46.7	-44.6	5	0.4	22.35	15.3

a Determined by ¹³C NMR.

b Determined by DSC.

c Determined by XRD.

ค่าความเป็นผลึกของ MCL-PHA sample มีความใกล้เคียงกันจากข้อมูลที่กล่าวไปข้างต้น. อย่างไรก็ตามคุณสมบัติของวัสดุไม่ขึ้นอยู่กับสัดส่วนของผลึกเพียงอย่างเดียว ตำแหน่งหรือจำนวนผลึกที่เกิดขึ้นใน โครงสร้างอาจมีผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพของพอลิเมอร์ได้เช่นกันซึ่งสังเกตได้จาก พฤติกรรมการหลอมละลายแบบคู่ของ fraction A1 และ A2 การวิเคราะห์รูปแบบของผลึกของ MCL-PHA fraction จึงถูกศึกษาเพื่อใช้ยืนยันความแตกต่างของจำนวนผลึกที่เกิดขึ้นภายใน โครงสร้างของวัสดุ

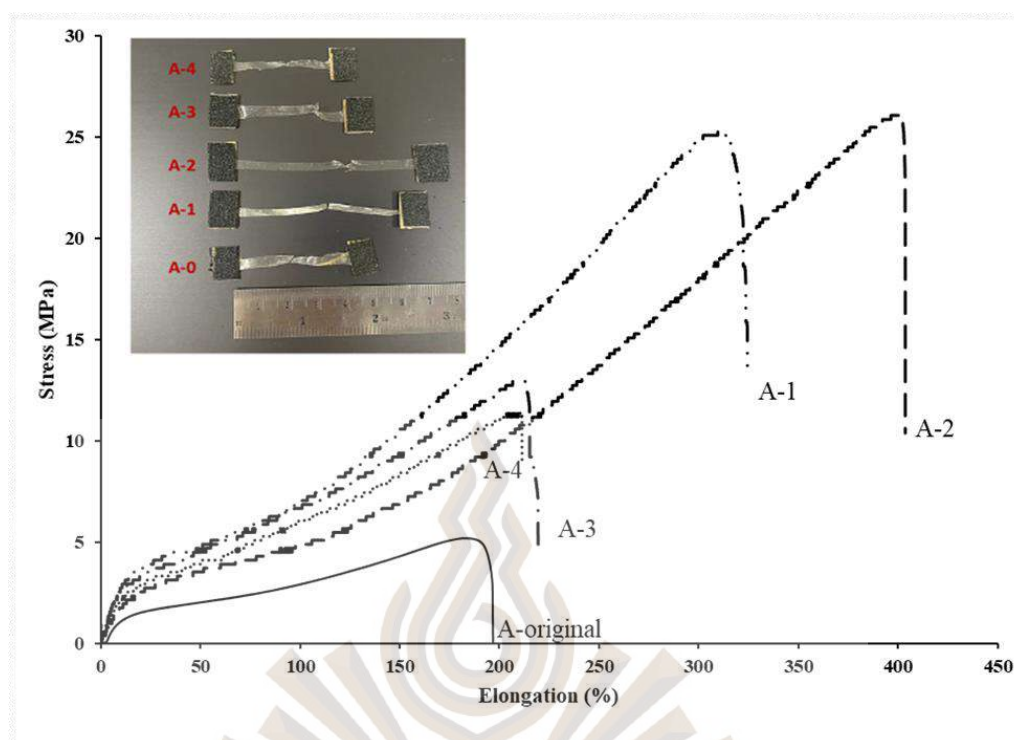


รูปแบบ X-ray diffraction ของ MCL-PHA ที่ผลิตเทียบกับ MCL-PHA ที่ถูกแยกส่วน

รูปแบบผลึกขององค์ประกอบ MCL-PHA co monomer ที่แตกต่างกันถูกประเมินจาก X-ray diffraction pattern. มุมการเลี้ยวเบนที่เกิดขึ้นจาก MCL-PHA sample ได้แก่ 19° , 21.5° และ 28.5° สอดคล้องกับ Miller Index ที่ (110), (101) และ (002) ตามลำดับ MCL-PHA original มีรูปแบบการเลี้ยวเบนที่ตำแหน่ง (110) และ (101) เป็นหลัก ในขณะที่ MCL-PHA fraction มีรูปแบบการเลี้ยวเบนที่แตกต่างกัน fraction A1 และ A2 เกิด peak ของการเลี้ยวเบนที่ (110), (101) และ (002) การเลี้ยวเบนที่ตำแหน่งดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า X-ray ถูกสะท้อนจากผลึกมากกว่า 1 ตำแหน่งในโครงสร้างซึ่งยืนยันได้จากความแตกต่างของมุมที่ถูกสะท้อน fraction A3 และ A4 ปรากฏ peak การเลี้ยวเบนที่ (110) เป็นหลัก ในขณะที่ peak การเลี้ยวเบนที่ (002) ลดลง. จากรูปของตำแหน่งการเลี้ยวเบนของ X-ray แสดงให้เห็นว่าบริเวณองค์ประกอบของผลึกส่วนรวมกันอยู่ที่ (110) ในขณะที่ตำแหน่ง (101) กลายเป็นออสันฐาน ข้อมูลรูปแบบการเลี้ยวเบนข้างต้นแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของสัดส่วนของ co monomer composition กับตำแหน่งของผลึกที่เกิดขึ้น. 3HD composition ที่เพิ่มขึ้นก่อให้เกิดผลึกใหม่ขึ้นที่ (002) ในขณะที่ fraction ที่มี 3HD composition ลดลง หรือเกิดการกระจายของสัดส่วน monomer ไปยัง 3HHx และ 3HO เพิ่มขึ้นส่งผลให้ peak การเลี้ยวเบนของรังสี X-ray ที่ตำแหน่ง (002) ลดลง สาเหตุการลดลงของ peak การเลี้ยวเบนของรังสี X-ray ที่เกิดขึ้นที่ตำแหน่ง (002) อาจเกิดจาก long alkyl side-chains ที่เพิ่มขึ้นของ fraction A3 และ A4 ซึ่งสัมพันธ์กับสัดส่วนของ monomer composition MCL-PHA original เกิดจากการผสมกันของ monomer composition ทั้ง 4 fraction ซึ่งครอบคลุมลำดับการเกิดพอลิเมอร์ไรเซชันนำไปสู่ระดับความเป็นผลึกที่ลดลง

คุณสมบัติเชิงกลของ MCL-PHA ที่ถูกแยกส่วน

คุณสมบัติเชิงกลของ MCL-PHA ที่แยกส่วนได้มีการนำเสนอในเนื้อหาเล่มวิทยานิพนธ์นี้แล้ว บางส่วน ภาคผนวกนี้จะเพิ่มข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับคุณสมบัติเชิงกลซึ่งในวิทยานิพนธ์ไม่ได้นำเสนอเกี่ยวกับการ MCL-PHA ใน ส่วน A1 และ A4 พร้อมทั้งอธิบายปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการข้อมูลผลการทดสอบคุณลักษณะของ MCL-PHA ที่กล่าวถึงก่อนหน้านี้



กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเค้นกับเปอร์เซ็นต์การยืดตัวของ MCL-PHA ที่ผลิตและ MCL-PHA ที่แยกส่วน

คุณสมบัติเชิงกลของ MCL-PHA sample (film) ถูกตรวจสอบเพื่อแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของคุณสมบัติที่ชัดเจนมากขึ้น ผลการเปรียบเทียบแสดงให้เห็นว่า fraction A1 และ A2 มีค่าความเค้นสูงสุดที่มากกว่า MCL-PHA original ถึง 5 เท่า เปอร์เซ็นต์การยืดตัวของ fraction A1 และ A2 มีค่าสูงกว่า original MCL-PHA 2 เท่า ในขณะที่มอดุลัสของยังใกล้เคียงกัน ความเค้นสูงสุดและเปอร์เซ็นต์การยืดตัวที่เพิ่มขึ้นของทั้ง 2 fraction มี 2 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องและสามารถใช้อธิบายพฤติกรรมที่เกิดขึ้น. องค์ประกอบของ 3HD ที่เพิ่มขึ้น เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อระยะยืดซึ่งเกิดจากความยาวของสายโซ่ด้านข้างที่เป็นส่วนอสัญฐานเพิ่มขึ้น ปัจจัยที่ 2 พิจารณาจากรูปแบบ XRD ซึ่งเกิดผลึกคู่ขึ้นใน โครงสร้างของ fraction A1 และ A2. ผลึกคู่ส่งผลต่อการแยกตัวของ block segment copolymer ซึ่งมีความไม่เข้ากันภายในโครงสร้าง ความแตกต่างของผลึกทั้ง 2 ส่งผลต่อระดับการต้านแรงที่แตกต่างกัน. พฤติกรรมดังกล่าวทำให้ความแข็งแรงภายในโครงสร้างเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ segment ออสัญฐานที่เกิดจากการแยกตัวยังส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การยืดตัวเพิ่มขึ้นด้วย MCL-PHA A3 และ A4 มีค่าเปอร์เซ็นต์การยืดตัวใกล้เคียงกับ MCL-PHA ดั้งเดิมแต่มีค่าความเค้นสูงสุดและมอดุลัสของยังที่มากกว่า MCL-PHA ดั้งเดิม โดยมีความเค้นสูงสุดเป็น 2 เท่า ของ A-original ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า fraction A3 และ A4 มีการต้านทานการเสีรูปทางกลที่ดีซึ่งอาจเกิดจากการ

อาศัยองค์ประกอบร่วมกันของ 3HO และ 3HD สังเกตได้จากรูปแบบผลึกที่เกิด peck การเลี้ยวเบนเพียงตำแหน่งเดียว ข้อมูลกล่าวถึงก่อนหน้านี้อ้างบอกว่า MCL-PHA มีคุณสมบัติเป็นอิลาสโตเมอร์ กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเค้นกับเปอร์เซ็นต์การยืดตัวของ MCL-PHA พิสูจน์ให้เห็นถึงความ เป็นไฮเปอร์อิลาสติกของ MCL-PHA ซึ่งมีช่วงของมอดูลัสของยังหลังการเสียรูปปรากฏขึ้น มอดูลัสของยังตำแหน่งที่ 1 หรือสภาพยืดหยุ่นก่อนการเสียรูปของวัสดุแทบจะไม่แตกต่างกันสังเกตจาก ตารางแสดงคุณสมบัติเชิงกล อย่างไรก็ตามความแตกต่างของคุณสมบัติเกิดขึ้นที่มอดูลัสของยัง ตำแหน่งที่ 2 หรือสภาพยืดหยุ่นหลังการเสียรูป Fraction A1 A2 และ A3 มีสภาพหยุ่นหลังการเสียรูป ที่สูงกว่า MCL-PHA ดั้งเดิม ในขณะที่ fraction A4 มีสภาพยืดหยุ่นหลังการเสียรูปใกล้เคียงกับ MCL-PHA ดั้งเดิม ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า MCL-PHA ที่ถูกแยกส่วนยังคงความเป็นอิลาสโต เมอร์อยู่แม้องค์ประกอบของโคพอลิเมอร์จะแตกต่างจาก MCL-PHA ดั้งเดิม อีกทั้งบาง fraction ยัง แสดงสมบัติที่ดีขึ้นกว่า MCL-PHA ดั้งเดิมอีกด้วย การรบกวนลำดับของพอลิเมอร์ที่เกิดจากการผสม กันของ PHA มอนอเมอร์ของแบคทีเรีย ส่งผลต่อการสร้างโคมอนอเมอร์แบบสุ่มที่คุณสมบัติ โดยรวมลดลง การแยกส่วนส่งผลต่อคุณสมบัติทางกลอย่างมากแสดงให้เห็นชัดใน fraction ที่เกิด ผลึกคู่ขึ้น (A1 และ A2 fraction) ผลึกคู่ภายใน โครงสร้างของวัสดุส่งผลให้ความแข็งแรงและ เปอร์เซ็นต์การยืดตัวสูงกว่า MCL-PHA ดั้งเดิมอย่างมาก เนื่องจากผลึกคู่มีองค์ประกอบของการ จัดเรียงตัวของสายโซ่พอลิเมอร์มากขึ้นซึ่งต้านการเคลื่อนที่แบบสุ่มของสายโซ่พอลิเมอร์เมื่อได้รับ แรงทางกล การแยกส่วนแสดงให้เห็นถึงกระบวนการที่สามารถปรับปรุงคุณสมบัติของ MCL-PHA ที่ ผลิตภัณฑ์ได้ ความหลากหลายของคุณสมบัติของ MCL-PHA สามารถเป็นทางเลือกในการนำไป ประยุกต์ใช้งานที่ตรงต่อความต้องการ.

Fraction of MCL-PHA	Mechanical properties			
	Young's modulus (MPa)	Hyper-elastic modulus (MPa)	Elongation at break (%)	Ultimate strength (MPa)
A-original	20.1 ± 3.6	2.7 ± 0.6	250 ± 6	3.3 ± 1.5
A-1	20.9 ± 1.5	11.3 ± 1.9	321 ± 10	24.7 ± 2.5
A-2	21.3 ± 1.5	8.9 ± 0.6	405 ± 11	26.3 ± 2.5
A-3	26.7 ± 1.5	7.8 ± 1.2	214 ± 5	12.7 ± 3.1
A-4	25.0 ± 2.6	5.4 ± 0.6	210 ± 8	10.7 ± 2.1

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ	อนุชาญ พนักศรี
วัน เดือน ปีเกิด	16 ตุลาคม 2540
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานครฯ ประเทศไทย
ประวัติการศึกษา	มหาวิทยาลัยรังสิต ปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิศวกรรมชีวการแพทย์,2563 ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมชีวการแพทย์,2565
ที่อยู่ปัจจุบัน	8/1 กรุงเทพมหานคร 37 ถนนกรุงเทพมหานคร แขวงสะพาน สูง เขตสะพานสูง กรุงเทพมหานคร ฯ

