

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การพัฒนาท่อนำเส้นประสาทชนิดใหม่สำหรับใช้เป็น
โครงยึดชั่วคราวในศัลยกรรมการสร้างใหม่ของ
เส้นประสาท

ผู้เขียน

นางสาวดลพร ดารานรงค์

ปริญญา

ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษา

ผศ.ดร. วินิตา บุญโยดม

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

ดร. โรเบิร์ต มอลลอย

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ผศ.ดร. วีระ วงศ์คำ

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

รศ.ดร. จอห์น ฟอสเตอร์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การใช้ท่อนำเส้นประสาทเป็นโครงยึดชั่วคราวสำหรับการรักษาการบาดเจ็บของเส้นประสาทส่วนปลายมีประโยชน์หลายประการ อย่างไรก็ตามในการทดสอบทางคลินิกแสดงให้เห็นว่าการทำงานของท่อนำเส้นประสาทบ่อยครั้งจะน้อยกว่าวิธีออตोगราฟโดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงรอยแผลยาวเมื่อเร็วๆ นี้มีความก้าวหน้าอย่างเห็นได้ชัดในการออกแบบท่อนำเส้นประสาทในแง่ของการออกแบบโครงสร้างโมเลกุล การสังเคราะห์และขึ้นรูป วัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยนี้คือ ทำการสังเคราะห์วิเคราะห์ลักษณะเฉพาะ ขึ้นรูป และศึกษาสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพของแผ่นเยื่ออิเล็กโทรสปินพอลิ(แอล-แลคไทด์-โค-เอปไซลอน-คาโพรแลคโตน) เบลนด์กับคอลลาเจน (PLCL – Col) และพอลิไฮดรอกซีบิวทาเรท (PLCL - PHB) ที่มีผลต่อการสนับสนุนเซลล์ในการงอกใหม่ของเส้นประสาท เทคนิคอิเล็กโทรสปินนิ่งถูกใช้ผลิตโครงสร้างเส้นใยนาโนที่เลียนแบบสารองค์ประกอบนอกเซลล์และสนับสนุนการยึดเกาะของเซลล์ สำหรับการซ่อมแซมอย่างมีประสิทธิภาพและวิศวกรรมเนื้อเยื่อประสาท

อิเล็กโทรสปินโคพอลิเมอร์ของแอล-แลคไทด์ และ เอปไซลอน-คาโพรแลคโตน (67:33 โมลเปอร์เซ็นต์) ให้ผลเป็นโครงสร้างเส้นใยนาโนที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเส้นใยเฉลี่ยและรูพรุน 476 ± 88 และ 256 ± 17 นาโนเมตร ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าการเบลนด์ด้วยคอลลาเจนในปริมาณที่ต่ำ (น้อยกว่า 2.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ลดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยและรูพรุนอย่างมี

นัยสำคัญ การกระจายตัวของเส้นผ่านศูนย์กลางเส้นใยเพิ่มเป็นระเบียบมากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณคอลลาเจน โครงสร้างเส้นใยนาโนส่งเสริมการยึดเกาะและเพิ่มจำนวนของเซลล์โอลแฟกทอรีอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ประพุดเป็นเซลล์ปกติ ยิ่งไปกว่านั้นการวิเคราะห์สุขภาพเซลล์ผ่านไมโทคอนเดรียแอททิวิตี การรั่วไหลของเยื่อหุ้มเซลล์ การศึกษาวัฏจักรเซลล์ และ อะพอพโทซิสแสดงให้เห็นว่าแผ่นเยื่อเส้นใยนาโนส่งเสริมความแข็งแรงของเซลล์โดยลดการตายของเซลล์ การศึกษาได้เสนอว่าการใช้คอลลาเจนปริมาณน้อยๆ มีประสิทธิภาพคือช่วยสนับสนุนการเปลี่ยนแปลงสถานะวิทยาของโครงสร้างเส้นใยนาโนอิเล็กโทรสปิน PLCL ช่วยสนับสนุนการยึดเกาะและการเพิ่มจำนวนเซลล์โอลแฟกทอรีและมีการส่งเสริมความแข็งแรงของเซลล์ ข้อสรุปในครั้งนี้จะสนับสนุนการศึกษาต่อไปของอิเล็กโทรสปินของพอลิเมอร์เบลนด์เหล่านี้ในการนำไปใช้เป็นที่สำหรับการซ่อมแซมเส้นประสาท นอกจากนี้แผ่นเยื่อเส้นใยของ PLCL - PHB ได้ถูกเตรียมสำเร็จขึ้นมาโดยวิธีอิเล็กโทรสปินนิ่งเช่นเดียวกัน เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับโครงสร้าง PLCL ที่เบลนด์ด้วย PHB ซึ่งทำให้การจัดเรียงเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยไม่เป็นระเบียบมากกว่า มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของเส้นใยมากกว่าแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในขนาดของรูพรุน โครงสร้างพอลิเมอร์เบลนด์มีความชอบน้ำมากกว่า (น้อยกว่า 120°) พร้อมความแข็งแรงทนไชน์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (ประมาณ 1 เมกะปาสกาล) เปรียบเทียบกับโครงสร้าง PLCL ($150.9 \pm 2.8^{\circ}$, 5.8 ± 0.5 MPa) การใส่ PLCL เพิ่มขึ้นในโครงสร้าง PHB เพิ่มการยึดที่จุดขาด (4-6 เท่า) โครงสร้าง PLCL-PHB สนับสนุนการยึดเกาะและการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์โอลแฟกทอรี (OECs) ดีกว่าเซลล์ปกติบนแผ่นเพาะเลี้ยง ไมโทคอนเดรียแอททิวิตีของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนแผ่นเยื่ออิเล็กโทรสปินเบลนด์มีค่าเพิ่มขึ้นเปรียบเทียบกับที่เติบโตบนโครงสร้าง PLCL และ PHB (212, 179 และ 153% ตามลำดับ) การวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่า PLCL-PHB คอมโพสิต ส่งเสริมการยึดเกาะและการเพิ่มจำนวนของ OECs เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนประกอบที่มี PLCL และ PHB อย่างเดียวชี้ให้เห็นถึงความสามารถในการซ่อมแซมอย่างมีประสิทธิภาพและวิศวกรรมของเนื้อเยื่อประสาทบนพื้นฐานของผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าแผ่นอิเล็กโทรสปินเบลนด์นี้ได้นำมาพิจารณาว่ามีศักยภาพในการสนับสนุนใช้เป็นโครงสร้างชั่วคราวสำหรับการงอกใหม่ของเส้นประสาทได้

สำหรับการทดสอบภายในร่างกายโดยแพทย์จากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ หนูตัวผู้เพศผู้จำนวน 20 ตัวได้ถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว แต่ละกลุ่มถูกทำไปทดสอบการซ่อมแซมเส้นประสาทด้วยวิธีที่ต่างกันสำหรับการศึกษาของการงอกใหม่ของเส้นประสาทหลังการสร้างพื้นฟู วิธีการทดลอง 2 วิธีประกอบด้วยกลุ่ม 1 ใช้ท่ออิเล็กโทรสปินที่มีรูพรุนคอลลาเจนผสมกับ PLCL โคพอลิเมอร์ กลุ่ม 2 ท่ออิเล็กโทรสปินรูพรุน PLCL โคพอลิเมอร์ (ไม่มีคอลลาเจน) ทั้ง 2

วิธีการนี้ถูกใช้ในการซ่อมแซมเส้นประสาทที่เบียดทับกันเป็นขนาด 7 มิลลิเมตรในหนู การประเมินผลของการงอกใหม่ของเส้นประสาทถูกเปรียบเทียบในเทอมของ The tibial functional index (TFI) Nerve conduction velocity (NCV) Gastrocnemius muscle weight (GMW) และการศึกษา Histomorphometric ในการศึกษานี้ พบหลักฐานของการงอกใหม่ของเส้นประสาทผ่านช่องว่างจากการศึกษา Histomorphometric ผลการทดสอบแสดงผลอย่างชัดเจนว่ามีการฟื้นฟูและกลับมาของฟังก์ชันในกลุ่มทั้งสอง อย่างไรก็ตามค่าการวัดในแต่ละครั้งไม่สามารถแสดงผลที่ดีที่สุดของการงอกใหม่ของเส้นประสาทในกรณีมีคอลลาเจนในพอลิเมอร์ในโมเดลนี้ สิ่งนี้แสดงว่าไม่มีความจำเป็นของการเติมคอลลาเจนในผนังท่อ ซึ่งอาจจะเกิดจากระยะห่างของช่องว่างสั้นเพียง 7 มม. ซึ่งไม่มีผลการกระตุ้นเพียงพอที่จะผลักดันให้เกิดความแตกต่างระหว่างสองกลุ่ม จึงต้องมีการปรับปรุงคุณสมบัติต่อไปก่อนที่ท่อเส้นประสาทจะได้รับการยอมรับสำหรับการใช้งานทางคลินิกในประเทศไทย

Thesis Title	Development of New Absorbable Nerve Guides for Use as Temporary Scaffolds in Reconstructive Nerve Surgery	
Author	Miss Donraporn Daranarong	
Degree	Doctor of Philosophy (Chemistry)	
Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Winita Punyodom	Advisor
	Dr. Robert Molloy	Co-advisor
	Asst. Prof. Dr. Weerah Wongkham	Co-advisor
	Assoc. Prof. Dr. John Foster	Co-advisor

ABSTRACT

Nerve guide conduits using as temporary scaffold in peripheral nerve repair have many advantages. However, clinical trials have shown that the use of nerve guide conduits is often inferior to that of autografts, particularly over long lesion gaps. Recently, there have been significant advances in the designs of nerve conduits in terms of molecular design, synthesis and fabrication. The main objective of this work has been to synthesis, characterization, fabrication and biocompatibility study of poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone) blended with collagen (PLCL-Col) and polyhydroxybutyrate (PLCL-PHB) electrospun membranes which support cells for enhancing nerve regeneration. Electrospinning has been used to produce nanofibrous scaffolds that stimulate the extracellular matrix and support cell attachment for the potential repair and engineering of nerve tissue.

Electrospun copolymer of L-lactide and ϵ -caprolactone (67:33 mol%) resulted in a nanofibrous scaffold with average fibre diameter and pore size of 476 ± 88 and 253 ± 17 nm, respectively. Blending with low loadings of collagen ($< 2.5\%$ w/w) significantly reduced the average diameter and pore size. The uniformity of fibre diameter distributions was supported with increasing collagen loadings. The nanofibrous scaffolds significantly promoted the attachment and proliferation of olfactory

ensheathing cells compared to cells exhibiting asynchronous growth. Furthermore, analysis of cell health through mitochondrial activity, membrane leakage, cell cycle progression and apoptotic indices showed that the nanofibrous membranes promoted cell vigour, reducing necrosis. The study suggests that the use of more cost-effective, low loadings of collagen supports morphological changes in electrospun poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone) (PLCL) nanofibrous scaffolds, which also support attachment and proliferation of olfactory ensheathing cells while promoting cell health. The results here support further investigation of the electrospinning of these polymer blends as conduits for nerve repair. The fibrous membranes of polyhydroxybutyrate (PHB) with various loadings of PLCL were also successfully prepared by electrospinning. In comparison to PLCL scaffolds, its blends with PHB exhibited more irregular fibre diameter distributions, higher average fibre diameters but no significant differences in pore size. PLCL-PHB scaffolds were more hydrophilic ($< 120^\circ$) with significantly reduced tensile strength (ca. 1 MPa) compared PLCL scaffolds ($150.9 \pm 2.8^\circ$, 5.8 ± 0.5 MPa). Increasing PLCL loading in PHB scaffolds significantly increased the extension at break, (4 - 6 fold). PLCL-PHB scaffolds supported greater adhesion and proliferation of Olfactory Ensheathing Cells (OECs) than those exhibiting asynchronous growth on culture plates. Mitochondrial activity of cells cultivated on the electrospun blended membranes was enhanced compared to those grown on PLCL and PHB scaffolds (212, 179 and 153 % respectively). Analysis showed that PLCL-PHB nanofibrous membranes promoted cell cycle progression and reduced the onset of necrosis. Thus, electrospun PLCL/PHB composites promoted adhesion and proliferation of OECs when compared to its individual PLCL and PHB components suggesting potential in the repair and engineering of nerve tissue. On the basis of these results, it is concluded that these electrospun blended have considerable potential using as temporary scaffold for nerve regeneration.

For *in vivo* testing by doctor at Faculty of Medicine Chiang Mai University, total of 20 male Wistar rats were divided into 2 groups of 10 and each group subjected to a different nerve repair procedure for evaluation of nerve regeneration after reconstruction. The 2 procedures involved the use of: Group 1: porous electrospun PLCL-Col conduit, Group 2: porous electrospun PLCL conduit. These 2 procedures

were used to repair 7 mm long segmentary tibial nerve lesions in rats. Evaluation of nerve regeneration was compared in terms of the tibial functional index (TFI), nerve conduction velocity (NCV), gastrocnemius muscle weight (GMW) and a histomorphometric study. There was evidence of nerve regeneration across the gap from the histomorphologic study. Our results clearly showed that there are reinnervation and return of function in both groups. Unfortunately every measurement is unable to show any superiority of nerve regeneration in collagen adding with polymer in this model. This may address the unnecessary collagen component of conduit wall. This may also cause by short 7 mm distance gap, which is not critical enough to stretch the different between both groups. Further property improvements need to be made before absorbable nerve guides can gain acceptance for clinical usage in Thailand.