ME-NETT23
The 23rd Conference of the Mechanical Engineering Network of Thailand

BME-008241

การประชุมวิชาการเครือข่ายวิศวกรรมเครื่องกลแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 23
4 – 7 พฤศจิกายน 2552 จังหวัดเชียงใหม่

คุณสมบัติทางกายภาพและทางกลของแผ่นฟิล์มคอลลาเจนภายใต้อิทธิพลของสารเชื่อมโยงพันธะ EDC/NHS

Characterization on Physical and Mechanical Properties of EDC/NHS Crosslinked Collagen Film

ฟ้าใส วิวัฒน์วงศ์วนา[1] และ สมชาย พัฒนา[1,2]*

[1] ศูนย์วิศวกรรมชีวการแพทย์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200
[2] ภาควิชาวิศวกรรมเครื่องกล คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200
*ผู้ติดต่อ: E-mail: spattana@chiangmai.ac.th, โทรศัพท์: (66) 53944146, โทรสาร: (66) 53944145

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ศึกษาผลของการเชื่อมโยงพันธะแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ชีวภาพที่ผลิตจากคอลลาเจนด้วย 1-ethyl-3-3-dimethylaminopropyl carbodiimide hydrochloride (EDC) และ N-hydroxysuccinimide (NHS) โดยแผ่นฟิล์มคอลลาเจนบนกระจกใสแบบกลมซึ่งเตรียมจากการผสมระหว่างคอลลาเจนและ Phosphate Buffer Saline (PBS) ถูกเชื่อมโยงพันธะโครงสร้างโมเลกุล ด้วยวิธีการใช้ความร้อน และสารเคมี เพื่อเหนี่ยวนำการเชื่อมโยงของหมู่อะมิโนอิสระและหมู่คาร์บอกซิลในโครงสร้างโปรตีนคอลลาเจน คุณสมบัติทางกายภาพและทางกลของแผ่นฟิล์มคอลลาเจนแบบต่างๆ ถูกวิเคราะห์โดยกล้องจุลทรรศน์วัดแรงระดับอะตอม (Atomic Force Microscope: AFM) การเชื่อมโยงพันธะของแผ่นฟิล์มคอลลาเจนด้วยสารเคมี EDC/NHS ในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ส่งผลให้แผ่นฟิล์มคอลลาเจนมี ลักษณะพื้นผิวโดยรวม เกิดการเกาะกลุ่มรวมกันของโมเลกุลคอลลาเจน โดยมีขนาดเส้นใยคอลลาเจนเพิ่มขึ้น และจากการวิเคราะห์ค่ามอดูลัสความยืดหยุ่นของเส้นใยคอลลาเจนบนแผ่นฟิล์มแต่ละแบบ พบว่าแผ่นฟิล์มคอลลาเจนที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะส่งผลให้ค่า มอดูลัสความยืดหยุ่นของเส้นใยคอลลาเจนเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับค่ามอดูลัสความยืดหยุ่นของเส้นใยคอลลาเจนบนแผ่นฟิล์มที่ไม่ถูกเชื่อมโยงพันธะ ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าการใช้สารเคมีเชื่อมโยงพันธะ EDC/NHS เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพโดยส่งผลให้ขนาดเส้นใยคอลลาเจนเพิ่มขึ้นและช่วยเพิ่มคุณสมบัติทางกลของแผ่นฟิล์มคอลลาเจน โดยช่วยทำให้โครงสร้างคอลลาเจนมีความแข็งแรงมากขึ้น ซึ่งเหมาะกับการพัฒนานำไปใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนัง

คำหลัก: แผ่นฟิล์มคอลลาเจน, กล้องจุลทรรศน์วัดแรงระดับอะตอม, EDC/NHS, มอดูลัสความยืดหยุ่น, วิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนัง

Abstract

This research aims to investigate effects of chemical crosslinking 1-ethyl-3-3-dimethylaminopropyl carbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) on biopolymer collagen films. Collagen films on glass cover slips were fabricated by mixing collagen solution with Phosphate Buffer Saline (PBS). The crosslinking technique such as thermal and chemical crosslinking to induce conjugation of free amide and carboxyl groups in protein structures of different collagen films were studied. Physical and mechanical properties of different collagen films were investigated via Atomic Force Microscope (AFM). The chemical crosslinking EDC/NHS in various solvents (Deionized water (DI), 5 mM MES buffer in DI, 5 mM MES buffer in 40%Ethanol and 50 mM MES buffer in 40%Ethanol) demonstrated that the protein structure of collagen were aggregated with increasing in mean diameter of collagen fibrils and the Modulus of Elasticity of collagen fibrils increased in all of crosslinked collagen films compared to non-crosslinked collagen films. These results proved that using EDC/NHS crosslinking changed in morphology of collagen films and strengthened in protein structure which enhanced in mechanical properties of collagen films and had tendency to improve in tissue engineering applications.

Keywords*:* collagen films, AFM, EDC/NHS, Modulus of Elasticity, tissue engineering applications

1. บทนำ

ในปัจจุบันได้มีการผลิตและพัฒนาวัสดุทดแทนผิวหนังขึ้นในรูปแบบต่างๆ ตามลักษณะการใช้งาน เช่น วัสดุทดแทนผิวหนังโดยเฉพาะในชั้นหนังแท้ซึ่งเป็นชั้นที่ไม่สามารถสร้างใหม่ได้ด้วยตนเอง [1] โดยนำคอลลาเจนซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ได้จากธรรมชาติและได้รับความนิยมมาใช้เป็นวัสดุปลูกถ่ายบนผิวหนังเพื่อใช้ในขบวนการสมานแผล คอลลาเจนเป็นโปรตีนที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนมากกว่า 1000 โมเลกุล และมีกรดอะมิโนที่เรียงตัวกันคือ Arg-Gly-Asp (RGD) ซึ่งเป็นพื้นที่ในการชักนำให้เซลล์มายึดเกาะ และคอลลาเจนยังมี คุณสมบัติการเข้ากันกับร่างกายได้ดีและให้ความปลอดภัยกับร่างกายที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับพอลิเมอร์จากธรรมชาติชนิดอื่น แต่เนื่องจากคอลลาเจนมีคุณสมบัติทางกลที่ไม่แข็งแรงและมีการหดตัวเมื่อนำวัสดุทดแทนผิวหนังที่ผลิตจากคอลลาเจนมาใช้ปลูกถ่ายในร่างกาย [2-4]

เนื่องจากปัญหาดังกล่าวในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการสร้างแผ่นฟิล์มคอลลาเจนและเชื่อมโยงพันธะโดยใช้ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) และ N-hydroxysuccinimide (NHS) ซึ่งเป็นสารเคมีที่ในปัจจุบันนิยมนำมาใช้เป็นสารเชื่อมโยงพันธะวัสดุทดแทนผิวหนังเพื่อเพิ่มความเสถียร ความแข็งแรงและช่วยลดอัตราการย่อยสลายในเอนไซม์ อีกทั้งยังไม่ก่อความเป็นพิษกับเซลล์ผิวหนังในการยึดเกาะและการเจริญเติบโต [5,6] ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของ EDC/NHS ในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ที่มีต่อคุณสมบัติทางกายภาพ และทางกลของแผ่นฟิล์มคอลลาเจนเปรียบเทียบกับแผ่นฟิล์มคอลลาเจนที่ไม่ถูกเชื่อมโยงพันธะ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์วัดแรงระดับอะตอม (Atomic Force Microscope: AFM) เป็นเครื่องมือในการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและทางกลของแผ่นฟิล์ม ซึ่งในปัจจุบันได้มีการใช้ AFM มาวิเคราะห์พื้นผิวของวัสดุพอลิเมอร์อีกทั้งยัง ใช้เป็นเครื่องมือในการ วิเคราะห์พื้นผิวทางชีวภาพโดยพิจารณาในเรื่องของ ความเข้ากันได้ ภายนอกร่างกาย ของวัสดุปลูกถ่ายกับเซลล์ผิวหนังในระดับนาโน [7,8]

2. วัตถุดิบและเคมีภัณฑ์

คอลลาเจน (type I from calf skin 3 mg/ml, Ultrapure bovine) จาก Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA สารเชื่อมโยงพันธะ 1-ethyl-3-3-dimethylaminopropyl carbodiimide hydrochloride Reagent Grade (EDC), N-hydroxysuccinimide (1-Hydroxy-2,5-pyrrolidinedione) Reagent grade (NHS) และ 2-[n-morpholino]ethanesulfonic acid (MES), Free acid จาก BIO BASIC INC, Canada ส่วนสารเคมีชนิดอื่นจาก Merck kGaA, Germany และ POCH, Poland

3. วิธีการทดลอง

3.1 วิธีการขึ้นรูปแผ่นฟิล์มคอลลาเจน

การขึ้นรูปแผ่นฟิล์มคอลลาเจนทำได้โดย ผสมสารละลายคอลลาเจน (อุณหภูมิไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส) และ Phosphate Buffered Saline (PBS 10X, pH 6.8) ในอัตราส่วน 8:1 และปิเปตสารละลายลงบนแผ่นกระจกใสแบบกลม (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ซม.) จากนั้นทำให้เกิดแผ่นฟิล์มคอลลาเจน (CN) โดยการ อบสารละลาย คอลลาเจน ในตู้อบความร้อน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วจึงทิ้งแผ่นฟิล์มที่ได้ให้แห้งใน laminar flow hood และเก็บแผ่นฟิล์มในตู้ดูดความชื้น

3.2 การเชื่อมโยงพันธะแผ่นฟิล์มคอลลาเจนด้วยอุณหภูมิ

การเชื่อมโยงพันธะแผ่นฟิล์มคอลลาเจน ด้วยอุณหภูมิทำโดยการอบให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 140 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กับโครงสร้างโปรตีนของคอลลาเจนโดยให้สัญลักษณ์เป็น CT

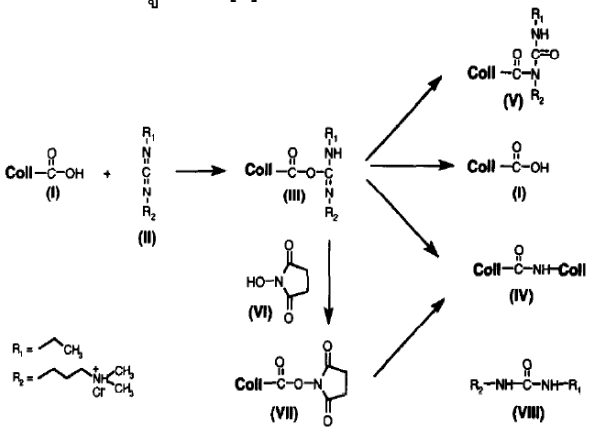
3.3 การเชื่อมโยงพันธะแผ่นฟิล์มคอลลาเจนด้วย EDC/NHS

การเชื่อมโยงพันธะแผ่นฟิล์ม ด้วย EDC/NHS ทำโดยการแช่แผ่นฟิล์มคอลลาเจนที่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะโดยใช้อุณหภูมิแล้วในสารละลาย EDC/NHS (14 mM /5.5 mM) ในตัวทำละลายต่างๆ ดังตารางที่ 1 เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง

ตารางที่ 1 ตัวทำละลายชนิดต่างๆ ใน EDC/NHS

สัญลักษณ์	ชนิดตัวทำละลาย
CEN	DI water
C5EN	5 mM MES buffer
C5EN-EtOH	5 mM MES buffer in 40%Ethanol
C50EN-EtOH	50 mM MES buffer in 40%Ethanol

หลังจากเชื่อมโยงพันธะด้วย EDC/NHS แล้วจึงทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการ ล้าง แผ่นฟิล์มคอลลาเจนที่เชื่อมโยงพันธะทางเคมีแล้วด้วย DI water เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนน้ำทุกๆ ชั่วโมง เพื่อกำจัดคอลลาเจนที่ไม่ถูกเชื่อมโยงพันธะ จากนั้นจึงทิ้งแผ่นฟิล์มไว้ให้แห้งใน laminar flow hood และเก็บแผ่นฟิล์มในตู้ดูดความชื้น ซึ่ง ปฏิกิริยา การเชื่อมโยงพันธะของโครงสร้างโปรตีนคอลลาเจนด้วย EDC และ NHS แสดงดังรูปที่ 1 [9]



รูปที่ 1 ปฏิกิริยาการเชื่อมโยงพันธะของคอลลาเจนด้วย EDC และ NHS

4. การทดสอบคุณสมบัติของแผ่นฟิล์ม

4.1 คุณสมบัติทางกายภาพ

วิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวแผ่นฟิล์มโดยรวมด้วยกล้องจุลทรรศ์วัดแรงระดับอะตอม (Atomic Force Microscope; AFM, XE-70, Park Systems Corp., Suwon, Korea) โดยวิเคราะห์พื้นผิวตามแนวราบ ใช้พื้นที่ในการวิเคราะห์ 30 ไมโครเมตร x30 ไมโครเมตร จากนั้นจึงหาขนาดของเส้นใยคอลลาเจน โดยคำนวณผลต่างของส่วนที่สูงสุดและส่วนที่ต่ำสุดของแต่ละเส้นใยคอลลาเจนที่ได้จากการวิเคราะห์พื้นผิวจากกล้อง AFM จำนวน 20 เส้นใยแบบสุ่มในแต่ละตัวอย่าง และนำมาหาค่าเฉลี่ย ซึ่งค่าที่ได้จะแสดงออกมาเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.2 คุณสมบัติทางกล

การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกลของแผ่นฟิล์มพิจารณาจากค่ามอดูลัสความยืดหยุ่น (Modulus of Elasticity) ของเส้นใยคอลลาเจนบนแผ่นฟิล์มแบบต่างๆ ซึ่งใช้ข้อมูลจากการวิเคราะห์กราฟของแรง (Force Curve Analysis) โดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่าง indentation (δ) และ loading force (F) แสดงดังสมการที่ 1 (Sneddon *cone-on-flat* model) [10,11]

$$F = \frac{2}{\pi}\frac{E}{1-\nu^2}\tan(\alpha)(\delta)^2 \qquad (1)$$

กำหนดให้

E = Young's modulus (modulus of elasticity)

ν = Poisson's ratio (0.35) [12]

α = Tip half cone opening angle (15°) [13]

โดยค่า F หาได้จากการคูณกันของ cantilever deflection, $d(z)$ และ spring constant, k แสดงดังสมการที่ 2 ซึ่ง $d(z)$ มีค่าเท่ากับการเคลื่อนที่ในแนวแกน z ของ piezo ซึ่งมีค่าลดลงเนื่องจากค่า indentation (δ) ที่พื้นผิวแผ่นฟิล์ม แสดงดังสมการที่ 3 [14]

$$F = kd(z) \qquad (2)$$

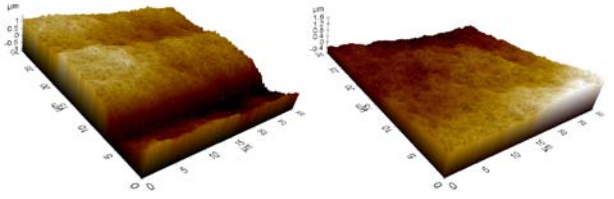
$$d(z) = z - \delta \qquad (3)$$

5. ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

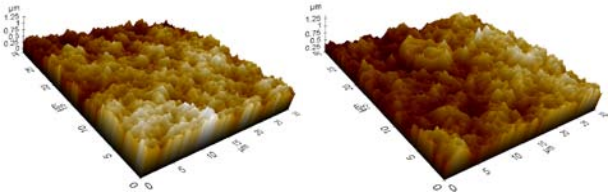
5.1 คุณสมบัติทางกายภาพ

แผ่นฟิล์ม คอลลาเจน ที่ไม่ผ่านการเชื่อมโยงพันธะ (CN) ซึ่งเคลือบอยู่บนแผ่นกระจกใสแบบกลม แสดงดังรูปที่ 2 และการวิเคราะห์พื้นผิวแผ่นฟิล์มแบบต่างๆ ด้วย AFM แสดงดังรูปที่ 3 โดยแสดงลักษณะทางกายภาพของพื้นผิวแผ่นฟิล์มคอลลาเจนที่ไม่ได้เชื่อมโยงพันธะ (CN) พื้นผิวแผ่นฟิล์มคอลลาเจนที่เชื่อมโยงพันธะด้วยอุณหภูมิ (CT) และพื้นผิวแผ่นฟิล์มคอลลาเจนที่เชื่อมโยงพันธะด้วยสารเคมี EDC/NHS โดยการผสมในตัวทำละลายที่ต่างกัน (CEN, C5EN, C5EN-EtOH และ C50EN-EtOH) จากการวิเคราะห์ลักษณะโดยรวมของพื้นผิว CN และ CT ไม่มีความแตกต่างกันอย่างเด่นชัดโดย มีลักษณะเรียบและแสดงโครงสร้างที่เป็นเส้นใยคอลลาเจน ดังนั้นการเพิ่มความแข็งแรงให้กับโครงสร้าง โปรตีนคอลลาเจนโดยใช้ความร้อน (CT) ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของแผ่นฟิล์มคอลลาเจนอย่างเห็นได้ชัด แผ่นฟิล์มคอลลาเจนที่ได้รับการเชื่อมโยงพันธะด้วยอุณหภูมิแล้ว สามารถเพิ่มความแข็งแรงให้กับโครงสร้างมากขึ้นโดยการเชื่อมโยงพันธะด้วย EDC และ NHS ในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน (CEN, C5EN, C5EN-EtOH และ C50EN-EtOH) ซึ่งลักษณะพื้นผิวของแผ่นฟิล์ม ที่ได้จากการเชื่อมโยงพันธะด้วยสารเคมีนี้มีความแตกต่างกับแผ่นฟิล์มแบบ CN และ CT อย่างเห็นได้ชัด โดยเมื่อเชื่อมโยงพันธะแผ่นฟิล์มด้วย EDC/NHS พบว่าโมเลกุลของคอลลาเจนเกิดการเกาะกลุ่มรวมกันมากขึ้น เนื่องมาจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง EDC/NHS กับโครงสร้างโมเลกุลของคอลลาเจนทำให้เกิดการเชื่อมโยงพันธะกัน อย่างไรก็ตามการเชื่อมโยงพันธะแผ่นฟิล์มด้วย EDC/NHS ในตัวทำละลายที่แตกต่างกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างเด่นชัดในลักษณะทางกายภาพของพื้นผิวแผ่นฟิล์ม

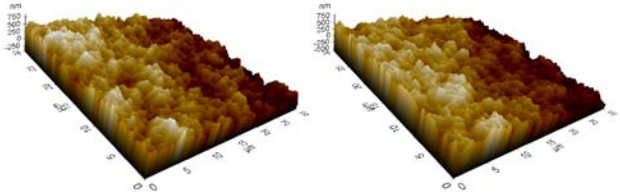
รูปที่ 2 แผ่นฟิล์มคอลลาเจน (CN)



(ก) (ข)



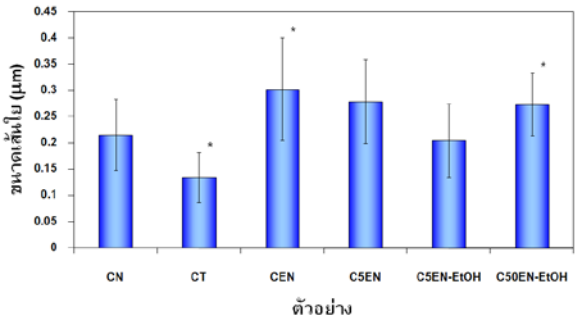
(ค) (ง)



(จ) (ฉ)

รูปที่ 3 รูปจากกล้องจุลทรรศน์วัดแรงระดับอะตอมของแผ่นฟิล์มคอลลาเจนแบบต่างๆ (ก) CN (ข) CT (ค) CEN (ง) C5EN (จ) C5EN-EtOH (ฉ) C50EN-EtOH

จาก ผลการวิเคราะห์ขนาดเส้น ใยคอลลาเจนของแผ่นฟิล์มแบบต่างๆ แสดงดัง รูปที่ 4 ขนาดเส้นใยคอลลาเจนของแผ่นฟิล์มที่ได้มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับวิธีการเชื่อมโยงพันธะ แผ่นฟิล์มที่ไม่ได้เชื่อมโยงพันธะ (CN) มีขนาดเส้นใยคอลลาเจนที่ 0.21 ± 0.06 µm ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าเส้นใยคอลลาเจนของแผ่นฟิล์มที่ เชื่อมโยงพันธะโดยการใช้อุณหภูมิ (CT) ซึ่งมีขนาดเส้นใยคอลลาเจนอยู่ที่ 0.13 ± 0.04 µm ส่วนการเชื่อมโยงพันธะแผ่นฟิล์มคอลลาเจนโดยใช้สารเคมี ส่งผลให้ขนาดเส้นใยที่ได้มีขนาดที่ใหญ่ขึ้น เนื่องมาจากการเชื่อมโยงพันธะภายในโครงสร้างคอลลาเจน ซึ่งขนาดของเส้น ใยคอลลาเจนของแผ่นฟิล์ม CEN, C5EN, C5EN-EtOH และ C50EN-EtOH อยู่ที่ 0.30 ± 0.09 µm, 0.27 ± 0.07 µm, 0.20 ± 0.07 µm และ 0.27 ± 0.05 µm ตามลำดับ ดังนั้น การเชื่อมโยงพันธะแผ่นฟิล์มคอลลาเจนด้วย EDC/NHS ส่งผลให้ลักษณะพื้นผิวแผ่นฟิล์มคอลลาเจนโดยรวมเปลี่ยนแปลงไป

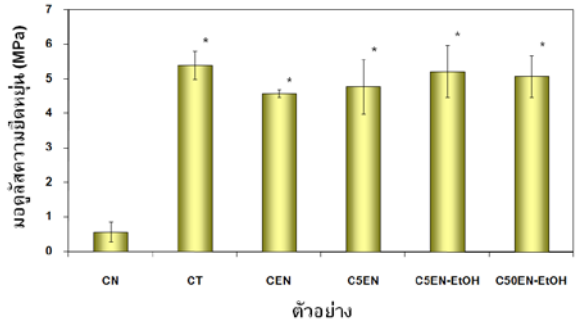


รูปที่ 4 ขนาดเส้นใยคอลลาเจนของแผ่นฟิล์ม CN, CT, CEN, C5EN, C5EN-EtOH และ C50EN-EtOH (n = 20) *แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p<0.05$ เปรียบเทียบกับ CN

5.2 คุณสมบัติทางกล

การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกลของแผ่นฟิล์ม โดยพิจารณาจากค่ามอดูลัสความยืดหยุ่นของเส้นใยคอลลาเจน แสดงดังรูปที่ 5 โดยแผ่นฟิล์มคอลลาเจนที่ไม่ได้เชื่อมโยงพันธะ (CN) มีค่ามอดูลัสความยืดหยุ่นของเส้นใยคอลลาเจนที่ 0.5 7 ± 0.29 MPa และแผ่นฟิล์มที่เชื่อมโยงพันธะแล้ว (CT, CEN, C5EN, C5EN-EtOH และ C50EN-EtOH) มีค่ามอดูลัสความยืดหยุ่นของเส้นใยคอลลาเจนที่ 5.40 ± 0.41 MPa, 4.59 ± 0.10 MPa, 4.78 ± 0.79 MPa, 5.23 ± 0.76 MPa และ 5.08 ± 0.60 MPa ตามลำดับ ซึ่งการเชื่อมโยงพันธะแผ่นฟิล์มคอลลาเจนด้วยอุณหภูมิและสารเคมีช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้กับโครงสร้างโปรตีน

ของคอลลาเจน โดยมอดูลัสความยืดหยุ่นของเส้นใยคอลลาเจนบนแผ่นฟิล์มที่เชื่อมโยงพันธะมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างเด่นชัดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยคอลลาเจนบนแผ่นฟิล์มที่ไม่ถูกเชื่อมโยงพันธะ ซึ่งเสถียรภาพทางโครงสร้างของวัสดุมีความสำคัญในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ทั้งนี้เพื่อรักษาขนาดและรูปร่างของวัสดุให้คงรูปอยู่ได้เมื่ออยู่ในสภาวะต่าง ๆ อาทิเช่น สามารถทนต่อแรงเฉือนในระบบการหมุนวนของอาหารเลี้ยงเซลล์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ การหดตัวที่เกิดจากการเจริญเติบโตของเซลล์บนพื้นผิวโครงสร้าง หรือสามารถรองรับแรงกดของเนื้อเยื่อโดยรอบ [15] แต่อย่างไรก็ตามการเชื่อมโยงพันธะแผ่นฟิล์มด้วย EDC/NHS ในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ไม่ส่งผลให้ค่ามอดูลัสความยืดหยุ่นของเส้นใยคอลลาเจนมีความแตกต่างกันอย่างเด่นชัด



รูปที่ 5 ค่ามอดูลัสความยืดหยุ่นของเส้นใยคอลลาเจนบนแผ่นฟิล์ม CN, CT, CEN, C5EN, C5EN-EtOH และ C50EN-EtOH (n = 5) *แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p<0.05$ เปรียบเทียบกับ CN

6. สรุปผลการทดลอง

สารเชื่อมโยงพันธะ EDC และ NHS ซึ่งในปัจจุบันนิยมนำมาใช้เป็นสารเชื่อมโยงพันธะของโครงสร้างโปรตีนเพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กับโครงสร้างและลดอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพเมื่อนำไปใช้ปลูกถ่ายในร่างกาย [4-6] โดยจากผลการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและทางกลของแผ่นฟิล์มคอลลาเจนเมื่อผ่านการเชื่อมโยงพันธะด้วย EDC/NHS ในตัวทำละลายที่แตกต่างกันพบว่า EDC/NHS สามารถเพิ่มความแข็งแรงให้กับแผ่นฟิล์มคอลลาเจนโดยเพิ่มค่ามอดูลัสความยืดหยุ่นของเส้นใยคอลลาเจนและพื้นผิวโดยรวมของแผ่นฟิล์มคอลลาเจนมีลักษณะที่เปลี่ยนไปโดยมีขนาดเส้นใยคอลลาเจนที่เพิ่มขึ้น แผ่นฟิล์มคอลลาเจนที่ใช้ DI water เป็นตัวทำละลาย EDC/NHS มีขนาดเส้นใยคอลลาเจนสูงสุดและค่ามอดูลัสความยืดหยุ่นของเส้นใยคอลลาเจนบนแผ่นฟิล์มที่เชื่อมโยงพันธะทุกแบบมีค่าสูงกว่าค่ามอดูลัสความยืดหยุ่นของเส้นใยคอลลาเจนบนแผ่นฟิล์มที่ไม่ได้เชื่อมโยงพันธะอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตามตัวทำละลายที่แตกต่างกันใน EDC/NHS ไม่ส่งผลให้มีความแตกต่างกันของค่ามอดูลัสความยืดหยุ่นของเส้นใยคอลลาเจน

7. เอกสารอ้างอิง

[1] Jones, I., Currie, L. and Martin, R. (2002). A guide to biological skin substitutes, *British Journal of Plastic Surgery*, vol. 55, pp.185-93.

[2] Lee, C.H., Singla, A. and Lee, Y. (2001). Biomedical applications of collagen, *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 221, pp.1-22.

[3] Kuijpers, A.J., Engbers, G.H., Krijgsveld, J., Zaat, S.A., Dankert, J. and Feijen, J. (2000). Cross-linking and characterisation of gelatin matrices for biomedical applications, *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, vol. 11, pp.225– 43.

[4] Zeeman, R., Dijkstra, P.J., Wachem, P.B.v., Luyn, M.J.A.v., Hendriks, M. and Cahalan, P.T. (1999). Successive epoxy and carbodiimide cross-linking of dermal sheep collagen, *Biomaterials*, vol. 20, pp. 921-31.

[5] Powell, H.M. and Boyce, S.T. (2006). EDC cross-linking improves skin substitute strength and stability, *Biomaterials*, vol. 27, pp. 5821-5827.

[6] Ma, L., Gao, C., Mao, Z., Zhou, J. and Shen, J. (2004). Enhanced biological stability of collagen porous scaffolds by using amino acids as novel cross-linking bridges, *Biomaterial*, vol. 25, pp. 2997-3004.

[7] Rotsch, C., Jacobson, K. and Radmacher, M. (1999). Dimensional and mechanical dynamics of active and stable edges in motile fibroblasts investigated by using atomic force microscopy, paper presented in *the National academy of Sciences of the United States of America*, Washington, DC, USA.

[8] Cristescu, R., Mihaiescu, D., Socol, G., Stamatin, I., Mihailescu, I.N. and Chrisey, D.B. (2004). Deposition of biopolymer thin films by matrix assisted pulsed laser evaporation, *Applied Physics A*, vol. 79, pp.1023-6.

[9] Damink, L.H.H.O., Dijkstra, P.J., Luyn, M.J.A.v., Wachem, P.B.v., Nieuwenhuis, P. and Feijen, J. (1996). Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide, *Biomaterials*, Vol. 17, pp. 765-773.

[10] Radmacher, M., Fritz, M., Kacher, C.M., Cleveland J.P. and Hansma P.K. (1996). Measuring the Viscoelastic Properties of Human Platelets with the Atomic Force Microscope, Biophysical Journal, Vol. 70, pp. 556-567.

[11] Domke, J. and Radmacher, M. (1998). Measuring the Elastic Properties of Thin Polymer Films with the Atomic Force Microscope, *Langmuir*, Vol. 14, pp. 3320-3325.

[12] Li, L.P., Herzog, W., Korhonen, R.K. and Jurvelin, J.S. (2005). The role of viscoelasticity of collagen fibers in articular cartilage: axial tension versus compression, *Medical Engineering & Physics*, Vol. 27, pp.51-57.

[13] Probe unique features of contact cantilever NSC36 from Park Systems Corp., Suwon, Korea.

[14] Rotsch, C., Jacobson, K. and Radmacher, M. (1999). Dimensional and mechanical dynamics of active and stable edges in motile fibroblasts investigated by using atomic force microscopy, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 96, pp. 921–926.

[15] Park, J.B. and Bronzino, J.D. (2003). *Biomaterials: Principles and Applications*, ISBN: 0-8493-1491-7, CRC Press, Boca Raton, Florida.