สารบัญ

บทที่ หน้า

กิตติกรรมประกาศ i

บทคัดย่อ ii

สารบัญ iv

สารบัญตาราง vii

สารบัญรูปภาพ viii

1. **บทนำ** 1

1.1 ที่มาและความสำคัญ 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 1

1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย 2

2. **ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง** 3

2.1 ไหมคืออะไร 3

2.2 โครงสร้างทางกายภาพของเส้นใยไหม 5

2.3 เส้นใยไหมต่อปฏิกิริยาต่างๆ 6

2.4 ไฟโบรอิน 7

2.4.1 คุณสมบัติที่เป็นสาร antigenotoxic ของสารไฟโบรอิน 9

2.5 การใช้ประโยชน์จากไฟโบรอิน 11

2.5.1 อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง 11

2.5.2 อุตสาหกรรมอาหาร 12

2.5.3 เยื่อเลือกผ่าน 12

2.5.4 วัสดุชีวภาพทางการแพทย์ 13

2.6 การละลายไหม 15

2.6.1 การเตรียมตัวอย่างสารละลายไฟโบรอิน 15

2.6.2 การเตรียมตัวอย่างแผ่นฟิล์มไฟโบรอิน 16

2.7 ผิวหนัง 16

2.8 เซลล์ที่มีส่วนสำคัญในการสร้างเนื้อเยื่อ 18

2.8.1 เซลล์ไฟโบรบลาสต์และการสมานบาดแผล 20

สารบัญ(ต่อ)

บทที่		หน้า
	2.9 บาดแผล	20
	2.10 ตัวอย่างสาร Polymer ที่ใช้ในการผสมเป็นสารเชื่อมกับโปรตีนไหมในการผลิตเป็นวัสดุทางการแพทย์	22
	2.10.1 Polyvinyl alcohol (PVA)	22
	2.10.2 Sodium alginate (AG)	25
	2.10.3 Polyethylene oxide (PEO)	26
3.	**วิธีการดำเนินงานวิจัย**	27
	3.1 การจัดหาตัวอย่างเส้นไหม	27
	3.1.1 ตัวอย่างเส้นไหมในประเทศไทย	27
	3.1.2 การเตรียมตัวอย่างไฟโบรอินเบื้องต้นและการวิเคราะห์ปริมาณเกลือ	27
	3.2 การเตรียมตัวอย่างแผ่นฟิล์มผสมพอลิเมอร์	28
	3.3 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ	29
	3.3.1 การวัดลักษณะ Mechanical testing	29
	3.3.2 การตรวจวัดคุณสมบัติ Scanning Electron Microscope (SEM)	29
	3.3.3 การตรวจวัดคุณสมบัติ Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)	30
	3.4 การวิเคราะห์ข้อมูลและเปรียบเทียบทางสถิติ	33
	3.5 การตรวจวัดประสิทธิภาพการเลี้ยงเซลล์ (Pre-cell culture test)	33
	3.5.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์บนแผ่นฟิล์ม (Cell culture test)	34
	3.5.2 วิธีการทดลองการเพาะเลี้ยงเซลล์บนแผ่นฟิล์ม	35
	3.5.3 การศึกษาเปรียบเทียบการยึดเกาะของเซลล์บนแผ่นฟิล์มด้วยเทคนิค MTT assay	37
	3.5.4 การศึกษารูปร่างของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนแผ่นฟิล์ม	37

สารบัญ(ต่อ)

บทที่		หน้า
4. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง		38
	4.1 การจัดหาตัวอย่างเส้นไหมขาว	38
	4.2 ผลการวิเคราะเชิงคุณภาพ	40
	4.2.1 การตรวจลักษณะแผ่นฟิล์มด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	41
	4.2.2 ผลการตรวจวัดแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสมพอลิเมอร์ด้วยวิธี FTIR spectroscopy	45
	4.2.2.1. ผลค่า FTIR ของแผ่นฟิล์มโปรตีนไฟโบรอินผสม PVA	45
	4.2.2.2. ผล FTIR ของแผ่นฟิล์มโปรตีนไฟโบรอินผสม PEO	48
	4.2.2.3. ผล FTIR ของแผ่นฟิล์มโปรตีนไฟโบรอินผสม AG	49
	4.2.3 ผลการวัดค่า Mechanical testing และเปรียบเทียบสูตรผสมของแผ่นฟิล์มโปรตีนไฟโบรอินผสมโดยการคำนวนทางสถิติด้วยโปรแกรม SAS	50
	4.2.4 การตรวจวัดประสิทธิภาพการเลี้ยงเซลล์ (Pre-cell culture test)	64
	4.2.4.1 การศึกษาการยึดเกาะและการเพิ่มจำนวนของเซลล์บนแผ่นฟิล์มด้วยเทคนิค MTT assay	65
	4.2.4.2 การศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนแผ่นฟิล์ม	67
5. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ		73
	5.1 สรุปผลการทดลอง	73
	5.2 ข้อเสนอแนะ	74
อ้างอิง		76
ภาคผนวก		83
ส่วนที่ 1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SAS		83
- ค่าทดสอบแรง Tensile		83
- ค่าทดสอบ % elongation		90
ส่วนที่ 2 ผลการเลี้ยงเซลล์ tissue culture plate (TCP)		96
ประวัติผู้วิจัย		

สารบัญตาราง

ตารางท **หน้า**

2.1	คุณสมบัติและคุณประโยชน์ของกรดอะมิโนในโปรตีนไฟโบรอินที่มีต่อร่างกาย	9
2.2	ปริมาณสาร Polyvinyl alcohol ที่กำหนดให้ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร	24
3.1	แสดง Vibrational band assigments for the amide I region of silk fibroin	31
3.2	ค่า Spectrum ได้จากการวัดด้วย FTIR spectroscopy ของโปรตีนไฟโบรอิน	31
3.3	ค่า Spectrum ได้จากการวัดด้วย FTIR spectroscopy ของโปรตีนไฟโบรอิน	32
3.4	ค่า Spectrum ได้จากการวัดด้วย FTIR spectroscopy ของโปรตีนไฟโบรอิน	32
3.5	ค่า Spectrum ได้จากการวัดด้วย FTIR spectroscopy ของโปรตีนไฟโบรอิน	32
4.1	เปรียบเทียบค่า Tensile strength ตามอัตราส่วนของ PEO ผสม Fibroin	51
4.2	เปรียบเทียบค่า Tensile strength ตามอัตราส่วนของ AG ผสม Fibroin	53
4.3	เปรียบเทียบค่า Tensile strength ตามอัตราส่วนของ PVA ผสม Fibroin	55
4.4	เปรียบเทียบค่า % elongation ตามอัตราส่วนของ PEO ผสม Fibroin	57
4.5	เปรียบเทียบค่า % elongation ตามอัตราส่วนของ AG ผสม Fibroin	58
4.6	เปรียบเทียบค่า % elongation ตามอัตราส่วนของ PVA ผสม Fibroin	60
4.7	สรุปผลการวิเคราะห์ค่า Tensile strength ทั้งสามพอลิเมอร์ในสูตรแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม (PEO, AG, PVA)	61
4.8	สรุปผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย % elongation ระหว่างแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสมพอลิเมอร์ทั้ง 3 ชนิด (PEO, AG, PVA)	63
4.9	แสดงรูปร่างลักษณะของเซลล์ที่ยึดเกาะอยู่บน substrates แต่ละชนิดที่ระยะเวลาต่างๆ	69-72
	ภาคผนวก	
1A	การเจริญเติบโตของเซลล์บนจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (TCP)	96
2A	การเจริญของเซลล์บนแผ่นฟิล์มไฟโบรอิน/Polyethylene oxide (90:10)	97
3A	การเจริญของเซลล์บนแผ่นฟิล์มไฟโบรอิน/Polyethylene oxide (85:15)	98
4A	เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ตั้งต้นของการเลี้ยงเซลล์บน TCP และแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม PEO	99
5A	การเจริญเติบโตของเซลล์ในจานอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ (TCP)	100
6A	การเจริญเติบโตของเซลล์บนแผ่นฟิล์มไฟโบรอิน/Polyethylene oxide (90:10)	100
7A	การเจริญเติบโตของเซลล์บนแผ่นฟิล์มไฟโบรอิน/Polyethylene oxide (85:15)	101

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	เส้นใยธรรมชาติและเส้นใยสังเคราะห์	5
2.2	โครงสร้างพันธะของกรดอะมิโนของไฟโบรอินแบบ beta-pleated sheet	7
2.3	โครงสร้างลักษณะของ การจับกันของกรดอะมิโนในไฟโบรอิน ยึดเกาะกันด้วยแรง dipole และ พันธะไฮโดรเจน	8
2.4	Glycine structure	10
2.5	Alanine structure	10
2.6	Serine structure	10
2.7	ชั้นผิวหนังมนุษย์	17
2.8	ตัวอย่างรูปเซลล์ไฟโบรบลาสต์และองค์ประกอบภายในเซลล์	19
2.9	ตัวอย่างภายถ่ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์	19
2.10	ลักษณะแผลฟกช้ำที่เกิดขึ้นหลังจากได้รับการกระแทก	21
2.11	สูตรโครงสร้างของ Sodium Alginate	25
3.1	แสดงตัวอย่างในการทดสอบ pre-cell culture โดยดูลักษณะการเปื่อยยุ่ยของแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสมพอลิเมอร์ต่างๆ	34
3.2	แสดงรูปถ่ายของแผ่นฟิล์มทั้งสองสูตรที่ตัดให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร	36
3.3	แสดงรูปถ่ายของแผ่นฟิล์มทั้งสองสูตรที่ผ่านการแช่ใน 70% ethanol เป็นเวลา 30 นาทีและล้างด้วย sterile water 2 ครั้งและถูกนำมาวางไว้ในหลุมของ 24 well plate เพื่อที่จะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไป	36
4.1	เส้นไหมขาวที่ใช้ในการทำงานทดลอง	38
4.2	สารละลายไหม	38
4.3	ผงโปรตีนไฟโบรอิน	39
4.4	ตัวอย่างแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสมพอลิเมอร์	39
4.5	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน SEM ของแผ่นฟิล์มไฟโบรอินและแผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม PVA ทำแห้งที่อุณหภูมิ 40 °C (a) FB 100: PVA 0, (b) FB 70: PVA 30, (c) FB 50: PVA 50, (d) FB 30: PVA 70, (e) FB 0: PVA 100	40
4.6	ภาพถ่าย SEM (a) ภาพตัดขวางของแผ่นฟิล์ม polyvinyl alcohol (PVA) เข้มข้น 1.5% (b) ภาพตัดขวางของแผ่นฟิล์มไฟโบรอินเข้มข้น 1.5%	41

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.7	ภาพถ่าย SEM ของแผ่นฟิล์มผสมระหว่างไฟโบรอินกับ Polyvinyl alcohol (PVA) ตามอัตราส่วน (a) อัตราส่วน PVA 30: FB 70 (b) อัตราส่วน PVA 50: FB 50 (c) อัตราส่วน PVA 70: FB 30	42
4.8	แผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม Sodium alginate (AG) อัตราส่วน (a) AG 100: FB 0 (b) AG 30: FB 70 (c) AG 50 : FB 50 (d) AG70 : FB 30	43
4.9	แผ่นฟิล์มไฟโบรอินผสม Poly (ethylene) oxide อัตราส่วน (a) PEO 100: FB 0 (b) PEO 30: FB 70 (c) PEO 50: FB 50 (d) PEO 70: FB 30	44
4.10	เปรียบเทียบค่า spectra ของฟิล์มไฟโบรอินที่ทำแห้ง ณ อุณหภูมิ 40°C (FB 05-03-10, 29-03-10) และอุณหภูมิห้อง (FB 05-03-10)	46
4.11	เปรียบเทียบค่า spectra ของฟิล์มไฟโบรอินผสม PVA ที่ทำแห้ง ณ อุณหภูมิ 40°Cข้ามคืน ซึ่งเส้นกราฟแต่ละเส้นแสดง ค่าอัตราส่วนของไฟโบรอินต่อ PVA เป็น 100:0, 70:30, 50:50, 30:70 และ 0:100 ตามลำดับจากบนลงล่าง	47
4.12	เปรียบเทียบค่า spectra ของฟิล์มไฟโบรอินผสม PEO ที่ทำแห้ง ณ อุณหภูมิ 40°C ข้ามคืน ซึ่งเส้นกราฟแต่ละเส้นแสดง ค่าอัตราส่วนของไฟโบรอินต่อ PEO เป็น 100:0, 70:30, 50:50, 30:70 และ 0:100 ตามลำดับจากบนลงล่าง	48
4.13	เปรียบเทียบค่า spectra ของฟิล์มไฟโบรอินผสม (Sodium alginate) AG ที่ทำแห้ง ณ อุณหภูมิ 40°C ข้ามคืน ซึ่งเส้นกราฟแต่ละเส้นแสดง ค่าอัตราส่วนของไฟโบรอินต่อ AG เป็น 100:0, 70:30, 50:50, 30:70 และ 0:100 ตามลำดับจากบนลงล่าง	50
4.14	เปรียบเทียบค่า Tensile strength ระหว่างแผ่นฟิล์มผสมของไฟโบรอินกับ Polyethylene oxide (PEO) ตามอัตราส่วน PEO:FB เป็น 100:0, 70:30, 50:50, 30:70 ตามลำดับ	51
4.15	เปรียบเทียบค่า Tensile strength ระหว่างแผ่นฟิล์มผสมของไฟโบรอินกับ Sodium Alginate (AG) ตามอัตราส่วน AG:FB เป็น 100:0, 70:30, 50:50, 30:70 ตามลำดับ	52
4.16	เปรียบเทียบค่า Tensile strength ระหว่างแผ่นฟิล์มผสมของไฟโบรอินกับ Poly-vinyl alcohol (PVA) ตามอัตราส่วน PVA:FB เป็น 100:0, 70:30, 50:50, 30:70 ตามลำดับ	54

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.17	เปรียบเทียบค่า % elongation ระหว่างแผ่นฟิล์มผสมของไฟโบรอินกับ Polyethylene oxide (PEO) ตามอัตราส่วน PEO:FB เป็น 100:0, 70:30, 50:50, 30:70 ตามลำดับ	56
4.18	เปรียบเทียบค่า % elongation ระหว่างแผ่นฟิล์มผสมของไฟโบรอินกับ Sodium alginate (AG) ตามอัตราส่วนAG:FB เป็น 100:0, 70:30, 50:50, 30:70 ตามลำดับ	58
4.19	เปรียบเทียบค่า % elongationระหว่างแผ่นฟิล์มผสมของไฟโบรอินกับ Polyvinyl alcohol (PVA) ตามอัตราส่วน PVA:FB เป็น 100:0, 70:30, 50:50, 30:70 ตามลำดับ	59
4.20	แสดง formazan crystal ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการ reduction ของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่บน substrate ชนิดต่างๆ	65
4.21	แสดงสารละลายสีม่วงที่เกิดขึ้นภายหลังจากเติม DMSO ลงไปละลาย formazan crystal ที่เกิดจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน	66
4.22	กราฟแท่งแสดงเซลล์มีชีวิตที่เกาะอยู่บน TCP, FB/PEO (90:10) และ FB/PEO (85:15) ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2, 8 ชั่วโมง 1, 3, 5 และ 7 วัน โดยที่เซลล์ที่เกาะอยู่บน TCP ที่เวลา 2 ชั่วโมงหลังจากการ seeding ได้ถูกใช้เป็นค่า reference เพื่อคำนวณหา %เซลล์ที่มีชีวิตที่ยึดเกาะอยู่บนแผ่นฟิล์ม FB/PEO ที่ระยะเวลาต่างๆ	67