เนื้อหางานวิจัย

สัญญาเลขที่ DBG5180017

โครงการ "คุณสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของฟิล์มปิดแผลที่ผลิตจากโปรตีนกาวไหม"

รายงานฉบับสมบูรณ์

เนื้อหางานวิจัย

.....

สืบเนื่องจากงานวิจัยจำนวนมากทั้งในและต่างประเทศได้แสดงให้เห็นว่า โปรตีนกาวไหมหรือที่เรียกว่าเซริซินมีคุณสมบัติทางชีวภาพที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ประโยชน์มากมายเช่น มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ สามารถป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ และเนื่องจากเซริซินเป็นสารที่สามารถดูดซึมน้ำได้ดีจึงสามารถทำให้ผิวหนังชุ่มชื้นอันเป็นคุณสมบัติที่ดีในการนำใช้กับบาดแผลเนื่องจากจะทำให้ผู้ป่วยเกิดความเจ็บปวดน้อยลง นอกจากนี้ยังได้มีงานวิจัยพบว่าเซริซินสามารถกระตุ้นการสร้างและเพิ่มการยึดเกาะกันของเซลล์สร้างเส้นใยผิวหนังของมนุษย์ได้ (human skin fibroblasts) อีกทั้งยังพบอีกว่าเซริซินสามารถเพิ่มการสร้างคอลลาเจนทำให้บาดแผลในหนูทดลองหายได้รวดเร็วขึ้น แต่เนื่องจากผลการทดลองส่วนใหญ่เป็นผลมาจากเซริซินของไหมพันธุ์ต่างประเทศซึ่งมีลักษณะรังไหม โปรตีนไหมทั้งในด้านปริมาณ คุณภาพและการเรียงตัวของกรดอะมิโนแตกต่างจากไหมพันธุ์ไทย นอกจากนี้กระบวนการสกัดโปรตีนกาวไหมด้วยวิธีต่างกันยังส่งผลให้ได้โปรตีนกาวไหมที่มีคุณสมบัติแตกต่างกันทั้งทางด้านกายภาพและชีวภาพ

<u>การคัดเลือกสายพันธุ์ไหม</u>

ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาคุณสมบัติของไหมสายพันธุ์ไทยต่าง ๆ ทางด้านกายภาพดังนี้

คัดเลือกไหมสายพันธุ์ไทยที่นิยมปลูกในประเทศ มีความเสถียร ผู้ผลิตทำการผลิตอย่างต่อเนื่องไม่ต่ำกว่า 3 รุ่น มีลักษณะของรังไหมที่แข็งแรง ขนาดสม่ำเสมอในแต่ละรุ่นของการผลิตโดยไหมสายพันธุ์ไทยที่ได้คัดเลือกมาศึกษาได้แก่

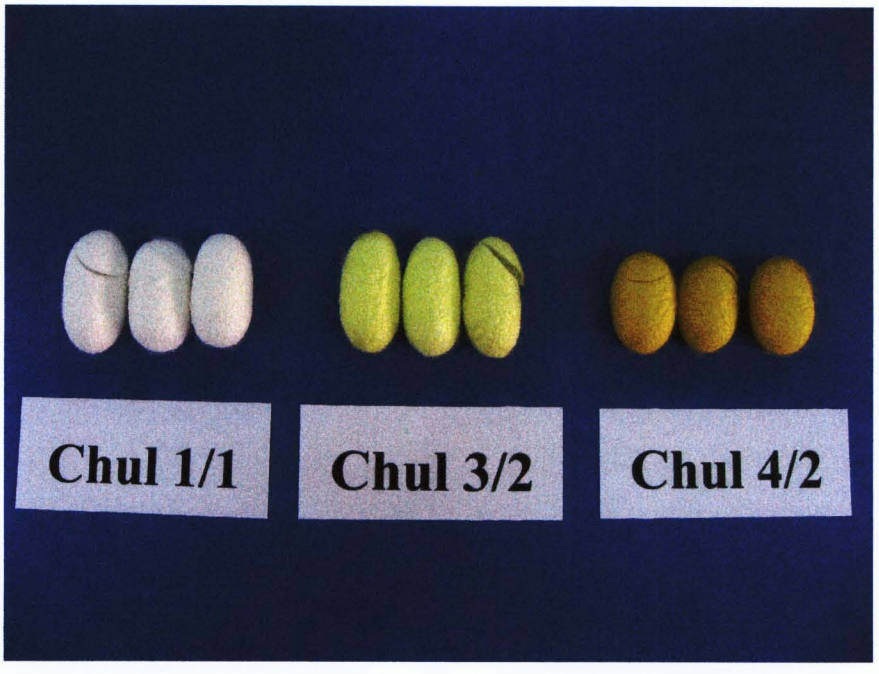
1. จุล 1/1 จากจังหวัดเพชรบูรณ์ ซึ่งเป็นไหม bivoltine มีรังไหมสีขาว
2. จุล 3/2 จากจังหวัดเพชรบูรณ์ ซึ่งเป็นไหม bivoltine มีรังไหมสีเขียวเหลือง
3. จุล 4/2 จากจังหวัดเพชรบูรณ์ ซึ่งเป็นไหม bivoltine มีรังไหมสีเหลือง
4. นางน้อยศรีสะเกษ 1 จากจังหวัดศรีสะเกษ ซึ่งเป็นรังไหม polyvoltine สีเหลือง
5. ขาวโคราช จากจังหวัดนครราชสีมา ซึ่งเป็นรังไหม polyvoltine สีขาว

นอกจากนี้ ผู้วิจัยได้ทำการเก็บรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับรังไหมแต่ละสายพันธุ์จากรุ่นที่นำมาทดสอบดังแสดงในตารางที่ 1

พันธุ์ไหม	ระยะเวลาในการเลี้ยง (วัน-ชม.)	Pupation rate จาก 4th Instar	% of double cocoon	No. of cocoon /liter	Single cocoon wt (g)	% of cocoon shell weight	Length of cocoon filament (m)	Size of cocoon filament (Denier)	% Reelability	% Raw silk	Neatness defects (Mark)	Rendita (kg)	% การฟักไข่ไหม	สีของไข่ไหม	สีของตัวไหม	อื่น ๆ
จุล 1/1	23.22	97.50	5	81	2.00	21.70	1,156	2.95	74	18.98	92.50	5.73	99.8	เขียวอมเทา	ขาวเทามีจุดแต้มตามตัว	ไข่ไหม 1,680 ฟอง/กรัม
จุล 3/2	25	95	4	97	1.73	17.90	530	2.60	70	10.03	92.50	9.97	90.62	เหลือง	ขาวขุ่นมีจุดแต้มตามตัว	
จุล 4/2	23.22	97.95	3	103	1.63	19.82	981	2.41	67.75	14.76	94.38	6.73	94.69	เหลือง	เหลืองขุ่น	
นางน้อยศรีสะเกษ 1	23.10	92	9	143	1.01	14.40	318	2.07	52	9.10	95.12	5.14	92.00	เหลือง-ขาว	เทา	
ขาวโคราช	23.22	92.20	17	130	1.19	16.11	285	1.98	48	8.42	92.54	4.12	93.98	ขาว	ขาว	

ตารางที่ 1 ข้อมูลรังไหมที่นำมาใช้ทดสอบทั้งสิ้น 5 สายพันธุ์

ภาพที่ 1 แสดงลักษณะทางกายภาพของรังไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ



เมื่อนำรังไหมแต่ละสายพันธุ์มาจำนวน 3 รุ่น ทำการวัดขนาดรังไหมทั้งความกว้าง ยาว และน้ำหนักไม่ต่ำกว่า 1,000 รัง เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างในแต่ละรุ่น พบว่าขนาดและน้ำหนักของรังไหมในแต่ละรุ่นและสายพันธุ์แสดงได้ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ขนาดและน้ำหนักของรังไหมแต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์	รุ่น	น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)	ความกว้างเฉลี่ย (ซม.)	ความยาวเฉลี่ย (ซม.)
จุล 1/1	1	0.436 ± 0.054	1.830 ± 0.106	3.380 ± 0.103
	2	0.462 ± 0.055	1.730 ± 0.082	3.110 ± 0.160
	3	0.421 ± 0.049	1.790 ± 0.095	3.410 ± 0.153
ค่าเฉลี่ยทั้ง 3 รุ่น		**0.440 ± 0.052**	**2.675 ± 0.106**	**3.300 ± 0.180**
จุล 3/2	1	0.244 ± 0.045	1.740 ± 0.126	3.160 ± 0.201
	2	0.255 ± 0.038	1.720 ± 0.148	3.260 ± 0.196
	3	0.248 ± 0.040	1.720 ± 0.135	3.210 ± 0.206
ค่าเฉลี่ยทั้ง 3 รุ่น		**0.249 ± 0.041**	**1.727 ± 0.134**	**3.210 ± 0.200**
จุล 4/2	1	0.307 ± 0.023	1.830 ± 0.095	2.880 ± 0.140
	2	0.303 ± 0.030	1.850 ± 0.071	2.860 ± 0.117
	3	0.310 ± 0.027	1.780 ± 0.080	2.820 ± 0.124
ค่าเฉลี่ยทั้ง 3 รุ่น		**0.307 ± 0.026**	**1.820 ± 0.082**	**2.853 ± 0.126**
นางน้อยศรีสะเกษ 1	1	0.210 ± 0.013	1.610 ± 0.058	3.160 ± 0.171
	2	0.225 ± 0.017	1.580 ± 0.064	3.080 ± 0.048
	3	0.219 ± 0.008	1.520 ± 0.061	3.220 ± 0.210
ค่าเฉลี่ยทั้ง 3 รุ่น		**0.218 ± 0.014**	**1.570 ± 0.062**	**3.153 ± 0.181**
ขาวโคราช	1	0.265 ± 0.025	1.733 ± 0.153	3.200 ± 0.200
	2	0.277 ± 0.018	1.800 ± 0.100	3.200 ± 0.100
	3	0.324 ± 0.031	1.950 ± 0.058	3.225 ± 0.222
ค่าเฉลี่ยทั้ง 3 รุ่น		**0.292 ± 0.036**	**1.840 ± 0.135**	**3.210 ± 0.166**

การสกัดโปรตีนกาวไหมด้วยวิธีต่าง ๆ กัน

วิธีการสกัด

การสกัดด้วยความร้อน โดยนำรังไหมมาตัดให้มีขนาดประมาณ 5 ตารางมิลลิเมตร หากเป็นรังไหมที่มีสีจะถูกนำมาสกัดสีก่อนโดยใช้ 70% ethanol แช่ที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง ทำการกรองเพื่อแยกรังไหมออก ผึ่งให้แห้งและนำมาสกัดโปรตีนกาวไหมโดยใส่น้ำบริสุทธิ์ในอัตราส่วน 1:30 นำไป autoclave ที่ 120 องศาเซลเซียสนาน 60 นาที หลังจากนั้นทำการกรองกากออก และนำสารละลายที่ได้ไปทำให้แห้งโดยวิธี freeze-drying

การสกัดด้วยสารละลายกรด ในที่นี้ทำการสกัดโดยใช้กรด citric โดยนำรังไหมมาตัดให้มีขนาดประมาณ 5 ตารางมิลลิเมตร หากเป็นรังไหมที่มีสีจะถูกนำมาสกัดสีก่อนโดยใช้ 70% ethanol แช่ที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง ทำการกรองเพื่อแยกรังไหมออก ผึ่งให้แห้งและนำมาสกัดโปรตีนกาวไหมโดยใส่กรด citric ความเข้มข้น 1.25% ในอัตราส่วน 1:18 และต้มให้เดือดนาน 30 นาที หลังจากนั้นทำการกรองกากออก นำสารละลายที่ได้ไป dialyzed 3 วันโดยเลือก cellulose tubing ที่มี MWCO 6,000-8,000 นำสารละลายที่ได้ไปทำให้แห้งโดยวิธี freeze-drying

การสกัดด้วยสารละลายด่าง ทำทุกขั้นตอนเช่นเดียวกับการสกัดด้วยสารละลายกรด แต่เปลี่ยนจาก citric acid เป็น 0.5% sodium carbonate

การสกัดด้วยสารละลายยูเรีย นำรังไหมที่ตัดให้มีขนาดประมาณ 5 ตารางมิลลิเมตรและถูกสกัดสีออกแล้วมาแช่ในสารละลายยูเรียที่มีความเข้มข้น 8 M นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำไป reflux ที่ 85 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที ทำการกรองเพื่อแยกเอากากออก นำสารละลายที่ได้ไป dialyzed 3 วันโดยเลือก cellulose tubing ที่มี MWCO 6,000-8,000 นำสารละลายที่ได้ไปทำให้แห้งโดยวิธี freeze-drying

ผลจากการสกัดพบว่าประสิทธิภาพในการผลิตโดยพิจารณาจาก % yield ให้ผลตามตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณของโปรตีนกาวไหมเซริซินที่สกัดได้จากรังไหม 5 สายพันธุ์ด้วยวิธีต่าง ๆ

สายพันธุ์/วิธีสกัด	ค่าเฉลี่ยปริมาณผลผลิต (Ave. % yield) $\pm$ SD
จุล 1/1 H	21.27 ± 3.83
จุล 1/1 U	18.60 ± 4.08
จุล 1/1 A	15.19 ± 2.14
จุล 1/1 B	12.18 ± 1.11
จุล 3/2 H	18.36 ± 0.29

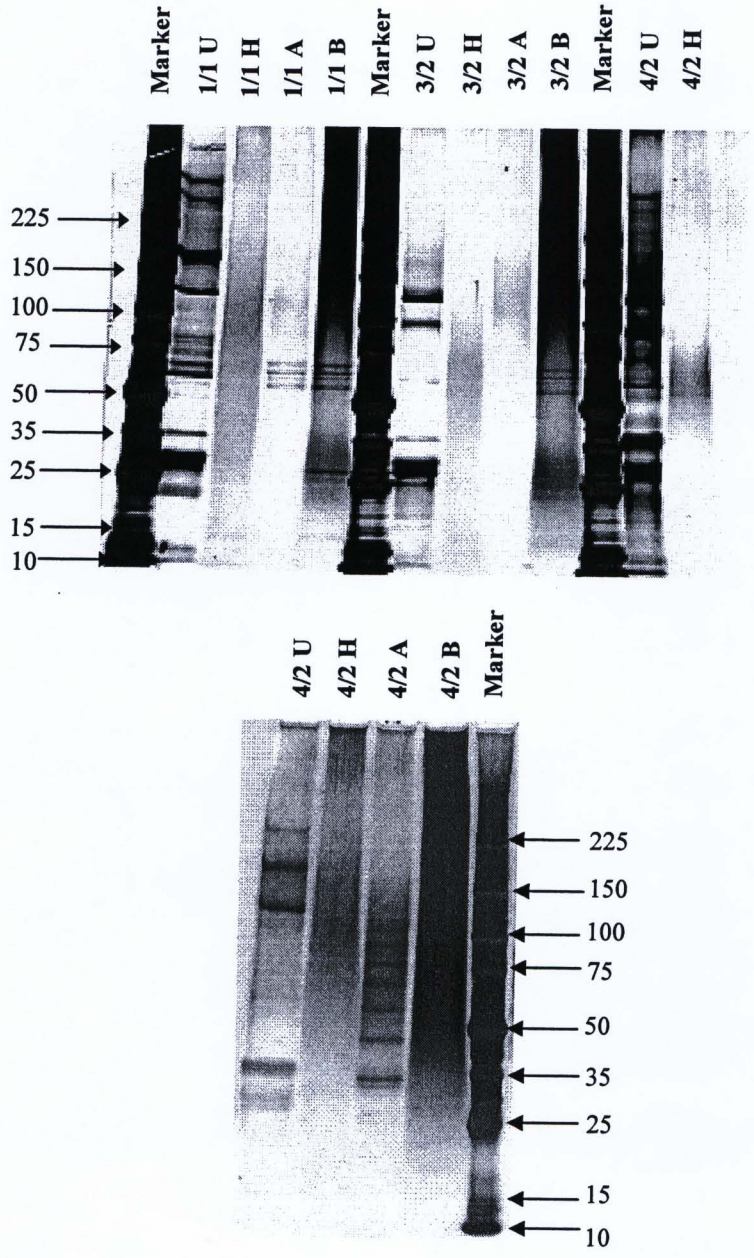
จุล 3/2 U	21.08 ± 4.19
จุล 3/2 A	8.41 ± 1.45
จุล 3/2 B	6.93 ± 0.85
จุล 3/2 H*	17.00 ± 1.12
จุล 3/2 U*	23.10 ± 2.85
จุล 3/2 A*	8.33 ± 0.95
จุล 3/2 B*	5.93 ± 1.16
จุล 4/2 H	21.47 ± 0.62
จุล 4/2 U	20.43 ± 2.22
จุล 4/2 A	13.60 ± 1.17
จุล 4/2 B	12.69 ± 0.87
จุล 4/2 H*	17.58 ± 2.21
จุล 4/2 U*	20.33 ± 2.45
จุล 4/2 A*	7.86 ± 0.89
จุล 4/2 B*	6.60 ± 1.67
นางน้อยศรีสะเกษ 1 H	19.25 ± 2.13
นางน้อยศรีสะเกษ 1 U	26.61 ± 2.68
นางน้อยศรีสะเกษ 1 A	15.11 ± 1.87
นางน้อยศรีสะเกษ 1 B	12.28 ± 1.12
นางน้อยศรีสะเกษ 1 H*	21.33 ± 3.01
นางน้อยศรีสะเกษ 1 U*	13.42 ± 1.04
นางน้อยศรีสะเกษ 1 A*	17.05 ± 1.22
นางน้อยศรีสะเกษ 1 B*	9.83 ± 1.12
ขาวโคราช H	18.66 ± 2.01
ขาวโคราช U	20.89 ± 1.54
ขาวโคราช A	15.23 ± 2.01
ขาวโคราช B	11.13 ± 2.44

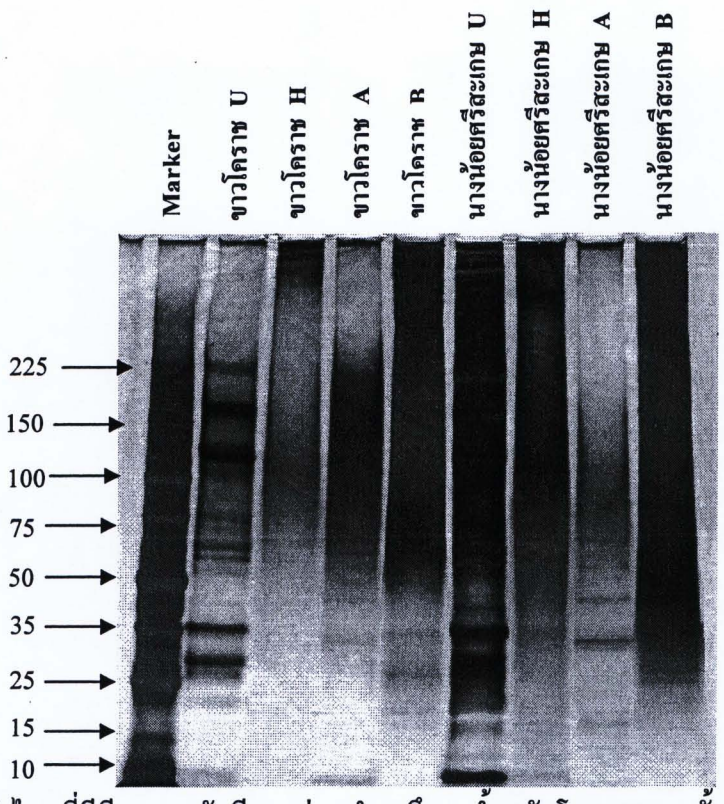
* แสดงการสกัดสีก่อนนำมาสกัดโปรตีนกาวไหม, H = การสกัดด้วยความร้อน, U=การสกัดด้วยสารละลายยูเรีย, A=การสกัดด้วยสารละลายกรด, B=การสกัดด้วยสารละลายด่าง

หมายเหตุ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการสกัดทั้งสิ้น 6 ครั้ง

เมื่อนำผงโปรตีนกาวไหมที่ได้มาทำการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ gel electophoresis (SDS-PAGE gradient gel 5-20%) และใช้ silver staining พบว่าได้ผลตามที่แสดงในรูปที่ 2

ภาพที่ 2 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กัน





หมายเหตุ: รังไหมที่มีสีจะถูกสกัดสีออกก่อนนำมาศึกษาน้ำหนักโมเลกุลทุกครั้ง

จากการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลด้วย SDS-PAGE พบว่า ค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กัน แสดงได้ตามตารางที่ 4

ตารางที่ 4 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ กันที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กัน

สายพันธุ์/วิธีสกัด	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
จุล 1/1 H	25-150
จุล 1/1 U	10 ถึง > 225
จุล 1/1 A	50-150
จุล 1/1 B	15-75
จุล 3/2 H*	35-100
จุล 3/2 U*	10-150
จุล 3/2 A*	50-150
จุล 3/2 B*	15-75
จุล 4/2 H*	35-75
จุล 4/2 U*	10 ถึง > 225
จุล 4/2 A*	50-150
จุล 4/2 B*	15-75
นางน้อยศรีสะเกษ 1 H*	25 ถึง > 225
นางน้อยศรีสะเกษ 1 U*	10 ถึง > 225
นางน้อยศรีสะเกษ 1 A*	15-150
นางน้อยศรีสะเกษ 1 B*	15 ถึง > 225
ขาวโคราช H	50 ถึง > 225
ขาวโคราช U	10-225
ขาวโคราช A	10 และ 35-225
ขาวโคราช B	15 ถึง > 225

*แสดงถึงการสกัดสีออกก่อนนำมาทดสอบต่อ, H = การสกัดด้วยความร้อน, U=การสกัดด้วยสารละลายยูเรีย, A=การสกัดด้วยสารละลายกรด, B=การสกัดด้วยสารละลายด่าง

ผลการทดลองพบว่า โปรตีนกาวไหมเซริซินที่สกัดได้จากไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ และวิธีต่าง ๆ กันมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน โดยวิธีการสกัดด้วยความร้อนเป็นวิธีที่ให้ลักษณะเป็นแถบติดต่อกัน (ไม่แยกเป็น band) ของทุกสายพันธุ์เมื่อนำมาทดสอบน้ำหนักโมเลกุล ส่วนวิธีที่สกัดด้วยยูเรียจะเป็นวิธีที่ให้แถบแยกออก

จากกันอย่างชัดเจนของทุกสายพันธุ์ เมื่อนำมาทดสอบน้ำหนักโมเลกุลอีกทั้งเป็นวิธีที่ทำให้ได้โปรตีนกาวไหมเซริซินที่มีน้ำหนักโมเลกุลในระดับต่ำ ๆ (10 kDa) จากทุกสายพันธุ์ด้วย

เมื่อพิจารณาโดยรวมจะเห็นว่า โปรตีนกาวไหมเซริซินที่สกัดได้จากไหมพันธุ์ polyvoltine มักจะมีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าโปรตีนกาวไหมเซริซินที่สกัดได้จากไหมพันธุ์ bivoltine โดยโปรตีนกาวไหมที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะละลายได้ง่ายในน้ำเย็น ส่วนโปรตีนกาวไหมเซริซินที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะละลายได้ในน้ำร้อน ซึ่งจะเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการศึกษาทดลองในขั้นตอนต่อ ๆ ไป

<u>การศึกษาค่าการละลายของโปรตีนกาวไหมที่ผลิตขึ้นด้วยวิธีต่าง ๆ กัน ที่อุณหภูมิและ pH ต่าง ๆ กัน</u>

เมื่อนำโปรตีนกาวไหมจากสายพันธุ์ไทยต่าง ๆ ที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กันมาศึกษาค่าการละลายที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันอันได้แก่ อุณหภูมิ 25, 37 และ 50°C โดยมีวิธีการศึกษาดังนี้

<u>วิธีการทดสอบ</u>

1. นำผงของโปรตีนกาวไหมในปริมาณที่มากเกินพอมาใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุสารละลาย phosphate buffer solution pH 7.0 ปิดด้วย parafilm ให้สนิท
2. Vortex ให้เข้ากันนาน 1 นาที
3. นำหลอดทดลองดังกล่าวมาใส่ใน water bath ที่มีการเขย่าอย่างสม่ำเสมอและปรับอุณหภูมิให้อยู่ที่ 25 องศาเซลเซียส (หรือ 37, 50 องศาเซลเซียส) นาน 3 ชั่วโมง
4. นำสารละลายในข้อ 3 มาทำการ vortex อีกครั้งประมาณ 1 นาที
5. นำตัวอย่างดังกล่าวมา centrifuge ที่ 2800 g นาน 50 นาที
6. นำ supernatant มาวัดค่าการละลายโดยใช้ BCA kit (เอกสารอ้างอิงที่ 1)

หมายเหตุ: ดัดแปลงมาจาก Stenvall et al. High-throughput solubility assay for purified recombinant protein immunogens. *Biochim Biophys Acta*, 2005. 1752(1): p. 6-10.

จากการศึกษาค่าการละลายของโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กันที่อุณหภูมิ 25, 37 และ 50 องศาเซลเซียสได้ผลดังตารางที่ 5 ดังนี้

ตารางที่ 5 ค่าการละลายของโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ กันที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กันที่อุณหภูมิ 25, 37 และ 50 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์ไหม	ค่าการละลาย (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)		
	ที่ 25°C	ที่ 37°C	ที่ 50°C
จุล 1/1 U	0.31 ± 0.03	4.52 ± 0.02	4.25 ± 0.04
จุล 1/1 H	33.74 ± 0.37	48.68 ± 0.19	42.55 ± 0.27
จุล 1/1 A	30.68 ± 0.36	36.65 ± 0.33	31.24 ± 0.49
จุล 1/1 B	154.78 ± 0.52	245.20 ± 1.84	225.74 ± 3.32
จุล 3/2 U	3.47 ± 0.02	6.26 ± 0.04	2.24 ± 0.01
จุล 3/2 H	146.43 ± 1.76	148.09 ± 2.20	101.57 ± 1.28
จุล 3/2 A	53.59 ± 0.51	58.05 ± 0.31	84.25 ± 3.48
จุล 3/2 B	208.35 ± 0.36	228.96 ± 1.91	187.22 ± 1.83
จุล 3/2 U*	3.84 ± 0.05	6.51 ± 0.06	4.04 ± 0.09
จุล 3/2 H*	152.32 ± 0.39	192.99 ± 1.63	123.40 ± 3.31
จุล 3/2 A*	23.32 ± 0.27	29.36 ± 0.20	35.55 ± 0.51
จุล 3/2 B*	186.70 ± 0.69	271.06 ± 1.28	184.66 ± 2.61
จุล 4/2 U	2.67 ± 0.06	7.12 ± 0.07	5.53 ± 0.03
จุล 4/2 H	48.33 ± 0.04	64.83 ± 0.90	56.47 ± 0.97
จุล 4/2 A	33.70 ± 0.14	12.69 ± 0.09	41.29 ± 0.24
จุล 4/2 B	187.43 ± 0.57	194.79 ± 1.70	233.39 ± 2.24
จุล 4/2 U*	2.89 ± 0.05	2.45 ± 0.09	6.75 ± 0.06
จุล 4/2 H*	145.81 ± 0.25	190.18 ± 0.72	221.70 ± 0.66
จุล 4/2 A*	23.90 ± 0.05	26.56 ± 0.14	27.37 ± 0.52
จุล 4/2 B*	232.88 ± 0.65	269.82 ± 0.53	204.88 ± 4.26
นางน้อยศรีสะเกษ 1 U	3.66 ± 0.01	4.64 ± 0.03	4.39 ± 0.15
นางน้อยศรีสะเกษ 1 H	66.56 ± 0.18	75.68 ± 0.30	73.25 ± 1.65
นางน้อยศรีสะเกษ 1 A	26.44 ± 0.04	33.90 ± 0.64	30.65 ± 0.31
นางน้อยศรีสะเกษ 1 B	196.14 ± 0.24	283.19 ± 2.11	187.69 ± 1.77

นางน้อยศรีสะเกษ 1 U*	0.86 ± 0.01	1.18 ± 0.02	1.63 ± 0.02
นางน้อยศรีสะเกษ 1 H*	83.71 ± 0.13	92.44 ± 1.49	92.86 ± 0.54
นางน้อยศรีสะเกษ 1 A*	29.45 ± 0.02	25.86 ± 0.13	28.28 ± 1.15
นางน้อยศรีสะเกษ 1 B*	265.73 ± 0.95	312.84 ± 5.21	215.34 ± 4.41
ขาวโคราช U	1.36 ± 0.02	2.65 ± 0.04	1.77 ± 0.03
ขาวโคราช H	68.94 ± 0.12	78.91 ± 1.12	77.58 ± 0.78
ขาวโคราช A	30.12 ± 0.03	31.26 ± 0.51	30.69 ± 0.47
ขาวโคราช B	212.33 ± 0.45	289.54 ± 1.11	204.63 ± 0.87

* แสดงการสกัดสีก่อนนำมาสกัดโปรตีนกาวไหม

H = การสกัดด้วยความร้อน, U=การสกัดด้วยสารละลายยูเรีย, A=การสกัดด้วยสารละลายกรด, B=การสกัดด้วยสารละลายด่าง

หมายเหตุ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการสกัดทั้งสิ้น 3 ครั้ง

ในการศึกษาผลของ pH ต่อค่าการละลายของโปรตีนกาวไหมเซริซิน ทำการศึกษาที่ pH 5, 7 และ 9 ได้ค่าการละลายดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ค่าการละลายของโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ กันที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กันที่ pH 5, 7 และ 9

สายพันธุ์ไหม	ค่าการละลาย (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ที่ 25°C		
	pH 5.0	pH 7.0	pH 9.0
จุล 1/1 U	1.84 ± 0.05	0.31 ± 0.03	1.44 ± 0.02
จุล 1/1 H	90.47 ± 0.02	33.74 ± 0.37	122.77 ± 1.89
จุล 1/1 A	31.52 ± 0.20	30.68 ± 0.36	14.13 ± 0.04
จุล 1/1 B	170.96 ± 0.71	154.78 ± 0.52	241.52 ± 0.67
จุล 3/2 U	1.84 ± 0.02	3.47 ± 0.02	1.13 ± 0.01
จุล 3/2 H	150.51 ± 0.34	146.43 ± 1.76	112.32 ± 1.31
จุล 3/2 A	44.54 ± 0.18	53.59 ± 0.51	24.70 ± 0.14
จุล 3/2 B	216.60 ± 2.29	208.35 ± 0.36	285.67 ± 2.00
จุล 3/2 U*	5.84 ± 0.03	3.84 ± 0.05	6.68 ± 0.17
จุล 3/2 H*	131.77 ± 0.71	152.32 ± 0.39	105.62 ± 1.05

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

จุล 3/2 A*	22.33 ± 0.08	23.32 ± 0.27	20.02 ± 0.12
จุล 3/2 B*	180.92 ± 0.49	186.70 ± 0.69	317.43 ± 2.90
จุล 4/2 U	0.40 ± 0.01	2.67 ± 0.06	1.77 ± 0.01
จุล 4/2 H	108.79 ± 1.27	48.33 ± 0.04	101.56 ± 0.67
จุล 4/2 A	27.74 ± 0.09	33.70 ± 0.14	21.54 ± 0.39
จุล 4/2 B	188.03 ± 1.24	187.43 ± 0.57	217.78 ± 0.90
จุล 4/2 U*	1.26 ± 0.02	2.89 ± 0.05	0.13 ± 0.02
จุล 4/2 H*	118.40 ± 1.14	145.81 ± 0.25	124.16 ± 2.39
จุล 4/2 A*	32.60 ± 0.42	23.90 ± 0.05	13.72 ± 0.21
จุล 4/2 B*	264.70 ± 3.08	232.88 ± 0.65	267.81 ± 10.07
นางน้อยศรีสะเกษ 1 U	1.01 ± 0.01	3.66 ± 0.01	1.56 ± 0.04
นางน้อยศรีสะเกษ 1 H	72.51 ± 0.50	66.56 ± 0.18	48.15 ± 0.05
นางน้อยศรีสะเกษ 1 A	17.81 ± 0.12	26.44 ± 0.04	7.86 ± 0.01
นางน้อยศรีสะเกษ 1 B	181.43 ± 1.13	196.14 ± 0.24	261.24 ± 1.49
นางน้อยศรีสะเกษ 1 U*	0.32 ± 0.01	0.86 ± 0.01	0.90 ± 0.01
นางน้อยศรีสะเกษ 1 H*	22.71 ± 0.36	83.71 ± 0.13	26.49 ± 0.32
นางน้อยศรีสะเกษ 1 A*	8.45 ± 0.03	29.45 ± 0.02	10.80 ± 0.14
นางน้อยศรีสะเกษ 1 B*	182.34 ± 0.43	265.73 ± 0.95	238.23 ± 1.60
ขาวโคราช U	0.98 ± 0.03	1.36 ± 0.02	1.08 ± 0.07
ขาวโคราช H	32.69 ± 1.14	68.94 ± 0.12	42.87 ± 1.15
ขาวโคราช A	11.15 ± 0.09	30.12 ± 0.03	7.59 ± 0.89
ขาวโคราช B	196.65 ± 1.65	212.33 ± 0.45	223.56 ± 2.98

* แสดงการสกัดสีก่อนนำมาสกัดโปรตีนกาวไหม

H = การสกัดด้วยความร้อน, U=การสกัดด้วยสารละลายยูเรีย, A=การสกัดด้วยสารละลายกรด, B=การสกัดด้วยสารละลายด่าง

<u>หมายเหตุ</u> ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการสกัดทั้งสิ้น 3 ครั้ง

เมื่อพิจารณาจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าอุณหภูมิมีผลต่อค่าการละลายของโปรตีนกาวไหม โดยโปรตีนกาวไหมสามารถละลายได้ดีขึ้นในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยที่รายงานว่า

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 22 มิ.ย. 2555
เลขทะเบียน 246124

โปรตีนกาวไหมเป็นโปรตีนที่ประกอบไปด้วยเปปไทด์ประมาณ 18 ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ กัน โดยเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะสามารถละลายได้ดีในอุณหภูมิต่ำ ส่วนเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะสามารถละลายได้เมื่อเพิ่มอุณหภูมิ อย่างไรก็ตามหากมีการเพิ่มอุณหภูมิสูงกว่า 37 องศาเซลเซียสเช่น 50 องศาเซลเซียส พบว่า ค่าการละลายของโปรตีนกาวไหมลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับที่ 37 องศาเซลเซียส ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเกิด polymerization ของโปรตีนที่อุณหภูมิสูง ดังนั้นควรใช้อุณหภูมิเพียง 37 องศาเซลเซียสในการละลายโปรตีนกาวไหมเพื่อให้ได้ค่าการละลายสูงสุด นอกจากนี้โปรตีนกาวไหมจากสายพันธุ์ไหมที่แตกต่างกันยังมีค่าการละลายแตกต่างกันอีกด้วย

ผลของ pH ที่มีต่อค่าการละลายของโปรตีนกาวไหมพบว่า โปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยสารละลายด่างละลายได้ดีที่สุดใน pH ที่เป็นด่าง (pH 9.0) และมีค่าการละลายสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดต่าง ๆ และที่ pH อื่น ๆ ในส่วนของวิธีการสกัดอื่น ๆ ไม่สามารถสรุปได้ว่าค่าการละลายของโปรตีนกาวไหมจะละลายได้ดีในภาวะที่เป็นกรดหรือด่าง ทั้งนี้ความแตกต่างของค่าการละลายใน pH ต่างกันอาจเนื่องมาจากความแตกต่างของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนกาวไหมหลังจากการสกัด ส่งผลให้ประจุรวมของโปรตีนกาวไหมที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีที่แตกต่างกันมีความแตกต่างกันด้วย

วิธีการสกัดก็มีผลต่อค่าการละลายของโปรตีนกาวไหม โดยการสกัดด้วยสารละลายด่างจะให้โปรตีนกาวไหมที่มีค่าการละลายสูงสุด รองลงมาคือโปรตีนกาวไหมที่ได้จากการสกัดด้วยความร้อน ด้วยสารละลายกรดและสารละลายยูเรียตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกันในทุกสายพันธุ์

ในส่วนของการสกัดสีจะพบว่า ส่วนใหญ่การสกัดสีออกจากรังไหมก่อนที่จะนำมาสกัดโปรตีนกาวไหมเซริซินมักจะส่งผลให้ค่าการละลายของโปรตีนกาวไหมเพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการจับตัวกันระหว่างโปรตีนกาวไหมกับสาร carotenoid หรือ flavonoid ซึ่งเป็นสารประกอบหลักที่ก่อให้เกิดสีในรังไหม โดย carotenoid หรือ flavonoid เป็นสารที่มีโครงสร้างเป็น aromatic ring ที่ละลายน้ำได้น้อย ส่งผลให้เกิดเป็นสารประกอบโมเลกุลใหญ่ที่มีการละลายลดลง

จากค่าการละลายสามารถสรุปได้ว่าการนำโปรตีนกาวไหมมาใช้ในรูปแบบของสารละลายควรหลีกเลี่ยงการใช้โปรตีนกาวไหมที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลายยูเรียและสารละลายกรด แต่ควรใช้โปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยด่างหรือความร้อนแทนเนื่องจากมีค่าการละลายที่สูงกว่า ทำให้สามารถใช้โปรตีนกาวไหมในความเข้มข้นสูงได้

<u>การศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กันในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของ fibroblast</u>

เนื่องจากโปรตีนกาวไหมมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ แต่เนื่องจากโปรตีนกาวไหมจากสายพันธุ์และวิธีการสกัดที่แตกต่างกันมีกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบต่างกัน อาจส่งผลให้คุณสมบัติ

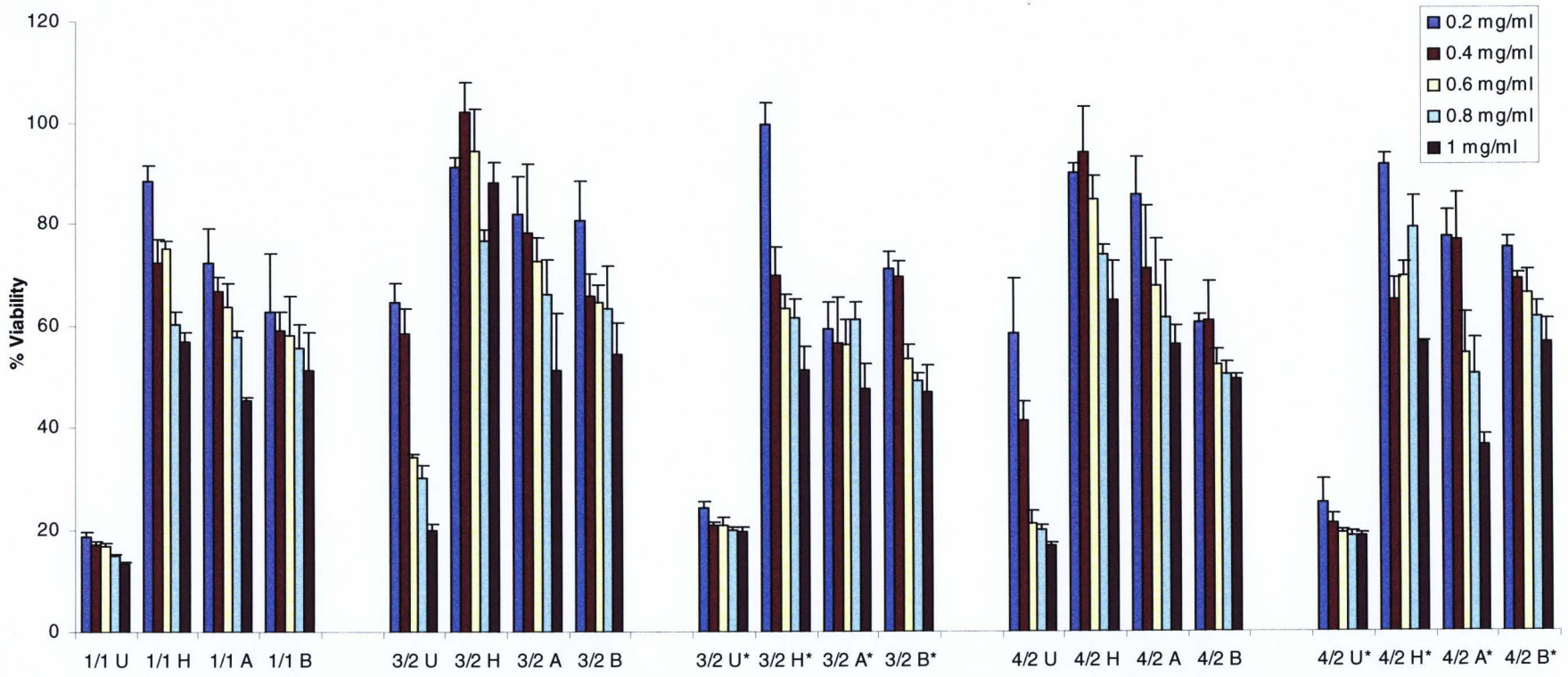
ทางชีวภาพแตกต่างกันรวมถึงคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของ fibroblast cell ด้วย ซึ่งการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์จะใช้ 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay ดังนี้

<u>วิธีการทดสอบ</u>

1. นำเซลล์ที่ต้องการทดสอบ ซึ่งในที่นี้ใช้ L929 mouse fibroblast cells ในความเข้มข้นเริ่มต้น 2 x 10^4/หลุมมาใส่ในถาดหลุมขนาด 96 หลุม/plate ซึ่งมี Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ร่วมกับ fetal bovine serum (FBS) เป็นองค์ประกอบ
2. หลังจากเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์พร้อมกับเติมสารละลายโปรตีนกาวไหมในน้ำบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เข้าไปในแต่ละหลุม (โดยสารละลายโปรตีนกาวไหมที่จะเติมเข้าไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ต้องผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อโดยใช้ filter sterilization ผ่าน 0.22 μm membrane filter (Sartorius Ltd., Epsom, UK)) ทำให้ความเข้มข้นของโปรตีนกาวไหมในแต่ละหลุมเป็น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ
3. ในหลุมที่ไม่มีโปรตีนกาวไหมเป็นส่วนประกอบร่วมกับอาหารเลี้ยงเซลล์จะจัดเป็น negative control พร้อมกันนั้นในส่วนที่เป็น positive control จะมีการเติม melittin ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่ได้จากพิษของผึ้งเข้าไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วย
4. หลังจากเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์ในแต่ละหลุมจะถูกวิเคราะห์ด้วย MTT assay และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm เปรียบเทียบกับปริมาณเซลล์ที่มีอยู่ใน negative control

ผลการทดสอบการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากโปรตีนกาวไหมแสดงในภาพที่ 3 และ 4

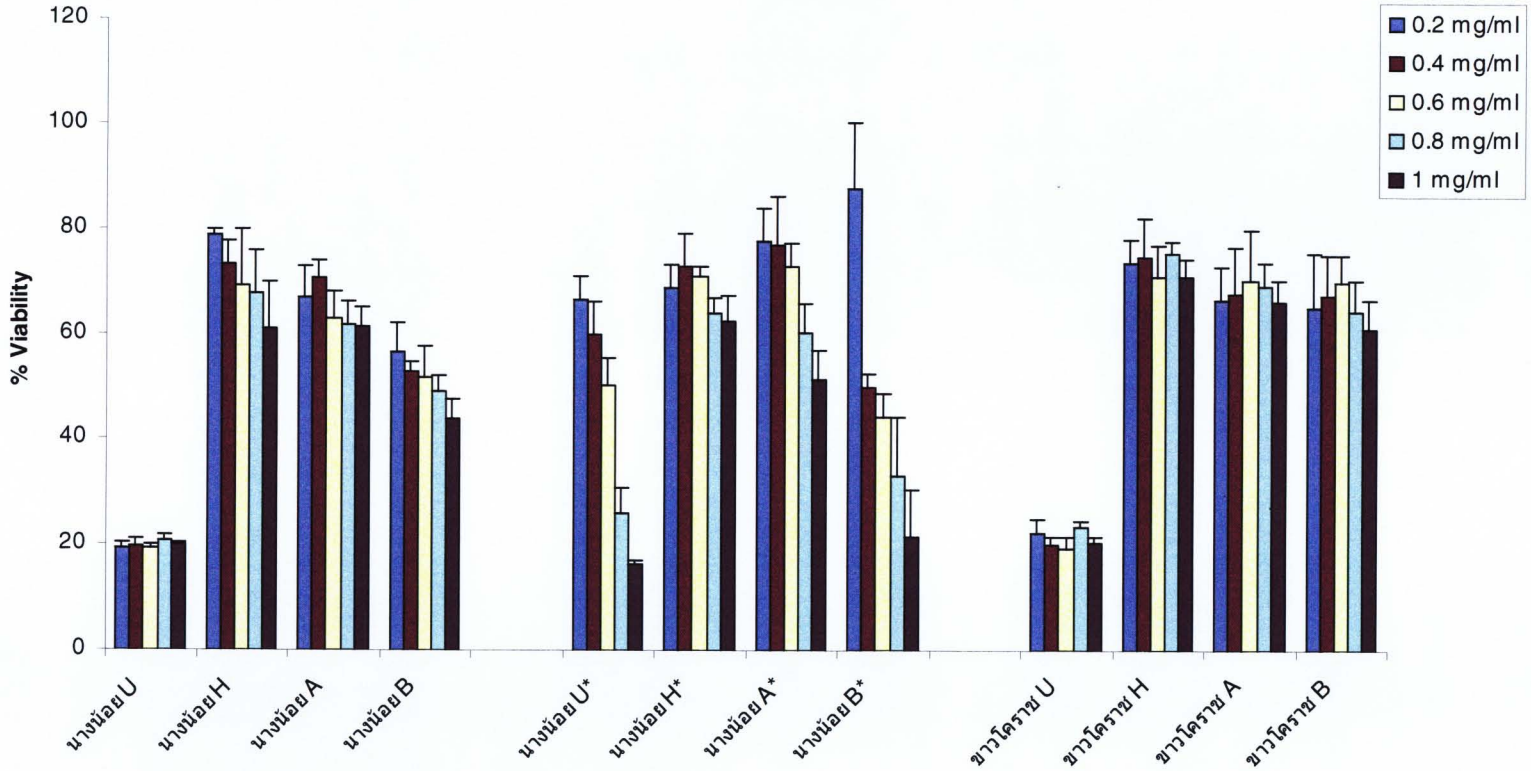
<u>หมายเหตุ</u> ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการสกัดและวัดทั้งสิ้น 6 ครั้ง



* แสดงการสกัดสีก่อนนำมาสกัดโปรตีนกาวไหม

H = การสกัดด้วยความร้อน, U=การสกัดด้วยสารละลายยูเรีย, A=การสกัดด้วยสารละลายกรด, B=การสกัดด้วยสารละลายด่าง

ภาพที่ 3: ผลการกระตุ้นการเจริญเติบโตของไฟโบรบสาลต์เซลล์จากโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์จุล 1/1, จุล 3/2 และ จุล 4/2 ที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กันในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน หลังการเลี้ยงนาน 24 ชม.



* แสดงการสกัดสีก่อนนำมาสกัดโปรตีนกาวไหม

H = การสกัดด้วยความร้อน, U=การสกัดด้วยสารละลายยูเรีย, A=การสกัดด้วยสารละลายกรด, B=การสกัดด้วยสารละลายด่าง

ภาพที่ 4: ผลการกระตุ้นการเจริญเติบโตของไฟโบรบลาสต์เซลล์จากโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษและขาวโคราชที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กันในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน หลังการเลี้ยงนาน 24 ชม.

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าโปรตีนกาวไหมที่ได้จากวิธีการสกัดที่แตกต่างกันมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของไฟโบรบลาสต์ได้แตกต่างกัน โดยโปรตีนกาวไหมที่ได้จากการสกัดด้วยความร้อนไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (ปริมาณเซลล์หลังจากการเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมงมีจำนวนมากกว่าร้อยละ 80 เมื่อเปรียบเทียบกับ negative control) นอกจากนี้ในความเข้มข้นของโปรตีนกาวไหมในระดับต่ำ ๆ คือ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรยังสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ด้วยโดยปริมาณของเซลล์สูงกว่าร้อยละ 100 เมื่อเปรียบเทียบกับ negative control ส่วนโปรตีนกาวไหมที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลายยูเรียมีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดทั้ง 4 วิธี โดยปริมาณของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เหลือหลังจากการเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมงมีต่ำกว่าร้อยละ 70 ของทุกสายพันธุ์ในทุก ๆ ความเข้มข้น

ในส่วนของสารก่อสีในรังไหมพบว่า สารก่อสีมีผลต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตของไฟโบรบลาสต์ได้ โดยเมื่อเปรียบเทียบปริมาณเซลล์หลังการเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมงในไหมสายพันธุ์ จุล 3/2 และ 4/2 รวมถึงพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษพบว่า โปรตีนกาวไหมที่ได้จากการสกัดโดยไม่แยกสารก่อสีออกจะสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของไฟโบรบลาสต์ได้มากกว่าโปรตีนกาวไหมที่ได้จากรังไหมสายพันธุ์เดียวกันแต่มีการสกัดสารก่อสีออก ซึ่งอาจกล่าวได้ว่า flavonoid และ carotenoid ในรังไหมมีประโยชน์ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์นอกเหนือไปจากคุณสมบัติในการป้องกันรังไหมอีกด้วย

จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่าโปรตีนกาวไหมที่ได้จากการสกัดด้วยความร้อนจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำที่สุดและสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ได้โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นของโปรตีนกาวไหมในระดับต่ำ ๆ คือ 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

<u>การศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กันในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจน</u>

เนื่องจากผลงานวิจัยเบื้องต้นได้พบว่า โปรตีนกาวไหมสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนในบาดแผลของหนูทดลอง แต่เนื่องจากโปรตีนกาวไหมจากสายพันธุ์และวิธีการสกัดที่แตกต่างกันส่งผลต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตของไฟโบรบลาสต์เซลล์ได้แตกต่างกัน ดังนั้นอาจส่งผลต่อการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนด้วย

<u>วิธีการทดสอบ</u>

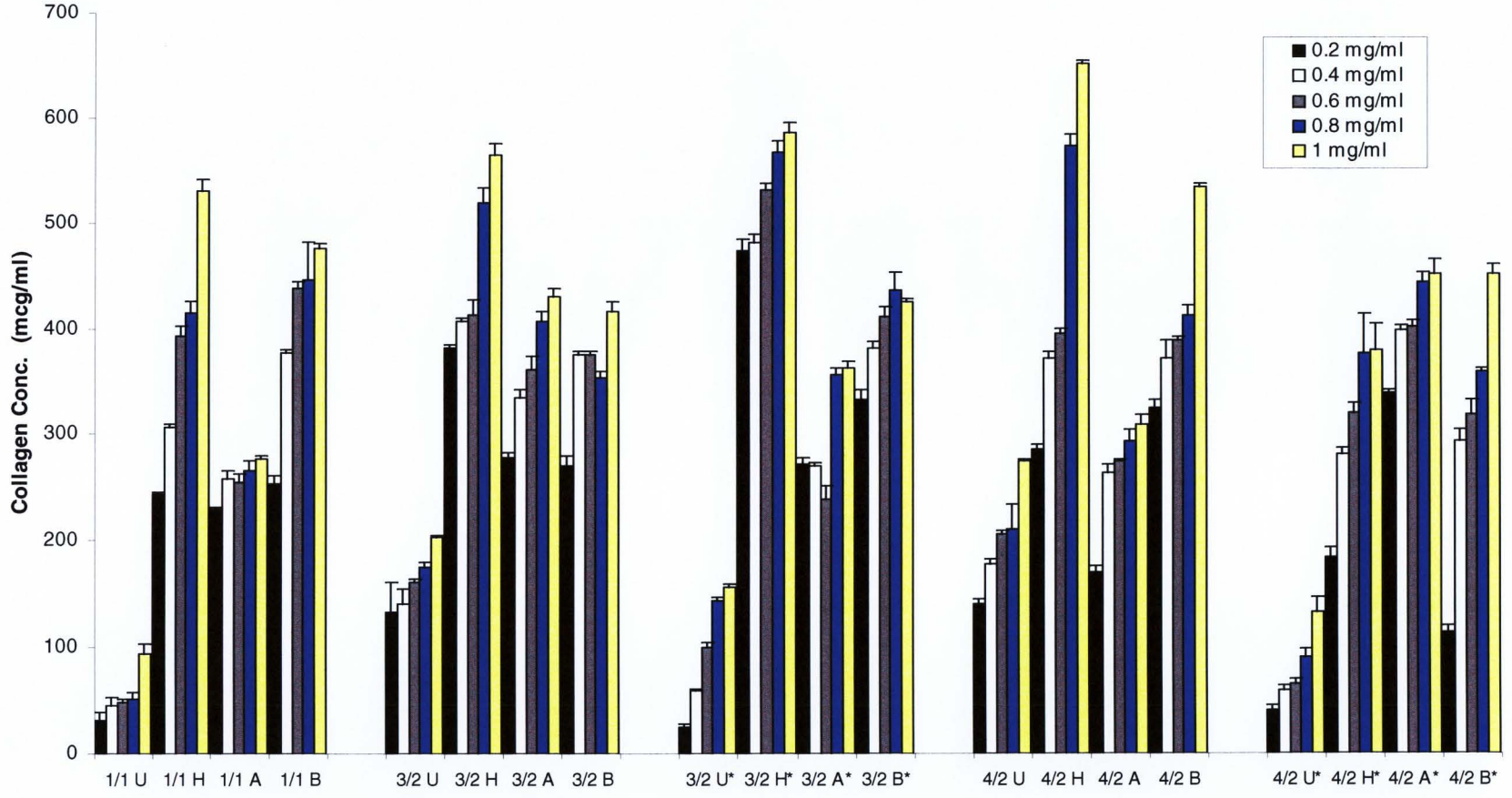
1. นำเซลล์ที่ต้องการทดสอบ ซึ่งในที่นี้ใช้ L929 mouse fibroblast cells ในความเข้มข้นเริ่มต้น 2 x 10^4/หลุมมาใส่ในถาดหลุมขนาด 96 หลุม/plate ซึ่งมี Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ร่วมกับ fetal bovine serum (FBS) เป็นองค์ประกอบ
2. หลังจากเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์พร้อมกับเติมสารละลายโปรตีนกาวไหมในน้ำบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เข้าไปในแต่ละหลุม (โดยสารละลายโปรตีนกาวไหมที่จะ

เติมเข้าไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ต้องผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อโดยใช้ filter sterilization ผ่าน 0.22 μm membrane filter (Sartorius Ltd., Epsom, UK)) ทำให้ความเข้มข้นของโปรตีนกาวไหมในแต่ละหลุมเป็น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

3. ในหลุมที่ไม่มีโปรตีนกาวไหมเป็นส่วนประกอบร่วมกับอาหารเลี้ยงเซลล์จะจัดเป็น negative control พร้อมกันนั้นในส่วนที่เป็น positive control จะมีการเติม melittin ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่ได้จากพิษของผึ้งเข้าไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วย
4. หลังจากเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง สารละลายในส่วนของ supernatant จะถูกนำมาทดสอบปริมาณของคอลลาเจนชนิดที่ 1 ด้วย Sircol® collagen assay kit (Biocolor Ltd., Northern Ireland, UK) (เอกสารอ้างอิงที่ 2) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 nm เปรียบเทียบกับ standard curve ของคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่สกัดจากวัว

ผลการทดสอบการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากโปรตีนกาวไหมแสดงในภาพที่ 5 และ 6

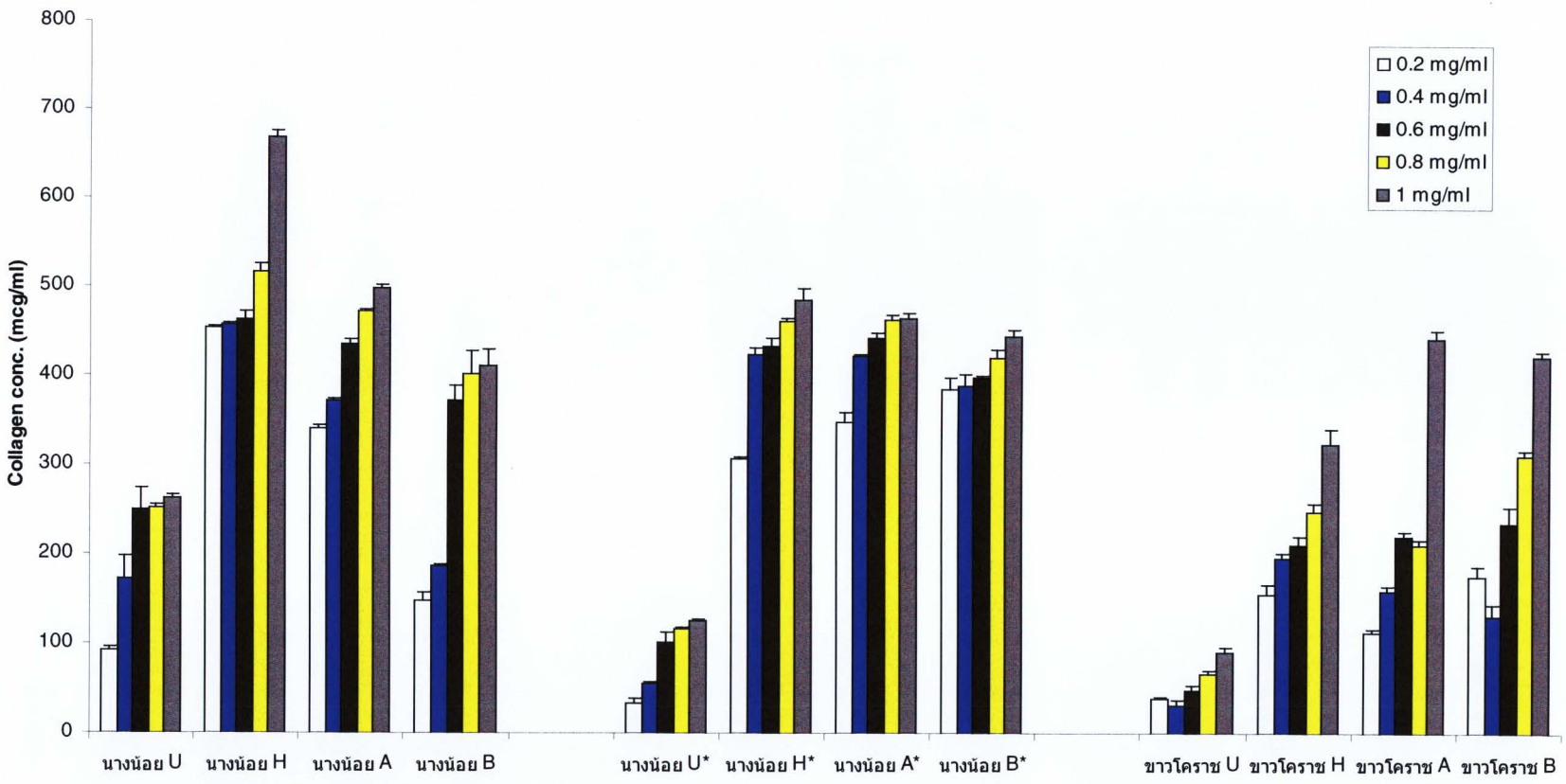
หมายเหตุ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการสกัดและวัดทั้งสิ้น 6 ครั้ง



* แสดงการสกัดสีก่อนนำมาสกัดโปรตีนกาวไหม

H = การสกัดด้วยความร้อน, U=การสกัดด้วยสารละลายยูเรีย, A=การสกัดด้วยสารละลายกรด, B=การสกัดด้วยสารละลายด่าง

ภาพที่ 5: ผลการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนของไฟโบรบสาลต์เซลล์จากโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์จุล 1/1, จุล 3/2 และ จุล 4/2 ที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กันในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน หลังการเลี้ยงนาน 24 ชม.



* แสดงการสกัดสีก่อนนำมาสกัดโปรตีนกาวไหม

H = การสกัดด้วยความร้อน, U=การสกัดด้วยสารละลายยูเรีย, A=การสกัดด้วยสารละลายกรด, B=การสกัดด้วยสารละลายด่าง

ภาพที่ 6: ผลการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนของไฟโบรบสาลต์เซลล์จากโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษและขาวโคราชที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กันในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน หลังการเลี้ยงนาน 24 ชม.

ผลการทดลองจะเห็นได้ว่า โปรตีนกาวไหมสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 จากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้ โดยเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนกาวไหมที่เพิ่มขึ้นจะสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนได้เพิ่มมากขึ้นเช่นกัน และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณคอลลาเจนที่ถูกสร้างขึ้นจากโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กันพบว่า โปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยความร้อนสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนได้สูงสุด ในขณะที่โปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยสารละลายยูเรียสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนได้ต่ำสุด นอกจากนี้โปรตีนกาวไหมที่สกัดจากสายพันธุ์ไหมที่มีสียังสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนได้สูงกว่าหากไม่ผ่านการสกัดสี ในขณะที่โปรตีนกาวไหมที่ผ่านการสกัดสีก่อนจะมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนได้ลดลง

จากผลการทดลองในส่วนของการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์และการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนทำให้วิธีการสกัดด้วยความร้อนเป็นวิธีที่ถูกคัดเลือกมาใช้ในการสกัดโปรตีนกาวไหมเซริซินเนื่องจากเป็นวิธีที่ให้โปรตีนกาวไหมที่มีความเป็นพิษต่ำสุดและกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนได้สูงสุด ส่วนสายพันธุ์ไหมที่เหมาะสมที่สุดในการนำมาใช้จะต้องทำการศึกษาคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้าง proinflammatory cytokines จากโปรตีนกาวไหมแต่ละสายพันธุ์ต่อไป

<u>การศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยความร้อนต่อการกระตุ้นการสร้าง nitric oxide</u>

ปริมาณ nitric oxide ที่สร้างขึ้นของบาดแผลมีผลต่ออัตราการหายของบาดแผล มีงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่า nitric oxide สามารถกระตุ้นกระบวนการสร้างโปรตีนโดยรวมถึงปริมาณคอลลาเจนและกระตุ้นการเจริญเติบโตของไฟโบรบลาสต์ได้ด้วย

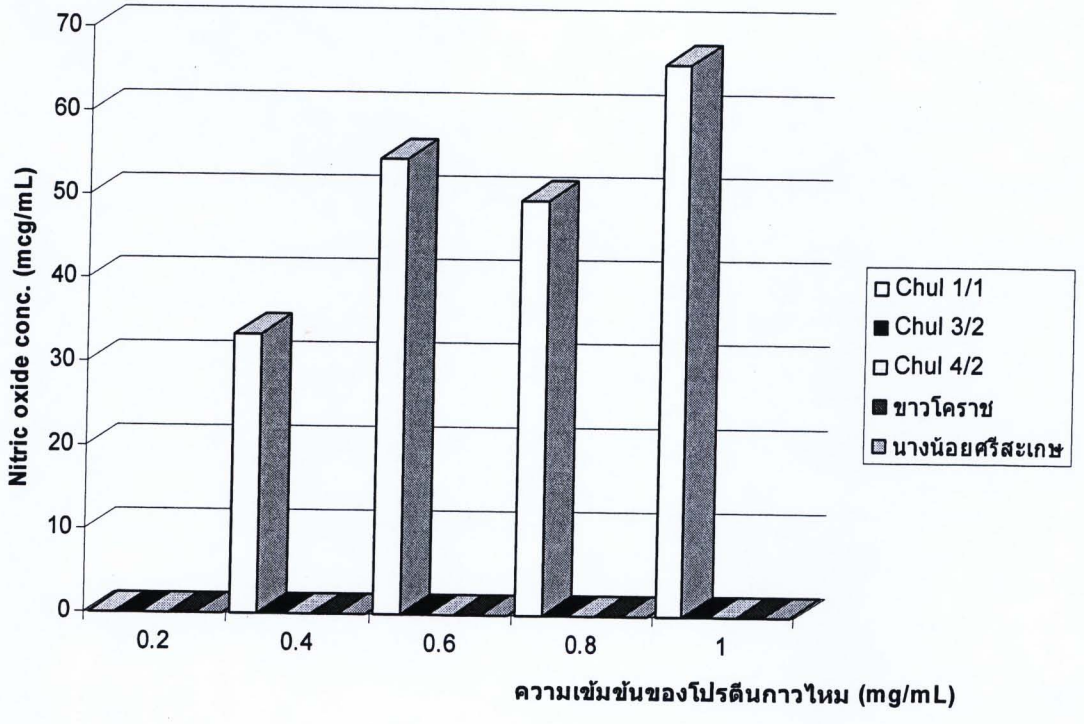
<u>วิธีการทดสอบ</u>

1. นำเซลล์ที่ต้องการทดสอบ ซึ่งในที่นี้ใช้ L929 mouse fibroblast cells ในความเข้มข้นเริ่มต้น 5 x 10^5/หลุมมาใส่ในถาดหลุมขนาด 96 หลุม/plate ซึ่งมี Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ร่วมกับ fetal bovine serum (FBS) เป็นองค์ประกอบ
2. หลังจากเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์พร้อมกับเติมสารละลายโปรตีนกาวไหมในน้ำบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เข้าไปในแต่ละหลุม (โดยสารละลายโปรตีนกาวไหมที่จะเติมเข้าไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ต้องผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อโดยใช้ filter sterilization ผ่าน 0.22 μm membrane filter (Sartorius Ltd., Epsom, UK)) ทำให้ความเข้มข้นของโปรตีนกาวไหมในแต่ละหลุมเป็น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

3. ในหลุมที่ไม่มีโปรตีนกาวไหมเป็นส่วนประกอบร่วมกับอาหารเลี้ยงเซลล์จะจัดเป็น negative control พร้อมกันนั้นในส่วนที่เป็น positive control จะมีการเติม melittin ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่ได้จากพิษของผึ้งเข้าไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วย
4. หลังจากเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง ปริมาณ nitric oxide จะถูกวัดโดยใช้ Griess reaction โดย 100 ไมโครลิตรของ Griess reagent (1% N-(1-Napthyl)-ethylenediamine dihydrochloride และ 1% sulfanilamide ใน 2.5% phosphoric acid) จะถูกผสมรวมกับ supernatant ในกรณีที่มีการสร้าง nitric oxide จะเห็นสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู ในขณะที่สารละลายสีเหลืองแสดงถึงการไม่มีการสร้าง nitric oxide ในตัวอย่าง การตรวจวัดปริมาณของสีจะเปรียบเทียบกับ standard curve ที่มี NaNO เป็นสารมาตรฐานเพื่อทำ standard curve และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm

ผลการทดสอบการกระตุ้นการสร้าง nitric oxide ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่สกัดด้วยความร้อนแสดงในภาพที่ 7

<u>หมายเหตุ</u> ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการสกัดและวัดทั้งสิ้น 3 ครั้ง



ภาพที่ 7: ผลการกระตุ้นการสร้าง nitric oxide ของไฟโบรบสาลต์เซลล์จากโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่สกัดด้วยความร้อนในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน หลังการเลี้ยงนาน 24 ชม.

ผลการทดลองจะเห็นได้ว่า โปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยความร้อนจากไหมสายพันธุ์จุล 1/1 เป็นโปรตีนกาวไหมชนิดเดียวที่สามารถกระตุ้นการสร้าง nitric oxide จากไฟโบรบลาสต์เซลล์ได้ และความเข้มข้นของ nitric oxide ที่ถูกสร้างขึ้นจัดว่ามีปริมาณน้อย เพียงพอต่อการกระตุ้นการสร้างโปรตีนของเซลล์ แต่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

<u>การศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยความร้อนต่อการกระตุ้นการสร้าง Interleukin-1β</u>

Interleukin-1β (IL-1β) และ tumor necrosis factor-α (TNF-α) จัดเป็น proinflammatory cytokine ที่พบได้มากในบาดแผลเมื่อเซลล์ได้รับบาดเจ็บ และมีส่วนเกี่ยวข้องต่อการเกิดปฏิกิริยาการอักเสบ ในกรณีที่สารใดสามารถกระตุ้นการสร้าง IL-1β หรือ TNF-α ได้ในปริมาณสูง อาจเป็นตัวบ่งชี้ได้ว่าสารนั้นสามารถกระตุ้นให้เกิดการอักเสบได้

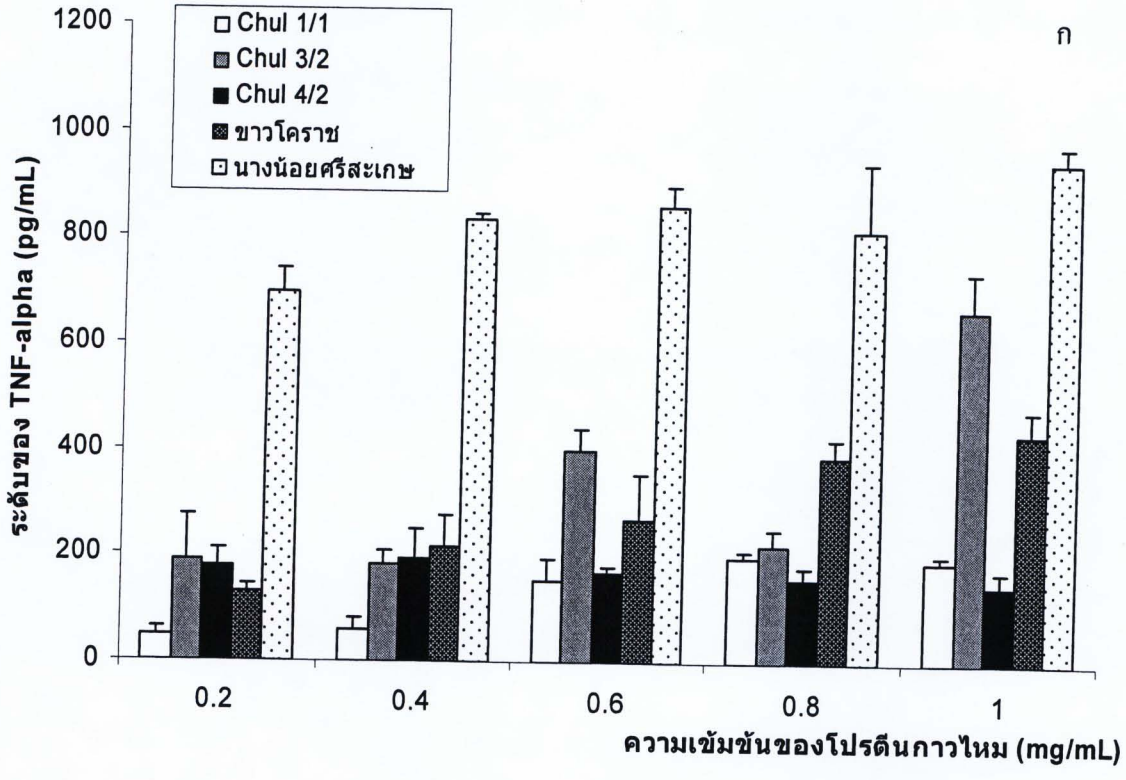
<u>วิธีการทดสอบ</u>

1. นำเซลล์ที่ต้องการทดสอบ ซึ่งในที่นี้ใช้ NR8383 และ J774.2 เซลล์ ที่เลี้ยงใน F-12 Kaighn's medium ในความเข้มข้นเริ่มต้น 5 x 10^5/หลุมมาใส่ในถาดหลุมขนาด 96 หลุม/plate ซึ่งมี Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ร่วมกับ fetal bovine serum (FBS) เป็นองค์ประกอบ
2. หลังจากเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์พร้อมกับเติมสารละลายโปรตีนกาวไหมในน้ำบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เข้าไปในแต่ละหลุม (โดยสารละลายโปรตีนกาวไหมที่จะเติมเข้าไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ต้องผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อโดยใช้ filter sterilization ผ่าน 0.22 μm membrane filter (Sartorius Ltd., Epsom, UK)) ทำให้ความเข้มข้นของโปรตีนกาวไหมในแต่ละหลุมเป็น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ
3. ในหลุมที่ไม่มีโปรตีนกาวไหมเป็นส่วนประกอบร่วมกับอาหารเลี้ยงเซลล์จะจัดเป็น negative control พร้อมกันนั้นในส่วนที่เป็น positive control จะมีการเติม lipopolysaccharide (LPS) จาก *E. coli* เข้าไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วย
4. หลังจากเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง ปริมาณ IL-1β และ TNF-α ที่ถูกสร้างขึ้นจะถูกตรวจวัดด้วย ELISA assay kit (R&D systems, MN, USA) (เอกสารอ้างอิงที่ 3 และ 4) โดยความเข้มข้นต่ำสุดของสาร TNF-α และ IL-1β ที่สามารถวัดได้มีค่าเป็น 5.0 pg/mL และ 3.0 pg/mL ตามลำดับ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm เปรียบเทียบกับ standard curve ในช่วงระหว่าง 12.5-800 pg/mL สำหรับการตรวจวัด TNF-α สำหรับ NR8383 cell line และในช่วงระหว่าง 47-1,500 pg/mL

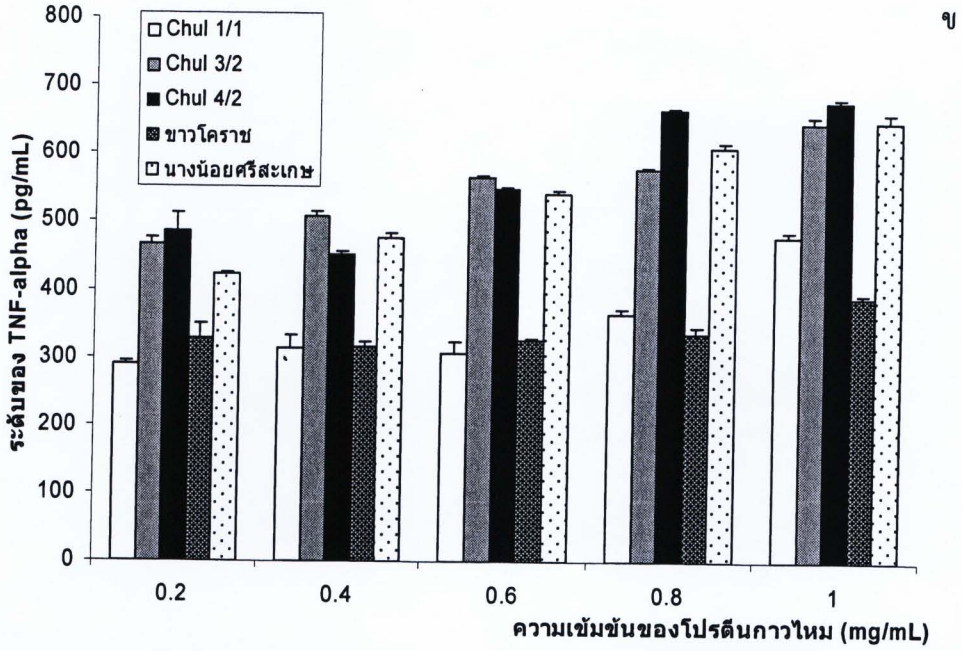
สำหรับการตรวจวัด TNF-α สำหรับ J774.2 cell line ในกรณีของการตรวจวัดระดับ IL-1β จะตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm เช่นเดียวกัน โดยเปรียบเทียบกับ standard curve ในช่วงระหว่าง 31-2,000 pg/mL สำหรับการตรวจวัด IL-1β สำหรับ NR8383 cell line และในช่วงระหว่าง 15-500 pg/mL สำหรับการตรวจวัด IL-1β สำหรับ J774.2 cell line

ผลการทดสอบการกระตุ้นการสร้าง TNF-α และ IL-1β จากโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่สกัดด้วยความร้อนแสดงในภาพที่ 8 และ 9 ตามลำดับ

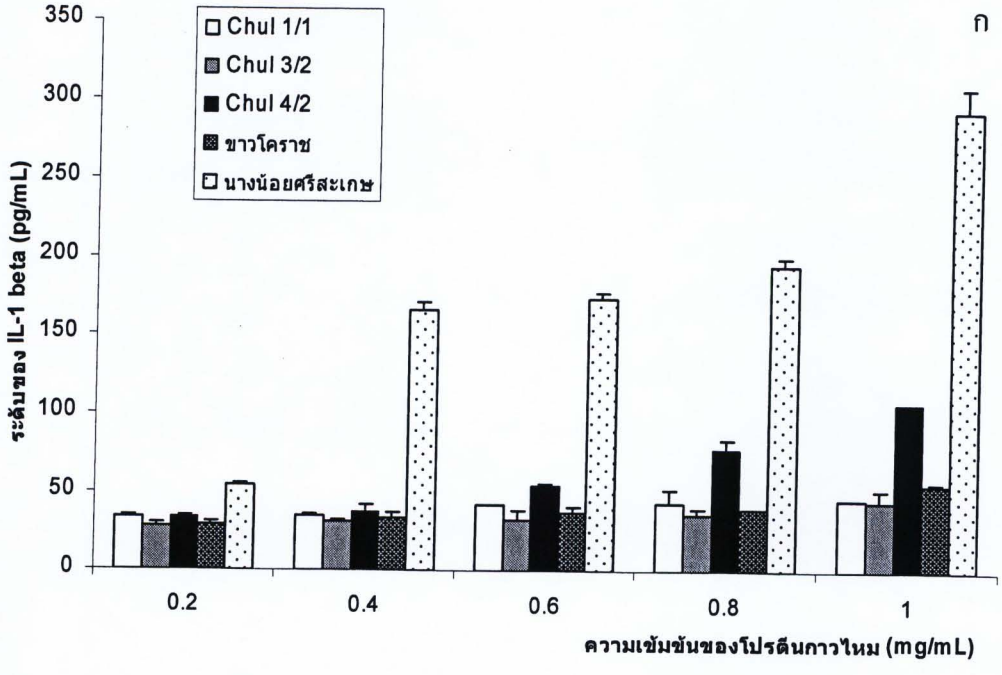
<u>หมายเหตุ</u> ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการสกัดและวัดทั้งสิ้น 3 ครั้ง

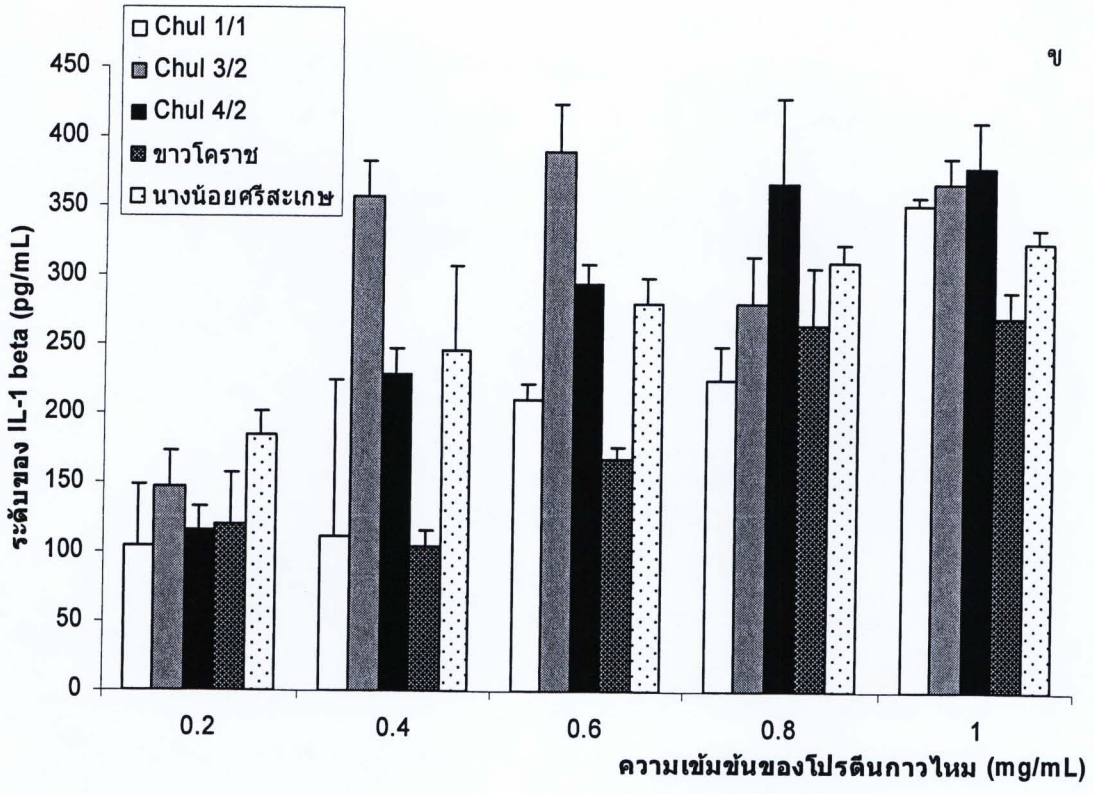


สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



ภาพที่ 8: ผลการกระตุ้นการสร้าง TNF-α ของ J744.2 cell (ก) และของ NR8383 cell (ข) จากโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่สกัดด้วยความร้อนในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน หลังการเลี้ยงนาน 24 ชม.





ภาพที่ 9: ผลการกระตุ้นการสร้าง IL-1β ของ J744.2 cell (ก) และของ NR8383 cell (ข) จากโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่สกัดด้วยความร้อนในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน หลังการเลี้ยงนาน 24 ชม.

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า โปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยความร้อนจากไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ กัน สามารถกระตุ้นให้เซลล์สร้าง TNF-α และ IL-1β ได้ โดยความเข้มข้นของโปรตีนกาวไหมที่เพิ่มขึ้นจะสามารถกระตุ้นการสร้าง proinflammatory cytokines ทั้ง 2 ตัวได้เพิ่มมากขึ้นด้วย โดยโปรตีนกาวไหมที่สกัดจากไหมสายพันธุ์จุล 1/1 สามารถกระตุ้นการสร้าง TNF-α และ IL-1β ได้ต่ำที่สุดทั้งจาก J744.2 cell และ NR8383 cell ซึ่งแสดงให้เห็นว่าหากนำโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยความร้อนจากไหมสายพันธุ์จุล 1/1 ไปพัฒนาเพื่อใช้ในทางการแพทย์น่าจะมีโอกาสก่อให้เกิดการแพ้ต่ำที่สุด อย่างไรก็ตาม ปริมาณของ TNF-α และ IL-1β ที่ถูกกระตุ้นขึ้นจากโปรตีนกาวไหมทุกสายพันธุ์นับว่ามีปริมาณต่ำมากจนอาจกล่าวได้ว่าไม่ก่อให้เกิดการแพ้

จากผลการทดลองทั้งหมดอันได้แก่ความเป็นพิษต่อเซลล์ คุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจน คุณสมบัติในการกระตุ้นสารสื่อกลางการอักเสบ (proinflammatory cytokine) ทำให้โปรตีนกาวไหม

จากไหมสายพันธุ์จุล 1/1 ที่สกัดด้วยความร้อนมีคุณสมบัติเหมาะสมที่สุดในการนำมาใช้พัฒนาแผ่นฟิล์มปิดแผล เพื่อใช้ในทางการแพทย์ต่อไป

<u>การคัดเลือกโพลิเมอร์และความเข้มข้นของโพลิเมอร์ที่เหมาะสมในการเป็นสารก่อฟิล์ม</u>

โพลิเมอร์ที่ได้รับการรับรองจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (FDA) เพื่อนำมาใช้ในการทำแผ่นเนื้อเยื่อในมนุษย์ได้แก่

1. Polyvinyl alcohol
2. Poloxamer (Pluronic®)
3. Agarose

ซึ่งได้นำโพลิเมอร์ชนิดต่าง ๆ มาผสมกับโปรตีนกาวไหมเพื่อขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน พบว่าจากคุณสมบัติทางกายภาพ polyvinyl alcohol เป็นโพลิเมอร์ที่เหมาะสมที่สุดที่จะนำมาใช้ทำแผ่นฟิล์มเนื่องจากให้แผ่นที่มีความยืดหยุ่นเหมาะสม เป็นเนื้อเดียวกัน ไม่มีรอยแตกบนแผ่น ดังนั้นจึงได้ศึกษาอัตราส่วนของโปรตีนกาวไหมและ polyvinyl alcohol ที่เหมาะสมต่อการนำมาทำเป็นแผ่นฟิล์ม

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. นำ polyvinyl alcohol มาละลายในน้ำให้มีความเข้มข้นร้อยละ 5 และนำไปอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง
2. นำสารละลายของโปรตีนกาวไหมมาผสมกับสารละลายในข้อ 1) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน
3. เทสารละลายที่ได้ลงใน petri dish และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชม.

จากการทดสอบผสมสารละลาย polyvinyl alcohol กับโปรตีนกาวไหมในอัตราส่วนต่าง ๆ ได้แก่

2% polyvinyl alcohol

1% sericin + 2% polyvinyl alcohol

2% sericin + 2% polyvinyl alcohol

3% sericin + 2% polyvinyl alcohol

4% sericin + 2% polyvinyl alcohol

5% sericin + 2% polyvinyl alcohol

ได้แผ่นฟิล์มที่มีลักษณะทางกายภาพดังที่แสดงในตารางที่ 7

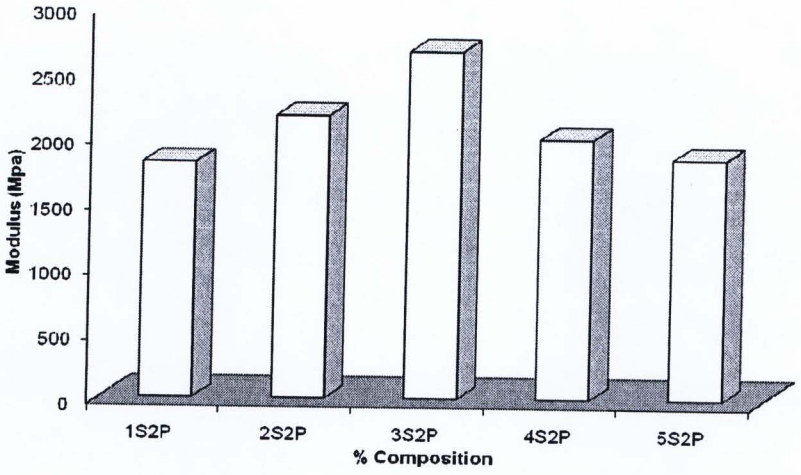
ตารางที่ 7 ลักษณะทางกายภาพของแผ่นฟิล์มที่มีส่วนประกอบของโปรตีนกาวไหมและโพลิเมอร์ในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน

ส่วนประกอบของแผ่นฟิล์ม	ลักษณะทางกายภาพ
2% Polyvinyl alcohol	เปราะบาง แตกง่าย ไม่เป็นแผ่นเรียบเนียน
1% Sericin + 2% Polyvinyl alcohol	แผ่นเปราะง่าย เรียบเนียนขึ้นเล็กน้อยแต่ไม่มีความยืดหยุ่น
2% Sericin + 2% Polyvinyl alcohol	เปราะเล็กน้อย มีการแยก phase (สีไม่สม่ำเสมอ)
3% Sericin + 2% Polyvinyl alcohol	แผ่นเรียบเนียน ยืดหยุ่นค่อนข้างดี ไม่มีการแยก phase
4% Sericin + 2% Polyvinyl alcohol	แผ่นเปราะเล็กน้อย มีสีเข้มและไม่ค่อยเป็นเนื้อเดียวกัน
5% Sericin + 2% Polyvinyl alcohol	แผ่นเปราะมาก มีการแยกชั้นและไม่เป็นเนื้อเดียวกัน สีเข้ม

ภาพที่ 10 แสดงแผ่นฟิล์มจาก 2% polyvinyl alcohol

ภาพที่ 11 แสดงแผ่นฟิล์มจาก 2% polyvinyl alcohol ร่วมกับโปรตีนกาวไหมเซริซินที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 1-5%

จากการทดสอบทำแผ่นฟิล์มโปรตีนกาวไหมร่วมกับ polyvinyl alcohol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า ความเข้มข้นของโปรตีนกาวไหมและ polyvinyl alcohol ในสัดส่วนร้อยละ 3 และ 2 ตามลำดับ จะให้แผ่นฟิล์มที่มีลักษณะทางกายภาพเหมาะสมที่สุด เนื่องจากแผ่นที่ได้มีความเรียบเนียน ไม่เปราะและไม่มีการแยก phase นอกจากนี้สียังไม่เข้มจนเกินไป นอกจากนี้ยังได้ศึกษาความยืดหยุ่นของแผ่นฟิล์มดังกล่าว ผลได้ตามภาพที่ 12

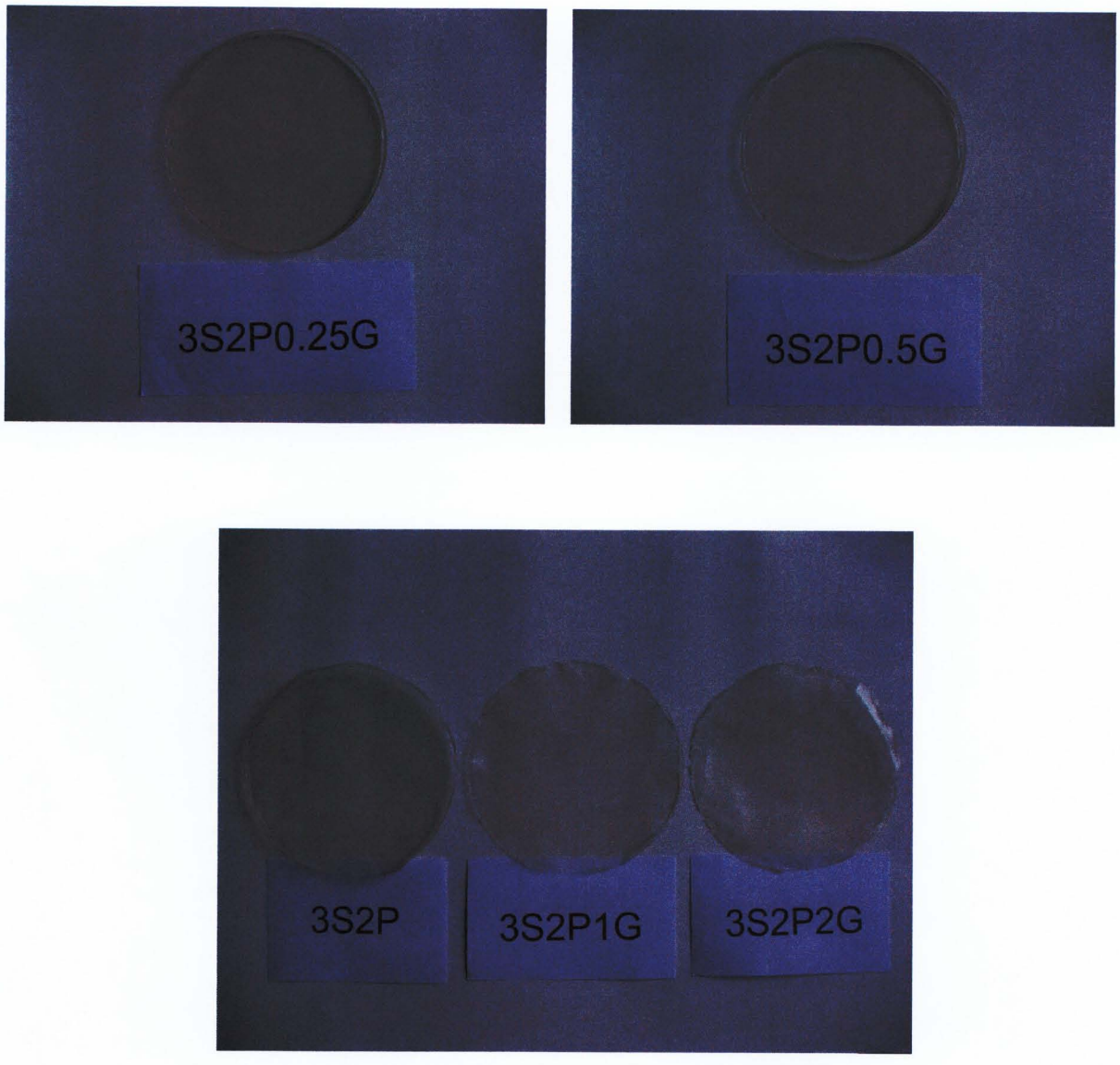


ภาพที่ 12 ค่าแสดงความยืดหยุ่นของแผ่นฟิล์มที่ประกอบด้วย polyvinyl alcohol ร้อยละ 2 และโปรตีนกาวไหมร้อยละ 1-5

จากผลแสดงให้เห็นว่าแผ่นฟิล์มจากโปรตีนกาวไหมร้อยละ 3 และ polynivyl alcohol ร้อยละ 2 จะให้ความยืดหยุ่นดีที่สุด เมื่อพิจารณาร่วมกับคุณสมบัติทางกายภาพทำให้ฟิล์มดังกล่าวมีความเหมาะสมที่สุดที่จะนำมาพัฒนาต่อ แต่อย่างไรก็ตาม แผ่นฟิล์มที่ได้ยังมีความยืดหยุ่นน้อย ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงได้ทดสอบโดยการเติมสารดูดความชื้นอันได้แก่ glycerin เข้าไปเพื่อเพิ่มความยืดหยุ่น โดยเติม glycerin เข้าไปในสัดส่วนร้อยละ 0.25-2 พบว่าลักษณะทางกายภาพที่ได้แสดงในตารางที่ 8 และภาพที่ 13

ตารางที่ 8 ลักษณะทางกายภาพของแผ่นฟิล์มที่ประกอบด้วยโปรตีนกาวไหม polyvinyl alcohol และ glycerin

ส่วนประกอบของแผ่นฟิล์ม	ลักษณะทางกายภาพ
3% Sericin + 2% Polyvinyl alcohol + 0.25% Glycerin	แผ่นยังมีความเปราะ ไม่เรียบเนียน
3% Sericin + 2% Polyvinyl alcohol + 0.5% Glycerin	เปราะเล็กน้อย เรียบเนียนขึ้น
3% Sericin + 2% Polyvinyl alcohol + 1% Glycerin	แผ่นเรียบเนียน ยืดหยุ่นดี เป็นเนื้อเดียวกัน
3% Sericin + 2% Polyvinyl alcohol + 1.5% Glycerin	แผ่นเหนอะหนะเล็กน้อย ไม่ค่อยเรียบเนียน
3% Sericin + 2% Polyvinyl alcohol + 2% Glycerin	แผ่นเหนอะหนะมาก ไม่เรียบเนียน



ภาพที่ 13 แสดงแผ่นฟิล์มจาก 3% sericin + 2% polyvinyl alcohol ร่วมกับ glycerin ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 0.25-2%

จากผลดังกล่าว จะเห็นได้ว่าแผ่นฟิล์มที่ประกอบด้วย 3% sericin + 2% polyvinyl alcohol + 1% glycerin มีคุณสมบัติดีที่สุดที่จะนำมาใช้เป็นแผ่นฟิล์มปิดแผล

การศึกษาคุณสมบัติในการดูดความชื้นของแผ่นฟิล์ม

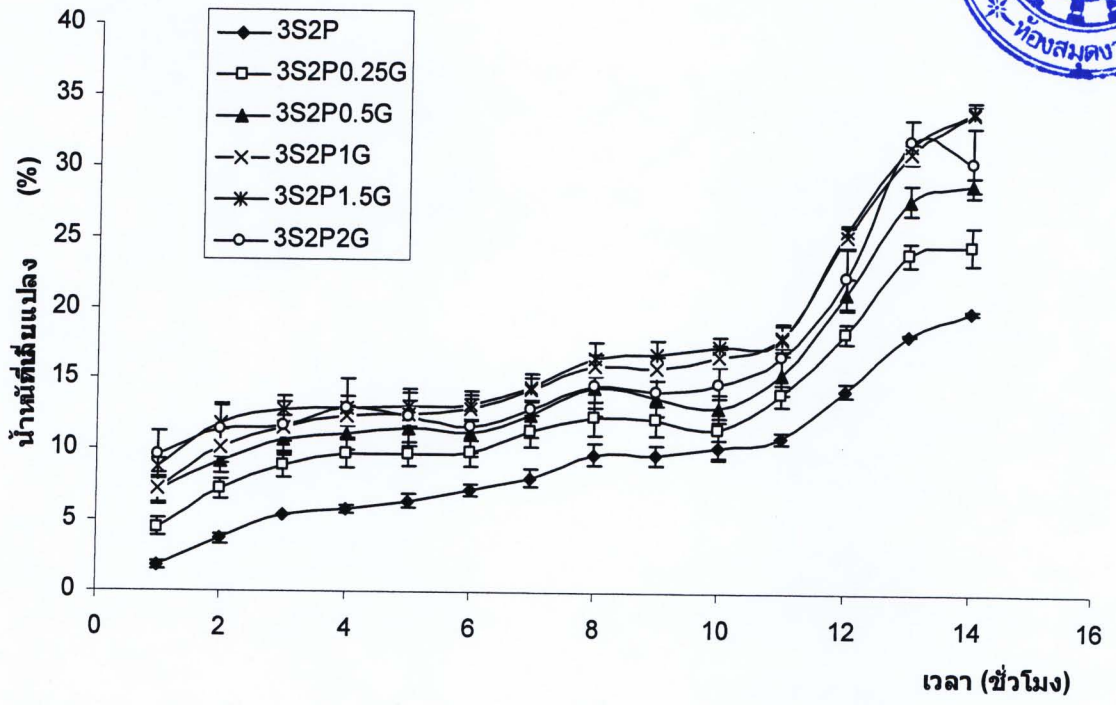
คุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของแผ่นฟิล์มปิดแผลคือ คุณสมบัติในการดูดความชื้น เนื่องจากบาดแผลส่วนใหญ่มักมีสิ่งคัดหลั่งออกมาในปริมาณมาก ซึ่งสิ่งคัดหลั่งดังกล่าวมีผลต่ออัตราการหายของบาดแผลด้วยเช่นกัน ดังนั้นแผ่นปิดแผลที่ดีจึงควรมีคุณสมบัติในการดูดความชื้นได้ดีด้วย

วิธีทำการทดลอง

1. นำเกลือ potassium sulfate ใส่ใน dessicator ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ
2. ควบคุมจนความชื้นได้ตามกำหนดไว้ (เกลือ potassium sulfate ให้ความชื้นประมาณ 98)
3. นำแผ่นฟิล์มที่ชั่งน้ำหนักแน่นอนแล้ว ใส่ใน dessicator
4. ชั่งน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงไป ณ ช่วงเวลาต่าง ๆ กัน

ผลการศึกษาได้ดังภาพที่ 14

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



ภาพที่ 14 น้ำหนักของแผ่นฟิล์มที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากใส่ในสภาวะที่มีความชื้นสูง โดย 3S2P = 3% sericin + 2% PVA, 3S2P0.25G = 3% sericin + 2% PVA + 0.25% glycerin, 3S2P0.5G = 3% sericin + 2% PVA

+ 0.5% glycerin, 3S2P1G = 3% sericin + 2% PVA + 1% glycerin, 3S2P1.5G = 3% sericin + 2% PVA + 1.5% glycerin, 3S2P2G = 3% sericin + 2% PVA + 2% glycerin

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า แผ่นฟิล์มที่มี glycerin เป็นองค์ประกอบจะสามารถดูดความชื้นได้มากขึ้น โดยแผ่นฟิล์มที่ประกอบด้วยโปรตีนกาวไหมเซริซินและ PVA จะสามารถดูดความชื้นได้ต่ำสุด เมื่อเพิ่มปริมาณของ glycerin เข้าไปในแผ่นฟิล์ม จะมีความสามารถในการดูดความชื้นได้มากกว่า แต่เมื่อความเข้มข้นของ glycerin สูงกว่าร้อยละ 1 ความสามารถในการดูดความชื้นของแผ่นฟิล์มไม่แตกต่างกันมากนัก โดยแผ่นฟิล์ม 3% sericin + 2% polyvinyl alcohol + 1% glycerin ซึ่งมีลักษณะทางกายภาพดีที่สุดสามารถดูดความชื้นได้ถึงร้อยละ 30 ของน้ำหนักหลังจากทิ้งไว้นาน 15 ชั่วโมง

<u>การแพร่ของอากาศผ่านแผ่นฟิล์มจากโปรตีนกาวไหม</u>

เนื่องจากแผ่นปิดแผลที่ดีต้องสามารถให้อากาศแพร่ผ่านได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งของการหายของบาดแผล ผู้วิจัยได้ศึกษาถึงอัตราการแพร่ของก๊าซออกซิเจนผ่านแผ่นปิดแผลจากโปรตีนกาวไหมดังนี้

<u>วิธีทำการทดลอง</u>

1. เตรียมแผ่นฟิล์มโปรตีนกาวไหมให้มีขนาดตามต้องการ
2. นำไปยึดติดกับอุปกรณ์ของเครื่อง OX-TRAN รุ่น 1/50 ซึ่งสามารถวัดการแพร่ผ่านของก๊าซออกซิเจนได้ในช่วงตั้งแต่ 0.1-200 cc/[m^2-day]]
3. วัดตัวอย่างซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง

ผลการทดลองพบว่าแผ่นฟิล์มโปรตีนกาวไหมสามารถให้ก๊าซออกซิเจนแพร่ผ่านได้ตามข้อมูลดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ผลการแพร่ผ่านของก๊าซออกซิเจนจากแผ่นฟิล์มโปรตีนกาวไหม

ตัวอย่าง	ความหนา (μm)	OTR (cc/[m^2-day])	PO_2 (mm-cc/[m^2-day])
3S2P	108.6	0.6705	0.073
3S2P0.25G	127.6	0.5670	0.072
3S2P0.5G	141	1.5361	0.216

3S2P1G	137.2	1.2145	0.166
3S2P2G	162.2	1.5877	0.257

OTR = Oxygen transmission rate, PO_2 = Oxygen pressure, 3S2P = 3% sericin + 2% PVA, 3S2P0.25G = 3% sericin + 2% PVA + 0.25% glycerin, 3S2P0.5G = 3% sericin + 2% PVA + 0.5% glycerin, 3S2P1G = 3% sericin + 2% PVA + 1% glycerin, 3S2P2G = 3% sericin + 2% PVA + 2% glycerin

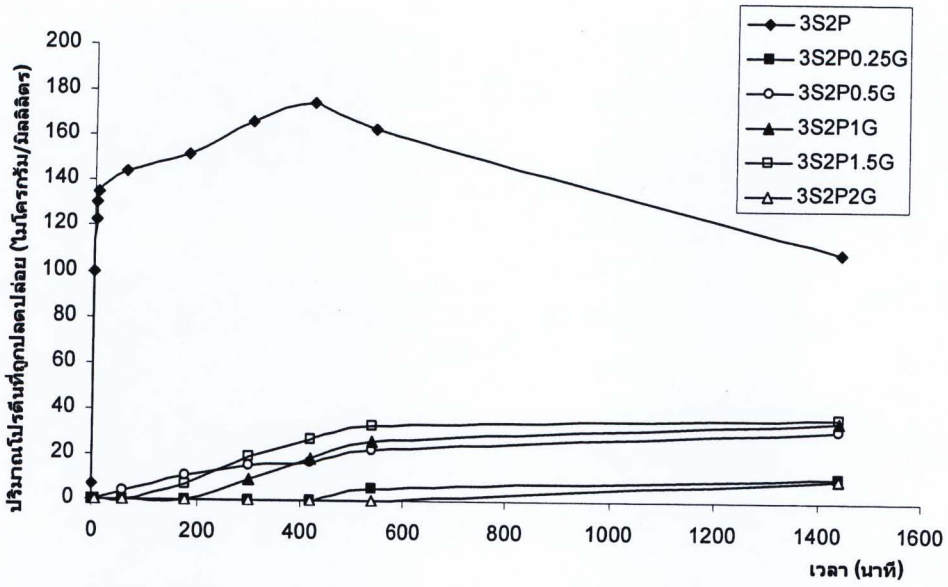
<u>การแพร่ของโปรตีนกาวไหมจากแผ่นฟิล์มสู่ biological fluid</u>

เนื่องจากโปรตีนกาวไหมมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนซึ่งจะก่อให้เกิดผลดีต่อการหายของบาดแผล ดังนั้นการแพร่ของโปรตีนกาวไหมจากแผ่นฟิล์มสู่ biological fluid ย่อมก่อให้เกิดผลดีเช่นเดียวกัน แต่ส่วนประกอบของแผ่นฟิล์มโปรตีนกาวไหมที่แตกต่างกันอาจมีผลต่อปริมาณโปรตีนกาวไหมที่ถูกปลดปล่อยออกมาด้วย

<u>วิธีทำการทดลอง</u>

1. นำแผ่นฟิล์มโปรตีนกาวไหมมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
2. นำแผ่นดังกล่าวใส่ไปในบีกเกอร์ที่บรรจุสารละลาย phosphate buffer solution pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บน stirrer
3. เก็บตัวอย่างสารละลายเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วย BCA assay kit ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน

ผลการศึกษาแสดงได้ดังภาพที่ 15



ภาพที่ 15 ปริมาณโปรตีนกาวไหมที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากแผ่นฟิล์มโปรตีนกาวไหมที่ประกอบด้วยเซริซิน PVA และ glycerin ในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน

ผลจากการศึกษาจะเห็นได้ว่า แผ่นฟิล์มที่ไม่มี glycerin เป็นองค์ประกอบจะปลดปล่อยโปรตีนกาวไหมออกมาได้ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับแผ่นฟิล์มที่มี glycerin เป็นองค์ประกอบอยู่ โดยปริมาณโปรตีนกาวไหมที่ถูกปลดปล่อยจากแผ่นฟิล์มที่มี glycerin ประกอบอยู่ร้อยละ 0.25 ถึง 2 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม ปริมาณโปรตีนที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากแผ่นฟิล์มจะสูงสุดที่เวลาประมาณ 9 ชั่วโมง

<u>ความเข้ากันได้ของแผ่นฟิล์มโปรตีนกาวไหมกับเซลล์</u>

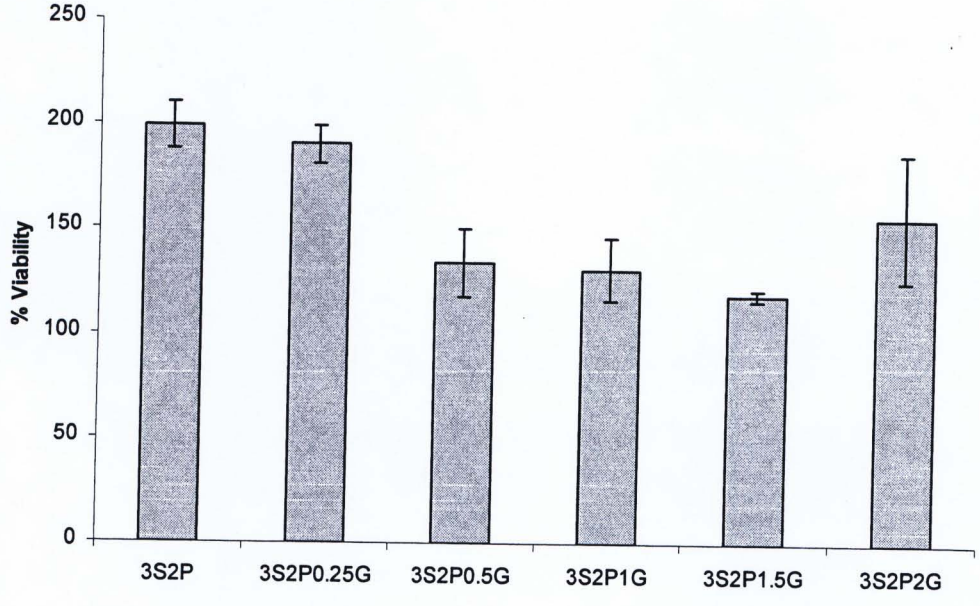
ทำการทดสอบโดยใช้ไฟโบรบลาสต์เซลล์ด้วยวิธี MTT assay

<u>วิธีการทดสอบ</u>

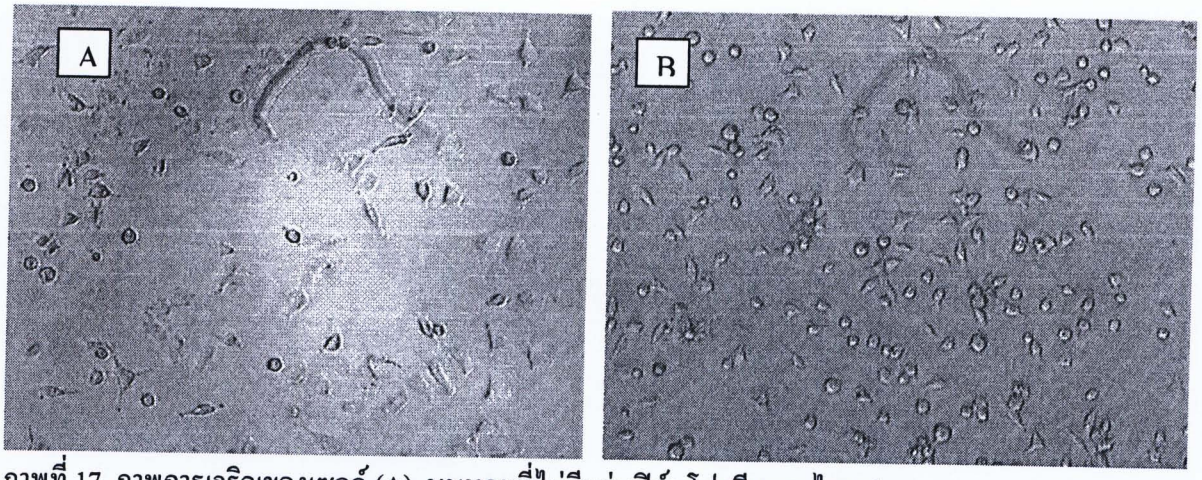
1. นำแผ่นฟิล์มโปรตีนกาวไหมมาตัดให้เป็นวงกลมขนาดเท่ากับ well plate
2. นำแผ่นฟิล์มที่ตัดแล้วไปวางใน well plate และฆ่าเชื้อด้วย ethylene oxide
3. นำเซลล์ที่ต้องการทดสอบ ซึ่งในที่นี้ใช้ L929 mouse fibroblast cells ในความเข้มข้นเริ่มต้น 2 x 10^4/หลุมมาใส่ในถาดหลุมขนาด 96 หลุม/plate ซึ่งมี Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ร่วมกับ fetal bovine serum (FBS) เป็นองค์ประกอบ

4. ในหลุมที่ไม่มีฟิล์มโปรตีนกาวไหมเป็นส่วนประกอบร่วมกับอาหารเลี้ยงเซลล์จะจัดเป็น negative control พร้อมกันนั้นในส่วนที่เป็น positive control จะมีการเติม melittin ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่ได้จากพิษของผึ้งเข้าไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วย
5. หลังจากเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์ในแต่ละหลุมจะถูกวิเคราะห์ด้วย MTT assay และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm เปรียบเทียบกับปริมาณเซลล์ที่มีอยู่ใน negative control

ผลการทดสอบแสดงในภาพที่ 16 และ 17



ภาพที่ 16 ผลของฟิล์มโปรตีนกาวไหมต่อการเจริญเติบโตของ fibroblast cell



ภาพที่ 17 ภาพการเจริญของเซลล์ (A) บนหลุมที่ไม่มีแผ่นฟิล์มโปรตีนกาวไหม (negative control) และ (B) บนหลุมที่มีแผ่นฟิล์มโปรตีนกาวไหม 3% sericin + 2% polyvinyl alcohol + 1% glycerine หลังจากเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง

จากภาพจะเห็นได้ว่าแผ่นฟิล์มที่ทำจากโปรตีนกาวไหมไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ อันจะเห็นได้จากอัตราการรอดชีวิตของเซลล์สูงกว่าร้อยละ 80 ทั้งสิ้นเมื่อเลี้ยงไปนาน 24 ชั่วโมง นอกจากนี้แผ่นฟิล์มที่มีองค์ประกอบของ glycerin อยู่ในปริมาณน้อย ๆ เช่น 0.25% จะทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์สูงกว่าแผ่นฟิล์มที่มีปริมาณ glycerin อยู่สูง ๆ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแผ่นฟิล์มที่มี glycerin เป็นส่วนผสมในปริมาณต่ำจะสามารถปลดปล่อยโปรตีนกาวไหมที่มีประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ออกมาได้มากกว่า ทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้สูงกว่า

จากผลการศึกษาทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า โปรตีนกาวไหมสามารถนำมาผลิตเป็นแผ่นฟิล์มที่ใช้ในการปิดแผลได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนซึ่งส่งผลดีต่ออัตราการหายของบาดแผลด้วย