แบบสรุปผู้บริหาร

(Executive Summary)

1. รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย/แผนงานวิจัย

1.1 ชื่อเรื่อง

(ภาษาไทย) การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลจากโปรตีนกาวไหมสำหรับการปลูกถ่ายผิวหนัง

(ภาษาอังกฤษ) Physical and biological properties of silk sericin scaffolds for skin grafting

1.2 ชื่อคณะผู้วิจัย

<u>หัวหน้าโครงการ</u>

รองศาสตราจารย์ ดร. พรอนงค์ อร่ามวิทย์
ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถนนพญาไท กทม. 10330
โทรศัพท์ 02-218-8409
โทรสาร 02-218-8403

<u>ผู้ร่วมงานวิจัย</u>

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โศรดา กนกพานนท์
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถนนพญาไท กทม. 10330
โทรศัพท์ 02-218-6867
โทรสาร 02-218-6867

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นิมิตร วรกุล
ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ต. คอหงส์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
โทรศัพท์ 074-428-148
โทรสาร 074-428-148

ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. ธีระพล ศรีชนะ
ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ต. คอหงส์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา
โทรศัพท์ 074-428-148
โทรสาร 074-428-148

1.3 งบประมาณและระยะเวลาทำวิจัย

ได้รับงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551 งบประมาณที่ได้รับ 1,166,000.00 บาท

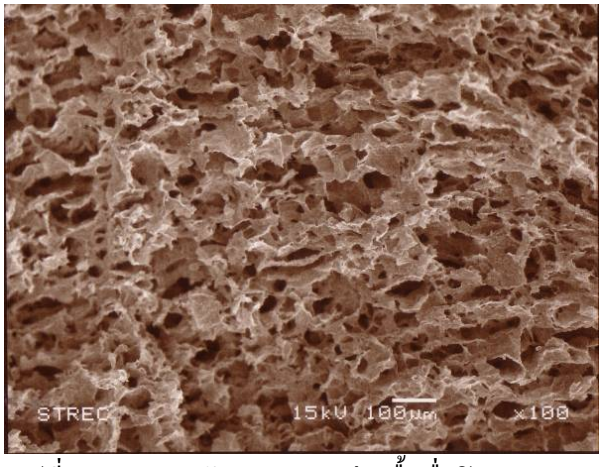
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ กันยายน 2551 ถึง สิงหาคม 2552

2. สรุปโครงการวิจัย

โปรตีนกาวไหมหรือที่เรียกว่าเซริซิน (sericin) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ยึดเกาะเส้นใยไหมให้ยึดติดกัน ซึ่งโปรตีนดังกล่าวจะถูกกำจัดออกในระหว่างกระบวนการสาวไหมและทิ้งไปในธรรมชาติ จากผลการวิจัยพบว่าโปรตีนกาวไหมสามารถเข้ากับเซลล์ผิวหนังมนุษย์ได้ดี มีส่วนประกอบของกรดอะมิโนที่สำคัญต่อร่างกายเช่น serine ในปริมาณสูง และสามารถกระตุ้นให้เซลล์สร้างคอลลาเจนซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งของการสมานแผลได้อีกด้วย โครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำโปรตีนกาวไหมมาพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อทดแทนของผิวหนังในผู้ป่วยที่ได้รับอุบัติเหตุจากสารเคมี ไฟไหม้ ความร้อน ทำการศึกษาโดยนำรังไหมสายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์ไทยลูกผสมมาสกัดโปรตีนกาวไหมด้วยวิธีต่าง ๆ อันได้แก่ การใช้ความร้อนภายใต้ความดัน การใช้สารละลายกรด สารละลายด่างและสารละลายยูเรีย คณะผู้วิจัยฯ พบว่าสายพันธุ์ไหมและวิธีการสกัดที่แตกต่างกันจะให้โปรตีนกาวไหมที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนในปริมาณที่แตกต่างกัน ส่งผลให้คุณสมบัติทางกายภาพและชีวภาพรวมถึงคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนแตกต่างกันไปด้วย อย่างไรก็ตาม โปรตีนกาวไหมจากทุกสายพันธุ์และทุกวิธีการสกัดยังประกอบไปด้วยกรดอะมิโน serine ในปริมาณสูงสุด รองลงมาได้แก่ aspartic acid และ glycine ตามลำดับ โดยโปรตีนกาวไหมที่ได้จากไหมสายพันธุ์ จุล 1/1 ที่สกัดด้วยความร้อนจะประกอบด้วยกรดอะมิโน methionine สูงกว่าโปรตีนกาวไหมที่ได้จากวิธีสกัดและจากไหมสายพันธุ์อื่น ๆ นอกจากนี้โปรตีนกาวไหมจากสายพันธุ์ดังกล่าวยังไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ สามารถกระตุ้นให้เซลล์สร้างคอลลาเจนได้สูงสุด ในขณะเดียวกันยังกระตุ้นให้เซลล์สร้าง interleukin-1β และ tumor necrosis factor-α ซึ่งเป็น proinflammatory cytokines ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการก่อการแพ้และความระคายเคืองได้ต่ำที่สุด เมื่อนำโปรตีนกาวไหมดังกล่าวมาขึ้นรูปร่วมกับ polyvinyl alcohol พบว่า แผ่นเนื้อเยื่อที่ได้มีความคงตัวดี มีขนาดรูพรุนที่เหมาะสมและสม่ำเสมอ การเชื่อมต่อระหว่างรูพรุนเหมาะสมต่อการเคลื่อนตัวของเซลล์เนื้อเยื่อมนุษย์เพื่อการสมานแผล นอกจากนี้ยังมี

ความยืดหยุ่นดี รวมถึงมีอัตราการปลดปล่อยโปรตีนกาวไหมออกจากแผ่นเนื้อเยื่อที่พอเหมาะต่อการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนจากบาดแผล ซึ่งขณะนี้อยู่ระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพของแผ่นเนื้อเยื่อในบาดแผลสัตว์ทดลองและในมนุษย์ เมื่อพิจารณาต้นทุนต่อชิ้นของแผ่นเนื้อเยื่อที่ผลิตขึ้นกับผลิตภัณฑ์จากต่างประเทศพบว่าแผ่นเนื้อเยื่อที่ผลิตจากโปรตีนกาวไหมมีราคาต่ำกว่าประมาณ 10 เท่า จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า ผลผลิตเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีในประเทศไทย หากนำมาศึกษาวิจัยเพื่อประยุกต์ใช้จะก่อให้เกิดประโยชน์และเพิ่มมูลค่าต่อสินค้าทางการเกษตรของไทย นับเป็นการยกระดับความเป็นอยู่ของเกษตรกรไทยอย่างยั่งยืน ดังตัวอย่างของงานวิจัยนี้ซึ่งมีการนำโปรตีนกาวไหมที่เหลือทิ้งในธรรมชาติมาพัฒนา ซึ่งนอกจากจะให้ประโยชน์ทางสาธารณสุขแล้ว ผลการวิจัยที่พบว่าโปรตีนกาวไหมมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนสามารถนำมาขยายผลเพื่อใช้ในทางอุตสาหกรรมอื่น ๆ เช่น อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง และเนื่องจากกรรมวิธีในการสกัดโปรตีนกาวไหมที่พบว่ามีประสิทธิภาพสูงสุดในผลงานวิจัยนี้ เป็นวิธีที่ไม่แตกต่างจากกรรมวิธีที่เกษตรกรใช้ในปัจจุบันมากนัก จากองค์ความรู้นี้ หากเกษตรกรมีการคัดแยกสายพันธุ์ของโปรตีนกาวไหมและวิธีการเก็บรักษาที่เหมาะสมแล้ว จะสามารถนำผลผลิตเหลือใช้ทางการเกษตรมาเพิ่มมูลค่าได้อีกมาก ก่อให้เกิดประโยชน์ทั้งทางด้านสาธารณสุขและเกษตรกรรมของประเทศอย่างยั่งยืน อีกทั้งยังสามารถลดการนำเข้าผลิตภัณฑ์จากต่างประเทศ

รูปที่ 1 แผ่นเนื้อเยื่อจากโปรตีนกาวไหม



รูปที่ 2 ภาพขยายตัดขวางของแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลด้วย SEM แสดงให้เห็นรูพรุนที่เชื่อมต่อกันเหมาะสำหรับการเคลื่อนตัวเข้าของเซลล์ผิวหนัง

3. บทคัดย่อภาษาไทยและบทคัดย่อภาษาอังกฤษ

<u>บทคัดย่อภาษาไทย</u>

โปรตีนจากกาวไหมที่เรียกว่า เซริซิน (sericin) เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่เชื่อมเส้นไหมให้ติดกันในรังไหม ในกระบวนการสาวไหมก่อนทำการสาวเป็นเส้นใย ผู้ผลิตจะต้องนำรังไหมไปต้มในน้ำร้อนเสียก่อนเพื่อกำจัดกาวไหม โปรตีนที่ได้จากกาวไหมมีส่วนประกอบของกรดอะมิโนที่สำคัญต่อร่างกายสูง แข็งตัว

เป็นเจลที่มีความแข็งแรงและยืดหยุ่นต่าง ๆ กันได้ตามอุณหภูมิในการผลิตและสารประกอบร่วมอื่น ๆ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ สามารถป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและดูดซึมน้ำได้ดีจึงสามารถทำให้ผิวหนังชุ่มชื้นอันเป็นคุณสมบัติที่ดีในการนำมาใช้กับบาดแผลเนื่องจากจะทำให้ผู้ป่วยเกิดความเจ็บปวดน้อยลง นอกจากนี้เซริซินยังสามารถกระตุ้นการสร้างและเพิ่มการยึดเกาะกันของเซลล์สร้างเส้นใยผิวหนังของมนุษย์ เพิ่มการสร้างคอลลาเจนทำให้บาดแผลในหนูทดลองหายได้รวดเร็วขึ้น ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงเห็นความเป็นไปได้ในการพัฒนาแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลจากโปรตีนกาวไหมสำหรับการปลูกถ่ายผิวหนัง

โครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกโปรตีนกาวไหมจากสายพันธุ์ไหมไทยที่มีคุณสมบัติเหมาะสม และคัดเลือกวิธีการสกัดที่มีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังมีการคัดเลือกสารประกอบร่วมอื่น ๆ (โพลิเมอร์) ที่จะนำมาใช้สร้างแผ่นเนื้อเยื่อ และศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผล โดยเริ่มดำเนินการจากการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของไหมไทย พิจารณาคุณสมบัติในการละลาย ปริมาณของกรดอะมิโนในโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ คุณสมบัติในการเกิดเจล คุณสมบัติทางชีวภาพของโปรตีนกาวไหม เช่น ความเข้ากันได้กับเซลล์ การกระตุ้นสารก่อการอักเสบอันได้แก่ Interleukin (IL) และ Tumor necrosis factor-α (TNF-α) หลังจากนั้นทำการคัดเลือกโพลิเมอร์ที่เหมาะสมที่จะนำมาทำเป็นแผ่นเนื้อเยื่อ (scaffold) ทำการขึ้นรูปโพลิเมอร์ผสมโปรตีนกาวไหมด้วยวิธี freeze-drying จนได้แผ่นเนื้อเยื่อที่ต้องการคือมีความพรุนสูง มีความยืดหยุ่นดี ดูดซับน้ำได้เหมาะสม อากาศสามารถถ่ายเทได้สะดวกและสามารถควบคุมการปลดปล่อยโปรตีนกาวไหมได้เพื่อใช้ในการทดสอบทางชีวภาพและในสัตว์ทดลองต่อไป

ผลการศึกษาวิจัยพบว่า รังไหมจากไหมสายพันธุ์ไทยที่ผ่านการคัดเลือกจำนวน 4 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์จุล 1/1 (รังไหมสีขาว) จุล 3/2 (รังไหมสีเขียว) จุล 4/2 (รังไหมสีเหลือง) และพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ (รังไหมสีเหลือง) เมื่อทำการสกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กันอันได้แก่ การสกัดด้วยความร้อน การสกัดด้วยกรด การสกัดด้วยด่างและด้วยสารละลายยูเรีย จะได้โปรตีนกาวไหมที่มีปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิดและคุณสมบัติทางกายภาพแตกต่างกัน แต่ยังประกอบด้วยกรดอะมิโน serine เป็นปริมาณสูงสุด รองลงมาได้แก่ aspartic acid และ glycine ตามลำดับ โปรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์จุล 1/1 ที่สกัดด้วยความร้อนสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังและการสร้างคอลลาเจนจากเซลล์ได้สูงสุด อีกทั้งยังกระตุ้นการสร้างสารก่อการอักเสบอันได้แก่ interleukin และ TNF-α ได้ต่ำที่สุด นอกจากนี้สายพันธุ์จุล 1/1 เป็นสายพันธุ์เดียวที่ให้โปรตีนกาวไหมซึ่งมีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้เซลล์สร้าง nitric oxide ได้ โดย nitric oxide ที่ถูกสร้างขึ้นมีปริมาณต่ำ ซึ่งปริมาณดังกล่าวอาจเป็นประโยชน์ในการกระตุ้นการสร้างโปรตีนและคอลลาเจนจากเซลล์มากกว่าที่จะก่อให้เกิดความเป็นพิษ ดังนั้นจึงเป็นสายพันธุ์ที่เหมาะที่จะนำมาใช้พัฒนาแผ่นเนื้อเยื่อต่อไป

จากการทดสอบโพลิเมอร์ต่าง ๆ พบว่า polyvinyl alcohol เป็นโพลิเมอร์ที่เหมาะสมในการนำมาใช้ขึ้นรูปแผ่นเนื้อเยื่อร่วมกับโปรตีนกาวไหมเซริซิน โดยอัตราส่วนที่เหมาะสมประกอบไปด้วยโปรตีนกาว

ไหม 3 ส่วนและ polyvinyl alcohol 2 ส่วน เมื่อนำมาขึ้นรูปโดยการใช้เครื่อง freeze-dryer พบว่าแผ่นเนื้อเยื่อที่ได้มีความเรียบเนียน ยืดหยุ่นดี ไม่มีการแยกส่วน และเมื่อศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของแผ่นดังกล่าวโดยใช้กล้อง scanning electron microscope ดูภาพตัดขวางพบว่า แผ่นเนื้อเยื่อดังกล่าวมีลักษณะเป็นรูพรุนสม่ำเสมอ แต่ละช่องรูพรุนมีการเชื่อมต่อกันซึ่งเป็นลักษณะที่เหมาะสมต่อการเคลื่อนตัวของเซลล์เนื้อเยื่อเพื่อการสมานแผลซึ่งจะทำการทดสอบในขั้นต่อไป

<u>บทคัดย่อภาษาอังกฤษ</u>

Silk sericin is a gumming protein in silkworm cocoons. Normally, sericin will be extracted out by heat during silk-waving process and then discarded. Since sericin composes of many essential amino acids, it also can form gel and has many biological activities such as anti-oxidant, anti-bacterial and moisture absorption, sericin may be a good material for wound healing. Moreover, many works show that sericin can activate the growth and attachment of fibroblast cells as well as collagen production.

The objectives of this work are to study physical and biological activities of silk sericin from Thai silk strain such as its amino acid content, gel forming property, cell-growth promotion, activate collagen production and pro-inflammatory cytokines activation. We also would like to select the appropriate extraction method of sericin for medical use. After forming silk sericin scaffold with polymers by freeze-drying, its physical and biological properties such as its elasticity, porousity and release of sericin from scaffold will be further investigated.

We found that the sericin obtained from four Thai silk strains, Chul 1/1 (white shell cocoon), Chul 3/2 (greenish shell cocoon), 4/2 (yellow shell cocoon) and Nangnoi (yellow shell cocoon) with different extraction methods (heat, acid, alkaline and urea extraction) composes of various amino acid content and different physical property. However, serine is still the most common amino acid found in sericin followed by aspartic acid and glycine, respectively. Sericin obtained by heat extraction from Chul 1/1 strain can promote the highest fibroblast cell proliferation and collagen production as well as the lowest pro-inflammatory cytokines activation (interleukin and tumor necrosis factor-α) compared to sericin from other silk strains. Moreover, sericin from Chul 1/1 strain is the only type which can activate small amount of nitric oxide production from cell. The level of nitric oxide generated from cell is low enough to activate protein and collagen synthesis without showing any toxicity. From these data, silk sericin obtained by heat extraction from Chul 1/1 will be selected for scaffold formation and future studies.

We also found that polyvinyl alcohol is a good candidate for sericin scaffold formation at the ratio of 2:3 for polyvinyl alcohol and sericin, respectively. After freeze-drying process, the sericin scaffold

shows smooth and homogenous structure with good elasticity. The cross section photos by scanning electron microscope (SEM) indicate homogenous porosity and inter-connected between pores which are the good property for cell migration during wound healing process.