รายงานการวิจัย

การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลจากโปรตีนกาวไหม สำหรับการปลูกถ่ายผิวหนัง

Physical and biological properties of silk sericin scaffolds for skin grafting

รองศาสตราจารย์ ดร. พรอนงค์ อร่ามวิทย์ (หัวหน้าโครงการ)

ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โศรดา กนกพานนท์

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นิมิตร วรกุล

ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

รองศาสตราจารย์ ดร. ธีระพล ศรีชนะ (ที่ปรึกษาโครงการ)

ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

กันยายน 2552

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

และผลงานนี้เป็นความรับผิดชอบของผู้วิจัยแต่ผู้เดียว

ปีงบประมาณ 2551

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2551 และคณะผู้ร่วมวิจัยทุกท่านที่สนับสนุนงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลจากโปรตีนกาวไหมสำหรับการปลูกถ่ายผิวหนัง

ชื่อผู้วิจัย ดร. พรอนงค์ อร่ามวิทย์ [1]

ดร. โศรดา กนกพานนท์ [2]

ดร. นิมิตร วรกุล [3]

ดร. ธีระพล ศรีชนะ[4]

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปี 2551 จำนวนเงิน 1,166,000.00 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ กันยายน 2551 **ถึง** สิงหาคม 2552

โปรตีนจากกาวไหมที่เรียกว่า เซริซิน (sericin) เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่เชื่อมเส้นไหมให้ติดกันในรังไหม ในกระบวนการสาวไหมก่อนทำการสาวเป็นเส้นใย ผู้ผลิตจะต้องนำรังไหมไปต้มในน้ำร้อนเสียก่อนเพื่อกำจัดกาวไหม โปรตีนที่ได้จากกาวไหมมีส่วนประกอบของกรดอะมิโนที่สำคัญต่อร่างกายสูง แข็งตัวเป็นเจลที่มีความแข็งแรงและยืดหยุ่นต่าง ๆ กันได้ตามอุณหภูมิในการผลิตและสารประกอบร่วมอื่น ๆ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ สามารถป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและดูดซึมน้ำได้ดีจึงสามารถทำให้ผิวหนังชุ่มชื้นอันเป็นคุณสมบัติที่ดีในการนำมาใช้กับบาดแผลเนื่องจากจะทำให้ผู้ป่วยเกิดความเจ็บปวดน้อยลง นอกจากนี้เซริซินยังสามารถกระตุ้นการสร้างและเพิ่มการยึดเกาะกันของเซลล์สร้างเส้นใยผิวหนังของมนุษย์ เพิ่มการสร้างคอลลาเจนทำให้บาดแผลในหนูทดลองหายได้รวดเร็วขึ้น ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงเห็นความเป็นไปได้ในการพัฒนาแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลจากโปรตีนกาวไหมสำหรับการปลูกถ่ายผิวหนัง

โครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกโปรตีนกาวไหมจากสายพันธุ์ไหมไทยที่มีคุณสมบัติเหมาะสมและคัดเลือกวิธีการสกัดที่มีประสิทธิภาพ 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 จนได้แผ่นเนื้อเยื่อที่

ต้องการคือมีความพรุนสูง 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 การสกัดด้วยด่างและด้วยสารละลายยูเรียจะได้โปรตีนกาวไหมที่มีปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิดและคุณสมบัติทางกายภาพแตกต่างกัน 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 ที่ถูกสร้างขึ้นมีปริมาณต่ำซึ่งปริมาณดังกล่าวอาจเป็นประโยชน์ในการกระตุ้นการสร้างโปรตีนและคอลลาเจนจากเซลล์มากกว่าที่จะก่อให้เกิดความเป็นพิษ ดังนั้นจึงเป็นสายพันธุ์ที่เหมาะที่จะนำมาใช้พัฒนาแผ่นเนื้อเยื่อต่อไป

จากการทดสอบโพลิเมอร์ต่าง ๆ พบว่า polyvinyl alcohol เป็นโพลิเมอร์ที่เหมาะสมในการนำมาใช้ขึ้นรูปแผ่นเนื้อเยื่อร่วมกับโปรตีนกาวไหมเซริซิน โดยอัตราส่วนที่เหมาะสมประกอบไปด้วยโปรตีนกาวไหม 3 ส่วนและ polyvinyl alcohol 2 ส่วน เมื่อนำมาขึ้นรูปโดยการใช้เครื่อง freeze-dryer พบว่าแผ่นเนื้อเยื่อที่ได้มีความเรียบเนียน ยืดหยุ่นดี ไม่มีการแยกส่วน และเมื่อศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของแผ่นดังกล่าวโดยใช้กล้อง scanning electron microscope ดูภาพตัดขวางพบว่า แผ่นเนื้อเยื่อดังกล่าวมีลักษณะเป็นรูพรุนสม่ำเสมอแต่ละช่องรูพรุนมีการเชื่อมต่อกันซึ่งเป็นลักษณะที่เหมาะสมต่อการเคลื่อนตัวของเซลล์เนื้อเยื่อเพื่อการสมานแผลซึ่งจะทำการทดสอบในขั้นต่อไป

---

[1] รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330 โทรศัพท์ 02-218-8409

[2] ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330 โทรศัพท์ 02-218-6867

[3] ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา โทรศัพท์ 074-428-148

[4] รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา โทรศัพท์ 074-428-148

คำสำคัญ เซริซิน, แผ่นปิดแผล, ปลูกถ่ายผิวหนัง

ABSTRACT

Title Physical and biological properties of silk sericin scaffolds for skin grafting

Researcher

1. Pornanong Aramwit, Pharm.D., Ph.D., Associate Professor
2. Sorada Kanokpanont, Ph.D., Assistant Professor
3. Nimit Worakul, Ph.D., Assistant Professor
4. Teerapol Srichana, Ph.D., Associate Professor

Budget 1,166,000.00 Baht

Period 1 year from September 2008 to August 2009

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.

Key words: Sericin, scaffold, skin grafting

สารบัญเรื่อง (Table of Content)

กิตติกรรมประกาศ 2

บทคัดย่อภาษาไทย 3

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ 5

บทนำ 12

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 14

ระเบียบวิธีการดำเนินการวิจัย 16

ผลการวิจัย

- การคัดเลือกสายพันธุ์ไหมที่มีความเหมาะสม 17
- การสกัดโปรตีนกาวไหมจากรังไหมด้วยวิธีต่าง ๆ กัน 24
- การศึกษาค่าการละลายของโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ ที่อุณหภูมิและ pH ต่าง ๆ กัน 26
- การศึกษาความหนืดของโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กันในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 32
- การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กัน 33
- การศึกษาคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนของโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กัน 36
- การศึกษาปริมาณของกรดอะมิโนประเภทต่าง ๆ ของโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กัน 41
- การศึกษาคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้าง interleukin-1 จากโปรตีนกาวไหม 44

สายพันธุ์ต่าง ๆ

- การศึกษาคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้าง tumor necrosis factor-α จากโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ 46
- การศึกษาคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้าง nitric oxide จากโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ 48
- การศึกษาคุณสมบัติของโพลิเมอร์ต่าง ๆ ที่มีอยู่ในท้องตลากที่สามารถนำมาใช้ทำแผ่นเนื้อเยื่อและขึ้นรูปแผ่นเนื้อเยื่อ 49

อภิปรายและวิจารณ์ผล 56

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 58

บรรณานุกรม 60

ภาคผนวก 64

สารบัญตาราง (List of Tables)

ตารางที่ 1	ลักษณะทางกายภาพของรังไหมที่ใช้ในการทดสอบ	17
ตารางที่ 2	ขนาดและน้ำหนักของรังไหมในแต่ละรุ่นของสายพันธุ์ต่าง ๆ	21
ตารางที่ 3	ปริมาณผลผลิตของโปรตีนกาวไหมที่สกัดจากไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ กันด้วยวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน	25
ตารางที่ 4	ค่าการละลายของโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กันที่อุณหภูมิ 25, 37 และ 50 องศาเซลเซียส	27
ตารางที่ 5	ค่าการละลายของโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ กันที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กันที่ pH 5, 7 และ 9	29
ตารางที่ 6	ปริมาณกรดอะมิโนของโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กัน	42
ตารางที่ 7	ปริมาณกรดอะมิโนของโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กัน	43
ตารางที่ 8	ลักษณะทางกายภาพของแผ่นเนื้อเยื่อที่มีส่วนประกอบของโปรตีนกาวไหมและโพลิเมอร์ในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน	50

สารบัญภาพ (List of Illustration)

ภาพที่ 1	ลักษณะของรังไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ ทั้ง 19 สายพันธุ์	18
ภาพที่ 2	ผลของอุณหภูมิต่อการละลายของโปรตีนกาวไหมที่ pH 7.0	29
ภาพที่ 3	ผลของ pH ต่อการละลายของโปรตีนกาวไหมที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	31
ภาพที่ 4	ค่าความหนืดของสารละลายโปรตีนกาวไหมจากสายพันธุ์จุล 1/1 ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	33
ภาพที่ 5	ผลการทดสอบความเป็นพิษของโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กันในความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังการเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง	35
ภาพที่ 6	ผลของโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กันที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1	38
ภาพที่ 7	ปริมาณคอลลาเจนต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ถูกสร้างขึ้นหลังจากได้รับโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ ในความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 24 ชั่วโมง	40
ภาพที่ 8	ผลการกระตุ้นสาร interleukin-1 จากโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่สกัดด้วยความร้อน	45
ภาพที่ 9	ผลการกระตุ้นสาร tumor necrosis factor-α จากโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่สกัดด้วยความร้อน	47
ภาพที่ 10	ปริมาณสาร nitric oxide ที่ถูกสร้างขึ้นจากเซลล์หลังจากถูกกระตุ้นด้วยโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์จุล 1/1 ที่สกัดด้วยความร้อน	49
ภาพที่ 11	ลักษณะทางกายภาพของแผ่นเนื้อเยื่อที่มีส่วนประกอบของ polyvinyl alcohol ร้อยละ 2	51
ภาพที่ 12	ลักษณะทางกายภาพของแผ่นเนื้อเยื่อที่มีส่วนประกอบของ polyvinyl alcohol และมีโปรตีนกาวไหมเป็นส่วนประกอบอยู่ตั้งแต่ร้อยละ 1-5	52
ภาพที่ 13	ภาพตัดขวางของแผ่นเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วย 2% polyvinyl alcohol เมื่อส่องด้วยกล้อง SEM	53
ภาพที่ 14	ภาพตัดขวางของแผ่นเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วย 1% sericin + 2% polyvinyl alcohol เมื่อส่องด้วยกล้อง SEM	53
ภาพที่ 15	ภาพตัดขวางของแผ่นเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วย 2% sericin + 2% polyvinyl alcohol เมื่อส่องด้วยกล้อง SEM	54
ภาพที่ 16	ภาพตัดขวางของแผ่นเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วย 3% sericin + 2% polyvinyl alcohol	54

เมื่อส่องด้วยกล้อง SEM
ภาพที่ 17 ภาพตัดขวางของแผ่นเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วย 4% sericin + 2% polyvinyl alcohol 55
เมื่อส่องด้วยกล้อง SEM
ภาพที่ 18 ภาพตัดขวางของแผ่นเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วย 5% sericin + 2% polyvinyl alcohol 55
เมื่อส่องด้วยกล้อง SEM

บทนำ

เนื่องจากการสร้างเนื้อเยื่อของผิวหนังในผู้ป่วยที่ได้รับอุบัติเหตุจากสารเคมี ไฟไหม้ ความร้อน ฯลฯ ที่ทำให้เกิดการหลุดลอกของผิวหนังมักจะเกิดขึ้นอย่างไม่สมบูรณ์ ก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ การเกิดแผลเป็น หรืออาจทำให้เกิดความผิดปกติต่อการทำงานของอวัยวะนั้น ๆ ได้ ด้วยเหตุนี้ศัลยแพทย์จึงจำเป็นต้องนำผิวหนังส่วนดีของผู้ป่วยมาติดบาดแผลดังกล่าวเพื่อช่วยให้การซ่อมแซมเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น ซึ่งในกระบวนการดังกล่าวนอกจากจะทำให้ผู้ป่วยต้องสูญเสียเนื้อเยื่อจากอวัยวะดีบางส่วนและก่อให้เกิดความเจ็บปวดแล้ว ยังอาจเป็นการเพิ่มความเสี่ยงต่อการติดเชื้อของผู้ป่วยได้อีกด้วย ในหลายประเทศได้มีการพยายามนำสารโพลิเมอร์มาใช้ติดบาดแผลแทนผิวหนังส่วนดีเหล่านี้แต่เนื่องจากสารโพลิเมอร์มักได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีทำให้ขาดคุณสมบัติที่เหมาะสมทางชีวภาพเช่น ความเข้ากันได้ต่อร่างกายมนุษย์ ความสามารถในการเสื่อมสลายในร่างกายมนุษย์ (biodegradable) การมีคุณสมบัติเป็นสารที่ก่อให้เกิดการแพ้ อีกทั้งคุณสมบัติทางด้านกายภาพอันได้แก่ความยืดหยุ่น คุณสมบัติในการละลาย การนำสารโพลิเมอร์หรือสารสังเคราะห์มาประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์ธรรมชาติบางตัวเช่น ไคโตซาน ได้พิสูจน์แล้วว่าสามารถก่อให้เกิดความเข้ากับเนื้อเยื่อสัตว์ทดลองได้ดี มีความยืดหยุ่นที่เหมาะสม สามารถเสื่อมสลายได้โดยเอ็นไซม์จากธรรมชาตินำมาใช้ประโยชน์เป็นเนื้อเยื่อปิดแผลได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามไคโตซานยังมีปัญหาด้านการผลิตที่ได้มาตรฐาน มีราคาค่อนเข้าสูง เป็นสารก่อเชื้อได้ดี อีกทั้งบางรายงานยังพบปัญหาด้านความเข้ากันได้ต่อร่างกายมนุษย์ในขนาดโมเลกุลต่าง ๆ กัน

โปรตีนไหมเป็นโปรตีนจากธรรมชาติ โดยเฉพาะโปรตีนจากกาวไหมที่เรียกว่า เซริซิน (sericin) เป็นส่วนที่ยังไม่มีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างจริงจัง ในกระบวนการสาวไหมก่อนทำการสาวเป็นเส้นใย ผู้ผลิตจะต้องนำรังไหมไปต้มในน้ำร้อนเสียก่อนเพื่อกำจัดกาวไหม หลังจากนั้นกาวไหมจะถูกทิ้งไปในธรรมชาติซึ่งนอกจากจะเป็นการสูญเสียโปรตีนที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ทางเศรษฐกิจแล้ว การเสื่อมสลายของกาวไหมในธรรมชาติอาจก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมได้ โปรตีนที่ได้จากกาวไหมมีส่วนประกอบของกรดอะมิโนที่สำคัญต่อร่างกายเช่น serine เป็นปริมาณสูง (ประมาณร้อยละ 30) สามารถแข็งตัวเป็นเจลที่มีความแข็งแรงและยืดหยุ่นต่าง ๆ กันได้ตามอุณหภูมิในการผลิตและสารประกอบร่วมอื่น ๆ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ และสามารถป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้อีกด้วย เนื่องจากเซริซินเป็นสารที่สามารถดูดซึมน้ำได้ดีจึงสามารถทำให้ผิวหนังชุ่มชื้นอันเป็นคุณสมบัติที่ดีในการนำใช้กับบาดแผลเนื่องจากจะทำให้ผู้ป่วยเกิดความเจ็บปวดน้อยลง ได้มีงานวิจัยพบว่าเซริซินสามารถกระตุ้นการสร้างและเพิ่มการยึดเกาะกันของเซลล์สร้างเส้นใยผิวหนังของมนุษย์ได้ (human skin fibroblasts) ผลการวิจัยเบื้องต้นยังพบอีกว่าเซริซินสามารถเพิ่มการสร้างคอลลาเจนทำให้บาดแผลในหนูทดลองหายได้รวดเร็วขึ้น ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงเห็นความเป็นไปได้ในการพัฒนาแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลจากโปรตีนกาวไหมสำหรับการปลูกถ่ายผิวหนังซึ่งนอกจากจะเป็น

ประโยชน์อย่างยิ่งต่อการแพทย์แล้ว ยังสามารถก่อให้เกิดรายได้แก่เกษตรกรอย่างยั่งยืนจากการนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาก่อให้เกิดประโยชน์และเพิ่มมูลค่าของไหมได้

ปัจจุบันในประเทศไทยมีการนำเข้าผิวหนังเทียมจากประเทศญี่ปุ่นซึ่งมีราคาสูงมาก ผลิตภัณฑ์เดียวที่มีการนำเข้าได้แก่ Terudermis® และมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในวงการแพทย์ อย่างไรก็ตาม Terudermis® ผลิตมาจาก bovine serum albumin ซึ่งนอกจากจะมีราคาสูงมากแล้ว ยังก่อให้เกิดการแพ้ในผู้ป่วยบางราย ซึ่งนับเป็นปัญหาที่มีความสำคัญอย่างยิ่งทางด้านสาธารณสุข หากนำโปรตีนไหมซึ่งเป็นโปรตีนที่ผลิตจากสัตว์เล็กซึ่งอาจก่อให้เกิดปฏิกิริยาและการแพ้ต่อร่างกายมนุษย์ที่น้อยกว่าจะก่อให้เกิดประโยชน์ทางการแพทย์อย่างมาก อีกทั้งยังสามารถลดรายจ่ายจากการนำเข้าสินค้าประเภทนี้ได้อย่างมาก

ได้มีการศึกษาคุณสมบัติในด้านต่าง ๆ ของเซริซินและพบว่าเซริซินประกอบด้วยกรดอะมิโนที่สำคัญต่าง ๆ เป็นจำนวนมาก เช่น serine ประมาณร้อยละ 30, asparagine ประมาณร้อยละ 18 และ glycine ประมาณร้อยละ 20 และเนื่องจากกรดอะมิโนหลายตัวในเซริซินเป็น polar hydrophilic groups ทำให้เซริซินมีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดีเมื่อเทียบกับไฟโบรอิน อีกทั้งยังมีความสามารถในการอุ้มน้ำ ทำให้ผิวหนังชุ่มชื้นเมื่อนำมาทาบนผิวด้วย นอกจากนี้ serine ยังเป็นกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในผิวหนังมนุษย์โดยมีคุณสมบัติในการเป็นสารดูดความชื้นจากธรรมชาติ (natural moisture factor) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่พบได้มากในโปรตีนกาวไหมเช่นกัน

นอกจากคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้นเซริซินยังมีคุณสมบัติอื่น ๆ อีกมากเช่น สามารถยับยั้งการสร้างเม็ดสีที่ผิวหนัง ยับยั้งการทำลายเซลล์จากรังสียูวีที่ทำให้เกิดเนื้องอก ลดการแข็งตัวของเลือด เพิ่มความสามารถในการเกาะยึดและเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างเส้นใย (fibroblast) ในหนูเมื่อใช้เซริซินแทนชั้นใต้ผิวหนัง (substratum) ได้ ในประเทศญี่ปุ่นพบว่าเซริซินมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของ human cell line หลายชนิด อีกทั้งยังสามารถกระตุ้นการสร้างและเพิ่มการยึดเกาะกันของเซลล์สร้างเส้นใยผิวหนังของมนุษย์ (human skin fibroblasts) นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยอีกเป็นจำนวนมากที่ใช้โปรตีนไหมเซริซินร่วมกับโปรตีนไหมไฟโบรอินเป็นเยื่อเลือกผ่าน (membrane) ในการสมานแผล โดยพบว่าสารทั้งสองตัวสามารถที่จะทำให้เซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนขึ้นและสามารถใช้แทนคอลลาเจนได้ แต่เนื่องจากสารสกัดโปรตีนไหมไฟโบรอินมีขั้นตอนที่ยุ่งยากและสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ไม่ง่ายนัก ทำให้ไฟโบรอินมีราคาค่อนข้างสูง อีกทั้งไฟโบรอินยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านอื่น ๆ เช่น ทางด้านสิ่งทอได้ ด้วยเหตุนี้จึงมีแนวคิดในการนำเฉพาะโปรตีนกาวไหมเซริซินซึ่งเป็นวัสดุเหลือใช้มาประยุกต์ใช้ในการรักษาแผลสดที่ผิวหนัง โดยในขั้นต้นพบว่าครีมเซริซินสามารถสมานแผลสดในหนูทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพและระยะเวลาในการสมานแผลลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับการรักษาแผลด้วย polyvinyl pyrrolidone (Betadine®) หรือ cream base ซึ่งผลของการใช้เซริซินในการรักษาขั้นต้นพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณการสร้างคอลลาเจนในแผล ดังได้กล่าวมาแล้วในเบื้องต้นว่าปริมาณคอลลาเจนเป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยทำให้บาดแผลหายเร็วขึ้น ดังนั้นหากสามารถ

นำโปรตีนกาวไหมเซริซินมาสร้างเป็นแผ่นเนื้อเยื่อซึ่งยังสามารถปลดปล่อยสารสำคัญและในขณะเดียวกันยังสามารถปกป้องบาดแผลพร้อมทั้งมีรูพรุนช่วยกระตุ้นการเคลื่อนตัวของเซลล์เนื้อเยื่อก็จะมีผลทำให้แผลหายได้รวดเร็วยิ่งขึ้นด้วย

เนื่องจากเซริซินมีฤทธิ์ในการสมานแผลได้ดี จึงมีแนวคิดว่าสามารถนำมาใช้สร้างเป็นแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลสำหรับการปลูกถ่ายผิวหนังได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งแนวคิดนี้ยังไม่มีการศึกษาทั้งในและต่างประเทศ อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะมีงานวิจัยตีพิมพ์ออกมาเป็นจำนวนมากเกี่ยวกับโปรตีนเซริซิน แต่การทดลองส่วนใหญ่เป็นผลมาจากเซริซินของไหมพันธุ์ต่างประเทศ ซึ่งมีลักษณะรังไหม โปรตีนไหมทั้งในด้านปริมาณและการเรียงตัวแตกต่างจากไหมพันธุ์ไทย ดังนั้นการนำเซริซินจากไหมพันธุ์ไทยซึ่งนับว่าเป็นหนึ่งในพันธุ์ไหมที่ดีที่สุดของโลกมาศึกษาจะเป็นการเพิ่มศักยภาพของผลิตผลทางการเกษตรในประเทศไทยอีกทั้งยังมีมูลค่าเพิ่มอย่างมากหากนำมาใช้ในทางการแพทย์ นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยที่มีแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวกซึ่งไม่จำเป็นต้องตัดผิวหนังส่วนดีมาเพื่อปะติดบริเวณที่เป็นแผลอีกต่อไป ด้วยแนวคิดนี้ ทำให้นักวิจัยเล็งเห็นถึงประโยชน์และความสำคัญของโครงการนี้ทั้งในด้านเศรษฐกิจ สังคม และทางการแพทย์

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ผลงานที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนไหมมีมากมาย แต่ส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับโปรตีนเส้นไหม (fibroin) ในขณะที่โปรตีนกาวไหม (sericin) ยังไม่มีคนศึกษามากนัก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการมีรายงานตั้งแต่ปี ค.ศ. 1999 โดย Kurosaki และคณะกล่าวว่า เส้นใยไหมที่ใช้ในการเย็บบาดแผลหากมีส่วนประกอบของเซริซินผสมอยู่จะทำให้ผู้ป่วยมีการตอบสนองโดยแสดงอาการแพ้ได้มากกว่า อย่างไรก็ตามรายงานข้างต้นเป็นการพบในผู้ป่วยเพียงรายเดียวเท่านั้น ต่อมาได้มีการศึกษาถึงผลของโปรตีนไหมทั้งไฟโบรอินและเซริซินต่อการตอบสนองโดย macrophage พบว่าโปรตีนไหมโดยเฉพาะเซริซินไม่ก่อให้เกิดการกระตุ้นของ macrophage แต่อย่างใด นอกจากนี้ยังไม่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการแพ้ ซึ่งเหตุผลดังกล่าวทำให้มีนักวิจัยสนใจนำโปรตีนไหมมาใช้เป็นวัสดุทางชีวเวช (biomedical materials) อย่างแพร่หลาย

มีการศึกษาผลของโปรตีนกาวไหมเซริซินต่อความสามารถในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังมนุษย์ (human fibroblast) และพบว่าเซริซินสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตและเพิ่มการยึดติด (attachment) กับเซลล์ผิวหนังได้เป็นอย่างดี ซึ่งสายพันธุ์ไหมที่ทำการศึกษาส่วนใหญ่จะเป็นไหมจากประเทศจีนหรือญี่ปุ่น นอกจากนี้ผลการวิจัยในเบื้องต้นพบว่าเซริซินสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนในบาดแผลของหนูทดลองได้ ซึ่งคอลลาเจนจัดเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งต่อการสมานแผล อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาการนำโปรตีนกาวไหมมาใช้ทำแผ่นปิดแผลอย่างจริงจัง มีเพียงการศึกษาโครงสร้างและคุณสมบัติทางกายภาพของเจลที่ผลิตจากโปรตีนเส้นไหมไฟโบรอินกับ polyvinyl alcohol และการศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างและคุณสมบัติทางกายภาพของเจลที่ผลิตจากโปรตีนกาวไหมเซริซินกับ polyvinyl alcohol เท่านั้น ส่วนการนำ

โปรตีนไหมมาทำเป็นโครง (scaffold) เพื่อใช้ประโยชน์การแพทย์มีเพียงการนำโปรตีนเส้นไหมไฟโบรอินมาประยุกต์ใช้สำหรับเป็นเอ็น (ligament) ทดแทน และหลอดเลือด (blood vessel) เท่านั้น

ในส่วนของสิทธิบัตรและทรัพย์สินทางปัญญาที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนกาวไหมเซริซินที่นำมาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์มีเฉพาะในต่างประเทศ โดยสิทธิบัตรที่มีเนื้อหาใกล้เคียงกับงานวิจัยนี้มากที่สุดคือ Wound dressing material containing silk fibroin and sericin as main component and method for preparing same ซึ่งเป็น United States Patent โดย Tsubouchi K และคณะ มีเนื้อหาในการใช้โปรตีนเส้นไหมไฟโบรอินและโปรตีนกาวไหมเซริซินเพื่อใช้สำหรับรักษาบาดแผล แต่สิทธิบัตรนี้เป็นเพียงแต่การนำโปรตีนไหมมาใช้เดี่ยว ๆ หรือนำโปรตีนไหมมาทำเป็นเกลือในรูปแบบต่าง ๆ เพื่อใช้สำหรับปิดแผลโดยไม่มีการนำโพลิเมอร์หรือสารอื่น ๆ เข้ามาเป็นส่วนประกอบ นอกจากนี้แผ่นปิดแผลที่กล่าวถึงยังมีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์มที่มีความหนาเพียง 10-130 ไมครอน ไม่มีลักษณะเป็นแผ่นรูพรุนที่ทำให้เกิดการเคลื่อน (migrate) ของเซลล์ผิวหนังเข้าไปยังรูพรุนนั้นได้ จึงมีลักษณะแตกต่างจากงานวิจัยนี้อย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังมีสิทธิบัตรอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องเช่น Wound covering material โดยนักวิจัยชาวญี่ปุ่นท่านเดียวกันที่กล่าวถึงการนำ non-crystalline fibroin ที่มีความหนา 10-100 ไมครอนมาใช้เป็นแผ่นปิดแผล ซึ่งสิทธิบัตรนี้ก็มีความแตกต่างจากงานวิจัยนี้เช่นเดียวกันเนื่องจากมุ่งเน้นไปที่โปรตีนเส้นไหมไฟโบรอินในขณะที่งานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่โปรตีนกาวไหมเซริซิน อีกทั้งสิทธิบัตรยังครอบคลุมถึงแผ่นปิดแผลที่มีความบาง ไม่ใช้สารอื่นหรือโพลิเมอร์เป็นส่วนประกอบ ไม่มีลักษณะเป็นรูพรุนอีกด้วย

สิทธิบัตรอื่นที่เกี่ยวข้องแต่มีความสัมพันธ์น้อยกว่ากับงานวิจัยนี้ได้แก่ Skin preparations for external use โดย Hiraki Y และคณะ ซึ่งวัตถุประสงค์หลักของสิทธิบัตรนี้ไม่ใช่เพื่อผลิตวัสดุที่ใช้ทางการแพทย์แต่เป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง โดยมีความครอบคลุมถึงการใช้ vitamin A และอนุพันธ์ รวมถึงเซริซินเป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอางดังกล่าว

ในด้านกระบวนการผลิตโครง (scaffold) มีการจดสิทธิบัตรในเรื่อง Method for preparing porous polymer scaffold for tissue engineering using gel spinning molding technique โดย Kim SH และคณะ ซึ่งวิธีการผลิตดังกล่าวแม้ว่าเจ้าของสิทธิบัตรจะอ้างว่า spinning molding technique จะทำให้ได้โครงที่มีรูพรุนขนาดเท่ากัน รูพรุนสามารถเชื่อมต่อกันได้ดีและมีประสิทธิภาพมากกว่าโครงที่สร้างขึ้นด้วยวิธีอื่น แต่การผลิตโครงที่ใช้ในงานวิจัยนี้ทำได้โดยกระบวนการ freeze-drying ซึ่งก็มีการยอมรับว่าสามารถให้รูพรุนที่มีประสิทธิภาพดีเช่นเดียวกัน

รายละเอียดของวัตถุดิบที่จะนำมาใช้ในงานวิจัยอันได้แก่โปรตีนกาวไหมเซริซิน Tsubouchi K และคณะได้จดสิทธิบัตรเกี่ยวกับน้ำหนักโมเลกุลของเซริซินที่มีผลต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ไว้ใน Sericin-containing material, process for producing the same method of using the same โดยระบุว่าเซริซินที่มีน้ำหนักโมเลกุล 400,000 ที่ถูกวัดโดย SDS-PAGE จะมีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์

ได้มากที่สุด อย่างไรก็ตามเซริซินที่เราสกัดได้จะมีน้ำหนักโมเลกุลเป็นช่วงตั้งแต่ 25-450 kDa ซึ่งในงานวิจัยนี้ไม่มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเซริซินที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วงใดช่วงหนึ่งโดยเฉพาะเนื่องจากจะทำให้วัสดุที่ผลิตขึ้นมีราคาแพงจากกระบวนการคัดแยกน้ำหนักโมเลกุลของเซริซิน และไม่ได้นำมาใช้เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์เท่านั้น ทำให้สิทธิบัตรที่ Tsubouchi K จดไว้ไม่เกี่ยวข้องโดยตรงกับงานวิจัยนี้

ในส่วนของการนำโพลิเมอร์หรือสารอื่น ๆ มาใช้เพื่อผลิตเป็นวัสดุทางการแพทย์ (medical materials) พบว่า Tanabe และคณะได้จดสิทธิบัตร Medical material of polyvinyl alcohol and process of making ในปี ค.ศ. 1988 โดยมีรายละเอียดเกี่ยวกับการนำ polyvinyl alcohol มาทำเป็น hydrogel เพื่อใช้เป็นส่วนประกอบในวัสดุทางการแพทย์ต่าง ๆ เนื่องจาก polyvinyl alcohol เป็นโพลิเมอร์หนึ่งที่นักวิจัยสนใจที่จะนำมาใช้ผลิตแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลร่วมกับโปรตีนกาวไหม แต่ในสิทธิบัตรดังกล่าวระบุถึงความเข้มข้นของ polyvinyl alcohol ที่สูงกว่าร้อยละ 6 และมี degree of hydrolysis ค่อนข้างสูงถึงร้อยละ 97 อีกทั้งมี polymerization degree ไม่ต่ำกว่า 1,100 ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้ความเข้มข้นของ polyvinyl alcohol ที่ต่ำกว่ามาก นอกจากนี้สิทธิบัตรดังกล่าวยังเป็นสิทธิบัตรที่ค่อนข้างเก่า ไม่ได้ระบุถึงการนำ polyvinyl alcohol มาผลิตเป็นแผ่นหรือนำมาใช้สำหรับบาดแผลด้วย

ดังจะเห็นได้ว่า มีสิทธิบัตรทั้งในและต่างประเทศที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนกาวไหมเซริซินที่นำมาใช้ทางด้านการแพทย์ไม่มากนัก โดยสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องมักจะอ้างถึงทั้งโปรตีนกาวไหมและโปรตีนเส้นไหม อีกทั้งยังไม่มีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับการนำมาใช้ทำแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผล อย่างไรก็ตามยังมีสิทธิบัตรเกี่ยวข้องกับโปรตีนกาวไหมที่นำมาใช้กับผิวหนังไม่ว่าจะเพื่อวัตถุประสงค์ด้านความงามในรูปแบบของเครื่องสำอางหรือรูปแบบเพื่อใช้ทางการแพทย์ ซึ่งเป็นหลักฐานอย่างหนึ่งที่แสดงให้เห็นว่าโปรตีนกาวไหมมีประสิทธิภาพในการรักษาเซลล์ผิวหนังได้เป็นอย่างดี สนับสนุนแนวคิดในการนำโปรตีนกาวไหมมาใช้เพื่อผลิตแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลได้

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

<u>การสกัดโปรตีนกาวไหม</u>

1. คัดเลือกสายพันธุ์ไหมที่มีความเหมาะสม โดยดูจากลักษณะทางกายภาพของรังไหม เส้นใย แหล่งผลิตที่ได้มาตรฐาน โดยดูจากกระบวนการควบคุมระหว่างการผลิต แหล่งอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงไหม
2. ทำการสกัดโปรตีนกาวไหมจากรังไหมด้วยวิธีต่าง ๆ อันได้แก่ การใช้ความร้อน การใช้กรด/ด่าง และการใช้สารละลายยูเรีย ทำการหาประสิทธิภาพในการผลิตและคุณภาพของโปรตีนกาวไหมที่ได้รับ เนื่องจากกรรมวิธีการสกัดที่แตกต่างกันจะให้โปรตีนกาวไหมที่มีคุณสมบัติ คุณภาพ ปริมาณของกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจมีผลต่อคุณสมบัติในการสมานแผลได้

<u>การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ เคมีและชีวภาพของโปรตีนกาวไหม</u>

ศึกษาลักษณะสมบัติของผงโปรตีนกาวไหมในด้านการละลาย เคมี (ปริมาณกรดอะมิโน) และชีวภาพ (ความเข้ากันได้กับเซลล์ผิวหนังแท้ ความสามารถในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจน การกระตุ้นการสร้างสารก่อการอักเสบ)

<u>การเตรียมและศึกษาลักษณะสมบัติของแผ่นเนื้อเยื่อ</u>

1. เตรียมแผ่นเนื้อเยื่อโดยใช้โปรตีนกาวไหมผสมกับโพลิเมอร์ต่าง ๆ เช่น polyvinyl alcohol หรือ poloxamer ในอัตราส่วนต่าง ๆ โดยวิธี freeze drying
2. ศึกษาลักษณะสมบัติของแผ่นเนื้อเยื่อที่ขึ้นรูปในด้านกายภาพ ได้แก่ ลักษณะทางภายนอก รูพรุนและความพรุน (electromicroscope)

ผลการวิจัย

การคัดเลือกสายพันธุ์ไหมที่มีความเหมาะสม

คณะผู้วิจัยได้ทำการหาแหล่งวัตถุดิบรังไหมจากแหล่งผลิตขนาดใหญ่ต่าง ๆ พบว่าแหล่งผลิตรังไหมที่มีขนาดใหญ่เพียงพอที่จะสามารถนำไปพัฒนาเป็นแหล่งผลิตโปรตีนกาวไหมเชิงพาณิชย์อีกทั้งยังมีการควบคุมคุณภาพในการผลิตรังไหมมี 2 แหล่งได้แก่

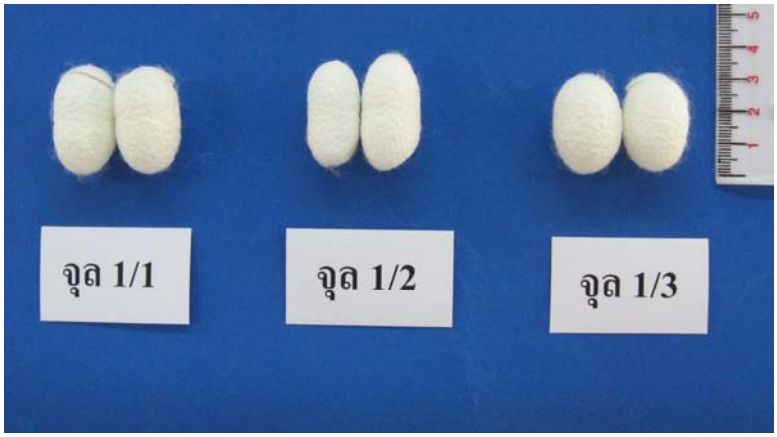
1. บริษัท จุลไหมไทย จำกัด ซึ่งผลิตรังไหมพันธุ์ไทยแท้และพันธุ์ไทยผสม จังหวัดเพชรบูรณ์
2. ไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 จากกลุ่มชาวบ้าน จังหวัดศรีสะเกษ

จากการพิจารณาลักษณะทางกายภาพของรังไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ และสอบถามข้อมูลจากแหล่งผลิตทั้งในด้านจำนวนผลผลิตต่อปี ความยาก-ง่ายในการเลี้ยง แหล่งอาหารที่ใช้และความสม่ำเสมอของการผลิต ผู้วิจัยได้คัดเลือกรังไหมสายพันธุ์ไทยผสมจำนวน 18 สายพันธุ์จากบริษัท จุลไหมไทย จำกัด และ 1 สายพันธุ์จากจังหวัดศรีสะเกษมาเพื่อทำการทดสอบคุณสมบัติของโปรตีนกาวไหมต่อไป ตารางที่ 1 สรุปลักษณะทางกายภาพของรังไหมแต่ละสายพันธุ์และ ภาพที่ 1 แสดงลักษณะทางกายภาพของรังไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ ทั้งสิ้นจำนวน 19 สายพันธุ์

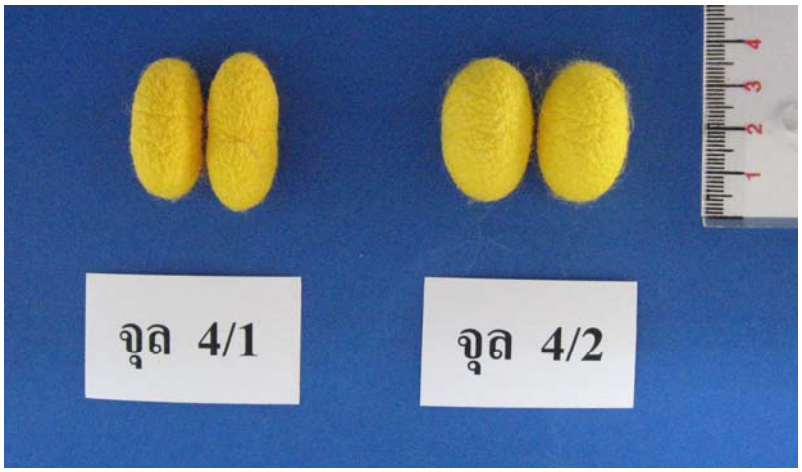
ตารางที่ 1 ลักษณะทางกายภาพของรังไหมที่ใช้ในการทดสอบ

ชื่อสายพันธุ์	**ลักษณะทางกายภาพของรังไหม**
จุล 1/1	รังไหมสีขาว มีขนาดรังใหญ่ รังอ้วนและมีเปลือกแข็ง
จุล 1/2	รังไหมสีขาว ลักษณะค่อนข้างรี
จุล 1/3	รังไหมสีขาว ลักษณะอ้วนป้อม

จุล 3/1	รังไหมสีเขียวเหลือง เปลือกค่อนข้างบาง
จุล 3/2	รังไหมสีเขียวเหลือง ลักษณะค่อนข้างรี เปลือกแข็ง
จุล 3/3	รังไหมสีเขียวเหลือง ลักษณะค่อนข้างรี เปลือกบาง
จุล 4/1	รังไหมสีเหลืองเข้ม ลักษณะค่อนข้างรี
จุล 4/2	รังไหมสีเหลืองเข้ม ลักษณะอ้วนป้อม เปลือกแข็ง
จุล 5/1	รังไหมสีขาว ลักษณะอ้วนป้อม
จุล 5/2	รังไหมสีขาว เปลือกแข็ง
จุล 5/3	รังไหมสีขาว รังค่อนข้างเล็ก มีลักษณะรี
จุล 5/4	รังไหมสีขาว ลักษณะอ้วนป้อม เปลือกแข็ง
จุล 6/1	รังไหมสีขาว เปลือกแข็ง ลักษณะรังใหญ่
จุล 6/2	รังไหมสีขาว ลักษณะค่อนข้างรี เปลือกบาง
จุล 10/1	รังไหมสีเขียว ลักษณะยาวรี เปลือกบาง
จุล 10/2	รังไหมสีเขียวเข้ม รังใหญ่ ลักษณะยาวรี
จุล 10/3	รังไหมสีเขียวเหลือง ลักษณะอ้วนป้อม เปลือกบาง
จุล 10/4	รังไหมสีเขียวอ่อน เปลือกบาง ลักษณะอ้วนป้อม
นางน้อยศรีสะเกษ 1	รังไหมสีเหลืองเข้ม เปลือกบาง ลักษณะรังยาว



จุล 3/1
จุล 3/2
จุล 3/3


จุล 4/1
จุล 4/2

จุล 5/1
จุล 5/2
จุล 5/3
จุล 5/4

ภาพที่ 1 ลักษณะของรังไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ ทั้ง 19 สายพันธุ์

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

ตารางที่ 2 ขนาดและน้ำหนักของรังไหมในแต่ละรุ่นของสายพันธุ์ต่าง ๆ

สายพันธุ์	รุ่น	น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)	SD `น้ำหนัก	ความกว้างเฉลี่ย (ซม.)	SD ความกว้าง	ความยาวเฉลี่ย (ซม.)	SD ความยาว
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 1/2	1	0.371	0.031	1.580	0.148	3.160	0.151
	2	0.366	0.039	1.630	0.116	3.330	0.189
	3	0.360	0.032	1.740	0.177	3.240	0.167
ค่าเฉลี่ยทั้ง 3 รุ่น		**0.366**	**0.035**	**1.650**	**0.132**	**3.243**	**0.188**
จุล 1/3	1	0.378	0.032	1.970	0.067	2.790	0.137
	2	0.375	0.019	1.850	0.151	2.840	0.117
	3	0.368	0.025	1.840	0.114	2.820	0.121
ค่าเฉลี่ยทั้ง 3 รุ่น		**0.374**	**0.025**	**1.887**	**0.129**	**2.817**	**0.127**
จุล 3/1	1	0.159	0.018	1.620	0.114	3.240	0.151
	2	0.174	0.015	1.660	0.143	3.280	0.123
	3	0.165	0.020	1.640	0.132	3.240	0.135
ค่าเฉลี่ยทั้ง 3 รุ่น		**0.166**	**0.018**	**1.640**	**0.127**	**3.253**	**0.135**
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 3/3	1	0.260	0.046	1.580	0.063	3.450	0.118
	2	0.299	0.027	1.590	0.099	3.440	0.158
	3	0.275	0.038	1.650	0.081	3.510	0.132

ค่าเฉลี่ยทั้ง 3 รุ่น		**0.278**	**0.042**	**1.607**	**0.084**	**3.467**	**0.136**
จุล 4/1	1	0.326	0.013	1.560	0.070	3.280	0.063
	2	0.308	0.016	1.550	0.071	3.270	0.142
	3	0.331	0.014	1.610	0.065	3.410	0.114
ค่าเฉลี่ยทั้ง 3 รุ่น		**0.322**	**0.016**	**1.573**	**0.069**	**3.320**	**0.117**
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**
จุล 5/1	1	0.396	0.052	1.700	0.105	3.260	0.135
	2	0.396	0.034	1.750	0.085	3.280	0.114
	3	0.410	0.045	1.820	0.115	3.140	0.128
ค่าเฉลี่ยทั้ง 3 รุ่น		**0.401**	**0.042**	**1.757**	**0.099**	**3.227**	**0.124**
จุล 5/2	1	0.399	0.051	1.750	0.108	3.310	0.137
	2	0.394	0.031	1.720	0.114	3.320	0.155
	3	0.410	0.029	1.810	0.120	3.260	0.127
ค่าเฉลี่ยทั้ง 3 รุ่น		**0.401**	**0.041**	**1.760**	**0.112**	**3.297**	**0.142**
จุล 5/3	1	0.318	0.029	1.630	0.067	3.240	0.143
	2	0.329	0.018	1.640	0.070	3.280	0.155
	3	0.365	0.024	1.710	0.072	3.310	0.161
ค่าเฉลี่ยทั้ง 3 รุ่น		**0.337**	**0.025**	**1.660**	**0.069**	**3.278**	**0.147**
จุล 5/4	1	0.341	0.035	1.900	0.082	2.960	0.097
	2	0.328	0.023	1.890	0.088	2.940	0.107
	3	0.349	0.031	1.920	0.076	2.870	0.089
ค่าเฉลี่ยทั้ง 3 รุ่น		**0.339**	**0.030**	**1.903**	**0.083**	**2.923**	**0.100**
จุล 6/1	1	0.390	0.049	1.790	0.110	3.270	0.095
	2	0.373	0.069	1.800	0.125	3.200	0.231
	3	0.385	0.051	1.840	0.135	3.310	0.115
ค่าเฉลี่ยทั้ง 3 รุ่น		**0.383**	**0.059**	**1.810**	**0.124**	**3.260**	**0.176**

จุล 6/2	1	0.373	0.041	1.880	0.092	3.290	0.160
	2	0.382	0.042	1.800	0.082	3.220	0.114
	3	0.380	0.038	1.820	0.079	3.310	0.155
ค่าเฉลี่ยทั้ง 3 รุ่น		**0.378**	**0.041**	**1.833**	**0.084**	**3.273**	**0.139**
จุล 10/1	1	0.285	0.023	1.720	0.079	3.540	0.126
	2	0.274	0.024	1.710	0.057	3.440	0.107
	3	0.291	0.021	1.800	0.062	3.510	0.115
ค่าเฉลี่ยทั้ง 3 รุ่น		**0.283**	**0.023**	**1.743**	**0.067**	**3.500**	**0.121**
จุล 10/2	1	0.291	0.021	1.750	0.053	3.530	0.116
	2	0.290	0.021	1.760	0.070	3.540	0.135
	3	0.310	0.019	1.800	0.062	3.510	0.122
ค่าเฉลี่ยทั้ง 3 รุ่น		**0.297**	**0.020**	**1.770**	**0.060**	**3.527**	**0.126**
จุล 10/3	1	0.270	0.021	1.810	0.057	3.300	0.082
	2	0.245	0.076	1.840	0.097	3.300	0.133
	3	0.261	0.035	1.910	0.074	3.150	0.114
ค่าเฉลี่ยทั้ง 3 รุ่น		**0.259**	**0.056**	**1.853**	**0.082**	**3.250**	**0.119**
จุล 10/4	1	0.281	0.021	1.900	0.094	3.360	0.107
	2	0.286	0.016	1.810	0.041	3.360	0.082
	3	0.292	0.018	2.100	0.077	3.420	0.079
ค่าเฉลี่ยทั้ง 3 รุ่น		**0.286**	**0.019**	**1.939**	**0.087**	**3.383**	**0.096**
นางน้อย	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**

จากคุณลักษณะในเบื้องต้น คณะผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ไหมเพื่อนำมาใช้ทดสอบต่อไปทั้งสิ้นจำนวน 4 สายพันธุ์อันได้แก่ จุล 1/1 (รังไหมสีขาว), จุล 3/2 (รังไหมสีเขียวเหลือง), จุล 4/2 (รังไหมสีเหลืองเข้ม) และพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 (รังไหมสีเหลืองเข้ม) เพื่อใช้ในการสกัดโปรตีนกาวไหม

การสกัดโปรตีนกาวไหมจากรังไหมด้วยวิธีต่าง ๆ กัน

ผู้วิจัยได้ใช้วิธีต่าง ๆ ในการสกัดโปรตีนกาวไหมจากรังไหมจำนวนทั้งสิ้น 4 วิธีได้แก่

1. การสกัดด้วยความร้อน
2. การสกัดด้วยสารละลายกรด
3. การสกัดด้วยสารละลายด่าง
4. การสกัดด้วยสารละลายยูเรีย

โดยแต่ละวิธีมีรายละเอียดในการสกัดดังต่อไปนี้

การสกัดด้วยความร้อน

โดยการนำรังไหมมาตัดเป็นชิ้นขนาด 5 มิลลิเมตร × 5 มิลลิเมตร ในกรณีที่รังไหมมีสี อาจทำการสกัดสีออกก่อน โดยการสกัดสีของรังไหมทำได้โดยการใช้สารละลาย 70% ethanol จนกว่าสีจะละลายออกหมดแล้วนำรังไหมที่สกัดสีออกแล้วไปตากให้แห้งในบรรยากาศปกติ หลังจากนั้นนำรังไหมที่ต้องการสกัดโปรตีนกาวไหมมาใส่ในน้ำ (อัตราส่วนน้ำหนักรังไหม:น้ำกลั่นบริสุทธิ์ = 1:30) และสกัดด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 121°C นาน 60 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วทำการกรองผ่านกระดาษกรองเพื่อแยกโปรตีนกาวไหมเซริซินออกจากโปรตีนเส้นไหมไฟโบรอิน นำสารละลายโปรตีนกาวไหมเซริซินไปทำให้แห้งด้วยวิธี freeze-drying

การสกัดด้วยสารละลายกรด

นำรังไหมมาตัดเป็นชิ้นขนาด 5 มิลลิเมตร × 5 มิลลิเมตร ในกรณีที่รังไหมมีสี อาจทำการสกัดสีออกก่อน โดยการสกัดสีของรังไหมทำได้โดยการใช้สารละลาย 70% ethanol จนกว่าสีจะละลายออกหมดแล้วนำรังไหมที่สกัดสีออกแล้วไปตากให้แห้งในบรรยากาศปกติ หลังจากนั้นนำรังไหมที่ต้องการสกัดโปรตีนกาวไหมมาใส่ในสารละลาย 1.25% citric acid (อัตราส่วนน้ำหนักรังไหม:สารละลายกรด = 9:160) และสกัดที่อุณหภูมิ 80°C นาน 30 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วทำการกรองผ่านกระดาษกรองเพื่อแยกโปรตีนกาวไหมเซริซินออกจากโปรตีนเส้นไหมไฟโบรอิน นำสารละลายที่ได้ไป dialyze ผ่าน membrane (MWCO 6,000-8,000) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลัง dialyze นำสารละลายที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยวิธี freeze-drying

การสกัดด้วยสารละลายด่าง

นำรังไหมมาตัดเป็นชิ้นขนาด 5 มิลลิเมตร × 5 มิลลิเมตร ในกรณีที่รังไหมมีสี อาจทำการสกัดสีออกก่อน โดยการสกัดสีของรังไหมทำได้โดยการใช้สารละลาย 70% ethanol จนกว่าสีจะละลายออกหมดแล้วนำรังไหมที่สกัดสีออกแล้วไปตากให้แห้งในบรรยากาศปกติ หลังจากนั้นนำรังไหมที่ต้องการสกัดโปรตีนกาวไหมมาใส่ในสารละลาย 0.5% sodium carbonate (อัตราส่วนน้ำหนักรังไหม:สารละลายด่าง = 9:160) และสกัดที่

อุณหภูมิ 80°C นาน 30 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วทำการกรองผ่านกระดาษกรองเพื่อแยกโปรตีนกาวไหมเซริซินออกจากโปรตีนเส้นไหมไฟโบรอิน นำสารละลายที่ได้ไป dialyze ผ่าน membrane (MWCO 6,000-8,000) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลัง dialyze นำสารละลายที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยวิธี freeze-drying

การสกัดด้วยสารละลายยูเรีย

นำรังไหมมาตัดเป็นชิ้นขนาด 5 มิลลิเมตร × 5 มิลลิเมตร ในกรณีที่รังไหมมีสี อาจทำการสกัดสีออกก่อน โดยการสกัดสีของรังไหมทำได้โดยการใช้สารละลาย 70% ethanol จนกว่าสีจะละลายออกหมดแล้วนำรังไหมที่สกัดสีออกแล้วไปตากให้แห้งในบรรยากาศปกติ หลังจากนั้นนำรังไหมที่ต้องการสกัดโปรตีนกาวไหมมาใส่ในสารละลาย 8M urea (อัตราส่วนน้ำหนักรังไหม:สารละลายยูเรีย = 6:150) และสกัดที่อุณหภูมิ 85°C นาน 30 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วทำการกรองผ่านกระดาษกรองเพื่อแยกโปรตีนกาวไหมเซริซินออกจากโปรตีนเส้นไหมไฟโบรอิน นำสารละลายที่ได้ไป dialyze ผ่าน membrane (MWCO 6,000-8,000) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลัง dialyze นำสารละลายที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยวิธี freeze-drying

จากผลการสกัดพบว่าปริมาณผลผลิต (yield) ที่ได้ในแต่ละวิธีมีความแตกต่างกันโดยวิธีการสกัดด้วยสารละลายด่างจะให้ปริมาณผลผลิตต่ำที่สุด ส่วนวิธีการสกัดด้วยความร้อนและสารละลายยูเรียจะให้ผลผลิตค่อนข้างสูง โดยผลผลิตที่ได้จากการสกัดแต่ละสายพันธุ์แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณผลผลิตของโปรตีนกาวไหมที่สกัดจากไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ กันด้วยวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน

สายพันธุ์/วิธีสกัด	**ค่าเฉลี่ยปริมาณผลผลิต (Ave. % yield)**	**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 H	19.26	1.47
นางน้อยศรีสะเกษ U	26.61	2.22
นางน้อยศรีสะเกษ A	15.11	0.98
นางน้อยศรีสะเกษ B	12.28	1.68
นางน้อยศรีสะเกษ H*	21.33	0.73
นางน้อยศรีสะเกษ U*	23.42	2.65
นางน้อยศรีสะเกษ A*	17.05	1.44
นางน้อยศรีสะเกษ B*	9.83	1.29

* แสดงการสกัดสีก่อนนำมาสกัดโปรตีนกาวไหม

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

<u>หมายเหตุ</u> ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการสกัดทั้งสิ้น 6 ครั้ง

จากผลการสกัดพบว่า ปริมาณของสารสกัดที่ได้และลักษณะทางภายนอกเช่น สี ความหนืดของการสกัดในแต่ละรุ่นไม่แตกต่างกันมากนัก

การศึกษาค่าการละลายของโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กันที่อุณหภูมิและpH ต่าง ๆ กัน

<u>วิธีการทดสอบ</u>

1. นำผงของโปรตีนกาวไหมในปริมาณที่มากเกินพอมาใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุสารละลาย phosphate buffer solution pH 7.0 ปิดด้วย parafilm ให้สนิท (หรือปรับ pH ให้เป็น 5 หรือ 9 ด้วยสารละลาย HCl หรือ NaOH)

2. Vortex ให้เข้ากันนาน 1 นาที
3. นำหลอดทดลองดังกล่าวมาใส่ใน water bath ที่มีการเขย่าอย่างสม่ำเสมอและปรับอุณหภูมิให้อยู่ที่ 25 องศาเซลเซียส (หรือ 37, 50 องศาเซลเซียส ในกรณีที่ต้องการศึกษาผลของอุณหภูมิ) 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 4 และภาพที่ 2 ดังนี้

ตารางที่ 4 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	4.52	4.25
จุล 1/1 H	33.74	48.68	42.55
จุล 1/1 A	30.68	36.65	31.24
จุล 1/1 B	154.78	245.20	225.74
จุล 3/2 U	3.47	6.26	2.24
จุล 3/2 H	146.43	148.09	101.57
จุล 3/2 A	53.59	58.05	84.25
จุล 3/2 B	208.35	228.96	187.22
จุล 3/2 U*	3.84	6.51	4.04
จุล 3/2 H*	152.32	192.99	123.40
จุล 3/2 A*	23.32	29.36	35.55
จุล 3/2 B*	186.70	271.06	184.66

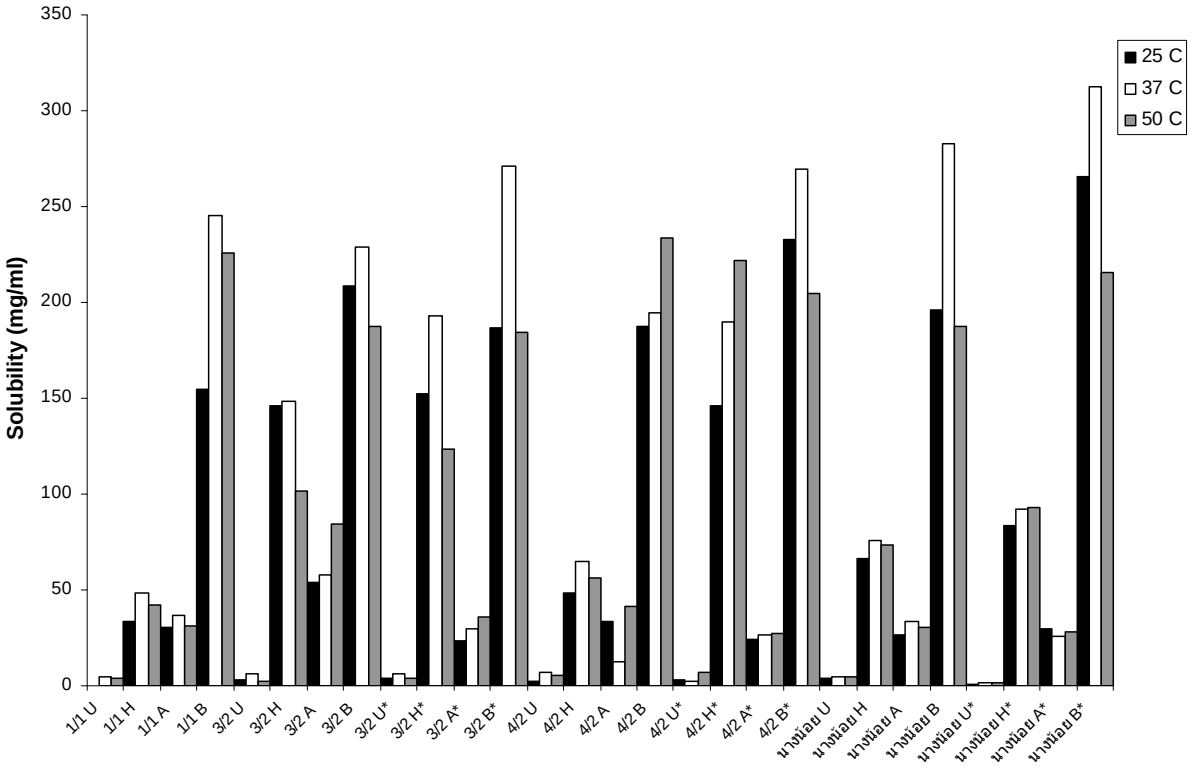
จุล 4/2 U	2.67	7.12	5.53
จุล 4/2 H	48.33	64.83	56.47
จุล 4/2 A	33.70	12.69	41.29
จุล 4/2 B	187.43	194.79	233.39
จุล 4/2 U*	2.89	2.45	6.75
จุล 4/2 H*	145.81	190.18	221.70
จุล 4/2 A*	23.90	26.56	27.37
จุล 4/2 B*	232.88	269.82	204.88
นางน้อยศรีสะเกษ 1 U	3.66	4.64	4.39
นางน้อยศรีสะเกษ 1 H	66.56	75.68	73.25
นางน้อยศรีสะเกษ 1 A	26.44	33.90	30.65
นางน้อยศรีสะเกษ 1 B	196.14	283.19	187.69
นางน้อยศรีสะเกษ 1 U*	0.86	1.18	1.63
นางน้อยศรีสะเกษ 1 H*	83.71	92.44	92.86
นางน้อยศรีสะเกษ 1 A*	29.45	25.86	28.28
นางน้อยศรีสะเกษ 1 B*	265.73	312.84	215.34

* แสดงการสกัดสีก่อนนำมาสกัดโปรตีนกาวไหม

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

หมายเหตุ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการสกัดทั้งสิ้น 3 ครั้ง

ค่าดังกล่าวสามารถนำมาแสดงได้ดังภาพที่ 2



* แสดงการสกัดสีก่อนนำมาสกัดโปรตีนกาวไหม

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

ภาพที่ 2: ผลของอุณหภูมิต่อการละลายของโปรตีนกาวไหมที่ pH 7.0

ค่าการละลายของโปรตีนกาวไหมที่ pH ต่าง ๆ กัน ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสแสดงในตารางที่ 5 และภาพที่ 3 ดังนี้

ตารางที่ 5 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	0.31	1.44
จุล 1/1 H	90.47	33.74	122.77
จุล 1/1 A	31.52	30.68	14.13
จุล 1/1 B	170.96	154.78	241.52

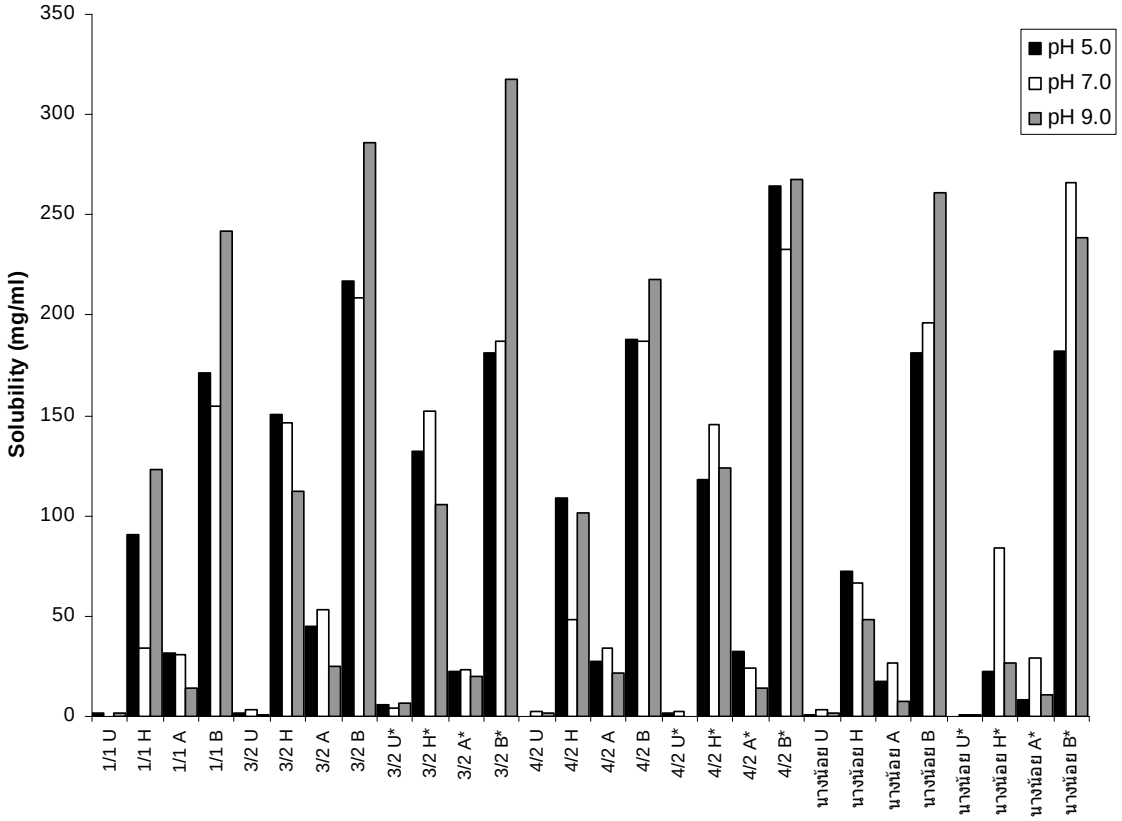
จุล 3/2 U	1.84	3.47	1.13
จุล 3/2 H	150.51	146.43	112.32
จุล 3/2 A	44.54	53.59	24.70
จุล 3/2 B	216.60	208.35	285.67
จุล 3/2 U*	5.84	3.84	6.68
จุล 3/2 H*	131.77	152.32	105.62
จุล 3/2 A*	22.33	23.32	20.02
จุล 3/2 B*	180.92	186.70	317.43
จุล 4/2 U	0.40	2.67	1.77
จุล 4/2 H	108.79	48.33	101.56
จุล 4/2 A	27.74	33.70	21.54
จุล 4/2 B	188.03	187.43	217.78
จุล 4/2 U*	1.26	2.89	0.13
จุล 4/2 H*	118.40	145.81	124.16
จุล 4/2 A*	32.60	23.90	13.72
จุล 4/2 B*	264.70	232.88	267.81
นางน้อยศรีสะเกษ 1 U	1.01	3.66	1.56
นางน้อยศรีสะเกษ 1 H	72.51	66.56	48.15
นางน้อยศรีสะเกษ 1 A	17.81	26.44	7.86
นางน้อยศรีสะเกษ 1 B	181.43	196.14	261.24
นางน้อยศรีสะเกษ 1 U*	0.32	0.86	0.90
นางน้อยศรีสะเกษ 1 H*	22.71	83.71	26.49
นางน้อยศรีสะเกษ 1 A*	8.45	29.45	10.80
นางน้อยศรีสะเกษ 1 B*	182.34	265.73	238.23

* แสดงการสกัดสีก่อนนำมาสกัดโปรตีนกาวไหม

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

<u>หมายเหตุ</u> ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการสกัดทั้งสิ้น 3 ครั้ง

ค่าดังกล่าวสามารถนำมาแสดงได้ดังภาพที่ 3



* แสดงการสกัดสีก่อนนำมาสกัดโปรตีนกาวไหม

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

ภาพที่ 3: ผลของ pH ต่อการละลายของโปรตีนกาวไหมที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าอุณหภูมิมีผลต่อค่าการละลายของโปรตีนกาวไหม โดยโปรตีนกาวไหมสามารถละลายได้ดีขึ้นในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยที่รายงานว่า โปรตีนกาวไหมเป็นโปรตีนที่ประกอบไปด้วยเปปไทด์ประมาณ 18 ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ กัน โดยเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะสามารถละลายได้ดีในอุณหภูมิต่ำ ส่วนเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะสามารถละลายได้เมื่อเพิ่มอุณหภูมิ อย่างไรก็ตามหากมีการเพิ่มอุณหภูมิสูงกว่า 37 องศาเซลเซียสเช่น 50 องศาเซลเซียส ผลพบว่าค่าการละลายของโปรตีนกาวไหมลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับที่ 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

ในส่วนของวิธีการสกัดก็มีผลต่อค่าการละลายของโปรตีนกาวไหม โดยวิธีการสกัดด้วยสารละลายด่างจะให้โปรตีนกาวไหมที่มีค่าการละลายสูงสุด รองลงมาคือโปรตีนกาวไหมที่ได้จากการสกัดด้วยความร้อน, ด้วยสารละลายกรดและสารละลายยูเรียตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกันในทุกสายพันธุ์

ในส่วนของการสกัดสีจะพบว่า ส่วนใหญ่การสกัดสีออกจากรังไหมก่อนที่จะนำมาสกัดโปรตีนกาวไหมเซริซินมักจะส่งผลให้ค่าการละลายของโปรตีนกาวไหมเพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการจับตัวกันระหว่างโปรตีนกาวไหมกับสาร carotenoid หรือ flavonoid ซึ่งเป็นสารประกอบหลักที่ก่อให้เกิดสีในรังไหม ส่งผลให้เกิดเป็นสารประกอบโมเลกุลใหญ่ที่มีการละลายลดลง

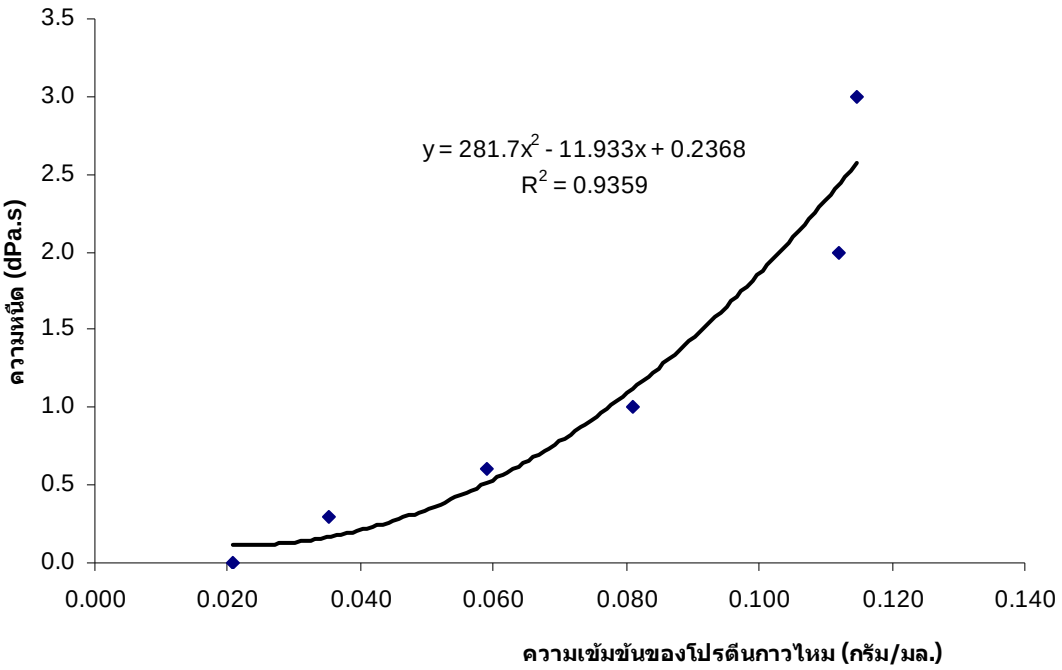
จากค่าการละลายสามารถสรุปได้ว่าการนำโปรตีนกาวไหมมาผสมรวมกับโพลิเมอร์เพื่อขึ้นรูปเป็นแผ่นเนื้อเยื่อควรหลีกเลี่ยงการใช้โปรตีนกาวไหมที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลายยูเรียและสารละลายกรด แต่ควรใช้โปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยด่างหรือความร้อนแทนเนื่องจากมีค่าการละลายที่สูงกว่า ทำให้สามารถใช้โปรตีนกาวไหมในความเข้มข้นสูงได้

การศึกษาความหนืดของโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กันในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

<u>วิธีการทดสอบ</u>

1. นำรังไหมมาสกัดด้วยความร้อนในน้ำ
2. นำตัวอย่างที่ได้มากรองเพื่อเอากากไหมออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1
3. นำสารละลายที่ได้ในข้อ 2) มาทำให้เข้มข้นด้วยการระเหยน้ำออกที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 3 ชั่วโมง
4. นำสารละลายในข้อ 2) มาทำการวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วย BCA kit พร้อมวัดความหนืด
5. ทำ serial dilution ของสารละลายโปรตีนกาวไหมในข้อ 4) ด้วยน้ำบริสุทธิ์จำนวน 5 ความเข้มข้น วัดความหนืดของแต่ละความเข้มข้น

จากการทดสอบโดยใช้รังไหมสายพันธุ์จุล 1/1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่มีสีมาเป็นตัวแทนเพื่อทดสอบค่าความหนืดของสารละลายโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยความร้อนในความเข้มข้นต่าง ๆ กันได้ผลดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4: ค่าความหนืดของสารละลายโปรตีนกาวไหมจากสายพันธุ์จุล 1/1 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการสกัดและวัดทั้งสิ้น 3 ครั้ง

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า สารละลายโปรตีนกาวไหมที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นจะมีความหนืดเพิ่มมากขึ้น ซึ่งความเข้มข้นที่สูงมาก ๆ อาจไม่เหมาะต่อการนำมาประยุกต์ใช้ต่อไปเนื่องจากสามารถเข้ากับสารละลายของโพลิเมอร์อย่างสม่ำเสมอได้ยาก โดยน้ำบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิห้องซึ่งจะเป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการละลายโพลิเมอร์มีความหนืดประมาณ 1.0 mPa.S จากค่าดังกล่าวจะเห็นได้ว่าสารละลายโปรตีนกาวไหมที่ได้จากไหมสายพันธุ์จุล 1/1 ด้วยวิธีการสกัดด้วความร้อน ที่นำมาใช้ไม่ควรมีความเข้มข้นสูงกว่า 0.08 กรัม/มิลลิลิตร หรือ 80 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กัน

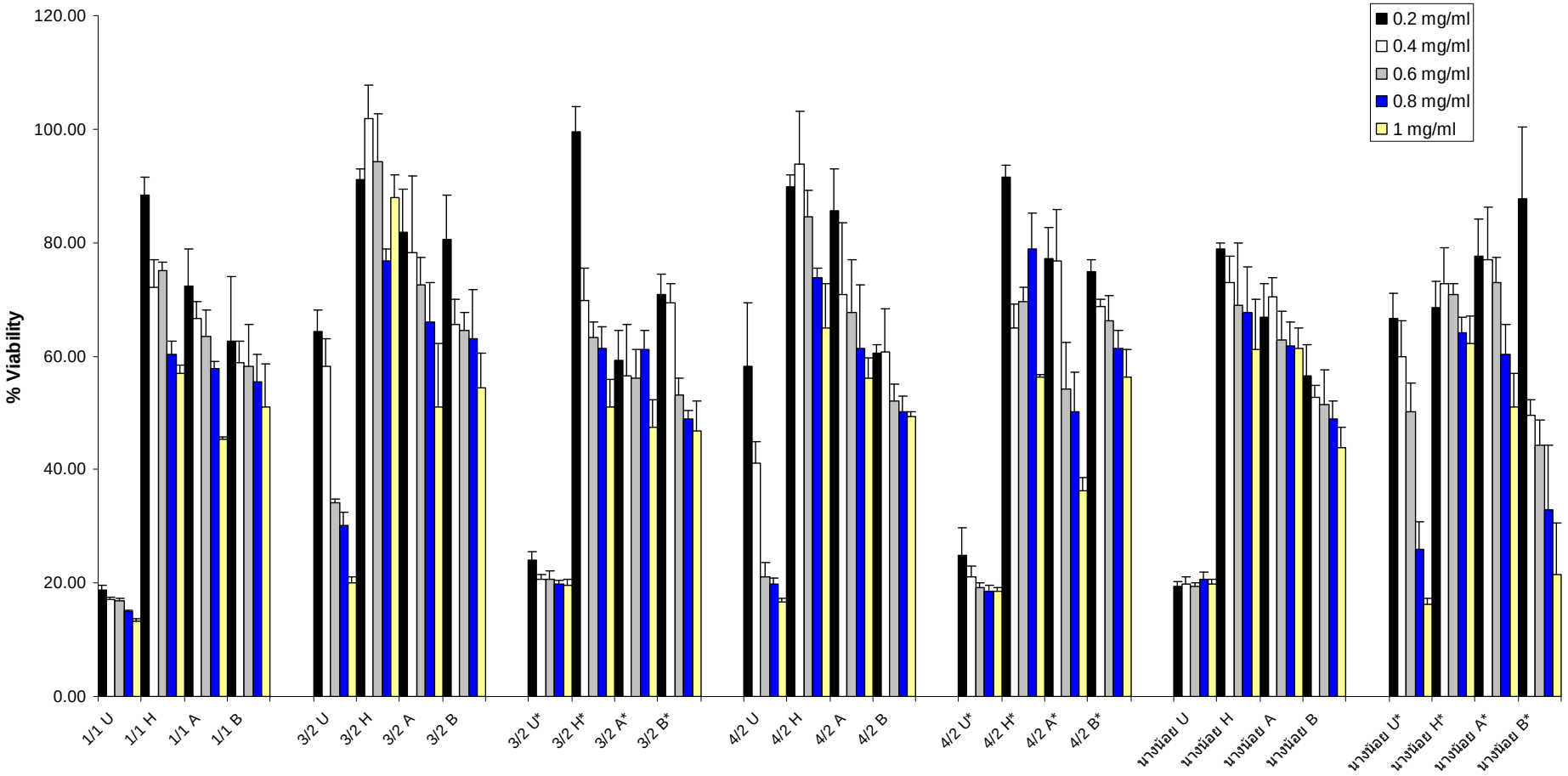
โดยก่อนที่จะมีการศึกษาคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนของโปรตีนกาวไหมต่อเซลล์จำเป็นต้องมีการศึกษาความเป็นพิษของโปรตีนกาวไหมต่อเซลล์ก่อน เนื่องจากปริมาณของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงอาจมีผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่ถูกสร้างขึ้นได้ วิธีการทดสอบความเป็นพิษของโปรตีนกาวไหมต่อเซลล์ทำได้โดยใช้ 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

วิธีการทดสอบความเป็นพิษของโปรตีนกาวไหมต่อเซลล์

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

ผลการทดสอบความเป็นพิษของโปรตีนกาวไหมต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์แสดงในภาพที่ 5

หมายเหตุ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการสกัดและวัดทั้งสิ้น 6 ครั้ง



* แสดงการสกัดสีก่อนนำมาสกัดโปรตีนกาวไหม

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

ภาพที่ 5: ผลการทดสอบความเป็นพิษของโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กันในความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ หลังการเลี้ยงนาน 24 ชม.

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าโปรตีนกาวไหมที่ได้จากวิธีการสกัดที่แตกต่างกันแสดงความเป็นพิษต่อการเจริญเติบโตของไฟโบรบลาสต์แตกต่างกัน 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

จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่าโปรตีนกาวไหมที่ได้จากการสกัดด้วยความร้อนจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำที่สุด ดังนั้นจึงควรใช้โปรตีนกาวไหมที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีนี้ในการสร้างแผ่นเนื้อเยื่อต่อไป นอกจากนี้ความเข้มข้นของโปรตีนกาวไหมในระดับต่ำ ๆ คือ 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จะเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการนำมาใช้สร้างแผ่นเนื้อเยื่อด้วย

การศึกษาคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนของโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กัน

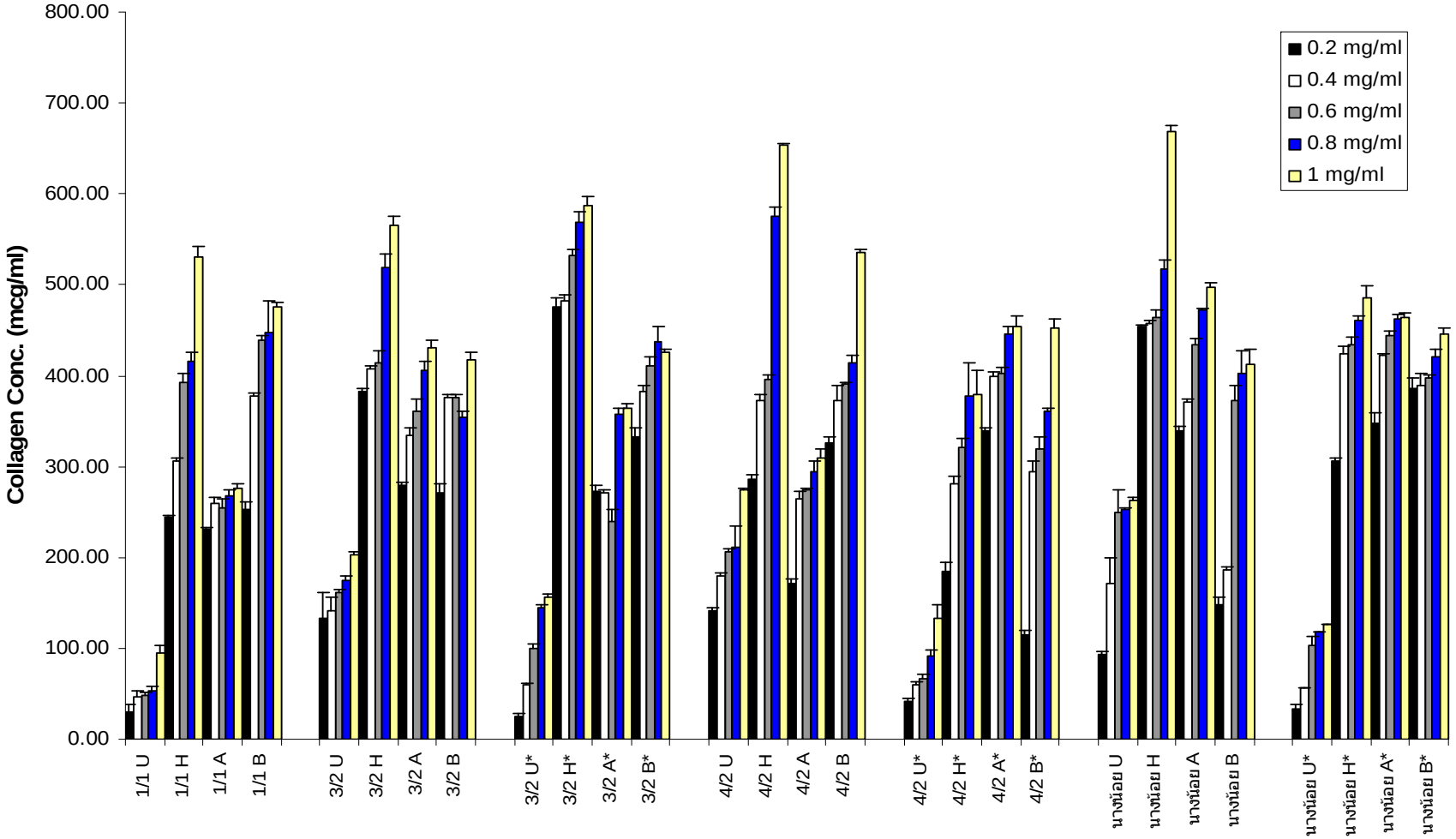
<u>วิธีทดสอบความสามารถในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนของโปรตีนกาวไหม</u>

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 สารละลายในส่วนของ supernatant จะถูกนำมาทดสอบปริมาณของคอลลาเจนชนิดที่ 1 ด้วย Sircol® collagen assay kit (Biocolor Ltd., Northern Ireland, UK) (เอกสารแนบที่ 2) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 nm เปรียบเทียบกับ standard curve ของคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่สกัดจากวัว

ผลการทดสอบคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนของโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กันแสดงในภาพที่ 6

<u>หมายเหตุ</u> ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการสกัดและวัดทั้งสิ้น 6 ครั้ง

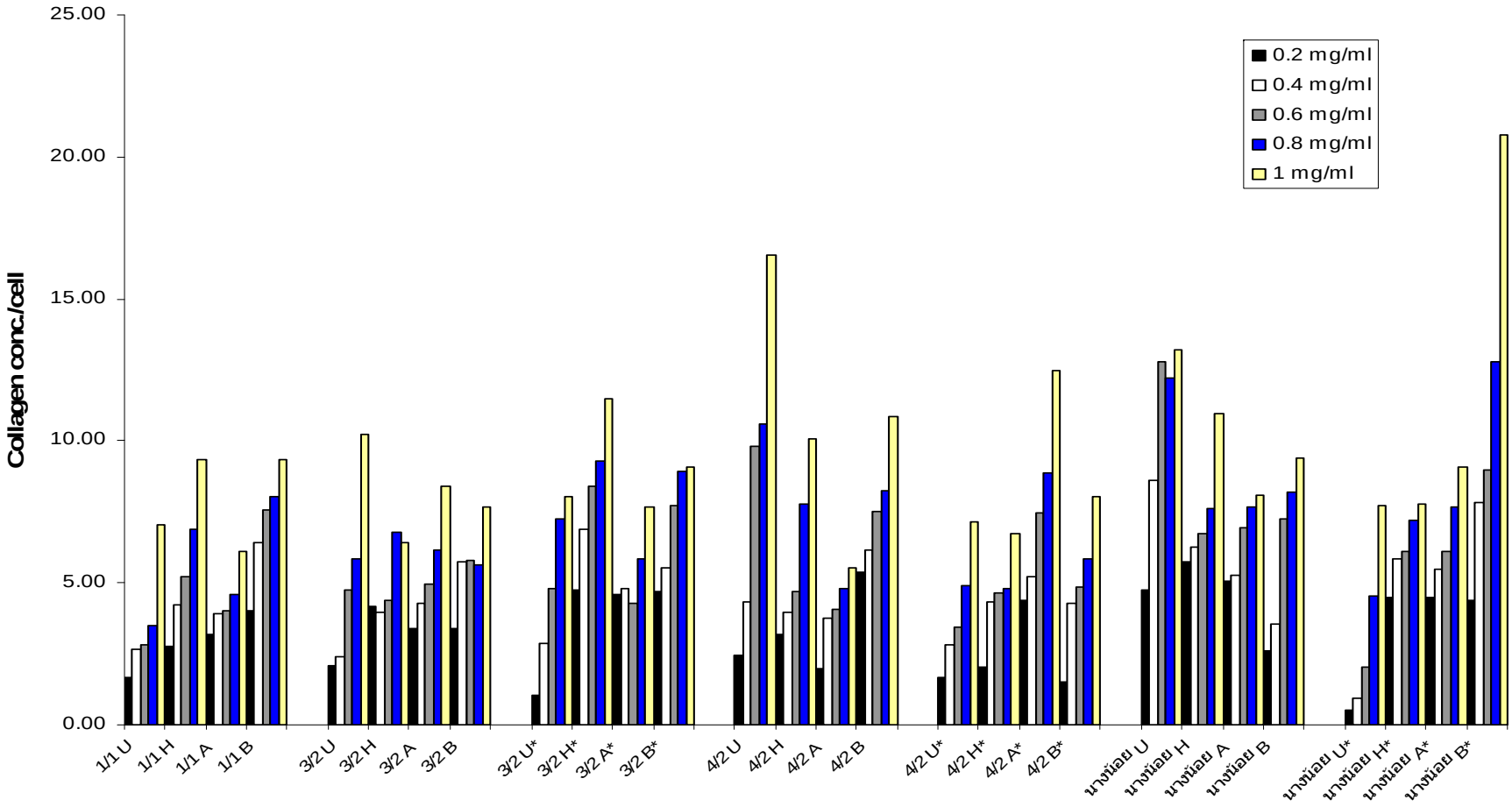


* แสดงการสกัดสีก่อนนำมาสกัดโปรตีนกาวไหม, H = การสกัดด้วยความร้อน, U=การสกัดด้วยสารละลายยูเรีย, A=การสกัดด้วยสารละลายกรด, B=การสกัดด้วยสารละลายด่าง

ภาพที่ 6: ผลของโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กันที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ หลังการเลี้ยงนาน 24 ชม.

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

อย่างไรก็ตาม ปริมาณคอลลาเจนที่ถูกกระตุ้นจากโปรตีนกาวไหมที่ผ่านการสกัดด้วยสารละลายยูเรียมีปริมาณต่ำกว่าปริมาณคอลลาเจนที่ถูกกระตุ้นจากโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยความร้อนอาจเนื่องมาจากปริมาณเซลล์ที่เหลือหลังจากการเลี้ยง 24 ชั่วโมงด้วยโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยยูเรียมีปริมาณต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยความร้อน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาปริมาณคอลลาเจนต่อเซลล์ดังแสดงในภาพที่ 7



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

ภาพที่ 7: ปริมาณคอลลาเจนต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (L929) ที่ถูกสร้างขึ้นหลังจากได้รับโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ ในความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 24 ชม.

แม้จะคำนวณปริมาณคอลลาเจนที่ถูกสร้างขึ้นต่อปริมาณเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เหลืออยู่ดังกราฟรูปที่ 7 ผลยังพบว่า โปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยสารละลายยูเรียยังมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนได้ต่ำกว่าโปรตีนกาวไหมที่ได้จากการสกัดวิธีอื่นๆ แม้ว่าปริมาณคอลลาเจนที่ถูกกระตุ้นจากโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กันจะมีความแตกต่างกันไม่มากนักก็ตาม โดยปริมาณคอลลาเจนที่ถูกสร้างขึ้นหลังจากการกระตุ้นด้วยโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยความร้อน, สารละลายกรด และสารละลายด่างมีปริมาณแตกต่างกันไม่มากนัก เมื่อพิจารณาร่วมกับผลของโปรตีนกาวไหมต่อความเป็นพิษของเซลล์ ทำให้วิธีการสกัดด้วยความร้อนน่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดเนื่องจากไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์แต่ในขณะเดียวกันก็ยังสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 จากเซลล์ได้ในปริมาณสูง

การศึกษาปริมาณของกรดอะมิโนประเภทต่าง ๆ ของโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กัน

เนื่องจากการใช้ความร้อน, สารละลายกรด, สารละลายด่าง หรือสารละลายยูเรียในการสกัดโปรตีนกาวไหมอาจส่งผลให้ตำแหน่งการตัดของโปรตีนกาวไหมแตกต่างกัน ด้วยเหตุนี้จึงส่งผลให้ปริมาณของกรดอะมิโนแต่ละชนิดของโปรตีนกาวไหมแตกต่างกันด้วย ซึ่งกรดอะมิโนแต่ละชนิดมีคุณสมบัติ, ประจุและขนาดที่ แตกต่างกัน ด้วยเหตุนี้การศึกษาปริมาณของกรดอะมิโนประเภทต่าง ๆ ของโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ อาจช่วยอธิบายคุณสมบัติของโปรตีนกาวไหมเหล่านั้นได้

<u>วิธีการทดสอบปริมาณกรดอะมิโนประเภทต่าง ๆ ของโปรตีนกาวไหม</u>

1. นำโปรตีนกาวไหมที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กันมาทำการ hydrolyze ด้วย 4 M methanesulfonic acid ที่ประกอบด้วย 0.2% 3-(2-aminoethyl) indole ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสภายใต้ภาวะสูญญากาศนาน 24 ชั่วโมง
2. นำตัวอย่างที่ได้มาทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนด้วย amino acid analyzer (Hitachi L-8500A, Tokyo, Japan)

ผลจากการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 6 ดังนี้

ตารางที่ 6 ปริมาณกรดอะมิโนของโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กัน

	1/1 U	1/1 H	1/1 A	1/1 B	3/2 U	3/2 H	3/2 A	3/2 B	4/2 U	4/2 H	4/2 A	4/2 B
Asp	18.31	15.64	15.93	19.88	17.93	15.62	16.00	21.58	17.69	15.97	16.61	19.92
Ser	31.27	33.63	31.86	30.01	32.24	34.50	32.01	28.41	30.69	33.84	31.95	27.59
Glu	6.27	4.61	5.75	5.93	6.02	4.76	5.40	7.66	5.97	4.86	5.88	7.03
Gly	11.23	15.03	10.49	11.01	10.75	15.09	10.38	11.16	10.96	15.14	10.69	12.58
His	3.26	1.06	2.47	1.72	2.82	1.22	2.83	2.38	2.50	1.37	2.29	2.15
Arg	5.41	2.87	4.92	4.92	5.21	2.95	4.87	3.79	5.71	3.09	5.24	4.83
Thr	8.36	8.16	8.51	6.49	8.78	8.43	8.78	6.09	9.04	8.34	8.30	5.56
Ala	4.33	4.10	3.72	4.21	3.80	4.45	3.57	3.96	4.63	4.98	3.56	4.40
Pro	1.46	0.54	0.78	1.24	0.79	0.62	0.73	0.92	1.16	0.71	0.79	1.01
Cys	0.39	0.44	0.53	0.23	0.33	0.43	0.50	0.19	0.42	0.27	0.52	0.16
Tyr	0.36	3.45	5.56	5.24	1.24	3.64	5.81	4.92	2.67	3.47	5.59	4.90
Val	2.96	2.88	2.95	2.94	3.28	3.04	3.03	3.03	2.98	2.92	2.76	2.99
Met	0.12	3.39	0.06	0.15	0.08	0.57	0.06	0.13	0.06	0.18	0.05	0.15
Lys	3.14	2.35	3.48	2.89	3.55	2.51	3.03	2.71	2.50	2.78	3.16	3.08
Ile	0.96	0.56	0.87	0.75	0.95	0.65	0.90	0.87	0.74	0.61	0.66	1.03
Leu	1.58	1.00	1.43	1.56	1.58	1.15	1.44	1.51	1.63	1.11	1.37	1.81
Phe	0.60	0.28	0.71	0.81	0.66	0.39	0.67	0.72	0.63	0.36	0.57	0.81
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

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

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ทั้งสิ้น 3 ครั้ง

ตารางที่ 7 ปริมาณกรดอะมิโนของโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กัน

	นางน้อย U	**นางน้อย H**	**นางน้อย A**	**นางน้อย B**
Asp	18.68	18.25	16.59	19.23
Ser	30.77	30.79	32.61	29.91
Glu	7.23	7.69	8.15	8.55
Gly	10.30	9.55	9.29	10.07
His	3.28	2.80	3.00	3.58
Arg	5.02	4.26	4.66	4.43
Thr	7.57	7.34	7.10	5.15
Ala	4.17	3.76	3.68	4.09
Pro	0.98	0.73	0.72	0.99
Cys	0.85	0.40	0.56	0.11
Tyr	0.64	4.52	4.50	4.67
Val	2.98	2.89	2.63	2.99
Met	0.13	0.14	0.07	0.08
Lys	3.96	3.60	3.54	2.56
Ile	1.15	1.06	0.79	1.10
Leu	1.57	1.39	1.21	1.60
Phe	0.72	0.85	0.89	0.88
Total	100.00	100.00	100.00	100.00

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ทั้งสิ้น 3 ครั้ง

จากผลการทดลองจะเห็นว่า รังไหมสายพันธุ์เดียวกันเมื่อนำมาสกัดด้วยวิธีต่างกันก็ให้ปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิดแตกต่างกันด้วย อย่างไรก็ตามโปรตีนกาวไหมจากทุกสายพันธุ์และวิธีการสกัดมีส่วนประกอบของกรดอะมิโน serine สูงที่สุด รองลงมากคือ aspartic acid ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่

รายงานโดยนักวิจัยอื่น ซึ่งความแตกต่างของกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบในโปรตีนกาวไหมอาจส่งผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพและชีวภาพด้วย

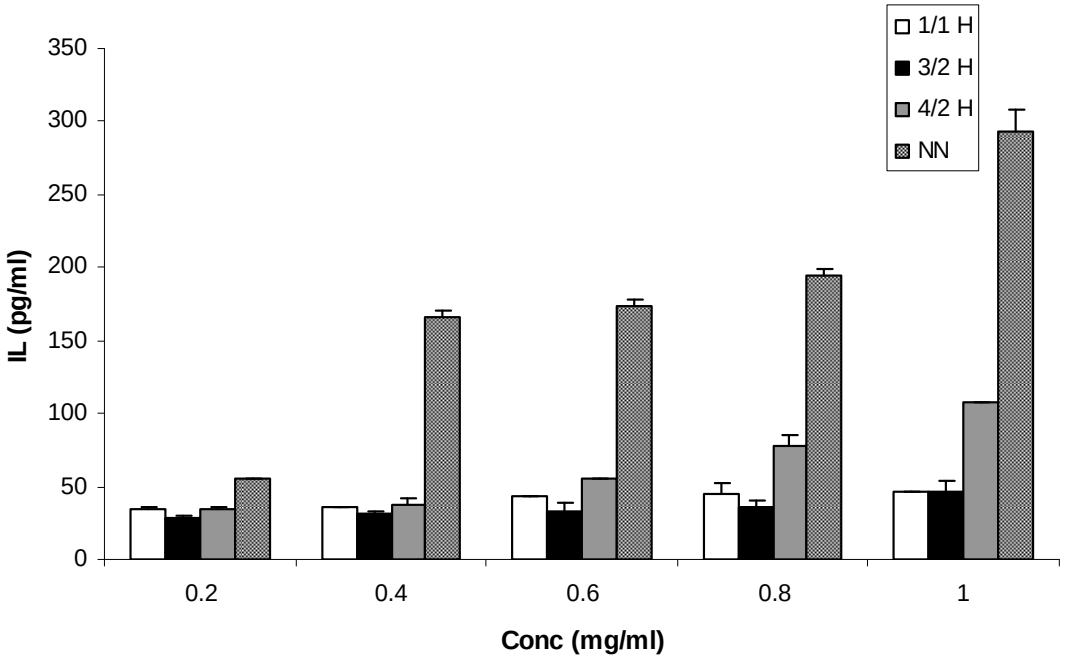
การศึกษาคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้าง interleukin-1 จากโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ

<u>วิธีการทดสอบ</u>

1. นำเซลล์ที่ต้องการทดสอบ ซึ่งในที่นี้ใช้ mouse monocyte cell line J774.2 หรือ rat alveolar macrophage cell line NR 8383 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 ส่วนใสเหนือเซลล์ (supernatant) ในแต่ละหลุมจะถูกวิเคราะห์เพื่อหา interleukin-1 ด้วย rat หรือ mouse ELISA assay kit (R&D Systems) (เอกสารแนบ 3) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm. เปรียบเทียบกับปริมาณเซลล์ที่มีอยู่ใน negative control โดยมี minimal detectable dose อยู่ที่ 3.0 pg/mL

ผลการศึกษา

เนื่องจากโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยความร้อนจะเป็นวิธีการสกัดที่ให้โปรตีนกาวไหมที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังได้สูงที่สุด อีกทั้งยังสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนได้สูงสุดอีกด้วย ดังนั้นจึงนำโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยความร้อนจากไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ มาศึกษาคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้าง interleukin-1 ได้ผลดังภาพที่ 8



หมายเหตุ: 1/1H = โปรตีนกาวไหมสายพันธุ์จุล 1/1 ที่สกัดด้วยความร้อน, 3/2 H = โปรตีนกาวไหมสายพันธุ์จุล 3/2 ที่สกัดด้วยความร้อน, 4/2 H = โปรตีนกาวไหมสายพันธุ์จุล 4/2 ที่สกัดด้วยความร้อน, NN = โปรตีนกาวไหมสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษที่สกัดด้วยความร้อน

ภาพที่ 8: ผลการกระตุ้นสาร interleukin-1 จากโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่สกัดด้วยความร้อน

ผลจากการศึกษาพบว่าโปรตีนกาวไหมแต่ละสายพันธุ์มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้าง interleukin-1 ได้แตกต่างกัน โดยโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้าง interleukin-1 ได้สูงสุด ในขณะที่โปรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์จุล 1/1 และ 3/2 มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้าง interleukin-1 ต่ำและมีค่าไม่แตกต่างกันมากนักเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนกาวไหมเข้าไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ ในขณะที่โปรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์จุล 4/2 สามารถกระตุ้นการสร้าง interleukin-1 ได้สูงกว่าเมื่อเทียบกับสายพันธุ์จุลอื่น ๆ อีกทั้งความเข้มข้นของโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์จุล 4/2 ที่เพิ่มขึ้นสามารถกระตุ้นการสร้าง interleukin-1 ได้สูงขึ้นเช่นเดียวกับที่พบในโปรตีนกาวไหมที่สกัดจากไหมสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ

จากผลการศึกษาดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าโปรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์จุล 1/1 และ จุล 3/2 น่าจะก่อให้เกิดการแพ้หรือการระคายเคืองได้น้อยกว่าโปรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์จุล 4/2 และสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ

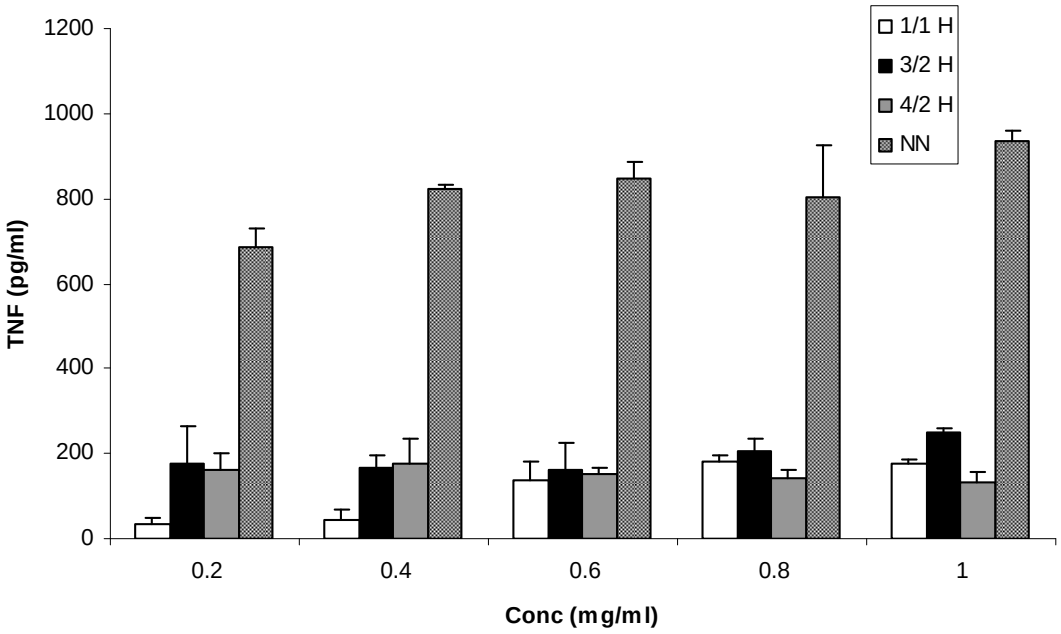
การศึกษาคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้าง tumor necrosis factor-α จากโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ

<u>วิธีการทดสอบ</u>

1. นำเซลล์ที่ต้องการทดสอบ ซึ่งในที่นี้ใช้ mouse monocyte cell line J774.2 หรือ rat alveolar macrophage cell line NR 8383 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 ส่วนใสเหนือเซลล์ (supernatant) ในแต่ละหลุมจะถูกวิเคราะห์เพื่อหา tumor necrosis factor-α ด้วย rat หรือ mouse ELISA assay kit (R&D Systems) (เอกสารแนบ 4) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm. เปรียบเทียบกับปริมาณเซลล์ที่มีอยู่ใน negative control โดยมี minimal detectable dose อยู่ที่ 5.0 pg/mL

ผลการศึกษา

เนื่องจากโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยความร้อนจะเป็นวิธีการสกัดที่ให้โปรตีนกาวไหมที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังได้สูงที่สุด อีกทั้งยังสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนได้สูงสุดอีกด้วย ดังนั้นจึงนำโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยความร้อนจากไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ มาศึกษาคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้าง tumor necrosis factor-α ได้ผลดังภาพที่ 9



หมายเหตุ: 1/1H = โปรตีนกาวไหมสายพันธุ์จุล 1/1 ที่สกัดด้วยความร้อน, 3/2 H = โปรตีนกาวไหมสายพันธุ์จุล 3/2 ที่สกัดด้วยความร้อน, 4/2 H = โปรตีนกาวไหมสายพันธุ์จุล 4/2 ที่สกัดด้วยความร้อน, NN = โปรตีนกาวไหมสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษที่สกัดด้วยความร้อน

ภาพที่ 9: ผลการกระตุ้นสาร tumor necrosis factor-α จากโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่สกัดด้วยความร้อน

ผลจากการศึกษาพบว่าโปรตีนกาวไหมแต่ละสายพันธุ์มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้าง tumor necrosis factor-α ได้แตกต่างกัน โดยโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้าง tumor necrosis factor-α ได้สูงสุด ในขณะที่โปรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์จุล 1/1 มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้าง tumor necrosis factor-α ต่ำที่สุด นอกจากนี้โปรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์จุล 3/2 และ 4/2 มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้าง tumor necrosis factor-α ได้สูงกว่าโปรตีนกาวไหมจากสายพันธุ์จุล 1/1 แต่ไม่แตกต่างกันมากนักโดยเฉพาะที่ความเข้มข้นสูงกว่า 0.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

จากผลการศึกษาดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าโปรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์จุล 1/1 น่าจะก่อให้เกิดการแพ้หรือการระคายเคืองได้น้อยกว่าโปรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์จุล 3/2 , จุล 4/2 และสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ

อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของ proinflammatory cytokines อันได้แก่ interleukin-1 และ tumor necrosis factor-α ที่น้อยกว่า 100 ng/mL มักจะไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษหรือระคายเคืองต่อเซลล์ ดังนั้นอาจ

กล่าวได้ว่าโปรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์จุล 1/1 ที่สกัดด้วยความร้อนที่เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเซลล์ในปริมาณที่สูงถึง 0.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไม่น่าจะก่อให้เกิดความเป็นพิษหรือระคายเคือง

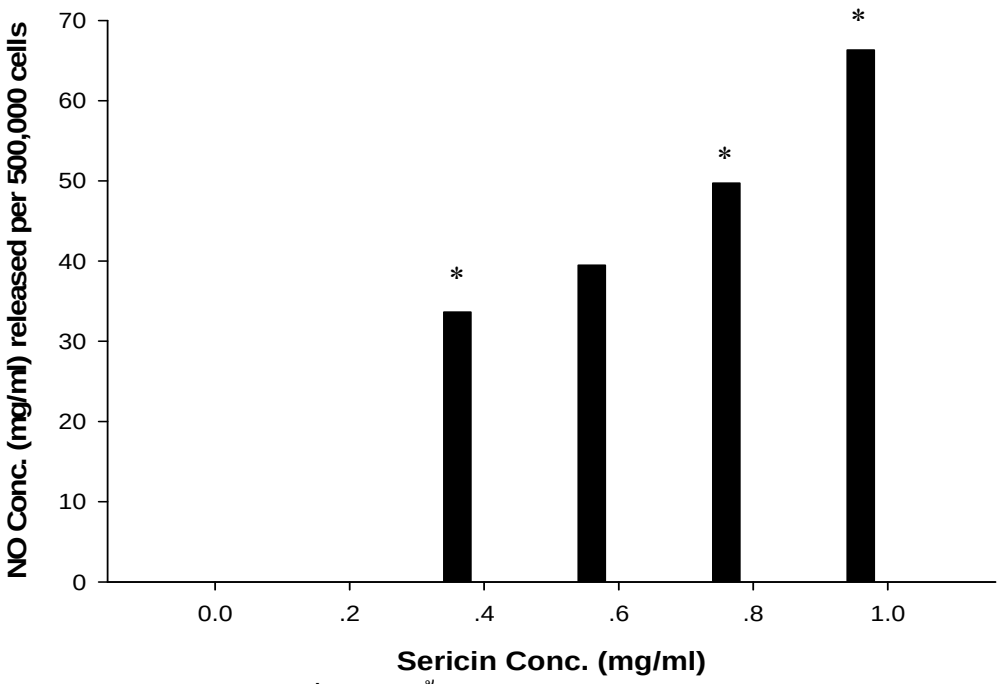
การศึกษาคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้าง nitric oxide จากโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ

<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 control
4. หลังจากเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง สารละลายในส่วนของ supernatant จะถูกนำมาทดสอบปริมาณของ nitric oxide ด้วย Griess reaction ซึ่งเป็นการนำ 100 μL Griess reagent (1% N-(1-Napthyl)-ethylenediamine dihydrochloride และ 1% sulfanilamide ใน 2.5% phosphoric acid) ในปริมาณที่เท่ากับสารละลายส่วนของ supernatant มาผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm เปรียบเทียบกับ standard curve ของ NaNO

ผลการศึกษา

จากการศึกษาพบว่าโปรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์จุล 3/2, 4/2 และสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษไม่สามารถกระตุ้นการสร้าง nitric oxide จากเซลล์ได้ มีเพียงโปรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์จุล 1/1 ที่สามารถกระตุ้นการสร้าง nitric oxide ได้ โดยความเข้มข้นของโปรตีนกาวไหมที่สูงขึ้นจะสามารถกระตุ้นการสร้าง nitric oxide จากเซลล์ได้มากขึ้นด้วยดังแสดงผลในภาพที่ 10



ภาพที่ 10: ปริมาณสาร nitric oxide ที่ถูกสร้างขึ้นจากเซลล์หลังจากถูกกระตุ้นด้วยโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์จุล 1/1 ที่สกัดด้วยความร้อน (* แสดงถึงการมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ)

Nitric oxide ปกติมักจะถูกสร้างในระหว่างที่เซลล์มีการอักเสบ เช่นในระหว่างการเกิดกระบวนการสมานแผล อย่างไรก็ตามปริมาณของ nitric oxide ที่ต่ำ ๆ จะมีประโยชน์ต่อเซลล์เนื่องจากจะสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนหรือโปรตีนอื่น ๆ ที่สำคัญต่อเซลล์ได้

การศึกษาคุณสมบัติของโพลิเมอร์ต่าง ๆ ที่มีอยู่ในท้องตลาดที่สามารถนำมาใช้ทำแผ่นเนื้อเยื่อและขึ้นรูปแผ่นเนื้อเยื่อ

โพลิเมอร์ที่ได้รับการรับรองจาก FDA เพื่อนำมาใช้ในการทำแผ่นเนื้อเยื่อในมนุษย์ได้แก่

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

ซึ่งได้นำโพลิเมอร์ชนิดต่าง ๆ มาผสมกับโปรตีนกาวไหมเซริซินเพื่อขึ้นรูปเป็นแผ่นเนื้อเยื่อในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน พบว่าจากคุณสมบัติทางกายภาพ polyvinyl alcohol เป็นโพลิเมอร์ที่เหมาะสมที่สุดที่จะนำมาใช้ทำแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลเนื่องจากให้แผ่นเนื้อเยื่อที่มีความยืดหยุ่นเหมาะสม เป็นเนื้อเดียวกัน ไม่มีรอยแตกบนแผ่นเนื้อเยื่อ อย่างไรก็ตาม แผ่นเนื้อเยื่อที่ได้ยังมีผลึกน้ำอยู่บนพื้นผิวเนื้อเยื่อเล็กน้อย ซึ่งเป็นผลมาจาก

การแข็งตัวที่เร็วเกินไปในระหว่างกระบวนการ freeze-dry ซึ่งจำเป็นที่ต้องปรับเปลี่ยนสภาวะให้เหมาะสมต่อไป

วิธีการทดลอง

1. นำ polyvinyl alcohol มาละลายในน้ำให้มีความเข้มข้นร้อยละ 5 และนำไปอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง
2. นำสารละลายของโปรตีนกาวไหมเซริซินมาผสมกับสารละลายในข้อ 1) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน
3. เทสารละลายที่ได้ลงในแผ่นขึ้นรูป นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง
4. นำแผ่นที่ได้ในข้อ 3) ไปขึ้นรูปโดยใช้เครื่อง freeze-dryer

ผลการทดลอง

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

ได้แผ่นเนื้อเยื่อที่มีลักษณะทางกายภาพดังที่แสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ลักษณะทางกายภาพของแผ่นเนื้อเยื่อที่มีส่วนประกอบของโปรตีนกาวไหมและโพลิเมอร์ในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน

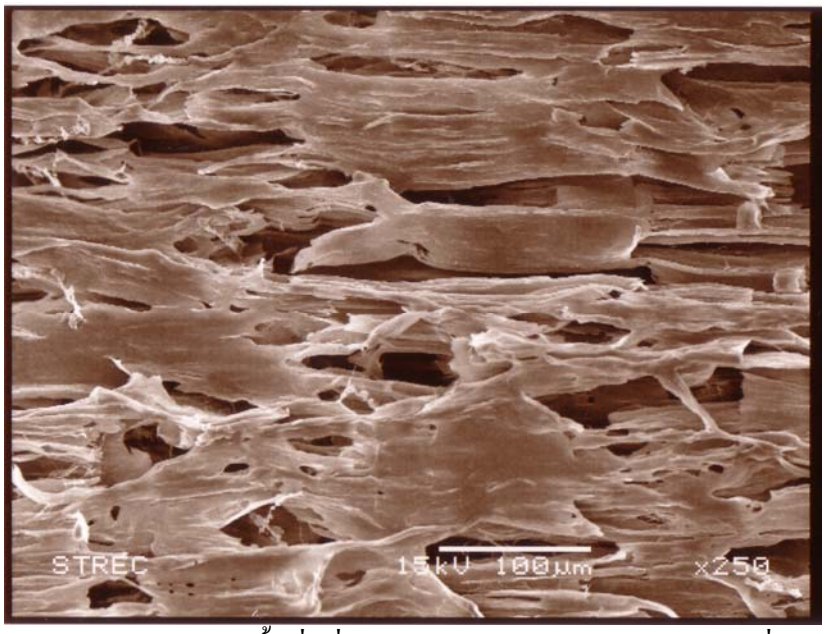
ส่วนประกอบของแผ่นเนื้อเยื่อ	ลักษณะทางกายภาพ
2% Polyvinyl alcohol	เปราะบาง แตกง่าย ไม่เป็นแผ่นเรียบเนียน
1% Sericin + 2% Polyvinyl alcohol	แผ่นเปราะง่าย เรียบเนียนขึ้นเล็กน้อยแต่ไม่มีความยืดหยุ่น
2% Sericin + 2% Polyvinyl alcohol	เปราะเล็กน้อย มีการแยก phase (สีไม่สม่ำเสมอ)
3% Sericin + 2% Polyvinyl alcohol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

ลักษณะทางกายภาพของแผ่นปิดแผลแสดงได้ดังภาพที่ 11-12

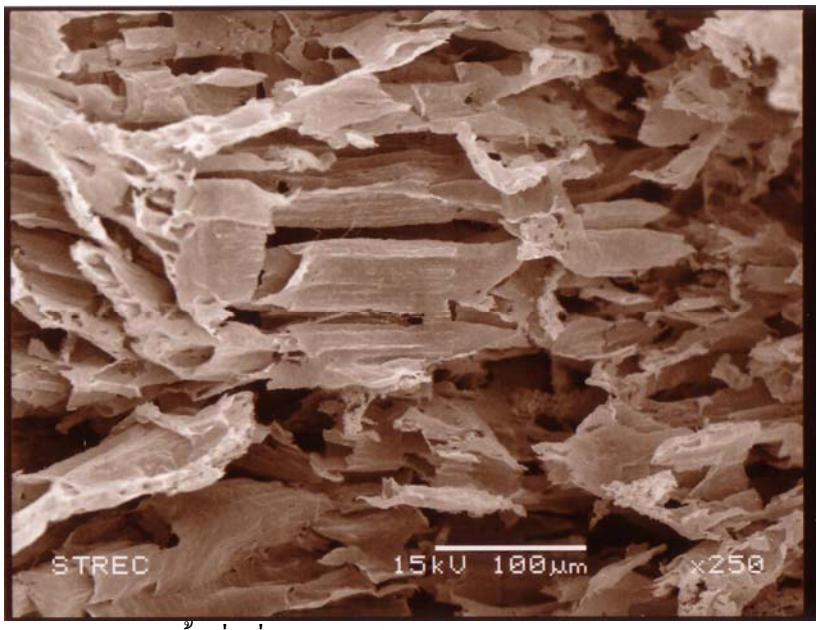
ภาพที่ 11: ลักษณะทางกายภาพของแผ่นเนื้อเยื่อที่มีส่วนประกอบของ polyvinyl alcohol ร้อยละ 2

ภาพที่ 12: ลักษณะทางกายภาพของแผ่นเนื้อเยื่อที่มีส่วนประกอบของ polyvinyl alcohol ร้อยละ 2 และมีโปรตีนกาวไหมเป็นส่วนประกอบอยู่ตั้งแต่ร้อยละ 1-5 ตามลำดับ

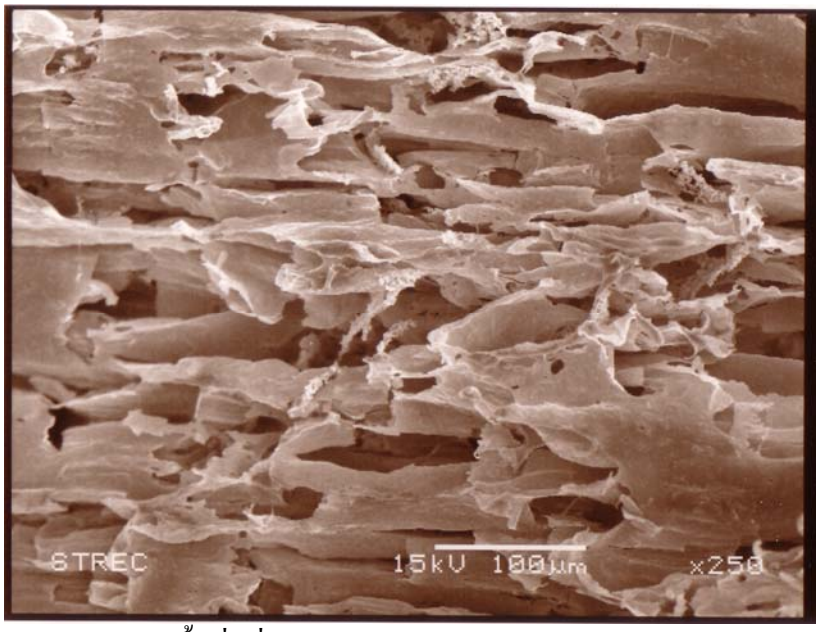
จากคุณสมบัติทางกายภาพ ทำให้มีการคัดเลือกส่วนประกอบที่เป็น 3% Sericin + 2% Polyvinyl alcohol มาทำเป็นแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผล พบว่าแผ่นเนื้อเยื่อทุกชนิดมีลักษณะเป็นรูพรุน ดังนั้นจึงได้นำแผ่นดังกล่าวไปศึกษาความเป็นรูพรุนโดยการส่องกล้อง scanning electron microscope (SEM) ภาพตัดขวางได้ผลดังภาพที่ 13-18



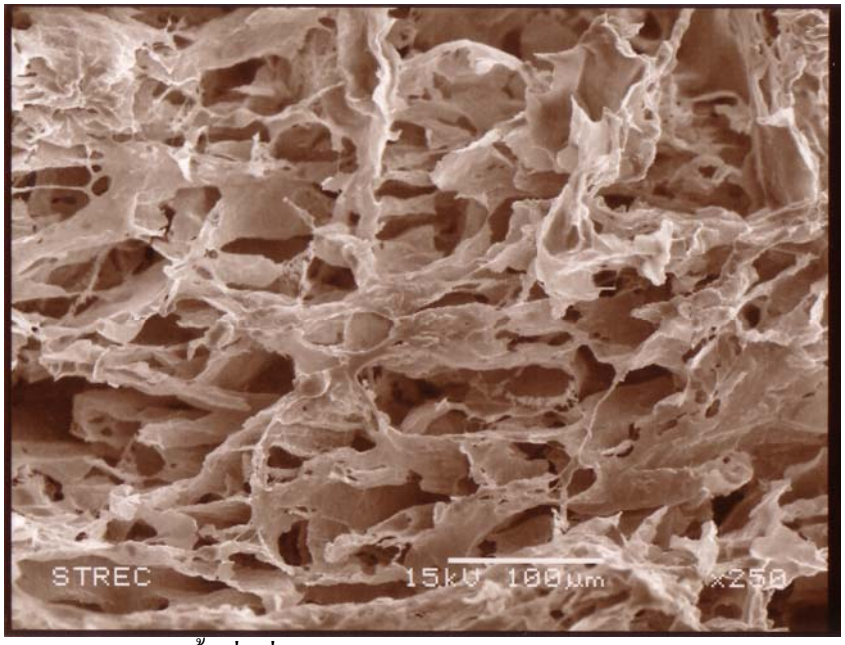
ภาพที่ 13: ภาพตัดขวางของแผ่นเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วย 2% polyvinyl alcohol เมื่อส่องด้วย SEM



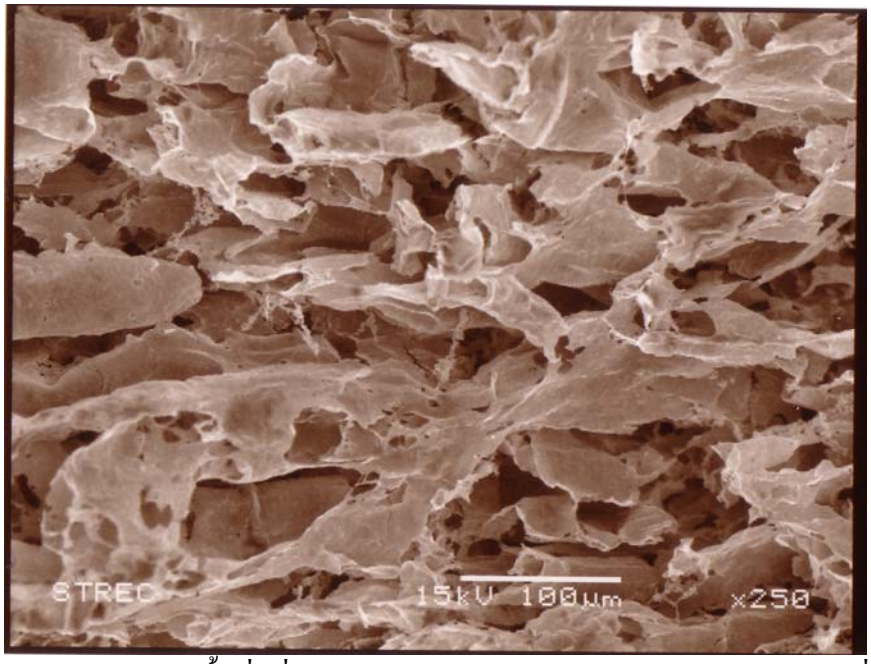
ภาพที่ 14: ภาพตัดขวางของแผ่นเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วย 1% sericin + 2% polyvinyl alcohol เมื่อส่องด้วย SEM



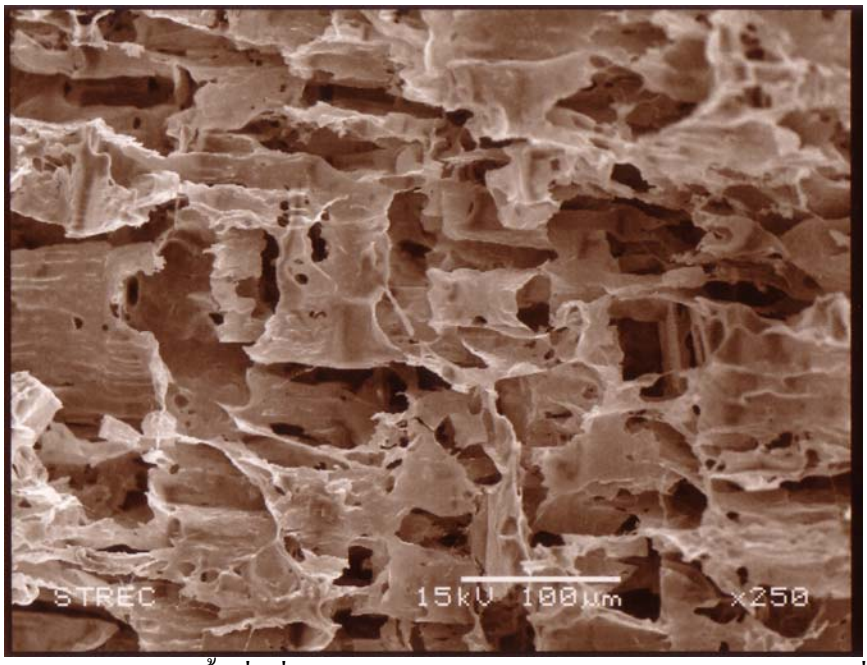
ภาพที่ 15: ภาพตัดขวางของแผ่นเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วย 2% sericin + 2% polyvinyl alcohol เมื่อส่องด้วย SEM



ภาพที่ 16: ภาพตัดขวางของแผ่นเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วย 3% sericin + 2% polyvinyl alcohol เมื่อส่องด้วย SEM



ภาพที่ 17: ภาพตัดขวางของแผ่นเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วย 4% sericin + 2% polyvinyl alcohol เมื่อส่องด้วย SEM



ภาพที่ 18: ภาพตัดขวางของแผ่นเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วย 5% sericin + 2% polyvinyl alcohol เมื่อส่องด้วย SEM

จากภาพถ่าย SEM จะเห็นได้ว่าแผ่นเนื้อเยื่อที่มีส่วนประกอบเป็น 2% polyvinyl alcohol, 1% sericin + 2% polyvinyl alcohol และ 2% sericin + 2% polyvinyl alcohol ยังมีลักษณะเป็นแผ่นเนื้อเยื่อที่ไม่สมบูรณ์ มี

การเรียงตัวเป็นชั้นโดยไม่เกิดเป็นรูพรุน อีกทั้งยังมีการเรียงตัวแบบไม่สม่ำเสมอซึ่งไม่เหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นแผ่นเนื้อเยื่อ

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนกาวไหมมากขึ้นเป็น 3% sericin + 2% polyvinyl alcohol พบว่าแผ่นเนื้อเยื่อที่ได้มีการขึ้นรูปเป็นรูพรุนที่สม่ำเสมอ แต่ละช่องของรูพรุนมีการเชื่อมต่อกันซึ่งลักษณะดังกล่าวจะเป็นลักษณะที่เหมาะสมต่อการเคลื่อนตัวของเซลล์เนื้อเยื่อเพื่อการสมานแผล แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนกาวไหมมากขึ้นเป็น 4% และ 5% พบว่ารูพรุนบนแผ่นเนื้อเยื่อมีลักษณะใหญ่ขึ้น ไม่สม่ำเสมอทั่วแผ่น มีลักษณะค่อนข้างเปราะดังจะเห็นได้จากการมีแตกหักระหว่างช่องรูพรุน

ผลจากการศึกษาจึงสรุปได้ว่า แผ่นเนื้อเยื่อที่ขึ้นรูปจาก 3% sericin + 2% polyvinyl alcohol มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้พัฒนาเป็นแผ่นปิดแผลต่อไป

อภิปรายและวิจารณ์ผล

จากผลการศึกษาพบว่ารังไหมสายพันธุ์ไทยสามารถนำมาสกัดโปรตีนกาวไหมเซริซินได้ด้วยวิธีต่าง ๆ อันได้แก่ การสกัดด้วยความร้อน การสกัดด้วยสารละลายกรด สารละลายด่างและสารละลายยูเรีย เช่นเดียวกับไหมสายพันธุ์อื่น ๆ ทั่วโลก ซึ่งกระบวนการสกัดด้วยความร้อนและการสกัดด้วยสารละลายยูเรียจะให้ปริมาณการผลิต (% yield) ได้สูงกว่าเมื่อเทียบกับกระบวนการสกัดด้วยกรดและด่าง โดยปริมาณของโปรตีนกาวไหมที่สกัดได้ด้วยความร้อนหรือสารละลายยูเรียคิดเป็นประมาณร้อยละ 20 ซึ่งใกล้เคียงกับผลของนักวิจัยอื่น ๆ ที่รายงานว่าโปรตีนกาวไหมเป็นส่วนประกอบในรังไหมประมาณร้อยละ 30 และสามารถสกัดออกมาได้ประมาณร้อยละ 20 เมื่อนำโปรตีนกาวไหมที่ได้มาศึกษาคุณสมบัติในการละลายพบว่า โปรตีนกาวไหมสามารถละลายได้ดีขึ้นในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยที่รายงานว่า โปรตีนกาวไหมเป็นโปรตีนที่ประกอบไปด้วยเปปไทด์ประมาณ 18 ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ กัน โดยเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะสามารถละลายได้ดีในอุณหภูมิต่ำ ส่วนเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะสามารถละลายได้เมื่อเพิ่มอุณหภูมิ อย่างไรก็ตามหากมีการเพิ่มอุณหภูมิสูงกว่า 37 องศาเซลเซียสจะทำให้ค่าการละลายลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเกิด polymerization ของโปรตีนที่อุณหภูมิสูง นอกจากนี้โปรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์ที่ต่างกันยังมีค่าการละลายต่างกันด้วย

เมื่อศึกษาปริมาณกรดอะมิโนประเภทต่าง ๆ ของโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กันพบว่า วิธีการสกัดที่แตกต่างกันส่งผลให้ปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิดในโปรตีนกาวไหมแตกต่างกันด้วย อย่างไรก็ตามปริมาณกรดอะมิโน serine ยังมีสูงสุด (ประมาณร้อยละ 30) รองลงมาคือกรดอะมิโน aspartic acid (ประมาณร้อยละ 17) สำหรับโปรตีนกาวไหมจากไหมทุกสายพันธุ์และทุกวิธีการสกัด ซึ่งสอดคล้องกับผลที่รายงานโดยนักวิจัยอื่น เป็นที่น่าสังเกตุว่า โปรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์จุล 1/1 ที่สกัดด้วยความร้อน มีปริมาณกรดอะมิโน methionine สูงกว่าโปรตีนกาวไหมที่สกัดจากไหมสายพันธุ์อื่นและวิธีการสกัดอื่นอย่างมีนัยสำคัญ

จากการศึกษาผลของ pH ที่มีต่อค่าการละลายของโปรตีนกาวไหมพบว่า โปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยสารละลายด่างสามารถละลายได้ดีที่สุดใน pH ที่เป็นด่าง (pH 9.0) และมีค่าการละลายสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดอื่น ๆ ซึ่งผลของค่าการละลายที่แตกต่างกันนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนกาวไหมหลังการสกัด ส่งผลให้ประจุรวมของโปรตีนกาวไหมที่ได้จากวิธีการสกัดที่แตกต่างกันมีความแตกต่างกันด้วย นอกจากนี้ยังพบว่า การสกัดสีออกจากรังไหมก่อนที่จะนำมาสกัดโปรตีนกาวไหมมักจะส่งผลให้ค่าการละลายของโปรตีนกาวไหมเพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการจับตัวกันระหว่างโปรตีนกาวไหมกับสาร flavonoid หรือสาร carotenoid ซึ่งเป็นสารประกอบหลักที่ก่อให้เกิดสีในรังไหม ส่งผลให้เกิดเป็นสารประกอบโมเลกุลใหญ่ที่มีค่าการละลายลดลง

ในส่วนของการศึกษาค่าความหนืดของสารละลายโปรตีนกาวไหมพบว่า โปรตีนกาวไหมที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นจะมีความหนืดเพิ่มมากขึ้น โดยความเข้มข้นของโปรตีนกาวไหมที่มีความหนืดเหมาะสมที่จะนำมาผสมกับโพลิเมอร์ไม่ควรเกิน 80 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เพื่อหลีกเลี่ยงความหนืดที่สูงเกินไปจนอาจทำให้การผสมรวมเข้ากับโพลิเมอร์ทำได้ยาก ซึ่งผลนี้สอดคล้องกับความเข้มข้นของโปรตีนกาวไหมที่นำมาใช้ในการทำแผ่นฟิล์มที่รายงานโดยนักวิจัยอื่น ๆ

เมื่อนำโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กันมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์พบว่าโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีที่แตกต่างกันแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ได้แตกต่างกัน โดยโปรตีนกาวไหมที่ได้จากการสกัดด้วยความร้อนไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์หลังจากใส่โปรตีนกาวไหมเข้าไปในอาหารเลี้ยงเซลล์นาน 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ความเข้มข้นของโปรตีนกาวไหมในระดับต่ำ ๆ คือ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรยังสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลการทดลองที่รายงานโดยนักวิจัยอื่นที่ระบุว่าโปรตีนกาวไหมสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ได้หลายชนิดและสามารถนำมาใช้พัฒนาเป็น serum-free media ได้ อย่างไรก็ตามผู้วิจัยยังพบว่า โปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยสารละลายยูเรียมีความเป็นพิษสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดทุกวิธี และพบลักษณะเช่นเดียวกันนี้กับโปรตีนกาวไหมที่สกัดได้จากไหมทุกสายพันธุ์

สารก่อสีในรังไหมอันประกอบด้วยสารประเภท flavonoid หรือ carotenoid ยังมีผลต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตของไฟโบรบลาสต์เซลล์ด้วย โดยพบว่าโปรตีนกาวไหมที่ได้จากการสกัดโดยไม่แยกสารก่อสีออกจะสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของไฟโบรบลาสต์ได้มากกว่าโปรตีนกาวไหมที่ได้จากรังไหมสายพันธุ์เดียวกันแต่มีการสกัดสารก่อสีออก ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า flavonoid และ carotenoid ในรังไหมมีประโยชน์ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ได้

จากการนำโปรตีนกาวไหมมาศึกษาผลในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนจากเซลล์พบว่า โปรตีนกาวไหมสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 จากเซลล์ไฟโบรบลาสได้ โดยเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนกาวไหมที่เพิ่มขึ้นจะสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนได้เพิ่มมากขึ้นเช่นกัน และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณคอลลาเจนที่ถูกสร้างขึ้นจากโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กันพบว่า โปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยความ

ร้อนสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนได้สูงที่สุด ในขณะที่โปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยสารละลายยูเรียจะสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนได้ต่ำที่สุด นอกจากนี้โปรตีนกาวไหมที่สกัดจากไหมสายพันธุ์ที่มีสียังสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนได้สูงกว่าหากไม่ผ่านการสกัดสี ในขณะที่โปรตีนกาวไหมที่ผ่านการสกัดสีก่อนจะมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนได้ลดลง

เมื่อนำโปรตีนกาวไหมจากการสกัดด้วยความร้อนมาศึกษาถึงคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้างสารก่อการอักเสบอันได้แก่ interleukin-1 และ tumor necrosis factor-α พบว่า โปรตีนกาวไหมจากไหมต่างสายพันธุ์สามารถกระตุ้นการสร้าง interleukin-1 และ tumor necrosis factor-α ได้แตกต่างกัน โดยโปรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์จุล 1/1 สามารถกระตุ้นการสร้าง interleukin-1 และ tumor necrosis factor-α จากเซลล์ได้ต่ำที่สุด ในขณะที่โปรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษสามารถกระตุ้นการสร้าง interleukin-1 และ tumor necrosis factor-α ได้สูงที่สุด หรืออาจกล่าวได้ว่า โปรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์จุล 1/1 มีโอกาสก่อให้เกิดการระคายเคืองหรืออักเสบต่ำที่สุด ในขณะที่มีโอกาสเกิดการระคายเคืองหรือแพ้จากการใช้โปรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษได้มากกว่าโปรตีนกาวไหมจากสายพันธุ์อื่น อย่างไรก็ตามโปรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์จุล 1/1 เป็นโปรตีนกาวไหมชนิดเดียวที่สามารถกระตุ้นการสร้าง nitric oxide จากเซลล์ได้ ซึ่ง nitric oxide มักจะถูกสร้างในระหว่างที่เซลล์เกิดการอักเสบ แต่ปริมาณของ nitric oxide ที่ต่ำ ๆ จะมีประโยชน์ต่อเซลล์เนื่องจากจะสามารถกระต้นการสร้างคอลลาเจนหรือโปรตีนอื่น ๆ ที่สำคัญต่อเซลล์ได้

การนำโปรตีนกาวไหมมาขึ้นรูปเป็นแผ่นเนื้อเยื่อร่วมกับโพลิเมอร์พบว่า โพลิเมอร์ที่เหมาะสมที่สุดในการขึ้นรูปคือ polyvinyl alcohol เนื่องจากเป็นโพลิเมอร์ที่ผ่านการรับรองจาก FDA ประเทศสหรัฐอเมริกาให้สามารถนำมาใช้ในมนุษย์ได้ นอกจากนี้แผ่นเนื้อเยื่อที่ขึ้นรูปมีลักษณะทางกายภาพที่เหมาะสม เป็นเนื้อเดียวกัน มีความยืดหยุ่นดี ไม่มีรอยแตกบนแผ่นเนื้อเยื่อ เมื่อนำ polyvinyl alcohol ในความเข้มข้นร้อยละ 2 มาผสมกับโปรตีนกาวไหมเพื่อขึ้นรูปเป็นแผ่นเนื้อเยื่อโดยใช้โปรตีนกาวไหมที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 1-5 พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับแผ่นเนื้อเยื่อคือ polyvinyl alcohol ร้อยละ 2 และโปรตีนกาวไหมร้อยละ 3 ซึ่งจะให้แผ่นเนื้อเยื่อที่เรียบเนียน ยืดหยุ่นดี ไม่มีการแยกเป็นส่วน นอกจากนี้เมื่อศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของแผ่นดังกล่าวโดยใช้กล้อง scanning electron microscope (SEM) ดูภาพตัดขวาง พบว่าแผ่นเนื้อเยื่อดังกล่าวมีลักษณะเป็นรูพรุนที่สม่ำเสมอ แต่ละช่องของรูพรุนมีการเชื่อมต่อกันซึ่งเป็นลักษณะที่เหมาะสมต่อการเคลื่อนตัวของเซลล์เนื้อเยื่อเพื่อการสมานแผล ซึ่งส่วนประกอบดังกล่าวจึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ทำแผ่นเนื้อเยื่อเพื่อทดสอบในขั้นต่อไป

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัยจะเห็นได้ว่าโปรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์ไทยสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ได้โดยไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยโปรตีนกาวไหมที่ได้จากไหมต่างสายพันธุ์กันจะมีคุณสมบัติทางกายภาพและชีวภาพที่แตกต่างกัน อีกทั้งวิธีการสกัดโปรตีนกาวไหมยังมีผลต่อคุณสมบัติทาง

กายภาพและชีวภาพอีกด้วย เมื่อนำโปรตีนกาวไหมมาผสมร่วมกับโพลิเมอร์ที่เหมาะสมจะสามารถขึ้นรูปเป็นแผ่นเนื้อเยื่อที่มีคุณลักษณะเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาเป็นแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลได้ ส่วนของรังไหมที่เหลือจากการสกัดโปรตีนกาวไหมออกแล้วสามารถนำไปสาวเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอต่อไป

ผลการศึกษาในเบื้องต้นได้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของโปรตีนกาวไหมในการนำมาประยุกต์ใช้ทางกายแพทย์ อย่างไรก็ตามผลการศึกษาดังกล่าวเป็นเพียงการศึกษา *in vitro* ซึ่งหากจะนำมาใช้ ประโยชน์และเพิ่มคุณค่าในเชิงพาณิชย์ จำเป็นต้องมีการศึกษาคุณสมบัติของแผ่นเนื้อเยื่อดังกล่าวในสัตว์ทดลองต่อไป

บรรณานุกรม

1. Aramwit P, Sangcakul A. The effects of sericin cream on wound healing in rats. Biosci Biotechnol Biochem 2007;71:2473-7.
2. Cai K, Yao K, Cui Y, Yang Z, Li X, Xie H, et al. Influence of different surface modification treatments on poly(D,L-lactic acid) with silk fibroin and their effects on the culture of osteoblast in vitro. Biomaterials 2002;23:1603-11.
3. Cai K, Yao K, Lin S, Yang Z, Li X, Xie H, et al. Poly(D,L-lactic acid) surfaces modified by silk fibroin: effects on the culture of osteoblast in vitro. Biomaterials 2002;23:1153-60.
4. Celedon J, Palmer L, Xu X, Wang B, Fang Z, Weiss S. Sensitization to silk and childhood asthma in rural China. Pediatrics 2001;107:E80.
5. Clark R. The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair, 2nd Edn edition. New York: Plenum Press, 1996;3-50.
6. Coquette A, Berna N, Vandenbosch A, Rosdy M, De Wever B, Poumay Y. Analysis of interleukin-1alpha (IL-1alpha) and interleukin-8 (IL-8) expression and release in in vitro reconstructed human epidermis for the prediction of in vivo skin irritation and/or sensitization. Toxicol In Vitro 2003;17:311-21.
7. Corsini E, Bruccoleri A, Marinovich M, Galli C. In vitro mechanism(s) of ultraviolet-induced tumor necrosis factor-alpha release in a human keratinocyte cell line. Photodermatol Photoimmunol Photomed 1995;11:112-8.
8. Dal Pra I, Chiarini A, Boschi A, Freddi G, Armato U. Novel dermo-epidermal equivalents on silk fibroin-based formic acid-crosslinked three-dimensional nonwoven devices with prospective applications in human tissue engineering/regeneration/repair. Int J Mol Med 2006;18:241-7.
9. Dewair M, Baur X, Ziegler K. Use of immunoblot technique for detection of human IgE and IgG antibodies to individual silk proteins. J Allergy Clin Immunol 1985;76:537-42.
10. Dinarello C. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. Int Rev Immunol 1998;16:457-99.
11. Du M, Islam M, Lin L, Ohmura Y, Moriyama Y, Fujimura S. Promotion of proliferation of murine BALB/C3T3 fibroblasts mediated by nitric oxide at lower concentrations. Biochem Mol Biol Int 1997;41:625-31.
12. Efron D, Kirk S, Regan M, Wasserkrug H, Barbul A. Nitric oxide generation from L-arginine is required for optimal human peripheral blood lymphocyte DNA synthesis. Surgery 1991;110:327-34.

13. Elias J, Freundlich B, Adams S, Rosenbloom J. Regulation of human lung fibroblast collagen production by recombinant interleukin-1, tumor necrosis factor, and interferon-gamma. Ann N Y Acad Sci 1990;580:233-44.
14. Elias J, Reynolds M, Kotloff R, Kern J. Fibroblast interleukin 1 beta: synergistic stimulation by recombinant interleukin 1 and tumor necrosis factor and posttranscriptional regulation. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:6171-5.
15. Erdmann K, Grosser N, Schroder H. L-methionine reduces oxidant stress in endothelial cells: role of heme oxygenase-1, ferritin, and nitric oxide. AAPS J 2005;7:E195-200.
16. Gotoh Y, Tsukada M, Minoura N. Effect of the chemical modification of the arginyl residue in Bombyx mori silk fibroin on the attachment and growth of fibroblast cells. J Biomed Mater Res 1998;39:351-7.
17. Gotoh Y, Tsukada M, Minoura N, Imai Y. Synthesis of poly(ethylene glycol)-silk fibroin conjugates and surface interaction between L-929 cells and the conjugates. Biomaterials 1997;18:267-71.
18. Groves R, Allen M, Ross E, Barker J, MacDonald D. Tumour necrosis factor alpha is pro-inflammatory in normal human skin and modulates cutaneous adhesion molecule expression. Br J Dermatol 1995;132:345-52.
19. Hynes R. Fibronectins. Scientific American 1986;254:32-41.
20. Kato N, Sato S, Yamanaka A, Yamada H, Fuwa N, Nomura M. Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. Biosci Biotechnol Biochem 1998;62:145-7.
21. Khan F, Roychowdhury S, Nemes R, Vyas P, Woster P, Svensson C. Effect of pro-inflammatory cytokines on the toxicity of the arylhydroxylamine metabolites of sulphamethoxazole and dapsone in normal human keratinocytes. Toxicology 2006;218:90-9.
22. Koller D, Halmerbauer G, Bock A, Engstler G. Action of a silk fabric treated with AEGIS in children with atopic dermatitis: A 3-month trial. Pediatr Allergy Immunol 2007;18:335-8.
23. Miljkovic D, Cvetkovic I, Stosic-Grujicic S, Trajkovic V. Mycophenolic acid inhibits activation of inducible nitric oxide synthase in rodent fibroblasts. Clin Exp Immunol 2003;132:239-46.
24. Minoura N, Aiba S, Gotoh Y, et al. Attachment and growth of cultured fibroblast cells on silk protein matrices. J Biomed Mater Res. 1995;29:1215-1221.
25. Minoura N, Aiba S, Higuchi M, Gotoh Y, Tsukada M, Imai Y. Attachment and growth of fibroblast cells on silk fibroin. Biochem Biophys Res Commun 1995;208:511-6.

26. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983;65:55-63.
27. Nathan C. Perspectives series. Inducible nitric oxide synthase: What difference does it make? J Clin Invest 1997;100:2417-23.
28. Panilaitis B, Altman G, Chen J, Jin H, Karageorgiou V, Kaplan D. Macrophage responses to silk. Biomaterials 2003;24:3079-85.
29. Patel M, Wypij D, Rose D, Rimele T, Wiseman J. Secretion of cyclic GMP by cultured epithelial and fibroblast cell lines in response to nitric oxide. J Pharmacol Exp Ther 1995;273:16-25.
30. Pfaender, H.G., Schott guide to glass. 2 ed. 1996: Springer.
31. Qwarnstrom E, Jarvelainen H, Kinsella M, Ostberg C, Sandell L, Page R, et al. Interleukin-1 beta regulation of fibroblast proteoglycan synthesis involves a decrease in versican steady-state mRNA levels. Biochem J 1993;294:613-20.
32. Sen U, Tyagi N, Kumar M, Moshal K, Rodriguez W, Tyagi S. Cystathionine-beta-synthase gene transfer and 3-deazaadenosine ameliorate inflammatory response in endothelial cells. Am J Physiol Cell Physiol 2007;293:C1779-87.
33. Soong H, Kenyon K. Adverse reactions to virgin silk sutures in cataract surgery. Ophthalmology. 1984;91:479-483.
34. Stenvall, M., et al., High-throughput solubility assay for purified recombinant protein immunogens. Biochim Biophys Acta, 2005. 1752(1): p. 6-10.
35. Takasu Y, Yamada H, Tsubouchi K. Isolation of three main sericin components from the cocoon of the silkworm, Bombyx mori. Biosci Biotechnol Biochem 2002;66:2715-8.
36. Terada S, Nishimura T, Sasaki M, et al. Sericin, a protein derived from silkworms, accelerates the proliferation of several mammalian cell lines including a hybridoma. Cytotechnology. 2002;40:3-12.
37. Tsubouchi K, Igarashi Y, Takasu Y, Yamada H. Sericin enhances attachment of cultured human skin fibroblasts. Biosci Biotechnol Biochem. 2005;69:403-405.
38. Uff C, Scott A, Pockley A, Phillips R. Influence of soluble suture factors on in vitro macrophage function. Biomaterials 1995;16:355-60.
39. Unemori E, Ehsani N, Wang M, Lee S, McGuire J, Amento E. Interleukin-1 and transforming growth factor-alpha: synergistic stimulation of metalloproteinases, PGE2, and proliferation in human fibroblasts. Exp Cell Res 1994;210:166-71.

40. Wen C, Ye S, Zhou L, Yu Y. Silk-induced asthma in children: a report of 64 cases. Ann Allergy 1990;65:375-8.
41. Williamson M, Fromm H. Effect of cystine and methionine on healing of experimental wounds. Proc Soc Exp Biol Med 1952;80:623-6.
42. Williamson M, Fromm H. Excretion of sulfur during healing of experimental wounds. Proc Soc Exp Biol Med 1954;87:366-8.
43. Witte M, Thornton F, Efron D, Barbul A. Enhancement of fibroblast collagen synthesis by nitric oxide. Nitric Oxide 2000;4:572-82.
44. Yeo J, Lee K, Kim H, Oh H, Kim A, Kim S. The effects of PVA/chitosan/fibroin (PCF)- blended spongy sheets on wound healing in rats. Biol Pharm Bull 2000;23:1220-3.
45. Zaoming W, Codina R, Fernandez-Caldas E, Lockey R. Partial characterization of the silk allergens in mulberry silk extract. J Investiq Allergol Clin Immunol. 1996;6:237-241.
46. Zhaorigetu S, Yanaka N, Sasaki M, Watanabe H, Kato N. Silk protein, sericin, suppresses DMBA-TPA-induced mouse skin tumorigenesis by reducing oxidative stress, inflammatory responses and endogenous tumor promoter TNF-alpha. Oncol Rep 2003;10:537-43.

ภาคผนวก