

บทนำ

เนื่องจากการสร้างเนื้อเยื่อของผิวหนังในผู้ป่วยที่ได้รับอุบัติเหตุจากสารเคมี ไฟไหม้ ความร้อน ฯลฯ ที่ทำให้เกิดการหลุดลอกของผิวหนังมักจะเกิดขึ้นอย่างไม่สมบูรณ์ ก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ การเกิดแผลเป็น หรืออาจทำให้เกิดความผิดปกติต่อการทำงานของอวัยวะนั้น ๆ ได้ ด้วยเหตุนี้ศัลยแพทย์จึงจำเป็นต้องนำผิวหนังส่วนดีของผู้ป่วยมาติดบาดแผลดังกล่าวเพื่อช่วยให้การซ่อมแซมเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น ซึ่งในกระบวนการดังกล่าวนอกจากจะทำให้ผู้ป่วยต้องสูญเสียเนื้อเยื่อจากอวัยวะดีบางส่วนและก่อให้เกิดความเจ็บปวดแล้ว ยังอาจเป็นการเพิ่มความเสี่ยงต่อการติดเชื้อของผู้ป่วยได้อีกด้วย ในหลายประเทศได้มีการพยายามนำสารโพลีเมอร์มาใช้ติดบาดแผลแทนผิวหนังส่วนดีเหล่านี้แต่เนื่องจากสารโพลีเมอร์มักได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีทำให้ขาดคุณสมบัติที่เหมาะสมทางชีวภาพเช่น ความเข้ากันได้ต่อร่างกายมนุษย์ ความสามารถในการเสื่อมสลายในร่างกายมนุษย์ (biodegradable) การมีคุณสมบัติเป็นสารที่ก่อให้เกิดการแพ้ อีกทั้งคุณสมบัติทางด้านกายภาพอันได้แก่ความยืดหยุ่น คุณสมบัติในการละลาย การนำสารโพลีเมอร์หรือสารสังเคราะห์มาประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์ธรรมชาติบางตัวเช่น ไคโตซาน ได้พิสูจน์แล้วว่าสามารถก่อให้เกิดความเข้ากันได้เนื้อเยื่อสัตว์ทดลองได้ดี มีความยืดหยุ่นที่เหมาะสม สามารถเสื่อมสลายได้โดยเอ็นไซม์จากธรรมชาติ นำมาใช้ประโยชน์เป็นเนื้อเยื่อปิดแผลได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามไคโตซานยังมีปัญหาด้านการผลิตที่ได้มาตรฐาน มีราคาค่อนข้างสูง เป็นสารก่อเชื้อได้ดี อีกทั้งบางรายงานยังพบปัญหาด้านความเข้ากันได้ต่อร่างกายมนุษย์ในขนาดโมเลกุลต่าง ๆ กัน

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

ประโยชน์อย่างยิ่งต่อการแพทย์แล้ว ยังสามารถก่อให้เกิดรายได้แก่เกษตรกรอย่างยั่งยืนจากการนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาก่อให้เกิดประโยชน์และเพิ่มมูลค่าของใหม่ได้

ปัจจุบันในประเทศไทยมีการนำเข้าผิวหนังเทียมจากประเทศญี่ปุ่นซึ่งมีราคาสูงมาก ผลิตภัณฑ์เดียวที่มีการนำเข้าได้แก่ Terudermis[®] และมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในวงการแพทย์ อย่างไรก็ตาม Terudermis[®] ผลิตมาจาก bovine serum albumin ซึ่งนอกจากจะมีราคาสูงมากแล้ว ยังก่อให้เกิดการแพ้ในผู้ป่วยบางราย ซึ่งนับเป็นปัญหาที่มีความสำคัญอย่างยิ่งทางด้านสาธารณสุข หากนำโปรตีนใหม่ซึ่งเป็นโปรตีนที่ผลิตจากสัตว์เล็กซึ่งอาจก่อให้เกิดปฏิกิริยาและการแพ้ต่อร่างกายมนุษย์ที่น้อยกว่าจะก่อให้เกิดประโยชน์ทางการแพทย์อย่างมาก อีกทั้งยังสามารถลดรายจ่ายจากการนำเข้าสินค้าประเภทนี้ได้อย่างมาก

ได้มีการศึกษาคุณสมบัติในด้านต่าง ๆ ของเซรีซินและพบว่าเซรีซินประกอบด้วยกรดอะมิโนที่สำคัญต่าง ๆ เป็นจำนวนมาก เช่น serine ประมาณร้อยละ 30, asparagine ประมาณร้อยละ 18 และ glycine ประมาณร้อยละ 20 และเนื่องจากกรดอะมิโนหลายตัวในเซรีซินเป็น polar hydrophilic groups ทำให้เซรีซินมีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดีเมื่อเทียบกับไฟโบรอิน อีกทั้งยังมีความสามารถในการอุ้มน้ำ ทำให้ผิวหนังชุ่มชื้นเมื่อนำมาทาบนผิวหนัง นอกจากนี้ serine ยังเป็นกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในผิวหนังมนุษย์โดยมีคุณสมบัติในการเป็นสารดูดความชื้นจากธรรมชาติ (natural moisture factor) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่พบได้มากในโปรตีนกาวใหม่เช่นกัน

นอกจากคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้นเซรีซินยังมีคุณสมบัติอื่น ๆ อีกมากเช่น สามารถยับยั้งการสร้างเม็ดสีที่ผิวหนัง ยับยั้งการทำลายเซลล์จากรังสียูวีที่ทำให้เกิดเนื้องอก ลดการแข็งตัวของเลือด เพิ่มความสามารถในการเกาะยึดและเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างเส้นใย (fibroblast) ในหนูเมื่อใช้เซรีซินแทนชั้นใต้ผิวหนัง (substratum) ได้ ในประเทศญี่ปุ่นพบว่าเซรีซินมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของ human cell line หลายชนิด อีกทั้งยังสามารถกระตุ้นการสร้างและเพิ่มการยึดเกาะกันของเซลล์สร้างเส้นใยผิวหนังของมนุษย์ (human skin fibroblasts) นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยอีกเป็นจำนวนมากที่ใช้โปรตีนใหม่เซรีซินร่วมกับโปรตีนใหม่ไฟโบรอินเป็นเยื่อเลือกผ่าน (membrane) ในการสมานแผล โดยพบว่าสารทั้งสองตัวสามารถที่จะทำให้เซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนขึ้นและสามารถใช้แทนคอลลาเจนได้ แต่เนื่องจากสารสกัดโปรตีนใหม่ไฟโบรอินมีขั้นตอนที่ยุ่งยากและสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ไม่ถนัด ทำให้ไฟโบรอินมีราคาค่อนข้างสูง อีกทั้งไฟโบรอินยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านอื่น ๆ เช่น ทางด้านสิ่งทอได้ ด้วยเหตุนี้จึงมีแนวคิดในการนำเฉพาะโปรตีนกาวใหม่เซรีซินซึ่งเป็นวัสดุเหลือใช้มาประยุกต์ใช้ในการรักษาแผลสดที่ผิวหนัง โดยในขั้นต้นพบว่าครีมเซรีซินสามารถสมานแผลสดในหนูทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพและระยะเวลาในการสมานแผลลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับการรักษาแผลด้วย polyvinyl pyrrolidone (Betadine[®]) หรือ cream base ซึ่งผลของการใช้เซรีซินในการรักษาขั้นต้นพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณการสร้างคอลลาเจนในแผล ดังได้กล่าวมาแล้วในเบื้องต้นว่าปริมาณคอลลาเจนเป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยทำให้บาดแผลหายเร็วขึ้น ดังนั้นหากสามารถ

นำโปรตีนกาวไหมเซริซินมาสร้างเป็นแผ่นเนื้อเยื่อซึ่งยังสามารถปลดปล่อยสารสำคัญและในขณะที่เดียวกันยังสามารถปกป้องบาดแผลพร้อมทั้งมีรูพรุนช่วยกระตุ้นการเคลื่อนตัวของเซลล์เนื้อเยื่อที่จะมีผลทำให้แผลหายได้รวดเร็วยิ่งขึ้นด้วย

เนื่องจากเซริซินมีฤทธิ์ในการสมานแผลได้ดี จึงมีแนวคิดที่สามารถนำมาใช้สร้างเป็นแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลสำหรับการปลูกถ่ายผิวหนังได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งแนวคิดนี้ยังไม่มีการศึกษาทั้งในและต่างประเทศ อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะมีงานวิจัยตีพิมพ์ออกมาเป็นจำนวนมากเกี่ยวกับโปรตีนเซริซิน แต่การทดลองส่วนใหญ่เป็นผลมาจากเซริซินของไหมพันธุ์ต่างประเทศ ซึ่งมีลักษณะรังไหม โปรตีนไหมทั้งในด้านปริมาณและการเรียงตัวแตกต่างจากไหมพันธุ์ไทย ดังนั้นการนำเซริซินจากไหมพันธุ์ไทยซึ่งนับว่าเป็นหนึ่งในพันธุ์ไหมที่ดีที่สุดในโลกมาศึกษาจะเป็นการเพิ่มศักยภาพของผลิตผลทางการเกษตรในประเทศไทย อีกทั้งยังมีมูลค่าเพิ่มอย่างมากหากนำมาใช้ในทางการแพทย์ 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 ซึ่งสายพันธุ์ไหมที่ทำการศึกษาล้วนส่วนใหญ่จะเป็นไหมจากประเทศจีนหรือญี่ปุ่น 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 หรือนำโปรตีนไหมมาทำเป็นเกลียวในรูปแบบต่าง ๆ เพื่อใช้สำหรับปิดแผลโดยไม่มีการนำโพลีเมอร์หรือสารอื่น 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 ไม่ใช้สารอื่นหรือโพลีเมอร์เป็นส่วนประกอบ ไม่มีลักษณะเป็นรูพรุนอีกด้วย

สิทธิบัตรอื่นที่เกี่ยวข้องแต่มีความสัมพันธ์น้อยกว่ากับงานวิจัยนี้ได้แก่ Skin preparations for external use โดย Hiraki Y และคณะ ซึ่งวัตถุประสงค์หลักของสิทธิบัตรนี้ไม่ใช่เพื่อผลิตวัสดุที่ใช้ทางการแพทย์แต่เป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง โดยมีความครอบคลุมถึงการใส่ 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 อย่างไรก็ตามเชริซินที่เราสกัดได้จะมีน้ำหนักโมเลกุลเป็นช่วงตั้งแต่ 25-450 kDa ซึ่งในงานวิจัยนี้ไม่มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเชริซินที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วงใดช่วงหนึ่งโดยเฉพาะเนื่องจากจะทำให้วัสดุที่ผลิตขึ้นมีราคาแพงจากกระบวนการคัดแยกน้ำหนักโมเลกุลของเชริซิน 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 มีสิทธิบัตรทั้งในและต่างประเทศที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนกาวไหมเชริซินที่นำมาใช้ทางการแพทย์ไม่มากนัก โดยสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องมักจะอ้างถึงทั้งโปรตีนกาวไหมและโปรตีนเส้นไหม อีกทั้งยังไม่มีมีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับการนำมาใช้ทำแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผล อย่างไรก็ตามยังมีสิทธิบัตรเกี่ยวข้องกับโปรตีนกาวไหมที่นำมาใช้กับผิวหนังไม่ว่าจะเพื่อวัตถุประสงค์ด้านความงามในรูปแบบของเครื่องสำอางหรือรูปแบบเพื่อใช้ทางการแพทย์ ซึ่งเป็นหลักฐานอย่างหนึ่งที่แสดงให้เห็นว่าโปรตีนกาวไหมมีประสิทธิภาพในการรักษาเซลล์ผิวหนังได้เป็นอย่างดี สนับสนุนแนวคิดในการนำโปรตีนกาวไหมมาใช้เพื่อผลิตแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลได้

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

การสกัดโปรตีนกาวไหม

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

การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ เคมีและชีวภาพของโปรตีนกาวไหม

ศึกษาลักษณะสมบัติของผงโปรตีนกาวไหมในด้านการละลาย เคมี (ปริมาณกรดอะมิโน) และชีวภาพ (ความเข้ากันได้กับเซลล์ผิวหนังแท้ ความสามารถในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจน การกระตุ้นการสร้างสารก่อการอักเสบ)

การเตรียมและศึกษาลักษณะสมบัติของแผ่นเนื้อเยื่อ

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

ผลการวิจัย

การคัดเลือกสายพันธุ์ไหมที่มีความเหมาะสม

คณะผู้วิจัยได้ทำการหาแหล่งวัตถุดิบรังไหมจากแหล่งผลิตขนาดใหญ่ต่าง ๆ พบว่าแหล่งผลิตรังไหมที่มีขนาดใหญ่เพียงพอที่จะสามารถนำไปพัฒนาเป็นแหล่งผลิตโปรตีนกาวไหมเชิงพาณิชย์อีกทั้งยังมีการควบคุมคุณภาพในการผลิตรังไหมมี 2 แหล่งได้แก่

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

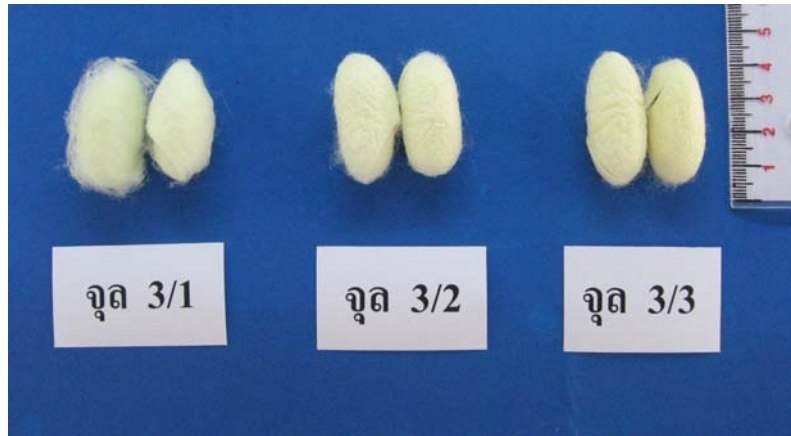
จากการพิจารณาลักษณะทางกายภาพของรังไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ และสอบถามข้อมูลจากแหล่งผลิตทั้งในด้านจำนวนผลผลิตต่อปี ความยาก-ง่ายในการเลี้ยง แหล่งอาหารที่ใช้และความสม่ำเสมอของการผลิต ผู้วิจัยได้คัดเลือกรังไหมสายพันธุ์ไทยผสมจำนวน 18 สายพันธุ์จากบริษัท จุลไหมไทย จำกัด และ 1 สายพันธุ์จากจังหวัดศรีสะเกษมาเพื่อทำการทดสอบคุณสมบัติของโปรตีนกาวไหมต่อไป 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 |

| | |
|-------------------|---|
| จุด 3/1 | รังไหมสีเขียวเหลือง เปลือกค่อนข้างบาง |
| จุด 3/2 | รังไหมสีเขียวเหลือง ลักษณะค่อนข้างรี เปลือกแข็ง |
| จุด 3/3 | รังไหมสีเขียวเหลือง ลักษณะค่อนข้างรี เปลือกบาง |
| จุด 4/1 | รังไหมสีเหลืองเข้ม ลักษณะค่อนข้างรี |
| จุด 4/2 | รังไหมสีเหลืองเข้ม ลักษณะอ้วนป้อม เปลือกแข็ง |
| จุด 5/1 | รังไหมสีขาว ลักษณะอ้วนป้อม |
| จุด 5/2 | รังไหมสีขาว เปลือกแข็ง |
| จุด 5/3 | รังไหมสีขาว รังค่อนข้างเล็ก มีลักษณะรี |
| จุด 5/4 | รังไหมสีขาว ลักษณะอ้วนป้อม เปลือกแข็ง |
| จุด 6/1 | รังไหมสีขาว เปลือกแข็ง ลักษณะรังใหญ่ |
| จุด 6/2 | รังไหมสีขาว ลักษณะค่อนข้างรี เปลือกบาง |
| จุด 10/1 | รังไหมสีเขียวยาว ลักษณะยาวรี เปลือกบาง |
| จุด 10/2 | รังไหมสีเขียวยาวเข้ม รังใหญ่ ลักษณะยาวรี |
| จุด 10/3 | รังไหมสีเขียวเหลือง ลักษณะอ้วนป้อม เปลือกบาง |
| จุด 10/4 | รังไหมสีเขียวยาวอ่อน เปลือกบาง ลักษณะอ้วนป้อม |
| นางน้อยศรีสะเกษ 1 | รังไหมสีเหลืองเข้ม เปลือกบาง ลักษณะรังยาว |







ภาพที่ 1 ลักษณะของรังไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ ทั้ง 19 สายพันธุ์

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

ตารางที่ 2 ขนาดและน้ำหนักของรังไหมในแต่ละรุ่นของสายพันธุ์ต่าง ๆ

| สายพันธุ์ | รุ่น | น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) | SD น้ำหนัก | ความกว้างเฉลี่ย (ซม.) | SD ความกว้าง | ความยาวเฉลี่ย (ซม.) | SD ความยาว |
|-----------------------------|------|----------------------|--------------|-----------------------|--------------|---------------------|--------------|
| จูล 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 |
| จูล 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 |
| จูล 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 |
| จูล 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 |
| จูล 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 |
| จูล 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 |
| จุด 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 |
| จุด 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 |
| จุด 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 |
| จุด 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 |
| จุด 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 |
| จุด 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 |
| จุด 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 |

| | | | | | | | |
|----------------------|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| จุด 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 |
| จุด 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 |
| จุด 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 |
| จุด 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 |
| จุด 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 |

จากคุณลักษณะในเมืองต้น คณะผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่เพื่อนำมาใช้ทดสอบต่อไปทั้งสิ้น จำนวน 4 สายพันธุ์อันได้แก่ จุด 1/1 (รังไหมสีขาว), จุด 3/2 (รังไหมสีเขียวเหลือง), จุด 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 จนกว่าสีจะละลายออกหมดแล้ว นำรังไหมที่สกัดสีออกแล้วไปตากให้แห้งในบรรยากาศปกติ 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 ที่ให้เย็นแล้วทำการกรองผ่านกระดาษกรองเพื่อแยกโปรตีนขาวไหมเซริซินออกจากโปรตีนเส้นไหมไฟโบรอิน 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 หลังจากนั้นนำรังไหมที่ต้องการสกัดโปรตีนขาวไหมมาใส่ในสารละลาย 8M urea (อัตราส่วนน้ำหนักรังไหม:สารละลายยูเรีย = 6:150) และสกัดที่อุณหภูมิ 85°C นาน 30 นาที ที่ให้เย็นแล้วทำการกรองผ่านกระดาษกรองเพื่อแยกโปรตีนขาวไหมเซริซินออกจากโปรตีนเส้นไหมไฟโบรอิน นำสารละลายที่ได้ไป dialyze ผ่าน membrane (MWCO 6,000-8,000) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลัง dialyze นำสารละลายที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยวิธี freeze-drying

จากผลการสกัดพบว่าปริมาณผลผลิต (yield) ที่ได้ในแต่ละวิธีมีความแตกต่างกัน โดยวิธีการสกัดด้วยสารละลายต่างจะให้ปริมาณผลผลิตต่ำที่สุด ส่วนวิธีการสกัดด้วยความร้อนและสารละลายยูเรียจะให้ผลผลิตค่อนข้างสูง โดยผลผลิตที่ได้จากการสกัดแต่ละสายพันธุ์แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณผลผลิตของโปรตีนขาวไหมที่สกัดจากไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ กันด้วยวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน

| สายพันธุ์/วิธีสกัด | ค่าเฉลี่ยปริมาณผลผลิต (Ave. % yield) | SD |
|--------------------|--------------------------------------|------|
| จุด 1/1 H | 21.27 | 3.83 |
| จุด 1/1 U | 18.60 | 4.08 |
| จุด 1/1 A | 15.19 | 2.14 |
| จุด 1/1 B | 12.18 | 1.11 |
| จุด 3/2 H | 18.36 | 0.29 |
| จุด 3/2 U | 21.08 | 4.19 |
| จุด 3/2 A | 8.41 | 1.45 |
| จุด 3/2 B | 6.93 | 0.85 |
| จุด 3/2 H* | 17.00 | 1.12 |
| จุด 3/2 U* | 23.10 | 2.85 |
| จุด 3/2 A* | 8.33 | 0.95 |

| | | |
|--------------------|-------|------|
| จุด 3/2 B* | 5.93 | 1.16 |
| จุด 4/2 H | 21.47 | 0.62 |
| จุด 4/2 U | 20.43 | 2.22 |
| จุด 4/2 A | 13.60 | 1.17 |
| จุด 4/2 B | 12.69 | 0.87 |
| จุด 4/2 H* | 17.58 | 2.21 |
| จุด 4/2 U* | 20.33 | 2.45 |
| จุด 4/2 A* | 7.86 | 0.89 |
| จุด 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

หมายเหตุ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการสกัดทั้งสิ้น 6 ครั้ง

จากผลการสกัดพบว่า ปริมาณของสารสกัดที่ได้และลักษณะทางกายนอกเช่น สี ความหนืดของการสกัดในแต่ละรุ่นไม่แตกต่างกันมากนัก

การศึกษาค่าการละลายของโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กันที่อุณหภูมิและ pH ต่าง ๆ กัน

วิธีการทดสอบ

1. นำผงของโปรตีนกาวไหมในปริมาณที่มากเกินพอกมาใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุสารละลาย 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: คัดแปลงมาจาก 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 |
| จุด 1/1 U | 0.31 | 4.52 | 4.25 |
| จุด 1/1 H | 33.74 | 48.68 | 42.55 |
| จุด 1/1 A | 30.68 | 36.65 | 31.24 |
| จุด 1/1 B | 154.78 | 245.20 | 225.74 |
| จุด 3/2 U | 3.47 | 6.26 | 2.24 |
| จุด 3/2 H | 146.43 | 148.09 | 101.57 |
| จุด 3/2 A | 53.59 | 58.05 | 84.25 |
| จุด 3/2 B | 208.35 | 228.96 | 187.22 |
| จุด 3/2 U* | 3.84 | 6.51 | 4.04 |
| จุด 3/2 H* | 152.32 | 192.99 | 123.40 |
| จุด 3/2 A* | 23.32 | 29.36 | 35.55 |
| จุด 3/2 B* | 186.70 | 271.06 | 184.66 |

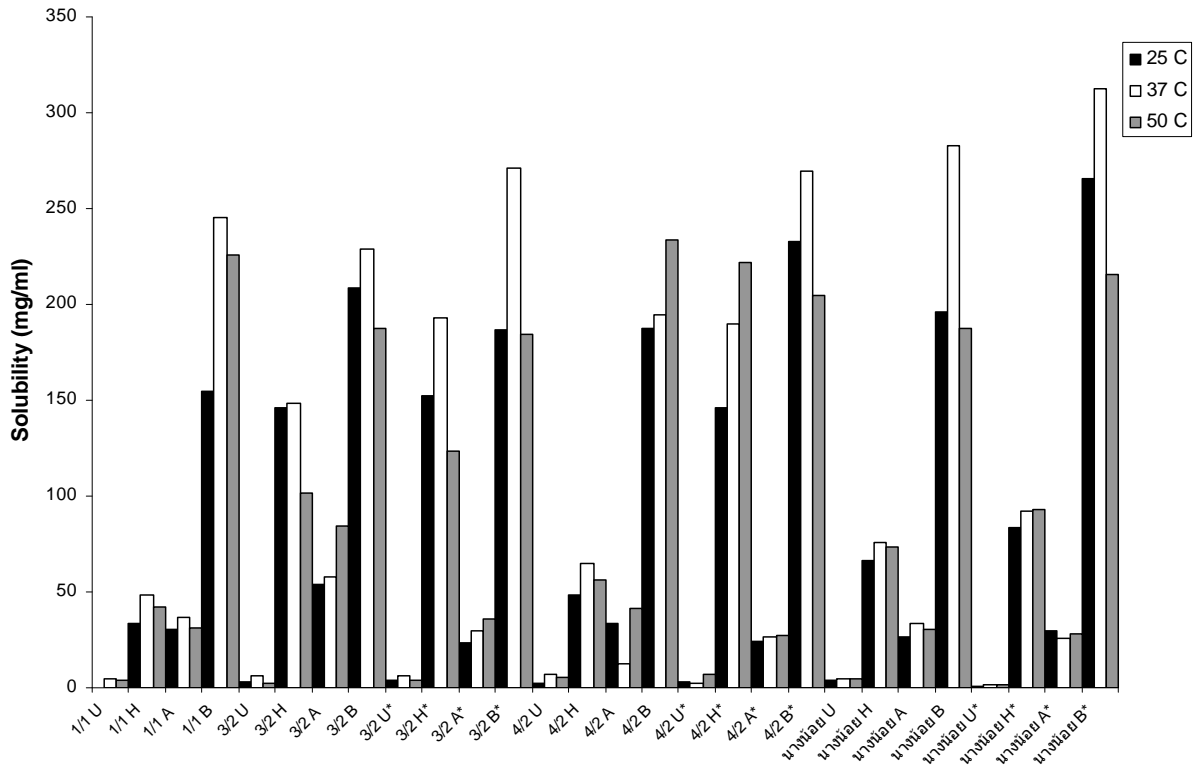
| | | | |
|----------------------|--------|--------|--------|
| จุด 4/2 U | 2.67 | 7.12 | 5.53 |
| จุด 4/2 H | 48.33 | 64.83 | 56.47 |
| จุด 4/2 A | 33.70 | 12.69 | 41.29 |
| จุด 4/2 B | 187.43 | 194.79 | 233.39 |
| จุด 4/2 U* | 2.89 | 2.45 | 6.75 |
| จุด 4/2 H* | 145.81 | 190.18 | 221.70 |
| จุด 4/2 A* | 23.90 | 26.56 | 27.37 |
| จุด 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 |

* แสดงการสกัดสีก่อนนำมาสกัดโปรตีนขาวใหม่

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

หมายเหตุ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการสกัดทั้งสิ้น 3 ครั้ง

ค่าดังกล่าวสามารถนำมาแสดงได้ดังภาพที่ 2



* แสดงการสกัดก่อนนำมาสกัดโปรตีนกาวไหม

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 |
| จุด 1/1 U | 1.84 | 0.31 | 1.44 |
| จุด 1/1 H | 90.47 | 33.74 | 122.77 |
| จุด 1/1 A | 31.52 | 30.68 | 14.13 |
| จุด 1/1 B | 170.96 | 154.78 | 241.52 |

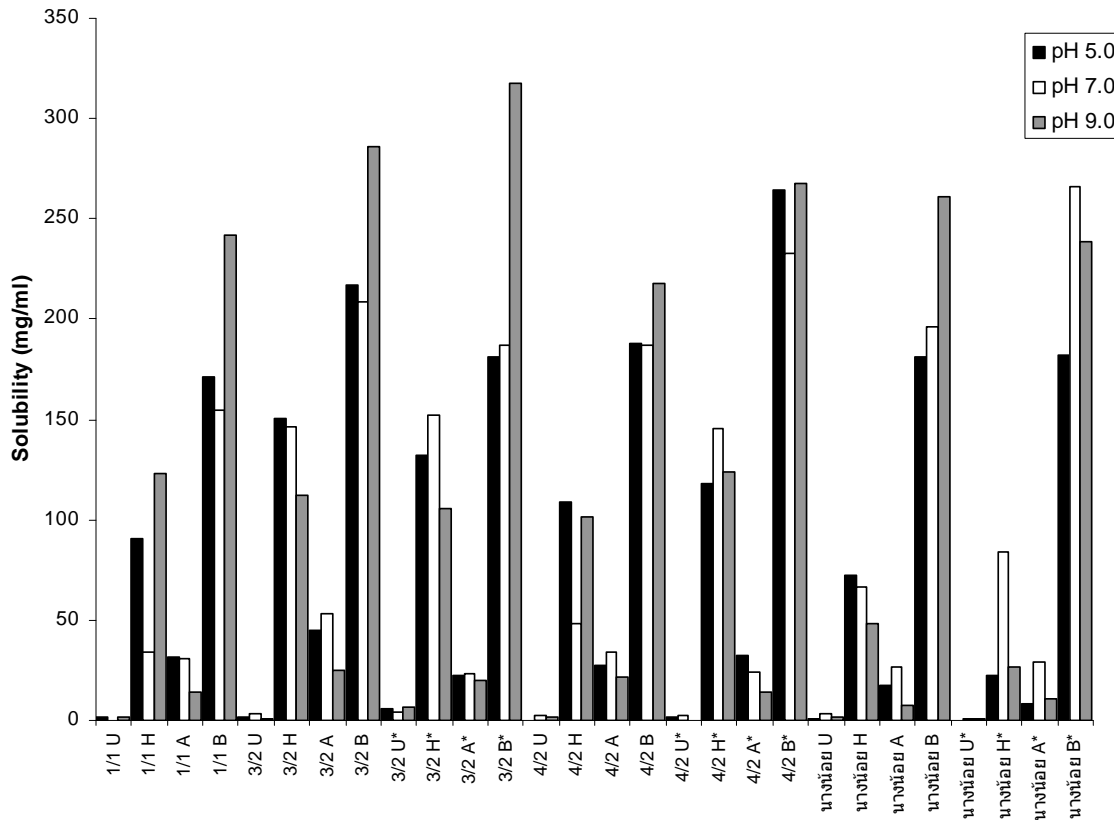
| | | | |
|----------------------|--------|--------|--------|
| จุด 3/2 U | 1.84 | 3.47 | 1.13 |
| จุด 3/2 H | 150.51 | 146.43 | 112.32 |
| จุด 3/2 A | 44.54 | 53.59 | 24.70 |
| จุด 3/2 B | 216.60 | 208.35 | 285.67 |
| จุด 3/2 U* | 5.84 | 3.84 | 6.68 |
| จุด 3/2 H* | 131.77 | 152.32 | 105.62 |
| จุด 3/2 A* | 22.33 | 23.32 | 20.02 |
| จุด 3/2 B* | 180.92 | 186.70 | 317.43 |
| จุด 4/2 U | 0.40 | 2.67 | 1.77 |
| จุด 4/2 H | 108.79 | 48.33 | 101.56 |
| จุด 4/2 A | 27.74 | 33.70 | 21.54 |
| จุด 4/2 B | 188.03 | 187.43 | 217.78 |
| จุด 4/2 U* | 1.26 | 2.89 | 0.13 |
| จุด 4/2 H* | 118.40 | 145.81 | 124.16 |
| จุด 4/2 A* | 32.60 | 23.90 | 13.72 |
| จุด 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 |

* แสดงการสกัดสีก่อนนำมาสกัดโปรตีนขาวใหม่

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

หมายเหตุ 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 พบว่าค่าการละลายของโปรตีนกาวไหมลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับที่ 37 องศาเซลเซียส ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเกิด polymerization ของโปรตีนที่อุณหภูมิสูง ดังนั้นควรใช้อุณหภูมิเพียง 37 องศาเซลเซียสในการละลายโปรตีนกาวไหมเพื่อให้ได้ค่าการละลายสูงสุด นอกจากนี้โปรตีนกาวไหมจากสายพันธุ์ใหม่ที่แตกต่างกันยังมีค่าการละลายแตกต่างกันอีกด้วย

ผลของ pH ที่มีต่อค่าการละลายของโปรตีนกาวใหม่พบว่า โปรตีนกาวใหม่ที่สกัดด้วยสารละลายต่าง ๆ ละลายได้ดีที่สุดใน pH ที่เป็นด่าง (pH 9.0) และมีค่าการละลายสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดต่าง ๆ และที่ pH อื่น ๆ ในส่วนของวิธีการสกัดอื่น ๆ ไม่สามารถสรุปได้ว่าค่าการละลายของโปรตีนกาวใหม่จะละลายได้ดีในภาวะที่เป็นกรดหรือด่าง ทั้งนี้ความแตกต่างของค่าการละลายใน pH ต่างกันอาจเนื่องมาจากความแตกต่างของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนกาวใหม่หลังจากการสกัด ส่งผลให้ประจุรวมของโปรตีนกาวใหม่ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีที่แตกต่างกันมีความแตกต่างกันด้วย

ในส่วนของวิธีการสกัดก็มีผลต่อค่าการละลายของโปรตีนกาวใหม่ โดยวิธีการสกัดด้วยสารละลายต่าง ๆ จะทำให้โปรตีนกาวใหม่ที่มีค่าการละลายสูงสุด รองลงมาคือโปรตีนกาวใหม่ที่ได้จากการสกัดด้วยความร้อน, ด้วยสารละลายกรดและสารละลายยูเรียตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกันในทุกสายพันธุ์

ในส่วนของสารสกัดสีจะพบว่า ส่วนใหญ่การสกัดสีออกจากกุ้งใหม่ก่อนที่จะนำมาสกัดโปรตีนกาวใหม่ เซริซินมักจะส่งผลให้ค่าการละลายของโปรตีนกาวใหม่เพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการจับตัวกันระหว่างโปรตีนกาวใหม่กับสาร carotenoid หรือ flavonoid ซึ่งเป็นสารประกอบหลักที่ก่อให้เกิดสีในกุ้งใหม่ ส่งผลให้เกิดเป็นสารประกอบโมเลกุลใหญ่ที่มีการละลายลดลง

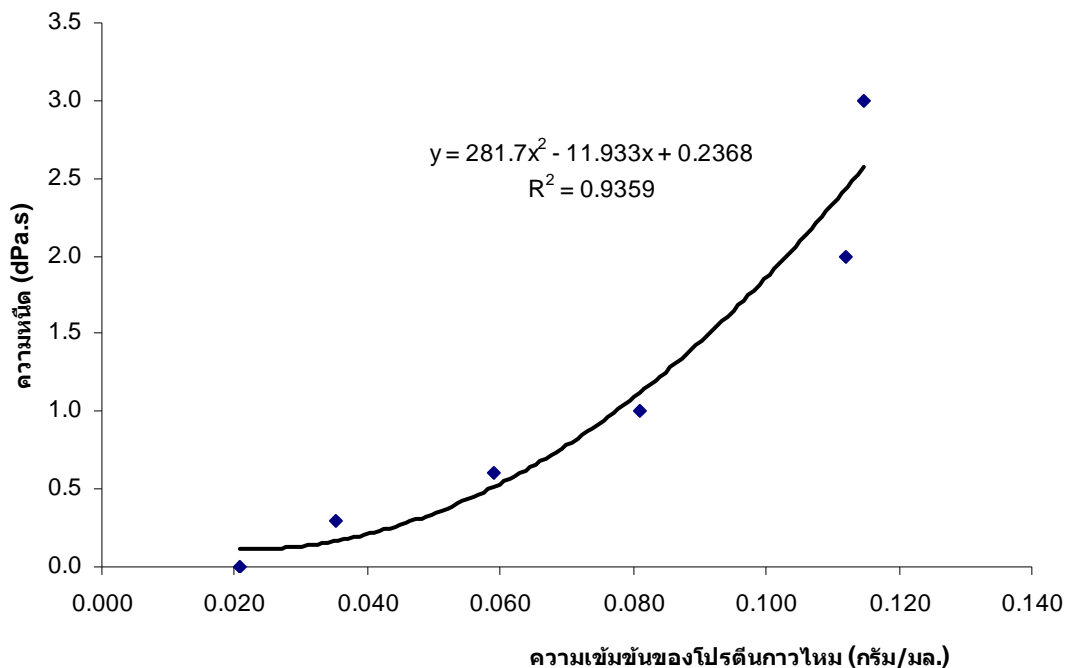
จากค่าการละลายสามารถสรุปได้ว่าการนำโปรตีนกาวใหม่มาผสมรวมกับโพลีเมอร์เพื่อขึ้นรูปเป็นแผ่นเนื้อเยื่อควรหลีกเลี่ยงการใช้โปรตีนกาวใหม่ที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลายยูเรียและสารละลายกรด แต่ควรใช้โปรตีนกาวใหม่ที่สกัดด้วยด่างหรือความร้อนแทนเนื่องจากมีค่าการละลายที่สูงกว่า ทำให้สามารถใช้โปรตีนกาวใหม่ในความเข้มข้นสูงได้

การศึกษาความหนืดของโปรตีนกาวใหม่ที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กันในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

วิธีการทดสอบ

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

จากการทดสอบโดยใช้รังไหมสายพันธุ์จุด 1/1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่มีสีมาเป็นตัวแทนเพื่อทดสอบค่าความหนืดของสารละลายโปรตีนกาวใหม่ที่สกัดด้วยความร้อนในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4: ค่าความหนืดของสารละลายโปรตีนกาวไหมจากสายพันธุ์จุล 1/1 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
หมายเหตุ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการสกัดและวัดทั้งสิ้น 3 ครั้ง

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

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กัน

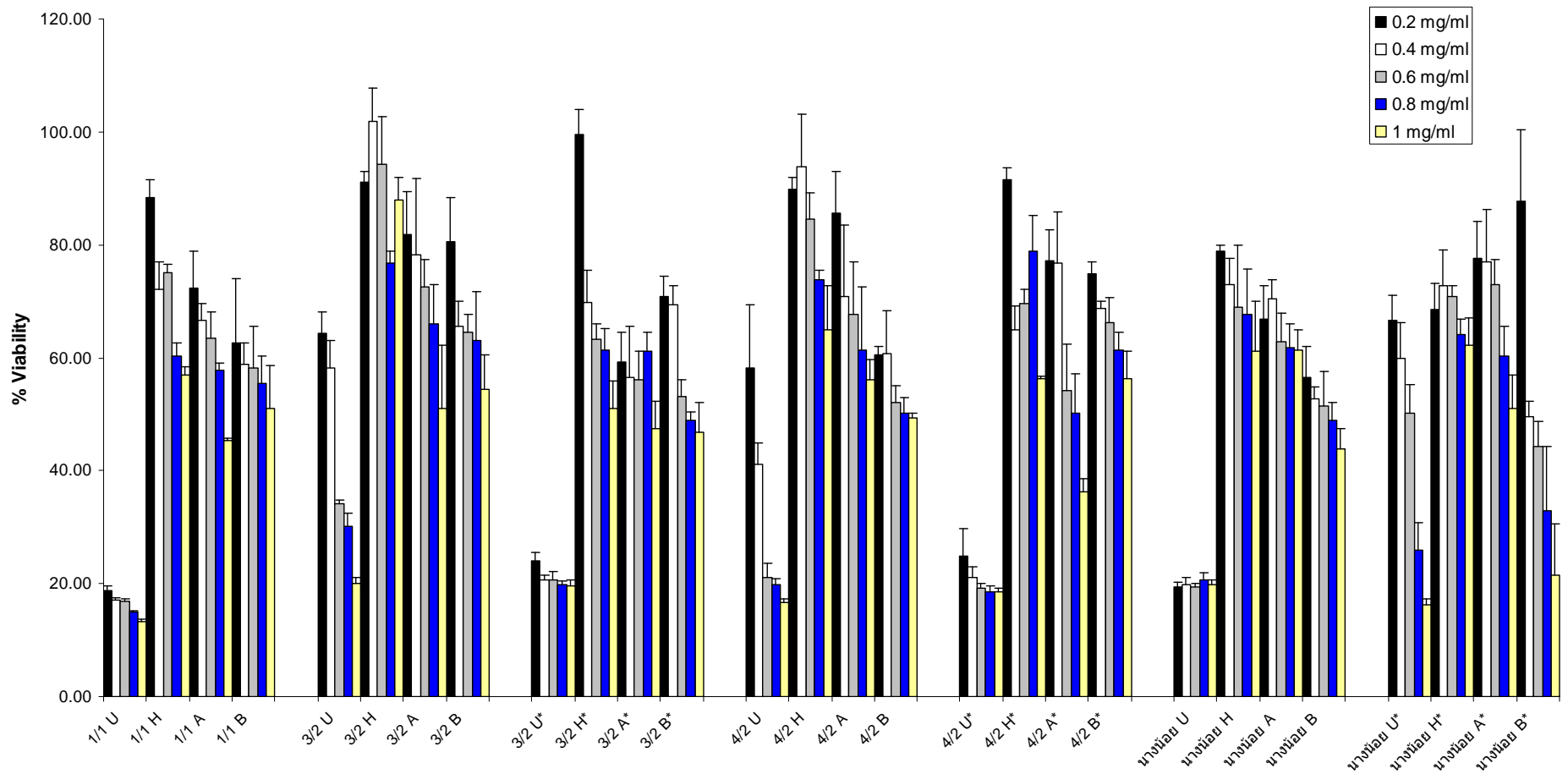
โดยก่อนที่จะมีการศึกษาคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนของโปรตีนกาวไหมต่อเซลล์ จำเป็นต้องมีการศึกษาความเป็นพิษของโปรตีนกาวไหมต่อเซลล์ก่อน เนื่องจากปริมาณของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงอาจมีผลต่อปริมาณคอลลาเจนที่ถูกสร้างขึ้นได้ วิธีการทดสอบความเป็นพิษของโปรตีนกาวไหมต่อเซลล์ทำได้โดยใช้ 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium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

วิธีการทดสอบความเป็นพิษของโปรตีนกาวไหมต่อเซลล์

1. นำเซลล์ที่ต้องการทดสอบ ซึ่งในที่นี้ใช้ L929 mouse fibroblast cells ในความเข้มข้นเริ่มต้น 2×10^4 /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 $0.22 \mu\text{m}$ 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 (ปริมาณเซลล์หลังการเลี้ยงนาน 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 จุด 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

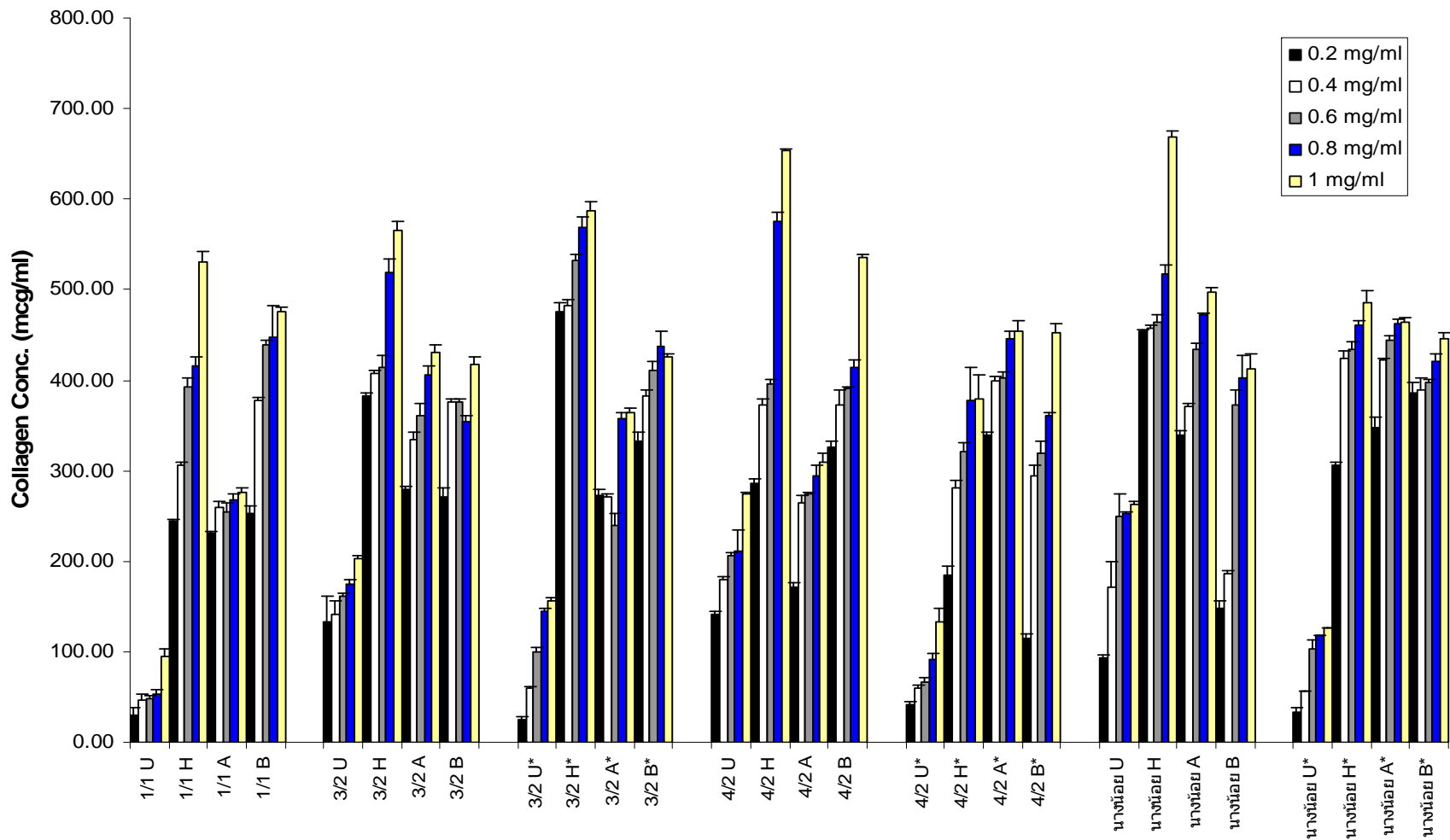
วิธีทดสอบความสามารถในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนของโปรตีนกาวไหม

1. นำเซลล์ที่ต้องการทดสอบ ซึ่งในที่นี้ใช้ L929 mouse fibroblast cells ในความเข้มข้นเริ่มต้น 2×10^4 /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 $0.22 \mu\text{m}$ 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

หมายเหตุ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการสกัดและวัดทั้งสิ้น 6 ครั้ง

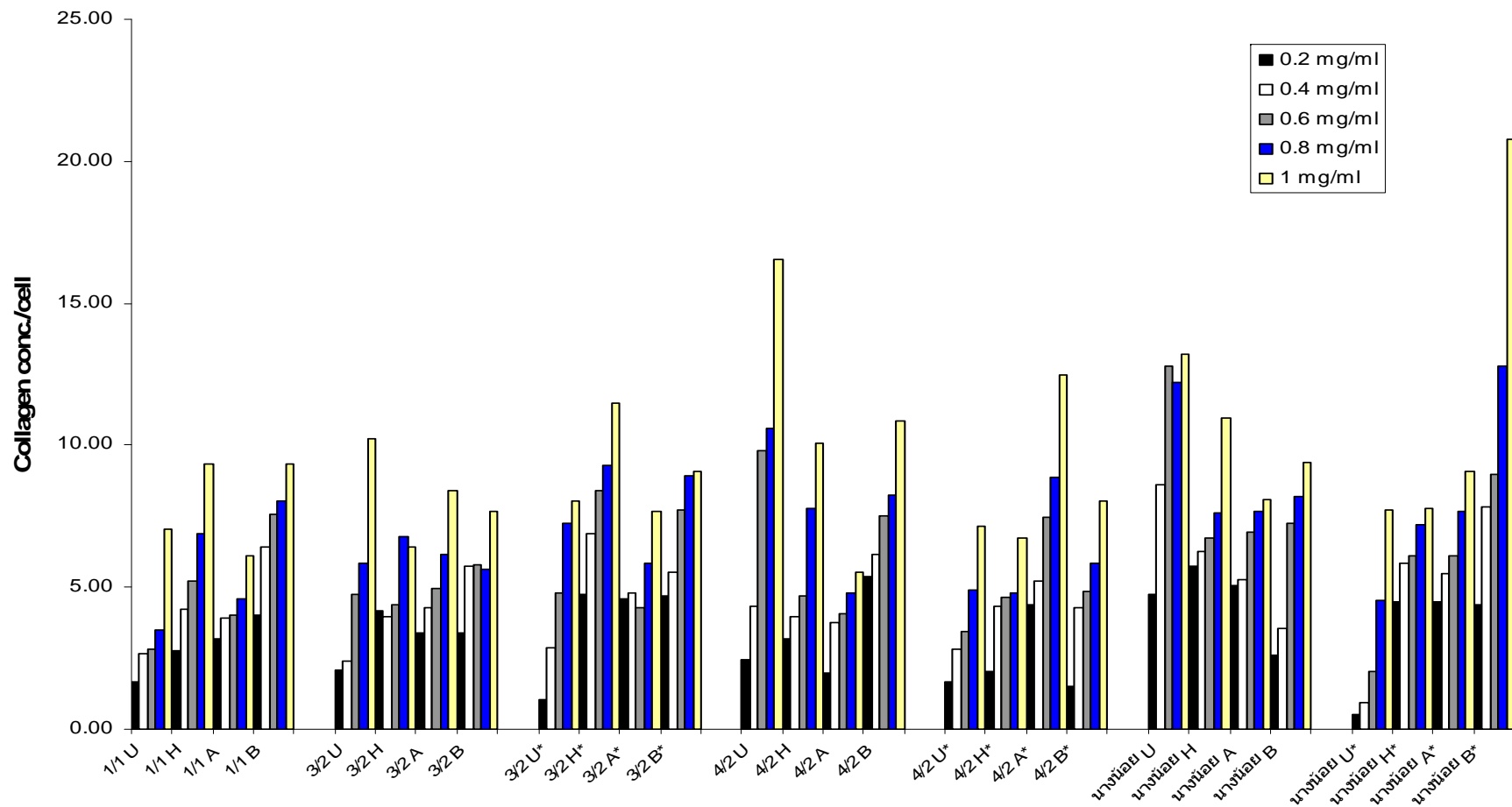


* แสดงการสกัดสีก่อนนำมาสกัดโปรตีนกาวไหม, H = การสกัดด้วยความร้อน, U=การสกัดด้วยสารละลายยูเรีย, A=การสกัดด้วยสารละลายกรด, B=การสกัดด้วยสารละลายด่าง

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

ผลการทดลองจะเห็นได้ว่า โพรตีนกาวไหมสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 จากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้ โดยเมื่อความเข้มข้นของโพรตีนกาวไหมที่เพิ่มขึ้นจะสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนได้เพิ่มมากขึ้นเช่นกัน และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณคอลลาเจนที่ถูกสร้างขึ้นจากโพรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กันพบว่า โพรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยความร้อนสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนได้สูงสุด ในขณะที่โพรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยสารละลายยูเรียสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนได้ต่ำสุด นอกจากนี้โพรตีนกาวไหมที่สกัดจากสายพันธุ์ไหมที่มีสียังสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนได้สูงกว่าหากไม่ผ่านการสกัดสี ในขณะที่โพรตีนกาวไหมที่ผ่านการสกัดสีก่อนจะมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนได้ลดลง

อย่างไรก็ตาม ปริมาณคอลลาเจนที่ถูกกระตุ้นจากโพรตีนกาวไหมที่ผ่านการสกัดด้วยสารละลายยูเรียมีปริมาณต่ำกว่าปริมาณคอลลาเจนที่ถูกกระตุ้นจากโพรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยความร้อนอาจเนื่องมาจากปริมาณเซลล์ที่เหลือหลังจากการเลี้ยง 24 ชั่วโมงด้วยโพรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยยูเรียมีปริมาณต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับโพรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยความร้อน 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 โพรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยสารละลายยูเรียยังมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนได้ต่ำกว่าโพรตีนกาวไหมที่ได้จากการสกัดวิธีอื่นๆ แม้ว่าปริมาณคอลลาเจนที่ถูกกระตุ้นจากโพรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กันจะมีความแตกต่างกันไม่มากนักก็ตาม โดยปริมาณคอลลาเจนที่ถูกสร้างขึ้นหลังจากการกระตุ้นด้วยโพรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยความร้อน, สารละลายกรด และสารละลายด่างมีปริมาณแตกต่างกันไม่มากนัก เมื่อพิจารณาพร้อมกับผลของโพรตีนกาวไหมต่อความเป็นพิษของเซลล์ ทำให้วิธีการสกัดด้วยความร้อนน่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดเนื่องจากไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์แต่ในขณะเดียวกันก็ยังสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 จากเซลล์ได้ในปริมาณสูง

การศึกษาปริมาณของกรดอะมิโนประเภทต่าง ๆ ของโพรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กัน

เนื่องจากการใช้ความร้อน, สารละลายกรด, สารละลายด่าง หรือสารละลายยูเรียในการสกัดโพรตีนกาวไหมอาจส่งผลให้ตำแหน่งการตัดของโพรตีนกาวไหมแตกต่างกัน ด้วยเหตุนี้จึงส่งผลให้ปริมาณของกรดอะมิโนแต่ละชนิดของโพรตีนกาวไหมแตกต่างกันด้วย ซึ่งกรดอะมิโนแต่ละชนิดมีคุณสมบัติ, ประจุและขนาดที่ แตกต่างกัน ด้วยเหตุนี้การศึกษาปริมาณของกรดอะมิโนประเภทต่าง ๆ ของโพรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ อาจช่วยอธิบายคุณสมบัติของโพรตีนกาวไหมเหล่านั้นได้

วิธีการทดสอบปริมาณกรดอะมิโนประเภทต่าง ๆ ของโพรตีนกาวไหม

1. นำโพรตีนกาวไหมที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กันมาทำการ hydrolyze ด้วย 4 M methanesulfonic acid ที่ประกอบด้วย 0.2% 3-(2-aminoethyl) indole ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ภายใต้ภาวะสุญญากาศนาน 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 รองลงมาคือ aspartic acid ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่

รายงานโดยนักวิจัยอื่น ซึ่งความแตกต่างของกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบในโปรตีนกาวไหมอาจส่งผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพและชีวภาพด้วย

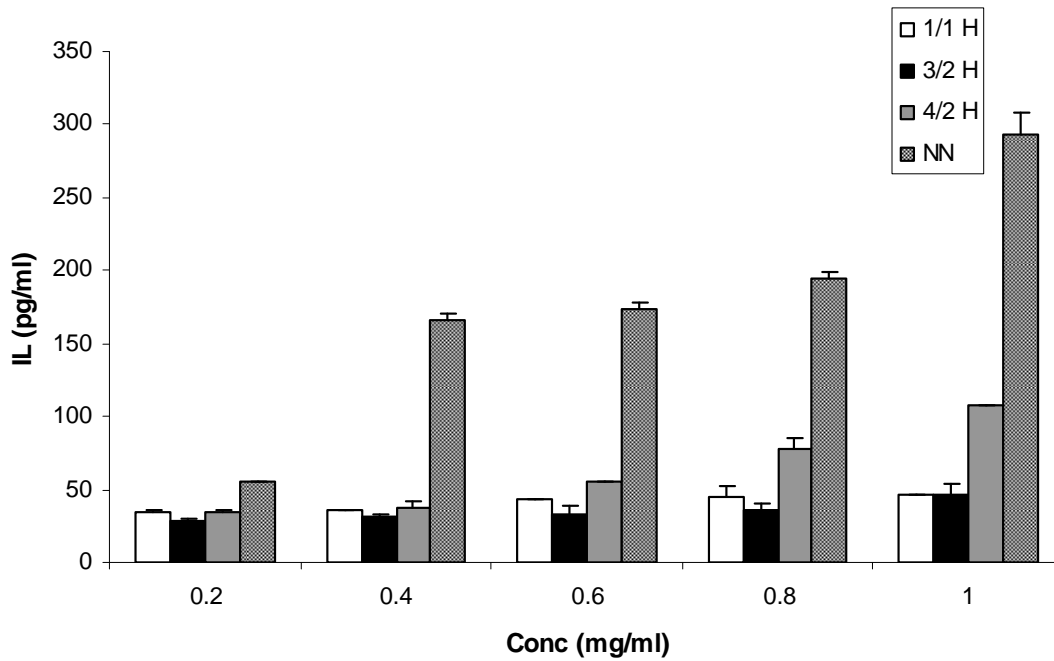
การศึกษาคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้าง interleukin-1 จากโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ

วิธีการทดสอบ

1. นำเซลล์ที่ต้องการทดสอบ ซึ่งในที่นี้ใช้ mouse monocyte cell line J774.2 หรือ rat alveolar macrophage cell line NR 8383 ในความเข้มข้นเริ่มต้น 5×10^5 /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 $0.22 \mu\text{m}$ 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 อีกทั้งยังสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนได้สูงที่สุดอีกด้วย ดังนั้นจึงนำโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยความร้อนจากไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ มาศึกษาคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้าง interleukin-1 ได้ผลดังภาพที่ 8



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

ภาพที่ 8: ผลการกระตุ้นสาร interleukin-1 จากโพรตีนกาวไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่สกัดด้วยความร้อน

ผลจากการศึกษาพบว่าโพรตีนกาวไหมแต่ละสายพันธุ์มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้าง interleukin-1 ได้แตกต่างกัน โดยโพรตีนกาวไหมสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้าง interleukin-1 ได้สูงสุด ในขณะที่โพรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์จูล 1/1 และ 3/2 มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้าง interleukin-1 ต่ำและมีค่าไม่แตกต่างกันมากนักเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโพรตีนกาวไหมเข้าไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ ในขณะที่โพรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์จูล 4/2 สามารถกระตุ้นการสร้าง interleukin-1 ได้สูงกว่าเมื่อเทียบกับสายพันธุ์จูลอื่น ๆ อีกทั้งความเข้มข้นของโพรตีนกาวไหมสายพันธุ์จูล 4/2 ที่เพิ่มขึ้นสามารถกระตุ้นการสร้าง interleukin-1 ได้สูงขึ้นเช่นเดียวกับที่พบในโพรตีนกาวไหมที่สกัดจากไหมสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ

จากผลการศึกษาดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าโพรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์จูล 1/1 และ จูล 3/2 น่าจะก่อให้เกิดการแพ้หรือการระคายเคืองได้น้อยกว่าโพรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์จูล 4/2 และสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ

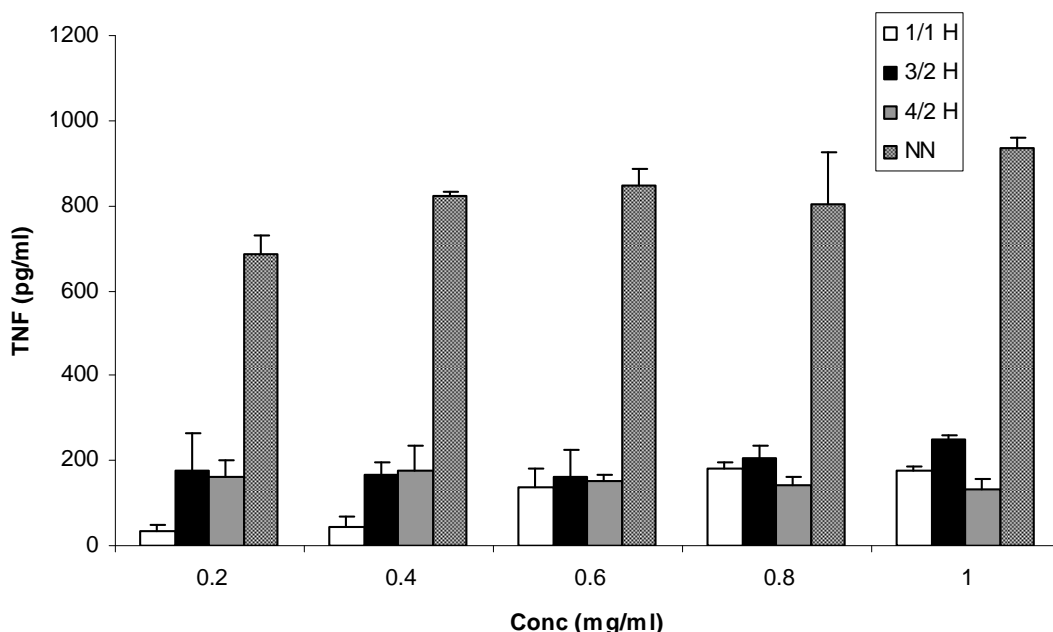
การศึกษาคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้าง tumor necrosis factor- α จากโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ

วิธีการทดสอบ

1. นำเซลล์ที่ต้องการทดสอบ ซึ่งในที่นี้ใช้ mouse monocyte cell line J774.2 หรือ rat alveolar macrophage cell line NR 8383 ในความเข้มข้นเริ่มต้น 5×10^5 /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 $0.22 \mu\text{m}$ 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 = โพรตีนกาวไหมสายพันธุ์จูล 1/1 ที่สกัดด้วยความร้อน, 3/2 H = โพรตีนกาวไหมสายพันธุ์จูล 3/2 ที่สกัดด้วยความร้อน, 4/2 H = โพรตีนกาวไหมสายพันธุ์จูล 4/2 ที่สกัดด้วยความร้อน, NN = โพรตีนกาวไหมสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษที่สกัดด้วยความร้อน

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

ผลจากการศึกษาพบว่าโพรตีนกาวไหมแต่ละสายพันธุ์มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้าง tumor necrosis factor- α ได้แตกต่างกัน โดยโพรตีนกาวไหมสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้าง tumor necrosis factor- α ได้สูงสุด ในขณะที่โพรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์จูล 1/1 มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้าง tumor necrosis factor- α ต่ำที่สุด นอกจากนี้โพรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์จูล 3/2 และ 4/2 มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้าง tumor necrosis factor- α ได้สูงกว่าโพรตีนกาวไหมจากสายพันธุ์จูล 1/1 แต่ไม่แตกต่างกันมากนักโดยเฉพาะที่ความเข้มข้นสูงกว่า 0.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

จากผลการศึกษาดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าโพรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์จูล 1/1 น่าจะก่อให้เกิดการแพ้หรือการระคายเคืองได้น้อยกว่าโพรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์จูล 3/2 , จูล 4/2 และสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ

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

กล่าวได้ว่าโปรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์จูล 1/1 ที่สกัดด้วยความร้อนที่เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเซลล์ในปริมาณที่สูงถึง 0.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไม่น่าจะก่อให้เกิดความเป็นพิษหรือระคายเคือง

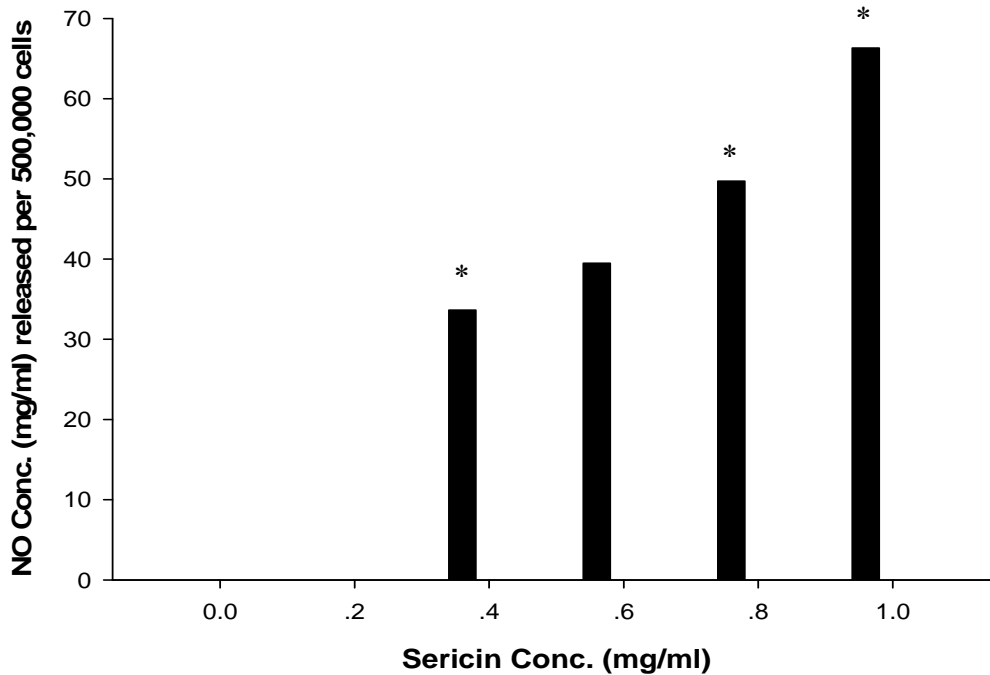
การศึกษาคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้าง nitric oxide จากโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์ต่าง ๆ

วิธีการทดสอบ

1. นำเซลล์ที่ต้องการทดสอบ ซึ่งในที่นี้ใช้ L929 mouse fibroblast cells ในความเข้มข้นเริ่มต้น 5×10^5 /หลุมมาใส่ในถาดหลุมขนาด 96 หลุม/plate ซึ่งมี Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ร่วมกับ fetal bovine serum (FBS) เป็นองค์ประกอบ
2. หลังจากเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์พร้อมกับเติมสารละลายโปรตีนกาวไหมในน้ำบริสุทธิ์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ เข้าไปในแต่ละหลุม (โดยสารละลายโปรตีนกาวไหมที่จะเติมเข้าไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ต้องผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อโดยใช้ filter sterilization ผ่าน $0.22 \mu\text{m}$ 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 $100 \mu\text{L}$ Griess reagent (1% N-(1-Naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride และ 1% sulfanilamide ใน 2.5% phosphoric acid) ในปริมาณที่เท่ากับสารละลายส่วนของ supernatant มาผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm เปรียบเทียบกับ standard curve ของ NaNO

ผลการศึกษา

จากการศึกษาพบว่าโปรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์จูล 3/2, 4/2 และสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษไม่สามารถกระตุ้นการสร้าง nitric oxide จากเซลล์ได้ มีเพียงโปรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์จูล 1/1 ที่สามารถกระตุ้นการสร้าง nitric oxide ได้ โดยความเข้มข้นของโปรตีนกาวไหมที่สูงขึ้นจะสามารถกระตุ้นการสร้าง nitric oxide จากเซลล์ได้มากขึ้นด้วยดังแสดงผลในภาพที่ 10



ภาพที่ 10: ปริมาณสาร nitric oxide ที่ถูกสร้างขึ้นจากเซลล์หลังจากถูกกระตุ้นด้วยโปรตีนกาวไหมสายพันธุ์จูล 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 ซึ่งจำเป็นต้องปรับเปลี่ยนสถานะให้เหมาะสมต่อไป

วิธีการทดลอง

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

ผลการทดลอง

จากการทดสอบผสมสารละลาย polyvinyl alcohol กับ โปรตีนกาวไหมในอัตราส่วนต่าง 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 ลักษณะทางกายภาพของแผ่นเนื้อเยื่อที่มีส่วนประกอบของโปรตีนกาวไหมและ โพลีเมอร์ในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน

| ส่วนประกอบของแผ่นเนื้อเยื่อ | ลักษณะทางกายภาพ |
|-----------------------------------|---|
| 2% Polyvinyl alcohol | เปราะบาง แตกง่าย ไม่เป็นแผ่นเรียบเนียน |
| 1% Sericin + 2% Polyvinyl alcohol | แผ่นเปราะบาง 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

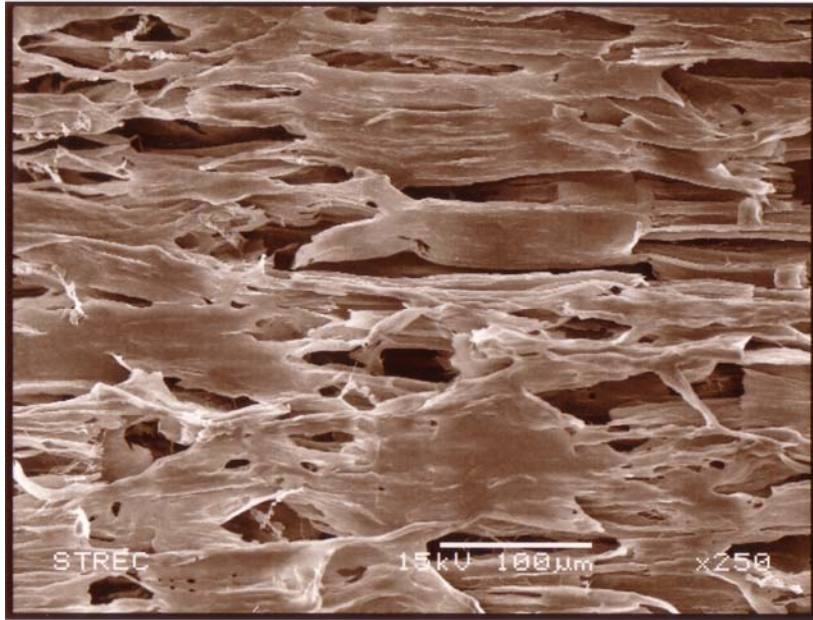


ภาพที่ 11: ลักษณะทางกายภาพของแผ่นเนื้อเยื่อที่มีส่วนประกอบของ polyvinyl alcohol ร้อยละ 2

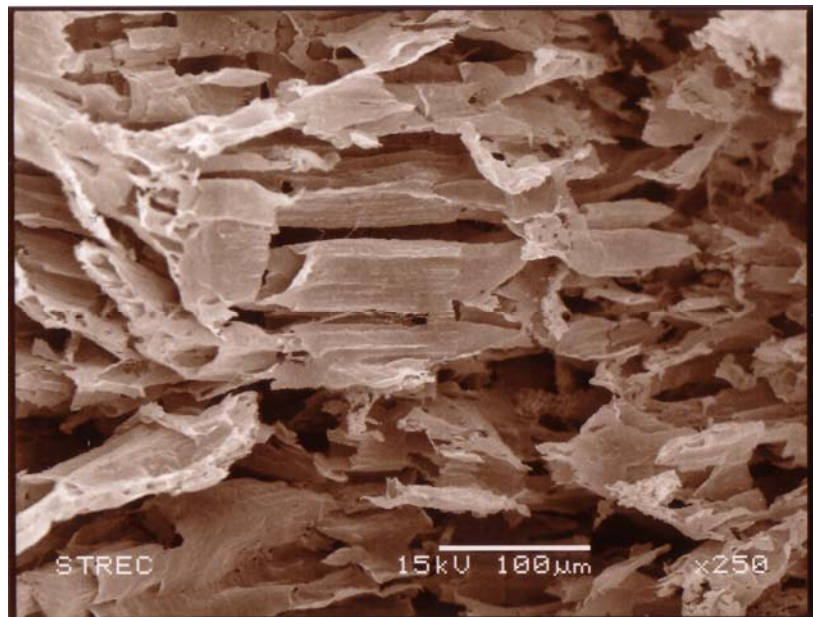


ภาพที่ 12: ลักษณะทางกายภาพของแผ่นเนื้อเยื่อที่มีส่วนประกอบของ polyvinyl alcohol ร้อยละ 2 และมีโปรตีน กาวไหมเป็นส่วนประกอบอยู่ตั้งแต่ร้อยละ 1-5 ตามลำดับ

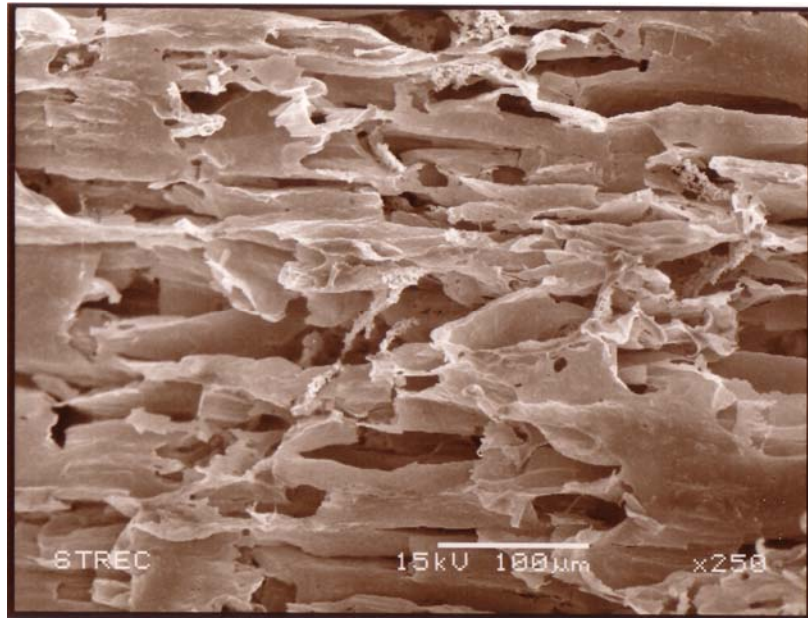
จากคุณสมบัติทางกายภาพ ทำให้มีการคัดเลือกส่วนประกอบที่เป็น 3% Sericin + 2% Polyvinyl alcohol มาทำเป็นแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผล พบว่าแผ่นเนื้อเยื่อทุกชนิดมีลักษณะเป็นรูพรุน ดังนั้นจึงได้นำแผ่น ดังกล่าวไปศึกษาความเป็นรูพรุนโดยการส่องกล้อง scanning electron microscope (SEM) ภาพตัดขวางได้ผลดัง ภาพที่ 13-18



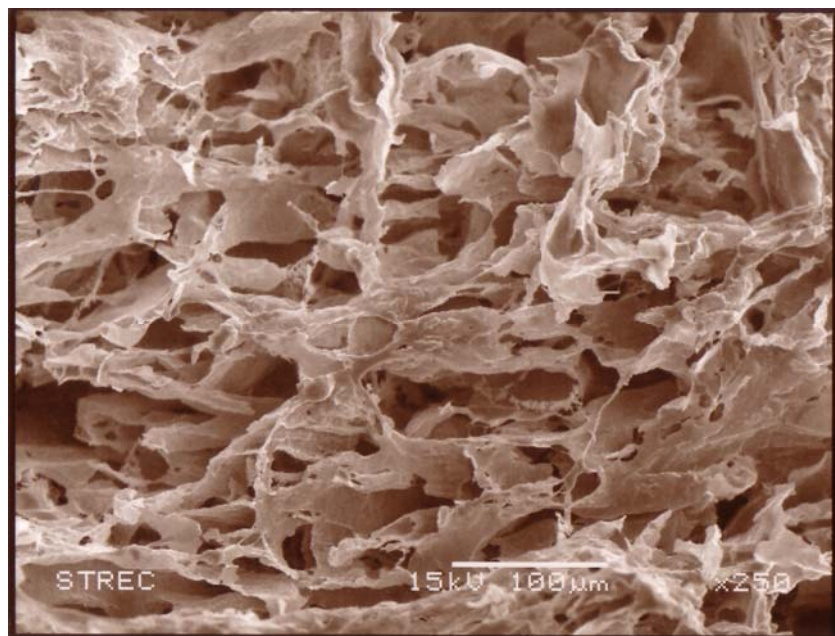
ภาพที่ 13: ภาพตัดขวางของแผ่นเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วย 2% polyvinyl alcohol เมื่อส่องด้วย SEM



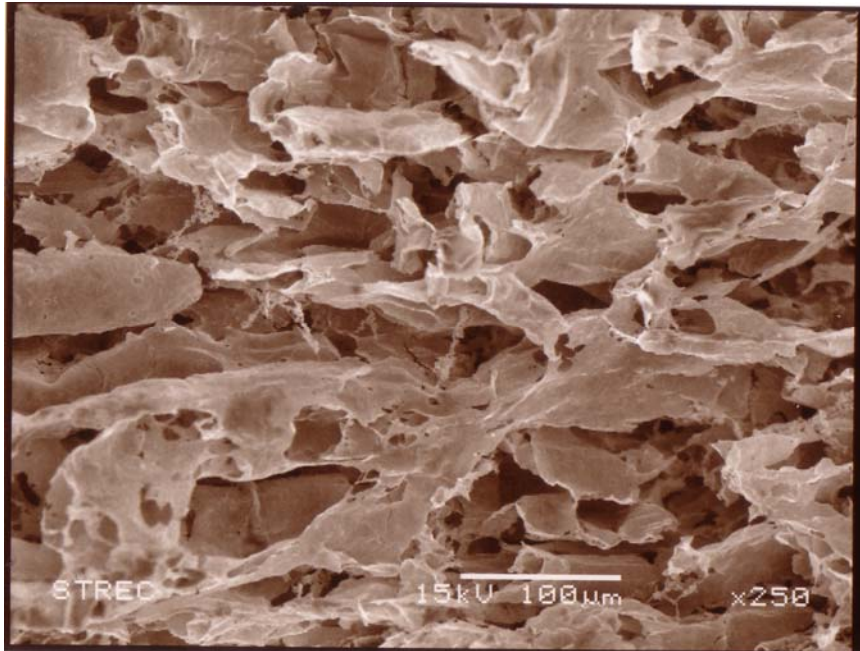
ภาพที่ 14: ภาพตัดขวางของแผ่นเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วย 1% sericin + 2% polyvinyl alcohol เมื่อส่องด้วย SEM



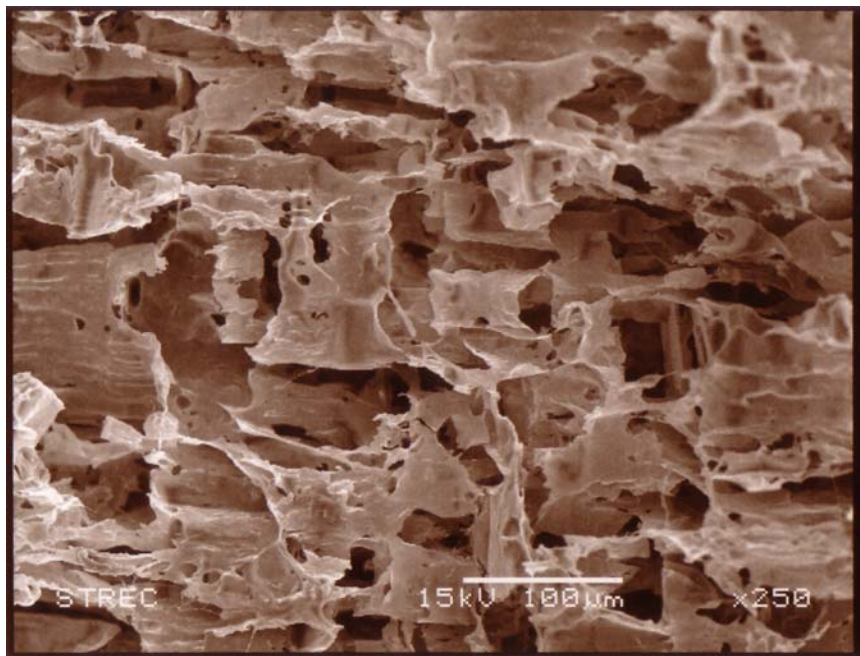
ภาพที่ 15: ภาพตัดขวางของแผ่นเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วย 2% sericin + 2% polyvinyl alcohol เมื่อส่องด้วย SEM



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

การเรียงตัวเป็นชั้น โดยไม่เกิดเป็นรูพรุน 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 เป็นที่น่าสังเกตว่า โปรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์จูล 1/1 ที่สกัดด้วยความร้อน มีปริมาณกรดอะมิโน methionine สูงกว่าโปรตีนกาวไหมที่สกัดจากไหมสายพันธุ์อื่นและวิธีการสกัดอื่นอย่างมีนัยสำคัญ

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

ในส่วนของการศึกษาค่าความหนืดของสารละลายโปรตีนกาวไหมพบว่า โปรตีนกาวไหมที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นจะมีความหนืดเพิ่มมากขึ้น โดยความเข้มข้นของโปรตีนกาวไหมที่มีความหนืดเหมาะสมที่จะนำมาผสมกับโพลีเมอร์ไม่ควรเกิน 80 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เพื่อหลีกเลี่ยงความหนืดที่สูงเกินไปจนอาจทำให้การผสมรวมเข้ากับโพลีเมอร์ทำได้ยาก ซึ่งผลนี้สอดคล้องกับความเข้มข้นของโปรตีนกาวไหมที่นำมาใช้ในการทำแผ่นฟิล์มที่รายงานโดยนักวิจัยอื่น ๆ

เมื่อนำโปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ กันมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์พบว่า โปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยวิธีที่แตกต่างกันแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ได้แตกต่างกัน 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 จากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้ 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 โดยโปรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์จูล 1/1 สามารถกระตุ้นการสร้าง interleukin-1 และ tumor necrosis factor- α จากเซลล์ได้ต่ำที่สุดในขณะที่โปรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษสามารถกระตุ้นการสร้าง interleukin-1 และ tumor necrosis factor- α ได้สูงที่สุด หรืออาจกล่าวได้ว่า โปรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์จูล 1/1 มีโอกาสก่อให้เกิดการระคายเคืองหรืออักเสบต่ำที่สุด ในขณะที่มีโอกาสเกิดการระคายเคืองหรือแพ้จากการใช้โปรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษได้มากกว่าโปรตีนกาวไหมจากสายพันธุ์อื่น อย่างไรก็ตามโปรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์จูล 1/1 เป็นโปรตีนกาวไหมชนิดเดียวที่สามารถกระตุ้นการสร้าง nitric oxide จากเซลล์ได้ ซึ่ง nitric oxide มักจะถูกสร้างในระหว่างที่เซลล์เกิดการอักเสบ แต่ปริมาณของ nitric oxide ที่ต่ำ ๆ จะมีประโยชน์ต่อเซลล์เนื่องจากจะสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนหรือโปรตีนอื่น ๆ ที่สำคัญต่อเซลล์ได้

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

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัยจะเห็นได้ว่าโปรตีนกาวไหมจากไหมสายพันธุ์ไทยสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ได้โดยไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยโปรตีนกาวไหมที่ได้จากไหมต่างสายพันธุ์กันจะมีคุณสมบัติทางกายภาพและชีวภาพที่แตกต่างกัน อีกทั้งวิธีการสกัดโปรตีนกาวไหมยังมีผลต่อคุณสมบัติทาง

กายภาพและชีวภาพอีกด้วย เมื่อนำโปรตีนกาวไหมมาผสมร่วมกับ โพลีเมอร์ที่เหมาะสมจะสามารถขึ้นรูปเป็นแผ่นเนื้อเยื่อที่มีคุณลักษณะเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาเป็นแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลได้ 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, Vandebosch 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.