หน้าสรุปโครงการ

(Executive Summary)

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โดยส่วนใหญ่ เวชภัณฑ์บำบัดแผล (wound care materials) ที่ใช้ภายในประเทศไทย มักนำเข้ามาจากต่างประเทศ ส่งผลทำให้ราคาของเวชภัณฑ์บำบัดแผลมีราคาแพง อีกทั้งยังทำให้ผู้ป่วยที่ได้รับบาดเจ็บอย่างรุนแรงต้องเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลเป็นจำนวนมาก ดังนั้น วิธีการหนึ่งที่สามารถช่วยลดราคาของเวชภัณฑ์บำบัดแผลและค่าใช้จ่ายของผู้ป่วยได้อย่างมีประสิทธิภาพ คือ การพัฒนาเวชภัณฑ์บำบัดแผลขึ้นใช้เองภายในประเทศอันเป็นจุดมุ่งหมายที่สำคัญของโครงการวิจัยนี้ นอกจากนี้ การเพิ่มประสิทธิภาพในการสมานแผลของเวชภัณฑ์บำบัดแผลยังถือได้ว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งในการรักษาบาดแผลของผู้ป่วย ดังนั้น โครงการวิจัยนี้จึงได้ทำการดัดแปรคุณลักษณะทางพื้นผิวของวัสดุพอลิเมอร์ที่มีศักยภาพในการนำมาใช้งานเป็นเวชภัณฑ์บำบัดแผลให้มีประสิทธิภาพต่อการสมานแผลมากยิ่งขึ้น

ในแต่ละปี คนไข้จำนวนมากได้รับความทุกข์ทรมานจากอาการบาดเจ็บทางผิวหนังอันเป็นผลเนื่องมาจากการเกิดอุบัติเหตุและโรคภัยไข้เจ็บต่างๆ เช่น เหตุการณ์ไฟไหม้ การได้รับผลกระทบจากรังสี การสัมผัสกับสารเคมี หรือกระแสไฟฟ้าแรงสูง และโรคเบาหวาน เป็นต้น ซึ่งบาดแผลแต่ละชนิดสามารถจำแนกออกเป็นหลายประเภทด้วยกัน ในกรณีของบาดแผลไฟไหม้นั้น บาดแผลที่เกิดขึ้นสามารถจำแนกตามระดับความลึกของบาดแผลออกเป็น 3 ระดับ โดยบาดแผลระดับแรกจำกัดระดับความลึกถึงส่วนที่เป็นหนังกำพร้าของผิวหนังเท่านั้น ซึ่งบาดแผลประเภทนี้ไม่เกิดอาการพุพองและมักหายได้เองภายในระยะเวลา 3-5 วัน และเมื่อบาดแผลมีความลึกถึงส่วนที่เป็นหนังแท้จึงจัดบาดแผลที่เกิดขึ้นให้อยู่ในระดับต่อมา ซึ่งบาดแผลในระดับนี้ยังสามารถแบ่งย่อยออกเป็นอีก 2 ระดับตามระดับความลึกของส่วนที่เป็นหนังแท้ นั่นคือ บาดแผลในระดับตื้นและบาดแผลในระดับลึกที่อาจเกี่ยวข้องกับการสูญเสียส่วนที่เป็นหนังแท้ทั้งหมด โดยบาดแผลที่เกิดขึ้นอาจมีสีแดงหรือสีขาวซีด และมีอาการปวดแสบร้อนร่วมด้วย ในบางกรณี บาดแผลในระดับนี้อาจมีความจำเป็นต้องใช้ระยะเวลานานกว่า 4 อาทิตย์ในการรักษาให้หายเป็นปกติ สำหรับบาดแผลระดับสุดท้ายนั้น บาดแผลที่เกิดขึ้นมีความลึกเกินกว่าส่วนที่เป็นหนังแท้หรือมีระดับความลึกถึงชั้นใต้ผิวหนัง โดยทั่วไปบาดแผลในระดับนี้มีสีดำและแห้งแข็ง นอกจากนี้ ผู้ป่วยยังไม่มีความรู้สึกเจ็บปวดใดๆ ทั้งสิ้น เนื่องจากเส้นประสาททั้งหมดได้รับความเสียหาย

ผู้ป่วยที่ได้รับบาดเจ็บทางผิวหนังที่มีระดับความลึกมากกว่าส่วนที่เป็นหนังกำพร้านั้นมีความจำเป็นเป็นอย่างยิ่งที่ต้องได้รับการรักษาบาดแผลอย่างถูกวิธี รวมทั้งการได้รับการดูแลอย่างต่อเนื่องและ

ใกล้ชิดเพื่อหลีกเลี่ยงภาวการณ์ติดเชื้อและการลุกลามของบาดแผลจนกลายเป็นบาดแผลในระดับลึกมากยิ่งขึ้น วิธีการหนึ่งที่ใช้ในการรักษาบาดแผลดังกล่าวอย่างแพร่หลาย คือ การปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ (skin grafting) อย่างไรก็ตาม วิธีการดังกล่าวก็ยังมีข้อจำกัดในการรักษาผู้ป่วย ดังนั้น เพื่อเป็นการแก้ไขปัญหาดังกล่าว ศาสตร์แขนงใหม่ที่เรียกว่า วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) จึงได้รับการพัฒนาขึ้น

วิศวกรรมเนื้อเยื่อเป็นศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อเพื่อใช้ทดแทนเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่ผู้ป่วยต้องสูญเสียไป การรักษาผู้ป่วยด้วยเทคนิควิศวกรรมเนื้อเยื่อนั้นสามารถทำได้โดยเริ่มต้นจากการสกัดเซลล์จากเนื้อเยื่อของร่างกายผู้ป่วยเองมาทำการเพาะเลี้ยงภายนอกร่างกายในวัสดุร่างรับ (scaffold) ซึ่งเป็นวัสดุที่มีรูพรุนคล้ายฟองน้ำ จากนั้นจึงทำการปลูกถ่ายวัสดุร่างรับนี้ให้แก่ผู้ป่วยเพื่อให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อใหม่ในที่สุด เนื่องจากวัสดุร่างรับนั้นมีความเกี่ยวข้องโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ การออกแบบโครงสร้างวัสดุร่างรับจึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อ โดยอันตรกิริยาระหว่างเซลล์และพื้นผิวของวัสดุร่างรับนั้นถือได้ว่าเป็นข้อควรคำนึงถึงที่สำคัญมากประการหนึ่ง กล่าวคือ คุณลักษณะทางพื้นผิว (surface characteristic) ของวัสดุร่างรับต้องมีความเหมาะสมต่อการเกาะและการแผ่ขยายขนาดของเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยง เนื่องจากการเกาะและการแผ่ขยายขนาดของเซลล์นั้นเป็นปัจจัยสำคัญในการอยู่รอดและการเจริญเติบโตของเซลล์ คุณลักษณะทางพื้นผิวของวัสดุนั้นสามารถดัดแปรให้มีคุณสมบัติตามที่ต้องการได้หลายวิธีการด้วยกัน เช่น การดัดแปรด้วยปฏิกิริยาเคมีการ ดัดแปรด้วยสารเคลือบผิว การดัดแปรด้วยสารเติมแต่ง (additive) เป็นต้น วิธีการหนึ่งที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการดัดแปรคุณลักษณะทางพื้นผิวของวัสดุร่างรับให้มีความเหมาะสมต่อการเกาะและการแผ่ขยายขนาดของเซลล์ที่นำมาเพาะเลี้ยง ได้แก่ การดัดแปรด้วยกระบวนการดูดซับสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ลงบนพื้นผิวของวัสดุพอลิเมอร์ที่สามารถนำมาใช้งานเป็นวัสดุร่างรับได้

สารลดแรงตึงผิวสามารถดูดซับลงบนพื้นผิวของวัสดุได้โดยง่าย เนื่องจากธรรมชาติของสารลดแรงตึงผิวนั้นมีแนวโน้มที่จะดูดซับลงบนรอยต่อระหว่างเฟส ดังนั้น เมื่อทำการจุ่มหรือแช่วัสดุลงในสารละลายของสารลดแรงตึงผิว สารลดแรงตึงผิวจึงสามารถดูดซับลงบนพื้นผิวของวัสดุ ณ บริเวณรอยต่อระหว่างเฟสของแข็งและของเหลวได้ โดยกระบวนการดูดซับสารลดแรงตึงผิวสามารถเกิดขึ้นได้ผ่านกลไกหลายกลไกด้วยกัน กลไกสำคัญที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดูดซับสารลดแรงตึงผิว ได้แก่ การแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchange) การจับคู่กันของไอออนที่มีประจุตรงกันข้าม (ion pairing) แรงอันตรกิริยาระหว่างกรดและเบส (acid-base interaction) แรงกระทำลอนดอน แวน เดอ วาลส์ (London-van der Waals) การโพลาไรเซชันของอิเล็กตรอน และพันธะที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic bonding) กระบวนการดัดแปรคุณลักษณะทางพื้นผิวผ่านกระบวนการดูดซับสารลดแรงตึงผิวอาจก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของคุณลักษณะทางพื้นผิวของวัสดุหลายประการด้วยกัน คุณลักษณะทางพื้นผิวของวัสดุที่อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงภายหลังจากที่ทำการดัด

แปรพื้นผิวของวัสดุ ได้แก่ ลักษณะทางเคมีของพื้นผิว ประจุบนพื้นผิว และ ความสามารถในการเปียก สำหรับสารลดแรงตึงผิวที่เลือกใช้ในโครงงานวิจัยนี้ คือ สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ (biosurfactant) ซึ่งมีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่มนุษย์ สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพสามารถผลิตได้จากจุลชีพหลายชนิดในธรรมชาติ ได้แก่ แบคทีเรีย รา และยีสต์ โดยปราศจากกระบวนการทางเคมี นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพยังมีแนวโน้มที่สามารถนำมาใช้งานในทางการแพทย์ได้อีกด้วย

2. วัตถุประสงค์

2.1 เพื่อทำการคัดเลือกและระบุสายพันธุ์จุลชีพที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพได้ โดยทำการคัดแยกจุลชีพดังกล่าวออกมาจากตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียมซึ่งนำมาจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย

2.2 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพจากจุลชีพ โดยใช้น้ำมันปาล์มซึ่งเป็นน้ำมันที่หาได้ง่ายในประเทศไทยและมีราคาถูก เป็นแหล่งคาร์บอน (carbon source) ในการเพาะเลี้ยงจุลชีพ

2.3 เพื่อวิเคราะห์สมบัติทั้งทางกายภาพและชีวภาพของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ได้ ตลอดจนทำการแยกและวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีขององค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

2.4 เพื่อทำการดัดแปรคุณลักษณะทางพื้นผิวของวัสดุพอลิเมอร์ ด้วยกระบวนการดูดซับสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ เพื่อนำไปใช้งานเป็นเวชภัณฑ์บำบัดแผล ทำให้สามารถประเมินความเป็นไปได้ในการนำสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพไปใช้งานในทางการแพทย์ได้

3. ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การศึกษา ค้นคว้า และรวบรวมข้อมูลจากเอกสารงานวิจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง

3.2 การจัดเตรียมวัสดุและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

3.3 การจัดเตรียมตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียมซึ่งนำมาจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย

3.4 การคัดแยกจุลชีพออกจากตัวอย่างดิน

3.5 การคัดเลือกหาจุลชีพที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพได้

3.6 การระบุสายพันธุ์ของจุลชีพที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพได้

3.7 การทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

3.8 การผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพจากจุลชีพภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

3.9 การแยกองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจุลชีพ

3.10 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีขององค์ประกอบที่แยกได้จากสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

3.11 การวิเคราะห์สมบัติทั้งทางกายภาพและชีวภาพของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ได้

3.12 การศึกษาพฤติกรรมการดูดซับของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพบนพื้นผิวตัวอย่างที่แตกต่างกัน

3.13 การเตรียมฟิล์มของพอลิเมอร์ทางชีวภาพ

3.14 การดัดแปรคุณลักษณะทางพื้นผิวของพอลิเมอร์ชีวภาพด้วยการดูดซับสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

3.15 การวิเคราะห์คุณลักษณะทางพื้นผิวของพอลิเมอร์ชีวภาพ

3.16 การวิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง

4. แผนการดำเนินการวิจัยตลอดโครงการในแต่ละช่วง 6 เดือน

ปีที่ 1: การคัดเลือกหาจุลชีพที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพได้และการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

แผนการดำเนินการวิจัย	Month											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. วารสารปริทัศน์	←	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	→
2. การจัดเตรียมวัสดุและสารเคมี	←	—	→									
3. การจัดเตรียมตัวอย่างดิน		←	—	→								
4. การคัดแยกจุลชีพออกจากตัวอย่างดิน				←	→							
5. การคัดเลือกจุลชีพที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้					←	→						
6. การระบุสายพันธุ์ของจุลชีพ						←	→					
7. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิว							←	—	—	—	→	
8. การวิเคราะห์และสรุปผล											←	→

ปีที่ 2: การแยกองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีขององค์ประกอบ และการวิเคราะห์สมบัติของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

แผนการดำเนินการวิจัย	Month											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. การผลิตสารลดแรงตึงผิว	←	—	→									
2. การแยกองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิว				←	—	→						
3. การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีขององค์ประกอบที่แยกได้						←	—	→				
4. การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของสารลดแรงตึงผิว							←	—	→			
5. การวิเคราะห์สมบัติทางชีวภาพของสารลดแรงตึงผิว									←	—	→	
6. การวิเคราะห์และสรุปผล											←	— →

ปีที่ 3: การดัดแปรคุณลักษณะทางพื้นผิวของพอลิเมอร์ด้วยการดูดซับสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ

แผนการดำเนินการวิจัย	Month											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. การจัดเตรียมวัสดุ	←	—	→									
2. การศึกษาพฤติกรรมการดูดซับ			←	—	→							
3. การเตรียมฟิล์มของพอลิเมอร์						←	→					
4. การดัดแปรคุณลักษณะทางพื้นผิวของพอลิเมอร์							←	—	→			
5. การวิเคราะห์คุณลักษณะทางพื้นผิวของพอลิเมอร์									←	—	→	
6. การวิเคราะห์และสรุปผล											←	— →

5. ผลที่ได้รับ

จากจุลชีพจำนวน 120 สายพันธุ์ ที่คัดแยกออกจากตัวอย่างซึ่งนำมาจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย มีเพียงจุลชีพสายพันธุ์ PT2 ที่คัดแยกออกจากตัวอย่างกากน้ำมันและจุลชีพสายพันธุ์ SP4 ที่คัดแยกออกจากตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติดีเยี่ยมได้ ผลการระบุชนิดของจุลชีพสายพันธุ์ PT2 พบว่า สายพันธุ์ PT2 ที่คัดแยกได้เป็นแบคทีเรียประเภทแกรมบวก (Gram-positive bacteria) ในตระกูล *Bacillus subtilis* ในขณะที่ ผลการระบุชนิดของจุลชีพสายพันธุ์ SP4 พบว่า สายพันธุ์ SP4 ที่คัดแยกได้เป็นแบคทีเรียประเภทแกรมลบ (Gram-negative bacteria) ในตระกูล *Pseudomonas aeruginosa* หลังจากทำการเพาะเลี้ยงจุลชีพทั้งสองสายพันธุ์ในเครื่อง shaking incubator ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้ nutrient broth เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อและใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนเสริม พบว่า เวลาที่เหมาะสมต่อการเตรียมหัวเชื้อ (inoculum) ของแบคทีเรียสายพันธุ์ PT2 คือ 30 ชั่วโมง สำหรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ PT2 นั้น คือ ที่ปริมาณหัวเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ปริมาณน้ำมันปาล์มใน nutrient broth 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงจุลชีพ 51 ชั่วโมง ในขณะที่เวลาที่เหมาะสมต่อการเตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรียสายพันธุ์ SP4 คือ 22 ชั่วโมง และสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ SP4 คือ ที่ปริมาณหัวเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ปริมาณน้ำมันปาล์มใน nutrient broth 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงจุลชีพ 48 ชั่วโมง

ผลจากการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่สกัดได้ พบว่า สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ผลิตโดยจุลชีพสายพันธุ์ SP4 นั้น ประกอบไปด้วยสารแรมโนลิพิด (rhamnolipid) จำนวน 11 ชนิด โดยองค์ประกอบหลักมีโครงสร้างทางเคมีเป็น Rha-C_{10}-C_{10} สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่สกัดได้มีสมบัติทางกายภาพที่ดีเทียบเท่ากับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ 2 ชนิดที่ใช้ในการทดลองเปรียบเทียบ อันได้แก่ Pluronic F-68 และโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS) อันเป็นการชี้ให้เห็นถึงความสามารถในการนำไปใช้ทดแทนสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ได้ นอกจากนี้ โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพยังเกิดการรวมตัวในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (phosphate buffer saline, PBS) ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง (pH) เท่ากับ 7.4 ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า เวซิเคิล (vesicle) ได้อีกด้วย โดยโครงสร้างที่เกิดจากการรวมตัวดังกล่าวชี้ให้เห็นถึงศักยภาพในการนำไปใช้งานในด้านการส่งผ่านยาเข้าสู่ร่างกาย (drug delivery) ของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ ผลจากการวิเคราะห์สมบัติทางชีวภาพ ยังพบอีกว่าสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งและวัณโรค

นอกจากนี้ สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพยังได้รับการนำไปใช้ในการดัดแปรคุณลักษณะทางพื้นผิวของฟิล์มพอลิเมอร์สองชนิด อันได้แก่ ไหมไฟโบรอิน และไคโตซาน ด้วยกระบวนการดูดซับ เพื่อศึกษาถึงการนำไปใช้งานในทางการแพทย์ พื้นผิวของไหมไฟโบรอินและไคโตซานมีความไม่ชอบน้ำเพิ่มมากขึ้นภายหลังจากกระบวนการดูดซับ แต่กระบวนการดูดซับไม่ได้ดัดแปรลักษณะทางพื้นผิวของฟิล์มพอลิเมอร์ทั้งสองชนิดอย่างมีนัยสำคัญ ชั้นของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ดูดซับอยู่บนพื้นผิวของฟิล์มพอลิเมอร์มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ที่นำมาทดสอบ อันได้แก่ เซลล์ไฟโบรบลาสต์และเซลล์เคราติโนไซต์จากผิวหนังของมนุษย์ แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตาม สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ทั้งสองชนิดที่นำมาทดสอบเป็นอย่างดี ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นถึงความสามารถในการนำสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพมาใช้ในการดัดแปรพื้นผิวของวัสดุพอลิเมอร์เพื่อนำมาใช้ในทางการแพทย์ต่อไป เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำนั่นเอง