

คุณลักษณะและความเข้ากันได้ทางชีวภาพของไฟโบรอินจากไหมบ้านสายพันธุ์ต่างๆ

นางสาวกัญญาลักษณ์ แก้วประสิทธิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)

are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

CHARACTERISTICS AND BIOCOMPATIBILITY OF FIBROIN
FROM VARIOUS DOMESTIC SILKWORMS

Miss Kanyaluk Kaewprasit

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering Program in Chemical Engineering

Department of Chemical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

กันยาลักษณ์ แก้วประสิทธิ์: คุณลักษณะและความเข้ากันได้ทางชีวภาพของ
ไฟโบรอินจากไหมบ้านสายพันธุ์ต่างๆ. (CHARACTERISTICS AND
BIOCOMPATIBILITY OF FIBROIN FROM VARIOUS DOMESTIC
SILKWORMS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ.ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล,
อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ.ดร.อมรรัตน์ พรหมบุญ, 122 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และความ
เข้ากันได้ทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการของไฟโบรอินจากไหม บ้าน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สาย
พันธุ์ นางน้อยศรีสะเกษ 1 (NN) สายพันธุ์พันธุ์นครราชสีมา 1 (K1) และสายพันธุ์พันธุ์
นครราชสีมา 2 (K8) ผลการศึกษาด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ FTIR พบว่า ไฟโบรอินของไหม
ทั้ง 3 สายพันธุ์มีน้ำหนักโมเลกุลเหมือนกันและไม่พบความแตกต่างของ โครงสร้างทางเคมีของ
ฟิล์มไฟโบรอินแต่ละสายพันธุ์ นอกจากนี้สมบัติทางความร้อนและค่า ศักย์เซต้ำของสารละลาย
ไฟโบรอินมีค่าใกล้เคียงกัน ส่วนค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มไฟโบรอิน พบว่า ฟิล์มไฟโบรอินสาย
พันธุ์ K1 มีค่าต่ำที่สุดอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ NN แต่ไม่พบความแตกต่างเมื่อ
เทียบกับสายพันธุ์ K8 เมื่อพิจารณาปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนในสารละลาย
ไฟโบรอิน พบว่าสารละลายไฟโบรอินพันธุ์ K1 มีค่าผลรวมเปอร์เซ็นต์โดยโมล ของกรดอะมิโน
กลุ่มที่มีความชอบน้ำมากกว่าสารละลายไฟโบรอินพันธุ์ NN ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์
ค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มไฟโบรอิน ทำให้สามารถ สรุปได้ว่า ไฟโบรอินสายพันธุ์ K1
มีความชอบน้ำมากกว่าสายพันธุ์ NN อย่างมีนัยสำคัญ ผลการ ศึกษาการยึดเกาะ การ
เจริญเติบโตของเซลล์ L929 และเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (MSC) บนฟิล์มไฟโบรอิน
ให้ผลสอดคล้องกัน คือ ฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 มีแนวโน้มส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์ได้
ดีกว่าฟิล์มไฟโบรอินอีกสองสายพันธุ์ ผลการศึกษการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์
ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูบนฟิล์มไฟโบรอินพบแนวโน้มว่า ปริมาณเอนไซม์ ALP และปริมาณ
แคลเซียมสะสมที่บนฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 มีค่ามากกว่าฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ NN และ
สายพันธุ์ K8 เล็กน้อย ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 มีสมบัติความชอบน้ำ
มากกว่าสายพันธุ์ NN และ K8 ดังนั้นไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 มีแนวโน้มช่วยส่งเสริมการยึดเกาะ
และการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกได้ดีกว่าสายพันธุ์ NN และสายพันธุ์ K8

ภาควิชา.....วิศวกรรมเคมี..... ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา.....วิศวกรรมเคมี..... ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ปีการศึกษา.....2555..... ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5370399621 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORDS : SILK FIBROIN / BIOCOMPATIBILITY / BONE TISSUE ENGINEERING

KANYALUK KAEWPRASIT: CHARACTERISTICS AND BIOCOMPATIBILITY OF FIBROIN FROM VARIOUS DOMESTIC SILKWORMS. ADVISOR: ASSOC. PROF. SIRIPORN DAMRONGSAKKUL, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST.PROF. AMORNRAT PROMBOON, Ph.D., 122 pp.

The aim of this research is to compare the physicochemical properties and biocompatibility of three silk fibroin domestic races, including Nangnoi Srisaket 1 (NN), Nakhon Ratchasima 1 (K1) and Nakhon Ratchasima 2 (K8). The results on gel electrophoresis (SDS-PAGE) and FTIR showed that molecular weight and chemical conformation of all silk fibroin races were not different. They were also similar in thermal properties and zeta potential. For water contact angle on fibroin films, it was found that the contact angle of water on K1 film was significantly lower than that on NN film, but not significantly different when compared to that on K8 film. The percentages of hydrophilic amino acid groups of K1 were higher than those of the others. This corresponded with the water contact angle result. Therefore, it could be concluded that the hydrophlicity of K1 fibroin race was significantly higher than that of NN fibroin race. The result of *in vitro* attachment and proliferation of L929 mouse fibroblast and bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSC) on silk fibroin films indicated that K1 film could enhance cell attachment slightly greater than the other two fibroin films. *In vitro* osteogenic differentiation of MSC was investigated by alkaline phosphatase activity (ALP) and calcium content. The results showed that K1 films promote MSC osteogenic differentiation slightly greater than NN and K8 films. Thus, K1 silk fibroin tends to enhance the attachment and proliferation better than NN silk fibroin and K8 silk fibroin.

Department : ..Chemical Engineering..... Student's Signature

Field of Study : ..Chemical Engineering..... Advisor's Signature

Academic Year : 2012..... Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลือจากหลายท่าน ซึ่งผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล อาจารย์ที่ปรึกษา, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พรหมบุญ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม เป็นอย่างสูงสำหรับการให้คำปรึกษาเกี่ยวกับงานวิจัย วางแผนการวิจัย การตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ และแนวทางในการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบคุณคณะกรรมการ ได้แก่ รองศาสตราจารย์ ดร. ศราวุธ ริมดุสิต ประธานกรรมการ, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ไชยดา กนกพานนท์ และ ดร.อิศราวุธ ประเสริฐสังข์ กรรมการ ที่ได้สละเวลาอันมีค่ามาสอบวิทยานิพนธ์และให้คำแนะนำที่มีคุณค่า

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจาก สำนักบริหารโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษา และพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ (AS615A) และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.)

ขอขอบคุณ ศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ จังหวัดนครราชสีมา และกรมหม่อนไหมที่อนุเคราะห์รังไหมสายพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการวิจัยวัสดุทางการแพทย์ และห้องปฏิบัติการวิศวกรรมพอลิเมอร์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์, ห้องปฏิบัติการ วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (i-Tissue Lab) คณะแพทยศาสตร์, ศูนย์เครื่องมือวิเคราะห์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และห้องปฏิบัติการชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำหรับสถานที่และอุปกรณ์ในการทำการทดลองรวมทั้งเชื้อเพื่อเครื่องมือในการวิเคราะห์ต่างๆ

ขอขอบคุณ ดร. จุฑามาศ รัตนวราภรณ์, คุณภักดี อมรสุทธิวัฒน์, คุณสุนิสา สุวรรณพันธ์ และคุณปิยะนุช จิตฺติภูมิเกียรติ รวมทั้งพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ห้องปฏิบัติการวิจัยวัสดุทางการแพทย์ และห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวเคมีที่ได้ให้กำลังใจ คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดทั้งความช่วยเหลือในด้านต่างๆ จนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัย กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัวที่เป็นกำลังใจ ที่ให้การสนับสนุนตลอดมาจนกระทั่งงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฎ
สารบัญรูป	ฐ
บทที่	
1 บทนำ	1
1.1 ที่มาของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	3
2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 ใหม่.....	5
2.1.1 การเจริญเติบโตของใหม่.....	5
2.1.1.1 ระยะไข่ (Egg stage)	5
2.1.1.2 ระยะหนอนใหม่ (Larvae stage)	5
2.1.1.3 ระยะดักแด้ (Pupae stage)	6
2.1.1.4 ระยะผีเสื้อ (Moth stage)	6
2.1.2 การจำแนกประเภทของใหม่.....	7
2.1.2.1 การจำแนกพันธุ์ใหม่ตามจำนวนการฟักเป็นไข่ใหม่ ตามธรรมชาติต่อปี (Voltinism)	7
2.1.2.2 การจำแนกพันธุ์ใหม่ตามชนิดของหนอนใหม่	8
2.1.2.3 การจำแนกพันธุ์ใหม่ตามลักษณะการฟักตัวในระยะไข่ใหม่.....	10
2.1.3 พันธุ์ใหม่ที่นำมาใช้ในงานวิจัย	13
2.1.3.1 พันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 (NN)	13
2.1.3.2 พันธุ์นครราชสีมา 1 (K1)	13
2.1.3.2 พันธุ์นครราชสีมา 2 (K8)	14

บทที่	หน้า	
2.1.4	โครงสร้างของเส้นใยไหม	15
2.1.5	สมบัติของเส้นใยไฟโบรอิน	19
2.1.6	การประยุกต์ใช้เส้นใยไฟโบรอินในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ	20
2.2	ประเภทของเซลล์	20
2.2.1	เซลล์ขั้นปฐมภูมิ (Primary cells)	20
2.2.2	เซลล์ที่สามารถเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง (Continuous cell line)	21
2.3	เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก (Bone marrow-derived mesenchymal stem cells, MSC)	22
2.4	วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue Engineering)	25
2.5	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	26
2.5.1	การศึกษาโครงสร้างและสมบัติทางกายภาพของไหม	26
2.5.2	การขึ้นรูปไฟโบรอินไหมและการศึกษาผลการตอบสนองของเซลล์เพื่อใช้งานทางการแพทย์	30
3	วัสดุและวิธีการดำเนินงานวิจัย	36
3.1	วัสดุและสารเคมี	36
3.1.1	วัสดุและสารเคมีสำหรับเตรียมสารละลายไฟโบรอิน	36
3.1.2	วัสดุและสารเคมีสำหรับเตรียมฟิล์มไฟโบรอิน	36
3.1.3	วัสดุและสารเคมีสำหรับเตรียมเจลพอลิอะคริลาไมด์ (Polyacrylamide gel)	36
3.1.4	วัสดุและสารเคมีสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์	37
3.2	อุปกรณ์	38
3.3	ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย	40
3.3.1	ขั้นตอนการเตรียมสารละลายไฟโบรอิน	41
3.3.2	ขั้นตอนการขึ้นรูปฟิล์มไฟโบรอิน	43
3.3.3	การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของฟิล์มไฟโบรอิน	43
3.3.3.1	การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินด้วยเทคนิค SDS-PAGE	43
3.3.3.2	การวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนของฟิล์มไฟโบรอิน	45

บทที่	หน้า
3.3.3.3 การวิเคราะห์ค่าศักย์เซต้าของสารละลายไฟโบรอิน	46
3.3.3.4 การวิเคราะห์ค่ามุมสัมผัสของฟิล์มไฟโบรอิน	46
3.3.4 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของฟิล์มไฟโบรอิน	46
3.3.4.1 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของฟิล์มไฟโบรอิน	46
3.3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโน ของสารละลายไฟโบรอิน	47
3.3.5 การทดสอบสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพของฟิล์มไฟโบรอิน	47
3.3.5.1 การเตรียมเซลล์และการเพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนังของหนู หรือเซลล์ L929 (L929 Mouse fibroblast)	47
3.3.5.2 การยึดเกาะ (Attachment) และการเจริญเติบโต (Proliferation) ของเซลล์ L929 บนฟิล์มไฟโบรอิน	48
3.3.5.3 การเตรียมและการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก (Bone marrow-derived mesenchymal stem cells, MSC).....	50
3.3.5.4 การยึดเกาะ (Attachment) และการเจริญเติบโต (Proliferation) ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกบนฟิล์มไฟโบรอิน	51
3.3.5.5 การเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก (Differentiation) ของเซลล์ ต้นกำเนิดไขกระดูกบนฟิล์มไฟโบรอิน	51
3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ	54
4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง	55
4.1 สมบัติทางกายภาพของไฟโบรอิน	56
4.1.1 น้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอิน	56
4.1.2 สมบัติทางความร้อนของฟิล์มไฟโบรอิน.....	59
4.1.2.1 อุณหภูมิการเปลี่ยนแปลงสถานะคล้ายแก้วของฟิล์มไฟโบรอิน (Glass transition temperature; T_g)	59
4.1.2.2 อุณหภูมิการสลายตัวของฟิล์มไฟโบรอิน (Degradation temperature; T_d)	61

บทที่	หน้า
4.1.3 ค่าศักย์เซต้าของสารละลายไฟโบรอิน	63
4.1.4 ค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มไฟโบรอิน	65
4.2 สมบัติทางเคมีของไฟโบรอิน	68
4.2.1 โครงสร้างทางเคมีของฟิล์มไฟโบรอิน	68
4.2.2 ปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนในสารละลายไฟโบรอิน	71
4.3 สมบัติทางชีวภาพของฟิล์มไฟโบรอิน	75
4.3.1 การยึดเกาะ (Attachment) และการเจริญเติบโต (Proliferation) ของเซลล์ L929 บนฟิล์มไฟโบรอิน	75
4.3.2 การยึดเกาะ (Attachment) และการเจริญเติบโต (Proliferation) ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูบนฟิล์มไฟโบรอิน	79
4.3.1 การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก (Differentiation) ของเซลล์ ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูบนฟิล์มไฟโบรอิน	84
5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	95
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	95
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	98
รายการอ้างอิง	99
ภาคผนวก	109
ภาคผนวก ก	110
ภาคผนวก ข	113
ภาคผนวก ค	115
ภาคผนวก ง	116
ภาคผนวก จ	117
ภาคผนวก ฉ	118
ภาคผนวก ช	119
ภาคผนวก ซ	120
ภาคผนวก ฌ	121
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	122

สารบัญตาราง

	ตาราง	หน้า
2.1	สภาพสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลต่อการพักตัวในระยะไข่ใหม่สำหรับไหม ที่มีการพักเป็นไข่ใหม่ตามธรรมชาติ 2 ครั้งต่อปี	12
2.2	เปรียบเทียบลักษณะทางสายพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 (NN) สายพันธุ์นครราชสีมา 1 (K1) และสายพันธุ์นครราชสีมา 2 (K8).....	14
2.3	การจัดเรียงลำดับกรดอะมิโนของไฟโบรอินในไหมแต่ละสกุล	18
2.4	เปรียบเทียบสมบัติเชิงกลระหว่างเส้นใยไฟโบรอินและวัสดุประเภทต่างๆ	19
2.5	การขึ้นรูปและการประยุกต์ใช้งานของเส้นใยไฟโบรอิน	20
4.1	สัญลักษณ์ของสายพันธุ์ไหมที่ใช้ในการศึกษา	55
4.2	ค่าศักย์เซต้าของสารละลายไฟโบรอินแต่ละสายพันธุ์	63
4.3	ค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มไฟโบรอินแต่ละสายพันธุ์	65
4.4	สรุปค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มไฟโบรอินจากไหมบ้าน	66
4.5	ความสัมพันธ์ระหว่างค่ามุมสัมผัสของของเหลวกับพื้นผิววัสดุ	67
4.6	ปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ในสารละลายไฟโบรอิน ของไหมแต่ละสายพันธุ์	73
4.7	เปอร์เซ็นต์โดยโมลของปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ในสารละลายไฟโบรอินของไหมแต่ละสายพันธุ์.....	74
4.8	ร้อยละการยืดเกาะของเซลล์ L929, เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT) และอัตราการ เจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ของเซลล์ L929 บนฟิล์มไฟโบรอินแต่ละสายพันธุ์.....	78
4.9	ร้อยละการยืดเกาะของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู, เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู บนฟิล์มไฟโบรอินแต่ละสายพันธุ์	83

ตาราง หน้า

4.10 ปริมาณธาตุ (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ที่ตรวจสอบวิธี Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX) ที่มีอยู่บนฟิล์มไฟโบรอินหลังการเพาะเลี้ยงด้วยเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติมสารที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก (Osteogenic differentiation media; OM ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂ 91

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า	
2.1	วงจรชีวิตของไหม	6
2.2	รูปร่างและลักษณะของรังไหมชนิดต่างๆ	10
2.3	โครงสร้างของเส้นใยไหม	15
2.4	โครงสร้างของต่อมไหม	16
2.5	โครงสร้างเป็นแผ่นพลีทหรือโครงสร้างแบบเบตาชีท (β - pleated sheet)	17
2.6	โครงสร้างโมเลกุลของไฟโบรอิน	17
2.7	ปฏิกิริยาออกซิเดชันและการเกิดพันธะไดซัลไฟด์จากหมู่อะมิโนซิสทีน	18
2.8	เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (Bone marrow-derived mesenchymal stem cells)	21
2.9	เซลล์ผิวหนังของหนูหรือเซลล์ L929 (L929 mouse fibroblast)	21
2.10	เซลล์ไลน์กระดูกชนิด MC3T3 (MC3T3 mouse osteoblast)	22
2.11	การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อเกี่ยวพันไปเป็นเซลล์ต่างๆ	23
2.12	สารสำคัญที่หลั่งออกมาระหว่างการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อกระดูก	24
2.13	ขั้นตอนโดยทั่วไปของวิศวกรรมเนื้อเยื่อ	25
3.1	แผนผังการดำเนินงานวิจัย	40
3.2	ขั้นตอนในการการลอกกาวยไหมและการเตรียมสารละลายไฟโบรอิน	42
3.3	ชุดอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์แบบแนวตั้ง	44
3.4	ชุดอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์แบบแนวตั้งที่ต่อเข้ากับแหล่งจ่ายไฟฟ้า	45
3.5	การวัดค่ามุมสัมผัส (θ) ของน้ำ	46
4.1	ลักษณะภายนอกของรังไหม	56
4.2	ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินแต่ละสายพันธุ์ด้วยเทคนิค SDS -PAGE	58
4.3	เทอร์โมแกรม (DSC thermogram) ของฟิล์มไฟโบรอินของแต่ละสายพันธุ์	60
4.4	เทอร์โมแกรม (TGA Thermogram) ของฟิล์มไฟโบรอินของแต่ละสายพันธุ์	62
4.5	สเปกตรัมการดูดกลืนของฟิล์มไฟโบรอินฟิล์มไฟโบรอินแต่ละสายพันธุ์	70

รูปที่	หน้า
4.6	จำนวนเซลล์ L929 ที่ยึดเกาะและเจริญเติบโตบนฟิล์มไฟโบรอินพ่นฐานางน้อย ศรีสะเกษ 1 (NN) ฟิล์มไฟโบรอินพ่นฐานครวราซีมา 1 (K1) และฟิล์มไฟโบรอิน พ่นฐานครวราซีมา 2 (K8) เปรียบเทียบกับถาดเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน (TCP) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO ₂ 77
4.7	อันตรกิริยาระหว่างอินทีกรินบนเยื่อหุ้มเซลล์กับลำดับกรดอะมิโน RGD 81
4.8	จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูที่ยึดเกาะและเจริญเติบโตบนฟิล์ม ไฟโบรอินพ่นฐานางน้อยศรีสะเกษ 1 (NN) ฟิล์มไฟโบรอินพ่นฐานครวราซีมา 1 (K1) และฟิล์มไฟโบรอินพ่นฐานครวราซีมา 2 (K8) เปรียบเทียบกับถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ พอลิสไตรีน (TCP) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด α -MEM ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศา เซลเซียส, 5 CO ₂ 82
4.9	จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (MSC) ที่เจริญเติบโตบนถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ พอลิสไตรีน (TCP) ฟิล์มไฟโบรอินพ่นฐานางน้อยศรีสะเกษ 1 (NN) ฟิล์มไฟโบรอินพ่น นครวราซีมา 1 (K1) และฟิล์มไฟโบรอินพ่นฐานครวราซีมา 2 (K8) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มีการเติมสารที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก (Osteogenic differentiation media; OM) ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO ₂ 86
4.10	กิจกรรมของเอนไซม์แอลคาร์ไนด์ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase; ALP) บนถาดเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน (TCP) ฟิล์มไฟโบรอินพ่นฐานางน้อยศรีสะเกษ 1 (NN) ฟิล์มไฟโบรอินพ่นฐานครวราซีมา 1 (K1) และฟิล์มไฟโบรอินพ่นฐานครวราซีมา 2 (K8) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติมสารที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็น เซลล์กระดูก (Osteogenic differentiation media; OM) ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศา เซลเซียส, 5% CO ₂ 87
4.11	ปริมาณแคลเซียม (Calcium content) บนถาดเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน (TCP) ฟิล์มไฟโบรอินพ่นฐานางน้อยศรีสะเกษ 1 (NN) ฟิล์มไฟโบรอินพ่นฐานครวราซีมา 1 (K1) และฟิล์มไฟโบรอินพ่นฐานครวราซีมา 2 (K8) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติมสารที่ ช่วยกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก (Osteogenic differentiation media; OM) ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5%CO ₂ 88

รูปที่	หน้า	
4.12	แผนภาพแสดงปริมาณธาตุต่างๆ ที่มีอยู่บนฟิล์มไฟโบรอินพ่นฐานางน้อย ศรีสะเกษ 1 (NN) ด้วยวิธี Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX) หลังการเพาะเลี้ยงด้วยเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูในอาหาร เลี้ยงเซลล์ที่มีการเติมสารที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก (Osteogenic differentiation media; OM) ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO ₂ เป็นระยะเวลา 28 วัน	92
4.13	แผนภาพแสดงปริมาณธาตุต่างๆ ที่มีอยู่บนฟิล์มไฟโบรอินพ่นฐานครวาชสีมา 1 (K1) ด้วยวิธี Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX) หลังการเพาะเลี้ยง ด้วยเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี การเติมสารที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก (Osteogenic differentiation media; OM) ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO ₂ เป็นระยะเวลา 28 วัน	93
4.14	แผนภาพแสดงปริมาณธาตุต่างๆ ที่มีอยู่บนฟิล์มไฟโบรอินพ่นฐานครวาชสีมา 2 (K8) ด้วยวิธี Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX) หลังการเพาะเลี้ยง ด้วยเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี การเติมสารที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก (Osteogenic differentiation media; OM) ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO ₂ เป็นระยะเวลา 28 วัน	95
ข.1	ขั้นตอนการสกัดไฟโบรอินจากต่อมไทม์ส่วนท้ายที่ได้จากหนอนไทม์	113
ค.1	กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์ผิวหนังของหนูหรือเซลล์ L929 โดยวิธี MTT.....	115
ง.1	กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังของหนูหรือเซลล์ L929 บนฟิล์ม ไฟโบรอินพ่นฐานางน้อยศรีสะเกษ 1 (NN) ฟิล์มไฟโบรอินพ่นฐานครวาชสีมา 1 (K1) และฟิล์มไฟโบรอินพ่นฐานครวาชสีมา 2 (K8) และภาคเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน (TCP) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5%CO ₂	116
จ.1	กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (MSC) โดยวิธี MTT.....	117

รูปที่	หน้า
<p>จ.1 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (MSC) บนฟิล์มไฟโบรอินพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 (NN) ฟิล์มไฟโบรอินพันธุ์นครราชสีมา 1 (K1) และฟิล์มไฟโบรอินพันธุ์นครราชสีมา 2 (K8) และถอดเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน (TCP) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด α-MEM ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5%CO₂</p>	118
<p>ช.1 กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (MSC) โดยวิธี DNA</p>	119
<p>ช.1 กราฟมาตรฐานของการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase (ALP)...</p>	120
<p>ณ.1 กราฟมาตรฐานของการวัดปริมาณแคลเซียม</p>	121

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาของงานวิจัย

ไหมเป็นเส้นใยโปรตีนธรรมชาติที่ได้จากหนอนไหม เส้นใยไหมสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตเชิงการค้าในอุตสาหกรรมสิ่งทอและเครื่องนุ่งห่มได้เป็นอย่างดี เนื่องจากเส้นไหมเป็นใยธรรมชาติที่มีความแข็งแรง ความมันวาวสวยงาม แตกต่างจากผ้าที่ทอด้วยเส้นใยชนิดอื่น ซึ่งเป็นเอกลักษณ์สำคัญของผ้าไหม ไหมประกอบด้วยโปรตีนประมาณ 97 เปอร์เซ็นต์ และอื่นๆ อีก 3 เปอร์เซ็นต์เป็นซีรี่ส์ คาร์โบไฮเดรต สารมีสีธรรมชาติ และสารอินทรีย์อื่นๆ โปรตีนหลักที่เป็นองค์ประกอบในไหมมี 2 ชนิด ได้แก่ ไฟโบรอิน (Fibroin) เป็นเส้นใยคู่ 2 เส้นประกบกันหุ้มด้วยโปรตีนเซรีซิน (Sericin) หรือกาวไหม (Silk glue) ซึ่งไหมสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ ไหมบ้าน (Domestic silkworm) และไหมป่า (Wild silkworm) ทั้งนี้กว่า 18 ปีที่ผ่านมาได้มีรายงานการนำไหมมาใช้เป็นวัสดุเพื่อการพัฒนาเป็นโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ [Minoura, N. และคณะ 1995] เนื่องจากไหมเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ มีสมบัติเชิงกลที่ดีและสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ [Altman, G.H. และคณะ 2003]

จากการศึกษาพบว่า มีงานวิจัยที่นำไหมบ้าน สายพันธุ์ญี่ปุ่น (จาก Institute of Sericulture, Tsukuba, Japan) มาขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ไหม 2 ประเภท คือ ประเภทที่ขึ้นรูปโดยใช้น้ำ (Water-based silk scaffold) และประเภทที่ขึ้นรูปโดยใช้ตัวทำละลาย Hexafluoro-2-propanol (HFIP) เมื่อนำโครงเลี้ยงเซลล์ไหม ไปเพาะเลี้ยง เซลล์ไขกระดูกของมนุษย์ (hMSCs) ใน osteogenic medium พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไหมประเภทที่ขึ้นรูปโดยใช้น้ำจะช่วยให้มีการสร้างกระดูกได้มากกว่า [Kim, H.J. และคณะ 2005] นอกจากนี้ยังมีการนำไหมบ้านสายพันธุ์จีน (จาก Xian Raw Silk Factory, China) เพื่อขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินผสมโคโคโตซาน โดยศึกษาการย่อยสลายทางธรรมชาติในสารละลาย Phosphate buffered saline (PBS) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินผสมโคโคโตซานสามารถย่อยสลายได้ 19.28% ภายในระยะเวลา 8 สัปดาห์ โดยน้ำหนัก [She Z. และคณะ 2008]

ส่วนไหมป่าซึ่งมีหลายชนิด เช่น ไหมอีรี่ (Eri silkworm) ไหมทาสาร์ (Tasar silkworm) ไหมมูกา (Muga silkworm) ได้มีรายงานการนำไหมสายพันธุ์ทาสาร์ในสกุล *Antheraea pernyi* มาศึกษาสมบัติทางกลเปรียบเทียบกับไหมบ้าน พบว่า เส้นใยไหมสกุล *Antheraea pernyi* มีค่าความต้านทานแรงดึงและความเหนียวสูงกว่าไหม บ้านและฟิล์มไหมสกุล *Antheraea pernyi* สามารถ

ชักนำให้เกิดการยึดเกาะ การเจริญเติบโตของเซลล์ feline normal skin fibroblast (AH927) ได้ดีกว่าฟิล์มไหมบ้าน [Acharya, C. และคณะ 2009]

สำหรับในประเทศไทยมีการแบ่งสายพันธุ์ไหมบ้านออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ ไหมพันธุ์แท้ ซึ่งเป็นไหมที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์จนมีลักษณะคงตัว ไม่มีการกระจายพันธุ์ตามแบบพันธุ์แท้ เช่น พันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 (NN) พันธุ์นครราชสีมา 1 (K1) พันธุ์นครราชสีมา 2 (K8) พันธุ์นครราชสีมา 60-13 (K13) และพันธุ์นครราชสีมา 60-2 (K6) เป็นต้น อีกกลุ่มหนึ่งเป็นไหมพันธุ์ไหมที่ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีสมบัติดีขึ้น เช่น พันธุ์นครราชสีมาลูกผสม 1 พันธุ์อุบลราชธานี 60-35 (ดอกบัว) พันธุ์นครราชสีมาลูกผสม 60 (เหลืองโคราช) พันธุ์ไทยลูกผสมอุตรธานี และพันธุ์ไทยลูกผสมสกจนคร 1 เป็นต้น โดยมีรายงานการศึกษาศักยภาพการประยุกต์ใช้ไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อและการควบคุมการปลดปล่อยในช่วง 5 ปีที่ผ่านมา อาทิ การพัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยโดยใช้ไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 และปรับปรุงพื้นผิวด้วยการคอนจูเกตด้วยเจลาติน โดยพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่มีการปรับปรุงพื้นผิวด้วยการคอนจูเกตเจลาตินมีการเชื่อมต่อของโครงสร้างที่แข็งแรงและสามารถส่งเสริมการยึดเกาะ การเจริญเติบโตของเซลล์กระดูก (MC3T3-E1) ได้ดีกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย [Chamchongkaset, J. และคณะ 2008] และโครงเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมโดยมีไฟโบรอินไหมไทยเป็นองค์ประกอบหลักไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในสัตว์ทดลอง ตามมาตรฐาน ISO 10993 Part 6 [Tungtasana, H. และคณะ 2010] การพัฒนาเปรียบเทียบสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพของฟิล์มแบบต่างๆ ได้แก่ ฟิล์มไฟโบรอิน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ ฟิล์มไฟโบรอิน/เจลาติน ฟิล์มไฟโบรอิน/เจลาติน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ และฟิล์มไฮดรอกซีอะพาไทต์/โคโคซาน ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้เซลล์กระดูก (MC3T3-E1) และเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนู (Rat bone marrow-derived stem cells) พบว่า เซลล์ยึดเกาะ และเจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนฟิล์มไฟโบรอิน/เจลาติน และเซลล์สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกได้ดีที่สุดบนฟิล์มไฟโบรอิน/เจลาติน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ [Vachiraroj, N. และคณะ 2009] รวมถึงการขึ้นรูปแผ่นเส้นใยผสมของไฟโบรอินไหมไทยสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 กับเจลาตินโดยกระบวนการปั่นด้วยไฟฟ้าสถิตย์และประยุกต์ใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยสาร ซึ่งพบว่า เมื่อความต่างศักย์ทางไฟฟ้าเพิ่มขึ้นจะทำให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยเล็กลง และถ้าอัตราส่วนของเจลาตินเพิ่มขึ้นจะทำให้มีความสามารถย่อยสลายทางชีวภาพเร็วขึ้น แผ่นเส้นใยที่ผลิตได้สามารถใช้ในการควบคุมการปลดปล่อย Methylene blue ได้ โดย Methylene blue จะถูกดูดซับบนแผ่นเส้นใย และถูกปลดปล่อยตามอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพของแผ่นเส้นใย [Okhawilai, M. และคณะ 2010]

นอกจากนี้ยังมีการนำไหมพันธุ์นางลายและไหมพันธุ์ผสมระหว่างจีนกับญี่ปุ่น (DOAE-7) มาขึ้นรูปเป็นแผ่นเส้นใยด้วยกระบวนการปั่นด้วยไฟฟ้าสถิตย์ และศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพโดยใช้เซลล์กระดูก (MC3T3-E1) พบว่า แผ่นเส้นใยที่ขึ้นรูปด้วยกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตย์จากไหมทั้งสองสายพันธุ์มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพเป็นอย่างดี [Meechaisue, C. และคณะ 2007]

เนื่องจากความหลากหลายของแหล่งที่มาของรังไหมบ้านและประกอบกับยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับความสามารถในการเข้ากันได้ทางชีวภาพของไหมบ้าน (Domestic silkworms) สายพันธุ์ต่างๆ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาเปรียบเทียบไฟโบรอิน ของไหมบ้าน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 (NN) ซึ่งเป็นไหมสายพันธุ์ไทยแท้ สายพันธุ์นครราชสีมา 1 (K1) ซึ่งเป็นไหมพันธุ์ผสม (N124×C124) โดยมีการปรับปรุงสายพันธุ์จนมีลักษณะความคงตัวแบบสายพันธุ์ญี่ปุ่น และสายพันธุ์นครราชสีมา 2 (K8) เป็นไหมที่ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์ (C134) จนมีลักษณะคงตัวแบบสายพันธุ์จีน จากนั้นนำไหมดังกล่าวมาผ่านกระบวนการลอกกาไหม กระบวนการเตรียมสารละลายด้วยลิเทียมโบรไมด์และการไดอะไลส์ โดยจะนำไฟโบรอินที่ได้มาทำการทดสอบสมบัติทางกายภาพ ทางเคมีและสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการด้วยเซลล์ชนิดต่างๆ โดยคาดหวังว่า ผลการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สำคัญในการเลือกใช้และพัฒนาไฟโบรอินไหมบ้านสายพันธุ์ต่างๆ ให้เหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อเปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และความเข้ากันได้ทางชีวภาพ พิล์มของไฟโบรอินจากไหม บ้าน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ นางน้อยศรีสะเกษ 1 (NN) สายพันธุ์ นครราชสีมา 1 (K1) และสายพันธุ์นครราชสีมา 2 (K8)

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 เตรียมแผ่นฟิล์มจากสารละลายไฟโบรอินของไหมบ้านสายพันธุ์ต่างๆ ด้วยการทำให้แห้งด้วยอากาศ (Air dry) และชักนำให้เกิดโครงสร้างแบบ เบต้าชีท (β - sheet structure) ด้วยสารละลายเมทานอลที่มีความเข้มข้น 70% โดยปริมาตร

1.3.2 วิเคราะห์เปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพและสมบัติทางเคมีของฟิล์มไฟโบรอินไหม บ้าน ทั้ง 3 สายพันธุ์ ดังนี้

1.3.2.1 นำหนักโมเลกุลของ ไฟโบรอิน ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

1.3.2.2 สมบัติทางความร้อน โดยใช้เครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) และเครื่อง Thermogravimetric analyzer (TGA)

1.3.2.3 ค่าประจุทางไฟฟ้าของสารละลายไฟโบรอิน (Zeta Potential)

1.3.2.4 ค่ามุมสัมผัสของฟิล์มไฟโบรอิน (Contact angle)

1.3.2.5 โครงสร้างทางเคมีโดยใช้ด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

1.3.2.6 ปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโน ของสารละลายไฟโบรอิน ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

1.3.3 ทดสอบสมบัติทางชีวภาพของฟิล์มไฟโบรอินแต่ละสายพันธุ์โดยใช้เซลล์ 2 ชนิด ได้แก่ เซลล์ผิวหนังของหนูหรือเซลล์ L929 (L929 mouse fibroblast) และเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (Bone marrow-derived mesenchymal stem cells, MSCs) โดยทำการทดสอบ ดังนี้

1.3.3.1 การยึดเกาะ (Attachment) และการเจริญเติบโต (Proliferation) ของเซลล์ผิวหนังของหนูหรือเซลล์ L929 และเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู

1.3.3.2 การเปลี่ยนแปลงไปเป็น เนื้อเยื่อกระดูก (Differentiation) ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไหม

2.1.1 การเจริญเติบโตของไหม [Yataro Tazima, 1964]

ไหม เป็นแมลงที่มี การเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงรูปร่างตามขั้นตอนแบบสมบูรณ์ (Completely metamorphosis insect) โดยวงจรชีวิตของไหมจะใช้เวลาดังแต่เป็นไหมจนกระทั่งกลายเป็นไหม ทั้งหมดประมาณ 55-60 วัน ที่อุณหภูมิ 23 – 25 องศาเซลเซียส ซึ่งวงจรชีวิตของไหมแบ่งออกได้ 4 ระยะ ดังนี้

2.1.1.1 ระยะไข่ (Egg stage)

ไข่ไหมจะมีลักษณะกลมรี สีและขนาดของไข่ไหมจะแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ โดยจะสามารถแบ่งชนิดของไข่ไหมเป็น 2 ชนิด คือ ไข่ไหมที่มีการพักตัวหรือจำศีล (Hibernating eggs หรือ Diapause eggs) และไข่ไหมที่ไม่มีการพักตัว (Non – hibernating eggs หรือ Non - diapause eggs) โดยไข่ไหมที่มีการพักตัวนั้น จะพบในไหมสายพันธุ์พื้นเมือง เช่น สายพันธุ์ยุโรป สายพันธุ์ญี่ปุ่น เป็นต้น บางสายพันธุ์มีระยะเวลาการ พักตัวในฤดูหนาว นานประมาณ 4-10 เดือน แต่สามารถกระตุ้นให้ฟักออกเป็นตัวได้เช่นเดียวกับไข่ไหมชนิดไม่พักตัว ด้วยการพักเทียม โดยการนำไข่ไหม ไปแช่ใน สารละลาย ยกรดไฮโดรคลอริก เป็นเวลา 3-5 นาที ซึ่งจะใช้เวลาในการ ฟัก ออกเป็นตัวภายใน 11-14 วัน ที่อุณหภูมิ 23-25 องศาเซลเซียส ส่วนไข่ไหมชนิดไม่พักตัว จะพบในไหมสายพันธุ์ที่อยู่ในแถบเขตร้อน เช่น สายพันธุ์อินเดีย เป็นต้น โดยใช้เวลาในการ ฟัก ออกเป็นตัว ภายใน 9 – 12 วัน

2.1.1.2 ระยะหนอนไหม (Larvae stage)

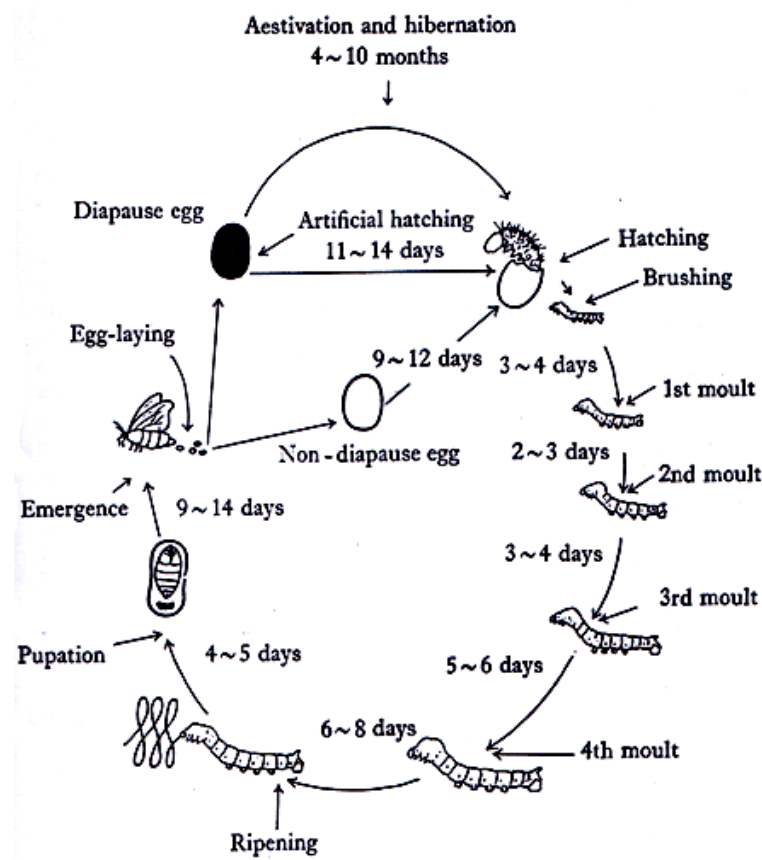
ในระยะนี้จะใช้เวลาประมาณ 19-25 วัน โดยสามารถแบ่งหนอนไหมออกเป็น 5 วัย คือ วัยที่ 1 เริ่มจากตัวหนอนฟักออกจากไข่ (Hatching) ลักษณะของ หนอนไหมแรกเกิด จะมีสีดำ ยาว ลำตัวประมาณ 3 มิลลิเมตร มีน้ำหนักตัวประมาณ 0.45 มิลลิกรัม ต่อมาในวัยที่ 2-5 หนอนไหมจะเริ่มมีการลอกคราบ (Moulting) ประมาณ 4 ครั้ง หนอนไหมที่โตเต็มที่จะมีน้ำหนักประมาณ 10,000 เท่าของน้ำหนัก หนอนไหมแรกเกิด ซึ่งหนอนไหมในวัยที่ 1-3 จะเรียกว่า ไหมวัยอ่อน ส่วน หนอนไหมในวัยที่ 4-5 เรียกว่า ไหมวัยแก่ โดยในระยะที่เป็นหนอนไหมเท่านั้นที่จะมีการกินอาหาร และหยุดกินอาหารเมื่อลอกคราบ สำหรับไหมบ้าน อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงหนอนไหมคือ ใบหม่อน

2.1.1.3 ระยะดักแด้ (Pupae stage)

ในช่วงปลายหนอนไหมวัยที่ 5 หนอนไหมจะมีการเปลี่ยนแปลงเพื่อเข้าสู่ระยะดักแด้ คือ หนอนไหมจะหยุดกินอาหาร ลำตัวค่อนข้างโปร่งแสง และหาสถานที่ที่เหมาะสม สำหรับการสร้างรัง ในระยะนี้จะเรียกว่า ไหมสุก ในช่วงวันแรกของการสร้างรัง เส้นใยที่ฟ่อนออกมาทำรังจะเกาะอยู่กับสิ่งต่างๆ อาทิ กระดิ่ง จ่อ เป็นต้น หนอนไหมจะทำรังเสร็จภายใน 4-5 วัน จากนั้นจะเริ่มลอกคราบและพัฒนามากลายเป็นดักแด้นอนนิ่งอยู่ภายในรังไหม ซึ่งระยะเวลาที่เป็นดักแด้ประมาณ 9-14 วัน

2.1.1.4 ระยะผีเสื้อ (Moth stage)

เมื่อผ่านระยะดักแด้แล้วจะลอกคราบและพัฒนามากลายเป็นผีเสื้ออยู่ภายในรังไหม เมื่อผีเสื้อโตเต็มที่จะพ่นน้ำลายที่มีฤทธิ์เป็นด่าง เพื่อเจาะรังไหมออกมาสู่โลกภายนอก โดยผีเสื้อจะมีการผสมพันธุ์และจะเริ่มวางไข่ทันที หลังจากวางไข่เสร็จแล้วประมาณ 2-3 วัน ผีเสื้อก็จะตาย ซึ่งวงจรชีวิตของไหมแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 วงจรชีวิตของไหม [Yataro Tazima, 1964]

2.1.2 การจำแนกประเภทของไหม [โมโตอิ มินะกาเว, 2530 และไชยา ชัยสูงเนิน, 2543]

ไหมมีหลากหลายพันธุ์และพบได้ในหลายประเทศทั่วโลก ซึ่งนักวิทยาศาสตร์สามารถจำแนกพันธุ์ไหมได้หลายอย่าง เช่น การจำแนกพันธุ์ไหมตามจำนวนครั้งในการลอกคราบของหนอนไหม การจำแนกพันธุ์ไหมตามสีของรังไหม การจำแนกพันธุ์ไหมตามรูปร่างของรังไหม การจำแนกพันธุ์ไหมตามถิ่นกำเนิด การจำแนกพันธุ์ไหมตามจำนวน การปักเป็นไขไหมตามธรรมชาติต่อ ปี (Voltinism) การจำแนกพันธุ์ไหมตามชนิดของหนอนไหม การจำแนกพันธุ์ไหมตามลักษณะการปักตัวในระยะไขไหม เป็นต้น

2.1.2.1 การจำแนกพันธุ์ไหมตามจำนวน การปักเป็นไขไหมตามธรรมชาติต่อ ปี (Voltinism) สามารถแบ่งได้ 3 ประเภท ดังนี้

1. ไหมที่มีการปักเป็นไขไหมตามธรรมชาติ 1 ครั้งต่อปี (Monovoltine/Univoltine)

ไหมที่มีการปักเป็นไขไหมตามธรรมชาติ 1 ครั้งต่อปี มักพบในท้องถิ่นที่มีอากาศหนาว เช่น ประเทศในแถบยุโรป เป็นต้น หนอนไหมประเภทนี้จะมีอายุยืนยาวกว่าหนอนไหมประเภทอื่น ลักษณะของ หนอนไหม จะมีขนาดค่อนข้าง ใหญ่ และเส้นไหมที่ได้มีคุณภาพดี ความยาวเส้นไหมต่อรังประมาณ 1,200 - 1,500 เมตร

2. ไหมที่มีการปักเป็นไขไหมตามธรรมชาติ 2 ครั้งต่อปี (Bivoltine)

ไหมที่มีการปักเป็นไขไหมตามธรรมชาติ 2 ครั้งต่อปี มักพบในท้องถิ่นที่มีอากาศอบอุ่น เช่น จีน ญี่ปุ่น เกาหลี เป็นต้น หนอนไหม แข็งแรง แต่มีอายุสั้นและเส้นไหมมีคุณภาพด้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับประเภทไหมที่มีการปักเป็นไขไหมตามธรรมชาติ 1 ครั้งต่อปี ความยาวเส้นไหมต่อรังประมาณ 1,000 - 1,200 เมตร

3. ไหมที่มีการปักเป็นไขไหมตามธรรมชาติหลายครั้งต่อปี (Polyvoltine/Multivoltine)

ไหมที่มีการปักเป็นไขไหมตามธรรมชาติหลายครั้งต่อปี มักพบในท้องถิ่น อากาศร้อนชื้น เช่น ไทย ลาว เป็นต้น หนอนไหมมีอายุสั้นกว่าทั้ง สองประเภทที่กล่าวมา ข้างต้นแต่มีความแข็งแรงมากกว่า รังไหมที่ได้มีขนาดเล็ก รังไหมมีทั้งสีขาวและสีเหลือง แต่เส้นไหมที่ได้มีความมันเงาสูง ความยาวเส้นไหมต่อรังประมาณ 200-400 เมตร

2.1.2.2 การจำแนกพันธุ์ไหมตามชนิดของหนอนไหม สามารถแบ่งได้ 2 ประเภท ได้แก่

1. ไหมบ้าน (Domesticated silkworms)

ไหมบ้าน (Domesticated silkworms) เป็นแมลงชนิดหนึ่งที่มนุษย์เลี้ยงกันมา เป็นอาชีพมากกว่า 4,000 ปีมาแล้ว ตัวไหมที่ใช้เลี้ยงมีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Bombyx mori* ซึ่งมี ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ของไหมดังนี้

Phylum	:	<i>Arthropoda</i>
Class	:	<i>Insecta</i>
Sub – Class	:	<i>Pterygota</i>
Division	:	<i>Endopterygota</i>
Order	:	<i>Lepidoptera</i>
Family	:	<i>Bombycidae</i>
Genus	:	<i>Bombyx</i>
Species	:	<i>Mori</i>

2. ไหมป่า (Wild silkworms or Non – mulberry silkworms)

ไหมป่าเป็นไหมที่สามารถดำรงชีวิตเองได้ในธรรมชาติ ส่วนใหญ่จะกินพืช โดยจะสามารถเก็บรังไหมป่าได้ 2 – 8 ครั้งต่อปี ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่

ก.) ไหมอีรี (Eri silkworms)

ไหมอีรีเป็นไหมป่ามีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Samia ricini* มีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดีย รังไหมส่วนมากมีสีขาว สีเหลืองและสีน้ำตาล ความยาวของรังไหมชนิดนี้ประมาณ 4-5 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 เซนติเมตร ลักษณะของรังไหมจะยาวและรี

ในประเทศไทย มีการเพาะเลี้ยงไหม อีรีเช่นกันในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยสายพันธุ์ที่นิยมเพาะเลี้ยง ได้แก่ สายพันธุ์จีน สายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์เชียงใหม่ ซึ่งไหมอีรี จะกินใบมันสำปะหลังและใบละหุ่งเป็นอาหาร

ข.) ไหมทาสาร์ (Tasar silkworms)

ไหมทาสาร์เป็นไหมป่าที่จัดอยู่ในสกุล *Antheraea* ซึ่งสามารถแบ่งสายพันธุ์ของไหมได้ดังนี้

- สายพันธุ์จีน (Chinese tasar silkworms) ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Antheraea pernyi* ถือว่าเป็นไหมป่าที่ให้เส้นใยมากที่สุด รองลงมาจากไหมบ้าน ไหมชนิดนี้มีการเพาะเลี้ยงใน

ประเทศจีนและญี่ปุ่น รั้งไหมมีสีน้ำตาลแกมเหลือง ความยาวของรั้งไหมชนิดนี้ประมาณ 4-5 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-3 เซนติเมตร ลักษณะของรั้งไหมจะคล้ายกับไข่ม้วนๆ

- สายพันธุ์อินเดีย (Indian tasar silkworms) ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Antheraea mylitta* ซึ่งผลิตได้มากรองลงมาจากรังไหมจีน มีแหล่งผลิตในประเทศแถบอินโดจีน เส้นไหมที่ได้จะมีสีเทาหรือสีน้ำตาลแกมเหลือง ความยาวของรั้งไหมชนิดนี้ประมาณ 5 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 เซนติเมตร ลักษณะของรั้งไหมจะเป็นวงรี

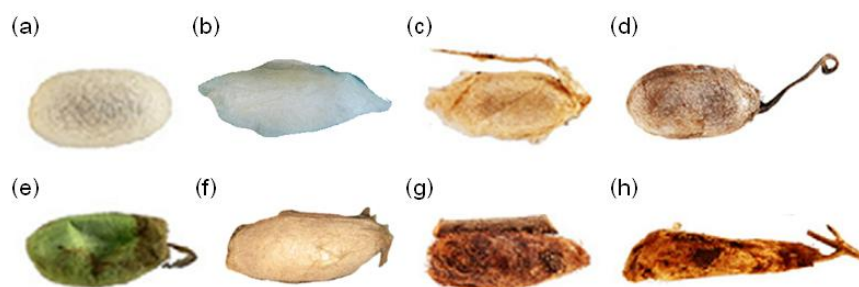
- สายพันธุ์ญี่ปุ่น (Japanese tasar silkworms) ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Antheraea yamanai* มีอีกชื่อหนึ่งว่า ไหมเทนซัน (Tensan) นิยมเลี้ยงกันในญี่ปุ่นประเทศเดียว เส้นไหมที่ได้จะมีสีเขียวหรือสีน้ำตาล ความยาวของรั้งไหมชนิดนี้ประมาณ 4-6 เซนติเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-3 เซนติเมตร

ทั้งไหมพันธุ์ญี่ปุ่นและพันธุ์จีนมักชอบกินใบไฉ้ค และใบพืชสกุลข้างเคียงอีกหลายชนิดเป็นอาหาร ส่วนไหมพันธุ์อินเดียชอบกินใบ จากต้นสมอเทศ (*Terminalia sp.*) หนอนไหมดังกล่าวอาจเป็นสายพันธุ์ไหมที่มีการพักเป็นไข่ม้วน 1 ครั้งต่อปีหรือ สายพันธุ์ไหมที่มีการพักเป็นไข่ม้วน 2 ครั้งต่อปีก็ได้ ซึ่งรั้งไหมป่าจำพวกนี้อาจนำไปสาวให้เป็นไหมดิบเช่นเดียวกับรั้งไหมพวกที่กินใบหม่อน สำหรับในประเทศไทยสามารถเพาะเลี้ยงไหมชนิดนี้ได้ ยับมะกอก และใบพะยอม

ค.) ไหมมูกา (Muga silkworms)

ไหมมูกา มีแหล่งกำเนิดใน แคว้นอัสสัมของประเทศอินเดีย เป็นไหม ที่อยู่ใกล้กันกับไหมทาชาร์ คือ *Antheraea assama* แต่ให้เส้นไหมที่มีสีเหลืองทองเป็นประกายสวยงาม คุณภาพเส้นใยเหนียว ความยาวของรั้งไหมชนิดนี้ประมาณ 4-5 เซนติเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.0 เซนติเมตร ลักษณะของรั้งไหมจะคล้ายกับไข่ม้วนๆ ไหมชนิดนี้จะกินใบพืชชนิดผลัดใบ ปริมาณเส้นใยที่ผลิตได้ในแต่ละปีค่อนข้างน้อย

นอกจากที่กล่าวมาแล้ว ยังมีไหมอีกหลายชนิด เช่น ไหมเตกูซันของไต้หวัน (*Saturnia pyretorum*) ซึ่งมีแหล่งกำเนิดในประเทศไต้หวัน เส้นไหมที่ได้จะมีสีน้ำตาลหรือสีน้ำตาลแกมดำ ลักษณะของรั้งไหมจะเหมือนหลอดปั่นด้าย โดยหนอนไหมจะกินใบการบูรเป็นอาหาร ไหมซินจุซานของญี่ปุ่น (*Sarnia cynthia pryer*) มีแหล่งกำเนิดในจังหวัดนากาโน เส้นไหมที่ได้จะมีสีน้ำตาลแกมเหลือง ลักษณะของรั้งไหม เป็นวงรียาวๆ โดยหนอนไหมชนิดนี้จะกินใบของต้นรักญี่ปุ่น (Japanese lacquer tree) เป็นอาหาร เป็นต้น ซึ่งมีรูปร่างและลักษณะของรั้งไหมชนิดต่างๆ แสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 รูปร่างและลักษณะของรังไหมชนิดต่างๆ (a) *Bombyx mori* (b) *Samia cynthia ricini* (c) *Antheraea pernyi* (d) *Antheraea mylitta* (e) *Antheraea yamanai* (f) *Antheraea assama* (g) *Saturnia pyretorum* (h) *Samia cynthia pryeri* [Chen, F. และคณะ 2012]

2.1.2.3 การจำแนกพันธุ์ไหมตามลักษณะการพักตัวในระยะไข่ไหม [Wang San-ming, 1989 และ Yataro Tazima, 1964]

สำหรับการจำแนกพันธุ์ไหมตามลักษณะการพักตัวในระยะไข่ไหม สามารถแบ่งได้ 3 ประเภท ดังนี้

1. ไหมที่มีการมีการพักตัวในระยะไข่ไหม (Hibernating eggs/Diapause eggs)

ไหมที่มีการมีการพักตัวในระยะไข่ไหม หรือมีการจำศีล คือ ไข่ไหมมีการพักตัวนานประมาณ 4-10 เดือนก่อนเกิดการพักเป็นหนอนไหม

2. ไหมที่ไม่มีการมีการพักตัวในระยะไข่ไหม (Non - Hibernating eggs/Non - Diapause eggs)

ไหมที่ไม่มีการมีการพักตัวในระยะไข่ไหม โดยใช้ระยะเวลาที่ใช้ในการพักตัวเป็นหนอนไหมประมาณ 9-12 วัน

ในการจำแนกประเภท พันธุ์ไหมตามลักษณะการพักตัวในระยะไข่ไหม มีความสัมพันธ์กับการจำแนกพันธุ์ไหมตามจำนวนการพักเป็นไข่ไหมตามธรรมชาติต่อปี (Voltinism) กล่าวคือ ไข่ไหมที่มีการพักเป็นไข่ไหมตามธรรมชาติ 1 ครั้งต่อปี (Monovoltine/Univoltine) จะเป็นไหมที่มีการพักตัวในระยะไข่ไหม ส่วนไหมที่มีการพักเป็นไข่ไหมตามธรรมชาติหลายครั้งต่อปี (Polyvoltine/Multivoltine) จะเป็นไหมที่ไม่มีการพักตัวในระยะไข่ไหม ในขณะที่ไหมที่มีการพักเป็นไข่ไหมตามธรรมชาติ 2 ครั้งต่อปี (Bivoltine) จะเป็นไหมทั้งที่มีการพักตัวในระยะไข่ไหม และไหมที่ไม่มีการพักตัวในระยะไข่ไหมขึ้นกับสภาพสิ่งแวดล้อมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไข่ไหม (รุ่นพ่อแม่) โดยสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการพักตัวในระยะไข่ไหม ได้แก่

- อุณหภูมิ (Temperature) ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไข่มุข (รุ่นพ่อแม่) เป็นปัจจัยสิ่งที่มีผลต่อลักษณะของการพักตัวของไข่มุขในรุ่นถัดไป สามารถสรุปดังแสดงในตารางที่ 2.1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไข่มุขรุ่นพ่อแม่มีความสำคัญที่สุดสำหรับ ไข่มุขที่มีการพักเป็นไข่มุขตามธรรมชาติ 2 ครั้งต่อปี ว่า ไข่มุขในรุ่นถัดไปจะมีหรือไม่มี การพักตัวในระยะไข่มุข

- แสง (Light) เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญรองลงมาจากอุณหภูมิ โดยแสงจะไม่มีผลชัดเจนในกรณีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไข่มุขรุ่นพ่อแม่ มีอุณหภูมิสูงมากกว่า 25 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส แต่ในกรณีที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิประมาณ 20 องศาเซลเซียส แสงจะช่วยเพิ่มอัตราการเปลี่ยนแปลงไปเป็นไข่มุข ที่มีการพักตัวในระยะไข่มุข ส่วนถ้าไม่มีแสงจะทำให้อัตราดังกล่าวเกิดช้าลง

- ความชื้น (Humidity) เป็นปัจจัยที่มีผลรองลงมาจากแสง และอาจไม่เห็นความแตกต่างชัดเจนกรณีที่สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไข่มุขรุ่นพ่อแม่ มีอุณหภูมิสูงมากกว่า 25 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส แต่ในกรณีที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิประมาณ 20 องศาเซลเซียส สภาวะที่มีความชื้นสูงจะเหมาะสมในการวางไข่แบบที่ การพักตัวในระยะไข่มุขมากกว่าสภาวะที่มีความชื้นต่ำ

ทั้งนี้ลักษณะการพักตัวในระยะไข่มุข สามารถบ่งบอกถึงคุณภาพของเส้นไหมที่ได้ โดยไหมที่มีการมีการพักตัวในระยะไข่มุข ทำให้เมื่อฟักออกมาจากไข่มุขหนอนไหมที่ได้ไม่ค่อยแข็งแรง แต่เส้นไหมที่ได้มีคุณภาพดีและมีความยาวของเส้นไหมมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับไหมที่ไม่มีการพักตัวในระยะไข่มุข

ตารางที่ 2.1 สภาพสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลต่อการพักตัวในระยะไข่ใหม่ สำหรับ ไข่ใหม่ที่มีการพักเป็นไข่ใหม่ตามธรรมชาติ 2 ครั้งต่อปี (Bivoltine) [Wang San-ming, 1989]

สภาวะที่ใช้เพาะเลี้ยง ไข่ใหม่รุ่นพ่อแม่	ระยะหนอนใหม่	ระยะดักแด้	ลักษณะการพักตัวใน ระยะไข่ใหม่รุ่นถัดไป
อุณหภูมิสูง (มากกว่า 25 องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิสูง (มากกว่า 25 องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิสูง (28 องศาเซลเซียส)	มีการพักตัวในระยะไข่ ใหม่
	อุณหภูมิต่ำ (18 องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิต่ำ (20 องศาเซลเซียส)	มีการพักตัวในระยะไข่ ใหม่
อุณหภูมิต่ำ (15 องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิสูง (มากกว่า 25 องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิสูง (28 องศาเซลเซียส)	ไม่มีการพักตัวในระยะ ไข่ใหม่
	อุณหภูมิต่ำ (18 องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิต่ำ (20 องศาเซลเซียส)	ไม่มีการพักตัวในระยะ ไข่ใหม่
อุณหภูมิประมาณ 20 องศาเซลเซียส	อุณหภูมิสูง (มากกว่า 25 องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิสูง (28 องศาเซลเซียส)	ส่วนใหญ่จะไม่ มีการ พักตัวในระยะไข่ใหม่
	อุณหภูมิต่ำ (18 องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิต่ำ (20 องศาเซลเซียส)	ส่วนใหญ่จะ มีการพัก ตัวในระยะไข่ใหม่

2.1.3 พันธุ์ใหม่ที่น่าสนใจในงานวิจัย [สถาบันวิจัยหม่อนไหม, 2546]

สำหรับในประเทศไทยจะนิยมเลี้ยงไหมบ้านหรือไหมกินใบหม่อน (Mulberry silkworms) กันอย่างแพร่หลาย ปัจจุบันกรมวิชาการเกษตร โดยคณะอนุกรรมการวิจัยปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์พืชได้รวบรวมและบำรุงรักษาพันธุ์ไหมในแหล่งต่าง ๆ ไว้ โดยเป็นไหมที่มีการปักเป็นไขไหมตามธรรมชาติหลายครั้งต่อปี (Polyvoltine/Multivoltine) จำนวน 27 สายพันธุ์ และไหมที่มีการปักเป็นไขไหมตามธรรมชาติ 2 ครั้งต่อปี (Bivoltine) จำนวน 170 สายพันธุ์

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยเลือกศึกษาไหม 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ไทย (พันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1; NN) สายพันธุ์ญี่ปุ่น (พันธุ์นครราชสีมา 1 ; K1) และสายพันธุ์จีน (พันธุ์นครราชสีมา 2 ; K8) มีรายละเอียดดังนี้

2.1.3.1. พันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1(NN)

ไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 เป็นไหมสายพันธุ์ไทยแท้ ซึ่งลักษณะหนอนไหมและรังไหมมีความสม่ำเสมอ ลักษณะประจำพันธุ์ คือ เป็นไหมชนิดปักออกตามธรรมชาติปีละหลายครั้ง (Polyvoltine) เป็นไหมที่ไม่มีการมีการพักตัวในระยะไขไหม (Non - Hibernating eggs/Non - Diapause eggs) ลำตัวของหนอนไหมสีขาวนวลตลอด อายุของหนอนไหมประมาณ 18-22 วัน รังไหมจะมีลักษณะหัวป้านท้ายแหลม เปลือกรังสีเหลืองสด ขนาดของรังไหม 1.5×3.0 เซนติเมตร² มีน้ำหนักของรังไหมสดเฉลี่ย 0.96 กรัมต่อรัง ความยาวของเส้นใยไหมประมาณ 370-410 เมตร ขนาดของเส้นใยไหมประมาณ 2.5 ดีเนียร์ และผ่านการรับรองจากกรมวิชาการเกษตรเมื่อวันที่ 19 ธันวาคม พ.ศ. 2531

2.1.3.2 พันธุ์นครราชสีมา 1 (K1)

ไหมพันธุ์นครราชสีมา 1 เป็นไหมที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ N124 กับพันธุ์ C124 ซึ่งเป็นพันธุ์จากประเทศญี่ปุ่น จากนั้นนำมาปรับปรุงพันธุ์จนมีลักษณะคงตัว ไม่มีการกระจายพันธุ์ตามแบบพันธุ์แท้สายพันธุ์ญี่ปุ่น ลักษณะประจำพันธุ์ คือ เป็นไหมชนิดปักออกตามธรรมชาติปีละ 2 ครั้ง (Bivoltine) เป็นไหมที่มีการมีการพักตัวในระยะไขไหม (Hibernating eggs/Diapause eggs) ลำตัวมีลายดำตรงส่วนอกและส่วนท้อง สีของผิวเป็นสีขาวขุ่นอมเทา อายุของหนอนไหมประมาณ 20-22 วัน รังไหมจะมีลักษณะ คอดกลางเล็กน้อย เป็นรูปฝักถั่วลิสง (Peanut shape) เปลือกรังสีขาวอมเหลือง ขนาดของรังไหม 1.7×3.5 เซนติเมตร² มีน้ำหนักของรังไหมสดเฉลี่ย 1.42 กรัมต่อรัง ความยาวของเส้นใยไหมประมาณ 1,167 เมตร และผ่านการรับรองจากกรมวิชาการเกษตรในปี พ.ศ. 2529

2.1.3.3 พันธุ์นครราชสีมา 2 (K8)

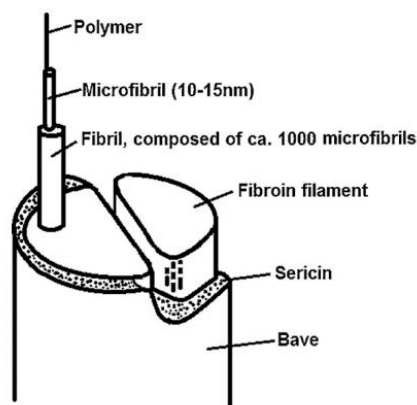
ไหมพันธุ์นครราชสีมา 2 เป็นไหมที่ได้จากการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ จากไหมพันธุ์ C134 ซึ่งเป็นพันธุ์แท้สายพันธุ์จีนจนมีลักษณะคงตัว ไม่มีการกระจายพันธุ์ ลักษณะประจำพันธุ์ คือ เป็นไหมชนิดฟักออกตามธรรมชาติปีละ 2 ครั้ง (Bivoltine) เป็นไหมที่มีการมีการพักตัวในระยะเวลาไหม (Hibernating eggs/ Diapause eggs) ลำตัวมี สีขาวขุ่นอมเหลือง อายุของหนอนไหมประมาณ 20 –22 วัน รั้งไหมจะมีลักษณะ กลมรี เปลือกรั้งสีขาว ขนาดของรั้งไหม 2.0×3.4 เซนติเมตร² มีน้ำหนักของรั้งไหมสดเฉลี่ย 1.61 กรัมต่อรั้ง ความยาวของเส้นใย ไหมประมาณ 911 เมตร และผ่านการรับรองจากกรมวิชาการเกษตรในปี พ.ศ. 2529 โดยไหมที่นำมาใช้ ในงานวิจัยนี้ สามารถสรุปลักษณะสำคัญของแต่ละสายพันธุ์ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบลักษณะทางสายพันธุ์ระหว่าง สายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ1 (NN) สายพันธุ์นครราชสีมา 1 (K1) และสายพันธุ์นครราชสีมา 2 (K8)

ลักษณะ \ สายพันธุ์	สายพันธุ์ NN	สายพันธุ์ K1	สายพันธุ์ K8
<u>ประวัติความเป็นมาของพันธุ์</u> ที่มาของสายพันธุ์	พันธุ์ไทยแท้	N124×C124 (พันธุ์ญี่ปุ่น)	C134 (พันธุ์จีน)
ประเภทการฟักไข่ต่อปี การพักตัวในระยะเวลาไหม	Polyvoltine ไม่มีการพักตัว	Bivoltine มีการพักตัว	Bivoltine มีการพักตัว
<u>ลักษณะประจำพันธุ์</u>			
สีของรั้งไหม	สีเหลือง	สีขาวอมเหลือง	สีขาว
รูปร่างของรั้งไหม	ยาวรี	คอคอดตรงกลางรั้ง	กลมรี
ขนาดของรั้งไหม (ซม.×ซม.)	1.2×3.6	1.7×3.5	2.0×3.4
น้ำหนักของรั้งไหมสด (กรัมต่อรั้ง)	0.78	1.57	1.69
ความยาวของเส้นใย (เมตรต่อรั้ง)	312	1,167	911

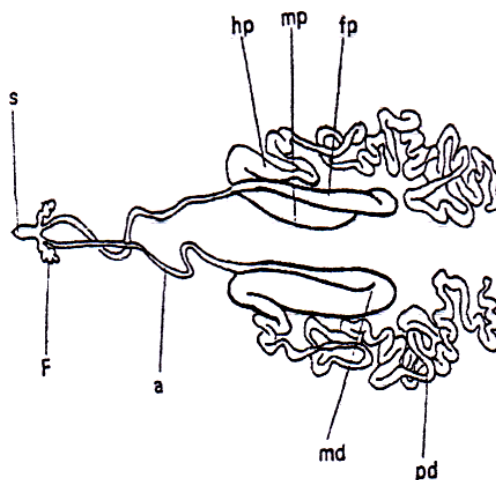
2.1.4 โครงสร้างของเส้นใยไหม

เส้นไหมเป็นเส้นใยธรรมชาติของพอลิเอไมด์ที่หนอนไหมสร้างขึ้น ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ต่อเป็นสายโซ่ยาว (Long chain) โดยมีโปรตีนที่สำคัญ 2 ชนิด ได้แก่ โปรตีนไฟโบรอิน (Fibroin) คิดเป็นน้ำหนักประมาณ 70-75% (โดยน้ำหนัก) และเคลือบด้วย โปรตีนเซรีซิน (Sericin) ประมาณ 25-30% (โดยน้ำหนัก) แสดงในรูปที่ 2.3 นอกจากนี้ยังมีไขมันหรือน้ำมันอยู่ประมาณ 0.5-1% สารสีธรรมชาติประมาณ 1-1.4% และมีส่วนประกอบอื่นอีกเล็กน้อย เช่น ซัลเฟอร์ สารอนินทรีย์ เป็นต้น ปริมาณของเซรีซินหรือกาวไหมจะขึ้นกับพันธุ์ไหม เช่น ไหม บ้านจะมีปริมาณของเซรีซิน 20-30 % (โดยน้ำหนัก) ในขณะที่ไหม ทาร์ซาร์จะมีปริมาณของเซรีซิน 5-15 % (โดยน้ำหนัก) [สิริรัตน์ จารุจินดา, 2548]



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของเส้นใยไหม [Shang, S. และคณะ 2013]

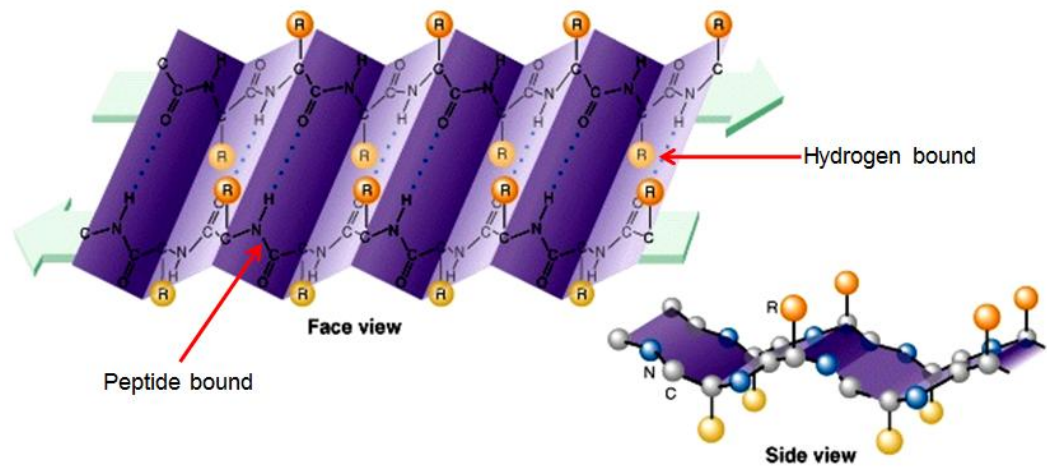
ในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนในเส้นใยไหมจะเกิดขึ้นที่ต่อมไหม (Silk gland) ดังแสดงในรูปที่ 2.4 ที่อยู่ภายในลำตัวของหนอนไหม โดยสารละลายไหมที่เป็นของเหลวจะถูกขับออกมาทางต่อมไหมส่วนท้าย (Posterior silk gland) หลังจากนั้นสารละลายดังกล่าวจะถูกส่งไปยังต่อมไหมส่วนกลาง (Middle silk gland) ซึ่งระหว่างที่สารละลายไหมอยู่ที่ต่อมไหมส่วนกลางจะกลายเป็นสารที่มีลักษณะคล้ายเจลาติน ส่วนเซรีซินจะถูกขับออกมาจากส่วนอื่นของต่อมไหมส่วนกลางเพื่อใช้ในการเคลือบสารละลายไหมที่มีลักษณะเป็นเจลาติน ต่อมาสารละลายไหมดังกล่าวจะมีความเหนียวมากขึ้นโดยอาศัยการสลายตัวของหนอนไหมซึ่งจะเกิดขึ้นที่บริเวณต่อมไหมส่วนหน้า (Anterior silk gland) หลังจากนั้นไฟโบรอิน 2 เส้นจะรวมเข้าด้วยกันด้วยเซรีซิน (กาวไหม) เมื่อผ่านรูขนาดเล็ก (Orifice of spinneret) ก็จะกลายเป็นเส้นใยไหม (Silk fiber) [โมโตอิ มินะกาว่า, 2530]



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของต่อมไหม [Yataro Tazima, 1978]

เมื่อ a คือ Anterior silk gland, F คือ Filippi's gland, fp คือ Fore part of the middle silk gland, hp คือ Hind part of the middle silk gland, md คือ Middle silk gland, mp คือ Mid part of the middle silk gland, pd คือ Posterior silk gland, s คือ Orifice of spinneret

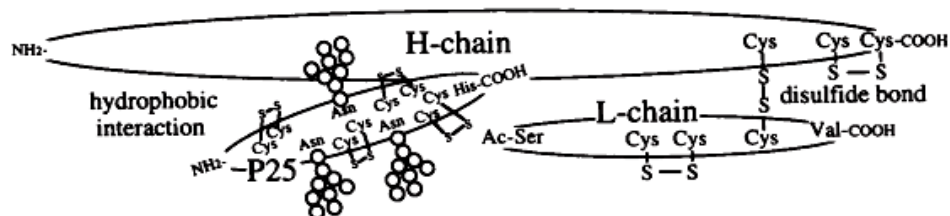
ไฟโบรอินของเส้นไหม นั้นเกิดจากปฏิกิริยาการควบแน่น ของ α -amino acid กลายเป็นพันธะเปปไทด์ซึ่ง เกิดจากการเรียงลำดับของกรดอะมิโนเป็นหน่วยซ้ำๆกัน คือ Gly-Ser-Gly-(Ala)₂-Gly-[Ser-Gly-(Ala-Gly)_n]-Tyr (เมื่อ n เป็น 2 เสมอ) [Tokiwa และคณะ 1999] และมีการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่คาร์บอกซิลกับหมู่ เอมีนของกรดอะมิโน 2 ตัว และเกิดผลึกภัณฑ์เป็น น้ำ 1 โมเลกุล ทำให้ มีลักษณะ โครงสร้างเป็น แบบ แผ่นพับหรือโครง สร้างแบบเบตาชีท (β -pleated sheet) ชนิดที่สายเปปไทด์สวนทางกัน (Anti-parallel) แสดงดังรูปที่ 2.5 โดยแผ่นพับไฟโบรอินแต่ละแผ่นจะซ้อนทับกันด้วย แรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der waals forces) ระหว่างแผ่นเพื่อเสริมความแข็งแรงอีกทางหนึ่งด้วย ทำให้เส้นไหมไฟโบรอินมีความแข็งแรงสูงมาก และแต่ละสายโซ่ของเปปไทด์มีความไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) สูง



รูปที่ 2.5 โครงสร้างเป็นแผ่นพับหรือโครงสร้างแบบเบตาชีท (β - pleated sheet)

[<http://www.mun.ca/biology/scarr/Gr09-06.html>]

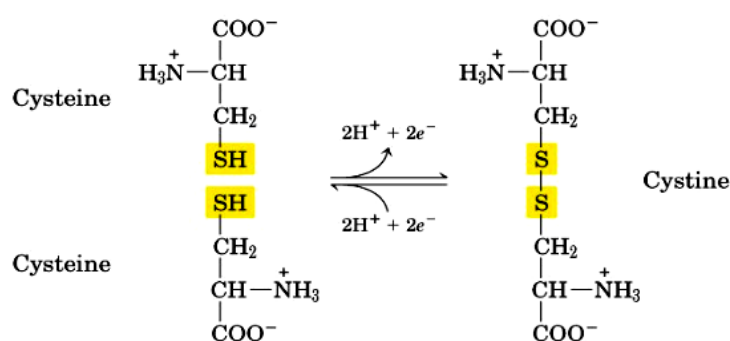
สำหรับโครงสร้าง โมเลกุลตามธรรมชาติของไฟโบรอิน ซึ่งแสดงในรูป 2.6 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 391.367 กิโลดาลตัน [Zhou C.Z.และคณะ 2001] ซึ่งจะประกอบด้วย 3 ส่วน ได้แก่ Heavy chain (H-chain), Light chain (L-chain) และ P25



รูปที่ 2.6 โครงสร้างโมเลกุลของไฟโบรอิน [Tanaka, K. และคณะ 1999]

ส่วนแรกเป็นส่วนของ Heavy chain (H-chain) เป็นหน่วยย่อยที่มีขนาดใหญ่ที่สุด มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 350 กิโลดาลตันซึ่งภายในประกอบด้วยกรดอะมิโนที่สำคัญ 2 ชนิด คือ ไกลซีน (Glycine, Gly) และอะลานีน (Alanine, Ala) ส่วนที่สองคือ ส่วน Light chain (L-chain) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิด อาทิเช่น ลิวซีน (Leucine, Leu) ไอโซลิวซีน (Isoleucine, Ile) วาลีน (Valine, Val) เป็นต้น ซึ่งทั้งส่วน Heavy chain (H-chain) และส่วน Light chain (L-chain) จะมีการดะมิโนซิสทีอีน (Cysteine, Cys) โดยบริเวณปลายด้านหนึ่งจะมีหมู่คาร์บอกซิลเรียกว่า ปลายซี (C terminal) ทำหน้าที่เชื่อมหน่วยย่อย Heavy chain (H-chain) และ Light chain (L-chain) ด้วยการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ (Disulfide bond) จากหมู่ดะมิโนดังกล่าว โดยจะทำปฏิกิริยาออกซิเดชัน ได้เป็นองค์ประกอบที่มีความซับซ้อนที่เรียกว่า

H-L complex และเกิด Dimeric amino acid ขึ้นเรียกว่า ซีสทีน (Cystine) โดยรูปที่ 2.7 จะแสดงปฏิกิริยาออกซิเดชันและ การเกิดพันธะไดซัลไฟด์ ส่วนสุดท้ายคือ P25 เป็นไกลโคโปรตีน ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล ประมาณ 30 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยพอลิเปปไทด์ (Polypeptide) และโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Oligosaccharide) ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 2-10 โมเลกุล ซึ่งพบว่าส่วนใหญ่จะเป็น น้ำตาล แมนโนส (Mannose) โดยจะ เชื่อม อยู่กับหมู่อะมิโน แอสปาราจิ้น (Asparagine, Asn) ภายในพันธะเปปไทด์ 3 ตำแหน่งและเชื่อมอยู่กับส่วน H-L complex ด้วยแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic interaction) [Tanaka, K. และคณะ 1999]



รูปที่ 2.7 ปฏิกิริยาออกซิเดชันและการเกิดพันธะไดซัลไฟด์จากหมู่อะมิโนซิสทีน

[<http://philomath.exteen.com/20070910/r>]

ไฟโบรอินประกอบด้วยกรดอะมิโน จำนวน 18 ชนิด โดยมีกรดอะมิโน ที่สำคัญ 4 ชนิด ได้แก่ ไกลซีน (Glycine, Gly) อะลานีน (Alanine, Ala) ซีรีน (Serine, Ser/S) และไทโรซีน (Tyrosine, Y) สำหรับการจัดเรียงลำดับกรดอะมิโนของเส้นใยไหมในแต่ละสกุลสามารถแสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 การจัดเรียงลำดับกรดอะมิโนของไฟโบรอินไหมแต่ละสกุล [Wang, Y. และคณะ 2006]

ลำดับ	สกุลไหม	การจัดลำดับกรดอะมิโน
1.	ไหมบ้าน	GAGAGSGAAG[SGAGAG] ₈ Y
2.	<i>A. pernyi</i>	GSGAGG(X)GGGYGWGSGGYGSDS (เมื่อ X = S, A, V, R)
3.	<i>Galleria mellonella</i>	GS(SAA) ₂ (SGA) ₂ GE(VI) ₂ DDRS(SAA) ₂ AASSG ASGLGGLG

หมายเหตุ G = ไกลซีน, A = อะลานีน, S = ซีรีน, Y = ไทโรซีน, V = วาลีน, R = อาร์จินีน,
I = ไอโซลิวซีน, D = แอสปาดิก, L = ลิวซีน

2.1.5 สมบัติของเส้นใยไฟโบรอิน

เส้นใยไฟโบรอินเป็นเส้นใยธรรมชาติที่มีความเสถียรต่อตัวทำละลายสูง ใอน้ำและออกซิเจน สามารถผ่านได้ เป็นวัสดุที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ มีความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพ นอกจากนี้เส้นใยไฟโบรอินยังมีความสามารถในการทนต่อแรงดึงได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวัสดุอื่นๆ แต่ไม่ดีเท่าเส้นใยแมงมุมและเส้นใยเคฟลาร์ สำหรับความสามารถในการทนต่อแรงกด นั้นเส้นใยไฟโบรอินสามารถทนแรงกดได้ดีกว่าวัสดุทุกชนิด รองลงมาจาก กระดุกเท่านั้น โดยสมบัติเชิงกลของเส้นใยไฟโบรอิน แสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 เปรียบเทียบสมบัติเชิงกลระหว่าง เส้นใยไฟโบรอินและวัสดุประเภทต่างๆ [Altman, G.H. และคณะ 2003]

Material	Ultimate Tensile Strength (MPa)	Modulus (GPa)
<i>Bombyx mori</i> silk (w/sericin)	500	5-12
<i>Bombyx mori</i> silk (w/o sericin)	610-690	15-17
Spider silk	875-972	11-13
Collagen	0.9-7.4	0.0018-0.046
Collagen X-linked	47-72	0.4-0.8
Polylactic Acid (PLA)	28-50	1.2-3.0
Tendon (comprised of mainly collagen)	150	1.5
Bone	160	20
Kavlar	3,600	130
Synthetic Rubber	50	0.001

2.1.6 การประยุกต์ใช้เส้นใยไฟโบรอินในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

จากสมบัติของไหมที่ได้กล่าวมาในหัวข้อข้างต้น จึงทำให้มีการนำไหมมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย เช่น สิ่งทอ เครื่องสำอาง เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำมาประยุกต์ใช้ในงานทางการแพทย์และทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ซึ่งจะนำไฟโบรอินจากเส้นใยไหมมาขึ้นรูปได้ในหลายรูปแบบ เช่น การขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มเพื่อใช้ในเคลือบวัสดุและการทำไบโอเซนเซอร์ การขึ้นรูปเป็นไฮโดรเจลเพื่อใช้ทำตัวนำส่งยาและเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เกิดเป็นเซลล์กระดูก การขึ้นรูปเป็นเมมเบรนหรือแผ่นเส้นใยเพื่อใช้เป็นผ้าปิดแผล เป็นต้น โดยรายละเอียดแสดงดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 การขึ้นรูปและการประยุกต์ใช้งานของเส้นใยไฟโบรอิน [Wang, Y และคณะ 2006]

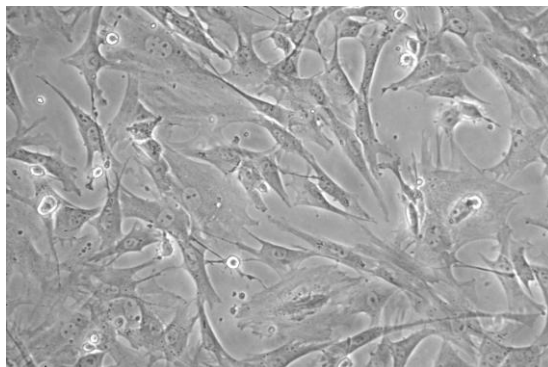
Material format	Processing method	Features	Applications
Film	Casting	Biocompatible	Coating materials
	Layer-by-layer deposition	Good oxygen and water permeability Diverse surface modification options	Wound dressing/skin repair Biosensors
Hydrogel	Sol-gel transition in the presence of acid, ions, and other additives	Biocompatible Diverse formulation for gelation Easy delivery (injectable)	Guided bone repair Drug release/delivery Cartilage tissue engineering
Non-woven mat/net/ membrane	Fiber deposition	Biocompatible	Guided bone repair
	Electrospinning	High strength Diverse surface modification options	Wound dressing/skin repair Tissue engineering
3D porous sponge	Salt leaching	Biocompatible	Bone tissue engineering
	Gas foaming	High porosity (up to 99%) and pore interconnectivity	
	Freeze drying	High strength	Cartilage tissue engineering
	Freezing and thawing	Diverse surface modification options	

2.2 ประเภทของเซลล์ [Gstraunthaler G. 2002]

โดยทั่วไปเซลล์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเพื่องานทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ สามารถ จำแนกออกเป็น 2 ประเภท ดังนี้

2.2.1 เซลล์ขั้นปฐมภูมิ (Primary cells)

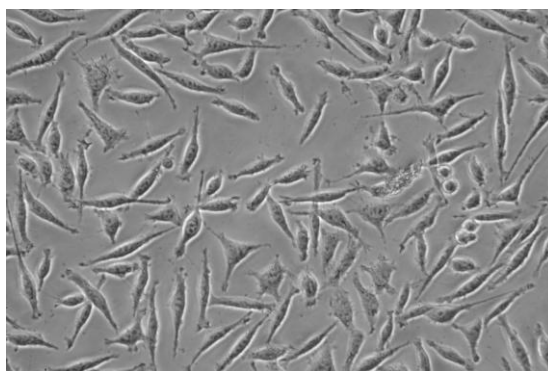
เซลล์ขั้นปฐมภูมิเป็นเซลล์ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต และสามารถเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ที่ต้องการได้อย่างรวดเร็วขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายชนิด ได้แก่ ชนิดของอาหารเลี้ยงเซลล์ องค์ประกอบของเนื้อเยื่อนอกเซลล์ (Extracellular matrix) และชนิดของเซลล์ เช่น เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (Bone marrow-derived mesenchymal stem cells, MSCs) แสดงในรูปที่ 2.8 เป็นต้น



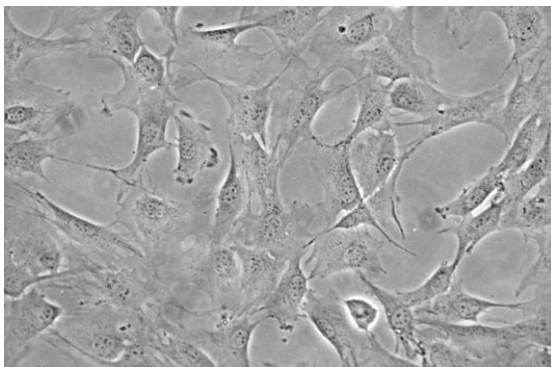
รูปที่ 2.8 เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (Bone marrow-derived mesenchymal stem cells) ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 3 วัน ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด OM

2.2.2 เซลล์ที่สามารถเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง (Continuous cell line)

เซลล์ที่สามารถเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่องเป็นเซลล์ที่ได้รับการปรับปรุงรูปแบบมาจากเซลล์ขั้นปฐมภูมิ มีลักษณะเฉพาะ คือ สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างไม่จำกัด และสามารถเก็บเซลล์ด้วยวิธีการแช่แข็งได้ ส่วนข้อจำกัดของเซลล์ชนิดนี้คือ จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปจากเดิมเพียงเล็กน้อยและการนำไปใช้ในงานที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ต้องการ เซลล์ที่สามารถเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง เช่น เซลล์ผิวหนังของหนูหรือเซลล์ L929 (L929 mouse fibroblast) เซลล์ไลน์กระดูกชนิด MC3T3 (MC3T3 mouse osteoblast) เป็นต้น ซึ่งแสดงรูปร่างและลักษณะของเซลล์แสดงในรูปที่ 2.9 และรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.9 เซลล์ผิวหนังของหนูหรือเซลล์ L929 (L929 mouse fibroblast) ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 2 วัน ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM

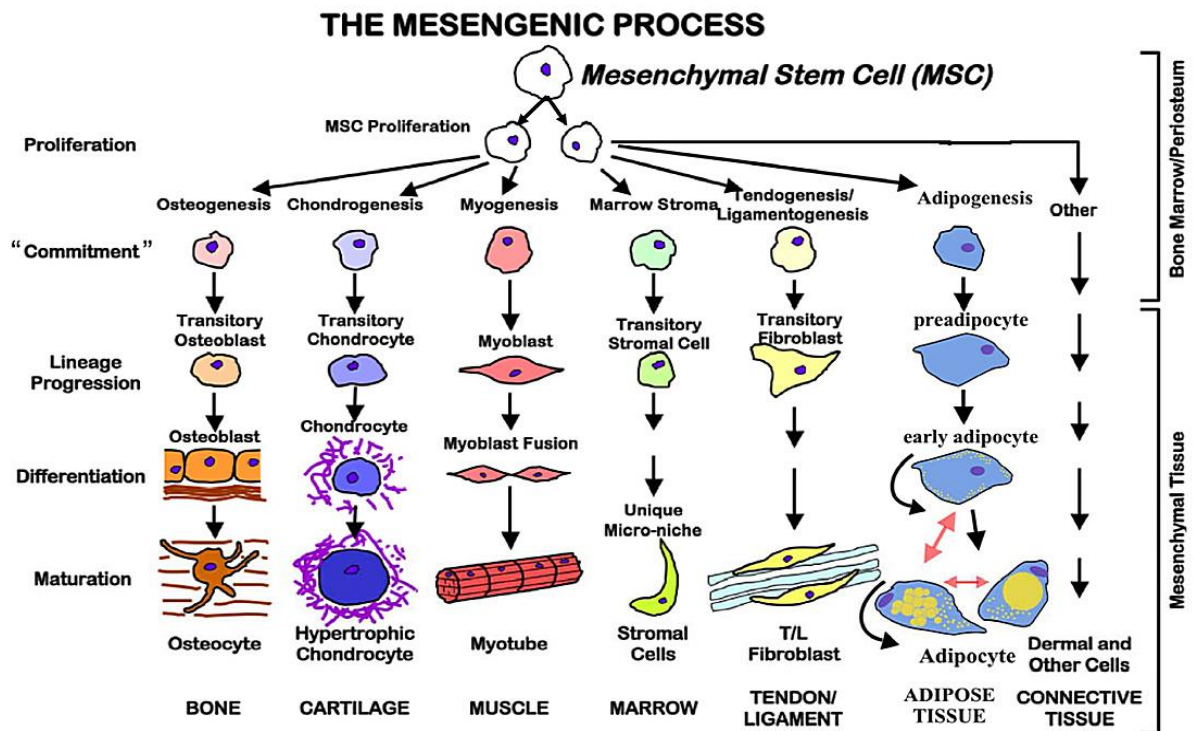


รูปที่ 2.10 เซลล์ไลน์กระดูกชนิด MC3T3 (MC3T3 mouse osteoblast) ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 3 วัน ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด α -MEM

2.3 เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก (Bone marrow-derived mesenchymal stem cells, MSCs)

เซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Mesenchymal stem cells) เป็นเซลล์ที่พบได้ในร่างกายมนุษย์ สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้มาก และสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ต่างๆ ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันได้ เมื่อได้รับสิ่งกระตุ้นที่เหมาะสม เช่น กระดูก กระดูกอ่อน กล้ามเนื้อ เอ็น และไขมัน เป็นต้น โดยเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อเกี่ยวพันนี้สามารถสกัดได้จากไขกระดูก (Bone marrow) เนื้อเยื่อของไขมัน (Adipose tissue) เลือดจากสายสะดือ (Cord blood) เยื่อหุ้มกระดูก (Periosteum) เยื่อบุข้อ (Synovial membrane) กล้ามเนื้อ ผิวหนัง ฟัน เป็นต้น แต่ที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาคือ ไขกระดูก นอกจากนี้เซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อเกี่ยวพันยังสามารถนำมาแยกเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนได้ง่ายในระดับห้องปฏิบัติการ ดังนั้นจึง นิยมนำเซลล์ดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อของกระดูกและกล้ามเนื้อ [สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก, 2553]

Friedenstein A.J. และคณะเป็น นักวิจัยกลุ่มแรกที่ได้ รายงานว่า เซลล์ MSCs เป็นเซลล์ที่ลักษณะคล้ายกับเซลล์ Fibroblasts อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (Colony – forming fibroblast – like cells) สามารถยึดเกาะบนวัสดุ เจริญเตบิตและเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกได้ [Friedenstein A.J. และคณะ 1966] การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อเกี่ยวพันไปเป็นเซลล์ต่างๆ ดังแสดงรูปที่ 2.11

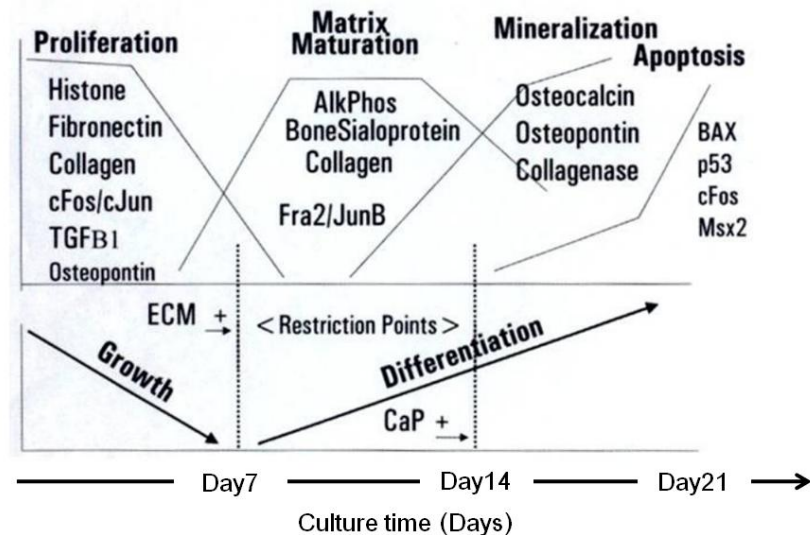


รูปที่ 2.11 การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อเกี่ยวพันไปเป็นเซลล์ต่างๆ

[<http://www.discoverymedicine.com/Tracey-L-Bonfield/2010/04/15/adult-mesenchymal-stem-cells-an-innovative-therapeutic-for-lung-diseases>]

การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจะสามารถแบ่งออกได้ 3 ช่วง ได้แก่ ช่วงแรกเป็นการเจริญเติบโตของเซลล์ (Proliferation) โดยจะมีการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนเซลล์ ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 7 วัน ในช่วงนี้จะมีการแสดงออกของยีน Histone, Fibronectin, Collagen, cFos/cJun, TGF β 1 และ Osteopontin ช่วงที่สองจะเป็นการสร้างและพัฒนา Extracellular matrix (Matrix maturation) ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์เริ่มมีอัตราการเจริญเติบโตลดลงและเริ่มมีการสร้าง Extracellular matrix (ECM) ใช้เวลาประมาณ 14 วัน โดยจะเกิดการสร้างเอนไซม์ Alkaline phosphatase, Bone sialoprotein, Collagen และ Fra2/JunB ซึ่งเป็น Early marker ของการที่เซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจะเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ต่างๆ (Differentiation) ช่วงสุดท้ายเป็นช่วงที่เซลล์จะมีการสร้างแร่ธาตุสะสม (Mineralization) เช่น ถ้าเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจะเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกจะมีการสร้างและสะสมแคลเซียม โดยช่วงนี้จะมีแสดงออกของยีน Osteocalcin, Osteopontin และ Collagenase ซึ่งเป็น Late marker ในช่วงนี้จะใช้เวลาประมาณ 21 วัน [Lian J.B.และคณะ 1992, Komori, T. และคณะ 1998]

ซึ่งสารสำคัญที่หลั่งออกมาระหว่างกระบวนการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกแสดง
ดังรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.12 สารสำคัญที่หลั่งออกมาระหว่างการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อกระดูก

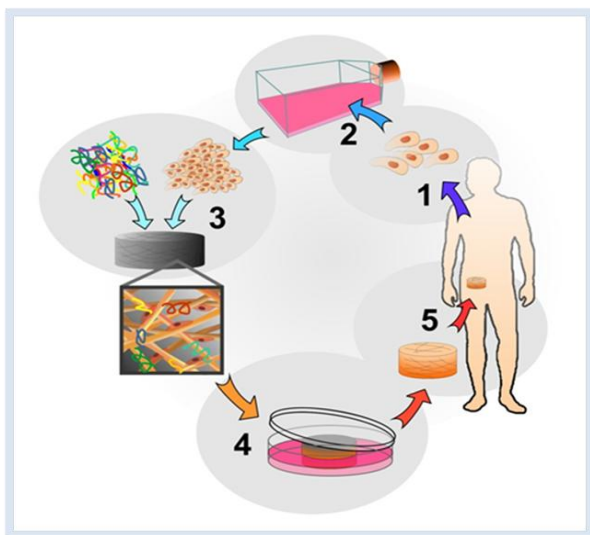
[Lian J.B.และคณะ 1992]

สำหรับการควบคุมการเปลี่ยนแปลงเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อต่างๆ สามารถทำได้โดยการเติมสารอาหาร อาทิเช่น Growth factor หรือสารที่มีฤทธิ์ส่งเสริมให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ต้องการ โดยมีการรายงานไว้ว่า เมื่อเติมสาร β -Glycerophosphate, Dexamethasone, L-ascorbic และ Hexose monophosphate ในอาหารเลี้ยงเซลล์พบว่าสามารถส่งเสริมให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อกระดูก (Osteogenic differentiation) ได้ซึ่งจะเกิดขึ้นในช่วงสองสัปดาห์แรกของการเพาะเลี้ยงเซลล์ [Kim และคณะ 2005] สำหรับ Dexamethasone สามารถกระตุ้นหรือยับยั้งการเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกได้ขึ้นอยู่กับปริมาณที่ใช้ โดยถ้าใช้ที่ความเข้มข้นต่ำจะมีผลกระตุ้นการเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อกระดูก (Osteogenic differentiation) ได้แต่ถ้าใช้ที่ความเข้มข้นสูงจะเกิดการยับยั้งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว และทำให้เกิด การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ไขมัน (Adipogenic differentiation) [Evans, N.D.และคณะ 2006]

2.4 วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue Engineering) [สิทธิศักดิ์ ธรรมชาติ, 2553]

วิศวกรรมเนื้อเยื่อเป็นการศึกษาทางวิทยาศาสตร์สหสาขาแขนงใหม่โดยอาศัยความรู้ ความก้าวหน้าทางชีวภาพระดับเซลล์ เคมี ฟิสิกส์ วัสดุศาสตร์ วิศวกรรมศาสตร์และแพทยศาสตร์ เพื่อทำการสร้างเนื้อเยื่อและอวัยวะใหม่สำหรับทดแทนเนื้อเยื่อ และอวัยวะเดิมของผู้ป่วย ที่สูญเสียไปหรือถูกทำลาย

ในการสร้างเนื้อเยื่อสังเคราะห์โดยวิศวกรรมเนื้อเยื่อจำเป็นต้องอาศัยองค์ประกอบหลัก 3 อย่าง คือ 1) เซลล์ 2) โครงเลี้ยงเซลล์ธรรมชาติหรือวัสดุที่สังเคราะห์ขึ้น 3) สิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งในการสร้างเนื้อเยื่อทางวิศวกรรมเนื้อเยื่ออาจจำเป็นต้องใช้ องค์ประกอบทั้ง 3 อย่างนี้ หรืออาจใช้เพียงบางอย่างก็ได้ ทั้งนี้พิจารณาจากความจำเป็นในการ สร้างเนื้อเยื่อแต่ละชนิดและการนำไปประยุกต์ใช้งาน



รูปที่ 2.13 ขั้นตอนโดยทั่วไปของวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

[http://biomed.brown.edu/Courses/BI108/BI108_2007_Groups/group12/Homepage.html]

ขั้นตอนโดยทั่วไปที่เกี่ยวข้องกับวิศวกรรมเนื้อเยื่อแสดงดังรูปที่ 2. 13 โดยเริ่มต้นจาก ขั้นตอนที่ 1 เป็นการคัดแยกเซลล์ที่ต้องการจากเนื้อเยื่อในร่างกาย ขั้นตอนที่ 2 นำมาเพาะเลี้ยง เพื่อเพิ่มจำนวน ขั้นตอนที่ 3 เมื่อได้จำนวนเซลล์ที่มากเพียงพอแล้วจึงนำเซลล์เข้าสู่โครงเลี้ยงเซลล์ ธรรมชาติ หรือวัสดุที่สังเคราะห์ขึ้น โดยอาจใช้โปรตีนกระตุ้นการเจริญของเซลล์ลงไปด้วย ขั้นตอนที่ 4 นำไปเพาะเลี้ยง และชักนำให้เกิดการพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อที่ต้องการ ขั้นตอนสุดท้ายจะ นำเนื้อเยื่อสังเคราะห์ที่สร้างได้เข้าสู่ร่างกายเพื่อการบำบัดรักษา

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องสามารถแบ่งออกได้ 2 หัวข้อ ดังนี้

2.5.1 การศึกษาโครงสร้างและสมบัติทางกายภาพของไหม

Chen, X. และคณะ (2001) ได้ศึกษาเกี่ยวกับสารที่ใช้สำหรับละลายเส้นใยไฟโบรอิน ไหมบ้าน โดยสนใจเรื่องพฤติกรรมการไหลของสารละลายไฟโบรอินและโครงสร้างของเมมเบรนที่ขึ้นรูปจากสารละลายดังกล่าว สารที่ใช้เป็นตัวทำละลาย ได้แก่ 1.) แคลเซียม -เอทานอล -น้ำ 2.) แคลเซียมไนเตรต-เมทานอล-น้ำ 3.) ลิเทียมโบรไมด์ -เอทานอล 4.) ลิเทียมโบรไมด์-น้ำ พบว่าแคลเซียมไนเตรต-เมทานอล-น้ำ และลิเทียมโบรไมด์-เอทานอล-น้ำ ยังคงสภาพสายโซ่ไฟโบรอินได้อย่างดีเห็นได้จากค่าความหนืดที่คงที่ในช่วงของอัตราการเฉือน (Shear rate) 0.1-500 ต่อวินาที จึงมีคุณสมบัติเป็นของไหลชนิด Newtonian ซึ่งของไหลชนิดนี้จะเกิดปฏิกิริยาระหว่างสายโซ่เปปไทด์และเกิดการรวมตัวกันของสายโซ่ ในทางตรงกันข้ามสารละลายลิเทียมโบรไมด์ -น้ำที่มีความเข้มข้น 9.5 โมลาร์ มีความสามารถในการละลายสายโซ่ไฟโบรอินได้ จากการทดสอบด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) ทำให้ทราบว่า เมมเบรนไฟโบรอินที่ขึ้นรูปจากสารละลายทั้ง 4 ชนิดมีโครงสร้างส่วนใหญ่เป็นแบบ Random coil และมีโครงสร้างแบบ β -sheet เล็กน้อย

Yamada, H. และคณะ (2001) ได้ศึกษาเกี่ยวกับน้ำหนักโมเลกุลของสารละลายไฟโบรอิน ด้วยวิธี โซเดียมโดเดคิลซัลเฟต พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส หรือ Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ในตัวทำละลายไหมที่แตกต่างกัน โดยการเตรียมเจลที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 2-15% และผสมตัวอย่างที่ต้องการทดสอบกับอิเล็กโตรโฟรีซิสบัฟเฟอร์ (10% โซเดียมโดเดคิลซัลเฟต , 1% เมอร์แคปโทเอทานอล และยูเรีย 8 โมลาร์) เก็บที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีและย้อมสีด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250 พบว่า 1) โครงสร้างตามธรรมชาติของไฟโบรอินมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 25 กิโลดาลตันและ 350 กิโลดาลตัน ซึ่งแสดงถึงสายโซ่โปรตีนขนาดเล็กและสายโซ่โปรตีนขนาดใหญ่ตามลำดับ 2) นำไหมที่ผ่านการลอกกาวยไหมออกแล้วมาละลายในสารละลาย Ajisawa (แคลเซียมคลอไรด์ : เอทานอล : น้ำ ในอัตราส่วน 111 : 92 : 144 โดยน้ำหนัก) พบว่า น้ำหนักโมเลกุลของสารละลายไฟโบรอินที่ได้อยู่ในช่วง 70 กิโลดาลตัน 3) นำรังไหมสดละลายในสารละลาย Ajisawa จะพบน้ำหนักโมเลกุลของสารละลายไฟโบรอินที่ 25 กิโลดาลตันและ 200 กิโลดาลตัน 4) นำรังไหมสดละลายในสารละลายลิเทียมไฮโอไซยานเนต พบว่า สารละลายไฟโบรอินที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่

25 กิโลดาลตัน และ 350 กิโลดาลตัน ซึ่งเหมือนกับโครงสร้างตามธรรมชาติของไฟโบรอิน 5) นำไหมที่ยังไม่ได้ลอกขาวไหมละลายในสารละลายลิเทียมไธโอไซยาเนต พบว่า สารละลายไฟโบรอินมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 25 กิโลดาลตัน และอยู่ในช่วงมากกว่า 350 กิโลดาลตัน 6) นำไหมที่ผ่านการลอกขาวไหมออกแล้วมาละลายในสารละลายลิเทียมไธโอไซยาเนต พบว่า สารละลายไฟโบรอินมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 100 กิโลดาลตัน ดังนั้นจะเห็นได้ว่า เมื่อนำไหมมาละลายในสารละลาย Ajisawa จะทำให้สายโซ่เปปไทด์ที่มีขนาดใหญ่ (Heavy chain) ในโครงสร้างไฟโบรอินถูกย่อยสลาย ในขณะที่นำไหมมาละลายในสารละลายลิเทียมไธโอไซยาเนตจะไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่สายโซ่เปปไทด์

Wang, H. และคณะ (2005) ศึกษาเกี่ยวกับอิทธิพลของอุณหภูมิและความเข้มข้นที่มีผลต่อเสถียรภาพในการไหลของสารละลายไฟโบรอิน ซึ่งพบว่า เสถียรภาพในการไหลจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิและความเข้มข้นของสารละลายไฟโบรอินเพิ่มขึ้น จากการทดสอบด้วยเทคนิค X-ray diffraction (XRD), FTIR และ Raman spectroscopy analysis แสดงให้เห็นว่า โครงสร้างส่วนใหญ่ของสารละลายไฟโบรอินเป็นแบบ Random coil และหลังจากกระบวนการเกิดเจล โครงสร้างจะเปลี่ยนไปเป็นแบบ α -helix และแบบ β -sheet ดังนั้นในการเก็บรักษาสารละลายไฟโบรอินควรเก็บในที่ที่มีอุณหภูมิและความเข้มข้นค่อนข้างต่ำ

Hu, X. และคณะ (2007) ได้ศึกษาผลกระทบของน้ำในฟิล์มไฟโบรอินต่ออุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว (Glass transition temperature, T_g) พบว่า ถ้ามีน้ำอยู่ในฟิล์มไฟโบรอิน จะชักนำให้อุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้วต่ำลง เมื่อต้องการเห็นการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้วที่ชัดเจน จะต้องกำจัดน้ำออกจากไฟโบรอิน โดยวิธีที่ใช้ในการกำจัดน้ำคือ การเพิ่มอุณหภูมิ จากนั้นลดอุณหภูมิลง ไปถึงอุณหภูมิต่ำและเพิ่มอุณหภูมิซ้ำอีกครั้ง โดยทำเป็นรอบดังกล่าวจำนวน 6 รอบ ซึ่งอุณหภูมิสุดท้ายของแต่ละรอบจะเพิ่มขึ้นเริ่มจาก 338 เคลวิน 368 เคลวิน 398 เคลวิน, 428 เคลวิน 458 เคลวินและ 483 เคลวิน นอกจากนี้ยังพบว่า ฟิล์มไฟโบรอินมีอุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้วอยู่ที่ 451 องศาเคลวินและไม่พบจุดหลอมเหลว (Melting point)

Tao, W. และคณะ (2007) ศึกษาโครงสร้างและสมบัติของสารละลายไฟโบรอินของไหมสกุล *A. pernyi* โดยนำไหมพันธุ์ดังกล่าวมาละลายในสารละลายลิเทียมไธโอไซยาเนตจนได้เป็นสารละลายไฟโบรอิน จากนั้นนำสารละลายไฟโบรอินที่ได้ไปหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี SDS-PAGE โดยการเตรียมเจลที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 7.5% และผสมตัวอย่างที่ต้องการทดสอบกับอิเลคโตร -

ไพรีซีสบัฟเฟอร์ พบว่า มีน้ำหนักโมเลกุลกระจายตัวในช่วง 20 ถึง 150 กิโลดาลตัน นอกจากนี้ยังศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างไฟโบรอินของไหมสกุลดังกล่าวเปรียบเทียบกับไหม บ้าน พบว่า โครงสร้างส่วนใหญ่ของไหมสกุล *A. pernyi* เป็นแบบ α -helix และแบบ Random coil ซึ่งอาจจะ มีโครงสร้างแบบ β -sheet เล็กน้อย ส่วนไหม บ้าน มีโครงสร้างส่วนใหญ่เป็นแบบ β -sheet และมีโครงสร้างแบบ α -helix เล็กน้อย

Vasconcelos A. และคณะ (2008) ได้ศึกษาการย่อยสลายทางธรรมชาติของฟิล์มไฟโบรอินผสมเคอราติน โดย สารที่ใช้เป็นตัวทำละลาย ได้แก่ น้ำและกรดฟอร์มิกความเข้มข้น 1% (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) นอกจากนี้ยังสนใจศึกษาเกี่ยวกับคุณลักษณะเบื้องต้นเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโน พบว่า ไฟโบรอินมีปริมาณของกรดอะมิโนไกลซีน (Gly), อะลานีน (Ala) และเซอรีน (Ser) รวมกันเท่ากับ 85% (โดยโมล) ไทโรซีน 5.3% (โดยโมล) กลุ่มของกรดอะมิโนที่มีประจุบวก (Acidic amino acid) 3.0% (โดยโมล) และกลุ่มของกรดอะมิโนที่มีลบ (Basic amino acid) 1.1% (โดยโมล) ส่วนการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่า ไฟโบรอิน มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 30-200 กิโลดาลตัน โดยทั่วไปน้ำหนักโมเลกุลของ Heavy chain จะพบที่ 350 กิโลดาลตัน ซึ่งการพบน้ำหนักโมเลกุลในช่วงดังกล่าวอาจเกิดจากการที่ไฟโบรอินมีการย่อยสลายในระหว่างกระบวนการกำจัดเซรีซินและกระบวนการเตรียมสารละลายไฟโบรอิน นอกจากนี้ยังพบน้ำหนักโมเลกุลที่ 25 กิโลดาลตันเล็กน้อยซึ่งสอดคล้องกับน้ำหนักโมเลกุลของ Light chain ที่มักพบในโปรตีนไหม

Lu, Q. และคณะ (2010) ทำการศึกษาเกี่ยวกับฟิล์มไหมที่ไม่ละลายน้ำ (Water-insoluble silk film) ด้วยการเตรียมฟิล์ม 3 วิธี คือ 1) การเตรียมฟิล์มไหมด้วยวิธีการทำแห้งอย่างช้า (Slow drying) 2) การเตรียมฟิล์มไหมด้วยการ Air dry และนำไปแช่น้ำภายใต้ความดันบรรยากาศ 25 inHg เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (Water annealing) 3) การเตรียมฟิล์มไหมด้วยการ Air dry และนำไปแช่เมทานอลความเข้มข้น 80% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Methanol annealing) พบว่า การเตรียมฟิล์มไหมประเภท Water annealing ก่อให้เกิดโครงสร้าง α -form (Silk I) มากกว่าโครงสร้างแบบ β -sheet (Silk II) ทำให้มีความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพได้เร็วกว่าการเตรียมฟิล์มไหมประเภท Methanol annealing

Nogueira, G. และคณะ (2010) ศึกษาเกี่ยวกับเมมเบรนที่ไม่มีรูพรุนโดยเตรียมจากเส้นใยไฟโบรอิน จากไหมบ้าน ที่ลอกขาวไหมด้วยสารละลายไฮเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 0.5% (โดยน้ำหนัก) ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปละลายด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์

: เอทานอล : น้ำ ในสัดส่วนโมลเท่ากับ 1 : 2 : 8 ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส จนได้เป็น สารละลายไฟโบรอิน นำไปขึ้นรูปเป็นเมมเบรนและแช่ในสารละลายเมทานอลความเข้มข้น 70% (โดยปริมาตร) เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างและลดความสามารถในการละลายน้ำ เมื่อนำไปทดสอบด้วย เทคนิค FTIR พบว่า เมมเบรนที่ยังไม่ได้แช่ในสารละลายเมทานอล มีโครงสร้างแบบ Random coil จะพบหมู่เอไมด์ I และหมู่เอไมด์ II ที่เลขคลื่นเท่ากับ 1,656 และ 1,530 ต่อเซนติเมตร ตามลำดับ หลังจากนำเมมเบรนไปแช่ในสารละลายเมทานอล จะมีโครงสร้างแบบ β -sheet จะพบหมู่เอไมด์ I และหมู่เอไมด์ II ที่เลขคลื่น เท่ากับ 1,623 หรือ 1,700 และ 1,527 ต่อเซนติเมตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังทดสอบด้วยเครื่อง Differential scanning calorimeter (DSC) พบว่า เมมเบรนที่ นำไปแช่ในสารละลายเมทานอลมีพีคดูดพลังงานที่อุณหภูมิต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจเป็น พีคที่เกิดจากการสลายตัวของน้ำระหว่างทำให้ความร้อน และมีพีคของการย่อยสลายตัวที่ อุณหภูมิ 283 องศาเซลเซียส และ 287 องศาเซลเซียส

Wadbua, P. และคณะ (2012) ศึกษาเกี่ยวกับการขึ้นรูปและสมบัติของ โครงเลี้ยงเซลล์ เส้นใย (Electrospun scaffold) ที่ได้มาจากการแยก ส่วนของ Light-chain และ Heavy-chain โดย ทั้งสองนี้เป็นองค์ประกอบหลักของไฟโบรอิน ซึ่งในงานนี้สนใจศึกษา การสกัดไฟโบรอินจากไหม บ้านด้วยสารเคมีชนิดต่างๆ 7 ชนิด ได้แก่ 1) Ajisawa's reagent (แคลเซียมคลอไรด์: เมทานอล: น้ำ = 1:2:8) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 2) สารละลายลิเทียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 9 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 3) สารละลายลิเทียมโบรไมด์ความเข้มข้น 9 โมลาร์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 4) สารละลายลิเทียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 65% (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 5) สารละลายลิเทียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 75% (โดยน้ำหนักต่อ ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 6) สารละลายลิเทียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 85% (โดย น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 7) สารละลายลิเทียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 85% (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากการศึกษาพบว่า การสกัด ไฟโบรอินโดยใช้ Ajisawa's reagent สามารถแยกไฟโบรอินได้ทั้งส่วน Light-chain และ Heavy-chain เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ทำให้เห็นแถบของน้ำหนักโมเลกุลชัดเจน ที่ 25 และ 350 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ในขณะที่สารเคมีชนิดอื่นสามารถแยก ได้เพียงส่วนของ Light-chain และเกิดแถบครอบคลุมบริเวณที่น้ำหนักโมเลกุลสูง (Smear) เมื่อนำส่วนของไฟโบรอินที่มีเฉพาะ ส่วน Heavy chain ไฟโบรอินที่มีเฉพาะส่วน Light chain และส่วนไฟโบรอินผสม(ไฟโบรอินผสม ระหว่างส่วน Light-chain และส่วน Heavy-chain) มาขึ้นรูปโดยใช้กระบวนการปั่นด้วยไฟฟ้า สถิติ (Electrospinning method) พบว่า ไฟโบรอิน ผสมและไฟโบรอินที่มีเฉพาะส่วน Heavy

chain มีโครงสร้างแบบ β -sheet เหมือนกัน ในขณะที่โครงสร้างของไฟโบรอิน ที่มีเฉพาะส่วน Light-chain จะมีโครงสร้างแบบ Random coil ทั้งก่อนและหลังการแช่ด้วยเมทานอลความเข้มข้น 50% (โดยปริมาตร) อย่างไรก็ตาม โครงเลี้ยงเซลล์ เส้นใยที่ได้จากไฟโบรอินผสมและไฟโบรอินใน ที่มีเฉพาะส่วน Heavy chain นั้นมีสมบัติคล้ายคลึงกัน ในขณะที่โครงเลี้ยงเซลล์เส้นใยไฟโบรอินใน ที่มีเฉพาะส่วน Light-chain จะมีสมบัติความแตกต่างอย่างชัดเจน เช่น สมบัติความชอบน้ำ ความสามารถในการดูดซับน้ำ อัตราการย่อยสลายและผลการยึดเกาะของเซลล์ เป็นต้น

2.5.2 การขึ้นรูปไฟโบรอินใหม่และการศึกษาผลการตอบสนองของเซลล์เพื่อใช้งานทางการแพทย์

Minoura, N. และคณะ (1995) ได้ศึกษาการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ L929 บนฟิล์มไหมบ้าน (DSF) และฟิล์มไหมสกุล *A. pernyi* (WSF) เปรียบเทียบกับฟิล์มคอลลาเจน ซึ่งฟิล์มไหมทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันในการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโน โดยฟิล์มไหมชนิด WSF นั้นไม่เพียงแต่จะประกอบไปด้วยกรดอะมิโนพื้นฐานที่มีขนาดใหญ่เหมือนกับฟิล์มไหมชนิด DSF แต่ยังมีเปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่สำคัญถึง 3 ชนิดคือ อาร์จินีน (Arginine) ไกลซีน (Glycine) และกรดแอสปาร์ติก (Aspartic acid) จากการทดสอบพบว่า การยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ L929 บนฟิล์มไหม ชนิด DSF ให้ผลดีเหมือนกับฟิล์มคอลลาเจน แต่เมื่อสังเกตภาพที่ได้จากเครื่อง Scanning electron microscope (SEM) พบว่า เซลล์ L929 มีการยึดเกาะและแผ่ขยายบนฟิล์มไหมชนิด DSF ได้ดีกว่าฟิล์มคอลลาเจน แต่อย่างไรก็ตามฟิล์มไหมชนิด WSF มีการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ดีกว่าฟิล์มชนิด DSF

Meinel L. และคณะ (2004) ได้ศึกษาเพื่อเปรียบเทียบโครงเลี้ยงเซลล์ 3 ชนิด ได้แก่ 1) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน 2) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่มีปรับปรุงการคอนจูเกตกับลำดับหมู่ อะมิโน RGD (silk-RGD) 3)โครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน โดยทดสอบกับเซลล์ต้นกำเนิดจากมนุษย์ (Human mesenchymal stem cells, hMSCs) และเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร osteogenic medium พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่มีการปรับปรุงด้วยการคอนจูเกตหมู่ อะมิโน RGD (silk-RGD) แสดงผลการยึดเกาะของเซลล์ที่ดี อีกทั้งสามารถตรวจวัดสัญญาณการเกิดกระดูกได้จาก กิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase activity, ALP), Osteocalcin, Osteopontin และ Bone sialoprotein ได้อย่างเด่นชัดเมื่อเปรียบเทียบกับ โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน และโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน

Kim, H.J. และคณะ (2005) ศึกษาผลของการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ใหม่ 2 ประเภท คือ ประเภทที่ขึ้นรูปโดยใช้น้ำ (Water-based silk scaffold) และประเภทใช้ตัวทำละลาย Hexafluoro-

2-propanol (HFIP) โดยใช้วิธีกำจัดเกลือออก เพื่อให้เกิดรูพรุนที่มีขนาด 900 ± 50 ไมโครเมตร จากนั้นนำมาทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการโดย ใช้ Human mesenchymal stem cells (hMSCs) ซึ่งเพาะเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวใน Osteogenic differentiation medium เมื่อเวลาผ่านไป 28 วันได้มีการวิเคราะห์ กิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline Phosphatase activity, ALP) และปริมาณแคลเซียม พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ใหม่ประเภทที่ขึ้นรูปโดยใช้น้ำ (Water-based silk scaffold) จะมีปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส และปริมาณแคลเซียมสูงกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่ขึ้นรูปโดยใช้ตัวทำละลาย HFIP นอกจากนี้ระดับของคอลลาเจน Type I และ Osteopontin ยังมีปริมาณที่สูงกว่าด้วย แสดงให้เห็นว่า การเตรียมโครงเลี้ยงเซลล์ใหม่ประเภท Water-based silk scaffold จะช่วยให้มีการสร้างกระดูกได้มากกว่า และเมื่อศึกษาภาพจากการย้อมชิ้นงาน (Histological staining) ก็ให้ผลในแนวทางเดียวกัน คือ โครงเลี้ยงเซลล์ใหม่ประเภท Water-based silk scaffold มีการย้อม Alcian blue ติดเป็นสีฟ้า แต่สำหรับในโครงเลี้ยงเซลล์ที่ขึ้นรูปแบบใช้ตัวทำละลาย พบว่าเมื่อทำการย้อม Alcian blue ไม่มีการติดสี

Donzelli, E. และคณะ (2007) ได้ทำการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน type I เพื่อนำมาเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (Sprague-Dawley rat) เพศเมีย อายุ 10 สัปดาห์ โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวจำนวน 1×10^6 เซลล์/โครงเลี้ยงเซลล์และเปรียบเทียบการใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ 2 ชนิด ได้แก่ อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติและอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของสารที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก (Osteogenic medium; OS medium) ประกอบไปด้วย β -glycerophosphate, 2-phosphate-ascorbic acid, และ Dexamethasone พบว่า ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงในวันที่ 7 เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด OS medium มีการเจริญเติบโตบนโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจนอย่างทั่วถึงและเกิดการรวมตัวกันของเซลล์ แต่เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ พบว่า เซลล์จะเกิดการรวมตัวกันในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 21 วัน นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ กิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส พบว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด OS medium จะมีปริมาณ ALP สูงกว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณการสะสมแคลเซียมด้วยการย้อมสี Alizarin red พบว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด OS medium มีการสะสมแคลเซียมเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (28 วัน)

Meechaisue, C. และคณะ (2007) นำไหมบ้านสาย พันธุ์นางลายและไหมพันธุ์ผสมระหว่างจีนกับญี่ปุ่น (DOAE-7) มาขึ้นรูปเป็นแผ่นเส้นใยด้วยกระบวนการปั่นด้วยไฟฟ้าสถิตย์โดยจะเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายไฟโบรอินและค่าความต่างศักย์ทางไฟฟ้า พบว่า เมื่อความเข้มข้นของสารละลายไฟโบรอินของไหมทั้งสองสายพันธุ์เพิ่มขึ้น (มากกว่าหรือเท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) จะ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเส้นใยเรียบสม่ำเสมอ และเมื่อเพิ่มความต่างศักย์ไฟฟ้ามากขึ้น จะทำให้เม็ดบิดบนเส้นใยลดลง ผลการทดสอบทางชีวภาพจะใช้เซลล์กระดูก (MC3T3-E1) พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ เส้นใยที่ขึ้นรูปด้วยกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตย์จากไหมสายพันธุ์นางลายมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ

Chamchongkaset, J. และคณะ (2008) ได้พัฒนาโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหม บ้านสาย พันธุ์ไทยด้วยวิธีการกำจัดเกลือออกโดยใช้ไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 แล้วทำการคอนจุกต์ด้วยเจลาตินเพื่อช่วยเพิ่มสมบัติทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยที่มีการปรับปรุงพื้นผิวด้วยการคอนจุกต์เจลาตินมีการเชื่อมต่อของโครงสร้างที่แข็งแรง โดยดูจากค่ามอดูลัสของแรงกด ซึ่งมีค่าสูงขึ้น 93% และสามารถส่งเสริมการยึดเกาะ การเจริญเติบโตของเซลล์ Mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1) บนโครงเลี้ยงเซลล์ได้ดีกว่าโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทย

She Z. และคณะ (2008) ทำการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน (SF) ผสมไคโตซาน (CS) ไหมที่ใช้ในการศึกษาเป็นรังไหมบ้านสายพันธุ์จีน (จาก Yi Xian Raw Silk Factory, จีน) โดยใช้อัตราส่วนระหว่างไฟโบรอินกับไคโตซาน เท่ากับ 4wt%SF, 3 wt%SF - 1wt%CS, 2 wt%SF - 2wt%CS, 1wt%SF - 3 wt%CS และ 4wt%CS พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินผสมไคโตซานในอัตราส่วน 3wt%SF - 1wt%CS มีค่าความต้านทานแรงกดน้อยที่สุดเหมาะกับการนำไปประยุกต์ใช้งานด้าน Soft tissue engineering จึงนำโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินผสมไคโตซานในอัตราส่วน 3wt%SF - 1wt%CS ไปทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการในสารละลาย PBS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวสามารถย่อยสลายได้รวดเร็วในช่วง 2 สัปดาห์แรก และมี อัตราส่วนของการย่อยสลายเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักที่หายไปกับน้ำหนักเริ่มต้นของโครงเลี้ยงเซลล์ (Degradation ratio) ที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์ เท่ากับ 19.28% โดยน้ำหนัก

Acharya, C. และคณะ (2009) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการนำไหมสายพันธุ์ทาสาร์ซึ่งอยู่ในสกุล *A. pernyi* มาพัฒนาเป็นวัสดุสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยมีการเปรียบเทียบกับไหมบ้าน ในการ

ทดสอบสมบัติเชิงกลของเส้นใยไหม ป่า พบว่า มีค่าความต้านทานแรงดึงและค่าความเหนียวสูงกว่าไหม บ้าน ส่วนความชอบน้ำที่ทดสอบด้วยวิธีการวัดค่ามุมสัมผัสของน้ำและนอร์มอลเฮปแทน บนฟิล์มไหมสกุล *A. pernyi* พบว่า มีความชอบน้ำน้อยกว่าฟิล์มไหม บ้าน สำหรับโครงสร้างของไหม ซึ่งตรวจสอบด้วยเครื่อง Circular dichroism spectroscope พบว่า ฟิล์มไหมสกุล *A. pernyi* มีโครงสร้างแบบ β -sheet ประมาณ 31.5% ในขณะที่ฟิล์มไหมบ้านมีโครงสร้างแบบ β -sheet ประมาณ 15.0% และผลการทดสอบทางชีวภาพ พบว่า การยึดเกาะ และการเจริญเติบโตของเซลล์ feline normal skin fibroblast (AH927) บนฟิล์มไหมสกุล *A. pernyi* ดีกว่าฟิล์มไหมบ้าน

Vachiraroj, N. และคณะ (2009) ได้พัฒนาฟิล์มโดยเลือกใช้วัสดุต่างๆ ได้แก่ โฟโบรินจากไหมสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 เจลาติน ไคโตซานและไฮดรอกซีอะพาไทต์ แล้วนำฟิล์มแบบต่างๆ ได้แก่ 1) ฟิล์มโฟโบริน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ 2) ฟิล์มโฟโบริน/เจลาติน 3) ฟิล์มโฟโบริน/เจลาติน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ 4) ฟิล์มไฮดรอกซีอะพาไทต์/ไคโตซาน มาทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้เซลล์กระดูก (MC3T3-E1) และเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (Rat bone marrow-derived stem cells) พบว่า เซลล์ยึดเกาะและเจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนฟิล์มโฟโบริน/เจลาติน และเซลล์สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกได้ดีที่สุดบนฟิล์มโฟโบริน/เจลาติน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ โดยวิเคราะห์จากปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ALP) และปริมาณแคลเซียม

Okhawilai, M. และคณะ (2010) ได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการขึ้นรูปแผ่นเส้นใยจากไหมโฟโบริน/เจลาตินโดยผ่านกระบวนการปั่นด้วยไฟฟ้าสถิตย์ เพื่อนำไปใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยสาร ซึ่งปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ ความต่างศักย์ทางไฟฟ้า (15 กิโลโวลต์ – 25 กิโลโวลต์) และอัตราส่วนผลระหว่างไหมโฟโบริน/เจลาติน (50/50 – 80/20) พบว่า เมื่อความต่างศักย์ทางไฟฟ้าเพิ่มขึ้นจะทำให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยลดลงและเมื่ออัตราส่วนของไหมโฟโบรินน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยลดลง จากนั้นนำแผ่นเส้นใยที่มีอัตราส่วนระหว่างไหมโฟโบริน/เจลาตินที่ 50/50, 30/70 และ 10/90 มาทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพ พบว่า แผ่นเส้นใยที่มีอัตราส่วนระหว่างไหมโฟโบริน/เจลาตินเท่ากับ 50/50 จะมีการย่อยสลายทางชีวภาพช้าที่สุดเนื่องจากมีปริมาณของไหมโฟโบรินมาก ส่วนความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยสารโดยใช้สารแม่แบบ 2 ชนิด คือ Azo-casein และ Methylene blue พบว่า แผ่นเส้นใยที่ผลิตได้สามารถใช้ในการควบคุมการปลดปล่อย Methylene

blue ได้ โดย Methylene blue จะถูกดูดซับบนแผ่นเส้นใย และถูกปลดปล่อยตามอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพของแผ่นเส้นใย

Tungtasana, H. และคณะ (2010) ได้ศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและในสัตว์ทดลอง รวมถึงการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในสัตว์ทดลอง ตามมาตรฐาน ISO 10993 Part 6 ของโครงเลี้ยงเซลล์ ซึ่งเตรียมจากองค์ประกอบ 3 ส่วน ได้แก่ ไฟโบรอินจากไหมสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 เจลาติน และไฮดรอกซีอะพาไทต์ โดยผลิตโครงเลี้ยงเซลล์ 4 กลุ่ม ได้แก่ 1) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน 2) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน/เจลาติน 3) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ 4) โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน/เจลาติน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์ ผลการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพ พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน/ไฮดรอกซีอะพาไทต์มีความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการได้ช้าที่สุด เนื่องจากมีการเชื่อมขวางทางเคมี (EDC/NHS) และการเชื่อมขวางทางความร้อน ส่วนการย่อยสลายทางชีวภาพในสัตว์ทดลอง พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 12 สัปดาห์ โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินทุกชนิดมีการย่อยสลายทางชีวภาพในสัตว์ทดลองไม่มากนัก สำหรับการทดสอบความเป็นพิษในหนู พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ ทั้ง 4 กลุ่ม ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในสัตว์ทดลอง ตามมาตรฐาน ISO 10993 Part 6

Jetbumpenkul P. และคณะ (2012) ได้ศึกษาและเปรียบเทียบโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยผสมเจลาติน ในอัตราส่วนระหว่างไฟโบรอินไหมไทยต่อเจลาติน เท่ากับ 0/100, 20/80, 40/60, 50/50, 60/40, 80/20 และ 100/0 พบว่า สารละลายไฟโบรอินไหมไทยผสมเจลาตินในอัตราส่วน 50/50 มีค่าศักย์ゼต้าใกล้เคียงศูนย์ทั้งในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH 5.6 และค่า pH 7.4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า อัตราส่วนผสมดังกล่าวก่อให้เกิดความสมดุลของประจุในสารละลายของไฟโบรอินกับเจลาติน นอกจากนี้โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยผสมเจลาตินในอัตราส่วน 40/60, 50/50 และ 60/40 มีค่าความต้านทานแรงกดสูงทั้งสภาวะแห้งและเปียกเมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ในอัตราส่วนอื่น และโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยผสมเจลาตินในอัตราส่วน 50/50 มีค่าความต้านทานแรงกดสูงสุดในสภาวะเปียก สำหรับการทดสอบทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการด้วยเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (MSCs) พบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินไหมไทยผสมเจลาตินในทุกอัตราส่วนช่วยสนับสนุนให้เซลล์สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตได้

Zhu H. และคณะ (2012) ได้ศึกษาคุณลักษณะของฟิล์มไฟโบรอินที่ผสมสาร Nano bioactive glass (NBG) โดยนำไฟโบรอินมาจากรังไหมสกุลบ้านสายพันธุ์จีน (จาก China nation

silk museum, จีน) ในขณะที่สาร NBG ได้จากการผสมระหว่าง $\text{SiO}_2 : \text{CaO} : \text{P}_2\text{O}_5$ เท่ากับ 58 : 23 : 9 (อัตราส่วนโดยน้ำหนัก) จากการจะเตรียมฟิล์มในอัตราส่วนของสาร NBG กับสารละลายไฟโบรอิน เท่ากับ 0/100 (SF pure), 1/99 (1 wt% NBG), 4/96 (4 wt% NBG), 7/93 (1 wt% NBG) และ 10/90 (10 wt% NBG) พบว่า การเพิ่มปริมาณสาร NBG ลงในฟิล์มไฟโบรอินไม่ได้ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมี ในขณะที่ค่ามุมสัมผัสของน้ำซึ่งแสดงถึงความชอบน้ำของวัสดุนั้นลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเพิ่มสาร NBG ลงไป 10% โดยน้ำหนัก (10 wt% NBG) เมื่อทดสอบการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของ บนฟิล์มไฟโบรอินที่ผสมสาร NBG พบว่า ที่เวลา 6 ชั่วโมงจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะบนฟิล์มในทุกอัตราส่วนไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่ 1, 3 และ 7 วันมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยง และเมื่อเพิ่มปริมาณสาร NBG จะช่วยให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้น นอกจากนี้ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ พบว่า เซลล์สามารถสร้าง กิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ALP) ซึ่งเป็นสัญญาณแรกของการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกได้สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญบนฟิล์มไฟโบรอินผสมสาร NBG ที่อัตราส่วน 10% โดยน้ำหนัก (10 wt% NBG)

บทที่ 3

วัสดุและวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและสารเคมี

3.1.1 วัสดุและสารเคมีสำหรับเตรียมสารละลายไฟโบรอิน

3.1.1.1 รังไหมสายพันธุ์ไทย (พันธุ์นางน้อยศรีษะเกษ 1; NN, สถาบันหม่อนไหมแห่งชาติเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์พระบรมราชินีนาถ, นครราชสีมา, ไทย)

3.1.1.2 รังไหมสายพันธุ์ญี่ปุ่น (พันธุ์นครราชสีมา 1; K1, สถาบันหม่อนไหมแห่งชาติเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์พระบรมราชินีนาถ, นครราชสีมา, ไทย)

3.1.1.3 รังไหมสายพันธุ์จีน (พันธุ์นครราชสีมา 2; K8, สถาบันหม่อนไหมแห่งชาติเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์พระบรมราชินีนาถ, นครราชสีมา, ไทย)

3.1.1.4 โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3 , Ajax Finechem, ออสเตรเลีย)

3.1.1.5 ถุงไดอะไลส์ (MWCO 12,000-16,000, Viskase Company Inc., ญี่ปุ่น)

3.1.1.6 ลิเทียมโบรไมด์ (LiBr, Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา)

3.1.2 วัสดุและสารเคมีสำหรับเตรียมฟิล์มไฟโบรอิน

3.1.2.1 กระจกใส (Glass slip 15 mm in diameter, Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา)

3.1.2.2 แม่พิมพ์เทฟลอน (ญี่ปุ่น)

3.1.2.3 Methanol (Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา)

3.1.3 วัสดุและสารเคมีสำหรับการเตรียมเจลพอลิอะคริลาไมด์ (Polyacrylamide gel)

3.1.3.1 Acrylamide (Plusone, สวีเดน)

3.1.3.2 Ammonium persulphate (Fluka, สวิตเซอร์แลนด์)

3.1.3.3 Bromophenolblue (Merck, เยอรมัน)

3.1.3.4 Coomassie brilliant blue R-250 (Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา)

3.1.3.5 Glycerol (BDH, อังกฤษ)

3.1.3.6 *N,N'*-methylenebis acrylamide, BIS (Plusone, สวีเดน)

3.1.3.7 β -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา)

- 3.1.3.8 Sodium dodecyl sulfate (SDS, Merck, เยอรมัน)
- 3.1.3.9 Sodium hydroxide (BDH, อังกฤษ)
- 3.1.3.10 *N,N,N',N'*-tetramethylethylene diamine (TEMED, Plusone, สวีเดน)
- 3.1.3.11 Tris (hydroxymethyl)aminmethane, Tris (Merck, เยอรมัน)

3.1.4 วัสดุและสารเคมีสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์

- 3.1.4.1 Alpha-modified eagle powder medium (α -MEM, Hyclone, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.4.2 Ascorbic acid for cell culture tested
- 3.1.4.3 CO₂ gas
- 3.1.4.4 Dexamethasone (Sigma Co., St. Louis, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.4.5 Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.4.6 Deionized Water (DI water)
- 3.1.4.7 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldric, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.4.8 Dulbecco's modified eagle powder medium (D-MEM, Hyclone, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.4.9 Ethanol (99.7 – 100 %, VWR International Ltd., อังกฤษ)
- 3.1.4.10 Ethanolamine (C₂H₇NO, Sigma-Aldric, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.4.11 Fetal bovine serum (FBS, Hyclone, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.4.12 β -glycerophosphate disodium salt pentahydrate (Fluka, เยอรมัน)
- 3.1.4.13 Hoechst 33258 (Sigma-Aldric, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.4.14 Hydrochloric acid (HCl, J.T. Baker, NJ, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.4.15 L-glutamine (200 mM, Hyclone, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.4.16 O-cresolphythalein complex substrate (OCPC, Fluka, เยอรมัน)
- 3.1.4.17 Penicillin-Streptomycin solution (10,000 units/ml, Hyclon, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.4.18 Phosphate buffered saline (PBS, Bio basic inc., แคนาดา)
- 3.1.4.19 p-Nitrophenyl phosphate liquid substrate (Sigm-Aldrich, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.4.20 p-Nitrophenol standard solution (Sigm-Aldrich, สหรัฐอเมริกา)

- 3.1.4.21 Sodium dodecyl sulfate lysis buffer (SDS, Bio basic inc., แคนาดา)
- 3.1.4.22 Sodium hydroxide (0.02 N NaOH, Ajax Finechem, ออสเตรเลีย)
- 3.1.4.23 Sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3 99%, Merck, เยอรมัน)
- 3.1.4.24 Trypan blue stain 0.4 % (Gibco, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.4.25 Trypsin/EDTA (0.25 % Trypsin in EDTA.4Na, Hyclone, สหรัฐอเมริกา)

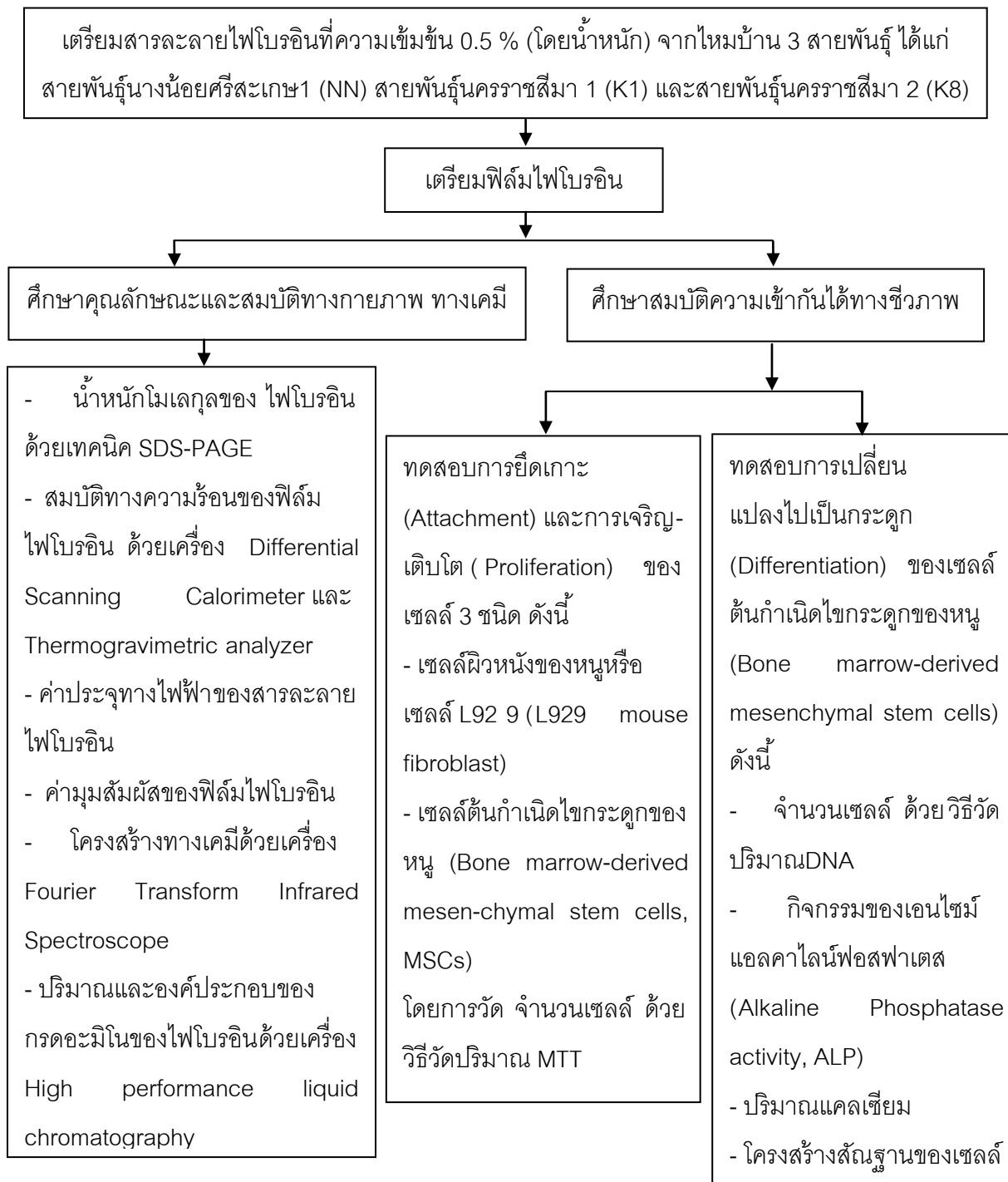
3.2 อุปกรณ์

- 3.2.1 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด Scanning Electron Microscope (JEOL Ltd., ญี่ปุ่น)
- 3.2.2 กล้องถ่ายรูป (D5000, Nikon, ญี่ปุ่น)
- 3.2.3 เครื่องปั่นเหวี่ยงสาร (Centrifuge, Universal 320R, Hettich, เยอรมัน)
- 3.2.4 เครื่องทำแห้งด้วยความเย็น (Freeze dry, CHRIST®, เยอรมัน)
- 3.2.5 ตู้แช่ 4 องศาเซลเซียส (NR-BU343, Panasonic, ไทย)
- 3.2.6 ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Sandenintercool, ไทย)
- 3.2.7 ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส (Haier, จีน)
- 3.2.8 ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (New Brunswick scientific, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.9 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow) (Thermo scientific, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.10 ตู้ดูดความชื้น (SR Lab, ไทย)
- 3.2.11 ตู้เพาะเชื้อบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 incubator) (Thermo scientific, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.12 ตู้อบแห้งแบบสูญญากาศ และปั๊ม (VD23, Binder, เยอรมัน)
- 3.2.13 Chemical Fume Hood (Dac 2005 plus, ProLAB laboratory Fume Hood, แคนาดา)
- 3.2.14 Contact angle meter (Model CAM-PLUS MICCRO, TANTEC INC. , สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.15 Differential Scanning Calorimeter (DSC, TA Instrument, USA)
- 3.2.16 Digital balance (AL204, Mettler TOLEDO, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.17 Fluorescence microplate reader (Perkin elmer, 1420 multilabel counter, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.18 Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR, Spectrum GX, Perkin Elmer, อังกฤษ)

- 3.2.19 Hemacytometer (Boeco, เยอรมัน)
- 3.2.20 High performance liquid chromatography (HPLC) รุ่น LC – 10A (Shimadzu, ญี่ปุ่น)
- 3.2.21 Micro plate reader (UVM 340, ASYS, ออสเตรเลีย)
- 3.2.22 Micropipette (Pipetman P20, P200, P1000 and P5000, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.23 Magnetic stirrer / Hot plate (RCT Basic, Ika labortechnik, เยอรมัน)
- 3.2.24 Nonpyrogenic serological pipet (Costar®, Corning, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.25 pH-meter (Denver, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.26 24-well, 48 well and 96-well polystyrene tissue culture plates (Corning, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.27 Thermogravimetric analyzer (TGA, TA Instrument, USA)
- 3.2.28 10 cm Tissue culture dish (Costar®, Corning, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.29 Water bath (Grant, อังกฤษ)
- 3.2.30 Zeta sizer 650 (Malvern, อังกฤษ)

3.3 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

แผนผังการดำเนินงานวิจัยแสดงดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แผนผังการดำเนินงานวิจัย

3.3.1 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายไฟโบรอิน [Kim, U.J และคณะ 2005]

3.2.2.1 การลอกกาวยไหม

1. ชั่งรังไหมหนัก 40 กรัม
2. เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ให้มีความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ เพื่อใช้ในการลอกกาวยไหม โดยนำรังไหมต้มในสารละลาย โซเดียมคาร์บอเนต ในอัตราส่วนระหว่าง น้ำหนักของรังไหมกับสารละลาย โซเดียมคาร์บอเนต เท่ากับ 1 : 25 ที่อุณหภูมิเดือดประมาณ 20 นาที
3. นำรังไหมที่ต้มแล้วไปล้างด้วยน้ำปราศจาก ประจุ (Deionized Water, DI) 4 - 5 ครั้ง เพื่อกำจัดเซอรีซินและสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตออก และทำซ้ำในข้อ 2 - 3 อีกครั้ง
4. นำเส้นใยไหมที่ได้ไปผึ่งให้แห้งในตู้ดูดควันเป็นเวลาประมาณ 2 วัน จากนั้นจึง ใหมให้ฟูเพื่อเตรียมทำสารละลายไฟโบรอิน

3.2.2.2 การเตรียมสารละลายไฟโบรอิน

1. นำเส้นใยไหมที่ผ่านการลอกกาวยไหม 8 กรัมผสมกับสารละลายลิเทียมโบรไมด์ (LiBr) 24 กรัม โดยใช้สารละลายลิเทียมโบรไมด์ที่มีความเข้มข้น 9.3 โมลาร์
2. นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 - 4 ชั่วโมง เพื่อช่วยเพิ่ม ความสามารถในการละลายของเส้นใยไฟโบรอิน
3. ไดอะไลส์สารละลายไฟโบรอินโดยใช้ถุงไดอะไลส์ (MWCO เท่ากับ 12,000-16,000) ในน้ำปราศจาก ประจุ เพื่อกำจัดลิเทียมโบรไมด์ ในช่วงแรกจะเปลี่ยนน้ำทุก 15 นาที จำนวน 3 ครั้ง หลังจากนั้นในวันถัดมาจะเปลี่ยนน้ำ 3 ครั้งต่อวัน คือ ช่วง เช้า ช่วงกลางวันและช่วง เย็น จนค่าการนำไฟฟ้าของน้ำที่ผ่านการไดอะไลส์แล้วมีค่าเท่ากับค่าการนำไฟฟ้าของน้ำปราศจาก ประจุ
4. นำสารละลายไฟโบรอินที่ได้ไปกรองด้วยตะแกรงที่มีขนาด 212 ไมโครเมตร แล้ว นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อกำจัดตะกอนและฝุ่นละอองในสารละลายไฟโบรอิน จากนั้นนำสารละลายไฟโบรอินที่ได้ไปหา ความเข้มข้นของสารละลายโดยการอบแห้งเพื่อหาน้ำหนักไฟโบรอิน (Solid weight) ซึ่งความเข้มข้นของสารละลายไฟโบรอินที่ได้จะมีค่าประมาณ 7.0 - 7.5% (โดยน้ำหนัก) และนำสารละลายไฟโบรอิน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยขั้นตอนทั้งหมดในการ การลอกกาวยไหม และการ เตรียมสารละลายไฟโบรอินแสดงในรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 ขั้นตอนในการการลอกกาวไหมและการเตรียมสารละลายไฟโบรอิน

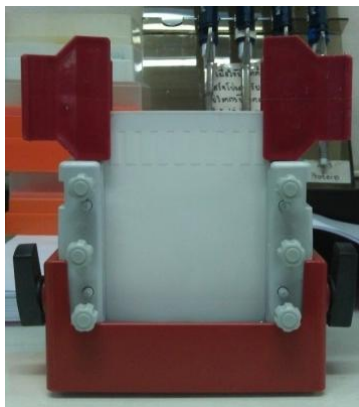
3.3.2 ขั้นตอนการขึ้นรูปฟิล์มไฟโบรอิน

1. นำสารละลายไฟโบรอินที่ได้ไปเจือจาง ให้มีความเข้มข้น 0.5% (โดยน้ำหนัก) จากนั้นนำสารละลายไฟโบรอิน 100 ไมโครลิตรหยดลงในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม (24 well polystyrene tissue culture plates) แล้วเกลี่ยให้ทั่วหลุมโดยใช้ปลายปิเปตขนาด 100 ไมโครลิตร
2. ปล่อยให้แห้ง (Air dry) เป็นเวลา 1 วันในตู้ดูดควัน และชักนำให้เกิดโครงสร้างแบบ β -sheet ซึ่งดัดแปลงวิธีการมาจาก Ishida M. และคณะ [Ishida M. และคณะ 1990] โดยการเติมสารละลายเมทานอลที่มีความเข้มข้น 70% โดยปริมาตร ปริมาณ 1 มิลลิตรในแต่ละหลุม แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเทสารละลายเมทานอลออกและปล่อยให้แห้งในที่ๆ สะอาด

3.3.3 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของฟิล์มไฟโบรอิน

3.3.3.1 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินด้วยเทคนิค SDS-PAGE

การหาน้ำหนักโมเลกุลของสารละลายไฟโบรอินด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ด้วยชุดอุปกรณ์อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแนวตั้งซึ่งแสดงในรูปที่ 3.3 โดยก่อนติดตั้งอุปกรณ์จะต้องเช็คทำความสะอาดแผ่นกระจกด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 70% (โดยปริมาตร) จากนั้นนำแผ่นกระจก 2 แผ่น ประกบกันและคั่นด้วย spacer ที่ขอบกระจก ติดตั้งกระจกดังกล่าวเข้ากับแท่นอิเล็กโตรโฟรีซิสแล้วหนีบกระจกให้แน่นด้วยตัวหนีบทั้งสองข้าง เตรียม Separating gel แล้วเทลงในช่องระหว่างกระจกทั้ง 2 แผ่นประมาณ 3 ใน 4 ส่วนของความสูงกระจกและปรับผิวหน้าเจลให้เรียบด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งให้เจลเกิดการแข็งตัวประมาณ 30 นาที เทน้ำกลั่นออกจากนั้นเตรียม Stacking gel และเทที่บส่วนด้านบนของ Separating gel ประมาณ 1 ใน 4 ส่วนของความสูงกระจกและนำหัวเสียบ (Template comb) กดลงในส่วนของ Stacking gel เพื่อให้เกิดเป็นช่อง (Well) สำหรับใส่ตัวอย่างเพื่อทดสอบ ตั้งทิ้งให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที ดึงหัวเสียบออกแล้วนำไปติดตั้งใน Chamber เกล็ดอิเล็กโตรดบัฟเฟอร์ให้ท่วมถึงช่องที่ใส่ตัวอย่าง



รูปที่ 3.3 ชุดอุปกรณ์อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแนวตั้ง

การเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์นั้นจะนำสารละลายไฟโบรอินที่ได้ไปผ่านกระบวนการทำให้แห้งด้วยความเย็น (Freeze dry) จากนั้นจะชั่งตัวอย่างประมาณ 20 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิตร โดยอาศัยการปั่นและอุ่นในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการละลาย จากนั้นนำสารละลายที่ได้ประมาณ 20 ไมโครลิตรผสมกับสาร Sample buffer ปริมาณ 3 ไมโครลิตรแล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเพื่อช่วยให้เกิดการเสื่อมสภาพของโปรตีนไฟโบรอิน ต่อมานำสารละลายที่ได้ใส่ลงในช่องใส่ตัวอย่าง โดย Protein marker ที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ Fermentas #SM 0661 หลังจากนั้นนำชุดอุปกรณ์อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแนวตั้งต่อแหล่งจ่ายไฟฟ้า ดังแสดงในรูปที่ 3.4 โดยกระแสไฟฟ้าจะเคลื่อนจากขั้วลบไปยังขั้วบวก ในการวิเคราะห์ (รันเจล) จะให้กระแสไฟฟ้า 30 มิลลิแอมแปร์ เวลาที่ใช้ประมาณ 90 นาที หรือกระทั่งโปรตีนเคลื่อนมาจนสุดแผ่นกระดาษ จากนั้นหยุดกระแสไฟฟ้าและแกะแผ่นเจลด้วยความระมัดระวัง นำแผ่นเจลไปย้อมสีด้วย Staining solution เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปล้างสีย้อมออกด้วยสาร Destaining จนเจลใสจะเห็นแถบโปรตีนปรากฏขึ้นชัดเจน ซึ่งรายละเอียดของสารเคมีที่ใช้แสดงในภาคผนวก ก



รูปที่ 3.4 ชุดอุปกรณ์อิเล็กโทรโพสิซแบบแนวตั้งที่ต่อเข้ากับแหล่งจ่ายไฟฟ้า

3.3.3.2 การวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนของฟิล์มไฟโบรอิน

การทดสอบ สมบัติทางความร้อนของฟิล์มไฟโบรอิน ทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยนำสารละลายไฟโบรอินเจือจาง ที่ความเข้มข้น 2% (โดยน้ำหนัก) และเทสารละลาย ดังกล่าว 2 มิลลิลิตร ลงในแม่พิมพ์ นำไปผึ่งไว้ให้แห้งเป็นเวลา 2 วัน ในตู้ดูดควันและชักนำให้เกิดโครงสร้างแบบ β -sheet นำฟิล์มไฟโบรอินที่ได้ทำการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

ก.) อุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว (Glass transition temperature; T_g)

นำฟิล์มไฟโบรอินทั้ง 3 สายพันธุ์ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) โดยช่วงอุณหภูมิที่ใช้ในการทดสอบตั้งแต่ 30 องศาเซลเซียส ถึง 200 องศาเซลเซียส ใช้อัตราการให้ความร้อนที่ 5 องศาเซลเซียสต่อนาที และอัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 50 มิลลิเมตรต่อนาที

ข.) อุณหภูมิการสลายตัว (Degradation temperature; T_d)

นำฟิล์มไฟโบรอินทั้ง 3 สายพันธุ์ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Thermogravimetric Analyzer (TGA) โดยช่วงอุณหภูมิที่ใช้ในการทดสอบตั้งแต่ 30 องศาเซลเซียส ถึง 600 องศาเซลเซียส ใช้อัตราการให้ความร้อน ที่ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที และอัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 90 มิลลิเมตรต่อนาที

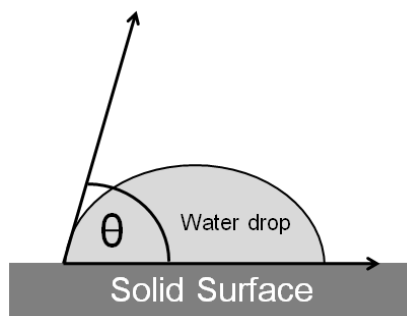
3.3.3.3. การวิเคราะห์ค่าประจุทางไฟฟ้าของสารละลายไฟโบรอิน

ในการวิเคราะห์ค่าประจุทางไฟฟ้าของสารละลายไฟโบรอิน จะเจือจางสารละลายไฟโบรอินใน PBS (Phosphate buffered saline, pH 7.4) ให้มีความเข้มข้น 0.5% (โดยน้ำหนัก) แล้วนำไปวัดค่าศักย์เซต้าด้วยเครื่อง Zeta sizer ในการวิเคราะห์นี้จะทำเพื่อศึกษาความเสถียรของ

สารละลายไฟโบรอิน โดยพิจารณาจากแนวโน้มที่อนุภาคจะเกิดการรวมตัวกันเป็นก้อนในสารละลาย โดยจะใช้การวัดอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของอนุภาคเมื่ออยู่ภายใต้สนามไฟฟ้าด้วย Laser Doppler Velocimetry

3.3.3.4 การวิเคราะห์ค่ามุมสัมผัสของฟิล์มไฟโบรอิน

การวิเคราะห์ ค่ามุมสัมผัส (Contact angle) ของฟิล์มไฟโบรอิน โดยใช้ น้ำที่ปราศจากไอออนเป็นสารที่ใช้ในการทดสอบ โดยจะขึ้นรูปฟิล์มไฟโบรอินจากสารละลายไฟโบรอินที่มีความเข้มข้น 0.5% (โดยน้ำหนัก) หยดบนกระจกใส (Glass slip) แล้วนำฟิล์มแห้งไปวัดค่ามุมสัมผัส (θ) ของน้ำที่เวลา 30 วินาที อุณหภูมิห้องแสดงดังรูปที่ 3.5 โดยใช้วิธี Static sessile drop [Bachmann J. และคณะ 2000] ด้วยเครื่อง Contact angle meter



รูปที่ 3.5 การวัดค่ามุมสัมผัส (θ) ของน้ำ

3.3.4 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของฟิล์มไฟโบรอิน

3.3.4.1 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของฟิล์มไฟโบรอิน

การ วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมี ของฟิล์มไฟโบรอิน ทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยขึ้นรูปฟิล์มไฟโบรอินจากสารละลายไฟโบรอินที่มีความเข้มข้น 2% (โดยน้ำหนัก) นำไปผึ่งไว้ให้แห้งเป็นเวลา 2 วัน ในตู้ดูดควัน และชักนำให้เกิดโครงสร้างแบบ เบต้าชีท ต่อมานำแผ่นฟิล์มที่ได้ไปแช่ในไนโตรเจนเหลว แล้วอบจนได้ผงละเอียด นำสารตัวอย่างดังกล่าวประมาณ 2 มิลลิกรัมผสมกับโพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr) ประมาณ 198 มิลลิกรัม [Aznar-Cervantes S.D. และคณะ 2013] แล้วบรรจุลงใน Holder และอัดให้ได้เป็นเหรียญ (Dise) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) โดยใช้ช่วงเลขคลื่น (Wave number) ตั้งแต่ 400 - 4,000 ต่อเซนติเมตร

3.3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนของสารละลายไฟโบรอิน

ในการวิเคราะห์ ปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนของไฟโบรอิน ทั้ง 3 สายพันธุ์ จะเตรียมสารละลายไฟโบรอินที่ความเข้มข้น 20% (โดยน้ำหนัก) ด้วยเครื่องกลั่นระเหยแห้งแบบหมุน (Rotary Evaporator) และนำสารตัวอย่างส่งวิเคราะห์ที่ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว. บางปู) ซึ่งวิเคราะห์ด้วย เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งเฟสหยุดนิ่งหรือคอลัมน์ที่ใช้ในการทดสอบ คือ Shim-pack ISC-07/S1504Na และใช้เฟสเคลื่อนที่หรือ Mobile phase 3 ชนิด ได้แก่

- โซเดียมซิเตรตในเอทานอลความเข้มข้น 2 นอร์มอล (pH 3.2)
- โซเดียมซิเตรตความเข้มข้น 0.6 นอร์มอลผสมกับกรดบอริกความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (pH 10)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

3.3.5 การทดสอบสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพของฟิล์มไฟโบรอิน

3.3.5.1 การเตรียมเซลล์และการเพาะเลี้ยง เซลล์ผิวหนังของหนูหรือ เซลล์ L929 (L929

Mouse fibroblast)

นำเซลล์ L929 ที่ถูกแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว มาละลายน้ำแข็งและเลี้ยงด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) ซึ่งประกอบด้วย DMEM ที่มี 10% Fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine, 1% antibiotic (penicillin-streptomycin) จากนั้นเปลี่ยนอาหารทุก 3 วัน หลังการเพาะเลี้ยงเซลล์สามารถ แบ่งเซลล์ (subculture) ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิโมลลาร์ (pH 7.4) ที่มี Trypsin ความเข้มข้น 0.25% (โดยน้ำหนัก) และ EDTA ความเข้มข้น 0.02% (โดยน้ำหนัก) นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 5 นาที โดยจะเพาะเลี้ยงเซลล์ให้ได้จำนวนตามที่ต้องการเพื่อนำใช้ในการทดสอบต่อไป

3.3.5.2 การยึดเกาะ (Attachment) และการเจริญเติบโต (Proliferation) ของเซลล์ L929 บนฟิล์มไฟโบรอิน

เตรียมสารละลายเซลล์ L929 จำนวน 2×10^4 เซลล์ต่อหลุม (1×10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร) จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยง ลงบนฟิล์มไฟโบรอิน เพื่อตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่ ยึดเกาะที่เวลา 6 ชั่วโมงและจำนวนเซลล์ที่เจริญเติบโตที่เวลา 1, 2 และ 3 วัน ด้วยวิธีการตรวจวัดปริมาณ

MTT [Mosmann T. และคณะ 1983] และเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ทราบจำนวนเซลล์ โดยสาร MTT หรือ 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงแหวนของเกลือ Tetrazolium มีสีเหลือง จะเปลี่ยนเป็นผลึก Formazan ที่มีสีม่วงเมื่อถูกทำลายวงแหวน Tetrazolium ด้วยเอนไซม์ Dehydrogenase จากไมโทคอนเดรียที่อยู่ในเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ โดยผลึกสีม่วงที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ไม่สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ แต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลาย เช่น Dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นต้น ซึ่งสารละลายสีม่วงที่ได้จะถูกนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร โดยปริมาณผลึก Formazan ที่ถูกละลายออกมาจะมีค่าแปรผันโดยตรงกับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งขั้นตอนในการดำเนินการมีดังนี้

- กราฟมาตรฐานจากเซลล์ L929 จะเตรียมจากสารละลาย เซลล์ L929 ที่ทราบปริมาณเซลล์ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใส่ในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม จากนั้นทำการเจือจางความเข้มข้นเซลล์ (Serial dilution) ให้มีความหนาแน่นของเซลล์เป็นครึ่งหนึ่งของความหนาแน่นเดิม โดยเริ่มจาก 5×10^5 ถึง 1.5625×10^4 เซลล์ต่อหลุม เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง

- เตรียมสารละลาย MTT ที่มีความเข้มข้น 0.5 % (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่ไม่มี Phenol red หรือ PBS โดยจะต้องระมัดระวังไม่ให้ถูกแสง

- นำสารมาตรฐานจากเซลล์ L929 และตัวอย่างฟิล์มไฟโบรอินที่เพาะเลี้ยงตามช่วงเวลาต่างๆ มาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วล้างด้วย PBS ต่อมาใส่สารละลาย MTT ในแต่ละหลุมแล้วนำไปปัมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดสารละลาย MTT ออก จะเห็นผลึก Formazan ที่มีสีม่วง ใส่ DMSO ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เพื่อไปละลายผลึกดังกล่าวออกมาแล้วทำให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้ ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตรพ่นซ้ำหลายครั้ง จากนั้นปิเปตสารละลายมา 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม (96-well polystyrene tissue culture plates) นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Micro plate reader

- คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของเซลล์ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (Specific growth rate, μ) รวมถึงระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 2 เท่า (Population doubling time, PDT) บนฟิล์มไฟโบรอิน และวิเคราะห์โครงสร้างสัณฐาน (Morphology) ด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM) โดยสูตรที่ใช้ในการคำนวณมีดังต่อไปนี้

เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของเซลล์ (% Cell attachment)

$$\% \text{ Cell attachment} = (N_1/N_0) \times 100 \quad \dots (1)$$

เมื่อ N_0 คือ จำนวนเซลล์เริ่มต้น

N_1 คือ จำนวนเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (Specific growth rate, μ , หน่วย: ต่อชั่วโมง) คำนวณได้

จาก

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dx}{dt} \quad \dots (2)$$

$$\mu \int_{t_1}^{t_2} dt = \int_{X_1}^{X_2} \frac{1}{X} dX \quad \dots (3)$$

$$\mu(t_2 - t_1) = \ln X_2 - \ln X_1 \quad \dots (4)$$

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{(t_2 - t_1)} \quad \dots (5)$$

เมื่อ X_1 คือ จำนวนเซลล์ ที่เวลา t_1

X_2 คือ จำนวนเซลล์ ที่เวลา t_2

ระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 2 เท่า (Population doubling time, PDT, หน่วย: ชั่วโมง)

คำนวณได้จาก

$$\text{PDT} = \frac{1}{r} \quad \dots (6)$$

โดย อัตราการแบ่งตัว (Multiplication rate, r , หน่วย: รุ่นต่อชั่วโมง) สามารถคำนวณได้จาก

$$r = \frac{n}{(t_2 - t_1)} \quad \dots (7)$$

จากสมการ

$$N_H = N_0 2^n \quad \dots (8)$$

$$\log N_H = \log N_i + n \log 2 \quad \dots (9)$$

$$n = 3.32 (\log N_H - \log N_i) \quad \dots (10)$$

ดังนั้นอัตราการแบ่งตัว คือ

$$r = \frac{3.32 (\log N_H - \log N_i)}{(t_2 - t_1)} \quad \dots (11)$$

เมื่อ N_i คือจำนวนเซลล์เริ่มต้น ที่เวลา t_1

N_H คือจำนวนเซลล์ทั้งหมด ที่เวลา t_2

3.3.5.3 การเตรียมและการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก (Bone marrow-derived mesenchymal stem cells, MSCs) [Takahashi Y. และคณะ 2003]

เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกที่ใช้ในการทดสอบจะถูก แยกมาจากขาหลังจากหนูพันธุ์ วิสต้า เพศเมีย อายุ 3 สัปดาห์ (จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล) เริ่มจากการผ่ากระดูกต้นขาหลังของหนูออกตั้งแต่บริเวณสะโพก กำจัดชิ้นเนื้อออกให้หมดจนสะอาด จากนั้นตัดที่ปลายทั้งสองข้างของกระดูกและใช้เข็มฉีดยา เบอร์ 24 (24 gauge needle) ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 มิลลิลิตร (Alpha-modified eagle medium: α -MEM ที่มี 15 % FBS และ 50 U/ml penicillin streptomycin) ซะล้างผ่านช่องไขกระดูกลงหลอดขนาด 1 มิลลิลิตร ทำซ้ำหลายครั้งจนกระทั่งก้อนไขกระดูกหลุดออกหมดและสีของกระดูกขาวใสขึ้น ทำสารแขวนลอยเซลล์ที่ได้ให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เข็มฉีดยา ซ้ำหลายครั้ง นำ สารแขวนลอย เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก ที่ได้ใส่จานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 10 เซนติเมตร (10 cm Tissue culture dish) ที่ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ 10 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงไว้ในตู้บ่ม (Incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ในวันที่ 4 เพื่อกำจัดเซลล์เม็ดเลือดที่ไม่เกาะจานเพาะเลี้ยงเซลล์ จากนั้น เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน จนกระทั่งเซลล์มีการเจริญเติบโตประมาณ 80% ของพื้นที่เพาะเลี้ยงเซลล์ จะ ทำการแบ่งเซลล์ (subculture) ไปเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ เพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ตามที่ต้องการ โดยจะเพาะเลี้ยง เป็นเวลาประมาณ 2 - 3 สัปดาห์ ซึ่งเซลล์ที่นำไปใช้จะเป็นเซลล์ใน Passage ที่ 2-3

3.3.5.4 การยึดเกาะ (Attachment) และการเจริญเติบโต (Proliferation) ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกบนฟิล์มไฟโบรอิน

เตรียมสารละลาย เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก จำนวน 2×10^4 เซลล์ต่อหลุม (1×10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร) นำไปเพาะเลี้ยง ลงบนฟิล์มไฟโบรอิน เพื่อตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่เกาะติดที่เวลา 6 ชั่วโมง และจำนวนเซลล์ที่เจริญเติบโตที่เวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน ด้วยวิธีการตรวจวัดปริมาณ MTT ตามขั้นตอนและคำนวณค่าต่างๆ เหมือนในหัวข้อ 3.3.5.2

3.3.5.5 การเปลี่ยนแปลงไปเป็น เนื้อเยื่อกระดูก (Differentiation) ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกบนฟิล์มไฟโบรอิน

เตรียมสารละลาย เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกบนฟิล์มไฟโบรอิน จำนวน 5×10^4 เซลล์ต่อหลุม (หลุม (2.5×10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร) จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยง ลงบนฟิล์มไฟโบรอิน ใน Osteogenic differentiation media ซึ่งประกอบด้วย α -MEM ที่มี 10% FBS, 50 U/ml penicillin streptomycin, 50 μ g/ml L-ascorbic, 10^{-6} M dexamethasone และ 1 M β -glycerophosphate เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน จากนั้นตรวจสอบจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกด้วย วิธีการตรวจวัดปริมาณ DNA หรือ DNA assay [Takahashi, Y และคณะ 2005] โดยวิธีการนี้จะวิเคราะห์ปริมาณสารเรืองแสง Hoechst 33258 ซึ่งมีคุณสมบัติจับจำเพาะกับ DNA โดยสารดังกล่าวจะแทรกเข้าสู่ DNA double strands จากนั้นนำไปวัดค่า fluorescent intensity ที่มีการกระตุ้น (Excitation) ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 355 นาโนเมตร และปลดปล่อยพลังงานแสง (Emission) ที่ 460 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Fluorescent microplate reader และเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ทราบจำนวนเซลล์ ซึ่งขั้นตอนในการดำเนินการมีดังนี้

- เตรียมสารมาตรฐานจากเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกซึ่ง ทราบปริมาณเซลล์ 4×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใส่ใน vial แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทอาหารออก แล้วเติมสาร Sodium dodecyl sulfate lysis buffer (SDS) ปริมาณ 4 มิลลิลิตรลงใน vial ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์แตกและปล่อย DNA ออกมา จากนั้นทำการเจือจางความเข้มข้นเซลล์ (Serial dilution) ให้มีความหนาแน่นของเซลล์เป็นครึ่งหนึ่งของความหนาแน่นเดิมโดยเริ่มจาก 5×10^5 ถึง 1.5625×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

- เตรียมตัวอย่างฟิล์มไฟโบรอินที่เพาะเลี้ยงตามช่วงเวลาต่างๆ มาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วล้างด้วย PBS จากนั้นใส่สาร SDS ลงไป ปริมาณ 1 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

- เตรียมสารละลาย Hoechst 33258 ปริมาณ 20 ไมโครลิตรผสมกับน้ำปราศจาก
ประจุปริมาณ 19 มิลลิลิตรและ SSC ปริมาณ 1 มิลลิลิตร

- นำสารมาตรฐานและตัวอย่างไปวัดปริมาณ DNA โดยให้นำตัวอย่างมาละลายที่
อุณหภูมิห้อง แล้วทำให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตรพ่นซ้ำหลายครั้ง
จากนั้นปิเปตสารละลายมา 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม

- เตรียมสารละลาย Hoechst 33258 ลงไป 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดปริมาณ
DNA ด้วยเครื่อง spectrofluorimeter ที่ช่วงความยาวคลื่น 355 และ 460 นาโนเมตร

นอกจากนี้ยังมีการ วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline
Phosphatase activity, ALP) การหาปริมาณแคลเซียมในช่วงเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน การ
วิเคราะห์โครงสร้าง-สร้างสัณฐาน (Morphology) ของเซลล์ด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด
(Scanning electron microscope, SEM) และการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของพื้นผิว ของ
ฟิล์มไฟโบรอินภายหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์แล้ว 28 วัน

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline Phosphatase
activity, ALP) [Hofmann, S. และคณะ 2007]

ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส ซึ่งกิจกรรมนี้เป็น Early
marker ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกที่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก โดยจะดูจากเอนไซม์
ALP ภายในเซลล์ ซึ่งมีขั้นตอนในการดำเนินการมีดังนี้

- เตรียมกราฟมาตรฐานจาก p-nitrophenol (ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์) ทำการ
เจือจางความเข้มข้น ของสารดังกล่าวให้มี ความเข้มข้น เป็นครึ่งหนึ่งของ ความเข้มข้น เดิมโดยเริ่ม
จาก 10 ถึง 0.0097 มิลลิโมลาร์

- นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์มาใส่ SDS ปริมาณ 1 มิลลิลิตรเพื่อให้เซลล์แตก
แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จาก
นั้นปิเปตตัวอย่างมา 20 ไมโครลิตร ใส่ลงในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม แล้วเติมสาร
p-nitrophenyl phosphate ซึ่งเป็นซับสเตรทของเอนไซม์ ปริมาณ 100 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุม
นำบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 5% แก๊สคาร์บอนได-ออกไซด์ เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้น หยุด
ปฏิกิริยาด้วยการเติม สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้น 0.02 นอร์มอล ปริมาณ 80
ไมโครลิตร โดยเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตสจะเปลี่ยน p-nitrophenyl phosphate ให้เป็น
p-nitrophenol และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ 405 นาโนเมตรด้วยเครื่อง
Micro plate reader

การวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียม (Calcium assay) [Takahashi Y. และคณะ, 2005]

ในการวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียม ซึ่งเป็น Late marker ของกระบวนการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อกระดูก มีขั้นตอนในการดำเนินการดังนี้

- เตรียมกราฟมาตรฐานจากสารละลาย แคลเซียมคาร์บอเนต ในกรดไฮโดรคลอริก (ความเข้มข้น 1 โมลาร์) จากนั้นทำการเจือจางความเข้มข้นของสารดังกล่าวให้มีความเข้มข้นเป็นครึ่งหนึ่งของความเข้มข้นเดิมโดยเริ่มจาก 2.5 ถึง 0.0097 มิลลิโมลาร์

- นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์มาใส่ SDS ปริมาณ 1 มิลลิลิตรเพื่อทำให้เซลล์แตก แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเปิดตัวอย่างมา 100 ไมโครลิตรใส่ลงในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 48 หลุม (48-well polystyrene tissue culture plates) แล้วเติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาณ 100 มิลลิลิตรเพื่อเพิ่มความสามารถในการย่อยแคลเซียม นำไปไว้ในตู้บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 5% แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปิดตัวอย่างมา 10 ไมโครลิตรใส่ลงในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 48 หลุมแล้วเติมสารละลาย ethanalamine buffer ความเข้มข้น 0.88 โมลาร์ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และสาร O-cresolphthalein complex substrate (OCPC) ความเข้มข้น 0.63 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 100 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน ซึ่งถ้าในตัวอย่างมีแคลเซียมอยู่จะทำปฏิกิริยากับ สาร OCPC และเปลี่ยนเป็นสาร Calcium-O-cresolphthalein complex ซึ่งมีสีม่วง นำสารที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Micro plate reader

การวิเคราะห์ลักษณะของเซลล์และองค์ประกอบทางเคมีของฟิล์มไฟโบรอิน

สำหรับการวิเคราะห์ลักษณะของเซลล์และธาตุแคลเซียม ฟอสฟอรัสที่เซลล์ผลิตขึ้นบนฟิล์มไฟโบรอิน ภายหลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 28 วัน จะใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM) และ Energy dispersive X-ray (EDX) โดยในการวิเคราะห์จะแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ การตรวจวัดปริมาณธาตุแคลเซียมและฟอสฟอรัสที่สะสมบนตัวเซลล์ และการตรวจวัดปริมาณธาตุแคลเซียมและฟอสฟอรัสที่สะสมบนพื้นผิวของฟิล์ม อย่างละ 6 จุด

3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในงานวิจัยนี้เปรียบเทียบค่าความแตกต่างของข้อมูล โดยจะเก็บตัวอย่างมา 4 ซ้ำแล้วนำข้อมูลมาหาค่าเฉลี่ย (Average) และค่าการเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation, SD) เพื่อศึกษาว่า ข้อมูลมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance : ANOVA) ด้วยโปรแกรมมินิแทบ (Minitab 14) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P-value < 0.05)

บทที่ 4

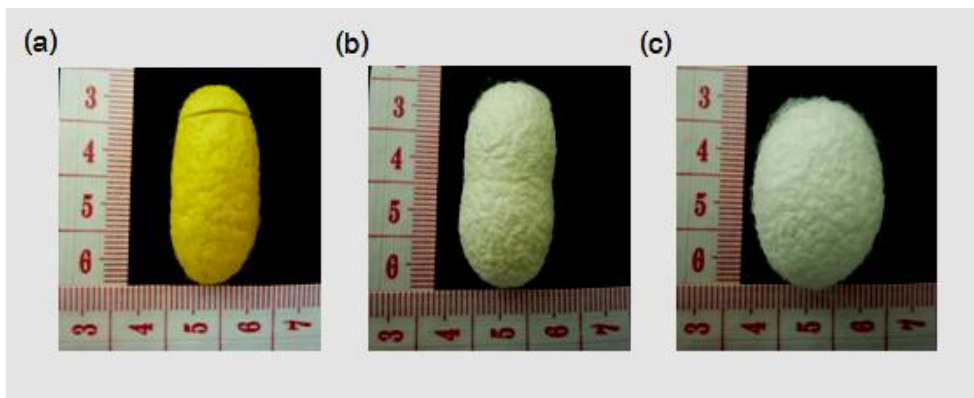
ผลการทดลอง และการวิเคราะห์ผลการทดลอง

ในการศึกษาคุณลักษณะและความเข้ากันได้ทางชีวภาพของไฟโบรอินจากไหมสายพันธุ์ต่างๆ นี้งไหมที่นำมาใช้ในการศึกษาเป็นไหมบ้านได้รับการสนับสนุนจากศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 3 สายพันธุ์ ประกอบด้วย สายพันธุ์ไทยจะเลือกใช้ไหมสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 สายพันธุ์ญี่ปุ่นจะเลือกใช้ไหมสายพันธุ์นครราชสีมา 1 และสายพันธุ์จีนจะเลือกใช้ไหมสายพันธุ์นครราชสีมา 2 ดังสรุปพร้อมสัญลักษณ์ในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 สัญลักษณ์ของสายพันธุ์ไหมที่ใช้ในการศึกษา

สายพันธุ์ของไหมที่ใช้ในการศึกษา	สัญลักษณ์
สายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1	NN
สายพันธุ์นครราชสีมา 1	K1
สายพันธุ์นครราชสีมา 2	K8

เมื่อพิจารณาจากลักษณะภายนอกของรังไหมในแต่ละสายพันธุ์พบว่า มีลักษณะภายนอกแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจน โดยรังไหมสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 จะมีลักษณะหัวป้านท้ายแหลม เปลือกรังไหมมีสีเหลืองสด ส่วนรังไหมสายพันธุ์นครราชสีมา 1 นั้น จะมีลักษณะคอดกลาง รังเล็กน้อย มีรูปร่างคล้ายฝักถั่วลิสง (Peanut shape) เปลือกรังไหมมีสีขาวอมเหลือง และรังไหมสายพันธุ์นครราชสีมา 2 จะมีลักษณะกลมรี เปลือกรังไหมมีสีขาว ดังแสดงในรูปที่ 4.1 เมื่อนำไฟโบรอินที่ได้มาผ่านกระบวนการเตรียมสารละลายด้วยสารละลายเทียมโบรไมด์ความเข้มข้น 9.3 โมลาร์ พบว่า สารละลายไฟโบรอินพันธุ์ นางน้อยศรีสะเกษ 1 มีสีเหลืองใส ในขณะที่สารละลายไฟโบรอินพันธุ์ นครราชสีมา 1 จะมีสีขาวอมเหลือง ส่วนสารละลายไฟโบรอินพันธุ์ นครราชสีมา 2 จะมีสีขาวขุ่น



รูปที่ 4.1 ลักษณะภายนอกของรังไหม (a) สายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 (NN) (b) สายพันธุ์นครราชสีมา 1 (K1) (c) สายพันธุ์นครราชสีมา 2 (K8)

4.1 สมบัติทางกายภาพของไฟโบรอิน

หลังจากนำรังไหมมาผ่านกระบวนการลอกกาไหมและกระบวนการไดอะไลซิสจนได้เป็นสารละลายไฟโบรอิน จากนั้นนำไปขึ้นรูปเป็นฟิล์มไฟโบรอินแล้ว ชักนำให้เกิดโครงสร้างแบบ β -sheet และผึ่งไว้ให้แห้ง (Air dry) ต่อมานำฟิล์มไฟโบรอินที่ได้มาทดสอบคุณลักษณะและสมบัติทางกายภาพของไฟโบรอินจากไหมแต่ละสายพันธุ์ ได้แก่ การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินด้วยเทคนิค SDS-PAGE การวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนเพื่อหาอุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว (Glass transition temperature; T_g) และอุณหภูมิการสลายตัว (Degradation temperature; T_d) การวิเคราะห์ค่า ศักย์เซต้า ของสารละลายไฟโบรอิน และการวิเคราะห์ค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มไฟโบรอิน

4.1.1 น้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอิน

ผลการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอิน แต่ละสายพันธุ์ ด้วยเทคนิค SDS-PAGE แสดงดังรูปที่ 4.2

จากรูปที่ 4.2 (a) เป็นผลการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE ที่ใช้ความเข้มข้นของเจลที่ 12% เมื่อนำไฟโบรอินที่ได้จากต่อมผลิตไหมส่วนท้าย (Posterior silk gland) ของหนอนไหม โดยมีวิธีการสกัดไฟโบรอินดังกล่าวแสดงในภาคผนวก ข ซึ่งเปรียบเสมือนโครงสร้างไฟโบรอินจากธรรมชาติ พบว่า มีแถบครอบคลุม (Smear band) เป็นช่วงกว้างตั้งแต่ 20-200 กิโลดาลตัน และพบมีแถบครอบคลุมที่น้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 200 กิโลดาลตัน ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นส่วน Heavy chain (H-chain) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 350 กิโลดาลตัน และเมื่อนำไฟโบรอินจากไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 (NN) มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค

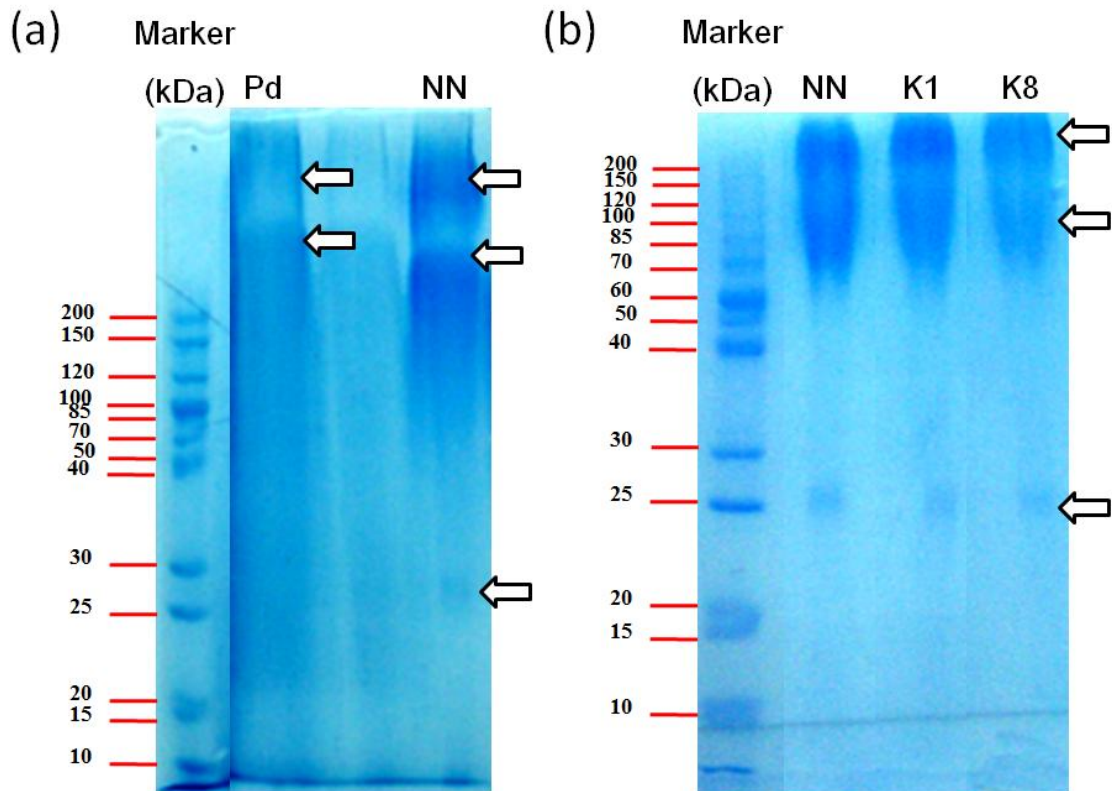
เดียวกันพบแถบน้ำหนักโมเลกุลที่ตำแหน่งเดียวกับที่พบใน ไฟโบรอินที่ได้จากต่อมผลิตใหม่ ส่วนท้ายของหนอนใหม่

เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินที่ได้จากใหม่ทั้ง 3 สายพันธุ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ที่ใช้ความเข้มข้นของเจลที่ 15% ซึ่งแสดงดังรูปที่ 4.2 (b) พบแถบน้ำหนักโมเลกุลที่ 25 กิโลดาลตัน นอกจากนี้ยังพบแถบครอบคลุมบริเวณที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 70-120 กิโลดาลตัน และพบแถบครอบคลุมบริเวณที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 200 กิโลดาลตัน ซึ่งสอดคล้องกับแถบครอบคลุมที่น้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 200 กิโลดาลตันในรูปที่ 4.2 (a) โดยทั่วไปโครงสร้างตามธรรมชาติของไฟโบรอินจะประกอบด้วยโครงสร้าง 3 ส่วน คือ ส่วน Heavy chain (H-chain), ส่วน Light chain (L-chain) และ P25 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 350, 25 และ 30 กิโลดาลตัน ตามลำดับ [Tanaka, K. และคณะ 1999]

ทั้งนี้จากรายงานของ Yamada, H. และคณะ [Yamada, H. และคณะ 2001] พบว่า เมื่อนำรังไหมสด มาละลายในสารละลายลิเทียมไธโอไซยาเนต (LISCN) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบแถบน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 25 กิโลดาลตัน และพบแถบครอบคลุมค่อนข้างจางที่บริเวณน้ำหนักโมเลกุล 350 กิโลดาลตัน ซึ่งคล้ายกับโครงสร้างตามธรรมชาติของไฟโบรอิน แต่เมื่อนำไหมที่ผ่านกระบวนการ ลอกกาไหมออกแล้วมาละลายในสารละลายลิเทียมไธโอไซยาเนต จะพบแถบครอบคลุมบริเวณน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 100 กิโลดาลตัน จากรายงานของ Vasconcelos A. และคณะ [Vasconcelos, A. และคณะ 2008] พบว่า เมื่อนำไหมที่ผ่านกระบวนการลอกกาไหม มาละลายใน สารละลายลิเทียมโบรไมด์ (LiBr) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พบ แถบครอบคลุมบริเวณน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 30-200 กิโลดาลตัน ในขณะที่รายงานของ Siri, S. และคณะ [Wadbua, P. และคณะ 2012] พบว่า หลังจากนำไหมที่ผ่านกระบวนการลอกกาไหมด้วย สารละลายแคลเซียมคาร์บอเนต (ไหม : สารละลายแคลเซียมคาร์บอเนตเท่ากับ 1:50 โดยน้ำหนัก ต่อปริมาตร) แล้วนำไหมมาละลายใน สารละลายลิเทียมโบรไมด์ความเข้มข้น 9 โมลาร์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พบแถบของน้ำหนักโมเลกุลชัดเจนที่ 25 กิโลดาลตันและแถบครอบคลุมบริเวณที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง

สำหรับสาเหตุที่ทำให้ พบแถบครอบคลุม ในช่วงน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 200 กิโลดาลตัน อาจเกิดจากการทำลายโครงสร้างไฟโบรอินในระหว่างกระบวนการลอกกาไหมและ กระบวนการเตรียมสารละลายไฟโบรอิน [Vasconcelos, A. และคณะ 2008, Wadbua, P. และ คณะ 2012, Tao, W. และคณะ 2007] รวมไปถึงเชิฐินบางส่วนที่ยังถูกกำจัดออกไปไม่หมด

จากผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่า ไฟโบรอินที่ได้จากไหมทั้ง 3 สายพันธุ์ซึ่งผ่านกระบวนการลอกการไหมและการเตรียมสารละลายไฟโบรอินโดยนำไหมมาละลายใน สารละลายลิเทียมโบรไมด์ความเข้มข้น 9.3 โมลาร์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จะประกอบไปด้วยสายโซ่ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเหมือนกัน



รูปที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอินแต่ละสายพันธุ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE (a) การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอิน โดยใช้ 12% SDS-PAGE เมื่อ Pd คือ Posterior silk gland (b) การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไฟโบรอิน โดยใช้ 15% SDS-PAGE เมื่อ NN คือ ไฟโบรอินสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1, K1 คือ ไฟโบรอินสายพันธุ์นครราชสีมา 1 และ K8 คือ ไฟโบรอินสายพันธุ์นครราชสีมา 2

4.1.2 สมบัติทางความร้อนของฟิล์มไฟโบรอิน

4.1.2.1 อุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้วของฟิล์มไฟโบรอิน (*Glass transition temperature; T_g*)

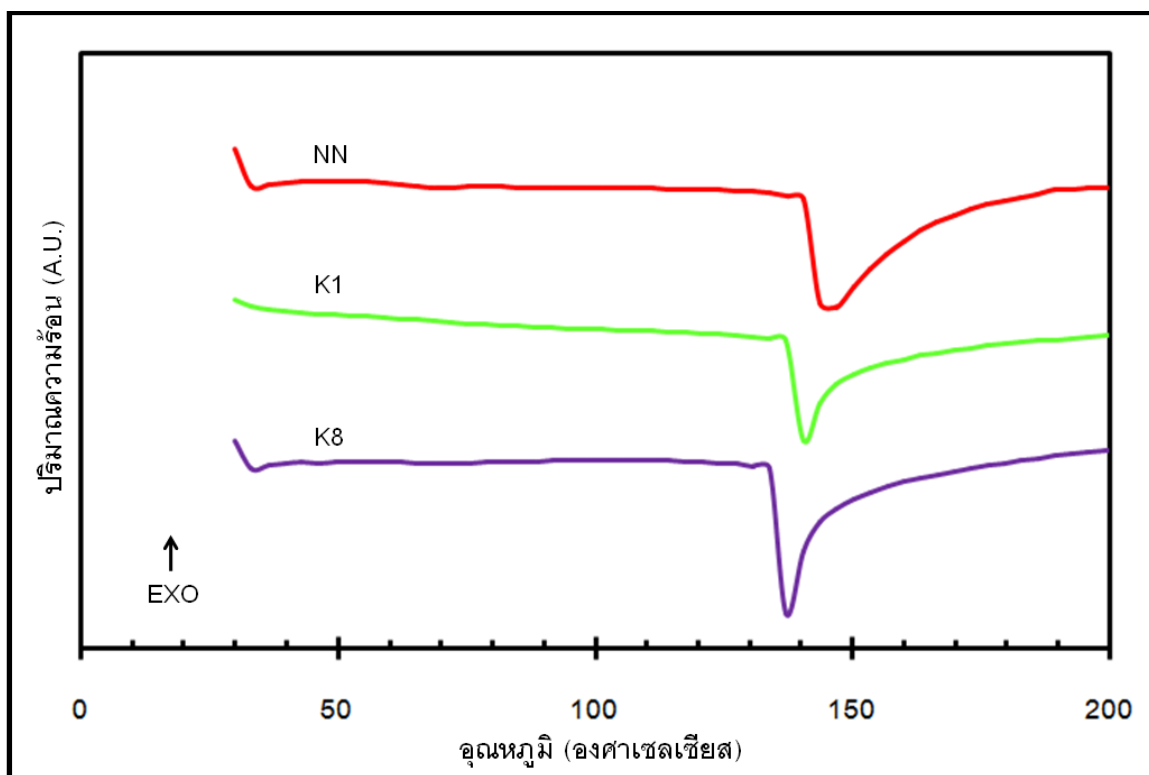
ผลการวิเคราะห์ ด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) ของฟิล์มไฟโบรอินทั้ง 3 สายพันธุ์แสดงดังรูปที่ 4.3 จะพบ Endothermic peak ซึ่งเมื่อใช้วิธีการตัดกราฟแบบ Linear interpolation แล้วจะได้ค่าอุณหภูมิของปรากฏการณ์ Endothermic ดังกล่าวของฟิล์มไฟโบรอินของสายพันธุ์ NN, K1 และ K8 เท่ากับ 144, 139 และ 136 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

จากรายงานของ Cilurzo, F. และคณะ [Cilurzo, F. และคณะ 2011] เมื่อนำไหมในสกุล *Bombyx mori* ที่ผ่านกระบวนการลอกกาวไหมและการเตรียมสารละลายไฟโบรอินโดยใช้สารผสมระหว่างแคลเซียมคลอไรด์, น้ำและเอทานอลในอัตราส่วน 1:8:2 (โดยโมล) จากนั้นนำสารละลายไฟโบรอินที่ได้ไปขึ้นรูปเป็นฟิล์ม พบอุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้วที่ 179 องศาเซลเซียส ส่วนรายงานของ Xu, Y. และคณะ [Xu, Y. และคณะ 2005] พบว่า เมื่อนำไฟโบรอินจากไหมบ้านที่ผ่านกระบวนการลอกกาวไหมแล้วมาละลายในสารละลายลิเทียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 9.3 โมลาร์ พบอุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้วเท่ากับ 175 องศาเซลเซียส

ทั้งนี้ยังมีรายงานของ Hu, X. และคณะ [Hu, X. และคณะ 2007] พบว่า โมเลกุลของน้ำที่อยู่ในฟิล์มไฟโบรอินที่ได้จากไหมบ้าน (รังไหมสายพันธุ์ญี่ปุ่นจาก Tsukuba, ญี่ปุ่น) มีผลต่ออุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว กล่าวคือ ถ้ามีโมเลกุลน้ำอยู่ในฟิล์มไฟโบรอินมากจะทำให้อุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้วต่ำลง ถ้าต้องการเห็นอุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้วที่ชัดเจน จะต้องกำจัดน้ำออกจาก ฟิล์มไฟโบรอิน ด้วยการนำฟิล์มดังกล่าวไปอบในตู้อบสุญญากาศเป็นเวลา 3 – 4 วันเพื่อกำจัดความชื้นและโมเลกุลของน้ำชนิด Freezing free water และเมื่อทำการศึกษาอุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้วด้วยเครื่อง DSC จะต้องมีการเพิ่มอุณหภูมิ จากนั้นลดอุณหภูมิลง ไปถึงอุณหภูมิต่ำและเพิ่มอุณหภูมิซ้ำอีกครั้ง เพื่อเป็นการกำจัดโมเลกุลของน้ำชนิด Non-freezing bound water ซึ่งเป็นพันธะที่เกิดจากอันตรกิริยาที่แข็งแรงระหว่างโมเลกุลของน้ำกับวัสดุพอลิเมอร์ (ในที่นี้คือ โมเลกุลไฟโบรอิน)

จากรายงานข้างต้นทำให้สามารถสันนิษฐานได้ว่า ค่าอุณหภูมิที่ได้จากการวิเคราะห์ปรากฏการณ์ Endothermic อาจจะเกิดจากการสลายพันธะของโมเลกุลของน้ำชนิด Non-freezing bound water ในฟิล์มไฟโบรอินซึ่งเป็นพันธะที่แข็งแรงและอาจจะมีได้ถูกกำจัดออก ทั้งนี้ส่งผลให้ Endothermic peak ที่เกิดขึ้นบดอาจบังอุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้วของ

ฟิล์มไฟโบรอินทั้ง 3 สายพันธุ์ ทำให้ไม่สามารถเห็นอุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้วของฟิล์มได้อย่างชัดเจน



รูปที่ 4.3 เทอร์โมแกรม (DSC thermogram) ของฟิล์มไฟโบรอินของแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) โดยช่วงอุณหภูมิ 30-200 องศาเซลเซียส อัตราการให้ความร้อน 5 องศาเซลเซียสต่อนาที และอัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 50 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อ NN คือ ไฟโบรอินสายพันธุ์ นางน้อยศรีสะเกษ1 , K1 คือ ไฟโบรอินสายพันธุ์ นครราชสีมา 1 และ K8 คือ ไฟโบรอินสายพันธุ์นครราชสีมา 2

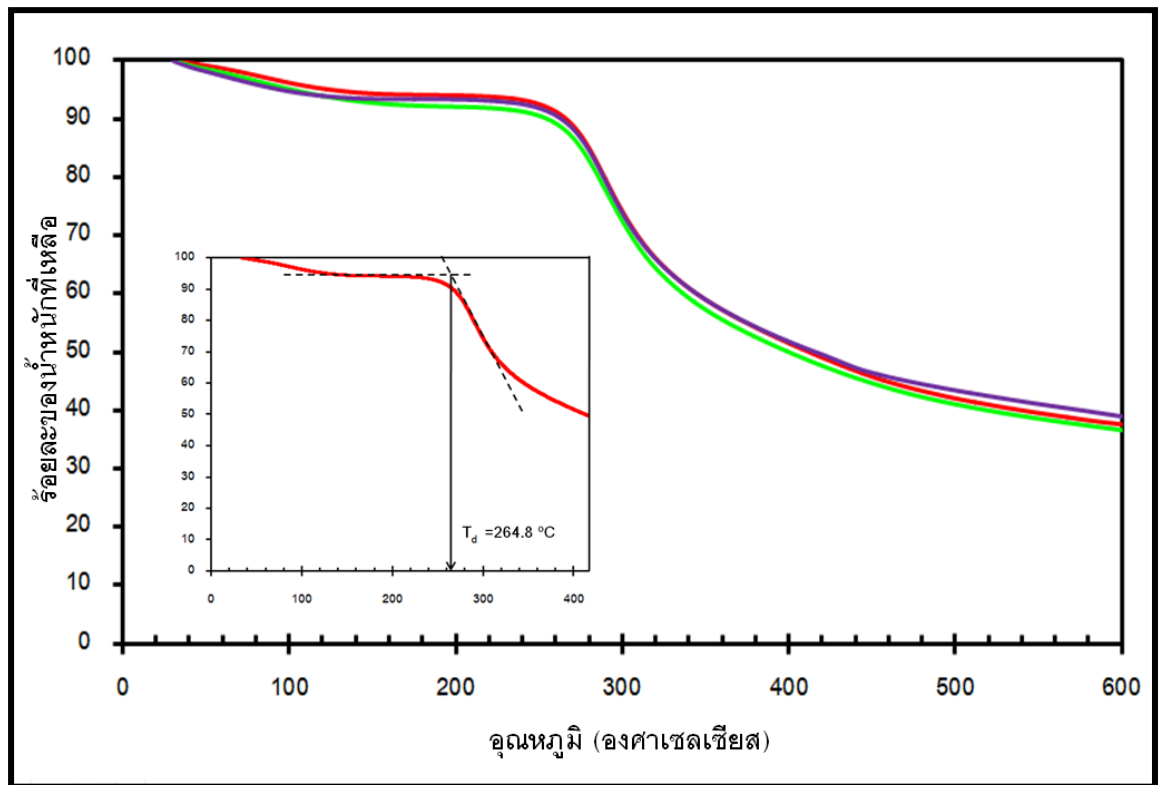
4.1.2.2 อุณหภูมิการสลายตัวของฟิล์มไฟโบรอิน (*Degradation temperature; T_d*)

ผลการศึกษาอุณหภูมิการสลายตัวของฟิล์มไฟโบรอินแต่ละสายพันธุ์ด้วยเครื่อง Thermogravimetric Analysis (TGA) แสดงในรูปที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าเทอร์โมแกรมมีลักษณะคล้ายคลึงกันและมีการสูญเสียน้ำหนักของฟิล์มไฟโบรอิน 2 ช่วง ได้แก่ ช่วงแรกของการสูญเสียน้ำหนักดังกล่าว เป็นการสลายตัวของน้ำซึ่งใช้เป็นตัวกลางในการเตรียมฟิล์มไฟโบรอิน เนื่องจากน้ำเป็นสารโมเลกุลเล็กจึงมีช่วงอุณหภูมิในการสลายตัวที่ต่ำคือ ช่วงอุณหภูมิประมาณ 100 องศาเซลเซียส ช่วงที่สองเป็นการสลายตัว (Degradation) ของโมเลกุลไฟโบรอิน โดยใช้การลากเส้นสัมผัสกับเส้นกราฟดังแสดงในรูปที่ 4.4 อุณหภูมิการสลายตัวของฟิล์มไฟโบรอินของแต่ละสายพันธุ์ ได้แก่ NN, K1 และ K8 มีค่าเท่ากับ 264.8, 264.2 และ 265.0 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

จากรายงานของ Lu, Q. และคณะ [Lu, Q. และคณะ 2010] พบว่า เมื่อนำฟิล์มไฟโบรอินที่ได้จากไหมบ้าน (รังไหมสายพันธุ์ญี่ปุ่นจากบริษัท Tajima Shoji, Yokohama, Japan) ไปแช่ในสารละลายเมทานอลความเข้มข้น 80% (โดยปริมาตร) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบอุณหภูมิการสลายตัวประมาณ 260 องศาเซลเซียส ในขณะที่รายงานของ Yuan, Q. และคณะ [Yuan, Q. และคณะ 2010] กล่าวว่า ฟิล์มไฟโบรอินที่ผ่านการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไฟโบรอินจากโครงสร้างแบบ Random coil ไปเป็นโครงสร้างแบบ β -sheet ด้วยการแช่ในสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 80% (โดยปริมาตร) เป็นเวลา 2, 5, 10, 20, 60 นาทีและ 24 ชั่วโมง พบว่า เมื่อเพิ่มเวลาการแช่ฟิล์มไฟโบรอินในสารละลายเอทานอลจะทำให้อุณหภูมิการสลายตัวลดลงจาก 300 องศาเซลเซียสเป็น 270 องศาเซลเซียส เนื่องจากความแตกต่างในการจัดเรียงตัวของระหว่างโดเมนที่เกิดความผิดปกติ (Disordered domain) กับโดเมนที่มีโครงสร้างแบบ β -sheet ซึ่งส่งผลต่ออุณหภูมิการสลายตัว นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Um, I.C. และคณะ [Um, I.C. และคณะ 2001] พบว่า ฟิล์มไฟโบรอินที่ได้จากไหมในสกุล *Bombyx mori* หลังจากนำไปแช่ในสารละลายเมทานอลเป็นเวลา 10 นาทีเพื่อเปลี่ยนแปลงโครงสร้างแบบ Random coil เป็นโครงสร้างแบบ β -sheet มีอุณหภูมิการสลายตัวอยู่ในช่วง 270 – 370 องศาเซลเซียส ซึ่งจะขึ้นอยู่กับสภาวะการสลายตัวของกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่เป็นสายข้าง (Side chain) และการสลายตัวของพันธะเปปไทด์

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ค่าอุณหภูมิการสลายตัวของฟิล์มไฟโบรอินทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันแต่มีค่าต่ำกว่ารายงานก่อนหน้านี้นี้เล็กน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก

ความแตกต่างในสภาวะที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจากโครงสร้างแบบ Random coil เป็นโครงสร้างแบบ β -sheet



รูปที่ 4.4 เทอร์โมแกรม (TGA Thermogram) ของฟิล์มไฟโบรอินของแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Thermogravimetric Analysis (TGA) เมื่อใช้ช่วงอุณหภูมิในการทดสอบ 30 – 600 องศาเซลเซียส อัตราการให้ความร้อน 10 องศาเซลเซียสต่อนาที และอัตราการให้แก๊สไนโตรเจน 90 มิลลิลิตรต่อนาที โดย (—) ฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 (NN), (—) ฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ญี่ปุ่น (K1) และ (—) ฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์จีน (K8)

4.1.3 ค่าศักย์ไฟฟ้าของสารละลายไฟโบรอิน

ผลการศึกษาค่าศักย์เซต้าของสารละลายไฟโบรอินแต่ละสายพันธุ์ใน สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH = 7.4) แสดงในตารางที่ 4.2 โดยสารละลายไฟโบรอินพันธุ์ NN มีค่าศักย์เซต้าเท่ากับ -3.88 ± 0.07 มิลลิโวลต์ ส่วนสารละลายไฟโบรอินพันธุ์ K1 และพันธุ์ K8 มีค่าศักย์เซต้าเท่ากับ -4.73 ± 0.06 และ -4.29 ± 0.27 มิลลิโวลต์ ตามลำดับ ทั้งนี้จะสังเกตได้ว่า ค่าศักย์เซต้าของสารละลายไฟโบรอินพันธุ์ K1 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายไฟโบรอินพันธุ์ NN แต่เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายไฟโบรอินพันธุ์ K8 พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จากผลการวิเคราะห์ค่าศักย์เซต้าซึ่งเป็น ค่าความต่างศักย์ทางไฟฟ้าระหว่างผิวของโมเลกุลกับบริเวณชั้นของประจุของสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH = 7.4) ที่ล้อมรอบโมเลกุลไฟโบรอินของไหมทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่า ค่าศักย์เซต้าของสารละลายไฟโบรอินทุกสายพันธุ์แสดงประจุเป็นลบเล็กน้อย

ตารางที่ 4.2 ค่าศักย์เซต้าของสารละลายไฟโบรอินแต่ละสายพันธุ์ เมื่อนำมาละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH = 7.4) ที่ความเข้มข้น 0.5% (โดยน้ำหนัก)

สายพันธุ์ของไหม	ค่าศักย์เซต้า (มิลลิโวลต์)
พันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 (NN)	-3.88 ± 0.07^a
พันธุ์ญี่ปุ่น (K1)	-4.73 ± 0.06^b
พันธุ์จีน (K8)	$-4.29 \pm 0.27^{a,b}$

(เมื่อ a และ b แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูล “ค่าศักย์เซต้าของสารละลายไฟโบรอิน”)

จากรายงาน Malay, Ö. และคณะ [Malay, Ö. และคณะ 2007] พบว่า เมื่อนำไหมบ้าน (จาก Bursa Institute for Silkworm Research, Bursa, Turkey) มาผ่านกระบวนการลอกกาไหมและเตรียมสารละลายไฟโบรอินด้วยสารละลายลิเทียมโบรไมด์ความเข้มข้น 9 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบค่า Isoelectric point หรือค่า IEP ของสารละลายไฟโบรอินอยู่ในช่วง 3.80 – 4.20 ส่วนรายงานของ Chen, B. และคณะ [Chen, B. และคณะ 2011] พบว่า เมื่อเตรียมสารละลายไฟโบรอินที่ได้จากไหมบ้าน (รังไหมสายพันธุ์จีนจาก College of Textiles and Garments, Southwest University, Chongqing, China) ด้วยสารละลายลิเทียมโบรไมด์ความ

เข้มข้น 9 โมลาร์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พบค่า IEP ประมาณ 4.20 ในขณะที่รายงานของ Wang, X. และคณะ [Wang, X. และคณะ 2007] พบว่า เมื่อเตรียมสารละลายไฟโบรอินจากไหมบ้าน (จาก Institute of Sericulture, Tsukuba, Japan) ด้วยสารละลายลิเทียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 9.3 โมลาร์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบค่า IEP ประมาณ 4.03 ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ค่าศักย์ゼต้าข้างต้น ดังนั้นเมื่อโมเลกุลไฟโบรอินอยู่ในสารละลายที่มีค่า $\text{pH} = 7.4$ จะทำให้สารละลายไฟโบรอินแสดงประจุเป็นลบ

4.1.4 ค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มไฟโบรอิน

ผลการศึกษาค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มไฟโบรอินแต่ละสายพันธุ์แสดงในตารางที่ 4.3 สำหรับฟิล์มไฟโบรอินพันธุ์ NN, K1 และ K8 มีค่ามุมสัมผัสของน้ำเท่ากับ 58.7 ± 3.5 , 49.5 ± 3.7 และ 52.2 ± 3.5 องศาตามลำดับ ทั้งนี้จะสังเกตได้ว่า ค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มไฟโบรอินพันธุ์ K1 มีค่าต่ำที่สุดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มไฟโบรอินพันธุ์ NN แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มไฟโบรอินพันธุ์ K8

ตารางที่ 4.3 ค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มไฟโบรอินแต่ละสายพันธุ์ด้วยวิธี Static sessile drop

สายพันธุ์ของไหม	ค่ามุมสัมผัสของน้ำ (องศา)
พันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 (NN)	58.7 ± 3.5^a
พันธุ์ญี่ปุ่น (K1)	49.5 ± 3.7^b
พันธุ์จีน (K8)	$52.2 \pm 3.5^{a,b}$

(เมื่อ a และ b แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูล “ค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มไฟโบรอิน”)

นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มไฟโบรอิน จากไหมบ้าน ดังสรุปในตารางที่ 4.4 พบว่า ค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มไฟโบรอินจะอยู่ในช่วงค่อนข้างกว้าง (55 – 68 องศา) จากผลการศึกษาพบว่า ค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มไฟโบรอินของไหมทั้ง 3 สายพันธุ์อยู่ในช่วงที่มีการรายงานดังที่สรุปไว้ในตารางที่ 4.4 ทั้งนี้ค่ามุมสัมผัสของน้ำที่ได้มีความแตกต่าง ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากปัจจัยหลายอย่าง เช่น แหล่งที่มาของรังไหม ตัวทำละลายที่ใช้ในการเตรียมสารละลายไฟโบรอิน การเตรียมฟิล์มไฟโบรอิน เป็นต้น

ตารางที่ 4.4 สรุปค่ามูมสัมพัทธ์ของน้ำบนฟิล์มไฟโบรอินจากไหมบ้าน

รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	แหล่งที่มาของรังไหม	ตัวทำละลายที่ใช้เตรียมสารละลายไฟโบรอิน	การเตรียมฟิล์มไฟโบรอิน	ค่ามูมสัมพัทธ์ของน้ำ (องศา)
Hofmann, S. และคณะ [Hofmann, S. และคณะ 2006]	บริษัท Trudel Silk Inc. (Zurich, Switzerland)	สารละลายลิเทียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 9 โมลาร์	แช่ฟิล์มไฟโบรอินใน สารละลายเมทานอลความ เข้มข้น 90% (โดยปริมาตร)	55.0
Murphy, A.R. และคณะ [Murphy, A.R. และคณะ 2008]	บริษัท Tajima Shoji (Yokohama, Japan)	สารละลายลิเทียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 9 โมลาร์	แช่ฟิล์มในสารละลายเมทา นอลเป็นเวลา 2 ชั่วโมง	58.0±5.0
Acharya, C. และคณะ [Acharya, C. และคณะ 2009]	West Bengal, India	สารละลายลิเทียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 9.3 โมลาร์	-	67.2±2.9
Du, C. และคณะ [Du, C. และคณะ 2009]	Huzhou Academy of Agricultural Science (Huzhou, China)	สารผสมระหว่างแคลเซียม คลอไรด์, น้ำและเอทานอลใน อัตราส่วน 1:8:2 (โดยโมล)	-	56.4±1.4
Zhu, H. และคณะ [Zhu, H. และคณะ 2012]	China National Silk Museum (Hangzhou, China)	สารผสมระหว่างแคลเซียม คลอไรด์, น้ำและเอทานอลใน อัตราส่วน 1:8:2 (โดยโมล)	-	67.7±1.0

ค่ามุมสัมผัสของของเหลวบนพื้นผิววัสดุที่เป็นของแข็งจะแสดงถึงความชอบน้ำ/ไม่ชอบน้ำของพื้นผิววัสดุ กล่าวคือ ถ้ามุมสัมผัสมีค่าน้อยแสดงว่า พื้นผิววัสดุมีความชอบน้ำ ในขณะที่ถ้าค่ามุมสัมผัสมีค่ามากแสดงว่า พื้นผิววัสดุมีความไม่ชอบน้ำ ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างค่ามุมสัมผัสของของเหลวกับพื้นผิววัสดุแสดงในตารางที่ 4.5 จากเกณฑ์ดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า พื้นผิวของฟิล์มไฟโบรอินจากไหมทั้ง 3 สายพันธุ์จัดอยู่ในกลุ่มวัสดุที่มีความชอบน้ำ โดยพื้นผิวของฟิล์มไฟโบรอินพันธุ์ K1 มีแนวโน้มที่จะมีความชอบน้ำมากที่สุด รองลงมาคือ พื้นผิวของฟิล์มไฟโบรอินพันธุ์ K8 และพื้นผิวของฟิล์มไฟโบรอินพันธุ์ NN มีแนวโน้มที่จะมีความชอบน้ำน้อยที่สุด

ตารางที่ 4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ามุมสัมผัสของของเหลวกับพื้นผิววัสดุ [Förch, R. และคณะ 2009]

ค่ามุมสัมผัสของของเหลว (θ ; องศา)	ระดับความชอบน้ำของพื้นผิววัสดุ
$\theta = 0$	พื้นผิววัสดุมีความชอบน้ำมาก (Hydrophilic)
$0 < \theta < 90$	พื้นผิววัสดุมีความชอบน้ำ (Less strongly hydrophilic)
$90 \leq \theta < 150$	พื้นผิววัสดุมีความไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic)
$\theta > 150$	พื้นผิววัสดุมีความชอบน้ำมาก (Superhydrophobic)

4.2 สมบัติทางเคมีของไฟโบรอิน

สำหรับ คุณสมบัติและสมบัติทางเคมี ของไฟโบรอินจากไหมสายพันธุ์ ต่างๆ จะทำการ ศึกษา โครงสร้างทางเคมีของฟิล์มไฟโบรอินด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FTIR) และวิเคราะห์หาปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนชนิด ต่างๆ ในสารละลายไฟโบรอินแต่ละสายพันธุ์ โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

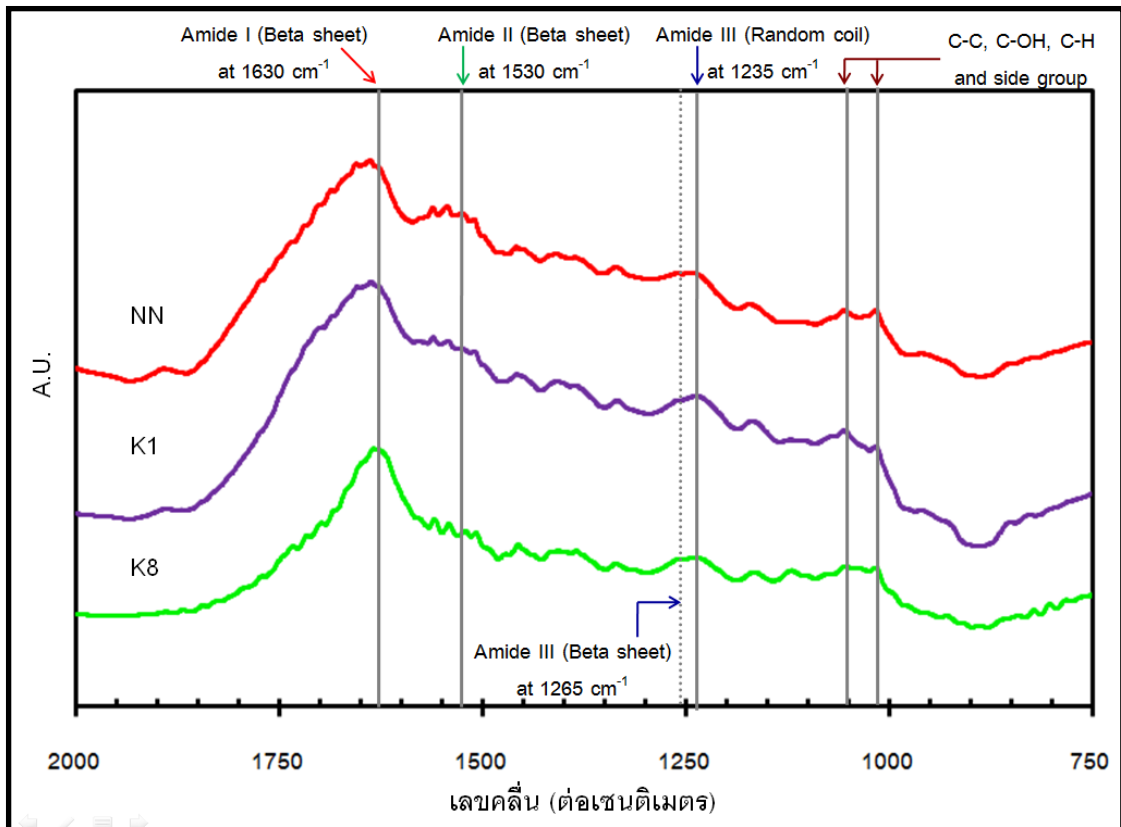
4.2.1 โครงสร้างทางเคมีของฟิล์มไฟโบรอิน

สำหรับการศึกษาสมบัติทางเคมีของฟิล์มไฟโบรอิน ด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FTIR) โดยใช้เทคนิค Attenuated Total Reflectance (ATR) เพื่อวิเคราะห์ หมู่ฟังก์ชันของฟิล์มไฟโบรอินภายหลังการแช่ในสารละลายเมทานอลความเข้มข้น 70% (โดย ปริมาตร) เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งเป็นการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจากโครงสร้างแบบ Random coil เป็นโครงสร้างแบบ β -sheet ผลการวิเคราะห์แสดงดังรูปที่ 4.5 พบว่า สเปกตรัมการ ดูดกลืนแสงของฟิล์มไฟโบรอินเกิดพีคที่ชัดเจน 3 ตำแหน่ง กล่าวคือ ตำแหน่งที่หนึ่งเกิดพีคที่เลข คลื่น 1630 ต่อเซนติเมตร ซึ่ง สอดคล้องกับพันธะเอไมด์ I (Amide I) ที่เกิดจากการสั่นแบบยืดของ พันธะ C=O (C=O stretching) ที่มีในโครงสร้างแบบ β -sheet ตำแหน่งที่สองเกิดพีคที่เลขคลื่น เท่ากับ 1530 ต่อเซนติเมตร โดยพีคที่ปรากฏสอดคล้องกับ พันธะเอไมด์ II (Amide II) ที่เกิดจาก การสั่นแบบงอของพันธะ N-H (N-H bending) และเกิดจากการ สั่นแบบยืดของพันธะ C-N (C-N stretching) ที่มีในโครงสร้างแบบ β -sheet และตำแหน่งที่สามจะพบ 2 พีค คือพีคแรกพบที่เลข คลื่น 1235 ต่อเซนติเมตร ซึ่งสอดคล้องกับ พันธะเอไมด์ III (Amide III) เกิดจากการสั่นแบบงอ ของพันธะ N-H (N-H deformation) และการสั่นแบบยืดของพันธะ C-N (C-N stretching) ที่มีใน โครงสร้างแบบ Radom coil/ α -helix พีคที่สองพบที่เลขคลื่น 1265 ต่อเซนติเมตร ซึ่งพีคนี้ สอดคล้องกับพันธะเอไมด์ III (Amide III) ที่มีในโครงสร้างแบบ β -sheet นอกจากนี้ยังพบพีคที่ ช่วงเลขคลื่นเท่ากับ 1020 และ 1050 ต่อเซนติเมตรแสดงถึงการสั่นของพันธะ C-C, C-OH และ C-H โดยพันธะเหล่านี้มักพบในโซ่ข้าง (Side chain) ของกรดอะมิโน [Mizi Fan, 2012] ดังนั้นจาก ผลการวิเคราะห์ แสดงให้เห็นว่า ไม่พบความแตกต่างของ หมู่ฟังก์ชัน บนฟิล์มไฟโบรอินแต่ละสาย พันธุ์

จากรายงานวิจัยของ Nogueira, G.M. และคณะ [Nogueira, G.M. และคณะ 2010] กล่าวว่า เมื่อนำรังไหมบ้าน (จาก Bratac, São Paulo, Brazil) ที่ผ่านการลอกกาไหมและละลายใน สารละลายผสมระหว่างแคลเซียมคลอไรด์ :น้ำ:เอทานอล (1:8:2โดยโมล) ที่อุณหภูมิ 85 องศา

เซลเซียส จากนั้นนำมาขึ้นเป็นเมมเบรนและชักนำไปเปลี่ยนแปลงโครงสร้างด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 70% (โดยปริมาตร) พบว่า เมื่อนำมาทดสอบด้วยเครื่อง FTIR จะพบพีคที่ 1623 และ 1527 ต่อเซนติเมตร ซึ่งสอดคล้องกับ พันธะเอไมด์ I (Amide I) และพันธะเอไมด์ II (Amide II) ที่อยู่ในโครงสร้างแบบ β -sheet

ทั้งนี้จากรายงานของ Murphy, A.R. และคณะ [Murphy, A.R. และคณะ 2008] พบว่า ฟิล์มไฟโบรอินจากไหมบ้าน (จากบริษัท Tajima Shoji, Yokohama, ญี่ปุ่น) ที่ผ่านการลอกกาวยไหมและละลายในสารละลายลิเทียมโบรไมด์ความเข้มข้น 9 โมลาร์ มาแช่ในสารละลายเมทานอลเป็นเวลา 2 ชั่วโมงเพื่อชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นโครงสร้างแบบ β -sheet พบพีคแรกที่เลขคลื่น 1630 ต่อเซนติเมตรซึ่งแสดงถึงพันธะเอไมด์ I (Amide I) ที่อยู่ในโครงสร้างแบบ β -sheet พีคที่สองพบที่เลขคลื่นเท่ากับ 1520 ต่อเซนติเมตร โดยพีคที่ปรากฏนี้สอดคล้องกับ พันธะเอไมด์ II (Amide II) ที่อยู่ในโครงสร้างแบบ β -sheet สำหรับพีคที่สามพบที่ เลขคลื่นเท่ากับ 1270 ต่อเซนติเมตร ซึ่งสอดคล้องกับพันธะเอไมด์ III (Amide III) ที่อยู่ในโครงสร้างแบบ β -sheet และพีคสุดท้ายพบที่ เลขคลื่น 1235 ต่อเซนติเมตร ซึ่งสอดคล้องกับ พันธะเอไมด์ III (Amide III) ที่มีโครงสร้างแบบ Radom coil



รูปที่ 4.5 สเปกตรัมการดูดกลืนของฟิล์มไฟโบรอินฟิล์มไฟโบรอินแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งวิเคราะห์ ด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FTIR) เมื่อ NN คือ ฟิล์มไฟโบรอินพันธุ์ นางน้อยศรีสะเกษ 1, K1 คือ ฟิล์มไฟโบรอินพันธุ์นครราชสีมา 1 และ K8 คือ ฟิล์มไฟโบรอินพันธุ์ นครราชสีมา 2

4.2.2 ปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนในสารละลายไฟโบรอิน

ผลการวิเคราะห์หา ปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนในสารละลายไฟโบรอิน สายพันธุ์ต่างๆ ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) แสดงดังตารางที่ 4.6 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบหลักของไฟโบรอิน ได้แก่ ไกลซีน (Gly) อะลานีน (Ala) เซอรีน (Ser) และไทโรซีน (Tyr) เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานวิจัยของ Suzuki, Y. และคณะ [Suzuki, Y. และคณะ 2009] ที่มีการนำรังไหมบ้าน (Shunrei×Shogetsu) มาวิเคราะห์ พบว่า ปริมาณของกรดอะมิโนแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของแหล่งที่มาของรังไหมที่ใช้ในการทำการทดลองและขั้นตอนในการเตรียมสารละลายไฟโบรอิน

เมื่อพิจารณาการแบ่งประเภทของกรดอะมิโนตามลักษณะของโซ่ข้าง (Side chain) สามารถแบ่งได้ดังนี้ [Mhuka, V. และคณะ 2013]

- ก.) โซ่ข้างแสดงประจุบวก (Positive side chain) ได้แก่ อาร์จินีน ไลซีน และฮิสทีดีน
- ข.) โซ่ข้างแสดงประจุลบ (Negative side chain) ได้แก่ แอสปาร์ติก และกลูตามิค
- ค.) โซ่ข้างแสดงควมมีขั้วแต่ไม่มีประจุ (Polar side chain) ได้แก่ เซอรีน ทรีโอนีน ซิสทีอีน
- ง.) โซ่ข้างเป็นอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน (Aliphatic side chain) ได้แก่ ไกลซีน อะลานีน วาลีน ลิวซีน โพรลีน ไอโซลิวซีน และเมทไธโอนีน
- จ.) โซ่ข้าง เป็นอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Aromatic side chain) ได้แก่ ฟีนิลอะลานีน ไทโรซีน และทริปโต-แฟน

โดย โซ่ข้างแสดงประจุบวก โซ่ข้างแสดงประจุลบ และโซ่ข้างแสดงควม มีขั้วแต่ไม่มีประจุจัดอยู่ในกลุ่มของกรดอะมิโนที่มีความชอบน้ำ (Hydrophilicity) ในขณะที่โซ่ข้าง เป็น อะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน และโซ่ข้าง เป็นอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน จัดอยู่ในกลุ่มของกรดอะมิโนที่มีความไม่ชอบน้ำ (Hydrophobicity) ดังแสดงในตารางที่ 4.7 พบว่า ผลรวมเปอร์เซ็นต์โดยโมล เมื่อพิจารณากลุ่มอะมิโนที่มีความชอบน้ำของ สารละลายไฟโบรอิน พันธุ์ NN, K1 และ K8 มีค่าเท่ากับ 18.33, 22.93 และ 22.83 ตามลำดับ ในทางตรงกันข้าม ผลรวมเปอร์เซ็นต์โดยโมล เมื่อพิจารณากลุ่มอะมิโนที่มีความไม่ชอบน้ำของ สารละลายไฟโบรอิน พันธุ์ NN มีค่าเท่ากับ 81.67 ส่วน สารละลายไฟโบรอินพันธุ์ K1 และพันธุ์ K8 มีค่าเท่ากับ 77.07 และ 77.17 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า สารละลายไฟโบรอินพันธุ์ K1 มีค่า ผลรวมเปอร์เซ็นต์โดยโมล เมื่อพิจารณากลุ่มอะมิโนที่มีความชอบน้ำมากที่สุด รองลงมาคือ สารละลายไฟโบรอิน พันธุ์ K8 และสารละลายไฟโบรอิน พันธุ์ NN มีค่าต่ำที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ ค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มไฟโบรอิน กล่าวคือ

ฟิล์มไฟโบรอิน พันธุ์ K1 มีค่ามอดุลัสต่ำที่สุด รองลงมาคือ ฟิล์มไฟโบรอิน พันธุ์ K8 และฟิล์มไฟโบรอิน พันธุ์ NN โดยค่ามอดุลัสของของเหลวบนพื้นผิววัสดุที่เป็นของแข็งจะแสดงถึงความชอบน้ำ/ไม่ชอบน้ำของพื้นผิววัสดุ ถ้ามอดุลัสมีค่าน้อยแสดงว่า พื้นผิววัสดุมีความชอบน้ำ ในขณะที่ถ้าค่ามอดุลัสมีค่ามากแสดงว่า พื้นผิววัสดุมีความไม่ชอบน้ำ ดังนั้นสามารถเรียงลำดับความชอบน้ำของไฟโบรอินจากมากไปหาน้อยดังนี้ สายพันธุ์ K1 > สายพันธุ์ K8 > สายพันธุ์ NN ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 และสายพันธุ์ K8 ได้มาจากรังไหมที่มีลักษณะทางสายพันธุ์เป็นพันธุ์ต่างประเทศและ เป็นไหมชนิดฟักออกตามธรรมชาติปี ละ 2 ครั้ง (Bivoltine) ในขณะที่ไฟโบรอินพันธุ์ NN ได้มาจากรังไหมที่มีลักษณะทางสายพันธุ์เป็นพันธุ์ไทยแท้และ เป็นไหมชนิดฟักออกตามธรรมชาติปีละหลายครั้ง (Polyvoltine) ด้วยเหตุนี้จึงอาจทำให้สมบัติของไฟโบรอินที่ได้จากหนอนไหมมีความแตกต่างกัน และอาจส่งผลถึงสมบัติ ความชอบน้ำ/ไม่ชอบน้ำของพื้นผิววัสดุ

ตารางที่ 4.6 ปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ในสารละลายไฟโบรอินของไหมบ้านแต่ละสายพันธุ์

ลำดับ	ชนิดของกรดอะมิโน	เปอร์เซ็นต์โดยโมล (%)			
		สายพันธุ์ NN	สายพันธุ์ K1	สายพันธุ์ K8	Suzuki, Y. และคณะ 2009
1	ไกลซีน (Gly)	38.32	33.00	35.76	44.40
2	อะลานีน (Ala)	34.29	31.26	29.39	29.30
3	เซอรีน (Ser)	13.42	16.87	16.30	12.10
4	ไทโรซีน (Try)	5.75	7.66	7.16	5.20
5	แอสปาร์ติก (Asp)	1.63	2.08	2.18	1.30
6	วาลีน (Val)	1.15	1.67	1.53	2.20
7	กลูตามิก (Glu)	1.15	1.52	1.51	1.00
8	ฟีนิลอะลานีน (Phe)	0.98	1.69	1.39	0.60
9	ฮิสทีดีน (His)	0.83	0.81	1.02	0.30
10	ทรีโอนีน (Thr)	0.80	1.08	1.08	0.90
11	โพรลีน (Pro)	0.42	0.64	0.64	0.30
12	อาร์จินีน (Arg)	0.30	0.31	0.44	0.60
13	ลิวซีน (Leu)	0.27	0.38	0.43	0.50
14	ทริปโตแฟน(Trp)	0.21	0.33	0.45	0.30
15	ไลซีน (Lys)	0.20	0.26	0.30	0.30
16	ไอโซลิวซีน (Ile)	0.20	0.31	0.32	0.70
17	เมทไธโอนีน (Met)	0.08	0.13	0.10	0.00
18	ซิสทีอีน (Cys)	0.00	0.00	0.00	0.00
รวม		100	100	100	100

หมายเหตุ: Suzuki, Y. และคณะ 2009 ศึกษาองค์ประกอบของกรดอะมิโนจากสารละลายไฟโบรอินของไหมบ้าน (Shunrei×Shogetsu) จาก Usui Seishi Agricultural Association (ญี่ปุ่น) โดยนำรังไหมบ้านมาผ่านกระบวนการลอกการไหมด้วยสารละลายยูเรียความเข้มข้น 8 โมลาร์และเตรียมสารละลายไฟโบรอินด้วยสารละลายลิเทียมโบรไมด์ความเข้มข้น 9 โมลาร์

ตารางที่ 4.7 เปรอร์เซ็นต์โดยโมลของ ปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ใน สารละลายไฟโบรอินของไหมแต่ละสายพันธุ์ เมื่อพิจารณาแบ่งตามกลุ่มความชอบน้ำ (Hydrophilicity) และความไม่ชอบน้ำ (Hydrophobicity)

ลักษณะของโซ่ข้าง (Side chain)	เปอร์เซ็นต์โดยโมล		
	พันธู์นางน้อยคีรีสะเกษ 1 (NN)	พันธู์ญี่ปุ่น (K1)	พันธู์จีน (K8)
กรดอะมิโนในกลุ่มที่มีความชอบน้ำ (Hydrophilicity)			
โซ่ข้างแสดงประจุบวก (Positive side chain)	1.33	1.38	1.76
โซ่ข้างแสดงประจุลบ (Negative side chain)	2.78	3.60	3.69
โซ่ข้างแสดงควมมีขั้วแต่ไม่มี ประจุ (Polar side chain)	14.22	17.95	17.38
ผลรวมกลุ่มที่มีความชอบน้ำ	18.33	22.93	22.83
กรดอะมิโนในกลุ่มที่มีความไม่ชอบน้ำ (Hydrophobicity)			
โซ่ข้างเป็นอะลิฟาติก ไฮโดรคาร์บอน (Aliphatic side chain)	74.73	67.39	68.17
โซ่ข้างเป็นอะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน (Aromatic side chain)	6.94	9.68	9.00
ผลรวมกลุ่มที่มีความไม่ชอบน้ำ	81.67	77.07	77.17

4.3 สมบัติทางชีวภาพของฟิล์มไฟโบรอิน

4.3.1 การยึดเกาะ (Attachment) และการเจริญเติบโต (Proliferation) ของเซลล์ L929 บนฟิล์มไฟโบรอิน

ในการ ทดสอบการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ L929 บนฟิล์มไฟโบรอินแต่ละสายพันธุ์ทำเพื่อศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพฟิล์มไฟโบรอิน โดยตรวจวัดจำนวนเซลล์ด้วยวิธี MTT assays แสดงผลในรูปที่ 4.6 และ รวมถึงคำนวณร้อยละของการยึดเกาะของเซลล์ L929, เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของ เซลล์ L929 (μ) ซึ่งแสดงในตารางที่ 4.8

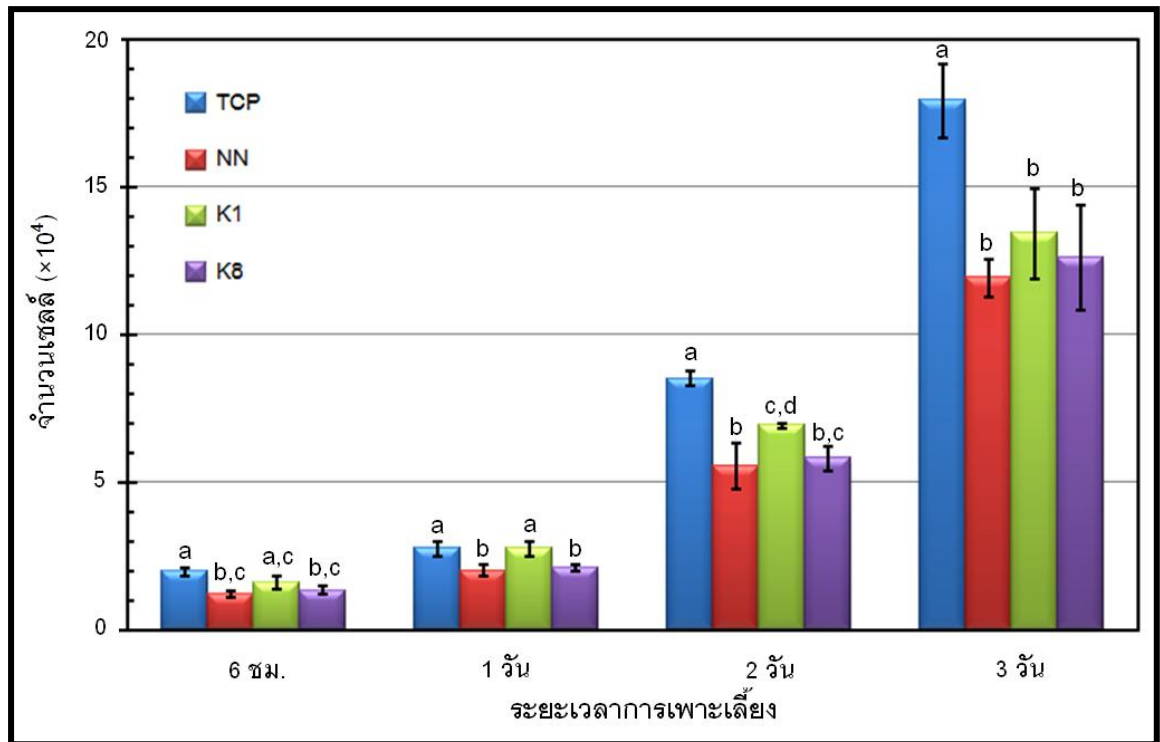
ผลการ ทดสอบการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ L929 บนฟิล์มไฟโบรอินแต่ละสายพันธุ์พบว่า ฟิล์มไฟโบรอินทั้ง 3 สายพันธุ์มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพและช่วยส่งเสริมให้มีการเจริญเติบโตของเซลล์ L929 เพิ่มมากขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาการยึดเกาะของจำนวน เซลล์ L929 บนฟิล์มไฟโบรอินแต่ละสายพันธุ์ที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง พบว่า ร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะ บนฟิล์มไฟโบรอินพันธุ์ NN, K1 และ K8 มีค่าประมาณ 60.6, 79.4 และ 66.9 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า เซลล์ L929 สามารถยึดเกาะบนฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 ได้ดีมากกว่าฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์อื่น แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ ภาตเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน (TCP) ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมในการทดลอง พบว่า ร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะบนภาตเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน มีค่าประมาณ 98.1 ซึ่งมากกว่าค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะบนฟิล์มไฟโบรอินทั้ง 3 สายพันธุ์ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

หลังจากนั้นเมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 1 , 2 และ 3 วัน เพื่อ ศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ L929 บนภาตเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน และฟิล์มไฟโบรอิน สายพันธุ์ต่างๆ พบว่า เซลล์เจริญเติบโตบนภาตเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีนได้มากกว่า ฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ต่างๆ โดยพิจารณาจากค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (Population doubling time, PDT) ของเซลล์ ซึ่งคำนวณจากช่วงการเพาะเลี้ยง 1-2 วัน แสดงดังรูปในภาคผนวก ง. พบว่า ค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ ของเซลล์ที่เจริญเติบโตบนภาตเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีนมีค่าเท่ากับ 14.8 ± 1.3 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Theerakittayakorn, K. และคณะ [Theerakittayakorn, K. และคณะ 2011] ที่ว่า ค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ ของเซลล์ L929 เท่ากับ 14 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวบน ภาตเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน โดยใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1×10^4 เซลล์/หลุม

ส่วน ค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ ของเซลล์ที่เจริญเติบโตบนฟิล์มไฟโบรอิน พันธุ์ NN, K1 และ K8 มีค่าประมาณ 16.5 ± 1.7 , 18.1 ± 1.6 และ 16.5 ± 2.1 ชั่วโมง ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า ค่าเวลาการ

แบ่งตัวทวีคูณ ของเซลล์บนฟิล์มไฟโบรอิน สายพันธุ์ต่างๆ มีค่ามากกว่า ค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ ของเซลล์บนสภาพเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน ส่วนฟิล์มไฟโบรอินพันธุ์ NN และสายพันธุ์ K8 มีค่า เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ ของเซลล์ใกล้เคียงกัน และมีแนวโน้มน้อยกว่า ค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ ของเซลล์บนฟิล์มไฟโบรอินพันธุ์ K1 แต่เมื่อทดสอบทางสถิติ พบว่า ค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ ของ เซลล์บนสภาพเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน และฟิล์มไฟโบรอิน ทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาการเพาะเลี้ยงเซลล์ในวันที่ 3 แสดงในรูปที่ 4.6 พบว่า จำนวนเซลล์ที่เจริญเติบโตบนสภาพเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีนมีค่ามากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ที่เจริญเติบโตบนฟิล์มไฟโบรอิน แต่เมื่อเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่ เจริญเติบโตบน ฟิล์มไฟโบรอิน แต่ละสายพันธุ์ พบว่า ฟิล์มไฟโบรอิน ทั้ง 3 สายพันธุ์มีค่าใกล้เคียง กัน และไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ฟิล์มไฟโบรอินพันธุ์ทั้ง 3 สายพันธุ์มีความเข้ากันได้ทาง ชีวภาพและช่วยส่งเสริมให้มีการเจริญเติบโตของเซลล์ L929 โดย ฟิล์มไฟโบรอิน พันธุ์ K1 มีแนวโน้มที่จะช่วยสนับสนุนเซลล์ในการยึดเกาะได้ดีกว่า ฟิล์มไฟโบรอิน สายพันธุ์อื่นเล็กน้อย แต่เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของเซลล์ L929 บนฟิล์มไฟโบรอินทั้ง 3 สายพันธุ์พบว่าไม่มีความ แตกต่างกัน



รูปที่ 4.6 จำนวนเซลล์ L929 ที่ยึดเกาะและเจริญเติบโต บนฟิล์มไฟโบรอินพ่นอุ้งนางน้อย ศรีสะเกษ 1 (NN) ฟิล์มไฟโบรอินพ่นอุ้งนครราชสีมา 1 (K1) และฟิล์มไฟโบรอินพ่นอุ้งนครราชสีมา 2 (K8) เปรียบเทียบกับ ถาดเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน (TCP) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ปริมาณเซลล์ที่ใช้ 1×10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร

(a, b, c และ d แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ เมื่อพิจารณาในช่วงเวลาเดียวกัน)

ตารางที่ 4.8 ร้อยละการยึดเกาะของเซลล์ L929, เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ของเซลล์ L929 บนฟิล์มไฟโบรอินแต่ละสายพันธุ์

ชนิดของวัสดุ	ร้อยละของการยึดเกาะของเซลล์ L929	เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (ชั่วโมง)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (ต่อชั่วโมง)
ถาดเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน (TCP)	98.1±6.3 ^a	14.8±1.3 ^d	4.7±0.4×10 ⁻² ^e
ฟิล์มไฟโบรอินพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 (NN)	60.6±6.2 ^{b,c}	16.5±1.7 ^d	4.2±0.4×10 ⁻² ^e
ฟิล์มไฟโบรอินพันธุ์นครราชสีมา 1 (K1)	79.4±10.8 ^{a,c}	18.1±1.6 ^d	3.9±0.4×10 ⁻² ^e
ฟิล์มไฟโบรอินพันธุ์นครราชสีมา 2 (K8)	66.9±6.3 ^{b,c}	16.5±2.1 ^d	4.3±0.5×10 ⁻² ^e

- เมื่อ a, b และ c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูล “ร้อยละของการยึดเกาะของเซลล์ L929”

- เมื่อ d แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูล “เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ”

- เมื่อ e แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูล “อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ L929”

4.3.2 การยึดเกาะ (Attachment) และการเจริญเติบโต (Proliferation) ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูบนฟิล์มไฟโบรอิน

ในการ ทดสอบการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูบนฟิล์มไฟโบรอินแต่ละสายพันธุ์ทำเพื่อศึกษา ความเข้ากันได้ทางชีวภาพเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูบนฟิล์มไฟโบรอิน โดยการตรวจวัดจำนวนเซลล์ด้วยวิธี MTT assays แสดงผลในรูปที่ 4.8 รวมถึงคำนวณร้อยละของการยึดเกาะของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู , เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (μ) ซึ่งแสดงในตารางที่ 4.9

ผลการทดสอบการ ยึดเกาะของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูบนภาด เพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน และฟิล์มไฟโบรอิน สายพันธุ์ต่างๆ ในระยะเวลา 6 ชั่วโมง พบว่า ร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะบนภาดเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีนที่ใช้เป็นตัวควบคุมในการทดลอง มีค่าประมาณ 95.6 ส่วนร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะบนฟิล์มไฟโบรอินพันธุ์ NN, K1 และ K8 มีค่าประมาณ 68.9, 81.1 และ 78.9 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูสามารถยึดเกาะบนภาดเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีนได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบการยึดเกาะของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูบนฟิล์มไฟโบรอิน พบว่า ฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 มีแนวโน้มในการช่วยส่งเสริมให้เซลล์ยึดเกาะได้ดีกว่าฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ K8 และสายพันธุ์ NN เล็กน้อย

เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู พบว่า เซลล์เจริญเติบโตบนภาดเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีนได้มากกว่า ฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ต่างๆ โดยพิจารณาจาก ค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (Population doubling time, PDT) ของเซลล์ในช่วงระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่ 1-3 วัน แสดงดังรูปในภาคผนวก จ. ซึ่งสามารถคำนวณค่า เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ ของเซลล์ที่เจริญเติบโตบนภาดเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีนได้เท่ากับ 27.9 ± 1.4 ชั่วโมง จากรายงานของ Vachiraroj และคณะ [Vachiraroj และคณะ, 2009] กล่าวว่า เมื่อเพาะเลี้ยง เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู โดยใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 2×10^4 เซลล์ต่อ หลุมในภาดเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน พบว่า มีค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณของเซลล์ประมาณ 26.0-26.3 ชั่วโมง นอกจากนี้จากงานวิจัยของรุ่งนภา แยมเดช (2555) ได้รายงานค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณของ เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูบนภาดเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีนประมาณ 25.7-26.3 ชั่วโมง ซึ่งใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 2×10^4 เซลล์/ หลุม จะเห็นได้ว่า ค่า เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ ของเซลล์ ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูที่รายงานข้างต้นมีค่าใกล้เคียงกันกับค่าที่ได้จากผลการทดสอบนี้

เมื่อเปรียบเทียบ ค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ ของเซลล์ที่ เจริญเติบโตบนฟิล์มไฟโบรอิน พันธุ์ NN, K1 และ K8 มีค่าประมาณ 36.0 ± 1.1 , 34.5 ± 1.4 และ 36.4 ± 1.4 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งเมื่อทดสอบทางสถิติ พบว่า ค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ ของเซลล์บนฟิล์มไฟโบรอินทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่มีค่ามากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ ค่าเวลาการแบ่งตัวทวีคูณของเซลล์บนสภาพเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูเจริญเติบโตบนฟิล์มไฟโบรอินทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ในอัตราการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกัน แต่ยังช้ากว่าบนสภาพเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน ดังนั้นเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นวันที่ 7 จึงพบว่า จำนวนเซลล์ที่เจริญเติบโตบนสภาพเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน มีค่ามากที่สุดและมากกว่า จำนวนเซลล์ที่เจริญเติบโตบน ฟิล์มไฟโบรอิน สายพันธุ์ต่างๆ ประมาณ 26-31% สำหรับจำนวนเซลล์ที่เจริญเติบโตบน ฟิล์มไฟโบรอิน ในแต่ละสายพันธุ์ พบว่า มีจำนวนเซลล์ใกล้เคียงกัน ซึ่งผลการทดสอบนี้มีแนวโน้มเดียวกันกับผลการทดสอบการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ L929 บนฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ต่างๆ

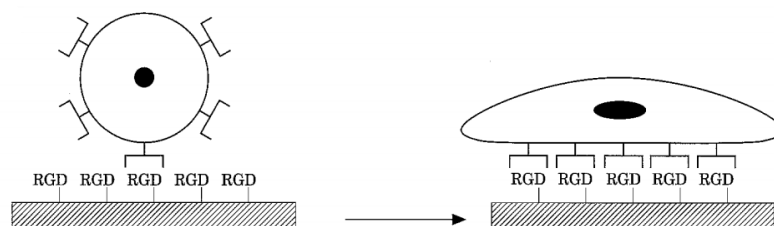
สำหรับการยึดเกาะและแผ่กระจายตัวของเซลล์ สามารถอธิบายได้ด้วย สมบัติทางเคมีกายภาพ (Physicochemical properties) ของพื้นผิววัสดุและการดูดซับของโปรตีน สำหรับกลไกของกระบวนการแบ่งออกเป็น 2 ส่วน กล่าวคือ ส่วนแรกเซลล์จะยึดเกาะกับวัสดุแบบไม่เฉพาะเจาะจง โดยขึ้นกับสมบัติทาง เคมีกายภาพ ของวัสดุ ซึ่งวัสดุที่มีความชอบน้ำจะช่วยส่งเสริมให้มีการยึดเกาะ การแผ่ขยายตัวของเซลล์และการจัดเรียงตัวของ ไซโทสเกเลตอน (Cytoskeleton) ของเซลล์ได้ดีกว่าวัสดุที่ไม่ชอบน้ำ และส่วนที่สองเซลล์จะมีการยึดเกาะกับวัสดุแบบเฉพาะเจาะจงกับโปรตีนบนพื้นผิววัสดุ ซึ่งพบว่าไฟโบรเนคติน เป็นโปรตีนที่สามารถส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์ได้ดี โดยการจับกับอินทีกริน (Integrins) บนเยื่อหุ้มเซลล์ [Yang, M. และคณะ 2004]

ดังนั้นจากเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้นจึง คาดว่า ความชอบน้ำของวัสดุน่าจะมีบทบาทสำคัญในการยึดเกาะของเซลล์ โดยถ้าพื้นผิววัสดุที่มีความชอบน้ำจะช่วยส่งเสริมให้เซลล์สามารถยึดเกาะได้ดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบการยึดเกาะ การเจริญเติบโตของเซลล์ L929 และเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูบนฟิล์มไฟโบรอิน สายพันธุ์ต่างๆ เนื่องจากฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 มีความชอบน้ำมากกว่า ฟิล์มไฟโบรอินอีกสองสายพันธุ์ เมื่อพิจารณาจาก ค่ามัมส์สัมผัสของน้ำบนฟิล์มไฟโบรอินและปริมาณของกรดอะมิโนในกลุ่มที่มีความชอบน้ำของสารละลายไฟโบรอิน ซึ่งแสดงในตารางที่ 4.3 และ 4.7 ตามลำดับ ประกอบกับการพิจารณาความแตกต่างของลักษณะทางสายพันธุ์ที่แสดงในตารางที่ 2.2 จะพบว่า ไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 และสายพันธุ์ K8 ได้มาจากรังไหมที่มี

ลักษณะทางสายพันธุ์เป็นพันธุ์ต่างประเทศและ เป็นใหม่ชนิดฟักออกตามธรรมชาติปี ละ 2 ครั้ง (Bivoltine) และมีแนวโน้มที่จะมีความชอบน้ำมากกว่าไฟโบรอินพันธุ์ NN ซึ่งได้มาจากรังไหมที่มีลักษณะทางสายพันธุ์เป็นพันธุ์ไทยแท้และ เป็นใหม่ชนิดฟักออกตามธรรมชาติปีละหลายครั้ง (Polyvoltine)

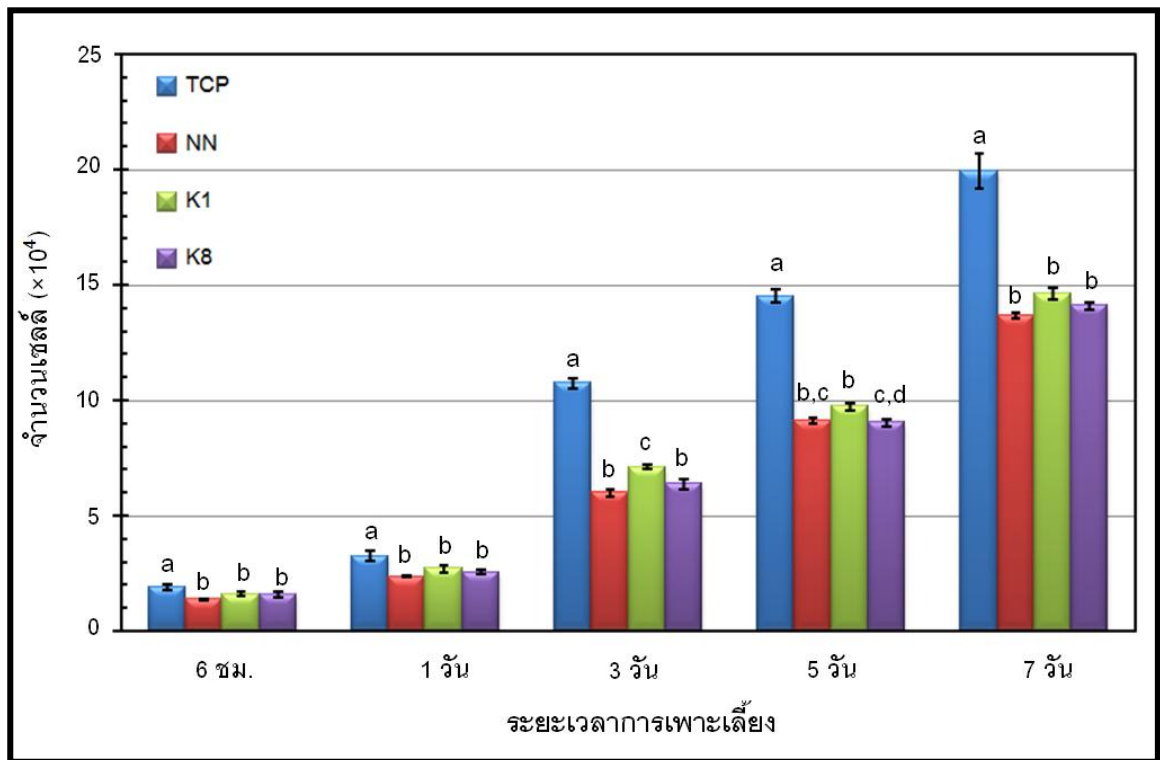
จากรายงานที่ผ่านมา ไหมไฟโบรอินเป็นชีววัสดุที่ได้รับการยอมรับว่ามีความเข้ากันได้ทางชีวภาพที่ดี ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ แต่ไม่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ดีเท่ากับโปรตีนในกลุ่มคอลลาเจนและเจลาติน ดังในรายงานของ Acharya, C. และคณะ [Acharya, C. และคณะ 2008] พบว่า เซลล์ L929 สามารถเจริญเติบโตบนฟิล์มคอลลาเจนได้ดีกว่าฟิล์มไฟโบรอินจากไหมสกุล *Bombyx mori* เมื่อใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 4×10^4 เซลล์ต่อตัวอย่าง นอกจากนี้ Vachiraroj, N. และคณะ [Vachiraroj, N. และคณะ 2009] รายงานว่า เซลล์ไลน์กระดูก (MC3T3-E1) และ เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนฟิล์มไฟโบรอิน ผสมเจลาติน จะเห็นได้ว่า คอลลาเจนและเจลาตินช่วยสนับสนุนในการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ เนื่องจากคอลลาเจนและเจลาตินมีลำดับกรดอะมิโน RGD (Arg-Gly-Asp) ซึ่งอินทีกรินที่อยู่บนเยื่อหุ้มของเซลล์จะจับกับลำดับกรดอะมิโนดังกล่าว ทำให้เซลล์สามารถ ยึดเกาะบนวัสดุได้ดียิ่งขึ้น [Pierschbacher, M. D. และคณะ 1984] ดังแสดงในรูปที่ 4.7

ส่วน ถาดเพาะ เลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน ที่มีขายโดยทั่วไปจะมีการปรับปรุงพื้นผิวของถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยพลาสมาแก๊สออกซิเจน ทำให้พื้นผิวมีประจุลบและความชอบน้ำเพิ่มขึ้น ซึ่งช่วยให้เซลล์ยึดเกาะและแผ่ขยายตัวได้ดีขึ้น [http://www.corning.com/lifesciences/us_canada/en/technical_resources/surfaces/culture/stc_treated_polystyrene.aspx]



รูปที่ 4.7 อันตรกิริยาระหว่างอินทีกรินบนเยื่อหุ้มเซลล์กับลำดับกรดอะมิโน RGD

[Walluscheck, K.P. และคณะ 1996]



รูปที่ 4.8 จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูที่ยึดเกาะและเจริญเติบโตบนฟิล์มไฟโบรอินพันธุ๋นางน้อยศรีสะเกษ 1 (NN) ฟิล์มไฟโบรอินพันธุ๋นครราชสีมา 1 (K1) และฟิล์มไฟโบรอินพันธุ๋นครราชสีมา 2 (K8) เปรียบเทียบกับถาดเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน (TCP) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด α -MEM ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ปริมาณเซลล์ที่ใช้ 1×10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร

(a, b, c และ d แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ เมื่อพิจารณาในช่วงเวลาเดียวกัน)

ตารางที่ 4.9 ร้อยละการยึดเกาะของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู , เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู บนฟิล์มไฟโบรอินแต่ละสายพันธุ์

ชนิดของวัสดุ	ร้อยละของการยึดเกาะของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู	เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (ชั่วโมง)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (ต่อชั่วโมง)
ธาตุปะเลียงเซลล์พอลิไตรีน (TCP)	95.6±5.1 ^a	27.9±1.4 ^d	2.5±0.1×10 ⁻² ^f
ฟิล์มไฟโบรอินพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 (NN)	68.9±1.9 ^{b,c}	36.0±1.1 ^e	1.9±0.1×10 ⁻² ^g
ฟิล์มไฟโบรอินพันธุ์นครราชสีมา 1 (K1)	81.1±5.1 ^{a,c}	34.5±1.4 ^e	2.0±0.1×10 ⁻² ^g
ฟิล์มไฟโบรอินพันธุ์นครราชสีมา 2 (K8)	78.9±6.9 ^{b,c}	36.4±1.4 ^e	1.9±0.1×10 ⁻² ^g

- เมื่อ a, b และ c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูล “ร้อยละของการยึดเกาะของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู”
- เมื่อ d และ e แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูล “เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ”
- เมื่อ f และ g แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูล “อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์”

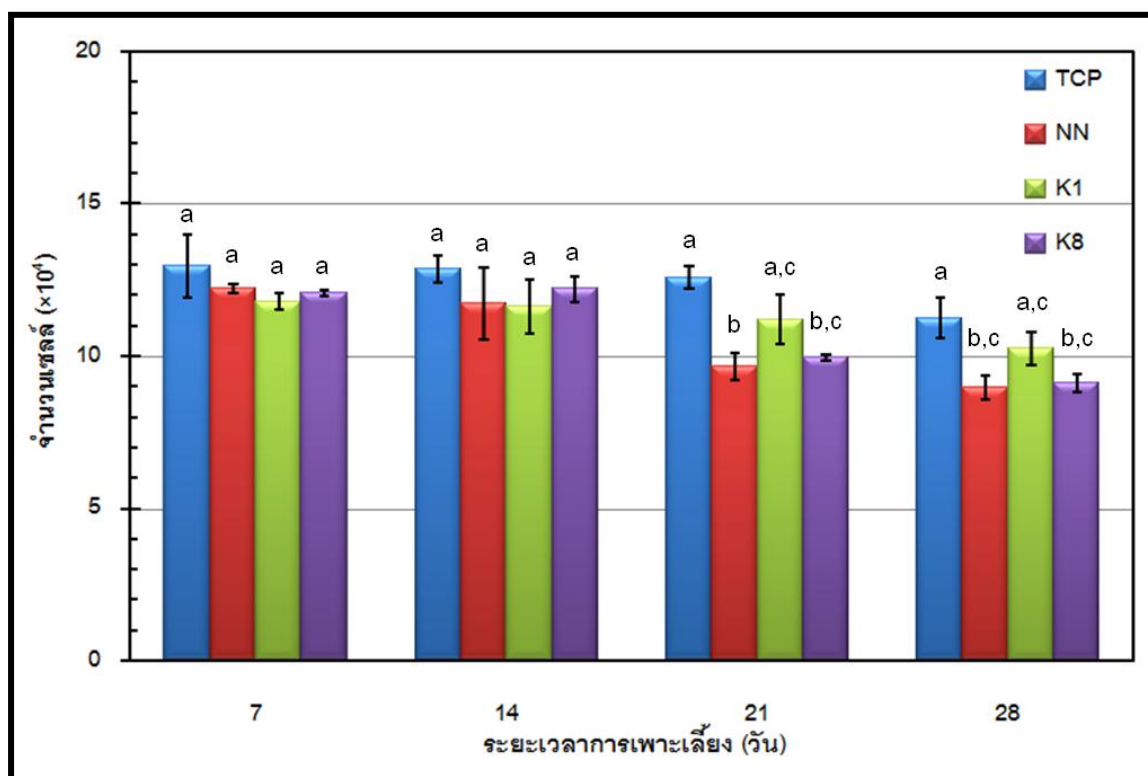
4.3.3 การเปลี่ยนแปลงไปเป็น เซลล์กระดูก (Differentiation) ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูบนฟิล์มไฟโบรอิน

การทดสอบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูบนฟิล์มไฟโบรอินแต่ละสายพันธุ์ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่างๆ ได้แก่ 7, 14, 21 และ 28 วัน โดยทำการวัดจำนวนเซลล์ ด้วยวิธี DNA assays แสดงผลในรูปที่ 4.9 จากผลการทดสอบจะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเซลล์ ปริมาณเซลล์มีแนวโน้มลดลงเล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องมาจากการใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติมสารที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก (Osteogenic differentiation media; OM) โดยทั่วไปเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด OM เซลล์จะต้องมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกทำให้การแบ่งตัวของเซลล์ลดลง [Belmonte และคณะ 2005] โดยในระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ 7 และ 14 วัน ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่ 21 และ 28 วัน พบว่า ปริมาณเซลล์บนถาดเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเซลล์ที่เจริญเติบโตบนฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ต่างๆ แต่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ที่เจริญเติบโตบนฟิล์มไฟโบรอินแต่ละสายพันธุ์นั้นไม่พบ ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จากงานวิจัยของรุ่งนภา แยมเดช (2555) พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยง เซลล์เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก บนถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ พอลิสไตรีน ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด OM จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก ลดลงแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละช่วงเวลา ซึ่งสอดคล้องกับผลทดสอบข้างต้น จากรูปที่ 4.10 แสดงค่า กิจกรรมของเอนไซม์แอลคาร์ไนด์ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase; ALP) ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่างๆ บนฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด OM พบว่า ในช่วงระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 7-14 วัน ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลคาร์ไนด์ฟอสฟาเตส มีค่าเพิ่มขึ้น และมีค่าสูงสุดที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเซลล์ 14 วัน หลังจากนั้นค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลคาร์ไนด์ฟอสฟาเตส มีค่าลดลง เมื่อพิจารณาที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเซลล์ 14 วัน พบว่า ถาดเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน มีปริมาณ ALP น้อยที่สุด สำหรับฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 มีปริมาณ ALP สูงกว่าฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ NN และสายพันธุ์ K8 โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ K8 แต่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ NN ทั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ Kim, H.J. และคณะ [Kim, H.J. และคณะ 2005] ที่กล่าวว่า เมื่อเติมสาร β -Glycerophosphate, Dexamethasone, L-ascorbic และ Hexose monophosphate ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ส่งเสริมให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ต้องการในอาหารเลี้ยงเซลล์ สามารถ

ส่งเสริมให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อกระดูก (Osteogenic differentiation) และ ปริมาณ กิจกรรมของเอนไซม์แอลคาร์โบไนฟอสฟาเตส ที่เซลล์สร้างขึ้นถือเป็นสัญญาณการ เปลี่ยนเป็นกระดูกช่วงแรก หรือ Early maker โดยจะเกิดขึ้นในช่วงสองสัปดาห์แรกของการ เพาะเลี้ยงเซลล์ จากรายงานของ Colelho, M.J. และคณะ [Colelho, M.J. และคณะ 2000] กล่าวว่า เมื่อเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของมนุษย์ด้วย การใช้อาหารเพาะเลี้ยง เซลล์ 2 ชนิด คือ Alpha modified eagle's medium (α -MEM) และ Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) ที่มีส่วนผสมของ Dexamethasone, β -glycerophosphate และ Ascorbic acid พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด α -MEM ที่ผสมสารกระตุ้นทั้ง 3 ชนิดสามารถ ช่วยกระตุ้นให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกได้ ดีกว่าอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มีส่วนผสมของสารดังกล่าว

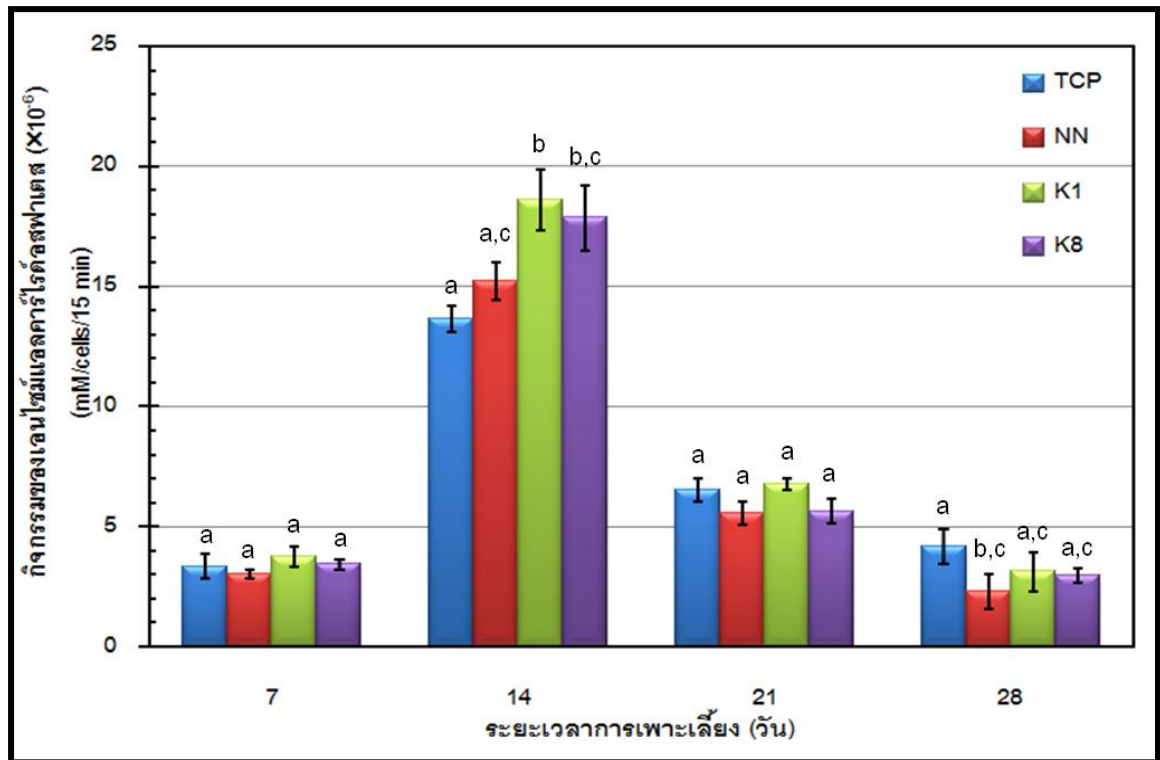
จากผลการวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมที่เซลล์สร้าง ขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ชนิด OM ดังแสดงในรูปที่ 4.11 พบว่า ปริมาณแคลเซียมสะสมบนฟิล์มไฟโบรอินทั้ง 3 สายพันธุ์มี ปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเซลล์ เพิ่มขึ้น และพบ ปริมาณแคลเซียมสูงที่สุดที่ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเซลล์ 28 วัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Komori, T. และคณะ [Komori, T. และคณะ 1998] ที่กล่าวว่า ปริมาณ แคลเซียมที่เกิดขึ้นเป็น Late marker ที่แสดงว่าเซลล์ต้น กำเนิดมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก เมื่อพิจารณาที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่ 28 วัน พบว่า ปริมาณแคลเซียมที่เกิดจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ต่างๆ มีค่ามากกว่า ที่เพาะเลี้ยงบนภาดเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีนประมาณ 44% ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ฟิล์มไฟโบรอิน ส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกได้ดีกว่าภาดเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน เมื่อพิจารณา ฟิล์มไฟโบรอินแต่ละสายพันธุ์ พบว่า ปริมาณแคลเซียมสะสมที่ตรวจพบไม่มีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญ แต่มีแนวโน้มว่าปริมาณแคลเซียมสะสมบนฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 มีค่า มากกว่าฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ NN และ K8 เล็กน้อย ซึ่งอาจจะเกิดจากฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 มีสมบัติความชอบน้ำมากกว่าฟิล์มไฟโบรอินอีกสองสายพันธุ์ โดยพิจารณาจากความแตกต่าง ของลักษณะทางสายพันธุ์ ค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มไฟโบรอินและผลปริมาณของกรดอะมิโน กลุ่มที่มีความชอบน้ำของสารละลายไฟโบรอิน ซึ่งแสดงในตารางที่ 2.2 , 4.3 และ 4.7 ตามลำดับ ทำให้ฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 มีแนวโน้มที่ ช่วยส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์ได้มากกว่าฟิล์ม ไฟโบรอินสายพันธุ์อื่น และอาจส่งผลให้เซลล์สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกได้ดีกว่าด้วย

จากผลการทดลองที่ได้กล่าวมาข้างต้นอาจกล่าวได้ว่า फिल्मไฟโบรอินทั้งสามสายพันธุ์ ช่วยส่งเสริมให้เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกเปลี่ยนแปลงไปเป็น เซลล์กระดูกได้ดีกว่าสภาพเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน และฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 มีแนวโน้มช่วยส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงไปเป็น เซลล์กระดูกได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ NN และ K8

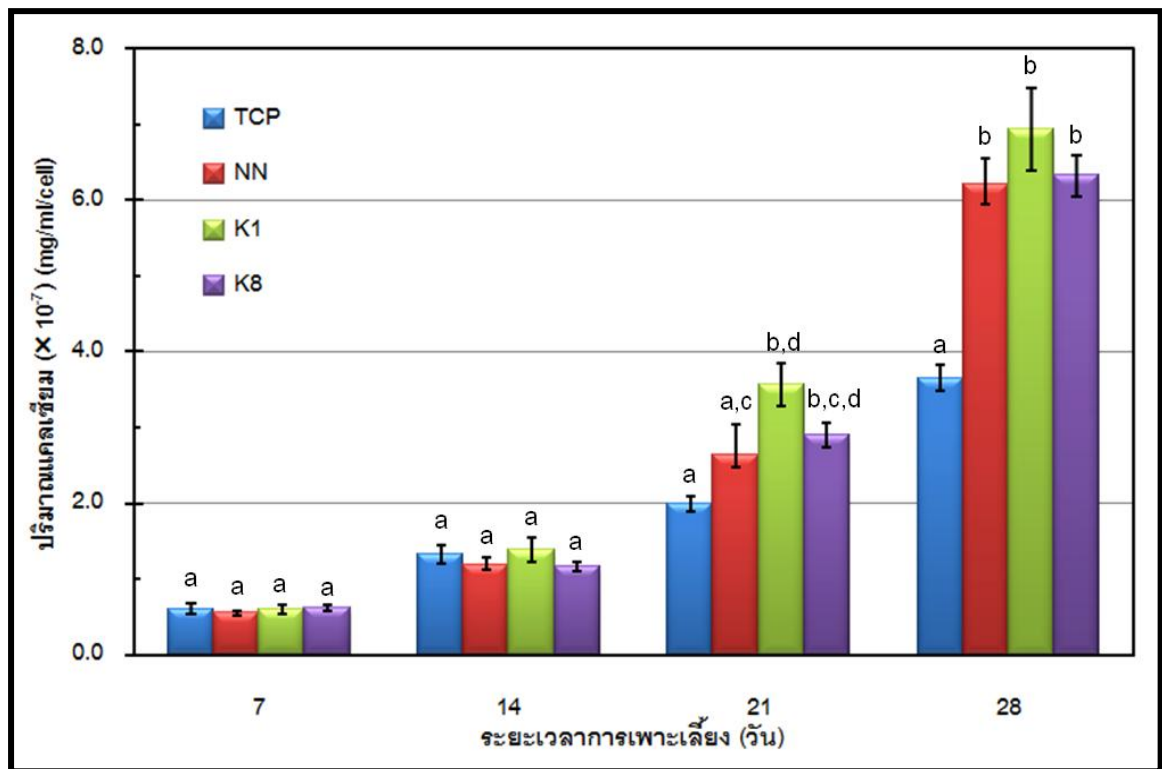


รูปที่ 4.9 จำนวนเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของ หนู (MSC) ที่เจริญเติบโตบนสภาพเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน (TCP) फिल्मไฟโบรอินพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 (NN) फिल्मไฟโบรอินพันธุ์นครราชสีมา 1 (K1) และฟิล์มไฟโบรอินพันธุ์นครราชสีมา 2 (K8) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติมสารที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก (Osteogenic differentiation media; OM) ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ปริมาณเซลล์ที่ใช้ 2.5×10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร

(a, b และ c, แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ เมื่อพิจารณาในช่วงเวลาเดียวกัน)



รูปที่ 4.10 กิจกรรมของเอนไซม์ แอลคาลาร์ไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase; ALP) บนภาคเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน (TCP) พิล์มไฟโบรอินพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 (NN) พิล์มไฟโบรอินพันธุ์นครราชสีมา 1 (K1) และพิล์มไฟโบรอินพันธุ์นครราชสีมา 2 (K8) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติมสารที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก (Osteogenic differentiation media; OM) ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส , 5% แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ปริมาณเซลล์ที่ใช้ 2.5×10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร (a, b และ c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% , $p < 0.05$ เมื่อพิจารณาในช่วงเวลาเดียวกัน)



รูปที่ 4.1.1 ปริมาณแคลเซียม (Calcium content) บนสภาพเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิไตรีน (TCP) ฟิล์มไฟโบรอินพันธุ nang น้อยศรีสะเกษ 1 (NN) ฟิล์มไฟโบรอินพันธุ นครราชสีมา 1 (K1) และฟิล์มไฟโบรอินพันธุ นครราชสีมา 2 (K8) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติมสารที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก (Osteogenic differentiation media; OM) ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 2.5×10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร (a, b, c และ d แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% , $p < 0.05$ เมื่อพิจารณาในช่วงเวลาเดียวกัน)

ผลการตรวจวัดปริมาณธาตุแคลเซียมและฟอสฟอรัสด้วยวิธี Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX) ที่มีอยู่บนตัวอย่างฟิล์มไฟโบรอินทั้ง 3 สายพันธุ์ แสดงในตารางที่ 4.10 และรูปที่ 4.12-4.14 โดยในการวิเคราะห์จะ แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ การตรวจวัดปริมาณธาตุแคลเซียมและฟอสฟอรัสที่สะสมบนตัวเซลล์ และการตรวจวัดปริมาณธาตุแคลเซียมและฟอสฟอรัสที่สะสมบนพื้นผิวของฟิล์ม ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด OM เป็นระยะเวลา 28 วัน

จากการวิเคราะห์ปริมาณธาตุแคลเซียมและฟอสฟอรัสที่เกิดขึ้นและสะสมบนตัวเซลล์ พบว่าเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ของธาตุแคลเซียม และฟอสฟอรัสที่ตรวจพบ บนฟิล์มไฟโบรอิน ทั้ง 3 สายพันธุ์มีค่าใกล้เคียงกัน และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อพิจารณา ค่าอัตราส่วนโดยน้ำหนักระหว่างแคลเซียมต่อฟอสฟอรัส ของฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ NN, K1 และ K8 มีค่าเท่ากับ 1.54 ± 0.05 , 1.60 ± 0.09 และ 1.46 ± 0.09 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันเช่นกัน

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณธาตุแคลเซียมและฟอสฟอรัส ที่เกิดขึ้นและสะสมบนพื้นผิวฟิล์ม พบว่าเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ของธาตุแคลเซียม ที่ตรวจพบบนฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 มีค่ามากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ของธาตุแคลเซียมบนฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ NN และสายพันธุ์ K8 ทั้งนี้เมื่อพิจารณา ค่าอัตราส่วนโดยน้ำหนักระหว่างแคลเซียมต่อฟอสฟอรัส ที่เกิดขึ้นและสะสมบนพื้นผิวฟิล์ม พบว่า ฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ NN, K1 และ K8 มีค่าเท่ากับ 1.28 ± 0.04 , 1.58 ± 0.02 และ 1.07 ± 0.05 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า ฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 เป็นฟิล์มไฟโบรอินที่มีค่า อัตราส่วนโดยน้ำหนักระหว่างแคลเซียมต่อฟอสฟอรัส ที่ตรวจพบบนพื้นผิวฟิล์มใกล้เคียงกับที่ตรวจพบบนตัวเซลล์ ในขณะที่ฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ NN และสายพันธุ์ K8 มีค่าอัตราส่วนดังกล่าวน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม ค่าที่ได้จากการทดสอบมีค่าต่ำกว่าและไม่สอดคล้องกับรายงานของ Zhang, L. และคณะ [Zhang, L. และคณะ 2009] ที่กล่าวว่า ค่าอัตราส่วนระหว่างแคลเซียมต่อฟอสฟอรัสในสารประกอบเชิงซ้อนของแคลเซียมและฟอสเฟตจะแตกต่างกันตามประเภทของสารประกอบ เช่น สารประกอบไฮดรอกซีอะพาไทต์มีอัตราส่วนโดยน้ำหนัก Ca/P เท่ากับ 2.15 (อัตราส่วนโดยโมล Ca/P เท่ากับ 1.67), โบฟาสิกแคลเซียมฟอสเฟตมี อัตราส่วนโดยน้ำหนัก Ca/P เท่ากับ 2.06 (อัตราส่วนโดยโมล Ca/P เท่ากับ 1.60) และเบต้าไตรแคลเซียมฟอสเฟต อัตราส่วนโดยน้ำหนัก Ca/P เท่ากับ 1.94 (อัตราส่วนโดยโมล Ca/P เท่ากับ 1.50)

จากแผนภาพแสดง ปริมาณธาตุ ต่างๆ ที่มีอยู่บนฟิล์มไฟโบรอิน แต่ละสายพันธุ์ หลังการเพาะเลี้ยง ด้วยเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด OM

ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส , 5% แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นระยะเวลา 28 วัน ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX) แสดงดังรูปที่ 4.12-4.14 จะสังเกตพบว่า เมื่อตรวจวัดปริมาณธาตุบนตัวเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนฟิล์มไฟโบรอินทั้ง 3 สายพันธุ์พบพีคของธาตุแคลเซียม (Ca) และฟอสฟอรัส (P) ในปริมาณค่อนข้างสูง ในขณะที่เมื่อตรวจวัดปริมาณธาตุที่สะสมบนพื้นผิวของฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ NN และสายพันธุ์ K8 จะพบพีคของซิลิกา (Si) ซึ่งซิลิกาเป็นองค์ประกอบหลักของกระจกที่ใช้เป็นวัสดุรองรับในการขึ้นรูปฟิล์มและพบพีคธาตุแคลเซียมและฟอสฟอรัสเล็กน้อย ทั้งนี้กลับไม่พบพีคของซิลิกากับฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 แต่พบพีคธาตุของแคลเซียมและฟอสฟอรัสเหมือนที่ตรวจวัดปริมาณธาตุบนตัวเซลล์ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าการสะสมของแคลเซียมและฟอสฟอรัสในปริมาณมากและสม่ำเสมอบนฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ K1

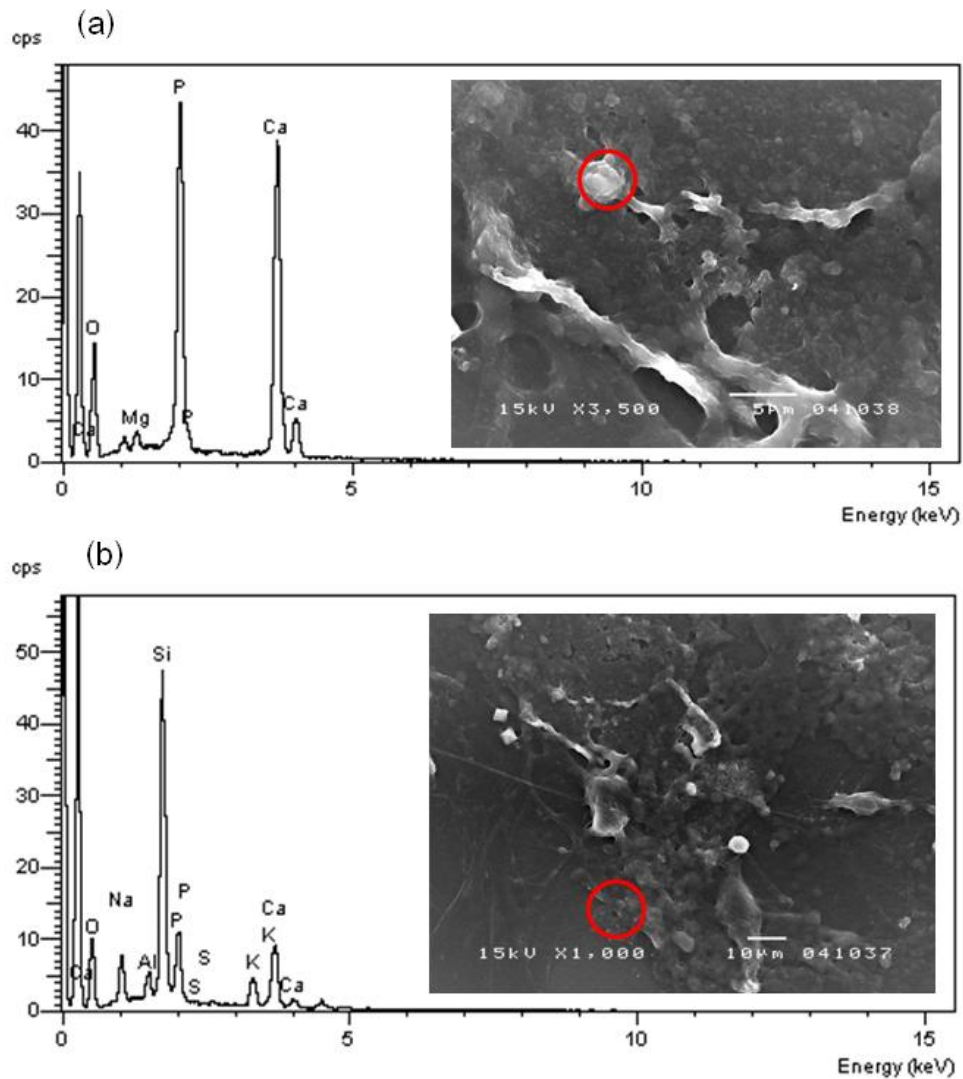
จากผลการวิเคราะห์ ปริมาณธาตุแคลเซียมและฟอสฟอรัสและแผนภาพแสดงปริมาณธาตุต่างๆ ที่มีอยู่บนฟิล์มไฟโบรอิน โดยทำการตรวจวัดปริมาณธาตุแคลเซียมและฟอสฟอรัสที่สะสมบนตัวเซลล์ และที่สะสมบนพื้นผิวของฟิล์มด้วยวิธี Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX) มีความสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียม ด้วยเทคนิค Calcium assay ซึ่งแสดงในรูปที่ 4.11 กล่าวคือ ปริมาณของแคลเซียมที่ตรวจพบกรณีเพาะเลี้ยงบนฟิล์มฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 มีค่ามากกว่ากรณีเพาะเลี้ยงบนฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ NN และสายพันธุ์ K8 ซึ่งแสดงว่า ฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 มีแนวโน้มที่จะ ช่วยสนับสนุนให้ เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกเปลี่ยนแปลงไปเป็น เซลล์กระดูก ได้ดีกว่าฟิล์มไฟโบรอินอีกสองสายพันธุ์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 มีสมบัติความชอบน้ำมากกว่า ฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ NN และสายพันธุ์ K8 (เมื่อพิจารณาจากปริมาณ ของกรดอะมิโนในกลุ่มที่มีความชอบน้ำของสารละลายไฟโบรอินและค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มไฟโบรอิน) ทำให้ช่วยส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์ได้มากกว่าส่งผลให้มีปริมาณเซลล์ที่สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกได้ดีกว่า

ตารางที่ 4.10 ปริมาณธาตุ (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ที่ตรวจสอบวิธี Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX) ที่มีอยู่บนฟิล์มไฟโบรอินหลังการเพาะเลี้ยงด้วยเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ชักนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติมสารที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก (Osteogenic differentiation media; OM ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นระยะเวลา 28 วัน โดยเปรียบเทียบตรวจวัด 2 ตำแหน่ง ได้แก่ บนตัวเซลล์และบนพื้นผิวฟิล์ม

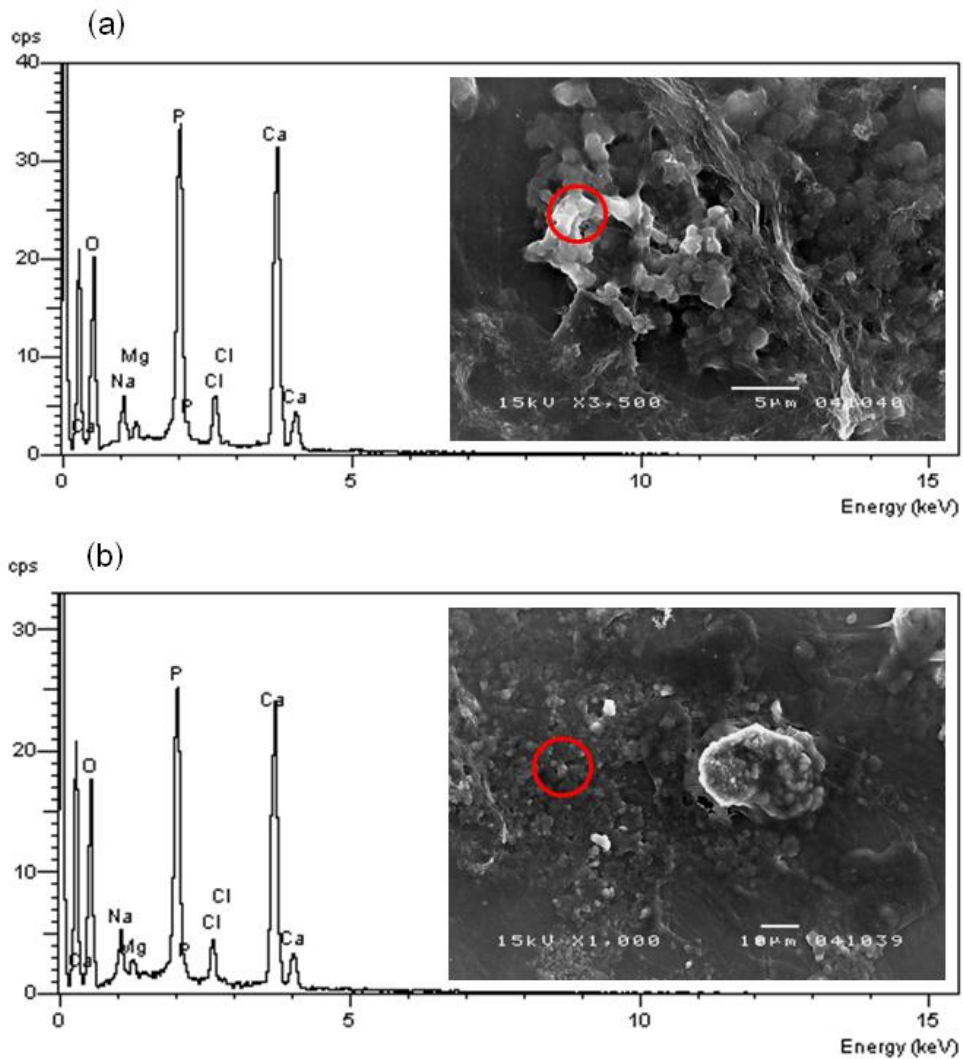
ฟิล์มไฟโบรอิน	ตรวจวัดธาตุบนตัวเซลล์			ตรวจวัดธาตุบนพื้นผิวฟิล์ม		
	Ca (%)	P (%)	Ca : P	Ca (%)	P (%)	Ca : P
NN	60.62±0.73 ^a	39.38±0.73 ^b	1.54±0.05 ^c	56.02±0.80 ^d	43.92±0.77 ^g	1.28±0.04 ^j
K1	61.45±0.16 ^a	38.55±0.16 ^b	1.60±0.09 ^c	61.21±0.28 ^e	38.81±0.24 ^h	1.58±0.02 ^k
K8	59.38±1.40 ^a	40.62±1.40 ^b	1.46±0.09 ^c	51.56±1.13 ^f	48.44±1.13 ⁱ	1.07±0.05 ^l

- เมื่อ a, b และ c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูล “เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ของธาตุแคลเซียมเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของธาตุฟอสฟอรัสและอัตราส่วนโดยน้ำหนักระหว่างแคลเซียมต่อฟอสฟอรัส เมื่อตรวจวัดธาตุบนตัวเซลล์” ตามลำดับ

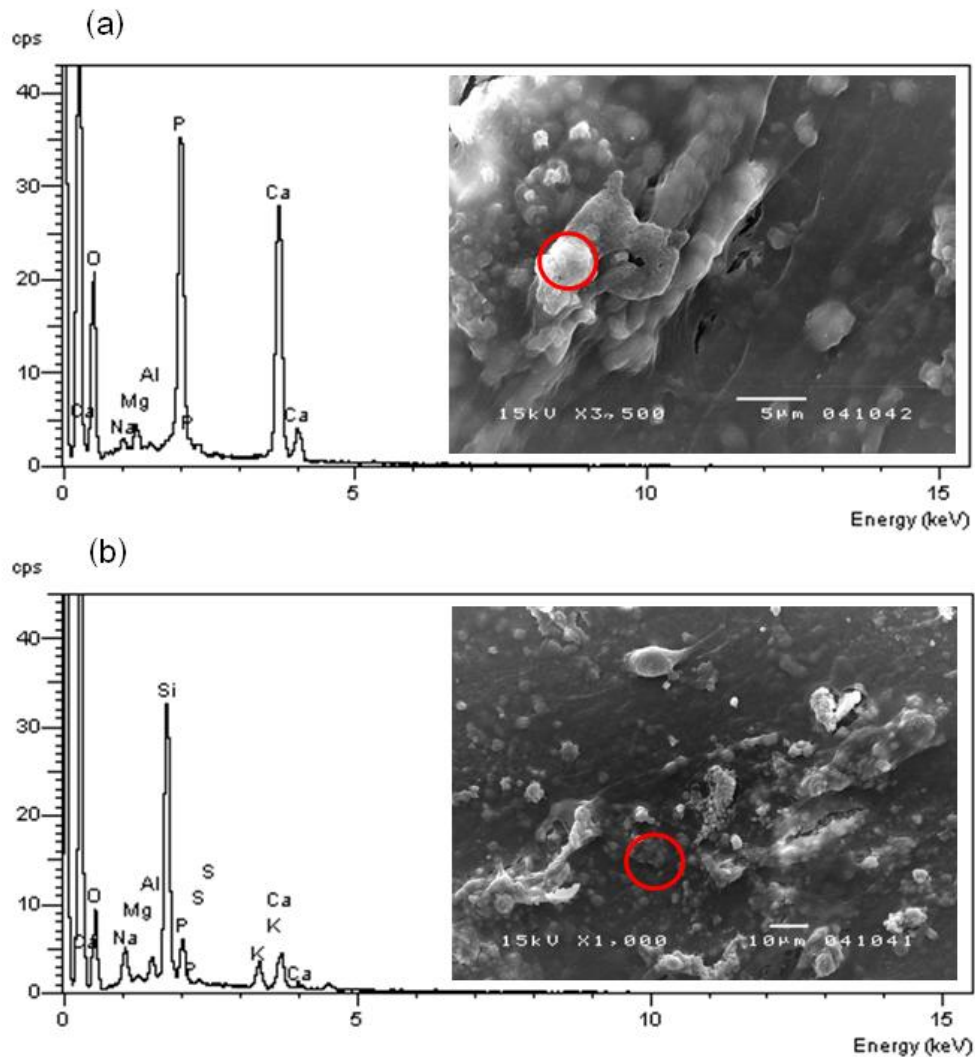
- เมื่อ d, e, f / g, h, i / j, k, l แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูล “เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ของธาตุแคลเซียมเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ของธาตุฟอสฟอรัสและอัตราส่วนโดยน้ำหนักระหว่างแคลเซียมต่อฟอสฟอรัส เมื่อ ตรวจวัดธาตุบนพื้นผิวฟิล์ม ” ตามลำดับ



รูปที่ 4.12 แผนภาพแสดง ปริมาณธาตุ ต่างๆ ที่มีอยู่บนฟิล์มโพลีเอไมด์ พื้นฐานางน้อยคีรีสะเกษ 1 (NN) ด้วยวิธี Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX) หลังการเพาะเลี้ยง ด้วยเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติมสารที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก (Osteogenic differentiation media; OM) ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นระยะเวลา 28 วัน (a) ตรวจวัดบนตัวเซลล์ (b) ตรวจวัดบนพื้นผิวของฟิล์ม



รูปที่ 4.13 แผนภาพแสดง ปริมาณธาตุ ต่างๆ ที่มีอยู่บนฟิล์มโพลีเอไมด์ พันธุ์นครราชสีมา 1 (K1) ด้วยวิธี Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX) หลังการเพาะเลี้ยง ด้วยเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติมสารที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก (Osteogenic differentiation media; OM) ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นระยะเวลา 28 (a) ตรวจวัด บนตัวเซลล์ (b) ตรวจวัดบนพื้นผิวของฟิล์ม



รูปที่ 4.14 แผนภาพแสดง ปริมาณธาตุ ต่างๆ ที่มีอยู่บนฟิล์มไฟโบริน พื้นฐานคราซลีมา 2 (K8) ด้วยวิธี Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX) หลังการเพาะเลี้ยง ด้วยเซลล์กระดูกของ เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติมสารที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดการ เปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก (Osteogenic differentiation media; OM) ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นระยะเวลา 28 วัน (a) ตรวจวัดบนตัวเซลล์ (b) ตรวจวัดบนพื้นผิวของฟิล์ม

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาคุณลักษณะและความเข้ากันได้ทางชีวภาพของไฟโบรอินจากไหมบ้านจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 (NN) สายพันธุ์นครราชสีมา 1 (K1) และสายพันธุ์นครราชสีมา 2 (K8) เมื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลไฟโบรอิน ที่ผ่านการเตรียมโดยกระบวนการทำแห้ง ด้วยความเย็น (Freeze dry) ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่า ไฟโบรอินจากไหมทั้ง 3 สายพันธุ์ประกอบด้วยสายโซ่ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเหมือนกัน เมื่อพิจารณาสมบัติทางความร้อนของฟิล์มไฟโบรอิน พบว่า ฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 และสายพันธุ์ K8 มีค่าอุณหภูมิการเปลี่ยนแปลงสถานะคล้ายแก้ว (T_g) ใกล้เคียงกัน ในขณะที่ฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ NN มีค่าอุณหภูมิดังกล่าวสูงกว่าประมาณ 4 - 7 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิการสลายตัว (T_d) ของฟิล์มไฟโบรอินทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกัน สำหรับค่าศักย์เซต้าของสารละลายไฟโบรอินพันธุ์ K1 มีค่ามากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายไฟโบรอินพันธุ์ NN แต่ไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายไฟโบรอินพันธุ์ K8 จากผลการวิเคราะห์ค่าศักย์เซต้าของสารละลายไฟโบรอินของไหมทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ค่า pH = 7.4 ทำให้ทราบว่า โมเลกุลไฟโบรอินทุกสายพันธุ์แสดงประจุเป็นลบเล็กน้อยและอนุภาคของไฟโบรอินไม่มีความเสถียร หรืออาจจะรวมตัวเกาะกันเป็นกลุ่มก้อนได้ และจากการทดสอบค่ามัมส์คัสของน้ำบนฟิล์มไฟโบรอิน พบว่า ค่ามัมส์คัสของน้ำบนฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 มีค่าต่ำที่สุด (49.5 ± 3.7) และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มไฟโบรอินพันธุ์ NN (58.7 ± 3.5) แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มไฟโบรอินพันธุ์ K8 (52.2 ± 3.5)

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของฟิล์มไฟโบรอิน ด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) พบว่า ไม่พบความแตกต่างของโครงสร้างทางเคมีของ ฟิล์มไฟโบรอินแต่ละสายพันธุ์ แต่เมื่อพิจารณาปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนในสารละลายไฟโบรอิน โดยแบ่งกรดอะมิโนออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กรดอะมิโนกลุ่มที่มีความชอบน้ำ (Hydrophilicity) และกรดอะมิโนกลุ่มที่มีความไม่ชอบน้ำ (Hydrophobicity) พบว่า สารละลายไฟโบรอินพันธุ์ K1 มีค่าผลรวมเปอร์เซ็นต์โดยโมลเมื่อพิจารณากลุ่มอะมิโนที่มีความชอบน้ำมากที่สุด (23.70%) รองลงมาคือ สารละลายไฟโบรอินพันธุ์ K8 (23.57%) และสารละลายไฟโบรอินพันธุ์ NN มีค่าต่ำที่สุด (18.84%) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ค่ามัมส์คัสของน้ำบนฟิล์มไฟโบรอิน กล่าวคือ ถ้ามัมส์คัสมีค่าน้อยแสดงว่า พื้นผิววัสดุมีความชอบน้ำ ในขณะที่ถ้าค่ามัมส์คัสมีค่ามากแสดงว่า

พื้นผิววัสดุมีความไม่ชอบน้ำ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาความแตกต่างของลักษณะทางสายพันธุ์ที่แสดงในตารางที่ 2.2 พบว่า ไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 และสายพันธุ์ K8 ได้มาจากรังไหมที่มีลักษณะทางสายพันธุ์เป็นพันธุ์ต่างประเทศและเป็นไหมชนิดฟักออกตามธรรมชาติปี ละ 2 ครั้ง (Bivoltine) และมีแนวโน้มที่จะมีความชอบน้ำมากกว่าไฟโบรอินพันธุ์ NN ซึ่งได้มาจากรังไหมที่มีลักษณะทางสายพันธุ์เป็นพันธุ์ไทยแท้และเป็นไหมชนิดฟักออกตามธรรมชาติปีละหลายครั้ง (Polyvoltine) ดังนั้นจากผลการวิเคราะห์ ปริมาณและองค์ประกอบของกรดอะมิโนของสารละลายไฟโบรอินและค่ามุมสัมผัสของน้ำบน फिल्मไฟโบรอินรวมทั้งความแตกต่างของลักษณะทางสายพันธุ์ของไฟโบรอิน ทำให้สามารถสรุปได้ว่า ไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 มีความชอบน้ำมากกว่าไฟโบรอินสายพันธุ์ NN อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ไฟโบรอินสายพันธุ์ K8 มีความชอบน้ำอยู่ระหว่างไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 และสายพันธุ์ NN แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ในการศึกษา สมบัติทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการ โดยศึกษาการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังของหนู (L929) และเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (MSC) บน फिल्मไฟโบรอินแต่ละสายพันธุ์ กล่าวคือ फिल्मไฟโบรอินพันธุ์ทั้ง 3 สายพันธุ์มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ และช่วยส่งเสริมให้มีการเจริญเติบโตของเซลล์ L929 และเซลล์ MSC ซึ่งพบว่า ร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะบน फिल्मไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 มีแนวโน้มที่จะช่วยสนับสนุนเซลล์ในการยึดเกาะได้ดีกว่า फिल्मไฟโบรอิน สายพันธุ์ NN และสายพันธุ์ K8 แต่เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโต แบ่งตัวของเซลล์บน फिल्मไฟโบรอินทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากความชอบน้ำของวัสดุซึ่งมีบทบาทสำคัญในการยึดเกาะของเซลล์ โดยถ้าพื้นผิววัสดุที่มีความชอบน้ำจะช่วยส่งเสริมให้เซลล์สามารถยึดเกาะได้ดีขึ้น ดังนั้น फिल्मไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 มีแนวโน้มที่จะช่วยส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์ได้ดีกว่า फिल्मไฟโบรอินอีกสองสายพันธุ์

เมื่อศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูบน फिल्मไฟโบรอินแต่ละสายพันธุ์ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่ 14 วัน พบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลคาร์ไลน์ฟอสฟา (Alkaline phosphatase; ALP) ที่เกิดขึ้นบน फिल्मไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 มีค่ามากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ फिल्मไฟโบรอินสายพันธุ์ K8 โดยไม่พบความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับ फिल्मไฟโบรอินสายพันธุ์ NN โดยเมื่อพิจารณา ปริมาณแคลเซียมที่เซลล์สร้าง ขึ้น พบว่า ปริมาณแคลเซียมสะสมบน फिल्मไฟโบรอินทั้ง 3 สายพันธุ์มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้น และพบปริมาณแคลเซียมสูงที่สุดที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเซลล์ 28 วัน และไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่มีแนวโน้มว่าปริมาณแคลเซียมสะสมบน फिल्मไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 มีค่ามากกว่า फिल्मไฟโบรอินสายพันธุ์ NN และสายพันธุ์ K8 เล็กน้อย ซึ่ง

อาจจะเกิดจากฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 มีสมบัติความชอบน้ำมากกว่าฟิล์มไฟโบรอินอีกสองสายพันธุ์ ทำให้ฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 มีแนวโน้มที่ ช่วยส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์ได้มากกว่าฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์อื่น และอาจส่งผลให้เซลล์สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกได้ดีกว่าด้วย

เมื่อตรวจวัดปริมาณธาตุแคลเซียมและฟอสฟอรัสด้วยวิธี Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX) โดยตรวจวัด 2 ส่วนคือ การตรวจวัดปริมาณธาตุแคลเซียมและฟอสฟอรัสที่สะสมบนตัวเซลล์ และการตรวจวัดปริมาณธาตุแคลเซียมและฟอสฟอรัสที่สะสมบนพื้นผิวของฟิล์ม โดยผลการวิเคราะห์ปริมาณธาตุที่เกิดขึ้นและสะสมบนตัวเซลล์ พบว่า ค่าอัตราส่วนโดยน้ำหนักระหว่างแคลเซียมต่อฟอสฟอรัสของฟิล์มไฟโบรอินแต่ละสายพันธุ์มีค่าใกล้เคียงกัน แต่เมื่อวิเคราะห์ปริมาณธาตุที่เกิดขึ้นและสะสมบนพื้นผิวฟิล์ม พบว่า ค่าอัตราส่วนโดยน้ำหนักระหว่างแคลเซียมต่อฟอสฟอรัส ของฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 ใกล้เคียงกับที่ตรวจพบบนตัวเซลล์ ในขณะที่ฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ NN และสายพันธุ์ K8 มีค่าอัตราส่วนดังกล่าวน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากแผนภาพแสดงปริมาณธาตุต่างๆ ที่มีอยู่บนฟิล์มไฟโบรอิน จะสังเกตเห็นว่า เมื่อตรวจวัดปริมาณธาตุบนตัวเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนฟิล์มไฟโบรอินทั้ง 3 สายพันธุ์พบพีคของธาตุแคลเซียม (Ca) และฟอสฟอรัส (P) ในปริมาณค่อนข้างสูง เมื่อตรวจวัดปริมาณธาตุที่สะสมบนพื้นผิวของฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ NN และสายพันธุ์ K8 จะพบพีคของซิลิกา (Si) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของกระจกที่ใช้เป็นวัสดุรองรับในการขึ้นรูปฟิล์มและพบพีคธาตุแคลเซียมและฟอสฟอรัสเล็กน้อย ทั้งนี้กลับไม่พบพีคของซิลิกากับฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 แต่พบพีคธาตุของแคลเซียมและฟอสฟอรัสเหมือนที่ตรวจวัดปริมาณธาตุบนตัวเซลล์ ผลการวิเคราะห์แคลเซียมด้วยเทคนิค EDX มีความสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมด้วยเทคนิค Calcium assay กล่าวคือ ปริมาณของแคลเซียมที่ตรวจพบกรณีเพาะเลี้ยง เซลล์บนฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 มีมากกว่ากรณีเพาะเลี้ยง เซลล์บนฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ NN และสายพันธุ์ K8 ซึ่งแสดงว่า ฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 มีแนวโน้มที่จะช่วยสนับสนุนให้เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกได้ดีกว่าฟิล์มไฟโบรอินอีกสองสายพันธุ์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ K1 มีสมบัติความชอบน้ำมากกว่าฟิล์มไฟโบรอินสายพันธุ์ NN และสายพันธุ์ K8 ทำให้ช่วยส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์ได้มากกว่า และส่งผลให้มีเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกได้ดีกว่า

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของฟิล์มไฟโบรอิน ควรมีการวิเคราะห์สมบัติพื้นผิวของฟิล์มไฟโบรอินแต่ละสายพันธุ์ด้วยเทคนิค X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) เพื่อช่วยในการอธิบายสมบัติอื่นได้ดียิ่งขึ้น แต่ในงานวิจัยนี้ไม่ได้ทำเพราะมีข้อจำกัดเกี่ยวกับเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ไชยา ชัยสูงเนิน. หม่อนไหม. ศูนย์ผลตตำราเกษตรเพื่อชนบท (2543)

ปรัชญา รัศมีธรรมวงศ์. การปลูกหม่อนและการเลี้ยงไหม. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์เพชรกระจัด จำกัด (2552)

ไมโตอิ มินะกาว่า , เออีซีชิ คาวาอิ และ เข็มชัย เหมะจันทร์. วิทยาการไหม เล่ม 1. กรุงเทพมหานคร: ศูนย์การส่งเสริมสินค้าไหมไทย กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม (2530)

รุ่งนภา แยมเดช. ผลของสารดูดซับสารสกัดหม่อนบนอนุภาคไมโครอัลจิเนตต่อความคงตัวของสารแอนโธไซยานินที่อุณหภูมิสูง, วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารธุรกิจ , สาขาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (2555)

สถาบันวิจัยหม่อนไหม. 30 ปี วิชาการหม่อนไหม. พิมพ์ครั้งที่ 1. ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, 2546

สิทธิศักดิ์ หารราชเวก . ชีววิทยาของกระดุก ชีวเคมีระดับเซลล์และโรคที่พบบ่อย. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์จามจุรีโปรดักท์ (2553)

สิริรัตน์ จารุจินดา. ไหม: การลอกกาไหมและการฟอกขาวไหม. Colour way. ฉบับที่ 56 (มกราคม – กุมภาพันธ์ 2548): 34 – 38

ภาษาอังกฤษ

Acharya, C., Ghosh, S.K. and Kundu, S.C. Silk fibroin film from non-mulberry tropical tasar silkworms: A novel substrate for in vitro fibroblast culture, Acta Biomaterialia 5 (2009): 429–437.

Acharya, C., Ghosh, S.K. and Kundu, S.C. Silk fibroin protein from mulberry and non-mulberry silkworms: cytotoxicity, biocompatibility and kinetics of L929 murine fibroblast adhesion, Journal of Materials Science: Materials in Medicine 19 (2008): 2827-2836.

- Altman, G.H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R.L., Kaplan, D.L. and others. Silk-based biomaterials, Biomaterials 24 (2003): 401–416.
- Aznar-Cervantes, S.D., Vicente-Cervantes, D., Meseguer-Olmo, L., Cenis, J.L. and Lozano-Pérez, A.A. Influence of the protocol used for fibroin extraction on the mechanical properties and fiber sizes of electrospun silk mats, Materials Science and Engineering C 33 (2013): 1945–1950.
- Bachmann, J., Ellies, A. and Hartge, K.H. Development and application of a new sessile drop contact angle method to assess soil water repellency, Journal of Hydrology 231-232 (2000): 66-75.
- Belmonte, M.M., Lucarini, G., Virgili, L., Biagini, G., Detomaso, L., Favia, P., D' Agostino, R., Gristina, R., Gigante, A. and Bevilacqua, C. Mesenchymal stem cells on plasma-deposited acrylic acid coatings: An in vitro investigation to improve biomaterial performance in bone reconstruction. Journal of Bioactive and Compatible Polymers 20 (2005): 343-360.
- Biomaterials Based Tissue Engineering. File. (Online). 2012. . Available from: http://biomed.brown.edu/Courses/BI108/BI108_2007_Groups/Homepage.html (2012, 15 November)
- Chamchongkaset, J., Kanokpanont, S., Kaplan, D.L. and Damrongsakkul, S. Modification of Thai Silk Fibroin Scaffolds by Gelatin Conjugation for Tissue Engineering, Advanced Material Research 55–57 (2008): 685–688.
- Chen, B., Li, H., Ding, Y. and Rao, J. Improvement of physicochemical stabilities of emulsions containing oil droplets coated by non-globular protein–beet pectin complex membranes, Food Research International 44 (2011): 1468–1475.
- Chen, F., Porter, D. and Vollrath, F. Morphology and structure of silkworm cocoons, Materials Science and Engineering C 32 (2012): 772-778.

- Chen, X., Knight, D.P., Shao Z. and Vollrath, F. Regenerated *Bombyx* silk solution studied with rheometry and FTIR, Polymer 42 (2001): 9969 – 9974.
- Cilurzo, F., Gennari, C.G.M., Selmin, F., Marotta, L.A., Minghetti, P. and Montanari, L. An investigation into silk fibroin conformation in composite materials intended for drug delivery, International Journal of Pharmaceutics 414 (2011): 218– 224.
- Corning Intercorporate. File. (Online). 2013. Available from: http://www.corning.com/lifesciences/lifesciences/us_canada/en/technical_resources/surfaces/culture/stc_treated_polystyrene.aspx (2013, 25 March)
- Coelho, M.J., Cabral, A.T. and Fernandes, M.H. Human bone cell cultures in biocompatibility testing, Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in MEM and in DMEM, Biomaterials 21 (2000): 1087-1094.
- Discovery medicine. File. (Online). 2012. Available from: <http://www.discoverymedicine.com/Tracey-L-Bonfield/2010/04/15/adult-mesenchymal-stem-cells-an-innovative-therapeutic-for-lung-diseases> (2012, October 9)
- Donzelli, E., Salvadè, A., Mimo, P., Viganò, M., Morrone, M., Papagna, R., Carini, F., Zaopo, A., Miloso, M., Baldoni, M., Tredici, G., Mesenchymal stem cells culture on a collagen scaffold: In vitro osteogenic differentiation, Archives of oral biology 52 (2007): 64–73.
- Du, C., Jin, J., Li, Y., Kong, X., Wei, K. and Yao, J. Novel Silk fibroin/hydroxyapatite composite films: Structure and properties, Materials Science and Engineering C 29 (2009): 62–68
- Evans, N.D., Gentleman, E. and Polak, J.M. Scaffold for stem cells, Materialstoday 9 (2006): 26-33.

- Friedenstein, A.J., Piatetzky-Shapiro II. and Petrakova, K.V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cell, Journal of Embryology & Experimental Morphology 16 (1966): 381-390.
- Forch, R., Schonherr, H., Jenkins, A.T., Surface Design: Applications in Bioscience and Nanotechnology Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., 2009
- Gstraunthaler, G. and Hartung, T. Cell Culture Models of Biological Barriers in vitro Test Systems for Drug Absorption and Delivery Taylor & Francis Inc , 2002
- Hofmann, S., Wong Po Foo, C.T., Rossetti, F., Textor, M., Vunjak-Novakovic, G., Kaplan, D.L., Merkle, H.P. and Meinel, L. Silk fibroin as an organic polymer for controlled drug delivery, Journal of Controlled Release 111 (2006): 219–227.
- Hofmann, S., Hagenmuller, H., Koch, A.M., Muller, R., Novakovic, G.V., Kaplan, D.L., Merkle, H.P. and Meinel, L. Control of in vitro tissue-engineered bone-like structures using human mesenchymal stem cells and porous silk scaffolds. Biomaterials 28 (2007): 1152-1162.
- Hu, X., Kaplan, D.L. and Cebe, P. Effect of water on thermal properties of silk fibroin, Thermochemical Acta 461 (2007): 137 – 144.
- Hunter R. J. Zeta Potential in Colloid Science: Principle and application. Academic Press, New York. (1981).
- Ishida, M., Asakura, T., Yokoi, M., Saito, H. Solvent and mechanical treatment induce conformational transition of silk fibroin studied by high resolution solid state carbon-13 NMR spectroscopy, Macromolecules 23 (1990): 88-94.
- Jetbumpenkul, P., Amornsudthiwat, P., Kanokpanont, S. and Damrongsakkul, S. Balanced electrostatic blending approach –An alternative to chemical crosslinking of Thai silk fibroin/gelatin scaffold, International Journal of Biological Macromolecules 50 (2012): 7–13.

- Kim, H.J., Kim, U.J., Vunjak-Novakovic, G., Min, B.H. and Kaplan, D.L. Influence of macroporous protein scaffolds on bone tissue engineering from bone marrow stem cells, Biomaterials 26 (2005): 4442–4452.
- Kim, U.J., Park, J., Kim, H.J., Wada, M. and Kaplan, D.L. Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin, Biomaterials 26 (2005): 2775–2785.
- Komori, T. and Kishimoto, T. Cbfa1 in bone development, Current Opinion in Genetics & Development (1998): 494-499.
- Lian, J.B.; and Stein, G.S. Concept of osteoblast growth and differentiation: basis of modulation of bone cell development and tissue formation, Critical Reviews in Oral Biology & Medicine 3 (1992): 269-305.
- Lu, Q., Hu, X., Wang, X., Kluge, J. A., Cebe, P., Kaplan, D.L. and others. Water-insoluble silk films with silk I structure, Acta Biomaterialia 6 (2010): 1380–1387.
- Malay, O., Bayraktar, O. and Batigun, A. Complex coacervation of silk fibroin and hyaluronic acid, International Journal of Biological Macromolecules 40 (2007): 387–393.
- Meechaisue, C., Wutticharoenmongkol, P., Waraput, R., Huangjing, T., Ketbumrung, N., Pavasant, P., Supaphol, P. Preparation of electrospun silk fibroin fiber mats as bone scaffolds: a preliminary study. Biomedical Material (2007): 181 – 188.
- Meinel, L., Karageorgiou, V., Hofmann, S., Fajardo, R., Snyder, B., Li, C., Zichner, L., Langer, R., Vunjak-Novakovic, G. and Kaplan, D.L. Engineering bone-like tissue in vitro using human bone marrow stem cells and silk scaffolds. Journal of Biomedical Materials Research (2004): 25-34.

- Mhuka, V., Dube, S. and Nindi, M.M. Chemical, structural and thermal properties of *Gonometa postica* silk fibroin, a potential biomaterial, International Journal of Biological Macromolecules 52 (2013): 305– 311.
- Minoura, N., Aiba, S.I., Higuchi, M., Gotoh, Y., Tsukada, M. and Imai, Y. Attachment and growth of fibroblast cells on silk fibroin, Biochemical and Biophysical Research Communications 208 (1995): 511 -516.
- Mizi Fan, Dasong Dai and Biao Huang, Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Natural Fibres, Fourier Transform - Materials Analysis, Great Britain, 2012.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, Journal of Immunological Method 65 (1983): 55-63.
- Murphy, A.R., St. John, P. and Kaplan, D.L. Modification of silk fibroin using diazonium coupling chemistry and the effects on hMSC proliferation and differentiation, Biomaterials 29 (2008): 2829–2838.
- Nogueira, G., Rodas, A.C.D., Leite, C.A.P., Giles, C., Higa, O.Z. and others. Preparation and characterization of ethanol – treated silk fibroin dense membranes for biomaterials application using waste silk fibers as raw material, Bioresource Technology 101 (2010): 8446 – 8451.
- Okhawilai, M., Rangkupan, R., Kanokpanont, S., and Damrongsakkul, S. Preparation of silk fibroin/gelatin electrospun fiber mats for controlled release applications, International Journal of Biological Macromolecules 46 (2010): 544 - 550.
- Philomath.exteen. File. (Online) 2012. Available from: <http://philomath.exteen.com/20070910/r> (2012, October 17).

- Pierschbacher, M.D. and Ruoslahti, E. Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 81(1984): 5985-5988.
- Secondary protein structure. File. 2012. Available from: <http://www.mun.ca/biology/scarr/Gr09-06.html> (2012, November 10)
- Shang, S., Zhu, L. and Fan, J. Intermolecular interactions between natural polysaccharides and silk fibroin protein, Carbohydrate Polymers 93 (2013): 561– 573.
- She, Z., McCarthy, Zhang, B., Jin, C., Feng, Q., Xu, Y. Preparation and in vitro degradation of porous three-dimensional silk fibroin/chitosan scaffold, Polymer Degradation and Stability 93 (2008): 1316–1322.
- Sofia, S., McCarthy, M.B., Gronowicz, G., and Kaplan, D.L. Functionalized silk-based biomaterials for bone formation, Journal of Biomedical Materials Research 54 (2001): 139–148.
- Suzuki, Y., Matsui, H., Tsujimoto, Y. and Watanabe, K. Enzymatic degradation of fibroin fiber by a fibroinolytic enzyme of *Brevibacillus thermoruber* YAS-1, Journal of Bioscience and Bioengineering 108 (2009): 211-215.
- Takahashi, Y. and Tabata Y. Homogeneous seeding of mesenchymal stem cells into nonwoven fabric for tissue engineering, Tissue Engineering 9 (2003):931-938.
- Takahashi, Y., Yamamoto, M. and Tabata, Y. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and β -tricalcium phosphate, Biomaterials 26, (2005):3587-3596.
- Tanaka, K., Inoue, S. and Mizuno, S. Hydrophobic interaction of P25, containing Asn-linked oligosaccharide chains, with the H-L complex of silk fibroin produced by *Bombyx mori*, Insect Biochemistry and Molecular Biology 29 (1999): 269-276.

- Tao, W., Li, M. and Zhao, C. Structure and properties of regenerated *Antheraea pernyi* silk fibroin in aqueous solution, International Journal of Biological Macromolecules 40 (2007): 472 - 478.
- Theerakittayakorn, K. and Bunprasert, T. Differentiation capacity of mouse L929 fibroblastic cell line compare with human dermal fibroblast, World Academy of Science, Engineering and Technology 50 (2011): 373-376.
- Tungtasana, H., Shuangshoti, S., Kanokpanont, S., Kaplan, D.L., Bunaprasert, T. and Damrongsakkul, S. Tissue response and biodegradation of composite scaffolds prepared from Thai silk fibroin, gelatin and hydroxyapatite. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 21 (2010): 3151 -3162.
- Vachiraroj, N., Ratanavaraporn, J., Damrongsakkul, S., Pichyangkura, R., Banaprasert, T. and Kanokpanont, S. A comparison of Thai silk fibroin-based and chitosan-based materials on in vitro biocompatibility for bone substitutes, International Journal of Biological Macromolecules 45 (2009): 470–477.
- Um, I.M., Kweon, H.Y., Park, Y.H. and Hudson, S. Structural characteristics and properties of the regenerated silk fibroin prepared from formic acid, International Journal of Biological Macromolecules 29 (2001): 91 – 97.
- Vasconcelos, A., Freddi, G. and Paulo, C. Biodegradable materials based on silk fibroin and keratin, Biomacromolecules 9 (2008): 1299–1305.
- Wadbua, P., Promdonkoy, B., Maensiri, S. and Siri, S. Different properties of electrospun fibrous scaffolds of separated heavy-chain and light-chain fibroins of *Bombyx mori*, International Journal of Biological Macromolecules 46 (2010): 493-501.
- Walluscheck, K.P., Steinhoff, G., Keim, S. and Haverich, A. Improved endothelial cell attachment on eptfe vascular grafts pretreated with synthetic RGD-containing peptides, European Journal of Vascular and Endovascular Surgery 12 (1996): 321-330.

- Wang, H., Zhang, Y., Shao, H. and Hu, X. A study on the flow stability of regenerated silk fibroin aqueous solution, International Journal of Biological Macromolecules 36 (2005): 66–70.
- Wang San-ming. Silk egg production Volume III. Rome. Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1989.
- Wang, X., Hu, X., Daley, A., Rabotyagova, O., Cebe, P. and Kaplan, D.L. Nanolayer biomaterial coatings of silk fibroin for controlled release, Journal of Controlled Release 121 (2007): 190–199.
- Wang, Y., Kim, H.J., Vunjak-Novakovic, G. and Kaplan, D.L. Review stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials, Biomaterials 27 (2006): 6064–6082.
- Xu, Y., Zhang, Y., Shao, H. and Hu, X. Solubility and rheological behavior of silk fibroin (*Bombyx mori*) in N-methyl morpholine N-oxide, International Journal of Biological Macromolecules 35 (2005): 155–161.
- Yamada, H., Nakao, H., Takasu, Y. and Tsubouchi, K. Preparation of undegraded native molecular fibroin solution from silkworm cocoons, Materials Science and Engineering C 14 (2001): 41–46.
- Yang, M., Zhu, S., Chen, Y., Chang, Z., Chen, G., Gong, Y., Zhao, N. and Zhang, X. Studies on bone marrow stromal cells affinity of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate), Biomaterials 25 (2004): 1365–1373.
- Yataro Tazima. The genetics of the silkworm. London. Great Britain: J.W. Arrowsmith Ltd., 1964.
- Yataro Tazima. The silkworm: an important laboratory tool. Tokyo. Japan: Kodansha Ltd., 1978.
- Zhang, L., Hanagata, N., Maeda, M., Minowa, T., Ikoma, T., Fan, H. and Zhang, X. Porous hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate ceramics promote

ectopic osteoblast differentiation from mesenchymal stem cells, Science and Technology of Advanced Materials 10 (2009): 1-9.

Zhou, C.Z., Confalonieri, F., Jacquet, M., Perasso, R., Li, Z.G. and Janin, J. Silk fibroin: structural implications of a remarkable amino acid sequence, PROTEINS: Structure, Function, and Genetics 44 (2001) 119-122.

Zhu, H., Liu, N., Feng, X. and Chen, J. Fabrication and characterization of silk fibroin/bioactive glass composite films, Materials Science and Engineering C 32 (2012): 822-829.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

การเตรียมสารเคมีสำหรับใช้ในการทำ Gel Electrophoresis

การเตรียมสารละลายผสมระหว่าง Acrylamide ที่มีความเข้มข้น 30% และ Bis-acrylamide ที่มีความเข้มข้น 0.8%

1. ชั่งสาร Acrylamide และ Bis-acrylamide ปริมาณ 75 และ 2 กรัม ตามลำดับ
2. นำสารในข้อที่ 1 มาละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 250 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายที่ได้กรองด้วยกระดาษกรอง
3. นำสารละลายผสมที่ได้เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลาย Tri-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ (ค่า pH = 8.8)

1. ชั่งสาร Tris(hydroxymethyl)-aminomethane ปริมาณ 45.41 กรัม แล้วนำไปละลายในน้ำกลั่น
2. นำสารละลายจากข้อที่ 1 มาปรับค่า pH ให้เท่ากับ 8.8 โดยใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์
3. เติมน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 250 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลาย Tri-HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (ค่า pH = 6.8)

1. ชั่งสาร Tris(hydroxymethyl)-aminomethane ปริมาณ 15.14 กรัม แล้วนำไปละลายในน้ำกลั่น
2. นำสารละลายจากข้อที่ 1 มาปรับค่า pH ให้เท่ากับ 6.8 โดยใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์
3. เติมน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 250 มิลลิลิตร

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม 12% Separating gel

30% Acrylamide/0.8% Bisacrylamide	4.0	มิลลิลิตร
1.5 M Tris-HCl	2.5	มิลลิลิตร
10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)	100	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	3.3	มิลลิลิตร
10% Ammonium persulfate	100	ไมโครลิตร
<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylene diamine (TEMED)	8	ไมโครลิตร

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม 15% Separating gel

30% Acrylamide/0.8% Bisacrylamide	5.0	มิลลิลิตร
1.5 M Tris-HCl	2.5	มิลลิลิตร
10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)	100	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	2.3	มิลลิลิตร
10% Ammonium persulfate	100	ไมโครลิตร
<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylene diamine (TEMED)	8	ไมโครลิตร

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม 5% Stacking gel

30% Acrylamide/0.8% Bisacrylamide	0.67	มิลลิลิตร
0.5 M Tris-HCl	0.5	มิลลิลิตร
10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)	40	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	2.7	มิลลิลิตร
10% Ammonium persulfate	40	ไมโครลิตร
<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylene diamine (TEMED)	4	ไมโครลิตร

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม 5 เท่าของ Electrophoresis buffer

Tris base	15.1	กรัม
Glycine	72	กรัม
SDS	5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

หมายเหตุ: มีการควบคุมค่า pH เท่ากับ 8.4 และเมื่อนำไปใช้จะต้องทำการเจือจางเป็น 1 เท่า

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม 5 เท่าของ Samaple buffer

1M Tris-HCl (pH 6.8)	0.6	มิลลิลิตร
50% Glycerol	5	มิลลิลิตร
10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)	2	มิลลิลิตร
β -mercaptoethanol	0.5	มิลลิลิตร
1% Bromophenol blue	1	มิลลิลิตร

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม Staining solution

Coomassie Brilliant blue R-250	1	กรัม
Methanol	450	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	450	มิลลิลิตร

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม Staining solution

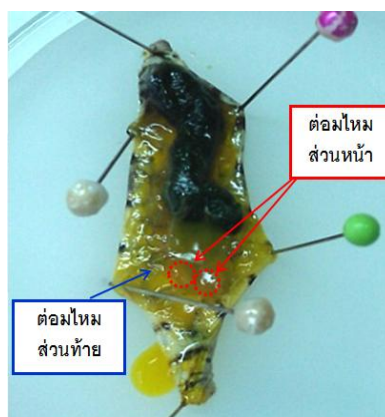
Methanol	100	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข.

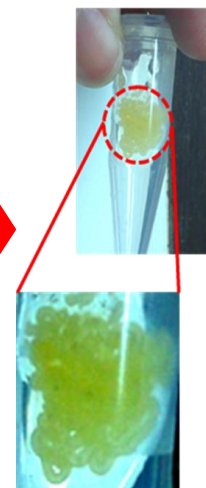
การสกัดไฟโบรอินจากต่อมไหมส่วนท้าย (Posterior silk gland; P₀) ที่ได้จากหนอนไหม



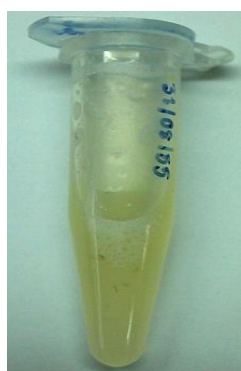
หนอนไหมสายพันธุ์
นางลาย



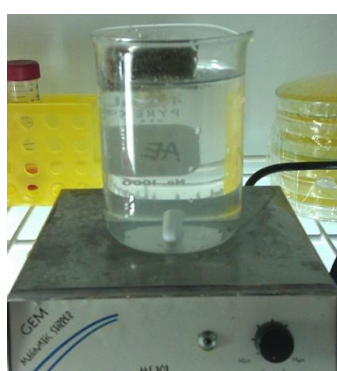
กำจัดส่วนทางเดินอาหารและต่อม
ไหมส่วนหน้าออก แล้วสกัดเฉพาะ
ต่อมไหมส่วนท้าย



ต่อมไหมส่วนท้าย



สารละลายไฟโบรอินที่สกัด
ได้จากต่อมไหมส่วนท้าย



นำสารละลายที่ได้มาไดอะไลส์
และเปลี่ยนน้ำวันละ 3 ครั้ง
เป็นเวลา 3 วัน



นำต่อมไหมส่วนหลังผสมกับ
สารละลายลิเทียมโบรไมด์
ความเข้มข้น 9.3 โมลาร์

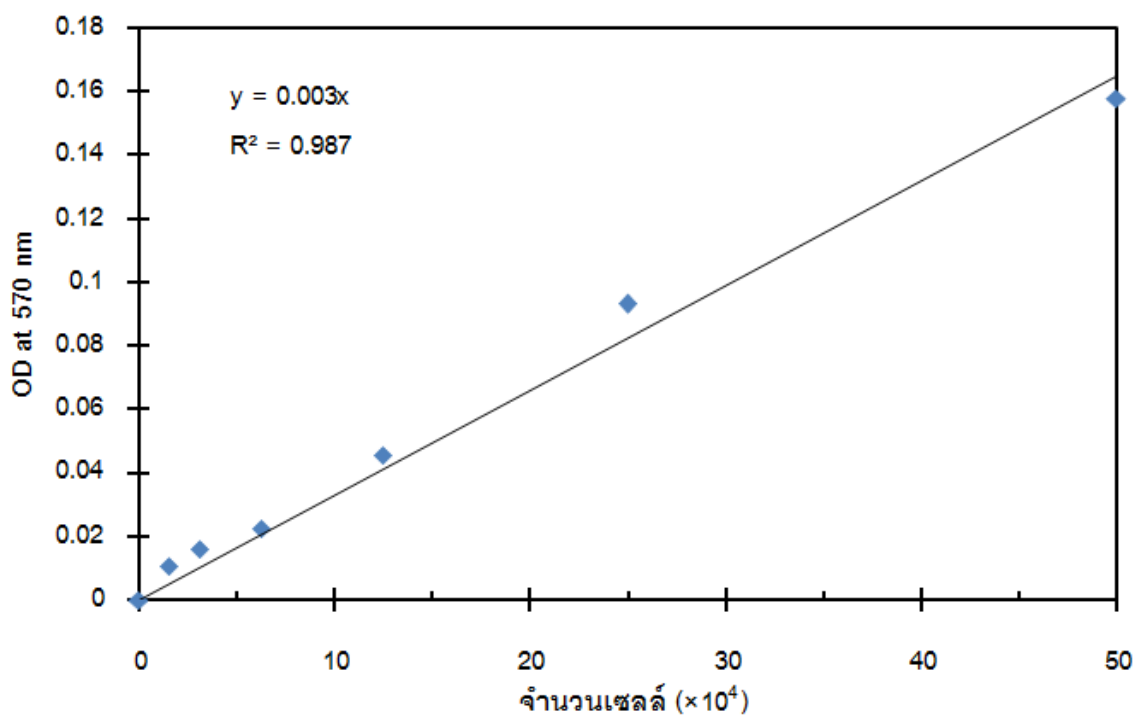
รูปที่ ข.1 ขั้นตอนการสกัดไฟโบรอินจากต่อมไหมส่วนท้ายที่ได้จากหนอนไหม

การสกัดไฟโบรอินจากต่อมไทม์ส่วนท้ายที่ได้จากหนอนใหม่

1. นำหนอนใหม่ที่ผ่านการแช่แข็งมาตั้งทิ้งไว้เพื่อให้น้ำแข็งละลายและตึ่งด้วยเข็มหมุดบริเวณส่วนหัวและส่วนท้ายของลำตัวหนอนใหม่
2. กำจัดส่วนที่เป็นทางเดินอาหารและต่อมไทม์ส่วนหน้า (Anterior silk gland) ออก
3. นำต่อมไทม์ส่วนท้าย (Posterior silk gland) ที่ได้ผสมกับสารละลายลิเทียมโบรไมด์ (LiBr) ที่มีความเข้มข้น 9.3 โมลาร์
4. ไดอะไลส์สารละลายไฟโบรอินโดยใช้ถุงไดอะไลส์ (MWCO เท่ากับ 12,000-16,000) ในน้ำปราศจากประจุ เพื่อกำจัดลิเทียมโบรไมด์ โดยจะเปลี่ยนน้ำ 3 ครั้งต่อวัน คือ ช่วงเช้า ช่วงกลางวัน และช่วงเย็น จนค่าการนำไฟฟ้าของน้ำที่ผ่านการไดอะไลส์แล้วมีค่าเท่ากับค่าการนำไฟฟ้าของน้ำปราศจากประจุ
5. นำสารละลายไฟโบรอินที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที เพื่อกำจัดตะกอนและฝุ่นละอองในสารละลายไฟโบรอิน จะได้เป็นสารละลายไฟโบรอินที่ต้องการ โดยขั้นตอนการสกัดไฟโบรอินจากต่อมไทม์ส่วนท้ายที่ได้จากหนอนใหม่ แสดงดังรูป ข.1

ภาคผนวก ค.

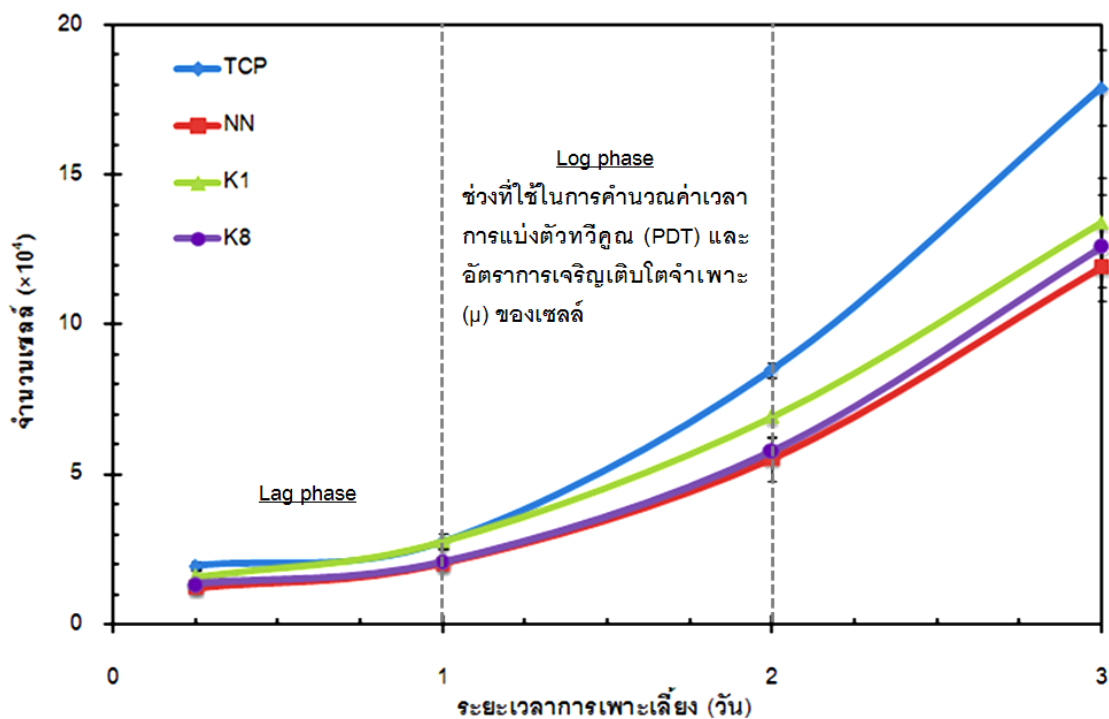
กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์ผิวหนังของหนูหรือเซลล์ L929 โดยวิธี MTT



รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์ผิวหนังของหนูหรือเซลล์ L929 โดยวิธี MTT

ภาคผนวก ง.

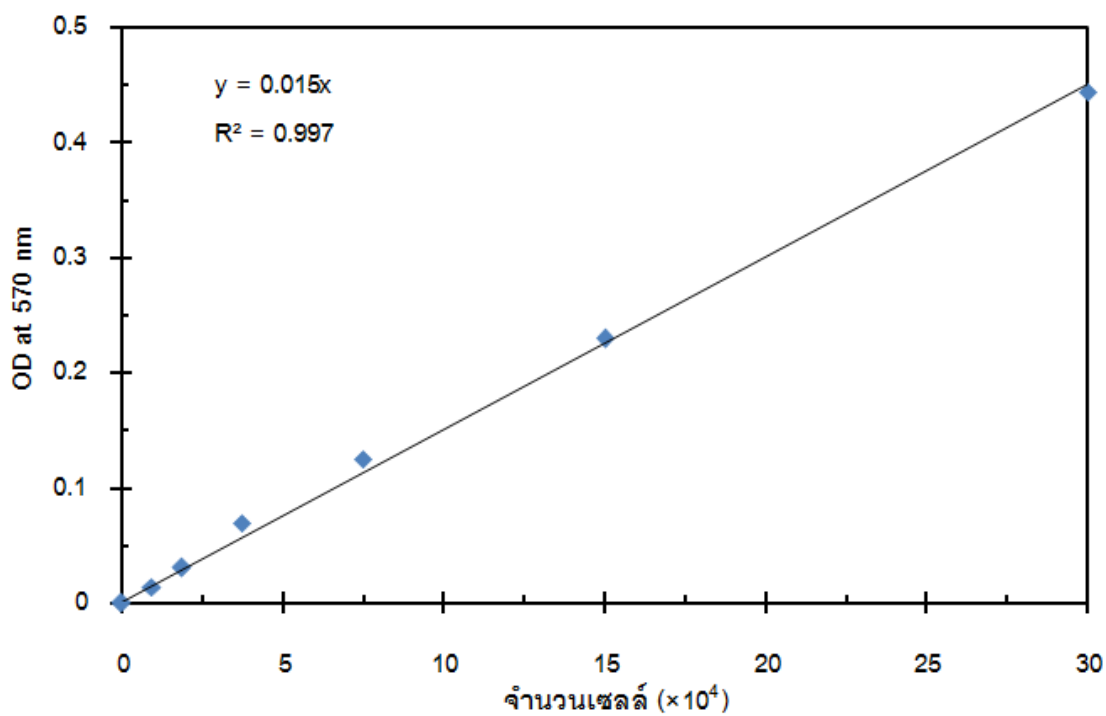
กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังของหนู (L929) บนพื้นผิววัสดุประเภทต่างๆ



รูปที่ ง.1 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของ เซลล์ผิวหนังของหนูหรือเซลล์ L929 บนฟิล์มไฟโบรอิน พันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 (NN) ฟิล์มไฟโบรอินพันธุ์นครราชสีมา 1 (K1) และฟิล์มไฟโบรอินพันธุ์นครราชสีมา 2 (K8) และถาดเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน (TCP) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์

ภาคผนวก จ.

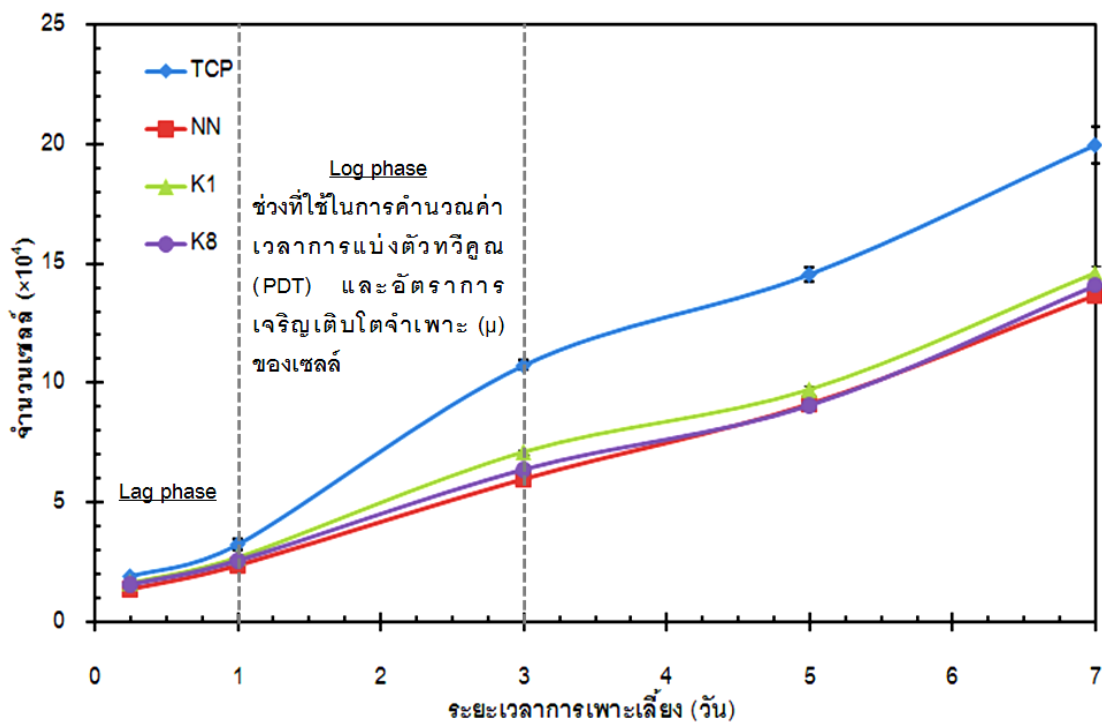
กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (MSC) โดยวิธี MTT



รูปที่ จ.1 กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (MSC) โดยวิธี MTT

ภาคผนวก จ.

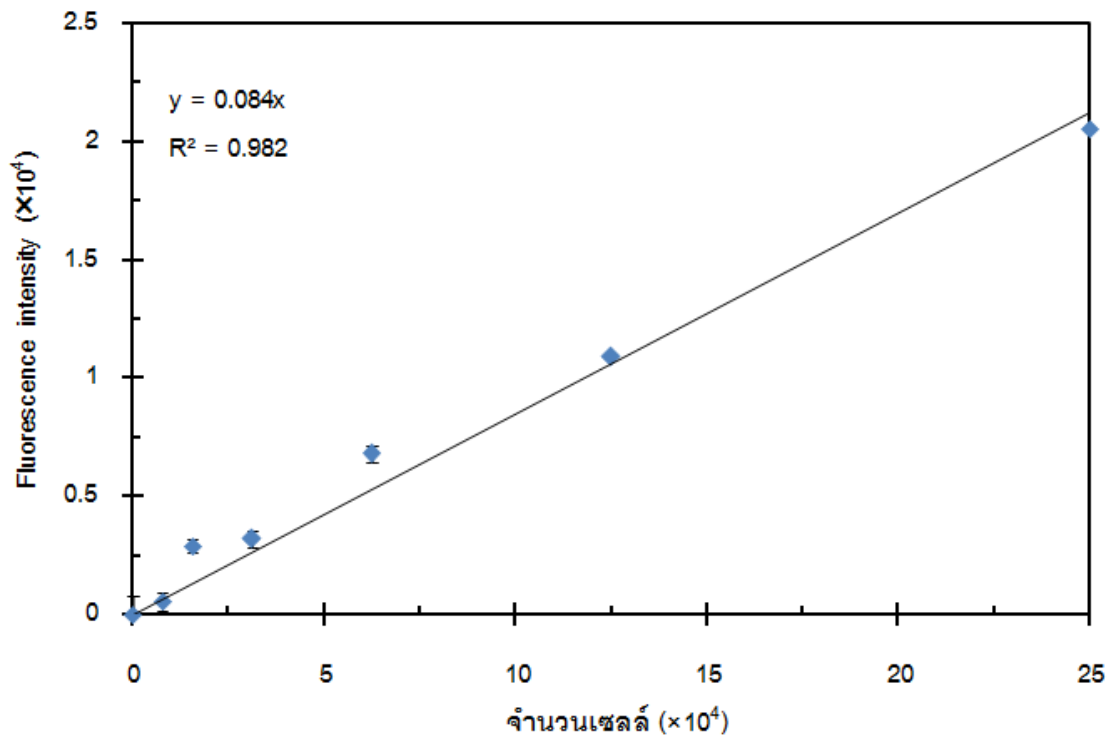
กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (MSC) บนพื้นผิววัสดุประเภทต่างๆ



รูปที่ จ.1 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของ เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (MSC) บนฟิล์มไฟโบรอินพ่นฐานางน้อยสี่ระยะ 1 (NN) ฟิล์มไฟโบรอินพ่นฐานครราชสีมา 1 (K1) และฟิล์มไฟโบรอินพ่นฐานครราชสีมา 2 (K8) และถาดเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน (TCP) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด α -MEM ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์

ภาคผนวก ข.

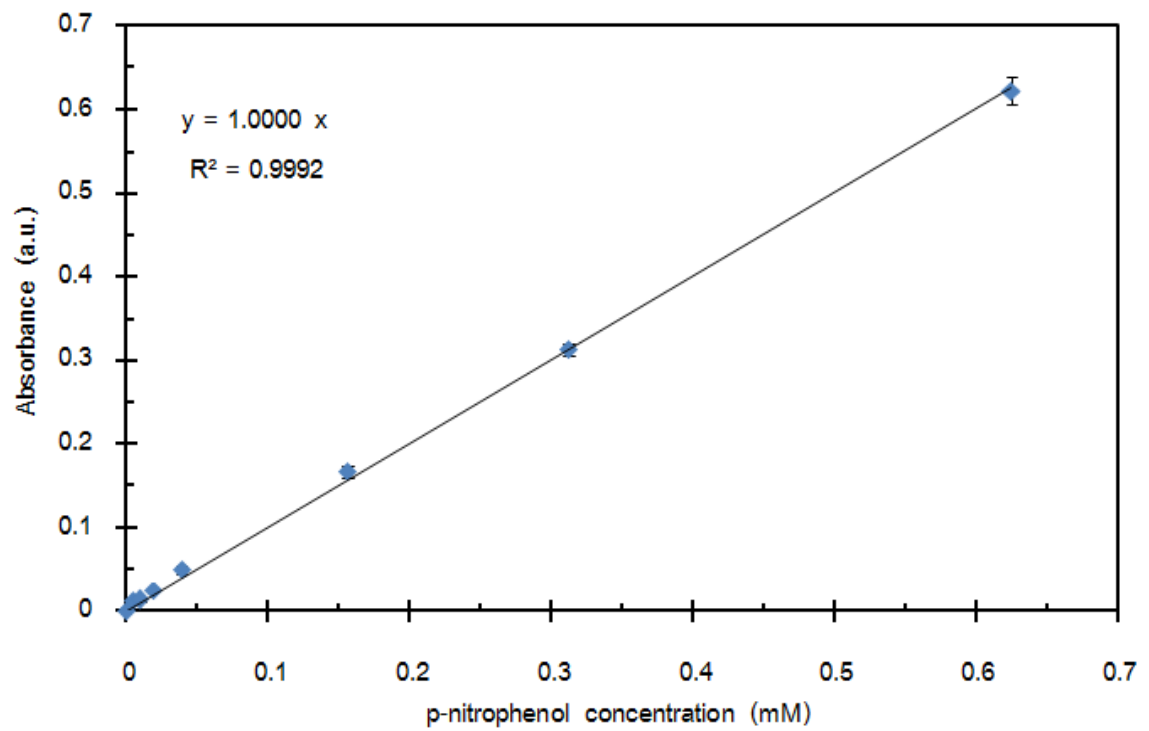
กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (MSC) โดยวิธี DNA



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู (MSC) โดยวิธี DNA

ภาคผนวก ซ.

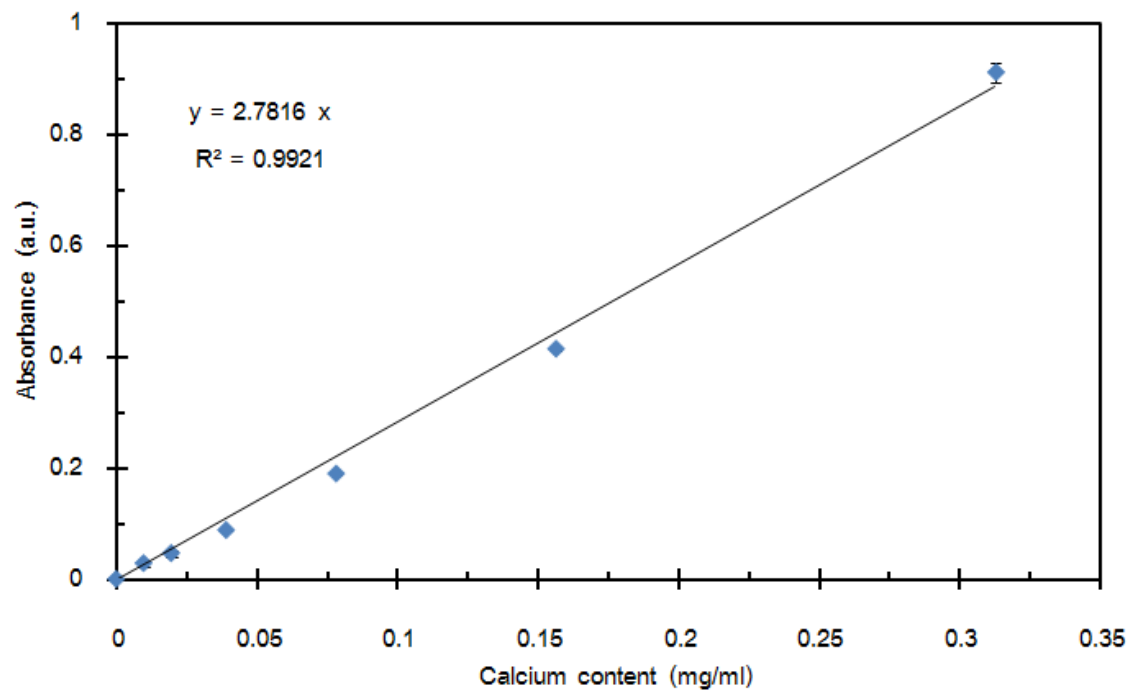
กราฟมาตรฐานของการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase (ALP)



รูปที่ ซ.1 กราฟมาตรฐานของการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase (ALP)

ภาคผนวก ฉ.

กราฟมาตรฐานของการวัดปริมาณแคลเซียม



รูปที่ ฉ.1 กราฟมาตรฐานของการวัดปริมาณแคลเซียม

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวกัญญาลักษณ์ แก้วประสิทธิ์ เกิดเมื่อวันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2530 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร เข้าศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาที่โรงเรียน สारविทยา สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2552 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2553

การเผยแพร่ผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

K. Kaewprasit, S. Kanokpanont and S. Damrongsakkul, Biocompatibility of *Bombyx mori* Thai silk fibroin from various races of Thai silkworms, Poster Presentation, Pure and Applied Chemistry International Conference 2012 (PACCON2012), The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand, 11 – 13 January 2012.

K. Kaewprasit, A. Promboon and S. Damrongsakkul, Characteristics and cell responses on silk fibroin film prepared from three the silkworms, *Bombyx mori*, Oral Presentation, Pure and Applied Chemistry International Conference 2013 (PACCON2013), The Tide Resort, Chon Buri, Thailand, 23 – 25 January 2013.