

ฟิล์มผสมไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน กลีเซอรอลที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยกรดอะมิโนอาร์จินิลไกลซิล
แอสปาติกบนไวรัสใบยาสูบ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

BLENDED FILM OF THAI SILK FIBROIN GELATIN AND GLYCEROL WITH SURFACE
MODIFICATION BY ARGINYL GLYCYL ASPATIC ACID (RGD) ON TOBACCO MOSAIC VIRUS



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

Department of Chemical Engineering

FACULTY OF ENGINEERING

Chulalongkorn University

Academic Year 2019

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ฟิล์มผสมไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน กลีเซอรอลที่ดัดแปร พื้นผิวด้วยกรดอะมิโนอาร์จินิลไกลซิลแอสปาติกบนไวรัสบี ยาสูบ
โดย	น.ส.จุฑาทิพย์ ปัญจมนี
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกษัชกรหญิง ดร.จิตติมา ลัคนากุล

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ เตชวรสินสกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิรักษ์ สุทธิธรรวัช)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกษัชกรหญิง ดร.จิตติมา ลัคนากุล)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไศรดา กนกพานนท์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ วรมงคลชัย)

จุฬาทิพย์ ปัญจภณี : फिल्मผสมไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน กลีเซอรอลที่ดัดแปรพื้นผิว ด้วยกรดอะมิโนอาร์จินิลไกลซิลแอสปาติกบนไวรัสใบยาสูบ. (BLENDED FILM OF THAI SILK FIBROIN GELATIN AND GLYCEROL WITH SURFACE MODIFICATION BY ARGINYL GLYCYL ASPATIC ACID (RGD) ON TOBACCO MOSAIC VIRUS) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ศ. ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ภญ. ดร.จิตติมา ลัคนากุล

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาฟิล์มไฟโบรอินไหมไทยให้มีความยืดหยุ่น โดยการเติมเจลาติน และกลีเซอรอลที่สัดส่วนต่าง ๆ ในฟิล์มไฟโบรอินไหมไทย จากนั้นนำฟิล์มที่ได้ไปผ่านกระบวนการอบนึ่งด้วยไอน้ำเพื่อเพิ่มความคงตัว ผลการวิเคราะห์พบว่าฟิล์มผสมไฟโบรอินไหมไทย และกลีเซอรอล (SF/GA) และฟิล์มผสมไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกลีเซอรอล (SF/GA/Gly) ที่มีปริมาณกลีเซอรอลร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก มีค่าร้อยละการดึงยืด ณ จุดขาด สูงถึงร้อยละ 70 ค่าอุณหภูมิเปลี่ยนแปลงสภาพแก้วมีค่าลดลงตามปริมาณกลีเซอรอลที่เพิ่มขึ้น เนื่องด้วยโมเลกุลของกลีเซอรอลรบกวนการจัดเรียงตัวของสายโซ่ ส่งผลให้สายโซ่โปรตีนเคลื่อนที่เป็นอิสระมากขึ้น ฟิล์มผสมจึงมีความยืดหยุ่นมากขึ้น ขณะที่กระบวนการอบนึ่งด้วยไอน้ำเหนี่ยวนำให้โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนไฟโบรอินไหมจากโครงสร้างแบบเกลียวสุมไปเป็นแผ่นพลิทเบต้าที่มีความเป็นระเบียบ ส่งผลให้ฟิล์มมีความคงตัวมากขึ้น นอกจากนี้ ได้มีการดัดแปรพื้นผิวฟิล์มผสมด้วยไวรัสใบยาสูบที่ดัดแปลงพันธุกรรมด้วยลำดับกรดอะมิโนอาร์จินิลไกลซิลแอสปาติก (TMV-RGD) เพื่อเพิ่มความสามารถในการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ จากการทดสอบการเพาะเลี้ยงเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าเซลล์ผิวหนังหนู L929 ที่เพาะเลี้ยงบนแผ่นฟิล์มที่ดัดแปรพื้นผิวโดยการเชื่อมขวางไวรัส TMV-RGD มีการยึดเกาะและการเจริญเติบโตสูงกว่าฟิล์มที่ไม่ได้เชื่อมขวางด้วยไวรัส TMV-RGD ดังนั้นฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่มีปริมาณกลีเซอรอลร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก และผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำรวมถึงดัดแปรพื้นผิวฟิล์มด้วยไวรัส TMV-RGD จึงเป็นฟิล์มชีววัสดุทางเลือกที่มีศักยภาพในการพัฒนาต่อยอดเพื่อประยุกต์ใช้ในงานด้านชีวเวช

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี

ปีการศึกษา 2562

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5970426421 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORD: Silk fibroin, Gelatin, Glycerol, Water vapor anneal, Tobacco mosaic virus, RGD

Jutathip Panchamane : BLENDED FILM OF THAI SILK FIBROIN GELATIN AND GLYCEROL WITH SURFACE MODIFICATION BY ARGINYL GLYCYL ASPARTIC ACID (RGD) ON TOBACCO MOSAIC VIRUS. Advisor: Prof. SIRIPORN DAMRONGSAKKUL, Ph.D. Co-advisor: Asst. Prof. Jittima Luckanagul, Ph.D.

The objective of this work was to develop silk fibroin film with high flexibility by blending with gelatin and glycerol as plasticizers. Water vapor annealing was also employed to improve the stability of the films. The results showed that the incorporation of 20% glycerol into silk fibroin and silk fibroin/gelatin films increased the elongation at break of the films up to 70%. The glass transition temperatures of the films were gradually decreased with the increase of glycerol content. The hydroxyl groups of glycerol interfered the arrangement of silk fibroin and gelatin chains, leading to a high chain movement which could enhance the flexibility of the films. Furthermore, water vapor annealing induced structural transition of silk fibroin from predominated random coil to beta sheet structure, resulting in a higher stability of films. Additionally, arginyl-glycyl-aspartic acid mutant of tobacco mosaic virus (TMV-RGD) were conjugated to the films to enhance cell attachment and proliferation. From in vitro cell culture tests, the attachment and proliferation of L929 mouse fibroblasts cultured on the films covalently crosslinked with TMV-RGD were greater than those without TMV-RGD. In summary, the blended film of silk fibroin, gelatin, and 20% glycerol, treated with water vapor annealing and conjugated with TMV-RGD, exhibited as a potential biomaterial for biomedical applications.

Field of Study: Chemical Engineering

Student's Signature

Academic Year: 2019

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลือและการสนับสนุนจากบุคคลหลายท่าน ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ตำรงค์ศักดิ์กุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาณุ. ดร. จิตติมา ลักนากุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม เป็นอย่างสูงที่ได้ให้คำปรึกษา และคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ การวางแผนงานวิจัย แนวทางในการดำเนินงานวิจัย ให้ความรู้ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการวิจัยนี้ อีกทั้งยังคงยอให้กำลังใจและเป็นแรงผลักดันให้ผู้วิจัยก้าวต่อไปได้เสมอมา คอยเตือนให้ผู้วิจัยมีสติ สมาธิ ในการอ่านเอาเรื่องทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ การใช้ชีวิต และทำให้ผู้วิจัยตระหนักได้ว่าเราสามารถพัฒนาตัวเองให้ดียิ่งขึ้นได้เสมอ หากเรากำจัดความกลัวและพร้อมที่จะกล้าเผชิญหน้ากับปัญหาต่าง ๆ

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โศรดา กนกพานนท์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จุฑามาศ รัตนวรารณณ์ และดร.พีรพัฒน์ ทองนิก ที่คอยให้ความรู้ คำแนะนำต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการวิจัยนี้ และให้ความช่วยเหลือในทุกด้านการทดลอง งานวิจัยนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิรักษ์ สุธธิธรรวรัช ประธาน รองศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ วรมงคลชัย กรรมการภายนอก ที่สละเวลาอันมีค่ามาสอบวิทยานิพนธ์ และให้ความรู้ คำแนะนำต่าง ๆ มากมาย

ขอขอบคุณศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์พระบรมราชินีนาถ จังหวัดนครราชสีมา สำหรับความอนุเคราะห์รังไหมสำหรับใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณหน่วยปฏิบัติการวิจัยวิศวกรรมชีววัสดุเพื่อการแพทย์และสุขภาพ หน่วยปฏิบัติการวิจัยวิศวกรรมพอลิเมอร์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ หน่วยปฏิบัติการคณะเภสัชศาสตร์ ภาควิชาวิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม และศูนย์เครื่องมือวิจัยทางเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับสถานที่ วัสดุ อุปกรณ์เครื่องมือในการทำวิจัย และความอนุเคราะห์เอื้อเฟื้อในการใช้เครื่องมือต่าง ๆ งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณคุณอัจฉรา เพ็งจันทร์ ที่คอยช่วยเหลือและให้คำปรึกษาในเรื่องเอกสารต่าง ๆ ตั้งแต่เรื่องการลงทะเบียนเรียน ถอดถอนและเพิ่มรายวิชาเรียน ตลอดจนเอกสารสำหรับการสอบจบ ให้ผ่านพ้นไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคุณชวี่ เหล่ามีผล คุณรุ่งนภา แยมเดช คุณกันยาลักษณ์ แก้วประสิทธิ์ คุณอรทัย ศุภวรรณวิบูล คุณอนงค์นาฏ ดวงภักดี คุณปรมาภรณ์ สหไพบุลย์กิจ คุณอริกา ชุ่มมงคล คุณพัชระ อ่ำประเสริฐ Mrs. Ana Cláudia Lima และพี่ ๆ น้อง ๆ ทุกคน รวมทั้งคุณนภพรรณ คุณานุสนธิ์ คุณภัทริน โมราและเพื่อน ๆ จากห้องปฏิบัติการวิจัยวิศวกรรมพอลิเมอร์ ที่ได้ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือ ชี้แนะในทุกด้านของการทดลอง ให้พลังบวกและกำลังใจงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี คอยสนับสนุน

สร้างรอยยิ้ม เสียงหัวเราะ สนุกสนานและอบอุ่นตลอดเวลาที่ได้อยู่ด้วยกัน ทำให้แลบเป็นเหมือนอีกครอบครัวหนึ่ง และขอบคุณเพื่อน ๆ จากโรงเรียนวัฒนาวิทยาลัยและมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่คอยให้พลัง ความเชื่อมั่นและกำลังใจดีตลอดเวลา

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และอ๊ากที่เป็นแรงผลักดัน ให้คำปรึกษา คอยสนับสนุนทุกอย่าง รวมทั้งให้กำลังใจและทำให้ผู้วิจัยสามารถก้าวผ่านอุปสรรคต่าง ๆ และดำเนินงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบคุณที่เชื่อใจไม่กดดันจนทำให้เครียด ขอขอบคุณที่ช่วยทำงานบ้านและทำอาหารอร่อย ๆ อาหารบำรุงสมองให้เพื่อให้มีเวลาทำงานวิจัยเพิ่มขึ้น ขอขอบคุณที่คอยสร้างรอยยิ้ม พลังใจ พลังกาย และเสียงหัวเราะให้เสมอ และขอบคุณวงดนตรีจากเกาหลี่ได้ บังทั้นโซยอนดัน ที่ได้ให้แง่คิดและกำลังใจในวันที่ผู้วิจัยรู้สึกท้อ หมดหวังผ่านเนื้อเพลง ก่อนที่เราจะพบกับแสงสว่าง แสงนั้นจะอยู่ในจุดที่มีดมืดที่สุด ไม่ว่าจะตอนนี้จะหยุดอยู่ที่ใด มันเป็นเพียงความท้อ ไม่ใช่การถอย ถ้าบินไม่ได้ก็ต้องวิ่ง ถ้าวิ่งไม่ไหวก็ต้องเดิน ถ้าเดินไม่ไหวก็ต้องคลาน การที่เราอยู่อยู่กับที่ มันจะทำให้วันพรุ่งนี้มาถึงช้าลง จงอย่ายอมแพ้ และก้าวเดินต่อไปด้วยสติ และขอบคุณตัวผู้วิจัยเองเช่นกันที่สามารถเอาชนะตัวเองในอดีตได้ จากที่เคยบอกว่า Dear me, one day I'll make you proud. วันนี้ I can make me proud แล้วนะ ฝากถึงตัวเองในอนาคตเช่นกันว่าไม่มีอะไรที่เราทำไม่ได้หากเราตั้งใจและไม่ย่อท้อ Just because it's hard doesn't mean it's impossible!.

จุฑาทิพย์ ปัญจมนี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูปภาพ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	3
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.1 ชีววัสดุ (Biomaterials).....	6
2.1.1 ไหม (Silk).....	6
2.1.1.1 โครงสร้างและองค์ประกอบของเส้นใยไหม.....	6
1. เซรีซิน (Sericin).....	8
2. ไฟโบรอิน (Fibroin).....	8
2.1.1.2 สมบัติของไฟโบรอินไหม.....	11
2.1.1.3 การประยุกต์ใช้งานของไฟโบรอินไหม.....	11
2.1.2 เจลาติน (Gelatin).....	13
2.1.2.1 โครงสร้างและองค์ประกอบของเจลาติน.....	14

2.1.2.2 สมบัติของเจลาติน.....	16
2.1.2.3 การประยุกต์ใช้งานของเจลาติน.....	17
2.2 กลีเซอรอล (Glycerol)	18
2.2.1 โครงสร้างของกลีเซอรอล.....	18
2.2.2 สมบัติของกลีเซอรอล.....	18
2.2.3 การประยุกต์ใช้งานของกลีเซอรอล	18
2.3 ไวรัสใบต่างยาสูบ (Tobacco mosaic virus; TMV).....	19
2.3.1 โครงสร้างของไวรัสใบต่างยาสูบ.....	19
2.3.2 การประยุกต์ใช้งานของไวรัสใบต่างยาสูบ	21
2.4 การอบนึ่งด้วยไอน้ำ (Water vapor annealing).....	22
2.5 การเชื่อมขวาง (Crosslinking).....	23
2.5.1 การเชื่อมขวางทางกายภาพ (Physical crosslinking).....	23
2.5.1.1 การเชื่อมขวางด้วยความร้อนแบบกำจัดน้ำออก (Dehydrothermal treatment, DHT).....	23
2.5.1.2 การเชื่อมขวางโดยการใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet irradiation).....	24
2.5.1.3 การเชื่อมขวางโดยการฉายรังสีแกมมา (Gamma radiation).....	24
2.5.2 การเชื่อมขวางทางเคมี (Chemical crosslinking)	25
2.4.2.1 การเชื่อมขวางด้วยกลูตารอลดีไฮด์ (Glutaraldehyde)	25
2.4.2.2 การเชื่อมขวางด้วยฟอร์มอลดีไฮด์ (Formaldehyde)	27
2.4.2.3 การเชื่อมขวางด้วยสารประกอบอีพอกซี (Epoxy compound).....	28
2.4.2.4 การเชื่อมขวางด้วย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) และ N-hydroxysuccinimide esters (NHS)	29
2.6 ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility).....	30
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	32

2.7.1 การพัฒนาฟิล์มผสมระหว่างไฟโบรอินไหมและเจลาติน	32
2.7.2 การตัดแปรฟิล์มไฟโบรอินไหมไทยด้วยกลีเซอรอล	34
2.7.3 การอบนึ่งด้วยไอน้ำของไฟโบรอินไหมไทย	35
2.7.4 การตัดแปรพื้นผิววัสดุด้วยไวรัสไบต่างยาสูบที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมด้วยลำดับกรดอะมิโนอาร์จินิลไกลซิลแอสปาดิก	36
บทที่ 3 วัสดุและวิธีการดำเนินการวิจัย.....	37
3.1 วัสดุและสารเคมี.....	37
3.2 อุปกรณ์.....	38
3.3 แผนผังการดำเนินงานวิจัย	40
3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....	41
3.4.1 การเตรียมสารละลายผสมไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน	41
3.4.1.1 การเตรียมสารละลายไฟโบรอินไหมไทย	41
3.4.1.2 การเตรียมสารละลายเจลาติน	44
3.4.2 การวิเคราะห์ค่าศักย์ซีตา (Zeta potential) ของสารละลายด้วยเครื่อง Zeta sizer .	44
3.4.3 การขึ้นรูปฟิล์มผสมไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกลีเซอรอล.....	44
3.4.4 การอบนึ่งด้วยไอน้ำของฟิล์มผสมไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกลีเซอรอล.....	44
3.4.5 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของฟิล์มผสม.....	44
3.4.5.1 การทดสอบความแข็งแรงในการทนแรงดึงด้วยเครื่อง Universal Testing Analyzer	44
3.4.5.2 การทดสอบสมบัติทางความร้อนของฟิล์มผสมด้วยเครื่อง Dynamic mechanical analyzer.....	46
3.4.5.3 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมี.....	47
3.4.5.4. ความคงตัวของฟิล์มผสมไฟโบรอินไหม เจลาติน และกลีเซอรอล.....	48
3.4.6 การเตรียมสารละลายไวรัสไบต่างยาสูบ	49
3.4.7 การวิเคราะห์คุณลักษณะและความเข้มข้นของไวรัสไบต่างยาสูบ	52

3.4.7.1	สัณฐานของไวรัสใบต่างยาสูบ.....	52
3.4.7.2	การหาความเข้มข้นของสารละลายไวรัสใบต่างยาสูบ.....	52
3.4.7.3	การจำแนกชนิดของไวรัส โดยเทคนิค Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF).....	53
3.4.8	การตัดแปรพื้นผิวของฟิล์มผสมด้วยไวรัสใบต่างยาสูบ TMV-wt และ TMV-RGD โดยวิธีการเคลือบและการเชื่อมขวางด้วย EDC/NHS และการประเมินประสิทธิภาพของการตัดแปรทั้งสองวิธี.....	54
3.4.8.1	โดยวิธีการเคลือบ	54
3.4.8.2	โดยการเชื่อมขวางด้วย EDC/NHS.....	55
3.4.9	การวิเคราะห์สมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพของฟิล์มผสม	57
3.4.9.1	การเตรียมเซลล์ไฟโบรบลาสต์ผิวหนังหนู (L929 mouse fibroblast)	57
3.4.9.2	การยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการ	57
3.5	การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	60
3.6	สถานที่ทำงานวิจัย	60
บทที่ 4	ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง	61
4.1	สมบัติของฟิล์มผสมไฟโบรอินไหมไทยและกลีเซอรอล SF/Gly() และฟิล์มผสม ไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกลีเซอรอล (SF/GA/Gly) ที่ไม่ผ่านและผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ	61
4.1.1	ค่าศักย์ซีตาของสารละลาย	61
4.1.2	สมบัติของฟิล์มผสม SF/Gly และฟิล์มผสม SF/GA/Gly.....	64
4.1.2.1	ผลการทดสอบความแข็งแรงของฟิล์มผสมในการทนแรงดึง.....	64
4.1.2.2	ผลการทดสอบสมบัติทางความร้อน.....	70
4.1.2.3	สมบัติทางเคมีของฟิล์มผสม.....	73
4.1.2.4	ผลการทดสอบความคงตัวในน้ำของฟิล์มผสม.....	80
4.2	คุณลักษณะและสมบัติของไวรัสใบต่างยาสูบที่ไม่ถูกตัดแปลงพันธุกรรม (TMV-wt) และถูกตัดแปลงพันธุกรรมด้วยกรดอะมิโนอาร์จินีนไกลซิลแอสปาทิก (TMV-RGD)	84

4.2.1	สัณฐานของไวรัสใบต่างยาสูบ	84
4.2.2	ความเข้มข้นของสารละลายไวรัสใบต่างยาสูบ.....	86
4.2.3	ผลการจำแนกชนิดของไวรัส	87
4.3	ผลการตัดแปรพื้นผิวฟิล์มผสมด้วยไวรัส TMV-wt และไวรัส TMV-RGD โดยวิธีการเคลือบและการเชื่อมขวางด้วยสารเคมี	89
4.4	สมบัติทางชีวภาพของฟิล์มผสมที่ถูกตัดแปรพื้นผิวด้วยไวรัสใบต่างยาสูบที่ไม่ถูกตัดแปรพันธุกรรม (TMV-wt) และที่ถูกตัดแปรพันธุกรรมด้วยกรดอะมิโนอาร์จินีนไกลซิลแอลสปาดิก (TMV-RGD).....	93
4.4.1	ผลการยึดเกาะของเซลล์บนฟิล์มผสม	93
4.4.2	ผลการเจริญเติบโตของเซลล์บนฟิล์มผสม	97
บทที่ 5	สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	101
5.1	สรุปผลการทดลอง	101
	บรรณานุกรม.....	104
	ภาคผนวก.....	113
	ภาคผนวก ก	114
	ความสัมพันธ์ระหว่างความเค้นและความเครียดต่อความแข็งแรงของฟิล์มในการทนแรงดึง.....	114
	ภาคผนวก ง.....	119
	ภาคผนวก จ	120
	กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์ผิวหนังหนู (L929).....	120
	ประวัติผู้เขียน.....	121

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 องค์ประกอบของเส้นใยไหม [20]	7
ตารางที่ 2 องค์ประกอบกรดอะมิโนในเส้นใยไฟโบรอินไหมและเซรีซิน [41].....	10
ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบสมบัติเชิงกลของไฟโบรอินไหมและวัสดุชนิดอื่นๆ [42]	11
ตารางที่ 4 การขึ้นรูปและการประยุกต์การใช้งานของเส้นใยไฟโบรอินไหม [20]	12
ตารางที่ 5 โครงสร้างของเจลาตินที่ได้จากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของหมู [47]	15
ตารางที่ 6 สมบัติของเจลาตินชนิดเอและชนิดบี [49]	17
ตารางที่ 7 โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนและหมูไทโรซีน [80]	47
ตารางที่ 8 ค่าศักย์ซีตาของสารละลายไฟโบรอินไหม สารละลายเจลาติน สารละลายกลีเซอรอล และ สารละลายผสมไฟโบรอินเจลาตินและกลีเซอรอล ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ในน้ำปราศจาก ประจุ (pH 5.5) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส.....	63
ตารางที่ 9 โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนและหมูไทโรซีน [80]	76
ตารางที่ 10 ร้อยละโครงสร้างทุติยภูมิและหมูไทโรซีนของฟิล์ม SF100 และฟิล์มผสม SF/Gly และ ฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ไม่ผ่าน (No WVA) และผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ (WVA).....	77
ตารางที่ 11 ร้อยละโครงสร้างทุติยภูมิและหมูไทโรซีนของฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ไม่ผ่าน (No WVA) และผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ (WVA)	77
ตารางที่ 12 ร้อยละการยึดเกาะ (Percentage of attachment) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate, μ) และระยะเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (Population doubling time, PDT) ของเซลล์ L929 บนฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ไม่ถูกดัดแปรพื้นผิว (Unmodified) และฟิล์มผสมถูกดัด แปรพื้นผิวด้วยไวรัส TMV-wt และ TMV-RGD โดยวิธีการเคลือบและการเชื่อมขวาง เปรียบเทียบกับ เซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนภาชนะเลี้ยงพอลิสไตรีน (TCP).....	95

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 โครงสร้างของเส้นใยไหมที่ได้จากหนอนไหม ก) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ ข) ภาพวาด [10]	7
รูปที่ 2 โครงสร้างโมเลกุลของไฟโบรอิน Hydrophobic interaction of P25, containing Asn-linked oligosaccharide chains, with the H-L complex of silk fibroin produced by <i>Bombyx mori</i> [40]	9
รูปที่ 3 กระบวนการผลิตเจลาตินชนิดเอ และชนิดบี [46]	13
รูปที่ 4 โครงสร้างของกลีเซอรอล [24]	18
รูปที่ 5 ก) รูปร่างลักษณะของไวรัสใบต่างยาสูบ ข) โครงสร้างของไวรัสใบต่างยาสูบ [39, 54].....	20
รูปที่ 6 การอบนึ่งนมด้วยไอน้ำของโปรตีน	22
รูปที่ 7 การเชื่อมขวางคอลลาเจนด้วยความร้อนแบบกำจัดน้ำออก [57].....	23
รูปที่ 8 โครงสร้างของกลูตาโรลดีไฮด์ [63].....	26
รูปที่ 9 กลไกการเชื่อมขวางด้วยกลูตาโรลดีไฮด์ [64].....	26
รูปที่ 10 การเชื่อมขวางด้วยฟอร์มอลดีไฮด์ [66].....	27
รูปที่ 11 การเชื่อมขวางด้วยสารประกอบอีพอกซี [68].....	28
รูปที่ 12 การเชื่อมขวางของคอลลาเจนด้วย EDC และ NHS [70].....	29
รูปที่ 13 สันฐานวิทยาของเซลล์ผิวหนังของหนูที่กำลังขยายของกล้อง 100 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 100 ไมครอน) [74]	31
รูปที่ 14 แผนผังการดำเนินงานวิจัย.....	40
รูปที่ 15 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายไฟโบรอิน.....	43
รูปที่ 16 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายไวรัสใบต่างยาสูบ.....	51
รูปที่ 17 คำศัพย์ซีตาของสารละลายผสมไฟโบรอินไหม เจลาตินและกลีเซอรอล ความเข้มข้น ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในช่วงค่าความเป็นกรดต่าง 2-9.....	63

รูปที่ 18 (ก) ค่าการดึงยึด ณ จุดขาด (ข) ค่ามอดูลัสของยัง ของฟิล์มผสม SF/Gly ที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ (No WVA) และผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ (WVA)	65
รูปที่ 19 (ก) ค่าการดึงยึด ณ จุดขาด (ข) ค่ามอดูลัสของยัง ของฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ไม่ผ่าน (No WVA) และผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ (WVA)	67
รูปที่ 20 ค่าอุณหภูมิเปลี่ยนแปลงสภาพแก้วของ (ก) ฟิล์มผสม SF/Gly และ (ข) ฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ไม่ผ่าน (No WVA) และผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ (WVA).....	71
รูปที่ 21 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของฟิล์ม SF100 ฟิล์มผสม SF/Gly และฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ไม่ผ่าน (No WVA) และผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ (WVA).....	76
รูปที่ 22 ร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือของ (ก) ฟิล์มผสม SF/Gly และ (ข) ฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ไม่ผ่าน (No WVA) และผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ (WVA) ภายหลังจากแช่น้ำปราศจากประจุ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	82
รูปที่ 23 ร้อยละปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำของ (ก) ฟิล์มผสม SF/Gly และ (ข) ฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ไม่ผ่าน (No WVA) และผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ (WVA) ภายหลังจากแช่น้ำปราศจากประจุ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	83
รูปที่ 24 ลักษณะสัณฐานของ (ก) ไวรัส TMV-wt (ข) ไวรัส TMV-RGD ที่กำลังขยาย 150,000 เท่า	85
รูปที่ 25 กราฟสเปกตรัมมวลต่อประจุของ (ก) ไวรัส TMV-wt และ (ข) ไวรัส TMV-RGD ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) ที่สัดส่วนมวลต่อประจุบวกของไอออนเป็น 1:1	88
รูปที่ 26 การเชื่อมขวางทางเคมีของไวรัสไบต่างยาสูบกับฟิล์มผสม SF/GA/Gly ด้วย EDC ร่วมกับ NHS โดยที่ R1 คือ ฟิล์มผสม SF/GA/Gly และ R2 คือไวรัสไบต่างยาสูบ [69].....	91
รูปที่ 27 สัณฐานพื้นผิวฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ตัดแปรด้วยไวรัส TMV-RGD ที่ความเข้มข้น 0.1M โดยวิธีการเชื่อมขวางทางเคมี วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Atomic force microscope (AFM) ก) ภาพสามมิติ ข) ภาพสองมิติ (ระดับความสูงของข้อมูลภาพที่ 30 นาโนเมตร).....	92
รูปที่ 28 การเปลี่ยนแปลงความสูง - ต่ำของพื้นผิวฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ตัดแปรด้วยไวรัส TMV-RGD ที่ความเข้มข้น 0.1 M ด้วยวิธีการเชื่อมขวางทางเคมี จากการกวาดหัวเข็มไปบนพื้นผิวฟิล์มที่บริเวณเส้นสีขาวในภาพ 27ข (ระดับความสูงของข้อมูลภาพที่ 30 นาโนเมตร).....	92

รูปที่ 29 รูปร่างของเซลล์ผิวหนังหนู (L929) เมื่อเพาะเลี้ยงบนฟิล์มผสมที่ไม่ดัดแปร (Unmodified) และดัดแปรด้วยไวรัส TMV-wt และ TMV-RGD โดยวิธีการเคลือบ (Coating) และวิธีการเชื่อมขวาง (Crosslinking) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กำลังขยาย (20x)..... 96

รูปที่ 30 อันตรกิริยาระหว่างอินทิกรินบนเยื่อหุ้มเซลล์กับลำดับกรดอะมิโน RGD บนไวรัสใบตองยาสูบ ที่ดัดแปรบนฟิล์มผสม SF/GA/Gly 96

รูปที่ 31 ปริมาณเซลล์ L929 ที่ถูกเพาะเลี้ยงบน ภาชนะเลี้ยงพอลิสไตรีน (TCP) ฟิล์มผสมที่ไม่ถูกดัดแปร (Unmodified) และถูกดัดแปรด้วยไวรัส TMV-wt และ TMV-RGD โดยวิธีการเคลือบ (Coating) และวิธีการเชื่อมขวาง (Crosslinking) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง 1, 3, 5 และ 7 วัน ในสภาวะบรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ ความเข้มข้น 5% (a – q แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$)..... 99

รูปที่ 32 กราฟการเติบโตของเซลล์ L929 ที่เพาะเลี้ยงบนฟิล์มผสมที่ดัดแปรด้วยไวรัสโดย ก) วิธีการเคลือบ ข) วิธีการเชื่อมขวาง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง, 1, 3, 5 และ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะบรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5%..... 100

รูปที่ 33 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเค้น (Tensile stress) และความเครียด (Tensile strain) ของ ก) ฟิล์ม SF100 ฟิล์มผสม SF/Gly ที่ปริมาณกลีเซอรอลร้อยละ ข) 5 ค) 10 ง) 20 และ จ) 30 โดยน้ำหนัก..... 114

รูปที่ 34 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเค้น (Tensile stress) และความเครียด (Tensile strain) ของ ก) ฟิล์ม SF/GA ฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ปริมาณกลีเซอรอลร้อยละ ข) 5 ค) 10 ง) 20 และ จ) 30 โดยน้ำหนัก 115

รูปที่ 35 กราฟอุณหภูมิเปลี่ยนสภาพแก้วของฟิล์มไฟโบรอินไหม และฟิล์มผสม SF/Gly ที่ปริมาณกลีเซอรอลต่าง ๆ (5, 10, 20 และ 30 โดยน้ำหนัก) ก) ก่อนการอบนึ่งด้วยไอน้ำ และ ข) หลังการอบนึ่งด้วยไอน้ำ..... 116

รูปที่ 36 กราฟอุณหภูมิเปลี่ยนสภาพแก้วของฟิล์มไฟโบรอินไหม และฟิล์มผสม SF/Gly ที่ปริมาณกลีเซอรอลต่าง ๆ (5, 10, 20 และ 30 โดยน้ำหนัก) ก) ก่อนการอบนึ่งด้วยไอน้ำ และ ข) หลังการอบนึ่งด้วยไอน้ำ..... 116

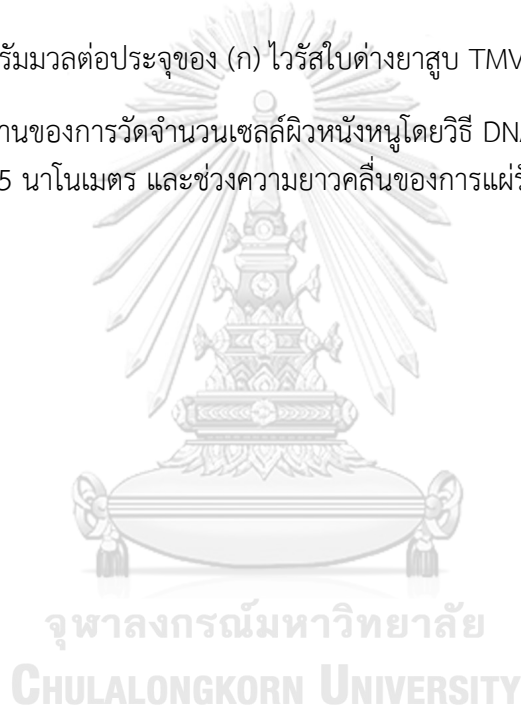
รูปที่ 37 กราฟมอดุลัสสะสม (Storage modulus) ของฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ปริมาณกลีเซอรอลต่าง ๆ (5, 10, 20 และ 30 โดยน้ำหนัก) (ก) ก่อนการอบนึ่งด้วยไอน้ำ และ (ข) หลังการอบนึ่งด้วยไอน้ำ 117

รูปที่ 38 กราฟมอดุลัสสูญเสีย (Loss modulus) ของฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ปริมาณกลีเซอรอลต่าง ๆ (5, 10, 20 และ 30 โดยน้ำหนัก) (ก) ก่อนการอบนึ่งด้วยไอน้ำ และ (ข) หลังการอบนึ่งด้วยไอน้ำ 117

รูปที่ 39 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของฟิล์มไฟโบรอิน (SF100) ฟิล์มผสม SF/Gly และฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ไม่ผ่าน (No WVA) และผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ (WVA) 118

รูปที่ 40 กราฟสเปกตรัมมวลต่อประจุของ (ก) ไวรัสใบตำยาสูบ TMV-wt (ข) ไวรัสใบตำยาสูบ. 119

รูปที่ 41 กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์ผิวหนังหนูโดยวิธี DNA assay (ช่วงความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นที่ 355 นาโนเมตร และช่วงความยาวคลื่นของการแผ่รังสีที่ 460 นาโนเมตร)..... 120



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ

วิศวกรรมเนื้อเยื่อ เป็นการนำองค์ความรู้ด้านชีววิทยา วัสดุศาสตร์ เกษศาสตร์ แพทยศาสตร์ และวิศวกรรมศาสตร์มาประยุกต์ใช้ โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อทดแทน ซ่อมแซม หรือฟื้นฟูการทำงานของเนื้อเยื่อ หรืออวัยวะที่สูญเสีย หรือบาดเจ็บ และไม่สามารถสร้างใหม่ได้เอง วิศวกรรมเนื้อเยื่อประกอบไปด้วย 3 ส่วนสำคัญ ได้แก่ (1) เซลล์ (2) สัญญาณทางเคมี ภายภาพ หรือชีวภาพที่กระตุ้นการทำงานของเซลล์ และ (3) ชีววัสดุซึ่งทำหน้าที่เป็นโครงเลี้ยง เซลล์ [1] โดยเมื่อใช้วัสดุดังกล่าวในเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตระบบภูมิคุ้มกันจะต้องมีการตอบสนอง อย่างเหมาะสม [2] วัสดุสามารถย่อยสลายได้ และผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสลายต้องไม่ เป็นพิษ ส่งผลให้วัสดุนั้น ๆ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ [3, 4]

ชีววัสดุรูปแบบหนึ่งที่น่าสนใจในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ได้แก่ พิล์ม ซึ่งเป็นชีววัสดุ รูปแบบสองมิติที่สามารถใช้งานกับเนื้อเยื่อเป้าหมายได้หลากหลาย เช่น เปลือกตา หรือกระจก ตา [5, 6] นอกจากนี้ พิล์มยังเตรียมได้ง่ายจากพอลิเมอร์หลากหลายชนิด เช่น พอลิเมอร์ สังเคราะห์ ได้แก่ พอลิแลกติกแอซิด [7] พอลิไกลคอลิกแอซิด [8] พอลิคาโพรแลคโตน [9] และพอลิเมอร์ธรรมชาติ ได้แก่ ไพโบรอินไหม [10] คอลลาเจน [11] เจลาติน [12] กรดไฮยาลู รอนิก [13] ไคโตซาน [14] พอลิเมอร์ธรรมชาติมีข้อดีเหนือพอลิเมอร์สังเคราะห์คือ สามารถ เกิดขึ้นได้ตามธรรมชาติและได้ผลผลิตในปริมาณมาก และผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสลายมี ความปลอดภัย อย่างไรก็ตาม พอลิเมอร์ธรรมชาติ เช่น คอลลาเจน เจลาติน และกรดไฮยาลู รอนิก มีอัตราการย่อยสลายในร่างกายอย่างรวดเร็ว [15, 16] และมีสมบัติทางกลต่ำ [17] ไพโบรอินไหม เป็นชีววัสดุประเภทโปรตีนจากธรรมชาติ ที่มีอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพต่ำ และมีสมบัติทางกลที่ดี [18] จึงมีการนำพอลิเมอร์ธรรมชาติเหล่านี้มาผสมกันเพื่อให้ฟิล์มมี สมบัติที่เหมาะสมต่อความต้องการในการนำไปใช้งาน

ไพโบรอินไหมเป็นโปรตีนที่ได้จากหนอนไหมกินใบหม่อน (*Mulberry silkworms*) สาย พันธุ์ *Bombyx mori* ที่มีประวัติการใช้งานทางการแพทย์มาอย่างยาวนาน ในรูปแบบของไหม เย็บแผล [19] นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาและใช้งานไพโบรอินไหมในรูปแบบอื่น ๆ เช่น อนุภาค ขนาดไมครอน โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติ เส้นใยขนาดนาโน และแผ่นฟิล์ม [20] เนื่องจาก ไพโบรอินไหมมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ สามารถปรับปรุงอัตราการย่อยสลายได้ และมี สมบัติทางกลที่โดดเด่น อันเนื่องมาจากการจัดเรียงโครงสร้างทุติยภูมิชนิดแผ่นพลีทเบต้า (β -sheet) ที่เกิดจากอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลไม่มีขั้ว (Hydrophobic interaction) และ

พันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bond) [21] จากการศึกษาก่อนหน้านี้ มีการพัฒนาแผ่นฟิล์มจากไฟโบรอินใหม่สำหรับเปลือกตา [22] หรือผิวหนัง [23] โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อเพิ่มความคงทนต่อการเสียดสีของอวัยวะเหล่านั้น อย่างไรก็ตาม ฟิล์มไฟโบรอินใหม่ดังกล่าวมีลักษณะแข็งเปราะ ไม่ยืดหยุ่น ส่งผลให้ไม่สะดวกต่อการใช้งาน ดังนั้น จึงมีการปรับปรุงฟิล์มไฟโบรอินใหม่ให้มีความยืดหยุ่นด้วยพลาสติกไซเซอร์ (Plasticizers) โดยพลาสติกไซเซอร์ที่นิยมนำมาใช้คือ กลีเซอรอล [24] เนื่องด้วยเป็นสารที่ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (USFDA) สำหรับใช้ในทางการแพทย์

ถึงแม้ว่าไฟโบรอินใหม่จะมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ แต่โครงสร้างปฐมภูมิของไฟโบรอินใหม่นั้นไม่มีลำดับกรดอะมิโนที่ส่งเสริมการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ ส่งผลให้เซลล์มีอัตราการยึดเกาะต่ำ และเจริญเติบโตช้า [25] โดยสมบัติดังกล่าวสามารถปรับปรุงได้โดยวิธีการต่าง ๆ เช่น การปรับปรุงพื้นผิวของแผ่นฟิล์มไฟโบรอินใหม่ด้วยพลาสมา [26] หรือการผสมกับชีววัสดุอื่น เช่น เจลาติน เนื่องจากเจลาตินมีลำดับกรดอะมิโนอาร์จินิลไกลซิล แอสปาทิก (Arginyl-Glycyl-Aspartic acid, RGD) ที่สนับสนุนการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ [27] งานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่าร้อยละการยึดเกาะของเซลล์ผิวหนังหนู L929 ที่เพาะเลี้ยงบนฟิล์มผสมไฟโบรอินใหม่และเจลาตินเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มไฟโบรอินใหม่ [28] นอกจากการปรับปรุงสมบัติทางชีวภาพของไฟโบรอินใหม่ ชีววัสดุผสมระหว่างไฟโบรอินใหม่และเจลาตินยังมีสมบัติทางกายภาพที่ดีขึ้น เช่น มีความยืดหยุ่นเพิ่มขึ้น และสนับสนุนการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์ให้ดีขึ้น ดังนั้นจึงมีการนำเจลาตินมาประยุกต์ใช้กับไฟโบรอินใหม่ในหลายรูปแบบ ได้แก่ ฟิล์ม [29] โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติ [30] แผ่นเส้นใย [31] อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน [32] หรือไฮโดรเจล [33]

แต่ข้อจำกัดของเจลาตินคือ เจลาตินละลายในน้ำได้ง่าย [34] โดยในงานวิจัยก่อนหน้านี้ ได้เพาะเลี้ยงเซลล์บนฟิล์มผสมไฟโบรอินใหม่และเจลาติน (อัตราส่วน 80 ต่อ 20 โดยปริมาตร) พบว่าร้อยละการยึดเกาะของเซลล์เท่ากับ 60 ถึง 70 [27, 35] และอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงลดลงตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากอันตรกิริยาระหว่างไฟโบรอินใหม่และเจลาตินเป็นอันตรกิริยาทางกายภาพเท่านั้น เจลาตินจึงมีโอกาสที่เกิดการละลายในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ [36] ดังนั้นเพื่อพัฒนาฟิล์มผสมให้เซลล์สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตได้ดีขึ้น จึงนำไวรัสจากพืชมาประยุกต์ใช้ ซึ่งในปัจจุบันมีการดัดแปลงพันธุกรรมของไวรัสจากพืชเพื่อให้ตรงต่อวัตถุประสงค์ที่จะนำไปใช้งานในทางการแพทย์อย่างแพร่หลาย [37] ในงานวิจัยนี้ จึงเลือกใช้ไวรัสใบด่างยาสูบ (Tobacco mosaic virus; TMV) ที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมด้วยลำดับกรดอะมิโน RGD (TMV-RGD) ในการดัดแปรพื้นผิวของฟิล์มด้วยการเคลือบ และการเชื่อมขวางทางเคมี โดยข้อดีของไวรัส TMV-RGD คือ ผลิตได้ใน

ปริมาณมาก สามารถคำนวณปริมาณลำดับกรดอะมิโน RGD ได้อย่างแม่นยำเป็นส่วนต่อ
จำนวนไวรัส และไวรัสชนิดนี้ติดต่อกันได้เฉพาะในพีช จึงปลอดภัยต่อการใช้งานกับเซลล์สัตว์มี
กระดูกสันหลัง [38, 39]

ในงานวิจัยนี้ มีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาฟิล์มไฟโบรอินใหม่ที่มีความยืดหยุ่น โดยใช้
กลีเซอรอลเป็นพลาสติกไซเซอร์ รวมทั้งปรับปรุงสมบัติทางชีวภาพที่สนับสนุนการยึดเกาะและ
เจริญเติบโตของเซลล์ โดยผสมเจลาตินในสัดส่วนร้อยละ 20 โดยปริมาตร นอกจากนี้ มีการใช้
กระบวนการอบนึ่งด้วยไอน้ำ (Water vapor annealing; WVA) เพื่อเพิ่มความคงตัวของฟิล์ม
ฟิล์มที่ได้จะนำไปวิเคราะห์สมบัติทางกล และความร้อน ความคงตัวในสารละลาย และสมบัติ
ทางเคมี เพื่อเปรียบเทียบผลของเจลาติน กลีเซอรอลที่ปริมาณต่าง ๆ และกระบวนการอบนึ่ง
ด้วยไอน้ำ ต่อสมบัติดังกล่าวของฟิล์ม จากนั้น จึงนำฟิล์มมาตัดแปรพื้นผิวด้วยไวรัส เพื่อ
ปรับปรุงการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์บนพื้นผิวฟิล์ม ซึ่งจะเป็นการส่งเสริมการ
ประยุกต์ใช้ฟิล์มในงานทางการแพทย์ให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 ศึกษาผลของการเติมเจลาตินร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก การเติมกลีเซอรอลใน
สัดส่วนต่าง ๆ (5 10 20 และ 30 โดยน้ำหนัก) และการอบนึ่งด้วยไอน้ำต่อสมบัติทางกายภาพ
และทางเคมีของฟิล์มไฟโบรอินใหม่

1.2.2 ศึกษาผลการตัดแปรพื้นผิวฟิล์มผสมด้วยไวรัสใบบางยาสูบโดยการเคลือบ และ
เชื่อมขวางด้วยสารเคมี EDC/NHS ต่อสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพของฟิล์มผสมไฟโบรอิน
ใหม่ เจลาตินและกลีเซอรอล

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 เตรียมสารละลายไฟโบรอินใหม่ไทยพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 สารละลายเจลาติน
ชนิดเอ และกลีเซอรอล

1.3.2 ขึ้นรูปฟิล์มผสมไฟโบรอินใหม่และกลีเซอรอล และฟิล์มผสมไฟโบรอินใหม่
เจลาตินชนิดเอ และกลีเซอรอล

ตัวแปรที่ศึกษา ได้แก่

- การเติมเจลาตินร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ในฟิล์มไฟโบรอินใหม่ไทย
- ปริมาณของกลีเซอรอลร้อยละ 5 10 20 และ 30 โดยน้ำหนัก
- การอบนึ่งด้วยไอน้ำของฟิล์มผสม

1.3.3 วิเคราะห์โครงสร้างทางกายภาพและสมบัติทางเคมีของฟิล์มผสมไฟโบรอินไหมและกลีเซอรอล และฟิล์มผสมไฟโบรอินไหมไทยผสมเจลาตินและกลีเซอรอล ได้แก่

- ความแข็งแรงในการทนแรงดึงยืดของฟิล์มผสมด้วยเครื่อง Universal testing machine
- สมบัติทางความร้อนของวัสดุด้วยเครื่องวิเคราะห์สมบัติเชิงกลพลวัต (Dynamic mechanical analyzer, DMA)
- โครงสร้างทางเคมีของฟิล์มผสมด้วยเครื่องฟลูเรียร์ทรานส์ฟอร์ม อินฟราเรดสเปคโตรมิเตอร์ (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)
- ความสามารถในการคงตัวของฟิล์มผสม

1.3.4 สกัดสารละลายไวรัสไบต่างยาสูบที่ไม่ดัดแปลงพันธุกรรม (TMV-wt) และไวรัสไบต่างยาสูบที่ดัดแปลงพันธุกรรมด้วยลำดับกรดอะมิโนอาร์จินิลไกลซิลแอสปาทิก (TMV-RGD) จากต้นยาสูบและศึกษาคุณลักษณะของไวรัสไบต่างยาสูบ

- วิเคราะห์สัณฐานของไวรัสไบต่างยาสูบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope; TEM)
- หาความเข้มข้นของสารละลายไวรัสไบต่างยาสูบด้วยเครื่องวัดปริมาณกรดนิวคลีอิกและโปรตีน (Nano drop spectrophotometer)
- จำแนกชนิดของไวรัส โดยเทคนิค Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF)

1.3.5 การดัดแปรพื้นผิวของฟิล์มผสมด้วยไวรัสไบต่างยาสูบที่ไม่ดัดแปลงพันธุกรรม (TMV-wt) และไวรัสไบต่างยาสูบที่ดัดแปลงพันธุกรรมด้วยลำดับกรดอะมิโนอาร์จินิลไกลซิลแอสปาทิก (TMV-RGD) โดยวิธีการเคลือบและการเชื่อมขวางด้วย สารเคมี 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) และ N-Hydroxysuccinimide (NHS)

1.3.6 สมบัติทางชีวภาพของฟิล์มไฟโบรอินไหมไทยผสมเจลาตินและกลีเซอรอลที่ถูกดัดแปรพื้นผิวฟิล์มผสมด้วยไวรัสไบต่างยาสูบ ที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมด้วยลำดับกรดอะมิโนอาร์จินิลไกลซิลแอสปาทิก

- การยึดเกาะของเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการ
- การเจริญเติบโตของเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ฟิล์มผสมไฟโบรอินไหม เจลาติน กลีเซอรอลที่ตัดแปรพื้นผิวด้วยไวรัสไบต่างยาสูบที่ถูกตัดแปลงพันธุกรรมด้วยลำดับกรดอะมิโนอาร์จินิลไกลซิลแอสปาทิก ที่สกัดได้จากใบต่างยาสูบที่มีสมบัติความยืดหยุ่น และช่วยสนับสนุนการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ดี สามารถประยุกต์ใช้ในร่างกายแล้วไม่ก่อให้เกิดพิษ และสามารถต่อยอดเพื่อประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ได้



บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชีววัสดุ (Biomaterials)

2.1.1 ไหม (Silk)

ไหม เป็นเส้นใยธรรมชาติซึ่งได้มาจากหนอนไหม (Silkworm) หรือแมลงชนิดอื่นๆ ส่วนใหญ่เป็นแมลงในไฟลัมสัตว์ขาปล้อง (Arthropoda) โดยหนอนไหมแบ่งได้ 2 ประเภท คือ

1. ไหมบ้าน (Domestic silkworm หรือ Mulberry silkworm) เป็นหนอนที่กินใบหม่อนเป็นอาหาร

Phylum	:	Arthropoda
Class	:	Insecta
Sub-Class	:	Pterygota
Division	:	Endopterygota
Order	:	Lepidoptera
Family	:	Bombycidae
Genus	:	Bombyx
Species	:	Mori

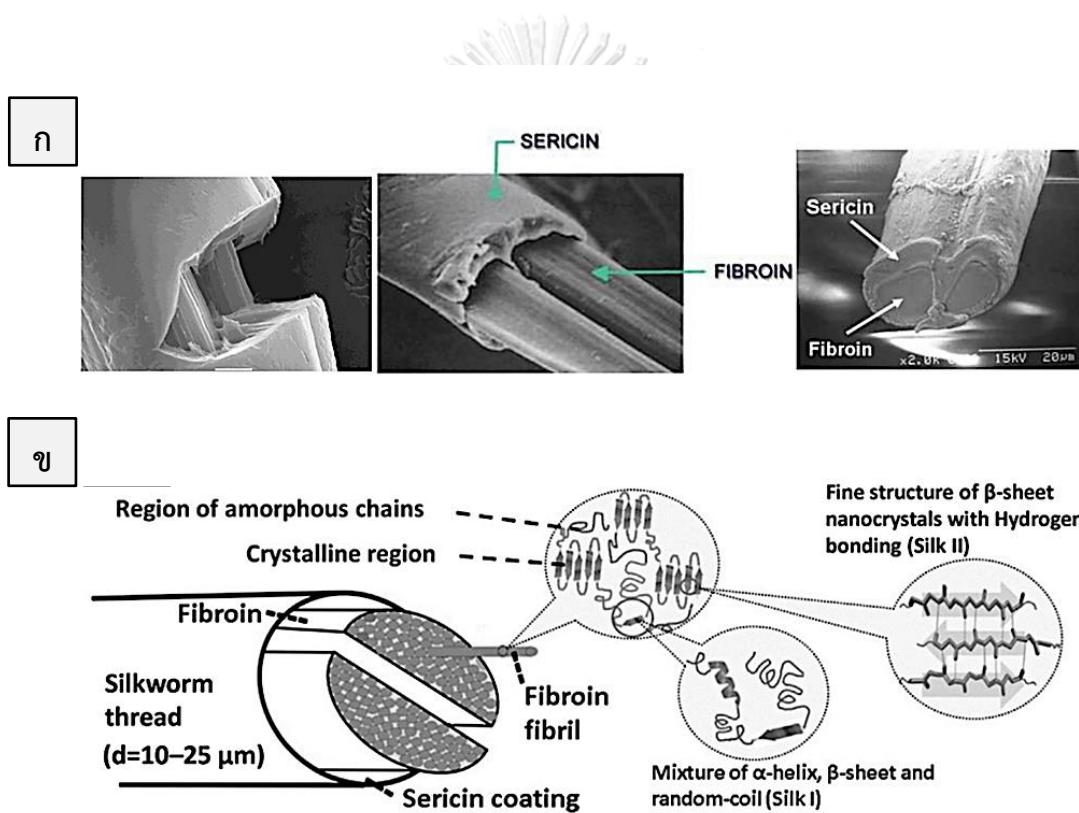
2. ไหมป่า (Wild silkworm หรือ Non-mulberry silkworm) เป็นหนอนที่ไม่ได้กินใบหม่อนเป็นอาหาร เช่น ไหมป่าอีรี (Eri silkworm) ไหมทาชาร์ (Tasar silkworm) และไหมมูก้า (Muga silkworm) โดยไหมป่าทั้ง 3 ชนิด ได้ถูกนำมาเลี้ยงในเชิงการค้าแล้ว แต่ยังคงเรียกว่าไหมป่าเช่นเดิม โดยสามารถอยู่รอดในธรรมชาติได้เอง

2.1.1.1 โครงสร้างและองค์ประกอบของเส้นใยไหม

เส้นใยไหมประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิดที่เชื่อมกันด้วยพันธะเพปไทด์ ในเส้นใยไหมมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก 2 ชนิด คือ โปรตีนเซรีซิน (Sericin) และโปรตีนไฟโบรอิน (Fibroin) โดยโปรตีนเซรีซินจะทำหน้าที่เป็นกาว ที่ทำให้เส้นใยไฟโบรอินสามารถยึดติดกันได้ ดังแสดงในรูปที่ 1 โดยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20 - 310 กิโลดาลตัน และมีสัดส่วนประมาณร้อยละ 20 - 30 ของปริมาณเส้นใยไหม โปรตีนเซรีซินจะมีสมบัติความชอบน้ำมากกว่าไฟโบรอิน ซึ่งสามารถกำจัดออกโดยการนำไปต้มกับสารละลายที่มีฤทธิ์เป็นด่างอ่อนหรือในน้ำร้อน ส่วนประกอบหลักอีกส่วนคือโปรตีนไฟโบรอิน (Fibroin) ซึ่งมีสัดส่วนประมาณร้อยละ 70 - 80 ของปริมาณเส้นใยไหม องค์ประกอบต่างๆของเส้นใยไหมแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของเส้นใยไหม [20]

องค์ประกอบ	ไฟโบรอินไหม (%)	เซรีซิน (%)
คาร์บอน (C)	47.6	46.50
ไฮโดรเจน (H)	6.39	6.04
ไนโตรเจน (N)	18.33	16.50
ออกซิเจน (O)	27.68	30.96



รูปที่ 1 โครงสร้างของเส้นใยไหมที่ได้จากหนอนไหม ก) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ ข) ภาพวาด [10]

1. เซรีซิน (Sericin)

เซรีซิน (Sericin) หรือเรียกอีกอย่างว่า กาวไหม เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่หล่อลื่นและยึดเส้นใยไฟโบรอิน 2 เส้นให้ติดอยู่ด้วยกัน มีประมาณร้อยละ 20 - 30 ของรังไหม เซรีซินสามารถละลายน้ำได้ องค์ประกอบหลักของเซรีซินคือ หมูอะมิโนที่มีความเป็นขั้วสูงและมีโครงสร้างอสัณฐาน (Amorphous) ได้แก่ กรดแอสปาทิก (Aspartic acid, Asp) ทรีโอนิน (Threonine, Thr) กรดกลูตามิก (Glutamic acid, Glu) และซีรีน (Serine, Ser)

โครงสร้างของเซรีซินแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ เซรีซินชั้นนอก ซึ่งสามารถละลายออกได้ง่ายที่สุด เซรีซินชั้นกลางซึ่งสามารถละลายได้ในต่างอ่อน และเซรีซินชั้นใน โดยเซรีซินทั้ง 3 ส่วน มีความสามารถในการละลายที่เพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิของน้ำและสามารถละลายได้ในต่าง [10]

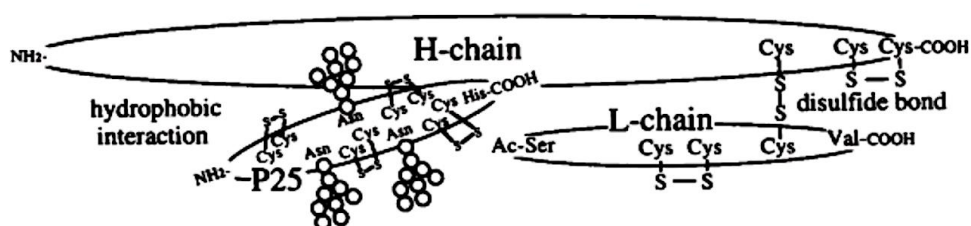
2. ไฟโบรอิน (Fibroin)

ไฟโบรอินเป็นเส้นใยโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 - 25 ไมโครเมตร ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 18 ชนิด โดยมีกรดอะมิโนหลัก 4 ชนิด ได้แก่ ไทโรซีน (Tyrosine; Tyr) ซีรีน (Serine; Ser) อะลานิน (Alanine; Ala) และไกลซีน (Glycine, Gly) ดังแสดงในตารางที่ 2 โครงสร้างไฟโบรอินประกอบไปด้วย 3 องค์ประกอบ ดังแสดงในรูปที่ 2 ได้แก่

1. สายโซ่โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (Heavy chain) หรือเรียกว่า H-chain มีน้ำหนักโมเลกุล ประมาณ 350 กิโลดาลตัน ประกอบด้วย ไกลซีนร้อยละ 42.8 โดยน้ำหนัก อะลานินร้อยละ 32.4 โดยน้ำหนัก และเซรีนร้อยละ 14.7 โดยน้ำหนัก ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยจะแบ่งเป็นส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) เรียงตัวแบบสลับ ซึ่งส่วนที่ไม่ชอบน้ำนั้นจะประกอบไปด้วยหมู่อะมิโนคือ $[-\text{Gly-Ala-Gly-Ala-Ser-}]_n$ โดยจะเรียงตัวเป็นหน่วยซ้ำ ซึ่งพบประมาณร้อยละ 70 ของลำดับกรดอะมิโนทั้งหมด ซึ่งจัดเรียงตัวอยู่ในรูปของแผ่นพลิทเบต้า มีพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bond) เชื่อมระหว่างสายพอลิเพปไทด์ จึงทำให้ H chain นั้นมีความไม่ชอบน้ำสูง หน้าที่ของ H-chain คือ เชื่อมสายโซ่โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำไว้ด้วยกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (Disulfide bond)

2. สายโซ่โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Light chain) หรือเรียกว่า L-chain มีน้ำหนักโมเลกุล ประมาณ 25 กิโลดาลตัน ประกอบไปด้วย กรดอะมิโนลิวซีน (Leucine, Leu) ไอโซลิวซีน (Isoleucine, Ile) วาลีน (Valine, Val) และกรดอะมิโนประเภทที่เป็นกรด (Acidic amino acid)

3. โปรตีน P25 เป็นไกลโคโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30 กิโลดาลตัน โดย P25 จะเชื่อมกับ H-chain - L-chain ด้วยอันตรกิริยาของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic interaction) โดยอัตราส่วนของ H-chain : L-chain : P25 คือ 6:6:1 [40]



รูปที่ 2 โครงสร้างโมเลกุลของไฟโบรอิน Hydrophobic interaction of P25, containing Asn-linked oligosaccharide chains, with the H-L complex of silk fibroin produced by *Bombyx mori* [40]

ตารางที่ 2 องค์ประกอบกรดอะมิโนในเส้นใยไฟโบรอินไหมและเซรีซิน [41]

ชนิดกรดอะมิโน	กรดอะมิโน	ไฟโบรอินไหม (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	เซรีซิน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
กรดอะมิโน ชนิดไม่มีขั้ว (Non-polar amino acid)	Glycine (Gly)	42.8	8.8
	Alanine (Ala)	32.4	4.0
	Leucine (Leu)	0.7	0.9
	Isoleucine (Ile)	0.9	0.6
	Valine (Val)	3.0	3.1
	Phenylalanine (Phe)	1.2	0.6
	Proline (Pro)	0.6	0.5
กรดอะมิโน ชนิดที่เป็นกรด (Acidic amino acid)	Glutamic acid (Glu)	1.7	10.1
	Aspartic acid (Asp)	1.9	16.8
กรดอะมิโน ชนิดที่เป็นเบส (Basic Amino acid)	Arginine (Arg)	0.9	4.2
	Lysine (Lys)	0.5	5.5
	Histidine (His)	0.3	1.4
Oxy-amino acid	Threonine (Thr)	1.2	8.5
	Tyrosine (Tyr)	11.8	4.9
	Serine (Ser)	14.7	30.1
Sulfur complex Amino acid	Tryptophan (Trp)	0.5	0.5
	Methionine (Met)	0.2	0.1
	Cysteine (Cys)	0.1	0.3

2.1.1.2 สมบัติของไฟโบรอินไหม

ไฟโบรอินไหมมีสมบัติที่โดดเด่นหลายประการ ได้แก่ ความสามารถในการย่อยสลายได้ ทางชีวภาพ ซึ่งมีสมบัติเชิงกลที่ดี จึงทำให้ไฟโบรอินไหมมีความแข็งแรง ดังแสดงในตารางที่ 3 จะเห็นได้ว่าไฟโบรอินไหมมีความสามารถในการทนต่อแรงดึงได้ดีกว่าวัสดุอื่น ๆ เช่น คอลลาเจน กรดพอลิแลคติก แต่ไม่ตีเท่าเส้นใยแมงมุมและเส้นใยเคฟลาร์ นอกจากนี้ยังมีความเข้ากันได้กับเซลล์ของสิ่งมีชีวิตโดยไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ด้วยสมบัติเหล่านี้ทำให้มีการนำไหมมาประยุกต์ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่ออย่างแพร่หลาย

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบสมบัติเชิงกลของไฟโบรอินไหมและวัสดุชนิดอื่นๆ [42]

Source of biomaterial	Modulus (MPa)	Tensile strength (MPa)
<i>B. mori</i> silk (with sericin)	5 - 12	500
<i>B. mori</i> silk (Without sericin)	15 - 17	610 - 690
<i>N. clavipes</i> silk	11 - 13	875 - 972
Collagen	0.0018 - 0.046	0.9 - 7.4
Cross-linked collagen	0.4 - 0.8	47 - 72
Polylactic acid	1.2 - 3.0	28 - 50
Bone	20	160
Kavlar	130	3,600
Synthetic rubber	0.001	50

2.1.1.3 การประยุกต์ใช้งานของไฟโบรอินไหม

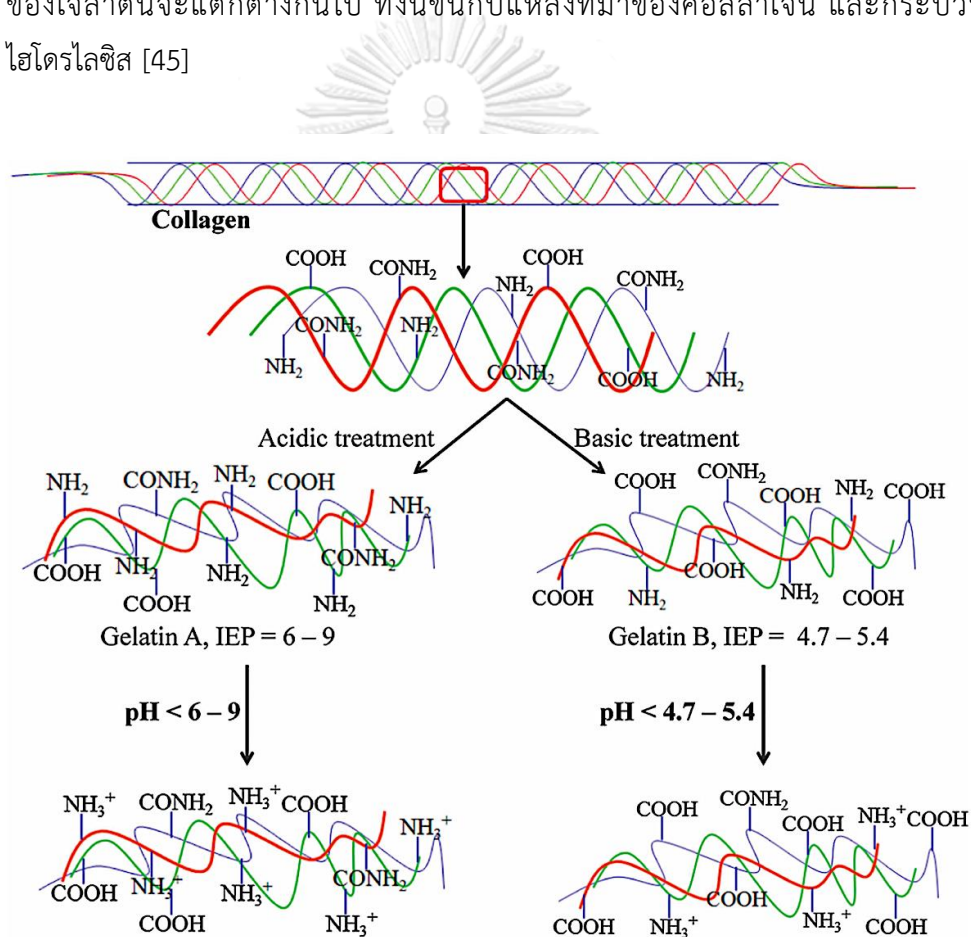
ในปัจจุบันมีการนำไฟโบรอินไหมมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์มากขึ้น เนื่องจากไฟโบรอินไหมสามารถผลิตเป็นวัสดุทางการแพทย์ได้ง่ายและหลากหลายรูปแบบ อาทิ การขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มเพื่อใช้ในงานทางการแพทย์ [28] การขึ้นรูปเป็นไฮโดรเจลเพื่อใช้เป็นโครงเลี้ยงเซลล์ที่มีศักยภาพในการสร้างเนื้อเยื่อกระดูก [36] การขึ้นรูปเป็นเมมเบรนหรือแผ่นเส้นใยขนาดนาโนเพื่อใช้เป็นแผ่นปิดแผล [43] และโครงเลี้ยงเซลล์ [44] เพื่อประยุกต์ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โดยรายละเอียดแสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การขึ้นรูปและการประยุกต์การใช้งานของเส้นใยไฟโบรินไหม [20]

Material format	Processing method	Features	Applications
Film	Casting	Biocompatible	Coating materials
	Layer-by-layer deposition	Good oxygen and water permeability	Wound dressing/skin repair
		Diverse surface modification options	Biosensors
Hydrogel	Sol-gel transition in the presence of acid ions, and other additives	Biocompatible	Guided bone repair
		Diverse formulation for gelatin	Drug release/delivery
		Easy delivery (injectable)	Cartilage tissue engineering
Non-woven mat /net/membrane	Fiber deposition	Biocompatible	Guided bone repair
	Electrospinning	High strength	Wound dressing/skin repair
		Diverse surface modification options	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	-

2.1.2 เจลาติน (Gelatin)

เจลาตินเป็นโปรตีนที่ได้จากคอลลาเจน (Collagen) ที่สามารถพบได้ในธรรมชาติและเป็น องค์ประกอบหลักของผิวหนัง กระดูก เอ็นและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของสัตว์ เช่น หมู วัว และปลา โดยโครงสร้าง ของคอลลาเจนประกอบไปด้วยสายโซ่ของพอลิเพปไทด์ 3 สาย พันกันเป็นเกลียวสาม (Triple helix structure) แบบวนขวา โดยภายในโมเลกุลจะยึดเกี่ยวกันด้วยพันธะโควาเลนต์และระหว่างโมเลกุลจะถูกเชื่อมขวางด้วยพันธะไฮโดรเจน เมื่อนำคอลลาเจนมาผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยกรดหรือด่าง จะทำให้โครงสร้างเกิดการเสถียรภาพกลายเป็นเจลาติน ซึ่งสายโซ่โมเลกุลที่สั้นลงและมีลักษณะเป็นขดแบบสุ่ม (Random coil) โดยที่สมบัติของเจลาตินจะแตกต่างกันไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของคอลลาเจน และกระบวนการไฮโดรไลซิส [45]



รูปที่ 3 กระบวนการผลิตเจลาตินชนิดเอ และชนิดบี [46]

ชนิดของเจลาตินสามารถแบ่งได้ตามกระบวนการผลิต โดยแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ดังรูปที่ 3 คือ

1. เจลาตินชนิดเอ (Gelatin type A; GA)

เจลาตินชนิดนี้ได้มาจากการกระบวนการใช้กรด (Acid process) เจลาตินชนิดนี้ได้จากการที่นำหนังหมูมาผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยกรด ซึ่งกรดที่ใช้ส่วนมาก ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก (HCl) กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) และกรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) เป็นต้น ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ทำให้เกิดการสลายหมู่เอไมด์ (Amide group) ในสายโซ่คอลลาเจนซึ่งเกิดขึ้นได้ค่อนข้างยาก ส่งผลให้เจลาตินชนิดนี้มีค่า Isoelectric point (pI) ใกล้เคียงกับคอลลาเจน คือ ประมาณ 9 ดังนั้นจึงทำให้เจลาตินชนิดเอ เหมาะกับการใช้งานร่วมกับโปรตีนที่มีสมบัติเป็นกรด

2. เจลาตินชนิดบี (Gelatin type B; GB)

เจลาตินชนิดนี้ได้มาจากการนำคอลลาเจนจากหนังและกระดูกวัว มาผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยด่าง เช่น แคลเซียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น ซึ่งเป็นวิธีที่ทำให้เกิดการไฮโดรไลซิสกลุ่มเอไมด์ในคอลลาเจน โดยจะได้เจลาตินที่มีกลุ่มคาร์บอกซิลจำนวนมาก และมีค่า Isoelectric point ที่ประมาณ 5 จึงทำให้เจลาตินชนิดนี้มีประจุเป็นลบ ดังนั้นเจลาตินชนิดบี จึงเหมาะสำหรับการใช้งานร่วมกับโปรตีนที่มีสมบัติเป็นเบส

2.1.2.1 โครงสร้างและองค์ประกอบของเจลาติน

เจลาตินประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 18 ชนิด เชื่อมกันด้วยพันธะเพปไทด์ (Peptide bond) โดยมีกรดอะมิโนหลัก 3 ชนิด คือ ไกลซีน (Glycine, Gly) โพรลีน (Proline, Pro) และไฮดรอกซีโพรลีน (Hydroxyproline, Hyp) จัดเรียงตัวเป็นหน่วยที่ซ้ำๆกัน $[-Gly-Pro-Hyp-]_n$ และยังมีลำดับกรดอะมิโน Arginyl-Glycyl-Aspartic (RGD) ที่ช่วยในกระตุ้นกิจกรรมต่างๆของเซลล์ โดยปริมาณของกรดอะมิโนในองค์ประกอบ ของเจลาตินที่ได้จากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของหมู แสดงในตารางที่ 5 ซึ่งโครงสร้างของเจลาตินจะมีลักษณะเป็นขดแบบสุ่ม (Random coil) และมีช่วงน้ำหนักโมเลกุลที่ค่อนข้างกว้าง ในช่วง 20,000 – 200,000 ดาลตัน โดยน้ำหนักโมเลกุลของเจลาตินขึ้นอยู่กับชนิดและแหล่งที่มา กรดอะมิโนเหล่านี้จะแสดงสมบัติความชอบน้ำ (Hydrophilic amino acids) เจลาตินจึงสามารถละลายในน้ำได้ดี

ตารางที่ 5 โครงสร้างของเจลาตินที่ได้จากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของหมู [47]

กรดอะมิโน	ร้อยละ
Alanine (Ala)	8.9
Arginine (Arg)	7.8
Aspartic (Asp)	6.0
Glutamic acid (Glu)	10.0
Glycine (Gly)	21.4
Histidine (His)	0.8
Hydroxylysine (Hyl)	1.0
Hydroxyproline (Hyp)	11.9
Isoleucine (Ile)	1.5
Leucine (Leu)	3.3
Lysine (Lys)	3.5
Methionine (Met)	0.7
Phenylalanine (Phe)	2.4
Proline (Pro)	12.4
Serine (Ser)	3.6
Threonine (Thr)	2.1
Tyrosine (Tyr)	0.5
Valine (Val)	2.2
รวม	100

2.1.2.2 สมบัติของเจลาติน

เจลาตินมีความชื้นประมาณร้อยละ 8 – 12 โดยน้ำหนัก และความหนาแน่นประมาณ 1.3 – 1.4 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร [11] เจลาตินสามารถพองตัวได้ในน้ำเย็นและละลายได้ในน้ำที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส อีกทั้งเจลาตินยังมีความสามารถในการละลายได้ในสารละลายอินทรีย์ที่มีขี้้ว สารละลายประเภทพอลิไฮดรอลิกแอลกอฮอล์ (Polyhydric alcohol) เช่น กลีเซอรอล เป็นต้น แต่ไม่สามารถละลายได้ในสารละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขี้้ว

เจลาตินมีสมบัติทางกายภาพที่สำคัญคือ การเกิดเจลแบบผันกลับได้ด้วยอุณหภูมิ (Thermal reversible) กล่าวคือ เมื่อเราให้ความร้อนกับสารละลายเจลาติน สารละลายจะมีสถานะเป็นของเหลว แต่หากทิ้งไว้ที่อุณหภูมิต่ำหรือต่ำกว่าอุณหภูมิห้อง เจลาตินจะมีสภาพเป็นเจล โดยเจลที่เกิดขึ้นเกิดจากการเรียงติดกันของพันธะภายในสายโซ่ ซึ่งอาจเป็นแรงจากพันธะไฮโดรเจน หรืออันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic interaction) และยังสามารถผันกลับจากสถานะเจลกลายเป็นสารละลายได้เมื่อเพิ่มอุณหภูมิ เนื่องจากความร้อนจะเข้าไปทำลายพันธะ และเมื่อมีการลดอุณหภูมิลง สารละลายเจลาตินสามารถสร้างพันธะใหม่เกิดเป็นเจลได้อีกครั้ง เจลาตินสามารถเป็นได้ทั้งกรดและเบส เรียกว่าแอมโฟเทอริก (Amphoteric) คือ สารละลายเจลาตินที่เป็นกรดจะมีประจุเป็นบวก และจะรวมตัวกับประจุลบในสนามไฟฟ้า แต่สารละลายเจลาตินที่เป็นเบสจะมีประจุลบและรวมตัวกับประจุบวกในสนามไฟฟ้า โดยตารางที่ 6 แสดงสมบัติทางกายภาพของเจลาตินชนิดเอและเจลาตินชนิดบี ซึ่งมีค่า Isoelectric point (pI) เท่ากับ 9 และ 5 ตามลำดับ [48] ซึ่งขึ้นอยู่กับแหล่งของคอลลาเจนที่นำมาสกัด และกระบวนการสกัด สมบัติที่โดดเด่นของเจลาตินทางด้านชีวภาพคือ สามารถย่อยสลายทางชีวภาพ สามารถเข้ากับเซลล์ของสิ่งมีชีวิตโดยไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ และช่วยในการยึดเกาะของเซลล์

ตารางที่ 6 สมบัติของเจลาตินชนิดเอและชนิดบี [49]

คุณสมบัติ	เจลาตินชนิดเอ	เจลาตินชนิดบี
ค่าความเป็นกรดต่าง (pH)	3.8 – 5.5	5.0 – 7.5
ความชื้น (%)	8 – 12	8 – 12
ค่าไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric point, pI)	9	5
ค่าความแข็งแรงของเจล (Gel strength)	50 – 300	50 – 300
ความหนืด (Viscosity) (mps)	15 – 75	20 – 75
เถ้า (%)	0.3 – 2.0	0.5 – 2.0

2.1.2.3 การประยุกต์ใช้งานของเจลาติน

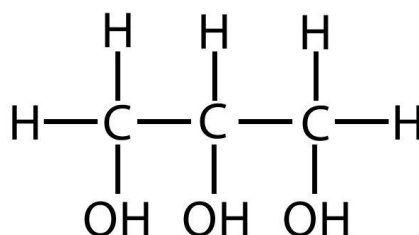
เจลาตินได้จากคอลลาเจนซึ่งเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติ มีความปลอดภัยสูง จึงถูกนำมาใช้งานในทางการแพทย์อย่างแพร่หลาย เนื่องจากสามารถเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (Biocompatibility) อีกทั้งยังสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable) ทำให้เจลาตินถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางด้าน เภสัชศาสตร์และแพทยศาสตร์โดยใช้เป็นส่วนประกอบของยา และทางการแพทย์อย่างแพร่หลาย อีกทั้งยังนำมาใช้งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อด้วยเนื่องจากเจลาตินนั้นมีสมบัติในการช่วยสนับสนุนให้เซลล์สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตได้ดี และสามารถขึ้นรูปเจลาตินให้มีลักษณะตามที่ต้องการ เช่น การปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ การทำแผ่นปิดแผล การขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับประยุกต์ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เป็นต้น [50] นอกจากนี้เจลาตินยังผ่านการรับรองจากองค์การอาหารและยา (United States Food and Drug Administration; FDA) ซึ่งได้รับการพิจารณาแล้วว่าสามารถใช้งานได้อย่างปลอดภัย (Generally Recognized as safe; GRAS) ดังนั้นเจลาตินจึงเป็นที่นิยมนำมาใช้เป็นวัสดุในอุตสาหกรรมอาหารและยา ยา เครื่องสำอาง และวัสดุทางการแพทย์

2.2 กlycerol (Glycerol)

glycerol (Glycerol) หรือ glycerin (Glycerin) เป็น plasticizer ที่ใช้ในการกระบวนการผลิต polymer เพื่อให้ polymer มีความอ่อนตัวเพิ่มขึ้น โดยที่ plasticizer ไม่ได้เกิดปฏิกิริยากับ polymer แต่จะแทรกตัวอยู่ระหว่างโมเลกุล polymer ที่เชื่อมต่อกันด้วยแรง van der Waals และทำให้แรง van der Waals ลดลง จึงส่งผลให้โมเลกุลของ polymer ที่อยู่ใกล้กันอ่อนตัวลง จึงทำให้สมบัติของ polymer เปลี่ยนไป เช่น มีความอ่อนนุ่มหรือความยืดหยุ่นเพิ่มขึ้น ทนต่อสภาวะความเป็นกรดต่าง [51]

2.2.1 โครงสร้างของ glycerol

glycerol เป็นสารประกอบอินทรีย์ประเภทแอลกอฮอล์ มีโครงสร้างโมเลกุลเป็น polyol ที่มีคาร์บอน (C) 3 อะตอม และมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) 3 หมู่ ดังแสดงในรูปที่ 4 มีสูตรโมเลกุลคือ $C_3H_8O_3$ น้ำหนักโมเลกุล 92.09 กรัมต่อโมล [24]



รูปที่ 4 โครงสร้างของ glycerol [24]

2.2.2 สมบัติของ glycerol

glycerol สามารถละลายได้ดีในแอลกอฮอล์และน้ำ จึงทำให้มีสมบัติในการจับตัวกับน้ำ (Hydroscopic) แต่ไม่สามารถละลายได้ในไขมัน สามารถดูดความชื้นจากอากาศได้ เป็นสารที่เป็นของเหลวใส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น มีจุดเดือด 290 องศาเซลเซียส และจุดหลอมเหลว 19 องศาเซลเซียส และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เนื้อเยื่อ หรือสิ่งมีชีวิต [51]

2.2.3 การประยุกต์ใช้งานของ glycerol

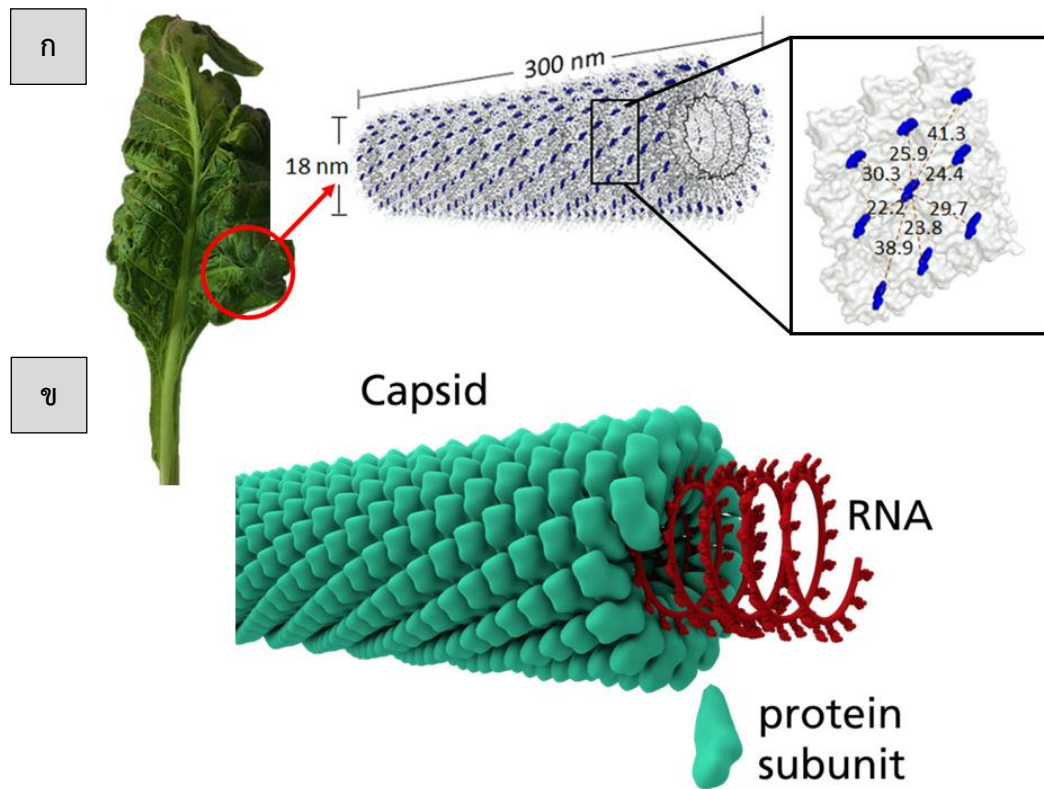
glycerol เป็นสารที่ไม่มีพิษในทุกรูปแบบของการประยุกต์ใช้ ไม่ว่าจะใช้เป็นสารตั้งต้น หรือสารเติมแต่ง ทำให้ glycerol เป็นสารเคมีที่ได้รับความนิยม และนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ด้วย [52] อีกทั้งยังเป็นตัว plasticizer ที่สำคัญสำหรับวัสดุที่มีความแข็ง เพื่อเพิ่มความยืดหยุ่นให้กับวัสดุและป้องกันการแตกหัก ในงานวิจัยนี้จึงเติม glycerol ไปในฟิล์มผสมเพื่อช่วยเพิ่มความยืดหยุ่น ฟิล์มผสมที่ได้จะมีลักษณะทางกายภาพที่ดี และสามารถคงความยืดหยุ่น

2.3 ไวรัสใบต่างยาสูบ (Tobacco mosaic virus; TMV)

ไวรัสจัดเป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่น่านำมาใช้ในทางการชีวการแพทย์กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากไวรัสสามารถผลิตได้ง่ายและได้ผลผลิตที่มีจำนวนมาก โดยที่มีรูปร่างลักษณะที่เหมือนกัน อีกทั้งไวรัสพืชนั้นสามารถติดเชื้อและเพิ่มจำนวนได้เฉพาะในพืชเท่านั้น ไม่มีการติดเชื้อในคน โดยไวรัสที่มีสมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่คงที่มากกว่าไวรัสชนิดอื่น ๆ คือ ไวรัสใบต่างยาสูบ (Tobacco mosaic virus) [53] โดยในงานวิจัยนี้เรียกไวรัสชนิดนี้ว่า ไวรัสใบต่างยาสูบที่ไม่ถูกดัดแปลงพันธุกรรม (Tobacco mosaic virus wild type; TMV-wt)

2.3.1 โครงสร้างของไวรัสใบต่างยาสูบ

ไวรัสใบต่างยาสูบ มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อนตรง (Rod) มีความยาว 300 นาโนเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 18 นาโนเมตร ดังรูปที่ 5ก โดยไวรัสใบยาสูบ 1 ท่อน ประกอบไปด้วยโปรตีนหน่วยย่อย (Protein subunit) จำนวน 2,130 หน่วยย่อย ซึ่งโปรตีนแต่ละหน่วยหน่วยมีระยะห่างระหว่างกันประมาณ 20 – 40 อังสตรอม เกาะตัวแบบบันไดเวียน (Helix) ล้อมรอบกรดนิวคลีอิก RNA ที่มีนิวคลีโอไทด์ 6400 ตัว เรียงตัวเป็นเส้นเดี่ยว (Single stranded genomic RNA) [39] มีลักษณะเป็นเกลียวหรือขดสปริง ดังแสดงในรูปที่ 5ข



รูปที่ 5 ก) รูปร่างลักษณะของไวรัสใบด่างยาสูบ ข) โครงสร้างของไวรัสใบด่างยาสูบ [39, 54]

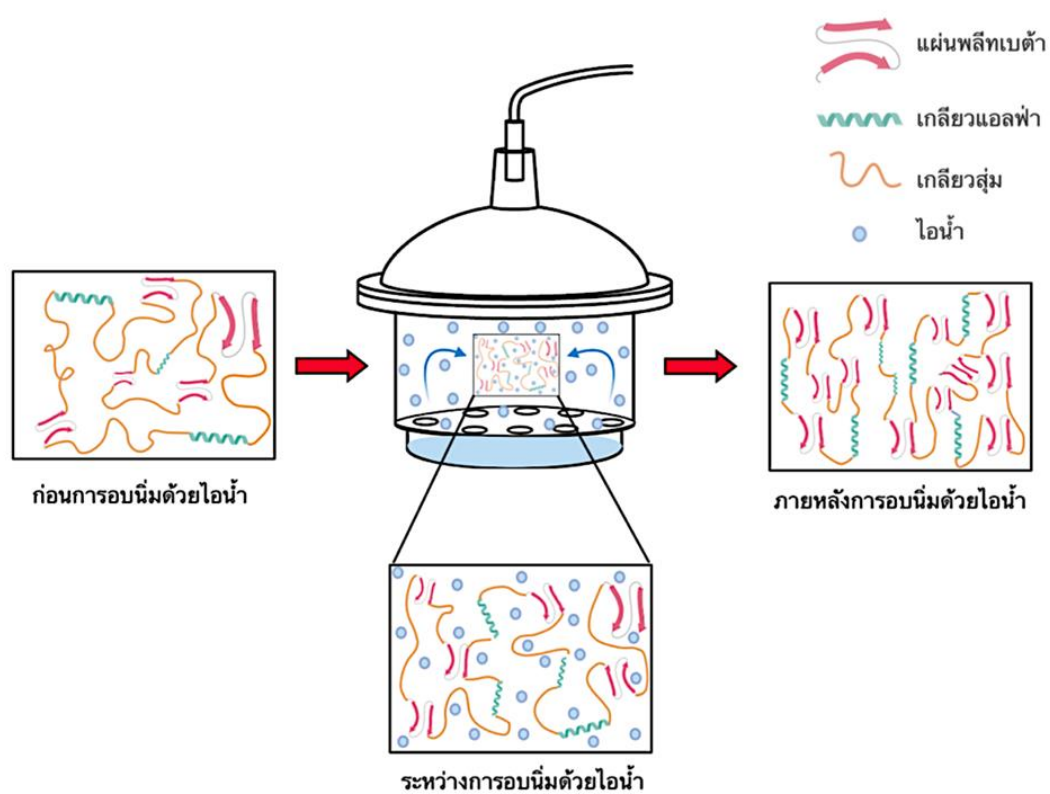
2.3.2 การประยุกต์ใช้งานของไวรัสใบต่างยาสูบ

ในปัจจุบันมีการนำไวรัสมาประยุกต์ใช้งานในทางด้านชีวการแพทย์กันอย่างแพร่หลาย โดยการนำไวรัสใบต่างยาสูบ (Tobacco mosaic virus wild type; TMV-wt) มาดัดแปรคุณลักษณะ โดยการดัดแปลงลำดับพันธุกรรมของไวรัส เช่น การดัดแปลงพันธุกรรมของไวรัสด้วยลำดับกรดอะมิโนอาร์จินิลไกลซิลแอสปาทิก (RGD) ซึ่งการดัดแปลงพันธุกรรมนั้นสามารถทำได้ 2 วิธี คือการดัดแปลงพันธุกรรม (Genetic modification) และการดัดแปลงทางเคมี (Chemical modification) ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ใช้วิธีการดัดแปลงพันธุกรรมของไวรัสใบต่างยาสูบด้วยลำดับกรดอะมิโน RGD โดยวิธี Genetic modification ตามในงานวิจัยของ Andrew Lee และคณะ [37] โดยในงานวิจัยดังกล่าวได้ดัดแปลงลำดับกรดอะมิโนไกลซิล (Glycyl) อาร์จินิล (Arginyl) แอสปาทิก (Aspartic acid) เซอรีน (Serine) เพียวรีน (Purine) และไกลซิล (Glycyl) (GRGDS^{PG}) ไปในสาย RNA ของไวรัสใบต่างยาสูบและเรียกไวรัสใบยาสูบชนิดนี้ว่า TMV-RGD เนื่องจากลำดับกรดอะมิโน RGD เป็นลำดับกรดอะมิโนที่มีความจำเพาะต่ออินทิกรินที่เยื่อหุ้มเซลล์ จึงทำให้เซลล์สามารถยึดเกาะที่พื้นผิวได้ดี โดยการประยุกต์ใช้ไวรัสใบยาสูบที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมด้วยกรดอะมิโน RGD นั้นมีข้อดีเหนือการใช้ RGD สั้งเคราะห์คือ

1. ไวรัส 1 แห่งมีปริมาณ RGD อยู่ 2130 ตัว ซึ่งเป็นปริมาณที่แน่นอน และเหมือนกันทุกแห่ง
2. ลำดับอะมิโน RGD ในแต่ละหน่วยย่อยของโปรตีนมีความสม่ำเสมอของ RGD ที่บริเวณพื้นผิวของไวรัสที่มี ซึ่งส่งผลต่อการยึดเกาะของเซลล์
3. กระบวนการที่ได้มาซึ่งการดัดแปลงพันธุกรรมด้วยลำดับกรดอะมิโน RGD บนไวรัส ไม่ต้องใช้สารทำลายอินทรีย์เข้ามาเกี่ยวข้อง อีกทั้งยังผลิตง่าย ได้ปริมาณมาก และปลอดภัยกว่า RGD สั้งเคราะห์

2.4 การอบนึ่งด้วยไอน้ำ (Water vapor annealing)

การอบนึ่งด้วยไอน้ำ เป็นกระบวนการภายใต้สภาวะสุญญากาศซึ่งไอน้ำจะเข้าไปแทรกตัวอยู่ในสายโซ่พอลิเมอร์ ทำให้สายโซ่พอลิเมอร์มีการเคลื่อนที่และจัดเรียงตัวใหม่เป็นระเบียบมากขึ้น โดยกระบวนการอบนึ่งด้วยไอน้ำของโปรตีน (แสดงในรูปที่ 6) จะช่วยให้โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนมีการจัดเรียงตัวเป็นระเบียบมากขึ้น ส่งผลให้สมบัติทางกลของวัสดุภายหลังการอบนึ่งด้วยไอน้ำจึงมีความแข็งแรงมากกว่าก่อนการอบนึ่งด้วยไอน้ำ [55, 56]



รูปที่ 6 การอบนึ่งด้วยไอน้ำของโปรตีน

2.5 การเชื่อมขวาง (Crosslinking)

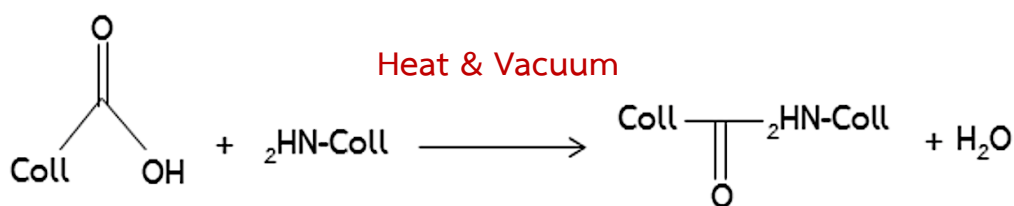
การเชื่อมขวาง คือ การสร้างพันธะเคมีระหว่างโมเลกุลพอลิเมอร์สองโมเลกุลขึ้นไปที่อยู่ใกล้เคียงกัน เพื่อให้สมบัติของพอลิเมอร์เปลี่ยนแปลงไป เช่น อัตราการย่อย สลาย ช้ำลง ปรับปรุงสมบัติเชิงกลของพอลิเมอร์ เพื่อให้มีความเหมาะสมในการนำมาประยุกต์ใช้งานด้านต่าง ๆ [57] การเชื่อมขวางแบ่งเป็น 2 ประเภทหลัก คือ การเชื่อมขวางทางกายภาพ (Physical crosslinking) และการเชื่อมขวางทางเคมี (Chemical crosslinking)

2.5.1 การเชื่อมขวางทางกายภาพ (Physical crosslinking)

การเชื่อมขวางทางกายภาพเป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมในงานด้านการแพทย์ เนื่องจากไม่มีการใช้สารเคมีในวิธีการดำเนินการ แต่ใช้วิธีการทางกายภาพเช่น การเชื่อมขวางด้วยความร้อน การเชื่อมขวางด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต เป็นต้น พอลิเมอร์ที่ผ่านการเชื่อมขวางทางกายภาพจะมีร้อยละการเชื่อมขวางค่อนข้างน้อย แต่ข้อดีคือไม่มีสารเคมีที่เป็นพิษตกค้างในพอลิเมอร์ [58] การเชื่อมขวางทางกายภาพ แบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่

2.5.1.1 การเชื่อมขวางด้วยความร้อนแบบกำจัดน้ำออก (Dehydrothermal treatment, DHT)

การเชื่อมขวางทางกายภาพด้วยความร้อนแบบกำจัดน้ำออก เป็นเทคนิคลดความดัน ของระบบให้อยู่ในสภาวะสุญญากาศภายในตู้อบที่อุณหภูมิสูงกว่า 90 องศาเซลเซียส ทำให้เกิดการสร้างพันธะเอไมด์จากปฏิกิริยา Amidation ระหว่างหมู่เอมิโนอิสระ (Free amino group) และหมู่คาร์บอกซิล (Carboxyl group) ที่อยู่ใกล้กัน และมีการกำจัดน้ำออกจากโมเลกุลของพอลิเมอร์โดยผ่านปฏิกิริยาควบแน่น ดังแสดงในรูปที่ 7 ซึ่งเป็นการเชื่อมขวางคอลลาเจนด้วยความร้อนแบบกำจัดน้ำออก นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิและระยะเวลาในการเชื่อมขวางส่งผลให้ค่าร้อยละของการเชื่อมขวางเพิ่มขึ้นและทำให้พอลิเมอร์มีสมบัติทางกลที่แข็งแรงมากขึ้น แต่ข้อเสียของวิธีนี้คือความร้อนสูงอาจทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพ (Protein denature) ได้เช่นเดียวกัน [57]



รูปที่ 7 การเชื่อมขวางคอลลาเจนด้วยความร้อนแบบกำจัดน้ำออก [57]

2.5.1.2 การเชื่อมขวางโดยการใช้รังสีอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet irradiation)

การเชื่อมขวางทางกายภาพโดยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet; UV) เป็นกระบวนการย่อยสลายด้วยแสง (Photodegradation) เมื่อโปรตีนสัมผัสกับรังสี UV บริเวณหมู่ฟังก์ชันที่เป็นวงแหวนอะโรมาติกจะเกิดการตัดสายโซ่ระหว่างพันธะภายในโมเลกุลของพอลิเมอร์เกิดเป็นอนุมูลอิสระ (Free radical) ของหมู่เอมีนอิสระ และหมู่เอมีนอิสระที่เกิดขึ้นจะไปเชื่อมขวางกับพอลิเมอร์โมเลกุลอื่น ๆ ข้อดีของการเชื่อมขวางวิธีนี้คือ ระยะเวลาที่ใช้ในการเชื่อมขวางสั้น ไม่ก่อให้เกิดสารเคมีตกค้าง แต่ข้อจำกัดของการเชื่อมขวางวิธีนี้คือการเชื่อมขวางจะขึ้นกับจำนวนกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติกในพอลิเมอร์ และถ้าหากฉายแสง UV นานเกินไป จะทำให้สายโซ่พอลิเมอร์สั้นลง นอกจากนี้พบว่าวิธีการเชื่อมขวางวิธีนี้ไม่มีการใช้ความร้อน จึงนิยมนำไปประยุกต์ใช้กับคอลลาเจน และเจลาติน ซึ่งสลายตัวได้ง่ายด้วยความร้อนในกระบวนการผลิต [59]

2.5.1.3 การเชื่อมขวางโดยการฉายรังสีแกมมา (Gamma radiation)

การเชื่อมขวางโดยการฉายรังสีแกมมาเป็นวิธีการที่นำมาใช้เพื่อปรับปรุงสมบัติของพอลิเมอร์ เมื่อนำพอลิเมอร์ไปฉายรังสี พลังงานจากรังสีที่ถูกถ่ายทอดไปยังโมเลกุลของพอลิเมอร์สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างพอลิเมอร์ได้ โดยมีปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นพร้อมกันสองชนิด ได้แก่ ปฏิกิริยาการย่อยสลาย (Degradation) และปฏิกิริยาการเชื่อมขวาง (Crosslinking) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลักสองประการ คือ โครงสร้างทางเคมีของพอลิเมอร์และปริมาณรังสีที่ฉาย (Kilogray; kGy) ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อสมบัติเชิงกลและสมบัติเชิงความร้อนของพอลิเมอร์ [60]

รังสีแกมมา (Gamma Ray) ใช้สัญลักษณ์เป็นตัวอักษรกรีกว่า γ เกิดจากการที่นิวเคลียสของธาตุที่เป็นไอโซโทปกัมมันตรังสี (Radioisotope elements) ที่อยู่ในสถานะ กระตุ้นกลับสู่สถานะพื้นฐานโดยการปลดปล่อยรังสีแกมมาออกมา รังสีแกมมาคือโฟตอน ของการแผ่คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าเช่นเดียวกับรังสีเอ็กซ์ แต่มีความยาวคลื่นสั้นกว่าและมีอำนาจ ในการทะลุทะลวงสูงมากกว่ารังสีเอ็กซ์ ไม่มีประจุไฟฟ้าและมวล ไม่เบี่ยงเบนในสนามไฟฟ้า และสนามแม่เหล็กและเคลื่อนที่ด้วยความเร็วเท่าแสง การประยุกต์ใช้งานของการเชื่อมขวาง ด้วยวิธีนี้ ได้แก่ เทคโนโลยีพันธุกรรม (Genetic Technology) โดยที่รังสีแกมมามีพลังงานที่ ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid; DNA) ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิต รังสีแกมมาสามารถทำลายเชื้อโรคในอาหารเนื่องจาก รังสีแกมมามีพลังงานสูง โดยการไปทำลายเซลล์สิ่งมีชีวิต รวมไปถึงสารพันธุกรรมต่าง ๆ และไม่ส่งผลกระทบต่ออาหาร จึง

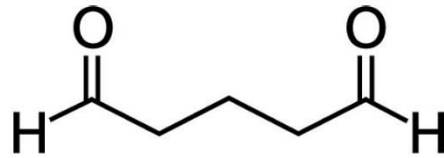
นำมาประยุกต์ใช้ในเทคโนโลยีการถนอมอาหาร นอกจากนี้รังสีแกมมาสามารถประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์โดยใช้ในการรักษาโรคมะเร็งระยะแรกบางชนิด โดยการฉายรังสีแกมมาที่ได้จากโคบอลต์ 60 (Cobalt-60) เพื่อทำลายเซลล์มะเร็ง [61]

2.5.2 การเชื่อมขวางทางเคมี (Chemical crosslinking)

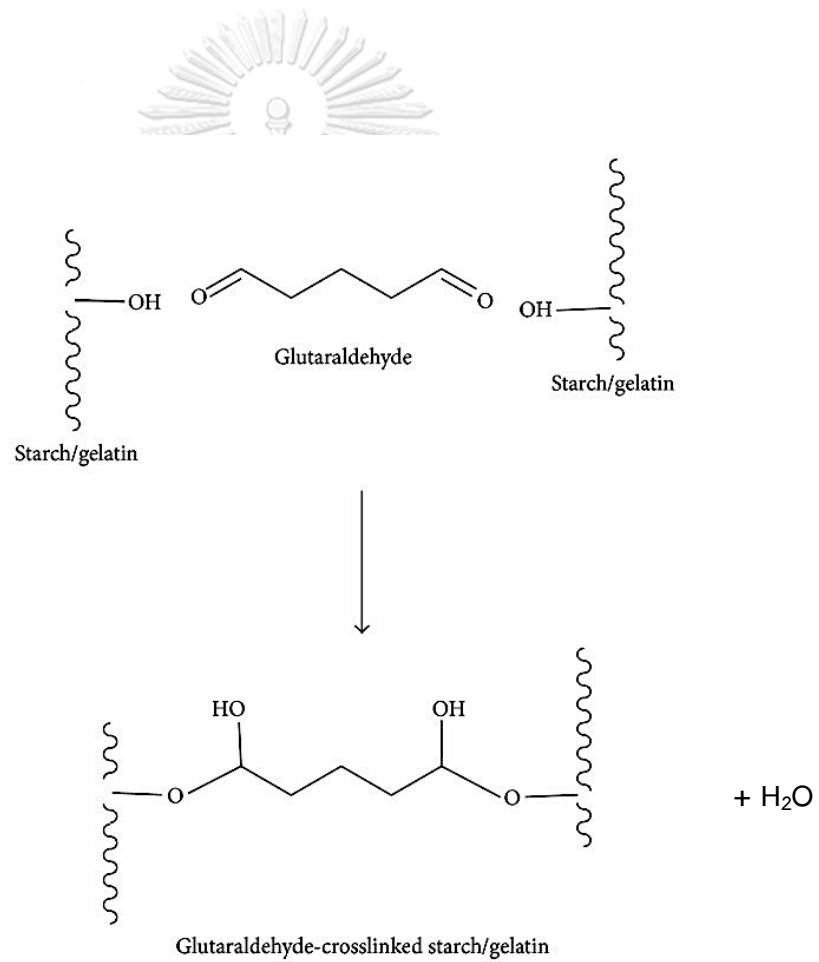
การเชื่อมขวางทางเคมีเป็นการใช้สารเคมีที่ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชัน 2 หมู่ในโมเลกุลเดียวกัน มาทำปฏิกิริยากับหมู่ฟังก์ชันของโปรตีนเพื่อให้เกิดการสร้างพันธะโควาเลนต์ [62] ได้แก่ การเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ การเชื่อมขวางด้วยฟอร์มอลดีไฮด์ การเชื่อมขวางด้วย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminoprpyl) carboiimide (EDC) และ N-hydroxysuccinimide ester (NHS) เป็นต้น ค่าร้อยละการเชื่อมขวางที่ได้จากวิธีทางเคมีจะมีค่าค่อนข้างสูง แต่ข้อเสียของวิธีนี้คืออาจมีสารเคมีที่เป็นพิษตกค้างอยู่ในพอลิเมอร์ภายหลังการเสร็จสิ้นกระบวนการเชื่อมขวาง การเชื่อมขวางทางเคมีแบ่งออกเป็น 4 ประเภท ดังนี้

2.4.2.1 การเชื่อมขวางด้วยกลูตารอลดีไฮด์ (Glutaraldehyde)

โครงสร้างของกลูตารอลดีไฮด์เป็นสายโซ่ตรงประกอบด้วยคาร์บอน 5 อะตอม หมู่แอลดีไฮด์ (-CHO) 2 หมู่ อยู่ที่ปลายทั้งสองข้างของโมเลกุล ดังแสดงในรูปที่ 8 ซึ่งหมู่แอลดีไฮด์นี้จะทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีน (NH_2) ของโปรตีนและปลดปล่อยน้ำออกมา ดังแสดงในรูปที่ 9 การเชื่อมขวางด้วยกลูตารอลดีไฮด์ขึ้นกับค่าความเป็นกรดต่าง ตัวทำลายละลาย ความเข้มข้น และความบริสุทธิ์ของกลูตารอลดีไฮด์ ข้อดีของการเชื่อมขวางด้วยวิธีนี้คือ ราคาไม่แพง ประสิทธิภาพในการเชื่อมขวางสูง ระยะเวลาในการเชื่อมขวางเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว สมบัติทางกลของพอลิเมอร์ดีขึ้น อัตราการย่อยสลายช้าลง พอลิเมอร์ที่เชื่อมขวางด้วยวิธีนี้จะมีความแข็งแรงกว่าพอลิเมอร์ที่เชื่อมขวางด้วยฟอร์มอลดีไฮด์ [58] ข้อเสียของวิธีการนี้คือ กลูตารอลดีไฮด์มีความเป็นพิษต่อเซลล์ จึงต้องกำจัดกลูตารอลดีไฮด์ส่วนเกินออกด้วยการล้างไกลซิน เนื่องจากไกลซินมีหมู่เอมีน ($-\text{NH}_2$) ซึ่งกลูตารอลดีไฮด์ส่วนเกินจะจับกับหมู่เอมีนของไกลซินแทน [63]



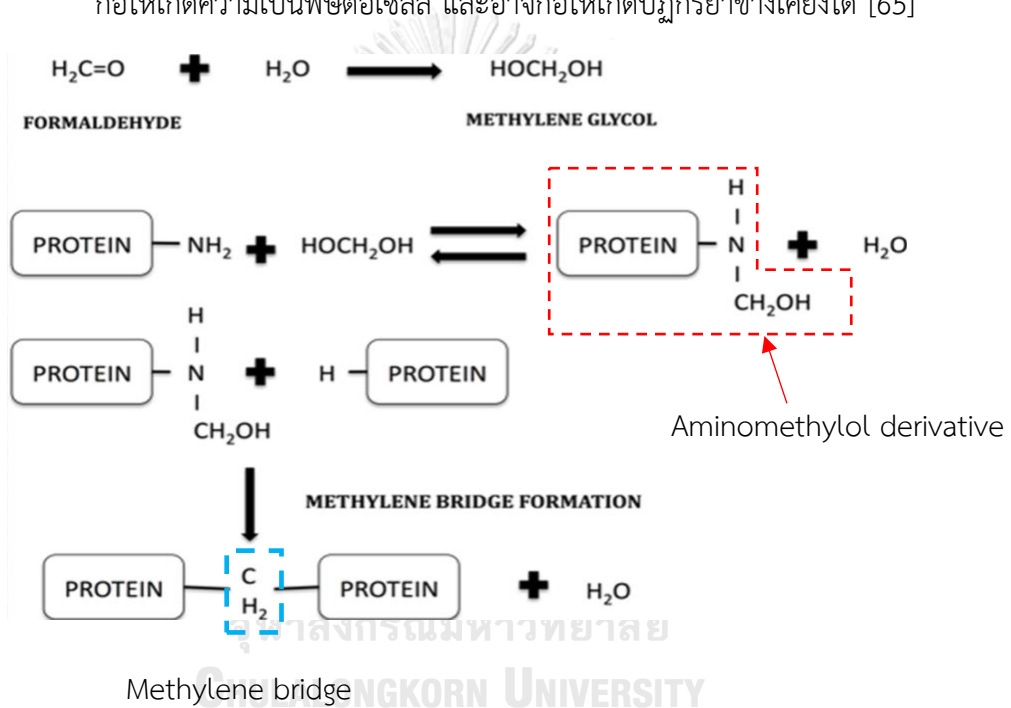
รูปที่ 8 โครงสร้างของกลูตารอลดีไฮด์ [63]



รูปที่ 9 กลไกการเชื่อมขวางด้วยกลูตารอลดีไฮด์ [64]

2.4.2.2 การเชื่อมขวางด้วยฟอร์มอลดีไฮด์ (Formaldehyde)

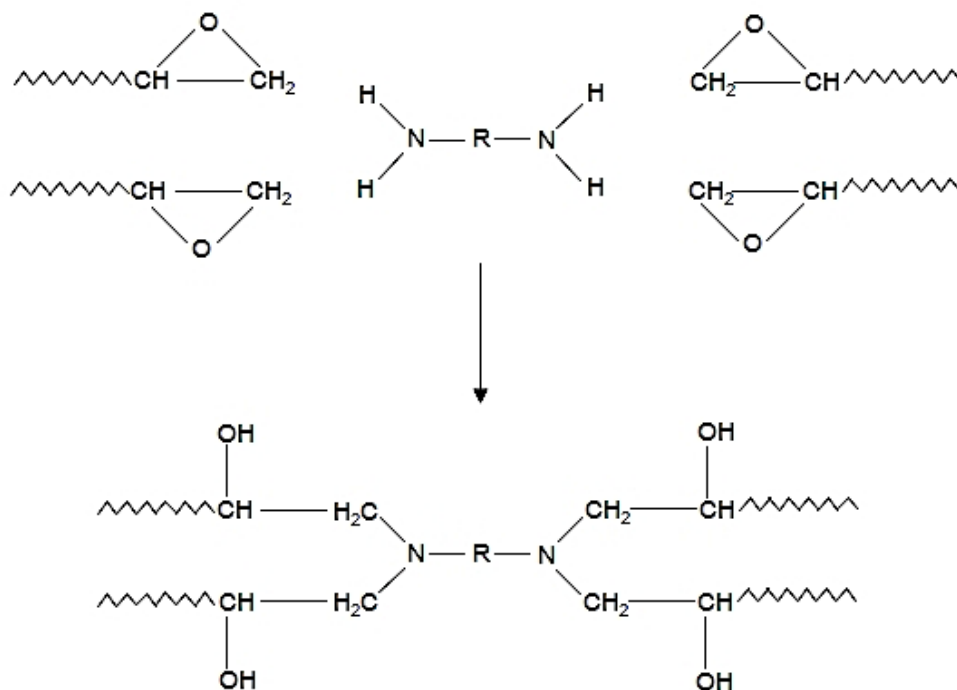
การเชื่อมขวางด้วยฟอร์มอลดีไฮด์มีหลักการเหมือนกับการเชื่อมขวางด้วยกลูตาโรลดีไฮด์ โดยที่ฟอร์มอลดีไฮด์จะทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีนของโปรตีน ($-NH_2$) เกิดสารอนุพันธ์ในรูปไม่เสถียร เรียกว่า Aminomethylol derivative ซึ่งทำหน้าที่ในการเชื่อมขวางกับหมู่เอมีนของโปรตีน และเกิด Methylene bridge ที่มีความเสถียร ดังแสดงในรูปที่ 10 ข้อเสียของวิธีการนี้คือ ทำให้พอลิเมอร์แข็งเปราะ มีการเปลี่ยนแปลงสี ประสิทธิภาพของการเชื่อมขวางด้วยวิธีนี้จะน้อยกว่าการเชื่อมขวางด้วยกลูตาโรลดีไฮด์ นอกจากนี้การเชื่อมขวางด้วยฟอร์มอลดีไฮด์มีความเป็นพิษ หากล้างออกไม่หมดอาจก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ และอาจก่อให้เกิดปฏิกิริยาข้างเคียงได้ [65]



รูปที่ 10 การเชื่อมขวางด้วยฟอร์มอลดีไฮด์ [66]

2.4.2.3 การเชื่อมขวางด้วยสารประกอบอีพอกซี (Epoxy compound)

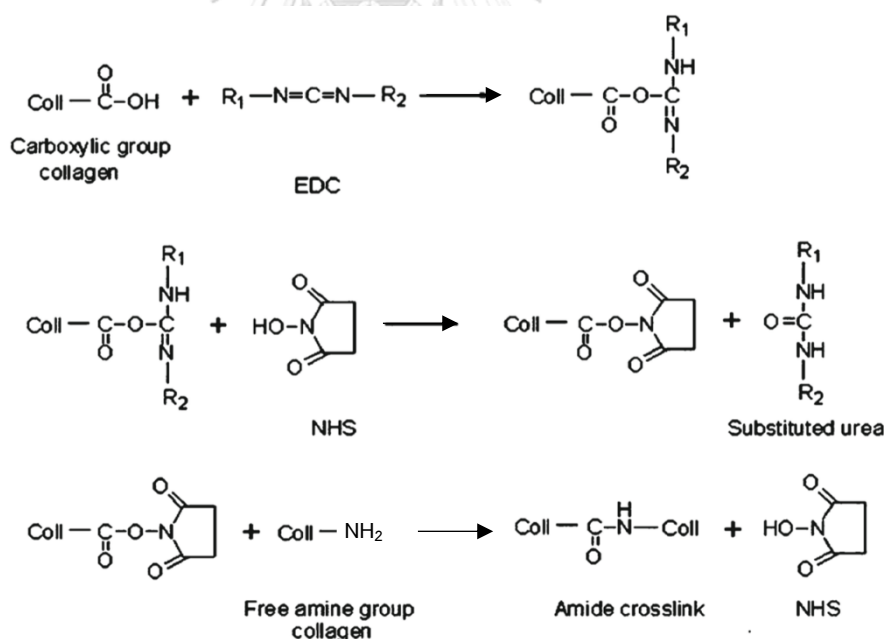
การเชื่อมขวางด้วยสารประกอบอีพอกซี เช่น เอทิลีนไกลคอลไดกลีซิดิเอเทอร์ (Ethylene glycol diglycidyl ether) ไกลคอลพอลิกลีซิดิเอเทอร์ (Glycol polyglycidyl ether) และเมทิลไกลลีซิดิเอเทอร์ (Methylglycidyl ether) เป็นต้น ข้อดีคือวัสดุที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยวิธีการนี้จะมีความยืดหยุ่นกว่าวัสดุที่เชื่อมขวางด้วยกลูตารอลดีไฮด์ [67] การเชื่อมขวางด้วยสารประกอบอีพอกซีเป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างหมู่เอมีน (Amine group) กับหมู่อีพอกไซด์ (Epoxyde) โดยจะเกิดการเชื่อมต่อกันไปเรื่อย ๆ ระหว่างโมเลกุล ดังรูปที่ 11



รูปที่ 11 การเชื่อมขวางด้วยสารประกอบอีพอกซี [68]

2.4.2.4 การเชื่อมขวางด้วย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) และ N-hydroxysuccinimide esters (NHS)

การเชื่อมขวางด้วย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) จะเกิดขึ้นโดย EDC ทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลิกในสายโซ่โปรตีน เกิดเป็นสารที่อยู่ในรูปไม่เสถียร (Intermediate) เรียกว่า O-acylisourea ester intermediate ซึ่ง O-acylisourea ester intermediate มีความไวต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ซึ่งสามารถกลับมาอยู่ในรูปคาร์บอกซิลิกได้อีก จึงจำเป็นต้องเติม N-hydroxysuccinimide esters (NHS) เพื่อให้มีความเสถียรมากขึ้น และป้องกันไม่ให้เกิดกลับมาอยู่ในรูปคาร์บอกซิลิก ได้อีก โดย NHS ทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีนในสายโปรตีน และเกิดเป็นพันธะเพปไทด์ที่มีความเสถียร ดังแสดงในรูปที่ 12 ข้อดีของการเชื่อมขวางด้วยวิธีนี้คือ ภายหลังจากการเชื่อมขวางจะได้อนุพันธ์ยูเรีย ซึ่งไม่เป็นพิษต่อร่างกาย และสามารถล้างออกได้ง่ายด้วยน้ำ นอกจากนี้ยังไม่มีสารเคมีเป็นองค์ประกอบในโมเลกุล ภายหลังจากการเชื่อมขวางด้วย [69]



รูปที่ 12 การเชื่อมขวางของคอลลาเจนด้วย EDC และ NHS [70]

2.6 ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility)

ความเข้ากันได้ทางชีวภาพเป็นสมบัติที่มีความสำคัญอย่างหนึ่งของชีววัสดุ เมื่อนำชีววัสดุไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ วิศวกรรมชีวเวช หรือประยุกต์ใช้กับระบบภายในร่างกาย วัสดุเหล่านี้จำเป็นต้องมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับร่างกาย โดยการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพทำได้โดยการทดสอบการตอบสนองของเซลล์ต่อวัสดุในห้องปฏิบัติการ โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์บนวัสดุที่ระยะเวลาหนึ่งและศึกษาการยึดเกาะของเซลล์ และการเจริญเติบโตของเซลล์ [71] ซึ่งปัจจัยที่ทำให้เซลล์สามารถยึดเกาะบนพื้นผิวของวัสดุมีหลายปัจจัย อาทิ [72]

- ความขรุขระของพื้นผิว (Surface roughness) เซลล์จะสามารถแผ่ขยายและยึดเกาะได้ดีถ้าพื้นผิวของวัสดุมีความขรุขระ
- ความแข็งของพื้นผิว (Stiffness surface) เซลล์สามารถยึดเกาะบนพื้นผิวที่มีความแข็งได้ดี
- ความชอบน้ำของพื้นผิว (Hydrophilic surface) โดยมีค่ามุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำและพื้นผิวประมาณ $20^{\circ} - 40^{\circ}$
- พื้นผิวที่มีประจุเป็นบวก (Positive charge surface) เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์มีประจุเป็นลบ ดังนั้นจึงสามารถยึดเกาะที่พื้นผิวที่เป็นประจุบวกได้ดี จึงได้มีการวิจัยที่เคลือบพื้นผิวของวัสดุด้วย Poly-D-lysine (PDL) [61] Silane [39] ซึ่งปรับปรุงพื้นผิวของวัสดุให้มีประจุเป็นบวก เพื่อสนับสนุนการยึดเกาะของเซลล์ให้ดีขึ้น
- ลำดับกรดอะมิโน Arginine Glycine Aspartic acid หรือ RGD เนื่องจากเป็นลำดับกรดอะมิโนที่มีความจำเพาะต่ออินทิกรินที่เยื่อหุ้มเซลล์ จึงทำให้เซลล์สามารถยึดเกาะที่พื้นผิวได้

โดยในงานวิจัยนี้ได้มีการดัดแปรพื้นผิวของวัสดุโดยการดัดแปรไวรัสไบต่างยาสูบบนพื้นผิวของฟิล์ม เพื่อให้พื้นผิวมีความขรุขระ อีกทั้งไวรัสไบต่างยาสูบที่ใช้มีการดัดแปลงพันธุกรรมด้วยลำดับกรดอะมิโน RGD เพื่อเพิ่มความสามารถในการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์บนฟิล์ม

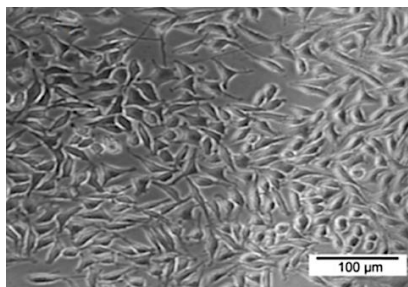
เซลล์ (Cell)

เซลล์ เป็นโครงสร้างและหน่วยที่เล็กที่สุดของเนื้อเยื่อในสิ่งมีชีวิตแทบทุกชนิด ในบางครั้งอาจเรียกว่าหน่วยที่เป็นองค์ประกอบของชีวิต เซลล์ประกอบด้วย 3 ส่วนหลัก คือ นิวเคลียส (Nucleus) ออร์แกเนล (Organelle) และส่วนที่ห่อหุ้มเซลล์ คือโครงสร้างที่อยู่ถัดออกมาจากเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น ผนังเซลล์ (Cell wall) ที่พบในพืช รา สาหร่าย และเมทริกซ์นอกเซลล์ (Extracellular matrix) ที่พบในเซลล์สัตว์ โดยส่วนใหญ่เป็นไกลโคโปรตีน ซึ่งได้แก่ คอลลาเจน (Collagen) โพรทีโอไกลแคน (Proteoglycan) ไฟโบรเนคติน (Fibronectin) ซึ่งทำหน้าที่ในการเชื่อมต่อกับบริเวณรับของอินทิกริน (Integrin receptor) ในเยื่อหุ้มเซลล์ และอินทิกรินทำหน้าที่เชื่อมต่อกับระบบเส้นใยภายในเซลล์ (Cytoskeleton) ทำให้เกิดการประสานระหว่างเมทริกซ์นอกเซลล์ และไซโทพลาสซึม (Cytoplasm) ภายในเซลล์ [73]

ในงานวิจัยนี้ เลือกใช้เซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังของหนู (L929 mouse fibroblast; L929) ในการทดสอบกับฟิล์มผสมไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน กลีเซอรอลที่ถูกตัดแปรพื้นผิวด้วยไวรัสสไปด่างยาสูบ ซึ่ง L929 เป็นเซลล์มาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพของวัสดุในระดับห้องปฏิบัติการ

เซลล์ผิวหนังของหนู (L929 mouse fibroblast) [74]

เซลล์ผิวหนังของหนู (L929 mouse fibroblast) เป็นเซลล์ชนิดหนึ่งที่สังเคราะห์เมทริกซ์นอกเซลล์ (Extracellular matrix) และคอลลาเจน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อในสัตว์ โดยพบมากในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissue) สันฐานวิทยาของเซลล์ขึ้นกับตำแหน่งที่เซลล์อาศัยและหน้าที่ของเซลล์ ส่วนใหญ่มักพบว่า เซลล์มีลักษณะเรียวยาว ดังแสดงในรูปที่ 13 หน้าที่หลักของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ คือ รักษาโครงสร้างของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันให้สมบูรณ์



รูปที่ 13 สันฐานวิทยาของเซลล์ผิวหนังของหนูที่กำลังขยายของกล้อง 100 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 100 ไมครอน) [74]

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.7.1 การพัฒนาฟิล์มผสมระหว่างไฟโบรอินไหมและเจลาติน

ในปี 2009 Bilman B. M. และคณะ [29] ได้ศึกษาการควบคุมการปลดปล่อยสารจากฟิล์มหลายชั้น จากไฟโบรอินไหมจากไหมสายพันธุ์ *Bombyx mori* และเจลาตินชนิดเอที่อัตราส่วนต่าง ๆ โดยแช่ฟิล์มในสารละลายเมทานอล เพื่อชักนำโครงสร้างแผ่นพอลิเมอร์ของไฟโบรอิน โดยทำการเปรียบเทียบจำนวนชั้นของฟิล์มไฟโบรอินไหมผสมกับเจลาติน 1 ชั้น 3 ชั้น และ 5 ชั้น และเปรียบเทียบสัดส่วนไฟโบรอินไหมต่อเจลาติน 1:1 2:1 และ 4:1 จากการศึกษาพบว่า พฤติกรรมการควบคุมการปลดปล่อยสารจากฟิล์มผสมขึ้นกับสัดส่วนการผสมไฟโบรอินและเจลาติน จำนวนชั้นของฟิล์มผสม และอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพ เมื่อเพิ่มอัตราส่วนของเจลาติน ส่งผลให้สมบัติทางกลของฟิล์มผสมด้อยลง อัตราการย่อยสลายเร็วขึ้น และอัตราการปลดปล่อยสารช้าลง นอกจากนี้พบว่าการเพิ่มจำนวนชั้นฟิล์มผสมช่วยให้อัตราการย่อยสลายช้าลง อีกทั้งปลดปล่อยสารช้าลงด้วย และเมื่อนำฟิล์มผสมไฟโบรอินและเจลาตินไปเลี้ยงเซลล์ พบว่าเซลล์เจริญเติบโตได้ดี เมื่อเทียบกับฟิล์มไฟโบรอินไหมเพียงอย่างเดียว ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเจลาตินช่วยสนับสนุนการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้

ในปี 2009 Watcharin O. และคณะ [75] ได้ศึกษาสัณฐานวิทยา โครงสร้างทฤษฎี และสมบัติทางความร้อนของฟิล์มไฟโบรอินไหม ฟิล์มเจลาติน และฟิล์มผสมไฟโบรอินไหมและเจลาติน จากการศึกษาพบว่าฟิล์มผสมไฟโบรอินไหมและเจลาตินประกอบด้วยโครงสร้างแผ่นพอลิเมอร์และเกลียวแอลฟา ซึ่งมีลักษณะคล้ายกันกับไฟโบรอินไหม และเจลาติน จากการศึกษาวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยา พบว่าฟิล์มผสมไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินมีพื้นผิวเรียบกว่าเมื่อเทียบกับฟิล์มไฟโบรอินไหมเพียงอย่างเดียว แสดงให้เห็นว่าเจลาตินช่วยให้พื้นผิวของไฟโบรอินไหมเรียบ นอกจากนี้ผลจากการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของสารโดยอาศัยสมบัติทางความร้อน (Thermogravimetric Analysis, TGA) พบว่าเสถียรภาพทางความร้อน (Thermal stability) ของฟิล์มผสมไฟโบรอินไหมและเจลาตินเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับฟิล์มไฟโบรอิน และฟิล์มเจลาติน

ในปี 2010 Simchuer W. และคณะ [76] ได้ศึกษาการขึ้นรูปฟิล์มผสมระหว่างไฟโบรอินไหมสายพันธุ์ *Bombyx mori* และเจลาตินชนิดเอที่อัตราส่วนเจลาตินต่างๆ คือ 0 5 10 20 30 40 และ 50 โดยน้ำหนัก เพื่อประยุกต์ใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยยาที่มีสมบัติชอบน้ำ จากการศึกษาพบว่าเมื่อเพิ่มอัตราส่วนเจลาติน ส่งผลให้ฟิล์มผสมมีความอ่อนตัวสูงขึ้นเมื่อเทียบกับฟิล์มไฟโบรอินไหมเพียงอย่างเดียว อีกทั้งพบว่าคลอโรเฮกซีดีน (Chlorhexidine, CHX) ถูกปลดปล่อยอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยฟิล์ม

ผสมที่มีอัตราส่วนของเจลาตินเป็นองค์ประกอบอยู่มากจะส่งผลให้อัตราการปลดปล่อยค่อนข้างช้า เมื่อเทียบกับฟิล์มผสมที่มีอัตราส่วนของเจลาตินปริมาณน้อยกว่าเนื่องจากคลอเฮ็กซีดีนและเจลาตินมีความชอบน้ำ ส่งผลให้อันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างโมเลกุลของคลอเฮ็กซีดีนและเจลาตินมีความแข็งแรงมากกว่าไฟโบรอินไหมเพียงอย่างเดียว

ในปี 2015 Luyuan Y. และคณะ [27] ได้ศึกษาการตัดแปรงฟิล์มไฟโบรอินไหมจากไหมสายพันธุ์ *Bombyx mori* ด้วยเจลาตินชนิดเอสำหรับเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยใช้เซลล์ NIH 3T3 เป็นเซลล์ที่พัฒนาจากไฟโบรบลาสต์ตัวอ่อนของหนู และเปรียบเทียบปริมาณเจลาตินที่เติมในสารละลายไฟโบรอินร้อยละ 0.625 1.25 2.5 5 10 และ 20 โดยน้ำหนัก จากนั้นแช่ฟิล์มในเมทานอล เพื่อชักนำโครงสร้างทุติยภูมิของไฟโบรอินไหม และนำฟิล์มผสมไปศึกษาสมบัติทางกายภาพและทางชีวภาพ จากการศึกษาพบว่า เมื่อเพิ่มสัดส่วนของเจลาติน ส่งผลให้เซลล์เจริญเติบโตและยึดเกาะได้ดีบนพื้นผิวเมื่อเทียบกับฟิล์มไฟโบรอินไหมเพียงอย่างเดียวเนื่องจากโครงสร้างของเจลาตินมีลำดับกรดอะมิโนอาร์จินิลไกลซิลแอสปาทิกประกอบอยู่ จึงทำให้เซลล์สามารถยึดเกาะที่พื้นผิวของฟิล์มได้ นอกจากนี้พบว่าเจลาตินช่วยปรับปรุงพื้นผิวของฟิล์มไฟโบรอินให้เรียบเนียนขึ้น

2.7.2 การตัดแปรฟิล์มไฟโบรินไหมไทยด้วยกลีเซอรอล

ในปี 2010 Shenzhou Lu S. และคณะ [77] ได้ศึกษาผลของการเติมกลีเซอรอลในอัตราส่วนต่าง ๆ คือ 2 5 10 20 30 40 และ 50 โดยน้ำหนัก ที่มีผลต่อความยืดหยุ่นของฟิล์มไฟโบรินไหมสายพันธุ์ *Bombyx mori* จากการศึกษาพบว่า การเติมกลีเซอรอลร้อยละ 2 -5 โดยน้ำหนัก ไม่ได้ส่งผลต่อความยืดหยุ่นของฟิล์มไฟโบรินไหม และเมื่อเพิ่มปริมาณกลีเซอรอลในฟิล์มเป็นร้อยละ 10 ถึง 20 โดยน้ำหนัก พบว่าฟิล์มผสมมีความยืดหยุ่นเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง แต่พบว่าความยืดหยุ่นของฟิล์มผสมที่มีปริมาณกลีเซอรอลเป็นร้อยละ 30 ถึง 50 โดยน้ำหนัก ไม่แตกต่างกับฟิล์มผสมที่มีปริมาณกลีเซอรอลอย่างมีนัยสำคัญชี้ให้เห็นว่าปริมาณกลีเซอรอลร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก เป็นปริมาณสูงสุดที่กลีเซอรอลสามารถเข้าไปแทรกตัวในสายโซ่ไฟโบรินและทำให้ฟิล์มผสมมีความยืดหยุ่นสูงสุด

ในปี 2013 Wang Y. และคณะ [52] ได้ศึกษาการขึ้นรูปฟิล์มไฟโบรินไหมและกลีเซอรอลที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยเจนิพิน (Genipin) โดยเติมกลีเซอรอลเพื่อปรับปรุงสมบัติทางกลและสมบัติทางกายภาพของฟิล์ม จากการศึกษาทดสอบสมบัติทางกลพบว่าเมื่อปริมาณกลีเซอรอลร้อยละ 20 ค่าความแข็งแรงในการทนแรงดึงยึดของฟิล์มผสมเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาณกลีเซอรอลร้อยละ 60 ค่าความแข็งแรงลดลง ค่าร้อยละการดึงยึดมีค่าเพิ่มขึ้น และค่ามอดูลัสของยัง (Young's modulus) ลดลง

ในปี 2016 Joseph E. B. และคณะ [78] ได้ศึกษาการขึ้นรูปฟิล์มผสมไฟโบรินไหมและกลีเซอรอลในอัตราส่วนกลีเซอรอลต่อไฟโบรินไหมเป็น 1:99 5:95 10:90 20:80 30:70 40:60 โดยน้ำหนักตามลำดับ เพื่อศึกษาสมบัติทางความร้อนและทางกายภาพของฟิล์มผสม จากการศึกษาสมบัติทางความร้อนพบว่าเมื่อปริมาณกลีเซอรอลเพิ่มขึ้นส่งผลให้ค่าอุณหภูมิเปลี่ยนสภาพแก้ว (Glass transition temperature) ลดต่ำลง เนื่องจากโมเลกุลของกลีเซอรอลทำหน้าที่เป็นสารเสริมสภาพพลาสติกแทรกตัวอยู่ระหว่างสายโซ่ของไฟโบรินไหม จึงส่งผลกระทบต่อกระบวนการจัดเรียงตัวของสายโซ่ไฟโบรินไหมให้เคลื่อนที่เป็นอิสระมากขึ้น และจากผลการศึกษาโครงสร้างทุติยภูมิของฟิล์มผสมพบว่า โครงสร้างเกลียวแอลฟาในฟิล์มผสมที่มีปริมาณกลีเซอรอลร้อยละ 30 โดยน้ำหนักมีปริมาณมากกว่าในฟิล์มไฟโบรินไหม โดยกลไกที่เกิดขึ้นระหว่างโมเลกุลของกลีเซอรอลและไฟโบรินไหมเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของกลีเซอรอลและหมู่เอมีนของไฟโบรินไหม ดังนั้นการเติมกลีเซอรอลในฟิล์มไฟโบรินไหมจึงทำให้ฟิล์มผสมมีความยืดหยุ่นเพิ่มมากขึ้น

2.7.3 การอบนึ่งด้วยไอน้ำของไฟโบรินไหมไทย

ในปี 2011 Xiao H. และคณะ[55] ได้รายงานผลการอบนึ่งด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิต่างๆ (4 25 37 50 และ 95 องศาเซลเซียส) ต่อโครงสร้างของฟิล์มไฟโบรินไหม พบว่าสเปกตรัมการดูดกลืนของฟิล์มไฟโบรินไหมที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำปรากฏยอดคลื่นที่ 1648 ต่อเซนติเมตร ซึ่งแสดงถึงโครงสร้างแบบเกลียวสุม และเมื่อนำฟิล์มไฟโบรินไหมไปอบนึ่งด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะพบยอดคลื่นที่ 1626 ต่อเซนติเมตร ซึ่งแสดงถึงโครงสร้างแผ่นพลิทเบต้า และเมื่อเพิ่มเวลาของการอบนึ่งด้วยไอน้ำ จะพบว่าสเปกตรัมการดูดกลืนของไฟโบรินไหมจะปรากฏยอดคลื่น 1626 ต่อเซนติเมตรที่ชัดเจน แสดงให้เห็นว่าการอบนึ่งด้วยไอน้ำส่งผลต่อสายโซ่ไฟโบรินไหมมีการจัดเรียงตัวที่เป็นระเบียบมากขึ้น

ในปี 2010 Qiang L. และคณะ [28] ได้ศึกษาการเปรียบเทียบผลของการอบนึ่งด้วยไอน้ำและการอบไอน้ำด้วยสารละลายเมทานอลของฟิล์มไฟโบริน เพื่อชักนำโครงสร้างทุติยภูมิแบบแผ่นพลิทเบต้าให้แก่ไฟโบรินไหม จากผลการศึกษาโครงสร้างทุติยภูมิของฟิล์มไฟโบรินพบว่าการอบนึ่งด้วยไอน้ำเป็นเวลา 6 ชั่วโมง สามารถชักนำโครงสร้างทุติยภูมิที่เป็นระเบียบให้แก่ไฟโบรินไหมได้ใกล้เคียงกับการอบไอน้ำด้วยเมทานอลที่ความเข้มข้นของสารละลายเมทานอลร้อยละ 80 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง อีกทั้งสมบัติทางกายภาพของฟิล์มไฟโบรินที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำและอบไอน้ำด้วยสารละลายเมทานอลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และมีความแข็งแรงมากกว่าเมื่อเทียบกับฟิล์มไฟโบรินไหมที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการทั้งสอง แสดงให้เห็นว่าการอบนึ่งด้วยไอน้ำเป็นเวลา 6 ชั่วโมง สามารถชักนำโครงสร้างทุติยภูมิของสายโซ่ไฟโบรินไหมให้เป็นระเบียบเทียบเท่าการอบไอน้ำด้วยสารละลายเมทานอลเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ในปี 2007 Xiao hu และคณะ [79] ได้ศึกษาผลของการอบนึ่งด้วยไอน้ำต่อสมบัติทางความร้อนของฟิล์มไฟโบรินไหม จากการศึกษาพบว่าเมื่อนำฟิล์มไฟโบรินไปผ่านกระบวนการอบนึ่งด้วยไอน้ำ โมเลกุลของไอน้ำจะแทรกเข้าไปในสายโซ่ของไฟโบริน สายโซ่ไฟโบรินจึงเคลื่อนที่เป็นอิสระมากขึ้น และจัดเรียงตัวเป็นระเบียบได้มากขึ้น ส่งผลให้ค่าอุณหภูมิเปลี่ยนสภาพแก้ว (Glass transition temperature; T_g) ของฟิล์มไฟโบรินที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำมีค่าสูงกว่าฟิล์มไฟโบรินที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ

2.7.4 การดัดแปรพื้นผิววัสดุด้วยไวรัสใบต่างยาสูบที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมด้วยลำดับกรดอะมิโนอาร์จินีนไกลซีนแอสปาทิก

ในงานวิจัยของ L.Andrew Lee และคณะ [37] ได้ศึกษาการดัดแปรพื้นผิวภาชนะเลี้ยงเซลล์ด้วยไวรัสใบต่างยาสูบที่ไม่ถูกดัดแปลงพันธุกรรม (TMV-wt) และไวรัสใบต่างยาสูบที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมด้วยลำดับกรดอะมิโนอาร์จินีนไกลซีนแอสปาทิก (TMV-RGD) โดยใช้สารละลายไวรัสที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากการศึกษาพบว่าเซลล์ไตของลูกหนูแฮมสเตอร์ (Baby hamster kidney cell; BHK) สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตบนพื้นผิวที่ถูกดัดแปรด้วยไวรัส TMV-RGD ได้ดีกว่าในพื้นผิวที่ถูกดัดแปรด้วยไวรัส TMV-wt เนื่องจากไวรัส TMV-RGD มีลำดับกรดอะมิโนอาร์จินีนไกลซีนแอสปาทิก ซึ่งจำเพาะต่ออินทิกริน (Integrin) ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งจะจับกับลำดับกรดอะมิโน RGD ที่อยู่บนพื้นผิวของไวรัส TMV-RGD จึงส่งผลให้เซลล์สามารถยึดเกาะที่พื้นผิวที่ดัดแปรด้วยไวรัส TMV-RGD ได้ดีขึ้น

ในงานวิจัยของ Pongkwan S. และคณะ [39] ได้ศึกษาการดัดแปรพื้นผิว 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) ด้วยไวรัส TMV-wt และไวรัส TMV-RGD โดยใช้สารละลายไวรัสที่มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากการศึกษาสัณฐานพื้นผิวด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม Atomic Force Microscope (AFM) พบว่าการดัดแปรพื้นผิว APTES ด้วยไวรัสทั้งสองชนิดนั้น ส่งผลให้พื้นผิว APTES มีความขรุขระเพิ่มมากขึ้น และเมื่อศึกษาสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพของเซลล์สโตรมอลจากไขกระดูก (Bone marrow stromal cells; BMSc) ที่เพาะเลี้ยงบน APTES ที่ถูกดัดแปรพื้นผิวด้วยไวรัสทั้งสองชนิด พบว่าจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะและเจริญเติบโตบนพื้นผิวที่ถูกดัดแปรด้วยไวรัส TMV-RGD มีปริมาณมากกว่าพื้นผิวที่ถูกดัดแปรด้วยไวรัส TMV-wt เนื่องจากลำดับกรดอะมิโน RGD มีความจำเพาะต่ออินทิกรินที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ จึงทำให้เซลล์สามารถยึดเกาะที่พื้นผิวที่ถูกดัดแปรด้วยไวรัส TMV-RGD ได้ดีกว่าพื้นผิวที่ถูกดัดแปรด้วย TMV-wt

บทที่ 3

วัสดุและวิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุและสารเคมี

- 3.1.1 ไหมไทย (สายพันฐานางน้อยศรีสะเกษ 1 จากศูนย์หม่อนไหมแห่งชาติเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์พระบรมราชินีนาถ จังหวัดนครราชสีมา)
- 3.1.2 เจลาตินชนิดเอ (น้ำหนักรวม 1 กิโลกรัม, Isoelectric point (pI) = 9 (Nitta Gelatin Inc., ญี่ปุ่น)
- 3.1.3 กลีเซอรอลเกรดงานวิเคราะห์ (Glycerol; $C_3H_8O_3$)
- 3.1.4 สารละลายไวรัสใบตองยาสูบที่ไม่ถูกตัดแปลงพันธุกรรม (TMV-wt)
- 3.1.5 สารละลายไวรัสใบตองยาสูบที่ถูกตัดแปลงพันธุกรรมด้วยลำดับกรดอะมิโน RGD (TMV-RGD)
- 3.1.6 โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate; Na_2CO_3) (Ajax Finechem, ออสเตรเลีย)
- 3.1.7 ลิเทียมโบรไมด์ (Lithium bromide; LiBr) (Sigma-Aldrich, เยอรมนี)
- 3.1.8 กรดไฮโดรคลอริก (HCl; 36.5-38%, J.T. Baker, NJ, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.9 1-ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) (Nacalai Tesque ญี่ปุ่น)
- 3.1.10 N-hydroxysuccinimide (NHS) (Nacalai Tesque ญี่ปุ่น)
- 3.1.11 แม่พิมพ์แก้ว (Glass mold) ขนาด 7 x 7 ตารางเซนติเมตร
- 3.1.12 เครื่องชั่งน้ำหนักแบบดิจิตอล (AL204, Mettler TOLEDO, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.13 เยื่อเลือกผ่านสำหรับการไดอะลิซิส (molecular weight cut-off (MWCO) 12-16 กิโลดาลตัน, Viskase Company, ญี่ปุ่น)
- 3.1.14 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, เยอรมัน)
- 3.1.15 บิวทานอล (n-butanol) (99.5%, Qrec chemical Co., Ltd., นิวซีแลนด์)
- 3.1.16 คลอโรฟอร์ม (Chloroform) (Sigma-Aldrich, เยอรมัน)
- 3.1.17 โซเดียมคลอไรด์ ($\geq 99.5\%$ (AT), Sigma-Aldrich, Inc. CAS Number 7647-14-5)
- 3.1.18 พอลิเอทิลีนไกลคอล (Polyethylene glycol)
- 3.1.19 สารละลายซูโครส (Sigma-Aldrich, เยอรมัน)

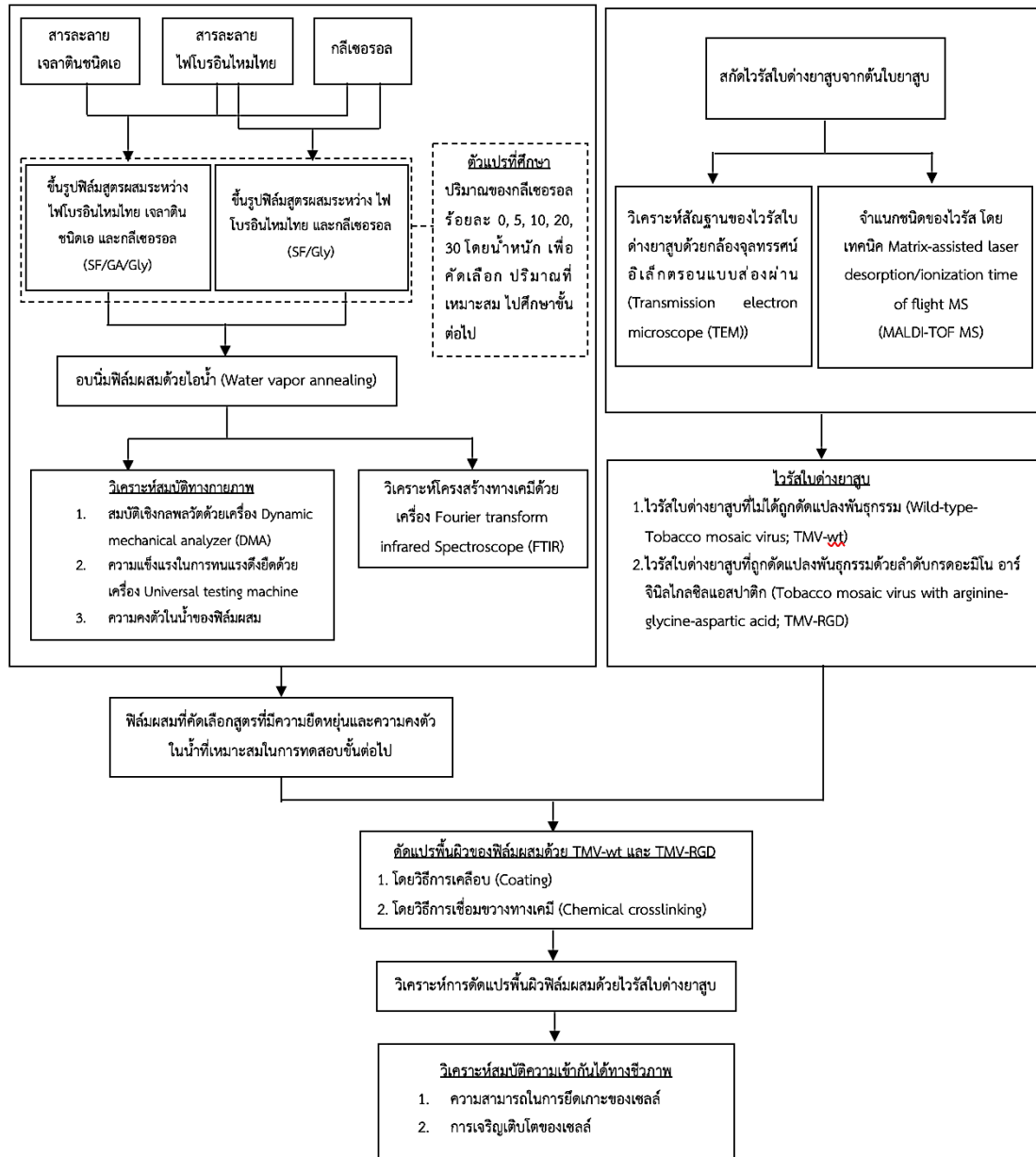
- 3.1.20 บัฟเฟอร์ฟอสเฟต (PBS, pH 6.5, Bio basic Inc., แคนาดา)
- 3.1.21 Dulbecco's modified eagle powder medium with high glucose (DMEM, Hyclone, GE Healthcare, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.22 Fetal bovine serum (FBS, Hyclone, GE Healthcare, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.23 Trypan blue Stain 0.4% (Gibco, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.24 Sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3 , MW 84.01 g/mol, Merck, เยอรมัน)
- 3.1.25 SDS lysis buffer Sodium dodecylsulfate (SDS, $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{OSO}_3\text{Na}$, MW 288.38 g/mol, Biotech Basic Canada Inc., แคนาดา)
- 3.1.26 กระจกสไลด์ (Glass slide, 25.4 x 76.2 x 1.2 mm, Sail band, จีน)

3.2 อุปกรณ์

- 3.2.1 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) Universal 320R, Hettich เยอรมนี
- 3.2.2 ตู้เย็น (NR-BU343, Panasonic ไทย)
- 3.2.3 ปิเปตต์อัตโนมัติ (Automatic pipette) (Eppendorf เยอรมัน)
- 3.2.4 เครื่องกวนสารละลาย (Magnetic stirrer) / เตาให้ความร้อน (Hot plate) (RCT Basic, lka labortecgnik เยอรมัน)
- 3.2.5 ตู้อบ (VD23, Binder, เยอรมัน)
- 3.2.6 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter, professional meter, pp-50, เยอรมัน)
- 3.2.7 เครื่อง Zetasizer (650, Malvern, อังกฤษ)
- 3.2.8 เครื่องวิเคราะห์สมบัติทางกลพลวัต (Dynamic mechanical analyzer ,DMA) (242C, NETZSCH เยอรมัน)
- 3.2.9 เครื่องทดสอบยูนิเวอร์แซล (Universal Testing machine)(Instron 5567 สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.10 Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR, Perkin Elmer Spectrum One, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.11 กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (Atomic Force Microscope) (MFP-3D-BIO, Asylum Research สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.12 เครื่องปั่น (Panasonic, ไทย)

- 3.2.13 เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกสารความเร็วสูงแบบยี่งวดชนิดควบคุมอุณหภูมิ
(Ultracentrifuge)
- 3.2.14 เครื่องวัดปริมาณกรดนิวคลีอิกและโปรตีน (Nanodrop, Impren, เยอรมัน)
- 3.2.15 MALDI TOF (Autoflex Speed, Bruker, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.16 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (1235 PC, Shel-Lab, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.17 เครื่อง Microplate Reader (FLUOstar Omega, BMG LABTECH, เยอรมัน)
- 3.2.18 กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, JEM-1400
JEOL Ltd., ญี่ปุ่น)
- 3.2.19 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope Nikon, Eclipse 80i, ญี่ปุ่น)
- 3.2.20 ตู้ดูดความชื้น (SR Lab, ไทย)
- 3.2.21 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow Cabinet, ScanLaf, Mars 1800, เดนมาร์ก)
- 3.2.22 ตู้เพาะเชื้อบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (CO2 Incubator, Galaxy 170R, New
Brunswick, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.23 จานเพาะเลี้ยงเซลล์ 24 หลุม (24-well polystyrene tissue culture plates)
(Corning, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.24 จานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96-well polystyrene tissue culture plates)
(Corning, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.25 Polystyrene tissue culture flask (Corning, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.26 emocytometer (Boeco, เยอรมัน)

3.3 แผนผังการดำเนินงานวิจัย



รูปที่ 14 แผนผังการดำเนินงานวิจัย

การดำเนินงานวิจัยแบ่งออกเป็น 2 ส่วนหลัก ดังแสดงในรูปที่ 14 ได้แก่ กระบวนการขึ้นรูปฟิล์มผสมระหว่างโฟโบรินไทยกับกลีเซอรอล และฟิล์มผสมระหว่างโฟโบรินไทย เจลาติน และกลีเซอรอล และการทดสอบสมบัติทางกายภาพและทางเคมี เพื่อคัดเลือกฟิล์มผสมที่มีสมบัติเหมาะสม จากนั้นตัดแปรพื้นผิวของฟิล์มผสมด้วยไวรัสใบต๋ายยาสูบ TMV-wt และ TMV-RGD โดยวิธีการเคลือบและการเชื่อมขวาง และนำไปศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพ

3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การเตรียมสารละลายไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน

3.4.1.1 การเตรียมสารละลายไฟโบรอินไหมไทย

เตรียมสารละลายไฟโบรอินไหมไทยโดยวิธีซึ่งดัดแปลงจากงานวิจัยของ Kim U. และคณะในปี 2004 [25] ดังแสดงในรูปที่ 15 โดยต้มรังไหม 40 กรัมในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ปริมาตร 1 ลิตร เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างเส้นไหมที่ได้ในน้ำปราศจากไอออน (deionized water) และทำซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดกาวไหม ผึ่งเส้นไหมไฟโบรอินไหมไทยที่ได้ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ละลายเส้นไหมไฟโบรอินในสารละลายลิเทียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 9.3 โมลาร์ ในอัตราส่วนเส้นไหมไฟโบรอินต่อสารละลายลิเทียมโบรไมด์ 1 ต่อ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ณ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 4 ชั่วโมง

บรรจุสารละลายไฟโบรอินที่ได้ในถุงเยื่อเลือกผ่านสำหรับการไดอะลิซิส (dialysis tube) และไดอะลิซิสในน้ำปราศจากไอออน 5 ลิตร ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนน้ำสำหรับไดอะลิซิส 8 ครั้ง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อ นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อกำจัดตะกอนสิ่งสกปรก วิเคราะห์ความเข้มข้นของสารละลายไฟโบรอินไหมไทยที่เตรียมได้โดยเปรียบเทียบน้ำหนักของสารละลายก่อน และหลังอบแห้ง และเก็บสารละลายไฟโบรอินไหมที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การกำจัดกาวไหม (เซรีซิน)

- 1) นำรังไหมไทยสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 มาทำความสะอาดโดยกำจัดสิ่งสกปรกออกจากรังไหม จากนั้นชั่งน้ำหนักรังไหม 40 กรัม
- 2) ต้มรังไหมในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 0.02 โมลต่อลิตร เป็นเวลา 20 นาที
- 3) นำรังไหมที่ผ่านการต้มแล้วมาล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionized water) ประมาณ 5 ครั้ง ครั้งละ 5 ลิตร เพื่อกำจัดเซรีซินและสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต
- 4) ทำซ้ำข้อ 2) และ 3) อีก 1 ครั้ง
- 5) นำเส้นไหมไฟโบรอินที่ผ่านการกำจัดกาวไหมไปผึ่งให้แห้งเป็นเวลา 2 – 3 วัน
- 6) ฉีกเส้นไหมไฟโบรอินให้ฟู เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัส สำหรับเตรียมสารละลาย

ไหมไฟโบรอินต่อไป

การเตรียมสารละลายไฟโบรอิน

1) นำเส้นใยไหมไฟโบรอินที่ผ่านการกำจัดกาวไหมแล้วละลายในสารละลายลิเทียมโบรไมด์ (LiBr) ความเข้มข้น 9.3 โมลต่อลิตร ในอัตราส่วน เส้นใยไฟโบรอินไหม 4 กรัม ต่อ สารละลายลิเทียมโบรไมด์ 16 มิลลิลิตร โดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จนได้สารละลายไหมไฟโบรอินที่มีลักษณะเหลืองใส

2) นำสารละลายไฟโบรอินไหมที่ได้มาไดอะไลซ์ในน้ำปราศจากไอออนด้วยถุงไดอะไลซ์ (MWCO เท่ากับ 12,000-16,000) อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อกำจัดลิเทียมโบรไมด์ โดยเปลี่ยนน้ำปราศจากไอออนที่เวลา 20 40 และ 60 นาที ในช่วงแรก จากนั้นเปลี่ยนน้ำวันละ 3 ครั้ง (เช้า กลางวัน เย็น)

3) นำสารละลายไหมไฟโบรอินที่ผ่านการไดอะไลซ์แล้วไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยทำซ้ำทั้งหมด 2 รอบ เพื่อกำจัดตะกอนส่วนที่ไม่ละลายน้ำและสิ่งสกปรกออกจากสารละลายดังกล่าว จากนั้นนำสารละลายไหมไฟโบรอินไปเก็บที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4) วิเคราะห์ความเข้มข้นของสารละลายไหมไฟโบรอินด้วยการอบแห้งเพื่อหาน้ำหนักของไฟโบรอิน โดยสารละลายไหมไฟโบรอินจะมีความเข้มข้นประมาณร้อยละ 6.0 – 7.0 โดยน้ำหนัก ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\text{ความเข้มข้นของสารละลายไฟโบรอิน (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักไฟโบรอินแห้ง}}{\text{น้ำหนักของสารละลาย}} \times 100\% \dots (\text{สมการที่ 1})$$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

ขั้นตอนที่ 1 การกำจัดกาวไหม



รังไหม 40 กรัม
(สายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1)



ต้มรังไหมใน 0.02 M Na_2CO_3
20 นาที ซ้ำ 2 รอบ



เส้นใยไฟโบรอินไหม
ที่กำจัดกาวไหมแล้ว

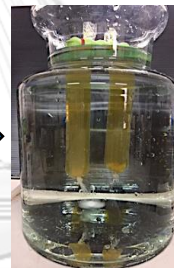
ขั้นตอนที่ 2 การเตรียมสารละลายไฟโบรอิน



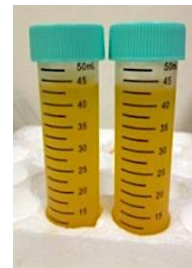
ละลายไฟโบรอินไหมใน
0.9 M LiBr ที่อุณหภูมิ 60°C
4 ชั่วโมง



สารละลาย
ไฟโบรอินไหมใน LiBr



ไดอะไลซ์ด้วยน้ำ
ปราศจากไอออนและ
เปลี่ยนน้ำ 3 วัน



สารละลายไฟโบรอิน
ความเข้มข้น 6-7%
โดยน้ำหนัก

รูปที่ 15 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายไฟโบรอิน

3.4.1.2 การเตรียมสารละลายเจลาติน

เตรียมสารละลายเจลาตินชนิดเอ ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก โดยแช่ผงเจลาตินในน้ำปราศจากไอออนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และปั่นกวนสารละลายเจลาติน ณ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที เพื่อให้ได้สารละลายที่เป็นเนื้อเดียวกัน

3.4.2 การวิเคราะห์ค่าศักย์ซีตา (Zeta potential) ของสารละลายด้วยเครื่อง Zeta sizer

วิเคราะห์ค่าศักย์ซีตาของสารละลายไฟโบรอินไหม เจลาติน กลีเซอรอล และสารละลายผสม ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่าง 2 – 9 ด้วยเครื่อง Zeta sizer โดยใช้เทคนิค Laser Doppler Electrophoresis (LDE)

3.4.3 การขึ้นรูปฟิล์มผสมไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกลีเซอรอล

1) เตรียมสารละลายผสมระหว่างสารละลายไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน ความเข้มข้นรวมร้อยละ 4.0 โดยน้ำหนัก โดยอัตราส่วนโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยต่อเจลาตินคิดเป็น 80 ต่อ 20 และผสมกลีเซอรอลในสัดส่วนร้อยละ 5 10 20 30 โดยน้ำหนักของสารละลายโปรตีนผสม ปั่นกวนสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที

2) เทสารละลายผสมปริมาตร 20 มิลลิลิตรลงในแม่พิมพ์แก้วขนาด 7 x 7 ตารางเซนติเมตร และผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง จะได้ฟิล์มผสมที่มีความหนาประมาณ 150 ไมโครเมตร

3.4.4 การอบนึ่งด้วยไอน้ำของฟิล์มผสมไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกลีเซอรอล

การอบนึ่งด้วยไอน้ำ (Water vapor annealing; WVA) ของฟิล์มผสมไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกลีเซอรอล มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มความคงตัวของฟิล์มในน้ำ โดยกระบวนการดังกล่าวสามารถกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนไฟโบรอินให้มีความเป็นระเบียบเพิ่มขึ้น [45] กระบวนการอบนึ่งด้วยไอน้ำทำได้โดยบรรจุฟิล์มสูตรผสมที่เตรียมได้ในโถแก้ว (Desiccator) ที่บรรจุไอน้ำปริมาตร 1 ลิตร และปรับสภาวะภายในโถแก้วให้เป็นสุญญากาศ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงนำฟิล์มไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อกำจัดความชื้น

3.4.5 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของฟิล์มผสม

3.4.5.1 การทดสอบความแข็งแรงในการทนแรงดึงด้วยเครื่อง Universal Testing Analyzer

การทดสอบความแข็งแรงในการทนแรงดึงของฟิล์มผสมไฟโบรอินไหมและกลีเซอรอลและฟิล์มผสมไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกลีเซอรอล ก่อนและหลังการอบนึ่งด้วยไอน้ำ โดยตัดฟิล์มผสมขนาด 1 x 7 ตารางเซนติเมตร และนำไปทดสอบแรง

ดึงด้วยเครื่อง Universal testing machine ตามมาตรฐาน ASTM-D882-2 ความเร็วในการดึง 12.5 มิลลิเมตรต่อนาที ใช้ก้อนน้ำหนัก (Load cell) ขนาด 1 กิโลนิวตัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำซ้ำ 10 ครั้ง ซึ่งความแข็งแรงในการทนแรงดึงยึดของฟิล์มผสมพิจารณาได้จาก

ร้อยละการดึงยึด ณ จุดขาด (Elongation at break)

ค่าความยืดหยุ่นของฟิล์มผสม สามารถหาได้จากร้อยละการดึงยึด ณ จุดขาด (%Elongation at break) ดังสมการ

$$\% \text{ Elongation at break} = \frac{L - L_0}{L_0} \times 100\% = \frac{\Delta L}{L_0} \times 100\% \quad \dots(\text{สมการที่ 2})$$

ค่ามอดูลัสของยัง (Young's modulus, E)

ค่ามอดูลัสของยังมีความสำคัญในเชิงวิศวกรรมที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ ฟิล์มผสม หาได้จากกราฟความสัมพันธ์ความเค้นและความเครียด ในช่วงที่ฟิล์มผสมมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างแบบฮิสเทติก ถ้านำแรงที่กระทำต่อชิ้นงานออกไปจะทำให้รูปทรงของฟิล์มผสมกลับคืนสู่สภาพเดิมได้ ซึ่งเป็นไปตามกฎของฮุก (Hook's Law) คำนวณได้จากสมการ

$$\text{Young's modulus} = \frac{\sigma \text{ ในช่วงที่ฟิล์มผสมอยู่ในช่วงฮิสเทติก}}{\epsilon \text{ ในช่วงที่ฟิล์มผสมอยู่ในช่วงฮิสเทติก}} \quad \dots(\text{สมการที่ 3})$$

โดยที่ σ คือ ความเค้นทางวิศวกรรม (Engineering stress)

ϵ คือ ความเครียดทางวิศวกรรม (Engineering strain)

L คือ ความยาวสุดท้ายของฟิล์มผสม

L_0 คือ ความยาวเริ่มต้นของฟิล์มผสม

3.4.5.2 การทดสอบสมบัติทางความร้อนของฟิล์มผสมด้วยเครื่อง Dynamic mechanical analyzer

การทดสอบสมบัติทางความร้อนของฟิล์มผสมไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกลีเซอรอล ก่อนและหลังการอบนึ่งไอน้ำ โดยการตัดฟิล์มผสมขนาด 0.5×3 ตารางเซนติเมตร และนำไปทดสอบ ที่ช่วงอุณหภูมิ 25 ถึง 250 องศาเซลเซียส ความถี่ 1 เฮิรตซ์ อัตราการให้ความร้อน 3 องศาเซลเซียสต่อนาที ในการวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนของฟิล์มผสมนั้น สามารถหาได้จากพิกของค่า Damping factor หรือค่า $\text{Tan}(\delta)$ ซึ่งบ่งบอกถึงอัตราส่วนของมอดุลัสสูญเสียต่อมอดุลัสสะสมจะเกิดในช่วงของการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้วพอลิเมอร์ ซึ่งพอลิเมอร์จะเปลี่ยนสภาพจากคล้ายแก้วเป็นคล้ายยาง เนื่องจากการเคลื่อนที่ของสายโซ่โมเลกุลในโครงสร้างพอลิเมอร์ ซึ่งที่จุดสูงสุดของกราฟ $\text{Tan}(\delta)$ จะสอดคล้องกับค่าอุณหภูมิเปลี่ยนสภาพแก้ว (Glass transition temperature, T_g) ของพอลิเมอร์

โดยหาได้จากสมการดังนี้

$$E^* = E' + E'' \quad \dots(\text{สมการที่ } 4)$$

$$\text{Tan} \delta = \frac{E''}{E'} \quad \dots(\text{สมการที่ } 5)$$

โดยที่ E^* = มอดุลัสเชิงซ้อน (Complex modulus)

E' = มอดุลัสสะสม (Storage modulus)

E'' = มอดุลัสสูญเสีย (Loss modulus)

3.4.5.3 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมี

การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของฟิล์มผสมด้วยเครื่อง Attenuated Total Reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) ของฟิล์มผสมไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกลีเซอรอล ก่อนและหลังการอบนึ่งด้วยไอน้ำ โดยอาศัยหลักการดูดกลืนคลื่นรังสีอินฟราเรดในช่วงกลาง (Middle infrared region) ที่ความละเอียด 4 ต่อเซนติเมตร ช่วงความยาวคลื่น 400 – 4,000 ต่อเซนติเมตร เพื่อตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันเคมีที่บ่งชี้ถึงคุณลักษณะเฉพาะโปรตีนไฟโบรอินไหม เจลาติน และกลีเซอรอล นอกจากนี้ นำข้อมูลในช่วง Amide I (ช่วงคลื่นประมาณ 1600 – 1700 ต่อเซนติเมตร) ซึ่งเป็นพีคหลักที่ใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน เนื่องจากเป็นพีคที่มีความเข้มสเปกตรัมสูง และมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงพันธะของสายพอลิเพปไทด์ไปเป็นโครงสร้างแบบทุติยภูมิ ซึ่งประกอบด้วยการสั่นแบบยืดของพันธะ C=O มากถึงร้อยละ 80 อย่างไรก็ตามพีคที่ปรากฏจะมีลักษณะกว้าง (Broaden peak) ซึ่งทำให้ไม่สามารถศึกษาโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนได้อย่างละเอียด ดังนั้นวิธี Fourier self-deconvolution (FSD) จึงได้รับการพัฒนาเพื่อช่วยวิเคราะห์สเปกตรัมของ FTIR โดยการนำสเปกตรัมที่ได้มาวิเคราะห์ในเชิงปริมาณด้วยเทคนิค Curve fitting ซึ่งจะได้พีคย่อยหลายพีค และนำเลขคลื่นของแต่ละพีคย่อยมาวิเคราะห์หาโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนและหมู่ไทโรซีน ดังแสดงข้อมูลในตารางที่ 7 จึงทำให้สามารถวิเคราะห์ทั้งองค์ประกอบและปริมาณของโครงสร้างโปรตีนได้

ตารางที่ 7 โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนและหมู่ไทโรซีน [80]

เลขคลื่น (cm ⁻¹)	โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนและหมู่ไทโรซีน
1,605 – 1,615	หมู่ไทโรซีน (Tyrosine)
1,616 – 1,621	แผ่นพลีทเบต้า (β -sheet)
1,638 – 1,653	เกลียวสุ่ม (Random coil)
1,656 – 1,622	เกลียวแอลฟา (Alpha helix)
1,663 – 1,696	เบต้าเทิร์น (β -turn)

3.4.5.4. ความคงตัวของฟิล์มผสมไฟโบรอินไหม เจลาติน และกลีเซอรอล

การวิเคราะห์ความสามารถในการคงตัวในน้ำของฟิล์มผสม SF/Gly และฟิล์มผสม SF/GA/Gly ก่อนและหลังการอบนึ่งด้วยไอน้ำ มีขั้นตอนดังนี้

1. ตัดฟิล์มผสมขนาด 1x1 ตารางเซนติเมตร และชั่งน้ำหนักแห้งของฟิล์มผสม (W_1) จากนั้นนำฟิล์มผสมไปแช่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS, ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.4) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

2. นำฟิล์มผสมภายหลังการแช่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ไปตากให้แห้งในตู้ดูดความชื้น อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นชั่งน้ำหนักแห้งของฟิล์มผสม (W_2)

จากนั้นประเมินความสามารถในการคงตัวในน้ำของฟิล์มผสม ได้จาก

- การวิเคราะห์ร้อยละน้ำหนักแห้งของฟิล์ม

การวิเคราะห์ร้อยละน้ำหนักแห้งของฟิล์มผสมของไฟโบรอินไหม เจลาติน และกลีเซอรอลก่อนและหลังการอบนึ่งด้วยไอน้ำ ภายหลังการแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ สามารถหาได้จากสมการ

$$\text{ร้อยละน้ำหนักแห้งของฟิล์ม} = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100\% \quad \dots(\text{สมการที่ 6})$$

- การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายออกมา

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายออกมาวิเคราะห์โดยใช้ชุดตรวจวัดโปรตีน Bio-Rad Bradford protein assay โดยนำสารละลายโปรตีนปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับสีย้อม Coomassie blue dye reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงสีน้ำเงินของสีย้อม Coomassie blue และคำนวณค่าปริมาณโปรตีนโดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน Bovine serum albumin (BSA) ซึ่งสีย้อมนี้จะทำพันธะด้วยแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic interaction) และแรงยึดเหนี่ยวระหว่างไอออนิกกับกรดอะมิโนที่เป็นเบส ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนอาร์จินีน (Arginine) ฮิสทีดีน (Histidine) และไลซีน (Lysine) และยังทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็น

วงอะโรมาติก เช่น ฟีนิลอลานีน (Phenylalanine) โพรลีน (Proline) ทริปโตแฟน (Tryptophan) และไทโรซีน (Tyrosine) [81]

3.4.6 การเตรียมสารละลายไวรัสใบต่างยาสูบ

การเตรียมสารละลายไวรัสใบยาสูบทั้งสองชนิด (ไวรัส TMV-wt และไวรัส TMV-RGD) มีขั้นตอนในการเตรียม (แสดงในรูปที่ 16) [82] ดังต่อไปนี้

1) ฉีดสารละลายไวรัสใบต่างยาสูบแต่ละชนิดที่ใบยาสูบแต่ละต้นเพื่อขยายพันธุ์ไวรัสใบต่างยาสูบ และควรปลูกต้นใบยาสูบทั้งสองชนิดให้ห่างกัน เพื่อป้องกันการติดเชื้อและปนเปื้อนของไวรัสอีกชนิดหนึ่ง เพาะเลี้ยงต้นใบต่างยาสูบเป็นระยะเวลา 2 เดือน (ความสูงของต้นประมาณ 20 เซนติเมตร) จากนั้นตัดใบต่างยาสูบที่มีลักษณะหยิกและมีรอยดำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

2) บดใบยาสูบที่แช่แข็งให้ละเอียด และผสมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรใบยาสูบ และเติม 2-mercaptoethanol ซึ่งเป็น reducing agent ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ถึง 0.3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อใช้ทำลายพันธะไดซัลไฟด์ในสารละลายใบต่างยาสูบ จากนั้น นำไปปั่นกวนด้วยความเร็วระดับต่ำเป็นระยะเวลา 2 นาที และปั่นกวนด้วยความเร็วสูงเป็นระยะเวลา 3 นาที

3) กรองสารละลายใบยาสูบด้วยผ้าขาวบาง นำสารละลายที่ได้ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที เพื่อแยกส่วนตะกอนและส่วนของเหลวเหนือตะกอน

4) ผสมส่วนของเหลวเหนือตะกอนกับตัวทำละลาย n-butanol และ chloroform ในอัตราส่วน 2:1:1 (สารละลายใบยาสูบต่อ n-butanol ต่อ chloroform) โดยปริมาตร

5) นำสารผสมที่ได้ไปปั่นกวนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

6) ผสมส่วนของเหลวเหนือตะกอนกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ และพอลิเอทิลีนไกลคอล (น้ำหนักโมเลกุล 8,000 ดาลตัน) (PEG-8000) ความเข้มข้นร้อยละ 8 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นปั่นกวนเป็นเวลา 30 นาที โดยใส่น้ำแข็งไว้รอบนอกภาชนะเพื่อควบคุมอุณหภูมิ และนำสารละลายผสมไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดย PEG-8000 จะจับตัวกับไวรัสและตกตะกอนลงมา

7) ผสมตะกอนไวรัสจากข้อ 6 กับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

8) ปั่นเหวี่ยงสารละลายผสมที่ได้จากข้อ 8 ที่ความเร็วรอบ 9,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัด PEG-8000 ส่วนเกินออก

9) เปิดส่วนของเหลวเหนือตะกอนใส่ในหลอดขนาดเล็ก (Ultracentrifuge tube) และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 42,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง เพื่อแยกตะกอนของไวรัส (Virus pellet)

10) นำตะกอนของไวรัสที่ได้จากข้อ 9 มาผสมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน

11) นำสารละลายไวรัสใบต่างยาสูบมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดเศษตะกอนส่วนที่ไม่ละลายน้ำ

12) เก็บสารละลายไวรัสใบต่างยาสูบที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส



3.4.7 การวิเคราะห์คุณลักษณะและความเข้มข้นของไวรัสใบต่างยาสูบ

3.4.7.1 สันฐานของไวรัสใบต่างยาสูบ

โครงสร้างสันฐานของไวรัสใบต่างยาสูบถูกวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM) โดยหยดสารละลายไวรัสใบต่างยาสูบบนแผ่น Grid แล้วย้อมสีด้วย Uranyl acetate 1% [83] และส่องอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่านที่กำลังขยาย 50,000 100,000 200,000 เท่า เพื่อดูรูปร่างและลักษณะของไวรัสใบต่างยาสูบ และนำภาพที่ได้มาวิเคราะห์รูปร่างและหาขนาดไวรัสโดยใช้โปรแกรม Image J วัดขนาดของไวรัสใบต่างยาสูบทั้งหมด 20 แห่ง และคำนวณหาขนาดไวรัสใบต่างยาสูบเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.4.7.2 การหาความเข้มข้นของสารละลายไวรัสใบต่างยาสูบ

การตรวจวัดปริมาณ RNA ของไวรัสใบต่างยาสูบ วิเคราะห์โดยใช้เครื่องดูดกลืนแสงระดับนาโน (Nanodrop) โดยนำสารละลายไวรัสปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ตามกฎของเบียร์และแลมเบิร์ต (Beer-Lambert law) จากนั้นแทนค่าในกฎของเบียร์และแลมเบิร์ต [37]

$$A = \epsilon bc \quad \dots\dots\dots(\text{สมการที่ 7})$$

โดย A = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย

ϵ = ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (Extinction coefficient; ϵ) ของไวรัสใบต่างยาสูบทั้งสองชนิด (TMV-wt และ TMV-RGD) ซึ่งเท่ากับ $3 \text{ (L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1})$ [84]

b = ระยะทางที่แสงผ่านตัวอย่าง (cm)

c = ความเข้มข้นของสารละลาย (M)

การตรวจหาความบริสุทธิ์ของสารละลายไวรัสใบต่างยาสูบ (RNA purification) สามารถทำได้จากสัดส่วนของค่าการดูดกลืนแสงของ RNA ที่ 260 นาโนเมตร ต่อค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ 280 นาโนเมตร ($\frac{A_{260}}{A_{280}}$) โดยค่าความบริสุทธิ์ของสารละลายไวรัสใบต่างยาสูบโดยทั่วไปมีค่าอยู่ในช่วง 1.2 – 1.3 โดยโครงสร้างของไวรัสใบยาสูบประกอบไปด้วย RNA ที่เป็นแกนกลาง และมีโปรตีนหุ้มล้อมรอบ ดังนั้นหากค่าสัดส่วนนี้มีค่าสูงหรือต่ำกว่าในช่วงดังกล่าว หมายถึงลักษณะของไวรัสไม่สมบูรณ์ เช่นกรณีค่าสัดส่วนสูง อาจหมายความว่าไวรัสแตกและมี RNA หลุดออกมา หรือในกรณี

ค่าสัดส่วนต่ำอาจหมายถึงโปรตีนที่หุ้มล้อมหลุดออกมาหรือมีการปนเปื้อนจากโปรตีนอื่น [37]

3.4.7.3 การจำแนกชนิดของไวรัส โดยเทคนิค Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF)

การจำแนกชนิดของไวรัสใบต่างยาสูบ TMV-wt และไวรัสใบต่างยาสูบ TMV-RGD สามารถวิเคราะห์ได้โดยเทคนิค MALDI-TOF ซึ่งเป็นการรวมตัวกันเป็นผลึก (Co-crystallization) ระหว่างสารละลายไวรัสใบต่างยาสูบประมาณ 1 – 2 ไมโครลิตร กับ สารเมตริกซ์ Sinapic acid 0.1% และ Tri-Fluro acetic acid (TFA) และเมื่อมีการกระตุ้นด้วยแสงเลเซอร์ความยาวคลื่นช่วงยูวีซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่เมตริกซ์สามารถดูดกลืนแสงได้ดี จะทำให้สารแตกตัวเป็นไอออนในวัฏภาคแก๊ส ไอออนจะถูกเร่งความเร็ว (Accelerated) และถูกส่งเข้าไปในท่อสุญญากาศ (Vacuum flight tube) ซึ่งในท่อนี้ไอออนจะถูกแยก (Seperated) ตามความเร็วในการเคลื่อนที่ของไอออนโดยความเร็วของการเคลื่อนที่ขึ้นกับอัตราส่วนของมวลต่อประจุ (Mass/Charge ratio: m/z) โดยที่ m คือ มวลของสารที่กลายเป็นไอออนบวกในหน่วยดาลตัน และ z คือค่าประจุบวกของไอออนนั้นซึ่งเกิดจากการสูญเสียอิเล็กตรอนและรับโปรตอน (H^+) เข้ามาในโมเลกุลเรียกว่ากระบวนการ Protonation ดังนั้น m/z จึงบ่งบอกมวลของสารได้ ในกรณีที่ z มีค่าเท่ากัน ไอออนที่มีค่า m/z สูงคือมีมวลมากจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าไอออนที่มีค่า m/z ต่ำกว่า ส่วนในกรณีที่มวลเท่ากันแต่ z ไม่เท่ากันก็จะทำให้ค่า m/z แตกต่างไป โดยไอออนที่มีค่า z มากกว่าทำให้ค่า m/z ต่ำจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าไอออนที่มี z น้อยกว่า วิธีการนี้จะใช้จำแนกโปรตีนซึ่งก็คือสายเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโนเรียงตัวกัน โปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโนต่างกันก็จะมีน้ำหนักของสายเพปไทด์ (Peptide mass) ที่ต่างกันด้วย ซึ่งก็จะถูกตรวจวัดด้วย detector ผลการตรวจวัดจะแสดงค่าออกมาในรูปแบบ Mass spectrum ที่สามารถจำแนกน้ำหนักของโปรตีนและจะถูกนำไปใช้จำแนกชนิดไวรัสได้ [85]

3.4.8 การตัดแปรพื้นผิวของฟิล์มผสมด้วยไวรัสใบต่างยาสูบ TMV-wt และ TMV-RGD โดยวิธีการเคลือบและการเชื่อมขวางด้วย EDC/NHS และการประเมินประสิทธิภาพของการตัดแปรทั้งสองวิธี

3.4.8.1 โดยวิธีการเคลือบ

การตัดแปรพื้นผิวของฟิล์มผสมด้วยไวรัสใบต่างยาสูบโดยวิธีการเคลือบทำได้ โดย กรองสารละลายไวรัสใบต่างยาสูบด้วยหัวกรองขนาด 0.22 ไมครอน เพื่อให้ สารละลายไวรัสใบต่างยาสูบมีความบริสุทธิ์ จากนั้นหยดสารละลายไวรัสใบต่างยาสูบ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อพื้นที่ 0.32 ตาราง เซนติเมตรของฟิล์มผสม SF/GA/Gly และตากให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อ อุณหภูมิ 25 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นประเมินประสิทธิภาพของการตัดแปรพื้นผิวฟิล์ม ผสมด้วยไวรัสใบต่างยาสูบโดยวิธีการเคลือบได้จาก

1. แช่ฟิล์มผสมที่ถูกตัดแปรพื้นผิวด้วยไวรัสใบต่างยาสูบในน้ำปราศจากประจุ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง
2. นำน้ำปราศจากประจุที่แช่ฟิล์มผสมไปทดสอบหาปริมาณไวรัสใบต่างยาสูบ ที่หลุดออกมาจากฟิล์มผสม โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของ RNA ที่ 260 นาโนเมตร เพื่อหาความเข้มข้นของไวรัสต่างยาสูบที่ละลายในน้ำ (C_a) [85]

จากนั้นคำนวณหาร้อยละของไวรัสที่คงเหลืออยู่บนฟิล์มผสม

$$\text{ร้อยละของไวรัสที่คงเหลือบนฟิล์มผสม} = \frac{C_i - C_a}{C_i} \times 100\% \quad \text{..(สมการที่ 8)}$$

โดยที่ C_i = ความเข้มข้นของสารละลายไวรัสก่อนการตัดแปรบนพื้นผิวฟิล์มผสม (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

C_a = ความเข้มข้นของไวรัสในน้ำปราศจากประจุภายหลังการแช่ฟิล์มผสม (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

3.4.8.2 โดยการเชื่อมขวางด้วย EDC/NHS

1. แชนฟิล์มผสมในสารเชื่อมขวางที่ประกอบด้วย 1-ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ร่วมกับ N-hydroxysuccinimide (NHS) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และเติมสารละลายไวรัสใบต่างยาสูบความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้นร้อยละ 10 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการเชื่อมขวางระหว่างไวรัสใบต่างยาสูบและฟิล์มผสมภายหลังการเชื่อมขวาง เก็บสารละลาย EDC/NHS ที่ใช้ในการเชื่อมขวางไวรัสใบต่างยาสูบกับฟิล์มผสม (C_1) [86]

2. เมื่อครบกำหนดเวลาที่ใช้ในการเชื่อมขวาง ล้างฟิล์มผสมที่ถูกตัดแปรพื้นผิวด้วยไวรัสใบยาสูบโดยการเชื่อมขวางด้วย EDC/NHS ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ 3 ครั้ง ครั้งละ 20 นาที เพื่อกำจัด EDC ส่วนเกินออก เก็บสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ทั้งสามรอบ จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงของ RNA ที่ 260 นาโนเมตร เพื่อหาความเข้มข้นของไวรัสใบต่างยาสูบในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ทั้งสามรอบ (C_2, C_3, C_4)

จากนั้นคำนวณหาร้อยละความสำเร็จในการเชื่อมขวางของฟิล์มผสมที่ถูกตัดแปรพื้นผิวด้วยไวรัสใบต่างยาสูบโดย EDC/NHS ได้จาก

$$\text{ร้อยละของไวรัสที่ถูกเชื่อมขวางบนฟิล์มผสม} = \frac{C_i - (C_1 + C_2 + C_3 + C_4)}{C_i} \times 100\% \quad .(\text{สมการที่ 9})$$

C_i = ความเข้มข้นของสารละลายไวรัสก่อนการเชื่อมขวาง (mg/ml)

C_1 = ความเข้มข้นของไวรัสในสารละลาย EDC/NHS ที่ใช้ในการเชื่อมขวาง (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

C_2, C_3, C_4 = ความเข้มข้นของไวรัสในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการล้างฟิล์มผสมรอบที่ 1, 2, 3 ตามลำดับ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

จากนั้นประเมินประสิทธิภาพของการตัดแปรพื้นผิวฟิล์มผสมด้วยไวรัสใบต่างยาสูบโดยวิธีการเชื่อมขวางได้เช่นเดียวกับวิธีการเคลือบ (สมการที่ 8) และเพื่อยืนยันประสิทธิภาพของการตัดแปรพื้นผิวฟิล์มผสมด้วยไวรัสใบต่างยาสูบโดยวิธีการเชื่อมขวางด้วย EDC/NHS ในเชิงคุณภาพ จึงวิเคราะห์โครงสร้างสัณฐานของพื้นผิวฟิล์มผสมภายหลังการแช่น้ำปราศจากประจุด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (Atomic force microscopy; AFM) โหมดกึ่งสัมผัส (Tapping mode) คลื่นความถี่ที่ใช้คือ

300 กิโลเฮิร์ตซ์ ให้แรงคงที่ 40 นิวตันต่อเมตร และอัตราการเปลี่ยนค่าความต่างศักย์ในการวิเคราะห์ คือ 0.75 เฮิร์ตซ์ ในการวิเคราะห์พื้นผิว ซึ่ง AFM เป็นเทคนิควิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวของฟิล์มบางระดับนาโน โดยใช้หลักการส่งผ่านแสงเลเซอร์ลงปลายแหลม (Tip) บนคานยี่น (Cantilever) ที่สามารถเคลื่อนที่ขึ้นลงได้ตามลักษณะของพื้นผิววัสดุ ด้วยแรงปฏิกิริยาที่กระทำในแนวตั้งฉากระหว่างอะตอมบนพื้นผิววัสดุและอะตอมบนปลายแหลมของคานยี่น แล้วตรวจวัดออกมาในรูปแบบของพลังงานและแปลงเป็นภาพสามมิติ ข้อมูลค่าเฉลี่ยผลรวมกำลังสอง (Root mean square, RMS) แสดงถึงความขรุขระของพื้นผิวได้จากซอฟต์แวร์ Argyle Light และ Gwyddion การวิเคราะห์ค่า RMS ของพื้นผิวจะตรวจวัดจากพื้นที่ 5 ตำแหน่งของตัวอย่าง (พื้นที่แสกน 10×10 ไมโครเมตร สเกลความสูงของภาพสามมิติสูงสุดที่ 30 นาโนเมตร) และรายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=5$)



3.4.9 การวิเคราะห์สมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพของฟิล์มผสม

3.4.9.1. การเตรียมเซลล์ไฟโบรบลาสต์ผิวหนังหนู (L929 mouse fibroblast)

การเตรียมเซลล์ไฟโบรบลาสต์ผิวหนังหนู (L929) ทำได้โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ L929 ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ซึ่งจะประกอบไปด้วย DMEM ที่มีเซรัม (Fetal Bovine serum; FBS) ร้อยละ 10 โดยปริมาตร แอลกลูตามีน (L-Glutamine) ร้อยละ 1 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายในสภาวะแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 โดยปริมาตร จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 3 วัน เมื่อจำนวนเซลล์ L929 มีการเจริญเติบโตร้อยละ 80 ของพื้นที่ภาชนะ ให้แบ่งเซลล์ (Subculture) ด้วยการ Trypsinization เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากพื้นผิวของภาชนะ โดยใช้สารละลายทริปซิน (Trypsin) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะบรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5% เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นหยุดการทำงานของเอนไซม์ทริปซินด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์และแบ่งสารละลายเซลล์ที่ได้เติมลงภาชนะเพาะเลี้ยงใหม่ แล้วเพาะเลี้ยงเซลล์จนได้ปริมาณที่เพียงพอสำหรับการทดสอบการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ในขั้นต่อไป

3.4.9.2. การยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการ

1. ขึ้นรูปฟิล์มผสมในถาดเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีนขนาด 96 หลุม (พื้นที่ผิวต่อหลุมเท่ากับ 0.32 ตารางเซนติเมตร) และทำให้ปราศจากเชื้อ (Sterilization) ด้วยวิธีอบแก๊สเอทิลีนออกไซด์ (Ethylene oxide; EO) โดยกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ จะแบ่งเป็น 5 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 : ฟิล์มผสมไฟโบรอินใหม่เจลาตินและกลีเซอรอลที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ

กลุ่มที่ 2 : ฟิล์มผสมไฟโบรอินใหม่เจลาตินและกลีเซอรอลที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ ที่ตัดแปรพื้นผิวฟิล์มผสมด้วยไวรัสใบต่างยาสูบ TMV-wt โดยวิธีการเคลือบ

กลุ่มที่ 3 : ฟิล์มผสมไฟโบรอินใหม่เจลาตินและกลีเซอรอลที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ ที่ตัดแปรพื้นผิวฟิล์มผสมด้วยไวรัสใบต่างยาสูบ TMV-RGD โดยวิธีการเคลือบ

กลุ่มที่ 4 : ฟิล์มผสมไฟโบรอินใหม่เจลาตินและกลีเซอรอลที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ ที่ตัดแปรพื้นผิวฟิล์มผสมด้วยไวรัสใบต่างยาสูบ TMV-wt โดยวิธีการเชื่อมขวางด้วย EDC/NHS

กลุ่มที่ 5 : फिल्मผสมไฟโบรอินไหมเจลาคตินและกลีเซอรอลที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ ที่ตัดแปรพื้นผิวฟิล์มผสมด้วยไวรัสไบตางยาสูบ TMV-RGD โดยวิธีการเชื่อมขวาง ด้วย EDC/NHS

2.เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปฟิล์มผสมหุลุมละ 150 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำ สารละลายเซลล์ L929 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพาะเลี้ยงลงไปบนฟิล์มผสม ที่ความหนาแน่นเท่ากับ 1×10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 โดยปริมาตร โดยทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน

3.ภายหลังกการเพาะเลี้ยงเซลล์ตามระยะเวลา (6 ชั่วโมง 1 3 5 7 วัน) ดูด สารละลายเซลล์ออกให้หมด จากนั้นเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) ลงไป เพื่อกำจัดเซลล์ที่ไม่ได้เกาะบนพื้นผิวฟิล์มออก

4.นำฟิล์มที่ได้ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และนำมาละลายที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนครบ 3 รอบ แล้วเติมสารละลาย SDS และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะบรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ทั้งหมดแตก จากนั้นทำให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

5.ดูดสารละลายด้านบน (Supernatant) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติมลงในจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสี่ตาขนาด 96 หลุม แล้วเติมสารละลาย Hoechst 33258 0.1 มิลลิลิตร ในที่มีดและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Fluorescence microplate reader ที่ช่วงความยาวคลื่น 355/460 นาโนเมตร [18] ซึ่งการวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ด้วยการวัดปริมาณดีเอ็นเอของเซลล์เป็นการวัดสารเรืองแสงของดีเอ็นเอที่เกิดจากการย้อมสีด้วย Hoechst 33258 และเทียบกับกราฟมาตรฐานของเซลล์ L929 โดยงานวิจัยนี้ได้ศึกษาความสามารถในการยึดเกาะของเซลล์ L929 บนฟิล์มผสม หลังจากระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 6 ชั่วโมง และการเจริญเติบโตของเซลล์ L929 บนฟิล์มผสมหลังระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 1 3 5 และ 7 วัน ซึ่งร้อยละการยึดเกาะของเซลล์ (Percentage of cell attachment) สามารถคำนวณได้จาก

$$\text{ร้อยละการยึดเกาะ} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะในฟิล์มผสมหลังการเพาะเลี้ยง}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่เพาะเลี้ยงบนฟิล์มผสม}} \times 100\% \quad (\text{สมการที่ 10})$$

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (Specific growth rate, μ) และระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 2 เท่า หรือเวลาการแบ่งตัวทีคูณ (Population doubling time) บนฟิล์มผสมคำนวณได้จาก

ก) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (Specific growth rate)

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dx}{dt} \quad \dots(\text{สมการที่ } 11)$$

$$\mu \int_{t_1}^{t_2} dt = \int_{X_1}^{X_2} \frac{1}{x} dx \quad \dots(\text{สมการที่ } 12)$$

$$\mu(t_2 - t_1) = \ln X_2 - \ln X_1 \quad \dots(\text{สมการที่ } 13)$$

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{(t_2 - t_1)} \quad \dots(\text{สมการที่ } 14)$$

โดย X_1 คือ จำนวนเซลล์ที่เวลา t_1

X_2 คือ จำนวนเซลล์ที่เวลา t_2

ข) เวลาการแบ่งตัวทีคูณ (Population doubling time, PDT)

$$\text{PDT} = \frac{\ln 2}{\mu} \quad \dots(\text{สมการที่ } 15)$$

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทำโดยนำข้อมูลเชิงปริมาณที่ได้จากการทดลองมาหาค่าเฉลี่ยและส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐาน จากนั้นวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p\text{-value} < 0.05$)

3.6 สถานที่ทำงานวิจัย

- หน่วยปฏิบัติการวิจัยวิศวกรรมชีววัสดุเพื่อการแพทย์และสุขภาพ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ห้องปฏิบัติการวิจัยวิศวกรรมพอลิเมอร์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ห้องปฏิบัติการคณะเภสัชศาสตร์ ภาควิชาวิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



บทที่ 4

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ขึ้นรูป และศึกษาสมบัติทางกายภาพ และเคมีของฟิล์มผสมไฟโบรอินไหมไทยและกลีเซอรอล (SF/Gly) และฟิล์มผสมไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกลีเซอรอล (SF/GA/Gly) ที่เติมกลีเซอรอลร้อยละ 5 ถึง 30 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร รวมทั้งเปรียบเทียบผลของการอบนึ่งด้วยไอน้ำ (Water vapor annealing; WVA) ต่อสมบัติของฟิล์มผสมทั้งสองชนิด จากนั้น คัดเลือกฟิล์มผสมสูตรที่เหมาะสม ไปตัดแปรรูปพื้นผิวด้วยไวรัสไบต่างยาสูบที่ดัดแปลงพันธุกรรมให้มีลำดับกรดอะมิโนอาร์จินีน ไกลซิลแอสปาทิก (arginine-glycine-aspartic acid; RGD) บนพื้นผิวไวรัส โดยวิธีการการเชื่อมขวางด้วย EDC/NHS และศึกษาสมบัติทางชีวภาพของฟิล์มผสมดังกล่าว ผลการศึกษาแสดงรายละเอียดดังหัวข้อต่อไปนี้

4.1 สมบัติของฟิล์มผสมไฟโบรอินไหมไทยและกลีเซอรอล (SF/Gly) และฟิล์มผสมไฟโบรอินไหมไทย เจลาติน และกลีเซอรอล (SF/GA/Gly) ที่ไม่ผ่านและผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ

4.1.1 ค่าศักย์ซีตาของสารละลาย

ผลการศึกษาค่าศักย์ซีตาของสารละลาย แสดงถึงค่าประจุไฟฟ้าบริเวณระนาบเฉือน (Shear Plane) ของอนุภาคที่แขวนลอยอยู่ในชั้นของสารละลาย การเปลี่ยนแปลงค่าศักย์ซีตาหรือค่าประจุทางไฟฟ้าของสารละลายจะขึ้นกับสมดุลของประจุบวกและประจุลบ (Charge balance) ที่อยู่ในสารละลาย โดยสามารถปรับค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของสารละลายให้มีสภาพเป็นกรดด้วยกรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid; HCl) โดยโมเลกุลของกรดไฮโดรคลอริกจะสามารถแตกตัวให้โปรตอน (Proton; H^+) ที่แสดงประจุบวก ทำให้ค่าศักย์ซีตาที่ได้เมื่อค่าความเป็นกรดต่างต่ำลงมีค่าประจุของสารละลายเป็นบวก นอกจากนี้เมื่อปรับค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายให้มีสภาพเป็นด่างเพิ่มขึ้นด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide; NaOH) อิทธิพลของประจุลบจากหมู่ไฮดรอกซิล (OH^-) ในโมเลกุลของโซเดียมไฮดรอกไซด์จะทำให้ค่าศักย์ซีตาของสารละลายที่ได้มีค่าเป็นลบ

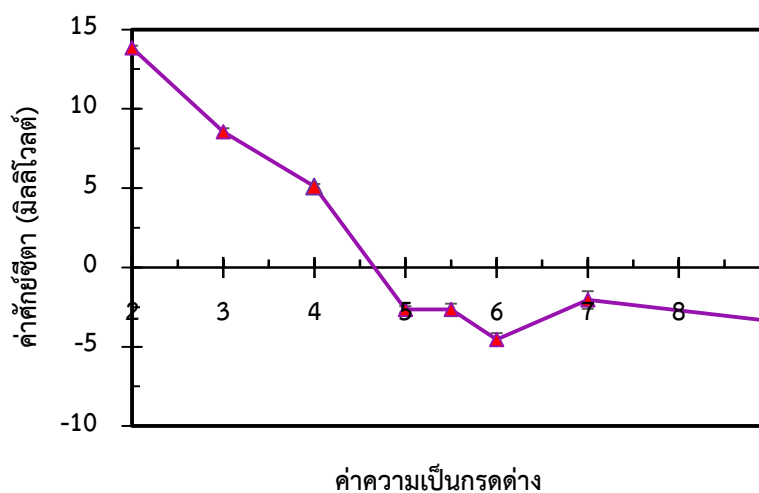
จากผลการศึกษาค่าศักย์ซีตาของสารละลายแต่ละชนิดดังแสดงในตารางที่ 8 พบว่าสารละลายไฟโบรอินไหมไทย (SF100) สารละลายเจลาตินชนิดเอ (GA) และสารละลายกลีเซอรอล (Gly) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดต่างที่ 5.5 มีค่าศักย์ซีตาเท่ากับ -7.61 ± 0.31 , 5.34 ± 0.51 และ -4.49 ± 1.46 มิลลิโวลต์ ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของโมเลกุล พบว่าโครงสร้างกลีเซอรอล 1 โมเลกุล มีหมู่ไฮดรอกซิล ($-OH$) 3 หมู่ จึงทำให้ค่าศักย์ซีตาแสดงประจุลบ ในขณะที่ค่า

ศักย์ซีตาของสารละลายเจลาตินชนิดแอสแตงค่าเป็นบวก เนื่องจากอิทธิพลของประจุบวกจากสายโซ่รอบข้างของกรดอะมิโนอาร์จินีน (Arginine) กรดอะมิโนไลซีน (Lysine) และกรดอะมิโนฮิสทีดีน (Histidine) ที่เป็นองค์ประกอบในสายโซ่โมเลกุลของเจลาติน [45, 47] และค่าไอโซอิเล็กทริกของเจลาตินชนิดแอสแตงค่าเท่ากับ 9 [49] ซึ่งสูงกว่าค่าความเป็นกรดต่างของสารละลาย (pH = 5.5) จึงส่งผลให้ค่าศักย์ซีตาของสารละลายเจลาตินชนิดแอสแตงค่าเป็นบวก ในขณะที่ค่าไอโซอิเล็กทริกของไฟโบรอินไหมมีค่าเท่ากับ 4.53 [87] ซึ่งมีค่าต่ำกว่า pH ของสารละลาย (pH = 5.5) จึงส่งผลให้ค่าศักย์ซีตาของสารละลายไฟโบรอินไหมมีค่าเป็นลบ

ผลการวิเคราะห์ค่าศักย์ซีตาของสารละลายผสมระหว่างไฟโบรอินไหมและเจลาติน (80/20) ที่เติมกลีเซอรอลร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก (SF/GA/Gly) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ตั้งแต่ 2.0 ถึง 9.0 ดังแสดงในรูปที่ 17 พบว่า ศักย์ซีตาของสารละลายผสมที่ค่าเป็นบวกในช่วงความเป็นกรดต่างต่ำ และมีค่าเป็นลบในช่วงความเป็นกรดต่างสูง โดยที่ความเป็นกรดต่างที่ 4 และ 5 สารละลายผสมมีค่าศักย์ซีตา 5.10 และ -2.64 มิลลิโวลต์ ตามลำดับ ทำให้สามารถประมาณค่าไอโซอิเล็กทริกของสารละลายผสม SF/GA/Gly ได้ที่ 4.6 และเมื่อพิจารณาที่ค่าความเป็นกรดต่าง 5.5 ซึ่งใช้ในการเตรียมฟิล์มผสม SF/GA/Gly พบว่าค่าศักย์ซีตาของสารละลายผสมมีค่า -2.65 ± 0.36 มิลลิโวลต์ ซึ่งมีผลมาจากค่าศักย์ซีตาของสารละลายแต่ละชนิดที่ได้ระบุในตารางที่ 8 โดยเมื่อเปรียบเทียบกับ ผลงานวิจัยของ Jetbumpenkul P. และคณะ ซึ่งได้ศึกษาค่าศักย์ซีตาของสารละลายผสมไฟโบรอินไหมและเจลาตินที่สัดส่วนต่าง ๆ (0:100, 20:80, 40:60, 50:50, 60:40, 80:20, 100:0) ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 5.6 พบว่าสารละลายผสมที่มีสัดส่วนของเจลาตินเป็นองค์ประกอบสูงจะแสดงประจุบวก เนื่องจากค่าไอโซอิเล็กทริกของเจลาตินมีค่ามากกว่าค่าความเป็นกรดต่างของสารละลาย ในขณะที่สารละลายที่มีองค์ประกอบของไฟโบรอินไหมมาก ค่าศักย์ซีตาจะแสดงประจุลบ โดยค่าศักย์ซีตาของสารละลายผสมไฟโบรอินไหมและเจลาตินที่มีสัดส่วนของการผสม 80/20 มีค่า -2.54 ± 0.14 มิลลิโวลต์ [88]

ตารางที่ 8 ค่าศักย์ซีตาของสารละลายไฟโบรอินไหม สารละลายเจลาติน สารละลายกลีเซอรอล และสารละลายผสมไฟโบรอินเจลาตินและกลีเซอรอล ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ในน้ำปราศจากประจุ (pH 5.5) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ตัวอย่าง	ค่าศักย์ซีตา (มิลลิโวลต์)
สารละลายไฟโบรอินไหม (SF100)	- 7.61 ± 0.31
สารละลายเจลาตินชนิด A (GA100)	5.34 ± 0.51
สารละลายกลีเซอรอล (Gly)	- 4.49 ± 1.46



รูปที่ 17 ค่าศักย์ซีตาของสารละลายผสมไฟโบรอินไหม เจลาตินและกลีเซอรอล ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในช่วงค่าความเป็นกรดต่าง 2-9

4.1.2 สมบัติของฟิล์มผสม SF/Gly และฟิล์มผสม SF/GA/Gly

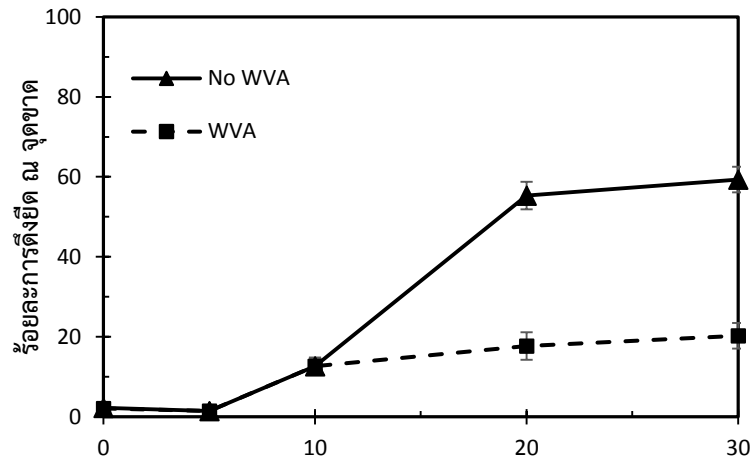
4.1.2.1 ผลการทดสอบความแข็งแรงของฟิล์มผสมในการทนแรงดึง

ผลการทดสอบแรงดึงของฟิล์มผสม SF/Gly ที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ แสดงในรูปที่ 18(ก) พบว่าร้อยละการดึงยืด ณ จุดขาด (Elongation at break) ของฟิล์มผสม SF/Gly ที่มีปริมาณกลีเซอรอลร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก ไม่แตกต่างจากฟิล์มที่ปราศจากกลีเซอรอล และเมื่อเพิ่มปริมาณกลีเซอรอลจากร้อยละ 5 เป็น 10, 20 และ 30 โดยน้ำหนัก พบว่าร้อยละการดึงยืด ณ จุดขาด เพิ่มขึ้นตามปริมาณกลีเซอรอลที่มากขึ้นตามลำดับ จากร้อยละ 2.14 เป็น 55.34 และเมื่อพิจารณาค่ามอดูลัสของยัง (Young's modulus) ที่แสดงในรูปที่ 18(ข) ของฟิล์มผสม SF/Gly พบว่า ฟิล์มผสม SF/Gly ที่มีปริมาณกลีเซอรอลร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก มีค่ามอดูลัสของยังไม่แตกต่างจากฟิล์มที่ปราศจากกลีเซอรอล และเมื่อเพิ่มปริมาณกลีเซอรอลจากร้อยละ 5 เป็นร้อยละ 30 โดยน้ำหนัก พบว่าค่าดังกล่าวลดลงตามลำดับ จาก 23.55 เป็น 2.49 เมกะปาสคาล

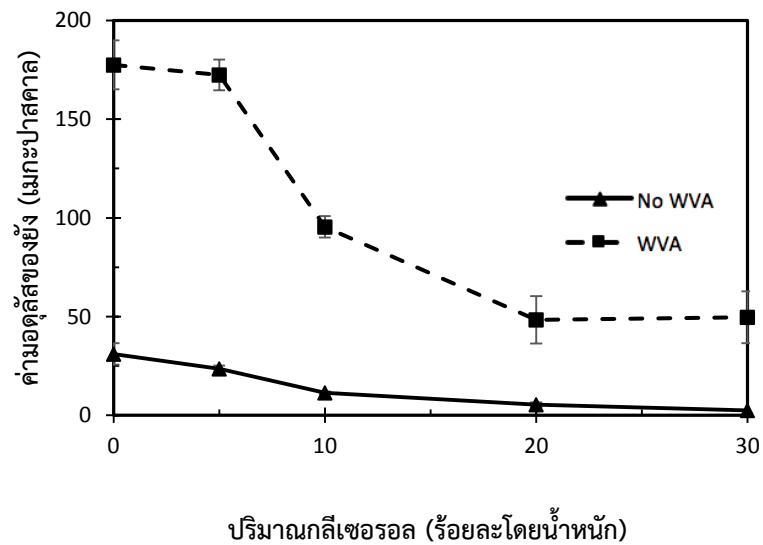
เมื่อพิจารณาการอบนึ่งด้วยไอน้ำของฟิล์มผสม SF/Gly พบว่าร้อยละการดึงยืด ณ จุดขาดของฟิล์มที่ปราศจากกลีเซอรอล มีค่าไม่แตกต่างจากฟิล์มผสมที่มีปริมาณกลีเซอรอลจากร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก และเมื่อเพิ่มปริมาณกลีเซอรอลจากร้อยละ 5 เป็น 30 โดยน้ำหนัก พบว่าค่าการดึงยืด ณ จุดขาดมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจากร้อยละ 1.46 เป็น 23.26 และค่ามอดูลัสของยังของฟิล์มที่ปราศจากกลีเซอรอลและที่มีปริมาณกลีเซอรอลเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 5 เป็น 30 โดยน้ำหนัก มีค่าลดลงจาก 177.49 เป็น 49.69 เมกะปาสคาล ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาผลของการอบนึ่งด้วยไอน้ำต่อฟิล์มผสม SF/Gly พบว่าร้อยละการดึงยืด ณ จุดขาดของฟิล์มที่ปราศจากกลีเซอรอล และมีปริมาณกลีเซอรอลร้อยละ 5 และ 10 โดยน้ำหนักที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ มีค่าไม่แตกต่างจากฟิล์มผสมที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ และเมื่อเพิ่มปริมาณกลีเซอรอลเป็นร้อยละ 20 และ 30 โดยน้ำหนัก พบว่าค่าดังกล่าวต่ำกว่าฟิล์มผสมที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำอย่างชัดเจน และค่ามอดูลัสของยังของฟิล์มผสมที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำมีค่าสูงกว่าฟิล์มผสมที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำอย่างเด่นชัด

ก



ข

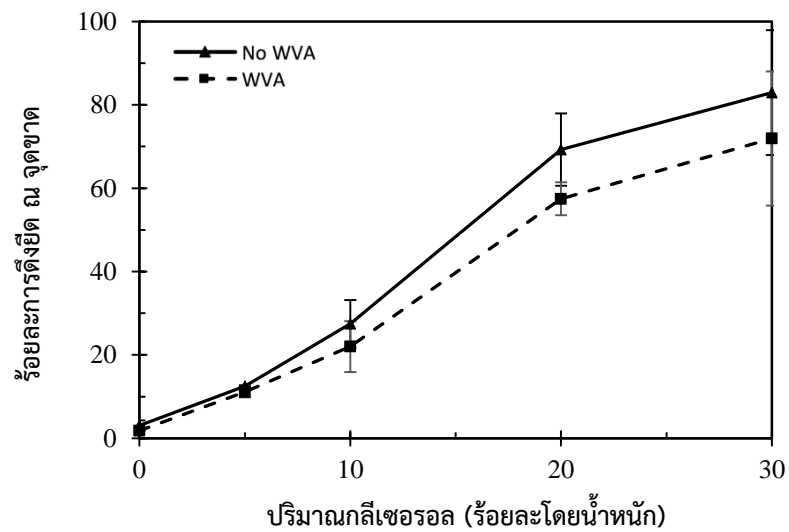


รูปที่ 18 (ก) ค่าการดึงยึด ผน จุดขาด (ข) ค่ามอดูลัสของยัง ของฟิล์มผสม SF/Gly ที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ (No WVA) และผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ (WVA)

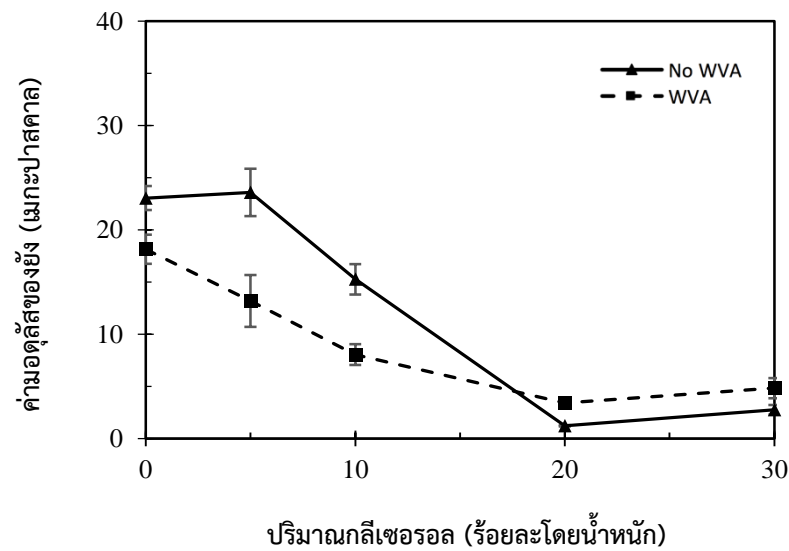
รูปที่ 19(ก) แสดงร้อยละการดึงยืด ณ จุดขาดของฟิล์มผสม SF/GA/Gly พบว่าค่าดังกล่าวของฟิล์ม SF/GA/Gly ที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ (No WVA) มีค่าสูงกว่าฟิล์มผสมที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ (WVA) เล็กน้อย เช่น เมื่อพิจารณาฟิล์มผสมที่มีปริมาณกลีเซอรอลร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก พบว่าฟิล์มผสมที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำมีค่าการดึงยืด ณ จุดขาดร้อยละ 70 โดยประมาณ ในขณะที่ฟิล์มผสมที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำมีค่าร้อยละ 60 โดยประมาณ

ค่ามอดูลัสของยัง (Young's modulus) ของฟิล์มผสม SF/GA/Gly เมื่อปริมาณกลีเซอรอลเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0 เป็น 20 โดยน้ำหนัก แสดงในรูป 19(ข) พบว่าค่ามอดูลัสของฟิล์มที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำและผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำมีค่าลดลงจาก 23.04 เป็น 1.22 เมกะปาสคาล และ จาก 18.13 เป็น 3.40 เมกะปาสคาล ตามลำดับ แต่ค่ามอดูลัสของยังของฟิล์มผสมทั้งสองชนิดมีค่าไม่แตกต่างกันเมื่อปริมาณของกลีเซอรอลเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 20 เป็นร้อยละ 30 โดยน้ำหนัก

ก



ข



รูปที่ 19 (ก) ค่าการดัดงอ ๓ จุดขาด (ข) ค่ามอดูลัสของยัง ของฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ไม่ผ่าน (No WVA) และผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ (WVA)

เมื่อพิจารณาผลของเจลาตินต่อสมบัติการดึงยึดของฟิล์มโปรตีนผสมกลีเซอรอล พบว่าเจลาติน (ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก) มีผลชัดเจนต่อฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ เมื่อเทียบกับฟิล์มผสม SF/Gly ในขณะที่ฟิล์มผสม SF/Gly และ SF/GA/Gly ที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำมีค่าดังกล่าวใกล้เคียงกัน โดยค่ามอดูลัสของยังของฟิล์มผสม SF/Gly ที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ อยู่ในช่วง 50-180 เมกะปาสคาล ซึ่งสูงกว่าฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่มีค่าอยู่ในช่วง 3-25 เมกะปาสคาล เช่นเดียวกับในกรณีของฟิล์มผสมที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ โดยพบว่าฟิล์มผสม SF/Gly มีค่ามอดูลัสของยังอยู่ในช่วง 3-30 เมกะปาสคาล ขณะที่ค่าของฟิล์มผสม SF/GA/Gly มีค่าระหว่าง 5 - 18 เมกะปาสคาล จากผลการทดลองดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าฟิล์มผสมที่มีเจลาติน (SF/GA/Gly) มีความยืดหยุ่นมากกว่าฟิล์มผสมที่ไม่มีเจลาติน ผลการทดลองนี้ (SF/Gly) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Biman B. และคณะ [65] ที่ศึกษาการทดสอบแรงดึงของฟิล์มผสมไฟโบรอินไหมและเจลาตินแบบเคลือบหลายชั้นสำหรับควบคุมการปลดปล่อยยา พบว่า เมื่อปริมาณเจลาตินเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0 ถึงร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก ค่ามอดูลัสของยังมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง แสดงให้เห็นว่าเจลาตินมีผลต่อความยืดหยุ่นของฟิล์ม

เมื่อพิจารณาผลของการเติมกลีเซอรอลที่มีต่อฟิล์มผสม SF/Gly และฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ไม่ผ่าน และผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ พบว่าการเติมกลีเซอรอลในฟิล์มทั้งสองประเภท จะทำให้ร้อยละการดึงยึดเพิ่มสูงขึ้น และค่ามอดูลัสของยังลดลง แสดงให้เห็นว่า การเติมกลีเซอรอลช่วยเพิ่มความยืดหยุ่นของฟิล์ม เนื่องมาจากกลีเซอรอลทำหน้าที่เป็นพลาสติกไซเซอร์ โดยการลดแรงระหว่างโมเลกุลของพอลิเมอร์ จึงทำให้สายโซ่โมเลกุลโปรตีนเคลื่อนตัวมากขึ้น [8] ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shenzhou Lu และคณะ [77] ที่รายงานผลของการเติมกลีเซอรอลที่ปริมาณต่าง ๆ ในฟิล์มไฟโบรอินไหม พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณกลีเซอรอลร้อยละ 5 ถึง 50 โดยน้ำหนัก ฟิล์มไฟโบรอินมีความยืดหยุ่นเพิ่มขึ้นตามลำดับ

เมื่อพิจารณาผลของปริมาณกลีเซอรอลที่เติมในฟิล์มผสม SF/Gly และ SF/GA/Gly พบว่าการเติมกลีเซอรอลร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก ไม่ได้ส่งผลต่อความยืดหยุ่นของฟิล์มผสม SF/Gly แต่ส่งผลต่อฟิล์มผสม SF/GA/Gly เล็กน้อย และเมื่อเพิ่มปริมาณกลีเซอรอลจากร้อยละ 5 เป็น 10 และ 20 โดยน้ำหนัก พบว่าฟิล์มผสมทั้งสองชนิดมีความยืดหยุ่นเพิ่มขึ้นตามลำดับ และเมื่อเพิ่มปริมาณกลีเซอรอลจากร้อยละ 20 เป็น 30 โดยน้ำหนัก พบว่าฟิล์มผสม SF/Gly ที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ ยังคงมีความยืดหยุ่นเพิ่มขึ้น ในขณะที่ฟิล์มผสม SF/Gly ที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ และ ฟิล์มผสม

SF/GA/Gly ที่ไม่ผ่านและผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ ค่าการดึงยึด ณ จุดขาด และค่ามอดุลัสของยังไม่แตกต่างกัน ซึ่งอาจแสดงถึงปริมาณกลีเซอรอลสูงสุดที่มีผลต่อสมบัติทางกลของฟิล์ม กล่าวคือปริมาณกลีเซอรอลร้อยละ 20 โดยน้ำหนักในฟิล์มผสมอาจเพียงพอต่อการแทรกตัวระหว่างสายโซ่โมเลกุลของโปรตีนในฟิล์มผสมแล้ว

เมื่อพิจารณาผลของการอบนึ่งด้วยไอน้ำต่อผลการทดสอบแรงดึงของฟิล์มผสมพบว่า ฟิล์มผสม SF/Gly ที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ มีค่าการดึงยึด ณ จุดขาด และค่ามอดุลัสของยัง แตกต่างจากฟิล์มผสมที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำอย่างชัดเจน เนื่องจากฟิล์มผสม SF/Gly ที่มีโปรตีนไฟโบรอินไหมเพียงอย่างเดียว เมื่อผ่านกระบวนการอบนึ่งด้วยไอน้ำ ซึ่งเป็นการนำฟิล์มไปไว้ในสภาวะที่อิ่มตัวด้วยไอน้ำ โมเลกุลของน้ำจึงแทรกตัวเข้าไปในสายโซ่ไฟโบรอิน ทำให้สายโซ่ไฟโบรอินเคลื่อนที่ได้อิสระมากขึ้น และจัดเรียงตัวใหม่เป็นโครงสร้างที่เป็นระเบียบ [55] ส่งผลให้ฟิล์มผสม SF/Gly ที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำมีความแข็งแรงมากขึ้น ส่วนกรณีฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำไม่มีความแตกต่างที่ชัดเจนจากกรณีที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ อาจเนื่องมาจากฟิล์มผสม SF/GA/Gly มีโปรตีนเจลาตินซึ่งเป็นโปรตีนที่มีสมบัติอ่อนนิ่ม และแทรกตัวอยู่กับโมเลกุลไฟโบรอิน ทำให้สายโซ่ไฟโบรอินไม่สามารถจัดเรียงโครงสร้างให้มีระเบียบ ส่งผลให้สมบัติการทนแรงดึงยึดไม่มีการเปลี่ยนแปลง

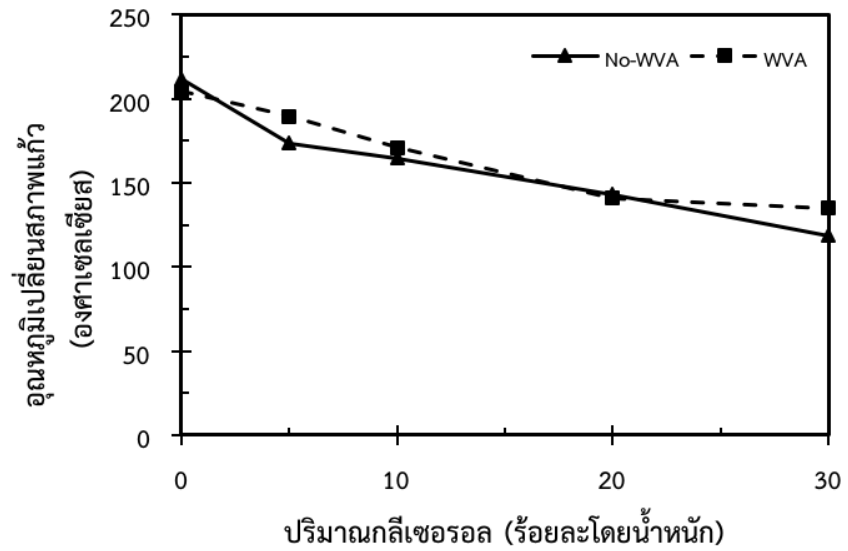
ผลจากการศึกษาข้างต้นสรุปได้ว่า เจลาตินและกลีเซอรอลมีผลเพิ่มความยืดหยุ่นของฟิล์มผสม โดยการเติมกลีเซอรอลจะส่งผลชัดเจนเมื่อมีการผสมกลีเซอรอลร้อยละ 10 ถึง 20 โดยน้ำหนัก และการอบนึ่งด้วยไอน้ำส่งผลต่อสมบัติทางกลของฟิล์มผสม SF/Gly โดยทำให้ฟิล์มผสม SF/Gly ที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำมีความแข็งแรงมากขึ้นอย่างชัดเจน ในขณะที่สมบัติทางกลของฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำไม่แตกต่างจากฟิล์มผสมที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ

4.1.2.2 ผลการทดสอบสมบัติทางความร้อน

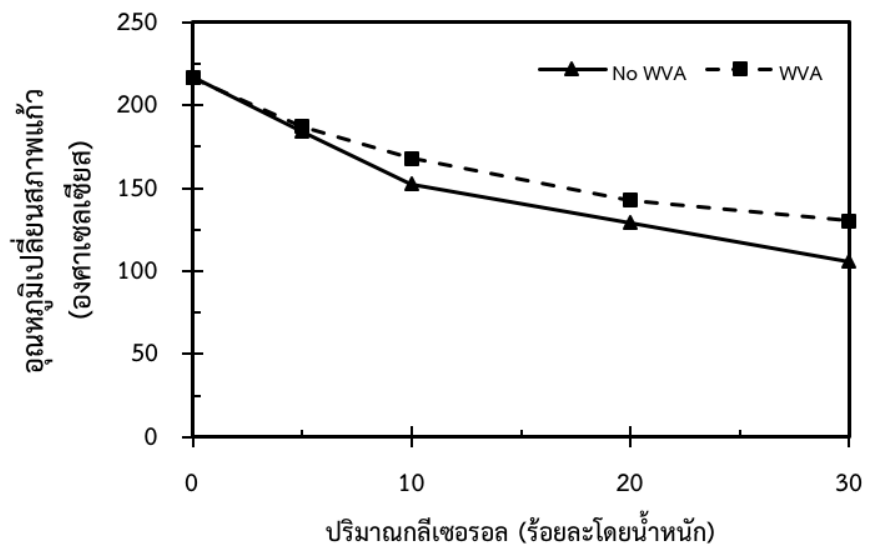
การทดสอบสมบัติทางความร้อนของฟิล์มผสม SF/Gly และ SF/GA/Gly เพื่อหาอุณหภูมิเปลี่ยนสภาพแก้ว (Glass transition temperature; T_g) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงการเปลี่ยนแปลงสมบัติของวัสดุจากสภาพคล้ายแก้ว (Glassy state) เป็นสภาพคล้ายยาง (Rubbery state) โดยอาจใช้ค่าดังกล่าวเพื่ออธิบายอันตรกิริยาระหว่างสายโซ่พอลิเมอร์ได้ [89] ในงานวิจัยนี้ ได้ศึกษาสมบัติดังกล่าวด้วยการวิเคราะห์สมบัติเชิงกลพลวัต (Dynamic mechanical analyzer ;DMA) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงสมบัติทางกลของวัสดุในช่วงอุณหภูมิต่าง ๆ เมื่อมีแรงกระทำ ความถี่ และความเครียด โดยค่า T_g หาได้จากจุดยอดกราฟ (Peak) ของค่าสัมประสิทธิ์การหน่วง (Damping coefficient) หรือ $\tan \delta$ (แสดงในภาคผนวก ข) ซึ่งคำนวณจากสัดส่วนของค่ามอดุลัสสูญเสีย (Loss modulus) ต่อมอดุลัสสะสม (Storage modulus) ของวัสดุ

ผลการวิเคราะห์อุณหภูมิเปลี่ยนสภาพแก้วของฟิล์มไฟโบรอินไหมที่ปราศจากกลีเซอรอล ที่ไม่ผ่านและผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ แสดงในรูปที่ 20ก มีค่า 212.0 และ 204.2 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานของ Qichun Liu และคณะ [90] ซึ่งพบว่า T_g ของฟิล์มไฟโบรอินไหมมีค่า 218.92 องศาเซลเซียส ส่วนฟิล์มผสม SF/Gly ที่ไม่ผ่านและผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ ที่ปราศจากกลีเซอรอล มีค่าอุณหภูมิเปลี่ยนสภาพแก้ว 212.0 และ 204.3 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มปริมาณกลีเซอรอลจากร้อยละ 5 เป็น 30 โดยน้ำหนัก พบว่า ค่า T_g มีค่าลดลงจาก 173.8 เป็น 118.8 และ 189.4 เป็น 134.9 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (รูปที่ 20(ก)) เช่นเดียวกันกับในกรณีของฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ไม่ผ่านและผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ ที่ปราศจากกลีเซอรอลมีค่า T_g เท่ากับ 216.7 และ 216.4 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มปริมาณกลีเซอรอลจากร้อยละ 5 เป็นร้อยละ 30 โดยน้ำหนัก พบว่าค่า T_g มีค่าลดลงจาก 184.1 เป็น 105.8 องศาเซลเซียส และ 187.3 เป็น 130.1 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (รูปที่ 20(ข))

ก



ข



รูปที่ 20 ค่าอุณหภูมิเปลี่ยนแปลงสภาพแก้วของ (ก) फिल्मผสม SF/Gly และ (ข) फिल्मผสม SF/GA/Gly ที่ไม่ผ่าน (No WVA) และผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ (WVA)

เมื่อเปรียบเทียบค่า T_g ของฟิล์มไฟโบรินผสมกลีเซอรอลซึ่งไม่มีเจลาติน (SF/Gly) ที่ไม่ผ่านและผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ พบว่า ค่า T_g อยู่ในช่วง 135 – 204 และ 118 – 212 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ในขณะที่ค่า T_g ของฟิล์มที่ผสมเจลาติน (SF/GA/Gly) อยู่ในช่วง 130 – 216 และ 105 – 216 องศาเซลเซียส ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าค่า T_g ของฟิล์มทั้งสองชนิดอยู่ในช่วงใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าเจลาตินที่สัดส่วนร้อยละ 20 อาจไม่มีผลชัดเจนต่ออุณหภูมิสภาพแก้วของฟิล์มผสม

เมื่อพิจารณาผลของกลีเซอรอลต่อสมบัติทางความร้อนของฟิล์มผสม พบว่าการเติมกลีเซอรอลส่งผลให้ ค่า T_g ของฟิล์มผสมลดลง เนื่องจากโมเลกุลของกลีเซอรอลซึ่งทำหน้าที่เป็นสารเสริมสภาพพลาสติก แทรกตัวระหว่างสายโซ่โพรตีนไฟโบริน และเจลาติน จึงส่งผลกระทบต่อการจัดเรียงสายโซ่โพรตีนที่เป็นระเบียบ ทำให้โมเลกุลของสายโซ่เคลื่อนที่เป็นอิสระมากขึ้น [78] จึงทำให้ค่าอุณหภูมิเปลี่ยนสภาพแก้วลดต่ำลงอย่างต่อเนื่องตามปริมาณกลีเซอรอลที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบแรงดึงของฟิล์มผสมที่สามารถดึงยืดได้มากขึ้นเมื่อปริมาณกลีเซอรอลเพิ่มขึ้น

เมื่อพิจารณาผลของการอบนึ่งด้วยไอน้ำต่อสมบัติทางความร้อนของฟิล์มผสม SF/Gly พบว่าค่า T_g ของฟิล์มผสมที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำมีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ ส่วนค่า T_g ของฟิล์มผสม SF/GA/Gly ในกลุ่มที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำมีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำเล็กน้อย เนื่องจากการอบนึ่งด้วยไอน้ำส่งผลให้สายโซ่โพรตีนมีการจัดเรียงตัวเป็นระเบียบมากขึ้น ทำให้ฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำมีความยืดหยุ่นน้อยกว่าและมีความแข็งมากกว่ากรณีที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ ดังผลการทดสอบแรงดึงที่พบว่าฟิล์มผสมกลุ่มที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำมีการดึงยืด ณ จุดขาดต่ำ และค่ามอดุลัสของยังสูง

4.1.2.3 สมบัติทางเคมีของฟิล์มผสม

จากการศึกษาผลการทดสอบความแข็งแรงของฟิล์มผสมในการทนแรงดึง และผลการทดสอบสมบัติทางความร้อนของฟิล์มผสมไฟโบรอินไหม (SF100) และฟิล์มผสมไฟโบรอินไหมและเจลาติน (SF/GA) ที่ปริมาณกลีเซอรอลร้อยละ 5 10 20 และ 30 โดยน้ำหนัก จะเห็นได้ว่าการเติมกลีเซอรอลมีผลต่อความยืดหยุ่นของฟิล์มผสมทั้งสองชนิด และเมื่อพิจารณาปริมาณของกลีเซอรอลที่ผสมในฟิล์มผสม พบว่า เมื่อเติมกลีเซอรอล

ร้อยละ 5 จนถึงร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ฟิล์มผสมมีความยืดหยุ่นเพิ่มมากขึ้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาณกลีเซอรอลเป็นร้อยละ 30 โดยน้ำหนัก พบว่าความยืดหยุ่นไม่แตกต่างจากฟิล์มผสมที่มีปริมาณกลีเซอรอลร้อยละ 20 ดังนั้นจึงได้เลือกสูตรฟิล์มผสม SF/Gly และฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่มีปริมาณกลีเซอรอลร้อยละ 20 โดยน้ำหนักมาทำการศึกษาสมบัติทางเคมีของฟิล์มผสม หมูฟิงก์ชั้นทางเคมี และสัดส่วนโครงสร้างทุติยภูมิของฟิล์มผสม ตรวจวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (FT-IR spectroscopy) โหมด Attenuated Total Reflectance (ATR) ที่ช่วงอินฟราเรดกลาง ($700 - 4000 \text{ cm}^{-1}$)

รูปที่ 21 แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของฟิล์มผสม SF/Gly และฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ไม่ผ่าน (No WVA) และผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ (WVA) พบว่าสเปกตรัมการดูดกลืนของฟิล์มผสม แสดงพีกจำเพาะของโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนที่ชัดเจน 4 ตำแหน่ง กล่าวคือ ตำแหน่งที่หนึ่ง จะพบ 2 พีก โดยพีกแรกเกิดที่เลขคลื่น 1652 cm^{-1} ที่มีในโครงสร้างแบบเกลียวสุ่ม (Random coil) [18] และเลขคลื่น 1621 cm^{-1} ซึ่งสอดคล้องกับพันธะเอไมด์ I (Amide I) ที่เกิดจากการสั่นแบบยืดของพันธะ C=O (C=O stretching) ที่มีในโครงสร้างแบบแผ่นพริตเบต้า (Beta sheet) ตำแหน่งที่สอง เกิดพีกที่เลขคลื่น 1533 cm^{-1} โดยพีกที่ปรากฏสอดคล้องกับพันธะเอไมด์ II (Amide II) ที่เกิดจากการสั่นแบบงอของพันธะ N-H (N-H bending) พีกที่ตำแหน่งที่สามที่เลขคลื่น 1238 cm^{-1} แสดงถึงพันธะเอไมด์ III (Amide III) ที่เกิดจากการสั่นของพันธะ C-N (C-N stretching) ซึ่งเป็นลักษณะโครงสร้างแบบเกลียวสุ่ม/เกลียวแอลฟา [30] และตำแหน่งที่สี่แสดงพีกจำเพาะของหมู่ C-OH ที่เลขคลื่น 1045 cm^{-1} [28] เมื่อพิจารณาสเปกตรัมการดูดกลืนของฟิล์มที่ไม่มีการเติมกลีเซอรอล (ฟิล์ม SF100 และฟิล์มผสม SF/GA) พบว่ายอดพีกของฟิล์มทั้งสองจะปรากฏที่เลขคลื่น 1055 cm^{-1} ซึ่งแสดงถึงการสั่นแบบยืดของ C=O (C=O stretching) ในสายโซ่โปรตีน [78] แต่เมื่อฟิล์มมีการเติมกลีเซอรอล (ฟิล์มผสม SF/Gly และฟิล์มผสม SF/GA/Gly) พบว่ายอดพีกของฟิล์มผสมทั้งสองมีลักษณะกว้างขึ้นที่บริเวณเลขคลื่น 1045 cm^{-1} เนื่องจาก

โครงสร้างของกลีเซอรอลประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) 3 หมู่ จึงทำให้พิกที่ตำแหน่ง 1045 cm^{-1} ที่จำเพาะต่อหมู่ไฮดรอกซิลในกลีเซอรอลปรากฏขึ้น [28] และเมื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัมการดูดกลืนของฟิล์มไฟโบรอินไหม (SF100) และฟิล์มผสมไฟโบรอินไหมและกลีเซอรอล (SF/Gly) ที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ (No WVA) พบว่ายอดพิกปรากฏที่เลขคลื่น 1652 cm^{-1} ที่แสดงถึงโครงสร้างแบบเกลียวคู่ และเมื่อนำฟิล์มผสมทั้งสองชนิดไปผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ (WVA) จะพบว่ายอดพิกที่แสดงถึงโครงสร้างแบบเกลียวคู่มีความชัดเจนลดลงเล็กน้อย และปรากฏยอดพิกใหม่ที่เลขคลื่น 1621 cm^{-1} ที่แสดงถึงโครงสร้างแบบแผ่นพลิทเบต้า แต่เมื่อพิจารณาสเปกตรัมการดูดกลืนของฟิล์มผสม SF/GA และฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ไม่ผ่านและผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ พบว่าไม่เห็นความแตกต่างที่เด่นชัด จึงจำเป็นต้องใช้โมเดลทางคณิตศาสตร์ Fourier self-deconvolution (FSD) ของสเปกตรัมช่วงพิก Amide I ในการวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนอย่างละเอียด เนื่องจากพิก Amide I เป็นพิกที่มีความเข้มของสเปกตรัมการดูดกลืนสูง (High intensity) และมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงพันธะของสายพอลิเพปไทด์ที่แสดงโครงสร้างทุติยภูมิ ซึ่งพบการสั่นแบบยืดของพันธะ C=O มากถึงร้อยละ 80 [30] โดยช่วงเลขคลื่นที่สอดคล้องกับโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนและหมู่ไทโรซีนแสดงดังตารางที่ 9

ทั้งนี้โครงสร้างทุติยภูมิ (Secondary structure) จะบ่งบอกถึงรูปร่างของโปรตีน ซึ่งมีโอกาสที่จะเกิดได้เป็นหลายรูปร่าง โดยเกิดจากสายพอลิเพปไทด์มีลักษณะม้วนตัว (Folding) เป็นรูปแบบที่ซ้ำกันและสม่ำเสมอทำให้เกิดลักษณะที่เป็นเกลียว (Helix) หรือแผ่นพลิท (Pleated sheet) ที่เกิดจากการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่คาร์บอนิลและหมู่เอมีนในสายพอลิเพปไทด์ ทำให้โครงสร้างของโปรตีนมีความเป็นระเบียบและเสถียรมากขึ้น จำแนกได้ดังนี้ [31]

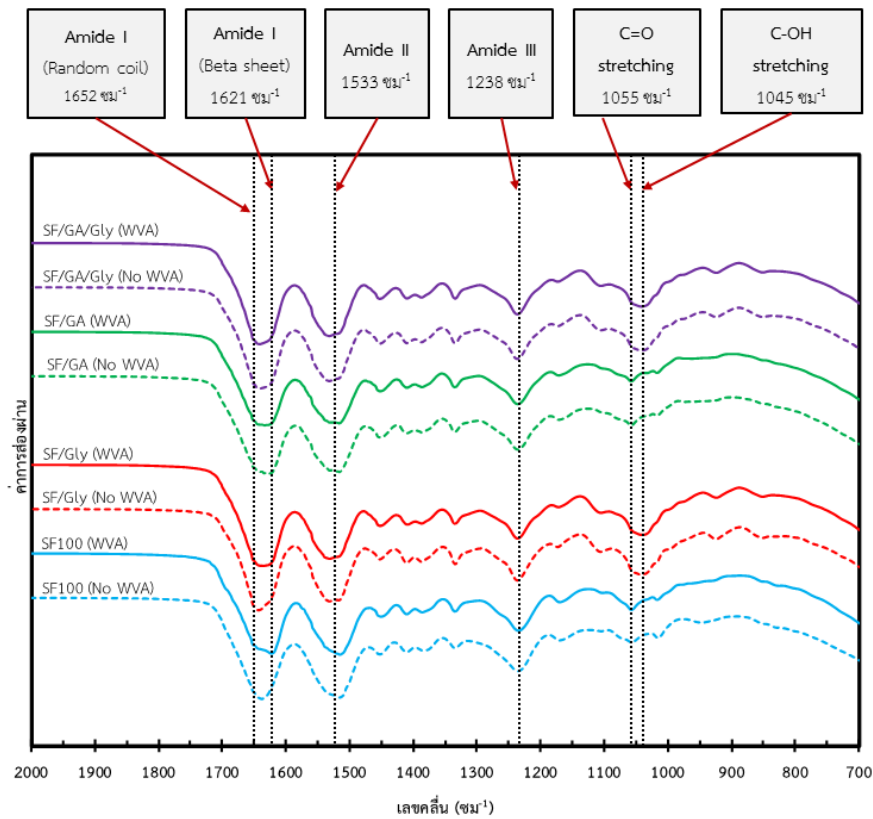
1. โครงสร้างแบบเกลียวแอลฟา (Alpha helix) เป็นสายพอลิเพปไทด์ที่มีโครงสร้างลักษณะเป็นแท่งแข็ง (Rigid rodlike structure) เกิดจากการม้วนตัวของสายพอลิเพปไทด์ หมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนแต่ละตัวจะสร้างพันธะไฮโดรเจนกับหมู่เอมีนของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 4 ตัวถัดมาและเป็นเช่นนี้ซ้ำ ๆ กัน ทำให้เกิดเกลียวแอลฟา ที่มีทั้งเกลียววนขวา และวนซ้าย โดยชนิดเกลียววนขวาจะเสถียรกว่าเกลียววนซ้าย
2. โครงสร้างแผ่นพลิทเบต้า (Beta sheet) เป็นโครงสร้างที่มีลักษณะแผ่นพับซ้อนกันไปมา โดยสายพอลิเพปไทด์ที่อยู่ใกล้กันจะมีการจับตัวกันด้วยพันธะไฮโดรเจนที่ก่กระหว่างหมู่คาร์บอกซิลของสายพอลิเพปไทด์สายหนึ่งกับหมู่เอมีนของสายพอลิเพปไทด์อีกสายหนึ่ง จึงทำให้การจัดเรียงตัวของโครงสร้างเป็นผลึกซึ่งเป็นสัณฐานที่มีความ

เป็นระเบียบสูง การจับตัวกันแบบแผ่นพลิทเบต้าจะเกิดได้ 2 ลักษณะ โดยขึ้นกับทิศทางการเรียงตัวของกรดอะมิโนบนสายพอลิเพปไทด์ที่อยู่ติดกัน กล่าวคือถ้ากรดอะมิโนบนสายพอลิเพปไทด์ที่อยู่ใกล้กันมีการจัดเรียงตัวจาก N-terminal ไปยัง C-terminal เหมือนกันทั้ง 2 สาย จะเรียกว่าการจัดเรียงตัวแบบทิศทางเดียวกัน (Parallel) แต่ถ้าการเรียงตัวของกรดอะมิโนเป็นไปในทิศตรงข้ามจะเรียกว่าการจัดเรียงตัวแบบทิศทางสวนกัน (Antiparallel) โดยทั่วไปโครงสร้างแบบทิศทางสวนกันจะเสถียรกว่าแบบทิศทางเดียวกันส่งผลให้การจัดเรียงตัวของโปรตีนเป็นระเบียบมากขึ้น

3. โครงสร้างแบบเบต้าเทิร์น (Beta turn) เป็นโครงสร้างที่เปลี่ยนทิศทางเพื่อให้เกิดการม้วนพับของสายพอลิเพปไทด์ที่เกิดจากพันธะไฮโดรเจน โดยมีกรดอะมิโนที่พบมากในโครงสร้างนี้คือ ไกลซีน (Glycine) และโพรลีน (Proline) เนื่องจากไกลซีนมีหมู่ R ในกรดอะมิโนเป็น ไฮโดรเจน (-H) ซึ่งมีขนาดเล็ก จึงสามารถสวมเข้าได้กับโครงสร้างสามมิติของโปรตีน ในขณะที่หมู่ R ของกรดอะมิโนชนิดอื่นๆหันออกข้างนอก จึงทำให้เกิดการม้วนพับ หรือการโค้งของสายพอลิเพปไทด์ ส่วนโพรลีนจะมีอะตอมของไนโตรเจนอยู่ในวงแหวนไพโรลิดีน (Pyrrolidine ring) จึงไม่มีการเปลี่ยนโครงรูป ทำให้สายพอลิเพปไทด์เกิดการโค้งงอได้

โปรตีนที่มีโครงสร้างทุติยภูมิที่กล่าวมาข้างต้นจัดว่าเป็นโปรตีนที่มีความเสถียร โดยหากจัดเรียงตามโครงสร้างที่มีความเป็นผลึก (Crystallization structure) พบว่าโครงสร้างแบบแผ่นพลิทเบต้ามีความเป็นผลึก และจัดเรียงตัวเป็นระเบียบสูงสุด ถัดมาคือโครงสร้างแบบเกลียวแอลฟา และแบบเบต้าเทิร์นตามลำดับ [91, 92]

นอกจากนี้ยังมีโครงสร้างแบบเกลียวสุ่ม (Random coil) ซึ่งเป็นโครงสร้างอสัณฐาน (Amorphous structure) มีลักษณะไม่เป็นระเบียบ เนื่องจากสายพอลิเพปไทด์ไม่ได้มีการจัดเรียงตัวให้อยู่ในรูปเสถียร รวมถึงหมู่ไทโรซีนที่มีหมู่อะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอนซึ่งจัดเป็นโครงสร้างแบบอสัณฐานที่แสดงถึงความไม่เป็นระเบียบในโครงสร้างของโปรตีน [93]



รูปที่ 21 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของฟิล์ม SF100 ฟิล์มผสม SF/Gly และฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ไม่ผ่าน (No WVA) และผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ (WVA)

ตารางที่ 9 โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนและหมูไทโรซีน [80]

เลขคลื่น (cm ⁻¹)	โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน และหมูไทโรซีน
1,605 – 1,615	หมูไทโรซีน (Tyrosine)
1,616 – 1,621	แผ่นพลิทเบต้า (β -sheet)
1,638 – 1,653	เกลียวสุ่ม (Random coil)
1,656 – 1,622	เกลียวแอลฟา (Alpha helix)
1,663 – 1,696	เบต้าเทิร์น (β -turn)

ตารางที่ 10 ร้อยละโครงสร้างทุติยภูมิและหมู่ไทโรซีนของฟิล์ม SF100 และฟิล์มผสม SF/Gly และฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ไม่ผ่าน (No WVA) และผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ (WVA)

โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน	ร้อยละของโครงสร้างทุติยภูมิและหมู่ไทโรซีน			
	ฟิล์ม SF100		ฟิล์มผสม SF/Gly	
	No WVA	WVA	No WVA	WVA
แผ่นพลีทเบต้า	20.36	44.05	14.85	38.21
เกลียวแอลฟา	3.64	6.94	6.76	7.86
เบต้าเทิร์น	15.04	15.76	13.61	12.77
เกลียวสุ่ม	53.07	26.67	49.19	35.80
หมู่ไทโรซีน	7.89	6.58	5.59	5.36

ตารางที่ 11 ร้อยละโครงสร้างทุติยภูมิและหมู่ไทโรซีนของฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ไม่ผ่าน (No WVA) และผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ (WVA)

โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน	ร้อยละของโครงสร้างทุติยภูมิและหมู่ไทโรซีน			
	ฟิล์มผสม SF/GA		ฟิล์มผสม SF/GA/Gly	
	No WVA	WVA	No WVA	WVA
แผ่นพลีทเบต้า	38.07	44.61	29.27	40.78
เกลียวแอลฟา	8.94	3.88	10.37	4.34
เบต้าเทิร์น	15.53	24.12	11.93	18.23
เกลียวสุ่ม	30.07	22.94	43.55	31.99
หมู่ไทโรซีน	7.40	4.45	4.88	4.66

เมื่อพิจารณาผลของการเติมเจลาตินที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิ และหมู่ไทโรซีนในฟิล์มผสม โดยการเปรียบเทียบระหว่างฟิล์มที่ไม่มีการเติมเจลาติน (ฟิล์ม SF100 และฟิล์มผสม SF/Gly) (แสดงในตารางที่ 10) และฟิล์มที่มีการเติมเจลาติน (ฟิล์มผสม SF/GA และฟิล์มผสม SF/GA/Gly) (แสดงในตารางที่ 11) กรณีที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ (No WVA) พบว่าฟิล์มผสมที่มีเจลาตินมีปริมาณโครงสร้างแผ่นพอลิเบต้าและเกลียวแอลฟามากกว่าฟิล์มที่ไม่มีการเติมเจลาติน ในขณะที่โครงสร้างแบบเกลียวสุ่มลดลง ส่วนในกรณีของฟิล์มที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ พบว่าฟิล์มผสมที่มีเจลาตินจะมีปริมาณโครงสร้างแผ่นพอลิเบต้า และเบต้าเทิร์นเพิ่มขึ้น โครงสร้างเกลียวแอลฟาและเกลียวสุ่มมีปริมาณลดลงเมื่อเทียบกับฟิล์มผสมที่ไม่มีเจลาติน ซึ่งเมื่อพิจารณาฟิล์มผสมทั้งสองกรณีที่ไม่ผ่านและผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ พบว่าการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างทุติยภูมิของฟิล์มผสมเมื่อเติมเจลาตินคือ การเพิ่มขึ้นของโครงสร้างแผ่นพอลิเบต้า และการลดลงของโครงสร้างเกลียวสุ่ม จึงคาดว่าเจลาตินมีแนวโน้มชักนำโครงสร้างทุติยภูมิของไฟโบรอินใหม่ให้มีความเป็นระเบียบมากขึ้น แต่ทั้งนี้ผลการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของฟิล์มผสมด้วยวิธี FSD นี้ไม่สอดคล้องกับผลการทดสอบความแข็งแรงของฟิล์มผสมในการทนต่อแรงดึงยืด ที่พบว่าการเติมเจลาตินในฟิล์มผสมส่งผลให้ฟิล์มผสมมีความยืดหยุ่นเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้การวิเคราะห์ปริมาณโครงสร้างทางเคมีนี้คำนวณจากหนึ่งชิ้นงานตัวอย่างขนาดเล็ก ซึ่งอาจมีความคลาดเคลื่อนได้ ในขณะที่สมบัติทางกลที่ทดสอบเป็นสมบัติระดับมหภาค

เมื่อพิจารณาผลของการเติมกลีเซอรอลต่อโครงสร้างทุติยภูมิของฟิล์มที่ผสมกลีเซอรอล (ฟิล์มผสม SF/Gly และฟิล์มผสม SF/GA/Gly) ในกรณีที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ พบว่าโครงสร้างที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อฟิล์มผสมทั้งสองชนิดมีการเติมกลีเซอรอลร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก คือ โครงสร้างเกลียว 20แอลฟา และเกลียวสุ่ม ในขณะที่โครงสร้างแผ่นพอลิเบต้า เบต้าเทิร์น และหมู่ไทโรซีนมีปริมาณลดลง และเมื่อพิจารณาในกรณีที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ พบว่าฟิล์มที่ผสมกลีเซอรอล มีโครงสร้างแผ่นพอลิเบต้าและเบต้าเทิร์นลดลง และโครงสร้างแบบเกลียวสุ่มเพิ่มมากขึ้นเช่นเดียวกับในกรณีของฟิล์มผสมที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ แต่โครงสร้างเกลียวแอลฟาและหมู่ไทโรซีนไม่มีความแตกต่างจากในกรณีของฟิล์มที่ไม่ผสมกลีเซอรอล (ฟิล์ม SF100 และฟิล์ม SF/GA) แสดงให้เห็นว่าการเติมกลีเซอรอลมีส่วนช่วยในการชักนำโครงสร้างที่มีความเป็นระเบียบให้ลดลง จึงทำให้ฟิล์มที่ผสมกลีเซอรอลมีความยืดหยุ่นเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบการทนแรงดึงยืดที่ได้กล่าวไปในหัวข้อ 4.1.2.1 ที่แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการผสมกลีเซอรอลในฟิล์ม ส่งผลให้ร้อยละการดึงยืด ณ จุดขาดมีค่า

มากกว่า และค่ามอดูลัสของยังมีค่าน้อยกว่าฟิล์มที่ไม่การผสมกลีเซอรอล ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบสมบัติเชิงกลพลวัตที่พบว่าค่าอุณหภูมิเปลี่ยนสภาพแก้วของฟิล์มที่ผสมกลีเซอรอลมีค่าต่ำกว่าฟิล์มที่ไม่ผสมกลีเซอรอล ในงานวิจัยของ Shenzhou Lu และคณะ [77] ได้ศึกษาผลของการเติมกลีเซอรอลที่ปริมาณต่าง ๆ (1, 2, 5, 10, 20 และ 30 โดยน้ำหนัก) ในฟิล์มโพลีเอทิลีนไกลคอล จากผลการศึกษาโครงสร้างทุติยภูมิของฟิล์มผสมที่มีการเติมกลีเซอรอลตั้งแต่ร้อยละ 5 เป็น 20 โดยน้ำหนัก พบว่าโครงสร้างที่พบมากที่สุดคือ โครงสร้างแบบเกลียวแอลฟา ที่มีประมาณร้อยละ 50 โดยปริมาณของเกลียวแอลฟาจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณกลีเซอรอลที่เพิ่ม และปริมาณโครงสร้างที่ลดลงคือ โครงสร้างเบต้าเทิร์น

เมื่อพิจารณาผลของการอบนึ่งด้วยไอน้ำต่อโครงสร้างทุติยภูมิของฟิล์มทั้ง 4 สูตรที่แสดงในตารางที่ 10 และ 11 พบว่า โครงสร้างที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนภายหลังจากการอบนึ่งด้วยไอน้ำคือโครงสร้างแผ่นพลิทเบต้า ในขณะที่โครงสร้างแบบเกลียวส้อมมีปริมาณลดลง แสดงให้เห็นว่าการอบนึ่งด้วยไอน้ำส่งผลต่อโครงสร้างทุติยภูมิของโพรตีน โดยการชักนำให้สายโซ่โพรตีนเกิดการเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบการทนแรงดึงของฟิล์มผสม ที่แสดงให้เห็นว่าเมื่อฟิล์มผสมผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำจะมีร้อยละการดึงยืด ณ จุดขาดต่ำกว่ากรณีที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ และค่ามอดูลัสของยังของฟิล์มผสมที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำมีค่าสูงกว่าฟิล์มผสมที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ และพบว่าอุณหภูมิเปลี่ยนสภาพแก้วของฟิล์มผสมที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำมีค่าสูงกว่าในกรณีที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ

ในงานวิจัยของ Xiao Hu และคณะ [55] ได้ศึกษาผลของการอบนึ่งด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิต่าง ๆ (4, 25, 37, 50 และ 95 องศาเซลเซียส) ต่อโครงสร้างของฟิล์มโพลีเอทิลีนไกลคอล พบว่าสเปกตรัมการดูดกลืนของฟิล์มโพลีเอทิลีนไกลคอลที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ ปรากฏยอดคลื่นที่ประมาณ 1648 cm^{-1} ซึ่งแสดงถึงยอดคลื่นแบบเกลียวส้อม และเมื่อนำฟิล์มโพลีเอทิลีนไกลคอลไปอบนึ่งด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะพบยอดคลื่น 1626 cm^{-1} ที่ชัดเจน แสดงให้เห็นว่าการอบนึ่งด้วยไอน้ำส่งผลต่อสายโซ่โพลีเอทิลีนไกลคอลให้มีการจัดเรียงตัวที่เป็นระเบียบมากขึ้น

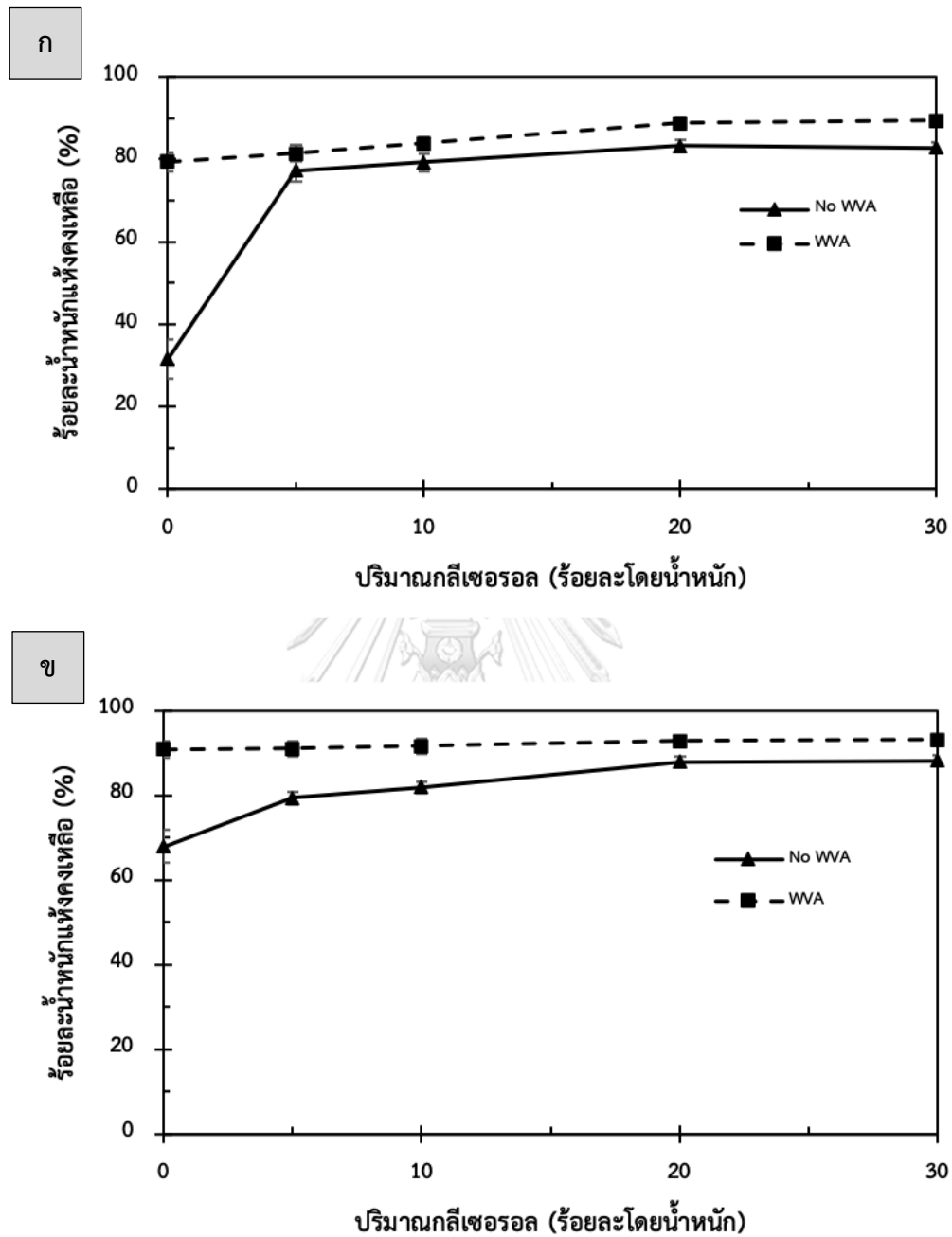
4.1.2.4 ผลการทดสอบความคงตัวในน้ำของฟิล์มผสม

เพื่อยืนยันผลการทดลองในหัวข้อสมบัติทางเคมีของฟิล์มผสม ที่พบว่าการเติม เจลาติน กลีเซอรอล และการอบนึ่งด้วยไอน้ำ ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ทฤษฎีของไฟโบรอินใหม่ จึงได้มีการทดสอบความคงตัวของฟิล์มผสม SF/Gly และ SF/GA/Gly ที่ไม่ผ่าน (No WVA) และผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ (WVA) โดยประเมิน จากร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือของฟิล์มผสม (รูปที่ 22ก และ 22ข) และปริมาณโปรตีน ที่ละลายน้ำ (รูปที่ 23ก และ 23ข) ภายหลังจากแช่ฟิล์มผสมสูตรต่าง ๆ ในน้ำปราศจาก ประจุ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

โดยเมื่อพิจารณาผลของการเติมเจลาตินต่อความคงตัวของฟิล์ม พบว่าภายหลัง การแช่น้ำฟิล์มไฟโบรอินที่ไม่มีเจลาติน (SF100) ไม่สามารถคงสภาพเป็นแผ่นฟิล์มได้ โดยฟิล์มละลายและแยกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ในขณะที่ฟิล์มผสมที่มีเจลาติน (SF/GA) ยังคง สภาพเป็นแผ่นเดียว โดยมีบางส่วนละลายออกไปในน้ำ ทั้งนี้ร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือ ของฟิล์ม SF100 ที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ (รูปที่ 22ก) มีค่าประมาณร้อยละ 31 ในขณะที่ฟิล์ม SF/GA (รูปที่ 22ข) มีค่าประมาณร้อยละ 68 ซึ่งสูงกว่ากรณีที่ไม่มีการ เติมเจลาตินอย่างชัดเจน และเมื่อพิจารณาในกลุ่มของฟิล์มผสมกลีเซอรอลที่ไม่มี เจลาติน (SF/Gly) (รูปที่ 22ก) และมีเจลาติน (SF/GA/Gly) (รูปที่ 22ข) พบว่าร้อยละ น้ำหนักแห้งคงเหลือของฟิล์มผสม SF/Gly ที่ไม่ผ่านและผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ มีค่า ต่ำกว่าฟิล์มผสม SF/GA/Gly ทั้งสองกรณี ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณโปรตีนที่ละลายในน้ำ ภายหลังจากแช่ฟิล์มซึ่งมีน้อยลงเมื่อฟิล์มมีการผสมเจลาติน ดังแสดงในรูปที่ 23ก และ 23ข แสดงให้เห็นว่าการเติมเจลาตินช่วยให้ฟิล์มไฟโบรอินใหม่มีความคงตัวมากขึ้น อาจ เนื่องมาจากค่าศักย์ซีตา (Zeta potential) ที่ได้กล่าวไปในหัวข้อ 4.1.1 กล่าวคือค่า ศักย์ซีตาของสารละลายไฟโบรอินใหม่และกลีเซอรอลมีค่าเป็นลบ ในขณะที่สารละลาย เจลาตินมีค่าเป็นบวก เมื่ออยู่ในรูปสารละลายผสมระหว่างไฟโบรอินใหม่และกลีเซอรอล จึงทำให้ประจุรวมของสารละลายมีค่าเป็นลบ ในขณะที่สารละลายผสมไฟโบรอิน เจลาติน และกลีเซอรอล ประจุรวมของสารละลายมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ ซึ่งเมื่อนำ สารละลายผสมมาขึ้นรูปเป็นฟิล์มผสม SF/Gly และฟิล์มผสม SF/GA/Gly และนำฟิล์ม ผสมทั้งสองชนิดแช่ในน้ำที่มีขี้ผึ้งมีแนวโน้มที่ทำให้ฟิล์มผสมที่ไม่มีเจลาติน (SF/GA/Gly) ที่มีประจุรวมเข้าใกล้ศูนย์ จึงส่งผลให้ฟิล์มผสม SF/GA/Gly มีความคงตัว มากกว่าฟิล์มผสม SF/Gly ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบสมบัติทางเคมีของฟิล์มผสมที่ ได้กล่าวมาข้างต้นว่าเจลาตินสามารถชักนำโครงสร้างทฤษฎีของไฟโบรอินใหม่ที่มีความ เป็นระเบียบให้มีปริมาณเพิ่มขึ้น

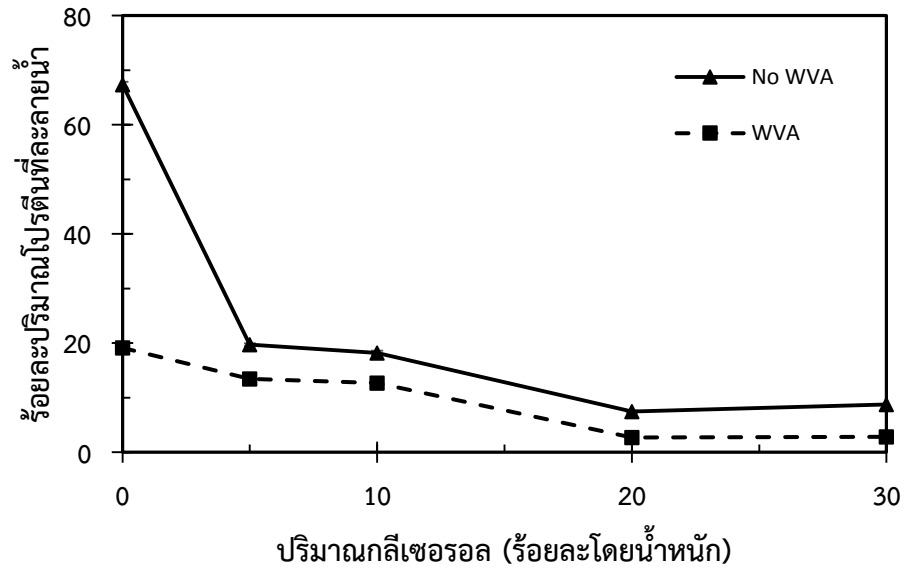
เมื่อพิจารณาผลของกลีเซอรอลต่อสมบัติความคงตัวของฟิล์มทั้ง 4 สูตร พบว่าการเติมกลีเซอรอลในฟิล์มสามารถช่วยให้ฟิล์มมีความคงตัวในน้ำได้ เช่น ในกรณีของฟิล์ม SF100 ที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ มีค่าร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือประมาณร้อยละ 30 และเมื่อเติมกลีเซอรอลเพียงร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก พบว่าค่าดังกล่าวเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน เป็นร้อยละ 77 สอดคล้องกับปริมาณโปรตีนที่ละลายในน้ำของฟิล์มที่ลดลงจากร้อยละ 68 เป็น 20 ดังแสดงในรูปที่ 23ก แสดงให้เห็นว่าการเติมกลีเซอรอลช่วยให้ฟิล์มผสมทั้ง 4 สูตรสามารถคงตัวอยู่ในน้ำได้มากขึ้น เนื่องจากโมเลกุลกลีเซอรอลชักนำให้สายโซ่โปรตีนจัดเรียงตัวเป็นระเบียบมากขึ้น โดยเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของกลีเซอรอล และหมู่เอไมด์ (NH₂) ของโปรตีน ที่จะส่งผลให้สายโซ่ไฟโบรอินเรียงตัวเป็นระเบียบมากขึ้น ด้วยอันตรกิริยาที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic interaction) จากกรดอะมิโนไกลซีน (Glycine) และอลานีน (Alanine) ที่เรียงตัวเข้าจึงทำให้ฟิล์มมีความสามารถในการละลายน้ำได้ลดลงเมื่อมีปริมาณกลีเซอรอลเพิ่มมากขึ้น [94]

เมื่อพิจารณาผลของการอบนึ่งด้วยไอน้ำต่อสมบัติความคงตัวของฟิล์มทั้ง 4 สูตร ที่แสดงในรูปที่ 22 พบว่าฟิล์มในกลุ่มที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำมีค่าร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือมากกว่าในกลุ่มที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ โดยเมื่อเปรียบเทียบในกรณีของฟิล์ม SF100 ก่อนและหลังการอบนึ่งด้วยไอน้ำ (รูปที่ 22ก) พบว่าร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือของฟิล์มเพิ่มขึ้นมากกว่าเท่าตัว จากร้อยละ 32 เป็น 80 เช่นเดียวกับฟิล์มผสม SF/GA (รูปที่ 22ข) ที่พบว่าค่าดังกล่าวเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 69 เป็น 91 ค่าร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือของฟิล์มผสม SF/Gly และ SF/GA/Gly ในกรณีที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำมีค่ามากกว่าในกรณีที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำเช่นกัน สอดคล้องกับปริมาณโปรตีนที่ละลายในน้ำของฟิล์ม (รูปที่ 23) ซึ่งมีค่าลดลงเมื่อฟิล์มผสมผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ แสดงให้เห็นว่าการอบนึ่งด้วยไอน้ำมีผลต่อสมบัติความคงตัวของฟิล์มผสมทั้งสองชนิด เนื่องมาจากกระบวนการอบนึ่งด้วยไอน้ำส่งผลให้การจัดเรียงตัวของสายโซ่ไฟโบรอินเป็นระเบียบมากขึ้น [19] จึงทำให้ฟิล์มละลายน้ำได้น้อยลงเมื่อเทียบกับฟิล์มที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบสมบัติทางเคมีที่กล่าวมาข้างต้น ที่พบว่าการอบนึ่งด้วยไอน้ำส่งผลต่อการเหนียวนาโครงสร้างทุติยภูมิแบบแผ่นพลิเบตต้าของไฟโบรอินให้มากยิ่งขึ้น มีการเชื่อมระหว่างสายโซ่พอลิเพปไทด์ด้วยพันธะไฮโดรเจนซึ่งเป็นพันธะที่มีความไม่ชอบน้ำสูง ทำให้โมเลกุลของสารละลายเข้าไปไฮโดรไลซ์ได้น้อย

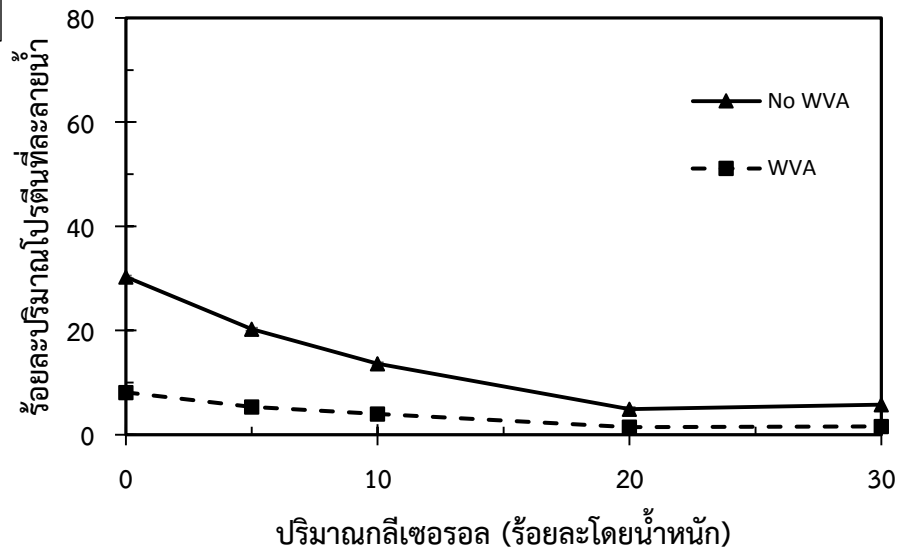


รูปที่ 22 ร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือของ (ก) फिल्मผสม SF/Gly และ (ข) फिल्मผสม SF/GA/Gly ที่ไม่ผ่าน (No WVA) และผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ (WVA) ภายหลังการแช่น้ำปราศจากประจุ ออสมอสมิตี 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ก



ข



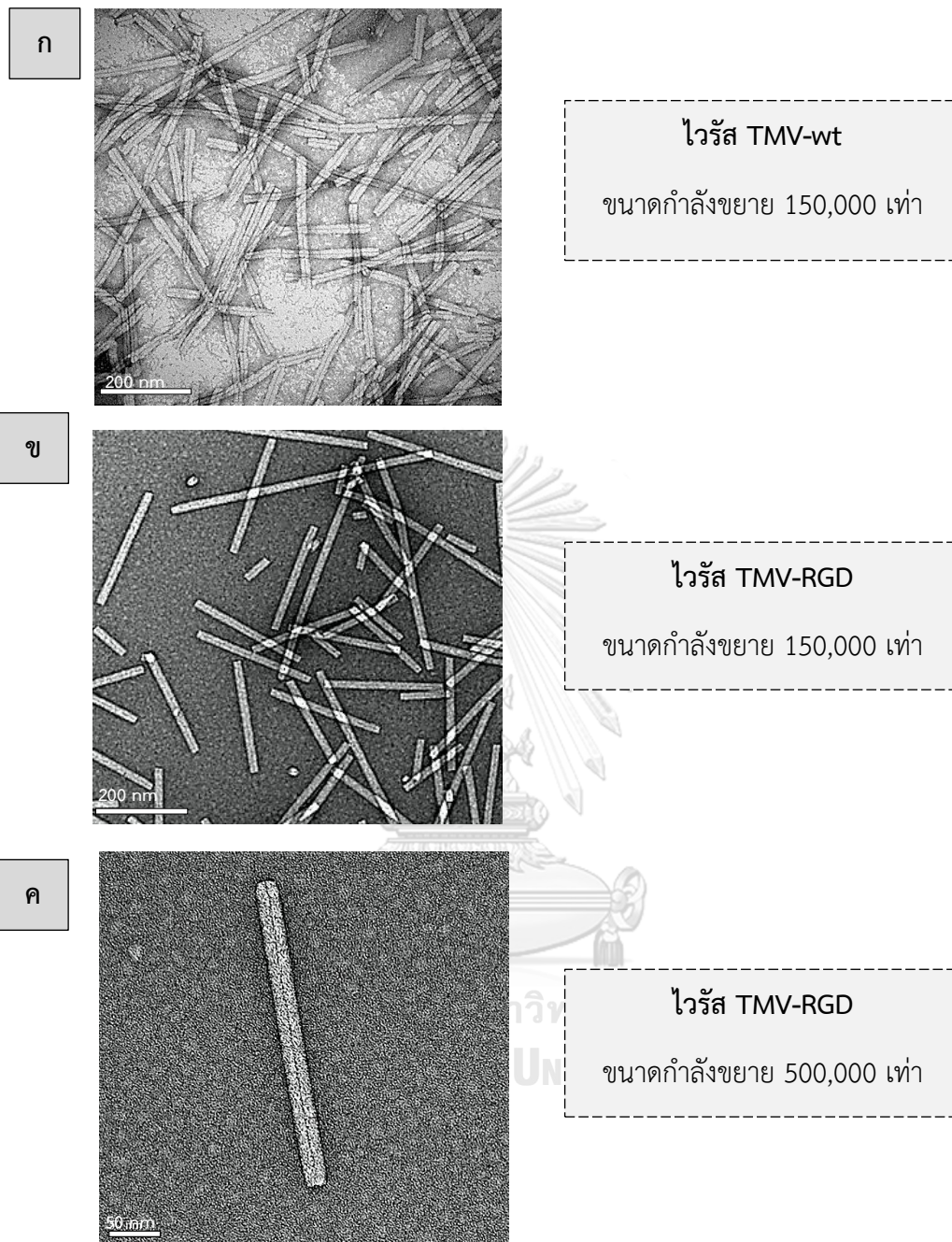
รูปที่ 23 ร้อยละปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำของ (ก) फिल्मผสม SF/Gly และ (ข) फिल्मผสม SF/GA/Gly ที่ไม่ผ่าน (No WVA) และผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ (WVA) ภายหลังจากแช่ในน้ำปราศจากประจุ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.2 คุณลักษณะและสมบัติของไวรัสใบต่างยาสูบที่ไม่ถูกตัดแปลงพันธุกรรม (TMV-wt) และถูกตัดแปลงพันธุกรรมด้วยกรดอะมิโนอาร์จินีนไกลซิลแอสปาดิก (TMV-RGD)

การศึกษาคุณลักษณะของไวรัสใบต่างยาสูบ (Tobacco mosaic virus; TMV) 2 ชนิด คือไวรัสใบต่างยาสูบที่ไม่ได้ถูกตัดแปลงพันธุกรรม (TMV-wt) และไวรัสที่ถูกตัดแปลงพันธุกรรมด้วยกรดอะมิโนอาร์จินีนไกลซิลแอสปาดิก (TMV-RGD) ที่เตรียมได้ เพื่อยืนยันความถูกต้องและความบริสุทธิ์ของไวรัสแต่ละชนิด โดยวิเคราะห์โครงสร้างพื้นฐาน ปริมาณ RNA ความบริสุทธิ์ของไวรัส และจำแนกชนิดของไวรัสทั้งสองชนิดโดยเทคนิค Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) มีรายละเอียดในหัวข้อต่อไปนี้

4.2.1 สัณฐานของไวรัสใบต่างยาสูบ

การวิเคราะห์โครงสร้างพื้นฐานของไวรัสใบต่างยาสูบ (Tobacco mosaic virus, TMV) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy, TEM) แสดงในรูปที่ 24 ซึ่งส่งไวรัส TMV-wt และ TMV-RGD ชนิดละ 20 แท่ง มาวัดด้วยโปรแกรม ImageJ และหาค่าเฉลี่ยจากการวัด สังเกตได้ว่า โครงสร้างของไวรัสใบต่างยาสูบทั้งสองชนิดมีลักษณะเป็นแท่ง (rod shape) และมีขนาดใกล้เคียงกัน โดยไวรัสใบต่างยาสูบ TMV-wt (รูปที่ 24ก) มีความยาวประมาณ 300.5 ± 2.2 นาโนเมตร และความกว้าง 18.3 ± 0.6 นาโนเมตร และไวรัสใบต่างยาสูบ TMV-RGD (รูปที่ 24ข) มีความยาวประมาณ 301.3 ± 7.9 นาโนเมตร และความกว้าง 18.8 ± 0.9 นาโนเมตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Klug A [35] ที่รายงานว่าไวรัสใบต่างยาสูบ TMV-wt มีลักษณะเป็นแท่ง ความยาว 300 นาโนเมตร และความกว้าง 18 นาโนเมตร และในงานวิจัยของ Pongkwan S. และคณะ [39] รายงานว่าไวรัสใบต่างยาสูบ TMV-RGD มีความยาวประมาณ 300 นาโนเมตร และความกว้างประมาณ 15 – 20 นาโนเมตร



รูปที่ 24 ลักษณะสัณฐานของ (ก) ไวรัส TMV-wt (ข) ไวรัส TMV-RGD ที่กำลังขยาย 150,000 เท่า (สเกลบาร์ 200 นาโนเมตร) (ค) ไวรัส TMV-RGD ที่กำลังขยาย 500,000 เท่า (สเกลบาร์ 50 นาโนเมตร) วิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

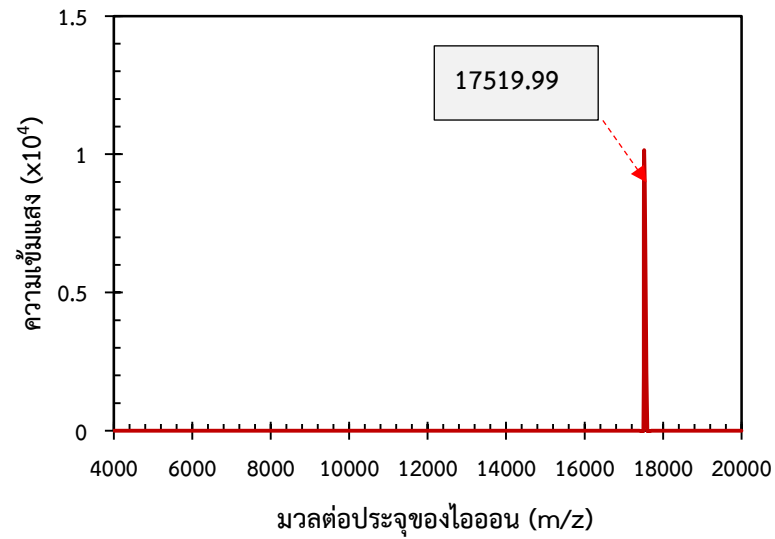
4.2.2 ความเข้มข้นของสารละลายไวรัสใบต่างยาสูบ

การตรวจวัดความเข้มข้นของสารละลายไวรัสใบต่างยาสูบจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร คำนวณได้จากกฎของเบียร์-แลมเบิร์ต (Beer Lambert's law) โดยสัมพันธ์กับการดูดกลืนแสง (Extinction coefficient; ϵ) ของไวรัสใบต่างยาสูบทั้งสองชนิด (TMV-wt และ TMV-RGD) มีค่าเท่ากับ 3 (มิลลิลิตร/มิลลิกรัม⁻¹เซนติเมตร⁻¹) [41] ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของสารละลายไวรัส TMV-wt ที่เตรียมได้ เท่ากับ 12 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และความเข้มข้นของสารละลายไวรัส TMV-RGD มีค่า 9 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายไปเจือจางเป็น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ เพื่อใช้ในการทดลองในหัวข้อถัดไป ส่วนความบริสุทธิ์ของไวรัส (Virus purification) ที่แสดงถึงความสมบูรณ์ของโครงสร้างไวรัส ซึ่งประกอบด้วยแกนกลาง (Core) ของ RNA และมีโปรตีนหุ้มล้อมรอบ (Capsid) วิเคราะห์ได้จากสัดส่วนของค่าการดูดกลืนแสงของ RNA ต่อค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีน ($\frac{A_{260}}{A_{280}}$) ซึ่งมีค่าอยู่ช่วง 1.20 – 1.30 [37] โดยคาดว่าหากค่าสัดส่วนนี้มีค่าสูงหรือต่ำกว่าในช่วงดังกล่าว อาจหมายถึงลักษณะของไวรัสไม่สมบูรณ์ เช่นกรณีค่าสัดส่วนสูง อาจหมายความว่าไวรัสแตกและมี RNA หลุดออกมา หรือในกรณีค่าสัดส่วนต่ำอาจหมายถึงโปรตีนที่หุ้มล้อมหลุดออกมาหรือมีการปนเปื้อนจากโปรตีนอื่น โดยไวรัส TMV-wt และ TMV-RGD ที่เตรียมได้ มีค่าดังกล่าวเท่ากับ 1.28 และ 1.26 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ MA Bruckman และคณะ ที่ได้รายงานสัดส่วนค่าการดูดกลืนแสงของ RNA ต่อโปรตีนในไวรัส TMV-wt ว่าอยู่ในช่วง 1.2 – 1.3[86] และรายงานวิจัยของ Andrew Lee และคณะ ที่ระบุค่าดังกล่าวของไวรัส TMV-RGD เท่ากับ 1.26 – 1.27[37] ซึ่งจากผลความบริสุทธิ์ของไวรัสในหัวข้อนี้สอดคล้องกับลักษณะโครงสร้างไวรัสที่มีลักษณะแท่งที่สมบูรณ์ที่ได้กล่าวในหัวข้อ 4.2.1

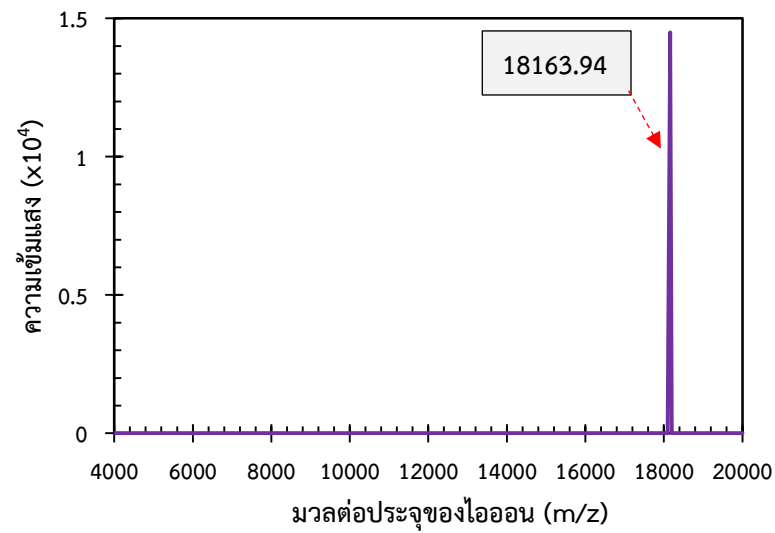
4.2.3 ผลการจำแนกชนิดของไวรัส

การจำแนกชนิดของไวรัสใบต่างยาสูบที่ไม่ได้ถูกตัดแปลงพันธุกรรม (TMV-wt) และไวรัสที่ถูกตัดแปลงพันธุกรรมด้วยกรดอะมิโนอาร์จินีนไกลซีนแอสปาทิก (TMV-RGD) สามารถวิเคราะห์ได้จากน้ำหนักโมเลกุลของไวรัสซึ่งตรวจวัดด้วยเทคนิค Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) โดยนำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเพปไทด์และพีคของมวลของสารต่อประจุบวกของไอออน (Mass/charge ratio; m/z) ที่เรียงตัวกันเป็น Peptide mass fingerprint (PMF) มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล โดย m คือมวลของสารที่กลายเป็นไอออนบวกในหน่วยดาลตัน และ z คือค่าประจุบวกของไอออน ซึ่งเกิดจากการสูญเสียอิเล็กตรอนและรับโปรตอน (H^+) เข้ามาในโมเลกุลเรียกว่าการ protonation ดังนั้น m/z จึงบ่งบอกมวลโมเลกุลของสารได้ ในกรณีที่ z เท่ากัน ไอออนที่มีค่า m/z สูงคือมีมวลโมเลกุลมาก จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าไอออนที่มี m/z น้อยกว่า ส่วนในกรณีที่มวลเท่ากัน แต่ z ไม่เท่ากันจะทำให้ค่าอัตราส่วน m/z แตกต่างไป โดยไอออนที่มี z มากกว่าทำให้ค่า m/z ต่ำจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าไอออนที่มี z น้อยกว่า [45] (แสดงในภาคผนวก ง รูปที่ 34) จากรูปที่ 25ก แสดงให้เห็นกราฟสเปกตรัมมวลต่อประจุของไวรัสใบต่างยาสูบ TMV-wt ปรากฏพีคที่ตำแหน่ง 17519.99 ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยของ A Klug และคณะ ที่พบว่าสเปกตรัมมวลต่อประจุของไวรัส TMV-wt ปรากฏพีคที่ตำแหน่ง 17534 [39] และเมื่อพิจารณาในรูปที่ 25ข ซึ่งแสดงสเปกตรัมมวลต่อประจุของไวรัสใบต่างยาสูบ TMV-RGD ปรากฏพีคที่ 18163.94 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Andrew Lee และคณะ ที่พบว่าสเปกตรัมของไวรัส TMV-RGD ปรากฏที่ตำแหน่ง 18161 [36] และเมื่อพิจารณาน้ำหนักโมเลกุลของไวรัส TMV-wt และ TMV-RGD (ไวรัส TMV-wt ที่มีการตัดแปรพื้นผิวด้วยลำดับกรดอะมิโน Glycine Alanine Glycine Aspartic Serine Proline Glycine; GRGDSPG) พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของลำดับกรดอะมิโน GRGDSPG มีค่า 644.64 ดาลตัน โดยการคำนวณด้วยโปรแกรม Molecular weight amino sequence calculator [46] จึงสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักโมเลกุลของไวรัส TMV-wt เป็น TMV-RGD จาก 17519.99 เป็น 18163.94 ดาลตัน

ก



ข



รูปที่ 25 กราฟสเปกตรัมมวลต่อประจุของ (ก) ไวรัส TMV-wt และ (ข) ไวรัส TMV-RGD ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) ที่สัดส่วนมวลต่อประจุบวกของไอออนเป็น 1:1

4.3 ผลการดัดแปรพื้นผิวฟิล์มผสมด้วยไวรัส TMV-wt และไวรัส TMV-RGD โดยวิธีการเคลือบและการเชื่อมขวางด้วยสารเคมี

จากผลการทดสอบสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของฟิล์มผสม SF/Gly และฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ปริมาณกลีเซอรอลร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ที่ไม่ผ่านและผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ พบว่าฟิล์มผสมที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ มีโครงสร้างทุดียกมิตที่เป็นระเบียบมากกว่ากรณีที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ จึงส่งผลให้ฟิล์มสามารถคงตัวในน้ำได้มากกว่าฟิล์มผสมที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ ซึ่งความคงตัวในน้ำมีความสำคัญต่อสมบัติทางชีวภาพ เนื่องจากฟิล์มต้องสัมผัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน ดังนั้นฟิล์มผสมที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ จึงมีความเหมาะสมในการนำไปศึกษาสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพ และเพื่อเพิ่มความสามารถในการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ [40] ในงานวิจัยนี้จึงได้เลือกฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ปริมาณกลีเซอรอลร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ มาดัดแปรพื้นผิวฟิล์มด้วยไวรัสใบต่างยาสูบที่ไม่ถูกดัดแปลงพันธุกรรม (TMV-wt) และไวรัสใบต่างยาสูบที่ดัดแปลงพื้นผิวด้วยลำดับกรดอะมิโนอาร์จินิลไกลซิลแอสปาทิก (TMV-RGD) ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยวิธีการเคลือบ (Coating) และวิธีการเชื่อมขวางด้วยสารเคมี (Chemical crosslinking) ซึ่งผลการดัดแปรพื้นผิวฟิล์มผสมด้วยไวรัสทั้งสองวิธี ประเมินได้จากปริมาณไวรัสในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่หลุดออกมาจากฟิล์ม ภายหลังจากแช่ฟิล์มผสมในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยเมื่อเปรียบเทียบวิธีในการดัดแปรพื้นผิวฟิล์มผสมด้วยไวรัสโดยวิธีการเคลือบและการเชื่อมขวาง พบว่าปริมาณของไวรัส TMV-wt และ TMV-RGD ที่หลุดออกมาจากฟิล์มโดยวิธีการเคลือบ มีค่า 1.92 ± 0.03 และ 1.90 ± 0.03 ไมโครกรัม คิดเป็นร้อยละ 96 และ 95 ของปริมาณไวรัสเริ่มต้น ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณของไวรัส TMV-wt และ TMV-RGD ที่หลุดออกจากฟิล์มโดยวิธีการเชื่อมขวางมีปริมาณน้อยกว่า ซึ่งมีค่า 0.08 ± 0.01 และ 0.09 ± 0.01 ไมโครกรัม คิดเป็นร้อยละ 4 และ 4.5 ของปริมาณไวรัสเริ่มต้น ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการดัดแปรพื้นผิวฟิล์มผสมด้วยไวรัสโดยวิธีเชื่อมขวางด้วยสารเคมีสามารถทำให้ไวรัสทั้งสองชนิดคงอยู่บนฟิล์มผสมได้ถึงประมาณร้อยละ 96 ซึ่งมากกว่าวิธีการเคลือบที่มีไวรัสเหลือเพียงประมาณร้อยละ 5 ของปริมาณไวรัสเริ่มต้น

เมื่อพิจารณาอันตรกิริยาทางไฟฟ้าสถิต (Electrostatic interaction) ระหว่างไวรัสใบต่างยาสูบและฟิล์มผสม SF/GA/Gly พบว่า ค่า Isoelectric point ของไวรัสใบต่างยาสูบมีค่าประมาณ 3.5 [60] ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 6.7 ส่งผลให้ไวรัสในสารละลายดังกล่าวมีสภาพประจุเป็นลบ (Negative charge) และค่าศักย์ซีตาของสารละลายผสม SF/GA/Gly มีสภาพประจุรวมเข้าใกล้ศูนย์ ซึ่งได้รายงานไปในหัวข้อ 4.1.1 จึงทำให้ไม่มีอันตรกิริยาทางไฟฟ้าสถิตที่ดึงดูดกันระหว่างไวรัสและฟิล์มผสม การเคลือบไวรัสบนพื้นผิวฟิล์มจึงไม่สามารถทำให้ไวรัสคงอยู่บน

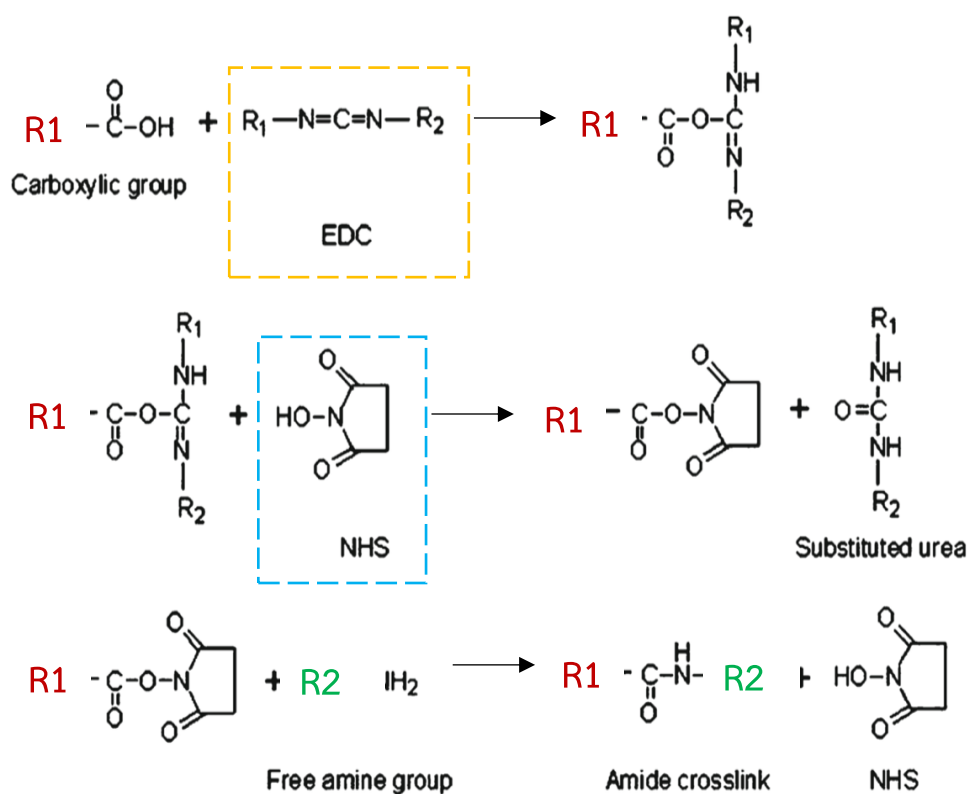
พื้นผิวได้เมื่อสัมผัสกับน้ำหรืออาหารเลี้ยงเซลล์ โดยในงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้รายงานไวรัสไบต่างยาสูบสามารถยึดติดที่พื้นผิวที่มีประจุบวก (Positive charge) ได้ เช่น พื้นผิวที่มีหมู่ Silane (SiH_4) [37] พื้นผิวที่เคลือบทอง [95] พื้นผิวที่เคลือบด้วย Poly-D-Lysine (PDL) [37] จากงานวิจัยข้างต้นจะเห็นว่าไวรัสไบต่างยาสูบสามารถยึดเกาะบนพื้นผิวซึ่งมีประจุบวกได้ทั้งหมด เช่นเดียวกับงานวิจัยของ David W. และคณะ ที่รายงานไวรัสไบต่างยาสูบสามารถยึดติดได้ดีกับวัสดุที่มีประจุบวก และพื้นผิวที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic surface) [96]

ในกรณีการตัดแปรพื้นผิวฟิล์มผสมด้วยไวรัสโดยการเชื่อมขวางด้วยสารเคมี สามารถอธิบายกลไกการเชื่อมขวางในรูปที่ 26 โดย EDC จะทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลิกในไวรัสไบต่างยาสูบ เกิดเป็นสารที่ไม่เสถียร หรือ intermediate ซึ่งคือ O-acylisourea intermediate โดย O-acylisourea intermediate ที่เกิดขึ้นมีความไวต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ดังนั้นเพื่อป้องกันไม่ให้นำกลับมาอยู่ในรูปของหมู่คาร์บอกซิลิกได้อีก จึงจำเป็นต้องเติม NHS เพื่อเพิ่มอัตราการเกิดปฏิกิริยาในการเชื่อมขวางและเพื่อให้มีความเสถียรมากขึ้น โดย NHS จะทำปฏิกิริยากับ O-acylisourea intermediate เกิดเป็น O-acylisourea ester ซึ่งเป็นสารที่มีความเสถียร จากนั้น O-acylisourea ester จะทำปฏิกิริยาต่อเนื่องกับหมู่เอมีนในฟิล์มโปรตีนผสมเกิดเป็นพันธะเพปไทด์ที่มีความเสถียร [70]

เพื่อยืนยันผลเชิงคุณภาพของการตัดแปรพื้นผิวฟิล์มผสมด้วยไวรัสโดยวิธีการเชื่อมขวาง จึงนำฟิล์มผสมที่ถูกตัดแปรพื้นผิวด้วยไวรัสภายหลังการแช่บัพเฟอร์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ไปทดสอบสัณฐานพื้นผิว ด้วยเครื่อง Atomic Force Microscope (AFM) ผลการทดสอบแสดงในรูปที่ 27ก พบว่าพื้นผิวของฟิล์มผสมที่ตัดแปรด้วยไวรัสมีความขรุขระเป็นลักษณะแท่งคล้ายไวรัส โดยในรูปที่ 27ข พบว่าสีที่ปรากฏในรูปที่มีลักษณะเป็นแท่ง มีความเข้มสีอยู่ในช่วงความสูง 15 – 30 นาโนเมตร (เทียบกับแถบสีที่แสดงระยะความต่ำ-สูงของภาพ ที่ 0 – 30 นาโนเมตร) และเมื่อพิจารณาระยะต่ำ – สูงของพื้นผิวฟิล์มโดยการใช้หัวเข็มที่ติดอยู่บนคานกระเดื่องของเครื่อง AFM เคลื่อนที่กวาดไปตามแนวเส้นสีขาวในรูปที่ 27ข และแปรผลออกมาเป็นกราฟในรูปที่ 28 พบว่าความสูงของพื้นผิวในบริเวณดังกล่าวมีค่าประมาณ 15 – 25 นาโนเมตร และมีค่า Root mean square (RMS) เท่ากับ 0.25 ± 0.05 นาโนเมตร ซึ่งความสูงของพื้นผิวดังกล่าวมีค่าใกล้เคียงกับเส้นผ่านศูนย์กลางของไวรัสที่ได้กล่าวไปในหัวข้อ 4.2 ขนาดประมาณ 18 – 20 นาโนเมตร โดยบริเวณที่สูงกว่า (20 นาโนเมตรอาจเกิดจากการซ้อนทับกันของแท่งไวรัสไบต่างยาสูบ

จากผลการตัดแปรพื้นผิวของฟิล์มผสมด้วยไวรัสไบต่างยาสูบทั้งสองชนิดโดยวิธีการเคลือบและการเชื่อมขวางด้วยสารเคมี โดยการแช่ฟิล์มผสมในบัพเฟอร์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าการตัดแปรพื้นผิวฟิล์มผสม SF/GA/Gly ด้วยไวรัสทั้งสองชนิดโดยวิธีการเชื่อมขวางด้วยสารเคมี สามารถช่วยให้ไวรัสยึดเกาะบนฟิล์มผสมได้มากกว่าวิธีการเคลือบ และเพื่อยืนยันผลการเปรียบเทียบวิธีการตัดแปร

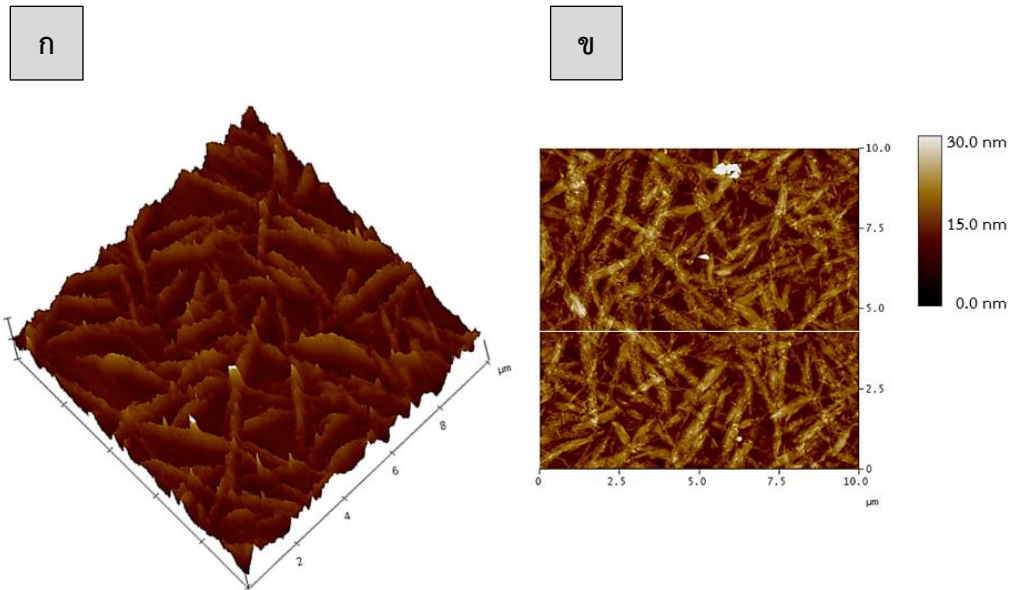
พื้นผิวฟิล์มผสมด้วยไวรัส และการเปรียบเทียบชนิดของไวรัส TMV-wt และ TMV-RGD จึงได้ศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของฟิล์มผสมที่ตัดแปรด้วยไวรัสทั้งสองชนิดโดยวิธีการเคลือบและการเชื่อมขวางด้วยสารเคมีในหัวข้อถัดไป



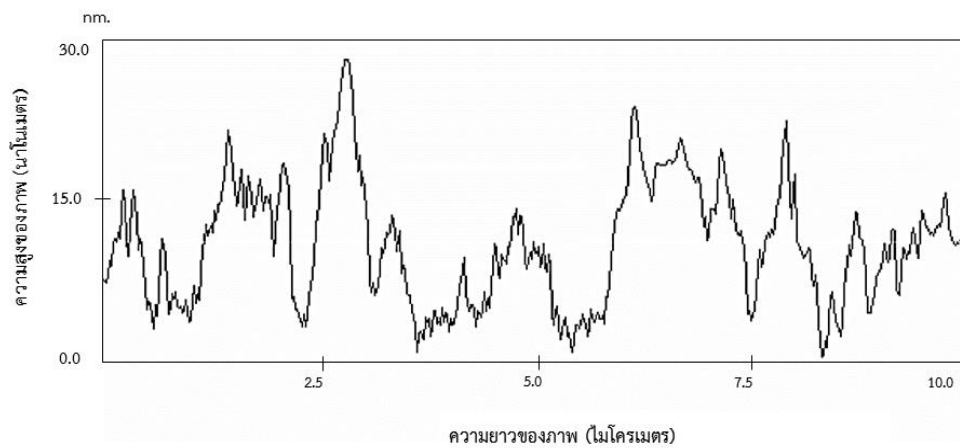
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 26 การเชื่อมขวางทางเคมีของไวรัสไบต่างยาสูบกับฟิล์มผสม SF/GA/Gly ด้วย EDC ร่วมกับ NHS โดยที่ R1 คือ ฟิล์มผสม SF/GA/Gly และ R2 คือไวรัสไบต่างยาสูบ [69]



รูปที่ 27 สัณฐานพื้นผิวฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ตัดแปรด้วยไวรัส TMV-RGD ที่ความเข้มข้น 0.1M โดยวิธีการเชื่อมขวางทางเคมี วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Atomic force microscope (AFM) ก) ภาพสามมิติ ข) ภาพสองมิติ (ระดับความสูงของข้อมูลภาพที่ 30 นาโนเมตร)



รูปที่ 28 การเปลี่ยนแปลงความสูง - ต่ำของพื้นผิวฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ตัดแปรด้วยไวรัส TMV-RGD ที่ความเข้มข้น 0.1 M ด้วยวิธีการเชื่อมขวางทางเคมี จากการกวาดหัวเข็มไปบนพื้นผิวฟิล์มที่บริเวณเส้นสีขาวในภาพ 27ข (ระดับความสูงของข้อมูลภาพที่ 30 นาโนเมตร)

4.4 สมบัติทางชีวภาพของฟิล์มผสมที่ถูกดัดแปรพื้นผิวด้วยไวรัสไบต่างยาสูบที่ไม่ถูกดัดแปลงพันธุกรรม (TMV-wt) และที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมด้วยกรดอะมิโนอาร์จินิลไกลซิลแอสปาติก (TMV-RGD)

การทดสอบสมบัติทางชีวภาพของฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยไวรัสไบต่างยาสูบที่ไม่ถูกดัดแปรพันธุกรรม (TMV-wt) และที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมด้วยลำดับกรดอะมิโนอาร์จินิลไกลซิลแอสปาติก (TMV-RGD) โดยวิธีการเคลือบ (Coating) และวิธีการเชื่อมขวาง (Crosslinking) ด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนังของหนู (เซลล์ L929) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 7 วัน โดยพิจารณาผลการยึดเกาะของเซลล์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และการเจริญเติบโตของเซลล์ ด้วยวิธี DNA assay มีรายละเอียดดังนี้

4.4.1 ผลการยึดเกาะของเซลล์บนฟิล์มผสม

ผลการศึกษาร้อยละการยึดเกาะของเซลล์ L929 บนพื้นผิวต่าง ๆ ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง แสดงในตารางที่ 12 พบว่า เซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนภาชนะเลี้ยงพอลิสไตรีน (TCP) ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมในการทดลอง มีค่าร้อยละการยึดเกาะของเซลล์ ประมาณ 97 ในขณะที่เซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ไม่ได้ดัดแปรพื้นผิว (Unmodified) มีค่าร้อยละการยึดเกาะประมาณ 61 ซึ่งมีความน้อยกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบน TCP อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นเพื่อปรับปรุงสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพของฟิล์มผสม SF/GA/Gly เพื่อให้เซลล์สามารถยึดเกาะได้ดีขึ้น จึงดัดแปรพื้นผิวฟิล์มผสมด้วยไวรัส TMV-wt และ ไวรัส TMV-RGD โดยวิธีการเคลือบ จากการศึกษาพบว่าร้อยละการยึดเกาะของเซลล์บนฟิล์มผสมที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยไวรัส TMV-wt และ TMV-RGD มีค่าประมาณร้อยละ 61 และ 68 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับฟิล์มผสม Unmodified แสดงให้เห็นว่าการดัดแปรพื้นผิวฟิล์มผสมด้วยไวรัสโดยวิธีการเคลือบไม่มีผลต่อการยึดเกาะของเซลล์บนพื้นผิวฟิล์ม จึงได้ใช้วิธีการดัดแปรพื้นผิวฟิล์มผสมด้วยไวรัสโดยการใช้สารเคมี EDC ร่วมกับ NHS ในการเชื่อมขวางระหว่างไวรัสและฟิล์มผสม จากผลการเพาะเลี้ยงเซลล์พบว่า เซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนฟิล์มผสมที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยไวรัส TMV-wt และ TMV-RGD โดยวิธีการเชื่อมขวางด้วยสารเคมี มีค่าร้อยละการยึดเกาะของเซลล์ ประมาณ 87 และ 99 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเทียบกับฟิล์มผสม Unmodified แล้วพบว่าร้อยละการยึดเกาะของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนฟิล์มผสมที่ดัดแปรด้วยไวรัสทั้งสองชนิดโดยวิธีการเชื่อมขวางด้วยสารเคมี สูงกว่าบนฟิล์มผสม Unmodified อย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากการดัดแปรไวรัสบนฟิล์มผสม ทำให้พื้นผิวของฟิล์มผสมมีความขรุขระมากขึ้น ซึ่งช่วยส่งเสริมให้เซลล์สามารถยึดเกาะบนพื้นผิวได้ดีขึ้นเมื่อเทียบกับฟิล์มผสม Unmodified ซึ่งมีพื้นผิวเรียบ โดยลักษณะความขรุขระของพื้นผิว (Surface topography) เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อพฤติกรรมการยึดเกาะของเซลล์ (Cell adhesion) [97] นอกจากนี้เมื่อพิจารณาวิธีในการดัดแปรพื้นผิว

ฟิล์มผสมด้วยไวรัสโดยวิธีการเคลือบและการเชื่อมขวางที่มีผลต่อการยึดเกาะของเซลล์ พบว่าเซลล์สามารถยึดเกาะบนฟิล์มผสมที่ถูกต้องแปรพื้นผิวด้วยไวรัสโดยวิธีการเชื่อมขวางได้ดีกว่าวิธีการเคลือบ เนื่องจากการตัดแปรโดยวิธีการเคลือบไม่มีอันตรกิริยาทางไฟฟ้าสถิตที่ดึงดูดระหว่างไวรัสและฟิล์มผสม จึงต้องใช้ EDC/NHS ในการเชื่อมขวางระหว่างไวรัสและฟิล์มผสม และเมื่อพิจารณาสัญญาณของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนฟิล์มผสม เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (รูปที่ 29) พบว่า เซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนฟิล์มผสมในกลุ่มที่ตัดแปรโดยวิธีการเคลือบจะมีการแผ่ได้น้อยโดยเซลล์มีรูปร่างค่อนข้างกลม ในขณะที่เซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนฟิล์มผสมในกลุ่มที่ตัดแปรโดยการเชื่อมขวางจะมีลักษณะแผ่อย่างชัดเจน

เมื่อพิจารณาชนิดของฟิล์มผสมที่ตัดแปรพื้นผิวด้วยไวรัส TMV-wt และไวรัส TMV-RGD โดยวิธีการเชื่อมขวาง ที่มีผลต่อการยึดเกาะของเซลล์ พบว่าร้อยละการยึดเกาะของเซลล์บนฟิล์มผสมที่ตัดแปรพื้นผิวด้วยไวรัส TMV-RGD มากกว่าบนฟิล์มผสมที่ตัดแปรด้วยไวรัส TMV-wt เนื่องจากไวรัส TMV-RGD มีลำดับกรดอะมิโนอาร์จินีน (Arginine) ไกลซีน (Glycine) และกรดแอสปาทิก (Aspartic acid) หรือ RGD (Arg-Gly-Asp) เรียงตัวกัน ซึ่งอินทิกริน (Integrin) ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์จะจับกับลำดับกรดอะมิโน RGD ที่อยู่บนพื้นผิวของไวรัส TMV-RGD จึงส่งผลให้เซลล์สามารถยึดเกาะที่พื้นผิวของฟิล์มผสมที่ตัดแปรด้วยไวรัส TMV-RGD ได้ดีขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 30 และเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนสภาพเพาะเลี้ยงพอลิ สเตลีน (TCP) ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมในการทดลอง ที่มีร้อยละการยึดเกาะของเซลล์ประมาณ 97 ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับฟิล์มผสมที่ตัดแปรพื้นผิวด้วยไวรัส TMV-RGD โดยวิธีการเชื่อมขวาง แสดงให้เห็นว่าฟิล์มผสมที่ตัดแปรด้วยไวรัส TMV-RGD สนับสนุนให้เซลล์ยึดเกาะบนพื้นผิวฟิล์มผสมได้ดี สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kamolrat M. และคณะ ที่ได้ศึกษาอิทธิพลของพื้นผิวที่แตกต่างกันที่มีผลต่อเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคมอล (Mesenchymal stem cells) โดยเลี้ยงเซลล์บนพื้นผิว PVA (ตัวควบคุม) และ PVA ที่ตัดแปรพื้นผิวด้วยไวรัส TMV (PVA-TMV) และ PVA ที่ตัดแปรพื้นผิวด้วยไวรัส TMV-RGD (PVA-TMV/RGD) จากการศึกษาพบว่าเซลล์ที่เลี้ยงบนพื้นผิว PVA ที่มีลักษณะเรียบ ไม่สามารถแผ่ขยายได้ ในขณะที่เซลล์ที่เลี้ยงบน PVA-TMV/RGD มีการแผ่ขยายมากกว่าเซลล์บน PVA ผู้วิจัยจึงสรุปว่า ลักษณะพื้นผิวที่มีความขรุขระ และการตัดแปรพื้นผิวด้วยลำดับกรดอะมิโน RGD เป็นปัจจัยสำคัญที่สามารถทำให้เซลล์ยึดเกาะได้ดี [98]

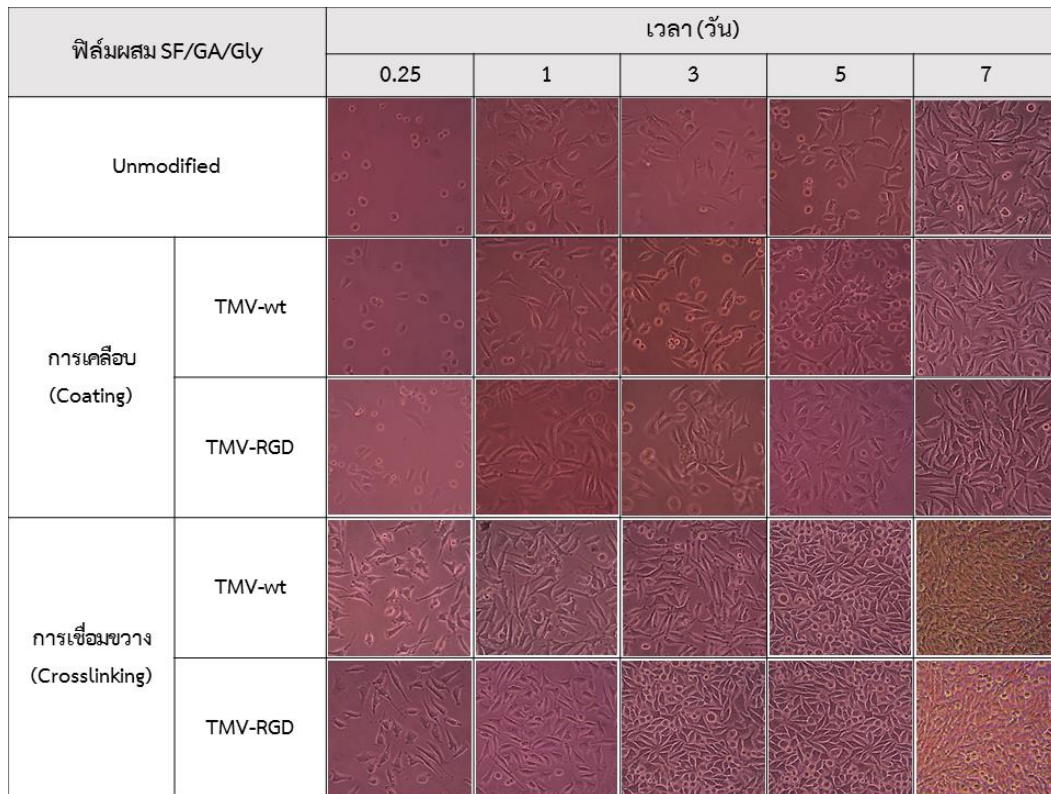
ตารางที่ 12 ร้อยละการยึดเกาะ (Percentage of attachment) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate, μ) และระยะเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (Population doubling time, PDT) ของเซลล์ L929 บนฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ไม่ถูกดัดแปรพื้นผิว (Unmodified) และฟิล์มผสมถูกดัดแปรพื้นผิวด้วยไวรัส TMV-wt และ TMV-RGD โดยวิธีการเคลือบและการเชื่อมขวาง เปรียบเทียบกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนสภาพเพาะเลี้ยงพอลิสไตรีน (TCP)

ฟิล์มผสม SF/GA/Gly		ร้อยละการยึดเกาะ	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ($\times 10^{-2} \mu$, ชม. ⁻¹)	ระยะเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT, ชม.)
TCP		96.87 \pm 0.01 ^c	3.70 \pm 0.10 ^e	18.49 \pm 0.24 ^j
Unmodified		61.45 \pm 0.02 ^a	2.30 \pm 0.20 ^d	29.89 \pm 1.09 ^f
การเคลือบ (Coating)	TMV-wt	61.62 \pm 0.03 ^a	2.50 \pm 0.20 ^d	27.72 \pm 2.39 ^f
	TMV-RGD	67.68 \pm 0.02 ^a	2.40 \pm 0.20 ^d	28.88 \pm 2.98 ^f
การเชื่อมขวาง (Crosslink)	TMV-wt	87.18 \pm 0.01 ^b	4.00 \pm 0.10 ^e	17.22 \pm 0.27 ^j
	TMV-RGD	99.16 \pm 0.01 ^c	4.50 \pm 0.10 ^e	15.39 \pm 0.29 ^k

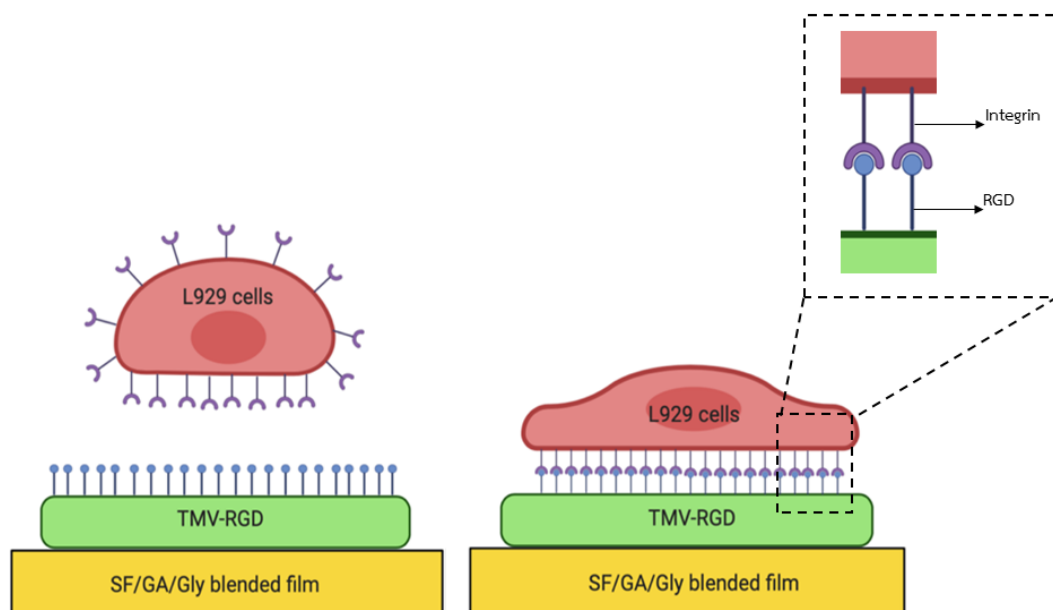
(a - c แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของร้อยละการยึดเกาะของเซลล์ L929 ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 6 ชั่วโมง)

(d - e แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ L929)

(f - k แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของระยะเวลาการแบ่งตัวทวีคูณของเซลล์ L929)



รูปที่ 29 รูปร่างของเซลล์ผิวหนังหนู (L929) เมื่อเพาะเลี้ยงบนฟิล์มผสมที่ไม่ได้ดัดแปร (Unmodified) และดัดแปรด้วยไวรัส TMV-wt และ TMV-RGD โดยวิธีการเคลือบ (Coating) และวิธีการเชื่อมขวาง (Crosslinking) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กำลังขยาย (20x)



รูปที่ 30 อันตรกิริยาระหว่างอินทิกรินบนเยื่อหุ้มเซลล์กับลำดับกรดอะมิโน RGD บนไวรัสใบต่างยาสูบ ที่ดัดแปรบนฟิล์มผสม SF/GA/Gly

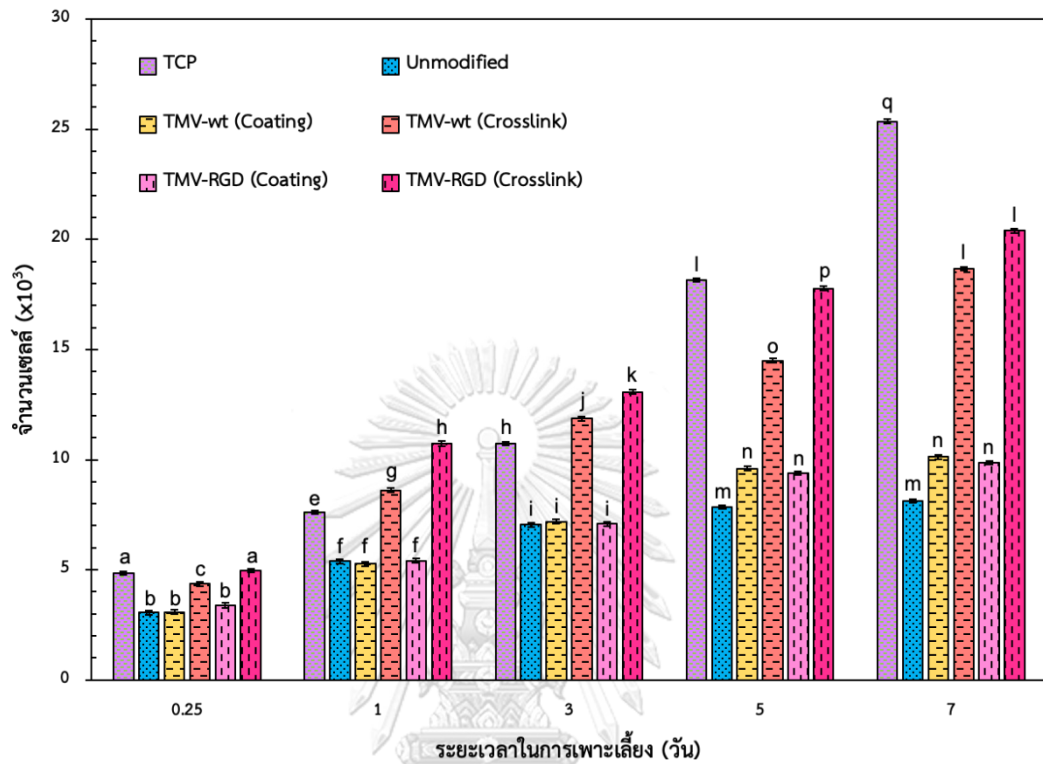
4.4.2 ผลการเจริญเติบโตของเซลล์บนฟิล์มผสม

การศึกษาผลของการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังหนู (เซลล์ L929) ภายหลังการเพาะเลี้ยงบนฟิล์มผสมที่ดัดแปรไวรัส TMV-wt และไวรัส TMV-RGD โดยวิธีการเคลือบ (Coating) และวิธีการเชื่อมขวาง (Crosslinking) เป็นเวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน (แสดงดังรูปที่ 31) พบว่า จำนวนเซลล์ที่เลี้ยงบน TCP ที่ใช้เป็นตัวควบคุมในการทดลองนี้ มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง เนื่องจากพื้นผิวของ TCP มีการทรึงด้วยออกซิเจนพลาสมา ส่งผลให้พื้นผิวมีสภาพประจุเป็นลบเล็กน้อย อีกทั้งพื้นผิวมีความแข็งมากกว่าผิวฟิล์มโพรตีนผสม จึงทำให้เซลล์สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตได้ดี และเมื่อพิจารณาจำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนฟิล์มผสมที่ไม่ได้ดัดแปรไวรัส (Unmodified) และฟิล์มผสมที่ดัดแปรด้วยไวรัส TMV-wt และ TMV-RGD โดยวิธีการเคลือบ (Coating) เป็นเวลา 3 วัน พบว่ามีค่าประมาณ 7,045, 7,186 และ 7,087 เซลล์ ตามลำดับ (ความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น 5,000 เซลล์/หลุม) ซึ่งจำนวนเซลล์ทั้งสามกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 5 และ 7 วัน พบว่าเซลล์ L929 ที่เลี้ยงบนฟิล์มผสมที่ดัดแปรไวรัสทั้งสองชนิดมีจำนวนเซลล์มากกว่าฟิล์มผสมที่ไม่ดัดแปรด้วยไวรัสเล็กน้อย ในขณะที่จำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนฟิล์มผสมที่ดัดแปรด้วยไวรัสทั้งสองชนิดโดยการเชื่อมขวาง มีมากกว่าที่เลี้ยงบนฟิล์มผสมที่ถูกดัดแปรพื้นผิวด้วยไวรัสทั้งสองชนิดโดยวิธีการเคลือบอย่างมีนัยสำคัญ จึงสามารถสรุปได้ว่าการดัดแปรพื้นผิวฟิล์มผสมด้วยไวรัสโดยวิธีการเชื่อมขวางด้วยสารเคมีมีประสิทธิภาพที่สามารถทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดีกว่าการดัดแปรพื้นผิวฟิล์มผสมด้วยไวรัสโดยวิธีการเคลือบ

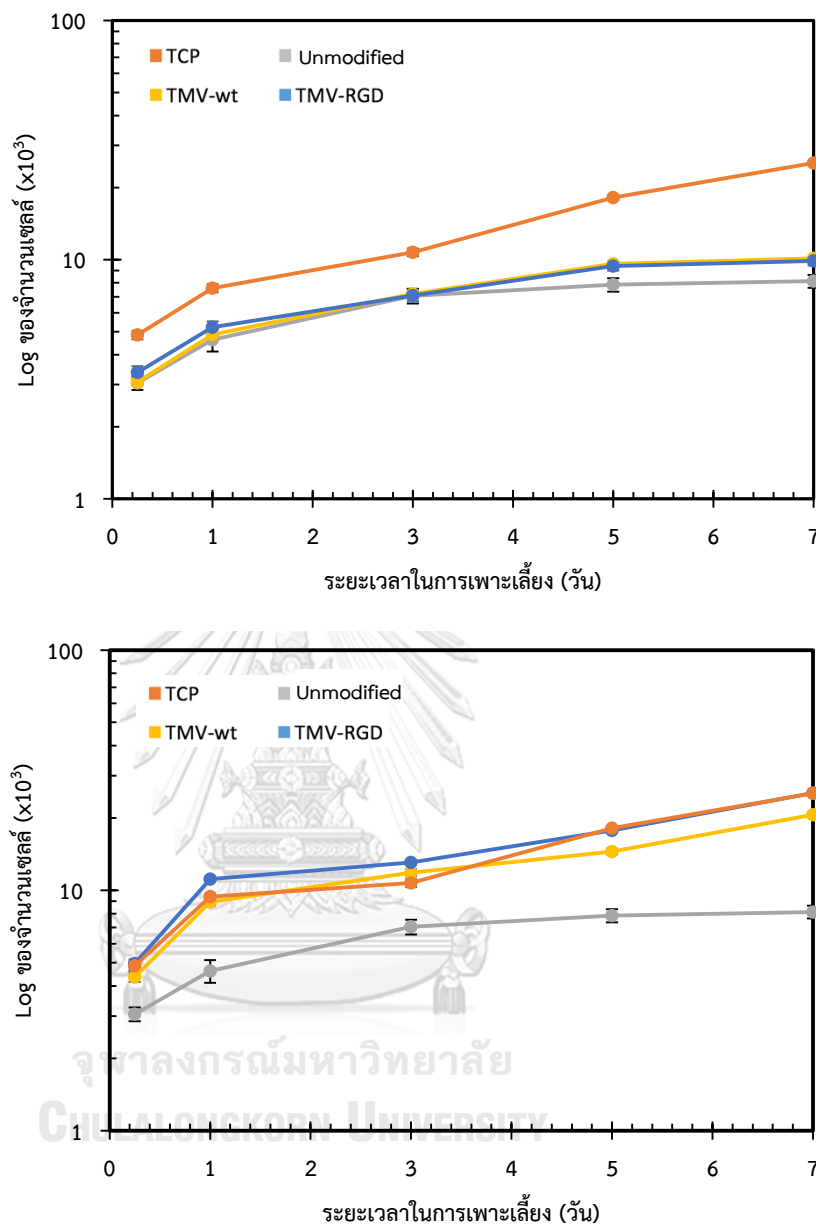
เมื่อพิจารณาชนิดของฟิล์มผสมที่ถูกดัดแปรพื้นผิวฟิล์มผสมด้วยไวรัส TMV-wt และ TMV-RGD โดยการเชื่อมขวาง ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ พบว่าจำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนฟิล์มผสมที่ดัดแปรด้วยไวรัส TMV-RGD มีปริมาณมากกว่ากรณีฟิล์มผสมที่ดัดแปรด้วยไวรัส TMV-wt อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าเซลล์ L929 สามารถเจริญเติบโตบนฟิล์มผสมที่ดัดแปรด้วยไวรัส TMV-RGD ได้ดีกว่าฟิล์มที่ดัดแปรด้วยไวรัส TMV-wt เนื่องจากลำดับกรดอะมิโน RGD ที่ถูกดัดแปรบนพื้นผิวไวรัส TMV-RGD มีผลช่วยเหนี่ยวนำให้เซลล์สามารถยึดเกาะ และเจริญเติบโตได้มากขึ้น โดยในงานวิจัยของ Pongkwan S. และคณะได้ศึกษาการดัดแปรโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยไวรัส TMV-wt และไวรัส TMV-RGD โดยการเคลือบไวรัสทั้งสองชนิดบน 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) จากการศึกษาพบว่าจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะและเจริญเติบโตบนพื้นผิวที่ถูกดัดแปรด้วยไวรัส TMV-RGD มีปริมาณมากกว่าพื้นผิวที่ถูกดัดแปรด้วยไวรัส TMV-wt [39] เช่นเดียวกับรายงานวิจัยของ Andrew Lee และคณะที่พบว่าเซลล์ Chinese hamster ovary (CHO cells) สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตบน

พื้นผิว APTES ที่ถูกดัดแปรด้วยไวรัส TMV-RGD ได้ดีกว่าพื้นผิวที่ถูกดัดแปรด้วยไวรัส TMV-wt [37]

จากกราฟการเติบโตของเซลล์ L929 ที่เพาะเลี้ยงบนฟิล์มผสมที่ดัดแปรพื้นผิวด้วยไวรัส โดยวิธีการเคลือบและวิธีการเชื่อมขวาง (รูปที่ 32) พบว่า กราฟดังกล่าวไม่ปรากฏช่วง Lag phase ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์อยู่ในระยะพักตัวและปรับตัวเพื่อให้เข้ากับสภาวะใหม่ ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ที่ Lag phase อยู่ในช่วงต่ำกว่า 6 ชั่วโมง จากนั้นเซลล์จะเข้าสู่ช่วงระยะแบ่งตัว (Exponential phase หรือ Log phase) เป็นระยะที่เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตเร็วที่สุด ซึ่งกราฟจะมีค่าความชันสูงที่สุด โดยจากกราฟในรูปที่ 31 พบว่าในช่วงระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ 6 ถึง 24 ชั่วโมง เป็นช่วงที่เซลล์มีการเจริญเติบโตเร็วที่สุด อีกทั้งเซลล์ L929 มีระยะเวลาในการแบ่งตัวทวีคูณ (Population doubling time, PDT) ประมาณ 18 ชั่วโมง [71] ดังนั้นจึงได้เลือกช่วงระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเซลล์ 6 ถึง 24 ชั่วโมง เพื่อคำนวณการเจริญเติบโตของเซลล์ L929 ดังแสดงในตารางที่ 12 โดยพบว่าเวลาที่ใช้ในการแบ่งตัวทวีคูณของเซลล์ที่เลี้ยงบนฟิล์มผสมที่ไม่ดัดแปรและดัดแปรไวรัสทั้งสองชนิดโดยการเคลือบมีค่าอยู่ในช่วง 28 – 30 ชั่วโมง ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ฟิล์มผสมที่ไม่ดัดแปรและดัดแปรพื้นผิวด้วยไวรัสโดยการเชื่อมขวางมีระยะเวลาในการแบ่งตัวทวีคูณน้อยกว่าในกลุ่มที่ดัดแปรโดยการเคลือบอย่างมีนัยสำคัญ โดยเมื่อพิจารณาระยะเวลาในการแบ่งตัวทวีคูณของฟิล์มทั้งสองชนิดในกรณีที่ดัดแปรโดยการเชื่อมขวาง พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนฟิล์มที่ดัดแปรด้วยไวรัส TMV-RGD มีระยะเวลาในการแบ่งตัวทวีคูณ 15 ชั่วโมง ซึ่งน้อยกว่าฟิล์มที่ดัดแปรด้วยไวรัส TMV-wt ซึ่งมีค่าประมาณ 17 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าเซลล์ L929 สามารถเจริญเติบโตบนฟิล์มผสมที่ดัดแปรด้วยไวรัส TMV-RGD ได้ดีกว่าฟิล์มที่ดัดแปรด้วยไวรัส TMV-wt เนื่องจากลำดับกรดอะมิโน RGD บนพื้นผิวไวรัส TMV-RGD ช่วยเหนี่ยวนำให้เซลล์สามารถยึดเกาะ และเจริญเติบโตได้มากขึ้นนั่นเอง



รูปที่ 31 ปริมาณเซลล์ L929 ที่ถูกเพาะเลี้ยงบน ภาชนะเพาะเลี้ยงพอลิโอสไทีน (TCP) ฟิล์มผสมที่ไม่ถูกดัดแปร (Unmodified) และถูกดัดแปรด้วยไวรัส TMV-wt และ TMV-RGD โดยวิธีการเคลือบ (Coating) และวิธีการเชื่อมขวาง (Crosslinking) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง 1, 3, 5 และ 7 วัน ในสภาวะบรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ ความเข้มข้น 5% (a – q แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$)



รูปที่ 32 กราฟการเติบโตของเซลล์ L929 ที่เพาะเลี้ยงบนฟิล์มผสมที่ดัดแปรด้วยไวรัสโดย ก) วิธีการเคลือบ ข) วิธีการเชื่อมขวาง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง, 1, 3, 5 และ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะบรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5%

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาฟิล์มไฟโบรอินไหมไทย (SF100) และฟิล์มผสมที่มีอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยต่อเจลาติน 80:20 (SF/GA) ให้มีความยืดหยุ่นเพิ่มขึ้นโดยการเติมเจลาติน และกลีเซอรอลที่ปริมาณต่าง ๆ (ร้อยละ 5 10 20 และ 30 โดยน้ำหนัก) และพัฒนาให้ฟิล์มมีความคงตัวได้ดี โดยผ่านกระบวนการอบนึ่งด้วยไอน้ำ อีกทั้งตัดแปรรูปผิวฟิล์มผสมด้วยไวรัสใบต่างยาสูบที่ไม่ถูกตัดแปลงพันธุกรรม (TMV-wt) และถูกตัดแปลงพันธุกรรมด้วยลำดับกรดอะมิโนอาร์จินินไกลซิลแลสเปดิก (TMV-RGD) เพื่อช่วยเพิ่มการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังหนู (L929) บนฟิล์ม

ผลการศึกษาความแข็งแรงของฟิล์มผสมในการทนต่อแรงดึงยืด สรุปได้ว่า ฟิล์มผสมมีความยืดหยุ่นเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเติมกลีเซอรอลร้อยละ โดยน้ำหนัก สอดคล้อง 20 จนถึงร้อยละ 5 กับค่าอุณหภูมิเปลี่ยนแปลงสภาพแก้ว (T_g) ที่ลดต่ำลงตามปริมาณกลีเซอรอลที่เพิ่มขึ้น เป็นผลมาจากโมเลกุลของกลีเซอรอลที่ทำหน้าที่เป็นสารเสริมสภาพพลาสติก แทรกตัวระหว่างสายโซ่โปรตีนไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน จึงส่งผลกระทบต่อการจัดเรียงสายโซ่โปรตีนที่เป็นระเบียบ ทำให้โมเลกุลของสายโซ่โปรตีนเคลื่อนที่เป็นอิสระมากขึ้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาณกลีเซอรอลเป็นร้อยละ โดย 30 น้ำหนัก พบว่าความยืดหยุ่นไม่แตกต่างจากฟิล์มผสมที่มีปริมาณกลีเซอรอลร้อยละ โดยน้ำหนัก 20 ดังนั้นปริมาณกลีเซอรอลร้อยละ 20 โดยน้ำหนักน่าจะเป็นปริมาณสูงสุดที่สามารถแทรกตัวระหว่างสายโซ่โมเลกุลของโปรตีนในฟิล์มผสม เมื่อนำฟิล์มผสม SF/Gly และฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่มีปริมาณกลีเซอรอลร้อยละ 20 มาผ่านกระบวนการอบนึ่งด้วยไอน้ำ พบว่าฟิล์มผสมที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำมีปริมาณโครงสร้างทุติยภูมิแบบแผ่นพลีทเบต้าซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความเป็นระเบียบเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ในขณะที่โครงสร้างแบบเกลียวสุมซึ่งเป็นโครงสร้างที่ไม่เป็นระเบียบมีปริมาณลดลง แสดงให้เห็นว่าการอบนึ่งด้วยไอน้ำส่งผลต่อโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน โดยการชักนำให้สายโซ่โปรตีนเกิดการเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบมากขึ้น และพบว่าการเติมเจลาตินในฟิล์มผสมส่งผลให้โครงสร้างแผ่นพลีทเบต้ามีปริมาณเพิ่มขึ้น และโครงสร้างเกลียวสุมมีปริมาณลดลง แสดงให้เห็นว่าการอบนึ่งด้วยไอน้ำและการเติมเจลาตินในฟิล์มผสมสามารถชักนำโครงสร้างทุติยภูมิของไฟโบรอินไหมไทยให้มีความเป็นระเบียบมากขึ้น ส่งผลให้ฟิล์มผสมที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำและมีเจลาตินมีความคงตัวในสารละลายได้ดีกว่ากรณีที่ไม่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำและไม่มีเจลาติน

เพื่อพัฒนาฟิล์มผสมให้มีสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพ จึงตัดแปรรูปผิวของฟิล์มผสมด้วยไวรัสใบต่างยาสูบที่ไม่ถูกตัดแปลงพันธุกรรม (TMV-wt) และถูกตัดแปลงพันธุกรรมด้วยลำดับ

กรดอะมิโนอาร์จินีนไกลซิลแอสปาทิก (TMV-RGD) โดยวิธีการเคลือบและการเชื่อมขวางด้วยสารเคมี EDC/NHS ผลการประเมินความสำเร็จในการตัดแปรพื้นผิวฟิล์มผสมด้วยไวรัสทั้งสองวิธี พบว่าวิธีการเชื่อมขวางด้วยสารเคมีมีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีการเคลือบ เนื่องจากวิธีการเคลือบฟิล์มผสมด้วยไวรัสไม่มีอันตรกิริยาทางไฟฟ้าสถิตที่ดึงดูดระหว่างกัน

ผลการศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของฟิล์มผสม SF/GA/Gly โดยการศึกษาการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังของหนู (L929) ที่เพาะเลี้ยงบนฟิล์มผสมที่ตัดแปรพื้นผิวด้วยไวรัสใบต่างยาสูบ TMV-wt และ TMV-RGD พบว่าเซลล์ L929 สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตบนพื้นผิวฟิล์มผสมที่ถูกตัดแปรด้วยไวรัสใบต่างยาสูบทั้งสองชนิดได้มากกว่าฟิล์มผสมที่ไม่ได้ตัดแปรด้วยไวรัสใบต่างยาสูบ (Unmodified) อย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากการตัดแปรไวรัสบนฟิล์มผสม ช่วยทำให้พื้นผิวของฟิล์มผสมมีความขรุขระมากขึ้น ซึ่งช่วยส่งเสริมให้เซลล์สามารถยึดเกาะบนพื้นผิวได้ดีขึ้นเมื่อเทียบกับฟิล์มผสมที่ไม่ตัดแปรพื้นผิวด้วยไวรัส ซึ่งมีพื้นผิวเรียบ โดยลักษณะความขรุขระของพื้นผิวเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อพฤติกรรมการยึดเกาะของเซลล์ และเมื่อวิเคราะห์ชนิดของฟิล์มผสมที่ตัดแปรพื้นผิวด้วยไวรัส TMV-wt และไวรัส TMV-RGD พบว่าเซลล์ L929 สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตบนฟิล์มผสมที่ตัดแปรพื้นผิวด้วยไวรัส TMV-RGD ได้มากกว่าฟิล์มผสมที่ตัดแปรพื้นผิวด้วยไวรัส TMV-wt อย่างมีนัยสำคัญเนื่องจากไวรัส TMV-RGD มีลำดับกรดอะมิโนอาร์จินีน ไกลซีน และกรดแอสปาทิก หรือ RGD ซึ่งอินทิกริน (Integrin) ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์จะจับกับลำดับกรดอะมิโน RGD ที่อยู่บนพื้นผิวของไวรัส TMV-RGD จึงส่งผลให้เซลล์สามารถยึดเกาะพื้นผิวของฟิล์มผสมที่ตัดแปรด้วยไวรัส TMV-RGD ได้ดีขึ้น

จากผลการวิจัยสรุปได้ว่าฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ปริมาณกลีเซอรอลร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ที่ผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ และตัดแปรพื้นผิวฟิล์มผสมด้วยไวรัส TMV-RGD โดยวิธีการเชื่อมขวางด้วย EDC/NHS เป็นฟิล์มผสมที่มีสมบัติยืดหยุ่นสูง มีความคงตัวได้ดี อีกทั้งยังช่วยสนับสนุนการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ จึงมีความเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ถึงแม้ว่ามีงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่รายงานว่าการใช้ไวรัสใบต่างยาสูบมีความปลอดภัย และสนับสนุนการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์สัตว์มีกระดูกสันหลัง [32] แต่เนื่องจากโครงสร้างของไวรัสใบต่างยาสูบ ประกอบด้วยแกนกลางที่เป็นกรดนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นสารพันธุกรรม RNA และมีโปรตีน 2130 หน่วยย่อย หุ้มล้อมรอบสายพันธุกรรม จึงอาจมีโอกาที่สายพันธุกรรมของไวรัสจะเกิดการกลายพันธุ์ได้ [33] ดังนั้นเพื่อป้องกันโอกาสในการกลายพันธุ์ของสายพันธุกรรมในการประยุกต์ใช้งานในทางการแพทย์ จึงอาจทำลายสารพันธุกรรม RNA ของไวรัส และใช้เฉพาะลำดับกรดอะมิโน RGD บนโปรตีนแต่ละหน่วยย่อย [34]

2. ควรนำไปทดสอบต่อในสัตว์ทดลองเพื่อศึกษากระบวนการสร้างใหม่ของเนื้อเยื่อ



บรรณานุกรม

1. Murphy, C.M., et al., *Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad*. Eur Cell Mater, 2013. **26**: p. 120-32.
2. Langer, R. and J. Vacanti, *Advances in tissue engineering*. Journal of Pediatric Surgery, 2016. **51**(1): p. 8-12.
3. Zurina, I.M., et al., *Tissue engineering using a combined cell sheet technology and scaffolding approach*. Acta Biomaterialia, 2020.
4. Talikowska, M., X. Fu, and G. Lisak, *Application of conducting polymers to wound care and skin tissue engineering: A review*. Biosensors and Bioelectronics, 2019. **135**: p. 50-63.
5. Srivastava, A., et al., *Use of porcine acellular dermal matrix as a dermal substitute in rats*. Annals of surgery, 2001. **233**(3): p. 400-408.
6. Özkaya, Ö., et al., *Comparative analysis of the nail xenografts with cartilage autografts in eyelid reconstruction*. J Craniofac Surg, 2012. **23**(4): p. 1028-31.
7. Jin, K., et al., *Poly(lactic acid) based biocomposite films reinforced with silanized nanocrystalline cellulose*. International Journal of Biological Macromolecules, 2020. **162**: p. 1109-1117.
8. Shirazi, R.N., et al., *Nanomechanical properties of poly(lactic-co-glycolic) acid film during degradation*. Acta Biomaterialia, 2014. **10**(11): p. 4695-4703.
9. Zhou, L., et al., *Grafting polycaprolactone diol onto cellulose nanocrystals via click chemistry: Enhancing thermal stability and hydrophobic property*. Carbohydrate Polymers, 2018. **189**: p. 331-341.
10. Qi, Y., et al., *A Review of Structure Construction of Silk Fibroin Biomaterials from Single Structures to Multi-Level Structures*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(3).
11. Gomez-Guillen, M.C., et al., *Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review*. Food Hydrocolloids, 2011. **25**(8): p. 1813-1827.
12. Li, X., et al., *Gelatin films incorporated with thymol nanoemulsions: Physical properties and antimicrobial activities*. International Journal of Biological

- Macromolecules, 2020. **150**: p. 161-168.
13. Wang, D.G., et al., *Properties of HA-based composite films fabricated by pulsed laser deposition with an in-situ heat treatment*. Surface and Coatings Technology, 2020. **394**: p. 125863.
 14. Fundo, J.F., et al., *Molecular mobility, composition and structure analysis in glycerol plasticised chitosan films*. Food Chemistry, 2014. **144**: p. 2-8.
 15. Bao, D., et al., *Preparation and characterization of double crosslinked hydrogel films from carboxymethylchitosan and carboxymethylcellulose*. Carbohydr Polym, 2014. **110**: p. 113-20.
 16. Goodarzi, H., et al., *Preparation and in vitro characterization of cross-linked collagen–gelatin hydrogel using EDC/NHS for corneal tissue engineering applications*. International Journal of Biological Macromolecules, 2019. **126**: p. 620-632.
 17. Liu, Y., L. Ren, and Y. Wang, *Crosslinked collagen–gelatin–hyaluronic acid biomimetic film for cornea tissue engineering applications*. Materials Science and Engineering: C, 2013. **33**(1): p. 196-201.
 18. Acharya, C., S.K. Ghosh, and S.C. Kundu, *Silk fibroin protein from mulberry and non-mulberry silkworms: cytotoxicity, biocompatibility and kinetics of L929 murine fibroblast adhesion*. J Mater Sci Mater Med, 2008. **19**(8): p. 2827-36.
 19. Nguyen, T.P., et al., *Silk Fibroin-Based Biomaterials for Biomedical Applications: A Review*. Polymers, 2019. **11**(12): p. 1933.
 20. Kundu, B., et al., *Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations*. Adv Drug Deliv Rev, 2013. **65**(4): p. 457-70.
 21. Hu, X., D. Kaplan, and P. Cebe, *Effect of water on the thermal properties of silk fibroin*. Thermochimica Acta, 2007. **461**(1-2): p. 137-144.
 22. Farokhi, M., et al., *Functionalized silk fibroin nanofibers as drug carriers: Advantages and challenges*. Journal of Controlled Release, 2020. **321**: p. 324-347.
 23. Farokhi, M., et al., *Overview of Silk Fibroin Use in Wound Dressings*. Trends in Biotechnology, 2018. **36**(9): p. 907-922.
 24. Data Research Analyst, W.c. *Glycerol: Properties, Production and Uses*. Available

from: <https://www.worldofchemicals.com/607/chemistry-articles/glycerol-properties-production-and-uses.html>.

25. Kaewprasit, K., et al., *Physico-chemical properties and in vitro response of silk fibroin from various domestic races*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2014. **102**(8): p. 1639-47.
26. Amornsudthiwat, P., et al., *Improvement of early cell adhesion on Thai silk fibroin surface by low energy plasma*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2013. **111**: p. 579-586.
27. Yang, L., et al., *Gelatin modified ultrathin silk fibroin films for enhanced proliferation of cells*. Biomed Mater, 2015. **10**(2): p. 025003.
28. Lawrence, B.D., et al., *Effect of hydration on silk film material properties*. Macromol Biosci, 2010. **10**(4): p. 393-403.
29. Mandal, B.B., J.K. Mann, and S.C. Kundu, *Silk fibroin/gelatin multilayered films as a model system for controlled drug release*. Eur J Pharm Sci, 2009. **37**(2): p. 160-71.
30. Moisenovich, M.M., et al., *Composite scaffolds containing silk fibroin, gelatin, and hydroxyapatite for bone tissue regeneration and 3D cell culturing*. Acta Naturae, 2014. **6**(20): p. 96-101.
31. Okhawilai, M., et al., *Preparation of Thai silk fibroin/gelatin electrospun fiber mats for controlled release applications*. International Journal of Biological Macromolecules, 2010. **46**(5): p. 544-550.
32. Ratanavaraporn, J., S. Kanokpanont, and S. Damrongsakkul, *The development of injectable gelatin/silk fibroin microspheres for the dual delivery of curcumin and piperine*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2014. **25**(2): p. 401-410.
33. Lee, H., et al., *Effect of gelatin on dimensional stability of silk fibroin hydrogel structures fabricated by digital light processing 3D printing*. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2020. **89**: p. 119-127.
34. van den Bosch, E. and C. Gielens, *Gelatin degradation at elevated temperature*. International Journal of Biological Macromolecules, 2003. **32**(3-5): p. 129-138.
35. Taddei, P., et al., *Silk fibroin/gelatin blend films crosslinked with enzymes for*

- biomedical applications*. *Macromol Biosci*, 2013. **13**(11): p. 1492-510.
36. Das, S., et al., *Bioprintable, cell-laden silk fibroin–gelatin hydrogel supporting multilineage differentiation of stem cells for fabrication of three-dimensional tissue constructs*. *Acta Biomaterialia*, 2015. **11**: p. 233-246.
37. Lee, L.A., et al., *Mutant plant viruses with cell binding motifs provide differential adhesion strengths and morphologies*. *Biomacromolecules*, 2012. **13**(2): p. 422-31.
38. Meinel, L., et al., *Engineering bone-like tissue in vitro using human bone marrow stem cells and silk scaffolds*. *J Biomed Mater Res A*, 2004. **71**(1): p. 25-34.
39. Sitasuwan, P., et al., *RGD-conjugated rod-like viral nanoparticles on 2D scaffold improve bone differentiation of mesenchymal stem cells*. *Front Chem*, 2014. **2**: p. 31.
40. Tanaka, K., S. Inoue, and S. Mizuno, *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*, 1999. **29**: p. 269-276.
41. <[Silk_Fibroin_Sericin_Amino_acids.pdf](#)>.
42. Gil, E.S., et al., *Impact of sterilization on the enzymatic degradation and mechanical properties of silk biomaterials*. *Macromol Biosci*, 2014. **14**(2): p. 257-69.
43. Gil, E.S., et al., *Silk fibroin membranes from solvent-crystallized silk fibroin/gelatin blends: Effects of blend and solvent composition*. *Materials Science and Engineering: C*, 2007. **27**(3): p. 426-431.
44. Yan, S., et al., *Silk fibroin/chondroitin sulfate/hyaluronic acid ternary scaffolds for dermal tissue reconstruction*. *Acta Biomaterialia*, 2013. **9**(6): p. 6771-6782.
45. Madkhali, O., G. Mekhail, and S.D. Wettig, *Modified gelatin nanoparticles for gene delivery*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2019. **554**: p. 224-234.
46. Samal, S., et al., *Cationic polymers and their therapeutic potential*. *Chemical Society reviews*, 2012. **41**: p. 7147-94.
47. Eastoe, J.E., *The amino acid composition of mammalian collagen and gelatin*. *The Biochemical journal*, 1955. **61**(4): p. 589-600.

48. Tabata, Y. and Y. Ikada, *Protein release from gelatin matrices*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1998. **31**(3): p. 287-301.
49. Ratanavaraporn, J., et al., *Influences of physical and chemical crosslinking techniques on electrospun type A and B gelatin fiber mats*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2010. **47**(4): p. 431-438.
50. Govindan, R., et al., *Effect of phosphate glass reinforcement on the mechanical and biological properties of freeze-dried gelatin composite scaffolds for bone tissue engineering applications*. *Materials Today Communications*, 2020. **22**: p. 100765.
51. Gultekinoglu, M., et al., *Preparation of poly(glycerol sebacate) fibers for tissue engineering applications*. *European Polymer Journal*, 2019. **121**: p. 109297.
52. Wang, Y., et al., *Flexible silk fibroin films modified by genipin and glycerol*. *RSC Advances*, 2015. **5**(123): p. 101362-101369.
53. Bos, L., *Beijerinck's Work on Tobacco Mosaic Virus: Historical Context and Legacy*. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, 1999. **354**(1383): p. 675-685.
54. Luckanagul, J.A., et al., *Tobacco Mosaic Virus Functionalized Alginate Hydrogel Scaffolds for Bone Regeneration in Rats with Cranial Defect*. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2016. **2**(4): p. 606-615.
55. Hu, X., et al., *Regulation of silk material structure by temperature-controlled water vapor annealing*. *Biomacromolecules*, 2011. **12**(5): p. 1686-96.
56. Lu, Q., et al., *Water-insoluble silk films with silk I structure*. *Acta Biomater*, 2010. **6**(4): p. 1380-7.
57. Haugh, M., M. Jaasma, and F. O'Brien, *The effect of dehydrothermal treatment on the mechanical and structural properties of collagen-GAG scaffolds*. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 2009. **89**: p. 363-9.
58. Khor, E., *Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprostheses*. *Biomaterials*, 1997. **18**(2): p. 95-105.
59. Bhat, R. and A.A. Karim, *Ultraviolet irradiation improves gel strength of fish gelatin*. *Food chemistry*, 2009. **113**(4): p. 1160-1164.
60. Fazolin, G.N., et al., *Simultaneous intramolecular crosslinking and sterilization*

- of papain nanoparticles by gamma radiation*. Radiation Physics and Chemistry, 2020. **171**: p. 108697.
61. Kong, W., et al., *The effects of chemical crosslinking manners on the physical properties and biocompatibility of collagen type I/hyaluronic acid composite hydrogels*. International Journal of Biological Macromolecules, 2020. **160**: p. 1201-1211.
 62. Kalaoglu-Altan, O.I., et al., *Crosslinking of electrospun and bioextruded partially hydrolyzed poly(2-ethyl-2-oxazoline) using glutaraldehyde vapour*. European Polymer Journal, 2019. **120**: p. 109218.
 63. Wang, S., et al., *Selenium(VI) and copper(II) adsorption using polyethyleneimine-based resins: Effect of glutaraldehyde crosslinking and storage condition*. Journal of Hazardous Materials, 2020. **386**: p. 121637.
 64. Ofner, C.M., et al., *Crosslinking Studies in Gelatin Capsules Treated with Formaldehyde and in Capsules Exposed to Elevated Temperature and Humidity*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2001. **90**(1): p. 79-88.
 65. Yanshan, L., et al., *Preparation and characterization of melamine/formaldehyde/polyethylene glycol crosslinking copolymers as solid-solid phase change materials*. Solar Energy Materials and Solar Cells, 2014. **127**: p. 92-97.
 66. Choi, D., M.H. Khan, and J. Jung, *Crosslinking of PVA/alginate carriers by glutaraldehyde with improved mechanical strength and enhanced inhibition of deammonification sludge*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2019. **145**: p. 104788.
 67. Okabe, T., et al., *Molecular dynamics simulation of crosslinked epoxy resins: Curing and mechanical properties*. European Polymer Journal, 2016. **80**: p. 78-88.
 68. Liu, R., et al., *EDC/NHS crosslinked electrospun regenerated tussah silk fibroin nanofiber mats*. Fibers and Polymers, 2012. **13**(5): p. 613-617.
 69. YANG, C., *Enhanced physicochemical properties of collagen by using EDC/NHS-crosslinking*. Bulletin of Materials Science, 2012. **35**(5): p. 913-918.
 70. Wang, Y., et al., *Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials*.

- Biomaterials, 2006. **27**(36): p. 6064-6082.
71. Ruoslahti, E. and M. Pierschbacher, *New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins*. Science, 1987. **238**(4826): p. 491-497.
 72. Hersel, U., C. Dahmen, and H. Kessler, *RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond*. Biomaterials, 2003. **24**(24): p. 4385-4415.
 73. *1929 Cells*. Available from: <https://www.thermofisher.com/th/en/home/technical-resources/cell-lines/l/cell-lines-detail-125.html>.
 74. Watcharin, O.-c., et al., *Morphology, Secondary Structure and Thermal Properties of Silk Fibroin/Gelatin Blend Film*. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2009. **12**(23): p. 1526-1530.
 75. Wilaiwan, S., et al., *Silk Fibroin/Gelatin Hybrid Films for Medical Applications: Study on Chlorhexidine Diacetate*. Journal of Biological Sciences, 2010. **10**: p. 455-459.
 76. Lu, S., et al., *Insoluble and Flexible Silk Films Containing Glycerol*. Biomacromolecules, 2010. **11**(1): p. 143-150.
 77. Brown, J.E., et al., *Thermal and Structural Properties of Silk Biomaterials Plasticized by Glycerol*. Biomacromolecules, 2016. **17**(12): p. 3911-3921.
 78. Huang, X., et al., *Tunable Structures and Properties of Electrospun Regenerated Silk Fibroin Mats Annealed in Water Vapor at Different Times and Temperatures*. Journal of Nanomaterials, 2014. **2014**: p. 1-7.
 79. Wi, S., P. Pancoska, and T.A. Keiderling, *Predictions of protein secondary structures using factor analysis on Fourier transform infrared spectra: effect of Fourier self-deconvolution of the amide I and amide II bands*. Biospectroscopy, 1998. **4**(2): p. 93-106.
 80. Ernst, O. and T. Zor, *Linearization of the Bradford protein assay*. Journal of visualized experiments : JoVE, 2010(38): p. 1918.
 81. Stanley, W.M., *THE PREPARATION AND USE OF TOBACCO MOSAIC VIRUS CONTAINING RADIOACTIVE PHOSPHORUS*. The Journal of general physiology, 1942. **25**(6): p. 881-890.
 82. Amelunxen, F., *[Quantitative contrast method for electron microscopy. I.*

- Contrasting of tobacco mosaic virus with osmium tetroxide, calcium bichromate, uranyl nitrate and uranyl acetate]. Z Naturforsch B, 1959. 14b(1): p. 28-32.*
83. Lam, P., et al., *Bioengineering of Tobacco Mosaic Virus to Create a Non-Infectious Positive Control for Ebola Diagnostic Assays*. Scientific Reports, 2016. **6**(1): p. 23803.
 84. Calderaro, A., et al., *Identification of different respiratory viruses, after a cell culture step, by matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)*. Scientific Reports, 2016. **6**(1): p. 36082.
 85. Bruckman, M.A., et al., *Tobacco mosaic virus-based protein nanoparticles and nanorods for chemotherapy delivery targeting breast cancer*. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society, 2016. **231**: p. 103-113.
 86. Hawley, T.G. and T.B. Johnson, *The Isoelectric Point of Silk Fibroin*. Industrial & Engineering Chemistry, 1930. **22**(3): p. 297-299.
 87. Jetbumpenkul, P., et al., *Balanced electrostatic blending approach - An alternative to chemical crosslinking of Thai silk fibroin/gelatin scaffold*. International journal of biological macromolecules, 2012. **50**: p. 7-13.
 88. Xie, R., et al., *Glass transition temperature from the chemical structure of conjugated polymers*. Nature Communications, 2020. **11**(1): p. 893.
 89. Liu, Q., et al., *Exploring the Structural Transformation Mechanism of Chinese and Thailand Silk Fibroin Fibers and Formic-Acid Fabricated Silk Films*. International Journal of Molecular Sciences, 2018. **19**: p. 3309.
 90. de Brevern, A.G., *Extension of the classical classification of β -turns*. Scientific Reports, 2016. **6**(1): p. 33191.
 91. Ahn, J.M., et al., *6.03 - Strategy and Tactics for Designing Analogs: Biochemical Characterization of the Large Molecules \star* , in *Comprehensive Medicinal Chemistry III*, S. Chackalamannil, D. Rotella, and S.E. Ward, Editors. 2017, Elsevier: Oxford. p. 66-115.
 92. Cai, S. and B.R. Singh, *Identification of β -turn and random coil amide III infrared*

- bands for secondary structure estimation of proteins.* Biophysical Chemistry, 1999. **80**(1): p. 7-20.
93. Li, X., et al., *Flexible nanofibers-reinforced silk fibroin films plasticized by glycerol.* Composites Part B: Engineering, 2018. **152**: p. 305-310.
94. Lim, J.-S., et al., *Quantitative study of Au(III) and Pd(II) ion biosorption on genetically engineered Tobacco mosaic virus.* Journal of Colloid and Interface Science, 2010. **342**(2): p. 455-461.
95. Koch, C., et al., *Modified TMV Particles as Beneficial Scaffolds to Present Sensor Enzymes.* Frontiers in Plant Science, 2015. **6**(1137).
96. Masters, K.S. and K.S. Anseth, *CELL-MATERIAL INTERACTIONS*, in *Advances in Chemical Engineering*. 2004, Academic Press. p. 7-46.
97. Wu, L., et al., *Electrospinning fabrication, structural and mechanical characterization of rod-like virus-based composite nanofibers.* J. Mater. Chem., 2011. **21**: p. 8550-8557.



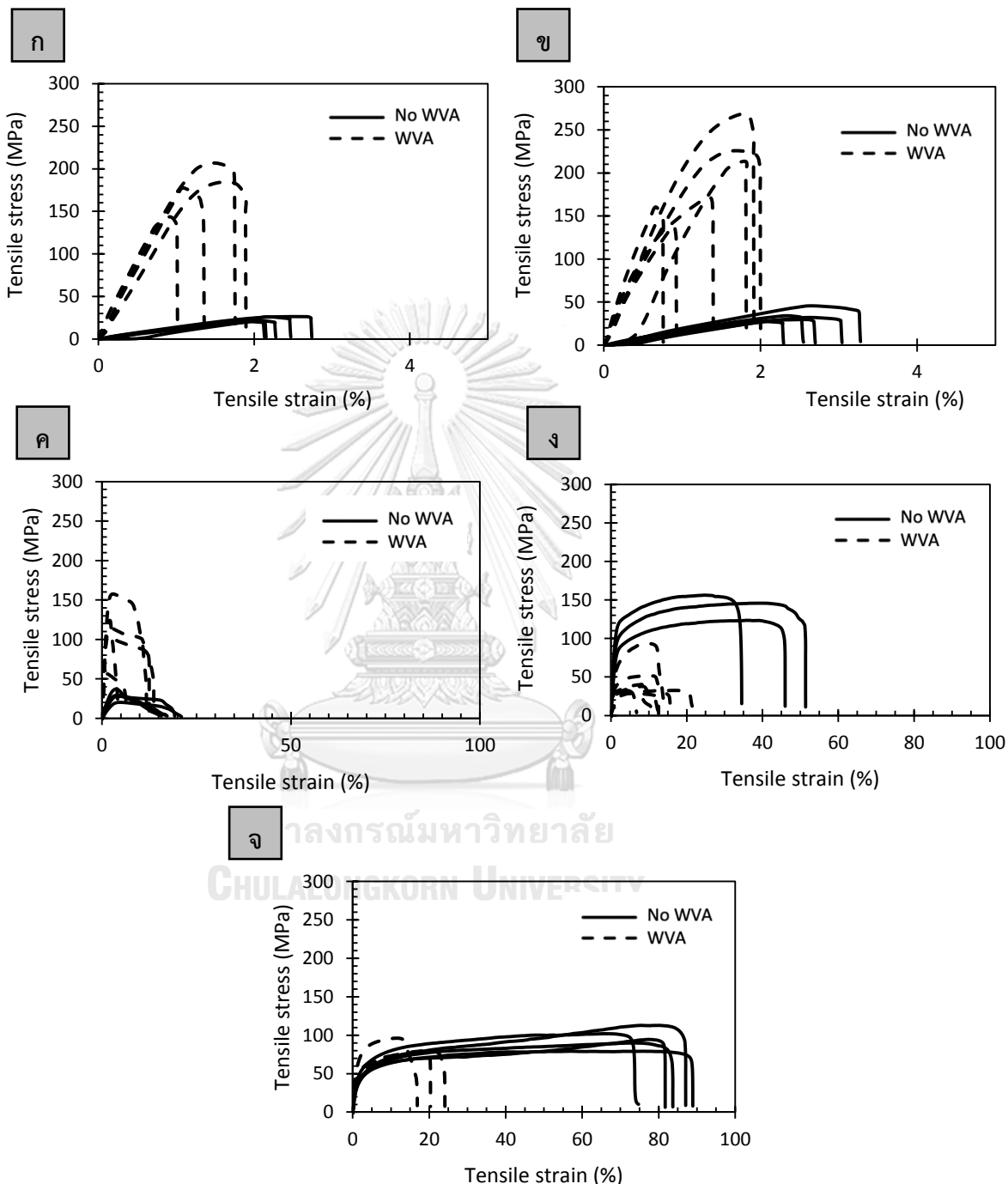


ภาคผนวก

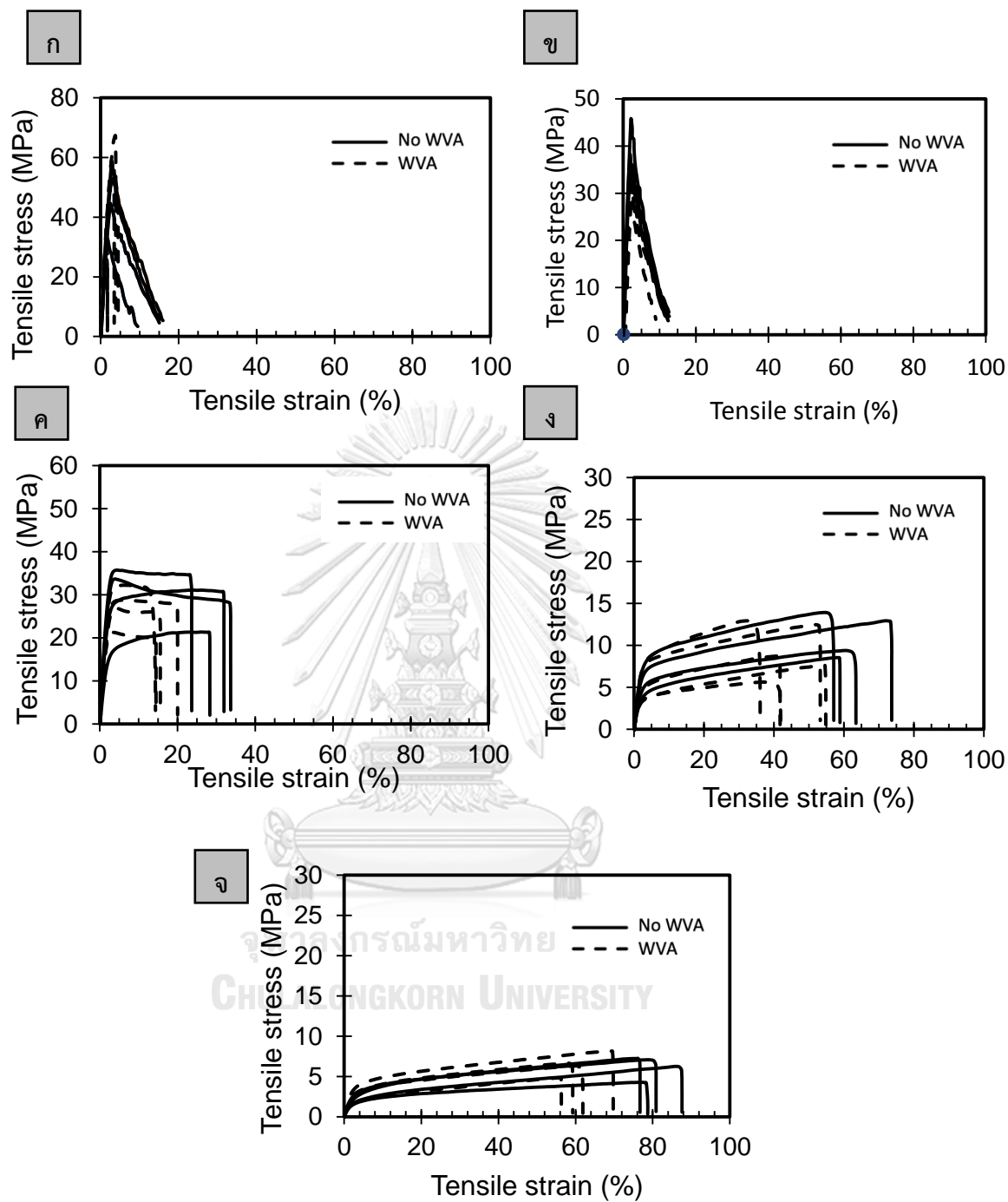
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

ความสัมพันธ์ระหว่างความเค้นและความเครียดต่อความแข็งแรงของฟิล์มในการทนแรงดึง



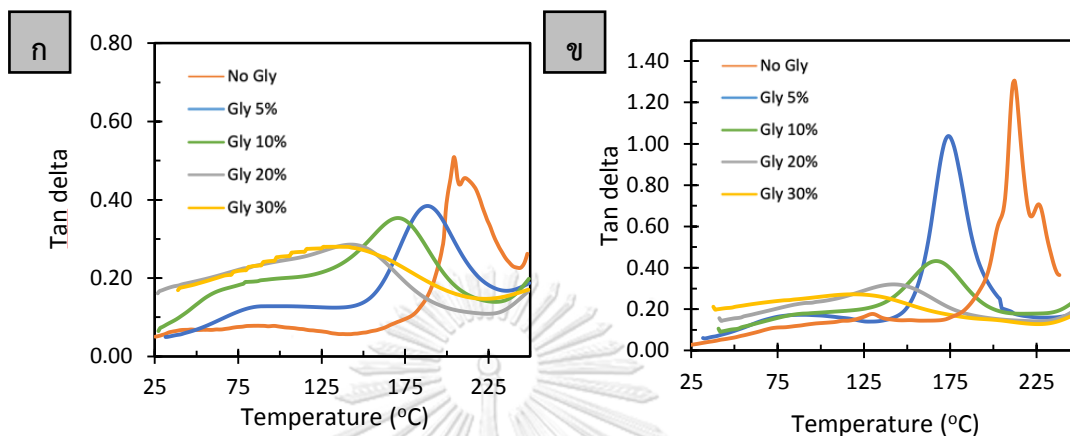
รูปที่ 33 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเค้น (Tensile stress) และความเครียด (Tensile strain) ของ (ก) ฟิล์ม SF100 ฟิล์มผสม SF/Gly ที่ปริมาณกลีเซอรอลร้อยละ (ข) 5 (ค) 10 (ง) 20 และ (จ) 30 โดยน้ำหนัก



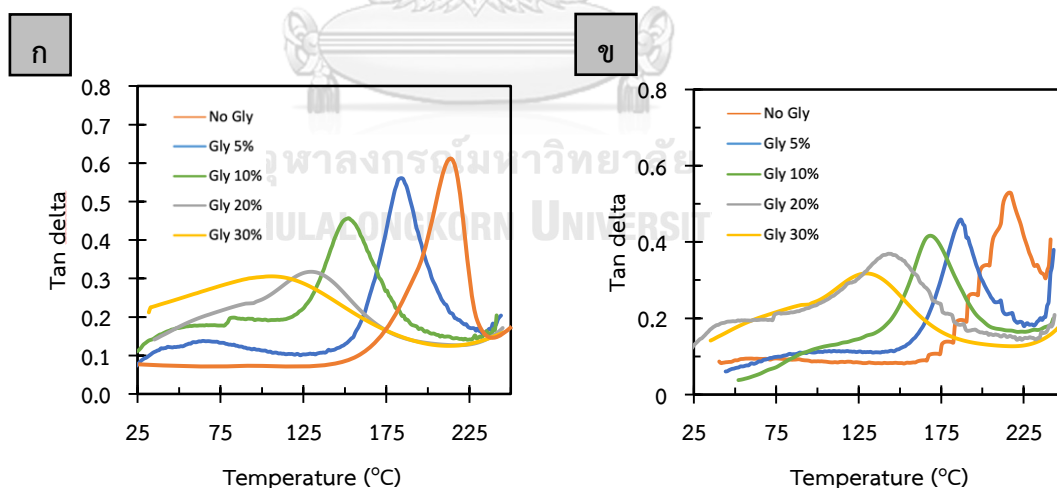
รูปที่ 34 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเค้น (Tensile stress) และความเครียด (Tensile strain) ของ (ก) फिल्म SF/GA फिल्मผสม SF/GA/Gly ที่ปริมาณกลีเซอรอลร้อยละ (ข) 5 (ค) 10 (ง) 20 และ (จ) 30 โดยน้ำหนัก

ภาคผนวก ข

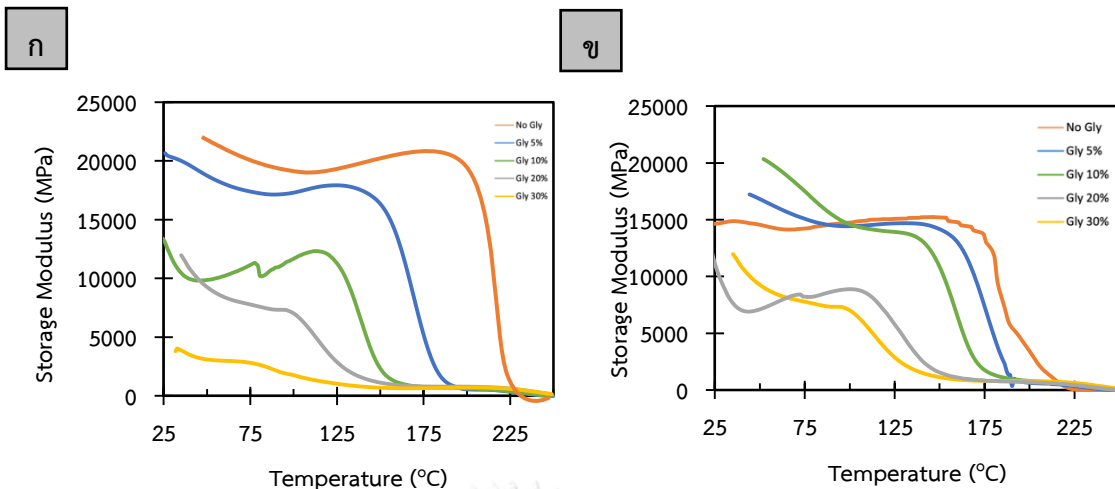
สมบัติทางความร้อนของฟิล์มผสม



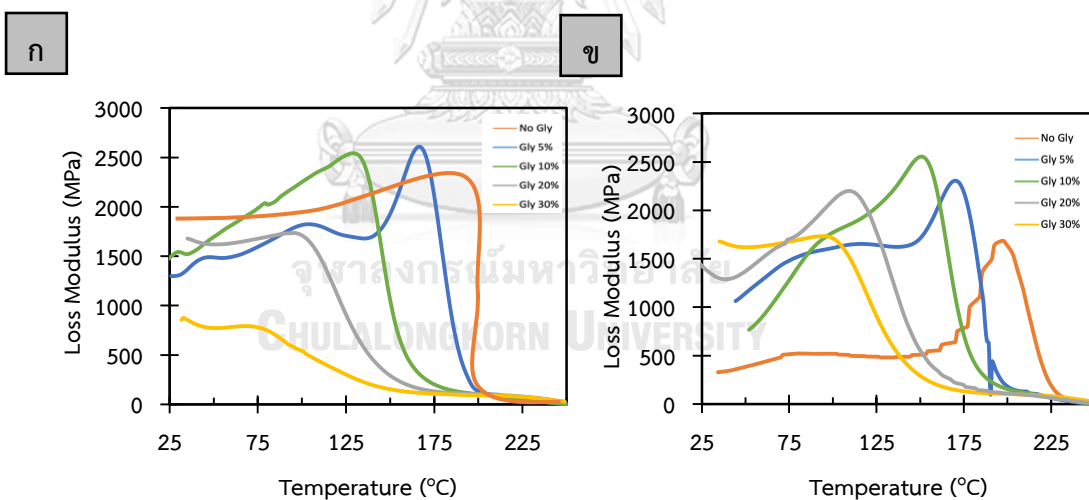
รูปที่ 35 กราฟอุณหภูมิเปลี่ยนสภาพแก้วของฟิล์มไฟโบรอินไหม และฟิล์มผสม SF/Gly ที่ปริมาณกลีเซอรอลต่าง ๆ (5, 10, 20 และ 30 โดยน้ำหนัก) (ก) ก่อนการอบนึ่งด้วยไอน้ำ และ (ข) หลังการอบนึ่งด้วยไอน้ำ



รูปที่ 36 กราฟอุณหภูมิเปลี่ยนสภาพแก้วของฟิล์มไฟโบรอินไหม และฟิล์มผสม SF/Gly ที่ปริมาณกลีเซอรอลต่าง ๆ (5, 10, 20 และ 30 โดยน้ำหนัก) (ก) ก่อนการอบนึ่งด้วยไอน้ำ และ (ข) หลังการอบนึ่งด้วยไอน้ำ



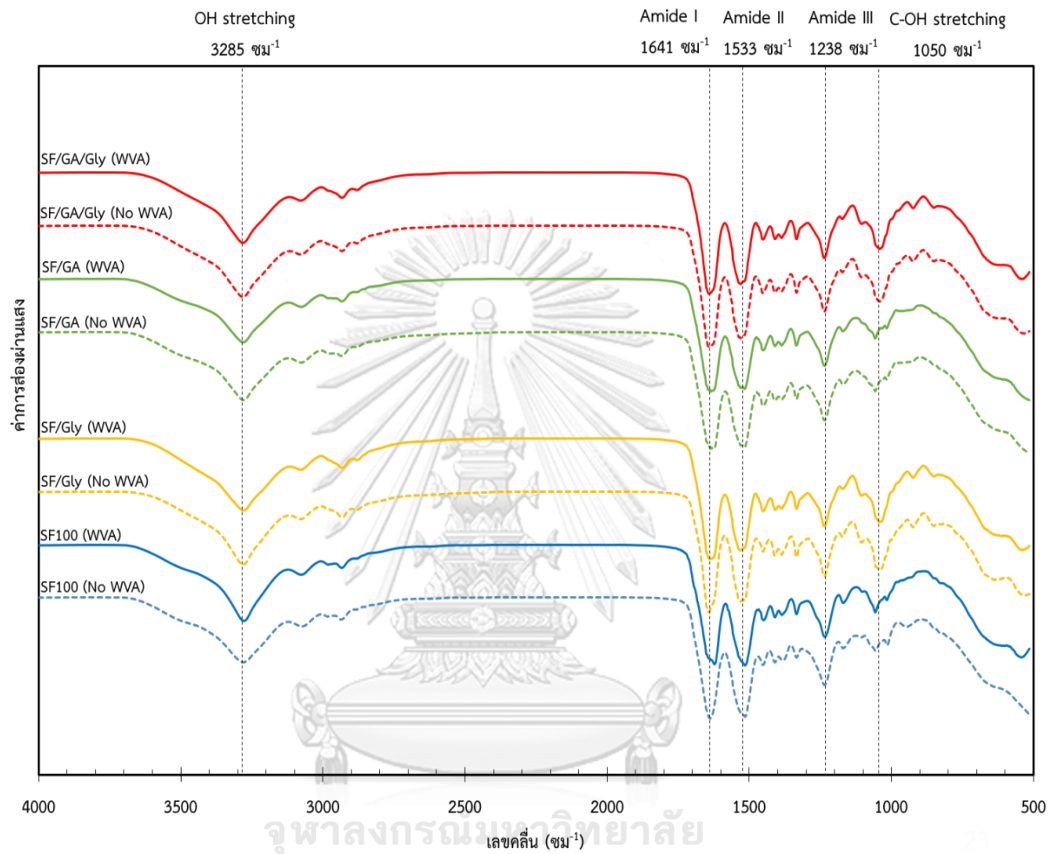
รูปที่ 37 กราฟมอดุลัสสะสม (Storage modulus) ของฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ปริมาณกลีเซอรอลต่าง ๆ (5, 10, 20 และ 30 โดยน้ำหนัก) (ก) ก่อนการอบนึ่งด้วยไอน้ำ และ (ข) หลังการอบนึ่งด้วยไอน้ำ



รูปที่ 38 กราฟมอดุลัสสูญเสีย (Loss modulus) ของฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ปริมาณกลีเซอรอลต่าง ๆ (5, 10, 20 และ 30 โดยน้ำหนัก) (ก) ก่อนการอบนึ่งด้วยไอน้ำ และ (ข) หลังการอบนึ่งด้วยไอน้ำ

ภาคผนวก ค

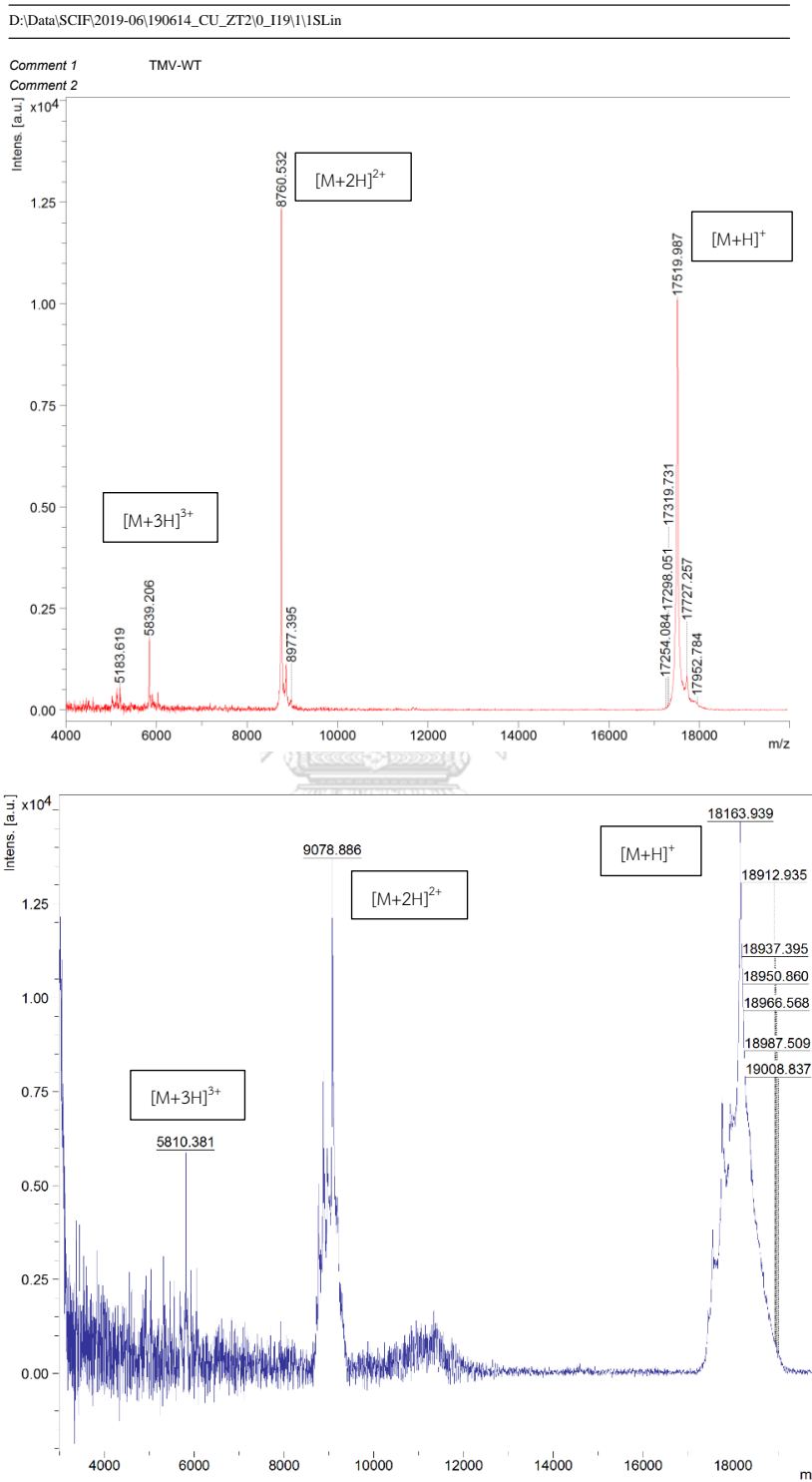
สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของฟิล์มผสม SF100, SF/Gly และ SF/GA/Gly
ที่ไม่ผ่านและผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ



รูปที่ 39 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของฟิล์มไฟโบรอิน (SF100) ฟิล์มผสม SF/Gly และฟิล์มผสม SF/GA/Gly ที่ไม่ผ่าน (No WVA) และผ่านการอบนึ่งด้วยไอน้ำ (WVA)

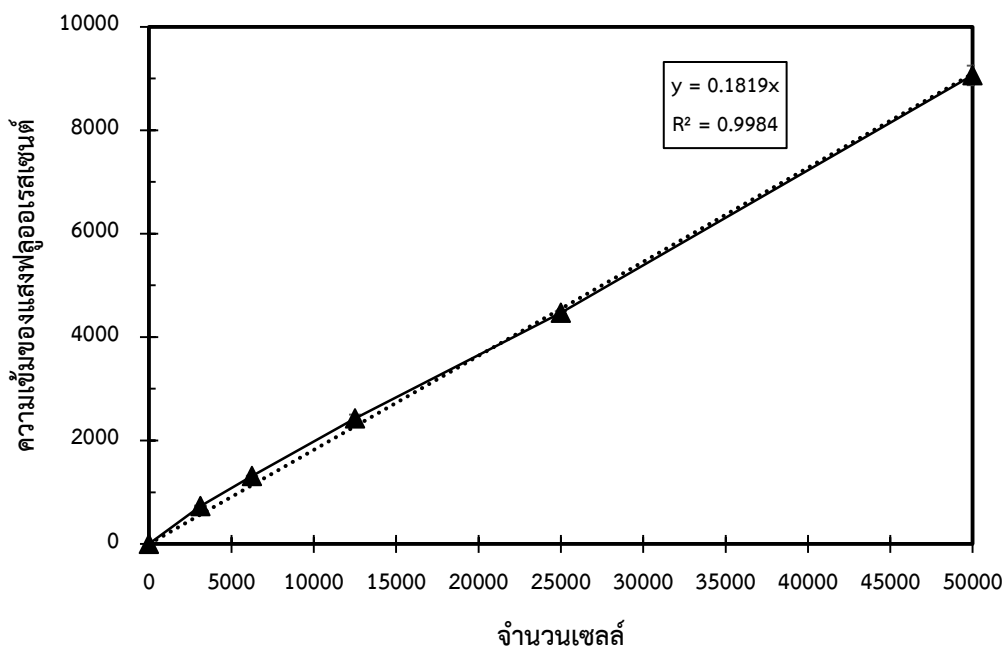
ภาคผนวก ง

กราฟสเปกตรัมมวลต่อประจุของไวรัสไบต่างยาสูบ TMV-wt และ TMV-RGD



รูปที่ 40 กราฟสเปกตรัมมวลต่อประจุของ (ก) ไวรัสไบต่างยาสูบ TMV-wt (ข) ไวรัสไบต่างยาสูบ TMV-RGD ที่ค่าประจุบวกของไอออนแตกต่างกัน

ภาคผนวก จ
กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์ผิวหนังหนู (L929)



รูปที่ 41 กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์ผิวหนังหนูโดยวิธี DNA assay (ช่วงความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นที่ 355 นาโนเมตร และช่วงความยาวคลื่นของการแผ่รังสีที่ 460 นาโนเมตร)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	จุฑาทิพย์ ปัญจมนี
วัน เดือน ปี เกิด	28 ธันวาคม 2536
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการบรรจุและวัสดุ คณะ อุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ที่อยู่ปัจจุบัน	101/519 ซอย11A หมู่บ้านปรีชา ถนนพุทธมณฑลสาย4 นครปฐม 73220
ผลงานตีพิมพ์	Panchamane, J., Luckanagul, J., & Damrongsakkul, S. (2019). Flexible blended film of Thai silk fibroin, gelatin and glycerol with enhanced cellular response using Arginyl-Glycyl-Aspartic acid (RGD) from tobacco mosaic virus. (pp. 20–27). Bangkok, Thailand; The 7th International Conference On Bio-Based Polymers .