



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การสังเคราะห์และศึกษาคุณสมบัติของคอมโพสิตยางธรรมชาติและโปรตีนในการใช้เป็นวัสดุปิดแผล”

โดย

ดร. วนิตา วัฒนการุณ และคณะ

กรกฎาคม 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การสังเคราะห์และศึกษาคุณสมบัติของคอมโพสิตยางธรรมชาติและโปรตีนในการใช้เป็นวัสดุปิดแผล”

คณะผู้วิจัย	สังกัด
ดร. วนิดา วัฒนการุณ	มหาวิทยาลัยศิลปากร
นางสาววรรณภา แก้วกัญญา	มหาวิทยาลัยศิลปากร
นางสาวพิชญานิน อภิษฐ์กุล	มหาวิทยาลัยศิลปากร
นางสาววิมล เผ่าดี	มหาวิทยาลัยศิลปากร

ชุดโครงการวิจัยแห่งชาติ: โครงการวิจัยขนาดเล็กเรื่องยางพารา

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

1. บทสรุปย่อรายงานสำหรับผู้บริหาร

ชื่อโครงการ การสังเคราะห์และศึกษาคุณสมบัติของคอมโพสิตยางธรรมชาติและโปรตีนในการใช้เป็นวัสดุปิดแผล (Synthesis and properties of natural rubber latex and protein composites for wound dressing applications)

ชื่อหัวหน้าโครงการ

ชื่อ-สกุล ดร. วณิดา วัฒนการุณ

หน่วยงาน มหาวิทยาลัยศิลปากร

ที่อยู่ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม
มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม 73000

โทรศัพท์ 034-219360, 089-2019080

โทรสาร 034-219360

Email wanida@su.ac.th

นักศึกษา/ผู้ร่วมวิจัย

นางสาววรรณภา แก้วกัญญา

นางสาวพิชญานิน อกนิษฐ์กุล

นางสาววิมล เผ่าดี

ระยะเวลาดำเนินการ 9 เดือน และขอขยายเวลา 3 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 สิงหาคม 2554 ถึงวันที่ 31 กรกฎาคม 2555

ปัญหาที่ทำวิจัยและความสำคัญ

งานวิจัยนี้มีแนวคิดต่อยอดจากโครงการที่ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี Window II สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ปี 2553 โดยในงานวิจัยดังกล่าวได้พัฒนาวัสดุปิดแผลซึ่งทำหน้าที่ในลักษณะที่เป็นการผสมผสาน (multi-functionality) โดยการใช้วัตถุดิบในกลุ่มของเปปไทด์และมีสารออกฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อร่วมกับสารต้านอนุมูลอิสระเป็นองค์ประกอบ ผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาได้จะอยู่ในรูปของไฮโดรเจลสำหรับทาและไฮโดรเจลขึ้นรูปที่เคลือบบนแผ่นปิดแผลในลักษณะที่เป็น gauze pad อย่างไรก็ตาม จากผลการทดสอบพบว่า ไฮโดรเจลขึ้นรูปที่พัฒนานั้นมีความคงตัวและรักษาการคงรูปของวัสดุได้นานเพียง 2-3 วัน ทำให้เป้าหมายของการนำวัสดุดังกล่าวไปใช้กับแผลเรื้อรังในผู้ป่วย (เช่น โรคเบาหวาน แผลกดทับ และการติดเชื้อ) ซึ่งจำเป็นต้องใช้ระยะเวลาในการสมานแผลที่ยาวนาน

(ระยะเวลานานเป็นสัปดาห์ถึงเดือน) ประสบกับปัญหาได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการพัฒนาเพิ่มเติมโดยการใช้ยางธรรมชาติเป็นวัสดุเสริมเพื่อช่วยเพิ่มความคงตัวและรักษาการคงรูปในรูปของคอมโพสิต เนื่องจากยางธรรมชาติถือเป็น renewable resource ที่สามารถรวมกันกับสารอินทรีย์ได้ดี มีราคาไม่แพง และย่อยสลายได้

วัตถุประสงค์

พัฒนานวัตกรรมการผลิตภัณฑ์วัสดุปิดแผลในรูปของคอมโพสิตยางธรรมชาติเป็นวัตถุดิบร่วมกับโปรตีนมาตรฐาน ศึกษาสมบัติเชิงกล คุณสมบัติทางกายภาพของวัสดุด้านความคงตัวและการรักษาการคงรูป และประเมิน allergen profile ตลอดจนการทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อและการฟื้นฟูเซลล์ของคอมโพสิต

ผลการดำเนินงาน

วิธีการ	ผลการทดลองที่ได้
การเตรียมน้ำยางโปรตีนต่ำและสังเคราะห์คอมโพสิต	สามารถเตรียมน้ำยางโปรตีนต่ำโดยใช้วิธีทางชีวภาพได้ปริมาณโปรตีนลดลง 61-95 เปอร์เซ็นต์ และสังเคราะห์วัสดุปิดแผลคอมโพสิตด้วยวิธีการที่ทำได้ง่าย ไม่ทำให้สารองค์ประกอบเสียสภาพ โดยใช้สภาวะการขึ้นรูปที่อุณหภูมิของการเกิดพอลิเมอร์ -18 องศาเซลเซียส นาน 50 ชั่วโมง
การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและสมบัติเชิงกล ได้แก่ การดูดซับน้ำ การปลดปล่อยสาร สันฐานวิทยาและสมบัติความต้านทานแรงดึง	คอมโพสิตแปรรูปอัตราส่วนของน้ำยางโปรตีนต่ำ (DPNR) และอัลบูมิน (BSA) มีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน สามารถเลือกประยุกต์ใช้ให้เหมาะสมกับลักษณะของแผลได้ โดยคอมโพสิตที่ประกอบด้วยอัลบูมินในอัตราส่วนที่มากกว่า ดูดซับได้มากขึ้น และคอมโพสิต DPNR: BSA อัตราส่วน 5:1 โดยปริมาตร คงสภาพอยู่ได้นานถึง 18 วัน การปลดปล่อยสารพบว่าคอมโพสิตปลดปล่อยยาปฏิชีวนะได้สูงสุดในวันที่ 1 การเติมแอสตาแซนทินแบบจุ่มแช่ ทำให้แอสตาแซนทินปลดปล่อยออกได้ปริมาณมากกว่าแบบที่ผสมแอสตาแซนทินลงไปในช่วงขั้นตอนของการเตรียมคอมโพสิต เมื่อวิเคราะห์สันฐานวิทยาพบว่า มีลักษณะเป็นโพรงบนพื้นผิว ซึ่งเหมาะสำหรับการบรรจุสารออกฤทธิ์ ส่วนสมบัติความต้านทานแรงดึงของคอมโพสิต DPNR: BSA อัตราส่วน 5:1 โดยปริมาตร มีค่าความต้านทานแรงดึงและค่าความยืดเมื่อขาดเท่ากับ $0.154 \pm 0.017 \text{ N/mm}^2$ และ $569 \pm 75\%$ ตามลำดับ

วิธีการ	ผลการทดลองที่ได้
การทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อ ความเป็นพิษ และการฟื้นฟูเซลล์	คอมโพสิตที่ประกอบด้วยยาปฏิชีวนะไซโปรฟลอกซาซิน และแอสตาแซนทินออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> เมื่อเทียบกับคอมโพสิตที่ใช้เปรียบเทียบกับเชื้อ <i>S. aureus</i> เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เมื่อประเมินความเป็นพิษและการฟื้นฟูเซลล์ คอมโพสิตที่ประกอบด้วยแอสตาแซนทินช่วยเพิ่มการเกาะผิวและกระตุ้นการเจริญของเซลล์ได้อย่างไรก็ตาม คอมโพสิตมีการปลดปล่อยสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้สังเคราะห์วัสดุปิดแผลคอมโพสิตที่ประกอบด้วยน้ำยางโปรตีนต่ำและโปรตีนอัลบูมิน ที่ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อ ฟื้นฟูเซลล์ และคงสภาพอยู่ได้นาน คอมโพสิตที่แปรผันองค์ประกอบมีคุณสมบัติแตกต่างกันสามารถนำไปประยุกต์ใช้ให้เหมาะสมกับลักษณะของแผล ในการทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อพบว่า ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคที่เป็นตัวแทนทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้ และในการทดสอบความเป็นพิษและการฟื้นฟูเซลล์แสดงให้เห็นว่า คอมโพสิตช่วยฟื้นฟูเซลล์ได้ แต่สารที่ปลดปล่อยออกมาจากคอมโพสิตมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์

ข้อเสนอแนะที่คาดว่าจะควรวิจัยเพิ่มเติม

จากการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำน้ำยางโปรตีนต่ำมาใช้เป็นองค์ประกอบร่วมในการสังเคราะห์วัสดุปิดแผลพบว่า สามารถช่วยเพิ่มการคงรูปได้ดี อย่างไรก็ตาม สารที่ปลดปล่อยออกมาจากคอมโพสิตมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ ซึ่งอาจเกิดจากการใช้ SDS ในขั้นตอนของการเตรียมน้ำยางโปรตีนต่ำ ดังนั้น การพัฒนาที่ควรมุ่งเน้นต่อไปคือ การใช้สารทดแทน SDS ที่ไม่มีความเป็นพิษเช่น สารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและในทางเภสัชกรรม (ได้แก่ สารในกลุ่ม Tween หรือกลีเซอรอล เป็นต้น) ร่วมกับการประเมินทางเนื้อเยื่อวิทยาและการทดสอบในสัตว์ทดลองเพื่อต่อยอดจากผลงานวิจัยนี้ ก่อนนำไปใช้จริงกับผู้ป่วย

ผลงานทางวิชาการที่คาดว่าจะเกิดขึ้น

ตีพิมพ์ผลงานในวารสารทางวิชาการระดับชาติหรือระดับนานาชาติ 1 ฉบับ

2. บทคัดย่อ

วัสดุปิดแผลใช้เพื่อป้องกันการติดเชื้อ รักษาความชุ่มชื้น ดูดซับของเหลวที่ออกจากแผล และช่วยฟื้นฟูเซลล์และเนื้อเยื่อ ปัจจุบันนิยมนำวัสดุชีวภาพมาพัฒนาเป็นวัสดุปิดแผลเพื่อทดแทนวัสดุปิดแผลสังเคราะห์ งานวิจัยนี้พัฒนาวัสดุปิดแผลที่ประกอบด้วยน้ำยางโปรตีนต่ำและโปรตีนอัลบูมิน ที่ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อ และฟื้นฟูเซลล์ เพื่อนำไปใช้รักษาแผลที่มีความรุนแรงและเรื้อรัง โดยเตรียมวัสดุปิดแผลคอมโพสิตพรีพอลิเมอร์ขององค์ประกอบพบว่า คอมโพสิตที่ประกอบด้วยน้ำยางโปรตีนต่ำและเจลอัลบูมินขึ้นรูปได้ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส นาน 50 ชั่วโมง ส่วนการดูดซับน้ำของคอมโพสิตพบว่า เปอร์เซ็นต์การดูดซับพรีพอลิเมอร์ตามสัดส่วนของอัลบูมินที่ใช้เป็นองค์ประกอบร่วม ในการปลดปล่อยยาไซโปรฟลอกซาซินของคอมโพสิตพบว่า สูงสุดในวันที่ 1 ส่วนวิธีการเตรียมแบบจุ่มช่วยทำให้การปลดปล่อยแอสตาแซนทินได้มากขึ้น เมื่อศึกษาสัญญาณวิทยาของคอมโพสิตที่ประกอบด้วยน้ำยางโปรตีนต่ำและเจลอัลบูมิน มีลักษณะเป็นโพรงบนพื้นผิว ที่มีความลึกลงไป และเชื่อมต่อกับโพรงบริเวณรอบ และมีค่าความต้านแรงดึงและค่าความยืดเมื่อขาดเท่ากับ $0.154 \pm 0.017 \text{ N/mm}^2$ และ $569 \pm 75\%$ ตามลำดับ ในการทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อพบว่า คอมโพสิตที่ประกอบด้วยยาไซโปรฟลอกซาซินความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ ในขณะที่ SDS ที่ใช้ในการเตรียมน้ำยางโปรตีนต่ำยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ในการทดสอบความเป็นพิษและการฟื้นฟูเซลล์พบว่า คอมโพสิตที่ประกอบด้วยแอสตาแซนทินความเข้มข้น 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ช่วยเพิ่มการเกาะผิวและกระตุ้นการเจริญของเซลล์ได้อย่างไรก็ตาม คอมโพสิตมีการปลดปล่อยสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ งานวิจัยนี้สามารถออกแบบวัสดุปิดแผลที่เหมาะสมกับการนำไปประยุกต์ใช้จริงได้

Abstract

Application of dressing materials is to protect against infection, create a moist healing environment for rapid wound healing, absorb exudates, and promote the replacement and regeneration of cell and tissue. Recently, the wound dressing synthesized from biocompatible materials are of interest for applications in which synthetic polymers have traditionally been the materials of choice. This research describes the synthesis and testing of the natural composite material for use as a wound dressing. A composite wound dressing comprising deproteinized natural rubber latex (DPNR) and albumin (BSA) with antimicrobial and cell proliferating properties was developed for healing impaired wounds. The composites with different compositions were prepared. The solutions of DPNR and BSA gel were polymerized at -18 °C for 50 hours. Water absorption of composite was enhanced with the increase of BSA gel used. The release of ciprofloxacin in the composite was the highest within the first day. Astaxanthin incorporated into the composite by dipping showed higher release. SEM analysis showed some apparent holes on the surface and throughout the

composite. The composite exhibited the tensile strength and elongation at break at $0.154 \pm 0.017 \text{ N/mm}^2$ and $569 \pm 75\%$, respectively. Antibacterial testing indicated that the ciprofloxacin-incorporated composite at $10 \text{ }\mu\text{g/mL}$ was effective in killing *Pseudomonas aeruginosa* and that SDS in this material exerted significant killing effect towards *Staphylococcus aureus*. The composite containing astaxanthin at a concentration of $60 \text{ }\mu\text{g/mL}$ was able to promote cellular adhesion and proliferation. However, cell viability testing revealed that the conditioned culture medium from composite immersion was cytotoxic. These results aid in the design of the broad range of dressings complicate the selection of proper wound treatment.

3. เนื้อหา

ความสำคัญและความเป็นมาของการวิจัย

การรักษาบาดแผลโดยการใช้วัสดุสมานแผลที่สามารถให้ความชุ่มชื้นแก่แผล ป้องกันการติดเชื้อ ส่งผ่านความชื้น ออกซิเจนสามารถแทรกเข้าไปในเนื้อตายเพื่อให้อ่อนตัวลง และเร่งฟื้นฟูเนื้อเยื่อให้เกิดใหม่ ได้ ถือเป็นแนวทางในการพัฒนาวัสดุปิดแผลในอุดมคติหรือเป็นต้นแบบ มีรายงานการวิจัยและพัฒนาการใช้ วัสดุปิดแผลในกลุ่ม biomaterial-based เพื่อทดแทนวัสดุเส้นใยสังเคราะห์ โดยวัสดุที่ได้รับการยอมรับและมี รายงานการนำไปใช้ ได้แก่ แป้ง เซลลูโลส และคอลลาเจน (Yudanov และ Reshetov, 2006) ในงานวิจัยที่ ผู้วิจัยได้รับงบประมาณสนับสนุนจากทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี Window II สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ปี 2553 เลือกใช้โปรตีน เนื่องจากข้อดีในด้านการเข้ากันได้กับร่างกาย (biocompatibility) การเกิดเป็นเจลหรือโครงสร้างที่เป็นร่างแหจากการเสียสภาพเมื่อได้รับความร้อน (Nelson และ Cox, 2000) ซึ่งช่วยในการห่อหุ้มสาร ตลอดจนคุณสมบัติของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของ โปรตีนในการช่วยฟื้นฟูเซลล์ อย่างไรก็ตาม เจลของโปรตีนที่พัฒนาขึ้นประสบปัญหาเรื่องการคงรูป ผู้วิจัยจึง เกิดแนวคิดในการเพิ่มความคงตัวโดยการนำยางพารามาใช้เป็นองค์ประกอบในการขึ้นรูปเป็นคอมโพสิทร่วมกับ เจลของโปรตีนเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว เนื่องจากยางพารามีคุณสมบัติสำคัญที่เหมาะสมต่อการนำไปขึ้นรูปทั้ง ในด้านความยืดหยุ่น ความทนทานต่อแรงดึง และการฉีกขาด (พงษ์ธร แซ่ฮุย, 2548) ตลอดจนคุณสมบัติใน การย่อยสลายได้ (Rose และ Steinbüchel, 2005)

วัตถุประสงค์

1. พัฒนานวัตกรรมผลิตภัณฑ์วัสดุปิดแผลในรูปของคอมโพสิททางธรรมชาติเป็นวัตถุดิบร่วมกับโปรตีน มาตรฐาน
2. ศึกษาสมบัติเชิงกล และคุณสมบัติทางกายภาพของวัสดุด้านความคงตัวและการรักษาการคงรูป
3. ประเมิน allergen profile ทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อ และการฟื้นฟูเซลล์ของคอมโพสิทที่เตรียมได้ก่อน การนำไปใช้

ทฤษฎี แนวคิดในการวิจัย และผลงานที่เกี่ยวข้อง

กลไกทางชีววิทยาของการรักษาบาดแผลของร่างกาย (wound healing) เป็นกระบวนการซ่อมแซมและสร้างที่ซับซ้อน ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้ (1) ระยะการห้ามเลือด (hemostasis) (2) ระยะการอักเสบ (inflammation) (3) ระยะการแบ่งเซลล์ (proliferation) และ (4) ระยะการเสริมสร้างความแข็งแรง (remodeling) โดยในระยะที่ (2) ร่างกายใช้กลไกของระบบภูมิคุ้มกันตนเองในการทำลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมจากภายนอก เซลล์ที่เกี่ยวข้องได้แก่ เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophils และ macrophages จากนั้นในระยะที่ (3) เซลล์บริเวณใกล้เคียงบาดแผล (คือเซลล์ fibroblast และเซลล์เยื่อบุผิว epithelial) เริ่มมีการแบ่งตัวเพื่อสร้างเนื้อเยื่อใหม่ทดแทน (Singer และ Clark, 1999) ซึ่งสารที่เกิดขึ้นในกลไกของการรักษาบาดแผลตามธรรมชาติของร่างกายนี้คือ อนุมูลอิสระ (free radicals หรือ reactive oxygen species, ROS) ที่เซลล์เม็ดเลือดขาวสร้างขึ้นมาเพื่อทำลายแบคทีเรียบางชนิดที่จับกินเข้าไปในเซลล์ และใช้เป็นสัญญาณ (signals หรือ cellular messengers) ในการกระตุ้นการเจริญของเซลล์ fibroblast (McCord, 2000) แต่ในกรณีของแผลเรื้อรัง (chronic, non-healing wounds) ซึ่งถือเป็น impaired wound healing ที่ทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์อนุมูลอิสระได้ เนื่องจากการขาดเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ ส่งผลให้การทำหน้าที่ของเม็ดเลือดขาวผิดปกติไป และเกิดปัญหาของการติดเชื้อได้ง่ายและนานขึ้น (Gordillo และ Sen, 2003) หรืออีกกรณีหนึ่งคือ มีการสังเคราะห์อนุมูลอิสระในปริมาณที่มากเกินไป ทำให้เซลล์เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ซึ่งมีรายงานวิจัยที่พบว่า แผลเรื้อรังที่มีการหายช้าหรือไม่หายนั้น สาเหตุที่สำคัญอันหนึ่งมาจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น ซึ่งไปขัดขวางขั้นตอนการรักษาแผล โดยทำให้เกิดความเสียหายของเซลล์และเนื้อเยื่อ (Moseley และคณะ, 2004; Schäfer และ Werner, 2008) ถึงแม้ว่าโดยปกติร่างกายสามารถสร้างสารต้านอนุมูลอิสระเองได้ (เช่น glutathione, ubiquinones เป็นต้น) หรือจากการรับประทานสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มของวิตามินอี (แอลฟาโทโคฟีรอล) และวิตามินซี แต่พบว่า สารต้านอนุมูลอิสระดังกล่าวมีการลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อทดสอบในหนูที่มีอายุหรือมีแผลเรื้อรัง (Rasik และ Shukla, 2000) ดังนั้น การแก้ไขโดยการให้สารออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อเพื่อทำลายเชื้อโรคและป้องกันการติดเชื้อ ร่วมกับการให้สารต้านอนุมูลอิสระเพื่อมาช่วยควบคุมสภาวะโรคอกซ์โดยการจับกับอนุมูลอิสระที่มากเกินไป (Martin, 1996) และเร่งฟื้นฟูการเจริญของเซลล์เยื่อบุผิวเพื่อให้บาดแผลปิดเร็วขึ้น ถือเป็นแนวทางในการแก้ปัญหาของแผลเรื้อรัง ในงานวิจัยนี้จึงได้เลือกสารออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อในกลุ่มของยาปฏิชีวนะ ได้แก่ tobramycin และ ciprofloxacin ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ และธาตุซิลเวอร์นาโน โดยยาปฏิชีวนะมีกลไกในการออกฤทธิ์คือ tobramycin ออกฤทธิ์โดยการไปจับกับไรโบโซม ทำให้เซลล์แบคทีเรียไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ (Le Goffic และคณะ, 1979) ciprofloxacin มีผลต่อการถ่ายแบบ (replication) ดีเอ็นเอ (Chalkley และ Koornhof, 1985) ส่วนซิลเวอร์สามารถทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เข้าไปยับยั้งการสังเคราะห์ DNA และไปปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางโมเลกุลของเอนไซม์ที่มีผลต่อการสร้างโปรตีนของเซลล์ และใช้สารต้านอนุมูลอิสระคือแอสตาแซนทิน เนื่องจากมีฤทธิ์ความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารอื่นในกลุ่มเดียวกัน โดยพบว่ามีประสิทธิภาพมากกว่าวิตามินอีถึง 500 เท่า และสูงกว่าเบต้าแคโรทีน 40 เท่า จึงถือได้ว่าเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดในปัจจุบัน (Shimidzu และคณะ, 1996)

ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลักในการพัฒนาวัสดุปิดแผลโดยมุ่งเน้นไปที่แผลเรื้อรัง แผลเปิดมีการติดเชื้อแทรกซ้อน ครอบคลุมแผลกดทับ (Bedsore) แผลของโรคเบาหวาน (Diabetic ulcers) และแผลเลือดดำคั่งที่ขา (Venous leg ulcers) โดยในงานวิจัยที่พัฒนาขึ้น ผลลัพธ์ที่ได้อยู่ในรูปของไฮโดรเจลขึ้นรูปในลักษณะที่เป็น gauze pad ซึ่งมีข้อดีคือ ช่วยทำให้แผลชุ่มชื้นไม่แห้งเกินไป สามารถดูดซับ exudates ได้ดี และไม่ติดแผลเวลาลอกออก ลดการ trauma ต่อบาดแผลได้ อย่างไรก็ตาม จากผลการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไฮโดรเจลขึ้นรูปที่พัฒนามีความคงตัวและรักษาการคงรูปของวัสดุได้นานเพียง 2-3 วัน ทำให้เป้าหมายของการนำวัสดุดังกล่าวไปใช้กับแผลเรื้อรังในผู้ป่วย ซึ่งจำเป็นต้องใช้ระยะเวลาในการสมานแผลที่ยาวนานขึ้นประสบกับปัญหาได้

สมบัติทางกลที่ดีของวัสดุปิดแผลคือ ความแข็งแรง (strength) มีความยืดหยุ่น (elasticity) และความคงรูป (conformability) สูง (Czaja และคณะ, 2006) งานวิจัยนี้จึงได้ทำการสังเคราะห์คอมโพสิตของยางธรรมชาติและโปรตีน โดยอาศัยหลักการที่น้ำยางมีประจุลบจึงสามารถสร้างพันธะด้วยแรงทางไฟฟ้ากับหมู่เอมีนที่มีประจุบวกของโปรตีน ซึ่งช่วยให้ยางแข็งขึ้น มีรายงานการวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ของ Rouilly และคณะ (2004) ในการสังเคราะห์คอมโพสิตที่มียางธรรมชาติและแบ่งเป็นองค์ประกอบ ส่วน Jong (2005 และ 2006) เลือกใช้ยางสังเคราะห์ในกลุ่มของสไตรีนบิวตาไดอีน (styrene-butadiene latex) ร่วมกับ soy protein เพื่อสังเคราะห์เป็นคอมโพสิต และต่อมาในปี 2009 Byars และ Jong ได้พัฒนาต่อโดยใช้น้ำยางธรรมชาติทดแทนยางสังเคราะห์ Nair และ Dufresne (2003) สังเคราะห์คอมโพสิตยางธรรมชาติและไคติน ซึ่งผลการทดลองพบว่า ไคตินเกิดเป็น network สามมิติ โดยยางธรรมชาติทำหน้าที่เสมือนเป็น matrix ของคอมโพสิต

วิธีการ

สารเคมีสำคัญ

1. น้ำยางข้นชนิด High ammonia (ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท ไทยรับเบอร์ลาเท็กซ์คอร์ปอเรชั่น (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน) จังหวัดสมุทรปราการ)
2. เอนไซม์โปรติเอส (ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท Kao Industrial (Thailand) จำกัด กรุงเทพฯ)
3. Sodium dodecyl sulfate (SDS) (บริษัท Sigma, USA)
4. Bicinchoninic acid disodium salt hydrate (BCA) (บริษัท Sigma, USA)
5. โปรตีนอัลบูมิน (Bovine serum albumin) (บริษัท Sigma, USA)
6. ยาปฏิชีวนะไซโปรฟลอกซาซิน (Ciprofloxacin) (บริษัท Fluka, Switzerland)
7. แอสตาแซนทิน (ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท โกเวล จำกัด จังหวัดสมุทรปราการ)
8. Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) (บริษัท Invitrogen, USA)

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเตรียมน้ำยางโปรตีนต่ำ

ซังเอนไซม์โปรติเอส 0.16 กรัม ละลายในสารละลาย SDS ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 100 กรัม กวนให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำยางชั้น 100 กรัม (ได้ความเข้มข้นของเอนไซม์คิดเป็น 0.08% โดยน้ำหนัก) นำไปบ่มในตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปแยกเนื้อเยื่อออกจากส่วนใสโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เก็บเนื้อเยื่อและละลายในสารละลาย SDS ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 70 กรัม กวนให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิเฉลี่ย 26-28 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อช่วยกระจายอนุภาคของเนื้อเยื่อ ทำเช่นนี้ซ้ำ 2 ครั้ง แล้วนำเนื้อเยื่อที่เตรียมได้ละลายในสารละลาย SDS ความเข้มข้น 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 70 กรัม กวนให้เข้ากันก่อนนำไปเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด

วิเคราะห์ปริมาณเนื้อเยื่อแห้ง (dry rubber content) ในน้ำยางโปรตีนต่ำที่ทราบน้ำหนักเริ่มต้น นำไปทำให้แห้งในตู้อบแห้งอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ แล้วคำนวณปริมาณเนื้อเยื่อแห้งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์โดยเทียบน้ำหนักน้ำยางที่หายไปต่อน้ำหนักเริ่มต้น ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (protein content) ในน้ำยาง อ้างอิงตามงานวิจัยของ Siler และ Cornish (1995) และการหาปริมาณโปรตีนใช้วิธี BCA (Walker, 2002)

2. การสังเคราะห์คอมโพสิต

ผสมน้ำยางโปรตีนต่ำกับเจลอัลบูมินในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร แปรผันความเข้มข้นของอัลบูมินเป็น 6% และ 8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (เจลอัลบูมินเตรียมโดยละลายอัลบูมินใน phosphate buffer pH 7.4 ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วในอ่างน้ำแข็ง) เติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และตัวทำละลาย DMSO ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 30 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนาน 30 นาที แล้วเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร (ปริมาตรจานละ 5 มิลลิลิตร) จากนั้นนำคอมโพสิตที่เตรียมได้ไปขึ้นรูปที่สภาวะดังนี้ (1) อุณหภูมิห้อง นาน 50 ชั่วโมง (2) -18 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง และอุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง (3) -80 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง และอุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง (4) -18 องศาเซลเซียส นาน 50 ชั่วโมง และ (5) -80 องศาเซลเซียส นาน 50 ชั่วโมง จากนั้นตัดเป็นแผ่นให้มีขนาด 25 x 25 มิลลิเมตร ที่ความหนาประมาณ 1-2 มิลลิเมตร สังเกตลักษณะการขึ้นรูป และการคงสภาพของคอมโพสิตที่เตรียมได้ (ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Herculano และคณะ, 2010)

เตรียมคอมโพสิต 2 ชนิดคือ (1) คอมโพสิตที่ใช้เปรียบเทียบ โดยผสมน้ำยางโปรตีนต่ำกับเจลอัลบูมิน ความเข้มข้น 6% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในอัตราส่วน 5:1, 1:1 และ 1:5 โดยปริมาตร เติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และตัวทำละลาย DMSO ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 30 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนาน 30 นาที แล้วเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีขนาดเส้น

ผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร (ปริมาตรจานละ 5 มิลลิลิตร) นำไปขึ้นรูปที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส นาน 50 ชั่วโมง และ (2) คอมโพสิตที่ประกอบด้วยยาปฏิชีวนะไซโปรฟลอกซาซินและแอสตาแซนทิน โดยผสมน้ำยางโปรตีนต่ำกับเจลอัลบูมินความเข้มข้น 6% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในอัตราส่วนเดียวกับคอมโพสิตที่ใช้เปรียบเทียบ เติมไซโปรฟลอกซาซินที่ละลายในกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ให้ได้ในความเข้มข้นสุดท้ายของไซโปรฟลอกซาซินเป็น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเติมแอสตาแซนทินที่ละลายในตัวทำละลาย DMSO โดยแบ่งรูปแบบวิธีการเติมแอสตาแซนทินดังนี้คือ เติมแอสตาแซนทิน ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ในระหว่างการเตรียมคอมโพสิต ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของแอสตาแซนทินเป็น 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปขึ้นรูปที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส นาน 50 ชั่วโมง และเติมโดยการจุ่มแช่คอมโพสิตในสารละลายแอสตาแซนทินความเข้มข้น 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากการขึ้นรูปที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส นาน 50 ชั่วโมงแล้ว จากนั้นนำแผ่นคอมโพสิตที่เตรียมได้ไปฆ่าเชื้อด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตนานด้านละ 15 นาที ก่อนนำไปประเมินคุณสมบัติและทดสอบต่อไป

3. การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและสมบัติเชิงกล

3.1 การดูดซับน้ำ

แช่คอมโพสิตที่ทราบน้ำหนักเริ่มต้นในภาชนะปิดบรรจุ phosphate buffer pH 7.4 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในระยะเวลาที่คอมโพสิตคงรูปได้นานที่สุด โดยในแต่ละวันของการบ่ม นำคอมโพสิตมาชั่งน้ำหนักและเก็บ phosphate buffer pH 7.4 ไว้เพื่อนำไปทดสอบการปลดปล่อยองค์ประกอบ จากนั้นนำคอมโพสิตใส่กลับในภาชนะเดิมที่เติม phosphate buffer pH 7.4 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำน้ำหนักที่บันทึกได้ในแต่ละวันไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การดูดซับน้ำ (% water absorption) ของคอมโพสิต แสดงดังสมการที่ 1

$$\% \text{ water absorption} = \left(\frac{W_t - W_0}{W_0} \right) \times 100 \quad \text{สมการที่ 1}$$

โดยที่

W_t น้ำหนักของคอมโพสิตในแต่ละวันของการบ่ม (หน่วยเป็นกรัม)

W_0 น้ำหนักของคอมโพสิตเริ่มต้น (หน่วยเป็นกรัม)

3.2 การปลดปล่อยสาร

ทดสอบการปลดปล่อยองค์ประกอบของคอมโพสิต ได้แก่ ไซโปรฟลอกซาซิน แอสตาแซนทิน และโปรตีน (ในที่นี้คือ อัลบูมินรวมกับโปรตีนในน้ำยาง) โดยนำ phosphate buffer pH 7.4 ในข้อ 3.1 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของไซโปรฟลอกซาซินและโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วคำนวณเป็นปริมาณของโปรตีนในแผ่นคอมโพสิตที่ใช้เปรียบเทียบ และเป็นปริมาณของไซโปรฟลอกซาซินรวมกับโปรตีนในแผ่นคอมโพสิตที่ประกอบด้วยไซโปรฟลอกซาซินและแอสตาแซนทิน เนื่องจากไซโปรฟลอกซาซินและโปรตีนมีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นเดียวกัน การหาปริมาณของไซโปรฟลอกซาซินที่ปลดปล่อยออกมาจึงต้อง

คำนวณจากกราฟมาตรฐานของความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของไซโปรฟลอกซาซิน ในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับกราฟมาตรฐานของอัลบูมินในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และความสัมพันธ์ตามกฎของเบียร์ (Beer's Law) ที่แสดงดังสมการที่ 2 และ 3

$$Abs_{total} = 47432C_1 + 31573C_2 \quad \text{สมการที่ 2}$$

$$Abs_1 = 47432C_1 \quad \text{สมการที่ 3}$$

โดยที่

Abs_1 ค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนในแผ่นคอมโพสิตที่ใช้เปรียบเทียบ

Abs_{total} ค่าการดูดกลืนแสงของไซโปรฟลอกซาซินรวมกับโปรตีนในแผ่นคอมโพสิตที่ประกอบด้วย ไซโปรฟลอกซาซินและแอสตาแซนทิน

C_1 ปริมาณของโปรตีนในแผ่นคอมโพสิตที่ใช้เปรียบเทียบ (หน่วยเป็นโมลาร์)

C_2 ปริมาณของไซโปรฟลอกซาซินในแผ่นคอมโพสิตที่ประกอบด้วยไซโปรฟลอกซาซินและ แอสตาแซนทิน (หน่วยเป็นโมลาร์)

วิเคราะห์แอสตาแซนทินโดยนำ phosphate buffer pH 7.4 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาสกัดด้วยตัวทำละลายผสมของ hexane: ethanol: acetone อัตราส่วน 50: 25: 25 โดยปริมาตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อให้แยกชั้น เก็บตัวทำละลายชั้นบนไว้ สกัดซ้ำ 2 ครั้ง นำตัวทำละลายทั้งหมดที่สกัดได้ไปทำให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน ในที่มีด จากนั้นเติมตัวทำละลาย DMSO ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านค่าการดูดกลืนแสงในไมโครเพลท (บริษัท Tecan, Switzerland) คำนวณเป็นปริมาณของแอสตาแซนทิน โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของแอสตาแซนทินในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3 สันฐานวิทยา

นำคอมโพสิตน้ำยางโปรตีนต่ำและเจลอัลบูมินอัตราส่วน 5:1 โดยปริมาตร ที่ประกอบด้วย ไซโปรฟลอกซาซินและแอสตาแซนทิน ไปประเหิดแห้ง และวิเคราะห์ลักษณะสันฐานและพื้นผิวของคอมโพสิต โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) (บริษัท CamScan รุ่น Maxim 2000, UK)

3.4 สมบัติความต้านทานแรงดึง

ตัดคอมโพสิตน้ำยางโปรตีนต่ำและเจลอัลบูมินอัตราส่วน 5:1 โดยปริมาตร ที่ประกอบด้วย ไซโปรฟลอกซาซินและแอสตาแซนทิน เป็นรูปดัมป์เบลล์ (dumbbell-shaped) ตามมาตรฐาน ISO37 (Type 2) และทดสอบสมบัติความต้านทานแรงดึง (tensile properties) ของคอมโพสิตด้วยเครื่อง Universal Testing Machine (INSTRON 5566) โดยให้อุปกรณ์ที่ใช้ยึดตัวอย่างเคลื่อนที่ออกจากกันด้วยความเร็วคงที่ เท่ากับ 500 มิลลิเมตรต่อนาที โหลดเซลล์ขนาด 1 kN วัดค่าความต้านแรงดึงของคอมโพสิต (tensile strength) และค่าความยืดเมื่อขาด (elongation at break) รายงานเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของคอมโพสิตทดสอบ 3 ตัวอย่าง

4. การทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อ

ทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อในเชิงคุณภาพของคอมโพสิตน้ำยางโปรตีนต่ำและเจลอัลบูมินอัตราส่วน 5:1 โดยปริมาตร ต่อ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 1467 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 517 โดยหยดเชื้อทดสอบปริมาณเริ่มต้น 10^8 CFU/มิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหาร nutrient agar (ประกอบด้วย beef extract 3 กรัมต่อลิตร peptone 5 กรัมต่อลิตร และ agar 15 กรัมต่อลิตร) แล้วจึงวางแผ่นคอมโพสิตทับลงไป จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญของเชื้อเป็นเวลา 3-5 วัน

5. การทดสอบความเป็นพิษและการฟื้นฟูเซลล์

เพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ Vero (ATCC CCL-81) เป็นเซลล์ชนิดเกาะผิวจากไตลิง และ HepG2 (ATCC HB-8065) เป็นเซลล์ชนิดเกาะผิวจากตับคน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ minimum essential medium (MEM) ที่ประกอบด้วย fetal bovine serum (FBS) 10% บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มที่ควบคุมความชื้นและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ให้เข้าสู่ระยะ log phase โดยดูการเกาะแผ่ (confluence) ที่ 60-80%

เตรียมคอมโพสิตน้ำยางโปรตีนต่ำและเจลอัลบูมินอัตราส่วน 5:1 โดยปริมาตร ขนาดกว้าง x ยาว เท่ากับ 12 x 12 มิลลิเมตร และฆ่าเชื้อด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตในตู้ปลอดเชื้อ นานด้านละ 15 นาที จากนั้นนำไปแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย FBS 10% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลา ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่แช่คอมโพสิตออกเพื่อนำไปทดสอบกับเซลล์เพาะเลี้ยง

ทดสอบความเป็นพิษ (allergen profile หรือ cytotoxicity) ของคอมโพสิตต่อเซลล์เพาะเลี้ยงโดยวัดค่าความมีชีวิตของเซลล์ วิเคราะห์ด้วยวิธี MTT reduction (Zhang และคณะ, 2008) โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ให้มีความหนาแน่นเริ่มต้นเท่ากับ 4.0×10^3 เซลล์ต่อหลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มที่ควบคุมความชื้นและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นาน 1 วัน จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์แช่คอมโพสิตที่เตรียมได้ข้างต้น ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และทำชุดควบคุม (positive control) คือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย FBS 10% ควบคู่กัน บ่มทิ้งไว้ต่อเป็นเวลา 1, 3 และ 5 วัน เมื่อครบระยะเวลา ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์และสารทดสอบทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย PBS pH 7.4 จำนวน 2 ครั้ง แล้วเติมสารละลาย MTT ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (ซึ่ง MTT 0.025 กรัม ละลายใน PBS pH 7.4 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มต่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ในตู้บ่มและในที่มืด แล้วเติมตัวทำละลาย DMSO ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายผลึกฟอร์มาซานที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยารีดักชันของ tetrazolium วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านค่าการดูดกลืนแสงในไมโครเพลท โดยปริมาณผลึกฟอร์มาซานที่เกิดขึ้นแปรผันตรงกับค่าความมีชีวิตของเซลล์ รายงานสัดส่วนความมีชีวิตของเซลล์ที่บ่มร่วมกับอาหารเลี้ยงเซลล์แช่คอมโพสิตเทียบกับเซลล์ชุดควบคุม และวิเคราะห์สถิติ two-sample, two-sided *t*-test ที่ค่านัยสำคัญเท่ากับ 0.05 และ 0.01 (ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99%)

ทดสอบความสามารถในการฟื้นฟูเซลล์ของคอมโพสิต วิธีการดัดแปลงจากงานวิจัยของ Wiegand และคณะ (2009) และของ Ferreira และคณะ (2010) โดยใส่เซลล์เพาะเลี้ยงที่มีความหนาแน่นเริ่มต้นเท่ากับ 4.0×10^3 เซลล์ต่อหลอด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงบนคอมโพสิตที่ผ่านการแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์นาน 24 ชั่วโมง บ่มทิ้งไว้ต่อเป็นระยะเวลา 1, 3 และ 5 วัน (เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน) เมื่อครบระยะเวลา ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย PBS pH 7.4 จำนวน 1 ครั้ง แล้วเติม trypsin-EDTA ความเข้มข้น 0.25% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มนาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่ม ที่ควบคุมความชื้นและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากพื้นผิว จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ $5,000 \times g$ นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง เติมน้ำละลาย MTT ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มต่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ในตู้บ่มและในที่มืด แล้วเติมตัวทำละลาย DMSO ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านค่าการดูดกลืนแสงในไมโครเพลท รายงานค่าเปอร์เซ็นต์การยืดเกาะของเซลล์ที่บ่มร่วมกับคอมโพสิตเทียบกับเซลล์ชุดควบคุมที่ปราศจากคอมโพสิต และวิเคราะห์สถิติ two-sample, two-sided *t*-test ที่ค่านัยสำคัญเท่ากับ 0.05 และ 0.01 (ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99%)

ผลการวิจัย

1. การเตรียมน้ำยางโปรตีนต่ำ

ในการเตรียมน้ำยางโปรตีนต่ำโดยใช้เอนไซม์โปรตีเอสพบว่า การลดลงของโปรตีนเท่ากับ 61-95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1) และน้ำยางโปรตีนต่ำที่เตรียมได้มีปริมาณเนื้อเยื่อแห้งคิดเป็น 30-31 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1. ปริมาณโปรตีนในน้ำยางและเปอร์เซ็นต์การลดลง

น้ำยาง	ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์การลดลง
น้ำยางชั้น	41-124	
น้ำยางโปรตีนต่ำ	2-48	61-95

ตารางที่ 2. ปริมาณเนื้อเยื่อแห้งในน้ำยาง

น้ำยาง	ปริมาณเนื้อเยื่อแห้ง (เปอร์เซ็นต์)
น้ำยางชั้น	63
น้ำยางโปรตีนต่ำ	30-31

2. การสังเคราะห์คอมโพสิต

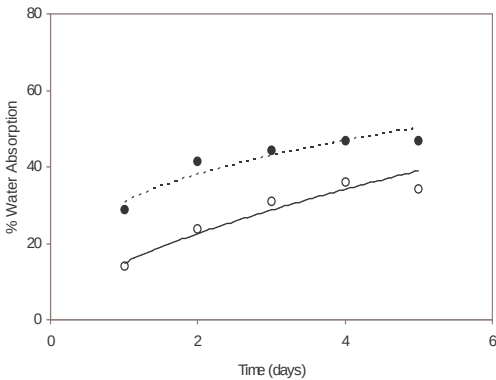
ในการสังเคราะห์คอมโพสิตน้ำยางโปรตีนต่ำและเจลอัลบูมินพบว่า มีการผสมเข้ากันได้ดี และจากการสังเกตลักษณะภายนอกของคอมโพสิตที่ขึ้นรูปอุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส นาน 50 ชั่วโมง พื้นผิวมีความ

สม่ำเสมอ เรียบเนียน ขึ้นรูปเป็นแผ่น คงสภาพ ตัดเป็นชิ้นได้ง่าย ในการขึ้นรูปวัสดุด้วยวิธี thermally induced phase separation พบว่า ถ้าอุณหภูมิของการเกิดพอลิเมอร์ต่ำ ทำให้ความเป็นรูพรุนและขนาดของรูพรุนเพิ่มขึ้น Herculano และคณะ (2010) พบว่า การขึ้นรูปน้ำยางที่อุณหภูมิ -100 องศาเซลเซียส ความหนาแน่นของรูพรุน (pore density) มากขึ้น และลักษณะพื้นผิวเกิดรอยแตก สอดคล้องกับผลการทดลองนี้ที่อาจเป็นไปได้ว่าที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ให้ผลการขึ้นรูปได้ไม่ดีเท่ากับที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส และเมื่อแปรผันความเข้มข้นของอัลบูมินพบว่า คอมโพสิตมีลักษณะไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 3) นอกจากนี้ ในการทดสอบการดูดซับน้ำพบว่า คอมโพสิตที่ประกอบด้วยอัลบูมิน 8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีค่าเปอร์เซ็นต์การดูดซับน้ำมากกว่าของอัลบูมิน 6% (รูปที่ 1) จากการสำรวจเอกสารพบว่า วัสดุปิดแผลในทางการค้ามีหลายชนิดซึ่งจะต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมกับชนิดและลักษณะของแผล ตลอดจนระยะในการรักษา (healing phase) ในงานวิจัยนี้เลือกใช้อัลบูมินที่ความเข้มข้น 6% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อเป็นต้นแบบในการศึกษาและพัฒนาเป็นวัสดุปิดแผล เนื่องจากใช้วัตถุดิบในปริมาณที่น้อยกว่า

ตารางที่ 3. ลักษณะของคอมโพสิตที่แปรผันความเข้มข้นของอัลบูมินตามสภาวะการขึ้นรูป

สภาวะการขึ้นรูป	ลักษณะของคอมโพสิต	
	อัลบูมิน 6% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	อัลบูมิน 8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
อุณหภูมิห้อง 50 ชั่วโมง	-	-
-18 °C 2 ชั่วโมง + อุณหภูมิห้อง 48 ชั่วโมง	+	+
-80 °C 2 ชั่วโมง + อุณหภูมิห้อง 48 ชั่วโมง	-	-
-18 °C 50 ชั่วโมง	++	++
-80 °C 50 ชั่วโมง	+	+

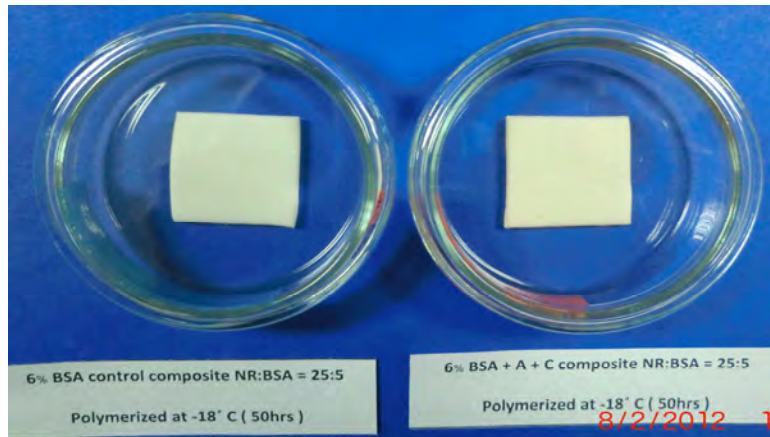
- ไม่สามารถขึ้นรูปได้ เป็นของเหลว, + ขึ้นรูปได้ อ่อนนิ่มไม่เป็นแผ่น ไม่คงสภาพ, ++ ขึ้นรูปเป็นแผ่น คงสภาพ ตัดเป็นชิ้นได้
ข้อมูลที่แสดงมาจากการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง



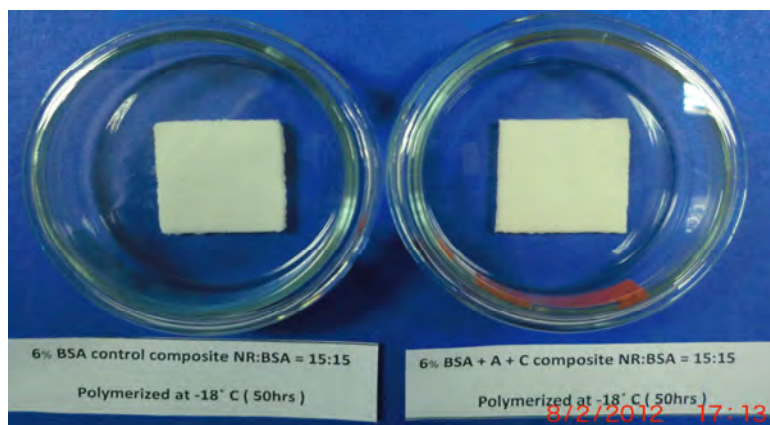
รูปที่ 1. การดูดซับน้ำของคอมโพสิตที่ประกอบด้วยน้ำยางโปรตีนต่ำและอัลบูมิน 6% และ 8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แปรผันกับเวลาที่ใช้ในการทดสอบ ขึ้นรูปที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส นาน 50 ชั่วโมง โดยที่ (○-) อัลบูมิน 6% และ (●-) อัลบูมิน 8%

ในการสังเคราะห์คอมโพสิตโดยแปรผันองค์ประกอบแล้วสังเกตลักษณะภายนอกพบว่า คอมโพสิตที่อัตราส่วนเท่ากับ 5:1 และ 1:5 โดยปริมาตร มีผิวเรียบเนียน (รูปที่ 2A และ 2C) ส่วนที่อัตราส่วน 1:1 มีลักษณะเนื้อฟูมากกว่า (รูปที่ 2B)

(A)

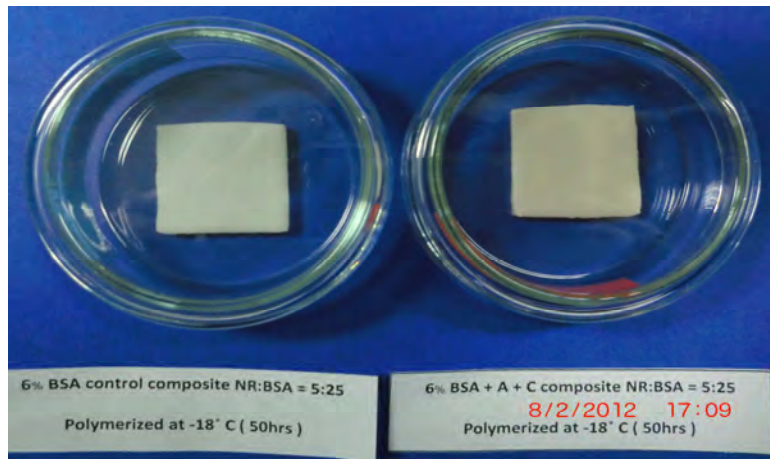


(B)



รูปที่ 2. ลักษณะของคอมโพสิต DPNR: BSA อัตราส่วน (A) 5:1, (B) 1:1 และ (C) 1:5 โดยปริมาตร คอมโพสิตที่ใช้เปรียบเทียบกับ (ด้านซ้ายมือ) และที่ประกอบด้วยไฮโปรฟลอกซาซินและแอสตาแซนทิน (ด้านขวามือ) ขึ้นรูปที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส นาน 50 ชั่วโมง

(C)



รูปที่ 2. (ต่อ)

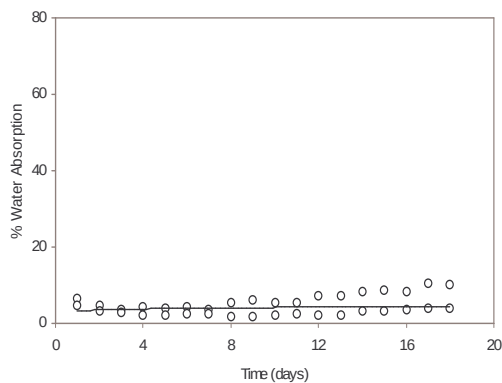
3. การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและสมบัติเชิงกล

3.1 การดูดซับน้ำ

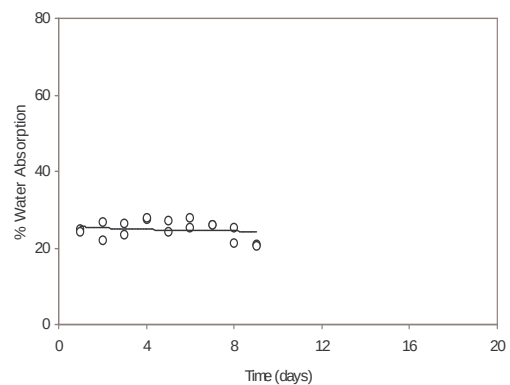
การดูดซับน้ำถือเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของวัสดุปิดแผลในการช่วยรักษาความชุ่มชื้นและดูดซับ exudates จากบาดแผล ผลการทดลองพบว่า คอมโพสิทน้ำยางโปรตีนต่ำและเจลอัลบูมินประกอบด้วยเจลในอัตราส่วนที่มากกว่า ดูดซับได้มากยิ่งขึ้น โดยอัตราส่วน 1:5 มีการดูดซับน้ำได้สูงสุด ในขณะที่อัตราส่วน 5:1 มีการดูดซับได้ต่ำที่สุด และเปอร์เซ็นต์การดูดซับน้ำโดยเฉลี่ยของคอมโพสิทอัตราส่วน 5:1, 1:1 และ 1:5 โดยปริมาตร คิดเป็น 4.6, 24.9 และ 56.5% ตามลำดับ (รูปที่ 3A, 3B และ 3C) ทั้งนี้ เนื่องมาจากสมบัติของ ไฮโดรเจลอัลบูมินที่มีความชอบน้ำสูง (highly hydrophilic) จึงดูดซับน้ำได้ดี และมีข้อสังเกตเพิ่มเติมว่า คอมโพสิทอัตราส่วน 5:1 คงสภาพอยู่ได้นานที่สุด (นานถึง 18 วัน) ในขณะที่อัตราส่วน 1:1 และ 1:5 เริ่มมีส่วนชอบของคอมโพสิทหลุดลอยออกมา ในวันที่ 9 ของการทดลอง ดังนั้น คอมโพสิทที่คงสภาพได้นานขึ้น แต่มีประสิทธิภาพการดูดซับน้ำลดลง

จากผลการทดลองข้างต้นสามารถใช้เป็นแนวทางในการนำไปพัฒนาเป็นวัสดุปิดแผลได้ดังนี้ คอมโพสิทที่อัตราส่วนเท่ากับ 5:1 เหมาะกับแผลที่มี exudates น้อย เช่น แผลกดทับ แผลที่เท้าจากโรคเบาหวาน และแผลไหม้ เป็นต้น ที่อัตราส่วน 1:1 เหมาะกับแผลที่มี exudates ปานกลาง และที่อัตราส่วน 1:5 เหมาะกับแผลที่มี exudates มาก เช่น แผลเรื้อรังขนาดแผลลึกและมึกลื่น เป็นต้น โดยสามารถดูดซับสารเก็บไว้ภายในโครงสร้างเจลของอัลบูมิน (Skórkowska-Telichowska และคณะ, 2011)

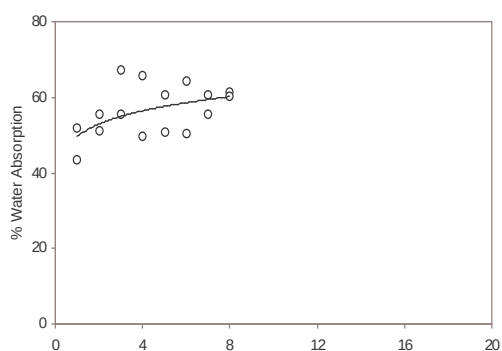
(A)



(B)



(C)



รูปที่ 3. การดูดซับน้ำของคอมโพสิต DPNR: BSA อัตราส่วน (A) 5:1, (B) 1:1 และ (C) 1:5 โดยปริมาตร แปรผันกับเวลาที่ใช้ในการทดสอบ ขึ้นรูปที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส นาน 50 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงมาจากค่าเฉลี่ยของการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง ทั้งของคอมโพสิตที่ใช้เปรียบเทียบกับที่ประกอบด้วยไฮโดรฟลอกซาซินและแอสตาแซนทิน

3.2 การปลดปล่อยสาร

การปลดปล่อยสารมีความสำคัญต่อกลไกของการรักษาบาดแผล ในการประเมินการปลดปล่อยยา ไฮโดรฟลอกซาซินพบว่า คอมโพสิตทุกอัตราส่วนปลดปล่อยได้สูงสุดในวันที่ 1 โดยที่อัตราส่วน 1:5 ปลดปล่อยได้ปริมาณมากที่สุด คิดเป็น 1.55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่อัตราส่วน 5:1 และ 1:1 มีค่าไม่แตกต่างกัน โดยรูปแบบการปลดปล่อยเป็นแบบช้าๆ (slow release) ซึ่งช่วยให้การออกฤทธิ์ต่อเนื่องได้นานสม่ำเสมอ Hu และคณะ (2010) รายงานการจับกันของไฮโดรฟลอกซาซินกับอัลบูมินว่าเกิดขึ้นได้เอง (spontaneous) และอาศัยอันตรกิริยาไฟฟ้าสถิต (electrostatic interaction) โดยอัลบูมินยังช่วยเพิ่มการละลายของยาได้ด้วย ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในงานวิจัยนี้ที่พบว่า คอมโพสิตอัตราส่วน 1:5 ปลดปล่อยยาในสถานะที่เกิดการแลกเปลี่ยนไอออน ใน phosphate buffer pH 7.4 ได้ในปริมาณสูงสุด นอกจากนี้ยังพบว่า คอมโพสิตอัตราส่วน 5:1 ตรวจวัดปริมาณการปลดปล่อยยาได้นานถึง 4 วัน แต่ที่อัตราส่วน 1:1 และ 1:5 ปริมาณของไฮโดรฟลอกซาซินไม่สามารถตรวจวัดได้ในวันที่ 3 และ 4 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการคงรูปของคอมโพสิตที่แตกต่างกัน ทำให้โปรตีนในคอมโพสิตที่อัตราส่วน 1:1 และ 1:5 ซึ่งมีความคงรูปน้อยกว่าที่อัตราส่วน 5:1 เริ่ม

หลุดออกมาได้เร็วกว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในแผ่นคอมโพสิตที่ใช้เปรียบเทียบกับที่ประกอบด้วยไฮโปฟลอกซาซินและแอสตาแซนทินจึงมีค่าไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4. การปลดปล่อยไฮโปฟลอกซาซินจากคอมโพสิต

คอมโพสิต DPNR: BSA อัตราส่วนโดยปริมาตร	ปริมาณไฮโปฟลอกซาซินที่ปลดปล่อย (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)			
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4
5:1	1.33	0.71	0.49	0.35
1:1	1.28	0.35	-	-
1:5	1.55	0.83	-	-

ข้อมูลที่แสดงมาจากค่าเฉลี่ยของการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

ส่วนการปลดปล่อยแอสตาแซนทินพบว่า การเติมแอสตาแซนทินแบบจุ่มแช่แผ่นคอมโพสิต ทำให้แอสตาแซนทินปลดปล่อยออกได้ปริมาณมากกว่าแบบที่ผสมลงไปในช่วงขั้นตอนของการเตรียมคอมโพสิต ปริมาณคิดเป็น 1.2-2.2 และ 0.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 5) ทั้งนี้ สัดส่วนของแอสตาแซนทินที่วัดได้มีปริมาณน้อย อาจเนื่องมาจากการทดสอบทำใน phosphate buffer pH 7.4 (physiological buffer) แต่แอสตาแซนทินมีคุณสมบัติชอบไขมัน ละลายในน้ำได้น้อย (hydrophobic) และเมื่อพิจารณาอัตราการปลดปล่อยทั้งสองแบบพบว่า มีแนวโน้มคงที่ ในช่วงเวลาที่ทดสอบนาน 2 วัน ซึ่งเหมาะสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้กับบาดแผลที่ต้องฟื้นฟูเซลล์แบบทันที (immediate cell proliferation)

ตารางที่ 5. การปลดปล่อยแอสตาแซนทินจากคอมโพสิต

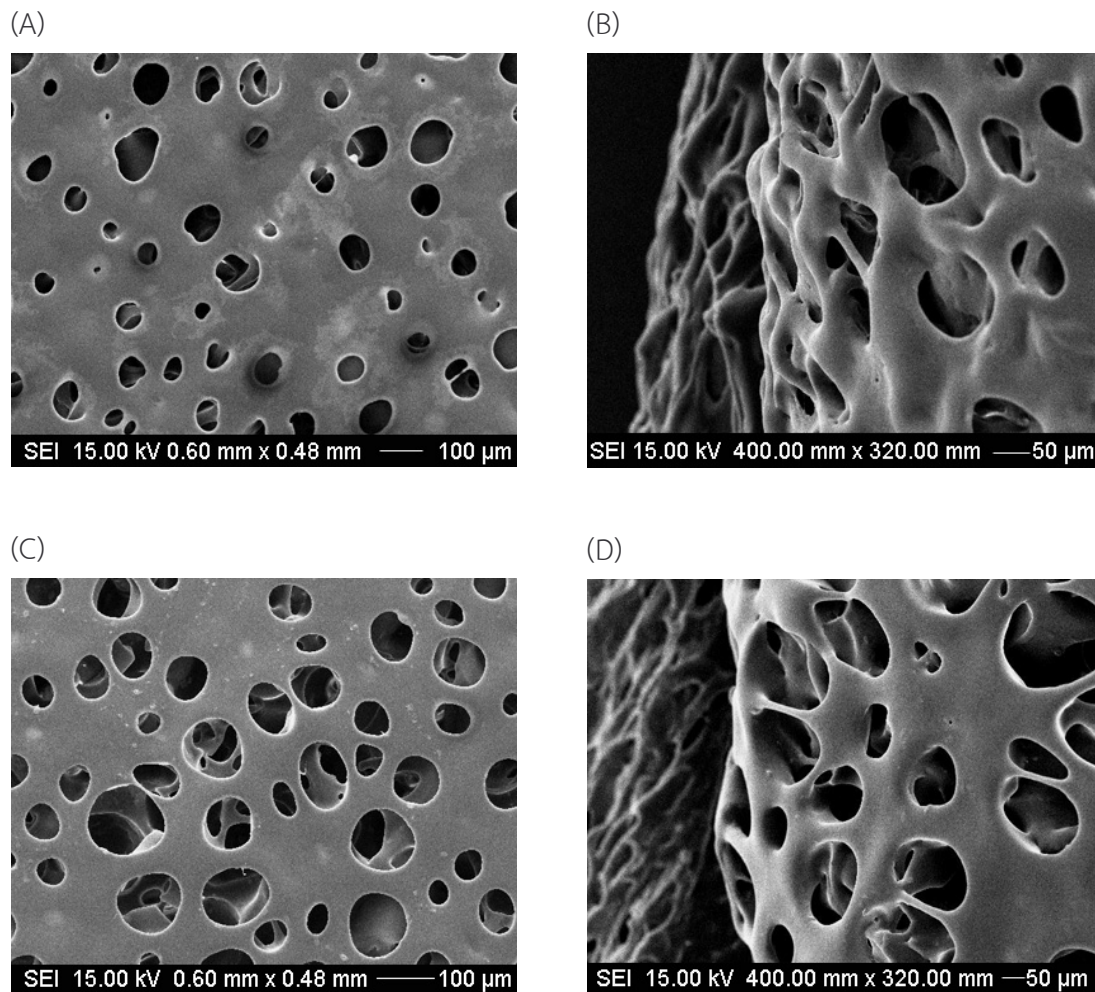
คอมโพสิต DPNR: BSA อัตราส่วนโดยปริมาตร	ปริมาณแอสตาแซนทินที่ปลดปล่อย (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	วันที่ 1	วันที่ 2
5:1		
แบบจุ่มแช่	2.20	1.19
แบบผสม	0.67	0.67
1:1	ND	ND
1:5	ND	ND

ND หมายถึง Not determined และข้อมูลของแบบจุ่มแช่และแบบผสมที่แสดงมาจากค่าเฉลี่ยของการทดลองซ้ำ 3 และ 2 ครั้ง ตามลำดับ

3.3 สัณฐานวิทยา

การวิเคราะห์ลักษณะสัณฐานและพื้นผิวของคอมโพสิตโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่า มีลักษณะเป็นโพรงบนพื้นผิว ที่มีความลึกลงไป (รูปที่ 4A และ 4C) และเชื่อมต่อกับโพรงบริเวณรอบ (รูปที่ 4B และ 4D) ซึ่งเกิดจากการขึ้นรูปคอมโพสิตที่อุณหภูมิต่ำและเกิดการต่อประสาน

(interfacial interaction) ของอัลูมินกับน้ำยางเกิดขึ้น (Herculano และคณะ, 2010) มีข้อที่น่าสังเกตว่า คอมโพสิตแบบจุ่มแช่แอสตาแซนทินหลังการขึ้นรูป โพรงมีขนาดกว้างกว่า และพบอนุภาคอยู่นอกผิวเนื้ออย่าง



รูปที่ 4. ภาพถ่ายด้วย SEM ของสัณฐานและพื้นผิวของคอมโพสิต DPNR: BSA อัตราส่วน 5:1 โดยปริมาตร ที่ประกอบด้วย ไฮโปรฟลอกซาซินและแอสตาแซนทิน (A)-(B) คอมโพสิตแบบผสมแอสตาแซนทินก่อนการขึ้นรูป และ (C)-(D) คอมโพสิตแบบจุ่มแช่แอสตาแซนทินหลังการขึ้นรูป โดย (A) และ (C) แสดงภาพในแนวระนาบ และ (B) และ (D) แสดงภาพในแนวตัดขวาง และ scale bar แสดงได้รูป

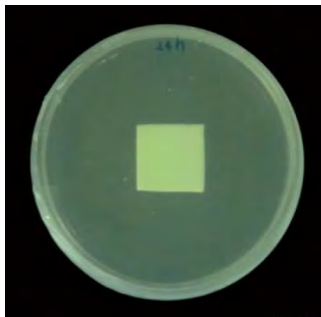
3.4 สมบัติความต้านทานแรงดึง

ในการทดสอบสมบัติความต้านทานแรงดึงของคอมโพสิตอัตราส่วน 5:1 โดยปริมาตร ที่ประกอบด้วย ไฮโปรฟลอกซาซินและแอสตาแซนทิน ขึ้นรูปที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส นาน 50 ชั่วโมง พบว่า ค่าความต้านแรงดึงของคอมโพสิต (tensile strength) และค่าความยืดเมื่อขาด (elongation at break) เท่ากับ $0.154 \pm 0.017 \text{ N/mm}^2$ และ $569 \pm 75\%$ ตามลำดับ

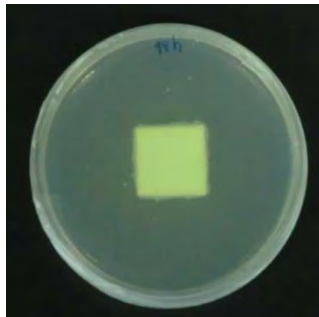
4. การทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อ

การทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อด้วยยาปฏิชีวนะไซโพรฟลอกซาซินซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม fluoroquinolone ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมลบและแกรมบวกในกลุ่มของ cocci ได้ ผลการทดลองพบว่า คอมโพสิตน้ำยางโปรตีนต่ำและเจลอัลบูมินที่ประกอบด้วยไซโพรฟลอกซาซินและแอสตาแซนทินออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ตลอดระยะเวลาของการทดสอบ เมื่อเทียบกับคอมโพสิตที่ใช้เปรียบเทียบกับพบการเจริญของเชื้อบริเวณใต้แผ่นที่เวลา 24 ชั่วโมง และมีการเจริญเพิ่มมากขึ้นบริเวณรอบๆ คอมโพสิตที่เวลา 48-72 ชั่วโมง (รูปที่ 5A-5C และ 5D-5F) ในขณะที่การยับยั้งการเจริญไม่มีความแตกต่างกันเมื่อทดสอบกับเชื้อ *S. aureus* โดยไม่พบการเจริญเกิดขึ้นทั้งบริเวณใต้แผ่นและรอบๆ คอมโพสิต (รูปที่ 6A-6E และ 6F-6J) เนื่องจาก *S. aureus* ถือเป็นแบคทีเรียที่มีรายงานการดื้อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในทางการแพทย์ปัจจุบันมากที่สุด จึงทดสอบเป็นระยะเวลานานขึ้น (120 ชั่วโมง) ในการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของคอมโพสิตที่ใช้เปรียบเทียบกับอาจวิเคราะห์ว่า เป็นผลจากองค์ประกอบคือ อัลบูมิน, สาร SDS และ/หรือน้ำยางโปรตีนต่ำ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อขององค์ประกอบดังกล่าว โดยการวัดปริมาณเชื้อที่มีชีวิต (เชิงปริมาณ) และพบว่า SDS ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ (ไม่ได้แสดงผลการทดลองไว้ในที่นี้)

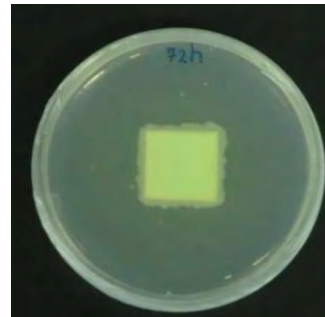
(A) 24 ชั่วโมง



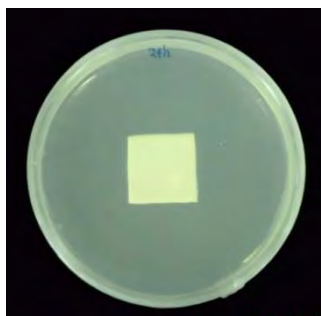
(B) 48 ชั่วโมง



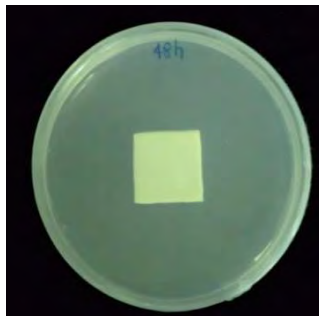
(C) 72 ชั่วโมง



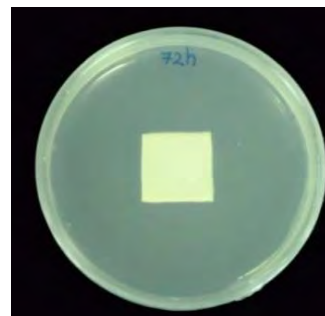
(D) 24 ชั่วโมง



(E) 48 ชั่วโมง

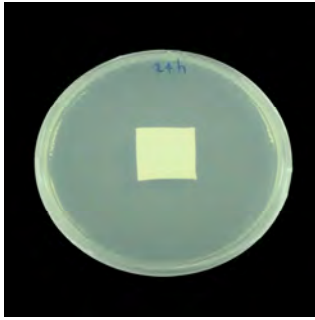


(F) 72 ชั่วโมง

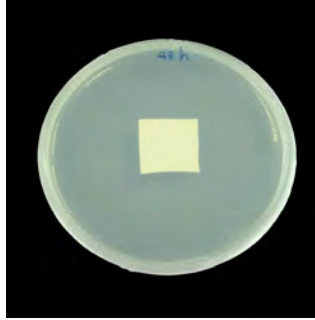


รูปที่ 5. ฤทธิ์การฆ่าเชื้อของคอมโพสิต DPNR: BSA อัตราส่วน 5:1 โดยปริมาตร ต่อ *P. aeruginosa* TISTR 1467 (A)-(C) คอมโพสิตที่ใช้เปรียบเทียบกับ และ (D)-(F) คอมโพสิตที่ประกอบด้วยไซโพรฟลอกซาซินและแอสตาแซนทิน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง

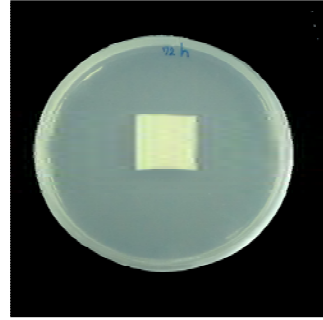
(A) 24 ชั่วโมง



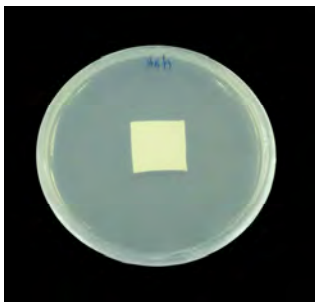
(B) 48 ชั่วโมง



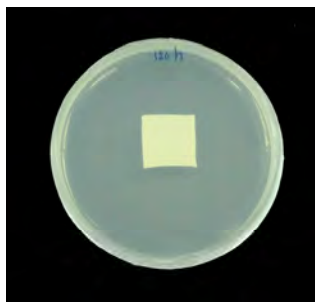
(C) 72 ชั่วโมง



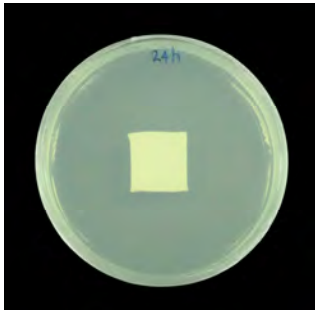
(D) 96 ชั่วโมง



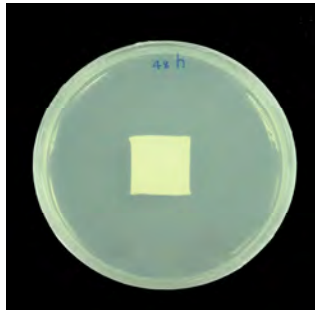
(E) 120 ชั่วโมง



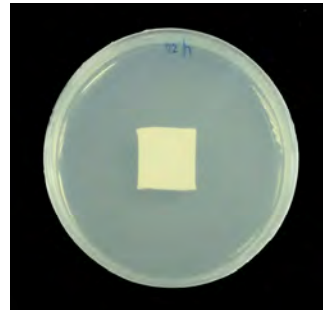
(F) 24 ชั่วโมง



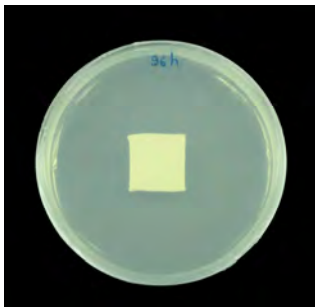
(G) 48 ชั่วโมง



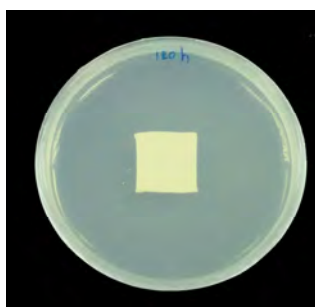
(H) 72 ชั่วโมง



(I) 96 ชั่วโมง



(J) 120 ชั่วโมง

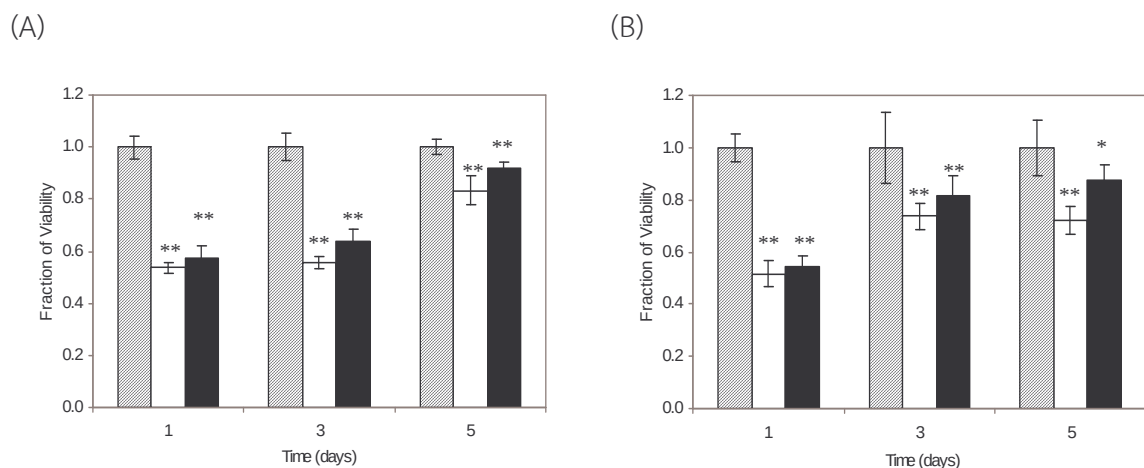


รูปที่ 6. ฤทธิ์การฆ่าเชื้อของคอมโพสิต DPNR: BSA อัตราส่วน 5:1 โดยปริมาตร ต่อ *S. aureus* TISTR 517 (A)-(E) คอมโพสิตที่ใช้เปรียบเทียบ และ (F)-(J) คอมโพสิตที่ประกอบด้วยไฮโปฟล็อกซาซินและแอสตาแซนทิน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-120 ชั่วโมง

5. การทดสอบความเป็นพิษและการฟื้นฟูเซลล์

การประเมินความเป็นพิษและการฟื้นฟูเซลล์ของคอมโพสิทเลือกใช้เซลล์ไลน์ต้นแบบได้แก่ เซลล์ Vero (fibroblast) ซึ่งเป็นเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ทำหน้าที่สร้างเส้นใยชนิดต่างๆ และเซลล์ HepG2 (epithelial-like) ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งตับคน

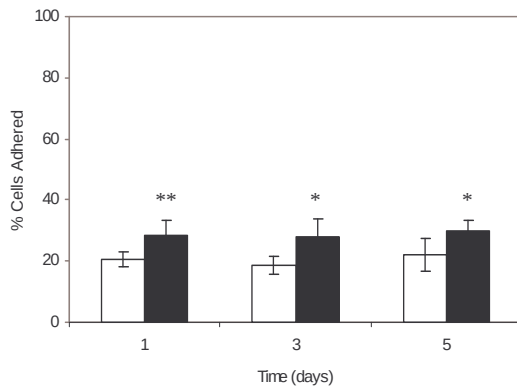
การทดสอบความเป็นพิษโดยการวิเคราะห์ค่าความมีชีวิตของเซลล์พบว่า คอมโพสิทมีการปลดปล่อยสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้แช่ และสัดส่วนความมีชีวิตของเซลล์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในเซลล์ Vero เมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้เป็นชุดควบคุมที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ตลอดระยะเวลาเพาะเลี้ยงนาน 5 วัน (รูปที่ 7A) และในเซลล์ HepG2 ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ในวันที่ 1, 3 และ 5 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้แช่คอมโพสิทที่ใช้เปรียบเทียบกับ และที่ 95% ในวันที่ 5 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้แช่คอมโพสิทที่ประกอบด้วยไซโปรฟลอกซาซินและแอสตาแซนทิน (รูปที่ 7B) โดยทั่วไปการประเมินความเป็นพิษในงานเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ สัดส่วนความมีชีวิตของเซลล์ที่ยอมรับได้ควรเท่ากับหรือมากกว่า 0.8 หรือคิดเป็น 80% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งพบในวันที่ 3 และ 5 เนื่องจากเซลล์มีการปรับตัวในสภาวะดังกล่าวได้นอกจากนี้ เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้แช่คอมโพสิทที่ประกอบด้วยไซโปรฟลอกซาซินและแอสตาแซนทินมีสัดส่วนความมีชีวิตของเซลล์สูงกว่าในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้แช่คอมโพสิทที่ใช้เปรียบเทียบกับ ซึ่งอาจเนื่องมาจากแอสตาแซนทินช่วยในการกระตุ้นการเจริญของเซลล์ สอดคล้องกับงานวิจัยเมื่อไม่นานนี้ของ วิมล เผ่าดี (2554) และของ Shimidzu และคณะ (1996) ที่รายงานผลของแอสตาแซนทินในการช่วยกระตุ้นการเจริญของเซลล์ และของ Ohgami และคณะ (2003) ซึ่งพบว่าแอสตาแซนทินช่วยลดการอักเสบของเซลล์ macrophage ของหนู อีกทั้งยังช่วยให้ความมีชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้น



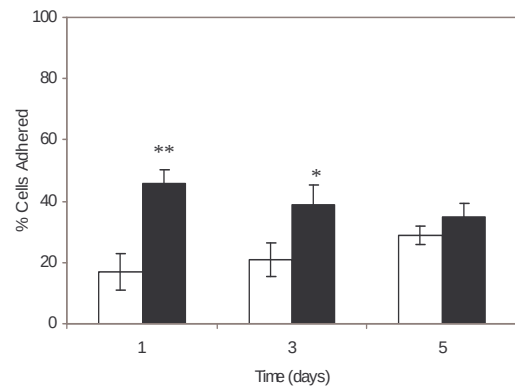
รูปที่ 7. สัดส่วนความมีชีวิตของเซลล์ไลน์ (A) Vero และ (B) HepG2 หลังบ่มร่วมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ (ชุดควบคุม) (แท่งลายขวาง) อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้แช่คอมโพสิทที่ใช้เปรียบเทียบกับ (แท่งสีขาว) และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้แช่คอมโพสิทที่ประกอบด้วยไซโปรฟลอกซาซินและแอสตาแซนทิน (แท่งสีดำ) เป็นเวลานาน 1, 3 และ 5 วัน รายงานผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการทดสอบจำนวน 8 ซ้ำ ** และ * แสดงถึงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้แช่คอมโพสิทเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ (ชุดควบคุม) ที่ $p < 0.01$ และ $p < 0.05$ ตามลำดับ

การทดสอบความสามารถในการฟื้นฟูเซลล์ทำโดยการวัดปริมาณเซลล์เกาะผิวที่เพิ่มขึ้น เมื่อวิเคราะห์การเกาะผิวของเซลล์บนคอมโพสิตหะเลียงเป็นเวลา 1 วัน พบว่า เซลล์ HepG2 มีการเกาะผิวบนคอมโพสิตที่ประกอบด้วยไฮโปรฟลอกซาซินและแอสตาแซนทินได้ดีกว่าเซลล์ Vero คิดเป็น 46 และ 29% ตามลำดับ ในขณะที่การเกาะผิวบนคอมโพสิตที่ใช้เปรียบเทียบไม่แตกต่างกันและมีค่าอยู่ในช่วง 17-20% ส่วนการฟื้นฟูเซลล์โดยประเมินจากการเพาะเลี้ยงนาน 5 วันพบว่า คอมโพสิตที่ประกอบด้วยไฮโปรฟลอกซาซินและแอสตาแซนทินช่วยเพิ่มการเกาะผิวและกระตุ้นการเจริญของเซลล์ได้เมื่อเทียบกับคอมโพสิตที่ใช้เปรียบเทียบ โดยเปอร์เซ็นต์ของการเกาะผิวของเซลล์ Vero บนคอมโพสิตที่ประกอบด้วยไฮโปรฟลอกซาซินและแอสตาแซนทินมีค่าไม่แตกต่างกันตลอดระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ในวันที่ 1 และที่ 95% ในวันที่ 3 และ 5 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับการเกาะผิวบนคอมโพสิตที่ใช้เปรียบเทียบ (รูปที่ 8A) ในขณะที่เซลล์ HepG2 ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 5 เมื่อเทียบกับการเกาะผิวบนคอมโพสิตที่ใช้เปรียบเทียบ ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจาก HepG2 เป็นเซลล์มะเร็งจึงสามารถเจริญและปรับตัวในสภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้อย่างรวดเร็ว (รูปที่ 8B) นอกจากนี้ ยังมีข้อสังเกตอีกว่าคอมโพสิตที่ใช้เปรียบเทียบช่วยฟื้นฟูเซลล์ได้ด้วย (ปริมาณเซลล์เกาะผิวมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในวันที่ 5) ซึ่งอาจเป็นผลของอัลบูมิน ตลอดจนสารที่ไม่ใช่ยาง (non-rubber constituents) (วารสาร ฆจรไชยกุล, 2549) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่แล้วในน้ำยาง และเซลล์ HepG2 มีการฟื้นฟูได้มากกว่า Vero ซึ่งเป็นเซลล์ปกติ ทั้งในวันที่ 3 และ 5 Ferreira และคณะ (2010) ทดสอบการฟื้นฟูเซลล์ skin fibroblast ที่คัดแยกได้จากผู้ป่วยบนวัสดุปิดแผลในกลุ่มของวัสดุเซลลูโลส โดยพบการเกาะผิวสูงถึง 70% และการฟื้นฟูเซลล์ 12% ในเวลา 7 วัน ส่วน Teramoto และคณะ (2008) รายงานการเกาะผิวของเซลล์ fibroblast ของหนูบนแผ่นฟิล์มที่ทำจากโปรตีน sericin เกิดขึ้นภายใน 2 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง และมีปริมาณเซลล์เกาะผิวในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยซีรัมมากกว่าในอาหารที่ปราศจากซีรัม

(A)



(B)



รูปที่ 8. เปอร์เซ็นต์การเกาะผิวของเซลล์ไลน์ (A) Vero และ (B) HepG2 หลังบ่มร่วมกับคอมโพสิต DPNR: BSA อัตราส่วน 5:1 โดยปริมาตร ที่ใช้เปรียบเทียบ (แท่งสีขาว) และคอมโพสิตที่ประกอบด้วยไฮโดรฟลอกซาซินและแอสตาแซนทิน (แท่งสีดำ) เทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงพอลิสไตรีนที่ปราศจากคอมโพสิต เป็นเวลานาน 1, 3 และ 5 วัน รายงานผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ ** และ * แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของเซลล์เพาะเลี้ยงบนคอมโพสิตที่ประกอบด้วยไฮโดรฟลอกซาซินและแอสตาแซนทิน เทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงบนคอมโพสิตที่ใช้เปรียบเทียบที่ $p < 0.01$ และ $p < 0.05$ ตามลำดับ

วิจารณ์ผล

คอมโพสิตที่แปรผันอัตราส่วนของน้ำยางโปรตีนดำและอัลบูมิน นำไปออกแบบวัสดุปิดแผลให้เหมาะสมกับการใช้งานได้จริง อย่างไรก็ตาม ยังคงต้องมีการแก้ไขปัญหาคือความเป็นพิษของคอมโพสิต ร่วมกับการทดสอบทางเนื้อเยื่อวิทยาและสัตว์ทดลอง ก่อนนำไปประยุกต์ใช้ในทางคลินิกต่อไป

สรุปผล

งานวิจัยนี้พัฒนาวัสดุปิดแผลคอมโพสิตที่ช่วยเร่งการเจริญและซ่อมแซมเนื้อเยื่อ โดยมีขั้นตอนการเตรียมไม่ยุ่งยาก สามารถดัดเป็นชิ้นได้ง่าย ซึ่งองค์ประกอบในคอมโพสิตทำหน้าที่เฉพาะที่สำคัญดังนี้ อัลบูมินมีคุณสมบัติที่ชอบน้ำ ทำให้เป็นผลดีต่อการควบคุมความชื้นและการดูดซับ exudates ของแผล ส่วนน้ำยางโปรตีนดำช่วยในการเพิ่มการคงรูป ความยืดหยุ่น ทำให้เพิ่มการสัมผัสกับบาดแผลได้ดีขึ้น ทำให้สามารถนำไปใช้งานกับแผลบริเวณข้อต่อ หรือแผลเรื้อรังได้ดี การเติมยาปฏิชีวนะไฮโดรฟลอกซาซินพบว่า ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค และแอสตาแซนทินช่วยเพิ่มการเกาะผิวและกระตุ้นการเจริญของเซลล์ได้ อย่างไรก็ตาม ยังคงต้องมีการแก้ไขปัญหาคือความเป็นพิษต่อเซลล์จากสารที่ปลดปล่อยออกมาจากคอมโพสิต

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำน้ำยางโปรตีนต่ำมาใช้เป็นองค์ประกอบร่วมในการสังเคราะห์วัสดุปิดแผลพบว่า น้ำยางช่วยเพิ่มการคงรูปของคอมโพสิตได้ดี แต่สารที่ปลดปล่อยออกมาจากคอมโพสิตมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ที่ใช้ทดสอบ ซึ่งอาจเกิดจากการใช้ SDS ในขั้นตอนของการเตรียมน้ำยางโปรตีนต่ำ

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยได้รับการสนับสนุนจากโครงการวิจัยขนาดเล็กเรื่องยางพารา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ขอขอบคุณบริษัท ไทยรับเบอร์ลาเท็กซ์คอร์ปอเรชั่น (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน) ที่ให้ความอนุเคราะห์น้ำยางชนิด High ammonia บริษัท Kao Industrial (Thailand) จำกัด ในความอนุเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอส และบริษัท โกเวล จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์แอสตาแซนทิน ขอขอบคุณสถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา สำหรับการทำระเหิดแห้ง ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ในการวิเคราะห์สัณฐานวิทยา ศูนย์วิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมยางไทย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา ในการทดสอบสมบัติความต้านทานแรงดึงของคอมโพสิต และขอขอบคุณเภสัชกรหญิง รศ. ดร. ปราณิศา โอปะณะโสภิต คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร และสถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ให้ความอนุเคราะห์เซลล์ไลน์ HepG2 และ Vero ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

- พงษ์ธร แซ่ฮุย. 2548. ยาง: ชนิด สมบัติ และการใช้งาน. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ศูนย์เทคโนโลยีและวัสดุแห่งชาติ (เอ็มเทค).
- วิมล เผ่าดี. 2554. วัสดุเจลเปปไทด์ปิดแผลจากธรรมชาติสำหรับการสมานแผล. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. นครปฐม: มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- วรภรณ์ ขจรไชยกูล. 2549. ยางธรรมชาติ: การผลิตและการใช้งาน (Natural rubber: production and applications). กรุงเทพฯ: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.).
- Byars JA, Jong L. 2009. Flow properties of natural rubber composites filled with defatted soy flour. *J Appl Polym Sci* 111: 2049-2055.
- Chalkley LJ, Koornhof HJ. 1985. Antimicrobial activity of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* determined by the killing curve method: antibiotic comparisons and synergistic interactions. *Antimicrob Agents Chemother* 28: 331-342.
- Czaja W, Krystynowicz A, Bielecki S, Brown Jr. RM. 2006. Microbial cellulose- the natural power to heal wounds. *Biomaterials* 27: 145-151.

- Ferreira LM, Sobral CS, Blanes L, Ipolito MZ, Horibe EK. 2010. Proliferation of fibroblasts cultured on a hemi-cellulose dressing. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 63: 865-869.
- Gordillo GM, Sen CK. 2003. Revisiting the essential role of oxygen in wound healing. *Am J Surg* 186: 259-263.
- Herculano RD, Guimarães SAC, Belmonte GC, Duarte MAH, Júnior ONO, Kinoshita A, Graeff CFO. 2010. Metronidazole release using natural rubber latex as matrix. *Mater Res* 13: 57-61.
- Hu Y-J, Ou-Yang Y, Zhang Y, Liu Y. 2010. Affinity and specificity of ciprofloxacin-bovine serum albumin interactions: spectroscopic approach. *Protein J* 29: 234-241.
- Jong L. 2005. Characterization of soy protein/styrene-butadiene rubber composites. *Compos Part A Appl Sci Manuf* 36: 675-682.
- Jong L. 2006. Effect of soy protein concentrate in elastomer composites. *Compos Part A Appl Sci Manuf* 37: 438-446.
- Le Goffic F, Capmau ML, Tangy F, Baillarge M. 1979. Mechanism of action of aminoglycoside antibiotics (binding studies of tobramycin and its 6'-N-acetyl derivative to the bacterial ribosome and its subunits. *Eur J Biochem* 102: 73-81.
- Martin A. 1996. The use of antioxidants in healing. *Dermatol Surg* 22: 156-160.
- McCord JM. 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 108: 652-659.
- Moseley R, Hilton JR, Waddington RJ, Harding KG, Stephens P, Thomas DW. 2004. Comparison of oxidative stress biomarker profiles between acute and chronic wound environments. *Wound Repair Regen* 12: 419-429.
- Nair KG, Dufresne A. 2003. Crab shell chitin whisker reinforced natural rubber nanocomposites (1. processing and swelling behavior). *Biomacromolecules* 4: 657-665.
- Nelson DL, Cox MM. 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3rd ed. New York: Worth Publisher: 192.
- Ohgami K, Shiratori K, Kotake S, Nishida T, Mizuki N, Yazawa K, Ohno S. 2003. Effects of astaxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation *in vitro* and *in vivo*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 2694-2701.
- Rasik AM, Shukla A. 2000. Antioxidant status in delayed healing type of wounds. *Int J Exp Pathol* 81: 257-268.
- Rose K, Steinbüchel A. 2005. Biodegradation of natural rubber and related compounds: recent insights into a hardly understood catabolic capability of microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 71: 2803-2812.

- Rouilly A, Rigal L, Gilbert RG. 2004. Synthesis and properties of composites of starch and chemically modified natural rubber. *Polymer* 45: 7813-7820.
- Schäfer M, Werner S. 2008. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacol Res* 58: 165-171.
- Shimidzu N, Goto M, Miki W. 1996. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. *Fish Sci* 62: 134-137.
- Siler DJ, Cornish K. 1995. Measurement of protein in natural rubber latex. *Anal Biochem* 229: 278-281.
- Singer AJ, Clark RAF. 1999. Mechanisms of disease: cutaneous wound healing. *New Engl J Med* 341:738-746.
- Skórkowska-Telichowska K, Czemplik M, Kulma A. 2011. The local treatment and available dressings designed for chronic wounds. *J Am Acad Dermatol* (In press).
- Teramoto H, Kameda T, Tamada Y. 2008. Preparation of gel film from *Bombyx mori* silk sericin and its characterization as a wound dressing. *Biosci Biotechnol Biochem* 72: 3189-3196.
- Walker JM. 2002. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. In *The Protein Protocols Handbook*. 2nd ed. New Jersey: Humana Press: 11-14.
- Wiegand C, Heinze T, Hipler UC. 2009. Comparative *in vitro* study on cytotoxicity, antimicrobial activity, and binding capacity for pathophysiological factors in chronic wounds of alginate and silver-containing alginate. *Wound Rep Reg* 17: 511-521.
- Yudanov TN, Reshetov IV. 2006. Drug synthesis methods and manufacturing technology (Modern wound dressings: manufacturing and properties). *Pharm Chem J* 40: 85-92.
- Zhang X, Yang F, Xu C, Liu W, Wen S, Xu Y. 2008. Cytotoxicity evaluation of three pairs of hexabromocyclododecane (HBCD) enantiomers on HepG2 cell. *Toxicol In Vitro* 22: 1520-1527.

สรุปข้อคิดเห็นของผู้ทรงคุณวุฒิต่อโครงการ

“การสังเคราะห์และศึกษาคุณสมบัติของคอมโพสิตยางธรรมชาติและโปรตีนในการใช้เป็นวัสดุปิดแผล” สัญญาเลขที่ RDG5450057

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ชี้แจงโดยนักวิจัย
ความเห็นด้านวิชาการ - ควรระบุจำนวนครั้งที่ทำการทดลองสภาวะการขึ้นรูป - ควรให้เหตุผลที่เป็นไปได้ว่า เพราะเหตุใดอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ให้ผลการขึ้นรูปได้ไม่ดีเท่ากับทำที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส ซึ่งมีอุณหภูมิที่สูงกว่า - ในรูปที่ 1 จำเป็นต้องปรับผลการทดลองให้เป็นเส้นตรงหรือไม่ - กรณีที่กล่าวถึงคอมโพสิตที่มี “ผิวเรียบเนียน” และ “เนื้อฟู” นั้น ควรจะระบุด้วยว่า ในการทดลองนี้ต้องการผิวของคอมโพสิตที่มีลักษณะแบบใด เพราะเหตุใด - ในรูปที่ 2 พิจารณาลักษณะพื้นผิวได้ยาก เพราะภาพไม่ชัดเจน	- แก้ไขแล้ว ตารางที่ 3 หน้า 15 - แก้ไขแล้ว หน้า 15 - ในการดูดซับน้ำ ปริมาณน้ำ (water content) ที่คอมโพสิตดูดซับเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการทดสอบ จนกระทั่งเข้าสู่สมดุล (equilibrium) ซึ่งปริมาณน้ำที่ดูดซับได้และระยะเวลาที่ใช้จนกระทั่งเข้าสู่สมดุลนั้น ขึ้นกับชนิดของวัสดุปิดแผล กราฟที่แสดงความสัมพันธ์ดังกล่าวมีลักษณะเป็นไฮเพอร์โบลา - คอมโพสิตอัตราส่วน 5:1 และ 1:5 โดยปริมาตร ที่มีลักษณะผิวเรียบเนียน มีลักษณะคล้ายคลึงกับวัสดุปิดแผลทางการค้าคือ Allevyn® และ Askina® Foam ซึ่งเป็น foam dressing ส่วนคอมโพสิตอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตรที่มีเนื้อฟูนั้น มีลักษณะคล้ายคลึงกับวัสดุปิดแผลทางการค้าคือ Askina® Transorbant ซึ่งทำให้การนำไปประยุกต์ใช้นั้น ขึ้นกับประสิทธิภาพในการดูดซับดังที่ได้กล่าวไว้ในหัวข้อ “การดูดซับน้ำ” - ได้จัดพิมพ์เป็นรูปสีแล้ว ทำให้ภาพชัดเจนขึ้น

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ชี้แจงโดยนักวิจัย
6. ในรูปที่ 3 แสดงผลการทดลองในระยะเวลาไม่เท่ากัน โดยภาพ (A) มีผลการทดลอง 18 วัน, ภาพ (B) มีผลการทดลอง 8 วัน และภาพ (C) มีผลการทดลอง 8 วัน เป็นเพราะเหตุใด (ในส่วนของระเบียบวิธีวิจัยระบุไว้ว่า ทำการทดลอง 18 วัน) 7. ในตารางที่ 4 เป็นการวัดปริมาณการปลดปล่อยไฮโปรฟล็อกซาซินที่ความยาวคลื่น 280 nm ใช่หรือไม่ 8. ในตารางที่ 5 เป็นการวัดปริมาณการปลดปล่อยแอสตาแซนทินที่ความยาวคลื่น 490 nm ใช่หรือไม่ 9. สำหรับ footnote ของตารางที่ 5 ที่ระบุจำนวนข้อมูลว่า “ข้อมูลที่แสดงมาจากค่าเฉลี่ยของการทดลองซ้ำ 2-3 ครั้ง” นั้น ควรจะระบุจำนวนครั้งที่ทำการทดลองที่แน่นอนว่า 2 หรือ 3 ครั้ง 10. ในการระบุค่าการยืดขนาดของคอมโพสิตที่ได้จากการทดลองนั้น ไม่ได้อธิบายว่าค่าที่ได้นั้นเป็นค่าที่ยอมรับได้หรือไม่ และเป็นค่าที่ระบุถึงความทนต่อแรงดึงได้ดีระดับใด โดยเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน (ถ้ามี) 11. รูปที่ 5 และ 6 พิจารณาแล้วดูว่าไม่แตกต่างกัน เพราะภาพไม่ชัดเจน อีกทั้งไม่มีการอธิบายถึงวิธีการสังเกตผลการทดลองว่าให้พิจารณาบริเวณพื้นที่สีหรืออื่นๆ ควรรายงานการยับยั้งการเจริญของเชื้อเป็นความกว้าง/ยาว ของส่วนสีที่เกิดขึ้นรอบๆ คอมโพสิตที่เวลาต่างๆ	6. ในรูปที่ 3 แสดงผลการทดลองในระยะเวลาไม่เท่ากัน เนื่องจากเป็นการประเมินจากระยะเวลาที่คอมโพสิตคงรูปได้นานที่สุด ขอแก้ไขในหน้าที่ 11 ส่วนของระเบียบวิธีวิจัยจากคำว่า “เป็นเวลานาน 18 วัน” เป็น “ในระยะเวลาที่คอมโพสิตคงรูปได้นานที่สุด” และบรรยายเพิ่มเติมในหน้าที่ 17 ว่า “ในขณะที่อัตราส่วน 1:1 และ 1:5 เริ่มมีส่วนขอบของคอมโพสิตหลุดลอยออกมาในวันที่ 9 ของการทดลอง” 7. ใช่ ตารางที่ 4 เป็นการวัดปริมาณการปลดปล่อยไฮโปรฟล็อกซาซินที่ความยาวคลื่น 280 nm 8. ใช่ ตารางที่ 5 เป็นการวัดปริมาณการปลดปล่อยแอสตาแซนทินที่ความยาวคลื่น 490 nm 9. แก้ไขแล้ว 10. ศูนย์วิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมยางไทย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล อธิบายว่าแรงดึงที่ได้ถือว่าน้อย แต่ยึดได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน 11. ได้จัดพิมพ์เป็นรูปสีแล้ว ทำให้ภาพชัดเจนขึ้น และแก้ไขเพิ่มเติมคำอธิบายในหน้าที่ 21 เป็นดังนี้ “ผลการทดลองพบว่า คอมโพสิตน้ำยางโปรตีนต่ำและเจลอัลบูมินที่ประกอบด้วยไฮโปรฟล็อกซาซินและแอสตาแซนทินออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ได้ตลอดระยะเวลาของการ

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ชี้แจงโดยนักวิจัย
12. ควรทำการทดลองต่อไปเพื่อพัฒนาให้คอมโพสิตที่มีการปลดปล่อยสารที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ และทดสอบกับสัตว์ทดลองเพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการพัฒนาใช้กับคน 13. ในบทคัดย่อ บรรทัดที่ 10 ควรเขียนว่า และมีค่าความต้านแรงดึงและค่าความยืดเมื่อขาด 14. ในหัวข้อ 3.4 น่าจะทดสอบ 5 ชั้น เพื่อดูว่าค่าต่างกันเกินเกณฑ์หรือไม่ 15. ควรใช้คำว่า ร้อยละ แทนเครื่องหมาย % และควรใช้คำว่า “สมบัติความต้านทานแรงดึง” แทนคำว่า สมบัติความทนต่อแรงดึง 16. ใช้คำว่า “สมบัติของไฮโดรเจล” แทนคำว่า คุณสมบัติของไฮโดรเจล หรือประโยชน์อื่นๆ เช่นเดียวกัน	ทดสอบเมื่อเทียบกับคอมโพสิตที่ใช้เปรียบเทียบกับที่พบการเจริญของเชื้อบริเวณใต้แผ่นที่เวลา 24 ชั่วโมง และมีการเจริญเพิ่มมากขึ้นบริเวณรอบๆ คอมโพสิตที่เวลา 48-72 ชั่วโมง (รูปที่ 5A-5C และ 5D-5F) ในขณะที่ยังการเจริญไม่มีความแตกต่างกันเมื่อทดสอบกับเชื้อ <i>S. aureus</i> โดยไม่พบการเจริญเกิดขึ้นทั้งบริเวณใต้แผ่นและรอบๆ คอมโพสิต” 12. จะเสนอเป็นโครงการต่อเนื่อง/งานที่คาดว่าจะทำในอนาคต 13. แก้ไขแล้ว 14. ศูนย์วิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมยางไทย แนะนำเช่นเดียวกัน การทดสอบ 3 ชั้นประเมินทางสถิติได้ แต่ความแม่นยำน้อยกว่า 5 ชั้น ทั้งนี้ในการทดสอบขณะนั้น ปริมาณของน้ำยางโปรตีนต่ำมีจำกัด 15. - ไม่ได้แก้ไขในการใช้คำว่า “ร้อยละ” แทน ขอคงใช้เครื่องหมาย % (เปอร์เซ็นต์) ของความเข้มข้นของสารไว้ เช่น % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นต้น - แก้ไขแล้วในการใช้คำ “สมบัติความต้านทานแรงดึง” แทน 16. แก้ไขแล้ว