การขึ้นรูปแผ่นปิดแผลที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจากโปรตีนไหมไฟโบรอินและอนุภาคเงินนาโน

พิมพ์พร อุทยารัตน์[1] สุวิมล เจตะวัฒนะ[1] พิริยาธร สุวรรณมาลา[1] จารุรัตน์ เอี่ยมศิริ[1] และ *สุชาดา พงษ์พัฒน์[1]
[1] กลุ่มวิจัยและพัฒนา สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน)
9/9 หมู่ 7 ต. ทรายมูล อ. องครักษ์ จ. นครนายก 26120
โทรศัพท์ : 037 372 943 โทรสาร : 037 372 942 E-mail: puttayar@alumni.upenn.edu

บทคัดย่อ

ผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่มีบาดแผลจากอุบัติเหตุไฟไหม้หรือน้ำร้อนลวกเป็นบริเวณลึกและกว้างมักมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อสูง จำเป็นต้องใช้แผ่นปิดแผลหรือผิวหนังเทียมปิดทับบนบาดแผลก่อนที่ชั้นผิวหนังใหม่จะถูกสร้างขึ้นมา งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาการขึ้นรูปแผ่นปิดแผลที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากโปรตีนไหมไฟโบรอินที่สกัดจากเศษรังไหมในธรรมชาติรวมกับอนุภาคเงินนาโนที่สังเคราะห์โดยวิธีการฉายรังสีแกมมา ในการทดลองได้ใช้วิธีการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตขึ้นรูปโปรตีนไหมไฟโบรอินให้เป็นแผ่นที่มีโครงสร้างของเส้นใยไฟโบรอินซ้อนทับกันไปมา โดยเส้นใยส่วนใหญ่มีขนาด 670 ± 11.5 นาโนเมตร จากนั้นได้เคลือบแผ่นไฟโบรอินด้วยคอลลอยด์ของอนุภาคเงินนาโนที่เตรียมได้จากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตโดยการฉายรังสีแกมมาและทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion test ผลการทดสอบพบว่าคอลลอยด์ของอนุภาคเงินนาโนความเข้มข้นมากกว่า 1 มิลลิโมลาร์ทำให้เกิด zone of inhibition รอบ ๆ แผ่นไฟโบรอินบนจานเพาะเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* เหมือนกับแผ่นปิดแผลทางการค้าที่มีส่วนผสมของเงินไอออน ดังนั้นผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าแผ่นไฟโบรอินที่เตรียมได้โดยการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตและเคลือบด้วยอนุภาคเงินนาโนนั้นมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียและสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้สมานแผลผู้ป่วยจากอุบัติเหตุไฟไหม้หรือน้ำร้อนลวกได้

คำสำคัญ : แผ่นไฟโบรอิน อนุภาคเงินนาโน การปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต การฉายรังสีแกมมา

Fabrication of Antibacterial Wound Dressings from Silk Fibroin and Silver Nanoparticles

Uttayarat[1], Jetawattana[1], Suwanmala[1], Eamsiri[1] and *Pongpat[1]
[1]Thailand Institute of Nuclear Technology (Public Organization)
9/9 Mu 7, Tambon Sai Mun, Ongkarak, Nakorn Nayok 26120
Phone: 037 372 943, Fax: 037 37 2942, E-mail: puttayar@alumni.upenn.edu

Abstract

Patients with burn wounds that cover large body surface area are susceptible to infection which can lead to fatality. Wound dressings or skin grafts are needed to cover the wound during the regeneration of new skin tissue. The aim of this research is to fabricate antibacterial wound dressings from silk fibroin derived from the natural silk cocoon and silver nanoparticles (AgNPs) prepared by gamma irradiation. Fibroin mats composed of nonwoven fibers with diameter of 670 ± 11.5 nm were fabricated by electrospinning. Using gamma irradiation, the starting silver nitrate solution was reduced to colloidal AgNPs. The fibroin mats were coated with AgNPs at various AgNP concentration and then evaluated for their antibacterial property by disc diffusion test. The concentration of colloidal AgNP solution $\geq$ 1 mM was found to be as sufficient in inhibiting the growth of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* as commercial wound dressings embedded with silver ions. These results demonstrate that electrospun fibroin mats coated with AgNPs exhibite antibacterial property and can be further developed for the treatment of burn wounds.

Keywords: fibroin mat, silver nanoparticles, electrospinning, gamma irradiation

1.บทนำ

โปรตีนไหมไฟโบรอินเป็นที่รู้จักและได้ถูกนำมาใช้ในเป็นเวชภัณฑ์ทางการแพทย์เป็นเวลากว่าทศวรรษในรูปของไหมเย็บแผล ปัจจุบันงานวิจัยด้านวัสดุชีวภาพ (biomaterials) ส่วนใหญ่ได้ให้ความสำคัญกับการนำโปรตีนไหมไฟโบรอินซึ่งสกัดได้จากเศษรังไหมในธรรมชาติมาพัฒนาขึ้นรูปเป็นวัสดุต่าง ๆ มากขึ้น เช่น แผ่นปิดแผล[1] หลอดเลือดเทียม[2] และกระดูกเทียม[3] เนื่องจากสมบัติการเข้ากันได้กับร่างกาย (biocompatibility) ที่ดีของโปรตีนไหมไฟโบรอิน ในส่วนของการพัฒนาแผ่นปิดแผล ได้ไมีการนำโปรตีนไฟโบรอินมาขึ้นรูปเป็นแผ่นปิดแผลด้วยวิธีต่าง ๆ อาทิเช่น การเทสารละลายและรอให้ระเหยแห้งหรือใช้วิธีทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศและอุณหภูมิเยือกแข็ง เพื่อให้เป็นแผ่นฟิล์ม[4, 5] รวมถึงการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต[6,7] ซึ่งกำลังได้รับความนิยมอย่างมากในการนำมาขึ้นรูปโครงร่างเลียนแบบเนื้อเยื่อธรรมชาติ เนื่องจากเส้นใยที่ปั่นได้มีการซ้อนทับกันไปมาแบบ nonwoven mat คล้ายกับการจัดเรียงของเส้นใยโปรตีนในเนื้อเยื่อธรรมชาติ ผลงานวิจัยแผ่นปิดแผลที่พัฒนาจากโปรตีนไฟโบรอินโดยการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตของ Min และคณะ[7] พบว่าแผ่นปิดแผลดังกล่าวไม่มีพิษต่อเซลล์ keratinocyte และเซลล์ fibroblast ซึ่งเป็นเซลล์ของเนื้อเยื่อผิวหนัง ที่สามารถเกาะติดและเจริญบนแผ่นปิดแผลไฟโบรอิน

เพื่อเป็นการเพิ่มสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรีย แผ่นปิดแผลทางการค้าในปัจจุบันได้ผสมอนุภาคเงินลงในแผ่นปิดแผลเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนบาดแผล เนื่องจากอนุภาคเงินสามารถเปลี่ยนโครงสร้างของโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ รวมถึงโปรตีนที่เป็น

ส่วนประกอบของกระบวนการหายใจ ทำให้แบคทีเรียตายในที่สุด งานวิจัยหลายชิ้นได้แสดงให้เห็นว่าแผ่นปิดแผลที่มีอนุภาคเงินผสมสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้หลายสายพันธุ์[8] ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาการขึ้นรูปแผ่นปิดแผลที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียโปรตีนไหมไฟโบรอินและอนุภาคเงินนาโนที่เตรียมโดยกระบวนการทางรังสี ผลการทดสอบเบื้องต้นพบว่าแผ่นปิดแผลไฟโบรอินที่เคลือบด้วยอนุภาคเงินนาโนสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีเท่ากับแผ่นปิดแผลทางการค้าที่ผสมเงิน

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 การสกัดและวิเคราะห์โปรตีนไฟโบรอินจากเศษรังไหม

ทำความสะอาดเศษรังไหมไทย *Bombyx mori* สายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษสีเหลืองเพื่อกำจัดฝุ่นและสิ่งสกปรก ก่อนกำจัดโปรตีนเซริซินที่เคลือบอยู่ชั้นนอกสุดออกจากเส้นไหมโดยการต้มให้เดือดในสารละลาย Na_2CO_3 ความเข้มข้น 2 % เป็นเวลา 30 นาที จำนวน 2 ครั้ง ตามด้วยการต้มในน้ำกลั่นเดือดเป็นเวลา 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นนำเส้นไหมที่ผ่านการอบแห้งไปสกัดโปรตีนไฟโบรอินด้วยสารละลายผสม $CaCl_2$: CH_3CH_2OH : H_2O ที่อัตราส่วน 1:2:8 โดยโมล ณ อุณหภูมิ 70 - 80 ^{o}C เป็นเวลา 60 นาที ก่อนนำไป dialyze ผ่าน dialysis membrane ในน้ำกลั่น (double distilled water) จนได้สารละลายโปรตีนไฟโบรอินบริสุทธิ์ แล้วทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศและอุณหภูมิเยือกแข็ง

2.2 การปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตและวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของเส้นใยนาโน

ทดสอบความเข้มข้นของโปรตีนไหมไฟโบรอินในสารละลาย hexafluoro isopropanol (HFP) ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 18% ก่อนนำไปปั่นเป็นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตที่ความแรงสนามไฟฟ้า 1.2 kV/cm เพื่อให้ได้เส้นใยที่มีความเรียบสม่ำเสมอตลอดเส้น โดยขนาดและคุณภาพของเส้นใยจะถูกตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopy, SEM)

2.3 การเตรียมและวิเคราะห์ขนาดของอนุภาคเงินนาโน

ได้เตรียมสารแขวนลอยที่มีอนุภาคเงินนาโนโดยการฉายรังสีแกมมา โดยเริ่มจากการเตรียมสารประกอบเงินซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$) ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 mM ในสารละลายที่มีส่วนผสม 2 % poly(vinyl alcohol) (PVA) และ 1 M เอทานอล ในขวดแก้วที่มีฝาปิดและกำจัดออกซิเจนโดยการแทนที่ด้วยไนโตรเจน ก่อนนำไปฉายรังสีแกมมาจากต้นกำเนิดรังสี ^{60}Co (gamma cell 220, แคนาดา) ที่ปริมาณรังสี 0, 8, 10 และ 40 กิโลเกรย์เพื่อให้สารประกอบ $AgNO_3$ กระจายตัวออกเป็นสารละลายเงินนาโน จากนั้นวิเคราะห์ขนาดของอนุภาคเงินนาโนในสารละลายด้วยกล้อง

จุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy, TEM) ก่อนการวิเคราะห์ได้เจือจางตัวอย่างด้วยน้ำ (deionized water) ที่ผ่านการกรอง ที่อัตราส่วน 1:1000 เพื่อช่วยการกระจายตัวของอนุภาคเงินนาโน

2.4 การทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรียของแผ่นปิดแผลไฟโบรอิน

วิเคราะห์การต้านเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* ด้วยเทคนิค disc diffusion test โดยใช้แผ่นปิดแผลรูปวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ที่เคลือบด้วยสารละลายเงินนาโนความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วง 0.1, 0.4, 1, 2, and 4 mM เปรียบเทียบกับแผ่นปิดแผลทางการค้า Tegaderm Ag และ Aquacel Ag ที่มีเงินผสม ในการทดสอบได้เตรียมแบคทีเรียให้เป็น suspension ใน physiological saline ให้มีความเข้มข้น 10^6 CFU /ml ใช้ sterile swab ป้ายเชื้อลงบนจานเพาะเชื้อ Mueller-Hinton agar จากนั้นคว่ำให้แผ่นปิดแผลให้สัมผัสกับ agar อย่างสม่ำเสมอตลอดทั้งแผ่น ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วทำการวัด zone of inhibition และบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิทัล

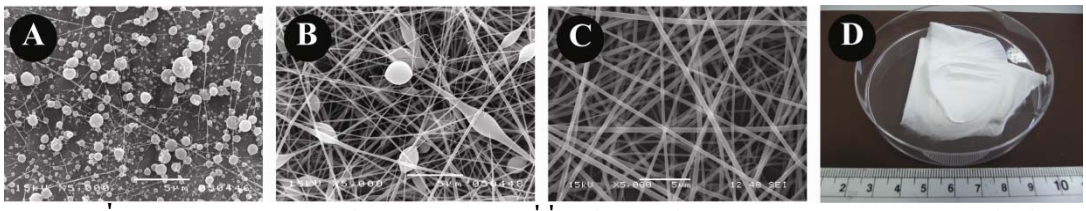
2.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

สำหรับการวัดขนาดเส้นใยไฟโบรอินได้ใช้โปรแกรม SemAfore (JOEL, Sweden) วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยจำนวน 100 – 200 เส้นจากภาพ SEM ในส่วนของการวัดขนาดอนุภาคเงินนาโนได้วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคจำนวน 100 – 150 อนุภาคจากภาพ TEM และในการทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรียได้วัดขนาด zone of inhibition จากการทดลอง 3 ซ้ำที่แตกต่างกัน ข้อมูลได้แสดงด้วยค่า mean ± standard error of the mean

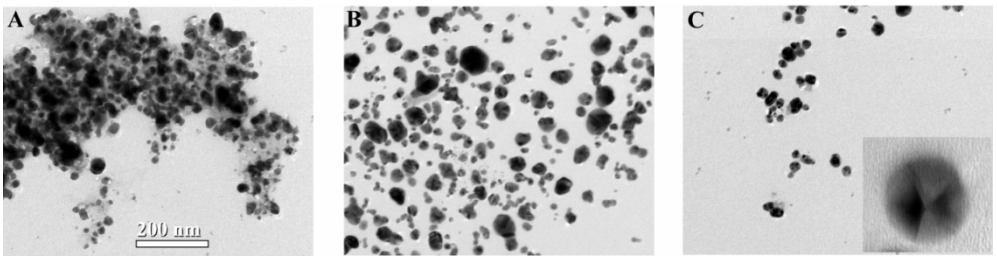
3. ผลการทดลองและวิจารณ์

ในการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตเพื่อขึ้นรูปแผ่นปิดแผลไฟโบรอินพบว่าความเข้มข้นของสารละลายไฟโบรอินมีผลโดยตรงกับลักษณะของเส้นใยที่ปั่นได้ (รูปที่ 1) โดยที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 5% สารละลายไฟโบรอินกลายสภาพเป็นก้อนโดยส่วนใหญ่เมื่อผ่านสนามไฟฟ้า และมีเส้นใยเส้นสั้น ๆ เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย ที่ความเข้มข้นสารละลายไฟโบรอิน 10% เส้นใยที่ปั่นได้มีลักษณะของเม็ดปมเกาะและมีการโป่งพองบนเส้นใย ส่วนที่ความเข้มข้น 15 % และ 18% เส้นใยมีลักษณะเรียบและสม่ำเสมอตลอดทั้งเส้น และซ้อนทับกันไปมาแบบ nonwoven mat ดังนั้นในการขึ้นรูปแผ่นปิดแผลที่มีความหนาประมาณ 100 ไมโครเมตร จึงได้เลือกสารละลายไฟโบรอินความเข้มข้น 18% เพื่อปั่นให้เป็นเส้นใยที่มีขนาด 670 ± 11.5 นาโนเมตรเป็นโครงสร้างของแผ่นปิดแผล

สำหรับการเตรียมคอลลอยด์ของอนุภาคเงินนาโนพบว่าปริมาณรังสีแกมมาสูงสุดที่ 40 kGy ทำให้อนุภาคเงินนาโนกระจายตัวออกจากกันเป็นอนุภาคเดี่ยวมากที่สุด (รูปที่ 2) อนุภาคเงินนาโนที่เตรียมได้มีขนาด 23.8 ± 0.7 นาโนเมตร

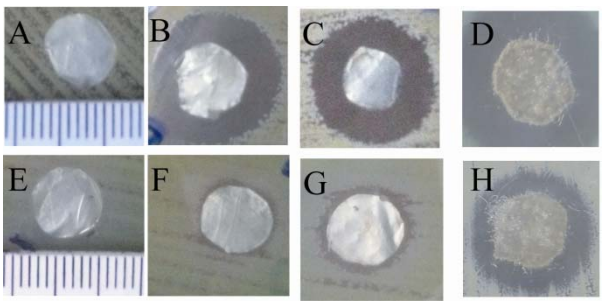


รูปที่ 1 ภาพ SEM แสดงเส้นใยไฟโบรอินที่ปั่นด้วยไฟฟ้าสถิตจากสารละลายความเข้มข้นต่าง ๆ (A) 5 %, (B) 10% และ (C) 18% และภาพถ่ายดิจิทัล (D) แสดงแผ่นปิดแผลไฟโบรอิน



รูปที่ 2 ภาพถ่าย TEM แสดงอนุภาคเงินนาโนที่เตรียมจากสารละลาย $AgNO_3$ ความเข้มข้น 40 mM โดยการฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณ (A) 0, (B) 10 และ (C) 40 กิโลเกรย์ scale bar ขนาด 200 นาโนเมตรสำหรับ (A) – (C) ภาพแทรกใน (C) แสดงภาพขยายอนุภาคเงินนาโนที่เป็นอนุภาคเดี่ยว

ในส่วนของการทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรียพบว่าแผ่นปิดแผลไฟโบรอินที่เคลือบด้วยคอลลอยด์ของอนุภาคเงินนาโนความเข้มข้น $\geq$ 1 mM สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ S. aureus และ P. aeruginosa ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีการเกิด zone of inhibition รอบ ๆ แผ่นตัวอย่างที่มีขนาดใกล้เคียงกับแผนปิดแผลทางการค้าทั้งสองชนิดที่ใช้เป็นตัวอย่างเปรียบเทียบดังแสดงไว้ในรูปที่ 3



รูปที่ 3 ภาพถ่ายดิจิทัลจาก disc diffusion test โดยภาพแถวบนถ่ายจากจานเพาะเชื้อ *S. aureus* และภาพแถวล่างถ่ายจากจานเพาะเชื้อ *P. aeruginosa* (A)-(C) และ (E)-(G) แสดง zone of inhibition รอบแผ่นปิดแผลไฟโบรอินที่เคลือบด้วยสารละลายอนุภาคเงินนาโนความเข้มข้น 0, 1 และ 4 mM ตามลำดับ ส่วน (D) และ (H) แสดง zone of inhibition บนตัวอย่างแผ่นปิดแผลทางการค้า Aquacel Ag

4. สรุป

วิธีการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตสามารถนำมาประยุกต์ใช้ขึ้นรูปโปรตีนไหมไฟโบรอินให้เป็นแผ่นปิดแผลที่มีโครงสร้างเป็นเส้นใยแบบ nonwoven mat ส่วนการเตรียมอนุภาคเงินนาโนนั้นสามารถเตรียมได้โดยการฉายรังสีแกมมาสารประกอบเงินตั้งต้น สำหรับการต้านเชื้อแบคทีเรียของแผ่นปิดแผลไฟโบรอินที่เคลือบด้วยอนุภาคเงินนาโนนั้นพบว่าความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคเงินนาโนความเข้มข้น $\geq$ 1 mM ช่วยให้แผ่นปิดแผลไฟโบรอินมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* และ *P. aeruginosa* ได้ดีใกล้เคียงกับแผ่นปิดแผลทางการค้าที่มีส่วนผสมของเงิน

5. เอกสารอ้างอิง

[1] Kweon H, Yeo JH, Lee KG, Lee HC, Na HS, Won YH, Cho CS. Semi-interpenetrating polymer networks composed of silk fibroin and poly(ethylene glycol) for wound dressing. Biomed Mater. 2008;3:034115.

[2] Soffer L, Wang X, Zhang X, Kluge J, Dorfmann L, Kaplan DL, Leisk G. Silk-based electrospun tubular scaffolds for tissue-engineered vascular grafts. J Biomater Sci Polym Ed. 2008;19:653-64.

[3] Li C, Vepari C, Jin HJ, Kim HJ, Kaplan DL. Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials. 2006;27:3115-24.

[4] Sugihara A, Sugiura K, Morita H, Ninagawa T, Tubouchi K, Tobe R, Izumiya M, Horio T, Abraham NG, Ikehara S. Promotive effects of a silk film on epidermal recovery from full-thickness skin wounds. Proc Soc Exp Biol Med. 2000;225:58-64.

[5] Roh DH, Kang SY, Kim JY, Kwon YB, Young KH, Lee KG, Park YH, Baek RM, Heo CY, Choe J, Lee JH. Wound healing effect of silk fibroin/alginate-blended sponge in full thickness skin defect of rat. J Mater Sci Mater Med. 2006;17:547-52.

[6] Jin HJ, Fridrikh SV, Rutledge GC, Kaplan DL. Electrospinning Bombyx mori silk with poly(ethylene oxide). Biomacromolecules. 2002;3:1233-9.

[7] Min BM, Lee G, Kim SH, Nam YS, Lee TS, Park WH. Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro. Biomaterials. 2004;25:1289-97.

[8] Ong SY, Wu J, Moochhala SM, Tan MH, Lu J. Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties. Biomaterials. 2008;29:4323-32.