

การศึกษาผลของขนาดและความเข้มข้นของโปรตีนที่มีต่อปริมาณของโปรตีนที่ถูกดูดซับและหลุดออกได้ยากบริเวณพื้นผิวของวัสดุชีวภาพทางการแพทย์

ดร.นริศร์ บาลทิพย์ ดร.มรกต พุทธกาล นางสาวอัมย์ ทุมวงงาม

บทนำ

วัสดุชีวภาพสมัยใหม่ (Advanced Biomaterials) หรือวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในทางการแพทย์ (Medical Device) ที่มีการปรับปรุงและพัฒนาให้สามารถทำงานและปรับสภาพเข้ากันได้เมื่อนำไปใช้แทนที่หรือนำไปใช้ในการรักษาที่เกี่ยวข้องกับระบบของสิ่งมีชีวิต (Biocompatibility) เป็นสิ่งที่มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง

Biocompatibility ถูกควบคุมโดยการตอบสนองทางชีวภาพของระบบสิ่งมีชีวิตสู่วัสดุ โดยมีสมมติฐานหลักที่ถูกกำหนดขึ้นเป็นหลักพื้นฐานในการศึกษาและพัฒนาองค์ความรู้ในสาขา Biomaterials-Surface-Science มานานกว่าหลายศตวรรษในส่วนของงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับวัสดุชีวภาพ ซึ่งกล่าวไว้ว่า Protein Adsorption เป็นขั้นตอนแรกในกระบวนการการตอบสนองจากระบบสิ่งมีชีวิตสู่วัสดุเทียม ดังนั้น Biocompatibility จึงมีส่วนสัมพันธ์หรือเกี่ยวข้องโดยตรงกับกระบวนการดูดซับของโปรตีน (Protein Adsorption) นั่นเอง โดยข้อมูลตัวอย่างซึ่งสามารถนำมาสนับสนุนสมมติฐานข้างต้นมีทั้งที่เป็นหลักฐานทางการแพทย์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดการตอบสนองของระบบสิ่งมีชีวิตต่อวัสดุเทียม และข้อมูลการวิจัยอื่นๆ มากมายในอดีตที่ผ่านมาซึ่งกล่าวได้ว่าเป็นอุปสรรคหรือปัญหาในการพัฒนาในส่วนของตัววัสดุเทียม อาทิเช่น การเกิดการแข็งตัวของเลือด (Blood Coagulation) และการเชื่อมต่อหรือประสานกันของเซลล์ (Cell Adhesion) เป็นต้น ปัญหาดังกล่าวข้างต้นนี้ล้วนเป็นปรากฏการณ์ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับ กระบวนการดูดซับของโปรตีน (Protein Adsorption) ทั้งสิ้น

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการที่จะพัฒนาและปรับปรุงในส่วนของ Biocompatibility ให้ดียิ่งๆ ขึ้นไปนั้น จะต้องอาศัยองค์ความรู้และความเข้าใจอย่างดีในส่วนของความเข้าใจพื้นฐานเกี่ยวกับ Protein Adsorption ซึ่งถือว่าเป็นองค์ความรู้พื้นฐานที่มีส่วนสำคัญอย่างยิ่งต่อการพัฒนาและผลิตวัสดุชีวภาพให้สามารถใช้งานได้ดีภายในระบบของสิ่งมีชีวิต การอธิบายด้วยความรู้พื้นฐานเดิมหรือด้วยผลการวิจัยเท่าที่ผ่านมา ถือว่ายังไม่เพียงพอและถูกต้องเท่าที่ควร ดังนั้นการทำการศึกษา วิจัย เพิ่มเติมอย่างต่อเนื่องและเร่งด่วน ถือว่ามีความสำคัญยิ่งในการพัฒนาวัสดุชีวภาพที่มีความเหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้ในแต่ละวัสดุประสงค์อย่างมีประสิทธิภาพในอนาคตอันใกล้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- เพื่อศึกษาลักษณะกระบวนการการดูดซับของโปรตีนแบบผันกลับได้และผันกลับไม่ได้ (Reversible/Irreversible Process) สู่วัสดุชีวภาพ
- เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์และผลของขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่มีต่อกระบวนการดูดซับแบบผันกลับได้และผันกลับไม่ได้สู่วัสดุชีวภาพ

3. เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์และผลของความเข้มข้นของโปรตีนที่มีต่อกระบวนการดูดซับแบบผันกลับได้และผันกลับไม่ได้สู่วัสดุชีวภาพ
4. เพื่อนำผลการศึกษาข้างต้นไปใช้เป็นข้อมูลหรือสร้างเป็นองค์ความรู้พื้นฐานเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการพัฒนาและปรับปรุงคุณภาพของวัสดุชีวภาพทางการแพทย์

ผลการทดลองและการวิเคราะห์ผลการทดลอง

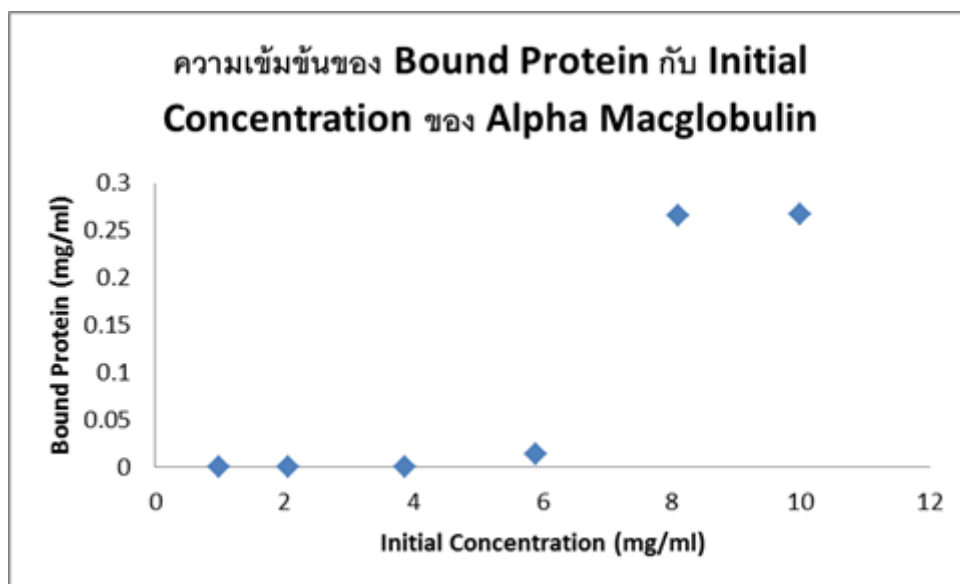
ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ใช้โปรตีนที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในเลือด 5 ชนิด คือ

- Human Serum Albumin
- IgG
- Fibrinogen
- IgM
- Alpha Macroglobulin

และพื้นผิวตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาคือ Octyl Sepharose โดยพื้นผิวดังกล่าวถูกนำมาใช้เป็นวัสดุตัวอย่างในการศึกษาการดูดซับของโปรตีนอย่างแพร่หลาย

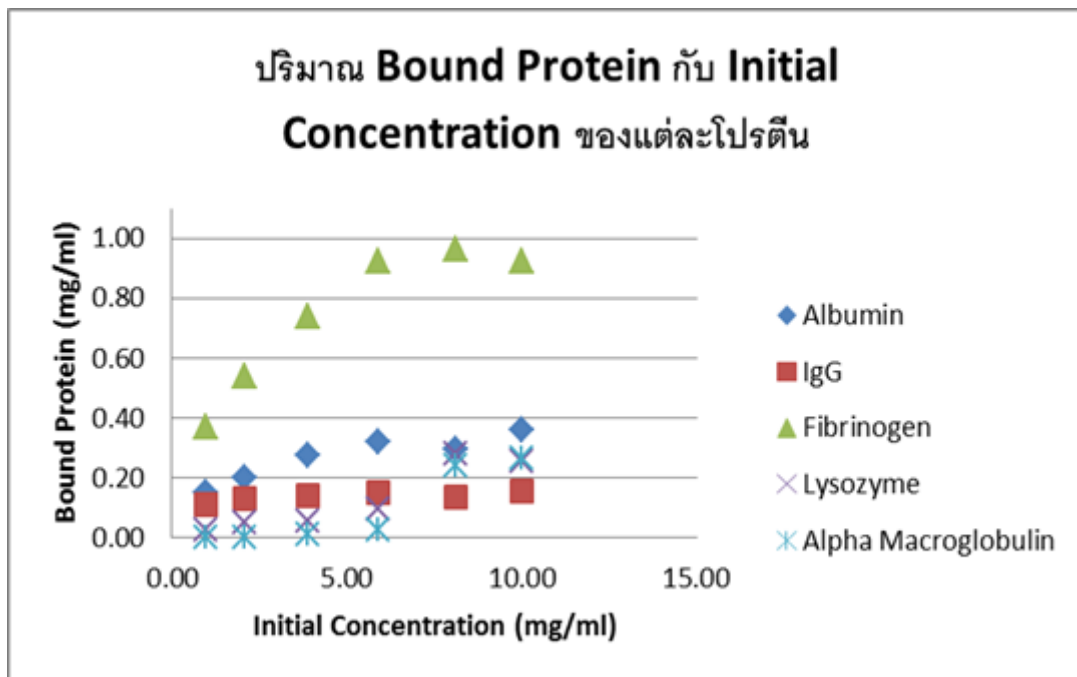
จากการศึกษาถึงผลของขนาดและความเข้มข้นของโปรตีนที่มีต่อการดูดซับของโปรตีนนั้น สามารถแยกพิจารณาออกเป็นสองหัวข้อใหญ่ๆ คือ

ผลของความเข้มข้นของโปรตีนที่มีต่อการดูดซับของโปรตีนบนพื้นผิววัสดุตัวอย่าง

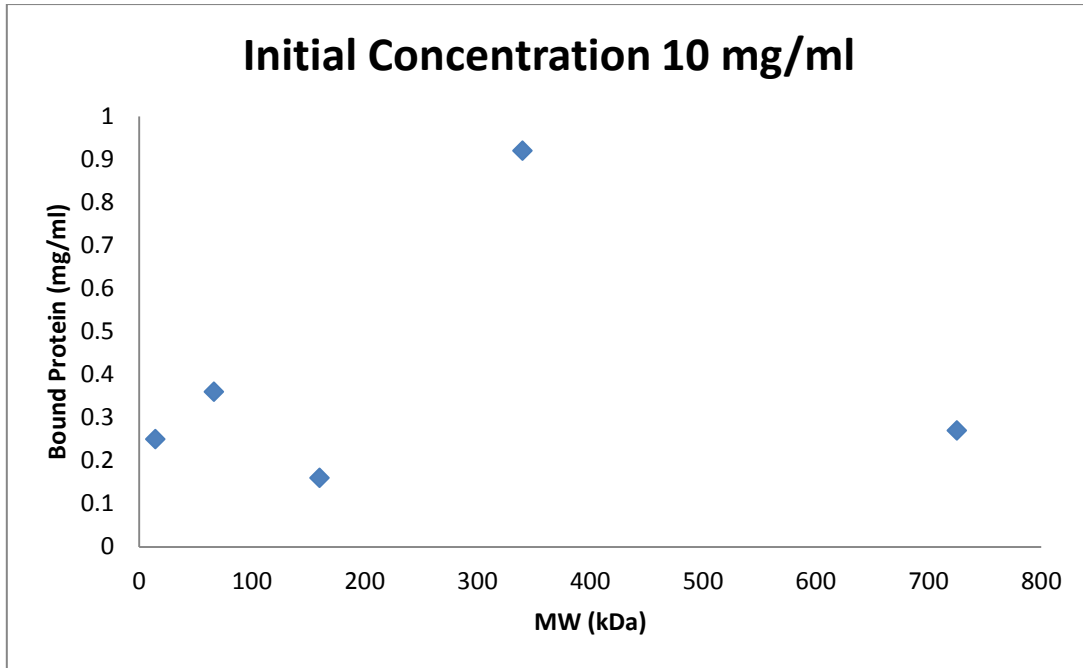


รูปที่ 1 กราฟ แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Bound Protein และค่าความเข้มข้นเริ่มต้น ของ α -mac

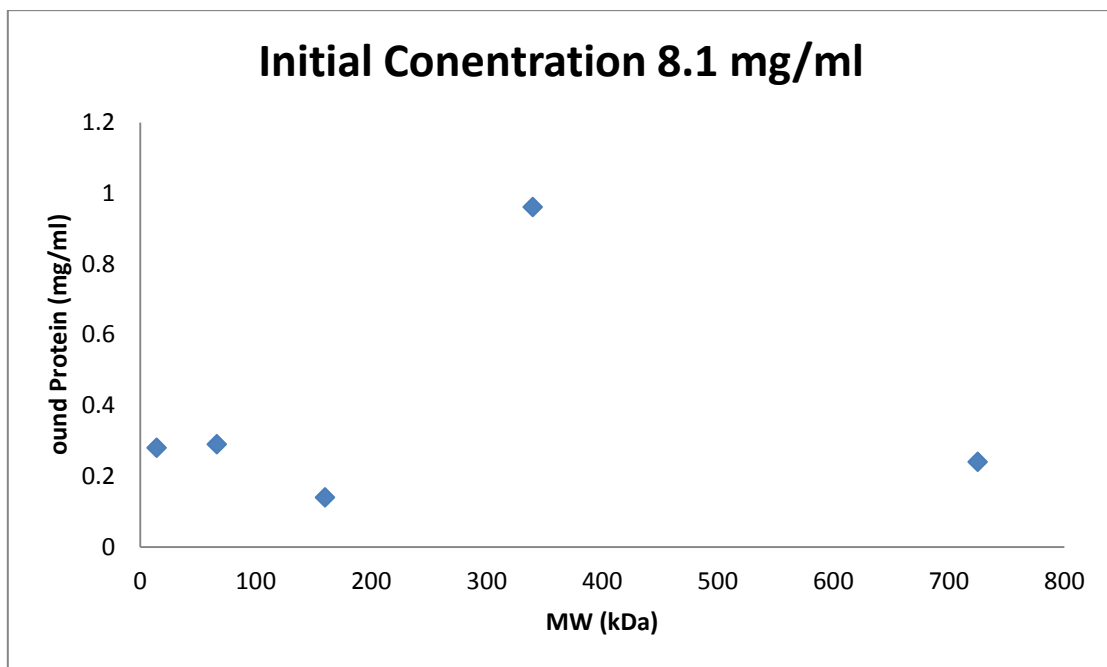
จากรูปที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของโปรตีนที่ถูกดูดซับหลังจากการชะล้างครั้งที่สาม (Bound Protein) กับ ค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของการทดลองสำหรับแต่ละโปรตีน (Initial Concentration) พบว่าในทุกๆ โปรตีนสำหรับช่วงของความเข้มข้นที่ศึกษานั้น ในช่วงต้นหากเพิ่มค่าความเข้มข้นของโปรตีน เริ่มต้นให้เพิ่มสูงขึ้น ปริมาณของ Bound Protein ก็เพิ่มขึ้นด้วย กล่าวคือ ปริมาณของ Bound Protein แปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของโปรตีนตอนเริ่มต้นนั่นเอง จนถึงที่ระดับความเข้มข้นค่าหนึ่งของโปรตีนแต่ละชนิด ปริมาณของ Bound Protein จะเริ่มคงที่ นั่นคือ ถึงแม้ว่าจะทำการเพิ่มความเข้มข้นให้กับระบบต่อไป ปริมาณของ Bound Protein ก็ไม่ได้เพิ่มขึ้น นั่นบ่งบอกให้เห็นว่าระบบอาจจะสามารถมี Bound Protein ได้ในระดับที่สามารถยึดกันได้ดีกับพื้นผิวอย่างแข็งแรงเท่านั้น ซึ่งการยึดกันอย่างแข็งแรงนี้ ย่อมแสดงให้เห็นว่าเป็นการก่อตัวแบบชั้นเดียว (Monolayer) ของโปรตีนกับพื้นผิว ส่วนโปรตีนที่หลุดออกไปจากการชะล้างในแต่ละครั้ง น่าจะเป็นโปรตีนที่มีการก่อตัวแบบหลายชั้น (Multilayer) จึงสามารถหลุดออกจากพื้นผิวได้ง่าย ผลของขนาดของโปรตีนที่มีต่อการดูดซับของโปรตีนบนพื้นผิววัสดุตัวอย่าง



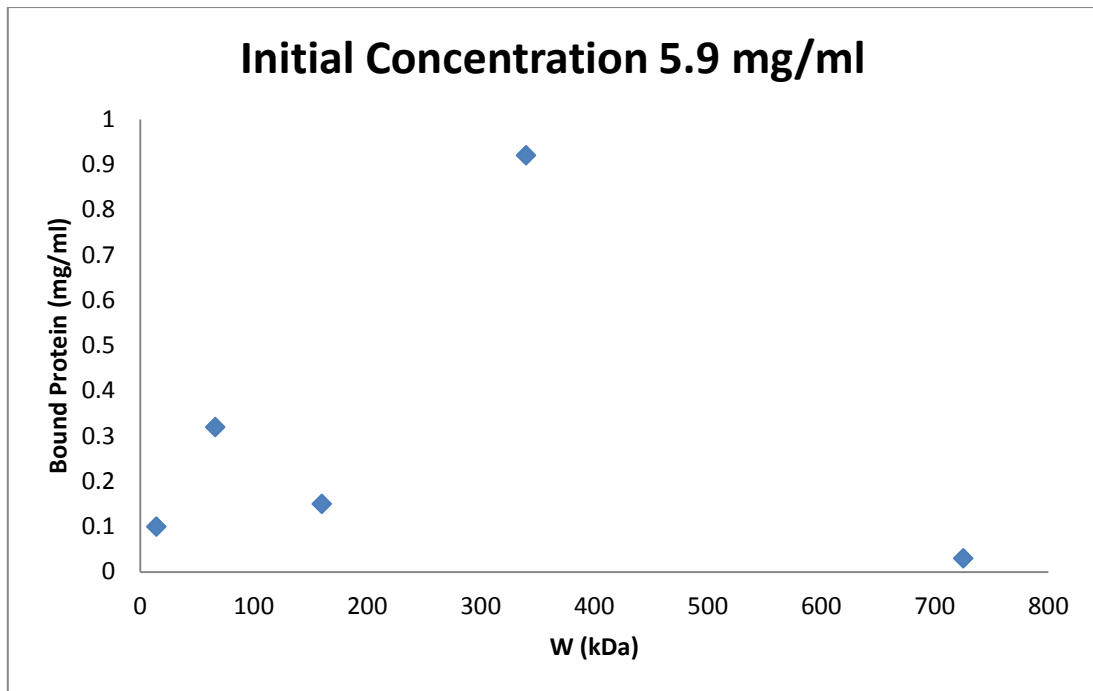
รูปที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Bound Protein และค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของโปรตีนแต่ละชนิด



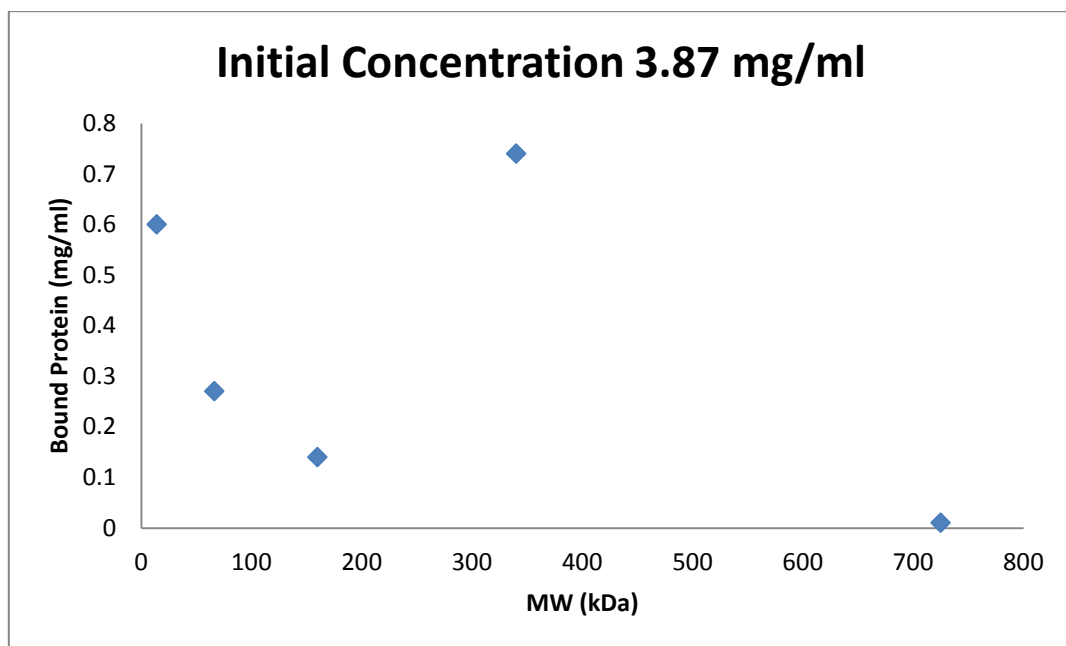
รูปที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Bound Protein และขนาดของโปรตีนแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 mg/ml



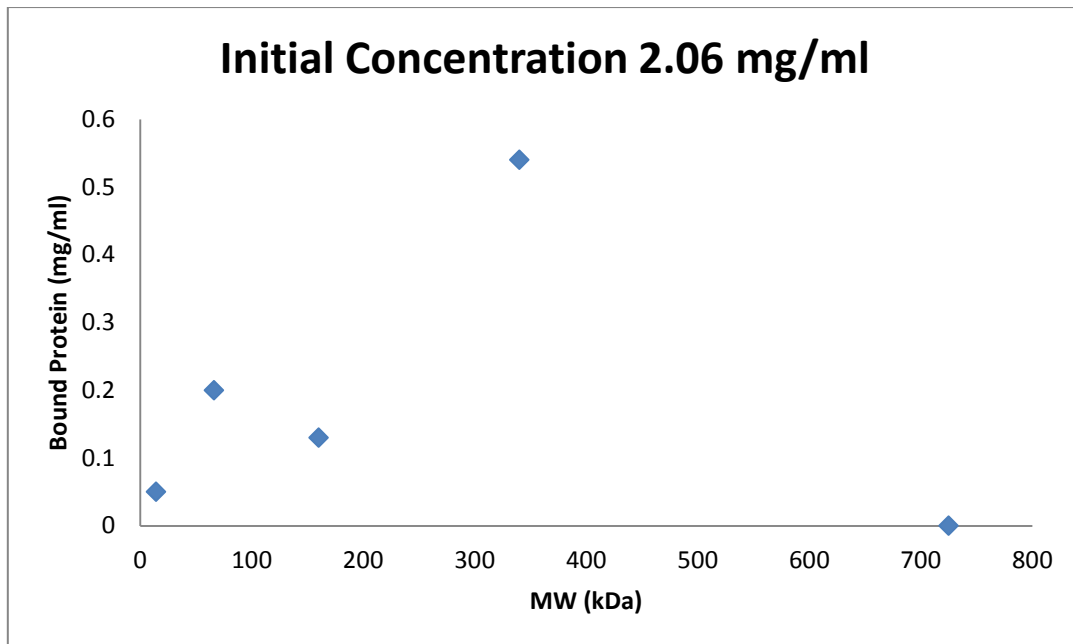
รูปที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Bound Protein และขนาดของโปรตีนแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 8.1 mg/ml



รูปที่ 5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Bound Protein และขนาดของโปรตีนแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5.9 mg/ml



รูปที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Bound Protein และขนาดของโปรตีนแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 3.87 mg/ml



รูปที่ 7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Bound Protein และขนาดของโปรตีนแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 2.06 mg/ml

จากรูปที่ 2-7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของโปรตีนที่ถูกดูดซับหลังจากการชะล้างครั้งที่สามกับขนาดของโปรตีนแต่ละชนิด (MW) พบว่า ในทุกๆ เงื่อนไขของความเข้มข้น ปริมาณการดูดซับของโปรตีนที่พื้นผิวหลังจากการชะล้างนั้นไม่มีความสัมพันธ์เป็นลักษณะเชิงเส้นกับขนาดของโปรตีน แต่จะสามารถสังเกตเห็นได้ว่า รูปแบบการจัดเรียงตัวของกราฟดังกล่าวจะมีลักษณะเช่นเดียวกันทั้ง 6 กราฟ ซึ่งบ่งบอกให้เห็นว่า แรงในการดูดซับระหว่างโปรตีนแต่ละชนิดกับพื้นผิวมีแนวโน้มในลักษณะเดียวกันสำหรับในทุกๆ ความเข้มข้นที่ทำการศึกษา นั่นคือ Fibrinogen จะมีแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของโปรตีนกับพื้นผิวสูงกว่าโปรตีนชนิดอื่นๆ และ Alpha Macglobulin มีแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของโปรตีนกับพื้นผิวต่ำที่สุด ซึ่งจะสามารถเห็นได้จากกราฟว่าปริมาณของโปรตีนบนพื้นผิวสามารถหลุดออกได้เกือบทั้งหมดหลังจากที่ดูดซับอยู่บริเวณพื้นผิวในช่วงแรกก่อนการชะล้าง

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า ระบบการดูดซับของโปรตีนจากสารละลายสู่วัสดุพื้นผิวตัวอย่างเป็นการดูดซับแบบผันกลับได้ (reversible process) ซึ่งเห็นได้จากปริมาณการดูดซับของโปรตีนบนพื้นผิวหลังจากการชะล้างที่มีปริมาณลดลงเมื่อเทียบกับก่อนการชะล้างนั่นเอง อีกทั้งยังสามารถสรุปได้ว่า การดูดซับของโปรตีนมีการจัดเรียงตัวแบบหลายชั้น (multilayer) เพราะหากเป็นการเรียงตัวแบบชั้นเดียว (monolayer) ปริมาณการหลุดออกของโปรตีนจากพื้นผิวหลังจากการชะล้าง ควรมีปริมาณน้อย หรือไม่มีเลย เพราะแรงดึงดูดระหว่างโปรตีนในชั้นแรกที่ติดกับพื้นผิววัสดุจะมีค่าสูงกว่าแรงที่เกิดขึ้นจากการชะล้าง

เอกสารอ้างอิง

1. Barnthip N, Noh H, Leibner E, Vogler EA. Volumetric Interpretation of Protein Adsorption: Kinetic Consequences of a Slowly-Concentrating Interphase. *Biomaterials* 2008;29:3062- 3074.
2. Barnthip N, Parhi P, Golas A, and Vogler E. Volumetric Interpretation of Protein Adsorption: Kinetics of Protein-Adsorption Competition from Binary Solution. *Biomaterials*. 2009; In Press.
3. Leibner E, Barnthip N, Chen W, Baumrucker C, Badding J, Pishko M, and Vogler E. Superhydrophobic Effect on the Adsorption of Human Serum Albumin, *Acta Biomaterialia*. 2009; 5(5): 1389-1398.