

IN VIVO ANTICANCER EFFECT OF CURCUMIN RELEASED FROM GELATIN AND THAI SILK
FIBROIN MICROSPHERES

Miss Patcharida Kongton



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biomedical Engineering
Faculty of Engineering
Chulalongkorn University
Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

ผลการด้านมะเร็งในสัตว์ทดลองของเคอร์คูมินที่ถูกลดปล่อยจากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของ
เจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมชีวเวช (สหสาขาวิชา)
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2559
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลการต้านมะเร็งในสัตว์ทดลองของเคอร์คูมินที่ถูก ปลดปล่อยจากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาติน และไฟโบรอินไหมไทย
โดย	นางสาวพัชริดา คงทน
สาขาวิชา	วิศวกรรมชีวเวช (สหสาขาวิชา)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.จุฑารัตน์ กิจสงเสริมธน

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ เตชวรสินสกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช)

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

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร.จุฑารัตน์ กิจสงเสริมธน)

.....กรรมการ
(ดร.พีรพัฒน์ ทองนีก)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธวัชชัย แพชมัด)

พัชรिता คงทน : ผลการต้านมะเร็งในสัตว์ทดลองของเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย (IN VIVO ANTICANCER EFFECT OF CURCUMIN RELEASED FROM GELATIN AND THAI SILK FIBROIN MICROSPHERES) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
 หลัก: ศ. ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร.จุฑารัตน์ กิจสงเสริมธน, 157 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเตรียมอนุภาคทรงกลมของเจลาตินชนิดเอ (G) ผสมไฟโบรอินไหมไทย เพื่อใช้เป็นระบบควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินเพื่อต้านมะเร็งในสัตว์ทดลอง โดยเตรียมอนุภาคทรงกลมในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยเท่ากับ G80SF50 และ G50SF50 ด้วยเทคนิคอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน และใช้ Span 80 เป็นสารทำอิมัลชัน จากนั้นทำการเชื่อมขวางด้วยความร้อนแบบก้ำจืดน้ำออก ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส จากผลการศึกษา พบว่า ร้อยละผลได้ของอนุภาคทรงกลมที่มีขนาดอยู่ในช่วง 32-75 ไมครอนมีค่ามากที่สุด (ประมาณร้อยละ 46-55) อนุภาคที่ได้มีลักษณะเป็นทรงกลมตัน ผิวค่อนข้างเรียบ ผลทดสอบความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการด้วยเอนไซม์โปรติเอส XIV พบว่า อนุภาคทรงกลมทั้ง 2 ชนิด มีการย่อยสลายอย่างรวดเร็ว ภายใน 24 ชั่วโมง และอนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินไหมไทยในปริมาณมากกว่าถูกย่อยช้ากว่าอนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินน้อย เมื่อนำอนุภาคทรงกลมไปดูดซับเคอร์คูมินซึ่งละลายในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำในสัดส่วนต่างๆ พบว่า ประสิทธิภาพในการกักเก็บและปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกดูดซับบนอนุภาคทรงกลมทั้งสองชนิดจะเพิ่มขึ้นในตัวทำละลายผสมที่มีสัดส่วนของน้ำเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากองค์ประกอบของเจลาตินที่มีความชอบน้ำและมีความสามารถในการบวมน้ำสูง โดยเคอร์คูมินจะถูกดูดซับบนอนุภาคได้ด้วยอันตรกิริยาที่แข็งแรงของส่วนไม่ชอบน้ำ อนุภาคทรงกลมนี้สามารถปลดปล่อยเคอร์คูมินภายใต้สภาวะมีเอนไซม์โปรติเอส XIV เป็นองค์ประกอบ โดยอาศัยกลไกการปลดปล่อยแบบการแพร่และการย่อยสลายซึ่งอนุภาคทรงกลมชนิด G50SF50 จะปลดปล่อยเคอร์คูมินในช่วงแรกด้วยกลไกการแพร่และเมื่อเวลาผ่านไปอนุภาคทรงกลมสามารถปลดปล่อยเคอร์คูมินได้ด้วยกลไกการย่อยสลาย แต่อนุภาคทรงกลมชนิด G80SF20 มีสัดส่วนของเจลาตินสูงกว่า สามารถปลดปล่อยเคอร์คูมินจากการย่อยสลายของเจลาติน ผลทดสอบการต้านมะเร็งปากมดลูก (CaSki) ในหนูชนิดไม่มีขน (BALB/c-nude mice) พบว่า เคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนชนิด G50SF50 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งได้ในช่วง 21 วัน ซึ่งน่าจะเกิดจากการยับยั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) ของเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยออกมา ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินผสมไฟโบรอินไหมไทยมีศักยภาพในการใช้เป็นระบบควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินสำหรับต้านมะเร็งในสัตว์ทดลอง

สาขาวิชา วิศวกรรมชีวเวช (สหสาขาวิชา)

ปีการศึกษา 2559

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5670302021 : MAJOR BIOMEDICAL ENGINEERING

KEYWORDS: SILK FIBROIN, GELATIN, CURCUMIN, CONTROLLED RELEASE, ANTICANCER

PATCHARIDA KONGTON: *IN VIVO* ANTICANCER EFFECT OF CURCUMIN RELEASED FROM GELATIN AND THAI SILK FIBROIN MICROSPHERES. ADVISOR: PROF.SIRIPORN DAMRONGSAKKUL, Ph.D., CO-ADVISOR: JUTARAT KITSONGSERMTHON, Ph.D., 157 pp.

This research aimed to fabricate microspheres from gelatin type A (G) blended with Thai silk fibroin (SF) as controlled curcumin release system for *in vivo* anticancer effect. The microspheres with two weight blending ratios of G80SF50 and G50SF50 were produced by water in oil emulsion technique using Span 80 as an oil-soluble emulsifier. The microspheres were crosslinked by dehydrothermal treatment at 140°C. In this study, the percentage yield of the obtained microspheres with the size of 32-75 µm were highest, around 46-55 %, and their shape was round with smooth surface. From *in vitro* enzymatic biodegradation test, the results showed that both microspheres were rapidly degraded in protease XIV solution after incubating for 24 h and the microspheres with high SF content were degraded slower than the ones with low SF content. When the microspheres were used to adsorb curcumin in mixed solvent of ethanol and deionized water at various volume ratios, the result showed that increasing water content in mixed solvent resulted in an increased entrapment efficiency of curcumin, possibly due to water swelling ability of gelatin leading the diffusion of curcumin into the microspheres. In addition, the microspheres containing high content of silk fibroin could entrap more curcumin because of hydrophobic interaction between curcumin and silk fibroin. From the release of curcumin from microspheres in phosphate buffer saline (PBS) solution containing protease XIV, it was found that the release kinetics were governed by diffusion and degradation mechanisms. The release of curcumin from G50SF50 microspheres seemed to be manipulated by both the diffusion and the microspheres' degradation mechanisms. On the other hand, the G80SF20 microspheres could release curcumin mainly by the degradation of gelatin. The tumor suppression effect in CaSki-induced tumor in BALB/c-nude mice treated with G50SF50 absorbed curcumin was clearly seen within 21 days after treatment. The effect was possibly explained by the anti-angiogenesis of released curcumin. The result of this study indicated the potential of controlled release of curcumin from the gelatin blended with Thai silk fibroin microspheres for *in vivo* anticancer activity.

Field of Study: Biomedical Engineering

Academic Year: 2016

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลือและการสนับสนุนจากบุคคลหลายท่าน ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ ญญ. ดร. จุฬารัตน์ กิจสงเสริมธนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม เป็นอย่างสูงที่ได้ให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ รวมถึงการวางแผนการวิจัย แนวทางการดำเนินการวิจัย การตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ และการอบรมให้ความรู้ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช ประธาน ดร. พีรพัฒน์ ทองนีก และรองศาสตราจารย์ ดร. ธวัชชัย แพชมัด กรรมการ ที่สละเวลาอันมีค่ามาสอบวิทยานิพนธ์ และให้คำแนะนำต่าง ๆ มากมาย และขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โศรดา กนกพานนท์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จุฑามาศ รัตนวราภรณ์ ที่ให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ภาวพันธ์ ภัทรโกศล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความอนุเคราะห์เซลล์มะเร็งปากมดลูก (CaSki) ขอขอบคุณสัตวแพทย์หญิง วุฒิพร ลิ้มประสูตร และนางสาวศุภกานดา สุขแพทย์ ที่สละเวลาและให้ความช่วยเหลืออย่างเต็มที่ในการผ่าตัดสัตว์ทดลอง

ขอขอบคุณศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ จังหวัดศรีสะเกษ ที่อนุเคราะห์รังไหมสำหรับใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการวิศวกรรมเนื้อเยื่อและห้องปฏิบัติการวิศวกรรมวัสดุการแพทย์ ศูนย์เครื่องมือกลาง (Chula MRC) คณะแพทยศาสตร์ ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ห้องปฏิบัติการหน่วย ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ และศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์สำหรับสถานที่ อุปกรณ์และเครื่องมือที่ในการดำเนินการทดลอง

ขอขอบคุณ คุณรุ่งนภา แยมเดช คุณเทพฤทธิ์ วงศ์ภาคี คุณอนงค์นาฏ ดวงภักดี และสมาชิกห้องปฏิบัติการชีววัสดุทางการแพทย์ทุกท่าน สำหรับคำแนะนำ รวมทั้งความช่วยเหลือในด้านต่างๆ

ขอขอบคุณทางสภาการศึกษาไทยที่ให้โอกาสในการลาศึกษาต่อและสนับสนุนทุนการศึกษานี้

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ และคุณแม่ ที่ให้คำปรึกษา และสนับสนุน การศึกษาตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา รวมทั้งให้กำลังใจและเป็นแรงผลักดันทำให้ผู้วิจัยก้าวผ่านอุปสรรคต่างๆ และดำเนินงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูป.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	4
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	4
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ.....	5
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.1 โรคมะเร็ง (Cancer).....	6
2.2 เคอร์คูมิน (Curcumin).....	8
2.3 ระบบนำส่งยา (Drug delivery systems).....	16
2.3.1 ระบบควบคุมการปลดปล่อย (Controlled release systems).....	18
2.3.1.1 ระบบควบคุมที่ใช้หลักการแพร่ (diffusion controlled system).....	20
2.3.1.2 ระบบควบคุมที่ใช้ปฏิกิริยาเคมี (chemical controlled systems).....	21
2.3.1.3 ระบบควบคุมที่ใช้การซึมผ่านของน้ำ (water penetration controlled systems).....	21
2.3.1.4 ระบบควบคุมที่ไวต่อสิ่งกระตุ้น (regulated systems or stimuli sensitive systems).....	22
2.4 ชีววัสดุ (Biomaterials).....	23

2.4.1 ไหม (silk).....	23
2.4.2 เจลาติน (gelatin).....	28
2.5 อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน (Microspheres).....	32
2.6 สารทำอิมัลชัน (Emulsifier)	36
2.7 การเชื่อมขวาง (Crosslinking).....	39
2.7.1 การเชื่อมขวางทางกายภาพ (physical crosslinking).....	39
2.7.1.1 การเชื่อมขวางด้วยความร้อนแบบกำจัดน้ำออก (dehydrothermal treatment; DHT).....	39
2.7.1.2 การเชื่อมขวางด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต (UV-irradiation).....	39
2.7.2 การเชื่อมขวางทางเคมี (chemical crosslinking).....	40
2.7.2.1 การเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde).....	40
2.7.2.2 การเชื่อมขวางด้วยฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde).....	41
2.7.2.3 การเชื่อมขวางด้วย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) และ N-hydroxysuccinimide esters (NHS)	41
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	43
2.8.1 การพัฒนาระบบเจลาตินและไฟโบรอินไหมเพื่อใช้ควบคุมการปลดปล่อยยา	43
2.8.2 การพัฒนาระบบนำส่งเคอร์คูมิน	48
2.8.3 การศึกษาประสิทธิภาพการต้านมะเร็งของเคอร์คูมินในสัตว์ทดลอง	51
บทที่ 3 วัสดุและวิธีดำเนินงานวิจัย	62
3.1 วัสดุและสารเคมี.....	62
3.2 อุปกรณ์.....	63
3.3 แผนผังการดำเนินงานวิจัย	65
3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....	66
3.4.1.1 การกำจัดกาวยไหม (เซริซิน).....	66

3.4.1.2 การเตรียมสารละลายไฟโบรอิน.....	66
3.4.2 การเตรียมสารละลายเจลาติน.....	67
3.4.3 การขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่เตรียมจากเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอิน ไหมไทย.....	68
3.4.4 การเชื่อมขวางอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนด้วยความร้อนแบบกำจัดน้ำออก.....	69
3.4.5 การวิเคราะห์คุณลักษณะและสมบัติทางกายภาพ และชีวภาพของอนุภาคทรงกลม ขนาดไมครอน.....	69
3.4.5.1 การวิเคราะห์โครงสร้างพื้นฐานและขนาดเฉลี่ยของอนุภาคทรงกลมขนาด ไมครอน.....	69
3.4.5.2 การวิเคราะห์ร้อยละการเชื่อมขวางของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนด้วย เทคนิค 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS).....	69
3.4.5.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพของอนุภาคทรง กลมขนาดไมครอนในระดับห้องปฏิบัติการ.....	70
3.4.6 การวิเคราะห์สมบัติการดูดซับและควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ของอนุภาค ทรงกลมขนาดไมครอน.....	71
3.4.6.1 ศึกษาความสามารถในการละลายและการดูดซับเคอร์คูมินบนอนุภาคทรง กลมขนาดไมครอนในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำ.....	71
3.4.6.2 ศึกษาความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินจากอนุภาค ทรงกลมขนาดไมครอนในระดับห้องปฏิบัติการ.....	72
3.4.7 การศึกษาผลการต้านมะเร็งในสัตว์ทดลองของเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยจาก อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน.....	73
3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	76
3.6 ปัญหาทางจริยธรรม.....	77
3.7 สถานที่ทำงานวิจัย.....	77
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	78

4.1 สมบัติของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่เตรียมจากเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทย	78
4.1.1 ร้อยละผลได้ทั้งหมดและขนาดของอนุภาคทรงกลม	79
4.1.2 โครงสร้างสัณฐานของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน	84
4.1.3 ร้อยละการเชื่อมขวางของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน	87
4.2 ความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในระดับห้องปฏิบัติการ (<i>In vitro</i> biodegradability)	90
4.3 ความสามารถในการดูดซับและควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในระดับห้องปฏิบัติการ.....	94
4.3.1 ความสามารถในการละลายและการดูดซับเคอร์คูมินบนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำ	94
4.3.2 ความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินจากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในระดับห้องปฏิบัติการ	99
4.4 ประสิทธิภาพการต้านมะเร็งในสัตว์ทดลองของเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน.....	105
4.4.1 การปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกในสัตว์ทดลอง	105
4.4.2 ผลการต้านมะเร็งในสัตว์ทดลองของเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน	110
4.4.2.1 ผลการต้านมะเร็งของเคอร์คูมินที่ปลดปล่อยจากอนุภาคทรงกลมต่อปริมาตรก้อนมะเร็ง (tumor volume) และร้อยละการเปลี่ยนแปลงก้อนมะเร็ง (%tumor change).....	110
4.4.2.2 ผลการต้านมะเร็งของเคอร์คูมินที่ปลดปล่อยจากอนุภาคทรงกลมต่อความหนาแน่นของหลอดเลือดที่เกิดขึ้นใหม่ (neocapillary density; NCD)	114
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	128
5.1 สรุปผลการทดลอง	128

5.2 ข้อเสนอแนะ	130
รายการอ้างอิง	131
ภาคผนวก ก	141
ภาคผนวก ข	142
ภาคผนวก ค	146
ภาคผนวก ง	147
ภาคผนวก จ	151
ภาคผนวก ฉ	153
ภาคผนวก ช	154
ภาคผนวก ซ	155
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	157



สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 ระบบควบคุมการปลดปล่อย (controlled release systems).....	19
ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในเส้นใยไฟโบรอินและเซรีซิน.....	25
ตารางที่ 2.3 สมบัติทางกลของเส้นใยไหมและพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ.....	27
ตารางที่ 2.4 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในเจลาติน.....	29
ตารางที่ 2.5 สมบัติของเจลาตินชนิดเอและบี.....	32
ตารางที่ 2.6 ค่า HLB และการนำไปประยุกต์ใช้งาน.....	38
ตารางที่ 2.7 ค่า HLB ของสารทำอิมัลชันที่ใช้งานในปัจจุบัน.....	38
ตารางที่ 2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาประสิทธิภาพการต้านมะเร็งของเคอร์คูมินใน สัตว์ทดลอง.....	52
ตารางที่ 2.9 น้ำหนักตัวของหนูทดลองก่อนและหลังได้รับการรักษาด้วยเคอร์คูมิน.....	53
ตารางที่ 4.1 ร้อยละผลได้ทั้งหมดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินชนิดเอและ ไฟโบรอินไหมไทยขนาดใหญ่กว่า 32 ไมครอนที่เตรียมได้โดยการเติมและไม่เติม Span 80	80
ตารางที่ 4.2 ร้อยละผลได้ภายหลังการคัดแยกขนาดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของ เจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทย ในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ที่เตรียมได้จาก การเติมและไม่เติม Span 80 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	83
ตารางที่ 4.3 ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินเอและไฟโบรอิน ไหมไทยที่ผ่านการคัดแยกขนาดด้วยตะแกรงคัดแยกขนาด 32 และ 75 ไมครอน และนำมาเชื่อม ขวางอนุภาคด้วยความร้อนแบบกำจัดน้ำออก.....	86
ตารางที่ 4.4 ประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินและปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกดูดซับบนอนุภาค ทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยชนิด G80SF20 และ G50SF50 ในตัว ทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำในสัดส่วนที่ต่างกัน	98
ตารางที่ 4.5 ค่าคงที่สำหรับการปลดปล่อยเคอร์คูมิน (Release constant; k) ตัวเลขชี้กำลังการ ปลดปล่อย (Release exponent; n) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlarion coefficient; R ²) ภายใต้สภาวะการควบคุมการปลดปล่อยที่มีเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อ มิลลิลิตรเป็นองค์ประกอบ	104

ตารางที่ 4.6	น้ำหนักหนูทดลองก่อนฉีด (วันที่ 0) และหลังปลูกมะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki.....	108
ตารางที่ 4.7	ปริมาณก้อนมะเร็งหลังฉีดปลูกมะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki ณ วันต่างๆ.....	109
ตารางที่ 4.8	ค่าร้อยละความหนาแน่นหลอดเลือดเกิดใหม่ (% Neocapillary density; NCD) (ณ วันที่ 52 ในกลุ่ม PBS, วันที่ 62 ในกลุ่ม Blank-G80SF20 และ G80SF20-Cur, วันที่ 43 ในกลุ่ม Blank-G50SF50 และวันที่ 36 ในกลุ่ม G50SF50-Cur).....	126
ตารางที่ ง.1	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ, เวลาการแบ่งตัววิคูณ และร้อยละการยึดเกาะที่เวลา 6 ชั่วโมง ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki ที่เพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน 24 หลุม	150
ตารางที่ ข.1	ปริมาณก้อนมะเร็งหลังทำการฉีดรักษา ณ วันต่างๆ ของกลุ่ม PBS	155
ตารางที่ ข.2	ปริมาณก้อนมะเร็งหลังทำการฉีดรักษา ณ วันต่างๆ ของกลุ่มทดลอง Blank-G80SF20.....	155
ตารางที่ ข.3	ปริมาณก้อนมะเร็งหลังทำการฉีดรักษา ณ วันต่างๆ ของกลุ่มทดลอง G80SF20-Cur	155
ตารางที่ ข.4	ปริมาณก้อนมะเร็งหลังทำการฉีดรักษา ณ วันต่างๆ ของกลุ่มทดลอง Blank-G50SF50.....	156
ตารางที่ ข.5	ปริมาณก้อนมะเร็งหลังทำการฉีดรักษา ณ วันต่างๆ ของกลุ่มทดลอง G50SF50-Cur	156

สารบัญรูป

รูปที่ 2.1	กระบวนการเกิดมะเร็ง	7
รูปที่ 2.2	โครงสร้างโมเลกุลของสารสำคัญในเคอร์คูมินอยด์	9
รูปที่ 2.3	โครงสร้างโมเลกุลของรูปแบบคีโตและอินอล	9
รูปที่ 2.4	โครงสร้างทางเคมีของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลายตัวของเคอร์คูมิน	10
รูปที่ 2.5	กลไกการยับยั้งการอักเสบของเคอร์คูมิน	12
รูปที่ 2.6	ฤทธิ์ต้านการอักเสบของเคอร์คูมินในโรคต่างๆ	13
รูปที่ 2.7	ฤทธิ์ของเคอร์คูมินในการยับยั้งความผิดปกติระดับชีวโมเลกุลและสารพันธุกรรมของเซลล์	16
รูปที่ 2.8	ระดับความเข้มข้นของยาในเลือดที่ได้รับระบบจากการให้ยาในรูปแบบทั่วไปหลายๆครั้งเปรียบเทียบกับระดับความเข้มข้นของยาในเลือดในรูปแบบของยาออกฤทธิ์เนิ่นหรือออกฤทธิ์นาน	18
รูปที่ 2.9	การควบคุมการปลดปล่อยยาด้วยระบบกักเก็บ	20
รูปที่ 2.10	การควบคุมการปลดปล่อยยาด้วยระบบเมทริกซ์	21
รูปที่ 2.11	โครงสร้างของเส้นใยไหมที่ได้จากหนอนไหม	23
รูปที่ 2.12	โครงสร้างและการเรียงตัวของหมู่เอมิโนของเส้นใยไฟโบรอิน	26
รูปที่ 2.13	โครงสร้างของเซรีซิน	26
รูปที่ 2.14	การเสียดสภาพของคอลลาเจนด้วยกระบวนการไฮโดรไลซิส	28
รูปที่ 2.15	กระบวนการผลิตเจลาตินชนิดเอและบี	30
รูปที่ 2.16	อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ผลิตจากไฟโบรอินไหม	33
รูปที่ 2.17	การเตรียมอิมัลชันแบบชั้นเดียวชนิด oil-in-water emulsion	35
รูปที่ 2.18	อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (oil-in-water emulsion; O/W) และชนิดน้ำในน้ำมัน (water-in-oil emulsion, W/O)	35
รูปที่ 2.19	การเตรียมอิมัลชันเชิงซ้อนชนิด water in oil in water emulsion	36

รูปที่ 2.20 ส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำของสารทำอิมัลชัน	36
รูปที่ 2.21 การเรียงตัวของสารทำอิมัลชันในอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำและชนิดน้ำในน้ำมัน	37
รูปที่ 2.22 โครงสร้างของกลูตารัลดีไฮด์	41
รูปที่ 2.23 การเชื่อมขวางของโปรตีนด้วยกลูตารัลดีไฮด์	41
รูปที่ 2.24 การเชื่อมขวางของโปรตีนด้วยฟอร์มัลดีไฮด์	42
รูปที่ 2.25 การเชื่อมขวางของโปรตีนด้วย EDC/NHS	42
รูปที่ 2.26 ปริมาณเคอร์คูมินที่พบในพลาสมาหลังจากการฝังแผ่นเจลลาตินดัดแปลง	49
รูปที่ 3.1 แผนผังการดำเนินงานวิจัย	65
รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายไฟโบรอิน	67
รูปที่ 4.1 ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลลาตินเอและไฟโบรอินใหม่ไทยที่มีขนาดอนุภาคในช่วง 32-75 ไมครอน ในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ซึ่งถูกเชื่อมขวางอนุภาคด้วยความร้อนแบบกำจัดน้ำออก ถ้ายกจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ขนาดกำลังขยาย 200 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 100 ไมครอน) และขนาดกำลังขยาย 1,000 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมครอน)	85
รูปที่ 4.2 ลักษณะพื้นฐานภายในของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลลาตินเอและไฟโบรอินใหม่ไทยที่มีขนาดอนุภาคในช่วง 32-75 ไมครอน ในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ซึ่งถูกเชื่อมขวางอนุภาคด้วยความร้อนแบบกำจัดน้ำออก ถ้ายกจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ขนาดกำลังขยาย 1000 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมครอน) และขนาดกำลังขยาย 5,000 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมครอน)	86
รูปที่ 4.3 ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระก่อนและหลังการเชื่อมขวางของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลลาตินและไฟโบรอินใหม่ไทยในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ที่มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 32-75 ไมครอน ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยความร้อนแบบกำจัดน้ำออกที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส ที่สภาวะสุญญากาศ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	89
รูปที่ 4.4 ค่าร้อยละการเชื่อมขวางของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลลาตินและไฟโบรอินใหม่ไทยขนาด 32-75 ไมครอน ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยความร้อนแบบกำจัดน้ำออกที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส ที่สภาวะสุญญากาศ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	90

รูปที่ 4.5 ร้อยละของน้ำหนักแห้งของเนื้อของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่างๆ (เชื่อมขวางอนุภาคด้วยความร้อนแบบกำจัดน้ำออกที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง) ภายหลังการแช่ในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาในการแช่ต่าง ๆ 93

รูปที่ 4.6 สารละลายเคอร์คูมินความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำ ในสัดส่วนต่างๆ A) เอทานอลบริสุทธิ์ (E100) B) ตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำสัดส่วน 90:10 (E90) และ C) ตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำสัดส่วน 80:20 (E80) หลังจากตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลามากกว่า 12 ชั่วโมง ในที่มีด 94

รูปที่ 4.7 (a,b) การบวมน้ำและสีของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยชนิด G50SF50 และ G80SF20 ในสารละลายเคอร์คูมินความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำในสัดส่วนที่ต่างกัน (c,d) อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนชนิด G50SF50 และ G80SF20 ที่ทำการดูดซับเคอร์คูมินในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำและผ่านกระบวนการแห้งแบบเยือก โดยที่ A) เอทานอลบริสุทธิ์ (E100) B) ตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำสัดส่วน 90:10 (E90) และ C) ตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำสัดส่วน 80:20 (E80)..... 97

รูปที่ 4.8 ร้อยละการปลดปล่อยสะสมเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่างๆ (เชื่อมขวางอนุภาคด้วยความร้อนแบบกำจัดน้ำออกที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง) ภายหลังการแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต และ Fetal bovine serum ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ค่าความเป็นกรดต่าง 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้อุณหภูมิที่มีเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นองค์ประกอบ 101

รูปที่ 4.9 การฉีดปลูกเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki บนหลังบริเวณ dorsal skin-fold chamber..... 106

รูปที่ 4.10 ภาพถ่ายหนูทดลอง ณ วันต่างๆ หลังจากฉีดเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki (10×10^6 เซลล์/200 ไมโครลิตร) ทางใต้ผิวหนังบริเวณ dorsal skin-fold chamber..... 107

รูปที่ 4.11 กราฟแสดงร้อยละการเปลี่ยนแปลงปริมาณก้อนมะเร็ง (%tumor change) ของหนูทดลองกลุ่มต่างๆหลังทำการฉีดรักษา ในวันที่ 7, 14, 21, 28 และวันที่หาความหนาแน่นหลอดเลือด

เกิดใหม่ (กลุ่ม PBS ทดลองวันที่ 52 กลุ่ม Blank-G80SF20 และ G80SF20-Cur ทดลองวันที่ 62 กลุ่ม Blank-G50SF50 ทดลองวันที่ 43 และกลุ่ม G50SF50-Cur ทดลองวันที่ 36).....	116
รูปที่ 4.12 ภาพถ่ายก่อนมะเร็งร้ายภายนอกร่างกายและภายในร่างกาย หลังทำการฉีดรักษาด้วย Blank-G80SF20 ณ วันที่ 62	117
รูปที่ 4.13 ภาพถ่ายก่อนมะเร็งร้ายภายนอกร่างกายและภายในร่างกาย หลังทำการฉีดรักษาด้วย G80SF20-Cur ณ วันที่ 62	118
รูปที่ 4.14 ภาพถ่ายก่อนมะเร็งร้ายภายนอกร่างกายและภายในร่างกาย หลังทำการฉีดรักษาด้วย Blank-G50SF50 ณ วันที่ 43	119
รูปที่ 4.15 ภาพถ่ายก่อนมะเร็งร้ายภายนอกร่างกายและภายในร่างกาย หลังทำการฉีดรักษาด้วย G50SF50-Cur ณ วันที่ 36.....	120
รูปที่ 4.16 ภาพถ่ายหลอดเลือดของหนูทดลองผ่านกล้องฟลูออเรสเซนซ์ตำแหน่งต่างๆ หลังฉีดรักษาด้วย PBS ณ วันที่ 52	121
รูปที่ 4.17 ภาพถ่ายหลอดเลือดของหนูทดลองผ่านกล้องฟลูออเรสเซนซ์ตำแหน่งต่างๆ หลังฉีดรักษาด้วย Blank-G80SF20 ณ วันที่ 62	122
รูปที่ 4.18 ภาพถ่ายหลอดเลือดของหนูทดลองผ่านกล้องฟลูออเรสเซนซ์ตำแหน่งต่างๆ หลังฉีดรักษาด้วย G80SF20-Cur ณ วันที่ 62.....	123
รูปที่ 4.19 ภาพถ่ายหลอดเลือดของหนูทดลองผ่านกล้องฟลูออเรสเซนซ์ตำแหน่งต่างๆ หลังฉีดรักษาด้วย Blank-G50SF50 ณ วันที่ 43	124
รูปที่ 4.20 ภาพถ่ายหลอดเลือดของหนูทดลองผ่านกล้องฟลูออเรสเซนซ์ตำแหน่งต่างๆ หลังฉีดรักษาด้วย G50SF50-Cur ณ วันที่ 36	125
รูปที่ 4.21 ภาพถ่ายก่อนมะเร็งและหลอดเลือดที่เกิดใหม่บริเวณก้อนมะเร็งในกลุ่มที่ทำการฉีดรักษาด้วย G80SF20-Cur-3 จากกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (สเกลบาร์เท่ากับ 100 ไมครอน)	127
รูปที่ ก.1 การทำปฏิกิริยาระหว่าง 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) กับหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีน เกิดเป็นอนุพันธ์ของของ trinitrophenyl (TNP) และซัลเฟตไอออน	141
รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานของสารละลาย β -Alanine ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร.....	141

รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายเคอร์คูมินที่ผ่านการระเหยตัวทำละลายเอทานอลบริสุทธิ์ความเข้มข้น 99.9 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (E100) ก่อนการละลายในตัวทำละลายไดเมทิลซัลโฟไซด์ (DMSO) ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร.....	142
รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายเคอร์คูมินที่ผ่านการระเหยตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำในสัดส่วน 9:1 (E90) ก่อนการละลายในตัวทำละลายไดเมทิลซัลโฟไซด์ (DMSO) ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร.....	143
รูปที่ ข.3 กราฟมาตรฐานของสารละลายเคอร์คูมินที่ผ่านการระเหยตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำ ในสัดส่วน 8:2 (E80) ก่อนการละลายในตัวทำละลายไดเมทิลซัลโฟไซด์ (DMSO) ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร.....	144
รูปที่ ข.4 กราฟมาตรฐานของสารละลายเคอร์คูมินที่ผ่านการระเหยตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำ ในสัดส่วน 8:2 (E80) ก่อนการละลายในสารละลายผสมของบัพเฟอร์ฟอสเฟตและ Fetal bovine serum ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร.....	145
รูปที่ ค.1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยสะสมที่เวลา t (M_t) หารด้วยปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยสะสมที่เวลาอนันต์ (M_∞) เทียบกับเวลาในการปลดปล่อยเคอร์คูมิน ของอนุภาคทรงกลมภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นองค์ประกอบ.....	146
รูปที่ ง.1 กราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์ CaSki.....	147
รูปที่ ง.2 กราฟอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ CaSki.....	148
รูปที่ จ.1 รูปร่างของเซลล์ Caski หลังจากเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM (ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน.....	151

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาของงานวิจัย

ปัจจุบันโรคมะเร็งเป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตและจัดเป็นปัญหาทางสาธารณสุขของโลก ผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น จากสถิติของสถาบันมะเร็งแห่งชาติในปี พ.ศ. 2537 [1] พบว่ามีจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งมากกว่า 18 ล้านคน และมีผู้ป่วยใหม่ประมาณ 9 ล้านคน ในทุกๆ ปี และองค์การอนามัยโลกได้คาดการณ์ว่า ในปี 2563 จะมีผู้เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งทั่วโลกกว่า 11 ล้านคน โดยจะเกิดขึ้นในประเทศที่กำลังพัฒนามากกว่า 7 ล้านคน แนวทางการรักษาโรคมะเร็งตามหลักสากลนั้นมีหลายวิธี ได้แก่ การผ่าตัด การฉายรังสี การใช้ยาเคมีบำบัด และการให้ฮอร์โมน เป็นต้น โดยการผ่าตัดและการฉายรังสีนั้นเป็นวิธีที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งชนิดก้อนเนื้อที่เจริญเฉพาะที่ ส่วนการใช้ยาเคมีบำบัดเป็นการรักษาโรคมะเร็งทั้งชนิดก้อนเนื้อและเซลล์แพร่กระจาย โดยยาเคมีบำบัดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง แต่สามารถเกิดผลข้างเคียงกับเซลล์ร่างกายปกติที่มีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วด้วย เช่น ไชกระดูก เซลล์เม็ดเลือด ผม เยื่อบุทางเดินอาหาร และอวัยวะสืบพันธุ์ เป็นต้น ซึ่งการให้ยาในรูปแบบทั่วไปมีข้อจำกัดอยู่หลายประการ กล่าวคือ ในช่วงแรกของการให้ยาจะมีการปลดปล่อยยาออกมามากที่สุดและค่อยๆ ลดลงจนยาหมด จึงจำเป็นต้องให้ยาซ้ำตามขนาดเดิมหลายครั้งต่อวัน เพื่อให้ระดับยาในเลือดอยู่ในช่วงการรักษา แต่การให้ยาซ้ำอาจทำให้เกิดการแหว่งของระดับยาในเลือดได้ โดยสามารถเกิดความเป็นพิษของยาเนื่องมาจากระดับยาในเลือดที่สูงมาก หรือไม่สามารถให้ผลทางการรักษาเนื่องมาจากระดับยาในเลือดต่ำเกินไป ดังนั้น การพัฒนาระบบนำส่งยาในรูปแบบต่างๆ ที่สามารถควบคุมให้ปลดปล่อยยาในอัตราและปริมาณที่กำหนด และสามารถนำยาไปยังอวัยวะ หรือบริเวณเป้าหมายในร่างกายได้ตามต้องการ เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการรักษาสูงสุด จึงได้รับความสนใจในปัจจุบัน [2]

รูปแบบของระบบนำส่งยาที่ควบคุมการปลดปล่อยนั้นมีหลายแบบ เช่น แผ่นฟิล์ม ไฮโดรเจล และอนุภาคทรงกลมขนาดไมโครหรือนาโน เป็นต้น พอลิเมอร์ที่นิยมนำมาใช้เป็นระบบนำส่ง แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ พอลิเมอร์สังเคราะห์ เช่น พอลิไกลโกลิคแอซิด (polyglycolic acid; PGA) พอลิแลคติกแอซิด (polylactic acid; PLA) เป็นต้น พอลิเมอร์เหล่านี้มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพและสามารถควบคุมอัตราการปลดปล่อยยาได้จากสมบัติการย่อยสลายของพอลิเมอร์ แต่มีข้อเสียคือ เมื่อ

ย่อยสลายแล้วจะให้ผลิตภัณฑ์บางชนิด เช่น แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งทำให้ค่า pH ลดลง ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาวะทางสรีรวิทยา (physiological condition) ทำให้เกิดการตายของเซลล์และเนื้อเยื่อ [3] เป็นต้น พอลิเมอร์อีกกลุ่ม ได้แก่ พอลิเมอร์ธรรมชาติ เช่น คอลลาเจน เจลาติน ไหม แอลจิเนต และ ไคโตซาน เป็นต้น มีสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพ สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพโดยไม่ก่อให้เกิดสารพิษ และสามารถควบคุมอัตราการปลดปล่อยยาได้ ด้วยสมบัติเหล่านี้ทำให้มีการนำพอลิเมอร์ธรรมชาติมาประยุกต์ใช้เป็นระบบการนำส่งยาอย่างแพร่หลาย

เจลาตินเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่นิยมใช้ทางการแพทย์ และเภสัชกรรม เนื่องจากราคาไม่แพง มีสมบัติย่อยสลายทางชีวภาพ มีสมบัติการเข้ากันได้ดีกับร่างกาย และไม่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบในร่างกาย [4] ด้วยสมบัติเหล่านี้ทำให้เจลาตินได้รับการยอมรับว่าเป็นสารที่มีความปลอดภัยสูง โดยในปัจจุบันมีงานวิจัยในด้านการควบคุมการปลดปล่อยสารจากเจลาตินมากมาย แต่เนื่องจากเจลาตินสามารถละลายน้ำได้ดีและมีอัตราการย่อยสลายที่เร็วซึ่งเป็นข้อจำกัดสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้งาน จึงมีการนำไฟโบรอินมาผสมกับเจลาตินเพื่อปรับปรุงสมบัติการย่อยสลาย โดยไฟโบรอินเป็นโปรตีนเส้นใยที่ได้มาจากหนอนไหมและใยแมงมุม มีสมบัติทางกลที่ดี มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ดังนั้นการนำไฟโบรอินมาใช้ร่วมกับเจลาตินจึงทำให้พอลิเมอร์ผสมย่อยสลายช้าลง และสามารถปลดปล่อยตัวยาหรือสารสำคัญได้อย่างช้าๆและต่อเนื่อง [4-6]

เคอร์คูมิน (curcumin) เป็นสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ (curcuminoids) สกัดได้จากเหง้าขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) เป็นสารที่ได้รับความสนใจในวงการแพทย์และเภสัชกรรมเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายประการและไม่ก่อให้เกิดพิษต่อร่างกาย แม้ว่าร่างกายจะได้รับในปริมาณมากก็ตาม (12 กรัมต่อวัน โดยการรับประทาน) [7] จึงมีการนำเคอร์คูมินมาใช้ในการรักษาและป้องกันโรคต่างๆ ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของเคอร์คูมิน ได้แก่ ด้านเชื้อจุลชีพ รา และไวรัส ด้านการอักเสบ ด้านอนุมูลอิสระ และต้านมะเร็ง จากรายงานพบว่า เคอร์คูมินสามารถยับยั้งความผิดปกติในระดับชีวโมเลกุลและสารพันธุกรรมของเซลล์ ทำให้ขนาดของก้อนมะเร็งลดลงและชักนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งแบบ apoptosis ในหลอดทดลอง (*in vitro*) ได้หลายชนิด เช่น มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (bladder cancer) มะเร็งเต้านม (breast cancer) มะเร็งปอด (lung cancer) มะเร็งตับอ่อน (pancreatic cancer) มะเร็งต่อมลูกหมาก (prostate cancer) มะเร็งปากมดลูก (cervical cancer) มะเร็งรังไข่ (ovarian cancer) เป็นต้น [8, 9] และยังมีฤทธิ์ในการป้องกันและ

รักษาโรคมะเร็งดังกล่าวในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) [10, 11] นอกจากนี้ยังพบว่า เคอร์คูมินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งโดยยับยั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) ซึ่งเป็นกลไกที่เซลล์มะเร็งมีการสร้างหลอดเลือดเพื่อให้ได้รับสารอาหารและออกซิเจนเพิ่มขึ้นเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง โดยเคอร์คูมินจะออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแสดงออกทางพันธุกรรมของสารที่เกี่ยวข้องกับการเกิดหลอดเลือดในกลุ่ม proangiogenic factor เช่น vascular endothelial growth factors (VEGF), cyclooxygenase-2 (COX-2) เป็นต้น [12] อย่างไรก็ตามเคอร์คูมินเป็นสารที่มีความสามารถในการละลายและมีความคงตัวค่อนข้างต่ำ โดยจะสลายตัวอย่างรวดเร็วเมื่อค่า pH เป็นกลาง [13] จึงมีการพัฒนาระบบการนำส่งในรูปแบบต่างๆ ได้แก่ อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนหรือนาโน (micro/nanospheres)[14, 15] ไมเซลล์ (micelles)[16] แผ่นเส้นใย (fiber mats) และไฮโดรเจล (hydrogels)[17-19] เป็นต้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของเคอร์คูมิน

ในปี 2014 Ratanavaraporn, J. และคณะ[15] ได้ขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนระหว่างไฟโบรอินและเจลาตินที่สัดส่วนการผสมต่างๆ ด้วยเทคนิคอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (water in oil emulsion) เพื่อประยุกต์ใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินและ/หรือไพเพอรีน (piperine) และเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ พบว่า อนุภาคทรงกลมในสภาวะแห้งมีขนาดเฉลี่ย 194-217 ไมครอน และค่าร้อยละการเชื่อมขวางของอนุภาคทรงกลมของเจลาตินประมาณ 20 ส่วนอนุภาคทรงกลมผสมระหว่างไฟโบรอินและเจลาติน มีค่าร้อยละการเชื่อมขวางประมาณ 45-55 การทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส พบว่าอนุภาคทรงกลมของ เจลาตินจะถูกย่อยสลายหมดภายในระยะเวลา 14 วัน ในขณะที่อนุภาคทรงกลมผสมไฟโบรอินและ เจลาตินไม่ย่อยสลายภายในระยะเวลา 14 วัน นอกจากนี้ พบว่าอนุภาคที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินสูงสามารถดูดซับเคอร์คูมินและไพเพอรีนได้สูงด้วยอันตรกิริยาความไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) และอนุภาคทรงกลมมีความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินและไพเพอรีนได้อย่างต่อเนื่อง

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการศึกษาผลการต้านมะเร็งในสัตว์ทดลอง (*In vivo* anticancer activity) ของเคอร์คูมินที่ปลดปล่อยจากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินผสมไฟโบรอินไหมไทย ที่เตรียมจากเทคนิคอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน ซึ่งปรับปรุงจากรายงานในปี 2014 ของ Ratanavaraporn J. และคณะ [15] เพื่อให้ได้อนุภาคทรงกลมขนาดเล็กประมาณ 32-75 ไมครอน ซึ่งสามารถฉีดผ่านเข็ม

ฉีดยาขนาด 27G (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในประมาณ 210 ไมครอน) จากนั้นทำการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยความร้อนแบบก้ำจัดน้ำออก (dehydrothermal treatment) เพื่อให้อนุภาคที่ได้มีอัตราการย่อยสลายเร็วกว่าการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์และควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินได้อย่างต่อเนื่อง โดยศึกษาความสามารถในการปลดปล่อยเคอร์คูมินจากอนุภาคทรงกลมและทดสอบผลการต้านมะเร็งในสัตว์ทดลองที่มีการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปอกมดลูก

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อเตรียมอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนจากเจลาตินชนิดเอผสมกับไฟโบรอินไหมไทยเพื่อใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมิน

1.2.2 เพื่อทดสอบผลการต้านมะเร็งในสัตว์ทดลองของเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทย

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 เตรียมสารละลายเจลาตินชนิดเอ (G) และสารละลายไฟโบรอินไหมไทย (SF) ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก ในอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินชนิดเอต่อไฟโบรอินไหมไทย ได้แก่ G50SF50 และ G80SF20

1.3.2 ขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนด้วยวิธี water in oil emulsion โดยใช้อัตราส่วนน้ำต่อน้ำมัน 1:12 และเติม Span[®] 80 ซึ่งเป็นสารก่ออิมัลชัน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และทำการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยความร้อนแบบก้ำจัดน้ำออก (Dehydrothermal treatment)

- คัดแยกขนาดด้วยตะแกรงคัดแยกขนาด 32, 75, 100, 180, 300 ไมครอน และศึกษาร้อยละผลได้ของอนุภาคแต่ละขนาด
- คัดเลือกอนุภาคขนาด 32-75 ไมครอน เพื่อทำการศึกษาวิจัยขั้นต่อไป

1.3.3 วิเคราะห์คุณลักษณะและสมบัติทางกายภาพ และชีวภาพของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน ได้แก่

- โครงสร้างพื้นฐานโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) ขนาดอนุภาคเฉลี่ย

- ค่าร้อยละของการเชื่อมขวาง (% crosslinking degree) ของอนุภาคโดยใช้เทคนิค 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic Acid (TNBS)
- ความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในระดับห้องปฏิบัติการ (*In vitro* biodegradation) โดยใช้สารละลายเอนไซม์โปรตีเอส XIV (Protease XIV) ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.4 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

1.3.4 ศึกษาความสามารถในการดูดซับและการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินในระดับห้องปฏิบัติการ

- ความสามารถในการดูดซับเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน (Drug Loading และ Entrapment Efficiency)
- ความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในระดับห้องปฏิบัติการ (*In vitro* controlled release)

1.3.5 ศึกษาประสิทธิภาพการต้านมะเร็งในสัตว์ทดลองของเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน โดยทำการทดลองในหนู nude mice ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูก (human cervical carcinoma cell line; CaSki) โดยวิเคราะห์เปรียบเทียบกลุ่มการทดลอง ดังนี้

- สุขภาพสัตว์ทดลอง และผลของบริเวณที่ได้รับยา
- ปริมาณหลอดเลือดเกิดใหม่ (Neocapillary density)
- ขนาดก้อนมะเร็ง (ปริมาตรก้อนมะเร็ง) และร้อยละการเปลี่ยนแปลงของก้อนมะเร็ง (% Tumor change)

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ

ได้องค์ความรู้เกี่ยวกับความสามารถในการปลดปล่อยและผลการยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก (CaSki) ในสัตว์ทดลองของสารเคอร์คูมินจากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินผสมไฟโบรอินไหมไทย

บทที่ 2

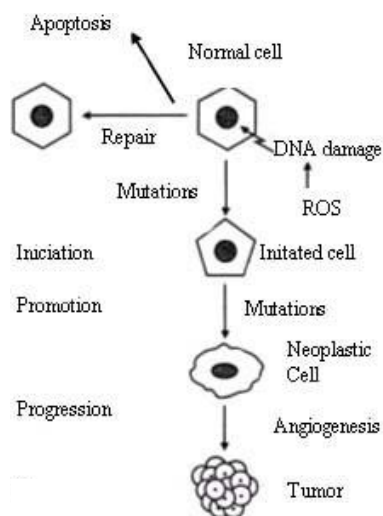
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคมะเร็ง (Cancer)

โรคมะเร็ง เกิดจากความผิดปกติในระดับชีวโมเลกุลและสารพันธุกรรมของเซลล์ร่างกาย ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโต การแบ่งตัว และการตาย (apoptosis) ของเซลล์ [20] โดยมีการเปลี่ยนแปลงหลายขั้นตอนกว่าที่เซลล์ร่างกายปกติจะกลายเป็นเซลล์มะเร็งได้ ซึ่งเรียกว่า multistage carcinogenesis กระบวนการเกิดมะเร็งประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังรูปที่ 2.1 ดังนี้

- **ขั้นก่อตัว (initiation)** เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับชีวโมเลกุลและสารพันธุกรรมในเซลล์ร่างกายอย่างถาวร โดยถูกชักนำจากปัจจัยทางกายภาพภายนอก เช่น สารเคมี การติดเชื้อไวรัส รังสี เป็นต้น การเปลี่ยนแปลงในขั้นก่อตัวเกิดขึ้นภายในระยะเวลาสั้นๆ และเกิดขึ้นรวดเร็วเมื่อถูกชักนำจากปัจจัยภายนอก โดยสิ่งเหล่านี้มีผลทำให้เซลล์ร่างกายเกิดความผิดปกติในช่วงการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์
- **ขั้นส่งเสริม (promotion)** เป็นการสะสมความผิดปกติที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงในขั้นก่อตัว โดยเซลล์ที่ผิดปกติจะมีการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์เกิดเป็นเนื้อเยื่อที่ผิดปกติ
- **ขั้นก้าวหน้า (progression)** เป็นการแพร่กระจายของเนื้อเยื่อที่ผิดปกติ จากอวัยวะหนึ่ง ไปอีกอวัยวะหนึ่ง หรือจากเนื้อเยื่อที่ผิดปกติเพียงเล็กน้อยที่อยู่ในขอบเขตจำกัด แพร่กระจายเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วไปยังส่วนอื่นๆของร่างกาย (metastasis)

ความผิดปกติในระดับชีวโมเลกุลของการเกิดมะเร็งนั้นมีได้หลายแบบ ตั้งแต่มีการเพิ่มหรือลดจำนวนของชุดของโครโมโซม การแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมระหว่างคู่ (translocation) การสูญเสียชิ้นส่วนของโครโมโซม (deletion) ความผิดปกติจากการผ่าเหล่าเฉพาะจุด (point mutation) ของยีนที่มีการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง [21] มี 2 กลุ่ม คือ



รูปที่ 2.1 กระบวนการเกิดมะเร็ง [22]

1. ยีนก่อมะเร็ง (oncogene) คือ ยีนที่เมื่อเกิดความผิดปกติจะทำหน้าที่มากขึ้นและจะทำให้เซลล์ปกติเปลี่ยนแปลงไปกลายเป็นเซลล์มะเร็ง โดยเริ่มแรกเกิดจากยีนที่ควบคุมการเจริญเติบโตแบบปกติของร่างกาย (proto-oncogene)

2. ยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) ในสภาวะปกติยีนต้านมะเร็งจะทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของเซลล์ หากยีนนี้มีความผิดปกติจะทำให้เกิดมะเร็งได้

คุณลักษณะที่สำคัญของเซลล์มะเร็ง [21]

1. Proliferation เซลล์มะเร็งมีความสามารถในการแบ่งตัวที่อยู่นอกเหนือความควบคุมของร่างกาย เรียกว่า autonomy โดยปกติแล้วการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งจะช้ากว่าเซลล์ร่างกายปกติที่เป็นเซลล์ที่แบ่งตัวได้ เช่น เยื่อบุลำไส้ ไชกระดุก เป็นต้น และพบว่าเซลล์มะเร็งมีวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) นานกว่าเซลล์ธรรมดาประมาณ 3-4 เท่า แต่การที่มะเร็งเกิดขึ้นได้รวดเร็วนั้นเป็นเพราะเซลล์มีความสามารถที่จะเข้าสู่วัฏจักรของเซลล์ได้ตลอดเวลาทำให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากขึ้นเรื่อยๆ

2. Loss of differentiation คือ คงสภาพความเป็นเซลล์ตัวอ่อนที่คงคุณสมบัติและความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ตลอดเวลา ไม่สามารถที่จะเจริญเติบโตเป็นเซลล์ตัวแก่หรือเป็นเซลล์เป้าหมายได้

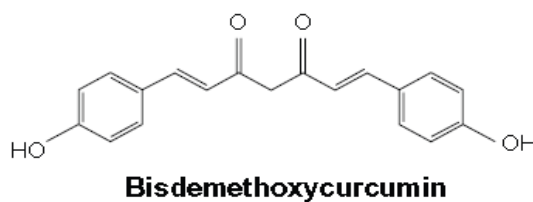
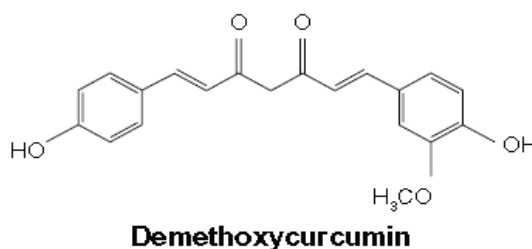
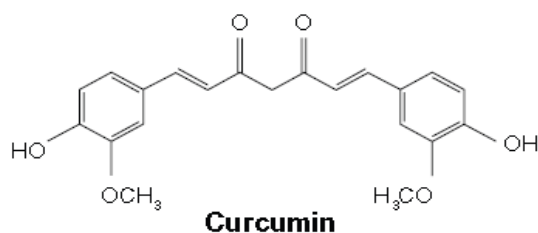
3. Invasion and metastasis คุณสมบัตินี้ใช้ในการจำแนกระหว่างเนื้องอกชนิดธรรมดา กับเนื้องอกชนิดร้ายหรือมะเร็งที่สามารถลุกลามไปยังอวัยวะข้างเคียงหรือการแพร่กระจายอวัยวะอื่นซึ่งไกลออกไป เช่น ต่อม้ำเหลือง ตับ ปอด เป็นต้น

2.2 เคอร์คูมิน (Curcumin) [23]

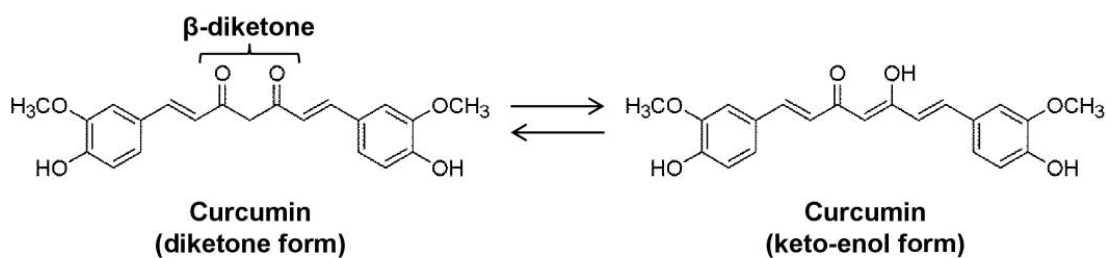
เคอร์คูมินเป็นสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ (curcuminoid) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารประกอบพอลิฟีนอล (polyphenolic compound) สกัดได้จากเหง้าขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ซึ่งเป็นพืชวงศ์ขิง เคอร์คูมินอยด์ประกอบด้วยสารสำคัญ 3 ชนิด (ดังแสดงในรูปที่ 2.2) คือ เคอร์คูมิน (curcumin หรือ curcumin I) ประมาณ 77% ดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน (demethoxycurcumin หรือ curcumin II) ประมาณ 17% และ บิสดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน (bis-demethoxycurcumin หรือ curcumin III) ประมาณ 3%

เคอร์คูมินถูกสกัดครั้งแรกในปี ค.ศ. 1815 และอยู่ในรูปการตกผลึกในปี ค.ศ. 1870 โดยมีชื่อทางเคมีว่า 1,6-heptadiene-3,5-dione-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-(1E,6E) เคอร์คูมินมีลักษณะเป็นผงสีเหลืองส้ม ไม่ละลายในน้ำและอีเทอร์ แต่ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอล เอทานอล ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) และอะซิโตน เป็นต้น เคอร์คูมินมีจุดหลอมเหลวอยู่ที่ 183 องศาเซลเซียส สูตรโมเลกุล $C_{21}H_{20}O_6$ และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 368.37 กรัมต่อโมล

เคอร์คูมินสามารถอยู่ในรูปของทาวโทเมอร์ริก (tautomeric form) ได้อย่างน้อย 2 รูปแบบ โดยขึ้นอยู่กับสถานะของตัวทำละลาย กล่าวคือ โครงสร้างโมเลกุลสามารถเปลี่ยนจากรูปคีโต (keto form) ไปเป็นรูปเอนอล (enol form) หรือจากรูปเอนอลไปเป็นรูปคีโตได้ ดังรูปที่ 2.3 โดยพบว่าในสารละลายที่มีสภาวะกรดและกลาง เคอร์คูมินจะแสดงรูปแบบของคีโต และในสารละลายที่มีสภาวะเบส เคอร์คูมินจะแสดงรูปแบบของเอนอล [7] โดยปกติแล้วเคอร์คูมินประมาณ 95% จะอยู่ในรูปเอนอล โดยรูปเอนอลจะมีความคงตัวในสถานะของแข็งและสารละลาย [24]



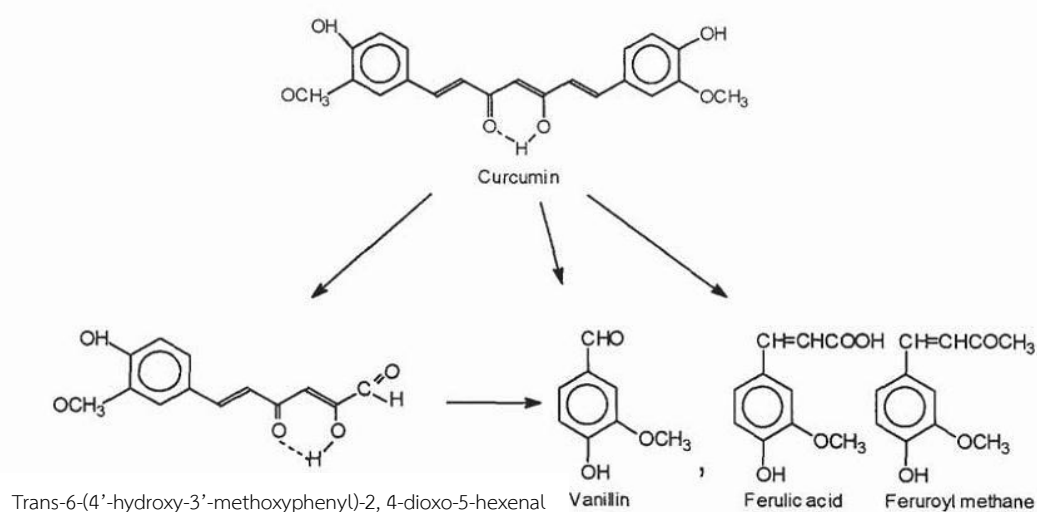
รูปที่ 2.2 โครงสร้างโมเลกุลของสารสำคัญในเคอร์คูมินอยด์ [25]



รูปที่ 2.3 โครงสร้างโมเลกุลของรูปแบบคีโตและอินอล [26]

สารละลายเคอร์คูมินในเมทานอลสามารถดูดกลืนแสงสูงสุดได้ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร และเมื่อละลายในอะซิโตนพบค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วง 415-420 นาโนเมตร โดยทั่วไปเคอร์คูมินจะมีสีเหลืองเมื่อละลายในตัวกลางที่มีค่า pH อยู่ในช่วง 2.5 - 7 และมีสีแดงเมื่อละลายในตัวกลางที่มีค่า pH มากกว่า 7 ซึ่งเคอร์คูมินมีความคงตัวมากเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรด และไม่คงตัวเมื่ออยู่ในสภาวะเป็นกลางและเป็นเบส

ในการศึกษาความคงตัวของเคอร์คูมิน พบว่าการสลายตัวของเคอร์คูมินขึ้นอยู่กับค่า pH กล่าวคือ เคอร์คูมินจะสลายตัวอย่างรวดเร็วเมื่อมีค่า pH เป็นกลาง และสลายตัวได้ช้าเมื่อค่า pH อยู่ในช่วง 1 – 6 และจากการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาความคงตัวของเคอร์คูมินในสารละลายที่สภาวะต่างๆ ได้แก่ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ที่ pH 7.2, อาหารเลี้ยงเซลล์, อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยซีรัมและเลือดมนุษย์ 10% โดยทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลา 1, 4 และ 8 ชั่วโมง พบว่าเคอร์คูมินในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และอาหารเลี้ยงเซลล์จะสลายตัวภายในระยะเวลา 1 ชั่วโมง แต่เคอร์คูมินในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยซีรัมและเลือดของมนุษย์ 10% จะมีการสลายตัวไปเพียง 20% ภายหลังจากบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และสลายตัวไปเพียง 50 % เมื่อเวลาผ่านไป 8 ชั่วโมง [13] โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลายตัวของเคอร์คูมิน คือ Trans-6-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-2, 4-dioxo-5-hexenal นอกจากนี้ยังมี vanillin ferulic acid และ feruloylmethane ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลายตัวของเคอร์คูมิน [13]

สมบัติของเคอร์คูมิน

เคอร์คูมินเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายประการ จึงได้รับความนิยมนำมาใช้ในด้านการแพทย์และเภสัชกรรมเพื่อการรักษาและป้องกันโรคต่างๆ เคอร์คูมินไม่ก่อให้เกิดพิษต่อร่างกาย

แม้ว่าร่างกายจะได้รับในปริมาณมากก็ตาม (12 กรัมต่อวัน โดยการรับประทาน) [7] ซึ่งฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของเคอร์คูมิน มีดังนี้

1. ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ รา และไวรัส (antimicrobial, antifungal and antiviral activities) [25]

เคอร์คูมินมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพได้หลายชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Penicillium notatum* และ *Aspergillus niger* เป็นต้น โดยเคอร์คูมินมีกลไกการออกฤทธิ์ทำลายผนังเซลล์ของเชื้อจุลชีพ และจากการศึกษาในหนูทดลองยังพบว่าเคอร์คูมินสามารถยับยั้งการติดเชื้อ *Helicobacter pylori* ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร (gastric ulcer) และโรคกระเพาะอาหารอักเสบ (gastritis) ได้

เคอร์คูมินสามารถยับยั้งเชื้อรากลุ่ม *Candida* ได้ทั้งหมด 14 สายพันธุ์ เช่น *C. albicans* และ *C. glabrata* เป็นต้น โดยเคอร์คูมินจะออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง ergosterol ซึ่งเป็นสารองค์ประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์เชื้อรา

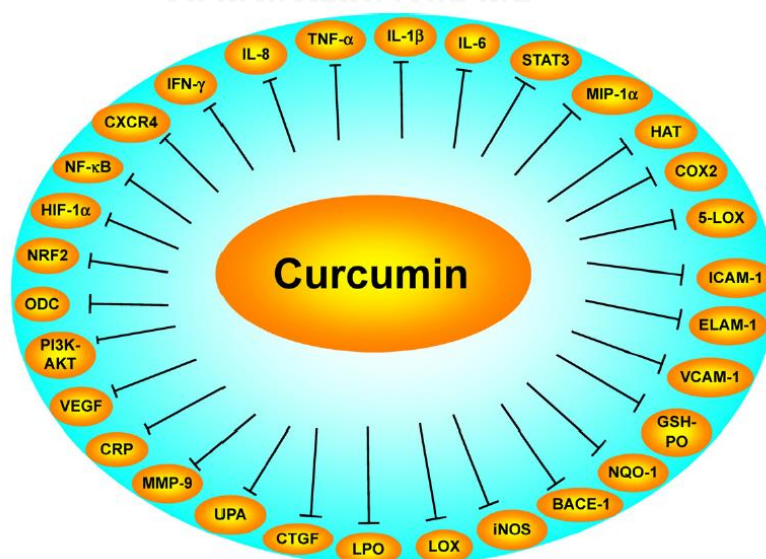
จากการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการยังพบว่า เคอร์คูมินมีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสได้หลายชนิด ได้แก่ human immunodeficiency virus (HIV) โดยออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase [27] ซึ่งใช้ในการสร้างสารทางพันธุกรรมของไวรัส และยังสามารถยับยั้งเชื้อไวรัส herpes simplex virus-1 (HSV-1) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเริมชนิดที่ไม่ติดต่อทางเพศสัมพันธ์ โดยการใส่เคอร์คูมินร่วมกับธาตุโลหะ เช่น แกลเลียม (Ga) หรือ ทองแดง (Cu) จะสามารถยับยั้งการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ (DNA replication) ได้ [28]

2. ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory activities)

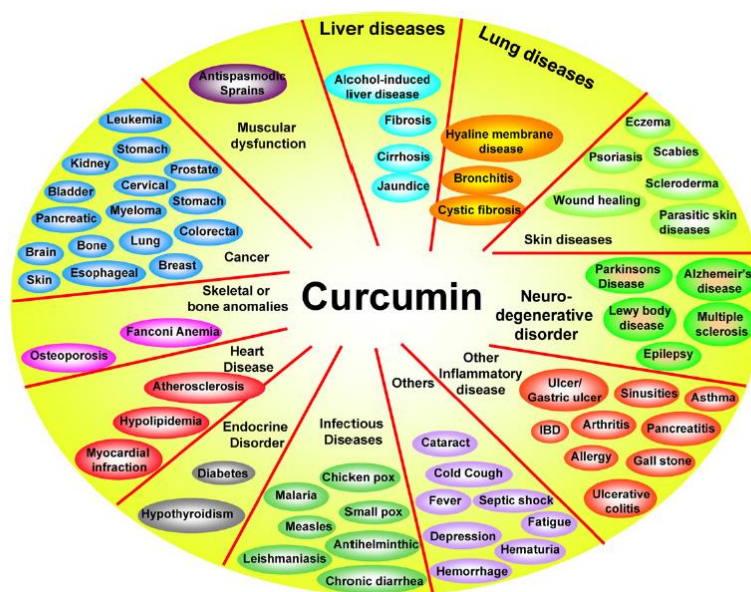
การอักเสบ (inflammation) เป็นกระบวนการที่ร่างกายตอบสนองต่อสิ่งที่ทำให้เนื้อเยื่อของร่างกายได้รับบาดเจ็บ เช่น การติดเชื้อ การตายของเซลล์จากการขาดเลือดหรือขาดออกซิเจน เป็นต้น การตอบสนองของเนื้อเยื่อในร่างกายต่อกระบวนการอักเสบ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด การเคลื่อนตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาว (leukocyte) และการเปลี่ยนแปลงในหลายระบบของร่างกาย (systemic effect) นอกจากนี้การอักเสบยังมีบทบาทในการเริ่มต้นการซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่บาดเจ็บ

เคอร์คูมินมีกลไกด้านการอักเสบหลายกลไก ดังรูปที่ 2.5 ได้แก่ ควบคุมการสร้าง (down regulation) สารสื่อการอักเสบ (inflammatory cytokines) เช่น tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-1 (IL-1) และ interleukin-8 (IL-8) เป็นต้น และยังควบคุมการทำงานของ nuclear factor kappa B (NF- κ B) จึงเพิ่มการสร้างสารต้านการอักเสบ (anti-inflammatory cytokines) เช่น interleukin-4 (IL-4) interleukin-6 (IL-6) interleukin-10 (IL-10) interleukin-11 (IL-11) และ interleukin-13 (IL-13) เป็นต้น นอกจากนี้ NF- κ B ยังเป็นตัวควบคุมการแสดงออกของหน่วยพันธุกรรม (gene) ที่สร้างเอ็นไซม์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ เช่น cyclooxygenase-2 (COX-2), 5-lipoxygenase (5-LOX) และ inducible nitric oxide synthase (iNOS) เป็นต้น [29]

โดยมีการรายงานว่าเคอร์คูมินมีประสิทธิภาพในการต้านการอักเสบได้ดีเทียบเท่ากับเฟนิลบูทาโซน (phenylbutazone) ซึ่งเป็นยาต้านการอักเสบ [8] และพบว่าเคอร์คูมินสามารถยับยั้งการอักเสบแบบเฉียบพลันและการอักเสบเรื้อรังซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเรื้อรังต่างๆ ดังรูปที่ 2.6 เช่น โรคพาร์กินสัน (parkinson's disease) โรคสมองเสื่อมหรืออัลไซเมอร์ (alzheimer's disease) โรคปลอกประสาทเสื่อมแข็ง (multiple sclerosis) โรคหลอดเลือดและหัวใจ (cardiovascular disease), โรคเบาหวาน (diabetes) โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) โรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) ตับอ่อนอักเสบ (pancreatitis) โรคลำไส้อักเสบ (inflammatory bowel disease) อากการลำไส้ใหญ่อักเสบ (colitis) โรคกระเพาะอักเสบ (gastritis) เป็นต้น



รูปที่ 2.5 กลไกการยับยั้งการอักเสบของเคอร์คูมิน [30]



รูปที่ 2.6 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของเคอร์คูมินในโรคต่างๆ [30]

3. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) [31]

อนุมูลอิสระ (free radical) คืออะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนไม่เป็นคู่ (unpaired electron) อย่างน้อย 1 ตัว โคจรรอบวงนอกสุด ทำให้อนุมูลอิสระไม่เสถียร และมีความไวในการเข้าทำปฏิกิริยาทางเคมี โดยอนุมูลอิสระจะไปแย่งจับอิเล็กตรอนจากอะตอมหรือโมเลกุลที่อยู่ใกล้เคียงเพื่อให้เกิดความเสถียร โมเลกุลที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่ไม่เสถียร และเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) อนุมูลอิสระเกิดขึ้นในร่างกายจากการขนถ่ายอิเล็กตรอนในกระบวนการเผาผลาญอาหารหรือกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) โดยอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการนี้จะถูกจับโดยออกซิเจนเกิดเป็นอนุมูลของออกซิเจนที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเรียกว่า reactive oxygen species (ROS) เช่น hydroxyl superoxide และ peroxide เป็นต้น อนุมูลอิสระชนิดอื่นที่เกิดขึ้นในร่างกาย ได้แก่ reactive nitrogen species เช่น nitric oxide, nitrogen dioxide เป็นต้น นอกจากการเผาผลาญอาหารที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระแล้ว แหล่งอื่นในร่างกายที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ได้แก่ ปฏิกิริยาทางเอนไซม์ เช่น ปฏิกิริยาเพอร์ออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) โดยกรดไขมันไม่อิ่มตัว เป็นต้น และสภาวะทางอารมณ์ เช่น ความเครียด และพยาธิสภาพของร่างกาย เช่น การมีไข้ การติดเชื้อ เป็นต้น

นอกจากนี้ยังมีแหล่งอนุมูลอิสระจากภายนอกร่างกายได้แก่ รังสี ไอโซน และมลภาวะต่างๆ เช่น คาร์บอนหรือ ก๊าซพิษ เป็นต้น

โดยปกติแล้วร่างกายมีการป้องกันการสะสมของสารอนุมูลอิสระ 2 ส่วน คือ ส่วนแรกเกิดจากการที่ร่างกายมีการสร้างเอนไซม์หรือกลไก เช่น เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant enzymes) เพื่อควบคุมอนุมูลอิสระให้อยู่ในปริมาณที่สมดุล เช่น superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) และ glutathione (GSH) เป็นต้น แต่เมื่อใดที่ร่างกายได้รับอนุมูลอิสระจากภายนอกมากเกินไป ส่งผลให้ระบบการป้องกันการสะสมอนุมูลอิสระในร่างกายทำงานได้น้อยลง สารอนุมูลอิสระจึงมีการสะสมมากขึ้นจนกลายเป็นสารพิษ ดังนั้น จึงจำเป็นต้องพึ่งพาในส่วนที่สอง คือ กลุ่มสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้มาจากอาหาร เพื่อเข้าไปช่วยเสริมสร้างระบบต้านออกซิเดชันในร่างกายให้มีประสิทธิภาพในการทำลายอนุมูลอิสระได้ดียิ่งขึ้น โดยสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้มาจากอาหาร ได้แก่ วิตามินเอ (vitamin A) วิตามินซี (vitamin C) วิตามินอี (vitamin E) รวมทั้งสารกลุ่มพอลิฟีนอล เช่น เคอร์คูมิน ที่พบในเหง้าของขมิ้นชัน เป็นต้น

เคอร์คูมินมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีใกล้เคียงกับวิตามินซี [32] โดยมีการรายงานว่าการเคอร์คูมินสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาเพอร์ออกซิเดชันของไขมัน ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรคเบาหวาน โรคหลอดเลือดและหัวใจ โรคพาร์กินสัน และโรคสมองเสื่อม เป็นต้น และพบว่าเคอร์คูมินสามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชันของเซลล์ที่ไตได้ โดยยับยั้งการสลายตัวของกรดไขมันและยับยั้งกระบวนการที่ทำให้เซลล์แตก (cytolysis) นอกจากนี้เคอร์คูมินยังสามารถลดภาวะหัวใจขาดเลือดได้ [33]

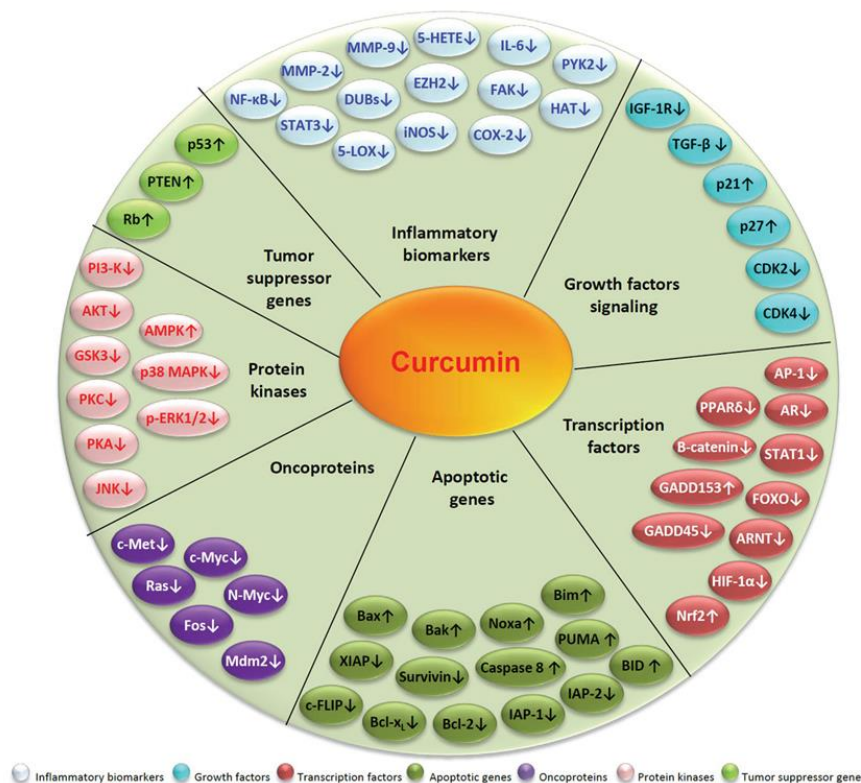
4. ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anticancer activities)

เคอร์คูมินเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งและยับยั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) [9] โดยสามารถยับยั้งความผิดปกติในระดับชีวโมเลกุลและสารพันธุกรรมของเซลล์ ดังรูปที่ 2.7 ได้แก่

- ยับยั้งการอักเสบซึ่งเกิดจากสร้างสารสื่อการอักเสบ เช่น TNF- α , IL-1 และควบคุมการทำงานของ NF-KB นอกจากนี้ยับยั้งการแสดงออกของยีนเกี่ยวกับการอักเสบ เช่น COX-2, 5-LOX และ iNOS เป็นต้น
- กระตุ้นการทำงานของกลุ่มยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor genes) เช่น p53, Rb และ PTEN เป็นต้น

- ควบคุมการทำงานของเอนไซม์ protein kinases ซึ่งทำหน้าที่เติมหมู่ฟอสเฟตให้โปรตีนเป้าหมาย เพื่อให้เกิดการถ่ายทอดสัญญาณในระดับโมเลกุลและการควบคุมการตอบสนองของเซลล์
- ยับยั้งการเปลี่ยนแปลงยีนที่ควบคุมการเจริญเติบโตแบบปกติของร่างกาย (proto-oncogenes) ไปเป็นยีนก่อมะเร็ง (oncogene) และยับยั้งการสร้าง oncoprotein
- ควบคุมการทำงานของยีน (apoptosis genes) ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ซึ่งเป็นรูปแบบหนึ่งของการตายของเซลล์แบบที่มีการโปรแกรมไว้แล้ว (programmed cell death)
- ควบคุมการทำงานของ transcription factor ซึ่งเป็นชีวโมเลกุลที่ควบคุมการถอดรหัสพันธุกรรม (transcription) จากดีเอ็นเอ (DNA) ไปเป็นอาร์เอ็นเอ (RNA)
- ควบคุมการส่งสัญญาณของ growth factor ซึ่งเป็นชีวโมเลกุลที่กระตุ้นให้เซลล์เจริญเติบโต มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) และเปลี่ยนแปลงและพัฒนาเพื่อไปทำหน้าที่ต่างๆ (differentiation) ได้

เคอร์คูมินสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวน (proliferation) ของเซลล์มะเร็งและเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองได้หลายชนิด เช่น มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ มะเร็งเต้านม มะเร็งปอด มะเร็งตับอ่อน มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งปากมดลูก มะเร็งรังไข่ เป็นต้น และยังมีฤทธิ์ในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็งดังกล่าวในสัตว์ทดลอง ซึ่งเคอร์คูมินจะเข้าไปยับยั้งความผิดปกติในระดับโมเลกุลและพันธุกรรมของเซลล์และยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งในระหว่างขั้นส่งเสริม และขั้นก้าวหน้า นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ที่จะไปเลี้ยงเซลล์มะเร็งได้ [8]



รูปที่ 2.7ฤทธิ์ของเคอร์คูมินในการยับยั้งความผิดปกติระดับชีวโมเลกุลและสารพันธุกรรมของเซลล์

[34]

ข้อจำกัดของเคอร์คูมิน

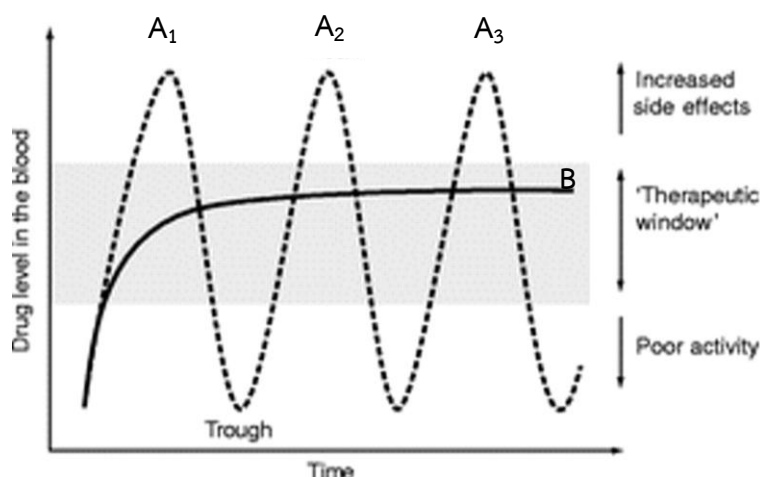
เคอร์คูมินมีความสามารถในการละลายและมีความคงตัวค่อนข้างต่ำ โดยจะสลายตัวอย่างรวดเร็วเมื่อมีค่า pH เป็นกลาง นอกจากนี้ยังถูกดูดซึมได้น้อยในร่างกาย และถูกกำจัดด้วยกระบวนการเมตาบอลิซึมของร่างกายอย่างรวดเร็ว จึงส่งผลให้ชีวประสิทธิผล (bioavailability) ลดลง กล่าวคือ ปริมาณของเคอร์คูมินที่สามารถเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือดและเข้าถึงบริเวณที่จะออกฤทธิ์ลดลง จากข้อจำกัดเหล่านี้จึงมีหลายงานวิจัยที่ทำการพัฒนาระบบการนำส่ง (delivery system) เคอร์คูมินในรูปแบบต่างๆ เพื่อลดปัญหาดังกล่าว

2.3 ระบบนำส่งยา (Drug delivery systems) [2, 35, 36]

เป็นรูปแบบยาชนิดต่างๆ ที่สามารถควบคุมให้ยาปลดปล่อยในอัตราและปริมาณที่กำหนด และสามารถนำส่งยาไปยังอวัยวะ หรือบริเวณเป้าหมายในร่างกายได้ตามต้องการ เพื่อทำให้เกิดประสิทธิภาพในการรักษาสูงสุดและลดผลข้างเคียงจากยา

ในช่วงแรกของการเตรียมเภสัชภัณฑ์ยา พบว่ารูปแบบที่นิยมเตรียมมากที่สุดคือ รูปแบบทั่วไป (conventional dosage forms) ได้แก่ ยาเม็ด ยาน้ำ ยาพ่น ยาฉีด แคปซูล ยาพ่น เป็นต้น แต่เภสัชภัณฑ์รูปแบบทั่วไปยังมีข้อจำกัดอยู่หลายประการซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำให้ความเข้มข้นของระดับยาในเลือดอยู่ในช่วงการรักษา (therapeutic level) กล่าวคือ ในช่วงแรกของการให้ยาจะมีการปลดปล่อยยาออกมามากที่สุดและค่อยๆลดลงจนยาหมด จึงจำเป็นต้องให้ยาซ้ำตามขนาดเดิมหลายครั้งต่อวัน เพื่อให้ระดับยาในเลือดอยู่ในช่วงการรักษา แต่ทำให้เกิดการแกว่งของระดับยาในเลือด ดังรูปที่ 2.8 ลักษณะเช่นนี้ทำให้เกิดความเสี่ยงต่อการที่ระดับยาในเลือดสูงมากจนเกิดอาการข้างเคียงหรือพิษของยาหรือต่ำมากจนไม่สามารถให้ผลการรักษาได้

ในปัจจุบันจึงมีการพัฒนาเทคนิคเพื่อควบคุมการปลดปล่อยยาออกมาในอัตราเร็วที่ต้องการ ทำให้ระยะเวลาออกฤทธิ์ของยายาวนานขึ้น โดยเรียกว่ายาออกฤทธิ์เนิ่นหรือออกฤทธิ์นาน (sustained release) และต่อมามีการคิดค้นรูปแบบยาที่สามารถควบคุมการปลดปล่อยที่เที่ยงตรงและแม่นยำ เรียกว่าระบบนำส่งยา (drug delivery systems) ซึ่งมีระบบนำส่งแบบควบคุมการปลดปล่อยยา (controlled drug delivery systems) นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาจนสามารถควบคุมหรือกำหนดเป้าหมายในการนำส่งยาซึ่งอาจเป็นเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะส่วนต่างๆได้โดยตรง ทำให้ประสิทธิภาพในการรักษาเพิ่มขึ้น เรียกว่าระบบนำส่งยาสู่เป้าหมาย (targeted drug delivery systems) โดยการปลดปล่อยยาจากระบบนำส่งยาสู่เป้าหมายอาจเป็นแบบค่อยๆปลดปล่อยหรือปลดปล่อยอย่างรวดเร็วก็ได้



รูปที่ 2.8 ระดับความเข้มข้นของยาในเลือดที่ได้ระบบจากการให้ยาในรูปแบบทั่วไปหลายๆครั้ง [2] (A1,A2,A3) เปรียบเทียบกับระดับความเข้มข้นของยาในเลือดในรูปแบบของยาออกฤทธิ์เนิ่นหรือออกฤทธิ์นาน (B)

2.3.1 ระบบควบคุมการปลดปล่อย (Controlled release systems) [2]

ปัจจุบันมักมีการเรียกระบบควบคุมการนำส่งยาแบบออกฤทธิ์เนิ่นว่า sustained release หรือ controlled release แต่ความจริงแล้ว sustained release และ controlled release มีความแตกต่างกัน ซึ่งอาจกล่าวได้โดยสังเขป ดังนี้

sustained release หมายถึง ระบบการบริหารยาโดยการรับประทานเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งสามารถปลดปล่อยตัวยาสำคัญยาวนานและช่วงเวลาที่ยาออกฤทธิ์นานขึ้น โดยกลไกการปลดปล่อยจะขึ้นอยู่กับปัจจัยภายนอก โดยเฉพาะปัจจัยทางสรีระของผู้ได้รับยา เช่น ค่า pH เอนไซม์ ในทางเดินอาหาร หรือการเคลื่อนไหวของกระเพาะอาหาร เป็นต้น

controlled release หมายถึง ระบบนำส่งใดๆไม่ว่าจะเป็นการบริหารยาโดยการรับประทาน ฉีด เป็นต้น ที่สามารถปลดปล่อยตัวยาสำคัญได้โดยไม่ขึ้นกับปัจจัยทางสรีระของผู้ได้รับยา แต่กลไกการปลดปล่อยจะขึ้นกับระบบการนำส่งเอง อัตราการปลดปล่อยตัวยาสำคัญถูกควบคุมอย่างแม่นยำ ทำให้ความเข้มข้นของยาในเลือดช่วงเวลาที่ยาออกฤทธิ์ได้สม่ำเสมอว่า จึงสามารถทำนายจลนศาสตร์ของยาได้ และให้ผลเหมือนเดิมทุกครั้ง บางครั้งพบว่าระบบที่ปลดปล่อยยาแบบ controlled release ก็สามารถปลดปล่อยยาที่ตำแหน่งเป้าหมายได้ ซึ่งข้อดีของการเตรียมยาในรูปแบบระบบควบคุมการปลดปล่อยยา อาจกล่าวได้โดยสังเขปดังนี้

1. สามารถรักษาระดับยาในเลือดให้อยู่ในช่วงที่ให้ผลการรักษาได้นาน จึงลดความถี่ในการให้ยา และลดปริมาณยาที่ให้แก่ผู้ป่วยเมื่อเทียบกับการให้ยาโดยทั่วไป
2. สามารถออกฤทธิ์ได้นาน ทำให้ระดับยาในเลือดค่อนข้างคงที่ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาและช่วยลดผลข้างเคียงและความเป็นพิษของยาได้ ช่วยเพิ่มความปลอดภัยของยาที่มีช่วงการรักษา (therapeutic level) แคบ
3. เพิ่มคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยที่ต้องได้รับยาอย่างต่อเนื่องและสม่ำเสมอเป็นเวลานาน เช่น โรคนิวตัน หัวใจ มะเร็ง ไช้ข้ออักเสบ และหอบหืด เป็นต้น

ระบบควบคุมการปลดปล่อยตัวยาสำคัญเกือบทั้งหมดใช้กลไกพื้นฐานในการควบคุมการปลดปล่อยยา คือ กลไกการแพร่ (diffusion) ปฏิกิริยาทางเคมี (chemical reaction) และกลไกของตัวทำละลาย (action of solvent) โดยระบบควบคุมการปลดปล่อยแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ระบบควบคุมการปลดปล่อย (controlled release systems) [2]

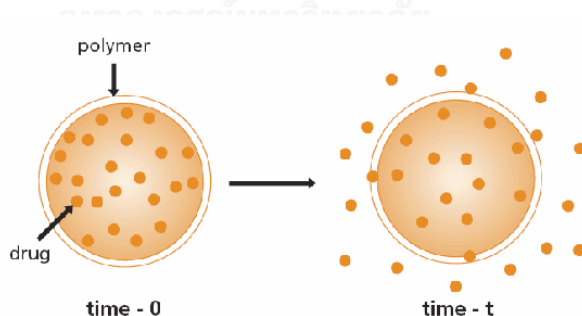
ระบบควบคุมการปลดปล่อย (Controlled release systems)
1. ระบบควบคุมที่ใช้การแพร่ (diffusion controlled systems) <ul style="list-style-type: none"> - ระบบกักเก็บยา (reservoir systems/diffusion controlled by membranes) - ระบบเมทริกซ์ (matrix systems)
2. ระบบควบคุมที่ใช้ปฏิกิริยาเคมี (chemical controlled systems) <ul style="list-style-type: none"> - ระบบย่อยสลายได้ (bioerodible/biodegradable systems) - ระบบปฏิกิริยาลูกโซ่ (pendant chain systems)
3. ระบบควบคุมที่ใช้การซึมผ่านของน้ำ (water penetration controlled systems) <ul style="list-style-type: none"> - ระบบที่ใช้การบวมตัวของพอลิเมอร์ (swelling controlled systems) - ระบบที่ใช้แรงดันออสโมซิส (osmotic controlled systems)
4. ระบบควบคุมที่ไวต่อสิ่งกระตุ้น (regulated systems or stimuli sensitive systems) <ul style="list-style-type: none"> - ระบบตัวกระตุ้นภายนอก (externally regulated systems) - ระบบควบคุมผลจากการสะท้อนกลับของร่างกาย (self-regulated delivery systems)

2.3.1.1 ระบบควบคุมที่ใช้หลักการแพร่ (diffusion controlled system) แบ่งได้ 2

ประเภท ดังนี้

1) ระบบกักเก็บยา (reservoir systems/diffusion controlled by membranes)

เป็นระบบที่ใช้ส่วนกักเก็บยา (drug reservoir) รูปแบบต่างๆ เช่น ทรงกลม ทรงกระบอก หรือแผ่นแบน เป็นต้น ด้วยสำคัญอาจอยู่ในรูปยาผง ครีม หรือสารละลายจะถูกบรรจุอยู่ในแกนกลางของส่วนกักเก็บยา และล้อมรอบด้วยชั้นบางๆ (layer) ของพอลิเมอร์ ดังรูปที่ 2.9 ซึ่งชั้นบางๆของพอลิเมอร์จะเป็นตัวกำหนดอัตราการปลดปล่อยยาจากระบบ ยาจะถูกปลดปล่อยออกมา โดยอาศัยความแตกต่างของความเข้มข้นของตัวยา ระหว่างภายในและภายนอกกระบอก ซึ่งในช่วงแรกการแพร่จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว และเมื่อเวลาผ่านไป การแพร่จะเริ่มคงที่ (steady state) [37] โดยพบว่าสมบัติของยาและชั้นพอลิเมอร์จะเป็นตัวกำหนดอัตราการแพร่ผ่านของยาออกจากส่วนกักเก็บยาไปสู่กระแสเลือด ดังนั้นเพื่อควบคุมความสม่ำเสมอในการปลดปล่อยยา จึงต้องควบคุมความสม่ำเสมอของการเคลือบชั้นพอลิเมอร์ ข้อเสียของระบบนี้ คือถ้าชั้นพอลิเมอร์ที่เคลือบเกิดการฉีกขาดหรือทะลุในระหว่างใช้งาน ยาจะถูกปลดปล่อยในปริมาณมากอย่างรวดเร็วจนอาจเกิดความเป็นพิษได้ โดยเฉพาะยาที่มีช่วงการรักษาแคบ เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า drug dumping หรือ dumping effect

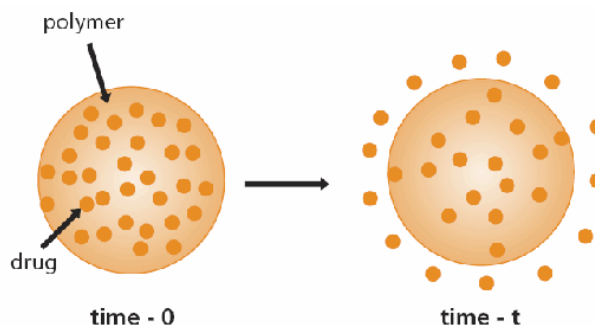


รูปที่ 2.9 การควบคุมการปลดปล่อยยาด้วยระบบกักเก็บ [38]

2) ระบบเมทริกซ์ (matrix systems)

ระบบนี้ยาจะกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอในเมทริกซ์พอลิเมอร์ ดังรูปที่ 2.10 ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการปลดปล่อยตัวยานอกสู่ภายนอก โดยอนุภาคของยาจะค่อยๆแพร่

ผ่านโครงสร้างของพอลิเมอร์เมทริกซ์ หรือแพร่ออกมาตามรูพรุนของพอลิเมอร์ ระบบนี้มีข้อดีคือ มีการกระจายตัวยาวอย่างสม่ำเสมอในเมทริกซ์พอลิเมอร์ จึงไม่เกิด drug dumping



รูปที่ 2.10 การควบคุมการปลดปล่อยยาด้วยระบบเมทริกซ์ [38]

2.3.1.2 ระบบควบคุมที่ใช้ปฏิกิริยาเคมี (chemical controlled systems) แบ่งได้ 2 ประเภท ดังนี้

1) ระบบย่อยสลายได้ (bioerodible/biodegradable systems)

ระบบนี้ตัวยาที่กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอในเนื้อของพอลิเมอร์จะค่อยๆ ถูกปลดปล่อยออกมาร่วมกับการสลายตัวหรือการกร่อนของพอลิเมอร์ ซึ่งกลไกการกร่อนอาจเกิดพร้อมกันทุกส่วนพอลิเมอร์ (homogeneous erosion/bulk erosion) หรืออาจเกิดการกร่อนเฉพาะผิวหน้าของพอลิเมอร์ (heterogeneous erosion/surface erosion) ข้อดีของระบบนี้คือ ตัวยาสำคัญอาจจะละลายน้ำหรือไม่ละลายก็ได้ และไม่จำเป็นต้องนำพอลิเมอร์ออกจากร่างกายหลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการปลดปล่อยยา

2) ระบบปฏิกิริยาลูกโซ่ (pendant chain systems)

ระบบนี้จะจับกับพอลิเมอร์ที่สลายตัวได้ในร่างกายด้วยพันธะโควาเลนต์ ตัวยาสำคัญจะถูกปลดปล่อยออกมาเมื่อมีการสลายพันธะ ซึ่งมักเกิดขึ้นโดยปฏิกิริยาการไฮโดรไลซิส (chemical hydrolysis หรือ enzymatic hydrolysis)

2.3.1.3 ระบบควบคุมที่ใช้การซึมผ่านของน้ำ (water penetration controlled systems)

เป็นระบบควบคุมการนำส่งยาที่สามารถลดปัญหาของระบบการแพร่ (diffusion controlled) โดยระบบนี้อาศัยกลไกการซึมผ่านของน้ำ สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

1) ระบบที่ใช้การบวมน้ำของพอลิเมอร์ (swelling controlled systems)

ระบบนี้เกี่ยวข้องกับพอลิเมอร์บางชนิดที่สามารถบวมน้ำได้และอัตราเร็วในการบวมน้ำมีผลต่อการปลดปล่อยยา ซึ่งการปลดปล่อยยาจากระบบนี้มีความซับซ้อนมากทั้งในด้านการละลาย การซึมผ่านของยา การบวมน้ำและการสลายตัวของพอลิเมอร์ ระบบนี้จะประกอบด้วยยาละลายหรือกระจายในพอลิเมอร์โดยยาไม่สามารถซึมผ่านพอลิเมอร์ในสภาพของแข็ง (glassy state) แต่เมื่อระบบอยู่ในสารละลายหนึ่งๆ สารละลายนั้นจะซึมผ่านเข้าไปในโครงสร้างของพอลิเมอร์ทำให้เกิดการบวมและอยู่ในสภาพคล้ายยาง (rubbery state) ซึ่งยอมให้ยาซึมผ่านและถูกปลดปล่อยออกมาได้

2) ระบบที่ใช้แรงดันออสโมซิส (osmotic controlled systems)

ระบบนำส่งยานี้เป็นระบบที่อาศัยแรงดันออสโมซิส ไปผลักดันตัวยาน้ำให้ปลดปล่อยออกมาในอัตราที่คงที่ [37] โดยมีหลักการคือ น้ำจากภายนอกจะซึมผ่านเยื่อเลือกผ่าน (semipermeable membrane) เข้าสู่ภายในระบบ ซึ่งเยื่อเลือกผ่านมีคุณสมบัติที่ยอมให้น้ำซึมผ่านแต่ไม่ยอมให้ยาผ่านได้ จึงทำให้เกิดแรงดันออสโมซิสภายในซึ่งพยายามจะลดความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นของยา โดยการเคลื่อนที่ของของเหลวจะเป็นตัวบังคับให้ยาละลายอยู่ภายในถูกผลักออกสู่ภายนอกผ่านรูขนาดเล็ก (small orifice)

2.3.1.4 ระบบควบคุมที่ไวต่อสิ่งกระตุ้น (regulated systems or stimuli sensitive systems)

เป็นการพัฒนาระบบนำส่งโดยอาศัยพอลิเมอร์ที่มีสมบัติการเปลี่ยนแปลงได้เมื่อถูกกระตุ้น โดยแบ่งระบบควบคุมที่ไวต่อสิ่งกระตุ้นได้ได้ 2 ประเภท ดังนี้

1) ระบบตัวกระตุ้นภายนอก (externally regulated systems)

เป็นระบบควบคุมการปลดปล่อยยาที่ขึ้นอยู่กับ การเปลี่ยนแปลงภายนอก (external stimuli) ซึ่งอาจเป็นการกระตุ้นจากปัจจัยทางกายภาพ (physical stimuli) เช่น อุณหภูมิ แสง สนามแม่เหล็ก และกระแสไฟฟ้า เป็นต้น หรืออาจเป็นการกระตุ้นจากปัจจัยทางเคมี (chemical stimuli) เช่น ค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็นต้น

2) ระบบควบคุมผลจากการสะท้อนกลับของร่างกาย (self-regulated delivery systems)

อัตราการปลดปล่อยยาของระบบนี้จะขึ้นกับผลการสะท้อนกลับของร่างกายโดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม ตัวอย่างเช่น การนำส่งอินซูลินโดยขึ้นอยู่กับระดับน้ำตาลในเลือด

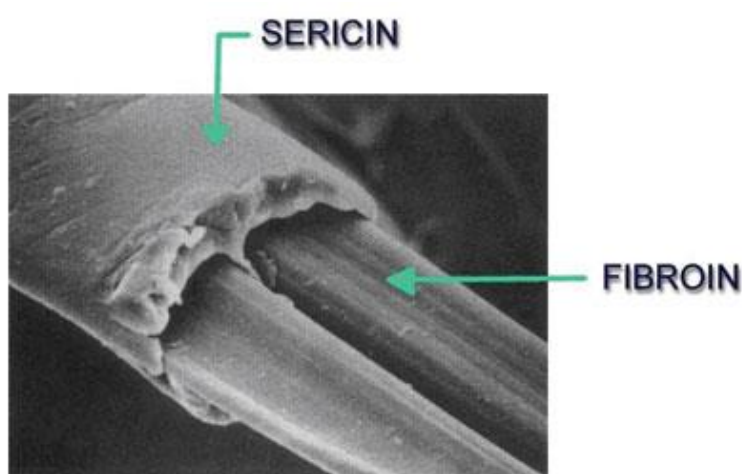
2.4 ชีววัสดุ (Biomaterials)

2.4.1 ไหม (silk) [39, 40]

ไหมเป็นเส้นใยโปรตีนธรรมชาติที่ได้มาจากหนอนไหมซึ่งเป็นแมลงจำพวกผีเสื้อและแมงมุม โดยไหมที่ได้จากหนอนไหมได้รับความสนใจในการวิจัยพัฒนาทางการแพทย์และเครื่องสำอางอย่างแพร่หลาย หนอนไหมอาจแบ่งออกเป็น 2 ประเภทตามแหล่งอาหาร ได้แก่ ไหมกินใบหม่อนหรือไหมบ้าน (domesticated mulberry silkworm) และไหมป่า (wild non-mulberry silkworm) [41] โดยไหมที่ได้รับความนิยมในงานวิจัยทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อและระบบนำส่งยา คือ ไหมกินใบหม่อนซึ่งมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Bombyx mori* ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ *Bombycidae*

โครงสร้างของเส้นใยไหม [42, 43]

เส้นใยไหมประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิดเชื่อมกันด้วยพันธะเปปไทด์ ในเส้นใยไหมมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก 2 ชนิด ได้แก่ ไฟโบรอิน (fibroin) ประมาณร้อยละ 72-81 และเซริซิน (sericin) หรือกาวไหมประมาณร้อยละ 19-28 โดยเซริซินจะทำหน้าที่เป็นกาวยึดไฟโบรอิน 2 เส้นให้ติดกัน ดังแสดงในรูปที่ 2.11 นอกจากนี้เส้นใยไหมยังมีส่วนประกอบอื่นๆ อีก ได้แก่ ไขมันและแว็กซ์ ประมาณร้อยละ 0.8-1.0 สารสีและปริมาณเถ้าประมาณร้อยละ 1.0-1.4 เป็นต้น



รูปที่ 2.11 โครงสร้างของเส้นใยไหมที่ได้จากหนอนไหม [44]

1. ไฟโบรอิน (fibroin) [45]

ไฟโบรอิน (fibroin) เป็นโปรตีนเส้นใยที่ไม่ละลายน้ำ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 – 25 ไมโครเมตร ประกอบด้วยกรดอะมิโน 18 ชนิดดังแสดงในตารางที่ 2.2 โดยมีกรดอะมิโนหลัก 4 ชนิด คือ ไกลซีน (glycine; Gly) อะลานีน (alanine; Ala) เซรีน (serine; Ser) และไทโรซีน (tyrosine; Tyr) ดังแสดงในรูปที่ 2.12 โดยไฟโบรอินมีองค์ประกอบที่ซับซ้อนอยู่ 3 ส่วน ได้แก่ สายโซ่โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (Heavy chain; H-chain) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 350 กิโลดาลตัน (kDa) ทำหน้าที่เชื่อมสายโซ่โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Light chain; L-chain) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25 กิโลดาลตัน ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) และส่วนที่สาม คือ โปรตีน P25 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30 กิโลดาลตัน ซึ่งถูกเชื่อมด้วยอันตรกิริยาของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) โดยอัตราส่วนของ H-chain:L-chain:P25 คือ 6:1:1 สำหรับส่วนของ H-chain เป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำประกอบด้วยหมู่อะมิโนที่เรียงตัวเป็นหน่วยซ้ำ คือ (Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser)_n ซึ่งจัดเรียงตัวอยู่ในรูปแผ่นพลิทเบตา (β-pleated sheet) ดังแสดงในรูปที่ 2.12 มีลักษณะเป็นจีบหรือคลื่นแบบไม่ขนาน (antiparallel) ในขณะที่บริเวณ L-chain มีความชอบน้ำ (hydrophilic) มากกว่าและมีความยืดหยุ่น และในส่วนของโปรตีน P25 มีบทบาทในการรักษาความสมบูรณ์ส่วนนี้

2. เซรีซิน (sericin) [43]

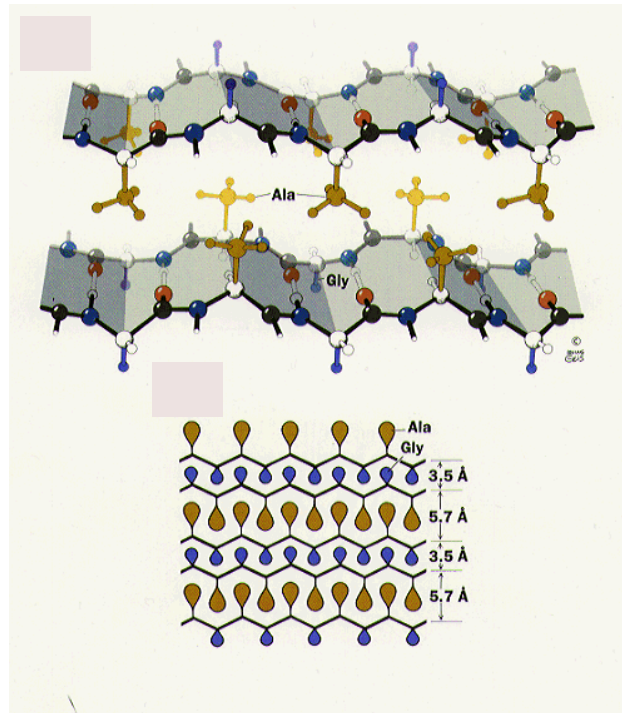
เซรีซิน (sericin) หรือกาวไหม เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ห่อหุ้มและยึดเส้นใยไฟโบรอิน 2 เส้นให้ติดกัน มีน้ำหนักประมาณ 20 – 30% ของรังไหม เซรีซินสามารถละลายน้ำได้ กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบหลักของเซรีซิน ได้แก่ เซรีน (serine) ทรีโอนีน (threonine) กรดแอสพาทิก (aspartic acid) และกรดกลูตามิก (glutamic acid) โครงสร้างของเซรีซินแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ดังแสดงในรูปที่ 2.13 ได้แก่ เซรีซิน I เป็นส่วนที่อยู่ด้านนอกสามารถละลายน้ำได้ง่าย เซรีซิน II เป็นส่วนที่อยู่ตรงกลางระหว่างเซรีซิน I และเซรีซิน III เป็นส่วนที่อยู่ด้านในสุดและละลายน้ำได้ยาก ซึ่งเซรีซินทั้ง 3 ส่วน ยังมีความสามารถในการละลายที่เพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิของน้ำ นอกจากนี้เซรีซินยังถูกไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ได้ง่ายด้วยกรดต่างและเอนไซม์ให้เป็นกรดอะมิโนและโอลิโกเมอร์ของกรดอะมิโนที่ละลายน้ำได้ [46]

สมบัติของไหม [42, 47]

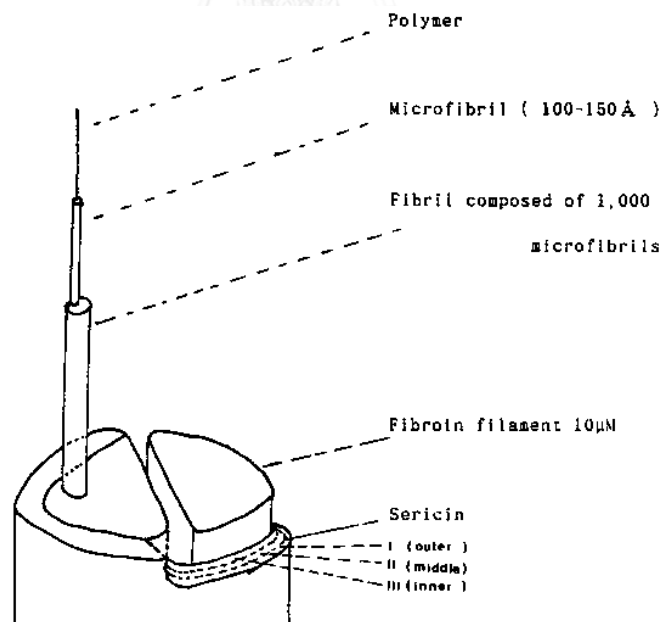
ไหมเป็นเส้นใยโปรตีนที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ และมีสมบัติทางกลที่ดี มีความเหนียวและยืดหยุ่นสูง สามารถทนแรงกดอัดได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.3 นอกจากนี้ยังสามารถทนอุณหภูมิได้สูง ไม่นำไฟฟ้า มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพโดยไม่ก่อพิษต่อเซลล์ ด้วยสมบัติเหล่านี้ทำให้มีการนำไหมมาประยุกต์ใช้ในงานทางวิศวกรรมเนื้อเยื่ออย่างแพร่หลาย

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในเส้นใยไฟโบรอินและเซรีซิน [43]

Amino Acid	Fibroin (g/100 g protein)	Sericin (g/100 g protein)
Glycine	42.8	8.8
Alanine	32.4	4.0
Leucine	0.7	0.9
Isoleucine	0.9	0.6
Valine	3.0	3.1
Arginine	0.9	4.2
Histidine	0.3	1.4
Lysine	0.5	5.5
Aspartic Acid	1.9	16.8
Glutamic Acid	1.7	10.1
Serine	14.7	30.1
Threonine	1.2	8.5
Phenylalanine	1.2	0.6
Tyrosine	11.8	4.9
Proline	0.6	0.5
Methionine	0.2	0.1
Tryptophan	0.5	0.5
Cystine	0.1	0.3



รูปที่ 2.12 โครงสร้างและการเรียงตัวของหมู่เอมิโนของเส้นใยไฟโบรอิน [44]



รูปที่ 2.13 โครงสร้างของเซริซิน [43]

การประยุกต์ใช้งานของไหม

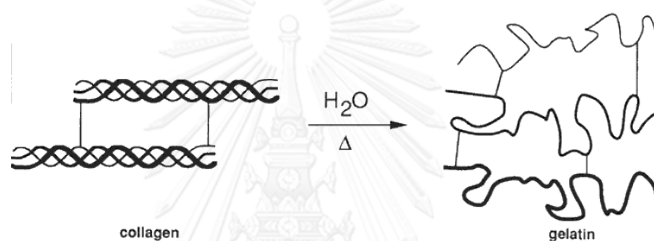
ไหมถูกนำมาประยุกต์ใช้งานในหลากหลายด้าน เช่น งานด้านวัสดุสิ่งทอ เครื่องสำอาง ด้านการแพทย์และวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันไหมถูกนำมาประยุกต์ใช้งานด้านการแพทย์และวิศวกรรมเนื้อเยื่ออย่างแพร่หลาย เช่น การขึ้นรูปเป็นฟิล์มหรือเป็นแผ่นเส้นใยเพื่อใช้ในการตกแต่งแผลหรือผิวหนังที่มีรอยแผลเป็น โครงเลี้ยงเซลล์ สำหรับประยุกต์ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อและระบบนำส่งเพื่อควบคุมการปลดปล่อยยาในรูปแบบต่างๆ ได้แก่ แผ่นฟิล์ม ไฮโดรเจล (hydrogels) และอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน (microspheres) เป็นต้น

ตารางที่ 2.3 สมบัติทางกลของเส้นใยไหมและพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ [47]

Material	Ultimate Tensile Strength (UTS; MPa)	Modulus (GPa)	% Strain at break
<i>B. mori</i> silk (with sericin)	500	5-12	19
<i>B. mori</i> silk (without sericin)	610-690	15-17	4-16
<i>B. mori</i> silk	740	10	20
Spider silk	875-972	11-13	17-18
Collagen	0.9-7.4	0.0018-0.046	24-68
Cross-linked collagen	47-72	0.4-0.8	12-16
Polylactic acid (PLA)	28-50	1.2-3.0	2-6
Tendon (composed mainly of collagen)	150	1.5	12
Bone	160	20	3
Kevlar (49 fiber)	3600	130	2.7
Synthetic Rubber	50	0.001	850

2.4.2 เจลาติน (gelatin) [48]

เจลาตินเป็นโปรตีนที่ได้จากคอลลาเจน (collagen) ซึ่งพบในธรรมชาติและเป็นองค์ประกอบหลักของผิวหนัง กระดูก เอ็นและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของมนุษย์และสัตว์ เช่น หมู วัว และปลา เป็นต้น โครงสร้างของคอลลาเจนประกอบด้วยสายโซ่ของพอลิเพปไทด์ 3 สาย พันกันเป็นเกลียวสาม (triple helix structure) ชนิดวนขวา ภายในโมเลกุลจะยึดกันด้วยพันธะโควาเลนต์และระหว่างโมเลกุลจะถูกเชื่อมขวางด้วยพันธะไฮโดรเจน เมื่อนำคอลลาเจนมาผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยกรดหรือด่าง จะทำให้โครงสร้างเกิดการเสียสภาพกลายเป็นเจลาติน ดังรูป 2.14 ซึ่งมีสายโซ่โมเลกุลที่สั้นลงและมีลักษณะเป็นขดแบบสุ่ม (random coil) โดยสมบัติของเจลาตินที่ได้จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของคอลลาเจนและกระบวนการไฮโดรไลซิส [49]



รูปที่ 2.14 การเสียสภาพของคอลลาเจนด้วยกระบวนการไฮโดรไลซิส [50]

โครงสร้างและองค์ประกอบของเจลาติน [51]

เจลาตินประกอบด้วยกรดอะมิโน 18 ชนิด เชื่อมกันด้วยพันธะเปปไทด์ ดังแสดงในตารางที่ 2.4 โครงสร้างของเจลาตินประกอบด้วยไกลซีน (glycine; Gly) เป็นองค์ประกอบหลัก มีการจัดเรียงหน่วยซ้ำของกรดอะมิโน Gly-X-Y- โดยส่วนใหญ่จะพบโพรลีน (proline; Pro) และไฮดรอกซีโพรลีน (hydroxyproline; Hyp) ในส่วนของ X และ Y และถูกเชื่อมด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายพอลิเพปไทด์ [49] โครงสร้างของเจลาตินมีลักษณะเป็นขดแบบสุ่มและมีช่วงน้ำหนักโมเลกุลค่อนข้างกว้างตั้งแต่ 20,000 - 200,000 ดาลตัน [52]

ตารางที่ 2.4 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในเจลาติน [53]

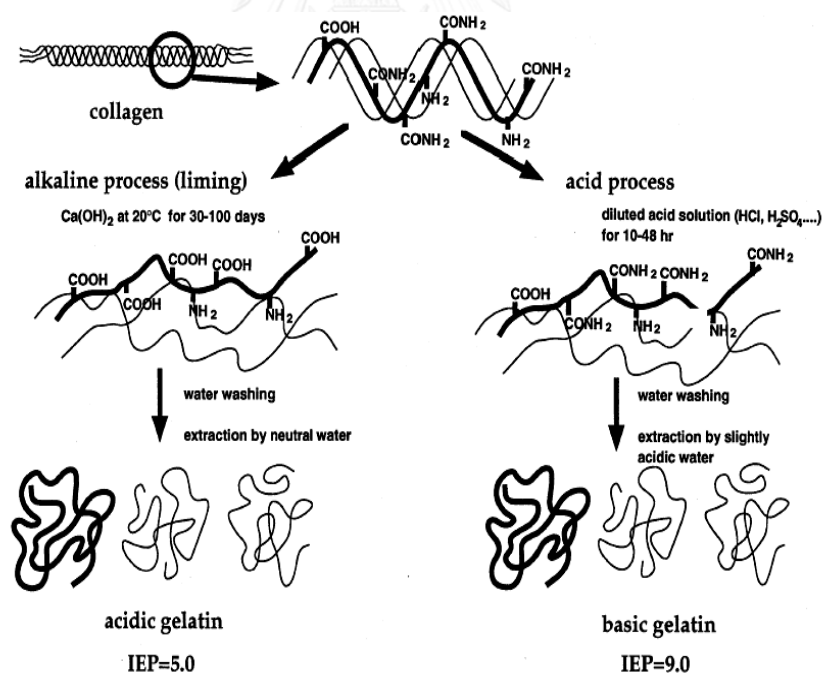
กรดอะมิโน	ร้อยละ
Alanine	8.9
Arginine	7.8
Aspartic acid	6.0
Glutamic acid	10.0
Glycine	21.4
Histidine	0.8
Hydroxylysine	1.0
Hydroxyproline	11.9
Isoleucine	1.5
Leucine	3.3
Lysine	3.5
Methionine	0.7
Phenylalanine	2.4
Proline	12.4
Serine	3.6
Threonine	2.1
Tyrosine	0.5
Valine	2.2
รวมทั้งสิ้น	100

ชนิดของเจลาติน [54]

โดยทั่วไปเจลาตินแบ่งตามกระบวนการผลิตได้เป็น 2 ชนิด ดังรูปที่ 2.15 ดังนี้

1. **เจลาตินชนิดเอ (type A gelatin)** หรือ basic gelatin เจลาตินชนิดนี้ได้จากการนำคอลลาเจนจากหนังหมูมาผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยกรด เช่น กรดไฮโดรคลอริกและกรดซัลฟูริก เป็นต้น โดยทั่วไปกระบวนการไฮโดรไลซิสที่หมู่เอไมด์ของคอลลาเจนเกิดได้ค่อนข้างยาก จึงส่งผลให้เจลาตินชนิดนี้มีค่า isoelectric point ใกล้เคียงกับคอลลาเจน คือ ประมาณ 9 ดังนั้นเจลาตินชนิดเอจึงเหมาะสำหรับการนำไปใช้ควบคุมการปลดปล่อยสารที่มีสมบัติเป็นกรด

2. **เจลาตินชนิดบี (type B gelatin)** หรือ acidic gelatin ได้จากการนำคอลลาเจนจากหนังและกระดูกวัวมาผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเบส เช่น แคลเซียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น โดยเกิดปฏิกิริยาที่หมู่เอไมด์ของคอลลาเจนทำให้เจลาตินที่ได้มีหมู่คาร์บอกซิลเป็นจำนวนมาก จึงส่งผลให้เจลาตินชนิดนี้มีประจุลบ และมีค่า isoelectric point ประมาณ 5 ดังนั้นเจลาตินชนิดบีจึงเหมาะสำหรับการนำไปใช้ควบคุมการปลดปล่อยสารที่มีสมบัติเป็นเบส



รูปที่ 2.15 กระบวนการผลิตเจลาตินชนิดเอและบี [54]

สมบัติของเจลาติน [55]

เจลาตินมีลักษณะเป็นผง แผ่น ชื้น เกร็ด ค่อนข้างเปราะ มีสีเหลืองอ่อนหรือเหลืองอำพัน ไม่มีกลิ่นและรสชาติ มีความชื้นประมาณ 8-13% และความหนาแน่นประมาณ 1.3-1.4 โดยทั่วไปเจลาตินสามารถพองตัวในน้ำเย็นและละลายได้ในน้ำได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40°C นอกจากนี้เจลาตินยังสามารถละลายได้ในสารละลายประเภทพอลิไฮดรอลิกแอลกอฮอล์ (polyhydric alcohol) เช่น กลีเซอรอล (glycerol) หรือ พอพิลีนไกลคอล (propylene glycol) เป็นต้น และในสารละลายที่มีความเป็นขั้วสูงและตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติก (acetic acid) ไตรฟลูออโรเอทานอล (trifluoroethanol) และฟอร์มามาไมด์ (formamide) เป็นต้น แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วน้อย เช่น เบนซีน (benzene) อะซีโตน (acetone) และไดเมทิลฟอร์มามาไมด์ (dimethylformamide) เป็นต้น

เจลาตินมีสมบัติทางกายภาพที่สำคัญ ได้แก่ การเกิดเจลแบบ thermal reversible กล่าวคือ เมื่อตั้งสารละลายเจลาตินทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องหรือต่ำกว่าอุณหภูมิห้อง สารละลายจะเกิดเจลได้ และเมื่อให้ความร้อนแก่เจลจะสามารถเปลี่ยนกลับไปเป็นของเหลวได้ โดยความแข็งแรงของเจล (gel strength) นั้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายเจลาติน นอกจากนี้เจลาตินยังมีสมบัติที่สามารถเป็นได้ทั้งกรดและเบส หรือที่เรียกว่าแอมโฟเทอริก (Amphoteric) กล่าวคือเมื่อเจลาตินอยู่ในสารละลายที่มีสภาวะเป็นกรดเจลาตินจะแสดงประจุบวก แต่ถ้าเจลาตินอยู่ในสารละลายที่มีสภาวะเป็นเบสเจลาตินจะแสดงประจุลบ สำหรับสมบัติเด่นด้านชีวภาพของเจลาติน ได้แก่ สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ สามารถเข้ากับเซลล์ของสิ่งมีชีวิตได้โดยไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ ช่วยในการยึดเกาะของเซลล์ และมีราคาไม่แพง [4]

การประยุกต์ใช้งานของเจลาติน

เจลาตินได้จากคอลลาเจนซึ่งเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติ มีความปลอดภัยสูงจึงถูกนำไปใช้งานอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้แก่ อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม เช่น การผลิตเยลลี่ วัณขนมเค้ก นม และน้ำผลไม้ เป็นต้น อุตสาหกรรมยา เช่น การผลิตแคปซูลยาแบบเปลือกนิ่มและเปลือกแข็ง ระบบนำส่งเพื่อควบคุมการปลดปล่อยยา เป็นต้น อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เช่น ครีม โลชั่น เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการนำเจลาตินมาใช้ทางการแพทย์และวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เช่น การปลูก

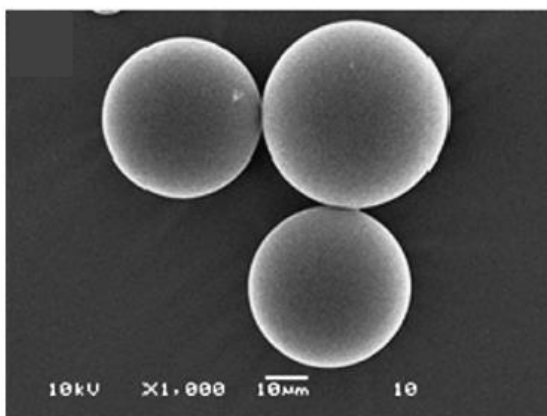
ถ่ายเนื้อเยื่อ การทำแผ่นปิดแผล และการขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับประยุกต์ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เป็นต้น

ตารางที่ 2.5 สมบัติของเจลาตินชนิดเอและบี [55]

สมบัติ	ชนิดเอ	ชนิดบี
pH	3.8-5.5	5.0-7.5
Isoelectric Point (pI)	7.0-9.0	4.7-6.0
ค่าความแข็งแรงของเจล (bloom)	50-300	50-300
ความหนืด (mps)	15-75	20-75
เถ้า (%)	0.3-2.0	0.5-2.0

2.5 อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน (Microspheres)

อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเป็นอนุภาคทรงกลมขนาดเล็ก มีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 1-1000 ไมครอน (μm) ดังรูปที่ 2.16 พอลิเมอร์ที่นำมาใช้ในการขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนอาจเป็นได้ทั้ง พอลิเมอร์สังเคราะห์ (synthetic polymer) เช่น พอลิแลคติก แอซิด (polylactic acid; PLA) พอลิคาโพรแลคโตน (polycaprolactone; PCL) เป็นต้น และพอลิเมอร์ธรรมชาติ (natural polymer) เช่น คอลลาเจน เจลาติน ไฟโบรอิน กรดไฮยาลูโรนิก และอัลจินต เป็นต้น พอลิเมอร์จากธรรมชาติเป็นที่นิยมในการนำมาขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเนื่องจากสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ สามารถเข้ากันได้ดีกับร่างกายโดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ด้วยเหตุนี้จึงมีการนำอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ขึ้นรูปจากพอลิเมอร์ธรรมชาติมาประยุกต์ใช้ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เช่น โครงเลี้ยงเซลล์สามมิติเพื่อใช้ทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการ เป็นต้น และในด้านระบบนำส่งเพื่อควบคุมการปลดปล่อยยาชนิดต่างๆ



รูปที่ 2.16 อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ผลิตจากไฟโบรอินไหม [56]

เทคนิคการขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน [57]

การขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนมีปัจจัยหลักที่ต้องคำนึงถึง ได้แก่ สมบัติของพอลิเมอร์ที่ใช้ในการขึ้นรูป ขนาดและรูปร่างอนุภาคที่ต้องการ เป็นต้น เทคนิคการขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การแยกเฟสหรือการตกตะกอน (phase separation or precipitation) การทำอิมัลชันโดยการระเหยตัวทำละลาย (emulsion/solvent evaporation) และการทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying) เป็นต้น

1. การแยกเฟสหรือการตกตะกอน (phase separation or precipitation)

หลักการคือ อาศัยความแตกต่างของการละลายพอลิเมอร์ในตัวทำละลาย กล่าวคือ เริ่มทำการละลายพอลิเมอร์ในตัวทำละลาย จากนั้นทำให้พอลิเมอร์เกิดการแยกเฟสหรือตกตะกอนออกมา เช่น การเติมตัวทำละลายอีกชนิดที่ทำให้พอลิเมอร์นั้นมีความการละลายลดลง หรือปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเพื่อให้พอลิเมอร์มีการละลายที่ลดลง

2. การทำอิมัลชันโดยการระเหยตัวทำละลาย (emulsion/solvent evaporation)

อิมัลชัน เป็นระบบคอลลอยด์ (colloidal system) ที่ประกอบด้วยของเหลวตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป โดยทั่วไปไม่สามารถผสมเป็นเนื้อเดียวกัน (immiscible) เช่น น้ำกับน้ำมัน เป็นต้น แต่สามารถแตกตัวหรือกระจายตัวเป็นหยดเล็กๆ ซึ่งเรียกส่วนนี้ว่า วัฏภาคภายในหรือวัฏภาคกระจายตัว (internal หรือ dispersed phase) ซึ่งจะกระจายตัวแทรกอยู่ในของเหลวอีกชนิดที่มีปริมาณมากกว่า เรียกว่า วัฏภาคภายนอกหรือวัฏภาคต่อเนื่อง (external หรือ continuous phase) ได้

กลไกการเกิดอิมัลชัน

- การทำให้ของเหลวแตกตัวหรือกระจายเป็นหยดขนาดเล็กๆ ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างของเหลว 2 ชนิด สามารถทำได้ด้วยการใช้แรงกล เช่น การปั่นผสม ด้วยเครื่องปั่นผสม (stirrer) หรือเครื่องโฮโมจีไนซ์ (homogenizer)
- การทำให้อิมัลชันคงตัวโดยการเติมสารทำอิมัลชัน (emulsifier) ได้แก่ สารลดแรงตึงผิว เช่น Tween, Span, sodium lauryl sulfate เป็นต้น เพื่อลดแรงตึงผิวของของเหลวทั้งสองส่วนและไม่ให้แยกชั้นเมื่อตั้งทิ้งไว้

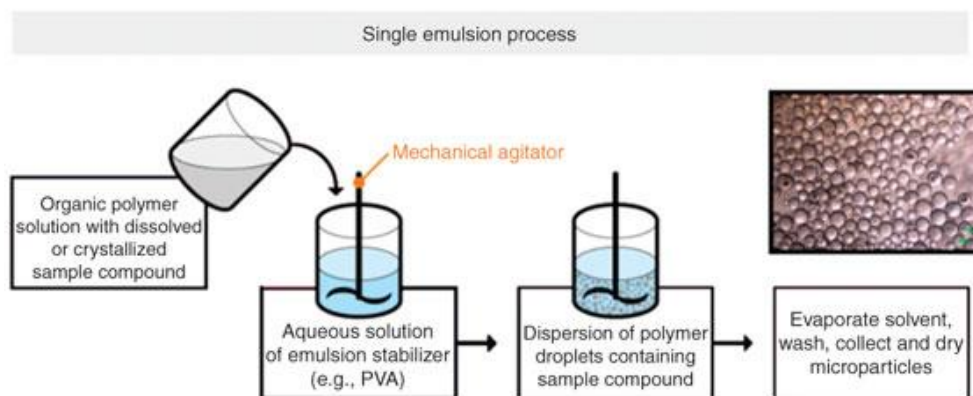
ชนิดของอิมัลชัน

อิมัลชันสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้ดังนี้

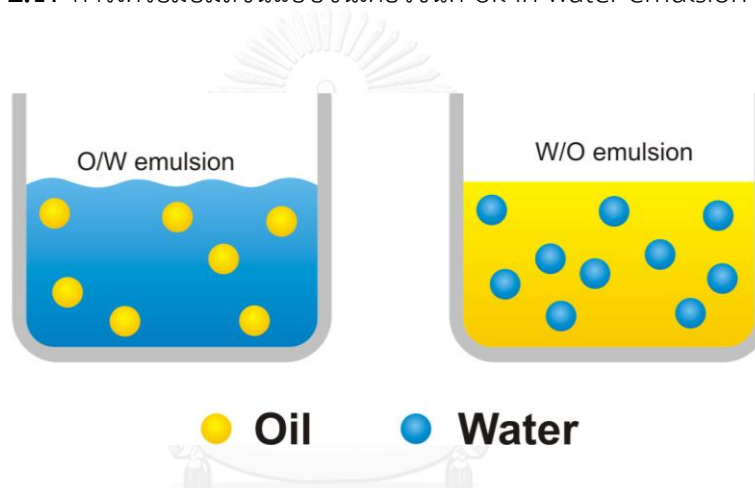
1. conventional emulsion เป็นการเกิดอิมัลชันแบบชั้นเดียว (single emulsion) ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ดังรูปที่ 2.17 และ 2.18 ได้แก่

1.1 อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (oil-in-water emulsion; O/W) มีน้ำมันเป็นวัฏภาคภายใน และน้ำเป็นวัฏภาคภายนอก โดยเทคนิคนี้จะละลายพอลิเมอร์ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ระเหยง่าย เช่น ไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม เป็นต้น จากนั้นเติมลงในวัฏภาคภายนอก และถูกทำให้เป็นอิมัลชันโดยการเติมสารทำอิมัลชันที่สามารถละลายในน้ำได้และใช้แรงกลช่วยทำให้พอลิเมอร์ซึ่งเป็นวัฏภาคภายในกระจายตัวเป็นหยดขนาดเล็กๆ จากนั้นทำการกำจัดตัวทำละลายอินทรีย์โดยการระเหย ผลลัพธ์ที่ได้จะเป็นอนุภาคของแข็งขนาดเล็กแขวนลอยอยู่ในวัฏภาคน้ำ

1.2 อิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (water-in-oil emulsion, W/O) มีน้ำเป็นวัฏภาคภายใน และน้ำมันเป็นวัฏภาคภายนอก โดยเทคนิคนี้จะละลายพอลิเมอร์ในน้ำซึ่งเป็นวัฏภาคภายใน จากนั้นเติมลงในน้ำมันซึ่งเป็นวัฏภาคภายนอก และถูกทำให้เกิดอิมัลชันโดยการเติมสารทำอิมัลชันที่สามารถละลายในน้ำมันและใช้แรงกลช่วยให้พอลิเมอร์กระจายตัวเป็นหยดเล็กๆ ผลลัพธ์ที่ได้จะเป็นอนุภาคของแข็งขนาดเล็กแขวนลอยอยู่ในวัฏภาคน้ำมัน



รูปที่ 2.17 การเตรียมอิมัลชันแบบชั้นเดียวชนิด oil-in-water emulsion [58]

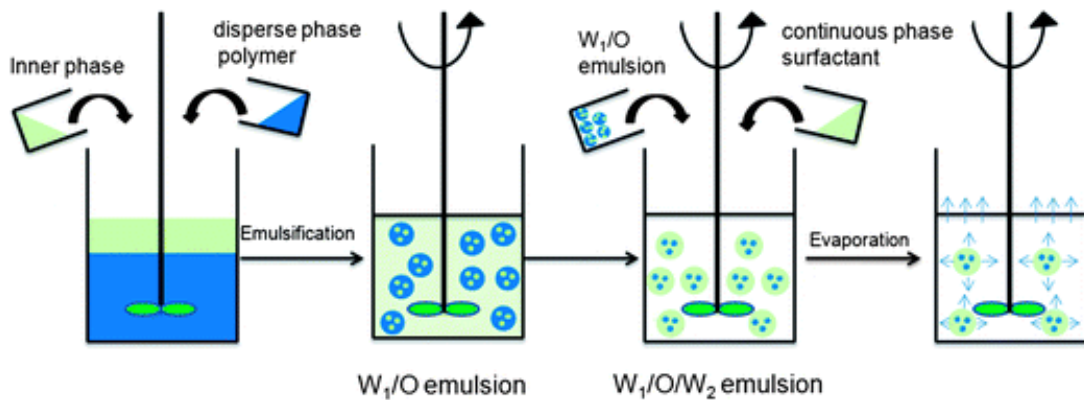


รูปที่ 2.18 อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (oil-in-water emulsion; O/W) และชนิดน้ำในน้ำมัน (water-in-oil emulsion, W/O) [59]

2. อิมัลชันเชิงซ้อน (multiple emulsion) เป็นอิมัลชันที่มีวัฏภาคภายในซ้อนกันอยู่ ดังรูปที่ 2.19 ซึ่งเป็นของเหลวต่างชนิดกัน สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทได้แก่

2.1 อิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันในน้ำ (water in oil in water emulsion; W/O/W) คือระบบที่มีการกระจายตัวของ W/O ในวัฏภาคน้ำ

2.2 อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำในน้ำมัน (oil in water in oil emulsion; O/W/O) คือระบบที่มีการกระจายตัวของ O/W ในวัฏภาคน้ำมัน



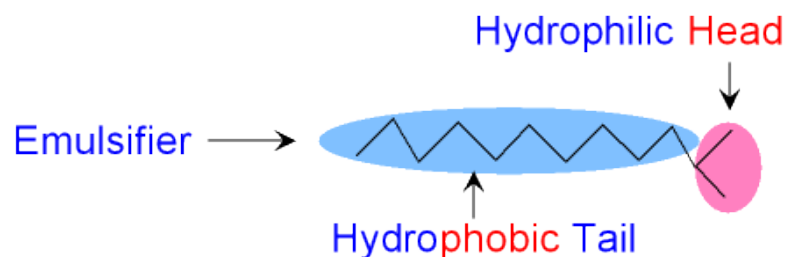
รูปที่ 2.19 การเตรียมอิมัลชันเชิงซ้อนชนิด water in oil in water emulsion [60]

3. การทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying) [61]

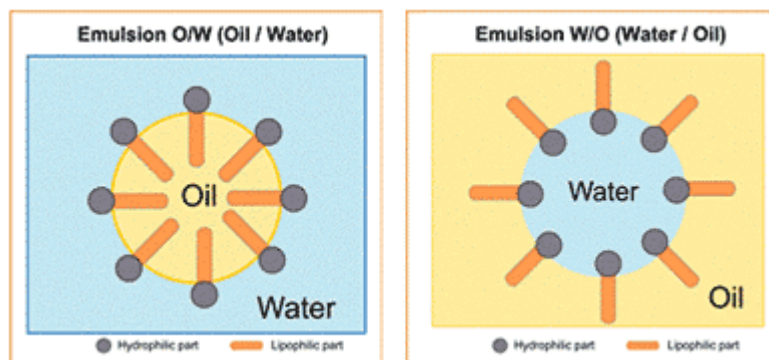
เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการทำแห้งตัวทำละลายอินทรีย์ อิมัลชัน และของเหลวชนิดต่างๆ โดยการพ่นฝอยสารละลายที่มีอนุภาคของแข็งในลมร้อนที่อุณหภูมิ 150-200°C เกิดการถ่ายเทความร้อนให้แก่ผลิตภัณฑ์ที่เคลื่อนที่ในทิศทางสวนกัน ทำให้เกิดการระเหยตัวทำละลายอย่างรวดเร็ว ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะอยู่ในรูปของของแข็งอนุภาคเล็กหรือผงแห้ง วิธีนี้มีข้อเสียคือ อาจเกิดการเสถียรภาพของผลิตภัณฑ์จากอุณหภูมิสูงได้

2.6 สารทำอิมัลชัน (Emulsifier) [59]

เป็นสารที่ช่วยให้อิมัลชันคงตัวด้วยการลดแรงตึงผิว (surface tension) ของของเหลวและป้องกันไม่ให้อิมัลชันแยกเป็นชั้น ซึ่งโมเลกุลของสารทำอิมัลชัน มีทั้งส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ดังรูปที่ 2.20 โดยจะหันส่วนที่ชอบน้ำเข้าหาน้ำ และหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำเข้าหาน้ำมัน ดังรูปที่ 2.21



รูปที่ 2.20 ส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำของสารทำอิมัลชัน [62]



รูปที่ 2.21 การเรียงตัวของสารทำอิมัลชันในอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำและชนิดน้ำในน้ำมัน [63]

การเลือกใช้สารทำอิมัลชัน

การเลือกใช้จะพิจารณาจากค่าความสมดุลระหว่างส่วนที่ชอบน้ำกับส่วนที่ชอบน้ำมัน เรียกว่าค่า เอชแอลบี (hydrophile-lipophile balance; HLB) ซึ่งคำนวณได้จากวิธีของ Griffin (Griffin's method) [64]

$$HLB = 20 \times \frac{M_h}{M}$$

โดยที่ M_h คือ มวลโมเลกุลของส่วนที่ชอบน้ำของสารทำอิมัลชัน

M คือ มวลโมเลกุลของสารทำอิมัลชัน

ค่า HLB มีค่าตั้งแต่ 0 - 20 กล่าวคือ สารที่มีค่า HLB เท่ากับ 0 คือสารที่ไม่โมเลกุลมีส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ทั้งหมดและไม่ละลายในน้ำ สารที่มีค่า HLB สูงขึ้น คือสารที่โมเลกุลจะมีส่วนที่ชอบน้ำมากขึ้น กระจายตัวในน้ำได้ดีขึ้น ค่า HLB เป็นค่าที่กำหนดการประยุกต์ใช้งานของสารได้ ดังแสดงในตารางที่ 2.6 สำหรับค่า HLB ของสารทำอิมัลชันที่มีการใช้งานในปัจจุบันแสดงในตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.6 ค่า HLB และการนำไปประยุกต์ใช้งาน [64]

HLB Range	Use
4-6	W/O emulsifiers
7-9	Wetting agents
8-18	O/W emulsifiers
13-15	Detergents
15-18	Solubilizing

ตารางที่ 2.7 ค่า HLB ของสารทำอิมัลชันที่ใช้งานในปัจจุบัน [65]

ชื่อทางการค้า	ชื่อทางเคมี	ค่า HLB
Span 85	sorbitan trioleate	1.8
Span 65	sorbitan tristearate	2.1
Atmos 150	mono หรือ diglyceride	3.2
Atmul 500	mono หรือ diglyceride	3.5
Atmul 84	glycerol monostearate	3.8
Span 80	sorbitan monooleate	4.3
Span 60	sorbitan monostearate	4.7
Span 40	sorbitan monopalmitate	6.7
Span 20	sorbitan monolaurate	8.6
Tween 61	polyoxyethylene sorbitan monostearate	9.6
Tween 81	polyoxyethylene sorbitan monooleate	10.0
Tween 85	polyoxyethylene sorbitan trioleate	11.0
Arlacel 165	glycerol monostearate (acid stable,self-emulsifying)	11.0
Myrj 45	polyoxyethylene monostearate	11.0
Atlas G-2127	polyoxyethylene monostearate	11.1
Myrj 49	polyoxyethylene monolaurate	12.8

2.7 การเชื่อมขวาง (Crosslinking) [66-68]

การเชื่อมขวางเป็นการสร้างพันธะเคมีภายในโมเลกุลของพอลิเมอร์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติของพอลิเมอร์ โดยมีอัตราการย่อยสลายที่ช้าลง และความสามารถในการบวมตัวในน้ำดีขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถปรับปรุงสมบัติทางกลของพอลิเมอร์ให้ดียิ่งขึ้น เพื่อให้มีความเหมาะสมในการนำมาประยุกต์ใช้งานในด้านต่างๆ การเชื่อมขวางสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ การเชื่อมขวางทางกายภาพ และการเชื่อมขวางทางเคมี โดยในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะการเชื่อมขวางสำหรับโปรตีนเท่านั้น

2.7.1 การเชื่อมขวางทางกายภาพ (physical crosslinking)

เป็นวิธีการเชื่อมขวางโมเลกุลของพอลิเมอร์โดยไม่ใช้สารเคมี แต่ใช้วิธีทางกายภาพ เช่น การเชื่อมขวางด้วยความร้อน การเชื่อมขวางด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต เป็นต้น พอลิเมอร์ที่ผ่านการเชื่อมขวางทางกายภาพจะมีร้อยละการเชื่อมขวางค่อนข้างน้อย แต่มีข้อดีคือ ไม่มีสารเคมีที่เป็นพิษตกค้างในพอลิเมอร์

2.7.1.1 การเชื่อมขวางด้วยความร้อนแบบกำจัดน้ำออก (dehydrothermal treatment; DHT)

เป็นการเชื่อมขวางโดยใช้ความร้อนสูงมากกว่า 90°C ภายใต้สภาวะสุญญากาศ จะทำให้เกิดการสร้างพันธะเอไมด์จากปฏิกิริยา amidation ระหว่างหมู่เอมิโนอิสระและหมู่คาร์บอกซิลที่อยู่ใกล้กัน และมีการกำจัดน้ำออกจากโมเลกุลของพอลิเมอร์โดยผ่านปฏิกิริยาการควบแน่น นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิและระยะเวลาในการเชื่อมขวาง ส่งผลให้ค่าร้อยละของการเชื่อมขวางเพิ่มขึ้นและทำให้พอลิเมอร์มีความแข็งแรงทางกลเพิ่มขึ้น แต่ความร้อนที่สูงขึ้นก็อาจจะทำให้เกิดการเสียสภาพได้เช่นกัน [66]

2.7.1.2 การเชื่อมขวางด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV-irradiation)

เป็นการนำรังสีอัลตราไวโอเล็ตมาใช้เพื่อให้เกิดการเชื่อมขวางของฟรีเรดิคัล (free radical) ของหมู่อะโรมาติกที่พบในกรดอะมิโน เช่น ไทโรซีน (tyrosine) ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) เป็นต้น ค่าความหนาแน่นของการเชื่อมขวางที่ได้จากวิธีนี้มีค่าจำกัด โดยขึ้นอยู่กับปริมาณของหมู่อะโรมาติกที่พบในกรดอะมิโน

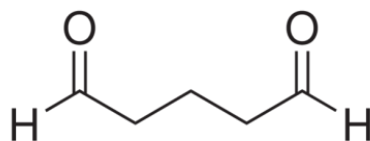
เนื่องจากวิธีนี้ไม่ใช้ความร้อน ดังนั้นจึงนิยมใช้ในการเชื่อมขวางคอลลาเจนและเจลาติน ซึ่งสลายตัวได้ง่ายด้วยความร้อน และช่วยปรับปรุงสมบัติทางกลของคอลลาเจนและเจลาตินให้ดีขึ้น [69]

2.7.2 การเชื่อมขวางทางเคมี (chemical crosslinking)

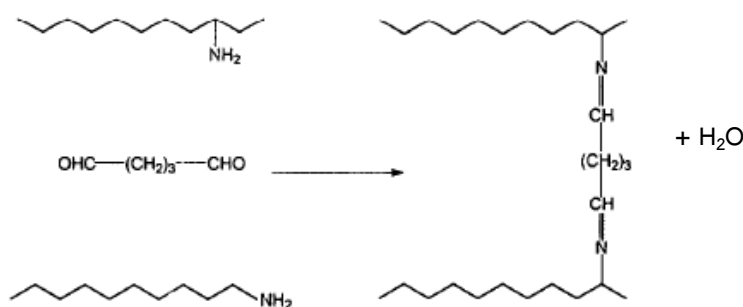
เป็นการใช้สารเคมีที่ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชัน 2 หมู่ในโมเลกุลเดียวกัน มาทำปฏิกิริยากับหมู่ฟังก์ชันของโปรตีนเพื่อให้เกิดการสร้างพันธะโควาเลนต์ [70] ได้แก่ การเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ การเชื่อมขวางด้วย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) และ N-hydroxysuccinimide ester (NHS) เป็นต้น ค่าร้อยละการเชื่อมขวางที่ได้จากการวิธีทางเคมีจะมีค่าค่อนข้างมาก แต่อาจทำให้โครงสร้างของวัสดุเปลี่ยนไป ข้อเสียของวิธีนี้คือ อาจมีสารเคมีที่เป็นพิษตกค้างอยู่ในพอลิเมอร์หลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการเชื่อมขวาง

2.7.2.1 การเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde)

กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารกลุ่มแอลดีไฮด์ มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดคล้ายน้ำมัน สีไม่มีสี มีกลิ่นฉุน โครงสร้างของกลูตารัลดีไฮด์มีลักษณะเป็นสายโซ่ตรง ประกอบด้วยคาร์บอน 5 อะตอมและมีหมู่แอลดีไฮด์ 2 หมู่อยู่ที่ปลายทั้งสองข้างของโมเลกุล ดังแสดงในรูปที่ 2.22 ซึ่งหมู่แอลดีไฮด์ (-CHO) นี้จะทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโน (-NH₂) ของโปรตีนและมีการปลดปล่อยน้ำออกมา ดังแสดงใน รูปที่ 2.23 พอลิเมอร์ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยวิธีนี้มีสมบัติทางกลที่ดีขึ้น และมีอัตราการย่อยสลายที่ช้าลง โดยปฏิกิริยาการเชื่อมขวางขึ้นอยู่กับค่าพีเอช ตัวทำละลาย ความเข้มข้น และความบริสุทธิ์ของกลูตารัลดีไฮด์ ข้อดีของวิธีนี้ คือ ระยะเวลาที่ใช้ในการเชื่อมขวางเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ประสิทธิภาพในการเชื่อมขวางสูงและพอลิเมอร์ที่ได้มีความแข็งแรงมากกว่าพอลิเมอร์ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารประเภทฟอร์มมาดีไฮด์ แต่ก็มีข้อเสีย คือ กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารที่มีพิษ ดังนั้นหลังเสร็จสิ้นกระบวนการเชื่อมขวางจึงต้องกำจัดกลูตารัลดีไฮด์ส่วนเกินที่อาจตกค้างออกให้หมดโดยการล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ไกลซีน ซึ่งมีหมู่ -NH₂ โดยกลูตารัลดีไฮด์ที่ตกค้างอยู่จะไปจับกับหมู่ -NH₂ ของสารละลายบัฟเฟอร์ไกลซีนแทน



รูปที่ 2.22 โครงสร้างของกลูตารัลดีไฮด์ [71]



รูปที่ 2.23 การเชื่อมขวางของโปรตีนด้วยกลูตารัลดีไฮด์ [67]

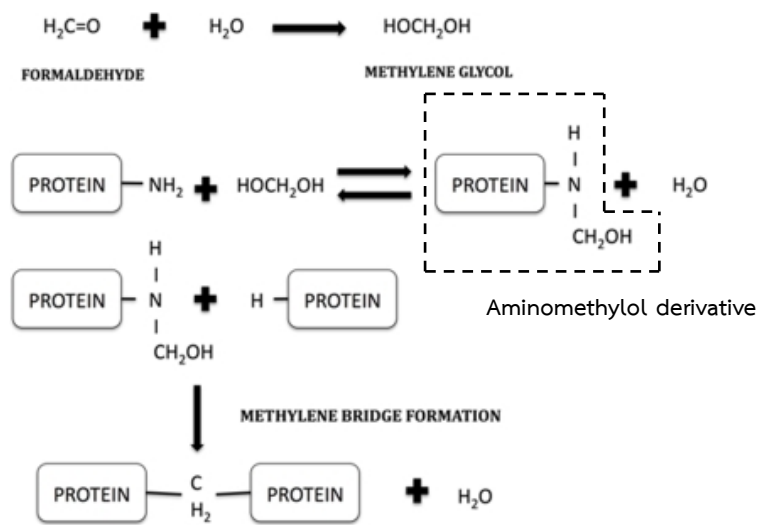
2.7.2.2 การเชื่อมขวางด้วยฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde)

เป็นการเชื่อมขวางที่ใช้หลักการเดียวกันกับการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ โดยฟอร์มัลดีไฮด์จะทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโน (-NH₂) ของโปรตีนเกิดเป็นสารอนุพันธ์ที่อยู่ในรูปไม่เสถียร เรียกว่า aminomethylol derivative ซึ่งทำหน้าที่เชื่อมขวางกับหมู่อะมิโนของโปรตีน และเกิด methylene bridge ที่มีความเสถียร ดังรูปที่ 2.24 การเชื่อมขวางด้วยฟอร์มัลดีไฮด์มีข้อเสียคือ ทำให้พอลิเมอร์มีความเปราะและมีการเปลี่ยนแปลงสี นอกจากนี้ยังประสิทธิภาพในการเชื่อมขวางที่น้อยกว่าเมื่อกับการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์

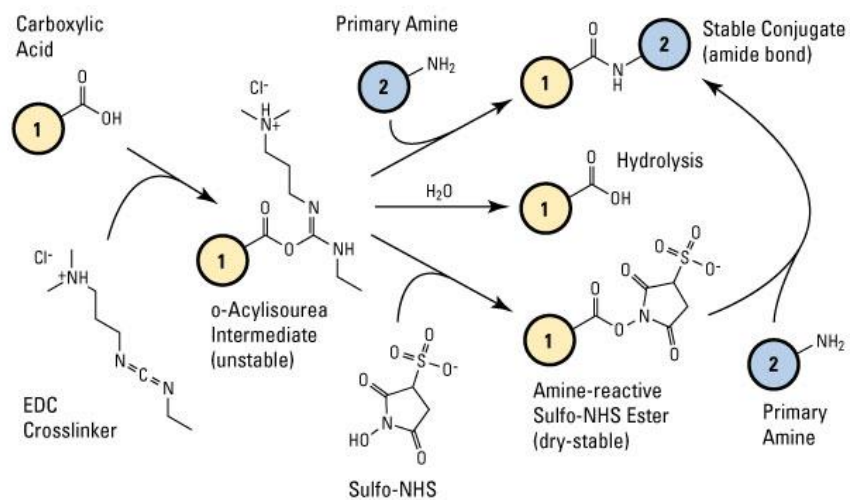
2.7.2.3 การเชื่อมขวางด้วย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) และ N-hydroxysuccinimide esters (NHS) [72]

การเชื่อมขวางจะเกิดขึ้นโดย EDC จะทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลิกในโปรตีนสายโซ่ที่ 1 เกิดเป็นสารที่อยู่ในรูปไม่เสถียร เรียกว่า O-acylisourea ester intermediate ซึ่ง O-acylisourea ester intermediate ที่เกิดขึ้นมีความไวต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส จึงสามารถกลับมาอยู่ในรูปของหมู่คาร์บอกซิลิกได้อีก จึง

จำเป็นต้องเติม NHS เพื่อให้มีความเสถียรมากขึ้น โดย NHS จะทำปฏิกิริยากับ O-acylisourea ester intermediate เกิดเป็นสาร NHS-ester intermediate ที่มีความเสถียร และไปทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีนในโปรตีนสายโซ่ที่ 2 เกิดเป็นพันธะเปปไทด์ที่มีความเสถียร ดังแสดงในรูปที่ 2.25 ข้อดีของการเชื่อมขวางด้วยวิธีนี้คือ หลังกระบวนการเชื่อมขวางสิ้นสุดลงจะได้อนุพันธ์ของยูเรีย ซึ่งไม่เป็นพิษต่อร่างกาย สามารถกำจัดออกได้ง่ายด้วยน้ำ และไม่ปรากฏอยู่ในโมเลกุลที่เชื่อมขวาง



รูปที่ 2.24 การเชื่อมขวางของโปรตีนด้วยฟอร์มัลดีไฮด์ [73]



รูปที่ 2.25 การเชื่อมขวางของโปรตีนด้วย EDC/NHS [74]

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.8.1 การพัฒนาระบบเจลาตินและไฟโบรอินไหมเพื่อใช้ควบคุมการปลดปล่อยยา

ในปี 2007 Adhirajan, N. และคณะ [75] ได้ทำการขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนจากเจลาตินปีและทำการเชื่อมขวางด้วย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) เพื่อประยุกต์ใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยสาร โดยปัจจัยที่ทำการศึกษา ได้แก่ ความเข้มข้นของ EDC และเวลาในการเชื่อมขวาง ต่อดัชนีการย่อยสลายทางชีวภาพและอัตราการปลดปล่อยสาร จากการศึกษาพบว่า อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ทำการเชื่อมขวางด้วย EDC ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ระยะเวลาในการเชื่อมขวาง 24 ชั่วโมง จะมีอัตราการปลดปล่อยสารช้าที่สุด และเมื่อทำการทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนสพบว่า อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ทำการเชื่อมขวางด้วย EDC ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ระยะเวลาในการเชื่อมขวาง 24 ชั่วโมง มีอัตราการย่อยสลายช้าที่สุด นอกจากนี้ยังมีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง (fibroblast cell) พบว่า อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสาร EDC ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

ในปี 2009 Mandal, B.B. และคณะ [4] ได้ทำการศึกษาการควบคุมการปลดปล่อยสารจากแผ่นฟิล์มหลายชั้น (multilayer films) ที่เตรียมจากไฟโบรอินไหมและเจลาตินชนิดเอในสัดส่วนต่างๆ และนำไปแช่ในสารละลายเมทานอลเพื่อชักนำให้เกิดโครงสร้าง β -sheet โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างฟิล์ม 1 ชั้น 3 ชั้น และ 5 ชั้น ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่า พฤติกรรมการควบคุมการปลดปล่อยสารจากฟิล์มผสมขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ สัดส่วนการผสมระหว่างไฟโบรอินไหมและเจลาติน จำนวนชั้นของฟิล์ม และอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพ โดยพบว่า สัดส่วนของเจลาตินมีผลต่ออัตราการย่อยสลายและความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยสาร กล่าวคือ เมื่อเพิ่มสัดส่วนของเจลาติน จะทำให้สมบัติทางกลของฟิล์มผสมด้อยลงและมีอัตราการย่อยสลายเร็วขึ้น ส่งผลให้อัตราการปลดปล่อยสารจากฟิล์มผสมเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังพบว่า การเพิ่มจำนวนชั้นของฟิล์มจะช่วยให้อัตราการย่อยสลายเกิดช้าลง และมีอัตราการปลดปล่อยสารช้าลงด้วย ดังนั้นการผสมสารระหว่างไฟโบรอินไหมและเจลาตินที่สัดส่วนต่างๆ มีผลต่อความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อย

สาร และเมื่อนำฟิล์มผสมระหว่างไฟโบรอินไหมและเจลาตินไปเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ พบว่าการเพิ่มสัดส่วนของเจลาติน ส่งผลให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดีเมื่อเทียบกับกรณีฟิล์มไหมไฟโบรอินเพียงชนิดเดียว ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเจลาตินช่วยสนับสนุนการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์

ในปี 2010 Okhawilai, M. และคณะ [76] ได้ศึกษาการขึ้นรูปแผ่นเส้นใยผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินชนิดบีโดยการปั่นแบบไฟฟ้าสถิตเพื่อประยุกต์ใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยสาร ซึ่งปัจจัยที่ศึกษาได้แก่ สัดส่วนของไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน และความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการปั่นแผ่นเส้นใยผสม จากการศึกษาพบว่าเมื่อเพิ่มความต่างศักย์ไฟฟ้า จะได้เส้นใยผสมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโดยเฉลี่ยลดลงและการกระจายของขนาดเส้นใยลดลง และเมื่อเพิ่มสัดส่วนของไฟโบรอินไหมไทย ส่งผลให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโดยเฉลี่ยของเส้นใยเพิ่มขึ้น เมื่อนำแผ่นเส้นใยผสมไปทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนสพบว่า แผ่นเส้นใยที่มีสัดส่วนเจลาตินสูงจะมีอัตราการย่อยสลายค่อนข้างเร็ว ในขณะที่แผ่นเส้นใยผสมที่มีสัดส่วนเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย 50/50 จะมีอัตราการย่อยสลายช้าที่สุด และเมื่อนำแผ่นเส้นใยผสมไปทดสอบการควบคุมการปลดปล่อยสารที่มีประจุต่างกัน 2 ชนิด ได้แก่ เมทิลีนบลู (methylene blue) ซึ่งมีประจุบวก และ เอโซเคซีน (azo-casein) ซึ่งมีประจุลบ พบว่าสารเมทิลีนบลูที่มีประจุเหมือนกับแผ่นเส้นใยผสมไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินชนิดบี จะเกิดแรงผลักกันทางไฟฟ้า ทำให้มีอัตราการปลดปล่อยค่อนข้างเร็วในช่วง 72 ชม. แรก ในทางตรงกันข้ามสารเอโซเคซีนซึ่งมีประจุตรงข้ามกับแผ่นเส้นใยผสม จะเกิดแรงดึงดูดทางไฟฟ้าขึ้นส่งผลให้เกิดการควบคุมการปลดปล่อยอย่างช้าๆ โดยพบว่า แผ่นเส้นใยผสมที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินไหมไทยเป็นองค์ประกอบอยู่สูง จะมีอัตราการปลดปล่อยช้า เนื่องจากอัตราการปลดปล่อยขึ้นอยู่กับอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพของแผ่นเส้นใยผสมด้วย

ในปี 2012 Srisuwan, Y. และคณะ [5] ได้ขึ้นรูปฟิล์มผสมระหว่างไฟโบรอินจากไหมสายพันธุ์อีรี (Eri) และเจลาตินที่สัดส่วนการผสมต่างๆ เพื่อประยุกต์ใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยยาที่มีสมบัติชอบน้ำ จากการศึกษาพบว่าคลอเฮกซิดีน (chlorhexidine) จะถูกปลดปล่อยจากฟิล์มผสมอย่างรวดเร็วในช่วง 30 นาทีแรก ภายใต้อุณหภูมิร่างกาย

ฟอสเฟต (PBS), pH 7.4 ซึ่งเป็นผลมาจากยาที่เกาะอยู่บนผิวของฟิล์ม และคลอเฮ็กซีดีนยังถูกปลดปล่อยอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยฟิล์มผสมที่มีสัดส่วนของเจลาตินเป็นองค์ประกอบอยู่มากมีอัตราการปลดปล่อยค่อนข้างช้า เมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มผสมที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินเป็นองค์ประกอบสูง เนื่องจากทั้งเจลาตินและคลอเฮ็กซีดีนมีความชอบน้ำ จึงส่งผลให้อันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างโมเลกุลของคลอเฮ็กซีดีนและเจลาตินมีความแข็งแรงมากกว่าไฟโบรอิน จึงกล่าวได้ว่าอัตราการปลดปล่อยยาขึ้นอยู่กับสมบัติของระบบนำส่งและประเภทของยา

ในปี 2014 Elakkiya, T. และคณะ [6] ได้ขึ้นรูปแผ่นเส้นใยผสมระหว่างไฟโบรอินและเคอร์คูมินด้วยกระบวนการปั่นแบบไฟฟ้าสถิต เพื่อประยุกต์ใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยสาร จากการศึกษาพบว่าแผ่นเส้นใยไฟโบรอินมีประสิทธิภาพในการกักเก็บ (entrapment efficiency) เคอร์คูมินมากกว่า 80% และเมื่อศึกษาความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยสารภายใต้สารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (PBS), pH 7.4 ที่ประกอบด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ความเข้มข้น 10% โดยปริมาตร พบว่าเคอร์คูมินถูกปลดปล่อยออกมาจากแผ่นเส้นใยไฟโบรอินได้อย่างรวดเร็วที่เวลาเริ่มต้น เนื่องจากเคอร์คูมินที่เกาะอยู่บนผิวของแผ่นเส้นใย หลังจากนั้นอัตราการปลดปล่อยเคอร์คูมินเกิดขึ้นอย่างช้าๆ และต่อเนื่อง แสดงให้เห็นว่าแผ่นเส้นใยไฟโบรอินมีความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินได้

ในปี 2014 Ratanavaraporn, J. และคณะ [15] ได้ขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนผสมระหว่างไฟโบรอินและเจลาตินที่สัดส่วนการผสมต่างๆ เพื่อประยุกต์ใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินและ/หรือ ไฟเพอริน โดยขึ้นรูปอนุภาคด้วยเทคนิคอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันและเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ จากการศึกษาพบว่าอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนระหว่างไฟโบรอินและเจลาตินในสภาวะแห้งและบวมน้ำมีขนาดเฉลี่ย 194-217 ไมครอนและ 297-367 ไมครอน ตามลำดับ ค่าร้อยละการเชื่อมขวางของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินประมาณ 20 ส่วนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนระหว่างไฟโบรอินและเจลาตินที่สัดส่วนผสมโดยน้ำหนัก 30/70 และ 50/50 มีร้อยละการเชื่อมขวางประมาณ 45-55 ทั้งนี้เนื่องจากความหนาแน่นของหมู่อะมิโนอิสระที่มาก

เกินไปของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินอาจเป็นอุปสรรคต่อการเชื่อมขวางจึงทำให้มีค่าร้อยละการเชื่อมขวางน้อยที่สุด เมื่อนำอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินไปทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส พบว่า อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินจะถูกย่อยสลายหมดภายในระยะเวลา 14 วัน ในขณะที่อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนผสมระหว่างไฟโบรอินและเจลาตินที่สัดส่วนผสมโดยน้ำหนัก 30/70 และ 50/50 ไม่ย่อยสลายภายในระยะเวลา 14 วัน ในการทดสอบความสามารถดูดซับของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน พบว่าอนุภาคที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินสูง สามารถดูดซับเคอร์คูมินและไฟเพอรินได้สูงด้วยอันตรกิริยาความไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) และเมื่อนำไปทดสอบการควบคุมการปลดปล่อย พบว่าอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินและเจลาตินมีความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินและไฟเพอรินได้อย่างต่อเนื่อง (sustained release) สำหรับการควบคุมการปลดปล่อยร่วมกันระหว่างเคอร์คูมินและไฟเพอริน พบว่าอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนสามารถชะลอการปลดปล่อยเคอร์คูมินได้มากกว่าไฟเพอริน เนื่องจากอันตรกิริยาระหว่างอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนและเคอร์คูมินมีความแข็งแรงมากกว่าไฟเพอริน

รายงานวิจัยในปี พ.ศ. 2556 ของกัณฐรัตน์ [17] ได้ศึกษาและพัฒนาระบบไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน โดยการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตาร์ลดีไฮด์เพื่อประยุกต์ใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยสารเคอร์คูมิน และ/หรือดีเอชเอ จากการศึกษาพบว่า ไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอิน/เจลาตินมีค่าร้อยละการเชื่อมขวางมากกว่าไฮโดรเจลเจลาตินหรือไฮโดรเจลไฟโบรอิน เนื่องจากความหนาแน่นของหมู่อะมิโนอิสระที่มากเกินไปของเจลาตินอาจเป็นอุปสรรคต่อการเชื่อมขวางจึงทำให้มีค่าร้อยละการเชื่อมขวางน้อย เมื่อนำไปศึกษาความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนสเป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่า ไฮโดรเจลเจลาตินถูกย่อยสลายเร็วกว่าไฮโดรเจลไฟโบรอินและไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอิน/เจลาติน เนื่องจากเอนไซม์คอลลาจีเนสมีความจำเพาะเจาะจงต่อการย่อยสลายคอลลาเจนและเจลาติน ประกอบกับไฮโดรเจลเจลาตินมีร้อยละการเชื่อมขวางน้อยที่สุด จึงทำให้เกิดการย่อยสลายเร็ว ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังหนู (เซลล์ L929) พบว่า ไฮโดรเจลไฟโบรอิน/เจลาตินไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ในการศึกษาความสามารถในการดูดซับของไฮโดรเจลชนิด

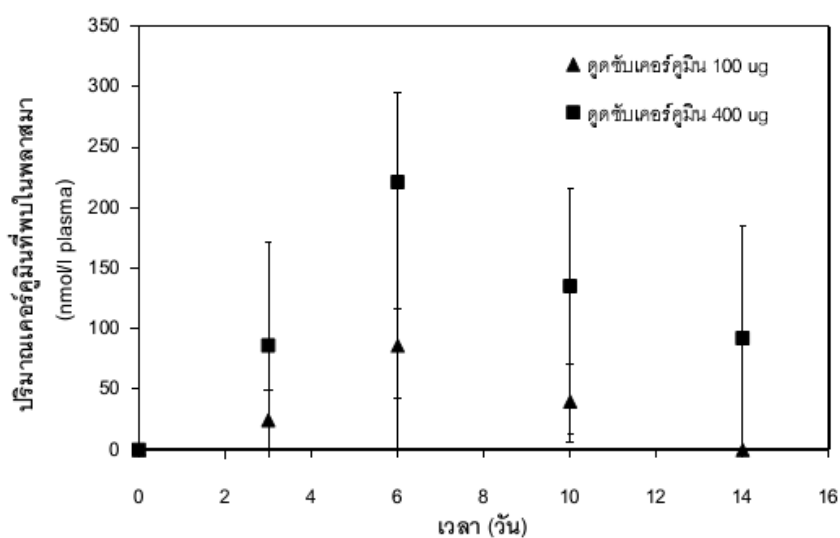
G100, SF5G95, SF50G50, SF80G20 และSF100 พบว่า ในการดูดซับเคอร์คูมินหรือ ดีเอชเอของไฮโดรเจลทุกอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักมีร้อยละการดูดซับเคอร์คูมินมากกว่าดีเอชเอเล็กน้อย และเมื่อพิจารณาการดูดซับเคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอของไฮโดรเจล พบว่าดีเอชเอถูกดูดซับโดยไฮโดรเจลมากกว่าเคอร์คูมิน เนื่องจากดีเอชเอมีสมบัติความไม่ชอบน้ำ และค่าพื้นที่ผิวของโมเลกุลที่สามารถเข้าถึงตัวทำละลายได้มากกว่าเคอร์คูมิน ประกอบกับดีเอชเอมีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าเคอร์คูมินเล็กน้อย ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ดีเอชเอมีโอกาสถูกดูดซับอยู่บนโมเลกุลของส่วนที่มีความไม่ชอบน้ำของไฮโดรเจลได้มากกว่าเคอร์คูมิน เมื่อนำไฮโดรเจลไปทดสอบความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยสารภายใต้สภาวะที่ไม่มีและมีเอนไซม์คอลลาจีเนส พบว่า การเติมเอนไซม์คอลลาจีเนส มีผลต่อการปลดปล่อยดีเอชเอ โดยเฉพาะกรณีการปลดปล่อยร่วม ซึ่งพบว่าดีเอชเอถูกปลดปล่อยเพิ่มมากขึ้นอย่างเด่นชัด และการควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ของไฮโดรเจล ประกอบด้วย 2 กลไก ได้แก่ กลไกการแพร่ และกลไกการย่อยสลาย โดยกลไกเด่นของการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมิน คือ การแพร่ ในขณะที่กลไกเด่นของการควบคุมการปลดปล่อยดีเอชเอ คือ การย่อยสลายของไฮโดรเจล นอกจากนี้ยังพบว่าไฮโดรเจลไฟโบรอินและไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอิน/เจลาตินสามารถชะลอการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ได้มากกว่าไฮโดรเจลเจลาตินเพียงอย่างเดียว ในการศึกษาประสิทธิภาพการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ของไฮโดรเจลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki โดยใช้ไฮโดรเจลที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ที่ดูดซับสารละลายเคอร์คูมินความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ สารละลายดีเอชเอความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ และสารละลายผสมระหว่างเคอร์คูมินและดีเอชเอที่สัดส่วนความเข้มข้น C1:D4 โดยเฉพาะเลี้ยงจำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 6×10^4 เซลล์/1.9 ตารางเซนติเมตร และประเมินจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ที่เวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน พบว่าไฮโดรเจลที่ดูดซับสารละลายผสม C1:D4 มีจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่น้อยกว่าจำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยไฮโดรเจลที่ดูดซับสารละลายเคอร์คูมินความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ และสารละลายดีเอชเอความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์

2.8.2 การพัฒนาระบบนำส่งเคอร์คูมิน

รายงานวิจัยในปี พ.ศ. 2549 ของจุฑามาส [18] ได้ศึกษาและพัฒนาระบบนำส่งเคอร์คูมินโดยดัดแปลงโครงสร้างของเจลาตินเพื่อควบคุมการนำส่งเคอร์คูมินในร่างกาย ซึ่งดัดแปลงโดยการเชื่อมพันธะกับคอเลสเทอรอลผ่านปฏิกิริยาทางเคมีของหมู่ไฮดรอกซิลโดยใช้ N,N'-Disuccinimidyl carbonate (DSC) เป็นสารเชื่อมพันธะ (conjugating agent) มีการขึ้นรูปแผ่นเจลาตินและมีการทดสอบการปลดปล่อยของเคอร์คูมินภายนอกร่างกาย รวมถึงทดสอบระดับของเคอร์คูมินในเลือดของสัตว์ทดลอง จากผลการวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินในพลาสมาของตัวอย่างที่เก็บในวันที่ 3, 6, 10 และ 14 หลังการปลูกถ่ายพบว่าเคอร์คูมินถูกปลดปล่อยจากแผ่นเจลาตินแบบคงที่ (zero order reaction) เป็นเวลาอย่างน้อย 10 วัน โดยแผ่นเจลาตินที่ดูดซับเคอร์คูมิน 100 มิลลิกรัม พบระดับเคอร์คูมินในเลือดของสัตว์ทดลองสูงสุดในวันที่ 6 และลดลงเรื่อยๆในวันต่อ จนกระทั่งไม่พบเลยในวันที่ 14 โดยในเวลา 14 วัน จะพบปริมาณเคอร์คูมินในร่างกายทั้งหมดเท่ากับ 0.32 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเริ่มต้น (รูปที่ 2.26) ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเจลาตินดัดแปลงมีความเป็นไปได้ในการควบคุมการนำส่งยาชนิดไม่ละลายน้ำภายในร่างกาย

ในปี พ.ศ. 2556 หนึ่งฤทัย [16] ได้พัฒนาและศึกษาคุณสมบัติของระบบนำส่งเคอร์คูมินแบบไมเซลล์ โดยอาศัยเจลาตินที่ดัดแปลงด้วยคอเลสเทอรอลอัตราส่วนในการดัดแปลงร้อยละ 50 75 100 และ 125 เพื่อศึกษาปริมาณเคอร์คูมินที่กักเก็บได้ความสามารถในการนำส่งเคอร์คูมินและการยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki นอกจากร่างกาย จากการศึกษาพบว่า ขนาดเฉลี่ยของไมเซลล์เปล่าและเคอร์คูมินไมเซลล์มีค่าเท่ากับ 109.38 ± 8.94 นาโนเมตร และ 132.90 ± 33.57 นาโนเมตรตามลำดับ เมื่อพิจารณาปริมาณเคอร์คูมินที่กักเก็บได้และประสิทธิภาพในการกักเก็บ พบว่าไมเซลล์ที่ผลิตจากเจลาตินที่ดัดแปลงโดยใช้คอเลสเทอรอลร้อยละ 75 ที่ปริมาณเคอร์คูมิน 0.25 มิลลิกรัม/เจลาตินดัดแปลง 30 มิลลิกรัม มีร้อยละการกักเก็บเคอร์คูมินได้สูงสุดเท่ากับ 21.69 ± 0.21 และร้อยละประสิทธิภาพการกักเก็บเคอร์คูมินเท่ากับ 26.25 ± 0.25 เมื่อทำการศึกษาผลของเคอร์คูมินไมเซลล์ที่มีผลยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki นอกจากร่างกาย พบว่าเคอร์คูมินไมเซลล์ที่ความเข้มข้นของเคอร์คูมินเท่ากับ 125 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ

เซลล์มะเร็งได้โดยมีค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์สูงสุดอยู่ในช่วง 79.8 ± 3.3 ที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1×10^4 เซลล์/หลุม ใน 96 well plate (3.16×10^4 เซลล์/ตารางเซนติเมตร) หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าเมื่อเวลาผ่านไป เคอร์คูมินถูกปลดปล่อยออกมาจากไมเซลล์ และทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้



รูปที่ 2.26 ปริมาณเคอร์คูมินที่พบในพลาสมาหลังจากการฝังแผ่นเจลาคตินดัดแปลง (CG66, 10 มิลลิกรัม) ได้แผ่นหลังของ BALB/cA mice เพศผู้ อายุ 6-8 สัปดาห์ ที่ระยะเวลาต่างๆ [18]

ในปี 2007 Suwanton, O. และคณะ [77] ได้พัฒนาระบบนำส่งเคอร์คูมินด้วยกระบวนการขึ้นรูปเส้นใยแบบปั่นแบบไฟฟ้าสถิต โดยใช้เซลลูโลสอะซิเตท ($M_w = 30,000$ Da) เตรียมที่ความเข้มข้น 17เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในอัตราส่วนสารละลาย acetone:dimethylacetamide เท่ากับ 2:1 และใช้เคอร์คูมิน 5-20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของเซลลูโลสอะซิเตท พบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยที่ได้เท่ากับ 314-340 นาโนเมตร มีประสิทธิภาพในการกักเก็บเท่ากับ 91-102 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบการปลดปล่อยเคอร์คูมินพบว่าปริมาณการปลดปล่อยได้สูงสุด 90-95 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังของหนู (เซลล์ L929) ในระดับห้องปฏิบัติการ ที่ความหนาแน่น 1×10^4 เซลล์/0.32 ตารางเซนติเมตร พบว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

ในปี 2009 Anindita, M. และ Jamboor, K. V. [14] ได้ทำการศึกษาและ พัฒนาการบรรจุเคอร์คูมินในอนุภาคทรงกลมขนาดนาโนของ PLGA (PLGA nanospheres) เพื่อรักษาโรคมะเร็ง ซึ่งใช้เทคนิค Solid/Oil/Water พบว่าอนุภาคที่ได้มีลักษณะเป็นทรงกลม โดยมีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 45 นาโนเมตร และการกระจายตัวของอนุภาคอยู่ระหว่าง 35 – 100 นาโนเมตร ประสิทธิภาพของการกักเก็บเคอร์คูมินของอนุภาคเท่ากับ 90.88 ± 0.14 เปอร์เซ็นต์ ในการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากในระดับห้องปฏิบัติการของเคอร์คูมินที่ปลดปล่อยจากอนุภาคทรงกลมขนาดนาโนของ PLGA (curcumin-PLGA nanospheres) โดยศึกษาเปรียบเทียบกับเคอร์คูมินอิสระ พบว่าความเข้มข้นของเคอร์คูมินที่ใช้ 20 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากที่ความหนาแน่น 6.25×10^3 เซลล์/ตารางเซนติเมตร ได้

ในปี 2009 Das, R. K. และคณะ [78] ได้ศึกษาการกักเก็บเคอร์คูมินด้วยอนุภาคระดับนาโนเมตร (nanoparticles; NPs) โดยใช้พอลิเมอร์ที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ 3 ชนิด คือ แอลจีเนต (alginate; ALG) ไคโตซาน (chitosan; CS) และพลูโรนิค (pluronic) โดยอาศัย polycationic cross-linking และใช้ pluronic F127 ช่วยเพิ่มการละลายของเคอร์คูมินในโคพอลิเมอร์ ALG-CS NPs ซึ่งลักษณะของพอลิเมอร์ที่ได้เป็นทรงกลมมีขนาดเฉลี่ย 100 ± 20 นาโนเมตร ผลของประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมิน โดยเปรียบเทียบระหว่าง ALG-CS NPs กับ ALG-CS-PF127 NPs พบว่า ALG-CS-PF127 NPs มีประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินมากกว่า ALG-CS NPs โดยประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินของ ALG-CS-PF127 NPs และ ALG-CS NPs มีค่าสูงสุดเท่ากับ 12.8 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด Hela ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC50) ของเคอร์คูมินที่ถูกกักเก็บด้วย NPs เท่ากับ 14.34 ไมโครโมลาร์ ที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1×10^4 เซลล์/หลุม (96 well plate)

ในปี 2011 Manju, S. และคณะ [19] ได้พัฒนาระบบนำส่งเคอร์คูมินโดยการคอนจูเกตเคอร์คูมินกับกรดไฮยาลูรอนิก (hyaluronic acid) จากการศึกษาพบว่า เคอร์คูมินที่คอนจูเกตกับกรดไฮยาลูรอนิกมีการสลายตัวค่อนข้างน้อยภายใต้สภาวะของสารละลาย

PBS, pH 7.4 เมื่อเปรียบกับเคอร์คูมินอิสระ เนื่องจากเคอร์คูมินและกรดไฮยาลูรอนิคมีการจัดเรียงตัวอยู่ในรูปของไมเซลล์ โดยกักเก็บเคอร์คูมินไว้ภายในแกนกลาง (core) และเมื่อนำไปทดสอบกับเซลล์ผิวหนังของหนู (เซลล์ L929) พบว่าเคอร์คูมินที่คอนจูเกตกับกรดไฮยาลูรอนิคสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ L929 มากกว่าเคอร์คูมินอิสระ เนื่องจากเคอร์คูมินที่คอนจูเกตกับกรดไฮยาลูรอนิคมีการจัดเรียงตัวอยู่ในรูปของไมเซลล์จึงสามารถละลายน้ำได้เพิ่มขึ้น ทำให้เซลล์สามารถดูดซึมเคอร์คูมินได้มากขึ้น ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์จึงเพิ่มขึ้น

2.8.3 การศึกษาประสิทธิภาพการต้านมะเร็งของเคอร์คูมินในสัตว์ทดลอง

รายงานการศึกษาประสิทธิภาพการต้านมะเร็งของเคอร์คูมินในสัตว์ทดลองจากอดีตถึงปัจจุบันสรุปได้ดังตารางที่ 2.8



ตารางที่ 2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาประสิทธิภาพการต้านมะเร็งของเคอร์คูมินในสัตว์ทดลอง

ปี	ผู้วิจัย	วิธีการศึกษา	ผลการศึกษา/สรุปผลการศึกษา
2005	Aggarwal, B. B. และคณะ [79]	<p>การศึกษาในระยะแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในสัตว์ทดลอง</p> <p>ศึกษาในหนูทดลอง (nude mice) เพศเมีย โดยปลูกถ่ายมะเร็งเต้านม (MDA-MB-435LVB) จำนวน 2×10^6 เซลล์ และเลี้ยงในสภาวะควบคุมประมาณ 58-60 วัน จนกระทั่งได้ก้อนมะเร็งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 10 มิลลิเมตร และผ่าตัดเอาก้อนมะเร็งออกเพื่อให้เซลล์มะเร็งแพร่กระจายไปที่ปอด และแบ่งหนูทดลองโดยการสุ่ม กลุ่มละ 15 ตัว เพื่อทำการรักษา ดังนี้</p> <p><u>กลุ่มที่ 1</u> ได้รับอาหารชนิดผงเพียงอย่างเดียว</p> <p><u>กลุ่มที่ 2</u> ได้รับอาหารชนิดผงผสมกับเคอร์คูมิน 2% โดยน้ำหนักตั้งแต่วันที่ 5 ของการผ่าตัดก้อนมะเร็งจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง</p>	<p>จากการศึกษาในระยะแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในสัตว์ทดลองพบว่ากลุ่มทดลองที่ได้รับเคอร์คูมินร่วมกับยา paclitaxel สามารถยับยั้งการแพร่กระจายของมะเร็งเต้านมไปยังปอดได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และจากการศึกษาจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อปอดยืนยันว่ากลุ่มทดลองที่ได้รับเคอร์คูมินร่วมกับยา paclitaxel พบเปอร์เซ็นต์การแพร่กระจายของมะเร็งเต้านมไปยังปอดได้ 28% ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับเคอร์คูมินหรือ paclitaxel เพียงอย่างเดียว</p> <p>จากศึกษาอิมมูโนพยาธิวิทยาแสดงให้เห็นว่า Paclitaxel สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออก antiapoptotic gene ได้แก่ <i>NF-KB</i>, <i>COX-2</i>, and <i>MMP-9</i> ในเนื้อเยื่อมะเร็งของหนูทดลอง และเมื่อให้เคอร์คูมินพบว่าสามารถยับยั้งการแสดงออกของ antiapoptotic gene เหล่านี้ได้</p>

ตารางที่ 2.8 (ต่อ) งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาประสิทธิภาพการต้านมะเร็งของเคอร์คูมินในสัตว์ทดลอง

ปี	ผู้วิจัย	วิธีการศึกษา	ผลการศึกษา/สรุปผลการศึกษา												
		<p>โดยทั้ง 2 กลุ่ม จะได้รับยา paclitaxel ขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ที่เตรียมด้วยการละลายใน cremopher หรือสารละลาย cremopher เพียงอย่างเดียว ทางการฉีดหน้าท้อง (i.p.) ตั้งแต่วันที่ 10, 17 และ 24 ของการผ่าตัดก้อนมะเร็ง และทำการฆ่าหนูทดลองในสัปดาห์ที่ 5 และตัดเนื้อเยื่อปอดมาย้อมสี H&E และศึกษาจุลกายวิภาคศาสตร์ (histology) และศึกษาอิมมูโนพยาธิวิทยา</p>	<p>สรุปผลการศึกษา</p> <p>เคอร์คูมินสามารถยับยั้งการแพร่กระจายของมะเร็งได้โดยการยับยั้งการแสดงออกของ antiapoptotic gene ได้แก่ <i>NF-KB</i>, <i>COX-2</i>, and <i>MMP-9</i></p>												
2007	Jing, Z. และคณะ [80]	<p>ศึกษาในหนูทดลอง (nude mice BALB/c) เพศเมีย โดยฉีดเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) ทางใต้ผิวหนัง จำนวน 1×10^7 เซลล์ ในสารละลาย PBS 100 μL จนกระทั่งก้อนมะเร็งมีปริมาตรประมาณ 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร และแบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้</p>	<p><i>Tab. 1. Body weight of BALB/C mice before and after treatment</i></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>n</th> <th>Control ($\bar{x} \pm s$)</th> <th>Curcumin ($\bar{x} \pm s$)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Weight before treatment (g)</td> <td>15</td> <td>21.55\pm1.037</td> <td>21.85\pm1.306</td> </tr> <tr> <td>Weight after treatment (g)</td> <td>15</td> <td>23.07\pm1.056*</td> <td>21.18\pm1.042**</td> </tr> </tbody> </table> <p>Compared with the weight before treatment, *P<0.05, **P<0.05</p> <p>ตารางที่ 2.9 น้ำหนักตัวของหนูทดลองก่อนและหลังได้รับการรักษาด้วยเคอร์คูมินจากน้ำหนักตัวของหนูทั้งสองกลุ่มทั้งก่อนและหลังรับการรักษาแสดงให้เห็นว่าหนูทดลองที่ได้รับเคอร์คูมินไม่มีน้ำหนักตัวเปลี่ยนแปลง</p>	Group	n	Control ($\bar{x} \pm s$)	Curcumin ($\bar{x} \pm s$)	Weight before treatment (g)	15	21.55 \pm 1.037	21.85 \pm 1.306	Weight after treatment (g)	15	23.07 \pm 1.056*	21.18 \pm 1.042**
Group	n	Control ($\bar{x} \pm s$)	Curcumin ($\bar{x} \pm s$)												
Weight before treatment (g)	15	21.55 \pm 1.037	21.85 \pm 1.306												
Weight after treatment (g)	15	23.07 \pm 1.056*	21.18 \pm 1.042**												

ตารางที่ 2.8 (ต่อ) งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาประสิทธิภาพการต้านมะเร็งของเคอร์คูมินในสัตว์ทดลอง

ปี	ผู้วิจัย	วิธีการศึกษา	ผลการศึกษา/สรุปผลการศึกษา
		<p><u>กลุ่มที่ 1</u> ฉีดเคอร์คูมิน 250 $\mu\text{mol/L}$ ในสารละลาย PBS ปริมาตร 200 μl</p> <p><u>กลุ่มที่ 2</u> ฉีดสารละลาย PBS ปริมาตร 200 μl</p> <p>โดยฉีดยวันละครั้งที่บริเวณหน้าท้อง (i.p.) เป็นเวลา 10 วัน และวัดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณก้อนมะเร็งและคำนวณหาอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็ง (tumor inhibition rate/IR)</p> <p>(IR = $\frac{\text{น้ำหนักเฉลี่ยของกลุ่มควบคุม}-\text{น้ำหนักเฉลี่ยของกลุ่มที่ได้รับเคอร์คูมิน}}{\text{น้ำหนักเฉลี่ยของกลุ่มควบคุม}} \times 100\%$)</p> <p>ถ้าค่า $IR < 30$ แสดงว่าเคอร์คูมินไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้อย่างมีประสิทธิภาพ</p> <p>ถ้าค่า $IR \geq 30$ แสดงว่าเคอร์คูมินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้อย่างมีประสิทธิภาพ</p>	<p>ผลของอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็ง (IR) พบว่ากลุ่มที่ได้รับเคอร์คูมินมีค่า IR เท่ากับ 74.33 และวัดปริมาตรก้อนมะเร็งได้ $53 \pm 8.52 \text{ mm}^3$ ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มควบคุม และในการทดลองนี้ไม่พบการตายของหนูทดลองที่ได้รับเคอร์คูมิน</p> <p>ในการศึกษาอิมมูโนพยาธิวิทยาพบว่าการให้เคอร์คูมิน 25 $\mu\text{mol/L}$ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะพบการแสดงออกของโปรตีน Bax และ Caspase-3 เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม</p> <p>สรุปผลการทดลอง</p> <p>เคอร์คูมินสามารถยับยั้งการเกิดมะเร็งปากมดลูก (HeLa) ในหนูทดลองได้เนื่องจากการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน Bax และ Caspase-3 ซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งแบบ apoptosis</p>

ตารางที่ 2.8 (ต่อ) งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาประสิทธิภาพการต้านมะเร็งของเคอร์คูมินในสัตว์ทดลอง

ปี	ผู้วิจัย	วิธีการศึกษา	ผลการศึกษา/สรุปผลการศึกษา
2008	Yoysung noen, P. และคณะ [11]	ศึกษาในหนูทดลอง (nude mice BALB/c) น้ำหนักตัว 20-25 กรัม จำนวน 90 ตัว ฉีดเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) จำนวน 2×10^6 เซลล์ ปริมาตร 30 μ L บริเวณ dorsal skin-fold chamber จนกระทั่งได้ก้อนมะเร็งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 7 มิลลิเมตร และแบ่งการทดลองเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ <u>กลุ่มที่ 1</u> (Control) หนูทดลอง จำนวน 15 ตัว ซึ่งได้รับการรักษาด้วยตัวทำละลาย 0.1% DMSO <u>กลุ่มที่ 2</u> (HepG2-group) หนูทดลองจำนวน 15 ตัว ที่ปลูกเซลล์ HepG2 และทำการรักษาด้วยตัวทำละลาย 0.1% DMSO <u>กลุ่มที่ 3</u> (HepG2-CUR group) หนูทดลองจำนวน 30 ตัว ที่ปลูกเซลล์ HepG2 และทำการรักษาด้วยเคอร์คูมิน 300 และ 3000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใน 0.1% DMSO	จากการศึกษา microcirculation ในวันที่ 14 และ 21 ของการรักษา แสดงให้เห็นว่าหนูทดลองที่ปลูกเซลล์ HepG2 และได้รับการรักษาด้วยเคอร์คูมินและเตตระไฮโดรเคอร์คูมิน 3000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบความผิดปกติของหลอดเลือดและการเกิดหลอดเลือดใหม่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ จาก การ คำนวณ capillary vascularity (CV) ของ HepG2-group พบว่า %CV มีค่าเพิ่มขึ้นในวันที่ 7 (52.43%), 14 (69.17%) และ 21 (74.08%) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (33.04%, $P < 0.001$) ในกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยเคอร์คูมินและเตตระไฮโดรเคอร์คูมินพบว่า %CV มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.005$ และ $P < 0.001$ ตามลำดับ) และผลของยับยั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่เพิ่มความเข้มข้นของยา

ตารางที่ 2.8 (ต่อ) งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาประสิทธิภาพการต้านมะเร็งของเคอร์คูมินในสัตว์ทดลอง

ปี	ผู้วิจัย	วิธีการศึกษา	ผลการศึกษา/สรุปผลการศึกษา
		<p>กลุ่มที่ 4 (HepG2-THC group) หนูทดลองจำนวน 30 ตัว ที่ปลูกเซลล์ HepG2 และทำการรักษาด้วยเตตระไฮโดรเคอร์คูมิน 300 และ 3000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใน 0.1% DMSO ซึ่งแต่ละกลุ่มจะทำการรักษาด้วยให้ยาโดยการรับประทานวันละหนึ่งครั้ง</p> <p>ศึกษา microcirculation ในวันที่ 7, 14 และ 21 ของการรักษา ด้วยวิธี fluorescence microscope โดยฉีด 5% fluorescein isothiocyanate-labeled dextran ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บริเวณ jugular vein เป็นเวลา 5 นาที แล้วบันทึกภาพถ่าย 5 ตำแหน่งของพื้นผิวของก้อนมะเร็ง และคำนวณ capillary vascularity (CV) ด้วยโปรแกรม Global Lab II โดย</p> $CV = (\text{number of pixels within the capillaries}) \times 100 (\%) / \text{total number of pixels within the selected window area}$	<p>สรุปผลการทดลอง</p> <p>ในกลุ่ม HepG2-group พบการเกิดหลอดเลือดใหม่ และการเพิ่มขึ้นของ %CV อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และผลของยับยั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่เพิ่มตามความเข้มข้นของยา และเตตระไฮโดรเคอร์คูมินมีประสิทธิภาพยับยั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่ได้ดีกว่าเคอร์คูมินที่ความเข้มข้นเท่ากัน</p>

ตารางที่ 2.8 (ต่อ) งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาประสิทธิภาพการต้านมะเร็งของเคอร์คูมินในสัตว์ทดลอง

ปี	ผู้วิจัย	วิธีการศึกษา	ผลการศึกษา/สรุปผลการศึกษา
2013	Yin, H-T. และคณะ [81]	ได้ทำการขึ้นรูปอนุภาคขนาดนาโน (nanoparticles) จาก methoxy poly(ethyleneglycol)- polycaprolactone (mPEG-PCL) ซึ่งบรรจุเคอร์คูมิน (Cum-NPs) และศึกษาในหนูทดลอง (nude mice) อายุ 6-8 สัปดาห์ น้ำหนักตัว 18-22 กรัม โดยปลูกเซลล์มะเร็งปอด (A549) ทางหลอดเลือดดำ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ซึ่งมีจำนวนเซลล์ $4-6 \times 10^6$ เซลล์ จนได้ปริมาตรก้อนมะเร็ง 100 ลูกบาศก์มิลลิเมตร จึงเริ่มทำการรักษาโดยฉีดยาทางหลอดเลือดดำ (i.v.) ในวันที่ 7-8 ของการปลูกเซลล์มะเร็ง ซึ่งได้แบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว ดังนี้ <u>กลุ่มที่ 1</u> ได้รับน้ำเกลือ (saline) <u>กลุ่มที่ 2</u> ได้รับ methoxy poly(ethylene glycol)- polycaprolactone (mPEG-PCL) nanoparticles ซึ่งปราศจากเคอร์คูมิน (blank nanoparticles)	จากผลการทดลอง blank nanoparticles ไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ free curcumin และ Cum-NPs สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ตั้งแต่วันที่ 4 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) และ Cum-NPs สามารถยับยั้งการเจริญได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่า Free curcumin ($P < 0.05$) จากการคำนวณหา relative tumor volume (RTV) พบว่า กลุ่มที่ได้รับ free curcumin มีค่า RTV 10.42 ± 1.23 ในขณะที่ กลุ่มที่ได้รับ Cum-NPs มีค่า RTV 6.24 ± 0.59 จากการวิเคราะห์น้ำหนักตัวเพื่อดูผลข้างเคียงจากการได้รับการรักษาของหนูทดลองทั้ง 4 กลุ่ม ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 2.8 (ต่อ) งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาประสิทธิภาพการต้านมะเร็งของเคอร์คูมินในสัตว์ทดลอง

ปี	ผู้วิจัย	วิธีการศึกษา	ผลการศึกษา/สรุปผลการศึกษา
		<p>กลุ่มที่ 3 ได้รับเคอร์คูมินในรูปอิสระ (Free curcumin) ปริมาณ 15 มิลลิกรัม/กิโลกรัม</p> <p>กลุ่มที่ 4 ได้รับ methoxy poly (ethylene glycol)- polycaprolactone (mPEG-PCL) nanoparticles ซึ่งบรรจุเคอร์คูมิน (Cum-NPs) ในน้ำเกลือซึ่งมีขนาดยาสมมูล 15 มิลลิกรัม/กิโลกรัม</p> <p>วัดการเปลี่ยนแปลงของขนาดก้อนมะเร็งและคำนวณหาปริมาตรตามสูตร</p> $\text{Tumor volume} = (W^2 \times L)/2$	<p>สรุปผลการทดลอง</p> <p>Cum-NPs สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอด (A549) ในหนูทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพ</p>
2013	Wang, P. และคณะ [82]	<p>ได้ทำการขึ้นรูปอนุภาคนาโนไขมันแข็ง (solid lipid nanoparticles; SLN) ด้วยวิธีโซลเจล (sol-gel) เพื่อกักเก็บเคอร์คูมินเคอร์คูมินและศึกษาในหนูทดลอง (Taconics, Ncr nude) เพศเมีย อายุ 5-6 สัปดาห์ โดยปลูกเซลล์มะเร็งปอด (A549) ทางใต้ผิวหนังบริเวณข้างลำตัว จำนวน 2.5×10^6 เซลล์ ใน sterile Dulbecco's phosphate</p>	<p>จากการทดลองพบว่า กลุ่มที่ได้รับ SLN-curcumin มี tumor volume ลดลง 65.3% ($p < 0.005$) ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับ curcumin มีขนาดลดลงเพียง 19.5%</p> <p>จากศึกษาปริมาณเคอร์คูมินในเลือดที่เวลาต่างๆพบว่า กลุ่มที่ได้รับ SLN-curcumin พบปริมาณ curcumin ในเลือดสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับ curcumin ในรูปแบบอิสระ เนื่องจาก</p>

ตารางที่ 2.8 (ต่อ) งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาประสิทธิภาพการต้านมะเร็งของเคอร์คูมินในสัตว์ทดลอง

ปี	ผู้วิจัย	วิธีการศึกษา	ผลการศึกษา/สรุปผลการศึกษา
		<p>buffered saline ซึ่งผสมกับ matrigel ปริมาตร 100 μL จนกระทั่งได้ปริมาณก้อนมะเร็ง 100 ลูกบาศก์มิลลิเมตร แล้วแบ่งเป็นกลุ่มการทดลอง ดังนี้</p> <p><u>กลุ่มที่ 1</u> ได้รับสารละลาย PBS</p> <p><u>กลุ่มที่ 2</u> ได้รับ SLN-curcumin ปริมาณ 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม</p> <p><u>กลุ่มที่ 3</u> ได้รับเคอร์คูมินปริมาณ 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม</p> <p>ทำการรักษาหนูโดยการฉีดยาทางหน้าท้อง (i.p.) ทุกวัน เป็นเวลา 19 วัน (5 วัน/สัปดาห์) แล้ววัดขนาดของก้อนมะเร็ง เพื่อกำหนดหาปริมาณตามสูตร หลังจาก 19 วัน ทำการฆ่าหนูทดลองเพื่อเก็บตัวอย่างเลือดและก้อนมะเร็ง</p> <p>การศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์</p> <p>ศึกษาปริมาณเคอร์คูมินในเลือดที่เวลาต่างๆ ด้วยวิธี HPLC โดยใช้หนูทดลอง (nude mice BALB/c) เพศเมีย อายุ 5-6 สัปดาห์ ที่ได้รับ curcumin หรือ SLN-curcumin มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยให้ทางหน้าท้อง หรือทางการรับประทาน</p> <p>ศึกษาการกระจายเคอร์คูมินที่อวัยวะต่างๆ ได้แก่ หัวใจ, ปอด, ตับ, ลำไส้, ไต, และก้อนมะเร็ง หลังจากให้ยาในหนูทดลองเป็นเวลา 1 ชั่วโมง</p>	<p>curcumin ในรูปอิสระจะถูก metabolism อย่างรวดเร็ว และมีชีวประสิทธิผลต่ำ</p> <p>จากศึกษาการกระจายเคอร์คูมินที่อวัยวะต่างๆพบว่า กลุ่มที่ได้รับ SLN-curcumin ทั้งทางการฉีดหน้าท้องและการรับประทาน มีการกระจายไปยังอวัยวะต่างๆในปริมาณที่สูง โดยเฉพาะที่ปอดและก้อนมะเร็ง</p>

ตารางที่ 2.8 (ต่อ) งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาประสิทธิภาพการต้านมะเร็งของเคอร์คูมินในสัตว์ทดลอง

ปี	ผู้วิจัย	วิธีการศึกษา	ผลการศึกษา/สรุปผลการศึกษา
2014	Yoysung noen-Chintana, P. และคณะ [10]	<p>ศึกษาในหนูทดลอง (nude mice BALB/c) น้ำหนักตัว 20-25 กรัม โดยฉีดเซลล์มะเร็งปากมดลูก (CaSki) จำนวน 10×10^7 เซลล์ ปริมาตร 200 μL บริเวณ dorsal skin-fold chamber หลังการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งเป็นเวลาประมาณ 4 สัปดาห์ จนก้อนมะเร็งมีปริมาตร 100-120 ลูกบาศก์มิลลิเมตร และแบ่งการทดลองเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว ดังนี้</p> <p><u>กลุ่มที่ 1</u> (Control+vehicle) หนูทดลองปกติที่ได้รับน้ำมันข้าวโพด (corn oil)</p> <p><u>กลุ่มที่ 2</u> (Control+CUR) หนูทดลองปกติที่ได้รับเคอร์คูมินขนาด 1500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในน้ำมันข้าวโพด</p> <p><u>กลุ่มที่ 3</u> (CaSki+vehicle) หนูทดลองที่ปลูกถ่ายเซลล์ CaSki และได้รับน้ำมันข้าวโพด</p> <p><u>กลุ่มที่ 4</u> (CaSki+CUR500) หนูทดลองที่ปลูกเซลล์ CaSki และได้รับเคอร์คูมินขนาด 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในน้ำมันข้าวโพด</p>	<p>จากการศึกษาฤทธิ์การต้านมะเร็งของเคอร์คูมินพบว่า ในวันที่ 12 ของการทดลองของหนูทดลองกลุ่มที่ปลูกถ่ายเซลล์ CaSki และได้รับเคอร์คูมิน 1500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีก้อนมะเร็งขนาดเล็กกล (439.53 \pm 23.66mm³) อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่หนูทดลองกลุ่มที่ปลูกถ่ายเซลล์ CaSki และได้รับเคอร์คูมิน 1000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบก้อนมะเร็งมีขนาดเล็กกล (918.06 \pm 33.86mm³) อย่างมีนัยสำคัญ ในวันที่ 18 ของการทดลอง และเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า เคอร์คูมินขนาด 1000 และ 1500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สามารถชะลอการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งได้ 21.03% และ 35.57% ตามลำดับ นอกจากนี้หนูทดลองกลุ่มที่ปลูกถ่ายเซลล์ CaSki และได้รับเคอร์คูมิน 1500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบปริมาตรก้อนมะเร็งที่ลดลง (1,266.00 \pm 36.41mm³) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับเคอร์คูมิน 1000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (1,964.78 \pm 40.20mm³) อย่างมีนัยสำคัญ</p>

ตารางที่ 2.8 (ต่อ) งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาประสิทธิภาพการต้านมะเร็งของเคอร์คูมินในสัตว์ทดลอง

ปี	ผู้วิจัย	วิธีการศึกษา	ผลการศึกษา/สรุปผลการศึกษา
		<p>กลุ่มที่ 5 (CaSki+CUR1000) หนูทดลอง ที่ปลูกเซลล์ CaSki และได้รับเคอร์คูมินขนาด 1000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในน้ำมันข้าวโพด</p> <p>กลุ่มที่ 6 (CaSki+CUR1500) หนูทดลองที่ปลูกเซลล์ CaSki และได้รับเคอร์คูมิน ขนาด 1500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในน้ำมันข้าวโพด</p> <p>ซึ่งแต่ละกลุ่มจะทำการรักษาด้วยให้ยาโดยการรับประทานวันละหนึ่งครั้ง เป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นศึกษา microcirculation ในวันที่ 30 ของการรักษา ด้วยวิธี fluorescence microscope โดยฉีด 0.5% fluorescein isothiocyanate- (FITC-) labeled dextran ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บริเวณ jugular vein แล้ววิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ confocal microscope เพื่อหา microvessel density (MVD) ซึ่งเป็นตัวชี้บ่งถึงการเกิดหลอดเลือดใหม่ และศึกษาอิมมูโนพยาธิวิทยาเพื่อหาการแสดงออกของ CD31, VEGF, COX-2 และ EGFR</p>	<p>จากการศึกษา microcirculation พบว่า หนูทดลองที่ปลูกเซลล์ CaSki พบความผิดปกติของหลอดเลือดและการเกิดหลอดเลือดใหม่เพิ่มขึ้น แต่หนูทดลองกลุ่มที่ปลูกถ่ายเซลล์ CaSki และได้รับเคอร์คูมิน 1000 และ 1500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบความผิดปกติของหลอดเลือดและการเกิดหลอดเลือดใหม่ลดลง และมีค่า MDV ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองที่ปลูกถ่ายเซลล์ CaSki และได้รับ corn oil</p> <p>จากการศึกษาอิมมูโนพยาธิวิทยา พบว่าหนูทดลองกลุ่มที่ปลูกถ่ายเซลล์ CaSki และได้รับ corn oil มีการแสดงออกของ VEGF COX-2 และ EGFR เพิ่มขึ้น</p> <p>สรุปผลการทดลอง</p> <p>เคอร์คูมินในขนาดยาสูง (1000 และ 1500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ต่อวัน) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งและการเกิดหลอดเลือดใหม่อันเนื่องมาจากการควบคุมการสร้าง VEGF, COX-2 และ EGFR</p>

บทที่ 3

วัสดุและวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและสารเคมี

- 3.1.1 รังไหมไทย *Bombyx mori* (สายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1, ศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์พระบรมราชินีนาถ จังหวัดศรีสะเกษ)
- 3.1.2 เจลาตินชนิดเอ, น้ำหนักโมเลกุล 100 kDa, pl = 9 (Nitta Gelatin Inc., ญี่ปุ่น)
- 3.1.3 เคอร์คูมิน (Curcumin; $C_{21}H_{20}O_6$ = 368.38 g/mol, Sigma Co., สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.4 ลิเทียมโบรไมด์ (LiBr; Sigma-Aldrich Laborchemikalien, เยอรมัน)
- 3.1.5 กุ้งไคอะไลซ์ (MWCO 12,000-16,000, Viskase Company Inc., ญี่ปุ่น)
- 3.1.6 น้ำปราศจากไอออน (Deionized water)
- 3.1.7 โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3 , Ajax Finechem, Pty'Ltd, ออสเตรเลีย)
- 3.1.8 โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$ 99%, Fluka, Buchs, เยอรมัน)
- 3.1.9 อะซิโตน (Acetone, SR Lab, Thailand)
- 3.1.10 น้ำมันถั่วเหลือง (Soybean oil, Thanakorn Vegetable Oil Products Co.,Ltd, ไทย)
- 3.1.11 ตัวทำอิมัลชัน Span 80 (Fluka Chemika, สวิตเซอร์แลนด์)
- 3.1.12 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl Sulfoxide (DMSO), $(CH_3)_2SO$ = 78.13 g/mol, Riedel-de Haen[®], Sigma-Aldrich Laborchemikalien, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.13 กรดไฮโดรคลอริก (HCl; 36.5-38%, J.T. Baker, NJ, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.14 2, 4, 6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) (Nacalai Tesque, ญี่ปุ่น)
- 3.1.15 β -Alanine (Nacalai Tesque, Inc., ญี่ปุ่น)
- 3.1.16 เอทานอล (99.7-100%, VWR International Ltd., อังกฤษ)
- 3.1.17 โปรตีเอส XIV (Protease = 3.5 units/mg, Sigma-Aldrich, เยอรมัน)
- 3.1.18 โซเดียมเอไซด์ (NaN_3 Labchem, APS, ออสเตรเลีย)
- 3.1.19 บัฟเฟอร์ฟอสเฟต (PBS, pH 7.3-7.5, Bio basic Inc., แคนาดา)
- 3.1.20 Minimum Essential Medium powder (MEM; HyClone[®], Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.21 Penicillin/streptomycin antibiotic (100 units/ml, Hyclone, สหรัฐอเมริกา)

- 3.1.22 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.23 Trypsin-EDTA (0.25% trypsin with EDTA, Hyclone, Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.24 Trypan blue Stain 0.4% (Gibco, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.25 Fetal Bovine Serum (FBS; HyClone[®], Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.26 bisBenzimide fluorescent dye (Hoechst 33258, 1mg/ml DMSO, SigmaAldric, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.27 Sodium dodecyl sulfate lysis buffer (SDS, Bio basic, แคนาดา)
- 3.1.28 Fluorescein isothiocyanate dextran (FITC-Dextran 250, MW 250,000, Sigma-Aldric, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.29 Pentobarbital Sodium (Nembutal[®], CEVA SANTE ANEMALE, ฝรั่งเศส)

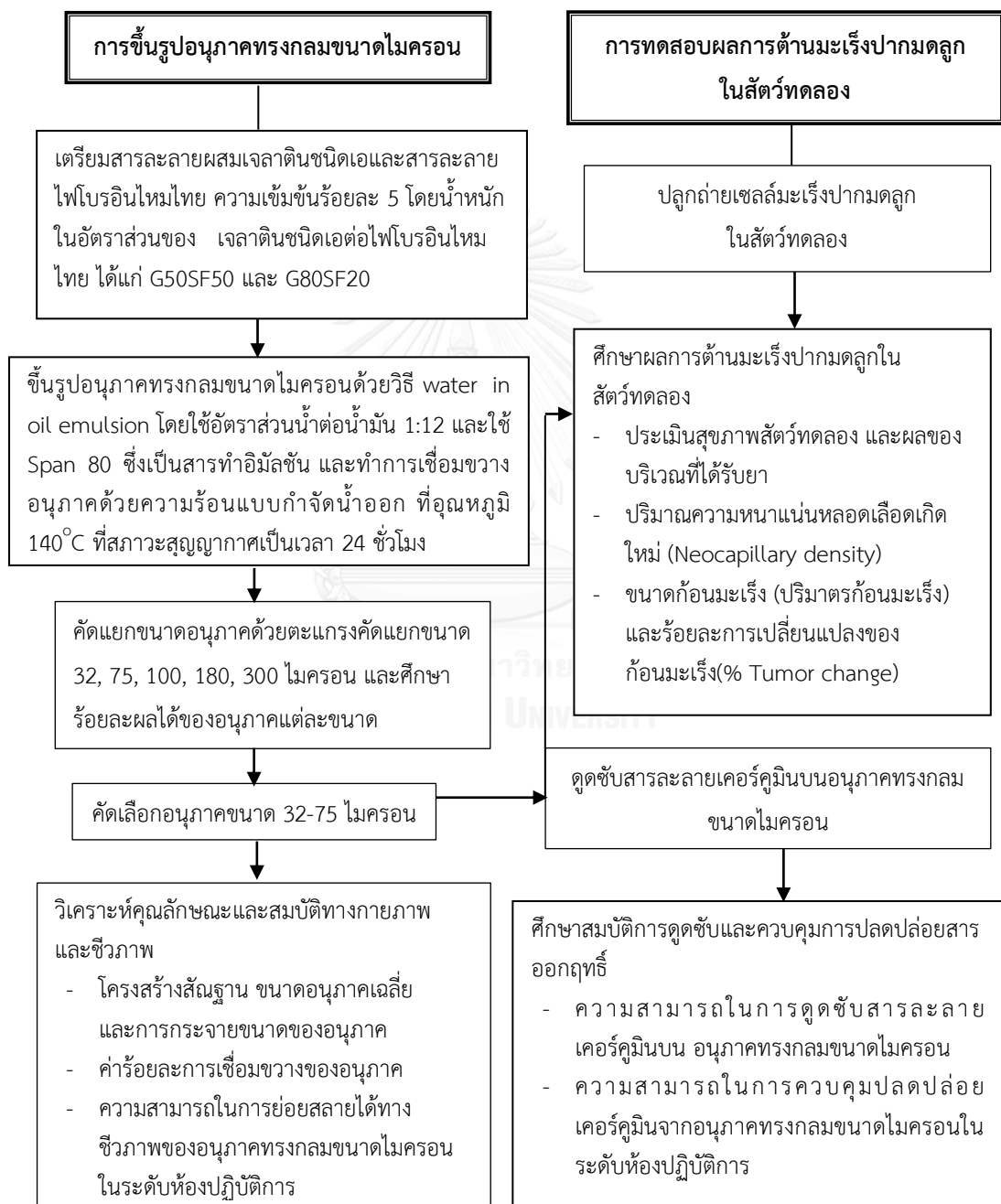
3.2 อุปกรณ์

- 3.2.1 Overhead stirrer (IKA Labortechnik, เยอรมัน)
- 3.2.2 Round bottom flask (Becthai, ไทย)
- 3.2.3 Hot plate stirrer (Cimarec 3, Thermolyne, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.4 Magnetic stirrer / Hot plate (RCT Basic, Ika labortechnik, เยอรมัน)
- 3.2.5 ตะแกรงคัดแยกขนาด (Osaka IIDA Co.Ltd, ญี่ปุ่น)
- 3.2.6 เครื่องปั่นเหวี่ยงสาร (Universal 320R, Hettich, เยอรมัน)
- 3.2.7 ตู้แช่ 4°C (NR-BU343, Panasonic, ไทย)
- 3.2.8 ตู้แช่แข็ง -20°C (Sandenintercool, ไทย)
- 3.2.9 ตู้แช่แข็ง -40°C (Haier, จีน)
- 3.2.10 ตู้แช่แข็ง -80°C (New Brunswick scientific, USA)
- 3.2.11 ตู้อบความร้อน (VD23, Binder, เยอรมัน)
- 3.2.11 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dry, CHRIST[®], เยอรมัน)
- 3.2.12 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (1235 PC, Shel-Lab, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.13 Autopipette (Eppendorf, เยอรมัน)

- 3.2.14 Micro centrifuge tube (Hycon Plastic, ไทย)
- 3.2.15 เครื่อง Microplate Reader (FLUOstar Omega, BMG LABTECH, เยอรมัน)
- 3.2.16 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, JSM-5410LV, JEOL Ltd., ญี่ปุ่น)
- 3.2.17 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope Nikon, Eclipse 80i, ญี่ปุ่น)
- 3.2.18 กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Confocal microscope, Eclipse E800, Nikon, ญี่ปุ่น)
- 3.2.19 กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Inverted Microscopes, Eclipse TS100, Nikon, ญี่ปุ่น)
- 3.2.20 ตู้ดูดความชื้น (SR Lab, ไทย)
- 3.2.19 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow Cabinet, ScanLaf, Mars 1800, เดนมาร์ก)
- 3.2.20 ตู้เพาะเชื้อบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ Incubator, Galaxy 170R, New Brunswick, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.21 กระบอกฉีดยา (1, 5, 10 ml, NIPRO, ญี่ปุ่น)
- 3.2.22 กระบอกฉีดยาอินซูลิน (0.5 ml (29G) x 12.7mm, BD Medical, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.23 กระบอกฉีดยาอินซูลิน (1 ml, (27G) x1/2", Terumo, ญี่ปุ่น)
- 3.2.24 24-well polystyrene tissue culture plates (Corning, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.25 96-well polystyrene tissue culture plates (Corning, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.26 Polystyrene tissue culture flask (Corning, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.27 Hemocytometer (Boeco, เยอรมัน)
- 3.2.28 Nonpyrogenic serological pipet (Costar[®], Corning, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.29 10 cm Tissue culture dish (Costar[®], Corning, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.30 Polyethylene tubing (I.D. 0.28 mm, O.D. 0.61 mm, Intramedic[®], Clay Adams, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.31 3-way stopcock (NIPRO, ญี่ปุ่น)

3.3 แผนผังการดำเนินงานวิจัย

การดำเนินงานวิจัยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ การขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน เจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกเชื่อมขวางด้วยความร้อน จากนั้นทำการดูดซับเคอร์คูมินบนอนุภาค และการทดสอบประสิทธิภาพการต้านมะเร็งของเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในสัตว์ทดลองที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง ดังสรุปได้ในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แผนผังการดำเนินงานวิจัย

3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การเตรียมสารละลายไฟโบรอิน ดำเนินการตามงานวิจัยเมื่อปี 2005 ของ Kim, U.J. และคณะ [42] โดยแบ่งเป็น 2 ชั้น ดังแสดงในรูปที่ 3.2

3.4.1.1 การกำจัดกาวไหม (เซรีซิน)

- 1) ชั่งรังไหมไทยพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 น้ำหนัก 40 กรัม โดยใช้รังไหมที่ผ่านการดั่งปุ๋ยไหมและตัวดักแต่อกแล้ว
- 2) ต้มรังไหมในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 0.02 โมลต่อลิตร ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที
- 3) ล้างรังไหมที่ต้มแล้วด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionized Water; DI) ประมาณ 4-5 ครั้ง เพื่อกำจัดกาวไหมและสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต
- 4) ทำซ้ำข้อ 2-3 อีก 1 ครั้ง
- 5) ผึ่งเส้นใยไหมที่ผ่านการกำจัดกาวไหมให้แห้งประมาณ 2 วัน และนำไปชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาร้อยละของเซรีซินที่หายไป
- 6) ฉีกเส้นใยไหมให้ฟูเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิว สำหรับเตรียมทำสารละลายไฟโบรอินต่อไป

3.4.1.2 การเตรียมสารละลายไฟโบรอิน

- 1) นำเส้นใยไหมที่กำจัดกาวไหมแล้วมาละลายในสารละลายลิเทียมโบรไมด์ (LiBr) ความเข้มข้น 9.3 โมลต่อลิตร ในอัตราส่วนไหม 8 กรัมต่อสารละลายลิเทียมโบรไมด์ 24 กรัม นำไปอบที่อุณหภูมิ 60°C ประมาณ 3-4 ชั่วโมง จนได้สารละลายไฟโบรอินที่มีลักษณะสีเหลืองคล้ายน้ำผึ้ง
- 2) นำสารละลายไฟโบรอินมาไดอะไลซ์ในน้ำปราศจากไอออน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน เพื่อกำจัดลิเทียมโบรไมด์ โดยเปลี่ยนน้ำที่เวลา 15 นาที, 35 นาที และ 55 นาทีในช่วงแรก จากนั้นเปลี่ยนน้ำวันละ 3 ครั้ง (เช้า กลางวัน เย็น)
- 3) นำสารละลายไฟโบรอินที่ผ่านการไดอะไลซ์แล้วไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 rpm, อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อน จากนั้นนำไปเก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C

4) ตรวจสอบความเข้มข้นของสารละลายไฟโบรอินโดยการอบให้แห้งเพื่อหาน้ำหนักของไฟโบรอิน ซึ่งสารละลายไฟโบรอินในน้ำที่ได้จะมีความเข้มข้นประมาณ 6.8-7.8% โดยน้ำหนัก



รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายไฟโบรอิน [42]

3.4.2 การเตรียมสารละลายเจลาติน

1. เตรียมสารละลายเจลาตินชนิดเอที่ชั่งน้ำหนักตามที่คำนวณ โดยแช่ในน้ำปราศจากไอออน เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เจลาตินพองตัวเต็มที่
2. ปั่นกวนที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง เพื่อให้ได้สารละลายที่เป็นเนื้อเดียวกัน

3.4.3 การขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่เตรียมจากเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอิน ไหมไทย

ขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนด้วยวิธีอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (Water-in-oil emulsion) ซึ่งดัดแปลงจากงานวิจัยในปี 2014 ของ Ratanavaraporn, J. และคณะ [15] ตามขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมวัฏภาคน้ำ (Aqueous phase or Disperse phase) โดยเตรียมสารละลายผสมระหว่างเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย 40 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของของแข็งรวมร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก ในอัตราส่วนผสมของเจลาตินชนิดเอต่อไฟโบรอินไหมไทย เท่ากับ G80SF20 และ G50SF50 โดยปั่นกวนที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้สารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกัน

2. เตรียมวัฏภาคน้ำมัน (Oil phase or Continuou phase) โดยเตรียมน้ำมันถั่วเหลืองปริมาตร 480 มิลลิลิตร ผสมกับตัวทำอิมัลชัน Span 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก ต่อปริมาตร และปั่นกวนที่อุณหภูมิ 40 °C ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3. เทวัฏภาคน้ำลงในวัฏภาคน้ำมัน ปั่นกวนที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 15 นาที จนเกิดสารละลายอิมัลชัน

4. ลดอุณหภูมิเป็น 4 °C อย่างรวดเร็ว โดยการใช้น้ำแข็งหล่อเย็นรอบภาชนะ และปั่นกวนต่อที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้สารละลายผสมระหว่างเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยเกิดการก่อตัวเป็นอนุภาคที่คงตัวในวัฏภาคน้ำมัน

5. เติมอะซิโตนเย็นปริมาตร 200 มิลลิลิตรและปั่นกวนต่อที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อช่วยล้างน้ำมันออกจากผิวอนุภาค

6. ล้างน้ำมันออกจากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนจนหมดด้วยอะซิโตนเย็นประมาณ 5-7 รอบ และคัดแยกขนาดอนุภาคด้วยตะแกรงคัดแยกขนาด 32, 75, 100, 180, 300 ไมครอน

7. ผึ่งให้แห้งในตู้เย็น 4 °C เป็นเวลา 1 คืน

8. ชั่งน้ำหนักและคำนวณร้อยละผลได้ของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ผ่านการคัดแยกขนาดด้วยตะแกรงแต่ละขนาด

3.4.4 การเชื่อมขวางอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนด้วยความร้อนแบบกำจัดน้ำออก

นำอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ผ่านการผึ่งแห้ง 4°C เป็นเวลา 1 คืน มาทำการเชื่อมขวางด้วยความร้อนแบบกำจัดน้ำออกโดยนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 140°C ที่สภาวะสุญญากาศเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4.5 การวิเคราะห์คุณลักษณะและสมบัติทางกายภาพ และชีวภาพของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน

3.4.5.1 การวิเคราะห์โครงสร้างพื้นฐานและขนาดเฉลี่ยของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน

วิเคราะห์โครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ผ่านตะแกรงคัดแยกขนาด 32-75 ไมครอน ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM, JSM-5410LV, JEOL Ltd., ญี่ปุ่น) โดยนำอนุภาคที่ได้มาวางบนแท่นเตรียมตัวอย่าง แล้วนำไปเคลือบด้วยทองเพื่อให้ชิ้นงานเกิดการนำไฟฟ้า แล้วส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 200, 1000 และ 5000 เท่า เพื่อดูรูปร่างและลักษณะพื้นผิวภายนอกของอนุภาค สำหรับการศึกษาลักษณะภายในอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน เนื่องจากอนุภาคที่มีขนาดเล็กสามารถเตรียมโดยการสับอนุภาคให้ละเอียดแล้วนำมาวางบนแท่นเตรียมตัวอย่าง และนำไปเคลือบทองเพื่อให้ชิ้นงานเกิดการนำไฟฟ้า แล้วส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดเพื่อดูภาพตัดขวางอนุภาคด้วยกำลังขยายเท่ากัน และนำภาพที่ได้มาวิเคราะห์รูปร่างและหาขนาดอนุภาคโดยใช้โปรแกรม Image J วัดขนาดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนทั้งหมด 50 อนุภาค และคำนวณหาขนาดอนุภาคเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.4.5.2 การวิเคราะห์ร้อยละการเชื่อมขวางของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนด้วยเทคนิค 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS)

ทดสอบร้อยละการเชื่อมขวางโดยการหาปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนด้วยเทคนิค 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) โดยดัดแปลงจากงานวิจัยในปี 1992 ของ Bubnis, W.A. และ Ofner, C.M. III [83] และ เมื่อปี 2014 ของ Ratanavaraporn, J. และคณะ [15] โดยนำอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ผ่านตะแกรงคัดแยกขนาด 32-75 ไมครอน น้ำหนัก 5 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติม

สารละลาย NaHCO_3 ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และสารละลาย TNBS ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง และนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย HCl ความเข้มข้นร้อยละ 37 โดยปริมาตร ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 1 คืน เพื่อให้อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนละลายอย่างสมบูรณ์ จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของ β -Alanine เพื่อหาปริมาณหมู่เอมีโนอิสระที่เหลืออยู่ในอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนและคำนวณร้อยละการเชื่อมขวางได้จากสูตร

$$\text{ร้อยละการเชื่อมขวาง} = \left[1 - \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ผ่านการเชื่อมขวาง}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ไม่ผ่านการเชื่อมขวาง}} \right] \times 100$$

3.4.5.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในระดับห้องปฏิบัติการ

ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพ อ้างอิงจากงานวิจัยในปี 2014 ของ Gil, E.S. และคณะ [84] โดยนำอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ผ่านตะแกรงคัดแยกขนาด 32-75 ไมครอน น้ำหนัก 5 มิลลิกรัม แช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (PBS) ที่มีค่า pH 7.4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ผสมกับสารละลายเอนไซม์ โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C โดยเปลี่ยนสารละลายทุกๆ 2 วัน และเก็บผลตามเวลาที่กำหนด ได้แก่ 1, 3, 7, 10 และ 14 วัน เมื่อครบกำหนดจึงนำอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนมาล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 3 รอบ จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง และชั่งน้ำหนักแห้งคงเหลือของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน จากนั้นคำนวณหาร้อยละของน้ำหนักแห้งคงเหลือของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนได้จากสูตร

$$\text{ร้อยละของน้ำหนักคงเหลือ} = \frac{W_f}{W_i} \times 100$$

โดยที่

Wf คือ น้ำหนักแห้งคงเหลือของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน หลังแช่ในสารละลาย เอนไซม์โปรติเอส XIV

Wi คือ น้ำหนักแห้งเริ่มต้นของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน ก่อนแช่ในสารละลายเอนไซม์ โปรติเอส XIV

3.4.6 การวิเคราะห์สมบัติการดูดซับและควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ของอนุภาค ทรงกลมขนาดไมครอน

3.4.6.1 ศึกษาความสามารถในการละลายและการดูดซับเคอร์คูมินบนอนุภาค ทรงกลมขนาดไมครอนในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำ ตามขั้นตอนดังนี้

1) เตรียมสารละลายเคอร์คูมินในตัวทำละลาย ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 4 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร โดยแบ่งกลุ่มตามตัวทำละลาย ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ละลายเคอร์คูมินในเอทานอลบริสุทธิ์

กลุ่มที่ 2 ละลายเคอร์คูมินในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำ ในสัดส่วน 90:10

กลุ่มที่ 3 ละลายเคอร์คูมินในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำ ในสัดส่วน 80:20

2) ชั่งอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ผ่านตะแกรงคัดแยกขนาด 32-75 ไมครอน น้ำหนัก 45 มิลลิกรัม และเติมสารละลายเคอร์คูมินที่เตรียมไว้ ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปแช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลาอย่างน้อย 12 ชั่วโมงในที่มืด เพื่อให้สารละลาย เคอร์คูมินถูกดูดซับบนอนุภาคทรงกลมอย่างเต็มที่

3) คัดสารละลายเคอร์คูมินออก และนำอนุภาคทรงกลมไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 °C อย่างน้อย 12 ชั่วโมง และนำไปผ่านกระบวนทำแห้งแบบเยือกแข็งเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4) ทดสอบความสามารถในการดูดซับสารออกฤทธิ์ของอนุภาคทรงกลมขนาด ไมครอนโดยนำอนุภาคทรงกลมที่ดูดซับเคอร์คูมินเรียบร้อยแล้ว 4 หลอด หลอดละ 5 มิลลิกรัม มาเติมด้วยสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) เพื่อละลายเคอร์คูมินที่ดูดซับ บนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว คลื่น 430 นาโนเมตร

5) เปลี่ยนสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ใหม่ แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของ เคอร์คูมินเช่นเดิม

6) ทำซ้ำข้อ 5 จนกว่าสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์จะละลายเคอร์คูมินออกหมด

7) คำนวณหาร้อยละน้ำหนักเคอร์คูมินบนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน (%Drug loading) และประสิทธิภาพในการดักจับเคอร์คูมินบนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน (Entrapment efficiency) ได้จากสูตร

ร้อยละน้ำหนักเคอร์คูมินบนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน (%Drug loading) =

$$\frac{\text{น้ำหนักเคอร์คูมินทั้งหมดที่ตรวจวัดได้}}{\text{น้ำหนักเคอร์คูมินทั้งหมดที่ตรวจวัดได้} + \text{น้ำหนักอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน}} \times 100$$

ประสิทธิภาพในการดักจับเคอร์คูมินบนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน (Entrapment efficiency) =

$$\frac{\text{น้ำหนักเคอร์คูมินทั้งหมดที่ตรวจวัดได้}}{\text{น้ำหนักเคอร์คูมินเริ่มต้นที่ใช้ในการดักจับ}} \times 100$$

จากนั้นคัดเลือกกลุ่มที่มีการดักจับเคอร์คูมินบนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนมากที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.4.6.2 ศึกษาความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินจากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในระดับห้องปฏิบัติการ

ทำการทดสอบความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยจากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ โดยดำเนินการตามงานวิจัยในปี พ.ศ. 2557 ของปิยะรัตน์ [85] ตามขั้นตอน ดังนี้

1) นำอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ดักจับเคอร์คูมิน ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เรียบร้อยแล้ว ปริมาณ 5 มิลลิกรัม แช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (PBS) ที่มีค่า pH 7.4 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร สารละลาย Fetal Bovine Serum (FBS) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร เพื่อช่วยรักษาความเสถียรของเคอร์คูมิน และโซเดียมเอไซด์ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

2) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเก็บผลตามช่วงเวลา คือ 1, 2, 3, 4, 6, 10, 16, 24, 32, 48, 72 และ 168 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายมาวัดค่าการดูดกลืนแสงของเคอร์คูมิน ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร และดูดสารละลายที่เหลือออกให้

หมดแล้วเติมสารละลายบัฟเฟอร์ ฟอสเฟต (PBS) ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 7.4 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยสารละลาย Fetal Bovine Serum (FBS) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และโซเดียมเอไซด์ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในปริมาตรเท่าเดิมลงไปทดแทน จากนั้นคำนวณหาปริมาณร้อยละการปลดปล่อยสะสมของเคอร์คูมิน จากสูตร

$$C_i = \sum_{i=0}^t M_i$$

$$\text{ร้อยละการปลดปล่อยสะสม} = \frac{C_i}{C_t} \times 100$$

โดยที่

C_i คือ ปริมาณของเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยสะสมในแต่ละช่วงเวลา

M_i คือ ปริมาณของเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยที่ช่วงเวลา i

C_t คือ ปริมาณของเคอร์คูมินที่ถูกดูดซับได้จริงบนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน

3.4.7 การศึกษาผลการต้านมะเร็งในสัตว์ทดลองของเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน

ดำเนินการทดลองโดยดัดแปลงจากงานวิจัยในปี 2009 ของ Lertworapreecha, M. และคณะ [86] และปี 2014 ของ Yoysungnoen-Chintana, P. และคณะ [10] ดังนี้

1) การเตรียมสัตว์ทดลองก่อนปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง

ดำเนินการวิจัยโดยใช้หนูถีบ (nude mice BALB/c) เพศเมีย น้ำหนักประมาณ 20 ± 5 กรัม อายุ 6-8 สัปดาห์ จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยสัตว์ทดลองจะถูกเลี้ยงตามแนวทางปฏิบัติของ Home office guidelines on the scientific use of animal (Scientific procedures) Act 1986 ในห้องควบคุมเชื้อ (Strictly Hygienic Conventional) ที่อาคารพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โดยมีการควบคุมสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ได้แก่ อุณหภูมิ 25 ± 2 °C ความชื้นสัมพัทธ์ $60 \pm 10\%$ วงจรการให้แสง 12 ชั่วโมงสว่าง 12 ชั่วโมงมืด มีการถ่ายเทอากาศเพียงพอ มีการดูแลให้

อาหารและน้ำ และปฏิบัติกับสัตว์ทดลองตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองของสภาวิจัยแห่งชาติ พ.ศ. 2542

2) การปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งในสัตว์ทดลอง

ปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูก (human cervical carcinoma cell line; CaSki cell) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากภาคจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้เซลล์มะเร็งปากมดลูกจำนวน 10×10^6 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Minimum Essential Media (MEM) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทางใต้ผิวหนัง (subcutaneous) บนหลังบริเวณ dorsal skin-fold chamber จำนวน 15 ตัว และทำการชั่งน้ำหนัก และวัดขนาดก้อนมะเร็งทุกๆ 3-4 วัน โดยใช้เวอร์เนียคาลิเปอร์และคำนวณปริมาตรก้อนมะเร็ง (tumor volume) จากสูตร [10]

$$\text{ปริมาตรก้อนมะเร็ง (tumor volume)} = a^2 \times b \times 0.52$$

โดยที่

a คือ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่สั้นที่สุดของก้อนมะเร็ง

b คือ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่ยาวที่สุดของก้อนมะเร็ง

ภายหลังการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกเป็นเวลาประมาณ 1 เดือน จะพบก้อนมะเร็งมีปริมาตรประมาณ 70-100 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

3) การศึกษาผลการต้านมะเร็งในสัตว์ทดลองของเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน

หนูชนิดที่ถูกปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกเป็นเวลาประมาณ 1 เดือน และมีก้อนมะเร็งมีปริมาตร 70-100 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ออกเป็น 5 กลุ่ม (n=3) โดยแยกเลี้ยง และแบ่งเป็นกลุ่มย่อยดังนี้

กลุ่มที่ 1 (Control) ฉีดสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (PBS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

กลุ่มที่ 2 (Blank-G50SF50) ฉีดอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนชนิด G50SF50 ขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (PBS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

กลุ่มที่ 3 (Blank-G80SF20) ฉีดอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนชนิด G80SF20 ขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (PBS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

กลุ่มที่ 4 (G50SF50-Cur treatment) ฉีดอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนชนิด G50SF50 ซึ่งผ่านการดูดซับสารละลายเคอร์คูมินที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำ ในสัดส่วน 8:2 ขนาด ขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (PBS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร (คิด เป็นปริมาณเทียบเท่าของเคอร์คูมินประมาณ 79 ไมโครกรัม)

กลุ่มที่ 5 (G80SF20-Cur treatment) ฉีดอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนชนิด G80SF20 ซึ่งผ่านการดูดซับสารละลายเคอร์คูมินที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำ ในสัดส่วน 8:2 ขนาด ขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (PBS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร (คิด เป็นปริมาณเทียบเท่าของเคอร์คูมินประมาณ 53 ไมโครกรัม)

โดยหนูแต่ละกลุ่มจะถูกฉีดยาตั้งกล่าวเข้าทางใต้ผิวหนัง (subcutaneous) ที่ บริเวณใกล้เคียงกับก้อนมะเร็ง ทุกๆ 7 วัน เป็นจำนวน 4 ครั้ง (ภายในระยะเวลา 28 วัน)

ศึกษาผลการต้านมะเร็งของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ดูดซับเคอร์คูมิน โดย เปรียบเทียบกลุ่มการทดลอง ดังนี้

- สุขภาพของสัตว์ทดลอง และผลของบริเวณที่มีการใช้ยา โดยการสังเกตและ ถ่ายภาพ

- ขนาดก้อนมะเร็งวัดจากภายนอก โดยจะทำการวัดขนาดของก้อนมะเร็งทุกๆ 3 วัน ตลอดการทดลองโดยใช้เวอร์เนียคาลิเปอร์ จากนั้นทำการคำนวณหาปริมาตรของ ก้อนมะเร็งและคำนวณร้อยละการเปลี่ยนแปลงของก้อนมะเร็ง (% Tumor change) จาก สูตร

$$\text{ร้อยละการเปลี่ยนแปลงของก้อนมะเร็ง (\% Tumor change)} = \left[1 - \frac{TVn}{TVo} \right] \times 100$$

โดยที่

TV_n คือ ปริมาตรก้อนมะเร็ง (tumor volume) ในแต่ละช่วงเวลาภายหลังการฉีด
 ทรินทเมนต์ (treatment) กลุ่มต่างๆ

TV_0 คือ ปริมาตรก้อนมะเร็ง (tumor volume) เริ่มต้นเมื่อทำการฉีดทรินทเมนต์
 (treatment) กลุ่มต่างๆ

- ความหนาแน่นของหลอดเลือดที่เกิดขึ้นใหม่ (neocapillary density; NCD) วัด
 จำนวนเส้นเลือดและขนาดก้อนมะเร็งในบริเวณที่ปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งใน dorsal chamber
 เมื่อทำการทดลองจนครบกำหนด โดยใช้วิธี Intravital fluorescence videomicroscopy
 โดยเริ่มแรกจะทำการฉีดยาสลบ (Sodium pentobarbital: 50 มิลลิกรัม/100 กรัมของ
 น้ำหนักตัวหนูทดลอง) เข้าช่องท้องของหนู จากนั้นทำการสอดสายสวนหลอดเลือด
 (catheter) เข้าไปในหลอดเลือดดำที่บริเวณคอ (jugular vein) ของหนูทดลอง และทำการ
 ฉีดสารเรืองแสง 5% fluorescein isothiocyanate-labeled dextran (FITC-dextran)
 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เข้าไปภายหลัง จากนั้นทำการขึงก้อนมะเร็งที่บริเวณหลังโดยการตรึง
 บนแผ่นซีฟิ่ง และดูหลอดเลือดผ่านกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ และบันทึกภาพหลอด
 เลือด เพื่อนำมาคำนวณความหนาแน่นของหลอดเลือดที่เกิดขึ้นใหม่ โดยใช้โปรแกรม Image-
 Pro Plus 6.0 จากสูตร

$$\text{ร้อยละความหนาแน่นของหลอดเลือดที่เกิดขึ้นใหม่} = \frac{\text{ผลรวมพื้นที่หลอดเลือดเกิดขึ้นใหม่}}{\text{พื้นที่ภาพทั้งหมด}} \times 100$$

เมื่อเสร็จสิ้นการทดลอง ซากหนูทดลองจะถูกนำไปทำลายโดยการเผาซากสัตว์ต่อไป

3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

งานวิจัยนี้จะเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของข้อมูล โดยนำมาหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบน
 มาตรฐาน จากนั้นวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติใช้ One-way analysis of variance (ANOVA)
 ด้วยโปรแกรมมินิแทบ (Minitab system for Windows version 14) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p-
 value < 0.05)

3.6 ปัญหาทางจริยธรรม

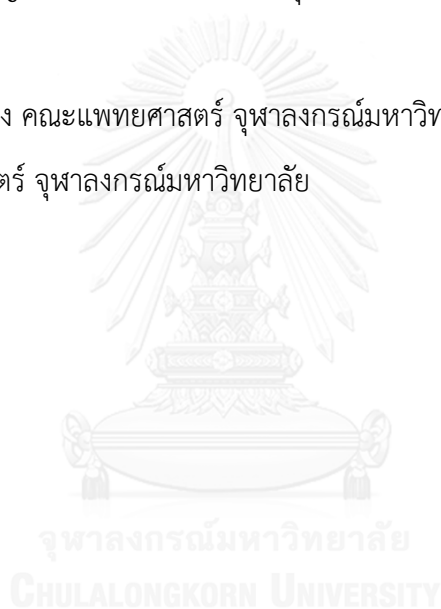
การวิจัยในสัตว์ทดลองจะดำเนินการตามมาตรฐานการดูแลและใช้สัตว์ทดลอง Home office guideline on the scientific use of animal (Scientific procedure) Act 1986 โดยมีการขออนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลและใช้สัตว์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ใบรับรองการอนุมัติ เลขที่ 016/2558 แสดงในภาคผนวก ฉ

3.7 สถานที่ทำงานวิจัย

- ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางหลอดเลือดจลภาค ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- ศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



บทที่ 4

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนระหว่างเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย ด้วยวิธีอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (Water-in-oil emulsion) และนำไปเชื่อมขวางด้วยความร้อนแบบก้ำจัดน้ำออกที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปศึกษาสมบัติทางกายภาพและชีวภาพ ตลอดจนความสามารถในการดูดซับและควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์เคอร์คูมิน และผลการต้านมะเร็งในสัตว์ทดลองของเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน โดยผลการศึกษาแสดงดัง รายละเอียดในหัวข้อต่อไป

4.1 สมบัติของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่เตรียมจากเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทย

ในขั้นการศึกษาวิจัยเริ่มต้น (Preliminary study) เพื่อให้ได้อนุภาคขนาดเล็กกว่า 100 ไมครอนและมีปริมาณมากเพียงพอกับการนำไปศึกษาวิจัยในขั้นต่อไป ทางผู้วิจัยได้เริ่มต้นขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมโดยดัดแปลงจากงานวิจัยในปี 2014 ของ Ratanavaraporn, J. และคณะ[14] โดยใช้สารละลายผสมเจลาติน (G) และไฟโบรอินไหมไทย (SF) ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักในอัตราส่วนผสมของเจลาตินชนิดเอต่อไฟโบรอินไหมไทย เท่ากับ G80SF20 และ G50SF50 และขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมด้วยวิธีอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันโดยปราศจากการเติมสารทำอิมัลชัน โดยใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำต่อน้ำมัน เท่ากับ 40:480 (1:12) และทำให้วัฏภาคน้ำแตกตัวเป็นอนุภาคขนาดเล็กกระจายตัวในวัฏภาคน้ำมันด้วยเครื่องปั่นผสมความเร็วรอบสูง (homogenizer) ที่ความเร็วรอบ 3400-5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แทนการใช้ใบพัดในการปั่นกวน พบว่า เกิดการเจลของเส้นใยไฟโบรอินเกาะอยู่บริเวณรอบหัวปั่นผสม และไม่เกิดเป็นอนุภาคขนาดเล็กตามที่ต้องการ ต่อมาจึงทดลองขึ้นรูปอนุภาคโดยใช้ใบพัดในการปั่นกวน ที่ความเร็วรอบ 300 และ 400 รอบต่อนาที ที่ความเข้มข้นผสมสารละลายผสมของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยเป็นร้อยละ 5 และ 10 โดยน้ำหนัก โดยใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำต่อน้ำมัน เท่ากับ 40:480 (1:12) และเติม Span 80 ซึ่งเป็นสารทำอิมัลชัน [56] ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5-1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารละลายผสมร้อยละ 5 ในสภาวะที่มีการเติมสารทำอิมัลชันความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และทำการปั่นกวนที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที ให้ค่าร้อยละผลได้ของอนุภาคขนาดเล็กกว่า 100 ไมครอนในปริมาณมาก ดังนั้นจึงได้เลือกสภาวะนี้มาทำการศึกษาวิจัยในขั้นต่อไปและ

นำไปเชื่อมขวางด้วยความร้อนแบบก้ำจัดน้ำออกที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีผลการศึกษาดังนี้

4.1.1 ร้อยละผลได้ทั้งหมดและขนาดของอนุภาคทรงกลม

ร้อยละผลได้ทั้งหมดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทยเป็นปัจจัยสำคัญในการเลือกอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนมาใช้ในงานวิจัย โดยงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาผลของอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทย และการเติมสารทำอิมัลชันที่มีต่อร้อยละผลได้ทั้งหมดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่เตรียมได้ โดยแสดงผลการศึกษาในตารางที่ 4.1 เมื่อพิจารณาผลของการเติมสารทำอิมัลชันในแต่ละอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทยที่มีต่อร้อยละผลได้ทั้งหมดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน พบว่า ร้อยละผลได้ทั้งหมดของอนุภาคทรงกลมที่ขนาดใหญ่กว่า 32 ไมครอนที่มีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทยเท่ากับ G50SF50 มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเติมสารทำอิมัลชัน อาจเป็นผลมาจากสารทำอิมัลชันที่เติมลงไปในช่วงขั้นตอนการเตรียมอนุภาคทรงกลมช่วยลดแรงตึงผิวของสารละลายผสม จึงทำให้ก่อตัวเป็นอนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่า 32 ไมครอนเป็นจำนวนมาก และเมื่อทำการคัดแยกขนาดอนุภาคในสภาวะเปียกด้วยตะแกรงคัดแยกขนาด 32 ไมครอน จึงทำให้อนุภาคขนาดเล็กหลุดลอดผ่านตะแกรงคัดแยกได้ ส่งผลให้ร้อยละผลได้ทั้งหมดของอนุภาคทรงกลมชนิด G50SF50 มีค่าน้อย แต่เมื่อพิจารณาผลของอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทยในแต่ละกลุ่มที่มีการเติมและไม่เติมสารทำอิมัลชันที่มีต่อร้อยละผลได้ทั้งหมดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน พบว่า ร้อยละผลได้ทั้งหมดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในทุกอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทั้งในกลุ่มที่มีการเติมและไม่เติมสารทำอิมัลชัน

ตารางที่ 4.1 ร้อยละผลได้ทั้งหมดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทยขนาดใหญ่มากกว่า 32 ไมครอนที่เตรียมได้โดยการเติมและไม่เติม Span 80 (สารทำอิมัลชัน)

ตัวอย่าง	สารทำอิมัลชัน	ร้อยละผลได้ทั้งหมดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเทียบกับปริมาณโปรตีนรวมที่ใช้
G80SF20	ไม่เติม	98.1 ± 2.3 ^{a,d}
	เติม	92.7 ± 4.6 ^{a,e}
G50SF50	ไม่เติม	93.5 ± 3.2 ^{b,d}
	เติม	81.8 ± 4.7 ^{c,e}

(a, b, c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของร้อยละผลได้ทั้งหมดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ผลิตได้ โดยเปรียบเทียบการเติมและไม่เติมสารทำอิมัลชันในการเตรียมอนุภาคทรงกลมที่มีอัตราส่วนการผสมของเจลาตินชนิดเอต่อไฟโบรอินไหมไทยเดียวกัน)

(d, e แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของร้อยละผลได้ทั้งหมดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ผลิตได้ โดยเปรียบเทียบการเติมหรือไม่เติมสารทำอิมัลชันในการเตรียมอนุภาคทรงกลมที่มีอัตราส่วนการผสมของเจลาตินชนิดเอต่อไฟโบรอินไหมไทยต่างกัน)

ขนาดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทยเป็นปัจจัยหนึ่งในการเลือกอนุภาคทรงกลมไปใช้งาน ซึ่งอนุภาคทรงกลมควรมีการกระจายตัวของขนาดในช่วงแคบและมีขนาดสม่ำเสมอ ในงานวิจัยนี้จึงนำอนุภาคทรงกลมเปียกที่เตรียมได้ในตารางที่ 4.1 มาทำการคัดแยกขนาดภายหลังการผึ่งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยแบ่งออกเป็น 6 ขนาด คือ ขนาดใหญ่กว่า 300 ไมครอน, 180-300 ไมครอน, 100-180 ไมครอน, 75-100 ไมครอน, 32-75 ไมครอนและขนาดเล็กกว่า 32 ไมครอน ผลการคัดแยกขนาดแสดงในตารางที่ 4.2 ซึ่งพบว่าภายหลังการผึ่งอนุภาคทรงกลมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อนุภาคจะมีการหดตัวลงกว่าในสภาวะเปียกเล็กน้อย และทำให้พบอนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่า 32 ไมครอนได้บางส่วน ทั้งนี้อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนทั้งสองอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอิน

ไหมไทยที่ได้จากการเตรียมโดยปราศจากการเติมสารทำอิมัลชัน มีร้อยละผลได้ของอนุภาคทรงกลมที่มีขนาดมากกว่า 300 ไมครอน (มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของอนุภาคที่เตรียมได้ทั้งหมด) รองลงมาคือ อนุภาคทรงกลมที่มีขนาดอยู่ในช่วง 180-300 ไมครอน, 100-180 ไมครอน, 75-100 ไมครอน, 32-75 ไมครอน และขนาดอนุภาคเล็กกว่า 32 ไมครอน ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาผลของการเติมสารทำอิมัลชันในแต่ละอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทย พบว่า เมื่อเติมสารทำอิมัลชัน ร้อยละผลได้ของอนุภาคทรงกลมที่มีขนาดมากกว่า 300 ไมครอน มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทยเท่ากับ G80SF20 และ G50SF50 มีค่าร้อยละผลได้เท่ากับ 30.1 ± 13.2 และ 12.9 ± 5.0 ตามลำดับ และอนุภาคทรงกลมที่มีขนาดอยู่ในช่วง 32-75 ไมครอน มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทยเท่ากับ G80SF20 และ G50SF50 มีค่าร้อยละผลได้เท่ากับ 46.1 ± 10.6 และ 55.3 ± 6.1 ตามลำดับ ซึ่งเป็นผลมาจากสารทำอิมัลชัน (Span 80) ที่เติมลงในขั้นตอนการเตรียมอนุภาคทรงกลมช่วยลดแรงตึงผิวของของวิญภาคน้ำ (สารละลายผสมระหว่างเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย) และน้ำมัน เมื่อเริ่มต้นกระบวนการปั่นกวนอิมัลชัน วิญภาคน้ำจะก่อตัวเป็นอนุภาคขนาดเล็กๆ ที่คงตัวในวิญภาคน้ำมัน ซึ่งการเติมสารทำอิมัลชันในระบบจะทำให้อิมัลชันมีความคงตัวมากขึ้น อนุภาคมีขนาดเล็กลง

ในปี 2014 Ratanavaraporn, J. และคณะ [15] ได้ขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนผสมระหว่างเจลาตินและไฟโบรอินที่อัตราส่วนการผสม เท่ากับ 100/0, 70/30, 50/50 และ 30/70 เพื่อประยุกต์ใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินและ/หรือ ไพเพอรีน โดยขึ้นรูปด้วยวิธีอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันโดยปราศจากการเติมสารทำอิมัลชัน และเตรียมสารละลายผสมเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทยที่ความเข้มข้นของของแข็งรวมร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก และปั่นกวนด้วยความเร็วรอบที่ 350 รอบต่อนาที และทำการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ จากการศึกษาพบว่าอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนระหว่างไฟโบรอินและเจลาตินในสภาวะแห้งและบวมน้ำมีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 194-217 ไมครอน และ 297-367 ไมครอน ตามลำดับ นอกจากนี้ในปี พ.ศ. 2557 สวรรยา [87] ได้ศึกษาการพัฒนาอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนจากเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทยเพื่อประยุกต์ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งแบบสามมิติ โดยเตรียมอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนด้วยวิธีอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันโดยปราศจากการเติมสารทำอิมัลชัน และเตรียมสารละลายผสมเจลาติน

ชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทยที่ความเข้มข้นของของแข็งรวมร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ในอัตราส่วนผสมของเจลาตินชนิดเอต่อไฟโบรอินไหมไทย เท่ากับ 100/10, 90/10, 70/30 และ 50/50 และใช้ความเร็วรอบในการปั่นกวนที่แตกต่างกัน เพื่อให้มีค่าร้อยละผลได้ของขนาดเฉลี่ยประมาณ 70-90 ได้แก่ ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เพื่อให้ได้อนุภาคขนาดเล็ก (316.78 ± 13.23 ไมครอน) ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที เพื่อให้ได้อนุภาคขนาดกลาง (555.66 ± 23.58 ไมครอน) และ ความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที เพื่อให้ได้อนุภาคขนาดใหญ่ (736.64 ± 17.51 ไมครอน) และทำการเชื่อมขวางอนุภาคด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์หรือความร้อนแบบกำจัดน้ำออกที่สภาวะสุญญากาศ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การเตรียมอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนด้วยวิธีอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันโดยปราศจากการเติมสารทำอิมัลชัน และใช้ความเร็วรอบต่ำในการปั่นกวนอิมัลชัน จะทำให้อนุภาคมีขนาดใหญ่กว่า 300 ไมครอน และมีค่าร้อยละผลได้ของอนุภาคสูง

ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะนำอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทยมาประยุกต์ใช้เป็นระบบนำส่งเคอร์คูมินที่สามารถฉีดผ่านหัวเข็มได้เพื่อใช้ในการทดสอบผลการต้านมะเร็งในสัตว์ทดลอง โดยอนุภาคทรงกลมที่เตรียมได้ควรมีขนาดที่สามารถฉีดผ่านหัวเข็มทางการแพทย์ ขนาด 27G (0.41×12.7 มิลลิเมตร) ได้เป็นอย่างดี จากการทดลองพบว่า ขนาดอนุภาคในช่วง 32-75 ไมครอน สามารถฉีดผ่านหัวเข็มฉีดยาขนาดดังกล่าวได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกอนุภาคทรงกลมที่มีขนาดช่วง 32-75 ไมครอน ในทุกอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนัก ซึ่งเป็นขนาดที่มีร้อยละผลได้ของอนุภาคมากที่สุดกรณีใช้สารทำอิมัลชัน โดยนำมาเชื่อมขวางด้วยความร้อนแบบกำจัดน้ำออกที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส สภาวะสุญญากาศเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้อนุภาคที่ได้มีอัตราการย่อยสลายเร็วกว่าการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ [15] วิเคราะห์ขนาดโครงสร้างพื้นฐาน อนุภาคเฉลี่ย สมบัติต่างๆของอนุภาคทรงกลมที่ผลิตได้ ตลอดจนความสามารถในการดูดซับและควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์เคอร์คูมิน เพื่อนำไปทดสอบผลการต้านมะเร็งในสัตว์ทดลองในขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.2 ร้อยละผลได้ภายหลังการคัดแยกขนาดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทย ในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ที่เตรียมได้จากการเติมและไม่เติม Span 80 ซึ่งเป็นสารทำอิมัลชัน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

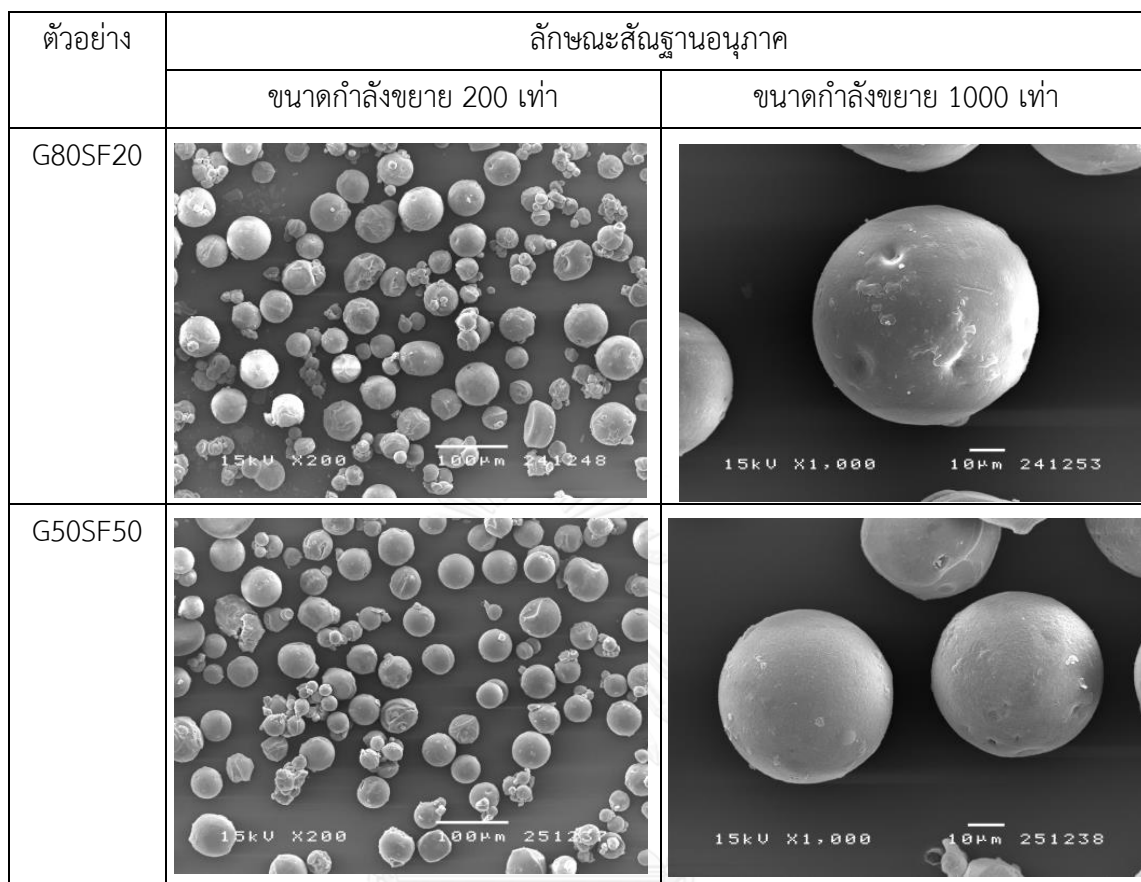
ตัวอย่าง	สารทำอิมัลชัน	ร้อยละผลได้ของอนุภาคในช่วงขนาดอนุภาคต่าง ๆ					
		ขนาดใหญ่กว่า 300 μm	ขนาด 180-300 μm	ขนาด 100-180 μm	ขนาด 75-100 μm	ขนาด 32-75 μm	ขนาดเล็กกว่า 32 μm
G80SF20	ไม่เติม	84.7 \pm 1.4 ^{a,c}	7.3 \pm 0.5 ^{a,c}	5.8 \pm 0.9 ^{a,c}	1.4 \pm 0.4 ^{a,c}	0.7 \pm 0.2 ^{a,c}	0.1 \pm 0.1 ^{a,c}
	เติม	30.1 \pm 13.2 ^{b,c}	5.0 \pm 1.1 ^{a,c}	6.4 \pm 1.8 ^{a,c}	4.6 \pm 2.3 ^{a,c}	46.1 \pm 10.6 ^{b,c}	7.9 \pm 5.6 ^{b,c}
G50SF50	ไม่เติม	73.8 \pm 0.6 ^{a,d}	22.7 \pm 1.1 ^{a,d}	1.7 \pm 0.3 ^{a,d}	0.9 \pm 0.3 ^{a,c}	0.8 \pm 0.1 ^{a,c}	0.1 \pm 0.0 ^{a,c}
	เติม	12.9 \pm 5.0 ^{b,c}	3.2 \pm 0.5 ^{b,c}	5.3 \pm 0.4 ^{b,c}	2.3 \pm 0.2 ^{b,c}	55.3 \pm 6.1 ^{b,c}	21.1 \pm 1.8 ^{b,d}

(a,b แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลร้อยละผลได้ของอนุภาคในช่วงขนาดต่าง ๆ โดยเปรียบเทียบการเติมและไม่เติมสารทำอิมัลชันในการเตรียมอนุภาคทรงกลมที่มีขนาดเท่ากันที่อัตราส่วนการผสมของเจลาตินชนิดเอต่อไฟโบรอินไหมไทยเดียวกัน)

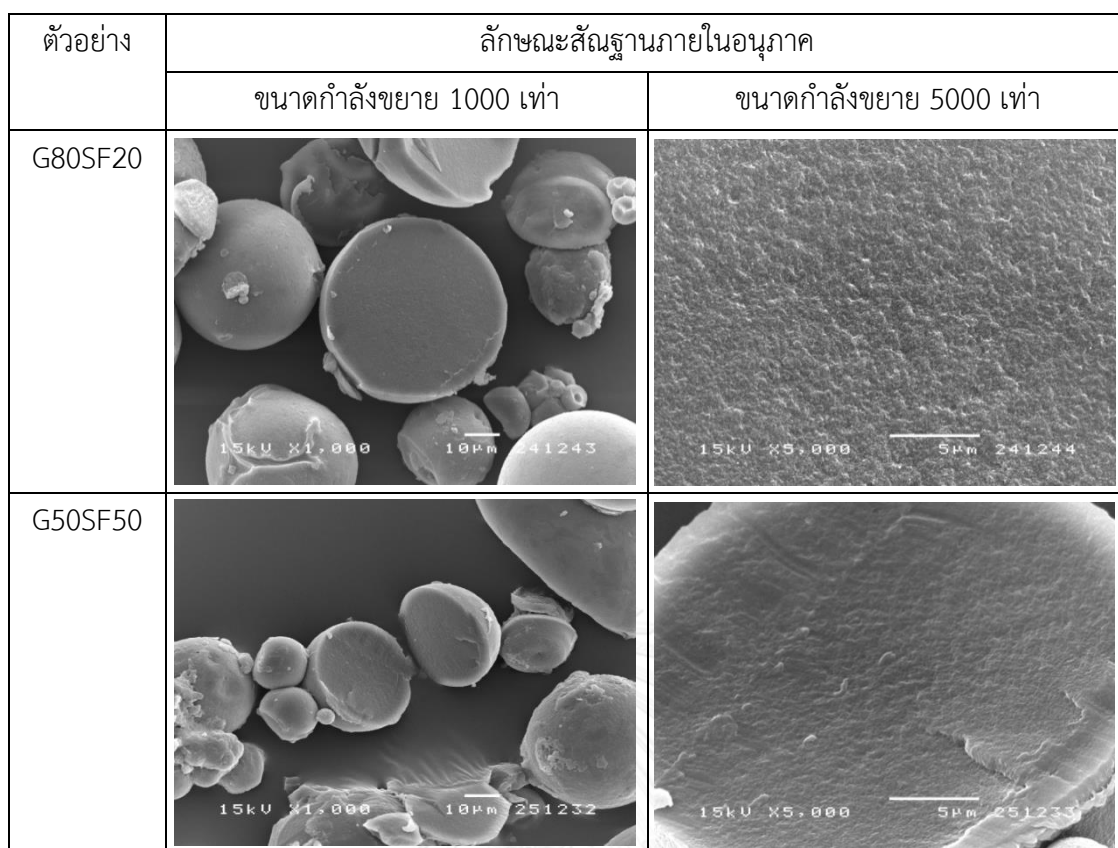
(c,d แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลร้อยละผลได้ของอนุภาคในช่วงขนาดต่าง ๆ โดยเปรียบเทียบการเติมหรือไม่เติมสารทำอิมัลชันในการเตรียมอนุภาคทรงกลมที่มีขนาดเท่ากันที่อัตราส่วนการผสมของเจลาตินชนิดเอต่อไฟโบรอินไหมไทยต่างกัน)

4.1.2 โครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน

การศึกษาโครงสร้างพื้นฐานและลักษณะพื้นผิวของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของ เจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทยที่อัตราส่วนการผสมต่างๆ ที่ผ่านการคัดแยกขนาดอยู่ในช่วง 32-75 ไมครอน ซึ่งถูกเชื่อมขวางด้วยความร้อนแบบกำจัดน้ำออกและนำมาวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy, SEM) แสดงผลในรูปที่ 4.1 ซึ่งแสดงให้เห็นพื้นผิวภายนอกอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน จากลักษณะโครงสร้างพื้นฐานดังกล่าวพบว่าอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทยทุกอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนัก ซึ่งถูกเชื่อมขวางด้วยความร้อนแบบกำจัดน้ำออก มีลักษณะเป็นทรงกลม พื้นผิวค่อนข้างเรียบ และเมื่อทำการตัดขวางอนุภาคเพื่อดูโครงสร้างพื้นฐานภายใน ดังแสดงในรูปที่ 4.2 พบว่าอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ได้มีลักษณะเป็นทรงกลมตัน ไม่มีรูพรุน ซึ่งอาจเกิดจากความเข้มข้นของสารละลายผสมระหว่างเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทยที่นำมาเตรียมเป็นอนุภาคทรงกลมมีความเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก ทำให้โครงสร้างภายในมีความความหนาแน่นสูง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในปี พ.ศ. 2557 ของ สวรรยา [87] สำหรับการวิเคราะห์ขนาดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนซึ่งถูกเชื่อมขวางอนุภาคด้วยความร้อนแบบกำจัดน้ำออก ซึ่งสุ่มอนุภาคจำนวน 50 อนุภาคมาวัดด้วยโปรแกรม Image J และหาขนาดเฉลี่ยจากการวัด ผลการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 4.3 พบว่าอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่มีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทยเท่ากับ G80SF20 และG50SF50 มีขนาดเฉลี่ยอยู่ 50.3 ± 8.5 และ 47.9 ± 5.6 ตามลำดับ



รูปที่ 4.1 ลักษณะโครงสร้างสัณฐานของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินเอและไฟโบรอินไหมไทยที่มีขนาดอนุภาคในช่วง 32-75 ไมครอน ในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ซึ่งถูกเชื่อมขวางอนุภาคด้วยความร้อนแบบกึ่งอัตโนมัติ ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ขนาดกำลังขยาย 200 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 100 ไมครอน) และขนาดกำลังขยาย 1,000 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมครอน)



รูปที่ 4.2 ลักษณะสัณฐานภายในของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินเอและไฟโบรอินไหมไทยที่มีขนาดอนุภาคในช่วง 32-75 ไมครอน ในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ซึ่งถูกเชื่อมขวางอนุภาคด้วยความร้อนแบบกำจัดน้ำออก ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ขนาดกำลังขยาย 1000 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมครอน) และขนาดกำลังขยาย 5,000 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมครอน)

ตารางที่ 4.3 ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินเอและไฟโบรอินไหมไทยที่ผ่านการตัดแยกขนาดด้วยตะแกรงตัดแยกขนาด 32 และ 75 ไมครอน และนำมาเชื่อมขวางอนุภาคด้วยความร้อนแบบกำจัดน้ำออก

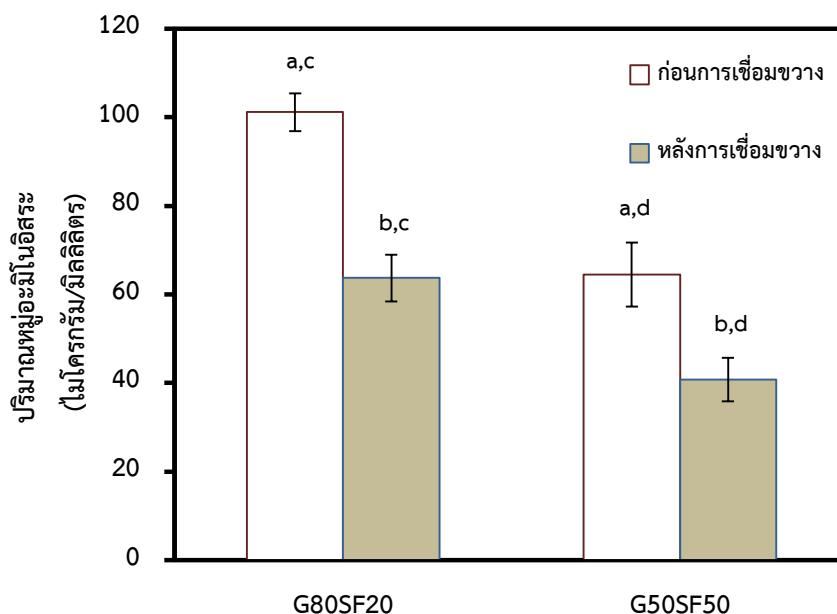
ตัวอย่าง	ขนาดอนุภาคเฉลี่ย (ไมครอน)
G80SF20	50.3 ± 8.5
G50SF50	47.9 ± 5.6

4.1.3 ร้อยละการเชื่อมขวางของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน

กระบวนการเชื่อมขวางเป็นวิธีที่ใช้ในการปรับปรุงสมบัติของอนุภาคให้มีความคงตัวมากขึ้น โดยการเชื่อมขวางเป็นการสร้างพันธะเคมีภายในสายโซ่โม่เลกุล ซึ่งส่งผลต่อสมบัติทางกายภาพชีวภาพ และทางกล ทำให้มีอัตราการย่อยสลายช้าลง เพื่อให้เหมาะสมในการนำมาประยุกต์ใช้งานในด้านต่างๆ ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทยที่มีขนาดอยู่ในช่วง 32-75 ไมครอน ที่ถูกเชื่อมขวางความร้อนแบบกึ่งอัตโนมัติที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส ที่สภาวะสูญญากาศ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยพันธะเคมีที่เชื่อมขวางจะเกิดขึ้นระหว่างหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีน ($-NH_2$) และหมู่คาร์บอกซิล ($-COOH$) ของโปรตีนที่อยู่ใกล้กัน และมีการกำจัดน้ำออกจากโม่เลกุลโดยผ่านปฏิกิริยาการควบแน่น [66] ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า ร้อยละการลดลงของปริมาณหมู่ อะมิโนอิสระสามารถวิเคราะห์ได้จากปริมาณหมู่อะมิโนก่อนและหลังการเชื่อมขวาง ซึ่งได้จากการทำปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนกับสารละลาย 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) ซึ่งเป็นวิธีที่ดัดแปลงจากงานวิจัยในปี 1992 ของ Bubnis, W.A. และ Ofner, C.M. III [83] และปี 2014 ของ Ratanavaraporn, J. และคณะ [15] โดยผลการศึกษาปริมาณหมู่อะมิโนอิสระก่อนและหลังการเชื่อมขวางของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน แสดงในรูปที่ 4.3 พบว่า ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในทุกอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนัก ภายหลังจากเชื่อมขวางด้วยความร้อนจะมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการเชื่อมขวาง ซึ่งบ่งบอกถึงหมู่อะมิโนที่ถูกใช้ไปในกระบวนการเชื่อมขวาง เมื่อพิจารณาอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทย พบว่า ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระจะมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของไฟโบรอินไหมไทย ซึ่งอาจเนื่องมาจากหมู่อะมิโนอิสระที่มีปริมาณมากในองค์ประกอบของเจลาติน ดังนั้นเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของไฟโบรอินไหมไทยในอนุภาคจึงทำให้ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระมีค่าลดลง และเมื่อพิจารณาค่าร้อยละการเชื่อมขวางของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน พบว่าอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่อัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทยเท่ากับ G80SF20 และ G50SF50 มีค่าร้อยละการเชื่อมขวางเท่ากับ 37.1 ± 2.6 และ 36.7 ± 4.6 ตามลำดับ ซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

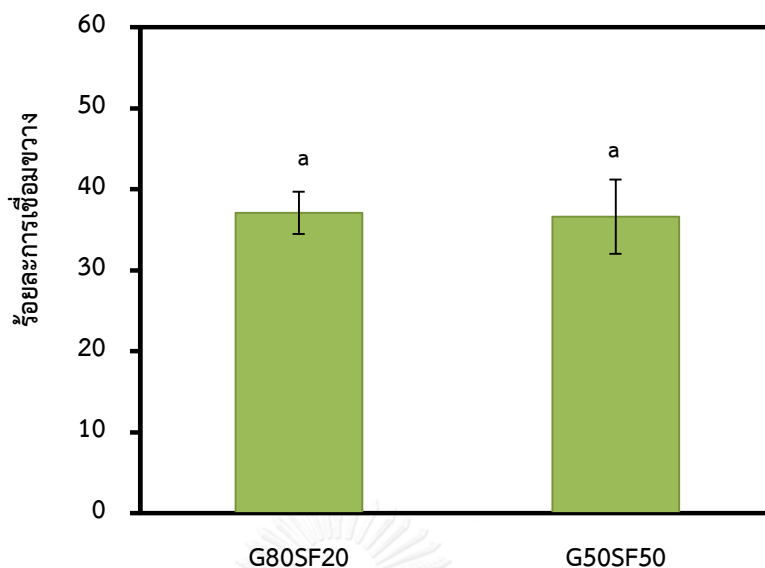
จากรายงานในปี 2014 ของ Ratanavaraporn, J. และคณะ [15] ได้ศึกษาอัตราการเชื่อมขวางของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนผสมระหว่างเจลาตินและไฟโบรอินที่ขึ้นรูปด้วยวิธีอิมัลชันน้ำในน้ำมันและเชื่อมขวางอนุภาคที่เตรียมได้วิธีทางเคมีด้วยตัวสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่มีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินและไฟโบรอินใหม่ไทยเท่ากับ G100 และ G70SF30 มีค่าอัตราการเชื่อมขวางต่ำที่สุดประมาณร้อยละ 20-25 ส่วนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่มีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินและไฟโบรอินใหม่ไทยเท่ากับ G50SF50 และ G30SF70 จะมีค่าอัตราการเชื่อมขวางสูงประมาณร้อยละ 45-55

จากการศึกษาอัตราการเชื่อมขวางของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่มีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินและไฟโบรอินใหม่ไทยเท่ากับ G50SF50 ผ่านการเชื่อมขวางด้วยความร้อนแบบกำจัดน้ำออกที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส ที่สภาวะสุญญากาศ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ศึกษาโดย Ratanavaraporn, J. และคณะ ในปี 2014 [15] จะสังเกตเห็นว่า อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนผ่านการเชื่อมขวางด้วยความร้อนมีค่าอัตราการเชื่อมขวางที่ต่ำกว่าการเชื่อมขวางด้วยสารละลาย กลูตารัลดีไฮด์ เนื่องจากการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ทำในสภาวะสารละลายซึ่งกลูตารัลดีไฮด์จะเข้าไปทำปฏิกิริยาได้อย่างทั่วถึง โดยจะเกิดจากหมู่แอลดีไฮด์ (-CHO) ของกลูตารัลดีไฮด์ 1 โมเลกุล ทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนอิสระ 2 หมู่ จึงทำให้การเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์แสดงปริมาณหมู่ อะมิโนอิสระที่เหลือภายหลังการเชื่อมขวางน้อยกว่า ซึ่งบ่งบอกถึงการเชื่อมขวางที่สูงกว่า ในขณะที่การเชื่อมขวางด้วยความร้อนแบบกำจัดน้ำออกจะเกิดระหว่างหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีน (-NH₂) และหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) ของโปรตีนที่อยู่ใกล้กันเท่านั้น ในกระบวนการมีการสูญเสียหมู่อะมิโนอิสระเพียง 1 หมู่ ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่เหลือภายหลังการเชื่อมขวางมากกว่า ซึ่งบ่งบอกถึงการเชื่อมขวางที่ต่ำกว่า



อัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินชนิดเอต่อไฟโบรอินใหม่

รูปที่ 4.3 ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระก่อนและหลังการเชื่อมขวางของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินใหม่ไทยในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่าง ๆ ที่มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 32-75 ไมครอน ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยความร้อนแบบกึ่งอัตโนมัติที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส ที่สภาวะสุญญากาศ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (a, b แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระโดยเปรียบเทียบก่อนและหลังการเชื่อมขวางที่อัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินชนิดเอต่อไฟโบรอินใหม่ไทยเดียวกัน และ c,d แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระโดยเปรียบเทียบก่อนหรือหลังการเชื่อมขวางที่อัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินชนิดเอต่อไฟโบรอินใหม่ไทยต่างกัน)



อัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินชนิดเอต่อไฟโบรอินไหม

รูปที่ 4.4 ค่าร้อยละการเชื่อมขวางของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยขนาด 32-75 ไมครอน ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยความร้อนแบบก้ำจัดน้ำออกที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส ที่สภาวะสุญญากาศ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (a แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของค่าร้อยละการเชื่อมขวางที่อัตราอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของ เจลาตินชนิดเอต่อไฟโบรอินไหมไทยต่างกัน)

4.2 ความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในระดับห้องปฏิบัติการ (*In vitro* biodegradability)

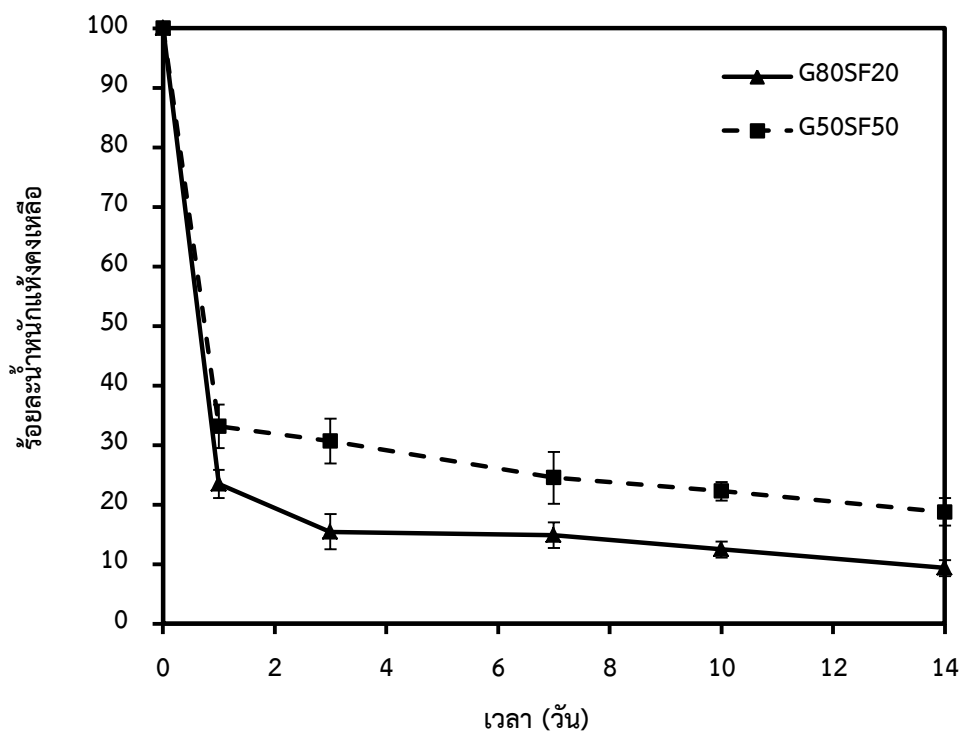
เจลาตินเป็นโปรตีนธรรมชาติที่สามารถละลายน้ำได้ดีและมีอัตราการย่อยสลายที่เร็ว ในขณะที่ไฟโบรอินไหมไทยเป็นโปรตีนที่มีสมบัติทางกลที่ดี และโมเลกุลมีความแข็งแรงสูงกว่า เมื่อมีการนำไฟโบรอินมาผสมกับเจลาตินเพื่อปรับปรุงสมบัติการย่อยสลาย จะทำให้พอลิเมอร์ผสมที่ได้มีการย่อยสลายช้า ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน โดยเน้นที่การย่อยสลายของโมเลกุลไฟโบรอินไหมไทยซึ่งย่อยสลายได้ยากกว่าเมื่อเทียบกับโมเลกุลของเจลาติน ดังนั้นเอนไซม์ที่จะนำมาใช้ในการศึกษาควรมีความจำเพาะเจาะจงกับการย่อยสลายไฟโบรอินด้วย จากรายงานการศึกษาในปี 2003 ของ Li., M. และคณะ [88] ซึ่งมีการเปรียบเทียบการย่อยสลายทางชีวภาพของไฟโบรอินโดยใช้เอนไซม์ชนิดต่างกัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 วัน พบว่า ภายในระยะเวลา 1 วัน น้ำหนักแห้งคงเหลือของแผ่น

ไฟโบรอินที่ทำการแช่ในสารละลายเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ α -Chymotrypsin, คอลลาจีเนส IA, โปรติเอส XIV ที่ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร และสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตที่ปราศจากเอนไซม์ มีค่าใกล้เคียงกันประมาณร้อยละ 70 และภายในระยะเวลา 15 วัน มีน้ำหนักแห้งคงเหลือเท่ากับร้อยละ 68, 48, 30, และ 68 ตามลำดับ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า เอนไซม์ α -Chymotrypsin ไม่มีความจำเพาะเจาะจงกับไฟโบรอิน เนื่องจากน้ำหนักแห้งคงเหลือของแผ่นไฟโบรอินในสารละลายเอนไซม์ α -Chymotrypsin มีค่าไม่แตกต่างจากน้ำหนักแห้งคงเหลือของแผ่นไฟโบรอินในสภาวะที่ปราศจากเอนไซม์ และเมื่อพิจารณาความสามารถในการย่อยสลายไฟโบรอินในสารละลายเอนไซม์ โปรติเอส XIV และเอนไซม์คอลลาจีเนส IA พบว่า น้ำหนักแห้งคงเหลือของแผ่นไฟโบรอินในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV มีค่าน้อยกว่าน้ำหนักแห้งคงเหลือของแผ่นไฟโบรอินในสารละลายคอลลาจีเนส IA ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์โปรติเอส XIV มีความจำเพาะเจาะจงกับไฟโบรอินมากกว่าเอนไซม์คอลลาจีเนส IA นอกจากนี้ ในปี 2011 Zhao., C. และคณะ [89] ได้ทำการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์และเส้นใยของไหมไฟโบรอินชนิด *Antheraea pernyi* (Ap-SF) โดยใช้เอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ α -Chymotrypsin, คอลลาจีเนส IA, โปรติเอส XIV ที่ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร และสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตที่ปราศจากเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า น้ำหนักแห้งคงเหลือของโครงเลี้ยงเซลล์ที่แช่ในสารละลายเอนไซม์ทุกชนิดลดลงอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลา 1 วัน และที่ระยะเวลาในการแช่ 18 วัน น้ำหนักแห้งคงเหลือของโครงเลี้ยงเซลล์ในสารละลายเอนไซม์ α -chymotrypsin, คอลลาจีเนส IA, และสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตที่ปราศจากเอนไซม์ มีค่าเท่ากับร้อยละ 20.5, 8.0, และ 77.3 ตามลำดับ ส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ที่แช่ในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV ละลายได้อย่างสมบูรณ์ในระยะเวลา 18 วัน นอกจากนี้ในปี 2013 Wongnarat C. และคณะ [90] ได้ทำการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของเส้นใยไฟโบรอินของไหมไทยสายพันธุ์สำโรง และสายพันธุ์นางลาย โดยใช้สารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV และเอนไซม์โปรติเอส XXIII ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร พบว่า ภายในระยะเวลา 49 วัน ร้อยละน้ำหนักแห้งที่หายไปของเส้นใยไฟโบรอินไหมไทยทั้งสองสายพันธุ์ที่แช่ในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV มีค่ามากกว่าเส้นใยไฟโบรอินที่แช่ในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XXIII โดยน้ำหนักแห้งที่หายไปของไฟโบรอินไหมไทยสายพันธุ์สำโรงที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรติเอส XIV และเอนไซม์โปรติเอส XXIII มีค่าเท่ากับร้อยละ 27.5 และ 17.5 ตามลำดับ และน้ำหนักแห้งที่หายไปของไฟโบรอินไหมไทยสายพันธุ์

นางลายที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรติเอส XIV และเอนไซม์โปรติเอส XXIII มีค่าเท่ากับร้อยละ 25 และ 13 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า การย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรติเอส XIV มีความจำเพาะเจาะจงกับไฟโบรอิน

ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงเลือกเอนไซม์โปรติเอส XIV มาใช้ในการย่อยสลายอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ผ่านการคัดแยกขนาดอยู่ในช่วง 32-75 ไมครอน และเชื่อมขวางอนุภาคด้วยความร้อนแบบก้ำจัดน้ำออกที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส สภาวะสุญญากาศ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นคำนวณหาร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนภายหลังการแช่ในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 4.5 พบว่า เมื่อผ่านไป 24 ชั่วโมง อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่มีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยเท่ากับ G80SF20 และG50SF50 มีการย่อยสลายอย่างรวดเร็วและมีร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือต่ำกว่าร้อยละ 35 ซึ่งอาจเนื่องมาอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่นำมาศึกษาทั้ง 2 อัตราส่วนการผสม มีค่าร้อยละการเชื่อมขวางที่ใกล้เคียงกันประมาณร้อยละ 37 ประกอบกับเอนไซม์โปรติเอส XIV ความจำเพาะเจาะจงกับโปรตีนทั้งเจลาตินและไฟโบรอิน ทำให้อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็ว และเมื่อผ่านไป 14 วัน ร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่มีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยเท่ากับ G80SF20 และG50SF50 มีค่าประมาณ 9 และ 19 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินไหมไทยในปริมาณมากกว่าจะมีร้อยละของน้ำหนักแห้งคงเหลือภายหลังการแช่ในสารละลายที่มีเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตรมาก ซึ่งแสดงถึงการย่อยสลายทางชีวภาพของอนุภาคทรงกลมที่ช้า สอดคล้องกับรายงานในปี 2011 ของ Jo Y. Y. และคณะ [91] ซึ่งศึกษาเปรียบเทียบการย่อยสลายทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่มีความหนาแน่นต่างกันในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า ภายในระยะเวลา 15 วัน โครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่มีความหนาแน่นสูงจะมีน้ำหนักแห้งที่หายไปมีค่าประมาณร้อยละ 60 และถูกย่อยสลายสมบูรณ์ภายในระยะเวลา 60 วัน แต่เมื่อเปรียบเทียบกับโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่มีความหนาแน่นต่ำพบว่า ภายในระยะเวลา 7 วัน น้ำหนัก

แห้งที่หายไปของโครมเลียงเซลล์มีค่าประมาณร้อยละ 90 และถูกย่อยสลายสมบูรณ์ภายในระยะเวลา 15 วัน

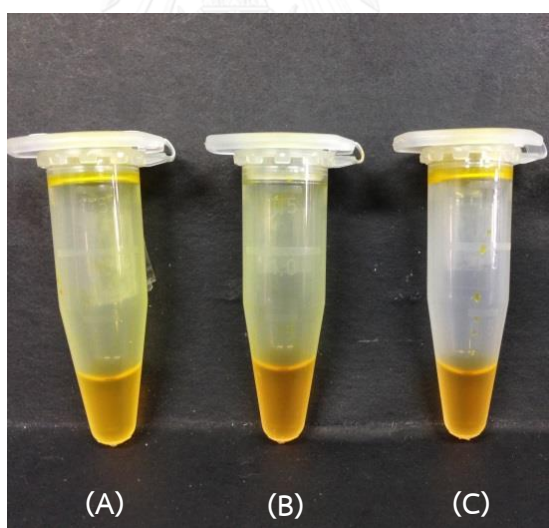


รูปที่ 4.5 ร้อยละของน้ำหนักแห้งคงเหลือของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่างๆ (เชื่อมขวางอนุภาคด้วยความร้อนแบบกำจัดน้ำออก ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง) ภายหลังจากแช่ในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาในการแช่ต่าง ๆ

4.3 ความสามารถในการดูดซับและควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในระดับห้องปฏิบัติการ

4.3.1 ความสามารถในการละลายและการดูดซับเคอร์คูมินบนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำ

งานวิจัยนี้ได้ทดสอบความสามารถในการละลายของเคอร์คูมินความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำในสัดส่วนต่างๆ ได้แก่ เอทานอล บริสุทธิ์ (E100) สารละลายผสมสัดส่วน 90:10 (E90) และ 80:20 (E80) พบว่า ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เคอร์คูมินสามารถละลายได้อย่างสมบูรณ์ภายในระยะเวลา 15 นาที ในตัวทำละลายเอทานอลบริสุทธิ์ และละลายได้อย่างสมบูรณ์ในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำทุกสัดส่วน การผสมภายในระยะเวลา 30 นาที และเมื่อนำสารละลายเคอร์คูมินที่ถูกละลายในตัวทำละลายผสมในสัดส่วนต่างๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลามากกว่า 12 ชั่วโมง ในที่มืด ไม่พบเคอร์คูมินตกตะกอนที่ก้นหลอดทดลอง แสดงดังรูปที่ 4.6



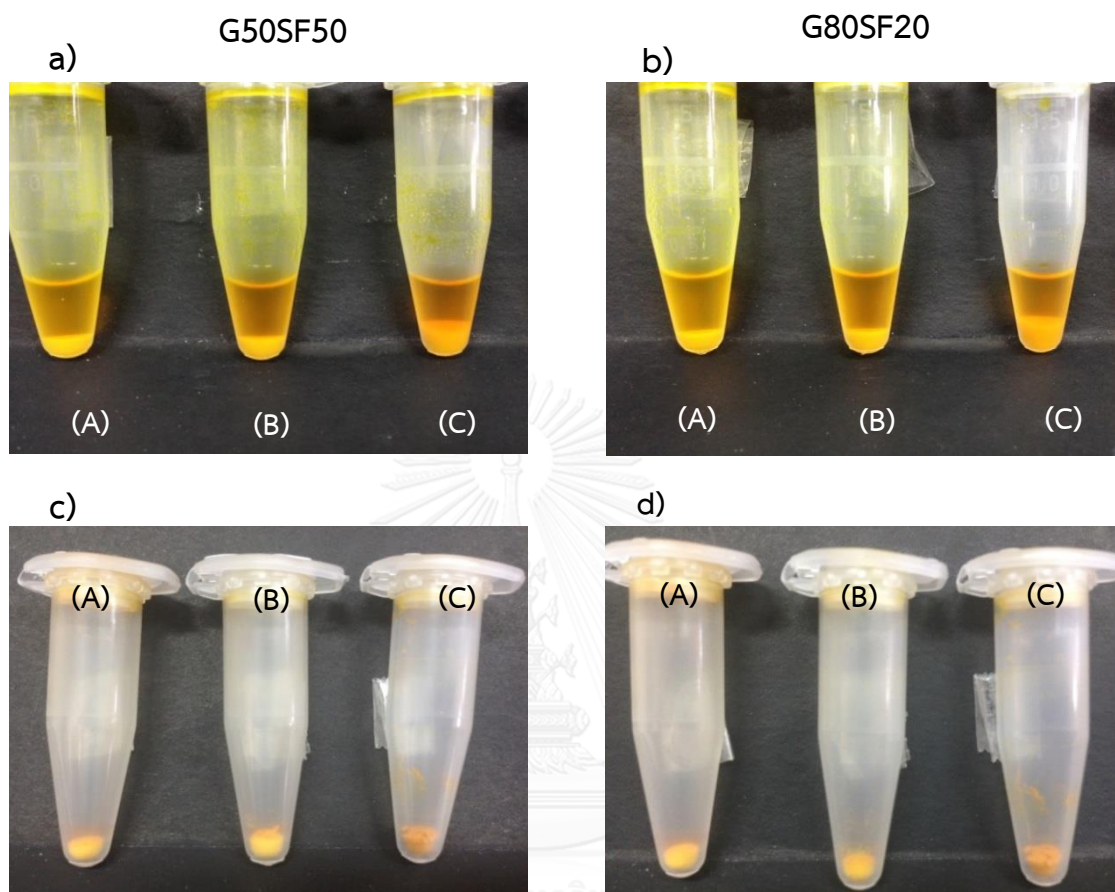
รูปที่ 4.6 สารละลายเคอร์คูมินความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำ ในสัดส่วนต่างๆ A) เอทานอลบริสุทธิ์ (E100) B) ตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำสัดส่วน 90:10 (E90) และ C) ตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำสัดส่วน 80:20 (E80) หลังจากตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลามากกว่า 12 ชั่วโมง ในที่มืด

เมื่อนำอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยชนิด G50SF50 และ G80SF20 ที่ถูกเชื่อมขวางด้วยความร้อนแบบก้ำจัดน้ำออกมาทำการดูดซับเคอร์คูมินความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งละลายในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำในสัดส่วนที่ต่างกัน จากการสังเกตด้วยตาเปล่า พบว่า อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนทั้ง 2 ชนิด มีการบวมน้ำมากขึ้นในตัวทำละลายผสมที่มีสัดส่วนของน้ำเพิ่มขึ้น โดยอนุภาคมีการบวมน้ำมากที่สุดเมื่ออยู่ในตัวทำละลายผสมระหว่าง เอทานอลและน้ำในสัดส่วน 80:20 และเมื่อสังเกตสีของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ทำการดูดซับเคอร์คูมินในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำ พบว่า อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนทั้ง 2 ชนิด ที่แช่อยู่ในสารละลายเคอร์คูมินในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำมีสีเหลืองเข้มขึ้น โดยอนุภาคจะมีสีเหลืองเข้มที่สุดเมื่อถูกแช่อยู่ในสารละลายเคอร์คูมินในตัวทำละลายผสมระหว่าง เอทานอลและน้ำในสัดส่วน 80:20 แสดงดังรูปที่ 4.7 (a,b) และเมื่อนำอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ดูดซับเคอร์คูมินแล้วไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือก พบว่า อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนทั้ง 2 ชนิดมีลักษณะเป็นผงละเอียด ไม่เกาะติดกัน และมีสีเหลืองเข้มที่สุดเมื่อถูกนำมาดูดซับเคอร์คูมินในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำในสัดส่วน 80:20 แสดงดังรูปที่ 4.7 (c,d)

จากผลการศึกษาประสิทธิภาพในการกักเก็บและปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกดูดซับบนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยชนิด G50SF50 และ G80SF20 ซึ่งถูกเชื่อมขวางด้วยความร้อนแบบก้ำจัดน้ำออก แสดงในตารางที่ 4.4 พบว่าอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนชนิด G50SF50 มีประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินประมาณร้อยละ 6.3-29.8 โดยมีประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำที่มีสัดส่วนของน้ำเพิ่มขึ้น กล่าวคือ อนุภาคทรงกลมจะมีประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินสูงสุดเมื่อทำการดูดซับในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำในสัดส่วน 80:20 (E80) และมีประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินต่ำที่สุดเมื่อทำการดูดซับในตัวทำละลายเอทานอลบริสุทธิ์ (E100) ในทำนองเดียวกับอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนชนิด G80SF20 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินประมาณร้อยละ 5.3-19.8 โดยประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อทำการดูดซับในตัวทำละลายผสมที่มีสัดส่วนของน้ำเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกันกับอนุภาคทรงกลมชนิด G50SF50 ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า ธรรมชาติของเจลาตินจะมีความชอบน้ำและ

มีความสามารถในการบวมน้ำสูง จึงทำให้เกิดกลไกการแพร่ของเคอร์คูมินโดยมีน้ำเป็นตัวพาเคอร์คูมินเข้าสู่อนุภาคทรงกลมเกิดการบวมน้ำในส่วนที่มีเจลาตินเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่มีเจลาตินเป็นองค์ประกอบจึงสามารถดูดซับเคอร์คูมินเพิ่มขึ้นในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำที่มีสัดส่วนน้ำเพิ่มขึ้น และเมื่อพิจารณาประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินบนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ต่างกัน โดยทำการดูดซับในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำในสัดส่วนเดียวกัน พบว่าอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนชนิด G50SF50 มีประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินมากกว่าชนิด G80SF20 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำในสัดส่วน 90:10 และ 80:20 ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า เจลาตินมีความสามารถละลายน้ำได้ดีและมีความชอบน้ำสูง แต่โครงสร้างโมเลกุลของไฟโบรอินไหมไทยมีการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนที่เป็นระเบียบซึ่งแสดงความไม่ชอบน้ำ ทำให้ไฟโบรอินไหมไทยมีความไม่ชอบน้ำสูง และเคอร์คูมินเป็นยาที่มีความไม่ชอบน้ำสูงเช่นกัน ดังนั้นเคอร์คูมินจึงเกิดอันตรกิริยากับส่วนไม่ชอบน้ำในโมเลกุลของไฟโบรอินไหมไทยได้ดี ทำให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินสูงจึงมีค่าสูงกว่า ซึ่งสอดคล้องกับรายงานในปี 2014 ของ Ratanavaraporn J. และคณะ [11] ที่ได้ศึกษาประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนผสมระหว่างเจลาตินและไฟโบรอินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ พบว่าอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินมีประสิทธิภาพในการกักเก็บเท่ากับร้อยละ 20.1 และปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกดูดซับบนอนุภาคทรงกลมเท่ากับร้อยละ 4 จากปริมาณเคอร์คูมินเริ่มต้น ในขณะที่อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนผสมระหว่างเจลาตินและไฟโบรอินมีประสิทธิภาพในการกักเก็บอยู่ในช่วงประมาณร้อยละ 24.9-30.0 และปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกดูดซับบนอนุภาคทรงกลมประมาณร้อยละ 4.9- 6.0 จากปริมาณเคอร์คูมินเริ่มต้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เมื่อสัดส่วนของไฟโบรอินเพิ่มขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินสูงขึ้น เนื่องจากอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นในส่วนที่ไม่ชอบน้ำของไฟโบรอินและเคอร์คูมิน นอกจากนี้ จากรายงานในปี 2009 ของ Gupta V. และคณะ [92] ได้ศึกษาประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินบนอนุภาคทรงกลมขนาดนาโนของไฟโบรอินและไคโตซาน พบว่า ประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินบนอนุภาคนาโนไฟโบรอินและไคโตซานมีค่าประมาณร้อยละ 64-73 แต่ประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินบนอนุภาคนาโนไฟโบรอินมีค่ามากกว่าร้อยละ 96 เนื่องจากโมเลกุลไคโตซานมีหมู่กลูโคซามีน (Glucosamine) ที่ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (OH) เป็นจำนวนมาก ซึ่งส่งผลให้ไคโตซานมีความชอบน้ำสูง เมื่อนำมา

ผสมกับไฟโบรอินที่มีความไม่ชอบน้ำ จึงทำให้อนุภาคนาโนไฟโบรอินและไคโตซานมีความชอบน้ำมากขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บคอร์คูมินซึ่งเป็นโมเลกุลไม่ชอบน้ำมีค่าลดลง



รูปที่ 4.7 (a,b) การบวมน้ำและสีของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยชนิด G50SF50 และ G80SF20 ในสารละลายคอร์คูมินความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำในสัดส่วนที่ต่างกัน (c,d) อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนชนิด G50SF50 และ G80SF20 ที่ทำการดูดซับคอร์คูมินในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำและผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือก โดยที่ A) เอทานอลบริสุทธิ์ (E100) B) ตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำสัดส่วน 90:10 (E90) และ C) ตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำสัดส่วน 80:20 (E80)

ตารางที่ 4.4 ประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินและปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกดูดซับบนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยชนิด G80SF20 และ G50SF50 ในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำในสัดส่วนที่ต่างกัน

ตัวอย่าง	สัดส่วนตัวทำละลายผสมเอทานอล:น้ำ	ประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมิน (ร้อยละ) (Entrapment efficiency)	ปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกดูดซับบนอนุภาคทรงกลม (ร้อยละ) (Drug loading)
G80SF20	100:0	$5.3 \pm 1.6^{a,d}$	$0.3 \pm 0.1^{a,d}$
	90:10	$8.9 \pm 0.6^{b,d}$	$0.5 \pm 0.0^{b,d}$
	80:20	$19.8 \pm 1.5^{c,d}$	$1.0 \pm 0.1^{c,d}$
G50SF50	100:0	$6.3 \pm 2.4^{a,d}$	$0.3 \pm 0.1^{a,d}$
	90:10	$13.8 \pm 0.9^{b,e}$	$0.7 \pm 0.1^{b,e}$
	80:20	$29.8 \pm 1.5^{c,e}$	$1.6 \pm 0.1^{c,e}$

(a,b,c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมิน และปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกดูดซับบนอนุภาคทรงกลมอัตราส่วนการผสมของเจลาตินชนิดเอต่อไฟโบรอินไหมไทยเดียวกัน ในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำสัดส่วนต่างกัน) *กลางกรรณมหาวิทยาลัย*

(d,e แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมิน และปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกดูดซับบนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่อัตราส่วนการผสมของเจลาตินชนิดเอต่อไฟโบรอินไหมไทยต่างกัน ในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำสัดส่วนต่างกัน)

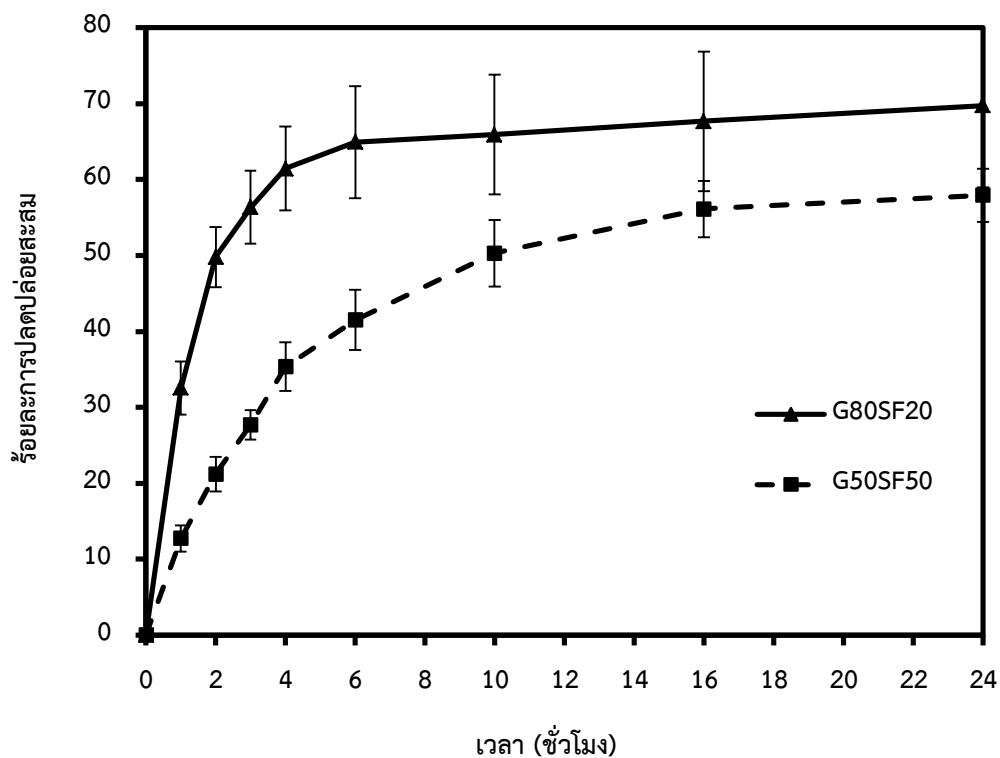
เมื่อพิจารณาปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกดูดซับได้บนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเทียบกับปริมาณเคอร์คูมินเริ่มต้น (Drug loading) พบว่า อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในทุกอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย จะมีปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกดูดซับได้บนอนุภาคทรงกลมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเพิ่มสัดส่วนของน้ำในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำ ซึ่งมีค่าประมาณร้อยละ 0.3-1.0 ในอนุภาคทรงกลมชนิด G80SF20 และมีค่าประมาณร้อยละ 0.3-1.6 ในอนุภาคทรงกลมชนิด G50SF50 และเมื่อพิจารณาปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกดูดซับได้บนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยที่ต่างกัน ในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำในสัดส่วนเดียวกัน พบว่าปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกดูดซับได้บนอนุภาคทรงกลมเพิ่มขึ้นในอนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินสูง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำในสัดส่วน 90:10 และ 80:20 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาประสิทธิภาพในการกักเก็บเคอร์คูมินบนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน (Entrapment efficiency)

4.3.2 ความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินจากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในระดับห้องปฏิบัติการ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยชนิด G80SF20 และ G50SF50 ซึ่งถูกเชื่อมขวางด้วยความร้อน เมื่อแช่อนุภาคทรงกลมในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตและ Fetal bovine serum (FBS) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ค่าความเป็นกรดต่าง 7.4 บมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นองค์ประกอบเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งผลการศึกษาดังรูปที่ 4.8 พบว่า อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยชนิด G80SF20 สามารถปลดปล่อยเคอร์คูมินออกมาอย่างต่อเนื่องในช่วง 4 ชั่วโมงแรก โดยมีค่าร้อยละการปลดปล่อยสะสมประมาณ 62 และการปลดปล่อยจะเริ่มช้าลงในชั่วโมงที่ 6 โดยมีค่าประมาณร้อยละ 65 และเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง อนุภาคทรงกลมสามารถปลดปล่อยเคอร์คูมินเพิ่มขึ้นเท่ากับร้อยละ 70 ในขณะที่อนุภาคทรงกลมชนิด G50SF50 สามารถปลดปล่อยเคอร์คูมินออกมาอย่างต่อเนื่องในช่วง 10 ชั่วโมงแรก โดยมีค่าร้อยละการ

ปลดปล่อยสะสมประมาณร้อยละ 50 จากนั้นการปลดปล่อยจะเริ่มช้าลงจนกระทั่งเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง อนุภาคทรงกลมสามารถปลดปล่อยเคอร์คูมินสะสมได้ร้อยละ 58

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่ออนุภาคทรงกลมอยู่ภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตรเป็นองค์ประกอบ อนุภาคที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินใหม่ไทยมากสามารถปลดปล่อยเคอร์คูมินได้ช้ากว่าอนุภาคที่มีสัดส่วนของเจลาตินมาก เนื่องจากไฟโบรอินใหม่ไทยเป็นโมเลกุลที่มีสมบัติทางกลที่ดี มีการย่อยสลายทางชีวภาพได้ช้ากว่าเจลาตินซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน ในหัวข้อ 4.2 และประกอบกับอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นในส่วนไม่ชอบน้ำของโมเลกุลไฟโบรอินใหม่ไทยและเคอร์คูมิน มีความแข็งแรงมากกว่าอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างโมเลกุลของเจลาตินและเคอร์คูมิน จึงส่งผลให้การปลดปล่อยเคอร์คูมินออกจากอนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินใหม่ไทยมากเกิดได้ช้า ซึ่งสอดคล้องกับรายงานในปี พ.ศ. 2557 ของปิยะรัตน์ [85] ได้ศึกษาการเตรียมอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอินใหม่ไทยผสมกรดไฮยาลูรอนิกที่สัดส่วนการผสมต่างๆ เพื่อประยุกต์ใช้ในการนำส่งเคอร์คูมิน พบว่าภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตรเป็นองค์ประกอบ อนุภาคทรงกลมสามารถปลดปล่อยเคอร์คูมินออกมาอย่างต่อเนื่อง และเริ่มปลดปล่อยช้าลงเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง และเมื่อระยะเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง อนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนการผสมต่างๆ สามารถปลดปล่อยเคอร์คูมินได้ประมาณร้อยละ 82-88 ซึ่งอนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินใหม่ไทยมากสามารถชะลอการปลดปล่อยเคอร์คูมินได้มากกว่าอนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนของกรดไฮยาลูรอนิกมาก อันเนื่องมาจากอันตรกิริยาในส่วนไม่ชอบน้ำของโมเลกุลเคอร์คูมินและไฟโบรอินใหม่ไทยมีความแข็งแรงกว่าอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างโมเลกุลของเคอร์คูมินและเจลาติน นอกจากนี้ยังพบว่า การปลดปล่อยเคอร์คูมินจากอนุภาคทรงกลมของไฟโบรอินใหม่ไทยผสมกรดไฮยาลูรอนิกเกิดผ่านกลไกการแพร่และการย่อยสลายของอนุภาคทรงกลม



รูปที่ 4.8 ร้อยละการปลดปล่อยสะสมคอร์คูมินของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินและไฟโบรโรนใหม่ไทยในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่างๆ (เชื่อมขวางอนุภาคด้วยความร้อนแบบกำจัดน้ำออกที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง) ภายหลังจากแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต และ Fetal bovine serum ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ค่าความเป็นกรดต่าง 7.4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้อุณหภูมิที่มีเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นองค์ประกอบ (n = 4)

ในการประเมินกลไกการปลดปล่อยเคอร์คูมินจากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลลาตินและไฟโบรอินไหมไทย สามารถประเมินได้จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์แบบ Power law [93-95] ดังแสดงในสมการที่ 4.1 และ 4.2 โดยอาศัยการคำนวณแบบการวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้น (Linear regression analysis) ซึ่งคำนวณหาค่าคงที่สำหรับการปลดปล่อยเคอร์คูมิน (Release constant; k) และตัวเลขชี้กำลังของการปลดปล่อย (Release exponent; n) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยสะสมที่เวลา t หารด้วยปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยสะสมที่เวลานั้น (M_t/M_∞) เทียบกับเวลา (t) กล่าวคือ สัดส่วนของยาที่ปลดปล่อยออกมามีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับเวลากกำลัง n (ภาคผนวก ค)

$$M_t/M_\infty = kt^n \quad (4.1)$$

$$\log(M_t/M_\infty) = n \log t + \log k \quad (4.2)$$

โดยที่ M_t คือ ปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยสะสมที่เวลา t

M_∞ คือ ปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยสะสมที่เวลานั้น

k คือ ค่าคงที่สำหรับการปลดปล่อยแบบจำลอง Power law

n คือ ตัวเลขชี้กำลังของการปลดปล่อย (Release exponent)

เมื่อ

$n \leq 0.43$ แสดงลักษณะการปลดปล่อยยาแบบ Fickian diffusion

$0.43 < n < 0.85$ แสดงลักษณะการปลดปล่อยยาแบบ Non-fickian diffusion (Anomalous transport)

$n = 0.85$ แสดงลักษณะการปลดปล่อยยาแบบ Case II transport (relaxation)

$n > 0.85$ จะแสดงลักษณะการปลดปล่อยยาแบบ Super case II-transport

จากการคำนวณค่าคงที่สำหรับการปลดปล่อยเคอร์คูมิน (k) ตัวเลขชี้กำลังของการปลดปล่อย (n) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient; R^2) ของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลลาตินและไฟโบรอินไหมไทยในแต่ละอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนัก กรณีการควบคุมการปลดปล่อยภายใต้สภาวะมีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ แสดงได้ในตารางที่ 4.5 พบว่า อนุภาคทรงกลมชนิด G50SF50 มีค่าตัวเลขชี้กำลังการปลดปล่อยอยู่ในช่วง $0.43 < n < 0.85$ ซึ่งแสดงลักษณะ

การปลดปล่อยยาแบบ Non-fickian diffusion กล่าวคือ การปลดปล่อยสารถูกควบคุมด้วยกลไกการแพร่ (Diffusion-controlled) และกลไกการบวมหรือย่อยสลาย (Swelling or erosion-controlled) โดยอนุภาคทรงกลมเมื่อสัมผัสกับตัวกลางที่เป็นน้ำ ยาที่อยู่บริเวณผิวของอนุภาคจะเกิดการแพร่ออกมา ในขณะที่เดียวกันผิวของอนุภาคทรงกลมที่สัมผัสกับน้ำจะเกิดการบวมตัวและเกิดขึ้นเจลรอบผิวอนุภาคและปลดปล่อยยาออกมาเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานในปี 2009 ของ Gupta V. และคณะ [92] ได้ศึกษาการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินของอนุภาคนาโนไฟโบรอิน พบว่าอนุภาคนาโนไฟโบรอินที่ใช้ความเข้มข้นไฟโบรอินในการเตรียมเท่ากับ 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สามารถปลดปล่อยเคอร์คูมินอย่างรวดเร็วในช่วง 2 วันแรก และการปลดปล่อยจะเกิดช้าลงและต่อเนื่อง เมื่อประเมินกลไกที่ใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินจากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ Power law พบว่า ตัวเลขชี้กำลังของการปลดปล่อย (Release exponent; n) และค่าคงที่สำหรับการปลดปล่อย (k) มีค่าเท่ากับ 0.55 และ 0.9 ตามลำดับ โดยค่าตัวเลขชี้กำลังการปลดปล่อยอยู่ในช่วง $0.43 < n < 0.85$ แสดงถึงลักษณะการปลดปล่อยเคอร์คูมินแบบ Non-Fickian diffusion (anomalous transport) คือ การปลดปล่อยสารถูกควบคุมด้วยกลไกการแพร่และกลไกการบวมหรือย่อยสลาย

ในส่วนของอนุภาคทรงกลมชนิด G80SF20 เมื่อประเมินกลไกที่ใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมิน พบว่ามีค่าตัวเลขชี้กำลังของการปลดปล่อย $n \leq 0.43$ ซึ่งแสดงลักษณะการปลดปล่อยยาแบบ Fickian diffusion กล่าวคือ กลไกการแพร่ของยาจะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ ดังนั้นการปลดปล่อยยาจะถูกควบคุมด้วยกลไกการบวมหรือย่อยสลาย (Swelling or erosion-controlled) ซึ่งอาจเนื่องมาจากอนุภาคทรงกลมชนิด G80SF20 มีสัดส่วนของเจลาตินสูงกว่าอนุภาคทรงกลมชนิด G50SF50 จึงมีความสามารถในการบวมน้ำและละลายน้ำได้ดีกว่า ส่งผลให้อนุภาคทรงกลมชนิด G80SF20 สามารถปลดปล่อยเคอร์คูมินจากการย่อยสลายของเจลาติน ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาย่อยสลายทางชีวภาพของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน ในหัวข้อ 4.2

ตารางที่ 4.5 ค่าคงที่สำหรับการปลดปล่อยเคอร์คูมิน (Release constant; k) ตัวเลขชี้กำลังการปลดปล่อย (Release exponent; n) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient; R^2) ภายใต้สภาวะการควบคุมการปลดปล่อยที่มีเอโนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นองค์ประกอบ

ตัวอย่าง	ค่าคงที่สำหรับการปลดปล่อยเคอร์คูมิน (k)	ตัวเลขชี้กำลังการปลดปล่อย (n)	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2)
G80SF20	0.59±0.04	0.20±0.05	0.71
G50SF50	0.27±0.05	0.48±0.05	0.92



4.4 ประสิทธิภาพการต้านมะเร็งในสัตว์ทดลองของเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน

4.4.1 การปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกในสัตว์ทดลอง

การทดลองนี้ใช้หนูชนิดไม่มีขน (nude mice BALB/c) เพศเมีย ทั้งหมด 24 ตัว อายุ 6-8 สัปดาห์ น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นเท่ากับ 19.6 ± 1.0 กรัม ซึ่งต่ำกว่าเกณฑ์ปกติ (20-25 กรัม) เล็กน้อย จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยนำมาเลี้ยงในห้องควบคุมเชื้อ (Strictly Hygienic Conventional) ซึ่งมีการควบคุมสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ได้แก่ อุณหภูมิ 25 ± 2 °C ความชื้นสัมพัทธ์ $60 \pm 10\%$ วงจรการให้แสง 12 ชั่วโมงสว่าง 12 ชั่วโมงมืด มีการถ่ายเทอากาศ และมีการดูแลให้อาหารและน้ำเพียงพอ พบว่า หลังจากเลี้ยงหนูทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์ หนูทดลองมีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเล็กน้อยและอยู่ในเกณฑ์ปกติ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 21.4 ± 1.8 และเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ หนูทดลองมีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 21.9 ± 1.0 กรัม แสดงให้เห็นว่าหนูทดลองสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดีขึ้นจากวันแรกที่ทำกรเลี้ยง

หลังจากเลี้ยงหนูทดลองเป็นเวลาประมาณ 3 สัปดาห์ จึงเริ่มปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki จำนวน 10×10^6 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทางใต้ผิวหนัง (subcutaneous) บนหลังบริเวณ dorsal skin-fold chamber แสดงดังรูปที่ 4.9 และทำการสังเกตสุขภาพของหนูทดลองโดยทำการชั่งน้ำหนักทุกๆ 7 วัน แสดงในตารางที่ 4.6 พบว่า หนูทดลองหลังการปลูกเซลล์มะเร็งมีการกินอาหารและน้ำเป็นปกติ และมีน้ำหนักอยู่ในช่วง 20-26 กรัม ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ปกติ แต่ในวันที่ 21 หลังการปลูกเซลล์มะเร็ง พบการเสียชีวิตของหนูทดลองหมายเลข 6 ซึ่งในระหว่างการทดลอง ไม่พบความผิดปกติในการกินอาหารและน้ำ รวมทั้งพฤติกรรมที่ผิดปกติของหนูทดลองตัวดังกล่าว ดังนั้นสันนิษฐานว่าอาจเนื่องมาจากการดำเนินไปของสภาวะโรคทำให้เกิดการอักเสบและติดเชื้อเฉียบพลันทำให้หนูทดลองเสียชีวิต

ในการทดลองนี้ได้ทำการวัดขนาดก้อนมะเร็งทุกๆ 7 วัน เป็นเวลาทั้งหมด 30 วัน โดยแสดงเป็นปริมาตรก้อนมะเร็งหลังฉีดปลูก แสดงในตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.10 ซึ่งจากการทดลองพบว่า ในวันที่ 1 หลังการฉีดเซลล์มะเร็ง จะสังเกตเห็นตุ่ม (nodule) มีลักษณะนูน แดง และบวม บริเวณที่ฉีด ซึ่งเกิดจากกลไกการอักเสบ ยังไม่สามารถวัดขนาดก้อนมะเร็งได้ ต่อมาในวันที่ 3 จะเริ่มสังเกตเห็นก้อนมะเร็ง และยังคงพบการบวม แดงเล็กน้อย ในวันที่ 7 เป็นต้นไปจะเริ่มสังเกตเห็นก้อนมะเร็ง

ชัดเจนขึ้น และเริ่มวัดขนาดก้อนมะเร็งได้ โดยมีปริมาตรก้อนประมาณ 21-155 ลูกบาศก์มิลลิเมตร แต่ยังคงพบว่าหนูทดลองบางตัวมีก้อนขนาดเล็กน้อยแต่ไม่สามารถวัดขนาดได้เช่นกัน และวันที่ 14 หลังการฉีดปลูก พบว่า ก้อนมะเร็งที่พบเริ่มมีขนาดเล็กลง โดยมีปริมาตรก้อนประมาณ 21-112 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ในวันที่ 21 หลังการฉีดปลูก พบว่า ก้อนมะเร็งมีขนาดเล็กลงกว่าที่พบในวันที่ 14 โดยมีปริมาตรก้อนประมาณ 20-70 ลูกบาศก์มิลลิเมตร และนอกจากนี้ยังพบการตายของหนูทดลองตัวที่ 6 ซึ่งในระหว่างการทดลอง ไม่พบความผิดปกติในการกินอาหารและน้ำ รวมทั้งพฤติกรรมที่ผิดปกติของหนูทดลองตัวดังกล่าว ในวันที่ 23 หลังการฉีดปลูก พบว่าปริมาตรหนูทดลองบางตัวมีก้อนมะเร็งลดลงอีกเล็กน้อยและบางตัวเริ่มมีแนวโน้มนคงที่ และบางตัวมีแนวโน้มนเพิ่มขึ้น โดยมีปริมาตรก้อนประมาณ 22-86 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ซึ่งในวันที่ 23 หลังการฉีดปลูก ได้จัดกลุ่มหนูทดลองหมายเลข 8,9 และ 10 ซึ่งมีอายุและปริมาตรก้อนมะเร็ง 61-77 ลูกบาศก์มิลลิเมตรไว้ในกลุ่มเดียวกัน และเริ่มทำการทดลองผลการต้านมะเร็งของเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน ซึ่งจะกล่าวในหัวข้อถัดไป และในวันที่ 30 หลังการฉีดปลูก พบว่า ก้อนมะเร็งเริ่มมีปริมาตรคงที่ประมาณ 15-91 ลูกบาศก์มิลลิเมตร และสามารถแบ่งกลุ่มหนูทดลองที่มีอายุและปริมาตรก้อนมะเร็งใกล้เคียงกันได้ และเริ่มทำการทดลองผลการต้านมะเร็งในหัวข้อถัดไป ซึ่งหนูทดลองที่สามารถปลูกมะเร็งขึ้นจากการฉีดเพียงครั้งเดียวคิดเป็นจำนวน 15 ตัวจากทั้งหมด 23 ตัว โดยคิดเป็นร้อยละ 65 ทั้งนี้หนูทดลองที่ฉีดปลูกมะเร็งไม่สำเร็จในครั้งแรกนั้น ได้มีการฉีดปลูกซ้ำในครั้งที่ 2 แต่ไม่ประสบความสำเร็จเช่นกัน



รูปที่ 4.9 การฉีดปลูกเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki บนหลังบริเวณ dorsal skin-fold chamber



รูปที่ 4.10 ภาพถ่ายหนูทดลอง ณ วันต่างๆ หลังจากฉีดเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki (10×10^6 เซลล์/200 ไมโครลิตร) ทางใต้ผิวหนังบริเวณ dorsal skin-fold chamber

ตารางที่ 4.6 น้ำหนักหนุทดลองก่อนฉีด (วันที่ 0) และหลังปลูกมะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki

ณ วันต่างๆ

หมายเลข สัตว์ทดลอง	น้ำหนัก (กรัม)					
	วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 23	วันที่ 28
1	24.16	24.37	24.99	25.90	25.18	25.48
2	23.65	23.78	22.49	22.70	22.62	23.66
3	22.49	23.61	23.51	25.29	24.93	25.49
4	22.59	23.39	24.37	24.43	24.28	24.76
5	24.49	25.37	25.54	25.11	25.00	26.00
6	22.16	23.03	23.87	เสียชีวิตระหว่างการทดลอง		
7	23.25	23.03	23.67	24.67	23.58	22.77
8	23.44	24.58	24.21	24.64	23.82	24.88
9	23.98	24.23	23.54	24.62	24.55	24.62
10	21.30	21.28	21.08	21.73	21.79	21.48
11	22.79	23.27	24.33	24.29	23.54	23.40
12	23.30	23.53	23.92	24.08	23.85	22.90
13	22.34	21.78	22.47	24.18	22.34	23.00
14	21.82	21.87	22.25	23.67	22.40	23.60
15	21.60	21.61	22.07	22.93	21.30	22.27
16	20.64	19.97	21.11	21.83	21.11	21.15
17	21.91	21.54	22.25	23.21	22.30	22.54
18	20.68	20.77	21.56	22.48	21.49	21.92
19	24.02	24.04	25.04	25.59	25.63	25.98
20	22.42	23.53	23.64	23.55	22.89	24.62
21	22.47	22.95	23.84	24.56	23.48	23.68
22	22.14	22.08	23.12	22.78	21.80	21.95
23	23.36	23.70	24.98	25.26	24.78	24.68
24	23.32	24.12	25.17	25.36	24.92	25.01

ตารางที่ 4.7 ปริมาตรก้อนมะเรียงหลังฉีดปลุกมะเรียงปากมดลูกชนิด CaSki ณ วันต่างๆ

หมายเลข สัตว์ทดลอง	ปริมาตรก้อนมะเรียง (ลูกบาศก์มิลลิเมตร)					
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 23	วันที่ 28	วันที่ 30
1	81.90	62.40	20.39	26.45	29.65	70.47
2	96.40	81.47	35.72	36.61	37.59	71.68
3	60.74	47.17	24.49	28.48	42.47	79.91
4	132.95	84.36	70.20	86.43	49.49	75.74
5	155.38	87.64	50.00	78.00	106.86	82.40
6	210.60	108.13	เสียชีวิตระหว่างการทดลอง			
7	92.02	92.02	วัดไม่ได้	วัดไม่ได้	วัดไม่ได้	วัดไม่ได้
8	66.02	66.02	55.02	70.33	-	-
9	111.51	111.51	57.92	76.68	-	-
10	86.52	86.52	56.38	60.88	-	-
11	21.64	21.64	วัดไม่ได้	วัดไม่ได้	วัดไม่ได้	91.00
12	121.68	121.68	วัดไม่ได้	วัดไม่ได้	วัดไม่ได้	วัดไม่ได้
13	114.04	92.50	68.22	66.34	83.87	86.15
14	108.61	74.10	52.65	63.50	80.15	86.18
15	132.55	80.41	57.69	55.04	64.33	81.15
16	113.20	97.95	27.05	21.64	วัดไม่ได้	วัดไม่ได้
17	วัดไม่ได้	93.72	46.50	59.62	60.74	85.06
18	73.49	36.04	30.33	40.77	48.44	58.32
19	77.33	58.71	62.03	62.03	77.09	84.72
20	81.55	57.22	44.03	40.34	74.39	75.74
21	79.91	72.80	58.58	50.54	23.22	33.22
22	78.74	66.30	58.32	42.31	31.54	41.28
23	122.30	90.56	54.36	44.95	67.60	65.42
24	81.90	71.17	58.58	34.54	17.99	15.31

หมายเหตุ วัดไม่ได้เนื่องจากบริเวณที่ฉีดมีลักษณะเป็นตุ่มนูน บวม และเป็นก้อนไม่ชัดเจน

4.4.2 ผลการต้านมะเร็งในสัตว์ทดลองของเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน

4.4.2.1 ผลการต้านมะเร็งของเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคทรงกลมต่อปริมาตรก้อนมะเร็ง (tumor volume) และร้อยละการเปลี่ยนแปลงก้อนมะเร็ง (%tumor change)

หลังจากทำการฉีดปลูกมะเร็งในหนูทดลองเป็นระยะเวลา 23-30 วัน ก้อนมะเร็งจะมีขนาดประมาณ 61-90 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ซึ่งได้ทำการแบ่งหนูทดลองที่มีปริมาตรก้อนมะเร็งใกล้เคียงกันเป็นกลุ่มต่างๆ กลุ่มละ 3 ตัว เพื่อศึกษาผลการต้านมะเร็งของเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคทรงกลม ชนิด G80SF20 และ G50SF50 เปรียบเทียบกับอนุภาคทรงกลมชนิดเดียวกันที่ไม่ถูกดูดซับเคอร์คูมิน ปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักหนู (คำนวณมาจากน้ำหนักเฉลี่ยหนูทดลองที่ 25 กรัม ซึ่งแสดงในภาคผนวก ข) ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตปริมาตร 200 ไมโครลิตร โดยฉีดทางใต้ผิวหนังบริเวณใกล้เคียงก้อนมะเร็ง ทุกๆ 7 วันเป็นจำนวน 4 ครั้ง (ภายในระยะเวลา 28 วัน) แต่เนื่องจากเกิดปัญหาทำให้ไม่สามารถทำการเก็บภาพหลอดเลือดเกิดใหม่ได้ตามกำหนด จึงต้องเลื่อนวันที่สิ้นสุดการทดลองออกไป และยังคงวัดขนาดก้อนมะเร็งทุกๆ 7 วันต่อเนื่อง จนกระทั่งถึงกำหนดการทดลองเก็บภาพหลอดเลือดเกิดใหม่ซึ่งถือเป็นวันสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งปริมาตรก้อนมะเร็งหลังจากฉีดรักษา ณ วันต่างๆ แสดงในภาคผนวก ข และรูปที่ 4.11 แสดงร้อยละการเปลี่ยนแปลงปริมาตรก้อนมะเร็งของหนูทั้ง 5 กลุ่ม

จากผลการทดลอง พบว่า หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตทั้ง 3 ตัว มีปริมาตรก้อนมะเร็งเพิ่มขึ้นในวันที่ 7 และ 14 โดยมีค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงปริมาตรก้อนมะเร็ง (% tumor change) ประมาณร้อยละ 1-69 และ 27-113 ตามลำดับ แต่ในวันที่ 21 พบว่า หนูทดลอง 1 ใน 3 ตัวมีปริมาตรก้อนมะเร็งที่ลดลงจนกระทั่งถึงวันสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 52 ในขณะที่หนูทดลอง 2 ใน 3 ตัวมีปริมาตรก้อนมะเร็งเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งสาเหตุที่พบการลดลงของปริมาตรก้อนมะเร็งในหนู 1 ตัว ที่ได้รับสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตนั้น อาจเนื่องมาจากก้อนที่เกิดขึ้นเป็นหนองจากการอักเสบตรงบริเวณที่ฉีด เมื่อระยะเวลาผ่านไป การอักเสบลดลง ก้อนจึงมีขนาดเล็กลง

เมื่อพิจารณาหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับอนุภาคทรงกลมชนิด G80SF20 และ G50SF50 ที่ถูกดูดซับเคอร์คูมิน (G80SF20-Cur และ G50SF50-Cur) พบว่าหนูทดลองทั้ง 3 ตัวในกลุ่มที่ได้รับ G50SF50-Cur มีค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงปริมาตรก้อนมะเร็งลดลงในวันที่ 7-21 ประมาณร้อยละ 1 ถึง 38 และตั้งแต่วันที่ 28 เป็นต้นไป พบว่าหนูทดลองทั้ง 3 ตัวมีปริมาตรก้อนมะเร็งเพิ่มขึ้น ในขณะที่หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ G80SF20-Cur พบว่า หนูทดลอง 1 ตัวมีปริมาตรก้อนมะเร็งลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยลดลงสูงสุดร้อยละ 81 ในวันที่ 28 ส่วนหนูทดลองอีกตัวพบว่าปริมาตรก้อนมะเร็งเพิ่มขึ้นในช่วงแรก และกลับลดลงถึงร้อยละ 41 ในวันที่ 28 ในขณะที่หนูทดลองอีกหนึ่งตัวมีปริมาตรก้อนมะเร็งเพิ่มขึ้น และเมื่อพิจารณาหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับอนุภาคทรงกลมชนิด G80SF20 และ G50SF50 ที่ไม่ถูกดูดซับเคอร์คูมิน พบว่า หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ G50SF50 ทั้ง 3 ตัว มีค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงปริมาตรก้อนมะเร็งเพิ่มขึ้นในวันที่ 7-28 (จากร้อยละ 34-116 ในวันที่ 7 เป็นร้อยละ 110-230 ในวันที่ 28) ในขณะที่หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ G80SF20 มีค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงปริมาตรก้อนมะเร็งเพิ่มขึ้นทั้ง 3 ตัวในวันที่ 7 โดยมีค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงปริมาตรก้อนมะเร็งประมาณ 6-128 และในวันที่ 14-28 พบว่า หนูทดลอง 1 ตัวจาก 3 ตัวมีค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงปริมาตรก้อนมะเร็งลดลง ในขณะที่หนูทดลอง 2 ตัวจาก 3 ตัวมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับวันแรก

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างหนูทดลองที่ได้รับอนุภาคทรงกลมชนิด G50SF50 ที่ดูดซับและไม่ดูดซับเคอร์คูมิน (G50SF50-Cur และ G50SF50) จะพบว่า หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ G50SF50-Cur มีค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงปริมาตรก้อนมะเร็งลดลงตั้งแต่วันที่ 7-21 และมีค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงปริมาตรก้อนมะเร็งเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 28 ไปจนถึงวันที่สิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 36) ในขณะที่หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ G50SF50 มีค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงปริมาตรก้อนมะเร็งเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 7 ไปจนถึงวันที่สิ้นสุดการทดลอง ซึ่งอาจกล่าวได้ว่า เคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนชนิด G50SF50 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งได้ในช่วง 21 วันแรก และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างหนูทดลองที่ได้รับอนุภาคทรงกลมชนิด G80SF20 ที่ดูดซับและไม่ดูดซับเคอร์คูมิน (G80SF20-Cur และ G80SF20) จะพบว่าหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ G80SF20-

Cur มีแนวโน้มของค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงปริมาตรก้อนมะเร็งลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ หนูทดลองที่ได้รับ G80SF20 ตั้งแต่วันที่ 7 ไปจนถึงวันที่สิ้นสุดการทดลอง กล่าวคือ หนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับ G80SF20-Cur และ G80SF20 มีค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงปริมาตรก้อนมะเร็งของแต่ละกลุ่มไม่เป็นไปในแนวทางเดียวกัน จึงเห็นเพียงแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงเท่านั้น

จากงานวิจัยในปี 2014 ของ Yoosungnoen-Chintana, P. และคณะ [10] ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านมะเร็งของเคอร์คูมิน พบว่า ในวันที่ 12 ของการทดลองของหนูทดลองกลุ่มที่ปลูกถ่ายเซลล์ CaSki และได้รับเคอร์คูมิน 1500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยการรับประทาน มีก้อนมะเร็งขนาดเล็กกลอง ($439.53 \pm 23.66\text{mm}^3$) อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ หนูทดลองกลุ่มที่ปลูกถ่ายเซลล์ CaSki และได้รับเคอร์คูมิน 1000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบก้อนมะเร็งมีขนาดเล็กกลอง ($918.06 \pm 33.86\text{mm}^3$) อย่างมีนัยสำคัญ ในวันที่ 18 ของการทดลอง และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่า เคอร์คูมินขนาด 1000 และ 1500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สามารถชะลอการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งได้ 21.03% และ 35.57% ตามลำดับ และจากงานวิจัยในปี 2007 ของ Jing, Z และคณะ [80] ที่ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านมะเร็งของเคอร์คูมินในหนูทดลองที่ฉีดปลูกเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa พบว่า หนูทดลองที่ได้รับเคอร์คูมินขนาด 250 ไมโครโมล/ลิตร ในสารละลาย PBS 200 ไมโครลิตร (คิดเป็นปริมาณเคอร์คูมินประมาณ 1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) โดยให้ยาทางการฉีดบริเวณหน้าท้อง เป็นเวลา 10 วัน มีปริมาตรก้อนมะเร็งประมาณ 53 ± 8.52 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีปริมาตรก้อนมะเร็งประมาณ 350 ± 34.95 ลูกบาศก์มิลลิเมตร และหนูกลุ่มที่ได้รับเคอร์คูมินมีอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็ง (tumor inhibition rate/IR) เท่ากับ 74.33 ซึ่งสามารถชะลอการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งได้มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อเปรียบเทียบทั้ง 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการทดลองนี้ที่มีการใช้อุณหภูมิของหลอดขนาด 32-75 ไมครอน ชนิด G80SF20 และ G50SF50 เป็นระบบนำส่งเคอร์คูมิน เมื่อคำนวณขนาดยาที่ให้ในแต่ละครั้ง จะได้ว่า อนุภาคทรงกลมชนิด G80SF20 ขนาด 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม จะมีปริมาณ เคอร์คูมิน 2.12 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และอนุภาคทรงกลมชนิด G50SF50 ขนาด 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม จะมีปริมาณเคอร์คูมิน

3.16 มิลลิกรัม/กิโลกรัม จะเห็นได้ว่าการใช้ระบบนำส่งอนุภาคทรงกลม โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนังเพื่อควบคุมการปลดปล่อยคอร์คูมินเฉพาะที่ในบริเวณที่ต้องการให้ออกฤทธิ์ จะมีปริมาณคอร์คูมินที่หนูทดลองได้รับน้อยกว่าการให้โดยการรับประทาน ซึ่งเป็นข้อดีของระบบนี้

จากการทดลองผลการต้านมะเร็งของคอร์คูมินที่ปลดปล่อยจากอนุภาคทรงกลมที่มีต่อร้อยละการเปลี่ยนแปลงก้อนมะเร็งจะเห็นได้ว่า มีปัจจัยหลายประการที่มีผลต่อร้อยละการเปลี่ยนแปลงปริมาตรก้อนมะเร็ง อาทิ การเจริญของเซลล์มะเร็งซึ่งสามารถพัฒนาเพื่อต่อต้านกับสารคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อย จึงทำให้คอร์คูมินออกฤทธิ์ได้ลดลง ซึ่งเห็นได้จากในวันที่ 21 ของการรักษา หนูทดลองกลุ่ม G50SF50-Cur เริ่มมีค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงก้อนมะเร็งเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ ในการทดลองนี้ใช้ระบบอนุภาคทรงกลมที่มีขนาด 32-75 ไมครอน ที่ทำการดูดซับคอร์คูมิน เพื่อฉีดเข้าใต้ผิวหนังหนูบริเวณใกล้เคียงกับก้อนมะเร็ง แต่ยังมีข้อจำกัดที่ไม่สามารถควบคุมอนุภาคทรงกลมให้อยู่เฉพาะบริเวณตำแหน่งที่ต้องการได้ ซึ่งในการทดลองพบว่าอนุภาคทรงกลมสามารถไหลตามสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตที่ใช้เป็นตัวกลางในการนำพาอนุภาคเข้าสู่ร่างกาย จึงพบการสะสมของอนุภาคทรงกลมทั้งในบริเวณใกล้เคียงและไกลจากก้อนมะเร็งได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.12-4.15 จึงอาจส่งผลให้คอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยออกมาไม่สามารถไปถึงตำแหน่งของก้อนมะเร็งที่ต้องการให้ออกฤทธิ์ได้ ซึ่งจะเห็นว่า ค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงก้อนมะเร็งในช่วงวันที่ 7-21 ภายหลังการรักษา ของหนูทดลองกลุ่ม G50SF50-Cur นั้นมีค่าลดลง และมีค่าค่อนข้างแตกต่างกันในช่วงกว้าง นอกจากนี้ การย่อยสลายทางชีวภาพในสัตว์ทดลองของอนุภาคทรงกลมก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ต้องคำนึงถึง กล่าวคือ การย่อยสลายทางชีวภาพในสัตว์ทดลองนั้นเกิดขึ้นได้ช้ากว่าการย่อยสลายในห้องปฏิบัติการ อาจส่งผลให้อนุภาคทรงกลมที่มีส่วนผสมของเจลาติน เมื่อหลงเหลืออยู่ในร่างกายอาจจะกระตุ้นให้เกิดการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งได้ โดยสังเกตได้จากหนูทดลองที่ได้รับ Blank-G50SF50 มีค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงปริมาตรก้อนมะเร็งเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 7 และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นไปจนถึงวันที่ 28 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม G50SF50-Cur

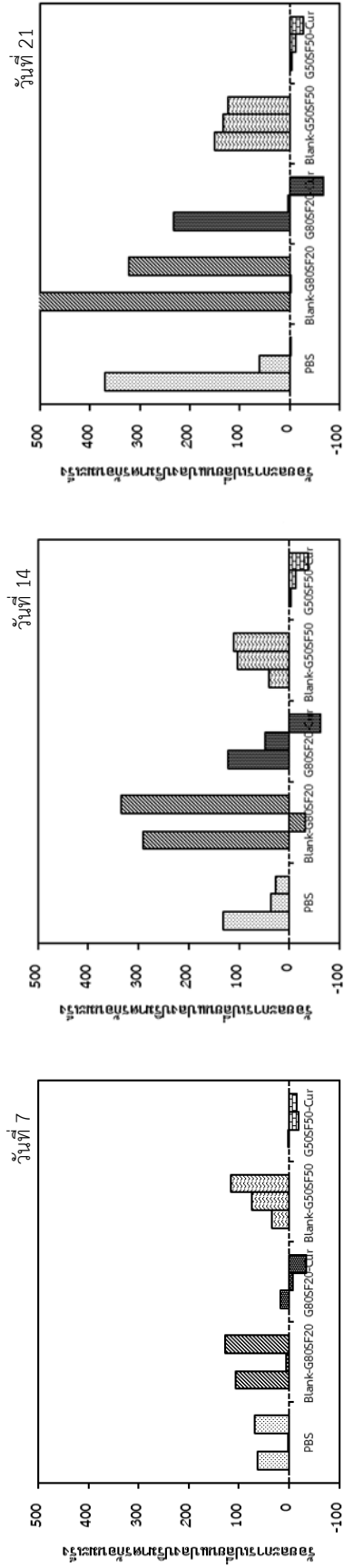
4.4.2.2 ผลการต้านมะเร็งของเคอร์คูมินที่ปลดปล่อยจากอนุภาคทรงกลมต่อความหนาแน่นของหลอดเลือดที่เกิดขึ้นใหม่ (neocapillary density; NCD)

หลังจากทำการฉีดยารักษาหนูทดลองด้วยอนุภาคทรงกลม ชนิด G80SF20 และ G50SF50 ที่ถูกดูดซับเคอร์คูมิน เปรียบเทียบกับอนุภาคทรงกลมชนิดเดียวกันที่ไม่ถูกดูดซับเคอร์คูมิน ขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมหนู ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตทางใต้ผิวหนังบริเวณใกล้ก้อนมะเร็ง ทุกๆ 7 วันเป็นจำนวน 4 ครั้ง (ภายในระยะเวลา 28 วัน) แต่เนื่องจากเกิดปัญหาด้านเทคนิคทำให้ไม่สามารถทำการเก็บภาพหลอดเลือดเกิดใหม่ได้ตามกำหนด จึงต้องเลื่อนวันที่สิ้นสุดการทดลองออกไป ดังนั้นจึงต้องเลี้ยงหนูทดลองต่อไปโดยไม่ได้ฉีดยาเพิ่มและยังคงวัดขนาดก้อนมะเร็งทุกๆ 7 วัน จนกระทั่งถึงกำหนดการทดลองเก็บภาพหลอดเลือดเกิดใหม่ซึ่งถือเป็นวันสิ้นสุดการทดลอง และได้ภาพถ่ายหลอดเลือดของหนูทดลองผ่านกล้องฟลูออเรสเซนซ์ในตำแหน่งที่ใกล้เคียงกับก้อนมะเร็งตัวละ 3 ตำแหน่งในแต่ละกลุ่มการทดลอง แสดงในรูปที่ 4.16-4.20 หลังจากนั้นได้นำภาพถ่ายหลอดเลือดมาวิเคราะห์หาค่าร้อยละความหนาแน่นของหลอดเลือดที่เกิดขึ้นใหม่ ด้วยโปรแกรม Image-Pro Plus6.0 ซึ่งแสดงเป็นค่าเฉลี่ยของหนูทดลองแต่ละตัวในตารางที่ 4.5 นอกจากนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างภาพถ่ายก้อนมะเร็งและหลอดเลือดที่เกิดขึ้นใหม่บริเวณก้อนมะเร็ง ในกลุ่มที่ทำการฉีดยาด้วย G80SF20-Cur ด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ ดังแสดงในรูปที่ 4.21

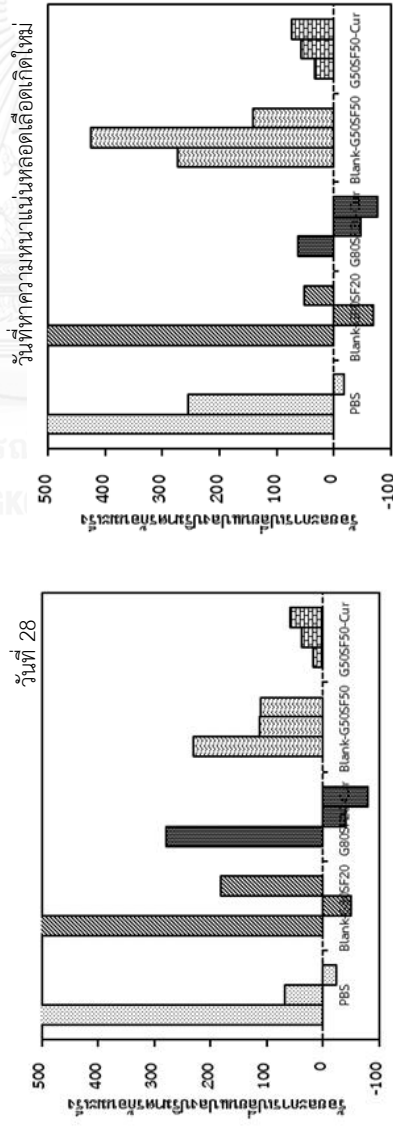
จากการทดลองพบว่า หนูทดลองที่ได้รับสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตมีค่าร้อยละความหนาแน่นของหลอดเลือดที่เกิดขึ้นใหม่ ณ วันที่ 52 ของการฉีดยา ประมาณ 36-45 ส่วนหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับอนุภาคทรงกลม ชนิด Blank-G80SF20 และ G80SF20-Cur มีค่าร้อยละความหนาแน่นของหลอดเลือดที่เกิดขึ้นใหม่ ณ วันที่ 62 ของการฉีดยา ประมาณ 37-40 และ 24-25ตามลำดับ ซึ่งเห็นได้ว่าหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนชนิด G80SF20 ที่ถูกดูดซับเคอร์คูมิน มีแนวโน้มของการเกิดหลอดเลือดใหม่น้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับอนุภาคทรงกลมชนิดเดียวกันที่ไม่ได้ดูดซับเคอร์คูมิน และเมื่อพิจารณาหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับอนุภาคทรงกลม ชนิด Blank-G50SF50 และ G50SF50-Cur พบว่า ค่าร้อยละความหนาแน่นของหลอดเลือดเกิดใหม่ของหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับ Blank-G50SF50 ณ วันที่ 43 ของการฉีดยา มีค่าประมาณ 39-48 ส่วนกลุ่มที่ได้รับ

G50SF50-Cur มีค่าร้อยละความหนาแน่นของหลอดเลือดเกิดใหม่ ณ วันที่ 36 ของการรักษา มีค่าประมาณ 27-36 ซึ่งเห็นได้ว่าหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนชนิด G50SF50 ที่ถูกดูดซับเคอร์คูมิน มีแนวโน้มของการเกิดหลอดเลือดใหม่ลดลง และเป็นไปในแนวทางเดียวกับกลุ่มที่ได้รับอนุภาคทรงกลมชนิด G80SF20 ที่ถูกดูดซับเคอร์คูมิน

จากการผลทดลองนี้อาจกล่าวได้ว่าเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน (โดยเฉพาะชนิด G80SF20) สามารถชะลอการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งได้ โดยกลไกการยับยั้งการเกิดหลอดเลือด (angiogenesis) ซึ่งเป็นกลไกการสร้างหลอดเลือดใหม่เพื่อทำให้เซลล์มะเร็งมีการเจริญเติบโตและพัฒนาลุกลามเนื้อเยื่อปกติจนมีขนาดใหญ่ขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในปี 2014 ของ Yoysungnoen-Chintana, P. และคณะ [10] ซึ่งพบว่า หนูทดลองกลุ่มที่ปลูกถ่ายเซลล์ CaSki และได้รับการป้องกันเคอร์คูมินขนาด 1,000 และ 1500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีค่าร้อยละความหนาแน่นของหลอดเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าประมาณร้อยละ 20 และ 13 ตามลำดับ ในขณะที่หนูทดลองกลุ่มควบคุมมีค่าร้อยละความหนาแน่นของหลอดเลือดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าประมาณร้อยละ 39 ในงานวิจัยนี้ได้มีการทดลองหาปริมาณหลอดเลือดเกิดที่ใหม่ (Neocapillary density) ในแต่ละกลุ่มการทดลอง แต่เกิดปัญหาในช่วงการเก็บผลการทดลอง กล่าวคือ ไม่สามารถถ่ายภาพหลอดเลือดได้ตามระยะเวลาที่กำหนดในแผนการวิจัย อีกทั้งจำนวนภาพถ่ายหลอดเลือดที่นำมาวิเคราะห์ไม่มากเพียงพอกับการวิเคราะห์ทางสถิติ จึงไม่สามารถเปรียบเทียบค่าร้อยละปริมาณความหนาแน่นของหลอดเลือดเกิดใหม่ในเชิงสถิติได้ อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบผลร้อยละการเปลี่ยนแปลงปริมาตรก้อนมะเร็งกับค่าร้อยละความหนาแน่นของหลอดเลือดเกิดใหม่ในหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับอนุภาคทรงกลมชนิด G80SF20 ที่ดูดซับเคอร์คูมิน พบว่ามีความสอดคล้องกัน



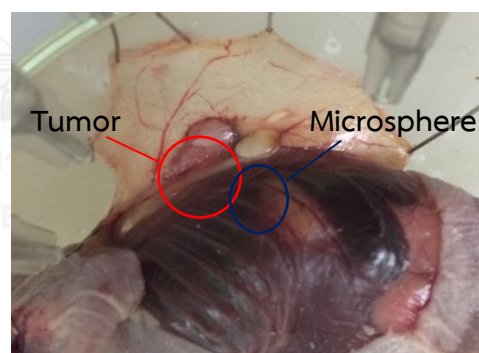
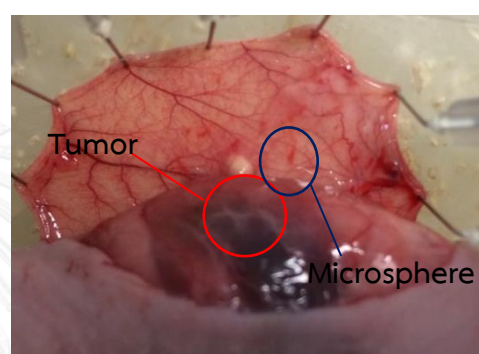
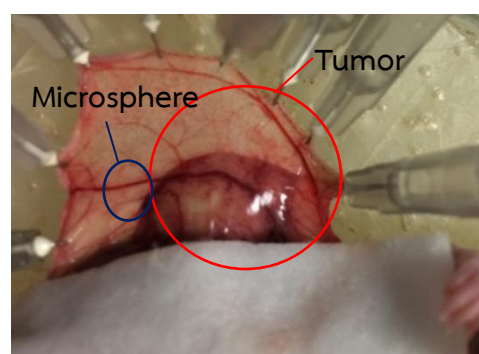
วันที่ความหนาแน่นหลอดเลือดเกิดใหม่



รูปที่ 4.11 กราฟแสดงร้อยละการเปลี่ยนแปลงปริมาตรก้อนมะเร็ง (% tumor change) ของหนูทดลองกลุ่มต่างๆหลังทำการฉีดรักษา ในวันที่ 7, 14, 21, 28 และวันที่หาความหนาแน่นหลอดเลือดเกิดใหม่ (กลุ่ม PBS ทดลองวันที่ 52 กลุ่ม Blank-G80SF20 และ G80SF20-Cur ทดลองวันที่ 62 กลุ่ม Blank-G50SF50 ทดลองวันที่ 43 และกลุ่ม G50SF50-Cur ทดลองวันที่ 36)

ก) ภาพถ่ายจากภายนอก

ข) ภาพถ่ายจากภายใน

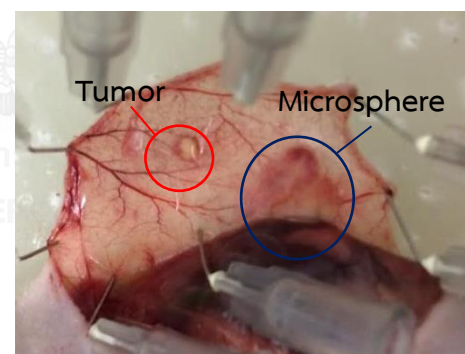
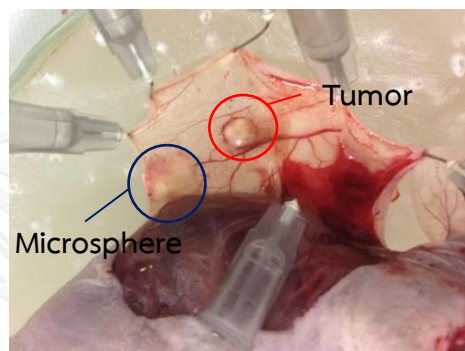
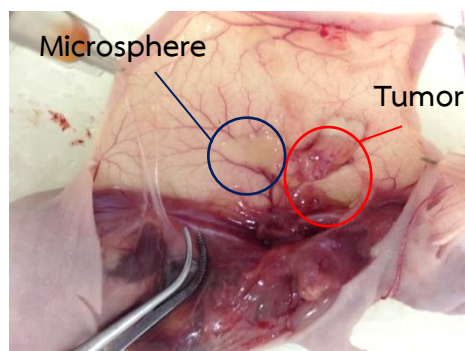


รูปที่ 4.12 ภาพถ่ายก่อนมะเร็งร้ายภายนอกร่างกายและภายในร่างกาย หลังทำการฉีดรักษาด้วย Blank-G80SF20 ณ วันที่ 62

ก) ภาพถ่ายจากภายนอก



ข) ภาพถ่ายจากภายใน

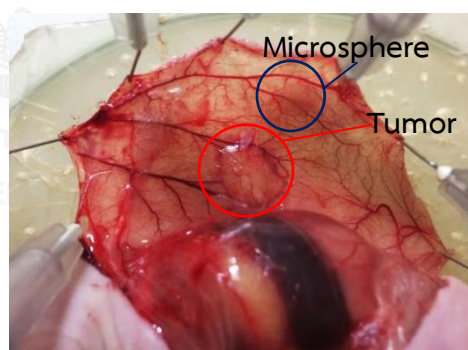
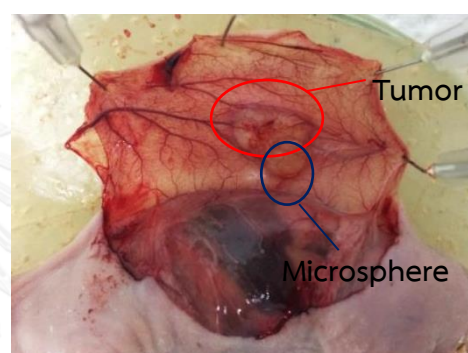
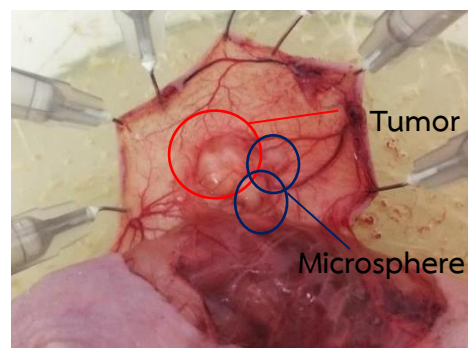


รูปที่ 4.13 ภาพถ่ายก่อนมะเร็งร้ายภายนอกร่างกายและภายในร่างกาย หลังทำการฉีดรักษาด้วย G80SF20-Cur ณ วันที่ 62

ก) ภาพถ่ายจากภายนอก



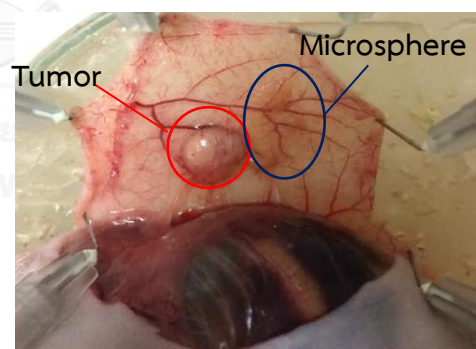
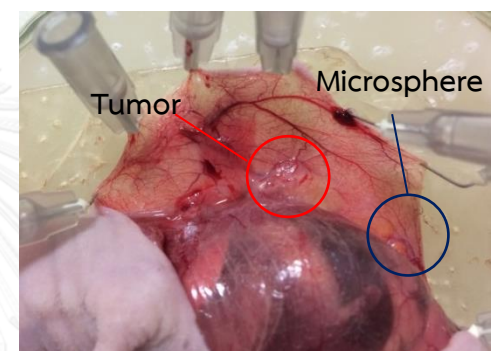
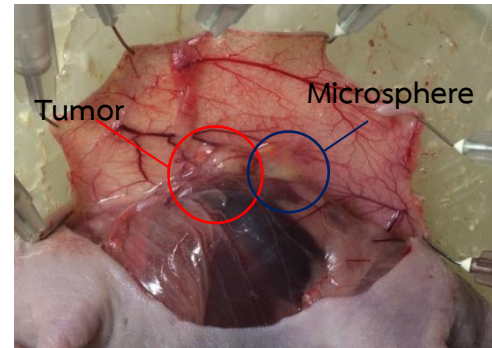
ข) ภาพถ่ายจากภายใน



รูปที่ 4.14 ภาพถ่ายก่อนมะเร็งภายนอกร่างกายและภายในร่างกาย หลังทำการฉีดรักษาด้วย Blank-G50SF50 ณ วันที่ 43

ก) ภาพถ่ายจากภายนอก

ข) ภาพถ่ายจากภายใน



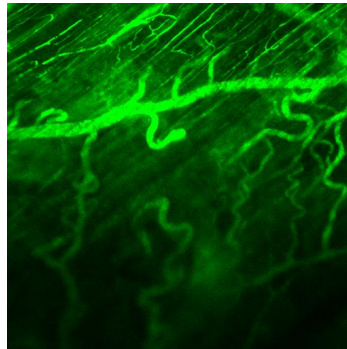
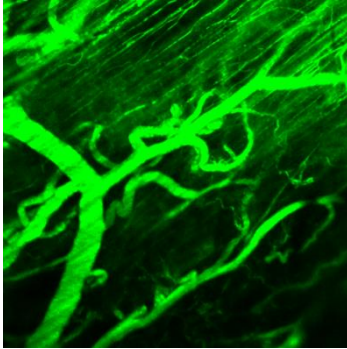
รูปที่ 4.15 ภาพถ่ายก่อนมะเร็งภายนอกร่างกายและภายในร่างกาย หลังทำการฉีดรักษาด้วย G50SF50-Cur ณ วันที่ 36

ก) ตำแหน่งที่ 1

ข) ตำแหน่งที่ 2

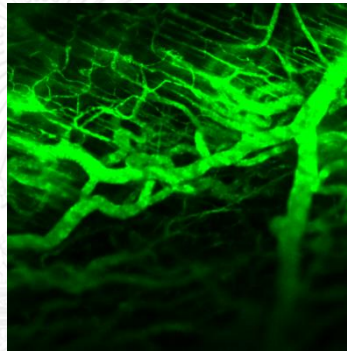
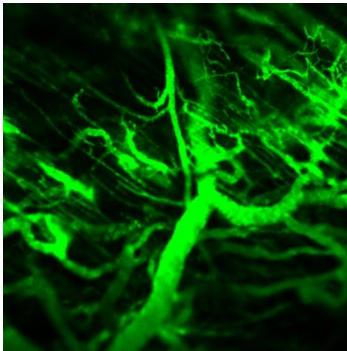
ค) ตำแหน่งที่ 3

PBS-1



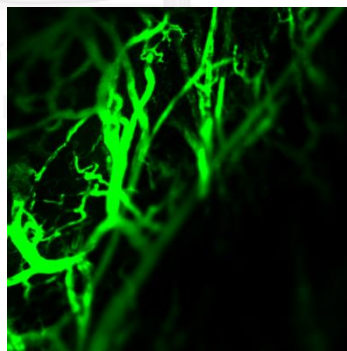
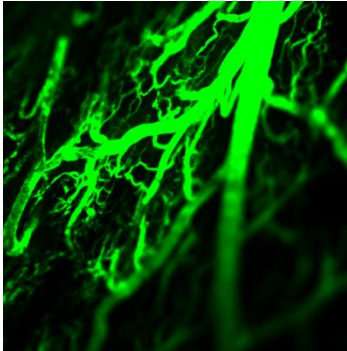
(ถ่ายภาพไม่ได้)

PBS-2



(ถ่ายภาพไม่ได้)

PBS-3



(ถ่ายภาพไม่ได้)

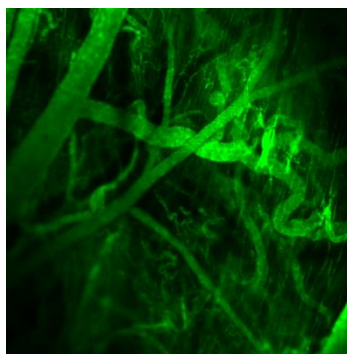
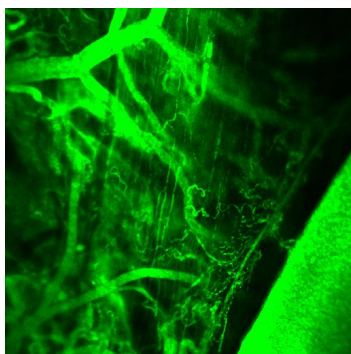
รูปที่ 4.16 ภาพถ่ายหลอดเลือดของหนูทดลองผ่านกล้องฟลูออเรสเซนซ์ตำแหน่งต่างๆ หลังฉีดรักษา ด้วย PBS ณ วันที่ 52

ก) ตำแหน่งที่ 1

ข) ตำแหน่งที่ 2

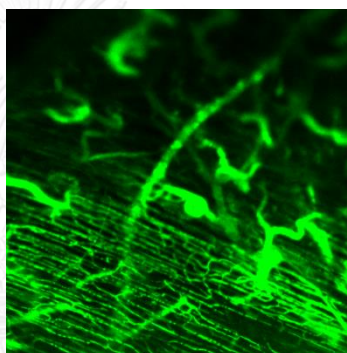
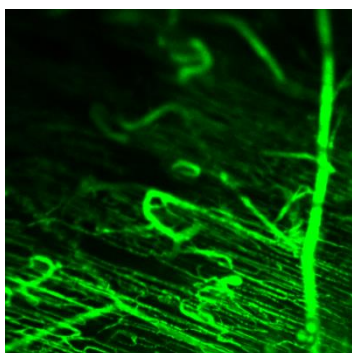
ค) ตำแหน่งที่ 3

Blank-G80SF20-1



(ถ่ายภาพไม่ได้)

Blank-G80SF20-2



(ถ่ายภาพไม่ได้)

Blank-G80SF20-3

(ถ่ายภาพไม่ได้)

(ถ่ายภาพไม่ได้)

(ถ่ายภาพไม่ได้)

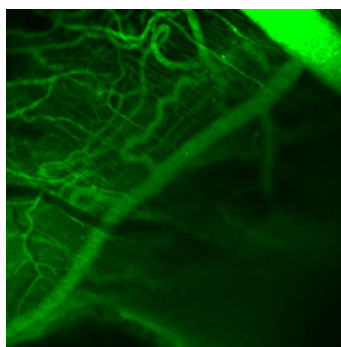
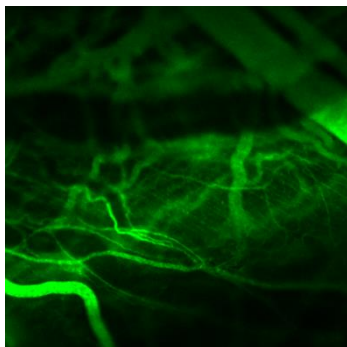
รูปที่ 4.17 ภาพถ่ายหลอดเลือดของหนูทดลองผ่านกล้องฟลูออเรสเซนซ์ตำแหน่งต่างๆ หลังฉีกรักษา ด้วย Blank-G80SF20 ณ วันที่ 62

ก) ตำแหน่งที่ 1

ข) ตำแหน่งที่ 2

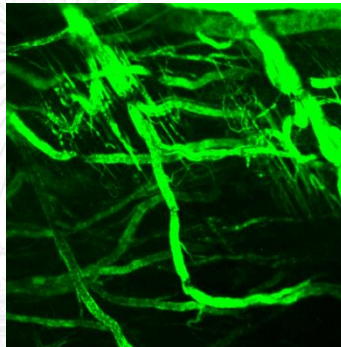
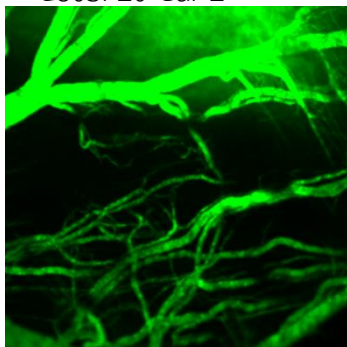
ค) ตำแหน่งที่ 3

G80SF20-Cur-1



(ถ่ายภาพไม่ได้)

G80SF20-Cur-2



(ถ่ายภาพไม่ได้)

G80SF20-Cur-3

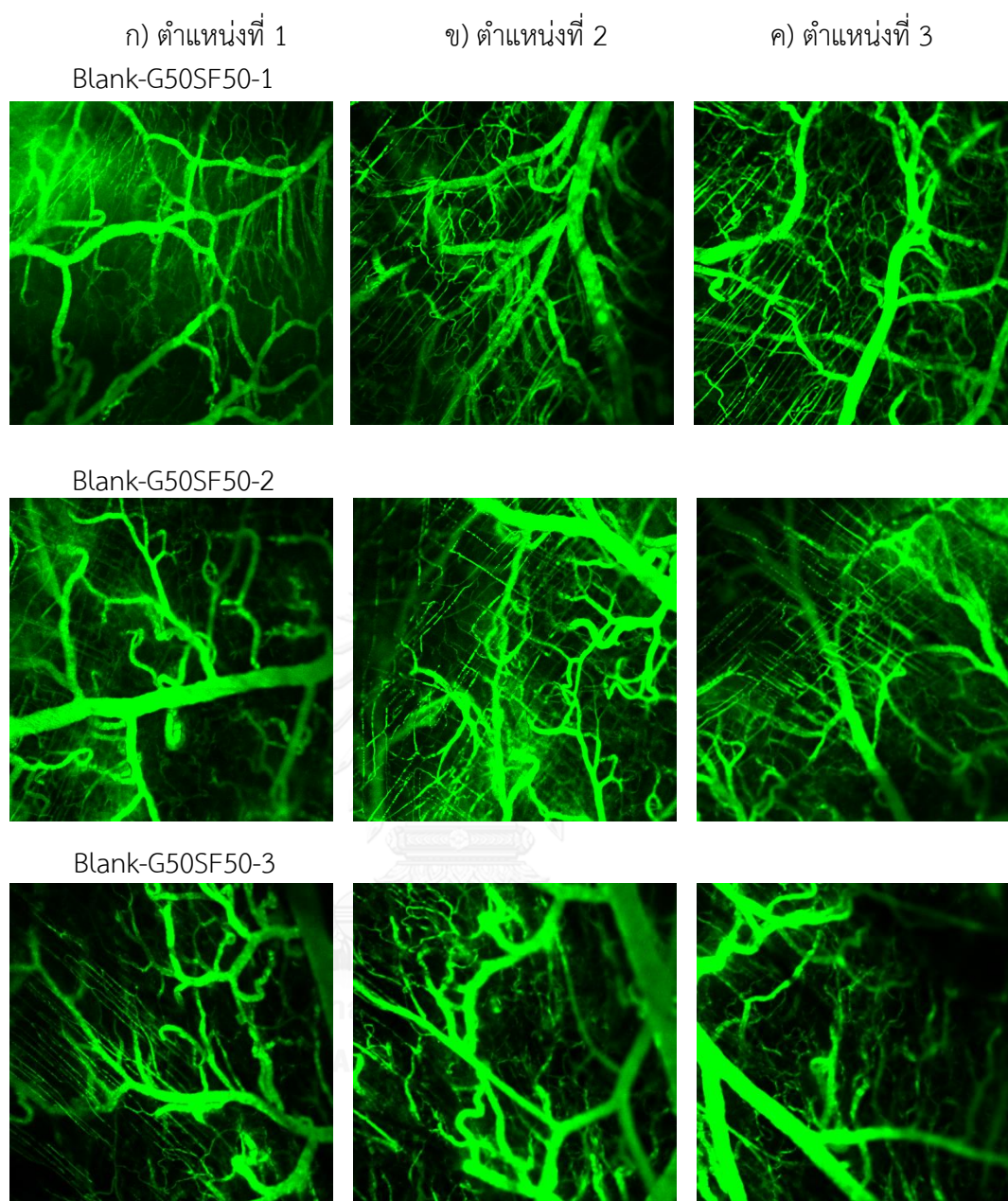
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

(ถ่ายภาพไม่ได้)

(ถ่ายภาพไม่ได้)

(ถ่ายภาพไม่ได้)

รูปที่ 4.18 ภาพถ่ายหลอดเลือดของหนูทดลองผ่านกล้องฟลูออเรสเซนซ์ ตำแหน่งต่างๆ หลังฉีดยา
ด้วย G80SF20-Cur ณ วันที่ 62



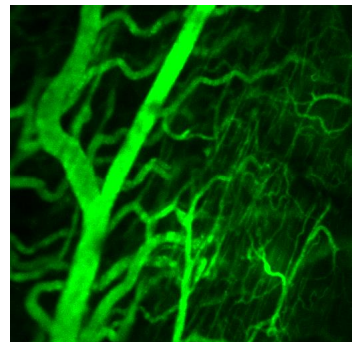
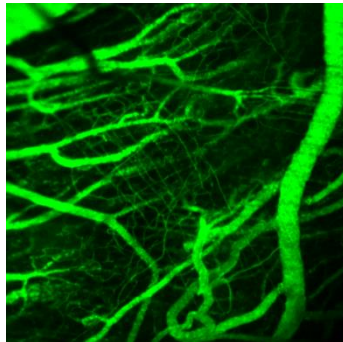
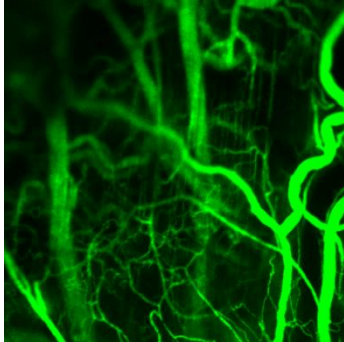
รูปที่ 4.19 ภาพถ่ายหลอดเลือดของหนูทดลองผ่านกล้องฟลูออเรสเซนซ์ ตำแหน่งต่างๆ หลังฉีดรักษาด้วย Blank-G50SF50 ณ วันที่ 43

ก) ตำแหน่งที่ 1

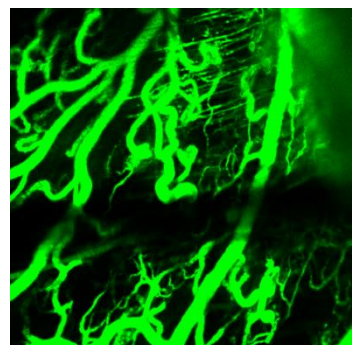
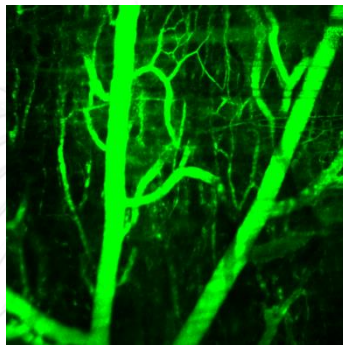
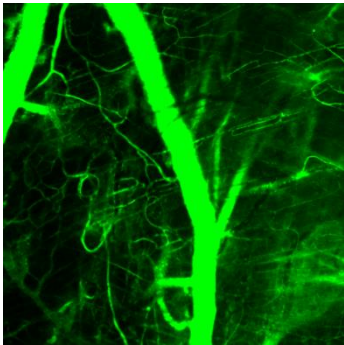
ข) ตำแหน่งที่ 2

ค) ตำแหน่งที่ 3

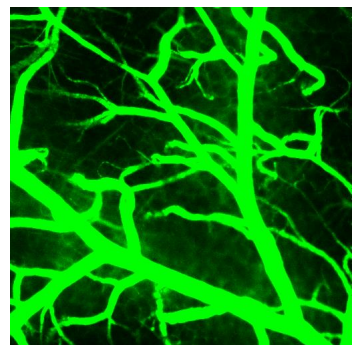
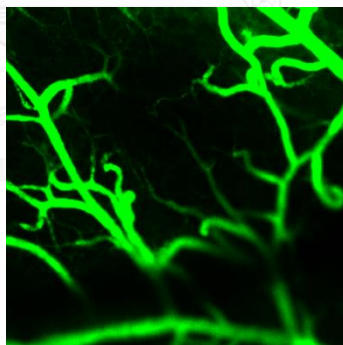
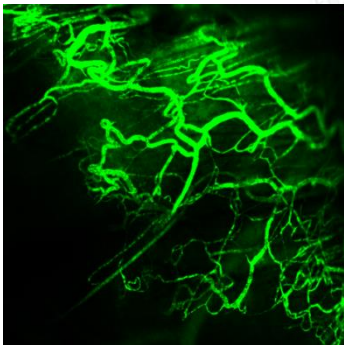
G50SF50-Cur-1



G50SF50-Cur-2



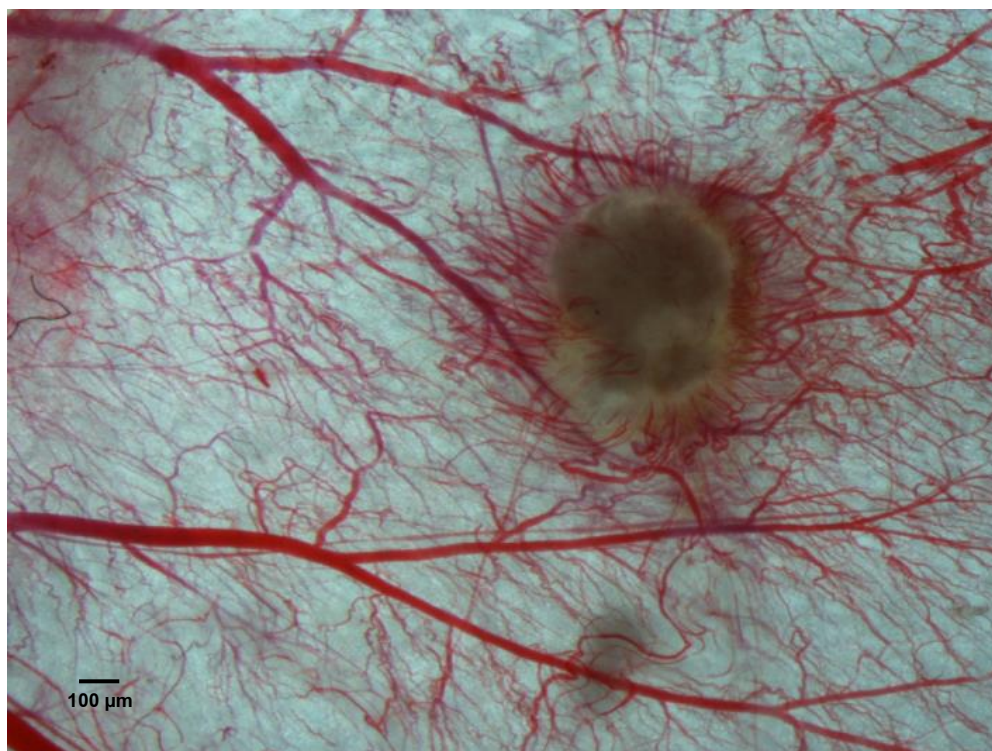
G50SF50-Cur-3



รูปที่ 4.20 ภาพถ่ายหลอดเลือดของหนูทดลองผ่านกล้องฟลูออเรสเซนซ์ ตำแหน่งต่างๆ หลังฉีดยาด้วย G50SF50-Cur ณ วันที่ 36

ตารางที่ 4.8 ค่าร้อยละความหนาแน่นหลอดเลือดเกิดใหม่ (% Neocapillary density; NCD)
(ณ วันที่ 52 ในกลุ่ม PBS, วันที่ 62 ในกลุ่ม Blank-G80SF20 และ G80SF20-Cur, วันที่ 43 ในกลุ่ม
Blank-G50SF50 และวันที่ 36 ในกลุ่ม G50SF50-Cur)

กลุ่ม	ค่าเฉลี่ยร้อยละความหนาแน่นหลอดเลือดเกิดใหม่
PBS-1	44.90 (n=2)
PBS-2	41.48 (n=2)
PBS-3	35.54 (n=2)
Blank-G80SF20-1	39.76 (n=2)
Blank-G80SF20-2	37.15 (n=2)
Blank-G80SF20-3	ไม่สามารถเก็บภาพได้
G80SF20-Cur-1	25.23 (n=2)
G80SF20-Cur-2	24.05 (n=2)
G80SF20-Cur-3	ไม่สามารถเก็บภาพได้
Blank-G50SF50-1	41.37 (n=3)
Blank-G50SF50-2	48.49 (n=3)
Blank-G50SF50-3	38.67 (n=3)
G50SF50-Cur-1	35.69 (n=3)
G50SF50-Cur-2	31.52 (n=3)
G50SF50-Cur-3	26.93 (n=3)



รูปที่ 4.21 ภาพถ่ายก้อนมะเร็งและหลอดเลือดที่กำเนิดใหม่บริเวณก้อนมะเร็ง ในกลุ่มที่ทำการฉีดรักษา ด้วย G80SF20-Cur-3 จากกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (สเกลบาร์เท่ากับ 100 ไมครอน)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการเตรียมอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินชนิดเอและไฟโบรอินไหมไทยที่มีอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินต่อไฟโบรอินไหมไทย G80SF20 และ G50SF50 ด้วยเทคนิคอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน ซึ่งดัดแปลงจากงานวิจัยในปี 2014 ของ Ratanavaraporn, J. และคณะ [15] โดยใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำและน้ำมัน เท่ากับ 1:12 และเติม Span 80 เป็นสารทำอิมัลชันที่ทำให้อนุภาคมีความคงตัวมากขึ้นโดยการเชื่อมขวางด้วยความร้อนแบบก้ำจัดน้ำออกภายหลังการขึ้นรูป ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส และนำอนุภาคทรงกลมไปดูดซับเคอร์คูมินที่ละลายในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำในสัดส่วนต่างๆ เพื่อนำไปการศึกษาผลการต้านมะเร็งในสัตว์ทดลองของเคอร์คูมินที่ปลดปล่อยจากอนุภาคทรงกลม

ผลการศึกษาร้อยละผลได้ทั้งหมดของอนุภาคทรงกลม สรุปได้ว่า ร้อยละผลได้ของอนุภาคทรงกลมที่มีขนาดมากกว่า 300 ไมครอนมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเติมสารทำอิมัลชันในการเตรียมอนุภาค ซึ่งเป็นผลมาจาก สารทำอิมัลชันไปช่วยการลดแรงตึงผิวของวุ้นภาคน้ำและน้ำมัน ทำให้ได้อนุภาคส่วนใหญ่มีขนาดเล็กลง ทำให้ได้อนุภาคที่มีขนาดระหว่าง 32-75 ไมครอนมากที่สุด ซึ่งเป็นขนาดที่สามารถฉีดผ่านเข็มฉีดยาขนาด 27G (0.41×12.7 มิลลิเมตร) ได้ดี เหมาะสมในการใช้เป็นระบบนำส่งโดยการฉีดผ่านเข็มฉีดยา โดยอนุภาคทั้งชนิด G80SF20 และ G50SF50 ที่มีขนาด 32-75 ไมครอน มีลักษณะเป็นทรงกลม พื้นผิวค่อนข้างเรียบ และภายในไม่มีรูพรุน

เมื่อนำอนุภาคทรงกลมชนิด G80SF20 และ G50SF50 มาเชื่อมขวางด้วยความร้อนแบบก้ำจัดน้ำออกที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส พบว่า ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของอนุภาคทรงกลมภายหลังการเชื่อมขวางด้วยความร้อนแบบก้ำจัดน้ำออกมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการเชื่อมขวาง ซึ่งบ่งบอกถึงหมู่อะมิโนที่ถูกใช้ในการเชื่อมขวาง และเมื่อพิจารณาอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย พบว่า ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของไฟโบรอินไหมไทย ซึ่งเป็นผลมาจากหมู่อะมิโนอิสระที่มีปริมาณมากในองค์ประกอบของเจลาติน เมื่อเพิ่มอัตราส่วนของโบรอินไหมไทยในอนุภาคจึงทำให้ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระมีค่าลดลง แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าร้อยละการเชื่อมขวาง

อนุภาคทรงกลมชนิด G80SF20 และ G50SF50 สามารถย่อยสลายทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการได้อย่างรวดเร็วในวันแรกเมื่อแช่ในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส XIV เนื่องจากอนุภาคทรงกลมทั้ง 2 ชนิด มีค่าร้อยละการเชื่อมขวางที่ใกล้เคียงกัน ประกอบกับเอนไซม์โปรติเอส

XIV จำเพาะเจาะจงกับโปรตีนทั้งเจลาตินและไฟโบรอิน และเมื่อผ่านไป 14 วัน อนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินใหม่ไทยในปริมาณมากกว่าจะถูกย่อยสลายได้น้อยกว่าเล็กน้อย

ผลการศึกษาความสามารถในการละลายและการดูดซับเคอร์คูมินบนอนุภาคทรงกลมในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำ พบว่า อนุภาคทรงกลมทั้ง 2 ชนิดมีการบวมน้ำมากขึ้นในตัวทำละลายผสมที่มีสัดส่วนของน้ำเพิ่มขึ้น และมีประสิทธิภาพในการกักเก็บและปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกดูดซับบนอนุภาคทรงกลมทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำที่มีสัดส่วนของน้ำเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากเจลาตินที่มีความชอบน้ำและมีความสามารถในการบวมน้ำสูง ทำให้เกิดกลไกการแพร่ของเคอร์คูมินโดยมีน้ำเป็นตัวพาเคอร์คูมินเข้าสู่อนุภาคทรงกลมที่เกิดการบวมน้ำ และเมื่อพิจารณาอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนักของเจลาตินและไฟโบรอินใหม่ไทยที่สัดส่วนต่างกัน พบว่า อนุภาคทรงกลมชนิด G50SF50 มีประสิทธิภาพในการกักเก็บและปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกดูดซับบนอนุภาคมากกว่าชนิด G80SF20 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งเป็นผลมาจาก เคอร์คูมินที่มีความไม่ชอบน้ำสูงจึงเกิดอันตรกิริยากับส่วนไม่ชอบน้ำในโมเลกุลของไฟโบรอินใหม่ไทยที่ดีกว่าเจลาติน ทำให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บและปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกดูดซับบนอนุภาคทรงกลมที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินสูงจึงมีค่าสูงกว่า

นอกจากนี้ยังพบว่า อนุภาคสามารถปลดปล่อยเคอร์คูมินภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์โปรติเอสเป็นองค์ประกอบ ได้อย่างต่อเนื่อง โดยอนุภาคที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินใหม่ไทยมากสามารถปลดปล่อยเคอร์คูมินได้ช้ากว่าอนุภาคที่มีสัดส่วนเจลาตินมาก เนื่องจากการย่อยสลายของอนุภาคทรงกลมในส่วนของไฟโบรอินเกิดได้ช้ากว่าเจลาติน ประกอบกับอันตรกิริยาที่มีความแข็งแรงของส่วนไม่ชอบน้ำระหว่างโมเลกุลไฟโบรอินและเคอร์คูมิน โดยกลไกการปลดปล่อยเคอร์คูมินจากอนุภาคทรงกลมประกอบด้วย 2 กลไก คือ การแพร่และการย่อยสลาย

ผลการต้านมะเร็งในสัตว์ทดลองของเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคทรงกลม พบว่าหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับอนุภาคทรงกลมชนิด G50SF50 ที่ดูดซับเคอร์คูมิน (G50SF50-Cur) มีค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงปริมาตรก้อนมะเร็งลดลงตั้งแต่วันที่ 7-21 ในขณะที่หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับอนุภาคทรงกลมชนิดเดียวกันที่ไม่ดูดซับเคอร์คูมิน (G50SF50) มีค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงปริมาตรก้อนมะเร็งเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 7 ไปจนถึงวันที่สิ้นสุดการทดลอง ซึ่งกล่าวได้ว่า เคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนชนิด G50SF50 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งได้ใน 21 วัน และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างหนูทดลองที่ได้รับอนุภาคทรงกลมชนิด G80SF20 ที่ดูดซับและไม่ดูดซับเคอร์คูมิน (G80SF20-Cur และ G80SF20) จะพบว่าหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ G80SF20-Cur มีแนวโน้มของค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงปริมาตรก้อนมะเร็งที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองที่ได้รับ G80SF20 ตั้งแต่วันที่ 7 ไปจนถึงวันที่สิ้นสุดการทดลอง นอกจากนี้

พบว่าเคอร์คูมินที่ถูกลดปล่อยจากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนชนิด G80SF20 และ G50SF50 สามารถชะลอการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ปรับปรุงสมบัติด้านการย่อยสลายของอนุภาคทรงกลมให้มีการย่อยสลายในสัตว์ทดลองที่เร็วขึ้น โดยลดระยะเวลาที่ใช้ในการเชื่อมขวางด้วยความร้อนแบบกึ่งอัตโนมัติ
2. ควรมีการศึกษาการย่อยสลายของอนุภาคทรงกลมในสัตว์ทดลอง (*In vivo* biodegradability) เพื่อให้สามารถออกแบบการทดลองผลการต้านมะเร็งให้สัมพันธ์กับการย่อยสลายของอนุภาคทรงกลม
3. ควรวางแผนการทดลองในการหาปริมาณหลอดเลือดเกิดใหม่ (Neocapillary density) ให้แต่ละกลุ่มการทดลองเพื่อให้สามารถเก็บภาพหลอดเลือดเกิดใหม่ได้ในวันเดียวกัน และมีจำนวนตัวอย่างที่เพียงพอกับการนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติ
4. ควรมีการศึกษามิโมโนพยาธิวิทยา (immunohistochemistry) โดยหาการแสดงออกของ angiogenic biomarkers เช่น *VEGF* *COX-2* และ *EGFR* เพิ่มเติมเพื่อพิสูจน์ว่าเคอร์คูมินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งได้จริงโดยกลไกการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis)

รายการอ้างอิง

1. ฝ่ายแผนงานและสถิติ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ (National Cancer Institute), อุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็ง. [online]. Available from: http://www.srth.moph.go.th/nmsurat/index.php?option=com_content&view=article&id=53&Itemid=37. (2015 March)
2. ปราณีต โอปนนะโสภิต, ระบบนำส่งยา (*Drug delivery systems*). พิมพ์ครั้งที่ 3. 2557, นครปฐม: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์.
3. O'Brien, F.J., *Biomaterials & scaffolds for tissue engineering*. Materials Today, 2011. **14**(3): p. 88-95.
4. Mandal, B.B., J.K. Mann and S.C. Kundu, *Silk fibroin/gelatin multilayered films as a model system for controlled drug release*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009. **37**(2): p. 160-71.
5. Srisuwan, Y., N. Kotseang, K. Namtaku, W. Simchuer, C. Butiman and P. Srihanam, *Preparation of Eri silk fibroin and gelatin blend film loaded chlorhexidine using as model for hydrophilic drug release*. Natural Science, 2012. **04**(07): p. 454-460.
6. Elakkiya, T., G. Malarvizhi, S. Rajiv and T.S. Natarajan, *Curcumin loaded electrospun Bombyx mori silk nanofibers for drug delivery*. Polymer International, 2014. **63**(1): p. 100-105.
7. Anand, P., A.B. Kunnumakkara, R.A. Newman and B.B. Aggarwal, *Bioavailability of curcumin: problems and promises*. Molecular Pharmaceutics, 2007. **4**(6): p. 807-18.
8. Hatcher, H., R. Planalp, J. Cho ,et.al, *Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2008. **65**(11): p. 1631-52.
9. Kunnumakkara, A.B., P. Anand and B.B. Aggarwal, *Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins*. Cancer Letters, 2008. **269**(2): p. 199-225.

10. Yoysungnoen-Chintana, P., P. Bhattarakosol and S. Patumraj, *Antitumor and antiangiogenic activities of curcumin in cervical cancer xenografts in nude mice*. Biomed Research International, 2014. **2014**: p. 1-12.
11. Yoysungnoen, P., *Anti-cancer and anti-angiogenic effects of curcumin and tetrahydrocurcumin on implanted hepatocellular carcinoma in nude mice*. World Journal of Gastroenterology, 2008. **14**(13): p. 2003-2009.
12. Bhandarkar, S.S. and J.L. Arbiser, *Curcumin as an inhibitor of angiogenesis*. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2007. **595**: p. 185-195.
13. Wang, Y.-J., M.-H. Pan, A.-L. Cheng, Y.-S. Ho, L.-I. Lin, C.-Y. Hsieh and J.-K. Lin, *Stability of curcumin in buffer solution and characterization of its degradation products*. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 1997. **15**: p. 1867-1876.
14. Anindita, M. and K.V. Jamboor, *Formulation characterization and evaluation of curcumin-loaded PLGA nanospheres for cancer therapy*. Anticancer Research 2009. **29**: p. 3867-3876.
15. 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. 401-10.
16. หนึ่งฤทัย ใจฉวะ, ประสิทธิภาพการกักเก็บและการนำส่งเคอร์คูมินของไมเซลล์ที่ผลิตจากเจลาตินดัดแปลงด้วยคอเลสเตรอล, สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์. 2556, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
17. กัญฐรัตน์ เลิศไชย, การพัฒนาไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินสำหรับการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินและดีเอชเอ, สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์. 2556, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
18. จุฑามาส รุจิสมนภา, การดัดแปลงโครงสร้างเซลล์เจลาตินด้วยคอเลสเตรอลเพื่อการนำส่งเคอร์คูมิน, สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์. 2549, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
19. Manju, S. and K. Sreenivasan, *Conjugation of curcumin onto hyaluronic acid enhances its aqueous solubility and stability*. Journal of Colloid and Interface Science 2011. **359**: p. 318-325.

20. Yongvanit, P. and S. Pinlaor, *Mechanism of Opisthorchis viverrini associated cholangiocarcinogenesis is mediated by free radicals*. Srinagarind Medical Journal 2005. **3**: p. 150-154.
21. เอื้อมแพง สุขประเสริฐ, *Cancer Therapy*. 2554: p. 25-39.
22. Trueba, G.P., G.M. Sánchez and A. Giuliani, *Oxygen free radical and antioxidant defense mechanism in cancer*. Frontiers in Bioscience, 2004. **9**: p. 2029-1044.
23. Goel, A., A.B. Kunnumakkara and B.B. Aggarwal, *Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic*. Biochemical Pharmacology, 2008. **75**(4): p. 787-809.
24. Stankovic, I., *Curcumin*, in *61st JECFA Chemical and Technical Assessment (CTA)*. 2004. p. 1-8.
25. Beevers, C.S. and S. Huang, *Pharmacological and clinical properties of curcumin*. Botanic: Targets and Therapy, 2011. **1**: p. 5-18.
26. Yuan, B., M. Imai, H. Kikuchi, S. Fukushima, S. Hazama, T. Akaike, Y. Yoshino, K. Ohyama, H. Toyoda, X. Hu and X. Pei, *Cytocidal Effects of Polyphenolic Compounds, Alone or in Combination with, Anticancer Drugs Against Cancer Cells: Potential Future Application of the Combinatory Therapy*, in *Apoptosis and Medicine*, T.M. Ntuli, Editor. 2012, InTech.
27. Seal, A., R. Aykkal, R. Babu and M. Ghosh, *Docking study of HIV-1 reverse transcriptase with phytochemicals*. Bioinformation, 2011. **5**(10): p. 430-439.
28. Zandi, K., E. Ramedani, K. Mohammadi, S. Tajbakhsh, I. Deilami, Z. Rastian, M. Fouladvand, F. Yousefi and F. Farshadpour, *Evaluation of antiviral activities of curcumin derivatives against HSV-1 in Vero cell line*. Natural Product Communications, 2010. **5**(12): p. 1935-1938.
29. Sony, D., L. Latheef, K. Kamath, M. Khaled, J. Wilkins, B.M. Kochikuzhyil and M.S. Baligaz, *Turmeric and its principle compound curcumin are effective in the prevention and treatment of arthritis*, in *Polyphenols in Human Health and Disease*, R.R. Watson, V. Preedy and S. Zibadi, Editors. 2014, Academic Press: UK. p. 785-789.
30. Aggarwal, B.B. and K.B. Harikumar, *Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular,*

- pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2009. **41**(1): p. 40-59.
31. Weecharangsan, W. and P. Opanasopit, *An overview of free radicals and in vitro antioxidant activity tests in plant extracts*. Srinakharinwirot Journal of Pharmaceutical Sciences, 2004. **9**: p. 73-80.
 32. Asouri, M., R. Ataee, A. Ahmadi, A. Amini and M.R. Moshaei, *Antioxidant and free radical scavenging activities of curcumin*. Asian Journal of Chemistry, 2013. **25**(13): p. 7593-7595.
 33. Maheshwari, R.K., A.K. Singh, J. Gaddipati and R.C. Srimal, *Multiple biological activities of curcumin: a short review*. Life Sciences, 2006. **78**(18): p. 2081-7.
 34. *Turmeric Extract*. [Online]. Available from: <http://www.goldvitamins.com/drcell.html>. (2016 March)
 35. ภาควิชาเภสัชกรรม, การดูดซึมของยาจากทางเดินอาหารและการเอื้อประโยชน์ในร่างกาย (*Gastrointestinal Drug Absorption and Bioavailability*). 2540, ภาควิชาวิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
 36. ศรีสกุล สังข์ทองจีน, ระบบนำส่งยา (*Drug Delivery Systems*). 2551, ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร.
 37. ณรงค์ สารีสุด, การผลิตยาออกฤทธิ์เน้นและระบบนำส่งยาแบบต่างๆ. 2535, กรุงเทพฯ: ไทยมิตรการพิมพ์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 38. SIGMA-ALDRICH. *Biomaterials Tutorial*. [Online]. Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/biomaterials/tutorial.html>. (2015 December)
 39. Kundu, B., N.E. Kurland, S. Bano C. Patra, F.B. Engel, V.K. Yadavalli and S.C. Kundu, *Silk proteins for biomedical applications: Bioengineering perspectives*. Progress in Polymer Science, 2014. **39**(2): p. 251-267.
 40. Wenk, E., H.P. Merkle and L. Meinel, *Silk fibroin as a vehicle for drug delivery applications*. Journal of Controlled Release, 2011. **150**(2): p. 128-41.
 41. 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*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2008. **19**(8): p. 2827-36.

42. Kim, U.J., J. Park, H.J. Kim, M. Wada and D.L. Kaplan, *Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin*. *Biomaterials*, 2005. **26**(15): p. 2775-85.
43. Lee, Y.-W., *Silk Reeling and Testing Manual*. 1996, Rome: Viale delle Termedi Caracalla.
44. *Silk Fibroin*. [Online]. Available from: <http://dermasilk.com.au/pics/extra/Sericin-Fibroin.jpg>. (2015 February)
45. Hardy, J.G. and T.R. Scheibel, *Composite materials based on silk proteins*. *Progress in Polymer Science*, 2010. **35**(9): p. 1093-1115.
46. Komatsu, K., *Studies on dissolution behaviors and structural characteristic of silk Sericin*. *Bull. Sericult. Exp. Sta.*, 1975. **26**: p. 135-256.
47. Altman, G.H., F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R.L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond and D.L. Kaplan, *Silk-based biomaterials*. *Biomaterials*, 2003. **24**(3): p. 401-416.
48. Duconseille, A., T. Astruc, N. Quintana, F. Meersman and V. Sante-Lhoutellier, *Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: A review*. *Food Hydrocolloids*, 2015. **43**: p. 360-376.
49. Gómez-Guillén, M.C., B. Giménez, M.E. López-Caballero and M.P. Montero, *Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review*. *Food Hydrocolloids*, 2011. **25**(8): p. 1813-1827.
50. *Denaturation of collagen*. [Online]. Available from: http://holowiki.nss.rpi.edu/wiki/Dichromated_Gelatin. (2015 May)
51. Segtnan, V.H. and T. Isaksson, *Temperature, sample and time dependent structural characteristics of gelatine gels studied by near infrared spectroscopy*. *Food Hydrocolloids*, 2004. **18**(1): p. 1-11.
52. Podczeck, F. and B.E. Jones, *Pharmaceutical capsules*. 2nd ed. 2004: Pharmaceutical Press
53. GMAP Gelatin Manufacturers Association of Asia Pacific, *Amino acid composition*. [Online]. Available from: http://www.gmap-gelatin.com/about_gelatin_AminoAcidComp.html. (2015 March)

54. Tabata, Y. and Y. Ikada, *Protein release from gelatin matrices*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1998. **31**: p. 287-301.
55. G.M.I.A., *Gelatin*. Gelatin Manufacturers Institute of America, 1992.
56. Imsombut, T., Y. Srisuwan, P. Srihanam and Y. Baimark, *Genipin-cross-linked silk fibroin microspheres prepared by the simple water-in-oil emulsion solvent diffusion method*. Powder Technology, 2010. **203**(3): p. 603-608.
57. Kim, K.K. and D.W. Pack, *Microspheres for drug delivery*, in *BioMEMS and Biomedical Nanotechnology*, M. Ferrari, A. Lee and J. Lee, Editors. 2006, Springer Science+Business Media LLC: USA. p. 19-50.
58. Bible, E., D.Y. Chau, M.R. Alexander, J. Price, K.M. Shakesheff and M. Modo, *Attachment of stem cells to scaffold particles for intra-cerebral transplantation*. Nature Protocols, 2009. **4**(10): p. 1440-53.
59. พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนานพนนท์, *Emulsion*. [Online]. Available from: <http://www.foodnetworksolution.com>. (2015 March)
60. Fan, J.-B., C. Huang, L. Jiang and S. Wang, *Nanoporous microspheres: from controllable synthesis to healthcare applications*. Journal of Materials Chemistry B, 2013. **1**(17): p. 2222-2235.
61. เอกदनัย ก่อกิมพงษ์, *Spray dryer เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย*. [Online]. Available from: http://www.thaiscience.com/lab_vol/P28/Spray_Dryer.asp. (2015 January)
62. *Emulsifier*. [Online]. Available from: <http://www.gcsescience.com/emulsifier.gif>. (2015 January)
63. *Emulsion*. [Online]. Available from: <http://imk209.wikispaces.com/file/view/emulsion...jpg/270995184/emulsion...jpg>. (2015 January)
64. Griffin, W.C., *Classification of surface-active agents by 'HLB'*. Journal of the Society of Cosmetic Chemists, 1949. **1**: p. 311-326.
65. มหาวิทยาลัยแม่โจ้. การเกิดอิมัลชันของไขมันและน้ำมัน. [Online]. Available from: <http://coursewares.mju.ac.th:81/e-learning50/FT320/0315.htm>. (2015 January)
66. Haugh, M.G., M.J. Jaasma and F.J. 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**(2): p. 363-9.
67. Khor, E., *Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprotheses*. Biomaterials, 1997. **19**: p. 95-105.
68. Friess, W., *Collagen – biomaterial for drug delivery*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 1998. **45**: p. 113-136.
69. Bhat, R. and A.A. Karim, *Ultraviolet irradiation improves gel strength of fish gelatin*. Food Chemistry, 2009. **113**(4): p. 1160-1164.
70. Hemaprabha, E., *Chemical crosslinking of proteins a review*. Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation, 2012. **1**: p. 22-26.
71. MP Biomedicals, L. *Glutaraldehyde solution*. [Online]. Available from: <http://www.mpbio.com/product.php?pid=02198595&country=209>. (2015 January)
72. Pieper, J.S., T. Hafmans, J.H. Veerkamp and T.H. van Kuppevelt, *Development of tailor-made collagen–glycosaminoglycan matrices: EDC/NHS crosslinking, and ultrastructural aspects*. Biomaterials, 2000. **21**: p. 581-593.
73. *Formation of methylene bridges*. [Online]. Available from: http://openi.nlm.nih.gov/imgs/512/191/2566591/2566591_pone.0003378.g006.png. (2015 May)
74. *EDC/NHS*. [Online]. Available from: <http://www.piercenet.com/media/01-Carbodiimide-Sulfo-NHS-Rxn.jpg>. (2015 June)
75. Adhirajan, N., N. Shanmugasundaram and M. Babu, *Gelatin microspheres cross-linked with EDC as a drug delivery system for doxycycline: Development and characterization*. Journal of Microencapsulation, 2008. **24**(7): p. 659-671.
76. Okhawilai, M., R. Rangkupan, S. Kanokpanont and S. Damrongsakkul, *Preparation of Thai silk fibroin/gelatin electrospun fiber mats for controlled release applications*. International Journal of Biological Macromolecules, 2010. **46**(5): p. 544-50.
77. Suwantong, O., P. Opanasopit, U. Ruktanonchai and P. Supaphol, *Electrospun cellulose acetate fiber mats containing curcumin and release characteristic of the herbal substance*. Polymer, 2007. **48**(26): p. 7546-7557.

78. Das, R.K., N. Kasoju and U. Bora, *Encapsulation of curcumin in alginate-chitosan-pluronic composite nanoparticles for delivery to cancer cells*. *Nanomedicine*, 2010. **6**(1): p. 153-60.
79. Aggarwal, B.B., S. Shishodia, Y. Takada, S. Banerjee, R.A. Newman, C.E. Bueso-Ramos and J.E. Price, *Curcumin suppresses the paclitaxel-induced nuclear factor-kappaB pathway in breast cancer cells and inhibits lung metastasis of human breast cancer in nude mice*. *Clinical Cancer Research*, 2005. **11**(20): p. 7490-8.
80. Jing, Z., Z. Yong, Z. Yan and C. Wei, *Anti-tumor effect of curcumin on human cervical carcinoma HeLa cells in vitro and in vivo*. *Chinese Journal of Cancer Research*, 2007. **19**: p. 32-36.
81. Yin, H.-T., D.-G. Zhang, X.-L. Wu, X.-E. Huang and G. Chen, *In vivo evaluation of curcumin-loaded nanoparticles in a A549 xenograft mice model*. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2013. **14**(1): p. 409-412.
82. Wang, P., L. Zhang, H. Peng, Y. Li, J. Xiong and Z. Xu, *The formulation and delivery of curcumin with solid lipid nanoparticles for the treatment of non-small cell lung cancer both in vitro and in vivo*. *Materials Science and Engineering: C*, 2013. **33**(8): p. 4802-8.
83. Bubnis, W.A. and C.M.I. Ofner, *The determination of ϵ -amino groups in soluble and poorly soluble proteinaceous materials by a spectrophotometric method using trinitrobenzenesulfonic acid*. *Analytical Biochemistry*, 1992. **207**: p. 129-133.
84. Gil, E.S., S.H. Park, X. Hu, P. Cebe, D.L. Kaplan, *Impact of Sterilization on the Enzymatic Degradation and Mechanical Properties of Silk Biomaterials*. *Macromolecular Bioscience*, 2014. **14**(2): p. 257-269.
85. ปิยะรัตน์ สังข์พันธุ์, การเตรียมอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนจากไฟโบรอินไหมไทยผสมกรดไฮยาลูรอนิคเพื่อใช้ในการนำส่งยา, สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์. 2557, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
86. Lertworapreecha, M., S. Patumraj, S. Niruthisard, P. Hansasuta, P. Bhattarakosol, *Mouse acquired HPV tumor using dorsal skin-fold window chamber*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2009. **47**: p. 327-332.

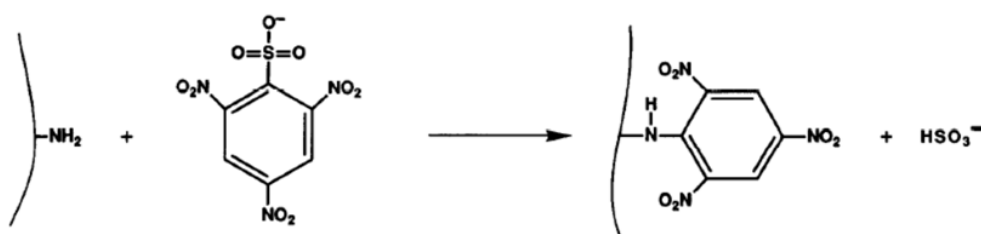
87. สวรรยา สิ้นธพ, การพัฒนาอนุภาคไมโครจากเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทยสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ, สาขาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์. 2557, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
88. Li, M., M. Ogiso and N. Minoura, *Enzymatic degradation behavior of porous silk fibroin sheets*. Biomaterials, 2003. **24**: p. 357-365.
89. Zhao, C., X. Wu, Q. Zhang, S. Yan and M. Li, *Enzymatic degradation of Antheraea pernyi silk fibroin 3D scaffolds and fibers*. International Journal of Biological Macromolecules, 2011. **48**(2): p. 249-55.
90. Wongnarat, C. and P. Srihanam, *Degradation behaviors of Thai Bombyx mori of silk fibroins exposure to protease enzymes*. Engineering, 2013. **05**(01): p. 61-66.
91. Jo, Y.-Y., H.-Y. Kweon, Y.-H. Koh, D.-C. Kang, J.-H. Yeo, S.-O. Woo, S.-M. Han, S.-W. Kang and K.-G. Lee, *Characteristics and degradability of silk scaffold fabricated by press method*. Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2011. **8**(1): p. 42-46.
92. Gupta, V., A. Aseh, C.N. Rios, B.B. Aggarwal and A.B. Mathur, *Fabrication and characterization of silk fibroin-derived curcumin nanoparticles for cancer therapy*. International Journal of Nanomedicine, 2009. **4**: p. 115-122.
93. Ritger, P.L. and N.A. Peppas, *A simple equation for description of solute release II. fickian and anomalous release from swellable devices*. Journal of Controlled Release, 1987. **5**: p. 37-42.
94. Siepmann, J. and N.A. Peppas, *Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC)*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2001. **48**: p. 139-157.
95. Dash, S., P.N. Murthy and P. Chowdhury, *Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems*. Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research, 2010. **67**(3): p. 217-223.



ภาคผนวก ก

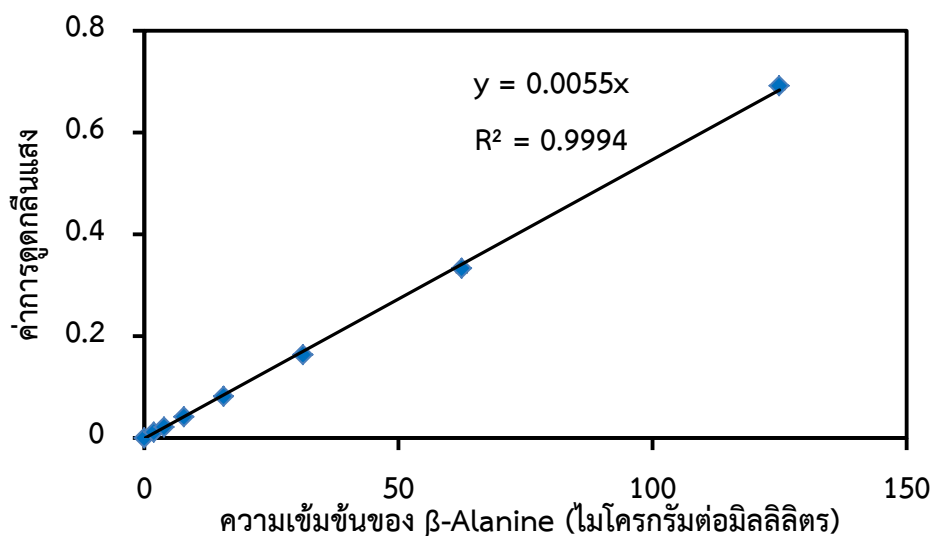
การวิเคราะห์ร้อยละการเชื่อมขวางด้วยวิธี 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS)

เป็นการหาปริมาณอะมิโนอิสระโดยใช้สาร TNBS ทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนอิสระ (-NH₂) ของโปรตีน เกิดอนุพันธ์ของ trinitrophenyl (TNP) และซัลเฟตไอออนซึ่งเป็นสารละลายสีเหลือง (รูปที่ ก.1) โดยสารละลายสีเหลืองสามารถดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายมาตรฐาน β -Alanine เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ [Bubnis W.A. และ Ofner lii C.M. 1992]



รูปที่ ก.1 การทำปฏิกิริยาระหว่าง 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) กับหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีน เกิดเป็นอนุพันธ์ของของ trinitrophenyl (TNP) และซัลเฟตไอออน [83]

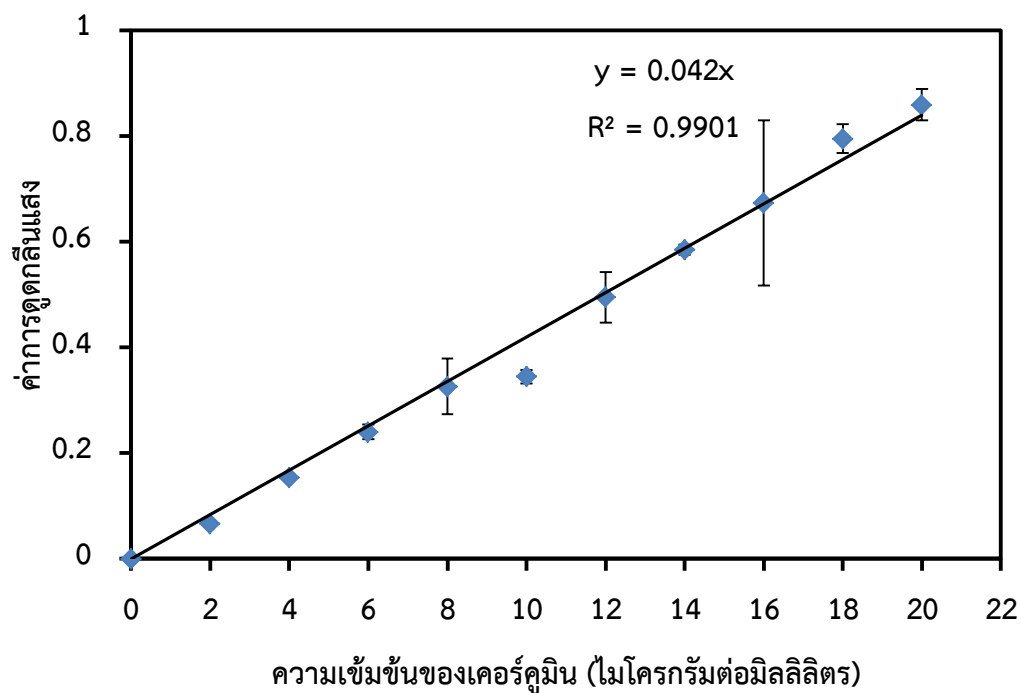
กราฟมาตรฐานของ β -Alanine ใช้ในการวัดปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ
ในอนุภาคทรงกลมก่อนและหลังการเชื่อมขวางด้วยความร้อน



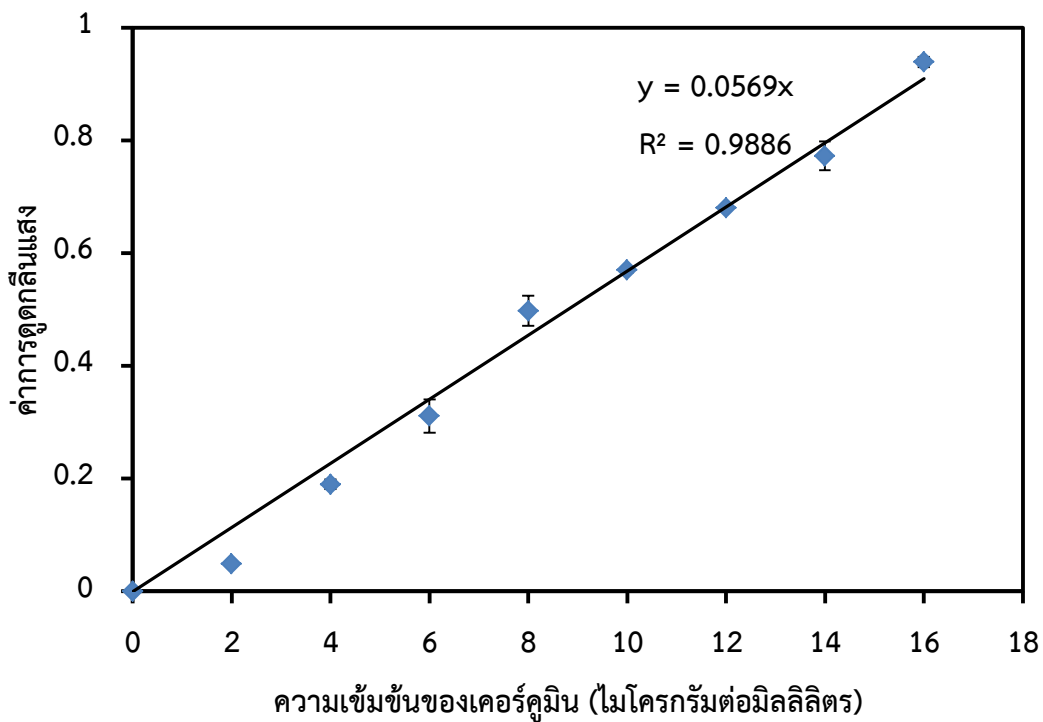
รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานของสารละลาย β -Alanine ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร

ภาคผนวก ข

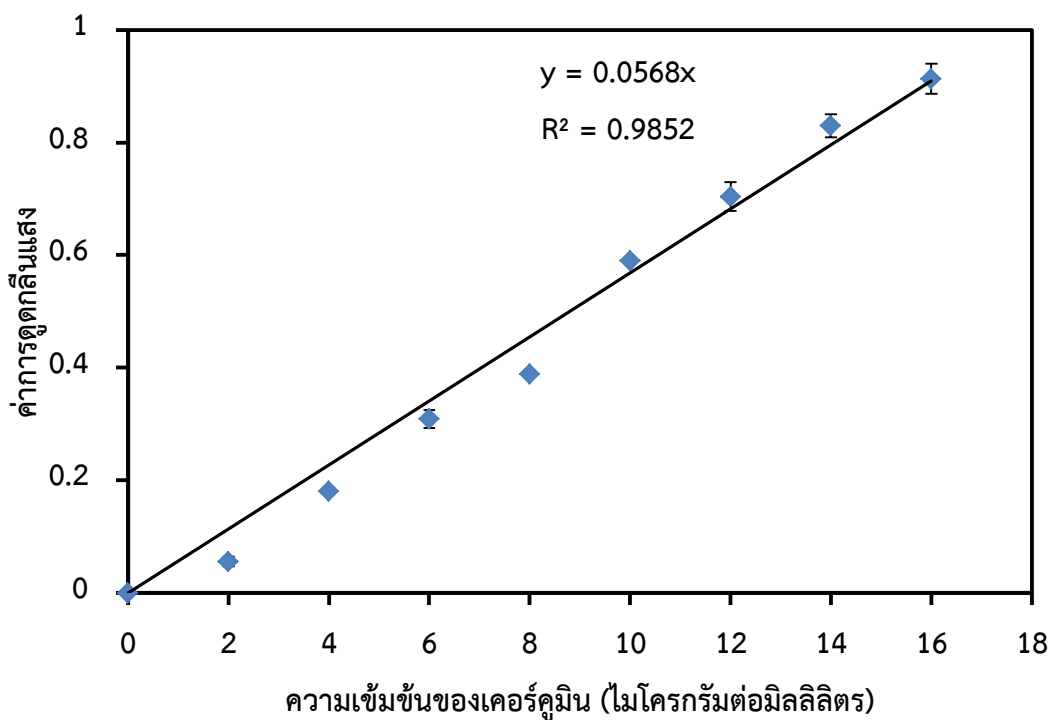
กราฟมาตรฐานของสารละลายเคอร์คูมินในสารละลายชนิดต่างๆ



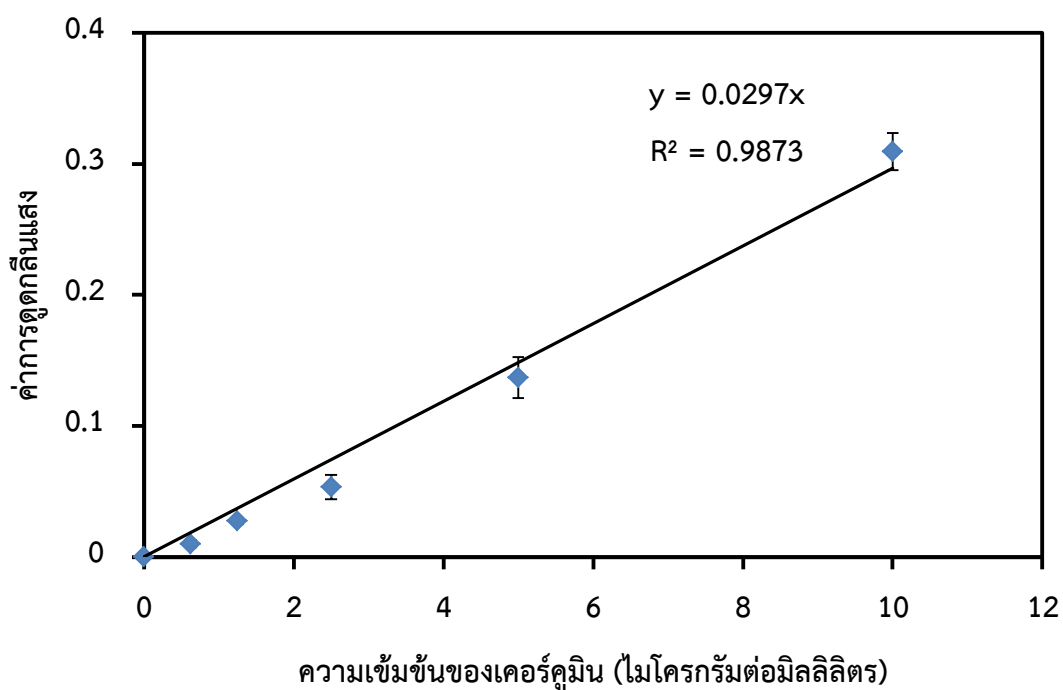
รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายเคอร์คูมินที่ผ่านการระเหยตัวทำละลายเอทานอลบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 99.9 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (E100) ก่อนการละลายในตัวทำละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร



รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายเคอร์คูมินที่ผ่านการระเหยตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำในสัดส่วน 9:1 (E90) ก่อนการละลายในตัวทำละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร



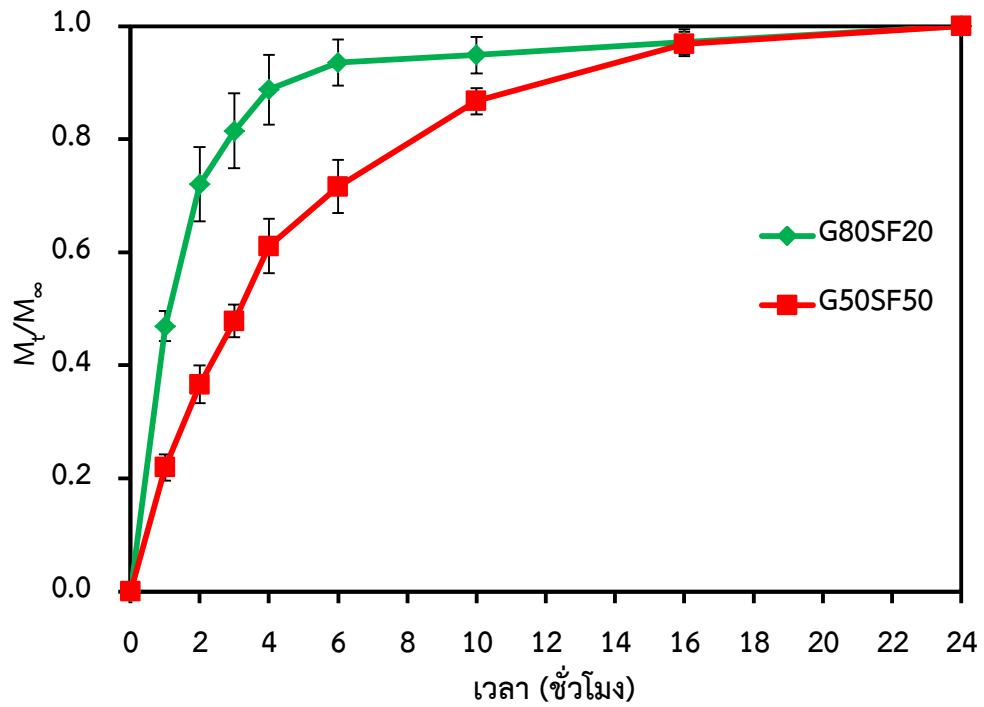
รูปที่ ข.3 กราฟมาตรฐานของสารละลายเคอร์คูมินที่ผ่านการระเหยตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำ ในสัดส่วน 8:2 (E80) ก่อนการละลายในตัวทำละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร



รูปที่ ข.4 กราฟมาตรฐานของสารละลายเคอร์คูมินที่ผ่านการระเหยตัวทำละลายผสมระหว่าง เอทานอลและน้ำ ในสัดส่วน 8:2 (E80) ก่อนการละลายในสารละลายผสมของบัฟเฟอร์ฟอสเฟตและ Fetal bovine serum ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร

ภาคผนวก ค

กราฟการปลดปล่อยสะสมเคอร์คูมินที่เวลาใด ๆ



รูปที่ ค.1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยสะสมที่เวลา t (M_t) หารด้วย ปริมาณ เคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยสะสมที่เวลานันต์ (M_∞) เทียบกับเวลาในการปลดปล่อย เคอร์คูมิน ของอนุภาคทรงกลมภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์โปรติเอส XIV ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อ มิลลิลิตร เป็นองค์ประกอบ

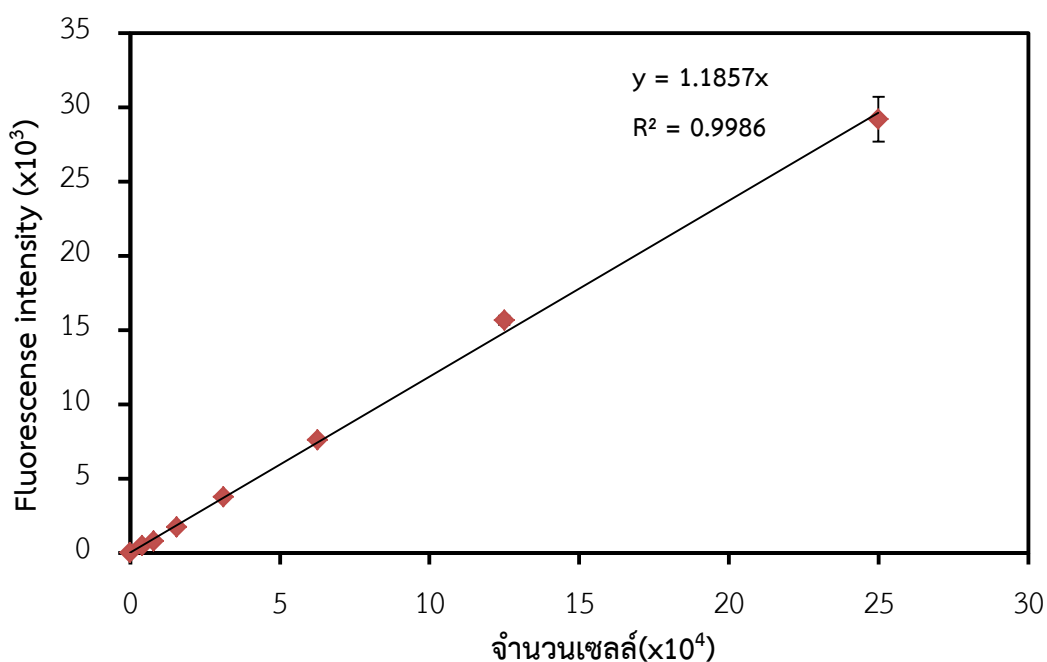
ภาคผนวก ง

จลศาสตร์การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (CaSki cell)

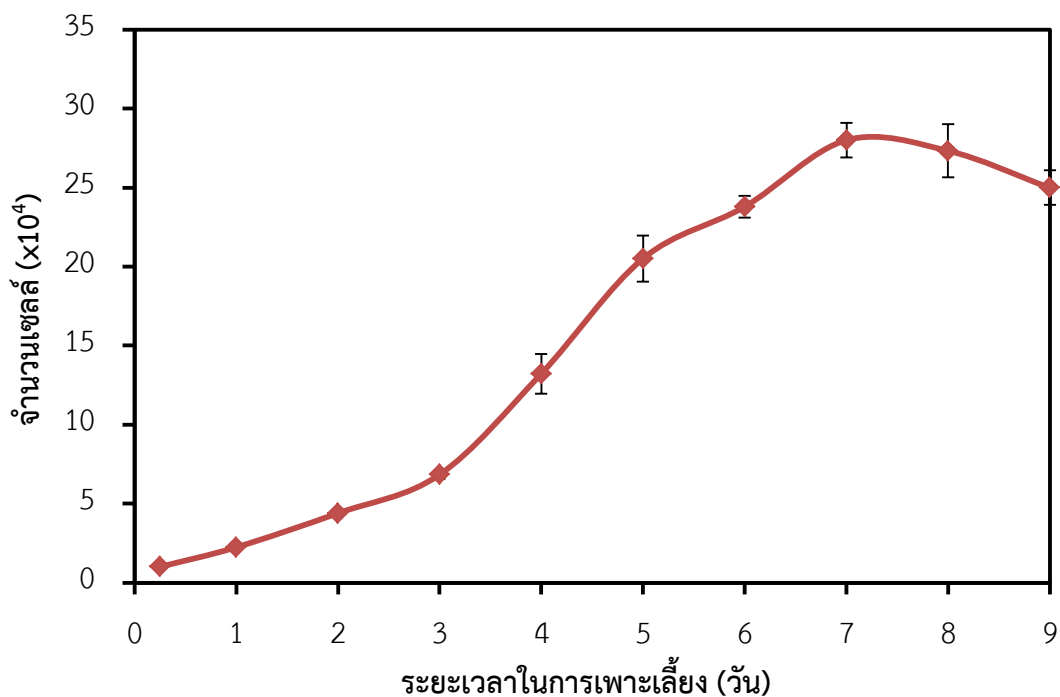
วิธีการทดลอง

1. เพาะเลี้ยงเซลล์ CaSki ในจานเพาะเลี้ยงพอลิสไตรีน 24 หลุม (24 well-plate) ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น 5000 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร (10,000 เซลล์ต่อหลุม) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM โดยเพาะเลี้ยงในตู้เพาะเชื้อที่สภาวะความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน ซึ่งจะเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 2 วัน
2. ตรวจสอบวิเคราะห์จำนวนเซลล์ CaSki ด้วยวิธี DNA assay ที่ความยาวคลื่น 355 และ 460 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์



รูปที่ ง.1 กราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์ CaSki



รูปที่ ง.2 กราฟอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ CaSki

ตัวอย่างการคำนวณ

1. อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate; μ)

คำนวณจาก Log phase (Exponential) ดังสมการนี้

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dx}{dt}$$

$$\mu \int_{t_1}^{t_2} dt = \int_{X_1}^{X_2} \frac{1}{X} \frac{dx}{dt}$$

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

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$$

โดยที่ X_1 คือ จำนวนเซลล์ที่เวลา t_1

X_2 คือ จำนวนเซลล์ที่เวลา t_2

จากรูปที่ ง.2 คำนวณอัตราการเจริญเติบโตเฉพาะในวันที่ 3 ถึง 5 ของการเพาะเลี้ยง

จำนวนเซลล์ วันที่ 3 เท่ากับ 6.84×10^4 เซลล์

จำนวนเซลล์ วันที่ 5 เท่ากับ 20.51×10^4 เซลล์

จากสมการ ...

$$\mu = \frac{\ln(20.5 \times 10^4) - \ln(6.84 \times 10^4)}{(120 - 72)}$$

$$\mu = 22.89 \times 10^{-3}$$

ดังนั้น อัตราการเจริญเติบโตเฉพาะของเซลล์เท่ากับ 22.89×10^{-3} ต่อชั่วโมง

2. เวลาในการแบ่งตัวทวีคูณ (Population Doubling Time; PDT)

$$PDT = \frac{\ln 2}{\mu}$$

$$= \frac{\ln 2}{22.89 \times 10^{-3}}$$

$$= 30.28$$

ดังนั้น เวลาในการที่เซลล์แบ่งตัวเท่ากับ 30.28 ชั่วโมง

3. ร้อยละการยึดเกาะที่ 6 ชั่วโมง

$$\text{ร้อยละการยึดเกาะ} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง}}{100}$$

จำนวนเซลล์เริ่มต้น

เพาะเลี้ยงด้วยเซลล์เริ่มต้น 10,000 เซลล์ต่อ 1.9 ตารางเซนติเมตร และจำนวนเซลล์ที่เวลา 6 ชั่วโมง เท่ากับ 9,983 เซลล์ต่อ 1.9 ตารางเซนติเมตร

$$\begin{aligned} \text{ร้อยละการยึดเกาะ} &= \frac{9,983 \times 100}{10,000} \\ &= 99.83 \end{aligned}$$

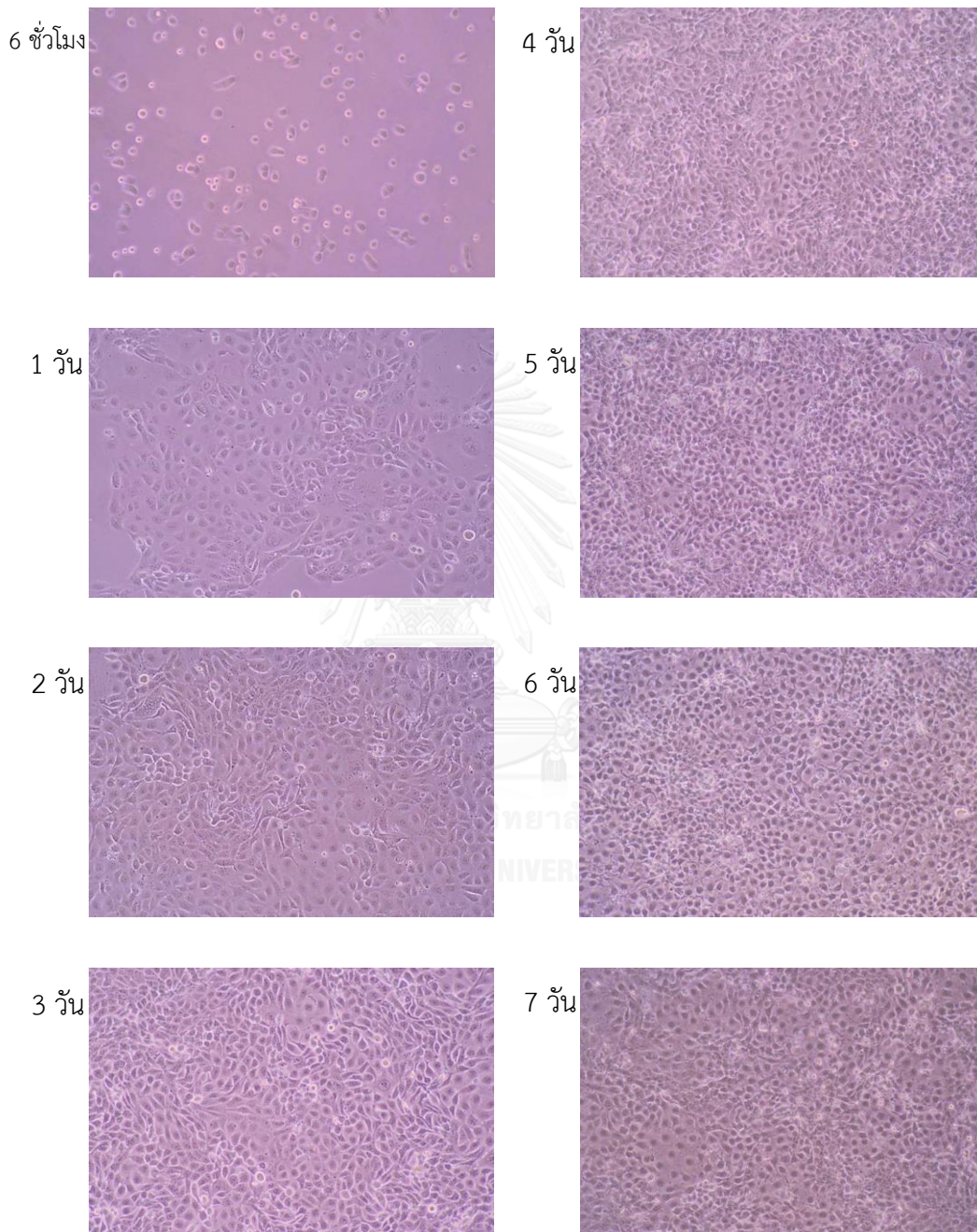
ดังนั้น ร้อยละการยึดเกาะของเซลล์ที่เวลา 6 ชั่วโมง เท่ากับ 99.83

ตารางที่ ง.1 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ, เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ และร้อยละการยึดเกาะที่เวลา 6 ชั่วโมง ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki ที่เพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน 24 หลุม (24 well-plate)

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (ชั่วโมง)	ร้อยละการยึดเกาะที่เวลา 6 ชั่วโมง
22.89×10^{-3}	30.28	99.8

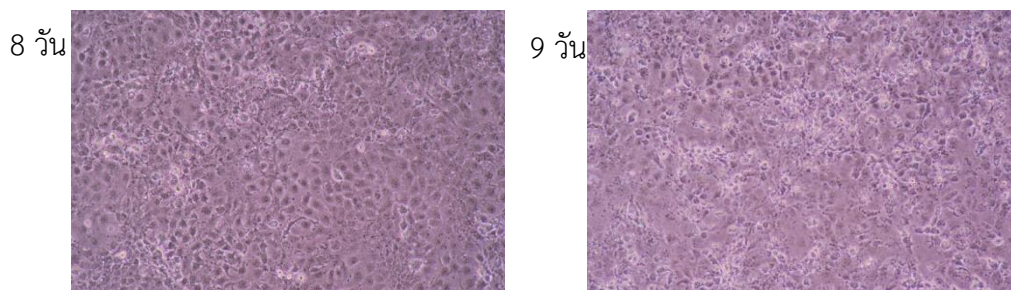
ภาคผนวก จ

ลักษณะรูปร่างของเซลล์ CaSki ที่เพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงพอลิสไตรีน



รูปที่ จ.1 รูปร่างของเซลล์ CaSki หลังจากเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM (ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน

ลักษณะรูปร่างของเซลล์ CaSki ที่เพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงพอลิสไตรีน (ต่อ)



รูปที่ จ.1 (ต่อ) รูปร่างของเซลล์ Caski หลังจากเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM (ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน



ภาคผนวก ฉ

ใบรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์



เลขที่ใบรับรอง 27/2558

เลขที่โครงการวิจัย 016/2558

คณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ใบรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์

ณ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อข้อเสนอการวิจัย

(ภาษาไทย) ผลการต้านมะเร็งในสัตว์ทดลองของเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินและไฟโบรอินไหมไทย

(ภาษาอังกฤษ) IN VIVO ANTICANCER EFFECT OF CURCUMIN RELEASED FROM GELATIN/THAI SILK FIBROIN MICROSPHERES

ผู้เสนอโครงการใช้สัตว์ทดลอง

นายแพทย์ จิรันดร อภินันท์

หน่วยงานที่สังกัด

ภาควิชาออร์โธปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอเสนอโครงการใช้สัตว์ทดลองนี้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์แล้ว เห็นว่ามีความสอดคล้องกับจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์สภาวิจัยแห่งชาติ จึงเห็นสมควรให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์ตามที่ขอเสนอโครงการใช้สัตว์ทดลองนี้ได้

ลงนาม.....

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์สมพล สงวนรังศิริกุล)
ประธานคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์

ลงนาม.....

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ)
คณบดี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วันที่รับรอง : มกราคม พ.ศ.2559

วันหมดอายุ : มกราคม พ.ศ.2560

ภาคผนวก ข

การคำนวณขนาดยาที่ให้ในหนูทดลอง

หนู 1 ตัว มีน้ำหนักปกติสูงสุด 25 กรัม โดยฉีดอนุภาคที่ดูดซับเคอร์คูมิน 5 มิลลิกรัม/ตัว/ครั้ง
 ดังนั้น หนูน้ำหนัก 25 กรัม

จะได้รับอนุภาคที่ดูดซับเคอร์คูมินเท่ากับ $(5 \times 1000) / 25 = 200$ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนัก
 หนู

จากการทดลอง อนุภาค G50SF50 ในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำสัดส่วน 80:20
 สามารถดูดซับเคอร์คูมินได้ 15.87 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมของอนุภาคทรงกลม

ในอนุภาค G50SF50 ที่ดูดซับเคอร์คูมิน 5 มิลลิกรัม จะมีปริมาณเคอร์คูมิน
 $= 15.87 \times 5$
 $= 79.35$ ไมโครกรัม

ดังนั้น หนู 1 ตัว (25 กรัม) จะได้รับปริมาณเคอร์คูมิน ประมาณ 79 ไมโครกรัมต่อครั้ง
 ซึ่งเท่ากับ 3.16 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักหนู

ดังนั้น ในการฉีดทรีทเมนต์ทั้งหมด 4 ครั้ง หนู 1 ตัวจะได้รับเคอร์คูมินปริมาณรวม
 $= 79 \times 4$
 $= 316$ ไมโครกรัม

จากการทดลอง อนุภาค G80SF20 ในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำสัดส่วน 80:20
 สามารถดูดซับเคอร์คูมินได้ 10.55 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมของอนุภาคทรงกลม

ในอนุภาค G80SF20 ที่ดูดซับเคอร์คูมิน 5 มิลลิกรัม จะมีปริมาณเคอร์คูมิน
 $= 10.55 \times 5$
 $= 52.75$ ไมโครกรัม

ดังนั้น หนู 1 ตัว (25 กรัม) จะได้รับปริมาณเคอร์คูมิน ประมาณ 53 ไมโครกรัมต่อครั้ง
 ซึ่งเท่ากับ 2.12 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักหนู

ดังนั้น ในการฉีดทรีทเมนต์ทั้งหมด 4 ครั้ง หนู 1 ตัวจะได้รับเคอร์คูมินปริมาณรวม
 $= 53 \times 4$
 $= 212$ ไมโครกรัม

ภาคผนวก ข

ปริมาณกร่อนมะเร็งของหนูทดลองหลังฉีดรักษา ณ วันต่างๆ

ตารางที่ ข.1 ปริมาณกร่อนมะเร็งหลังทำการฉีดรักษา ณ วันต่างๆ ของกลุ่ม PBS

หมายเลขสัตว์ทดลอง	กลุ่ม	ปริมาณกร่อนมะเร็ง (ลูกบาศก์มิลลิเมตร)								
		วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28	วันที่ 35	วันที่ 42	วันที่ 49	วันที่ 52
1	PBS-1	70.47	114.83	162.86	330.53	646.96	642.17	843.13	1167.40	1806.74
2	PBS-2	71.68	71.88	97.53	114.88	119.79	221.76	303.71	722.36	254.48
11	PBS-3	91.00	153.79	115.78	88.64	69.50	68.46	91.97	96.40	74.52

ตารางที่ ข.2 ปริมาณกร่อนมะเร็งหลังทำการฉีดรักษา ณ วันต่างๆ ของกลุ่มทดลอง Blank-G80SF20

หมายเลขสัตว์ทดลอง	กลุ่ม	ปริมาณกร่อนมะเร็ง (ลูกบาศก์มิลลิเมตร)									
		วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28	วันที่ 35	วันที่ 42	วันที่ 49	วันที่ 56	วันที่ 62
3	Blank G80SF20-1	79.91	165.11	312.70	491.99	564.10	753.66	1186.25	1224.51	1294.99	730.39
4	Blank G80SF20-2	75.74	80.34	51.92	74.52	38.53	55.14	56.29	51.72	23.57	24.04
5	Blank G80SF20-3	82.40	187.55	358.39	348.00	231.83	245.31	203.01	140.23	106.86	125.42

ตารางที่ ข.3 ปริมาณกร่อนมะเร็งหลังทำการฉีดรักษา ณ วันต่างๆ ของกลุ่มทดลอง G80SF20-Cur

หมายเลขสัตว์ทดลอง	กลุ่ม	ปริมาณกร่อนมะเร็ง (ลูกบาศก์มิลลิเมตร)									
		วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28	วันที่ 35	วันที่ 42	วันที่ 49	วันที่ 56	วันที่ 62
8	G80SF20-Cur-1	70.33	82.40	155.91	234.27	266.12	75.93	45.86	56.73	92.30	114.19
9	G80SF20-Cur-2	76.68	71.17	113.20	79.80	44.95	49.49	74.39	119.81	104.96	40.34
10	G80SF20-Cur-3	60.88	40.36	22.93	19.25	11.82	12.64	23.22	25.25	24.65	14.98

ตารางที่ ซ.4 ปริมาณก่อนมะเร็งหลังทำการฉีดรักษา ณ วันต่างๆ ของกลุ่มทดลอง Blank-G50SF50

หมายเลข สัตว์ทดลอง	กลุ่ม	ปริมาณก่อนมะเร็ง (ลูกบาศก์มิลลิเมตร)							
		วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28	วันที่ 35	วันที่ 42	วันที่ 43
13	Blank G50SF50-1	86.15	115.39	121.31	215.65	284.73	327.53	321.68	321.68
14	Blank G50SF50-2	86.18	150.66	174.65	200.75	183.47	300.23	447.84	452.14
19	Blank G50SF50-3	84.72	183.20	177.96	189.08	177.96	196.08	203.08	205.06

ตารางที่ ซ.5 ปริมาณก่อนมะเร็งหลังทำการฉีดรักษา ณ วันต่างๆ ของกลุ่มทดลอง G50SF50-Cur

หมายเลข สัตว์ทดลอง	กลุ่ม	ปริมาณก่อนมะเร็ง (ลูกบาศก์มิลลิเมตร)						
		วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28	วันที่ 35	วันที่ 36
15	G50SF50-Cur-1	81.15	87.18	83.86	81.55	100.79	111.68	114.83
17	G50SF50-Cur-2	85.06	70.47	74.76	75.82	119.55	135.76	135.76
20	G50SF50-Cur-3	75.74	71.50	52.84	62.30	134.78	141.92	146.54

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพัชรिता คงทน เกิดเมื่อวันที่ 26 สิงหาคม พ.ศ. 2526 ภูมิลำเนาจังหวัดเพชรบุรี เข้าศึกษาชั้นมัธยมศึกษาที่โรงเรียนเบญจมเทพอุทิศ จังหวัดเพชรบุรี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ในปีการศึกษา 2550 และเข้าศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรวิศวกรรมชีวเวช (สหสาขาวิชา) คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2556

ผลงานในการประชุมวิชาการ

Kongton, P., Ratanavaraporn, J., Kitsongsermthon, J. and Damrongsakkul, S. Physical characteristics and curcumin entrapment efficiency of gelatin/Thai silk fibroin microspheres, Oral Presentation, The 9th Biomedical Engineering International Conference (BMEiCON2016), Laung Prabang, Laos, 7-9 December 2016.