

ผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการสร้างหลอดเลือดฝอย โดยมุ่งเน้นศึกษาความ
เปลี่ยนแปลงที่เซลล์เพอร์ไซค์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ ไม่สังกัดภาควิชา/เทียบเท่า
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF GOLD NANOPARTICLES ON CAPILLARY TUBE FORMATION WITH SPECIAL
REFERENCE TO THE ALTERATION OF PERICYTES



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Sciences

Common Course

FACULTY OF MEDICINE

Chulalongkorn University

Academic Year 2019

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการสร้างหลอดเลือดฝอย โดยมุ่งเน้นศึกษาความเปลี่ยนแปลงที่เซลล์เพอร์ไซต์
โดย	น.ส.ศศิกานต์ ลู่ประเสริฐกุล
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เดภิชา จินดาทิพย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เดภิชา จินดาทิพย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์)

..... กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิไล อโนมะศิริ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร.รุจิรา วโนทยาน)

ศศิกานต์ ภูประเสริฐกุล : ผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการสร้างหลอดเลือดฝอย โดย
มุ่งเน้นศึกษาความเปลี่ยนแปลงที่เซลล์เพอริไซท์. (EFFECT OF GOLD NANOPARTICLES ON
CAPILLARY TUBE FORMATION WITH SPECIAL REFERENCE TO THE ALTERATION OF
PERICYTES) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. ดร.เดภิชา จินดาทิพย์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ดร. นพ.อมรพันธุ์
เสรีมาศพันธุ์

Pericytes เป็นเซลล์ที่วางตัวอยู่ติดกับผนังด้านนอกของหลอดเลือดขนาดเล็ก ได้แก่ capillary และ post-capillary venule เซลล์นี้ทำหน้าที่หลักในการคำนวณหลอดเลือดดังกล่าว และมีความสำคัญต่อทั้งกระบวนการทางสรีรวิทยาและพยาธิวิทยาของหลอดเลือด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการสร้างหลอดเลือดใหม่ ปัจจุบันอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (AuNPs) ถูกนำมาใช้เพื่อยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ โดยยับยั้งการแบ่งตัว การเคลื่อนย้าย และกระบวนการ tube formation โดยมุ่งเน้นผลไปยัง endothelial cells เพียงอย่างเดียว แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาถึงผลของ AuNPs ต่อลักษณะสัณฐานและการทำงานของ pericytes การศึกษานี้จึงนำ 20 nm AuNPs ที่ความเข้มข้น 30 ppm มาทดสอบกับ pericytes โดยการเคลื่อนย้ายของเซลล์ศึกษาโดยใช้เทคนิค transwell migration, และระดับการแสดงออกของยีน Ki-67 ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การแบ่งตัวของเซลล์ และ PDGFR- β ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ pericytes โดยใช้เทคนิค real-time RT-qPCR และลักษณะสัณฐานศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) นอกจากนี้ศึกษาการสร้างหลอดเลือดฝอยจำลองแบบสามมิติบน Matrigel โดยนำ pericytes ที่ได้รับ AuNPs มาเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์ human umbilical cord endothelial cells ผลการศึกษาพบว่า AuNPs มีผลทำให้การเคลื่อนย้าย การแบ่งตัว และการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน PDGFR- β ของ pericytes ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และผลการศึกษาภายใต้กล้อง TEM เปิดเผยให้เห็นอนุภาคทองคำที่ถูกบรรจุอยู่ใน organelles ต่างๆ ได้แก่ late endosomes, lysosomes และ mitochondria และที่น่าสนใจคือ mitochondria เหล่านี้มีลักษณะบวมพองหรือเสียหาย ในส่วนของการศึกษาจำนวนของการสร้างหลอดเลือดจำลอง พบว่ามีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มของ pericytes ที่ถูกใส่ AuNPs และพบว่า pericytes ในกลุ่มนี้มีลักษณะเป็นทรงกลม ไม่ยึดแขนงเพื่อสร้าง tube ส่งผลให้ tube มีลักษณะไม่สมบูรณ์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สรุปได้ว่า AuNPs สามารถส่งผลกระทบต่อลักษณะสัณฐานและคุณสมบัติของ pericytes ได้ จากผลการทดลองผู้วิจัยมุ่งหวังว่าจะสามารถนำอนุภาคทองคำมาปรับใช้เพื่อเป็นหนึ่งเ็นทางเลือกสำหรับ anti-capillary tube formation โดยมีเป้าหมายต่อ pericytes ได้ในอนาคต

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ปีการศึกษา 2562

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5974017130 : MAJOR MEDICAL SCIENCES

KEYWORD: Angiogenesis, Capillary tube formation, Endothelial cells, Gold nanoparticles,
 Pericytes

Sasikarn Looprasertkul : EFFECT OF GOLD NANOPARTICLES ON CAPILLARY TUBE
FORMATION WITH SPECIAL REFERENCE TO THE ALTERATION OF PERICYTES. Advisor:
Asst. Prof. DEPICHA JINDATIP, Ph.D. Co-advisor: Asst. Prof. Amornpun Sereemaspun,
Ph.D., M.D.

Pericytes are perivascular cells that wrap around endothelial cells to form wall of capillaries and post-capillary venules. These cells play important roles in physiological and pathological processes, including angiogenesis. Nowadays, gold nanoparticles (AuNPs) are used for anti-angiogenesis by inhibiting the activity of endothelial cell proliferation, migration, and tube formation. Nevertheless, the effects of gold nanoparticles on the alteration of pericyte morphology and their functions have not been well explored. In this study, 20 nm-AuNPs were applied to human placenta pericyte monoculture with concentration of 30 ppm. Morphology of pericytes was observed by transmission electron microscopy. Cell migration was evaluated by transwell migration assay. Real-time RT-qPCR was used to assess Ki-67 and PDGFR- β mRNA expression. Additionally, these AuNPs 30 ppm-treated pericytes were co-cultured with human umbilical cord endothelial cells on Matrigel to explore the 3D tube formation. The results showed that AuNPs significantly suppressed migration, proliferation, and PDGFR- β mRNA expression of pericytes. The ultrastructure of pericytes displayed AuNPs in several organelles, i.e., engulfed late endosomes, lysosomes, and mitochondria. Interestingly, these mitochondria were swollen or damaged. Furthermore, the number of capillary tube formations was essentially reduced. A number of pericytes on these capillary tubes were round shape and did not extend the processes along the tube, which in turn increased incomplete tube formation compared with the control. In summary, AuNPs could affect pericyte biology, including proliferation, migration, morphology, and tube formation property. These findings may help support the potential application of AuNPs in anti-capillary tube formation by pericyte-targeted therapy.

Field of Study: Medical Sciences

Student's Signature

Academic Year: 2019

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เดภิชา จินดาทิพย์ อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก สำหรับความช่วยเหลือ ความเข้าใจ คอยให้คำแนะนำ และข้อเสนอแนะต่างๆ จนทำให้
การศึกษาระดับมหาบัณฑิต และการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้เป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์ อาจารย์ที่
ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวฤทธิ์ สาระชนะ สำหรับความช่วยเหลือ
คำแนะนำ และข้อเสนอแนะต่างๆ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ, รองศาสตราจารย์ ดร.วิไล
โอโนมะศิริ, ศาสตราจารย์ ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช และอาจารย์ ดร.รุจิรา วโนทยาน ที่ให้ความกรุณา
ช่วยตรวจสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำต่างๆ ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำวิทยานิพนธ์ใน
ครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณวนิดา บัวสอน, คุณอาทิตย์ ร่วมวงศ์, คุณวิษวรัช อักษรกิตติ์ และ
เจ้าหน้าที่ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือทุกๆ ด้านในการทำการทดลองในวิทยานิพนธ์
ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณอภิญา บุตรลี เจ้าหน้าที่หลักสูตรวิทยาศาสตร์การแพทย์ สำหรับ
ความช่วยเหลือทุกๆ ด้าน

ขอขอบพระคุณ คุณบำเพ็ญภรณ์ สนั่นนาม, คุณสุรางค์รัตน์ ทองกร, คุณทรงพล กัลยา
ประสิทธิ์, คุณธนิต แซ่หลิว, คุณพัชรพล วงศ์ศิริ, คุณสุจิตรา โพธิ์เย็น, คุณปยุณภกร รัตนชีวร, คุณ
พิมพ์พิมล แดงอินทวัฒน์, คุณอมรรัตน์ โตทองหล่อ, คุณเพชรรินทร์ โคบุตรี, คุณชนิษฐา สุขเลิศ, และ
คุณสโรชา เขิดโฉม สำหรับความช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน ทั้งด้านการทำวิจัย และด้านจิตใจ

ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ทุกท่านในคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่
ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้จนสำเร็จการศึกษาในระดับมหาบัณฑิต

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัวที่เป็นแรงบันดาลใจ กำลังใจ
และสนับสนุนในทุกๆ ด้านจนสำเร็จการศึกษา

ศศิกานต์ ลู่ประเสริฐกุล

สารบัญ

	หน้า
.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ	13
ที่มาและความสำคัญของปัญหา (Background and Rationale).....	13
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	15
โครงสร้างหลอดเลือดฝอย (Capillaries)	15
การสร้างหลอดเลือดฝอย (Capillary tube formation).....	16
เซลล์องค์ประกอบของหลอดเลือดฝอย	17
Endothelial cells	17
Pericytes	17
Pericytes กับ capillary-tube formation ในระดับ <i>in-vivo</i>	18
การติดต่อสื่อสารระหว่าง endothelial cells และ pericytes	18
Vascular endothelial growth factor (VEGF) and receptors (VEGFR).....	19
- VEGF-A/VEGFR-2 signaling.....	19
Platelet-derived growth factor (PDGF) and receptors (PDGFR)	19

- PDGF-BB/PDGFR- β signaling.....	20
นาโนเทคโนโลยี (Nanotechnology).....	22
อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (Gold nanoparticles, AuNPs).....	23
ความสัมพันธ์ของ AuNPs กับ intracellular organelles	24
ความสัมพันธ์ของ AuNPs กับการสร้างหลอดเลือดฝอย.....	26
คำถามของงานวิจัย (Research Questions)	29
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Objectives).....	29
สมมติฐานของงานวิจัย (Hypothesis).....	29
รูปแบบงานวิจัย (Research Design)	29
กรอบความคิดงานวิจัย (Conceptual Framework).....	30
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	31
การตรวจสอบคุณสมบัติของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร.....	31
การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell culture).....	32
Experimental design.....	33
การทดลองที่ 1 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง AuNPs กับลักษณะทางชีวภาพของ pericytes และ PDGFR- β	34
1.1 การศึกษาอัตราการรอดของเซลล์ (Cell viability).....	34
1.2 การศึกษาการแบ่งตัวของเซลล์ (Cell proliferation).....	36
1.3 การศึกษาการเคลื่อนย้ายของเซลล์ (Cell migration).....	39
1.4 การศึกษาการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน PDGFR- β	40
1.5 การศึกษาลักษณะสัณฐานของ pericyte (Cell morphology).....	41
การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของ AuNPs ต่อ capillary tube formation	43
2.1 Immunofluorescence staining.....	43
การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis).....	45

บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	46
ผลการตรวจสอบคุณสมบัติของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร	46
ผลการทดลองที่ 1 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง AuNPs กับลักษณะทางชีวภาพของ pericytes	47
1.1 ผลการศึกษาความอยู่รอดของ pericyte (Cell viability).....	47
1.2 ผลการศึกษาการแบ่งตัวของเซลล์ (Cell proliferation).....	48
1.3 ผลการศึกษาการเคลื่อนย้ายของเซลล์ (Cell migration).....	49
1.4 ผลการศึกษาการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน <i>PDGFR-β</i>	50
1.5 ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานภายในเซลล์ของ pericytes.....	51
ผลการทดลองที่ 2 การศึกษา capillary tube formation โดยวิธี 3D co-culture ระหว่าง endothelial cells และ pericytes	57
2.1 ผลการศึกษาจำนวน capillary tube formation	57
2.2 ผลการศึกษา capillary tube formation ภายใต้กล้อง confocal laser-scanning microscope.....	58
บทที่ 5 วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง.....	61
อุปสรรคที่เกิดขึ้นและการแก้ไขปัญหาในการทดลอง.....	66
บรรณานุกรม.....	67
ประวัติผู้เขียน.....	73

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 forward และ reverse primer ของยีน Ki-67 และ GAPDH	38
ตารางที่ 2 ชนิดและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ทำ real-time reverse transcription-quantitative PCR (real-time RT-qPCR).....	38
ตารางที่ 3 forward และ reverse primer ของยีน PDGFR- β และ GAPDH	40



สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 Capillaries ชนิดต่างๆ: Continuous capillary (a), Fenestrated capillary (b), และ Discontinuous (sinusoid) capillary (c) ⁸	16
รูปที่ 2 ภาพ pericytes ในต่อมใต้สมองส่วนหน้าที่ถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopy, SEM) ² Primary processes ที่ยื่นออกจาก cell body (ลูกศรสีดำ), กรอบสี่เหลี่ยมเล็ก; the secondary processes (หัวลูกศรสีดำ) และ small processes (หัวลูกศรสีขาว) (a) และจากเส้นประสาท sciatic ที่ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy, TEM) ¹³ (b). โดย P คือ pericytes. Scale bars 1000 nm.....	18
รูปที่ 3 การจับกันของ PDGF isoform ต่างๆ กับ PDGFR: ระดับ in-vitro (a) และ in-vivo (b) ²¹ .	20
รูปที่ 4 PDGF-BB-PDGFR- β signaling ที่เกิดขึ้นใน pericytes (ดัดแปลงรูปจาก ²⁴).....	21
รูปที่ 5 อนุภาคระดับนาโนเมตร (nanoparticle) (ที่มา: http://www.wichlab.com/research/)	22
รูปที่ 6 แผนผังแสดงการนำ nanobiotechnology มาประยุกต์ในทางการแพทย์ ²⁸	23
รูปที่ 7 การนำสารชีวโมเลกุลมาต่อกับ AuNPs ³⁰	23
รูปที่ 8 วิธีการเข้าเซลล์แบบต่างๆ ของ NPs ที่มีขนาด, ลักษณะของผิว และรูปร่างที่แตกต่างกัน (ดัดแปลงรูปจาก ²⁴)	24
รูปที่ 9 Transmission electron micrographs ของ AuNPs ที่มีขนาดแตกต่างกันภายใน cytoplasm ของเซลล์ HeLa; AuNPs ขนาด 14 (a), 30 (b), 50 (c), 74 (d) และ 100 nm (e) ³² ..	25
รูปที่ 10 Transmission electron micrographs แสดง AgNPs ขนาด 75 nm ภายใน vesicles ในเซลล์ HUVECs: กลุ่มควบคุม (a), กลุ่ม AgNPs 75 nm (b), และภาพขยายรูป b (c)	26
รูปที่ 11 Intracellular trafficking pathway ของ AuNPs ³⁴	26
รูปที่ 12 หลักการของ PrestoBlue™	34
รูปที่ 13 Transwell membrane assay.....	39

รูปที่ 14 การตรวจสอบคุณสมบัติของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ด้วยเครื่อง TEM (a) และ UV-Vis spectrophotometer (b). Scale bar 100 nm 46

รูปที่ 15 ร้อยละความอยู่รอดของ pericyte หลังจากได้รับ 20 nm-AuNPs เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ความเข้มข้นที่ 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm; ***p<0.001..... 47

รูปที่ 16 ผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการแสดงออกของยีน Ki-67 หลังจากได้รับ 20 nm-AuNPs เป็นเวลา 24 ชั่วโมง; กลุ่ม control (a), กลุ่ม AuNPs 30 ppm (b), ระดับการแสดงออกของยีน Ki-67 (c); ***p<0.001. Scale bar 100 μ m 48

รูปที่ 17 ผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนย้ายผ่าน insert ของ transwell membrane หลังจาก pericyte ได้รับ 20 nm-AuNPs เป็นเวลา 24 ชั่วโมง; กลุ่ม control (a, c; กำลังขยายสูงขึ้นของ a), กลุ่ม AuNPs 30 ppm (b, d; กำลังขยายสูงขึ้นของ b), จำนวนเซลล์ที่มีการเคลื่อนย้าย (c); ***p<0.001. Scale bars 100 μ m 49

รูปที่ 18 ผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการแสดงออกของยีน PDGFR- β หลังจากได้รับ 20 nm-AuNPs เป็นเวลา 24 ชั่วโมง; กลุ่ม control (a), กลุ่ม AuNPs 30 ppm (b), ระดับการแสดงออกของยีน PDGFR- β (c); ***p<0.001. Scale bar 100 μ m 50

รูปที่ 19 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ pericyte กลุ่ม control; ลักษณะของ pericyte ที่ปกติ (a, b), organelles ของ pericyte ที่มีลักษณะปกติ; ER (endoplasmic reticulum), MT (mitochondria) (c, d). Scale bars 5000 nm (a, b), 1000 nm (c, d)..... 52

รูปที่ 20 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ pericyte กลุ่มที่ได้รับ 20 nm-AuNPs ที่ 30 ppm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง; พบ AuNPs (electron-dense dots) ภายใน late endosome ที่มี multivesicular bodies (black arrows) (b), lysosome (c), และ autolysosome (d), นอกจากนี้พบ autophagosome ที่มี mitochondria อยู่ภายใน (e-f). Scale bars 1000 nm (a), 100 nm (b-f) 53

รูปที่ 21 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ pericyte กลุ่มที่ได้รับ 20 nm-AuNPs ที่ 30 ppm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง; พบ mitochondria ที่มีการโป่งพอง (white arrows) (a), พบ mitochondria ที่มีขนาดใหญ่จนเสียสภาพ และพบ AuNPs (electron-dense dots) ภายใน (b-c). Scale bars 500 nm 54

รูปที่ 22 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ pericyte กลุ่มที่ได้รับ 20 nm-AuNPs ที่ 50 ppm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง; เซลล์ที่ plasma membrane แตกสลาย (a, c), พบช่องว่างขนาดใหญ่

ภายในเซลล์ (a), พบ mitochondria ที่มีลักษณะผิดปกติ (black arrows) เมื่อเทียบกับกลุ่ม control และพบ AuNPs (electron-dense dots) หลงเหลืออยู่บ้างภายใน cytoplasm (b), พบ plasmalemmal blebs (black arrowheads) ของเซลล์ที่กำลังแตกสลาย (d) และพบ mitochondria ที่มีลักษณะผิดปกติหลุดออกมานอกเซลล์ (e). Scale bars 1000 nm (a, c, d), 500 nm (b, e)..... 55

รูปที่ 23 ภาพถ่ายเพิ่มเติมจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ pericyte กลุ่มที่ได้รับ 20 nm-AuNPs ที่ 50 ppm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง; เซลล์ยังคงมี plasma membrane หุ้มรอบเซลล์ และพบช่องว่างขนาดใหญ่ภายในเซลล์ (a, c), พบ mitochondria ที่มีลักษณะผิดปกติ (black arrows) เมื่อเทียบกับกลุ่ม control และพบ autophagic vesicles (white arrows) (b), พบโครงสร้างของ multilamellar whorl bodies (double black arrows) ภายใน cytoplasm (d). Scale bars 5000 nm (c), 1000 nm (a, b, d) 56

รูปที่ 24 ผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อ capillary tube formation; กลุ่ม Intact endothelial cells + Intact pericytes (a), กลุ่ม Intact endothelial cells + AuNPs 30 ppm-treated pericytes (b), กราฟเปรียบเทียบจำนวน tubes (c); ***p<0.001. Scale bar 500 μm 57

รูปที่ 25 ภาพถ่ายจากกล้อง confocal laser-scanning microscope ของกลุ่ม Intact endothelial cells + Intact pericytes; พบเซลล์ pericytes ที่ยึดติดดี PDGFR-β บริเวณ tube ที่เป็นวงสมบูรณ์ (a-c), เซลล์มีการยื่น process ออก (white arrows) และมีตำแหน่งอยู่บริเวณด้านข้างของ endothelial cells (d-f). Scale bars; 100 μm..... 59

รูปที่ 26 ภาพถ่ายจากกล้อง confocal laser-scanning microscope ของกลุ่ม Intact endothelial cells + AuNPs 30 ppm-treated pericytes; พบเซลล์ที่ยึดติดดี PDGFR-β (white arrows) มีลักษณะเป็นตัวกลม ไม่ยึด cytoplasm และ process ออก และพบ endothelial cells และ pericytes รวมตัวอยู่เป็นกลุ่มไม่สร้าง tubes (a-f). Scale bars; 100 μm..... 60

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา (Background and Rationale)

การสร้างหลอดเลือดฝอย (capillary tube formation) ประกอบไปด้วย endothelial cells ซึ่งเป็นเซลล์ที่เรียงตัวต่อกันเป็นผนังหลอดเลือด และ pericytes ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่โอบล้อม endothelial cells โดยยื่น cytoplasmic process ออกมาและแผ่ในทิศทางต่างๆ บนหลอดเลือด^{1,2} โดยเซลล์ทั้งสองชนิดมีการติดต่อสื่อสารกันผ่านทาง paracrine signaling และมีการใช้ basement membrane ร่วมกัน โดยหน้าที่หลักของ pericytes คือ การรักษาขนาด (vascular diameter)³ และความเสถียรของหลอดเลือด (microvascular stabilizer), ควบคุมการไหลเวียนของเลือดในหลอดเลือดขนาดเล็ก (microvascular blood flow), การซึมผ่านได้ของหลอดเลือด (vessel permeability)⁴, สร้าง basement membrane, ควบคุมอัตราการแบ่งตัวของ endothelial cells, เป็นส่วนประกอบหลักของ blood-brain barrier (BBB)/ blood-nerve barrier (BNB) ในระบบประสาทส่วนกลางและส่วนปลาย และมีบทบาทสำคัญต่อการเกิด angiogenesis⁵ จึงถือเป็นเซลล์ที่สำคัญอย่างมากต่อโครงสร้างหลอดเลือด

ในปัจจุบันนาโนเทคโนโลยี (nanotechnology) เป็นเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับการนำวัสดุที่มีขนาดใหญ่ มาสังเคราะห์ให้มีอนุภาคเล็กระดับนาโนเมตร เรียกว่า nanoparticles ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์อย่างกว้างขวาง โดยนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยและการบำบัดรักษา เช่น โรคมะเร็ง, โรคเกี่ยวกับหัวใจและหลอดเลือด, โรค age-related macular degeneration (AMD) และโรคเบาหวาน เป็นต้น ในปี 2005 Mukherjee และคณะ ได้ใช้อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (gold nanoparticles, AuNPs) มายับยั้งการแบ่งตัว และการเคลื่อนย้ายของ endothelial cells โดยพบว่า AuNPs สามารถจับที่บริเวณ cysteine residue ของ heparin binding domain ของ VEGF-A₁₆₅ ได้อย่างจำเพาะเจาะจง⁶ นอกจากนี้ในปี 2016 Roh และคณะ นำ AuNPs มาใช้ในการยับยั้งการเกิด angiogenesis ในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ choroidal neovascularization ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค AMD ได้สำเร็จ โดยผลการทดลองพบว่าหลอดเลือดบริเวณ choroid มีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อได้ทำการศึกษาในระดับหลอดทดลอง (*in-vitro*) พบว่า AuNPs สามารถยับยั้งการเกิด tube formation, cell proliferation, ลดการเติมฟอสเฟตให้กับ extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2, protein kinase B (Akt) และ focal adhesion kinase (FAK) signaling pathways ของ endothelial cells ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย VEGF ได้ โดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติที่อยู่ข้างเคียง จากงานวิจัยข้างต้นที่กล่าวมานี้ จะเห็นได้ว่า

AuNPs สามารถยับยั้งการเกิด angiogenesis โดยมีเป้าหมาย (target) ต่อ VEGF signaling ของ endothelial cells แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาใดที่รายงานผลของ AuNPs ที่มีต่อคุณลักษณะของ pericytes มาก่อน ในขณะที่ pericytes เป็นเซลล์ที่มีความสำคัญอย่างมากต่อหลอดเลือดและสัมพันธ์กับการเกิดหลอดเลือดใหม่ถึง 80%⁷

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่นำ AuNPs ขนาด 20 นาโนเมตร (nm) ที่มีค่าความเข้มข้นจากที่ได้ทำการคัดเลือกมาทดสอบ เพื่อศึกษาความเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของ pericytes รวมถึงยีน *PDGFR-β* นอกจากนี้ทำการจำลองโครงสร้างหลอดเลือด (tube formation) แบบสามมิติขึ้นมาในระดับ *in-vitro* โดยนำ pericytes ที่ได้รับ AuNPs มาเพาะเลี้ยงร่วมกับ endothelial cells แบบ co-cultured บน Matrigel เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาประมวลผลร่วมกับการศึกษาผลของ AuNPs ต่อ endothelial cells ที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ ที่วิจัยมุ่งหวังว่าจะสามารถนำ AuNPs มาใช้เป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับ anti-capillary tube formation โดยมีเป้าหมายต่อทั้ง endothelial cells และ pericytes ได้ในอนาคต

บทที่ 2

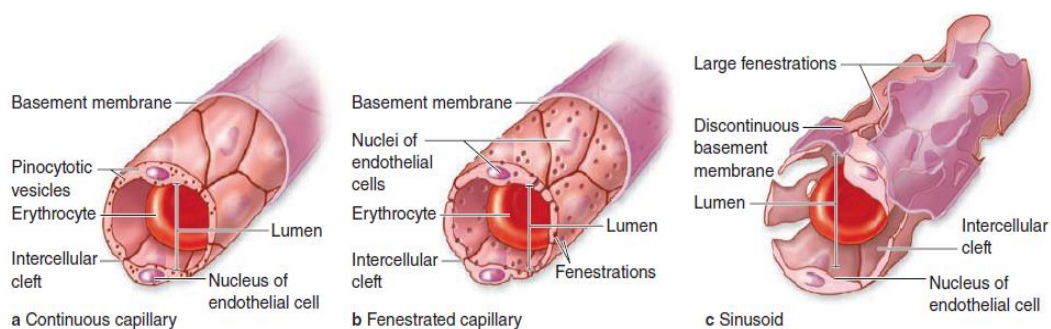
ทบทวนวรรณกรรม

โครงสร้างหลอดเลือดฝอย (Capillaries)

Capillaries เป็นหลอดเลือดที่มีขนาดเล็กที่สุดในระบบไหลเวียนเลือด มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 4-10 ไมโครเมตร สานตัวต่อกันเป็นร่างแหเรียกว่า capillary bed ประกอบด้วย endothelial cells ที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของหลอดเลือด ที่บริเวณผนังด้านนอกของหลอดเลือดจะพบเซลล์อีกชนิดคือ pericytes โดยปริมาณของ capillaries ขึ้นกับ metabolic activity ของแต่ละเนื้อเยื่อ

Capillaries แบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่

- Continuous capillaries เป็นหลอดเลือดที่ endothelial cells เรียงตัวติดต่อกันอย่างแน่นหนา และมี basement membrane ห่อหุ้มตลอดความยาวของผนังหลอดเลือด การแลกเปลี่ยนสารผ่านทาง endothelial cells เป็นแบบการแพร่ (diffusion) และการขนส่งสารจากผิวเซลล์ด้านหนึ่งไปอีกด้านหนึ่ง ด้วย pinocytotic vesicles หลอดเลือดชนิดนี้พบมากที่สุดในร่างกาย ยกตัวอย่างเช่น ปอด, เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน, กล้ามเนื้อ, เนื้อเยื่อประสาท และต่อมไร้ท่อ เป็นต้น (รูปที่ 1a)
- Fenestrated capillaries เป็นหลอดเลือดที่ cytoplasm ของ endothelial cells สามารถพบรูพรุนเล็กๆ ที่ผนังหลอดเลือดได้ เพื่อใช้ในการแลกเปลี่ยนสารขนาดใหญ่มาก มี basement membrane ห่อหุ้มตลอดความยาวของผนังหลอดเลือด มักพบในอวัยวะที่ต้องเกิดการแลกเปลี่ยนสารหรือส่งสารอย่างรวดเร็ว ได้แก่ ไต, ลำไส้ และต่อมไร้ท่อ เป็นต้น (รูปที่ 1b)
- Discontinuous (sinusoid) capillaries เป็นหลอดเลือดที่มีช่องว่างขนาดใหญ่, มี basement membrane ห่อหุ้มแบบไม่ต่อเนื่อง (discontinuous) เนื่องจากต้องใช้ในการแลกเปลี่ยนโมเลกุลขนาดใหญ่ (macromolecules) หรือเซลล์เม็ดเลือด (blood cells) อวัยวะที่พบ เช่น ตับ และม้าม เป็นต้น (รูปที่ 1c)⁸



รูปที่ 1 Capillaries ชนิดต่างๆ: Continuous capillary (a), Fenestrated capillary (b), และ Discontinuous (sinusoid) capillary (c)⁸

การสร้างหลอดเลือดฝอย (Capillary tube formation)

กระบวนการสร้างหลอดเลือด ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ได้แก่ การสร้างหลอดเลือด (vasculogenesis) จาก primitive vascular cells หรือ hemangioblasts ซึ่งเกิดในระยะ embryo และการสร้างหลอดเลือดใหม่จากหลอดเลือดที่มีอยู่เดิม (angiogenesis) เป็นการเกิดการแตกกิ่งจากหลอดเลือดเดิมออกมา เพื่อให้ได้โครงร่างของหลอดเลือดทั่วทั้งร่างกาย โดยทั่วไปนั้นกระบวนการ vasculogenesis จะหยุดหลังจากช่วงการพัฒนาตัวอ่อน แต่การสร้างหลอดเลือดใหม่จะยังเกิดขึ้นได้ตลอดชีวิต⁹

การสร้างหลอดเลือดฝอยเป็นกระบวนการหนึ่งที่เกิดขึ้นเพื่อสานต่อโครงร่างของหลอดเลือดเพื่อเข้าหล่อเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อทั่วร่างกาย เป็นการทำงานร่วมกันของสามองค์ประกอบหลัก ได้แก่ endothelial cells, pericytes และ extracellular matrix (ECM) โดยมี growth factors ต่างๆ เช่น vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor (FGF) และ platelet-derived growth factor (PDGF) เป็นต้น ควบคุมให้มีการสร้างหลอดเลือดฝอยได้อย่างสมดุล ร่วมกับกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) รวมถึงการเคลื่อนย้ายของเซลล์ (cell migration)¹⁰

เซลล์องค์ประกอบของหลอดเลือดฝอย

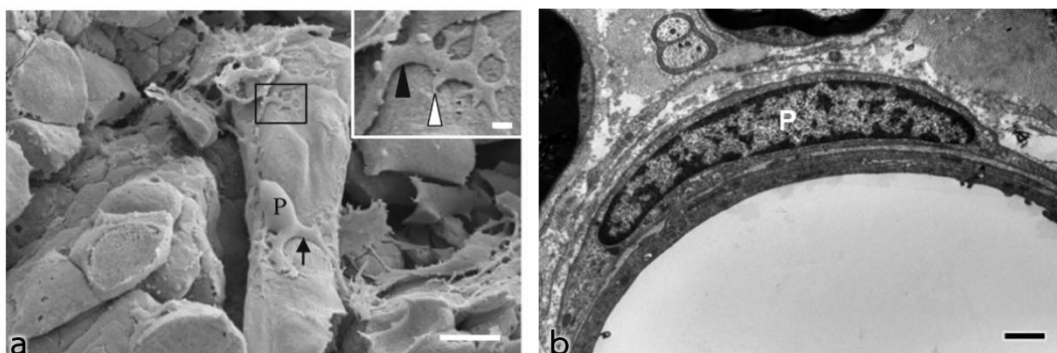
Endothelial cells

Endothelial cells คือ เซลล์บุผนังหลอดเลือดที่เรียงตัวต่อกันแบบ simple squamous epithelium ตลอดความยาวของหลอดเลือด โดยมีคุณสมบัติดังนี้ แลกเปลี่ยน (exchange) หรือเป็นตัวกั้น (barrier) ระหว่างสารที่ไหลเวียนในหลอดเลือดกับอวัยวะต่างๆ, ควบคุมความดันเลือด, สร้าง growth factors เช่น VEGF, angiopoietin (Ang), ephrin, และ PDGF, และการเกิด angiogenesis¹¹ เป็นต้น

การบ่งชี้ endothelial cells ในระดับกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) สามารถใช้วิธีการย้อมแบบธรรมดาด้วย H&E โดยดูตำแหน่งของนิวเคลียสของเซลล์ที่ยื่นเข้าไปใน lumen ของหลอดเลือด นอกจากนี้ หากต้องการระบุเซลล์อย่างจำเพาะเจาะจง จะมีการนำวิธี Immunohistochemistry เข้ามาใช้ โดย marker ที่นิยมนำมาบ่งชี้ endothelial cells ได้แก่ von Willebrand factor (vWF)¹¹, CD34¹ และ Isolectin B4¹² เป็นต้น

Pericytes

Pericytes เป็นเซลล์ที่อยู่บริเวณผิวด้านนอกของผนังหลอดเลือดขนาดเล็ก ได้แก่ capillary และ post-capillary venule, มี cytoplasmic process ยื่นไปโอบล้อมผนังหลอดเลือด (รูปที่ 2)²¹ สร้างและใช้ basement membrane ร่วมกันกับ endothelial cells และติดต่อสื่อสารกันผ่าน adhesion plaque และบริเวณที่เป็น peg-socket³ Pericytes ทำหน้าที่ในการรักษาความเสถียรของหลอดเลือดขนาดเล็ก (microvascular stabilizer), ควบคุมการไหลเวียนของเลือด (microvascular blood flow) และการซึมผ่านของสาร (vessel permeability)⁵, ควบคุมอัตราการแบ่งตัวของ endothelial cells, เป็นส่วนประกอบหลักของ blood-brain barrier (BBB)/ blood-nerve barrier (BNB) ในระบบประสาทส่วนกลางและส่วนปลาย และมีบทบาทสำคัญต่อการเกิด angiogenesis⁷ โดยความหนาแน่นของจำนวน pericytes ต่อ endothelial cells มีความแตกต่างกันไปในแต่ละบริเวณ ขึ้นกับตำแหน่งและหน้าที่ของหลอดเลือดฝอยนั้นๆ เช่น ที่ระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system, CNS) และ retina จะพบ pericytes:endothelial cells มากที่สุด^{1, 10}



รูปที่ 2 ภาพ pericytes ในต่อมใต้สมองส่วนหน้าที่ถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopy, SEM)² Primary processes ที่ยื่นออกจาก cell body (ลูกศรสีดำ), กรอบสี่เหลี่ยมเล็ก; the secondary processes (หัวลูกศรสีดำ) และ small processes (หัวลูกศรสีขาว) (a) และจากเส้นประสาท sciatic ที่ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy, TEM)¹³ (b). โดย P คือ pericytes. Scale bars 1000 nm

การบ่งชี้ pericytes ในระดับกล้องจุลทรรศน์ markers ที่นิยมใช้ ได้แก่ desmin, platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)- β , neuron-glia (NG)-2 proteoglycan, alpha smooth muscle actin (α -SMA), regulator of G protein signaling 5 (RGS-5) และ CD146 เป็นต้น^{1, 14} ในขณะนี้ยังไม่มี pan marker ใดที่สามารถใช้ระบุ pericytes ได้ทุกๆ อวัยวะ⁴ จึงต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมสำหรับเนื้อเยื่อที่จะนำมาศึกษา

Pericytes กับ capillary-tube formation ในระดับ *in-vivo*

ในกระบวนการเริ่มต้นของการเกิดสร้างหลอดเลือดฝอย พบว่า pericytes จะถูกกระตุ้นให้เพิ่มการแบ่งตัว โดยเกิดการหด cytoplasmic processes ให้สั้นลง จากนั้น basement membrane ที่หลอดเลือดเดิมจะถูกย่อยสลาย ทำให้ pericyte หลุดออกจากผนังหลอดเลือด นอกจากนี้ pericytes ทำหน้าที่เป็นตัวนำทางในการหาตำแหน่งที่ตั้งใหม่ของหลอดเลือดที่จะทำการงอกออกไป เมื่อ pericytes ไปโอบล้อมหลอดเลือดใหม่ จะทำหน้าที่สร้าง basement membrane ร่วมกันกับ endothelial cells เพื่อใช้ในการห่อหุ้มหลอดเลือดอย่างสมบูรณ์¹⁴

การติดต่อสื่อสารระหว่าง endothelial cells และ pericytes

นอกจากการติดต่อสื่อสารของ endothelial cells และ pericytes ผ่านทาง adhesion plaque และบริเวณที่เป็น peg-socket ยังติดต่อสื่อสารกันผ่าน receptors 2 ชนิดหลักๆ ได้แก่

vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) และ platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) โดยเป็นตัวรับ growth factors 2 ชนิด ได้แก่ VEGF และ PDGF ตามลำดับ โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

Vascular endothelial growth factor (VEGF) and receptors (VEGFR)

VEGF family ประกอบด้วย VEGF-A, -B, -C, -D, -E, -F (*Trimeresurus flavoviridis* svVEGF) และ PIGF (placental growth factor) โดย VEGF receptor (VEGFR) เป็นชนิด tyrosine kinase receptor (TKRs) ประกอบด้วย VEGFR-1, -2 และ -3 โดย VEGF-A เป็น pro-angiogenic growth factor ที่มีความสำคัญต่อการเกิด angiogenesis กระบวนการ alternative splicing ส่งผลให้ VEGF-A แบ่งออกหลาย subtypes เช่น VEGF-A_{121, 165, 189} และ ₂₀₆ โดยมีตัวรับ 2 ชนิด ได้แก่ VEGFR-1 และ VEGFR-2¹⁵

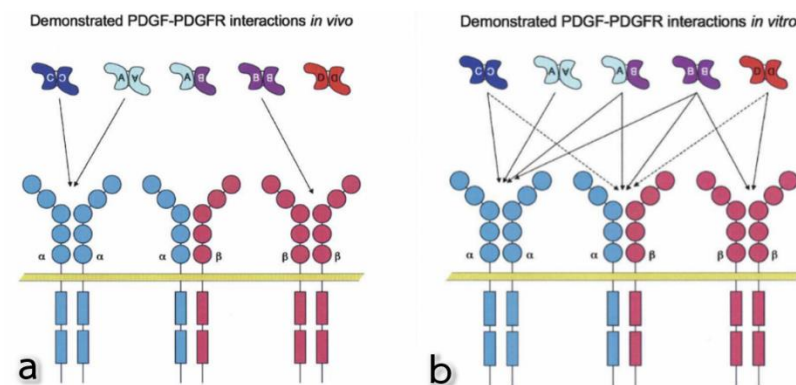
- VEGF-A/VEGFR-2 signaling

การจับกันของ VEGF-A กับ VEGFR-2 ทำให้เกิด signaling pathway ส่งผลให้ endothelial cells ดำรงอยู่ (survival), การเจริญเติบโต, เกิดการเคลื่อนย้ายตำแหน่ง และสนับสนุนให้เกิด angiogenesis รวมถึงทำให้เกิด vascular permeability¹⁶ นอกเหนือจาก endothelial cells ยังมี macrophage, activated T-cells¹⁷ รวมถึง pericytes ที่สามารถสร้าง VEGF-A ระดับต่ำๆ ออกมาให้ endothelial cells เพื่อให้อยู่ในสภาวะสมดุล โดยลักษณะ paracrine signaling^{3, 19}

Platelet-derived growth factor (PDGF) and receptors (PDGFR)

PDGF เป็น growth factor ที่ประกอบด้วย di-sulfide-bonded homodimers ของ A-, B-, C- และ D-polypeptide chains และ heterodimers AB โดย PDGF receptors ประกอบด้วย 2 isoforms ได้แก่ PDGFR- α และ PDGFR- β ทั้ง 2 isoforms เป็น receptors ชนิด tyrosine kinase receptor ที่มี Src homology 2 (SH2) domain²⁰

การศึกษาระดับ *in-vitro* พบว่า PDGF แต่ละ isoform สามารถจับกับ PDGFR ได้แตกต่างกัน ได้แก่ PDGF-AA, -AB, -BB, -CC จะจับกับ PDGFR- $\alpha\alpha$ homodimers ส่วน PDGF-BB และ PDGF-DD จะจับกับ PDGFR- $\beta\beta$ homodimers และ PDGF-AB, -BB, -CC และ -DD จะจับกับ PDGFR- $\alpha\beta$ heterodimers (รูปที่ 3a) แต่ในระดับ *in-vivo* พบว่า PDGF-AA และ -CC จะจับกับ PDGFR- $\alpha\alpha$ homodimers และ PDGF-BB จะจับกับ PDGFR- $\beta\beta$ homodimers เท่านั้น (รูปที่ 3b)²¹

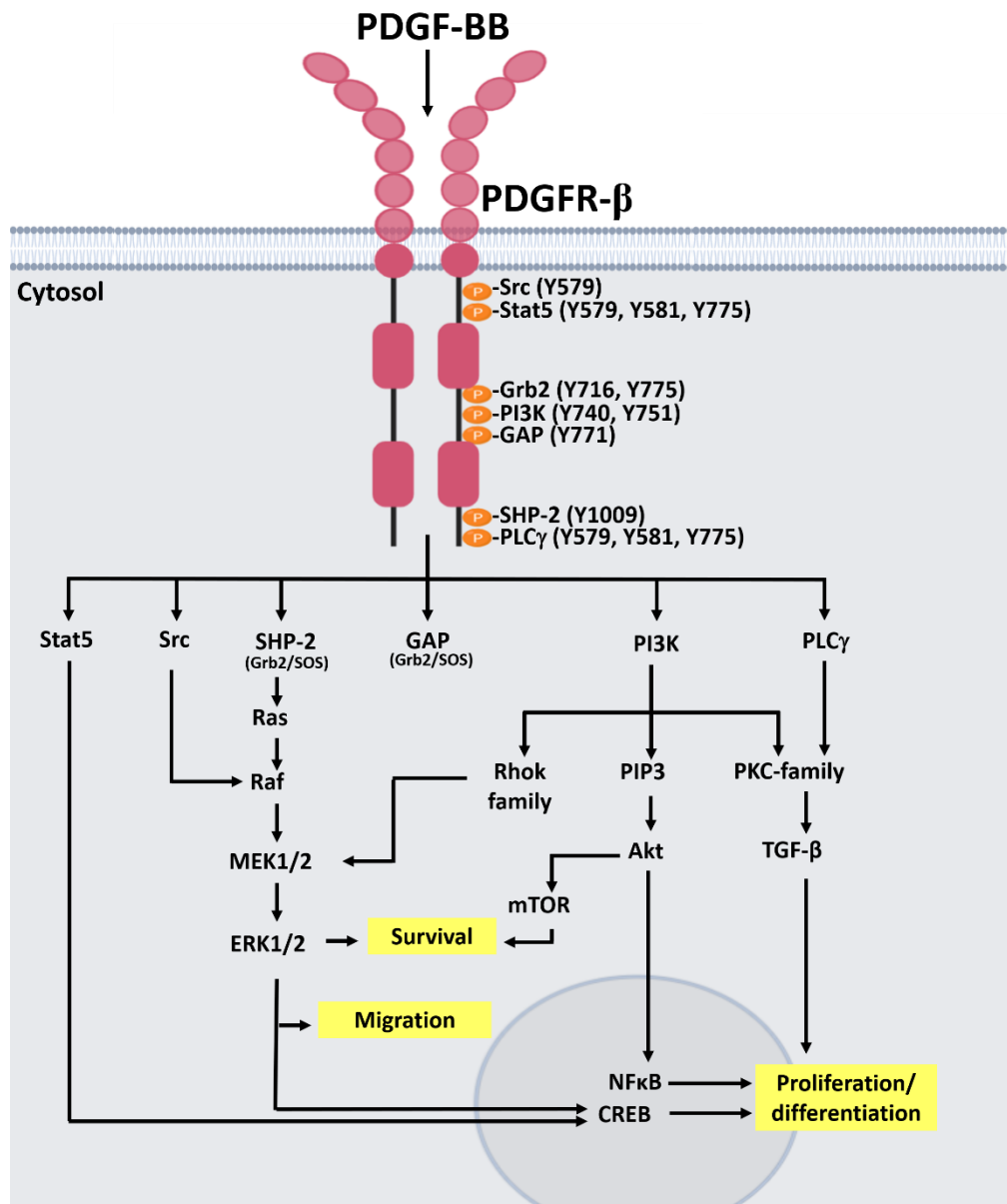


รูปที่ 3 การจับกันของ PDGF isoform ต่างๆ กับ PDGFR: ระดับ *in-vitro* (a) และ *in-vivo* (b)²¹

- PDGF-BB/PDGFR- β signaling

PDGF-BB เป็น pro-angiogenic growth factor ถูกสร้างมาจาก endothelial cells เพื่อใช้ติดต่อสื่อสารกับ mesenchymal cells ข้างเคียง เช่น pericytes และ fibroblasts ผ่าน paracrine signaling การติดต่อสื่อสารระหว่าง PDGF-BB กับ PDGFR- β มีผลต่อการเจริญและความเสถียรของหลอดเลือด²², wound healing²³ และ tube formation นอกจากนี้ที่บริเวณปลายของหลอดเลือดเดิม จะมี endothelial tip cells ซึ่งหลัง PDGF-BB ออกมาด้วยเช่นกัน ทำให้เหนี่ยวนำ pericytes ให้เคลื่อนที่มายังหลอดเลือดส่วนที่กำลังจะงอกออกไป (sprouting) เมื่อ pericytes มาจับกับ endothelial cells จะทำให้เกิดการหลั่ง VEGF และกระตุ้นให้ endothelial cells เกิดการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นตามไปด้วย⁹

กลไกการทำงานของ PDGF-BB ที่หลั่งออกมาจาก endothelial cells เมื่อจับกับ PDGFR- β ที่เป็น receptor อยู่บนผิวของ pericytes ส่งผลให้เกิด autophosphorylation และ receptor dimerization ไปยัง SH2-domain containing proteins หลายชนิด ได้แก่ Src, Stat5, Grb2, PI3K, GAP, SHP-2 และ PLC γ ให้มาจับกับ phosphorylated cytoplasmic tyrosine residues แล้วกระตุ้นการทำงานของ PDGFR- β ให้ส่ง downstream signaling เพื่อการทำงานด้านต่างๆ ของเซลล์ เช่น ความอยู่รอด, การแบ่งตัว, และการเคลื่อนย้ายของ pericytes (รูปที่ 4)

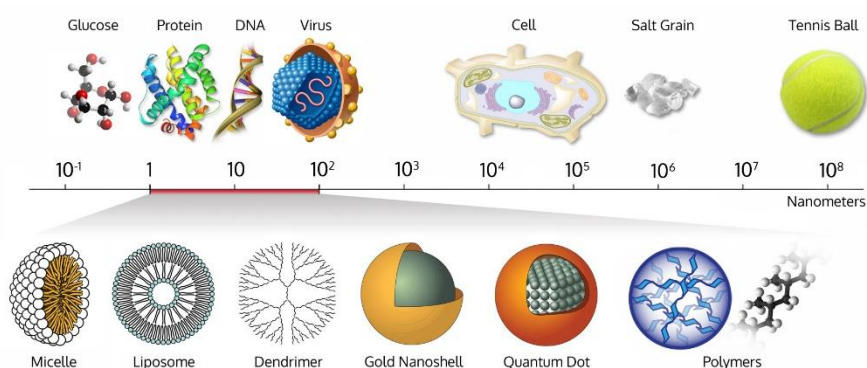


รูปที่ 4 PDGF-BB-PDGFR- β signaling ที่เกิดขึ้นใน pericytes (ดัดแปลงรูปจาก²⁴)

ในหนูทดลองพบว่าการแสดงออกของ PDGF-BB จากเยื่อผนังหลอดเลือด (endothelium) มีความสำคัญต่อการมี pericyte มาห่อหุ้มที่ผนังหลอดเลือดด้านนอก²⁵ การขาดการสื่อสารของ PDGF-BB หรือ PDGFR- β ระหว่าง endothelial cell และ pericyte นำมาซึ่งหลอดเลือดที่มี pericyte ห่อหุ้มลดลง ส่งผลให้เกิดความผิดปกติของ endothelial junction, มีการรั่วของหลอดเลือดขนาดเล็ก, หลอดเลือดขยายตัว, การไหลเวียนของเลือดต่ำลง และการตกเลือด (hemorrhage)^{26, 27}

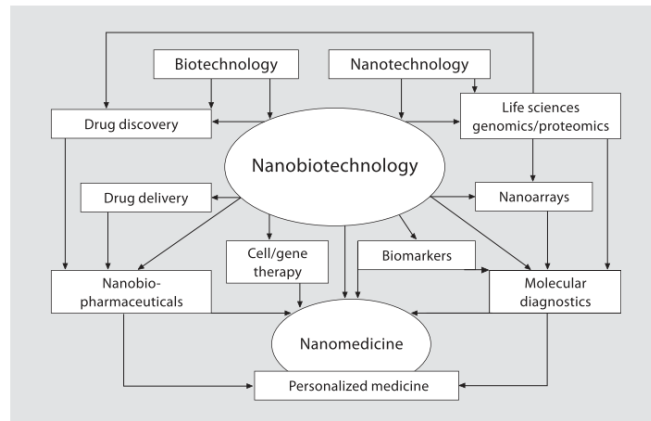
นาโนเทคโนโลยี (Nanotechnology)

เป็นเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการศึกษา การจัดการ และการประยุกต์ใช้วัสดุที่มีขนาดใหญ่ นำมาสังเคราะห์ให้มีขนาดเล็กระดับนาโนเมตร เรียกว่า อนุภาคระดับนาโนเมตร (nanoparticle; NPs) เป็นอนุภาคที่มีขนาดตั้งแต่ 1-100 นาโนเมตร ซึ่งเทียบเท่ากับระดับอะตอมและโมเลกุล เช่น micelle, liposome, dendrimer เป็นต้น (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 อนุภาคระดับนาโนเมตร (nanoparticle) (ที่มา: <http://www.wichlab.com/research/>)

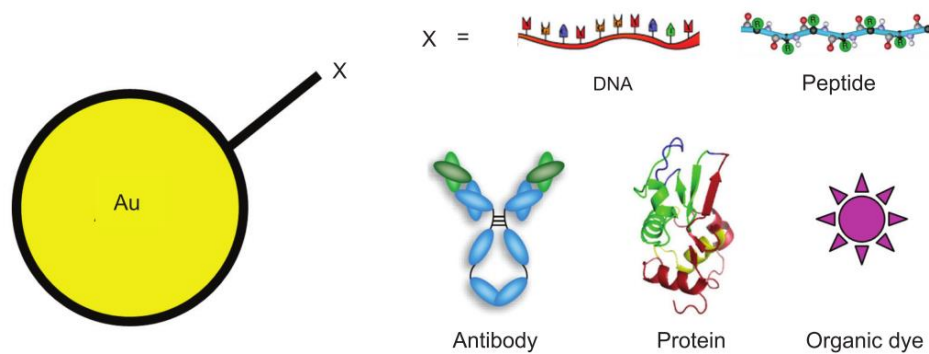
ปัจจุบัน NPs ถูกพัฒนาเพื่อนำมาใช้กับสิ่งมีชีวิต เรียกว่า nanobiotechnology และนำมาประยุกต์ใช้กับทางการแพทย์หลายๆ แขนง เช่น nanoneurology ในโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท, nanocardiology ในโรคเกี่ยวกับหัวใจและหลอดเลือด, nanoortho-pedics ในโรคกระดูกและข้อ และ nanoophthalmology ในโรคเกี่ยวกับตา เป็นต้น²⁸ โดยมีวัตถุประสงค์ เพื่อการตรวจวินิจฉัย และตรวจคัดกรองทางการแพทย์²⁸, เพื่อใช้ขนส่งยาเข้าสู่ร่างกาย (drug delivery)²⁹, เพื่อใช้เป็น biomarker, และใช้ในการรักษา gene therapy เป็นต้น (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 แผนผังแสดงการนำ nanobiotechnology มาประยุกต์ในทางการแพทย์²⁸

อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (Gold nanoparticles, AuNPs)

วัสดุนาโนชนิดหนึ่งที่ยินนำมาใช้กับทางการแพทย์อย่างแพร่หลาย คือ อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร หรือ AuNPs เนื่องจากมีคุณสมบัติที่ดีหลายประการ เช่น มีความสามารถในการนำไฟฟ้าได้ดี มีความเป็นพิษต่ำ มีความเข้ากันได้กับร่างกาย (biocompatibility) สามารถสังเคราะห์ได้ง่าย และสามารถนำสารชีวโมเลกุลมาต่อได้หลายรูปแบบ (รูปที่ 7)^{12, 30} AuNPs มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 510-550 nm โดยค่าจะมากขึ้นตามขนาดของ AuNPs³⁰ และมีเลขอะตอมสูง ทำให้สามารถดูดกลืนช่วงคลื่น X-rays ได้ดี³¹

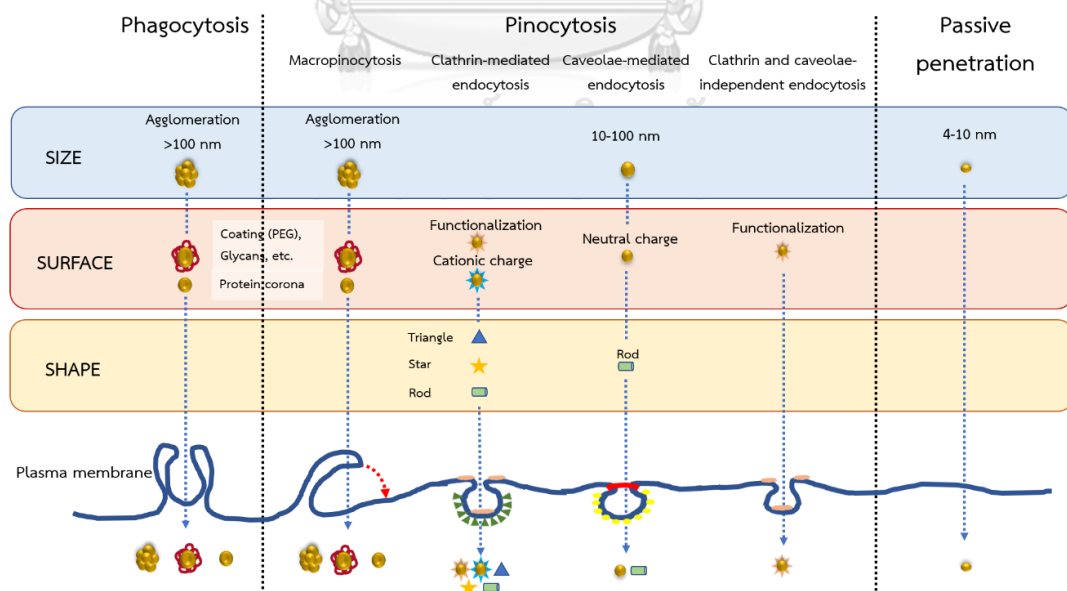


รูปที่ 7 การนำสารชีวโมเลกุลมาต่อกับ AuNPs³⁰

ความสัมพันธ์ของ AuNPs กับ intracellular organelles

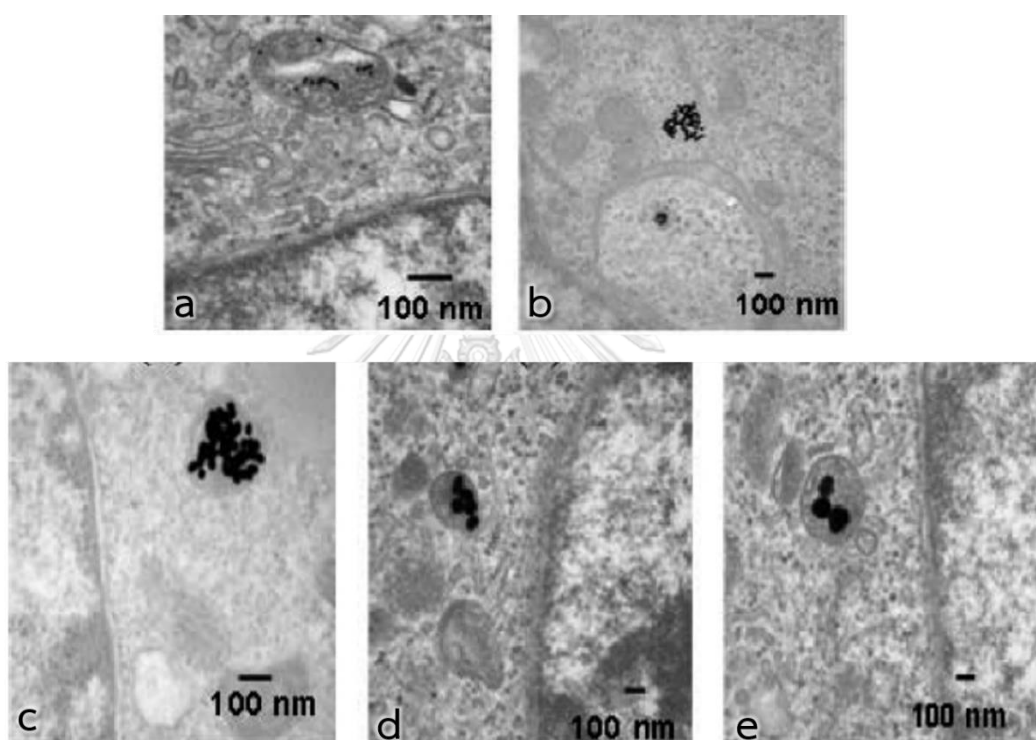
จากการทบทวนวรรณกรรมของ Panzarini E และคณะในปี 2018 พบว่า AuNPs ที่มีขนาด, ลักษณะของผิว และรูปร่างที่แตกต่างกัน ส่งผลให้มีวิธีการเข้าเซลล์แตกต่างกัน โดยแบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ แบบ passive penetration, pinocytosis และ phagocytosis²⁴ (รูปที่ 8)

- Passive penetration คือ NPs สามารถแพร่ผ่านเข้าเยื่อหุ้มเซลล์ได้เอง เป็นวิธีการเข้าเซลล์ของ NPs ที่มีขนาดเล็ก ตั้งแต่ 4-10 nm
- Pinocytosis คือ NPs สัมผัสกับ plasma membrane แล้วเกิดการเว้าเข้าไปในเซลล์ จนหลุดเป็นถุง หรือเป็นการดื่มของเซลล์ (cell drinking) เป็นวิธีการเข้าเซลล์ของ NPs ที่มีขนาดเล็ก ตั้งแต่ 10 nm แบ่งออกเป็น 4 แบบ ได้แก่ clathrin-mediated endocytosis, caveolae-mediated endocytosis, clathrin and caveolae-independent endocytosis, และ macropinocytosis
- Phagocytosis คือ การที่ NPs เข้าเยื่อหุ้มเซลล์โดยมีส่วนหนึ่งของ plasma membrane ยื่นออกมาโอบล้อมแล้วนำเข้าสู่เซลล์ เป็นวิธีการเข้าเซลล์ของ NPs ที่มีขนาดใหญ่กว่า 100 nm หรือมีการเคลือบผิวด้วยสารอื่นๆ ที่ทำให้ NPs มีขนาดใหญ่ และมีลักษณะจำเพาะ



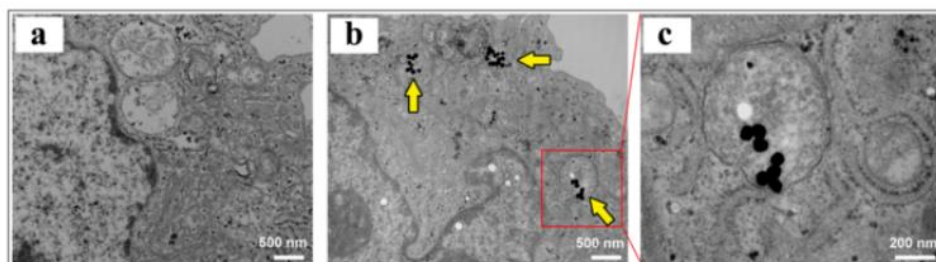
รูปที่ 8 วิธีการเข้าเซลล์แบบต่างๆ ของ NPs ที่มีขนาด, ลักษณะของผิว และรูปร่างที่แตกต่างกัน (ดัดแปลงรูปจาก²⁴)

แต่อย่างไรก็ตามวิธีการเข้าเซลล์ที่แตกต่างกัน ยังขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ที่นำมาศึกษา เช่นกัน เช่น จากการศึกษาของ Chithrani และคณะในปี 2006 พบว่า AuNPs ที่มีลักษณะเป็นทรงกลม (spherical) ที่มีขนาด 14, 30, 50, 74 และ 100 nm สามารถเข้าสู่ภายในเซลล์ชนิด HeLa ได้ ผ่านกลไก receptor-mediated endocytosis (RME) เข้าสู่ vesicle บริเวณ cytoplasm แต่ไม่สามารถเข้านิวเคลียสได้³² (รูปที่ 9)



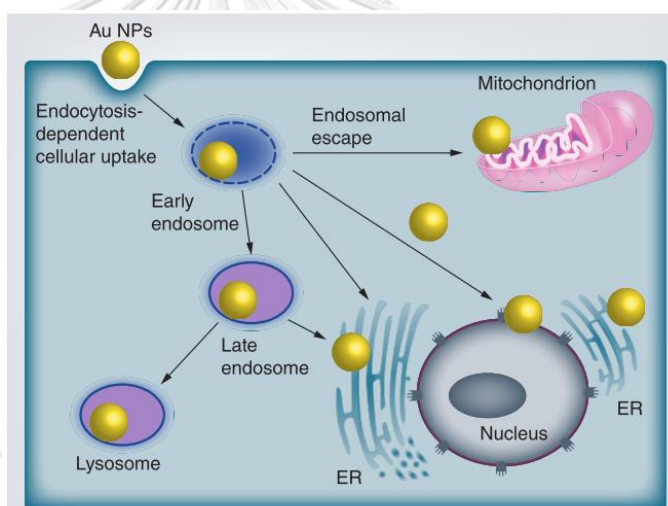
รูปที่ 9 Transmission electron micrographs ของ AuNPs ที่มีขนาดแตกต่างกันภายใน cytoplasm ของเซลล์ HeLa; AuNPs ขนาด 14 (a), 30 (b), 50 (c), 74 (d) และ 100 nm (e)³²

จากการศึกษาของ Guo และคณะในปี 2016 รายงานว่า AgNPs ขนาด 75 nm เข้าสู่ภายในเซลล์ HUVECs โดยพบอยู่ภายใน autolysosomes และ vesicles นอกจากนี้พบว่า AgNPs ที่มีความเข้มข้นสูง และขนาดใหญ่ มีความสามารถในการเข้าเซลล์ได้เพิ่มขึ้น³³ (รูปที่ 10)



รูปที่ 10 Transmission electron micrographs แสดง AgNPs ขนาด 75 nm ภายใน vesicles ในเซลล์ HUVECs: กลุ่มควบคุม (a), กลุ่ม AgNPs 75 nm (b), และภาพขยายรูป b (c)

จากการรายงานของ Yang และคณะ ในปี 2017 พบว่า AuNPs มีความสามารถในการเข้าสู่ นิวเคลียส, mitochondria, endoplasmic reticulum, endosome รวมถึง lysosome และเข้าสู่เซลล์โดยกลไก endocytotic pathway³⁴ (รูปที่ 11)



รูปที่ 11 Intracellular trafficking pathway ของ AuNPs³⁴

ความสัมพันธ์ของ AuNPs กับการสร้างหลอดเลือดฝอย

ในปี 2005 Mukherjee และคณะ ได้นำ AuNPs ขนาด 5 nm มาทำการศึกษากับ endothelial cells ชนิด HUVECs พบว่า AuNPs มีความสามารถจับกับ cysteine residue ของ heparin binding domain ของ VEGF-A₁₆₅ ได้อย่างจำเพาะเจาะจง และสามารถยับยั้งการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ VEGFR-2 ได้⁶ นอกจากนี้ AuNPs ขนาด 5 nm สามารถยับยั้ง VEGF-induced proliferation รวมถึง AuNPs ขนาด 15 nm สามารถลดการเคลื่อนย้ายของ endothelial cells และ tube formation ได้^{35, 36} สอดคล้องกับการศึกษาของ Roh และคณะ ในปี 2016 ได้นำ AuNPs

ขนาด 20 nm มาใช้ในการยับยั้งการเกิด angiogenesis ในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ choroidal neovascularization นำมาซึ่งโรค AMD ผลการทดลองพบว่าหลอดเลือดบริเวณ choroid มีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และได้ทำการศึกษาในระดับ *in-vitro* พบว่า AuNPs สามารถยับยั้งการเกิด tube formation, proliferation และลดการเติมฟอสเฟตให้กับ extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2, protein kinase B (Akt), และ focal adhesion kinase (FAK) signaling pathways ของ endothelial cells ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย VEGF ได้ โดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติที่อยู่ข้างเคียง¹²

ในปี 2011 Arvizo และคณะ นำ AuNPs ขนาด 5, 10 และ 20 nm มาทำการทดลองกับ HUVECs เช่นกัน เพื่อศึกษาบทบาทของขนาด และ surface charge ของ AuNPs ในการยับยั้งการเกิด angiogenesis จากการศึกษาพบว่า AuNPs ขนาด 20 nm ในปริมาณต่ำ สามารถยับยั้ง cell proliferation ของ HUVECs ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด เมื่อเทียบกับขนาด 5 และ 10 nm นอกจากนี้ยังทำการยืนยันความสามารถในการจับกันของ AuNPs กับ VEGF-A₁₆₅ โดยการทำให้ ELISA พบว่า AuNPs จับกับ VEGF-A₁₆₅ แล้วทำให้โปรตีนเปลี่ยนรูปร่าง เนื่องจาก AuNPs จับกับ surface charge ได้แก่ หมู่ -NH₂ และ -SH ของ heparin binding domain ของ VEGF-A₁₆₅³⁷

ในปี 2014 Pan และคณะ ทดลอง AuNPs ขนาด 15 nm กับ HUVECs ที่เลี้ยงใน hepatic carcinoma-condition medium (HepG2-CM) ผลคือ AuNPs ที่ความเข้มข้น 2 nM (0.000394 ppm) และ 4 nM (0.000788 ppm) ไม่ส่งผลเป็นพิษต่อ HUVECs ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ แต่พบว่ายับยั้ง proliferation และ migration ในเซลล์ที่เลี้ยงด้วย HepG2-CM เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเซลล์พิเศษชนิดนี้มี VEGF จำนวนมาก ทำให้ AuNPs ไปแย่งจับกับ VEGF ก่อนที่จะเข้าเซลล์³⁸

ในปี 2018 Shen และคณะ พบว่า AuNPs ขนาด 26 nm ที่มีความเข้มข้น 10 และ 20 ppm สามารถลด cell viability และยับยั้ง cell proliferation, cell migration และ tube formation รวมถึงทำให้การแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ autophagy เพิ่มขึ้น ได้แก่ ATG5, beclin1 (autophagosome formation marker), p62 (degradation marker), LC3-II (autophagy activation marker) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยผู้วิจัยสรุปว่าการยับยั้งการทำงานของ HUVECs เหล่านี้เป็นผลจาก AuNPs ผ่านกระบวนการ autophagy³⁹

จากการทบทวนวรรณกรรม จะเห็นได้ว่าผู้วิจัยส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นศึกษาไปที่การยับยั้งต่อ endothelial cells อย่างไรก็ตามในองค์ประกอบของหลอดเลือดยังมีเซลล์ที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง คือ pericytes ที่เป็นเซลล์หลักของหลอดเลือดฝอย แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงผลของ AuNPs ต่อ pericytes มาก่อน



คำถามของงานวิจัย (Research Questions)

1. อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรส่งผลให้คุณลักษณะทางชีวภาพของ pericytes เกิดความเปลี่ยนแปลงหรือไม่
2. อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรส่งผลให้เกิดความไม่สมบูรณ์ของ tube formation ที่มี endothelial cells และ AuNPs-treated pericytes เป็นองค์ประกอบหรือไม่ และอย่างไร

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Objectives)

เพื่อทำการศึกษาผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางชีวภาพของ pericytes รวมถึงการสร้าง tube formation ที่มี endothelial cells และ pericytes เป็นองค์ประกอบ

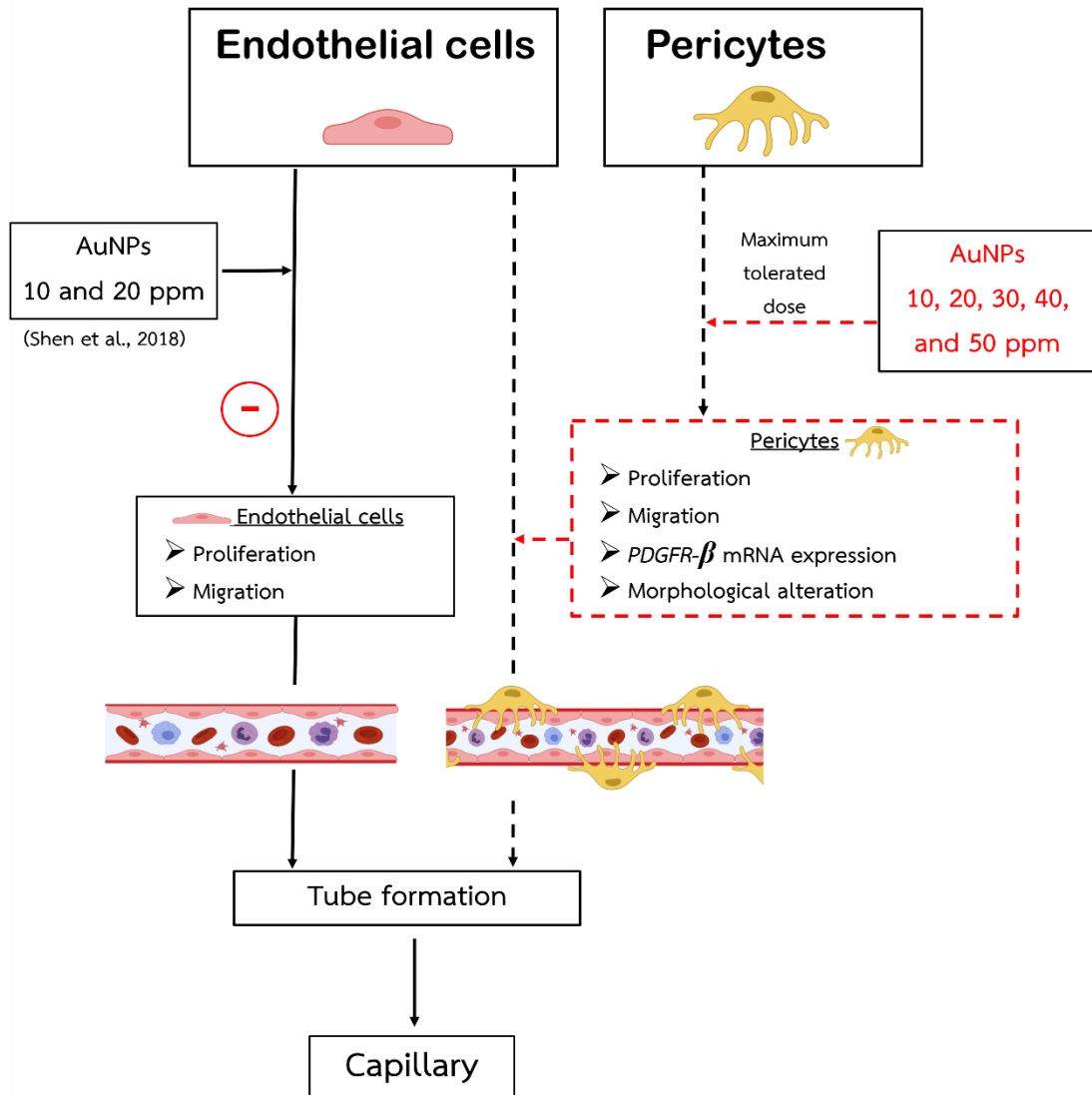
สมมติฐานของงานวิจัย (Hypothesis)

1. อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรส่งผลให้การแบ่งเซลล์และการเคลื่อนย้ายของ pericytes ลดลง เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ รวมถึง organelles และพบ vesicles ที่สะสมอนุภาคทองคำภายใน cytoplasm ของ pericytes นอกจากนี้ระดับการแสดงออกของ $PDGFR-\beta$ เกิดการเปลี่ยนแปลงด้วยเช่นกัน
2. อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรสามารถยับยั้งการสร้าง tube formation ที่มี endothelial cells และ AuNPs-treated pericytes เป็นองค์ประกอบ

รูปแบบงานวิจัย (Research Design)

- การวิจัยเชิงทดลอง (Experimental Research)

กรอบความคิดงานวิจัย (Conceptual Framework)



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การตรวจสอบคุณสมบัติของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

นำอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ขนาด 20 นาโนเมตร ใน citrate buffer จากบริษัท Sigma-Aldrich (741965, USA) มาตรวจสอบขนาดและการกระจายตัวของอนุภาค โดยการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ transmission electron microscope (TEM; JEM-1400 plus, JEOL, USA) รวมถึงการตรวจสอบคุณสมบัติการดูดกลืนแสง โดยใช้เทคนิค UV-Vis spectroscopy ด้วยเครื่อง Multiskan GO spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) โดยค่า maximum absorption ควรอยู่ในช่วง 518-522 นาโนเมตร



การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell culture)

- เซลล์ที่ใช้ในการศึกษานี้มี 2 ชนิด ได้แก่

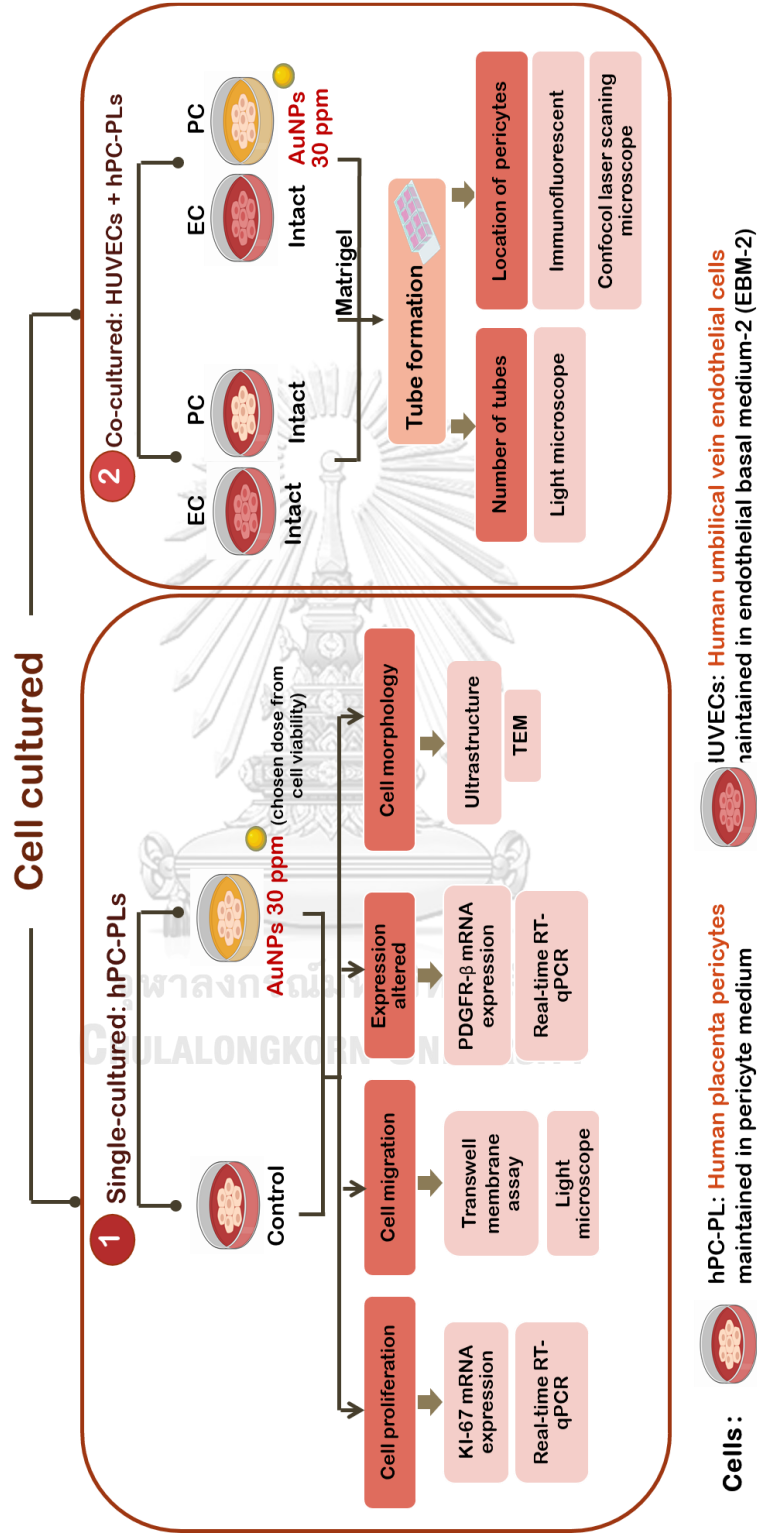
- 1) Human pericytes from placenta (hPC-PL) เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด pericyte growth medium (Promocell, Germany)
- 2) Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด endothelial cell growth medium (Lonza, Germany)

โดยเติม 1% antibiotic (Penicillin and streptomycin)-antimycotic (Gibco, USA) และเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (°C) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ (%)

- Trypsinization

ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด จากนั้นล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหลืออยู่ด้วย 10 mM phosphate buffer saline (PBS; VWR Chemicals BDH Prolabo, Australia) ดูด PBS ออก เติม 0.25% trypsin/EDTA (1 ml/75 cm² of surface area) เอียงภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยง เพื่อให้ trypsin กระจายทั่วถึงทั้งภาชนะ นำไปบ่มในตู้บ่มที่ 37°C, 5% CO₂ เป็นเวลา 3 นาที นำมาส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ inverted microscope เพื่อตรวจสอบว่าเซลล์หลุดออกจากภาชนะเพาะเลี้ยงทั้งหมด จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาณเท่ากับ trypsin ที่ใช้ ลงไปในภาชนะเลี้ยงเซลล์ และทำการผสมให้เข้ากันเพื่อหยุดปฏิกิริยา สารละลายทั้งหมดถูกดูดจากภาชนะเลี้ยงเซลล์ ใส่ลงในหลอดทดลอง และนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้เซลล์ตกตะกอนที่ความเร็ว 1500 revolutions per minute (rpm) เป็นเวลา 3 นาที เทสารละลายด้านบนออกให้หมด และทำการ resuspend เซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ตามจำนวนที่คำนวณไว้

Experimental design



การทดลองที่ 1 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง AuNPs กับลักษณะทางชีวภาพของ pericytes และ PDGFR- β

- การทดลองนี้แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

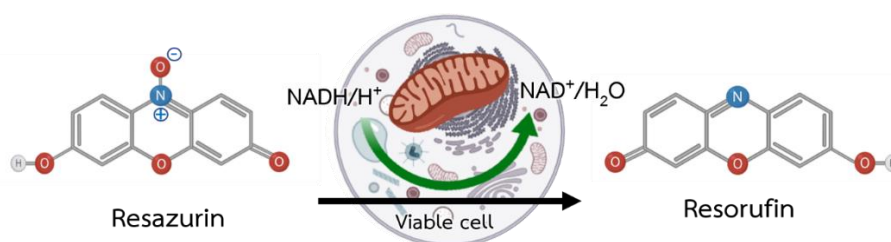
1. กลุ่ม Control คือ กลุ่มที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ตามปกติ
2. กลุ่ม AuNPs-treated pericytes คือ กลุ่มที่เซลล์ได้รับ 20 nm-AuNPs ที่ความเข้มข้น 30 ppm

1.1 การศึกษาอัตราการอยู่รอดของเซลล์ (Cell viability)

เพื่อศึกษาผลของ AuNPs ต่ออัตราการอยู่รอดของเซลล์ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง โดยใช้ PrestoBlue™ cell viability reagent (Molecular Probes, Invitrogen, USA) โดยมีขั้นตอนดังนี้

ทำการเพาะเลี้ยง pericytes แบบ monoculture ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96-well plate (10,000 cells/100 μ L/well) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเตรียมอนุภาคทองคำที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm ในอาหารเลี้ยงเซลล์ และใส่ลงไปในหลุมเพาะเลี้ยง บ่มในตู้บ่มที่ 37°C, 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำ PrestoBlue™ ผสมกับ media ในอัตราส่วน 10x (1:9) ปริมาตร 100 μ L/well และบ่มในตู้บ่มที่ 37°C, 5% CO₂ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัด UV absorbance ที่ความยาวคลื่น 570 และ normalized absorbance 600 nm ด้วยเครื่อง microplate reader (Multiskan GO spectrophotometer, Thermo Scientific)

หลักการของ PrestoBlue™ คือ การที่เซลล์ที่มีชีวิตจะมีการทำงานของ mitochondria โดยเมื่อหยดสารตั้งต้นชนิด resazurin ซึ่งมีสีน้ำเงิน เซลล์ที่มีชีวิตจะทำปฏิกิริยา reduction ได้ ผลิตภัณฑ์เป็น resorufin ที่มีสีชมพู (รูปที่ 12)



รูปที่ 12 หลักการของ PrestoBlue™

และนำมาคำนวณหาร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ โดยใช้สูตรดังสมการ ดังต่อไปนี้

$$\text{ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ (\%)} = \frac{a-b}{\text{average of } c} * 100$$

a = absorbance (570 nm-600 nm) of control and treatment

b = average of absorbance (570 nm-600 nm) of blank

c = absorbance (570 nm-600 nm) of control subtract with average of absorbance (570 nm-600 nm) of blank

เมื่อได้ค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์แต่ละกลุ่ม จะนำมาคำนวณหาค่า IC50 โดยใช้โปรแกรม Graphpad version 5.01 (GraphPad Software Inc., USA) มีขั้นตอนการคำนวณดังต่อไปนี้

1. ใช้การคำนวณแบบ XY โดยกำหนดให้ Y เป็น 9 ค่า จากนั้นกำหนดให้แกน X เป็นค่าความเข้มข้นของ AuNPs และแกน Y เป็นร้อยละการอยู่รอดของเซลล์แต่ละกลุ่ม (9 ค่า) โดยช่องสุดท้ายของค่า Y ให้กำหนดค่า 50 ทุกช่อง
2. ทำการ Analyze โดยใช้ XY analyses>Fit spline/LOWESS
3. เลือก Method to create curve>LOWESS (20 (fine), Number of segments: 100) และ Standard curve calculations เลือก Standard Curve X from Y
4. จากนั้นจะได้ค่า IC50 อยู่ที่ Result>Spline of data>Interpolated X values

1.2 การศึกษาการแบ่งตัวของเซลล์ (Cell proliferation)

เพื่อศึกษาผลของ AuNPs ต่อการแบ่งตัวของ pericytes ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง โดยทำการวัดการแสดงออกของระดับ mRNA ของยีน *Ki-67* ซึ่งเป็น proliferation marker ด้วยเทคนิค real-time reverse transcription-quantitative PCR (real-time RT-qPCR) โดยมีขั้นตอนดังนี้

- การเตรียมเซลล์

ทำการเพาะเลี้ยง pericytes (1×10^5 cells/well) แบบ monoculture ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ชนิด 24-well plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเตรียมอนุภาคทองคำที่ความเข้มข้น 30 ppm (เป็นความเข้มข้นที่ได้จากการทดลองที่ 1.1) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ และใส่สารลงไปในห้องบ่มในตู้บ่มที่ 37°C, 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

- การสกัด RNA

ใส่ Trizol® ลงไปในหลุมที่เลี้ยงเซลล์ จำนวน 1 mL เป็นเวลา 5 นาที ใช้ไมโครปิเปตต์ดูดเซลล์ทั้งหมดใส่หลอด microcentrifuge ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที จากนั้นใส่ chloroform 200 μ L เขย่าให้เข้ากัน เป็นเวลา 15 วินาที จะเป็นสีชมพูๆ และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g, 4°C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ RNA, DNA และโปรตีน แยกชั้นจากกัน โดยส่วนของ RNA เป็นส่วนใสชั้นบนสุด ใช้ไมโครปิเปตต์ดูดสารละลายชั้นบนสุด ประมาณ 200 μ L ไปใส่หลอดใหม่ ทำการตกตะกอน RNA ด้วย 100% isopropanol 250 μ L (ร่วมกับสารละลาย glycogen 2 μ L) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาทีแล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g, 4°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทสารละลายออกจากหลอด microcentrifuge และซับของเหลวในหลอดด้วยการคว่ำลงบนกระดาษที่ซับน้ำได้ดี จากนั้นทำการล้าง RNA pellet ด้วย 75% EtOH 1 mL และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7,500 g, 4°C เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายออกจากหลอด และทำให้ RNA pellet แห้งโดยเปิดฝาหลอด microcentrifuge ไว้บนน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นใส่สารละลาย DEPC หรือ RNA-free ultrapure water 30 μ L ทำให้ตะกอนละลาย โดยนำไปบ่มในเครื่อง heat block 60°C เป็นเวลา 15 นาที RNA ที่สกัดได้จะถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์ในลำดับถัดไป

- การวัดคุณภาพและปริมาณของ RNA

นำ RNA ที่สกัดได้ มาวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density, O.D.) เพื่อตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของสารสกัด โดยใช้เครื่อง NanoDrop 2000/2000C spectrophotometer (Thermofisher, Friendship, ME, USA)

- การเปลี่ยน RNA เป็น cDNA ด้วยวิธี reverse transcription

นำ RNA ที่สกัดได้ มาทำการ reverse transcription โดยใช้ RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (K1622, Thermofisher) โดยมีขั้นตอนดังนี้ นำ template ปริมาณ 100 ng (ไม่เกิน 11 μ L), Oligo dT18 primer 1 μ L ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 12 μ L จากนั้นนำไปป้อนในเครื่อง thermocycler (Eppendorf Mastercycler pro Gradient S, Germany) ที่ 65°C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ Oligo dT18 primer จับกับ template RNA เมื่อครบ 5 นาที ให้รีบนำ RNA ใส่ในน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเตรียมผสม 5x reaction buffer 4 μ L, ribolock RNase inhibitor (20 U/ μ L) 1 μ L, 10 mM dNTP mix 2 μ L และ revertAid M-MuLV RT (200 U/ μ L) 1 μ L ต่อ 1 reaction ตามด้วยสารละลาย RNA ตั้งต้น นำไปสังเคราะห์ cDNA ด้วยเครื่อง thermocycler ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 60 นาที และ 94°C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาของการ reverse transcription

- การตรวจสอบปริมาณ RNA ตั้งต้น ด้วยวิธี real-time RT qPCR

เพื่อตรวจสอบการแสดงออกระดับ RNA ของยีน *Ki-67* ใช้วิธี real-time RT-qPCR ในการตรวจวัดปริมาณ RNA ตั้งต้นแบบสัมพัทธ์ (relative gene expression) โดยใช้ยีน *GAPDH* เป็น internal control ด้วย primer สำหรับเพิ่มปริมาณยีน *Ki-67* แสดงในตารางที่ 1 โดยสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา qPCR คือ AccuPower® 2X Greenstar qPCR Master Mix (BIONEER, Korea) ใน 1 ปฏิกิริยา ปริมาตร 12.5 μ L ประกอบด้วย 2X GreenStar Master Mix และ primer 0.8 μ M (ตารางที่ 2) และมีขั้นตอนดังนี้ Pre-denaturation ที่ 95°C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ DNA template แยกสายออกเป็น single-stranded DNA อย่างสมบูรณ์ ทำการ denaturation ที่ 95°C เป็นเวลา 15 วินาที ต่อด้วยการ annealing ที่ 60°C เป็นเวลา 20 วินาที และ extension ที่ 72°C เป็นเวลา 20 วินาที เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ทั้งสิ้น 40 รอบ ด้วยเครื่อง CFX 96 thermocycler (Bio-rad Laboratories, USA) โดยใช้ SYBR green เป็นตัวรายงานสัญญาณแบบ real-time และทำการวัดค่า Melt curve analysis แล้วนำมาคำนวณหาค่า Relative gene expression ด้วยวิธี delta Ct

- วิธีการคำนวณค่า Relative gene expression ด้วยวิธี delta Ct

$$\Delta Ct (\text{sample}) = Ct (\text{target gene of sample}) - Ct (\text{reference gene of sample})$$

$$\Delta Ct (\text{calibrator}) = Ct (\text{target gene of calibrator}) - Ct (\text{reference gene of calibrator})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{sample}} - \Delta Ct_{\text{calibrator}}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

ตารางที่ 1 forward และ reverse primer ของยีน Ki-67 และ GAPDH

Sequence Name	Sequence (5'-3')	Product size (bases)	Accession
KI67_F96	GATCGTCCCAGTGGGAAGAGTT	195	NM_002417.5
KI67_R290	CCCCTTCCAACAAGCAGGT		
GAPDH_F85	GTGAAGGTCGGAGTCAACGG	107	NM_002046.7
GAPDH_R191	TCAATGAAGGGGTCATTGATGG		

ตารางที่ 2 ชนิดและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ทำ real-time reverse transcription-quantitative PCR (real-time RT-qPCR)

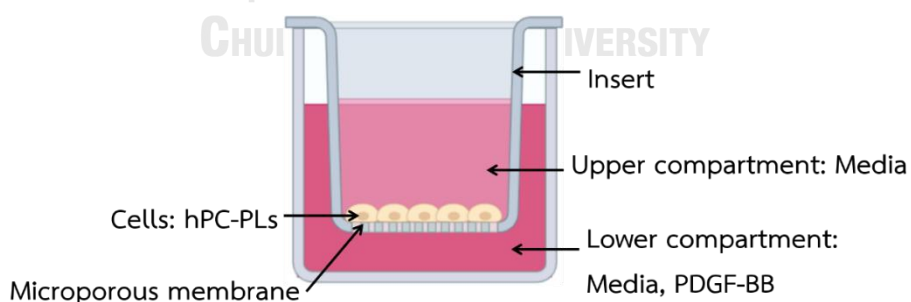
สารเคมี	ปริมาตร (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
2X GreenStar Master Mix	6.25	1X
Template DNA	1	100 ng/μl
Forward primer (10 pmol/μl)	0.5	0.4 μM
Reverse primer (10 pmol/μl)	0.5	0.4 μM
PCR grade water	4.25	-

1.3 การศึกษาการเคลื่อนย้ายของเซลล์ (Cell migration)

เพื่อศึกษาผลของ AuNPs ต่อการเคลื่อนย้ายของ pericytes ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ด้วยวิธี transwell membrane assay (รูปที่ 13) โดยนับจำนวนเซลล์ที่แทรกผ่านรู membrane ของ transwell compartment ซึ่งประกอบด้วยส่วน insert ที่มี microporous membrane ขนาด 8 μm โดยมีขั้นตอนดังนี้

ทำการเพาะเลี้ยง pericytes (1×10^5 cells/well) แบบ monoculture ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ชนิด 24-well plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำ 20 nm-AuNPs ที่ความเข้มข้น 30 ppm ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ใส่ลงไปในหลุม บ่มในตู้บ่มที่ 37°C , 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำ 20 ng/mL PDGF-BB^{40, 41} ที่ผสมในอาหารเลี้ยงเซลล์มาใส่ลงด้านล่างของ transwell เพื่อเป็นตัวเหนี่ยวนำและกระตุ้นให้ pericytes เกิดการเคลื่อนย้าย และทำการ trypsinized เซลล์ที่บ่มกับ AuNPs 24 ชั่วโมง มาใส่ลงใน chamber ด้านบนส่วน insert ของ transwell และบ่มในตู้บ่มที่ 37°C , 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ทำการ fix เซลล์ ด้วย 4% paraformaldehyde เป็นเวลา 10 นาที เซลล์ที่อยู่ด้านบน microporous membrane คือเซลล์ที่ไม่เกิดการเคลื่อนย้าย จะใช้ cotton swap เช็ดออก ส่วนเซลล์ที่อยู่ด้านล่างของ membrane นำมาย้อมด้วย 1% crystal violet ใน 2% EtOH เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปนับจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่อยู่ด้านล่างมานับ โดยใช้กล้อง inverted-phase contrast microscope (CKX53, Olympus, Japan)



รูปที่ 13 Transwell membrane assay

1.4 การศึกษาการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน *PDGFR-β*

เพื่อศึกษาผลของ AuNPs ต่อการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน *PDGFR-β* ใน pericytes เนื่องจาก *PDGFR-β* เป็น receptor ที่อยู่บริเวณ cell membrane ของ pericytes เกี่ยวข้องกับ PDGF-BB—*PDGFR-β* signaling ที่มีผลต่อการแบ่งตัว, การเคลื่อนย้าย รวมถึง tube formation ของ pericytes การทดลองนี้จึงใช้เทคนิค real-time RT-qPCR ในการตรวจวัดปริมาณ RNA ตั้งต้นแบบสัมพัทธ์ โดยมีขั้นตอน ดังนี้

- การเตรียมเซลล์

ทำการเพาะเลี้ยง pericytes (1×10^5 cells/well) แบบ monoculture ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ชนิด 24-well plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเตรียมอนุภาคทองคำที่ความเข้มข้น 30 ppm ในอาหารเลี้ยงเซลล์ และใส่สารลงไปในหลุม บ่มในตู้บ่มที่ 37°C, 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

- การสกัด RNA, การวัดคุณภาพและปริมาณของ RNA, การทำ DNase treatment, การเปลี่ยน RNA เป็น cDNA ด้วยวิธี reverse transcription

ตามวิธีการทดลองในหัวข้อที่ 1.2

- การตรวจสอบปริมาณ RNA ตั้งต้น ด้วยวิธี real-time RT-qPCR และวิธีการคำนวณค่า Relative gene expression ด้วยวิธี delta Ct

ตามวิธีการทดลองในหัวข้อที่ 1.2 รายละเอียดของ primer ที่ใช้ในการทดลองนี้ แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 forward และ reverse primer ของยีน *PDGFR-β* และ *GAPDH*

Sequence Name	Sequence (5'-3')	Product size (bases)	Accession/Reference
<i>PDGFR-β</i> _F5312	ACTGCCAGACCTAGCAGTG	179	NM_002609.4
<i>PDGFR-β</i> _R5490	CAGGGAAGTAAGGTGCCAAC		
<i>GAPDH</i> _F85	GTGAAGGTCGGAGTCAACGG	107	NM_002046.7
<i>GAPDH</i> _R191	TCAATGAAGGGGTCATTGATGG		

1.5 การศึกษาลักษณะสัณฐานของ pericyte (Cell morphology)

เพื่อศึกษาผลของ AuNPs ต่อลักษณะสัณฐานของเซลล์ระดับภายในเซลล์ ด้วย transmission electron microscope (TEM) ทำการเพาะเลี้ยง pericytes (2.5×10^5 cells/well) แบบ monoculture ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ชนิด 6-well plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเตรียมอนุภาคทองคำ ได้แก่ 20 nm AuNPs ที่ความเข้มข้น 30 ppm ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ใส่ ลงไปในหลุมบ่มในตู้บ่มที่ 37°C, 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ การทดลองนี้ยังเพิ่มการทดสอบเซลล์ด้วยอนุภาคทองคำที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น ได้แก่ 50 ppm เพื่อแสดงให้เห็นลักษณะสัณฐานของเซลล์ที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มควบคุม (control) กลุ่มที่ทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงแต่ไม่ตาย (20 nm-AuNPs 30 ppm) และกลุ่มที่ทำให้เซลล์ตาย (20 nm-AuNPs 50 ppm)

- กระบวนการเตรียมเซลล์ลง epon resin block

ทำการ trypsinization เซลล์ และนำไปปั่นให้เป็น pellet จากนั้นทำการ fix เซลล์โดยใช้ 2.5% glutaraldehyde ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer (PB) pH 7.4 จำนวน 4 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที จากนั้นทำ post-fixation ด้วย 1% Osmium tetroxide (OsO₄, EMS, USA) เป็นเวลา 90 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นเย็น ทำการ dehydration ด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นต่ำไปยังความเข้มข้นสูง จาก 50%-100% ethanol (EtOH; Merck Millipore, Germany) ตามด้วยการ clearing ใน EtOH:propylene oxide mixture 5 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จนถึง 100% propylene oxide (Merck Millipore) จากนั้นเข้าสู่กระบวนการ infiltration ด้วย propylene oxide:epon mixture แช่วัวข้ามคืน แล้วทำการ infiltration ต่อด้วย 100% epon resin (EMS, USA) 3 ครั้ง ครั้งละ 20 นาที เท 100% epon resin ที่เตรียมไว้อีกส่วนลงในแม่พิมพ์ (capsule mold) หย่อนก้อน pellet ของเซลล์ลงไปอยู่กลางสุดของแม่พิมพ์บริเวณกลางหน้าตัด นำไปเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60°C เมื่อครบ 3 วัน นำ epon resin block ออกมาจากแม่พิมพ์ เพื่อเตรียมนำมาตัดด้วยเครื่อง ultramicrotome ต่อไป

- การตัด epon resin block แบบ semi-thin sections

นำเซลล์ที่ฝังใน epon resin block มาตัดด้วยเครื่อง ultramicrotome (Leica EM UC6, Leica, Singapore) โดยลำดับแรกจะตัดแบบ semi-thin ที่ความหนาประมาณ 1500 nm ด้วยมีดแก้ว ย้อมด้วย toluidine blue เพื่อตรวจหาตำแหน่งบริเวณของเซลล์

- การตัด epon resin block แบบ ultrathin sections สำหรับนำไปถ่ายภาพ ด้วยกล้อง TEM

ใช้มีดเพชร (diamond knife) ตัดชิ้นเนื้อแบบ ultrathin ที่ความหนาประมาณ 70 nm วางลงบน grid และย้อมด้วย 2% uranyl acetate เป็นเวลา 5 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น 4 ครั้ง จากนั้นนำ lead citrate มาย้อม เป็นเวลา 5 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ทิ้งไว้จนแห้งสนิท แล้วนำไปศึกษาด้วยกล้อง TEM เพื่อศึกษาองค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ของ pericytes



การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของ AuNPs ต่อ capillary tube formation

ทำการจำลองการเกิด tube formation แบบสามมิติในระดับหลอดทดลอง (*in-vitro*) โดยการ co-culture ระหว่าง endothelial cells (HUVECs) และ pericytes (hPC-PL) โดยมีขั้นตอนดังนี้

- การเตรียม Matrigel®

นำ Matrigel® (growth factor reduced, phenol red-free, Cat.No.356231, Corning, USA) มาเคลือบบริเวณภาชนะเลี้ยงเซลล์ (100 μ L/well) บ่มในตู้บ่มที่ 37°C, 5% CO₂ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ Matrigel® จัดเรียงตัว

- การเตรียมเซลล์

1. HUVECs ที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. hPC-PL ที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. hPC-PL ที่ได้รับ 20 nm AuNPs ความเข้มข้น 30 ppm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ทำการเลี้ยงแบบ co-culture ในอัตราส่วน 20:1 (2×10^5 cells: 1×10^4 cells) โดยใช้ภาชนะเลี้ยงเซลล์แบบ 8-well chamber cover glass (Eppendorf) จากนั้นบ่มในตู้บ่มที่ 37°C, 5% CO₂ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อให้เกิด tube ที่สมบูรณ์ แล้วทำการถ่ายภาพทั่ว well โดยใช้กล้อง inverted-phase contrast microscope เพื่อศึกษาผลของ AuNPs ต่อการสร้างหลอดเลือด (tube formation)

- การทดลองนี้แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

1. กลุ่ม endothelial cells และ pericytes ที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ นำมา co-culture
2. กลุ่ม endothelial cells ที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ และ pericytes ที่ได้รับ 20 nm AuNPs; 30 ppm นำมา co-culture

2.1 Immunofluorescence staining

เพื่อศึกษาดำแหน่งการวางตัวของ pericytes รวมถึงลักษณะของหลอดเลือดที่จำลองขึ้นของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง โดยมีขั้นตอนดังนี้ ทำการ fix เซลล์กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองด้วย 4% paraformaldehyde (PFA) ปริมาตร 200 μ l เป็นเวลา 20 นาที ล้างเซลล์ด้วย PBS รอบละ 5 นาที, 3 รอบ ทำการ blocking non-specific binding ด้วย 2% normal goat serum (NGS)

ปริมาตร 200 μ l ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที ล้างเซลล์ด้วย PBS 1 รอบ จากนั้นหยด primary antibody ได้แก่ monoclonal rabbit IgG anti-PDGFRB antibody (1:100, 28E1; Cell signaling, USA) ซึ่งเป็น marker ของ pericytes ลงในแต่ละ well บ่มที่ 4°C ที่งัวข้ามคืน ล้างด้วย PBS รอบละ 5 นาที, 3 รอบ จากนั้นหยด secondary antibody ได้แก่ alexa fluor[®] 488 goat anti-rabbit igG conjugated secondary antibody (1:200, A11008, Invitrogen) บ่มที่ 30°C ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วย PBS รอบละ 5 นาที, 3 รอบ หยด prolong diamond antifade mountant with DAPI (P36962, Invitrogen) เพื่อป้องกันการจางหายของสีและยังเป็นการช่วยย้อมนิวเคลียส ถ่ายภาพโดยใช้กล้อง confocal laser scanning microscope (LSM900, ZEISS, Germany) ร่วมกับโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ Imaris (Bitplane, USA)



การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

ในแต่ละการทดลอง จะทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง ข้อมูลถูกนำเสนอในรูปแบบของ ค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของการวัด (mean \pm SEM) ในการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ระหว่าง 2 กลุ่มทดลองจะใช้ student's t-test และการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของ ค่าเฉลี่ยที่มีมากกว่า 2 กลุ่มทดลอง จะใช้ Analysis of variance (ANOVA) และใช้ post-hoc Tukey HSD ในการหาความสัมพันธ์ภายในกลุ่มแต่ละกลุ่ม โดยกำหนดค่านัยสำคัญทางสถิติที่ p -value ≤ 0.05 โดยทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Graphpad version 5.01 (USA) และ SPSS 23.0 (SPSS Inc., USA)

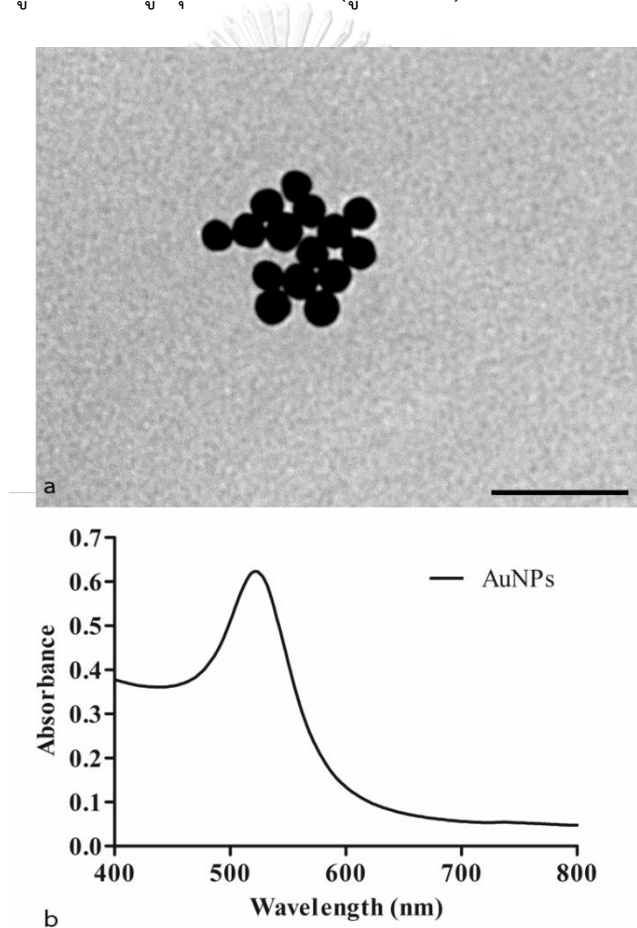


บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการตรวจสอบคุณสมบัติของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

เมื่อนำอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ใช้ในการศึกษา มาตรวจสอบคุณสมบัติ ได้แก่ ขนาด รูปร่าง การกระจายตัว และค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง TEM และ UV-Vis spectrophotometer พบว่า AuNPs มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง เท่ากับ 20.04 ± 0.13 nm รูปร่างเป็นทรงกลม มีการกระจายตัวสม่ำเสมอ ไม่เกาะรวมเป็นก้อน ซ้อนทับกัน (รูปที่ 14a) และมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 522 nm (รูปที่ 14b)



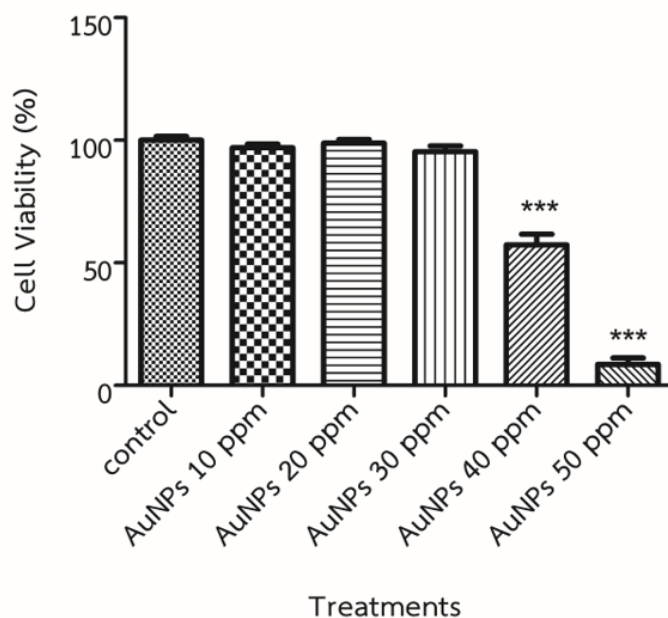
รูปที่ 14 การตรวจสอบคุณสมบัติของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ด้วยเครื่อง TEM (a) และ UV-Vis spectrophotometer (b). Scale bar 100 nm

ผลการทดลองที่ 1 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง AuNPs กับลักษณะทางชีวภาพของ pericytes

1.1 ผลการศึกษาความอยู่รอดของ pericyte (Cell viability)

ทำการศึกษาความเป็นพิษของ AuNPs ต่อ pericyte ด้วย Presto Blue® จากนั้นนำมาคำนวณหาร้อยละความอยู่รอดของเซลล์ โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเซลล์ที่ไม่ได้รับ AuNPs จะมีร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เท่ากับ 100

ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อบ่ม pericyte ด้วย AuNPs เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า AuNPs ที่ 10, 20, 30, 40, และ 50 ppm มีค่าเฉลี่ยร้อยละความอยู่รอดของเซลล์เท่ากับ 96.98 ± 1.42 , 98.83 ± 1.51 , 95.33 ± 2.38 , 57.27 ± 4.40 ($p < 0.001$), และ 8.61 ± 2.54 ($p < 0.001$) โดยกลุ่มที่ได้รับ AuNPs ความเข้มข้น 30 ppm เป็นความเข้มข้นที่สูงที่สุดก่อนถึงค่า IC₅₀ (41.517 ppm) ในขณะที่ความเข้มข้นสูงกว่า 40 ppm ทำให้ความอยู่รอดของ pericyte ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 15) จากผลการทดลองนี้ ผู้วิจัยจึงเลือกความเข้มข้นที่ 30 ppm สำหรับการทดลองถัดไป

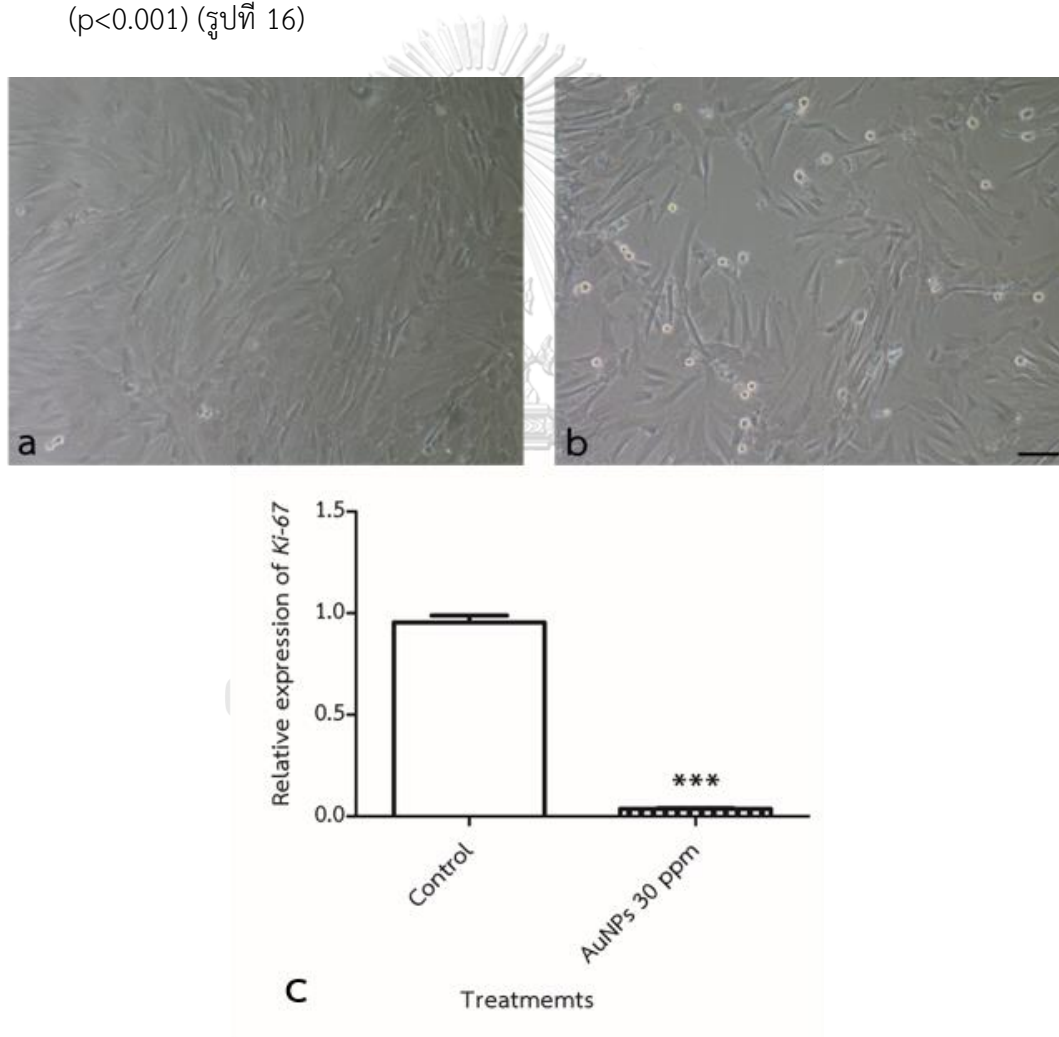


รูปที่ 15 ร้อยละความอยู่รอดของ pericyte หลังจากได้รับ 20 nm-AuNPs เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ความเข้มข้นที่ 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm; *** $p < 0.001$

1.2 ผลการศึกษาการแบ่งตัวของเซลล์ (Cell proliferation)

เนื่องจาก *Ki-67* เป็นยีนที่แสดงออกเมื่อมีการแบ่งเซลล์ในระยะ G1, S และ M จึงนำมาใช้ศึกษาผลของ AuNPs ต่อการแสดงออกของยีน *Ki-67* โดยใช้ยีน *GAPDH* เป็นยีน internal control ด้วยวิธี real-time RT-qPCR โดยนำเซลล์กลุ่มที่ได้รับ AuNPs เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่เวลา 24 ชั่วโมง

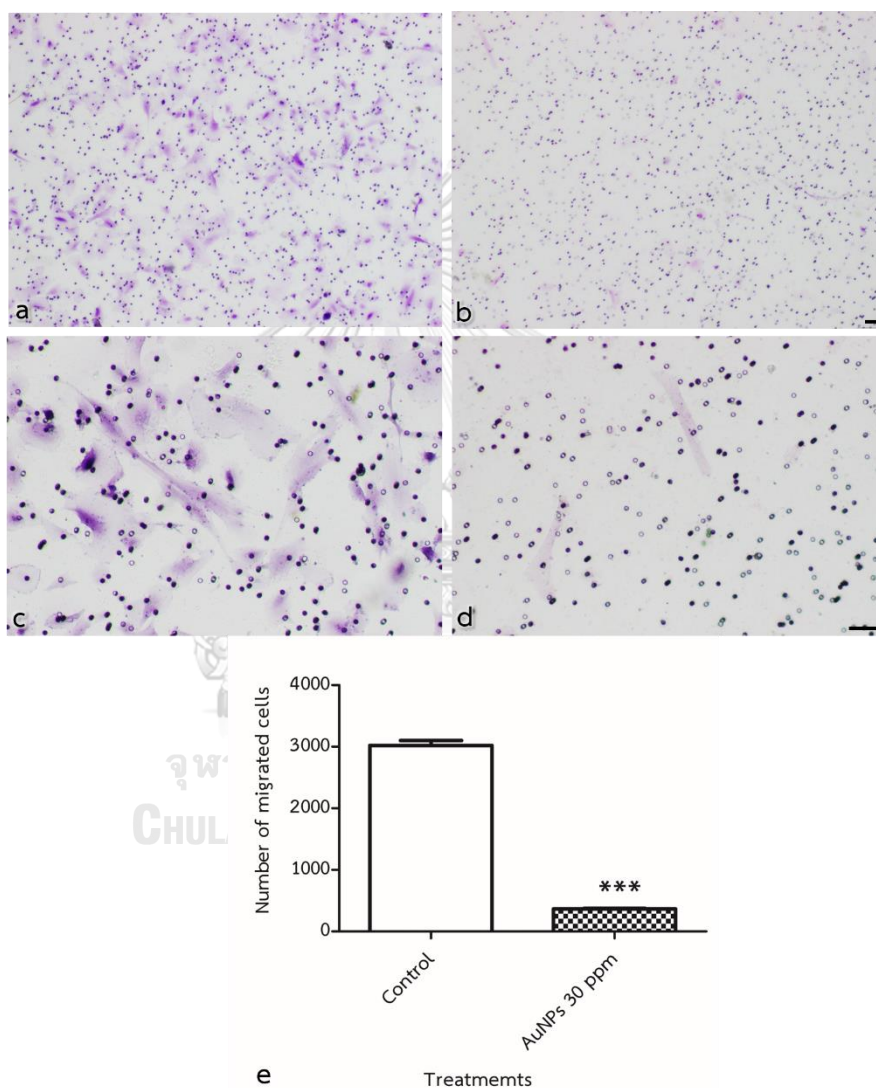
จากผลการทดลองพบว่า AuNPs ทำให้การแสดงออกของยีน *Ki-67* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย AuNPs 30 ppm มีค่าเฉลี่ยของการแสดงออกเท่ากับ 0.037 ± 0.004 ($p < 0.001$) (รูปที่ 16)



รูปที่ 16 ผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการแสดงออกของยีน *Ki-67* หลังจากได้รับ 20 nm-AuNPs เป็นเวลา 24 ชั่วโมง; กลุ่ม control (a), กลุ่ม AuNPs 30 ppm (b), ระดับการแสดงออกของยีน *Ki-67* (c); *** $p < 0.001$. Scale bar 100 μ m

1.3 ผลการศึกษาการเคลื่อนย้ายของเซลล์ (Cell migration)

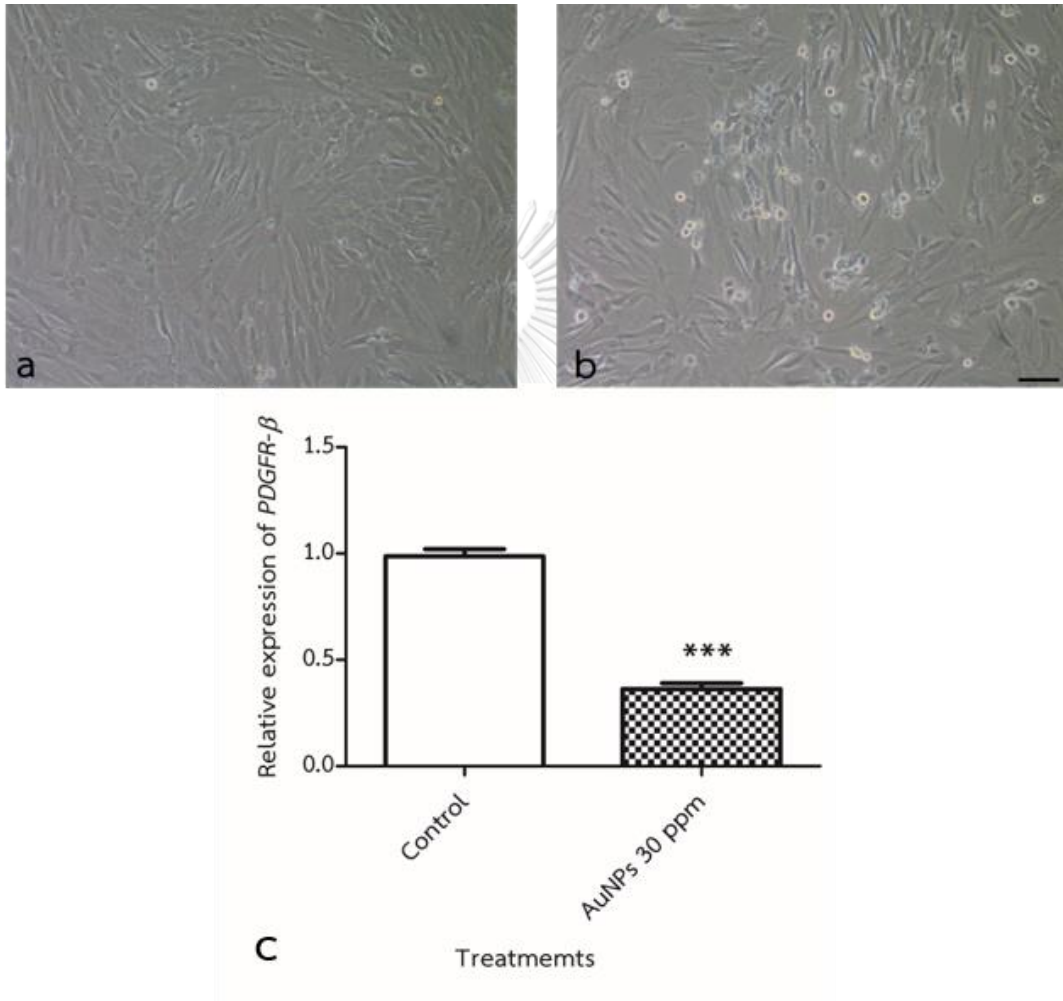
จากผลจากการทดลองพบว่า AuNPs ทำให้จำนวนเซลล์ที่เคลื่อนย้ายผ่าน insert ของ transwell membrane ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกลุ่มควบคุม และ กลุ่ม AuNPs 30 ppm มีเซลล์ที่เคลื่อนย้ายลงสู่ด้านล่างมีค่าเฉลี่ย 3022 ± 80 เซลล์ และ 365 ± 10 เซลล์ ($p < 0.001$) ตามลำดับ (รูปที่ 17)



รูปที่ 17 ผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนย้ายผ่าน insert ของ transwell membrane หลังจาก pericyte ได้รับ 20 nm-AuNPs เป็นเวลา 24 ชั่วโมง; กลุ่ม control (a, c; กำลังขยายสูงขึ้นของ a), กลุ่ม AuNPs 30 ppm (b, d; กำลังขยายสูงขึ้นของ b), จำนวนเซลล์ที่มีการเคลื่อนย้าย (c); *** $p < 0.001$. Scale bars 100 μ m

1.4 ผลการศึกษาการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน *PDGFR-β*

จากผลการทดลองพบว่า AuNPs ทำให้การแสดงออกของยีน *PDGFR-β* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย AuNPs 30 ppm มีค่าเฉลี่ยของการแสดงออกเท่ากับ 0.363 ± 0.028 ($p < 0.001$) (รูปที่ 18)



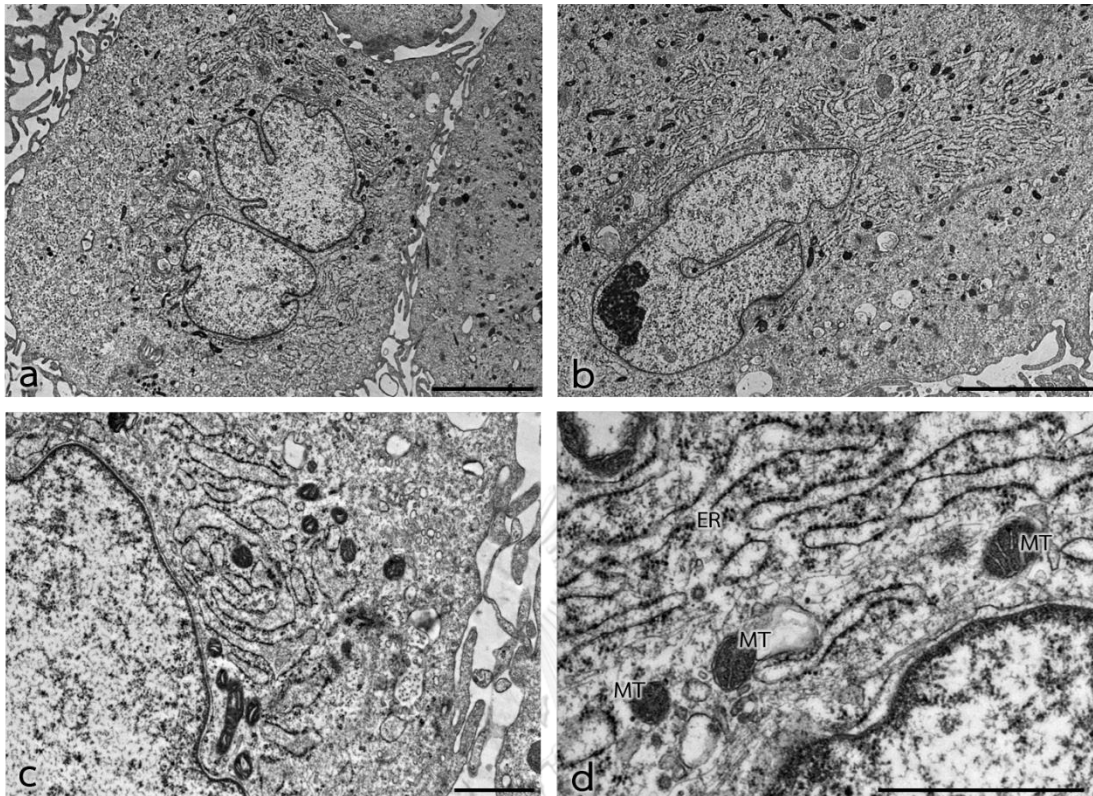
รูปที่ 18 ผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการแสดงออกของยีน *PDGFR-β* หลังจากได้รับ 20 nm-AuNPs เป็นเวลา 24 ชั่วโมง; กลุ่ม control (a), กลุ่ม AuNPs 30 ppm (b), ระดับการแสดงออกของยีน *PDGFR-β* (c); *** $p < 0.001$. Scale bar 100 μm

1.5 ผลการศึกษาลักษณะพื้นฐานภายในเซลล์ของ pericytes

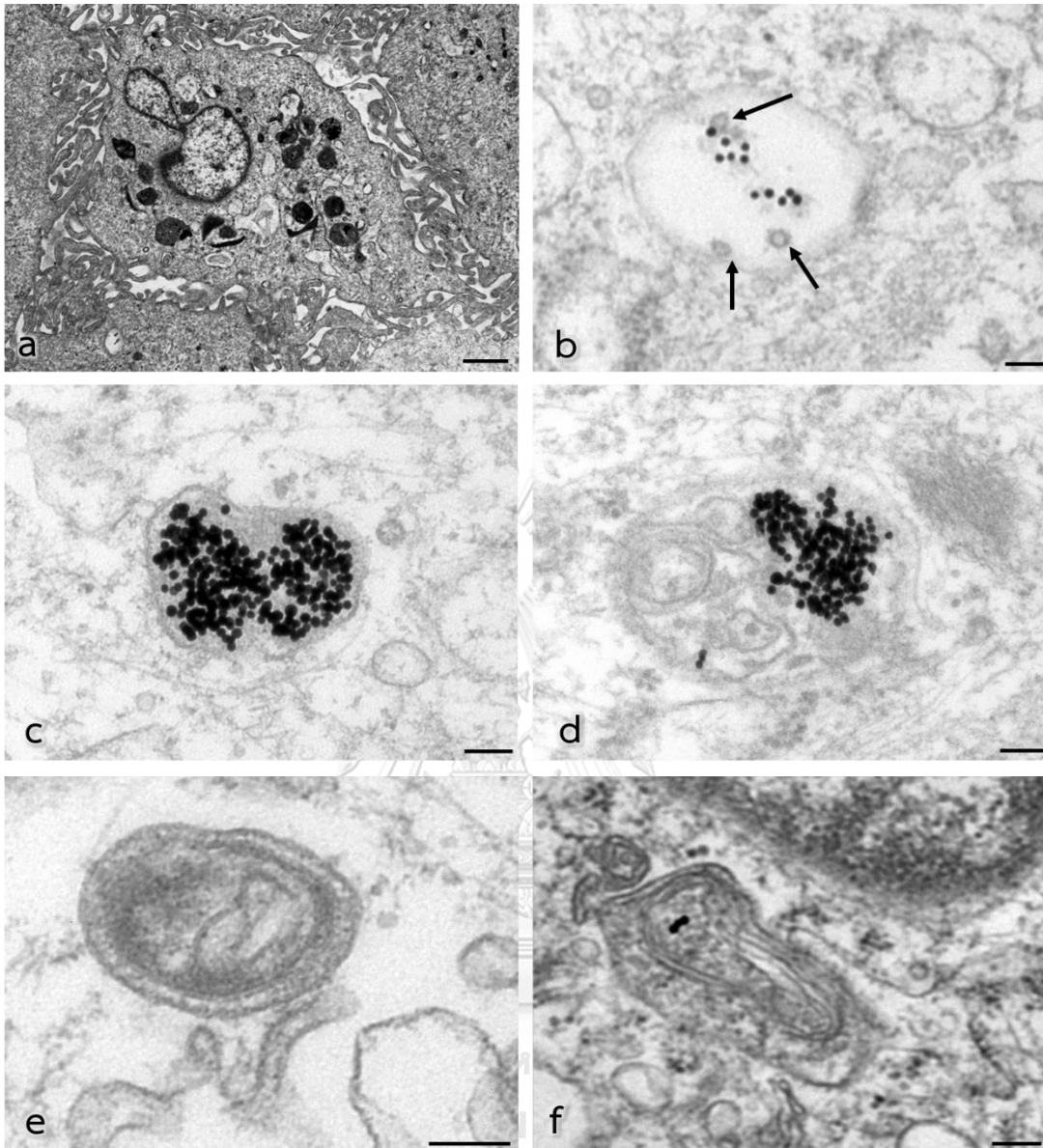
- กลุ่ม control พบว่าเซลล์มี plasma membrane (รูปที่ 19a) และ intracellular organelles เช่น nucleus, nuclear membrane (รูปที่ 19b), ER, mitochondria (รูปที่ 19c, 19d) มีลักษณะปกติ

- กลุ่มที่ได้รับ 20 nm-AuNPs ที่ 30 ppm พบว่าเซลล์ยังมี plasma membrane, nucleus และ nuclear membrane (รูปที่ 20a) คล้ายกับกลุ่มควบคุม, พบ AuNPs ภายใน late endosome (รูปที่ 20b), lysosome (รูปที่ 20c) และ autolysosome (รูปที่ 20d) และยังพบ autophagosome ที่บรรจุ mitochondria อยู่ภายใน (รูปที่ 20e-f) นอกจากนี้พบ AuNPs ภายใน mitochondria ซึ่ง mitochondria เหล่านี้จะเกิดการโป่งพองตัวอย่างมาก และทำให้เสียรูปร่างไป (รูปที่ 21)

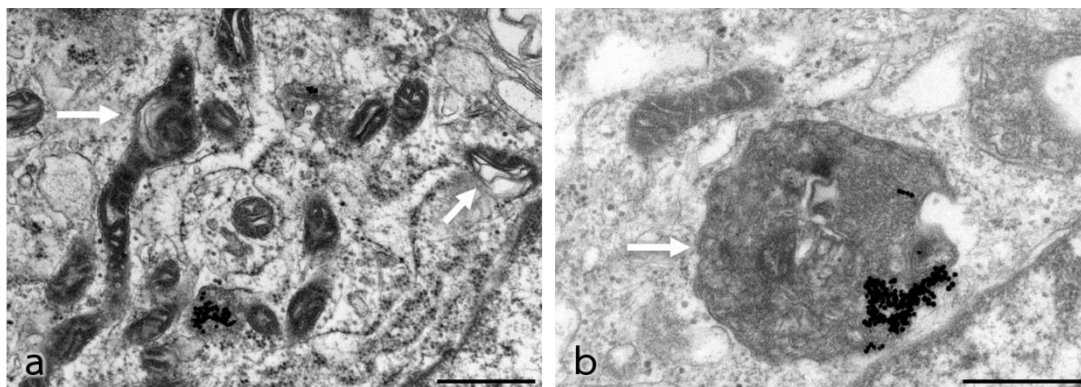
- กลุ่มที่ได้รับ 20 nm-AuNPs ที่ 50 ppm พบว่าเซลล์มีลักษณะผิดปกติ แบ่งออกเป็น 2 ประเภท ประเภทแรกพบการแตกสลายของ plasma membrane, และ organelles กระจายออกมาภายนอกเซลล์ ซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์ที่ตายแล้ว (รูปที่ 22a), พบ mitochondria ที่มีรูปร่างผิดปกติเมื่อเทียบกับกลุ่ม control และมักจะพบ AuNPs อยู่บ้างภายใน cytoplasm (รูปที่ 22b), พบว่าที่ plasma membrane เกิด plasmalemmal blebs ของเซลล์ที่กำลังแตกสลาย (รูปที่ 22c) และพบ mitochondria ที่มีลักษณะผิดปกติหลุดออกมาจากเซลล์ (รูปที่ 22d-e) ประเภทที่สอง พบเซลล์ที่มี plasma membrane ปกติ (รูปที่ 23a, c), พบ mitochondria ที่มีลักษณะผิดปกติเมื่อเทียบกับกลุ่ม control และพบ autophagic vesicles (รูปที่ 23b), พบ multilamellar whorl bodies ที่เซลล์สร้างขึ้น (รูปที่ 23d) รวมถึงพบช่องว่างภายใน cytoplasm ขนาดใหญ่ (รูปที่ 23a, 23c)



รูปที่ 19 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ pericyte กลุ่ม control; ลักษณะของ pericyte ที่ปกติ (a, b), organelles ของ pericyte ที่มีลักษณะปกติ; ER (endoplasmic reticulum), MT (mitochondria) (c, d). Scale bars 5000 nm (a, b), 1000 nm (c, d)

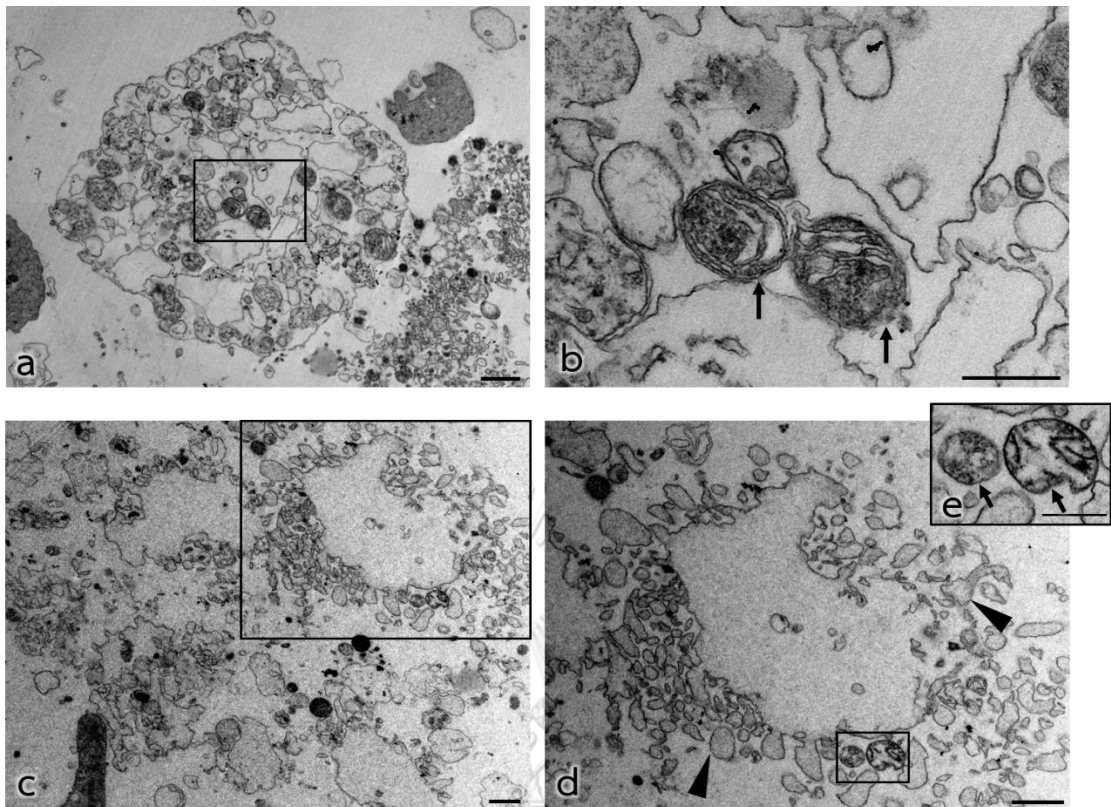


รูปที่ 20 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ pericyte กลุ่มที่ได้รับ 20 nm-AuNPs ที่ 30 ppm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง; พบ AuNPs (electron-dense dots) ภายใน late endosome ที่มี multivesicular bodies (black arrows) (b), lysosome (c), และ autolysosome (d), นอกจากนี้พบ autophagosome ที่มี mitochondria อยู่ภายใน (e-f). Scale bars 1000 nm (a), 100 nm (b-f)

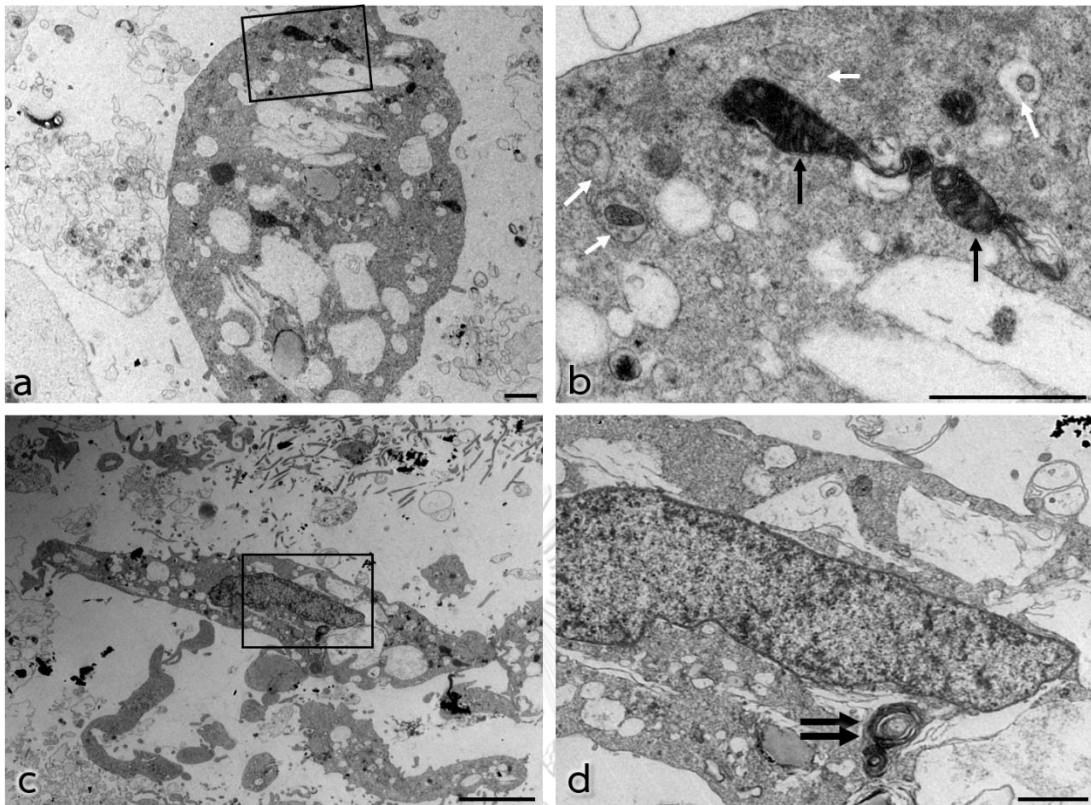


รูปที่ 21 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ pericyte กลุ่มที่ได้รับ 20 nm-AuNPs ที่ 30 ppm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง; พบ mitochondria ที่มีการโป่งพอง (white arrows) (a), พบ mitochondria ที่มีขนาดใหญ่จนเสียสภาพ และพบ AuNPs (electron-dense dots) ภายใน (b-c). Scale bars 500 nm





รูปที่ 22 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ pericyte กลุ่มที่ได้รับ 20 nm-AuNPs ที่ 50 ppm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง; เซลล์ที่ plasma membrane แตกสลาย (a, c), พบช่องว่างขนาดใหญ่ภายในเซลล์ (a), พบ mitochondria ที่มีลักษณะผิดปกติ (black arrows) เมื่อเทียบกับกลุ่ม control และพบ AuNPs (electron-dense dots) หลงเหลืออยู่บ้างภายใน cytoplasm (b), พบ plasmalemmal blebs (black arrowheads) ของเซลล์ที่กำลังแตกสลาย (d) และพบ mitochondria ที่มีลักษณะผิดปกติหลุดออกมานอกเซลล์ (e). Scale bars 1000 nm (a, c, d), 500 nm (b, e)

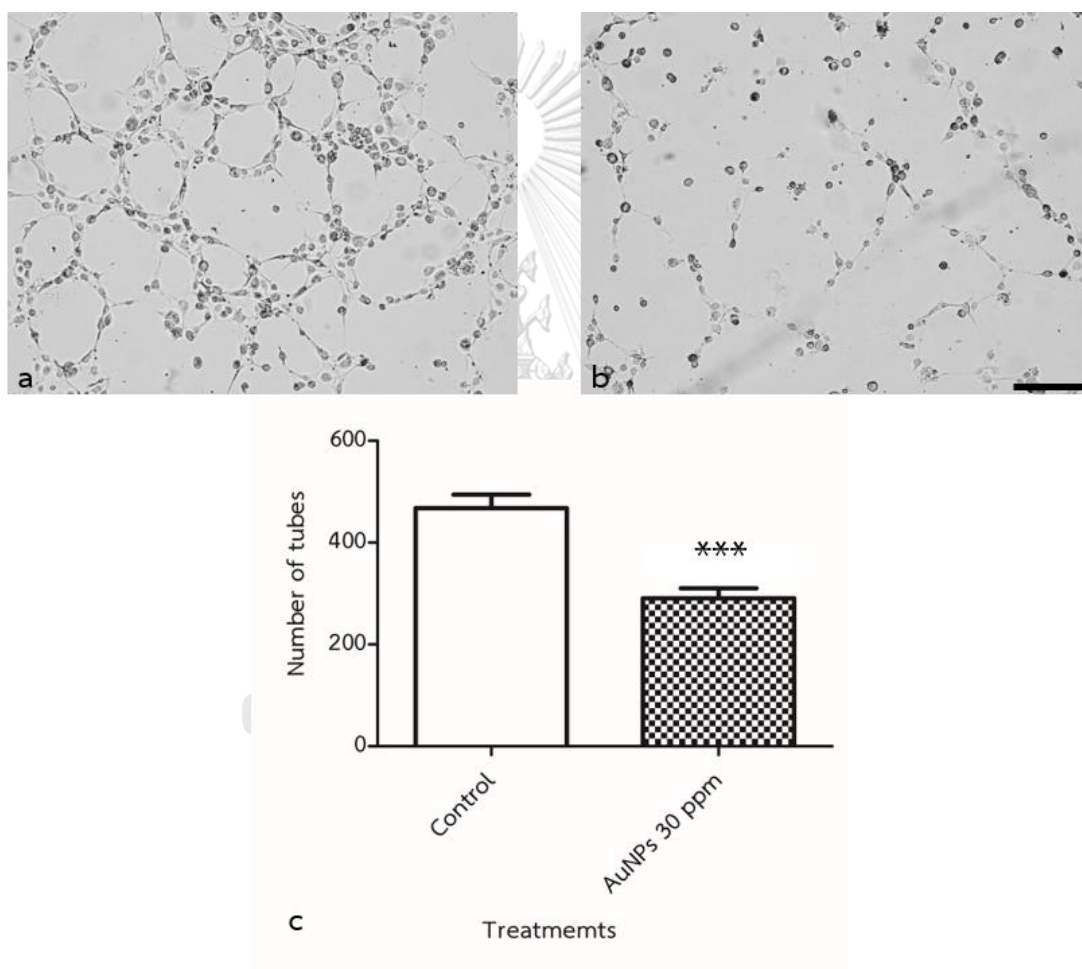


รูปที่ 23 ภาพถ่ายเพิ่มเติมจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ pericyte กลุ่มที่ได้รับ 20 nm-AuNPs ที่ 50 ppm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง; เซลล์ยังคงมี plasma membrane หุ้มรอบเซลล์ และพบช่องว่างขนาดใหญ่ภายในเซลล์ (a, c), พบ mitochondria ที่มีลักษณะผิดปกติ (black arrows) เมื่อเทียบกับกลุ่ม control และพบ autophagic vesicles (white arrows) (b), พบโครงสร้างของ multilamellar whorl bodies (double black arrows) ภายใน cytoplasm (d). Scale bars 5000 nm (c), 1000 nm (a, b, d)

ผลการทดลองที่ 2 การศึกษา capillary tube formation โดยวิธี 3D co-culture ระหว่าง endothelial cells และ pericytes

2.1 ผลการศึกษาจำนวน capillary tube formation

เมื่อทำการนับจำนวน tubes ด้วยโปรแกรม Imaris® พบว่ากลุ่มควบคุม (Intact endothelial cells + Intact pericytes) มีจำนวนเท่ากับ 467.70 ± 26.76 tubes ในขณะที่กลุ่มทดลอง (Intact endothelial cells + AuNPs 30 ppm-treated pericytes) มีจำนวนที่นับได้เพียง 290.80 ± 19.56 (รูปที่ 24)

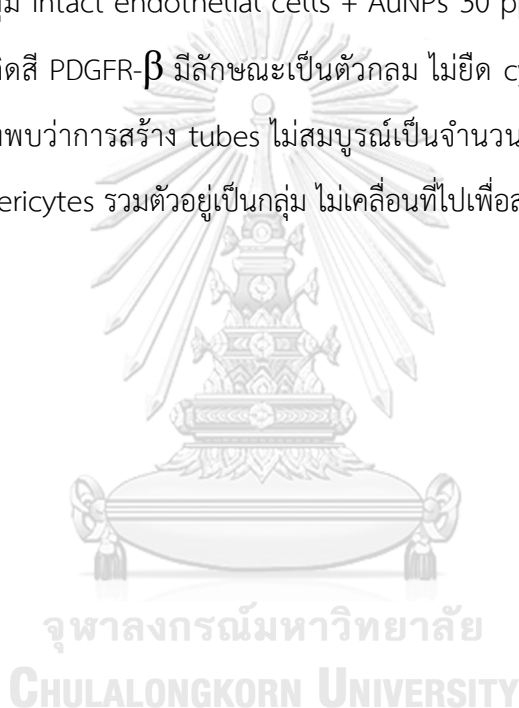


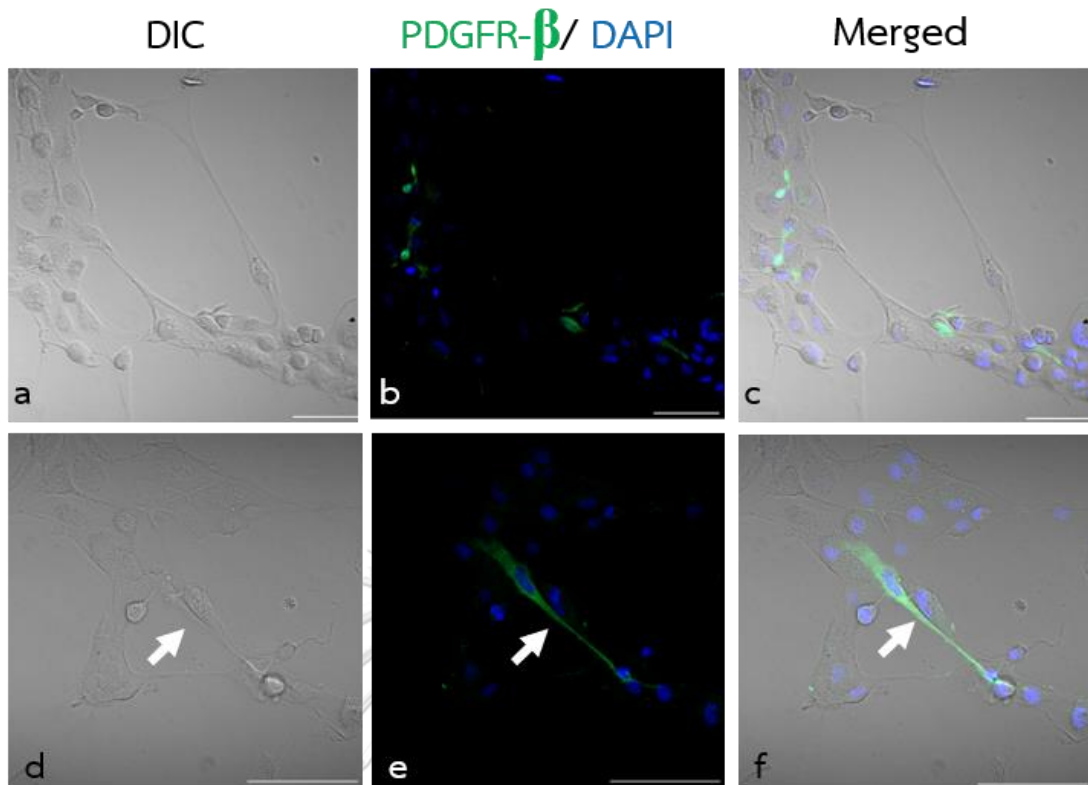
รูปที่ 24 ผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อ capillary tube formation; กลุ่ม Intact endothelial cells + Intact pericytes (a), กลุ่ม Intact endothelial cells + AuNPs 30 ppm-treated pericytes (b), กราฟเปรียบเทียบจำนวน tubes (c); ***p < 0.001. Scale bar 500 μ m

2.2 ผลการศึกษา capillary tube formation ภายใต้กล้อง confocal laser-scanning microscope

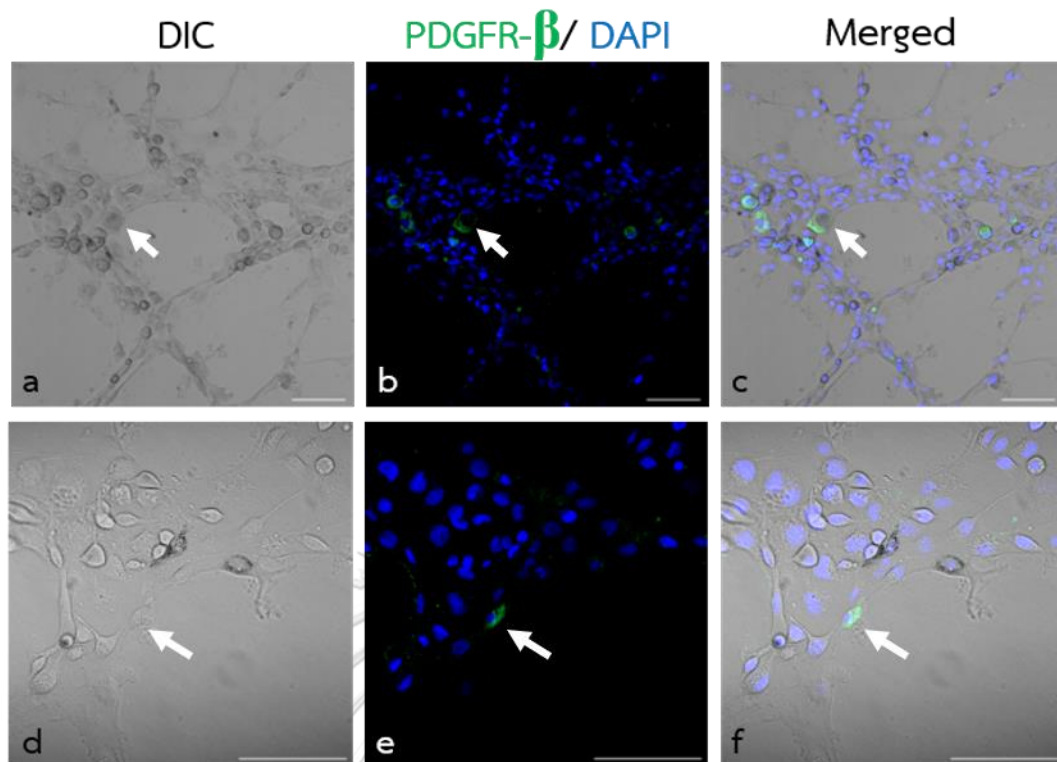
- กลุ่ม Intact endothelial cells + Intact pericytes พบว่าเซลล์ที่ย้อมติดสี PDGFR- β ซึ่งเป็น marker ของ pericytes มีตำแหน่งอยู่บริเวณด้านข้างของ endothelial cells และไม่มีการแทรกตัวเข้ามาระหว่างชั้นของ endothelium, pericytes มีรูปร่างเหยียดยาว ยึด process ไปชนเข้ากับ tube (รูปที่ 25) โดยตำแหน่งและรูปร่างดังกล่าวนี้ คล้ายกับหลอดเลือดในร่างกาย

- กลุ่ม Intact endothelial cells + AuNPs 30 ppm-treated pericytes พบว่าเซลล์ที่ย้อมติดสี PDGFR- β มีลักษณะเป็นตัวกลม ไม่ยึด cytoplasm และ process ออก นอกจากนี้ยังพบว่าการสร้าง tubes ไม่สมบูรณ์เป็นจำนวนมาก และมักพบ endothelial cells และ pericytes รวมตัวอยู่เป็นกลุ่ม ไม่เคลื่อนที่ไปเพื่อสร้าง tubes (รูปที่ 26)





รูปที่ 25 ภาพถ่ายจากกล้อง confocal laser-scanning microscope ของกลุ่ม Intact endothelial cells + Intact pericytes; พบเซลล์ pericytes ที่ยึดติดดี PDGFR- β บริเวณ tube ที่เป็นวงสมบูรณ์ (a-c), เซลล์มีการยื่น process ออก (white arrows) และมีตำแหน่งอยู่บริเวณด้านข้างของ endothelial cells (d-f). Scale bars; 100 μ m



รูปที่ 26 ภาพถ่ายจากกล้อง confocal laser-scanning microscope ของกลุ่ม Intact endothelial cells + AuNPs 30 ppm-treated pericytes; พบเซลล์ที่ย้อมติดสี PDGFR- β (white arrows) มีลักษณะเป็นตัวกลม ไม่ยืด cytoplasm และ process ออก และพบ endothelial cells และ pericytes รวมตัวอยู่เป็นกลุ่มไม่สร้าง tubes (a-f). Scale bars; 100 μ m

บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการศึกษาผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางชีวภาพของ pericytes รวมถึงการสร้างหลอดเลือดฝอยที่มี endothelial cells และ pericytes เป็นองค์ประกอบ ใช้อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีขนาดประมาณ 20 nm โดยมีสาร sodium citrate เป็นสารรักษาความเสถียร จากภาพถ่ายทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แสดงให้เห็นได้ว่า AuNPs ที่เลือก มีความเหมาะสมตรงตามลักษณะที่จะนำมาใช้ทำการทดลอง คือ รูปร่างเป็นทรงกลม มีการกระจายตัวสม่ำเสมอ ไม่เกาะรวมกันเป็นก้อน หรือซ้อนทับกัน และจากการตรวจสอบคุณสมบัติค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis spectroscopy พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 522 nm ซึ่งเป็นค่าที่แสดงลักษณะที่ถูกต้องของ AuNPs ที่ยอมรับค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 500-550 nm⁴² เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้ามีรายงานว่า AuNPs ที่มีขนาดใหญ่กว่า 5 nm จะมีลักษณะของความเป็นสารที่มีความเฉื่อย (chemically inert)¹² ส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ โดยพบว่า AuNPs ที่มีขนาด 20 nm มีประสิทธิภาพในการลดการแบ่งตัวของ human umbilical vein endothelial cell (HUVECs) สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับขนาด 5 และ 10 nm³⁷ และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่อไปนี้ ได้แก่ retina pigment epithelium (ARPE-19 cells)¹², retinal vascular endothelial cells, nonmalignant NIH3T3 fibroblast cells⁴³ และ neural retinal tissue⁴⁴ ทำให้ AuNPs ที่มีขนาด 20 nm มักถูกเลือกมาใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับการสร้างหลอดเลือด (tube formation) และการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) โดยใช้เซลล์ชนิด HUVECs นอกจากนี้ยังพบว่า AuNPs ขนาด 20 nm ที่มีความเข้มข้นไม่สูงมาก สามารถทำให้ HUVECs มีความเปลี่ยนแปลงต่อลักษณะทางชีวภาพได้อย่างมีนัยสำคัญ เช่น ทำให้การแบ่งตัวของเซลล์ลดลง, การเคลื่อนย้ายของเซลล์ลดลง, และการสร้างหลอดเลือดฝอยที่มีเพียงแค่ endothelial cells ลดลง^{12, 39} อย่างไรก็ตาม ผลของ AuNPs ต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ยังขึ้นอยู่กับ รูปร่าง, surface charge, ความเข้มข้น, การกระจายตัวของอนุภาคในตัวทำละลาย, ระยะเวลาการรับสาร, สารหรือโมเลกุลอื่นๆ ที่นำมาเคลือบ และที่สำคัญคือ ชนิดของเซลล์ที่แตกต่างกัน⁴² ดังนั้น ในแต่ละงานวิจัยจึงจำเป็นต้องอาศัยปัจจัยดังกล่าวนี้ มาพิจารณาเพื่อออกแบบการทดลองและปรับแก้ไขปัญหาได้อย่างเหมาะสม

การเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อเซลล์ pericytes ผู้วิจัยเริ่มต้นการทดลองโดยใช้ AuNPs ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า AuNPs ที่ความเข้มข้น 40 และ 50 ppm เป็นความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์เกิดความเสียหายอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนเซลล์ที่รอดจากการตาย เมื่อตรวจสอบด้วยกล้อง light microscope พบลักษณะภายนอกของเซลล์เปลี่ยนแปลงเป็นอย่างมาก ผู้วิจัยจึงเลือก AuNPs ที่ความเข้มข้นที่ 30 ppm ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงที่สุดก่อนถึงค่า IC50, เป็นค่า maximum tolerated dose และไม่ทำให้ความอยู่รอดของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับ AuNPs มีรายงานจากการศึกษาก่อนหน้าใน endothelial cells พบว่า AuNPs ที่ความเข้มข้น 5 ppm สามารถทำให้ความอยู่รอดของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ³⁹ ดังนั้น ผลของงานวิจัยในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า pericytes มีความทนทานต่อ AuNPs สูงกว่า endothelial cells

การศึกษาดัดมาเป็นการศึกษาการแบ่งตัวของเซลล์ pericytes โดยทำการวัดระดับการแสดงออกของยีน *Ki-67* ซึ่งเป็นยีนที่แสดงออกเมื่อมีการแบ่งเซลล์ในระยะ G1, S และ M จากผลการทดลองพบว่า AuNPs 30 ppm ทำให้ pericytes แบ่งตัวลดลงอย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับการศึกษาใน endothelial cells³⁹ รวมถึงในเซลล์ human papillary thyroid carcinoma (BCPCP และ TPC-1)⁴⁵, เซลล์ human pancreatic cancer cells (PANC-1 และ AsPC-1)^{43, 46}, เซลล์ human embryonic kidney 293 cells (HEK-293) และเซลล์ human liver cancer cell line (HepG2)⁴⁷ ที่มีการรายงานออกมาว่า AuNPs ทำให้การแบ่งตัวของเซลล์ลดลงเช่นกัน

การศึกษากการเคลื่อนย้ายของเซลล์ pericytes ใช้เทคนิค transwell membrane โดยใช้ PDGF-BB มาเป็นสารที่เหนี่ยวนำให้ pericytes เกิดการเคลื่อนย้ายจากด้านบนลงสู่ด้านล่าง และใช้เวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการเคลื่อนย้ายและเซลล์แผ่อย่างสมบูรณ์ จากผลการทดลองพบว่า AuNPs ส่งผลทำให้จำนวนเซลล์ที่เคลื่อนย้ายผ่าน insert ของ transwell membrane น้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับ AuNPs อย่างมีนัยสำคัญ เป็นไปในทางเดียวกันกับการศึกษาของ Shen และคณะในปี 2018 ที่พบว่า AuNPs สามารถยับยั้งการเคลื่อนย้ายของ endothelial cells³⁹ รวมถึงในเซลล์ human pancreatic cancer cells⁴⁶

PDGF-BB—PDGFR- β signaling เป็น signaling ที่มีความสำคัญต่อการทำงานของ pericytes ในแง่ของการ proliferation, migration, maturation, differentiation และ survival ในการสร้างหลอดเลือดฝอย โดย PDGF-BB ที่หลั่งออกมาจาก endothelial cells จะจับกับ

PDGFR- β ที่เป็น receptor อยู่บนผิวของ pericytes ส่งผลให้เกิด autophosphorylation และ non-covalent dimerization ต่อ cytoplasmic tyrosine residues ทั้ง 13 ตัว บน PDGFR- β ไปกระตุ้นการทำงานของ PDGFR- β ให้ส่ง downstream signaling ที่แตกต่างกันเพื่อการทำงานที่แตกต่างกันของเซลล์ โดยการแบ่งตัวของเซลล์ เป็นกระบวนการที่เกิดผ่าน PI3K pathway และการเคลื่อนย้ายของเซลล์ เป็นกระบวนการที่เกิดผ่าน SHP-2-mediated MAPK pathway⁴⁸ จึงสันนิษฐานว่าการแสดงออกของ PDGFR- β mRNA ในเซลล์ pericytes ที่ลดลงนี้เอง ที่มีส่วนสำคัญต่อการแบ่งตัวและเคลื่อนย้ายของเซลล์ pericytes ที่ลดลง

นอกจากนี้ผู้วิจัยทำการศึกษาผลของ AuNPs ต่อ pericytes ในระดับ ultrastructure เพื่อศึกษารูปร่างและลักษณะภายในเซลล์ของ pericytes จากภาพถ่ายทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน กลุ่มที่ได้รับ AuNPs ที่ 30 ppm ซึ่งไม่ทำให้เซลล์เกิดการตาย และไม่ทำให้ plasma membrane, nucleus และ nuclear membrane มีลักษณะเปลี่ยนไปจากกลุ่มควบคุม แต่ทำให้ mitochondria มีการโป่งพองตัวและเสีรูปร่าง ตามที่แสดงในรูปที่ 21 และพบ AuNPs จำนวนมากภายใน organelles เช่น mitochondria, late endosome, lysosome และ autolysosome ซึ่งทำให้สันนิษฐานได้ว่า AuNPs ที่สะสมอยู่ภายในเซลล์นี้ เกิดจากกระบวนการเข้าสู่เซลล์ (cellular uptake) ในรูปแบบ endocytosis pathway³⁴ นอกจากนี้ที่มิวิจัยยังพบ vesicles ที่ภายในบรรจุ mitochondria หรือเศษ organelles อื่น ตามที่แสดงในรูปที่ 20 สันนิษฐานว่าเป็น autophagosomes กระบวนการที่เซลล์สร้างเยื่อหุ้ม มาหุ้ม organelles ที่มีความผิดปกติ เพื่อเข้าสู่กระบวนการย่อยภายใน autolysosome ต่อไป

เมื่อศึกษาเพิ่มเติมในกลุ่มที่ได้รับ AuNPs ที่ความเข้มข้น 50 ppm ซึ่งเป็นกลุ่มที่ AuNPs ทำให้เซลล์เกิดความเป็นพิษ และเกิดการตายของเซลล์เป็นอย่างมาก พบว่าเซลล์มีลักษณะแตกต่างจากกลุ่มควบคุมและกลุ่ม 30 ppm อย่างเห็นได้ชัด โดยพบการแตกสลายของ plasma membrane, mitochondria มีรูปร่างผิดปกติ, พบเซลล์ที่ยังคงมีนิวเคลียสหลงเหลืออยู่เพียงเล็กน้อย รวมถึงพบช่องว่างขนาดใหญ่ภายใน cytoplasm เมื่อทำการรวบรวมข้อมูลของผลจากการทดลองนี้ ทำให้มีข้อสันนิษฐานการตายของเซลล์ได้เป็น 2 ลักษณะดังต่อไปนี้ คือ AuNPs ที่ทำให้เซลล์เกิดการตายแบบ necrosis เป็นการตายในลักษณะที่เซลล์ได้รับสารเคมี แล้วทำให้เกิดการหลั่ง pro-inflammatory proteins เช่น nuclear factor- κ B ส่งผลให้ cell membrane ฉีกขาดและแตกสลาย ทำให้

ส่วนประกอบใน cytoplasm เช่น intracellular organelles หลุดออกมาจากเซลล์ รวมถึงมี cascade of inflammation ออกมาด้วย เป็นสาเหตุทำให้เกิดการอักเสบไปยังเซลล์รอบข้าง⁴⁹ ในระดับ ultrastructure พบว่าเซลล์บวมและแตก มี vacuoles จำนวนมากเกิดขึ้นภายในเซลล์ อีกทั้งยังพบว่า mitochondria บวมและสูญเสียการทำงาน^{50, 51} ซึ่งตรงกับผลการทดลองในรูปที่ 22 ส่วนการตายอีกลักษณะ สันนิษฐานว่าเซลล์อาจเกิดการตายแบบ autophagy ดังแสดงในรูป 23 เป็นกระบวนการที่นำ organelles ที่ได้รับความเสียหาย หรือโปรตีนที่มีอายุมากเข้าสู่ autophagosome มาย่อยสลายและ recycle เพื่อให้ได้พลังงานกลับมาใช้ในเซลล์⁵² นอกจากนี้ยังพบ multilamellar whorl bodies ดังแสดงในรูปที่ 23d ซึ่งเป็น membrane-bound cellular organelles ที่มักพบใน autophagic vesicles⁵³ ด้วย อนึ่ง การศึกษาของ Shen และคณะ ได้ให้ข้อมูลเพิ่มเติมว่า AuNPs ทำให้ endothelial cells เกิดการตายแบบ autophagy โดยยืนยันจากการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของยีน ได้แก่ *LC3II*, *p62*, *ATG5* และ *Beclin1* ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ autophagy³⁹ ดังนั้น ในส่วนของการตายของ pericytes ที่ได้รับ AuNPs อาจทำการตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนเพื่อยืนยันเพิ่มเติมจากลักษณะภายใต้กล้อง TEM ในการศึกษาถัดไปในอนาคต

มีการศึกษาการจำลอง endothelial cell tube formation แบบสามมิติ พบว่า AuNPs ส่งผลให้สร้าง tube ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยรายงานที่เกิดจากการตายของเซลล์แบบ autophagy และสามารถนำมาใช้ยับยั้ง retinal angiogenesis³⁹ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Roh และคณะ ในปี 2016 ได้นำ AuNPs มายับยั้ง choroidal neovascularization เพื่อการรักษาโรค age-related macular degeneration (AMD) ผ่านกระบวนการยับยั้งการเติม phosphate ของ ERK1/2, Akt, and FAK¹² จะเห็นได้ว่าทั้งสองการศึกษา เป็นการศึกษา tube formation ที่มีองค์ประกอบเป็น endothelial cell เพียงเซลล์เดียว แต่งานวิจัยในครั้งนี้เป็นการศึกษา capillary tube formation โดยวิธี 3D co-culture ระหว่าง endothelial cells และ pericytes บน Matrigel[®] ซึ่งทำหน้าที่เสมือนเป็น extracellular matrix เพื่อจำลองให้ใกล้เคียงกับองค์ประกอบของหลอดเลือดฝอยในสภาวะจริง จากผลการศึกษาพบว่า จำนวน capillary tube formation ที่มีจำนวนลดลงนั้น อาจเกิดจาก pericytes ที่ได้รับ AuNPs ส่วนใหญ่มีลักษณะกลม ไม่ยืด cytoplasm และ process ออกไปตาม tube ประกอบกับผลการทดลองทาง molecular และ morphological study ที่ได้รายงานมาแล้วข้างต้น ทำให้ทราบได้ว่าถึงแม้ endothelial cells จะมีความปกติ แต่หาก pericytes อยู่ในภาวะที่ไม่ปกตินั้น สามารถส่งผลให้กระบวนการ capillary tube formation ที่สร้างขึ้นมีความ

ไม่สมบูรณ์ได้ นอกจากนี้ยังพบการรวมตัวอยู่เป็นกลุ่มใหญ่ของทั้ง endothelial cells และ pericytes โดยไม่มีการเคลื่อนที่ไปเพื่อสร้าง tubes สันนิษฐานได้ว่า หน้าที่ในการเป็นตัว guiding tube³ ของ pericytes นั้น เกิดบกพร่องหรือสูญเสียไปหลังจากได้รับอนุภาคทองคำ

จากผลการศึกษานี้จะเห็นได้ว่า AuNPs ส่งผลให้ pericyte proliferation, migration และ tube formation ลดลง เนื่องจาก pericytes มีบทบาทสำคัญต่อหลอดเลือด ทั้ง vessel stabilization, vessel maturation และ angiogenesis จึงอาจจะสามารถนำ AuNPs ไปประยุกต์ใช้กับภาวะพยาธิสภาพที่ต้องการลดการเจริญหรือสร้างหลอดเลือดใหม่ เช่น เนื้องอกหรือมะเร็ง โดยเป็น anti-angiogenesis ในรูปแบบ targeted-therapy ไปที่ pericytes โดยตรง



อุปสรรคที่เกิดขึ้นและการแก้ไขปัญหาในการทดลอง

1. เซลล์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

เนื่องจากเซลล์ที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นเซลล์ที่ทีมวิจัยยังไม่เคยศึกษามาก่อน ทำให้ยังไม่ทราบ condition และลักษณะการเติบโตของเซลล์ จึงทำให้ใช้เวลาพอสมควรในการควบคุมการทดลองทุกๆ ครั้งให้มีความคงที่

2. การกำหนดค่าความเข้มข้นของ AuNPs ในการทดลอง

เนื่องจากค่าความเข้มข้นของ AuNPs ในการทดลอง ตอนเสนอโครงร่างงานวิจัย ได้ค่ามาจากการทบทวนวรรณกรรม ซึ่งเป็นค่าจากเซลล์ชนิดอื่น และค่าดังกล่าวเป็นค่าที่ต่ำมากเกินไป จึงไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อ pericytes ชนิดนี้ (human placenta pericytes) จึงแก้ปัญหาโดยการทำ cell viability assay ดังการทดลองที่ 1.1



บรรณานุกรม

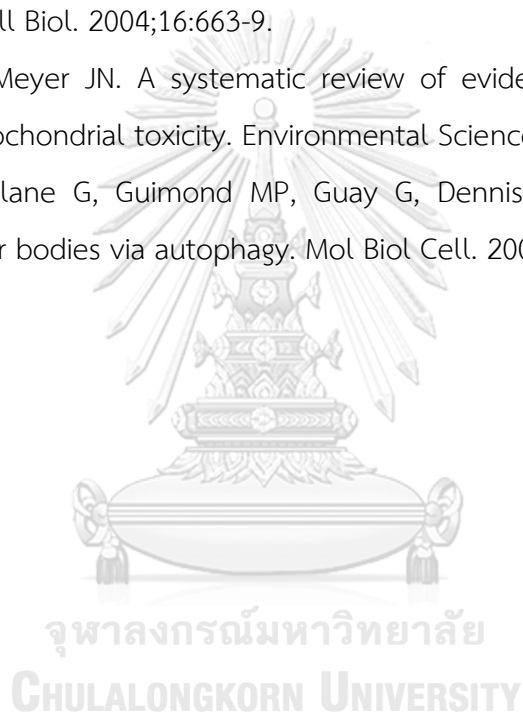
1. Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Developmental Cell*. 2011;21:193-215.
2. Jindatip D, Fujiwara K, Kouki T, Yashiro T. Transmission and scanning electron microscopy study of the characteristics and morphology of pericytes and novel desmin-immunopositive perivascular cells before and after castration in rat anterior pituitary gland. *Anat Sci Int*. 2012;87:165-73.
3. Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro-Oncology*. 2005;7:452-64.
4. Hall AP. Review of the pericyte during angiogenesis and its role in cancer and diabetic retinopathy. *Toxicol Pathol*. 2006;34:763-75.
5. Trost A, Lange S, Schroedl F, Bruckner D, Motloch KA, Bogner B, et al. Brain and retinal pericytes: origin, function and role. *Front Cell Neurosci*. 2016;10:20.
6. Mukherjee P, Bhattacharya R, Wang P, Wang L, Basu S, Nagy JA, et al. Antiangiogenic properties of gold nanoparticles. *Clin Cancer Res*. 2005;11:3530-4.
7. Erber R, Thurnher A, Katsen AD, Groth G, Kerger H, Hammes HP, et al. Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms. *FASEB J*. 2004;18:338-40.
8. Mescher A. Junqueira's basic histology : text and atlas. 13 ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2013.
9. Hirschi K. Control of angiogenesis by the pericyte: molecular mechanisms and significance. *Regulation of angiogenesis*: Springer; 1997. p. 419-28.
10. Sweeney M, Foldes G. It Takes Two: Endothelial-Perivascular Cell Cross-Talk in Vascular Development and Disease. *Front Cardiovasc Med*. 2018;5:154.
11. Michiels C. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol*. 2003;196:430-43.
12. Roh YJ, Rho CR, Cho WK, Kang S. The antiangiogenic effects of gold nanoparticles on experimental choroidal neovascularization in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.

- 2016;57:6561-7.
13. Jindatip D, Nopparat W, Kobutree P, Roumwong A, Agthong S. Pericyte Loss and Detachment in Experimental Cisplatin-Induced Neuropathy. *Int J Morphol.* 2019;37:509-14.
 14. Ribatti D, Nico B, Crivellato E. The role of pericytes in angiogenesis. *International Journal of Developmental Biology.* 2011;55:261-8.
 15. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (VEGFR) signaling in angiogenesis: a crucial target for anti- and pro-angiogenic therapies. *Genes Cancer.* 2011;2:1097-105.
 16. Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res.* 2006;312:549-60.
 17. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond).* 2005;109:227-41.
 18. Hanahan D, Weinberg Robert A. Hallmarks of cancer: The Next Generation. *Cell.* 2011;144:646-74.
 19. Gaengel K, Genove G, Armulik A, Betsholtz C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:630-8.
 20. Heldin CH, Lennartsson J, Westermark B. Involvement of platelet-derived growth factor ligands and receptors in tumorigenesis. *J Intern Med.* 2018;283:16-44.
 21. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 2008;22:1276-312.
 22. Battegay EJ, Rupp J, Iruela-Arispe L, Sage EH, Pech M. PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis in vitro via PDGF beta-receptors. *J Cell Biol.* 1994;125:917-28.
 23. Robson MC, Phillips LG, Thomason A, Robson LE, Pierce GF. Platelet-derived growth factor BB for the treatment of chronic pressure ulcers. *Lancet.* 1992;339:23-5.
 24. Panzarini E, Mariano S, Carata E, Mura F, Rossi M, Dini L. Intracellular Transport of Silver and Gold Nanoparticles and Biological Responses: An Update. *Int J Mol Sci.*

- 2018;19.
25. Raza A, Franklin MJ, Dudek AZ. Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. *Am J Hematol.* 2010;85:593-8.
 26. Hellstrom M, Gerhardt H, Kalen M, Li X, Eriksson U, Wolburg H, et al. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol.* 2001;153:543-53.
 27. Bjarnegard M, Enge M, Norlin J, Gustafsdottir S, Fredriksson S, Abramsson A, et al. Endothelium-specific ablation of PDGFB leads to pericyte loss and glomerular, cardiac and placental abnormalities. *Development.* 2004;131:1847-57.
 28. Jain KK. Nanomedicine: application of nanobiotechnology in medical practice. *Med Princ Pract.* 2008;17:89-101.
 29. Emerich DF, Thanos CG. Nanotechnology and medicine. *Expert Opin Biol Ther.* 2003;3:655-63.
 30. Cai W, Gao T, Hong H, Sun J. Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. *Nanotechnol Sci Appl.* 2008;1:17-32.
 31. Jain S, Hirst DG, O'Sullivan JM. Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. *Br J Radiol.* 2012;85:101-13.
 32. Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WC. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett.* 2006;6:662-8.
 33. Guo H, Zhang J, Boudreau M, Meng J, Yin JJ, Liu J, et al. Intravenous administration of silver nanoparticles causes organ toxicity through intracellular ROS-related loss of inter-endothelial junction. *Part Fibre Toxicol.* 2016;13:21.
 34. Yang Y, Ren L, Wang H. Strategies in the design of gold nanoparticles for intracellular targeting: opportunities and challenges. *Ther Deliv.* 2017;8:879-97.
 35. Bhattacharya R, Mukherjee P, Xiong Z, Atala A, Soker S, Mukhopadhyay D. Gold nanoparticles inhibit VEGF165-induced proliferation of HUVEC cells. *Nano Letters.* 2004;4:2479-81.
 36. Pan Y, Wu Q, Qin L, Cai J, Du B. Gold nanoparticles inhibit VEGF165-induced migration and tube formation of endothelial cells via the Akt pathway. *Biomed Res Int.* 2014;2014:418624.
 37. Arvizo RR, Rana S, Miranda OR, Bhattacharya R, Rotello VM, Mukherjee P.

- Mechanism of anti-angiogenic property of gold nanoparticles: role of nanoparticle size and surface charge. *Nanomedicine*. 2011;7:580-7.
38. Pan Y, Wu Q, Liu R, Shao M, Pi J, Zhao X, et al. Inhibition effects of gold nanoparticles on proliferation and migration in hepatic carcinoma-conditioned HUVECs. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014;24:679-84.
 39. Shen N, Zhang R, Zhang HR, Luo HY, Shen W, Gao X, et al. Inhibition of retinal angiogenesis by gold nanoparticles via inducing autophagy. *Int J Ophthalmol*. 2018;11:1269-76.
 40. Reinmuth N, Liu W, Jung YD, S.A. A, Shaheen RM, Fan F, et al. Induction of VEGF in perivascular cells defines a potential paracrine mechanism for endothelial cell survival. *The FASEB Journal*. 2001;15:1239-41.
 41. Abouantoun TJ, MacDonald TJ. Imatinib blocks migration and invasion of medulloblastoma cells by concurrently inhibiting activation of platelet-derived growth factor receptor and transactivation of epidermal growth factor receptor. *Mol Cancer Ther*. 2009;8:1137-47.
 42. Tan G, Onur MA. Cellular localization and biological effects of 20nm-gold nanoparticles. *J Biomed Mater Res A*. 2018;106:1708-21.
 43. Saha S, Xiong X, Chakraborty PK, Shameer K, Arvizo RR, Kudgus RA, et al. Gold Nanoparticle Reprograms Pancreatic Tumor Microenvironment and Inhibits Tumor Growth. *ACS Nano*. 2016;10:10636-51.
 44. Kim JH, Kim MH, Jo DH, Yu YS, Lee TG, Kim JH. The inhibition of retinal neovascularization by gold nanoparticles via suppression of VEGFR-2 activation. *Biomaterials*. 2011;32:1865-71.
 45. Liu FZ, Ma DW, Chen W, Chen XY, Qian YC, Zhao YB, et al. Gold Nanoparticles Suppressed Proliferation, Migration, and Invasion in Papillary Thyroid Carcinoma Cells via Downregulation of CCT3. *J Nanomater*. 2019:1-12.
 46. Huai Y, Zhang Y, Xiong X, Das S, Bhattacharya R, Mukherjee P. Gold Nanoparticles sensitize pancreatic cancer cells to gemcitabine. *Cell Stress*. 2019;3:267-79.
 47. Tlotleng N, Vetten MA, Keter FK, Skepu A, Tshikhudo R, Gulumian M. Cytotoxicity, intracellular localization and exocytosis of citrate capped and PEG functionalized gold nanoparticles in human hepatocyte and kidney cells. *Cell Biol Toxicol*.

- 2016;32:305-21.
48. Sweeney MD, Ayyadurai S, Zlokovic BV. Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways. *Nat Neurosci*. 2016;19:771-83.
 49. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019;43:582-92.
 50. Lemasters JJ. *Essential Concepts in Molecular Pathology*. 1 ed. USA: Elsevier; 2010. 467 p.
 51. Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol*. 2004;16:663-9.
 52. Maurer LL, Meyer JN. A systematic review of evidence for silver nanoparticle-induced mitochondrial toxicity. *Environmental Science: Nano*. 2016;3:311-22.
 53. Hariri M, Millane G, Guimond MP, Guay G, Dennis JW, Nabi IR. Biogenesis of multilamellar bodies via autophagy. *Mol Biol Cell*. 2000;11:255-68.





จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวศศิگانต์ ลู่ประเสริฐกุล
วัน เดือน ปี เกิด	25 มีนาคม 2537
สถานที่เกิด	ลำปาง
วุฒิการศึกษา	Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University
ที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 9/228 หมู่บ้านบุศรินทร์ ตำบลกระทู่มลัม อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม 73220
ผลงานตีพิมพ์	Looprasertkul S, Sereemasapun A, Jindatip D. Effects of Low Dose of Gold Nanoparticles on Pericytes Biology. In: Potiyaraj P, Laphookhieo S, Pinyakong O, eds. Proceedings of the 45th Congress on Science and Technology of Thailand: Seedling Innovation for Sustainable Development, 2019 Oct 7-9; Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand; 2019. p.449-455