



การพัฒนานาโนเจลโดยใช้รังสีแกมมาสำหรับนำส่งยาต้านมะเร็งด็อกโซรูบิซิน
DEVELOPMENT OF NANOGELS PREPARED BY GAMMA RADIATION
FOR DOXORUBICIN DELIVERY

ภัทรา เลิศศรารุณ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2563

การพัฒนานาโนเจลโดยใช้รังสีแกมมาสำหรับนำส่งยาต้านมะเร็งดอกไซบูชิน



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ปีการศึกษา 2563

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

DEVELOPMENT OF NANOGELS PREPARED BY GAMMA RADIATION
FOR DOXORUBICIN DELIVERY



PATTRA LERTSARAWUT

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF SCIENCE
(Pharmaceutical Product Development)
Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University

2020

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนานาโนเจลโดยใช้รังสีแกมมาสำหรับนำส่งยาต้านมะเร็งดีออกโซรูบิซิน

ของ

ภัทรา เลิศศราวุธ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ประธาน
(อาจารย์ ดร. ภาณุ.ดวงรัตน์ ชูวิสิฐกุล) (รองศาสตราจารย์ ดร. ภาณุ.ชูดา จิตตสุโก)

..... ที่ปรึกษาร่วม กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาณุ.ศุจินันต์ ดันวิเชียร) (รองศาสตราจารย์ ดร. ภาณุ.วีระศักดิ์ สามมี)

ชื่อเรื่อง	การพัฒนานาโนเจลโดยใช้รังสีแกมมาสำหรับนำส่งยาต้านมะเร็งด็อกโซรูบิซิน
ผู้วิจัย	ภัทรา เลิศศรารุณ
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2563
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร. ภาณุ ดวงรัตน์ ฐวิสิฐกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาณุ ศุภจินน ดันวิเชียร

นาโนเจลเป็นระบบนำส่งยาแบบหนึ่งที่สามารถนำส่งยาต้านมะเร็งไปยังบริเวณอวัยวะเป้าหมายได้ การใช้รังสีแกมมาทำให้เกิดการเชื่อมโยงข้ามของพอลิเมอร์ ทำให้เกิดนาโนเจลได้ง่าย และเป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาการพัฒนานาโนเจลโดยใช้รังสีแกมมาสำหรับนำส่งยาด็อกโซรูบิซิน (doxorubicin) ซึ่งเป็นยาต้านมะเร็ง โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมนาโนเจล ได้แก่ ชนิดของพอลิเมอร์ ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ และปริมาณรังสีแกมมาที่ใช้ ศึกษาประสิทธิภาพการกักเก็บยา การปลดปล่อยยา และร้อยละความอยู่รอดของเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด HepG2 จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมนาโนเจล พบว่าสารประกอบเชิงซ้อนของกรดไฮยาลูโรนิกและไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 1 กิโลเกรย์ สามารถเกิดเป็นนาโนเจลที่มีขนาดอนุภาคที่เหมาะสม ประสิทธิภาพการกักเก็บยาขึ้นกับสัดส่วนของยากับพอลิเมอร์ นาโนเจลที่เตรียมจากสัดส่วนพอลิเมอร์ต่อยา 1:2 ได้ผลประสิทธิภาพการกักเก็บยาสูงสุด และสามารถควบคุมการปลดปล่อยโดยตอบสนองต่อค่าพีเอช นาโนเจลจะปลดปล่อยยาได้ดีกว่าที่ pH 4.5 ซึ่งเป็นค่าความเป็นกรดต่างที่ใกล้เคียงกับภายในเซลล์มะเร็ง ผลการทดสอบร้อยละความอยู่รอดของเซลล์ HepG2 แสดงให้เห็นว่านาโนเจลไม่บรรจุตัวยามีความเป็นพิษต่อเซลล์ และยาด็อกโซรูบิซินที่บรรจุในนาโนเจลมีประสิทธิภาพการยับยั้งการอยู่รอดของเซลล์ HepG2 ได้มากกว่าสารละลายยาด็อกโซรูบิซิน นาโนเจลที่เตรียมจากกรดไฮยาลูโรนิกและไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้เป็นระบบนำส่งยาต้านมะเร็งที่มีประสิทธิภาพดี ยับยั้งการอยู่รอดของเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดเซลล์มะเร็งตับ จึงสามารถต่อยอดการวิจัยโดยการศึกษาเพิ่มเติมด้วยยาต้านมะเร็งต่างชนิด และศึกษาเซลล์มะเร็งที่หลากหลาย เพื่อเพิ่มประโยชน์ในการนำส่งยาต้านมะเร็งไปยังเซลล์เป้าหมายอื่นต่อไป

คำสำคัญ : นาโนเจล, รังสีแกมมา, ไคโตซาน, ไฮยาลูโรนิกแอซิด, ระบบนำส่งยา, ด็อกโซรูบิซิน

Title	DEVELOPMENT OF NANOGELS PREPARED BY GAMMA RADIATION FOR DOXORUBICIN DELIVERY
Author	PATTRA LERTSARAWUT
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2020
Thesis Advisor	Dr. Duangratana Shuwisitkul
Co Advisor	Assistant Professor Sujimon Tunvichien , Ph.D.

Nanogels are a dosage form that can deliver a drug to a specific target. The radiation induced crosslinking of inter-polymer complexes is a convenient method and a green technology for the preparation of nanogels. This research focused on the development of nanogels using gamma radiation for doxorubicin delivery, which is an anti-cancer drug. The optimum conditions for preparing nanogels, such as the polymer type, the polymer concentration and gamma radiation doses were studied. Encapsulation efficiency, drug release and the cytotoxicity test of the HepG2 cell line were investigated. The results showed that the optimum conditions for preparing nanogels were the inter-polymer complexes at a concentration of 0.25 mg/mL hyaluronic acid (HA) and high molecular weight of chitosan (CSHMW) at 1 kGy. The appropriate particle size was obtained. The encapsulation efficiency of nanogels depended on the polymer-drug ratio and the maximum encapsulation efficiency was achieved when using polymers with the drug at a ratio of 1:2. Nanogels are pH responsive nanoparticles and released more in the release medium at pH 4.5, which is the pH closing to the inside of cancer cells. Nanogels were non-toxic to the HepG2 cell line and doxorubicin loading in nanogels were more effective in inhibiting the survival of HepG2 cells culture than free doxorubicin. In conclusion, the newly developed HA-CSHMW nanogels are a possibly effective anti-cancer drug carrier. It can inhibit the survival of hepatocellular carcinoma cell line. HA-CSHMW nanogels is able to be further developed for other anticancer drugs and carcinoma cells as a potential targeting drug delivery system.

Keyword : Nanogels, Gamma radiation, Chitosan, Hyaluronic acid, Drug delivery, Doxorubicin

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีเนื่องจากผู้วิจัยได้รับความกรุณาและความเมตตา อย่างยิ่ง จากอาจารย์ ดร. ดวงรัตน์ ชูวิสิฐกุล ที่ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภจิน ตันวิเชียร ที่ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทั้งสองท่าน ที่ให้คำแนะนำ ดูแลเอาใจใส่การดำเนินการวิจัยทุกขั้นตอนอย่างยิ่ง นับตั้งแต่เริ่มดำเนินการจนสำเร็จ เรียบร้อยสมบูรณ์เป็นปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ไว้ ณ ที่นี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ชูดา จิตตสุโก ที่ให้ความกรุณาเป็นผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัยในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะเพื่อให้ปริญญานิพนธ์มีความถูกต้องและสมบูรณ์อย่างยิ่ง ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. วีระศักดิ์ สามี (กรรมการบริหารหลักสูตร) ที่ให้ความกรุณาเป็นประธานกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ และผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาการเภสัชภัณฑ์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ทุกท่านที่ให้ความกรุณาให้คำแนะนำ ช่วยเหลือ และถ่ายทอดวิชาความรู้ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งแก่ผู้วิจัย นอกจากนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ดร. พิริยธร สุวรรณมาลา ดร. เกศินี เหมวิเชียร ดร. วิจิตรรัตน์ รัตนวงษ์วิบูลย์ และ ดร. ละมัย ไหมแก้ว นักวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์ ที่ได้ให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ ตลอดจนช่วยเหลืออำนวยความสะดวก และให้ความอนุเคราะห์ในการใช้ห้องปฏิบัติการ และเครื่องมือวิทยาศาสตร์สำหรับงานวิจัย สุดท้ายผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาที่ให้การสนับสนุนด้านการศึกษา และ กำลังใจในการทำให้งานวิจัยประสบผลสำเร็จสมบูรณ์

ภัทรา เลิศศรารักษ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ	ข
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ	ฎ
บทที่1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 สมมติฐาน.....	2
1.4 ปัจจัย และตัวแปรที่ศึกษา	2
1.5 กรอบแนวคิดการวิจัย	3
1.6 ขอบเขตการวิจัย	3
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่2 แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 นาโนเจล	5
2.1.1 สมบัติของนาโนเจล	5
2.1.1.1 ความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อในร่างกาย (biocompatibility) และ การย่อย สลายได้ (biodegradability)	5
2.1.1.2 ความสามารถในการพองน้ำหรือสารละลายที่เหมาะสม	5
2.1.1.3 ความสามารถในการกักเก็บยาและปลดปล่อยยา.....	5

2.1.1.4 ขนาดของอนุภาค.....	6
2.1.2 กระบวนการเตรียมนาโนเจล	6
2.1.2.1 การเชื่อมโยงข้ามทางกายภาพ (Physical cross-linking)	6
2.1.2.2 การเชื่อมโยงข้ามทางเคมี (Chemical cross-linking).....	6
ที่มาภาพ:(Sultana et al., 2013).....	7
2.1.2.3 การเชื่อมโยงข้ามด้วยรังสี (Radiation cross-linking).....	7
2.2 กลไกการควบคุม และปลดปล่อยยาของนาโนเจล	8
2.3 ตัวอย่างพอลิเมอร์ที่ใช้ในการเตรียมนาโนเจลสำหรับนำส่งยา.....	8
2.3.1 โพลีเอทิลีนไกลคอล.....	9
ที่มา: (Huang, Chen, Kang, & Jin, 2017)	9
2.3.2 ไคโตซาน	10
2.3.2 พอลิไวนิลไพโรลิโดน.....	11
2.4 เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง	12
ที่มา: (Mattheolabakis, Milane, Singh, & Amiji, 2015; Wang, Su, Liu, & Zhou, 2012; วิยะดา ปัญจรักษ์, 2558).....	13
บทที่3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	15
3.1 อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี	15
3.1.1 อุปกรณ์เครื่องมือ	15
3.1.2 สารเคมี	15
3.2 วิธีการทดลอง	16
3.2.1 การเตรียมสารละลายพอลิเมอร์	16
3.2.2 การเตรียมสารประกอบพอลิเมอร์เชิงซ้อนร่วมกับการฉายรังสีแกมมา	16
3.2.3 การศึกษาเสถียรภาพของนาโนเจล.....	16

3.2.4 การเตรียมนาโนเจลสำหรับกักเก็บยาต้านมะเร็งดอกโหลบิซิน	17
3.2.5 การศึกษาประสิทธิภาพการกักเก็บยาต้านมะเร็งดอกโหลบิซิน (Encapsulation efficiency, (%))	17
3.2.6 การศึกษาประสิทธิภาพการปลดปล่อยยาต้านมะเร็งดอกโหลบิซิน	18
3.2.7 การศึกษาสมบัติทางกายภาพ และทางเคมีของนาโนเจล	18
3.2.7.1 การวิเคราะห์ขนาดอนุภาค การกระจายตัว และศักย์ซีต้า	18
3.2.7.2 การศึกษาโครงสร้างทางเคมีของพอลิเมอร์	18
3.2.7.3 การวิเคราะห์ลักษณะอนุภาคของนาโนเจล	19
3.2.8 การทดสอบอัตราการตายของเซลล์มะเร็ง	19
บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการทดลอง	21
4.1 ชนิดของพอลิเมอร์ที่มีผลต่อการเกิดนาโนเจล	21
4.2 ปัจจัยที่ส่งผลต่อขนาดอนุภาคของนาโนเจล	24
4.3 เสถียรภาพของนาโนเจล	25
4.4 สมบัติของนาโนเจล HA-CSHMW	27
4.4.1 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)	27
4.4.2 Transmission electron microscope (TEM)	28
4.4.3 ประสิทธิภาพการกักเก็บยาต้านมะเร็งดอกโหลบิซิน (Encapsulation efficiency) ..	28
4.4.4 ประสิทธิภาพการปลดปล่อยยาต้านมะเร็งดอกโหลบิซิน	29
4.5 ผลของนาโนเจล HA-CSHMW ต่อการตายของเซลล์ HepG2	31
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	33
บรรณานุกรม	35
ประวัติผู้เขียน	40

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 แสดง marker ของเซลล์มะเร็งแต่ละชนิด	12
ตาราง 2 แสดงค่าศักย์ไฟฟ้าของตัวอย่างนาโนเจล HA-CSHMW ที่ระยะเวลาต่างๆ ใน 2 สภาวะ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	26



สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 แสดงตัวอย่างการเตรียมนาโนเจลให้เกิดการเชื่อมโยงข้ามทางกายภาพ.....	7
ภาพประกอบ 2 แสดงตัวอย่างการเตรียมนาโนเจลให้เกิดการเชื่อมโยงข้ามทางเคมี (ก) และการเตรียมโดยใช้รังสีเหนี่ยวนำให้เกิดการเชื่อมโยงข้าม (ข)	7
ภาพประกอบ 3 แสดงโครงสร้างทางเคมีของโพลีไฮดรอกซีอะลกอฮอล์.....	9
ภาพประกอบ 4 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน.....	10
ภาพประกอบ 5 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของพอลิไวนิลไพโรลิโดน.....	11
ภาพประกอบ 6 สูตรโครงสร้างทางเคมีที่เกิดจากการเชื่อมโยงข้ามของ CS-PVP.....	21
ภาพประกอบ 7 สูตรโครงสร้างทางเคมีที่เกิดจากการเชื่อมโยงข้ามของ HA-PVP.....	22
ภาพประกอบ 8 สูตรโครงสร้างทางเคมีที่เกิดจากการเชื่อมโยงข้ามของ HA-CSHMW	22
ภาพประกอบ 9 เส้นสเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์ขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง zetasizer ของอนุภาคนาโนเจลที่เตรียมจากสารประกอบพอลิเมอร์เชิงซ้อนของ CSLMW-PVP (ก) CSHMW-PVP (ข) HA-PVP(ค) และ HA-CSHMW (ง) ตามลำดับ	23
ภาพประกอบ 10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารประกอบพอลิเมอร์เชิงซ้อน HA-CSHMW ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.1 - 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และปริมาณรังสีแกมมาที่ 1 (■) 3 (▣) และ 5 กิโลเกรย์ (■) ที่มีผลต่อขนาดอนุภาคของนาโนเจล โดยในวงเล็บแสดงถึงค่า PDI	24
ภาพประกอบ 11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดอนุภาคนาโนเจล HA-CSHMW ที่ระยะเวลาต่างๆ ใน 2 สภาวะ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง (■) และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (▣)	26
ภาพประกอบ 12 สเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันทางเคมีของ HA, CSHMW, HA-CSHMW NGs, DOX และ NGs•DOX ด้วยเครื่อง FTIR	27
ภาพประกอบ 13 ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน TEM ของ HA-CSHMW NGs และ NGs•DOX ที่ผ่านการฉายรังสี 1 กิโลเกรย์	28

ภาพประกอบ 14 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการปลดปล่อยยา DOX นาโนเจลที่บรรจุยา DOX อัตราส่วนระหว่างพอลิเมอร์ต่อ DOX 1:1 1:2 และ 2:1 ในสารละลายบัฟเฟอร์ค่าพีเอช 4.5 (ก) และสารละลายบัฟเฟอร์ค่าพีเอช 7.4 (ข).....	30
ภาพประกอบ 15 กราฟแสดงร้อยละความอยู่รอดของเซลล์ HepG2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของ ยาต้านมะเร็ง DOX (ก) HA-CSHMW NGs (ข) และ NGs • DOX (ค) ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	32



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

โรคมะเร็งถือว่าเป็นโรคร้ายที่ทำให้เกิดการเสียชีวิตสูงในปัจจุบัน มีวิธีการรักษาหลักได้แก่ การผ่าตัด การให้ยาเคมีบำบัด และการฉายแสง เมื่อทำการรักษาด้วยยาหรือรังสีจะสามารถฆ่าเซลล์มะเร็ง แต่ขณะเดียวกันก็จะทำลายเซลล์ปกติบริเวณข้างเคียง ซึ่งผู้ป่วยอาจมีอาการข้างเคียงเกิดขึ้นจากการรักษา เนื่องจากการรักษาไม่สามารถจำเพาะเจาะจงบริเวณเซลล์มะเร็งได้ นอกจากนี้การรักษามะเร็งด้วยการให้ยาจำเป็นต้องได้รับการรักษาบ่อยครั้ง ทำให้เกิดภาวะดื้อยาซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเกิดซ้ำของโรค และการแพร่กระจายไปยังบริเวณอวัยวะอื่น (กมลรัตน์ ธนพระภัสร์, 2557) จึงมีการสนใจศึกษาการพัฒนาระบบนำส่งยา เพื่อให้ยาส่งตรงถึงบริเวณรักษาได้มากขึ้น ช่วยลดผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากการรักษา และเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาอีกด้วย

นาโนเจลมีสมบัติเฉพาะตัวคือ มีขนาดอนุภาคเล็กอยู่ในช่วง 20-200 นาโนเมตร (Sultana, Manirujjaman, Imran-Ul-Haque, & Sharmin, 2013) สามารถหลีกเลี่ยงการตรวจจับและกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายโดย phagocytic cell ได้ จึงมีประสิทธิภาพในการนำส่งยาเข้าสู่เป้าหมายได้ดีขึ้น สามารถดูดซับน้ำ กักเก็บยา โปรตีน และโมเลกุลอื่นๆ ไว้ภายในโครงสร้าง มีความยืดหยุ่น (flexibility) และสามารถเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อในร่างกาย (biocompatibility) นอกจากนี้ยังสามารถพัฒนานาโนเจลให้มีโครงสร้างตามต้องการจากการเลือกใช้พอลิเมอร์ที่มีความเหมาะสม เพื่อใช้ควบคุมการปลดปล่อยยาให้อยู่ในช่วงปริมาณที่กำหนด หรือให้ความจำเพาะกับบริเวณเป้าหมายที่ต้องการรักษา

หนึ่งในวิธีการพัฒนานาโนเจลที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (green synthesis) คือ การใช้กระบวนการทางรังสี เช่น รังสีแกมมา ซึ่งเป็นรังสีก่อก่อไอออนมีอำนาจทะลุทะลวงสูง เมื่อตัวกลางของสารละลายหรือพอลิเมอร์ได้รับการฉายรังสี จะสามารถแตกตัวและสร้างอนุมูลอิสระที่เป็นตัวริเริ่มในการเกิดปฏิกิริยาของระบบ จึงช่วยลดการใช้สารตั้งต้นปฏิกิริยา (initiator) หรือสารเหนี่ยวนำให้เกิดการเชื่อมโยงข้าม (cross-linker) ที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษ และช่วยลดขั้นตอนการเตรียมที่ยุ่งยากซับซ้อน อีกทั้งยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างพันธะโคเวเลนต์ ซึ่งเป็นพันธะที่มีความแข็งแรง ทำให้โครงสร้างของนาโนเจลมีเสถียรภาพเพิ่มมากขึ้น

งานวิจัยชิ้นนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาและพัฒนาการเตรียมนาโนเจลโดยใช้รังสีแกมมาสำหรับนำส่งยาต้านมะเร็งด็อกโซรูบิซิน (doxorubicin, DOX) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและเสถียรภาพของนาโนเจล สำหรับเป็นต้นแบบในการพัฒนาต่อยอดเป็นระบบนำส่งยาต้านมะเร็งสู่ตลาดยาต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อพัฒนานาโนเจลโดยใช้รังสีแกมมาเหนี่ยวนำให้เกิดการเชื่อมโยงข้ามของสารประกอบพอลิเมอร์เชิงซ้อน เพื่อให้กักเก็บและควบคุมการปลดปล่อยยาต้านมะเร็งด็อกโซรูบิซิน โดยมีวัตถุประสงค์ย่อยดังต่อไปนี้

1.2.1 เพื่อศึกษาหาสภาวะในการเตรียมให้เกิเป็นนาโนเจลที่สามารถกักเก็บยาต้านมะเร็งด็อกโซรูบิซิน

1.2.2 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพและเสถียรภาพของนาโนเจล

1.3 สมมติฐาน

การปรับสภาวะในการเตรียมนาโนเจล ได้แก่ ชนิดของพอลิเมอร์ ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ อัตราส่วนระหว่างพอลิเมอร์ต่อยาต้านมะเร็งด็อกโซรูบิซิน และปริมาณรังสีที่ใช้ ทำให้ได้นาโนเจลที่มีประสิทธิภาพในการกักเก็บยาต้านมะเร็งด็อกโซรูบิซิน มีเสถียรภาพ และมีประสิทธิภาพในการฆ่าเซลล์มะเร็งแตกต่างกัน

1.4 ปัจจัย และตัวแปรที่ศึกษา

โครงการนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ส่วน ดังนี้

ส่วนที่ 1 การพัฒนานาโนเจล

ตัวแปรต้น : ชนิดของพอลิเมอร์

ความเข้มข้นของพอลิเมอร์

ปริมาณรังสีที่ใช้

ตัวแปรตาม : ขนาดอนุภาคและการกระจายตัวของนาโนเจล

เสถียรภาพของนาโนเจล

ส่วนที่ 2 การศึกษาประสิทธิภาพของนาโนเจล

ตัวแปรต้น : อัตราส่วนระหว่างพอลิเมอร์ต่อยาต้านมะเร็งด็อกโซรูบิซิน

ปริมาณรังสีที่ใช้

ตัวแปรตาม : ประสิทธิภาพการกักเก็บยาต้านมะเร็งด็อกโซรูบิซิน

การปลดปล่อยยาต้านมะเร็งด็อกโซรูบิซิน

ส่วนที่ 3 การศึกษาอัตราการตายของเซลล์มะเร็ง

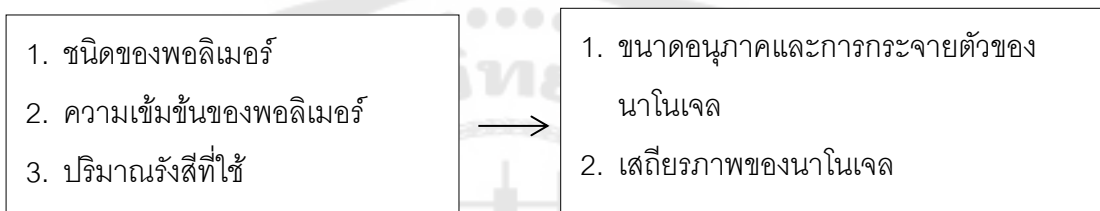
ตัวแปรต้น : รูปแบบของยา

ตัวแปรตาม : อัตราการตายของเซลล์มะเร็ง

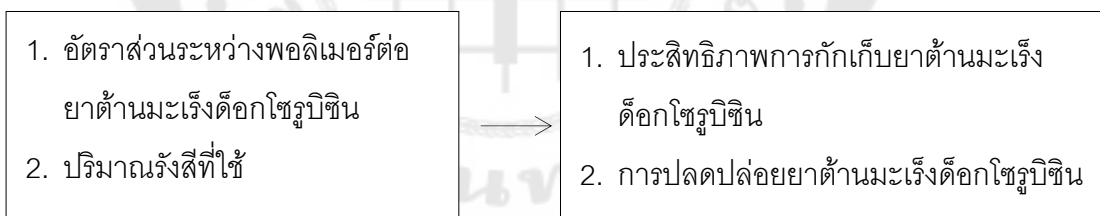
1.5 กรอบแนวคิดการวิจัย

โครงการนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ส่วน ดังนี้

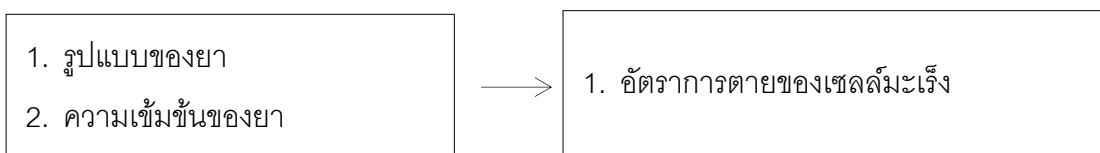
ส่วนที่ 1 การพัฒนานาโนเจล



ส่วนที่ 2 การศึกษาประสิทธิภาพของนาโนเจล



ส่วนที่ 3 การศึกษาอัตราการตายของเซลล์มะเร็ง



1.6 ขอบเขตการวิจัย

โครงการนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ส่วน ดังนี้

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเตรียมนาโนเจลด้วยเทคนิคการเกิดสารประกอบพอลิเมอร์เชิงซ้อน (inter-polymer complexes, IPCs) โดยใช้พอลิเมอร์ต่างชนิด ได้แก่ ไคโตซาน

(CS) ไฮเดียมไฮยาโรนิกแอซิด (HA) และพอลิไวนิลไพโรริโดน (PVP) ช่วงความเข้มข้น 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมพอลิเมอร์แต่ละชนิดที่ความเข้มข้นเดียวกันในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร จากนั้นนำไปฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 0-5 กิโลเกรย์ ศึกษาขนาดอนุภาค การกระจายตัว และเสถียรภาพของนาโนเจล

2. ศึกษาอัตราส่วนระหว่างพอลิเมอร์ต่อยาต้านมะเร็งดอกไซโรบิซินที่อัตราส่วน 1:0.5-2 โดยน้ำหนัก ใช้ปริมาณรังสีแกมมา 0-5 กิโลเกรย์ สำหรับเตรียมนาโนเจลกักเก็บยาต้านมะเร็งดอกไซโรบิซิน โดยคัดเลือกชนิดและความเข้มข้นของพอลิเมอร์ที่มีความเหมาะสมมาทำการศึกษา ในส่วนของการปลดปล่อยยาต้านมะเร็งดอกไซโรบิซินนั้นจะศึกษาในสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอช 4.5 และ 7.4

3. ศึกษาอัตราการตายของเซลล์มะเร็ง จากการอยู่รอดของเซลล์ HepG2 โดยเปรียบเทียบผลจากการได้รับยา 3 รูปแบบ ได้แก่ ยาต้านมะเร็งดอกไซโรบิซิน นาโนเจลเปล่า และยาต้านมะเร็งดอกไซโรบิซินที่บรรจุในรูปแบบนาโนเจล ในช่วงความเข้มข้น 1-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ระบบนำส่งยาในรูปแบบนาโนเจลจากการใช้กระบวนการทางรังสี ซึ่งเป็นระบบนำส่งยาที่พร้อมจะนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นระบบนำส่งยาต้านมะเร็งสู่ตลาดยาต่อไป

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 นาโนเจล

นาโนเจลเกิดจากการเชื่อมโยงข้ามระหว่างสายโซ่ของพอลิเมอร์ ทำให้โครงสร้างมีความพรุน สามารถกักเก็บโมเลกุลยา หรือโมเลกุลอื่นได้ เป็นอนุภาคนาโนขนาดเล็กอยู่ในระดับนาโนเมตร ทำให้สามารถหลีกเลี่ยงการตรวจจับและกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายโดยกระบวนการฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการนำส่งยาตรงสู่อวัยวะเป้าหมาย ทำให้ประสิทธิภาพการรักษาเพิ่มสูงขึ้น (Sultana et al., 2013) ปัจจุบันการพัฒนา ระบบนำส่งยาในรูปแบบนาโนเจลจึงได้รับความสนใจในการศึกษาเป็นอย่างมาก

2.1.1 สมบัติของนาโนเจล

2.1.1.1 ความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อในร่างกาย (biocompatibility) และ การย่อยสลายได้ (biodegradability)

นาโนเจลมีสมบัติเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อในร่างกาย ไม่ก่อให้เกิดการตอบสนองทางชีวภาพที่เป็นอันตรายกับโมเลกุลของเซลล์ หรืออวัยวะต่างๆ ในร่างกาย รวมถึงระบบอื่นๆ ของร่างกาย ได้แก่ ระบบภูมิคุ้มกัน ภาวะการอักเสบเรื้อรัง หรือการกลายพันธุ์ซึ่งนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีรวิทยา หรือทางกายวิภาคอันไม่พึงประสงค์ ได้แก่ อาการแพ้ การแข็งตัวของเลือด หรือการทำให้เกิดโรค เช่น โรคมะเร็ง (Eckmann, Composto, Tsourkas, & Muzykantov, 2014) นอกจากนี้นาโนเจลที่ทำจากพอลิเมอร์ทางชีวภาพ ยังสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพอีกด้วย

2.1.1.2 ความสามารถในการพองน้ำหรือสารละลายที่เหมาะสม

ปัจจัยที่ส่งผลต่อความสามารถในการพองตัวของนาโนเจล คือ ความหนาแน่นของการเชื่อมโยงข้าม และปัจจัยแวดล้อมภายนอก ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และค่าความแรงประจุ (Eckmann et al., 2014)

2.1.1.3 ความสามารถในการกักเก็บยาและปลดปล่อยยา

ความสามารถของการกักเก็บยาขึ้นอยู่กับหมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์ที่ใช้ในการเตรียมนาโนเจล นอกจากนี้ยังส่งผลต่อการลำเลียงขนส่งยา และการปลดปล่อยยาสู่อวัยวะเป้าหมาย (Sultana et al., 2013)

2.1.1.4 ขนาดของอนุภาค

โดยทั่วไปนาโนเจลมีขนาดอนุภาคอยู่ระหว่าง 20-200 นาโนเมตร ทำให้สามารถหลีกเลี่ยงการกำจัดออกทางไต และมีความสามารถในการซึมผ่านได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาจสามารถต่อต้านการกรองสารพิษโดย blood brain barrier (BBB) ได้ (Sultana et al., 2013)

2.1.2 กระบวนการเตรียมนาโนเจล

หลักในการเตรียมนาโนเจล คือการทำให้เกิดการเชื่อมโยงข้าม ซึ่งสามารถทำได้ 3 วิธี ได้แก่ การเชื่อมโยงข้ามทางกายภาพ (physical cross-linking) การเชื่อมโยงข้ามทางเคมี (chemical cross-linking) และการเชื่อมโยงข้ามด้วยรังสี (radiation cross-linking)

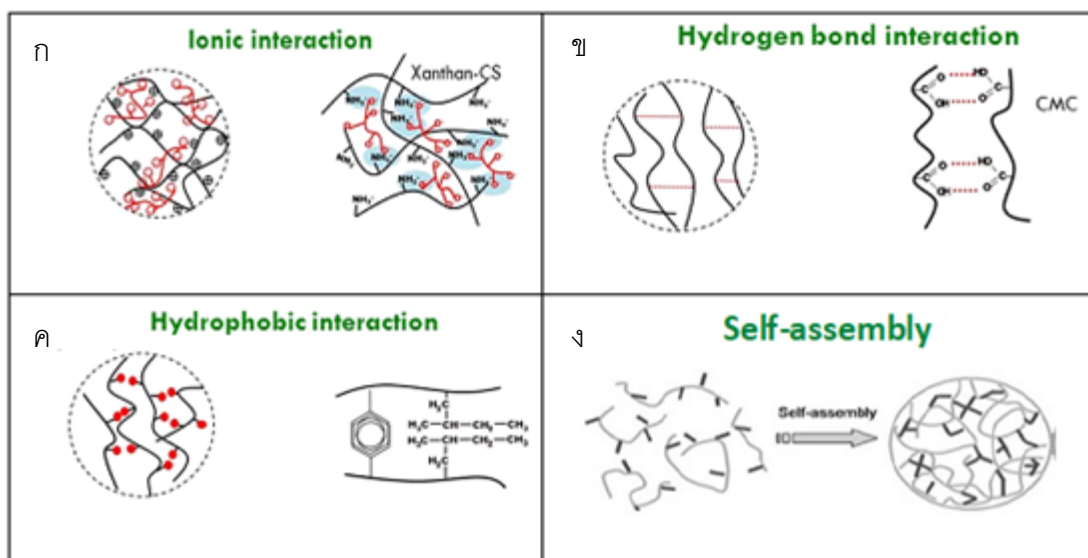
2.1.2.1 การเชื่อมโยงข้ามทางกายภาพ (Physical cross-linking)

ปัจจัยที่ใช้ในการควบคุมการเกิดการเชื่อมโยงข้ามทางกายภาพ ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าความแรงประจุ และอุณหภูมิ เป็นต้น ปัจจัยเหล่านี้จะเหนี่ยวนำให้สายโซ่ของพอลิเมอร์เกิดการเชื่อมโยงข้ามด้วยแรงไฟฟ้าสถิต (electrostatic) และแรงแวนเดอร์วาลส์ (van der Waals) ข้อดีของการสังเคราะห์ด้วยวิธีนี้คือ ขั้นตอนกระบวนการเตรียมไม่ยุ่งยาก สามารถกำหนดขนาดอนุภาคที่ต้องการได้แต่ต้องควบคุมปัจจัยอย่างเข้มงวดเพื่อให้ได้ขนาดของอนุภาคที่ต้องการ (Hui Zhang, Zhai, Wang, & Zhai, 2016) ข้อเสียคือ นาโนเจลที่เตรียมได้มีเสถียรภาพต่ำ เนื่องจากโมเลกุลภายในโครงสร้างของนาโนเจลถูกยึดเหนี่ยวกันด้วยความแรงพันธะแบบอ่อน

ตัวอย่างกระบวนการเชื่อมโยงข้ามทางกายภาพ ดังภาพประกอบ 1 เช่น อันตรกิริยาระหว่างประจุ (ionic interaction) อันตรกิริยาระหว่างพอลิเมอร์ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) อันตรกิริยาระหว่างพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond interaction) (Rattanawongwiboon, Ghaffarlou, Sütekin, & Pasanphan, 2018) และการรวมตัวกันเองของพอลิเมอร์ (self-assembly) เป็นต้น (Sultana et al., 2013)

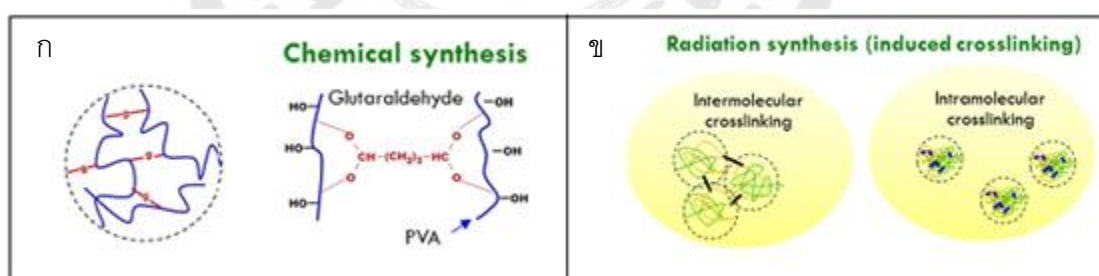
2.1.2.2 การเชื่อมโยงข้ามทางเคมี (Chemical cross-linking)

อาศัยกระบวนการทางเคมีในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสายโซ่ของพอลิเมอร์ ซึ่งสายโซ่ของพอลิเมอร์แต่ละสายภายในโครงสร้างของนาโนเจลจะถูกยึดเหนี่ยวกันด้วยพันธะโคเวเลนต์ ที่มีความแข็งแรงสูงเมื่อเทียบกับการเชื่อมโยงข้ามทางกายภาพ ดังภาพประกอบ 2ก แต่กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีจำเป็นต้องใช้สารช่วยในการทำให้เกิดการเชื่อมโยงข้าม (crosslinker) หรือ สารช่วยลดแรงตึงผิว (surfactant) ซึ่งมีความเป็นพิษสูง (Sultana et al., 2013)



ภาพประกอบ 1 แสดงตัวอย่างการเตรียมนาโนเจลให้เกิดการเชื่อมโยงข้ามทางกายภาพ โดยเกิด ionic interaction (ก) การเกิด hydrogen bond interaction (ข) การเกิด hydrophobic interaction (ค) และการเกิด self-assembly (ง)

ที่มารูปภาพ:(Sultana et al., 2013)



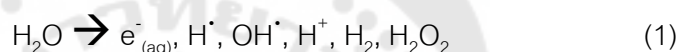
ภาพประกอบ 2 แสดงตัวอย่างการเตรียมนาโนเจลให้เกิดการเชื่อมโยงข้ามทางเคมี (ก) และการเตรียมโดยใช้รังสีเหนี่ยวนำให้เกิดการเชื่อมโยงข้าม (ข)

2.1.2.3 การเชื่อมโยงข้ามด้วยรังสี (Radiation cross-linking)

กระบวนการทางรังสีเป็นกระบวนการที่สะอาด ปราศจากการใช้สารประกอบทางเคมีที่มีความเป็นพิษ ได้แก่ สารตั้งต้นปฏิกิริยา สารเหนี่ยวนำให้เกิดการเชื่อมโยงข้าม สารเร่งปฏิกิริยา และสารลดแรงตึงผิว เป็นต้น (Matusiak, Kadlubowski, & Ulanski, 2018) การใช้รังสี

เหนี่ยวนำให้เกิดการเชื่อมโยงข้าม สามารถเกิดได้ 2 กรณี ได้แก่ การเชื่อมโยงข้ามภายในโมเลกุล (intramolecular cross-linking) และการเชื่อมโยงข้ามระหว่างโมเลกุล (intermolecular cross-linking) ดังภาพประกอบ 2x ซึ่งสามารถจำแนกตามลักษณะการเกิดได้จากน้ำหนักโมเลกุล และขนาดอนุภาคที่เตรียมได้ (Kadlubowski, Ulanski, & Rosiak, 2012)

การเตรียมนาโนเจลโดยใช้รังสี สามารถทำได้โดยฉายรังสีให้แก่สารละลายพอลิเมอร์ที่มีความเข้มข้นต่ำ โดยรังสีที่นิยมใช้เป็นรังสีชนิดก่อก่อไอออน ได้แก่ ลำอิเล็กตรอน และแกมมา เมื่อทำการฉายรังสี น้ำซึ่งเป็นตัวกลางของสารละลายจะดูดกลืนพลังงานจากรังสี และกระตุ้นให้เกิดการแตกตัว (radiolysis of water) ได้ผลผลิตเป็นอนุมูลอิสระมากมาย ดังกลไกที่ 1 (Ghaffarlou, Sütėkin, & Güven, 2018)



$\text{H}^\cdot$ หรือ $\text{OH}^\cdot$ จะทำหน้าที่เป็นตัวตั้งต้นการเกิดปฏิกิริยา โดยดึงอะตอม H จากสายโซ่ของพอลิเมอร์บริเวณใกล้เคียง เมื่ออะตอมของ H ถูกดึงออกไป สายโซ่ของพอลิเมอร์จะมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเนื่องจากมีอนุมูลอิสระอยู่บนโครงสร้าง จึงเกิดการสร้างพันธะโคเวเลนต์ระหว่างโมเลกุลใกล้เคียง หรือโมเลกุลเดียวกัน เพื่อทำให้โครงสร้างมีเสถียรภาพมากขึ้น

2.2 กลไกการควบคุม และปลดปล่อยยาของนาโนเจล

นาโนเจล คือพอลิเมอร์ที่มีลักษณะเป็นโครงร่างตาข่ายขนาดเล็ก มีความพรุน จึงสามารถกักเก็บยา โปรตีน หรือโมเลกุลอื่นไว้ภายในโครงสร้างได้ แต่เมื่อโครงสร้างของนาโนเจลเกิดการเสียสภาพหรือเกิดการพองตัว จะทำให้โมเลกุลที่ถูกกักเก็บไว้ภายในถูกปลดปล่อยออกมา การที่โครงสร้างของนาโนเจลจะเกิดการเสียสภาพหรือเกิดการพองตัวขึ้นนั้นขึ้นอยู่กับลักษณะทางกายภาพของนาโนเจล แรงยึดเหนี่ยวระหว่างนาโนเจลกับโมเลกุลของยา และสิ่งกระตุ้นจากภายนอก ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และเอนไซม์ เป็นต้น (Hui Zhang et al., 2016)

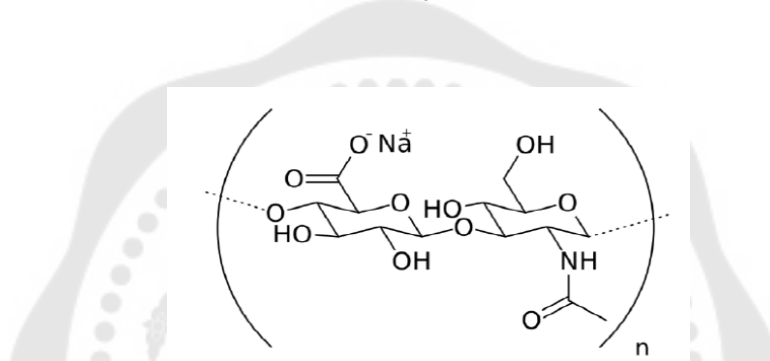
2.3 ตัวอย่างพอลิเมอร์ที่ใช้ในการเตรียมนาโนเจลสำหรับนำส่งยา

การพัฒนาระบบนำส่งในรูปแบบนาโนเจลได้รับความนิยมศึกษาอย่างแพร่หลายในทศวรรษที่ผ่านมา เนื่องจากสามารถนำส่งยาได้หลายชนิด และสามารถควบคุมการปลดปล่อยยาได้ จากการเลือกใช้พอลิเมอร์ที่มีความเหมาะสมในการเตรียม สำหรับงานวิจัยนี้สนใจศึกษา

โซเดียมไฮยาลูโรเนต (sodium hyaluronate, HA) ไคโตซาน (chitosan, CS) และพอลิไวนิลไพร์โรลิโดน (polyvinyl pyrrolidone, PVP) ในการเตรียมนานาเจล

2.3.1 โซเดียมไฮยาลูโรเนต

โซเดียมไฮยาลูโรเนต (sodium hyaluronate, HA) หรือเกลือโซเดียมของไฮยาลูโรนิก-แอซิดเป็นพอลิเมอร์ทางชีวภาพ ที่สามารถเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อในร่างกาย ไม่มีความเป็นพิษ (Choi, Chung, Min, & Yoon, 2010) โครงสร้างประกอบด้วยมोनอแซ็กคาไรด์ 2 หน่วย คือ N-acetyl-D-glucosamine และ D-gluronic acid เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β (1-4) และ β (1-3) ไกลโคซิดิก โครงสร้างทางเคมีดังภาพประกอบ 3



ภาพประกอบ 3 แสดงโครงสร้างทางเคมีของโซเดียมไฮยาลูโรเนต

ที่มา: (Huang, Chen, Kang, & Jin, 2017)

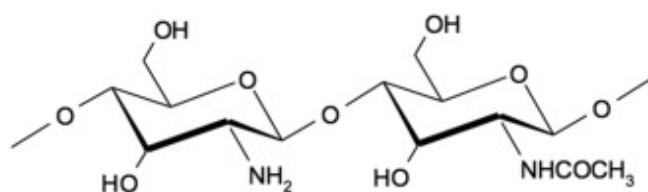
HA สามารถพบได้ในร่างกายของมนุษย์ ซึ่งส่วนใหญ่จะพบใน extracellular matrix (ECM) เนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดอ่อน ได้แก่ สายสะดือ น้ำไขข้อ ผิวหนัง และของเหลวคล้ายวุ้นในโพรงลูกตา นอกจากนี้ยังสามารถสังเคราะห์ได้จากพืช และแบคทีเรีย เช่น หงอนไก่ หนูหนูขาว *Bacillus subtilis* และ streptococcus bacteria เป็นต้น (Bracke & Thacker, 1985; พิมพ์พร ศรีสันติแสง, 2556) ปัจจุบัน HA ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายทางด้านการแพทย์ โดยใช้เป็นส่วนผสมของเครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์บำรุงผิว ในการช่วยลดเลือนริ้วรอย และให้ความชุ่มชื้นแก่ผิว

นอกจากนี้ยังช่วยบำบัดรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม (osteoarthritis) ภาวะอักเสบรอบข้อไหล่ (scapulohumeral periarthritis) หรือลดอาการปวดกล้ามเนื้อ ผลิตเป็นน้ำตาเทียม (artificial tear) เพื่อช่วยหล่อลื่นลูกตา ลดอาการระคายเคืองในลูกตา บรรเทาอาการตาแห้ง และยังมีสมบัติที่โดดเด่นคือ สามารถจับกับตัวรับ (receptor) บริเวณเซลล์มะเร็ง เช่น CD44, CD168, RHAMM และ TSG6 ได้ ด้วยเหตุนี้จึงมีการศึกษาพัฒนานาโนเจลของ HA สำหรับนำส่งยาต้าน

มะเร็งหลายชนิด เช่น doxorubicin, paclitaxel, 5-fluorouracil, curcumin, cisplatin เป็นต้น (Yadav, Agarwal, Rai, & Mishra, 2010; Haiqun Zhang, Huang, Yang, & Zhai, 2014)

2.3.2 ไคโตซาน

ไคโตซาน (chitosan, CS) เป็นอนุพันธ์ของไคตินที่ได้จากการกำจัดหมู่อะเซทิลออก (deacetylation) ประกอบด้วย หมู่ β -1,4-linked glucosamine (2-amino-2-deoxy- β -D-glucose) และ N-acetyl glucosamine ดังภาพประกอบ 4



ภาพประกอบ 4 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน

ที่มา: (Jiang, James, Kumbar, & Laurencin, 2014)

ไคโตซานจัดเป็นพอลิเมอร์ทางธรรมชาติที่พบมากที่สุดรองจากเซลลูโลส มีสมบัติเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อในร่างกาย สามารถย่อยสลายได้ มีความสามารถในการเกิดเจล ไม่เป็นพิษ และมีความหนาแน่นของประจุสูง (Debele, Mekuria, & Tsai, 2016) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียไวรัส และยับยั้งการทำงานของเซลล์มะเร็ง (Maite Arteche Pujana, Leyre Pérez-Álvarez, L Carlos Cesteros Iturbe, & Issa Katime, 2014) จึงนิยมนำมาใช้ประโยชน์ทางเภสัชกรรม โดยเฉพาะการพัฒนาไคโตซานในรูปของไมโครสเฟียร์ เม็ดบีดส์ หรืออนุภาคนาโนเมตรเพื่อใช้สำหรับนำส่งยา หรือโปรตีน (Hu, Jiang, Ding, & Ge, 2002)

การเตรียมไคโตซานสำหรับนำส่งยาสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การพ่นแห้ง (spray drying) การตกตะกอน (precipitation) และการเชื่อมโยงข้ามของอิมัลชัน (emulsion cross-linking) (น้อย เนียมสา, 2556) ซึ่งวิธีดังกล่าวจำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นจำนวนมาก

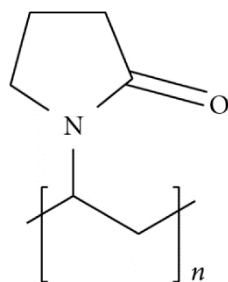
มีการศึกษาพัฒนาอนุภาคนาโนเมตรด้วยไคโตซานและพอลิเอทิลีนออกไซด์ (CS-PEO NGs) โดยวิธีการเกิดเจลแบบไอออนิก (ionic gelation) เพื่อช่วยลดการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ในการเตรียมอนุภาคนาโนเมตรชนิดขบน้ำสำหรับนำส่งโปรตีนโดยการผสมสาร

สองเฟส เฟสแรกประกอบด้วย CS โคพอลิเมอร์ของเอทิลีนออกไซด์ และโพรพิลีนออกไซด์ (PEO-PPO) และเฟสที่สองประกอบด้วยโซเดียมไตรฟอสเฟต (TPP) ซึ่งการเกิดอนุภาคนาโนเมตรอาศัยการเกิดอันตรกิริยาระหว่างประจุบวกของ CS และประจุลบของ TPP อนุภาคนาโนเมตรนี้สามารถกักเก็บโปรตีนได้มากถึง 80% และปลดปล่อยโปรตีนได้อย่างต่อเนื่องนานถึง 1 สัปดาห์ (Calvo, Remunan-Lopez, Vila-Jato, & Alonso, 1997)

นอกจากการพัฒนา CS-PEO NGs แล้ว ยังมีการพัฒนาอนุภาคนาโนเมตรสำหรับนำส่งโปรตีนใหม่ ด้วยเทคนิคการเกิดเจลแบบไฮออนิกเช่นเดียวกัน โดยอาศัยประจุบวกของ CS และประจุลบของ poly(acrylic acid) (PAA) พบว่าอนุภาคที่เตรียมได้มีขนาดอยู่ในช่วง 50-400 นาโนเมตร เป็นอนุภาคนาโนเมตรที่มีความไวต่อความเป็นกรด-ด่าง และสามารถควบคุมการปลดปล่อยโปรตีนได้นานถึง 10 วัน (Hu et al., 2002)

มีงานวิจัยที่ศึกษาพัฒนาอนุภาคนาโนเมตรของ CS และ HA ด้วยเทคนิคการเกิดเจลแบบไฮออนิกสำหรับนำส่งยาหลายชนิด ได้แก่ เฮพาริน (heparin) นำส่งเข้าสู่ระบบทางเดินหายใจตอนล่าง (Oyarzun-Ampuero, Brea, Loza, & Torres, 2009) นำส่ง curcumin เพื่อรักษามะเร็งสมอง (glioma) (L. Yang, Gao, Asghar, & Liu, 2015) และการนำส่งยีน MiR-34a ร่วมกับ doxorubicin เพื่อรักษามะเร็งเต้านม (Deng, Cao, Zhang, & Hu, 2014) ซึ่ง CS และ HA สามารถเกิดพันธะไฮออนิกระหว่างกันได้จากประจุบวกของหมู่เอมีน ($-NH_3^+$) บนโครงสร้างของ CS และประจุลบจากหมู่คาร์บอกซิล ($-COO^-$) ของ HA

2.3.2 พอลิไวนิลไพโรลิโดน



ภาพประกอบ 5 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของพอลิไวนิลไพโรลิโดน

ที่มา: (Negahdary, Mazaheri, Rad, & Hadi, 2012)

พอลิไวนิลไพโรลิโดน (polyvinyl pyrrolidone, PVP) เป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ มีสูตรโครงสร้างทางเคมี ดังภาพประกอบ 5 มีสมบัติเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อในร่างกาย และไม่มี ความเป็นพิษ นิยมนำมาใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง โดยใช้เป็นสาร ช่วยเพิ่มค่าการละลาย สารช่วยเพิ่มเสถียรภาพ (stabilizer) สารช่วยยึดเกาะ (binder) เป็นต้น (Awasthi, Manchanda, Das, & Velu, 2018)

นอกจากนี้ยังมีการใช้ PVP เป็นพอลิเมอร์ในการพัฒนาระบบนำส่งยาที่ตอบสนองต่อ ความเป็นกรด-ด่าง โดยอาศัยสมบัติการเป็นพอลิเมอร์ที่ชอบน้ำและไม่มีประจุ (non-ionic hydrophilic polymer) และเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถรับโปรตอน (proton accepting polymer) ได้ ของ PVP ทำปฏิกิริยาร่วมกับพอลิเมอร์ที่มีประจุ เช่น poly(acrylic acid) (PAA) (El-Rehim, Hegazy, Hamed, & Swilem, 2013) CS (Zhao, Xu, Mitomo, & Yoshii, 2006) และ HA (Lim, Gwon, Park, & Nho, 2011) เป็นต้น ซึ่งพอลิเมอร์เหล่านี้สามารถแตกตัวและให้โปรตรอน (proton) เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม

2.4 เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง

เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งมีบทบาทสำคัญอย่างมากในการเกิดซ้ำของมะเร็ง (relapse) การก้าวหน้าของมะเร็ง (progression) และการแพร่กระจายของมะเร็ง (metastasis) จากการศึกษาพบว่าเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งแต่ละชนิดมี surface marker ในการระบุเซลล์ต้นกำเนิด มะเร็งแตกต่างกันออกไป (วิยะดา บุญจรัญ, 2558) ดังแสดงตาราง 1

ตาราง 1 แสดง marker ของเซลล์มะเร็งแต่ละชนิด

Tumor types	Marker(s)
Leukemia	CD34 CD38 HLA DR CD71 CD90 CD117 CD123
Breast cancer	ESA CD44 CD24/low Lineage, ALDH1high
Liver cancer	CD133, CD90, CD44, OV6, epithelial cell adhesion molecule (EpCAM), CD13 CD49f CD90
Brain cancer	CD133, BCRP1, A2B5, SSEA

ตาราง 1 (ต่อ)

Tumor types	Marker(s)
Lung cancer	CD133, ABCG2high, CD44
Colon cancer	CD133, CD44, CD166, EpCAM, CD24
Multiple myeloma	CD138
Prostate cancer	CD44, $\alpha\beta$ 1high, CD133
Pancreatic cancer	CD133, CD44, EpCAM, CD24
Melanoma	CD20
Head and neck cancer	CD44

ที่มา : (Mattheolabakis, Milane, Singh, & Amiji, 2015; Wang, Su, Liu, & Zhou, 2012; วิยะดา ปัญจรัก, 2558)

CD44 เป็น cell surface glycoprotein ชนิดหนึ่ง พบมากในเซลล์เม็ดเลือด (hematopoietic cells) เซลล์ผิวหนัง (fibroblasts) และเป็น marker ของเซลล์มะเร็งหลายชนิด ได้แก่ มะเร็งเต้านม มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งลำไส้ และ มะเร็งตับ เป็นต้น CD44 สามารถจับกับ ligand หลักอย่าง HA และ ligand อื่น เช่น osteopontin (OPN), chondroitin, collagen, fibronectin และ serglycin/sulfated proteoglycan (Chen, Zhao, Karnad, & Freeman, 2018) ได้ จึงมีการศึกษาการรักษา มะเร็งที่มุ่งตรงไปยังเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งโดยอาศัย marker cell เป็นตัวรับ เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง และการเกิดซ้ำของโรคมะเร็ง

มีการศึกษา apoptosis ของเซลล์โดยการย้อมสี เพื่อเปรียบเทียบการนำส่งไปยังเป้าหมาย และการดูดซึมของ metformin ที่บรรจุในอนุภาคนาโนเมตรของคาร์บอนกับ HA (MET-H-AuNPs) ของเซลล์ HepG2 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ และเซลล์ NIH3T3 ซึ่งเป็นเซลล์ embryonic fibroblast ของหนู ผลการศึกษาพบว่าในเซลล์ HepG2 แสดงให้เห็นถึงการตายของเซลล์ และการดูดซึมของยามากกว่าเซลล์ NIH3T3 เนื่องจากเซลล์ HepG2 มี CD44 เป็น

receptor สามารถจับกับ HA (Kumar, Raja, Sundar, & Antoniraj, 2015) ในขณะที่เซลล์ NIH3T3 ไม่มี CD44 เป็น receptor สอดคล้องกับงานวิจัยของ (C. Yang, Wang, Yao, & Zhang, 2015) ที่พบการแสดงออกของ CD44 บนเซลล์ HepG2 และเซลล์ A549 (เซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์) สูง เมื่อเปรียบเทียบกับ NIH3T3 และ H22

ด้วยสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งที่มี marker เฉพาะ และ HA ที่สามารถจับกับ CD44 marker cell ได้ จึงมีการศึกษาพัฒนาการนำส่งยาต้านมะเร็งโดยใช้ HA เพื่อเพิ่มความจำเพาะต่อการรักษา



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์เครื่องมือ

เครื่องฉายรังสีแกมมา	(Gamma chamber 5000, India)
Zetasizer Nano-ZS	(Malvern, Worcestershire, UK)
Fourier transform infrared spectroscopy	(Tensor 27, Bruker, Germany)
Transmission electron microscope	(Hitachi, HT7700)
pH meter	(Mettler Toledo, China)
Ultra-centrifuge	(Sigma 3-30KS, Germany)
เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง	(Mettler Toledo, Switzerland)
เครื่องกวนสารละลาย	(IKA [®] C-MAG HS7, Malaysia)
เครื่องทำแห้งเยือกแข็ง	(Freezone12plus, Labconco, USA)
Dialysis bag MWCO 3,000 Da	(Cellu Sep, USA)
Centrifugal MWCO 3,000 Da	(Amicon ultra, Merck, Germany)
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ	(New Brunswick scientific, USA)
UV spectrophotometer	(Shimadzu UV-1700, Japan)
ตู้อบเลี้ยงเซลล์	(Binder C150, Germany)
Microplate reader	(Evolution 300, USA)

3.1.2 สารเคมี

Sodium hyaluronic acid (HA); MW = 1100 kDa	(Soliance, Pomaele, France)
Chitosan (CSHMW); DD 85%; MW = 500 kDa	(Seafresh chitosan (Lab) Co., LTD, Thailand)
Chitosan (CSLMW); MW < 190 kDa	(Sigma, Japan)
Acetic acid	(Merck, Darmstadt, Germany)
Polyvinyl pyrrolidone (PVP); MW = 360 kDa	(Fluka, USA)

Doxorubicin Hydrochloride (DOX)	(Cayman, USA)
Sterile water for injection (SWI)	(Thai Nakorn Patina Co., LTD, Thailand)
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	(OmniPur [®] , China)
Sodium Acetate	(Merck, Darmstadt, Germany)
3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (MTT)	(Sigma, USA)
Penicillin/streptomycin	(Gibco, USA)
Fetal Bovine serum (FBS)	(Gibco, USA)
Trypsin EDTA	(Gibco, USA)
Phosphate Buffer Saline (PBS) Tablets	(Merck, Darmstadt, Germany)
Isopropanol (IPA)	(RCI Labscan, Thailand)

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมสารละลายพอลิเมอร์

เตรียมสารละลาย HA, CSLMW, CSHMW และ PVP ในช่วงความเข้มข้น 0.1-0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลาย HA และ PVP ในน้ำปราศจากเชื้อ สำหรับ CSLMW และ CSHMW ละลายในร้อยละ 1 โดยปริมาตรต่อปริมาตรของ acetic acid ตั้งละลายทิ้งไว้ข้ามคืน

3.2.2 การเตรียมสารประกอบพอลิเมอร์เชิงซ้อนร่วมกับการฉายรังสีแกมมา

เตรียมสารประกอบพอลิเมอร์เชิงซ้อนของ HA-PVP, CSLMW-PVP, CSHMW-PVP และ HA-CSHMW โดยนำสารละลายพอลิเมอร์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.1 ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ผสมเข้าด้วยกันในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ค่อยๆ หยดสารละลาย PVP หรือ HA ลงในสารละลาย CS ผ่านทางเข็มฉีดยาเบอร์ 21 ขณะตั้งผสม และผสมทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที ทำเช่นเดียวกันนี้กับสารละลายทุกความเข้มข้น จากนั้นไล่อากาศออกด้วยแก๊สไนโตรสออกไซด์ในสภาวะปิด เป็นเวลา 10 นาที ก่อนนำไปฉายรังสีแกมมา ที่ปริมาณรังสี 1-5 กิโลเกรย์ ด้วยเครื่องฉายรังสีแกมมา รุ่น Gamma chamber 5000 สารละลายก่อนและหลังจากการฉายรังสี เรียกว่า inter-polymer complexes (IPCs) และ nanogel (NGs) ตามลำดับ

3.2.3 การศึกษาเสถียรสภาพของนาโนเจล

เก็บตัวอย่าง NGs ไว้ที่อุณหภูมิห้อง และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์ขนาดอนุภาค และค่าศักย์ซีต้า ที่ระยะเวลาต่างๆ (0, 1, 3, 5, 7 และ 14 วัน) ด้วยเครื่อง Zetasizer

แต่ละตัวอย่างทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ บันทึกข้อมูลที่ได้ผ่านโปรแกรม Zetasizer version 7.03 เปรียบเทียบขนาดอนุภาค และค่าศักย์ซีต้าที่ระยะเวลาต่างๆ กับระยะเวลาเริ่มต้น เพื่อคัดเลือกตำรับที่มีความเหมาะสมสำหรับทำการศึกษาต่อ

3.2.4 การเตรียมนาโนเจลสำหรับกักเก็บยาต้านมะเร็งด็อกโซรูบิซิน

นำตำรับที่สามารถเกิดเป็นนาโนเจลที่มีเสถียรภาพ พิจารณาจากขนาดอนุภาค และศักย์ซีต้าที่มีความเหมาะสม มาศึกษาอัตราส่วนระหว่างพอลิเมอร์ต่อ DOX ที่อัตราส่วน 1:0.5 1:1 และ 1:2 โดยน้ำหนัก โดยซึ่ง DOX ละลายลงในสารละลาย CS ตั้งละลายทิ้งไว้ข้ามคืนในที่มืด จากนั้นทำการเตรียมสารละลาย IPCs โดยนำสารละลาย HA หยดลงในสารละลาย CS ที่มี DOX ละลายอยู่ ผ่านทางเข็มฉีดยาเบอร์ 21 ขณะตั้งผสม ทำการผสมทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที และนำไปฉายรังสีแกมมา ที่ปริมาณรังสี 1 กิโลเกรย์ ด้วยเครื่องฉายรังสีแกมมา รุ่น Gamma chamber 5000 โดยก่อนนำสารละลายไปฉายรังสีให้ควบคุมปริมาณออกซิเจน โดยนำสารละลายมาไล่ออกซิเจนออกด้วยแก๊สไนโตรสออกไซด์ในสภาวะปิด เป็นเวลา 10 นาที สารละลายก่อนและหลังจากการฉายรังสี เรียกว่า inter-polymer complexes loaded DOX (IPCs•DOX) และ nanogel loaded DOX (NGs•DOX) ตามลำดับ

3.2.5 การศึกษาประสิทธิภาพการกักเก็บยาต้านมะเร็งด็อกโซรูบิซิน (Encapsulation efficiency, (%))

นำสารละลาย NGs•DOX มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงผ่านตัวกรอง (centrifugal) MWCO 3,000 Da ที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อคัดแยกโมเลกุลของสารที่ไม่ถูกกักเก็บ และนำสารละลายส่วนใสที่ผ่านตัวกรองมาวิเคราะห์หาปริมาณยาที่หลงเหลืออยู่ ด้วยเทคนิค UV-vis spectrophotometry ความยาวคลื่น 480.96 นาโนเมตร โดยมียาต้านมะเร็งด็อกโซรูบิซินไฮโดรคลอไรด์ (DOX•HCl) เป็นสารมาตรฐาน คำนวณหาประสิทธิภาพในการกักเก็บยา และปริมาณยาที่ถูกกักเก็บ ดังสมการ

$$\text{ประสิทธิภาพการกักเก็บยา (Encapsulation efficiency, \%)} = \frac{\text{ปริมาณยาเริ่มต้น} - \text{ปริมาณยาที่ไม่ถูกกักเก็บในนาโนเจล} \times 100}{\text{ปริมาณยาเริ่มต้น}}$$

$$\text{ปริมาณยาที่ถูกกักเก็บ (Drug loading, \%)} = \frac{\text{ปริมาณยาเริ่มต้น} - \text{ปริมาณยาที่ไม่ถูกกักเก็บในนาโนเจล} \times 100}{\text{ปริมาณของอนุภาค}}$$

ส่วนนาโนเจลที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงนำมาล้างด้วยน้ำ และปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เพื่อทำการชะล้างให้นาโนเจลมีความบริสุทธิ์ขึ้น จากนั้นทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง เพื่อเก็บตัวอย่างตะกอนที่ได้นำไปวิเคราะห์ข้อมูลอื่นต่อไป

3.2.6 การศึกษาประสิทธิภาพการปลดปล่อยยาต้านมะเร็งด็อกโซรูบิซิน

เนื่องจากตัวอย่างมีปริมาณจำกัด จึงได้ออกแบบภาชนะสำหรับการทดลองอิงตามหลักการทดลองแบบไดอะไลซิส โดยออกแบบภาชนะบรรจุสารให้มีลักษณะเป็นหลุมที่ถูกปิดด้วยถุงเมมเบรนไดอะไลซิส ซึ่งภาชนะที่นำมาใช้คือฝา PCR (PCR cap strips) การทดลองสามารถทำได้โดยนำสารละลาย NGs·DOX ปริมาตร 70 ไมโครลิตร บรรจุลงหลุมซึ่งเป็นฝา PCR และทำการปิดฝาด้วยถุงเมมเบรนไดอะไลซิส (MWCO: 3,000 กรัมต่อโมล) จากนั้นนำไปใส่ขวดแก้วปริมาตร 5 มิลลิตร ซึ่งมีสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4.5 บรรจุอยู่ปริมาตร 2 มิลลิตร ตั้งเขย่าตลอดการทดลองที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการสุ่มแบบแทนที่ และนำสารละลายบัฟเฟอร์ภายนอกไปวิเคราะห์หาปริมาณยาด็อกโซรูบิซินที่ถูกปลดปล่อยออกมาในระยะเวลาต่าง ๆ ด้วยเครื่อง UV-vis spectroscope ความยาวคลื่นเท่ากับ 480.96 นาโนเมตร (ทำการทดลองเช่นเดียวกันนี้ แต่เปลี่ยนสารละลายบัฟเฟอร์เป็นพีเอช 7.4) และคำนวณหาปริมาณยาที่ถูกปลดปล่อยออกมาที่ระยะเวลาต่าง ๆ ได้จาก สมการ

$$\text{ยาที่ปลดปล่อย (\%)} = \frac{\text{ปริมาณยาที่ถูกปลดปล่อย ณ เวลานั้น}}{\text{ปริมาณยาเริ่มต้น}} \times 100$$

3.2.7 การศึกษาสมบัติทางกายภาพ และทางเคมีของนาโนเจล

3.2.7.1 การวิเคราะห์ขนาดอนุภาค การกระจายตัว และศักย์ซีต้า

นำสารละลายตัวอย่าง IPCs , NGs และ NGs·DOX ที่ต้องการวิเคราะห์มาเจือจางลง 0.5 เท่า จากนั้นปิเปตสารละลายที่เจือจางลง disposable zeta cell ในปริมาตร 750 ไมโครลิตร ทำการวิเคราะห์ขนาดอนุภาค การกระจายตัว และค่าศักย์ซีต้า ด้วยเครื่อง zeta sizer โดยอาศัยหลักการ Dynamic Light Scattering (DLS) ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำต่อ 1 ตัวอย่าง

3.2.7.2 การศึกษาโครงสร้างทางเคมีของพอลิเมอร์

นำผงตัวอย่าง IPCs , NGs และ NGs·DOX มาวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันทางเคมี ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectroscope (FTIR) ของบริษัท Bruker รุ่น Tensor27

โหมด ATR เลขคลื่น (wave number) อยู่ระหว่างช่วง 650-4000 ต่อเซนติเมตร ความละเอียด 4 ต่อเซนติเมตร ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์บันทึก และแปรผลผ่านโปรแกรม OPUS

3.2.7.3 การวิเคราะห์ลักษณะอนุภาคของนาโนเจล

นำผงตัวอย่าง IPCs , NGs และ NGs·DOX มากระจายตัวในน้ำปราศจากเชื้อ และเขย่าด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicate) จากนั้นนำตัวอย่างที่มีการกระจายตัวดีแล้ว มาหยดลงบนแผ่นรองรับตัวอย่าง (grid) และปล่อยให้แห้ง กำจัดความชื้นโดยใส่ desiccator และนำมาวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope, TEM) (เพ็ญนภา มุทิตามงคล, 2558)

3.2.8 การทดสอบอัตราการตายของเซลล์มะเร็ง

เป็นการศึกษาแบบ *in vitro* ด้วยวิธี MTT assay เปรียบเทียบจากอัตราการอยู่รอดของเซลล์ HepG2 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ (human hepatocellular carcinoma cell line) ทำการเพาะเลี้ยงใน T25 flask ด้วย Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ที่มี 10% fetal bovine serum (FBS) และ 1% penicillin/streptomycin เป็นส่วนประกอบ ในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ที่สภาวะ 37 องศาเซลเซียส และ 5% CO₂

การ subculture หรือ passage cell สามารถทำได้โดยนำเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะข้างต้น มาทำการถ่ายอาหารและล้าง monolayer ออก ด้วย buffer phosphate saline (PBS) ที่ปราศจากแคลเซียมและแมกนีเซียม จากนั้นทำการถ่าย PBS ออก และเติมสารละลาย trypsin EDTA บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้เซลล์ลอยตัว และเติม complete medium ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เพื่อ inactivated trypsin นำส่วนผสมทั้งหมดใส่หลอด centrifuge และปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายสารละลายออก ก่อนเติม complete medium อีกครั้ง และทำให้เซลล์กระจายตัวด้วยการใช้ปิเปตดูดเข้าออก เติมเซลล์ลงใน T75 flask และบ่มเลี้ยงต่อไปในสภาวะ 5% CO₂ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การทดสอบ MTT assay นำเซลล์มาปรับให้มีความหนาแน่น 10,000 เซลล์ต่อ มิลลิลิตร (Luan, Zhu, Wu, & Wang, 2017) และเติมเซลล์ลงใน 96-well plate บ่มเลี้ยงไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเติมสารตัวอย่าง (ยาต้านมะเร็งดอกโศภิขิน นาโนเจลเปล่า และยาต้านมะเร็งดอกโศภิขินที่บรรจุในรูปแบบนาโนเจล) ที่ความเข้มข้นระหว่าง 1-500 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร บ่มเลี้ยงต่ออีกเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂ จากนั้นนำมาถ่ายอาหารออก และเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 3 - 4 ชั่วโมง ถ่ายสารละลาย MTT ออกแล้วเติมสารละลาย

ไอโซโพรพานอล ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าในที่มืด เพื่อละลาย formazan crystals ก่อนนำมาวิเคราะห์ค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader เพื่อนำข้อมูลมาคำนวณหาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์จากสูตร (C. Yang et al., 2015)

$$\% \text{ cell viability} = (\text{OD}_{\text{sample}} / \text{OD}_{\text{control}}) \times 100$$

โดยที่ $\text{OD}_{\text{sample}}$ คือค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่มีการใส่ตัวอย่าง (ยาต้านมะเร็ง ดอกโศภิณี นาโนเจลเปล่า และยาต้านมะเร็งดอกโศภิณีที่บรรจุในรูปแบบนาโนเจล) และ $\text{OD}_{\text{control}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่มีเพียงอาหาร ไม่มีการใส่สารตัวอย่าง

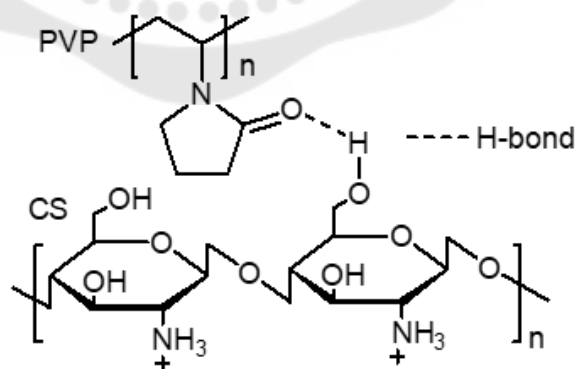


บทที่ 4

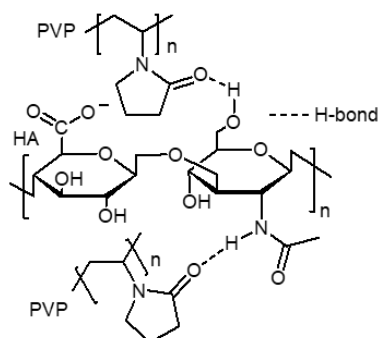
ผลและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 ชนิดของพอลิเมอร์ที่มีผลต่อการเกิดนาโนเจล

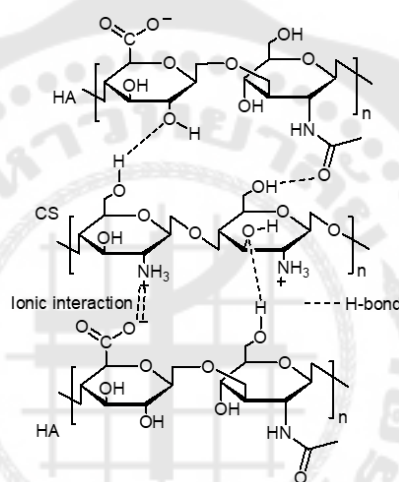
นาโนเจล คือ ไฮโดรเจลที่มีขนาดเล็กอยู่ในระดับนาโนเมตร เกิดจากการเชื่อมโยงข้ามระหว่างสายโซ่ของพอลิเมอร์ (Hamidi, Azadi, & Rafiei, 2008; Sultana et al., 2013) ซึ่งการเตรียมนาโนเจลสามารถทำได้หลายวิธี วิธีหนึ่งที่สามารถทำให้เกิดนาโนเจล ได้แก่ การเตรียมนาโนเจลด้วยสารประกอบพอลิเมอร์เชิงซ้อนร่วมกับกระบวนการฉายรังสี พอลิเมอร์ที่มีรายงานการใช้เตรียมนาโนเจลมีหลายชนิด สำหรับงานวิจัยนี้เลือกศึกษา CS PVP และ HA ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่นิยมนำมาใช้ทางเภสัชกรรม ไม่มีความเป็นพิษ และสามารถเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อในร่างกาย (Awasthi et al., 2018; Choi et al., 2010; Debele et al., 2016) นอกจากนี้ยังมีรายงานการพัฒนา นาโนเจล CS เป็นระบบนำส่งที่ตอบสนองต่อค่าความเป็นกรดต่าง (Hu et al., 2002; Maite Arteché Pujana, Leyre Pérez-Álvarez, Luis Carlos Cesteros Iturbe, & Issa Katime, 2014) และนาโนเจลจาก HA เป็นระบบนำส่งไปยังอวัยวะเป้าหมายจากการจับกับตัวรับบริเวณเซลล์มะเร็งที่มีเครื่องหมาย CD44 (Basakran, 2015; Kumar et al., 2015) ด้วยเหตุนี้จึงทำการศึกษาการเกิดนาโนเจลจากการจับคู่ของพอลิเมอร์ ดังนี้ CSLMW-PVP, CSHMW-PVP, HA-PVP และ HA-CSHMW การเหนี่ยวนำให้เกิดการเชื่อมโยงข้ามระหว่างพอลิเมอร์ทั้ง 4 ชนิด แสดงดังสูตรโครงสร้างดังภาพประกอบ 6-8



ภาพประกอบ 6 สูตรโครงสร้างทางเคมีที่เกิดจากการเชื่อมโยงข้ามของ CS-PVP



ภาพประกอบ 7 สูตรโครงสร้างทางเคมีที่เกิดจากการเชื่อมโยงข้ามของ HA-PVP

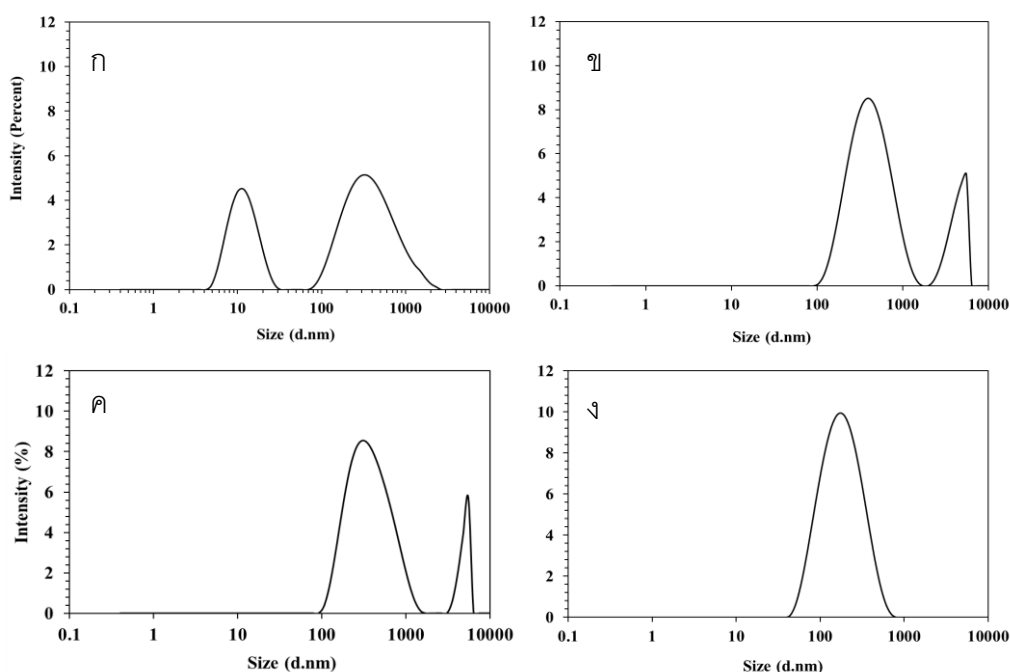


ภาพประกอบ 8 สูตรโครงสร้างทางเคมีที่เกิดจากการเชื่อมโยงข้ามของ HA-CSHMW

จากการศึกษาการเกิดนาโนเจลโดยใช้สารประกอบเชิงซ้อนร่วมกับกระบวนการฉายรังสีที่ 1 กิโลเกรย์ พบว่าสารประกอบเชิงซ้อนของ CSLMW-PVP ไม่สามารถเกิดเป็นนาโนเจลได้อย่างสมบูรณ์ พบอนุภาคที่มีขนาดต่างกันสองช่วง เป็นฟิคปรากฏขึ้น 2 ฟิคอย่างเด่นชัด ดังภาพประกอบ 8ก บอกถึงการทำปฏิกิริยากันอย่างไม่สมบูรณ์ ซึ่งฟิคที่ปรากฏแสดงถึงขนาดอนุภาคของสารละลาย PVP (ประมาณ 18 นาโนเมตร) และสารละลาย CSLMW (ประมาณ 340 นาโนเมตร) ตามลำดับ ในขณะที่ CSHMW-PVP และ HA-PVP สามารถเกิดนาโนเจลจากการใช้รังสีแกมมาเหนี่ยวนำได้ ดังที่ปรากฏฟิคในช่วงขนาดอนุภาค 4000 นาโนเมตร ดังภาพประกอบ 9 ข-ค ซึ่งแสดงถึงการเกาะกลุ่มรวมกันของอนุภาค ทำให้อนุภาคมีขนาดใหญ่ และขนาดอนุภาคตลอดจนค่าการกระจายตัวของอนุภาคนาโนเจลที่ได้มีค่าสูง โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 436.83 ± 10.97 และ 290.30 ± 1.27 นาโนเมตร ค่าการกระจายตัว (PDI) ของอนุภาคนาโนเจล CSHMW-PVP และ HA-PVP เท่ากับ 0.406 ± 0.03 และ 0.573 ± 0.04 ตามลำดับ อนุภาค

นาโนเจลที่ต้องการควรมีขนาดอยู่ในช่วง 20-200 นาโนเมตร เพื่อหลีกเลี่ยงการตรวจจับและกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายด้วยกระบวนการฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) ทำให้มีความสามารถในการผ่านเข้าเซลล์ได้ดี และสามารถต้านการกรองสารพิษโดย blood brain barrier (BBB) ได้ (Sultana et al., 2013)

HA-CSHMW ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาสามารถเกิดเป็นนาโนเจลได้อย่างสมบูรณ์ โดยมีขนาดอนุภาค และค่าการกระจายตัวเฉลี่ย 155.87 ± 0.84 นาโนเมตร และ 0.230 ± 0.01 ตามลำดับ เส้นสเปกตรัมจากการวิเคราะห์ขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง zetasizer เป็นพิกัดเดียวของนาโนเจลที่เกิดขึ้น ดังแสดงภาพประกอบ 9 โดย HA และ CSHMW สามารถเกิดปฏิกิริยาระหว่างกันได้โดยอาศัยแรงดึงดูดของไอออน (ionic interaction) ระหว่าง $(-NH_3^+)$ ไอออนบวกของไคโตซาน และ $(-COO^-)$ ไอออนลบของไฮดรอกซีอะซิเตด ดังนั้นจากการศึกษาชนิดของพอลิเมอร์ที่สามารถนำมาใช้ในการเตรียมนาโนเจล โดยพิจารณาจากขนาดอนุภาค การกระจายตัวของอนุภาค และเส้นสเปกตรัมจากการวิเคราะห์ขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง zetasizer ของพอลิเมอร์ทั้ง 4 ชนิด พบว่า HA-CSHMW คือพอลิเมอร์ที่มีความเหมาะสมที่สุด ที่สามารถใช้เตรียมนาโนเจลด้วยเทคนิคสารประกอบพอลิเมอร์เชิงซ้อนร่วมกับกระบวนการฉายรังสีแกมมาได้



ภาพประกอบ 9 เส้นสเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์ขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง zetasizer ของ

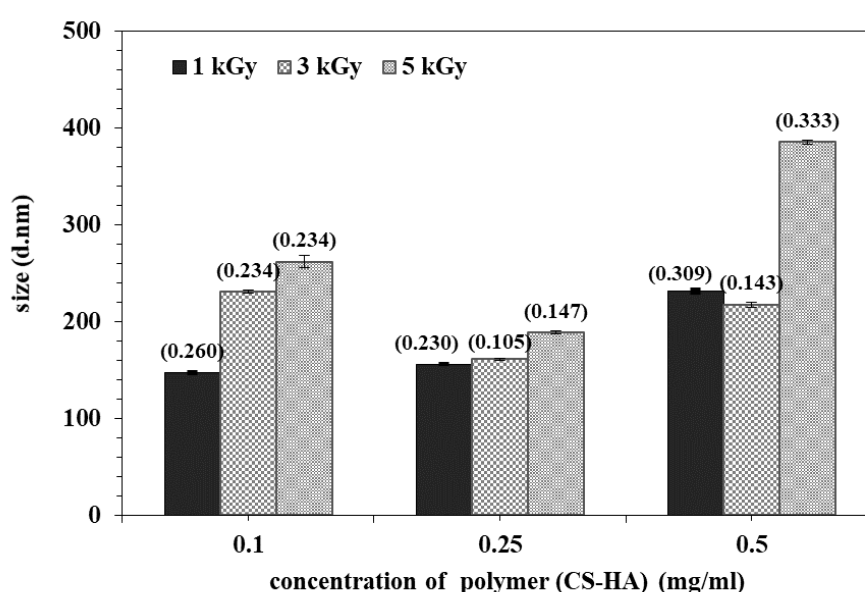
อนุภาคนาโนเจลที่เตรียมจากสารประกอบพอลิเมอร์เชิงซ้อนของ CSLMW-PVP (ก)

CSHMW-PVP (ข) HA-PVP(ค) และ HA-CSHMW (ง) ตามลำดับ

4.2 ปัจจัยที่ส่งผลต่อขนาดอนุภาคของนาโนเจล

จากการศึกษาความเข้มข้นของพอลิเมอร์ HA และ CSHMW ในช่วงระหว่าง 0.10 – 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า เมื่อความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์เพิ่มขึ้น ค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายไม่เปลี่ยนแปลง แต่ปริมาณสารในระบบมีเพิ่มขึ้น ทำให้โอกาสที่อนุภาคจะเกิดการรวมตัวกันสูงขึ้น การเกิดนาโนเจลจึงเกิดเป็นอนุภาคที่มีขนาดใหญ่กว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ (Saharan, Bhatt, Saharan, & Bahmani, 2015) ดังภาพประกอบ 10

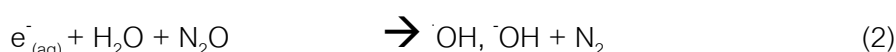
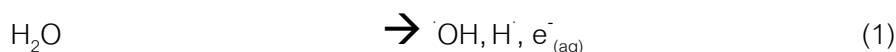
นอกจากนี้รังสีแกมมาก็ส่งผลถึงขนาดอนุภาคของนาโนเจลเช่นกัน โดยรังสีจะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระบนสายโซ่ของพอลิเมอร์ หากจำนวนอนุมูลอิสระบนสายโซ่ของพอลิเมอร์มาก โอกาสที่จะเกิดการเชื่อมโยงข้ามระหว่างโมเลกุล (intermolecular crosslinking) จะมากกว่าการเชื่อมโยงข้ามภายในโมเลกุล (intramolecular crosslinking) (Guvén, Isik, & Barsbay, 2010) ทำให้อนุภาคของนาโนเจลมีขนาดใหญ่ขึ้น จากการศึกษาการเตรียมนาโนเจลที่ปริมาณรังสี 1-5 กิโลเกรย์ พบว่า เมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น ขนาดอนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น ดังภาพประกอบ 10



ภาพประกอบ 10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารประกอบพอลิเมอร์เชิงซ้อน HA-CSHMW ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.1 - 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และปริมาณรังสีแกมมาที่ 1 (■) 3 (▨) และ 5 กิโลเกรย์ (▩) ที่มีผลต่อขนาดอนุภาคของนาโนเจล

โดยในวงเล็บแสดงถึงค่า PDI

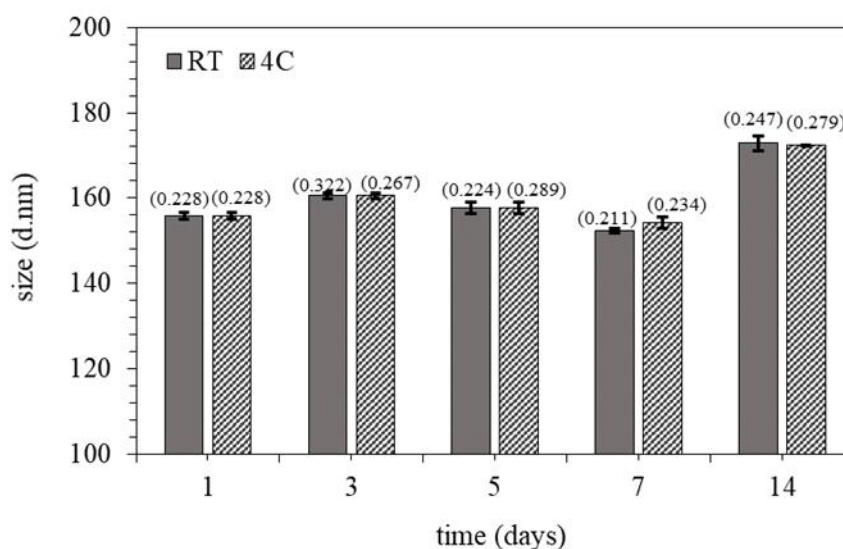
เพราะฉะนั้นการเตรียมอนุภาคให้มีขนาดอยู่ในระดับนาโนเมตรจำเป็นต้องใช้สารละลายที่มีความเจือจางต่ำ และใช้น้ำเป็นตัวกลางสำหรับการละลาย เมื่อรังสีเคลื่อนที่ผ่านน้ำซึ่งเป็นตัวกลาง ทำให้น้ำเกิดการแตกตัวดังกล่าต่อไปนี้ (Kadlubowski, 2014)



$\cdot\text{OH}$ และ $\text{H}^{\cdot}$ ซึ่งเป็นผลผลิตจากกลไกที่ 1 จะทำหน้าที่เป็นตัวริเริ่มการเกิดปฏิกิริยา และสามารถเพิ่ม $\cdot\text{OH}$ โดยควบคุมปริมาณ $\text{e}^{-}_{(\text{aq})}$ ด้วยแก๊สไนตรัสออกไซด์ ดังกลไกที่ 2 $\cdot\text{OH}$ และ $\text{H}^{\cdot}$ จะดึงอะตอมของไฮโดรเจน (H-abstraction) บนโครงสร้างของ macromolecule ดังกลไกที่ 3 เกิดเป็น macroradical ที่มีความว่องไวในการทำปฏิกิริยา สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเชื่อมโยงข้ามกับโมเลกุลใกล้เคียงเกิดเป็นนาโนเจลในที่สุด (Ghaffarlou et al., 2018) โดยจากการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเตรียมนาโนเจลจากสารประกอบพอลิเมอร์เชิงซ้อนของ HA และ CSHMW คือที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ปริมาณรังสีแกมมา 1 กิโลเกรย์ ให้ขนาดอนุภาคเฉลี่ยเท่ากับ 155.87 ± 0.84 นาโนเมตร

4.3 เสถียรภาพของนาโนเจล

การศึกษานาโนเจลของ HA-CSHMW ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขนาดอนุภาคเริ่มต้นเท่ากับ 155.87 ± 0.84 นาโนเมตร พบว่านาโนเจลของ HA-CSHMW สามารถคงเสถียรภาพได้นาน 1 สัปดาห์ โดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาคที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับขนาดของอนุภาคที่เวลาเริ่มต้น โดยเก็บตัวอย่างนาโนเจลของ HA-CSHMW ในสองสภาวะ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ขนาดอนุภาคของนาโนเจล (ภาพประกอบ 11) ค่าศักย์ซีต้า (ตาราง 1) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) เมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน พบว่าขนาดอนุภาคนาโนเจลใหญ่ขึ้น โดยที่การกระจายตัวของอนุภาค และศักย์ซีต้าคงเดิม ซึ่งเกิดจากการพองตัวของนาโนเจล



ภาพประกอบ 11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดอนุภาคนาโนเจล HA-CSHMW ที่ระยะเวลาต่างๆ ใน 2 สภาวะ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง (■) และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (▨)

ตาราง 2 แสดงค่าศักย์ไฟฟ้าของตัวอย่างนาโนเจล HA-CSHMW ที่ระยะเวลาต่างๆ ใน 2 สภาวะ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

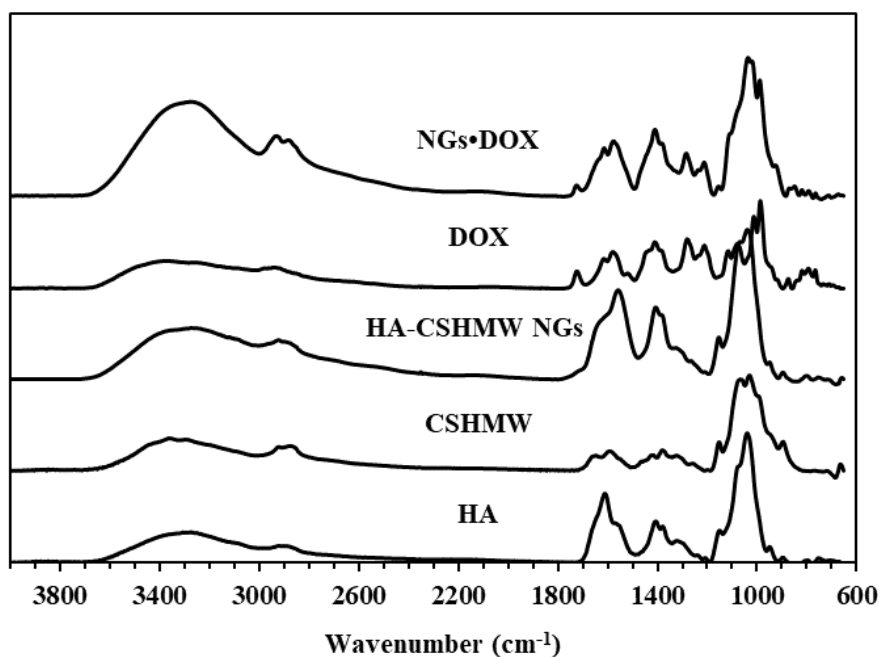
สภาวะการเก็บ	ค่าศักย์ไฟฟ้า (มิลลิโวลต์, mV)		
	1 วัน	7 วัน	14 วัน
อุณหภูมิห้อง	26.07 ± 0.50	25.15 ± 1.06	25.97 ± 1.10
อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	26.07 ± 0.50	23.27 ± 1.27	25.40 ± 1.14

ค่าศักย์ไฟฟ้าเป็นอีกค่าที่บ่งถึงเสถียรภาพของนาโนเจล หากค่าศักย์ไฟฟ้ามากขึ้น (ค่าบวก) หรือน้อยลง (ค่าลบ) แสดงว่าอนุภาคมีค่าประจุสูงขึ้นสามารถเกิดแรงผลักทางไฟฟ้าระหว่างกัน โอกาสที่อนุภาคจะเกาะกลุ่มรวมกันจึงเป็นไปได้ยาก โดยค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมของนาโนเจลควรมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ ± 30 มิลลิโวลต์ (Atta et al., 2016) จากการศึกษาค่าศักย์ไฟฟ้าของนาโนเจล HA-CSHMW พบว่ามีค่าประมาณ +25 มิลลิโวลต์ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่เหมาะสม จากขนาดอนุภาคและค่าศักย์ไฟฟ้าข้างต้นได้นาโนเจล HA-CSHMW ที่เตรียมได้มีเสถียรภาพอยู่ในเกณฑ์ดี และสามารถคงเสถียรภาพได้นาน 1 สัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.4 สมบัติของนาโนเจล HA-CSHMW

4.4.1 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

จากการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันทางเคมีด้วยเทคนิค FTIR โดยแสดงเส้นสเปกตรัมของตัวอย่างพอลิเมอร์ HA CSHMW นาโนเจลของ HA-CSHMW ยาต้านมะเร็ง DOX และนาโนเจลที่บรรจุยา DOX ดังภาพประกอบ 12 ศึกษาเส้นสเปกตรัมของ HA-CSHMW นาโนเจล เปรียบเทียบกับ HA และ CSHMW พบว่า เส้นสเปกตรัมของ HA-CSHMW พบพีกแถบกว้างในช่วงเลขคลื่น 1700 ถึง 1460 cm^{-1} ซึ่งเกิดการคาบเกี่ยวกันระหว่างกลุ่มคาร์บอนิล และ amide vibration ของ HA และ CSHMW นอกจากนี้พบพีกที่เลขคลื่น 1612 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ฟังก์ชันของกลุ่มคาร์บอนิล ($-\text{COO}^-$) ของ HA ขยับไปทางซ้ายเล็กน้อย และพบพีกที่เลขคลื่น 1556 cm^{-1} สูงขึ้น แสดงถึงการเพิ่มจำนวนของกลุ่มเอไมด์ II บนโครงสร้าง บ่งชี้ได้ว่าโครงสร้างของ HA-CSHMW นาโนเจลสามารถเกิดการเชื่อมโยงข้ามโดยใช้รังสีแกมมาเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างหมู่ ($-\text{NH}_3^+$) ของ CSHMW และหมู่ ($-\text{COO}^-$) ของ HA (Coimbra et al., 2011)

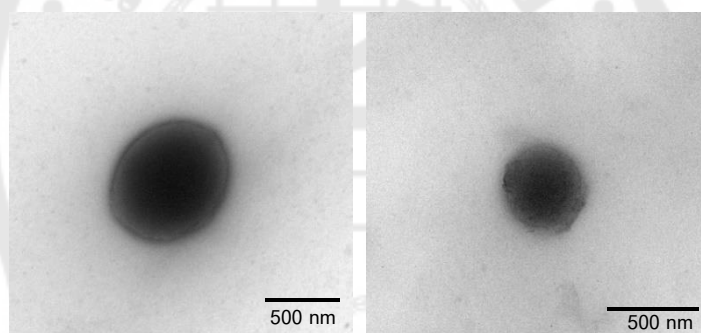


ภาพประกอบ 12 สเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันทางเคมีของ HA, CSHMW, HA-CSHMW NGs, DOX และ NGs•DOX ด้วยเครื่อง FTIR

ศึกษาเส้นสเปกตรัมของ NGs•DOX โดยพิจารณาเทียบเส้นสเปกตรัมของ HA-CSHMW นาโนเจล และ DOX พบว่าช่วงเลขคลื่น $3600-3000\text{ cm}^{-1}$ แสดงถึงหมู่ฟังก์ชัน O-H stretching vibration คาบเกี่ยวกับ -NH_2 stretching และช่วงเลขคลื่น $3000-2800\text{ cm}^{-1}$ แสดงถึง C-H stretching vibration สูงขึ้น แสดงถึงการมีอยู่ของหมู่ฟังก์ชันดังกล่าวจากโครงสร้างของพอลิเมอร์ HA-CSHMW และ DOX ที่เกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดการเชื่อมโยงข้ามของพอลิเมอร์เป็นนาโนเจล และการมีอยู่ของ DOX (Coimbra et al., 2011)

4.4.2 Transmission electron microscope (TEM)

ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน แสดงให้เห็นลักษณะของอนุภาค HA-CSHMW NGs ที่มีลักษณะเป็นทรงกลม ดังภาพประกอบ 13ก และเมื่อทำการเติม DOX เพื่อให้เกิดการกักเก็บภายใน NGs พบว่าอนุภาคยังคงมีลักษณะเป็นทรงกลม ดังภาพประกอบ 13ข และเกิดเป็นนาโนเจลได้เช่นเดียวกัน



ภาพประกอบ 13 ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน TEM ของ HA-CSHMW NGs และ NGs•DOX ที่ผ่านการฉายรังสี 1 กิโลเกรย์

4.4.3 ประสิทธิภาพการกักเก็บยาต้านมะเร็งดีออกโซรูบิซิน (Encapsulation efficiency)

จากการศึกษาผลอัตราส่วนระหว่างพอลิเมอร์ต่อการกักเก็บยาต้านมะเร็ง DOX ดังแสดงตารางที่ 2 พบว่า ค่าพีเอชของแต่ละสูตรมีค่าประมาณ 3.30 ประสิทธิภาพการกักเก็บยาต้านมะเร็ง DOX มีค่าสูงสุดเท่ากับร้อยละ 58.11 ± 0.40 และปริมาณของยา DOX ที่บรรจุอยู่ในนาโนเจลสูงสุดเท่ากับร้อยละ 73.78 ± 0.51 ที่อัตราส่วนระหว่างพอลิเมอร์ต่อยา DOX เท่ากับ 1:2 กล่าวได้ว่าเมื่อปริมาณของยาเพิ่มขึ้น ยาสามารถที่จะจับกับอนุภาคของนาโนเจล และถูกกักเก็บ

อยู่ในนาโนเจลได้มากขึ้น เพราะโครงสร้างของยา DOX เป็นประจุเป็นบวก เมื่อผสมรวมกับ HA ซึ่งเป็นประจุลบ จะสามารถสร้างพันธะระหว่างกันด้วยแรงไอออน (ionic interaction) การที่ปริมาณของยา DOX เพิ่มขึ้นจึงสามารถสร้างพันธะไอออนิกกับ HA ได้เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ประสิทธิภาพการกักเก็บยาสูงขึ้น (Deng et al., 2014)

ตาราง 2 แสดงค่าขนาดอนุภาค ค่าศักย์ซีต้า ค่าพีเอช ประสิทธิภาพการกักเก็บยา DOX และปริมาณของยา DOX ที่กักเก็บอยู่ในนาโนเจลของตัวอย่างนาโนเจลเปล่า และนาโนเจลที่บรรจุ DOX ในอัตราส่วนต่างๆ

polymer : doxorubicin	Particle size (nm)	Zeta potential (mV)	Encapsulation (%)	Drug loading (%)
0.25 mg/ml (nanogels)	154.07 ± 0.75 (0.070 ± 0.05)	26.07 ± 0.50	-	-
1:0.5	163.47 ± 3.53 (0.200 ± 0.01)	36.20 ± 0.36	34.84 ± 0.13	6.39 ± 0.05
1:1	159.40 ± 2.15 (0.230 ± 0.01)	30.20 ± 0.30	49.48 ± 2.09	20.91 ± 2.04
1:2	140.97 ± 0.640 (0.210 ± 0.00)	27.43 ± 0.67	58.11 ± 0.40	51.64 ± 0.36

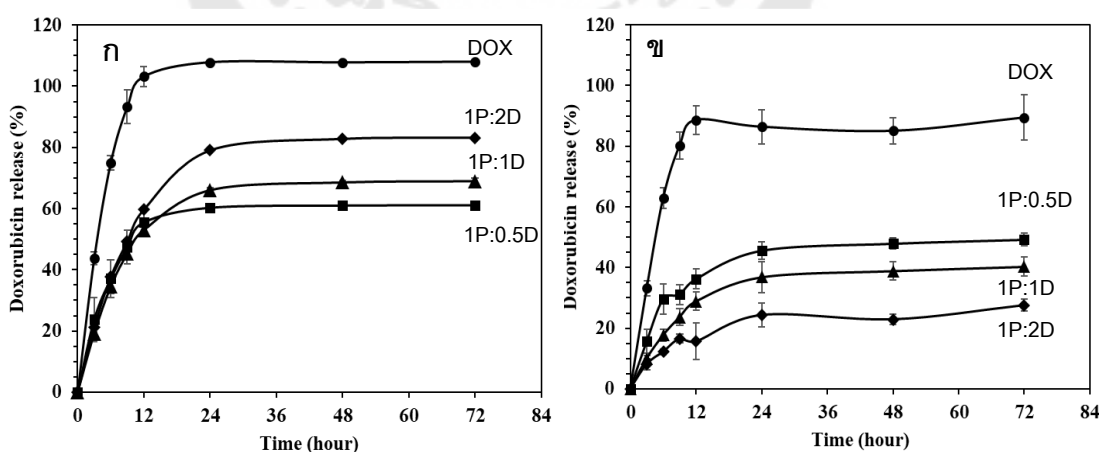
4.4.4 ประสิทธิภาพการปลดปล่อยยาด้านมะเร็งดีออกโซรูบิซิน

จากการทดลองแบบ in vitro ในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 และ 7.4 ซึ่งเป็นการจำลองพีเอชบริเวณ endosome ของเซลล์มะเร็ง และระบบเลือด ตามลำดับ ผลพบว่า ยาด้านมะเร็ง DOX สามารถปลดปล่อยยาได้สูงที่พีเอช 4.5 และ 7.4 ภายในเวลา 12 ชั่วโมง ดังภาพประกอบ 14 ขณะที่การนำส่งยาในรูปแบบนาโนเจล ที่อัตราส่วนระหว่างพอลิเมอร์ต่อยา DOX เท่ากับ 1:2 สามารถควบคุมการปลดปล่อยยาได้ดีที่สุด โดยสามารถปลดปล่อย DOX ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอช 4.5 ได้ดีกว่าพีเอช 7.4 เนื่องจากการตอบสนองต่อค่าพีเอชของ CS ซึ่งมีค่า pKa เท่ากับ 6.5 เมื่ออยู่ในสารละลายมีค่าพีเอชต่ำกว่า $-NH_2$ จะรับโปรตรอนกลายเป็น $-NH_3^+$ ซึ่งมีประจุบวก (Jayakumar, Nair, Rejinold, Maya, & Nair, 2012) ยา DOX ในโครงสร้างมีประจุบวกเช่นกัน ทำให้เกิดแรงผลักทางประจุ ตัวยาจึงปลดปล่อยออกมาได้มากกว่า นาโนเจลที่

มี DOX บรรจุอยู่ภายในมากจึงมีประสิทธิภาพการปลดปล่อยสูงกว่านาโนเจลที่มี DOX บรรจุอยู่น้อย ดังภาพประกอบ 12ก

ขณะที่ประสิทธิภาพการปลดปล่อยยา DOX ในสารละลายที่พีเอช 7.4 ให้ผลตรงกันข้าม ดังภาพประกอบ 12ข พบว่าที่อัตราส่วนระหว่างพอลิเมอร์ต่อยาเท่ากับ 1:2 (1P:2D) ซึ่งมีปริมาณยากักเก็บอยู่ภายในนาโนเจลมากที่สุด มีประสิทธิภาพการปลดปล่อยยาน้อยที่สุด อธิบายด้วยขนาดอนุภาค และศักย์ซีต้าของนาโนเจล ที่อัตราส่วนระหว่างพอลิเมอร์ต่อยา 1:2 มีขนาดอนุภาคเล็กที่สุด บวกถึงการเชื่อมโยงข้ามที่หนาแน่นทำให้ยาที่อยู่ภายในออกมาได้ยาก ประกอบกับศักย์ซีต้าที่แสดงค่าเป็นบวกน้อยที่สุด บ่งชี้ถึงการที่ยา DOX ซึ่งมีประจุบวกฝังตัวอยู่ในโครงสร้างของนาโนเจลมากกว่าที่จะเกาะอยู่ที่ผิวของนาโนเจลเมื่อเปรียบเทียบกับศักย์ซีต้าของนาโนเจลที่อัตราส่วนระหว่างพอลิเมอร์ต่อยาเท่ากับ 1:0.5 ซึ่งมีขนาดอนุภาคใหญ่ที่สุด และศักย์ซีต้าสูงที่สุด บ่งชี้ว่ายา DOX มีโอกาสเกาะอยู่บริเวณผิวมากกว่าที่จะฝังตัวอยู่ด้านในนาโนเจล ดังนั้นที่อัตราส่วนระหว่างพอลิเมอร์ต่อยาเท่ากับ 1:0.5 จึงสามารถปลดปล่อยออกจากนาโนเจลได้ง่ายกว่า ทำให้ปริมาณยาที่ถูกปลดปล่อยออกจากนาโนเจลในสารละลายที่พีเอช 7.4 ให้ผลตรงกันข้าม

จากการศึกษาประสิทธิภาพการปลดปล่อยยาในสองสภาวะนี้ ชี้ให้เห็นว่าระบบนำส่งยา DOX ของนาโนเจล HA-CSHMW สามารถควบคุมการปลดปล่อยยาโดยอาศัยความเป็นกรดต่างเป็นตัวกระตุ้น และสามารถปลดปล่อยยาในสารละลายที่พีเอช 4.5 ซึ่งเป็นพีเอชบริเวณเซลล์มะเร็งได้ดี และช่วยชะลอการปลดปล่อยยา DOX ที่พีเอช 7.4 ซึ่งเป็นระบบหมุนเวียนเลือดได้



ภาพประกอบ 14 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการปลดปล่อยยา DOX นาโนเจลที่บรรจุยา DOX อัตราส่วนระหว่างพอลิเมอร์ต่อ DOX 1:1 1:2 และ 2:1 ในสารละลายบัฟเฟอร์ค่าพีเอช 4.5 (ก)

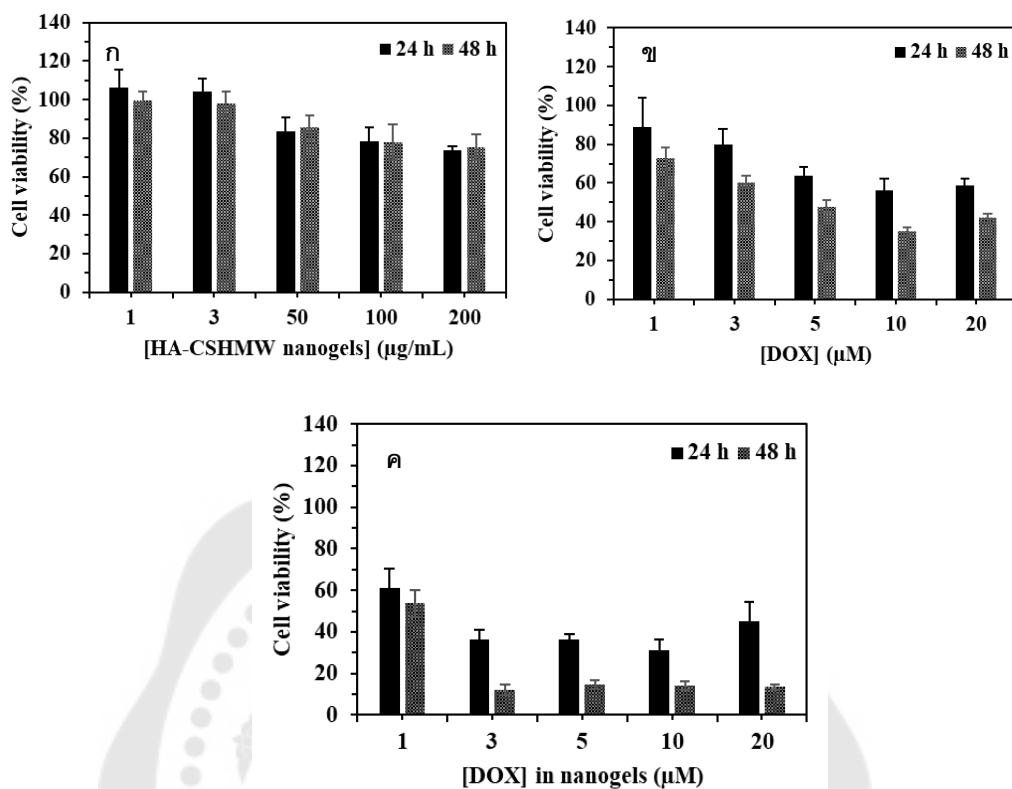
และสารละลายบัฟเฟอร์ค่าพีเอช 7.4 (ข)

4.5 ผลของนาโนเจล HA-CSHMW ต่อการตายของเซลล์ HepG2

ทำการศึกษาความเป็นพิษของ DOX และนาโนเจลเปล่าต่อเซลล์ HepG2 ซึ่งเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดเซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ที่ระยะเวลาการบ่ม 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อเลือกช่วงความเข้มข้นของ DOX และนาโนเจลเปล่าที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ HepG2 ภายหลังจากได้รับยา DOX ในรูปแบบนาโนเจล (NGs • DOX) จากภาพประกอบ 15ก แสดงถึงการศึกษาความเป็นพิษของนาโนเจลเปล่า (HA-CSHMW NGs) ในช่วงความเข้มข้น 1 – 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่านาโนเจลมีความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 ต่ำ เนื่องจากร้อยละความอยู่รอดของเซลล์มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 70 เมื่อความเข้มข้นของยาด้านมะเร็ง DOX เพิ่มขึ้นทำให้อัตราการอยู่รอดของเซลล์ HepG2 ลดลง

แต่อย่างไรก็ตามหากเลือกศึกษาการอยู่รอดของเซลล์ HepG2 โดยพิจารณาจากค่า IC_{50} ของ DOX ที่มีเท่ากับ 5.61 ไมโครโมลาร์ จะใช้ตัวอย่าง HA-CSHMW•DOX ที่มีความเข้มข้นของนาโนเจล HA-CSHMW เพียง 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจากภาพประกอบ 15ก พบว่าในช่วงความเข้มข้นของนาโนเจล HA-CSHMW ดังกล่าวมีอัตราการอยู่รอดของเซลล์ HepG2 ร้อยละ 100 ซึ่งบ่งบอกว่านาโนเจลเปล่าไม่ส่งผลต่อการตายของเซลล์ HepG2

ผลการศึกษาการอยู่รอดของเซลล์ HepG2 เมื่อเปรียบเทียบการใช้ตัวอย่าง DOX และ NGs • DOX พบว่าเมื่อความเข้มข้นของตัวอย่างเพิ่มขึ้นร้อยละความอยู่รอดของเซลล์ HepG2 ลดลง โดยร้อยละความอยู่รอดของเซลล์ในตัวอย่าง NGs • DOX มีค่าต่ำกว่า DOX เนื่องจากเซลล์ HepG2 ซึ่งเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดเซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ มีตัวรับ CD44 ที่สามารถจับกับลิแกนด์ของ HA ได้ ปริมาณของยา DOX ที่บรรจุอยู่ในรูปแบบนาโนเจล HA-CSHMW จึงสามารถนำเข้าสู่เซลล์ได้มากกว่า (Kumar et al., 2015) เมื่อเปรียบเทียบค่า IC_{50} ที่ระยะเวลาบ่ม 24 ชั่วโมงของ DOX และ HA-CSHMW•DOX พบว่ามีค่าเท่ากับ 24.32 และ 1.35 μM ตามลำดับ และระยะเวลาการบ่มที่ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 5.61 และ 0.98 μM แสดงให้เห็นว่าหากต้องการยับยั้งการอยู่รอดของเซลล์ HepG2 เท่ากับร้อยละ 50 จะใช้ HA-CSHMW•DOX ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 18 เท่าที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง กล่าวได้ว่านาโนเจลที่เตรียมได้จากสารประกอบเชิงซ้อน HA-CSHMW โดยใช้รังสีแกมมาเหนี่ยวนำให้เกิดการเชื่อมโยงข้าม มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการอยู่รอดของเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดเซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ได้ดีกว่ายา DOX ในรูปแบบเดิม



ภาพประกอบ 15 กราฟแสดงร้อยละความอยู่รอดของเซลล์ HepG2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของยาต้านมะเร็ง DOX (ก) HA-CSHMW NGs (ข) และ NGs • DOX (ค) ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การพัฒนานาโนเจลโดยใช้รังสีแกมมาเหนี่ยวนำให้เกิดการเชื่อมโยงข้ามของสารประกอบพอลิเมอร์เชิงซ้อน พบว่าชนิดของพอลิเมอร์ ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ และปริมาณรังสีแกมมา ส่งผลต่อการเกิดนาโนเจล ขนาดของนาโนเจล และเสถียรภาพของนาโนเจล ซึ่งสารประกอบเชิงซ้อนของ HA-CSHMW สามารถเกิดเป็นนาโนเจลที่มีขนาดอนุภาคเหมาะสมนาโนเจลของ HA-CSHMW เกิดจากการใช้รังสีเหนี่ยวนำให้เกิดการเชื่อมโยงข้ามระหว่าง HA และ CSHMW เมื่อความเข้มข้นของพอลิเมอร์ และปริมาณรังสีแกมมาที่ใช้สูงขึ้น ทำให้อนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น โดยความเข้มข้น และปริมาณรังสีที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมนาโนเจลจาก HA-CSHMW คือ ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณรังสีแกมมา 1 กิโลเกรย์ เกิดนาโนเจลที่สามารถคงเสถียรภาพนาน 1 สัปดาห์

ประสิทธิภาพการกักเก็บยาดีออกไซรูบิซินของนาโนเจลจาก HA-CSHMW ขึ้นอยู่กับสัดส่วนของพอลิเมอร์และยา เมื่อยามีปริมาณมากขึ้นประสิทธิภาพในการกักเก็บยาสูงขึ้น โดยประสิทธิภาพการกักเก็บยาสูงสุดที่อัตราส่วนระหว่างพอลิเมอร์ต่อยาดีออกไซรูบิซิน เท่ากับ 1:2 และสามารถควบคุมการปลดปล่อยยาโดยตอบสนองต่อค่าพีเอช สามารถปลดปล่อยยาในตัวกลางสารละลายสภาวะพีเอช 4.5 ซึ่งเป็นค่าความกรดต่างที่ใกล้เคียงกับภายในเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าในตัวกลางสารละลายพีเอช 7.4 นอกจากนี้ผลการทดสอบร้อยละความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) แสดงให้เห็นว่านาโนเจล HA-CSHMW ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ และยาดีออกไซรูบิซินที่บรรจุในนาโนเจลมีประสิทธิภาพยับยั้งการอยู่รอดของเซลล์ HepG2 ได้มากกว่าสารละลายยาดีออกไซรูบิซิน

นาโนเจลที่เตรียมได้จากสารประกอบเชิงซ้อน HA-CSHMW โดยใช้รังสีแกมมาเหนี่ยวนำให้เกิดการเชื่อมโยงข้าม สามารถใช้เป็นต้นแบบในการพัฒนาต่อยอดเป็นระบบนำส่งยา เพื่อนำส่งยาไปยังบริเวณอวัยวะเป้าหมาย ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นต้นแบบในการนำส่งยาด้านมะเร็งอื่นได้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาการกลืนกินและนำนาโนเจลเข้าสู่เซลล์ด้วยการถ่ายภาพฟลูออเรสเซนส์เพิ่มเติม เพื่อยืนยันการปลดปล่อยยาแบบจำเพาะบริเวณอวัยวะเป้าหมาย
2. สามารถต่อยอดงานวิจัยโดยศึกษาการกักเก็บยาชนิดอื่น หรือยาต้านมะเร็งต่างชนิด และศึกษาเซลล์มะเร็งที่หลากหลาย เพื่อเพิ่มประโยชน์ในการนำส่งยาต้านมะเร็งไปยังเซลล์เป้าหมายอื่น



บรรณานุกรม

- Atta, A. M., Al-Lohedan, H. A., ALothman, Z., Tawfeek, A. M., AbdelGhafar, A., & Hamad, N. A. (2016). Effect of zeta potential of exfoliated amphiphilic montmorillonite nanogels on removal efficiencies of cationic dye water pollutant. *International Journal of Electrochemical Science*, 11(5), 3786-3802.
- Awasthi, R., Manchanda, S., Das, P., & Velu, V. (2018). Poly (vinylpyrrolidone). In *Engineering of Biomaterials for Drug Delivery Systems* (pp. 255-272): Elsevier.
- Basakran, N. S. (2015). CD44 as a potential diagnostic tumor marker. *Saudi medical journal*, 36(3), 273.
- Bracke, J. W., & Thacker, K. (1985). Hyaluronic acid from bacterial culture. In: Google Patents.
- Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J. L., & Alonso, M. (1997). Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, 63(1), 125-132.
- Chen, C., Zhao, S., Karnad, A., & Freeman, J. W. (2018). The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. *Journal of hematology & oncology*, 11(1), 64.
- Choi, K. Y., Chung, H., Min, K. H., & Yoon, H. Y. (2010). Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles for active tumor targeting. *Biomaterials*, 31(1), 106-114.
- Coimbra, P., Alves, P., Valente, T. A. M., Santos, R., Correia, I., & Ferreira, P. (2011). Sodium hyaluronate/chitosan polyelectrolyte complex scaffolds for dental pulp regeneration: synthesis and characterization. *International journal of biological macromolecules*, 49(4), 573-579.
- Debele, T. A., Mekuria, S. L., & Tsai, H.-C. (2016). Polysaccharide based nanogels in the drug delivery system: Application as the carrier of pharmaceutical agents. *Materials Science and Engineering: C*, 68, 964-981.
- Deng, X., Cao, M., Zhang, J., & Hu, K. (2014). Hyaluronic acid-chitosan nanoparticles for co-delivery of MiR-34a and doxorubicin in therapy against triple negative breast

- cancer. *Biomaterials*, 35(14), 4333-4344.
- Eckmann, D., Composto, R., Tsourkas, A., & Muzykantov, V. (2014). Nanogel carrier design for targeted drug delivery. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(46), 8085-8097.
- El-Rehim, H. A. A., Hegazy, E.-S. A., Hamed, A. A., & Swilem, A. E. (2013). Controlling the size and swellability of stimuli-responsive polyvinylpyrrolidone–poly (acrylic acid) nanogels synthesized by gamma radiation-induced template polymerization. *European Polymer Journal*, 49(3), 601-612.
- Ghaffarlou, M., Sütekin, S. D., & Güven, O. (2018). Preparation of nanogels by radiation-induced cross-linking of interpolymer complexes of poly (acrylic acid) with poly (vinyl pyrrolidone) in aqueous medium. *Radiation Physics and Chemistry*, 142, 130-136.
- Güven, O., Isik, S. D., & Barsbay, M. (2010). *Radiation Synthesis of Poly (N-Vinyl Pyrrolidone) Nanogels and Nanoscale Grafting of Poly (Acrylic Acid) from Cellulose*. Retrieved from
- Hamidi, M., Azadi, A., & Rafiei, P. (2008). Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 60(15), 1638-1649.
- Hu, Y., Jiang, X., Ding, Y., & Ge, H. (2002). Synthesis and characterization of chitosan–poly (acrylic acid) nanoparticles. *Biomaterials*, 23(15), 3193-3201.
- Huang, W., Chen, L., Kang, L., & Jin, M. (2017). Nanomedicine-based combination anticancer therapy between nucleic acids and small-molecular drugs. *Advanced drug delivery reviews*, 115, 82-97.
- Jayakumar, R., Nair, A., Rejinold, N. S., Maya, S., & Nair, S. (2012). Doxorubicin-loaded pH-responsive chitin nanogels for drug delivery to cancer cells. *Carbohydrate polymers*, 87(3), 2352-2356.
- Jiang, T., James, R., Kumbar, S. G., & Laurencin, C. T. (2014). Chitosan as a biomaterial: structure, properties, and applications in tissue engineering and drug delivery. In *Natural and synthetic biomedical polymers* (pp. 91-113): Elsevier.
- Kadlubowski, S. (2014). Radiation-induced synthesis of nanogels based on poly (N-vinyl-2-

- pyrrolidone)—A review. *Radiation Physics and Chemistry*, 102, 29-39.
- Kadlubowski, S., Ulanski, P., & Rosiak, J. M. (2012). Synthesis of tailored nanogels by means of two-stage irradiation. *Polymer*, 53(10), 1985-1991.
- Kumar, C. S., Raja, M., Sundar, D. S., & Antoniraj, M. G. (2015). Hyaluronic acid co-functionalized gold nanoparticle complex for the targeted delivery of metformin in the treatment of liver cancer (HepG2 cells). *Carbohydrate polymers*, 128, 63-74.
- Lim, Y.-M., Gwon, H.-J., Park, J.-S., & Nho, Y.-C. (2011). Synthesis and properties of hyaluronic acid containing copolymers crosslinked by γ -ray irradiation. *Macromolecular research*, 19(5), 436-441.
- Luan, S., Zhu, Y., Wu, X., & Wang, Y. (2017). Hyaluronic-acid-based pH-sensitive nanogels for tumor-targeted drug delivery. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 3(10), 2410-2419.
- Mattheolabakis, G., Milane, L., Singh, A., & Amiji, M. M. (2015). Hyaluronic acid targeting of CD44 for cancer therapy: from receptor biology to nanomedicine. *Journal of drug targeting*, 23(7-8), 605-618.
- Matusiak, M., Kadlubowski, S., & Ulanski, P. (2018). Radiation-induced synthesis of poly (acrylic acid) nanogels. *Radiation Physics and Chemistry*, 142, 125-129.
- Negahdary, M., Mazaheri, G., Rad, S., & Hadi, M. (2012). Direct electron transfer of hemoglobin on Manganese III Oxide-Ag nanofibers modified glassy carbon electrode. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2012.
- Oyarzun-Ampuero, F., Brea, J., Loza, M., & Torres, D. (2009). Chitosan–hyaluronic acid nanoparticles loaded with heparin for the treatment of asthma. *International journal of pharmaceuticals*, 381(2), 122-129.
- Pujana, M. A., Pérez-Álvarez, L., Iturbe, L. C. C., & Katime, I. (2014). pH-sensitive chitosan-folate nanogels crosslinked with biocompatible dicarboxylic acids. *European Polymer Journal*, 61, 215-225.
- Pujana, M. A., Pérez-Álvarez, L., Iturbe, L. C. C., & Katime, I. (2014). Water soluble folate-chitosan nanogels crosslinked by genipin. *Carbohydrate polymers*, 101, 113-120.
- Rattanawongwiboon, T., Ghaffarlou, M., Sütekin, S. D., & Pasanphan, W. (2018).

- Preparation of multifunctional poly (acrylic acid)-poly (ethylene oxide) nanogels from their interpolymer complexes by radiation-induced intramolecular crosslinking. *Colloid and Polymer Science*, 296(9), 1599-1608.
- Saharan, P., Bhatt, D., Saharan, S., & Bahmani, K. (2015). To study the effect of polymer and surfactant concentration on characteristics of nanoparticle formulations. *Scholars Res. Libr*, 7(12), 365-371.
- Sultana, F., Manirujjaman, M., Imran-Ul-Haque, M. A., & Sharmin, S. (2013). An overview of nanogel drug delivery system. *J Appl Pharm Sci*, 3(8), 95-105.
- Wang, L., Su, W., Liu, Z., & Zhou, M. (2012). CD44 antibody-targeted liposomal nanoparticles for molecular imaging and therapy of hepatocellular carcinoma. *Biomaterials*, 33(20), 5107-5114.
- Yadav, A. K., Agarwal, A., Rai, G., & Mishra, P. (2010). Development and characterization of hyaluronic acid decorated PLGA nanoparticles for delivery of 5-fluorouracil. *Drug delivery*, 17(8), 561-572.
- Yang, C., Wang, X., Yao, X., & Zhang, Y. (2015). Hyaluronic acid nanogels with enzyme-sensitive cross-linking group for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 205, 206-217.
- Yang, L., Gao, S., Asghar, S., & Liu, G. (2015). Hyaluronic acid/chitosan nanoparticles for delivery of curcuminoid and its in vitro evaluation in glioma cells. *International journal of biological macromolecules*, 72, 1391-1401.
- Zhang, H., Huang, S., Yang, X., & Zhai, G. (2014). Current research on hyaluronic acid-drug bioconjugates. *European journal of medicinal chemistry*, 86, 310-317.
- Zhang, H., Zhai, Y., Wang, J., & Zhai, G. (2016). New progress and prospects: The application of nanogel in drug delivery. *Materials Science and Engineering: C*, 60, 560-568.
- Zhao, L., Xu, L., Mitomo, H., & Yoshii, F. (2006). Synthesis of pH-sensitive PVP/CM-chitosan hydrogels with improved surface property by irradiation. *Carbohydrate polymers*, 64(3), 473-480.
- เพ็ญนภา มุฑิตามงคล. (2558). การเตรียมชิ้นงานสำหรับเทคนิค TEM. เทคโนโลยีวัสดุ(77), 32-36.

- กมลรัตน์ ธนัประภัสร์. (2557). นาโนเทอรานอสติกสำหรับโรคมะเร็ง Cancer Nanotheranostics. *สงขลานครินทร์เวชสาร*, ปีที่ 32, ฉบับที่ 5 (ก.ย. - ต.ค. 2557), หน้า 339-352.
- น้อย เนียมสา. (2556). อนุภาคระดับไมโครของโคโคซานสำหรับใช้เป็นระบบนำส่งยาแบบควบคุมการปลดปล่อย. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 18(2), 281-287.
- พิมพ์พร ศรีสันติแสง. (2556). การสกัดกรดไฮยาลูโรนิกจากเหงือกไก่ด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของไก่. (ปริญญาานิพนธ์ วท.ม. (วิทยาศาสตร์การอาหาร)). บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- วิยะดา ปัญจรัก. (2558). Cancer Stem Cells: Perspective Application in Cancer เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง: ทัศนมิติการประยุกต์ใช้ในโรคมะเร็ง.



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ภัทรา เลิศศราวุธ
วัน เดือน ปี เกิด	10 กุมภาพันธ์ 2535
สถานที่เกิด	ประจวบคีรีขันธ์
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา รังสีประยุกต์และไอโซโทป มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ. 2557)
ที่อยู่ปัจจุบัน	303/67 หมู่ 9 ตำบลห้วยทราย อำเภอเมือง จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ 77000

