



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

ผลของประจุบนพื้นผิวพอลิเมอร์ิกไมเซลล์ที่บรรจุยาไรแฟมพิซินต่อการ
นำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านม

Surface charge effect of rifampicin loaded polymeric mixed micelles for
delivery to breast cancer cell.

โดย

นสภ.วรุตม์	เศรษฐกุลวดี	รหัส 57210139
นสภ.ภัทรา	ขาวประเสริฐ	รหัส 57210133
นสภ.พัชรภรณ์	สลัปศรี	รหัส 57210199

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2561

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

ผลของประจุบนพื้นผิวพอลิเมอร์ิกไมเซลล์ที่บรรจุยาไรแฟมพิซินต่อการ
นำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านม

Surface charge effect of rifampicin loaded polymeric mixed micelles for
delivery to breast cancer cell.

โดย

นสภ.วรุตม์	เศรษฐกุลวดี	รหัส 57210139
นสภ.ภัทรา	ขาวประเสริฐ	รหัส 57210133
นสภ.พัชรภรณ์	สลับศรี	รหัส 57210199

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2561
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

งานวิจัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิชาโครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ 791591 จัดทำขึ้นเนื่องจากผู้วิจัยเล็งเห็นถึงปัญหาจากการใช้ยาในด้านต่างๆ ทั้งปัญหาด้านการละลาย ความคงตัวของยา รวมถึงอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยา ซึ่งตัวอย่างยาที่ผู้วิจัยได้นำมาศึกษา นั้นคือ Rifampicin เนื่องจากมีงานวิจัยที่ศึกษาฤทธิ์ของยา Rifampicin สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ พัฒนาระบบนำส่งยาให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว นั่นคือ การศึกษาในรูปแบบพอลิเมอร์ไมเซลล์ ซึ่งเป็นกระบวนการของเทคนิคเพิ่มการละลาย ในระบบ micellar solubilization เกิดจากการรวมตัวกันของอนุภาคระดับนาโนของแอมฟิฟิลิกโมเลกุลที่ประกอบไปด้วย 2 ส่วนคือส่วนที่ชอบน้ำจะเกิดเป็นเปลือกอยู่ด้านนอก ส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะเกิดเป็นโพรงอยู่ด้านใน ซึ่งเป็นโครงสร้างที่เข้ากันได้กับร่างกาย สามารถกักเก็บตัวยาที่ไม่ละลายน้ำ นอกจากนี้ยังควบคุมการปลดปล่อยของยา ช่วยขนส่งยาไปยังอวัยวะเป้าหมายทำให้มีประสิทธิภาพในการรักษามากขึ้น ลดการเกิดความเป็นพิษและป้องกันการทำลายจากระบบการสลายตัวและเมแทบอลิซึมในร่างกาย นอกจากนี้งานวิจัยที่ผ่านมาได้ศึกษาผลของประจุบนพื้นผิวพอลิเมอร์ไมเซลล์ต่อการนำเข้าสู่ของยาไปยังเซลล์มะเร็ง พบว่าประจุมีผลต่อการนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาผลของประจุบนพื้นผิวพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุยา rifampicin ต่อการนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านม(MCF-7)

แม้ว่าในปัจจุบันได้มีการพัฒนายาในรูปแบบต่างๆ มากมาย แต่หากระบบที่เราศึกษานั้นสำเร็จและสามารถนำมาใช้ได้จริง ก็จะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับผู้ป่วยโรคมะเร็ง อย่างไรก็ตามงานวิจัยฉบับนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเท่านั้น ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคตเพื่อนำไปประยุกต์ใช้อย่างมีประสิทธิภาพ

ผู้วิจัย

พฤศจิกายน 2561

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ 2561

เรื่อง ผลของประจุบนพื้นผิวพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุยาไรแฟมพิซินต่อการนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านม

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

- | | | |
|-----------------|-------------|---------------|
| 1. นสภ.วรุฒม์ | เศรษฐกุลวดี | รหัส 57210139 |
| 2. นสภ.ภัทรา | ขาวประเสริฐ | รหัส 57210133 |
| 3. นสภ.พัชรภรณ์ | สลัปศรี | รหัส 57210199 |

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. ภก.อ.วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง
2. ดร.ณิชนันท์ ภิระคำ

บทคัดย่อ

ระบบนำส่งยาอนุภาคนาโนเป็นกลยุทธ์สำคัญในการเพิ่มความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง ร่วมกับเทคนิคการเพิ่มการละลายจะช่วยเพิ่มการนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งมากยิ่งขึ้นและยังลด ปัญหาความไม่คงตัวของยา โดยงานวิจัยมีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาระบบนำส่งยาโดยใช้เทคนิค micellar solubilization ที่เตรียม polymeric micelle โดยใช้ poloxamer407 ร่วมกับ CTAB หรือ lecithin ที่มียา rifampicin เพื่อให้นำส่งไปยังเซลล์มะเร็งด้วยวิธี thin-film hydration method โดย ตำรับที่เตรียมได้แต่ละสูตรจะนำมาเปรียบเทียบผลของประจุบนพื้นผิวของการใช้สารลดแรงตึงผิว รวมทั้ง 2 ชนิด โดยพิจารณาลักษณะทางกายภาพ ขนาด การกระจายตัวของอนุภาค และ ความสามารถในการกักเก็บยา พบว่าตำรับประจุบวกและประจุลบที่เหมาะสมที่สุดคือ poloxamer407 : CTAB ที่อัตราส่วน 10:1 มีขนาดอนุภาค 307.14 ± 62.01 nm zeta potential เท่ากับ 22.36 ± 7.97 และสามารถกักเก็บตัวยาได้ถึง 92.26 ± 1.49 และ poloxamer407 : lecithin ที่อัตราส่วน 50:1 มีขนาดอนุภาค 311.42 ± 32.42 nm zeta potential เท่ากับ -22.34 ± 1.31 และสามารถกักเก็บตัวยาได้ถึง 87.47 ± 3.14 เมื่อนำตำรับที่คัดเลือกนั้นมาทดสอบความสามารถในการนำส่งเข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง ผลการศึกษาพบว่าสูตร poloxamer407 : CTAB (10:1) ที่มียา rifampicin สามารถเพิ่มการนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งและ การยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุด โดยสรุปแล้ว polymeric micelle ที่มีประจุบวกนั้นสามารถนำมา พัฒนาเพื่อใช้เป็นระบบนำส่งยาต่อไปได้ในอนาคต

อาจารย์ที่ปรึกษา

Senior Project Academic Year 2018

: Surface charge effect of rifampicin loaded polymeric mixed micelles for delivery to breast cancer cell.

By

1. Mr. Warut Settakulvadee ID 57210139

2. Miss. Phattra Khaopraseot ID 57210133

3. Miss. Patcharaporn Salabsri ID 57210199

Advisor

1. Mr. Watcharapong Chaemsawang

2. Dr. Nichakan Peerakam

Abstract

Nano-drug delivery system is an important strategy to increase specificity towards cancer cells and also reduce side effect of the drug. The study aims to develop drug delivery system as polymeric micelle. The polymeric micelle was prepared from poloxamer407 with CTAB or lecithin which loaded rifampicin had to be delivered to breast cancer cells (MCF-7) using thin-film hydration method. Each formulation is prepared to compare the effect of ions on the surface of the surfactant including 2 types by considering parameter; physical properties, particle size, particle size distribution and entrapment efficiency. The results showed that cationic and anionic optimum formulations are poloxamer407: CTAB ratio of 10:1 (particle size was about 307.14 ± 62.01 nm, zeta potential 22.36 ± 7.97 and entrapment efficiency 92.26 ± 1.49) and poloxamer407: lecithin ratio of 50:1 (particle size was about 311.42 ± 32.42 nm, zeta potential -22.34 ± 1.31 and entrapment efficiency 87.47 ± 3.14). After that the selected formulation were cellular uptake and cell cytotoxicity (MCF-7) evaluation. The results showed that the poloxamer407: CTAB (10:1) which loaded rifampicin has highest values in cellular uptake and inhibit cancer cell. In conclusion polymeric micelle has a positive charge that can be developed and used as a drug delivery system further in the future.

Advisor

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง ผลของประจุบนพื้นผิวพอลิเมอร์กไมเซลล์ที่บรรจุยาไรแฟมพิซินต่อการนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านม ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความกรุณาจาก ภก.อ. วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง ที่ปรึกษาหลักโครงการวิจัย รวมถึง ดร.ณิชนันต์ ภีระคำ ที่ปรึกษาร่วมโครงการวิจัยที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ข้อคิดเห็น ตรวจสอบและแก้ไขร่างงานวิจัยพร้อมสนับสนุนสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

นอกจากนี้คณะผู้จัดทำต้องขอขอบพระคุณผู้ช่วยวิจัย ภก.อ. วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการใช้อุปกรณ์ จัดเตรียมสารเคมี รวมถึงเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการทางเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในเรื่องสถานที่อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง เป็นผลให้งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ผู้วิจัย

พฤศจิกายน 2561

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	๗
บทคัดย่อ	๙
กิตติกรรมประกาศ	๑
สารบัญ	๑-๑๖
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	6
บทที่ 3 วิธีการดำเนินวิจัย	27
บทที่ 4 ผลการวิจัย	35
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	60
เอกสารอ้างอิง	62

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และ zeta potential ของ polymeric micelle	35
ตารางที่ 2 แสดงขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค zeta potential และ % entrapment ของ polymeric micelle	37
ตารางที่ 3 แสดงขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาค และ zeta potential ของ polymeric micelle ที่เตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ CTAB ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1	41
ตารางที่ 4 แสดงขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาค และ zeta potential ของ polymeric micelle ที่เตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ lecithin ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1	42
ตารางที่ 5 แสดงขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาค zeta potential และ % entrapment ของ polymeric micelle ที่ load ยา rifampicin โดยเตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ CTAB ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1	45
ตารางที่ 6 แสดงขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาค zeta potential และ % entrapment ของ polymeric micelle ที่ load ยา rifampicin โดยเตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ lecithin ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1	47
ตารางที่ 7 แสดงผลการนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง MCF-7 (cellular uptake) ของ polymeric micelle ที่เตรียมโดยอัตราส่วน poloxamer ต่อ CTAB (10:1) หรือ poloxamer ต่อ lecithin (50:1) ที่ load ยา rifampicin ที่เวลา 2 ชั่วโมง	52
ตารางที่ 8 แสดงผลการนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง MCF-7 (cellular uptake) ของ polymeric micelle ที่เตรียมโดยอัตราส่วน poloxamer ต่อ CTAB (10:1) หรือ poloxamer ต่อ lecithin (50:1) ที่ load ยา rifampicin ที่เวลา 4 ชั่วโมง	53
ตารางที่ 9 แสดงปริมาณเซลล์รอดชีวิต (% viability) ของ MCF-7 cell	58

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 กรอบแนวคิดของงานวิจัย	4
รูปที่ 2 การเกิดโรคมะเร็งชนิดต่างๆ ในเพศชาย ปี พ.ศ. 2553-2555 (ต่อประชากร 100,000 คน)	7
รูปที่ 3 การเกิดโรคมะเร็งชนิดต่างๆ ในเพศหญิง ปี พ.ศ. 2553-2555 (ต่อประชากร 100,000 คน)	7
รูปที่ 4 จำนวนและอัตราการตายต่อประชากร 100,000 คน จำแนกตาม สาเหตุที่สำคัญ พ.ศ. 2552	8
รูปที่ 5 คุณลักษณะเด่นของเซลล์มะเร็ง(The Hallmarks of Cancer)	8
รูปที่ 6 วงจรชีวิตของเซลล์	9
รูปที่ 7 Anatomy of the female Breast	10
รูปที่ 8 โครงสร้าง rifampicin	13
รูปที่ 9 การจัดเรียงตัวของไมเซลล์	15
รูปที่ 10 ตัวอย่างของบล็อกโคพอลิเมอร์ที่นิยมใช้ในการเตรียมพอลิเมอร์ไมเซลล์	16
รูปที่ 11 ชนิดของPoloxamer	18
รูปที่ 12 สูตรโครงสร้างของPoloxamer	18
รูปที่ 13 การละลายของ poloxamer แต่ละชนิดในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน	20
รูปที่ 14 คุณสมบัติในการเป็น thermoreversible	21
รูปที่ 15 สูตรโครงสร้างของPoloxamer	23
รูปที่ 16 สูตรโครงสร้างของPoloxamer	24
รูปที่ 17 แสดงขนาดอนุภาคของ polymeric micelle ที่เตรียมจาก poloxamer ขนาดต่างๆ	36
รูปที่ 18 แสดง zeta potential ของ polymeric micelle ที่เตรียมจาก poloxamer ขนาดต่างๆ	36
รูปที่ 19 แสดงขนาดอนุภาคของ polymeric micelle ที่เตรียมจาก poloxamer ขนาดต่างๆ ที่ load ยา rifampicin	38
รูปที่ 20 แสดง zeta potential ของ polymeric micelle ที่เตรียมจาก poloxamer ขนาดต่างๆที่ load ยา rifampicin	38

สารบัญรูป(ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 21 แสดง % entrapment รูป ของ polymeric micelle ที่เตรียมจาก poloxamer ขนาดต่างๆที่ load ยา rifampicin	39
รูปที่ 22 แสดงลักษณะทางกายภาพของ polymeric micelle ที่เตรียมจาก poloxamer ที่ load ยา rifampicin	39
รูปที่ 23 แสดงลักษณะทางกายภาพของ polymeric micelle ที่เตรียมจาก poloxamer ที่ load ยา rifampicin เมื่อเก็บไว้ 7 วัน	40
รูปที่ 24 แสดงขนาดของอนุภาคที่เตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ CTAB ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1	41
รูปที่ 25 แสดง zeta potential ของ polymeric micelle ที่เตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ CTAB ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1	42
รูปที่ 26 แสดงขนาดของอนุภาคที่เตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ lecithin ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1	43
รูปที่ 27 แสดง zeta potential ของ polymeric micelle ที่เตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ lecithin ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1	43
รูปที่ 28 แสดงขนาดอนุภาคของ polymeric micelle ที่ load ยา rifampicin โดยเตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ CTAB ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1	45
รูปที่ 29 แสดง zeta potential ของ polymeric micelle ที่ load ยา rifampicin โดยเตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ CTAB ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1	46
รูปที่ 30 แสดง % entrapment ของ polymeric micelle ที่ load ยา rifampicin โดยเตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ CTAB ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1	46
รูปที่ 31 แสดงขนาดอนุภาค polymeric micelle ที่ load ยา rifampicin โดยเตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ lecithin ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1	47
รูปที่ 32 แสดง potential ของ polymeric micelle ที่ load ยา rifampicin โดยเตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ lecithin ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1	48
รูปที่ 33 แสดง % entrapment ของ polymeric micelle ที่ load ยา rifampicin โดยเตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ lecithin ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1	48

สารบัญรูป(ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 34 แสดงลักษณะทางกายภาพของ polymeric micelle ที่ load ยา rifampicin โดยเตรียมจาก poloxamer407 และ CTAB ที่อัตราส่วนต่าง ๆ	49
รูปที่ 35 แสดงลักษณะทางกายภาพของ polymeric micelle ที่ load ยา rifampicin โดยเตรียมจาก poloxamer407 และ CTAB ที่อัตราส่วนต่าง ๆ เมื่อเก็บไว้ 7 วัน	49
รูปที่ 36 แสดง chromatogram ของยา rifampicin ใช้ mobile phase : 0.01 M NaH_2PO_4 : ACN (50:50), retention time: 3.761 นาที, running time 10 นาที	51
รูปที่ 37 แสดง standard curve ของยา rifampicin	52
รูปที่ 38 แสดงผลการนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง MCF-7 (cellular uptake) ของ polymeric micelle ที่เตรียมโดยอัตราส่วน poloxamer ต่อ CTAB (10:1) (M+) หรือ poloxamer ต่อ lecithin (50:1) (M-) ที่ load ยา rifampicin เทียบกับ poloxamer (M0) ที่เวลา 2 ชั่วโมง	53
รูปที่ 39 แสดงผลการนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง MCF-7 (cellular uptake) ของ polymeric micelle ที่เตรียมโดยอัตราส่วน poloxamer ต่อ CTAB (10:1) (M+) หรือ poloxamer ต่อ lecithin (50:1) (M-) เทียบกับ poloxamer (M0) ที่ load ยา rifampicin ที่เวลา 4 ชั่วโมง	54
รูปที่ 40 แสดงลักษณะของ MCF-7 cell ในการศึกษาโดยส่องผ่านกล้อง inverted microscope	55
รูปที่ 41 แสดงผลการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (cytotoxicity) ของ MCF-7 cell ที่ treat ด้วย polymeric micelle ที่เตรียมโดยอัตราส่วน poloxamer ต่อ CTAB (10:1) หรือ poloxamer ต่อ lecithin (50:1) ที่ load ยา rifampicin และหาปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตด้วยวิธี crystal violet แล้ววิเคราะห์ด้วย microplate reader	55
รูปที่ 42 แสดงลักษณะเซลล์หลังย้อม crystal violet	56
รูปที่ 43 แสดงลักษณะเซลล์หลังย้อม crystal violet (ต่อ)	57
รูปที่ 44 แสดง % viability ของ MCF-7 cell ที่ treat ด้วยสูตรต่างๆ	58

บทที่ 1

บทนำ

โรคเอดส์เป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตในประเทศไทย ซึ่งเอดส์เป็นสาเหตุของการเจ็บป่วยที่สำคัญทั้งในประชากรไทยและทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศกำลังพัฒนา รวมทั้งประเทศไทยพบอุบัติการณ์การเกิดเอดส์เพิ่มขึ้นเป็นอันดับแรกมากกว่าเอดส์จากมดลูกมาเกือบสิบปี ในแต่ละปีมีผู้ป่วยเอดส์รายใหม่และรายเก่าที่ได้รับการรักษาตามระบบสาธารณสุขเป็นจำนวนมาก ถือได้ว่าเป็นปัญหาที่สำคัญของสาธารณสุขไทยและทั่วโลก จากข้อมูลระบาดวิทยาในประเทศสหรัฐอเมริกาปี พ.ศ.2557 พบว่ามีผู้ป่วยเอดส์รายใหม่ประมาณ 232,670 คน(1) จากข้อมูลสถาบันเอดส์แห่งชาติประเทศไทยในปี พ.ศ.2558 พบว่าเอดส์รายใหม่มีอุบัติการณ์มากที่สุด รองลงมาคือเอดส์ลำไส้ใหญ่ และ เอดส์ตับ ตามลำดับ(2) โดยแนวทางการรักษาผู้ป่วยเอดส์ในปัจจุบันมีหลายวิธีด้วยกัน เช่น การผ่าตัด รังสีรักษา และการใช้ยาเคมีบำบัดในการต้านเซลล์เอดส์(3) ในปัจจุบันมีการพัฒนาหาสารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอดส์หลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นฟอสโฟโนไมด์ หรือสารสำคัญ ที่ได้จากการสังเคราะห์ ซึ่งหนึ่งในที่ได้รับความสนใจคือ ยา rifampicin โรคเอดส์เป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับต้นๆของคนทั่วโลก องค์การอนามัยโลกพบว่าในปีพ.ศ. 2555 มีผู้ป่วยรายใหม่จำนวน 14 ล้านคน และในปี พ.ศ. 2558 มีผู้เสียชีวิตจากเอดส์ราว 8.8 ล้านคน ซึ่งจำนวนผู้เสียชีวิตพบได้มากกว่าการเสียชีวิตด้วยโรคเอดส์ วัณโรค และมาลาเรียรวมกัน โรคเอดส์ที่เป็นสาเหตุการตาย 5 อันดับแรกของโลก ได้แก่ เอดส์ปอด 1.69 ล้านราย เอดส์ตับ 788,000 ราย เอดส์ลำไส้ใหญ่และทวารหนัก 774,000 ราย เอดส์กระเพาะอาหาร 754,000 ราย และเอดส์ไต 571,000 คน(4)

ขณะเดียวกันสถาบันเอดส์แห่งชาติได้แสดงข้อมูลผู้ป่วยเอดส์รายใหม่ที่มาใช้บริการตรวจวินิจฉัยและรักษาที่สถาบันเอดส์แห่งชาติ ในระหว่างวันที่ 1 มกราคม 2558 ถึง 31 ธันวาคม 2558 จำนวนผู้ป่วยเอดส์รายใหม่ที่มาใช้บริการทั้งหมด 3,439 คน พบว่าเอดส์รายใหม่มีอุบัติการณ์

มากที่สุด 849 คน รองลงมาคือมะเร็งลำไส้ใหญ่ 406 คน มะเร็งตับ 378 คน ตามลำดับ และมะเร็งชนิดอื่น ๆ 1,806 คน(2) และจากข้อมูลสำนักระบาดวิทยาและยุทธศาสตร์ กระทรวงสาธารณสุขถึงสาเหตุการตายในข้อมูลมรณบัตรในปี พ.ศ. 2558 พบว่า สาเหตุการตายที่สำคัญได้แก่ มะเร็งทุกชนิด ปอดอักเสบ โรคหัวใจขาดเลือด และ อุบัติเหตุจากการคมนาคมขนส่งทางบก และเมื่อนำมาจำแนกตามกลุ่มโรคมะเร็งต่อประชากร 100,000 คน ประเทศไทย พ.ศ. 2554-2558 ได้แก่ มะเร็งตับ มะเร็งหลอดคอ หลอดลมใหญ่และปอด มะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งเต้านมหญิง และมะเร็งปากมดลูกตามลำดับ(5)

โดยแนวทางการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งในปัจจุบันมีหลายวิธีด้วยกัน เช่น การผ่าตัด รังสีรักษา และการใช้ยาเคมีบำบัดในการต้านเซลล์มะเร็ง ในปัจจุบันมีหลายประเทศได้มีการศึกษานำยาหรือสารสกัดสมุนไพรมาศึกษาฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง เมื่อไม่นานมานี้ประเทศจีนได้มีศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสมุนไพรที่มีเฉพาะในประเทศจีน ได้แก่ astragalus (Huang Qi)(6) curcumin(7) และยาอีกหนึ่งตัวที่น่าสนใจคือยา rifampicin ซึ่งฤทธิ์โดยตรงของยานำมารักษาวัณโรคแต่ปัจจุบันมีรายงานพบว่ามียุทธวิธีในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

Rifampicin คือยาที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในข้อบ่งใช้สำหรับรักษาโรควัณโรค มีรายงานพบว่า ยา rifampicin มีฤทธิ์ในการกำจัดเซลล์มะเร็งบางชนิด(8) โดยนอกจากการศึกษาฤทธิ์ของ rifampicin เดี่ยวแล้วยังมีการศึกษาการให้ร่วมกับยาต้านมะเร็งชนิดอื่น พบว่าทำให้มีการสะสมของยาต้านมะเร็งเพิ่มมากขึ้นและลดการดื้อต่อยาในหนูทดลองอีกด้วย(9)นอกจากนี้ยังมีรายงานในผู้ป่วยโรควัณโรคที่เป็นมะเร็งตับร่วมด้วย ที่ใช้ยา rifampicin ในการรักษาวัณโรคและไม่มีการใช้ยารักษาโรคมะเร็ง พบว่าสามารถลดการดำเนินไปของโรคมะเร็งตับได้(10) แต่อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าจะมีรายงานเกี่ยวกับประสิทธิภาพของ rifampicin ต่อเซลล์มะเร็ง ปัญหาที่สำคัญอย่างยิ่งของ rifampicin คือเรื่องการละลายที่ค่อนข้างต่ำซึ่งการละลายนั้นจะส่งผลต่อชีวประสิทธิผลของยาในรูปแบบการรับประทานหรือส่งผลกระทบต่อเตรียมยาในรูปแบบการบริหารอย่างอื่น โดยถ้ายามีค่าการละลายที่ต่ำจะต้องใช้ขนาดยาที่มากขึ้นเพื่อให้ถึงระดับความเข้มข้นที่ใช้รักษาโรค ในปัจจุบันจึงมีการพัฒนาเทคนิคการเพิ่มการละลายมากมาย(11) เช่น micellar solubilization(12) ซึ่งเป็นระบบที่เกิดจากการรวมตัวกันของอนุภาคระดับนาโนของแอมฟิฟิลิกโมเลกุลที่ประกอบไปด้วย 2 ส่วนคือส่วนที่ชอบน้ำจะเกิดเป็นเปลือก

อยู่ด้านนอก ส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะเกิดเป็นโพรงอยู่ด้านใน(13) ด้วยคุณสมบัติดังกล่าว ทำให้ช่วยเพิ่มการละลายของยาที่มีค่าการละลายน้ำต่ำ นอกจากนี้ยังควบคุมการปลดปล่อยของยา ช่วยขนส่งยาไปยังอวัยวะเป้าหมายทำให้มีประสิทธิภาพในการรักษามากขึ้น ลดความเป็นพิษจากการใช้ยาและป้องกันการทำลายจากกระบวนการสลายตัวและเมแทบอลิซึมในร่างกาย(14) จากงานวิจัยของ Saxena และคณะได้มีการพัฒนาระบบนำส่งแบบไมเซลล์ ที่ประกอบไปด้วย poloxamers เพื่อนำส่งยาที่มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง ผลการศึกษาพบว่าระบบนำส่งแบบพอลิเมอร์ไมเซลล์สามารถเพิ่มการนำเข้าของยาในเซลล์มะเร็งได้(7) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาผลของประจุบนพื้นผิวพอลิเมอร์ไมเซลล์ต่อการนำเข้าของยาไปยังเซลล์มะเร็ง พบว่าประจุมีผลต่อการนำยาเข้าเซลล์มะเร็ง(15)

จากที่มาและความสำคัญที่กล่าวมาข้างต้น จึงได้ทำการศึกษาผลของประจุบนพื้นผิวพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่บรรจุยา rifampicin ต่อการนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านม

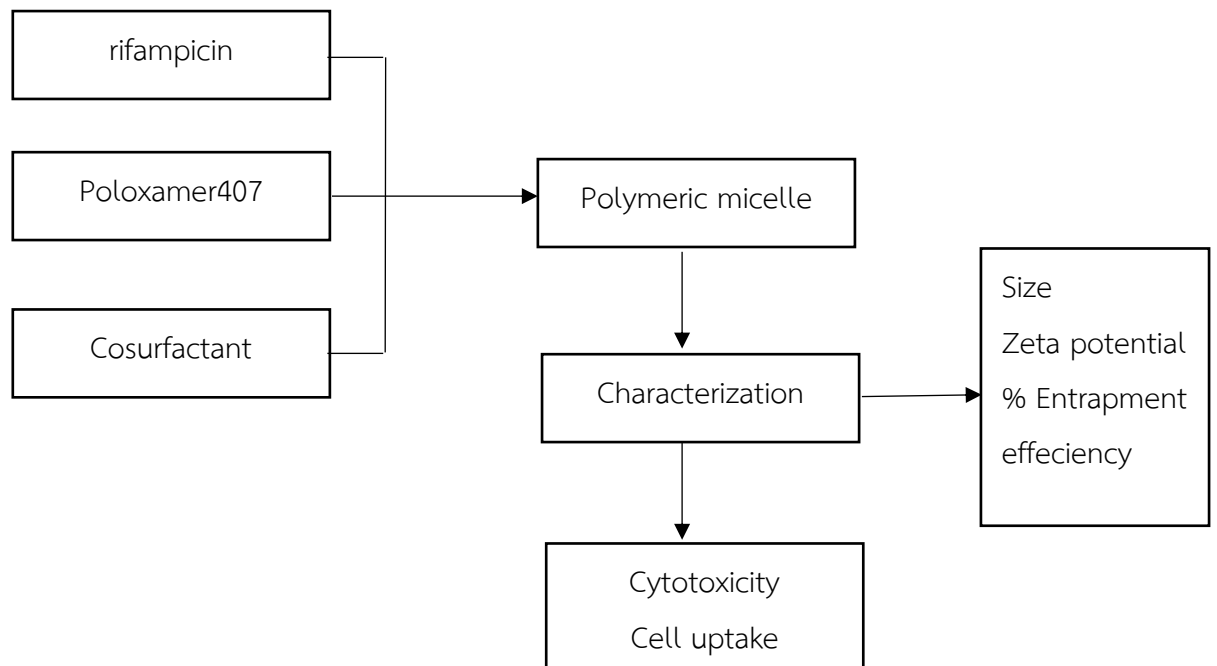
วัตถุประสงค์

1. เพื่อเปรียบเทียบผลของประจุบนพื้นผิวพอลิเมอร์ไมเซลล์ต่อการนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านม
2. พัฒนาระบบนำส่งยาในรูปแบบพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่มีส่วนประกอบ poloxamer และ co-surfactant

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงปัจจัยทางด้านประจุพื้นผิวที่ส่งผลต่ออนุภาคไมเซลล์และการนำส่งยาระดับเซลล์
2. ได้องค์ความรู้ในการเตรียมระบบนำส่งยารูปแบบพอลิเมอร์ไมเซลล์ และการเลี้ยงเซลล์เบื้องต้น

กรอบแนวคิด



รูปที่ 1 กรอบแนวคิดของงานวิจัย

นิยามศัพท์

1. Polymeric micelle คือ ระบบนำส่งยาในรูปแบบหนึ่ง ซึ่งเหมาะกับยาที่ละลายน้ำน้อย สามารถก่อตัวเป็นไมเซลล์ได้ด้วยตนเอง เช่นเดียวกับไมเซลล์ที่เกิดจากสารลดแรงตึงผิว โดยสามารถกักเก็บสารหรือยาที่ละลายน้ำได้น้อยไว้ในส่วนแกนกลางภายในอนุภาค
2. Cell uptake คือ การศึกษาความสามารถในการนำยาเข้าสู่เซลล์
3. Cell cytotoxicity คือ การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งจะดูจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตหลังจากการได้รับสารทดสอบ
4. Entrapment efficiency คือ ประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยาภายในพอลิเมอร์ไมเซลล์
5. Zeta potential คือ ค่าประจุบนพื้นผิวของอนุภาค ซึ่งเกี่ยวข้องกับแรงผลักระหว่างอนุภาค

บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

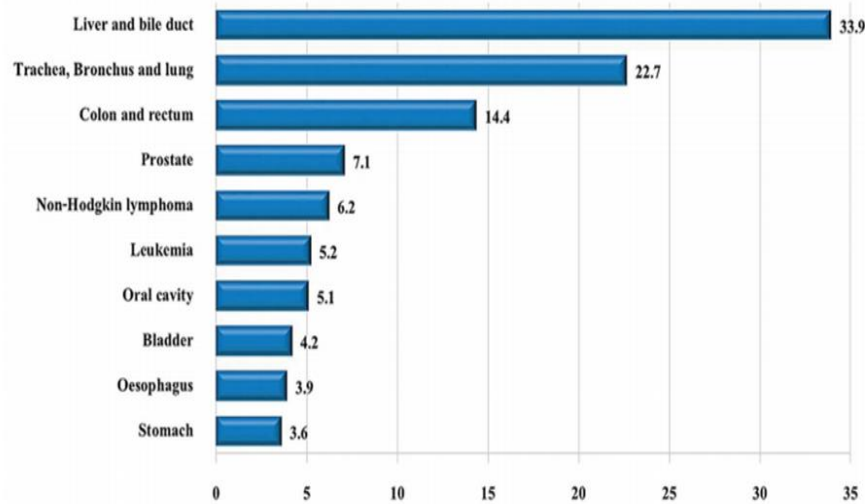
1. มะเร็ง

1.1. อุบัติการณ์การเกิดมะเร็ง

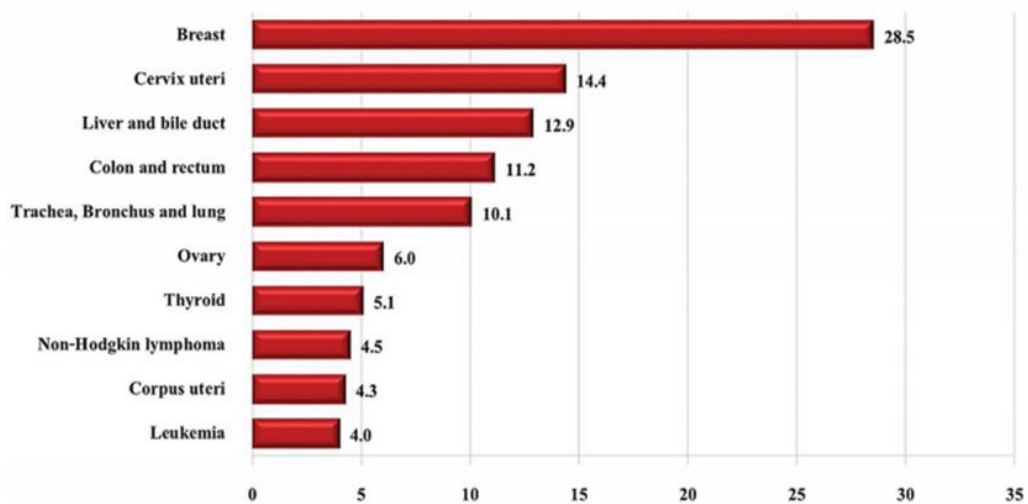
โรคมะเร็งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับต้นๆ ของคนทั่วโลก จากข้อมูลขององค์การอนามัยโลกพบว่าในปี พ.ศ. 2558 มีผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งราว 8.8 ล้านราย ซึ่งจำนวนผู้เสียชีวิตพบได้มากกว่าการเสียชีวิต ด้วย โรคเอดส์ วัณโรค และมาลาเรียรวมกัน โรคมะเร็งที่เป็นสาเหตุการตาย 5 อันดับแรกของโลก ได้แก่ มะเร็งปอด 1.69 ล้านราย มะเร็งตับ 788,000 ราย มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก 774,000 ราย มะเร็งกระเพาะอาหาร 754,000 ราย มะเร็งเต้านม 571,000 ราย(4)

ประเทศไทยได้มีการคำนวณสถิติผู้ป่วยโรคมะเร็งรายใหม่โดยสถาบันมะเร็งแห่งชาติจากข้อมูลของหน่วยทะเบียนมะเร็งระดับประชากร 15 แห่ง ทั่วประเทศ เป็นข้อมูลสถิติโรคมะเร็งในปี พ.ศ. 2553-2555 (Cancer in Thailand Vol VIII, 2010-2012)(ดั่งภาพ 2,3) พบว่าโรคมะเร็งที่พบบ่อยมาก 5 อันดับแรกในเพศชาย ได้แก่ มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งต่อมลูกหมาก และมะเร็งเม็ดเลือดขาว ส่วนโรคมะเร็งที่พบบ่อยมาก 5 อันดับแรกในเพศหญิง ได้แก่ มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก มะเร็งตับ มะเร็งลำไส้ใหญ่ และมะเร็งปอด จากข้อมูลของสำนักงานนโยบายและยุทธศาสตร์รายงานว่าในปี พ.ศ. 2554 ประเทศไทยมีผู้เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งประมาณ 61,082 คน เป็นเพศชาย 35,437 คน เป็นเพศหญิง 25,645 คนซึ่งถือเป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยเพศชายมีจำนวนผู้เสียชีวิต 5 อันดับแรก ได้แก่ มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งช่องปากและคอหอย มะเร็งเม็ดเลือดขาว ส่วนเพศหญิงมีจำนวนผู้เสียชีวิต 5 อันดับแรก ได้แก่ มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งลำไส้ใหญ่ จะเห็นได้ว่าโรคมะเร็งที่เป็นปัญหาสำคัญ 5 อันดับแรกของประเทศ คือ มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งคิดเป็น 56.38% ของมะเร็งทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบว่าโรคมะเร็งมีอัตราการตายสูงสุดในปี พ.ศ.2552(ดั่งภาพ 4)(16)

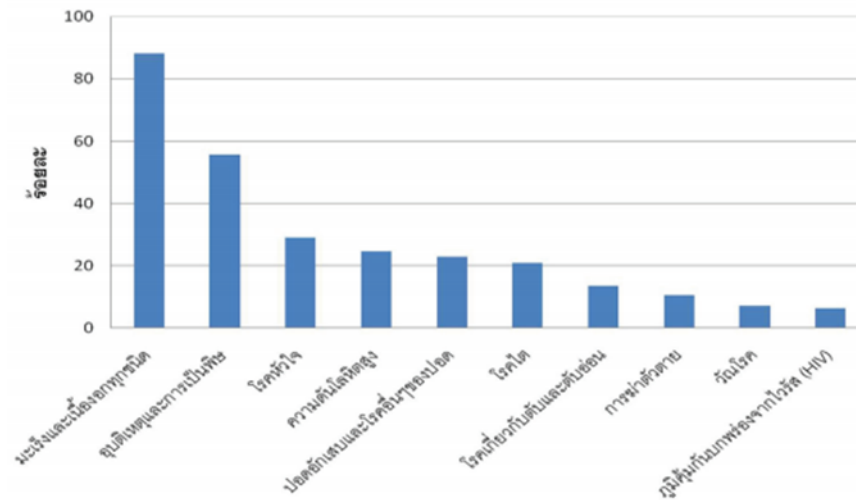
จากข้อมูลล่าสุดผู้ป่วยโรคมะเร็งรายใหม่ที่มาใช้บริการตรวจวินิจฉัยและรักษาที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ในระหว่างวันที่ 1 มกราคม 2558 ถึง 31 ธันวาคม 2558 จำนวนผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่ที่มาใช้บริการ ทั้งหมด 3,439 คน พบว่ามะเร็งเต้านมมีอุบัติการณ์มากที่สุด 849 คน รองลงมาคือมะเร็งลำไส้ใหญ่ 406 คน และ มะเร็งตับ 378 คน ตามลำดับ และมะเร็งชนิดอื่น ๆ 1,806 คน(2)



รูปที่ 2 การเกิดโรคมะเร็งชนิดต่างๆ ในเพศชาย ปี พ.ศ. 2553-2555
(ต่อประชากร 100,000 คน) (17)



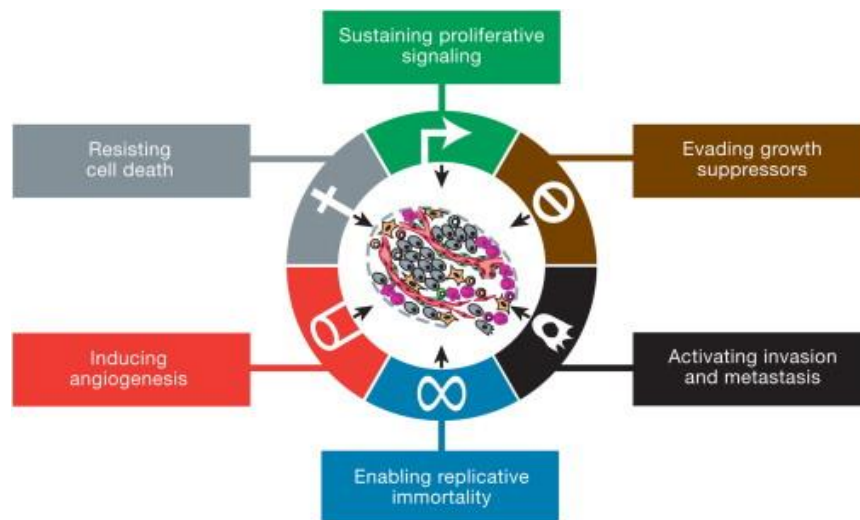
รูปที่ 3 การเกิดโรคมะเร็งชนิดต่างๆ ในเพศหญิง ปี พ.ศ. 2553-2555
(ต่อประชากร 100,000 คน) (17)



รูปที่ 4 จำนวนและอัตราตายต่อประชากร 100,000 คน จำแนกตามสาเหตุที่สำคัญ พ.ศ. 2552

(16)

1.2 มะเร็ง



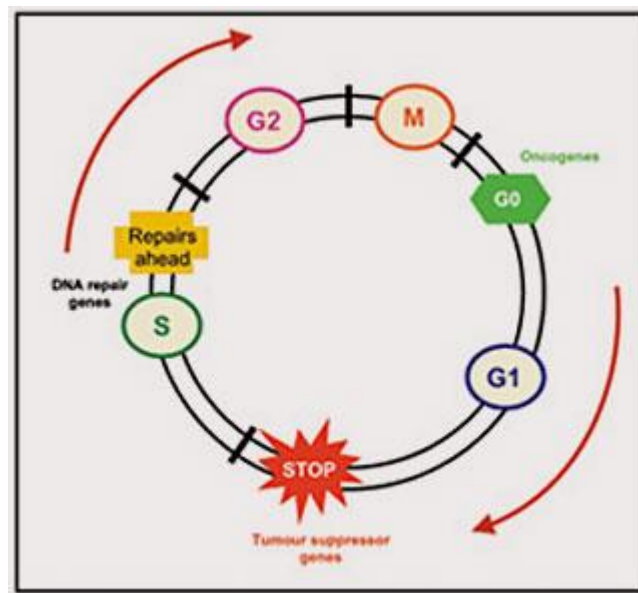
รูปที่ 5 คุณลักษณะเด่นของเซลล์มะเร็ง(The Hallmarks of Cancer)(18)

เซลล์มะเร็งเกิดจากการเจริญเติบโตของเซลล์ใหม่ที่ผิดปกติกล่าวคือไม่สามารถควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์และสามารถหลบหลีกกระบวนการตายของเซลล์ได้ เซลล์ที่เจริญเติบโตผิดปกตินี้เรียกว่าเนื้องอก(tumor) ซึ่งเป็นเนื้องอกที่ร้ายแรงสามารถรุกรานและแพร่กระจายไปยังอวัยวะส่วนต่างๆ

ของร่างกายได้ และระบบการทำงานของระบบต่างๆ ภายในร่างกาย ซึ่งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งจะต้องอาศัยระบบน้ำเหลือง และระบบหมุนเวียนโลหิต แต่ไม่ใช่เนื้องอกทุกชนิดจะเป็นมะเร็ง เพราะเนื้องอกไม่ร้ายแรงจะไม่ลุกลามไปยังอวัยวะข้างเคียงและไม่กระจายไปทั่วร่างกาย (19)

สาเหตุของการเกิดมะเร็งเกิดจากการกลายพันธุ์ ประกอบด้วย ทางพันธุกรรม และสิ่งแวดล้อม จะแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ 1. กลุ่มกายภาพ เช่น รังสี 2. กลุ่มเคมี เช่น บุหรี่ สารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมและในอาหารต่างๆ 3. กลุ่มชีวภาพ เช่น เชื้อไวรัส และแบคทีเรียบางชนิด

1.3 วงจรชีวิตของเซลล์



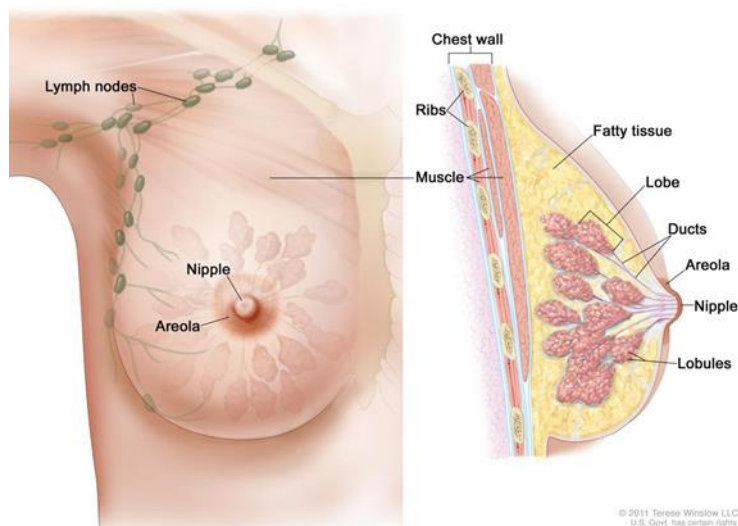
รูปที่ 6 วงจรชีวิตของเซลล์

วัฏจักรการแบ่งตัวของเซลล์ (cell cycle) ประกอบด้วย phases ต่างๆ ดังนี้ระยะ S(synthesis)เป็นระยะที่มีการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) ระยะ M phase เป็นระยะที่เซลล์มีการแบ่งตัว(cell division) สามารถแบ่งย่อยออกเป็น ไมโทซิส (Mitosis) และการแบ่งไซโตพลาสซึม(cytokinesis) ซึ่ง S และ M phase จะถูกคั่นด้วย G1 phase เป็นระยะที่เซลล์เจริญเติบโต

โดยมีการสร้างโปรตีน และส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์ ส่วนระยะที่คั่นระหว่าง S กับ M phase คือ G2 phase เป็นระยะที่สิ้นสุดการสร้าง ดีเอ็นเอ โครโมโซมเริ่มหดตัว แต่ละโครโมโซมจะปรากฏเห็นเป็น 2 โครมาติด (chromatids) โดยสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะใช้เวลาในการแบ่งเซลล์ 1 วัฏจักรไม่เท่ากัน แต่โดยทั่วๆ ไปแล้ว วัฏจักรของเซลล์ใช้เวลาประมาณ 20 ชั่วโมง

ยีนในร่างกายมนุษย์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งมีอยู่ 2 ชนิดคือ oncogenes และ tumor suppressor genes โดย oncogene เป็นยีนปกติหากมีการกลายพันธุ์แล้วทำให้ยีนนี้สร้างโปรตีนที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างก้อนมะเร็งได้ ส่วน Tumor suppressor gene เป็นยีนที่มีการผลิตโปรตีนซึ่งมีหน้าที่ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์และยับยั้งการเกิดก้อนมะเร็ง หากเกิดการกลายพันธุ์ขึ้นในยีนนี้ มีผลทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตที่ผิดปกติไปจากการที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้(20-22)

1.4 เต้านม



รูปที่ 7 Anatomy of the female Breast(23)

เต้านมประกอบด้วยต่อมน้ำนม (alveolar) และท่อน้ำนม (duct) รวมตัวกันเป็น lobe แต่ละ lobe แยกจากกันโดยมี connective tissue เป็นผนังกัน (septum) และมีหลอดเลือด

ท่อน้ำเหลือง และเส้นประสาททอดอยู่ใน septum แต่ละ lobe จะแบ่งย่อยเป็น lobule ประมาณ 20 – 30 lobule ภายใน lobule จะประกอบด้วย lactiferous duct ที่แตกแขนงออกเป็น ductule เล็กๆ ส่วนปลายจะพองออกเป็นกระเปาะเรียกว่า alveoli แต่ละ lobe จะมี alveoli ย่อยประมาณ 10 – 100 alveoli ดังแสดงในรูปที่ 7 ภายใน alveolus แต่ละอันจะประกอบด้วยเซลล์ 2 ชั้น ชั้นในคือ alveolar cells ทำหน้าที่สร้างน้ำนมเมื่อได้รับการกระตุ้นจากฮอร์โมนโปรแลคติน ชั้นนอกคือ myoepithelial cells เป็นเซลล์กล้ามเนื้อเรียบตัวประสานกันรอบ alveolus ทำหน้าที่หดตัวบีบไล่น้ำนมไปตามท่อน้ำเมื่อได้รับการกระตุ้นจากฮอร์โมนออกซิโตซิน

น้ำนมที่สร้างภายใน alveolar cells จะมารวมอยู่ภายในกระเปาะของ alveolus เมื่อ myoepithelial cells หดตัวจะบีบไล่น้ำนมใน alveolus ให้ไหลไปตาม ductule และไปรวมกันที่ lactiferous duct ซึ่งจะเปิดที่หัวนม ส่วนของท่อน้ำที่ทอดผ่านบริเวณใต้ลานหัวนมจะพองออกเป็นกระเปาะเรียกว่า lactiferous sinus ทำหน้าที่เป็นที่พักเก็บน้ำนม จากนั้นท่อน้ำจะมีขนาดเล็กลงและเปิดออกที่ปลายหัวนมประมาณ 15 – 20 ท่อ(24)

1.5 มะเร็งเต้านม(25)

เกิดจากการที่เซลล์ภายในเต้านมมีการแบ่งตัวผิดปกติ ซึ่งมักเกิดขึ้นบริเวณท่อน้ำนม และเนื้อเยื่อของต่อมน้ำนม เซลล์มะเร็งจะมีการแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่อหรืออวัยวะส่วนอื่นของร่างกาย โดยเริ่มจากการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองบริเวณใกล้เคียง ก่อนจะเข้าสู่อวัยวะอื่นที่อยู่ใกล้และไกลออกไปตามลำดับ เช่น หัวใจ กระดูก สมอง ปอด เป็นต้น กระบวนการเกิดมะเร็งเริ่มจากการกลายพันธุ์ของเซลล์ปกติที่มีการแบ่งตัวเพิ่มมากขึ้นจนทำให้เซลล์มีขนาดโตมากเกินไปจนทำให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์ที่ผิดปกติ แบ่งออกเป็นระยะดังนี้

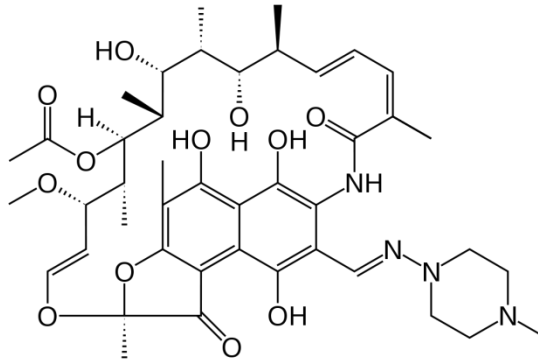
- มะเร็งเต้านมระยะที่ 0 หรือ DCIS (ductal carcinoma In situ) เซลล์มะเร็งเพิ่งก่อตัวขึ้นจำกัดอยู่ภายในเนื้อเยื่อยังไม่แบ่งตัวลุกลามสู่ภายนอกขอบเขต
- มะเร็งเต้านมระยะที่ 1 มะเร็งมีการลุกลามออกนอกเนื้อเยื่อ แต่ยังไม่มีการแพร่กระจายไปสู่ต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้ และขนาดก้อนมะเร็งไม่เกิน 2 ซม.
- มะเร็งเต้านมระยะที่ 2 ก้อนมะเร็งขนาดเกิน 2 ซม.แต่ไม่เกิน 5 ซม.ที่ยังไม่มีการแพร่กระจายไปสู่ต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้ หรือมะเร็งขนาดเล็กไม่เกิน 2 ซม.
- มะเร็งเต้านมระยะที่ 3 ก้อนมะเร็งขนาดใหญ่เกิน 5 ซม. หรือมะเร็งมีการแพร่กระจายเข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองรักแร้

- มะเร็งเต้านมระยะที่ 4 เป็นระยะสุดท้ายคือมะเร็งมีการแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ เช่น ปอด กระดูก ตับ สมอง

ปัจจัยเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งเต้านม(26)

1. ผู้หญิงที่มีอายุมากกว่า 50 ปี
2. มีประวัติการเป็นมะเร็งเต้านม โดยผู้ป่วยที่เกิดมะเร็งเต้านมขึ้นที่ข้างหนึ่งมีโอกาสที่จะเกิดก่อนมะเร็งขึ้นที่เต้านมอีกข้าง
3. มีประวัติการเป็นมะเร็งรังไข่ เนื่องจากการเป็นมะเร็งรังไข่เกี่ยวข้องกับการสัมผัสฮอร์โมน จึงเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งเต้านม
4. มีประวัติคนในครอบครัวเป็นมะเร็งเต้านม
5. การกลายพันธุ์ของยีน BRCA1 หรือ BRCA2 มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งเต้านม
6. การได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจน ซึ่งเป็นฮอร์โมนเพศหญิงที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางเพศ โดยพบว่าการได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนเป็นเวลานานจะเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งเต้านม
7. ลักษณะของการใช้ชีวิตประจำวัน เช่น ความอ้วน ขาดการออกกำลังกาย ดื่มแอลกอฮอล์ การได้รับรังสีในปริมาณสูง

2.คุณสมบัติทั่วไปของ rifampicin



รูปที่ 8 โครงสร้าง rifampicin(5)

2.1 ข้อมูลทั่วไป(27, 28)

Rifampicin ได้จากอนุพันธ์ของ rifamycin ที่สังเคราะห์จาก *Streptomyces mediterranei* มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยใช้เป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาโรควัณโรค สำหรับลักษณะทางกายภาพของยาผงมีลักษณะเป็นผลึก สีน้ำตาลแดง ไม่มีกลิ่น ไม่คงตัวในที่ที่มีแสง ความร้อน ความชื้นและอากาศ มีจุดหลอมเหลวระหว่าง 183 ถึง 188 มีค่า pka เท่ากับ 1.7 และ 7.9 โดยคุณสมบัติการละลายของยาสามารถละลายในแอลกอฮอล์ที่เจือเมทานอล และละลายในคลอโรฟอร์มได้บางส่วน ซึ่งค่าการละลายในน้ำเท่ากับ 1 กรัมในน้ำ 762 มิลลิลิตร

2.2 Rifampicin กับฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

จากการศึกษารายงานประสิทธิภาพฤทธิ์ของยา rifampicin มีผลการทดลองในการสนับสนุนฤทธิ์ทางยาว่าสามารถต้านเซลล์มะเร็งได้เนื่องจากการค้นพบในรายงานวิจัยการรักษาผู้ป่วยที่ได้รับยา rifampicin เป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรควัณโรค และผู้ป่วยมีโรคร่วมคือโรคมะเร็งตับ จากการได้รับยาไประยะหนึ่งพบว่าเซลล์มะเร็งมีการเจริญเติบโตที่ลดลง หลังจากนั้นได้มีการศึกษาฤทธิ์ฤทธิ์ทางยาต่อเซลล์มะเร็ง พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของยาที่ < 40 ไมโครกรัมต่อลิตร มีผลในการลดเจริญเติบโตของการสร้างเส้นเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็ง ซึ่งความเข้มข้นที่ใช้อยู่ในช่วง 10-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร(29) โดยกลไกของยาจะกีดการเจริญเยื่อผนังเซลล์ และ

ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้ง histone deacetylase ได้ประมาณ 3.42% ซึ่งถือว่าเป็นเป้าหมายที่สำคัญสำหรับการบำบัดโรคมะเร็ง เมื่อศึกษาความเข้มข้นของยาที่มีผลต่อการยับยั้ง sarcoma and melanoma cells อยู่ที่ 5-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่เซลล์ปกติ เซลล์มะเร็งปากมดลูก และเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีการตอบสนองต่อยาน้อยลง โดยกลไกจะยับยั้ง DNA-directed DNA polymerases(30) ซึ่งการศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งต้านมะเร็งของ rifampicin พบว่ามีการศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงระดับของ p53 ใน เซลล์ T47D และ progesterone receptor (PR) เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์เต้านม โดยจากการศึกษาผลของยาในหลอดทดลองสามารถยับยั้งการแสดงออกของ polymerase และยับยั้งการทำงานของ PR ผลของยาจะกีดการเจริญเติบโตของเซลล์ และเกิดการกลายพันธุ์ของ p53 ทำให้ควบคุมการเกิดเนื้องอกได้ และความเข้มข้นของยา rifampicin ที่สามารถลดการเจริญเติบโตของเซลล์ T47D ประมาณ 70-80% คือ 175 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า IC_{50} ของ rifampicin ที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ คือ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร(8)

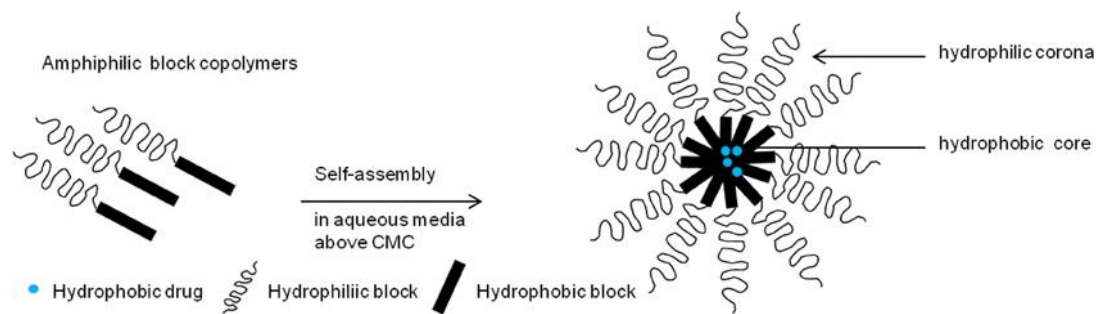
3.ไมเซลล์

ไมเซลล์ คืออนุภาคระดับนาโนของแอมฟิฟิลิกโมเลกุลในสารละลายน้ำที่ประกอบไปด้วย 2 ส่วนคือส่วนที่ชอบน้ำจะเกิดเป็นเปลือกอยู่ด้านนอก ส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะเกิดเป็นโพรงอยู่ด้านใน แอมฟิฟิลิกโมเลกุลจะอยู่เป็นอนุภาคเดี่ยวๆ ที่ผิวประจันระหว่างน้ำกับอากาศ เมื่อเติมแอมฟิฟิลิกโมเลกุลลงในน้ำจนถึงความเข้มข้นหนึ่ง ซึ่งเรียกว่าความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ (critical micelle concentration) จะทำให้การรวมตัวกันของแอมฟิฟิลิกโมเลกุลเป็นรูปทรงต่างๆ การรวมตัวเป็นไมเซลล์นั้นอาศัยปัจจัย 2 อย่างคือ ความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ (critical micelle concentration) และอุณหภูมิ ซึ่งขนาดและรูปร่างของไมเซลล์ขึ้นอยู่กับชนิดของสารและความเข้มข้น นอกจากนี้ยังมีการเกิดไมเซลล์ส่วนที่ชอบน้ำจะเกิดเป็นโพรงอยู่ด้านใน ส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะเกิดเป็นเปลือกอยู่ด้านนอก เรียกว่า อินเวอร์สไมเซลล์

แอมฟิฟิลิกโมเลกุลที่นิยมใช้ได้แก่สารลดแรงตึงผิว และพอลิเมอร์ สารลดแรงตึงผิวแบ่งออกเป็น 4 ประเภทได้แก่ สารลดแรงตึงผิวประจุลบ เช่น carboxylates, sulfonates, sulfates เป็นต้น สารลดแรงตึงผิวประจุบวก เช่น amines, quaternary ammonium halides และ pyridine

groups เป็นต้น สารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุ เช่น polysorbates, sorbitan เป็นต้นและสารลดแรงตึงผิวที่มีทั้ง 2 ประจุ เช่น lecitins, cehalins เป็นต้น(31)

พอลิเมอร์ไมเซลล์ คือบล็อกโคพอลิเมอร์ที่มีทั้งส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ โดยพอลิเมอร์ดังกล่าวจะสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดพอลิเมอร์ไมเซลล์ได้ด้วยตัวมันเอง (self-assembly) เมื่อละลายลงไปในตัวกลางที่เหมาะสมและความเข้มข้นมากกว่าความเข้มข้นเริ่มต้นของการเกิดไมเซลล์(critical micelle concentration : cmc) พอลิเมอร์ไมเซลล์ที่เกิดขึ้นประกอบด้วยส่วนแกนกลางที่เกิดจากการรวมตัวกันของส่วนที่ไม่ชอบน้ำและถูกล้อมรอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำ (core-shell) ดังรูปที่ 9 โดยส่วนใหญ่จะมีอนุภาคเป็นทรงกลม มีขนาดอยู่ในช่วง 10-100 นาโนเมตร เมื่อเปรียบเทียบระหว่างไมเซลล์ที่เกิดจากพอลิเมอร์กับสารลดแรงตึงผิว พบว่าพอลิเมอร์ไมเซลล์มีความคงทนด้านอุณหพลศาสตร์และจลนศาสตร์มากกว่าไมเซลล์ที่เกิดจากสารลดแรงตึงผิว(32)



รูปที่ 9 การจัดเรียงตัวของไมเซลล์(33)

ความสามารถของไมเซลล์ที่เกิดจากบล็อกโคพอลิเมอร์จะเกี่ยวข้องกับการเพิ่มคุณสมบัติการละลายของยาจากการเกิดอันตรกิริยากับส่วนที่ไม่ชอบน้ำในโมเลกุลของบล็อกโคพอลิเมอร์ นอกจากคุณสมบัติที่ช่วยเพิ่มการละลายของตัวยาแล้ว การใช้บล็อกโคพอลิเมอร์เพิ่มความจำเพาะต่อการนำส่งยาไปที่บริเวณเนื้อเยื่อในร่างกายทำให้เกิดความเป็นพิษลดลง นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มความคงตัวของยาในกระแสโลหิตซึ่งมีผลต่อการออกฤทธิ์ในการรักษา โดยทั่วไปพอลิเมอร์ไมเซลล์จะมีขนาดที่เหมาะสมในการหลีกเลี่ยงกระบวนการขั้วถ่ายในร่างกาย (>50kDa) และสามารถแพร่ผ่านผนังเซลล์ได้ (<200 nm) (14, 32)

พอลิเมอร์ที่เลือกมาใช้ในการเตรียมพอลิเมอร์ไมเซลล์ควรมีคุณสมบัติที่สามารถย่อยสลายเข้ากับเนื้อเยื่อของร่างกาย ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และสามารถขจัดออกจากร่างกายได้(11, 34, 35) พอลิเมอร์ที่นิยมนำมาใช้ในการเตรียมพอลิเมอร์ไมเซลล์ไม่ว่าจะเป็นแบบบล็อกโคพอลิเมอร์

(di, tri หรือtetra) หรือกราฟที่โคพอลิเมอร์ซึ่งมีทั้งส่วนชอบน้ำและไม่ชอบน้ำในสายพอลิเมอร์เดียวกัน จะประกอบด้วยสายพอลิเมอร์สายหลักเช่น สาย A และมีสายพอลิเมอร์อื่นมาเชื่อมต่อแสดงในรูปที่ 7 (36) โดยสาย พอลิเมอร์หลักส่วนใหญ่จะเป็นพอลิเมอร์ที่มีขั้วหรือชอบน้ำ (hydrophilic segment) ได้แก่ poly ethylene glycol (PEG), poly(N-vinyl-2pyrrolidone (PVP), poly(ethylene oxide) (PEO), polyelectrolyte และไคโตซาน เป็นต้น ส่วนสายพอลิเมอร์อื่นๆ ที่ไม่ชอบน้ำ ได้แก่ poly(L-amino acid) เช่น poly(L-aspartate), poly(L-glutamate), polyester เช่น poly(glycolic acid) , poly(D- lactic acid) , poly(D,L- lactic acid) , copolymer of lactide/glycolide และ poly- γ -caprolactone เป็นต้น (34-37)

ชนิดของโคพอลิเมอร์	โครงสร้าง		ตัวอย่างพอลิเมอร์
บล็อกโคพอลิเมอร์	di	- block	Poly(styrene)-b-poly(ethylene oxide)
	AAAAAABBBBBBBBBB		
กราฟโคพอลิเมอร์	tri	- block	Poly(ethylene oxide)-b-poly(propylene oxide)-b-poly(ethylene oxide)
	AAAAABBBBBBAAAAA		
	AAAAAABBBBBBBBBB		N-phthaloylchitosan-g-polycaprolactone
	B	B	
	B	B	
	B	B	
		B	

* A-hydrophilic unit; B-hydrophobic unit

รูปที่ 10 ตัวอย่างของบล็อกโคพอลิเมอร์ที่นิยมใช้ในการเตรียมพอลิเมอร์ไมเซลล์ (36)

การบรรจุยาในไมเซลล์ขึ้นกับความเข้ากันได้ของยากับพอลิเมอร์ สามารถแบ่งได้หลายวิธี ได้แก่ วิธีเตรียม polymeric micelle

1. Direct dissolution

ละลายพอลิเมอร์และยาในสารละลายน้ำ ซึ่งวิธีนี้จำเป็นต้องใช้พอลิเมอร์และยาที่สามารถละลายน้ำได้ โมเลกุลของยาจะรวมตัวกันและถูกกักเก็บเข้าไปในไมเซลล์โดยอาศัยอุณหภูมิหรือแรงผสมให้เข้ากัน อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อเสียคือ สามารถกักเก็บยาในไมเซลล์ได้น้อย(38)

2. Dialysis

เป็นการเตรียมโดยผสมยากับพอลิเมอร์ในตัวทำละลาย ซึ่งตัวทำละลายที่เลือกใช้ต้องสามารถละลายได้ทั้งยาและพอลิเมอร์ จากนั้นนำสารละลายผสมของยาและพอลิเมอร์ที่เตรียมได้ใส่ในถุงแยกสารผ่านเยื่อและแช่ในตัวทำละลายที่สามารถละลายได้เฉพาะพอลิเมอร์ส่วนที่ชอบน้ำ เพื่อทำให้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่อยู่ภายในถุงออกมาจากถุงแยกสารผ่านเยื่อจนหมดและมีน้ำเข้าไปแทนที่ ในขณะที่เดียวกันไมเซลล์จะเริ่มก่อตัวขึ้นโดยหุ้มตัวยาวัวภายใน(35)

3. Thin-film hydration

เหมาะสำหรับโคพอลิเมอร์ที่ละลายน้ำได้น้อย เป็นการเตรียมโดยผสมยากับพอลิเมอร์ในตัวทำละลายอินทรีย์ จากนั้นนำไประเหยเอาตัวทำละลายออกเพื่อให้เกิดเป็นฟิล์มบางๆ จากนั้นเติมน้ำ และใช้คลื่นเสียงในการลดขนาดและเกิดเป็นไมเซลล์ ข้อดีคือเป็นวิธีที่ใส่ยาและกักเก็บยาได้มาก ข้อเสียสามารถใช้ได้กับพอลิเมอร์ที่มีค่า HLB ต่ำ(35)

4. Freeze-drying

ละลายยาและพอลิเมอร์ลงในตัวทำละลายของผสมระหว่างน้ำกับตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น water/tert-butanol จากนั้นนำไประเหยเอาน้ำออกจะได้เป็นผงผสมของน้ำและพอลิเมอร์ การเกิดไมเซลล์จะเกิดเมื่อมีการเติมน้ำหรือบัพเฟอร์ลงไปในผงยา ปัญหาของวิธีนี้คืออาจมีตัวทำละลายอินทรีย์หลงเหลืออยู่ในผงยา(38)

5. Microphase separation

ละลายยากับโคพอลิเมอร์ในตัวทำละลายที่ระเหยและเข้ากับน้ำได้ (water-miscible volatile solvent) เช่น tetrahydrofuran (THF) แล้วนำสารละลายลงเป็นหยด (dropwise) ในน้ำภายใต้เครื่องกวนสารจากพลังงานแม่เหล็ก (magnetic stirring) ซึ่งจะเกิดเป็นไมเซลล์ได้เอง จากนั้นนำไประเหยภายใต้ความดันเพื่อนำตัวทำละลายอินทรีย์ออก ข้อเสียคือ อาจมีตัวทำละลายอินทรีย์หลงเหลืออยู่(38)

6. Oil in water emulsion

นำตัวทำละลายอินทรีย์ที่เข้ากับน้ำเช่น dichloromethane หรือ chloroform เติมลงในน้ำที่ประกอบด้วยโคพอลิเมอร์ อย่างช้าๆ และคนตลอดเวลา จะเกิดเป็นสารละลายอิมัลชัน จากนั้นเมื่อนำไประเหยเอาตัวทำละลายออกจึงได้เป็นไมเซลล์ ข้อเสียวิธีนี้คือกำจัดยาอิสระที่ไม่เกิดเป็นไมเซลล์และตัวทำละลายอินทรีย์ออกยาก(38)

7. solvent evaporation

เตรียมโดยผสมยากับพอลิเมอร์ในตัวทำละลายอินทรีย์ หรือ สารผสมของสารละลายอินทรีย์ จากนั้นนำไปผสมในน้ำอย่างรวดเร็ว แล้วนำไประเหยให้สารละลายอินทรีย์ออกอย่างช้าๆ 2 ถึง 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดเป็นไมเซลล์(35)

4. พอลิเมอร์และสารลดแรงตึงผิวที่เกี่ยวข้อง(39)

➤ Poloxamer

1. Nonproprietary Names

BP: Poloxamers

PhEur: Poloxamers

USP-NF: Poloxamer

2. Synonyms

Lutrol; Monolan; Pluronic; poloxalkol; poloxamera; polyethylene–propylene glycol copolymer; polyoxyethylene–polyoxypropylene copolymer; Supronic; Synperonic

3. Chemical Name and CAS Registry Number

a- Hydro- o- hydroxypoly(oxyethylene) poly(oxypropylene) poly-(oxyethylene) block copolymer [9003-11-6]

4. Empirical Formula and Molecular Weight

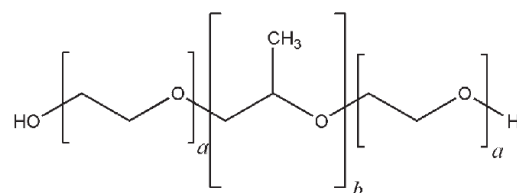
Poloxamer เป็นกลุ่มของ block copolymers ที่ประกอบด้วย ethylene oxide และ propylene oxide ซึ่งมีหลายชนิด ดังรูปที่ 11

Table I: Typical poloxamer grades.

Poloxamer	Physical form	<i>a</i>	<i>b</i>	Average molecular weight
124	Liquid	12	20	2 090–2 360
188	Solid	80	27	7 680–9 510
237	Solid	64	37	6 840–8 830
338	Solid	141	44	12 700–17 400
407	Solid	101	56	9 840–14 600

รูปที่ 11 ชนิดของ Poloxamer (39)

5. สูตรโครงสร้าง



รูปที่ 12 สูตรโครงสร้างของ Poloxamer(39)

6. สูตรอย่างง่าย $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_b(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})$

7. มวลโมเลกุล ดังรูปที่ 11

8. ประโยชน์ในทางเภสัชกรรม

Poloxamers คือ polyoxyethylene–polyoxypropylene copolymers ซึ่งไม่มีประจุ ประกอบไปด้วย 2 ส่วนคือ polyoxyethylene เป็นส่วนที่ชอบน้ำ และ polyoxypropylene เป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ poloxamers ทั้งหมดมีโครงสร้างเหมือนกันแต่แตกต่างกันที่

- ใช้เป็นสารก่ออิมัลชันในรูปแบบยาฉีดไขมัน อิมัลชัน
- ใช้เป็นสารช่วยเพิ่มการละลายเพื่อคงความใสของยาในรูปแบบยาน้ำเชื่อม และอิลิกเซอร์
- ใช้เป็นสารช่วยเปียกในตำรับยาขี้ผึ้ง ยาเหน็บ และเจล
- ใช้เป็น binders and coatings ในยาเม็ด
- ประโยชน์ในการรักษา การรับประทาน Poloxamer 188 ใช้รักษาอาการท้องผูก โดยเป็นสารช่วยเปียกและสารช่วยหล่อลื่น stool lubricant นอกจากนี้ยังมีการใช้ร่วมกับยาถ่ายเช่น danthron
- Poloxamer 338 และ 407 ใช้เป็นสารละลายสำหรับคอนแทคเลนส์

9. จุดหลอมเหลว

- 168°C สำหรับ poloxamer 124
- $52\text{--}578^{\circ}\text{C}$ สำหรับ poloxamer 188
- 498°C สำหรับ poloxamer 237
- 578°C สำหรับ poloxamer 338
- $52\text{--}578^{\circ}\text{C}$ สำหรับ poloxamer 407

10. การละลาย

ขึ้นอยู่กับชนิดของ poloxamer ดังรูปที่ 13

Table IV: Solubility at 20 °C for various types of poloxamer in different solvents.

Type	Solvent				
	Ethanol (95%)	Propan-2-ol	Propylene glycol	Water	Xylene
Poloxamer 124	Freely soluble	Freely soluble	Freely soluble	Freely soluble	Freely soluble
Poloxamer 188	Freely soluble	—	—	Freely soluble	—
Poloxamer 237	Freely soluble	Sparingly soluble	—	Freely soluble	Sparingly soluble
Poloxamer 338	Freely soluble	—	Sparingly soluble	Freely soluble	—
Poloxamer 407	Freely soluble	Freely soluble	—	Freely soluble	—

รูปที่ 13 การละลายของ poloxamer แต่ละชนิดในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน(39)

11. ความคงตัวและการเก็บรักษา

คงตัวในสารละลายกรด เบส หรือสารละลายที่มีโลหะ อย่างไรก็ตามมีโอกาสเกิดเชื้อราในสารละลายน้ำ ควรเก็บในภาชนะปิดสนิทที่เย็นและแห้ง

12. ความปลอดภัย

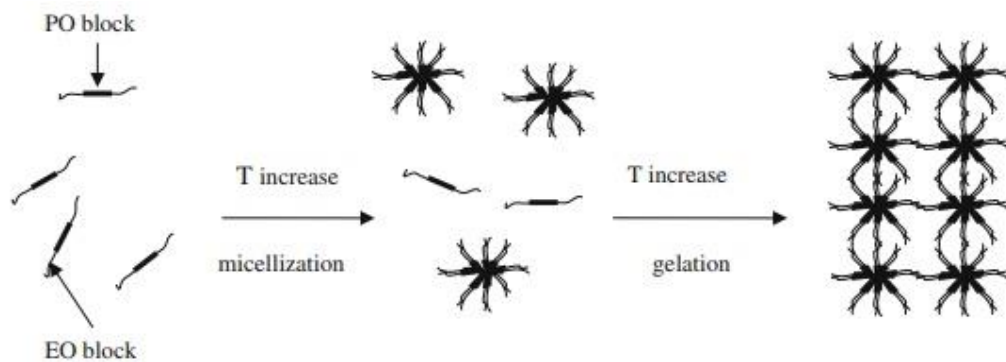
ไม่เกิดพิษ ระคายเคือง และเมทาบอลิซึมในร่างกาย

Poloxamer407(40, 41)

มีส่วนประกอบเป็น ethylene oxide (EO) และ propylene oxide (PO) มีการจัดเรียงตัวของพอลิเมอร์เป็นแบบ triblock (EO x -PO y -EO x) ซึ่งมีสูตรโมเลกุลดังนี้ $\text{HO}[\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{O}]_x[\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{O}]_y[\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{O}]_x\text{OH}$ ในปัจจุบันมีชื่อการค้าที่ได้รับการจดทะเบียนว่า Pluronic F127® (BASF laboratories, Wyandootte, USA) และ Synperonic F127® (ICI laboratories, Wilton, UK) มวลโมเลกุลประมาณ 9,840–14,600 โดยองค์การอาหารและ ยาแห่งสหรัฐอเมริกาแนะนำให้สามารถใช้ได้ในเภสัชภัณฑ์รูปแบบ IV, inhalation, oral solution, suspension, ophthalmic และ topical formulations

สารละลายของ Poloxamer407 มีคุณสมบัติเป็น เจลที่สามารถเปลี่ยนกลับเป็นของเหลว เมื่อได้รับความร้อน (thermoreversible) ในสารละลายจะมีอุณหภูมิหนึ่งที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสถานะของสาร เรียกว่า sol–gel transition temperature

คือ หากมีอุณหภูมิ ณ ขณะนั้นมากกว่าอุณหภูมิที่สารละลายจะมีลักษณะเป็นสารกึ่งแข็ง กึ่งเหลว แต่ถ้าอุณหภูมิที่น้อยกว่าสารจะผันกลับมาเป็นสารละลายเหมือนเดิม โดยการเกิดนั้นจะมีกลไกดังนี้ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มเรื่อยๆ ส่วน polypropylene oxide จะหันตัวเองเข้าด้านในซึ่งเป็นส่วนที่ไม่มีขั้วและ polyethylene oxide จะหันออกด้านนอกซึ่งส่วนที่มีขั้ว จนเกิดเป็นเจล โดยรูปร่างของไมเซลล์จะขึ้นกับสารละลายที่ใช้



รูปที่ 14 คุณสมบัติในการเป็น thermoreversible (40)

จากคุณสมบัติข้างต้นทำให้มีการนำมาใช้ที่หลากหลายในปัจจุบัน เช่น ในอุตสาหกรรมยา เนื่องจากพอลิเมอร์ดังกล่าวที่มีคุณสมบัติสามารถย่อยสลาย เข้ากับเนื้อเยื่อของร่างกายไม่เป็นพิษและสามารถจัดออกจากร่างกายได้ แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานพบว่า poloxamer407 อาจเกิดอันตรกิริยากับสารตัวอื่นๆ ในตำรับได้ เช่น สารช่วย ตัวยา และพอลิเมอร์ตัวอื่นๆ ซึ่งเป็นสิ่งที่ควรระมัดระวังและคำนึงเสมอเมื่อมีการนำไปใช้

ประโยชน์ทางเภสัชกรรม

1. ช่วยเพิ่มการละลายน้ำ

poloxamer407 สามารถเพิ่มค่าการละลายของยาที่ละลายน้ำต่ำได้หลากหลายสูตรตำรับเช่น ยาเม็ด ยาทาสำหรับภายนอก ยาตา ยาเหน็บทางทวาร ยาพ่นจมูกและยาฉีดเข้าหลอดเลือดดำ เป็นต้น(40) จากการศึกษาพบว่า ระบบ nanocapsules ของยา paclitaxel โดยใช้ poloxamer407 เป็นส่วนประกอบ สามารถเพิ่มค่าการละลายของยาที่ละลายน้ำต่ำได้ (42)

2. ช่วยเพิ่มการซึมผ่าน

จากการศึกษาผลของสูตรตำรับที่ส่งผลต่อการซึมผ่านผิวหนังชั้น percutaneous ของยา ketoprofen รูปแบบเจล พบว่าสูตรตำรับที่มี poloxamer407 เป็นส่วนประกอบ ช่วยเพิ่มการซึมผ่านของยาได้ดี(43)

3. ช่วยเพิ่มความคงตัว

จากการศึกษาการพัฒนาสูตรตำรับยาตา indomethacin ซึ่งใช้ pluronic F68 (15%) และ F127 (10%) เป็นส่วนประกอบของตำรับ พบว่าสามารถช่วยเพิ่มค่าการละลายของยาและเพิ่มความคงตัวทางเคมีของยา(44)

4. ช่วยเพิ่มการยึดเกาะ

จากการศึกษาการผสมระหว่าง poloxamer407 และสารช่วยยึดเกาะเยื่อเซลล์ พบว่าด้วยคุณสมบัติ thermoreversible gel ของตัว poloxamer407 ช่วยเพิ่มแรงยึดเกาะ ทำให้ยึดเกาะกับเยื่อได้ดียิ่งขึ้น (40)

➤ Lecithin(39)

1. Nonproprietary Names

USP-NF: Lecithin

2. Synonyms

USP-NF: egg lecithin; LSC 5050; LSC 6040; mixed soybean phosphatides; ovollecithin; Phosal 53 MCT; Phospholipon 100 H; ProKote LSC; soybean lecithin; soybean phospholipids; Sternpur; vegetable lecithin.

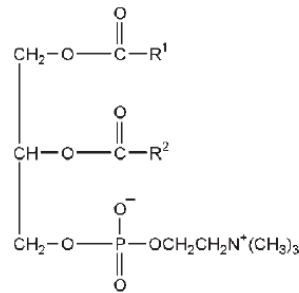
3. Chemical Name and CAS Registry Number

Lecithin [8002-43-5]

4. Empirical Formula and molecular weight

Lecithin เป็นส่วนผสมของ phosphatides ที่ไม่ละลายในอะซิโตน ที่ประกอบด้วย phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, และ phosphatidylinositol ผสมกับสารอื่นเช่น triglycerides, fatty acids และ carbohydrates ที่แยกจากสารระเหยน้ำมัน ส่วนประกอบที่อยู่ใน lecithin มีความหลากหลายมากขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาและความบริสุทธิ์

5. สูตรโครงสร้าง



R1 และ R2 เป็นกรดไขมันในซึ่งอาจจะเหมือนหรือต่างกันได้

รูปที่ 15 สูตรโครงสร้างของ Poloxamer(39)

6. หน้าที่

สารให้ความชุ่มชื้น สารก่ออิมัลชัน สารเพิ่มการละลาย

7. ประโยชน์ในทางเภสัชกรรม

- ใช้เป็นสารช่วยกระจายตัว สารก่ออิมัลชัน สารเพิ่มความคงทน รวมไปถึงมีการใช้ในตำรับยาฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ยาฉีดเข้าหลอดเลือดดำ สารอาหารที่ให้ทางหลอดเลือด ยาทาสำหรับใช้ภายนอก เช่น ครีม ขี้ผึ้ง และยังมีการใช้เป็นยาพื้นของตำรับยาเหน็บ
- สามารถเพิ่มการดูดซึมในตำรับยาพ่นจมูกอินซูลิน
- มีหลักฐานกล่าวว่า อาหารเสริมที่มี phosphatidylcholine ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของ lecithin มีความสำคัญต่อพัฒนาการของเด็กแรกเกิดและทารก
- จากงานวิจัย lecithin สามารถป้องกันโรคตับแข็งที่เกิดจากแอลกอฮอล์ และทำให้คุณภาพจิตใจและร่างกายดีขึ้นอีกด้วย
- ใช้เป็นส่วนประกอบในระบบนำส่งยาไลโปโซม

8. การละลาย

Lecithin ละลายใน aliphatic and aromatic hydrocarbons, halogenated hydrocarbons, mineral oil, และ fatty acids ไม่ละลายใน cold vegetable and animal oils, polar solvents และ water

9. ความคงตัวและการเก็บรักษา

Lecithins สลายตัวได้ในสภาวะ pH ที่สูงมากหรือต่ำมาก ดูดความชื้น ที่อุณหภูมิ 160–180 °C จะสลายตัวภายใน 24 ชั่วโมง สารละลายหรือขี้ผึ้ง lecithin ควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องหรือเหนือกว่า ที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 10 °C อาจเกิดแยกชั้นได้ ควรเก็บ lecithin ในภาชนะปิดสนิทป้องกันแสงและการเกิดออกซิเดชัน lecithin ที่เป็นของแข็งบริสุทธิ์ควรเก็บไว้ในภาชนะปิดสนิทได้ช่องแช่แข็ง

10. ความปลอดภัย

Lecithin เข้ากับสารในร่างกายนได้สูง ไม่ระคายต่อผิวหนังและก่อให้เกิดการแพ้

➤ Hexadecyltrimethylammonium bromide(39)

1. Nonproprietary Names

BP: Cetrimide

PhEur: Cetrimide

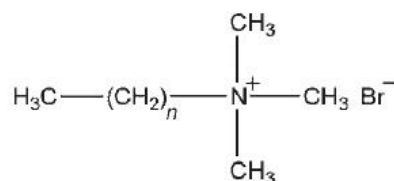
2. Synonyms

Cetrimide BP 1953; cetrimonium bromide; cetyltrimethylammonium bromide; CTAB; N,N,N-trimethylhexadecylammonium bromide

3. Chemical Name and CAS Registry Number

Cetrimide [57-09-0]

4. สูตรโครงสร้าง



รูปที่ 16 สูตรโครงสร้างของ Poloxamer(39)

การเรียกชื่อสารเมื่อ $n = 15$ for hexadecyltrimethylammonium bromide

5. สูตรอย่างง่าย C₁₉H₄₂BrN

6. มวลโมเลกุล 364.48

7. ประโยชน์ในทางเภสัชกรรม

- ใช้เป็นสารทนอมในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง และยาหรืออาจใช้เป็นสารลดแรงตึงผิวชนิด ประจุบวก ตัวอย่างของการนำไปใช้เป็นสารทนอมในยาหยอดตา
- เมื่อใช้ความเข้มข้น 0.1-1.0% w/v ในสารละลายน้ำจะมีคุณสมบัติเป็นยาฆ่าเชื้อสำหรับผิวหนัง
- สารละลายที่มีความเข้มข้น 10% w/v จะใช้เป็นแชมพูเพื่อกำจัดสะเก็ดรังแค
- ใช้เป็นสารทำความสะอาดและฆ่าเชื้อสำหรับคอนแทกเลนส์ชนิดแข็ง

8. จุดหลอมเหลว (melting point)

237–243 °C

9. การละลาย (Solubility)

สามารถละลายได้บ้างในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% และละลายหนึ่งในสิบส่วนของน้ำ

10. ความคงตัวและการเก็บรักษา

มีความคงตัวในบริเวณที่แห้งและสารละลายน้ำในอุณหภูมิห้องโดยสารละลายสามารถนำไปทำให้ปราศจากเชื้อได้ด้วยวิธีความร้อนขึ้น น้ำที่ประกอบไปด้วยไอออนของโลหะหรือสารอนินทรีย์จะทำให้คุณสมบัติการเป็นสารทนอมลดลง ควรเก็บสารไว้ในภาชนะปิดสนิทในบริเวณที่เย็นและแห้ง

11. ความปลอดภัย

LD₅₀ (guinea pig, SC): 100 mg/kgLD₅₀ (mouse, IP): 106 mg/kgLD₅₀ (mouse, IV): 32 mg/kgLD₅₀ (rabbit, IP): 125 mg/kgLD₅₀ (rabbit, SC): 125 mg/kgLD₅₀ (rat, IV): 44 mg/kgLD₅₀ (rat, oral): 410 mg/kg

4.งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง(7, 15, 45-48)

Saxena และคณะได้ทำการศึกษาระบบนำส่ง gambogic acid ซึ่งเป็นสารสกัดจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งแต่มีปัญหาที่สำคัญคือค่าการละลายต่ำจึงได้มี

การพัฒนาาระบบนำส่งแบบไมเซลล์ ประกอบไปด้วย Poloxamers และ D-alpha - Tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS ผลการศึกษาในหลอดทดลอง พบว่ามีการปลดปล่อย gambogic acid แบบเนิ่นเป็นเวลา 4 วัน นอกจากนั้นยังพบว่า ระบบนำส่งแบบไมเซลล์ยังสามารถเพิ่มการนำเข้าของ gambogic acid ในเซลล์มะเร็ง ชนิด NCI/ADR-RES ที่เป็นเซลล์มะเร็งที่ดื้อต่อยาค่อนข้างมากและเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 cells ยังมีการพัฒนาการนำส่งสาร curcumin ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกซึ่งให้ผลไปในทางเดียวกัน

Krasnici และคณะได้ทำการศึกษาอิทธิพลของประจุบนผิวต่อการนำเข้าสู่เซลล์ พบว่า liposome ที่ผิวเป็นประจุบวกจะมีการสะสมมากและจำเพาะในหลอดเลือดของ เซลล์มะเร็งมากกว่าประจุลบ โดยจากผลการศึกษาข้างต้นทำให้สามารถนำ liposome ที่ผิวเป็นประจุบวกไปใช้กับการนำส่งยาและการวินิจฉัยสำหรับ angiogenic blood vessels ของ solid tumors แต่ liposome ที่ผิวเป็นประจุลบและกลางสามารถนำไปใช้ส่วนของ หลอดเลือดภายนอกของเซลล์มะเร็งซึ่ง Yifan และคณะได้ทำการศึกษาผลของประจุบน ผิวของ liposome เช่นกัน โดยใช้ liposome ชนิดที่ผิวเป็นประจุบวกในการนำส่งวัคซีนใน เคนไคตริกเซลล์พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีนได้

Nguyen และคณะทำได้การศึกษาระบบนำส่งยา paclitaxel ซึ่งใช้ soybean- lecithin ทำ liposome ด้วยวิธี thin film method เมื่อทำการวัดค่า zeta potential พบว่า ให้ค่าประจุที่ผิวเป็นลบ โดยจากการศึกษาพบว่าสามารถเพิ่มความคงตัวของยา สามารถ ย่อยสลายได้ในร่างกาย และยังเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษามะเร็ง

Dagmara และคณะ ได้รายงานเกี่ยวกับการเข้าเซลล์ของระบบนำส่งด้วย liposome นั้นไม่ได้ขึ้นกับ electrostatic force (แรงทางประจุไฟฟ้า) เพียงอย่างเดียว ยังมี ปัจจัยอื่นๆ เช่น ตัวรับบนผิว liposome

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

- | | |
|---------------------------------|---------------------|
| 1. Beaker | 2. Cylinder |
| 3. Micropipette | 4. pipette |
| 5. Tips | 6. Droppers |
| 7. Stirring rod | 8. Volumetric flask |
| 9. Membrane filter 0.45 μ m | 10. Syringe |

เครื่องมือ

- | | |
|--|-----------------------------|
| 1. เครื่องซั่ง 4 ตำแหน่ง | 2. Rotary evaporator |
| 3. Zetasizer | 4. UV-vis spectrophotometer |
| 5. Microplate reader | 6. Sonicator |
| 7. High performance liquid chromatography (HPLC) | |

สารเคมี

- | | |
|---------------------------------|--------------------------------------|
| 1. Acetonitrile | 2. Water |
| 3. Ethanol | 4. Acetone |
| 5. 1% TritonX | 6. 0.1% Crystal violet in PBS 7.4 |
| 7. Trypsin | 8. 10% Acetic acid in purified water |
| 9. 1% Glutaraldehyde in PBS 7.4 | 10. Rifampicin |
| 11. DMEM | 12. FBS |
| 13. 1% antibiotic-antimycotic | 14. 1% L-glutamax |
| 15. CTAB | 16. Lecithin |
| 17. Poloxamer407 | 18. PBS |
| 19. trypan blue | |

ตอนที่ 1 : ศึกษาและพัฒนาระบบนำส่งยาในรูปแบบ micelle ที่มีส่วนประกอบของ poloxamer407

1. ศึกษาผลของ poloxamer407 ต่อการเกิด polymeric micelle ด้วยวิธีการ thin-film hydration method โดยมีกระบวนการดังนี้
 - 1.1. เตรียม poloxamer 50, 100, 200, 500, 750 และ 1000 mg โดยนำแต่ละสูตรมาละลายด้วย acetonitrile ปริมาตร 10 ml ใน round-bottom flask คนละใบ
 - 1.2. หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทำให้เกิดฟิล์มด้วยวิธี thin film hydration โดยการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่ความดัน 120 mbar อุณหภูมิ 45°C และรอบหมุน 2.5 rpm
 - 1.3. ทำการ dehydration ด้วยน้ำปริมาตร 10 ml เพื่อให้ฟิล์มเกิดเป็น polymeric micelle
 - 1.4. เมื่อได้อนุภาค polymeric micelle นำมาลดขนาดอนุภาคด้วยการ sonicate เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น นำมากรองด้วย membrane filter 0.45 μm ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 25 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ
 - 1.5. หลังจากปรับปริมาตรแล้วนำสารละลายที่เตรียมได้ไปวัด size และ zeta ด้วยเครื่อง zetasizer
2. ศึกษาผลของ poloxamer407 ต่อการเกิด polymeric micelle และการ load ยา rifampicin ด้วยวิธีการ thin-film hydration method โดยมีกระบวนการดังนี้
 - 2.1. เตรียม poloxamer 50, 100, 200, 500, 750 และ 1000 mg โดยนำแต่ละสูตรมาละลายด้วย acetonitrile ปริมาตร 10 ml ใน round-bottom flask คนละใบ
 - 2.2. หลังจากนั้นนำ rifampicin 10 mg มาละลายด้วย acetonitrile ปริมาตร 10 ml แล้วผสมลงใน round-bottom flask ในข้อที่ 2.1.
 - 2.3. นำสารละลายที่ได้ไปทำให้เกิดฟิล์มด้วยวิธี thin film hydration โดยระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่ความดัน 120 mbar อุณหภูมิ 45°C และรอบหมุน 2.5 rpm
 - 2.4. ทำการ dehydration ด้วยน้ำปริมาตร 10 ml เพื่อให้ฟิล์มเกิดเป็น polymeric micelle
 - 2.5. เมื่อได้อนุภาค polymeric micelle นำมา sonicate เพื่อลดขนาดอนุภาค เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น นำมากรองด้วย membrane filter 0.45 μm เพื่อกรอง rifampicin ที่ไม่ถูก

กักเก็บใน polymeric micelle ออก กรองลงใน volumetric flask ขนาด 25 ml แล้ว
ปรับปริมาตรด้วยน้ำ

- 2.6. หลังจากปรับปริมาตรแล้วนำสารละลายที่เตรียมได้ไปวัด size และ zeta ด้วยเครื่อง zetasizer
- 2.7. เตรียมสารละลายยา rifampicin standard (ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.25, 0.5, 1, 10, 250 และ 500 µg/ml ที่ละลายด้วย acetonitrile) เพื่อทำกราฟมาตรฐานในการหาปริมาณตัวยาที่ถูกกักเก็บใน polymeric micelle
- 2.8. หลังจากนั้นนำสารละลายยา rifampicin standard ที่เตรียมได้ไปวัดปริมาณยาด้วยเครื่อง uv-vis spectrophotometer โดยใช้ wavelength ที่ 470 nm
- 2.9. แบ่งสารละลายในข้อ 2.5 มา 1 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 10 ml แล้วปรับปริมาตรด้วย acetonitrile จากนั้นจึงนำไปวัด entrapment ด้วยเครื่อง uv-vis spectrophotometer โดยใช้ wavelength ที่ 470 nm
- 2.10. ทำการเลือกสูตร polymeric micelle ที่เหมาะสม โดยพิจารณาจาก size, PDI และ %entrapment จากสูตรต่อไปนี้ $\% EE = (c \text{ drug load} / c \text{ total drug}) \times 100$

ตอนที่ 2 : ศึกษา พัฒนาและเปรียบเทียบระบบนำส่งยาในรูปแบบ micelle ที่มี ส่วนประกอบของ poloxamer407 และ CTAB หรือ lecithin

1. ศึกษาผลของ poloxamer407 และ CTAB หรือ lecithin ต่อการเกิด polymeric micelle ด้วยวิธีการ thin-film hydration method โดยมีกระบวนการดังนี้
 - 1.1. เตรียมสารละลาย poloxamer ต่อ CTAB ในอัตราส่วน 10:1, 20:1 และ 50:1 โดยนำ poloxamer ปริมาณ 200 mg มาละลายด้วย acetonitrile ปริมาตร 10 ml และละลาย CTAB ตามสัดส่วนดังกล่าว ด้วย ethanol ปริมาตร 10 ml ลงใน round-bottom flask คน ละใบ
 - 1.2. นำสารละลายที่ได้ไปทำให้เกิดฟิล์มด้วยวิธี thin film hydration โดยระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่ความดัน 120 mbar อุณหภูมิ 45°C และรอบหมุน 2.5 rpm
 - 1.3. ทำการ dehydration ด้วยน้ำปริมาตร 10 ml เพื่อให้ฟิล์มเกิดเป็น polymeric micelle

- 1.4. เมื่อได้อนุภาค polymeric micelle นำมา sonicate เพื่อลดขนาดอนุภาคเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมากรองด้วย membrane filter 0.45 μm ลงใน volumetric flask ขนาด 25 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ
- 1.5. หลังจากปรับปริมาตรแล้วนำสารละลายที่เตรียมได้ไปวัด size และ zeta ด้วยเครื่อง zetasizer
- 1.6. เตรียมสารละลาย poloxamer ต่อ lecithin ในอัตราส่วน 10:1, 20:1, 50:1 โดยนำ poloxamer ปริมาณ 200 mg มาละลายด้วย acetonitrile ปริมาตร 10 ml และละลาย lecithin ตามสัดส่วนดังกล่าวด้วย ethanol 10 ml ใน round-bottom flask คนละใบ แล้วทำตามขั้นตอนข้อ 1.2.-1.5.
2. ศึกษาผลของ poloxamer407 และ CTAB หรือ lecithin ต่อการเกิด polymeric micelle ที่ load ยา rifampicin ด้วยวิธีการ thin-film hydration method โดยมีกระบวนการดังนี้
 - 2.1. เตรียมสารละลาย poloxamer ต่อ CTAB ในอัตราส่วน 10:1, 20:1 และ 50:1 โดยนำ poloxamer ปริมาณ 200 mg มาละลายด้วย acetonitrile ปริมาตร 10 ml และละลาย CTAB ตามสัดส่วนดังกล่าวด้วย ethanol ปริมาตร 10 ml ลงใน round-bottom flask คนละใบ
 - 2.2. นำ rifampicin 10 mg มาละลายด้วย acetonitrile ปริมาตร 10 ml แล้วผสมลงใน round-bottom flask ในข้อที่ 2.1.
 - 2.3. นำสารละลายที่ได้ไปทำให้เกิดฟิล์มด้วยวิธี thin film hydration โดยระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่ความดัน 120 mbar อุณหภูมิ 45°C และรอบหมุน 2.5 rpm
 - 2.4. ทำการ dehydration ด้วยน้ำ 10 ml เพื่อทำให้เกิด polymeric micelle
 - 2.5. เมื่อได้อนุภาค polymeric micelle นำมา sonicate เพื่อลดขนาดอนุภาคเป็นเวลา 15 นาที จากนั้น นำมากรองด้วย membrane filter 0.45 μm เพื่อกรอง rifampicin ที่ไม่ถูกกักเก็บใน polymeric micelle ออก ลงใน volumetric flask ขนาด 25 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ

- 2.6. หลังจากปรับปริมาตรนำสารละลายที่เตรียมได้ไปวัด size และ zeta ด้วยเครื่อง zetasizer
- 2.7. เตรียมสารละลาย poloxamer ต่อ lecithin ในอัตราส่วน 10:1, 20:1, 50:1 โดยนำ poloxamer ปริมาณ 200 mg มาละลายด้วย acetonitrile ปริมาตร 10 ml และละลาย lecithin ตามสัดส่วนดังกล่าวด้วย ethanol 10 ml ลงใน round-bottom flask คนละใบ แล้วทำตามขั้นตอนข้อ 2.2.-2.6.
- 2.8. หลังจากนั้นเตรียมสารละลายยา rifampicin standard (ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.25, 0.5, 1, 10, 250 และ 500 µg/ml ที่ละลายด้วย acetonitrile) เพื่อทำกราฟมาตรฐานในการหาปริมาณตัวยาที่ถูกกักเก็บใน polymeric micelle
- 2.9. นำสารละลายยา rifampicin standard ไปวัดปริมาณยาด้วยเครื่อง uv-vis spectrophotometer โดยใช้ wavelength 470 nm
- 2.10. แบ่งสารละลายในข้อ 2.5. มา 1 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 10 ml แล้วปรับปริมาตรด้วย acetonitrile จากนั้นจึงนำไปวัด entrapment ด้วยเครื่อง uv-vis spectrophotometer โดยใช้ wavelength 470 nm
- 2.11. ทำการเลือกสูตร polymeric micelle ที่เหมาะสม โดยพิจารณาจาก size, PDI และ % entrapment จากสูตรต่อไปนี้ $\% EE = (c \text{ drug load} / c \text{ total drug}) \times 100$

ตอนที่ 3 : ศึกษาผลของ polymeric micelle ที่มีส่วนประกอบของ poloxamer407 และ CTAB หรือ lecithin ที่ load ยา rifampicin ต่อประสิทธิภาพในการนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง

1. การศึกษาคุณสมบัติ cellular uptake

1.1. ขั้นตอนในการเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

- 1.1.1. เลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7 cell) โดยใช้สูตร media ประกอบด้วย dulbecco's modified minimum essential medium (DMEM), 10% fetal bovine serum (FBS), 1% antibiotic-antimycotic และ 1% L-glutamax
- 1.1.2. นำเซลล์มะเร็งที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมา incubate ที่อุณหภูมิ $37^{\circ}\text{C} \pm \text{CO}_2$ 5% ที่ทำให้เซลล์เจริญเติบโตใน culture flask ขนาด 75 cm^2 โดยเปลี่ยน medium ทุก 3 วัน

1.1.3. Subculture เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์มีขั้นตอนดังนี้

1. ดูด media ที่ใช้เลี้ยงเซลล์เดิมทิ้ง
2. ล้างผิวเซลล์โดยปิเปต sterile PBS 10 ml ใส่ลงใน flask แล้วดูดสารละลายทิ้ง
3. ปิเปต trypsin 2 ml ใส่ลงใน flask แล้วเคาะ flask เพื่อให้เซลล์ที่เกาะอยู่หลุดออก
4. ทำการหยุดปฏิกิริยาของ trypsin โดยปิเปต media 2 ml ใส่ลงใน flask แล้วดูดสารละลายที่ได้ใส่ centrifuge tube ขนาด 15 ml
5. นำสารละลายไป centrifuge โดยใช้ความเร็วรอบ 1500 rpm 4°C นาน 5 นาที จากนั้นดูด supernatant ทิ้ง
6. เมื่อดูด supernatant จนหมดจึงปิเปต media 2 ml ใส่ในหลอด centrifuge tube เพื่อให้เซลล์กระจายตัวอีกครั้ง
7. ดูดของเหลวที่มีเซลล์ 20 μ l ผสมกับ trypan blue 20 μ l แล้วนำไปนับเซลล์ด้วยกล้อง invert microscope โดยใช้สูตรตามด้านล่าง เพื่อใช้ศึกษาคุณสมบัติ cellular uptake และ cytotoxicity ต่อไป

$$\text{จำนวนเซลล์/ml} = \text{จำนวนเซลล์ที่นับ/จำนวนช่อง} \times \text{dilution factor} (2) \times 10^4$$

- 1.2. Seed MCF-7 cell จำนวน 50,000 cells/well ลงใน 24 well plate โดยทำเหมือนกันจำนวน 2 plate เพื่อศึกษาผลของการกักเก็บยาที่เวลา 2 และ 4 ชั่วโมง หลังจากนั้น treat cells ด้วยตัวอย่างปริมาตร 1 ml ซึ่งแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่ม ทำกลุ่มละ 3 ซ้ำ ดังนี้

1. กลุ่มที่ใส่ poloxamer 407 ที่กักเก็บ rifampicin (ดูดมา 940 μ l แล้วปรับปริมาตรด้วย media จนครบ 1 ml)
2. กลุ่มที่ใส่ poloxamer 407: CTAB (10:1) ที่กักเก็บ rifampicin (ดูดมา 940 μ l แล้วปรับปริมาตรด้วย media จนครบ 1 ml)
3. กลุ่มที่ใส่ poloxamer 407: lecithin (50:1) ที่กักเก็บ rifampicin (ดูดมา 1 ml)

- 1.3. เมื่อเวลาครบ 2 ชั่วโมง นำ plate แรกมาเทสารละลายทิ้ง แล้วล้าง plate ด้วย PBS 1 ml/well เพื่อกำจัดยาที่ไม่เข้าเซลล์ออก

- 1.4. เทสสารละลาย PBS ที่ทิ้งแล้วทำให้ผนังเซลล์แตก (cells lysis) เพื่อละลาย rifampicin ออกมาจาก cells โดยใช้ 1% TritonX 500 μ l/well
- 1.5. นำสารละลายหลังการ lysate มากรองด้วย membrane 0.45 μ m เพื่อกำจัดผนังเซลล์ออก แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เพื่อหาปริมาณยาที่ uptake เข้าไปในเซลล์
- 1.6. เตรียมสารละลายยา rifampicin standard ทั้งหมด 7 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.01, 0.25, 0.5, 1, 10, 250 และ 500 μ m/ml ที่ละลายด้วย acetonitrile และวิเคราะห์ปริมาณยาด้วยเครื่อง HPLC เพื่อทำการพลาสมาฐานในการวิเคราะห์หาปริมาณตัวยารifampicin ที่สามารถ uptake เข้าเซลล์ได้ โดยใช้ condition ดังนี้
 - mobile phase : 0.01 M NaH_2PO_4 : ACN (50:50)
 - stationary phase : C18 (254 mm x 4.6mm)
 - flow rate : 1.00 ml/min
 - UV detector wavelength: 254 nm
 - running time 10 min
 - injection volume 20.00 μ L
 - retention time : 3.7
- 1.7. เมื่อเวลาครบ 4 ชั่วโมง นำ plate ที่สองมาทำเช่นเดียวกับข้อ 1.3.-1.5.
2. การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง
 - 2.1. seed cells จำนวน 10,000 cells/well ลงใน 24 well plate หลังจากนั้น treat ด้วยตัวอย่างปริมาตร 1 ml ซึ่งแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 8 กลุ่ม ดังนี้
 1. กลุ่ม control : ไม่ได้ใส่สารใดๆ
 2. กลุ่ม positive control : ใส่ 1% tritonX
 3. กลุ่มที่ใส่ poloxamer 407 : CTAB (10:1)
 4. กลุ่มที่ใส่ poloxamer 407 : lecithin (50:1)
 5. กลุ่มที่ใส่ poloxamer 407
 6. กลุ่มที่ใส่ poloxamer 407 ที่กักเก็บ rifampicin (ดูตามา 940 μ l แล้วปรับปริมาตรด้วย media จนครบ 1 ml)

7. กลุ่มที่ใส่ poloxamer 407 : CTAB (10:1) ที่กักเก็บ rifampicin (ดูดมา 950 μ l แล้วปรับปริมาตรด้วย media จนครบ 1 ml)

8. กลุ่มที่ใส่ poloxamer 407 : lecithin (50:1) ที่กักเก็บ rifampicin (ดูดมา 1 ml)

2.2. วิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตด้วยวิธี crystal violet ด้วยวิธีดังนี้

2.2.1. เท media ที่จกนั้น fix cells ด้วย 1% glutaraldehyde in PBS 7.4 1 ml/well เป็นเวลา 10 นาที

2.2.2 เมื่อครบเวลาให้เทสารละลายทิ้งนำ plate มาย้อมสีเซลล์ที่ติดอยู่กับ plate ด้วย crystal violet 1 ml/well แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที

2.2.3. นำ plate ที่ย้อมเสร็จแล้วไปส่องด้วยกล้อง inverted microscope เพื่อดูการติดสีของเซลล์

2.2.4. ละลายสี crystal violet ที่ติดอยู่ในเซลล์ออกมา โดย lysate cells ด้วย 10% acetic acid in purified water ปริมาตร 1 ml

2.2.5. นำสารละลาย crystal violet ที่ได้ดูดมาใส่ 96 well plate 1 ml/well ไปวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 600 nm แล้วนำค่า absorbance ที่ได้มาคำนวณ % viability โดยใช้สูตรดังนี้

$$\% \text{ viability} = \text{absorbance of treat cells} / \text{absorbance of control cells} \times 100$$

3. การแสดงผลข้อมูล : mean $\pm$ SD สถิติ one way ANOVA และวิเคราะห์โดย Tukey's Honestly Significant Difference (HSD)

4. วิเคราะห์ผล และสรุปผลการทดลอง

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ตอนที่ 1 : ศึกษาและพัฒนาระบบนำส่งยาในรูปแบบ micelle ที่มีส่วนประกอบของ poloxamer407

1. ผลของ poloxamer407 ต่อการเกิด polymeric micelle

ตารางที่ 1 แสดงขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และ zeta potential ของ polymeric micelle

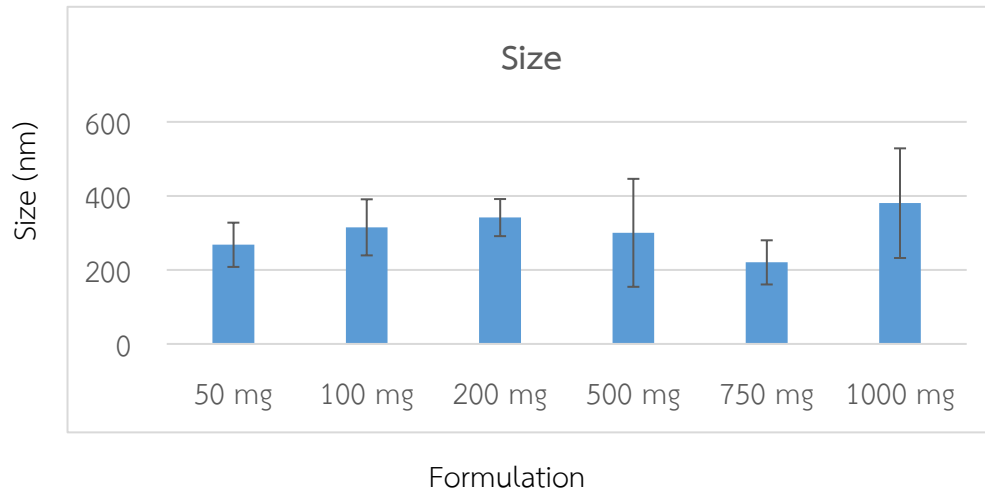
Formulation	Size(nm)	PDI	zeta potential(mV)
Poloxamer407 50 mg	267.84 ± 59.78	0.48 ± 0.22	-4.69 ± 2.94*
Poloxamer407 100 mg	314.96 ± 75.79	0.53 ± 0.14	-4.65 ± 1.86*
Poloxamer407 200 mg	341.36 ± 50.12	0.58 ± 0.13	-8.63 ± 1.05
Poloxamer407 500 mg	300.19 ± 145.90	0.73 ± 0.03	-7.44 ± 2.27
Poloxamer407 750 mg	220.30 ± 59.69	0.59 ± 0.25	-12.11 ± 0.83**
Poloxamer407 1000 mg	380.31 ± 148.14	0.72 ± 0.05	-5.99 ± 1.49***

Each value presents the mean ± SD (n=3); * $P < 0.05$ compare with Poloxamer407 750

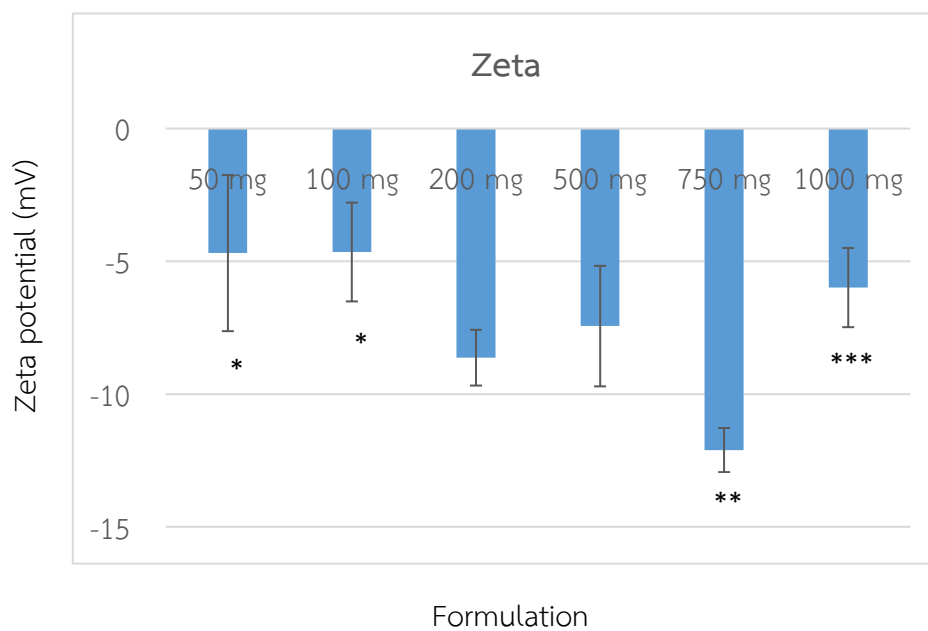
mg; ** $P < 0.05$ compare with Poloxamer407 50 mg, 100 mg, 1000 mg; *** $P < 0.05$

compare with Poloxamer407 750

1.1. ผลการวัดขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และ zeta potential ของ polymeric micelle



รูปที่ 17 แสดงขนาดอนุภาคของ polymeric micelle ที่เตรียมจาก poloxamer ขนาดต่างๆ



รูปที่ 18 แสดง zeta potential ของ polymeric micelle ที่เตรียมจาก poloxamer ขนาดต่างๆ

(* $P < 0.05$ compare with Poloxamer407 750 mg; ** $P < 0.05$ compare with Poloxamer407 50 mg, 100 mg, 1000 mg; *** $P < 0.05$ compare with Poloxamer407 750 mg)

จากผลการวัดขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาคและ zeta potential ของ polymeric micelle ที่เตรียมจาก poloxamer407 ขนาด 50, 100, 250, 500, 750 และ 1,000 mg พบว่า การเพิ่มปริมาณของ poloxamer407 ทำให้ขนาดอนุภาคของ polymeric micelle ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญแต่มีแนวโน้มเพิ่มการกระจายขนาดอนุภาคทำให้มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานมากขึ้น จากการวิจัยของ Rabah ถึงลักษณะรูปร่างของ micelle ที่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวพบว่าความเข้มข้นที่มากขึ้นสัมพันธ์กับค่า critical packaging parameter (CPP) ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงลักษณะรูปร่างของ micelle เมื่อค่า $0 < CPP < 1/3$ สารลดแรงตึงผิวก่อตัวเป็น spherical micelles หาก $1/3 < CPP < 1/2$ สารลดแรงตึงผิวส่วนใหญ่ก่อตัวเป็น rod-like shape หรือ hexagonal หาก $1/2 < CPP < 1$ สารลดแรงตึงผิวส่วนใหญ่ก่อตัวเป็น planar bilayer หรือ vesicles ดังนั้นหากค่า CPP เพิ่มขึ้นทำให้เกิดการกระจายขนาดอนุภาคและรูปร่าง micelle มากขึ้น(49) นอกจากนี้กลุ่มที่มีปริมาณ poloxamer407 50 และ 100 mg มีค่า zeta potential แตกต่างจากกลุ่มที่มี poloxamer407 750 mg อย่างมีนัยสำคัญ $P\text{-value} < 0.05$ และกลุ่มที่มี poloxamer407 750 mg แตกต่างจากกลุ่มที่มี poloxamer407 1,000 mg อย่างมีนัยสำคัญ $P\text{-value} < 0.05$

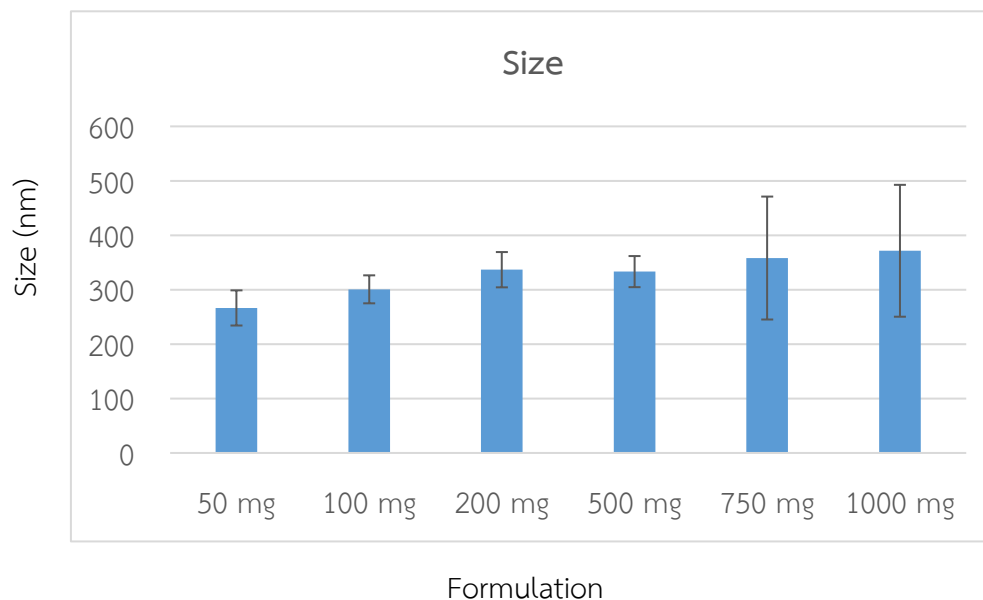
2. ผลของ poloxamer407 ต่อการเกิด polymeric micelle และการ load ยา rifampicin

ตารางที่ 2 แสดงขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค zeta potential และ %entrapment ของ polymeric micelle

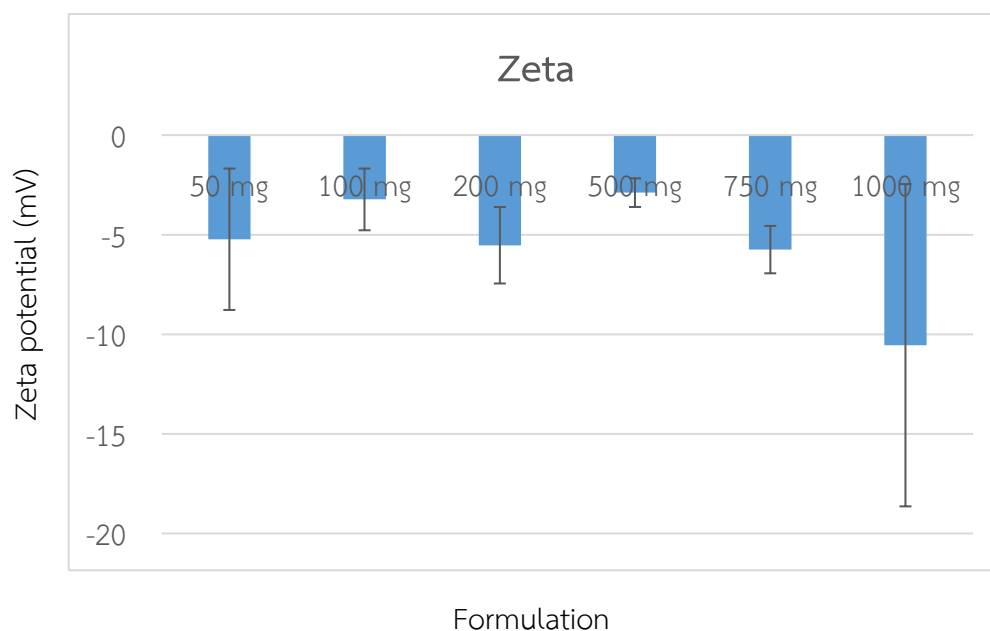
Formulation	Size (nm)	PDI	zeta potential (mV)	%entrapment
Poloxamer 50 mg	266.44 ± 32.30	0.52 ± 0.09	-5.23 ± 3.55	84.03 ± 11.41
Poloxamer100 mg	300.63 ± 25.69	0.57 ± 0.04	-3.23 ± 1.55	85.73 ± 8.63
Poloxamer 200 mg	336.70 ± 32.42	0.48 ± 0.16	-5.53 ± 1.92	92.05 ± 7.26
Poloxamer 500 mg	333.20 ± 28.57	0.63 ± 0.17	-2.89 ± 0.72	88.79 ± 11.95
Poloxamer 750 mg	358.12 ± 112.93	0.71 ± 0.06	-5.75 ± 1.19	93.16 ± 6.40
Poloxamer 1000 mg	371.46 ± 121.13	0.61 ± 0.17	-10.55 ± 8.09	91.04 ± 8.18

Each value presents the mean ± SD (n=3)

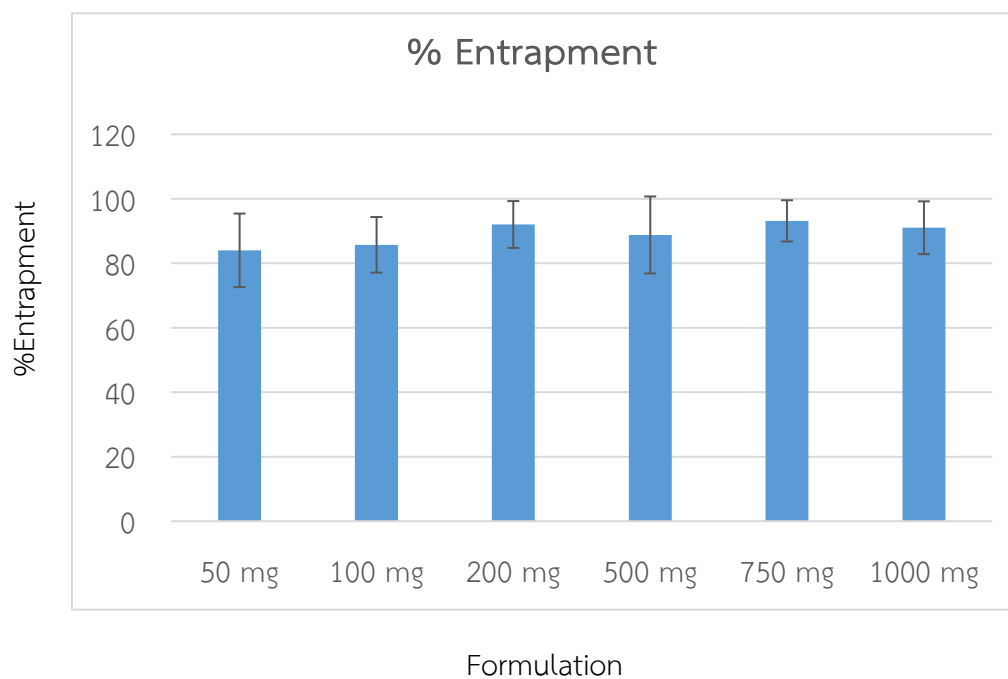
2.1. ผลการวัดขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค zeta potential และ %entrapment ของ polymeric micelle



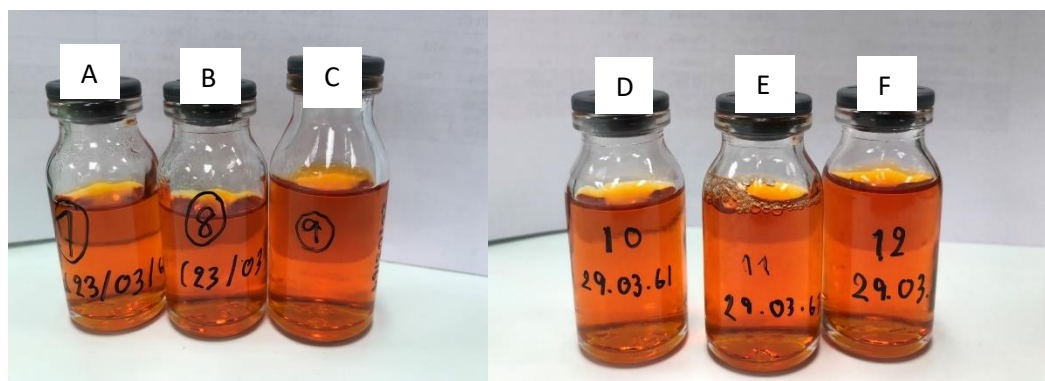
รูปที่ 19 แสดงขนาดอนุภาคของ polymeric micelle ที่เตรียมจาก poloxamer ขนาดต่างๆที่ load ยา rifampicin



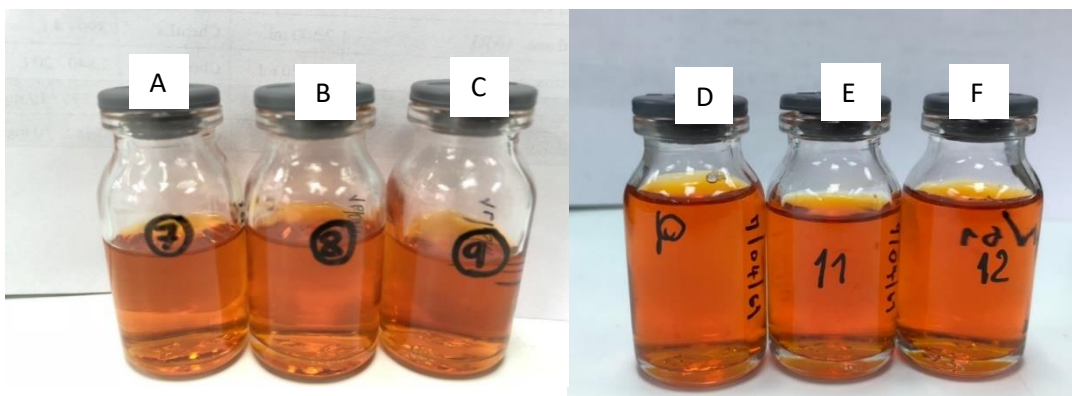
รูปที่ 20 แสดง zeta potential ของ polymeric micelle ที่เตรียมจาก poloxamer ขนาดต่างๆที่ load ยา rifampicin



รูปที่ 21 แสดง % entrapment ของ polymeric micelle ที่เตรียมจาก poloxamer ขนาดต่างๆ ที่ load ยา rifampicin



รูปที่ 22 แสดงลักษณะทางกายภาพของ polymeric micelle ที่เตรียมจาก poloxamer ที่ load ยา rifampicin (A, B, C, D, E และ F คือ poloxamer 50, 100, 250, 500, 750 และ 1000 mg ตามลำดับ)



รูปที่ 23 แสดงลักษณะทางกายภาพของ polymeric micelle ที่เตรียมจาก poloxamer ที่ load ยา rifampicin เมื่อเก็บไว้ 7 วัน (A, B, C, D, E และ F คือ poloxamer 50, 100, 250, 500, 750 และ 1000 mg ตามลำดับ)

จากผลการวัดขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค zeta potential และ %entrapment ของ polymeric micelle ที่เตรียมจาก poloxamer407 ขนาด 50, 100, 250, 500, 750 และ 1,000 mg ที่ load ยา rifampicin พบว่าขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค zeta potential และ %entrapment ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ปริมาณ poloxamer407 ที่เพิ่มมากขึ้นส่งผลให้การกระจายขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน จากผลการทดลองของ poloxamer407 ต่อการเกิด polymeric micelle และผลของ poloxamer407 ต่อการเกิด polymeric micelle ที่ load ยา rifampicin ทำให้สามารถคัดเลือกสูตรที่เหมาะสมได้แก่ สูตรที่ใช้ poloxamer 200 mg เนื่องจากมี %entrapment สูงแต่เมื่อเทียบกับสูตร poloxamer 750 mg ที่มี %entrapment ใกล้เคียงกันจึงพิจารณาขนาดอนุภาคและการกระจายขนาดอนุภาค พบว่าสูตรที่ใช้ poloxamer 200 mg มีค่าน้อยกว่าสูตร poloxamer 750 mg โดยมีขนาดเฉลี่ย 336.70 ± 32.42 , PDI เท่ากับ 0.48 ± 0.16 และขนาดเฉลี่ย 358.12 ± 112.93 , PDI เท่ากับ 0.71 ± 0.06 ตามลำดับเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

จากการสังเกตลักษณะทางกายภาพของสูตร poloxamer 50, 100, 250, 500, 750 และ 1000 mg ที่ load ยา rifampicin พบว่าได้สารละลายใสสีส้มแดง และเมื่อศึกษาความคงตัวโดยสังเกตลักษณะทางกายภาพเมื่อตั้งทิ้งไว้ 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าทุกสูตรมีความคงตัว

ตอนที่ 2 : ศึกษา พัฒนาและเปรียบเทียบกันระบบนำส่งยาในรูปแบบ micelle ที่มีส่วนประกอบของ poloxamer407 และ CTAB หรือ lecithin

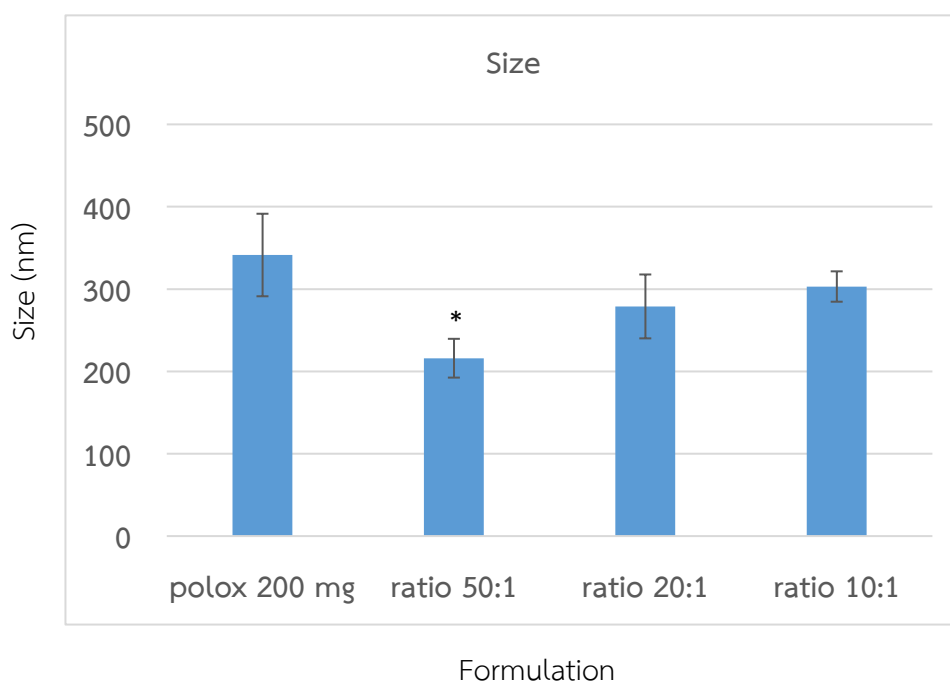
1. ศึกษาผลของ poloxamer407 และ CTAB หรือ lecithin ต่อการเกิด polymeric micelle

ตารางที่ 3 แสดงขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาค และ zeta potential ของ polymeric micelle ที่เตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ CTAB ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1

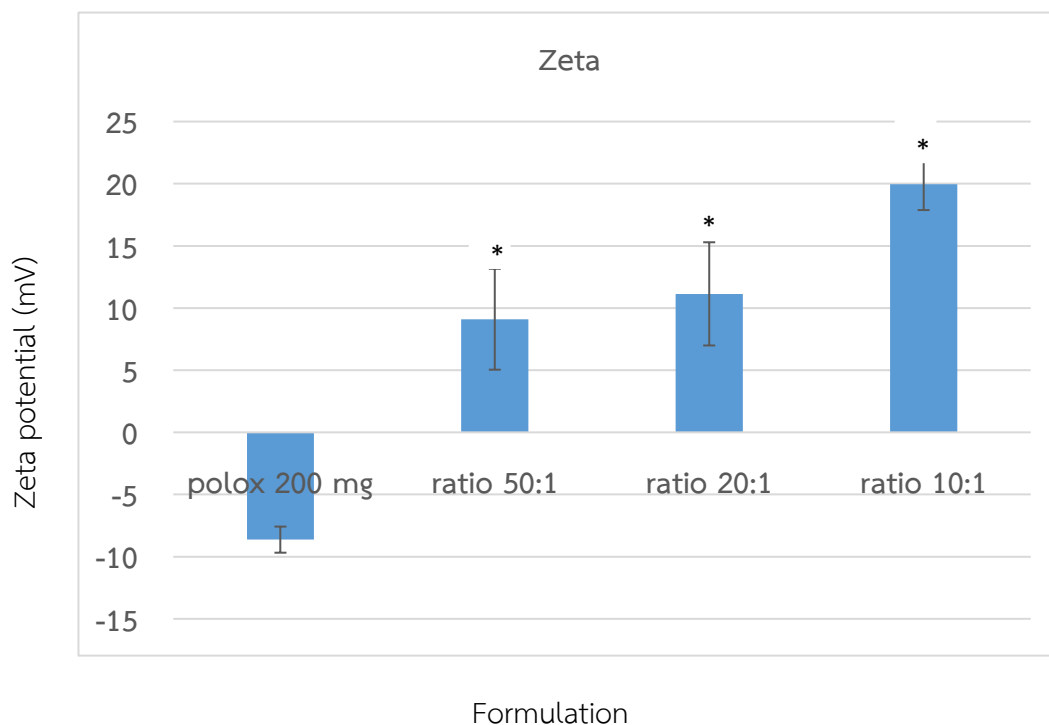
Formulation	Size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
poloxamer 200 mg	341.36 $\pm$ 50.12	0.58 $\pm$ 0.13	-8.63 $\pm$ 1.05
50:1	216.03 $\pm$ 23.55*	0.51 $\pm$ 0.12	9.10 $\pm$ 4.06*
20:1	278.92 $\pm$ 38.80	0.43 $\pm$ 0.10	11.14 $\pm$ 4.15*
10:1	303.08 $\pm$ 18.45	0.45 $\pm$ 0.24	19.95 $\pm$ 2.07*

Each value presents the mean $\pm$ SD (n=3); * P <0.05 compare with poloxamer 200 mg

1.1 ผลของการวัดขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาค และ zeta potential ของ polymeric micelle ที่เตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ CTAB ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1



รูปที่ 24 แสดงขนาดของอนุภาคที่เตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ CTAB ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1 (* P <0.05 compare with poloxamer 200 mg)



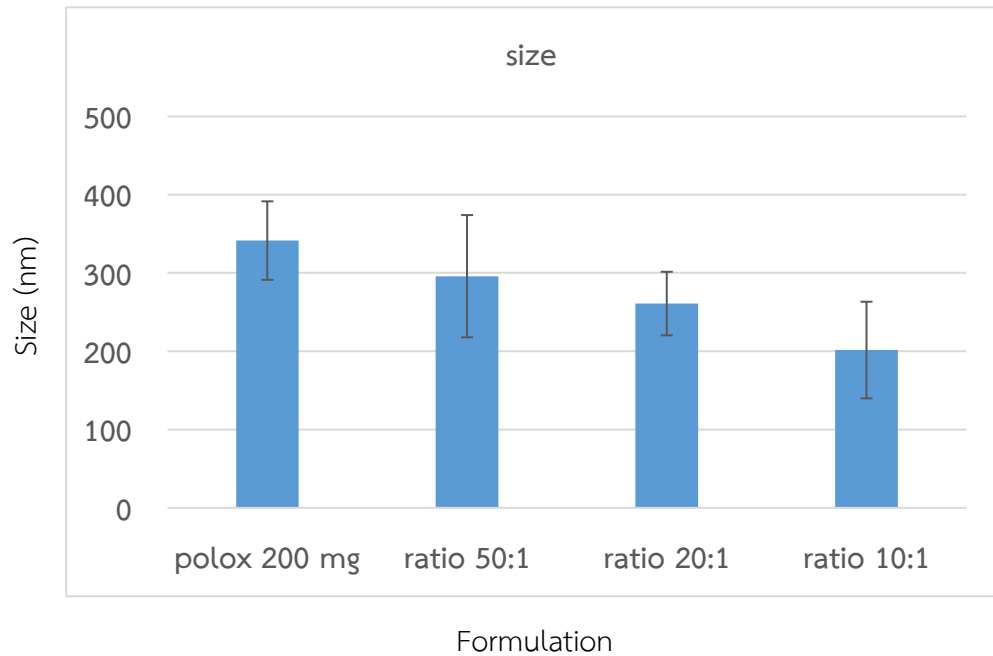
รูปที่ 25 แสดง zeta potential ของ polymeric micelle ที่เตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ CTAB ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1 (* $P < 0.05$ compare with poloxamer 200 mg)

ตารางที่ 4 แสดงขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาค และ zeta potential ของ polymeric micelle ที่เตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ lecithin ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1

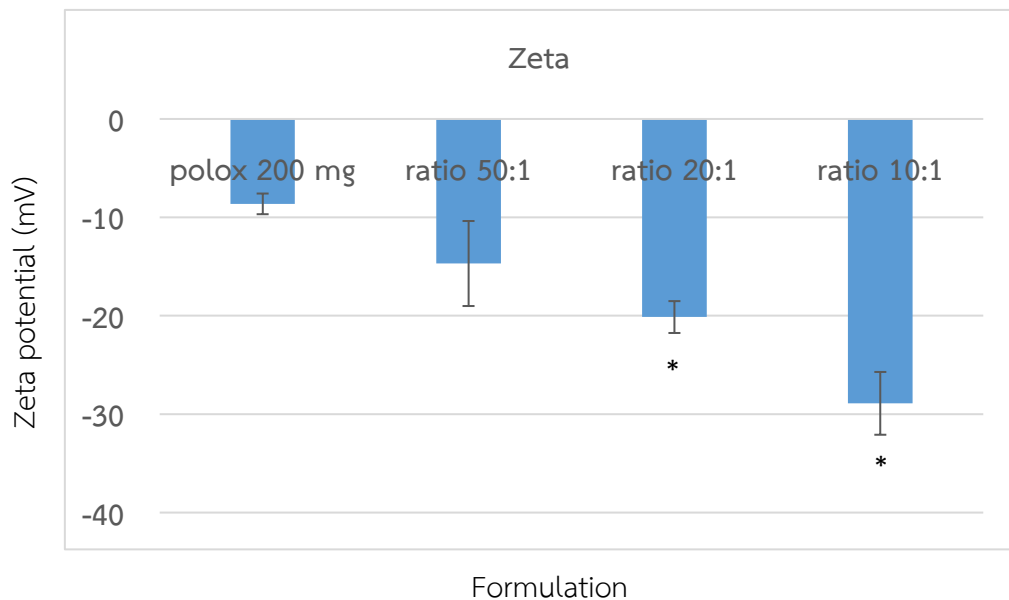
Formulation	Size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
poloxamer 200 mg	341.36 ± 50.12	0.58 ± 0.13	-8.63 ± 1.05
50:1	295.86 ± 78.10	0.44 ± 0.16	-14.69 ± 4.32
20:1	260.92 ± 40.60	0.59 ± 0.17	-20.13 ± 1.62*
10:1	201.53 ± 61.72	0.61 ± 0.06	-28.90 ± 3.19*

Each value presents the mean ± SD (n=3); * $P < 0.05$ compare with poloxamer 200 mg

1.2 ผลของการวัดขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาค และ zeta potential ของ polymeric micelle ที่เตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ lecithin ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1



รูปที่ 26 แสดงขนาดของอนุภาคที่เตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ lecithin ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1



รูปที่ 27 แสดง zeta potential ของ polymeric micelle ที่เตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ lecithin ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1 (* $P < 0.05$ compare with poloxamer 200 mg)

จากผลการวัดขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาค และ zeta potential ของ polymeric micelle ที่เตรียมจาก poloxamer407 และ CTAB ที่อัตราส่วน 50:1, 20:1, 10:1 พบว่า ที่อัตราส่วน 50:1 มีขนาดอนุภาค แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $P\text{-value} < 0.05$ และทุกอัตราส่วนมีค่า zeta potential แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $P\text{-value} < 0.05$ เมื่อเทียบกับ poloxamer407 200 mg ซึ่งปริมาณ CTAB ที่เพิ่มขึ้นมีแนวโน้มทำให้ขนาดอนุภาค และค่า zeta potential เพิ่มขึ้น จะเห็นว่าผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Leona ที่ศึกษาปริมาณของ CTAB ต่อขนาดอนุภาคของ alumina nanofluid พบว่าปริมาณ CTAB ที่เพิ่มขึ้นทำให้จำนวนโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวเพิ่มขึ้น ส่งผลให้โมเลกุลสารลดแรงตึงผิวไปแทรกอยู่ระหว่างชั้น hydration ทำให้ชั้น hydration หนาตัวขึ้นจึงทำให้ขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้น(50) ซึ่ง CTAB จัดเป็นสารลดแรงตึงผิวประจุบวกดังนั้นใส่ปริมาณเพิ่มขึ้นจึงทำให้ค่า zeta potential เพิ่มขึ้น

จากผลการวัดขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาค และ zeta potential ของ polymeric micelle ที่เตรียมจาก poloxamer407 และ lecithin ที่อัตราส่วน 50:1, 20:1, 10:1 พบว่าที่อัตราส่วน 20:1 และ 10:1 มีค่า zeta potential แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $P\text{-value} < 0.05$ เมื่อเทียบกับ poloxamer407 200 mg ซึ่งปริมาณ lecithin ที่เพิ่มขึ้นมีแนวโน้มทำให้ขนาดอนุภาคเล็กลง จะเห็นว่าผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Poopak ที่ศึกษาการเพิ่มขึ้นของปริมาณ lecithin ต่อขนาดอนุภาคนาโน พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณ lecithin มากขึ้นทำให้อนุภาคมีขนาดเล็กลง เนื่องจากการเพิ่มแรง electrostatic ของอนุภาคจึงเกิดการผลักกันระหว่างอนุภาค(51) แต่ในการศึกษานี้ปริมาณ lecithin ที่แตกต่างกันมีผลต่อขนาดอนุภาคไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ อาจเป็นผลมาจากปัจจัยเรื่อง ความเข้มข้นของ lecithin ความแรงและเวลาในการ sonicate (52) โดย lecithin จัดเป็นสารลดแรงตึงผิวประจุลบดังนั้นใส่ปริมาณเพิ่มขึ้นทำให้ค่า zeta potential ลดลง

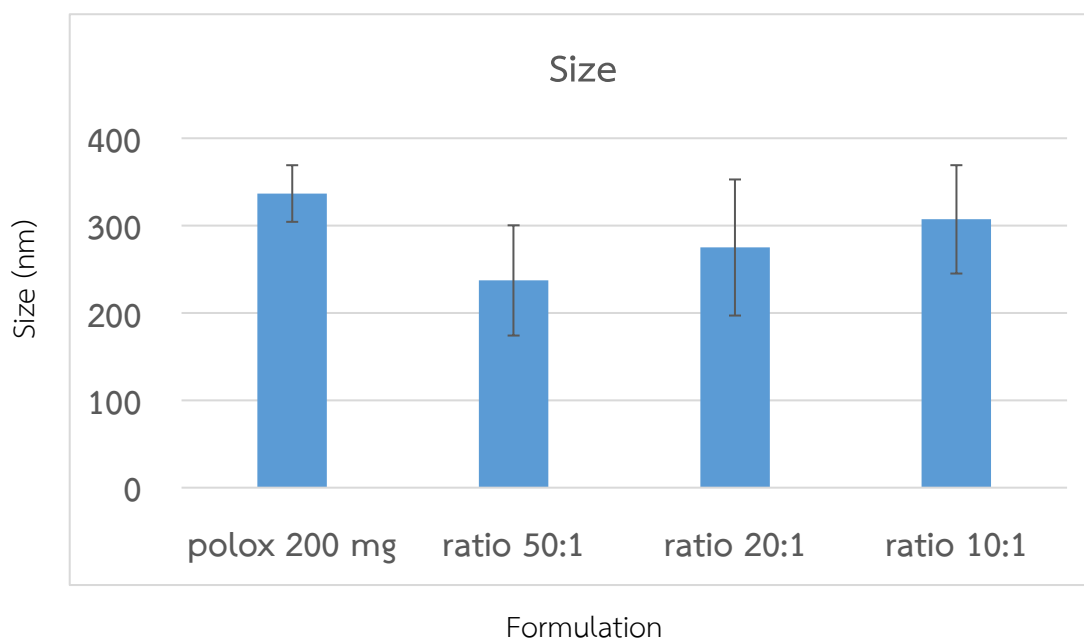
2. ศึกษาผลของ poloxamer407 และ CTAB หรือ lecithin ต่อการเกิด polymeric micelle ที่ load ยา rifampicin

ตารางที่ 5 แสดงขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาค zeta potential และ %entrapment ของ polymeric micelle ที่ load ยา rifampicin โดยเตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ CTAB ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1

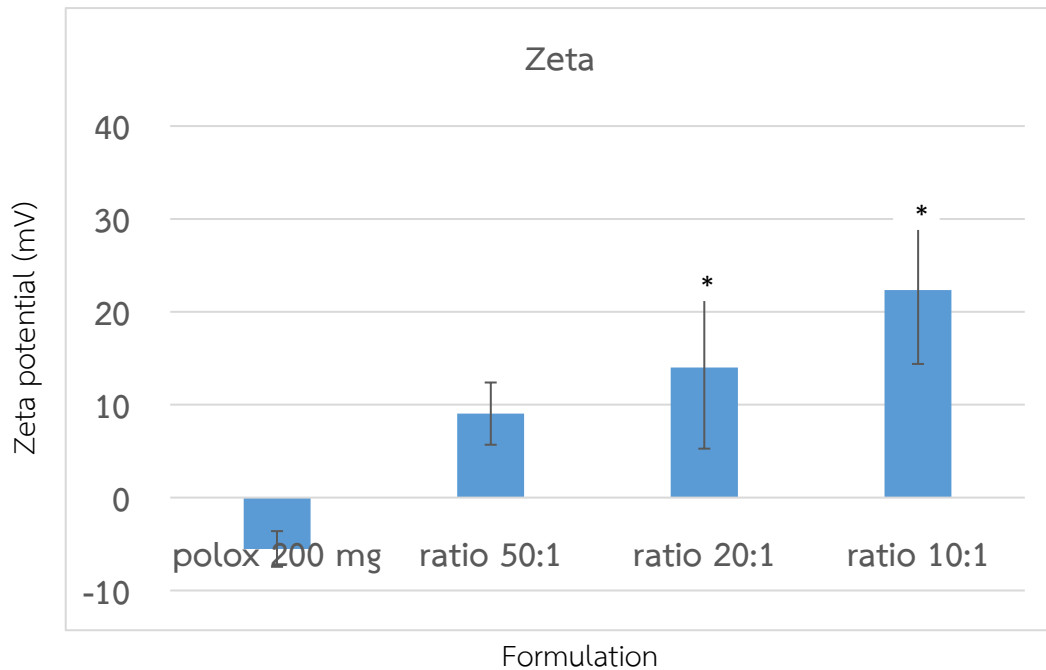
Formulation	Size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)	% Entrapment
poloxamer 200 mg	336.70 ± 32.42	0.48 ± 0.16	-5.53 ± 1.92	92.05 ± 7.26
50:1	237.22 ± 63.09	0.52 ± 0.02	9.04 ± 3.35	89.80 ± 4.75
20:1	274.91 ± 77.90	0.49 ± 0.09	14.00 ± 8.73*	91.77 ± 3.33
10:1	307.14 ± 62.01	0.53 ± 0.08	22.36 ± 7.97*	92.26 ± 1.49

Each value presents the mean ± SD (n=3); * $P < 0.05$ compare with poloxamer 200 mg

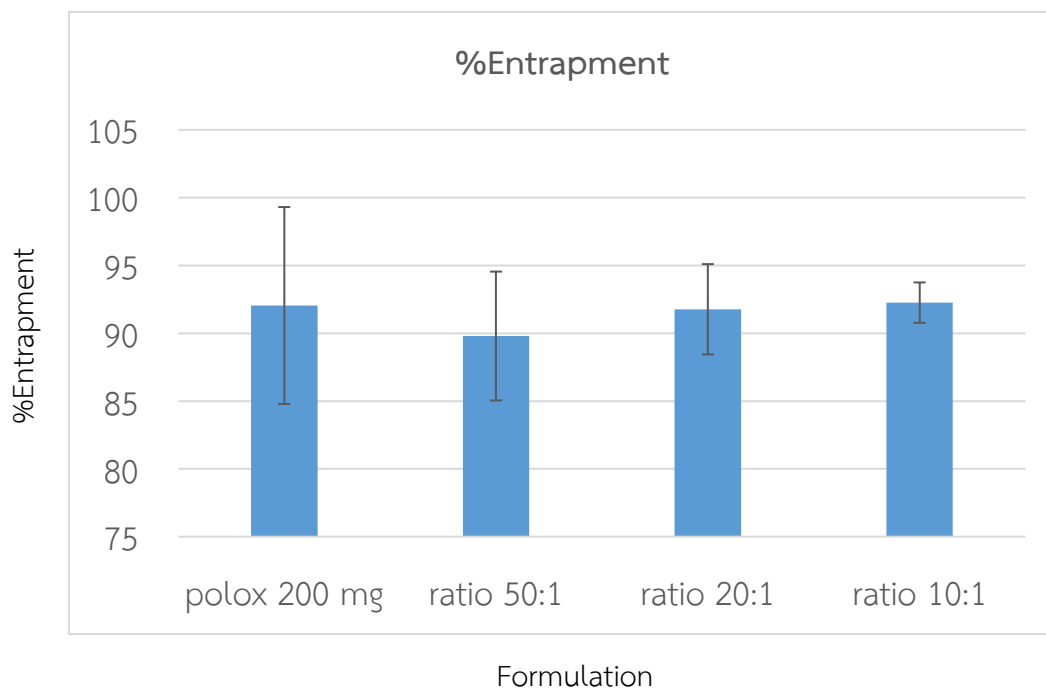
2.1. ผลการวัดขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาค zeta potential และ %entrapment ของ polymeric micelle ที่ load ยา rifampicin โดยเตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ CTAB ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1



รูปที่ 28 แสดงขนาดอนุภาคของ polymeric micelle ที่ load ยา rifampicin โดยเตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ CTAB ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1



รูปที่ 29 แสดง zeta potential ของ polymeric micelle ที่ load ยา rifampicin โดยเตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ CTAB ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1 (* $P < 0.05$ compare with poloxamer 200 mg)



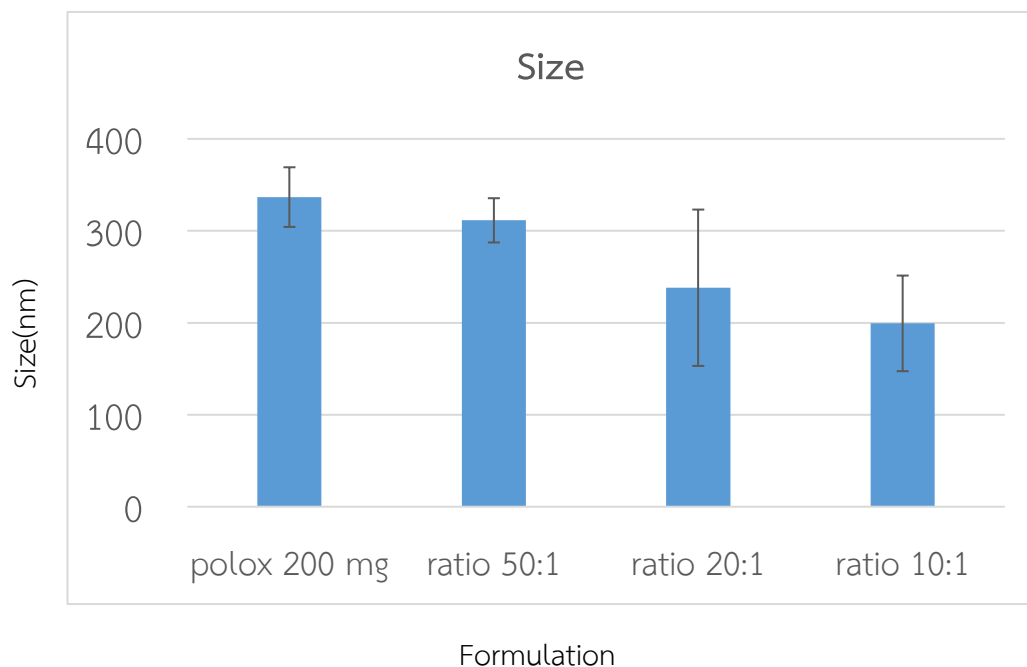
รูปที่ 30 แสดง %entrapment ของ polymeric micelle ที่ load ยา rifampicin โดยเตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ CTAB ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1

ตารางที่ 6 แสดงขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาค zeta potential และ %entrapment ของ polymeric micelle ที่ load ยา rifampicin โดยเตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ lecithin ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1

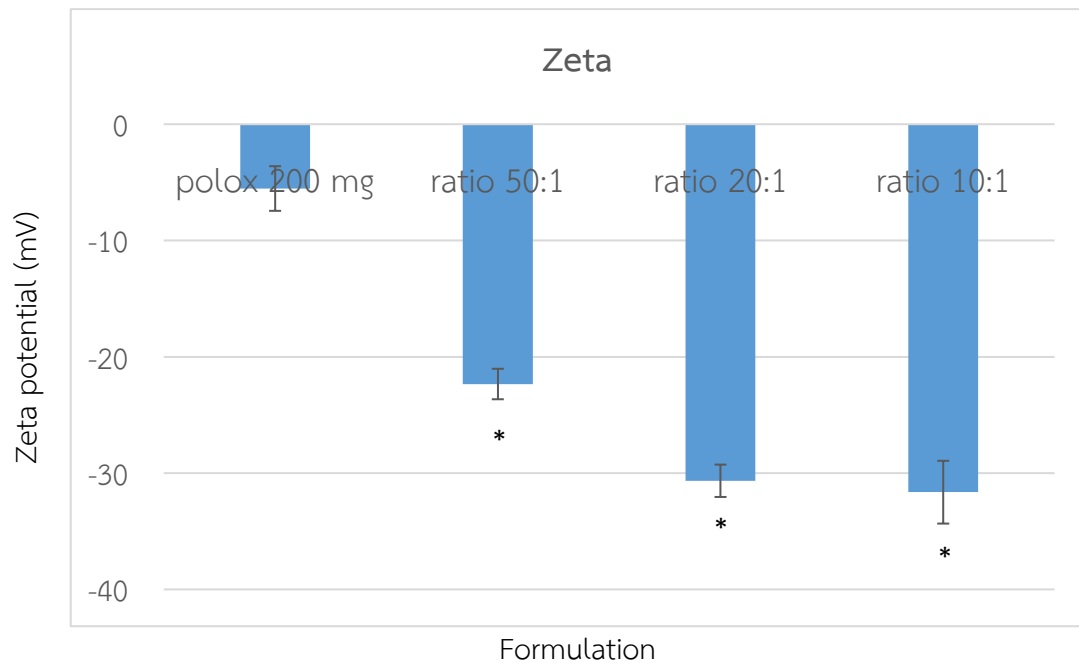
Formulation	Size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)	% Entrapment
poloxamer 200 mg	336.70 ± 32.42	0.48 ± 0.16	-5.53 ± 1.92	92.05 ± 7.26
50:1	311.42 ± 24.06	0.59 ± 0.13	-22.34 ± 1.31*	87.47 ± 3.14
20:1	238.10 ± 85.02	0.52 ± 0.07	-30.66 ± 1.39*	93.06 ± 5.41
10:1	199.36 ± 52.01	0.53 ± 0.05	-31.64 ± 2.70*	95.73 ± 1.72

Each value presents the mean ± SD (n=3); * $P < 0.05$ compare with poloxamer 200 mg

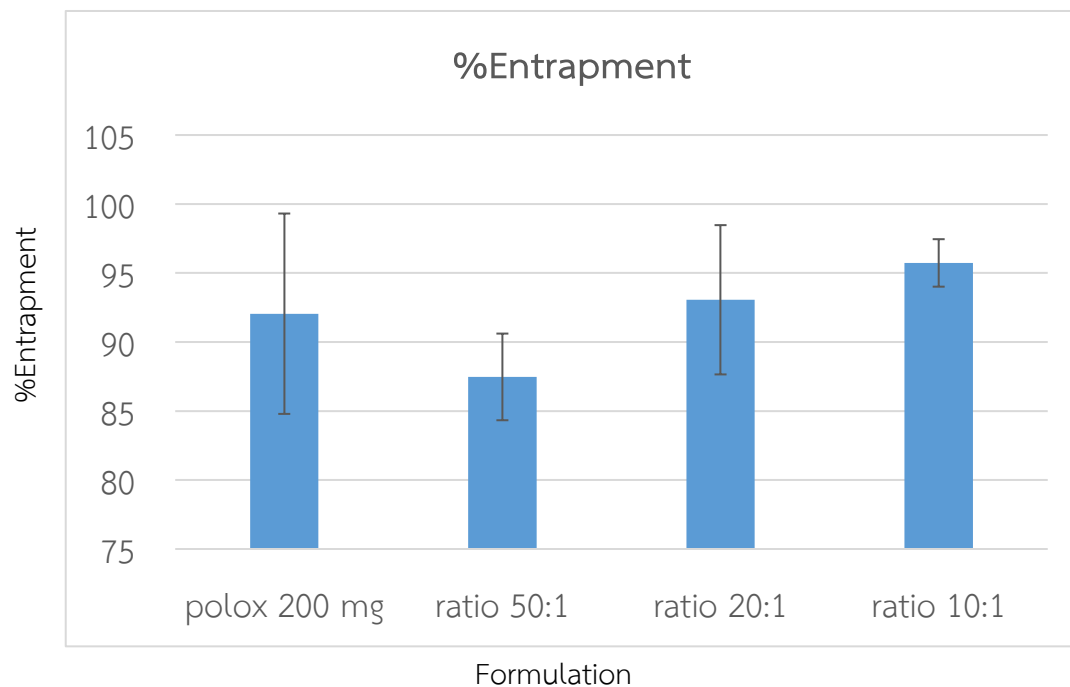
2.2 ผลการวัดขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาค zeta potential และ %entrapment ของ polymeric micelle ที่ load ยา rifampicin โดยเตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ lecithin ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1



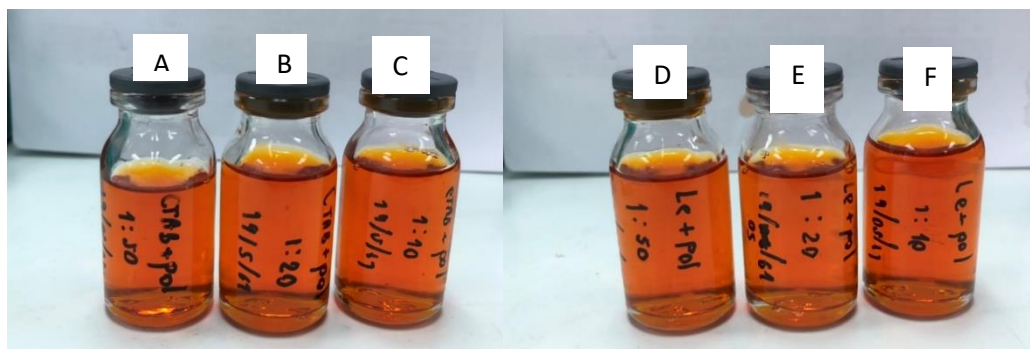
รูปที่ 31 แสดงขนาดอนุภาค polymeric micelle ที่ load ยา rifampicin โดย เตรียมจากอัตราส่วน ของ poloxamer407 ต่อ lecithin ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1



รูปที่ 32 แสดง potential ของ polymeric micelle ที่ load ยา rifampicin โดยเตรียมจาก อัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ lecithin ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1 (* $P < 0.05$ compare with poloxamer 200 mg)



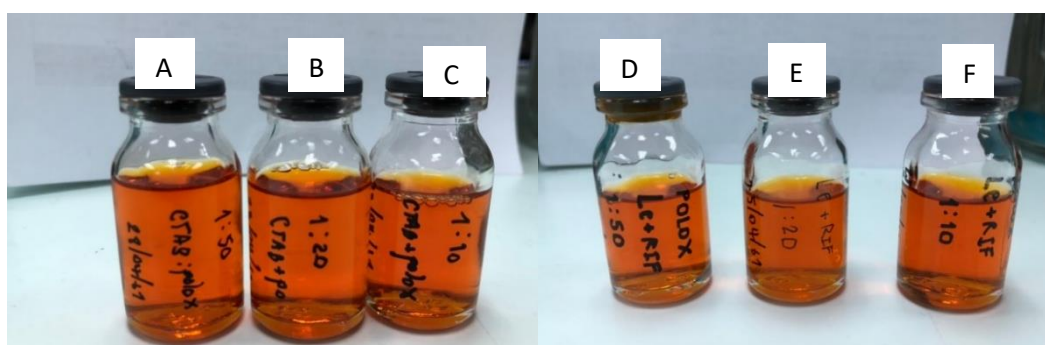
รูปที่ 33 แสดง %entrapment ของ polymeric micelle ที่ load ยา rifampicin โดยเตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ lecithin ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1



รูปที่ 34 แสดงลักษณะทางกายภาพของ polymeric micelle ที่ load ยา rifampicin โดยเตรียมจาก poloxamer 407 และ CTAB ที่อัตราส่วนต่าง ๆ

(A, B และ C คือ poloxamer : CTAB ที่อัตราส่วน 50:1, 20:1 และ 10:1

D, E และ F คือ poloxamer : lecithin ที่อัตราส่วน 50:1, 20:1 และ 10:1)



รูปที่ 35 แสดงลักษณะทางกายภาพของ polymeric micelle ที่ load ยา rifampicin โดยเตรียมจาก poloxamer 407 และ CTAB ที่อัตราส่วนต่าง ๆ เมื่อเก็บไว้ 7 วัน

(A, B และ C คือ poloxamer : CTAB ที่อัตราส่วน 50:1, 20:1 และ 10:1

D, E และ F คือ poloxamer : lecithin ที่อัตราส่วน 50:1, 20:1 และ 10:1)

จากผลการวัดขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาค zeta potential และ %entrapment ของ polymeric micelle ที่ load ยา rifampicin ที่เตรียมจาก poloxamer407 และ CTAB ที่อัตราส่วน 50:1, 20:1, 10:1 พบว่าที่อัตราส่วน 20:1 และ 10:1 มีค่า Zeta potential แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $P\text{-value} < 0.05$ เมื่อเทียบกับ poloxamer407 200 mg ซึ่งปริมาณ CTAB ที่เพิ่มขึ้นมีแนวโน้มทำให้ขนาดอนุภาค(50) และค่า zeta potential เพิ่มขึ้น

จากผลการวัดขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาค zeta potential และ %entrapment ของ polymeric micelle ที่ load ยา rifampicin ที่เตรียมจาก poloxamer407 และ lecithin ที่อัตราส่วน 50:1, 20:1, 10:1 พบว่าอัตราส่วน 50:1, 20:1 และ 10:1 มีค่า zeta potential แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $P\text{-value} < 0.05$ เมื่อเทียบกับ poloxamer407 200 mg ซึ่งปริมาณ lecithin ที่เพิ่มขึ้นมีแนวโน้มทำให้ขนาดอนุภาค(51) และค่า zeta potential ลดลง

จากการศึกษาของ Ruba ถึงปัจจัยที่ส่งผลต่อ %entrapment พบว่าคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิว และตัวยาที่ถูกกักเก็บในอนุภาค micelle หรือ liposome เป็นปัจจัยที่สำคัญ เนื่องจากปริมาณสารลดแรงตึงผิวมากขึ้นทำให้ membrane ของ micelle หรือ liposome มีรูพรุนทำให้สารที่ถูกกักเก็บไว้ด้านในรั่วออก และปริมาณสารลดแรงตึงผิวมากขึ้นจะเกิดปฏิกิริยากับอนุภาค micelle หรือ liposome โดยไปแย่งการกักเก็บยาเข้าในอนุภาค micelle หรือ liposome จึงทำให้ %entrapment ลดลง นอกจากนั้นโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวเช่น ความยาวของสายคาร์บอน หากมีความยาวไม่เหมาะสมทำให้การกักเก็บยาได้น้อยลง และ transition temperature (T_c) ของสารลดแรงตึงผิวหากมีค่า T_c มาก ทำให้อนุภาคมีความคงตัวและเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้น้อยกว่าสารลดแรงตึงผิวที่มีค่า T_c น้อย ซึ่งการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของอนุภาคทำให้ยาที่ถูกกักเก็บรั่ว จึงทำให้ %entrapment ลดลง แต่อย่างไรก็ตามมีการศึกษาพบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณสารลดแรงตึงผิวมากขึ้น ทำให้ปริมาณ vesicles มากขึ้นจึงทำให้ %entrapment เพิ่มขึ้น (53) แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้พบว่าสัดส่วนของสารลดแรงตึงผิวที่ต่างกันทั้ง CTAB และ lecithin ส่งผลต่อ %entrapment ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $P\text{-value} > 0.05$ แต่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณสารลดแรงตึงผิว

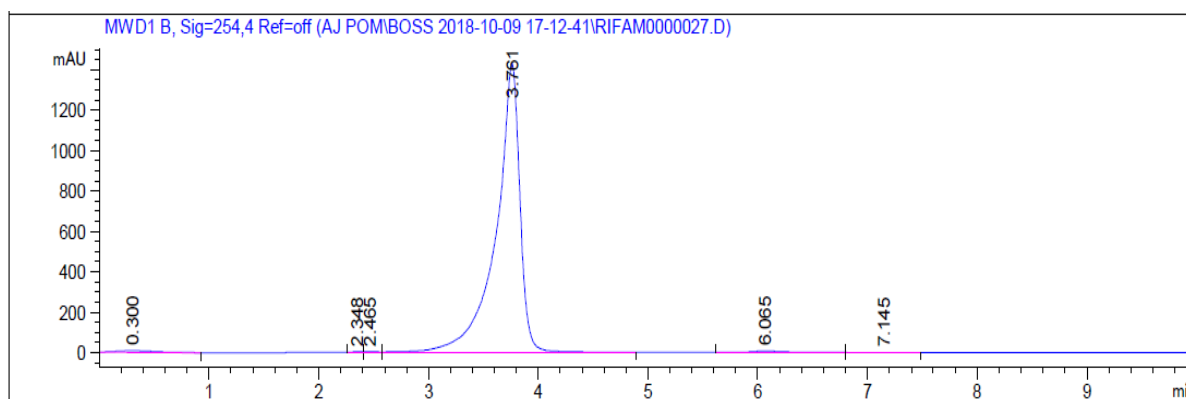
จากผลการทดลองศึกษาผลของ poloxamer407 และ CTAB หรือ lecithin ต่อการเกิด polymeric micelle ที่ load ยา rifampicin ทำให้สามารถคัดเลือกสูตรที่เหมาะสมได้แก่

poloxamer : CTAB (10:1) และ poloxamer : lecithin (50:1) เนื่องจากมีขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และ %entrapment ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ค่า zeta potential แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ $P\text{-value} < 0.05$ โดย poloxamer : CTAB (10:1) มีค่า 22.36 ± 7.97 ส่วน poloxamer : lecithin (50:1) มีค่า -22.34 ± 1.31

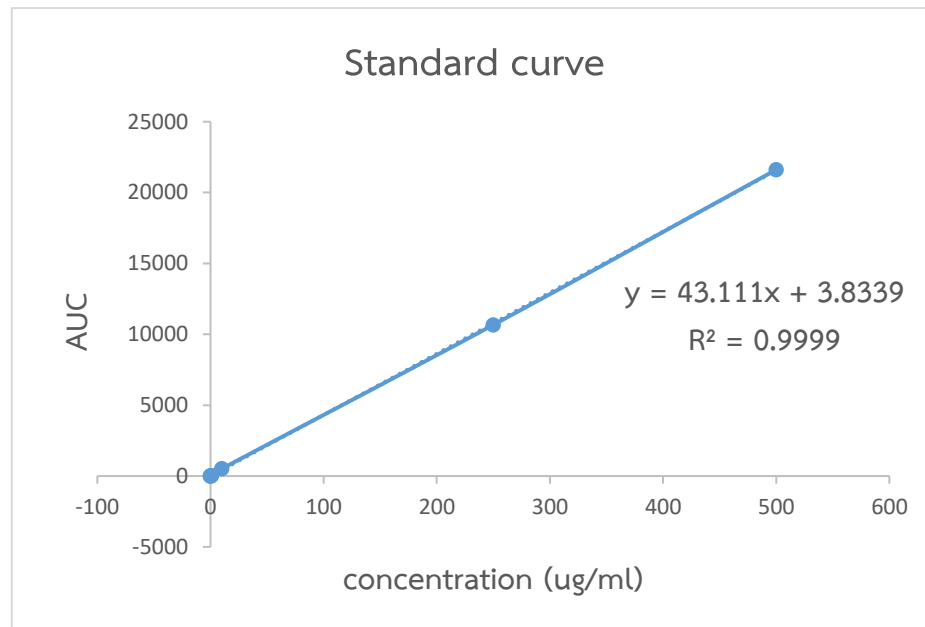
ตอนที่ 3 : ศึกษาผลของ polymeric micelle ที่มีส่วนประกอบของ poloxamer407 และ CTAB หรือ lecithin ที่ load ยา rifampicin ต่อประสิทธิภาพในการนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง

1. การศึกษาคุณสมบัติ cellular uptake

1.1 ตัวอย่าง chromatogram และ standard curve ของยา rifampicin ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ดังนี้ mobile phase : 0.01 M NaH_2PO_4 : ACN (50:50), stationary phase : C18 (254 mm x 4.6mm), flow rate : 1.00 ml/min, UV detector wavelength : 254 nm, running time 10 min, injection volume 20.00 μL , retention time : 3.7



รูปที่ 36 แสดง chromatogram ของยา rifampicin ใช้ mobile phase : 0.01 M NaH_2PO_4 : ACN (50:50), retention time: 3.761 นาที, running time 10 นาที



รูปที่ 37 แสดง standard curve ของยา rifampicin

การวิเคราะห์ปริมาณสาร rifampicin ต่ำสุด ได้แก่

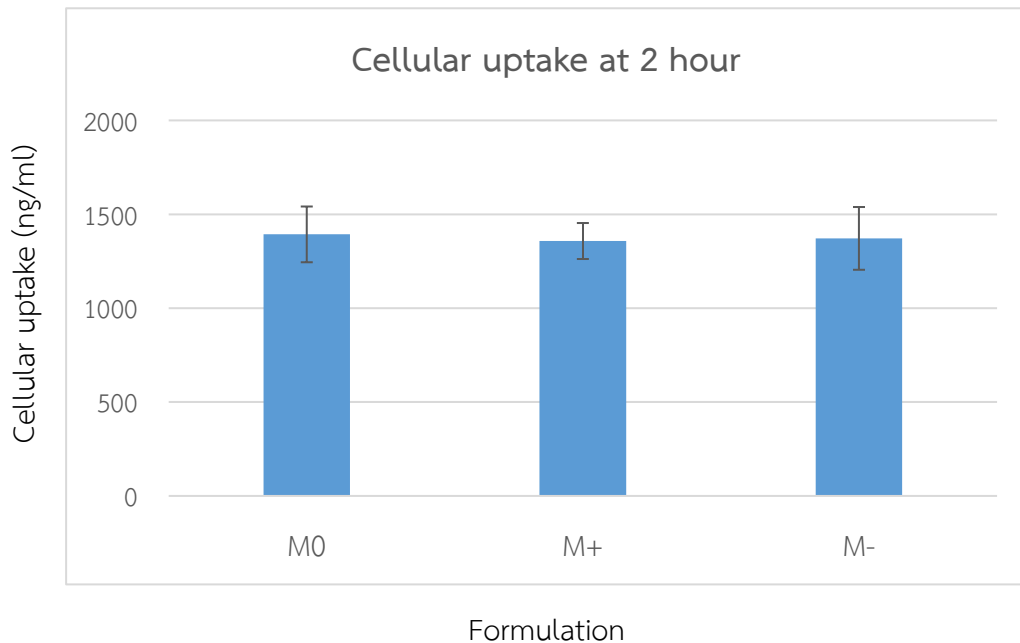
Limit of detection (LOD) = 3 ng/ml

Limit of quantification (LOQ) = 170 ng/ml

1.2 ผลการนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 (cellular uptake)

ตารางที่ 7 แสดงผลการนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง MCF-7 (cellular uptake) ของ polymeric micelle ที่เตรียมโดยอัตราส่วน poloxamer ต่อ CTAB (10:1) หรือ poloxamer ต่อ lecithin (50:1) ที่ load ยา rifampicin ที่เวลา 2 ชั่วโมง

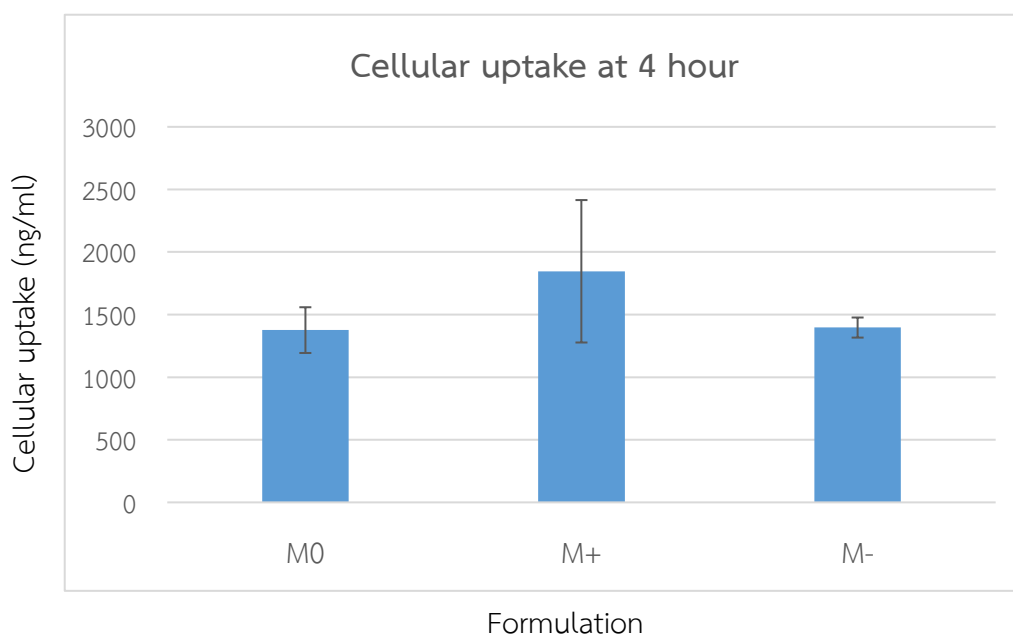
Formulation	Cellular uptake (ng/ml)
Poloxamer 200 mg	1,393.06 ± 148.45
poloxamer: CTAB (10:1)	1,357.72 ± 95.77
poloxamer: lecithin (50:1)	1,371.64 ± 167.07



รูปที่ 38 แสดงผลการนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง MCF-7 (cellular uptake) ของ polymeric micelle ที่เตรียมโดยอัตราส่วน poloxamer ต่อ CTAB (10:1) (M+) หรือ poloxamer ต่อ lecithin (50:1) (M-) ที่ load ยา rifampicin เทียบกับ poloxamer (M0) ที่เวลา 2 ชั่วโมง

ตารางที่ 8 แสดงผลการนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง MCF-7 (cellular uptake) ของ polymeric micelle ที่เตรียมโดยอัตราส่วน poloxamer ต่อ CTAB (10:1) หรือ poloxamer ต่อ lecithin (50:1) ที่ load ยา rifampicin ที่เวลา 4 ชั่วโมง

Formulation	Cellular uptake (ng/ml)
Poloxamer 200 mg	1,376.20 ± 182.71
poloxamer: CTAB (10:1)	1,846.15 ± 568.97
poloxamer: lecithin (50:1)	1,396.61 ± 80.17



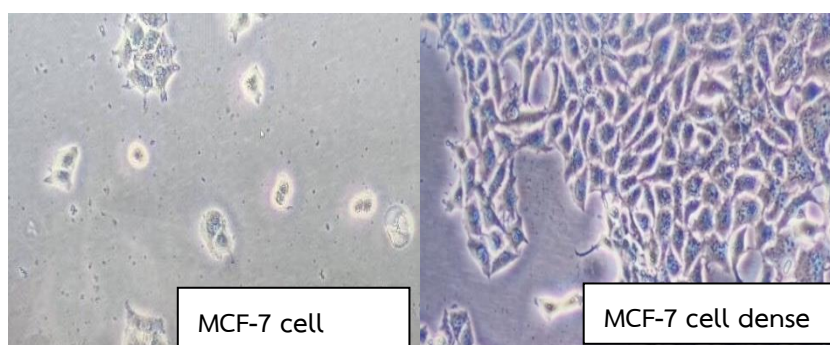
รูปที่ 39 แสดงผลการนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง MCF-7 (cellular uptake) ของ polymeric micelle ที่เตรียมโดยอัตราส่วน poloxamer ต่อ CTAB (10:1) (M+) หรือ poloxamer ต่อ lecithin (50:1) (M-) ที่ load ยา rifampicin เทียบกับ poloxamer (M0) ที่เวลา 4 ชั่วโมง

จากผลการนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง MCF-7 (cellular uptake) ของ polymeric micelle ที่เตรียมโดยอัตราส่วน poloxamer ต่อ CTAB (10:1) หรือ poloxamer lecithin (50:1) ที่ load ยา rifampicin ที่เวลา 2 ชั่วโมง พบว่าสูตรที่เตรียมด้วย poloxamer สามารถนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง MCF-7 มีค่า cellular uptake $1,393.06 \pm 148.45$ ng/ml ได้ดีกว่าสูตร poloxamer ต่อ CTAB (10:1) และ poloxamer ต่อ lecithin (50:1) จะเห็นว่าผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Quanlei ถึงผลของ pluronic F127 ต่อการนำส่งยา tacrolimus cyclodextrin inclusion complex เข้าสู่เซลล์ในรูปแบบ liposome โดยศึกษาใน Caco-2 cell พบว่าสูตรที่มี pluronic F127-modified liposome containing cyclodextrin drug inclusion complex (FLIC) มี % cellular uptake คือ 49.2 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ liposome containing cyclodextrin drug inclusion complex (LIC) และ cyclodextrin drug inclusion complex (IC) ที่มี % cellular uptake คือ 39.5 และ 23.7 ตามลำดับ(54) ดังนั้น poloxamer 407 จึงมีส่วนช่วยในการนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง แต่เมื่อวัดผลที่เวลา 4 ชั่วโมงพบว่า สูตรที่เตรียมด้วย poloxamer ต่อ CTAB (10:1) สามารถนำเข้าสู่เซลล์มะเร็ง MCF-7 มีค่า cellular uptake $1,846.15 \pm 568.97$ ng/ml ได้ดีกว่า

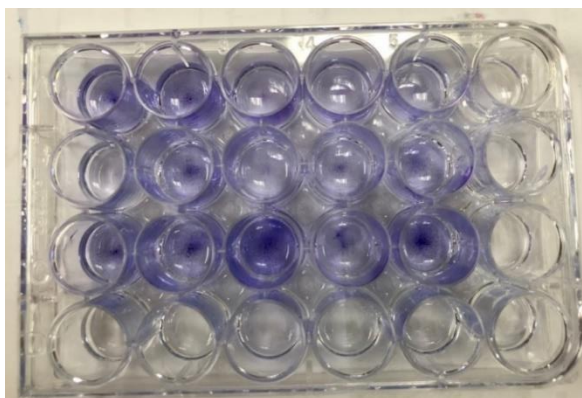
สูตร poloxamer เปลา และ poloxamer ต่อ lecithin (50:1) จะเห็นว่าผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Takeuchi และ Sara ถึงการนำส่งยา calcitonin ในรูปแบบ liposome โดยวิธีการกินในหนู rats พบว่าสูตร chitosan-coated liposome ซึ่งแสดงประจุบวกที่ผิวอนุภาค สามารถลดระดับแคลเซียมในเลือดได้ที่ 8, 12 และ 16 ชั่วโมงได้มากกว่าสูตร calcitonin solution และ non coated liposome(55) โดยผ่านกลไก endocytosis เนื่องจากประจุบวกที่ผิวอนุภาคไปจับกับประจุลบที่ผิวของเซลล์ membrane เกิดแรง electrostatic ทำให้ประจุบวก uptake ยาเข้าเซลล์ได้มากกว่าประจุลบ และกลาง(56)

2. การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

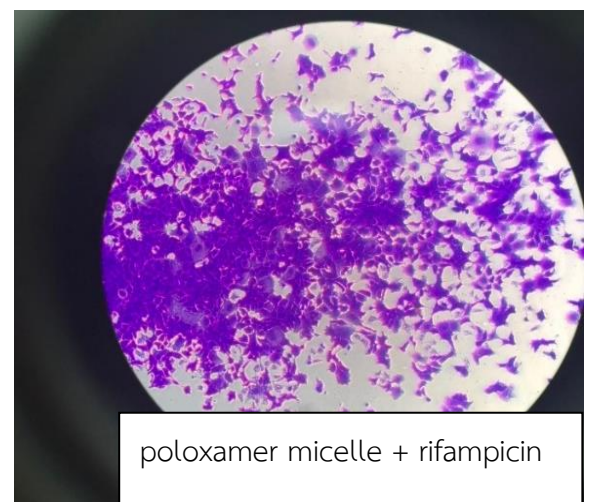
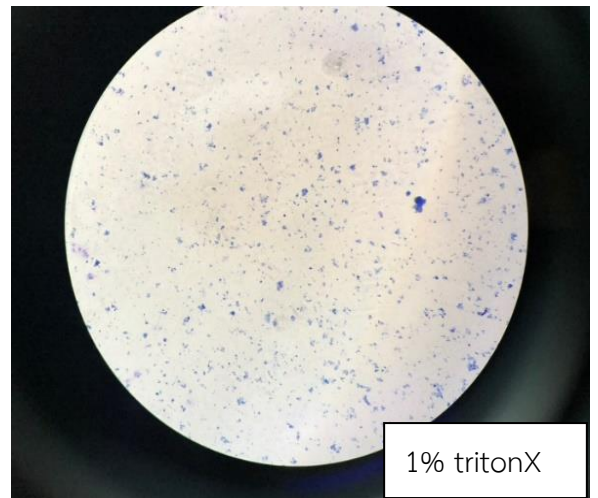
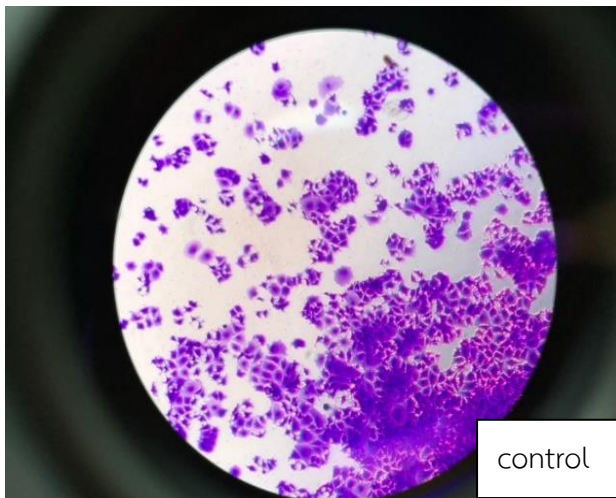
2.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง



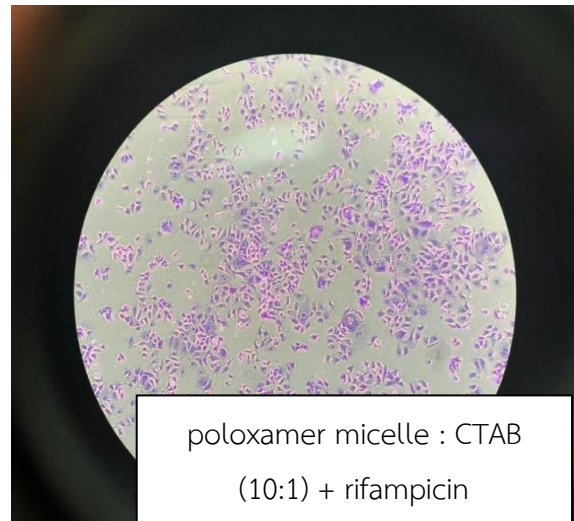
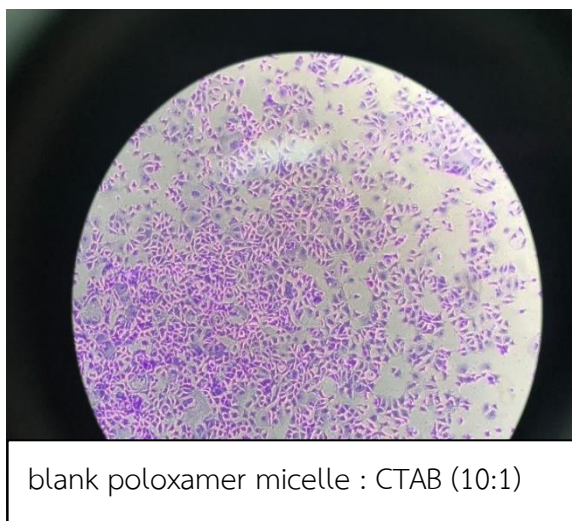
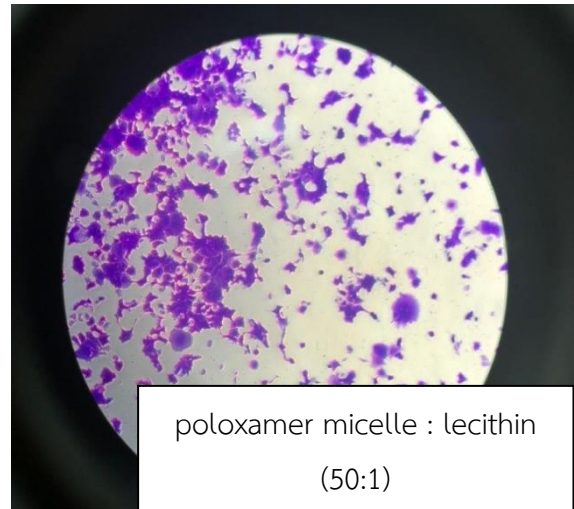
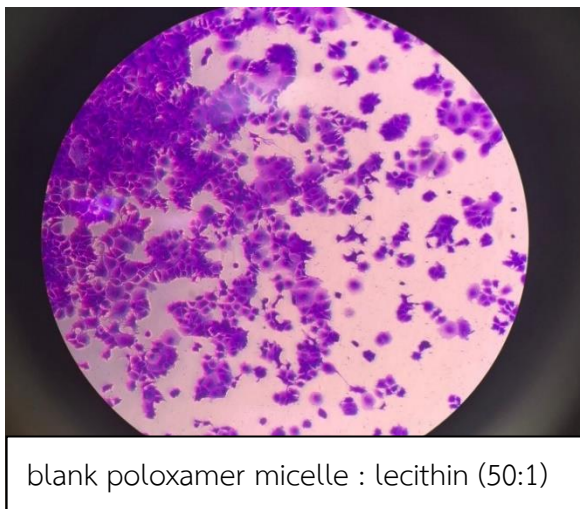
รูปที่ 40 แสดงลักษณะของ MCF-7 cell ในการศึกษาโดยส่องผ่านกล้อง inverted microscope



รูปที่ 41 แสดงผลการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (cytotoxicity) ของ MCF-7 cell ที่ treat ด้วย polymeric micelle ที่เตรียมโดยอัตราส่วน poloxamer ต่อ CTAB (10:1) หรือ poloxamer ต่อ lecithin (50:1) ที่ load ยา rifampicin และหาปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตด้วยวิธี crystal violet แล้ววิเคราะห์ด้วย microplate reader



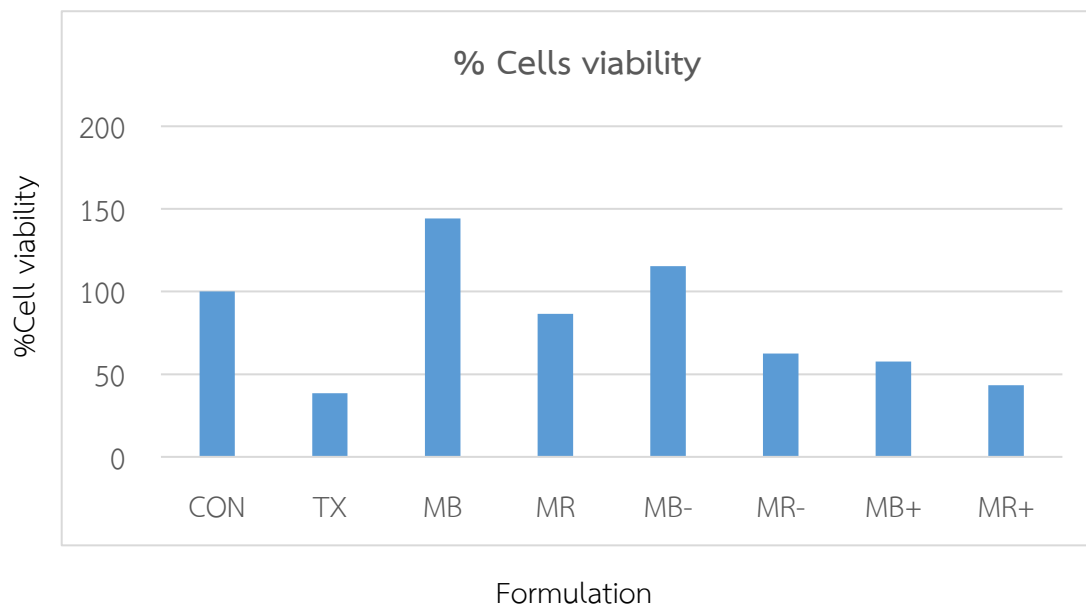
รูปที่ 42 แสดงลักษณะเซลล์หลังย้อม crystal violet



รูปที่ 43 แสดงลักษณะเซลล์หลังย้อม crystal violet (ต่อ)

ตารางที่ 9 แสดงปริมาณเซลล์รอดชีวิต (% viability) ของ MCF-7 cell

Formulation	% viability
control (media)	100
1% tritonX	38.46
poloxamer	144.23
poloxamer : CTAB (10:1)	57.69
poloxamer : lecithin (50:1)	115.38
poloxamer + rifampicin	86.54
poloxamer : CTAB (10:1) + rifampicin	43.27
poloxamer : lecithin (50:1) + rifampicin	62.50



รูปที่ 44 แสดง % viability ของ MCF-7 cell ที่ treat ด้วยสูตรต่างๆ (CON คือ control, TX คือ 1% tritonX, MB คือ blank poloxamer micelle, MR คือ poloxamer micelle + rifampicin, MB- คือ blank poloxamer micelle: lecithin (50:1), MR- คือ poloxamer micelle : lecithin (50:1) + rifampicin), MB+ คือ blank poloxamer micelle: CTAB (10:1), MR+ คือ poloxamer micelle : CTAB (10:1) + rifampicin)

จากผลการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (cytotoxicity) ของ MCF-7 cell โดยวัดปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิต (% viability) ด้วยวิธี crystal violet โดยหลักการคือน้ำย่าย้อมสีจะติดสีกับสารพันธุกรรมและ cytoplasm ของเซลล์มะเร็งที่มีชีวิต หากสีของสารละลายหลังจากการ lysate cells เป็นสีม่วงเข้ม แสดงถึงจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตมาก เมื่อนำไปวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 600 nm ด้วย microplate reader โดยปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตแปรผันตรงกับค่า absorbance เมื่อคำนวณ % viability พบว่าสูตร poloxamer : CTAB (10:1) + rifampicin มี % viability น้อยที่สุดคือ 43.27 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณ cellular uptake ที่เวลา 4 ชั่วโมงและจากรูปลักษณะเซลล์หลังย้อม crystal violet พบว่าสูตร poloxamer : CTAB (10:1) + rifampicin มีสีเข้มมากที่สุดแต่สูตร poloxamer : CTAB (10:1) ที่ไม่ได้ใส่ยา rifampicin สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้เช่นเดียวกันมีค่า % viability คือ 57.69 ซึ่งสอดคล้องกับรูปลักษณะเซลล์หลังย้อม crystal violet พบว่ามีสีเข้มเช่นกัน จากงานวิจัยของ Emma และ David ถึงความเป็นพิษของ CTAB ต่อเซลล์มะเร็ง พบว่า CTAB เกิด catalytic แตกตัวให้ CTA⁺ ซึ่งไปยับยั้งการทำงานของ H⁺-ATPase synthase ทำให้ mitochondria ของเซลล์เกิด apoptosis และยับยั้งการเกิด depolarization ของ mitochondria นอกจากนี้ CTAB สามารถไปแทนที่ phospholipid bilayer แล้วเกิดเป็นรู ทำให้เซลล์ membrane เกิดการรั่วและ ไม่คงตัวนำไปสู่การตายของเซลล์ (57,58) ดังนั้น % viability ที่ลดลงของสูตร poloxamer : CTAB (10:1) มีผลมาจากความเป็นพิษของ CTAB และเมื่อนำสูตร poloxamer + rifampicin เทียบกับสูตร poloxamer : CTAB (10:1) + rifampicin พบว่าค่า %viability ลดลงจาก 86.54 เป็น 43.27 แสดงว่า CTAB ช่วยในการนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง ซึ่งผลของ % viability สอดคล้องกับรูปลักษณะเซลล์หลังย้อม crystal violet พบว่าสูตร poloxamer : CTAB (10:1) + rifampicin สีเข้มกว่า poloxamer + rifampicin นอกจากนี้เมื่อพิจารณาสูตร poloxamer : lecithin (50:1) + rifampicin พบว่ามี %viability คือ 62.50 เทียบกับสูตร poloxamer : lecithin (50:1) ที่มี % viability คือ 115.38 แสดงว่า lecithin ไม่ได้มีฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็ง แต่เมื่อนำสูตร poloxamer + rifampicin เทียบกับสูตร poloxamer : lecithin (50:1) + rifampicin พบว่าค่า % viability ลดลงจาก 86.54 เป็น 62.50 แสดงว่า lecithin ช่วยในการนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง ซึ่งผลของ % viability สอดคล้องกับรูปลักษณะเซลล์หลังย้อม crystal violet พบว่าสูตร poloxamer : lecithin (50:1) + rifampicin สีเข้มกว่า poloxamer + rifampicin

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลวิจัย

จากการศึกษาผลของประจุบนพื้นผิว polymeric micelle โดยใช้ poloxamer407 ร่วมกับ CTAB หรือ lecithin ในการสร้าง polymeric micelle เพื่อนำส่งยา rifampicin เข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7 cell) เมื่อทำการประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของ polymeric micelle ได้แก่ ขนาด zeta potential และ %entrapment efficacy พบว่าขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค zeta potential และ %entrapment efficacy ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ปริมาณ poloxamer407 ที่เพิ่มมากขึ้นส่งผลให้การกระจายขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้น ทำให้สามารถคัดเลือกสูตรที่เหมาะสม ได้แก่ สูตร poloxamer407 200 mg มีขนาดเฉลี่ยของอนุภาคเท่ากับ 336.70 ± 32.4 nm และ %entrapment สูงกว่าสูตรอื่นๆ โดยมีการกระจายขนาดของอนุภาคที่น้อย จากนั้นนำสูตร poloxamer407 200 mg มาศึกษาต่อ โดยใช้ poloxamer407 : CTAB พบว่าอัตราส่วน ที่ 20:1 และ 10:1 มีค่า zeta potential แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $P\text{-value} < 0.05$ เมื่อเทียบกับ poloxamer407 200 mg ซึ่งปริมาณ CTAB ที่เพิ่มขึ้นมีแนวโน้มทำให้ขนาดอนุภาค และค่า zeta potential เพิ่มขึ้นและพบว่า poloxamer407 : lecithin ที่อัตราส่วน 50:1, 20:1 และ 10:1 มีค่า zeta potential แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $P\text{-value} < 0.05$ เมื่อเทียบกับ poloxamer407 200 mg ซึ่งปริมาณ lecithin ที่เพิ่มขึ้นมีแนวโน้มทำให้ขนาดอนุภาค และค่า zeta potential ลดลง เมื่อประเมิน ขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค zeta potential และ %entrapment efficacy ทำให้สามารถคัดเลือกสูตรที่เหมาะสมจากสูตรที่มี ค่า zeta potential ที่ใกล้เคียงกัน ได้แก่ poloxamer407 : CTAB คือ 10:1 และ poloxamer407 : lecithin คือ 50:1 ซึ่งมีค่า zeta potential เท่ากับ 22.36 ± 7.97 และ -22.34 ± 1.31 ตามลำดับ หลังจากนั้นจึงได้นำสูตร poloxamer407 : CTAB คือ 10:1 และ poloxamer407 : lecithin คือ 50:1 มาศึกษาคุณสมบัติ cellular uptake และฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (cytotoxicity) พบว่าผลการนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง MCF-7 (cellular uptake) ของ polymeric micelle ที่เตรียมโดยอัตราส่วน poloxamer

ต่อ CTAB (10:1) หรือ poloxamer lecithin (50:1) ที่ load ยา rifampicin ที่เวลา 2 ชั่วโมง พบว่าสูตรที่เตรียมด้วย poloxamer สามารถนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง MCF-7 มีค่า cellular uptake 1,376.36 ng/ml ได้ดีกว่าสูตร poloxamer ต่อ CTAB (10:1) และ poloxamer ต่อ lecithin (50:1) ดังนั้น poloxamer 407 จึงมีส่วนช่วยในการนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง แต่เมื่อวัดผลที่เวลา 4 ชั่วโมง พบว่า สูตรที่เตรียมด้วย poloxamer ต่อ CTAB (10:1) สามารถนำเข้าสู่เซลล์มะเร็ง MCF-7 มีค่า cellular uptake 1,846.07 ng/ml ได้ดีกว่าสูตร poloxamerเปล่า และ poloxamer ต่อ lecithin (50:1) โดยการ uptake เกิดผ่านกลไก endocytosis เนื่องจากประจุบวกที่ผิวอนุภาคไปจับกับประจุลบที่ผิวของเซลล์ membrane เกิดแรง electrostatic ทำให้ประจุบวก uptake ยาเข้าสู่เซลล์ได้มากกว่าประจุลบ และกลาง โดยผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (cytotoxicity) ที่สูตร poloxamer : CTAB (10:1) ที่ load rifampicin มี % viability น้อยที่สุด

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าระบบนำส่งยาในรูปแบบ polymeric micelle ที่มีประจุบนพื้นผิวเป็นประจุบวกจาก CTAB มีลักษณะด้านคุณสมบัติทางกายภาพที่เหมาะสมในการนำส่งยารวมถึงมีแนวโน้มช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านมและเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของยา rifampicin ในการฆ่าเซลล์มะเร็งเต้านม แต่จากการศึกษานี้ศึกษาเพียงคุณสมบัติของ polymeric micelle ในด้านทางกายภาพเท่านั้น ซึ่งอาจเพิ่มการศึกษาในด้านอื่นๆเช่น สมบัติทางเคมี หรือ สมบัติทางชีววิทยาต่อไป อีกทั้งการศึกษาศักยภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (cytotoxicity) และคุณสมบัติ cellular uptake ศึกษาเฉพาะในเซลล์มะเร็งเต้านมซึ่งในอนาคตอาจจะพัฒนาการศึกษาในเซลล์มะเร็งชนิดอื่น เพื่อสามารถอธิบายกลไกเพิ่มเติมต่อการนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งได้ของ polymeric micelle และอาจจะศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของมนุษย์ เพื่อเป็นการยืนยันความปลอดภัยต่อเซลล์ปกติได้ดียิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. CA: a cancer journal for clinicians. 2014;64(1):9-29.
2. Hospital-based cancer registry 2015 [Internet]. National cancer institute Department of medical service Ministry of public health [cited 2018 Feb 11]. Available from: http://www.nci.go.th/th/File_download/Nci%20Cancer%20Registry/HOSPITAL-BASED%202015.pdf.
3. Group EBCTC. Effects of radiotherapy and surgery in early breast cancer—an overview of the randomized trials. New England Journal of Medicine. 1995;333(22):1444-56.
4. Cancer [Internet]. World Health organization. [cited 2018 Feb 22]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
5. Public health A.D.2015 [Internet]. Strategy and Planning division. [cited 2017 Feb 11]. Available from: http://bps.moph.go.th/new_bps/sites/default/files/health_statistic2558.pdf.
6. 20 Herb that fight cancer [Internet]. Canceractive. [cited 2018 Feb 22]. Available from: <https://www.canceractive.com/cancer-active-page-link.aspx?n=3054>.
7. Saxena V, Hussain MD. Polymeric mixed micelles for delivery of curcumin to multidrug resistant ovarian cancer. Journal of biomedical nanotechnology. 2013;9(7):1146-54.
8. Winters WD, Tuan AL, Morton DL. Differential effects of rifampicin on cultured human tumor cells. Cancer research. 1974;34(12):3173-9.
9. Fardel O, Lecureur V, Loyer P, Guillouzo A. Rifampicin enhances anti-cancer drug accumulation and activity in multidrug-resistant cells. Biochemical pharmacology. 1995;49(9):1255-60.

10. Shichiri M, Fukai N, Kono Y, Tanaka Y. Rifampicin as an oral angiogenesis inhibitor targeting hepatic cancers. *Cancer research*. 2009;69(11):4760-8.
11. Lu Y, Park K. Polymeric micelles and alternative nanonized delivery vehicles for poorly soluble drugs. *International journal of pharmaceutics*. 2013;453(1):198-214.
12. Theja D, Rao VT, Jamuna P, Reddy SP. AN APPROACH TO INCREASE THE SOLUBILITY OF RIFAMPICIN BY SOLID DISPERSION TECHNIQUE. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2012;3(6):1800.
13. Micelles [Internet]. European Chemistry Thematic Network [cited 2018 Feb 7]. Available from: <http://www.whatischemistry.unina.it/en/micella.html>.
14. Croy S, Kwon G. Polymeric micelles for drug delivery. *Current pharmaceutical design*. 2006;12(36):4669-84.
15. Ma Y, Zhuang Y, Xie X, Wang C, Wang F, Zhou D, et al. The role of surface charge density in cationic liposome-promoted dendritic cell maturation and vaccine-induced immune responses. *Nanoscale*. 2011;3(5):2307-14.
16. National cancer control programmes [Internet]. National cancer institue. [cited 2018 Feb 22]. Available from: http://www.nci.go.th/th/File_download/D_index/NCCP_2556-2560.pdf.
17. Cancer in thailand [Internet]. Ministry of public health. [cited 2017 Feb 22]. Available from: http://www.nci.go.th/th/File_download/Nci%20Cancer%20Registry/Cancer%20in%20Thailand8.pdf.
18. Hallmarks of Cancer: The Next Generation [Internet]. 2011 [cited 2018 Feb 11]. Available from: [http://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(11\)00127-9](http://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(11)00127-9).
19. Osborne C, Wilson P, Tripathy D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *The oncologist*. 2004;9(4):361-77.
20. Lee EY, Muller WJ. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2010;2(10):a003236.

21. Lehman TA, Reddel R, Peiifer A, Spillare E, Kaighn ME, Weston A, et al. Oncogenes and tumor-suppressor genes. Environmental health perspectives. 1991;93:133.
22. Breast cancer [Internet]. U.S. National Library of medicine. [cited 2018 Feb 11]. Available from: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/breast-cancer>.
23. Breast cancer2 [Internet]. POBPED. [cited 2018 Feb 22]. Available from: <https://www.pobpad.com>.
24. stage of breast cancer [Internet]. Thaibreastcancer.com. [cited 2018 Feb 22]. Available from: <http://www.thaibreastcancer.com/ca-131/>.
25. Risk of breast cancer [Internet]. Bumrungrad international. [cited 2018 Feb 22]. Available from: <https://www.bumrungrad.com/th/horizon-cancer-treatment-center-chemotherapy-bangkok-thailand/conditions/breast-cancer>.
26. Rifampicinpicture [Internet]. chemicalbook. [cited 2018 Mar 21]. Available from: http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_DE_CB7474473.htm.
27. Remington the science and practice of pharmacy. 21 ed. B.troy D, editor. Baltimore,USA: Lippincott Williams & Wikins.
28. U.S Pharmacopeia 39 National Formulary 34. Baltimore,USA: United Book Press 2016.
29. Shichiri M, Tanaka Y. Inhibition of cancer progression by rifampicin: involvement of antiangiogenic and anti-tumor effects. Cell Cycle. 2010;9(1):64-8.
30. Dinda S, Kodali-Gali S, Sevilla L, Burkley M, Hurd C, Moudgil V. Inhibition of proliferation of T47D human breast cancer cells: alterations in progesterone receptor and p53 tumor suppressor protein. Molecular and cellular biochemistry. 1997;175(1-2):81-9.
31. Werawatganone P. Chemical reaction in micellar solutions. Journal of Health Research. 2005.
32. Molecular Simulation and Preparation of Block Copolymer Micelle

for Drug Delivery Application [Internet]. [cited 2018 Feb 11]. Available from:

<http://sutir.sut.ac.th:8080/sutir/bitstream/123456789/5154/2/Fulltext.pdf>.

33. Jhaveri AM, Torchilin VP. Multifunctional polymeric micelles for delivery of drugs and siRNA. *Frontiers in pharmacology*. 2014;5:77.
34. Xu W, Ling P, Zhang T. Polymeric micelles, a promising drug delivery system to enhance bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Journal of drug delivery*. 2013;2013.
35. Chen H, Khemtong C, Yang X, Chang X, Gao J. Nanonization strategies for poorly water-soluble drugs. *Drug discovery today*. 2011;16(7-8):354-60.
36. Mourya V, Inamdar N, Nawale R, Kulthe S. Polymeric micelles: general considerations and their applications. *Ind J Pharm Edu Res*. 2011;45(2):128-38.
37. Pu X, Liu J, Guo Y, Yan X, Yang H, Yuan Q. Study progression in polymeric micelles for the targeting delivery of poorly soluble anticancer agents to tumor. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012;7(1):1-17.
38. Almeida M, Magalhães M, Veiga F, Figueiras A. Poloxamers, poloxamines and polymeric micelles: Definition, structure and therapeutic applications in cancer. *Journal of Polymer Research*. 2018;25(1):31.
39. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6 ed. Rowe RC, Sheskey PJ, Quin ME, editors. Gurnee, USA: Pharmaceutical Press.
40. Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharmaceutical research*. 2006;23(12):2709-28.
41. Escobar-Chávez JJ, López-Cervantes M, Naik A, Kalia Y, Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A. Applications of thermo-reversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2006;9(3):339-58.
42. Bae KH, Lee Y, Park TG. Oil-Encapsulating PEO- b -PPO- b -PEO/PEG Shell Cross-Linked Nanocapsules for Target-Specific Delivery of Paclitaxel. *Biomacromolecules*. 2007;8(2):650-6.

43. El-Kattan AF, Asbill CS, Kim N, Michniak BB. Effect of formulation variables on the percutaneous permeation of ketoprofen from gel formulations. *Drug Delivery*. 2000;7(3):147-53.
44. Dimitrova E, Bogdanova S, Mitcheva M, Tanev I, Minkov E. Development of model aqueous ophthalmic solution of indomethacin. *Drug development and industrial pharmacy*. 2000;26(12):1297-301.
45. Saxena V, Hussain MD. Poloxamer 407/TPGS mixed micelles for delivery of gambogic acid to breast and multidrug-resistant cancer. *International journal of nanomedicine*. 2012;7:713.
46. Krasnici S, Werner A, Eichhorn ME, Schmitt-Sody M, Pahernik SA, Sauer B, et al. Effect of the surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels. *International journal of cancer*. 2003;105(4):561-7.
47. Nguyen TL, Nguyen TH, Nguyen DH. Development and In Vitro Evaluation of Liposomes Using Soy Lecithin to Encapsulate Paclitaxel. *International journal of biomaterials*. 2017;2017.
48. Baczynska D, Widerak K, Ugorski M, Langner M. Surface charge and the association of liposomes with colon carcinoma cells. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2001;56(9-10):872-7.
49. Khalil RA, Al-hakam AZ. Theoretical estimation of the critical packing parameter of amphiphilic self-assembled aggregates. *Applied Surface Science*. 2014;318:85-9.
50. Effect of Surfactant on the Size, Zeta Potential and Rheology of Alumina Nanofluids [Internet]. ingenta. [cited 2018 Nov 9]. Available from: <https://www.ingentaconnect.com/content/asp/jon/2014/00000003/00000004/art00004>
51. Farnia P, Velayati AA, Mollaei S, Ghanavi J. Modified rifampin nanoparticles: Increased solubility with slow release rate. *International journal of mycobacteriology*. 2017;6(2):171.

52. Dwiastuti R, Noegrohati S, Istyastono EP, Marchaban, editors. Formulation and physical properties observations of soy lecithin liposome containing 4-n-butylresorcinol. AIP Conference Proceedings; 2016: AIP Publishing.
53. Bryan R, Khan I, Ehtezazi T, Saleem I, Gordon S, O'Neill F, et al. Surfactant Effects on Lipid-Based Vesicles Properties. Journal of pharmaceutical sciences. 2018;107(5):1237-46.
54. Zhu Q, Guo T, Xia D, Li X, Zhu C, Li H, et al. Pluronic F 127-modified liposome-containing tacrolimus–cyclodextrin inclusion complexes: improved solubility, cellular uptake and intestinal penetration. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2013;65(8):1107-17.
55. Takeuchi H, Matsui Y, Yamamoto H, Kawashima Y. Mucoadhesive properties of carbopol or chitosan-coated liposomes and their effectiveness in the oral administration of calcitonin to rats. Journal of controlled release. 2003;86(2-3):235-42.
56. Salatin S, Yari Khosroushahi A. Overviews on the cellular uptake mechanism of polysaccharide colloidal nanoparticles. Journal of cellular and molecular medicine. 2017;21(9):1668-86.
57. Ito E, Yip KW, Katz D, Fonseca SB, Hedley DW, Chow S, et al. Potential use of cetrimonium bromide as an apoptosis-promoting anti-cancer agent for head and neck cancer. Molecular pharmacology. 2009.
58. Schachter D. The source of toxicity in CTAB and CTAB-stabilized gold nanorods: Rutgers University-Graduate School-New Brunswick; 2011

