

การพัฒนาไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน
สำหรับการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินและดีเอชเอ



นางสาวกัญฐรัตน์ เลิศไชย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

DEVELOPMENT OF THAI SILK FIBROIN-GELATIN BLENDED HYDROGELS FOR
CONTROLLED RELEASE OF CURCUMIN AND DHA

Miss Kantarat Lerdchai



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering Program in Chemical Engineering

Department of Chemical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การพัฒนาไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและ
เจลาติน สำหรับการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินและ
ดีเอชเอ

โดย

นางสาวกัญจรัตน์ เลิศไชย

สาขาวิชา

วิศวกรรมเคมี

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

เภสัชกรหญิง ดร.จุฑารัตน์ กิจสงเสริมธน

คณะกรรมการวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.บัณฑิต เอื้ออาภรณ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.อาทิตย์วรรณ โชติพิทักษ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(เภสัชกรหญิง ดร.จุฑารัตน์ กิจสงเสริมธน)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โศรดา กนกพานนท์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร.ณัฐพร พิมพะ)

กัณฐรัตน์ เลิศไชย : การพัฒนาไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน สำหรับการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินและดีเอชเอ. (DEVELOPMENT OF THAI SILK FIBROIN-GELATIN BLENDED HYDROGELS FOR CONTROLLED RELEASE OF CURCUMIN AND DHA) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ภญ. ดร.จุฑารัตน์ กิจสงเสริมธน, 171 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน เพื่อประยุกต์ใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินและดีเอชเอ ไฮโดรเจลถูกเตรียมจากไฟโบรอิน/เจลาติน ที่อัตราส่วน 0/100, 5/95, 10/90, 15/85, 20/80, 50/50, 80/20 และ 100/0 โดยน้ำหนัก และเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ และขึ้นรูปด้วยเทคนิคกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง พบว่าไฮโดรเจลที่ถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 0.20% โดยปริมาตร มีความคงตัวมากที่สุด จากผลค่าศักย์เซต้าพบว่าค่าศักย์เซต้าของสารละลายผสมไฟโบรอิน/เจลาตินที่เป็นบวกมีค่าลดลง เมื่อสัดส่วนของไฟโบรอินเพิ่มขึ้น ส่วนค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มผสมไฟโบรอิน/เจลาตินมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อสัดส่วนของไฟโบรอินเพิ่มขึ้นชี้ให้เห็นถึงสมบัติความชอบน้ำที่ลดลง โครงสร้างสัณฐานของไฮโดรเจลไฟโบรอิน/เจลาตินมีรูพรุนสม่ำเสมอและเชื่อมโยงกันเป็นเครือข่าย และมีร้อยละการบวมน้ำอยู่ในช่วง 700 จากผลการศึกษา ร้อยละการเชื่อมขวางด้วยวิธี TNBS พบว่าไฮโดรเจลผสมไฟโบรอิน/เจลาตินมีค่าร้อยละการเชื่อมขวางมากกว่าไฮโดรเจลเจลาตินหรือไฟโบรอินอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทดสอบการย่อยสลายได้ทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการพบว่า ไฮโดรเจลเจลาตินถูกย่อยสลายเร็วกว่าไฮโดรเจลไฟโบรอินและไฮโดรเจลผสมไฟโบรอิน/เจลาติน เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการพบว่าไฮโดรเจลที่เตรียมได้ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังของหนูชนิด L929 และเมื่อนำไฮโดรเจลไปดูดซับเคอร์คูมิน และ/หรือ ดีเอชเอเพื่อศึกษาการควบคุมการปลดปล่อย พบว่าเคอร์คูมินและดีเอชเอถูกดูดซับบนไฮโดรเจลด้วยอันตรกิริยาของความไม่ชอบน้ำ การปลดปล่อยเคอร์คูมินและดีเอชเอภายใต้สภาวะที่ไม่มีและมีเอนไซม์คอลลาจีเนส แสดงให้เห็นว่าไฮโดรเจลไฟโบรอินและไฮโดรเจลผสมไฟโบรอิน/เจลาตินสามารถชะลอการปลดปล่อยเคอร์คูมินและดีเอชเอได้มากกว่าไฮโดรเจลเจลาติน โดยกลไกการปลดปล่อยสามารถอธิบายได้ด้วยกลไกการแพร่และการย่อยสลายของไฮโดรเจล และเมื่อนำระบบควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมิน และ/หรือ ดีเอชเอนี้ไปทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก พบว่าการปลดปล่อยเคอร์คูมิน และ/หรือ ดีเอชเอจากไฮโดรเจลสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ภาควิชา วิศวกรรมเคมี

ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5470117021 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORDS: THAI SILK FIBROIN / GELATIN / CURCUMIN / DHA

KANTARAT LERDCHAI: DEVELOPMENT OF THAI SILK FIBROIN-GELATIN BLENDED HYDROGELS FOR CONTROLLED RELEASE OF CURCUMIN AND DHA. ADVISOR: ASSOC. PROF. SIRIPORN DAMRONGSAKKUL, Ph.D., CO-ADVISOR: JUTARAT KITSONGSERMTHON, Ph.D., 171 pp.

This research aimed to develop Thai silk fibroin/gelatin (SF/G) blended hydrogels for the controlled release of curcumin and DHA. The blended SF/G hydrogels at the different weight blending ratios of 0/100, 5/95, 10/90, 15/85, 20/80, 50/50, 80/20 and 100/0 were fabricated using freeze-dry technique and crosslinked with glutaraldehyde at various concentrations. The results showed that the most stable SF/G hydrogel was the one crosslinked with 0.20% v/v glutaraldehyde. The zeta potential of SF/G solutions was decreased when increasing SF content. On the other hand, water contact angle on the SF/G films was increased with the increasing of SF content, suggesting the decreased hydrophilicity. The cross-sectioned morphology of all SF/G hydrogels showed homogeneous porous structure and interconnected pores. The degrees of water swelling of SF/G hydrogels were around 700%. The results of crosslinking degrees analyzed by 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) method exhibited that the SF/G blended hydrogels were crosslinked to a higher extent than the pure G and SF hydrogels. Furthermore, the pure G hydrogels were found to degrade faster than the pure SF and SF/G blended hydrogels when incubated in collagenase solution. The cytotoxicity test showed that all SF/G hydrogels were not toxic to L929 mouse fibroblast. For the controlled release application, curcumin and/or DHA were adsorbed on the SF/G hydrogels by hydrophobic interaction. The *in vitro* release of curcumin and DHA from the SF/G hydrogels was studied both in the absence and presence of collagenase. It was found that pure SF and SF/G blended hydrogels could prolong the release of curcumin and DHA, compared to the pure G hydrogels. The controlled release of curcumin and DHA from hydrogels was governed by the diffusion and degradation mechanisms. When tested these controlled release systems with cervical cancer cells, curcumin and/or DHA released from the hydrogels effectively inhibit the growth of cervical cancer cells.

Department:	Chemical Engineering	Student's Signature
Field of Study:	Chemical Engineering	Advisor's Signature
Academic Year:	2013	Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลือจากหลายๆ ท่าน ซึ่งผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล อาจารย์ที่ปรึกษา, เกสัชกรหญิง ดร. จุฑารัตน์ กิจสงเสริมธน อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม เป็นอย่างสูงสำหรับการให้คำปรึกษาเกี่ยวกับงานวิจัย วางแผนการวิจัย การตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ และแนวทางในการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบคุณคณะกรรมการ ซึ่งได้แก่ รองศาสตราจารย์ ดร.อาทิวรรณ โชติพิฤกษ์ ประธานกรรมการ, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โศรดา กนกพานนท์ และ ดร.ณัฐพร พิมพะ กรรมการ ที่ท่านได้สละเวลาอันมีค่ามาสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ รศ. ดร.ภาวพันธ์ ภัทรโกศล หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์เรื่องเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Human cervical carcinoma cell line) ชนิด CaSki

ขอขอบคุณ ดร.จุฑามาศ รัตนวราภรณ์, คุณหนึ่งฤทัย ใจฉวะ และคุณรุ่งนภา แยมเดช สำหรับคำแนะนำและการให้ความช่วยเหลือในทุกด้านสำหรับการทำการทดลอง

ขอขอบคุณศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ จังหวัดศรีสะเกษ ที่อนุเคราะห์รังไหมสำหรับใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวเคมี และห้องปฏิบัติการวิศวกรรมพอลิเมอร์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ ห้องปฏิบัติการ i-Tissue Lab คณะแพทยศาสตร์ และศูนย์เครื่องมือวิเคราะห์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับสถานที่และอุปกรณ์ในการทำการทดลอง รวมทั้งเอื้อเฟื้อเครื่องมือในการวิเคราะห์ข้อมูลที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมวัสดุการแพทย์ที่ได้ให้กำลังใจ คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัวที่เป็นกำลังใจ ที่ให้การสนับสนุนตลอดมาจนกระทั่งงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูป.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 ระบบควบคุมการปลดปล่อย (Controlled release system).....	5
2.1.1 ระบบนำส่งยาที่ผลิตจากพอลิเมอร์.....	6
2.1.2 แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้อธิบายพฤติกรรมของการปลดปล่อยยา.....	8
2.1.3 กลไกควบคุมการปลดปล่อยยา.....	10
2.1.3.1 กลไกการควบคุมการปลดปล่อยทางกายภาพ.....	10
2.1.3.1.1 การควบคุมการปลดปล่อยโดยใช้หลักการแพร่.....	10
2.1.3.1.2 การควบคุมการปลดปล่อยโดยใช้ตัวทำละลายเป็นตัวกระตุ้น.....	11
2.1.3.2 กลไกการควบคุมการปลดปล่อยทางเคมี.....	11
2.1.3.2.1 การควบคุมการปลดปล่อยโดยการต่อเติมตัวยานสายโซ่พอลิเมอร์.....	11
2.1.3.2.2 การควบคุมการปลดปล่อยโดยการสลายตัวของพอลิเมอร์.....	12
2.2 ไฮโดรเจล (Hydrogel).....	12
2.3 ชีววัสดุ (Biomaterials).....	12
2.3.1 ไหม (Silk).....	12
2.3.2 เจลาติน (Gelatin).....	18

2.4	เทคนิคการขึ้นรูปด้วยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze-drying)	22
2.5	การเชื่อมขวาง (Crosslinking)	27
2.5.1	การเชื่อมขวางทางกายภาพ (Physical crosslinking).....	27
2.5.1.1	การเชื่อมขวางด้วยความร้อน	27
2.5.1.2	การเชื่อมขวางด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต	27
2.5.2	การเชื่อมขวางทางเคมี (Chemical crosslinking)	27
2.5.2.1	การเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์.....	28
2.5.2.2	การเชื่อมขวางด้วย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) และ N-hydroxysuccinimide esters (NHS) [Jetbumpenkul P. และคณะ 2012, Pieper J.S และคณะ 2000]	29
2.6	เคอร์คูมิน (Curcumin)	30
2.7	ดีเอชเอ (Docosahexaenoic acid; DHA)	33
2.8	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	36
2.8.1	การพัฒนาใหม่ไฟโบรอินและเจลาตินเพื่อใช้ในการควบคุมการปลดปล่อย	36
2.8.2	การพัฒนาระบบนำส่งเคอร์คูมิน	39
2.8.3	การใช้เคอร์คูมิน ดีเอชเอ และเคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอในการรักษาโรคต่างๆ	45
บทที่ 3	วัสดุและวิธีดำเนินการวิจัย	51
3.1	วัสดุและสารเคมี	51
3.2	อุปกรณ์	52
3.3	ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย	54
3.3.1	การเตรียมไฮโดรเจลไฟโบรอินใหม่ไทย/เจลาติน	54
3.3.1.1	การเตรียมสารละลายไฟโบรอินใหม่ไทยและสารละลายเจลาติน	55
3.3.1.2	การขึ้นรูปไฮโดรเจลไฟโบรอินใหม่ไทย/เจลาติน	57
3.3.2	การศึกษาความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ต่อความคงตัวของไฮโดรเจล	58
3.3.3	การวิเคราะห์สมบัติของชีววัสดุและสารออกฤทธิ์ (เคอร์คูมินและดีเอชเอ).....	58
3.3.3.1	การวิเคราะห์ค่าศักย์เซต้า (Zeta potential) ของสารละลายผสมของไฟโบรอินใหม่ไทยและเจลาติน สารละลายเคอร์คูมิน และสารละลายดีเอชเอ	58

3.3.3.2 การวิเคราะห์ค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มผสมของไฟโบรอินไหมไทยและ เจลาติน ฟิล์มเคอร์คูมิน และฟิล์มดีเอชเอ	59
3.3.4 การวิเคราะห์คุณลักษณะและสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของไฮโดรเจล	60
3.3.4.1 การวิเคราะห์โครงสร้างพื้นฐานของไฮโดรเจล	60
3.3.4.2 การวิเคราะห์ความพรุนของไฮโดรเจล	60
3.3.4.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการดูดซับน้ำของไฮโดรเจล.....	60
3.3.4.4 การวิเคราะห์ร้อยละการเชื่อมขวางของไฮโดรเจลด้วยเทคนิค TNBS	61
3.3.4.5 การวิเคราะห์ความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพในระดับ ห้องปฏิบัติการของไฮโดรเจล	61
3.3.4.6 การวิเคราะห์ความเป็นพิษของไฮโดรเจลต่อเซลล์ผิวหนังของหนู (เซลล์ L929)	62
3.3.5 การศึกษาสมบัติการดูดซับและการควบคุมการปลดปล่อยของไฮโดรเจล	63
3.3.5.1 การศึกษาความสามารถในการดูดซับเคอร์คูมิน ดีเอชเอ และเคอร์คูมินร่วมกับ ดีเอชเอของไฮโดรเจล	63
3.3.5.2 การศึกษาความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมิน ดีเอชเอ และ เคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอของไฮโดรเจลในระดับห้องปฏิบัติการ	64
3.3.5.6 การศึกษาประสิทธิภาพการปลดปล่อยเคอร์คูมิน ดีเอชเอ และเคอร์คูมิน ร่วมกับดีเอชเอของไฮโดรเจลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ปากมดลูกในระดับห้องปฏิบัติการ	65
3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ	67
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	68
4.1 ผลของความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ต่อความคงตัวของไฮโดรเจล.....	68
4.2 สมบัติของชีววัสดุและสารออกฤทธิ์ (เคอร์คูมิน และดีเอชเอ).....	71
4.2.1 ค่าศักย์เซต้าของสารละลายผสมของไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน สารละลายเคอร์คู มิน และสารละลายดีเอชเอ	71
4.2.2 ค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มผสมไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน ฟิล์มเคอร์คูมิน และ ฟิล์มดีเอชเอ	74
4.3 คุณลักษณะและสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของไฮโดรเจล	77
4.3.1 โครงสร้างพื้นฐานและความพรุนของไฮโดรเจล.....	77

4.3.2 ความสามารถในการดูดซับน้ำของไฮโดรเจล	81
4.3.3 ร้อยละการเชื่อมขวางของไฮโดรเจล	83
4.3.4 ความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพของไฮโดรเจลในระดับห้องปฏิบัติการ ...	84
4.3.5 ความเป็นพิษของไฮโดรเจลต่อเซลล์ผิวหนังของหนู (เซลล์ L929)	88
4.4 สมบัติการดูดซับและการควบคุมการปลดปล่อยของไฮโดรเจล	94
4.4.1 ความสามารถในการดูดซับเคอร์คูมิน ดีเอชเอ และเคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอของไฮโดรเจล	94
4.4.2 ความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมิน ดีเอชเอ และเคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอของไฮโดรเจลในระดับห้องปฏิบัติการ	101
4.4.3 ประสิทธิภาพการปลดปล่อยเคอร์คูมิน ดีเอชเอ และเคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอของไฮโดรเจลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกในระดับห้องปฏิบัติการ	115
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	136
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	136
5.2 ข้อเสนอแนะ	138
รายการอ้างอิง.....	140
ภาคผนวก	153
ภาคผนวก ก	154
ภาคผนวก ข	155
ภาคผนวก ค	157
ภาคผนวก ง.....	159
ภาคผนวก จ	160
ภาคผนวก ฉ	165
ภาคผนวก ช	166
ภาคผนวก ซ	167
ภาคผนวก ฌ	170
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	171

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 องค์ประกอบของไหมกินไบหม่อน.....	13
2.2 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในเส้นใยไฟโบรอินและเซรีซิน.....	15
2.3 ส่วนประกอบของธาตุต่างๆ ในเส้นใยไฟโบรอิน.....	16
2.4 สมบัติทางกลของพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ.....	18
2.5 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในเจลาตินชนิดเอและบี.....	20
2.6 งานวิจัยที่รายงานเกี่ยวกับความเสถียรของเคอร์คูมิน.....	40
3.1 ไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่อัตราส่วนผสมต่างๆ.....	58
4.1 ค่าศักย์เซต้าของสารละลายผสมไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินชนิดเอ ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนัก ที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร ในน้ำปราศจากไอออน (pH ~ 5.5) สารละลายเคอร์คูมิน และสารละลายดีเอชเอ ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนัก ในสารละลายเอนาทอล (pH ~ 7).....	72
4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นผิววัสดุกับค่ามัมสัมผัสน้ำ.....	75
4.3 ค่ามัมสัมผัสน้ำบนฟิล์มผสมไฟโบรอินไหมไทย/เจลาติน ที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร ฟิล์มเคอร์คูมิน และฟิล์มดีเอชเอ.....	75
4.4 ขนาดรูพรุนเฉลี่ยและความพรุนของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร.....	80
4.5 ร้อยละการดูดซับน้ำของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร เมื่อแช่ในสารละลาย PBS, pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	82
4.6 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) และเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT) ของเซลล์ L929 หลังจากรเพาะเลี้ยงด้วยตัวอย่างสารสกัด 100% และตัวอย่างสารสกัดเจือจางของไฮโดรเจลอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ซึ่งเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.20% โดยปริมาตร.....	93
4.7 ร้อยละการดูดซับสารออกฤทธิ์ (เคอร์คูมิน และ/หรือ ดีเอชเอ) ของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่สกัดส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ซึ่งถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.20% โดยปริมาตร.....	97
4.8 โครงสร้างและสมบัติของเคอร์คูมินและดีเอชเอ.....	100
4.9 ค่าคงที่สำหรับการปลดปล่อยเคอร์คูมิน (k), ตัวเลขชี้กำลังของการปลดปล่อย (Release exponent; n) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; R^2).....	113

4.10	ค่าคงที่สำหรับการปลดปล่อยดีเอชเอ (k) ภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์, ตัวเลขชี้กำลังของการปลดปล่อย (Release exponent; n) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; R ²).....	113
4.11	ค่าคงที่สำหรับการปลดปล่อยเคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอ (k), ตัวเลขชี้กำลังของการปลดปล่อย (Release exponent; n) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; R ²) .	114
4.12	ร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด Caski หลังจากการเพาะเลี้ยงด้วยสารละลายเคอร์คูมิน สารละลายดีเอชเอ และสารละลายผสมระหว่างเคอร์คูมินและดีเอชเอ.....	121
4.13	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) และเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT) ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด Caski หลังจากการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM, อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเอทานอล 0.1% โดยปริมาตร และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยสารละลายเคอร์คูมิน สารละลายดีเอชเอ และสารละลายผสมระหว่างเคอร์คูมินและดีเอชเอ.....	122
4.14	ร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด Caski หลังจากการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่สัดส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ที่ดูดซับสารละลายเคอร์คูมิน สารละลายดีเอชเอ และสารละลายผสมระหว่างเคอร์คูมินและดีเอชเอ.....	130
4.15	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) และเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT) ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด Caski หลังจากการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM, อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซิงค์อะซีเตตความเข้มข้น 100 ppm และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีไฮโดรเจลที่ดูดซับสารละลายเคอร์คูมิน สารละลายดีเอชเอ และสารละลายผสมระหว่างเคอร์คูมินและดีเอชเอ.....	131
ซ.1	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ, เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ และร้อยละการยึดเกาะที่เวลา 1 วันของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki ที่เพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน 6 หลุม (6 well-plate)	169

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	ปริมาณยาที่ถูกปล่อยออกมา ณ เวลาต่างๆ ผ่านกลไกของระบบนำส่งยาทั้งสามแบบ 7
2.2	พฤติกรรมของการปล่อยยาจากระบบนำส่งยา (Release profile) ด้วยอัตราต่างๆ 9
2.3	ลักษณะของระบบควบคุมการนำส่งยาแบบ Reservoir..... 10
2.4	ลักษณะของระบบควบคุมการนำส่งยาแบบเมทริกซ์..... 11
2.5	โครงสร้างของเส้นใยไหมที่ได้จากหนอนไหม ก) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ ข) ภาพวาด..... 14
2.6	โครงสร้างกรดอะมิโนที่สำคัญ 4 ชนิดในเส้นใยไฟโบรอิน 16
2.7	โครงสร้างของเส้นใยไฟโบรอิน ก) ลักษณะแผ่นแผ่นพ्लीทเบตา (β -Pleated Sheet) ข) การเรียงตัวของหมู่อะมิโน 16
2.8	โครงสร้างของเซรีซิน 17
2.9	โครงสร้างทางเคมีของเจลาติน..... 19
2.10	กระบวนการผลิตเจลาตินชนิดเอและบี 20
2.11	แผนภูมิสถานะของน้ำบริสุทธิ์ 24
2.12	การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในระหว่างการทำแห้งแบบเยือกแข็ง 26
2.13	โครงสร้างของกลูตาไรลดีไฮด์ 28
2.14	การเชื่อมขวางของโปรตีนด้วยกลูตาไรลดีไฮด์ 29
2.15	การเชื่อมขวางของโปรตีนด้วย EDC/NHS 29
2.16	โครงสร้างโมเลกุลของสารสำคัญในเคอร์คูมินอยด์ 30
2.17	โครงสร้างโมเลกุลของรูปแบบอินอลและคีโต 31
2.18	โครงสร้างของดีเอชเอ (Docosahexaenoic acid; DHA , 22:6 n-3) 34
2.19	กระบวนการสังเคราะห์ EPA และ DHA จากกรดแอลฟาไลโนเลอิก 35
2.20	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเคอร์คูมินความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ ก) ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.4 ข) ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.5 41
2.21	ร้อยละของเคอร์คูมินที่เหลืออยู่ในสารละลาย PBS ที่ค่า pH ต่างๆ หลังจากให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 120 นาที 42
2.22	ความเข้มข้นของเคอร์คูมินในสารละลายต่างๆ หลังจากให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง..... 43
3.1	แผนผังการดำเนินงานวิจัย..... 54
3.2	ขั้นตอนการเตรียมสารละลายไฟโบรอิน 56
3.3	ลักษณะของหยดน้ำบนพื้นผิวสัมผัส 59

- 4.1 ร้อยละโดยน้ำหนักที่หายไปของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ (G100, SF20G80, SF50G50, SF80G20 และ SF100) ซึ่งถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลาย กลูตารัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน หลังแช่ในสารละลาย PBS, pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 70
- 4.2 ค่าศักย์เซต้าของของสารละลายผสมไฟโบรอินไหมไทย/เจลาติน ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนัก ที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร ในน้ำปราศจากไอออน (pH ~ 5.5)..... 73
- 4.3 โครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ ก) เคอร์คูมิน และ ข) ดีเอชเอ 73
- 4.4 ความมัมผัสของน้ำบนฟิล์มไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลาย กลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร..... 76
- 4.5 ลักษณะภายนอกของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลาย กลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร..... 77
- 4.6 ลักษณะโครงสร้างภายในของไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหม/เจลาตินที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ซึ่งถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 35 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 500 ไมโครเมตร) และ 100 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 100 ไมโครเมตร) 79
- 4.7 ร้อยละการบวมน้ำของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลาย กลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร เมื่อแช่ในสารละลาย PBS, pH7.4 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 82
- 4.8 ก) ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินก่อนและหลังการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร ข) ร้อยละการเชื่อมขวางของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร 86
- 4.9 ร้อยละของน้ำหนักแห้งคงเหลือของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร ภายหลังจากแช่ในสารละลาย เอนไซม์คอลลาจีเนส ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร, pH7.4 ที่มีสารละลายโซเดียมเอไซด์ ความเข้มข้น 0.01% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 37°C ที่ระยะเวลาในการแช่ต่างๆ .. 87
- 4.10 จำนวนเซลล์ L929 ที่มีชีวิตหลังจากการเพาะเลี้ยงที่เวลาต่างๆ ด้วยตัวอย่างสารสกัด 100% และตัวอย่างสารสกัดเจือจางของแผ่นไฮโดรเจลชนิด G100 (G100-100%, G100-50%, G100-25% และ G100-12.5%) ที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2%

- โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับตัวควบคุมเชิงลบ (อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM free-serum) และตัวควบคุมเชิงบวก (อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซิงค์อะซีเตตความเข้มข้น 20 ppm).....89
- 4.11 จำนวนเซลล์ L929 ที่มีชีวิตหลังจากการเพาะเลี้ยงที่เวลาต่างๆ ด้วยตัวอย่างสารสกัด 100% และตัวอย่างสารสกัดเจือจางของแผ่นไฮโดรเจลชนิด SF50G50 (SF50G50-100%, SF50G50-50%, SF50G50-25% และ SF50G50-12.5%) ที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับตัวควบคุมเชิงลบ (อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM free-serum) และตัวควบคุมเชิงบวก (อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซิงค์อะซีเตตความเข้มข้น 20 ppm).....90
- 4.12 จำนวนเซลล์ L929 ที่มีชีวิตหลังจากการเพาะเลี้ยงที่เวลาต่างๆ ด้วยตัวอย่างสารสกัด 100% และตัวอย่างสารสกัดเจือจางของแผ่นไฮโดรเจลชนิด SF80G20 (SF80G20-100%, SF80G20-50%, SF80G20-25% และ SF80G20-12.5%) ที่เชื่อมขวางด้วยสารละลาย กลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับตัวควบคุมเชิงลบ (อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM free-serum) และตัวควบคุมเชิงบวก (อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซิงค์อะซีเตตความเข้มข้น 20 ppm).....91
- 4.13 จำนวนเซลล์ L929 ที่มีชีวิตหลังจากการเพาะเลี้ยงที่เวลาต่างๆ ด้วยตัวอย่างสารสกัด 100% และตัวอย่างสารสกัดเจือจางของแผ่นไฮโดรเจลชนิด SF100 (SF100-100%, SF100-50%, SF100-25% และ SF100-12.5%) ที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับตัวควบคุมเชิงลบ (อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM free-serum) และตัวควบคุมเชิงบวก (อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซิงค์อะซีเตตความเข้มข้น 20 ppm)...92
- 4.14 ร้อยละการดูดซับเคอร์คูมินของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่สัดส่วนการผสมโดย น้ำหนักต่างๆ ซึ่งถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.20% โดย ปริมาตร.....98
- 4.15 ร้อยละการดูดซับดีเอชเอของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่สัดส่วนการผสมโดย น้ำหนักต่างๆ ซึ่งถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.20% โดย ปริมาตร.....98
- 4.16 ร้อยละการดูดซับเคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่สัดส่วน การผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ซึ่งถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.20% โดยปริมาตร.....99
- 4.17 ร้อยละการปลดปล่อยเคอร์คูมินของไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและ เจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.20% โดยปริมาตร ภายหลัง การแช่ในสารละลาย PBS, pH 7.4 ที่ประกอบด้วยซีรัม 10% ก) ภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์

- เป็นองค์ประกอบ ข) ภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นองค์ประกอบ 102
- 4.18 ร้อยละการปลดปล่อยดีเอชเอของไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและ เจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.20% โดยปริมาตร ภายใต้สภาวะที่ปราศจากการแช่ในสารละลาย PBS, pH 7.4 ที่ประกอบด้วยซีรัม 10% ก) ภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ เป็นองค์ประกอบ ข) ภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นองค์ประกอบ 104
- 4.19 ร้อยละการปลดปล่อยเคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอของไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทย และเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.20% โดยปริมาตร ภายใต้สภาวะที่ปราศจากการแช่ในสารละลาย PBS, pH 7.4 ที่ประกอบด้วยซีรัม 10% ภายใต้สภาวะที่ไม่มี เอนไซม์เป็นองค์ประกอบ ก) ร้อยละการปลดปล่อยสะสมของเคอร์คูมิน ข) ร้อยละการ ปลดปล่อยสะสมของดีเอชเอ 107
- 4.20 ร้อยละการปลดปล่อยเคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอของไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทย และเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.20% โดยปริมาตร ภายใต้สภาวะที่ปราศจากการแช่ในสารละลาย PBS, pH 7.4 ที่ประกอบด้วยซีรัม 10% ภายใต้สภาวะที่มี เอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นองค์ประกอบ ก) ร้อยละการ ปลดปล่อยสะสมของเคอร์คูมิน ข) ร้อยละการปลดปล่อยสะสมของดีเอชเอ..... 108
- 4.21 จำนวนเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มีชีวิตหลังจากการเพาะเลี้ยงที่เวลาต่างๆ ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มีสารละลายเคอร์คูมินความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ (Cur25), สารละลายดีเอชเอความ เข้มข้น 12.5 (DHA12.5), 25 (DHA25), 50 (DHA50) และ 100 (DHA100) ไมโครโมลาร์ และ สารละลายผสมระหว่างเคอร์คูมินและดีเอชเอที่สัดส่วนความเข้มข้นต่างๆ (C1:D0.5, C1:D1, C1:D2 และ C1:D4) เปรียบเทียบกับตัวควบคุมเชิงลบ (อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM), อาหาร เลี้ยงเซลล์ที่มีเอทานอลความเข้มข้น 0.1% โดยปริมาตร และตัวควบคุมเชิงบวก (อาหารเลี้ยง เซลล์ที่มีซิงค์อะซีเตตความเข้มข้น 100 ppm)..... 120
- 4.22 รูปร่างของเซลล์มะเร็งปากมดลูกหลังจากเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM, อาหาร เลี้ยงเซลล์ที่มีเอทานอล 0.1% โดยปริมาตร, ซิงค์อะซีเตต 100 ppm และสารออกฤทธิ์ความ เข้มข้นต่างๆ หลังจากการเพาะเลี้ยงที่เวลา ก) 24 ชั่วโมง, ข) 48 ชั่วโมง และ ค) 72 ชั่วโมง..... 123
- 4.23 จำนวนเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มีชีวิตหลังจากการเพาะเลี้ยงที่เวลาต่างๆ ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มีไฮโดรเจลไฟโบรอิน/เจลาตินที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ที่ดูดซับสารละลาย เคอร์คูมินความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ (G100-Cur25, SF50G50-Cur25, SF80G20-Cur25

	และSF100-Cur25), สารละลายดีเอชเอความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ (G100-DHA100, SF50G50-DHA100, SF80G20-DHA100 และ SF100-DHA100) และสารละลายผสมระหว่างเคอร์คูมินและดีเอชเอที่สัดส่วนความเข้มข้น C1:D4 (G100-C1:D4, SF50G50-C1:D4, SF80G20-C1:D4 และ SF100-C1:D4) เปรียบเทียบกับตัวควบคุมเชิงลบ (อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM) และตัวควบคุมเชิงบวก (อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซิงค์อะซีเตตความเข้มข้น 100 ppm).....	128
4.24	จำนวนเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มีชีวิตหลังจากการเพาะเลี้ยงที่เวลาต่างๆ ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีไฮโดรเจลไฟโบรอิน/เจลาตินที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ที่ไม่ได้ดูดซับสารออกฤทธิ์ เปรียบเทียบกับตัวควบคุมเชิงลบ (อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM) และตัวควบคุมเชิงบวก (อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซิงค์อะซีเตตความเข้มข้น 100 ppm).....	129
4.25	รูปร่างของเซลล์มะเร็งปากมดลูกหลังจากเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM, อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซิงค์อะซีเตต 100 ppm และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีไฮโดรเจลที่ดูดซับสารออกฤทธิ์ ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากการเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลา 1 วัน	132
4.26	รูปร่างของเซลล์มะเร็งปากมดลูกหลังจากเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM, อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซิงค์อะซีเตต 100 ppm และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีไฮโดรเจลที่ดูดซับสารออกฤทธิ์ ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากการเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลา 3 วัน	133
4.27	รูปร่างของเซลล์มะเร็งปากมดลูกหลังจากเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM, อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซิงค์อะซีเตต 100 ppm และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีไฮโดรเจลที่ดูดซับสารออกฤทธิ์ ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากการเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลา 5 วัน	134
4.28	รูปร่างของเซลล์มะเร็งปากมดลูกหลังจากเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM, อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซิงค์อะซีเตต 100 ppm และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีไฮโดรเจลที่ดูดซับสารออกฤทธิ์ ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากการเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลา 7 วัน	135
ก.1	ปฏิกิริยาระหว่าง 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) กับหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีน เกิดเป็นอนุพันธ์ของของ trinitrophenyl (TNP) และซัลเฟตไอออน ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ (By product).....	154
ก.2	กราฟมาตรฐานของ β -Alanine	154
ข.1	กราฟมาตรฐานของสารละลายเคอร์คูมินในสารละลาย DMSO ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร.....	155
ข.2	กราฟมาตรฐานของสารละลายเคอร์คูมินในสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 99% ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร.....	155

ข.3	กราฟมาตรฐานของสารละลายเคอร์คูมินในสารละลาย PBS ที่ประกอบด้วยซีรัม 10% ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร.....	156
ค.1	กราฟมาตรฐานของสารละลายดีเอชเอในสารละลาย DMSO ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร.....	157
ค.2	กราฟมาตรฐานของสารละลายดีเอชเอในสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 99% ที่ความยาวคลื่น 233 นาโนเมตร.....	157
ค.3	กราฟมาตรฐานของสารละลายดีเอชเอในสารละลาย PBS ที่ประกอบด้วยซีรัม 10% ที่ความยาวคลื่น 248 นาโนเมตร.....	158
ง.1	กราฟสแกนค่าความยาวคลื่นของสารละลายดีเอชเอความเข้มข้น 60 ไมโครกรัม ในสารละลาย PBS ที่ประกอบด้วยซีรัม 10% เปรียบเทียบกับสารละลาย PBS ที่ประกอบด้วยซีรัม 10% ที่ได้ผ่านการแช่ไฮโดรเจลไฟโบรอิน/เจลาติน (Blank-hydrogel) เป็นช่วงเวลาต่างๆ	159
จ.1	กราฟระหว่างปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลา t ทหารด้วยปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลาอนันต์ (M_t/M_∞) ต่อเวลา (t) ของการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ.....	160
จ.2	กราฟระหว่างปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลา t ทหารด้วยปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลาอนันต์ (M_t/M_∞) ต่อเวลา (t) ของการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นองค์ประกอบ.....	161
จ.3	กราฟระหว่างปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลา t ทหารด้วยปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลาอนันต์ (M_t/M_∞) ต่อเวลา (t) ของการควบคุมการปลดปล่อยดีเอชเอภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ เป็นองค์ประกอบ.....	161
จ.4	กราฟระหว่างปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลา t ทหารด้วยปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลาอนันต์ (M_t/M_∞) ต่อเวลา (t) ของการควบคุมการปลดปล่อยดีเอชเอภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นองค์ประกอบ.....	162
จ.5	กราฟระหว่างปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลา t ทหารด้วยปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลาอนันต์ (M_t/M_∞) ต่อเวลา (t) ของการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ เมื่อมีการดูดซับเคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอ ..	162
จ.6	กราฟระหว่างปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลา t ทหารด้วยปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลาอนันต์ (M_t/M_∞) ต่อเวลา (t) ของการควบคุมการปลดปล่อยดีเอชเอภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ เมื่อมีการดูดซับเคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอ.....	163

จ.7 กราฟระหว่างปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลา t หาด้วยปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลาอนันต์ (M_t/M_∞) ต่อเวลา (t) ของการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นองค์ประกอบเมื่อมีการดูดซับเคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอ 163

จ.8 กราฟระหว่างปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลา t หาด้วยปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลาอนันต์ (M_t/M_∞) ต่อเวลา (t) ของการควบคุมการปลดปล่อยดีเอชเอภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นองค์ประกอบ เมื่อมีการดูดซับเคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอ..... 164

ฉ.1 ปฏิกริยาระหว่างสาร MTT กับเอนไซม์ที่หลังจากไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ม่วงของ Formazan..... 165

ช.1 กราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์ผิวหนังของหนู หรือเซลล์ L929 โดยวิธี MTT..... 166

ช.1 กราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki โดยวิธี DNA..... 167

ช.2 จำนวนเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki ที่เพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน 6 หลุม (6 well-plate) โดยวิธี DNA 168

ฅ.1 กราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki โดยวิธี MTT..... 170

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาของงานวิจัย

ในปัจจุบันระบบควบคุมการปลดปล่อย (Controlled release system) นับว่าได้รับความสนใจอย่างมากในการนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านการแพทย์และวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เนื่องจากสามารถนำส่งยาไปยังเป้าหมายได้อย่างแม่นยำ และสามารถควบคุมรูปแบบและปริมาณการปลดปล่อยยาในระยะเวลาที่นานขึ้น ช่วยรักษาเสถียรภาพของยา ช่วยลดปริมาณยาที่ให้แก่ผู้ป่วย ทำให้สามารถหลีกเลี่ยงผลข้างเคียงของยาในปริมาณที่มากเกินไป และความจำเป็น และช่วยลดจำนวนครั้งที่ผู้ป่วยต้องเข้ารับการรักษา [จอมใจ พิรพัฒน์ 2555, ปันรสี ฤทธิประวัตติ และคณะ 2553, Uhrich K. และคณะ 1999] โดยรูปแบบของระบบนำส่งยาที่ควบคุมการปลดปล่อยนั้นมีหลายแบบ เช่น แผ่นฟิล์ม อนุภาคกลมขนาดไมครอน เป็นต้น โดยวัสดุที่ใช้ในการผลิตระบบนำส่งยาแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ พอลิเมอร์สังเคราะห์ เช่น พอลิไกลโคลิกแอซิด (Polyglycolic Acid; PGA) พอลิแลคติกแอซิด (Polylactic Acid; PLA) เป็นต้น ซึ่งพอลิเมอร์เหล่านี้สามารถออกแบบให้มีคุณสมบัติและเวลาในการย่อยสลายได้ตามต้องการ แต่ข้อเสียคือไม่สามารถเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ร่างกาย เช่น เกิดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายให้เกิดการต่อต้านและเมื่อย่อยสลายแล้วจะให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นพิษ เช่น พอลิแลคติกแอซิด เมื่อย่อยสลายโดยผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) จะให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา ทำให้ค่าพีเอชบริเวณนั้นมีค่าลดลง ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์และเนื้อเยื่อ เป็นต้น [O'Brien F.J. 2011] และกลุ่มที่สองได้แก่ พอลิเมอร์ธรรมชาติ เช่น โปรตีน อาทิ คอลลาเจน เจลาติน ไหม เป็นต้น คาร์โบไฮเดรต อาทิ ไคโตซาน แอลจินेट เป็นต้น ซึ่งพอลิเมอร์เหล่านี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activity) ที่ดี เซลล์สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตได้ดี ประกอบกับสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ โดยไม่ก่อให้เกิดสารพิษ แต่ข้อเสียคือ มีความแข็งแรงทางกลต่ำ [O'Brien F.J. 2011] จากที่กล่าวข้างต้นจะเห็นได้ว่าวัสดุแต่ละชนิดมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป ดังนั้นจึงมีการนำพอลิเมอร์มาผสมกันทางกายภาพ (Physical Blending) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ง่ายและไม่ยุ่งยาก เพื่อปรับปรุงสมบัติบางประการ เช่น สมบัติทางกล ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ เป็นต้น ตัวอย่างของพอลิเมอร์ที่นำมาผสมกัน เช่น พอลิแลคติกแอซิด/เอทิลีนไวนิลอะซิเตด [Burt H.M. และคณะ 1995] ไหมไฟโบรอิน/พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ [Tsukada M. และคณะ 1994] กรดไฮยาลูรอนิก/ไคโตซาน [Lim S.T. และคณะ 2000] ไหมไฟโบรอิน/เจลาติน [Mandal B.B., Mann J.K. และคณะ 2009, Gil E.S. และคณะ 2005, Jetbumpenkul P. และคณะ 2012, Okhawilai M และคณะ 2010] เป็นต้น

เส้นใยไหมเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติประเภทโปรตีนที่ได้มาจากหนอนไหม ประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก ได้แก่ ไฟโบรอินประมาณ 70% และเซรีซินประมาณ 30% [David L. Kaplan และคณะ 2005] โดยเส้นใยไฟโบรอินนิยมนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เนื่องจากมีคุณสมบัติทางกลที่ดี มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ของสิ่งมีชีวิต โดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ สำหรับเจลาตินเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติอีกชนิดหนึ่งที่นิยมนำมาใช้เนื่องจากไม่มีพิษ ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ราคาไม่แพง และเป็นวัสดุที่ไม่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบเมื่อใส่เข้าไปในร่างกาย [Mandal B.B., Mann J.K. และคณะ 2009] แต่เนื่องจากเจลาตินมีอัตราการย่อยสลายที่เร็ว ซึ่งเป็นข้อจำกัดสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้งาน จึงมีรายงานการนำไฟโบรอินมาผสมกับเจลาตินเพื่อปรับปรุงสมบัติในส่วนนี้ กล่าวคือไฟโบรอินจะช่วยยืดระยะเวลาการย่อยสลายของเจลาติน [Mandal B.B., Mann J.K. และคณะ 2009, Jetbumpenkul P. และคณะ 2012, Okhawilai M. และคณะ 2010] สำหรับระบบนำส่งยาที่ถูกพัฒนาขึ้นมา นิยมนำไปใช้ในการกักเก็บตัวยาหรือสารสำคัญต่างๆ เช่น สารประเภทโปรตีนที่สามารถย่อยสลายในร่างกายได้อย่างรวดเร็ว หรือยาที่มีสมบัติละลายน้ำได้น้อย จำพวกยารักษาโรคมะเร็ง เป็นต้น

เคอร์คูมินเป็นสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ (Curcuminoids) ที่สกัดจากเหง้าของขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) [Wilken R. และคณะ 2011] ซึ่งได้รับความนิยมนำมาใช้ในงานด้านเภสัชกรรมอย่างมาก เนื่องจากเป็นสารที่สกัดจากธรรมชาติจึงมีความเป็นพิษต่ำ และยังมีสมบัติเด่นหลายประการ ได้แก่ มีฤทธิ์ต้านเชื้อราและเชื้อไวรัส ต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ และต้านมะเร็ง เป็นต้น [Akram M. และคณะ 2010] โดยมีการวิจัยพบว่า เคอร์คูมินมีฤทธิ์ต้านการเกิดหลอดเลือดใหม่ ทำให้ขนาดของก้อนมะเร็งลดลง และชักนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง (Apoptosis) [พรพรมม ย่อยสูงเนิน และสุทธิลักษณ์ ปทุมราช 2549] นอกจากนี้ยังมีการนำเคอร์คูมินมาใช้ร่วมกับสารชนิดอื่น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง เช่น ดีเอชเอ เป็นต้น

ดีเอชเอ (Docosahexaenoic acid; DHA) เป็นกรดไขมันจำเป็นในกลุ่มโอเมก้า 3 (Omega-3) พบมากในน้ำมันปลาและอาหารทะเล เช่น ปลาทูน่า และปลาแซลมอน นอกจากนี้ยังพบในน้ำมันของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมด้วย [Marszalek J.R. และ Lodish H.F. 2005, Stillwell W. และ Wassall S.R. 2003] ดีเอชเอเป็นสารที่มีสมบัติเด่นหลายประการ ได้แก่ ต้านการอักเสบ ป้องกันโรคหลอดเลือดและหัวใจ ป้องกันโรคอัลไซเมอร์ และต้านมะเร็ง เป็นต้น [Horrocks L.A. และ Yeo Y.K. 1999, Narayan B. และคณะ 2006] โดยมีการวิจัยพบว่า ผลรวมของเคอร์คูมินและดีเอชเอสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม และชักนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งได้ นอกจากนี้ยังสามารถลดระดับการแสดงออกของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการอักเสบของร่างกายลงได้ [Altenburg J.D. และคณะ 2011, Saw C.L.L. และคณะ 2010, Swamy M.V. และคณะ 2008]

สำหรับงานวิจัยนี้มุ่งเน้นการพัฒนาระบบไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน โดยการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์เพื่อประยุกต์ใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ โดยจะศึกษาคุณลักษณะและสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของไฮโดรเจลที่ผลิตได้ตลอดจนความสามารถในการดูดซับและการควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ (เคอร์คูมิน และ/หรือ ดีเอชเอ) จากไฮโดรเจลที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในระดับห้องปฏิบัติการ

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อพัฒนาไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินชนิดเอ เพื่อประยุกต์ใช้ในการควบคุมการปลดปล่อย

1.2.2 เพื่อศึกษาคุณลักษณะและสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาติน

1.2.3 เพื่อศึกษาความสามารถในการดูดซับและการควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ (เคอร์คูมิน และ/หรือ ดีเอชเอ) จากไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาติน

1.2.4 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ที่มีผลต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki ในระดับห้องปฏิบัติการ

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 เตรียมสารละลายไฟโบรอินไหมไทย พันธุนางน้อยศรีสะเกษ 1 และสารละลายเจลาตินชนิดเอที่ความเข้มข้นของสารละลาย 4% โดยน้ำหนัก

1.3.2 ขึ้นรูปไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินที่ถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ และนำไปผ่านกระบวนการทำแห้งด้วยความเย็น (Freeze-dry) โดยมีตัวแปรที่จะศึกษา ได้แก่

- ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ใช้ในการเชื่อมขวาง ได้แก่ 0.10%, 0.15% และ 0.20% โดยปริมาตร
- อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยต่อเจลาตินชนิดเอ ได้แก่ 0/100, 5/95, 10/90, 15/85, 20/80, 50/50, 80/20 และ 100/0

1.3.3 วิเคราะห์คุณลักษณะและสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน ได้แก่

- ค่าศักย์เซต้า (Zeta potential) ของสารละลายผสมของไฟโบรอินและเจลาติน สารละลายเคอร์คูมิน และสารละลายดีเอชเอ

- ค่ามัมสัมผัสของน้ำของฟิล์มผสมของไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน ฟิล์มเคอร์คูมิน และฟิล์มดีเอชเอ
- โครงสร้างพื้นฐานของไฮโดรเจล โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) และขนาดรูพรุนเฉลี่ยของไฮโดรเจล
- ความสามารถในการบวมน้ำของไฮโดรเจล
- ค่าร้อยละของการเชื่อมขวาง (%Crosslinking) ของไฮโดรเจล โดยใช้เทคนิค 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic Acid (TNBS)
- ความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการ (*In Vitro* biodegradation) ในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส (Collagenase) ความเข้มข้น 1 U/ml, pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 37°C

1.3.4 ศึกษาความสามารถในการดูดซับและการควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ (เคอร์คูมิน และ/หรือ ดีเอชเอ) จากไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินในระดับห้องปฏิบัติการ

1.3.5 ศึกษาประสิทธิภาพการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ (เคอร์คูมิน และ/หรือ ดีเอชเอ) ของไฮโดรเจลที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ต้นแบบไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินที่ถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นเหมาะสม และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ (เคอร์คูมิน และ/หรือ ดีเอชเอ) เพื่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพ

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ระบบควบคุมการปลดปล่อย (Controlled release system) [จอมใจ พีรพัฒนา 2555, ปันรสี ฤทธิประวัตติ และคณะ 2553, ภาคภูมิ เต็งอำนาจ. 2540, Uhrich K. และคณะ 1999, Leong K.W. และ Langer R. 1988]

วิธีการนำส่งยาหรือสารที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ในการรักษาโรคนั้นมีหลายวิธี เช่น การให้ยาโดยการรับประทาน (Oral) การสูดดมทางจมูก (Inhalation) การซึมผ่านทางผิวหนัง และการเหน็บทางทวารหนัก เป็นต้น ซึ่งการให้ยาโดยการรับประทานเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุด เนื่องจากมีความสะดวก ขนาดของยาแคบที่ และมีความคงตัวค่อนข้างสูง นอกจากนี้ยังมียาหลายชนิดที่ไม่สามารถให้ผู้ป่วยด้วยวิธีการดังกล่าวได้ เนื่องจากปริมาณยาที่ไปถึงอวัยวะเป้าหมายไม่เป็นไปตามที่ต้องการ ดังนั้นในการรักษาบางอย่างจึงจำเป็นต้องให้ยาแก่ผู้ป่วยโดยการฉีด เช่น การให้ยารักษาโรคมะเร็ง รวมถึงการให้วัคซีน เป็นต้น แต่สำหรับการให้ยาโดยทั่วไปผู้ป่วยจะได้รับยาวันละหลายครั้ง ส่งผลให้ระดับยาในเลือดขึ้นๆ ลงๆ โดยครั้งแรกที่ได้รับยา ระดับยาในเลือดอาจมีฤทธิ์ต่ำในการรักษา แต่เมื่อผู้ป่วยได้รับยาซ้ำ ระดับยาในเลือดอาจมีการสะสมจนทำให้เกิดผลข้างเคียงได้ ดังนั้นจึงมีการพัฒนาระบบนำส่งยา (Drug delivery system) ซึ่งเป็นวิทยาการที่ใช้สำหรับนำส่งยาไปสู่เซลล์หรืออวัยวะเป้าหมายได้โดยตรง เพื่อให้ยาถูกปลดปล่อยและดูดซึมไปออกฤทธิ์ได้

รูปที่ 2.1 แสดงระบบนำส่งยา 3 รูปแบบ ได้แก่ ระบบนำส่งยาที่ไม่มีการควบคุมปริมาณยาที่ถูกปลดปล่อยออกมา ระบบนำส่งยาแบบ Sustained release และระบบนำส่งยาแบบควบคุมการปลดปล่อย โดยระบบนำส่งยาแบบควบคุมการปล่อยยา มีข้อดีกว่าระบบนำส่งยาแบบไม่มีการควบคุมปริมาณยาที่ปล่อยออกมา และระบบนำส่งยาแบบ Sustained release กล่าวคือระบบนำส่งยาแบบที่ไม่มีการควบคุมการปล่อยยานั้น ปริมาณยาที่ผู้ป่วยได้รับจะไม่คงที่ อาจมีปริมาณเกินกว่าที่ต้องการหรือมากกว่าระดับที่เหมาะสมต่อการรักษา (Therapeutic level) เนื่องจากขณะที่มีการให้ยาครั้งแรก ระดับยาในเลือดจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และปริมาณยาจะค่อยๆ ลดลงจนไม่เพียงพอต่อการรักษา ดังนั้นเพื่อควบคุมปริมาณยาให้อยู่ในระดับที่ต้องการ จึงจำเป็นต้องมีการให้ยาซ้ำอีกครั้ง ทำให้ปริมาณยาในกระแสเลือดตามเวลา มีลักษณะขึ้นๆ ลงๆ เกิดเป็นรอบ (cycle) ไปเรื่อยๆ (รูป 2.1 ก)

ระบบนำส่งยาแบบ Sustained release นั้น จะสามารถควบคุมการปลดปล่อยตัวยาในปริมาณที่เหมาะสมในช่วงเวลายาวนาน ทำให้ลดจำนวนครั้งของการให้ยา และการผันผวนของระดับยาในเลือดได้ อย่างไรก็ตามระดับยาในเลือดที่อาจจะสูงเกินไปในช่วงต้นของการให้ยาก็จะทำให้เกิดผลข้างเคียงได้ (รูป 2.1 ข)

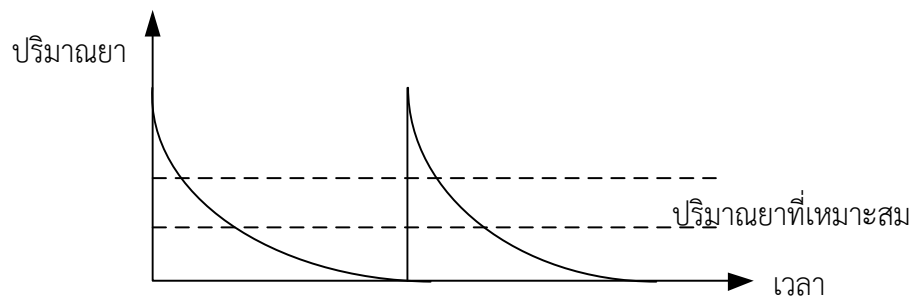
ส่วนระบบนำส่งยาแบบมีการควบคุมการปล่อยยา (Controlled release) ปริมาณยาที่ถูกปลดปล่อยออกมาจะคงที่และสามารถควบคุมระดับความเข้มข้นของยาที่อวัยวะเป้าหมายได้ นอกจากนี้ยังสามารถคาดการณ์ศาสตร์ของการปลดปล่อยตัวยาได้ (รูป 2.1 ค) ระบบนำส่งยาแบบนี้มีประโยชน์มากสำหรับยาที่มีช่วงการรักษา (Therapeutic range) แคบ เพราะการใช้ระบบนำส่งยาจะควบคุมปริมาณยาให้อยู่ภายในช่วงการรักษา ซึ่งจะทำให้การรักษามีประสิทธิภาพดีและช่วยลดผลข้างเคียงและความเป็นพิษของยาได้ นอกจากนี้ระบบนำส่งยาแบบควบคุมการปลดปล่อยยายังมีประโยชน์อื่นๆ อีก ได้แก่

1. ช่วยลดปริมาณยาที่ให้แก่ผู้ป่วย ในขณะที่สามารถเพิ่มปริมาณยาสะสมที่อวัยวะเป้าหมายได้ เมื่อเทียบกับการให้ยาโดยทั่วไป
2. ช่วยกักเก็บยา ทำให้ยาไม่สูญเสียไปเกินความจำเป็น
3. ช่วยลดจำนวนครั้งที่ผู้ป่วยจะต้องเข้ารับยา

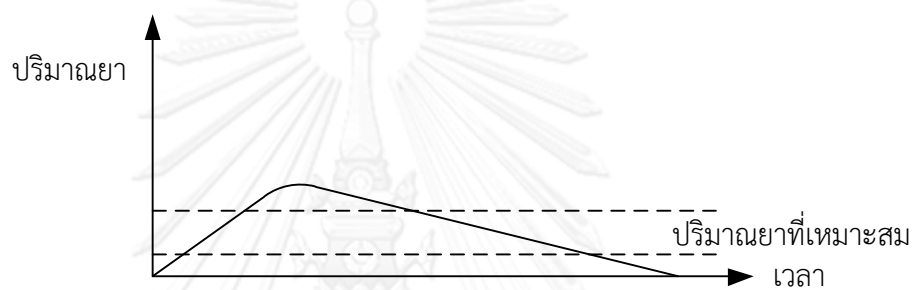
2.1.1 ระบบนำส่งยาที่ผลิตจากพอลิเมอร์ (Polymeric drug delivery system)

วัสดุที่ได้รับความนิยมและเหมาะสมในการผลิตระบบนำส่งยา คือ พอลิเมอร์ เนื่องจากมีสมบัติเด่นหลายประการ ดังนี้

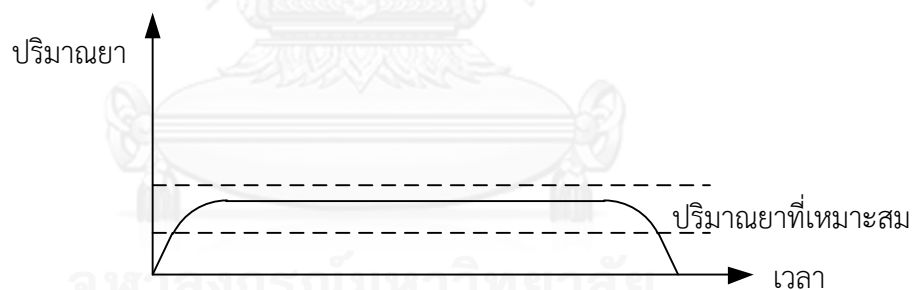
1. มีสมบัติเป็นเทอร์โมพลาสติก กล่าวคือ จะหลอมเหลวเมื่อได้รับความร้อนและแข็งตัวเมื่อทำให้เย็นลง ซึ่งการหลอมและการเย็นตัวนี้สามารถทำกลับไปมาได้หลายครั้ง จึงนำมาขึ้นรูปให้มีลักษณะต่างๆ ตามต้องการได้ง่าย
2. มีสมบัติทางความร้อน เช่น อุณหภูมิเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว (Glass transition temperature; T_g) และอุณหภูมิหลอมเหลว (Melting temperature; T_m) ที่สามารถปรับเปลี่ยนได้ โดยการควบคุมโมเลกุลและองค์ประกอบทางเคมี การปรับเปลี่ยนสมบัติเหล่านี้สามารถปรับเปลี่ยนให้สูงขึ้นเพื่อเพิ่มความทนทานต่อความร้อน หรือลดลงเพื่อความสะดวกในการขึ้นรูป
3. มีความชอบน้ำ (Hydrophilicity) ที่สามารถควบคุมได้ ซึ่งสมบัติข้อนี้มีผลต่ออัตราการดูดซับน้ำและอัตราการปล่อยยา
4. มีสมบัติความยืดหยุ่น (Viscoelastic property) และสายโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ (Segmental movement) ทำให้โมเลกุลของยาซึมผ่านสายโมเลกุลเหล่านี้ได้ และอัตราการซึมผ่านของยายังสามารถควบคุมได้โดยการปรับเปลี่ยนความสามารถในการเคลื่อนที่ของสายโมเลกุล
5. สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable) ภายหลังจากที่ปล่อยยาออกจนหมดแล้ว เพื่อผู้ป่วยจะได้ไม่ต้องเข้ารับการผ่าตัดเพื่อนำระบบนำส่งยาออกในภายหลัง



ก) ระบบนำส่งยาโดยไม่มีการควบคุมปริมาณยาที่ถูกปล่อยออกมา



ข) ระบบนำส่งยาแบบ Sustained release



ค) ระบบนำส่งยาแบบควบคุมการปล่อยยา

รูปที่ 2.1 ปริมาณยาที่ถูกปล่อยออกมา ณ เวลาต่างๆ ผ่านกลไกของระบบนำส่งยาทั้งสามแบบ [ปิ่นรสี ฤทธิประวัตติ และคณะ 2553]

2.1.2 แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้อธิบายพฤติกรรมของการปลดปล่อยยา (Mathematical modeling of release profile) [Dash S., Murthy P.N. และคณะ . 2010, Kasoju N. และ Bora U. 2012]

ระบบนำส่งยาที่สามารถควบคุมปริมาณการปลดปล่อยยากำลังได้รับความสนใจอย่างมาก โดยเฉพาะในระบบส่งยาด้านมะเร็งที่สามารถย่อยสลายได้ในร่างกาย ซึ่งนับว่ามีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการรักษาโรคมะเร็งในอนาคต

พฤติกรรมของการปลดปล่อยยาจากระบบนำส่งสามารถแบ่งออกเป็น 4 ลักษณะ คือ

1. พฤติกรรมของการปลดปล่อยยากิ่ง (Zero-order) แสดงได้ดังสมการ

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_0 t$$

โดยที่ M_t คือ ปริมาณยาปลดปล่อยสะสมที่เวลา t

M_∞ คือ ปริมาณยาปลดปล่อยสะสมที่เวลานั้น

k_0 คือ ค่าคงที่สำหรับกรณี Zero-order Release

2. พฤติกรรมของการปลดปล่อยยาขึ้นอยู่กับปริมาณยา (First-order) ที่อยู่ในระบบนำส่งยา โดยมีอัตราการปล่อยยาดังสมการ

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \exp(-k_1 t)$$

โดยที่ k_1 คือ ค่าคงที่สำหรับกรณี First-order release

3. พฤติกรรมของการปล่อยยาแบบ Higuchi (Higuchi model) คือ อัตราการปลดปล่อยยาจะเป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับรากที่สองของเวลา กล่าวคือ ตัวยาจะถูกปลดปล่อยออกมาน้อยลงเมื่อเวลาผ่านไป ดังสมการ

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_H t^{1/2}$$

โดยที่ k_H คือ ค่าคงที่สำหรับกรณี Higuchi model

4. พฤติกรรมการปล่อยยาแบบ Power law คือ สัดส่วนของยาที่ปลดปล่อยออกมา มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับเวลายกกำลัง n

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n$$

โดยที่ k คือ ค่าคงที่สำหรับกรณี Power law

n คือ ตัวเลขชี้กำลังของการปลดปล่อยยา (Release exponent)

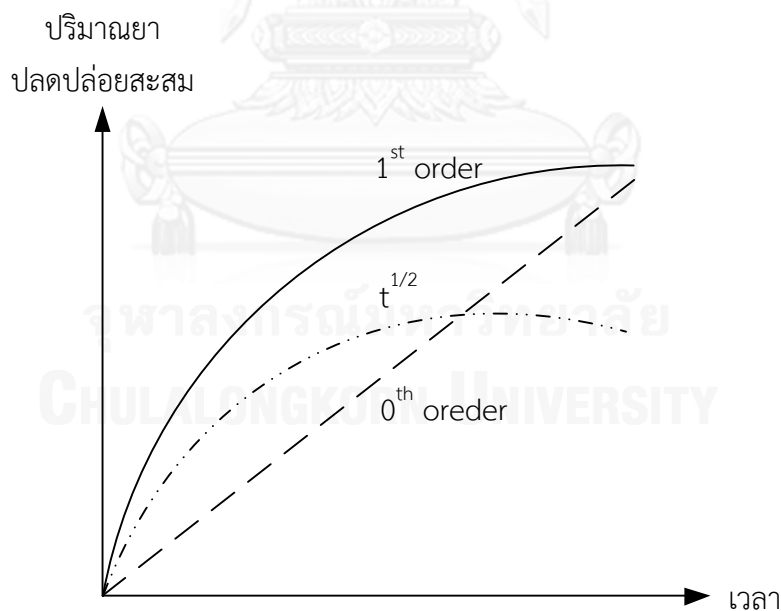
เมื่อ n = 0.45 สำหรับกรณี Fickian diffusion

n = 0.89 สำหรับกรณี Case II transport

(Relaxation)

0.45 < n < 0.89 สำหรับกรณี Non-fickian diffusion

รูปที่ 2.2 แสดงพฤติกรรมการปลดปล่อยตัวยา (Release profile) จากระบบนำส่งในลักษณะที่แตกต่างกัน



รูปที่ 2.2 พฤติกรรมการปล่อยยาจากระบบนำส่งยา (Release profile) ด้วยอัตราต่างๆ

[ปิ่นรสี ฤทธิประวัติ และคณะ 2553]

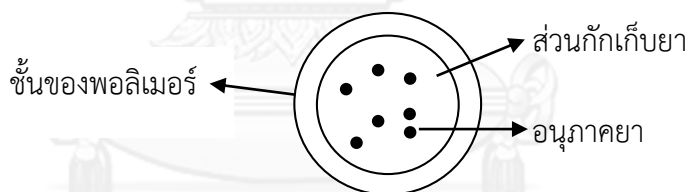
2.1.3 กลไกควบคุมการปลดปล่อยยา (Controlled drug release mechanism)

2.1.3.1 กลไกการควบคุมการปลดปล่อยทางกายภาพ (Physically controlled release mechanism)

2.1.3.1.1 การควบคุมการปลดปล่อยโดยใช้หลักการแพร่ (Diffusion controlled system) แบ่งได้ 2 ประเภท ดังนี้

1) การแพร่ผ่านส่วนกักเก็บยา (Reservoir)

ส่วนกักเก็บยาส่วนใหญ่ มีรูปร่างทรงกลม ทรงกระบอก หรือแผ่นดิสก์ ประกอบด้วยตัวยายู่แกนกลาง (Core) ในรูปของผงหรือของเหลว และส่วนแกนกลางจะเคลือบด้วยชั้นบางๆ (Layer) ของพอลิเมอร์ ดังแสดงในรูปที่ 2.3 โดยระบบนี้ตัวยายจะถูกปลดปล่อยออกมา โดยอาศัยความแตกต่างของความเข้มข้นของตัวยา ระหว่างภายในและภายนอกกระบอกทำให้ยากค่อยๆ แพร่ผ่านออกมาอย่างช้าๆ ซึ่งในช่วงแรกการแพร่จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว และเมื่อเวลาผ่านไปการแพร่จะเริ่มคงที่ (Steady state) [ณรงค์ สาริสุต. 2535] โดยที่สมบัติของยาและพอลิเมอร์จะเป็นตัวกำหนดอัตราการแพร่ผ่านของยาออกจากส่วนกักเก็บยาไปสู่กระแสเลือด ดังนั้นเพื่อควบคุมความสม่ำเสมอในการปลดปล่อยยา ความหนาของพอลิเมอร์ที่ใช้เคลือบจะต้องเคลือบอย่างสม่ำเสมอ ปัญหาของระบบนี้ คือถ้าพอลิเมอร์ที่เคลือบส่วนกักเก็บยาฉีกขาดในระหว่างใช้งานจะทำให้มีการปลดปล่อยยาออกมามุ่งสู่กระแสเลือดในปริมาณมากอย่างรวดเร็ว เรียกว่า Drug dumping

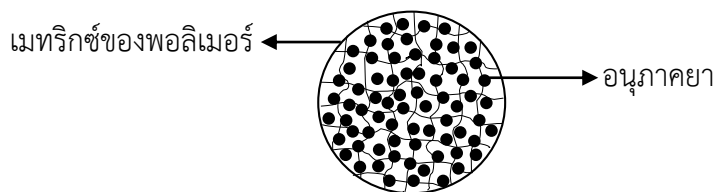


รูปที่ 2.3 ลักษณะของระบบควบคุมการนำส่งยาแบบ Reservoir

[ศรีสุกุล สังข์ทองจีน 2551]

2) การแพร่ผ่านเมทริกซ์ (Matrix)

วิธีนี้ตัวยายจะกระจายตัวอย่างสม่ำเสมออยู่ในเมทริกซ์ของพอลิเมอร์ ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการปลดปล่อยตัวยายออกสู่ภายนอก โดยอนุภาคของยาจะค่อยๆ แทรกผ่านโครงสร้างร่างแหของพอลิเมอร์เมทริกซ์ หรือแพร่ออกมาตามรูพรุนของพอลิเมอร์ ดังนั้นระบบนี้จึงไม่เกิดอันตรายจาก Drug Dumping



รูปที่ 2.4 ลักษณะของระบบควบคุมการนำส่งยาแบบเมทริกซ์ [จอมใจ พีรพัฒนา 2555]

2.1.3.1.2 การควบคุมการปลดปล่อยโดยใช้ตัวทำละลายเป็นตัวกระตุ้น (Solvent Activated controlled system) แบ่งได้ 2 ประเภท ดังนี้

1) การกระตุ้นโดยแรงดันออสโมติก (Osmotically activated system)

ระบบนำส่งยานี้เป็นระบบที่อาศัยแรงดันออสโมติก ไปขับเคลื่อนตัวยาให้ปลดปล่อยออกมาได้ในอัตราที่คงที่ [ณรงค์ สาริสุต. 2535] โดยมีหลักการคือ ของเหลวจากภายนอกที่ประกอบด้วยตัวยาความเข้มข้นต่ำจะแพร่ผ่านเยื่อเลือกผ่านไปยังบริเวณภายในซึ่งมีความเข้มข้นของตัวยาสูงกว่า ทำให้เกิดแรงดันออสโมติกซึ่งพยายามจะลดความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นของยา ด้านหนึ่งกับอีกด้านหนึ่งของเยื่อเลือกผ่าน โดยการเคลื่อนที่ของของเหลวจะเป็นตัวบังคับให้ยาที่ละลายอยู่ภายในถูกผลักออกสู่ภายนอกผ่านรูขนาดเล็ก (Small orifice)

2) การกระตุ้นโดยการพองตัว (Swelling activated system)

ระบบนี้ประกอบด้วยโครงสร้างร่างแหของพอลิเมอร์ที่ชอบน้ำ (Hydrophilic Polymer) โดยพอลิเมอร์จะดูดและกักเก็บน้ำปริมาณมากไว้ในร่างแหของพอลิเมอร์ แล้วเกิดการพองตัวกลายเป็นเจลห่อหุ้มส่วนของยาที่อยู่ภายใน ซึ่งชั้นของเจลนี้จะไปขัดขวางการปลดปล่อยตัวยา ทำให้ยาถูกปลดปล่อยออกมาช้าๆ จุดเด่นของวิธีนี้ คือเป็นการควบคุมการซึมผ่านของยาจากการควบคุมอัตราการพองตัวของร่างแหพอลิเมอร์

2.1.3.2 กลไกการควบคุมการปลดปล่อยทางเคมี (Chemically controlled release mechanism)

2.1.3.2.1 การควบคุมการปลดปล่อยโดยการต่อเติมตัวยาบนสายโซ่พอลิเมอร์ (Polymer-drug conjugate)

วิธีนี้ตัวยาอาจนำมาต่อเติมบนสายโซ่พอลิเมอร์โดยตรง หรืออาจต่อเติมผ่านหมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์ก็ได้ โดยในร่างกายประกอบด้วยเอนไซม์และของเหลวที่อยู่ภายในร่างกาย (Body fluid) จะก่อให้เกิด Chemical hydrolysis หรือ Enzymatic hydrolysis พร้อมกับการปลดปล่อยยาออกมาในอัตราที่ควบคุมได้

2.1.3.2.2 การควบคุมการปลดปล่อยโดยการสลายตัวของพอลิเมอร์ (Bioerodible or Biodegradable System)

ระบบนี้ตัวยาที่กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอในเนื้อของพอลิเมอร์จะค่อยๆ ถูกปลดปล่อยออกมาพร้อมกับการสลายตัวของพอลิเมอร์ ข้อดีของระบบนำส่งยาแบบนี้คือ ไม่จำเป็นต้องนำพอลิเมอร์ออกจากร่างกายหลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการปลดปล่อยยา และตัวยาสำคัญอาจจะละลายน้ำหรือไม่ละลายก็ได้ ส่งผลให้ระบบการปลดปล่อยยาแบบนี้มีการนำมาใช้งานเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ

2.2 ไฮโดรเจล (Hydrogel) [Drury J.L. และ Mooney D.J. 2003, Eun S. Gil และคณะ 2005, Xiao W. และคณะ 2011, Hoffman A.S. 2012]

ไฮโดรเจล คือ ไฮโดรฟิลิกพอลิเมอร์ที่มีลักษณะเป็นโครงสร้างร่างแห 3 มิติ ซึ่งเกิดจากการเชื่อมขวางโมเลกุลด้วยวิธีทางกายภาพหรือทางเคมี สมบัติของไฮโดรเจลทั้งทางกายภาพ เคมี และชีวภาพขึ้นอยู่กับระดับการเชื่อมขวางและวัสดุที่นำมาขึ้นรูป โดยวัสดุที่นำมาใช้ขึ้นรูปไฮโดรเจล ได้แก่ พอลิเมอร์ธรรมชาติ เช่น แอลจีเนต ไพโบรอินไหม คอลลาเจน เจลาติน ไคโตซาน เป็นต้น พอลิเมอร์สังเคราะห์ เช่น พอลิเอทิลีนออกไซด์ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ พอลิอะคริลิกแอซิด เป็นต้น ซึ่งพอลิเมอร์ธรรมชาติเป็นวัสดุที่นิยมใช้ในการขึ้นรูป เนื่องจากเป็นวัสดุที่เข้ากันได้ดีกับร่างกายของสิ่งมีชีวิต และสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

ไฮโดรเจลนิยมนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อและงานด้านการแพทย์ เช่น คอนแทคเลนส์ (Contact lens) โครนเง็งเซลล์ แผ่นปิดแผล และระบบนำส่งยา เป็นต้น

ข้อดีของไฮโดรเจล

1. สามารถดูดซับน้ำเข้าไปในโครงสร้างได้ในปริมาณมาก โดยที่ไม่ละลายน้ำ
2. มีสมบัติการแพร่ผ่านของสารที่ดี กล่าวคือ ออกซิเจน สารอาหาร และของเสียสามารถผ่านเข้าออกได้ดี
3. มีโครงสร้างคล้ายกับ Extracellular matrix (ECM) ส่งผลให้เข้ากันได้ดีกับเซลล์ของสิ่งมีชีวิต
4. สามารถควบคุมให้มีสมบัติตามที่ต้องการได้

2.3 ชีววัสดุ (Biomaterials)

2.3.1 ไหม (Silk) [Singh T. และ Saratchandra B. 2004, Altman G. H. และคณะ 2003]

ไหมเป็นเส้นใยพอลิเมอร์ธรรมชาติชนิดหนึ่งจัดอยู่ในประเภทโปรตีนที่ได้มาจากหนอนไหมซึ่งเป็นแมลงจำพวกผีเสื้อ หนอนไหมแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ ไหมกินใบหม่อนหรือไหมบ้าน (Domesticated mulberry silkworm) และไหมป่า (Wild non-mulberry silkworm)

[Acharya C. และคณะ 2008] ไหมกินใบหม่อนมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Bombyx mori* โดยมีการจัดจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์ดังนี้

Phylum	:	Arthropoda
Class	:	Hexapoda or Insecta
Sub-Class	:	Pterygota
Division	:	Endopterygota
Order	:	Lepiopta
Family	:	Bombycidae
Genus	:	Bombyx
Species	:	mori

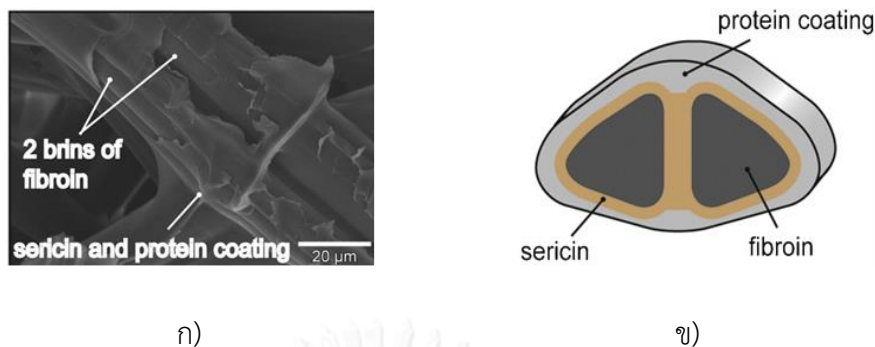
เส้นใยไหมได้จากการสังเคราะห์โปรตีนในต่อมที่ทำหน้าที่พิเศษ 2 ต่อมที่อยู่บริเวณหัวของหนอนไหม โดยหลังจากการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์เยื่อบุผิวแล้ว โปรตีนจะถูกส่งไปเก็บยังช่องว่าง (Lumen) ของต่อมก่อนถูกพ่นออกมาเป็นเส้นใย

โครงสร้างของเส้นใยไหม [Kim U.และคณะ 2005]

เส้นใยไหมประกอบด้วยกรดอะมิโน (Amino acid) ต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์เกิดเป็นสารโมเลกุลใหญ่ โดยมีโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลัก 2 ชนิด ได้แก่ ไฟโบรอิน (Fibroin) และเซรีซิน (Sericin) เซรีซินทำหน้าที่เป็นกาวไหมเคลือบเส้นใยไฟโบรอินซึ่งเป็นเส้นใยต่อเนื่องจำนวน 2 เส้นให้ยึดติดกัน ดังแสดงในรูปที่ 2.4 นอกจากนี้เส้นใยไหมยังมีส่วนประกอบอื่นๆ อีก ได้แก่ ไขมัน น้ำมัน และแร่ธาตุต่างๆ เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของไหมกินใบหม่อน [Yong-woo Lee 1996]

องค์ประกอบ	ปริมาณ (%)
1. ไฟโบรอิน (Fibroin)	72 – 81
2. เซรีซิน (Sericin)	19 - 28
3. ไขมัน แวกซ์ (Fat and wax)	0.8 - 1.0
4. สารสี และปริมาณเถ้า (Colouring Matter and Ash)	1.0 - 1.4



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของเส้นใยไหมที่ได้จากหนอนไหม ก) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ ข) ภาพวาด
[Hardy J.G. และ Scheibel T.R. 2010]

1. **ไฟโบรอิน (Silk Fibroin)** [Hardy J.G. และ Scheibel T.R. 2010, Wongpanit P. และ Rujiravanit R. 2012]

ไฟโบรอิน (Fibroin, $C_{15}H_{26}N_6O_6$) เป็นเส้นใยโปรตีนชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเส้นไหม (70 – 80%) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 – 25 ไมโครเมตร ประกอบด้วยกรดอะมิโน 18 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2.2 โดยมีกรดอะมิโนหลัก 4 ชนิด คือ ไกลซีน (Glycine; Gly) อะลานีน (Alanine; Ala) เซรีน (Serine; Ser) และไทโรซีน (Tyrosine; Tyr) ดังแสดงในรูปที่ 2.5 โดยไฟโบรอินมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบที่ซับซ้อนอยู่ 3 ส่วน ได้แก่ สายโซ่โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (Heavy chain) หรือที่เรียกว่า H-chain มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 350 กิโลดาลตัน (kDa) ทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมสายโซ่โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Light chain) หรือที่เรียกว่า L-chain ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25 กิโลดาลตัน ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (Disulfide bond) และส่วนที่สาม คือ โปรตีนที่เรียกว่า P25 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30 กิโลดาลตัน ซึ่งถูกเชื่อมด้วยอันตรกิริยาของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic interaction) โดยอัตราส่วนของ H-chain : L-chain : P25 คือ 6:1:1 สำหรับส่วนของ H-chain สามารถแบ่งออกได้ 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำเรียงตัวแบบสลับ โดยส่วนที่ไม่ชอบน้ำประกอบด้วยหมู่อะมิโนที่เรียงตัวเป็นหน่วยซ้ำ คือ $(Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser)_n$ ซึ่งจัดเรียงตัวอยู่ในรูปแผ่นพับเบตา (β -Pleated sheet) ดังแสดงในรูปที่ 2.6 มีลักษณะเป็นจีบหรือคลื่นแบบไม่ขนาน (Antiparallel) มีพันธะไฮโดรเจนเชื่อมระหว่างสายพอลิเปปไทด์และเป็นบริเวณที่ไม่มีประจุ แต่ในทางกลับกันส่วนที่ชอบน้ำประกอบด้วยหมู่อะมิโนที่มีประจุหลากหลาย เช่น หมู่อะมิโนที่มีประจุบวก ได้แก่ อาร์จินีน (Arginine) และไลซีน (Lysine) และหมู่อะมิโนที่มีประจุลบ ได้แก่ กรดแอสพาทิก (Aspartic acid) และกรดกลูตามิก (Glutamic acid) เป็นต้น ในขณะที่บริเวณ L-chain มีความชอบน้ำ (Hydrophilic) มากกว่าและมีความยืดหยุ่น และในส่วนของโปรตีน P25 มีบทบาทในการรักษาความสมบูรณ์ของความซับซ้อนนี้ ทั้งนี้เมื่อพิจารณาในเชิง

ปริมาณของธาตุที่เป็นองค์ประกอบจะเห็นว่าเส้นใยไฟโบรอินประกอบด้วยธาตุที่สำคัญ คือ คาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน และซัลเฟอร์ปริมาณเล็กน้อย [วีรศักดิ์ อุดมกิจเดชา 2543] ดังแสดงในตารางที่ 2.3

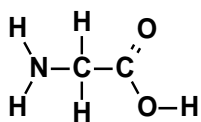
นอกจากนี้ประจุของเส้นใยไฟโบรอินยังขึ้นอยู่กับค่า pH ด้วย เนื่องจากค่าไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric point: pI) ของเส้นใยไฟโบรอินอยู่ในช่วง 3.8 – 4.5 ดังนั้นถ้าเส้นใยไฟโบรอินอยู่ในสารละลายที่มีค่า pH ต่ำกว่าค่า pI เส้นใยจะมีประจุสุทธิเป็นประจุบวก แต่ถ้าเส้นใยไฟโบรอินอยู่ในสารละลายที่มีค่า pH มากกว่าค่า pI ประจุสุทธิของเส้นใยจะเป็นประจุลบ

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในเส้นใยไฟโบรอินและเซรีซิน [Yong-woo Lee 1996]

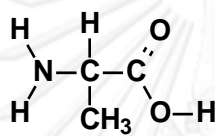
Amino Acid	Fibroin (g/100 g protein)	Sericin (g/100 g protein)
Glycine	42.8	8.8
Alanine	32.4	4.0
Leucine	0.7	0.9
Isoleucine	0.9	0.6
Valine	3.0	3.1
Arginine	0.9	4.2
Histidine	0.3	1.4
Lysine	0.5	5.5
Aspartic Acid	1.9	16.8
Glutamic Acid	1.7	10.1
Serine	14.7	30.1
Threonine	1.2	8.5
Phenylalanine	1.2	0.6
Tyrosine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

ตารางที่ 2.3 ส่วนประกอบของธาตุต่างๆ ในเส้นใยไฟโบรอิน [วีรศักดิ์ อุดมกิจเดชา 2543]

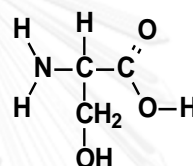
องค์ประกอบ	ปริมาณ (%)
1. คาร์บอน	48 - 49
2. ไฮโดรเจน	6.40 - 6.51
3. ไนโตรเจน	17.35 - 18.89
4. ออกซิเจน	26 - 27.90



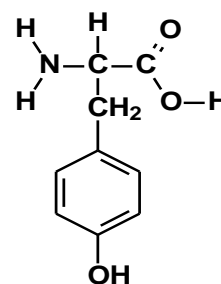
Glycine (Gly)



Alanine(Ala)

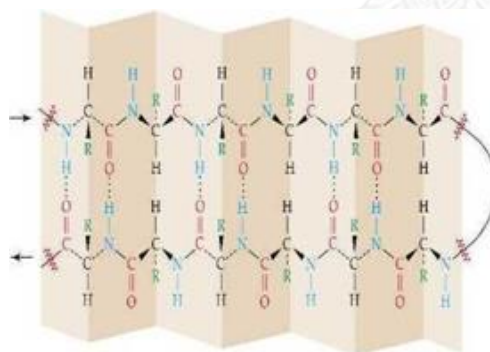


Serine(Ser)

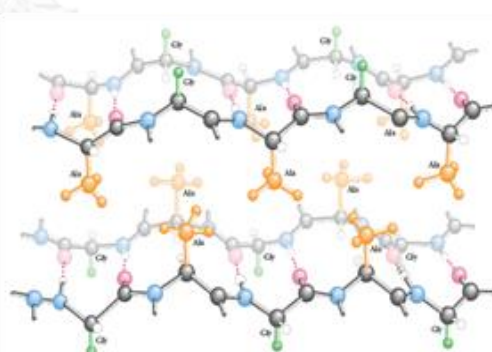


Tyrosin(Tyr)

รูปที่ 2.6 โครงสร้างกรดอะมิโนที่สำคัญ 4 ชนิดในเส้นใยไฟโบรอิน [<http://www.sidthomas.net>]



ก)

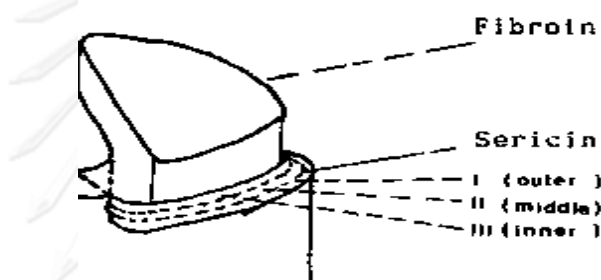


ข)

รูปที่ 2.7 โครงสร้างของเส้นใยไฟโบรอิน ก) ลักษณะแผ่นพับพลิทเบตา (β -Pleated Sheet) ข) การเรียงตัวของหมู่อะมิโน [<http://www.silkwoodsilk.com> และ <http://met.fzu.edu.cn>]

2. เซรีซิน (Sericin) [Yong-woo Lee 1996, Hardy J.G. และ Scheibel T.R. 2010]

เซรีซิน (Sericin, $C_{15}H_{23}N_5O_8$) หรือกาไหมมีประมาณ 20 – 30% ของรังไหม สามารถละลายน้ำได้ ทำหน้าที่ห่อหุ้มเส้นใยไฟโบรอิน 2 เส้นให้ยึดติดกัน หมู่อะมิโนที่เป็นองค์ประกอบหลักของเซรีซิน ได้แก่ เซรีน (Serine) ทรีโอนีน (Threonine) กรดแอสพาทิก (Aspartic Acid) และกรดกลูตามิก (Glutamic acid) โครงสร้างของเซรีซินแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ดังแสดงในรูปที่ 2.7 ได้แก่ เซรีซิน I เป็นส่วนที่อยู่ด้านนอกสุดละลายน้ำได้ง่าย เซรีซิน II เป็นส่วนที่อยู่ระหว่างเซรีซิน I และเซรีซิน III และเซรีซิน III เป็นส่วนที่อยู่ด้านในสุดติดกับเส้นใยไฟโบรอินและละลายน้ำได้ยาก



รูปที่ 2.8 โครงสร้างของเซรีซิน [Yong-woo Lee 1996]

สมบัติของไหม [Kim U. และคณะ 2005, Vepari C. และ Kaplan D. L. 2007]

ไหมมีสมบัติเด่นหลายประการ ได้แก่ สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ มีสมบัติทางกลที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับพอลิเมอร์ชนิดอื่นที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพดังแสดงในตารางที่ 2.4 เช่น มีความยืดหยุ่นสูงและเหนียว สามารถทนแรงกดอัดได้ดี เป็นต้น มีความสามารถในการเข้ากันได้กับเซลล์ของสิ่งมีชีวิตโดยไม่ก่อให้เกิดก่อกพิษต่อเซลล์ มีความคงตัว สามารถทนความร้อนได้สูง

การประยุกต์ใช้งานของไหม [Wang Y และคณะ 2006]

ไหมนับว่าเป็นวัสดุที่มีการนำมาประยุกต์ใช้งานในหลากหลายด้าน เช่น งานด้านสิ่งทอ เครื่องสำอาง ตลอดจนงานทางการแพทย์ เป็นต้น เนื่องจากสมบัติเด่นหลายประการดังกล่าวข้างต้น โดยมีการนำไหมมาใช้เป็นไหมเย็บแผลตั้งแต่อดีตและในปัจจุบันไหมได้รับความสนใจนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่ออย่างมาก เช่น นำไหมมาขึ้นรูปเป็นฟิล์มหรือเป็นแผ่นเส้นใยเพื่อใช้ในการตกแต่งแผลหรือผิวหนังที่มีรอยแผลเป็น หรือขึ้นรูปเป็นไฮโดรเจล (Hydrogel) เพื่อใช้เป็นตัวนำส่งยา นอกจากนี้ยังสามารถนำไปขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ เพื่อใช้เป็นวัสดุค้ำจุนสำหรับการยึดเกาะของเซลล์ เป็นต้น

ตารางที่ 2.4 สมบัติทางกลของพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ [Vepari C. และ Kaplan D.L. 2007]

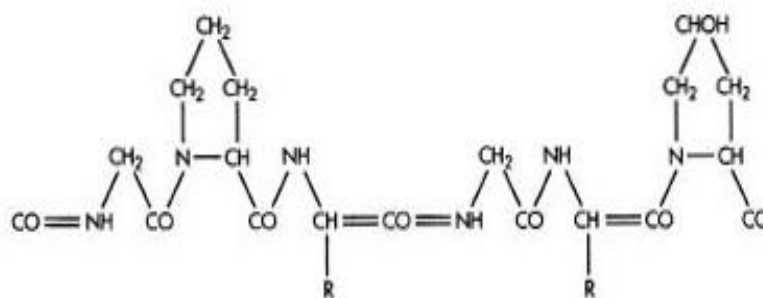
Source of biomaterial	Modulus (GPa)	Ultimate Tensile Strength (UTS; MPa)	Strain (%) at break
<i>B. mori</i> silk (with sericin)	5–12	500	19
<i>B. mori</i> silk (without sericin)	15–17	610–690	4–16
<i>B. mori</i> silk	10	740	20
<i>N. clavipes</i> (from spider)	11–13	875–972	17–18
Collagen	0.0018–0.046	0.9–7.4	24–68
Cross-linked collagen	0.4–0.8	47–72	12–16
Polylactic acid	1.2–3.0	28–50	2–6

2.3.2 เจลาติน (Gelatin)

เจลาตินเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งได้มาจากคอลลาเจน (Collagen) ที่เป็นองค์ประกอบหลักในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน กระดูก และผิวหนังของสิ่งมีชีวิต เช่น หนังหมู หนังวัว และกระดูกหมูและวัว เป็นต้น โดยผ่านการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ด้วยกรดหรือด่าง โดยสมบัติของเจลาตินที่ได้ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของคอลลาเจนและกระบวนการไฮโดรไลซิส [Gómez-Guillén M. C. และคณะ 2011]

โครงสร้างของเจลาติน [Segtnan V. และ Isaksson T. 2004]

เจลาตินเป็นสารอินทรีย์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 18 ชนิด ต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ เกิดเป็นพอลิเปปไทด์สายยาว โดยมีกรดอะมิโนหลัก 3 ชนิด คือ ไกลซีน (Glycine; Gly) โพรลีน (Proline; Pro) และไฮดรอกซีโพรลีน (Hydroxyproline; Hyp) ซึ่งจัดเรียงตัวเป็นหน่วยซ้ำ คือ (-Gly-Pro-Hyp)_n และเชื่อมด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายพอลิเปปไทด์ [Gómez-Guillén M. C. และคณะ 2011] ดังแสดงในรูปที่ 2.8 โครงสร้างของเจลาตินมีลักษณะเป็นขดแบบสุ่ม (Random Coil) เนื่องจากเกิดจากการสลายตัวของคอลลาเจนทำให้สายโซ่โมเลกุลสั้นลง และเจลาตินมีช่วงน้ำหนักโมเลกุลค่อนข้างกว้างตั้งแต่ช่วงต่ำกว่า 10,000 กรัม/โมล จนถึงสูงกว่า 400,000 กรัม/โมล [Schrieber R. และ Gareis H. 2007]



รูปที่ 2.9 โครงสร้างทางเคมีของเจลาติน

[<http://www.madehow.com/Volume5/Gelatin.html>]

ประเภทของเจลาติน [Lüpke, M. และ Brückner H. 1998, Tabata Y. และ Ikada Y. 1998]

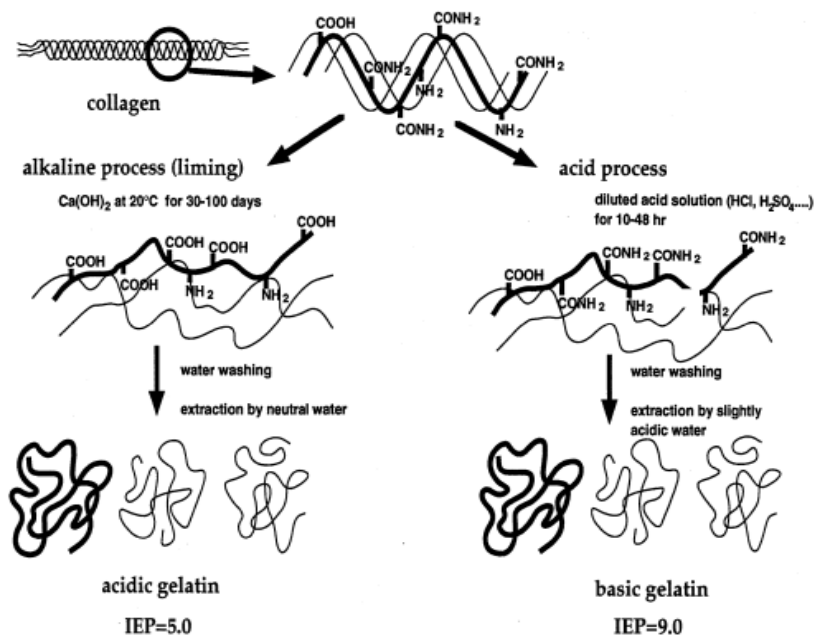
ประเภทของเจลาตินแบ่งตามกระบวนการไฮโดรไลซิสได้ 2 ประเภท ดังแสดงในรูปที่ 2.9 ดังนี้

1. เจลาตินชนิดเอ (Type A gelatin)

เจลาตินชนิดเอ หรือ Basic gelatin ส่วนใหญ่มาจากคอลลาเจนที่ได้จากหนังหมู โดยผ่านการไฮโดรไลซิสด้วยกรด เช่น กรดไฮโดรคลอริก กรดซัลฟูริก เป็นต้น แต่คอลลาเจนถูกไฮโดรไลซิสผ่านกระบวนการนี้ได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นกับกลุ่มเอไมด์ในคอลลาเจน มีน้อยส่งผลให้ค่า Isoelectric point ของเจลาตินที่ได้ใกล้เคียงกับคอลลาเจน คือ ประมาณ 8 – 9 ดังนั้นเจลาตินชนิดเอจึงเหมาะสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยสารที่มีสมบัติเป็นกรด

2. เจลาตินชนิดบี (Type B gelatin)

เจลาตินชนิดบี หรือ Acidic gelatin ส่วนใหญ่มาจากคอลลาเจนที่ได้จากกระดูกและหนังวัว โดยผ่านการไฮโดรไลซิสกลุ่มเอไมด์ของคอลลาเจนด้วยเบส เช่น แคลเซียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น ส่งผลให้เจลาตินที่ได้มีหมู่คาร์บอกซิลในปริมาณมากทำให้เจลาตินมีประจุลบและมีค่า Isoelectric point ประมาณ 4 – 5 ดังนั้นเจลาตินชนิดบีจึงเหมาะสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยสารที่มีสมบัติเป็นเบส



รูปที่ 2.10 กระบวนการผลิตเจลาตินชนิดเอและบี [Tabata Y. และ Ikada Y. 1998]

หมู่อะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในเจลาตินทั้ง 2 ประเภท สามารถสรุปได้ดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในเจลาตินชนิดเอและบี [Members of The Gelatin Manufacturers Institute of America (GMIA) 2012]

Amino Acid	Type A Gelatin (g/100 g dry gelatin)	Type B Gelatin (g/100 g dry gelatin)
Alanine	8.6	10.1
Arginine	8.3	5.0
Aspartic Acid	6.2	4.6
Cystine	0.1	Trace
Glutamic Acid	11.3	8.5
Glycine	26.4	24.5
Histidine	0.9	0.4
Hydroxylysine	1.0	0.7

ตารางที่ 2.5 (ต่อ) องค์ประกอบของกรดอะมิโนในเจลาตินชนิดเอและบี [Members of The Gelatin Manufacturers Institute of America (GMIA) 2012]

Amino Acid	Type A Gelatin (g/100 g dry gelatin)	Type B Gelatin (g/100 g dry gelatin)
Hydroxyproline	13.5	11.0
Isoleucine	1.4	1.3
Leucine	3.1	2.8
Lysine	4.1	2.1
Methionine	0.8	0
Phenylalanine	2.1	1.3
Proline	16.2	13.5
Serine	2.9	3.4
Threonine	2.2	2.0
Tyrosine	0.4	0
Valine	2.5	2.4

สมบัติของเจลาติน [Members of The Gelatin Manufacturers Institute of America (GMIA) 2012]

เจลาตินมีลักษณะเปราะ มีสีเหลืองอ่อน มีความชื้นประมาณ 8-13% และมีความหนาแน่นประมาณ 1.3-1.4 เจลาตินสามารถละลายน้ำและสารละลายประเภทพอลิไฮดริคแอลกอฮอล์ (Polyhydric alcohol) คือสารละลายที่มีหมู่ -OH มากกว่า 3 หมู่ เช่น กลีเซอรอล (Glycerol) หรือ พอพิลีนไกลคอล (Propylene Glycol) เป็นต้น นอกจากนี้เจลาตินยังสามารถละลายในสารละลายที่มีความเป็นขั้วสูงและตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติก (Acetic Acid) ไตรฟลูออโรเอทานอล (Trifluoroethanol) และฟอร์มาร์ไมด์ (Formamide) เป็นต้น ปกติเจลาตินสามารถละลายน้ำได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40°C [Segtnan V. และ Isaksson T. 2004] แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วน้อย เช่น เบนซิน หรืออะซิโตน เป็นต้น โดยเจลาตินที่อยู่ในรูปสารละลายจะไม่มีสี ไม่มีกลิ่น และมีสมบัติที่สามารถเป็นได้ทั้งกรดและเบส หรือที่เรียกว่าแอมโฟเทอริก (Amphoteric) กล่าวคือเมื่อเจลาตินอยู่ในสารละลายที่มีสภาพเป็นกรดเจลาตินจะแสดงประจุบวก แต่ถ้าเจลาตินอยู่ในสารละลายที่มีสภาพเป็นเบสเจลาตินจะแสดงประจุลบ

นอกจากนี้สมบัติของเจลาตินที่มักนำมาพิจารณาเพื่อนำไปประยุกต์ใช้งานสามารถแบ่งได้ 2 ส่วน ส่วนแรก คือ สมบัติการเกิดเจล สารละลายเจลาตินเมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องหรือต่ำกว่าอุณหภูมิห้องสามารถเกิดเจลได้ โดยเจลที่เกิดขึ้นมีสมบัติเป็น Thermoreversible Gel กล่าวคือสามารถเปลี่ยนกลับเป็นของเหลวได้เมื่อให้ความร้อน นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายเจลาตินเพิ่มขึ้นโอกาสในการเกิดเจลจะมากขึ้นตามลำดับ และความแข็งแรงของเจลขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายเจลาตินด้วย ส่วนที่ 2 คือ ความหนืด เมื่อความเข้มข้นของสารละลายเจลาตินเพิ่มขึ้นส่งผลให้ความหนืดเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิความหนืดจะมีค่าลดลง สำหรับสมบัติเด่นด้านอื่นของเจลาติน ได้แก่ สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ สามารถเข้ากับเซลล์ของสิ่งมีชีวิตได้โดยไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ ช่วยในการยึดเกาะของเซลล์ และมีราคาไม่แพง [Mandal B.B., Mann J.K. และคณะ 2009]

การประยุกต์ใช้งานของเจลาติน [Gómez-Guillén M.C. และคณะ 2011, Members of The Gelatin Manufacturers Institute of America (GMIA) 2012]

ในปัจจุบันเจลาตินถูกนำไปประยุกต์ใช้งานหลายด้าน ได้แก่ อุตสาหกรรมอาหาร เช่น ผลิตภัณฑ์นม เยลลี่ เนยแข็ง ขนมเค้ก เป็นต้น อุตสาหกรรมยา เช่น ผลิตภัณฑ์ยาแบบเปลือกนุ่มและเปลือกแข็ง เป็นต้น ด้านเครื่องสำอาง เช่น ครีม โลชั่น เป็นต้น ด้านภาพถ่ายใช้เจลาตินเคลือบบนฟิล์มถ่ายภาพ และด้านอื่นๆ เช่น นำเจลาตินไปผสมกับสารที่ใช้ทำหัวไม้ขีดไฟ ใช้เป็นสารที่ทำให้เกิดความคงตัว (Stabilizer) ใช้เป็นสารป้องกันการเกิดคอลลอยด์ (Protective colloidal) เป็นต้น นอกจากนี้เจลาตินยังได้รับความสนใจนำไปประยุกต์ใช้งานด้านการแพทย์และด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่ออย่างกว้างขวาง เช่น ใช้เป็นแผ่นตกแต่งแผล ใช้เป็นตัวนำส่งเพื่อควบคุมการปลดปล่อยยา หรือขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์สำหรับประยุกต์ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เป็นต้น [Mandal B.B., Priya A.S. และคณะ 2009]

2.4 เทคนิคการขึ้นรูปด้วยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze-drying) [ชรินทร์ เตชะพันธุ์ 2542, ปิณณธร ภัทรสถาพรกุล 2547]

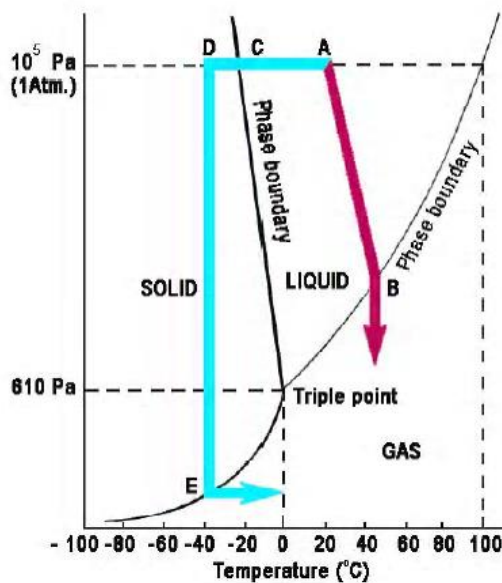
กระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze drying) หรือการทำแห้งแบบระเหิด (Sublimation drying) มีชื่อเรียกเฉพาะว่า "Lyophilization" เป็นกระบวนการทำแห้งภายใต้สภาวะอุณหภูมิต่ำและความดันต่ำ ซึ่งอาศัยหลักการแช่แข็ง (Freezing) เพื่อเปลี่ยนสถานะของน้ำจากสถานะของเหลวมาเป็นของแข็ง จากนั้นจึงกระตุ้นให้เกิดการระเหิดของน้ำแข็งให้กลายเป็นไอโดยตรง โดยการปรับความดันไอของน้ำให้ต่ำกว่าจุดรวมสามสถานะ (Triple point) ซึ่งเป็นจุดที่น้ำในสถานะของแข็ง ของเหลว และแก๊สสมดุลกัน ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นชิ้นงานแห้ง และมีความคงรูป

โดยทั่วไปเทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็งมีการนำไปประยุกต์ใช้กับงานหลายประเภท ไม่ว่าจะเป็นด้านการเกษตร อาหาร เครื่องสำอาง และเภสัชกรรม และในปัจจุบันนิยมนำเทคนิคนี้ไปประยุกต์ใช้ในด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อมากขึ้น เช่น การขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ และไฮโดรเจล เป็นต้น นอกจากนี้ยังเป็นเทคนิคที่นิยมใช้กับสารที่มีการสลายตัวได้ง่ายด้วยความร้อน ทำให้ไม่สามารถใช้การอบแห้ง หรือการทำแห้งโดยวิธีการนำหรือพาความร้อนได้โดยตรง เช่น เอนไซม์ ยาปฏิชีวนะ ฮอโมน ต่างๆ เป็นต้น

หลักการพื้นฐานของกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

กระบวนการทำแห้ง สามารถอธิบายได้จากแผนภูมิสถานะ (Phase diagram) ของน้ำบริสุทธิ์ ดังแสดงในรูปที่ 2.10 จุด A ที่อุณหภูมิและความดันบรรยากาศปกติ (30 °C และ 105 Pa) น้ำจะอยู่ในสถานะของเหลว การทำแห้งโดยทั่วไป (Conventional drying) จะให้พลังงานความร้อนกับน้ำหรือน้ำในผลิตภัณฑ์ จนถึงระดับความร้อนแฝงของการระเหยน้ำ (Latent heat of evaporation) ทำให้น้ำเปลี่ยนสถานะเป็นไอที่จุด B แต่การทำแห้งแบบเยือกแข็งจะลดอุณหภูมิของผลิตภัณฑ์จนถึงจุดเยือกแข็ง C หรือจุด D ซึ่งต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง เพื่อให้ น้ำเปลี่ยนสถานะเป็นของแข็งได้อย่างสมบูรณ์ จากนั้นลดความดันสุญญากาศลงจนต่ำกว่าจุด E หรือเส้นขอบเขตการเปลี่ยนสถานะ เพื่อให้ผลึกน้ำแข็งเกิดการระเหิด และในขั้นตอนสุดท้ายจึงค่อยๆ ให้พลังงานความร้อนแฝงของการระเหิด (Latent heat of sublimation) เพื่อให้ น้ำแข็งระเหิดเป็นไอได้อย่างสมบูรณ์

ในความเป็นจริงปริมาณความชื้นหรือน้ำที่อยู่ในผลิตภัณฑ์ไม่ได้อยู่ในรูปของน้ำบริสุทธิ์ มักจะอยู่ผสมกับสารอื่นๆ ในรูปของตัวทำละลาย (Solvent) และตัวถูกละลาย (Solute) ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสถานะของสาร ดังนั้นในการทำแห้งแบบเยือกแข็งกับผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดจึงมีข้อจำกัดและลักษณะเฉพาะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีของผลิตภัณฑ์นั้นๆ



รูปที่ 2.11 แผนภูมิสถานะของน้ำบริสุทธิ์ [ปิ่นธร ภัทรสถาพรกุล 2547]

ขั้นตอนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

กระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งมีลักษณะแตกต่างจากการทำแห้งโดยทั่วไป กล่าวคือ ระยะเวลาในการทำแห้งนานกว่าการทำแห้งโดยทั่วไป เนื่องจากต้องการคงสภาพของผลิตภัณฑ์ให้ใกล้เคียงกับตอนเริ่มต้นมากที่สุด โดยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งประกอบด้วย ขั้นตอนหลัก (Main process) 3 ขั้นตอน (ดังแสดงในรูปที่ 2.11) ดังนี้

1) การแช่เยือกแข็ง (Freezing) เป็นการลดอุณหภูมิของผลิตภัณฑ์ลงจนถึงจุดเยือกแข็งหรือต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง เพื่อให้น้ำหรือสารละลายเปลี่ยนสถานะเป็นของแข็งได้อย่างสมบูรณ์ ส่วนสำคัญของขั้นตอนนี้ คือ การเกิดผลึกน้ำแข็ง โดยอัตราการแช่แข็ง (Freezing rate) ควรมีอัตราสูง เพื่อให้ผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นมีขนาดเล็ก ซึ่งลักษณะของผลึกเช่นนี้ไม่ทำให้โครงสร้างของผลิตภัณฑ์เสียหาย แต่ถ้าอัตราการแช่แข็งต่ำ ส่งผลให้ระยะเวลาในการรวมตัวของน้ำเพื่อเกิดเป็นผลึกมีมากขึ้น ทำให้ผลึกน้ำแข็งที่ได้มีขนาดใหญ่ ซึ่งไปเบียดช่องว่างระหว่างเซลล์ทำให้เซลล์แตกและโครงสร้างของผลิตภัณฑ์ได้รับความเสียหาย การแช่เยือกแข็งที่มีอัตราการแช่แข็งสูงที่นิยมใช้กันมีหลายวิธี เช่น การแช่เยือกแข็งแบบเป่าลม การแช่เยือกแข็งแบบสัมผัส และการแช่เยือกแข็งแบบจุ่มในของเหลวเย็นจัด เป็นต้น

2) การทำแห้งระยะที่ 1 (Primary drying) ขั้นตอนนี้เป็นการลดความดันลง เพื่อให้ผลึกน้ำแข็งที่อยู่ภายในเกิดการระเหิดเป็นไอออกไปจากผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ โดยการระเหิดนี้ต้องอาศัยพลังงานจากภายนอกสูงถึง 2,800 kJ/kg ของน้ำ ซึ่งเป็นตัวพา (Convection) ความร้อนเข้าสู่เนื้อของสารแช่แข็ง เพื่อให้ชั้นของผลึกน้ำแข็งซึ่งเป็นน้ำอิสระ (Free water) ระเหิดออกไป ซึ่งแหล่ง

พลังงานดังกล่าวสามารถกระทำได้โดยใช้ปั๊มสุญญากาศเป็นตัวกำเนิดพลังงาน โดยอาศัยผลต่างความดันของผลิตภัณฑ์กับเครื่องมือเป็นตัวพาไอน้ำออกมา ความแตกต่างของความดันดังกล่าวต้องสูงกว่า 10^{-2} mbar หรืออาจกล่าวได้ว่าเมื่อทำการปรับสภาพความดันไอของน้ำให้ต่ำกว่า 6 mbar (4.6 mmHg) ทำให้น้ำเข้าสู่จุด Triple point และเกิดการพาความร้อนในลักษณะดังกล่าว ขั้นตอนการระเหิดนี้สามารถลดปริมาณความชื้นในผลิตภัณฑ์ให้เหลือต่ำกว่าร้อยละ 20 โดยน้ำหนักแห้งได้ในขณะที่ยังคงปริมาตรรวมของโครงสร้างผลิตภัณฑ์เท่ากับขั้นตอนการแช่แข็ง

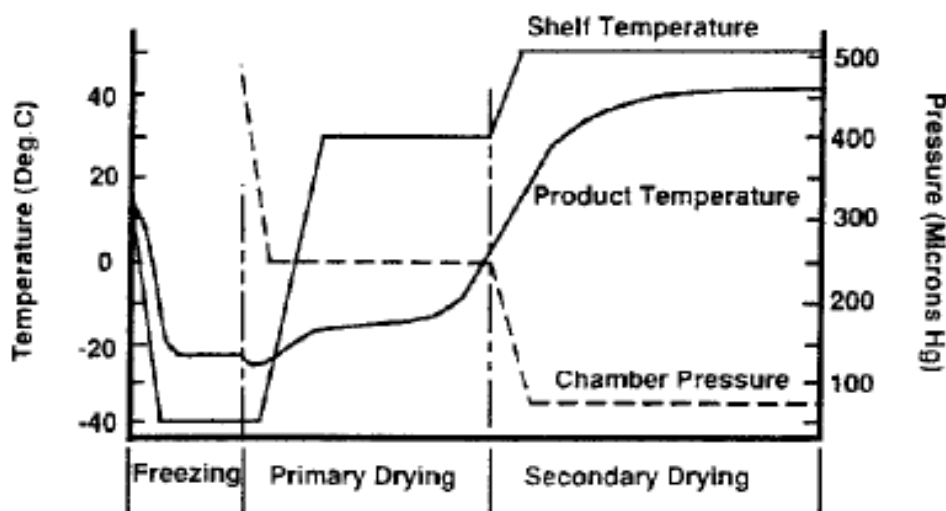
โดยพฤติกรรมของการระเหิดของผลึกน้ำแข็งระหว่างการทำแห้งระยะที่ 1 มีลำดับการระเหิด ดังนี้

- การระเหิดของชั้นน้ำแข็ง (Ice Layer) บริเวณผิวหน้าของผลิตภัณฑ์
- ชั้นน้ำแข็งที่ระเหิดไปกลายเป็นชั้นแห้ง (Dry Layer) อยู่บริเวณผิวหน้าของผลิตภัณฑ์
- ชั้นน้ำแข็งที่อยู่ภายในผลิตภัณฑ์ ระเหิดผ่านชั้นแห้งออกสู่ผิวหน้าของผลิตภัณฑ์

ทั้งนี้เวลาในการระเหิด (Sublimation Time) ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของผลิตภัณฑ์ว่ามีความหนาแน่นเพียงใด

3) การทำแห้งระยะที่ 2 (Secondary drying) เป็นการกำจัดน้ำที่อยู่ในรูปของพันธะกับสารอื่น (Bound water) ในผลิตภัณฑ์ซึ่งไม่ตกผลึกและแข็งตัวไปกับน้ำอิสระ เรียกขั้นตอนนี้ว่า Desorption โดย ขั้นตอนนี้จะเกิดขึ้นเมื่อการระเหิดของน้ำอิสระหมดไปในขั้นตอนการทำแห้งระยะที่ 1 ซึ่งช่วงของการ Desorption อุณหภูมิของผลิตภัณฑ์จะเพิ่มสูงขึ้นอยู่ในช่วง 20 – 40 °C เนื่องจากการถ่ายเทความร้อนแฝงให้ชั้นน้ำแข็งหมดไป พลังงานจากแหล่งให้ความร้อนจึงถ่ายเทสู่ผลิตภัณฑ์โดยตรง ซึ่งขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่ใช้เวลามากที่สุด

อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติพบว่าลำดับขั้นของการทำแห้งแบบเยือกแข็งนี้ไม่ได้แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนอย่างชัดเจน แต่มีการคาบเกี่ยวกันอยู่ตลอดเวลาในแต่ละรอบของการทำแห้ง เช่น ในกรณีมีสารที่มีจุดหลอมเหลวต่ำ เช่น เอทานอลเป็นองค์ประกอบ พบว่าไม่เกิดการแข็งตัวอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิที่ใช้ในการทำแช่แข็ง ดังนั้นในขณะที่ทำการระเหิดจึงมีการระเหยของเอทานอลออกจากส่วนของชั้นของเหลวก่อนจะเกิดการทำแห้งในส่วนของสารที่ต้องการจริงๆ ทำให้ในรอบการทำงานของการไล่น้ำในส่วน Bounded form (Desorption) เกิดขึ้นเร็วกว่าปกติ เพราะผิวหน้าของผลิตภัณฑ์แห้งมาก เนื่องจากการระเหยของเอทานอล ในขณะที่ส่วนเนื้อสารจริงๆ ยังเกิดการระเหิดไม่สมบูรณ์ ทำให้เกิดการคาบเกี่ยวกันระหว่างขั้นตอนการทำแห้งระยะที่ 1 และ 2 นอกจากนี้ปัจจัยดังกล่าวแล้วขนาดของผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นยังมีผลต่อการระเหิดของน้ำด้วย โดยผลึกน้ำแข็งที่มีขนาดเล็กและโครงสร้างของผลึกมีขนาดไม่สม่ำเสมอ จะเกิดการระเหิดได้ช้ากว่าผลึกที่มีขนาดใหญ่ ดังนั้นการแช่แข็งจึงควรทำให้เกิดการแข็งตัวของเนื้อสารอย่างค่อยเป็นค่อยไป ทำให้ได้ผลึกที่มีขนาดใหญ่ และมีโครงสร้างที่มีขนาดสม่ำเสมอ ช่วยลดเวลาในการระเหิดของสารลงได้



รูปที่ 2.12 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในระหว่างการทำแห้งแบบเยือกแข็ง [ชรินทร์ เตชะพันธุ์ 2542]

ข้อดีของกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

1. ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีโครงสร้างใกล้เคียงกับตอนเริ่มต้น
2. ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีโครงสร้างรูพรุนเกิดขึ้น เนื่องจากส่วนของ Bound water ถูกดึงออกไป
3. เมื่อนำผลิตภัณฑ์มาละลายน้ำ โมเลกุลของน้ำสามารถแทรกเข้าไปในโครงสร้างที่เป็นรูพรุนได้ ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์สามารถคืนตัว (Rehydration) ได้อย่างรวดเร็ว

ข้อเสียและข้อจำกัดของกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

1. เครื่องมือมีราคาแพงกว่าการทำแห้งโดยทั่วไป ประมาณ 3 เท่า
2. ใช้พลังงานในขั้นตอนการทำแห้งสูง 2 – 3 เท่า เมื่อเทียบกับวิธีการทำแห้งแบบทั่วไป
3. ใช้เวลาในการทำแห้งแต่ละรอบนานประมาณ 24 – 72 ชั่วโมง
4. สำหรับชิ้นงานชีวภาพ (Biological sample) โครงสร้างของชิ้นงานหลังเสร็จสิ้นกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งอาจมีการฉีกขาดได้ เนื่องจากการก่อตัวของผลึกน้ำแข็งภายในชิ้นงาน

2.5 การเชื่อมขวาง (Crosslinking) [Haugh M.G และคณะ 2009, Khor E. 1997, Friess W 1998, Ratanavaraporn J และคณะ 2010]

การเชื่อมขวางเป็นกระบวนการสร้างพันธะทางเคมีภายใน/ระหว่างสายโซ่โพลิเมอร์ของพอลิเมอร์ ส่งผลให้สมบัติของพอลิเมอร์เปลี่ยนแปลงไป โดยทำให้พอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้มีอัตราการย่อยสลายที่ช้าลง มีความสามารถในการบวมตัวได้ดีขึ้น โดยที่ไม่ละลายน้ำ และช่วยปรับปรุงสมบัติทางกลและทางความร้อนให้ดีขึ้น เพื่อให้มีความเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้งานต่างๆ การเชื่อมขวางแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ การเชื่อมขวางทางกายภาพ และการเชื่อมขวางทางเคมี โดยในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะการเชื่อมขวางสำหรับโปรตีน

2.5.1 การเชื่อมขวางทางกายภาพ (Physical crosslinking) เช่น การเชื่อมขวางด้วยความร้อน การเชื่อมขวางด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต เป็นต้น โดยการเชื่อมขวางทางกายภาพจะทำให้พอลิเมอร์ที่ได้มีร้อยละการเชื่อมขวางค่อนข้างน้อย แต่ข้อดีคือ ไม่มีสารเคมีที่เป็นพิษตกค้างอยู่ในพอลิเมอร์

2.5.1.1 การเชื่อมขวางด้วยความร้อน (Dehydrothermal treatment; DHT)

เป็นเทคนิคการเชื่อมขวางที่ใช้ความร้อนสูง (มากกว่า 90 °C) ภายใต้สภาวะสุญญากาศ ซึ่งการเชื่อมขวางด้วยวิธีนี้จะเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างพันธะเอไมด์ และปฏิกิริยา Esterification ระหว่างหมู่คาร์บอกซิล หมู่อะมิโนอิสระ และหมู่ไฮดรอกซิล และมีการกำจัดน้ำออกจากโมเลกุลของชิ้นงาน โดยผ่านปฏิกิริยาการควบแน่น นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิและระยะเวลาในการเชื่อมขวางมากขึ้น ส่งผลให้ความแข็งแรงทางกลเพิ่มขึ้น

2.5.1.2 การเชื่อมขวางด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV-irradiation)

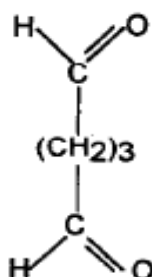
เป็นการเชื่อมขวางของฟรีเรดิคัล (Free radical) ของหมู่อะโรมาติกของกรดอะมิโน เช่น ไทโรซีน (Tyrosine) ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) เป็นต้น โดยค่าความหนาแน่นของการเชื่อมขวางมีจำกัด ขึ้นอยู่กับปริมาณของหมู่อะโรมาติกของกรดอะมิโนในโปรตีน วิธีนี้เป็นวิธีที่ไม่ใช้ความร้อน ดังนั้นจึงนิยมใช้ในการเชื่อมขวางคอลลาเจนและเจลาติน ซึ่งสลายตัวได้ง่ายด้วยความร้อน และช่วยปรับปรุงสมบัติทางกลของคอลลาเจนและเจลาตินให้ดีขึ้น [Bhat R. และ Karim A.A 2009]

2.5.2 การเชื่อมขวางทางเคมี (Chemical crosslinking) เป็นการสร้างพันธะโควาเลนต์โดยใช้สารเคมีที่ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชัน 2 หมู่ที่อยู่ในโมเลกุลเดียวกัน มาทำปฏิกิริยากับหมู่ฟังก์ชันของโปรตีน [Hemaprabha E. 2012] เช่น การเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ การเชื่อมขวางด้วย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) และ N-hydroxysuccinimide ester (NHS) เป็นต้น การเชื่อมขวางทางเคมีทำให้มีร้อยละการเชื่อมขวางค่อนข้างมาก แต่อาจทำให้

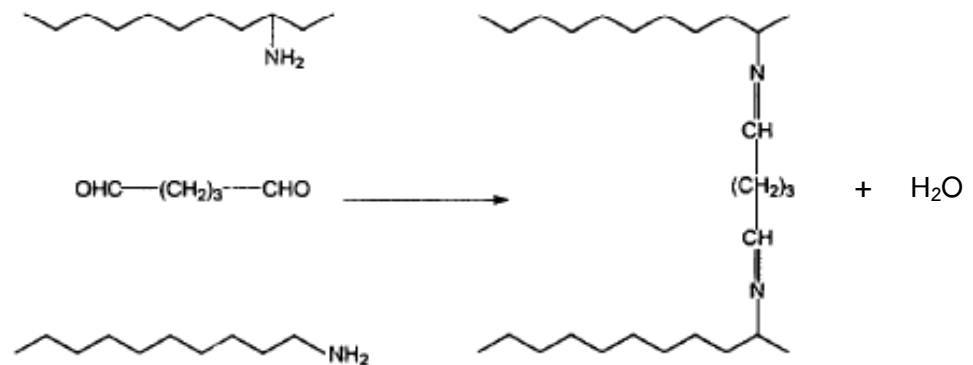
โครงสร้างของวัสดุเปลี่ยนไป ข้อเสียของวิธีนี้คือ อาจมีสารเคมีที่เป็นพิษตกค้างอยู่ในพอลิเมอร์หลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการเชื่อมขวาง

2.5.2.1 การเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde)

กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารประเภทแอลดีไฮด์ที่นิยมใช้ในการเชื่อมขวาง เนื่องจาก ราคาไม่แพง ระยะเวลาที่ใช้ในการเชื่อมขวางเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ประสิทธิภาพในการเชื่อมขวางสูง และพอลิเมอร์ที่ได้มีความแข็งแรงมากกว่าพอลิเมอร์ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารประเภทฟอร์มาดีไฮด์ โครงสร้างของกลูตารัลดีไฮด์มีลักษณะเป็นสายโซ่ตรงประกอบด้วยคาร์บอน 5 อะตอม และมีหมู่แอลดีไฮด์ 2 หมู่ อยู่ที่ปลายทั้งสองข้างของโมเลกุล ดังแสดงในรูปที่ 2.12 ซึ่งหมู่แอลดีไฮด์ (-CHO) นี้จะทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโน (-NH₂) ของโปรตีนและมีการปลดปล่อยน้ำออกมา ดังแสดงในรูปที่ 2.13 ส่งผลให้พอลิเมอร์ที่ได้มีสมบัติทางกลที่ดีขึ้น และมีอัตราการย่อยสลายที่ช้าลง โดยปฏิกิริยาการเชื่อมขวางขึ้นอยู่กับค่าพีเอช ตัวทำละลาย ความเข้มข้น และความบริสุทธิ์ของกลูตารัลดีไฮด์ ข้อเสียของวิธีนี้ คือ กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารที่มีพิษ ดังนั้นหลังเสร็จสิ้นกระบวนการเชื่อมขวางจึงจำเป็นต้องกำจัดกลูตารัลดีไฮด์ส่วนเกินที่อาจตกค้างอยู่ในชิ้นงานออก โดยการล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ไกลซีน ซึ่งมีหมู่ -NH₂ เหมือนกับโปรตีน โดยกลูตารัลดีไฮด์ที่ตกค้างอยู่จะไปจับกับหมู่ -NH₂ ของสารละลายบัฟเฟอร์ไกลซีนแทน



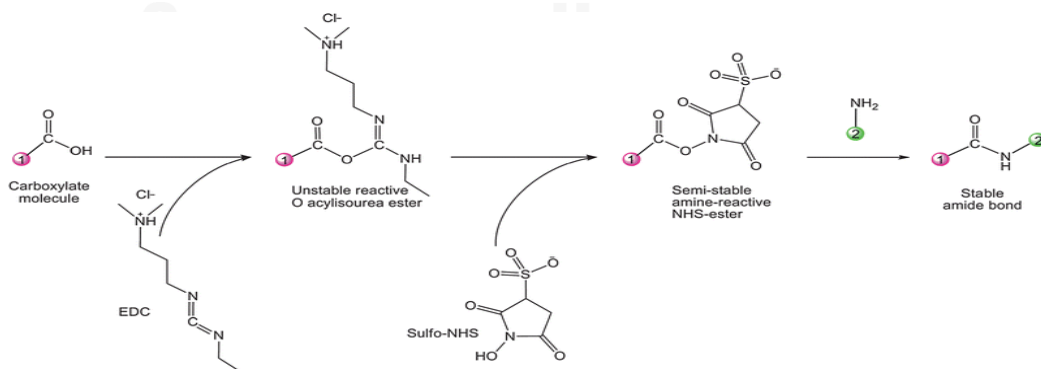
รูปที่ 2.13 โครงสร้างของกลูตารัลดีไฮด์ [Khor E. 1997]



รูปที่ 2.14 การเชื่อมขวางของโปรตีนด้วยกลูตารัลดีไฮด์ [Khor E. 1997]

2.5.2.2 การเชื่อมขวางด้วย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) และ N-hydroxysuccinimide esters (NHS) [Jetbumpenkul P. และคณะ 2012, Pieper J.S และคณะ 2000]

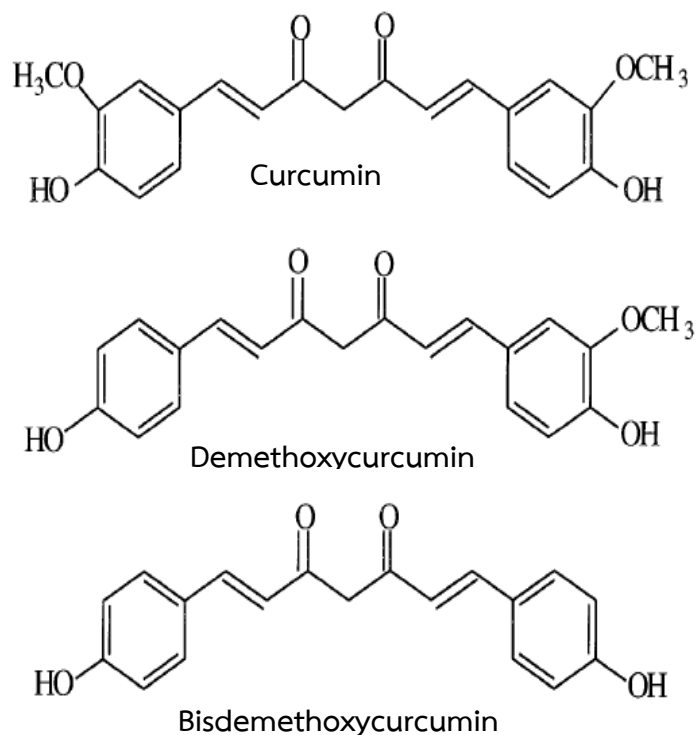
EDC จะทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลิกในโปรตีนสายโซ่ที่ 1 เกิดเป็นสารที่อยู่ในรูปไม่เสถียร เรียกว่า Intermediate ซึ่งก็คือ O-acylisourea ester โดย Intermediate ที่เกิดขึ้นมีความไวต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ดังนั้นจึงสามารถกลับไปอยู่ในรูปของหมู่คาร์บอกซิลิกได้อีก จึงจำเป็นต้องเติม NHS เข้าไปเพื่อให้ความเสถียรมากขึ้น โดย NHS จะทำปฏิกิริยากับ Intermediate เกิดเป็นสารที่มีความเสถียรขึ้น ซึ่งก็คือ NHS-ester Intermediate จากนั้น NHS-ester Intermediate จะทำปฏิกิริยากับหมู่เอไมด์ในโปรตีนสายโซ่ที่ 2 เกิดเป็นพันธะเปปไทด์ที่มีความเสถียร ดังแสดงในรูปที่ 2.14 หลังเสร็จสิ้นกระบวนการเชื่อมขวาง EDC และ NHS จะถูกกำจัดออกไม่ปรากฏอยู่ในโมเลกุลที่เชื่อมขวาง ผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจากการเชื่อมขวาง คือ อนุพันธ์ของยูเรีย ซึ่งสามารถกำจัดได้โดยการละลายน้ำ ข้อดีของวิธีนี้คือ ไม่มีสารเคมีตกค้างอยู่ในชิ้นงาน



รูปที่ 2.15 การเชื่อมขวางของโปรตีนด้วย EDC/NHS [<http://www.rsc.org>]

2.6 เคอร์คูมิน (Curcumin) [Akram M. และคณะ 2010, Mou-Tuan Huang และคณะ 1997, Ravindran J. และคณะ 2009, Wilken R. และคณะ 2011]

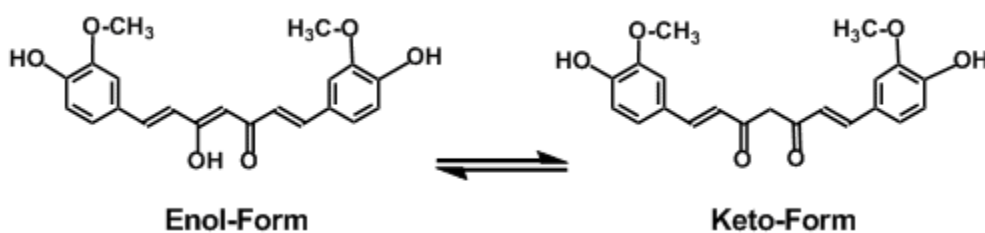
เคอร์คูมินเป็นสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ (Curcuminoids) มีสีเหลือง ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารประกอบโพลีฟีนอล (Polyphenolic compound) ที่สกัดจากเหง้าของขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) โครงสร้างของเคอร์คูมินอยด์ประกอบด้วยเมทอกซีเลทฟีนอล (Methoxylated phenols) 2 กลุ่ม จับกับตำแหน่ง α และ β ของหมู่คาร์บอนิล (Carbonyl group) ซึ่งอยู่ในรูปอีโนล (Enol form) ที่เสถียร โดยเคอร์คูมินอยด์ประกอบด้วยสารสำคัญ 3 ชนิด (ดังแสดงในรูปที่ 2.15) คือ เคอร์คูมิน (Curcumin) 77% ดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน (Demethoxycurcumin) 17% และบิสดีท็อกซีเคอร์คูมิน (Bisdemethoxycurcumin) 3%



รูปที่ 2.16 โครงสร้างโมเลกุลของสารสำคัญในเคอร์คูมินอยด์ [Mou-Tuan Huang และคณะ 1997]

เคอร์คูมินถูกสกัดครั้งแรกในปี ค.ศ. 1815 และอยู่ในรูปการตกผลึกในปี ค.ศ. 1870 มีชื่อทางเคมีว่า 1,6-heptadiene-3,5-dione-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-(1E,6E) หรือ Diferuloylmethane สูตรโมเลกุลคือ C₂₁H₂₀O₆ และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 368.38 กรัมต่อโมล [Manju S. 2011] โดยปกติเคอร์คูมินสามารถอยู่ในรูปของทาวโทเมอร์ริก (Tautomeric form) ได้อย่างน้อย 2 รูปแบบ กล่าวคือ โครงสร้างโมเลกุลสามารถเปลี่ยนจากรูป คีโต (Keto form) ไปเป็นรูปอีโนล

(Enol form) หรือจากรูปอินอลไปเป็นรูปคีโตได้ ดังแสดงในรูปที่ 2.16 ซึ่งขึ้นอยู่กับตัวทำละลาย โดยพบว่ากรณีที่สารละลายอยู่ในสภาวะกรดและกลาง เคอร์คูมินจะแสดงรูปแบบของคีโตออกมา และกรณีที่สารละลายอยู่ในสภาวะเบส เคอร์คูมินจะแสดงรูปแบบของอินอล [Anand P. และคณะ 2007] โดยรูปอินอลจะมีความคงตัวในสภาวะของแข็งและสารละลาย แต่โดยปกติแล้วเคอร์คูมินประมาณ 95% จะอยู่ในรูปอินอล [Ivan Stankovic. 2004]



รูปที่ 2.17 โครงสร้างโมเลกุลของรูปแบบอินอลและคีโต [<http://www.biologie.uni-freiburg.de>]

เคอร์คูมินมีลักษณะเป็นผงสีเหลือง ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide) อะซีโตน (Acetone) และเอทานอล (Ethanol) เป็นต้น ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถทำให้ละลายน้ำได้โดยผสมกับสารลดแรงตึงผิว เช่น โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate) เซทิลไพริดีเนียมโบรไมด์ (Cetylpyridinium bromide) พอลิเอทิลีนไกลคอล (Polyethyleneglycol) และไซโคลเดกซ์ทริน (Cyclodextrins) เป็นต้น เพื่อให้เกิดเป็นระบบไมเซลล์ขึ้น (Micellar systems)

สมบัติของเคอร์คูมิน

เคอร์คูมินได้รับความนิยมนำมาใช้ในงานด้านเภสัชกรรมอย่างมาก เนื่องจากไม่ก่อให้เกิดพิษต่อร่างกาย แม้ว่าร่างกายจะได้รับในปริมาณมากก็ตาม (12 กรัมต่อวัน โดยการรับประทาน) [Anand P. และคณะ 2007] และเคอร์คูมินยังมีสมบัติเด่นหลายประการ ดังนี้

1. ต้านเชื้อราและเชื้อไวรัส

เคอร์คูมินมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราและเชื้อไวรัสได้หลายชนิด และสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดหนองได้ นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่า เคอร์คูมินสามารถต้านเชื้อ Plasmodium falciparum ซึ่งเป็นเชื้อที่ร้ายแรงที่สุดที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคมาลาเรีย [Akram M. และคณะ 2010]

2. ด้านอนุมูลอิสระ

เคอร์คูมินมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับวิตามินซีและวิตามินอี โดยมีการรายงานว่าเคอร์คูมินจะไปยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (Lipid peroxidation) ซึ่งก็คือ การเกิดปฏิกิริยาระหว่างไขมันกับออกซิเจนภายในร่างกาย และได้ผลิตภัณฑ์ที่อาจเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรคเบาหวาน และโรคหัวใจ เป็นต้น และพบว่าเคอร์คูมินสามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชันของเซลล์ที่ไตได้ โดยยับยั้งการสลายตัวของลิพิดและยับยั้งกระบวนการที่ทำให้ เซลล์แตก (Cytolysis) นอกจากนี้เคอร์คูมินยังสามารถลดการเปลี่ยนแปลงภาวะขาดเลือดในหัวใจได้ [Maheshwari R.K. และคณะ 2006]

3. ด้านการอักเสบ

เคอร์คูมินสามารถยับยั้งการทำงานของ Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) และ Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวกับการอักเสบ เช่น Cyclooxygenase-2 (COX-2), lipoxygenase (LOX) และ Nitric Oxide Synthase (iNOS) เป็นต้น โดยมีการรายงานว่าเคอร์คูมินมีประสิทธิภาพในการต้านการอักเสบได้ดีเทียบเท่ากับเฟนิลบูทาโซน (Phenylbutazone) ซึ่งเป็นยาต้านการอักเสบชนิดหนึ่ง [Hatcher H. และคณะ 2008] และพบว่าเคอร์คูมินสามารถยับยั้งโรคอักเสบต่างๆ ได้หลายชนิด เช่น ตับอ่อนอักเสบ (Pancreatitis) โรคข้ออักเสบ (Arthritis) โรคลำไส้อักเสบ (Inflammatory bowel disease) อาการลำไส้ใหญ่บวม (Colitis) โรคกระเพาะอักเสบ (Gastritis) อาการแพ้และไข้หวัด เป็นต้น

4. ด้านมะเร็ง

มะเร็งเป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติในระดับโมเลกุลของเซลล์ร่างกาย และขั้นตอนการเกิดมะเร็งมีหลายขั้นตอน ดังนี้ [เอี่ยมแซ สุขประเสริฐ. 2554]

- Tumor initiation เป็นขั้นตอนแรกที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรม (Gene) ในเซลล์ร่างกายอย่างถาวร โดยถูกชักนำจากปัจจัยทางกายภาพภายนอก เช่น สารเคมี การติดเชื้อไวรัส รังสี เป็นต้น โดยสิ่งเหล่านี้จะไปมีผลทำให้เซลล์ร่างกายมีความผิดปกติในระดับโมเลกุล ทำให้เซลล์มีความผิดปกติในการเจริญเติบโตและแบ่งตัว
- Tumor promotion step ระยะนี้เซลล์ที่มีความผิดปกติในระดับโมเลกุลมีการเจริญเติบโตและแบ่งตัวเพิ่มขึ้น
- Conversion step มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากเซลล์ธรรมดากลายเป็นเซลล์ระยะก่อนมะเร็ง และกลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด
- Tumor progression เซลล์มะเร็งลุกลามไปยังอวัยวะข้างเคียงและแพร่กระจายไปยังส่วนอื่นๆ ของร่างกาย (Metastasis)

สำหรับเคอร์คูมินนั้นมีรายงานว่า สามารถยับยั้งการเกิดมะเร็งและชักนำให้เกิดการตายของ เซลล์มะเร็ง (Apoptosis) ได้หลายชนิด เช่น มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Colorectal cancer) มะเร็งต่อมลูกหมาก (Prostate cancer) มะเร็งปอด (Lung cancer) มะเร็งเต้านม (Breast cancer) และมะเร็งตับอ่อน (Pancreatic cancer) เป็นต้น ซึ่งเคอร์คูมินจะเข้าไปยับยั้งขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรม และกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งในระหว่างขั้นตอน Tumor promotion และ Tumor progression โดยไปยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ที่จะไปเลี้ยงเซลล์มะเร็ง [Hatcher H. และคณะ 2008]

ข้อจำกัดของเคอร์คูมิน

เคอร์คูมินมีความสามารถในการละลายและความเสถียรค่อนข้างต่ำ และร่างกายดูดซึมได้น้อย เนื่องจากถูกกำจัดด้วยกระบวนการเมตาบอลิซึม (Metabolism) ของร่างกายอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้ชีวปริมาณการออกฤทธิ์ (Bioavailability) ลดลง กล่าวคือ ขอบเขตการออกฤทธิ์ของยาที่สามารถเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือดและเข้าถึงจุดที่ยาจะออกฤทธิ์ลดลง จากข้อจำกัดเหล่านี้จึงมีหลายงานวิจัยที่เกี่ยวกับการห่อหุ้ม (Encapsulation) เคอร์คูมินด้วยพอลิเมอร์ในรูปแบบอนุภาคนาโน (Nanoparticles) เพื่อลดปัญหาข้างต้น

2.7 ดีเอชเอ (Docosahexaenoic acid; DHA) [Horrocks L.A. และ Yeo Y.K. 1999, Narayan B. และคณะ 2006, Thorne Research Monograph 2009]

ดีเอชเอ (DHA) คือ กรดไขมันจำเป็นในกลุ่มโอเมก้า 3 (Omega-3) ซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว และเป็นโครงสร้างพื้นฐานของเซลล์สมองประมาณ 40% และประสาทตาประมาณ 60% นอกจากนี้ DHA ยังเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของฟอสโฟลิพิดซึ่งเป็นส่วนประกอบของเยื่อเซลล์ด้วย ส่วนใหญ่ DHA พบมากในน้ำมันปลาและอาหารทะเล เช่น ปลาทูน่า ปลาแซลมอน เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบในน้ำมันของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมด้วย [Marszalek J.R. และ Lodish H.F. 2005, Stillwell W. และ Wassall S.R. 2003]

โครงสร้าง DHA ประกอบด้วยคาร์บอน 22 อะตอม กับพันธะคู่ที่ตำแหน่ง cis 6 พันธะ โดยพันธะคู่เริ่มที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 นับจากหมู่เมทิล (Methyl group) และมีหมู่คาร์บอกซิลิก (Carboxylic acid) อยู่ที่ปลายสายโซ่อีกด้านหนึ่ง ดังนั้นสูตรโมเลกุลของ DHA คือ 22:6 n-3 แสดงดังรูปที่ 2.17 นอกจากนี้ DHA ยังมีชื่ออื่นๆ อีก ได้แก่ Cervonic acid และ all-cis-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoic acid เป็นต้น



รูปที่ 2.18 โครงสร้างของดีเอชเอ (Docosahexaenoic acid; DHA , 22:6 n-3)
[Narayan B. และคณะ 2006]

โดยทั่วไปน้ำมันปลาไม่ได้มีเฉพาะ DHA เพียงอย่างเดียว แต่มีอีพีเอ (Eicosapentaenoic acid) ซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวอีกชนิดหนึ่งที่พบค่อนข้างมากในน้ำมันปลา สำหรับในร่างกายมนุษย์ DHA ไม่ได้มีที่มาจากอาหารที่รับประทานเท่านั้น แต่ยังสามารถสังเคราะห์ (Biosynthesis) โดยอาศัยเอนไซม์ 2 ชนิด ได้แก่ Desaturase และ Elongase เพื่อเปลี่ยนกรดแอลฟาไลโนเลอิก (α -linolenic acid) ของกรดไขมันโอเมก้า-3 ที่ได้รับจากอาหารให้เป็น EPA (Eicosapentaenoic acid) ซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่จำเป็นต่อร่างกายอีกชนิดหนึ่ง และ DHA ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2.18

สมบัติของ DHA

DHA มีส่วนช่วยในการพัฒนาสมอง ทักษะการเรียนรู้ และการมองเห็นของทารก และเป็นสารสำคัญที่ช่วยในการป้องกันและรักษาโรคหลายชนิด เช่น โรคอัลไซเมอร์ โรคสมองเสื่อม และโรคพาร์กินสัน เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่ามีสมบัติเด่นอีกหลายประการ ซึ่งได้รับความนิยมนำมาใช้ในการงานเภสัชกรรม ดังนี้

1. ต้านการอักเสบ

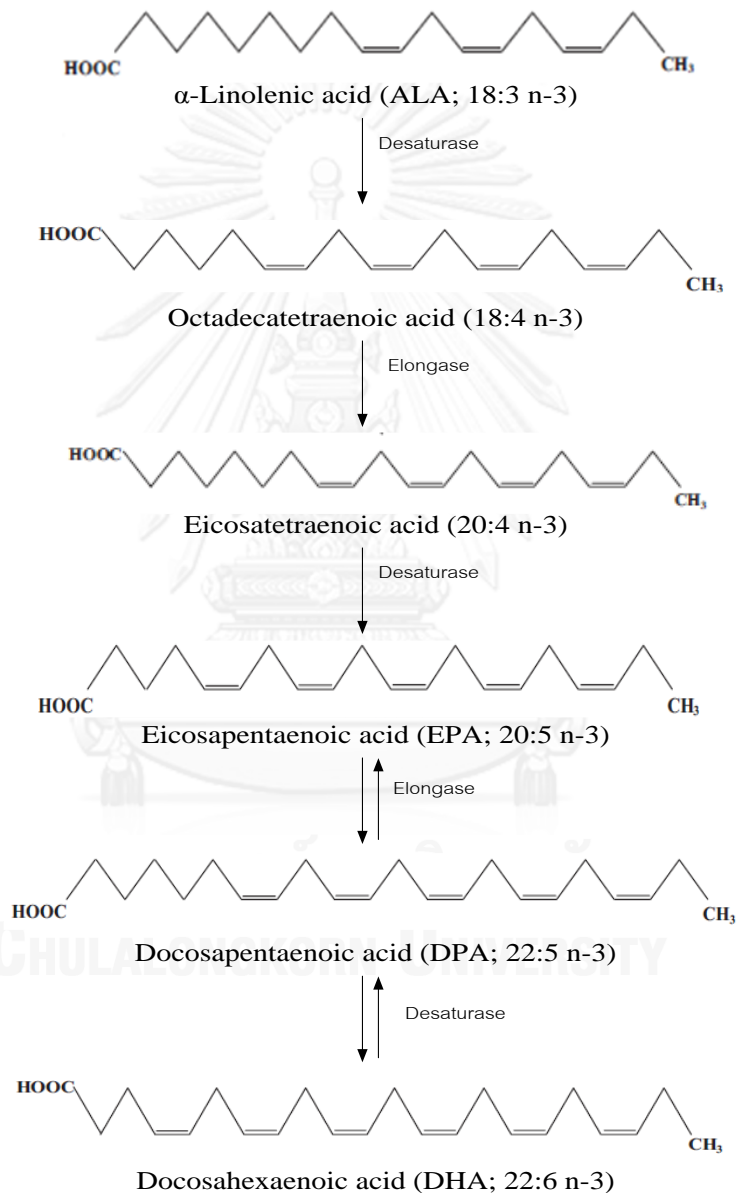
DHA สามารถยับยั้งการแสดงออกของตัวชี้วัดระดับการอักเสบในเลือด (Inflammatory markers) ได้ เช่น Pro-inflammatory cytokines ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบ และ Prostaglandins ซึ่งเป็นสารเคมีที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เป็นต้น

2. ป้องกันโรคหลอดเลือดและหัวใจ

DHA สามารถป้องกันการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจตีบได้ โดย DHA จะช่วยลดความดันเลือด ป้องกันการเกิดความดันโลหิตสูง และป้องกันการแข็งตัวของหลอดเลือด นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่ามี DHA ช่วยเพิ่ม HDL-cholesterol ซึ่งเป็นไขมันดี ช่วยในการป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด [Horrocks L.A. และ Yeo Y.K. 1999]

3. ต้านมะเร็ง

DHA มีบทบาทสำคัญต่อการป้องกันและรักษาโรคมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งตับอ่อน มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ และมะเร็งต่อมลูกหมาก เป็นต้น ซึ่ง DHA จะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง โดยเข้าไปยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมและชักนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง



รูปที่ 2.19 กระบวนการสังเคราะห์ EPA และ DHA จากกรดแอลฟาไลโนเลอิก

[Narayan B. และ คณะ 2006]

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.8.1 การพัฒนาไหมไฟโบรอินและเจลาตินเพื่อใช้ในการควบคุมการปลดปล่อย

Mandal B.B., Mann J.K. และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับฟิล์มผสมระหว่างไหมไฟโบรอินและเจลาตินชนิดเอทีสัดส่วนการผสมต่างๆ กัน และชักนำให้เกิดโครงสร้าง β -sheet โดยแช่ในสารละลายเมทานอล เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยยา โดยเปรียบเทียบระหว่างฟิล์ม 1 ชั้น 3 ชั้น และ 5 ชั้น ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่าพฤติกรรม การควบคุมการปลดปล่อยสารของฟิล์มผสมขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ สัดส่วนการผสมระหว่างไหมไฟโบรอินและเจลาติน จำนวนชั้นของฟิล์ม และอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพ โดยพบว่าเมื่อสัดส่วนของเจลาตินเพิ่มขึ้น สมบัติทางกลของฟิล์มผสมจะลดลงและมีอัตราการย่อยสลายที่เร็ว ส่งผลให้อัตราการปลดปล่อยสารเกิดขึ้นเร็วด้วย แต่เมื่อเพิ่มจำนวนชั้นของฟิล์มจะช่วยให้อัตราการย่อยสลายเกิดช้าลง และมีอัตราการปลดปล่อยสารที่ช้าลงด้วย นอกจากนี้ยังพบว่า การลดสัดส่วนของเจลาตินลง มีผลให้อัตราการย่อยสลายช้าลง และความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยเพิ่มขึ้น จึงกล่าวได้ว่าการผสมกันระหว่างไหมไฟโบรอินและเจลาตินที่สัดส่วนต่างๆ มีผลต่อความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยสาร และเมื่อนำฟิล์มผสมระหว่างไหมไฟโบรอินและเจลาตินไปเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Fibroblast cell) พบว่าเมื่อสัดส่วนของเจลาตินเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดีเมื่อเทียบกับกรณีฟิล์มไหมไฟโบรอินเพียงอย่างเดียว แสดงให้เห็นว่าเจลาตินช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์

Okhawilai M. และคณะ (2010) ได้ศึกษาการเตรียมแผ่นเส้นใยผสมระหว่างไหมไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินชนิดบี ที่สัดส่วนการผสมต่างๆ กัน โดยการปั่นแบบไฟฟ้าสถิตเพื่อประยุกต์ใช้ในการควบคุมการปลดปล่อย จากการศึกษาพบว่าเมื่อเพิ่มความต่างศักย์ที่ใช้ในการปั่นแผ่นเส้นใยผสม เส้นใยผสมที่ได้จะมีขนาดโดยเฉลี่ยลดลงและการกระจายของขนาดเส้นใยลดลง และเมื่อสัดส่วนของไหมไฟโบรอินไหมไทยในแผ่นเส้นใยผสมเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ขนาดโดยเฉลี่ยของเส้นใยเพิ่มขึ้น นอกจากนี้เมื่อนำแผ่นเส้นใยผสมไปทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพในสารละลายคอลลาจีเนส พบว่าแผ่นเส้นใยที่มีสัดส่วนของเจลาตินเป็นองค์ประกอบอยู่สูงจะมีอัตราการย่อยสลายที่ค่อนข้างเร็ว เนื่องจากเจลาตินมีโครงสร้างเหมือนกับคอลลาเจน ดังนั้นจึงถูกย่อยสลายได้ง่ายด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนส และเมื่อนำแผ่นเส้นใยผสมไปทดสอบการควบคุมการปลดปล่อย พบว่าสารประกอบที่มีประจุเหมือนกับแผ่นเส้นใยผสมไหมไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินชนิดบี (เมทิลีนบลู) จะเกิดแรงผลักกันทางไฟฟ้า ทำให้มีอัตราการปลดปล่อยค่อนข้างเร็วในช่วง 72 ชม. ในทางตรงกันข้ามเมื่อสารประกอบ (เอโซเคซิน) และแผ่นเส้นใยผสมมีประจุตรงข้ามกัน จะเกิดแรงดึงดูดทางไฟฟ้าขึ้น ส่งผลให้เกิดการควบคุมการปลดปล่อยอย่างช้าๆ โดยพบว่าแผ่นเส้นใยผสมที่มีสัดส่วนของไหมไฟโบรอินไหมไทยเป็นองค์ประกอบอยู่สูง จะมีอัตราการปลดปล่อยช้ากว่าในกรณีที่มีสัดส่วนของไหมไฟโบรอินไหมไทยเป็น

องค์ประกอบอยู่น้อย ทั้งนี้ความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยขึ้นอยู่กับอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพของแผ่นเส้นใยผสมด้วย

Jetbumpenkul P. และคณะ (2012) ได้ทำการขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ผสมระหว่างชีววัสดุ 2 ชนิด ที่มีประจุตรงข้ามกัน ได้แก่ โฟโบรินไหมไทยและเจลาตินชนิดเอทีสัดส่วนการผสมต่างๆ กัน ซึ่งชีววัสดุทั้ง 2 ชนิดอยู่ร่วมกันโดยการผสมระหว่างแรงทางไฟฟ้าสถิต (Electrostatic blending) โดยได้เปรียบเทียบสมบัติของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้กับโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยเทคนิค EDC/NHS จากการศึกษาพบว่า โครงเลี้ยงเซลล์ทั้งกรณีที่ผ่านการเชื่อมขวางและไม่ผ่านการเชื่อมขวาง มีโครงสร้างของรูพรุนที่สม่ำเสมอ และที่น่าสนใจคือ โครงเลี้ยงเซลล์ที่สัดส่วนการผสมระหว่างโฟโบรินไหมไทยและเจลาติน 50/50 มีสมบัติใกล้เคียงกับโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมขวางมากที่สุด กล่าวคือ มีค่าร้อยละโดยน้ำหนักที่หายไปน้อยที่สุด และมีความสามารถในการทนแรงกดได้ดี เนื่องจากความสมดุลของแรงดึงดูดระหว่างประจุของโฟโบรินไหมไทยและเจลาตินนั่นเอง สำหรับการทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพของโครงเลี้ยงเซลล์ในเอนไซม์คอลลาจีเนสพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ผ่านการเชื่อมขวางและม็องค์ประกอบของเจลาตินในสัดส่วนที่สูงกว่า จะมีอัตราการย่อยสลายที่ค่อนข้างเร็ว และเมื่อนำไปเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูวิสตา พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการเชื่อมขวางมีการเจริญเติบโตของเซลล์น้อยกว่ากรณีโครงเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเชื่อมขวาง เนื่องจากโครงเลี้ยงของโฟโบรินไหมไทยและเจลาตินที่ไม่ได้ผ่านการเชื่อมขวางจะอยู่ร่วมกันด้วยแรงดึงดูดทางประจุ ซึ่งเป็นแรงที่อ่อนกว่าพันธะเคมีที่เกิดจากการเชื่อมขวางด้วยเทคนิค EDC/NHS ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า โครงเลี้ยงเซลล์ที่ทำจากวัสดุ 2 ชนิด ที่มีประจุตรงข้ามกันและมีการผสมกันในอัตราส่วนที่สมดุล จะก่อให้เกิดแรงดึงดูดระหว่างประจุที่เหมาะสม ซึ่งถือเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการขึ้นรูปเพื่อหลีกเลี่ยงกระบวนการเชื่อมขวางที่ใช้สารเคมี

Srisuwan Y. และคณะ (2012) ได้ขึ้นรูปฟิล์มผสมระหว่างโฟโบรินจากรังไหมสายพันธุ์อีรี (Eri) และเจลาตินที่สัดส่วนการผสมต่างๆ เพื่อประยุกต์ใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยยาที่มีสมบัติชอบน้ำ จากการศึกษาพบว่าคลอเฮกซิดีน (Chlorhexidine) ถูกปลดปล่อยออกมาทันทีที่เวลา 30 นาทีแรก ภายใต้สารละลาย PBS, pH 7.4 ซึ่งเป็นผลมาจากยาที่เกาะอยู่บนผิวของฟิล์ม จากนั้นคลอเฮกซิดีนถูกปลดปล่อยออกมาอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยฟิล์มผสมที่มีสัดส่วนของเจลาตินเป็นองค์ประกอบอยู่สูงมีอัตราการปลดปล่อยค่อนข้างช้า เมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มผสมที่มีสัดส่วนของโฟโบรินเป็นองค์ประกอบสูง ทั้งนี้เนื่องจากคลอเฮกซิดีนเป็นยาที่มีสมบัติชอบน้ำ ประกอบกับเจลาตินเป็นโปรตีนที่มีความชอบน้ำ ส่งผลให้อันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างโมเลกุลของคลอเฮกซิดีนและเจลาตินมีความแข็งแรงมากกว่าโฟโบริน ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าอัตราการปลดปล่อยยาขึ้นอยู่กับสมบัติของระบบนำส่งและประเภทของยา

Wongpanit P. และ Rujiravanit R. (2012) ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของลักษณะประจุของฟิล์มไหมไฟโบรอินต่อพฤติกรรมการดูดซับและการปลดปล่อยสีย้อม โดยเปรียบเทียบระหว่างฟิล์มที่ผ่านการแช่ในสารละลายเมทานอล และฟิล์มที่ผ่านกระบวนการอบด้วยน้ำที่อุณหภูมิสูง (Water annealed) นอกจากนี้ได้ทำการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของสารละลายที่ใช้ในการดูดซับและปลดปล่อย ตลอดจนชนิดของประจุสีย้อมด้วย พบว่าฟิล์มที่ผ่านการแช่ในสารละลายเมทานอลจะมีความไม่ชอบน้ำสูงกว่ากรณีฟิล์มที่ผ่านกระบวนการอบด้วยน้ำที่อุณหภูมิสูง ซึ่งเป็นผลมาจากโครงสร้าง β -sheet ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการแช่ในสารละลายเมทานอล ดังนั้นฟิล์มที่ได้จึงมีความสามารถในการดูดซับโมเลกุลของสีย้อมที่มีความไม่ชอบน้ำได้ดี และพบว่าชนิดประจุของโปรตีนขึ้นอยู่กับค่าพีเอชของสารละลายด้วย กล่าวคือ เมื่อโปรตีนอยู่ในสารละลายที่มีค่าพีเอชน้อยกว่าค่า pI ของโปรตีน โปรตีนจะแสดงประจุบวก แต่ถ้าโปรตีนอยู่ในสารละลายที่มีค่าพีเอชมากกว่าค่า pI ของโปรตีน โปรตีนจะแสดงประจุลบ ดังนั้นสีย้อมและฟิล์มไหมไฟโบรอินที่มีประจุตรงข้ามกันย่อมมีอันตรกิริยา (Interaction) ระหว่างกันค่อนข้างสูง ส่งผลให้ค่าการดูดซับเพิ่มขึ้นและค่าการปลดปล่อยลดลง

Elakkiya T. และคณะ (2013) ได้ขึ้นรูปแผ่นเส้นใยผสมระหว่างไฟโบรอินและเคอร์คูมินด้วยกระบวนการปั่นแบบไฟฟ้าสถิต เพื่อประยุกต์ใช้ในการควบคุมการปลดปล่อย จากการศึกษาพบว่าแผ่นเส้นใยไฟโบรอินมีประสิทธิภาพในการกักเก็บ (Entrapment efficiency) เคอร์คูมินมากกว่า 80% และเมื่อศึกษาความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยภายใต้สารละลาย PBS, pH 7.4 ที่ประกอบด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ความเข้มข้น 10% โดยปริมาตร พบว่าที่เวลาเริ่มต้นเคอร์คูมินถูกปลดปล่อยออกจากแผ่นเส้นใยไฟโบรอินอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเคอร์คูมินที่เกาะอยู่ที่ผิวของแผ่นเส้นใย หลังจากนั้นอัตราการปลดปล่อยเคอร์คูมินเกิดขึ้นอย่างช้าๆ และต่อเนื่อง (Sustain release) แสดงให้เห็นว่าแผ่นเส้นใยไฟโบรอินมีความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินได้ดี

Ratanavaraporn J. และคณะ (2013) ได้ขึ้นรูปอนุภาคกลมขนาดไมครอนผสมระหว่างไฟโบรอิน/เจลาตินที่อัตราส่วนการผสมต่างๆ โดยใช้เทคนิคการขึ้นรูปแบบอิมัลชันน้ำในน้ำมัน (Water in oil) และผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตาร์ลดีไฮด์ เพื่อประยุกต์ใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมิน (Curcumin) และ/หรือ ไพเพอรีน (Piperine) จากการศึกษาพบว่าอนุภาคกลมขนาดไมครอนของเจลาตินมีค่าร้อยละการเชื่อมขวางน้อยที่สุดประมาณ 20 และอนุภาคกลมขนาดไมครอนผสมระหว่างไฟโบรอิน/เจลาตินที่สัดส่วนผสมโดยน้ำหนัก 30/70 และ 50/50 มีร้อยละการเชื่อมขวางประมาณ 45-55 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคกลมขนาดไมครอนของเจลาติน ทั้งนี้เนื่องจากความหนาแน่นของหมู่อะมิโนอิสระที่มากเกินไปของอนุภาค

กลมขนาดไมครอนของเจลาตินอาจเป็นอุปสรรคต่อการเชื่อมขวางจึงทำให้มีค่าร้อยละการเชื่อมขวางน้อยที่สุด ส่งผลให้อนุภาคกลมขนาดไมครอนของเจลาตินถูกย่อยสลายหมดในสารละลายคอลลาจีเนสภายในระยะเวลา 14 วัน ในขณะที่อนุภาคกลมขนาดไมครอนผสมระหว่างไฟโบรอิน/เจลาตินที่สัดส่วนผสมโดยน้ำหนัก 30/70 และ 50/50 ไม่ย่อยสลายภายในระยะเวลา 14 วัน สำหรับการทดสอบความสามารถในการดูดซับ พบว่าอนุภาคกลมขนาดไมครอนผสมที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินเป็นองค์ประกอบอยู่สูง สามารถดูดซับเคอร์คูมินและไฟเพอรินได้สูงด้วยอันตรกิริยาความไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic interaction) และเมื่อนำไปทดสอบการควบคุมการปลดปล่อย พบว่าอนุภาคกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอิน/เจลาตินมีความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินและไฟเพอรินได้อย่างต่อเนื่อง (sustained release) และสำหรับการควบคุมการปลดปล่อยร่วมกันระหว่างเคอร์คูมินและไฟเพอริน พบว่าอนุภาคกลมขนาดไมครอนสามารถชะลอการปลดปล่อยเคอร์คูมินได้มากกว่าไฟเพอริน เนื่องจากอันตรกิริยาระหว่างอนุภาคกลมขนาดไมครอนและเคอร์คูมินมีความแข็งแรงมากกว่าไฟเพอริน

Somvipart S. และคณะ (2013) ได้ศึกษาการเตรียมแผ่นเส้นใยที่มีปิดบนเส้นใยผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินชนิดปีทีสัดส่วนการผสมต่างๆ ด้วยกระบวนการปั่นแบบไฟฟ้าสถิต เพื่อประยุกต์ใช้ในการควบคุมการปลดปล่อย จากการศึกษาความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยเมทิลีนบลูจากแผ่นเส้นใย โดยเปรียบเทียบระหว่างแผ่นเส้นใยที่มีปิดบนเส้นใยกับแผ่นเส้นใยที่ไม่มีปิดบนเส้นใย พบว่าแผ่นเส้นใยที่มีปิดบนเส้นใยมีความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยเมทิลีนบลูได้ดีกว่าแผ่นเส้นใยที่ไม่มีปิดบนเส้นใย แสดงให้เห็นว่าเม็ดปิดสามารถดูดซับเมทิลีนบลูไว้ในเม็ดปิดได้ส่งผลให้เกิดการควบคุมการปลดปล่อยอย่างช้าๆ นอกจากนี้จะเป็นผลมาจากการสลายตัวของชีวภาพของเม็ดปิดที่ช้ากว่าส่วนของเส้นใย ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าแผ่นเส้นใยที่มีปิดเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมการปลดปล่อย

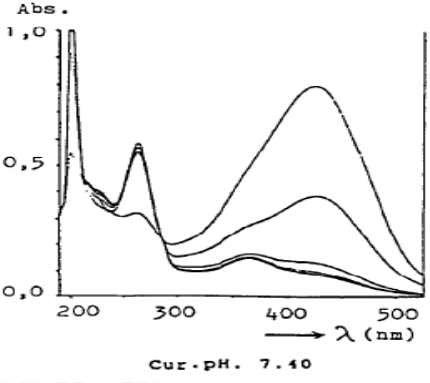
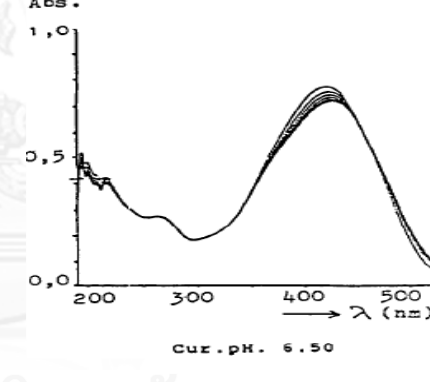
2.8.2 การพัฒนาระบบนำส่งเคอร์คูมิน

จากที่กล่าวไว้ข้างต้นว่าเคอร์คูมินมีความเสถียรค่อนข้างต่ำ ซึ่งเป็นข้อจำกัดของการนำไปประยุกต์ใช้งาน ดังนั้นจึงมีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับเรื่องความเสถียรของเคอร์คูมิน ดังแสดงในตารางที่ 2.6

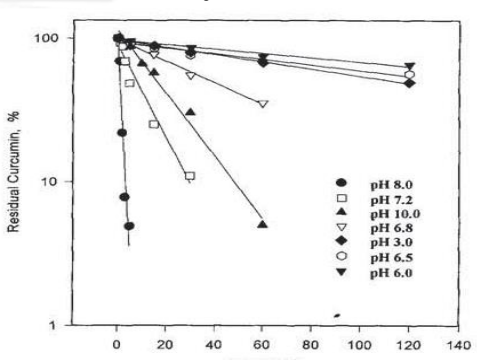
ตารางที่ 2.6 งานวิจัยที่รายงานเกี่ยวกับความเสถียรของเคอร์คูมิน

ปี	ผู้วิจัย	วิธีการศึกษา	ผลการศึกษา/สรุปผลการศึกษา
1996	Oetari S. และคณะ	<p>1. เตรียมสารละลาย เคอร์คูมินใน PBS, pH 7.4 และ pH 6.5 ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 25 ไมโครโมลาร์</p> <p>2. เตรียมสารละลาย เคอร์คูมินในบัฟเฟอร์ pH 7.4 ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 25 ไมโครโมลาร์ และเติมกลูตาไธโอน (ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์) กรดแอสคอร์บิก (ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์) ไมโครโซมของตับหนู (0.03 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรโปรตีน) หรือไซโตซอลของตับหนู (0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรโปรตีน) และ N-acetyl L-cysteine (ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์)</p> <p>3. นำสารละลาย เคอร์คูมินในข้อ 1 และ 2 ไปสแกนหาค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ความยาวคลื่น 200-600 นาโนเมตร ทุกๆ 5 นาที</p>	<p>1. เคอร์คูมินในสารละลาย PBS, pH 7.4 (รูปที่ 2.19 ก) มีการสลายตัวอย่างรวดเร็ว โดยพบว่าหลังจากผ่านไป 5 นาที ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 426 นาโนเมตร มีค่าลดลงประมาณ 50% และหลังจากผ่านไป 10 นาที ค่าการดูดกลืนแสงเหลืออยู่เพียงแค่ 10% นอกจากนี้ยังมีค่าการดูดกลืนแสงใหม่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 210 และ 262 นาโนเมตร</p> <p>2. สำหรับเคอร์คูมินในสารละลาย PBS, pH 6.5 (รูปที่ 2.19 ข) พบว่าหลังจากผ่านไป 30 นาที ค่าการดูดกลืนแสงมีค่าไม่เปลี่ยนแปลง แสดงให้เห็นว่าในสภาวะที่เป็นกรด เคอร์คูมินมีความเสถียรเพิ่มขึ้น</p> <p>3. สารละลาย PBS, pH 7.4 ที่มีการเติมกลูตาไธโอน กรดแอสคอร์บิก ไมโครโซมของตับหนูหรือไซโตซอลของตับหนู และ N-acetyl L-cysteine ช่วยทำให้เคอร์คูมินมีความเสถียรมากขึ้น</p> <p>สรุปผลการศึกษา ความเสถียรของเคอร์คูมินในสารละลายจะมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อสารละลายมีสภาวะเป็นกรด หรือมีการเติมสารประเภท Thiol (สารที่มีหมู่ -SH เป็นองค์ประกอบ) หรือ Non-thiol ที่ประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระลงไป</p>

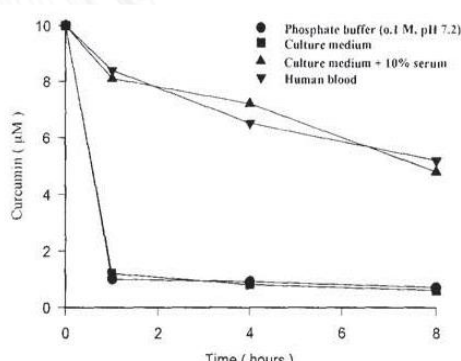
ตารางที่ 2.6 (ต่อ) งานวิจัยที่รายงานเกี่ยวกับความเสถียรของเคอร์คูมิน

ปี	ผู้วิจัย	วิธีการศึกษา	ผลการศึกษา/สรุปผลการศึกษา
			<p>ก)</p>  <p>ข)</p>  <p>รูปที่ 2.20 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเคอร์คูมินความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ ก) ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.4 ข) ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.5</p>
1997	Wang Y.J. และคณะ	1. เตรียมสารละลายเคอร์คูมินความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ในตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่	1. เคอร์คูมินในสารละลาย PBS ที่ค่า pH เป็นกลางและเบส (รูปที่ 2.20) มีการสลายตัวอย่างรวดเร็ว และสลายตัวมากกว่า 90% เนื่องจากที่สภาวะนี้มีการสูญเสียโปรตอนจาก

ตารางที่ 2.6 (ต่อ) งานวิจัยที่รายงานเกี่ยวกับความเสถียรของเคอร์คูมิน

ปี	ผู้วิจัย	วิธีการศึกษา	ผลการศึกษา/สรุปผลการศึกษา
		<p>1) สารละลาย PBS ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ค่า pH ต่างๆ</p> <p>2) อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยซีรัม 10%</p> <p>3) อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมเป็นองค์ประกอบ</p> <p>4) เลือดมนุษย์ (Blood human)</p> <p>2. นำสารละลายเคอร์คูมินในตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 37°C</p> <p>5. หาปริมาณเคอร์คูมินที่มีอยู่ตามช่วงเวลาที่กำหนด โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC</p>	<p>กลุ่มฟีนอลิก (Phenolic group) ส่งผลให้โครงสร้างของเคอร์คูมินถูกทำลาย</p> <p>2. เคอร์คูมินมีความเสถียรเพิ่มขึ้น เมื่อสารละลายบัฟเฟอร์มีค่า pH เป็นกรด เนื่องจากเกิดการคอนจูเกตในโครงสร้างไดอีน (diene) ของเคอร์คูมิน</p>  <p>รูปที่ 2.21 ร้อยละของเคอร์คูมินที่เหลืออยู่ในสารละลาย PBS ที่ค่า pH ต่างๆ หลังจากให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 120 นาที</p> <p>3. เคอร์คูมินในสารละลาย PBS, pH 7.2 และในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมเป็นองค์ประกอบ มีการสลายตัวอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลา 1 ชั่วโมง</p> <p>4. เคอร์คูมินในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยซีรัม 10% และในเลือดมนุษย์มีการสลายตัวน้อยกว่า 20% ภายในเวลา 1 ชั่วโมง และเมื่อเวลาผ่านไป 8 ชั่วโมง ยังคงมีเคอร์คูมินเหลืออยู่มากกว่า 50%</p>

ตารางที่ 2.6 (ต่อ) งานวิจัยที่รายงานเกี่ยวกับความเสถียรของเคอร์คูมิน

ปี	ผู้วิจัย	วิธีการศึกษา	ผลการศึกษา/สรุปผลการศึกษา
			<p>สรุปผลการศึกษา</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. การสลายตัวของเคอร์คูมินเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อสารละลายมีค่า pH เป็นกลางและเบส 2. สารละลายเคอร์คูมินในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยซีรัม 10% และในเลือดมนุษย์มีการสลายตัวลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับเคอร์คูมินในสารละลาย PBS, pH 7.2 และในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมเป็นองค์ประกอบ  <p>รูปที่ 2.22 ความเข้มข้นของเคอร์คูมินในสารละลายต่างๆ หลังจากให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง</p>

จากรายงานเรื่องความไม่เสถียรของเคอร์คูมินทำให้มีการพัฒนาระบบนำส่งเคอร์คูมินขึ้นมา เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว

Mohanty C. และคณะ (2010) ได้พัฒนาระบบนำส่งเคอร์คูมินโดยการกักเก็บเคอร์คูมินไว้ภายในอนุภาคกลมขนาดนาโนของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (Polyvinyl alcohol; PVA) จากการศึกษพบว่าเคอร์คูมินอิสระมีการสลายตัวอย่างรวดเร็วภายใต้สารละลาย PBS, pH 7.4 โดยหลังจากผ่านไป 6 ชั่วโมง มีเคอร์คูมินเหลืออยู่เพียง 6% แต่สำหรับกรณีเคอร์คูมินที่ถูกกักเก็บไว้

ภายในอนุภาค PVA ค่อนข้างมีความเสถียรภายใต้สภาวะเดียวกัน โดยมีเคอร์คูมินเหลืออยู่ประมาณ 90% เนื่องจาก PVA ช่วยป้องกันไม่ให้เคอร์คูมินถูกไฮโดรไลซิสโดยสารละลาย PBS และเมื่อนำไปทดสอบสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetics) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มแรก คือ ฉีดอนุภาคกลมขนาดนาโนของ PVA ที่กักเก็บเคอร์คูมินไว้เข้าไปที่บริเวณเส้นเลือดดำของหนูสายพันธุ์ BALB/c และกลุ่มที่สอง คือ ฉีดเคอร์คูมินอิสระเข้าไปที่บริเวณเส้นเลือดดำของหนู จากนั้นเก็บเลือดหนูเพื่อนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของเคอร์คูมินในซีรัมด้วยเทคนิค HPLC โดยหลังจากผ่านไป 1 ชั่วโมง พบว่าหนูที่ถูกฉีดอนุภาคกลมขนาดนาโนของ PVA เข้าไปที่เส้นเลือดดำมีปริมาณเคอร์คูมินอยู่ในซีรัม 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แต่สำหรับกรณีหนูที่ถูกฉีดเคอร์คูมินอิสระมีปริมาณเคอร์คูมินอยู่ในซีรัมเพียง 0.02 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอนุภาคกลมขนาดนาโนของ PVA ช่วยทำให้สมบัติทางชีวปริมาณการออกฤทธิ์ (Bioavailability) ของเคอร์คูมินเพิ่มขึ้น

Manju S. และคณะ (2011) ได้พัฒนาระบบนำส่งเคอร์คูมินโดยการคอนจูเกตเคอร์คูมินกับกรดไฮยาลูรอนิก (Hyaluronic acid) จากการศึกษาพบว่าเคอร์คูมินที่คอนจูเกตกับกรดไฮยาลูรอนิกมีการสลายตัวค่อนข้างน้อยภายใต้สภาวะของสารละลาย PBS, pH 7.4 เมื่อเปรียบเทียบกับเคอร์คูมินอิสระ เนื่องจากเคอร์คูมินและกรดไฮยาลูรอนิกมีการจัดเรียงตัวอยู่ในรูปของไมเซลล์ โดยกักเก็บเคอร์คูมินไว้ภายในแกนกลาง (Core) และเมื่อนำไปทดสอบกับเซลล์ผิวหนังของหนู (เซลล์ L929) พบว่าเคอร์คูมินที่คอนจูเกตกับกรดไฮยาลูรอนิกสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ L929 ได้เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเคอร์คูมินอิสระ เนื่องจากเคอร์คูมินสามารถละลายน้ำได้เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เซลล์สามารถดูดซึมเคอร์คูมินได้มากขึ้น ดังนั้นประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์จึงเพิ่มขึ้น

Liu L. และคณะ (2013) ได้ศึกษาการพัฒนาการพัฒนาระบบนำส่งเคอร์คูมินแบบไมเซลล์ เพื่อปรับปรุงสมบัติด้านการละลายน้ำของเคอร์คูมิน และเพิ่มระยะเวลาของเคอร์คูมินในการหมุนเวียนอยู่ในระบบไหลเวียนเลือด โพลีเมอร์ที่ใช้ คือ Monomethyl poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) copolymer (MPEG-PCL) โดยขึ้นรูปด้วยวิธี Solid dispersion ซึ่งเป็นวิธีการกระจายตัวยาในพอลิเมอร์ที่ละลายน้ำได้ จากการศึกษาพบว่าอนุภาคของเคอร์คูมินไมเซลล์ที่เตรียมได้มีขนาดประมาณ 28.2 นาโนเมตร และมีร้อยละของการบรรจุยา (Drug loading) และร้อยละของประสิทธิภาพการกักเก็บยา (Encapsulation efficiency) เท่ากับ 14.84 และ 98.91 ตามลำดับ และเมื่อทดสอบความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อย พบว่าเคอร์คูมินไมเซลล์มีพฤติกรรมการปลดปล่อยแบบ sustained release กล่าวคือมีการปลดปล่อยเคอร์คูมินออกมาอย่างช้าๆ และต่อเนื่อง และเมื่อนำเคอร์คูมินไมเซลล์ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด 4T1 ในระดับห้องปฏิบัติการ (*In vitro*) พบว่าเคอร์คูมินไมเซลล์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ

เซลล์มะเร็งเต้านมได้โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้น ถ้าความเข้มข้นของเคอร์คูมินไมเซลล์มาก ประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมจะเพิ่มขึ้นตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อนำเคอร์คูมินไมเซลล์ไปทดสอบในระดับสัตว์ทดลอง (*In vivo*) โดยการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งตับจำนวน 5×10^5 เซลล์ ลงในหนูชนิดไมซ์เพศผู้อายุ 7-8 สัปดาห์ เมื่อเห็นขนาดของก้อนมะเร็งชัดเจนในวันที่ 4 จึงทำการแบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ฉีดน้ำเกลือ 100 ไมโครลิตร เข้าเส้นเลือดดำของหนูทุกวันเป็นระยะเวลา 10 วัน กลุ่มที่ 2 ฉีดไมเซลล์ที่ไม่ได้บรรจุเคอร์คูมิน 100 ไมโครลิตร กลุ่มที่ 3 ฉีดเคอร์คูมินอิสระ 30 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของน้ำหนักหนู และกลุ่มที่ 4 ฉีดเคอร์คูมินไมเซลล์ 30 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของน้ำหนักหนู จากการศึกษาพบว่าหนูที่ได้รับการฉีดด้วยเคอร์คูมินไมเซลล์ ก้อนมะเร็งมีขนาดลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น และมีการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ (Apoptosis) นอกจากนี้ยังพบว่าเคอร์คูมินไมเซลล์สามารถลดการเกิดหลอดเลือดใหม่ที่ไปเลี้ยงเซลล์มะเร็ง และยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านมไปยังปอดได้ เนื่องจากอนุภาคของเคอร์คูมินไมเซลล์มีขนาดเล็กระดับนาโน ส่งผลให้ความสามารถในการซึมผ่านเข้าสู่เซลล์เพิ่มขึ้น ประกอบกับระยะเวลาในการหมุนเวียนอยู่ในระบบไหลเวียนเลือดเพิ่มขึ้น จึงส่งผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเพิ่มขึ้น ดังนั้นเคอร์คูมินไมเซลล์จึงนับเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง

มาริสา วาริชีนสุข (2553) ได้ศึกษาการพัฒนาาระบบนำส่งเคอร์คูมินแบบไมเซลล์ ด้วยการนำเจลาตินมาคอนจูเกตกับคอเลสเตอรอล ทำให้เจลาตินมีโครงสร้างแบบแอมฟิฟิลิก (Amphiphilic) และก่อตัวเป็นไมเซลล์ที่สามารถบรรจุเคอร์คูมินอยู่ในแกนกลางได้ จากการศึกษาพบว่า ความชอบน้ำของเจลาตินมีค่าลดลง เมื่อเพิ่มปริมาณคอเลสเตอรอล และเมื่อนำไมเซลล์มาบรรจุเคอร์คูมินและนำไปบ่มในพลาสมาของร่างกาย พบว่าไมเซลล์ที่ผลิตขึ้นจากเจลาตินดัดแปลงนี้สามารถปกป้องเคอร์คูมินจากกระบวนการเมตาบอลิซึมในร่างกายได้ และมีลักษณะการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินอย่างช้าๆ และเมื่อนำเคอร์คูมินไมเซลล์มาทดสอบประสิทธิภาพที่มีผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าเคอร์คูมินไมเซลล์ที่ความเข้มข้นของเคอร์คูมิน 150 ไมโครโมลลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับ ที่ความหนาแน่น 1.04×10^4 เซลล์/ตารางเซนติเมตร ในเวลา 48 ชั่วโมงได้

2.8.3 การใช้เคอร์คูมิน ดีเอชเอ และเคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอในการรักษาโรคต่างๆ

1) เคอร์คูมิน

Choudhuri T. และคณะ (2002) ทำการศึกษาผลของเคอร์คูมินต่อการชักนำให้เกิดการตาย (Apoptosis) ของเซลล์มะเร็งเต้านมในระดับห้องปฏิบัติการ (*In vitro*) โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์บน Coverslips และทำการเพาะเลี้ยงด้วยเคอร์คูมินที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้น

วิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยวิธี Western Blot พบว่าเคอร์คูมินที่ความเข้มข้น 10 μM สามารถเพิ่มระดับของยีน p53 (ยีนที่มีความสำคัญในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง) ได้ ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นการแสดงออกของ Bax (ยีนที่กระตุ้นการเกิด Apoptosis) จึงส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง ส่วนการแสดงออกของระดับ Bcl-xL ซึ่งเป็นยีนที่ต้านการเกิด Apoptosis ยังคงไม่มีการเปลี่ยนแปลง และพบว่าสัดส่วนของ Bcl-xL/Bax เปลี่ยนไปเข้าใกล้ Apoptosis มากขึ้น จึงกล่าวได้ว่าเคอร์คูมินสามารถต้านการเกิดมะเร็งได้ โดยชักนำให้เกิด Apoptosis

Jing Z. และคณะ (2007) ได้ศึกษาผลของเคอร์คูมินต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ส่วน ได้แก่ การทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ (*In vitro*) โดยเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกจำนวน 1×10^5 เซลล์/หลุม ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงด้วยสารละลายเคอร์คูมินความเข้มข้น 5, 10, 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากการศึกษาพบว่าเคอร์คูมินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกและชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ (Apoptosis) โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้น (Dose-dependent) และเวลาในการเพาะเลี้ยง (Time-dependent) กล่าวคือเมื่อความเข้มข้นของเคอร์คูมินและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งก็จะเพิ่มขึ้น และส่วนที่สอง คือ การทดลองในสัตว์ทดลอง (*In vivo*) โดยปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกจำนวน 1×10^7 เซลล์ ลงในหนูเพศเมียสายพันธุ์ BALA/c อายุ 8 สัปดาห์ บริเวณกลางหลัง (Mid-dorsal) และเมื่อก่อนมะเร็งมีขนาดประมาณ 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร จึงทำการฉีดเคอร์คูมินความเข้มข้น 250 ไมโครโมล/ลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เข้าที่บริเวณช่องท้องของหนูวันละครั้งเป็นเวลา 10 วัน จากการศึกษาพบว่าเคอร์คูมินสามารถลดขนาดของก้อนมะเร็งและยับยั้งอัตราการเกิดมะเร็งได้ประมาณ 74% เนื่องจากเคอร์คูมินช่วยเพิ่มระดับโปรตีนชนิด Bax และ Caspase-3 ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ แสดงให้เห็นว่าเคอร์คูมินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและระดับสัตว์ทดลอง

Singh M. และคณะ (2009) ได้ศึกษาผลของเคอร์คูมินต่อการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ (Apoptosis) มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa, SiHa และ Caski โดยเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกจำนวน 1×10^4 เซลล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเพาะเลี้ยงด้วยสารละลายเคอร์คูมินความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครโมล/ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเคอร์คูมินสามารถชักนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ โดยเคอร์คูมินจะไปเพิ่มระดับยีนที่กระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง (Bax) ประกอบกับไปลดระดับยีนที่ต้านการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ (Bcl-2 และ

Bcl-XL) นอกจากนี้เคอร์คูมินยังไปลดระดับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (COX-2 และ iNOS) อีกด้วย

Xu F. และคณะ (2009) ได้ศึกษาผลของเคอร์คูมินต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki โดยเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกจำนวน 1×10^5 เซลล์/หลุม ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเพาะเลี้ยงด้วยสารละลายเคอร์คูมินความเข้มข้น 10, 25 และ 50 ไมโครโมล/ลิตร เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากการศึกษาพบว่าเคอร์คูมินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ โดยเมื่อความเข้มข้นของเคอร์คูมินและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งก็จะเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าเคอร์คูมินช่วยลดระดับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (MMP-2 และ MT1-MMP) และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (NF- κ B) ได้อีกด้วย

พรพรหม ย่อยสูงเนิน และสุทธิลักษณ์ ปทุมราช (2549) ได้ศึกษาผลของเคอร์คูมินต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่ในหนูชนิดไมซ์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 โดย 1 วันหลังการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งมีการให้เคอร์คูมินแก่สัตว์ทดลองทางปากขนาด 300 และ 3,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของน้ำหนักหนู เป็นเวลา 3, 7 และ 14 วัน โดยพบว่าเคอร์คูมินสามารถลดความหนาแน่นของการเกิดหลอดเลือดใหม่และลดขนาดของก้อนมะเร็งลงได้ นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarkers) ได้แก่ COX-2 และ VEGF ซึ่งทั้ง 2 ชนิดเป็นเอนไซม์ที่ทำงานเมื่อมีการอักเสบบริเวณต่างๆ ของร่างกาย พบว่าเคอร์คูมินสามารถลดระดับของ COX-2 และ VEGF ลงได้ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าเคอร์คูมินสามารถลดขนาดของก้อนมะเร็งลงได้ ตลอดจนมีฤทธิ์ต้านการเกิดหลอดเลือดใหม่และลดระดับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบด้วย

2) ดีเอสเอ

Hardman W.E. (2002) ได้ศึกษาผลของน้ำมันปลาที่มีต่อเซลล์มะเร็งเต้านมในสัตว์ทดลอง (*In vivo*) โดยการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งเต้านมในหนูชนิดไมซ์และควบคุมการให้อาหาร จากการศึกษาพบว่ากลุ่มที่ควบคุมการให้อาหารที่ประกอบด้วยน้ำมันปลา ก้อนมะเร็งมีขนาดลดลงอย่างชัดเจน และไม่แพร่กระจายไปยังบริเวณอื่นของร่างกาย เนื่องจากน้ำมันปลาจะไปลดระดับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและยีนที่ต้านการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ ประกอบกับลดการเกิดหลอดเลือดใหม่ที่จะไปเลี้ยงเซลล์มะเร็ง จึงกล่าวได้ว่าน้ำมันปลามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

Wu M. และคณะ (2005) ได้ศึกษาผลของน้ำมันปลาต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ การทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ (*In vitro*) โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านมจำนวน 1×10^4 เซลล์/หลุม ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเพาะเลี้ยงด้วยสารละลายดีเอชเอความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากการศึกษาพบว่าดีเอชเอสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมได้ โดยเมื่อความเข้มข้นของดีเอชเอเพิ่มขึ้น ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตก็จะเพิ่มขึ้น (Dose-dependent) สำหรับส่วนที่สอง คือ การทดลองในสัตว์ทดลอง (*In vivo*) โดยทำการควบคุมอาหารของหนูชนิดไมซ์เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ซึ่งแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ Corn oil diet, Corn oil+fish oil diet และ Fish oil diet จากนั้นทำการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งเต้านมจำนวน 1×10^6 เซลล์ โดยการฉีดเซลล์มะเร็งบริเวณชั้นใต้ผิวหนังที่ด้านหลังของหนู และทำการควบคุมอาหารต่อไปอีกเป็นเวลา 3 สัปดาห์ จากการศึกษาพบว่า Fish oil diet สามารถลดขนาดของก้อนมะเร็งลงได้อย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับกรณี Corn oil diet และ Corn oil+Fish oil diet เนื่องจาก Fish oil จะไปเพิ่มกิจกรรม (Activity) ของ Sphingomyelinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์สฟิงโกไมอีลิน (Sphingomyelin; ฟอสโฟลิพิดชนิดหนึ่ง) ให้กลายเป็นเซราไมด์ (Ceramide; สารที่พบบริเวณชั้นผิวหนัง) ซึ่งเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ ประกอบกับ Fish oil ไปเพิ่มระดับของยีน p21 ที่มีหน้าที่ในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง

Taguchi A. และคณะ (2014) ได้ทำการศึกษาผลของกรดไขมันจำเป็นในกลุ่มโอเมก้า 3 ที่มีผลต่อมะเร็งปากมดลูกในสัตว์ทดลอง (*In vivo*) โดยปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกบริเวณชั้นใต้ผิวหนังของหนูและควบคุมการให้อาหาร จากการศึกษาพบว่ากลุ่มที่ควบคุมการให้อาหารที่ประกอบด้วยกรดไขมันจำเป็นในกลุ่มโอเมก้า 3 ก้อนมะเร็งมีขนาดลดลงอย่างชัดเจน ประกอบกับหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงเซลล์มะเร็งก็มีจำนวนลดลงด้วยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ให้อาหารตามปกติ) เนื่องจากโอเมก้า 3 ไปลดระดับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง

3) เคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอ

Swamy M.V. และคณะ (2008) ได้ศึกษาผลร่วมของเคอร์คูมินและดีเอชเอ (สารที่พบในน้ำมันปลา) ต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับอ่อนชนิด BxPC-3 และชักนำให้เกิด Apoptosis โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรก คือ การทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ (*In vitro*) โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับอ่อนใน Serum-deprived medium (0.5%) ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นแทนที่ Medium เก่าด้วย Serum-free medium ร่วมกับการใส่ตัวยาที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ เคอร์คูมิน (1-20 μM), ดีเอชเอ (1-100 μM) และ เคอร์คูมิน/ดีเอชเอ โดยเฉพาะเลี้ยงไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเคอร์คูมินและดีเอชเอสามารถยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งตับอ่อน และชักนำให้เกิด

Apoptosis โดยถ้าความเข้มข้นของเคอร์คูมินและดีเอชเอเพิ่มขึ้น ความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งและการเกิด Apoptosis ก็จะเพิ่มขึ้น และกรณีเคอร์คูมิน/ดีเอชเอ พบว่าสารทั้ง 2 ชนิดให้ผลร่วมกัน คือ สามารถยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งตับอ่อน และชักนำให้เกิด Apoptosis ได้ โดยที่ความเข้มข้นของเคอร์คูมิน 5 μM ต่อ ดีเอชเอ 25 μM สามารถยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งตับอ่อนได้มากกว่า 70% สำหรับส่วนที่สอง คือ การทดลองในสัตว์ทดลอง (*In vivo*) โดยการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งตับอ่อนลงในหนูชนิดไม่ช้ออายุ 7 สัปดาห์ เมื่อเซลล์มะเร็งมีขนาดประมาณ 200 mm^3 จึงทำการควบคุมอาหารของหนูทดลองเป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยแบ่งเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ Control diet (ไม่มีองค์ประกอบของ Fish oil และเคอร์คูมิน แต่มีองค์ประกอบของ Corn oil), Fish oil diet, Curcumin Diet และ Fish oil/Curcumin diet จากการศึกษพบว่า Fish oil/Curcumin Diet สามารถลดขนาดของก้อนมะเร็งลงได้ประมาณ 72% เมื่อเทียบกับกรณี Control Diet และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกรณี Fish oil diet และกรณี Curcumin diet นอกจากนี้ยังพบว่า Fish oil/Curcumin diet สามารถลดระดับการแสดงออกและยับยั้งกิจกรรมของ COX-2, 5-LOX และ iNOS ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการอักเสบของร่างกายลงได้ และยังช่วยเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน p21 อีกด้วย ซึ่งเป็นยีนที่มีหน้าที่ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง จึงกล่าวได้ว่าผลรวมของเคอร์คูมินและดีเอชเอสามารถยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็ง และชักนำให้เกิด Apoptosis ได้

Saw C.L.L และคณะ (2010) ศึกษาผลรวมของเคอร์คูมินและดีเอชเอหรืออีพีเอ ที่ความเข้มข้นต่ำๆ ที่มีผลต่อการต้านการอักเสบ และการแสดงออกของยีนในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้ Murine leukemic monocytic macrophage cell line (RAW 264.7) ซึ่งแบ่งเซลล์ออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่เพาะเลี้ยงและไม่เพาะเลี้ยงด้วย Inflammatory agent จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 ส่วนร่วมกับเคอร์คูมิน ดีเอชเอหรืออีพีเอ และเคอร์คูมิน/ดีเอชเอหรืออีพีเอ ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าเคอร์คูมินที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 5 μM ต่อ ดีเอชเอหรืออีพีเอ ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 25 μM สามารถยับยั้งการแสดงออกของไนตริกออกไซด์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ แต่ที่น่าสนใจคือ เคอร์คูมินที่ความเข้มข้น 2.5 μM ต่อ ดีเอชเอหรืออีพีเอที่ความเข้มข้น 0.78 μM สามารถยับยั้งการแสดงออกของระดับ PEG₂ (เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของร่างกาย) ได้ถึง 90-100% นอกจากนี้ยังพบว่าเคอร์คูมิน/ดีเอชเอหรืออีพีเอ สามารถยับยั้งการแสดงออกของ iNOS และ COX-2 ได้ ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของร่างกาย จึงกล่าวได้ว่าผลการต้านการอักเสบของเคอร์คูมินมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อนำไปใช้ร่วมกับดีเอชเอหรืออีพีเอที่ความเข้มข้นต่ำ

Altenburg J.D. และคณะ (2011) ได้ศึกษาผลรวมของเคอร์คูมินและดีเอชเอที่มีผลต่อมะเร็งเต้านมในระดับห้องปฏิบัติการ (*In vitro*) โดยเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านมเป็นเวลา 24

ข้าวโม่ ร่วมกับเคอร์คูมิน ดีเอชเอ และเคอร์คูมิน/ดีเอชเอที่ความเข้มข้นต่างๆ (0-100 μM) พบว่าเคอร์คูมิน/ดีเอชเอ ที่ความเข้มข้น 30 μM (เคอร์คูมิน 12 μM ต่อ ดีเอชเอ 18 μM) สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเต้านมได้อย่างมีนัยสำคัญ และเคอร์คูมิน/ดีเอชเอยังช่วยเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน p53 ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งเซลล์มะเร็ง และ PPARs ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการอักเสบด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าดีเอชเอช่วยเพิ่มความสามารถของเซลล์มะเร็งเต้านมในการดูดซึมเคอร์คูมิน ซึ่งนับว่าเป็นกลไกอย่างหนึ่งสำหรับการเพิ่มความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็ง

Siddiqui R.A. และคณะ (2013) ได้ศึกษาผลร่วมระหว่างเคอร์คูมินและดีเอชเอต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมในสัตว์ทดลอง (*In vivo*) โดยควบคุมการให้อาหารหนูเพศเมียสายพันธุ์ SENCAR (สายพันธุ์ที่มีความอ่อนไหวต่อการชักนำให้เกิดมะเร็ง) อายุ 3 สัปดาห์ น้ำหนัก 25-30 กรัม เวลา 3 สัปดาห์ ซึ่งแบ่งเป็น 4 กลุ่ม (กลุ่มละ 15 ตัว) ได้แก่ Control diet (ไม่มีองค์ประกอบของเคอร์คูมินและดีเอชเอในอาหาร แต่มีองค์ประกอบของ Corn Oil), Curcumin diet, DHA diet และ DHA+Curcumin diet และเมื่อหนูอายุครบ 6 สัปดาห์ ได้ทำการป้อน DMBA (7,12-dimethyl benz(α)anthracene) 200 ไมโครลิตร ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งชนิดหนึ่งที่สามารถชักนำให้เกิดมะเร็งเต้านมในหนูได้ โดยป้อน 1 ครั้งต่อสัปดาห์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ จากนั้นสังเกตขนาดของก้อนมะเร็งที่เกิดขึ้นทุกวัน จนกระทั่งเห็นขนาดของก้อนมะเร็งชัดเจน จึงทำการเก็บก้อนมะเร็งเพื่อนำมาวิเคราะห์การแสดงออกในระดับโปรตีนด้วยวิธี Western blot จากการศึกษาพบว่า DHA+Curcumin diet สามารถชะลอการเกิดมะเร็งเต้านมได้อย่างชัดเจน และเพิ่มระดับโปรตีนชนิด Maspin ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านการเกิดมะเร็ง ประกอบกับไปลดระดับการแสดงออกของโปรตีนชนิด Survivin ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่ยับยั้งกระบวนการ Apoptosis ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าการใช้เคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอสามารถลดอัตราการเกิดมะเร็งได้อย่างชัดเจน

นอกจากรายงานการใช้เคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง และภาวะโรคมะเร็งข้างต้นแล้ว เคอร์คูมินและดีเอชเอยังถูกนำไปใช้ร่วมกันในการศึกษาผลการตอบสนองของโรคอื่นๆ ได้แก่ โรคไขข้อเสื่อม (Joe B. และ Lokesh B.R. 1997), โรคอัลไซเมอร์ (Qiu-Lan Ma และคณะ 2009) และโรคอัมพาตเรื้อรังในลำไส้ใหญ่ (Jia Q. และคณะ 2011)

บทที่ 3

วัสดุและวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุและสารเคมี

- 3.1.1 รังไหมไทย *Bombyx mori* (สายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1, ศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์พระบรมราชินีนาถ จังหวัดศรีสะเกษ)
- 3.1.2 เจลาตินชนิดเอ, pl = 9 (Nitta Gelatin Inc., ญี่ปุ่น)
- 3.1.3 เคอร์คูมิน (Curcumin; $C_{21}H_{20}O_6$ = 368.38 g/mol, Sigma Co., สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.4 ดีเอชเอ (cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid; DHA, $C_{22}H_{32}O_2$ = 328.49 g/mol, Sigma Co., สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.5 ลิเทียมโบรไมด์ (LiBr; Sigma-Aldrich Laborchemikalien, เยอรมัน)
- 3.1.6 กุ้งไตอะไลซ์ (MWCO 12,000-16,000, Viskase Company Inc., ญี่ปุ่น)
- 3.1.7 น้ำปราศจากไอออน (Deionized water)
- 3.1.8 โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3 , Ajax Finechem, Pty'Ltd, ออสเตรเลีย)
- 3.1.9 โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$ 99%, Fluka, Buchs, เยอรมัน)
- 3.1.10 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl Sulfoxide (DMSO), $(CH_3)_2SO$ = 78.13 g/mol, Riedel-de Haen®, Sigma-Aldrich Laborchemikalien, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.11 สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (25%, Fluka, Buchs, เยอรมัน)
- 3.1.12 ไกลซีน (Sigma-Aldrich, เยอรมัน)
- 3.1.13 คอลลาจีเนส (Collagenase = 191 units/mg, Fluka, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.14 เฮกเซน (C_6H_{14} = 86.18 g/mol, J.T.Baker, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.15 กรดไฮโดรคลอริก (HCl; 36.5-38%, J.T. Baker, NJ, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.16 2, 4, 6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) (Nacalai Tesque, ญี่ปุ่น)
- 3.1.17 โซเดียมเอไซด์ (Labchem, APS, ออสเตรเลีย)
- 3.1.18 ซิงค์อะซีเตต (LOBA Chemie, อินเดีย)
- 3.1.19 Phosphate buffered saline (PBS, pH 7.3-7.5, Bio basic Inc., แคนาดา)
- 3.1.20 เอทานอล (99.7-100%, VWR International Ltd., อังกฤษ)
- 3.1.21 สารละลาย Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep, Hyclone, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.22 β -Alanine (Nacalai Tesque, Inc., ญี่ปุ่น)
- 3.1.23 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา)

- 3.1.24 Dulbecco's modified eagle powder medium (DMEM, HyClone®, Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.25 Fetal Bovine Serum (FBS; HyClone, Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.26 Hoechst 33258 (Sigma-Aldric, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.27 Minimum Essential Medium powder (MEM; HyClone®, Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.28 Trypan blue Stain 0.4% (Gibco, สหรัฐอเมริกา)
- 3.1.29 Trypsin-EDTA (0.25% trypsin with EDTA, Hyclone, Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา)

3.2 อุปกรณ์

- 3.2.1 เครื่องปั่นเหวี่ยงสาร (Universal 320R, Hettich, เยอรมัน)
- 3.2.2 ตู้แช่ 4°C (NR-BU343, Panasonic, ไทย)
- 3.2.3 ตู้แช่แข็ง -20°C (Sandenintercool, ไทย)
- 3.2.4 ตู้แช่แข็ง -40°C (Haier, จีน)
- 3.2.5 แม่พิมพ์เทพลอน (ญี่ปุ่น)
- 3.2.6 แผ่นกระจกกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 มิลลิเมตร (Glass slip, Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.7 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dry, CHRIST®, เยอรมัน)
- 3.2.8 Autopipette (Eppendorf, เยอรมัน)
- 3.2.9 Magnetic stirrer / Hot plate (RCT Basic, Ika labortechnik, เยอรมัน)
- 3.2.10 เครื่องวัดพีเอช (pH meter, professional meter PP-50, เยอรมัน)
- 3.2.11 เครื่อง Contact angle meter (Model CAM-PLUS MICCRO, TANTEC INC. สหรัฐอเมริกา)
- 3.2.12 เครื่อง Zetasizer (650, Malvern, อังกฤษ)
- 3.2.13 เครื่อง UV-Vis Spectrophotometer (UV -2450, Shimudzu, ญี่ปุ่น)
- 3.2.14 เครื่อง Microplate Reader (FLUOstar Omega, BMG LABTECH, เยอรมัน)
- 3.2.15 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, JSM-5410LV, JEOL Ltd., ญี่ปุ่น)
- 3.2.16 ตู้ดูดความชื้น (SR Lab, ไทย)
- 3.2.17 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (1235 PC, Shel-Lab, สหรัฐอเมริกา)

3.2.18 ตู้เพาะเชื้อบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (CO2 Incubator, Galaxy 170R, New Brunswick, สหรัฐอเมริกา)

3.2.19 กระจกฉีดยา (10 ml, NIPRO, ญี่ปุ่น)

3.2.20 กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Inverted Microscopes, Eclipse TS100, Nikon, ญี่ปุ่น)

3.2.21 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow, Cabinet, ScanLaf, Mars 1800, เดนมาร์ก)

3.2.22 Hemacytometer (Boeco, เยอรมัน)

3.2.23 Nonpyrogenic serological pipet (Costar®, Corning, สหรัฐอเมริกา)

3.2.24 6-well polystyrene tissue culture plates (Corning, สหรัฐอเมริกา)

3.2.25 24-well polystyrene tissue culture plates (Corning, สหรัฐอเมริกา)

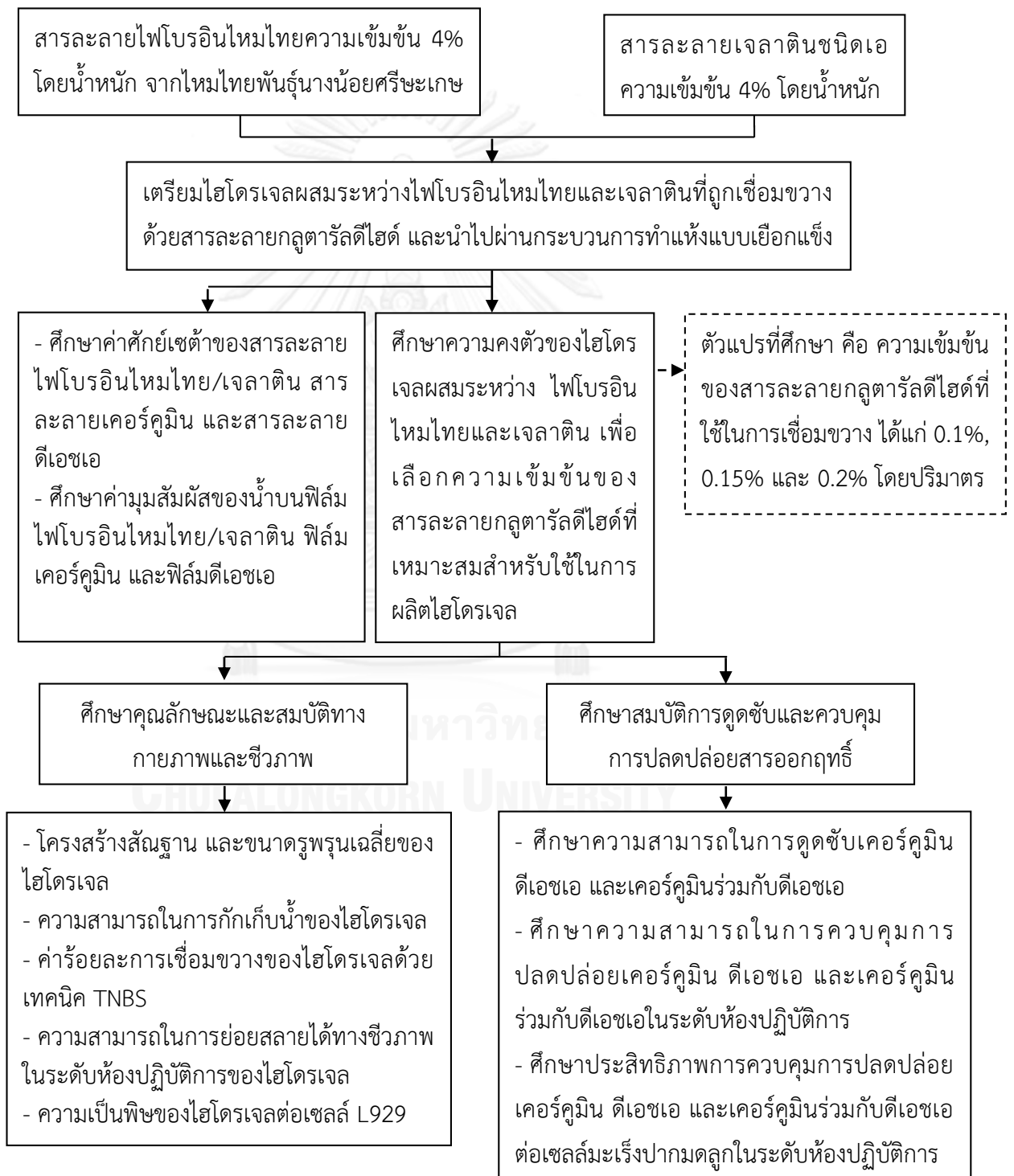
3.2.26 96-well polystyrene tissue culture plates (Corning, สหรัฐอเมริกา)

3.2.27 Polystyrene tissue culture flask (Corning, สหรัฐอเมริกา)

3.2.28 10 cm Tissue culture dish (Costar®, Corning, สหรัฐอเมริกา)

3.3 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

การดำเนินงานวิจัยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ การเตรียมไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินที่ถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ และการศึกษาคุณลักษณะและสมบัติทางกายภาพและชีวภาพ ตลอดจนความสามารถในการดูดซับและควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์(เคอร์คูมิน และดีเอชเอ) ดังสรุปได้ในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แผนผังการดำเนินงานวิจัย

3.3.1 การเตรียมไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาติน

3.3.1.1 การเตรียมสารละลายไฟโบรอินไหมไทยและสารละลายเจลาติน

การเตรียมสารละลายไฟโบรอิน แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน ดังแสดงในรูปที่ 3.2 [ดัดแปลงมาจากวิธีของ Kim U.J. และคณะ 2005]

1. การกำจัดกาวไหม

- 1) นำรังไหมไทยพันธุ์นางน้อยศรีษะเกษ 1 มาดึ่งปุยไหมและตัวดักแต่ออกจากนั้นชั่งน้ำหนักรังไหม 40 กรัม
- 2) ต้มรังไหมในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 0.02 โมลต่อลิตร ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที
- 3) นำรังไหมที่ต้มแล้วมาล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionized Water; DI) ประมาณ 4-5 รอบ เพื่อกำจัดเซรีรินและสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต
- 4) ทำซ้ำข้อ 2-3 อีก 1 รอบ
- 5) นำเส้นใยไหมที่ผ่านการกำจัดกาวไหมไปผึ่งให้แห้งประมาณ 2 วัน และนำไปชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาร้อยละของเซรีรินที่หายไป
- 6) ฉีกเส้นใยไฟโบรอินให้ฟู เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิว สำหรับเตรียมทำสารละลายไฟโบรอินต่อไป

2. การเตรียมสารละลายไฟโบรอิน

- 1) นำเส้นใยไฟโบรอินที่กำจัดกาวไหมแล้วละลายในสารละลายลิเทียมโบรไมด์ (LiBr) ความเข้มข้น 9.3 โมลต่อลิตร ด้วยอัตราส่วนไหม 8 กรัม ต่อ LiBr 24 กรัม ที่อุณหภูมิ 60°C ประมาณ 3-4 ชั่วโมง จนได้สารละลายไฟโบรอิน
- 2) นำสารละลายไฟโบรอินมาไดอะไลซ์ในน้ำปราศจากไอออน เป็นเวลา 3 วัน เพื่อกำจัดลิเทียมโบรไมด์ โดยเปลี่ยนน้ำที่เวลา 15 นาที, 35 นาที และ 55 นาทีในชั่วโมงแรก จากนั้นเปลี่ยนน้ำวันละ 3 ครั้ง (เช้า กลางวัน เย็น)
- 3) เมื่อไดอะไลซ์เสร็จนำสารละลายไฟโบรอินที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 9,000 rpm, อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อน
- 4) ตรวจสอบความเข้มข้นของสารละลายไฟโบรอินโดยการอบให้แห้งเพื่อหาน้ำหนักของไฟโบรอิน ซึ่งสารละลายไฟโบรอินในน้ำที่ได้จะมีความเข้มข้นประมาณ 6.5-7.5% โดยน้ำหนัก จากนั้นทำการเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ได้ความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนัก



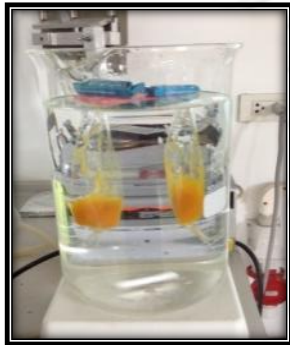
รังไหม 40 กรัม



ต้มรังไหมใน Na_2CO_3
20 นาที โดยทำซ้ำ 2 รอบ



เส้นใยไฟโบรอิน



ไดอะไลซ์ด้วย
น้ำปราศจากไอออน



สารละลายไฟโบรอิน



ละลายเส้นใยไฟโบรอิน
ในสารละลาย LiBr
ที่อุณหภูมิ 60°C



สารละลายไฟโบรอินในน้ำ
ความเข้มข้น 6.5-7.5% โดยน้ำหนัก

รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายไฟโบรอิน

การเตรียมสารละลายเจลาติน

1. เตรียมสารละลายเจลาตินความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนัก โดยนำเจลาตินชนิดเอ 4 กรัม มาแช่ในน้ำปราศจากไอออน เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เจลาตินพองตัวเต็มที่
2. ปั่นกวนที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง จนได้สารละลายที่เป็นเนื้อเดียวกัน

3.3.1.2 การขึ้นรูปไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาติน

1. นำสารละลายไฟโบรอินไหมไทยความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนัก ผสมกับสารละลายเจลาตินความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนัก ในอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักของไฟโบรอินไหมไทยต่อเจลาตินที่สัดส่วนต่างๆ ได้แก่ 0/100, 5/95, 10/90, 15/85, 20/80, 50/50, 80/20 และ 100/0 โดยปั่นกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. เติมสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร ปริมาตร 160 ไมโครลิตร ลงในสารละลายผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน และปั่นกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วินาที
3. เทสารละลายลงในแม่พิมพ์เทฟลอนและนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C อย่างน้อย 12 ชั่วโมง และ -40°C อีกอย่างน้อย 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze-dry) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง
4. จากนั้นนำไฮโดรเจลที่ได้มาล้างด้วยสารละลายไกลซีนความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ในปริมาตรที่มากเกินไป เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 3 ครั้งละ 15 นาที เพื่อกำจัดกลูตารัลดีไฮด์ส่วนเกิน
5. นำไฮโดรเจลไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -40°C อีกอย่างน้อย 12 ชั่วโมง และนำไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งอีกครั้ง จะได้ไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยต่อเจลาติน โดยตัวอย่างชิ้นงานไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่ใช้ในการวิจัยนี้มีอัตราส่วนผสมต่างๆ ดังสรุปในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่อัตราส่วนผสมต่างๆ

ประเภทของไฮโดรเจล	สัญลักษณ์
1. ไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาติน ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก 0/100	G100
2. ไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาติน ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก 5/95	SF5G95
3. ไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาติน ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก 10/90	SF10G90
4. ไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาติน ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก 15/85	SF15G85
5. ไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาติน ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก 20/80	SF20G80
6. ไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาติน ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก 50/50	SF50G50
7. ไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาติน ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก 80/20	SF80G20
8. ไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาติน ที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก 100/0	SF100

3.3.2 การศึกษาความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ต่อความคงตัวของไฮโดรเจล

การศึกษาความคงตัวของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาติน สามารถวิเคราะห์ได้จากร้อยละโดยน้ำหนักที่หายไปของไฮโดรเจล โดยนำไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินน้ำหนัก 10 มิลลิกรัม แช่ในสารละลาย PBS, pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำชิ้นไฮโดรเจลไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งและชั่งน้ำหนักแห้ง เพื่อคำนวณหาร้อยละโดยน้ำหนักที่หายไปของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาติน ได้จากสูตร

$$\text{ร้อยละโดยน้ำหนักที่หายไปของไฮโดรเจล} = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100$$

โดยที่ W_1 น้ำหนักแห้งของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาติน ก่อนแช่ในสารละลาย PBS

W_2 น้ำหนักแห้งของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาติน หลังแช่ในสารละลาย PBS

3.3.3 การวิเคราะห์สมบัติของชีววัสดุและสารออกฤทธิ์ (เคอร์คูมินและดีเอชเอ)

3.3.3.1 การวิเคราะห์ค่าศักย์เซต้า (Zeta potential) ของสารละลายผสมของไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน สารละลายเคอร์คูมิน และสารละลายดีเอชเอ

การวิเคราะห์ค่าศักย์เซต้า เริ่มจากการเตรียมสารละลายผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนัก ในน้ำปราศจากไอออน และเติมกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร ลงในสารละลายผสม และเตรียมสารละลายเคอร์คูมินและสารละลายดีเอชเอความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนัก ในสารละลายเอทานอล จากนั้นนำตัวอย่างสารละลายไปตรวจวัดค่าศักย์เซต้าด้วยเครื่อง Zetasizer (650, Malvern, อังกฤษ)

3.3.3.2 การวิเคราะห์ค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มผสมของไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน ฟิล์มเคอร์คูมิน และฟิล์มดีเอชเอ

การเตรียมฟิล์มผสมของไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน

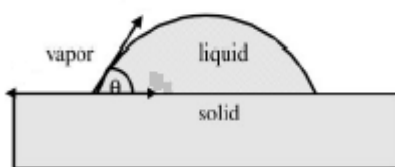
1. นำสารละลายไฟโบรอินไหมไทยความเข้มข้น 0.05% โดยน้ำหนัก ผสมกับสารละลายเจลาตินความเข้มข้น 0.05% โดยน้ำหนัก และปั่นกวนเป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร ลงในสารละลายผสม และปั่นกวนเป็นเวลา 20 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง

2. นำสารละลายผสมปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นกระจกกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 มิลลิเมตร (Glass slip) และตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง 1 คืน ที่อุณหภูมิห้องจนได้ฟิล์มผสมของไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน

3. นำฟิล์มผสมมาล้างด้วยสารละลายไกลซีนความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที เพื่อกำจัดกลูตารัลดีไฮด์ส่วนเกิน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง 1 คืน ที่อุณหภูมิห้อง

4. นำไปวัดค่ามุมสัมผัสด้วยเครื่อง Contact angle meter (Model CAM-PLUS MICCRO, TANTEC INC. สหรัฐอเมริกา) ที่เวลา 30 วินาที

การวิเคราะห์ค่ามุมสัมผัสของน้ำใช้วิธี Sessile drop ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Bachmann J. [Bachmann J. และคณะ 2000] โดยใช้น้ำปราศจากไอออนปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงบนพื้นผิวที่จะทำการวิเคราะห์ จากนั้นอ่านค่ามุมสัมผัสของน้ำ (θ) ที่เวลา 30 วินาที ดังแสดงในรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 ลักษณะของหยดน้ำบนพื้นผิวสัมผัส [Bachmann J. และคณะ 2000]

การเตรียมฟิล์มเคอร์คูมิน และฟิล์มดีเอชเอ

1. เตรียมสารละลายเคอร์คูมินและสารละลายดีเอชเอความเข้มข้น 0.05% โดยน้ำหนัก ในสารละลายเอทานอล

2. นำสารละลายเคอร์คูมินและสารละลายดีเอชเอ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นกระจกกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 มิลลิเมตร และตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง 1 คืน ที่อุณหภูมิห้องจนได้ฟิล์มเคอร์คูมิน และฟิล์มดีเอชเอ

3. นำไปวัดค่ามุมสัมผัสผิวน้ำที่เวลา 30 วินาที ด้วยเครื่อง Contact angle meter

3.3.4 การวิเคราะห์คุณลักษณะและสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของไฮโดรเจล

3.3.4.1 การวิเคราะห์โครงสร้างพื้นฐานของไฮโดรเจล

วิเคราะห์โครงสร้างพื้นฐานของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินในแนวตัดขวาง (Cross-section) ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM, JSM-5410LV, JEOL Ltd., ญี่ปุ่น) และบันทึกภาพที่กำลังขยาย 35 และ 100 เท่า จากนั้นนำภาพที่ได้มาวิเคราะห์หาขนาดรูพรุนเฉลี่ย ด้วยโปรแกรม Image J โดยการสุ่มวัดจำนวน 100 รู

3.3.4.2 การวิเคราะห์ความพรุนของไฮโดรเจล [ดัดแปลงมาจากวิธีของ Kim U.J. และคณะ 2005]

การวิเคราะห์หาความพรุนของไฮโดรเจล สามารถทำได้โดยใช้หลักการการแทนที่ของของเหลว ในที่นี้ใช้เฮกเซน (Hexane) ซึ่งมีความสามารถในการซึมผ่านไฮโดรเจลโดยไม่ทำให้ไฮโดรเจลเกิดการบวมหรือหดตัว โดยเริ่มจากชั่งน้ำหนักสารละลายเฮกเซนปริมาตร 1 มิลลิลิตร (W_1) จากนั้นนำไฮโดรเจลไปแช่ในสารละลายเฮกเซน เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เฮกเซนซึมเข้าสู่ไฮโดรเจล แล้วชั่งน้ำหนักทั้งหมดของเฮกเซนที่มีไฮโดรเจลแช่อยู่ด้วย (W_2) จากนั้นนำไฮโดรเจลออกจากภาชนะที่บรรจุเฮกเซนและชั่งน้ำหนักของเฮกเซนที่เหลืออยู่ในภาชนะบรรจุ (W_3) โดยความพรุนของไฮโดรเจลสามารถคำนวณได้จากสูตร

$$\text{ร้อยละความพรุนของไฮโดรเจล} = \frac{W_1 - W_3}{W_2 - W_3} \times 100$$

โดยที่ W_1 น้ำหนักของสารละลายเฮกเซนปริมาตร 1 มิลลิลิตร

W_2 น้ำหนักทั้งหมดของเฮกเซนที่มีไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินแช่อยู่ด้วย

W_3 น้ำหนักของเฮกเซนที่เหลืออยู่ในภาชนะบรรจุ ภายหลังจากนำไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินออก

3.3.4.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการดูดซับน้ำของไฮโดรเจล [ดัดแปลงจากวิธีของ Gil E.S. และคณะ 2005]

การวิเคราะห์ความสามารถในการดูดซับน้ำของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาติน โดยนำไฮโดรเจลขนาด 5x5x5 ลูกบาศก์มิลลิเมตร น้ำหนักประมาณ 10 ± 0.3 มิลลิกรัม แช่ในสารละลาย PBS, pH 7.4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำกระดาษไม่มีขุยซับไฮโดรเจลด้านละ 10 วินาที เพื่อกำจัดน้ำที่เกาะอยู่บนผิวของไฮโดรเจล และชั่งน้ำหนัก เพื่อหาน้ำหนักเปียกของไฮโดรเจล โดยร้อยละการดูดซับน้ำของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาติน สามารถคำนวณได้จากสูตร

$$\text{ร้อยละการดูดซับน้ำ} = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100$$

โดยที่ W_s น้ำหนักเปียกของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาติน หลังแช่ในสารละลาย PBS

W_d น้ำหนักแห้งของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาติน ก่อนแช่ในสารละลาย PBS

3.3.4.4 การวิเคราะห์ร้อยละการเชื่อมขวางของไฮโดรเจลด้วยเทคนิค TNBS

[ดัดแปลงมาจากวิธีของ Bubnis W.A. และ Ofner Iii C.M. 1992]

การวิเคราะห์ร้อยละการเชื่อมขวางโดยใช้ 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) เป็นการหาปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโมเลกุลของโปรตีน โดยนำไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาติน น้ำหนัก 5 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย NaHCO_3 ความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และสารละลาย TNBS ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง และนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย HCl ความเข้มข้น 37% โดยปริมาตร ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลาอย่างน้อย 12 ชั่วโมง เพื่อให้ไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินละลายอย่างสมบูรณ์ จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของ β -Alanine เพื่อหาปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่เหลืออยู่ในไฮโดรเจล และร้อยละการเชื่อมขวางซึ่งสามารถคำนวณได้จากสูตร

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

3.3.4.5 การวิเคราะห์ความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพในระดับ

ห้องปฏิบัติการของไฮโดรเจล [ดัดแปลงมาจากวิธีของ Jetbumpenkul P. และคณะ 2012]

การวิเคราะห์ความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ทำโดยนำไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินน้ำหนัก 10 มิลลิกรัม แขนใน 1 มิลลิตรของสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิตร pH 7.4 ที่มีสารละลายโซเดียมเอไซด์ความเข้มข้น 0.01% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C โดยเปลี่ยนสารละลายทุกๆ 2 วัน และเก็บผลตามช่วงเวลาที่กำหนด ได้แก่ 1, 3, 6, 8, 10, 16, 22, และ 28 วัน โดยนำไฮโดรเจลมาล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 3 รอบ จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง และชั่งน้ำหนักแห้งคงเหลือของไฮโดรเจล จากนั้นคำนวณหาร้อยละของน้ำหนักแห้งคงเหลือของไฮโดรเจลได้จากสูตร

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

โดยที่ W_f น้ำหนักแห้งคงเหลือของไฮโดรเจลหลังแขในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส

W_i น้ำหนักแห้งเริ่มต้นของไฮโดรเจลก่อนแขในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส

3.3.4.6 การวิเคราะห์ความเป็นพิษของไฮโดรเจลต่อเซลล์ผิวหนังของหนู (เซลล์

L929)

การวิเคราะห์ความเป็นพิษของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินต่อเซลล์ L929 ตามมาตรฐาน ISO 10993 part 5 โดยเป็นวิธีทางอ้อมในการตรวจสอบ (Indirect method) ซึ่งแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้

1. การเตรียมตัวอย่างสารสกัด

นำไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อ (Sterilization) ด้วยวิธีอบแก๊สเอธิลีนออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37°C แขนในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ไม่มีซีรัมเป็นองค์ประกอบ ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อสกัดสารออกจากไฮโดรเจล เรียกสารที่สกัดได้นี้ว่า ตัวอย่างสารสกัด 100% จากนั้นนำตัวอย่างสารสกัด 100% ไปทำการเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมเป็นองค์ประกอบ เพื่อให้ได้สารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 50%, 25% และ 12.5%

2. การทดสอบความเป็นพิษ

เพาะเลี้ยงเซลล์ L929 ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 24 หลุม (24 well-plate) โดยใช้เซลล์เริ่มต้น 5×10^4 เซลล์/1.9 ตารางเซนติเมตร (1 หลุม) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มีซีรัมเป็นองค์ประกอบ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเชื้อที่สภาวะความดันบรรยากาศที่มี 5% CO₂ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เจริญเติบโตและแผ่ตัวเป็นแบบชั้นเดียว (Monolayer) จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกและเติมตัวอย่างสารสกัด 100% และตัวอย่างสารสกัด

เจือจางลงไปในแต่ละหลุม นำไปเพาะเลี้ยงตามสภาวะข้างต้นและทำการประเมินจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ที่เวลา 6, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค MTT assay [Mosmann T. 1983] โดยกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทดสอบแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมเชิงลบ (Negative control) เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ไม่มีซีรัมเป็นองค์ประกอบ

กลุ่มที่ 2 กลุ่มควบคุมเชิงบวก (Positive control) เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยสารละลายซิงค์อะซีเตตความเข้มข้น 20 ppm

กลุ่มที่ 3 เลี้ยงเซลล์ในตัวอย่างสารสกัด 100% ของไฮโดรเจล G100, SF50G50, SF80G20 และ SF100

กลุ่มที่ 4 เลี้ยงเซลล์ในตัวอย่างสารสกัดเจือจาง 50% ของไฮโดรเจล G100, SF50G50, SF80G20 และ SF100

กลุ่มที่ 5 เลี้ยงเซลล์ในตัวอย่างสารสกัดเจือจาง 25% ของไฮโดรเจล G100, SF50G50, SF80G20 และ SF100

กลุ่มที่ 6 เลี้ยงเซลล์ในตัวอย่างสารสกัดเจือจาง 12.5% ของไฮโดรเจล G100, SF50G50, SF80G20 และ SF100

3.3.5 การศึกษาสมบัติการดูดซับและการควบคุมการปลดปล่อยของไฮโดรเจล

3.3.5.1 การศึกษาความสามารถในการดูดซับเคอร์คูมิน ดีเอชเอ และเคอร์คูมิน ร่วมกับดีเอชเอของไฮโดรเจล

1. ขั้นตอนการดูดซับสารออกฤทธิ์เพียงชนิดเดียว (เคอร์คูมินหรือดีเอชเอ)
 - 1) ตัดไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินขนาด 5x5x2 ลูกบาศก์กิโลเมตร น้ำหนักประมาณ 5 ± 0.3 มิลลิกรัม
 - 2) ละลายเคอร์คูมินในสารละลายเอทานอลให้ได้ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นหยดสารละลายเคอร์คูมินปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนไฮโดรเจล (คิดเป็นปริมาณเคอร์คูมินทั้งหมด 50 ไมโครกรัมต่อชิ้นไฮโดรเจล)
 - 3) นำไฮโดรเจลที่ดูดซับเคอร์คูมินแล้วแช่ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลาอย่างน้อย 12 ชั่วโมง เพื่อให้สารละลายเคอร์คูมินถูกดูดซับอย่างเต็มที่ จากนั้นนำไปวางทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
 - 4) ทำซ้ำตั้งแต่ข้อ 1-3 โดยใช้ดีเอชเอ แทนเคอร์คูมิน
2. ขั้นตอนการดูดซับเคอร์คูมินและดีเอชเอ (บนไฮโดรเจลชิ้นเดียวกัน)

ขั้นตอนการทำเช่นเดียวกับกรณีการดูดซับสารออกฤทธิ์เพียงชนิดเดียว แต่นำสารละลายเคอร์คูมินและดีเอชเอในปริมาตรที่เท่ากันมาผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อน แล้วจึงหยดสารละลายผสมปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนไฮโดรเจลชิ้นเดียวกัน (คิดเป็นปริมาณเคอร์คูมินและดีเอชเอทั้งหมด 50 ไมโครกรัมต่อชิ้นไฮโดรเจล)

3. การทดสอบความสามารถในการกักเก็บสารออกฤทธิ์ของไฮโดรเจล

นำไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่ดูดซับสารออกฤทธิ์เรียบร้อยแล้ว มาทำการชะด้วยสารละลาย DMSO เพื่อละลายสารออกฤทธิ์ที่ถูกกักเก็บอยู่ในไฮโดรเจล จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 430 นาโนเมตร เพื่อหาปริมาณดีเอชเอ และเคอร์คูมินตามลำดับ จากนั้นคำนวณหาร้อยละของสารออกฤทธิ์ที่ถูกดูดซับโดยไฮโดรเจลได้จากสูตร

$$\text{ร้อยละการดูดซับสารออกฤทธิ์ของไฮโดรเจล} = \frac{C_T}{C_C} \times 100$$

โดยที่ C_T ปริมาณของสารออกฤทธิ์ที่ถูกดูดซับได้จริงโดยไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาติน

C_C ปริมาณของสารออกฤทธิ์ที่ถูกดูดซับได้โดยไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินจากการคำนวณ

3.3.5.2 การศึกษาความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมิน ดีเอชเอ และเคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอของไฮโดรเจลในระดับห้องปฏิบัติการ [ดัดแปลงจากวิธีของ Okhawilai M. และคณะ 2010, Somvipart S. และคณะ 2013]

1. การทดสอบความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยของไฮโดรเจลภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ

นำไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่ดูดซับเคอร์คูมิน ดีเอชเอ และเคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอเรียบร้อยแล้ว แช่ในสารละลาย PBS, pH 7.4 ที่ประกอบด้วยซีรัม 10% (เพื่อช่วยรักษาความเสถียรของสารออกฤทธิ์) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นสภาวะ Sink condition (สภาวะที่สารละลายที่ใช้รองรับมีปริมาตรมากกว่า 10 เท่าของปริมาตรที่ใช้ในการเตรียมสารละลายอิมตัวของสารออกฤทธิ์) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C และเก็บผลตามช่วงเวลาที่กำหนด โดยเก็บตัวอย่างสารละลายทั้งหมดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 248 และ 430 นาโนเมตร เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณดีเอชเอ และเคอร์คูมินตามลำดับ จากนั้นเติมสารละลาย PBS ที่ประกอบด้วยซีรัม 10% ลงไปใหม่ในปริมาตรเท่าเดิม โดยสามารถคำนวณปริมาณร้อยละการปลดปล่อยสะสมของเคอร์คูมินและดีเอชเอได้จากสูตร

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

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

โดยที่ C_i ปริมาณของเคอร์คูมินหรือดีเอชเอที่ถูกปลดปล่อยสะสมในแต่ละช่วงเวลา

M_i ปริมาณของเคอร์คูมินหรือดีเอชเอที่ถูกปลดปล่อยที่ช่วงเวลา i

C_T ปริมาณของเคอร์คูมินหรือดีเอชเอที่ถูกดูดซับได้จริงโดยไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาติน

2. การทดสอบความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยของไฮโดรเจลภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ

ขั้นตอนการทำเช่นเดียวกับกรณีการควบคุมการปลดปล่อยภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ แต่เปลี่ยนสารละลายที่ใช้รองรับเป็นสารละลาย PBS, pH 7.4 ที่ประกอบด้วยซีรัม 10% และสารละลายคอลลาจีเนสความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.3.5.6 การศึกษาประสิทธิภาพการปลดปล่อยเคอร์คูมิน ดีเอชเอ และเคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอของไฮโดรเจลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกในระดับห้องปฏิบัติการ

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Human cervical carcinoma cell line; CaSki cell) บนจานเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Minimum Essential Medium (MEM) ที่ประกอบด้วย 10% FBS, 1% Penicillin-Streptomycin โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเชื้อที่สภาวะความดันบรรยากาศที่มี 5% CO₂ อุณหภูมิ 37°C เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ให้เพียงพอสำหรับใช้ในการทดสอบต่อไป โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่

1. ศึกษาผลของสารละลายเคอร์คูมิน สารละลายดีเอชเอ และสารละลายผสมระหว่างเคอร์คูมินและดีเอชเอต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งดังกล่าวในจานเลี้ยงเซลล์ 24 หลุม (24 well-plate) ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น 6×10^4 เซลล์/1.9 ตารางเซนติเมตร (1 หลุม) ด้วยชนิดของอาหารเลี้ยงเซลล์และสภาวะการเลี้ยงเซลล์เช่นเดียวกับข้างต้น เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะบนจานเลี้ยงเซลล์ หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยสารละลายเคอร์คูมิน สารละลายดีเอชเอ และสารละลายผสมระหว่างเคอร์คูมินและดีเอชเอลงไปในแต่ละหลุม ปริมาตร หลุมละ 300 ไมโครลิตร และเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไปอีกเป็นเวลา 3 วัน โดยเก็บผลและเปลี่ยนอาหาร

เลี้ยงเซลล์ทุกวัน และทำการประเมินจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ตามช่วงเวลาดังกล่าว ด้วยเทคนิค MTT assay [Mosmann T. 1983] โดยแบ่งการทดสอบออกเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมเชิงลบ (Negative control) เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM

กลุ่มที่ 2 กลุ่มควบคุมเชิงบวก (Positive control) เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยสารละลายซิงค์อะซีเตตความเข้มข้น 100 ppm (Zn 100 ppm)

กลุ่มที่ 3 เลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 0.1% โดยปริมาตร (EtOH 0.1% v/v)

กลุ่มที่ 4 เลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยสารละลายเคอร์คูมินความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ (Cur25)

กลุ่มที่ 5 เลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยสารละลายดีเอชเอความเข้มข้น 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ (DHA12.5, DHA25, DHA50 และ DHA100)

กลุ่มที่ 6 เลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยสารละลายเคอร์คูมินและสารละลายดีเอชเอที่สัดส่วนความเข้มข้น 1:0.5, 1:1, 1:2 และ 1:4 (C1:D0.5, C1:D1, C1:D2 และ C1:D4)

2. ศึกษาประสิทธิภาพการปลดปล่อยเคอร์คูมิน ดีเอชเอ และเคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอของไฮโดรเจลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งดังกล่าวในจานเลี้ยงเซลล์ 24 หลุม (24 well-plate) ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น 6×10^4 เซลล์/1.9 ตารางเซนติเมตร (1 หลุม) ด้วยชนิดของอาหารเลี้ยงเซลล์และสภาวะการเลี้ยงเซลล์เช่นเดียวกับข้างต้น เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะบนจานเลี้ยงเซลล์หลังจากเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่และนำไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อ (Sterilization) ด้วยวิธีอบแก๊สเอธิลีนออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37°C และทำการดูดซับเคอร์คูมิน ดีเอชเอ และเคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอเรียบร้อยแล้วใส่ลงไปในแต่ละหลุม และเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไปอีกเป็นเวลา 7 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกวัน ทั้งนี้ทำการประเมินจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับไฮโดรเจลที่เวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน ด้วยเทคนิค MTT assay เพื่อดูประสิทธิภาพของเคอร์คูมิน ดีเอชเอ และเคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอที่ปลดปล่อยจากไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก โดยแบ่งการทดสอบออกเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมเชิงลบ (Negative control) เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM

กลุ่มที่ 2 กลุ่มควบคุมเชิงบวก (Positive control) เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยสารละลายซิงค์อะซีเตตความเข้มข้น 100 ppm (Zn 100 ppm)

กลุ่มที่ 3 เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีไฮโดรเจลชนิด G100, SF50G50, SF80G20 และ SF100 ซึ่งไม่ได้ดูดซับสารออกฤทธิ์ (Blank-G100, Blank-SF50G50, Blank-SF80G20 และ Blank-SF100)

กลุ่มที่ 4 เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีไฮโดรเจลชนิด G100, SF50G50, SF80G20 และ SF100 ซึ่งดูดซับสารละลายเคอร์คูมินความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ (G100-Cur25, SF50G50-Cur25, SF80G20-Cur25 และ SF100-Cur25) คิดเป็นปริมาณเคอร์คูมินทั้งหมด 8.28 ไมโครกรัมต่อชิ้นไฮโดรเจล

กลุ่มที่ 5 เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีไฮโดรเจลชนิด G100, SF50G50, SF80G20 และ SF100 ซึ่งดูดซับสารละลายดีเอชเอความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ (G100-DHA100, SF50G50-DHA100, SF80G20-DHA100 และ SF100-DHA100) คิดเป็นปริมาณดีเอชเอทั้งหมด 29.52 ไมโครกรัมต่อชิ้นไฮโดรเจล

กลุ่มที่ 6 เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีไฮโดรเจลชนิด G100, SF50G50, SF80G20 และ SF100 ซึ่งดูดซับสารละลายผสมระหว่างเคอร์คูมินและดีเอชเอที่สัดส่วนความเข้มข้น 1:4 (G100-C1:D4, SF50G50-C1:D4, SF80G20-C1:D4 และ SF100-C1:D4) คิดเป็นปริมาณเคอร์คูมิน 8.28 ไมโครกรัม และดีเอชเอ 29.52 ไมโครกรัมต่อชิ้นไฮโดรเจล

3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลเชิงปริมาณมาหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากนั้นวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติแบบ ANOVA ด้วยโปรแกรมมินิแทบ (Minitab system for Windows version 14) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p -value < 0.05) เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้เตรียมไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินที่ถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ และนำไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง เพื่อศึกษาคุณลักษณะและสมบัติทางกายภาพและชีวภาพ ตลอดจนความสามารถในการดูดซับและควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ 2 ชนิด ได้แก่ เคอร์คูมิน และดีเอชเอ และศึกษาผลการปลดปล่อยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Human cervical carcinoma cell line; CaSki cell) ในระดับห้องปฏิบัติการ

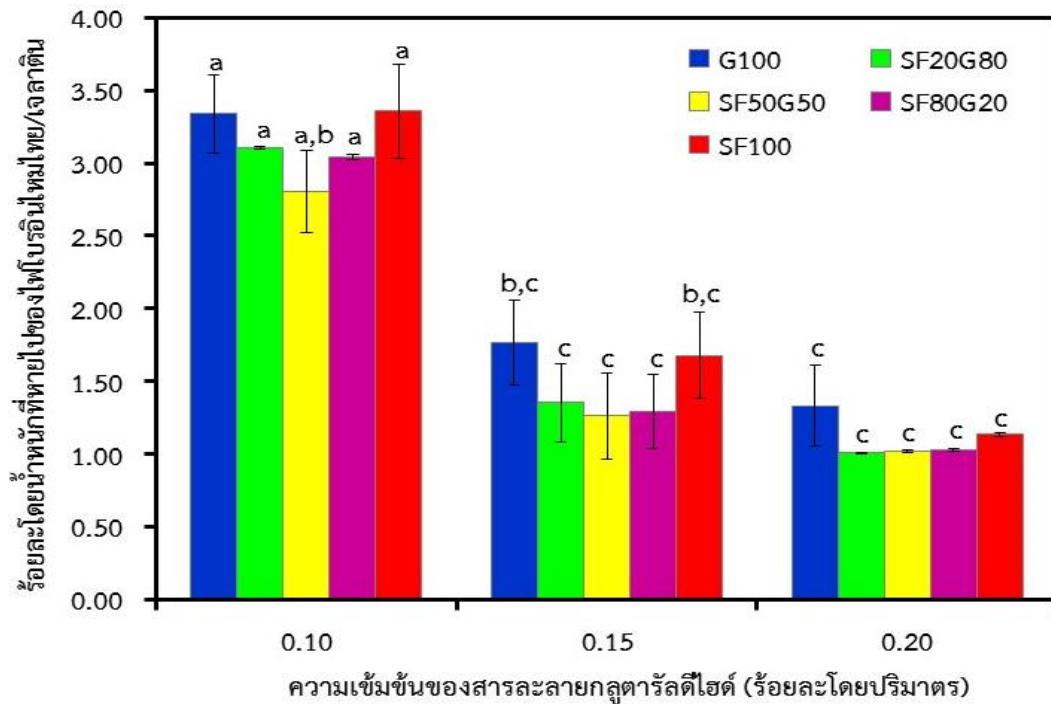
4.1 ผลของความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ต่อความคงตัวของไฮโดรเจล

ผลการศึกษาความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ต่อความคงตัวของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่เตรียมได้ สามารถพิจารณาได้จากค่าร้อยละโดยน้ำหนักที่หายไปของไฮโดรเจลภายหลังแช่ในสารละลาย PBS, pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 4.1 พบว่าไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่ถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.10%, 0.15% และ 0.20% โดยปริมาตร มีค่าร้อยละโดยน้ำหนักที่หายไปอยู่ในช่วงประมาณ 2.7-3.4%, 1.3-1.8% และ 1.0-1.3% ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าไฮโดรเจลที่ถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.20% โดยปริมาตร มีร้อยละโดยน้ำหนักที่หายไปน้อยที่สุด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกรณีใช้สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.10% โดยปริมาตร แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกรณีใช้สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.15% โดยปริมาตร

การเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ เป็นกลไกการสร้างพันธะเคมีระหว่างหมู่อะมิโนของ (-NH₂) โปรตีนและหมู่แอลดีไฮด์ (-CHO) ของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ [Bigi A. และคณะ 2001] จากการวิเคราะห์พบว่าสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.10% อาจมีปริมาณหมู่แอลดีไฮด์ไม่เพียงพอที่จะทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนของโปรตีน ส่งผลให้ไฮโดรเจลที่ได้มีความคงตัวต่ำ และพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์เพิ่มขึ้น ทำให้ความคงตัวของไฮโดรเจลเพิ่มขึ้น ซึ่งไฮโดรเจลที่เตรียมขึ้นโดยการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.20% มีความคงตัวมากที่สุด เนื่องจากความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่เพิ่มขึ้น ทำให้ปริมาณหมู่แอลดีไฮด์ที่จะทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนเพิ่มขึ้น ดังนั้นการเชื่อมขวางจึงเกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จากรายงานของ Sheu M.T. และคณะ (2001) ได้ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (0-0.2% โดยน้ำหนัก) ที่ใช้ในการเชื่อมขวางโครงเลี้ยงเซลล์คอลลาเจน พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ค่าร้อยละการเชื่อมขวางของคอลลาเจนเพิ่มขึ้น โดยที่ร้อยละการเชื่อมขวางมีค่า 100% เมื่อความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์มากกว่า 0.12% นอกจากนี้ยังทำให้ค่าอีลาสติคโมดูลัส (Elastic Modulus) และความหนืดของคอลลาเจนเพิ่มขึ้นด้วย และรายงานของ Kanokpanont S. และคณะ (2012) ได้ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (0-0.1% โดยปริมาตร) ที่ใช้ในการเชื่อมขวางแผ่นแปะแผล (Wound Dressing) ผสมระหว่างเซริซิน ไพโบรอิน และเจลาติน พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ค่าร้อยละการเชื่อมขวางของแผ่นแปะแผลเพิ่มขึ้น ส่งผลให้แผ่นแปะแผลมีความคงตัวเพิ่มขึ้นด้วย เนื่องจากความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่เพิ่มขึ้น ทำให้ปริมาณหมู่แอลดีไฮด์ที่จะทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนในสายโซ่โปรตีนเพิ่มขึ้น นอกจากนี้งานวิจัยของถนอม วงศ์พุทธรักษา (2554) ได้ศึกษาความคงตัวของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินที่คอนจูเกตด้วยสารละลายผสมของเจลาติน/ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ โดยใช้สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นต่างๆ (0.05-0.2% โดยปริมาตร) พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ที่คอนจูเกตด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.05% โดยปริมาตร มีความคงตัวน้อยที่สุด สำหรับโครงเลี้ยงเซลล์ที่คอนจูเกตด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.1-0.2% โดยปริมาตร มีความคงตัวเพิ่มขึ้น ทั้งนี้สังเกตเห็นได้ว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ทำให้ประสิทธิภาพในการเชื่อมขวางเพิ่มขึ้น ส่งผลให้โครงเลี้ยงเซลล์มีความคงตัวสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ข้างต้น

ดังนั้นในการศึกษาคุณลักษณะและสมบัติทางชีวภาพและกายภาพ ตลอดจนความสามารถในการดูดซับและควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ (เคอร์คูมิน และดีเอชเอ) ของไฮโดรเจล จึงเลือกใช้ไฮโดรเจลที่เตรียมโดยผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.20% โดยปริมาตร เท่านั้น



รูปที่ 4.1 ร้อยละโดยน้ำหนักที่หายไปของไฮโดรเจลไฟโบรอินใหม่ไทย/เจลาตินที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ (G100, SF20G80, SF50G50, SF80G20 และ SF100) ซึ่งถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน หลังแช่ในสารละลาย PBS, pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(a, b และ c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$)

4.2 สมบัติของชีววัสดุและสารออกฤทธิ์ (เคอร์คูมิน และดีเอชเอ)

4.2.1 ค่าศักย์เซต้าของสารละลายผสมของไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน สารละลาย เคอร์คูมิน และสารละลายดีเอชเอ

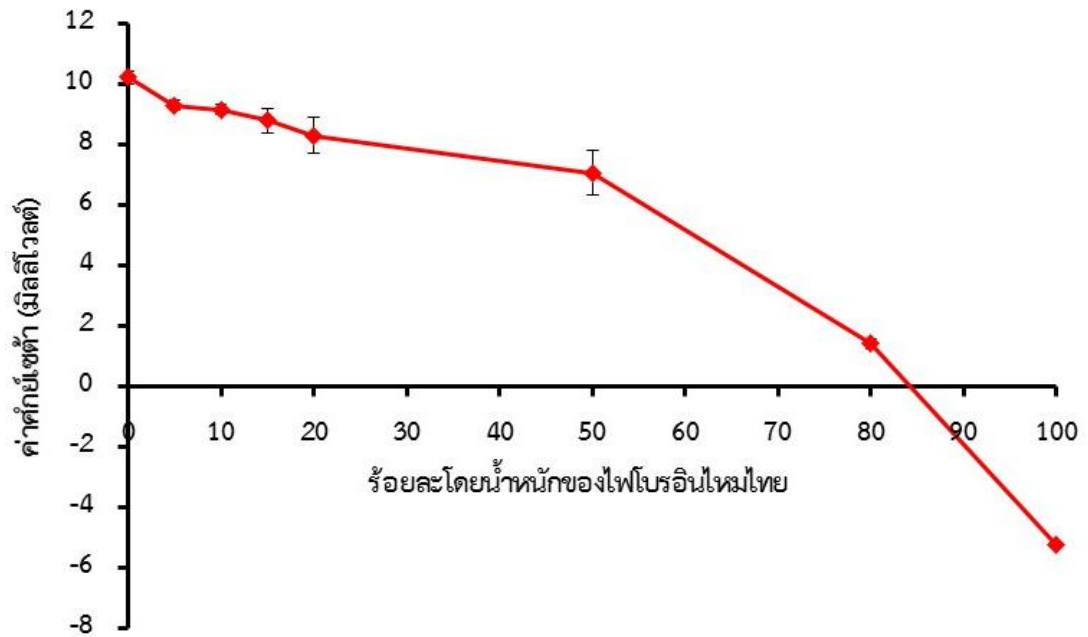
ผลการศึกษาค่าศักย์เซต้าของสารละลายผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทย/เจลาติน สารละลายเคอร์คูมิน และสารละลายดีเอชเอ แสดงถึงค่าประจุไฟฟ้าบริเวณระนาบเฉือน (Shear Plane) ของอนุภาคที่แขวนลอยอยู่ในชั้นของสารละลาย จากผลการศึกษาดังแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่าสารละลายเจลาติน (G100) และสารละลายไฟโบรอินไหมไทย (SF100) มีค่าศักย์เซต้าเท่ากับ $(+10.20 \pm 0.23)$ และ (-5.23 ± 0.10) มิลลิโวลต์ ตามลำดับ สำหรับสารละลายผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่สัดส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่างๆ นั้น พบว่าเมื่อสัดส่วนของไฟโบรอินไหมไทยในสารละลายผสมมีค่าเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ค่าศักย์เซต้าที่เป็นบวกมีค่าลดลง (ดังแสดงในรูปที่ 4.2) โดยสารละลายผสมที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินอยู่ในช่วง 5-20% ค่าศักย์เซต้ามีแนวโน้มลดลงเล็กน้อย และไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายเจลาติน และเมื่อเพิ่มสัดส่วนของไฟโบรอินเป็น 50% พบว่าค่าศักย์เซต้ามีค่าลดลง และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายเจลาติน แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายผสมที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินอยู่ในช่วง 10-20% ในขณะที่สัดส่วนของไฟโบรอินเพิ่มเป็น 80% พบว่าค่าศักย์เซต้ามีแนวโน้มลดลงอย่างมาก และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายเจลาติน และสารละลายผสมที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินอยู่ในช่วง 5-50% ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ratanavaraporn J. และคณะ (2013) ที่รายงานว่าค่าศักย์เซต้าของสารละลายผสมระหว่างไฟโบรอินและเจลาตินที่สัดส่วนการผสมต่างๆ มีค่าเป็นบวกลดลง เมื่อสัดส่วนของไฟโบรอินเพิ่มขึ้น เนื่องจากสารละลายผสมที่มีไฟโบรอินเป็นองค์ประกอบในปริมาณมากจะแสดงประจุบวกน้อยกว่ากรณีที่สารละลายผสมมีเจลาตินมาก เพราะประจุบวกของเจลาตินถูกบดบังโดยประจุลบของไฟโบรอิน นอกจากนี้รายงานของ Jetbumpenkul P. และคณะ (2012) พบว่าสารละลายผสมระหว่างไฟโบรอินและเจลาตินที่มีสัดส่วนของเจลาตินเป็นองค์ประกอบสูงจะแสดงประจุบวก เนื่องจากค่าไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric point; pI) ของเจลาตินมีค่ามากกว่าค่า pH ของสารละลาย ในขณะที่สารละลายที่มีองค์ประกอบของไฟโบรอินมาก จะแสดงประจุลบ เนื่องจากค่า Isoelectric Point ของไฟโบรอินมีค่าน้อยกว่าค่า pH ของสารละลาย

สำหรับค่าศักย์เซต้าของสารละลายเคอร์คูมินและสารละลายดีเอชเอ ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ที่จะใช้ในการทดสอบการดูดซับและการควบคุมการปลดปล่อยมีค่าเท่ากับ (-10.96 ± 0.65) และ (-1.24 ± 0.65) มิลลิโวลต์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ทั้งสองชนิดมีประจุเป็นลบ โดยเมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของโมเลกุล พบว่าเคอร์คูมิน (รูปที่ 4.3 ก) มีโครงสร้างที่แสดงประจุลบมากกว่าดีเอชเอ (รูปที่ 4.3 ข) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ค่าศักย์เซต้าข้างต้น

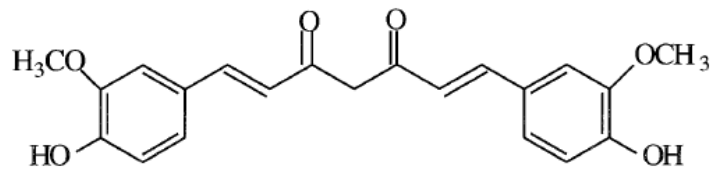
ตารางที่ 4.1 ค่าศักย์ゼต้าของสารละลายผสมไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินชนิดเอ ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนัก ที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร ในน้ำปราศจากไอออน (pH ~ 5.5) สารละลายเคอร์คูมิน และสารละลายดีเอชเอ ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนัก ในสารละลายเอนาทอล (pH ~ 7)

ตัวอย่าง	ค่าศักย์ゼต้า (มิลลิโวลต์)
G100	+10.20 ± 0.23 ^a
SF5G95	+9.28 ± 0.15 ^a
SF10G90	+9.14 ± 0.15 ^{a,b}
SF15G85	+8.77 ± 0.40 ^{a,b}
SF20G80	+8.28 ± 0.59 ^{a,b}
SF50G50	+7.05 ± 0.73 ^b
SF80G20	+1.40 ± 0.17 ^c
SF100	-5.23 ± 0.10 ^d
เคอร์คูมิน	-10.96 ± 0.65 ^e
ดีเอชเอ	-1.24 ± 0.65 ^c

(a, b, c, d และ e แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$)



รูปที่ 4.2 ค่าศักย์เซต้าของของสารละลายผสมไฟเบอร์อินไหมไทย/เจลาติน ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนัก ที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร ในน้ำปราศจากไอออน (pH ~ 5.5)



ก) เคอร์คูมิน



ข) ดีเอชเอ

รูปที่ 4.3 โครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ ก) เคอร์คูมิน [Mou-Tuan Huang และคณะ 1997] และ ข) ดีเอชเอ [Narayan B. และคณะ 2006]

4.2.2 ค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มผสมไฟโบรอินไหมไทยและเจลาติน ฟิล์มเคอร์คูมิน และฟิล์มทีเอชเอ

ค่ามุมสัมผัสของน้ำบนพื้นผิววัสดุ แสดงถึงความชอบน้ำ (Hydrophilicity) และความไม่ชอบน้ำ (Hydrophobicity) ของวัสดุ ดังความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติของพื้นผิววัสดุกับค่ามุมสัมผัสของน้ำในตารางที่ 4.2 จากผลการศึกษาดังแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่าฟิล์มเจลาตินมีค่ามุมสัมผัสของน้ำเท่ากับ 65.97 ± 0.20 องศา และฟิล์มไฟโบรอินไหมไทยมีค่ามุมสัมผัสของน้ำเท่ากับ 70.29 ± 1.28 องศา ซึ่งจะสังเกตได้ว่าค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มเจลาติน และฟิล์มไฟโบรอินไหมไทยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้เจลาตินเป็นโพรตีนที่มีความชอบน้ำและสามารถละลายน้ำได้ดี แต่เนื่องจากฟิล์มเจลาตินถูกเตรียมขึ้นโดยผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร ซึ่งมีการใช้หมู่อะมิโนที่มีความชอบน้ำในกระบวนการเชื่อมขวาง ทำให้ความชอบน้ำของโมเลกุลเจลาตินลดลง แต่ยังคงมีค่ามากกว่าฟิล์มไฟโบรอินไหมไทย สำหรับฟิล์มผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่สัดส่วนการผสมต่างๆ มีค่ามุมสัมผัสของน้ำอยู่ในช่วงประมาณ 68.14-74.92 องศา (ดังแสดงในรูปที่ 4.4) โดยค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มผสมที่สัดส่วนของไฟโบรอินอยู่ในช่วง 5-15% มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มเจลาติน และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อสัดส่วนของไฟโบรอินอยู่ในช่วง 20-50% ค่ามุมสัมผัสของน้ำมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มเจลาติน โดยฟิล์มผสมที่สัดส่วนของไฟโบรอิน 50% มีค่ามุมสัมผัสของน้ำสูงที่สุด ในขณะที่สัดส่วนของไฟโบรอินเพิ่มเป็น 80% พบว่าค่ามุมสัมผัสของน้ำมีแนวโน้มลดลง และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มเจลาติน แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มผสมที่สัดส่วนของไฟโบรอินอยู่ในช่วง 5-50% จะเห็นได้ว่าสัดส่วนของไฟโบรอินมีผลต่อค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มผสมระหว่างไฟโบรอิน/เจลาติน

จากรายงานของ Ratanavaraporn J. และคณะ (2013) ได้วิเคราะห์ค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มผสมระหว่างไฟโบรอิน/เจลาติน ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 0.05% โดยปริมาตร พบว่าฟิล์มเจลาตินมีค่ามุมสัมผัสของน้ำเท่ากับ 59.1 ± 2.1 องศา และฟิล์มผสมมีค่ามุมสัมผัสของน้ำอยู่ในช่วงประมาณ 63.6-67.7 องศา ทั้งนี้จะสังเกตได้ว่าการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ทำให้ความชอบน้ำของเจลาตินลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าสัดส่วนของไฟโบรอินที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ค่ามุมสัมผัสของน้ำเพิ่มขึ้น กล่าวคือทำให้สมบัติความชอบน้ำลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มเจลาติน ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาข้างต้น

สำหรับฟิล์มเคอร์คูมิน และฟิล์มทีเอชเอมีค่ามุมสัมผัสของน้ำเท่ากับ 64.30 ± 2.31 องศา และ 61.01 ± 0.84 องศา ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเคอร์คูมินและทีเอชเอจัดอยู่ในวัสดุประเภทที่มีความชอบน้ำ โดยเคอร์คูมินมีความชอบน้ำน้อยกว่าทีเอชเอเล็กน้อย

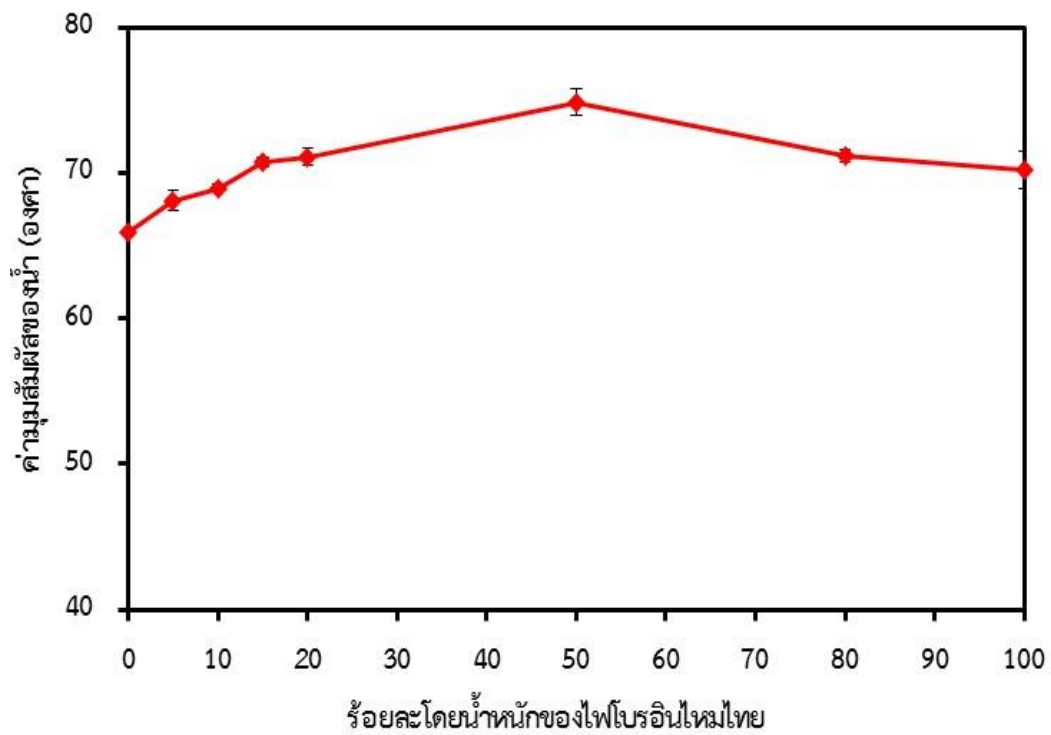
ตารางที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นผิววัสดุกับค่ามุมสัมผัสของน้ำ (Sepuer S. และคณะ 2008)

สมบัติของพื้นผิววัสดุ	ค่ามุมสัมผัสของน้ำ (องศา)
มีความชอบน้ำสูง (Super-hydrophilic)	$\theta = 0$
มีความชอบน้ำ (Hydrophilic)	$0^\circ < \theta < 90^\circ$
มีความไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic)	$90^\circ \leq \theta < 180^\circ$
มีความไม่ชอบน้ำสูง (Super-hydrophobic)	$\theta > 180^\circ$

ตารางที่ 4.3 ค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มผสมไฟโบรอินไหมไทย/เจลาติน ที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร ฟิล์มเคอร์คูมิน และฟิล์มดีเอชเอ

ตัวอย่าง	ค่ามุมสัมผัสของน้ำ (องศา)
G100	$65.97 \pm 0.20^{a,d}$
SF5G95	$68.14 \pm 0.70^{a,b}$
SF10G90	$69.00 \pm 0.23^{a,b}$
SF15G85	$70.77 \pm 0.32^{a,b,c}$
SF20G80	$71.14 \pm 0.59^{b,c}$
SF50G50	74.92 ± 0.93^c
SF80G20	$71.19 \pm 0.42^{b,c}$
SF100	$70.29 \pm 1.28^{a,b}$
เคอร์คูมิน	64.30 ± 2.31^d
ดีเอชเอ	61.01 ± 0.84^d

(a, b, c และ d แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$)



รูปที่ 4.4 ค่ามูสัมพัทธ์ของน้ำบนฟิล์มไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร

4.3 คุณลักษณะและสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของไฮโดรเจล

4.3.1 โครงสร้างพื้นฐานและความพรุนของไฮโดรเจล

ลักษณะภายนอกของไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่ทุกอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก ซึ่งถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร แสดงดังรูปที่ 4.5 พบว่าไฮโดรเจลที่ได้มีสีเหลืองอ่อน เนื่องมาจากสีของสารละลายไฟโบรอิน ประกอบกับสีที่เกิดจากสารละลายกลูตารัลดีไฮด์

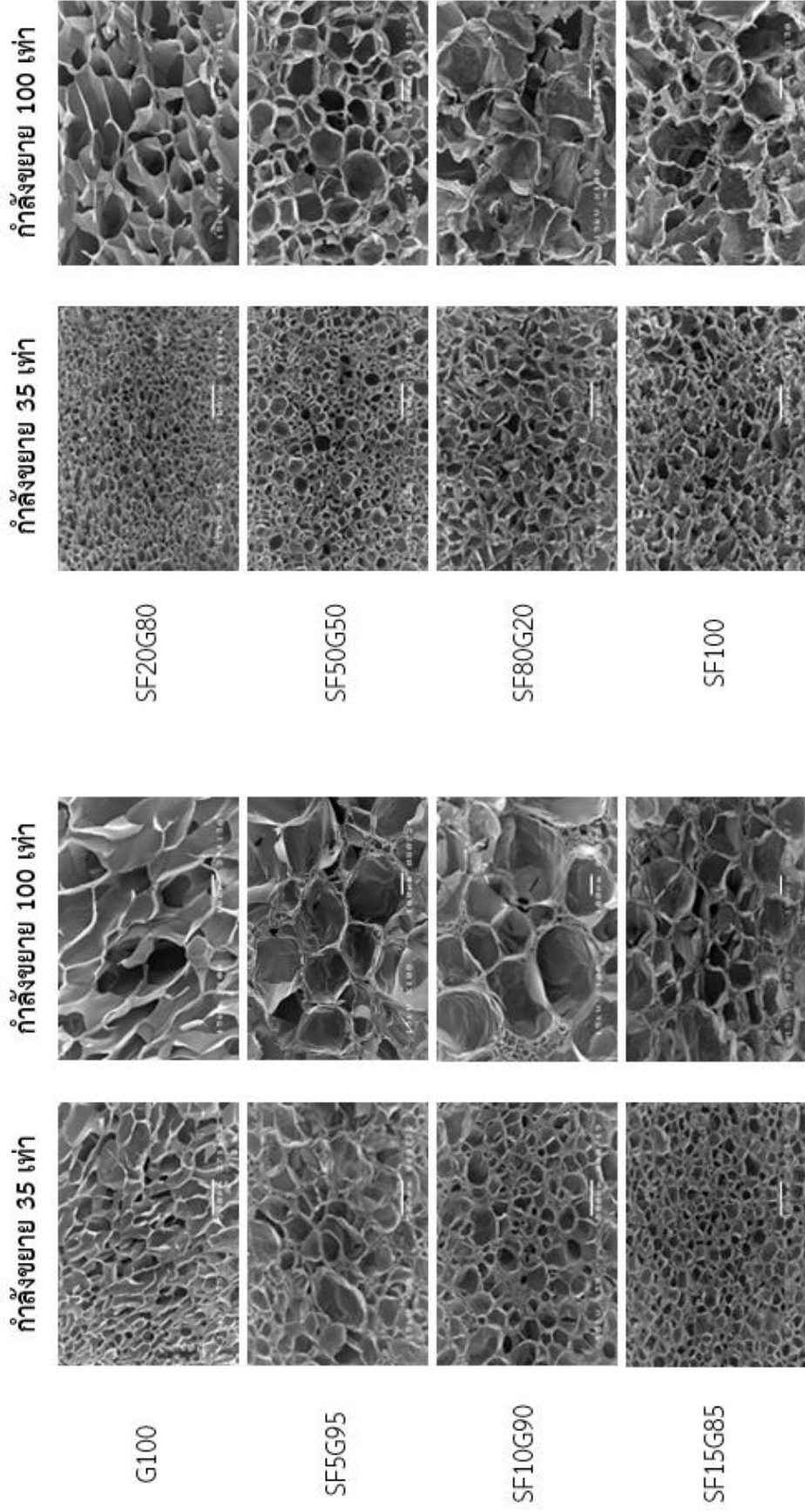


รูปที่ 4.5 ลักษณะภายนอกของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร

เมื่อพิจารณาโครงสร้างภายในของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ที่กำลังขยาย 35 และ 100 เท่า ดังแสดงในรูปที่ 4.6 พบว่าไฮโดรเจลที่ได้มีรูพรุนสม่ำเสมอและเชื่อมโยงกันเป็นเครือข่าย โดยมีขนาดรูพรุนเฉลี่ย ดังสรุปในตารางที่ 4.4 พบว่าไฮโดรเจลเจลาติน (G100) และไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย (SF100) มีขนาดรูพรุนเฉลี่ยเท่ากับ 273.72 ± 52.08 และ 190.99 ± 29.45 ไมโครเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่สัดส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่างๆ พบว่ามีขนาดรูพรุนเฉลี่ยอยู่ในช่วงประมาณ 132.97-278.76 ไมโครเมตร โดยไฮโดรเจลชนิด SF5G95 และ SF10G90 มีขนาดรูพรุนเฉลี่ยใกล้เคียงกับไฮโดรเจลชนิด G100 (ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ) และเมื่อเพิ่มสัดส่วนของไฟโบรอินเป็น 15% (ไฮโดรเจลชนิด SF15G85) พบว่ารูพรุนเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 157.60 ± 16.64 ไมโครเมตร ซึ่งขนาดดังกล่าวลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลชนิด G100, SF5G95 และ SF10G90 สำหรับไฮโดรเจลชนิด SF20G80 มีรูพรุนเฉลี่ยเท่ากับ 132.97 ± 11.26 ไมโครเมตร ซึ่งเป็นขนาดของรูพรุนที่เล็กที่สุดของไฮโดรเจลที่เตรียมได้ ขนาดรูพรุนดังกล่าวไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลชนิด SF15G85 แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลชนิด G100, SF5G95 และ SF10G90 ในขณะที่ไฮโดรเจลชนิด SF50G50 ขนาดรูพรุนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (146.62 ± 12.23 ไมโครเมตร) โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลชนิด SF15G85 และ SF20G80 แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลชนิด

G100, SF5G95 และ SF10G90 เมื่อเพิ่มสัดส่วนของไฟโบรอินเป็น 80% (ไฮโดรเจลชนิด SF80G20) รูพรุนที่ได้มีขนาดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (197.42 ± 22.55) เมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลชนิด SF15G85, SF20G80 และ SF50G50 และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลชนิด SF100 แต่รูพรุนยังคงมีขนาดเล็กกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลชนิด G100, SF5G95 และ SF10G90 ทั้งนี้จะสังเกตได้ว่าไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินจะมีขนาดรูพรุนเฉลี่ยเล็กลงเมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลเจลาตินเพียงอย่างเดียว และเมื่อพิจารณาความพรุนของไฮโดรเจล ดังสรุปในตารางที่ 4.4 พบว่าไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่สัดส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่างๆ มีค่าความพรุนค่อนข้างสูงประมาณ 83.45-94.98% และไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างไฮโดรเจลสูตรต่างๆ

จากรายงานของ Lv Q. และคณะ (2008) ได้ศึกษาโครงสร้างพื้นฐานของโครงเลี้ยง เซลล์ผสมระหว่างไฟโบรอินและคอลลาเจนที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย EDC พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์มี รูพรุนที่สม่ำเสมอ เนื่องจากอันตรกิริยา (Interaction) ที่เกิดขึ้นระหว่างไฟโบรอินและคอลลาเจน ทำให้ไฟโบรอินไม่เกิดการรวมตัวเป็นโครงสร้างแบบแผ่น (Lamellar) ดังนั้นโครงเลี้ยงเซลล์จึงมีลักษณะ เป็นรูพรุน นอกจากนี้รายงานของ He J. และคณะ (2012) พบว่าโครงสร้างพื้นฐานของโครงเลี้ยง เซลล์ผสมระหว่างไฟโบรอินและเจลาตินที่สัดส่วนการผสมต่างๆ ซึ่งถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลาย กูลตาร์ลดีไฮด์ มีโครงสร้างรูพรุนที่เชื่อมโยงกันตลอดทั้งโครงเลี้ยงเซลล์ โดยรูพรุนเฉลี่ยมีขนาดเพิ่มขึ้น เมื่อโครงเลี้ยงเซลล์มีสัดส่วนของเจลาตินเพิ่มขึ้น เนื่องจากการเพิ่มสัดส่วนของเจลาตินก่อให้เกิด อันตรกิริยาระหว่างสายโซ่ไฟโบรอินและเจลาติน ส่งผลให้เกิดการสูญเสียโครงสร้างที่มีลักษณะเป็น แผ่นของไฟโบรอิน ดังนั้นโครงสร้างรูพรุนจึงมีขนาดเพิ่มขึ้น และพบว่าสัดส่วนการผสมระหว่าง ไฟโบรอินและเจลาตินมีผลเล็กน้อยต่อค่าความพรุน โดยความพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ที่ได้มีค่าอยู่ ในช่วงประมาณ 70-90% ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาข้างต้น



รูปที่ 4.6 ลักษณะโครงสร้างภายในของไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟเบอร์อินไหม/เจลาตินที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ซึ่งถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลายยาลูกตารัลดีไฮต์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 35 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 500 ไมโครเมตร) และ 100 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 100 ไมโครเมตร)

ตารางที่ 4.4 ขนาดรูปทรงเฉลี่ยและความพรุนของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร

ตัวอย่าง	ขนาดรูปทรงเฉลี่ย (ไมโครเมตร)	ความพรุน (%)
G100	273.12 ± 52.09 ^a	93.77 ± 0.46 ^a
SF5G95	278.76 ± 39.41 ^a	94.01 ± 0.98 ^a
SF10G90	256.12 ± 28.96 ^a	94.98 ± 0.76 ^a
SF15G85	157.60 ± 16.64 ^b	85.19 ± 1.71 ^a
SF20G80	132.97 ± 11.26 ^b	83.45 ± 5.96 ^a
SF50G50	146.62 ± 12.23 ^b	87.31 ± 5.46 ^a
SF80G20	197.42 ± 22.55 ^c	89.57 ± 5.46 ^a
SF100	190.99 ± 29.45 ^c	88.67 ± 4.11 ^a

(a, b, และ c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$)

4.3.2 ความสามารถในการดูดซับน้ำของไฮโดรเจล

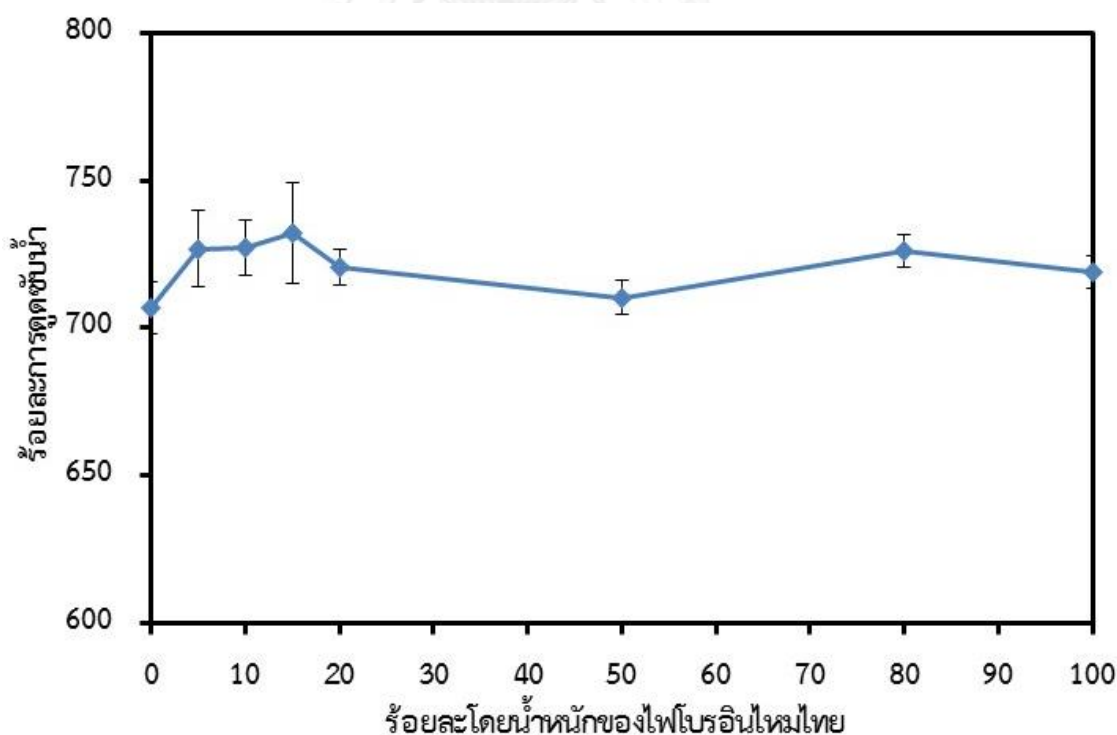
ผลการศึกษาความสามารถในการดูดซับน้ำของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร ภายหลังจากแช่ในสารละลาย PBS, pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังสรุปในตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.7 พบว่าไฮโดรเจลเจลาติน (G100) และไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย (SF100) มีร้อยละการดูดซับน้ำเท่ากับ 706.81 ± 9.01 และ 719.10 ± 5.54 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยมีค่าร้อยละการดูดซับน้ำมากกว่าไฮโดรเจลเจลาตินเล็กน้อยแต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ถึงแม้ว่าเจลาตินจะเป็นโปรตีนที่มีความชอบน้ำมากกว่าไฟโบรอิน ทั้งนี้เนื่องจากไฮโดรเจลไฟโบรอินมีความคงรูปมากกว่าไฮโดรเจลเจลาติน ดังนั้นจึงสามารถกักเก็บน้ำได้ดีกว่าไฮโดรเจลเจลาติน สำหรับไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่สัดส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่างๆ มีค่าร้อยละการดูดซับน้ำอยู่ในช่วงประมาณ 710.33-739.94 และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยค่าร้อยละการดูดซับน้ำของไฮโดรเจลที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินอยู่ในช่วง 5-15% มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลเจลาตินเพียงอย่างเดียว และเมื่อสัดส่วนของไฟโบรอินเพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 20-50% ค่าร้อยละการดูดซับน้ำมีแนวโน้มลดลง แต่ยังคงมีค่ามากกว่าค่าร้อยละการดูดซับน้ำของไฮโดรเจลเจลาติน ในขณะที่เมื่อสัดส่วนไฟโบรอินเพิ่มขึ้นเป็น 80% ค่าร้อยละการดูดซับน้ำมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย

จากการวิเคราะห์พบว่าค่าร้อยละการดูดซับน้ำของไฮโดรเจลไฟโบรอิน/เจลาตินมีค่ามากกว่า 100% เนื่องจากไฮโดรเจลมีโครงสร้างที่มีความพรุนสูง ประกอบกับไฮโดรเจลที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินเป็นองค์ประกอบจะมีความคงรูปสูง ดังนั้นความสามารถในการกักเก็บน้ำจึงเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลเจลาตินเพียงอย่างเดียว จากรายงานของ Tiyaboonchai W. และคณะ (2011) ซึ่งได้ศึกษาความสามารถในการดูดซับน้ำของโครงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอิน/เจลาตินที่ชักนำให้เกิดโครงสร้าง β -sheet โดยแช่ในสารละลายเมทานอล พบว่าโครงเลี้ยงเซลล์สามารถดูดซับน้ำได้มากกว่า 90% เนื่องจากโครงสร้างที่มีความพรุนสูงประมาณ 70% ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ข้างต้น

ตารางที่ 4.5 ร้อยละการดูดซับน้ำของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร เมื่อแช่ในสารละลาย PBS, pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ร้อยละการดูดซับน้ำ
G100	706.81 ± 9.01 ^a
SF5G95	726.86 ± 12.78 ^a
SF10G90	727.07 ± 9.41 ^a
SF15G85	732.04 ± 16.92 ^a
SF20G80	720.45 ± 6.08 ^a
SF50G50	710.33 ± 5.95 ^a
SF80G20	726.03 ± 5.66 ^a
SF100	719.10 ± 5.54 ^a

(a แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$)



รูปที่ 4.7 ร้อยละการดูดซับน้ำของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร เมื่อแช่ในสารละลาย PBS, pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.3.3 ร้อยละการเชื่อมขวางของไฮโดรเจล

ผลการศึกษาร้อยละการเชื่อมขวางของไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทย/เจลาติน สามารถพิจารณาได้จากปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของไฮโดรเจลก่อนและหลังการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ โดยใช้สาร 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) ทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีน (Bubnis W. และ Ofner lii C.M. 1992) จากผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 4.8 พบว่าไฮโดรเจลเจลาติน (G100) และไฮโดรเจลไฟโบรอิน (SF100) ทั้งก่อนและหลังการเชื่อมขวางมีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระมากที่สุดและน้อยที่สุดตามลำดับ (รูปที่ 4.8 ก) และมีค่าร้อยละการเชื่อมขวางประมาณ 33 และ 50 ตามลำดับ (รูปที่ 4.8 ข) ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินมีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลเจลาตินทั้งก่อนและหลังการเชื่อมขวาง โดยพบว่าเมื่อมีสัดส่วนของไฟโบรอินเพียง 5% (ไฮโดรเจลชนิด SF5G95) ส่งผลให้ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลเจลาติน และมีค่าร้อยละการเชื่อมขวางเพิ่มขึ้นจาก 33 เป็น 70 สำหรับไฮโดรเจลชนิด SF10G90 และ SF15G85 ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระหลังการเชื่อมขวางไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลชนิด SF5G95 แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลเจลาติน และมีค่าร้อยละการเชื่อมขวางประมาณ 70-75 ในขณะที่ไฮโดรเจลชนิด SF20G80, SF50G50 และ SF80G20 ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระหลังการเชื่อมขวางมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลชนิด G100, SF5G95, SF10G90, SF15G85 แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลชนิด SF100 ส่งผลให้ค่าร้อยละการเชื่อมขวางสูงประมาณ 83-89 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลชนิด G100, SF5G95, SF10G90, SF15G85 และ SF100 ยกเว้นไฮโดรเจลชนิด SF10G90 และ SF80G20 ที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารละลายกลูตารัลดีไฮด์สามารถใช้เชื่อมขวางทั้งเจลาตินและไฟโบรอินได้ โดยหมู่แอลดีไฮด์ของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์จะเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนไลซีน (Lysine) และหมู่อะมิโนที่ปลายสายโซ่โมเลกุลของโปรตีน (N-terminal amino groups) (Leo E. และคณะ 1997) ซึ่งจะเห็นได้ว่าทั้งเจลาตินและไฟโบรอินมีหมู่อะมิโนอิสระเป็นองค์ประกอบทั้งคู่

จากรายงานของ Ratanavaraporn J. และคณะ (2013) ได้ศึกษาร้อยละการเชื่อมขวางของอนุภาคกลมขนาดไมครอนของเจลาติน/ไฟโบรอินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ พบว่าอนุภาคกลมขนาดไมครอนของเจลาตินมีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระมากที่สุด และปริมาณหมู่อะมิโนอิสระมีค่าลดลง เมื่อสัดส่วนของไฟโบรอินในอนุภาคกลมขนาดไมครอนเพิ่มขึ้น และหลังจากการเชื่อมขวางพบว่าปริมาณหมู่อะมิโนอิสระมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับร้อยละการเชื่อมขวาง

พบว่าอนุภาคกลมขนาดไมครอนของเจลาติน (G100) และอนุภาคกลมขนาดไมครอนที่สัดส่วน G70SF30 มีค่าน้อยที่สุดประมาณ 20-25% ส่วนอนุภาคกลมขนาดไมครอนที่สัดส่วน G50SF50 และ G30SF70 มีค่าร้อยละการเชื่อมขวางประมาณ 55% และ 45% ตามลำดับ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคกลมขนาดไมครอนของเจลาตินเพียงอย่างเดียว ทั้งนี้จะสังเกตได้ว่าอนุภาคกลมขนาดไมครอนของสารผสมมีค่าร้อยละการเชื่อมขวางมากกว่าอนุภาคกลมขนาดไมครอนของเจลาติน ถึงแม้ว่าเจลาตินจะมีปริมาณของหมู่เอมิโนอิสระสำหรับการใช้ในการเชื่อมขวางมากที่สุดก็ตาม เนื่องจากความหนาแน่นของหมู่เอมิโนอิสระที่มากเกินไปของอนุภาคกลมขนาดไมครอนของเจลาตินอาจเป็นอุปสรรคต่อการเชื่อมขวางจึงทำให้มีค่าร้อยละการเชื่อมขวางน้อยที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาข้างต้น

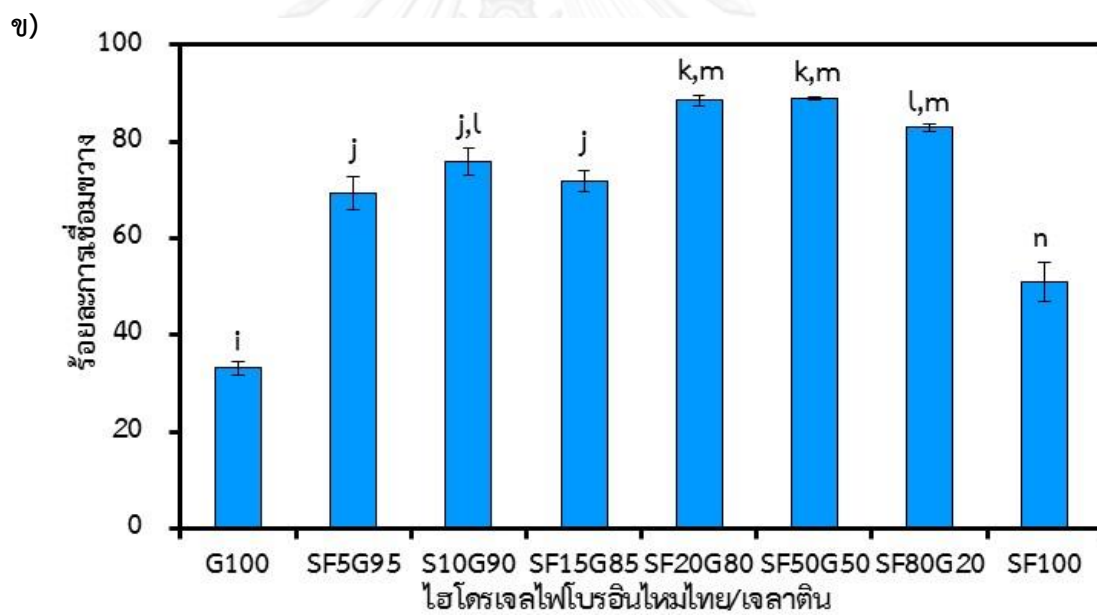
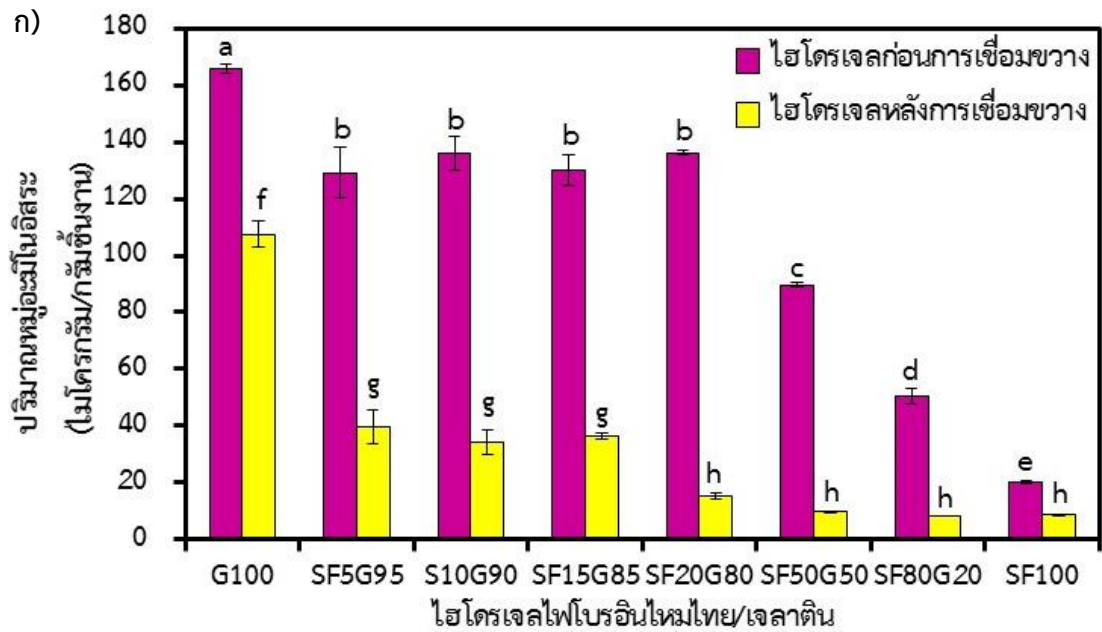
4.3.4 ความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพของไฮโดรเจลในระดับห้องปฏิบัติการ

ผลการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร สามารถพิจารณาได้จากร้อยละของน้ำหนักแห้งคงเหลือของไฮโดรเจลภายหลังแช่ในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร pH7.4 อุณหภูมิ 37°C ดังแสดงในรูปที่ 4.9 จากผลการศึกษาลดลงช่วงระยะเวลาแช่ 28 วัน พบว่าไฮโดรเจลเจลาติน (G100) มีร้อยละของน้ำหนักแห้งคงเหลือที่น้อยที่สุดเท่ากับ 67.31 ± 3.81 และไฮโดรเจลไฟโบรอิน (SF100) มีร้อยละของน้ำหนักแห้งคงเหลือเท่ากับ 87.89 ± 0.59 ซึ่งจะเห็นได้ว่าไฟโบรอินมีการย่อยสลายที่ช้ากว่าเจลาติน ทั้งนี้เนื่องจากคอลลาจีเนสเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการย่อยสลายคอลลาเจนและอนุพันธ์ของคอลลาเจน (เจลาติน) (Biman B. และคณะ 2009) ประกอบกับผลการศึกษาร้อยละการเชื่อมขวางพบว่าไฮโดรเจลเจลาตินมีร้อยละการเชื่อมขวางน้อยที่สุด และเจลาตินเป็นโปรตีนที่ชอบน้ำส่งผลให้ไฮโดรเจลเจลาตินถูกย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลไฟโบรอินและไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอิน/เจลาติน

เมื่อพิจารณาร้อยละของน้ำหนักแห้งคงเหลือของไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่สัดส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่างๆ พบว่ามีค่าอยู่ในช่วงประมาณ 80-88% โดยการมีไฟโบรอินเป็นองค์ประกอบในสัดส่วนเพียง 5% (ไฮโดรเจลชนิด SF5G95) ช่วยชะลอการย่อยสลายของเจลาตินได้อย่างชัดเจน โดยมีร้อยละของน้ำหนักแห้งคงเหลือเพิ่มขึ้นจาก 67 เป็น 80 และเมื่อเพิ่มสัดส่วนของไฟโบรอินจาก 5% เป็น 50% (ไฮโดรเจลชนิด SF50G50) พบว่าการย่อยสลายมีแนวโน้มช้าลงเล็กน้อยแต่ไม่ชัดเจน โดยมีค่าร้อยละของน้ำหนักแห้งคงเหลือมากที่สุดเท่ากับ 88 สำหรับไฮโดรเจลที่มีไฟโบรอินเป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ ไฮโดรเจลชนิด SF80G20 พบว่าการย่อยสลายเร็วกว่าไฮโดรเจลชนิด SF100 เล็กน้อย ถึงแม้จะมีค่าร้อยละการเชื่อมขวางมากกว่า ทั้งนี้ น่าจะเนื่องมาจากเอนไซม์คอลลาจีเนสมีความเจาะจงในการย่อยสลายส่วนของเจลาตินในไฮโดรเจล จากผล

การวิเคราะห์จะเห็นได้ว่าไฮโดรเจลผสมชนิด SF50G50 ซึ่งมีร้อยละการเชื่อมขวางสูงที่สุด ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ช้าที่สุด ทั้งนี้ร้อยละการเชื่อมขวางเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการย่อยสลายของไฮโดรเจล กล่าวคือ วัสดุที่มีการย่อยสลายช้าลง เมื่อร้อยละการเชื่อมขวางเพิ่มขึ้น เนื่องจากวัสดุจะมีความคงตัวสูงขึ้น (Tanigo T. และคณะ 2010) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาร้อยละการเชื่อมขวางที่พบว่าไฮโดรเจลไฟโบรอินและไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอิน/เจลาติน มีร้อยละการเชื่อมขวางสูงเมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลเจลาติน ดังนั้นการย่อยสลายจึงเกิดช้าลง

จากรายงานของ Tanigo T. และคณะ (2010) ได้ศึกษาการย่อยสลายของไฮโดรเจลเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ พบว่าการย่อยสลายขึ้นอยู่กับร้อยละการเชื่อมขวาง โดยเมื่อร้อยละการเชื่อมขวางเพิ่มขึ้น การย่อยสลายจะเกิดขึ้นช้าลง และรายงานของ Xiao W. และคณะ (2012) ได้ศึกษาการย่อยสลายของไฮโดรเจลผสมไฟโบรอิน/เจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยเจนิพิน พบว่าเมื่อไฮโดรเจลมีร้อยละการเชื่อมขวางเพิ่มขึ้น ส่งผลให้โครงสร้างมีความคงตัวมากขึ้น ดังนั้นการย่อยสลายจึงเกิดช้าลง นอกจากนี้รายงานของ Ratanavaraporn J. และคณะ (2013) พบว่าอนุภาคกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอิน/เจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์มีการย่อยสลายช้าลง เมื่อร้อยละการเชื่อมขวางเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ข้างต้น

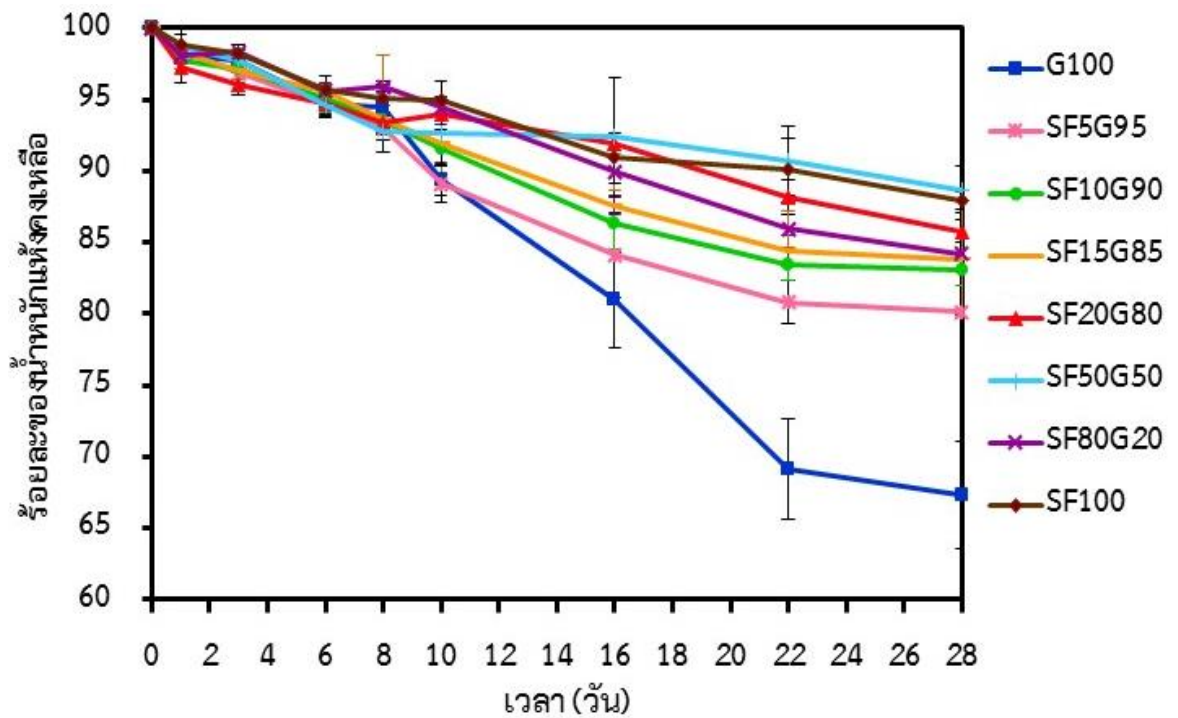


รูปที่ 4.8 ก) ปริมาณหมู่เอมีโนอิสระของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินก่อนและหลังการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตาไรลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร ข) ร้อยละการเชื่อมขวางของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตาไรลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร

(a, b, c, d และ e แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ เมื่อพิจารณาในกรณีไฮโดรเจลก่อนการเชื่อมขวาง)

(f, g และ h แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ เมื่อพิจารณาในกรณีไฮโดรเจลหลังการเชื่อมขวาง)

(i, j, k, l, m และ n แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ เมื่อพิจารณาในกรณีร้อยละการเชื่อมขวาง)



รูปที่ 4.9 ร้อยละของน้ำหนักแห้งคงเหลือของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่เชื่อมขวางด้วย สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร ภายหลังการแช่ในสารละลายเอนไซม์ คอลลาจีเนส ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร, pH7.4 ที่มีสารละลายโซเดียมเอไซด์ความเข้มข้น 0.01% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 37°C ที่ระยะเวลาในการแช่ต่างๆ

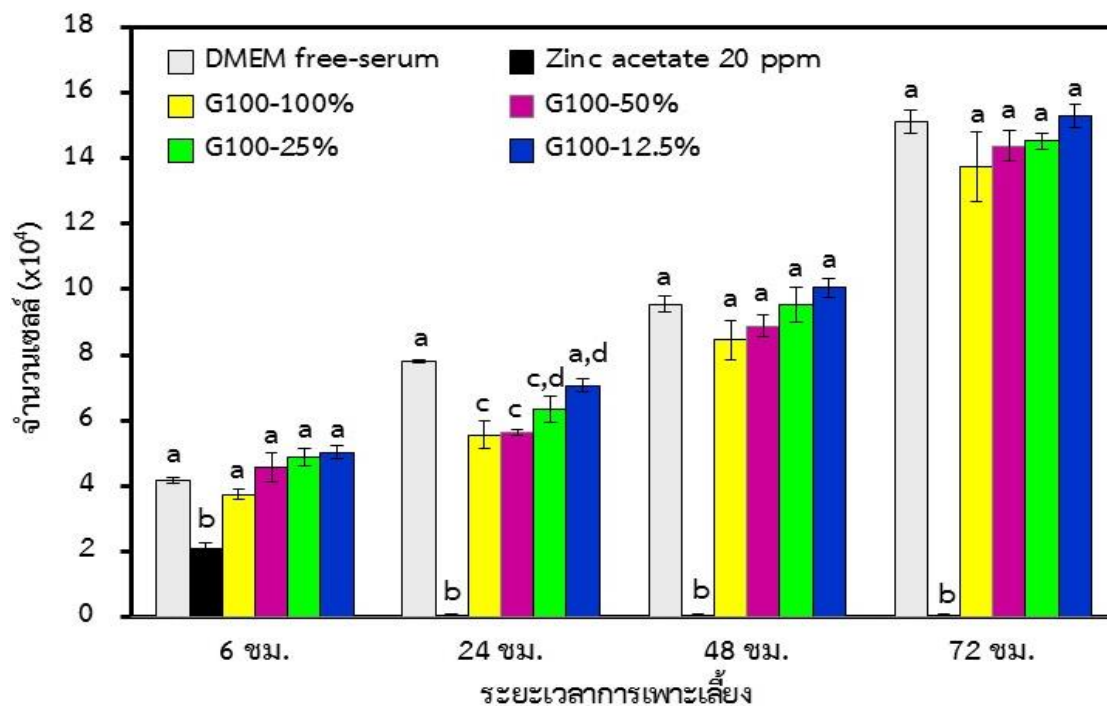
4.3.5 ความเป็นพิษของไฮโดรเจลต่อเซลล์ผิวหนังของหนู (เซลล์ L929)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ L929 ของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.20% โดยปริมาตร สามารถพิจารณาได้จากการประเมินจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ด้วยวิธี MTT assay หลังจากการเพาะเลี้ยงด้วยตัวอย่างสารสกัด 100% และตัวอย่างสารสกัดเจือจาง (50%, 25% และ 12.5%) ของไฮโดรเจลที่สัดส่วนการผสมต่างๆ ได้แก่ G100, SF50G50, SF80G20 และ SF100 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ (อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ไม่มีซีรัมเป็นองค์ประกอบ) และกลุ่มควบคุมเชิงบวก (อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารละลายซิงค์อะซีเตตความเข้มข้น 20 ppm) ดังแสดงในรูปที่ 4.10-4.13 โดยเฉพาะเลี้ยงด้วยจำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 5×10^4 เซลล์/1.9 ตารางเซนติเมตร (1 หลุม) ตลอดจนคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และค่าการแบ่งตัวทวีคูณ ดังสรุปในตารางที่ 4.6 จากผลการศึกษาเมื่อพิจารณาที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่มีจำนวนเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของตัวอย่างสารสกัดเจือจางลง และไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบแต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก และเมื่อเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นเป็น 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยตัวอย่างสารสกัดมีจำนวนเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น และสำหรับกลุ่มควบคุมเชิงบวกไม่มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่เลย ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ และกลุ่มของตัวอย่างสารสกัด

เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate; μ) ซึ่งคำนวณจากช่วงเวลาการเพาะเลี้ยง 48-72 ชั่วโมง พบว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ที่เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมเป็นองค์ประกอบ (กลุ่มควบคุมเชิงลบ) มีค่าเท่ากับ $2.30 \pm 0.37 \times 10^{-2}$ ต่อชั่วโมง สำหรับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยตัวอย่างสารสกัด 100% และตัวอย่างสารสกัดเจือจางของไฮโดรเจลชนิด G100, SF50G50, SF80G20 และ SF100 มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะอยู่ในช่วงประมาณ $1.9-2.3 \times 10^{-2}$, $1.6-2.2 \times 10^{-2}$, $1.7-2.1 \times 10^{-2}$ และ $1.8-2.2 \times 10^{-2}$ ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ ในขณะที่เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (Doubling time; t_d) สำหรับกลุ่มควบคุมเชิงลบมีค่าเท่ากับ 30.58 ± 2.12 ชั่วโมง และกลุ่มของตัวอย่างสารสกัด 100% และตัวอย่างสารสกัดเจือจางของไฮโดรเจลชนิด G100, SF50G50, SF80G20 และ SF100 มีค่าอยู่ในช่วงประมาณ 30.2-36.0, 32.3-45.3, 33.9-43.9 และ 30.9-37.7 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ เช่นเดียวกัน

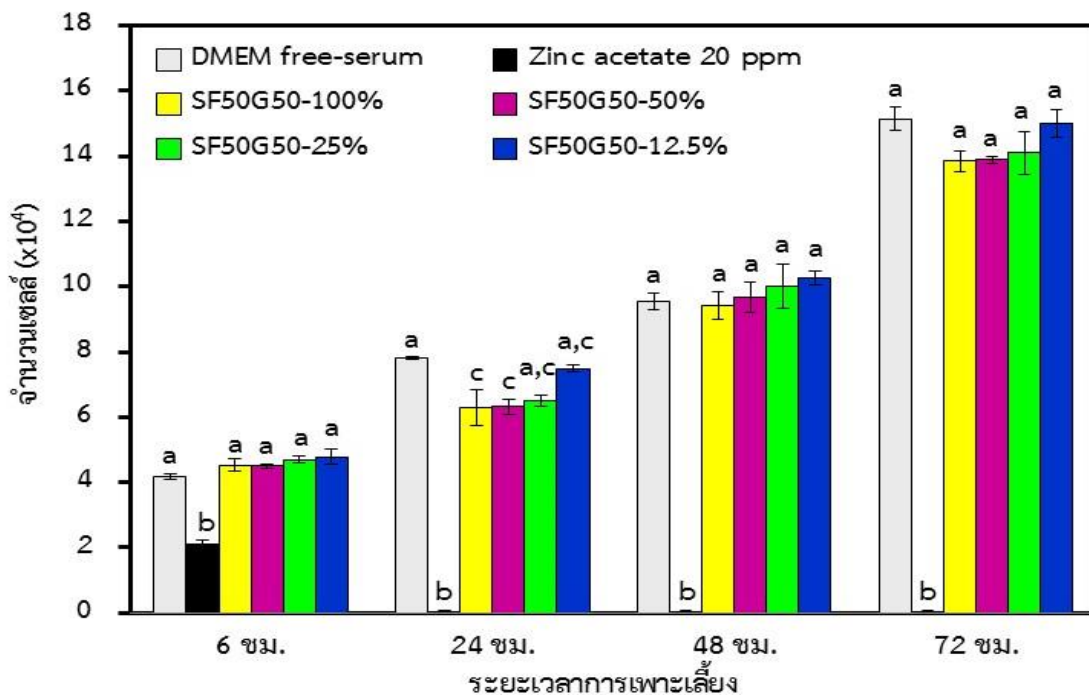
จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเซลล์ L929 ที่เพาะเลี้ยงด้วยตัวอย่างสารสกัด 100% และตัวอย่างสารสกัดเจือจางทุกสัดส่วนมีการเจริญเติบโตเช่นเดียวกับเซลล์ L929 ที่เพาะเลี้ยงใน

อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมเป็นองค์ประกอบ (ตัวควบคุมเชิงลบ) ซึ่งให้เห็นว่าไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่เตรียมโดยผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.20% โดยปริมาตร ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์



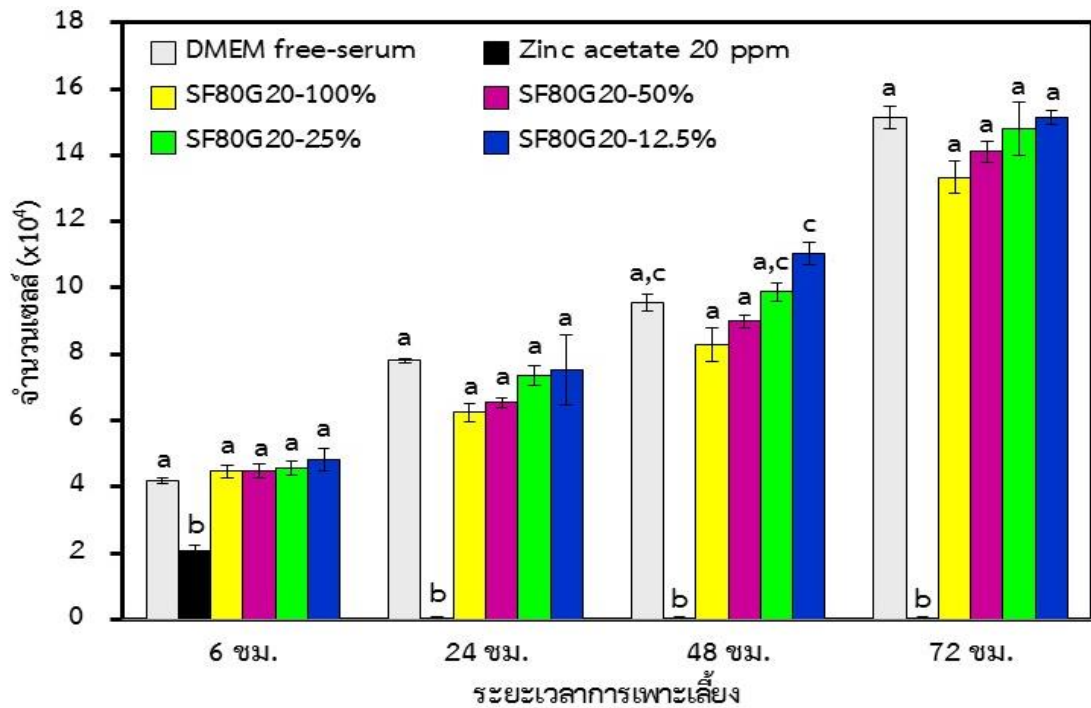
รูปที่ 4.10 จำนวนเซลล์ L929 ที่มีชีวิตหลังจากการเพาะเลี้ยงที่เวลาต่างๆ ด้วยตัวอย่างสารสกัด 100% และตัวอย่างสารสกัดเจือจางของแผ่นไฮโดรเจลชนิด G100 (G100-100%, G100-50%, G100-25% และ G100-12.5%) ที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับตัวควบคุมเชิงลบ (อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM free-serum) และตัวควบคุมเชิงบวก (อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซิงค์อะซิเตตความเข้มข้น 20 ppm)

(a, b, c และ d แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ เมื่อพิจารณาที่ช่วงเวลาเดียวกัน)



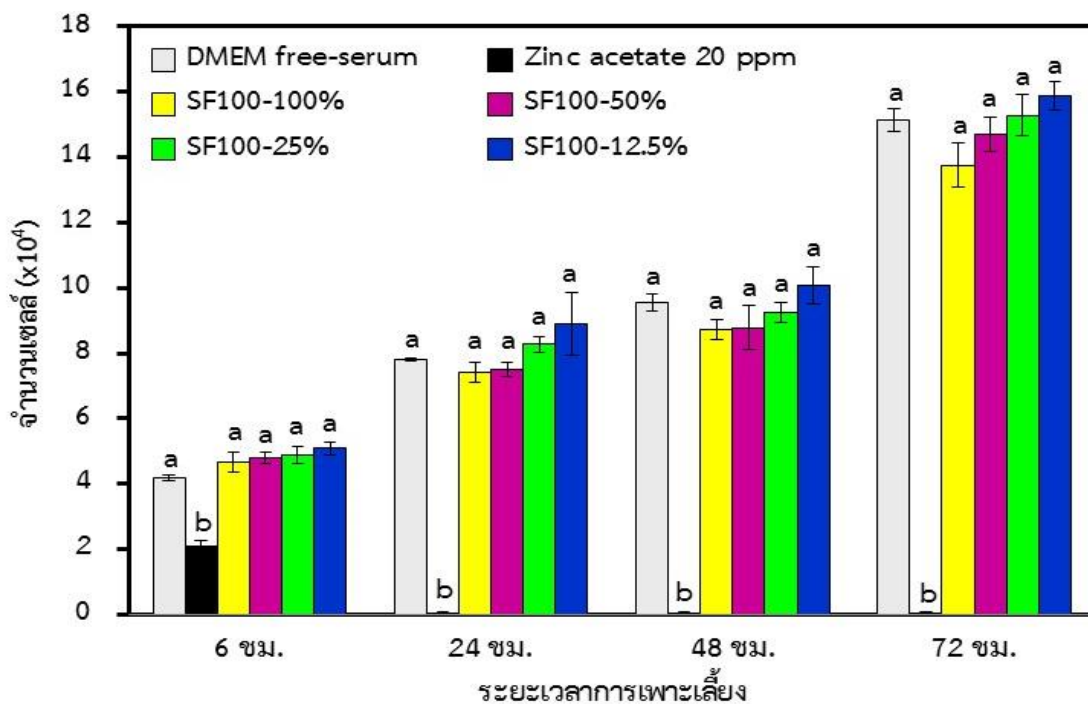
รูปที่ 4.11 จำนวนเซลล์ L929 ที่มีชีวิตหลังจากการเพาะเลี้ยงที่เวลาต่างๆ ด้วยตัวอย่างสารสกัด 100% และตัวอย่างสารสกัดเจือจางของแผ่นไฮโดรเจลชนิด SF50G50 (SF50G50-100%, SF50G50-50%, SF50G50-25% และ SF50G50-12.5%) ที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตาร์ลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับตัวควบคุมเชิงลบ (อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM free-serum) และตัวควบคุมเชิงบวก (อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซิงค์อะซิเตดความเข้มข้น 20 ppm)

(a, b และ c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ เมื่อพิจารณาที่ช่วงเวลาเดียวกัน)



รูปที่ 4.12 จำนวนเซลล์ L929 ที่มีชีวิตหลังจากการเพาะเลี้ยงที่เวลาต่างๆ ด้วยตัวอย่างสารสกัด 100% และตัวอย่างสารสกัดเจือจางของแผ่นไฮโดรเจลชนิด SF80G20 (SF80G20-100%, SF80G20-50%, SF80G20-25% และ SF80G20-12.5%) ที่เชื่อมขวางด้วยสารละลาย กลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับตัวควบคุมเชิงลบ (อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM free-serum) และตัวควบคุมเชิงบวก (อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซิงค์อะซีเตตความเข้มข้น 20 ppm)

(a, b และ c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ เมื่อพิจารณาที่ช่วงเวลาเดียวกัน)



รูปที่ 4.13 จำนวนเซลล์ L929 ที่มีชีวิตหลังจากการเพาะเลี้ยงที่เวลาต่างๆ ด้วยตัวอย่างสารสกัด 100% และตัวอย่างสารสกัดเจือจางของแผ่นไฮโดรเจลชนิด SF100 (SF100-100%, SF100-50%, SF100-25% และ SF100-12.5%) ที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.2% โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับตัวควบคุมเชิงลบ (อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM free-serum) และตัวควบคุมเชิงบวก (อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซิงค์อะซิเตตความเข้มข้น 20 ppm)

(a และ b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ เมื่อพิจารณาที่ช่วงเวลาเดียวกัน)

ตารางที่ 4.6 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) และเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT) ของเซลล์ L929 หลังจากการเพาะเลี้ยงด้วยตัวอย่างสารสกัด 100% และตัวอย่างสารสกัดเจือจางของไฮโดรเจลอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ซึ่งเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.20% โดยปริมาตร

ตัวอย่าง	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ(ชั่วโมง)
อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM free-serum	$2.3 \pm 0.4 \times 10^{-2}$ a,b,c,d	30.6 ± 2.1 e,f,g,h
G100-ตัวอย่างสารสกัด 100%	$2.0 \pm 0.7 \times 10^{-2}$ a	34.9 ± 1.1 e
G100-ตัวอย่างสารสกัด 50%	$2.2 \pm 1.0 \times 10^{-2}$ a	32.0 ± 2.2 e
G100-ตัวอย่างสารสกัด 25%	$2.3 \pm 0.8 \times 10^{-2}$ a	30.2 ± 2.6 e
G100-ตัวอย่างสารสกัด 12.5%	$1.9 \pm 0.5 \times 10^{-2}$ a	35.9 ± 0.9 e
SF50G50-ตัวอย่างสารสกัด 100%	$1.6 \pm 0.7 \times 10^{-2}$ b	45.3 ± 4.9 f
SF50G50-ตัวอย่างสารสกัด 50%	$1.9 \pm 0.9 \times 10^{-2}$ b	39.9 ± 7.2 f
SF50G50-ตัวอย่างสารสกัด 25%	$2.2 \pm 0.9 \times 10^{-2}$ b	32.3 ± 9.9 f
SF50G50-ตัวอย่างสารสกัด 12.5%	$2.1 \pm 0.9 \times 10^{-2}$ b	35.1 ± 5.1 f
SF80G20-ตัวอย่างสารสกัด 100%	$1.7 \pm 0.7 \times 10^{-2}$ c	43.9 ± 6.4 g
SF80G20-ตัวอย่างสารสกัด 50%	$1.9 \pm 0.3 \times 10^{-2}$ c	40.0 ± 1.7 g
SF80G20-ตัวอย่างสารสกัด 25%	$1.8 \pm 0.8 \times 10^{-2}$ c	40.7 ± 4.5 g
SF80G20-ตัวอย่างสารสกัด 12.5%	$2.1 \pm 0.6 \times 10^{-2}$ c	33.9 ± 8.8 g
SF100-ตัวอย่างสารสกัด 100%	$1.8 \pm 0.8 \times 10^{-2}$ d	37.7 ± 7.2 h
SF100-ตัวอย่างสารสกัด 50%	$2.2 \pm 1.0 \times 10^{-2}$ d	30.9 ± 6.7 h
SF100-ตัวอย่างสารสกัด 25%	$2.0 \pm 0.8 \times 10^{-2}$ d	36.7 ± 4.0 h
SF100-ตัวอย่างสารสกัด 12.5%	$1.9 \pm 0.7 \times 10^{-2}$ d	36.0 ± 7.3 h

(a, b, c และ d แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ)

(e, f, g และ h แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ)

4.4 สมบัติการดูดซับและการควบคุมการปลดปล่อยของไฮโดรเจล

สำหรับการทดสอบความสามารถในการดูดซับและการควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ (เคอร์คูมิน และ/หรือ ดีเอชเอ) ไฮโดรเจลที่เลือกนำมาใช้ทดสอบ ได้แก่ ไฮโดรเจลชนิด G100, SF5G95, SF50G50, SF80G20 และ SF100 เนื่องจากเมื่อพิจารณาผลการศึกษาร้อยละการเชื่อมขวางและความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพของไฮโดรเจลในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าการมีสัดส่วนของไฟโบรอินเป็นองค์ประกอบเพียง 5% (ไฮโดรเจลชนิด SF5G95) ทำให้ร้อยละการเชื่อมขวางเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลชนิด G100 ส่งผลให้สามารถชะลอการย่อยสลายของเจลาตินได้อย่างชัดเจน ในขณะที่ไฮโดรเจลชนิด SF10G90 และ SF15G85 มีร้อยละการเชื่อมขวางไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลชนิด SF5G95 ดังนั้นจึงไม่เลือกไฮโดรเจลชนิด SF10G90 และ SF15G85 ในการศึกษาสมบัติการดูดซับ เมื่อสัดส่วนของไฟโบรอินเพิ่มขึ้นเป็น 20-80% (SF20G80, SF50G50 และ SF80G20) ร้อยละการเชื่อมขวางของไฮโดรเจลทั้งสามชนิดมีค่าใกล้เคียงกันและมากกว่าค่าของไฮโดรเจลชนิด SF5G95 อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงเลือกไฮโดรเจลชนิด SF50G50 ซึ่งเป็นไฮโดรเจลที่มีไฟโบรอินและเจลาตินเป็นองค์ประกอบเท่าๆ กัน และไฮโดรเจลชนิด SF80G20 ซึ่งเป็นไฮโดรเจลที่มีไฟโบรอินเป็นองค์ประกอบหลักมาศึกษาสมบัติการดูดซับ สำหรับไฮโดรเจลชนิด G100 และ SF100 ถูกเลือกมาทำการศึกษาเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลผสม

ดังนั้นในการศึกษาสมบัติการดูดซับและการควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์จะใช้ไฮโดรเจล 5 สูตร ได้แก่ G100, SF5G95, SF50G50, SF80G20 และ SF100

4.4.1 ความสามารถในการดูดซับเคอร์คูมิน ดีเอชเอ และเคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอของไฮโดรเจล

ผลการศึกษาความสามารถในการดูดซับสารออกฤทธิ์ (เคอร์คูมิน และ/หรือ ดีเอชเอ) ของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่สัดส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ซึ่งถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.20% โดยปริมาตร แสดงในตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.14-4.16 จากผลร้อยละการดูดซับเคอร์คูมิน (รูปที่ 4.14) พบว่าไฮโดรเจลเจลาติน (G100) และไฮโดรเจลไฟโบรอิน (SF100) มีค่าร้อยละการดูดซับเท่ากับ 82.65 ± 0.90 และ 84.84 ± 4.79 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอิน/เจลาตินมีค่าร้อยละการดูดซับอยู่ในช่วงประมาณ 84-92 และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่าเมื่อมีสัดส่วนของไฟโบรอินเป็นองค์ประกอบ 5% (ไฮโดรเจลชนิด SF5G95) ร้อยละการดูดซับมีค่าใกล้เคียงกับไฮโดรเจลเจลาตินเพียงอย่างเดียว และเมื่อสัดส่วนของไฟโบรอินเพิ่มขึ้นเป็น 50% (ไฮโดรเจลชนิด SF50G50) และ 80% (ไฮโดรเจลชนิด SF80G20) พบว่าความสามารถในการดูดซับมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นโดยมีค่าร้อยละการดูดซับมากที่สุดเท่ากับ 92 และ 90 ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมี

นัยสำคัญ และจากรูปที่ 4.15 ซึ่งแสดงร้อยละการดูดซับดีเอชเอของไฮโดรเจล พบว่าไฮโดรเจล เจลาติน (G100) และไฮโดรเจลไฟโบรอิน (SF100) มีค่าร้อยละการดูดซับเท่ากับ 73.51 ± 0.63 และ 77.97 ± 0.36 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอิน/เจลาติน มีร้อยละการดูดซับอยู่ในช่วงประมาณ 77-86 และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยไฮโดรเจลชนิด SF5G95 มีร้อยละการดูดซับไม่แตกต่างกับไฮโดรเจลชนิด G100 ในขณะที่ไฮโดรเจล ชนิด SF50G50 และ SF80G20 มีร้อยละการดูดซับมากที่สุดเท่ากับ 86 และ 83 ตามลำดับ และไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างการดูดซับเคอร์คูมินและดีเอชเอของไฮโดรเจล ไฟโบรอิน/เจลาติน พบว่าไฮโดรเจลทุกอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักมีร้อยละการดูดซับเคอร์คูมิน มากกว่าดีเอชเอเล็กน้อยและไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ทั้งนี้รูปแบบ (Profile) การดูด ซึบสารออกฤทธิ์ของไฮโดรเจลมีลักษณะเหมือนกัน

สำหรับไฮโดรเจลที่ดูดซับสารออกฤทธิ์ผสมระหว่างเคอร์คูมินและดีเอชเอ (รูปที่ 4.16) พบว่ามีค่าร้อยละการดูดซับเคอร์คูมินอยู่ในช่วงประมาณ 31-34 และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมี นัยสำคัญ และร้อยละการดูดซับดีเอชเอมีค่าอยู่ในช่วงประมาณ 58-65 โดยพบว่าไฮโดรเจลเจลาติน (G100) และไฮโดรเจลไฟโบรอิน (SF100) มีค่าร้อยละการดูดซับดีเอชเอเท่ากับ 60.52 ± 0.94 และ 61.82 ± 2.27 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอิน/เจลาติน ที่สัดส่วน SF5G95 มีค่าร้อยละการดูดซับดีเอชเอใกล้เคียงกับไฮโดรเจลเจลาติน (ร้อยละ 58) และไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อสัดส่วนของไฟโบรอินเพิ่มเป็น 50% พบว่าค่าร้อยละการดูดซับ ดีเอชเอเพิ่มขึ้นเป็น 65 ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลเจลาติน แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลชนิด SF5G95 ในขณะที่ไฮโดร เจลชนิด SF80G20 มีค่าร้อยละการดูดซับดีเอชเอเท่ากับ 61 และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมี นัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลชนิด G100, SF5G95, SF50G50 และ SF100 ซึ่งจะสังเกตได้ ว่าดีเอชเอถูกดูดซับโดยไฮโดรเจลได้มากกว่าเคอร์คูมิน ทั้งนี้เมื่อพิจารณาสมบัติของสารออกฤทธิ์ทั้ง 2 ชนิดดังแสดงในตารางที่ 4.8 พบว่าดีเอชเอมีค่า $\log P$ (Partition coefficient) มากกว่าเคอร์คูมิน โดย $\log P$ คือ ปรากฏการณ์ที่ยาละลายอยู่ในตัวทำละลาย 2 ชนิดที่ไม่เข้ากัน (Immiscible) จนเกิด ภาวะสมดุล ซึ่งสามารถใช้บอกสมบัติความชอบน้ำ-ไม่ชอบน้ำของยาได้ โดยสูตรที่ใช้คำนวณคือ

$$\log P = \frac{\text{ความเข้มข้นของยาในออกทานอล (Octanal)}}{\text{ความเข้มข้นของยาในน้ำ}}$$

โดยถ้า $\log P$ มีค่ามาก แสดงถึงยาที่มีความไม่ชอบน้ำสูง นั่นหมายความว่าดีเอชเอมีความไม่ชอบน้ำ มากกว่าเคอร์คูมิน และเมื่อพิจารณาค่า Solvent accessible surface area ซึ่งเป็นค่าพื้นที่ผิวของ โมเลกุลที่สามารถเข้าถึงตัวทำละลายได้ พบว่าดีเอชเอมีค่ามากกว่าเคอร์คูมินเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่า

ดีเอสเอมีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายได้ดีกว่าเคอร์คูมิน ประกอบด้วยดีเอสเอ (น้ำหนักโมเลกุล 328.49 กรัม/โมล) มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าเคอร์คูมินเล็กน้อย (น้ำหนักโมเลกุล 368.39 กรัม/โมล) เหตุผลดังกล่าวข้างต้นน่าจะเป็นสาเหตุร่วมกันที่ทำให้ดีเอสเอมีโอกาสถูกดูดซับอยู่บนโมเลกุลของส่วนที่มีความไม่ชอบน้ำของไฮโดรเจลได้มากกว่าเคอร์คูมิน

จากการวิเคราะห์พบว่าไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอิน/เจลาติน (SF5G95, SF50G50 และ SF80G20) และไฮโดรเจลไฟโบรอิน (SF100) มีร้อยละการดูดซับสารออกฤทธิ์มากกว่าไฮโดรเจลเจลาติน (G100) เล็กน้อย ทั้งนี้สามารถอธิบายได้จากผลการศึกษาร้อยละการเชื่อมขวางที่พบว่า ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระหลังการเชื่อมขวางของไฮโดรเจลไฟโบรอิน และไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอิน/เจลาติน มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลเจลาติน ส่งผลให้มีความร้อยละการเชื่อมขวางสูง ดังนั้นสมบัติความชอบน้ำจึงมีค่าลดลง แสดงได้จากค่ามุมสัมผัสของน้ำที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.4) เมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลเจลาติน ทำให้ไฮโดรเจลมีความสามารถในการดูดซับสารออกฤทธิ์ ซึ่งเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำได้เพิ่มขึ้น

จากรายงานของ Gupta V. และคณะ (2009) ได้ศึกษาความสามารถของการกักเก็บเคอร์คูมินไว้ในอนุภาคกลมขนาดนาโนของไฟโบรอิน/ไคโตซาน พบว่าอนุภาคกลมขนาดนาโนของไฟโบรอิน สามารถกักเก็บเคอร์คูมินได้มากกว่า 96% ในขณะที่อนุภาคกลมขนาดนาโนของสารผสมสามารถกักเก็บเคอร์คูมินได้ประมาณ 73% เนื่องจากไคโตซานมีโครงสร้างโมเลกุลของกลูโคซามีน (Glucosamine) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีความชอบน้ำ ดังนั้นเมื่อนำมาผสมกับไฟโบรอิน ส่งผลให้อนุภาคกลมขนาดนาโนมีความชอบน้ำเพิ่มขึ้น ทำให้สามารถกักเก็บเคอร์คูมินซึ่งเป็นยาที่ไม่ละลายน้ำได้ลดลง นอกจากนี้รายงานของ Ratanavaraporn J. และคณะ (2013) ศึกษาความสามารถในการกักเก็บเคอร์คูมินของอนุภาคกลมขนาดไมครอนของเจลาติน/ไฟโบรอินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ พบว่าอนุภาคกลมขนาดไมครอนของเจลาตินมีร้อยละการกักเก็บเท่ากับ 20.1 ในขณะที่อนุภาคกลมขนาดไมครอนของสารผสมมีร้อยละการกักเก็บอยู่ในช่วงประมาณ 24-30 โดยพบว่าเมื่อสัดส่วนของไฟโบรอินเพิ่มขึ้น ทำให้ค่าร้อยละการกักเก็บเคอร์คูมินสูงขึ้น เนื่องจากอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างส่วนที่ไม่ชอบน้ำของไฟโบรอินและเคอร์คูมิน ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ข้างต้น

ตารางที่ 4.7 ร้อยละการดูดซับสารออกฤทธิ์ (เคอร์คูมิน และ/หรือ ดีเอชเอ) ของไฮโดรเจลไฟโบรอิน ไหมไทย/เจลาตินที่สัดส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ซึ่งถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 0.20% โดยปริมาตร

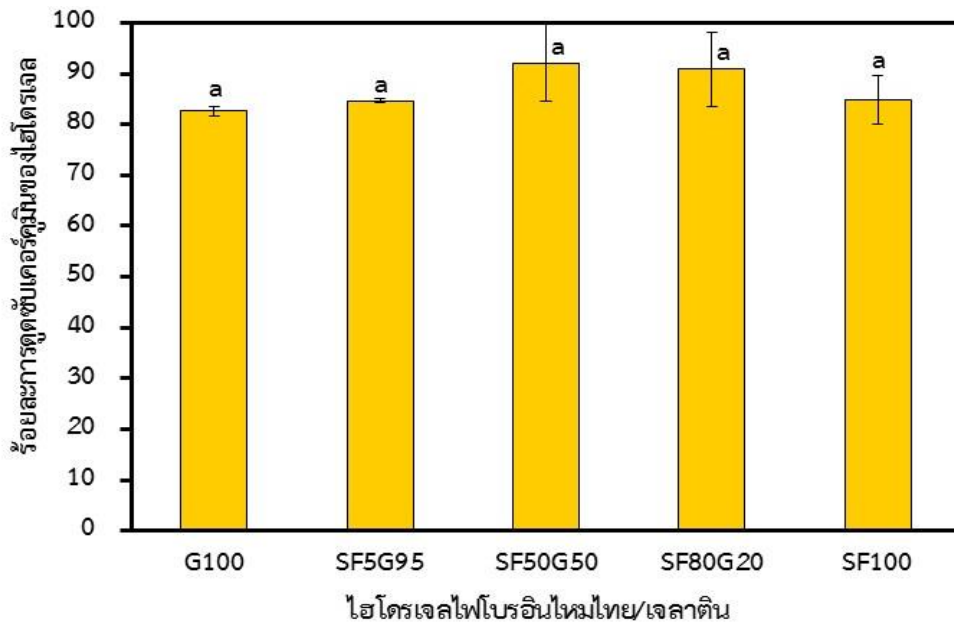
ตัวอย่าง	ร้อยละการดูดซับสารออกฤทธิ์			
	เคอร์คูมิน	ดีเอชเอ	สารผสมระหว่างเคอร์คูมินและดีเอชเอ	
			เคอร์คูมิน	ดีเอชเอ
G100	82.65±0.90 ^a	73.51±0.63 ^b	31.66±1.31 ^c	60.52±0.94 ^{d,e}
SF5G95	84.59±0.41 ^a	77.05±2.85 ^b	34.72±0.85 ^c	58.18±1.12 ^d
SF50G50	92.07±7.59 ^a	86.27±4.64 ^b	32.21±1.22 ^c	65.19±0.42 ^e
SF80G20	90.88±7.27 ^a	83.59±5.85 ^b	33.31±0.68 ^c	61.13±2.10 ^{d,e}
SF100	84.84±4.79 ^a	77.97±0.36 ^b	31.47±1.73 ^c	61.82±2.27 ^e

(a แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลร้อยละการดูดซับเคอร์คูมิน)

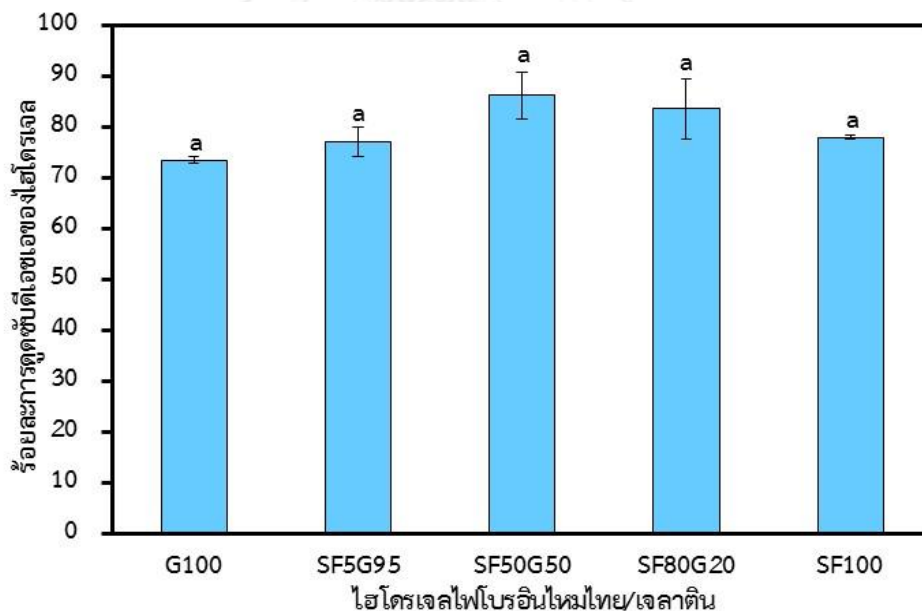
(b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลร้อยละการดูดซับดีเอชเอ)

(c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลร้อยละการดูดซับสารออกฤทธิ์ผสม โดยพิจารณากรณีการดูดซับเคอร์คูมิน)

(d และ e แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลร้อยละการดูดซับสารออกฤทธิ์ผสม โดยพิจารณากรณีการดูดซับดีเอชเอ)

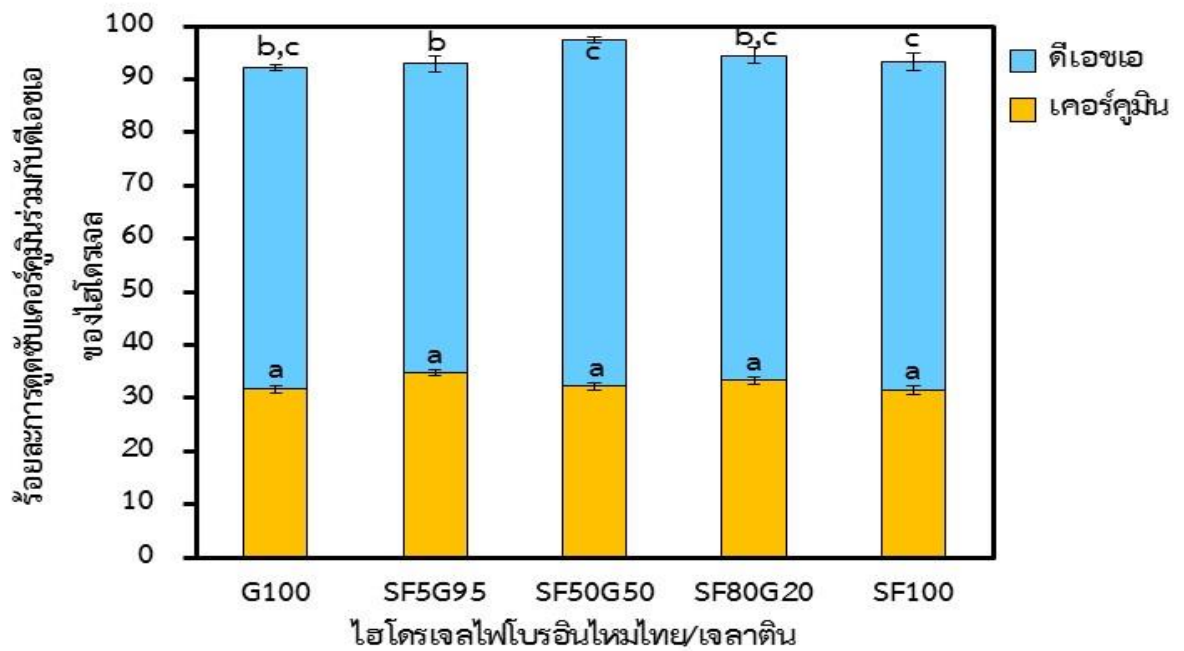


รูปที่ 4.14 ร้อยละการดูดซับเคอร์คูมินของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่สัดส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ซึ่งถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.20% โดยปริมาตร (a แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$)



รูปที่ 4.15 ร้อยละการดูดซับดีเอชเอของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่สัดส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ซึ่งถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.20% โดยปริมาตร (a แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$)

(***หมายเหตุ ร้อยละการดูดซับเคอร์คูมินและดีเอชเอของไฮโดรเจลทุกอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ)

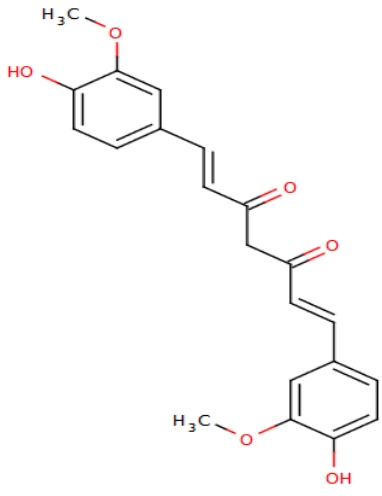
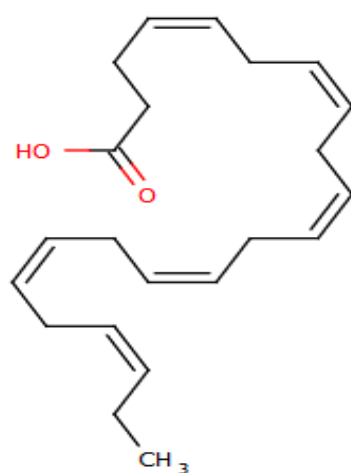


รูปที่ 4.16 ร้อยละการดูดซับคาร์บอนร่วมกับดีเอสเอของไฮโดรเจลไฟเบอร์อินไหมไทย/เจลาตินที่สัดส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ซึ่งถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.20% โดยปริมาตร

(a แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลการดูดซับคาร์บอน)

(b,c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลการดูดซับดีเอสเอ)

ตารางที่ 4.8 โครงสร้างและสมบัติของเคอร์คูมินและดีเอชเอ [http://www.chemicalize.org]

เคอร์คูมิน (Curcumin)	ดีเอชเอ (Docosahexaenoic acid)
	
น้ำหนักโมเลกุล 368.39 g/mol	น้ำหนักโมเลกุล 328.49 g/mol
Solvent accessible surface area 509.27 Å ²	Solvent accessible surface area 538.93 Å ²
log P = 4.12	log P = 6.57

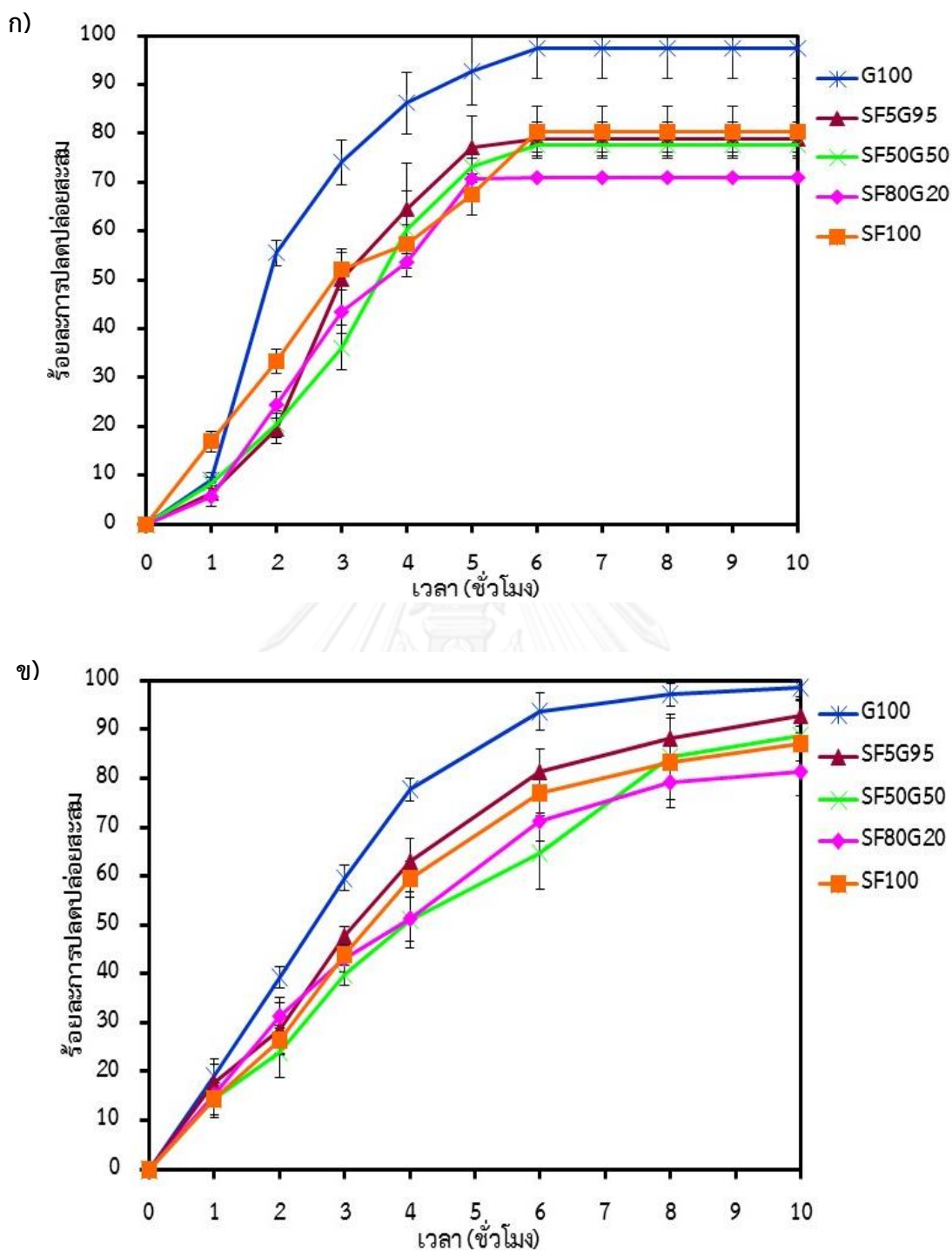
4.4.2 ความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมิน ดีเอชเอ และเคอร์คูมิน ร่วมกับดีเอชเอของไฮโดรเจลไฟโบรอินในระดัห้องปฏิบัติการ

ผลการศึกษาความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ (เคอร์คูมิน และ/หรือ ดีเอชเอ) ของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่สัดส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ซึ่งถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 0.20% โดยปริมาตร เมื่อแช่ในสารละลาย PBS, pH 7.4 ที่ประกอบด้วยซีรัม 10% และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 10 ชั่วโมง แสดงดังรูปที่ 4.17-4.19

จากรูปที่ 4.17 ก แสดงร้อยละการปลดปล่อยสะสมของเคอร์คูมินภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ พบว่าไฮโดรเจลที่สัดส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่างๆ มีการปลดปล่อยเคอร์คูมิน ออกมาอย่างต่อเนื่องและการปลดปล่อยเริ่มคงที่ (Steady state) เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 6 และเมื่อครบระยะเวลา 10 ชั่วโมง พบว่าไฮโดรเจลเจลาติน (G100) มีร้อยละการปลดปล่อยสะสมสูงที่สุดเท่ากับ 97 และไฮโดรเจลไฟโบรอิน (SF100) มีร้อยละการปลดปล่อยสะสมเท่ากับ 80 ในขณะที่ไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอิน/เจลาตินที่มีสัดส่วนของไฟโบรอินเป็นองค์ประกอบเพียง 5% (ไฮโดรเจลชนิด SF5G95) สามารถควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินให้ช้าลงเมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลเจลาติน โดยมีค่าร้อยละการปลดปล่อยสะสมลดลงจาก 97 เป็น 78 และเมื่อสัดส่วนของไฟโบรอินเพิ่มขึ้นเป็น 50% (ไฮโดรเจลชนิด SF50G50) และ 80% (ไฮโดรเจลชนิด SF80G20) ร้อยละการปลดปล่อยสะสมมีค่าเท่ากับ 77 และ 71 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับไฮโดรเจลชนิด SF5G95

เมื่อพิจารณาการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินของไฮโดรเจลภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.17 ข) พบว่าไฮโดรเจลไฟโบรอิน/เจลาตินในทุกอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักมีการปลดปล่อยเคอร์คูมินออกอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งเข้าสู่ชั่วโมงที่ 6 การปลดปล่อยเริ่มช้าลง (Sustain release) และเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 10 พบว่าไฮโดรเจลเจลาติน (G100) มีร้อยละการปลดปล่อยสะสมมากที่สุดเท่ากับ 98 และไฮโดรเจลไฟโบรอิน (SF100) มีร้อยละการปลดปล่อยสะสมเท่ากับ 87 ในขณะที่ไฮโดรเจลผสม (SF5G95, SF50G50 และ SF80G20) มีร้อยละการปลดปล่อยสะสมไม่แตกต่างกัน ซึ่งอยู่ในช่วงประมาณ 81-88

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินของไฮโดรเจลภายใต้สภาวะที่ไม่มีและมีเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นองค์ประกอบ พบว่าร้อยละการปลดปล่อยเคอร์คูมินสะสมแทบไม่มีความแตกต่างกันในระหว่าง 2 กรณี น่าจะเนื่องมาจากเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้นเพียง 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร อาจไม่เพียงพอที่จะย่อยสลายไฮโดรเจลและทำให้เคอร์คูมินที่ถูกกักขังอยู่ในเนื้อของไฮโดรเจลด้วยอันตรกิริยาที่แข็งแรงถูกปลดปล่อยออกมาได้ภายในระยะเวลาเพียง 10 ชั่วโมง เนื่องจากไฮโดรเจลมีร้อยละการเชื่อมขวางที่ค่อนข้างสูง แต่ทั้งนี้การมีเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้มีการปลดปล่อยเคอร์คูมินออกอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลา 10 ชั่วโมง

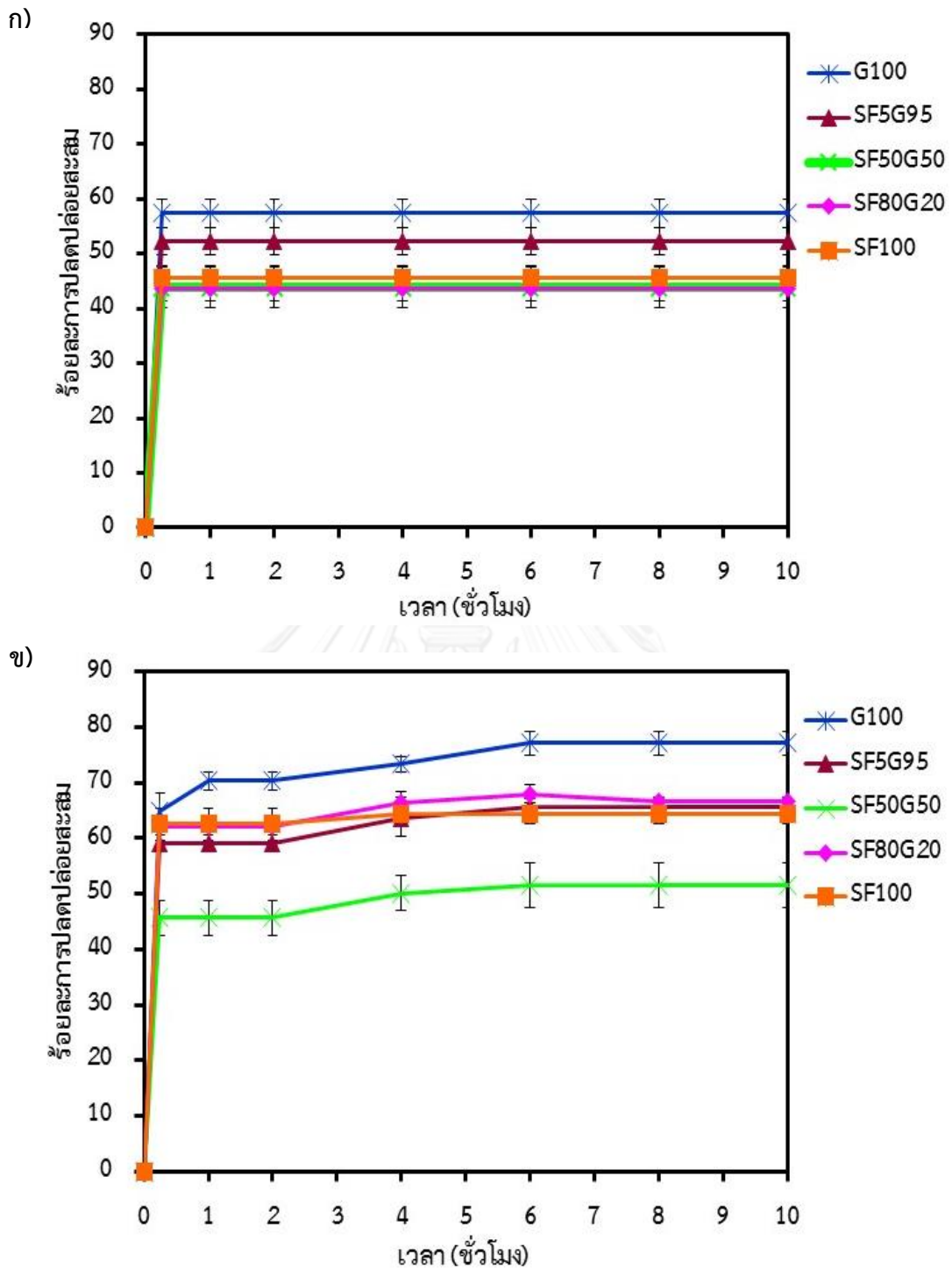


รูปที่ 4.17 ร้อยละการปลดปล่อยคอร์คิวมินของไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและ เจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.20% โดยปริมาตร ภายหลังจากแช่ ในสารละลาย PBS, pH 7.4 ที่ประกอบด้วยซีรัม 10% ก) ภายใตสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์เป็น องค์ประกอบ ข) ภายใตสภาวะที่มีเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นองค์ประกอบ

สำหรับการควบคุมการปลดปล่อยดีเอชเอของไฮโดรเจล แสดงดังรูปที่ 4.18 พบว่าในการควบคุมการปลดปล่อยภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ (รูปที่ 4.18 ก) ดีเอชเอถูกปลดปล่อยออกมาทันทีที่ 15 นาทีแรก ซึ่งให้เห็นถึงปริมาณดีเอชเอที่มากเกินไป (Excess) ซึ่งไม่ได้ถูกดูดซับเข้าไปภายในเนื้อของไฮโดรเจล ดังนั้นจึงถูกปลดปล่อยออกมาอย่างรวดเร็ว โดยพบว่าไฮโดรเจลเจลาติน (G100) มีร้อยละการปลดปล่อยมากที่สุดเท่ากับ 57 และเมื่อเพิ่มสัดส่วนของไฟโบรอินเข้ามา 5% (ไฮโดรเจลชนิด SF5G95) พบว่าร้อยละการปลดปล่อยมีค่าลดลงเพียงเล็กน้อย (ร้อยละ 52) เมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลเจลาติน ในขณะที่ไฮโดรเจลชนิด SF50G50 และ SF80G20 มีร้อยละการปลดปล่อยน้อยที่สุดเท่ากับ 43 สำหรับไฮโดรเจลไฟโบรอิน (SF100) มีร้อยละการปลดปล่อยเท่ากับ 45 และหลังจาก 15 นาทีแรก ไฮโดรเจลไม่มีการปลดปล่อยดีเอชเอออกมาอีกตลอดระยะเวลา 10 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าดีเอชเอส่วนที่เหลือถูกดูดซับอยู่ภายในเนื้อของไฮโดรเจลด้วยอันตรกิริยาที่แข็งแรงระหว่างโมเลกุลของดีเอชเอและไฮโดรเจล

เมื่อพิจารณาการควบคุมการปลดปล่อยดีเอชเอของไฮโดรเจลภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร แสดงดังรูปที่ 4.18 ข พบว่าดีเอชเอถูกปลดปล่อยออกมาทันทีที่เวลา 15 นาทีแรก โดยไฮโดรเจลเจลาติน (G100) และไฟโบรอิน (SF100) มีร้อยละการปลดปล่อยเท่ากับ 64 และ 62 ตามลำดับ สำหรับไฮโดรเจลผสมชนิด SF5G95, SF50G50 และ SF80G20 มีร้อยละการปลดปล่อยเท่ากับ 59, 45 และ 62 ตามลำดับ หลังจากนั้นดีเอชเอถูกปลดปล่อยออกมาอย่างช้าๆ จนกระทั่งเข้าสู่ชั่วโมงที่ 6-10 ซึ่งการปลดปล่อยสะสมของดีเอชเอเองไม่มีการเปลี่ยนแปลง โดยไฮโดรเจลเจลาตินและไฟโบรอินมีร้อยละการปลดปล่อยสะสมเท่ากับ 77 และ 64 ตามลำดับ ในขณะที่ไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอิน/เจลาตินมีค่าร้อยละการปลดปล่อยสะสมอยู่ในช่วงประมาณ 51-66 โดยไฮโดรเจลชนิด SF5G95 มีร้อยละการปลดปล่อยสะสมลดลงจาก 77 เป็น 65 เมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลเจลาติน และเมื่อเพิ่มสัดส่วนของไฟโบรอินเป็น 50% (ไฮโดรเจลชนิด SF50G50) พบว่าร้อยละการปลดปล่อยสะสมมีค่าเท่ากับ 51 ซึ่งเป็นค่าที่น้อยที่สุด และไฮโดรเจลชนิด SF80G20 มีค่าร้อยละการปลดปล่อยสะสมเท่ากับ 66

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการควบคุมการปลดปล่อยดีเอชเอของไฮโดรเจลภายใต้สภาวะที่ไม่มีและเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นองค์ประกอบ พบว่าการเติมเอนไซม์คอลลาจีเนสมีผลต่อการปลดปล่อยดีเอชเอสะสมของไฮโดรเจล กล่าวคือ ดีเอชเอที่ถูกปลดปล่อยออกมาทันทีที่ระยะเวลา 15 นาทีแรก เกิดจากปริมาณดีเอชเอที่มากเกินไปที่ไม่ได้ถูกดูดซับเข้าไปภายในเนื้อของไฮโดรเจล แต่การเติมเอนไซม์คอลลาจีเนสอาจทำให้เกิดการย่อยสลายที่บริเวณผิวบางส่วนของไฮโดรเจลโดยเฉพาะในส่วนของเจลาติน และดีเอชเอบางส่วนถูกปลดปล่อยออกมา จึงส่งผลให้มีร้อยละการปลดปล่อยสะสมเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกรณีไม่เติมเอนไซม์



รูปที่ 4.18 ร้อยละการปลดปล่อยดีเอชเอของไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.20% โดยปริมาตร ภายหลังจากแช่ในสารละลาย PBS, pH 7.4 ที่ประกอบด้วยซีรัม 10% ก) ภายใต้อุณหภูมิที่ไม่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ ข) ภายใต้อุณหภูมิที่มีเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นองค์ประกอบ

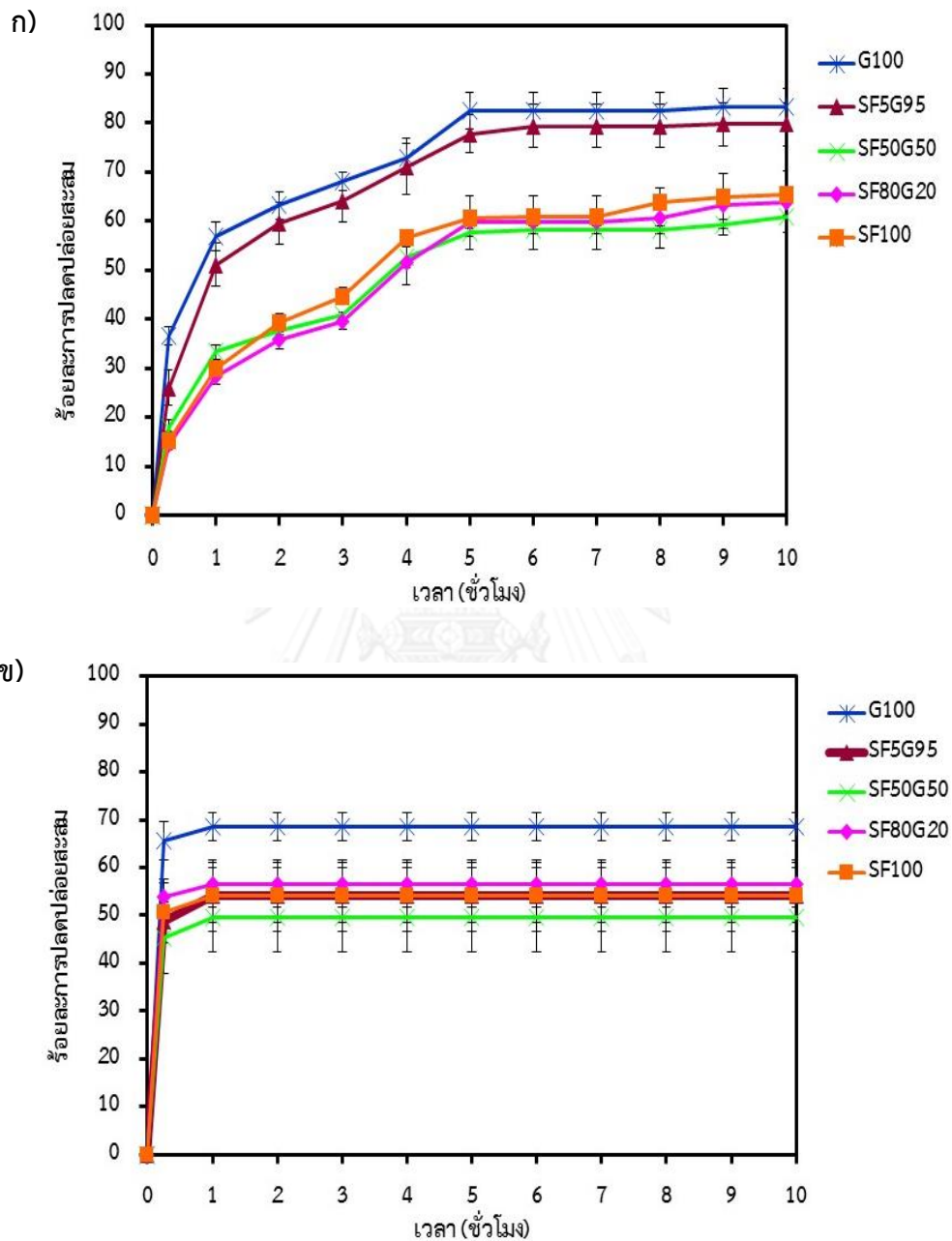
ผลการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอของไฮโดรเจลไฟโบรอิน/เจลาติน แสดงดังรูปที่ 4.19-4.20 เมื่อพิจารณาอัตราการปลดปล่อยสะสมของเคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอของไฮโดรเจลภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ (รูปที่ 4.19) พบว่าเคอร์คูมิน (รูปที่ 4.19 ก) และดีเอชเอ (รูปที่ 4.19 ข) ถูกปลดปล่อยออกมาทันทีที่เวลา 15 นาทีแรก โดยที่อัตราการปลดปล่อยเคอร์คูมินจากไฮโดรเจลในทุกอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักมีค่าน้อยกว่าดีเอชเอ ซึ่งไฮโดรเจลเจลาติน (G100) มีอัตราการปลดปล่อยเคอร์คูมินและดีเอชเอมากที่สุดเท่ากับ 36 และ 65 ตามลำดับ และไฮโดรเจลไฟโบรอิน (SF100) มีอัตราการปลดปล่อยเคอร์คูมินและดีเอชเอเท่ากับ 15 และ 50 ตามลำดับ ในขณะที่ไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอิน/เจลาติน (SF5G95, SF50G50 และ SF80G20) มีอัตราการปลดปล่อยเคอร์คูมินและดีเอชเออยู่ในช่วงประมาณ 14-26 และ 45-53 ตามลำดับ หลังจากเวลาที่ 15 นาที ดีเอชเอถูกปลดปล่อยออกมาอีกเพียงเล็กน้อย โดยสังเกตพบว่าในช่วงชั่วโมงที่ 1-10 อัตราการปลดปล่อยสะสมของดีเอชเอมีค่าคงที่ โดยอัตราการปลดปล่อยสะสมของดีเอชเอจากไฮโดรเจลเจลาตินมีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 68 สำหรับไฮโดรเจลไฟโบรอินและไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอิน/เจลาตินมีอัตราการปลดปล่อยสะสมของดีเอชเอไม่แตกต่างกัน ซึ่งอยู่ในช่วงประมาณ 49-56 แต่กรณีการปลดปล่อยเคอร์คูมิน พบว่าหลังจาก 15 นาทีแรก เคอร์คูมินถูกปลดปล่อยออกมาอย่างต่อเนื่อง และการปลดปล่อยเริ่มคงที่เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 6-10 โดยพบว่าไฮโดรเจลเจลาติน (G100) มีอัตราการปลดปล่อยสะสมเท่ากับ 83 และเมื่อมีสัดส่วนของไฟโบรอิน 5% (ไฮโดรเจลชนิด SF5G95) อัตราการปลดปล่อยสะสมมีค่าลดลงเล็กน้อย (ร้อยละ 79) ในขณะที่เมื่อสัดส่วนของไฟโบรอินเพิ่มเป็น 50-80% (ไฮโดรเจลชนิด SF50G50 และ SF80G20) และไฮโดรเจลไฟโบรอิน (SF100) มีอัตราการปลดปล่อยสะสมใกล้เคียงกันประมาณ 60-65

ทั้งนี้จะสังเกตได้ว่าอัตราการปลดปล่อยสะสมของเคอร์คูมินของไฮโดรเจลในทุกอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักตลอดระยะเวลา 10 ชั่วโมง มีค่ามากกว่าอัตราการปลดปล่อยสะสมของดีเอชเอ ถึงแม้ว่าจากผลการดูดซับสารออกฤทธิ์ผสมระหว่างเคอร์คูมินและดีเอชเอ (รูปที่ 4.16) ที่พบว่าดีเอชเอสามารถถูกดูดซับโดยไฮโดรเจลได้มากกว่าเคอร์คูมินก็ตาม ทั้งนี้เมื่อพิจารณาสมบัติของสารออกฤทธิ์ (ตารางที่ 4.9) พบว่าดีเอชเอมีพื้นที่ผิวของโมเลกุลที่สามารถเข้าถึงตัวทำละลายได้มากกว่าเคอร์คูมิน ซึ่งให้เห็นว่าดีเอชเอสามารถละลายในตัวทำละลายได้ดีกว่าเคอร์คูมิน ประกอบกับดีเอชเอมีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าเคอร์คูมิน ดังนั้นโอกาสที่ดีเอชเอจะถูกดูดซับและแทรกซึมเข้าไปอยู่ในเนื้อของไฮโดรเจลจึงมากกว่าเคอร์คูมิน นอกจากนี้ยังพบว่าดีเอชเอมีความไม่ชอบน้ำมากกว่าเคอร์คูมิน (มีค่า $\log P$ มากกว่าเคอร์คูมิน) ทำให้อันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างโมเลกุลของดีเอชเอและส่วนที่ไม่ชอบน้ำของไฮโดรเจลมีความแข็งแรงมากกว่าเคอร์คูมิน ดังนั้นส่วนของดีเอชเอจึงถูกปลดปล่อยออกมาน้อยกว่าเคอร์คูมิน

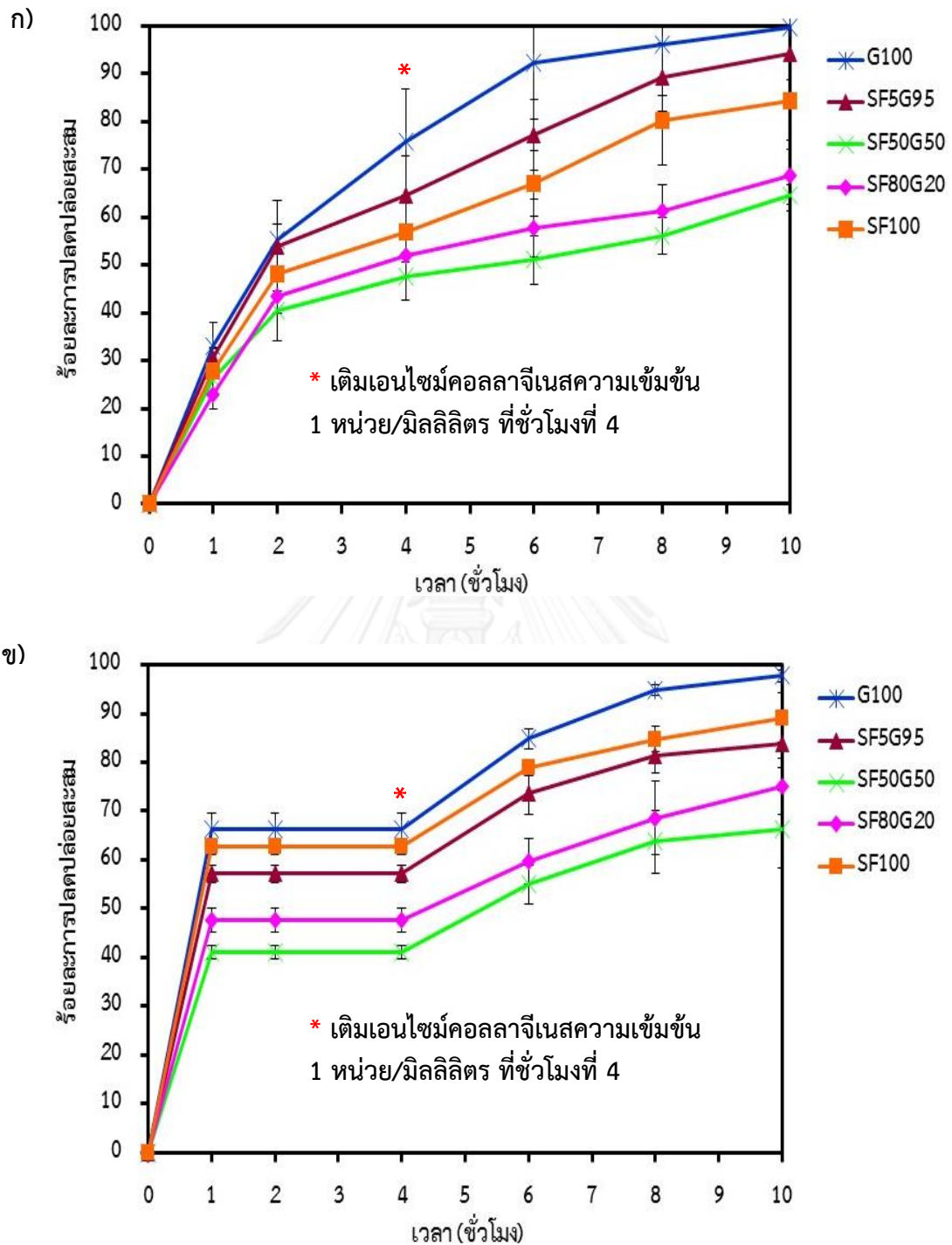
จากรูปที่ 4.20 ก และ ข แสดงร้อยละการปลดปล่อยสะสมของเคอร์คูมินร่วมกับ ดีเอชเอของไฮโดรเจลไฟโบรอิน/เจลาตินที่มีการเติมเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 1 หน่วยต่อ มิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 4 จากผลการศึกษาเมื่อพิจารณากรณีการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมิน (รูปที่ 4.20 ก) พบว่าที่ระยะเวลา 0-4 ชั่วโมง ร้อยละการปลดปล่อยเคอร์คูมินสะสมมีค่าใกล้เคียงกับกรณี การปลดปล่อยเคอร์คูมินภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบเมื่อมีการดูดซับเคอร์คูมิน ร่วมกับดีเอชเอ (รูปที่ 4.19 ก) โดย ณ ชั่วโมงที่ 4 พบว่าไฮโดรเจลเจลาติน (G100) และไฮโดรเจล ไฟโบรอิน (SF100) มีร้อยละการปลดปล่อยสะสมเท่ากับ 75 และ 56 ตามลำดับ และไฮโดรเจลผสม ระหว่างไฟโบรอิน/เจลาติน (SF5G95, SF50G50 และ SF80G20) มีร้อยละการปลดปล่อยสะสมอยู่ ในช่วงประมาณ 47-64 จากนั้นเมื่อเติมเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 4 พบว่าไฮโดรเจลในทุกอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักมีการปลดปล่อยเคอร์คูมินออกมามาก ต่อเนื่อง จนกระทั่งเข้าสู่ชั่วโมงที่ 10 โดยไฮโดรเจลเจลาตินมีร้อยละการปลดปล่อยสะสมมากที่สุด เท่ากับ 99 และไฮโดรเจลไฟโบรอินมีร้อยละการปลดปล่อยสะสมเท่ากับ 84 สำหรับไฮโดรเจลผสม ระหว่างไฟโบรอิน/เจลาตินมีร้อยละการปลดปล่อยสะสมอยู่ในช่วงประมาณ 64-94 โดยพบว่าเมื่อมี สัดส่วนของไฟโบรอิน 5% (ไฮโดรเจลชนิด SF5G95) ร้อยละการปลดปล่อยสะสมลดลงเล็กน้อย (ร้อยละ 94) เมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลเจลาติน และเมื่อสัดส่วนของไฟโบรอินเพิ่มเป็น 50% (ไฮโดรเจลชนิด SF50G50) และ 80% (ไฮโดรเจลชนิด SF80G20) พบว่าร้อยละการปลดปล่อยสะสม ลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลชนิด G100, SF5G95 และ SF100 โดยมีร้อยละการ ปลดปล่อยสะสมเท่ากับ 64 และ 68 ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาการควบคุมการปลดปล่อยดีเอชเอของไฮโดรเจล (รูปที่ 4.20 ข) พบว่าที่ ระยะเวลา 0-4 ชั่วโมง พฤติกรรมการปลดปล่อยมีลักษณะเหมือนกับการปลดปล่อยดีเอชเอภายใต้ สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบเมื่อมีการดูดซับเคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอ (รูปที่ 4.19 ข) จนกระทั่งเข้าสู่ชั่วโมงที่ 6 (หลังจากการเติมเอนไซม์ที่ชั่วโมงที่ 4) พบว่าไฮโดรเจลในทุกอัตราส่วนผสม โดยน้ำหนักมีการปลดปล่อยดีเอชเอเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนประมาณ 25-35% และต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 10 โดยไฮโดรเจลเจลาติน (G100) และไฟโบรอิน (SF100) มีร้อยละการปลดปล่อยสะสมมากที่สุด เท่ากับ 97 และ 89 ตามลำดับ สำหรับไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอิน/เจลาตินมีร้อยละการ ปลดปล่อยสะสมอยู่ในช่วงประมาณ 66-83 โดยที่เมื่อมีสัดส่วนของไฟโบรอิน 5% (ไฮโดรเจลชนิด SF5G95) ส่งผลให้ร้อยละการปลดปล่อยสะสมมีค่าลดลงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลชนิด G100 โดยมีร้อยละการปลดปล่อยสะสมลดลงจาก 97 เป็น 83 ในขณะที่เมื่อเพิ่มสัดส่วนของ ไฟโบรอินเป็น 50% (ไฮโดรเจลชนิด SF50G50) พบว่ามีร้อยละการปลดปล่อยสะสมเท่ากับ 66 ซึ่งเป็นค่าที่น้อยที่สุด และเมื่อเพิ่มสัดส่วนของไฟโบรอินเป็น 80% (ไฮโดรเจลชนิด SF80G20) พบว่ามี

ร้อยละการปลดปล่อยเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (ร้อยละ 75) เมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลชนิด SF50G50 แต่ยังคงมีค่าน้อยกว่าไฮโดรเจลชนิด G100, SF5G95 และ SF100



รูปที่ 4.19 ร้อยละการปลดปล่อยเคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอของไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.20% โดยปริมาตร ภายหลังจากการแช่ในสารละลาย PBS, pH 7.4 ที่ประกอบด้วยซีรัม 10% ภายใต้อุณหภูมิที่ไม่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ ก) ร้อยละการปลดปล่อยสะสมของเคอร์คูมิน ข) ร้อยละการปลดปล่อยสะสมของดีเอชเอ



รูปที่ 4.20 ร้อยละการปลดปล่อยคอร์คิวมินร่วมกับดีเอชเอของไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.20% โดยปริมาตร ภายหลังการแช่ในสารละลาย PBS, pH 7.4 ที่ประกอบด้วยซีรัม 10% ภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นองค์ประกอบ ก) ร้อยละการปลดปล่อยสะสมของคอร์คิวมิน ข) ร้อยละการปลดปล่อยสะสมของดีเอชเอ

จากผลการศึกษาจะเห็นได้ว่าการควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ (เฉพาะกรณีการปลดปล่อยดีเอชเอ และเคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอ) ภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร พบว่าร้อยละการปลดปล่อยสะสมโดยรวมของไฮโดรเจลไฟโบรอิน/เจลาตินในทุกอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก มีค่ามากกว่าการควบคุมการปลดปล่อยภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ เนื่องจากการมีเอนไซม์คอลลาจีเนสจะกระตุ้นให้เกิดการย่อยสลายของไฮโดรเจลโดยเฉพาะในส่วนของเจลาติน ส่งผลให้สารออกฤทธิ์ถูกปลดปล่อยออกมามากขึ้น แสดงให้เห็นว่าการย่อยสลายของไฮโดรเจลเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญที่กระตุ้นให้สารออกฤทธิ์ถูกปลดปล่อยออกมาเพิ่มขึ้น จากรายงานของ Anitha A. และคณะ (2011) ได้ศึกษาการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินของอนุภาคกลมขนาดนาโนของคาร์บอกซิลเมทิลไคโตซาน (Carboxymethyl chitosan) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไคโตซานที่ประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) และหมู่อะมิโน (-NH₂) โดยแบ่งเป็นการควบคุมการปลดปล่อยภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ และมีเอนไซม์ไลโซไซม์เป็นองค์ประกอบ พบว่าเคอร์คูมินถูกปลดปล่อยออกมาจากอนุภาคกลมขนาดนาโนของคาร์บอกซิลเมทิลไคโตซานอย่างช้าๆ และต่อเนื่อง (Sustain release) ทั้งนี้พบว่าร้อยละการปลดปล่อยสะสมของเคอร์คูมินในกรณีการควบคุมการปลดปล่อยภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบมีค่ามากกว่าการควบคุมการปลดปล่อยภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ เนื่องจากอนุภาคกลมขนาดนาโนของคาร์บอกซิลเมทิลไคโตซานถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลโซไซม์ ส่งผลให้เคอร์คูมินถูกปลดปล่อยออกมาเพิ่มขึ้น นอกจากนี้รายงานของ Ratanavaraporn J. และคณะ (2013) ได้ศึกษาการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมิน และ/หรือ ไฟเพอรินของอนุภาคกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอิน/เจลาตินที่อัตราส่วนผสมต่างๆ เมื่อแช่ในสารละลาย PBS, pH 7.4 ที่ประกอบด้วยทวิน 80 (Tween 80) ความเข้มข้น 0.1% โดยปริมาตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 14 วัน พบว่ากรณีการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินหรือไฟเพอรินเพียงอย่างเดียว อนุภาคกลมขนาดไมครอนในทุกอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักมีการปลดปล่อยเคอร์คูมินและไฟเพอรินอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งเข้าสู่สภาวะคงที่ (Steady state) ที่ชั่วโมงที่ 10 และสำหรับการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินร่วมกับไฟเพอริน พบว่าร้อยละการปลดปล่อยเคอร์คูมินและไฟเพอรินสะสมมีค่ามากกว่ากรณีการปลดปล่อยเคอร์คูมินหรือไฟเพอรินเพียงอย่างเดียว โดยเฉพาะไฟเพอรินที่มีการปลดปล่อยเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดและปลดปล่อยมากกว่าเคอร์คูมิน ทั้งนี้ น่าจะเนื่องมาจากการปลดปล่อยไฟเพอรินที่เพิ่มขึ้นถูกกระตุ้นโดยเคอร์คูมิน ประกอบกับอันตรกิริยาระหว่างอนุภาคกลมขนาดไมครอนและเคอร์คูมินมีความแข็งแรงมากกว่าไฟเพอริน ทำให้เคอร์คูมินถูกปลดปล่อยออกมาน้อยกว่าไฟเพอริน กล่าวคืออนุภาคกลมขนาดไมครอนของไฟโบรอิน/เจลาตินสามารถควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินได้มากกว่าไฟเพอริน นอกจากนี้ยังพบว่ากลไกที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการปลดปล่อย ได้แก่ การแพร่ และการย่อยสลายของวัสดุ โดยเคอร์คูมินและไฟเพอรินที่ดูดซับอยู่บนผิวของอนุภาคกลมขนาดไมครอนจะถูกปลดปล่อยออกมาโดยกลไกการแพร่ ในขณะที่เคอร์คูมินและ

ไฟเพอรินที่ถูกดูดซับอยู่บนโมเลกุลที่ถูกเชื่อมขวางของอนุภาคกลมขนาดไมครอนจะถูกปลดปล่อยออกมาเมื่ออนุภาคกลมขนาดไมครอนเกิดการย่อยสลาย ดังนั้นอนุภาคกลมขนาดไมครอนของเจลาตินซึ่งมีการสลายตัวอย่างรวดเร็วจึงมีร้อยละการปลดปล่อยสะสมเคอร์คูมิน และ/หรือ ไฟเพอรินมากที่สุด ในขณะที่อนุภาคกลมขนาดไมครอนผสมระหว่างไฟโบรอิน/เจลาตินมีการสลายตัวค่อนข้างช้าเมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคกลมขนาดไมครอนของเจลาติน ส่งผลให้ร้อยละการปลดปล่อยสะสมมีค่าลดลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาข้างต้น

สำหรับการประเมินกลไกการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ (เคอร์คูมิน และ/หรือ ดีเอชเอ) จากไฮโดรเจลไฟโบรอิน/เจลาติน ประเมินจากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์แบบ Power law ดังสมการที่ 4.1 และ 4.2 ซึ่งพิจารณากราฟระหว่างปริมาณยาปลดปล่อยสะสมที่เวลา t หารด้วยปริมาณยาปลดปล่อยสะสมที่เวลานันต์ (M_t/M_∞) ต่อเวลา (t) (ภาคผนวก จ) และคำนวณหาค่าคงที่สำหรับการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ (k) และตัวเลขชี้กำลังของการปลดปล่อย (Release exponent; n) โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์การถดถอย (Regression analysis)

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (4.1)$$

$$\log\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right) = n \log t + \log k \quad (4.2)$$

โดยที่ k คือ ค่าคงที่สำหรับกรณี Power Law

n คือ ตัวเลขชี้กำลังของการปลดปล่อยยา (Release Exponent)

เมื่อ $n = 0.45$ สำหรับกรณี Fickian Diffusion

$n = 0.89$ สำหรับกรณี Case II Transport (Relaxation)

$0.45 < n < 0.89$ สำหรับกรณี Non-Fickian Diffusion

จากตารางที่ 4.9-4.11 แสดงค่าคงที่สำหรับการปลดปล่อยเคอร์คูมิน (k), ตัวเลขชี้กำลังของการปลดปล่อย (Release exponent; n) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; R^2) สำหรับการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินทั้งแบบเดี่ยวและแบบร่วมจากไฮโดรเจลไฟโบรอิน/เจลาตินทุกอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนัก ทั้งกรณีการควบคุมการปลดปล่อยภายใต้สภาวะที่ไม่มีและมีเอนไซม์ พบว่าตัวเลขชี้กำลังของการปลดปล่อย (n) อยู่ในช่วง $0.45 < n < 0.89$ ซึ่งเป็นกรณีของ Non-Fickian Diffusion และเมื่อพิจารณาการควบคุมการปลดปล่อยดีเอชเอจากไฮโดรเจลไฟโบรอิน/เจลาตินทุกอัตราส่วนการผสมโดยน้ำหนัก พบว่ากรณีไฮโดรเจลที่ดูดซับดีเอชเอเพียงอย่างเดียว และไฮโดรเจลที่ดูดซับเคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอไม่สามารถคำนวณหาค่าคงที่และตัวเลขชี้กำลัง

ของการปลดปล่อยได้สำหรับการควบคุมการปลดปล่อยภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ เนื่องจากดีเอชเอ ไม่ถูกปลดปล่อยออกมาโดยกลไกการแพร่ แต่ปริมาณดีเอชเอที่ตรวจวัดได้ที่เวลา 15 นาทีแรก เป็น ปริมาณดีเอชเอที่มากเกินไปที่เกาะอยู่ที่ผิว (Surface) ของไฮโดรเจล สำหรับการควบคุมการ ปลดปล่อยดีเอชเอทั้งแบบเดี่ยวและแบบรวมภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์ พบว่าตัวเลขชี้กำลังของการ ปลดปล่อยมีค่าอยู่ในช่วง $0.45 < n < 0.89$

จากการวิเคราะห์กลไกการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ของไฮโดรเจลไฟโบรอิน/ เจลาติน พบว่าการควบคุมการปลดปล่อยของไฮโดรเจลประกอบด้วย 2 กลไกหลัก ได้แก่ กลไกการ แพร่ ซึ่งเกิดจากการดูดซับน้ำของไฮโดรเจลและเกิดการแพร่ของยาผ่านเมทริกซ์ของไฮโดรเจล โดย จากผลการศึกษาความสามารถในการดูดซับน้ำของไฮโดรเจล พบว่าร้อยละการดูดซับน้ำของ ไฮโดรเจลมีค่ามากกว่า 100% ส่งผลให้สารออกฤทธิ์เกิดการแพร่ผ่านเมทริกซ์ของไฮโดรเจล และอีก กลไกหนึ่งที่เกี่ยวข้องคือกลไกการย่อยสลายของไฮโดรเจล ซึ่งสารออกฤทธิ์ที่ถูกดูดซับอยู่บนโมเลกุล ของไฮโดรเจลจะถูกปลดปล่อยออกมาเมื่อไฮโดรเจลเกิดการย่อยสลาย จากรายงานของ Gupta V. และคณะ (2009) ได้ศึกษาการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินจากอนุภาคกลมขนาดนาโนของ ไฟโบรอิน พบว่าเคอร์คูมินถูกปลดปล่อยออกมาทันทีภายในช่วง 2 วันแรก จากนั้นการปลดปล่อยเริ่ม เกิดขึ้นอย่างช้าๆ และต่อเนื่อง และพบว่าค่าคงที่สำหรับการปลดปล่อย (k) และตัวเลขชี้กำลังของการ ปลดปล่อย (n) ซึ่งคำนวณจากสมการ Power law มีค่าเท่ากับ 0.9 และ 0.55 ตามลำดับ แสดงให้ เห็นว่ากลไกการแพร่และการย่อยสลายของวัสดุเป็นกลไกสำคัญที่มีผลต่อการควบคุมการปลดปล่อย เคอร์คูมิน และรายงานของ Cao F. และคณะ (2011) ได้ศึกษาการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมิน จากอนุภาคกลมขนาดไมครอนของเจลาติน พบว่าภายในเวลา 3 ชั่วโมงแรก เคอร์คูมินถูกปลดปล่อย ออกมาอย่างรวดเร็ว เนื่องมาจากเคอร์คูมินที่เกาะอยู่ที่ผิวของอนุภาคกลมขนาดไมครอนของเจลาติน หลังจากนั้นเคอร์คูมินถูกปลดปล่อยออกมาอย่างต่อเนื่อง โดยเมื่อครบระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่ามี ร้อยละการปลดปล่อยสะสมของเคอร์คูมินเท่ากับ 77 ทั้งนี้การควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินขึ้นอยู่กับกลไก 3 แบบ ได้แก่ กลไกการแพร่ของยาผ่านอนุภาคกลมขนาดไมครอน กลไกการย่อยสลายของ อนุภาคกลมขนาดไมครอน และกลไกการบวมตัวของอนุภาคกลมขนาดไมครอน นอกจากนี้รายงาน ของ Elakkiya T. และคณะ (2013) ได้ศึกษาการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินของแผ่นเส้นใย ไฟโบรอิน ภายหลังจากแช่ในสารละลาย PBS, pH 7.4 ที่ประกอบด้วยสารละลาย DMSO 10% โดย ปริมาตร พบว่าที่เวลา 2 ชั่วโมงแรก เคอร์คูมินถูกปลดปล่อยออกมาทันที (Initial burst release) เนื่องมาจากเคอร์คูมินที่เกาะอยู่บนผิวของแผ่นเส้นใย จากนั้นเคอร์คูมินถูกปลดปล่อยออกมาอย่าง ช้าๆ และต่อเนื่องตลอดช่วงการทดลอง ซึ่งเป็นส่วนของเคอร์คูมินที่เกิดอันตรกิริยา (Interaction) กับ แผ่นเส้นใยไฟโบรอิน และเมื่อวิเคราะห์กลไกการปลดปล่อยด้วยสมการ Power law โดยใช้เทคนิค การวิเคราะห์การถดถอย พบว่าค่าคงที่ของการปลดปล่อย (k) และตัวเลขชี้กำลังของการปลดปล่อย

(ก) มีค่าเท่ากับ 0.023 และ 0.674 ตามลำดับ ซึ่งชี้ให้เห็นว่ากลไกการปลดปล่อยเคอร์คูมินของแผ่นเส้นใยประกอบด้วย 2 กลไกหลัก ได้แก่ กลไกการแพร่และกลไกการย่อยสลายของแผ่นเส้นใยไฟโบรอิน ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาข้างต้น

ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ (เคอร์คูมิน และ/หรือดีเอชเอ) ภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์และมีเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นองค์ประกอบ พบว่าการเติมเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร มีผลชัดเจนต่อการปลดปล่อยดีเอชเอ โดยเฉพาะกรณีการปลดปล่อยร่วมซึ่งพบว่าดีเอชเอถูกปลดปล่อยเพิ่มมากขึ้นอย่างเด่นชัด ส่วนเคอร์คูมิน (เฉพาะกรณีการปลดปล่อยร่วมเท่านั้น) ถูกปลดปล่อยเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย (เคอร์คูมินมีการแพร่ออกมาอยู่ด้วย) ทั้งนี้การเติมเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้นเพียง 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นปริมาณที่น้อยซึ่งอาจจะไม่สามารถย่อยสลายไฮโดรเจลไฟโบรอิน/เจลาตินที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายไกลูตารัลดีไฮด์ได้มากนัก ดังนั้นจากผลการศึกษาจึงอาจกล่าวได้ว่ากลไกหลักของการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมิน คือ การแพร่ ในขณะที่กลไกหลักของการควบคุมการปลดปล่อยดีเอชเอ คือ การย่อยสลายของไฮโดรเจล

เมื่อพิจารณาชนิดของไฮโดรเจลไฟโบรอิน/เจลาตินต่อรูปแบบ (Profile) การควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ (เคอร์คูมิน และ/หรือดีเอชเอ) พบว่าทั้งกรณีการควบคุมการปลดปล่อยภายใต้สภาวะที่ไม่มีและเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ ไฮโดรเจลเจลาติน (G100) มีร้อยละการปลดปล่อยสะสมมากกว่าไฮโดรเจลไฟโบรอิน (SF100) และไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอิน/เจลาติน (SF5G95, SF50G50, SF80G20) เนื่องจากเกิดอันตรกิริยาที่แข็งแรงระหว่างส่วนที่ไม่ชอบน้ำของไฟโบรอินและสารออกฤทธิ์ ส่งผลให้สารออกฤทธิ์ถูกปลดปล่อยออกมาช้ากว่ากรณีดูดซับด้วยไฮโดรเจลเจลาติน ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าไฮโดรเจลไฟโบรอินและไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอิน/เจลาตินสามารถชะลอการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ได้มากกว่าไฮโดรเจลเจลาตินเพียงอย่างเดียว

ตารางที่ 4.9 ค่าคงที่สำหรับการปลดปล่อยคอร์คูมิน (k), ตัวเลขชี้กำลังของการปลดปล่อย (Release exponent; n) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; R^2)

ก) การควบคุมการปลดปล่อยภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์

ตัวอย่าง	ค่าคงที่ของการปลดปล่อย (k)	กลไกการปลดปล่อย (n)	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2)
G100	0.56 ± 0.23	0.52 ± 0.25	0.89
SF5G95	0.48 ± 0.32	0.57 ± 0.14	0.93
SF50G50	0.54 ± 0.16	0.52 ± 0.17	0.95
SF80G20	0.50 ± 0.21	0.55 ± 0.26	0.92
SF100	0.47 ± 0.20	0.60 ± 0.13	0.96

ข) การควบคุมการปลดปล่อยภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์

ตัวอย่าง	ค่าคงที่ของการปลดปล่อย (k)	กลไกการปลดปล่อย (n)	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2)
G100	0.34 ± 0.16	0.71 ± 0.09	0.96
SF5G95	0.29 ± 0.04	0.73 ± 0.06	0.98
SF50G50	0.26 ± 0.10	0.78 ± 0.07	0.98
SF80G20	0.22 ± 0.25	0.84 ± 0.17	0.95
SF100	0.18 ± 0.15	0.83 ± 0.19	0.95

ตารางที่ 4.10 ค่าคงที่สำหรับการปลดปล่อยดีเอชเอ (k) ภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์, ตัวเลขชี้กำลังของการปลดปล่อย (Release exponent; n) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; R^2)

ตัวอย่าง	ค่าคงที่ของการปลดปล่อย (k)	กลไกการปลดปล่อย (n)	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2)
G100	0.33 ± 0.16	0.69 ± 0.22	0.87
SF5G95	0.43 ± 0.22	0.65 ± 0.15	0.85
SF50G50	0.40 ± 0.28	0.65 ± 0.16	0.85
SF80G20	0.38 ± 0.34	0.67 ± 0.56	0.87
SF100	0.37 ± 0.31	0.67 ± 0.43	0.86

ตารางที่ 4.11 ค่าคงที่สำหรับการปลดปล่อยเคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอ (k), ตัวเลขชี้กำลังของการปลดปล่อย (Release exponent; n) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; R^2)

ก) การควบคุมการปลดปล่อยภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์

ตัวอย่าง	เคอร์คูมิน			ดีเอชเอ		
	ค่าคงที่ของการปลดปล่อย (k)	กลไกการปลดปล่อย (n)	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2)	ค่าคงที่ของการปลดปล่อย (k)	กลไกการปลดปล่อย (n)	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2)
G100	0.65±0.10	0.49±0.14	0.95	N/A	N/A	N/A
SF5G95	0.46±0.18	0.57±0.21	0.93	N/A	N/A	N/A
SF50G50	0.50±0.25	0.56±0.21	0.87	N/A	N/A	N/A
SF80G20	0.42±0.08	0.62±0.11	0.97	N/A	N/A	N/A
SF100	0.44±0.13	0.50±0.11	0.96	N/A	N/A	N/A

ข) การควบคุมการปลดปล่อยภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์

ตัวอย่าง	เคอร์คูมิน			ดีเอชเอ		
	ค่าคงที่ของการปลดปล่อย (k)	กลไกการปลดปล่อย (n)	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2)	ค่าคงที่ของการปลดปล่อย (k)	กลไกการปลดปล่อย (n)	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2)
G100	0.39±0.23	0.77±0.18	0.95	0.43±0.16	0.55±0.22	0.89
SF5G95	0.21±0.11	0.87±0.15	0.90	0.33±0.22	0.64±0.15	0.88
SF50G50	0.22±0.08	0.85±0.11	0.98	0.37±0.28	0.60±0.16	0.85
SF80G20	0.23±0.11	0.80±0.15	0.95	0.40±0.34	0.57±0.56	0.89
SF100	0.35±0.04	0.68±0.07	0.97	0.44±0.31	0.56±0.43	0.84

4.4.3 ประสิทธิภาพการปลดปล่อยเคอร์คูมิน ดีเอชเอ และเคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอของไฮโดรเจลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกในระดับห้องปฏิบัติการ

ในการทดสอบผลของสารละลายเคอร์คูมิน สารละลายดีเอชเอ และสารละลายผสมระหว่างเคอร์คูมินและดีเอชเอต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง มีจุดประสงค์เพื่อหาความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ที่เหมาะสมที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ เพื่อนำไปใช้ในการดูดซับลงบนไฮโดรเจลสำหรับใช้ทดสอบประสิทธิภาพการปลดปล่อยเคอร์คูมินและดีเอชเอของไฮโดรเจล ทั้งแบบเดี่ยวและแบบรวมต่อไป

ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด Caski ของสารละลายเคอร์คูมิน สารละลายดีเอชเอ และสารละลายผสมระหว่างเคอร์คูมินและดีเอชเอ สามารถพิจารณาได้จากการประเมินจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ด้วยวิธี MTT assay หลังการเพาะเลี้ยงที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ (เคอร์คูมิน และ/หรือ ดีเอชเอ) ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ (อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM), อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยสารละลายเอทานอล 0.1% โดยปริมาตร และกลุ่มควบคุมเชิงบวก (อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซิงค์อะซีเตต 100 ppm) โดยเพาะเลี้ยงด้วยจำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 6×10^4 เซลล์/1.9 ตารางเซนติเมตร (1 หลุม) รูปที่ 4.21 และ 4.22 แสดงจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่และรูปร่างของเซลล์มะเร็งปากมดลูกหลังจากการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ความเข้มข้นต่างๆ ตามลำดับ และร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก, อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และค่าการแบ่งตัวทวีคูณ ซึ่งคำนวณจากข้อมูลจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ สรุปในตารางที่ 4.12-4.13 จากผลการศึกษาเมื่อพิจารณาการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกด้วยสารละลายเคอร์คูมินความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ (Cur25) พบว่าที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่มีจำนวนลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และมีค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตเท่ากับ 13.5 และเมื่อระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นเป็น 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่มีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ โดยมีค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตเท่ากับ 17.4 และ 62.7 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.12) แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกของสารละลายเคอร์คูมินขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (Time-dependent) กล่าวคือ เมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกก็จะเพิ่มขึ้นตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Xu F. และคณะ (2009) ที่ได้ศึกษาผลของเคอร์คูมินต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารละลายเคอร์คูมินความเข้มข้น 10, 25 และ 50 ไมโครโมล/ลิตร เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากการศึกษาพบว่าเคอร์คูมินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโต

และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอกมดลูกได้ โดยเมื่อความเข้มข้นของเคอร์คูมินและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งก็จะเพิ่มขึ้น

เมื่อพิจารณาการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปอกมดลูกด้วยสารละลายดีเอชเอความเข้มข้นต่างๆ พบว่าที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารละลายดีเอชเอความเข้มข้น 12.5 และ 25 ไมโครโมลาร์ (DHA12.5 และ DHA25) เซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่มีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ ซึ่งมีค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตเป็นลบ แสดงให้เห็นว่าสารละลายดีเอชเอความเข้มข้น 12.5 และ 25 ไมโครโมลาร์ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายดีเอชเอเป็น 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ (DHA50 และ DHA100) พบว่าเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่มีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบและกลุ่มของสารละลายดีเอชเอความเข้มข้น 12.5 และ 25 ไมโครโมลาร์ โดยมีร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตเท่ากับ 29.9 และ 31.2 ตามลำดับ และเมื่อระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นเป็น 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยสารละลายดีเอชเอในทุกความเข้มข้น เซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่มีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ โดยที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง สารละลายดีเอชเอความเข้มข้น 12.5 และ 25 ไมโครโมลาร์ มีร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตเท่ากับ 9.4 และ 20.9 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และสารละลายดีเอชเอความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตเท่ากับ 80.6 และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายดีเอชเอความเข้มข้น 12.5 และ 25 ไมโครโมลาร์ ในขณะที่สารละลายดีเอชเอความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ มีร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ 94.6 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายดีเอชเอความเข้มข้น 12.5, 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ ทั้งนี้จะสังเกตได้ว่าจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่หลังจากการเพาะเลี้ยงด้วยสารละลายดีเอชเอความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก (อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซิงค์อะซีเตตความเข้มข้น 100 ppm) จากการวิเคราะห์ผลการศึกษ พบว่าร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอกมดลูกของสารละลายดีเอชเอมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น (Dose- and time- dependent)

จากรายงานของ Chen Z.Y. และคณะ (2000) ซึ่งได้ศึกษาผลของสารละลายดีเอชเอต่อการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารละลายดีเอชเอความเข้มข้น 0-200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 4, 8, 16 และ 24 ชั่วโมง พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายดีเอชเอและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น ส่งผลให้การชักนำให้เกิดการตายของ

เซลล์มะเร็งลำไส้เพิ่มขึ้น และรายงานของ Sagar P.S. และคณะ (1992) ซึ่งศึกษาผลของสารละลายดีเอชเอต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa โดยเพาะเลี้ยงร่วมกับสารละลายดีเอชเอความเข้มข้น 10, 20 และ 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่มีจำนวนลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารละลายดีเอชเอและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษานี้

สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกร่วมกับสารละลายผสมระหว่างเคอร์คูมินและดีเอชเอที่สัดส่วนความเข้มข้นต่างๆ (C1:D0.5, C1:D1, C1:D2 และ C1:D4) พบว่าที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารละลายผสมในทุกสัดส่วนความเข้มข้นจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ และมีร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตอยู่ในช่วงประมาณ 24-40 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยสารละลายผสมที่สัดส่วน C1:D0.5 และ C1:D1 มีร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายเคอร์คูมินความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ และสารละลายดีเอชเอความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ ในขณะที่เมื่อสัดส่วนการผสมเพิ่มขึ้นเป็น C1:D2 และ C1:D4 พบว่าร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายเคอร์คูมินความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายดีเอชเอความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ และเมื่อระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นเป็น 48 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยสารละลายผสมที่สัดส่วน C1:D0.5 และ C1:D1 จำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เพาะเลี้ยงด้วยสารละลายเคอร์คูมินความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ และสารละลายดีเอชเอความเข้มข้น 12.5 และ 25 ไมโครโมลาร์ แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เพาะเลี้ยงด้วยสารละลายดีเอชเอความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ โดยมีร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตเท่ากับ 36.1 และ 39.9 ตามลำดับ และเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยสารละลายผสมที่สัดส่วน C1:D2 และ C1:D4 จำนวนเซลล์มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายเคอร์คูมิน, สารละลายดีเอชเอในทุกความเข้มข้น และสารละลายผสมที่สัดส่วน C1:D0.5 แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายผสมที่สัดส่วน C1:D1 โดยมีร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตเท่ากับ 60.1 และ 68.3 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ยังมีระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นเป็น 72 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยสารละลายผสมที่สัดส่วน C1:D0.5 จำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยสารละลายเคอร์คูมินความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ แต่จำนวนเซลล์มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายดีเอชเอความเข้มข้น 12.5 และ 25 ไมโครโมลาร์ โดยมีร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตเท่ากับ 54.8 และเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยสารละลายผสมที่สัดส่วน

C1:D1 พบว่าจำนวนเซลล์มีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายผสมที่สัดส่วน C1:D0.5 แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตเท่ากับ 75.7 ในขณะที่สัดส่วนความเข้มข้นของสารละลายผสมเพิ่มขึ้นเป็น C1:D2 และ C1:D4 พบว่าจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายผสมที่สัดส่วน C1:D0.5 แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายผสมที่สัดส่วน C1:D1 โดยมีร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ 94.1 และ 99.3 ตามลำดับ ทั้งนี้จะสังเกตเห็นได้ว่าจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่หลังจากเพาะเลี้ยงด้วยสารละลายผสมที่สัดส่วน C1:D1, C1:D2 และ C1:D4 มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งที่สูง นอกจากนี้ยังพบว่าร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อสัดส่วนของดีเอชเอในสารละลายผสมระหว่างเคอร์คูมินและดีเอชเอเพิ่มขึ้น รวมถึงระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่เพิ่มขึ้นด้วย

จากการวิเคราะห์ผลการศึกษาค้นพบว่าเมื่อนำเคอร์คูมินและดีเอชเอมาใช้ร่วมกัน ส่งผลให้ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายเคอร์คูมินและสารละลายดีเอชเอที่ความเข้มข้นเดียวกัน และเมื่อสัดส่วนความเข้มข้นของสารละลายผสมเพิ่มขึ้น โดยมีสัดส่วนของดีเอชเอมากกว่าเคอร์คูมิน ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าเคอร์คูมินและดีเอชเอก่อให้เกิดผลร่วมกัน (Synergistic) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki

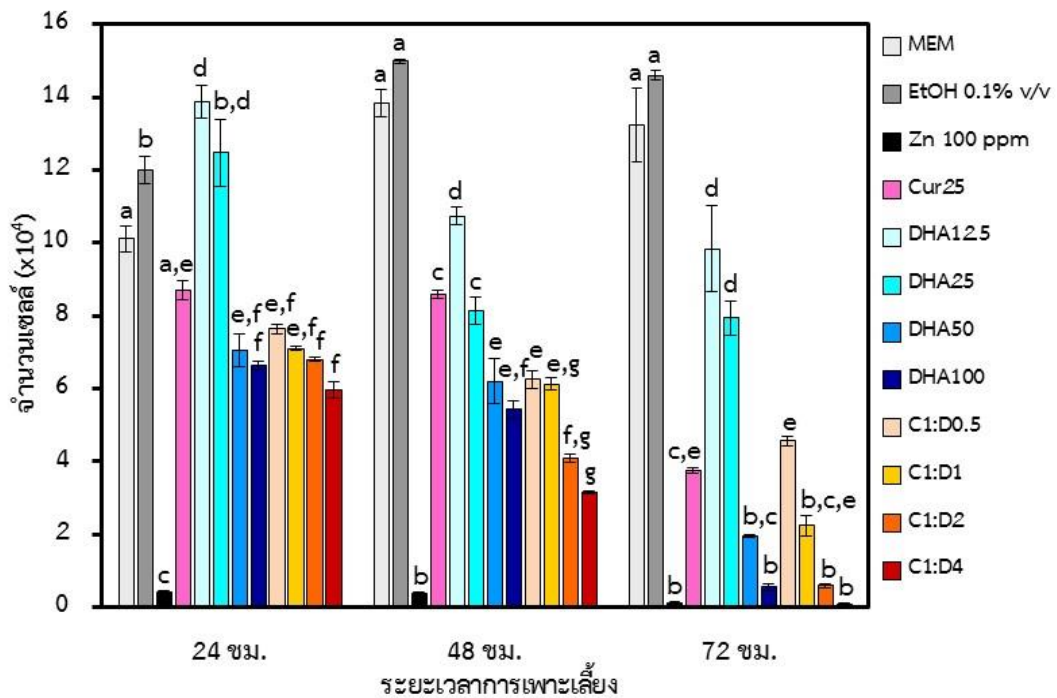
จากรายงานของ Swamy M.V. และคณะ (2008) ซึ่งได้ศึกษาผลร่วมของเคอร์คูมินและดีเอชเอต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตเซลล์มะเร็งตับอ่อนชนิด BxPC-3 โดยเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยสารละลายเคอร์คูมิน สารละลายดีเอชเอ และสารละลายผสมระหว่างเคอร์คูมินและดีเอชเอที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าเคอร์คูมินและดีเอชเอมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเพิ่มขึ้นเมื่อมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ในขณะที่สารละลายผสมระหว่างเคอร์คูมินและดีเอชเอให้ผลร่วมกันในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง โดยที่ความเข้มข้นของเคอร์คูมินเพียง 5 ไมโครโมลาร์ ต่อ ดีเอชเอ 25 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับอ่อนได้มากกว่า 70% และเมื่อสัดส่วนความเข้มข้นของเคอร์คูมินและดีเอชเอเพิ่มขึ้น (เคอร์คูมิน : ดีเอชเอ ที่สัดส่วน 5:50 และ 10:25 ไมโครโมลาร์) ทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเพิ่มขึ้น นอกจากนี้รายงานของ Altenburg J.D. และคณะ (2011) ได้ศึกษาผลร่วมของเคอร์คูมินและดีเอชเอที่มีผลต่อมะเร็งเต้านม พบว่าสารละลายผสมระหว่างเคอร์คูมินและดีเอชเอที่ความเข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์ (เคอร์คูมิน 12 ไมโครโมลาร์ และดีเอชเอ 18 ไมโครโมลาร์) สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเต้านมได้อย่างมีนัยสำคัญ

เนื่องจากดีเอชเอช่วยเพิ่มความสามารถของเซลล์มะเร็งในการดูดซึมเคอร์คูมิน ส่งผลให้ความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษานี้

เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และเวลาการแบ่งตัวทวีคูณของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (ตารางที่ 4.13) พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และเวลาการแบ่งตัวทวีคูณเท่ากับ $6.7 \pm 0.3 \times 10^{-3}$ ต่อชั่วโมง และ 105.6 ± 10.4 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยสารละลายเคอร์คูมิน, สารละลายดีเอชเอความเข้มข้นต่างๆ และสารละลายผสมระหว่างเคอร์คูมินและดีเอชเอที่สัดส่วนความเข้มข้นต่างๆ พบว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และเวลาการแบ่งตัวทวีคูณมีค่าติดลบ แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกของสารละลายเคอร์คูมินและดีเอชเอ

ทั้งนี้ตัวทำละลายที่ใช้ในการละลายเคอร์คูมินและดีเอชเอ คือ สารละลายเอทานอล โดยปรับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1% โดยปริมาตร และเพื่อเป็นยืนยันว่าการตายของเซลล์มะเร็งไม่ได้เกิดจากผลของสารละลายเอทานอล จึงได้ทำการทดสอบเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งร่วมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 0.1% โดยปริมาตร พบว่าจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และเวลาการแบ่งตัวทวีคูณเท่ากับ $4.6 \pm 0.7 \times 10^{-3}$ ต่อชั่วโมง และ 152.6 ± 11.9 ชั่วโมง ตามลำดับ ดังนั้นจึงยืนยันได้ว่าการตายของเซลล์มะเร็งปากมดลูกเกิดจากผลของสารละลายเคอร์คูมินและสารละลายดีเอชเอ

เมื่อพิจารณารูปร่างของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (รูปที่ 4.22) หลังจากการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยสารละลายเอทานอล 0.1% โดยปริมาตร พบว่าเซลล์มีการแผ่ขยายบนจานเลี้ยงเซลล์ และเมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น จำนวนเซลล์ที่แผ่ขยายก็จะเพิ่มขึ้น ในขณะที่เซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าเซลล์ที่แผ่ขยายบนจานเลี้ยงเซลล์มีจำนวนลดลง โดยที่เมื่อความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น จำนวนเซลล์ที่แผ่ขยายก็จะมีจำนวนลดลงและมีรูปร่างกลม ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการตายของเซลล์ และเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยซิงค์อะซีเตรด 100 ppm ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่างๆ พบว่าเซลล์แทบจะไม่มีแผ่ขยายเลย



รูปที่ 4.21 จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีชีวิตหลังจากการเพาะเลี้ยงที่เวลาต่างๆ ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารละลายเคอร์คูมินความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ (Cur25), สารละลายดีเอชเอความเข้มข้น 12.5 (DHA12.5), 25 (DHA25), 50 (DHA50) และ 100 (DHA100) ไมโครโมลาร์ และสารละลายผสมระหว่างเคอร์คูมินและดีเอชเอที่สัดส่วนความเข้มข้นต่างๆ (C1:D0.5, C1:D1, C1:D2 และ C1:D4) เปรียบเทียบกับตัวควบคุมเชิงลบ (อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM), อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเอทานอลความเข้มข้น 0.1% โดยปริมาตร และตัวควบคุมเชิงบวก (อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซิงค์อะซีเตตความเข้มข้น 100 ppm)

(a, b, c, d, e, f และ g แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ เมื่อพิจารณาที่ช่วงเวลาเดียวกัน)

ตารางที่ 4.12 ร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด Caski หลังจากการเพาะเลี้ยงด้วยสารละลายเคอร์คูมิน สารละลายดีเอชเอ และสารละลายผสมระหว่างเคอร์คูมินและดีเอชเอ

ตัวอย่าง	ร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
Cur25	13.5 ± 4.5 ^a	17.4 ± 3.2 ^a	62.7 ± 1.1 ^{a,e}
DHA12.5	-39.6 ± 5.9 ^b	-9.2 ± 4.0 ^b	9.4 ± 5.0 ^b
DHA25	-23.2 ± 7.7 ^b	19.2 ± 4.7 ^a	21.0 ± 6.4 ^b
DHA50	29.9 ± 5.2 ^{a,c}	38.7 ± 5.9 ^c	80.6 ± 1.1 ^{c,e}
DHA100	31.2 ± 0.7 ^{a,c}	46.1 ± 3.2 ^{c,d}	94.6 ± 1.0 ^d
C1:D0.5	24.4 ± 1.7 ^{a,c}	36.1 ± 1.7 ^c	54.8 ± 1.7 ^a
C1:D1	31.0 ± 2.0 ^{a,c}	40.0 ± 1.6 ^c	75.7 ± 3.3 ^e
C1:D2	33.3 ± 1.7 ^{a,c}	60.1 ± 0.8 ^{d,e}	94.1 ± 0.3 ^{c,d}
C1:D4	40.8 ± 3.4 ^c	68.3 ± 1.4 ^e	99.3 ± 0.3 ^d

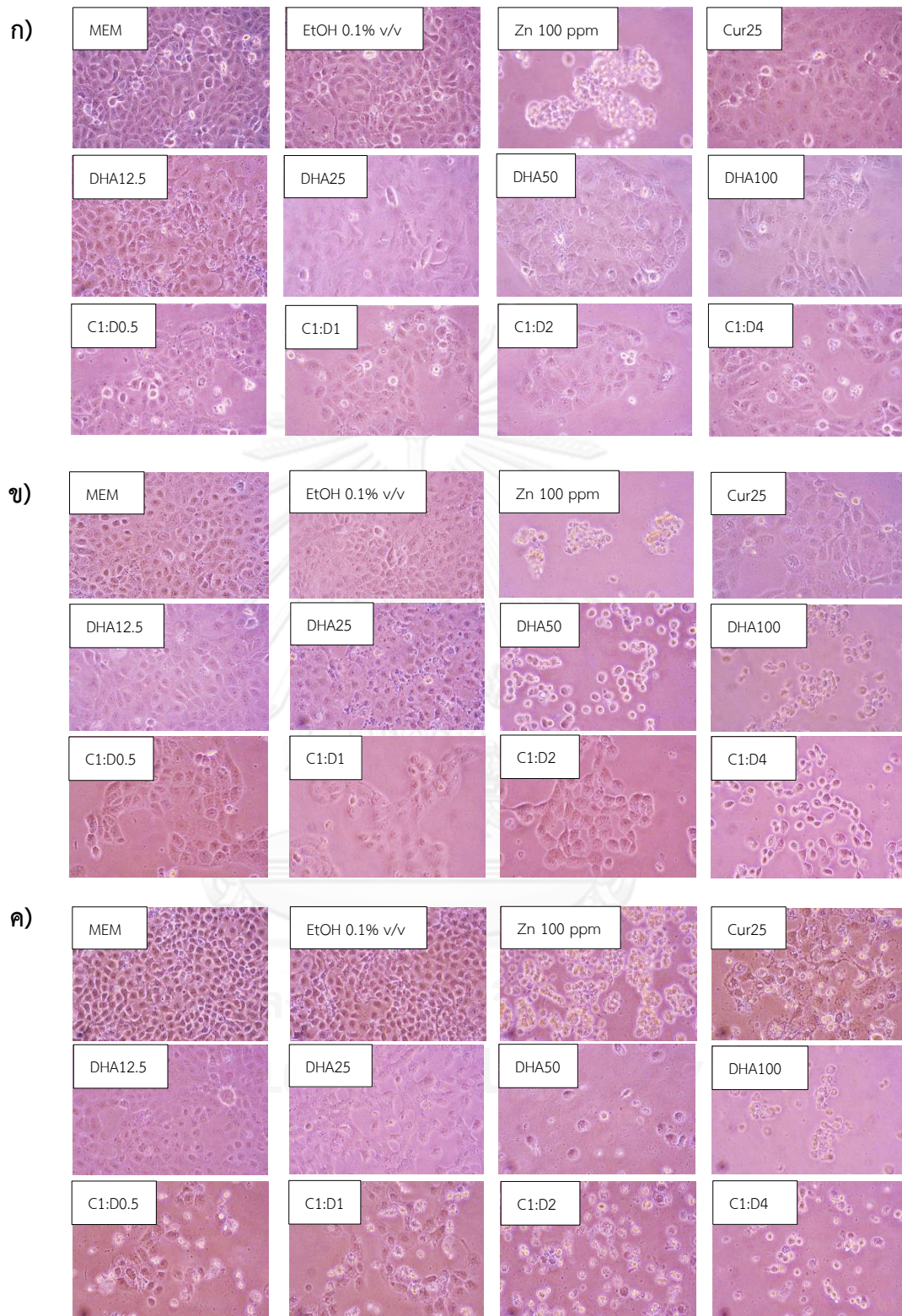
(a, b, c, d และ e แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ เมื่อพิจารณาที่ช่วงเวลาเดียวกัน)

ตารางที่ 4.13 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) และเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT) ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด Caski หลังจากการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM, อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเอทานอล 0.1% โดยปริมาตร และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยสารละลายเคอร์คูมิน สารละลายดีเอชเอ และสารละลายผสมระหว่างเคอร์คูมินและดีเอชเอ

ตัวอย่าง	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ(ชั่วโมง)
MEM	$6.7 \pm 0.3 \times 10^{-3} \text{ a}$	$105.6 \pm 10.4^{\text{g}}$
EtOH 0.1% v/v	$4.6 \pm 0.7 \times 10^{-3} \text{ a}$	$152.6 \pm 11.8^{\text{h}}$
Zn 100 ppm	$-3.7 \pm 0.2 \times 10^{-2} \text{ b,d}$	$-21.6 \pm 5.7^{\text{i,l,m}}$
Cur25	$-1.8 \pm 0.1 \times 10^{-2} \text{ b,d}$	$-41.1 \pm 0.7^{\text{i,l,m}}$
DHA12.5	$-9.4 \pm 1.0 \times 10^{-3} \text{ b}$	$-74.5 \pm 4.2^{\text{j}}$
DHA25	$-1.2 \pm 0.4 \times 10^{-2} \text{ b,e}$	$-67.9 \pm 15.8^{\text{ij}}$
DHA50	$-2.7 \pm 0.2 \times 10^{-2} \text{ d}$	$-26.1 \pm 1.0^{\text{k,l,m}}$
DHA100	$-5.3 \pm 0.8 \times 10^{-2} \text{ c}$	$-13.3 \pm 1.0^{\text{k,l,m}}$
C1:D0.5	$-1.1 \pm 0.6 \times 10^{-2} \text{ b}$	$-62.6 \pm 1.6^{\text{ij}}$
C1:D1	$-2.3 \pm 0.5 \times 10^{-2} \text{ d,e}$	$-31.3 \pm 3.2^{\text{l}}$
C1:D2	$-5.1 \pm 0.3 \times 10^{-2} \text{ c}$	$-13.6 \pm 0.4^{\text{m}}$
C1:D4	$-8.8 \pm 0.1 \times 10^{-2} \text{ f}$	$-7.9 \pm 0.4^{\text{k}}$

(a, b, c, d, e และ f แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ)

(g, h, i, j, k, l และ m แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ)



รูปที่ 4.22 รูปร่างของเซลล์มะเร็งปากมดลูกหลังจากเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM, อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเอทานอล 0.1% โดยปริมาตร, ซิงค์อะซีเตต 100 ppm และสารออกฤทธิ์ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากการเพาะเลี้ยงที่เวลา ก) 24 ชั่วโมง, ข) 48 ชั่วโมง และ ค) 72 ชั่วโมง

สำหรับการศึกษาการปลดปล่อยเคอร์คูมินและดีเอชเอ ทั้งแบบเดี่ยวและแบบร่วมของ ไฮโดรเจลไฟโบรอินใหม่ไทย/เจลาตินต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki ไฮโดรเจลที่เลือกนำมาใช้ศึกษา ได้แก่ ไฮโดรเจลชนิด G100, SF50G50, SF80G20 และ SF100 เนื่องจากเมื่อพิจารณาผลร้อยละการเชื่อมขวางพบว่าไฮโดรเจลชนิด SF5G95 มีร้อยละการเชื่อมขวางแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลผสมชนิด SF50G50 และ SF80G20 ในขณะที่ไฮโดรเจล 2 ชนิดนี้มีค่าร้อยละการเชื่อมขวางไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นเพื่อที่จะพิจารณาชนิดของไฮโดรเจลผสมที่มีผลต่อการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง จึงตัดไฮโดรเจลชนิด SF5G95 ออก เพื่อตัดปัจจัยในเรื่องของการเชื่อมขวาง ประกอบกับผลการทดสอบการควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ (เคอร์คูมิน และ/หรือ ดีเอชเอ) พบว่าไฮโดรเจลชนิด SF50G50 และ SF80G20 มีความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ได้มากกว่าไฮโดรเจลชนิด SF5G95 สำหรับไฮโดรเจลชนิด G100 และ SF100 ใช้ทดสอบเพื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลผสม

ผลการศึกษาการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมิน ดีเอชเอ และเคอร์คูมินร่วมกับ ดีเอชเอของไฮโดรเจลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki สามารถพิจารณาได้จากการประเมินจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ด้วยวิธี MTT assay หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยไฮโดรเจลที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ที่ดูดซับสารละลายเคอร์คูมินความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ (G100-Cur25, SF50G50-Cur25, SF80G20-Cur25 และ SF100-Cur25), สารละลายดีเอชเอความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ (G100-DHA100, SF50G50-DHA100, SF80G20-DHA100 และ SF100-DHA100) และสารละลายผสมระหว่างเคอร์คูมินและดีเอชเอที่สัดส่วนความเข้มข้น C1:D4 (G100-C1:D4, SF50G50-C1:D4, SF80G20-C1:D4 และ SF100-C1:D4) เปรียบเทียบกับตัวควบคุมเชิงลบ (อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM) และตัวควบคุมเชิงบวก (อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซิงค์อะซีเตตความเข้มข้น 100 ppm) ทั้งนี้ทำการประเมินจำนวนเซลล์ที่เวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน ดังแสดงในรูปที่ 4.23 โดยเฉพาะเลี้ยงด้วยจำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 6×10^4 เซลล์/1.9 ตารางเซนติเมตร (1 หลุม) และรูปที่ 4.24 แสดงจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่หลังจากการเพาะเลี้ยงที่เวลา 1, 2, และ 3 วัน ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีไฮโดรเจลที่ไม่ได้ดูดซับสารออกฤทธิ์ (Blank-G100, Blank-SF50G50, Blank-SF80G20 และ Blank-SF100) เปรียบเทียบกับตัวควบคุมเชิงลบและตัวควบคุมเชิงบวก สำหรับรูปที่ 4.25-4.28 แสดงรูปร่างของเซลล์มะเร็งหลังจากการเพาะเลี้ยงร่วมกับไฮโดรเจลที่ดูดซับสารออกฤทธิ์ที่ระยะเวลาต่างๆ ตลอดจนคำนวณร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก, อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และค่าการแบ่งตัวทวีคูณ ดังสรุปในตารางที่ 4.14 และ 4.15

จากรูปที่ 4.23 เมื่อพิจารณาที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 1 วัน พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีไฮโดรเจลที่ดูดซับสารละลายสารออกฤทธิ์ (เคอร์คูมิน และ/หรือ ดีเอชเอ) ทุกอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนัก เซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่มีจำนวนลดลงแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุมเชิงลบ และเมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นเป็น 3, 5 และ 7 วัน เซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีไฮโดรเจลที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ที่ดูดซับสารออกฤทธิ์ พบว่าจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ โดยเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยไฮโดรเจลที่ดูดซับสารละลายผสม C1:D4 จำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่มีค่าน้อยกว่าจำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยไฮโดรเจลที่ดูดซับสารละลายเคอร์คูมินความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ และสารละลายดีเอชเอความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้จะสังเกตได้ว่าที่ระยะเวลา 7 วัน เซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีไฮโดรเจลชนิด G100 จำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่มีค่ามากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยไฮโดรเจลชนิด SF50G50, SF80G20 และ SF100 ที่ดูดซับสารออกฤทธิ์ความเข้มข้นเดียวกัน แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจเนื่องมาจากเมื่อพิจารณาผลการศึกษาค้นคว้าการควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ของไฮโดรเจล พบว่าไฮโดรเจลเจลาตินมีการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์มากกว่าไฮโดรเจลไฟโบรอิน และไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอิน/เจลาติน ดังนั้นที่ระยะเวลา 7 วัน ปริมาณยาที่ถูกดูดซับโดยไฮโดรเจลอาจเหลืออยู่น้อย จึงส่งผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลดลง นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบระหว่างชนิดของไฮโดรเจลที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ที่ดูดซับสารออกฤทธิ์ที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ไม่แตกต่างกันของไฮโดรเจลแต่ละชนิด กล่าวคือ ชนิดของไฮโดรเจลไม่มีผลต่อการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก

จากการวิเคราะห์ผลการศึกษาค้นคว้าพบว่าไฮโดรเจลไฟโบรอิน/เจลาตินที่ดูดซับสารละลายผสมระหว่างเคอร์คูมินและดีเอชเอมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกมากกว่ากรณีการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยไฮโดรเจลที่ดูดซับสารละลายเคอร์คูมินหรือดีเอชเอเพียงอย่างเดียว ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบผลของสารละลายเคอร์คูมิน สารละลายดีเอชเอ และสารละลายผสมระหว่างเคอร์คูมินและดีเอชเอต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ที่พบว่าเคอร์คูมินและดีเอชเอก่อให้เกิดผลร่วมกัน (Synergistic) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก ทั้งนี้จะเห็นว่าที่ระยะเวลา 5 และ 7 วัน เซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยไฮโดรเจลชนิดเดียวกันที่ดูดซับสารออกฤทธิ์ความเข้มข้นต่างๆ โดยเฉพาะสารละลายผสมระหว่างเคอร์คูมินและดีเอชเอ พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลดลง ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากสารออกฤทธิ์ที่ถูกดูดซับโดยไฮโดรเจลมีปริมาณเหลืออยู่น้อย ดังนั้นถ้าต้องการให้การปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ของ

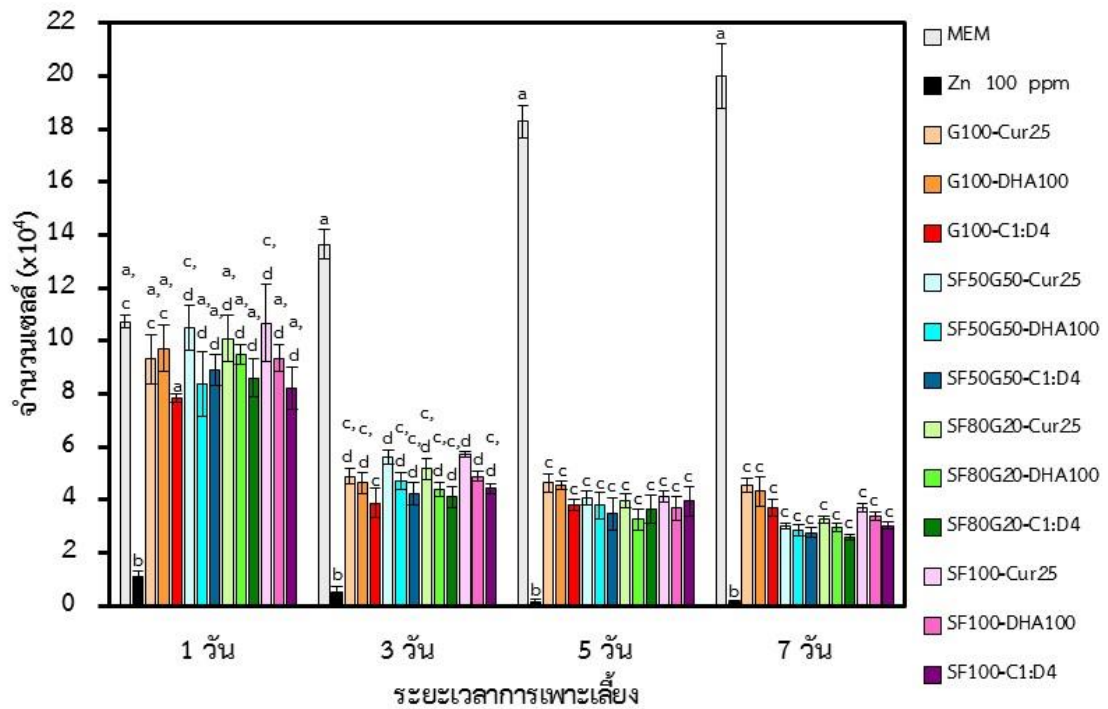
ไฮโดรเจลยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในระยะเวลาที่นานขึ้น จึงจำเป็นต้องเพิ่มปริมาณยาที่ดูดซับโดยไฮโดรเจล จึงกล่าวได้ว่าปริมาณยาที่ถูกดูดซับโดยไฮโดรเจลเป็นปัจจัยสำคัญต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอดมดลูก

นอกจากนี้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีไฮโดรเจลที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ที่ไม่ได้ดูดซับสารออกฤทธิ์ (Blank) ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่างๆ (รูปที่ 4.24) พบว่าเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่มีจำนวนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ แสดงให้เห็นว่าไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบความเป็นพิษของไฮโดรเจลต่อเซลล์ผิวหนังของหนู (เซลล์ L929) ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันได้ว่าการตายของเซลล์มะเร็งปอดมดลูกเกิดจากผลของเคอร์คูมินและดีเอชเอที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากไฮโดรเจลนั่นเอง

เมื่อพิจารณาอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอดมดลูก (ตารางที่ 4.14) พบว่าเมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น ค่าอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตก็จะเพิ่มขึ้นตามลำดับ แต่ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงโดยการใส่สารออกฤทธิ์ (เคอร์คูมิน และ/หรือ ดีเอชเอ) ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยตรง พบว่าที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงและความเข้มข้นเดียวกันมีอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งสูงกว่ากรณีการเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีไฮโดรเจลที่ดูดซับสารออกฤทธิ์ เนื่องจากไฮโดรเจลมีการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์อย่างช้าๆ และถูกปลดปล่อยออกมาในปริมาณน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการใส่สารออกฤทธิ์ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยตรง ส่งผลให้มีอัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตน้อยกว่า ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Anitha A. และคณะ (2011) ที่ได้ศึกษาผลของอนุภาคกลมขนาดนาโนของคาร์บอกซิลเมทิลไคโตซาน (Carboxymethyl chitosan) ที่กักเก็บเคอร์คูมินไว้ภายในต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม เปรียบเทียบกับอนุภาคกลมขนาดนาโนของคาร์บอกซิลเมทิลไคโตซานที่ไม่ได้กักเก็บเคอร์คูมินไว้ภายใน และสารละลายเคอร์คูมินอิสระ พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับอนุภาคกลมขนาดนาโนของคาร์บอกซิลเมทิลไคโตซานที่กักเก็บเคอร์คูมินไว้ภายใน มีร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มของอนุภาคกลมขนาดนาโนของคาร์บอกซิลเมทิลไคโตซานที่ไม่ได้กักเก็บเคอร์คูมินไว้ภายใน (Blank) แสดงให้เห็นว่าอนุภาคกลมขนาดนาโนที่เตรียมขึ้นไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงร่วมกับสารละลายเคอร์คูมินอิสระ พบว่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่น้อยกว่ากรณีการเพาะเลี้ยงร่วมกับอนุภาคกลมขนาดนาโนของคาร์บอกซิลเมทิลไคโตซานที่กักเก็บเคอร์คูมินไว้ภายใน เนื่องจากเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากอนุภาคกลมขนาดนาโนมีปริมาณน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงร่วมกับสารละลายเคอร์คูมินโดยตรง ทั้งนี้เคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยออกมายังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

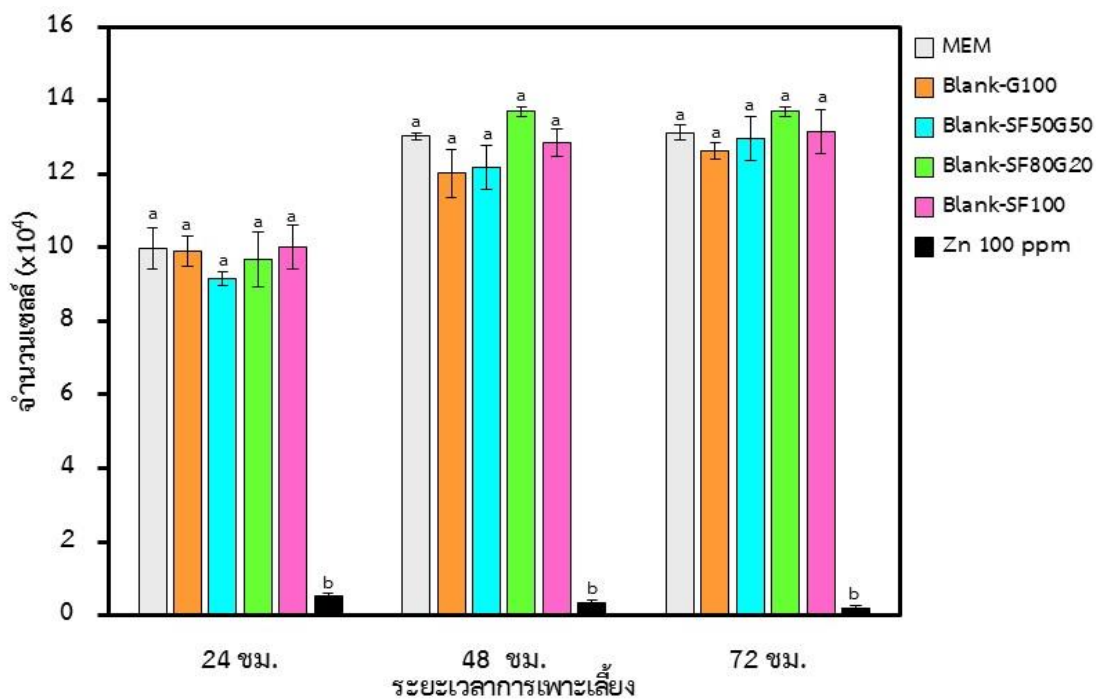
เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และเวลาการแบ่งตัวทวีคูณของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (ตารางที่ 4.15) พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และเวลาการแบ่งตัวทวีคูณเท่ากับ $5.9 \pm 0.3 \times 10^{-3}$ ต่อชั่วโมง และ 137.2 ± 5.2 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีไฮโดรเจลที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ที่ดูดซับสารละลายเคอร์คูมินความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์, สารละลายดีเอชเอ ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ และสารละลายผสม C1:D4 พบว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและเวลาการแบ่งตัวทวีคูณมีค่าติดลบ ซึ่งชี้ให้เห็นถึงประสิทธิภาพการปลดปล่อยเคอร์คูมิน และ/หรือ ดีเอชเอของไฮโดรเจลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก

เมื่อพิจารณารูปร่างของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (รูปที่ 4.25-4.28) หลังจากการเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลาต่างๆ ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM พบว่าเซลล์มีการแผ่ขยายบนจานเลี้ยงเซลล์ และมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น ในขณะที่เซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีไฮโดรเจลที่ดูดซับสารออกฤทธิ์ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าเซลล์ที่แผ่ขยายบนจานเลี้ยงเซลล์มีจำนวนลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ และเมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น จำนวนเซลล์ที่แผ่ขยายก็จะลดลงตามลำดับ ซึ่งชี้ให้เห็นการตายของเซลล์ และเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยซิงค์อะซีเตรด 100 ppm ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่างๆ พบว่าเซลล์แทบจะไม่มีแผ่ขยายเลย



รูปที่ 4.23 จำนวนเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มีชีวิตหลังจากการเพาะเลี้ยงที่เวลาต่างๆ ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีไฮโดรเจลไฟโบรอิน/เจลาตินที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ที่ดูดซับสารละลายเคอร์คูมินความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ (G100-Cur25, SF50G50-Cur25, SF80G20-Cur25 และ SF100-Cur25), สารละลายดีเอชเอความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ (G100-DHA100, SF50G50-DHA100, SF80G20-DHA100 และ SF100-DHA100) และสารละลายผสมระหว่างเคอร์คูมินและดีเอชเอที่สัดส่วนความเข้มข้น C1:D4 (G100-C1:D4, SF50G50-C1:D4, SF80G20-C1:D4 และ SF100-C1:D4) เปรียบเทียบกับตัวควบคุมเชิงลบ (อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM) และตัวควบคุมเชิงบวก (อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซิงค์อะซีเตตความเข้มข้น 100 ppm)

(a, b, c และ d แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ เมื่อพิจารณาที่ช่วงเวลาเดียวกัน)



รูปที่ 4.24 จำนวนเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มีชีวิตหลังจากการเพาะเลี้ยงที่เวลาต่างๆ ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีไฮโดรเจลไฟโบรอิน/เจลาตินที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ที่ไม่ได้ดูดซับสารออกฤทธิ์เปรียบเทียบกับตัวควบคุมเชิงลบ (อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM) และตัวควบคุมเชิงบวก (อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซิงค์อะซีเตตความเข้มข้น 100 ppm)

(a และ b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ เมื่อพิจารณาที่ช่วงเวลาเดียวกัน)

ตารางที่ 4.14 ร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด Caski หลังจากการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย/เจลาตินที่สัดส่วนการผสมโดยน้ำหนักต่างๆ ที่ดูดซับสารละลายเคอร์คูมิน สารละลายดีเอชเอ และสารละลายผสมระหว่างเคอร์คูมินและดีเอชเอ

ตัวอย่าง	ร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก			
	1 วัน	3 วัน	5 วัน	7 วัน
G100-Cur25	11.3 ± 9.9 ^a	52.9 ± 3.7 ^{a,b}	59.4 ± 0.9 ^a	60.2 ± 2.2 ^{a,d,f}
G100-DHA100	20.7 ± 5.5 ^a	55.7 ± 4.3 ^{a,b}	57.9 ± 1.0 ^a	63.1 ± 3.9 ^{a,c}
G100-C1:D4	33.0 ± 0.4 ^a	65.4 ± 6.5 ^a	66.1 ± 1.8 ^a	68.0 ± 2.1 ^{a,e,f}
SF50G50-Cur25	6.7 ± 8.9 ^a	48.0 ± 2.6 ^{b,c}	64.4 ± 0.9 ^a	72.5 ± 1.9 ^{b,c,e,f}
SF50G50-DHA100	30.0 ± 7.4 ^a	56.0 ± 3.3 ^{a,c,d}	68.5 ± 4.1 ^a	73.5 ± 2.3 ^{b,e,f}
SF50G50-C1:D4	26.2 ± 3.2 ^a	60.7 ± 2.7 ^{a,c,e}	73.5 ± 2.3 ^a	74.4 ± 1.4 ^{b,e,f}
SF80G20-Cur25	10.4 ± 6.7 ^a	49.4 ± 3.9 ^{b,d,e,f}	65.0 ± 1.1 ^a	69.7 ± 1.7 ^{b,c,e,f}
SF80G20-DHA100	20.4 ± 5.3 ^a	58.4 ± 2.1 ^{a,c,f}	71.4 ± 4.5 ^a	72.7 ± 1.4 ^{b,e,f}
SF80G20-C1:D4	27.6 ± 8.6 ^a	60.9 ± 4.2 ^{a,c,f}	68.6 ± 4.7 ^a	75.8 ± 1.5 ^{b,c,e}
SF100-Cur25	5.2 ± 1.0 ^a	45.5 ± 2.3 ^{b,d,g}	62.9 ± 2.8 ^a	66.5 ± 1.4 ^{f,g}
SF50G50-DHA100	22.3 ± 1.2 ^a	54.7 ± 2.0 ^{a,c,f,g}	65.4 ± 4.9 ^a	70.0 ± 0.5 ^{d,e,g}
SF100-C1:D4	29.2 ± 3.5 ^a	57.8 ± 2.0 ^{a,c,f,g}	63.4 ± 5.1 ^a	71.8 ± 1.8 ^{b,e,g}

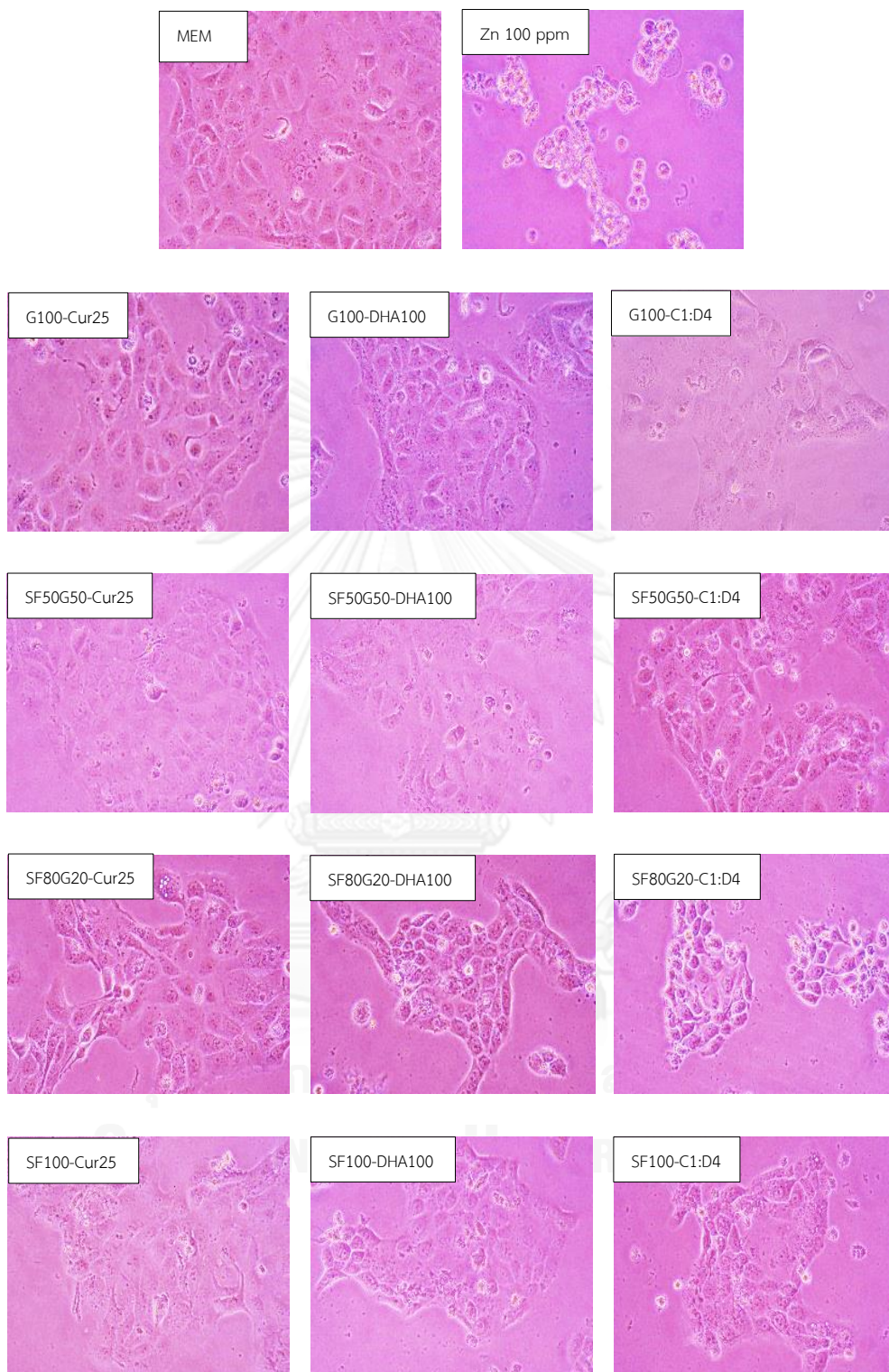
(a, b, c, d, e, f และ g แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ เมื่อพิจารณาในช่วงเวลาเดียวกัน)

ตารางที่ 4.15 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) และเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT) ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด Caski หลังจากการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM, อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซิงค์อะซีเตตความเข้มข้น 100 ppm และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีไฮโดรเจลที่ดูดซับสารละลายเคอร์คูมิน สารละลายดีเอชเอ และสารละลายผสมระหว่างเคอร์คูมินและดีเอชเอ

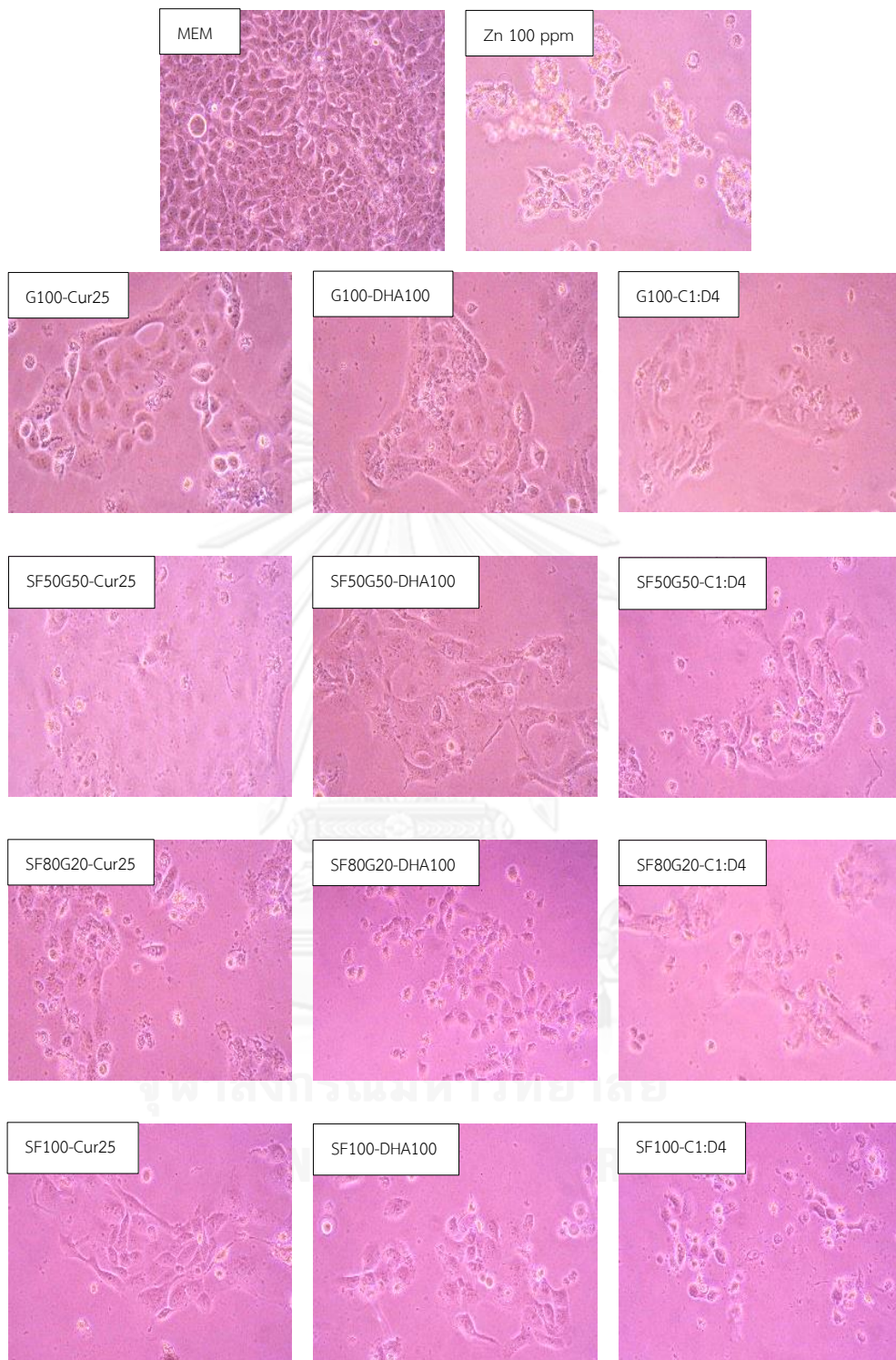
ตัวอย่าง	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ(ชั่วโมง)
MEM	$5.0 \pm 0.4 \times 10^{-3} \text{ a}$	$163.4 \pm 6.4 \text{ d}$
Zn 100 ppm	$-4.3 \pm 0.7 \times 10^{-2} \text{ b}$	$-89.5 \pm 3.7 \text{ e}$
G100-Cur25	$-1.3 \pm 0.7 \times 10^{-2} \text{ c}$	$-53.7 \pm 3.3 \text{ f}$
G100-DHA100	$-1.5 \pm 0.2 \times 10^{-2} \text{ c}$	$-44.8 \pm 6.6 \text{ f}$
G100-C1:D4	$-1.6 \pm 1.0 \times 10^{-2} \text{ c}$	$-52.1 \pm 11.6 \text{ f}$
SF50G50-Cur25	$-1.2 \pm 0.4 \times 10^{-2} \text{ c}$	$-69.0 \pm 15.9 \text{ f}$
SF50G50-DHA100	$-1.3 \pm 0.8 \times 10^{-2} \text{ c}$	$-54.5 \pm 5.3 \text{ f}$
SF50G50-C1:D4	$-1.5 \pm 0.7 \times 10^{-2} \text{ c}$	$-54.8 \pm 13.8 \text{ f}$
SF80G20-Cur25	$-1.5 \pm 0.3 \times 10^{-2} \text{ c}$	$-66.4 \pm 10.1 \text{ f}$
SF80G20-DHA100	$-1.7 \pm 0.4 \times 10^{-2} \text{ c}$	$-55.3 \pm 12.8 \text{ f}$
SF80G20-C1:D4	$-1.5 \pm 0.6 \times 10^{-2} \text{ c}$	$-56.2 \pm 13.1 \text{ f}$
SF100-Cur25	$-1.1 \pm 0.8 \times 10^{-2} \text{ c}$	$-64.5 \pm 12.5 \text{ f}$
SF100-DHA100	$-1.3 \pm 0.6 \times 10^{-2} \text{ c}$	$-54.1 \pm 7.3 \text{ f}$
SF100-C1:D4	$-1.1 \pm 0.4 \times 10^{-2} \text{ c}$	$-61.3 \pm 3.6 \text{ f}$

(a, b และ c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ)

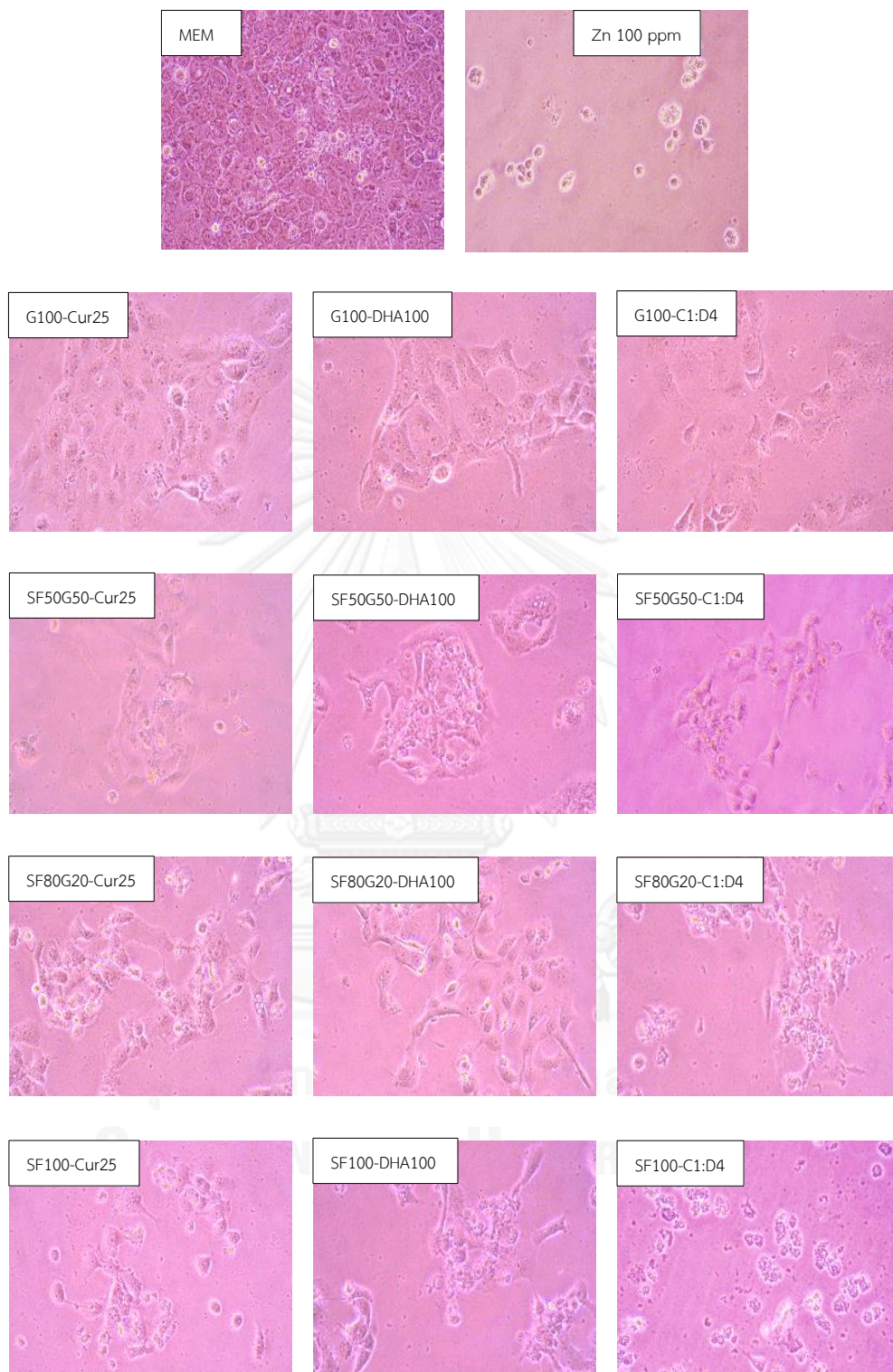
(d, e และ f แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$ ของข้อมูลเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ)



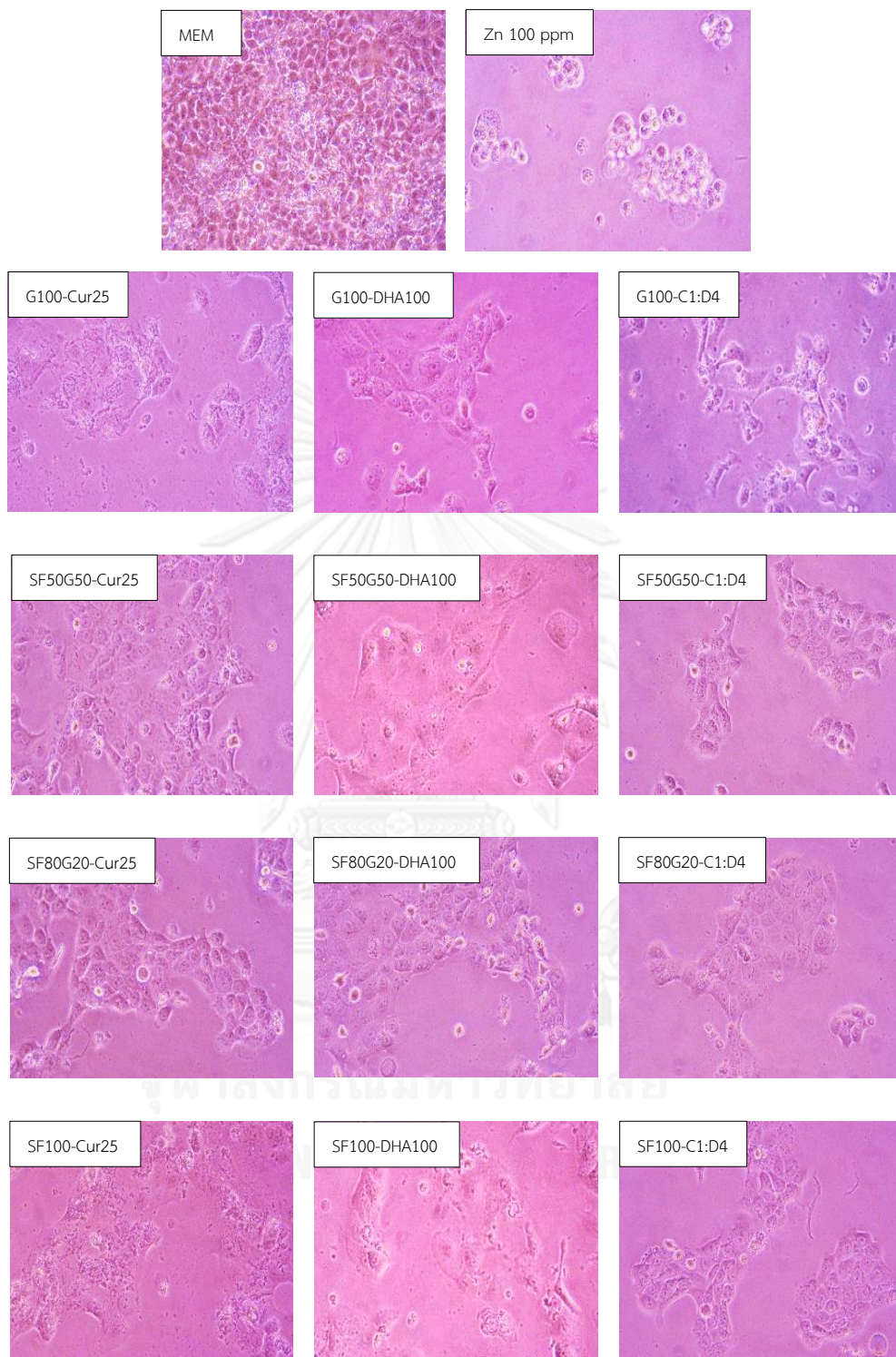
รูปที่ 4.25 รูปร่างของเซลล์มะเร็งปากมดลูกหลังจากเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM, อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซิงค์อะซีเตต 100 ppm และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีไฮโดรเจลที่ดูดซับสารออกฤทธิ์ ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากการเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลา 1 วัน



รูปที่ 4.26 รูปร่างของเซลล์มะเร็งปากมดลูกหลังจากเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM, อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซิงค์อะซีเตต 100 ppm และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีไฮโดรเจลที่ดูดซับสารออกฤทธิ์ ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากการเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลา 3 วัน



รูปที่ 4.27 รูปร่างของเซลล์มะเร็งปากรวมดลูกหลังจากเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM, อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซิงค์อะซีเตต 100 ppm และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีไฮโดรเจลที่ดูดซับสารออกฤทธิ์ ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากการเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลา 5 วัน



รูปที่ 4.28 รูปร่างของเซลล์มะเร็งปากมดลูกหลังจากเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM, อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซิงค์อะซีเตต 100 ppm และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีไฮโดรเจลที่ดูดซับสารออกฤทธิ์ ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากการเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลา 7 วัน

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาคุณลักษณะและสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ (G100, SF5G95, SF10G90, SF15G85, SF20G80, SF50G50, SF80G20 และ SF100) ซึ่งถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ และนำไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ตลอดจนศึกษาความสามารถในการดูดซับและควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ (เคอร์คูมิน และ/หรือ ดีเอชเอ) และศึกษาผลการปลดปล่อยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki ในระดับห้องปฏิบัติการ เมื่อศึกษาผลของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.10%, 0.15% และ 0.20% โดยปริมาตร ที่มีผลต่อความคงตัวของไฮโดรเจล พบว่าไฮโดรเจลที่ถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.20% โดยปริมาตร มีความคงตัวมากที่สุด ซึ่งพิจารณาจากร้อยละโดยน้ำหนักที่หายไปน้อยที่สุด ดังนั้นจึงเลือกไฮโดรเจลที่เตรียมโดยผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.20% โดยปริมาตร มาใช้ในการศึกษาคุณลักษณะและสมบัติทางกายภาพและชีวภาพ ตลอดจนการศึกษาสมบัติการดูดซับและควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์

จากการวิเคราะห์ค่าศักย์เซต้าของสารละลายผสมของไฟโบรอินและเจลาติน พบว่าเมื่อสัดส่วนของไฟโบรอินในสารละลายผสมมีค่าเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ค่าศักย์เซต้าที่เป็นบวกมีค่าลดลง สำหรับสารละลายเคอร์คูมิน และสารละลายดีเอชเอ พบว่ามีค่าศักย์เซต้าเป็นลบทั้งคู่ และเมื่อวิเคราะห์ค่ามุมสัมผัสของน้ำบนฟิล์มผสมไฟโบรอิน/เจลาติน ฟิล์มเคอร์คูมิน และฟิล์มดีเอชเอ เพื่อประเมินสมบัติความชอบน้ำ-ไม่ชอบน้ำของวัสดุ พบว่าการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ทำให้สมบัติความชอบน้ำของเจลาตินลดลง ซึ่งสังเกตได้จากค่ามุมสัมผัสของน้ำที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่เมื่อสัดส่วนของไฟโบรอินเพิ่มขึ้น ส่งผลให้สมบัติความชอบน้ำลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มเจลาติน สำหรับฟิล์มเคอร์คูมิน และฟิล์มดีเอชเอมีค่ามุมสัมผัสของน้ำเท่ากับ 64.30 และ 61.01 องศา ตามลำดับ

สำหรับไฮโดรเจลไฟโบรอิน/เจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.20% โดยปริมาตร ที่เตรียมได้มีรูพรุนสม่ำเสมอและเชื่อมโยงกันเป็นเครือข่าย โดยความพรุนของไฮโดรเจลมีค่าอยู่ในช่วงประมาณ 83-94% และเมื่อพิจารณาความสามารถในการบวมน้ำของไฮโดรเจล พบว่าไฮโดรเจลมีค่าร้อยละการบวมน้ำมากกว่า 100% เนื่องจากไฮโดรเจลมีโครงสร้างที่มีความพรุนสูง นอกจากนี้ยังพบว่าไฮโดรเจลไฟโบรอินมีร้อยละการบวมน้ำมากกว่าไฮโดรเจลเจลาตินเล็กน้อยแต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากไฮโดรเจลไฟโบรอินมีความคงรูปมากกว่าไฮโดรเจลเจลาติน ดังนั้นจึงสามารถกักเก็บน้ำได้ดีกว่าไฮโดรเจลเจลาติน

จากการศึกษาร้อยละการเชื่อมขวางของไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอิน/เจลาติน พบว่าไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอิน/เจลาตินมีค่าร้อยละการเชื่อมขวางมากกว่าไฮโดรเจลเจลาตินหรือไฮโดรเจลไฟโบรอินอย่างมีนัยสำคัญ ถึงแม้ว่าเจลาตินจะมีปริมาณของหมู่อะมิโนอิสระสำหรับการใช้ในการเชื่อมขวางมากที่สุดก็ตาม เนื่องจากความหนาแน่นของหมู่อะมิโนอิสระที่มากเกินไปอาจเป็นอุปสรรคต่อการเชื่อมขวางจึงทำให้มีค่าร้อยละการเชื่อมขวางน้อย เมื่อศึกษาความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพของไฮโดรเจลภายหลังแช่ในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่าไฮโดรเจลเจลาตินถูกย่อยสลายเร็วกว่าไฮโดรเจลไฟโบรอินและไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอิน/เจลาติน เนื่องจากเอนไซม์คอลลาจีเนสมีความจำเพาะเจาะจงต่อการย่อยสลายคอลลาเจนและเจลาติน ประกอบกับไฮโดรเจลเจลาตินมีร้อยละการเชื่อมขวางน้อยที่สุด จึงทำให้เกิดการสลายตัวเร็วภายใต้สารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส

ในการศึกษาความเป็นพิษของไฮโดรเจลไฟโบรอิน/เจลาตินต่อเซลล์ผิวหนังของหนู (เซลล์ L929) โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ L929 ด้วยตัวอย่างสารสกัดของไฮโดรเจลที่อัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักต่างๆ พบว่าจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่มีจำนวนเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของตัวอย่างสารสกัดเจือจางลงและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และเวลาการแบ่งตัวทวีคูณของเซลล์ L929 ที่เพาะเลี้ยงด้วยตัวอย่างสารสกัด 100% และตัวอย่างสารสกัดเจือจางทุกความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ แสดงให้เห็นว่าไฮโดรเจลไฟโบรอิน/เจลาตินที่เตรียมขึ้นไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์

สำหรับการศึกษาความสามารถในการดูดซับและควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ไฮโดรเจลที่นำมาใช้ทดสอบ ได้แก่ ไฮโดรเจลชนิด G100, SF5G95, SF50G50, SF80G20 และ SF100 ซึ่งพิจารณาเลือกจากผลการศึกษาร้อยละการเชื่อมขวางและความสามารถในการย่อยสลายได้ของไฮโดรเจล โดยสำหรับการดูดซับเคอร์คูมินหรือดีเอชเอของไฮโดรเจล พบว่าไฮโดรเจลทุกอัตราส่วนผสมโดยน้ำหนักมีร้อยละการดูดซับเคอร์คูมินมากกว่าดีเอชเอเล็กน้อย แต่ทั้งนี้ร้อยละการดูดซับของไฮโดรเจลแต่ละชนิดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อพิจารณาการดูดซับเคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอของไฮโดรเจล พบว่าดีเอชเอถูกดูดซับโดยไฮโดรเจลมากกว่าเคอร์คูมิน ทั้งนี้เนื่องจากดีเอชเอมีสมบัติความไม่ชอบน้ำและค่าพื้นที่ผิวของโมเลกุลที่สามารถเข้าถึงตัวทำละลายได้มากกว่าเคอร์คูมิน ประกอบกับดีเอชเอมีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าเคอร์คูมินเล็กน้อย ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ดีเอชเอมีโอกาสถูกดูดซับอยู่บนโมเลกุลของส่วนที่มีความไม่ชอบน้ำของไฮโดรเจลได้มากกว่าเคอร์คูมิน

เมื่อนำไฮโดรเจลไปทดสอบความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ (เคอร์คูมิน และ/หรือ ดีเอชเอ) ภายใต้สภาวะที่ไม่มีและมีเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นองค์ประกอบ พบว่าการควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ของไฮโดรเจลประกอบด้วย 2 กลไก ได้แก่ กลไกการแพร่ และกลไกการย่อยสลายของไฮโดรเจล แต่ทั้งนี้สังเกตพบว่าการเติม

เอนไซม์คอลลาจีเนสแทบไม่มีผลต่อการปลดปล่อยเคอร์คูมิน แต่มีผลต่อการปลดปล่อยดีเอชเอ โดยเฉพาะกรณีการปลดปล่อยร่วม ซึ่งพบว่าดีเอชเอถูกปลดปล่อยเพิ่มมากขึ้นอย่างเด่นชัด ส่วนเคอร์คูมินถูกปลดปล่อยเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ทั้งนี้การเติมเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้นเพียง 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยอาจจะไม่สามารถย่อยสลายไฮโดรเจลไฟโบรอิน/เจลาตินที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ได้มากนัก ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่ากลไกเด่นของการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมิน คือ การแพร่ ในขณะที่กลไกเด่นของการควบคุมการปลดปล่อยดีเอชเอ คือ การย่อยสลายของไฮโดรเจล นอกจากนี้ยังพบว่าไฮโดรเจลไฟโบรอินและไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอิน/เจลาตินสามารถชะลอการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ได้มากกว่าไฮโดรเจลเจลาตินเพียงอย่างเดียว

เมื่อทำการศึกษาประสิทธิภาพการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ของไฮโดรเจลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก พบว่าไฮโดรเจลไฟโบรอิน/เจลาตินที่ดูดซับสารละลายผสมระหว่างเคอร์คูมินและดีเอชเอมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกมากกว่ากรณีการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีไฮโดรเจลที่ดูดซับสารละลายเคอร์คูมินหรือดีเอชเอเพียงอย่างเดียว โดยที่เมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น ร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตก็จะเพิ่มขึ้นตามลำดับ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับกรณีการเพาะเลี้ยงโดยการใส่สารออกฤทธิ์ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยตรง พบว่าที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงและที่ความเข้มข้นเดียวกันมีร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งสูงกว่ากรณีการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีไฮโดรเจลที่ดูดซับสารออกฤทธิ์ เนื่องจากไฮโดรเจลมีการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์อย่างช้าๆ และปลดปล่อยในปริมาณน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการใส่สารออกฤทธิ์ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยตรง นอกจากนี้ยังพบว่าชนิดของไฮโดรเจลไม่มีผลต่อการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก

จากผลการวิจัยสามารถสรุปได้ว่าไฮโดรเจลผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินที่ถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.20% โดยปริมาตร สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการดูดซับและควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมิน และ/หรือ ดีเอชเอที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki ในระดับห้องปฏิบัติการ (*In vitro*) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยที่ไม่ทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพของเคอร์คูมินและดีเอชเอเปลี่ยนไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ในการทดสอบประสิทธิภาพการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ของไฮโดรเจลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกในระดับห้องปฏิบัติการ ควรทำการทดสอบที่ระยะเวลานานกว่านี้ เพื่อให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งอย่างชัดเจน

2. ควรทำการทดสอบการควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ของไฮโดรเจลในระดับ
สัตว์ทดลอง (*In vivo*)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- จอมใจ พีรพัฒนา. (2555). ระบบนำส่งยาแบบมาทริกซ์. พิมพ์ครั้งที่ 1. ขอนแก่น : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- ชรินทร์ เตชะพันธุ์. (2542). การทำโปรตีนและเอนไซม์ให้บริสุทธิ์. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- ณรงค์ สารีสุด. (2535). การผลิตยาออกฤทธิ์เนิ่น และระบบนำส่งยาแบบต่าง. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : ไทยมิตรการพิมพ์
- ถนอม วงศ์พุทธรักษา. (2554). การดัดแปรพันผิวโคงเลี้ยงเซลล์ไฟโบรอินใหม่ไทยด้วยเจลาตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท หลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ปณณธร ภัทรสถาพรกุล. (2547). เทคโนโลยีการทำแท้งแบบเยือกแข็ง (ตอนที่ 1). สมาคมเครื่องทำความเย็นไทย, 11, 20-22.
- ปณรสี ฤทธิประวัติ และคณาจารย์ในสาขาวิศวกรรมชีวการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล. (2553). วิศวกรรมชีวการแพทย์ขั้นพื้นฐาน. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์สมาคมส่งเสริมเทคโนโลยี (ไทย-ญี่ปุ่น).
- พรพรหม ย่อยสูงเนิน และสุทธิลักษณ์ ปทุมราช. (2549). ผลของเคอร์คูมินต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่ในหนูชนิดเมาส์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งตับ. รางวัลผลงานวิจัยดีเด่น ระดับนิสิตดุษฎีบัณฑิต.
- ภาคภูมิ เต็งอำนาจ. (2540). การดูดซึมยาจากทางเดินอาหารและการเอื้อประโยชน์ในร่างกาย. ภาควิชาวิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- มาริสา วาริชื่นสุข. (2553). ไมเซลล์ที่ผลิตจากเจลาตินดัดแปลงด้วยคอเลสเทอรอลสำหรับการนำส่งเคอร์คูมิน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท หลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วีรศักดิ์ อุดมกิจเดชา. (2543). วิทยาศาสตร์เส้นใย. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

- ศิริภรณ์ โสมวิภาต. (2554). การพัฒนาแผ่นเส้นใยที่มีเม็ดปิดจากไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินโดย การปั่นแบบไฟฟ้าสถิต. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท หลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ศรีสกุล สังข์ทองจีน. (2551). ระบบนำส่งยา (Drug Delivery Systems). ภาควิชาเทคโนโลยี เกษษกรรม คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- เอี่ยมแข สุขประเสริฐ. (2554). Cancer Therapy. หน่วยมะเร็งวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ภาษาอังกฤษ

- Acharya, C., S. Ghosh and S. C. Kundu. (2008). "Silk fibroin protein from mulberry and non-mulberry silkworms: cytotoxicity, biocompatibility and kinetics of L929 murine fibroblast adhesion." Journal of Materials Science: Materials in Medicine 19(8): 2827-2836.
- Akram M., Shahab-Uddin, Afzal Ahmed, et al. (2010). "CURCUMA LONGA AND CURCUMIN: A REVIEW ARTICLE." ROM. J. BIOL. – PLANT BIOL 55(2): 65–70.
- Altenburg, J., A. Bieberich, C. Terry, K. Harvey, J. VanHorn, Z. Xu, V. Jo Davisson and R. Siddiqui. (2011). "A synergistic antiproliferation effect of curcumin and docosahexaenoic acid in SK-BR-3 breast cancer cells: unique signaling not explained by the effects of either compound alone." BMC Cancer 11(1): 149.
- Altman, G. H., F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R. L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond and D. L. Kaplan. (2003). "Silk-based biomaterials." Biomaterials 24(3): 401-416.
- Amino acid. (online). Available from: <http://www.sidthomas.net> (2012, August 12)
- Anand, P., A. B. Kunnumakkara, R. A. Newman and B. B. Aggarwal. (2007). "Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises." Molecular Pharmaceutics 4(6): 807-818.
- Anitha, A., S. Maya, N. Deepa, K. P. Chennazhi, S. V. Nair, H. Tamura and R. Jayakumar. (2011). "Efficient water soluble O-carboxymethyl chitosan nanocarrier for the delivery of curcumin to cancer cells." Carbohydrate Polymers 83(2): 452-461.
- Bachmann, J., A. Ellies and K. H. Hartge. (2000). "Development and application of a new sessile drop contact angle method to assess soil water repellency." Journal of Hydrology 231–232(0): 66-75.

- Bansal, S. S., H. Kausar, M. V. Vadhanam, S. Ravoori and R. C. Gupta. (2012). "Controlled systemic delivery by polymeric implants enhances tissue and plasma curcumin levels compared with oral administration." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 80(3): 571-577.
- Bhat, R. and A. A. Karim. (2009). "Ultraviolet irradiation improves gel strength of fish gelatin." Food Chemistry 113(4): 1160-1164.
- Bigi, A., G. Cojazzi, S. Panzavolta, K. Rubini and N. Roveri. (2001). "Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking." Biomaterials 22(8): 763-768.
- Bubnis, W. A. and C. M. Ofner Iii. (1992). "The determination of ϵ -amino groups in soluble and poorly soluble proteinaceous materials by a spectrophotometric method using trinitrobenzenesulfonic acid." Analytical Biochemistry 207(1): 129-133.
- Burt, H. M., J. K. Jackson, S. K. Bains, R. T. Liggins, A. M. C. Oktaba, A. L. Arsenault and W. L. Hunter. (1995). "Controlled delivery of taxol from microspheres composed of a blend of ethylene-vinyl acetate copolymer and poly (d,l-lactic acid)." Cancer Letters 88(1): 73-79.
- Cao, F., B. Ding, M. Sun, C. Guo, L. Zhang and G. Zhai. (2011). "Lung-targeted delivery system of curcumin loaded gelatin microspheres." Drug Delivery 18(8): 545-554.
- Chen, Z. Y. and N. W. Istfan. (2000). "Docosahexaenoic acid is a potent inducer of apoptosis in HT-29 colon cancer cells." Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 63(5): 301-308.
- Chiono, V., E. Pulieri, G. Vozzi, G. Ciardelli, A. Ahluwalia and P. Giusti. (2008). "Genipin-crosslinked chitosan/gelatin blends for biomedical applications." Journal of Materials Science: Materials in Medicine 19(2): 889-898.
- Choudhuri, T., S. Pal, M. L. Agwarwal, T. Das and G. Sa. (2002). "Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction." FEBS Letters 512(1-3): 334-340.
- Dash, S., P. N. Murthy, L. Nath and P. Chowdhury. (2010). "Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems." Acta Pol Pharm 67(3): 217-223.

- Drury, J. L. and D. J. Mooney. (2003). "Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications." Biomaterials 24(24): 4337-4351.
- EDC/NHS. (online). Available from: <http://www.rsc.org> (2012, November 11)
- Elakkiya, T., G. Malarvizhi, S. Rajiv and T. S. Natarajan. (2013). "Curcumin loaded electrospun Bombyx mori silk nanofibers for drug delivery." Polymer International: n/a-n/a.
- Enol and keto form. (online). Available from: <http://www.biologie.uni-freiburg.de> (2012, November 19)
- Foss, C., E. Merzari, C. Migliaresi and A. Motta. (2012). "Silk Fibroin/Hyaluronic Acid 3D Matrices for Cartilage Tissue Engineering." Biomacromolecules 14(1): 38-47.
- Friess, W. (1998). "Collagen – biomaterial for drug delivery." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 45(2): 113-136.
- Gil, E. S., D. J. Frankowski, R. J. Spontak and S. M. Hudson. (2005). "Swelling Behavior and Morphological Evolution of Mixed Gelatin/Silk Fibroin Hydrogels." Biomacromolecules 6(6): 3079-3087.
- Gil, E. S., R. J. Spontak and S. M. Hudson. (2005). "Effect of β -Sheet Crystals on the Thermal and Rheological Behavior of Protein-Based Hydrogels Derived from Gelatin and Silk Fibroin." Macromolecular Bioscience 5(8): 702-709.
- Gómez-Guillén, M. C., B. Giménez, M. E. López-Caballero and M. P. Montero. (2011). "Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review." Food Hydrocolloids 25(8): 1813-1827.
- Gupta, V., A. Aseh, C. N. Rios, B. B. Aggarwal and A. B. Mathur. (2009). "Fabrication and characterization of silk fibroin-derived curcumin nanoparticles for cancer therapy." Int J Nanomedicine 4: 115-122.
- Hardman, W. E. (2002). "Omega-3 Fatty Acids to Augment Cancer Therapy." The Journal of Nutrition 132(11): 3508S-3512S.
- Hardy, J. G. and T. R. Scheibel. (2010). "Composite materials based on silk proteins." Progress in Polymer Science 35(9): 1093-1115.

- Hatcher, H., R. Planalp, J. Cho, F. M. Torti and S. V. Torti. (2008). "Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials." Cellular and Molecular Life Sciences 65(11): 1631-1652.
- Haugh, M. G., M. J. Jaasma and F. J. O'Brien. (2009). "The effect of dehydrothermal treatment on the mechanical and structural properties of collagen-GAG scaffolds." Journal of Biomedical Materials Research Part A 89A(2): 363-369.
- He, J., Y. Liu, X. Hao, M. Mao, L. Zhu and D. Li. (2012). "Bottom-up generation of 3D silk fibroin-gelatin microfluidic scaffolds with improved structural and biological properties." Materials Letters 78(0): 102-105.
- Hemaprabha E. (2012). "Chemical Crosslinking of Proteins: A Review." Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation 1(1): 22-26
- Hoffman, A. S. (2012). "Hydrogels for biomedical applications." Advanced Drug Delivery Reviews 64, Supplement(0): 18-23.
- Horrocks, L. A. and Y. K. Yeo. (1999). "HEALTH BENEFITS OF DOCOSAHEXAENOIC ACID (DHA)." Pharmacological Research 40(3): 211-225.
- International Organization for Standardization. (1992). "Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity (ISO 10993-5)." Geneva, Switzerland.
- Ivan Stankovic. (2004). Curcumin. Chemical and Technical Assessment (CTA), 61st JECFA
- Jetbumpenkul, P., P. Amornsudthiwat, S. Kanokpanont and S. Damrongsakkul. (2012). "Balanced electrostatic blending approach – An alternative to chemical crosslinking of Thai silk fibroin/gelatin scaffold." International Journal of Biological Macromolecules 50(1): 7-13.
- Jia, Q., I. Ivanov, Z. Z. Zlatev, R. C. Alaniz, B. R. Weeks, E. S. Callaway, J. S. Goldsby, L. A. Davidson, Y.-Y. Fan, L. Zhou, J. R. Lupton, D. N. McMurray and R. S. Chapkin. (2011). "Dietary fish oil and curcumin combine to modulate colonic cytokinetics and gene expression in dextran sodium sulphate-treated mice." British Journal of Nutrition 106(04): 519-529.

- Joe, B. and B. R. Lokesh. (1997). "Prophylactic and therapeutic effects of n-3 polyunsaturated fatty acids, capsaicin, and curcumin on adjuvant induced arthritis in rats." The Journal of Nutritional Biochemistry 8(7): 397-407.
- Kanokpanont, S., S. Damrongsakkul, J. Ratanavaraporn and P. Aramwit. (2012). "An innovative bi-layered wound dressing made of silk and gelatin for accelerated wound healing." International Journal of Pharmaceutics 436(1-2): 141-153.
- Kasoju, N. and U. Bora. (2012). "Fabrication and characterization of curcumin-releasing silk fibroin scaffold." Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials 100B(7): 1854-1866.
- Kathryn E. Uhrich, Scott M. Cannizzaro, et al. (1999). "Polymeric Systems for Controlled Drug Release." American Chemical Society 99(11): 3181-3198
- Khor, E. (1997). "Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprostheses." Biomaterials 18(2): 95-105.
- Kim, U.-J., J. Park, H. Joo Kim, M. Wada and D. L. Kaplan. (2005). "Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin." Biomaterials 26(15): 2775-2785.
- Leo, E., M. Angela Vandelli, R. Camerini and F. Forni. (1997). "Doxorubicin-loaded gelatin nanoparticles stabilized by glutaraldehyde: Involvement of the drug in the cross-linking process." International Journal of Pharmaceutics 155(1): 75-82.
- Leong, K. W. and R. Langer. (1988). "Polymeric controlled drug delivery." Advanced Drug Delivery Reviews 1(3): 199-233.
- Liao, L., Y. Luo, M. Zhao and Q. Wang. (2012). "Preparation and characterization of succinic acid deamidated wheat gluten microspheres for encapsulation of fish oil." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 92(0): 305-314.
- Lim, S. T., G. P. Martin, D. J. Berry and M. B. Brown. (2000). "Preparation and evaluation of the in vitro drug release properties and mucoadhesion of novel microspheres of hyaluronic acid and chitosan." Journal of Controlled Release 66(2-3): 281-292.
- Liu, L., L. Sun, Q. Wu, W. Guo, L. Li, Y. Chen, Y. Li, C. Gong, Z. Qian and Y. Wei. (2013). "Curcumin loaded polymeric micelles inhibit breast tumor growth and

- spontaneous pulmonary metastasis." International Journal of Pharmaceutics 443(1–2): 175-182.
- Lüpke, M. and H. Brückner. (1998). "Gas chromatographic evaluation of amino acid epimerisation in the course of gelatin manufacturing and processing." Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A 206(5): 323-328.
- Lv, Q., Q. Feng, K. Hu and F. Cui. (2005). "Three-dimensional fibroin/collagen scaffolds derived from aqueous solution and the use for HepG2 culture." Polymer 46(26): 12662-12669.
- Lv, Q., K. Hu, Q. Feng and F. Cui. (2008). "Fibroin/collagen hybrid hydrogels with crosslinking method: Preparation, properties, and cytocompatibility." Journal of Biomedical Materials Research Part A 84A(1): 198-207.
- Ma, Q.-L., F. Yang, E. R. Rosario, O. J. Ubeda, W. Beech, D. J. Gant, P. P. Chen, B. Hudspeth, C. Chen, Y. Zhao, H. V. Vinters, S. A. Frautschy and G. M. Cole. (2009). " β -Amyloid Oligomers Induce Phosphorylation of Tau and Inactivation of Insulin Receptor Substrate via c-Jun N-Terminal Kinase Signaling: Suppression by Omega-3 Fatty Acids and Curcumin." The Journal of Neuroscience 29(28): 9078-9089.
- Maheshwari, R. K., A. K. Singh, J. Gaddipati and R. C. Srimal. (2006). "Multiple biological activities of curcumin: A short review." Life Sciences 78(18): 2081-2087.
- Mandal, B. B., J. K. Mann and S. C. Kundu. (2009). "Silk fibroin/gelatin multilayered films as a model system for controlled drug release." European Journal of Pharmaceutical Sciences 37(2): 160-171.
- Mandal, B. B., A. S. Priya and S. C. Kundu. (2009). "Novel silk sericin/gelatin 3-D scaffolds and 2-D films: Fabrication and characterization for potential tissue engineering applications." Acta Biomaterialia 5(8): 3007-3020.
- Manju, S. and K. Sreenivasan. (2011). "Conjugation of curcumin onto hyaluronic acid enhances its aqueous solubility and stability." Journal of Colloid and Interface Science 359(1): 318-325.

- Manju, S. and K. Sreenivasan. (2011). "Hollow microcapsules built by layer by layer assembly for the encapsulation and sustained release of curcumin." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 82(2): 588-593.
- Marszalek, J. R. and H. F. Lodish. (2005). "Docosahexaenoic acid, fatty acid-interacting proteins, and neuronal function: breastmilk and fish are good for you." Annu Rev Cell Dev Biol 21: 633-657.
- Members of Members of The Gelatin Manufacturers Institute of America (GMIA). (2012). Gelatin Handbook. Massachusetts: Atlantic Gelatin/Kraft Foods Global Inc.
- Mohanty, C. and S. K. Sahoo. (2010). "The in vitro stability and in vivo pharmacokinetics of curcumin prepared as an aqueous nanoparticulate formulation." Biomaterials 31(25): 6597-6611.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays." Journal of Immunological Methods 65(0): 55-56.
- Mou-Tuan Huang, Harold L. Newmark, and Krystyna Frenkel. (1997) "Inhibitory Effects of Curcumin on Tumorigenesis in Mice." Journal of Cellular Biochemistry Supplement 27(0): 26-34.
- MTT. (online). Available from: <http://www.biotek.com/resources/articles/quantification-cell-viability-epoch.html> (2014, April 7)
- Narayan, B., K. Miyashita and M. Hosakawa. (2006). "Physiological Effects of Eicosapentaenoic Acid (EPA) and Docosahexaenoic Acid (DHA)—A Review." Food Reviews International 22(3): 291-307.
- O'Brien, F. J. (2011). "Biomaterials & scaffolds for tissue engineering." Materials Today 14(3): 88-95.
- Oetari, S., M. Sudiby, J. N. Commandeur, R. Samhoedi and N. P. Vermeulen. (1996). "Effects of curcumin on cytochrome P450 and glutathione S-transferase activities in rat liver." Biochem Pharmacol 51(1): 39-45.
- Okhawilai, M., R. Rangkupan, S. Kanokpanont and S. Damrongsakkul. (2010). "Preparation of Thai silk fibroin/gelatin electrospun fiber mats for controlled

- release applications." International Journal of Biological Macromolecules 46(5): 544-550.
- Park, S.-N., J.-C. Park, H. O. Kim, M. J. Song and H. Suh. (2002). "Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1 - ethyl-3 - (3 - dimethylaminopropyl)carbodiimide cross-linking." Biomaterials 23(4): 1205-1212.
- Pieper, J. S., T. Hafmans, J. H. Veerkamp and T. H. van Kuppevelt. (2000). "Development of tailor-made collagen–glycosaminoglycan matrices: EDC/NHS crosslinking, and ultrastructural aspects." Biomaterials 21(6): 581-593.
- Properties of curcumin. (online). Available from: <http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=curcumin&source=fp> (2014, February 28)
- Properties of DHA. (online). Available from: <http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=DHA&source=calculate> (2014, February 28)
- Qian Jia, Ivan Ivanov, et. al. (2011). "Dietary fish oil and curcumin combine to modulate colonic cytokinetics and gene expression in dextran sodium sulphate-treated mice." British Journal of Nutrition. 106(4): 519-529.
- Ratanavaraporn, J., S. Kanokpanont and S. Damrongsakkul. (2013). "The development of injectable gelatin/silk fibroin microspheres for the dual delivery of curcumin and piperine." Journal of Materials Science: Materials in Medicine: 1-10.
- Ratanavaraporn, J., R. Rangkupan, H. Jeeratawatchai, S. Kanokpanont and S. Damrongsakkul. (2010). "Influences of physical and chemical crosslinking techniques on electrospun type A and B gelatin fiber mats." International Journal of Biological Macromolecules 47(4): 431-438.
- Ravindran, J., S. Prasad and B. Aggarwal. (2009). "Curcumin and Cancer Cells: How Many Ways Can Curry Kill Tumor Cells Selectively?" The AAPS Journal 11(3): 495-510.
- Reinhard Schrieber and Herbert Gareis. (2007). Gelatin Handbook. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA.
- Sangeetha Sagar, P., U. N. Das, R. Koratkar, G. Ramesh, M. Padma and G. Sravan Kumar. (1992). "Cytotoxic action of cis-unsaturated fatty acids on human cervical c

- arcinoma (HeLa) cells: relationship to free radicals and lipid peroxidation and its modulation by calmodulin antagonists." Cancer Letters 63(3): 189-198.
- Saw, C. L. L., Y. Huang and A.-N. Kong. (2010). "Synergistic anti-inflammatory effects of low doses of curcumin in combination with polyunsaturated fatty acids: Docosahexaenoic acid or eicosapentaenoic acid." Biochemical Pharmacology 79(3): 421-430.
- Segtnan, V. H. and T. Isaksson. (2004). "Temperature, sample and time dependent structural characteristics of gelatine gels studied by near infrared spectroscopy." Food Hydrocolloids 18(1): 1-11.
- Shahani, K. and J. Panyam. (2011). "Highly loaded, sustained-release microparticles of curcumin for chemoprevention." Journal of Pharmaceutical Sciences 100(7): 2599-2609.
- Sheu, M.-T., J.-C. Huang, G.-C. Yeh and H.-O. Ho. (2001). "Characterization of collagen gel solutions and collagen matrices for cell culture." Biomaterials 22(13): 1713-1719.
- Siddiqui, R., K. Harvey, C. Walker, J. Altenburg, Z. Xu, C. Terry, I. Camarillo, Y. Jones-Hall and C. Mariash. (2013). "Characterization of synergistic anti-cancer effects of docosahexaenoic acid and curcumin on DMBA-induced mammary tumorigenesis in mice." BMC Cancer 13(1): 1-16.
- Singh, M. and N. Singh. (2009). "Molecular mechanism of curcumin induced cytotoxicity in human cervical carcinoma cells." Molecular and Cellular Biochemistry 325 (1-2): 107-119.
- Singh T. and Saratchandra B. (2004). Principles and Techniques of Silkworm Seed Production. (1st ed.). New Delhi: Discovery Publishing House.
- Somvipart, S., S. Kanokpanont, R. Rangkupan, J. Ratanavaraporn and S. Damrongsakkul. (2013). "Development of electrospun beaded fibers from Thai silk fibroin and gelatin for controlled release application." International Journal of Biological Macromolecules 55(0): 176-184.
- Stefan Sepuer and et al. (2008). Nanotechnology: Technical Basics and Applications. Germany: Vincentz Network, Hannover.

- Stillwell, W. and S. R. Wassall. (2003). "Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid." Chemistry and Physics of Lipids 126(1): 1-27.
- Structure of gelatin. (online). Available from: <http://www.madehow.com/Volume-5/Gelatin.html> (2012, August 21)
- Structure of silk. (online). Available from: <http://met.fzu.edu.cn/eduonline/chemistry/english/bjkc/jawd6.html> (2012, August 21)
- Structure of silk fibroin. (online). Available from: <http://www.silkwoodsilk.com/blog/2011/06/22/the-molecular-structure-of-silk> (2012, August 12)
- Swamy, M. V., B. Citineni, J. M. R. Patlolla, A. Mohammed, Y. Zhang and C. V. Rao. (2008). "Prevention and Treatment of Pancreatic Cancer by Curcumin in Combination With Omega-3 Fatty Acids." Nutrition and Cancer 60(sup1): 81-89.
- Tabata, Y. and Y. Ikada. (1998). "Protein release from gelatin matrices." Advanced Drug Delivery Reviews 31(3): 287-301.
- Taguchi, A., K. Kawana, K. Tomio, A. Yamashita, Y. Isobe, K. Nagasaka, K. Koga, T. Inoue, H. Nishida, S. Kojima, K. Adachi, Y. Matsumoto, T. Arimoto, O. Wada-Hiraike, K. Oda, J. X. Kang, H. Arai, M. Arita, Y. Osuga and T. Fujii. (2014). "Matrix Metalloproteinase (MMP)-9 in Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs) Is Suppressed by Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids *In Vitro* and *In Vivo*." PLoS ONE 9(2): e89605.
- Tanigo, T., R. Takaoka and Y. Tabata. (2010). "Sustained release of water-insoluble simvastatin from biodegradable hydrogel augments bone regeneration." Journal of Controlled Release 143(2): 201-206.
- Thorne Research Monograph. (2009). "Docosahexaenoic Acid (DHA)." Alternative Medicine Review 14(4): 391-399
- Tiyaboonchai, W., P. Chomchalao, S. Pongcharoen, M. Sutheerawattananonda and P. Sobhon. (2011). "Preparation and characterization of blended Bombyx mori silk fibroin scaffolds." Fibers and Polymers 12(3): 324-333.

- Tsukada, M., G. Freddi and J. S. Crighton. (1994). "Structure and compatibility of poly(vinyl alcohol)-silk fibroin (PVA/SA) blend films." Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics 32(2): 243-248.
- Vepari, C. and D. L. Kaplan. (2007). "Silk as a biomaterial." Progress in Polymer Science 32(8-9): 991-1007.
- Wang, Y.-J., M.-H. Pan, A.-L. Cheng, L.-I. Lin, Y.-S. Ho, C.-Y. Hsieh and J.-K. Lin. (1997). "Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 15(12): 1867-1876.
- Wang, Y., H.-J. Kim, G. Vunjak-Novakovic and D. L. Kaplan. (2006). "Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials." Biomaterials 27(36): 6064-6082.
- Wilken, R., M. Veena, M. Wang and E. Srivatsan (2011). "Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma." Molecular Cancer 10(1): 12.
- Wilken, R., M. Veena, M. Wang and E. Srivatsan (2011). "Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma." Molecular Cancer 10(1): 12.
- Wongpanit, P. and R. Rujiravanit. (2012). "Combinatorial Effects of Charge Characteristics and Hydrophobicity of Silk Fibroin on the Sorption and Release of Charged Dyes." Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 23(9): 1199-1215.
- Wu, M., K. A. Harvey, N. Ruzmetov, Z. R. Welch, L. Sech, K. Jackson, W. Stillwell, G. P. Zaloga and R. A. Siddiqui. (2005). "Omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuate breast cancer growth through activation of a neutral sphingomyelinase-mediated pathway." International Journal of Cancer 117(3): 340-348.
- Xiao, W., J. He, J. W. Nichol, L. Wang, C. B. Hutson, B. Wang, Y. Du, H. Fan and A. Khademhosseini. (2011). "Synthesis and characterization of photocrosslinkable gelatin and silk fibroin interpenetrating polymer network hydrogels." Acta Biomaterialia 7(6): 2384-2393.

- Xiao, W., W. Liu, J. Sun, X. Dan, D. Wei and H. Fan. (2012). "Ultrasonication and Genipin Cross-Linking to Prepare Novel Silk Fibroin–Gelatin Composite Hydrogel." Journal of Bioactive and Compatible Polymers 27(4): 327-341.
- Xu, F., X. Mu and J. Zhao. (2009). "Effects of curcumin on invasion and metastasis in the human cervical cancer cells Caski." Chinese Journal of Cancer Research 21(2): 159-162.
- Yaowalak Srisuwan, N. K., Komsan Namtaku, Wilaiwan Simchuer, Chirapha Butiman, Prasong Srihanam. (2012). "Preparation of Eri silk fibroin and gelatin blend film loaded chlorhexidine using as model for hydrophilic drug release." Natural Science 4: 454-460.
- Yong-woo Lee. (1996). *Silk Reeling and Testing Manual*. Rome: FAO, Viale delle Terme di Caracalla.
- YOSHITAKE, TAKAHASHI, M.Eng., and, YASUHIKO, TABATA, Ph.D. and D.Med.Sci. (2003). "Homogeneous Seeding of Mesenchymal Stem Cells into Nonwoven Fabric for Tissue Engineering " Tissue Engineering 9: 931-938.
- Zhao, J., Y. Zhao, Y. Zhang and W. Chen. (2007). "Anti-tumor effect of curcumin on human cervical carcinoma HeLa cells in vitro and in vivo." Chinese Journal of Cancer Research 19(1): 32-36.
- Zhou, C.-Z., F. Confalonieri, M. Jacquet, R. Perasso, Z.-G. Li and J. Janin. (2001). "Silk fibroin: Structural implications of a remarkable amino acid sequence." Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics 44(2): 119-122.
- Zhou, J., J. Zhang, Y. Ma and J. Tong. (2008). "Surface photo-crosslinking of corn starch sheets." Carbohydrate Polymers 74(3): 405-410.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

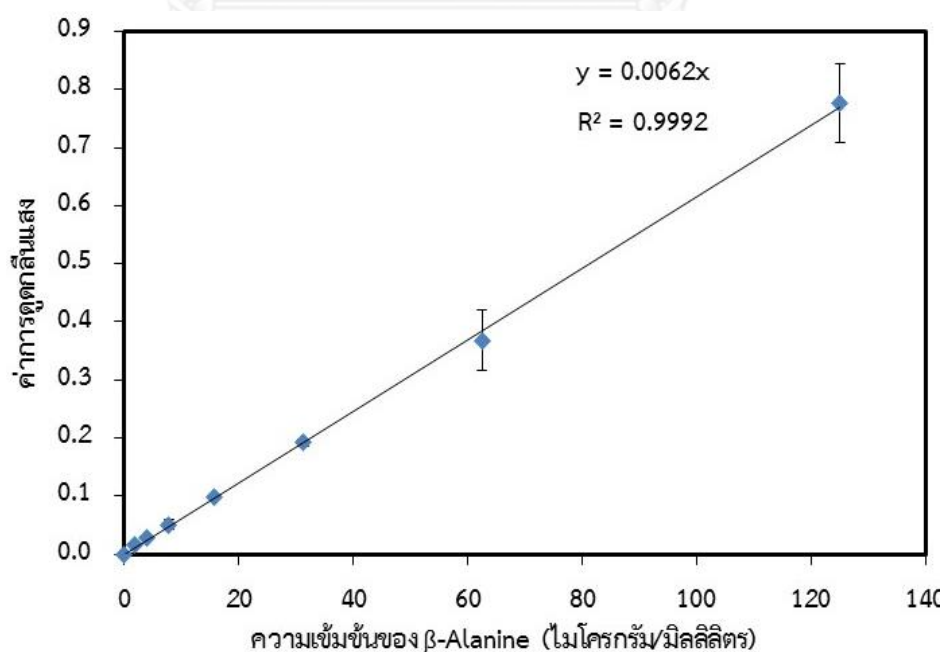
ภาคผนวก ก

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

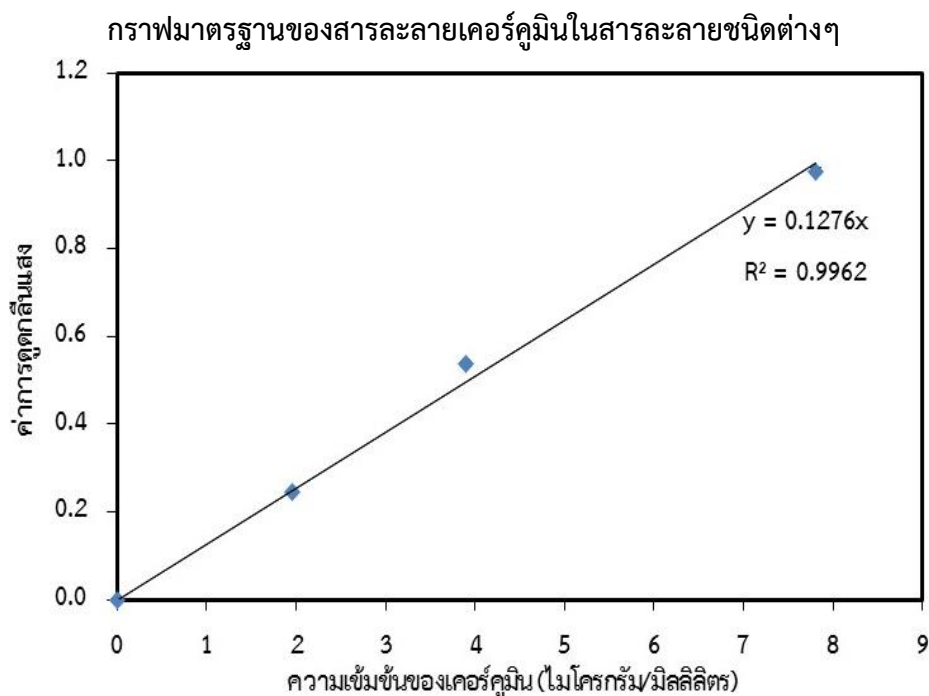
วิธีนี้เป็นการหาปริมาณอะมิโนอิสระโดยใช้สาร TNBS ทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนอิสระ (-NH₂) ของโปรตีน เกิดเป็นสารละลายสีเหลืองของอนุพันธ์ของ trinitrophenyl (TNP) และซัลเฟตไอออน (รูปที่ ข.1) โดยสารละลายสีเหลืองที่เกิดขึ้นดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร [Bubnis W.A. และ Ofner lii C.M. 1992]



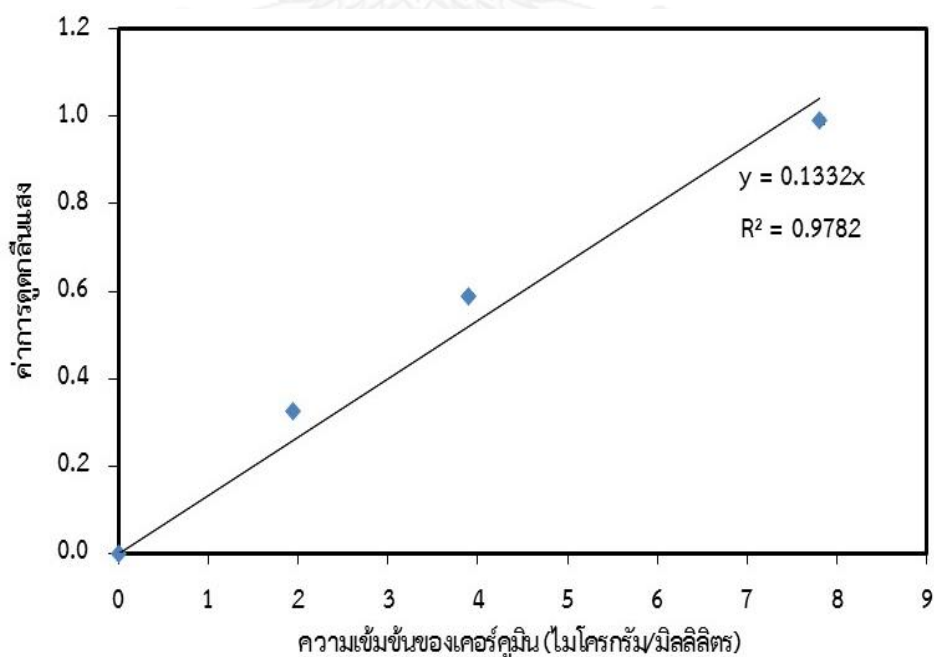
รูปที่ ก.1 ปฏิกิริยาระหว่าง 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) กับหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีน เกิดเป็นอนุพันธ์ของของ trinitrophenyl (TNP) และซัลเฟตไอออน ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ (By product) [Bubnis W.A. และ Ofner lii C.M. 1992]

กราฟมาตรฐานของ β -Alanine เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณหมู่อะมิโนอิสระรูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานของ β -Alanine

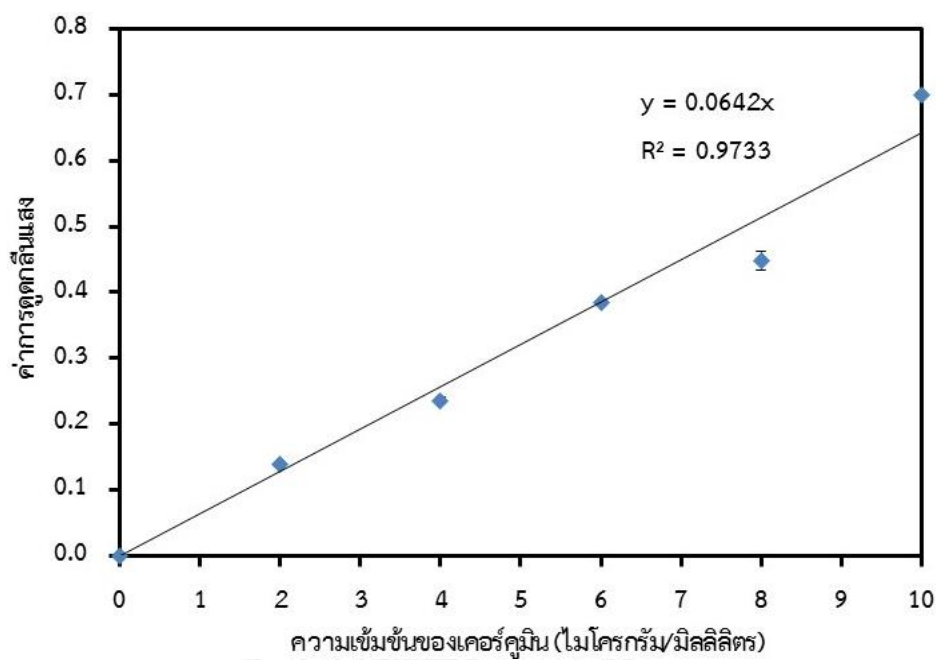
ภาคผนวก ข



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายเคอร์คูมินในสารละลาย DMSO ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร



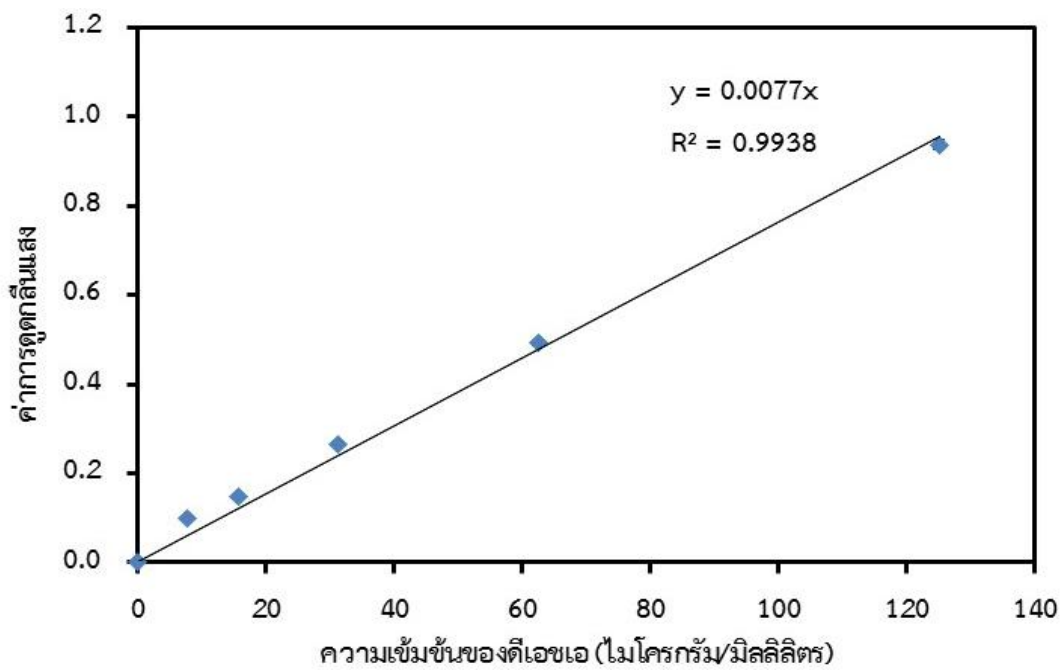
รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายเคอร์คูมินในสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 99% ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร



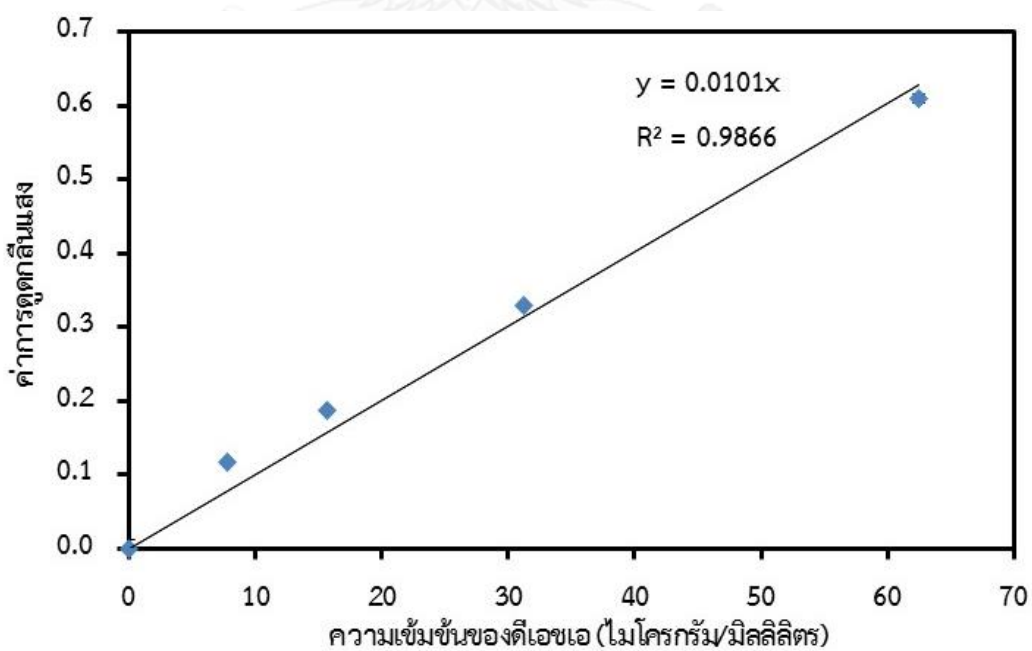
รูปที่ ข.3 กราฟมาตรฐานของสารละลายเซอร์คูมินในสารละลาย PBS ที่ประกอบด้วยซีรัม 10% ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร

ภาคผนวก ค

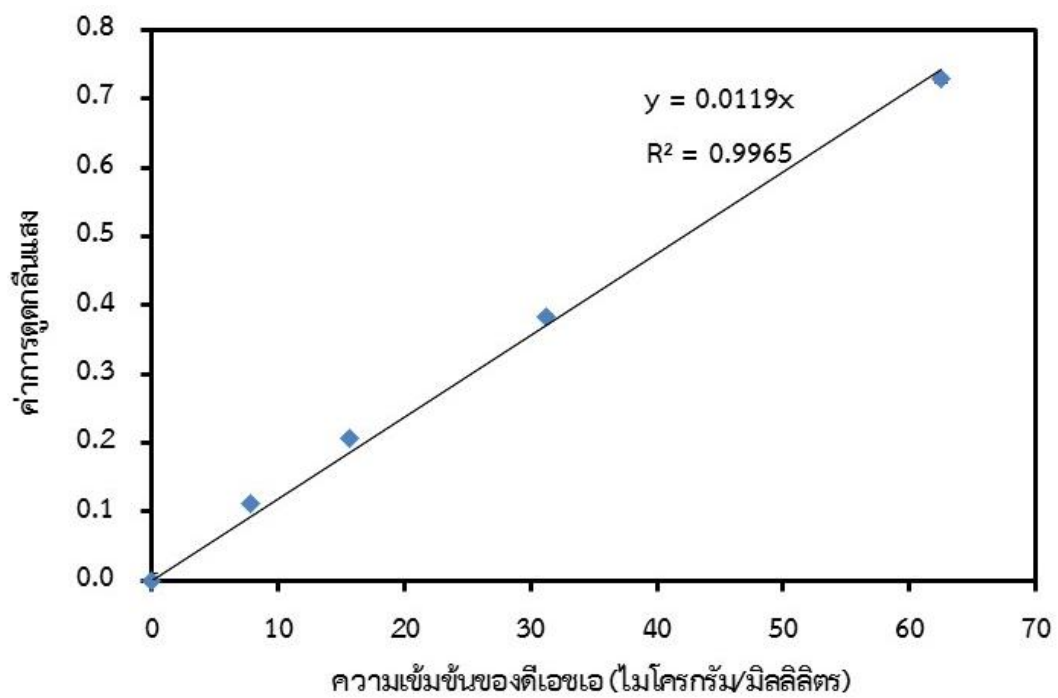
กราฟมาตรฐานของสารละลายดีเอชเอในสารละลายชนิดต่างๆ



รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายดีเอชเอในสารละลาย DMSO ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร



รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายดีเอชเอในสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 99% ที่ความยาวคลื่น 233 นาโนเมตร

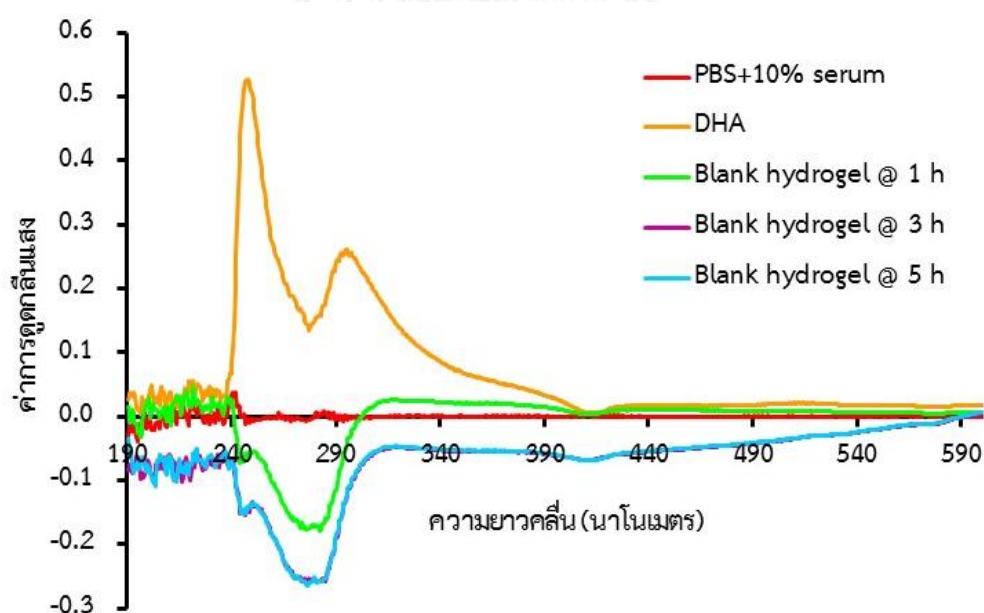


รูปที่ ค.3 กราฟมาตรฐานของสารละลายดีเอชเอในสารละลาย PBS ที่ประกอบด้วยซีรัม 10% ที่ความยาวคลื่น 248 นาโนเมตร

ภาคผนวก ง

กราฟสแกนค่าความยาวคลื่นของสารละลายดีเอชเอในสารละลาย PBS ที่ประกอบด้วยซีรัม 10% เปรียบเทียบกับสารละลาย PBS ที่ประกอบด้วยซีรัม 10% ที่ได้ผ่านการแช่ไฮโดรเจลไฟโบรอิน/เจลาติน (Blank-hydrogel) เป็นเวลาต่างๆด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer

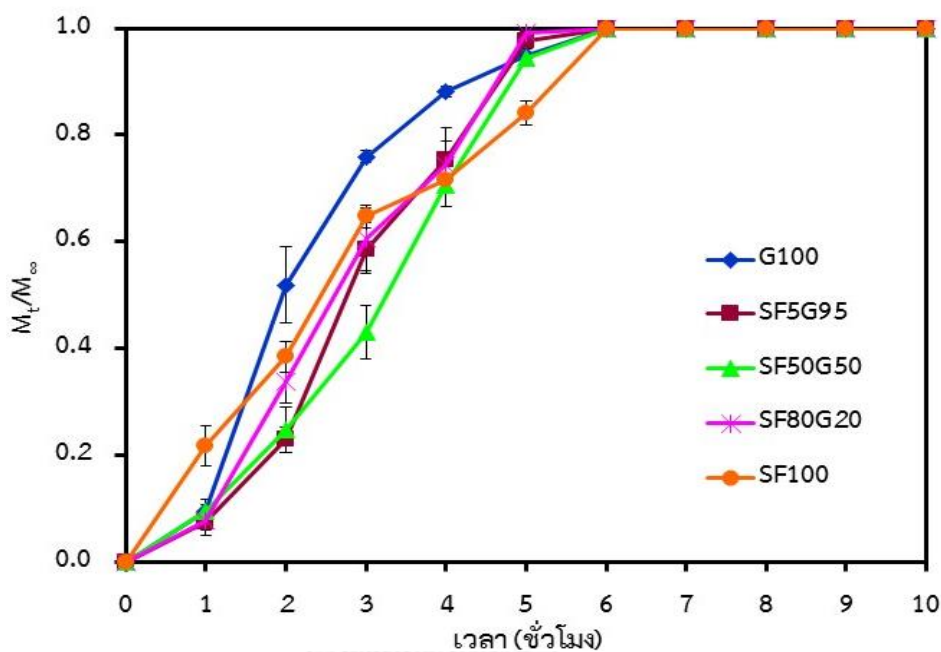
เนื่องจากช่วงการดูดกลืนแสงของดีเอชเออยู่ในช่วงเดียวกันกับหมู่อะมิโน ดังนั้นเพื่อยืนยันว่าค่าการดูดกลืนแสงของดีเอชเอที่ตรวจวัดได้จากเครื่อง UV-Vis spectrophotometer เป็นของดีเอชเอ ไม่ใช่ของหมู่อะมิโนที่อาจหลุดออกมาจากไฮโดรเจลไฟโบรอิน/เจลาติน จึงทำการสแกนค่าความยาวคลื่นของสารละลายดีเอชเอในสารละลาย PBS ที่ประกอบด้วยซีรัม 10% เปรียบเทียบกับสารละลาย PBS ที่ประกอบด้วยซีรัม 10% ที่ได้ผ่านการแช่ไฮโดรเจลไฟโบรอิน/เจลาติน (Blank-hydrogel) เป็นช่วงเวลาต่างๆ



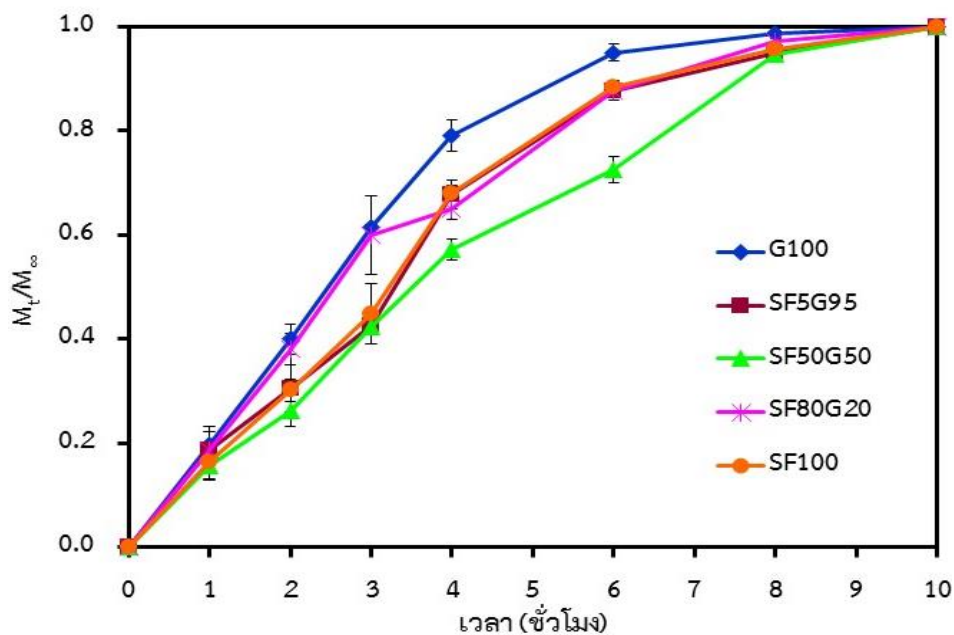
รูปที่ ง.1 กราฟสแกนค่าความยาวคลื่นของสารละลายดีเอชเอความเข้มข้น 60 ไมโครกรัม ในสารละลาย PBS ที่ประกอบด้วยซีรัม 10% เปรียบเทียบกับสารละลาย PBS ที่ประกอบด้วยซีรัม 10% ที่ได้ผ่านการแช่ไฮโดรเจลไฟโบรอิน/เจลาติน (Blank-hydrogel) เป็นช่วงเวลาต่างๆ

ภาคผนวก จ

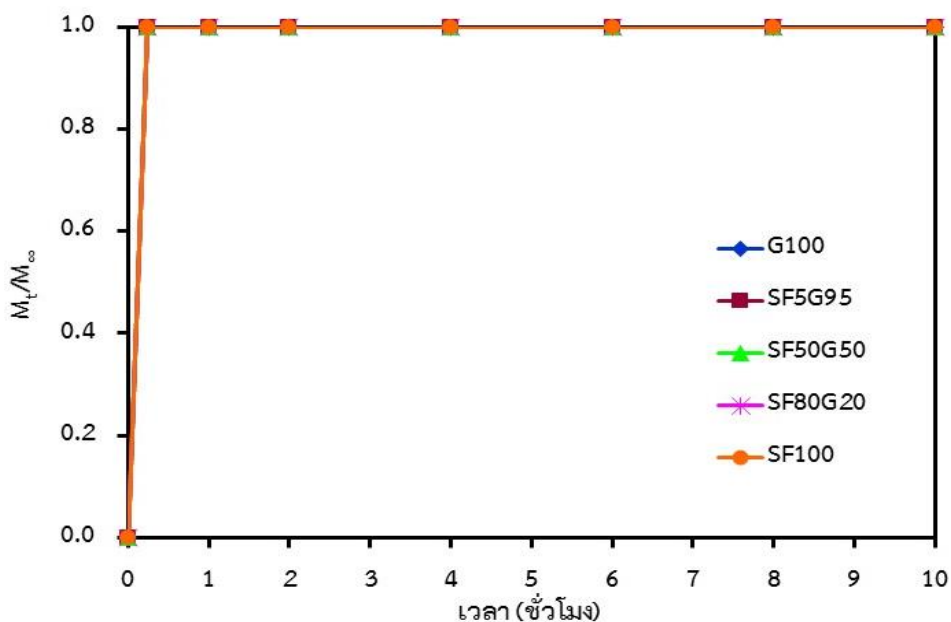
กราฟระหว่างปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลา t หารด้วยปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลานั้นต์ (M_t/M_∞) ต่อเวลา (t) ของการควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ (เคอร์คูมิน และ/หรือ ดีเอชเอ) ของไฮโดรเจลไฟโบรอิน/เจลาติน



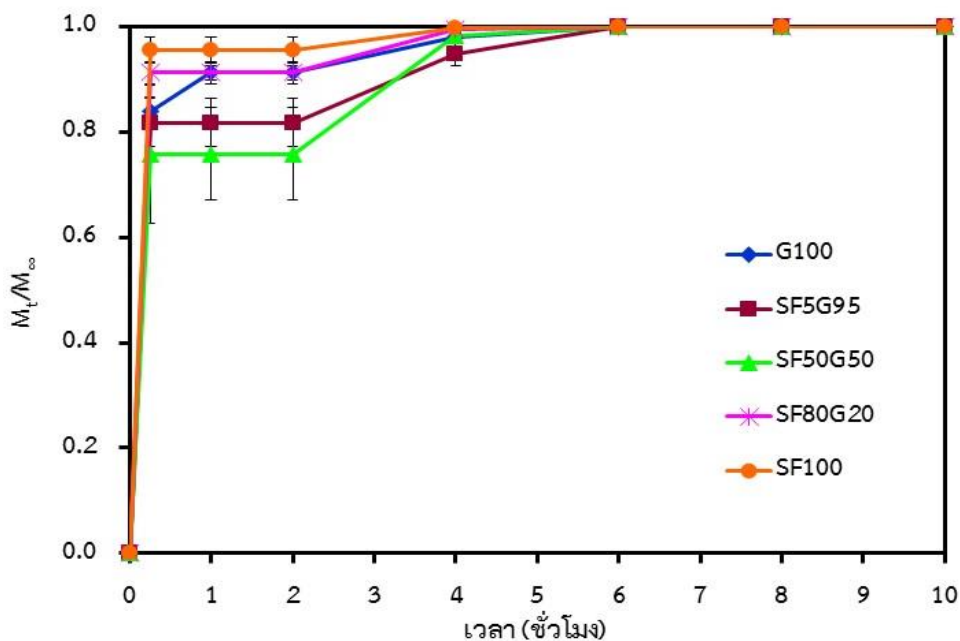
รูปที่ จ.1 กราฟระหว่างปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลา t หารด้วยปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลานั้นต์ (M_t/M_∞) ต่อเวลา (t) ของการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ



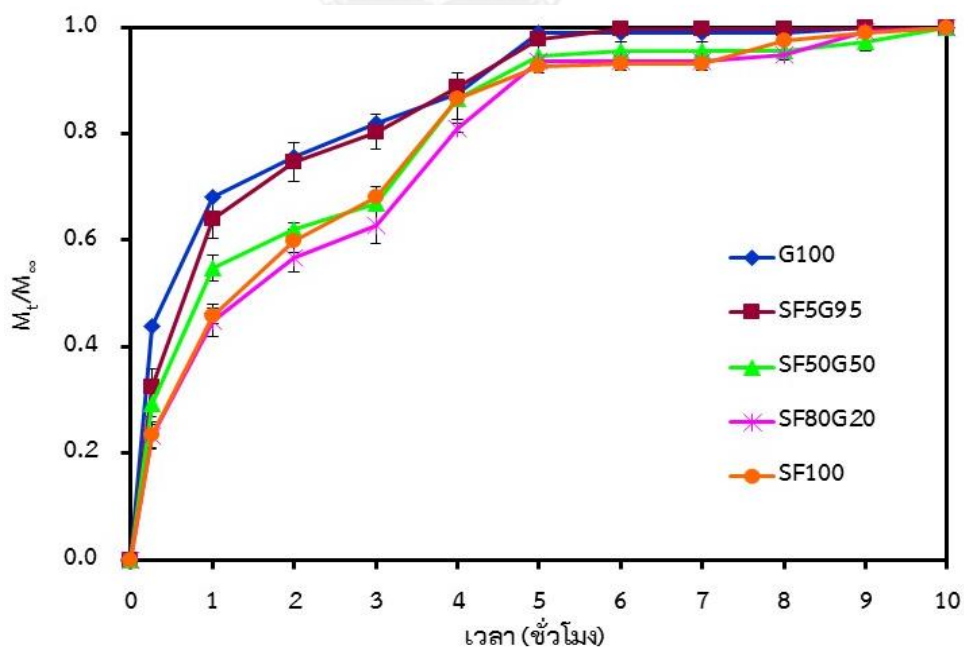
รูปที่ จ.2 กราฟระหว่างปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลา t ทหารด้วยปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลาอนันต์ (M_t/M_∞) ต่อเวลา (t) ของการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นองค์ประกอบ



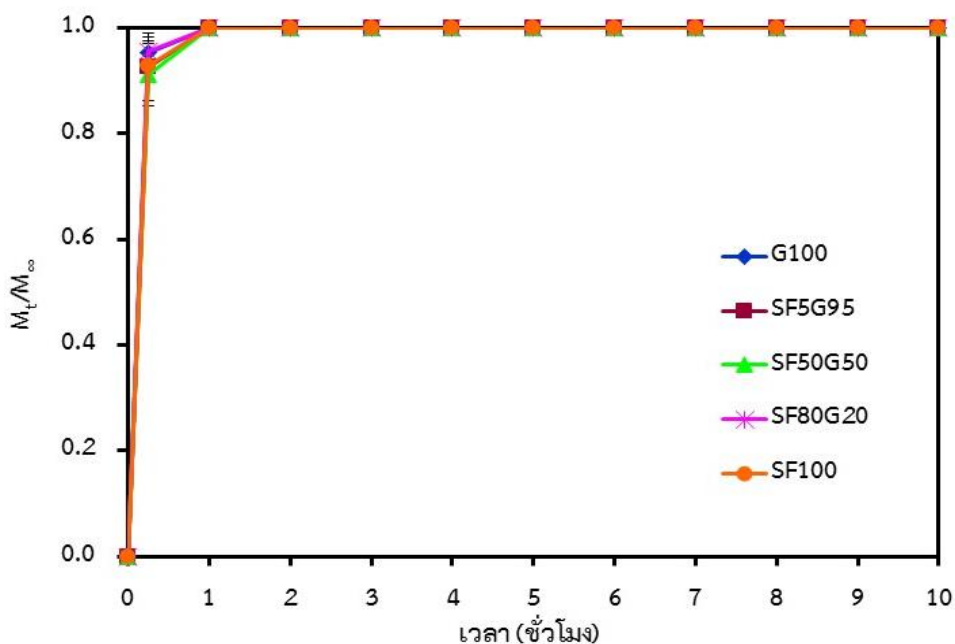
รูปที่ จ.3 กราฟระหว่างปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลา t ทหารด้วยปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลาอนันต์ (M_t/M_∞) ต่อเวลา (t) ของการควบคุมการปลดปล่อยดีเอชเอภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ เป็นองค์ประกอบ



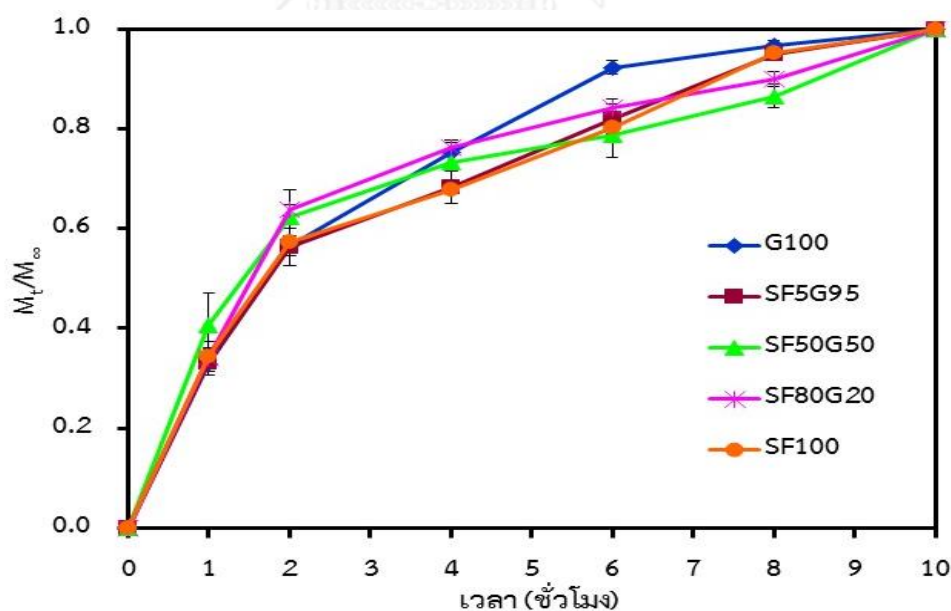
รูปที่ จ.4 กราฟระหว่างปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลา t ทหารด้วยปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลานั้นต์ (M_t/M_∞) ต่อเวลา (t) ของการควบคุมการปลดปล่อยดีเอชเอภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นองค์ประกอบ



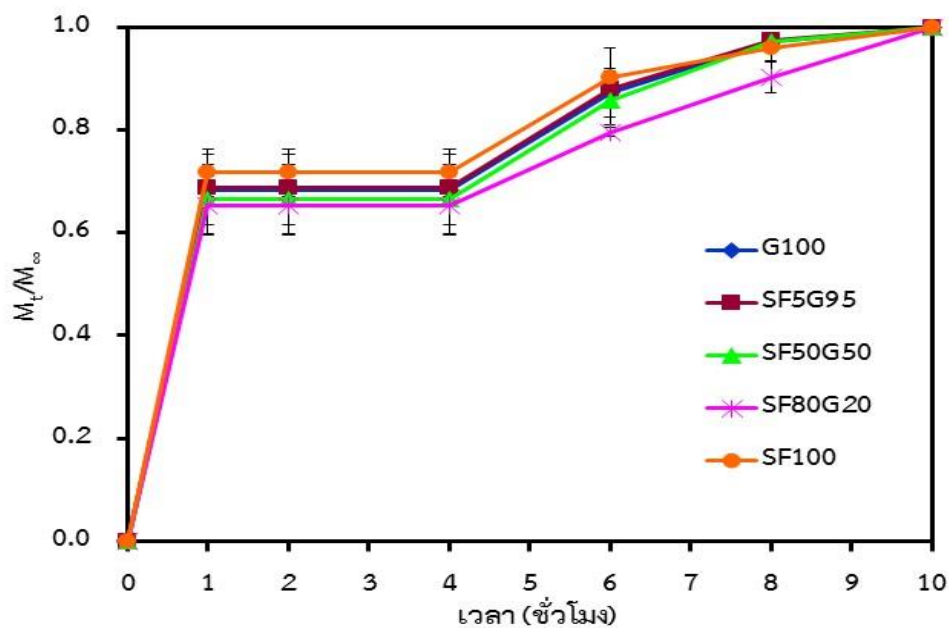
รูปที่ จ.5 กราฟระหว่างปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลา t ทหารด้วยปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลานั้นต์ (M_t/M_∞) ต่อเวลา (t) ของการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ เมื่อมีการดูดซับเคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอ



รูปที่ จ.6 กราฟระหว่างปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลา t ทหารด้วยปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลาอนันต์ (M_t/M_∞) ต่อเวลา (t) ของการควบคุมการปลดปล่อยดีเอชเอภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ เมื่อมีการดูดซับคอร์คิวมินร่วมกับดีเอชเอ



รูปที่ จ.7 กราฟระหว่างปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลา t ทหารด้วยปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลาอนันต์ (M_t/M_∞) ต่อเวลา (t) ของการควบคุมการปลดปล่อยคอร์คิวมินภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นองค์ประกอบ เมื่อมีการดูดซับคอร์คิวมินร่วมกับดีเอชเอ

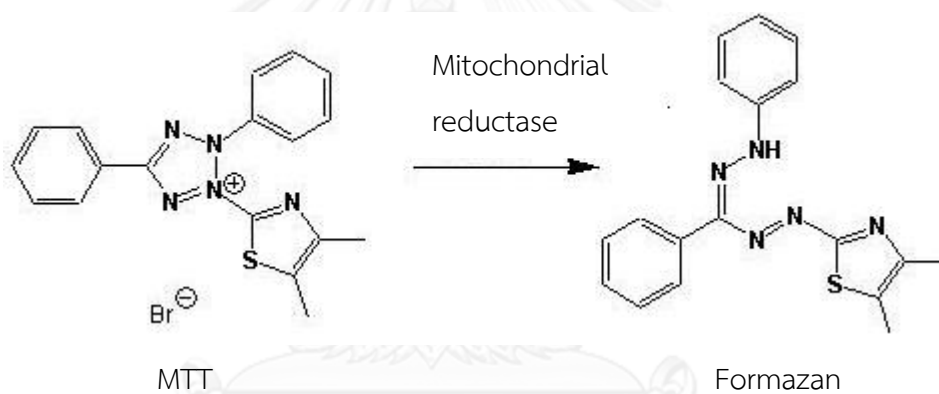


รูปที่ จ.8 กราฟระหว่างปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลา t หารด้วยปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลาอนันต์ (M_t/M_∞) ต่อเวลา (t) ของการควบคุมการปลดปล่อยดีเอชเอภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นองค์ประกอบ เมื่อมีการดูดซับคอร์คูมินร่วมกับดีเอชเอ

ภาคผนวก ฉ

การตรวจวัดจำนวนเซลล์ด้วยวิธี MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

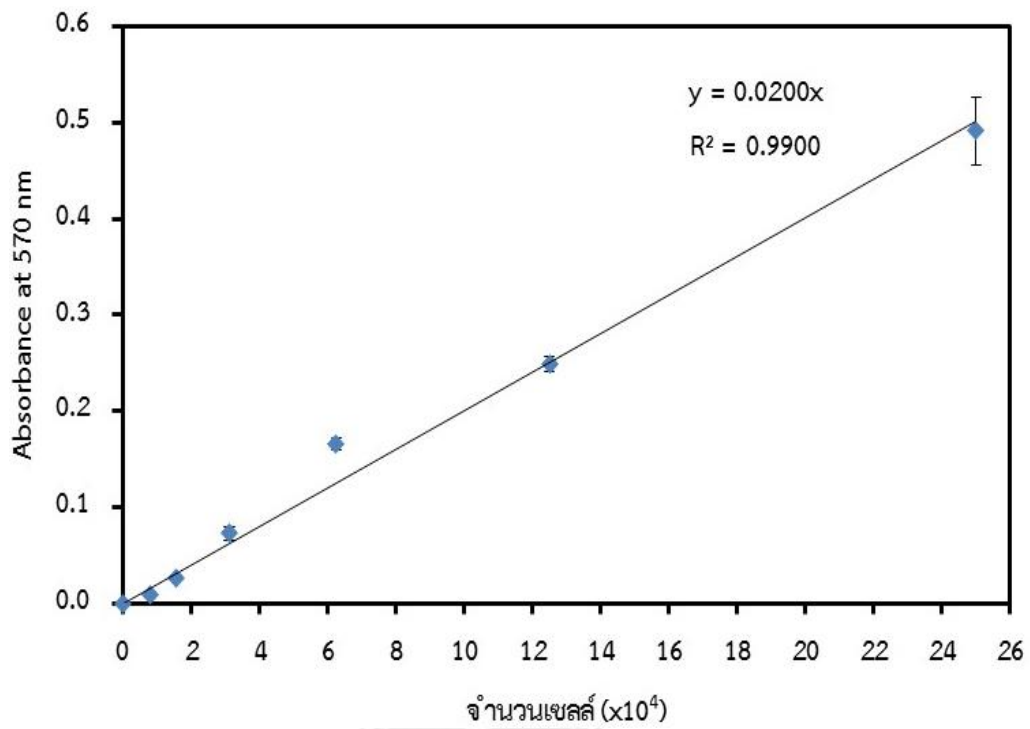
วิธีนี้เป็นการวัดจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ ด้วยสาร MTT ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงแหวนสี่เหลี่ยมของเกลือ Tetrazolium โดยสาร MTT จะเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่หลั่งมาจากไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ เกิดเป็นผลึกสีม่วงของ Formazan (รูปที่ ๑.1) ซึ่งจะแปรผันโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ และผลึก Formazan ที่เกิดขึ้นจะถูกละลายด้วยสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ หรือ DMSO ได้เป็นสารละลายสีม่วง ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร [MosmannT. 1983]



รูปที่ ๑.1 ปฏิกิริยาระหว่างสาร MTT กับเอนไซม์ที่หลั่งจากไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ เกิดเป็นผลึกสีม่วงของ Formazan [<http://www.biotek.com>]

ภาคผนวก ข

กราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์ผิวหนังของหนู หรือเซลล์ L929 โดยวิธี MTT



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์ผิวหนังของหนู หรือเซลล์ L929 โดยวิธี MTT

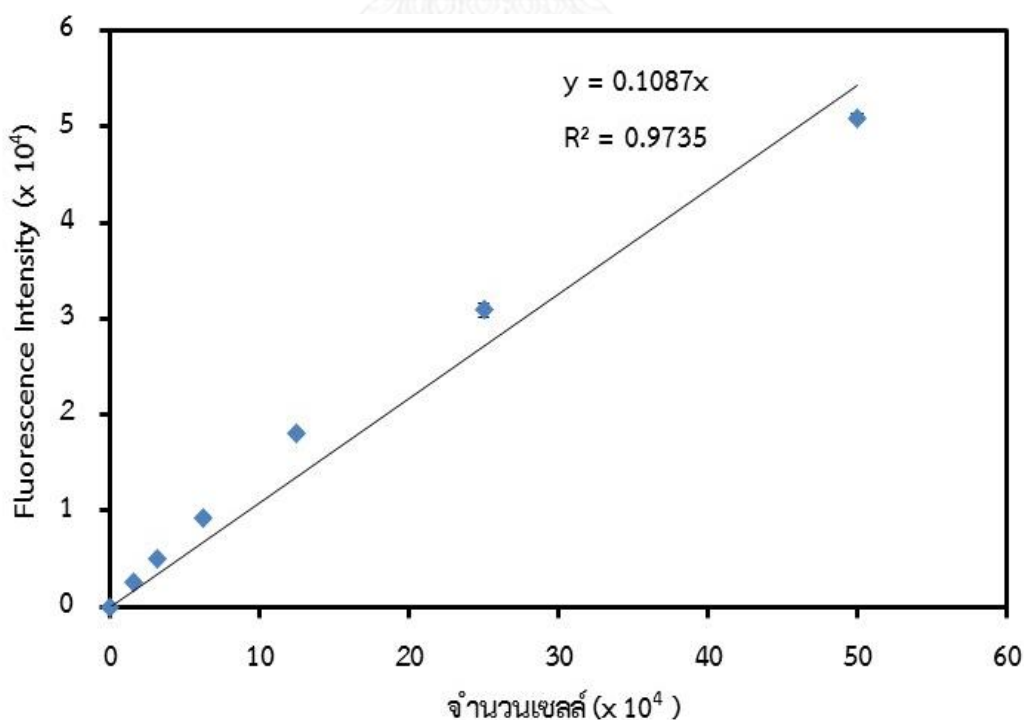
ภาคผนวก ซ

การหาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki

วิธีการทดลอง

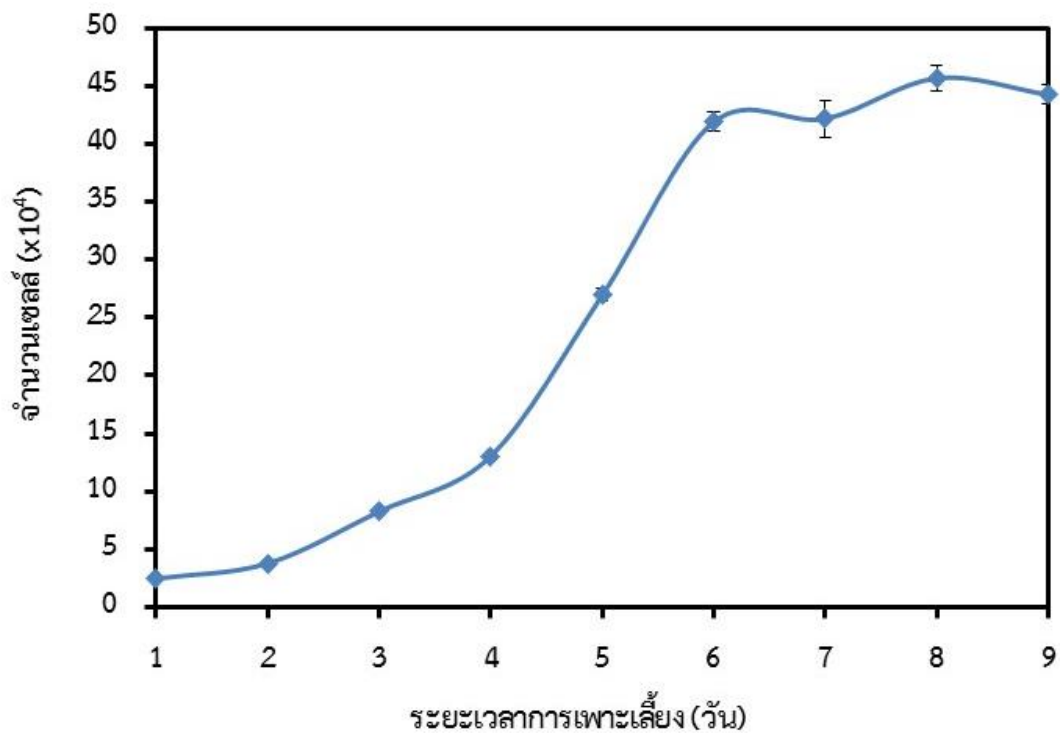
1. เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกในงานเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน 6 หลุม (6 well-plate) ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น 2.5×10^4 เซลล์/9.5 ตารางเซนติเมตร (1 หลุม) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM
2. ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเชื้อที่สภาวะความดันบรรยากาศที่มี 5% CO₂ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 9 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน
3. ประเมินจำนวนเซลล์มะเร็งปากมดลูกด้วยวิธี DNA ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ปริมาณสารเรืองแสง Hoechst 33258 ซึ่งเป็นสาร Bisbenzimidazole ที่จะไปจับกับคู่เบส Adenine-Thymine (A-T) ในสายโซ่ DNA และก่อให้เกิดการเรืองแสง จากนั้นวิเคราะห์ค่าความเข้มของแสง (Fluorescent intensity) ด้วยเครื่อง Fluorescent microplate reader โดยการกระตุ้น (Excitation) และปลดปล่อยพลังงานแสง (Emission) ที่ความยาวคลื่น 355 และ 460 นาโนเมตร ตามลำดับ [Takahashi Y. และคณะ 2003]

กราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki โดยวิธี DNA



รูปที่ ซ.1 กราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki โดยวิธี DNA

กราฟแสดงจำนวนเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki โดยวิธี DNA



รูปที่ ซ.2 จำนวนเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki ที่เพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน 6 หลุม (6 well-plate) โดยวิธี DNA

การคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate; μ)

$$\frac{dx}{dt} = \mu x$$

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

$$\mu \int_{t_1}^{t_2} dt = \int_{x_1}^{x_2} \frac{1}{x} dx$$

$$\mu(t_2 - t_1) = \ln x_2 - \ln x_1$$

$$\mu = (\ln x_2 - \ln x_1) / (t_2 - t_1) \quad (1)$$

การคำนวณเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (Doubling time; t_d)

$$\text{ให้ } x_2 = 2x_1 \text{ และ } t_d = t_2 - t_1$$

แทนค่าในสมการที่ (1) จะได้

$$\mu = [\ln(2x_1) - \ln x_1] / t_d$$

$$\mu = [(\ln 2 + \ln x_1) - \ln x_1] / t_d$$

$$\mu = \ln 2 / t_d$$

ดังนั้น

$$t_d = \ln 2 / \mu$$

การคำนวณร้อยละการยึดเกาะ

$$\text{ร้อยละการยึดเกาะ} = \left(\frac{\text{จำนวนเซลล์ที่ระยะเวลา 1 วัน}}{\text{จำนวนเซลล์เริ่มต้น}} \right) \times 100$$

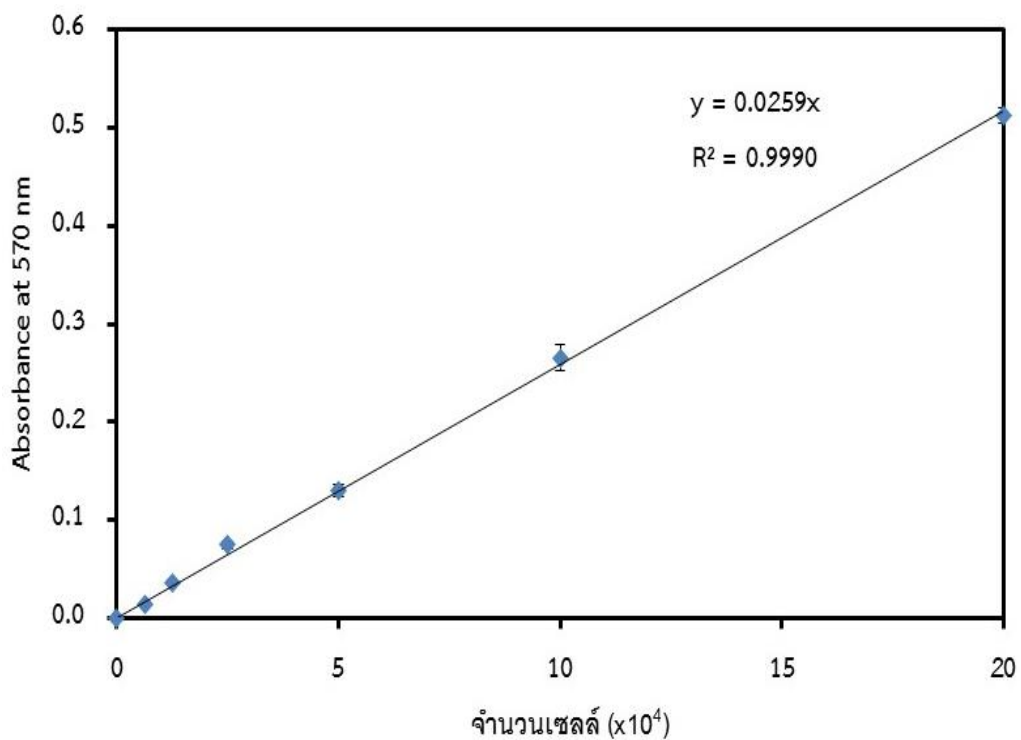
จากรูปที่ ซ.2 สามารถคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและเวลาการแบ่งตัวทวีคูณ จากช่วงเวลากเพาะเลี้ยง 4-6 วัน เนื่องจากเป็นช่วงที่เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด (Log phase) และคำนวณหาร้อยละการยึดเกาะที่เวลา 1 วัน ดังสรุปในตารางที่ ซ.1

ตารางที่ ซ.1 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ, เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ และร้อยละการยึดเกาะที่เวลา 1 วัน ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki ที่เพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน 6 หลุม (6 well-plate)

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ	เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ	ร้อยละการยึดเกาะที่เวลา 1 วัน
0.58 วัน ⁻¹	1.19 วัน (28.56 ชั่วโมง)	97%

ภาคผนวก ฅ

กราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki โดยวิธี MTT



รูปที่ ฅ.1 กราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด CaSki โดยวิธี MTT

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวกัญฐรัตน์ เลิศไชย เกิดเมื่อวันที่ 17 เมษายน พ.ศ. 2532 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร เข้าศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาที่โรงเรียนจอมสุรางค์อุปถัมภ์ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ในปีการศึกษา 2553 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2554

ผลงานในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

K. Lerdchai, J. Kitsongsermthon, J. Ratanavaraporn, S. Kanokpanont, S. Damrongsakkul, Development of Silk Fibroin/Gelatin Hydrogels for Controlled Release of Curcumin, Poster Presentation, Pure and Applied Chemistry International Conference 2013 (PACCON2013), The Tide Resort, Chon Buri, Thailand, 23 – 25 January 2013.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY