



## โครงการ

# การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

**ชื่อโครงการ** การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่ของอนุภาคระดับนาโนบนเยื่อไขมันสองชั้น

Study of Temperature Effect on the Movement of Nanoparticles on Lipid Bilayer Membranes

**ชื่อนิสิต** นางสาวภัทรวรรณ ไชยเสวี

**ภาควิชา** เคมี

**ปีการศึกษา** 2558

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่ของอนุภาคระดับนาโนบนเยื่อไขมันสองชั้น

Study of Temperature Effect on the Movement of Nanoparticles

on Lipid Bilayer Membranes



โดย

นางสาวภัทรวรรณ ไชยเสวี

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

เรื่อง การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่ของอนุภาคระดับนาโนบนเยื่อไขมันสองชั้น  
 โดย นางสาวภัทรวรรณ ไชยเสวี  
 ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
 ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี  
 คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

..... ประธานกรรมการ  
 (รองศาสตราจารย์ ดร. วรวิทย์ ไฮเว่น)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา  
 (รองศาสตราจารย์ ดร. ศุภศร วณิชเวชารุ่งเรือง)

..... กรรมการ  
 (อาจารย์ ดร. พร้อมพงศ์ เพียรพิณิชธรรม)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

.....  
 (รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิชัย พาราสุข)  
 หัวหน้าภาควิชาเคมี  
 วันที่.....เดือน..... พ.ศ. ....

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ  ดีมาก  ดี  พอใช้

ชื่อโครงการ การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่ของอนุภาคระดับนาโนบนเยื่อไขมันสองชั้น  
 ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวภัทรวรรณ ไชยเสวี เลขประจำตัว 5533135423  
 ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. ศุภสร วนิชเวหารุ่งเรือง  
 ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2558

### บทคัดย่อ

เยื่อหุ้มเซลล์เป็นองค์ประกอบที่สำคัญสำหรับเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ทำหน้าที่ในการห่อหุ้มและแบ่งแยกอาณาเขตของเซลล์จากสิ่งแวดล้อม การจัดเรียงตัวของเยื่อหุ้มเซลล์มีความสำคัญต่อการทำหน้าที่ต่าง ๆ ของเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อมีปัจจัยใด ๆ ที่มีผลต่อการเปลี่ยนการจัดเรียงตัวขององค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์จะเหนี่ยวนำให้ เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการจัดเรียงตัวใหม่ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาผลของ อุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่ของ อนุภาคระดับนาโนบนเยื่อไขมันสองชั้น โดยสร้างแบบจำลองของเซลล์โดยการสร้างไลโปโซมด้วยวิธีไฮเดรชันและ ใช้นุภาคพอลิสไตรีนเป็นตัวแทนของอนุภาคระดับนาโนพบว่าสารละลายของแคลเซียมไอออนสามารถทำให้อนุภาค พอลิสไตรีนเกาะติดบนไลโปโซมได้ จากนั้นให้ความร้อนเพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่ของอนุภาคระดับ นาโนบนเยื่อไขมันสองชั้นพบว่าที่อุณหภูมิสูงอนุภาคบนเยื่อไขมันสองชั้นสามารถเคลื่อนมาเกาะติดกันได้ โดยผู้วิจัยหวังว่างานวิจัยนี้จะประโยชน์ต่อความเข้าใจเกี่ยวกับการจัดเรียงตัวและการทำหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ต่อไป

คำสำคัญ : เยื่อหุ้มเซลล์, เยื่อไขมันสองชั้น, ไลโปโซม, อุณหภูมิ

Title : Study of Temperature Effect on the Movement of Nanoparticles on Lipid Bilayer Membranes

Student name : Phattarawan Jayasevi ID 5533135423

Adviser name : Associate Professor Dr. Supason Wanichwecharungruang

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic year 2015

### Abstract

Cell membranes are crucial to the cells. They enclose and separate the cell from extracellular environment. Structural organization of cell membranes is significant for normal cellular function. Any changes in its molecular composition can induce membrane restructuring. In this work, we have studied the effect of temperature on the movement of nanoparticles on lipid bilayer membranes. We mimicked cell system using liposomes that were produced by hydration method. Polystyrene nanoparticles were used as representative nanoparticles. Adhesion of particles on liposome was facilitated by calcium ion solution. The results indicated that increasing temperature can cause aggregation of nanoparticles on the lipid bilayer membrane. We anticipate this work to open new possibilities for the understanding of membrane structure and their functions.

Keywords : Cell membrane, Lipid bilayer membrane, Liposome, Temperature



## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่ของอนุภาคระดับนาโนบนเยื่อไขมันสองชั้น ในโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์ของอาจารย์ที่ปรึกษา โครงการ รองศาสตราจารย์ ดร. ศุภสร วณิชเวชารุ่งเรือง ที่ได้กรุณาให้ การสนับสนุน และ ให้คำแนะนำ ตลอด ระยะเวลา ในการทำงานวิจัย รวมถึงการเขียนเล่มรายงานฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้ และขอกราบขอบพระคุณ Associate Professor Tsutomu Hamada ที่ได้กรุณาให้ความรู้ ตลอดจนคำปรึกษาต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิจัยครั้งนี้ อีกทั้งยังให้คำแนะนำสำหรับปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงานอีกด้วย

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วรวิทย์ โยเว่น และ อาจารย์ ดร. พร้อมพงศ์ เพียรพิณีธรรม ที่ให้ความกรุณา สละเวลาอันมีค่ามาเป็นกรรมการประเมินโครงการในครั้งนี้

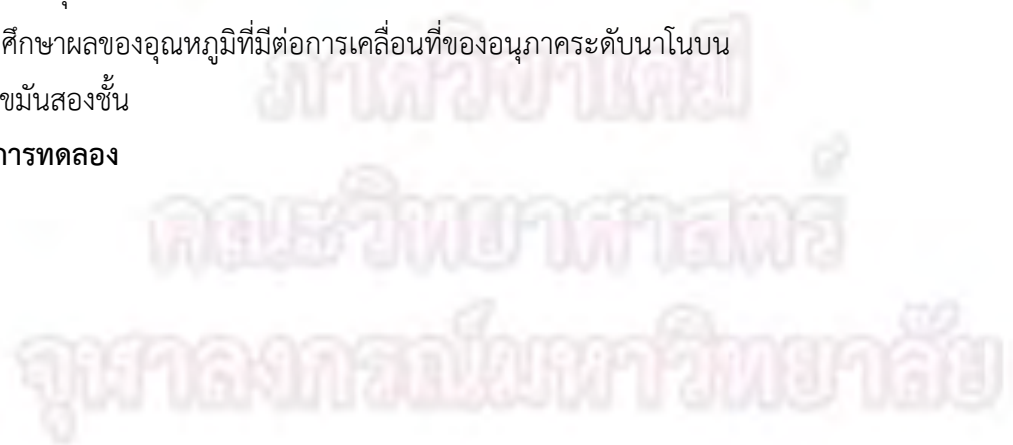
ขอขอบคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้และประสบการณ์ต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาที่ได้ศึกษาในภาควิชาเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ขอขอบคุณ Hamada group, School of Materials Science; Japan Advanced Institute of Science and Technology (JAIST) ที่เอื้อเพื่อการใช้ห้องปฏิบัติการ, สารเคมีและเครื่องมือวิจัยต่าง ๆ รวมถึง ความช่วยเหลือในทุกขั้นตอนระหว่างการทำวิจัย และ SW group สำหรับคำปรึกษา ความเป็นกันเองและ ความอบอุ่นที่มอบให้ มาโดยตลอด ขอขอบคุณกำลังใจสำคัญและแรงสนับสนุนจากบิดา มารดา และเพื่อนๆทุกคน

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณองค์การสนับสนุนนักศึกษาแห่งประเทศไทยญี่ปุ่น (Japan Student Services Organization, JASSO) ที่ให้การสนับสนุนการทำวิจัยและได้เปิดโอกาสให้ผู้วิจัยได้รับความรู้และประสบการณ์ใหม่ ๆ ในครั้งนี้



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	
สารบัญรูป	ช
สารบัญกราฟ	ฅ
สารบัญตาราง	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฐ
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงการ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	6
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	6
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
1.5 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย	7
<b>บทที่ 2 วิธีการทดลอง</b>	
2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	9
2.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	9
2.3 วิธีการทดลอง	10
<b>บทที่ 3 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง</b>	
3.1 การเตรียมไลโปโซมโดยวิธีไฮเดรชัน	15
3.2 การติดอนุภาคพอลิไสตรีนบนไลโปโซม	17
3.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่ของอนุภาคระดับนาโนบนเยื่อไขมันสองชั้น	19
<b>บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง</b>	23
เอกสารอ้างอิง	24
ประวัติผู้วิจัย	25



## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1.1 (ก) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดงของมนุษย์ (ข), (ค) ภาพสองมิติและ สามมิติแสดงการจัดเรียงตัวของไขมันและโปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์	1
รูปที่ 1.2 การรวมกันของ CTB และ ganglioside GM <sub>1</sub> บนไลโปโซมทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเฟส พิสูจน์เอกลักษณ์ ของไลโปโซมก่อนและหลังเติม A488-CTB โดยกล้องจุลทรรศน์ชนิดคอนโฟคอล ภาพ (ก), (จ) แสดงไลโปโซมที่มีเฟสเดียว ในองค์ประกอบต่างกั่ก่อนการเติม A488-CTB, ภาพ (ข) ถึง (ซ) แสดงการเปลี่ยนแปลงของเฟสเมื่อเติม A488-CTB โดย A488-CTB อยู่ในเฟสของเหลวอิมิตัว (liquid ordered phase, Lo) ดังแสดงในภาพ (ค และ ช) ส่วน C12:0-Dil ใช้ ติดตามเฟสของเหลวไม่อิมิตัว (liquid disordered phase, Ld) ดังแสดงในภาพ (ข และ ฉ), ส่วนภาพ (ง), (ซ) เป็นภาพที่ รวมเข้าด้วยกันของภาพ (ข), (ค) และ (ฉ), (ซ) ตามลำดับ ในสเกล 5 ไมโครเมตร	2
รูปที่ 1.3 ภาพ (ก) การจัดองค์ประกอบของเยื่อสองชั้นหลังเกิดการรวมกันระหว่างเยื่อสองชั้นและร่างแห ของโปรตีน แอตกตินที่อุณหภูมิสูงกว่าและต่ำกว่า T <sub>misc</sub> , ภาพ (ข) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์โนโคมด phase contrast และ epifluores-cence ของ fluorescent phospholipid probe dioleoyl phosphatidylethanolamine-N- carboxy fluorescein (fluo-DOPE) และ BODIPY TMR phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate (TMR-PIP <sub>2</sub> ) ของไลโปโซม ขณะอุณหภูมิสูงกว่าและต่ำกว่า T <sub>misc</sub> พบว่าในตอนสุดท้ายโดเมนของโมเลกุลไขมันเปลี่ยนรูปกลับไปมีลักษณะ เช่นเดียวกับตอนแรก โดยติดตามในสเกล 10 มิลลิเมตร	3
รูปที่ 1.4 แสดงการเปลี่ยนโครงสร้างของ KAON12 เมื่อได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ต	4
รูปที่ 1.5 ภาพ (ก), (ข) และ (ค) แสงเหนี่ยวนำให้เปลี่ยนแปลงการจัดวางองค์ประกอบใหม่ในโครงสร้าง เฟสเดียว และ (ง), (จ) สองเฟสของเยื่อสองชั้น โดยภาพ (ก), (ง) แสดงภาพจากกล้องฟลูออเรสเซนซ์, (ข) แสดงความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ ของ rho-PE ของโครงสร้าง tans และ cis ของเยื่อสองชั้นตาม เส้นประในภาพ (ก), ส่วนภาพ (ค) และ (จ) แสดงการ เปลี่ยนโครงสร้าง ของเยื่อสองชั้น โดยนอกรวงสี่เหลี่ยม แสดงลิปิตชนิดไม่อิมิตัว (1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine, DOPC) และ KAON12 ส่วนในวงสี่เหลี่ยมแสดงลิปิตชนิดอิมิตัว (1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine, DPPC) และ คอเลส เทอรอล	4



- รูปที่ 1.6 (ก) ภาพแสดงการสั่นของเยื่อสองชั้นของไลโปโซมที่บรรจุอนุพันธ์และไม่บรรจุอนุพันธ์ของ คอเลสเทอรอล เบนโซเอทเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจากอุณหภูมิห้องเป็น 25 องศาเซลเซียส (ข) กราฟแสดง การ สั่นของเยื่อสองชั้นที่ 22 องศาเซลเซียส (สีดำ) และ 23 องศาเซลเซียส (สีเทา) ของไลโปโซม ที่บรรจุ อนุพันธ์ของคอเลสเทอรอลเบนโซเอท และไม่บรรจุอนุพันธ์ของคอเลสเทอรอลเบนโซเอท ในฟังก์ชันของ รัศมีและการกระจายตัว โดยพลอตค่ารัศมีในรูป  $r-\langle r \rangle$  ในแต่ละค่า  $\theta$  โดยกำหนดให้  $\theta = \pm\pi/n$ ,  $n = 1, 2, 3 \dots 100$  ซึ่ง  $\theta$  คือมุมระหว่างระยะห่างสองจุดบนผิวไลโปโซม 5
- รูปที่ 1.7 (ก) โครงสร้างของโมเลกุลไขมันชนิด 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) ซึ่งแสดงถึงส่วนที่ชอบน้ำ และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (ข) โครงสร้างของเยื่อไขมัน สองชั้นที่เกิดจากการจัดเรียงตัวของส่วนหัว และส่วนหางของโมเลกุลไขมัน, (ค) การจัดเรียงตัวของ โมเลกุลไขมันเป็นไลโปโซมซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 0.02-250 ไมโครเมตร 7
- รูปที่ 1.8 ภาพแสดงการจำแนกประเภทของไลโปโซมโดยขนาดและจำนวนของเยื่อไขมันสองชั้น เป็น ประเภทต่างๆ ได้แก่ small unilamellar vesicles (SUV) มีขนาด 20-100 นาโนเมตร, large unilamellar vesicles (LUV) มีขนาดมากกว่า 100 นาโนเมตร, giant unilamellar vesicles (GUV) มี ขนาดมากกว่า 1000 นาโนเมตร, oligolamellar vesicle (OLV) มีขนาดมากกว่า 100-500 นาโนเมตร, multilamellar vesicles (MLV) มีขนาดมากกว่า 500 นาโนเมตร และ multivesicular vesicles (MVV) มีขนาดมากกว่า 1000 นาโนเมตร 8
- รูปที่ 2.1 ภาพวาดแสดงการสร้างไลโปโซมในขั้นตอนการสร้างฟิล์มไขมันโดยทำให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน และขั้นตอนการ สร้างสารแขวนลอยของไลโปโซมโดยการไฮเดรตฟิล์มไขมันด้วยน้ำ 10
- รูปที่ 3.1 โครงสร้างของไขมันอิมิตัวชนิด 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DiphyPC) 14
- รูปที่ 3.2 โครงสร้างของสารละลาย Rhodamine B 1,2-Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine (Rhodamine-DHPE) 14
- รูปที่ 3.3 แผนภาพแสดงการขยายตัวของไลโปโซมที่บรรจุน้ำตาลและไฮเดรตด้วยน้ำสารละลาย กลูโคสทำให้ตัวถูกละลายมีความเข้มข้นสูงขึ้น ซึ่งจะทำให้แรงผลักระหว่างเยื่อไขมัน สองชั้น มากพอที่จะทำให้แต่ละชั้นของ เยื่อไขมันสองชั้นแยกตัวออกจากกันได้ดีขึ้น 15
- รูปที่ 3.4 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด Inverted Microscope ในโหมด fluorescence และ phase contrast ตาม ลำดับ แสดงลักษณะและขนาดของไลโปโซมที่สร้างได้จากวิธีไฮเดรชัน 15
- รูปที่ 3.5 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด Inverted Microscope ภาพ (ก) ไลโปโซมผสมกับ อนุภาคพอลิ สไตรีน แสดงลักษณะของอนุภาคพอลิสไตรีนที่ไม่เกาะติดบนผิวไลโปโซม ภาพ (ข) แสดงการเกาะติด ของอนุภาคพอลิสไตรีนบน ไลโปโซมเมื่อใช้ไลโปโซมผสมกับอนุภาคพอลิสไตรีน และสารละลายของ แคลเซียม 16

รูปที่ 3.6 ภาพจำลองการติดอนุภาคพอลิस्टาไร์บนบนไลโปโซมโดยใช้สารละลายแคลเซียมไอออน	16
รูปที่ 3.7 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด Inverted Microscope ภาพ (ก) แสดงอนุภาคบนไลโปโซมที่อุณหภูมิห้องขณะ เริ่มต้นสังเกต, ภาพ (ข) แสดงอนุภาคบนไลโปโซมที่อุณหภูมิห้องหลังจากเวลาผ่านไป 15 นาที	18
รูปที่ 3.8 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด Inverted Microscope แสดงอนุภาคบนไลโปโซมที่อุณหภูมิ และเวลาต่างๆดังนี้ ภาพ (ก) ที่อุณหภูมิห้อง (21.8°C) นาทีที่ 0, ภาพ (ข) 35°C นาทีที่ 1.58, ภาพ (ค) 50°C นาทีที่ 4.10, ภาพ (ง) 60°C นาทีที่ 6.54, ภาพ (จ) 65°C นาทีที่ 9.10, ภาพ (ฉ) 60°C นาทีที่ 11.34, ภาพ (ช) 50°C นาทีที่ 16.14, ภาพ (ซ) 35°C นาทีที่ 20.48, ภาพ (ญ) ที่อุณหภูมิห้อง (22.4°C) นาทีที่ 28.44	19
รูปที่ 3.9 ภาพจำลองการสั่นของเยื่อไขมันสองชั้นที่มีอนุภาคเกาะติดบนผิวเมื่อให้ความร้อน	20
รูปที่ 3.10 ภาพจำลองการเคลื่อนที่ของอนุภาคบนเยื่อไขมันสองชั้นเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ	21
รูปที่ 3.11 ภาพแสดงการเปลี่ยนรูปร่างของไลโปโซมเมื่อถูกกดด้วย AFM Tip (ก) รูปร่างของไลโปโซม ในสารละลาย (ข) แสดงรูปร่างของไลโปโซมเมื่อกดด้วยแรงน้อยที่สุด (ค) แสดงรูปร่างของไลโปโซมเมื่อกดด้วยแรงปานกลาง (ง) แสดงรูปร่างของไลโปโซมเมื่อกดด้วยแรงมากที่สุด	22
รูปที่ 3.12 ภาพจำลองรอยเว้าบนเยื่อไขมันสองชั้นเมื่ออนุภาคมาเกาะติด(ก) แสดงรอยเว้า บนเยื่อไขมันสองชั้น ที่เกิดขึ้นจากการที่อนุภาคมาเกาะบนเยื่อไขมันสองชั้นในขณะที่อนุภาคอยู่แยกกัน (ข) แสดงรอยเว้าขนาดใหญ่ขึ้นบนเยื่อไขมันสองชั้นที่เกิดขึ้นเมื่ออนุภาคมาเกาะกัน	22

## สารบัญกราฟ

	หน้า
กราฟที่ 3.1 การสำรวจจำนวนของไลโปโซมที่ถูกเกาะติดโดยอนุภาคพอลิสไตรีน เมื่อใช้แคลเซียม ที่มีความเข้มข้น 0.4, 1, 2, 4, 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์มิลลิออสโมล (% mOsm)	17
กราฟที่ 3.2 แสดงระยะห่างระหว่างสองอนุภาคเมื่อทำการสังเกตที่อุณหภูมิห้อง (20.2°C) เป็นเวลา 15 นาที	18
กราฟที่ 3.3 แสดงระยะห่างระหว่างสองอนุภาคเมื่อทำการเพิ่มอุณหภูมิจากอุณหภูมิห้อง (21.8°C) เป็น 65 °C และลดอุณหภูมิจาก 65°C กลับสู่อุณหภูมิห้อง (22.4°C) ที่เวลาต่างๆ	20



ภาควิชาเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 แสดงปริมาณและความเข้มข้นของสารแขวนลอยของไลโปโซมชนิด DiphyPC สารแขวนลอยของอนุภาคพอลิस्टรีนและสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ใช้ในการติดอนุภาค พอลิस्टรีนบนไลโปโซม	11
ตารางที่ 2.2 แสดงปริมาณและความเข้มข้นของสารแขวนลอยของไลโปโซมชนิด DiphyPC สารแขวนลอยของอนุภาคพอลิस्टรีนและสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ใช้ในการหาปัจจัยที่ดีที่สุด ในการติดอนุภาคพอลิस्टรีนบนไลโปโซม	12
ตารางที่ 3.1 แสดงเวลาที่ใช้ในการเพิ่มอุณหภูมิของสารแขวนลอยไลโปโซมผสมอนุภาคพอลิस्टรีนจากโปรแกรม Temperature Management Software TEM	19

ภาควิชาเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 1

## บทนำ

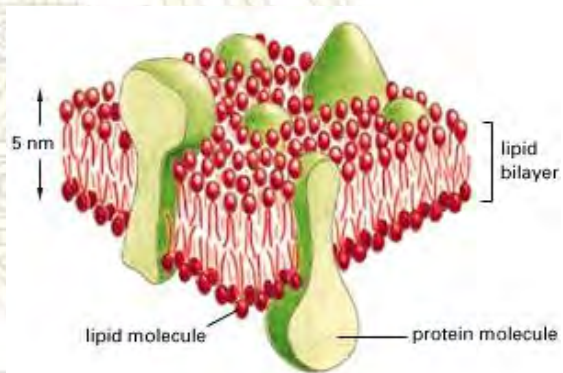
### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงการ

เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญสำหรับเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ทำหน้าที่ในการห่อหุ้มและแบ่งแยกอาณาเขตของเซลล์จากสิ่งแวดล้อม แม้ว่าเยื่อหุ้มเซลล์ของออร์แกเนลล์แต่ละชนิดจะมีหน้าที่แตกต่างกัน แต่เยื่อหุ้มเซลล์ทุกชนิดมีโครงสร้างพื้นฐานเหมือนกัน<sup>1</sup> ได้แก่ ไขมันและโปรตีนซึ่งส่วนมากยึดเกาะกันด้วยอันตรกิริยานอนโคเวเลนต์ (noncovalent interactions) โดยไขมันมีลักษณะเป็นเยื่อไขมันสองชั้น (lipid bilayer) ส่วนโปรตีนที่ยึดเกาะกับเยื่อไขมันสองชั้นเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดกระบวนการต่าง ๆ ขึ้น เช่น เป็นช่องทางให้ไอออนขนาดเล็กและโมเลกุลต่าง ๆ ผ่านเข้าออกระหว่างเซลล์ ทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณจากภายนอกและทำหน้าที่เป็นตัวถ่ายโอนสัญญาณให้เซลล์ตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมและตอบสนองต่อสัญญาณจากเซลล์อื่น ๆ

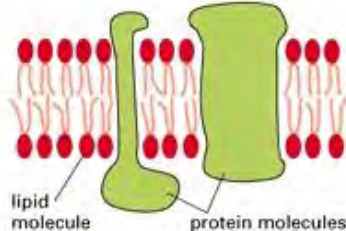
(ก)



(ค)



(ข)

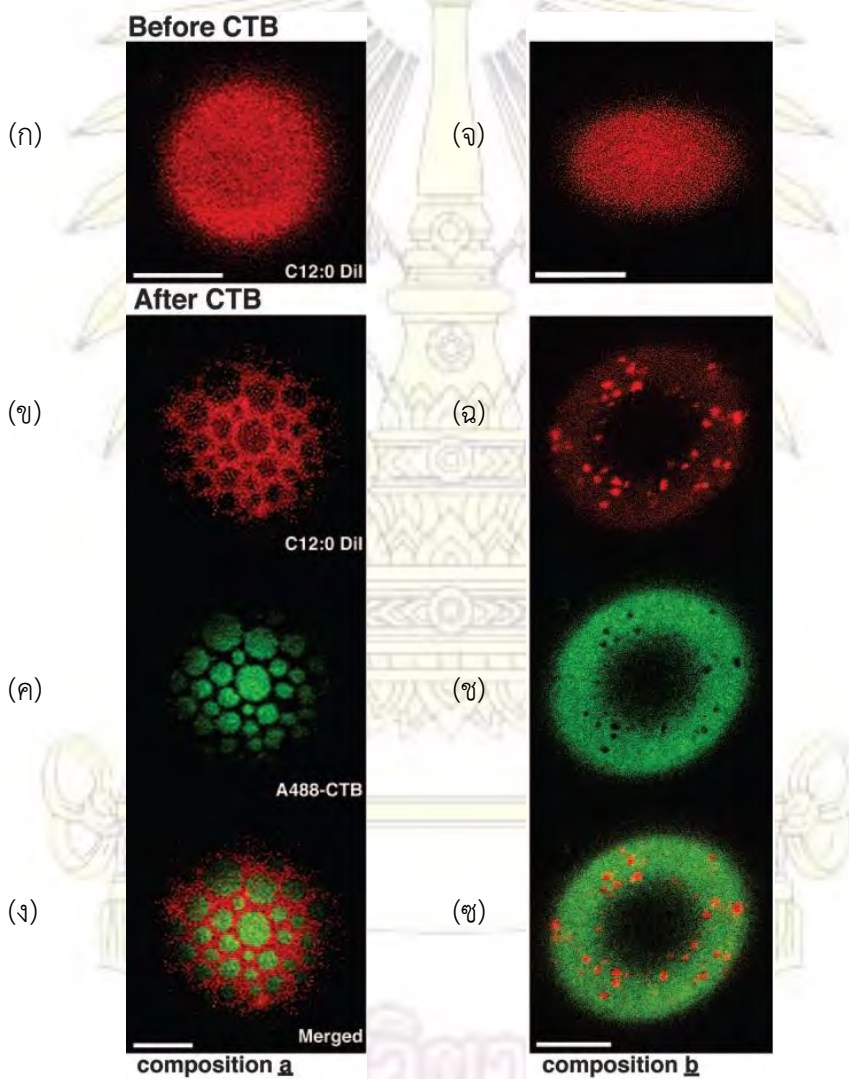


รูปที่ 1.1 (ก) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดงของมนุษย์ (ข), (ค) ภาพสองมิติและสามมิติแสดงการจัดเรียงตัวของไขมันและโปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์<sup>1</sup>

การจัดเรียงตัวของสารที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์มีความสำคัญต่อการทำหน้าที่ต่าง ๆ ของเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น การตอบสนองของเซลล์ต่อสิ่งเร้าจากภายในและภายนอกเซลล์ กระบวนการเอนโดไซโทซิส กระบวนการ เอกไซโทซิส การคัดแยกโปรตีน และการเคลื่อนที่ เมื่อมีปัจจัยใด ๆ ที่มีผลต่อการเปลี่ยนการจัดเรียงตัวขององค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์จะเหนี่ยวนำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการจัดเรียงตัวใหม่ โดยปัจจัยที่มีผลต่อองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ มีหลายปัจจัย เช่น การครอสลิงค์ขององค์ประกอบบนเยื่อหุ้มเซลล์<sup>2</sup> ปฏิกริยาพอลิเมอไรเซชันของโปรตีนต่อองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์<sup>3</sup> ผลของแสงต่อการจัดวางองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์<sup>4</sup> และผลของอุณหภูมิที่มีต่อคอเลสเตอรอล บนเยื่อหุ้มเซลล์<sup>5</sup>

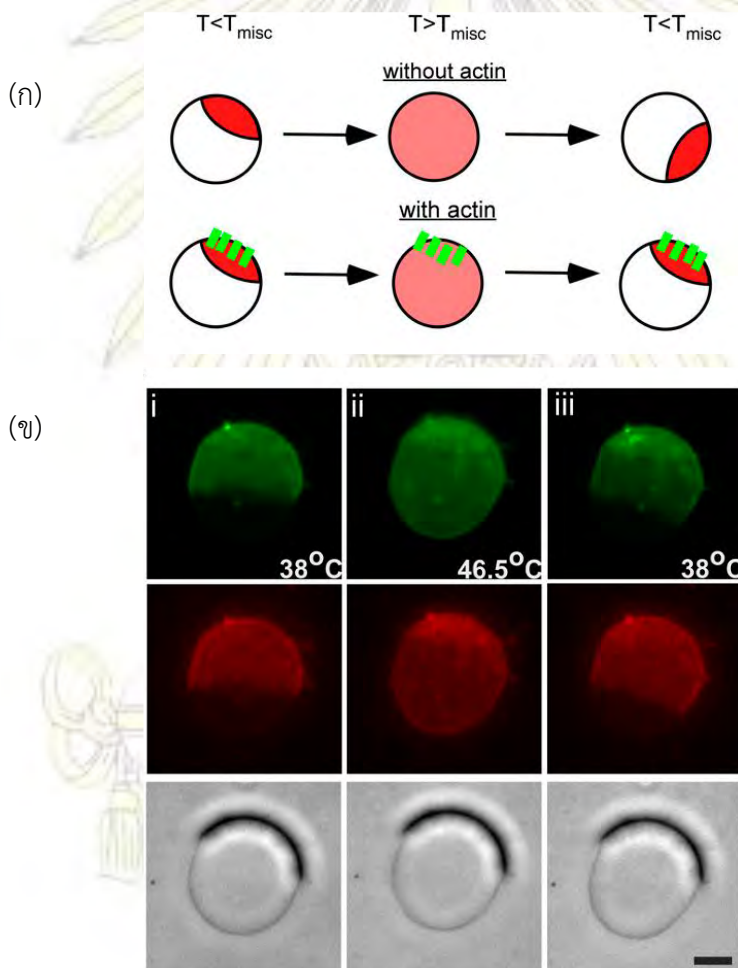


ในปี ค.ศ. 2005 Hammond และคณะ<sup>2</sup> ได้ศึกษาผลของการครอสลิงค์ขององค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ต่อการกระตุ้นให้เกิดการแยกเฟสของส่วนประกอบของเหลวอิมิตัวและไม่อิมิตัว (liquid ordered-liquid disordered phase separation) ของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยสร้างแบบจำลองเซลล์ด้วยไลโปโซมซึ่งบรรจุ ganglioside GM<sub>1</sub> ซึ่งทำหน้าที่เป็นโปรตีนตัวรับสำหรับ Cholera toxin บนเยื่อหุ้มเซลล์ พบว่าไลโปโซมที่บรรจุเฉพาะ ganglioside GM<sub>1</sub> ให้ไลโปโซมที่มีเฟสเดียว แต่เมื่อเติม A488-CTB ซึ่งเป็นสารผสมระหว่าง Cholera toxin B (CTB) และสีฟลูออเรสเซนต์ Alexa Fluor 488 ลงในไลโปโซม ทำให้ไลโปโซมแยกเป็นสองเฟสเนื่องจาก A488-CTB ทำให้เกิดโดเมนชนิดใหม่ จึงสรุปได้ว่าการครอสลิงค์ของ A488-CTB และ ganglioside GM<sub>1</sub> สามารถทำให้เยื่อสองชั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงของเฟส ได้



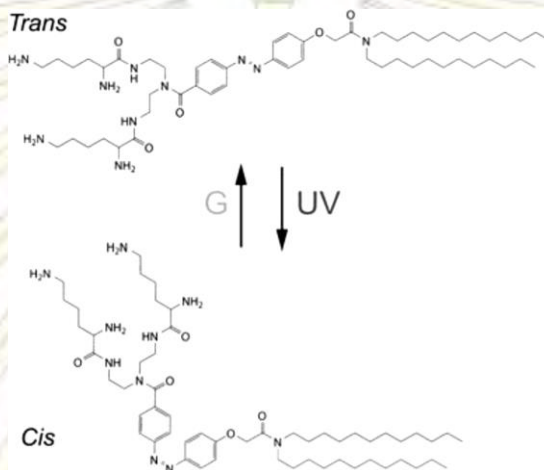
รูปที่ 1.2 การรวมกันของ CTB และ ganglioside GM<sub>1</sub> บนไลโปโซมทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเฟส พิสูจน์เอกลักษณ์ของไลโปโซมก่อนและหลังเติม A488-CTB โดยกล้องจุลทรรศน์ชนิดคอนโฟคอล ภาพ (ก), (จ) แสดงไลโปโซมที่มีเฟสเดียวในองค์ประกอบต่างกันก่อนการเติม A488-CTB, ภาพ (ข) ถึง (ซ) แสดงการเปลี่ยนแปลงของเฟสเมื่อเติม A488-CTB โดย A488-CTB อยู่ในเฟสของเหลวอิมิตัว (liquid ordered phase, Lo) ดังแสดงในภาพ (ค และ ช) ส่วน C12:0-DiI ใช้ติดตามเฟสของเหลวไม่อิมิตัว (liquid disordered phase, Ld) ดังแสดงในภาพ (ข และ ฉ), ส่วนภาพ (ง), (ซ) เป็นภาพที่รวมเข้าด้วยกันของภาพ (ข), (ค) และ (ฉ), (ช) ตามลำดับ ในสเกล 5 ไมโครเมตร<sup>2</sup>

ในปี ค.ศ. 2006 Allen และคณะ<sup>3</sup> ได้ศึกษาผลของปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันของโปรตีนแอกตินต่อองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยสร้างไลโปโซมด้วยไขมันชนิดอิ่มตัวและชนิดไม่อิ่มตัว คอเลสเทอรอล และ BODIPY TMR PIP<sub>2</sub> ซึ่งประกอบด้วย BODIPY TMR ซึ่งเป็นสีฟลูออเรสเซนต์ และ PIP<sub>2</sub> ซึ่งเป็นฟอสโฟลิปิดที่เป็นองค์ประกอบในปริมาณน้อยของเยื่อหุ้มเซลล์ จากนั้นเติมสารละลายของโปรตีนแอกตินลงในไลโปโซมที่สร้างได้ การเติม BODIPY TMR PIP<sub>2</sub> เพื่อเป็นการกระตุ้นการรวมกลุ่มของร่างแหของโปรตีนแอกติน เนื่องจากร่างแหของโปรตีนแอกตินจะรวมกลุ่มกันในบริเวณที่มี PIP<sub>2</sub> มาก และพบว่าปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันของร่างแหเดรนไดรต์ของโปรตีนแอกตินกับ PIP<sub>2</sub> บนเยื่อสองชั้นทำให้อุณหภูมิที่องค์ประกอบสามารถรวมเป็นเนื้อเดียวกัน (miscibility temperature,  $T_{misc}$ ) เปลี่ยนไป จึงเหนี่ยวนำให้เกิดการแยกเฟสของเยื่อสองชั้นขึ้น

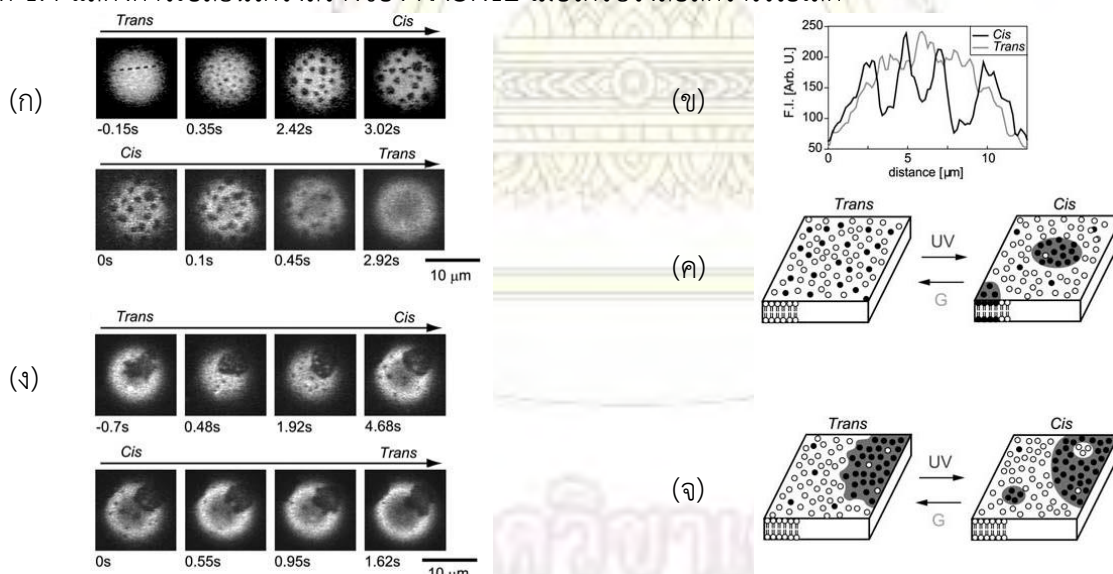


รูปที่ 1.3 ภาพ (ก) การจัดองค์ประกอบของเยื่อสองชั้นหลังเกิดการรวมกันระหว่างเยื่อสองชั้นและร่างแหของโปรตีน แอกตินที่อุณหภูมิสูงกว่าและต่ำกว่า  $T_{misc}$ , ภาพ (ข) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์โนโคมอด phase contrast และ epifluorescence ของ fluorescent phospholipid probe dioleoylphosphatidylethanolamine-N- carboxy fluorescein (fluo-DOPE) และ BODIPY TMR phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate (TMR-PIP<sub>2</sub>) ของไลโปโซม ขณะอุณหภูมิสูงกว่าและต่ำกว่า  $T_{misc}$  พบว่าในตอนสุดท้ายโดเมนของโมเลกุลไขมันเปลี่ยนรูปกลับไปมีลักษณะ เช่นเดียวกับตอนแรก โดยติดตามในสเกล 10 มิลลิเมตร<sup>3</sup>

ในปี ค.ศ. 2010 Hamada และคณะ<sup>4</sup> ได้ศึกษาผลของแสงที่มีต่อการจัดวางองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยสร้างแบบจำลองของเซลล์ซึ่งประกอบด้วยฟอสโฟลิปิดชนิดไม่อิ่มตัวและชนิดไม่อิ่มตัว คอเลสเตอรอลและ KAON12 ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่ประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำและส่วนที่ไม่ชอบน้ำและมีความสามารถในการตอบสนองต่อแสง โดยพบว่าก่อนให้รังสีอัลตราไวโอเล็ตผิวของเยื่อสองชั้นซึ่งมีลักษณะเป็น trans ตามโครงสร้างของ KAON12 มีความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneous) แต่เมื่อให้รังสีอัลตราไวโอเล็ต KAON12 จะเปลี่ยนโครงสร้างจาก trans เป็น cis ซึ่งเป็นการทำให้คุณสมบัติที่องค์ประกอบสามารถรวมเป็นเนื้อเดียวกัน (miscibility temperature,  $T_{misc}$ ) เปลี่ยนไป จึงเหนี่ยวนำให้เกิดการแยกเฟสบนเยื่อสองชั้นขึ้น



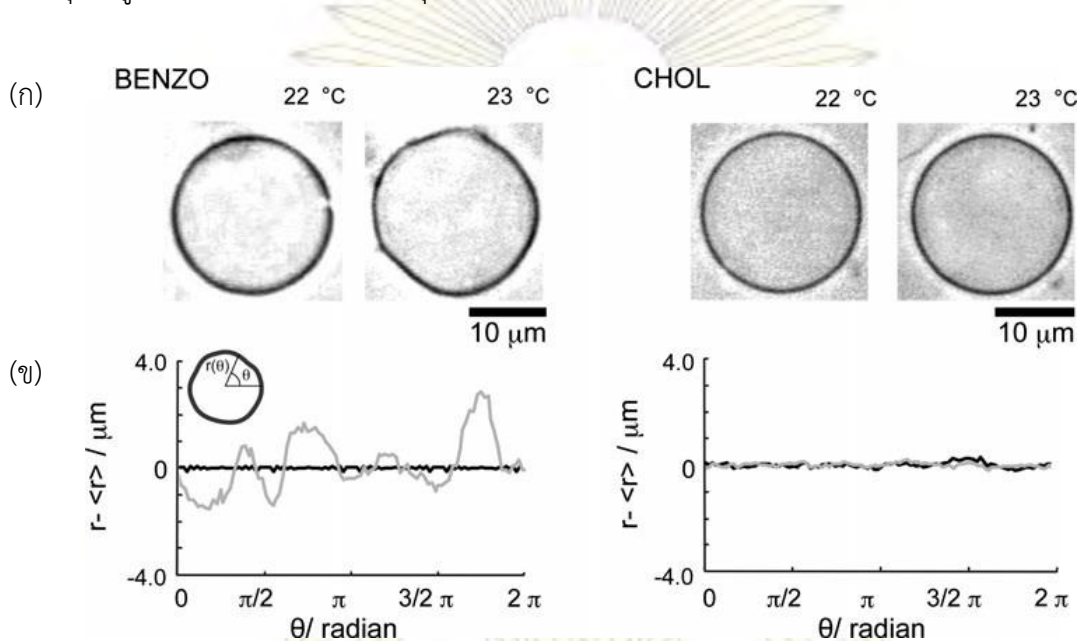
รูปที่ 1.4 แสดงการเปลี่ยนโครงสร้างของ KAON12 เมื่อได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ต<sup>4</sup>



รูปที่ 1.5 ภาพ (ก), (ข) และ (ค) แสดงเหนี่ยวนำให้เปลี่ยนแปลงการจัดวางองค์ประกอบใหม่ในโครงสร้างเฟสเดียว และ (ง), (จ) สองเฟสของเยื่อสองชั้น โดยภาพ (ก), (ง) แสดงภาพจากกล้องฟลูออเรสเซนซ์, (ข) แสดงความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของ rho-PE ของโครงสร้าง *trans* และ *cis* ของเยื่อสองชั้นตามเส้นประในภาพ (ก), ส่วนภาพ (ค) และ (จ) แสดงการเปลี่ยนโครงสร้างของเยื่อสองชั้น โดยนอกรังสีแสงแสดงลิปิดชนิดไม่อิ่มตัว (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, DOPC) และ KAON12 ส่วนในวงสี่เหลี่ยมแสดงลิปิดชนิดอิ่มตัว (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, DPPC) และคอเลสเตอรอล<sup>4</sup>



ในปี ค.ศ. 2012 Tsuyoshi และคณะ<sup>5</sup> ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อคอเลสเทอรอลบนเยื่อไขมันสองชั้น โดยสร้างแบบจำลองของเซลล์ ซึ่งบรรจุผลึกเหลวของคอเลสเทอรอล สารประกอบคอเลสเทอรอลเบนโซเอท และสาร ออกซิโดคอเลสเทอรอล พบว่าอนุพันธ์ของคอเลสเทอรอลเบนโซเอทบนเยื่อไขมันสองชั้นสามารถตอบสนองต่ออุณหภูมิ ได้ เนื่องจากเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นพื้นที่ผิวของโมเลกุลคอเลสเทอรอลจะเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการสั่นของเยื่อไขมันสองชั้น



รูปที่ 1.6 (ก) ภาพแสดงการสั่นของเยื่อสองชั้นของไลโปโซมที่บรรจุอนุพันธ์และไม่บรรจุอนุพันธ์ของคอเลสเทอรอล เบนโซเอทเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจากอุณหภูมิห้องเป็น 25 องศาเซลเซียส (ข) กราฟแสดงการสั่นของเยื่อสองชั้นที่ 22 องศาเซลเซียส (สีดำ) และ 23 องศาเซลเซียส (สีเทา) ของไลโปโซมที่บรรจุอนุพันธ์ของคอเลสเทอรอลเบนโซเอท และไม่บรรจุอนุพันธ์ของคอเลสเทอรอลเบนโซเอท ในฟังก์ชันของรัศมีและการกระจายตัว โดยพลอตค่ารัศมีในรูป  $r - \langle r \rangle$  ในแต่ละค่า  $\theta$  โดยกำหนดให้  $\theta = \pm\pi/n, n = 1, 2, 3 \dots 100$  ซึ่ง  $\theta$  คือมุมระหว่างระยะห่างสองจุดบนผิวไลโปโซม<sup>5</sup>

โดยงานวิจัยต่าง ๆ ที่ได้กล่าวมานี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์คือเป็นแบบจำลองในการควบคุมและปรับแต่ง เยื่อหุ้มเซลล์ได้ ซึ่งแต่ละงานวิจัยส่งผลต่อการควบคุมการทำงานที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ในรูปแบบต่าง ๆ กัน จากปัจจัยต่างๆ ที่ได้กล่าวมาข้างต้น ทำให้ผู้วิจัยสนใจศึกษาปัจจัยชนิดใหม่ที่ส่งผลต่อสารที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยจะศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่ของอนุภาคระดับนาโนบนเยื่อไขมันสองชั้น โดยการสร้างไลโปโซมและ ติดอนุภาคระดับนาโนซึ่งมีรูปร่างกลมบนไลโปโซม จากนั้นจึงให้ความร้อนเข้าไป ประโยชน์ของงานวิจัยนี้ใช้เพื่อเป็นแบบ จำลองในการศึกษาการควบคุมโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์และเมื่อสามารถสร้างแบบจำลองของโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ก็จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับแต่งเยื่อหุ้มเซลล์และควบคุมการทำงานของโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ซึ่งจะ เป็นประโยชน์ต่อการทำงานที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. สร้างไลโปโซมซึ่งมีลักษณะเป็นเยื่อไขมันสองชั้นเพื่อเป็นแบบจำลองของเซลล์
2. ติดอนุภาคลงบนเยื่อไขมันสองชั้นเพื่อเป็นแบบจำลองของโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์
3. ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่ของอนุภาคระดับนาโนบนเยื่อไขมันสองชั้น

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. ค้นคว้าเอกสารและข้อมูลที่เกี่ยวข้องเพื่อใช้ในการวางแผนการทดลอง จัดหาวัสดุอุปกรณ์และสารเคมี
2. สร้างไลโปโซมจากไขมันชนิด 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DiphyPC) โดยวิธีไฮเดรชัน จากนั้นพิสูจน์เอกลักษณ์ของไลโปโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์
3. ติดอนุภาคพอลิस्टาไทรินบนไลโปโซม โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการติดอนุภาคดังนี้
  - 3.1 ไลโปโซมผสมกับอนุภาคพอลิस्टาไทริน
  - 3.2 ไลโปโซมผสมกับอนุภาคพอลิस्टาไทริน และสารละลายของแคลเซียม โดยพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคบนไลโปโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์
4. ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่ของอนุภาคระดับนาโนบนเยื่อไขมันสองชั้น โดยให้ความร้อนด้วย thermo-control plate และติดตามผลด้วยกล้องจุลทรรศน์
5. วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผล และเขียนรายงาน

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

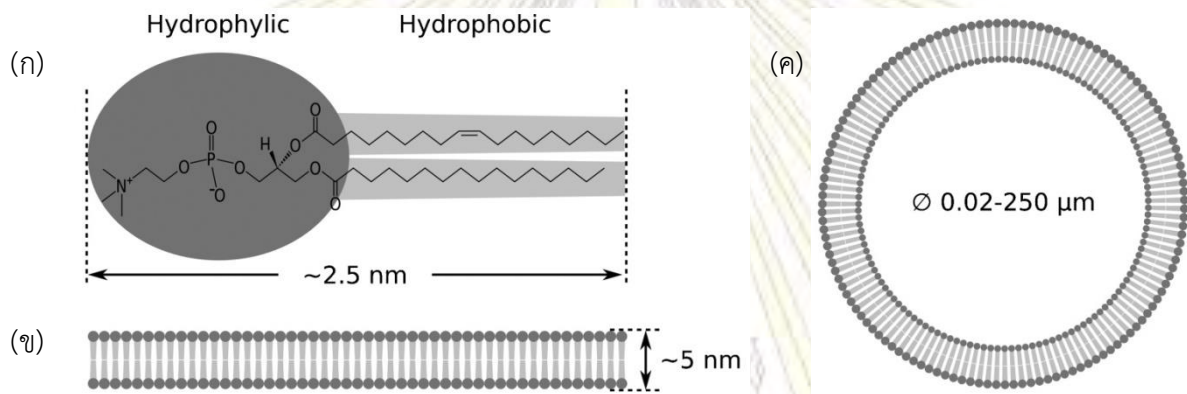
1. ได้วิธีการใหม่ในการติดอนุภาคระดับนาโนบนเยื่อไขมันสองชั้น
2. ได้ทราบผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่ของอนุภาคระดับนาโนบนเยื่อไขมันสองชั้นซึ่งจะสามารถนำความรู้  
นี้ไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ได้

ภาควิชาเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## 1.5 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

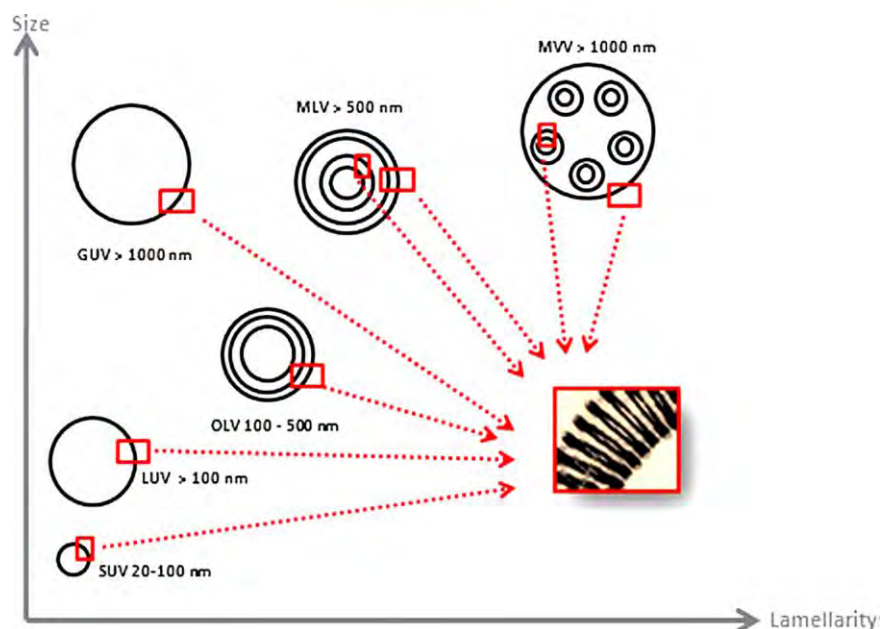
ไลโปโซม (liposome) คืออนุภาคขนาดเล็กมีรูปร่างกลมประกอบด้วยไขมันจำพวกฟอสโฟลิปิด (phospholipid) ซึ่งมีสมบัติแอมฟิพาติก (amphipathic) คือมีส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic)<sup>6</sup> ด้วยสมบัตินี้เมื่อรวมกับน้ำจึงทำให้ฟอสโฟลิปิดสามารถจัดเรียงตัวเป็นชั้นสลับกับชั้นของโมเลกุลน้ำ โดยส่วนที่ชอบน้ำหันออกหาโมเลกุลน้ำ ในขณะที่ส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะหันเข้าหากันในรูปของเยื่อไขมันสองชั้น (lipid bilayer membrane) ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับเยื่อหุ้มเซลล์ จึงทำให้สามารถนำไลโปโซมมาใช้เป็นแบบจำลองของ เยื่อหุ้มเซลล์ได้



รูปที่ 1.7 (ก) โครงสร้างของโมเลกุลไขมันชนิด 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) ซึ่งแสดงถึงส่วนที่ชอบน้ำ และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (ข) โครงสร้างของเยื่อไขมันสองชั้นที่เกิดจากการจัดเรียงตัวของส่วนหัว และส่วนหางของโมเลกุลไขมัน, (ค) การจัดเรียงตัวของโมเลกุลไขมันเป็นไลโปโซมซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 0.02-250 ไมโครเมตร<sup>6</sup>

ไลโปโซมสามารถจำแนกประเภทโดยขนาดและจำนวนของเยื่อไขมันสองชั้น<sup>7</sup> ได้เป็นหลายประเภท ได้แก่

1. Small unilamellar vesicles (SUV) เป็นไลโปโซมที่มีเยื่อสองชั้นเพียงชั้นเดียวและมีขนาด 20–100 นาโนเมตร
2. Large unilamellar vesicles (LUV) เป็นไลโปโซมที่มีเยื่อสองชั้นเพียงชั้นเดียวและมีขนาดมากกว่า 100 นาโนเมตร
3. Giant unilamellar vesicles (GUV) เป็นไลโปโซมที่มีเยื่อสองชั้นเพียงชั้นเดียวและมีขนาดมากกว่า 1000 นาโนเมตร
4. Oligolamellar vesicle (OLV) เป็นไลโปโซมที่มีเยื่อสองชั้นมากกว่าหนึ่งชั้นและมีขนาดมากกว่า 100–500 นาโนเมตร
5. Multilamellar vesicles (MLV) เป็นไลโปโซมที่มีเยื่อสองชั้นมากกว่าหนึ่งชั้นและมีขนาดมากกว่า 500 นาโนเมตร
6. Multivesicular vesicles (MVV) เป็นไลโปโซมขนาดใหญ่ที่ห่อหุ้มไลโปโซมขนาดเล็กหลายอนุภาคไว้และมีขนาดมากกว่า 1000 นาโนเมตร



รูปที่ 1.8 ภาพแสดงการจำแนกประเภทของไลโปโซมโดยขนาดและจำนวนของเยื่อไขมันสองชั้นเป็นประเภทต่างๆ ได้แก่ small unilamellar vesicles (SUV) มีขนาด 20–100 นาโนเมตร, large unilamellar vesicles (LUV) มีขนาดมากกว่า 100 นาโนเมตร, giant unilamellar vesicles (GUV) มีขนาดมากกว่า 1000 นาโนเมตร, oligolamellar vesicle (OLV) มีขนาดมากกว่า 100–500 นาโนเมตร, multilamellar vesicles (MLV) มีขนาดมากกว่า 500 นาโนเมตร และ multivesicular vesicles (MVV) มีขนาดมากกว่า 1000 นาโนเมตร<sup>7</sup>

วิธีการเตรียมไลโปโซมมีหลายวิธีขึ้นกับการนำไปใช้ประโยชน์โดยในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้เลือกใช้วิธีไฮเดรชัน (hydration) เนื่องจากเป็นวิธีที่ค่อนข้างง่าย ไม่รุนแรงและไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่มีความซับซ้อน อีกทั้งยังทำให้ได้ไลโปโซมที่เป็น Giant unilamellar vesicles (GUV) ซึ่งเหมาะกับการนำไปใช้เป็นเซลล์จำลองด้วย

หลักการของวิธีไฮเดรชัน (hydration)<sup>8</sup> คือไขมันที่ใช้ต้องละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ ตัวอย่างเช่นคลอโรฟอร์ม (chloroform) เพื่อให้ไขมันมีความเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกโดยใช้ก๊าซไนโตรเจน เพื่อให้ได้ฟิล์มไขมัน และกำจัดตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหลือในฟิล์มไขมันโดยทำให้แห้งในเดซิเคเตอร์ ทำการเติมสารละลายตัวกลางลงไป จะทำให้เยื่อไขมันสองชั้นแต่ละชั้นค่อยๆ แยกตัวออกจากกันและด้วยสมบัติ แอมฟิพาติกดั่งที่กล่าวข้างต้นทำให้เกิดเป็นไลโปโซมในที่สุด

## บทที่ 2

### วิธีการทดลอง

#### 2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. กล้องจุลทรรศน์ (Inverted Microscope, Nikon, ECLIPSE, TE2000-S, Japan)
2. เครื่องอัลตราโซนิก (Sonicator, Ultrasonic Cleaner VDT-1730QTD, China)
3. Thermo-control plate (Tokai-Hit, Japan)

#### 2.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. 1,2-Diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DiphyPC) (Avanti® Polar Lipids, INC.)
2. Glucose (Nacalai tesque, INC., Japan)
3. MilliQ water (Direct-Q® 3UV with Pump, Millipore, Molsheim, France)
4. Rhodamine B 1,2-Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3-Phos phoethanolamine (Rhodamine-DHPE) (Molecular probes®)
5. Polystyrene ขนาด 0.8 ไมโครเมตร (Polysciences, INC)
6. Calcium Chloride (Nacalai tesque, INC., Japan)

ภาควิชาเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## 2.3 วิธีการทดลอง

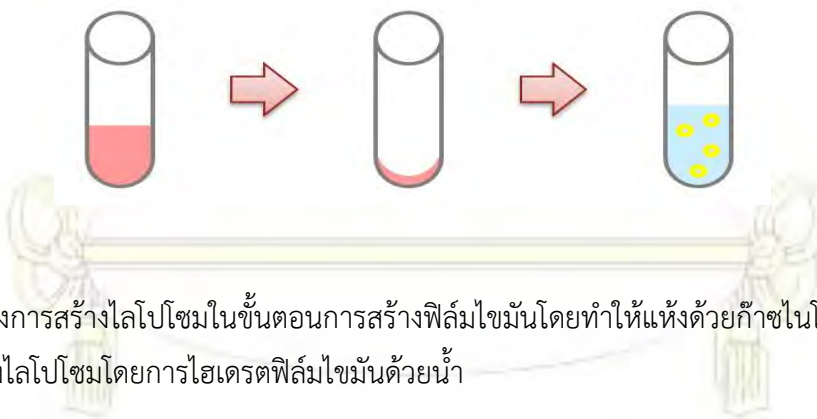
### 2.3.1 การเตรียมไลโปโซมเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ จากไขมันชนิด 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DiphyPC) โดยวิธีไฮเดรชัน

#### 1. การสร้างฟิล์มไขมัน

- 1.1) ปิเปตสารละลาย 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DiphyPC) เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร, สารละลายกลูโคสเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร สารละลาย Rhodamine B 1,2-Dihexadecanoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamine (Rhodamine-DHPE) เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง
- 1.2) ทำฟิล์มไขมันให้แห้งโดยใช้ก๊าซไนโตรเจน
- 1.3) เก็บฟิล์มไขมันในเดซิเคเตอร์ (Desiccator) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

#### 2. การไฮเดรตฟิล์มไขมันด้วยสารละลายตัวกลาง

- 2.1) ไฮเดรตฟิล์มไขมันด้วยน้ำ (MilliQ water) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร
- 2.2) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง



รูปที่ 2.1 ภาพวาดแสดงการสร้างไลโปโซมในขั้นตอนการสร้างฟิล์มไขมันโดยทำให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจนและขั้นตอนการสร้างสารแขวนลอยของไลโปโซมโดยการไฮเดรตฟิล์มไขมันด้วยน้ำ

## 2.3.2 การติดอนุภาคพอลิสไตรีนบนไลโปโซม

### 2.3.2.1 ศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการติดอนุภาค

1. ไลโปโซมผสมกับอนุภาคพอลิสไตรีน
2. ไลโปโซมผสมกับอนุภาคพอลิสไตรีน และสารละลายของแคลเซียม

โดยปีเปตสารแขวนลอยของไลโปโซมชนิด DiphyPC เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ สารแขวนลอยของอนุภาคพอลิสไตรีนเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 40 มิลลิออสโมล ในปริมาตรต่างๆดังนี้

เงื่อนไข	สารแขวนลอยของไลโปโซมชนิด DiphyPC เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์		สารแขวนลอยของอนุภาคพอลิสไตรีน เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์		สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 40 มิลลิออสโมล	
	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้น (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้น (มิลลิออสโมล)
1	95	0.95	5	0.5	-	-
2	94	0.94	5	0.5	1	0.4

ตารางที่ 2.1 แสดงปริมาตรและความเข้มข้นของสารแขวนลอยของไลโปโซมชนิด DiphyPC สารแขวนลอย ของอนุภาคพอลิสไตรีนและสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ใช้ในการติดอนุภาคพอลิสไตรีนบนไลโปโซม

จากนั้นผสมสารละลายให้เข้ากัน และนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์



### 2.3.2.2 ศึกษาหาปัจจัยที่ดีที่สุดที่มีผลต่อการติดอนุภาคโดยการเปลี่ยนปริมาณของสารละลายแคลเซียม

เตรียมสารละลายผสมของไลโปโซมและอนุภาคพอลิสไตรีน ที่มีสารละลายของแคลเซียมความดัน 0.4, 1, 2, 4, 6 และ 8 มิลลิออสโมล ตามลำดับ โดยเปิดสารแขวนลอยของไลโปโซมชนิด DiphyPC เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ สารแขวนลอยของอนุภาคพอลิสไตรีนเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 40 มิลลิออสโมล ในปริมาตรต่างๆดังนี้

เงื่อนไข	สารแขวนลอยของไลโปโซมชนิด DiphyPC เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์		สารแขวนลอยของอนุภาคพอลิสไตรีน เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์		สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 40 มิลลิออสโมล	
	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้น (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้น (มิลลิออสโมล)
1	94	0.94	5	0.5	1	0.4
2	92.5	0.925	5	0.5	2.5	1
3	90	0.90	5	0.5	5	2
4	85	0.85	5	0.5	10	4
5	80	0.80	5	0.5	15	6
6	75	0.75	5	0.5	20	8

ตารางที่ 2.2 แสดงปริมาตรและความเข้มข้นของสารแขวนลอยของไลโปโซมชนิด DiphyPC สารแขวนลอยของอนุภาคพอลิสไตรีนและสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ใช้ในการหาปัจจัยที่ดีที่สุดในการติดอนุภาคพอลิสไตรีนบนไลโปโซม

จากนั้นผสมสารละลายให้เข้ากัน และนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์

### 2.3.3 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่ของอนุภาคระดับนาโนบนเยื่อไขมันสองชั้น

1. ศึกษาการเคลื่อนที่ของอนุภาคระดับนาโนบนเยื่อไขมันสองชั้นที่อุณหภูมิคงที่
  - 1.1) ตรวจวัดสารแขวนลอยของไลโปโซมและอนุภาคพอลิสไตรีนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที
2. ศึกษาผลของการเปลี่ยนอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่ของอนุภาคระดับนาโนบนเยื่อไขมันสองชั้น
  - 2.1) เพิ่มอุณหภูมิของสารแขวนลอยไลโปโซมและอนุภาคพอลิสไตรีนจากอุณหภูมิห้องเป็น 65 องศาเซลเซียส โดยใช้ thermo-control plate
  - 2.2) สังเกตการเคลื่อนที่ของอนุภาคพอลิสไตรีน
  - 2.3) ลดอุณหภูมิของสารแขวนลอยไลโปโซมและอนุภาคพอลิสไตรีนจาก 65 องศาเซลเซียส กลับไปยังอุณหภูมิห้อง โดยใช้ thermo-control plate
  - 2.4) สังเกตการเคลื่อนที่ของอนุภาคพอลิสไตรีน

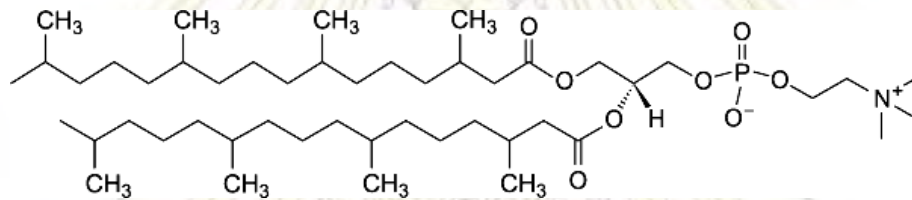
ภาควิชาเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### บทที่ 3

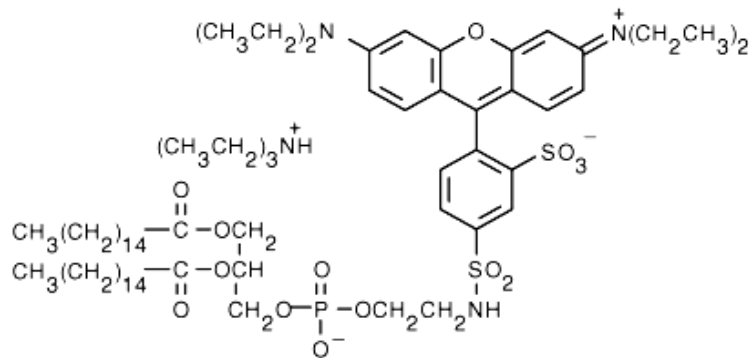
#### ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

#### 3.1 การเตรียมไลโปโซมเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ จากไขมันชนิด 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DiphyPC) โดยวิธีไฮเดรชัน

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยสร้างแบบจำลองของเซลล์โดยการสร้างไลโปโซม เนื่องจากไลโปโซมมีสมบัติแอมฟิพาติก คือมีส่วนที่ชอบน้ำและส่วนที่ไม่ชอบน้ำ เมื่อรวมกับน้ำจึงจัดเรียงตัวในลักษณะเยื่อสองชั้นเช่นเดียวกับเยื่อหุ้มเซลล์ โดยสร้างไลโปโซมด้วยวิธีไฮเดรชัน จากไขมันชนิด 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DiphyPC) ซึ่งเป็นไขมันชนิดอิ่มตัว, สารละลายกลูโคส, สารละลาย Rhodamine B 1, 2-Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine (Rhodamine-DHPE) จากนั้นทำการเติมน้ำซึ่งเป็นสารละลายตัวกลางลงไป



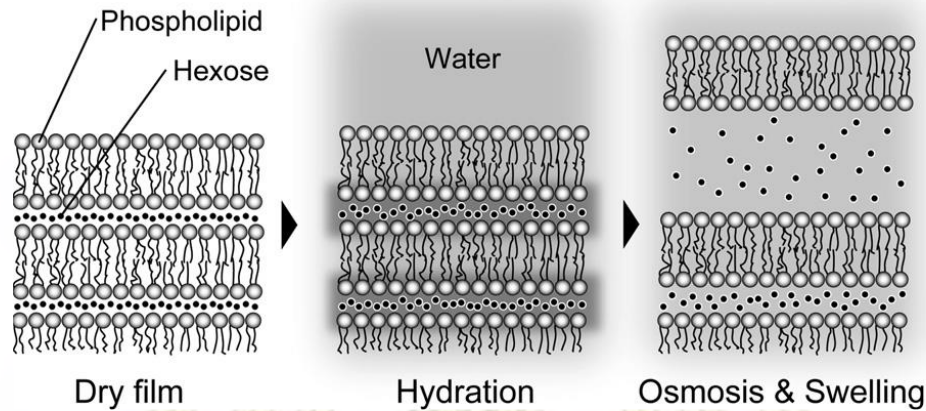
รูปที่ 3.1 โครงสร้างของไขมันอิ่มตัวชนิด 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DiphyPC)



รูปที่ 3.2 โครงสร้างของสารละลาย Rhodamine B 1,2-Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine (Rhodamine-DHPE)

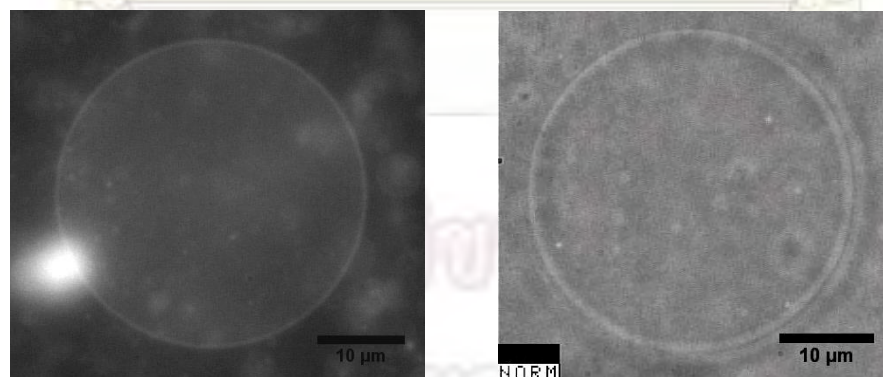


การใส่สารละลายกลูโคสในขั้นตอนการสร้างฟิล์มไขมันช่วยให้เกิดไลโปโซมชนิด unilamella ได้ดี ขึ้นเนื่องจากโมเลกุลน้ำตาลแทรกอยู่ระหว่างชั้นของเยื่อไขมันสองชั้น เมื่อไฮเดรตด้วยน้ำ โมเลกุลน้ำจะเข้าแทรกระหว่างชั้นของเยื่อไขมันสองชั้นและละลายโมเลกุลน้ำตาลทำให้ตัวถูกละลายมีความเข้มข้นสูงขึ้น ซึ่งความเข้มข้นสูง ของตัวถูกละลายจะส่งผลให้แรงผลักดันระหว่างเยื่อไขมันสองชั้นมากพอที่จะเกิดเป็นได้ไลโปโซมที่มี ลักษณะเป็น Giant unilamellar vesicles (GUV) ได้



รูปที่ 3.3 แผนภาพแสดงการขยายตัวของไลโปโซมที่บรรจุน้ำตาลและไฮเดรตด้วยน้ำ สารละลายกลูโคสทำให้ตัวถูกละลายมีความเข้มข้นสูงขึ้น ซึ่งจะทำให้แรงผลักดันระหว่างเยื่อไขมันสองชั้นมากพอที่จะทำให้แต่ละชั้นของ เยื่อไขมันสองชั้นแยกตัวออกจากกันได้ดีขึ้น<sup>9</sup>

สารละลาย Rhodamine-DHPE เป็นสีฟลูออเรสเซนต์ซึ่งมีทั้งส่วนที่มีขั้วและส่วนที่ไม่มีขั้วมี ลักษณะเช่นเดียวกับไขมัน จึงทำให้ Rhodamine-DHPE สามารถเข้าแทรกในชั้นไขมันในไลโปโซมได้ ทำให้เห็นสีของไลโปโซมและสังเกตไลโปโซมได้ง่ายเมื่อตรวจวัดด้วยกล้องจุลทรรศน์ในโหมด fluorescence

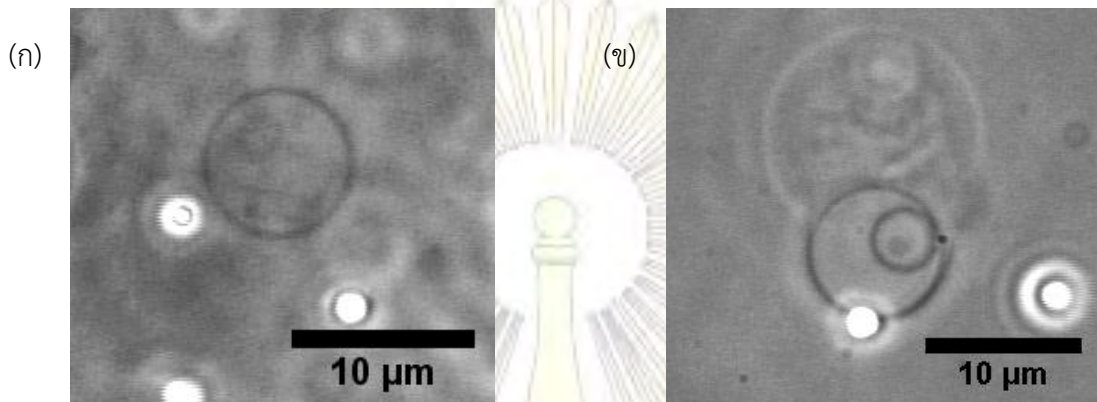


รูปที่ 3.4 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด Inverted Microscope ในโหมด fluorescence และ phase contrast ตามลำดับ แสดงลักษณะและขนาดของไลโปโซมที่สร้างได้จากวิธีไฮเดรชัน

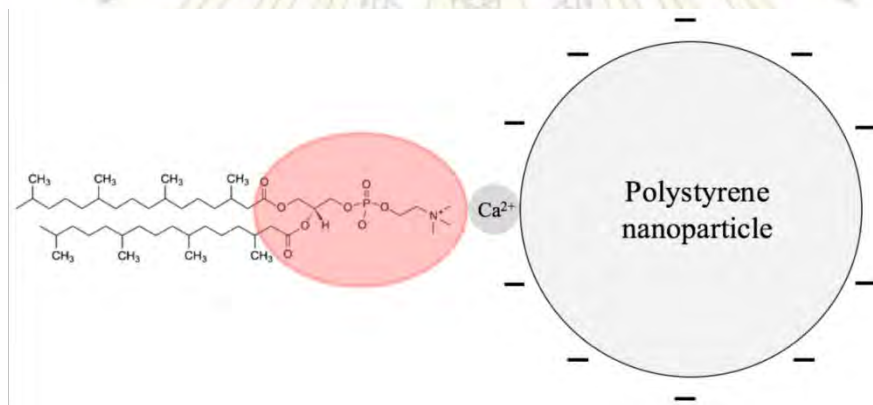
### 3.2 การติดอนุภาคพอลิไตรีนบนไลโปโซม



### 3.2.1 ศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการติดอนุภาค



รูปที่ 3.5 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด Inverted Microscope ภาพ (ก) โลโปโซมผสมกับอนุภาคพอลิสไตรีน แสดงลักษณะของอนุภาคพอลิสไตรีนที่ไม่เกาะติดบนผิวโลโปโซม ภาพ (ข) แสดงการเกาะติดของอนุภาคพอลิสไตรีนบนโลโปโซมเมื่อใช้โลโปโซมผสมกับอนุภาคพอลิสไตรีนและสารละลายของแคลเซียม



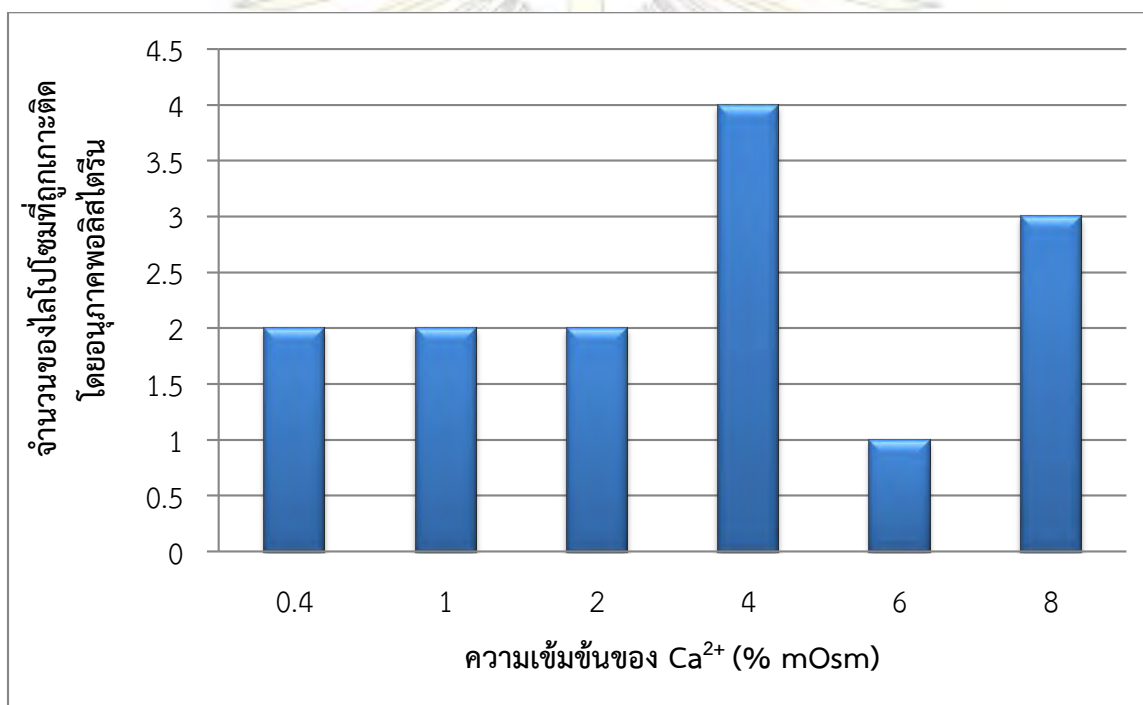
รูปที่ 3.6 ภาพจำลองการติดอนุภาคพอลิสไตรีนบนโลโปโซมโดยใช้สารละลายแคลเซียมไอออน

การเกาะติดของอนุภาคบนโลโปโซมสังเกตโดยอนุภาคที่เกาะติดบนโลโปโซมจะมีการเคลื่อนที่แบบบราวน์ (Brownian motion) ช้ากว่าอนุภาคที่อยู่ในสารละลาย และอนุภาคจะเกาะติดที่โลโปโซมตลอดเวลา ไม่หลุดออกจากผิวโลโปโซม พบว่าเงื่อนไขที่อนุภาคพอลิสไตรีนสามารถเกาะติดบนโลโปโซมเมื่อใช้สารละลายของแคลเซียม ช่วย นำจะมาจาก การที่หมู่ฟอสเฟตในโมเลกุลไขมันทำให้โลโปโซมมีผิวที่มีความเป็นลบ และอนุภาคพอลิสไตรีนมีความ เป็นลบ เช่นกัน จึงเกิดแรงระหว่างประจุไฟฟ้าผลักกัน ยากต่อการเกาะติดของอนุภาคบนโลโปโซมดังนั้นการใส่สารละลาย แคลเซียมซึ่งมีประจุเป็นบวกและเป็นไดวาเลนต์ไอออนจะช่วยทำตัวเป็นสะพานเชื่อมระหว่างโลโปโซมและอนุภาค

คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 3.2.2 ศึกษาหาปัจจัยที่ดีที่สุดในการติดอนุภาคโดยการเปลี่ยนปริมาณของสารละลายแคลเซียม

จากการศึกษาในตอนที่แล้วทำให้ทราบว่าสารละลายแคลเซียมสามารถช่วยให้เกิดการเกาะติดของอนุภาค พอลิस्टาไร์บนไลโปโซมที่สร้างจากวิธีไฮดรเจนได้ แต่การใส่สารละลายแคลเซียมไปในสารแขวนลอยของไลโปโซม และอนุภาคพอลิस्टาไร์นั้นจะมีผลต่อขนาดของไลโปโซมคือทำให้ไลโปโซมมีขนาดเล็กลงเนื่องมาจากผลของความดัน ผู้วิจัยจึงศึกษาหาปริมาณที่เหมาะสมของแคลเซียมที่ใช้ในการเกาะติดของอนุภาค โดยใช้แคลเซียม 0.4, 1, 2, 4, 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์มิลลิออสโมล (% mOsm) ตามลำดับ

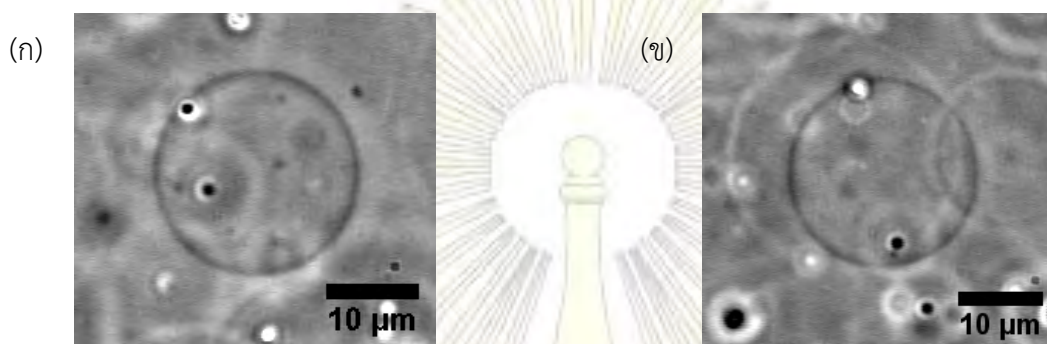


กราฟที่ 3.1 การสำรวจจำนวนของไลโปโซมที่ถูกเกาะติดโดยอนุภาคพอลิस्टาไร์ เมื่อใช้แคลเซียมที่มีความเข้มข้น 0.4, 1, 2, 4, 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์มิลลิออสโมล (% mOsm)

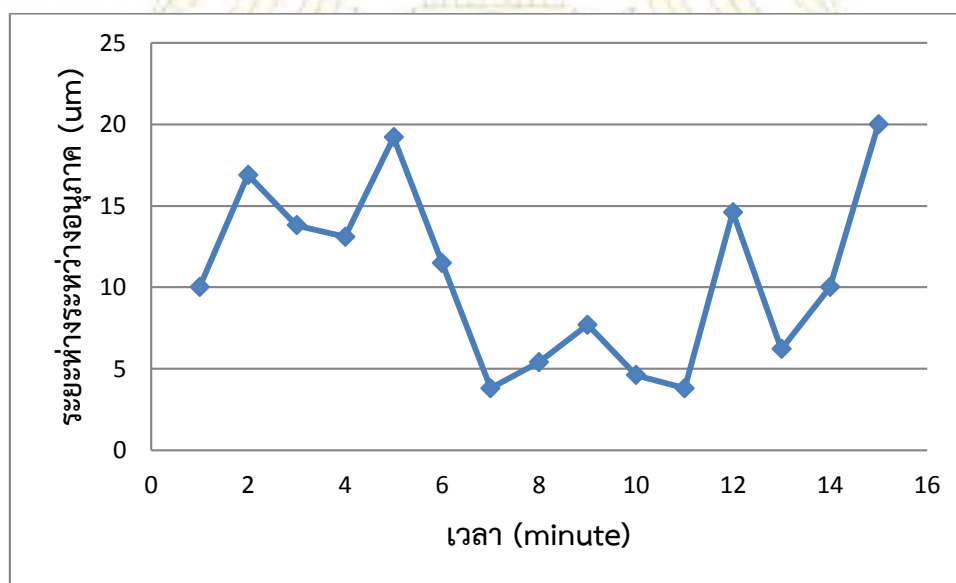
จากผลในการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าที่แคลเซียมเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์มิลลิออสโมล อนุภาคที่เกาะติดบนไลโปโซมมีมากกว่าที่ความเข้มข้นอื่นๆ และยังเป็นความเข้มข้นที่สามารถสังเกตไลโปโซมได้ โดยที่ขนาดไลโปโซมไม่เล็กลงมากนักและการเกาะติดกันเองของอนุภาคพอลิस्टาไร์น้อยกว่ามากเมื่อเทียบกับที่ความเข้มข้นแคลเซียม 6, 8 เปอร์เซ็นต์มิลลิออสโมลผู้วิจัยจึงเลือกใช้เงื่อนไขที่ปริมาณแคลเซียม 4 เปอร์เซ็นต์มิลลิออสโมล

### 3.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่ของอนุภาคระดับนาโนบนเยื่อไขมันสองชั้น

1) การทำคอนโทรลโดยศึกษาการเคลื่อนที่ของอนุภาคระดับนาโนบนเยื่อไขมันสองชั้นที่อุณหภูมิห้อง



รูปที่ 3.7 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด Inverted Microscope ภาพ (ก) แสดงอนุภาคบนไลโปโซมที่อุณหภูมิห้องขณะเริ่มต้นสังเกต, ภาพ (ข) แสดงอนุภาคบนไลโปโซมที่อุณหภูมิห้องหลังจากเวลาผ่านไป 15 นาที



กราฟที่ 3.2 แสดงระยะห่างระหว่างสองอนุภาคเมื่อทำการสังเกตที่อุณหภูมิห้อง (20.2°C) เป็นเวลา 15 นาที

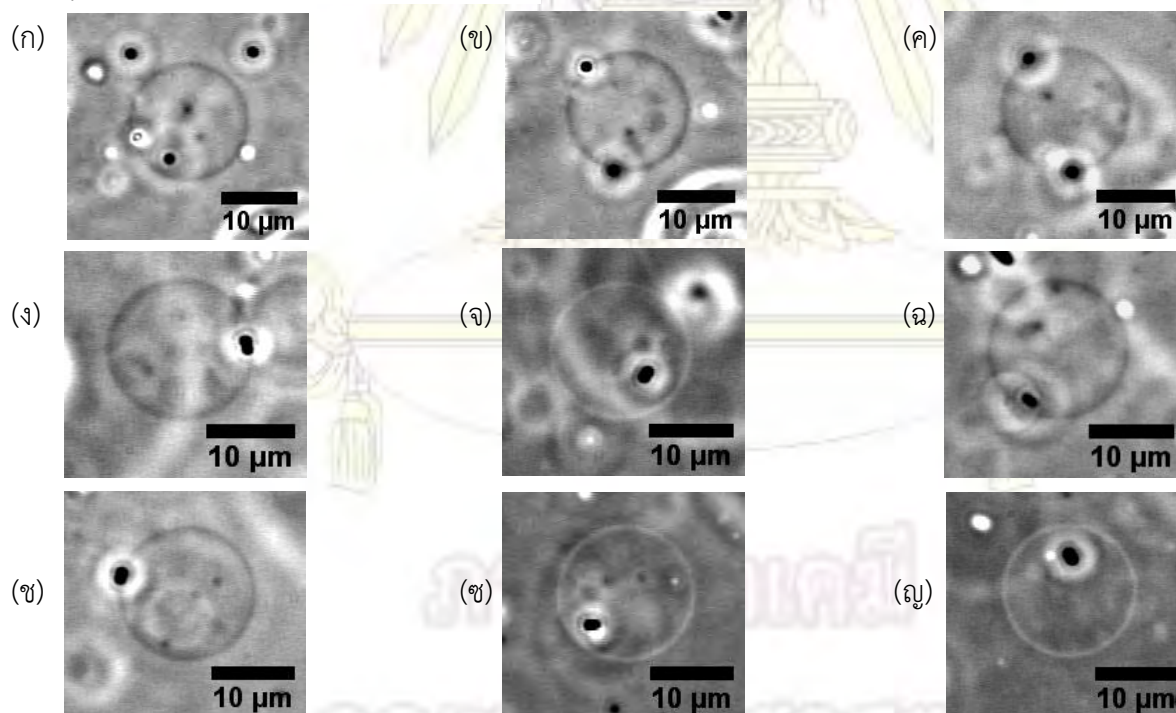
จากการทำคอนโทรลที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาทีพบว่าอนุภาคมีการเคลื่อนที่บนผิวของไลโปโซมอย่างอิสระ โดยไม่มีแนวโน้มของการเคลื่อนที่ที่แน่นอน

2) ศึกษาผลของการเปลี่ยนอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่ของอนุภาคระดับนาโนบนเยื่อไขมันสองชั้น

ในการทดลองนี้ใช้ thermo-control plate ควบคุมอุณหภูมิของสารแขวนลอยไลโปโซมผสมอนุภาคพอลิสไตรีน

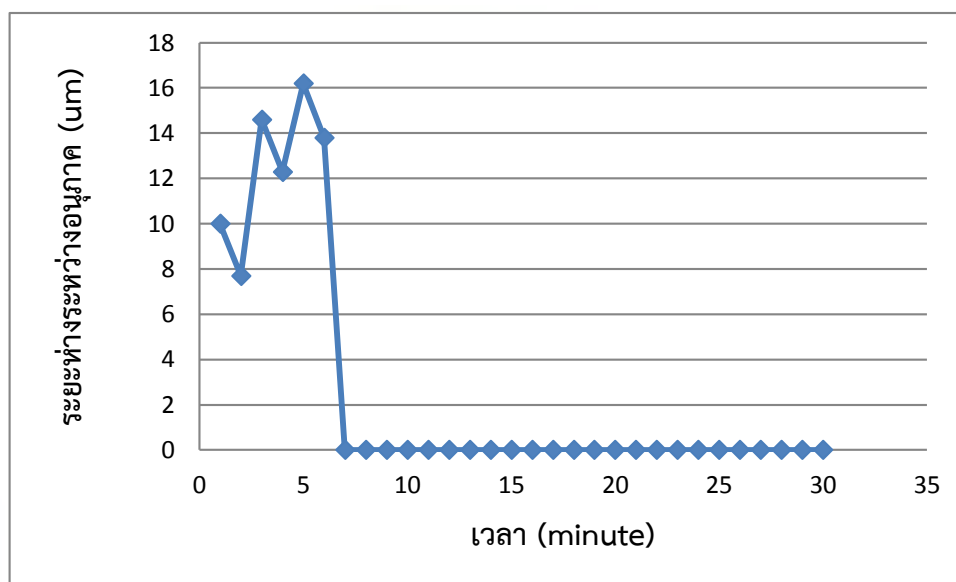
อุณหภูมิของสารแขวนลอย	เวลาที่ใช้
21.8 (อุณหภูมิห้อง)	0
35	1.58
50	4.10
60	6.54
65	9.10
60	11.34
50	16.14
35	20.48
22.4 (อุณหภูมิห้อง)	28.44

ตารางที่ 3.1 แสดงเวลาที่ใช้ในการเพิ่มอุณหภูมิของสารแขวนลอยไลโปโซมผสมอนุภาคพอลิสไตรีนจากโปรแกรม Temperature Management Software TEM



รูปที่ 3.8 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด Inverted Microscope แสดงอนุภาคบนไลโปโซมที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆดังนี้ ภาพ (ก) ที่อุณหภูมิห้อง (21.8°C) นาทีที่ 0, ภาพ (ข) 35°C นาทีที่ 1.58, ภาพ (ค) 50°C นาทีที่ 4.10, ภาพ (ง) 60°C นาทีที่ 6.54, ภาพ (จ) 65°C นาทีที่ 9.10, ภาพ (ฉ) 60°C นาทีที่ 11.34, ภาพ (ช) 50°C นาทีที่ 16.14, ภาพ (ซ) 35°C นาทีที่ 20.48, ภาพ (ญ) ที่อุณหภูมิห้อง (22.4°C) นาทีที่ 28.44

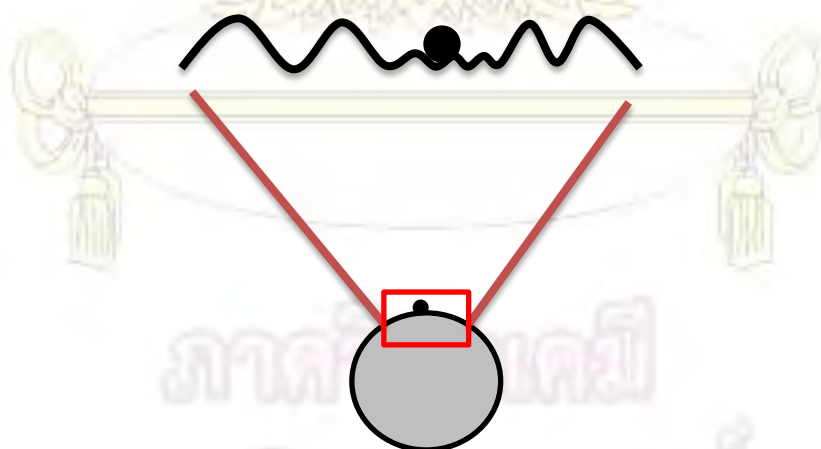




กราฟที่ 3.3 แสดงระยะห่างระหว่างสองอนุภาคเมื่อทำการเพิ่มอุณหภูมิจากอุณหภูมิห้อง ( $21.8^{\circ}\text{C}$ ) เป็น  $65^{\circ}\text{C}$  และลดอุณหภูมิจาก  $65^{\circ}\text{C}$  กลับสู่อุณหภูมิห้อง ( $22.4^{\circ}\text{C}$ ) ที่เวลาต่างๆ

จากผลการทดลองผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่ของอนุภาคบนไลโปโซมข้างต้นพบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิอนุภาคเริ่มเข้ามาเกาะติดกันที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ไปจนถึง 65 องศาเซลเซียส และเมื่อลดอุณหภูมิกลับสู่อุณหภูมิห้อง อนุภาคทั้งสองยังคงแสดงพฤติกรรมเกาะติดกันดังเดิม

จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นผู้วิจัยคาดว่าผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่ของอนุภาคบนเยื่อไขมันสองชั้นเกิดจากเหตุผลดังต่อไปนี้

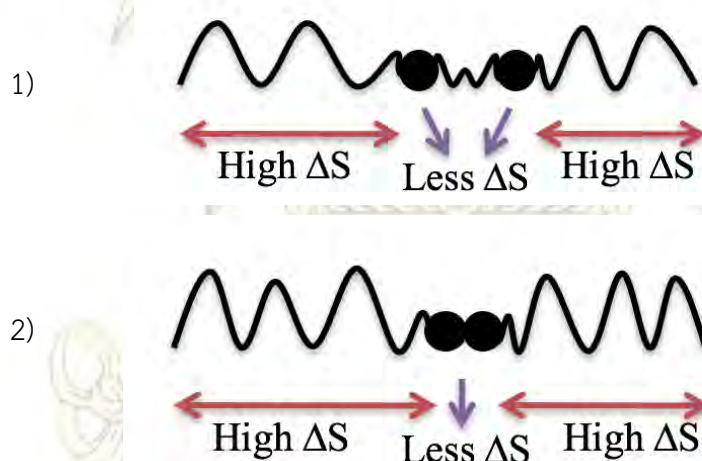


รูปที่ 3.9 ภาพจำลองการสั่นของเยื่อไขมันสองชั้นที่มีอนุภาคเกาะติดบนผิวเมื่อให้ความร้อน

โดยปกติเยื่อสองชั้นจะสามารถสั่นได้อย่างอิสระจึงทำให้มีความไม่เป็นระเบียบของระบบสูง แต่ในงานวิจัยนี้มีการติดอนุภาคลงบนไลโปโซมจึงทำให้เยื่อสองชั้นบริเวณที่ถูกอนุภาคเกาะติดสั่นได้น้อยลง ส่งผลให้ความไม่เป็นระเบียบของระบบลดลงด้วย เมื่อพิจารณาจากสมการ  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$  เทอม  $T\Delta S$  จึงมีค่าลดลง แต่การที่อนุภาคมาเกาะติดบน

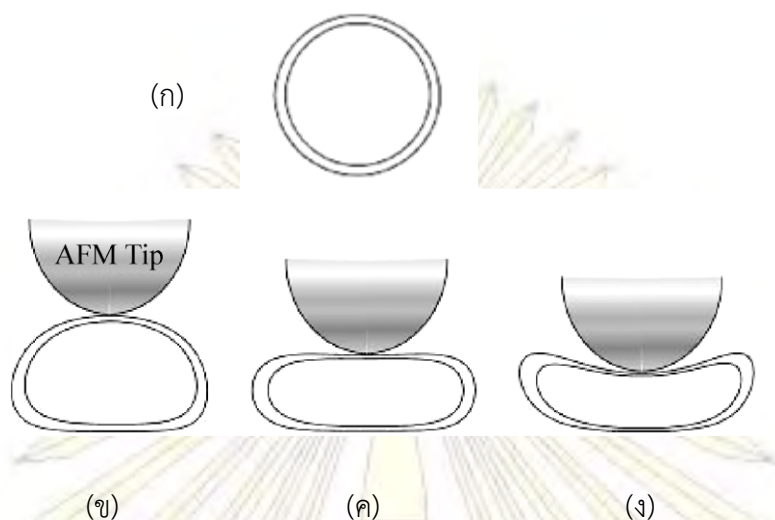
เยื่อไขมันสองชั้นจะมีการคายพลังงานออกมาทำให้เอนทาลปี ( $\Delta H$  (enthalpy)) เป็นลบมากขึ้น จึงส่งผลให้  $\Delta G$  ของระบบ มีความเป็นลบด้วย

เมื่อให้ความร้อนต่อสารแขวนลอยของไลโปโซมและอนุภาคพอลิสไตรีนจะมี 2 กรณีที่เกิดขึ้นได้คือ กรณีที่ 1) อนุภาคทั้งสองบนเยื่อไขมันสองชั้นอยู่แยกกัน และกรณีที่ 2) อนุภาคทั้งสองบนเยื่อไขมันสองชั้นเคลื่อนมาเกาะติดกัน (aggregate) เมื่อพิจารณาจากพื้นที่ของเยื่อสองชั้นที่มีอนุภาคมาเกาะติดพบว่า กรณีที่ 1) อนุภาคอยู่แยกกันจะมีพื้นที่ที่อนุภาคเกาะติดมากกว่ากรณีที่ 2) ที่อนุภาคทั้งสองมาเกาะติดกันเนื่องจากอนุภาคจะซ้อนกันเล็กน้อย ดังนั้นกรณีที่ 2) จึงมีบริเวณของเยื่อไขมันสองชั้นที่สามารถสันได้ยิ่งยวดมากกว่า คือมีความไม่เป็นระเบียบของเยื่อไขมันสองชั้นมากกว่ากรณีที่ 1) จึงส่งผลให้ความไม่เป็นระเบียบของระบบมากกว่ากรณีที่ 1) ด้วย และจากสมการ  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$  ปฏิกิริยาจะเกิดได้เมื่อ  $\Delta G$  มีความเป็นลบ ในกรณีที่ 2) เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ความไม่เป็นระเบียบของระบบมากกว่า ทำให้เอนทาลปี  $T\Delta S$  เป็นลบมากขึ้น จึงยังส่งผลให้  $\Delta G$  ของระบบมีความเป็นลบมากขึ้นด้วยถึงแม้ว่าเอนทาลปี  $\Delta H$  จะลดลงเนื่องจากเมื่ออนุภาคมาติดกันเองจึงทำให้บริเวณที่อนุภาคเกาะติดกับเยื่อไขมันสองชั้นน้อยลงก็ตาม จากเหตุผลข้างต้นจึงส่งผลทำให้เมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้กับระบบอนุภาคจึงเคลื่อนที่มาเกาะติดกันเอง



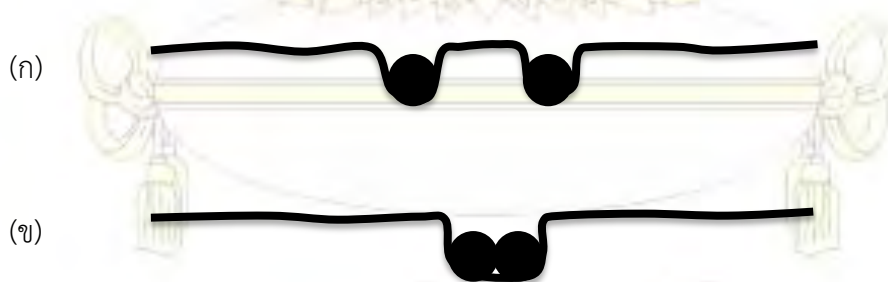
รูปที่ 3.10 ภาพจำลองการเคลื่อนที่ของอนุภาคบนเยื่อไขมันสองชั้นเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

แต่ในส่วนของการลดอุณหภูมิกลับไปยังอุณหภูมิห้อง พบว่าผลการทดลองไม่เป็นไปตามสมการดังกล่าว คือ อนุภาคยังคงเกาะติดกัน ซึ่งผลการทดลองในส่วนนี้น่าจะเป็นผลมาจากรอยแหว่งที่เกิดขึ้นเมื่อมีอนุภาคมาเกาะติด บนเยื่อไขมันสองชั้น โดยในงานวิจัยก่อนหน้านี้ Mao และคณะ<sup>10</sup> ได้ศึกษาเกี่ยวกับการวัดแรงที่เกิดบนไลโปโซมเมื่อใช้ Atomic Force Microscopy (AFM) และพบว่าไลโปโซมสามารถเกิดรอยแหว่งขึ้นได้ตามแรงที่กดลงบนไลโปโซม



รูปที่ 3.11 ภาพแสดงการเปลี่ยนรูปร่างของไลโปโซมเมื่อถูกกดด้วย AFM Tip (ก) รูปร่างของไลโปโซมในสารละลาย (ข) แสดงรูปร่างของไลโปโซมเมื่อกดด้วยแรงน้อยที่สุด (ค) แสดงรูปร่างของไลโปโซมเมื่อกดด้วยแรงปานกลาง (ง) แสดงรูปร่างของไลโปโซมเมื่อกดด้วยแรงมากที่สุด<sup>10</sup>

ผู้วิจัยจึงคาดว่า การที่อนุภาคติดบนไลโปโซม อนุภาคนั้นก็จะทำให้ไลโปโซมเกิดรอยเว้าขึ้นมาได้เช่นกัน โดยเมื่ออนุภาคเคลื่อนที่มาติดกันเองแล้วรอยเว้าจะมีขนาดที่กว้างกว่าตอนที่อนุภาคอยู่แยกกันในตอนแรก ประกอบกับเมื่อลดอุณหภูมิเยื่อไขมันสองชั้นจะสั้นได้น้อยลงอีกด้วย จึงทำให้รอยเว้าขนาดใหญ่ที่เกิดขึ้นนั้น สามารถจับอนุภาคทั้งสองไว้ทำให้อนุภาคไม่แยกออกจากกัน



รูปที่ 3.12 ภาพจำลองรอยเว้าบนเยื่อไขมันสองชั้นเมื่ออนุภาคมาเกาะติด(ก) แสดงรอยเว้าบนเยื่อไขมันสองชั้น ที่เกิดขึ้นจากการที่อนุภาคมาเกาะบนเยื่อไขมันสองชั้นในขณะที่อนุภาคอยู่แยกกัน (ข) แสดงรอยเว้าขนาดใหญ่ขึ้น บนเยื่อไขมันสองชั้นที่เกิดขึ้นเมื่ออนุภาคมาเกาะกัน

## บทที่ 4

### สรุปผลการทดลอง

#### จากผลการทดลองสรุปได้ว่า

- 1) การศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการติดอนุภาค พบว่าการใช้สารละลายแคลเซียมสามารถทำให้อนุภาคพอลิस्टาไร์นเกาะติดบนไลโปโซมที่สร้างโดยวิธีไฮดรเจนได้
- 2) การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่ของอนุภาคระดับนาโนบนเยื่อไขมันสองชั้น พบว่าที่อุณหภูมิห้องอนุภาคพอลิस्टาไร์นไม่เกาะติดกันและสามารถเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระ แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิอนุภาคพอลิस्टาไร์นได้เคลื่อนที่มากเกาะติดกัน จึงสรุปได้ว่าอุณหภูมิมิมีผลต่อการเคลื่อนที่ของอนุภาคระดับนาโนบนเยื่อไขมันสองชั้น



ภาควิชาเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## เอกสารอ้างอิง

1. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. Molecular biology of the cell. 5<sup>th</sup> ed. Garland Science. **2007**.
2. Hammond, A. T.; Heberle, F. A.; Baumgart, T.; Holowka, D.; Baird, B.; Feigenson, G. W. Crosslinking a lipid raft component triggers liquid ordered–liquid disordered phase separation in model plasma membranes. *PNAS*. **2005**, *102*, 6320–6325.
3. Liu, A. P.; Fletcher, D. A. Actin polymerization serves as a membrane domain switch in model lipid bilayers. *Biophys. J.* **2006**, *91*, 4064–4070.
4. Tsutomu, H.; Ryoko, S.; Takeshi, N.; Masahiro, T. Photochemical control of membrane raft organization. *Soft Matter*, **2011**, *7*, 220–224.
5. Tsuyoshi, Y.; Vestergaard, M. C.; Tsutomu, H.; Minh Le, P.T.; Takagi, M. Thermo-induced vesicular dynamics of membranes containing cholesterol derivatives. *Lipids*. **2012**, *47*, 813–820.
6. Swaay, D. V.; DeMello, A.; Microfluidic methods for forming liposomes. *Lab Chip*, **2013**, *13*, 752–767.
7. Laouini, A.; Maalej, C. J.; Blouza, I. L.; Sfar, S.; Charcosset, C.; Fessi, H. Preparation, characterization and applications of liposomes: State of the Art. *J. Colloid Sci. Biotechnol.* **2012**, *1*, 147–168
8. Dua, J.S.; Rana, A. C.; Bhandari, A. K. Liposome: Methods of preparation and applications. *IJPSR*. **2012**, *3*, 14-20.
9. Tsumoto, K.; Matsuo, H.; Tomita, M.; Yoshimura, T. Efficient formation of giant liposomes through the gentle hydration of phosphatidylcholine films doped with sugar. *Colloids Surf B Biointerfaces*. **2009**. *68*. 98–105.
10. Mao, G.; Liang, Xuemei.; Simon Ng, K.Y. Direct Force Measurement of Liposomes by Atomic Force Microscopy. **2004**. DOI: 10.1081/E-ENN 120014209

## ประวัติผู้วิจัย

นางสาวภัทรวรรณ ไชยเสวี เกิดเมื่อวันที่ 4 เดือนตุลาคม พ.ศ. 2536 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษา  
 ชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย แผนการเรียนวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ จากโรงเรียนวัดราชาธิวาส จังหวัดกรุงเทพมหานคร  
 เมื่อปีการศึกษา 2554 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์  
 มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2555 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 424/692 แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี จังหวัด  
 กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10400 อีเมล phattarawan.jayasevi@gmail.com



ภาควิชาเคมี  
 คณะวิทยาศาสตร์  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย