



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาระบบนำส่งระดับนาโนบรรจุตัวยาฟูราโซลิโดนไปสู่เซลล์มะเร็ง
Development nano-carrier containing furazolidone for delivery
to cancer cell

วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2561A10803008

สัญญาเลขที่ 97/2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาระบบนำส่งระดับนาโนบรรจุตัวยาฟูราโซลิโดนไปสู่เซลล์มะเร็ง
Development nano-carrier containing furazolidone for delivery
to cancer cell

วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

21 กุมภาพันธ์ 2563

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 97/2561

ขอขอบพระคุณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่อำนวยความสะดวกในด้านเครื่องมือในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ นางสาว ศุภลักษณ์แก่นยิ่ง และ นางสาว พนิดนันท์ พรหมจันทร์ ผู้ช่วยวิจัยที่ช่วยในส่วนของการทำงานทดลองปฏิบัติการวิจัยอย่างเรียบร้อย

คณะผู้วิจัย

21 กุมภาพันธ์ 2563

บทคัดย่อ

ระบบนำส่งยาอนุภาคนาโนเป็นกลยุทธ์สำคัญในการเพิ่มความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งร่วมกับเทคนิคการเพิ่มการละลายจะช่วยเพิ่มการนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งมากยิ่งขึ้นและยังลดปัญหาความไม่คงตัวของยา โดยงานวิจัยมีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาระบบนำส่งยาโดยใช้เทคนิค micellar solubilization ที่เตรียม polymeric micelle โดยใช้ poloxamer407 ร่วมกับ CTAB หรือ lecithin ที่มียา furazolidone เพื่อให้นำส่งไปยังเซลล์มะเร็งด้วยวิธี thin-film hydration method โดยตำรับที่เตรียมได้แต่ละสูตรจะนำมาเปรียบเทียบผลของประจุบนพื้นผิวของการใช้สารลดแรงตึงผิวรวมทั้ง 2 ชนิด โดยพิจารณาลักษณะทางกายภาพ ขนาด การกระจายตัวของอนุภาค และความสามารถในการกักเก็บยา พบว่าตำรับประจุบวกและประจุลบที่เหมาะสมที่สุดคือ poloxamer407 : CTAB ที่อัตราส่วน 10:1 มีขนาดอนุภาค 307.14 ± 62.01 nm zeta potential เท่ากับ 22.36 ± 7.97 และสามารถกักเก็บตัวยາได้ถึง 92.26 ± 1.49 และ poloxamer407 : lecithin ที่อัตราส่วน 50:1 มีขนาดอนุภาค 311.42 ± 32.42 nm zeta potential เท่ากับ -22.34 ± 1.31 และสามารถกักเก็บตัวยาได้ถึง 87.47 ± 3.14 เมื่อนำตำรับที่คัดเลือกนั้นมาทดสอบความสามารถในการนำส่งเข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง ผลการศึกษาพบว่าสูตร poloxamer407 : CTAB (10:1) ที่มียา furazolidone สามารถเพิ่มการนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งและการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุด โดยสรุปแล้ว polymeric micelle ที่มีประจุบวกนั้นสามารถนำมาพัฒนาเพื่อใช้เป็นระบบนำส่งยาต่อไปได้ในอนาคต

Abstract

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

สารบัญ

หน้า

บทที่ 1	1
บทที่ 2	5
บทที่ 3	23
บทที่ 4	29
บทที่ 5	54
บทที่ 6	56

บทที่ 1

บทนำ

โรคมะเร็งเป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตในประเทศไทย ซึ่งมะเร็งเต้านมเป็นสาเหตุของการเจ็บป่วยที่สำคัญทั้งในประชากรไทยและทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศกำลังพัฒนา รวมทั้งประเทศไทย พบอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งเต้านมเพิ่มสูงขึ้นเป็นอันดับแรกมากกว่ามะเร็งปากมดลูกมาเกือบสิบปี ในแต่ละปีมีผู้ป่วยมะเร็งเต้านมทั้งรายใหม่และรายเก่าที่ได้รับการรักษาตามระบบสาธารณสุขเป็นจำนวนมาก ถือได้ว่าเป็นปัญหาที่สำคัญของสาธารณสุขไทยและทั่วโลก จากข้อมูลระบาดวิทยาในประเทศไทย สหรัฐอเมริกาปี พ.ศ.2557 พบว่ามีผู้ป่วยมะเร็งเต้านมรายใหม่ประมาณ 232,670 คน⁽¹⁾ จากข้อมูลสถาบันมะเร็งแห่งชาติประเทศไทยในปี พ.ศ.2558 พบว่ามะเร็งเต้านมมีอุบัติการณ์มากที่สุด รองลงมาคือ มะเร็งลำไส้ใหญ่ และ มะเร็งตับ ตามลำดับ⁽²⁾ โดยแนวทางการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งในปัจจุบันมีหลายวิธีด้วยกัน เช่น การผ่าตัด รังสีรักษา และการใช้ยาเคมีบำบัดในการต้านเซลล์มะเร็ง⁽³⁾ ในปัจจุบันมีการพัฒนาหาสารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งมะเร็งหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นพืชสมุนไพร หรือสารสำคัญ ที่ได้จากการสังเคราะห์ ซึ่งหนึ่งในที่ได้รับความสนใจคือ ยา ยาฟูราโซลิโดน (Furazolidone) ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะ ออกฤทธิ์ครอบคลุม ทั้งเชื้อแกรมบวก แกรมลบ และโปรโตซัว เช่น E. coli, staphylococci, Salmonella, Shigella, Proteus, Aerobacter aerogenes, Vibrio cholerae และ Giardia lamblia โดยมีกลไกการออกฤทธิ์จับกับสายดีเอ็นเอของแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถสร้างสายดีเอ็นเอรวมถึงสร้างโปรตีนได้ นอกจากนี้มีงานวิจัยรายงานการทดสอบการนำยา furazolidone มาทดสอบกับเซลล์มะเร็งเบื้องต้นพบรายงานว่า มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ อย่างไรก็ตามด้วยยา furazolidone มีค่าการละลายที่ต่ำทำให้การนำส่งยา furazolidone ไปสู่เซลล์มะเร็งหรือประยุกต์ใช้เป็นสูตรตำรับสามารถทำได้ยาก เนื่องจากค่าการละลายส่งผลโดยตรงต่อการดูดซึมและการพาสาร์เข้าไปยังอวัยวะเป้าหมาย โดยงานวิจัยนี้ให้ความสนใจในเรื่องของการพัฒนาระบบนำส่งยาระดับนาโนให้กับยา furazolidone เพื่อเพิ่มค่าการละลายและเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง ในปัจจุบันการเก็บข้อมูลเชิงเอกสารสนเทศมีบทบาทสำคัญเนื่องจากสามารถเก็บข้อมูลและเข้าถึงแหล่งข้อมูลได้ง่าย ทำให้ผู้มีความสนใจสามารถเข้ามาศึกษาเพิ่มเติม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีการเก็บข้อมูลการพัฒนาอนุภาคนาโนที่กักเก็บยา furazolidone และศึกษาการเปลี่ยนแปลงของลักษณะเซลล์ที่มีการพาสาร์เข้าเซลล์โดยทำในรูปแบบของภาพถ่ายและข้อมูลเชิงปริมาณเพื่อเก็บเข้าระบบเอกสารสนเทศสำหรับการพัฒนาและประเมินการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในงานวิจัยหรือการทดสอบที่วิเคราะห์ผลเช่นเดียวกันในอนาคต โรคมะเร็งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับต้นๆของคน

ทั่วโลก องค์การอนามัยโลกพบว่าในปี พ.ศ. 2555 มีผู้ป่วยรายใหม่จำนวน 14 ล้านคน และในปี พ.ศ. 2558 มีผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งราว 8.8 ล้านคน ซึ่งจำนวนผู้เสียชีวิตพบได้มากกว่าการเสียชีวิตด้วยโรคเอดส์ วัณโรค และมาลาเรียรวมกัน โรคมะเร็งที่เป็นสาเหตุการตาย 5 อันดับแรกของโลก ได้แก่ มะเร็งปอด 1.69 ล้านราย มะเร็งตับ 788,000 ราย มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก 774,000 ราย มะเร็งกระเพาะอาหาร 754,000 ราย และมะเร็งเต้านม 571,000 คน⁽⁴⁾

ขณะเดียวกันสถาบันมะเร็งแห่งชาติได้แสดงข้อมูลผู้ป่วยโรคมะเร็งรายใหม่ที่มาใช้บริการตรวจวินิจฉัยและรักษาที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ในระหว่างวันที่ 1 มกราคม 2558 ถึง 31 ธันวาคม 2558 จำนวนผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่ที่มาใช้บริการทั้งหมด 3,439 คน พบว่ามะเร็งเต้านมมีอุบัติการณ์มากที่สุด 849 คน รองลงมาคือมะเร็งลำไส้ใหญ่ 406 คน มะเร็งตับ 378 คน ตามลำดับ และมะเร็งชนิดอื่น ๆ 1,806 คน⁽²⁾ และจากข้อมูลสำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ กระทรวงสาธารณสุขถึงสาเหตุการตายในข้อมูลมรณบัตรในปี พ.ศ. 2558 พบว่า สาเหตุการตายที่สำคัญได้แก่ มะเร็งทุกชนิด ปอดอักเสบ โรคหัวใจขาดเลือด และ อุบัติเหตุจากการคมนาคมขนส่งทางบก และเมื่อนำมาจำแนกตามกลุ่มโรคมะเร็งต่อประชากร 100,000 คน ประเทศไทย พ.ศ. 2554-2558 ได้แก่ มะเร็งตับ มะเร็งหลอดคอ หลอดลมใหญ่และปอด มะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งเต้านมหญิง และมะเร็งปากมดลูกตามลำดับ⁽⁵⁾

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

ยา furazolidone หรือชื่อสามัญคือ 3-(5'-Nitrofurfuralamino)-2-oxazolidone มีน้ำหนักโมเลกุล 225.15 g/mol เป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้สำหรับรักษาโรคท้องเสียจากการติดเชื้อ ด้วยกลไกของยาจะไปจับกับสาย DNA ทำให้รบกวนการแบ่งสาย DNA และการสร้างโปรตีนของแบคทีเรีย ของแบคทีเรียทำให้แบคทีเรียตายในที่สุด โดยออกฤทธิ์ครอบคลุม ทั้งเชื้อแกรมบวก แกรมลบ และโปรโตซัว เช่น E. coli, staphylococci, Salmonella, Shigella, Proteus, Aerobacter aerogenes, Vibrio cholerae และ Giardia lamblia การศึกษาวิจัยพบว่าตัวยา furazolidone มีคุณสมบัติเบื้องต้นเป็นยาต้านมะเร็งได้ โดยพบว่า สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งตับได้ โดยทำให้เซลล์มะเร็งตับเกิดการตายด้วยกลไก apoptosis นอกจากนี้ยังพบฤทธิ์ในการต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาว (Leukemia) อย่างไรก็ตามจากคุณสมบัติของตัวยา furazolidone ที่มีค่าการละลายเพียง 40 mg/lit และ log P = 0.15 ทำให้ตัวยา furazolidone มีค่าการละลายต่ำไม่ค่อยดูดซึม พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ได้ยากแต่อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าจะมีรายงานเกี่ยวกับประสิทธิภาพของ furazolidone ต่อเซลล์มะเร็ง ปัญหาที่สำคัญอย่างยิ่งของ furazolidone คือเรื่องการ

ละลายที่ค่อนข้างต่ำซึ่งการละลายนั้นจะส่งผลต่อชีวประสิทธิผลของยาในรูปแบบการรับประทานหรือส่งผลกระทบต่อเตรียมยาในรูปแบบการบริหารอย่างอื่น โดยถ้ายามีค่าการละลายที่ต่ำจะต้องใช้ขนาดยาที่มากขึ้นเพื่อให้ถึงระดับความเข้มข้นที่ใช้รักษาโรค ในปัจจุบันจึงมีการพัฒนาเทคนิคการเพิ่มการละลายมากมาย⁽¹¹⁾ เช่น micellar solubilization⁽¹²⁾ ซึ่งเป็นระบบที่เกิดจากการรวมตัวกันของอนุภาคระดับนาโนของแอมฟิฟิลิกโมเลกุลที่ประกอบไปด้วย 2 ส่วนคือส่วนที่ชอบน้ำจะเกิดเป็นเปลือกอยู่ด้านนอก ส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะเกิดเป็นโพรงอยู่ด้านใน⁽¹³⁾ ด้วยคุณสมบัติดังกล่าว ทำให้ช่วยเพิ่มการละลายของยาที่มีค่าการละลายน้ำต่ำ นอกจากนี้ยังควบคุมการปลดปล่อยของยา ช่วยขนส่งยาไปยังอวัยวะเป้าหมาย ทำให้มีประสิทธิภาพในการรักษามากขึ้น ลดความเป็นพิษจากการใช้ยาและป้องกันการทำลายจากกระบวนการสลายตัวและเมตาบอลิซึมในร่างกาย⁽¹⁴⁾ จากงานวิจัยของ Saxena และคณะได้มีการพัฒนาระบบนำส่งแบบไมเซลล์ ที่ประกอบไปด้วย poloxamers เพื่อนำส่งยาที่มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง ผลการศึกษาพบว่าระบบนำส่งแบบพอลิเมอริกไมเซลล์สามารถเพิ่มการนำเข้าของยาในเซลล์มะเร็งได้⁽⁷⁾ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาผลของประจุบนพื้นผิวพอลิเมอริกไมเซลล์ต่อการนำเข้าของยาไปยังเซลล์มะเร็ง พบว่าประจุมีผลต่อการนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง⁽¹⁵⁾

จากที่มาและความสำคัญที่กล่าวมาข้างต้น จึงได้ทำการศึกษาผลของประจุบนพื้นผิวพอลิเมอริกไมเซลล์ที่บรรจุยา furazolidone ต่อการนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านม

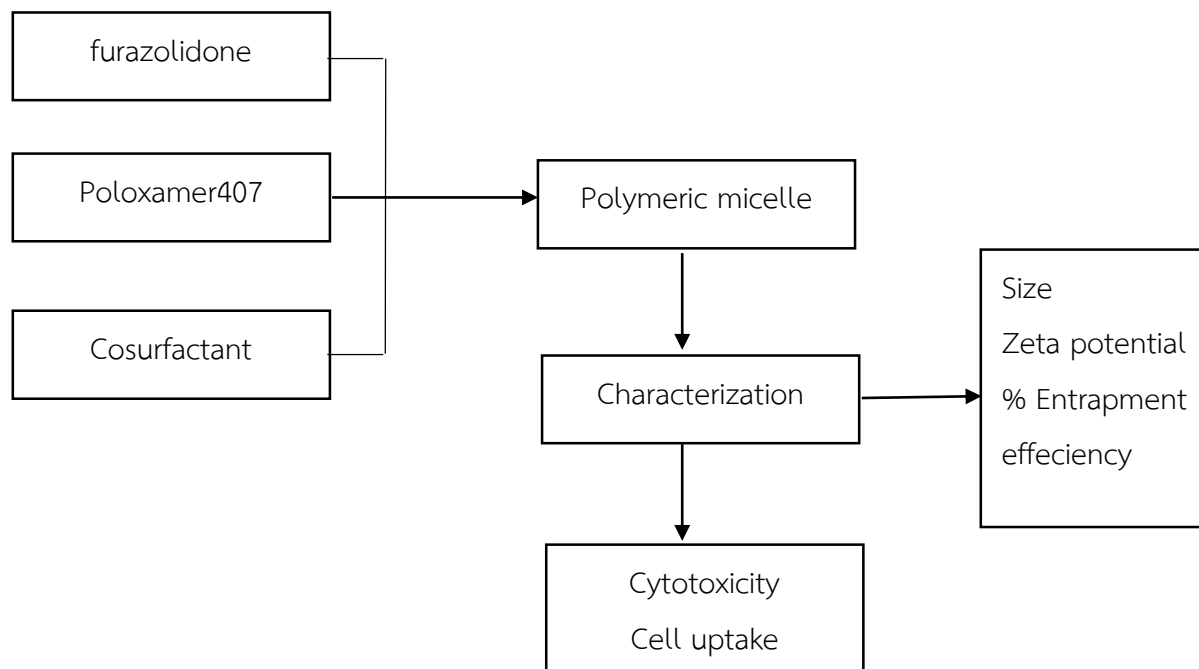
วัตถุประสงค์

1. เพื่อเปรียบเทียบผลของประจุบนพื้นผิวพอลิเมอริกไมเซลล์ ต่อการนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านม
2. พัฒนาระบบนำส่งยาในรูปแบบพอลิเมอริกไมเซลล์ที่มีส่วนประกอบ poloxamer และ co-surfactant

ขอบเขตงานวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้เพื่อศึกษาถึงระบบนำส่งพอลิเมอริกไมเซลล์เพื่อใช้เพิ่มค่าการละลายของตัวยาฟูราโซลิโดน โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของสารลดแรงตึงผิวร่วมที่มีผลต่อลักษณะทางกายภาพของระบบนำส่ง รวมถึงผลของประจุที่เกิดจาก สารลดแรงตึงผิวร่วมที่ส่งผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

กรอบแนวคิด



รูปที่ 1 กรอบแนวคิดของงานวิจัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงปัจจัยทางด้านประจุพื้นผิวที่ส่งผลต่ออนุภาคไมเซลล์และการนำส่งยาระดับเซลล์
2. ได้องค์ความรู้ในการเตรียมระบบนำส่งยาแบบพอลิเมอร์ไมเซลล์ และการเลี้ยงเซลล์เบื้องต้น

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

1. มะเร็ง

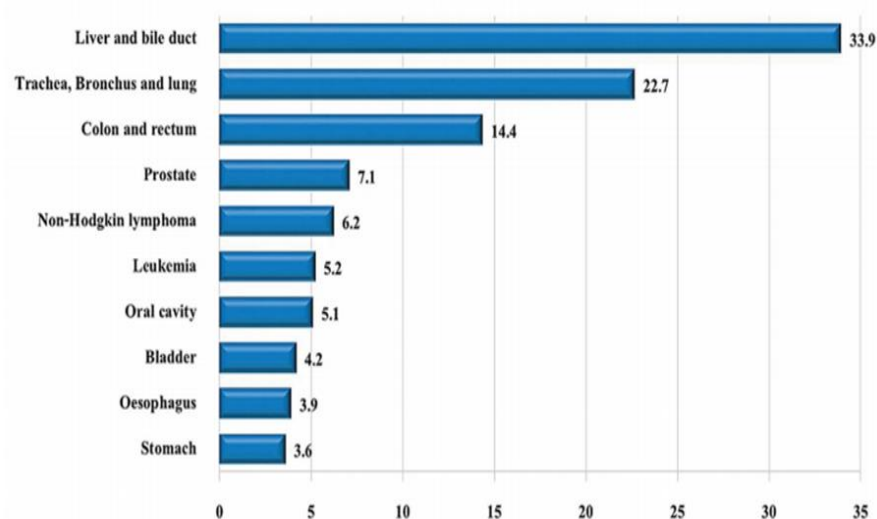
1.1. อุบัติการณ์การเกิดมะเร็ง

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

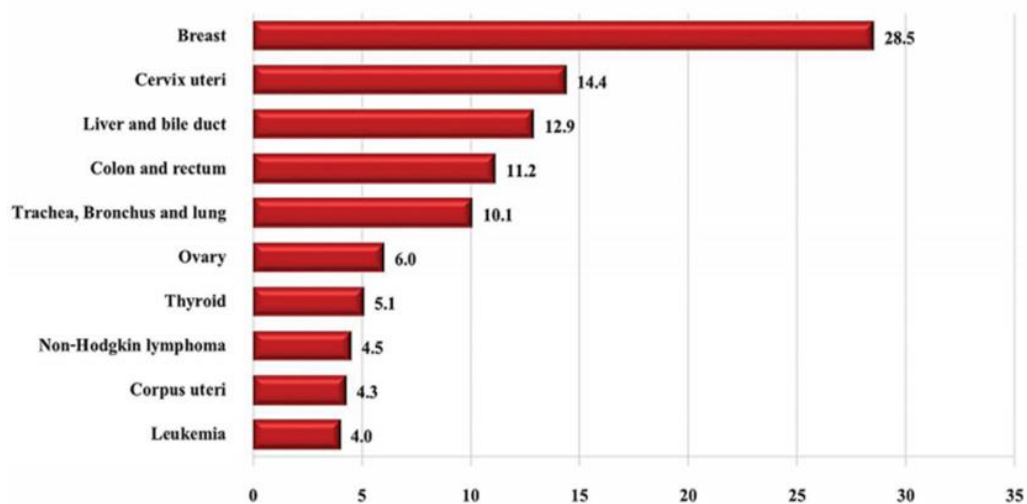
ประเทศไทยได้มีการคำนวณสถิติผู้ป่วยโรคมะเร็งรายใหม่โดยสถาบันมะเร็งแห่งชาติจากข้อมูลของหน่วยทะเบียนมะเร็งระดับประชากร 15 แห่ง ทั่วประเทศ เป็นข้อมูลสถิติโรคมะเร็งในปี พ.ศ. 2553-2555 (Cancer in Thailand Vol VIII, 2010-2012) (ดังภาพ 2,3) พบว่าโรคมะเร็งที่พบมาก 5 อันดับแรกในเพศชาย ได้แก่ มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งต่อมลูกหมาก และมะเร็งเม็ดเลือดขาว ส่วนโรคมะเร็งที่พบมาก 5 อันดับแรกในเพศหญิง ได้แก่ มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก มะเร็งตับ มะเร็งลำไส้ใหญ่ และมะเร็งปอด จากข้อมูลของสำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ รายงานว่าในปี พ.ศ. 2554 ประเทศไทยมีผู้เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งประมาณ 61,082 คน เป็นเพศชาย 35,437 คน เป็นเพศหญิง 25,645 คน ซึ่งถือเป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดย เพศชายมีจำนวนผู้เสียชีวิต 5 อันดับแรก ได้แก่ มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งช่องปากและคอกอยหอย มะเร็งเม็ดเลือดขาว ส่วนเพศหญิงมีจำนวนผู้เสียชีวิต 5 อันดับแรก ได้แก่ มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งลำไส้ใหญ่ จะเห็นได้ว่าโรคมะเร็งที่เป็นปัญหาสำคัญ 5 อันดับแรกของประเทศ คือ มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งคิดเป็น 56.38% ของมะเร็งทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบว่าโรคมะเร็งมีอัตราการตายสูงสุดในปี พ.ศ.2552 (ดังภาพ 4)⁽¹⁶⁾

จากข้อมูลล่าสุดผู้ป่วยโรคมะเร็งรายใหม่ที่มาใช้บริการตรวจวินิจฉัยและรักษาที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ในระหว่างวันที่ 1 มกราคม 2558 ถึง 31 ธันวาคม 2558 จำนวนผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่ที่มา

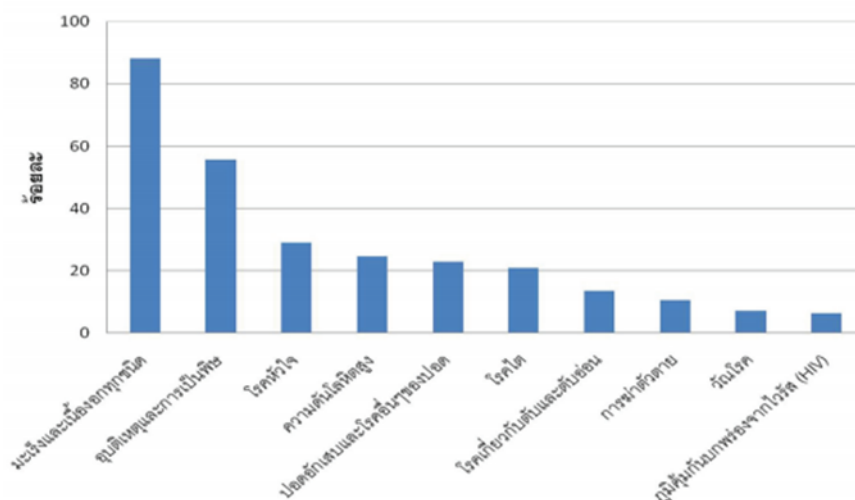
รับบริการ ทั้งหมด 3,439 คน พบว่ามะเร็งเต้านมมีอุบัติการณ์มากที่สุด 849 คน รองลงมาคือมะเร็งลำไส้ใหญ่ 406 คน และ มะเร็งตับ 378 คน ตามลำดับ และมะเร็งชนิดอื่น ๆ 1,806 คน⁽²⁾



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

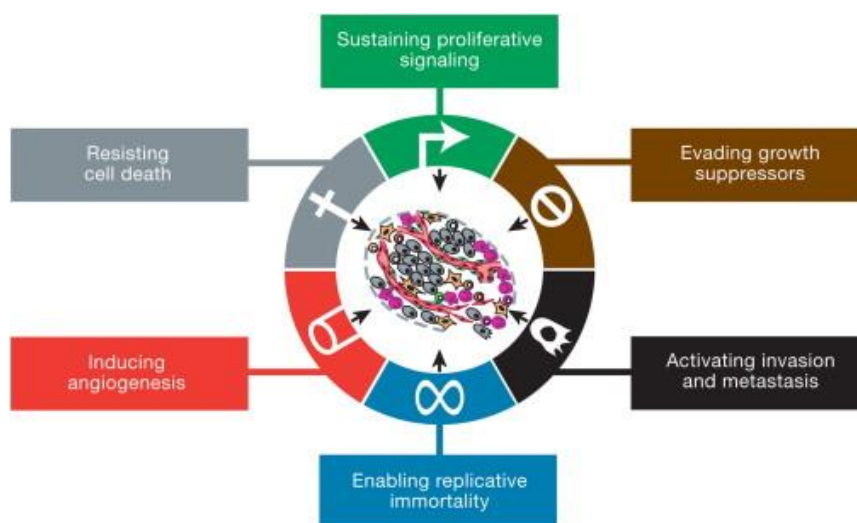


รูปที่ 3 การเกิดโรคมะเร็งชนิดต่างๆ ในเพศหญิง ปี พ.ศ. 2553-2555 (ต่อประชากร 100,000 คน)⁽¹⁷⁾



รูปที่ 4 จำนวนและอัตราการตายต่อประชากร 100,000 คน จำแนกตามสาเหตุที่สำคัญ พ.ศ. 2552⁽¹⁶⁾

1.2 มะเร็ง

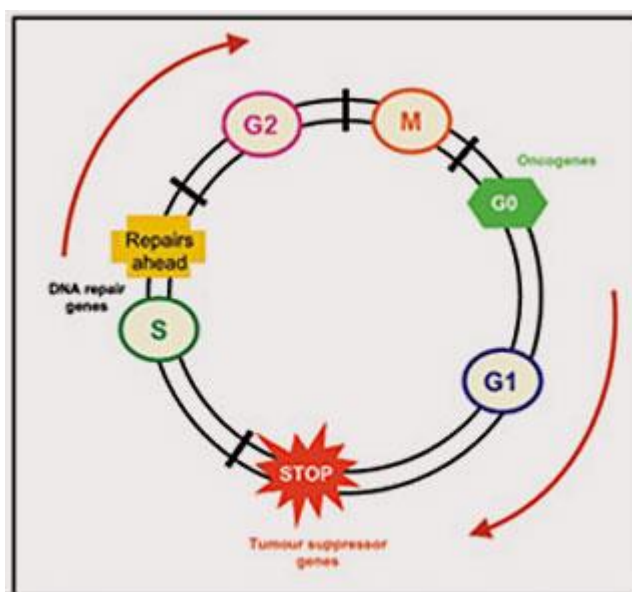


รูปที่ 5 คุณลักษณะเด่นของเซลล์มะเร็ง(The Hallmarks of Cancer)⁽¹⁸⁾

เซลล์มะเร็งเกิดจากการเจริญเติบโตของเซลล์ใหม่ที่ผิดปกติ กล่าวคือไม่สามารถควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์และสามารถหลบหลีกกระบวนการตายของเซลล์ได้ เซลล์ที่เจริญเติบโตผิดปกตินี้เรียกว่า เนื้องอก(tumor) ซึ่งเป็นเนื้องอกที่ร้ายแรงสามารถรุกรานและแพร่กระจายไปยังอวัยวะส่วนต่างๆ ของร่างกายได้ และรบกวนการทำงานของระบบต่างๆ ภายในร่างกาย ซึ่งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งจะต้องอาศัยระบบน้ำเหลือง และระบบหมุนเวียนโลหิต แต่ไม่ใช่เนื้องอกทุกชนิดจะเป็นมะเร็ง เพราะเนื้องอกไม่ร้ายแรงจะไม่ลุกลามไปยังอวัยวะข้างเคียงและไม่กระจายไปทั่วร่างกาย⁽¹⁹⁾

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

1.3 วงจรชีวิตของเซลล์



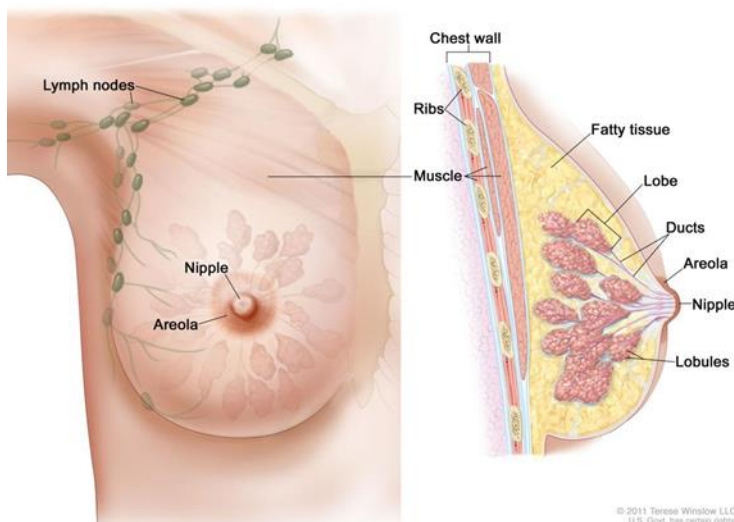
รูปที่ 6 วงจรชีวิตของเซลล์

วัฏจักรการแบ่งตัวของเซลล์ (cell cycle) ประกอบด้วย phases ต่างๆ ดังนี้ ระยะเวลา S (synthesis) เป็นระยะที่มีการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) ระยะ M phase เป็นระยะที่เซลล์มีการแบ่งตัว (cell division) สามารถแบ่งย่อยออกเป็น ไมโทซิส (Mitosis) และการแบ่งไซโตพลาสซึม (cytokinesis) ซึ่ง S และ M phase จะถูกคั่นด้วย G1 phase เป็นระยะที่เซลล์เจริญเติบโต โดยมีการสร้างโปรตีน และส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์ ส่วนระยะที่คั่นระหว่าง S กับ M phase คือ G2 phase เป็นระยะที่สิ้นสุดการสร้าง ดีเอ็นเอ โครโมโซมเริ่มหดตัว แต่ละโครโมโซมจะปรากฏเห็นเป็น 2 โครมาทิด (chromatids) โดยสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะใช้เวลาในการแบ่งเซลล์ 1 วัฏจักรไม่เท่ากัน แต่โดยทั่วไปแล้ว วัฏจักรของเซลล์ใช้เวลาประมาณ 20 ชั่วโมง

ยีนในร่างกายมนุษย์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งมีอยู่ 2 ชนิดคือ oncogenes และ tumor suppressor genes โดย oncogene เป็นยีนปกติหากมีการกลายพันธุ์แล้วทำให้ยีนนี้สร้างโปรตีนที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างก้อนมะเร็งได้ ส่วน Tumor suppressor gene เป็นยีนที่มีการผลิตโปรตีนซึ่งมีหน้าที่ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์และยับยั้งการเกิดก้อนมะเร็ง หากเกิดการ

กลายพันธุ์ขึ้นในยีนนี้ มีผลทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตที่ผิดปกติไปจากการที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้⁽²⁰⁻²²⁾

1.4 เต้านม



รูปที่ 7 Anatomy of the female Breast⁽²³⁾

เต้านมประกอบด้วยต่อมน้ำนม (alveolar) และท่อน้ำนม (duct) รวมตัวกันเป็น lobe แต่ละ lobe แยกจากกันโดยมี connective tissue เป็นผนังกัน (septum) และมีหลอดเลือด ท่อน้ำเหลือง และเส้นประสาททอดอยู่ใน septum แต่ละ lobe จะแบ่งย่อยเป็น lobule ประมาณ 20 – 30 lobule ภายใน lobule จะประกอบด้วย lactiferous duct ที่แตกแขนงออกเป็น ductule เล็กๆ ส่วนปลายจะพองออกเป็นกระเปาะเรียกว่า alveoli แต่ละ lobe จะมี alveoli ย่อยประมาณ 10 – 100 alveoli ดังแสดงในรูปที่ 7 ภายใน alveolus แต่ละอันจะประกอบด้วยเซลล์ 2 ชั้น ชั้นในคือ alveolar cells ทำหน้าที่สร้างน้ำนมเมื่อได้รับการกระตุ้นจากฮอร์โมนโพรแลคติน ชั้นนอกคือ myoepithelial cells เป็นเซลล์กล้ามเนื้อเรียบตัวประสานกันรอบ alveolus ทำหน้าที่หดตัวบีบไล่น้ำนมไปตามท่อเมื่อได้รับการกระตุ้นจากฮอร์โมนออกซิโทซิน

น้ำนมที่สร้างภายใน alveolar cells จะมารวมอยู่ภายในกระเปาะของ alveolus เมื่อ myoepithelial cells หดตัวจะบีบไล่น้ำนมใน alveolus ให้ไหลไปตาม ductule และไปรวมกันที่ lactiferous duct ซึ่งจะไปเปิดที่หัวนม ส่วนของท่อที่ทอดผ่านบริเวณใต้ลานหัวนมจะพองออกเป็นกระเปาะเรียกว่า lactiferous sinus ทำหน้าที่เป็นที่พักเก็บน้ำนม จากนั้นท่อจะมีขนาดเล็กลงและเปิดออกที่ปลายหัวนมประมาณ 15 – 20 ท่อ⁽²⁴⁾

1.5 มะเร็งเต้านม⁽²⁵⁾

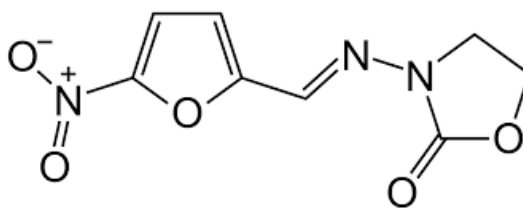
เกิดจากการที่เซลล์ภายในเต้านมมีการแบ่งตัวผิดปกติ ซึ่งมักเกิดขึ้นบริเวณท่อส่งน้ำนมและเนื้อเยื่อของต่อมน้ำนม เซลล์มะเร็งจะมีการแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่อหรืออวัยวะส่วนอื่นของร่างกาย โดยเริ่มจากการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองบริเวณใกล้เคียง ก่อนจะเข้าสู่อวัยวะอื่นที่อยู่ใกล้และไกลออกไปตามลำดับ เช่น หัวใจ กระดูก สมอง ปอด เป็นต้น กระบวนการเกิดมะเร็งเริ่มจากการกลายพันธุ์ของเซลล์ปกติที่มีการแบ่งตัวเพิ่มมากขึ้นจนทำให้เซลล์มีขนาดโตมากเกินไป จนทำให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์ที่ผิดปกติ แบ่งออกเป็นระยะดังนี้

- มะเร็งเต้านมระยะที่ 0 หรือ DCIS (ductal carcinoma in situ) เซลล์มะเร็งเพียงก่อตัวขึ้นจำกัดอยู่ภายในเนื้อเยื่อยังไม่แบ่งตัวลุกลามสู่ภายนอกขอบเขต
- มะเร็งเต้านมระยะที่ 1 มะเร็งมีการลุกลามออกนอกเนื้อเยื่อ แต่ยังไม่มีการแพร่กระจายไปสู่ต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้ และขนาดก้อนมะเร็งไม่เกิน 2 ซม.
- มะเร็งเต้านมระยะที่ 2 ก้อนมะเร็งขนาดเกิน 2 ซม.แต่ไม่เกิน 5 ซม.ที่ยังไม่มีการแพร่กระจายไปสู่ต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้ หรือมะเร็งขนาดเล็กไม่เกิน 2 ซม.
- มะเร็งเต้านมระยะที่ 3 ก้อนมะเร็งขนาดใหญ่เกิน 5 ซม. หรือมะเร็งมีการแพร่กระจายเข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองรักแร้
- มะเร็งเต้านมระยะที่ 4 เป็นระยะสุดท้ายคือมะเร็งมีการแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ เช่น ปอด กระดูก ตับ สมอง

ปัจจัยเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งเต้านม⁽²⁶⁾

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

2.คุณสมบัติทั่วไปของ furazolidone

รูปที่ 8 โครงสร้าง furazolidone⁽⁵⁾

2.1 ข้อมูลทั่วไป^(27, 28)

ยา furazolidone หรือชื่อสามัญคือ 3-(5'-Nitrofurfuralamino)-2-oxazolidone มีน้ำหนักโมเลกุล 225.15 g/mol เป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้สำหรับรักษาโรคท้องเสียจากการติดเชื้อ ด้วยกลไกของยาจะไปจับกับสาย DNA ทำให้รบกวนการแบ่งสาย DNA และการสร้างโปรตีนของแบคทีเรียของแบคทีเรียทำให้แบคทีเรียตายในที่สุด โดยออกฤทธิ์ครอบคลุม ทั้งเชื้อแกรมบวก แกรมลบ และโปรโตซัว เช่น *E. coli*, *staphylococci*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Aerobacter aerogenes*, *Vibrio cholerae* และ *Giardia lamblia* การศึกษาวิจัยพบว่าตัวยา furazolidone มีคุณสมบัติเบื้องต้นเป็นยาต้านมะเร็งได้ มีค่าการละลายเพียง 40 mg/lit และ log P = 0.15 ทำให้ตัวยา furazolidone มีค่าการละลายต่ำไม่ค่อยดูดซึม พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ได้ยาก

2.2 Furazolidone กับฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

จากการศึกษารายงานประสิทธิภาพฤทธิ์ของยา furazolidone มีผลการทดลองในการสนับสนุนฤทธิ์ทางยาว่าสามารถต้านเซลล์มะเร็งได้เนื่องจากการค้นพบในรายงานวิจัยการรักษาผู้ป่วยที่ได้รับยา furazolidone เป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรควัณโรค และผู้ป่วยมีโรคร่วมคือโรคมะเร็งตับจากการได้รับยาไประยะหนึ่งพบว่าเซลล์มะเร็งมีการเจริญเติบโตที่ลดลง หลังจากนั้นได้มีการศึกษาฤทธิ์ฤทธิ์ทางยาต่อเซลล์มะเร็ง พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของยาที่ <40 ไมโครกรัมต่อลิตร มีผลในการลดเจริญเติบโตของการสร้างเส้นเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็ง ซึ่งความเข้มข้นที่ใช้อยู่ในช่วง 10-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร⁽²⁹⁾ โดยกลไกของยาจะกุดการเจริญเยื่อผนังเซลล์ และความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร สามารถยับยั้ง histone deacetylase ได้ประมาณ 3.42% ซึ่งถือว่าเป็นเป้าหมายที่สำคัญสำหรับการบำบัดโรคมะเร็ง เมื่อศึกษาความเข้มข้นของยาที่มีผลต่อการยับยั้ง sarcoma and melanoma cells อยู่ที่ 5-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ในขณะที่เซลล์ปกติเซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีการตอบสนองต่อยาน้อยลง โดยกลไกจะยับยั้ง DNA-directed DNA polymerases⁽³⁰⁾ ซึ่งการศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งต้านของ furazolidone พบว่ามีการศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงระดับของ p53 ใน เซลล์ T47D และ progesterone receptor (PR) เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์เต้านม โดยจากการศึกษาผลของยาในหลอด

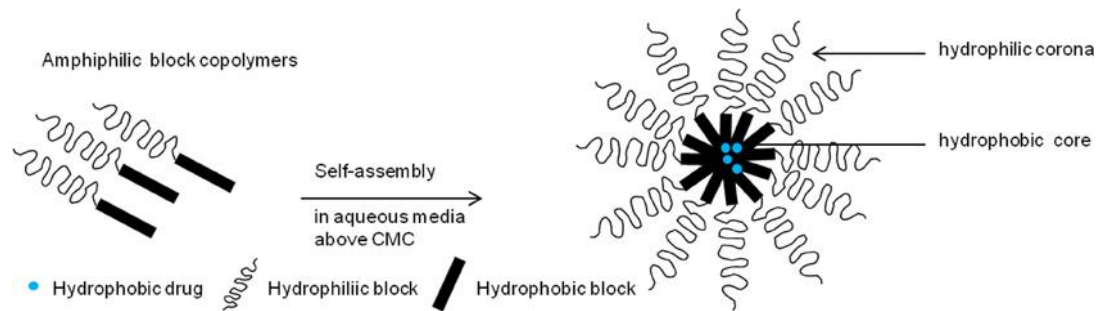
ทดลองสามารถยับยั้งการแสดงออกของ polymerase และ ยับยั้งการทำงานของ PR ผลของยาจะกีดการเจริญเติบโตของเซลล์ และเกิดการกลายพันธุ์ของ p53 ทำให้ควบคุมการเกิดเนื้องอกได้ และความเข้มข้นของยา furazolidone ที่สามารถลดการเจริญเติบโตของเซลล์ T47D ประมาณ 70-80% คือ 175 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า IC50 ของ Furazolidone ที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ คือ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร⁽⁸⁾

3. ไมเซลล์

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

แอมฟิฟิลิกโมเลกุลที่นิยมใช้ได้แก่สารลดแรงตึงผิว และพอลิเมอร์ สารลดแรงตึงผิวแบ่งออกเป็น 4 ประเภทได้แก่ สารลดแรงตึงผิวประจุลบ เช่น carboxylates, sulfunates, sulfates เป็นต้น สารลดแรงตึงผิวประจุบวก เช่น amines, quaternary ammonium halides และ pyridine groups เป็นต้น สารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุ เช่น polysorbates, sorbitan เป็นต้นและสารลดแรงตึงผิวที่มีทั้ง 2 ประจุ เช่น lecitins, cehalins เป็นต้น⁽³¹⁾

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

รูปที่ 9 การจัดเรียงตัวของไมเซลล์⁽³³⁾

ความสามารถของไมเซลล์ที่เกิดจากบล็อกโคพอลิเมอร์จะเกี่ยวข้องกับการเพิ่มคุณสมบัติการละลายของยาจากการเกิดอันตรกิริยากับส่วนที่ไม่ชอบน้ำในโมเลกุลของบล็อกโคพอลิเมอร์ นอกจากนี้คุณสมบัติที่ช่วยเพิ่มการละลายของตัวยาแล้ว การใช้บล็อกโคพอลิเมอร์เพิ่มความจำเพาะต่อการนำส่งยาไปที่บริเวณเนื้อเยื่อในร่างกายทำให้เกิดความเป็นพิษลดลง นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มความคงตัวของยาในกระแสโลหิตซึ่งมีผลต่อการออกฤทธิ์ในการรักษา โดยทั่วไปพอลิเมอร์ไมเซลล์จะมีขนาดที่เหมาะสมในการหลีกเลี่ยงกระบวนการขับถ่ายในร่างกาย (>50kDa) และสามารถแพร่ผ่านผนังเซลล์ได้ (<200 nm) ^(14, 32)

พอลิเมอร์ที่เลือกมาใช้ในการเตรียมพอลิเมอร์ไมเซลล์ควรมีคุณสมบัติที่สามารถย่อยสลายเข้ากับเนื้อเยื่อของร่างกาย ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และสามารถจัดออกจากร่างกายได้^(11, 34, 35) พอลิเมอร์ที่นิยมนำมาใช้ในการเตรียมพอลิเมอร์ไมเซลล์ไม่ว่าจะเป็นแบบบล็อกโคพอลิเมอร์ (di, tri หรือ tetra) หรือกราฟโคพอลิเมอร์ ซึ่งมีทั้งส่วนชอบน้ำและไม่ชอบน้ำในสายพอลิเมอร์เดียวกัน จะประกอบด้วยสายพอลิเมอร์สายหลักเช่น สาย A และมีสายพอลิเมอร์อื่นมาเชื่อมต่อ แสดงในรูปที่ 7 ⁽³⁶⁾ โดยสายพอลิเมอร์หลักส่วนใหญ่จะเป็นพอลิเมอร์ที่มีขั้วหรือชอบน้ำ (hydrophilic segment) ได้แก่ poly ethylene glycol (PEG), poly(N-vinyl-2-pyrrolidone (PVP), poly(ethylene oxide) (PEO), polyelectrolyte และไคโตซาน เป็นต้น ส่วนสายพอลิเมอร์อื่นๆ ที่ไม่ชอบน้ำ ได้แก่ poly(L-amino acid) เช่น poly(L-aspartate), poly(L-glutamate), polyester เช่น poly(glycolic acid), poly(D-lactic acid), poly(D,L-lactic acid), copolymer of lactide/glycolide และ poly- ϵ -caprolactone เป็นต้น ⁽³⁴⁻³⁷⁾

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

* A-hydrophilic unit; B-hydrophobic unit

รูปที่ 10 ตัวอย่างของบล็อกโคพอลิเมอร์ที่นิยมใช้ในการเตรียมพอลิเมอร์ไมเซลล์⁽³⁶⁾

การบรรจุยาในไมเซลล์ขึ้นกับความเข้ากันได้ของยากับพอลิเมอร์ สามารถแบ่งได้หลายวิธี ได้แก่ วิธีเตรียม polymeric micelle

1. Direct dissolution

ละลายพอลิเมอร์และยาในสารละลายน้ำ ซึ่งวิธีนี้จำเป็นต้องใช้พอลิเมอร์และยาที่สามารถละลายน้ำได้ โมเลกุลของยาจะรวมตัวกันและถูกกักเก็บเข้าไปในไมเซลล์โดยอาศัยอุณหภูมิจึงหรือแรงผสมให้เข้ากัน อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อเสียคือ สามารถกักเก็บยาในไมเซลล์ได้น้อย⁽³⁸⁾

2. Dialysis

เป็นการเตรียมโดยผสมยากับพอลิเมอร์ในตัวทำละลาย ซึ่งตัวทำละลายที่เลือกใช้ต้องสามารถละลายได้ทั้งยาและพอลิเมอร์ จากนั้นนำสารละลายผสมของยาและพอลิเมอร์ที่เตรียมได้ในถุงแยกสารผ่านเยื่อและแช่ในตัวทำละลายที่สามารถละลายได้เฉพาะพอลิเมอร์ส่วนที่ขอบน้ำ เพื่อให้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่อยู่ภายในถุงออกมาจากถุงแยกสารผ่านเยื่อจนหมดและมีน้ำเข้าไปแทนที่ ในขณะที่เดียวกันไมเซลล์จะเริ่มก่อตัวขึ้นโดยหุ้มตัวยาวัวภายใน⁽³⁵⁾

3. Thin-film hydration

เหมาะสำหรับโคพอลิเมอร์ที่ละลายน้ำได้น้อย เป็นการเตรียมโดยผสมยากับพอลิเมอร์ในตัวทำละลายอินทรีย์ จากนั้นนำไประเหยเอาตัวทำละลายออกเพื่อให้เกิดเป็นฟิล์มบางๆ จากนั้นเติมน้ำและใช้คลื่นเสียงในการลดขนาดและเกิดเป็นไมเซลล์ ข้อดีคือเป็นวิธีที่ใส่ยาและกักเก็บยาได้มาก ข้อเสียสามารถใช้ได้กับพอลิเมอร์ที่มีค่า HLB ต่ำ⁽³⁵⁾

4. Freeze-drying

ละลายยาและพอลิเมอร์ลงในตัวทำละลายของผสมระหว่างน้ำกับตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น water/tert-butanol จากนั้นนำไปประเหิดเอาน้ำออกจะได้เป็นผงผสมของน้ำและพอลิเมอร์ การเกิดไมเซลล์จะเกิดเมื่อมีการเติมน้ำหรือบัฟเฟอร์ลงไปในผงยา ปัญหาของวิธีนี้คืออาจมีตัวทำละลายอินทรีย์หลงเหลืออยู่ในผงยา⁽³⁸⁾

5. Microphase separation

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

6. Oil in water emulsion

นำตัวทำละลายอินทรีย์ที่เข้ากับน้ำเช่น dichloromethane หรือ chloroform เติมนลงในน้ำที่ประกอบด้วยโคพอลิเมอร์ อย่างช้าๆและคนตลอดเวลา จะเกิดเป็นสารละลายอิมัลชัน จากนั้นเมื่อ

นำไปประเหยเอาตัวทำละลายออกจึงได้เป็นไมเซลล์ ข้อเสียวิธีนี้คือกำจัดยาอิสระที่ไม่เกิดเป็นไมเซลล์ และตัวทำละลายอินทรีย์ออกยาก⁽³⁸⁾

7. solvent evaporation

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

4. พอลิเมอร์และสารลดแรงตึงผิวที่เกี่ยวข้อง⁽³⁹⁾

□ Poloxamer

1. Nonproprietary Names

BP: Poloxamers

PhEur: Poloxamers

USP-NF: Poloxamer

2. Synonyms

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

3. Chemical Name and CAS Registry Number

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

4. Empirical Formula and Molecular Weight

Poloxamer เป็นกลุ่มของ block copolymers ที่ประกอบด้วย ethylene oxide และ

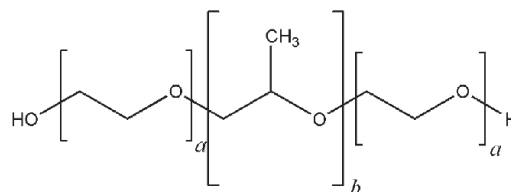
propylene oxide ซึ่งมีหลายชนิด ดังรูปที่ 11

Table I: Typical poloxamer grades.

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

รูปที่ 11 ชนิดของ Poloxamer⁽³⁹⁾

5. สูตรโครงสร้าง

รูปที่ 12 สูตรโครงสร้างของ Poloxamer⁽³⁹⁾

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

7. มวลโมเลกุล ดังรูปที่ 11

8. ประโยชน์ในทางเภสัชกรรม

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

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

9. จุดหลอมเหลว

- 168°C สำหรับ poloxamer 124
- 52–578°C สำหรับ poloxamer 188
- 498°C สำหรับ poloxamer 237
- 578°C สำหรับ poloxamer 338
- 52–578°C สำหรับ poloxamer 407

10. การละลาย

ขึ้นอยู่กับชนิดของ poloxamer ดังรูปที่ 13

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

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

รูปที่ 13 การละลายของ poloxamer แต่ละชนิดในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน⁽³⁹⁾

11. ความคงตัวและการเก็บรักษา

คงตัวในสารละลายกรด เบส หรือสารละลายที่มีโลหะ อย่างไรก็ตามมีโอกาสเกิดเชื้อราในสารละลายน้ำ ควรเก็บในภาชนะปิดสนิทที่เย็นและแห้ง

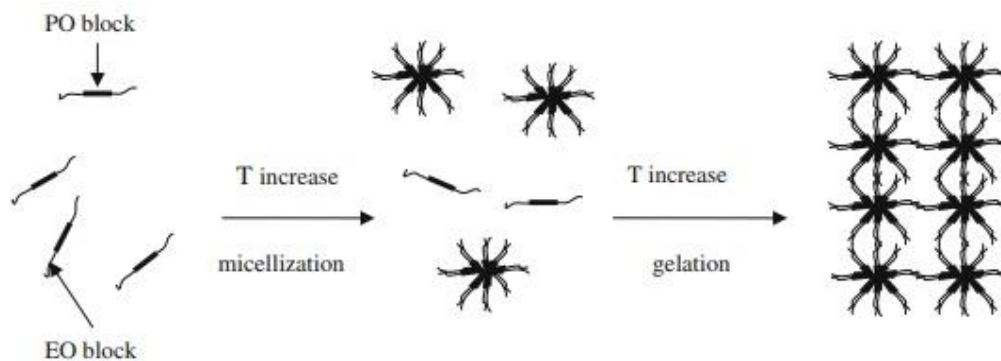
12. ความปลอดภัย

ไม่เกิดพิษ ระคายเคือง และเมทาบอลิซึมในร่างกาย

Poloxamer407^(40, 41)

มีส่วนประกอบเป็น ethylene oxide (EO) และ propylene oxide (PO) มีการจัดเรียงตัวของพอลิเมอร์เป็นแบบ triblock (EO_x-PO_y-EO_x) ซึ่งมีสูตรโมเลกุลดังนี้ HO[CH₂-CH₂O]_x[CH(CH₃)-CH₂O]_y[CH₂-CH₂O]_x OH ในปัจจุบันมีชื่อการค้าที่ได้รับการจดทะเบียนว่า Pluronic F127® (BASF laboratories, Wyandotte, USA) และ Synperonic F127® (ICI laboratories, Wilton, UK) มวลโมเลกุลประมาณ 9,840–14,600 โดยองค์การอาหารและ ยาแห่งสหรัฐอเมริกาแนะนำให้สามารถใช้ได้ ในเภสัชภัณฑ์ รูปแบบ IV, inhalation, oral solution, suspension, ophthalmic และ topical formulations

สารละลายของ Poloxamer407 มีคุณสมบัติเป็น เจลที่สามารถเปลี่ยนกลับเป็นของเหลว เมื่อได้รับความร้อน (thermoreversible) ในสารละลายจะมีอุณหภูมิหนึ่งที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสถานะของสาร เรียกว่า sol-gel transition temperature คือ หากมีอุณหภูมิ ณ ขณะนั้นมากกว่าอุณหภูมินี้สารละลายจะมีลักษณะเป็นสารกึ่งแข็งกึ่งเหลว แต่ถ้าอุณหภูมิน้อยกว่าสารจะผันกลับมาเป็นสารละลายเหมือนเดิม โดยการเกิดนั้นจะมีกลไกดังนี้เมื่ออุณหภูมิเพิ่มเรื่อยๆส่วน polypropylene oxide จะหันตัวเองเข้าด้านในซึ่งเป็นส่วนที่ไม่มีขั้วและ polyethylene oxide จะหันออกด้านนอกซึ่งส่วนที่มีขั้วจนเกิดเป็นเจล โดยรูปร่างของไมเซลล์จะขึ้นกับสารละลายที่ใช้



จากคุณสมบัติข้างต้นทำให้มีการนำมาใช้ที่หลากหลายในปัจจุบันเช่นในอุตสาหกรรมยา เนื่องจากพอลิเมอร์ดังกล่าวที่มีคุณสมบัติสามารถย่อยสลาย เข้ากับเนื้อเยื่อของร่างกายไม่เป็นพิษและสามารถขจัดออกจากร่างกายได้ แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานพบว่า poloxamer407 อาจเกิดอันตรกิริยากับสารตัวอื่นๆ ในตำรับได้เช่นสารช่วย ตัวยา และพอลิเมอร์ตัวอื่นๆซึ่งเป็นสิ่งที่ควรระมัดระวังและคำนึงเสมอเมื่อมีการนำไปใช้

ประโยชน์ทางเภสัชกรรม

1. ช่วยเพิ่มการละลายน้ำ

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

2. ช่วยเพิ่มการซึมผ่าน

จากการศึกษาผลของสูตรตำรับที่ส่งผลต่อการซึมผ่านผิวหนังชั้น percutaneous ของยา ketoprofen รูปแบบเจล พบว่าสูตรตำรับที่มี poloxamer407 เป็นส่วนประกอบช่วยเพิ่มการซึมผ่านของยาได้ดี⁽⁴³⁾

3. ช่วยเพิ่มความคงตัว

จากการศึกษาการพัฒนาสูตรตำรับยาตา indomethacin ซึ่งใช้ pluronic F68 (15%) และF127 (10%) เป็นส่วนประกอบของตำรับ พบว่าสามารถช่วยเพิ่มค่าการละลายของยาและเพิ่มความคงตัวทางเคมีของยา⁽⁴⁴⁾

4. ช่วยเพิ่มการยึดเกาะ

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

□ Lecithin⁽³⁹⁾

1. Nonproprietary Names

USP-NF: Lecithin

2. Synonyms

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

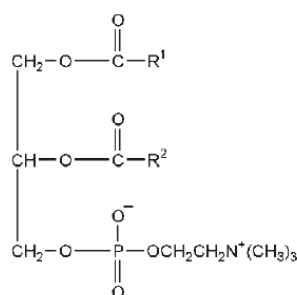
3. Chemical Name and CAS Registry Number

Lecithin [8002-43-5]

4. Empirical Formula and molecular weight

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

5. สูตรโครงสร้าง



R1 และ R2 เป็นกรดไขมันในซึ่งอาจจะเหมือนหรือต่างกันได้

รูปที่ 15 สูตรโครงสร้างของ Poloxamer⁽³⁹⁾

6. หน้าที่

สารเพิ่มความชุ่มชื้น สารก่ออิมัลชัน สารเพิ่มการละลาย

7. ประโยชน์ในทางเภสัชกรรม

- ใช้เป็นสารช่วยกระจายตัว สารก่ออิมัลชัน สารเพิ่มความคงทน รวมไปถึงมีการใช้ในตำรับยาฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ยาฉีดเข้าหลอดเลือดดำ สารอาหารที่ให้ทางหลอดเลือด ยาทาสำหรับใช้ภายนอก เช่นครีม ขี้ผึ้ง และยังมีการใช้เป็นยาพื้นของตำรับยาเหน็บ

- สามารถเพิ่มการดูดซึมในตำรับยาพ่นจมูกอินซูลิน
- มีหลักฐานกล่าวว่า อาหารเสริมที่มี phosphatidylcholine ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของ lecithin มีความสำคัญต่อพัฒนาการของเด็กแรกเกิดและทารก
- จากงานวิจัย lecithin สามารถป้องกันโรคตับแข็งที่เกิดจากแอลกอฮอล์ และทำให้คุณภาพจิตใจและร่างกายดีขึ้นอีกด้วย
- ใช้เป็นส่วนประกอบในระบบนำส่งยาลิโปโซม

8. การละลาย

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

9. ความคงตัวและการเก็บรักษา

Lecithins สลายตัวได้ในสภาวะ pH ที่สูงมากหรือต่ำมาก ดูดความชื้น ที่อุณหภูมิ 160–180 °C จะสลายตัวภายใน 24 ชั่วโมง สารละลายหรือซีฟี่ lecithin ควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องหรือเหนือกว่า ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10 °C อาจเกิดแยกชั้นได้ ควรเก็บ lecithin ในภาชนะปิดสนิทป้องกันแสงและการเกิดออกซิเดชัน lecithin ที่เป็นของแข็งบริสุทธิ์ควรเก็บไว้ในภาชนะปิดสนิทใต้ช่องแช่แข็ง

10. ความปลอดภัย

Lecithin เข้ากับสารในร่างกายได้สูง ไม่ระคายต่อผิวหนังและก่อให้เกิดการแพ้

□ Hexadecyltrimethylammonium bromide⁽³⁹⁾

1. Nonproprietary Names

BP: Cetrimide

PhEur: Cetrimide

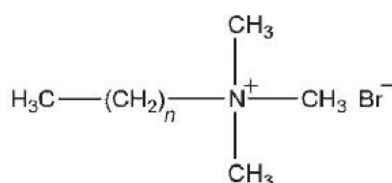
2. Synonyms

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

3. Chemical Name and CAS Registry Number

Cetrimide [57-09-0]

4. สูตรโครงสร้าง



รูปที่ 16 สูตรโครงสร้างของ Poloxamer⁽³⁹⁾

การเรียกชื่อสารเมื่อ $n = 15$ for hexadecyltrimethylammonium bromide

5. สูตรอย่างง่าย $C_{19}H_{42}BrN$
6. มวลโมเลกุล 364.48
7. ประโยชน์ในทางเภสัชกรรม
 - ใช้เป็นสารลดแรงตึงผิวในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง และยาหรืออาจใช้เป็นสารลดแรงตึงผิวชนิด ประจุบวก ตัวอย่างของการนำไปใช้-สารลดแรงตึงผิวในยาหยอดตา
 - เมื่อใช้ความเข้มข้น 0.1–1.0% w/v ในสารละลายน้ำจะมีคุณสมบัติเป็นยาฆ่าเชื้อสำหรับผิวหนัง
 - สารละลายที่มีความเข้มข้น 10% w/v จะใช้เป็นแชมพูเพื่อกำจัดสะเก็ดรังแค
 - ใช้เป็นสารทำความสะอาดและฆ่าเชื้อสำหรับคอนแทกเลนส์ชนิดแข็ง
8. จุดหลอมเหลว (melting point)

237–243 °C
9. การละลาย (Solubility)

สามารถละลายได้บ้างในเอทานอลความเข้มข้น 95% และละลายหนึ่งในสิบ ส่วนของน้ำ
10. ความคงตัวและการเก็บรักษา

มีความคงตัวในบริเวณที่แห้งและสารละลายน้ำในอุณหภูมิห้องโดยสารละลายสามารถนำไปทำให้ปราศจากเชื้อได้ด้วยวิธีความร้อนขึ้น น้ำที่ประกอบไปด้วยไอออนของโลหะหรือสารอนินทรีย์จะทำให้คุณสมบัติการเป็นสารลดแรงตึงผิวลดลง ควรเก็บสารไว้ในภาชนะปิดสนิทในบริเวณที่เย็นและแห้ง
11. ความปลอดภัย
 - LD50 (guinea pig, SC): 100 mg/kg
 - LD50 (mouse, IP): 106 mg/kg
 - LD50 (mouse, IV): 32 mg/kg
 - LD50 (rabbit, IP): 125 mg/kg
 - LD50 (rabbit, SC): 125 mg/kg
 - LD50 (rat, IV): 44 mg/kg
 - LD50 (rat, oral): 410 mg/kg

4.งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง^(7, 15, 45-48)

Saxena และคณะได้ทำการศึกษากระบวนการนำส่ง gambogic acid ซึ่งเป็นสารสกัดจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งแต่มีปัญหาที่สำคัญคือค่าการละลายต่ำจึงได้มีการพัฒนาระบบนำส่งแบบไมเซลล์ ประกอบไปด้วย Poloxamers และ D-alpha -Tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS) ผลการศึกษาในหลอดทดลองพบว่า

การปลดปล่อย gambogic acid แบบเนิ่นเป็นเวลา 4 วัน นอกจากนี้ยังพบว่าระบบนำส่งแบบไมเซลล์ยังสามารถเพิ่มการนำเข้าของ gambogic acid ในเซลล์มะเร็งชนิด NCI/ADR-RES ที่เป็นเซลล์มะเร็งที่ื้อต่อยาก่อนข้างมากและเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 cells ยังมีการพัฒนาการนำส่งสาร curcumin ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกซึ่งให้ผลไปในทางเดียวกัน

Krasnici และคณะได้ทำการศึกษาอิทธิพลของประจุบนผิวต่อการนำเข้าเซลล์พบว่า liposome ที่ผิวเป็นประจุบวกจะมีการสะสมมากและจำเพาะในหลอดเลือดของเซลล์มะเร็งมากกว่าประจุลบโดยจากผลการศึกษาข้างต้นทำให้สามารถนำ liposome ที่ผิวเป็นประจุบวกไปใช้กับการนำส่งยาและการวินิจฉัยสำหรับ angiogenic blood vessels ของ solid tumors แต่ liposome ที่ผิวเป็นประจุลบและกลางสามารถนำไปใช้ส่วนของหลอดเลือดภายนอกของเซลล์มะเร็งซึ่ง Yifan และคณะได้ทำการศึกษาผลของประจุบนผิวของ liposome เช่นกัน โดยใช้ liposome ชนิดที่ผิวเป็นประจุบวกในการนำส่งวัคซีนในเดนไดรติกเซลล์พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีนได้

Nguyen และคณะทำได้การศึกษาระบบนำส่งยา Paclitaxel ซึ่งใช้ soybean- lecithin ทำ liposome ด้วยวิธี thin film method เมื่อทำการวัดค่า zeta potential พบว่าให้ค่าประจุที่ผิวเป็นลบโดยจากการศึกษาพบว่าสามารถเพิ่มความคงตัวของยา สามารถย่อยสลายได้ในร่างกาย และยังเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษามะเร็ง

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

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

ตอนที่ 1 : ศึกษาและพัฒนาระบบนำส่งยาในรูปแบบ micelle ที่มีส่วนประกอบของ poloxamer407

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

ไม่ถูกกักเก็บใน polymeric micelle ออก กรองลงใน volumetric flask ขนาด 25 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ

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

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

1. ศึกษาผลของ poloxamer407 และ CTAB หรือ lecithin ต่อการเกิด polymeric micelle ด้วยวิธีการ thin-film hydration method โดยมีกระบวนการดังนี้
 - 1.1. เตรียมสารละลาย poloxamer ต่อ CTAB ในอัตราส่วน 10:1, 20:1 และ 50:1 โดยนำ poloxamer ปริมาณ 200 mg มาละลายด้วย acetonitrile ปริมาตร 10 ml และละลาย CTAB ตามสัดส่วนดังกล่าว ด้วย ethanol ปริมาตร 10 ml ลงใน round-bottom flask คนละใบ
 - 1.2. นำสารละลายที่ได้ไปทำให้เกิดฟิล์มด้วยวิธี thin film hydration โดยระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่ความดัน 120 mbar อุณหภูมิ 45°C และรอบหมุน 2.5 rpm
 - 1.3. ทำการ dehydration ด้วยน้ำปริมาตร 10 ml เพื่อให้ฟิล์มเกิดเป็น polymeric micelle
 - 1.4. เมื่อได้อนุภาค polymeric micelle นำมา sonicate เพื่อลดขนาดอนุภาคเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมากรองด้วย membrane filter 0.45 ลงใน volumetric flask ขนาด 25 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ

- 1.5. หลังจากปรับปริมาตรแล้วนำสารละลายที่เตรียมได้ไปวัด size และ zeta ด้วยเครื่อง zetasizer
- 1.6. เตรียมสารละลาย poloxamer ต่อ lecithin ในอัตราส่วน 10:1, 20:1, 50:1 โดยนำ poloxamer ปริมาณ 200 mg มาละลายด้วย acetonitrile ปริมาตร 10 ml และละลาย lecithin ตามสัดส่วนดังกล่าวด้วย ethanol 10 ml ใน round-bottom flask คนละเอียด แล้วทำตามขั้นตอนข้อ 1.2.-1.5.
2. ศึกษาผลของ poloxamer407 และ CTAB หรือ lecithin ต่อการเกิด polymeric micelle ที่ load ยา furazolidone ด้วยวิธีการ thin-film hydration method โดยมีกระบวนการดังนี้
 - 2.1. เตรียมสารละลาย poloxamer ต่อ CTAB ในอัตราส่วน 10:1, 20:1 และ 50:1 โดยนำ poloxamer ปริมาณ 200 mg มาละลายด้วย acetonitrile ปริมาตร 10 ml และละลาย CTAB ตามสัดส่วนดังกล่าวด้วย ethanol ปริมาตร 10 ml ลงใน round-bottom flask คนละเอียด
 - 2.2. นำ furazolidone 10 mg มาละลายด้วย acetonitrile ปริมาตร 10 ml แล้วผสมลงใน round-bottom flask ในข้อที่ 2.1.
 - 2.3. นำสารละลายที่ได้ไปทำให้เกิดฟิล์มด้วยวิธี thin film hydration โดยระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่ความดัน 120 mbar อุณหภูมิ 45°C และรอบหมุน 2.5 rpm
 - 2.4. ทำการ dehydration ด้วยน้ำ 10 ml เพื่อทำให้เกิด polymeric micelle
 - 2.5. เมื่อได้อนุภาค polymeric micelle นำมา sonicate เพื่อลดขนาดอนุภาคเป็นเวลา 15 นาที จากนั้น นำมากรองด้วย membrane filter 0.45 μm เพื่อกรอง furazolidone ที่ไม่ถูกกักเก็บใน polymeric micelle ออก ลงใน volumetric flask ขนาด 25 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ
 - 2.6. หลังจากปรับปริมาตรนำสารละลายที่เตรียมได้ไปวัด size และ zeta ด้วยเครื่อง zetasizer
 - 2.7. เตรียมสารละลาย poloxamer ต่อ lecithin ในอัตราส่วน 10:1, 20:1, 50:1 โดยนำ poloxamer ปริมาณ 200 mg มาละลายด้วย acetonitrile ปริมาตร 10 ml และละลาย lecithin ตามสัดส่วนดังกล่าวด้วย ethanol 10 ml ลงใน round-bottom flask คนละเอียด แล้วทำตามขั้นตอนข้อ 2.2.-2.6.
 - 2.8. หลังจากนั้นเตรียมสารละลายยา furazolidone standard (ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.25, 0.5, 1, 10, 250 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ ที่ละลายด้วย acetonitrile) เพื่อทำกราฟมาตรฐานในการหาปริมาณยาที่ถูกกักเก็บใน polymeric micelle
 - 2.9. นำสารละลายยา furazolidone standard ไปวัดปริมาณยาด้วยเครื่อง uv-vis spectrophotometer โดยใช้ wavelength 470 nm

2.10. แบ่งสารละลายในข้อ 2.5. มา 1 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 10 ml แล้วปรับปริมาตรด้วย acetonitrile จากนั้นจึงนำไปวัด entrapment ด้วยเครื่อง uv-vis spectrophotometer โดยใช้ wavelength 470 nm

2.11. ทำการเลือกสูตร polymeric micelle ที่เหมาะสม โดยพิจารณาจาก size, PDI และ% entrapment จากสูตรต่อไปนี้ $\% EE = \frac{c \text{ drug load}}{c \text{ total drug}} \times 100$

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

1. การศึกษาคุณสมบัติ cellular uptake

1.1. ขั้นตอนในการเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

1.1.1. เลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7 cell) โดยใช้สูตร media ประกอบด้วย dulbecco's modified minimum essential medium (DMEM), 10% fetal bovine serum (FBS), 1% antibiotic-antimycotic และ 1% L-glutamax

1.1.2. นำเซลล์มะเร็งที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมา incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C ± CO₂ 5% ที่งไว้ให้เซลล์เจริญเติบโตใน culture flask ขนาด 75 cm² โดยเปลี่ยน medium ทุก 3 วัน

1.1.3. Subculture เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์มีขั้นตอนดังนี้

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

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

- 1.2. Seed MCF-7 cell จำนวน 50,000 cells/well ลงใน 24 well plate โดยทำเหมือนกัน จำนวน 2 plate เพื่อศึกษาผลของการกักเก็บยาที่เวลา 2 และ 4 ชั่วโมง หลังจากนั้น treat cells ด้วยตัวอย่างปริมาตร 1 ml ซึ่งแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่ม ทำกลุ่มละ 3 ซ้ำ ดังนี้
 1. กลุ่มที่ใส่ poloxamer 407 ที่กักเก็บ furazolidone (ดูตามา 940 μ l แล้วปรับ ปริมาตรด้วย media จนครบ 1 ml)
 2. กลุ่มที่ใส่ poloxamer 407 : CTAB (10:1) ที่กักเก็บ furazolidone (ดูตามา 940 μ l แล้วปรับปริมาตรด้วย media จนครบ 1 ml)
 3. กลุ่มที่ใส่ poloxamer 407 : lecithin (50:1) ที่กักเก็บ furazolidone (ดูตามา 1 mL)
- 1.3. เมื่อเวลาครบ 2 ชั่วโมง นำ plate แรกมาทดสอบละลายทิ้ง แล้วล้าง plate ด้วย PBS 1 ml/well เพื่อกำจัดยาที่ไม่เข้าเซลล์ออก
- 1.4. ทดสอบละลาย PBS ทิ้งแล้วทำให้ผนังเซลล์แตก (cells lysis) เพื่อละลาย furazolidone ออกจาก cells โดยใช้ 1% TritonX 500 μ l/well
- 1.5. นำสารละลายหลังการ lysate มากรองด้วย membrane 0.45 μ m เพื่อกำจัดผนังเซลล์ ออก แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เพื่อหาปริมาณยาที่ uptake เข้าไปในเซลล์
- 1.6. เตรียมสารละลายยา furazolidone standard ทั้งหมด 7 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.01, 0.25, 0.5, 1, 10, 250 และ 500 μ m/ml ที่ละลายด้วย acetonitrile และวิเคราะห์ปริมาณยา ด้วยเครื่อง HPLC เพื่อทำกราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์หาปริมาณด้วยยา furazolidone ที่สามารถ uptake เข้าเซลล์ได้ โดยใช้ condition ดังนี้
 - mobile phase : Water: ACN (75:25)
 - stationary phase : C18 (254 mm x 4.6mm)
 - flow rate : 1.50 ml/min
 - uv detector wavelength: 360 nm
 - running time 5 min
 - injection volume 20.00 μ L
 - retention time : 3.02 min
- 1.7. เมื่อเวลาครบ 4 ชั่วโมง นำ plate ที่สองมาทำเช่นเดียวกับข้อ 1.3.-1.5.
2. การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง
 - 2.1. seed cells จำนวน 10,000 cells/well ลงใน 24 well plate หลังจากนั้น treat ด้วย ตัวอย่างปริมาตร 1 ml ซึ่งแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 8 กลุ่ม ดังนี้

1. กลุ่ม control : ไม่ได้ใส่สารใดๆ
2. กลุ่ม positive control : ใส่ 1%tritonX
3. กลุ่มที่ใส่ poloxamer 407 : CTAB (10:1)
4. กลุ่มที่ใส่ poloxamer 407 : lecithin (50:1)
5. กลุ่มที่ใส่ poloxamer 407
6. กลุ่มที่ใส่ poloxamer 407 ที่กักเก็บ furazolidone (ดูตามา 940 μ l แล้วปรับปริมาณด้วย media จนครบ 1 ml)
7. กลุ่มที่ใส่ poloxamer 407 : CTAB (10:1) ที่กักเก็บ furazolidone (ดูตามา 950 μ l แล้วปรับปริมาณด้วย media จนครบ 1 ml)
8. กลุ่มที่ใส่ poloxamer 407 : lecithin (50:1) ที่กักเก็บ furazolidone (ดูตามา 1 ml)

2.2. วิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตด้วยวิธี crystal violet ด้วยวิธีดังนี้

- 2.2.1. เท media ที่จกนั้น fix cells ด้วย glutaraldehyde 1 ml/well เป็นเวลา 10 นาที
- 2.2.2. เมื่อครบเวลาให้เทสารละลายที่จก นำ plate มาย้อมสีเซลล์ที่ติดอยู่กับ plate ด้วย crystal violet 1 ml/well แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที
- 2.2.3. นำ plate ที่ย้อมเสร็จแล้วไปส่องด้วยกล้อง inverted microscope เพื่อดูการติดสีของเซลล์
- 2.2.4. ละลายสี crystal violet ที่ติดอยู่ในเซลล์ออกมา โดย lysate cells ด้วย 10% acetic acid ปริมาตร 1 ml
- 2.2.5. นำสารละลาย crystal violet ที่ได้ดูตามาใส่ 96 well plate 1 ml/well ไปวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 600 nm แล้วนำค่า absorbance ที่ได้มาคำนวณ % viability โดยใช้สูตรดังนี้

$$\% \text{ viability} = \frac{\square\square\square \square\square\square\square\square\square}{\square\square\square \square\square\square\square\square\square} \times 100$$

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

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

ตอนที่ 1 : ศึกษาและพัฒนาระบบนำส่งยาในรูปแบบ micelle ที่มีส่วนประกอบของ poloxamer407

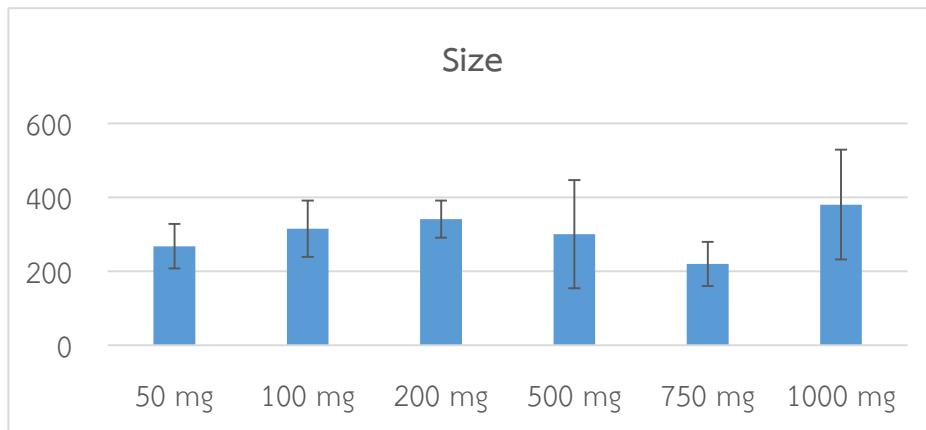
1. ผลของ poloxamer407 ต่อการเกิด polymeric micelle

ตารางที่ 1 แสดงขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และ zeta potential ของ polymeric micelle

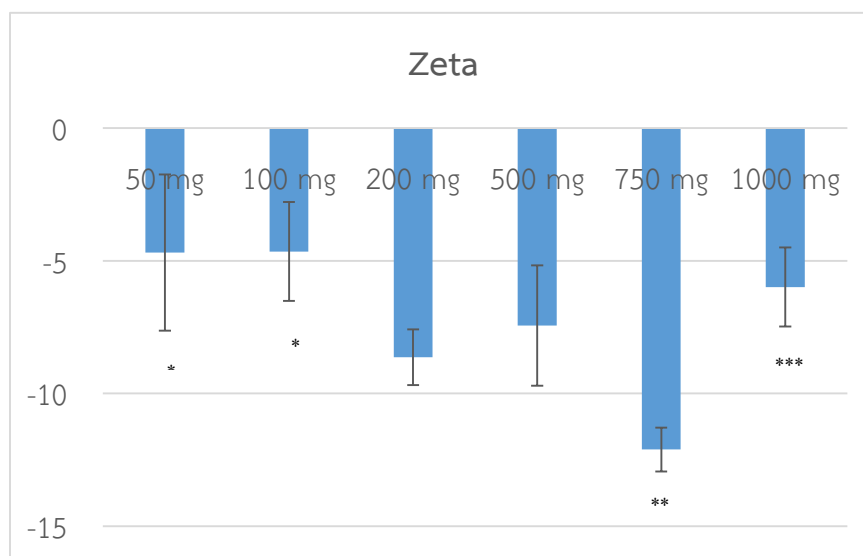
Formulation	Size(nm)	PDI	zeta potential(mV)
Poloxamer407 50 mg	267.84 ± 59.78	0.48 ± 0.22	-4.69 ± 2.94*
Poloxamer407 100 mg	314.96 ± 75.79	0.53 ± 0.14	-4.65 ± 1.86*
Poloxamer407 200 mg	341.36 ± 50.12	0.58 ± 0.13	-8.63 ± 1.05
Poloxamer407 500 mg	300.19 ± 145.90	0.73 ± 0.03	-7.44 ± 2.27
Poloxamer407 750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

Each value presents the mean ± SD (n=3); * $P < 0.05$ compare with Poloxamer407 750 mg; ** $P < 0.05$ compare with Poloxamer407 50 mg, 100 mg, 1000 mg; *** $P < 0.05$ compare with Poloxamer407 750 m

1.1. ผลการวัดขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และ zeta potential ของ polymeric micelle



รูปที่ 17 แสดงขนาดอนุภาคของ polymeric micelle ที่เตรียมจาก poloxamer ขนาดต่างๆ



รูปที่ 18 แสดง zeta potential ของ polymeric micelle ที่เตรียมจาก poloxamer ขนาดต่างๆ (* $P < 0.05$ compare with Poloxamer407 750 mg; ** $P < 0.05$ compare with Poloxamer407 50 mg, 100 mg, 1000 mg; *** $P < 0.05$ compare with Poloxamer407 750 mg)

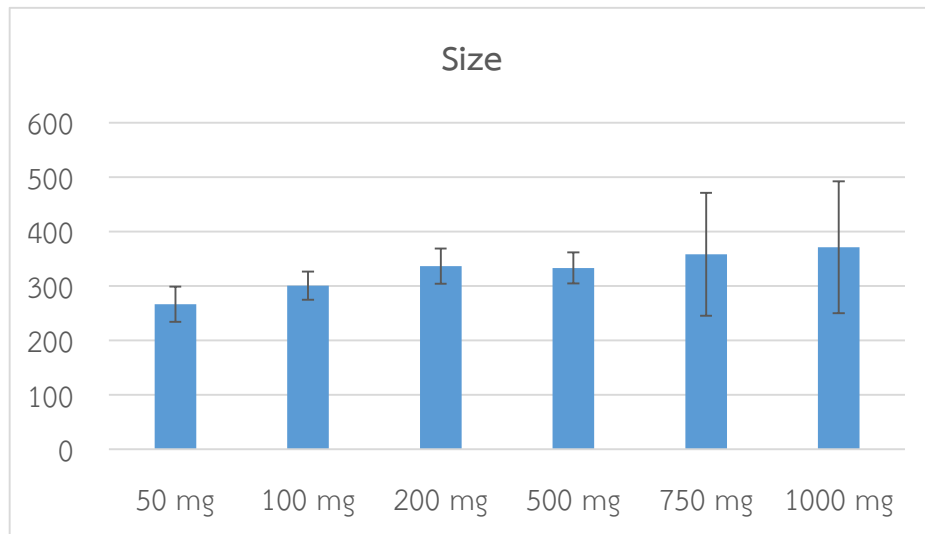
จากผลการวัดขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และ zeta potential ของ polymeric micelle ที่เตรียมจาก poloxamer407 ขนาด 50, 100, 250, 500, 750 และ 1,000 mg พบว่า การเพิ่มปริมาณของ poloxamer407 ทำให้ขนาดอนุภาคของ polymeric micelle ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่มีแนวโน้มเพิ่มการกระจายขนาดอนุภาคทำให้มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานมากขึ้น จากการวิจัยของ Rabah ถึงลักษณะรูปร่างของ micelle ที่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว พบว่าความเข้มข้นที่มากขึ้นสัมพันธ์กับค่า critical packaging parameter (CPP) ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงลักษณะรูปร่างของ micelle เมื่อค่า $0 < CPP < 1/3$ สารลดแรงตึงผิวก่อตัวเป็น spherical micelles หาก $1/3 < CPP < 1/2$ สารลดแรงตึงผิวส่วนใหญ่ก่อตัวเป็น rod-like shape หรือ hexagonal หาก $1/2 < CPP < 1$ สารลดแรงตึงผิวส่วนใหญ่ก่อตัวเป็น planar bilayer หรือ vesicles ดังนั้นหากค่า CPP เพิ่มขึ้นทำให้เกิดการกระจายขนาดอนุภาคและรูปร่าง micelle มากขึ้น⁽⁴⁹⁾ นอกจากนี้กลุ่มที่มีปริมาณ poloxamer407 50 และ 100 mg มีค่า zeta potential แตกต่างจากกลุ่มที่มี poloxamer407 750 mg อย่างมีนัยสำคัญ P-value เท่ากับ 0.003 และกลุ่มที่มี poloxamer407 750 mg แตกต่างจากกลุ่มที่มี poloxamer407 1,000 mg อย่างมีนัยสำคัญ P-value เท่ากับ 0.003

2. ผลของ poloxamer407 ต่อการเกิด polymeric micelle และการ load ยา furazolidone ตารางที่ 2 แสดงขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค zeta potential และ % entrapment ของ polymeric micelle

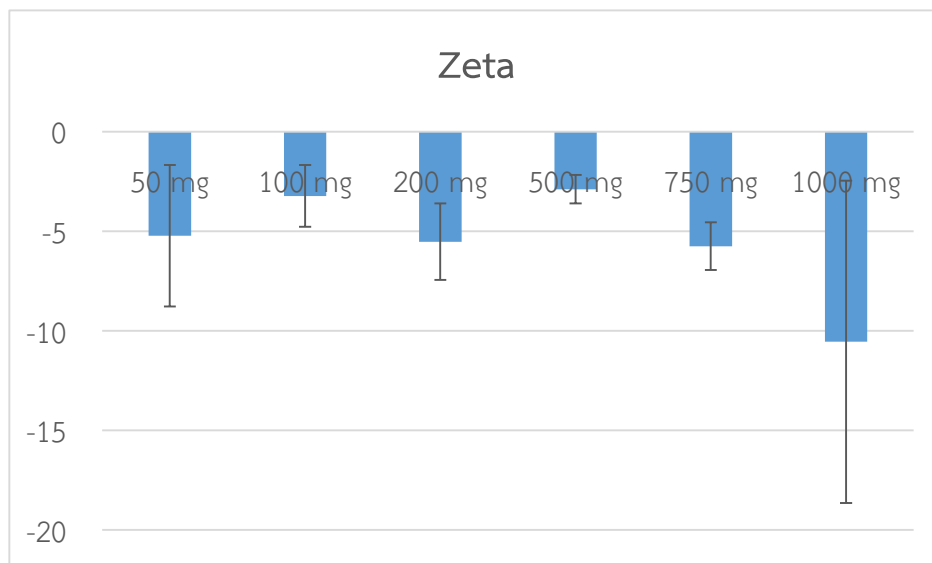
Formulation	Size (nm)	PDI	zeta potential (mV)	% entrapment
Poloxamer 50 mg	266.44 ± 32.30	0.52 ± 0.09	-5.23 ± 3.55	84.03 ± 11.41
Poloxamer100 mg	300.63 ± 25.69	0.57 ± 0.04	-3.23 ± 1.55	85.73 ± 8.63
Poloxamer 200 mg	336.70 ± 32.42	0.48 ± 0.16	-5.53 ± 1.92	92.05 ± 7.26
Poloxamer 500 mg	333.20 ± 28.57	0.63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

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

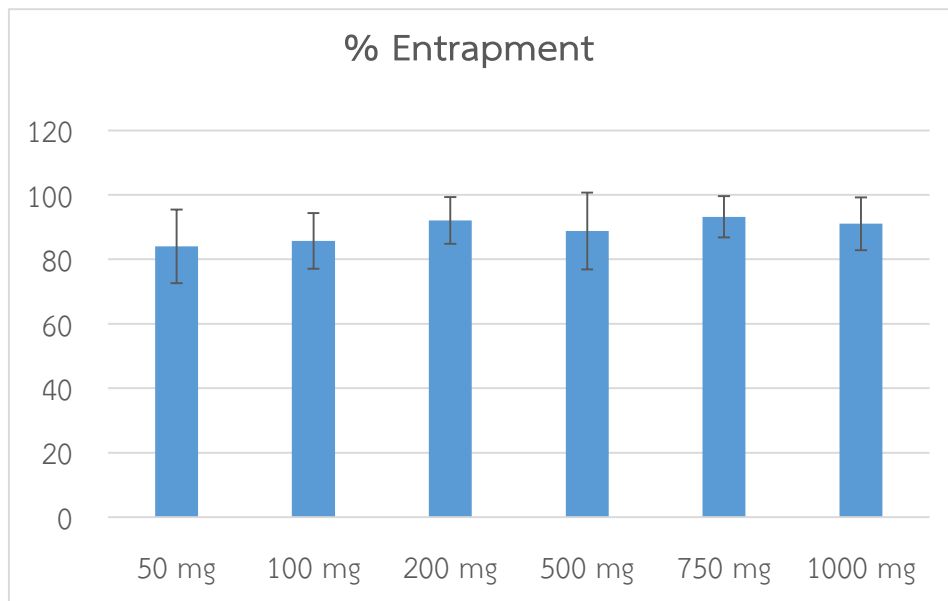
2.1. ผลการวัดขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค zeta potential และ % entrapment ของ polymeric micelle



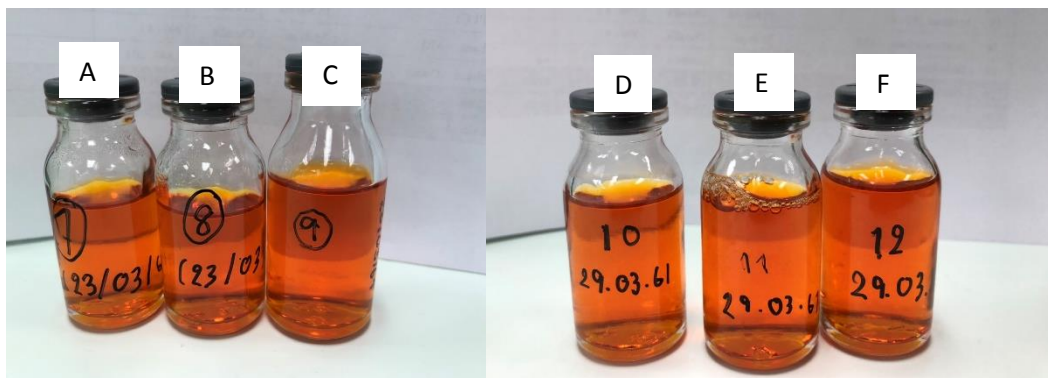
รูปที่ 19 แสดงขนาดอนุภาคของ polymeric micelle ที่เตรียมจาก poloxamer ขนาดต่างๆที่ load ยา furazolidone



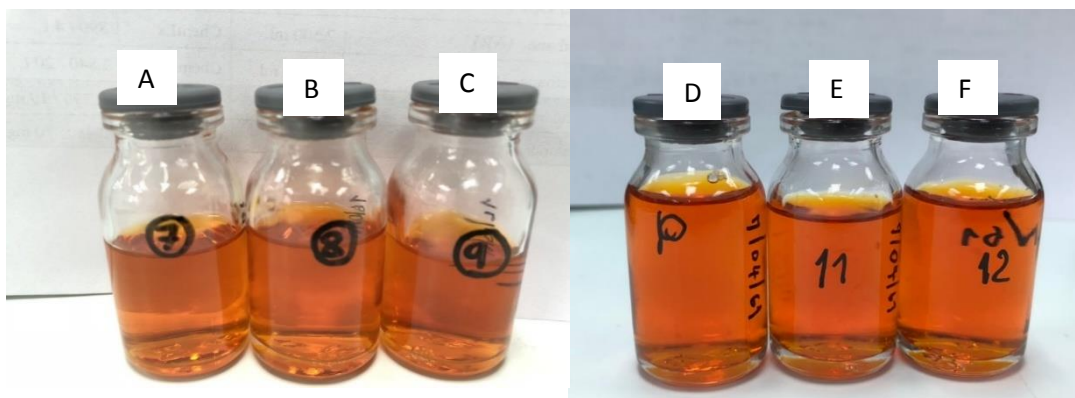
รูปที่ 20 แสดง zeta potential ของ polymeric micelle ที่เตรียมจาก poloxamer ขนาดต่างๆที่ load ยา furazolidone



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



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



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

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

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

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

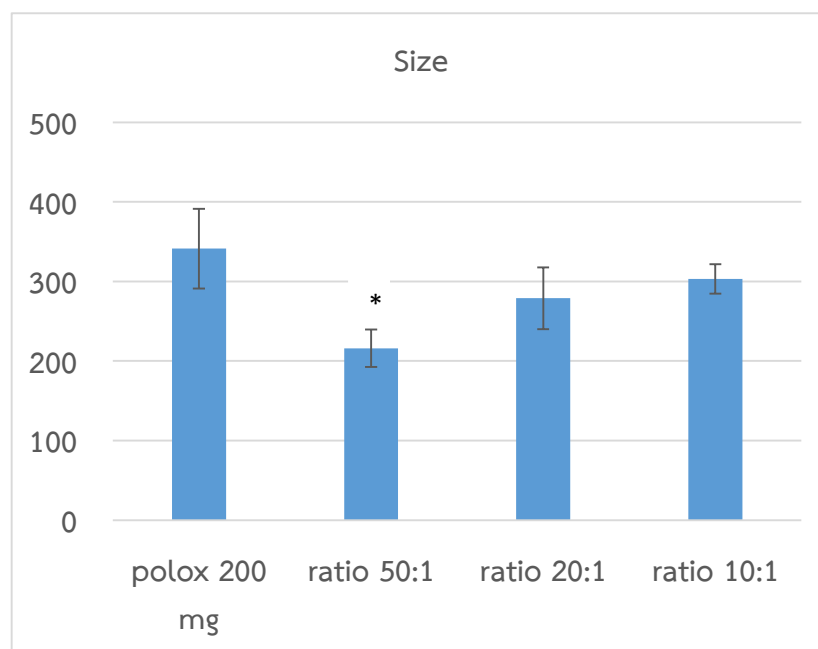
1. ศึกษาผลของ poloxamer407 และ CTAB หรือ lecithin ต่อการเกิด polymeric micelle

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

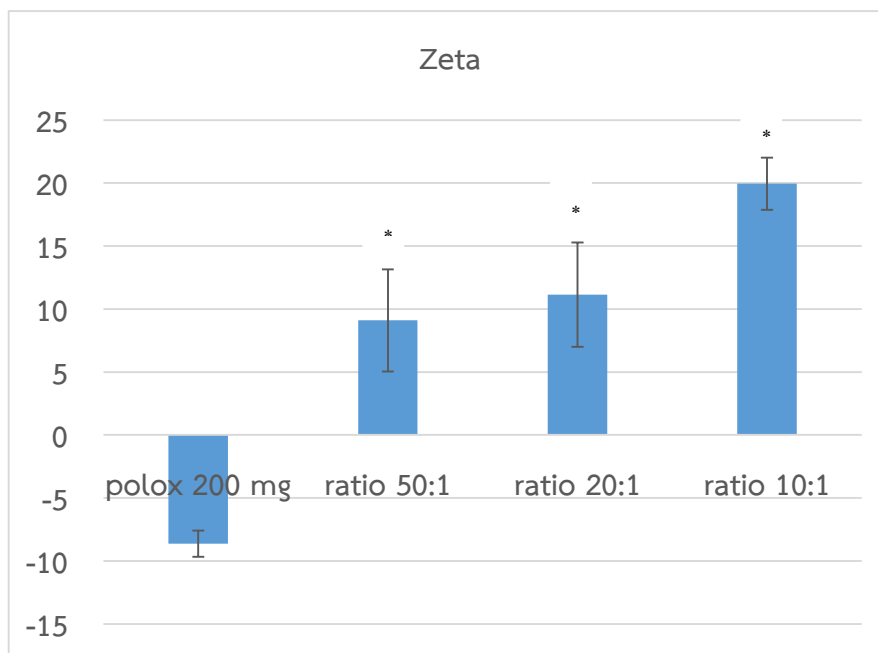
Formulation	Size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
poloxamer 200 mg	341.36 ± 50.12	0.58 ± 0.13	-8.63 ± 1.05
50:1	216.03 ± 23.55*	0.51 ± 0.12	9.10 ± 4.06*
20:1	278.92 ± 38.80	0.43 ± 0.10	11.14 ± 4.15*
10:1	303.08 ± 18.45	0.45 ± 0.24	19.95 ± 2.07*

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

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



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



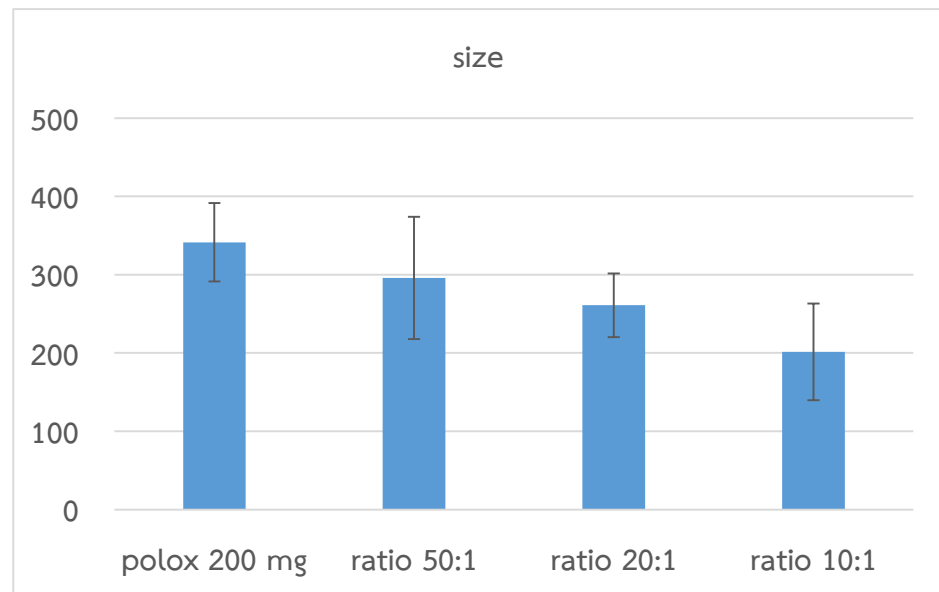
รูปที่ 25 แสดง zeta potential ของ polymeric micelle ที่เตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ CTAB ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1 (* $P < 0.05$ compare with poloxamer 200 mg)

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

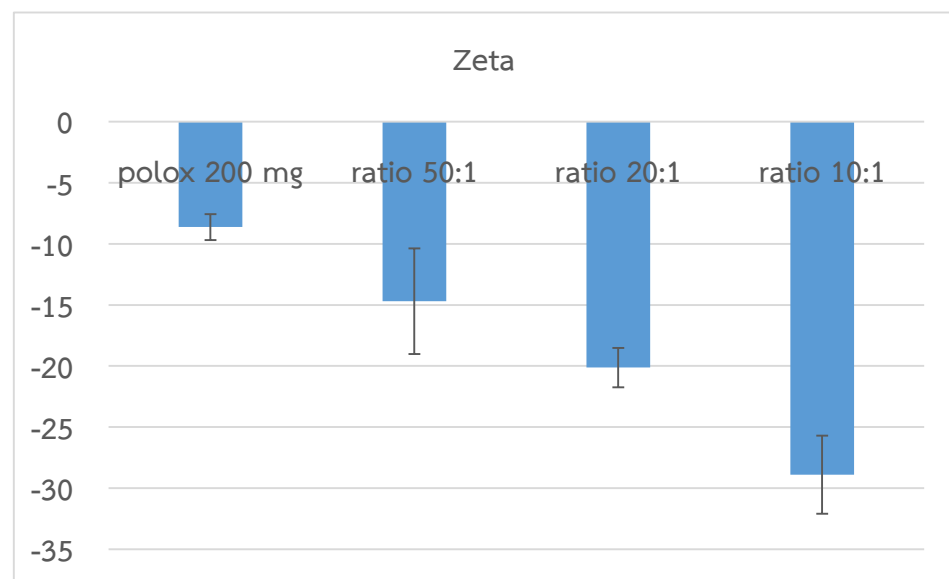
Formulation	Size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
poloxamer 200 mg	341.36 ± 50.12	0.58 ± 0.13	-8.63 ± 1.05
50:1	295.86 ± 78.10	0.44 ± 0.16	-14.69 ± 4.32
20:1	260.92 ± 40.60	0.59 ± 0.17	-20.13 ± 1.62*
10:1	201.53 ± 61.72	0.61 ± 0.06	-28.90 ± 3.19*

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

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



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



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

จากผลการวัดขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาค และ zeta potential ของ polymeric micelle ที่เตรียมจาก poloxamer407 และ CTAB ที่อัตราส่วน 50:1, 20:1, 10:1 พบว่า ที่อัตราส่วน 50:1 มีขนาดอนุภาค แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ P-value เท่ากับ 0.014 และทุกอัตราส่วนมีค่า zeta

potential แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ P -value เท่ากับ 0.000 เมื่อเทียบกับ poloxamer407 200 mg ซึ่งปริมาณ CTAB ที่เพิ่มขึ้นมีแนวโน้มทำให้ขนาดอนุภาค และค่า zeta potential เพิ่มขึ้น จะเห็นว่าผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Leona ที่ศึกษาปริมาณของ CTAB ต่อขนาดอนุภาคของ alumina nanofluid พบว่าปริมาณ CTAB ที่เพิ่มขึ้นทำให้จำนวนโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวเพิ่มขึ้น ส่งผลให้โมเลกุลสารลดแรงตึงผิวไปแทรกอยู่ระหว่างชั้น hydration ทำให้ชั้น hydration หนาตัวขึ้นจึงทำให้ขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้น⁽⁵⁰⁾ ซึ่งในการศึกษานี้ปริมาณ CTAB ที่เพิ่มขึ้นโดยสูตร poloxamer : lecithin (50:1) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบ poloxamer : lecithin (10:1) P -value เท่ากับ 0.023 และ CTAB จัดเป็นสารลดแรงตึงผิวประจุบวกดังนั้นใส่ปริมาณเพิ่มขึ้นจึงทำให้ค่า zeta potential เพิ่มขึ้น

จากผลการวัดขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาค และ zeta potential ของ polymeric micelle ที่เตรียมจาก poloxamer407 และ lecithin ที่อัตราส่วน 50:1, 20:1, 10:1 พบว่าที่อัตราส่วน 20:1 และ 10:1 มีค่า zeta potential แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ P -value เท่ากับ 0.000 เมื่อเทียบกับ poloxamer407 200 mg ซึ่งปริมาณ lecithin ที่เพิ่มขึ้นมีแนวโน้มทำให้ขนาดอนุภาคเล็กลง จะเห็นว่าผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Poopak ที่ศึกษาการเพิ่มขึ้นของปริมาณ lecithin ต่อขนาดอนุภาคนาโน พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณ lecithin มากขึ้นทำให้อนุภาคมีขนาดเล็กลงเนื่องจากการเพิ่มแรง electrostatic ของอนุภาคจึงเกิดการผลักกันระหว่างอนุภาค⁽⁵¹⁾ แต่ในการศึกษานี้ปริมาณ lecithin ที่แตกต่างกันมีผลต่อขนาดอนุภาคไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ อาจเป็นผลมาจากปัจจัยเรื่อง ความเข้มข้นของ lecithin ความแรงและเวลาในการ sonicate⁽⁵²⁾ โดย lecithin จัดเป็นสารลดแรงตึงผิวประจุลบดังนั้นใส่ปริมาณเพิ่มขึ้นทำให้ค่า zeta potential ลดลง

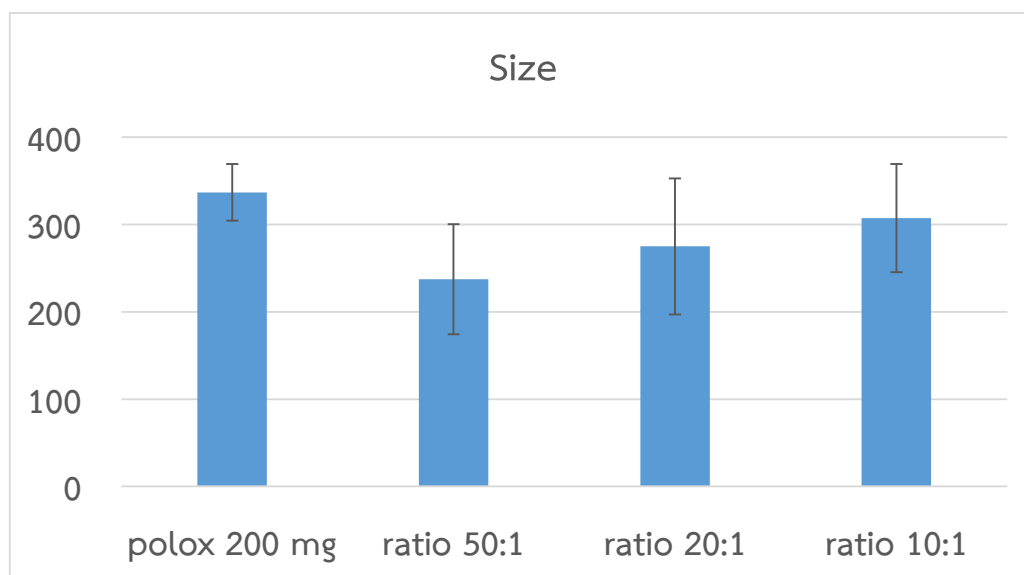
2. ศึกษาผลของ poloxamer407 และ CTAB หรือ lecithin ต่อการเกิด polymeric micelle ที่ load ยา furazolidone

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

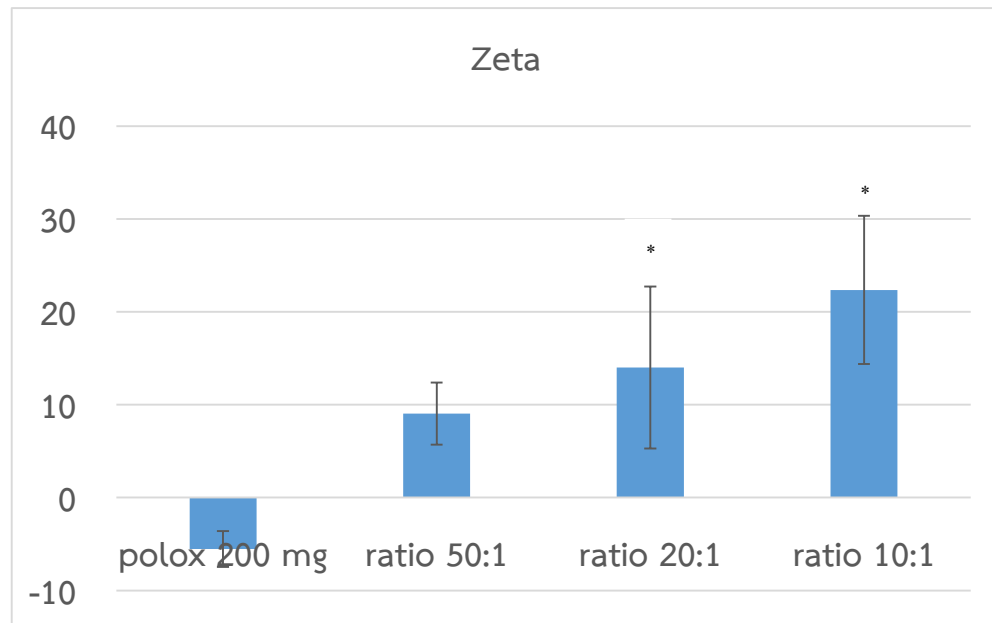
Formulation	Size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)	% Entrapment
poloxamer 200 mg	336.70 ± 32.42	0.48 ± 0.16	-5.53 ± 1.92	92.05 ± 7.26
50:1	237.22 ± 63.09	0.52 ± 0.02	9.04 ± 3.35	89.80 ± 4.75
20:1	274.91 ± 77.90	0.49 ± 0.09	14.00 ± 8.73*	91.77 ± 3.33
10:1	307.14 ± 62.01	0.53 ± 0.08	22.36 ± 7.97*	92.26 ± 1.49

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

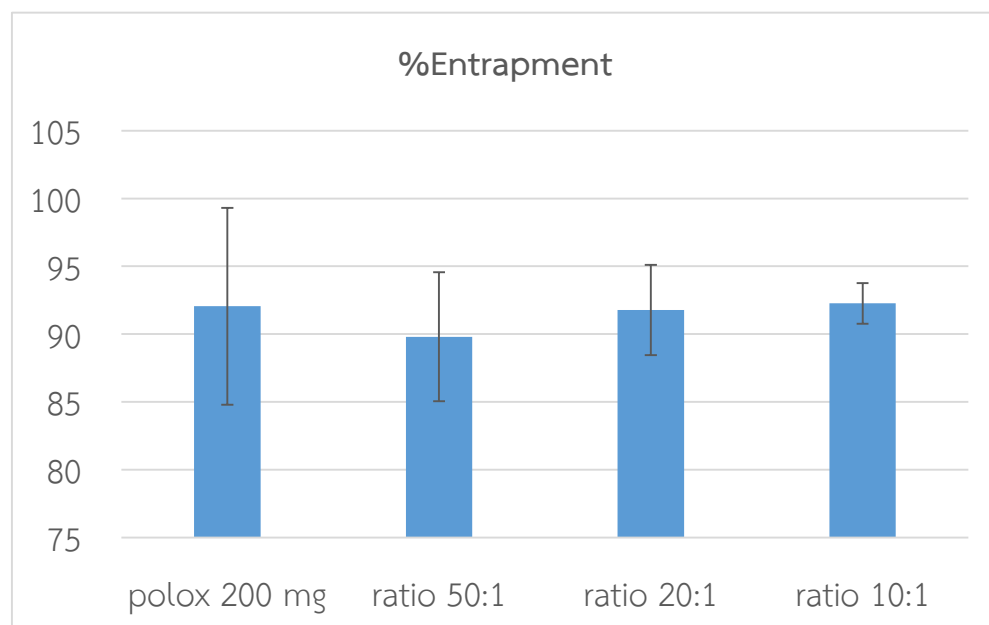
2.1. ผลการวัดขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาค zeta potential และ % entrapment ของ polymeric micelle ที่ load ยา furazolidone โดยเตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ CTAB ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1



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



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



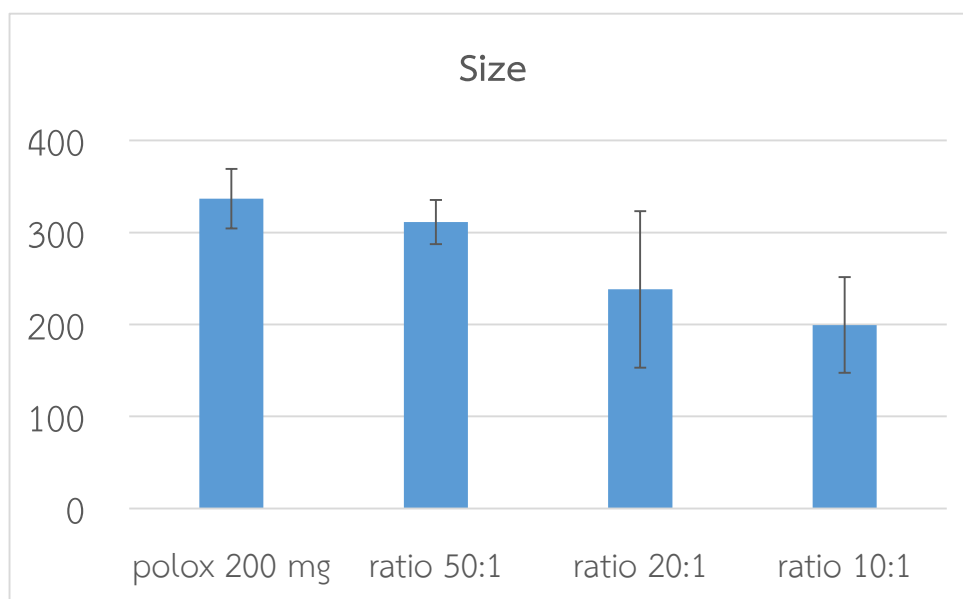
รูปที่ 30 แสดง % entrapment ของ polymeric micelle ที่ load ยา furazolidone โดยเตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ CTAB ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1

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

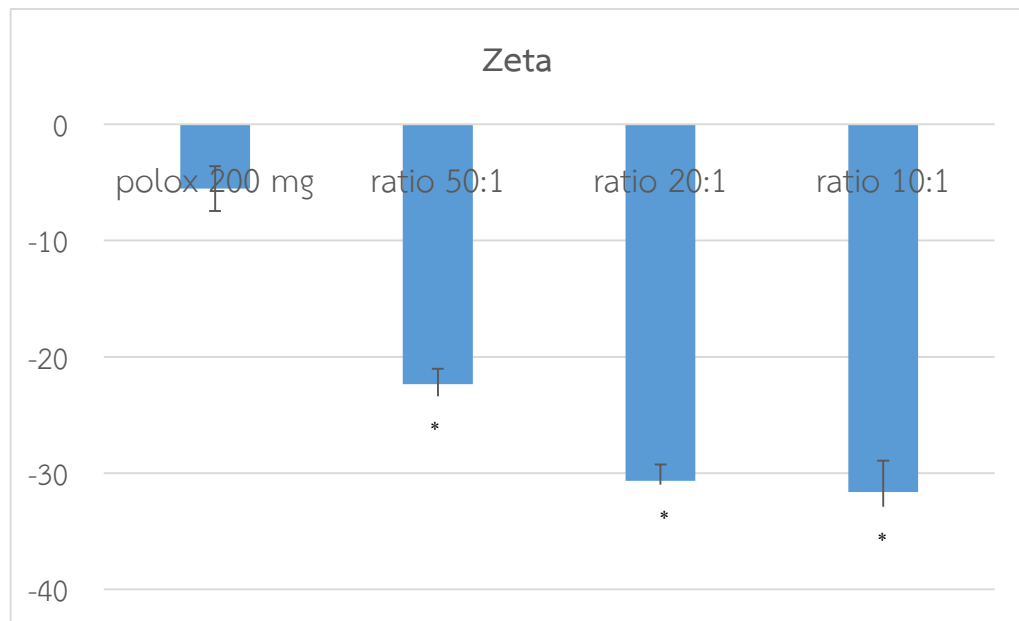
Formulation	Size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)	% Entrapment
poloxamer 200 mg	336.70 ± 32.42	0.48 ± 0.16	-5.53 ± 1.92	92.05 ± 7.26
50:1	311.42 ± 24.06	0.59 ± 0.13	-22.34 ± 1.31*	87.47 ± 3.14
20:1	238.10 ± 85.02	0.52 ± 0.07	-30.66 ± 1.39*	93.06 ± 5.41
10:1	199.36 ± 52.01	0.53 ± 0.05	-31.64 ± 2.70*	95.73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

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

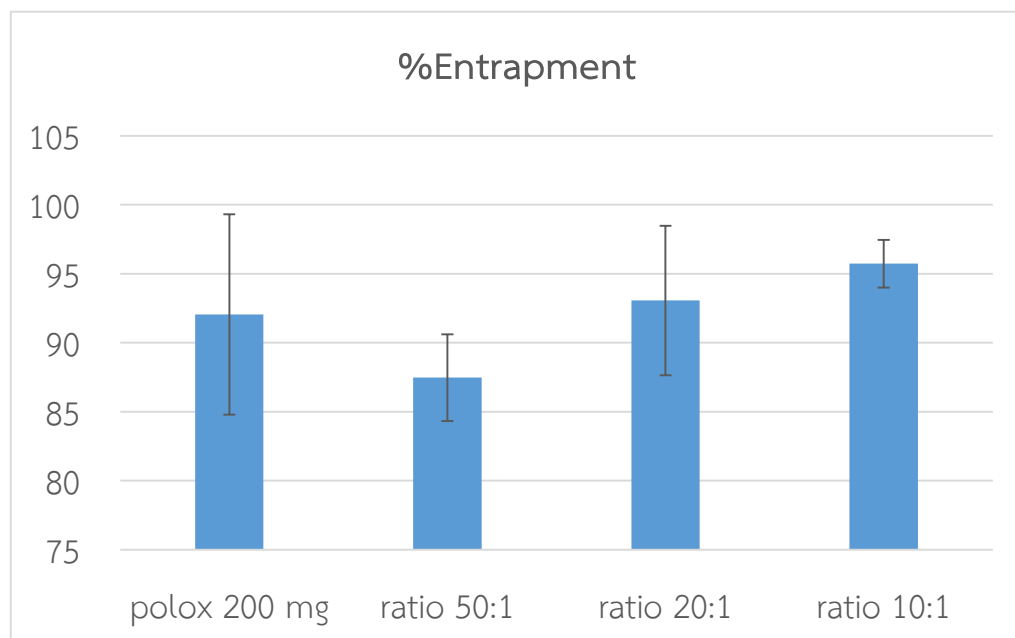
2.2 ผลการวัดขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาค zeta potential และ % entrapment ของ polymeric micelle ที่ load ยา furazolidone โดยเตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ lecithin ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1



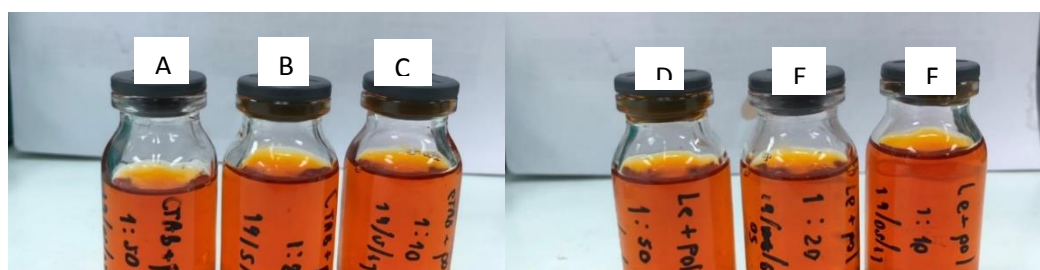
รูปที่ 31 แสดงขนาดอนุภาค polymeric micelle ที่ load ยา furazolidone โดยเตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ lecithin ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1



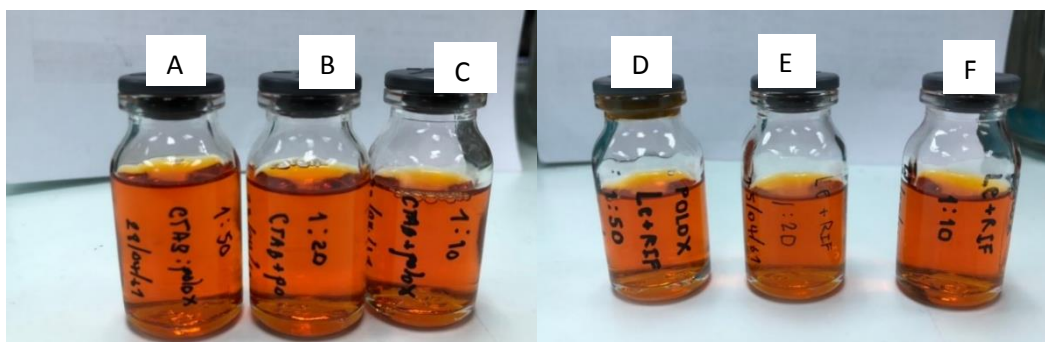
รูปที่ 32 แสดง potential ของ polymeric micelle ที่ load ยา furazolidone โดยเตรียมจากอัตราส่วนของ poloxamer407 ต่อ lecithin ที่ 50:1, 20:1 และ 10:1 (* $P < 0.05$ compare with poloxamer 200 mg)



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



รูปที่ 34 แสดงลักษณะทางกายภาพของ polymeric micelle ที่ load ยา furazolidone โดยเตรียมจาก poloxamer และ 407CTAB ที่อัตราส่วนต่าง ๆ (A, B และ C คือ poloxamer : CTAB ที่อัตราส่วน 50:1, 20:1 และ 10:1 D, E และ F คือ poloxamer : lecithin ที่อัตราส่วน 50:1, 20:1 และ 10:1)



รูปที่ 35 แสดงลักษณะทางกายภาพของ polymeric micelle ที่ load ยา furazolidone โดยเตรียมจาก poloxamer และ 407CTAB ที่อัตราส่วนต่าง ๆ เมื่อเก็บไว้ 7 วัน (A, B และ C คือ poloxamer : CTAB ที่อัตราส่วน 50:1, 20:1 และ 10:1 D, E และ F คือ poloxamer : lecithin ที่อัตราส่วน 50:1, 20:1 และ 10:1)

จากผลการวัดขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาค zeta potential และ % entrapment ของ polymeric micelle ที่ load ยา furazolidone ที่เตรียมจาก poloxamer 407 และ CTAB ที่อัตราส่วน 50:1, 20:1, 10:1 พบว่าที่อัตราส่วน 20:1 และ 10:1 มีค่า Zeta potential แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ P-value เท่ากับ 0.004 เมื่อเทียบกับ poloxamer 407 200 mg ซึ่งปริมาณ CTAB ที่เพิ่มขึ้นมีแนวโน้มทำให้ขนาดอนุภาค⁽⁵⁰⁾ และค่า zeta potential เพิ่มขึ้น

จากผลการวัดขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาค zeta potential และ % entrapment ของ polymeric micelle ที่ load ยา furazolidone ที่เตรียมจาก poloxamer407 และ lecithin ที่อัตราส่วน 50:1, 20:1, 10:1 พบว่าอัตราส่วน 50:1, 20:1 และ 10:1 มีค่า zeta potential แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ P-value เท่ากับ 0.000 เมื่อเทียบกับ poloxamer407 200 mg ซึ่งปริมาณ lecithin ที่เพิ่มขึ้นมีแนวโน้มทำให้ขนาดอนุภาค⁽⁵¹⁾ และค่า zeta potential ลดลง

จากการศึกษาของ Ruba ถึงปัจจัยที่ส่งผลต่อ % entrapment พบว่าคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิว และตัวยาที่ถูกกักเก็บในอนุภาค micelle หรือ liposome เป็นปัจจัยที่สำคัญ เนื่องจากปริมาณสารลดแรงตึงผิวมากขึ้นทำให้ membrane ของ micelle หรือ liposome มีรูพรุนทำให้สารที่ถูกกักเก็บไว้ด้านในรั่วออก และปริมาณสารลดแรงตึงผิวมากขึ้นจะเกิดปฏิกิริยากับอนุภาค micelle หรือ liposome โดยไปแย่งการกักเก็บยาเข้าในอนุภาค micelle หรือ liposome จึงทำให้ % entrapment ลดลง นอกจากนั้นโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวเช่น ความยาวของสายคาร์บอน หากมีความยาวไม่เหมาะสมทำให้การกักเก็บยาดู้น้อยลง และ transition temperature (Tc) ของสารลดแรงตึงผิวหากมีค่า Tc มาก ทำให้อนุภาคมีความคงตัวและเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้น้อยกว่าสารลดแรงตึงผิวที่มีค่า Tc น้อย ซึ่งการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของอนุภาคทำให้ยาที่ถูกกักเก็บรั่ว จึงทำให้ % entrapment ลดลง แต่อย่างไรก็ตามมีการศึกษาพบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณสารลดแรงตึงผิวมากขึ้น ทำให้ปริมาณ vesicles มากขึ้นจึงทำให้ % entrapment เพิ่มขึ้น⁽⁵³⁾ แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ พบว่าสัดส่วนของสารลดแรงตึงผิวที่ต่างกันทั้ง CTAB และ lecithin ส่งผลต่อ % entrapment ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ P-value เท่ากับ 0.671 และ 0.086 ตามลำดับ แต่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณสารลดแรงตึงผิว

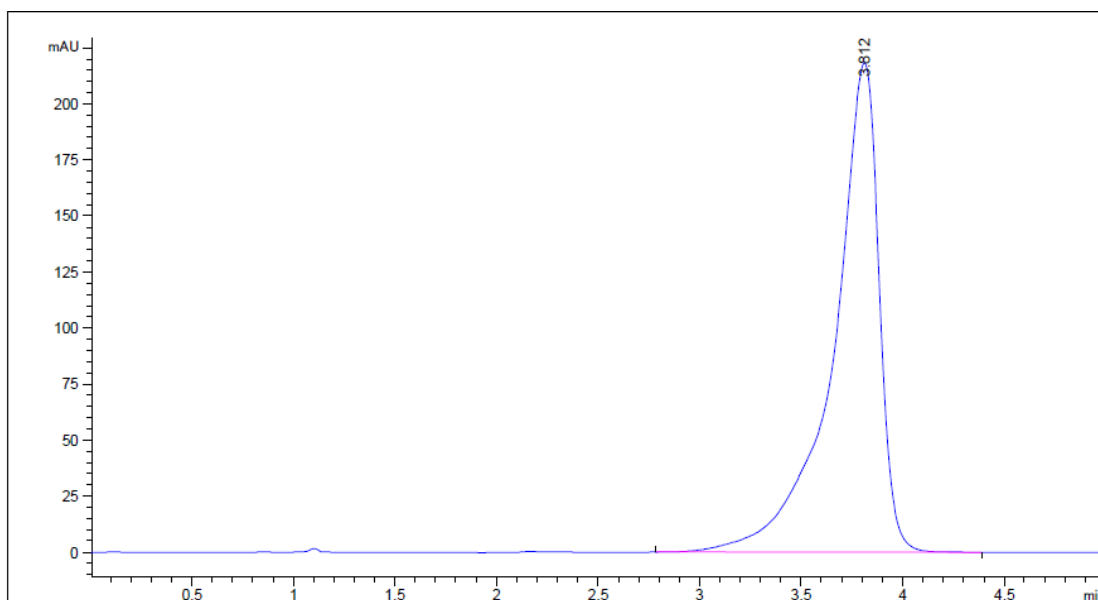
จากผลการทดลองศึกษาผลของ poloxamer407 และ CTAB หรือ lecithin ต่อการเกิด polymeric micelle ที่ load ยา furazolidone ทำให้สามารถคัดเลือกสูตรที่เหมาะสมได้แก่ poloxamer : CTAB (10:1) และ poloxamer : lecithin (50:1) เนื่องจากมีขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค และ % entrapment ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ค่า zeta potential แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ P-value เท่ากับ 0.001 โดย poloxamer : CTAB (10:1) มีค่า 22.36 ± 7.97 ส่วน poloxamer : lecithin (50:1) มีค่า -22.34 ± 1.31

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

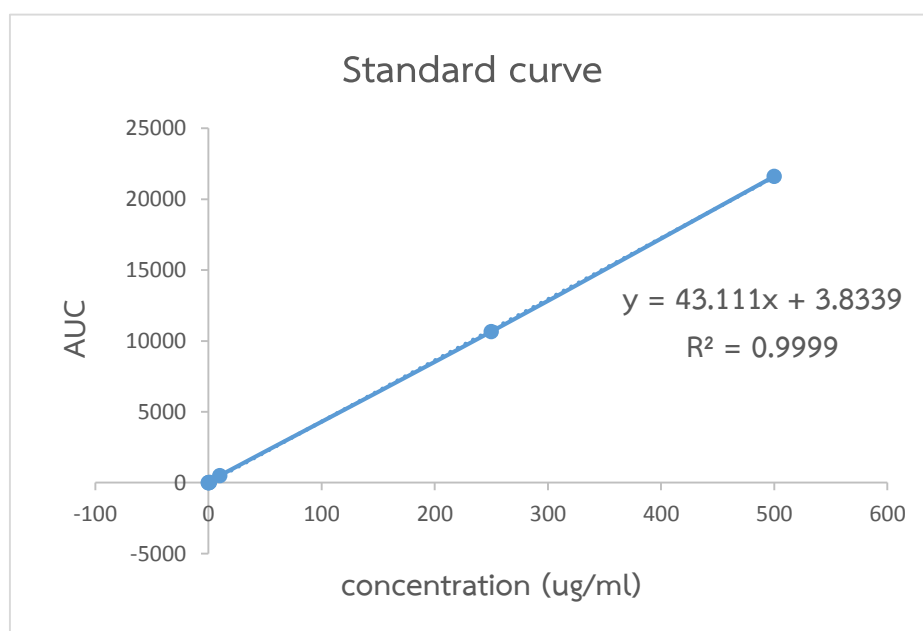
1. การศึกษาคุณสมบัติ cellular uptake

1.1 ตัวอย่าง chromatogram และ standard curve ของยา furazolidone ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ดังนี้ mobile phase : 0.01 M NaH₂PO₄: ACN (50:50), stationary phase :

C18 (254 mm x 4.6mm), flow rate : 1.00 ml/min, UV detector wavelength : 254 nm, running time 10 min, injection volume 20.00 μ L, retention time : 3.7



รูปที่ 36 แสดง chromatogram ของยา furazolidone ใช้ mobile phase : Water: ACN (75:25), retention time: 3.812 นาที, running time 5 นาที



รูปที่ 37 แสดง standard curve ของยา furazolidone

การวิเคราะห์ปริมาณสาร furazolidone ต่ำสุด ได้แก่

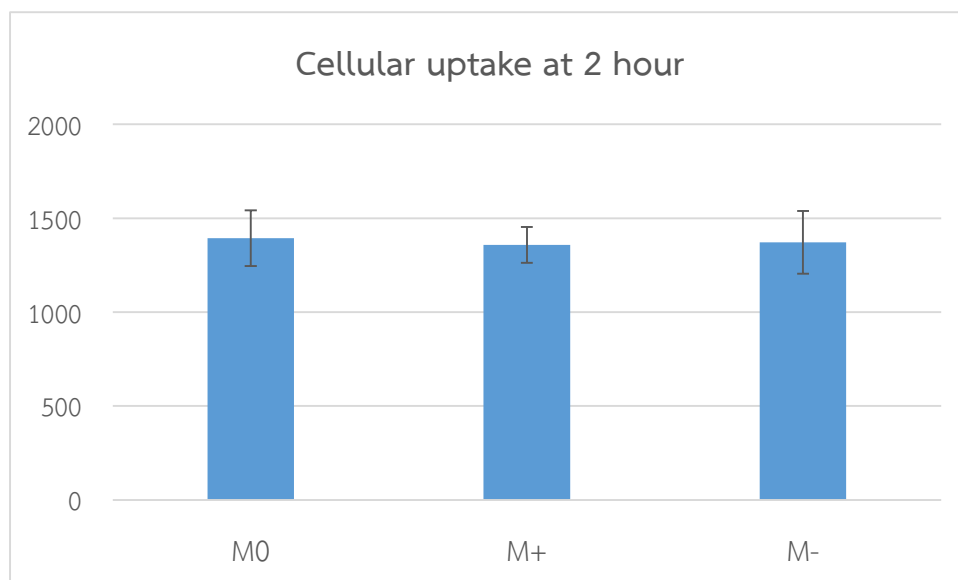
Limit of detection (LOD) = 3 ng/ml

Limit of quantification (LOQ) = 170 ng/ml

1.2 ผลการนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 (cellular uptake)

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

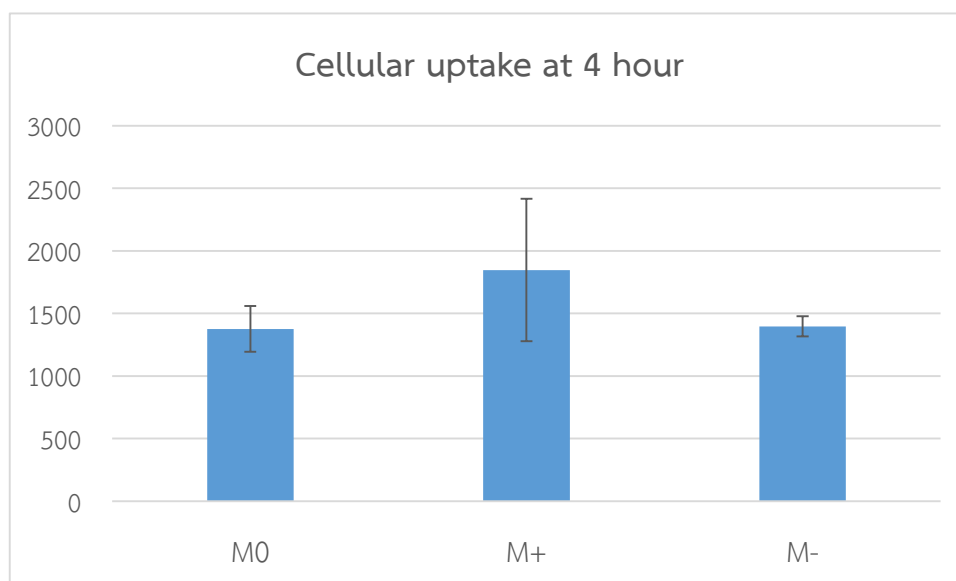
Formulation	Cellular uptake (ng/ml)
poloxamer	1,393.06 ± 148.45
poloxamer : CTAB (10:1)	1,357.72 ± 95.77
poloxamer : lecithin (50:1)	1,371.64 ± 167.07



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

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

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



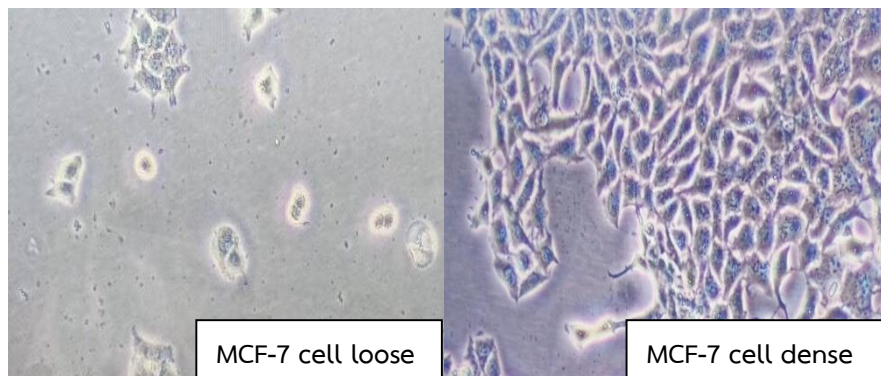
รูปที่ 39 แสดงผลการนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง MCF-7 (cellular uptake) ของ polymeric micelle ที่เตรียมโดยอัตราส่วน poloxamer ต่อ CTAB (10:1) หรือ poloxamer ต่อ lecithin (50:1) ที่ load ยา furazolidone ที่เวลา 4 ชั่วโมง

จากผลการนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง MCF-7 (cellular uptake) ของ polymeric micelle ที่เตรียมโดยอัตราส่วน poloxamer ต่อ CTAB (10:1) หรือ poloxamer lecithin (50:1) ที่ load ยา furazolidone ที่เวลา 2 ชั่วโมง พบว่าสูตรที่เตรียมด้วย poloxamer สามารถนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง MCF-7 มีค่า cellular uptake $1,393.06 \pm 148.45$ ng/ml ได้ดีกว่าสูตร poloxamer ต่อ CTAB

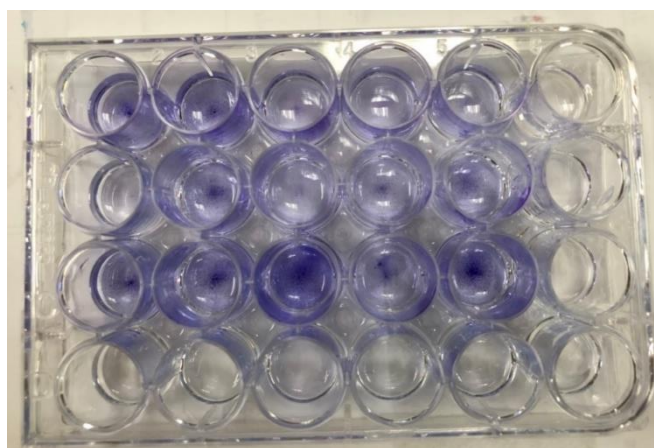
(10:1) และ poloxamer ต่อ lecithin (50:1) จะเห็นว่าผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Quanlei ถึงผลของ pluronic F127 ต่อการนำส่งยา tacrolimus cyclodextrin inclusion complex เข้าสู่เซลล์ในรูปแบบ liposome โดยศึกษาใน Caco-2 cell พบว่าสูตรที่มี pluronic F127-modified liposome containing cyclodextrin drug inclusion complex (FLIC) มี % cellular uptake คือ 49.2 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ liposome containing cyclodextrin drug inclusion complex (LIC) และ cyclodextrin drug inclusion complex (IC) ที่มี % cellular uptake คือ 39.5 และ 23.7 ตามลำดับ ⁽⁵⁴⁾ ดังนั้น poloxamer 407 จึงมีส่วนช่วยในการนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง แต่เมื่อวัดผลที่เวลา 4 ชั่วโมงพบว่า สูตรที่เตรียมด้วย poloxamer ต่อ CTAB (10:1) สามารถนำเข้าสู่เซลล์มะเร็ง MCF-7 มีค่า cellular uptake $1,846.15 \pm 568.97$ ng/ml ได้ดีกว่าสูตร poloxamerเปล่า และ poloxamer ต่อ lecithin (50:1) จะเห็นว่าผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Takeuchi และ Sara ถึงการนำส่งยา calcitonin ในรูปแบบ liposome โดยวิธีการกินในหนู rats พบว่าสูตร chitosan-coated liposome ซึ่งแสดงประจุบวกที่ผิวอนุภาค สามารถลดระดับแคลเซียมในเลือดได้ที่ 8, 12 และ 16 ชั่วโมงได้มากกว่าสูตร calcitonin solution และ non coated liposome ⁽⁵⁵⁾ โดยผ่านกลไก endocytosis เนื่องจากประจุบวกที่ผิวอนุภาคไปจับกับประจุลบที่ผิวของเซลล์ membrane เกิดแรง electrostatic ทำให้ประจุบวก uptake ยาเข้าเซลล์ได้มากกว่าประจุลบ และกลาง ⁽⁵⁶⁾

2. การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

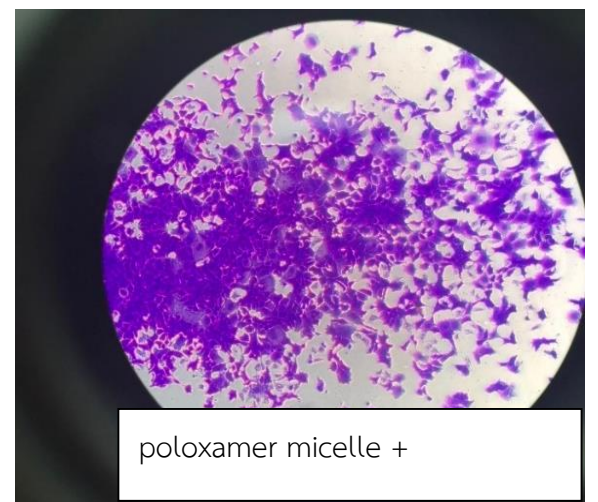
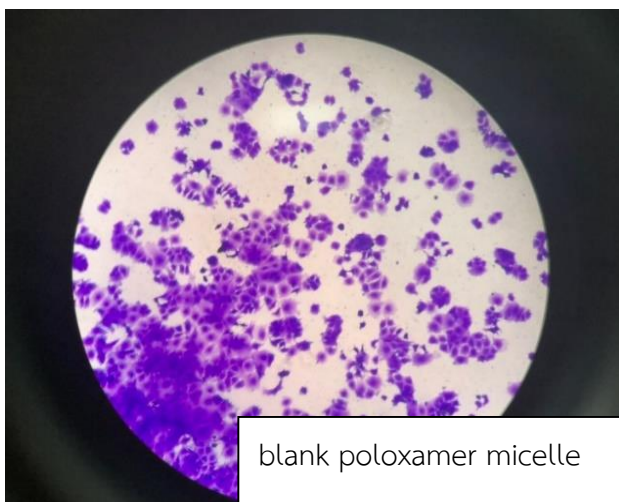
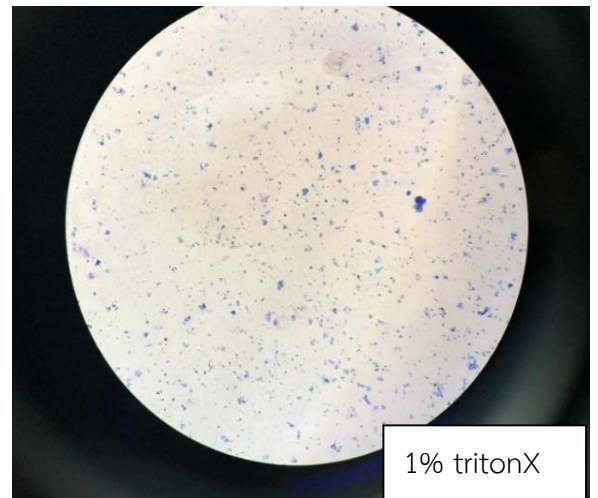
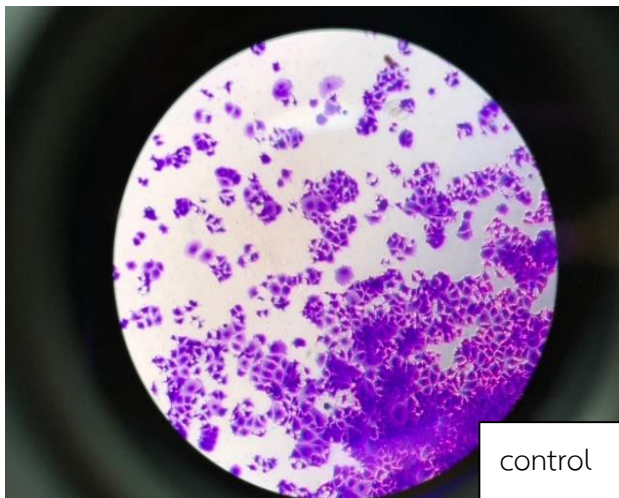
2.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง



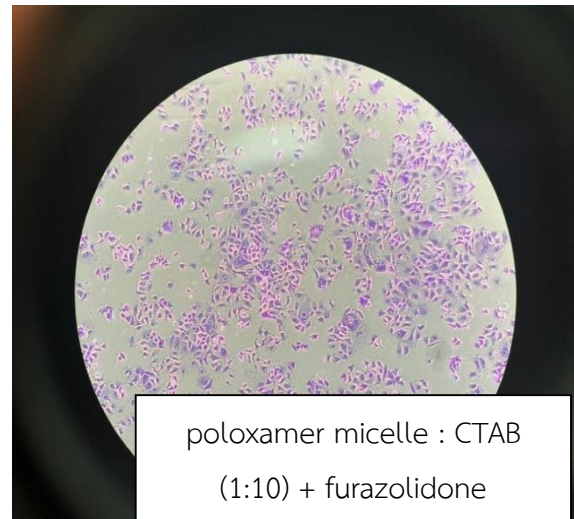
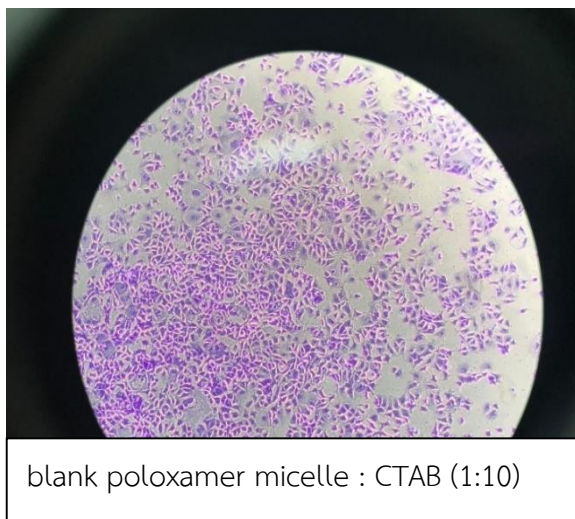
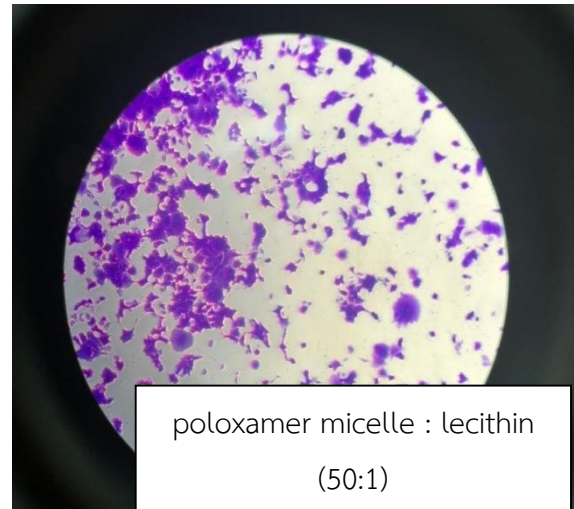
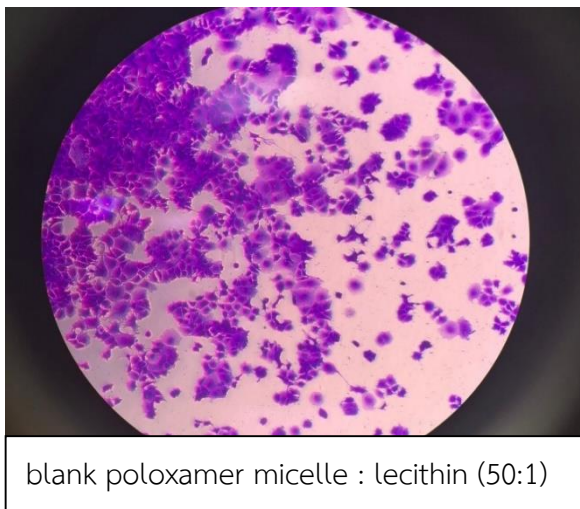
รูปที่ 40 แสดงลักษณะของ MCF-7 cell ในการศึกษาโดยส่องผ่านกล้อง inverted microscope



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



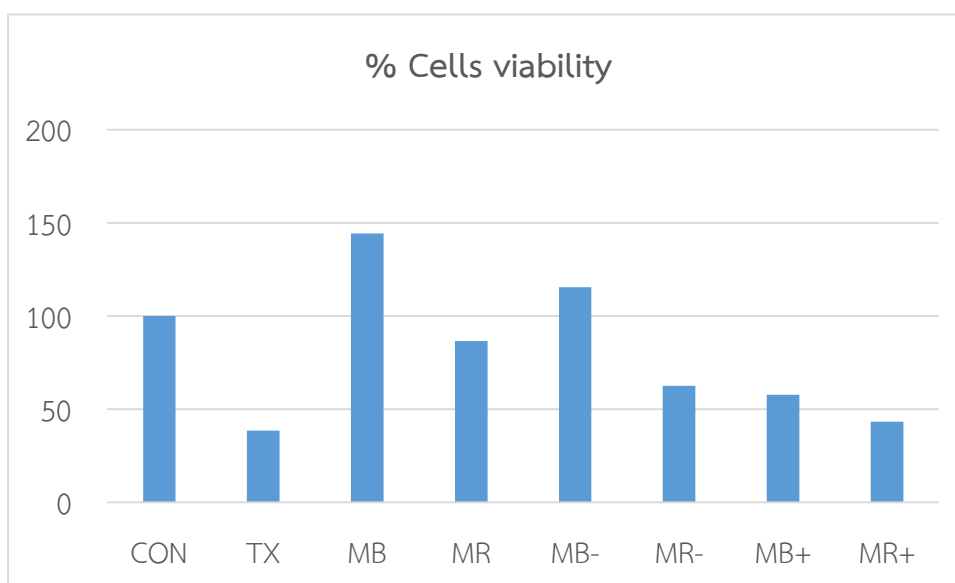
รูปที่ 42 แสดงลักษณะเซลล์หลังย้อม crystal violet



รูปที่ 43 แสดงลักษณะเซลล์หลังย้อม crystal violet (ต่อ)

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

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



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

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

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาผลของประจุบนพื้นผิว polymeric micelle โดยใช้ poloxamer407 ร่วมกับ CTAB หรือ lecithin ในการสร้าง polymeric micelle เพื่อนำส่งยา furazolidone เข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7 cell) เมื่อทำการประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของ polymeric micelle ได้แก่ ขนาด zeta potential และ % entrapment efficacy พบว่าขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค zeta potential และ % entrapment efficacy ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ปริมาณ poloxamer407 ที่เพิ่มมากขึ้นส่งผลให้การกระจายขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้น ทำให้สามารถคัดเลือกสูตรที่เหมาะสม ได้แก่ สูตร poloxamer407 200 mg มีขนาดเฉลี่ยของอนุภาคเท่ากับ 336.70 ± 32.4 nm และ % entrapment สูงกว่าสูตรอื่นๆ โดยมีการกระจายขนาดของอนุภาคที่น้อย จากนั้นนำสูตร poloxamer407 200 mg มาศึกษาต่อ โดยใช้ poloxamer407 : CTAB พบว่าอัตราส่วน ที่ 20:1 และ 10:1 มีค่า zeta potential แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ P-value เท่ากับ 0.004 เมื่อเทียบกับ poloxamer407 200 mg ซึ่งปริมาณ CTAB ที่เพิ่มขึ้นมีแนวโน้มทำให้ขนาดอนุภาค และค่า zeta potential เพิ่มขึ้นและพบว่า poloxamer407 : lecithin ที่อัตราส่วน 50:1, 20:1 และ 10:1 มีค่า zeta potential แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ P-value เท่ากับ 0.000 เมื่อเทียบกับ poloxamer407 200 mg ซึ่งปริมาณ lecithin ที่เพิ่มขึ้นมีแนวโน้มทำให้ขนาดอนุภาค และค่า zeta potential ลดลง เมื่อประเมิน ขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค zeta potential และ % entrapment efficacy ทำให้สามารถคัดเลือกสูตรที่เหมาะสมจากสูตรที่มี ค่า zeta potential ที่ใกล้เคียงกัน ได้แก่ poloxamer407 : CTAB คือ 10:1 และ poloxamer407 : lecithin คือ 50:1 ซึ่งมีค่า zeta potential เท่ากับ 22.36 ± 7.97 และ -22.34 ± 1.31 ตามลำดับ หลังจากนั้นจึงได้นำสูตร poloxamer407 : CTAB คือ 10:1 และ poloxamer407 : lecithin คือ 50:1 มาศึกษาคุณสมบัติ cellular uptake และฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (cytotoxicity) พบว่าผลการนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง MCF-7 (cellular uptake) ของ polymeric micelle ที่เตรียมโดยอัตราส่วน poloxamer ต่อ CTAB (10:1) หรือ poloxamer lecithin (50:1) ที่ load ยา furazolidone ที่เวลา 2 ชั่วโมง พบว่าสูตรที่เตรียมด้วย poloxamer สามารถนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง MCF-7 มีค่า cellular

uptake 1,376.36 ng/ml ได้ดีกว่าสูตร poloxamer ต่อ CTAB (10:1) และ poloxamer ต่อ lecithin (50:1) ดังนั้น poloxamer 407 จึงมีส่วนช่วยในการนำยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง แต่เมื่อวัดผลที่เวลา 4 ชั่วโมงพบว่า สูตรที่เตรียมด้วย poloxamer ต่อ CTAB (10:1) สามารถนำเข้าสู่เซลล์มะเร็ง MCF-7 มีค่า cellular uptake 1,846.07 ng/ml ได้ดีกว่าสูตร poloxamerเปล่า และ poloxamer ต่อ lecithin (50:1) โดยการ uptake เกิดผ่านกลไก endocytosis เนื่องจากประจุบวกที่ผิวอนุภาค ไปจับกับประจุลบที่ผิวของเซลล์ membrane เกิดแรง electrostatic ทำให้ประจุบวก uptake ยา เข้าสู่เซลล์ได้มากกว่าประจุลบ และกลไก โดยผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (cytotoxicity) ที่สูตร poloxamer : CTAB (10:1) ที่ load furazolidone มี % viability น้อยที่สุด

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าระบบนำส่งยาในรูปแบบ polymeric micelle ที่มีประจุบนพื้นผิวเป็นประจุบวกจาก CTAB มีลักษณะด้านคุณสมบัติทางกายภาพที่เหมาะสมในการนำส่งยารวมถึงมีแนวโน้มช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านมและเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของยา furazolidone ในการฆ่าเซลล์มะเร็งเต้านม แต่จากการศึกษานี้ศึกษาเพียงคุณสมบัติของ polymeric micelle ในด้านทางกายภาพเท่านั้น ซึ่งอาจเพิ่มการศึกษาในด้านอื่นๆเช่น สมบัติทางเคมี หรือ สมบัติทางชีววิทยาต่อไป อีกทั้งการศึกษาเซลล์ฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (cytotoxicity) และคุณสมบัติ cellular uptake ศึกษาเฉพาะในเซลล์มะเร็งเต้านมซึ่งในอนาคตอาจจะพัฒนาการศึกษาในเซลล์มะเร็งชนิดอื่น เพื่อสามารถอธิบายกลไกเพิ่มเติมต่อการนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งได้ของ polymeric micelle และอาจจะศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของมนุษย์ เพื่อเป็นยืนยันความปลอดภัยต่อเซลล์ปกติได้ดียิ่งขึ้น

บทที่ 6

ผลผลิต (Output)

กำลังดำเนินการตีพิมพ์ในวารสาร Isan Journal of Pharmaceutical Sciences ซึ่งอยู่ใน
ฐานข้อมูล TCI1 และ ACI

งบประมาณของโครงการวิจัย

รายละเอียดงบประมาณการวิจัย จำแนกตามงบประมาณประเภทต่างๆ

ปีที่ ดำเนินการ	งบประมาณที่เสนอขอ (บาท)						
	งบบุคลากร	ค่าตอบแทน	ค่าใช้สอย	ค่าวัสดุ	ค่าธรรมเนียมการ อุดหนุนสถาบัน	ครุภัณฑ์	รวม
ปีที่ 1	360,000	50,000	42,000	884,500	148,500	-	1,485,000

รายละเอียดงบประมาณการวิจัย จำแนกตามงบประมาณประเภทต่างๆที่เสนอขอในแต่ละปี

รายการ	จำนวนเงิน	หมายเหตุ
	ปี 2561	
1. งบบุคลากร 1.1 ค่าจ้างชั่วคราวผู้ช่วยนักวิจัย ทำงานเต็มเวลา - วุฒิปริญญาตรี 15,000 บาท x จำนวน 2 คน 12 เดือน)	360,000	
2. งบดำเนินงาน	403,950	
2.1 ค่าตอบแทน	50,000	

รายการ	จำนวนเงิน	หมายเหตุ
	ปี 2561	
(1) ค่าตอบแทนคณะผู้วิจัย (อาจารย์ต่ำกว่าระดับ 5x จำนวน 4 คน)	40,000	
(2) ค่าตอบแทนที่ปรึกษา โครงการ	10,000	
2.2 ค่าใช้สอย	42,000	
(1) ค่าใช้จ่ายในการเดินทางไปราชการ	4,000	
(2) ค่าใช้จ่ายในการสัมมนา/ฝึกอบรม	8,000	
(3) ค่าใช้สอยอื่น	30,000	
- ค่าถ่ายเอกสารและสืบค้นข้อมูล		
- ค่าตีพิมพ์		
2.3 ค่าวัสดุ	884,500	
ค่าวัสดุสำนักงาน	2,000	
- กระดาษ		
- ตู้อัดเอกสาร		
- แฟ้มใส่เอกสาร		
- เครื่องเจาะรูกระดาษ		
- ปากกาเคมี		
- แม่คีย์บอร์ด		
- คลิปหนีบกระดาษ		
ค่าวัสดุคอมพิวเตอร์		
ค่าวัสดุสารเคมีและค่าวัสดุวิทยาศาสตร์	100,000	
- สารมาตรฐาน		

รายการ	จำนวนเงิน	หมายเหตุ
	ปี 2561	
- ตัวทำละลาย HPLC grade	100,000	
- อาหารเลี้ยงเซลล์และอุปกรณ์เลี้ยง เซลล์	430,000	
-ค่าสั่งซื้อเซลล์	30,000	
-ค่าสารทดสอบทางชีวภาพ เช่น MTT	110,000	
-ค่าสารเคมีทั่วไป ในการเตรียมระบบ นำส่ง	112,500	
3. งบลงทุน (ค่าครุภัณฑ์ และ สิ่งก่อสร้าง)	-	
3.1 ค่าครุภัณฑ์	-	
3.2 ค่าที่ดินและสิ่งก่อสร้าง	-	
4. ค่าธรรมเนียมอุดหนุนสถาบัน (คำอธิบาย : เป็นค่าสาธารณูปโภค ไม่เกิน ร้อยละ 10 ของงบวิจัยไม่รวมค่าครุภัณฑ์)	148,500	
รวมงบประมาณที่เสนอขอ	1,485,000	

เอกสารอ้างอิง

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

10. Shichiri M, Fukai N, Kono Y, Tanaka Y. Furazolidone as an oral angiogenesis inhibitor targeting hepatic cancers. *Cancer research*. 2009;69(11):4760-8.
11. Lu Y, Park K. Polymeric micelles and alternative nanonized delivery vehicles for poorly soluble drugs. *International journal of pharmaceutics*. 2013;453(1):198-214.
12. Theja D, Rao VT, Jamuna P, Reddy SP. AN APPROACH TO INCREASE THE SOLUBILITY OF FURAZOLIDONE BY SOLID DISPERSION TECHNIQUE. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2012;3(6):1800.
13. Micelles [Internet]. European Chemistry Thematic Network [cited 2018 Feb 7]. Available from: <http://www.whatischemistry.unina.it/en/micella.html>.
14. Croy S, Kwon G. Polymeric micelles for drug delivery. *Current pharmaceutical design*. 2006;12(36):4669-84.
15. Ma Y, Zhuang Y, Xie X, Wang C, Wang F, Zhou D, et al. The role of surface charge density in cationic liposome-promoted dendritic cell maturation and vaccine-induced immune responses. *Nanoscale*. 2011;3(5):2307-14.
16. National cancer control programmes [Internet]. National cancer institute. [cited 2018 Feb 22]. Available from: http://www.nci.go.th/th/File_download/D_index/NCCP_2556-2560.pdf.
17. Cancer in thailand [Internet]. Ministry of public health. [cited 2017 Feb 22]. Available from: http://www.nci.go.th/th/File_download/Nci%20Cancer%20Registry/Cancer%20in%20Thailand8.pdf.
18. Hallmarks of Cancer: The Next Generation [Internet]. 2011 [cited 2018 Feb 11]. Available from: [http://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(11\)00127-9](http://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(11)00127-9).
19. Osborne C, Wilson P, Tripathy D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *The oncologist*. 2004;9(4):361-77.
20. Lee EY, Muller WJ. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2010;2(10):a003236.
21. Lehman TA, Reddel R, Peifer A, Spillare E, Kaighn ME, Weston A, et al. Oncogenes and tumor-suppressor genes. *Environmental health perspectives*. 1991;93:133.
22. Breast cancer [Internet]. U.S. National Library of medicine. [cited 2018 Feb 11]. Available from: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/breast-cancer>.

23. Breast cancer2 [Internet]. POBPED. [cited 2018 Feb 22]. Available from: <https://www.pobpad.com>.
24. stage of breast cancer [Internet]. Thaibreastcancer.com. [cited 2018 Feb 22]. Available from: <http://www.thaibreastcancer.com/ca-131/>.
25. Risk of breast cancer [Internet]. Bumrungrad international. [cited 2018 Feb 22]. Available from: <https://www.bumrungrad.com/th/horizon-cancer-treatment-center-chemotherapy-bangkok-thailand/conditions/breast-cancer>.
26. Furazolidonepicture [Internet]. chemicalbook. [cited 2018 Mar 21]. Available from: http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_DE_CB7474473.htm.
27. Remington the science and practice of pharmacy. 21 ed. B.troy D, editor. Baltimore,USA: Lippincott Williams & Wikins.
28. U.S Pharmacopeia 39 National Formulary 34. Baltimore,USA: United Book Press 2016.
29. Shichiri M, Tanaka Y. Inhibition of cancer progression by furazolidone: involvement of antiangiogenic and anti-tumor effects. *Cell Cycle*. 2010;9(1):64-8.
30. Dinda S, Kodali-Gali S, Sevilla L, Burkley M, Hurd C, Moudgil V. Inhibition of proliferation of T47D human breast cancer cells: alterations in progesterone receptor and p53 tumor suppressor protein. *Molecular and cellular biochemistry*. 1997;175(1-2):81-9.
31. Werawatganone P. Chemical reaction in micellar solutions. *Journal of Health Research*. 2005.
32. Molecular Simulation and Preparation of Block Copolymer Micelle for Drug Delivery Application [Internet]. [cited 2018 Feb 11]. Available from: <http://sutir.sut.ac.th:8080/sutir/bitstream/123456789/5154/2/Fulltext.pdf>.
33. Jhaveri AM, Torchilin VP. Multifunctional polymeric micelles for delivery of drugs and siRNA. *Frontiers in pharmacology*. 2014;5:77.
34. Xu W, Ling P, Zhang T. Polymeric micelles, a promising drug delivery system to enhance bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Journal of drug delivery*. 2013;2013.
35. Chen H, Khemtong C, Yang X, Chang X, Gao J. Nanonization strategies for poorly water-soluble drugs. *Drug discovery today*. 2011;16(7-8):354-60.

36. Mourya V, Inamdar N, Nawale R, Kulthe S. Polymeric micelles: general considerations and their applications. *Ind J Pharm Edu Res.* 2011;45(2):128-38.
37. Pu X, Liu J, Guo Y, Yan X, Yang H, Yuan Q. Study progression in polymeric micelles for the targeting delivery of poorly soluble anticancer agents to tumor. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2012;7(1):1-17.
38. Almeida M, Magalhães M, Veiga F, Figueiras A. Poloxamers, poloxamines and polymeric micelles: Definition, structure and therapeutic applications in cancer. *Journal of Polymer Research.* 2018;25(1):31.
39. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6 ed. Rowe RC, Sheskey PJ, Quin ME, editors. Gurnee,USA: Pharmaceutical Press.
40. Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharmaceutical research.* 2006;23(12):2709-28.
41. Escobar-Chávez JJ, López-Cervantes M, Naik A, Kalia Y, Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A. Applications of thermo-reversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences.* 2006;9(3):339-58.
42. Bae KH, Lee Y, Park TG. Oil-Encapsulating PEO– PPO– PEO/PEG Shell Cross-Linked Nanocapsules for Target-Specific Delivery of Paclitaxel. *Biomacromolecules.* 2007;8(2):650-6.
43. El-Kattan AF, Asbill CS, Kim N, Michniak BB. Effect of formulation variables on the percutaneous permeation of ketoprofen from gel formulations. *Drug Delivery.* 2000;7(3):147-53.
44. Dimitrova E, Bogdanova S, Mitcheva M, Tanev I, Minkov E. Development of model aqueous ophthalmic solution of indomethacin. *Drug development and industrial pharmacy.* 2000;26(12):1297-301.
45. Saxena V, Hussain MD. Poloxamer 407/TPGS mixed micelles for delivery of gambogic acid to breast and multidrug-resistant cancer. *International journal of nanomedicine.* 2012;7:713.
46. Krasnici S, Werner A, Eichhorn ME, Schmitt-Sody M, Pahernik SA, Sauer B, et al. Effect of the surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels. *International journal of cancer.* 2003;105(4):561-7.

47. Nguyen TL, Nguyen TH, Nguyen DH. Development and In Vitro Evaluation of Liposomes Using Soy Lecithin to Encapsulate Paclitaxel. *International journal of biomaterials*. 2017;2017.
48. Baczynska D, Widerak K, Ugorski M, Langner M. Surface charge and the association of liposomes with colon carcinoma cells. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2001;56(9-10):872-7.
49. Khalil RA, Al-hakam AZ. Theoretical estimation of the critical packing parameter of amphiphilic self-assembled aggregates. *Applied Surface Science*. 2014;318:85-9.
50. Effect of Surfactant on the Size, Zeta Potential and Rheology of Alumina Nanofluids [Internet]. ingenta. [cited 2018 Nov 9]. Available from: <https://www.ingentaconnect.com/content/asp/jon//00000004/00000003/2014art00004>
51. Farnia P, Velayati AA, Mollaei S, Ghanavi J. Modified rifampin nanoparticles: Increased solubility with slow release rate. *International journal of mycobacteriology*. 2017;6(2):171.
52. Dwiastuti R, Noegrohati S, Istyastono EP, Marchaban, editors. Formulation and physical properties observations of soy lecithin liposome containing 4-n-butylresorcinol. *AIP Conference Proceedings*; 2016: AIP Publishing.
53. Bnyan R, Khan I, Ehtezazi T, Saleem I, Gordon S, O'Neill F, et al. Surfactant Effects on Lipid-Based Vesicles Properties. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2018;107(5):1237-46.
54. Zhu Q, Guo T, Xia D, Li X, Zhu C, Li H, et al. Pluronic F 127-modified liposome-containing tacrolimus-cyclodextrin inclusion complexes: improved solubility, cellular uptake and intestinal penetration. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2013;65(8):1107-17.
55. Takeuchi H, Matsui Y, Yamamoto H, Kawashima Y. Mucoadhesive properties of carbopol or chitosan-coated liposomes and their effectiveness in the oral administration of calcitonin to rats. *Journal of controlled release*. 2003;86(2-3):235-42.

56. Salatin S, Yari Khosroushahi A. Overviews on the cellular uptake mechanism of polysaccharide colloidal nanoparticles. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2017;21(9):1668-86.
57. Ito E, Yip KW, Katz D, Fonseca SB, Hedley DW, Chow S, et al. Potential use of cetrimonium bromide as an apoptosis-promoting anti-cancer agent for head and neck cancer. *Molecular pharmacology*. 2009.
58. Schachter D. The source of toxicity in CTAB and CTAB-stabilized gold nanorods: Rutgers University-Graduate School-New Brunswick; 2013.