



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

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

วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้  
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 59323  
สัญญาเลขที่ 5.3/2562

## 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. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 5.3/2562

ขอขอบพระคุณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่อำนวยความสะดวกในด้านเครื่องมือในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ นางสาว ศุภลักษณ์แก่นยิ่ง และ นางสาว พนิดนันท์ พรหมจันทร์ ผู้ช่วยวิจัยที่ช่วยในส่วนของการทำงานทดลองปฏิบัติการวิจัยอย่างเรียบร้อย

คณะผู้วิจัย

21 กุมภาพันธ์ 2563

## บทคัดย่อ

ระบบนำส่งยาอนุภาคนาโนเป็นกลยุทธ์สำคัญที่สามารถเพิ่มความจำเพาะต่อการนำส่งไปยังเซลล์มะเร็ง ซึ่งจะช่วยลดอาการข้างเคียงของยาและเพิ่มความสามารถในการออกฤทธิ์ของยาได้ โดยงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาระบบ liposome เพื่อนำส่ง Furazolidone และเตรียม Liposome จาก DCA และ Phosphatidylcholine (PD) เพื่อนำส่งไปยังเซลล์มะเร็งด้วยวิธี lipid film hydration method. ตำรับที่เตรียมได้แต่ละสูตรจะนำมาเปรียบเทียบกันในปัจจัยของลักษณะทางกายภาพ ขนาดอนุภาค การกระจายตัวของอนุภาค และความสามารถในการกักเก็บยา ศึกษาความคงตัวในสภาวะจำลองภายในร่างกาย 3 สภาวะคือ Phosphate buffer saline solution (PBS pH 7.4), RPMI-1640 medium และ DMEM ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่าตำรับที่เหมาะสมที่สุดคือ PD: DCA: Furazolidone in ratio 4:1:5 มีขนาดอนุภาค  $177.9556 \pm 39.0976$  และสามารถกักเก็บตัวยาได้ถึง  $35.6087 \pm 4.3671$  % และนำตำรับที่คัดเลือกได้นั้นมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งและความสามารถในการนำส่งเข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ผลการศึกษาพบว่า PD: DCA: Furazolidone in ratio 4:1:5 สามารถเพิ่มการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งและนำส่งเข้าสู่เซลล์มะเร็งได้อย่างมีนัยยะสำคัญ ( $P < 0.05$ ) โดยสรุปแล้ว liposome-Deoxycholic acid สามารถนำมาพัฒนาเพื่อใช้เป็นระบบนำส่งยาต่อไปได้ในอนาคต

## Abstract

Nano-drug delivery system is important strategy to increase specific targeting, increase therapeutic effect and reduced adverse effect of anticancer drugs. The objective of this study was carried out to develop liposome as vehicle for delivery Furazolidone. The liposome was prepared from Phosphatidylcholine (PD) and Deoxycholic acid (DCA) for delivery to cancer cell. All formulations were prepared by lipid-film hydration method. The formulations were selected by comparing parameter; physical properties, particle size, zeta potential and entrapment efficacy. The stability of liposome have been stored in 3 conditions medium PBS pH 7.4, RPMI-1640 medium and DMEM, and control temperature at 37°C for 7 day. The result found that the optimal formulation PD: DCA: Furazolidone in ratio 4:1:5 had greater value of parameters (size=177.9556±39.0976, %EE=35.6087 ± 4.3671 %). The selected formulations were prepared for all cytotoxicity and cellular uptake evaluation in breast cancer cell line (MCF-7). The result show that liposome contained PD: DCA: Furazolidone in ratio 4:1:5 can be inhibit proliferation and increase cellular uptake significantly ( $P < 0.05$ ). In conclusion, the liposome-Deoxycholic acid can be developing to drug nano-carrier.

## สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	5
บทที่ 3 วิธีวิจัย	23
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	29
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	54
บทที่ 6	56

## บทที่ 1 บทนำ

เนื่องจากปัจจุบันพบอุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งในประเทศไทยสูงขึ้น โดยโรคมะเร็งที่เป็นปัญหาสำคัญ 5 อันดับแรกของประเทศได้แก่ มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 62.01 ของมะเร็งทั้งหมด(1) โดยโรคมะเร็งเต้านมและมะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็ง 2 อันดับแรกที่ก่อโรครในผู้หญิง ซึ่งถือเป็นโรคที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขของประเทศอย่างมาก โดยจากอัตราการเกิดโรคมะเร็งที่เพิ่มสูงขึ้นดังที่กล่าวข้างต้นคณะผู้วิจัยจึงเกิดความสนใจที่ศึกษาและพัฒนาระบบนำส่งยาที่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเต้านมเพื่อประโยชน์ต่อผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านม โดยปัจจุบันมีการคิดค้นและพัฒนาการรักษาโรคมะเร็งอย่างต่อเนื่องเพื่อให้การรักษา มะเร็งมีประสิทธิภาพสูงขึ้น แต่ก็ยังไม่สามารถกำจัดผลข้างเคียงของยาเคมีบำบัดได้ เนื่องจากยาเคมีบำบัดส่วนใหญ่จะมีกลไกในการออกฤทธิ์โดยรบกวนระยะวงจรเซลล์ (cell cycle) เช่น ยาที่ออกฤทธิ์ต่อกระบวนการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) หรือออกฤทธิ์ต่อกระบวนการเมทาบอลิซึม (metabolite) ของเซลล์เป็นต้น ยาเคมีบำบัดที่ไม่จำเพาะต่อระยะวงจรเซลล์ของเซลล์มะเร็ง เมื่อยาเข้าสู่ร่างกายจะไปมีผลต่อทั้งเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติของร่างกาย โดยเซลล์ที่ได้รับผลกระทบจากผลของยาเคมีบำบัดมักเป็นเซลล์ที่มีการแบ่งตัวเร็วเช่น เซลล์เยื่อบุ เซลล์เม็ดเลือด และเซลล์เส้นผม ทำให้เกิดผลข้างเคียงจากการใช้ยาขึ้น โดยผลข้างเคียงนี้สามารถเกิดได้กับทุกระบบของร่างกายและแสดงอาการต่างๆออกมาเช่น อาการคลื่นไส้อาเจียน เกิดภาวะซีด และผมร่วง เป็นต้น นอกจากนี้ปัญหาด้านอาการไม่พึงประสงค์ของยาเคมีบำบัดดังกล่าวข้างต้นแล้ว ยาเคมีบำบัดหลายชนิดยังมีปัญหาด้านลักษณะทางกายภาพของตัวยาเช่น ยามีการละลายที่ต่ำหรือมีความคงตัวต่ำ เป็นต้น อีกทั้งยาส่วนใหญ่มีค่าดัชนีในการรักษา (therapeutic index) แคบ ทำให้เกิดพิษจากการใช้ยาได้ง่าย ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาระบบนำส่งยามะเร็งเพื่อเพิ่มความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งและเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา ซึ่งจะช่วยลดอาการข้างเคียงของยาและเพิ่มความสามารถในการออกฤทธิ์ของยานั้นเอง

ในปัจจุบันระบบนำส่งยาถูกพัฒนาขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งแต่ละระบบมีข้อดีและข้อเสียที่แตกต่าง ดังนั้นการเลือกระบบนำส่งยาให้เหมาะสมกับลักษณะของยาและสภาวะโรคจึงเป็นสิ่งสำคัญ โดยคณะผู้วิจัยได้เร่งเห็นถึงความสำคัญของระบบนำส่งยาในรูปแบบ liposome ซึ่งเป็นระบบนำส่งยาแบบ nanovesicle ที่มีขนาดอนุภาคขนาดเล็กกว่าระดับไมครอน (submicron) และ

โครงสร้างหลักเป็น phospholipid และ cholesterol ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น amphipathic กล่าวคือมีทั้งส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ในโมเลกุล โดยจะเรียงตัวเป็นแถวของโมเลกุลซ้อนกันเป็นผนังสองชั้นหรือ lipid bilayer โดยตัวยาหรือสารสำคัญที่มีคุณสมบัติชอบน้ำจะกักเก็บอยู่ในส่วนของชั้นที่มีขั้ว ส่วนตัวยาหรือสารสำคัญที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำจะแทรกอยู่ใน lipid bilayer โดยยาในรูปแบบ liposome นี้มีข้อดีหลายประการได้แก่ สามารถเพิ่มความคงตัวของสารที่ถูกกักเก็บ ช่วยลดความเป็นพิษของสารที่ถูกกักเก็บ สามารถเข้ากันได้กับร่างกาย และถูกทำลายได้ในร่างกาย ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของสารที่ถูกกักเก็บและสามารถออกแบบระบบให้มีความจำเพาะต่อการนำส่งยาได้(2) ซึ่งจากข้อดีนี้เองจึงสนใจนำระบบนำส่งยาในรูปแบบ liposome มาพัฒนาและออกแบบให้มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาและลดอาการข้างเคียงจากการใช้ยาเคมีบำบัด ซึ่งจากการศึกษาของ Fuping Gao, Lei Li และคณะ พบว่า deoxycholic acid ซึ่งเป็น secondary bile acid ที่จัดเป็น polar lipid มีลักษณะเป็น amphiphilic นี้ สามารถเพิ่มความจำเพาะเจาะจงในการนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งได้หลายกลไกขึ้นกับชนิดของเซลล์มะเร็ง โดยไม่มีผลหรือมีผลน้อยต่อเซลล์ปกติของร่างกายและการใช้ deoxycholic acid มาเป็นองค์ประกอบของระบบนำส่งยายังสามารถลดอัตราการรอดชีวิต (%viability) ของเซลล์มะเร็งได้มากกว่าการใช้ยาเดี่ยวๆอย่างมีนัยยะสำคัญ(3) อีกทั้งยังสามารถแก้ไขคุณสมบัติที่ไม่เหมาะสมทางด้านต่างๆของยาได้ ดังนั้นจึงเกิดความสนใจที่จะนำ deoxycholic acid มาใช้ในการพัฒนาระบบนำส่งยาในรูปแบบ liposome เพื่อช่วยเพิ่มความจำเพาะต่อเซลล์มากยิ่งขึ้น แต่เนื่องจาก deoxycholic acid มี aggregation number ต่ำ ซึ่งทำให้ความสามารถในการเกิด liposome ได้ไม่ดี จึงจำเป็นต้องใช้สารอื่นช่วยในการเกิด liposome โดยจากการศึกษาของ De Castro B., Gameiro P. และคณะ พบว่าการใช้ phosphatidylcholine เป็น copolymer จะช่วยในการเกิด liposome ซึ่งเมื่อเพิ่ม phosphatidylcholine เข้าไปในสูตรจะสามารถเพิ่มความเป็น lipophilic drug ได้เป็นผลให้ประจวบกับผิวเล็กกว่าการใช้ bile acid เดี่ยวๆ ทำให้ความสามารถในการละลายของ liposome เพิ่มมากขึ้นได้นั่นเอง (4) อีกทั้ง phosphatidylcholine เป็นสารที่ได้จากธรรมชาติและนิยมนำมาใช้เป็นสารต้นแบบในการศึกษาระบบนำส่งยาในรูปแบบ liposome ดังนั้นจึงสนใจที่จะนำ phosphatidylcholine มาใช้ในการศึกษาและพัฒนาระบบนำส่งยา โดยตัวยาสำคัญที่จะนำมาใช้ในการศึกษานี้ เพื่อใช้เป็นต้นแบบของยามะเร็งในการพัฒนาระบบนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งได้แก่ furazolidone เนื่องจากเป็นสารที่ปัญหาด้านการละลายซึ่งสอดคล้องปัญหาของยามะเร็งที่เกิดขึ้น และ furazolidone มีประโยชน์ทางการแพทย์คือ ใช้เป็นยาฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และมีรายงานการต้านมะเร็งในหลอดทดลองได้ ซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ โดยไปมีผลยับยั้งวงจรการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งและทำให้เกิด apoptosis ได้ (5, 6) นอกจากนี้ยังเป็นสารที่สามารถหาได้ง่ายและราคาไม่แพง จึงเลือกนำมาศึกษาในงานวิจัยนี้

จากที่มาและความสำคัญดังกล่าวข้างต้นจึงได้ทำการศึกษาและพัฒนาระบบนำส่งยาในรูปแบบ liposome โดยใช้ deoxycholic acid ร่วมกับ phosphatidylcholine ในสัดส่วนต่างๆกันในการสร้าง liposome เพื่อนำส่งยา furazolidone เข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านม

## วัตถุประสงค์

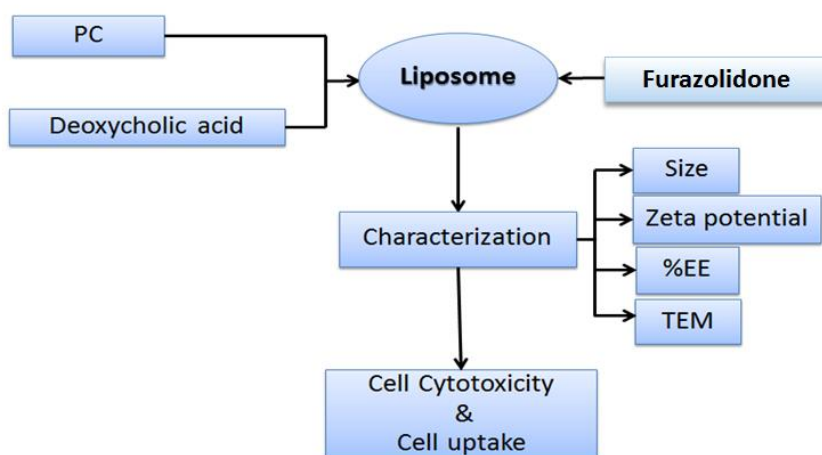


1. พัฒนาระบบนำส่งยาในรูปแบบ liposome ที่มีส่วนประกอบ deoxycholic acid และ phosphatidylcholine
2. ศึกษาผล deoxycholic acid ต่อคุณสมบัติของ liposome และประสิทธิภาพในการนำส่งเข้าสู่เซลล์มะเร็ง

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ระบบนำส่งยาในรูปแบบ liposome ที่เหมาะสมในการนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง
2. ได้องค์ความรู้ในการเตรียมผลิตภัณฑ์รูปแบบ liposome และการเลี้ยงเซลล์เบื้องต้น
3. ได้องค์ความรู้ในกระบวนการวิจัย

### กรอบแนวคิด

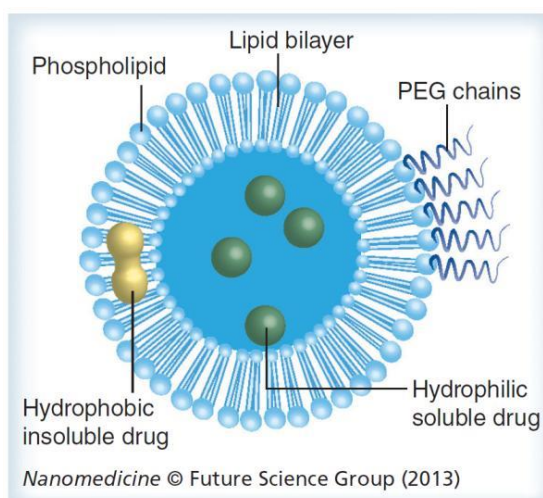


รูปที่ 1 แสดงกรอบแนวคิดของงานวิจัย

## บทที่ 2

### วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

#### 1. Liposome (7-13)



รูปที่ 2 แสดงลักษณะของ liposome(7)

Liposome มีลักษณะเป็นทรงกลม (spherical shape) มีขนาดประมาณ 15 -1000 nm. ประกอบด้วย phospholipid และอาจมี cholesterol เรียงตัวกันแบบ bilayer โดย phospholipid เป็นสารไขมันประเภทมีขั้ว (polar lipid) ชนิด amphipathic กล่าวคือมีทั้งกลุ่มที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ในโมเลกุล โดย phospholipids มีทั้งจากธรรมชาติและสังเคราะห์ขึ้น ซึ่งที่นิยมใช้คือ lecithin (phosphatidylcholine) หรืออาจใช้สารอื่นที่มีคุณสมบัติเป็น Amphipathic ในการสร้าง liposome ซึ่งการเกิด liposome ชนิดใดนั้นขึ้นกับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ธรรมชาติของลิพิดที่เป็นสารชอบน้ำและไขมันที่เลือกใช้ ส่วนประกอบของสารกระจายที่มีความดันออสโมซิสเสมอ (isotonic) และวิธีที่ใช้เตรียม liposome ดังนั้นจึงสามารถเลือกสารให้เหมาะสมกับระบบนำส่งยาที่ต้องการได้

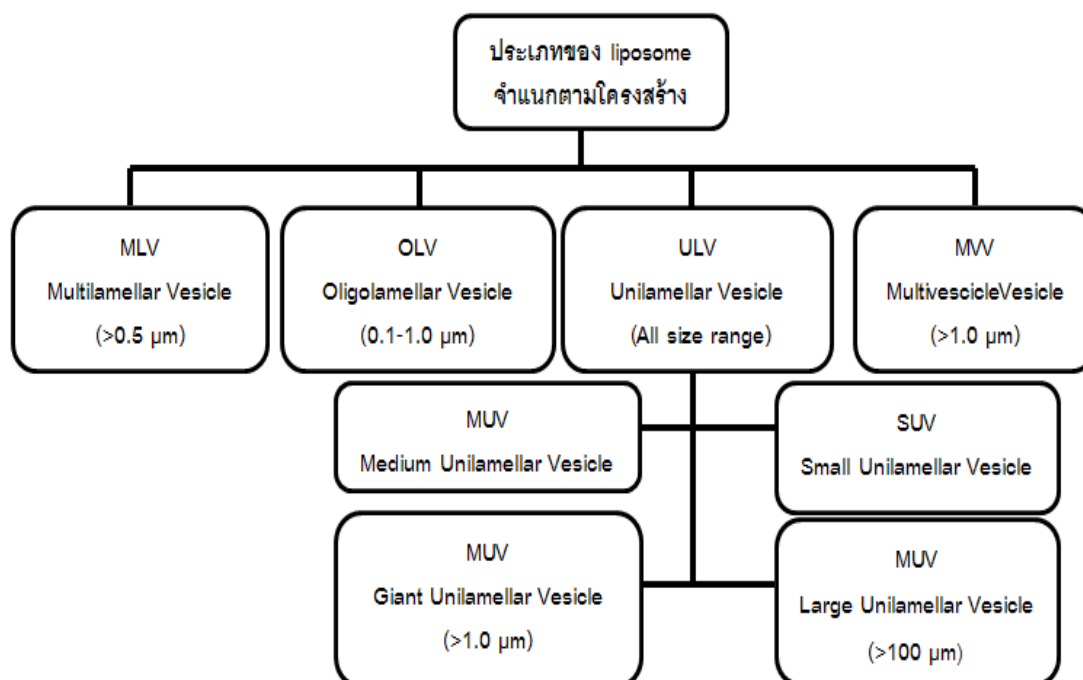
โดยระบบนำส่งยาในรูปแบบ liposome มีข้อดีหลายประการที่นำมาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาระบบนำส่งยา ได้แก่

1. เนื่องจาก liposome เตรียมจากไขมันที่ไม่เป็นพิษและเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทำให้เข้ากันได้กับร่างกายและสามารถถูกทำลายได้ในร่างกาย
2. สามารถเพิ่มความคงตัวของสารที่ถูกกักเก็บได้
3. ช่วยลดความเป็นพิษของสารที่ถูกกักเก็บ
4. สามารถดัดแปลงโครงสร้างได้ง่าย เช่นสามารถเตรียม liposome ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์ได้ โดยติดสารหรือลิแกนด์ เป็นต้น
5. ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของสารที่ถูกกักเก็บภายในและทำให้ยาออกฤทธิ์ได้นานขึ้น

แต่อย่างไรก็ตาม liposome พบปัญหาความไม่คงตัวของตำรับ เนื่องจาก phospholipid บางชนิดเกิด oxidation และ hydrolysis-like reaction การรั่วของสารที่ถูกกักเก็บภายใน และกระบวนการผลิตมีต้นทุนที่ค่อนข้างสูง

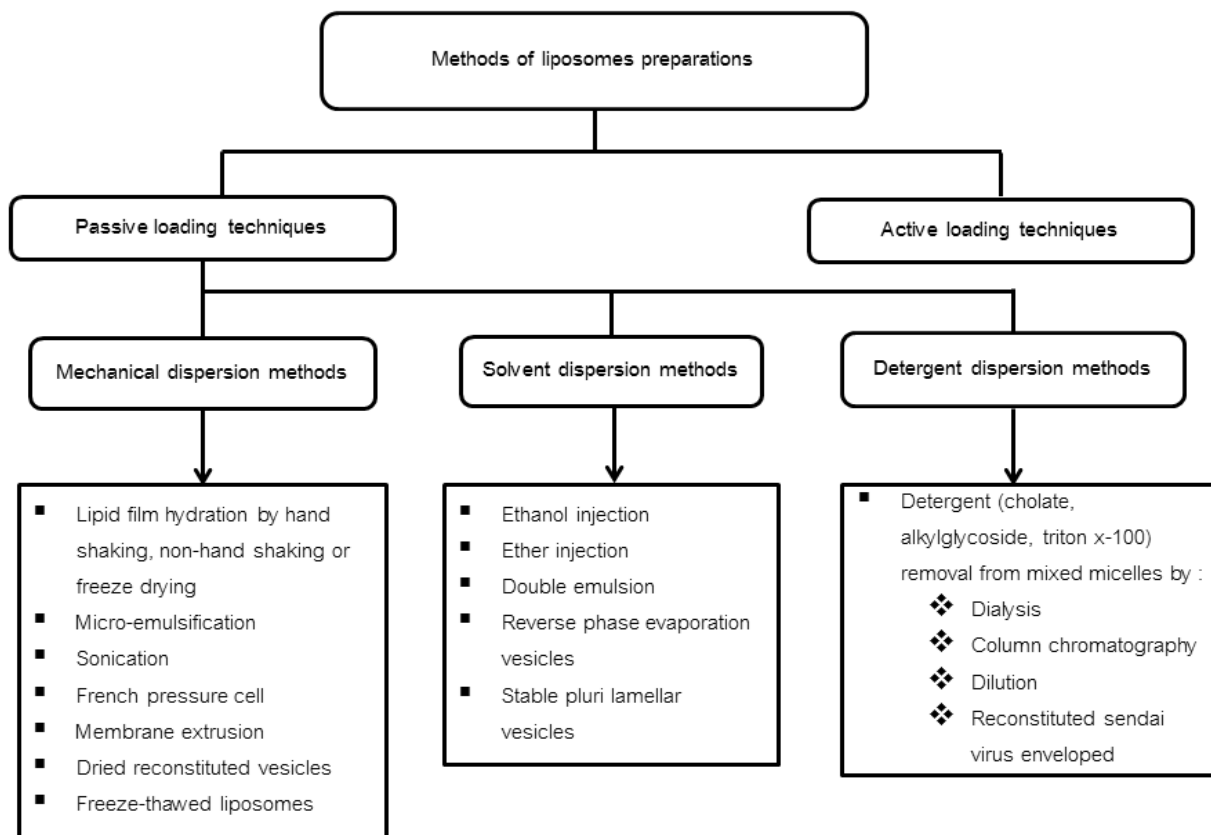
### 1.1. ประเภท liposome

การแบ่งประเภท liposome โดยแบ่งตาม structural parameter สามารถแบ่งได้ดังนี้



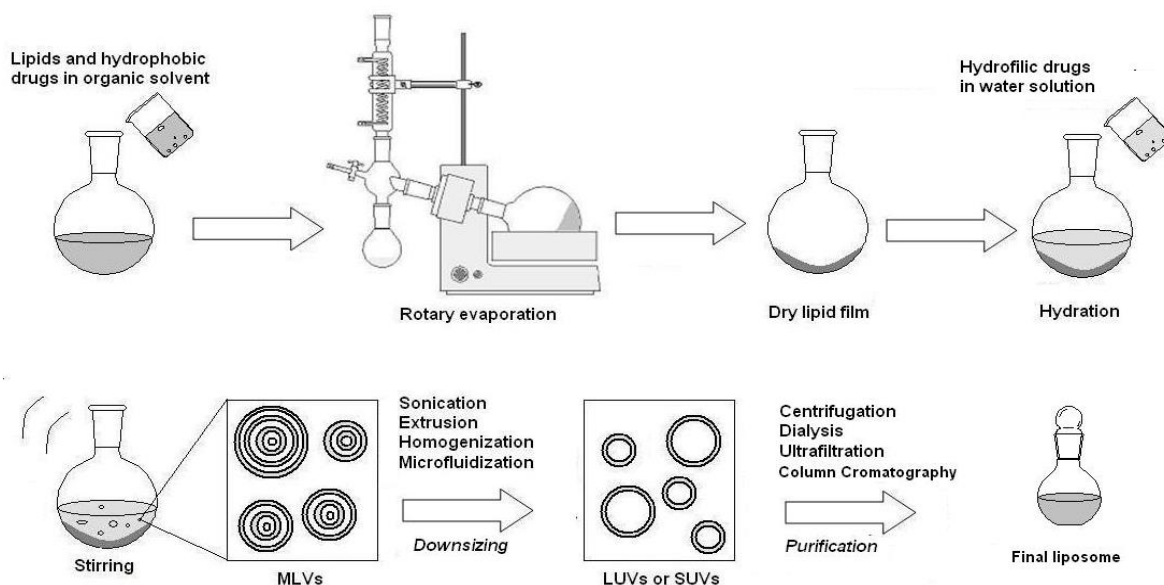
รูปที่ 3 แสดงการแบ่งประเภท liposome ตาม structural parameter (2)

### 1.2. วิธีการเตรียม liposome



รูปที่ 4 แสดงวิธีในการเตรียม liposome (2)

การเลือกวิธีในการเตรียม liposome ขึ้นกับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ 1) ลักษณะทางเคมี ความเข้มข้น ความเป็นพิษของสารที่จะนำเข้าสู่ liposome สารที่ใช้สร้าง liposome 2) ลักษณะทางเคมีของสารที่ใช้สร้าง liposome 3) ความเหมาะสมของ ขนาด polydispersity และ shelf-life ของ liposome ที่จะนำไปประยุกต์ใช้ และ 4) ขนาดการผลิต ซึ่งจากการศึกษาพบว่าวิธี Thin-film hydration method เป็นวิธีที่แพร่หลาย มีกระบวนการไม่ซับซ้อนและเหมาะสมกับสารที่ใช้ในการเตรียม liposome ซึ่งเตรียมโดยละลายสาร phospholipid ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม แล้วทำให้เกิดฟิล์มของ phospholipid ด้วยการระเหยเอาส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ออก จากนั้นเติมน้ำหรือสารละลายบัฟเฟอร์หรือสารละลายน้ำ (rehydration) ฟิล์มที่กลับมาเปียกจะสร้างเป็น liposome ชนิด MLV ซึ่งการเติมตัวยาลงไปจะขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายน้ำ ถ้าตัวยาละลายได้ไม่ดี จะเติมลงในสารละลาย phospholipid ในช่วงการสร้างฟิล์ม แต่ถ้าตัวยาละลายน้ำได้ดี จะเติมลงในส่วนของสารละลายน้ำในช่วงที่ทำให้ฟิล์มเปียกแทน

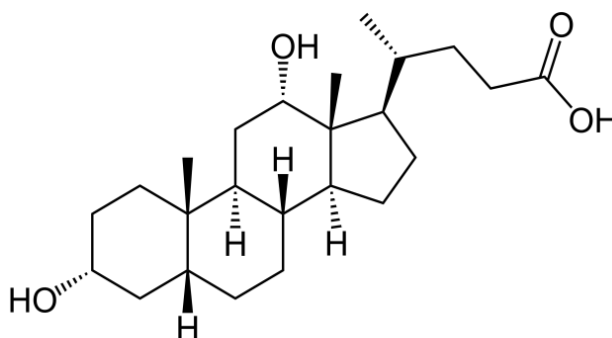


รูปที่ 5 แสดงวิธีการเตรียม liposome โดยวิธี Thin film hydration(12)

### 1.3. ประโยชน์ของระบบนำส่งยาในรูปแบบ liposome ต่อการรักษาโรคมะเร็ง

ยาที่ใช้ในการรักษามะเร็งส่วนใหญ่พบอุบัติการณ์การเกิดอาการไม่พึงประสงค์จากยาค่อนข้างสูงเนื่องจากยามีกกลไกในการยับยั้งการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งแต่อาจมีผลข้างเคียงต่อเซลล์ปกติที่สามารถแบ่งตัวได้เร็วเช่น เซลล์รากผม เซลล์ลำไส้ เซลล์เม็ดเลือด เป็นต้น ซึ่งพบว่าการนำส่งยา มะเร็งในรูปแบบ liposome สามารถลดอาการไม่พึงประสงค์ที่เกิดจากยาได้มากถึง 50% เนื่องจาก liposome ช่วยเพิ่มความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง อีกทั้งเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ได้โดยยาสามารถอยู่ในกระแสเลือดได้เป็นระยะเวลาอันยาวนานยิ่งขึ้น

## 2. Deoxycholic acid (3, 4, 14-18)



รูปที่ 6 แสดงโครงสร้างของ deoxycholic acid (17)

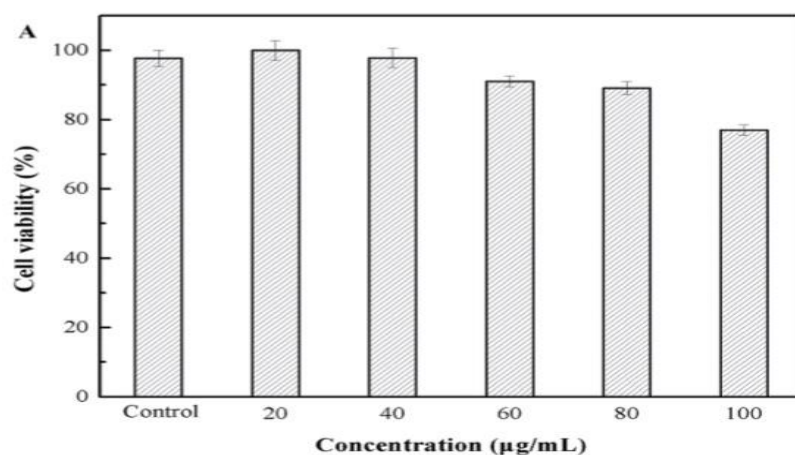
### 2.1. คุณสมบัติทั่วไปของ deoxycholic acid

□ Molecular formula :  $C_{24}H_{40}NaO_4$

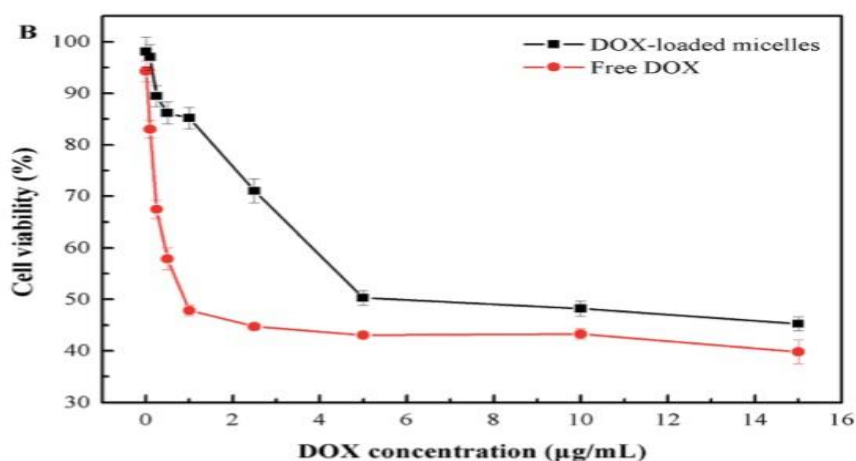
- Molecular weight : 392.6
- Melting Point: 177 °C
- CMC : 0.21 % (5mM)
- Water Solubility : 43.6 mg/L (at 20 °C)
  - free acid : soluble at 0.24 g/L in water at 15 °C
  - sodium salt : soluble at > 333 g/L in water at 15 °C
- Storage instructions: Store at Room Temperature

Deoxycholic acid (DCA) เป็น secondary bile acids ซึ่งได้จาก 7- dehydroxylation ของ cholic acid โดยเอาหมู่ OH ที่ตำแหน่ง C7 ออกมีโครงสร้างเป็น saturated cyclopentanophenanthrene ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ steroid ซึ่ง deoxycholic acid จัดเป็น polar lipid มีลักษณะเป็น amphiphilic ทำให้สามารถ form ตัวให้อยู่ในรูป micelle ได้

ปัจจุบันมีการนำ bile acid มาใช้ในการพัฒนาระบบนำส่งยาเพื่อแก้ไขคุณสมบัติที่ไม่เหมาะสม ทางด้านต่างๆของยา เช่น ค่าการละลาย, ความคงตัว, การดูดซึม, ความเป็นพิษ และผลข้างเคียงของยา ซึ่งมีงานวิจัยที่ได้ศึกษาระบบนำส่งยาโดยใช้ amphiphilic polymer นั่นคือ mPEGylated starch-deoxycholic acid, mPEG-St-DCA (mPEG-St-DCA) มาใช้ในการนำส่งยา doxorubicin (DOX) ซึ่งมีปัญหาในเรื่องของผลข้างเคียงสูง โดยผลการทดลอง in vitro cell cytotoxicity study เป็นการทดสอบ cytotoxicity ของ blank mPEG32-St-DCA13, DOX-loaded mPEG32-St-DCA13 และ free DOX โดยวิธี MTT assays ในเซลล์มะเร็ง HeLa cell โดยจาก รูปที่ 7 เป็นการทดลองโดยให้ blank mPEG32-St-DCA13 ที่ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 µg/ml ใน HeLa cell แล้ว incubate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววัด % cell availability พบว่า blank mPEG32-St-DCA13 มีผล toxicity น้อยมากคือไม่มีนัยยะสำคัญในการฆ่าเซลล์มะเร็ง ซึ่งมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ขนส่งยาเข้าเซลล์มะเร็ง ส่วนรูปที่ 8 เป็นการทดลองโดย DOX-loaded mPEG32-St-DCA13 และ free DOX ที่ความเข้มข้นของ DOX ต่างๆกันใน HeLa cell แล้ว Incubate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ DOX ขึ้นไปถึง 15 mg mL<sup>-1</sup> DOX-loaded mPEG32-St-DCA13 สามารถลดปริมาณ cell viability ได้ถึง 45% ในขณะที่ free DOX ลด cell viability ได้เพียง 40% แต่เมื่อเปรียบเทียบ IC<sub>50</sub> พบว่า DOX-loaded mPEG32-St-DCA13 มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 5.74 mg mL<sup>-1</sup> ซึ่งสูงกว่า free DOX ถึง 6 เท่า ซึ่งจากผลการทดลองดูเหมือนว่า free DOX ที่ความเข้มข้นเดียวกันจะมีประสิทธิภาพเหนือกว่าการใช้ DOX-loaded mPEG32-St-DCA13 เนื่องจากการใช้ carrier ในการนำส่งยาจะมีการปลดปล่อยตัวยาที่ช้ากว่าแต่มีการปลดปล่อยแบบสม่ำเสมอ



รูปที่ 7 แสดง % cell availability ของ blank mPEG32-St-DCA13 ที่ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 µg/ml(18)

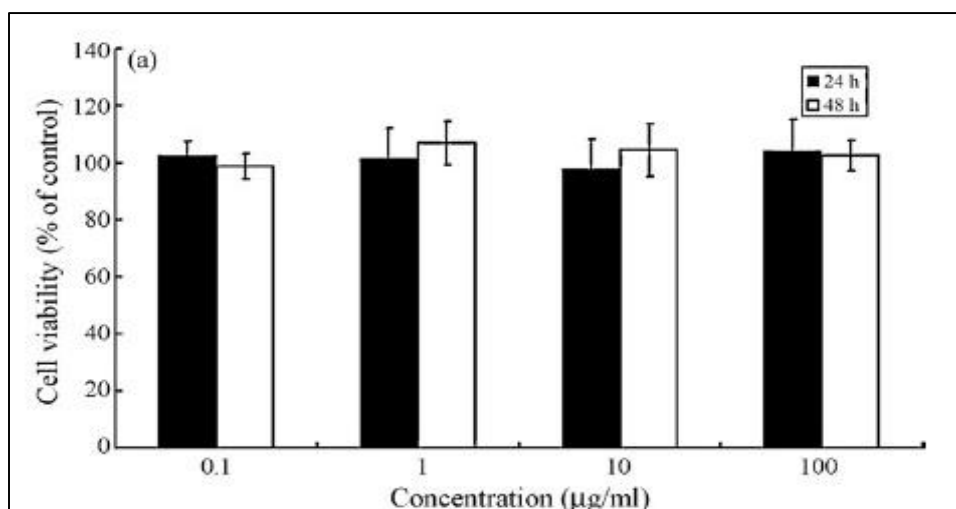


รูปที่ 8 แสดง % cell availability ของ DOX-loaded mPEG32-St-DCA13 และ free DOX ที่ความเข้มข้นของ DOX ต่างๆกัน และ Incubate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง(18)

อีกทั้งมีงานวิจัยศึกษาถึงความจำเพาะในการนำส่งยามะเร็งไปยังเซลล์มะเร็ง เพื่อลดผลข้างเคียงของยาและเพิ่มประสิทธิภาพในด้านต่างๆโดยมีการใช้self-assembled nanoparticles of deoxycholic acid (DOCA)-modified CM-Fudlan (DCMC) เป็น carrier ในการนำส่งตัวยาสำคัญ คือ epirubicin (EPB) ซึ่งเป็นยามะเร็งในกลุ่ม anthracycline ที่มีผลข้างเคียงมาก เช่น allergic reaction, cardiotoxicity และ blood problem โดยสามารถออกแบบให้ค่อยๆปลดปล่อยตัวยาสำคัญได้ทำให้มี circulation time ที่มากขึ้น เพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาและลดอาการข้างเคียงจากการใช้ยาได้

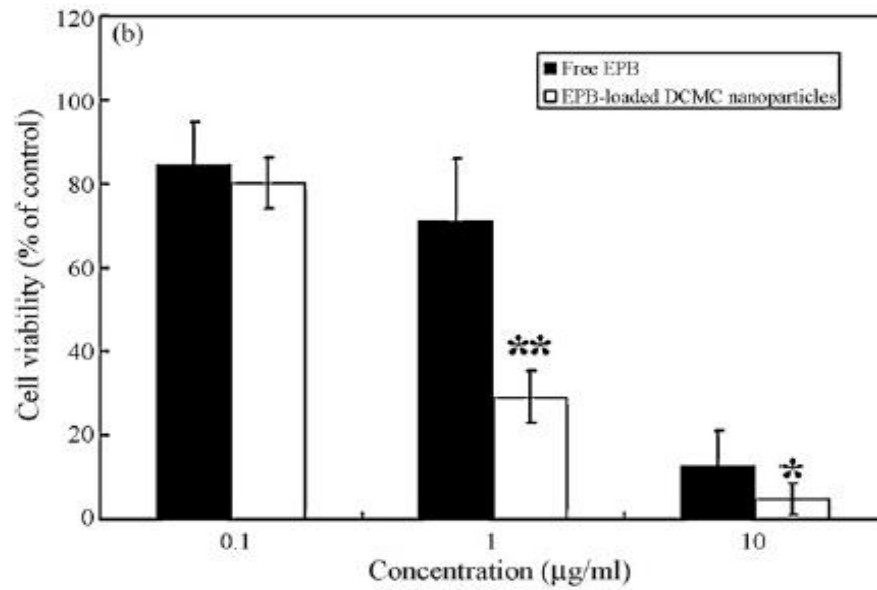
ซึ่งจากการทดลองพบว่าสัดส่วนของ drug : carrier ที่เหมาะสมอยู่ที่ 1:5 และ nanoparticles ที่ได้มีขนาดประมาณ 192 - 347 nm ซึ่งมีลักษณะเป็น spherical shape การทดสอบ cytotoxicity

จากการทดสอบ cytotoxicity ของ free EPB กับ EDN ในเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) โดยใช้วิธี MTT assay พบว่าได้ผลดังนี้ รูปที่ 9 (กราฟ a) เป็นการทดสอบผลของ DCMC เต็มๆที่ไม่ได้โหลดตัวยา พบว่า ไม่มีผลยับยั้งเซลล์มะเร็ง ( MCF-7 cells) อย่างมีนัยยะสำคัญ ส่วนรูปที่ 10 (กราฟ b, c) เป็นการทดลองให้ free EPB กับ EDN ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน 3 ความเข้มข้น คือ 0.1, 1.0, 10  $\mu\text{g/ml}$  พบว่า ทั้ง free EPB และ EDN มีผลยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง (MCF-7 cells) อย่างมีนัยยะสำคัญ ซึ่งพบว่า EDNs สามารถยับยั้งการแบ่งตัวได้มากกว่า free EPB อย่างมีนัยยะสำคัญ โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น  $1 \mu\text{g/ml}$  และ incubate เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

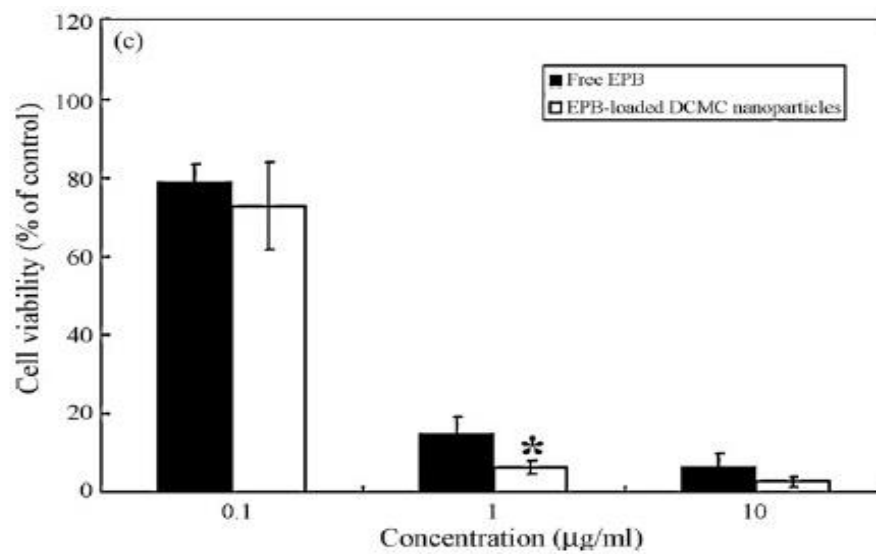


รูปที่ 9 แสดง % cell availability ของ blank DCMC self-assembled nanoparticles ที่ความเข้มข้น 0.1, 1.0, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$ (3)



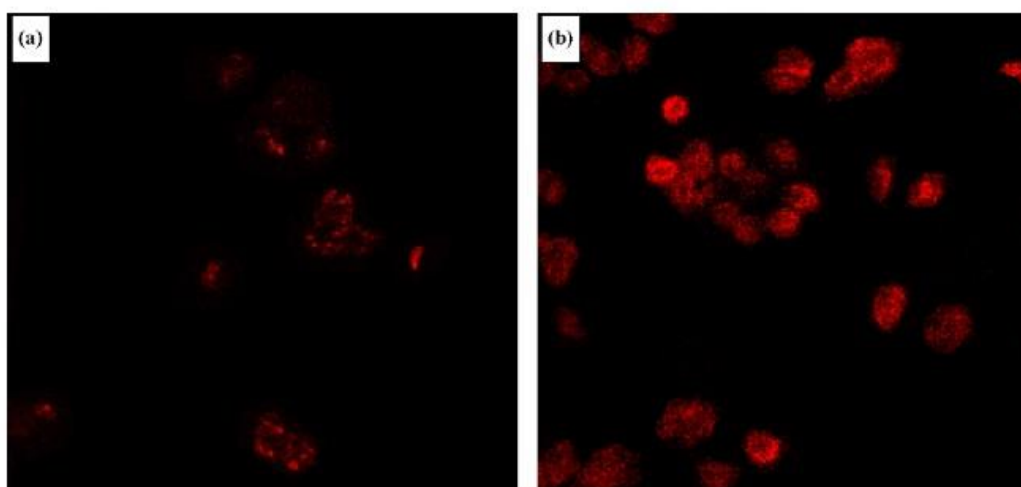


รูปที่ 10 แสดง % cell availability ของ free EPB และ EDN ที่ 3 ความเข้มข้น คือ 0.1, 1.0, 10 µg/ml และincubate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง(3)



รูปที่ 11 แสดง % cell availability ของ free EPB และ EDN ที่ 3 ความเข้มข้น คือ 0.1, 1.0, 10 µg/ml และincubate เป็นเวลา 48 ชั่วโมง(3)

### การทดสอบ cellular uptake



รูปที่ 12 แสดงการศึกษาการ uptake ของ free EPB และ EDN เข้าสู่ MCF-7 cell โดยใช้วิธี Fluorescence(3)

จากภาพเป็นการศึกษาการ Uptake ของ free EPB และ EDN เข้าสู่ MCF-7 cell โดยใช้วิธี Fluorescence พบว่า EDN (ภาพ b) มีความเข้มของ fluorescence ที่มากกว่า free EPB ดังรูปที่ 12 (ภาพ a) ซึ่งหมายความว่า EDN สามารถถูก uptake เข้าสู่เซลล์ได้มากกว่า ดังนั้นจึงสอดคล้องกับผล Cytotoxicity

### การทดสอบ Sub-acute toxicity of DCMC nanoparticles

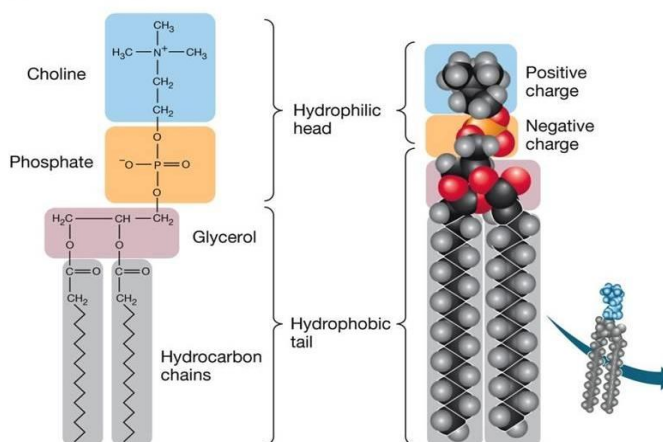
ทดสอบโดยการฉีด DCMC ที่ความเข้มข้น 2 mg/kg และ 20 mg/kg เข้าทางเส้นเลือดที่หางของหนู mice พบว่า ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว RBC, WBC, platelet count อย่างมีนัยยะสำคัญ ค่า AST, ALT, creatinine และ BUN อยู่ในช่วงปกติ การทำงานของตับไตเป็นปกติจึงสามารถสรุปได้ว่า DCMC ทำให้เกิดผลข้างเคียงที่ไม่ต้องการและมีความปลอดภัยที่จะนำมาใช้ในการนำส่งยา

**Table 2**  
Effect of DCMC conjugate in hematology and biochemistry of normal C57BL/6 mice (n=8).

	Control	DCMC conjugate (2 mg/kg/3day)	DCMC conjugate (20 mg/kg/3day)
RBC ( $\times 10^6 \mu\text{l}^{-1}$ )	9.99 $\pm$ 1.23	9.47 $\pm$ 0.45	10.48 $\pm$ 0.66
WBC ( $\times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$ )	6.36 $\pm$ 1.17	7.75 $\pm$ 1.70	7.59 $\pm$ 1.61
Platelet ( $\times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$ )	221.2 $\pm$ 93.2	260.0 $\pm$ 97.7	230.2 $\pm$ 58.3
BUN (mg/dl)	20.3 $\pm$ 2.87	23.5 $\pm$ 2.16	21.4 $\pm$ 1.98
Creatinine (mg/dl)	0.32 $\pm$ 0.02	0.35 $\pm$ 0.13	0.36 $\pm$ 0.07
ALT (U/l)	18.2 $\pm$ 3.56	21.3 $\pm$ 3.12	19.8 $\pm$ 2.56
AST (U/l)	35.2 $\pm$ 8.23	33.6 $\pm$ 9.26	37.1 $\pm$ 10.21

รูปที่ 13 แสดงค่าทาง Hematology และ Biochemistry test จากการให้ DCMC(3)

### 3. Phosphatidylcholine (16, 19-21)



รูปที่ 14 แสดงโครงสร้างของ phosphatidylcholine (21)

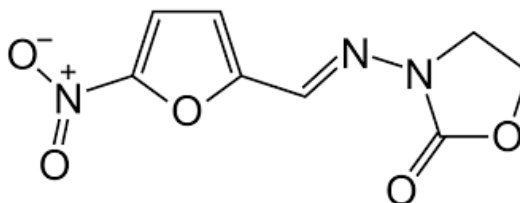
#### 3.1. คุณสมบัติทั่วไปของ phosphatidylcholine

- Solubility : 100 mg/ml ใน chloroform, ethanol, and hexane ที่มี 3% ethanol ที่อุณหภูมิห้อง
- Storage temperature : - 20 °C

Phosphatidylcholine หรือ lecithin คือ สารจากธรรมชาติที่เป็นส่วนประกอบสำคัญและมีมากที่สุดของพืชและสัตว์ ซึ่งพบได้ใน ไข่แดง ถั่วเหลือง เมล็ดธัญพืช เป็นต้น มีโครงสร้างเป็น phospholipid และมีคุณสมบัติ amphipathic สามารถละลายได้ทั้งในน้ำและไขมัน รวมถึงมีคุณสมบัติที่เป็นกลาง (neutral) นิยมนำมาใช้ในการขนส่งยาในรูปแบบ micelle และ liposome

จากการศึกษาพบว่า การใช้ bile salts ร่วมกับ phosphatidylcholine ในการสร้างเป็น mixed micelles มีผลทำให้มีประจุนผิวอนุภาคสุทธิมีขนาดเล็กกว่าการใช้ bile salts เดี่ยวๆ ซึ่งเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อความสามารถในการละลายของ mixed micelles อีกทั้งยังพบว่า การใช้ phosphatidylcholine ร่วมกับ bile salts ช่วยในการป้องกันการเกิดการทำลายเซลล์ในทางเดินอาหาร เนื่องจาก toxic ของ bile acid หาก bile salts ชนิดเดียวจะทำให้เกิดการสลาย membrane ในทางเดินอาหารและทำลาย gastric mucosal barrier ใน GI tract และปริมาณของ bile acid ที่ไม่ก่อให้เกิดพิษอยู่ที่ไม่เกิน 0.2 mM และเมื่อเพิ่มปริมาณ พบว่าความเป็นพิษต่อเซลล์ยิ่งเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นการใช้ phosphatidylcholine ร่วมกับ bile acid ในการออกแบบระบบนำส่งยามีความจำเป็นอย่างยิ่งในการช่วยป้องกันการเกิดพิษจาก bile acid และช่วยเพิ่มการละลายของยาที่เป็น lipophilic

#### 4. ฟูราโซลิโดน (furazolidone)



รูปที่ 8 โครงสร้าง furazolidone

##### ข้อมูลทั่วไป

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 มีค่าการละลายเพียง 40 mg/lit และ  $\log P = 0.15$  ทำให้ตัวยา furazolidone มีค่าการละลายต่ำไม่ค่อยดูดซึม พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ได้ยาก

##### 2.2 Furazolidone กับฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

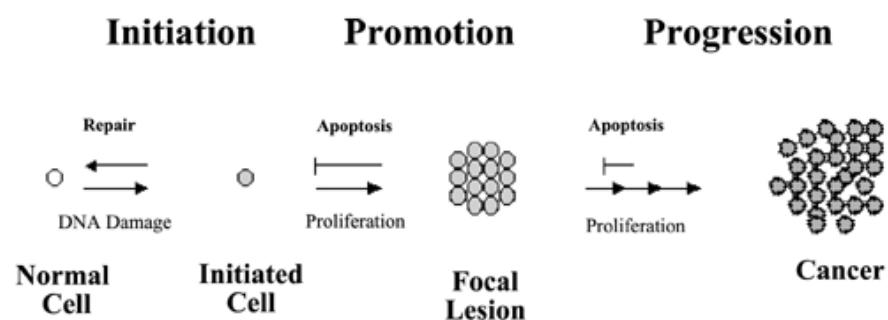
จากการศึกษารายงานประสิทธิภาพฤทธิ์ของยา furazolidone มีผลการทดลองในการสนับสนุนฤทธิ์ทางยาว่าสามารถต้านเซลล์มะเร็งได้เนื่องจากการค้นพบในรายงานวิจัยการรักษาผู้ป่วยที่ได้รับยา furazolidone เป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรควัณโรค และผู้ป่วยมีโรคร่วมคือโรคมะเร็งตับ จากการได้รับยาไประยะหนึ่งพบว่าเซลล์มะเร็งมีการเจริญเติบโตที่ลดลง หลังจากนั้นได้มีการศึกษาฤทธิ์ฤทธิ์ทางยาต่อเซลล์มะเร็ง พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของยาที่  $<40$  ไมโครกรัมต่อลิตร มีผลในการลดเจริญเติบโตของการสร้างเส้นเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็ง ซึ่งความเข้มข้นที่ใช้อยู่ในช่วง 10-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร(29) โดยกลไกของยาจะกุดการเจริญเยื่อบุผนังเซลล์ และความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร สามารถยับยั้ง histone deacetylase ได้ประมาณ 3.42% ซึ่งถือว่าเป็นเป้าหมายที่สำคัญสำหรับการบำบัดโรคมะเร็ง เมื่อศึกษาความเข้มข้นของยาที่มีผลต่อการยับยั้ง sarcoma and melanoma cells อยู่ที่ 5-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ในขณะที่เซลล์ปกติเซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีการตอบสนองต่อยาน้อยลง โดยกลไกจะยับยั้ง DNA-directed DNA polymerases(30) ซึ่งการศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเต้านมของ furazolidone พบว่ามีการศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงระดับของ p53 ใน เซลล์ T47D และ progesterone receptor (PR) เป็น

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

## 5. Cancer cell (22, 23)

โรคมะเร็งเป็นโรคที่เกิดจากการมีพยาธิสภาพที่มีความผิดปกติของยีน ซึ่งส่งผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์และทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตผิดปกติที่ไร้ระเบียบและเหนือการควบคุมของร่างกาย นอกจากนี้เซลล์มะเร็งยังสามารถพัฒนาคุณสมบัติในการแพร่กระจาย คือเซลล์มะเร็ง สามารถเคลื่อนออกจากอวัยวะต้นกำเนิดแล้วไปเจริญเติบโตยังเนื้อเยื่อที่อยู่ใกล้เคียง (local metastasis) หรืออวัยวะอื่นที่อยู่ไกลออกไป (distant metastasis) ได้ โดยผ่านทางกระแสเลือด (blood metastasis) หรือทางหลอดน้ำเหลือง (lymphatic metastasis) และเกิดการแบ่งเซลล์ต่อไปอีกเรื่อยๆภายในหลอดเลือด และอวัยวะต่างๆ เป็นเหตุให้มะเร็งเกิดการลุกลามไปยังที่อื่นได้ และเนื่องจากเซลล์มะเร็งมีอายุยืนและ ทนทานมากกว่าเซลล์ปกติจึงทำให้การรักษาโรคมะเร็งให้หายขาดนั้นค่อนข้างจะทำได้ยาก

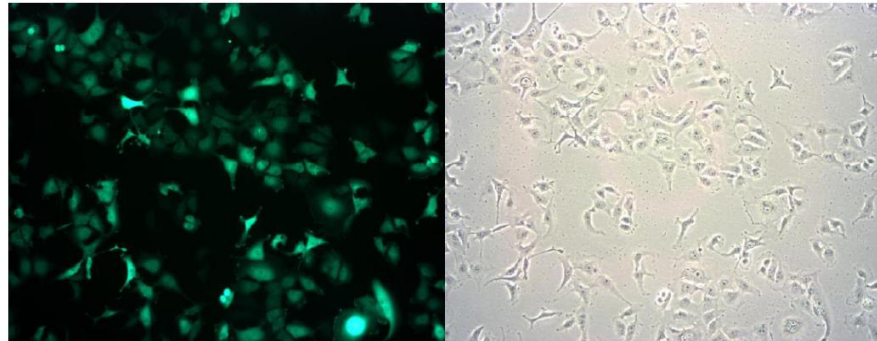
โดยขั้นตอนการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็งเมื่อมีถูกกระตุ้นจาก carcinogen ต่างๆ พบว่า การสังเคราะห์ DNA จะเกิดแบบควบคุมไม่ได้ ทำให้มีการจับคู่กันของ DNA ที่ผิดพลาด เป็นผลให้เซลล์พยายามที่จะซ่อมแซมตัวเองจนเกิดเป็นระยะ preneoplastic cells ตามด้วย preneoplastic lesion จนกลายเป็น neoplasm cell ในที่สุด



รูปที่ 16 แสดงกระบวนการการเกิดมะเร็ง(23)

โดยคณะผู้จัดทำเกิดความสนใจที่จะศึกษามะเร็ง ได้แก่ มะเร็งเต้านม เนื่องจากพบอุบัติการณ์การเกิดในประเทศไทยสูง

### 5.1. เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7 cell) (24, 25)



รูปที่ 17 แสดงลักษณะของ MCF-7 cell(24)

มะเร็งเต้านมเป็นมะเร็งที่พบบ่อยมากในผู้หญิง มีอุบัติการณ์การเกิดสูงขึ้น จึงทำให้มีการศึกษาเกี่ยวกับมะเร็งเต้านมออกมาอย่างแพร่หลายซึ่งการศึกษาแบบ *in vitro* จะใช้ MCF-7 Cell ซึ่งเป็น human breast cancer cell line ที่ได้มาจาก malignant adenocarcinoma breast tissue และ MCF-7 cell มีลักษณะคล้ายคลึงกับ mammary epithelium โดย MCF-7 cell จัดเป็นเซลล์ epithelial cell line แบบ attached cell

วิธีการเลี้ยง MCF-7 cell ได้แก่

- Culture medium: DMEM (high glucose), 10% fetal bovine serum (FBS), 0.1 mM MEM Non-Essential Amino Acids (NEAA), 2 mM L-glutamine, 1% Pen-Strep.
- เลี้ยงที่สภาวะ : 5 % ± 1 % CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37 °C

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินงานวิจัย

**ตอนที่ 1 :** ศึกษาและพัฒนาระบบนำส่งยาในรูปแบบ liposome ที่มีส่วนประกอบของ deoxycholic acid และ phosphatidylcholine

1. ศึกษาผลของ phosphatidylcholine (PC) ต่อการเกิด liposome และระยะเวลาในการลดขนาดอนุภาคด้วยการ sonicate ซึ่งเตรียม liposome ด้วยวิธี Thin-film hydration method (26) โดยมีกระบวนการดังนี้

1.1. นำ phosphatidylcoline (PC) ปริมาณ 50, 100, 200 และ 300 mg ละลายด้วย ethanol ปริมาตร 10 ml ใน round-bottom flask

1.2. นำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporation ที่ความดัน 120 mbar, อุณหภูมิ 50°C และรอบหมุน 2 rpm

1.3. ทำการ dehydration ด้วยการเติมสารละลาย NaCl 0.1 M จำนวน 10 ml เพื่อทำให้เกิด liposome

1.4. นำอนุภาค liposome ที่ได้มาลดขนาดอนุภาคด้วยการ sonicate ในน้ำแข็ง โดยใช้ระยะเวลาแตกต่างกันได้แก่ 0, 5, 15 และ 30 นาที

1.5. ประเมินลักษณะ liposome ด้วยตาเปล่า หลังจากนั้นวัดขนาดอนุภาคและ zeta potential ด้วยเครื่อง Zetasizer

1.6. เลือกสูตร phosphatidylcholine ที่เหมาะสมไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

2. ศึกษาผลของ deoxycholic acid (DCA) ต่อการเกิด liposome ด้วยวิธี Thin-film hydration method (26) โดยมีกระบวนการดังนี้

2.1. เตรียมสารละลาย phosphatidylcholine (PC) และ deoxycholic acid (DCA) ในอัตราส่วน PC: DCA ต่างๆดังนี้ 4:1, 2:1, 1:1, 1:2 และ 1:4 ซึ่งละลายด้วย ethanol ปริมาตร 10 ml ใน round-bottom flask

2.2. นำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporation ที่ความดัน 120 mbar, อุณหภูมิ 50 °C และรอบหมุน 2 rpm

2.3. dehydration ด้วยการเติมสารละลาย NaCl 0.1 M จำนวน 10 ml เพื่อทำให้เกิด liposome

2.4. นำอนุภาค liposome ที่ได้มาลดขนาดอนุภาคด้วยการ sonicate ในน้ำแข็ง เป็นระยะเวลา 15 นาที

2.5. ทำการประเมินลักษณะ liposome ด้วยตาเปล่า หลังจากนั้นวัดขนาดอนุภาค และ zeta potential ด้วยเครื่อง Zetasizer

3. ศึกษาผลของ deoxycholic acid ต่อการเกิด liposome และการ load ยา furazolidone ลงในอนุภาค liposome ด้วยวิธี Thin-film hydration method (26) โดยมีกระบวนการดังนี้

3.1. เตรียมสารละลาย phosphatidylcoline (PC) และ deoxycholic acid (DCA) ในอัตราส่วน PC : DCA ต่างๆ ดังนี้ 4:1, 2:1, 1:1, 1:2 และ 1:4 โดยมีการเติมยา furazolidone ปริมาณ 5 mg เท่ากันในทุกสูตรตำรับ ซึ่งละลายด้วย ethanol ปริมาตร 10 ml ใน round-bottom flask

3.2. นำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporation ที่ความดัน 120 mbar, อุณหภูมิ 50°C และรอบหมุน 2 rpm

3.3. dehydration ด้วยการเติมสารละลาย NaCl 0.1 M จำนวน 10 ml เพื่อให้ เกิด liposome

3.4. นำอนุภาค liposome ที่ได้มาลดขนาดอนุภาคด้วยการ sonicate ในน้ำแข็ง เป็นระยะเวลา 15 นาที

3.5. ประเมินลักษณะ liposome ด้วยตาเปล่า หลังจากนั้นวัดขนาดอนุภาคและ zeta potential ด้วยเครื่อง Zetasizer

3.6. นำ liposome จากขั้นตอน 3.5. มากรองด้วย membrane ขนาด 0.45  $\mu\text{m}$  เพื่อกรอง Furazolidone ที่ไม่ถูกกักเก็บใน liposome ออก

3.7. เตรียมสารละลายยา furazolidone standard จำนวน 5 ความเข้มข้นได้แก่ 10, 50, 100, 150 และ 300  $\mu\text{g/ml}$  ซึ่งละลายด้วย methanol

3.7. นำสารละลาย furazolidone standard และสารละลายที่กรองได้มาวิเคราะห์ ปริมาณด้วยยา (% entrapment efficiency) ด้วยเครื่อง HPLC (27) โดยใช้ condition ในการวิเคราะห์ ได้แก่

- Column : C-18 column (250 mm  $\times$  4.6 mm ,5  $\mu\text{m}$ )
- Mobile phase : acetonitrile และ DI water ในอัตราส่วน 25:75 v/v
- Running time : 5 นาที
- Injection volume : 20  $\mu\text{L}$
- Flow rate : 1.5 ml/min



- Retention time : 3.8 นาที
- Detector : UV detector wavelength 360 nm

โดยคำนวณปริมาณตัวยา(%entrapment efficiency) จากสูตรต่อไปนี้

$$EE\% = \frac{c \text{ drug load}}{c \text{ total drug}} \times 100$$

3.8. ประเมินลักษณะ liposome ด้วยตาเปล่า วัดขนาดอนุภาคและ zeta potential ด้วยเครื่อง Zetasizer

3.9. ศึกษา morphology ของระบบนำส่งยาโดยนำตัวอย่างไปส่องด้วยกล้อง polarized light microscope และ Transmission electron microscopy (TEM)

4) การศึกษาความคงตัวของ liposome ในสภาวะจำลองของร่างกาย

4.1. นำอนุภาค liposome ที่เตรียมได้เจือจางใน phosphate buffer saline solution (PBS, pH 7.4), RPMI-1640 medium และ DMEM ในอัตราส่วน 1:20 หลังจากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 37 °C

4.2. ประเมินลักษณะ liposome ด้วยตาเปล่า หลังจากนั้นวัดขนาดอนุภาค Zeta potential ด้วยเครื่อง Zetasizer

**ตอนที่ 2 :** ศึกษาผลของ deoxycholic acid ต่อประสิทธิภาพในการนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง

1. การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (cytotoxicity)

1.1. ขั้นตอนในการเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

1.1.1. ทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านม (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 ± CO<sub>2</sub> 5 % ให้เซลล์เจริญเติบโตใน culture flask ขนาด 75 cm<sup>2</sup> เปลี่ยน medium ทุก 3 วัน

1.1.3. ทำการ subculture เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ โดยมีกระบวนการดังต่อไปนี้

1.1.3.1. ดูด media ที่ใช้เลี้ยงเซลล์เดิมทิ้ง

1.1.3.2. ปิเปต sterile phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 เพื่อล้างผิวเซลล์ 3-5 ml ใส่ลงใน flask แล้วดูดสารละลายออก

1.1.3.3. ปิเปต trypsin 2 ml ใส่ลงใน flask หลังจากนั้น incubate ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 นาที เคาะเพื่อให้เซลล์ที่เกาะอยู่กับ flask หลุดออก

1.1.3.4. ปิเปต complete media 2 ml ใส่ลงใน flask เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ trypsin ทำการ resuspended อีกครั้ง หลังจากนั้นดูดใส่ centrifuge tube 15 ml และ centrifuge โดยใช้รอบหมุน 1500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที

1.1.3.5. ดูดของเหลว (supernatant) เหนือเซลล์ที่ตกตะกอนทิ้ง

1.1.3.6. ปิเปต complete media 2-3 ml ใส่ลงในหลอด ให้เซลล์กระจายตัวอีกครั้ง นำไปนับจำนวนเซลล์ เพื่อใช้ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งมะเร็ง (cytotoxicity) และการศึกษาคุณสมบัติ cellular uptake ต่อไป

1.1.4. นำไปนับเซลล์ โดยดูดของเหลวที่มีเซลล์ 20  $\mu$ L ผสมกับ trypanblue 20  $\mu$ L ใน microcentrifuge หลังจากนั้นปิเปตลง hemocytometer และทำการนับจำนวนเซลล์โดยใช้สูตรในการคำนวณดังนี้

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

1.1.5. ทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7 cell) และ seed cells จำนวน 10,000 cell/well ลงใน 96 well plate หลังจากนั้น treat ด้วยตัวอย่าง ซึ่งแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้

1. Control: กลุ่มที่ไม่ใส่สารตัวอย่างใดๆ
2. Negative control: กลุ่มที่ใส่ 1% tritonX
3. กลุ่มที่ใส่ สูตร PC: DCA: Fu (1:0:5) ที่กักเก็บ furazolidone
4. กลุ่มที่ใส่ สูตร PC: DCA: Fu (4:1:5) ที่กักเก็บ furazolidone
5. กลุ่มที่ใส่ สูตร PC: DCA: Fu (4:1:0) ที่ไม่มีการบรรจุตัวยาลงไป
6. กลุ่มที่ใส่ Furazolidone solution

1.1.6. หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตด้วยวิธี Presto blue (28) โดยหยดสารละลาย presto blue 10  $\mu$ L/100  $\mu$ L นำไป incubate เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง ในที่มืดที่อุณหภูมิ 37°C แล้ววิเคราะห์ด้วย Microplate reader ที่ความยาวคลื่น excitation 560 nm และ emission 590 nm และคำนวณ Viability โดยใช้สูตรดังนี้

$$\% \text{cell viability} = \frac{\text{Absorbance of treated cell}}{\text{Absorbance of control cell}} \times 100$$

## 2. การศึกษาคุณสมบัติ cellular uptake

2.1. ทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7 cell) และ seed cells จำนวน 100,000 cells/well ลงใน 12 well plate หลังจากนั้น treat ด้วยตัวอย่าง ซึ่งแบ่งกลุ่มตัวอย่างเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่

1. กลุ่มที่ใส่ สูตร PC : DCA : Fu (1:0:5) ที่กักเก็บ Furazolidone
2. กลุ่มที่ใส่ สูตร PC : DCA : Fu (4:1:5) ที่กักเก็บ Furazolidone
3. กลุ่มที่ใส่ สูตร PC : DCA : Fu (4:1:0) + Furazolidone (5) ที่ไม่มีการบรรจุตัวลงไป
4. กลุ่มที่ใส่ Furazolidone solution
5. Blank คือ กลุ่มที่ไม่ใส่สารใด

2.2. หลังจากนั้น 3 ชั่วโมง ดูดสารละลายยาทิ้งและล้างด้วย phosphate buffer จำนวน 2 ครั้ง เพื่อกำจัดยาที่ไม่เข้าเซลล์ออกให้หมด

2.3. ทำการเติมตัวทำลายให้ผนังเซลล์แตก (cell lysis) เพื่อละลาย furazolidone ที่อยู่ในเซลล์ออกมา

2.4. กรองด้วย membrane ขนาด 0.22  $\mu\text{m}$  เพื่อกำจัดผนังเซลล์ออกไปและทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

2.5. เตรียมสารละลายยา furazolidone standard จำนวน 6 ความเข้มข้นได้แก่ 0.1, 0.5, 5, 10, 20 และ 50  $\mu\text{M}$  ซึ่งละลายด้วย methanol และทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ condition ได้แก่

- Column : C-18 column (250 mm  $\times$  4.6 mm ,5  $\mu\text{m}$ )
- Mobile phase : acetonitrile และ DI water ในอัตราส่วน 50:50 v/v
- Running time :10 นาที
- Injection volume : 20  $\mu\text{L}$
- Flow rate : 1 ml/min
- Retention time : 7.2 นาที
- Detector : UV detector wavelength 421 nm

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

4. วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

**ตอนที่ 1 :** ศึกษาและพัฒนาระบบนำส่งยาในรูปแบบ liposome ที่มีส่วนประกอบของ deoxycholic acid และ phosphatidylcholine

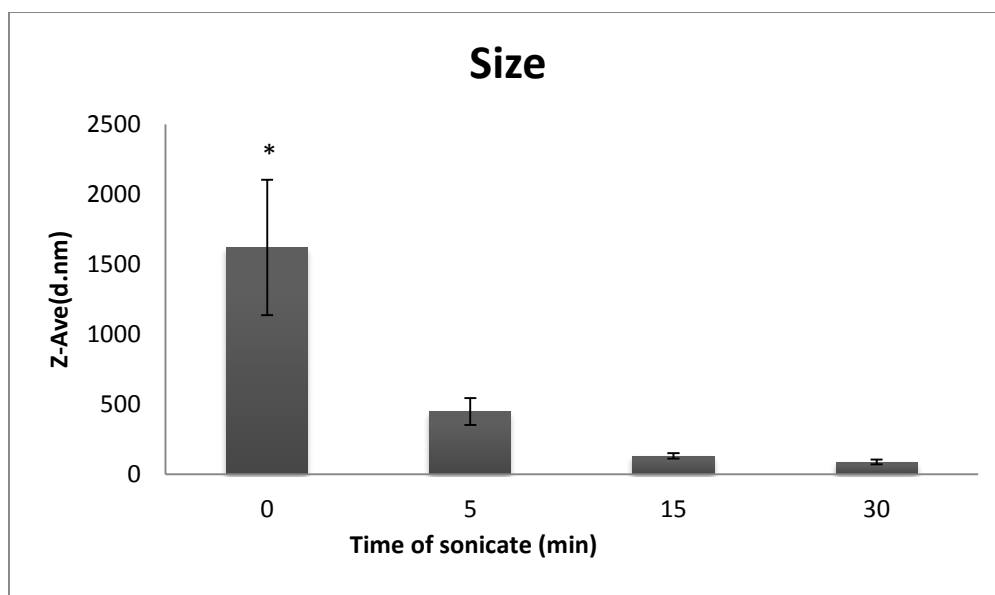
1. ผลการศึกษาผลของ phosphatidylcholine (PC) ต่อการเกิด liposome

ตารางที่ 1 แสดงขนาดอนุภาคและ zeta potential ของ liposome

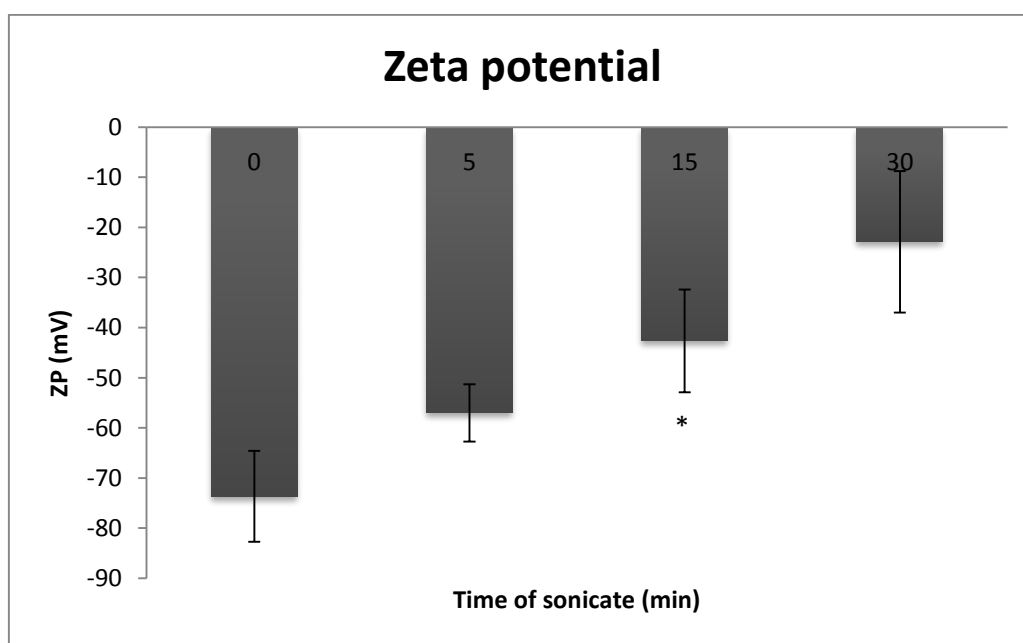
Formulation	Time of Sonicate (min)	Size (nm)	Zeta potential (mV)
PC 50 mg	0	1619.88 ± 483.79*	-73.65 ± 9.05
	5	447.98 ± 95.72	-57.01 ± 5.72
	15	130.98 ± 19.56	-42.64 ± 10.27
	30	88.55 ± 16.54	-22.88 ± 14.12*
PC 100 mg	0	976.65 ± 168.34	-63.48 ± 14.62
	5	1008.27 ± 137.99	-67.54 ± 2.91
	15	101.41 ± 11.71**	-43.24 ± 9.66
PC 200 mg	0	1035.56 ± 218.81	-73.46 ± 1.80
	5	883.41 ± 282.42	-70.67 ± 4.80
	15	122.40 ± 18.35***	-61.73 ± 1.10
	30	88.79 ± 8.20***	-47.55 ± 2.45
PC 300 mg	0	967.76 ± 31.18	-56.25 ± 25.81
	5	1037.01 ± 121.09	-55.65 ± 28.83
	15	117.91 ± 8.67	-60.36 ± 3.58
	30	101.59 ± 3.20****	-56 ± 2.08

Each value presents the mean ± S.D. (n=3); \* $P < 0.05$  compared with PC 50 mg(sonicate 0 min) ; \*\* $P < 0.05$  compared with PC 100 mg(sonicate 0 min) ; \*\*\* $P < 0.05$  compared with PC 200 mg(sonicate 0 min) ; \*\*\*\* $P < 0.05$  compared with PC 300 mg(sonicate 0 min)

1.1. ผลการวัดขนาดอนุภาคและ zeta potential ของ phosphatidylcholine 50 mg

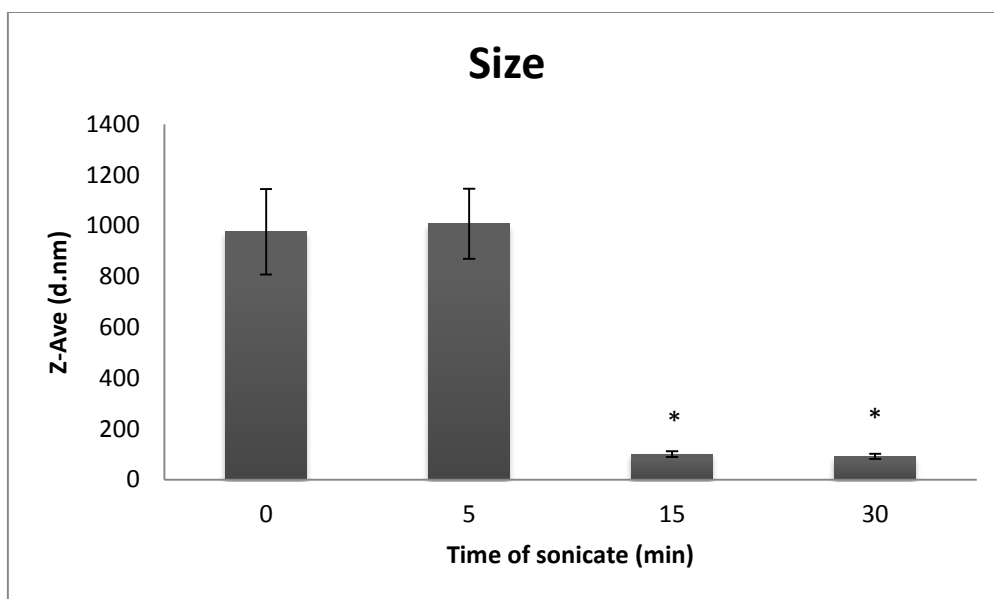


รูปที่ 18 แสดงขนาดอนุภาคของ phosphatidylcholine 50 mg ซึ่งใช้ระยะเวลาในการ sonicate แตกต่างกัน (\* $P < 0.05$  compared with PC 50 mg sonicate 0 min)

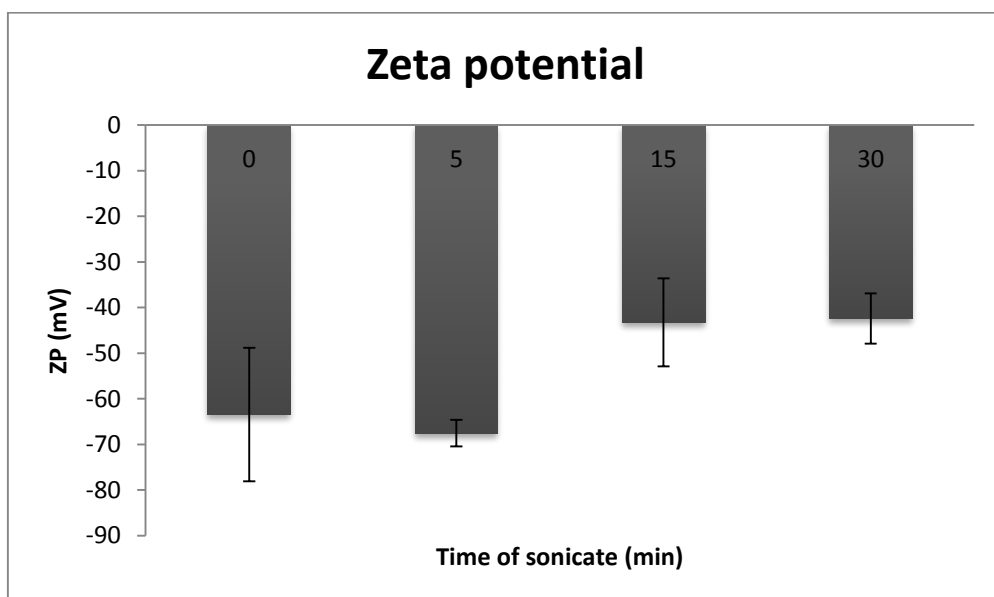


รูปที่ 19 แสดง zeta potential ของ Phosphatidylcholine 50 mg ซึ่งใช้ระยะเวลาในการ sonicate แตกต่างกัน (\* $P < 0.05$  compared with PC 50 mg sonicate 0 min)

1.2. ผลการวัดขนาดอนุภาคและ zeta potential ของ phosphatidylcholine 100 mg

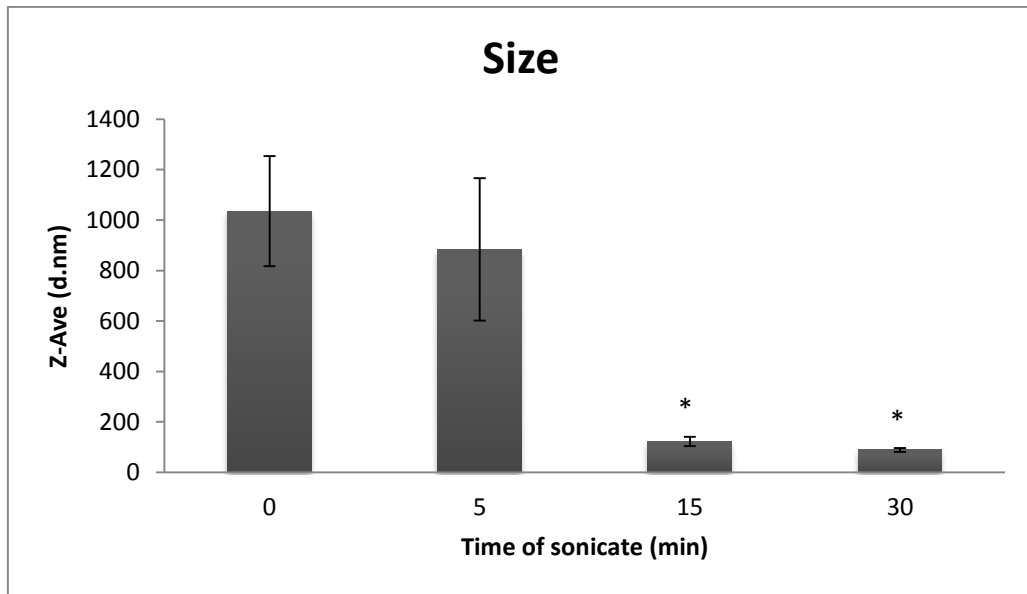


รูปที่ 20 แสดงขนาดอนุภาคของ phosphatidylcholine 100 mg ซึ่งใช้ระยะเวลาในการ sonicate แตกต่างกัน (\* $P < 0.05$  compared with PC 100 mg sonicate 0 min)

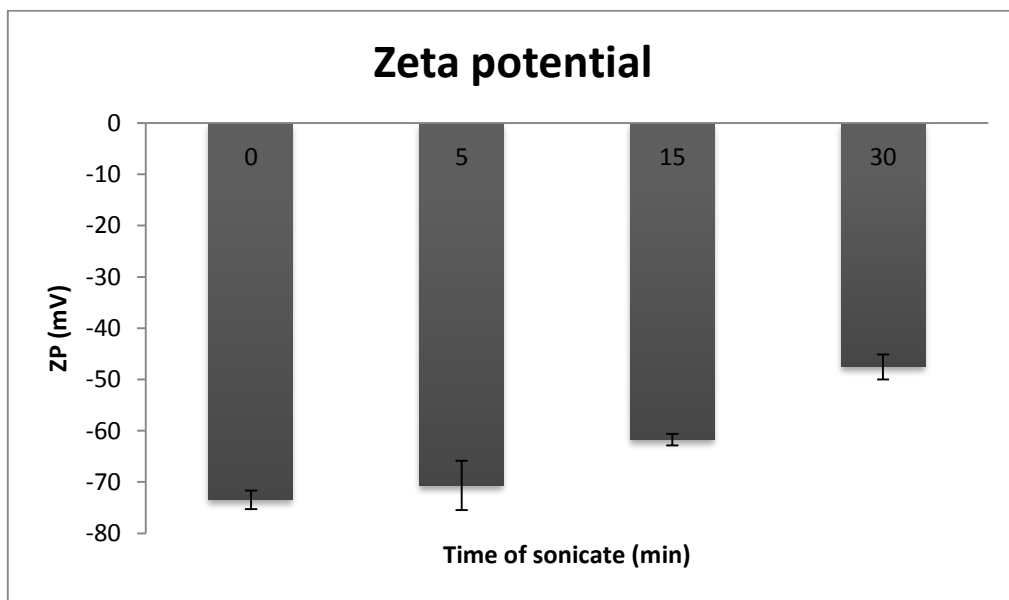


รูปที่ 21 แสดง zeta potential ของ phosphatidylcholine 100 mg ซึ่งใช้ระยะเวลาในการ sonicate แตกต่างกัน

1.3. ผลการวัดขนาดอนุภาคและ zeta potential ของ phosphatidylcholine 200 mg

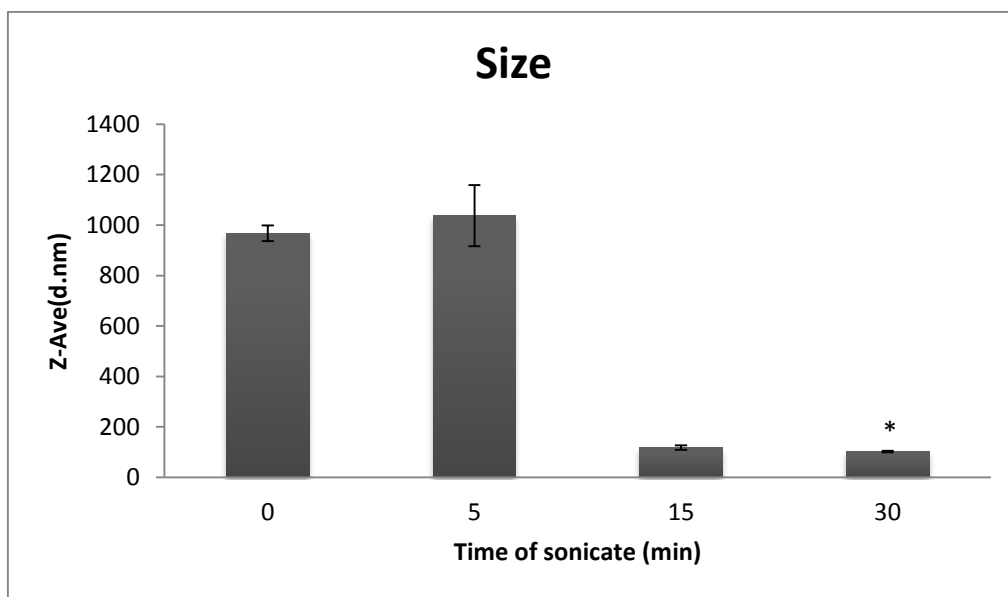


รูปที่ 22 แสดงขนาดอนุภาคของ phosphatidylcholine 200 mg ซึ่งใช้ระยะเวลาในการ sonicate แตกต่างกัน (\* $P < 0.05$  compared with PC 200 mg sonicate 0 min)

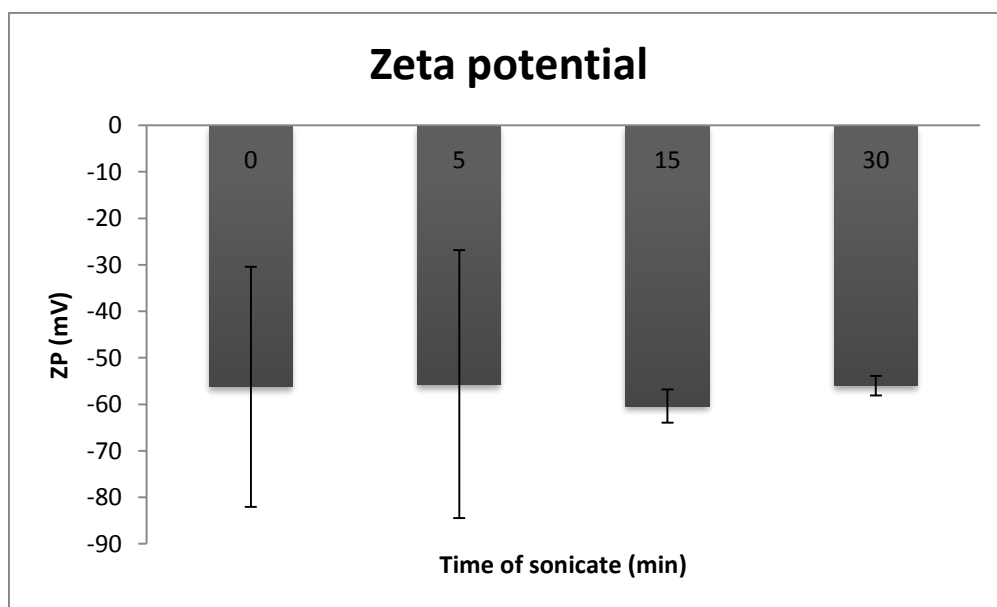


รูปที่ 23 แสดง zeta potential ของ phosphatidylcholine 200 mg ซึ่งใช้ระยะเวลาในการ sonicate แตกต่างกัน

1.4. ผลการวัดขนาดอนุภาคและ zeta potential ของ phosphatidylcholine 300 mg



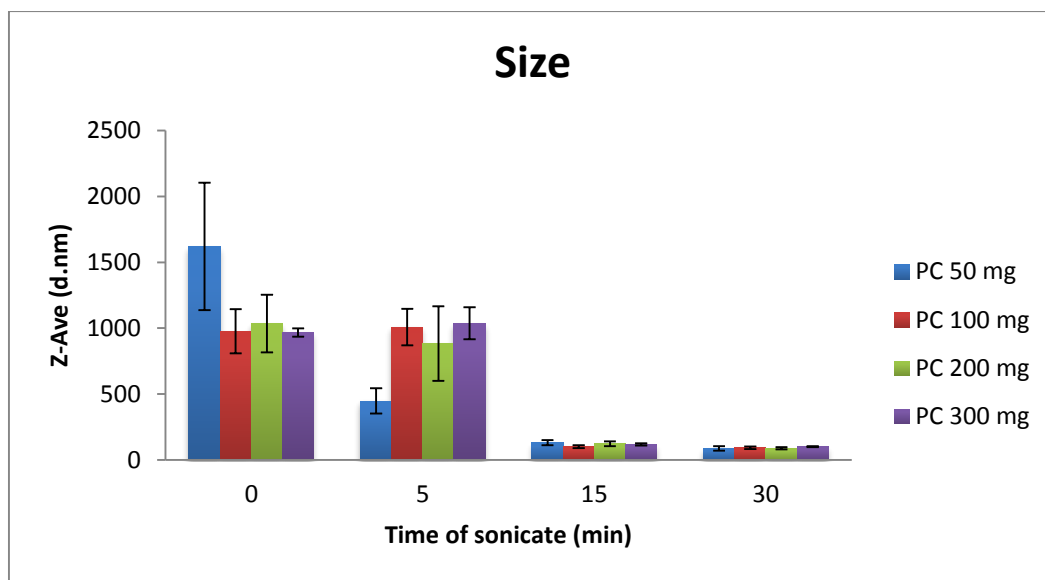
รูปที่ 24 แสดงขนาดอนุภาคของ phosphatidylcholine 300 mg ซึ่งใช้ระยะเวลาในการ sonicate ต่างกัน (\* $P < 0.05$  compared with PC (sonicate 0 min) in same concentrations.)



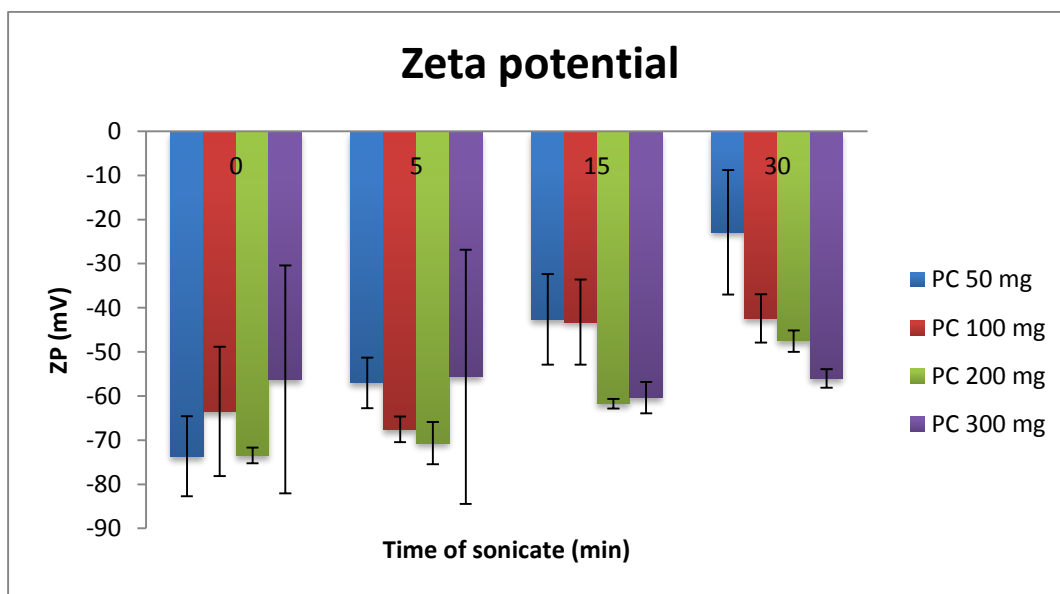
รูปที่ 25 แสดง zeta potential ของ phosphatidylcholine 300 mg ซึ่งใช้ระยะเวลาในการ sonicate ต่างกัน



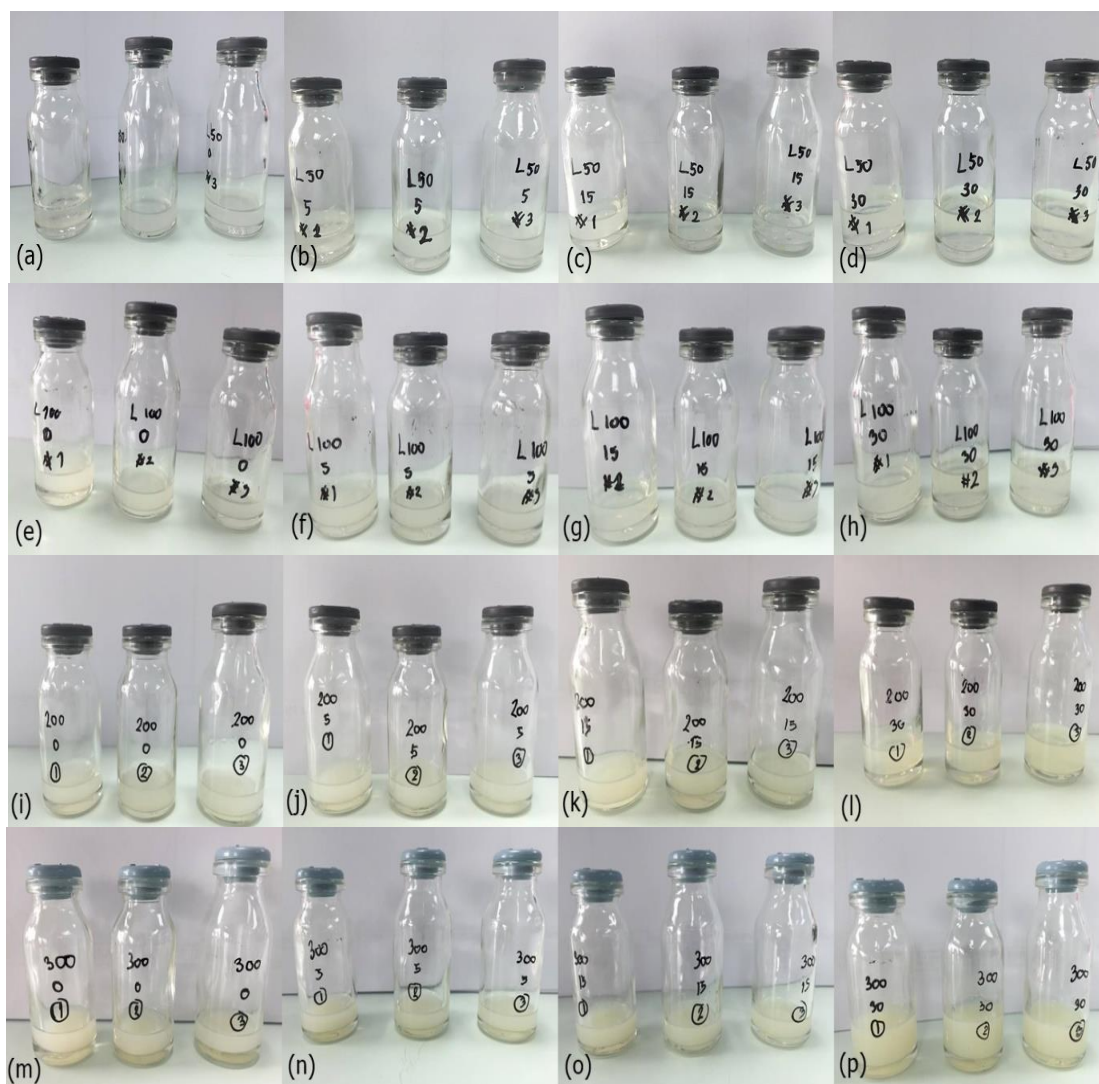
1.5. ผลการเปรียบเทียบขนาดอนุภาคและ zeta potential ของ phosphatidylcholine ความเข้มข้นและระยะเวลาในการ sonicate แตกต่างกัน



รูปที่ 26 แสดงการเปรียบเทียบขนาดอนุภาคของ phosphatidylcholine ความเข้มข้นและระยะเวลาในการ sonicate แตกต่างกัน



รูปที่ 27 แสดงการเปรียบเทียบ zeta potential ของ phosphatidylcholine ความเข้มข้นและระยะเวลาในการ sonicate แตกต่างกัน



รูปที่ 28 แสดงลักษณะทางกายภาพของ liposome ที่สร้างจาก PC

(a), (b), (c) และ (d) คือ PC 50 mg ซึ่ง sonicate เป็นระยะเวลา 0, 5, 15 และ 30 นาที ตามลำดับ  
 (e), (f), (g) และ (h) คือ PC 100 mg ซึ่ง sonicate เป็นระยะเวลา 0, 5, 15 และ 30 นาที ตามลำดับ  
 (i), (j), (k) และ (l) คือ PC 200 mg ซึ่ง sonicate เป็นระยะเวลา 0, 5, 15 และ 30 นาที ตามลำดับ  
 (m), (n), (o) และ (p) คือ PC 300 mg ซึ่ง sonicate เป็นระยะเวลา 0, 5, 15 และ 30 นาที ตามลำดับ

จากการผลการวัดขนาดอนุภาคและ zeta potential ของ Liposome ที่มีปริมาณ phosphatidylcholine ต่างกันได้แก่ 50 mg, 100 mg, 200 mg และ 300 mg โดยทำการลดขนาดอนุภาคด้วยการ sonicate ที่เวลาแตกต่างกันได้แก่ 0, 5, 15 และ 30 นาที เมื่อเปรียบเทียบผลของระยะเวลาในการ sonicate ที่เวลาต่างๆ ณ ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่า การ sonicate สามารถลดขนาดอนุภาค liposome ได้ดีกว่าการไม่ทำการ sonicate โดยหากใช้ phosphatidylcholine 100 mg และ sonicate เป็นเวลา 15 นาที จะทำให้ขนาดอนุภาคลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับ phosphatidylcholine 100 mg ที่ไม่ได้ทำการ sonicate เนื่องจากการ

sonicate จะทำให้เกิดแรง Shear ทำให้เกิดเป็นโพรง bubble ภายใน liposome และส่งผลให้ liposome ขนาดใหญ่แตกออกหลังจากนั้นเกิดการรวมตัวใหม่กลายเป็น liposome ที่ขนาดเล็กลงกว่าเดิม (29) เมื่อพิจารณาผล zeta potential พบว่าการใช้ระยะเวลาในการ sonicate ที่แตกต่างกันนั้นให้ผล zeta potential ไม่แตกต่างกัน เนื่องจากการ sonicate มีผลเพียงต่อขนาดเท่านั้นไม่มีผลต่อประจุและการกระจายตัวของอนุภาค โดยต้องทำที่อุณหภูมิต่ำกว่า critical temperature = 18 °C (30, 31)

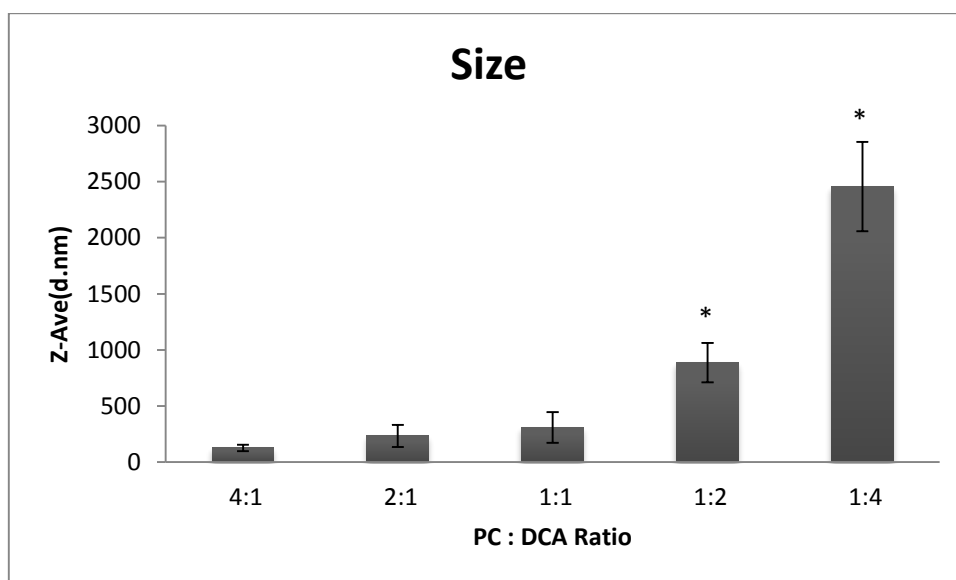
เมื่อเปรียบเทียบการใช้ระยะเวลาในการ sonicate ที่เท่ากัน แต่ความเข้มข้นของ phosphatidylcholine แตกต่างกัน พบว่าการ sonicate สามารถลดขนาดอนุภาคได้ไม่แตกต่างกัน ในแต่ละความเข้มข้นของ phosphatidylcholine รวมถึง ผลของ zeta potential ก็ให้ผลที่ไม่แตกต่างกันเช่นเดียวกันซึ่งเป็นเพราะปัจจัยที่ส่งผลต่อคุณลักษณะของ liposome จะขึ้นอยู่กับ 3 ปัจจัยคือ องค์ประกอบของโครงสร้าง lipid ระยะเวลาในการ sonicate และอุณหภูมิขณะ sonicate นั้นเอง ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ phosphatidylcholine จึงไม่มีผลต่อทั้งขนาดและ zeta potential ของ liposome (29) ดังนั้นจากการศึกษาผลของ phosphatidylcholine ต่อการเกิด liposome สามารถคัดเลือกสูตรที่เหมาะสม ได้แก่ สูตร phosphatidylcholine 100 mg ที่ sonicate เป็นระยะเวลา 15 นาที เนื่องจากมีขนาดอนุภาคที่เล็ก โดยมีขนาดเฉลี่ย  $101.41 \pm 11.71$  nm ซึ่งเมื่อเทียบกับสูตร 100 mg ที่ไม่ได้มีการ sonicate พบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญ ( $P=0.004$ ) และจากการสังเกตลักษณะทางกายภาพเปรียบเทียบกันทั้ง 16 สูตรดังรูปที่ 28 จะเห็นได้ว่าสูตรที่ได้คัดเลือกมามีความคงตัวและไม่มีการตกตะกอน นอกจากนี้มีงานวิจัยที่ศึกษาระบบนำส่งยา รูปแบบ liposome ที่มี phosphatidylcholine เป็นองค์ประกอบในการนำส่ง hyaluronidase เข้าเซลล์พบว่าปริมาณของ phosphatidylcholine มีผลต่อขนาดและความคงตัวของ liposome โดยจากการทดลองสรุปได้ว่าปริมาณของ phosphatidylcholine ที่ทำให้ liposome คงตัวอยู่ที่ 110-140 mg ที่รอบหมุนประมาณ 100-120 rpm และจะมีขนาดเล็กกว่า 500 nm เมื่อปริมาณ phosphatidylcholine 120 -140 mg ที่รอบหมุนน้อยกว่า 150 rpm (32)

## 2. ผลการศึกษาผลของ deoxycholic acid ต่อการเกิด liposome

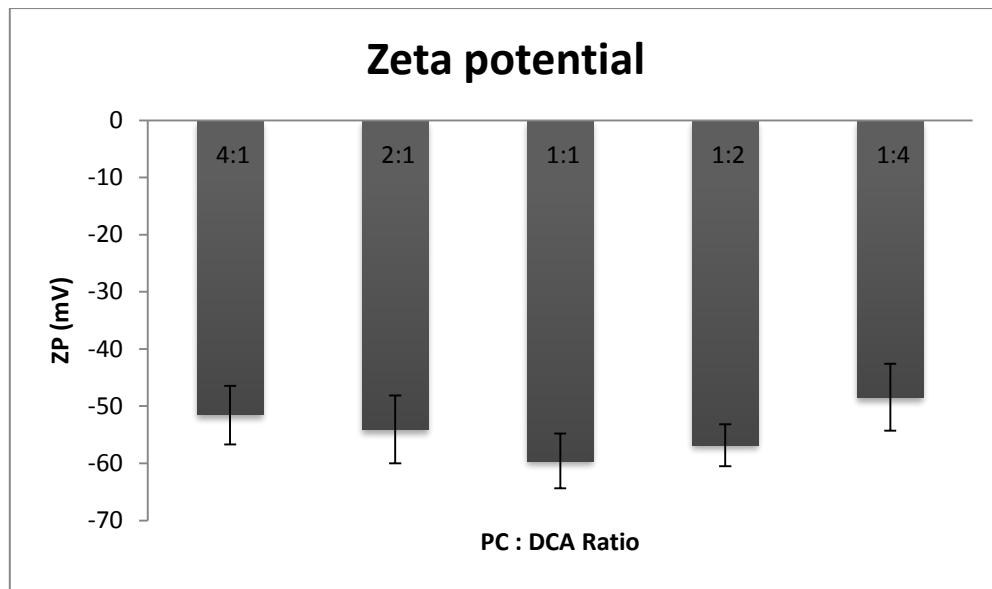
ตารางที่ 2 แสดงขนาดอนุภาคและ zeta potential ของ PC: DCA ในอัตราส่วนต่างๆ

Formulation	Size (nm)	Zeta potential (mV)
PC : DCA (4:1)	127.24 ± 27.69	-51.57 ± 5.14
PC : DCA (2:1)	234.24 ± 97.89	-54.07 ± 5.92
PC : DCA (1:1)	309.27 ± 136.64	-59.59 ± 4.79
PC : DCA (1:2)	886.50 ± 175.81	-56.83 ± 3.65
PC : DCA (1:4)	2456.22 ± 397.66	-35.11 ± 28.76

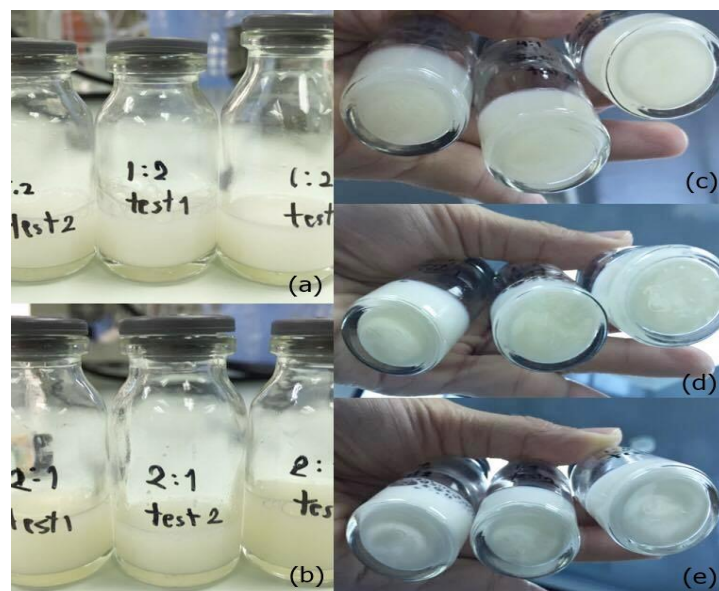
Each value presents the mean ± S.D. (n=3); \* $P < 0.05$  compared with PC: DCA in all formulation



รูปที่ 29 แสดงการเปรียบเทียบขนาดอนุภาคของ liposome ที่อัตราส่วน phosphatidylcholine (PC) และ deoxycholic acid (DCA) ต่างๆกัน (\* $P < 0.05$  compared with PC : DCA in all formulation)



รูปที่ 30 แสดงการเปรียบเทียบ zeta potential ของ liposome ที่อัตราส่วน phosphatidylcholine (PC) กับ deoxycholic acid (DCA) ต่างๆ



รูปที่ 31 แสดงลักษณะทางกายภาพของ phosphatidylcholine (PC) : deoxycholic acid (DCA) อัตราส่วนต่างๆโดย (a) อัตราส่วน 1:2 (b) อัตราส่วน 2:1 (c) อัตราส่วน 4:1 (d) อัตราส่วน 1:4 (e) อัตราส่วน 1:1

จากการศึกษาผลของ deoxycholic acid ต่อการเกิด liposome พบว่า ความเข้มข้นของ deoxycholic acid มีผลต่อขนาดของอนุภาค liposome โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ deoxycholic acid จะทำให้ขนาดของอนุภาคใหญ่ขึ้น โดยสูตร PC : DCA (1:2) และ PC :DCA (1:4) มีขนาดอนุภาคใหญ่แตกต่างจากสูตรอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) เนื่องจากมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ศึกษาโครงสร้าง membrane ของ large unilamellar vesicles หลังจากใส่ sodium cholate พบว่า การเพิ่มโมเลกุลของ cholate เข้าไปยังโครงสร้างจะทำให้ขนาดของ intramembrane pores ใหญ่ขึ้นเป็นผลให้ขนาดของลิโปโซมใหญ่ขึ้น (30) แต่ผลการวัด zeta potential พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ deoxycholic acid ให้ผล zeta potential ที่ไม่แตกต่างกันในแต่ละสูตร ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าที่อัตราส่วน PC : DCA (4:1) มีขนาดอนุภาค liposome เล็กที่สุดโดยเฉลี่ยคือ 127.24 nm และจากค่า zeta potential พบว่ามีค่าเฉลี่ย -51.57 mV ซึ่งมากกว่า -30 mV หมายถึงอนุภาคมีความเสถียรไม่เกาะกลุ่มกัน และเมื่อสังเกตลักษณะทางกายภาพของ liposome ดังรูปที่ 31 พบว่าสูตรที่เลือกค่อนข้างมีความคงตัว ในขณะที่อัตราส่วน 1:4 และ 1:1 มีการเกาะกันของอนุภาคและตกตะกอนอย่างชัดเจน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าอัตราส่วน PC : DCA (4:1) มีความเหมาะสมที่จะนำมาพัฒนาในขั้นตอนนี้ต่อไป

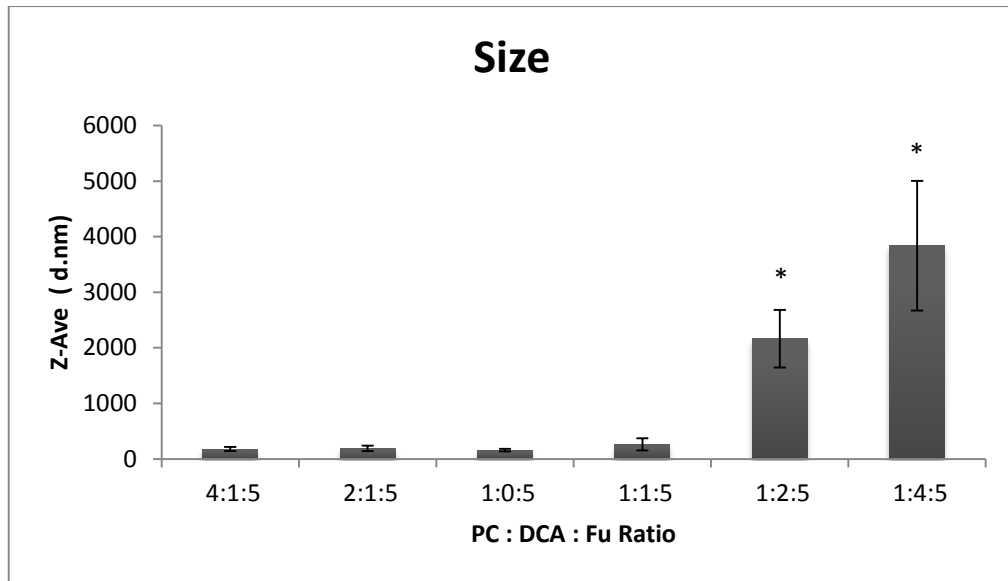
### 3. ผลการศึกษาผลของ deoxycholic acid ต่อการเกิด liposome และการ load ยา furazolidone

#### 3.1. ผลการวัดขนาดอนุภาคและ zeta potential

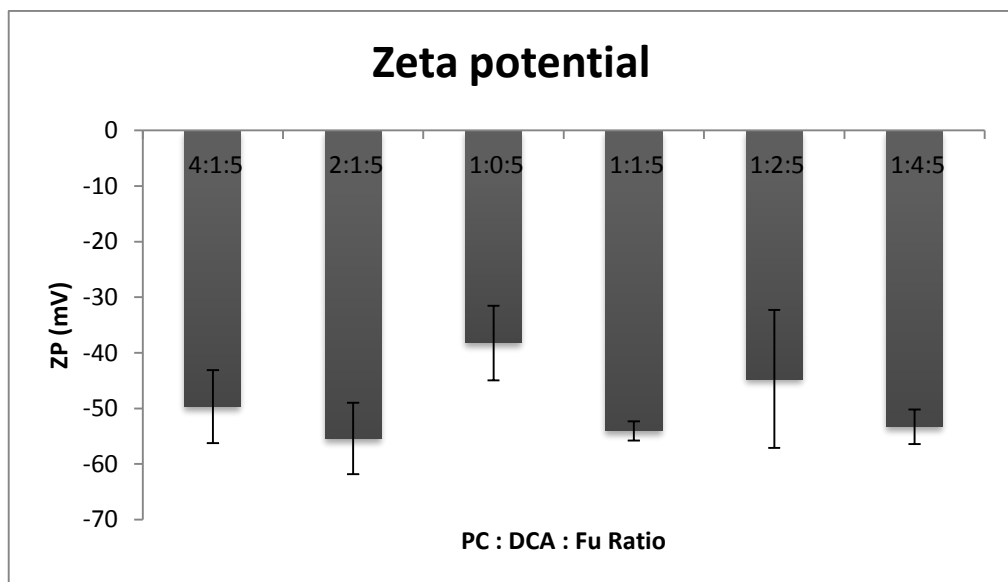
ตารางที่ 3 แสดงผลขนาดอนุภาคและ zeta potential (ก่อนกรอง)

Formulation	Size (nm)	Zeta potential (mV)
PC : DCA : Fu (4:1:5)	177.96 ± 39.09	-49.68 ± 6.56
PC : DCA : Fu (2:1:5)	191.48 ± 48.86	-55.39 ± 6.41
PC : DCA : Fu (1:0:5)	158.72 ± 25.74	-38.23 ± 6.72
PC : DCA : Fu (1:1:5)	261.66 ± 108.65	-54.07 ± 1.73
PC : DCA : Fu (1:2:5)	2163 ± 518.47*	-44.71 ± 12.41
PC : DCA : Fu (1:4:5)	3837.11 ± 1166.47*	-53.31 ± 3.12

Each value presents the mean ± S.D. (n=3); \* $P < 0.05$  compared with PC: DCA : Fu in all formulation



รูปที่ 32 แสดงการเปรียบเทียบขนาดอนุภาคของ liposome ที่อัตราส่วน phosphatidylcholine (PC) : deoxycholic acid (DCA) : furazolidone (Fu) ต่างๆกัน (ก่อนกรอง) (\* $P < 0.05$  compared with PC : DCA : Fu in all formulation)

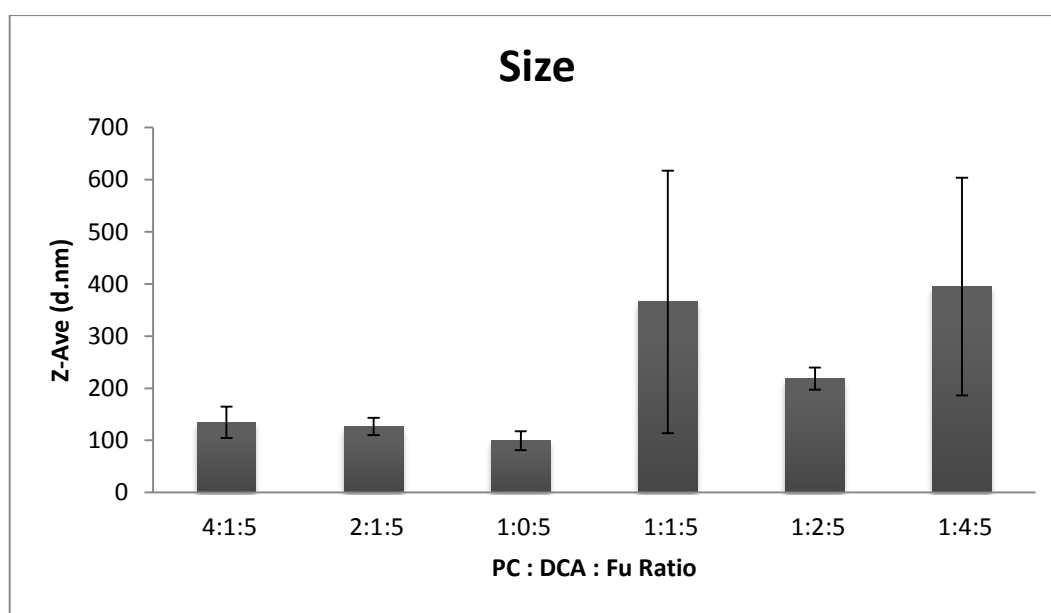


รูปที่ 33 แสดงการเปรียบเทียบ zeta potential ของ liposome ที่อัตราส่วน phosphatidylcholine (PC) : deoxycholic acid (DCA) : furazolidone (Fu) ต่างๆกัน (ก่อนกรอง)

ตารางที่ 4 แสดงผลขนาดอนุภาคและ zeta potential (หลังกรอง)

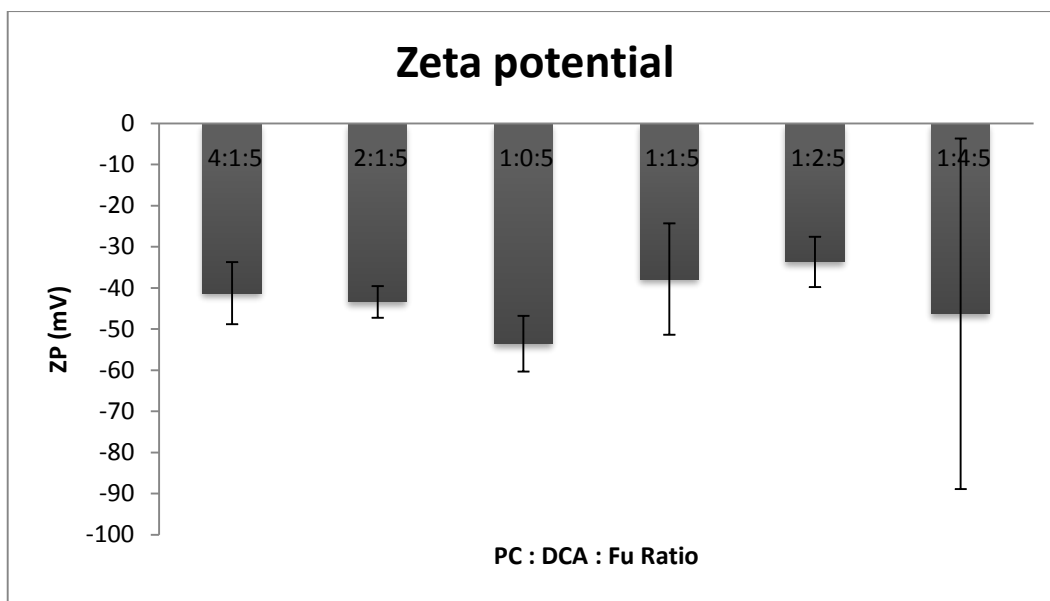
Formulation	Size (nm)	Zeta potential (mV)
PC : DCA : Fu (4:1:5)	134.71 ± 30.25	-41.28 ± 7.55
PC : DCA : Fu (2:1:5)	126.74 ± 16.45	-43.4 ± 3.87
PC : DCA : Fu (1:0:5)	99.43 ± 18.28	-53.57 ± 6.78
PC : DCA : Fu (1:1:5)	365.62 ± 251.62	-37.86 ± 13.55
PC : DCA : Fu (1:2:5)	218.45 ± 21.15	-33.66 ± 6.10
PC : DCA : Fu (1:4:5)	395.04 ± 208.80	-46.28 ± 42.59

Each value presents the mean ± S.D. (n=3)

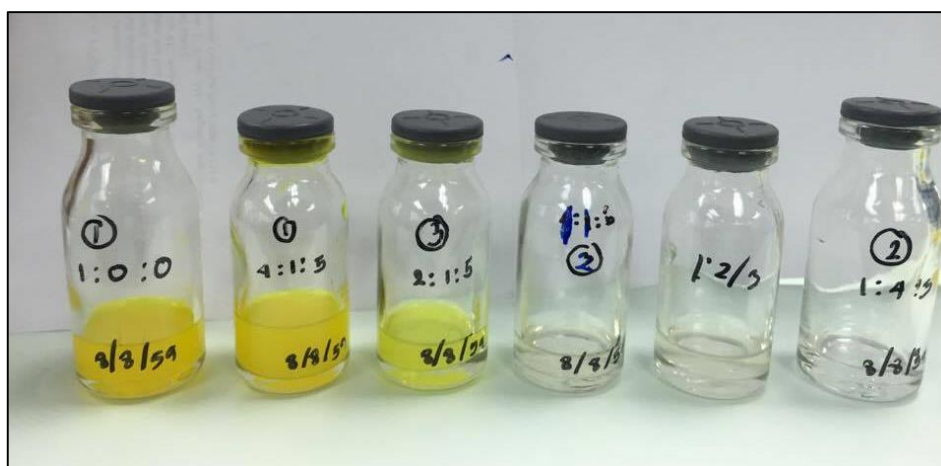


รูปที่ 34 แสดงการเปรียบเทียบขนาดอนุภาคของ liposome ที่อัตราส่วน phosphatidylcholine (PC) : deoxycholic acid (DCA) : furazolidone (Fu) ต่างๆกัน (หลังกรอง)





รูปที่ 35 แสดงการเปรียบเทียบ zeta potential ของ liposome ที่อัตราส่วน phosphatidylcholine (PC) : deoxycholic acid (DCA) : furazolidone (Fu) ต่างๆกัน (หลังกรอง)



รูปที่ 36 แสดงลักษณะทางกายภาพของ liposome สูตร PC : DCA : Fu (1:0:0), (4:1:0), (2:1:5), (1:1:5), (1:2:5) และ(1:4:5)

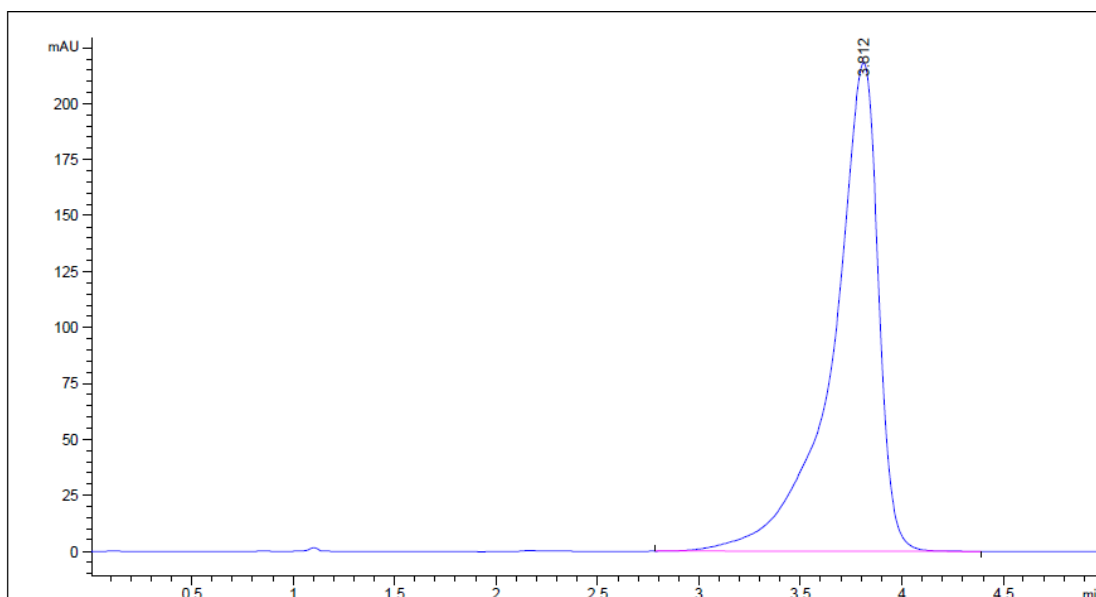
จากการศึกษาผลของ deoxycholic acid ต่อการเกิด liposome และการ load ยา furazolidone โดยการวัดขนาดอนุภาคและ zeta potential พบว่า เมื่อเปรียบเทียบขนาดอนุภาคก่อนและหลังการ load ยา furazolidone เข้าสู่ liposome สูตร PC : DCA : Fu (1:2:5) และสูตร

PC :DCA : Fu (1:4:5) มีขนาดอนุภาคแตกต่างจากก่อน load ยาสูตร PC : DCA (1:2) และสูตร PC : DCA (1:4) อย่างมีนัยสำคัญที่ P- value เท่ากับ 0.031 และ 0.016 ตามลำดับ เนื่องจากมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ศึกษาพบว่า การเพิ่ม Cholate เข้าไปในโมเลกุลจะเป็นผลให้ Intramembrane pore มีขนาดใหญ่ขึ้น ส่งผลให้ขนาดอนุภาคโดยรวมของ liposome ใหญ่ขึ้นด้วยนั่นเอง (31) ส่วนผลทางด้าน zeta potential ไม่แตกต่างกันทั้งก่อนและหลัง load ยา และเมื่อสังเกตลักษณะทางกายภาพของ liposome หลังกรองด้วย membrane ขนาด 0.45 nm เพื่อกรอง Furazolidone ส่วนที่ไม่ถูกกักเก็บออกดังรูปที่ 36 พบว่า ที่อัตราส่วน 1:1:5, 1:2:5 และ 1:4:5 สีของสารค่อนข้างใส ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า liposome สามารถกักเก็บตัวยาน furazolidone ได้น้อยมาก ดังนั้นจึงตัดสูตร 1:1:5, 1:2:5 และ 1:4:5 ทิ้งแล้วพิจารณาเพียงสูตร 4:1:5 และ 2:1:5 แทน ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกันจะเห็นได้ว่าลักษณะสีของสูตร 4:1:5 มีความเข้มกว่าอย่างเห็นได้ชัด คาดว่าน่าจะสามารถกักเก็บยา Furazolidone ได้มากกว่า ดังนั้นทั้งจากผลทางด้านขนาดอนุภาค zeta potential และลักษณะทางกายภาพจึงเลือกสูตร PC : DCA : Fu (4:1:5) มาใช้ในการศึกษาถัดไป

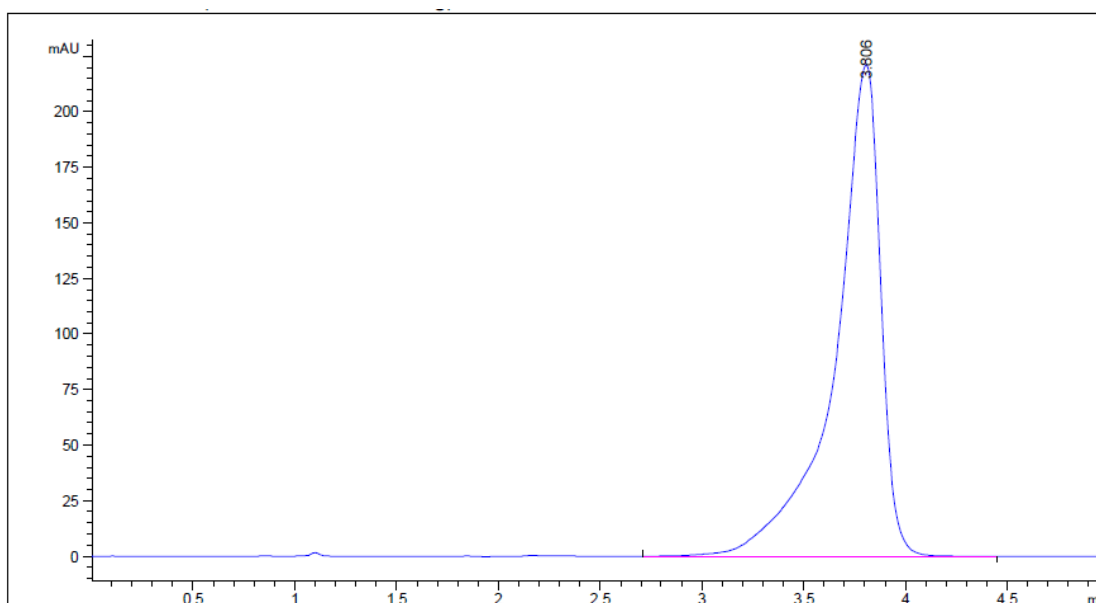
### 3.2. ผลการวิเคราะห์ปริมาณตัวยาน (%entrapment efficiency)

3.2.1. ตัวอย่าง chromatogram ของสารที่วิเคราะห์ และ standard Curve ของยา furazolidone ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ condition ดังนี้ Column : C-18 column (250 mm × 4.6 mm ,5 μm), Mobile phase : acetonitrile และ DI water ในอัตราส่วน 50:50 v/v, Running time : 10 นาที, Injection volume : 20μL, Flow rate : 1 ml/min, Retention time : 7.2 นาที และ Detector : UV detector wavelength 421 nm

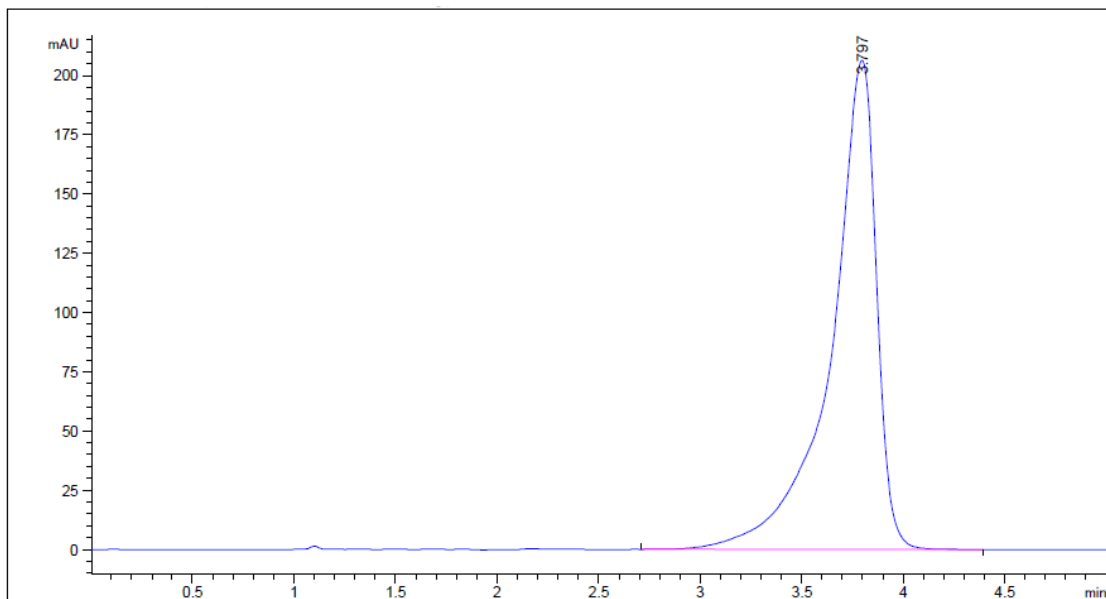
ตัวอย่าง chromatogram



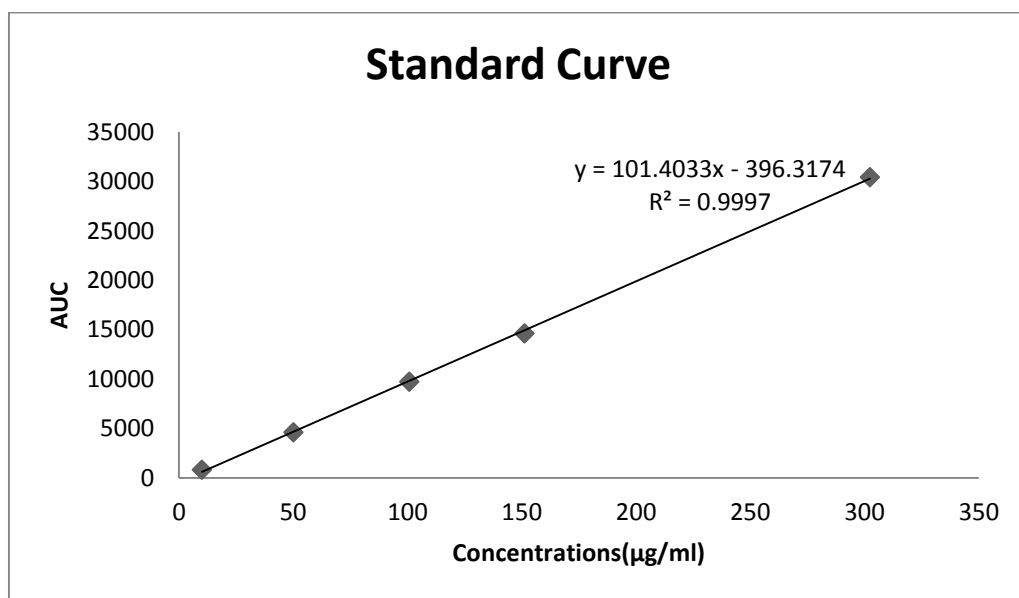
รูปที่ 37 แสดง chromatogram ของยา furazolidone ที่ความเข้มข้น 300  $\mu\text{g/ml}$  ใช้ mobile phase คือ acetonitrile : DI water (25:75); retention time : 3.812 นาที; running time : 5 นาที



รูปที่ 38 แสดง chromatogram ของสูตร PC : DCA : Fu(1:0:5) ใช้ mobile phase คือ acetonitrile acetonitrile : DI water (25:75); retention time : 3.806 นาที; running time : 5 นาที



รูปที่ 39 แสดง chromatogram ของสูตร PC : DCA : Fu (4:1:5) ใช้ mobile phase คือ acetonitrile : DI water (25:75); retention time : 3.797 นาที; running time : 5 นาที



รูปที่ 40 แสดง standard Curve ของยา Furazolidone

การวิเคราะห์ปริมาณสาร furazolidone ต่ำสุด ได้แก่

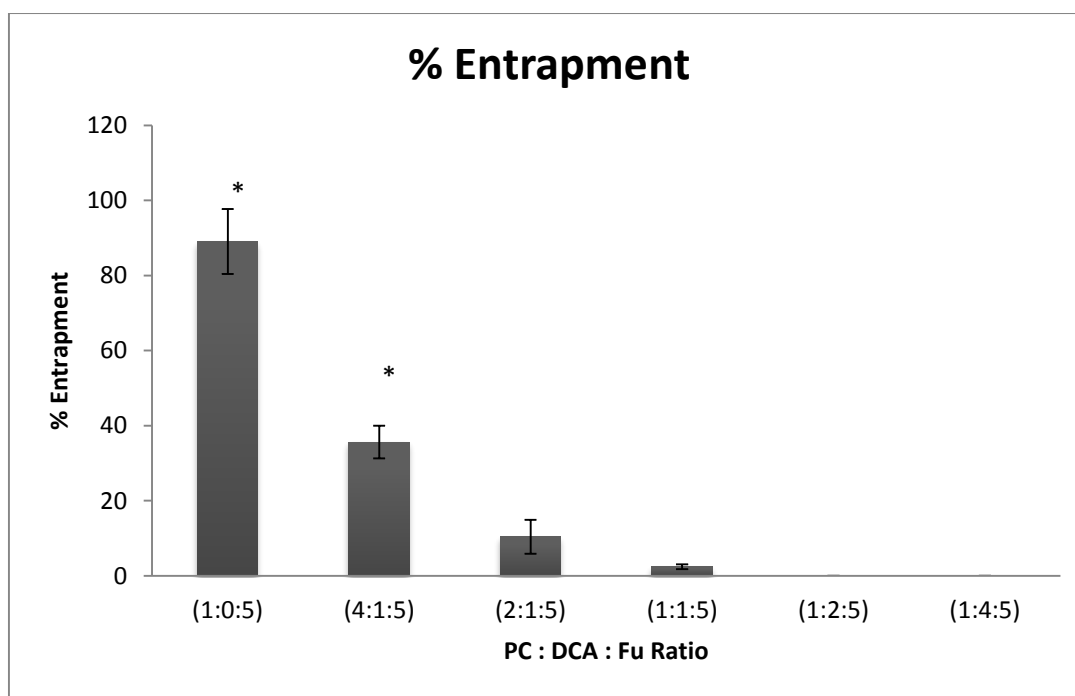
Limit of detection (LOD) = 0.1 µM

Limit of quantification (LOQ) = 0.5  $\mu$ M

3.2.2. ผลการวิเคราะห์ปริมาณตัวยา (%entrapment efficiency) ด้วยเครื่อง HPLC ตารางที่ 5 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณตัวยา (%entrapment efficiency)

Formulation	AUC	% Entrapment
PC : DCA : Fu (1:0:5)	22182.57	89.07 $\pm$ 8.63*
PC : DCA : Fu (4:1:5)	9670.07	35.61 $\pm$ 4.37*
PC : DCA : Fu (2:1:5)	2064.47	10.40 $\pm$ 4.50
PC : DCA : Fu (1:1:5)	2.93E+01	2.42 $\pm$ 0.66
PC : DCA : Fu (1:2:5)	N/A	N/A
PC : DCA : Fu (1:4:5)	N/A	N/A

Each value presents the mean  $\pm$  S.D. (n=3); \* $P$  < 0.05 compared with PC : DCA : Fu in all formulation

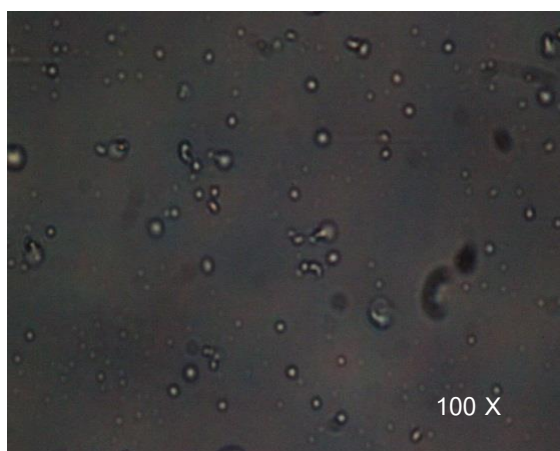


รูปที่ 41 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณตัวยา (% entrapment efficiency) ในสูตรต่างๆ

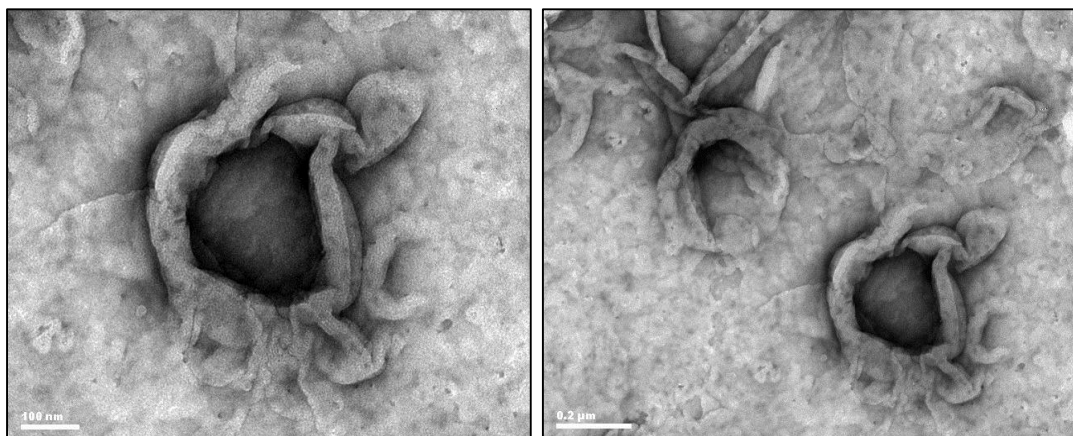
(\* $P$  < 0.05 compared with PC : DCA : Fu in all formulation)

จากการศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณตัวยา (% entrapment efficiency) พบว่าสูตรที่ไม่มี deoxycholic acid สามารถที่จะกักเก็บยา furazolidone ไว้ภายใน liposome ได้มากกว่าสูตรที่มี deoxycholic acid ได้แก่ สูตร PC : DCA : Fu (1:0:5) มี % entrapment efficiency เท่ากับ  $89.07 \pm 8.63$  ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสูตร liposome ที่มี deoxycholic acid ในอัตราส่วนต่างๆ พบว่า สูตร PC : DCA : Fu (4:1:5) มี % entrapment efficiency เท่ากับ  $35.61 \pm 4.37$  ซึ่งแตกต่างจากสูตร PC : DCA : Fu (2:1:5), (1:1:5), (1:2:5) และ (1:4:5) อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.000$ ) เนื่องจากกลไกหลักในการกักเก็บของ furazolidone คือจะไปจับกับโครงสร้างส่วน phosphatidylcholine ซึ่งเมื่อมีองค์ประกอบที่เป็น deoxycholic acid เพิ่มขึ้นจะไปสร้างพันธะกับ phosphatidylcholine ทำให้พื้นที่ในการจับกับตัวยา furazolidone ลดลง เป็นผลให้ % entrapment efficiency ลดลงเช่นกัน (31) ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าสูตรที่สามารถกักเก็บตัวยาได้มากที่สุดนั่นคืออัตราส่วน PC : DCA : Fu (4:1:5) มีค่า % entrapment เท่ากับ  $35.61 \pm 4.37$  ซึ่งมีค่าแตกต่างกับสูตรอื่นอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) และผลสอดคล้องกับลักษณะทางกายภาพจากการทดลองที่ 3.1. ผู้วิจัยจึงเลือกสูตรนี้มาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

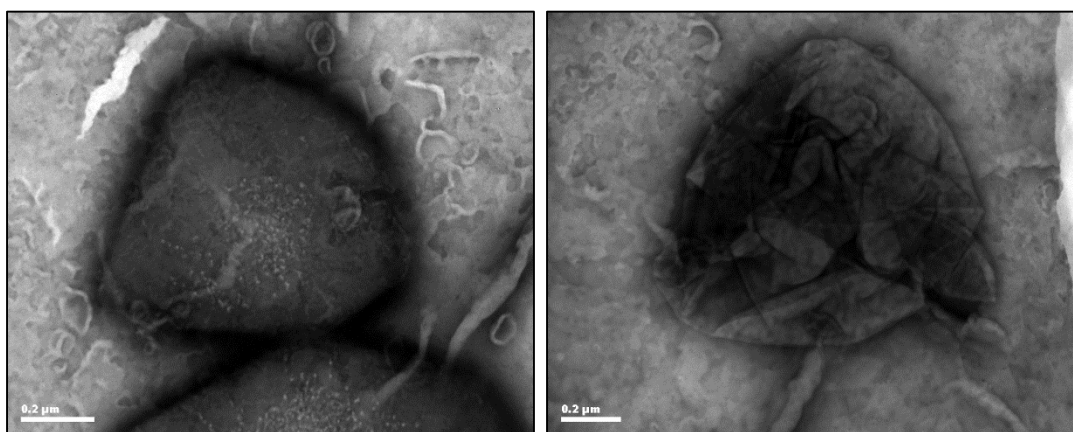
3.3. ศึกษา morphology ของระบบนำส่งยาโดยนำตัวอย่างไปส่องด้วยกล้อง Polarized light microscope และ Transmission electron microscopy (TEM)



รูปที่ 42 แสดงลักษณะ liposome ที่ใช้ในการศึกษาโดยส่องผ่านกล้อง Polarized light microscope

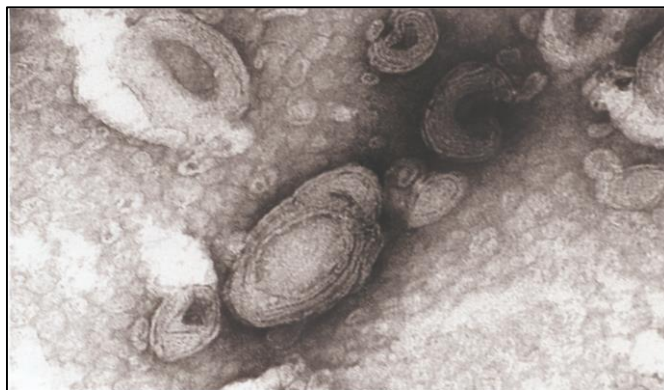


รูปที่ 43 แสดง morphology ของสูตร PC : DCA : Fu (4:1:5) โดยส่องผ่านกล้อง TEM



รูปที่ 44 แสดง morphology ของสูตร PC : DCA : Fu (1:0:5) โดยส่องผ่านกล้อง TEM

จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพโดยการส่องกล้อง Transmission electron microscopy (TEM) ด้วยเทคนิค negative staining พบว่ามีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 20 - 100 nm และจากรูปที่ 43 จะสังเกตเห็นว่ามีลักษณะเป็นถุงมีขอบซึ่งเป็นลักษณะของ liposome โดยเมื่อเทียบภาพจากงานวิจัยของ P. Chetanachan, P. Akarachalanon, D. Worawirunwong, ที่ศึกษา ลักษณะของ liposome โดยส่องผ่านกล้อง Transmission electron microscope (TEM) พบว่า ลักษณะ liposome แบบ multilamellar vesicle แสดงดังรูปที่ 45 จะสังเกตเห็นว่ามีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน จึงสามารถสรุปได้ว่าอนุภาคที่ได้เป็น liposome ชนิด unilamellar vesicle



รูปที่ 45 แสดงตัวอย่างการเรียงตัวของ multilamellar vesicle (32)

#### 4. การศึกษาความคงตัวของ liposome ในสภาวะจำลองของร่างกาย

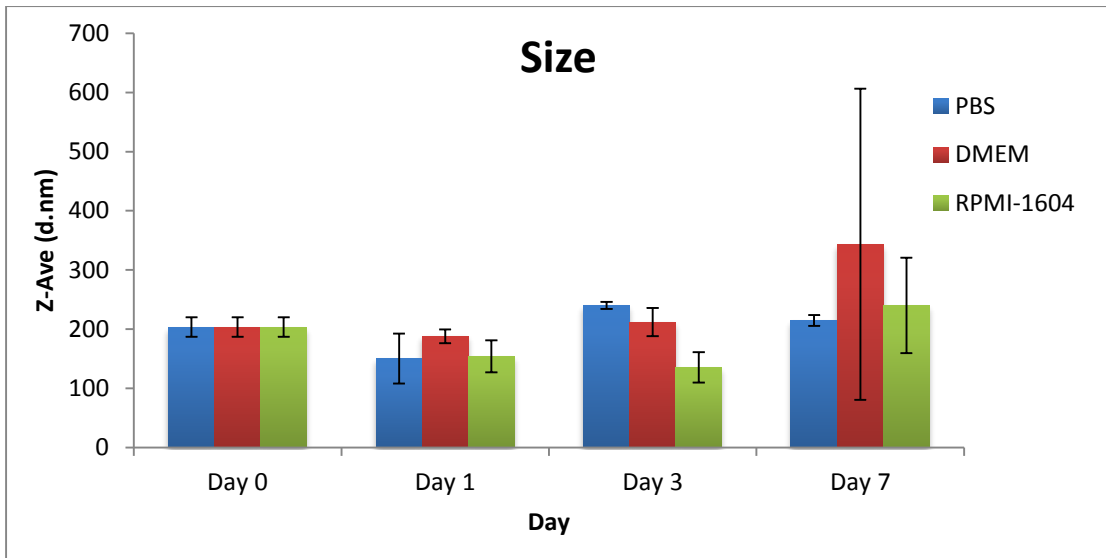
##### 4.1. ผลการวัดขนาดอนุภาคและ zeta potential ของสูตร PC: DCA: Fu (1:0:5)

ตารางที่ 6 แสดงผลความคงตัวของสูตร PC : DCA : Fu (1:0:5) ในสภาวะจำลองของร่างกายโดยใช้ medium ต่างๆกัน คือ PBS pH 7.4, RPMI-1640 และ DMEM ในอัตราส่วน 1:20 เก็บที่อุณหภูมิ 37 °C

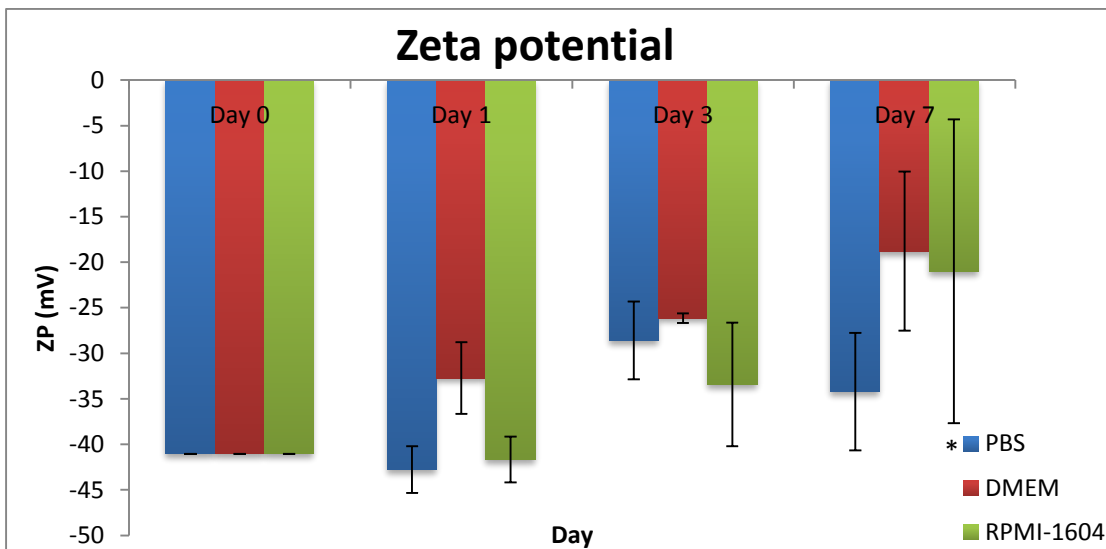
Day	medium	Size (nm)	Zeta potential (mV)
Day 0		203.37 ± 16.45	-41.07 ± 1.15
Day 1	PBS	150.33 ± 42.08	-42.78 ± 2.56
	DMEM	187.96 ± 11.54	-32.72 ± 3.93
	RPMI - 1604	153.84 ± 27.12	-41.67 ± 2.52
Day 3	PBS	240.18 ± 5.95	-28.59 ± 4.28
	DMEM	212.13 ± 23.82	-26.16 ± 0.53
	RPMI - 1604	135.27 ± 25.82	-33.41 ± 6.79
Day 7	PBS	214.73 ± 9.15	-34.21 ± 6.45
	DMEM	343.34 ± 263.21	-18.79 ± 8.73*
	RPMI - 1604	240 ± 80.70	-21.00 ± 16.69

Each value presents the mean ± S.D. (n=3); \*P < 0.05 compared with DMEM Day 1





รูปที่ 46 แสดงเปรียบเทียบขนาดอนุภาคของสูตร PC : DCA : Fu (1:0:5) ในสภาวะจำลองของร่างกายโดยใช้ medium คือ PBS pH 7.4, RPMI-1640 และ DMEM ในอัตราส่วน 1:20 ที่อุณหภูมิ 37 °C



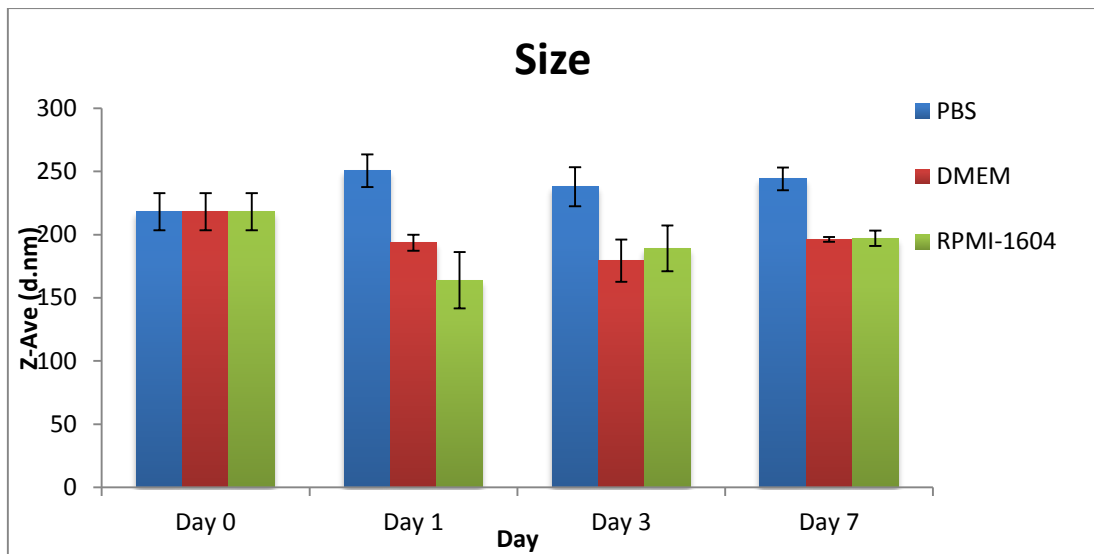
รูปที่ 47 แสดงการเปรียบเทียบ zeta potential ของสูตร PC : DCA : Fu (1:0:5) ในสภาวะจำลองของร่างกายโดยใช้ medium คือ PBS pH 7.4, RPMI-1640 และ DMEM ในอัตราส่วน 1:20 ที่อุณหภูมิ 37 °C (\* $P < 0.05$  compared with DMEM Day 1)

ซึ่งจากการผลความคงตัวของสูตร PC : DCA : Fu (1:0:5) ในสภาวะจำลองของร่างกายโดยใช้ medium ต่างๆกัน คือ PBS pH 7.4, RPMI-1640 และ DMEM ในอัตราส่วน 1:20 และควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C พบว่า ขนาดอนุภาคของ Liposome เมื่อเก็บเป็นระยะเวลา 1, 3 และ 7 วัน ไม่มีความแตกต่างกัน ส่วนผล zeta potential พบว่า สูตร PC : DCA : Fu (1:0:5) ที่อยู่ในสารละลาย DMEM เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 7 วัน มีค่า zeta potential เท่ากับ  $-18.79 \pm 8.73$  mV ซึ่งค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับค่าในวันที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญ P-value เท่ากับ 0.006

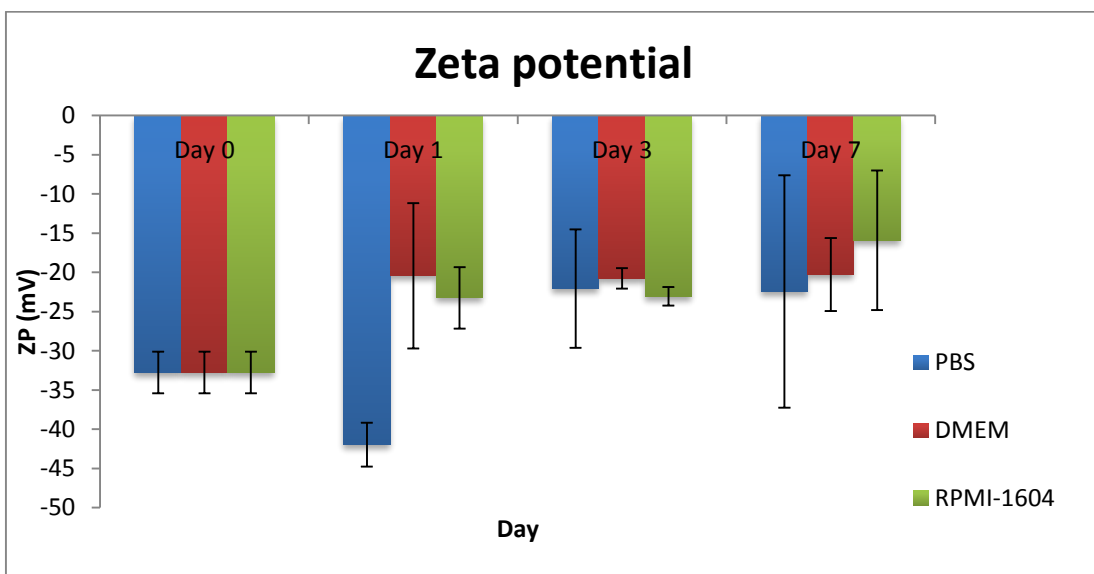
#### 4.2 ผลการวัดขนาดอนุภาคและ Zeta potential ของสูตร PC: DCA: Fu (4:1:5)

ตารางที่ 7 แสดงผลความคงตัวของสูตร PC : DCA : Fu (4:1:5) ในสภาวะจำลองของร่างกายโดยใช้ medium ต่างๆกัน คือ PBS pH 7.4, RPMI-1640 และ DMEM ในอัตราส่วน 1:20 ที่อุณหภูมิ 37 °C

Day	medium	Size (nm)	Zeta potential (mV)
Day 0		218.13 ± 14.72	-32.77 ± 2.65
Day 1	PBS	250.57 ± 12.87	-41.98 ± 2.78
	DMEM	193.68 ± 6.32	-20.43 ± 9.27
	RPMI - 1604	163.97 ± 22.32	-23.27 ± 3.93
Day 3	PBS	237.84 ± 15.51	-22.08 ± 7.54
	DMEM	179.34 ± 16.80	-20.77 ± 1.29
	RPMI - 1604	189.24 ± 18.11	-23.06 ± 1.18
Day 7	PBS	244.16 ± 9.05	-22.44 ± 14.83
	DMEM	196.24 ± 1.84	-20.28 ± 4.67
	RPMI - 1604	197.01 ± 6.06	-15.92 ± 8.89



รูปที่ 48 แสดงการเปรียบเทียบของสูตร PC : DCA : Fu (4:1:5) ในสภาวะจำลองของร่างกายโดยใช้ medium คือ PBS pH 7.4, RPMI-1640 และ DMEM ในอัตราส่วน 1:20 ที่อุณหภูมิ 37 °C



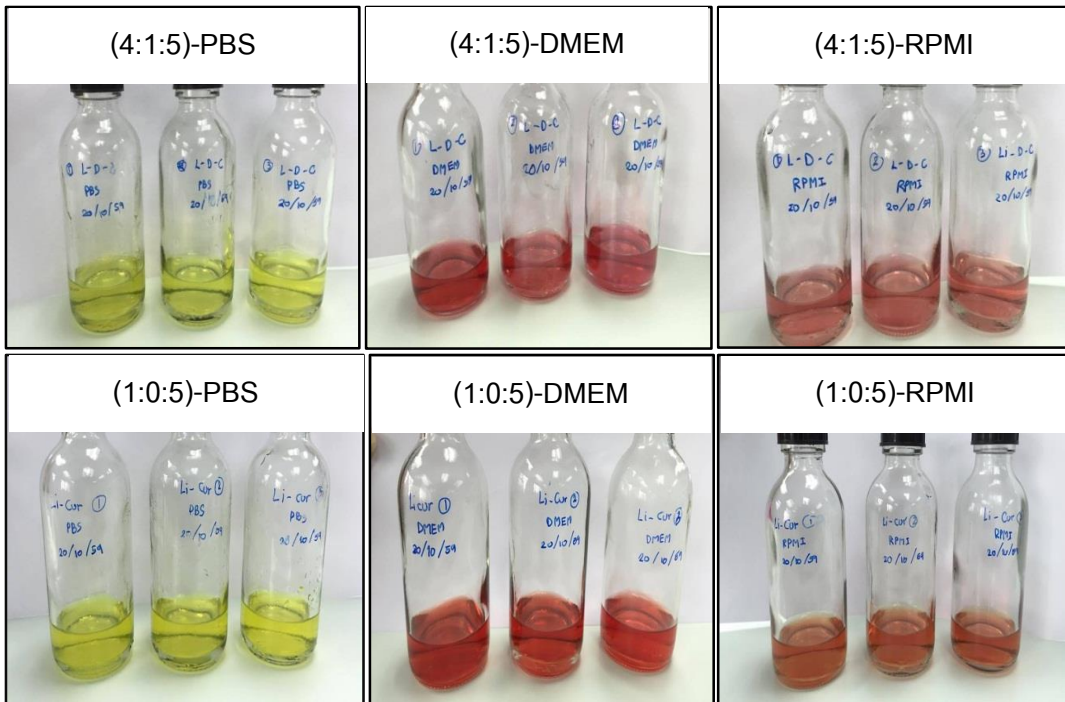
รูปที่ 49 แสดงการเปรียบเทียบ zeta potential ของสูตร PC : DCA : Fu (4:1:5) ในสภาวะจำลองของร่างกายโดยใช้ medium คือ PBS pH 7.4, RPMI-1640 และ DMEM ในอัตราส่วน 1:20 ที่อุณหภูมิ 37 °C

ซึ่งจากการผลความคงตัวของสูตร PC : DCA : Fu (4:1:5) ในสภาวะจำลองของร่างกายโดยใช้ medium ต่างๆกัน คือ PBS pH 7.4, RPMI-1640 และ DMEM ในอัตราส่วน 1:20 และควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C พบว่า ขนาดอนุภาคและ zeta potential ของสูตร PC : DCA : Fu (4:1:5) เมื่อเก็บเป็นระยะเวลา 1, 3 และ 7 วัน มีไม่แตกต่างกัน จึงสามารถสรุปได้ว่าสูตรตำรับ liposome ที่เตรียมได้มีความคงตัวเหมาะสมที่จะนำมาพัฒนาในขั้นตอนต่อไป

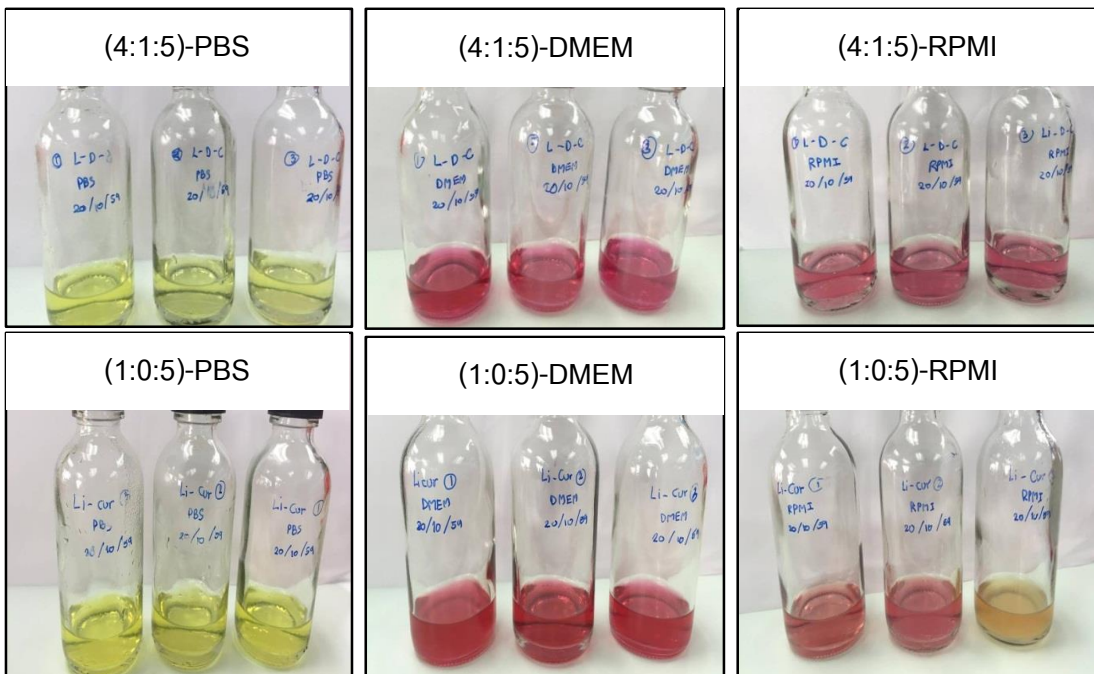
#### 4.3 ผลความคงตัวของ liposome ในสภาวะจำลองของร่างกายทางกายภาพ

ตารางที่ 8 แสดงความคงตัวของสูตร PC : DCA : Fu (1:0:5) และสูตร PC : DCA : Fu (4:1:5) ในสภาวะจำลองของร่างกายทางกายภาพ

Formulation	Day 0	Day 1	Day 3	Day 7
<b>PC : DCA : Fu (1:0:5)</b>				
DMEM	สารละลายใสสีแดง	สารละลายใสสีแดง	สารละลายใสสีแดง	สารละลายใสสีแดง
RPMI	สารละลายใสสีส้ม	สารละลายใสสีส้ม	สารละลายใสสีส้ม	สารละลายสีชมพูขุ่น
PBS	สารละลายใสสีเหลือง	สารละลายสีเหลือง, ตะกอนขุ่นขาวแขวง ลอยเล็กน้อย	สารละลายสีเหลือง, ตะกอนขุ่นขาวแขวง ลอยเล็กน้อย	สารละลายสีเหลือง, ตะกอนขุ่นขาวแขวง ลอยเล็กน้อย
<b>PC : DCA : Fu (4:1:5)</b>				
DMEM	สารละลายใสสีแดง	สารละลายใสสีแดง	สารละลายใสสีแดง	สารละลายใสสีแดง
RPMI	สารละลายใสสีส้ม	สารละลายสีส้มอ่อน	สารละลายใสสีส้ม	สารละลายสีชมพูใส
PBS	สารละลายใสสีเหลือง	สารละลายสีเหลือง, ตะกอนขุ่นขาวแขวง ลอยเล็กน้อย	สารละลายสีเหลือง, ตะกอนขุ่นขาวแขวง ลอยเล็กน้อย	สารละลายสีเหลือง, ตะกอนขุ่นขาวแขวง ลอยเล็กน้อย



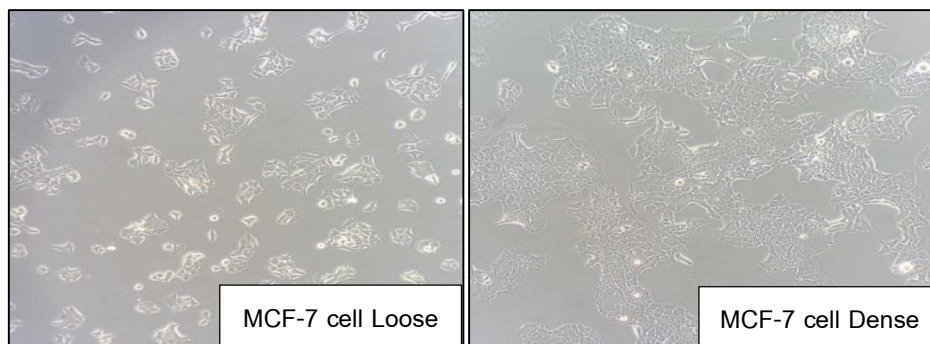
รูปที่ 50 แสดงลักษณะของสูตร PC : DCA : Fu (1:0:5) และสูตร PC : DCA : Fu (4:1:5) ในสถานะจำลองของร่างกายโดยใช้ medium คือ PBS pH 7.4, RPMI-1640 และ DMEM ในวันที่ 1



รูปที่ 51 แสดงลักษณะของสูตร PC : DCA : Fu (1:0:5) และสูตร PC : DCA : Fu (4:1:5) ในสถานะจำลองของร่างกายโดยใช้ medium คือ PBS pH 7.4, RPMI-1640 และ DMEM ในวันที่ 7

ตอนที่ 2 : ศึกษาผลของ deoxycholic acid ต่อประสิทธิภาพในการนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง

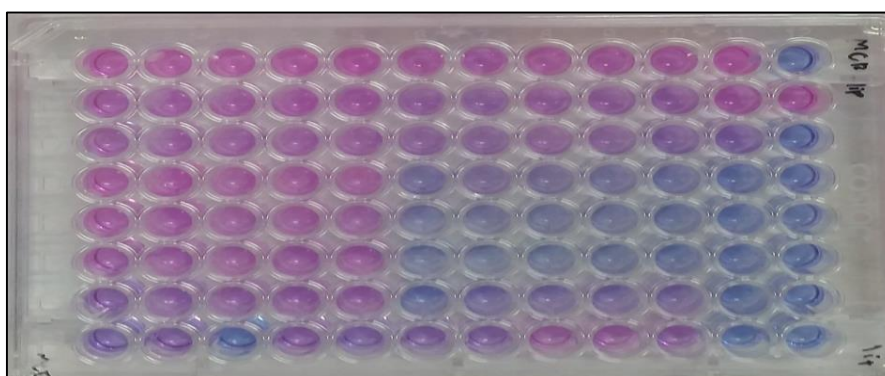
1. ผลการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (cytotoxicity)



รูปที่ 52 แสดงลักษณะของ MCF-7 cell ในการศึกษา โดยส่องผ่านกล้อง Inverted microscope



รูปที่ 53 แสดงการศึกษาความสามารถในการละลายของยา furazolidone ความเข้มข้น 15, 30, 50, 75, 100 และ 150  $\mu\text{M}$  ในอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร DMEM + 0.1% DMSO

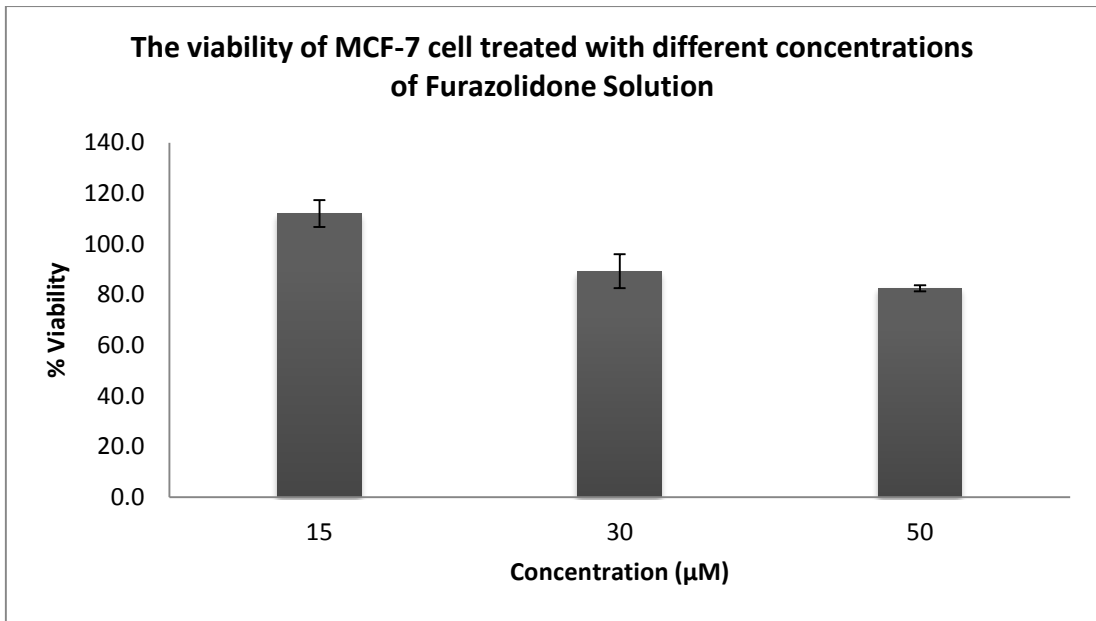


รูปที่ 54 แสดงผลการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (cytotoxicity) ของ MCF-7 cell ที่ treat ด้วย furazolidone acid solution, สูตร PC : DCA : Fu (1:0:5) และสูตร PC : DCA : Fu (4:1:5) และทำการหาปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตด้วยวิธี presto blue และวิเคราะห์ด้วย Microplate reader

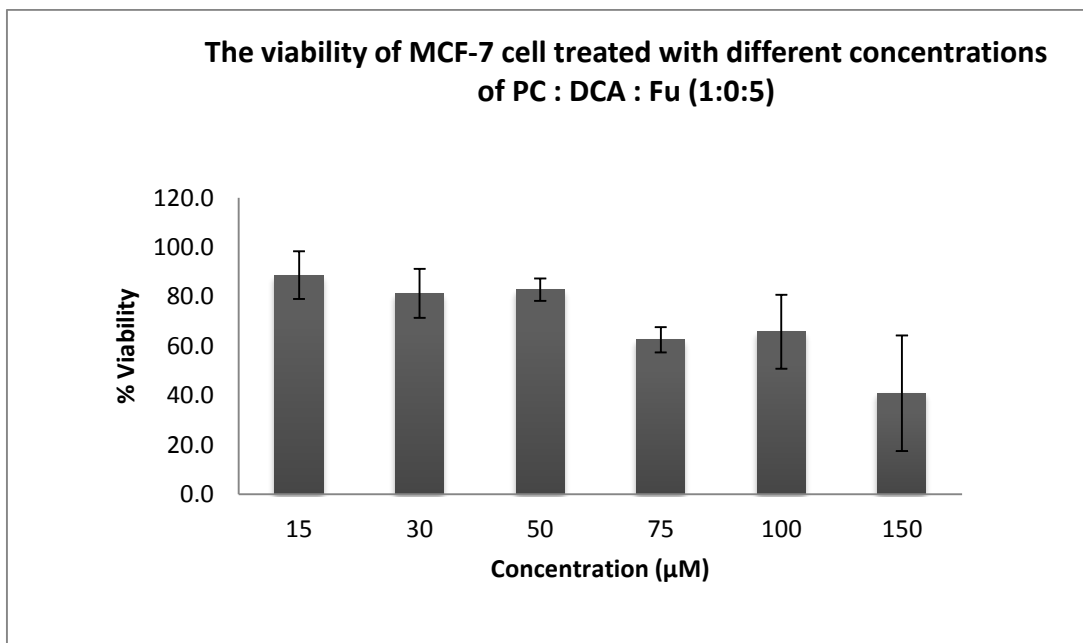
ตารางที่ 9 แสดงปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิต (% viability) ของ MCF-7 cell

Formulation	Mean $\pm$ S.D.
Furazolidone [15]	112.0 $\pm$ 5.3
Furazolidone [30]	89.3 $\pm$ 6.7
Furazolidone [50]	82.5 $\pm$ 1.2
PC : DCA : Fu (4:1:0) [100]	49.7 $\pm$ 6.0**
PC : DCA : Fu (4:1:5) [15]	95.5 $\pm$ 2.0
PC : DCA : Fu (4:1:5) [30]	70.4 $\pm$ 5.1
PC : DCA : Fu (4:1:5) [50]	62.0 $\pm$ 8.5
PC : DCA : Fu (4:1:5) [75]	22.8 $\pm$ 8.6***
PC : DCA : Fu (4:1:5) [100]	6.3 $\pm$ 2.6***
PC : DCA : Fu (4:1:5) [150]	0.2 $\pm$ 0.5***
PC : DCA : Fu (1:0:5) [15]	88.7 $\pm$ 9.6*
PC : DCA : Fu (1:0:5) [30]	81.4 $\pm$ 9.9
PC : DCA : Fu (1:0:5) [50]	82.9 $\pm$ 4.5
PC : DCA : Fu (1:0:5) [75]	62.5 $\pm$ 5.2
PC : DCA : Fu (1:0:5) [100]	61.9 $\pm$ 17.3
PC : DCA : Fu (1:0:5) [150]	44.8 $\pm$ 26.0

Each value represents the mean  $\pm$  S.D. (n=5) ; \* $P$  < 0.05 compared with Formulation(Furazolidone) in same concentrations;\*\* $P$  < 0.05 compared with PC : DCA : Fu (4:1:5) [100]; \*\*\* $P$  < 0.05 compared with each formulation in same concentrations

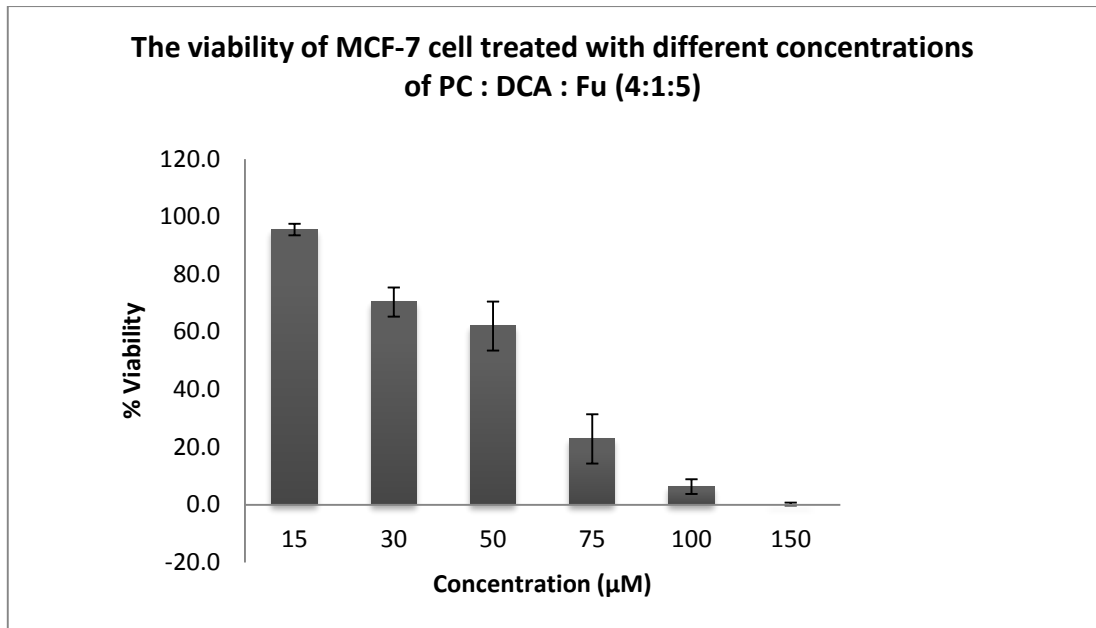


รูปที่ 55 แสดง % viability ของ MCF-7 cell ซึ่ง treated ด้วย furazolidone solution ความเข้มข้นต่างๆ

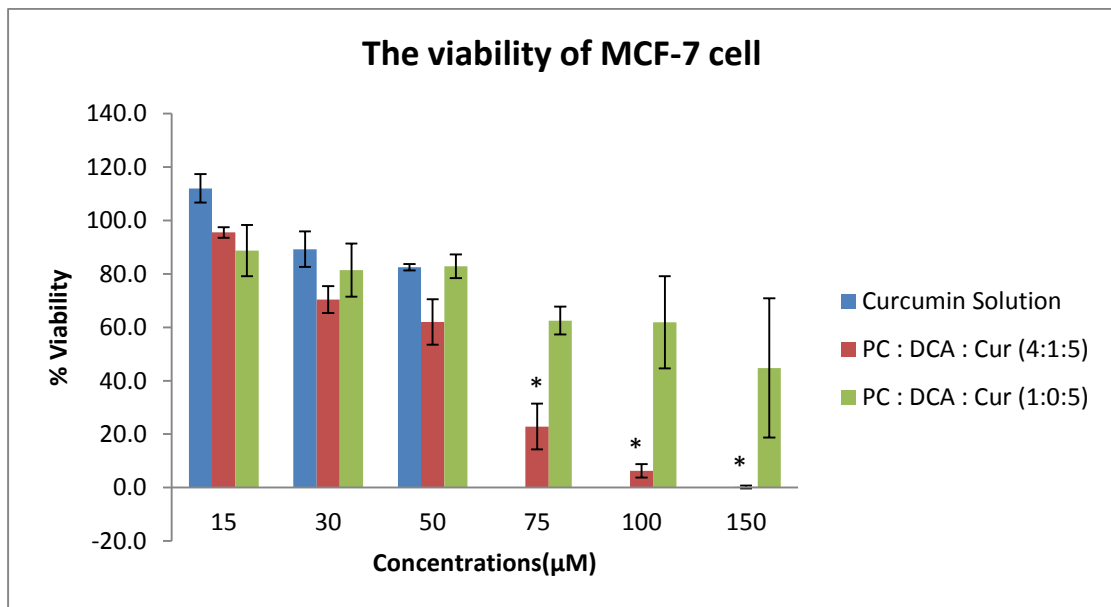


รูปที่ 56 แสดง % viability ของ MCF-7 cell ซึ่ง treated ด้วยสูตร PC : DCA : Fu (1:0:5) ความเข้มข้นต่างๆ





รูปที่ 57 แสดง % viability ของ MCF-7 cell ซึ่ง treated ด้วยสูตร PC : DCA : Fu (4:1:5) ความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 58 แสดงการเปรียบเทียบแสดง % viability ของ MCF-7 cell ซึ่ง treated ด้วย Furazolidone Solution, สูตร PC : DCA : Fu (1:0:5) และสูตร PC : DCA : Fu (4:1:5) ความเข้มข้นต่างๆ (\* $P < 0.05$  compared with each formulation in same concentrations)

ตารางที่ 10 แสดง The half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) ของ Furazolidone solution, สูตร PC : DCA : Fu (1:0:5) และสูตร PC : DCA : Fu (4:1:5)

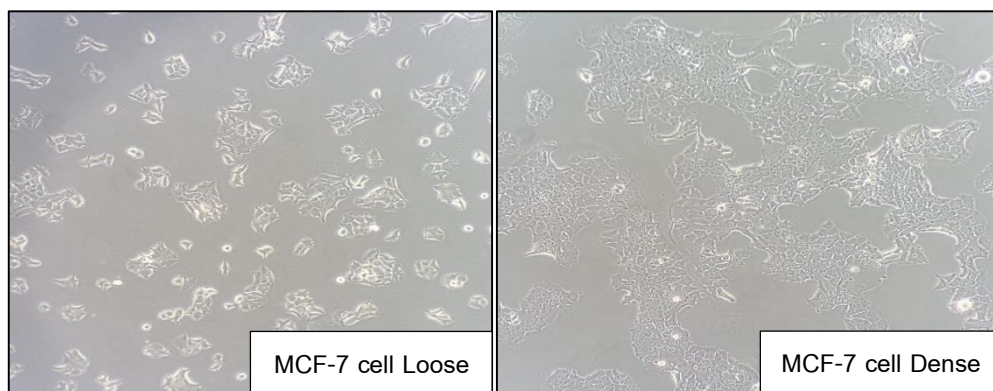
Formulation	$IC_{50}(\mu M)$
Furazolidone solution	86.40
PC : DCA : Fu (1:0:5)	115.28
PC : DCA : Fu (4:1:5)	54.04*

\* $P < 0.05$  compared with all formulation

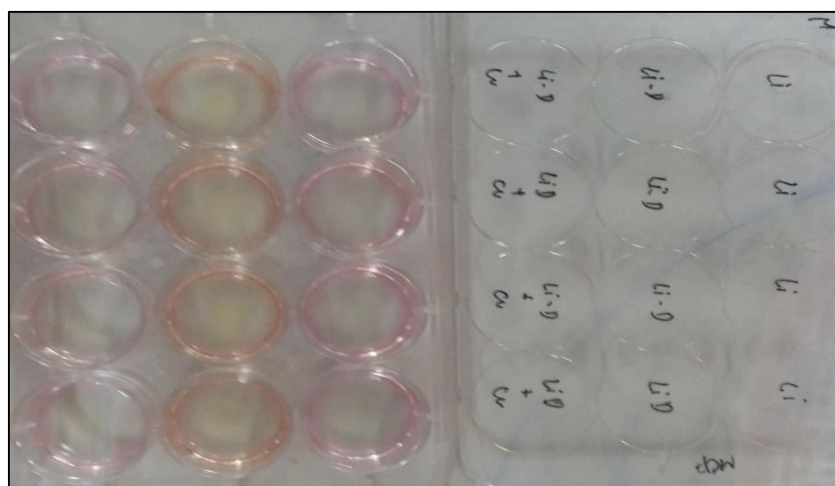
จากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (cytotoxicity) ซึ่งศึกษาโดยใช้เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7 cell) ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ประกอบด้วย dulbecco's modified minimum essential medium (DMEM), 10% fetal bovine serum (FBS), 1% antibiotic-antimycotic และ 1% L-glutamax แล้ว incubate ที่ อุณหภูมิ  $37^{\circ}C \pm CO_2$  5 % เปลี่ยนอาหารทุก 3 วัน พบว่า ลักษณะ MCF-7 cell ที่นำมาศึกษาจัดเป็น epithelial cell line แบบ attached cell ซึ่งลักษณะเซลล์แสดงดังรูปที่ 52 หลังจากนั้นจะนำ MCF-7 cell ที่ได้มาทดสอบด้วยสารสูตรต่างๆ ได้แก่ furazolidone solution, สูตร PC : DCA : Fu (1:0:5) และสูตร PC : DCA : Fu (4:1:5) โดยเตรียมสารละลายแต่ละสูตรจำนวน 6 ความเข้มข้น ได้แก่ 15, 30, 50, 75, 100 และ 150  $\mu M$  ในอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร DMEM + 0.1% DMSO ซึ่งพบว่า การละลายของยา furazolidone จะสามารถละลายได้ที่ความเข้มข้น 15, 30 และ 50  $\mu M$  แสดงดังรูปที่ 53 เนื่องจากที่ความเข้มข้น 75, 100 และ 150  $\mu M$  จะเริ่มมีการตกตะกอนของยา furazolidone ที่ไม่ละลาย ดังนั้นจึงศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (cytotoxicity) ของยา furazolidone เพียง 3 ความเข้มข้นดังกล่าว หลังจากทดสอบด้วย furazolidone solution, สูตร PC : DCA : Fu (1:0:5) และสูตร PC : DCA : Fu (4:1:5) แล้วจะทำการวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิต (% Viability) ด้วยวิธี Presto blue ซึ่งหากสีของสารละลาย presto blue เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีชมพู แสดงถึงเซลล์ที่รอดชีวิต โดยความเข้มของสีที่เปลี่ยนแปลงไปจะแปรผันตรงกับปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิต และวิเคราะห์ความเข้มของสีด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น excitation 560 nm และ emission 590 nm แล้วคำนวณออกมาเป็น % viability พบว่า หากใช้ความเข้มข้นของ furazolidone solution, สูตร PC : DCA : Fu (1:0:5) และสูตร PC : DCA : Fu (4:1:5) มากขึ้นจะสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้เพิ่มขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบ % Viability แต่ละสูตรที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าระบบนำส่งยาในรูปแบบ liposome สามารถเพิ่มการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้มากกว่าการที่ไม่มีระบบนำส่งยา เนื่องจากระบบนำส่งยาในรูปแบบ liposome มีขนาดอนุภาคเล็กทำให้สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ดีขึ้น อีกทั้งช่วยเพิ่มความคงตัวและประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของสารที่ถูกกักเก็บได้ ทำให้ furazolidone ที่อยู่ในระบบนำส่งยา liposome ออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีกว่า furazolidone ที่ไม่มีระบบนำส่งยา และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างระบบนำส่งยาสูตร PC : DCA : Fu (4:1:0) กับสูตร PC : DCA : Fu (4:1:5) ซึ่งมียา furazolidone และไม่มียา furazolidone อยู่ภายในที่ความเข้มข้นเดียวกันพบว่าสูตรที่มี furazolidone สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) แสดงให้ทราบว่า ยา

furazolidone มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Hua-qiang Li และคณะ ได้ศึกษาประสิทธิภาพของ furazolidone โดยศึกษา cytotoxicity ด้วยวิธี MTT assays พบว่า furazolidone สามารถลด proliferation ของ MCF-7 cell ได้อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ขึ้นกับขนาดยาและระยะเวลา (33) และจาก % viability ของสูตร PC : DCA : Fu (4:1:0) ที่ไม่มียา Furazolidone มีค่าเท่ากับ  $49.7 \pm 6.0 \mu\text{M}$  แสดงให้ทราบว่า ระบบนำส่งยาที่มี deoxycholic acid เป็นองค์ประกอบสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้แม้ไม่มียา furazolidone ในอนุภาค จึงคาดว่า deoxycholic acid มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Ksenija N. Kuhajda และคณะ ได้ศึกษาผลของ bile acid derivative ต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (cytotoxicity) พบว่า deoxycholic acid มีฤทธิ์ antiproliferation ต่อ MCF-7 cell ซึ่งมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $>100 \mu\text{M}$  (34) และจากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งของระบบนำส่งยาในสูตร PC : DCA : Fu (4:1:5) พบว่า สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้มากกว่าสูตร PC : DCA : Fu (1:0:5) ซึ่งไม่มี deoxycholic acid ที่ความเข้มข้น 75, 100 และ 150  $\mu\text{M}$  อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) และเมื่อคำนวณ The half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) พบว่า สูตร PC : DCA : Fu (4:1:5) มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 54.04  $\mu\text{M}$  แตกต่างจากสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) เนื่องจากสูตร liposome ที่สร้างจาก phosphatidylcholine ซึ่งมีโครงสร้างเป็น Phospholipid นี้เมื่อเข้าสู่เซลล์ด้วยกระบวนการ endocytosis ผ่าน caveolae pathway เพราะเยื่อหุ้มเซลล์ของ caveolae pathway มีลักษณะเป็น highly hydrophobic membrane ซึ่งประกอบไปด้วย sphingomyelin, phosphatidyl inositol  $P_2$ , ceramide และ diacylglycerol จะเห็นได้ว่าโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ของ caveolae pathway จะมีสารจำพวก lipid เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นสารที่มีโครงสร้างเป็น lipid เช่น liposome จึงสามารถเข้าสู่เซลล์ผ่าน caveolae pathway ได้ อีกทั้งจากการศึกษาของ Joanna REJMAN, Volker OBERLE และคณะ ได้ทำการศึกษา ผลของขนาดอนุภาคที่จะผ่านเข้าสู่ clathrin และ caveolae-mediated endocytosis pathways พบว่าขนาดอนุภาคที่จะชอบเข้าผ่าน caveolae-mediated endocytosis pathways นั้นมีขนาด ประมาณ 200 nm - 1  $\mu\text{m}$  (35) ซึ่งขนาดอนุภาคของสูตร liposome มีขนาดที่ใกล้เคียงกับช่วงขนาดอนุภาคที่ผ่านทาง caveolae pathway ดังนั้นเมื่อ liposome จับกับ caveolin protein ที่อยู่บนผิวเยื่อหุ้มเซลล์ จะเกิดกระบวนการ endocytosis เข้าสู่เซลล์เกิดเป็น caveosome ซึ่งจาก caveosome จะสามารถเข้าสู่กระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ โดยถ้าหาก caveosome เข้าสู่ระบบ lysosome ซึ่งทำหน้าที่ในการสลายอนุภาค โมเลกุล หรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่เซลล์ก็จะถูกจับทำลาย ทำให้เมื่อ liposome เข้าสู่เซลล์ผ่านกระบวนการนี้จึงมีโอกาสที่จะถูกทำลายโดย lysosome จึงส่งผลให้สูตร PC : DCA : Fu (1:0:5) ที่ไม่มี Deoxycholic acid มี  $IC_{50}$  ที่สูงกว่าสูตร PC : DCA : Fu (4:1:5) (36-38)

2. การศึกษาคุณสมบัติ cellular uptake โดยศึกษาความสามารถในการนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็ง MCF-7 cell ซึ่งวิเคราะห์ปริมาณยา furazolidone ที่อยู่ภายในเซลล์ด้วยเครื่อง HPLC



รูปที่ 59 แสดงลักษณะของ MCF-7 cell ในการศึกษา โดยส่องผ่านกล้อง Inverted microscope



รูปที่ 60 แสดงการศึกษาคุณสมบัติ cellular uptake เข้าสู่ MCF-7 cell

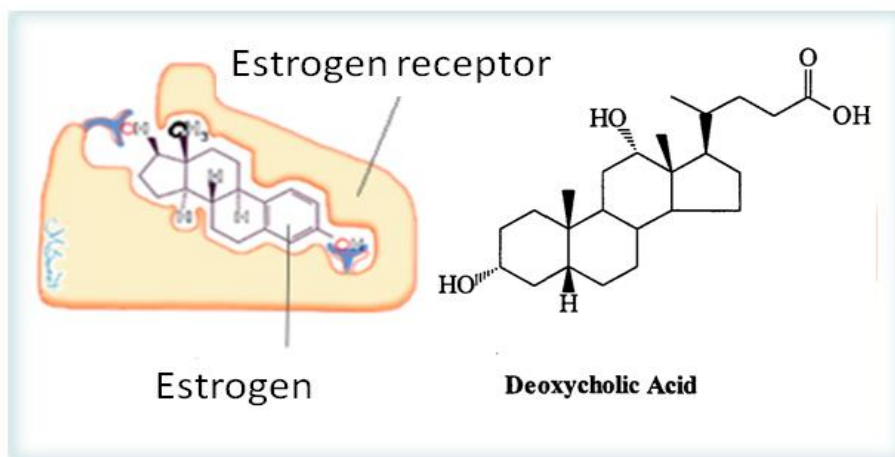
## 2.2. ผลการ uptake ยา furazolidone เข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7 cell)

ตารางที่ 11 แสดงคุณสมบัติ cellular uptake ของยา furazolidone เข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านม

Tumor	Formulation	Concentrations( $\mu\text{M}$ )
MCF-7 cell	Blank	N/A
	Furazolidone solution	N/A
	PC : DCA : Fu (1:0:5)	N/A
	PC : DCA : Fu (4:1:5)	$0.67 \pm 0.02^*$
	PC : DCA : Fu (4:1:0)-Furazolidone(5)	N/A

Each value represents the mean  $\pm$  S.D. (n=3);  $*P < 0.05$  compared with all formulation.

จากการศึกษาคุณสมบัติ cell uptake เข้าสู่ MCF-7 cells พบว่าสูตร PC : DCA : Fu (4:1:5) สามารถการนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งได้ดีกว่าสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (cytotoxicity) ที่สูตร PC : DCA : Fu (4:1:5) มี  $IC_{50}$  ต่ำกว่าสูตรอื่นๆ เนื่องจากดังที่กล่าวไว้ในส่วนของการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งแล้วว่า liposome นั้นจะเข้าสู่เซลล์โดยกระบวนการ endocytosis ผ่าน caveolae pathway ซึ่งเมื่อเข้าไปภายในเซลล์แล้วอาจถูกทำลายโดยระบบ lysosome ของเซลล์ ก่อนที่จะไปออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง แต่สารในสูตร PC : DCA : Fu (4:1:5) จะสามารถเพิ่มความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งมากขึ้น ทำให้ระบบนำส่งยานี้สามารถเข้าสู่เซลล์อย่างจำเพาะ โดยผ่านระบบ lysosome ลดลงทำให้ออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ยิ่งขึ้น เนื่องจากระบบนำส่งยารูปแบบ liposome ที่มี deoxycholic acid ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างเป็น steroid คล้ายคลึงกับฮอร์โมน estrogen โดยฮอร์โมนชนิดนี้ ปกติจะทำหน้าที่เป็น mitogenic กระตุ้น estrogen-receptor positive ซึ่งเป็นตัวรับสัญญาณฮอร์โมนที่อยู่บนผิวของเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7 cell) ทำให้เซลล์มะเร็งเต้านมเกิดการแบ่งตัวเพิ่มมากขึ้น ดังนั้น การที่ deoxycholic acid มีโครงสร้างคล้ายกับ estrogen นี้ ทำให้สามารถจับกับ estrogen-receptor positive ที่อยู่บนผิวของ MCF-7 cell ซึ่งลักษณะการจับกับ receptor แสดงดังรูปที่ 68



รูปที่ 61 แสดงลักษณะการจับของ estrogen กับ estrogen receptor

จึงสามารถช่วยเพิ่มความจำเพาะในการนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านมได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Baker PR, Wilton JC และคณะได้ทำการศึกษาผลของ bile acid ต่อ oestrogen receptor และ oestrogen-regulated proteins ใน MCF-7 human breast cancer cells พบว่า bile acid มีผลต่อ steroid receptor function ของ human breast cancer cells(39)

## บทที่ 5

### สรุปและวิจารณ์ผลวิจัย

จากการศึกษาและพัฒนาระบบนำส่งยาในรูปแบบ liposome โดยใช้ deoxycholic acid ร่วมกับ phosphatidylcholine ในสัดส่วนต่างๆกันในการสร้าง liposome เพื่อนำส่งยา furazolidone เข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7 cell) เมื่อทำการประเมินคุณสมบัติของ liposome ในทางกายภาพ (physical stability) ได้แก่ ขนาดอนุภาค ประจุบนพื้นผิวอนุภาค (zeta potential) การวิเคราะห์ปริมาณตัวยา (%entrapment efficiency) ศึกษา morphology โดยส่องผ่านกล้อง Polarized light microscope และ Transmission electron microscopy (TEM) และการศึกษาความคงตัวในสภาวะจำลองของร่างกาย พบว่า สูตรตำรับ liposome ที่เหมาะสมที่สุดคือ สูตร PC : DCA : Fu (4:1:5) มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยเท่ากับ  $177.96 \pm 39.09$  nm ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าสูตรอื่นๆ และ Zeta potential เฉลี่ยเท่ากับ  $-49.68 \pm 6.57$  mV โดยแสดงถึงอนุภาคมีความเสถียรไม่เกาะกลุ่มกัน อีกทั้ง liposome ในสูตรนี้สามารถกักเก็บตัวยาได้  $35.61 \pm 4.37$  % แตกต่างจากสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) โดยการกักเก็บตัวยา furazolidone ภายใน liposome อาศัยกลไก คือ ยา Furazolidone จับกับโครงสร้างส่วน phosphatidylcholine และเมื่อทดสอบความคงตัวในสภาวะจำลองของร่างกายของสูตร PC : DCA : Fu (4:1:5) ก็พบว่ามีความคงตัวใน medium ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ PBS (pH 7.4), RPMI-1640 medium และ DMEM ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 7 วัน หลังจากนั้นจึงได้นำสูตร PC : DCA : Fu (4:1:5) มาศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (cytotoxicity) และคุณสมบัติ cellular uptake โดยศึกษาในเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7 cell) พบว่า สูตร PC : DCA : Fu (4:1: 5) มี The half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) เท่ากับ  $54.04$   $\mu$ M แตกต่างจากสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) เนื่องจากการที่ liposome เข้าสู่เซลล์ด้วยกระบวนการ endocytosis ผ่าน caveolae pathway ซึ่งเยื่อหุ้มเซลล์ของ caveolae pathway มีลักษณะเป็น highly hydrophobic membrane จะเห็นได้ว่าโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ของ caveolae pathway จะมีสารจำพวก lipid เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นสารที่มีโครงสร้างเป็น lipid เช่น Liposome จึงสามารถเข้าสู่เซลล์ผ่าน caveolae pathway ได้ เมื่อ liposome เข้าสู่เซลล์แล้วจะเกิดเป็น caveosome ซึ่งจาก caveosome จะสามารถเข้าสู่กระบวนการต่างๆภายในเซลล์ โดยถ้าหาก caveosome เข้าสู่ระบบ lysosome ซึ่งทำหน้าที่ในการสลายอนุภาค โมเลกุล หรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่เซลล์ก็จะถูกจับทำลาย ทำให้เมื่อ liposome เข้าสู่เซลล์ผ่านกระบวนการนี้จึงมีโอกาที่จะถูกทำลายโดยระบบ lysosome แต่ liposome ในสูตร PC : DCA : Fu (4:1: 5) ซึ่งมี deoxycholic acid จะสามารถเพิ่มความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งมากขึ้น ทำให้ระบบนำส่งยานี้สามารถเข้าสู่เซลล์อย่างจำเพาะ โดยผ่านระบบ lysosome ลดลงทำให้ออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ยิ่งขึ้นจึงทำให้สูตร PC : DCA : Fu (4:1: 5) มีค่า  $IC_{50}$  ต่ำกว่าสูตรอื่นๆ เนื่องจากระบบนำส่งยาแบบ Liposome ที่มี Deoxycholic acid ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างเป็น steroid คล้ายคลึงกับฮอร์โมน estrogen โดยฮอร์โมนชนิดนี้ ปกติจะทำหน้าที่เป็น mitogenic กระตุ้น estrogen-receptor positive ซึ่งเป็นตัวรับ

สัญญาณฮอร์โมนที่อยู่บนผิวของเซลล์มะเร็งเต้านม(MCF-7 cell) ทำให้เซลล์มะเร็งเต้านมเกิดการแบ่งตัวเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นการที่ Deoxycholic acid มีโครงสร้างคล้ายกับ estrogen นี้ ทำให้สามารถจับกับ estrogen-receptor positive ที่อยู่บนผิวของ MCF-7 cell จึงสามารถช่วยเพิ่มความจำเพาะในการนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านม ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาคคุณสมบัติ cell uptake ของสูตร PC : DCA : Fu (4:1: 5) สามารถการนำส่งยาเข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7 cell) ได้ดีกว่าสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ )

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าระบบนำส่งยาในรูปแบบ liposome ที่มี deoxycholic acid เป็นองค์ประกอบนั้นมีลักษณะด้านสมบัติทางกายภาพ (physical stability) ที่เหมาะสมในการนำส่งยารวมถึงสามารถช่วยเพิ่มความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเต้านมและเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของยาได้ แต่จากการศึกษานี้ศึกษาเพียงคุณสมบัติของ liposome ในด้านทางกายภาพเท่านั้นซึ่งอาจเพิ่มการศึกษาในด้านอื่นๆเช่น สมบัติทางเคมี (chemical stability) หรือ สมบัติทางชีววิทยา (biological stability) ต่อไป อีกทั้งการศึกษากฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (cytotoxicity) และคุณสมบัติ cellular uptake ศึกษาเฉพาะในเซลล์มะเร็งเต้านมซึ่งในอนาคตอาจจะพัฒนาการศึกษาในเซลล์มะเร็งชนิดอื่นเช่น เซลล์มะเร็งตับ เซลล์มะเร็งปากมดลูก เป็นต้น เพื่อสามารถอธิบายกลไกในเพิ่มความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งได้ของ liposome ที่มี deoxycholic acid ได้ดียิ่งขึ้น

## บทที่ 6

## ผลผลิต (Output)

กำลังดำเนินการเพื่อเผยแพร่ผลงานทางวารสาร

งบประมาณของโครงการวิจัย

รายละเอียดงบประมาณการวิจัย จำแนกตามงบประมาณประเภทต่างๆ

ปีที่ดำเนินการ	งบประมาณที่เสนอขอ (บาท)						
	งบบุคลากร	ค่าตอบแทน	ค่าใช้สอย	ค่าวัสดุ	ค่าธรรมเนียมการอุดหนุนสถาบัน	ครุภัณฑ์	รวม
ปีที่ 1	360,000	50,000	42,000	884,500	148,500	-	1,485,000
ปีที่ 2	360,000	50,000	35,000	256,010	77,890	-	778,900

รายละเอียดงบประมาณการวิจัย จำแนกตามงบประมาณประเภทต่างๆที่เสนอขอในแต่ละปี

รายการ	จำนวนเงิน		หมายเหตุ
	ปี 2562		
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 2562	
(1) ค่าตอบแทนคณะผู้วิจัย (อาจารย์ต่ำกว่าระดับ 5x จำนวน 4 คน)	40,000	
(2) ค่าตอบแทนที่ปรึกษา โครงการ	10,000	
2.2 ค่าใช้สอย	35,000	
(1) ค่าใช้จ่ายในการเดินทางไปราชการ	4,000	
(2) ค่าใช้จ่ายในการสัมมนา/ฝึกอบรม	1,000	
(3) ค่าใช้สอยอื่น	30,000	
- ค่าถ่ายเอกสารและสืบค้นข้อมูล		
- ค่าตีพิมพ์		
2.3 ค่าวัสดุ	256,010	
ค่าวัสดุสำนักงาน	-	
- กระดาษ		
- ตู้เก็บเอกสาร		
- แฟ้มใส่เอกสาร		
- เครื่องเจาะรูกระดาษ		
- ปากกาเคมี		
- แม็คเย็บกระดาษ		
- คลิปหนีบกระดาษ		
ค่าวัสดุคอมพิวเตอร์		
ค่าวัสดุสารเคมีและค่าวัสดุวิทยาศาสตร์	20,000	
- สารมาตรฐาน		

รายการ	จำนวนเงิน	หมายเหตุ
	ปี 2562	
- ตัวทำละลาย HPLC grade	50,000	
- อาหารเลี้ยงเซลล์และอุปกรณ์เลี้ยง เซลล์	50,000	
-ค่าสั่งซื้อเซลล์	30,000	
-ค่าสารทดสอบทางชีวภาพ เช่น MTT	10,000	
-ค่าสารเคมีทั่วไป ในการเตรียมระบบ นำส่ง และ phospholipid	96,010	
3. งบลงทุน (ค่าครุภัณฑ์ และ สิ่งก่อสร้าง)	-	
3.1 ค่าครุภัณฑ์	-	
3.2 ค่าที่ดินและสิ่งก่อสร้าง	-	
4. ค่าธรรมเนียมอุดหนุนสถาบัน (คำอธิบาย : เป็นค่าสาธารณูปโภค ไม่เกิน ร้อยละ 10 ของงบวิจัยไม่รวมค่าครุภัณฑ์)	77,890	
รวมงบประมาณที่เสนอขอ	<b>778,900</b>	

### เอกสารอ้างอิง

1. กระทรวงสาธารณสุข ก. แผนการป้องกันและควบคุมโรคมะเร็งแห่งชาติ  
National Cancer Control Programmes (พ.ศ. 2556 – 2560). โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด: สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์; พ.ศ. 2556 – 2560.
2. J.S. Dua PACR, Dr. A. K. Bhandari. LIPOSOME: METHODS OF PREPARATION AND APPLICATIONS. International Journal of Pharmaceutical Studies and Research. 2012;3(2):14-20.
3. Fuping Gaoa, Lei Li , Huizhu Zhanga, Wenzhi Yanga. Deoxycholic acid modified-carboxymethyl curdlan conjugate as a novel carrier of epirubicin: In vitro and in vivo studies. International Journal of Pharmaceutics. 2010;392:254-60.
4. de Castro B, Gameiro P, Guimarães C, Lima JLFC, Reis S. Partition coefficients of  $\beta$ -blockers in bile salt/lecithin micelles as a tool to assess the role of mixed micelles in gastrointestinal absorption. Biophysical Chemistry. 2001;90(1):31-43.
5. Seo J-a, Kim B, Dhanasekaran DN, Tsang BK, Song YS. Curcumin induces apoptosis by inhibiting sarco/endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  ATPase activity in ovarian cancer cells. Cancer Letters. 2016;371(1):30-7.
6. Kumar A, Kaur G, Kansal SK, Chaudhary GR, Mehta SK. Enhanced solubilization of curcumin in mixed surfactant vesicles. Food Chemistry. 2016;199:660-6.
7. Pranali P Deshpande SB, and Vladimir P Torchilin. Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. Nanomedicine: Nanotechnology. 2013;8:1-31.
8. Abolfazl Akbarzadeh RR-S, Soodabeh Davaran1 Liposome: classification, preparation, and applications. Nanoscale Research Letters. 2013;8:1-9.
9. Agnieszka Z. Wilczewska KN, Karolina H. Markiewicz,, Ca H. Nanoparticles as drug delivery systems. Pharmacological Reports. 2012;64:1-18.
10. Mariusz Kepczy ński KN, Marta Kumorek, Agnieszka Kobierska,, Barbara Jachimska MN. Which physical and structural factors of liposome carriers control their drug-loading efficiency? Chemistry and Physics of Lipids. 2008;155:7-15.
11. จรรยาประเสริฐ ว. Nanotechnology in Skin Delivery. 1 ed. กรุงเทพมหานคร: บริษัท ประชาชน จำกัด; 2555.

12. Sávia Caldeira de Araújo Lopes CdSG. Liposomes as Carriers of Anticancer Drugs 2013 [Available from: <http://www.intechopen.com/books/cancer-treatment-conventional-and-innovative-approaches/liposomes-as-carriers-of-anticancer-drugs>.
13. มโนสร้อย อ. Liposome in Pharmaceutical and cosmetics. กรุงเทพมหานคร: โอ.เอส.พริ้นติ้ง เฮ้าส์; 2545.
14. KULLAK-UBLICK B, AND PAUMGARTNER. Molecular and Functional Characterization of Bile Acid Transport in Human Hepatoblastoma HepG2 Cells. HEPATOLOGY. 1996;23:1053-60.
15. JENKINS DSAG. An Overview of Bile-Acid Synthesis, Chemistry and Function. Royal Society of Chemistry. 2008:1-14.
16. Ya'nan Tan JQ, Yi Lu ,Tuqiang Hu. Lecithin in mixed micelles attenuate the cytotoxicity of bile salts in Caco -2 cells. Toxicology in vitro 2013;27:714-20.
17. PubChem. Deoxycholic acid [Available from: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/deoxycholic\\_acid](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/deoxycholic_acid).
18. Jinlong Yang CG, Shaoyu L`u, Xinggang Wang, Mingjia Chen, Liu aM. Novel self-assembled amphiphilic mPEGylated starch-deoxycholic acid polymeric micelles with pH-response for anticancer drug delivery. The Royal Society of Chemistry. 2014;4:55139-49.
19. Baltazar de Castro PG, Carla Guimarae. Partition coefficient of beta-blockers in bile salt/lecithin micelles atool to assess rhe role of mixed micells in gastrointestinal absorption. Biophysical Chemistry. 2001;90:31-43.
20. Baltazar de Castro PG, Carla Guimarae. Study of partition of nitrazepam inbile salt micelles and the role of lecithin. Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2001;24:595-602.
21. D`elia. phosphatidylcholine 2010 [Available from: <https://www.studyblue.com/notes/note/n/chapter-6/deck/1208453>.
22. Sulheim E. Mechanisms of Cellular Uptake and Intracellular Degradation of Polymeric Nanoparticles Norwegian University of Science and Technology. 2014:1-130.
23. วงศ์คำ ขอ. การแพร่กระจายของมะเร็งซสาเหตุหลักในการเสียชีวิตของผู้ป่วยมะเร็ง. วารสารโรคมะเร็ง. 2552;29(4):185-90.
24. Biolabs C. MCF-7/GFP Cell Line 2010-1016 [Available from: [www.cellbiolabs.com](http://www.cellbiolabs.com).

25. Teerasak E-kobon PT, Sittiruk Roytrakul , Ladda Meesuk , Pramote Chumnanpuen Prediction of anticancer peptides against MCF-7 breast cancer cells from the peptidomes of *Achatina fulica* mucus fractions. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2016;14:49-57.
26. Wei Zhang Ys, Yanzuo Chen, Jiang Ye. multifunctional Pluronic P123/F127 mixed polymeric micelles loaded with paclitaxel for treatment of multidrug resistant tumors. *Biomaterials*. 2011;32:2894-906.
27. THORAT RDJaBN. Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography Method for Analysis of Curcuminoids and curcuminoid-loaded Liposome Formulation. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013;2013:60-6.
28. Magdalena Boncler MR, Urszula Krajewska. Com-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells: comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of ant. *Jourrnacological and Toxicological Methodenal of pha*. 2014;69:9-16.
29. Kwok D. Optimization of Sonication Conditions to Formulate Liposomes for Drug Delivery Purposes [20/11/2559]. Available from: <http://sunzi.lib.hku.hk/ER/detail/hkul/5128604>.
30. Rolf Schubert KB, Hartwig Wolburg and Karl-Heinz Schmidt. Structural Changes in Membranes of Large Unilamellar Vesicles after Binding of Sodium Cholate+. *American Chemical Society* 1986;25(18):5263-68.
31. Murali M Yallapu MJ, and Subhash C Chauhan. Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer. *Drug Discov Today*. 2013;17(2):1-10.
32. P. Chetanachan PA, D. Worawirunwong, P. Dararutana, A. Bangtrakulnonth, M. Bunjop and S. Kongmuang. Ultrastructural Characterization of Liposomes Using Transmission Electron Microscope. *Advanced Materials Research* 2008;55-57:709-11.
33. Hua-qiang Li L-jj, Fei-fei Wu, Xiao-yu Li, Jian-song You, Zhen-hui Cao and Dan Li. Effect of curcumin on proliferation, cell cycle, and caspases and MCF-7 cells. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2012;6(12):864-70.
34. KSENIJA N. KUHAJDA SMC, EVGENIJA A. DJURENDIĆ,, al MNSe. SYNTHESIS AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF A SERIES OF BILE ACID DERIVATIVES. *Hem ind*. 2009;64(4):313-8.
35. Joanna REJMAN VO, Inge S. ZUHORN and Dick HOEKSTRA. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin and caveolae-mediated endocytosis. *Biochemical Society*. 2004;377:159-69.

36. สิทธิเวช ช. ราฟต์ คาร์วี่โอเล และการขนส่งคอเลสเตอรอลภายในเซลล์ Rafts, Caveolae and Intracellular Cholesterol Trafficking. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 2557;19(1):147-59.
37. Botos ALKaE. Endocytosis via caveolae: alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation? Foundation for Cellular and Molecular Medicine/Blackwell Publishing Ltd. 2009;13(7):1228-37.
38. Helenius LPaA. Endocytosis Via Caveolae. Munksgaard International Publishers. 2002;3:311-20.
39. Baker PR WJ, Jones CE, Stenzel DJ, Watson N and Smith GJ. Bile acids influence the growth, oestrogen receptor and oestrogen-regulated proteins of MCF-7 human breast cancer cells. Br J Cancer. 1992;65(4):566-72.

ภาคผนวก

## Abbreviations

ตารางที่ 12 แสดง Abbreviations

คำย่อ	คำเต็ม
DCA	Deoxycholic acid
PC	Phosphatidylcholine
Fu	Furazolidone
สูตร PC : DCA : Fu(1:0:5)	สูตร phosphatidylcholine ต่อ deoxycholic acid อัตราส่วน 1:0 ที่มียา furazolidone 5 mg
สูตร PC : DCA : Fu(4:1:5)	สูตร phosphatidylcholine ต่อ deoxycholic acid อัตราส่วน 4:1 ที่มียา furazolidone 5 mg
สูตร PC : DCA : Fu(4:1:0)	สูตร phosphatidylcholine ต่อ deoxycholic acid อัตราส่วน 4:1 ที่ไม่มียา furazolidone กักเก็บภายใน liposome
สูตร PC : DCA : Fu(4:1:0)+Furazolidone(5)	สูตร phosphatidylcholine ต่อ deoxycholic acid อัตราส่วน 4:1 ที่มียา Furazolidone 5 mg อยู่ในอกระบบ liposome
%EE	% Entrapment efficiency
PBS	Phosphate buffer saline
DMEM	Dulbecco's modified minimum essential medium
FBS	Fetal bovine serum
TEM	Transmission electron microscopy
MLV	Multilamellar vesicle
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
rpm	Revolution per minute