

การพัฒนาอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนสำหรับนำส่งสารสกัดชาเขียวเพื่อรักษาโรคข้อเสื่อม



นางสาวปภาวี ลิขิตเดชาโรจน์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมชีวเวช (สหสาขาวิชา)

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF MICROSPHERE FOR DELIVERY OF GREEN TEA
EXTRACT FOR TREATMENT OF OSTEOARTHRITIS

Miss Papawee Likitdecharoj



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

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2017

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนสำหรับนำส่งสารสกัดชาเขียวเพื่อรักษาโรคข้อเสื่อม
โดย	นางสาวปภาวี ลิขิตเดชาโรจน์
สาขาวิชา	วิศวกรรมชีวเวช (สหสาขาวิชา)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จุฑามาศ รัตนวราภรณ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.กัมปนาท สุนทรวิภาต

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ เตชวรสินสกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จุฑามาศ รัตนวราภรณ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.กัมปนาท สุนทรวิภาต)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไศรดา กนกพานนท์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐพล ถนัดช่างแสง)

ปกาวี ลิขิตเดชาโรจน์ : การพัฒนาอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนสำหรับนำส่งสารสกัดชาเขียวเพื่อรักษาโรคข้อ
 เสื่อม (DEVELOPMENT OF MICROSPHERE FOR DELIVERY OF GREEN TEA EXTRACT FOR
 TREATMENT OF OSTEOARTHRITIS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.จุฑามาศ รัตนวราภรณ์, อ.ที่
 ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. น.สพ. ดร.กัมปนาท สุนทรวิภาต, 122 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนจากเจลาตินเพื่อนำส่งสารสกัดชาเขียว
 Epigallocatechin 3-gallate (EGCG) ร่วมกับกรดไฮยาลูรอนิกสำหรับรักษาโรคข้อเสื่อม โดยได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบ
 สมบัติทางเคมี และกายภาพของเจลาติน 4 ชนิดได้แก่ เจลาตินชนิดเอ (GA) เจลาตินชนิดบี (GB) เจลาตินชนิดเอที่ดัดแปร
 ด้วยเอธิลีนไดเอมีน (GE) และเจลาตินชนิดบีที่ดัดแปรด้วยซัคซินิกแอนไฮไดรด์ (GS) พบว่า GE มีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ
 เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ GA ซึ่งเป็นเจลาตินตั้งต้นเนื่องมาจากการคอนจูเกตเอธิลีนไดเอมีนเข้าไปในโครงสร้าง และส่งผลมีค่าศักย์
 เซต้าเป็นบวกมากขึ้นและมีความชอบน้ำสูง ในขณะที่ GS มีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระลดลงเมื่อเทียบกับ GB ซึ่งเป็นเจลาตินตั้ง
 ต้นเนื่องจากหมู่อะมิโนอิสระถูกใช้ไปในกระบวนการคอนจูเกตซัคซินิกแอนไฮไดรด์ อย่างไรก็ตาม ผลสเปกตรัมจากการวิเคราะห์
 Fourier-transform infrared spectroscopy ยืนยันการปรากฏของหมู่ฟังก์ชันที่แสดงคุณลักษณะเฉพาะของโปรตีนในเจ
 ลาทินทั้ง 4 ชนิด เจลาตินทั้ง 4 ชนิดถูกนำมาขึ้นรูปเป็นอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนด้วยเทคนิคอัลซันซินีนาในน้ำมัน
 และเชื่อมขวางด้วยความร้อน หรือด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินที่ได้มีขนาดอยู่ในช่วง
 43-49 ไมครอน ซึ่งมีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ฉีดผ่านเข็มฉีดยาได้โดยไม่อุดตัน เมื่อเปรียบเทียบวิธีการเชื่อมขวาง พบว่า
 อนุภาคที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์มีความคงตัวมากกว่าอนุภาคที่เชื่อมขวางด้วยความร้อนโดยประเมินจาก
 อัตราส่วนการบวมและการละลายน้ำของอนุภาค อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน GE ที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัล
 ดีไฮด์มีร้อยละการเชื่อมขวางสูงที่สุด เนื่องจากมีหมู่อะมิโนอิสระจำนวนมากสำหรับการเกิดปฏิกิริยาเชื่อมขวางกับหมู่อัลดีไฮด์
 ของกลูตารัลดีไฮด์ และเมื่อทดสอบอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการในสภาวะจำลองร่างกายที่ไม่มีและ
 มีเอนไซม์คอลลาจีเนส พบว่าอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน GE มีอัตราการย่อยสลายช้าที่สุด อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน
 เจลาตินทั้ง 4 ชนิดไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังของหนูเมื่อทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO 10993
 part 5 และเมื่อนำอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินทั้ง 4 ชนิดไปดูดซับสารสกัดชาเขียว EGCG และทดสอบอัตราเร็ว
 ในการปลดปล่อยสาร EGCG ในสภาวะจำลองร่างกายที่ไม่มีและเอนไซม์คอลลาจีเนส พบว่าอนุภาค GE สามารถปลดปล่อย
 สาร EGCG ได้อย่างคงที่และเนิ่นนานที่สุดในทั้ง 2 สภาวะ โดยการปลดปล่อยควบคุมด้วยกลไกการแพร่ของสาร EGCG จาก
 อนุภาคเป็นหลัก ในขณะที่อนุภาค GA GB และ GS ปลดปล่อยสาร EGCG ด้วยกลไกการแพร่และการบวมน้ำหรือการย่อย
 สลายของอนุภาค จากผลการศึกษา สรุปได้ว่าอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน GE มีประสิทธิภาพเหมาะสมสำหรับการควบคุม
 การปลดปล่อยสาร EGCG ได้เนิ่นนาน อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน GE ที่กักเก็บสาร EGCG นี้ได้ถูกนำไปผสมกับ
 สารละลายกรดไฮยาลูรอนิกเพื่อเตรียมเป็นยาฉีดสำหรับรักษาโรคข้อเสื่อมในสุนัขต่อไป โดยผู้วิจัยคาดหวังว่ายาฉีดที่พัฒนาขึ้น
 นี้จะมีประสิทธิภาพในการรักษาโรคข้อเสื่อมได้ดีขึ้น เนื่องจากการออกฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัดชาเขียว EGCG ในการยับยั้ง
 การอักเสบ และกรดไฮยาลูรอนิกที่ช่วยฟื้นฟูการทำงานของข้อและกระตุ้นการสร้างกรดไฮยาลูรอนิกของเซลล์ไฟโบบลาสต์ใน
 ข้อ

สาขาวิชา วิศวกรรมชีวเวช (สหสาขาวิชา)

ลายมือชื่อนิสิต

ปีการศึกษา 2560

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5770439421 : MAJOR BIOMEDICAL ENGINEERING

KEYWORDS: MICROSPHERES, GELATIN, GREEN TEA EXTRACT, OSTEOARTHRITIS, HYALURONIC ACID

PAPAWEE LIKITDECHAROJ: DEVELOPMENT OF MICROSPHERE FOR DELIVERY OF GREEN TEA EXTRACT FOR TREATMENT OF OSTEOARTHRITIS. ADVISOR: ASST. PROF. JUTHAMAS RATANAVARAPORN, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. KUMPANART SOONTORNVIPART, Ph.D., 122 pp.

This research aimed to develop gelatin microspheres for delivery of green tea extract, Epigallocatechin 3-gallate (EGCG), in combination with hyaluronic acid injection for osteoarthritis treatment. The physico-chemical properties of 4 gelatin types including type A gelatin (GA), type B gelatin (GB), type A gelatin modified with ethylenediamine (GE), and type B gelatin modified with succinic anhydride (GS) were investigated. We found that GE had higher free amino groups than the original GA due to the conjugation of ethylenediamine, resulting in more positive charge and hydrophilicity. GS had lower free amino groups than the original GB because of the consumption by succinic anhydride conjugation. The spectra from Fourier-transform infrared spectroscopic analysis showed the presence of all characteristic peaks of protein in all gelatin types. The 4 types of gelatin were fabricated into microspheres using water in oil emulsion technique and crosslinked by dehydrothermal treatment or glutaraldehyde solution. The obtained microspheres had average size in the range of 43-49 μm which is suitable for injection through needle without aggregation. Comparing the crosslinking techniques, the gelatin microspheres crosslinked by glutaraldehyde solution were more stable than those crosslinked by dehydrothermal treatment, as characterized by swelling ratio and water solubility of the microsphere. The GE microspheres crosslinked by glutaraldehyde solution had the highest crosslinking degree due to the abundant free amino groups to react with aldehyde groups of glutaraldehyde. The GE microspheres also showed slowest rate of degradation when tested at physiological condition in the absence and presence of collagenase. The 4 types of gelatin microspheres were not toxic to L929 mouse fibroblast cells when tested *in vitro* following ISO 10993 part 5 standard. Then, EGCG was absorbed on the gelatin microspheres and the release of EGCG from microspheres at physiological condition in the absence and presence of collagenase was evaluated. The GE microspheres could release EGCG in a constant rate and sustained in both conditions. The release of EGCG from the GE microspheres was mainly governed by the diffusion mechanism while the release of EGCG from GA, GB, and GS microspheres was controlled by diffusion and microspheres' swelling/degradation. From the results, it could be summarized that the GE microspheres had high potential for controlled release of EGCG. The EGCG-encapsulated GE microspheres were mixed with hyaluronic acid solution and will be applied as injection treatment in osteoarthritic canine. The researcher supposed that this developed injection will have higher potential for osteoarthritis treatment because of the combination effects of EGCG with anti-inflammatory action and the hyaluronic acid that can improve the joint function as well as promote the production of hyaluronic acid by synovial cells in joint.

Field of Study: Biomedical Engineering

Academic Year: 2017

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลือและการสนับสนุนจากหลายท่าน ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จุฑามาศ รัตนวราภรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษา และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ. ดร.กัมปนาท สุนทรวิภาต ที่ให้คำปรึกษาให้คำแนะนำ แนวทางการวางแผนงานวิจัย และคอยชี้แนะให้ตลอดมา

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบ ซึ่งได้แก่ ศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล ประธานกรรมการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โสธรา กนกพานนท์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐพล ภูนต์ช่างแสง ที่สละเวลาอันมีค่ามาสอบวิทยานิพนธ์ และให้คำแนะนำต่างๆวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ผุสดี ปริยานนท์ และคุณพันธุ์ทิพย์ ท่านมูข ที่เอื้อเพื่ออุปกรณ์ ให้ความเมตตา และสนับสนุนการศึกษาตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

ขอขอบคุณ คุณณัฐฐา พรฐิติฉันทน์ คุณณัติมาศ ยุบลพันธ์ คุณอนุสรา คำเนตร คุณรุจิรา เสนาภักดิ์ คุณรัชณี ลีน้อย และว่าที่ร้อยตรีศักรินทร์ แสนสุข สำหรับคำแนะนำ และกำลังใจที่มีให้เสมอมา

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการวิศวกรรมวัสดุการแพทย์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ ที่เอื้อเพื่อสถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัย และเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ในการวิจัย

ขอขอบคุณ คุณรุ่งนภา แยมเดช คุณกัญญาลักษณ์ แก้วประสิทธิ์ และคุณชาวี เหล่ามีผล และเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆที่ไม่ได้กล่าวในที่นี้ ที่เป็นกำลัง ให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษา และการช่วยเหลือตลอดระยะเวลาในศึกษาวิจัย จนกระทั่งงานวิจัยลุล่วง

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณครอบครัว ที่เป็นแรงผลักดัน และกำลังใจที่ทำให้ก้าวผ่านอุปสรรคต่างๆ รวมถึงสนับสนุนการศึกษาตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฑ
สารบัญรูป	ฒ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	5
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	5
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	6
บทที่ 2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้องและทบทวนวรรณกรรม.....	8
2.1 โรคข้อเสื่อม (Osteoarthritis).....	8
2.1.1 สาเหตุการเกิดโรคข้อเสื่อม.....	9
2.1.1.1 การเกิดโรคแบบปฐมภูมิ (Primary Osteoarthritis หรือ idiopathic)	9
2.1.1.2 การเกิดโรคแบบทุติยภูมิ (Secondary Osteoarthritis).....	9
2.1.2 สัญญาณ และอาการของโรคข้อเสื่อม (Signs and Symptoms of Osteoarthritis).....	9
2.1.3 พยาธิสภาพของโรค	11
2.1.3.1 กระดูกอ่อนผิวข้อ (Articular cartilage).....	11
2.1.3.2 กระดูกแข็งใต้กระดูกอ่อนผิวข้อ (Subchondral bone).....	11
2.1.3.3 เยื่อหุ้มไขข้อ (Synovial Membrane).....	11
2.1.4 การรักษา	13

2.1.4.1 การรักษาโรคข้อเสื่อมแบบไม่ใช้ยา	13
2.1.4.2 การรักษาโรคข้อเสื่อมแบบให้ยารักษา	13
2.1.4.3 การรักษาโรคข้อเสื่อมด้วยวิธีการผ่าตัด	15
2.2 กรดไฮยาลูรอนิก (Hyaluronic acid)	15
2.2.1 โครงสร้างและแหล่งที่พบ	15
2.2.2 คุณสมบัติของกรดไฮยาลูรอนิก	16
2.2.3 หน้าที่ทางชีวภาพของกรดไฮยาลูรอนิก (Biological function)	17
2.2.4 การประยุกต์ใช้กรดไฮยาลูรอนิกในทางการแพทย์	17
2.2.5 การประยุกต์ใช้และกลไกของกรดไฮยาลูรอนิกในการรักษาข้อเสื่อม	17
2.2.5.1 ฟังก์ชันคุณสมบัติความยืดหยุ่นและความหนืดให้แก่น้ำไขข้อ	18
2.2.5.2 กระตุ้นหรือควบคุมกระบวนการชีวสังเคราะห์ เช่น กระตุ้นการแบ่งตัวของ เซลล์กระดูกอ่อน ยับยั้งและปกป้องการสลายของกระดูกอ่อน	18
2.2.5.3 บรรเทาอาการปวด ลดการอักเสบและควบคุมการแสดงออกของไซโตไคน์	19
2.3 ชาเขียว (Green tea).....	20
2.3.1 ส่วนประกอบและโครงสร้างทางเคมี	20
2.3.2 การออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร EGCG	23
2.3.2.1 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Anti-oxidation).....	23
2.3.2.2 ฤทธิ์ในการป้องกันและยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Prevention of cancer).....	23
2.3.2.3 ฤทธิ์ในการป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจ (Cardiovascular diseases).....	23
2.3.2.4 ฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบ (Anti-inflammation)	23
2.3.2.5 ฤทธิ์ในการต้านไวรัส และแบคทีเรีย (Anti-virus and Anti-bacteria)	24
2.3.3 การประยุกต์ใช้และกลไกของสาร EGCGในการรักษาโรคข้อเสื่อม	24
2.3.3.1 ปกป้องกระดูกอ่อน และเซลล์กระดูกอ่อน (Cartilage/chondrocyte protection)	24

2.3.3.2	ควบคุมกิจกรรมการทำงานของเซลล์กระดูก (Bone-preserving activity)...	25
2.3.3.3	กำหนดและควบคุมการทำงานของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในไขข้อ (synovial fibroblast).....	25
2.4.	เจลาติน (Gelatin).....	28
2.4.1	ส่วนประกอบและโครงสร้างทางเคมี	28
2.4.2	แหล่งที่มา	30
2.4.2.1	เจลาตินจากสัตว์ใหญ่.....	30
2.4.2.2	เจลาตินจากปลา.....	30
2.4.2.3	เจลาตินจากแมลง.....	30
2.4.3	ชนิดของเจลาติน	31
2.4.3.1	เจลาตินชนิดเอ (Type A gelatin, GA)	31
2.4.3.2	เจลาตินชนิดบี (Type B gelatin, GB).....	31
2.4.4	สมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของเจลาติน	32
2.4.4.1	ลักษณะทางกายภาพ	32
2.4.4.2	สมบัติการบวมน้ำ	32
2.4.4.3	การละลาย (Solubility).....	32
2.4.4.4	การเกิดเจล (Gelation)	32
2.4.4.5	การผันกลับได้ตามอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลง (Thermo-reversibility).....	32
2.4.4.6	ความหนืดของสารละลายเจลาติน (Viscosity and gel strength).....	32
2.4.4.7	การย่อยสลาย (Degradation).....	33
2.4.4.8	ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility).....	33
2.4.5	การประยุกต์ใช้งานทางการแพทย์.....	33
2.5.	ระบบนำส่งยา (Drug delivery system).....	33

2.5.1 คำจำกัดความ	33
2.5.2 วิธีการนำส่งยา (Drug delivery route).....	33
2.5.3 ตัวนำพายา (drug carrier).....	34
2.5.4 รูปแบบการปลดปล่อยยา	36
2.5.5 ตัวนำพายาชนิดอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน (Microspheres).....	37
2.5.5.1 การผลิตอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนด้วยเทคนิคอิมัลชัน (emulsion technique).....	37
2.5.5.2 การประยุกต์ใช้ออนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในระบบนำส่งยา	38
2.6. การเชื่อมขวาง.....	40
2.6.1 การเชื่อมขวางทางกายภาพด้วยความร้อน	40
2.6.2 การเชื่อมขวางทางเคมีด้วยสารกลูตารัลดีไฮด์.....	40
บทที่ 3 วัสดุและวิธีดำเนินงานวิจัย.....	42
3.1 วัสดุและสารเคมี.....	42
3.2 อุปกรณ์	43
3.3 ขั้นตอนดำเนินการวิจัย.....	44
3.3.1 การเตรียมเจลาตินดัดแปร และทดสอบสมบัติทางเคมีและกายภาพ.....	45
3.3.1.1 การดัดแปรเจลาตินชนิดเอด้วย Ethylenediamine (GE).....	45
3.3.1.2 การดัดแปรเจลาตินชนิดบีด้วย Succinic anhydride (GS).....	46
3.3.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของเจลาตินดัดแปร	46
3.3.1.4 การวิเคราะห์หมู่เคมีฟังก์ชันของเจลาตินดัดแปร	47
3.3.1.5 การวิเคราะห์ค่าศักย์เซต้าและค่าไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric point) ของสารละลายเจลาตินดัดแปร.....	48
3.3.1.6 การวิเคราะห์ค่ามุมสัมผัสน้ำของฟิล์มเจลาตินดัดแปร	48

3.3.1.7 วิเคราะห์ค่าความหนืดปรากฏ (Apparent viscosity) ของสารละลายเจลาตินตัดแปรร	49
3.3.1.8 วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารละลายเจลาตินตัดแปรร	49
3.3.2 การขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาติน	49
3.3.3 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมี สมบัติทางกายภาพ และสมบัติทางชีวภาพของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาติน	50
3.3.3.1 การวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาติน	50
3.3.3.2 การวิเคราะห์ร้อยละการเชื่อมขวางของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาติน	51
3.3.3.3 การวิเคราะห์ค่ามุมสัมผัสน้ำของฟิล์มเจลาตินที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยความร้อนและสารละลายกลูตารัลดีไฮด์	51
3.3.3.4 การละลายน้ำของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยความร้อนและสารละลายกลูตารัลดีไฮด์	51
3.3.3.5 การวิเคราะห์ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินในระดับห้องปฏิบัติการ	52
3.3.3.6 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาติน	52
3.3.4 การกักเก็บสาร EGCG บนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน	54
3.3.5 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการกักเก็บสาร EGCG และการควบคุมการปลดปล่อย EGCG ของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินในระดับห้องปฏิบัติการ	54
3.3.5.1 วิเคราะห์ประสิทธิภาพในการกักเก็บสาร EGCG บนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาติน	54
3.3.5.2 การทดสอบความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยสาร EGCG จากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินในสภาวะที่ไม่มีและมีเอนไซม์	55
3.3.6 การเตรียมสารละลายกรดไฮยาโลรอนิคผสมกับอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินที่กักเก็บ EGCG	56

3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	56
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง	57
4.1 สมบัติทางเคมีและสมบัติทางกายภาพของเจลาตินดัดแปร	57
4.1.1 ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของเจลาตินดัดแปร	57
4.1.2 โครงสร้างเคมีและหมู่ฟังก์ชันของเจลาตินดัดแปร	58
4.1.3 ค่าศักย์ゼต้าของสารละลายเจลาตินดัดแปร	61
4.1.4 ค่ามัมสัมผัสน้ำบนฟิล์มเจลาตินดัดแปร	63
4.1.5 ค่าความหนืดและน้ำหนักโมเลกุลของสารละลายเจลาตินดัดแปร	65
4.2 สมบัติทางเคมี กายภาพ และชีวภาพของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาติน	67
4.2.1 ร้อยละผลได้และขนาดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาติน	68
4.2.2 โครงสร้างสัณฐานของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาติน	69
4.2.3 ร้อยละการเชื่อมขวางอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยความร้อนและสารละลายกลูตารัลดีไฮด์	73
4.2.4 การละลายน้ำของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยความร้อนและสารละลายกลูตารัลดีไฮด์	76
4.2.5 ค่ามัมสัมผัสน้ำบนฟิล์มเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยความร้อนและสารละลายกลูตารัลดีไฮด์.....	79
4.2.6 ระยะเวลาการย่อยสลายทางชีวภาพของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินในระดับห้องปฏิบัติการ (In vitro biodegradability)	81
4.2.7 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาติน	82
4.3 ประสิทธิภาพในการกักเก็บและควบคุมการปลดปล่อยสาร EGCG ของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินในระดับห้องปฏิบัติการ	84
4.3.1 ประสิทธิภาพในการกักเก็บสาร EGCG บนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาติน	84

4.3.2 ประสิทธิภาพในการควบคุมการปลดปล่อยสาร EGCG ของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินในสถานะที่ไม่มีและมีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ	86
4.4 การเตรียมสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกที่บรรจุอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินนำส่ง EGCG สำหรับเป็นยาฉีดรักษาโรคข้อเสื่อม	95
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	99
5.1 สรุปผลการศึกษา.....	99
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	100
รายการอ้างอิง.....	101
ภาคผนวก ก กราฟมาตรฐานของ β -Alanine เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ	113
ภาคผนวก ข ตารางค่าศักย์เซต้าของสารละลายเจลาตินความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ที่ค่าความเป็นกรดต่างๆ ตาราง ข ค่าศักย์เซต้าของสารละลายเจลาตินความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ที่ค่าความเป็นกรดต่างๆ	114
ภาคผนวก ค รูปทรงหยดน้ำบนฟิล์มเจลาตินชนิดต่างๆที่ใช้วิเคราะห์ค่ามุมสัมผัส	115
ภาคผนวก ง กราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุล ($\log MW$) และ ระยะการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีน (Rf).....	116
ภาคผนวก จ รูปทรงหยดน้ำบนฟิล์มเจลาตินที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยความร้อนและสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ใช้วิเคราะห์มุมสัมผัสน้ำ	117
ภาคผนวก ฉ กราฟสแกนความยาวคลื่นของสารละลาย EGCG ในน้ำปราศจากไอออน	118
ภาคผนวก ช กราฟระหว่างปริมาณสารออกฤทธิ์สะสมที่เวลา t ทหารด้วยปริมาณสารออกฤทธิ์ที่ปลดปล่อยสะสมที่เวลานั้น (M_t/M_∞) ต่อเวลา (t) ของการควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ (EGCG) ของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาติน	119
ภาคผนวก ซ เอกสารกำกับยากรดไฮยาลูรอนิก (Hyalovet) Fidia Farmaceutici S.p.A.....	121
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	122

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1	สัญญาณ และอาการของโรคข้อเสื่อมที่บริเวณข้อต่างๆ.....	10
ตารางที่ 2.2	ตัวอย่างยาในกลุ่ม NSAIDs และสมุนไพรที่ใช้ในการรักษาโรคข้อเสื่อม	14
ตารางที่ 2.3	ความเข้มข้นของกรดไฮยาลูรอนิกในเนื้อเยื่อสัตว์และในส่วนประกอบของร่างกาย	16
ตารางที่ 2.4	ส่วนประกอบสารอาหารและแร่ธาตุที่พบในชาเขียว	21
ตารางที่ 2.5	สมบัติทางเคมีและทางกายภาพของสาร EGCG	22
ตารางที่ 2.6	สรุปงานวิจัยที่รายงานการใช้สาร EGCG ในโมเดลการรักษาโรคข้อเสื่อม.....	27
ตารางที่ 2.7	ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของเจลาตินที่สกัดได้จากผิวหนังหมู และผิวหนังวัว	29
ตารางที่ 2.8	รูปแบบต่างๆของตัวนำพายาชนิดพอลิเมอร์ (polymeric carrier) และข้อดี ข้อเสีย...35	
ตารางที่ 4.1	ความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติความชอบน้ำของพื้นผิววัสดุกับค่ามุมสัมผัสผิวน้ำ	64
ตารางที่ 4.2	ค่าความหนืดปรากฏ (Apparent viscosity) ของสารละลายเจลาตินทั้ง 4 ชนิด ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยมวลที่เตรียมในน้ำปราศจากไอออน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส.....	66
ตารางที่ 4.3	ร้อยละผลได้ของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินทั้ง 4 ชนิดที่ผลิตด้วย เทคนิคอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันและคัดแยกขนาดด้วยตะแกรง	69
ตารางที่ 4.4	ขนาดเฉลี่ยและอัตราส่วนการบวมตัวของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินทั้ง 4 ชนิดที่ได้จากการขึ้นรูปด้วยเทคนิคอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน และเชื่อมขวางด้วยความร้อนและ สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ในสภาวะแห้งและสภาวะบวมตัวในน้ำ	73
ตารางที่ 4.5	ประสิทธิภาพในการกักเก็บและปริมาณ EGCG ในอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน เจลาตินทั้ง 4 ชนิดที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์	85
ตารางที่ 4.6	ค่าคงที่ ค่าสัมประสิทธิ์ความเชื่อมั่น (R^2) และเลขชี้กำลังการปลดปล่อย (n) ของ การปลดปล่อยสาร EGCG จากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินทั้ง 4 ชนิดที่เชื่อมขวางด้วย สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ วิเคราะห์ด้วยแบบจำลองการปลดปล่อยยาจลนศาสตร์อันดับหนึ่ง (first order kinetics) แบบจำลอง Hixson-Crowell และแบบจำลอง Ritger-Peppas & Korsmeyer- Peppas หรือ power law	94

สารบัญรูป

รูปที่ 2.1	ลักษณะและองค์ประกอบของข้อต่อชนิด synovial joint	8
รูปที่ 2.2	ลักษณะของข้อปกติ (ซ้าย) และข้อเสื่อม (ขวา)	12
รูปที่ 2.3	โครงสร้างของกรดไฮยาลูโรนิก	15
รูปที่ 2.4	โครงสร้างสารโพลีฟีนอลในสารสกัดชาเขียว.....	22
รูปที่ 2.5	โครงสร้างโมเลกุลของเจลาติน ก) โครงสร้างปฐมภูมิ และ ข) โครงสร้างทุติยภูมิแบบ เกลียวคู่หลังผ่านกระบวนการไฮโดรไลซ์คอลลาเจน.....	28
รูปที่ 2.6	sorghum bug (ซ้าย) และ melon bug (ขวา)	30
รูปที่ 2.7	กระบวนการผลิตเจลาตินชนิดบี (ซ้าย) และเจลาตินชนิดเอ (ขวา)	31
รูปที่ 2.8	รูปแบบการปลดปล่อยยาซึ่งวัดความเข้มข้นของยาที่อยู่ในพลาสมาเทียบกับเวลา	36
รูปที่ 2.9	การเตรียมอนุภาคทรงกลมแบบ single emulsion และ double emulsion	38
รูปที่ 2.10	ปฏิกิริยาการเชื่อมขวางภายในโมเลกุลโปรตีน ก.) การเชื่อมขวางทางกายภาพด้วย ความร้อน ข) การเชื่อมขวางทางเคมีด้วยสารละลายกลูตาร์ลดีไฮด์	41
รูปที่ 3.1	แผนผังการดำเนินงานวิจัย	44
รูปที่ 3.2	ปฏิกิริยาการตัดแปรเจลาตินชนิดเอด้วยสารเอธิลีนไดเอมีน (ethylenediamine) ใน คาร์โบไดออกไซด์ที่ละลายน้ำ	45
รูปที่ 3.3	ปฏิกิริยาการตัดแปรเจลาตินชนิดบีด้วยกรดซัคซินิก แอนไฮไดรด์	46
รูปที่ 3.4	การเกิดปฏิกิริยาระหว่าง TNBS กับหมู่อะมิโนอิสระของโมเลกุลโปรตีน	47
รูปที่ 3.5	ปฏิกิริยาระหว่างสาร MTT กับเอนไซม์ Dehydrogenase ที่หลังจากไมโตคอนเดรีย ของเซลล์ที่มีชีวิต และเกิดเป็นสารประกอบผลิตภัณฑ์สีม่วงของ Formazan.....	53
รูปที่ 4.1	ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่พบในเจลาตินทั้ง 4 ชนิดวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TNBS.....	58
รูปที่ 4.2	สเปกตรัมการส่องผ่านรังสีอินฟราเรดของเจลาติน 4 ชนิดวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FT-IR ในช่วงเลขคลื่น ก) 4000 ถึง 600 ต่อเซนติเมตร และ ข) 1800 ถึง 1000 ต่อเซนติเมตร	60

รูปที่ 4.3 ค่าศักย์ไฟฟ้าของสารละลายเจลาติน 4 ชนิดที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก ที่ค่าความเป็นกรดต่างระหว่าง 2 ถึง 12.....	63
รูปที่ 4.4 ค่ามุมสัมผัสน้ำบนพื้นผิวฟิล์มเจลาตินทั้ง 4 ชนิดที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียสที่เวลา 5 10 15 และ 20 วินาที.....	64
รูปที่ 4.5 ขนาดโมเลกุลของเจลาตินทั้ง 4 ชนิดที่แยกขนาดด้วยวิธี SDS-PAGE	67
รูปที่ 4.6 ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินทั้ง 4 ชนิด ที่ได้จากการขึ้นรูปด้วยเทคนิคอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน และเชื่อมขวางด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียสในสภาวะแห้งและสภาวะบวมตัวในน้ำ วิเคราะห์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 200 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 100 ไมครอน) และกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 20 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 50 ไมครอน).....	71
รูปที่ 4.7 ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินทั้ง 4 ชนิด ที่ได้จากการขึ้นรูปด้วยเทคนิคอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน และเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ในสภาวะแห้งและสภาวะบวมตัวในน้ำ วิเคราะห์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 200 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 200 ไมครอน) และกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 20 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 50 ไมครอน).....	72
รูปที่ 4.8 ก (ซ้าย) ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินทั้ง 4 ชนิด ก่อน (■) และหลัง (□)การเชื่อมขวางด้วยความร้อน ก (ขวา) ร้อยละการเชื่อมขวางอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยความร้อน ข (ซ้าย) ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินทั้ง 4 ชนิด ก่อน (■) และหลัง (□) การเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ข (ขวา) ร้อยละการเชื่อมขวางอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์.....	75
รูปที่ 4.9 ร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินทั้ง 4 ชนิดที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย ก) ความร้อนที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส ข) สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 หลังจากแช่ในน้ำที่ปราศจากไอออนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 และ 24 ชั่วโมง.....	78
รูปที่ 4.10 ค่ามุมสัมผัสน้ำของฟิล์มเจลาตินทั้ง 4 ชนิด ที่เชื่อมขวางด้วย ก) ความร้อน ข) สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ที่เวลา 5 10 15 และ 20 วินาที.....	80

- รูปที่ 4.11 ร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินทั้ง 4 ชนิด
เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ภายหลังแช่ในเอนไซม์คอลลาจีเนสความ
เข้มข้น 125 หน่วยต่อมิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส82
- รูปที่ 4.12 ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ L929 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัดจากอนุภาคทรงกลม
ขนาดไมครอนเจลาตินทั้ง 4 ชนิด ที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ที่ความ
เข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง83
- รูปที่ 4.13 การเชื่อมกันด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่คาร์บอกซิลของอนุภาคทรงกลมขนาด
ไมครอนเจลาตินกับหมู่ไฮดรอกซิลของสาร EGCG.....86
- รูปที่ 4.14 ร้อยละการปลดปล่อยสะสม EGCG จากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินทั้ง 4
ชนิด ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ก) เมื่อแช่ในสารละลาย PBS
pH 7.4 ที่มีโซเดียมเอไซด์ร้อยละ 0.01 สภาวะไม่มีเอนไซม์ และ ข) เมื่อแช่ใน
สารละลาย PBS pH 7.4 ที่มีโซเดียมเอไซด์ร้อยละ 0.01 และมีเอนไซม์คอลลาจีเนส
ความเข้มข้น 125 หน่วยต่อมิลลิลิตร88
- รูปที่ 4.15 การปลดปล่อยยาด้วยกลไกการบวมน้ำของอนุภาค (Swelling) ก) การปลดปล่อยยา
เมื่ออนุภาคบวมน้ำได้อย่างไม่จำกัด ข) การปลดปล่อยยาเมื่ออนุภาคมีการเชื่อมขวาง
และสามารถบวมน้ำได้จำกัด89
- รูปที่ 4.16 การปลดปล่อยยาด้วยกลไกการย่อยหรือกัดกร่อนของพอลิเมอร์ (erosion)89
- รูปที่ 4.17 อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาติน GE นำส่ง EGCG ที่ผสมกับสารละลายกรด
ไฮยาลูรอนิก Hylovet[®] พร้อมใช้เป็นยาฉีดรักษาโรคข้อเสื่อมในสุนัข98

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ

โรคข้อเสื่อม (Osteoarthritis) เป็นหนึ่งในโรคทางกระดูกและข้อต่อ ที่เกิดจากความผิดปกติ ทั้งทางด้านโครงสร้างทางพยาธิสภาพ ชีวเคมี และชีวกลศาสตร์ภายในกระดูกอ่อนผิวข้อ (articular cartilage) ส่งผลให้กระดูกอ่อนผิวข้อบางลงและอาจสึกกร่อนจนถึงบริเวณชั้นกระดูกแข็งใต้กระดูกอ่อนผิวข้อ (subchondral bone) จนสูญเสียการทำงานไป นอกจากนี้อาจเกิดจากการสูญเสียคุณสมบัติของน้ำไขข้อ (synovial fluid) ที่ช่วยในการหล่อลื่นการเคลื่อนไหวของข้อต่อ ทำให้เกิดการเสียดสีของกระดูก จนเกิดเป็นการอักเสบของเยื่อหุ้มข้อ (synovitis) ตามมาได้ โรคข้อเสื่อมมักพบมาก ในบริเวณข้อเข่า ข้อมือ หรือข้อสะโพก โดยมีปัจจัยมาจากอายุที่มากขึ้น การรับน้ำหนักที่มากเกินไป ของข้อเข่า และการถ่ายทอดทางพันธุกรรม อาการโดยทั่วไปที่เป็นสัญญาณบอถึงการเกิดโรคข้อเสื่อมคือ อาการปวดข้อโดยเฉพาะช่วงเวลาที่ใช้งาน อาการบวมบริเวณข้อต่อเนื่องจากการอักเสบ ภายในข้อ มีเสียงขณะเคลื่อนไหวข้อซึ่งเกิดจากการเสียดสีของกระดูกต้นขา (Femur) และกระดูกหน้าแข้ง (Tibia) อาการเหล่านี้ หากไม่ได้รับการรักษาอย่างถูกต้องอาจเกิดเป็นความพิการตามมา เช่น ข้อหลวม ข้อโก่ง ข้อบิดเบี้ยว รูปร่างของข้อผิดไป [1, 2]

ในปัจจุบันมีผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมเป็นจำนวนมาก จากการศึกษาในโครงการวิจัย Johnston county Osteoarthritis ของมหาวิทยาลัยนอร์ทแคโรไลนาภายใต้ความร่วมมือของศูนย์ควบคุมและป้องกันโรค และสถาบันสุขภาพแห่งชาติ ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าชาวอเมริกันจำนวน 27 ล้านคน กำลังประสบปัญหาเกี่ยวกับภาวะโรคข้อเสื่อม โดยที่มีความเสี่ยงในการเกิดโรคข้อเสื่อมที่บริเวณข้อเข่าและสะโพกสูงถึง 46 และ 25 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สำหรับประเทศไทยนั้น ในปีพ.ศ. 2555 กระทรวงสาธารณสุขพบว่าผู้สูงอายุไทยป่วยเป็นโรคข้อเสื่อมมากกว่า 4 ล้านคน ด้านองค์การอนามัยโลก (WHO) คาดการณ์ว่าในอีก 10 ปีข้างหน้า จะมีผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมทั่วโลกเพิ่มขึ้นเป็น 570 ล้านคน องค์การอนามัยโลกจึงตระหนักเห็นความสำคัญของภาวะโรคข้อเสื่อมที่มีผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของมนุษย์ และได้ประกาศให้ พ.ศ. 2553-2563 เป็นทศวรรษแห่งการรณรงค์โรคกระดูกและข้อ

เพื่อให้ทุกประเทศตระหนักถึงการป้องกันและการรักษาโรคข้อเสื่อมอย่างถูกวิธี (<http://www.bjd.org.au/>)

การบำบัดรักษาโรคข้อเสื่อมในระยะแรกที่มีความรุนแรงของอาการไม่มาก มักรักษาด้วยการให้ยาบรรเทาอาการเช่น ibuprofen celecoxib หรือ diclofenac เพื่อบรรเทาอาการเจ็บปวด และลดการอักเสบบริเวณข้อ ในกรณีที่อาการของโรคมีความรุนแรงมากขึ้น มักรักษาด้วยการฉีดยา กรดไฮยาลูรอนิก (Hyaluronic acid) เข้าบริเวณข้อที่เสื่อมโดยตรง โดยกรดไฮยาลูรอนิกเป็นส่วนประกอบสำคัญของน้ำไขข้อ กระดูกอ่อน และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันต่างๆ กรดไฮยาลูรอนิกในน้ำไขข้อมีบทบาทต่อคุณสมบัติการหล่อลื่นของน้ำไขข้อบริเวณข้อต่อที่มีผลต่อการเคลื่อนไหวของข้อต่อ น้ำไขข้อของผู้เป็นโรคข้อเสื่อมจะมีความหนืดน้อยลง อันเนื่องจากการดไฮยาลูรอนิกเสื่อมสลายไป ทำให้เกิดการเสียดสีของกระดูกและทำให้มีอาการเจ็บปวดตามมา [3] นอกจากนี้ กรดไฮยาลูรอนิกในน้ำไขข้อยังทำหน้าที่กระตุ้นเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อ (Articular chondrocytes) ให้มีการสังเคราะห์ DNA sulphated glycosaminoglycan และ hydroxyproline รวมถึงควบคุมกิจกรรมของเซลล์ และเพิ่มการเรียงตัวของ chondroitin-6-sulphate และคอลลาเจนชนิดที่ 2 ถ้าขาดกรดไฮยาลูรอนิกไปจะส่งผลให้เซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อไม่สร้างสารที่จำเป็นในการค้ำจุนโครงสร้างของข้อ [4, 5] การฉีดยา กรดไฮยาลูรอนิกเข้าข้อจึงนับเป็นการรักษาที่สามารถบรรเทาอาการปวดและทำให้ข้อทำงานได้ปกติได้ในระยะสั้น และมีผลข้างเคียงต่ำเมื่อเทียบกับการรับประทานยา อย่างไรก็ตามการฉีดยา กรดไฮยาลูรอนิกเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอที่จะรักษาโรคข้อเสื่อมของผู้ป่วยบางรายได้ เนื่องจากกรดไฮยาลูรอนิกไม่ได้ออกฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยตรง นอกจากนี้ยังสามารถถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไฮยาลูรอนิเดส (Hyaluronidase) ภายในร่างกายได้อย่างรวดเร็ว จึงทำให้ต้องมีการฉีดซ้ำหลายครั้ง ทำให้ค่าใช้จ่ายในการรักษาสูงมาก ในผู้ป่วยบางราย จึงมักทำการรักษาด้วยการฉีดยา กรดไฮยาลูรอนิกควบคู่ไปกับการรับประทานยาแก้ปวดแก้อักเสบ ซึ่งให้ผลการรักษาที่ดีขึ้น [2]

ยาส่วนใหญ่ที่ใช้บรรเทาอาการเจ็บปวด เป็นยาที่มีคุณสมบัติในการยับยั้ง cyclooxygenase COX-1 และ COX-2 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่หลั่งออกจากเซลล์เพื่อเร่งปฏิกิริยาการสร้างสารโพรสตาแกรดิน (Prostaglandin) ที่ทำให้เกิดอาการเจ็บปวดและเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพที่บริเวณข้อ ยาบรรเทาอาการปวดที่นิยมใช้ในปัจจุบันเป็นยาในกลุ่ม NSAIDs (Non-steroidal anti-inflammatory drugs) คือยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่กลุ่มสเตอรอยด์ซึ่งจะมีผลข้างเคียงน้อยกว่ายาในกลุ่มสเตอรอยด์

อย่างไรก็ตามการได้รับยาในกลุ่ม NSAIDs เป็นประจำเป็นช่วงเวลานานๆอาจส่งผลข้างเคียงต่อระบบอวัยวะอื่นๆของร่างกาย เช่น เกิดการระคายเคืองในระบบทางเดินอาหาร ภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตาย เวียนศีรษะ ความดันโลหิตสูง เป็นต้น [6]

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาสารสกัดจากธรรมชาติหลายชนิด อาทิ เคอร์คูมิน (curcumin) ซึ่งเป็นสารสกัดจากขมิ้นชัน ไปเปอริน (piperine) ซึ่งเป็นสารสกัดจากพริกไทยดำ และ Epigallocatechin 3-gallate (EGCG) ซึ่งเป็นสารสกัดจากชาเขียว [7] ในการนำมารักษาโรคข้อเสื่อม แต่เนื่องด้วยเคอร์คูมินและไปเปอริน มีข้อจำกัดเรื่องความสามารถในการละลายน้ำต่ำ ทำให้มีชีวปริมาณการออกฤทธิ์ (bioavailability) ภายในร่างกายต่ำ ในขณะที่สาร EGCG มีความสามารถในการละลายน้ำที่ดีกว่าเคอร์คูมินและไปเปอริน และยังมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบได้ดีมาก [8, 9] มีงานศึกษาวิจัยรายงานว่า EGCG มีศักยภาพในการรักษาโรคข้อเสื่อมได้ดีโดยมีกลไกในการ 1) ป้องกันกระดูกอ่อนไม่ให้ถูกทำลายจากเอนไซม์ matrix metalloproteinases (MMPs) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำลายคอลลาเจน และ โปรตีโอไกลแคน (Proteoglycan) ที่เป็นองค์ประกอบใน extracellular matrix ในกระดูกอ่อน [10, 11] 2) รักษาสมดุลของกระบวนการทำงานของกระดูกที่ถูกทำลาย ไม่ให้มีการงอกใหม่ที่ผิดปกติ [12] และ 3) ควบคุมการทำงานของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในไขข้อ (synovial fibroblast) ไม่ให้สร้างเอนไซม์ MMPs มากเกินไป ซึ่งจะไปทำลายกระดูกอ่อนบริเวณข้อต่อและก่อให้เกิดการอักเสบตามมา [13, 14] ดังนั้น EGCG จึงเป็นสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการรักษาทุกองค์ประกอบของโรคข้อเสื่อม อย่างไรก็ตาม ในใบชาเขียวแห้ง 1.5 กรัม มีสาร EGCG เป็นส่วนประกอบเพียงประมาณ 35 - 110 มิลลิกรัมเท่านั้น หากต้องการฤทธิ์ของ EGCG ที่เพียงพอต่อการรักษา จะต้องรับประทานชาเขียวในปริมาณมาก ซึ่งจะทำให้ร่างกายได้รับคาเฟอีนมากเกินไป นอกจากนี้ สาร EGCG มีครึ่งชีวิตสั้นและถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ในร่างกายได้อย่างรวดเร็ว จึงอาจทำให้สูญเสียประสิทธิภาพในการรักษาโรคไปก่อนจะเดินทางไปถึงอวัยวะเป้าหมาย ในงานวิจัยนี้จึงขอเสนอการประยุกต์ใช้ระบบนำส่งยาเพื่อนำส่งสาร EGCG ไปสู่บริเวณข้อที่เสื่อมโดยตรง ซึ่งจะช่วยรักษาความคงตัวและควบคุมการปลดปล่อยสาร EGCG ให้ออกฤทธิ์เนิ่นนานขึ้น และเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาโรคข้อเสื่อม

ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ Ratanavaraporn และคณะ (2014) ได้พัฒนาอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ทำจากเจลาตินและไฟโบรอินและประยุกต์ใช้ในการนำส่งเคอร์คูมินและไปเปอริน โดย

พบว่าอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนนี้สามารถควบคุมการปลดปล่อยสารทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวได้ และตัวอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนนี้มีขนาดเล็กในระดับที่สามารถฉีดผ่านหัวเข็มฉีดยาเข้า ณ บริเวณข้อที่ต้องการรักษาได้โดยตรง [15] ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ประยุกต์ใช้อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินที่พัฒนาต่อยอดจากงานวิจัยก่อนหน้านี้เพื่อใช้เป็นระบบนำส่งสาร EGCG เจลาตินเป็นโปรตีนที่ได้จากกระบวนการไฮโดรไลซิสคอลลาเจน โดยแบ่งได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ เจลาตินชนิดเอสกัดได้จากกระบวนการไฮโดรไลซิสคอลลาเจนด้วยกรด และเจลาตินชนิดปีสกัดได้จากกระบวนการไฮโดรไลซิสคอลลาเจนด้วยด่าง นอกจากนี้ เจลาตินชนิดเอและบีสามารถดัดแปรโครงสร้างโมเลกุลเพื่อปรับปรุงสมบัติหรือเพิ่มหมู่ฟังก์ชันได้อีกด้วยเช่น เจลาตินชนิดเอที่ถูกดัดแปรด้วย Ethylenediamine และเจลาตินชนิดบีที่ถูกดัดแปรด้วย Succinic anhydride [16-18] เจลาตินชนิดต่าง ๆ นี้มีสมบัติ ประจุ และหมู่ฟังก์ชันแตกต่างกัน ซึ่งสมบัติที่ต่างกันดังกล่าวอาจมีผลต่อประสิทธิภาพในการกักเก็บและการควบคุมการปลดปล่อยสาร EGCG งานวิจัยนี้ จึงมีเป้าหมายที่จะศึกษาเปรียบเทียบสมบัติและประสิทธิภาพในการกักเก็บและควบคุมการปลดปล่อยสาร EGCG ของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ผลิตจากเจลาตินชนิดต่างๆ เพื่อหาอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินชนิดที่มีความเหมาะสมสำหรับนำไปพัฒนาต่อเป็นยาฉีดยาร่วมกับสารละลายกรดไฮยาลูรอนิก เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาโรคข้อเสื่อมให้ดีขึ้น ผู้วิจัยคาดหวังว่า อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินจะสามารถควบคุมการปลดปล่อยสาร EGCG ได้เนิ่นนาน ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของ EGCG ในการต้านการอักเสบ ในขณะที่กรดไฮยาลูรอนิกทำหน้าที่กระตุ้นการผลิตน้ำเลี้ยงไขข้อจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในไขข้อ ซึ่งจะช่วยลดแรงเสียดทานบริเวณผิวข้อและลดความเจ็บปวดของผู้ป่วยได้ ระบบนำส่งสาร EGCG ที่ฉีดร่วมกับสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้จะสามารถนำไปศึกษาเพิ่มเติมในการฉีดยารักษาข้อเสื่อมในสัตว์ทดลองต่อไป และพัฒนาต่อยอดเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการรักษาผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์

- 1.2.1 พัฒนาและศึกษาสมบัติของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ผลิตจากเจลาตินชนิดต่างๆ
- 1.2.2 ประยุกต์ใช้อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ผลิตจากเจลาตินชนิดต่างๆ เพื่อเป็นระบบนำส่งสาร EGCG และศึกษากลไกการควบคุมการปลดปล่อยสาร
- 1.2.3 พัฒนายาฉีดรักษาโรคข้อเสื่อมประเภทสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกที่ผสมอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินที่นำส่งสาร EGCG เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการฉีดรักษาโรคข้อเสื่อมในสัตว์ทดลองต่อไป

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

- 1.3.1 ศึกษาหาข้อมูลสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกที่ใช้ในการรักษาโรคข้อเสื่อมในทางการแพทย์ในปัจจุบัน
- 1.3.2 ศึกษาข้อมูลและทดสอบสมบัติเบื้องต้นของสาร EGCG ได้แก่
 - ความสามารถในการละลายน้ำ (solubility)
 - ความยาวคลื่นการดูดกลืนแสง
 - ขนาด (dose) ที่ใช้ในการรักษาโรคข้อเสื่อม
- 1.3.3 เตรียมเจลาตินดัดแปร 2 ชนิด ได้แก่
 - เจลาตินชนิดเอที่ถูกดัดแปรด้วย Ethylenediamine (GE)
 - เจลาตินชนิดบีที่ถูกดัดแปรด้วย Succinic anhydride (GS)
- 1.3.4 วิเคราะห์คุณลักษณะของเจลาตินดัดแปร
 - ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระด้วยเทคนิค 2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)
 - หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)
 - ค่าศักย์เซต้า (Zeta potential) และและค่าไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric point, pI) ด้วยเครื่อง Zeta sizer
 - ค่ามุมสัมผัสผิวน้ำ (Water contact angle)
 - วิเคราะห์ความหนืด (Viscosity)
 - วิเคราะห์น้ำหนักรวมโมเลกุลด้วยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

1.3.5 เตรียมอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนจากเจลาตินด้วยเทคนิคอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (water in oil emulsion)

ตัวแปรที่จะศึกษา

- ชนิดของเจลาติน ได้แก่ (1) เจลาตินชนิดเอ (GA) (2) เจลาตินชนิดบี (GB) (3) เจลาตินชนิดเอที่ถูกตัดแปรด้วย Ethylenediamine (GE) และ (4) เจลาตินชนิดบีที่ถูกตัดแปรด้วย Succinic anhydride (GS)

- วิธีการเชื่อมขวาง ได้แก่ การเชื่อมขวางด้วยความร้อน และการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์

1.3.6 วิเคราะห์สมบัติทางเคมี กายภาพ และชีวภาพของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินชนิดต่างๆ

- โครงสร้างสัณฐานด้วยเทคนิค Scanning electron microscope (SEM)

- ร้อยละการเชื่อมขวางด้วยเทคนิค 2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)

- สมบัติการละลายน้ำ

- อัตราการย่อยสลายในระดับห้องปฏิบัติการ ในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส (collagenase)

- ความเป็นพิษต่อเซลล์ L929 mouse fibroblasts ในระดับห้องปฏิบัติการ ตามมาตรฐาน ISO10993-Part 5 (2009)

1.3.7 ทำการกักเก็บสาร EGCG บนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาติน และศึกษาประสิทธิภาพในการกักเก็บและการควบคุมการปลดปล่อยสาร EGCG จากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินในระดับห้องปฏิบัติการ

1.3.8 เตรียมสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกที่สมกับอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินที่กักเก็บสาร EGCG ที่มีความพร้อมสำหรับเป็นยาฉีตรักษาข้อเสื่อมที่จะทดสอบในสัตว์ทดลองต่อไป

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินที่มีความเหมาะสมสำหรับเป็นระบบนำส่งสารสกัดจากธรรมชาติ EGCG

1.4.2 รูปแบบยาฉีตรักษาโรคข้อเสื่อมที่ประกอบด้วยสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกผสมกับอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินที่กักเก็บ EGCG สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพการรักษาในสัตว์ทดลอง

ต่อไป

1.4.3 องค์ความรู้ด้านการพัฒนาชีววัสดุเพื่องานทางการแพทย์

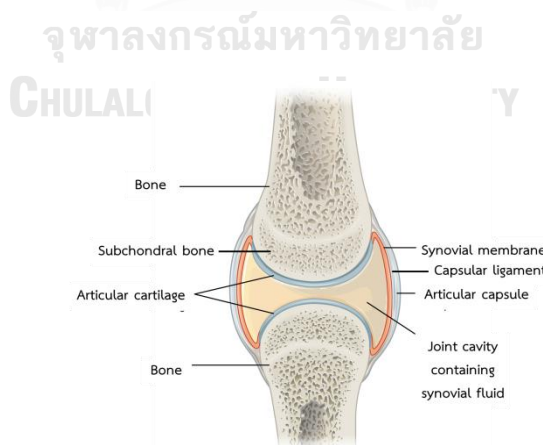


บทที่ 2

ทฤษฎีที่เกี่ยวข้องและทบทวนวรรณกรรม

2.1 โรคข้อเสื่อม (Osteoarthritis)

โรคข้อเสื่อม (Osteoarthritis; OA) เป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติของข้อต่อ โดยเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงทั้งทางด้านโครงสร้าง ชีวเคมี และชีวกลศาสตร์ของส่วนต่างๆบริเวณข้อต่อ ได้แก่ กระดูกอ่อนผิวข้อ (articular cartilage) กระดูกแข็งใต้กระดูกอ่อนผิวข้อ (subchondral bone) เยื่อหุ้มข้อ (synovium) น้ำไขข้อ (synovial fluid) และเอ็นแคปซูล (Capsular ligament) (ส่วนประกอบต่างๆของข้อแสดงในรูปที่ 2.1) ลักษณะทางพยาธิสภาพที่พบในโรคข้อเสื่อมคือ กระดูกอ่อนผิวข้อถูกทำลาย ขอบของกระดูกแข็งใต้กระดูกอ่อนผิวข้อหนาขึ้น นอกจากนี้ น้ำไขข้ออาจมีปริมาณและความหนืดลดลงเนื่องจากการเสื่อมสลายของกรดไฮยาลูรอนิก (Hyaluronic acid) ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของน้ำไขข้อ จึงทำให้เกิดการเสียดสีและการอักเสบของเยื่อหุ้มข้อนั้นๆได้ เป็นเหตุให้ผู้ป่วยไม่สามารถเคลื่อนไหวข้อได้อย่างปกติ และอาจมีอาการข้อบวมหรือข้ออักเสบ ข้อฝืด ข้อแข็ง ข้อยึดติด ปวดข้อ มีเสียงดังที่ข้อเวลาเคลื่อนไหว หากไม่ได้รับการรักษาอย่างถูกต้องอาจเกิดเป็นความพิการตามมา [19, 20] โดยทั่วไป โรคข้อเสื่อมสามารถเกิดขึ้นได้กับทุกข้อต่อในร่างกาย แต่มักพบในข้อเข่า ซึ่งเป็นข้อต่อชนิด synovial joint เพราะเป็นข้อหลักของร่างกายที่มีความสำคัญในการดำเนินชีวิตประจำวัน



รูปที่ 2.1 ลักษณะและองค์ประกอบของข้อต่อชนิด synovial joint

(<http://philschatz.com/anatomy-book/contents/m46394.html>)

2.1.1 สาเหตุการเกิดโรคข้อเสื่อม

สาเหตุการเกิดโรคข้อเสื่อมแบ่งเป็น 2 กรณี ได้แก่ การเกิดโรคแบบปฐมภูมิ และการเกิดโรคแบบทุติยภูมิ [19, 21, 22]

2.1.1.1 การเกิดโรคแบบปฐมภูมิ (Primary Osteoarthritis หรือ idiopathic) เป็นการเกิดโรคข้อเสื่อมแบบไม่ทราบสาเหตุแน่ชัด ซึ่งเป็นสาเหตุที่มักพบในผู้สูงอายุ

2.1.1.2 การเกิดโรคแบบทุติยภูมิ (Secondary Osteoarthritis) เป็นการเกิดโรคข้อเสื่อมแบบทราบสาเหตุชัดเจน เช่น เกิดจากการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของยีนสร้างคอลลาเจน (Genetic Factors) ที่ผิดปกติ ทำให้กระดูกอ่อนไม่เจริญ (chondrodysplasias) หรืออาจเกิดจากการที่ข้อต้องรับน้ำหนักมากเกินไป (Abnormal loading) ซึ่งมักเกิดกับกลุ่มคนที่มีน้ำหนักตัวมากเกินไป หรือในกลุ่มคนที่ทำงานเกี่ยวกับการใช้กล้ามเนื้อเคลื่อนไหวอย่างหนัก เช่น แรงงานชุดเหมืองแร่ แรงงานยกของ นักกีฬาบางประเภท ซึ่งทำให้บริเวณข้อต้องรับน้ำหนักมากเกินไปทำให้เกิดการเสียดสีของกระดูกข้อต่อ

2.1.2 สัญญาณ และอาการของโรคข้อเสื่อม (Signs and Symptoms of Osteoarthritis)

อาการที่เกิดขึ้นเมื่อเข้าสู่สภาวะข้อเสื่อมคือจะเริ่มมีอาการปวดที่บริเวณข้อ โดยจะปวดเมื่อมีการเคลื่อนไหวข้อ และอาการปวดจะบรรเทาลงเมื่อไม่มีการเคลื่อนไหวข้อ เรียกว่า ปรากฏการณ์ข้อฝืด (gelling phenomenon) นอกจากนี้อาการปวดที่บริเวณข้อมักเกิดขึ้นฉับพลันในตอนเช้าซึ่งเป็นผลจากการไม่ได้เคลื่อนไหวข้อเป็นเวลานานในช่วงนอน สัญญาณและอาการที่บ่งชี้ว่าอาจเป็นโรคข้อเสื่อมในแต่ละข้อต่อของร่างกายแสดงในตารางที่ 2.1 [23]

ตารางที่ 2.1 สัญญาณ และอาการของโรคข้อเสื่อมที่บริเวณข้อต่างๆ

ตำแหน่งข้อ	สัญญาณและอาการ
ข้อมือ	มีอาการปวดเมื่อเคลื่อนไหว เมื่อกดบริเวณข้อต่อฝ่ามือ (carpometacarpel joints) จะพบว่าแข็งและเจ็บ บริเวณข้อต้นนิ้วมือและปลายนิ้วมือ (proximal and distal interphalangeal joints) นูนเป็นก้อน
ข้อไหล่	มีอาการปวดเมื่อเคลื่อนไหว เคลื่อนไหวได้ค่อนข้างจำกัด เมื่อเคลื่อนไหวมีเสียงกระดูกอ่อนผิวข้อเสียดสีกัน
ข้อเข่า	มีอาการปวดเมื่อเคลื่อนไหว ข้อเข่าบวมจากการสร้างน้ำเลี้ยงข้อมากขึ้น เมื่อเคลื่อนไหวมีเสียงกระดูกอ่อนผิวข้อเสียดสีกัน เมื่อคลำบริเวณด้านพับข้อเข่ามีถุงน้ำ (Baker cyst) ที่เกิดจากน้ำไขข้อรั่วออกมา
ข้อสะโพก	มีอาการปวดเมื่อเคลื่อนไหว และมีอาการปวดที่บริเวณสะโพก เคลื่อนไหวได้ค่อนข้างจำกัด
ข้อเท้า	มีอาการปวดเมื่อมีการเดินเคลื่อนไหว เคลื่อนไหวได้ค่อนข้างจำกัดในบริเวณข้อระหว่างข้อเท้าและนิ้วเท้า (metatarsophalangeal joints) เกิดภาวะโรคข้อโคนนิ้วหัวแม่เท้าเสื่อม (hallux rigidus)
ข้อกระดูกสันหลัง	มีอาการปวดเมื่อเคลื่อนไหว เคลื่อนไหวได้ค่อนข้างจำกัด

2.1.3 พยาธิสภาพของโรค

พยาธิสภาพของโรคข้อเสื่อมจะพบในองค์ประกอบหลัก 3 ส่วนของข้อคือ กระดูกอ่อนผิวข้อ กระดูกแข็งใต้กระดูกอ่อนผิวข้อ และเยื่อหุ้มข้อ ดังแสดงในรูปที่ 2.2

2.1.3.1 กระดูกอ่อนผิวข้อ (Articular cartilage)

กระดูกอ่อนผิวข้อที่อยู่ในสภาวะปกติจะประกอบไปด้วย extracellular matrix และเซลล์กระดูกอ่อน (Chondrocyte) โดยส่วนประกอบหลักของ extracellular matrix คือ คอลลาเจนชนิดที่ 2 (type II collagen) ซึ่งทำหน้าที่ให้ความยืดหยุ่นแก่เนื้อเยื่อ และ แอ็กกรีแคน (Aggrecan) ซึ่งมีหน้าที่ทำให้เนื้อเยื่อทนต่อแรงดันและลดแรงกระแทกเมื่อรองรับน้ำหนักในสภาวะข้อเสื่อมจะมีเอนไซม์ที่เกิดจากการอักเสบเข้าไปทำลายและย่อยสลายโครงสร้าง extracellular matrix นี้

2.1.3.2 กระดูกแข็งใต้กระดูกอ่อนผิวข้อ (Subchondral bone)

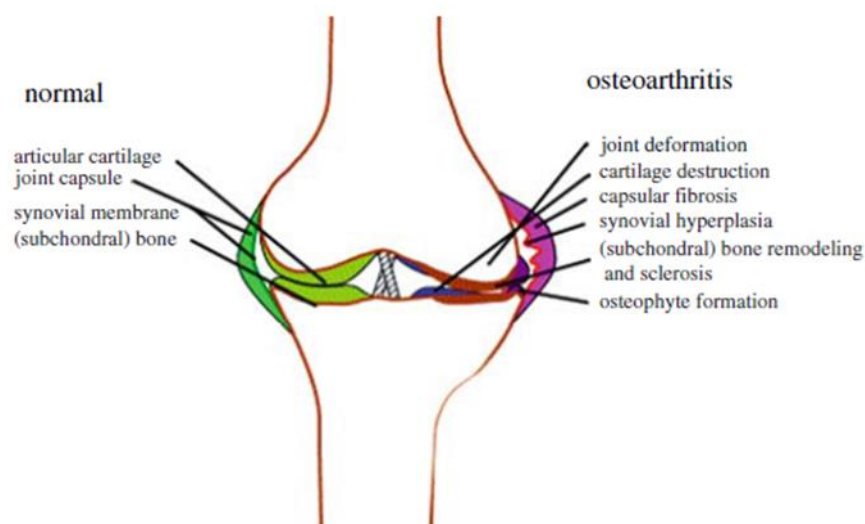
กระดูกแข็งใต้กระดูกอ่อนผิวข้อเป็นส่วนประกอบของกระดูกส่วนปลายที่มีลักษณะเรียบ บาง และไม่มีเส้นเลือด เมื่อเข้าสู่สภาวะข้อเสื่อม กระดูกแข็งใต้กระดูกอ่อนผิวข้อจะเกิดการเปลี่ยนแปลงจากการได้รับแรงกระทำมากขึ้น เนื้อกระดูกถูกทำลาย ทำให้เซลล์ osteoblast สร้างเนื้อกระดูกแข็งขึ้นมาทดแทนอย่างรวดเร็ว เกิดเป็นการสร้างกระดูกผิดรูป (bone remodeling) ซึ่งมีลักษณะแข็ง (subchondral stiffening) ขอบแข็ง (sclerotic) และเปราะ (brittle) [20, 24, 25]

2.1.3.3 เยื่อหุ้มข้อ (Synovial Membrane)

ในสภาวะปกติที่ไม่มีการเกิดโรค ช่องว่างระหว่างข้อจะมีของเหลวที่เรียกว่า น้ำไขข้อ (synovial fluid) บรรจุอยู่ กรดไฮยาลูรอนิก (Hyaluronic acid) เป็นองค์ประกอบสำคัญในน้ำไขข้อ ซึ่งมีบทบาทในการช่วยหล่อลื่น (lubricant) ทำให้เคลื่อนไหวได้สะดวก แต่เมื่อเข้าสู่ภาวะโรคข้อเสื่อม กรดไฮยาลูรอนิกจะเสื่อมสลายลง ความเข้มข้นลดลง และมีประสิทธิภาพในการหล่อลื่นน้อยลงช่องว่างระหว่างกระดูกจะแคบลง และเกิดการเสียดสีของกระดูกอ่อนผิวข้อ ซึ่งเป็นเหตุให้เยื่อหุ้มข้ออักเสบ (synovitis) การอักเสบที่เกิดขึ้นนี้เป็นผลมาจากการผลิตไซโตไคน์ (cytokine) ประเภท interleukin-1 β (IL-1 β) และ Tumor necrosis factor-

α (TNF- α) ของเซลล์เยื่อข้อ (synoviocytes) และเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (mononuclear cell) ที่อยู่ในข้อ [21, 26]

เมื่อผู้ป่วยเข้าสู่ภาวะข้อเสื่อมเต็มรูปแบบจะพบการงอกของเนื้อกระดูก (Osteophyte) ที่ช่องของเยื่อหุ้มกระดูก (periosteum) โดยมีการงอกที่บริเวณขอบของกระดูกอ่อน และกระดูกแข็ง กระดูกที่งอกออกมาจะมีเนื้อของกระดูกมากกว่าปกติและมีรูปร่างเป็นจะงอย (spurs) [27] ภายหลังจากการงอกจะมีการสร้างเส้นเลือด (Angiogenesis) เข้าไปเลี้ยง [28] การงอกของกระดูกที่ผิดปกตินี้ทำให้เกิดการอักเสบและเจ็บปวด ส่งผลต่อการเคลื่อนไหว สาเหตุการงอกกระดูกนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดแต่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการอักเสบของเยื่อข้อ โดยอาจเกิดจากการที่เซลล์แมคโครฟาจ (macrophage) จากเยื่อข้อเปลี่ยนไปเป็นเซลล์กระดูกประเภทออสทีโอคลาส (Osteoclast) และหลั่งโกรทแฟคเตอร์ (Growth factors) เข้าสู่ extracellular matrix ของกระดูก และเหนี่ยวนำเซลล์กระดูก (osteoblast) ให้สร้างกระดูกงอกออกมา [29]



รูปที่ 2.2 ลักษณะของข้อปกติ (ซ้าย) และข้อเสื่อม (ขวา) [21]

2.1.4 การรักษา

การรักษาโรคข้อเสื่อมสามารถแบ่งได้ตามระยะและความรุนแรงของโรคได้ดังต่อไปนี้ [21]

2.1.4.1 การรักษาโรคข้อเสื่อมแบบไม่ใช้ยา

ในผู้ป่วยระยะแรก ที่ยังมีอาการไม่รุนแรงมาก ผู้ป่วยอาจได้รับการรักษาโดยการปรับเปลี่ยนพฤติกรรม ได้แก่ การลดน้ำหนัก หรือการทำกายภาพบำบัดเพื่อให้ข้อต่อเคลื่อนไหวได้ การให้ผู้ป่วยออกกำลังกายเพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กล้ามเนื้อบริเวณข้อและเพิ่มพิสัยการเคลื่อนไหวของข้อ เป็นต้น

2.1.4.2 การรักษาโรคข้อเสื่อมแบบให้ยารักษา

ในผู้ป่วยที่มีอาการปวดข้อรุนแรง จะทำการรักษาโดยการให้ยา ซึ่งมีทั้งยารับประทานและยาฉีด ดังต่อไปนี้

ก. การรักษาโดยให้ยารับประทานเพื่อบรรเทาอาการปวดหรืออาการอักเสบ

ปัจจุบันการรักษาข้อเสื่อมโดยการให้ยารับประทานที่มีฤทธิ์ไปยับยั้งอาการปวดที่บริเวณข้อ จะใช้ยาในกลุ่ม NSAIDs (non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs) คือกลุ่มยาบรรเทาอาการปวด การอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ ยาในกลุ่ม NSAIDs นี้จะไปยับยั้งเอนไซม์ COX-2 (cyclooxygenase-2) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโพรสตาแกลนดิน (Prostaglandins) นอกจากยาในกลุ่ม NSAIDs แล้วก็มีสมุนไพรหลายชนิดที่มีฤทธิ์ในการบรรเทาอาการปวดในโรคข้อเสื่อมได้เช่นกัน ตารางที่ 2.2 แสดงตัวอย่างยาในกลุ่ม NSAIDs และสมุนไพรที่ใช้ในการรักษาโรคข้อเสื่อม [6]

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างยาในกลุ่ม NSAIDs และสมุนไพรที่ใช้ในการรักษาโรคข้อเสื่อม

ยา NSAIDs	Acetylsalicylic acid (aspirin) Diflunisal (dolobid) Diclofenac (voltaren, cataflam, arthrotec) Ketorolac (toradol) Ketoprofen (orudis, oruvail, axorid) Celecoxib (celebrex)
สมุนไพร	ชาเขียว (<i>Camellia sinensis</i>) ต้นเล็บแมว (<i>Uncaria tomentosa</i> , <i>Uncaria guanensis</i>) ขมิ้นชัน (<i>Curcumin longa</i>) เกาพระเจ้าฟ้าร้อง (<i>Tripterygium wilfordii</i> Hook F) จิง (<i>Zingiber officinale</i>)

ข. การฉีตรักษาเข้าบริเวณข้อต่อโดยตรง

- การฉีตคอร์ติโคสเตอรอยด์ (Corticosteroids) คอร์ติโคสเตอรอยด์เป็นยาในกลุ่มสเตอรอยด์ที่มีกลไกยับยั้งการแสดงออกของยีนที่สร้างไซโตไคน์ที่ทำให้เกิดการอักเสบ การฉีตคอร์ติโคสเตอรอยด์ จึงเป็นการบรรเทาอาการปวด และลดอาการข้อต่อฝืดเพียงชั่วคราว [30]

- การฉีตกรดไฮยาลูรอนิก ในปัจจุบันการฉีตรักษาโรคข้อเสื่อมด้วยกรดไฮยาลูรอนิกได้รับการยอมรับเป็นที่แพร่หลาย เนื่องจากกรดไฮยาลูรอนิกเป็นส่วนประกอบสำคัญในน้ำไขข้อ กระดูกอ่อน และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มความหล่อลื่นทำให้เคลื่อนไหวข้อได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยกระตุ้นการผลิตกรดไฮยาลูรอนิกจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในไขข้อได้อีกด้วย

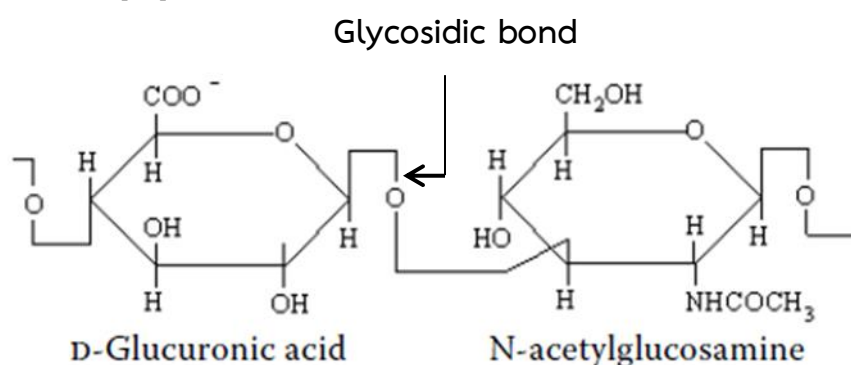
2.1.4.3 การรักษาโรคข้อเสื่อมด้วยวิธีการผ่าตัด

การรักษาด้วยวิธีการผ่าตัดจะกระทำเมื่อการรักษาด้วยการใช้ยาไม่ประสบความสำเร็จ หรืออาการโรคอยู่ในภาวะจำเป็นไม่สามารถใช้วิธีการอื่นใดรักษาได้ โดยการผ่าตัดจะมีการผ่าตัดแบบตัดเข้า (Osteotomy) การผ่าตัดเพื่อให้ผิวข้อมาชิดกัน (Arthrodesis) รวมถึงการผ่าตัดเพื่อใส่ข้อเทียม (Joint replacement) [21]

2.2 กรดไฮยาลูรอนิก (Hyaluronic acid)

2.2.1 โครงสร้างและแหล่งที่พบ

กรดไฮยาลูรอนิก เป็นคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ในกลุ่มไกลโคซามิโนไกลแคน (Glycoaminoglycan, GAGs) โครงสร้างของกรดไฮยาลูรอนิกประกอบไปด้วยหน่วยซ้ำของน้ำตาลโมเลกุลคู่ D-glucuronic acid และ D-N-acetyl-glucosamine ที่เชื่อมกันที่ตำแหน่ง β -1,4 และ β -1,3 ด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bonds) ดังแสดงในรูปที่ 2.3 และมีสูตรโครงสร้างทางเคมีคือ $(C_{14}H_{21}NO_{11})_n$ โดย n มีค่ามากกว่า 1000 ขึ้นไป น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 10^4 - 10^7 ดาลตัน ซึ่งแตกต่างกันไปตามแหล่งที่มา กรดไฮยาลูรอนิกมีความแตกต่างจาก GAGs ตัวอื่นๆ คือ ไม่มีหมู่ซัลเฟต กรดไฮยาลูรอนิกเกิดในรูปแบบของเกลือ เรียกว่า ไฮยาลูรอนेट (Hyaluronate) [31, 32] ตามปกติ กรดไฮยาลูรอนิกเป็นส่วนประกอบของ extracellular matrix ในร่างกายของสิ่งมีชีวิต โดยเป็นส่วนประกอบในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissues) ผิวหนัง รก น้ำไขข้อ วัุ้นในตา (Vitreous humor) ในสัตว์พบในหอยนไก สมองกระต่าย กระตูดอ้อนจุมกัวว โดยมีความเข้มข้นแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 2.3 [33]



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของกรดไฮยาลูรอนิก [31]

ตารางที่ 2.3 ความเข้มข้นของกรดไฮยาลูรอนิกในเนื้อเยื่อสัตว์และในส่วนประกอบของร่างกาย

แหล่งที่พบกรดไฮยาลูรอนิก	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)
หงอนไก่	7,500
รก (คน)	4,100
ข้อต่อ (น้ำไขข้อ)	1,400-3,600
กระดูกอ่อนจมูกวัว	1,200
วุ้นตา (คน)	140-340
ผิวหนังชั้นเดอร์มิส	200-500
ผิวหนังชั้นเอพิเดอร์มิส	100
สมองกระต่าย	65
หัวใจกระต่าย	27
ท่อน้ำเหลืองช่วงอก (Thoracic lymph)	0.2-50
ปัสสาวะ (คน)	0.1-0.3
เซรัม (คน)	0.01-0.1

2.2.2 คุณสมบัติของกรดไฮยาลูรอนิก

กรดไฮยาลูรอนิกมีลักษณะใส ไม่มีสี ละลายน้ำได้ดีจากการที่โครงสร้างมีหมู่คาร์บอกซิล และหมู่ N-acetyl ที่มีขั้วเป็นจำนวนมาก กรดไฮยาลูรอนิกมีประจุรวมเป็นลบจึงสามารถจับกับสารที่มีประจุบวกได้ดี และมีความหนืดค่อนข้างสูง เมื่ออยู่ในรูปแบบสารละลาย โครงสร้างสายโซ่ของกรดไฮยาลูรอนิกจะมีรูปร่างยืดขยาย และคดไม่เป็นระเบียบ นอกจากนี้กรดไฮยาลูรอนิกสามารถเข้ากันได้ทางชีวภาพกับร่างกาย ไม่ก่อให้เกิดอาการแพ้ และต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย และสามารถถูกย่อยสลายได้ด้วยกลไกทางชีวเคมีในร่างกายโดยอาศัยเอนไซม์ 3 ชนิดในร่างกายได้แก่ ไฮยาลูรอนิเดส (hyaluronidase; hyase) b-D-glucuronidase และ β -N-acetyl hexosaminidase

2.2.3 หน้าที่ทางชีวภาพของกรดไฮยาลูรอนิก (Biological function)

ปี 1996 Laurent และคณะ ได้อธิบายบทบาทหน้าที่ของกรดไฮยาลูรอนิกดังต่อไปนี้ [32]

1. เป็นสารเติมเต็มในช่องว่าง (Space filler) และเป็นสารหล่อลื่น (Lubrication) ในข้อต่อมีน้ำไขข้อซึ่งมีกรดไฮยาลูรอนิกเป็นองค์ประกอบ กรดไฮยาลูรอนิกนี้จะไหลอยู่ภายในข้อต่อ ช่วยหล่อลื่นข้อต่อทำให้เคลื่อนไหวได้สะดวก ไม่ฝืด ไม่ติด [27, 32]
2. กำจัดอนุมูลอิสระ (Scavenger function) ในร่างกายของคนเราจะมีเกิดการเกิดอนุมูลอิสระ ซึ่งส่งผลไปทำลายเนื้อเยื่อในร่างกาย กรดไฮยาลูรอนิกมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ [34]
3. ควบคุมการทำงานของเซลล์ (Regulation of cellular activities) กรดไฮยาลูรอนิกมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการทำงานของเซลล์ โดยมักมีผลต่อการสร้างและยับยั้งการเกิดกิจกรรมต่างๆในเซลล์ ไม่ว่าจะเป็นการลดผลิตภันท์ และตัวกลางในการสร้างสารอักเสบ การควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เป็นต้น [31, 35]

2.2.4 การประยุกต์ใช้กรดไฮยาลูรอนิกในทางการแพทย์

ในทางการแพทย์มีการนำกรดไฮยาลูรอนิกมาใช้ในการรักษาโดย Balazs และ Delinger (1984) [34] ได้จำแนกรูปแบบการนำไปใช้ออกเป็นทั้งหมด 5 รูปแบบดังนี้

1. Viscosurgery ใช้ในระหว่างทำการผ่าตัดดวงตา เพื่อรักษารูปร่างของช่องด้านหน้าในลูกตา [31]
2. Viscoaugmentation ใช้เป็นสารเพิ่มและเติมเต็มช่องว่างในผิวหนัง กล้ามเนื้อหูด และเนื้อเยื่อบริเวณคอหอย
3. Viscoseparation ใช้ในการแยกพื้นผิวของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดแผลเป็นที่เกิดจากการผ่าตัด หรือการบาดเจ็บ
4. Viscosupplementation ใช้เป็นสารทดแทน หรือเพิ่มเติมของเหลวเนื้อเยื่อ มักใช้ในการทดแทนน้ำไขข้อ และบรรเทาอาการปวด
5. Viscoprotection ใช้ป้องกันผิว บาดแผลและเนื้อเยื่อจากความแห้ง และสิ่งแวดล้อมที่เป็นอันตราย และช่วยส่งเสริมการรักษาผิวของบาดแผล

2.2.5 การประยุกต์ใช้และกลไกของกรดไฮยาลูรอนิกในการรักษาข้อเสื่อม

ในน้ำไขข้อบริเวณข้อเข่าของคนปกติทั่วไปที่มีอายุน้อยกว่า 40 ปีจะมีกรดไฮยาลูรอนประมาณ

3.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร [36] และมวลโมเลกุลประมาณ 6–7 ล้านดาลตัน (MDa) [32] ในขณะที่ผู้ป่วยที่เป็นโรคข้อเสื่อม จะพบว่าน้ำไขข้อจะมีความยืดหยุ่นและความหนืดลดลง ซึ่งเป็นผลมาจากขนาดโมเลกุลและความเข้มข้นของกรดไฮยาลูรอนิกในน้ำไขข้อลดลง ส่งผลให้ช่องว่างระหว่างข้อแคบลงจนเกิดการเสียดสีของกระดูกอ่อนผิวข้อทำให้เกิดการอักเสบและพยาธิสภาพอื่นตามมา

การรักษาโรคข้อเสื่อมด้วยการฉีดกรดไฮยาลูรอนิกเข้าไปทดแทนกรดไฮยาลูรอนิกที่เสื่อมสลายไป เป็นวิธีที่แพทย์นิยมใช้รักษาผู้ป่วยอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ผลิตภัณฑ์ทางการค้าส่วนใหญ่จะเป็นกรดไฮยาลูรอนิกที่ได้มาจากหงอนไก่ และการหมักจุลชีพ ในปี 2006 Kogan และคณะ [33] ได้อธิบายกลไกของกรดไฮยาลูรอนิกในการรักษาโรคข้อเสื่อม โดยมีทั้งหมด 3 กลไกหลักที่เกิดขึ้น ซึ่งจนถึงปัจจุบันก็ได้มีงานวิจัยมากมายที่อ้างอิงตามกลไกที่ Kogan และคณะกล่าวไว้ ดังต่อไปนี้

2.2.5.1 ฟันฟูคุณสมบัติความยืดหยุ่นและความหนืดให้แก่น้ำไขข้อ

การฉีดกรดไฮยาลูรอนิกช่วยเพิ่มความยืดหยุ่นให้ข้อ ช่วยในการดูดซับแรง (Shock absorption) และเพิ่มคุณสมบัติหล่อลื่น ลดการเสียดสีภายในช่องว่างระหว่างข้อต่อที่แคบลง [37]

2.2.5.2 กระตุ้นหรือควบคุมกระบวนการชีวสังเคราะห์ เช่น กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์กระดูกอ่อน ยับยั้งและปกป้องการสลายของกระดูกอ่อน

การฉีดกรดไฮยาลูรอนิกมีผลทางชีวเคมีต่อเซลล์กระดูกอ่อน โดยสามารถกระตุ้นการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์กระดูกอ่อนได้ [38] ในปี 2005 Akmal และคณะ [4] ศึกษาผลของกรดไฮยาลูรอนิกต่อเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อของวัว โดยทำการเปรียบเทียบการเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนแบบที่ให้กรดไฮยาลูรอนิกและไม่ให้กรดไฮยาลูรอนิก พบว่าเซลล์กระดูกอ่อนที่เลี้ยงแบบให้กรดไฮยาลูรอนิกมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากกว่าการเลี้ยงแบบที่ไม่ได้ใส่กรดไฮยาลูรอนิกลงไป ในส่วนของฤทธิ์ในการยับยั้งและปกป้องกระดูกอ่อน ได้มีการรายงานว่ากรดไฮยาลูรอนิกสามารถยับยั้งนิวโทรฟิล (Neutrophil) ซึ่งเป็นหนึ่งในปัจจัยของการย่อยสลายกระดูกอ่อน การฉีดกรดไฮยาลูรอนิกให้แก่สัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นข้อเสื่อม สามารถลดการย่อยสลายของกระดูกอ่อนผิวข้อได้ [39, 40]

2.2.5.3 บรรเทาอาการปวด ลดการอักเสบและควบคุมการแสดงออกของไซโตไคน์

กรดไฮยาลูรอนิกสามารถลดการอักเสบและความเจ็บปวด โดยการไปยับยั้งการหลั่ง Interleukin (IL)-1 β [41] นอกจากนี้ยังพบว่าการฉีดรักษาด้วยกรดไฮยาลูรอนิก สามารถป้องกันคอลลาเจนชนิดที่ 2 (Type II Collagen) และโปรตีนโอไกลแคนในกระดูกอ่อนไม่ให้ถูกทำลายจาก IL-1 β กรดไฮยาลูรอนิกสามารถยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส (Collagenase), matrix metalloproteinase (MMP-1 MMP-3 และ MMP-13) และสโตรเมไลซิน 1 (Stromelysin) ทำให้ชะลอการเกิดข้อเสื่อม นอกจากนี้มีงานวิจัยจำนวนมากรายงานว่า กรดไฮยาลูรอนิกสามารถยับยั้งตัวกลางที่ทำให้เกิดการอักเสบ (inflammatory mediators) เช่น โพรสตาแกรดิน (Prostaglandins) [42-45] มีข้อมูล และงานวิจัยจำนวนมากที่รายงานความสำเร็จของการใช้กรดไฮยาลูรอนิกในการรักษาข้อเสื่อมทั้งในสัตว์ทดลองและในผู้ป่วยจริง ในปี 2014 นที เตชะอาภรณ์กุล และคณะ [46] ได้ทำการ ทดสอบประสิทธิภาพของกรดไฮยาลูรอนิกในการรักษาภาวะข้อเข่าเสื่อมในสุนัขที่เข้ารับ การผ่าตัดเอ็นไขว้หน้าหัวเข่าขาดจำนวน 16 ตัว โดยแบ่งการทดสอบออกเป็น 2 กลุ่ม คือ สุนัขกลุ่มที่ได้รับกรดไฮยาลูรอนิกปริมาตร 2 มิลลิลิตร (Hyalgan® น้ำหนักโมเลกุล 500-730 กิโลดาลตัน ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เข้าทางข้อเข่า และอีกกลุ่มเป็นสุนัขกลุ่มควบคุม และให้คะแนนการกะเผลกของขา การลงน้ำหนักขา ภาพถ่ายทางรังสีวิทยา และระดับตัวชี้วัดทางชีวภาพ WF6 ในประเมินผลการศึกษา ผลการศึกษาพบว่าสุนัขกลุ่มที่ได้รับ กรดไฮยาลูรอนิกมีคะแนนการกะเผลกของขา และการลงน้ำหนักขาดีกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการประเมินด้านอื่นๆ ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ตลอดระยะเวลาการศึกษาใน 8 สัปดาห์

ในปี 2006 Sun และคณะ [47] ได้ทำการศึกษาการฉีดรักษาโรคข้อเสื่อมด้วย กรดไฮยาลูรอนิกในผู้ป่วยที่มีอาการโรคข้อเสื่อมมาไม่น้อยกว่า 6 เดือน โดยฉีดรักษาด้วย กรดไฮยาลูรอนิกที่สกัดมาจากหงอนไก่ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 6.2×10^5 ถึง 11.7×10^5 ดาลตัน มีความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมใน 2.5 มิลลิลิตรของ phosphate buffer saline ทำ การฉีด 1 ครั้งต่อสัปดาห์เป็นเวลา 5 สัปดาห์ จากนั้นประเมินความรุนแรงของโรคด้วย ภาพถ่ายรังสีตามเกณฑ์ Kellgren-Lawrence ที่ระดับ 1 และ 2 พบว่าการฉีดรักษาด้วย กรดไฮยาลูรอนิกมีศักยภาพบรรเทาปวดและทำให้การทำงานของข้อเข่าผู้ป่วยดีขึ้น

ปี 2013 Verdera และคณะ [48] ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพและ ความปลอดภัยของการฉีดรักษากรดไฮยาลูรอนิคร่วมกับการใส่ mannitol ในการรักษาโรคข้อเสื่อมในผู้ป่วย mannitol เป็นสารที่สามารถต้านอนุมูลอิสระและช่วยให้สายโซ่ของกรดไฮยาลูรอนิคมีความเสถียร ทำให้กรดไฮยาลูรอนิคอยู่ในข้อเข่าได้นานขึ้น ในงานวิจัยผู้วิจัยนี้ ได้ทำการฉีดกรดไฮยาลูรอนิคที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1.8×10^6 ดาลตัน ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ mannitol ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่บริเวณข้อเข่าของผู้ป่วยจำนวน 1 ครั้ง จากนั้นติดตามผลด้วยมาตรวัดความเจ็บปวด (visual analogue scale; VAS) เป็นเวลา 6 เดือน พบว่าการรักษาสามารถบรรเทาอาการปวดและทำให้การทำงานของข้อเข่าดีขึ้นได้นานถึง 6 เดือน โดยไม่พบผลข้างเคียงอื่นนอกจากการบวมแดงเล็กน้อยบริเวณที่ฉีดรักษา

2.3 ชาเขียว (Green tea)

ชาเขียวจัดเป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่มีการนำมาทำเป็นเครื่องดื่มและเป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์อื่น ๆ มากมาย ซึ่งได้รับความนิยมอย่างมากในปัจจุบันและมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ชาเขียวผลิตมาจากใบของชา *Camellia sinensis* เช่นเดียวกับชาอู่หลง ชาดำ เพียงแต่กระบวนการผลิตแตกต่างกัน ชาเขียวได้มาจากใบชาที่ไม่ผ่านการหมักและการให้ความร้อน ในขณะที่ชาดำได้มาจากใบชาที่ผ่านการหมัก ชาอู่หลงได้มาจากใบชาที่ผ่านกระบวนการหมักเพียงบางส่วน

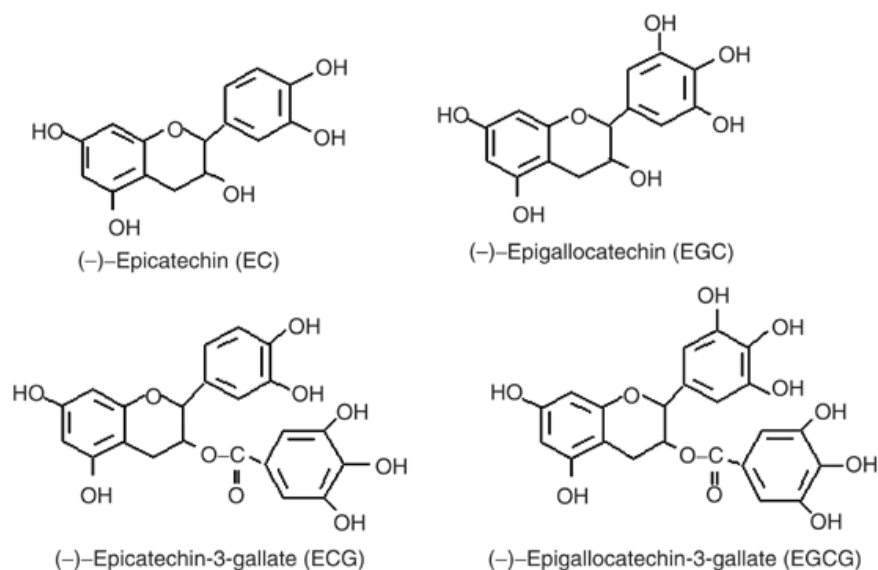
2.3.1 ส่วนประกอบและโครงสร้างทางเคมี

ชาเขียวประกอบไปด้วยสารอาหารและแร่ธาตุจำนวนมาก ไม่ว่าจะเป็นโปรตีน กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต และสารต่างๆอีกมากมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประกอบในกลุ่มฟีนอล (Phenolic compounds) ที่พบในปริมาณมาก ตารางที่ 2.4 แสดงส่วนประกอบสารอาหารและแร่ธาตุที่พบในชาเขียว

ตารางที่ 2.4 ส่วนประกอบสารอาหารและแร่ธาตุที่พบในชาเขียว [49]

สารอาหารและแร่ธาตุ	ร้อยละต่อน้ำหนักแห้ง
โปรตีน	15
กรดอะมิโน	4
เส้นใย	26
คาร์โบไฮเดรต	7
ไขมัน	7
รงควัตถุ	2
แร่ธาตุ	5
สารประกอบฟีนอล	30

สารประกอบโพลีฟีนอล (Polyphenol) กลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavanols) ที่พบมากในชาเขียว เป็นกลุ่ม คาเทชิน (Catechin) ซึ่งมีสารสำคัญได้แก่ (-)-epicatechin 6.4 เปอร์เซ็นต์ (-)-epigallocatechin 19 เปอร์เซ็นต์ (-)-epicatechin-3-gallate 13.6 เปอร์เซ็นต์ และ (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) 59 เปอร์เซ็นต์ โดยทั่วไปสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์จะมีโครงสร้างพื้นฐานเป็นฟีนิลเบนโซไพโรน (Benzopyrones) โดยมีวงแหวนเบนซีน (benzene ring) 2 วงเชื่อมต่อกับวงแหวนไพแรน (heterocyclic pyran ring) 1 วง และมีอะตอมของคาร์บอน 15 ตัวเป็นองค์ประกอบ ($C_6-C_3-C_6$) สารในกลุ่มคาเทชินจะแตกต่างกับสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่จำนวนหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group) และการมีหมู่ gallate เพิ่มขึ้นในโครงสร้าง ดังแสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 โครงสร้างสารโพลีฟีนอลในสารสกัดชาเขียว

(http://www.nature.com/onc/journal/v25/n13/fig_tab/1209227f1.html)

(-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) จัดเป็นสารที่พบมากที่สุดในการบรรดาสารในกลุ่มคาเทชินในชาเขียว สาร EGCG มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) สูงมาก เนื่องมาจากการมีหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group) ในโครงสร้างเป็นจำนวนมาก และมีหมู่ gallate เชื่อมตำแหน่งที่ 3 ของวงแหวนซี สมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสาร EGCG นี้สูงกว่าวิตามินซี และวิตามินอีถึง 25 – 100 เท่า [50] สมบัติทางเคมีและทางกายภาพอื่นๆของสาร EGCG แสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 สมบัติทางเคมีและทางกายภาพของสาร EGCG

สูตรโครงสร้าง	$C_{22}H_{18}O_{11}$
มวลโมเลกุล	458.4 กรัมต่อโมล
จุดหลอมเหลว	218 °C
สมบัติการละลาย	ละลายในน้ำ (ใส ไม่มีสี) เมื่อละลายที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ละลายได้ในอะซิโตน เอทานอล เมทานอล ไพรีดีน และเตตระไฮโดรฟลูออลน
ลักษณะของสารสกัด	เมื่ออยู่ในรูปแบบบริสุทธิ์ ไม่มีกลิ่น ลักษณะเป็นผงแป้งมีสีขาว สีมชมพูอ่อนหรือสีครีม และอาจเป็นผลึก

2.3.2 การออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร EGCG

2.3.2.1 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Anti-oxidation)

อนุมูลอิสระ (Free radical) เป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี จึงมีผลต่อการทำลายโมเลกุลอื่นๆในร่างกาย และนำมาสู่ซึ่งการเกิดโรค สาร EGCG สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ โดยสามารถดักจับอนุมูลเพอร์ออกซิล (Peroxyl Radical) และยับยั้งการทำลายผนังของเซลล์ในร่างกาย จากกระบวนการเพอรอกซิเดชันไขมัน (Lipid peroxidation) [51, 52]

2.3.2.2 ฤทธิ์ในการป้องกันและยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Prevention of cancer)

มีการศึกษาผลของสาร EGCG ต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ไม่ว่าจะเป็น มะเร็งต่อมลูกหมาก (Prostate cancer) มะเร็งเต้านม (Breast cancer) มะเร็งกระเพาะอาหาร (Gastric cancer) ฯลฯ พบว่าสาร EGCG สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งได้ [53-55] นอกจากนี้สาร EGCG ยังมีบทบาทในการยับยั้งการสร้างเส้นเลือด (anti-angiogenesis) ไม่ให้ไปเลี้ยงเซลล์มะเร็งอีกด้วย [56]

2.3.2.3 ฤทธิ์ในการป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจ (Cardiovascular diseases)

โรคหลอดเลือดหัวใจเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับการอุดตันของไขมันในหลอดเลือด ในปี 2013 งานวิจัย Kim และคณะ [57] ได้แสดงให้เห็นว่า สาร EGCG สามารถกระตุ้นเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด ให้ปกป้องตัวเองจากภาวะเครียด (stressful condition) และลดการสะสมของไขมันในหลอดเลือด

2.3.2.4 ฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบ (Anti-inflammation)

การอักเสบในร่างกายของคนเราเกิดจากไซโตไคน์ เช่น $IL-\beta$ และ $TNF-\alpha$ ไปกระตุ้นให้มีกระบวนการสร้างสารที่ทำให้เกิดการอักเสบ เช่น ไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide; No) โปสทาแกรดิน ผ่านการแสดงออกของเอนไซม์อินดิวิเบิลไนตริกออกไซด์ซินเทส (Indicible Nitric oxide syntase; iNOS) COX-2 และ Microsomal PGE syntase-1 (mPGES-1) ที่เซลล์เป้าหมาย มีการศึกษาผลของสาร EGCG ต่อการอักเสบในข้อเสื่อมของสัตว์ทดลอง

พบว่าสาร EGCG สามารถลดระดับการแสดงออกของ IL-1 β และตัวกลางที่ทำให้เกิดการอักเสบได้ [58-60]

2.3.2.5 ฤทธิ์ในการต้านไวรัส และแบคทีเรีย (Anti-virus and Anti-bacteria)

มีงานวิจัยที่รายงานว่าสาร EGCG มีประสิทธิภาพในการต้านไวรัสในกลุ่ม Retroviridae Orthomyxoviridae และ Flaviviridae ซึ่งก่อให้เกิดโรคในคน โดยกลไกการเข้าไปแย่งจับเซลล์เป้าหมายของไวรัส [61]

2.3.3 การประยุกต์ใช้และกลไกของสาร EGCG ในการรักษาโรคข้อเสื่อม

ในปี 2010 Ahmed [62] ได้ทบทวนงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้ของสาร EGCG ต่อการรักษาโรคข้อเสื่อมทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและในระดับสัตว์ทดลอง และได้สรุปกลไกของสาร EGCG ในการรักษาโรคข้อเสื่อม (ตารางที่ 2.6) ดังต่อไปนี้

2.3.3.1 ปกป้องกระดูกอ่อน และเซลล์กระดูกอ่อน (Cartilage/chondrocyte protection)

สาร EGCG สามารถยับยั้งการทำงานของ IL-1 β ที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของ COX-2 ไนตริกออกไซด์ซินเทส-2 และ สารโพสทาเกรดิน ในเซลล์กระดูกอ่อน และสามารถยับยั้งการสลายของกระดูกอ่อน (cartilage resorption) ในโรคข้อเสื่อมได้ ในปี 2014 Leong และคณะ [63] ได้ทำการทดลองฉีดสาร EGCG เข้าทางช่องท้องของหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เป็นโรคข้อเสื่อม และทำการประเมินผลทางพยาธิวิทยาหลังจากการฉีดรักษาเป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ พบว่าเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนบริเวณข้อของหนูที่ได้รับสาร EGCG ถูกทำลายน้อยกว่าเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนบริเวณข้อของหนูที่ไม่ได้รับสาร EGCG และเมื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Real time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) พบว่าสาร EGCG สามารถลดระดับการแสดงออกของยีน MMP-1 MMP-3 MMP-8 MMP-13 Adamts15 IL-1 β และ TNF- α ซึ่งเป็นยีนที่สำคัญในการแสดงออกถึงการอักเสบ สาร EGCG จึงสามารถบรรเทาอาการปวดและช่วยชะลอการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนที่ข้อได้

2.3.3.2 ควบคุมกิจกรรมการทำงานของเซลล์กระดูก (Bone-preserving activity)

EGCG จะยับยั้งเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) ไม่ให้เปลี่ยนเป็นเซลล์สลายกระดูก (osteoclast) ซึ่งเป็นเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการทำให้กระดูกเปลี่ยนรูป (bone remodeling) และการเกิดกระดูกแข็งแทนที่จากการถูกกำจัดเนื้อกระดูก (bone matrix) การงอกและการสลายกระดูกเกี่ยวข้องกับไซโตไคน์ และโมเลกุล Receptor activator of nuclear factor-B ligand (RANKL) ซึ่ง RANKL นี้จะเหนี่ยวนำ Nuclear factor of activated T cell c1 (NF-ATc1) ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์กระดูกไปเป็นเซลล์สลายกระดูก สาร EGCG สามารถลดการทำงานของ NF-ATc1 [64] จึงยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์สลายกระดูก และชะลอการเข้าสู่ภาวะข้อเสื่อมได้ [60]

ในปี 2010 Lee และคณะ [65] ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสาร EGCG ว่ามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์สลายกระดูก (osteoclast) และกลไกของโมเลกุลที่เกิดขึ้น โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ osteoclast ที่สกัดได้มาจากไขกระดูกหนูภายใต้สภาวะที่มี RANKL และ Macrophage colony-stimulating factor ร่วมกับสาร EGCG จากผลการศึกษาพบว่าสาร EGCG สามารถยับยั้งไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปเป็นเซลล์สลายกระดูก (osteoclast differentiation) โดยกลไกการยับยั้ง RANKL ไม่ให้กระตุ้น JNK/c-Jun และ NF-kappaB จึงเป็นผลให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของ c-Fos และ NFATc1 ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นในการถอดรหัส (transcription factor) ที่จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปเป็นเซลล์สลายกระดูก

2.3.3.3 กำหนดและควบคุมการทำงานของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในไขข้อ (synovial fibroblast)

บริเวณช่องว่างภายในข้อต่อจะมีเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในไขข้ออยู่รอบๆ ทำหน้าที่หลั่งน้ำไขข้อ (Synovial fluids) เข้าสู่ช่องว่าง เพื่อหล่อลื่นข้อต่อเวลาเคลื่อนไหว และควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน (immunomodulatory) แต่เมื่อเข้าสู่ภาวะข้อเสื่อม เซลล์ไฟโบรบลาสต์ในไขข้อ จะแบ่งตัวเร็วกว่าปกติ (Hyperproliferative) และหลั่งสารที่ทำให้เกิดการอักเสบ สารเหล่านี้ทำให้เกิดการสร้างเส้นเลือดใหม่ และทำลายกระดูก นอกจากนี้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ในไขข้อที่ข้อเสื่อมจะหลั่งเอนไซม์ที่ย่อยสลายเมทริกซ์กระดูกอ่อน เช่น MMPs ADAMTS และ

cathepsin [62] สาร EGCG สามารถยับยั้งการหลั่ง IL-1 β เซลล์ไฟโบรบลาสต์ในไขข้อที่จะไปเป็นตัวเหนี่ยวนำ MMP-1 MMP-2 และ MMP-13 ได้ [14, 62, 66]

ในปี 2006 Ahmed และคณะ [13] ได้ศึกษาอิทธิพลของสาร EGCG ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์พบว่า EGCG ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์และสามารถยับยั้งการหลั่ง IL-1 β จากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้ ซึ่งจะมีผลไปยับยั้งการแสดงออกของ epithelial neutrophil-activating peptide 78 (ENA-78) RANTES growth-regulated oncogene- α (GRO- α) โดยที่สาร EGCG ไปปิดกระบวนการ phosphorylation ของ PKC- α และยับยั้งการเคลื่อนย้ายผ่านนิวเคลียสของ NF-kB



ตารางที่ 2.6 สรุปงานวิจัยที่รายงานการใช้สาร EGCG ในโมเดลการรักษาโรคข้อเสื่อม

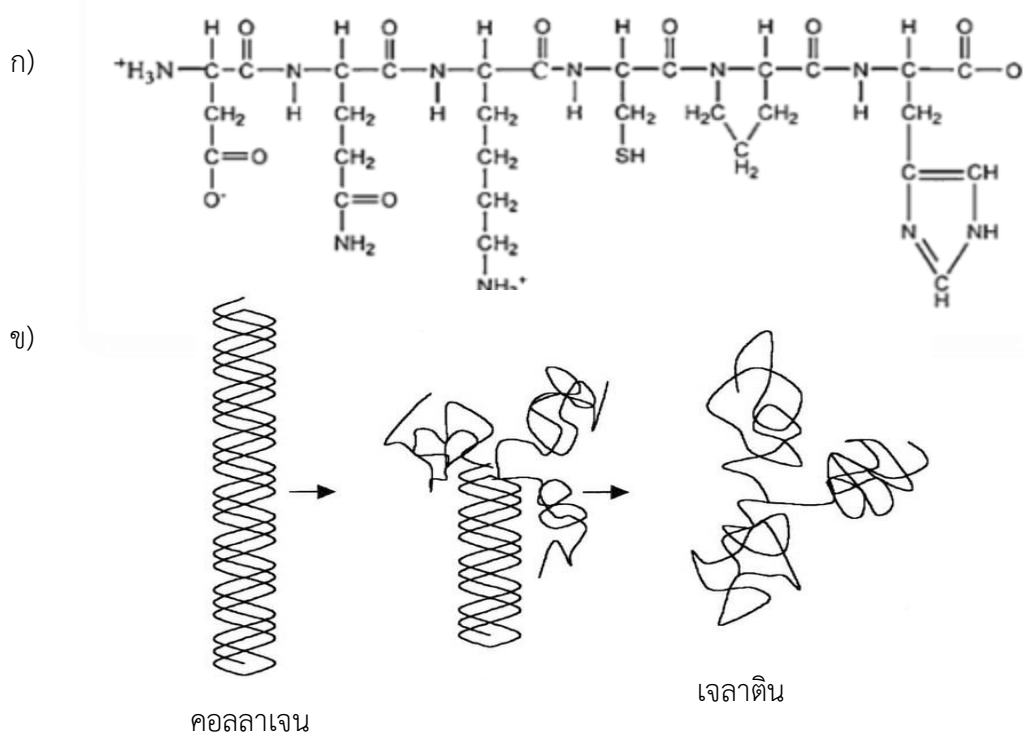
วิธีการให้สาร EGCG (route of administration)	ขนาดของสาร EGCG ที่ให้ (dose)	โมเดลการทดลอง (model)	ผลการทดลอง	อ้างอิง
เติมสาร EGCG ในอาหารเลี้ยงเซลล์	100 μ M	OA Human chondrocytes	Human chondrocyte มีการหลั่ง Nitric oxide ซึ่งเป็นตัวทำลายกระดูกอ่อนน้อยลง	[59].
เติมสาร EGCG ในอาหารเลี้ยงเซลล์	20, 50 และ 100 μ M	OA Human chondrocytes	สาร EGCG ที่ความเข้มข้น 100 μ M สามารถยับยั้ง IL-1 β ไม่ให้ชักนำให้เกิด MMP-1 และ MMP-3	[67]
เติมสาร EGCG ในอาหารเลี้ยงเซลล์	10-60 μ M	RA synovial fibroblast	สาร EGCG ที่ความเข้มข้น 10 และ 20 μ M ยับยั้ง IL-1 β ไม่ให้เกิด ENA-78, RANTES และ GRO α ในขณะที่ความเข้มข้น 50 μ M สามารถยับยั้งไม่ให้เกิดสารที่ทำให้เกิดการอักเสบที่มาจากการสร้างของ MCP-3	[13]
เติมสาร EGCG ในอาหารเลี้ยงเซลล์	10, 50 และ 100 μ M	OA Human chondrocytes	สาร EGCG ที่ความเข้มข้น 20 และ 100 μ M สามารถยับยั้ง IL-1 β	[68]
การฉีดเข้าช่องท้อง	25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัวหนู	หนู Mice เพศผู้ (อายุ 5-6 เดือน)	หนูที่เป็นข้อเสื่อมเมื่อได้รับสาร EGCG มีอาการปวดข้อลดลง โดยดูจากพฤติกรรมเคลื่อนไหวของหนู และลดการแสดงออกของไซโตไคน์ IL-1 β และ TNF- α	[63]

2.4. เจลาติน (Gelatin)

เจลาตินเป็นโปรตีนที่ได้มาจากการบวนการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ของคอลลาเจน (collagen) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในผิวหนัง กระดูก และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ของสิ่งมีชีวิต [69] สมบัติของเจลาตินขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของคอลลาเจนและการกระบวนการไฮโดรไลซิส

2.4.1 ส่วนประกอบและโครงสร้างทางเคมี

เจลาตินประกอบด้วยกรดอะมิโน 19 ชนิด โดยมีสัดส่วนของกรดอะมิโนแตกต่างกันตามแหล่งที่มา ดังแสดงในตารางที่ 2.7 กรดอะมิโนที่พบเป็นส่วนใหญ่คือ ไกลซีน (Glycine; Gly) โพลีน (Proline) และไฮดรอกซีโพลีน (Hydroxyproline) โดยมีการเรียงตัวเป็นหน่วยซ้ำๆ ในรูปแบบ Gly-X-Y ภายในสายโซ่ โดยที่ Gly คือไกลซีน X และ Y คือ กรดอะมิโนตัวอื่นๆ ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็น โพลีน และไฮดรอกซีโพลีน กรดอะมิโนเหล่านี้เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ (peptide bonds) เจลาตินมีรูปร่างโครงสร้างทุติยภูมิแบบเกลียวสุ่ม (random coil) [70, 71] ดังแสดงในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 โครงสร้างโมเลกุลของเจลาติน ก) โครงสร้างปฐมภูมิ [72] และ ข) โครงสร้างทุติยภูมิแบบเกลียวสุ่มหลังจากกระบวนการไฮโดรไลซ์คอลลาเจน (https://www.manuscript-cultures.uni-hamburg.de/lab_case_19_e.html)

ตารางที่ 2.7 ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของเจลาตินที่สกัดได้จากผิวหนังหมู และผิวหนังวัว [73]

กรดอะมิโน	เจลาตินที่สกัดได้จากผิวหนังหมู (หน่วยต่อ 1000 หน่วยของทั้งหมด)	เจลาตินที่สกัดได้จากผิวหนังวัว (หน่วยต่อ 1000 หน่วยของทั้งหมด)
Nonpolar hydrophobic		
Alanine	80	33
Valine	26	10
Leucine	29	12
Isoleucine	12	7
Phenylalanine	27	10
Methionine	10	4
Proline	151	63
Total	335	139
Polar uncharged		
Glycine	239	108
Serine	35	15
Threonine	26	10
Tyrosine	7	2
Total	307	135
Polar acidic		
Aspartic acid	41	17
Glutamic acid	83	34
Total	124	51
Polar basic		
Lysine	24	11
Arginine	111	47
Histidine	Not detected	Not detected
Total	138	58

2.4.2 แหล่งที่มา

เจลาตินผลิตจากคอลลาเจนที่ได้มาจากหลากหลายแหล่งของสิ่งมีชีวิต ซึ่งสามารถสรุปได้ดังนี้ [74]

2.4.2.1 เจลาตินจากสัตว์ใหญ่

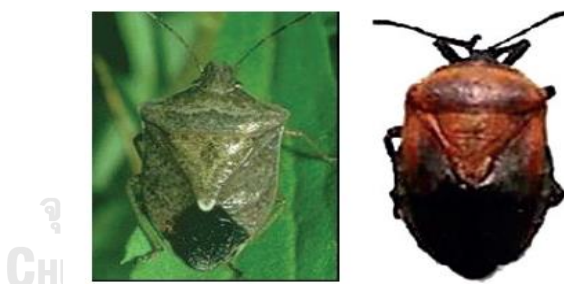
เจลาตินที่สกัดจากคอลลาเจนของสัตว์ใหญ่ เช่น หมู หรือวัว มักจะได้อาจมาจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและกระดูก

2.4.2.2 เจลาตินจากปลา

เจลาตินที่สกัดจากคอลลาเจนส่วนผิวหนังและกระดูกของปลา เป็นเจลาตินที่เป็นทางเลือกสำหรับชาวมุสลิมซึ่งรับประทานอาหารฮาลาล

2.4.2.3 เจลาตินจากแมลง

เจลาตินจากแมลงจำพวก *Aspongopus viduatus* (melon bug) และ *Agonoscelis pubescens* (sorghum bug) ที่พบในประเทศชูดาน ดังแสดงในรูปที่ 2.6 จัดเป็นเจลาตินอีกหนึ่งทางเลือกของชาวมุสลิม



รูปที่ 2.6 sorghum bug (ซ้าย) และ melon bug (ขวา) [74]

2.4.3 ชนิดของเจลาติน

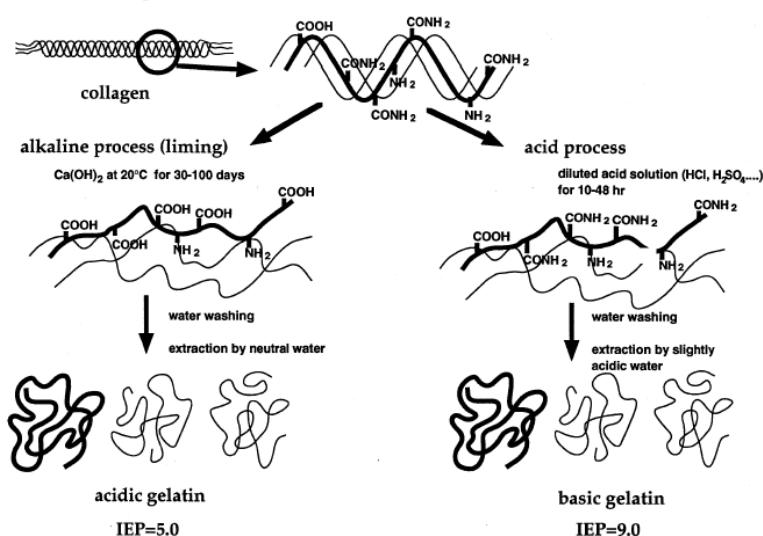
เจลาตินแบ่งตามกระบวนการผลิตและแหล่งที่มาได้ 2 ชนิดคือเจลาตินชนิดเอ และเจลาตินชนิดบี ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้ [75, 76]

2.4.3.1 เจลาตินชนิดเอ (Type A gelatin, GA)

เป็นเจลาตินที่ได้มาจากกระบวนการไฮโดรไลซ์คอลลาเจนที่ได้มาจากผิวหนังหมูด้วยกรด (acidic process) เช่น กรดไฮโดรคลอริก กรดซัลฟูริก เป็นต้น ซึ่งวิธีนี้ไม่ค่อยทำให้เกิดการสลายหมู่เอไมด์ (amide group) ในสายโซ่คอลลาเจน ทำให้เจลาตินชนิดเอนี้มีประจุบวกจากหมู่เอไมด์ และมีค่าไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric point) ใกล้เคียงกับคอลลาเจน คือ ประมาณ 7-9 (รูปที่ 2.7)

2.4.3.2 เจลาตินชนิดบี (Type B gelatin, GB)

เป็นเจลาตินที่ได้มาจากกระบวนการไฮโดรไลซ์คอลลาเจนที่ได้มาจากผิวหนังและกระดูกวัวด้วยด่าง (alkaline process) เช่น แคลเซียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น โดยด่างจะสลายหมู่เอไมด์ของกรดอะมิโนแอสพาราจีน (Asparagine) และกลูตามีน (glutamine) ในสายโซ่คอลลาเจน ให้เป็นหมู่คาร์บอกซิลิก (Carboxylic group) และเปลี่ยนกรดอะมิโนทั้งสองชนิดเป็นแอสพาราเตท และกลูตาเมท ทำให้เจลาตินชนิดบีมีประจุลบมากขึ้น และมีค่าไอโซอิเล็กทริกอยู่ในช่วง 4.6-5.4 (รูปที่ 2.7)



รูปที่ 2.7 กระบวนการผลิตเจลาตินชนิดบี (ซ้าย) และเจลาตินชนิดเอ (ขวา) [77]

2.4.4 สมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของเจลาติน [78, 79]

2.4.4.1 ลักษณะทางกายภาพ

เจลาตินเป็นสารไม่มีสีและไม่มีกลิ่น มีลักษณะเป็นเม็ดใส มีความแข็งเปราะ

2.4.4.2 สมบัติการบวมน้ำ

เมื่อนำเม็ดเจลาตินไปแช่ในน้ำ เม็ดเจลาตินสามารถอุ้มน้ำ (Hydrate) ได้มากถึง 5-10 เท่าของน้ำหนักแห้งเริ่มต้น

2.4.4.3 การละลาย (Solubility)

เจลาตินสามารถละลายได้ในน้ำ สารละลายที่มีขี้ มีพันธะไฮโดรเจน สารละลายอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติก (acetic acid) ไตรฟลูออโรเอทานอล (trifluoroethanol) ฟอร์มาไมด์ (formamide) แต่ละลายได้น้อยเมื่ออยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ไม่มีขี้ เช่น เบนซีน (benzene) อะซิโตน (acetone) แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ (primary alcohol) และไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (dimethylformamide) นอกจากนี้การละลายของเจลาตินยังขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-เบส ความเข้มข้น

2.4.4.4 การเกิดเจล (Gelation)

เจลาตินสามารถเกิดเจลได้ที่อุณหภูมิห้องหรือต่ำกว่าอุณหภูมิห้อง โดยเกิดจากกระบวนการเรียงชิดติดกันของพันธะภายในสายโซ่แบบไม่จำเพาะ ซึ่งอาจเป็นพันธะแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) หรือพันธะไฮโดรเจน อัตราเร็วในการเกิดเจลและความแข็งของเจลขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายเจลาติน

2.4.4.5 การผันกลับได้ตามอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลง (Thermo-reversibility)

เจลาตินในสภาวะเจลสามารถกลับสู่สภาวะของเหลวได้เมื่อได้รับความร้อน โดยความร้อนจะเป็นตัวเข้าไปทำลายพันธะที่ทำให้เส้นใยเรียงชิดติดกันภายในสายโซ่ ในทางกลับกัน สารละลายเจลาตินสามารถสร้างพันธะใหม่เกิดเป็นเจลได้อีกครั้งเมื่อลดอุณหภูมิ

2.4.4.6 ความหนืดของสารละลายเจลาติน (Viscosity and gel strength)

ความหนืดของเจลาตินที่อยู่ในรูปสารละลาย ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเจลาติน อุณหภูมิ น้ำหนักโมเลกุลของเจลาติน ความเป็นกรด-ด่าง สารที่เพิ่มเติมเข้าไปเพื่อปรับสภาพ สารละลายเจลาตินจะมีความหนืดต่ำเมื่อความเข้มข้นและน้ำหนักโมเลกุลน้อยและอุณหภูมิสูง

2.4.4.7 การ ย่อยสลาย (Degradation)

เจลาตินสามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ในภาวะที่มีเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน เช่น คอลลาจีเนส โปรตีเอส หรือสภาวะที่เป็นกรด-ด่าง หรือมีจุลินทรีย์

2.4.4.8 ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility)

เจลาตินมีความเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อร่างกาย ไม่ก่อให้เกิดอาการแพ้ ไม่มีการต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย นอกจากนี้ยังสามารถกระตุ้นกิจกรรมต่างๆ เช่น การยึดเกาะ การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์บางชนิดได้ดี

2.4.5 การ ประยุกต์ใช้งานทางการแพทย์

เจลาตินเป็นวัสดุที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง และผ่านการรับรองจากองค์การอาหารและยา (United States Food and Drug Administration; FDA) ว่าจัดเป็นสารในกลุ่มที่พิจารณาแล้วว่าสามารถใช้ได้อย่างปลอดภัย (Generally Recognized as safe; GRAS) [76, 80] ผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ที่ผลิตจากเจลาตินที่มีการใช้งานทางการแพทย์ในปัจจุบัน ได้แก่ Gelfoam® เป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบฟองน้ำ (sponge) ใช้สำหรับห้ามเลือดในการผ่าตัด Gelfilm® แผ่นฟิล์มที่ใช้ในการผ่าตัดเส้นประสาท ผ่าตัดทรวงอกและผ่าตัดตา Cultispher-G® เป็นผลิตภัณฑ์ทรงกลมขนาดเล็กที่สำหรับใช้ในงานเลี้ยงเซลล์ (microcarrier cell culture) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอีกเป็นจำนวนมากที่พัฒนาเจลาตินมาประยุกต์ในงานทางการแพทย์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.5. ระบบนำส่งยา (Drug delivery system)

2.5.1 คำจำกัดความ

ระบบนำส่งยา (Drug delivery system) หมายถึง รูปแบบหรือกลไกที่สามารถนำยาเข้าไปในร่างกายโดยมีการควบคุมอัตราการปลดปล่อยยา ระยะเวลา และบริเวณที่ให้อาหารในร่างกาย ทำให้อาหารมีประสิทธิภาพในการรักษาและมีความปลอดภัยมากขึ้น

2.5.2 วิธีการนำส่งยา (Drug delivery route)

การนำยาเข้าสู่ร่างกายสามารถทำได้หลายทาง ซึ่งขึ้นอยู่กับว่าต้องการให้ยาไปมีผลต่อระบบหรืออวัยวะใดในร่างกาย และขึ้นอยู่กับรูปแบบของยาว่าสามารถนำเข้าไปได้ในทางใด วิธีการให้ยา

รูปแบบต่างๆ สามารถจำแนกเป็นระบบได้ดังนี้ [81]

ก. การให้ยาทางระบบทางเดินอาหาร (Gastrointestinal system)

- ทางปาก (oral)
- ทางทวารหนัก (Rectal)

ข. การให้ยาทางระบบไหลเวียนโลหิต (Parenteral)

- การฉีดยาผ่านทางผิวหนัง (Subcutaneous injection)
- การฉีดยาผ่านทางกล้ามเนื้อ (Intramuscular injection)
- การฉีดยาผ่านทางเส้นเลือดดำ (Intravenous injection)
- การฉีดยาผ่านทางเส้นเลือดแดง (Intra-arterial injection)
- การฉีดยาผ่านทางข้อเข่า (Intra-articular system)

ค. การให้ยาทางระบบเยื่อเมือก (Transmucosal)

ง. การให้ยาทางระบบทางเดินหายใจ (Pulmonary, inhalation) และ การให้ยาทางจมูก (Transnasal)

จ. การให้ยาทางผิวหนัง (Transdermal drug delivery)

ฉ. การให้ยาทางไขกระดูก (Intra-osseous infusion)

2.5.3 ตัวนำพา (drug carrier)

ปัจจุบันรูปแบบการให้ยาแก่ผู้ป่วยมักจะมีอยู่ในรูปของผลิตภัณฑ์ยาเม็ด ยาแคปซูล ยาน้ำ ยาพ่นครีม และอื่นๆอีกมากมาย อย่างไรก็ตามการให้ยาในรูปแบบดังกล่าวมีข้อจำกัดในด้านการออกฤทธิ์ของยาในร่างกาย ที่ให้ชีวปริมาณการออกฤทธิ์ของยาดำ และมักมีผลข้างเคียงต่ออวัยวะอื่นที่ไม่ใช่อวัยวะเป้าหมาย เกิดการสะสมพิษของยาที่ตับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อได้รับยาต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน

ระบบนำส่งยาประกอบด้วยตัวนำพา (carrier) ที่สามารถกักเก็บและควบคุมการปลดปล่อยยาให้มีความเข้มข้นของยาให้อยู่ในช่วงที่ต้องการในการรักษา เพื่อลดผลข้างเคียงของยาที่เกินขนาด และสามารถควบคุมอัตราการปล่อยยาจากตัวนำพาให้คงที่หรือเนิ่นนานออกไป เพื่อลดความถี่ในการให้ยา นอกจากนี้ตัวนำพียบางชนิดสามารถนำส่งยาไปยังอวัยวะเป้าหมายได้โดยตรง จึงช่วยลดผลข้างเคียงของยาต่ออวัยวะอื่นได้ ตัวนำพาในระบบนำส่งยานิยมผลิตจากวัสดุในกลุ่ม

พอลิเมอร์ซึ่งอาจเป็นพอลิเมอร์จากธรรมชาติ หรือพอลิเมอร์สังเคราะห์ ซึ่งมีคุณสมบัติเข้ากันได้ทางชีวภาพกับร่างกาย ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และสามารถย่อยสลายในร่างกายได้โดยไม่มีสารพิษตกค้าง ตัวนำพาาชนิดพอลิเมอร์ (polymeric carrier) มีหลายรูปแบบ ซึ่งแต่ละรูปแบบมีข้อดี และข้อจำกัดแตกต่างกัน ดังสรุปในตารางที่ 2.8 [82]

ตารางที่ 2.8 รูปแบบต่างๆของตัวนำพาาชนิดพอลิเมอร์ (polymeric carrier) และข้อดี ข้อเสีย

รูปแบบของตัวนำพาาพอลิเมอร์	ข้อดี	ข้อเสีย
ไฮโดรเจลที่ฉีดได้ (injectable hydrogel)	<ul style="list-style-type: none"> - นำส่งในรูปแบบการฉีดได้ - ผลิตและขึ้นรูปง่าย - สามารถควบคุมการปลดปล่อยยาได้ - การปลดปล่อยยาจะตอบสนองต่อค่า pH อุณหภูมิ 	<ul style="list-style-type: none"> - มีขนาดค่อนข้างใหญ่ - คุณสมบัติเชิงกลต่ำ
ลิโปโซม/ไมเซลล์ (Liposome/micelles)	<ul style="list-style-type: none"> - มีขนาดเล็ก เข้าสู่เซลล์ได้ง่าย - นำส่งในรูปแบบการฉีดได้ 	<ul style="list-style-type: none"> - ควบคุมการปลดปล่อยยาได้ยาก - เป้าหมายในการนำส่งค่อนข้างจำกัด - ความเสถียรต่ำ - ต้นทุนการผลิตสูง
อนุภาคไมครอน (Microspheres)	<ul style="list-style-type: none"> - นำส่งในรูปแบบการฉีดได้ - สามารถควบคุมการปลดปล่อยยาได้ - มีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูง ทำให้มีประสิทธิภาพในการกักเก็บยาสูง 	<ul style="list-style-type: none"> - ย่อยสลายเร็ว เนื่องจากมีขนาดเล็กและมีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูง - ต้นทุนการผลิตสูง
Implantable materials	<ul style="list-style-type: none"> - กักเก็บยาได้ปริมาณมาก - สามารถควบคุมการปลดปล่อยยาได้ - สามารถกำหนดอัตราการย่อยสลายได้ 	<ul style="list-style-type: none"> - ต้องมีการผ่าตัดเพื่อฝังในร่างกายจึงมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ

2.5.4 รูปแบบการปลดปล่อยยา

โดยทั่วไป ระบบนำส่งยาที่มีการปลดปล่อยยา แบ่งได้เป็น 3 รูปแบบ ดังแสดงในรูปที่ 2.8 [83]

1) การปลดปล่อยยาแบบทันที (immediately release)

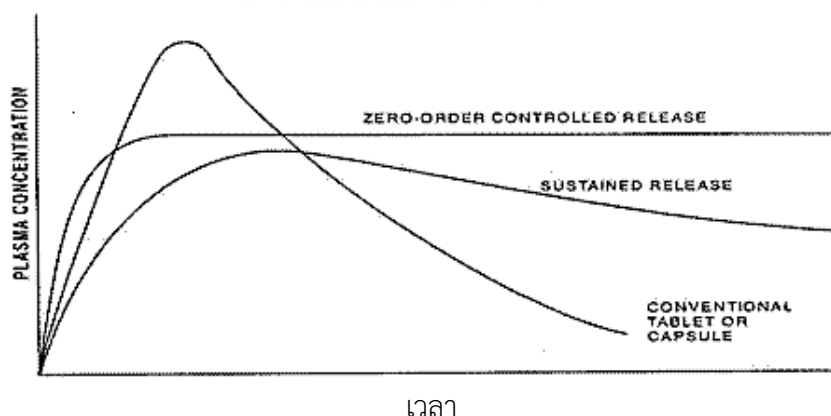
ยาจะถูกปลดปล่อยในปริมาณมาก ในระยะเวลาสั้นๆ รูปแบบนี้ทำให้ผู้ป่วยได้รับยามากเกินไปในต่อครั้งที่มีการให้ยา และต้องรับยาถี่ เนื่องจากยาสลายตัวไปอย่างรวดเร็ว

2) การปลดปล่อยยาแบบเนิ่นนาน (sustained release)

ระบบนี้สามารถควบคุมการปลดปล่อยยาในปริมาณที่เหมาะสมในช่วงเวลาที่ยาวนานกว่าระบบการปลดปล่อยยาแบบทันที ทำให้ลดความถี่ในการให้ยาและลดระดับการผันผวนของยาในกระแสเลือดได้ อย่างไรก็ตามระดับยาในกระแสเลือดในช่วงต้นของการให้ยาอาจสูงเกินช่วงที่เหมาะสมต่อการรักษา และทำให้เกิดผลข้างเคียงของยาได้

3) การปลดปล่อยยาแบบควบคุม (controlled release)

ในระบบนี้ ปริมาณยาจะถูกปลดปล่อยออกมาด้วยอัตราคงที่ และสามารถควบคุมปริมาณยาให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการรักษาเป็นระยะเวลายาวนาน ทำให้ช่วยลดความถี่ในการให้ยา และลดผลข้างเคียงของยาเกินขนาดได้



รูปที่ 2.8 รูปแบบการปลดปล่อยยาซึ่งวัดความเข้มข้นของยาที่อยู่ในพลาสมาเทียบกับเวลา

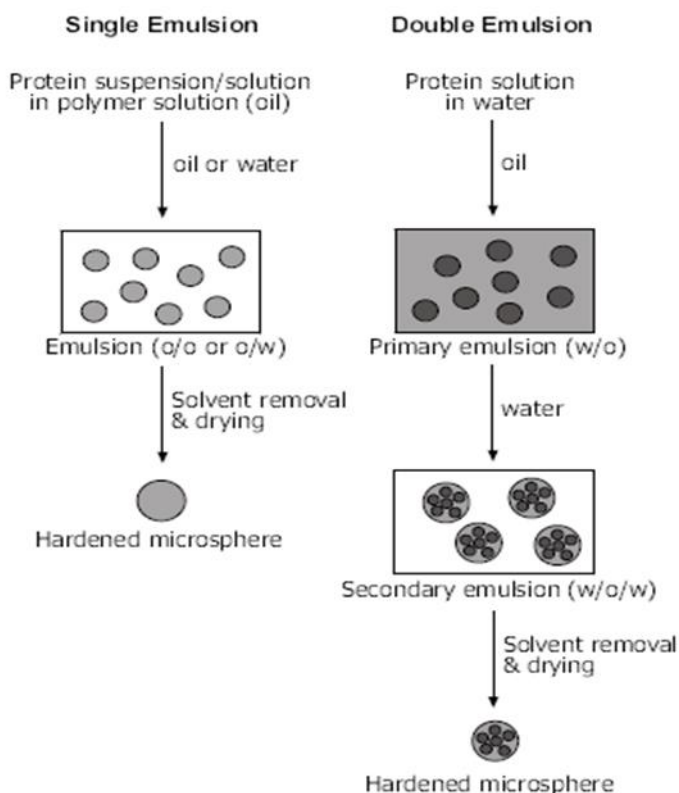
(<http://www.pharmatutor.org/articles/formulation-and-evaluation-of-enteric-coated-pellets-of-pentaprazole-sodium-by-extrusion-spheronization>)

2.5.5 ตัวนำพายาชนิดอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน (Microspheres)

อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน เป็นอนุภาคทรงกลมที่มีขนาดอยู่ในช่วง 1 – 1,000 ไมโครเมตร ผลิตได้จากทั้งพอลิเมอร์ธรรมชาติ พอลิเมอร์สังเคราะห์ เซรามิก และโลหะ อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ผลิตจากพอลิเมอร์ธรรมชาติ และพอลิเมอร์สังเคราะห์ได้รับความนิยมนำมาประยุกต์ใช้งานในงานทางการแพทย์อย่างแพร่หลายเนื่องจากมีความเข้ากันได้กับร่างกาย ย่อยสลายได้ในร่างกาย ไม่เป็นพิษ นอกจากนี้ยังสามารถนำส่งได้ด้วยการฉีดผ่านเข็มฉีดยา ซึ่งช่วยลดความจำเป็นในการผ่าตัดและลดความเสี่ยงในการติดเชื้อระหว่างผ่าตัดได้อีกด้วย อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนจึงจัดเป็นตัวนำพายาแบบรุกล้ำเพียงเล็กน้อย (minimal-invasive carrier)

2.5.5.1 การผลิตอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนด้วยเทคนิคอิมัลชัน (emulsion technique)

เทคนิคอิมัลชันเป็นหนึ่งในวิธีผลิตอนุภาคทรงกลมที่นิยมใช้แพร่หลาย เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ง่าย ต้นทุนต่ำ และสามารถผลิตอนุภาคที่มีขนาดและการกระจายตัวของขนาดสม่ำเสมอ โดยเทคนิคอิมัลชันนี้แบ่งเป็นอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (oil in water; o/w) และอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (water in oil; w/o) ซึ่งอาจเป็นแบบ single emulsion หรือ double emulsion ดังแสดงในรูปที่ 2.9 [84] ในระบบอิมัลชันประกอบด้วยวัฏภาคภายใน (dispersed phase) วัฏภาคภายนอกและมีอิมัลซิไฟเออร์ หรือสารลดแรงตึงผิว (emulsifier) เป็นตัวสร้างวัฏภาค และมีการใช้แรงกลร่วมด้วย เช่น การเขย่า (agitation) การปั่นกวน (homogenization) การใช้ความถี่สูง (sonication) เป็นต้น ขนาดและการกระจายตัวของขนาดอนุภาคทรงกลมที่ผลิตด้วยเทคนิคอิมัลชันสามารถควบคุมได้ด้วยการปรับสัดส่วนและชนิดของวัฏภาคภายในและวัฏภาคภายนอก ความเข้มข้นของอิมัลซิไฟเออร์ ความหนืดของวัฏภาค ขนาดของแรงกลที่ใช้เช่นอัตราเร็วในการปั่นกวน เป็นต้น



รูปที่ 2.9 การเตรียมอนุภาคทรงกลมแบบ single emulsion และ double emulsion

2.5.5.2 การประยุกต์ใช้ออนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในระบบนำส่งยา

มีงานวิจัยจำนวนมากรายงานถึงประสิทธิภาพของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนในการนำส่งยาไปรักษาอวัยวะเป้าหมาย โดยอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนสามารถช่วยรักษาเสถียรภาพของยา ควบคุมการปลดปล่อยยา และเพิ่มชีวปริมาณการออกฤทธิ์ของยา นอกจากนี้ยังสามารถฉีดผ่านหัวเข็มฉีดยาเพื่อนำส่งยาไปยังอวัยวะเป้าหมายโดยตรงได้ ในปัจจุบันก็มีผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ในรูปแบบของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนหลายชนิด เช่น Lupron® Nutropin® และ Depot® เป็นต้น นอกจากนี้ มีงานวิจัยที่พัฒนาระบบนำส่งยาชนิดอนุภาคขนาดไมครอนอย่างต่อเนื่อง ไม่ว่าจะเป็นการนำส่งยาเพื่อรักษาโรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคข้อเสื่อม เป็นต้น [82]

ในปี ค.ศ. 2014 Ratavanaporn และคณะ [15] ได้พัฒนาอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนจากเจลาตินผสมกับไฟโบรอินไหมไทยที่สัดส่วนต่างๆ ด้วยกระบวนการอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน อนุภาคขนาดไมโครที่ได้มีขนาด 297-367 ไมโครเมตร อนุภาคนี้ได้ถูกนำไปกักเก็บเคอร์คูมินซึ่งเป็นสารสกัดจากขมิ้นชัน และไฟเพอรินซึ่งเป็นสารสกัดจากพริกไทยดำ อนุภาคสามารถควบคุมการปลดปล่อยทั้งเคอร์คูมินและไฟเพอรินได้อย่างสม่ำเสมอตลอดระยะเวลา 14 วัน โดยกลไกการปลดปล่อยอธิบายได้ด้วยการย่อยสลายของอนุภาค อนุภาคขนาดไมโครที่ผลิตจากเจลาตินมีอัตราการย่อยสลายเร็ว จึงมีอัตราการปลดปล่อยเคอร์คูมินและไฟเพอรินเร็ว ส่วนอนุภาคที่ผลิตจากเจลาตินผสมไฟโบรอินไหมไทย มีอัตราการย่อยสลายช้าลง จึงปลดปล่อยมีอัตราการปลดปล่อยเคอร์คูมินและไฟเพอรินที่ช้าลงไปด้วย อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ปลดปล่อยเคอร์คูมินและไฟเพอรินนี้ได้มีการนำไปศึกษาเพิ่มเติมในการฉีดรักษาโรคข้อเสื่อมในหนูทดลองต่อไป

และในปี 2015 Aydin และคณะ [85] ได้พัฒนาอนุภาคขนาดไมครอนที่ผลิตจากโพลีคาร์โพลแลคโตน (polycaprolactone; PCL) ด้วยเทคนิคอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ เพื่อนำส่งยา 2 ชนิดคือ doxycycline และ chondroitin sulfate โดย doxycycline เป็นยาที่มีฤทธิ์ยับยั้ง MMPs ในขณะที่ chondroitin sulfate ช่วยกระตุ้นการสร้าง extracellular matrix ของกระดูกอ่อนผิวข้อ กลุ่มการทดลองแบ่งเป็น (1) อนุภาคที่กักเก็บ doxycycline และ (2) อนุภาคที่กักเก็บ doxycycline และ chondroitin sulfate เมื่อนำอนุภาคทั้ง 2 กลุ่มมาเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อที่สกัดจากกระดูกตายที่ถูกชักนำให้เป็นโรคข้อเสื่อม พบว่า เซลล์มีการแสดงออกของ MMP-13 ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มที่เลี้ยงในระบบที่ไม่มีอนุภาค จากนั้นได้นำอนุภาคทั้ง 2 กลุ่มไปผสมกับสารละลายกรดไฮยาลูรอนิก และนำไปฉีดเข้าข้อของกระดูกตายที่ถูกกระตุ้นให้เป็นโรคข้อเสื่อม พบว่า กลุ่มอนุภาคที่กักเก็บ doxycycline และ chondroitin sulfate ให้ผลการรักษาที่ดีทั้งในด้านผลทางภาพถ่ายรังสี การประเมินทางเนื้อเยื่อและทางกายวิภาค จึงสรุปได้ว่าการใช้อนุภาคขนาดไมครอน PCL เป็นระบบนำส่ง doxycycline และ chondroitin sulfate ร่วมกับสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกมีศักยภาพในการรักษาโรคข้อเสื่อม

2.6. การเชื่อมขวาง

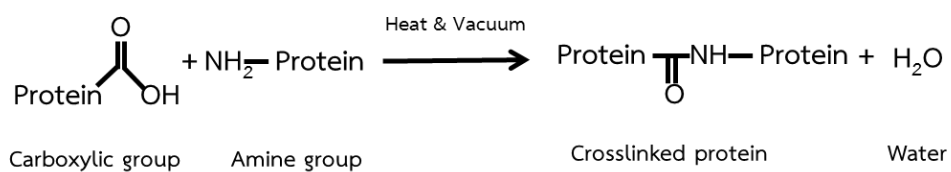
2.6.1 การเชื่อมขวางทางกายภาพด้วยความร้อน

การเชื่อมขวางทางกายภาพด้วยความร้อน (Dehydrothermal crosslinking) เป็นวิธีการใช้ด้วยความร้อน อุณหภูมิมากกว่า 98 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะสุญญากาศ ทำให้เกิดปฏิกิริยาควบแน่น (condensation) เพื่อดึงน้ำออกจากโครงสร้างโมเลกุลของพอลิเมอร์ และเกิดการเชื่อมขวางระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกกับหมู่เอมีน การเชื่อมขวางด้วยความร้อนมีข้อดีคือ ไม่ต้องใช้สารเคมีที่อาจก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ และเป็นวิธีการปลอดภัยเนื่องจากใช้อุณหภูมิที่สูงในการเชื่อมขวาง [86] แต่อย่างไรก็ตามการเชื่อมขวางด้วยวิธีดังกล่าวยังมีข้อจำกัดคือ ควบคุมการเกิดปฏิกิริยาการเชื่อมขวางได้ยากและมีระดับการเชื่อมขวางต่ำเพราะเกิดปฏิกิริยาได้เฉพาะหมู่คาร์บอกซิลิกและหมู่อะมิโนที่อยู่ใกล้กัน ทำให้คุณสมบัติทางกลไม่แข็งแรงเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเชื่อมขวางด้วยสารเคมี [86] รูปที่ 2.10 ก) แสดงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากการเชื่อมขวางโมเลกุลโปรตีนด้วยความร้อน ความร้อนจะกำจัดหมู่ไฮโดรเจน (H) และหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ออกจากโมเลกุลโปรตีน และทำให้เกิดการสร้างพันธะเอไมด์เชื่อมขวางระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิก (-COOH) กับหมู่เอมีน (-NH₂) ในขณะที่ H และ OH ที่ถูกกำจัดออกจะควบแน่นเป็นน้ำ 1 โมเลกุล [87]

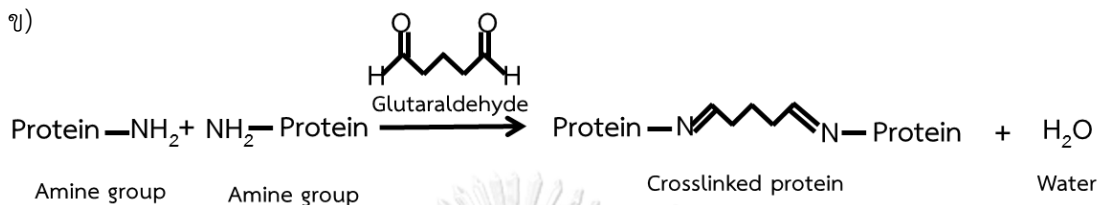
2.6.2 การเชื่อมขวางทางเคมีด้วยสารกลูตารัลดีไฮด์

การเชื่อมขวางทางเคมี ด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde) เป็นการเกิดปฏิกิริยาระหว่างหมู่แอลดีไฮด์ (-CHO) ของกลูตารัลดีไฮด์กับหมู่เอมีน (-NH₂) ของโปรตีน โดยโครงสร้างของกลูตารัลดีไฮด์ประกอบด้วยหมู่แอลดีไฮด์ 2 หมู่ อยู่ที่ปลายทั้งสองข้างของโมเลกุล ดังนั้นกลูตารัลดีไฮด์ 1 โมเลกุลจึงสามารถเชื่อมขวางเอมีนได้ 2 โมเลกุล และจะควบแน่นน้ำออกมา 1 โมเลกุล ดังแสดงในรูปที่ 2.10 ข) [88] สำหรับเจลาตินหมู่แอลดีไฮด์ของกลูตารัลดีไฮด์จะเข้าไปทำปฏิกิริยาระหว่างหมู่อะมิโนของไลซีน หมู่อะมิโนของไฮดรอกซีไลซีน และหมู่อะมิโนที่อยู่ปลายสายของโปรตีน (N-terminal amino acid) [87-89] การเชื่อมขวางด้วยวิธีนี้มีข้อดีคือ มีความเสถียรในการเชื่อมขวางวัสดุและให้ระดับการเชื่อมขวางสูง ทำให้วัสดุมีคุณสมบัติทางกลดีขึ้น ในขณะที่เดียวกันก็มีข้อจำกัดคือเมื่อใช้กลูตารัลดีไฮด์ที่มีความเข้มข้นสูง อาจก่อให้เกิดสารตกค้างในวัสดุซึ่งส่งผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ [86]

ก)



ข)



รูปที่ 2.10 ปฏิกริยาการเชื่อมขวางภายในโมเลกุลโปรตีน ก.) การเชื่อมขวางทางกายภาพด้วยความร้อน ข) การเชื่อมขวางทางเคมีด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์

บทที่ 3

วัสดุและวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและสารเคมี

- 3.1.1 เจลาตินชนิดเอ (GA, pl=9, Nitta Gelatin Inc., Japan)
- 3.1.2 เจลาตินชนิดบี (GB, pl=5, Nitta Gelatin Inc., Japan)
- 3.1.3 Epigallocatechin 3 gallate (EGCG, product code E4143, Sigma, USA)
- 3.1.4 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide HCl (EDC, product code 03450, Sigma, USA)
- 3.1.5 Ethylenediamine (product code 161869.1611, Panreac, EU)
- 3.1.6 กรดไฮโดรคลอริก (HCl, 36.5-38%, J.T. Baker, NJ, USA)
- 3.1.7 Succinic anhydride (product code 239690, Sigma, USA)
- 3.1.8 น้ำปราศจากไอออน (Deionized water)
- 3.1.9 อะซิโตน (Acetone, SR Lab, Thailand)
- 3.1.10 น้ำมันถั่วเหลือง (Soybean oil, Thanakorn Vegetable Oil Product Co., Ltd, Thailand)
- 3.1.11 2, 4, 6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS, (Nacalai Tesque, Japan)
- 3.1.12 Dimethyl Sulfoxide (DMSO, product code D/4121/PB17, Fisher Scientific, UK)
- 3.1.13 Sodium hydrogen carbonate (NaHCO₃, Ajax Finechem, Pty'Ltd, Australia)
- 3.1.14 Phosphate buffered saline (PBS, product code PD0100 ,BIO BASiC, CANADA.)
- 3.1.15 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Hyclone, USA)
- 3.1.16 Hyalovet (Fidia Farmaceutici S.p.A., Italy)
- 3.1.17 AccProtein Chrome (ENZMART BIOTECH, Thailand)

3.1.1.18 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Invitrogen, USA)

3.2 อุปกรณ์

- 3.2.1 Overhead stirrer (IKA Labortechnik, Germany)
- 3.2.2 Round bottom flask (Becthai, Thailand)
- 3.2.3 Hot plate stirrer (Cimarec 3, Thermolyne, USA)
- 3.2.4 Magnetic stirrer/Hot plate (RCT Basic, Ika labortechnik, Germany)
- 3.2.5 Sieve (Osaka IIDA Co., Ltd, Japan) ขนาด 25 75 และ 100 ไมครอน
- 3.2.6 ถุงไต่อะไลซ์ (MWCO 12,000-16,000, Vikase Company Inc., Japan)
- 3.2.7 ตู้เย็น 4oC (NR-BU343, Panasonic, Thailand)
- 3.2.8 ตู้แช่แข็ง -20oC (Sandenintercool, Thailand)
- 3.2.9 ตู้แช่แข็ง -40oC (Haier, China)
- 3.2.10 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dry, CHRIST®, Germany)
- 3.2.11 Autopipette (Eppendorf, Germany)
- 3.2.12 เครื่อง UV-Vis Spectrophotometer (UV-2450, Shimudzu, Japan)
- 3.2.13 เครื่อง Zetasizer (650, Malvern, England)
- 3.2.14 เครื่อง Microplate Reader (FLUOstar Omega, BMG LABTECH, Germany)
- 3.2.15 ตู้ดูดความชื้น (SR Lab, Thailand)
- 3.2.16 กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopes, JSM-5410LV, JEOL, Ltd., Japan)
- 3.2.17 96 well UV-transparent plates (Corning, USA)
- 3.2.18 PowerPac™ Basic Power Supply (Bio-Rad, USA)
- 3.2.19 Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, USA)

3.3 ขั้นตอนดำเนินการวิจัย

แผนผังการดำเนินงานวิจัยสรุปดังรูปที่ 3.1

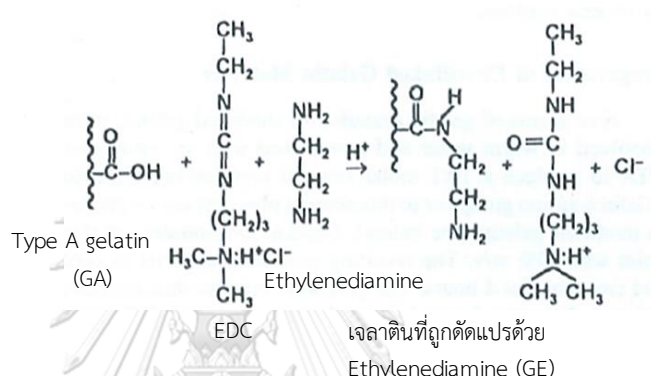


รูปที่ 3.1 แผนผังการดำเนินงานวิจัย

3.3.1 การเตรียมเจลาตินดัดแปร และทดสอบสมบัติทางเคมีและกายภาพ

3.3.1.1 การดัดแปรเจลาตินชนิดเอด้วย Ethylenediamine (GE)

การดัดแปรเจลาตินชนิดเอโดยการนำไปทำปฏิกิริยากับสารเอธิลีนไดเอมีน (ethylenediamine) ที่ตำแหน่งคาร์บอกซิลิก (carboxylic group) ของหมู่เอไมด์ในสายโซ่ ทำให้ได้เจลาตินที่มีหมู่เอมีนเพิ่มขึ้น เรียกว่า เจลาตินที่ถูกดัดแปรด้วย ethylenediamine (GE) ดังแสดงปฏิกิริยาในรูปที่ 3.2 [16, 90, 91]



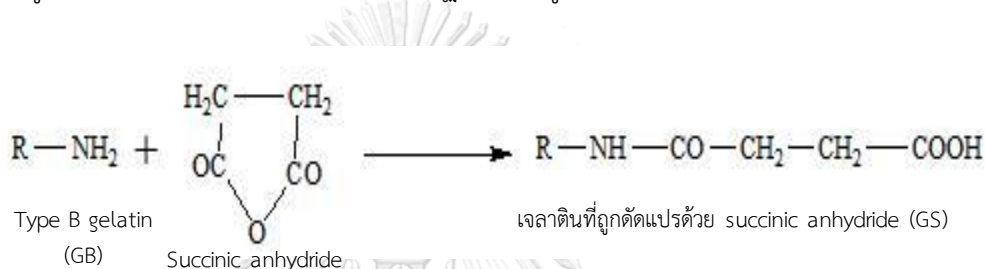
รูปที่ 3.2 ปฏิกิริยาการดัดแปรเจลาตินชนิดเอด้วยสารเอธิลีนไดเอมีน (ethylenediamine) ในคาร์โบไดเอไมด์ที่ละลายน้ำ [16]

วิธีการเตรียม GE ทำโดย เตรียมสารละลายเจลาตินชนิดเอ (GA) ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ปั่นกวนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จนได้สารละลายเนื้อเดียว จากนั้นเติมเอธิลีนไดเอมีนปริมาณ 27.9 กรัม ลงไปในสารละลายเจลาตินปรับ pH ของสารละลายให้เท่ากับ 5 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 11 N แล้วจึงเติมสาร 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide HCl (EDC) ปริมาณ 5.35 กรัม ลงในสารละลายเจลาตินเพื่อกระตุ้น (activate) หมู่คาร์บอกซิลิกของหมู่เอไมด์ของเจลาตินให้พร้อมเข้าทำปฏิกิริยากับ Ethylenediamine จากนั้นเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 500 มิลลิลิตร ปั่นกวนสารละลายเจลาตินที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อทิ้งให้

เกิดปฏิกิริยาดังสมการในรูปที่ 3.2 และนำสารละลายเจลาตินที่ได้มาไดอะไลซ์ในน้ำปราศจากไอออนที่อุณหภูมิห้อง 3-5 วันเพื่อกำจัดสารที่เหลือจากการทำปฏิกิริยา และนำสารละลายที่ได้ไปทำแห้งภายใต้สภาวะเยือกแข็ง (Freeze-drying)

3.3.1.2 การตัดแปรงเจลาตินชนิดบีด้วย Succinic anhydride (GS)

การคอนจูเกต (conjugate) เจลาตินชนิดบีกับสารที่มีประจุลบเช่น กรดซัคซินิก แอนไฮไดรต์ (Succinic anhydride) ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนไลซีน (lysine) ทำให้ได้เจลาตินที่มีหมู่คาร์บอกซิลิกเพิ่มขึ้น [71] ดังแสดงปฏิกิริยาในรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 ปฏิกิริยาการตัดแปรงเจลาตินชนิดบีด้วยกรดซัคซินิก แอนไฮไดรต์

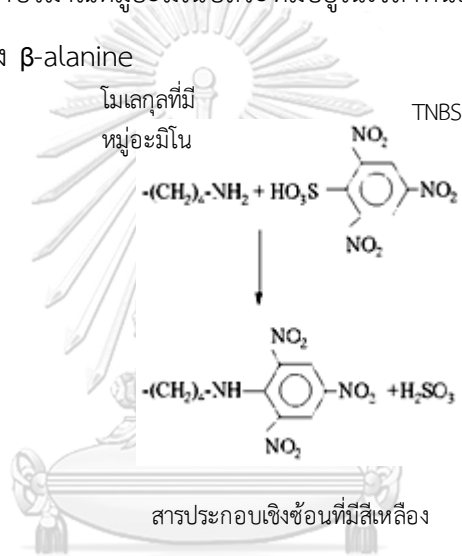
(Succinic anhydride) (<http://www.taotaoliu.cn/archives/129>)

วิธีการเตรียม GS ทำโดย เตรียมสารละลายเจลาตินชนิดบี (GB) ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรใน DMSO ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปั่นกวนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จนได้สารละลายเนื้อเดียว จากนั้น เตรียมสารละลาย succinic anhydride ความเข้มข้นร้อยละ 0.6 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรใน DMSO ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ปั่นกวนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลา 1 ชั่วโมง ค่อยๆหยดสารละลาย succinic anhydride ลงในสารละลายเจลาตินที่เตรียมไว้ และปั่นกวนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาดังสมการในรูปที่ 3.3 นำสารละลายที่ได้หลังปฏิกิริยาไปไดอะไลซ์ในน้ำปราศจากไอออนเป็นเวลา 4 วัน เพื่อกำจัดสารที่เหลือจากการทำปฏิกิริยา และนำสารละลายที่ได้ไปทำแห้งภายใต้สภาวะเยือกแข็ง

3.3.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของเจลาตินตัดแปรง

การวิเคราะห์ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระบนโครงสร้างเจลาตินทั้ง 4 ชนิด (GA GB GE และ GS) ใช้เทคนิค 2, 4, 6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) ทำโดยชั่งเจลาติน

ทั้ง 4 ชนิด 5 มิลลิกรัม (น้ำหนักแห้ง) ใส่ลงในแต่ละหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย NaHCO_3 ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และสารละลาย TNBS ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อย่างละ 1 มิลลิลิตรลงในแต่ละตัวอย่าง ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยาระหว่าง TNBS กับหมู่อะมิโนอิสระของเจลาติน ดังรูปที่ 3.4 จากนั้นเติมสารละลาย HCl ความเข้มข้น 6 N ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อหยุดปฏิกิริยา TNBS นำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่มีอยู่ในเจลาตินแต่ละชนิด โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ β -alanine



รูปที่ 3.4 การเกิดปฏิกิริยาระหว่าง TNBS กับหมู่อะมิโนอิสระของโมเลกุลโปรตีน

CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.3.1.4 การวิเคราะห์หมู่เคมีฟังก์ชันของเจลาตินตัดแปร

ทำการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของเจลาตินทั้ง 4 ชนิด จากสเปกตรัมของการดูดกลืนคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่ค่าเลขคลื่นต่างๆ เพื่อตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันที่บ่งชี้ถึงคุณลักษณะเฉพาะของสารแต่ละชนิด โดยการนำเจลาตินแต่ละชนิดที่ผ่านการทำให้แห้งแบบเยือกแข็งมาบดให้ละเอียดและผสมกับโพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr) จากนั้นนำมาอัดขึ้นรูปเป็นเหรียญขนาดเล็ก (disc) แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR, Spectrum GX, Perkin Elmer, UK)

3.3.1.5 การวิเคราะห์ค่าศักย์ゼต้าและค่าไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric point) ของสารละลายเจลาตินตัดแปร

ทำการวิเคราะห์ค่าศักย์ゼต้าของสารละลายเจลาตินทั้ง 4 ชนิด โดยนำสารละลายเจลาตินความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่เตรียมในน้ำปราศจากไอออน (pH 5.91) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ไปวัดค่าศักย์ゼต้าด้วยเครื่อง Zeta sizer

สำหรับการหาค่าไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric point; pI) ของเจลาติน ทำโดยเตรียมสารละลายเจลาตินทั้ง 4 ชนิดที่ค่าความเป็นกรดต่างที่ 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 ไปวัดค่าศักย์ゼต้าด้วยเครื่อง Zeta sizer โดยค่าไอโซอิเล็กทริกของโปรตีนเป็นค่า pH ที่ทำให้ประจุรวมของกรดอะมิโนหรือโปรตีนมีประจุสุทธิเท่ากับศูนย์หรือเป็นกลาง ค่าความเป็นกรดต่างที่เข้าใกล้ค่าศักย์ไฟฟ้าที่ศูนย์ เป็นช่วงที่แสดงประจุรวมของโปรตีนเป็นศูนย์ หรือเป็นค่าไอโซอิเล็กทริกของโปรตีน [92]

3.3.1.6 การวิเคราะห์ค่ามัมส์น้ำของฟิล์มเจลาตินตัดแปร

ทำการวิเคราะห์สมบัติความชอบน้ำของเจลาตินทั้ง 4 ชนิด จากการวัดค่ามัมส์น้ำบนพื้นผิวฟิล์มเจลาติน โดยเตรียมสารละลายเจลาตินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในน้ำปราศจากไอออน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารละลายเจลาติน (100 ไมโครลิตร) ไปหยดลงบน glass coverslip ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 มิลลิเมตร และผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำฟิล์มเจลาตินบน glass coverslip ที่ได้ ไปวัดค่ามัมส์น้ำ โดยการหยดน้ำปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงบนฟิล์มเจลาติน และทำการวัดค่ามัมส์น้ำที่ระยะเวลา 5 10 15 และ 20 วินาที

3.3.1.7 วิเคราะห์ค่าความหนืดปรากฏ (Apparent viscosity) ของสารละลายเจลาตินดัดแปร

เตรียมสารละลายเจลาตินชนิดต่างๆในน้ำที่ปราศจากไอออนที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารละลายเจลาติน ปริมาตร 13 มิลลิลิตร ไปวัดความหนืดด้วยเครื่อง Viscometer (SV-100, AND Discover Precision, Japan)

3.3.1.8 วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารละลายเจลาตินดัดแปร

ทำการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารละลายเจลาตินชนิดต่างๆ โดยใช้วิธีการแยกน้ำหนักโมเลกุลด้วยกระแสไฟฟ้าบนเจลพอลิอะคริลาไมด์ (Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) สารละลายเจลาตินถูกเตรียมที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำที่ปราศจากไอออนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารละลายเจลาตินที่เตรียมไว้เจือจางด้วย 2X Sample buffer (1 M Tris-HCl pH 6.8 ที่ละลายใน SDS ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยมวลต่อปริมาตร และกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตร) ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และทิ้งตัวอย่างให้อุณหภูมิลดลง นำสารละลายปริมาตร 15 ไมโครลิตร หยอด (load) ลงในหลุมเจลพอลิอะคริลาไมด์ที่เตรียมไว้ และให้กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที และนำเจลที่ได้ไปย้อมด้วยสี Coomassie blue เป็นเวลา 60 นาที เพื่อให้เห็นแถบโปรตีน น้ำหนักโมเลกุลของสารละลายเจลาตินจะหาได้จากกราฟมาตรฐานของความสัมพันธ์ระหว่างระยะทางแถบโปรตีนที่ปรากฏกับแถบโปรตีนมาตรฐาน (Protein marker)

3.3.2 การขึ้นรูปอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาติน

เตรียมเจลาตินแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (สำหรับ GE เตรียมที่ความเข้มข้นร้อยละ 20) ในน้ำปราศจากไอออน ปั่นกวนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จนได้สารละลายเนื้อเดียว ในขณะเดียวกัน เตรียมน้ำมันถั่วเหลืองตามอัตราส่วนที่ต้อง โดยมีอัตราส่วนระหว่างน้ำต่อน้ำมัน 1:8 ปั่นกวนด้วยใบพัดที่ความเร็ว 400 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ค่อยๆหยดสารละลายเจลาตินที่เตรียมไว้

ข้างต้นลงไปใต้น้ำมัน ปั่นกวนด้วยใบพัดที่ความเร็ว 400 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้น ให้ลดอุณหภูมิในอ่างน้ำลงอย่างรวดเร็ว โดยใช้ น้ำแข็งใส่ลงในอ่างให้มี อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส และปั่นกวนต่อไปอีก 1 ชั่วโมง นำอะซิโตนแห้งเย็นปริมาตร 100 มิลลิลิตร เทใส่ในสารละลาย ปั่นกวนต่อไปอีก 20 นาที จากนั้นนำอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ได้มาชะล้าง ด้วยอะซิโตนแห้งเย็นซ้ำหลายรอบเพื่อเอาน้ำมันออก และคัดแยกอนุภาคด้วยตะแกรงร่อนโดยแบ่ง ขนาดเป็น 3 ช่วงคือ ขนาด 32-75 ไมครอน ขนาด 76-100 ไมครอน และ ขนาดใหญ่กว่า 100 ไมครอน นำอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ได้ไปแห้งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน และไปทำแห้งภายใต้สภาวะเยือกแข็ง จากนั้นนำอนุภาคที่ได้ไปเชื่อมขวางทางกายภาพด้วยความร้อน และเชื่อมขวางทางเคมีด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ โดยการเชื่อมขวางทางกายภาพด้วยความร้อน จะนำอนุภาคไปอบที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะสุญญากาศ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง [93] ในขณะที่การเชื่อมขวางทางเคมีด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์จะนำอนุภาคปริมาณ 500 มิลลิกรัมไป ปั่นกวนในสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรที่ละลายอยู่ใน สารละลายอะซิโตนต่อน้ำในสัดส่วน 3:1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในที่มีด เป็นเวลา 20 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำอนุภาคไปล้างกลูตารัลดีไฮด์ที่เหลือจากการเกิดปฏิกิริยาด้วย สารละลายไกลซีนความเข้มข้น 0.1 โมล เป็นเวลา 20 ชั่วโมง และน้ำปราศจากไอออน จำนวน 3-4 รอบ

3.3.3 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมี สมบัติทางกายภาพ และสมบัติทางชีวภาพของอนุภาคทรงกลม ขนาดไมครอนเจลาติน

3.3.3.1 การวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน เจลาติน

อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ได้มา ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ ส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM, JSM-5410LV, JEOL Ltd, Japan) และบันทึกภาพที่กำลังขยาย 200 1,000 และ 5,000 เท่า เพื่อดูลักษณะพื้นผิวภายในและ ภายนอก และวัดขนาดอนุภาคจากภาพ โดยใช้โปรแกรม image J

3.3.3.2 การ วิเคราะห์ร้อยละการเชื่อมขวางของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาติน

ทำการวิเคราะห์ปริมาณหมู่เอมีโนอิสระบนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาติน ทั้ง 4 ชนิดด้วยเทคนิค 2, 4, 6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) ตามวิธีการที่ได้กล่าวในหัวข้อ 3.3.1.3 นำค่าการดูดกลืนแสงที่จากการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ β -alanine มาคำนวณหาร้อยละการเชื่อมขวางของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาติน ได้ตามสมการที่ 3.1

$$\text{ร้อยละการเชื่อมขวาง} = \left[1 - \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ผ่านการเชื่อมขวาง}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่ไม่ผ่านการเชื่อมขวาง}} \right] \times 100 \quad (3.1)$$

3.3.3.3 การ วิเคราะห์ค่ามัมสัมผัสน้ำของฟิล์มเจลาตินที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยความร้อนและสารละลายกลูตารัลดีไฮด์

เตรียมฟิล์มเจลาตินสำหรับวิเคราะห์ค่ามัมสัมผัสน้ำตามหัวข้อ 3.3.1.6 จากนั้นนำฟิล์มไปเชื่อมขวางด้วยความร้อนโดยการอบที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะสูญญากาศ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ นำฟิล์มแช่ในสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ที่ละลายอยู่ในสารละลายอะซิโตนต่อน้ำในสัดส่วน 3:1 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในที่มืด เป็นเวลา 20 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างฟิล์มด้วยสารละลายไกลซินความเข้มข้น 0.1 โมล เป็นเวลา 20 ชั่วโมง และน้ำปราศจากไอออน จำนวน 3-4 รอบ และผึ่งแห้งที่อุณหภูมิห้อง นำฟิล์มเจลาตินที่เชื่อมขวางข้างต้น ไปวัดค่ามัมสัมผัสน้ำ โดยการหยดน้ำปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงบนฟิล์มเจลาติน และทำการวัดค่ามัมสัมผัสน้ำที่ระยะเวลา 5 10 15 และ 20 วินาที

3.3.3.4 การ ละลายน้ำของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยความร้อนและสารละลายกลูตารัลดีไฮด์

นำอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินทั้ง 4 ชนิดที่เชื่อมขวางด้วยความร้อนและสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ปริมาณ 10 มิลลิกรัม แช่ในน้ำที่ปราศจากไอออนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่เวลา 3 และ 24 ชั่วโมง นำอนุภาคที่เหลือหลังการแช่ในน้ำปราศจาก

ไอออนไปอบที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปชั่งหาน้ำหนักของอนุภาคที่เหลืออยู่ เปรียบเทียบน้ำหนักอนุภาคเริ่มต้น

3.3.3.5 การวิเคราะห์ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินในระดับห้องปฏิบัติการ

ทำการศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินในระดับห้องปฏิบัติการ ที่สภาวะจำลองร่างกายมนุษย์ โดยการคำนวณหาร้อยละโดยน้ำหนักของอนุภาคที่หายไป เมื่อนำอนุภาคไปแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS pH 7.4) ที่มีเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ร้อยละโดยน้ำหนักของอนุภาคที่หายไป สามารถคำนวณได้จากสมการ 3.2

$$\text{ร้อยละโดยน้ำหนักของอนุภาคที่หายไป} = \frac{W_t - W_0}{W_0} \times 100 \text{ -----(3.2)}$$

โดยที่ W_0 คือ น้ำหนักแห้งเริ่มต้นของอนุภาคก่อนแช่ในสารละลายเอนไซม์

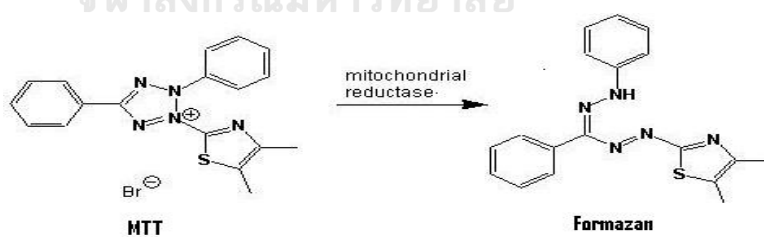
W_t คือ น้ำหนักแห้งของอนุภาคหลังแช่ในสารละลายเอนไซม์

3.3.3.6 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาติน

การทดสอบความเป็นพิษของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินต่อเซลล์ L929 mouse fibroblasts ใช้วิธีทางอ้อม (Indirect method) ตามมาตรฐาน ISO 10993 part 5 นำอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อ (Sterilization) ด้วยวิธีอบแก๊สเอธิลีนออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มาเตรียมสารสกัดอนุภาคในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ตามมาตรฐาน ISO 10993 part 12 สารสกัดอนุภาค (extracted solution) เตรียมได้จากการแช่อนุภาคปริมาณ 100 มิลลิกรัมในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่ไม่มีซีรัมเป็นองค์ประกอบ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารสกัดดังกล่าวไปทำการเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมเป็นองค์ประกอบที่ความเข้มข้นต่างๆ ในขณะเดียวกัน ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ L929 ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (96 well-plate) โดยเพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นที่ความหนาแน่น 1×10^4 เซลล์/0.32 ตาราง

เซนติเมตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มีซีรัมเป็นองค์ประกอบร้อยละ 10 โดยปริมาตร และ penicillin-streptomycin ร้อยละ 1 โดยปริมาตร ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเชื้อที่สภาวะความดันบรรยากาศที่มี CO₂ ร้อยละ 5 โดยปริมาตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะพื้นผิวจานเพาะเลี้ยงและแผ่ตัวเป็นแบบชั้นเดียว (Monolayer) จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกและเติมตัวอย่างสารสกัดจากอนุภาคที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงไปในแต่ละหลุม นำไปเพาะเลี้ยงตามสภาวะข้างต้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการประเมินจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ด้วยเทคนิค MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) [94]

สาร MTT หรือ 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide มีโครงสร้างเป็นวงแหวนของเกลือ Tetrazolium ซึ่งวงแหวน Tetrazolium นี้สามารถถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ Dehydrogenase จากไมโทคอนเดรียที่อยู่ในเซลล์ที่มีชีวิต ทำให้ MTT เปลี่ยนเป็นผลึก Formazan ที่มีสีม่วง ผลึกสีม่วงของ Formazan ที่เกิดขึ้นนี้สามารถละลายได้ในตัวทำละลาย เช่น Dimethyl sulfoxide (DMSO) ได้สารละลายสีม่วง ซึ่งสามารถนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ปริมาณผลึก Formazan ที่ถูกละลายออกมาจะมีค่าแปรผันโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต รูปที่ 3.5 แสดงปฏิกิริยาระหว่างสาร MTT กับเอนไซม์ Dehydrogenase ที่หลังจากไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิต และเกิดเป็นสารประกอบผลึกสีม่วงของ Formazan



รูปที่ 3.5 ปฏิกิริยาระหว่างสาร MTT กับเอนไซม์ Dehydrogenase ที่หลังจากไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิต และเกิดเป็นสารประกอบผลึกสีม่วงของ Formazan

(<http://www.biotek.com/resources/articles/quantification-cell-viability-epoch.html>)

จำนวนเซลล์สามารถคำนวณหาได้จากการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างกับกราฟมาตรฐานที่ทราบจำนวนเซลล์ ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ (viability) สามารถคำนวณหาได้จากสมการ 3.3

$$\% \text{ Cell viability} = \frac{OD_{570e}}{OD_{570b}} \times 100 \text{-----}(3.3)$$

เมื่อ OD_{570b} คือ จำนวนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ (กลุ่มที่เลี้ยงด้วย DMEM ไม่มีซีรัมเป็นองค์ประกอบ)
 OD_{570e} คือ จำนวนเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (เซลล์กลุ่มที่เพาะเลี้ยงในสารสกัดจากอนุภาค)

3.3.4 การกักเก็บสาร EGCG บนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน

เตรียมสารละลาย EGCG ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำปราศจากไอออน จากนั้นนำอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาติน (100 มิลลิกรัม) แขนสารละลาย EGCG ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อให้สารละลาย EGCG ดูดซับลงบนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาติน จากนั้นดูดสารละลาย EGCG ที่เหลือทิ้ง แล้วผึ่งอนุภาคให้แห้งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จะได้อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินที่กักเก็บสาร EGCG

3.3.5 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการกักเก็บสาร EGCG และการควบคุมการปลดปล่อย EGCG ของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินในระดับห้องปฏิบัติการ

3.3.5.1 วิเคราะห์ประสิทธิภาพในการกักเก็บสาร EGCG บนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาติน

ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการกักเก็บสาร EGCG บนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินโดยนำอนุภาคที่กักเก็บสาร EGCG ที่ได้จากข้อ 3.3.4 มาแช่ในน้ำที่ปราศจากไอออนปริมาตร 1 มิลลิลิตรเพื่อชะสาร EGCG ที่กักเก็บอยู่ในอนุภาค นำสารละลายที่ชะสาร EGCG ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 273 นาโนเมตร และทำการเปลี่ยนน้ำปราศจากไอออนที่ชะสาร EGCG จากอนุภาคหลายๆรอบ จนกระทั่งตรวจวัดไม่พบค่าการดูดกลืนแสงของสาร EGCG ปริมาณสาร EGCG ที่กักเก็บ ในอนุภาคหาได้จากการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่เตรียมจากสาร EGCG ที่ทราบความเข้มข้น ปริมาณของสาร

EGCG ที่ถูกกักเก็บบนอนุภาค (drug loading) และประสิทธิภาพในการกักเก็บสาร EGCG (loading efficiency) บนอนุภาค คำนวณได้จากสมการ 3.4 และ 3.5 ตามลำดับ

ปริมาณของสาร EGCG ที่ถูกกักเก็บบนอนุภาค (drug loading)

$$= \frac{\text{ปริมาณของสาร EGCG ที่วัดได้}}{\text{น้ำหนักรวมของ EGCG และอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน}} \text{-----}(3.4)$$

ประสิทธิภาพในการกักเก็บสาร EGCG บนอนุภาค (% encapsulation efficiency)

$$= \frac{\text{ปริมาณของสาร EGCG ที่ตรวจวัดได้}}{\text{ปริมาณของสาร EGCG ตั้งต้น}} \times 100 \text{-----}(3.5)$$

3.3.5.2 การทดสอบความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยสาร EGCG จากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินในสถานะที่ไม่มีและมีเอนไซม์

นำอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินที่กักเก็บสาร EGCG ที่ได้จากข้อ 3.3.4 ปริมาณ 10 มิลลิกรัม มาแช่ในสารละลาย PBS (pH 7.4) ที่ไม่มีและมีเอนไซม์คอลลาจีเนส ความเข้มข้น 125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นสภาวะ sink condition จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเก็บสารละลายที่เวลาต่างๆ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 273 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่เตรียมจากสาร EGCG ที่ทราบความเข้มข้น เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ EGCG ที่ถูกปลดปล่อยออกมา ร้อยละการปลดปล่อยสะสมของ EGCG จากอนุภาคสามารถคำนวณได้จากสมการ 3.6

$$C_i = \sum_{i=0}^t M_i \text{-----}(3.6)$$

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

โดย M_i คือปริมาณของสาร EGCG ที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคในช่วงเวลา i

C_i คือปริมาณของสาร EGCG ที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคในแต่ละช่วงเวลา

C_t คือปริมาณของสาร EGCG ทั้งหมดที่ถูกดูดซับบนอนุภาค

3.3.6 การเตรียมสารละลายกรดไฮยาลูรอนิคผสมกับอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินที่กักเก็บ EGCG

นำอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินที่กักเก็บสาร EGCG ปริมาณ 100 มิลลิกรัมมาผสมกับ Hyalovet ซึ่งเป็นสารละลายกรดไฮยาลูรอนิค (น้ำหนักโมเลกุล 500,000-700,000 กิโลดาลตัน) ที่ใช้ในการรักษาโรคข้อเสื่อมในสัตว์ ซึ่งมีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อปริมาตร 2 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมเป็นรูปแบบของยาฉีดรักษาข้อเสื่อมต่อไป

3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลจะถูกนำมาหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้วิธี ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p\text{-value} < 0.05$)



บทที่ 4

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

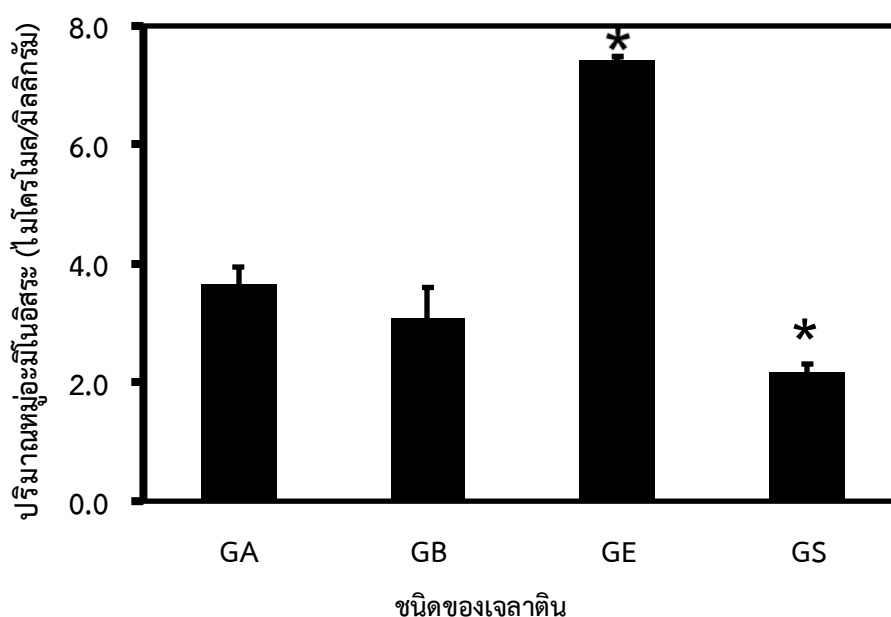
4.1 สมบัติทางเคมีและสมบัติทางกายภาพของเจลาตินดัดแปร

งานวิจัยนี้ได้ทำการผลิตเจลาตินดัดแปร 2 ชนิดจากเจลาตินชนิดเอและเจลาตินชนิดบีโดยกระบวนการทางเคมี ได้แก่ เจลาตินชนิดเอที่ถูกดัดแปรด้วยเอธิลีนไดเอมีน (Ethylenediamine) หรือ GE และเจลาตินชนิดบีที่ถูกดัดแปรด้วยซัคซินิคแอนไฮไดรด์ (Succinic anhydride) หรือ GS ตามลำดับ ในส่วนแรกของงานวิจัย ได้ทำการศึกษาคุณลักษณะของเจลาตินดัดแปรทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวเปรียบเทียบกับเจลาตินชนิดเอ (GA) และบี (GB) ที่เป็นเจลาตินตั้งต้น คุณลักษณะที่ศึกษา ได้แก่ ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ โครงสร้างเคมีและหมู่ฟังก์ชัน ค่าศักย์ゼต้า สมบัติความชอบน้ำ ความหนืดของสารละลายเจลาติน และน้ำหนักโมเลกุล

4.1.1 ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของเจลาตินดัดแปร

การวิเคราะห์หาปริมาณหมู่อะมิโนอิสระในโครงสร้างเจลาติน ใช้เทคนิค 2, 4, 6 - Trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) โดยสาร TNBS จะเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนอิสระ เกิดเป็นสารประกอบที่มีสีเหลืองซึ่งสามารถตรวจวัดปริมาณหมู่อะมิโนอิสระดังกล่าวด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เทคนิค spectrophotometry [95] รูปที่ 4.1 แสดงผลปริมาณหมู่อะมิโนอิสระในเจลาตินทั้ง 4 ชนิด พบว่า GA และ GB มีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ 0.37 ± 0.29 และ 0.31 ± 0.51 ไมโครโมลต่อเจลาติน 1 มิลลิกรัม ตามลำดับ GE มีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระเพิ่มขึ้นจาก GA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเป็น 0.74 ± 0.05 ไมโครโมลต่อเจลาติน 1 มิลลิกรัม (เพิ่มขึ้นร้อยละ 56.60) ซึ่งเป็นผลจากการคอนจูเกตเอธิลีนไดเอมีนบนหมู่คาร์บอกซิลิกของเจลาตินชนิดเอตามการเกิดปฏิกิริยาเคมี ดังรูปที่ 3.2 และสอดคล้องกับผลการทดลองของงานวิจัยของ Hori และคณะ (2007) [17] ที่รายงานการเพิ่มขึ้นของหมู่อะมิโนอิสระของ cationized gelatin (หรือ GE ในงานวิจัยนี้) ที่เตรียมได้จากการกระบวนการเดียวกันนี้ นอกจากนี้ยังรายงานว่าเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของเอธิลีนไดเอมีนในการทำปฏิกิริยา cationized gelatin ที่ได้จะมีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระในสายโซ่เพิ่มขึ้นด้วย สำหรับ GS ที่ถูกดัดแปรด้วยซัคซินิคแอนไฮไดรด์ พบว่ามีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเหลือ 0.22 ± 0.13 ไมโครโมลต่อเจลาติน 1 มิลลิกรัม (ลดลงร้อยละ 48.09) เมื่อเทียบกับ GB เนื่องจาก

หมู่ซัคซินิคแอนไฮไดรด์เข้าไปทำปฏิกิริยาที่ตำแหน่ง ϵ -amino ของไลซีน และปลายสาย N ของ γ -amino ของเจลาติน จึงส่งผลให้หมู่อะมิโนอิสระของ GS ลดลงในขณะที่หมู่คาร์บอกซิลิกเพิ่มขึ้น [96] ตามการเกิดปฏิกิริยาเคมีดังรูปที่ 3.3 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Sripriya และคณะ ในปี 2011 [97] ที่ศึกษาปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของคอลลาเจนที่ดัดแปรด้วยซัคซินิคแอนไฮไดรด์ พบว่าคอลลาเจนหลังดัดแปรด้วยซัคซินิคแอนไฮไดรด์มีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระลดลงเช่นเดียวกัน



รูปที่ 4.1 ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่พบในเจลาตินทั้ง 4 ชนิดได้แก่ GA GB GE และ GS วิเคราะห์ด้วยเทคนิค TNBS (* แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95, $p < 0.05$ ของข้อมูล โดยเปรียบเทียบกับเจลาตินตั้งต้นที่ใช้ในการดัดแปร; GE เทียบกับ GA และ GS เทียบกับ GB)

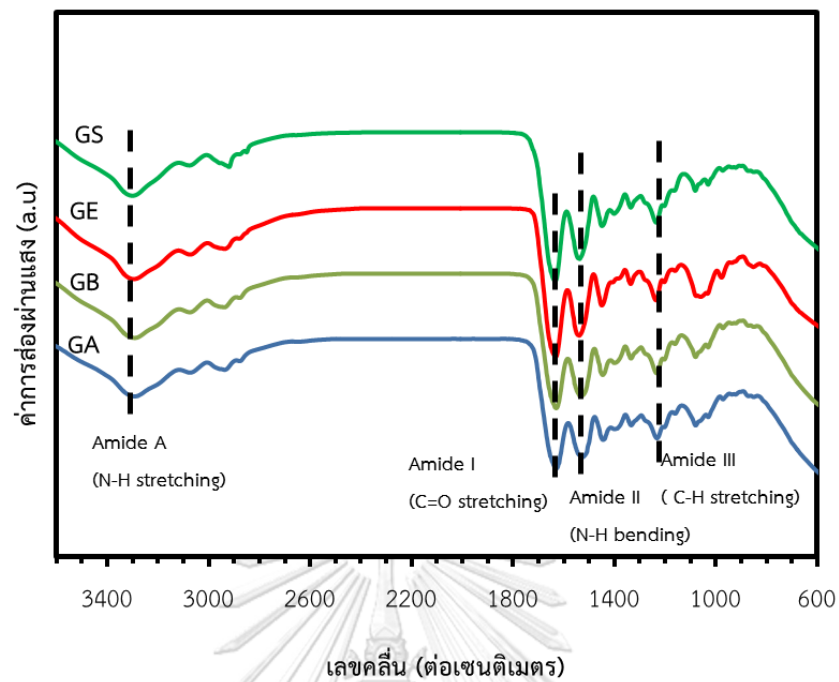
4.1.2 โครงสร้างเคมีและหมู่ฟังก์ชันของเจลาตินดัดแปร

การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันที่บ่งชี้คุณลักษณะโครงสร้างเคมีของเจลาตินทั้ง 4 ชนิดด้วยเทคนิค FT-IR ในช่วงเลขคลื่น 4000 ถึง 600 ต่อเซนติเมตร ดังรูปที่ 4.2 ก) พบช่วงสเปกตรัมของการส่องผ่านรังสีอินฟราเรดที่บ่งชี้ลักษณะเฉพาะของเจลาติน 4 ตำแหน่ง ตำแหน่งแรกคือตำแหน่งพีกที่เลขคลื่น 3300 ต่อเซนติเมตรสอดคล้องกับพันธะเอไมด์เอ (Amide A) ซึ่งแสดงถึงการสั่นแบบยืดของพันธะเปปไทด์ (N-H stretching) ตำแหน่งถัดมาคือพีกที่เลขคลื่น 1631 ต่อเซนติเมตรสอดคล้องกับ

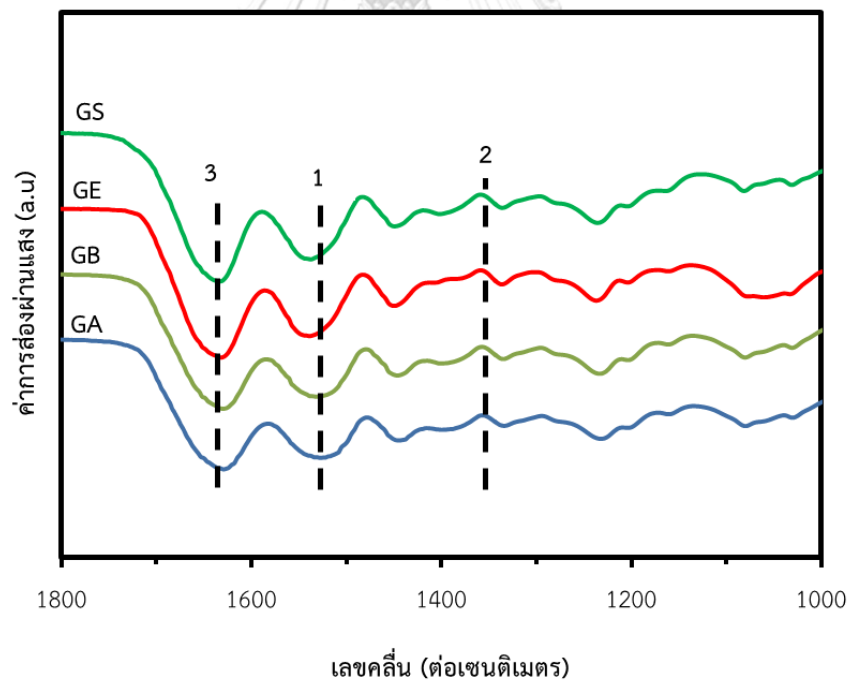
พันธะเอไมด์ I (Amide I) แสดงถึงการสั่นแบบงอของพันธะ C=O (C=O stretching) และตำแหน่งพีคที่เลขคลื่น 1546 และ 1235 ต่อเซนติเมตร สอดคล้องกับตำแหน่งของพันธะเอไมด์ II (Amide II) และพันธะเอไมด์ III (Amide III) ซึ่งแสดงการสั่นแบบงอของพันธะ N-H (N-H bending) และการสั่นแบบยืดของพันธะ C-H (C-H stretching) ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 4 ตำแหน่งข้างต้นแสดงหมู่ฟังก์ชันที่เป็นคุณลักษณะที่พบในโปรตีนเจลาตินทั่วไป [98]

4.2 ข) สำหรับสเปกตรัมของ GE เมื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของ GA พบการเลื่อนของตำแหน่งพีคหมายเลข 1 และพีคหมายเลข 2 ซึ่งสอดคล้องกับการสั่นของพันธะเอไมด์ II และพันธะเอไมด์ III ไปยังตำแหน่งเลขคลื่นมากขึ้นที่ประมาณ 1530 ต่อเซนติเมตร สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chen และ Su ปี 2011 [99] ที่รายงานผลสเปกตรัม FT-IR ของเจลาตินที่ดัดแปรด้วยเอธิลีนไดเอมีน พบการปรากฏตำแหน่งพีคที่เลขคลื่น 1653 และ 1539 ต่อเซนติเมตร ซึ่งแสดงถึงพันธะเอไมด์ I และพันธะเอไมด์ II ตามลำดับ สเปกตรัมของ GS เมื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของ GB พบการเลื่อนของพีคที่หมายเลข 3 ซึ่งตรงกับตำแหน่งเอไมด์ I และปรากฏไหล่ของสเปกตรัมที่ตำแหน่งเลขคลื่น 1735 ต่อเซนติเมตร ผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yang และคณะ (2014) [100] ที่รายงานการพบไหล่ของสเปกตรัมที่ตำแหน่ง 1735 ต่อเซนติเมตร ที่บ่งชี้ถึงการสั่นของ C=O (C=O stretching) ของหมู่คาร์บอกซิลิกภายหลังกระบวนการ Succinylation ของเจลาตินที่ถูกดัดแปรด้วยซัคซินิคแอนไฮไดรด์

ก)



ข)



รูปที่ 4.2 สเปกตรัมการส่องผ่านรังสีอินฟราเรดของเจลลาติน 4 ชนิดได้แก่ GA GB GE และ GS วิเคราะห์ด้วยเทคนิค FT-IR ในช่วงเลขคลื่น ก) 4000 ถึง 600 ต่อเซนติเมตร และ ข) 1800 ถึง 1000 ต่อเซนติเมตร

4.1.3 ค่าศักย์ゼต้าของสารละลายเจลาตินดัดแปร

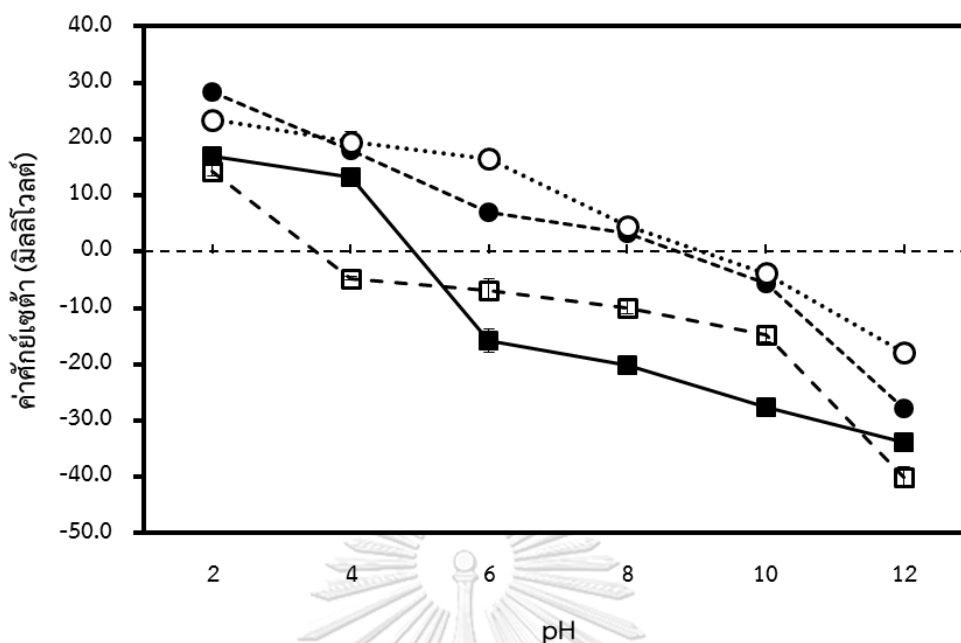
การศึกษาค่าศักย์ゼต้าทำให้ทราบถึงสมบัติทางประจุของสารละลาย และความเสถียรของการกระจายตัวของอนุภาคจากค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าบริเวณผิวอนุภาคกับศักย์ไฟฟ้าในชั้นสารละลาย [101] โดยค่าศักย์ゼต้าคำนวณตามสมการ Smoluchowski ซึ่งแสดงถึงการเคลื่อนที่ของโมเลกุลที่มีประจุในสนามไฟฟ้า (electrophoretic mobility) โดยค่าจะขึ้นกับค่าความหนืดและค่าคงที่ไดอิเล็กตริก (Dielectric constant) ของอนุภาคในสารละลาย

รูปที่ 4.3 แสดงผลการวิเคราะห์ค่าศักย์ゼต้าของสารละลายเจลาตินชนิดต่างๆที่ค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 2 ถึง 12 พบว่า ที่สภาวะกรด pH 2 ค่าศักย์ゼต้าของ GA GB GE และ GS มีค่า +28.3±1.4, +17.0±0.3, +23.3±0.4 และ +14.3±1.0 มิลลิโวลต์ ตามลำดับ ในขณะที่ pH 12 ค่าศักย์ゼต้าของเจลาติน GA GB GE และ GS มีค่า -27.9±0.2, -33.8±1.6, -17.9±0.5 และ -40.1±1.9 มิลลิโวลต์ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าเจลาตินทุกชนิดมีค่าศักย์ไฟฟ้าลดลงเมื่อค่า pH ของสารละลายเพิ่มขึ้น เนื่องจากโครงสร้างของเจลาตินเป็นโปรตีนซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีทั้งหมู่คาร์บอกซิลิกและหมู่เอมีนที่แสดงความเป็นกรดต่าง โดยหมู่คาร์บอกซิลิกจัดเป็นกรดอ่อน (weak acid) มีความสามารถแตกตัวให้โปรตรอน (deprotonation) ในขณะที่หมู่เอมีนจัดเป็นเบสอ่อน (weak base) สามารถรับโปรตรอนได้ (protonation) ดังสมการเคมีที่ 4.1 โดยการแตกตัวให้โปรตรอนและรับโปรตรอนในโครงสร้างจะเกิดขึ้นพร้อมกันเมื่อละลายน้ำ เรียกว่า ซวิตเทอร์ไอออน (switterion)



สำหรับค่า pH จุดที่ค่าศักย์ไฟฟ้าของสารละลายเจลาตินเป็นศูนย์ คือจุดไอโซอิเล็กตริก (isoelectric point) ซึ่งเป็นจุดที่ประจุบวกและประจุลบของเจลาตินมีค่าเท่ากัน ประจุมจึงเป็นศูนย์ GA และ GE มีค่าไอโซอิเล็กตริกประมาณ 9 หมายความว่า ที่ pH น้อยกว่า 9 GA และ GE แสดงประจุบวก ในขณะที่ pH มากกว่า 9 GA และ GE แสดงประจุลบ สำหรับ GB และ GS มีค่าไอโซอิเล็กตริกเท่ากับ 5 และ 3.8 ตามลำดับ แสดงว่า ที่ pH น้อยกว่า 5 และ 3.8 GB และ GS แสดงประจุบวก ในขณะที่ pH มากกว่า 5 และ 3.8 GB และ GS แสดงประจุลบ ตามลำดับ สำหรับงานวิจัยนี้ สารละลายเจลาตินถูกเตรียมในน้ำปราศจากไอออน (pH 5-6) จะเห็นว่าที่สภาวะนี้ GE แสดงประจุบวกมากที่สุดที่ประมาณ +16.5 มิลลิโวลต์ ตามด้วย GA แสดงประจุบวกประมาณ +7.0 มิลลิโวลต์

ส่วน GB และ GS แสดงประจุลบที่ประมาณ -15.8 และ -6.8 มิลลิโวลต์ ตามลำดับ GA ผลิตจากกระบวนการไฮโดรไลซ์คอลลาเจนด้วยกรด กระบวนการผลิตแบบนี้จะไม่รบกวนหมู่เอไมด์ของคอลลาเจน ดังนั้นจึงทำให้ GA แสดงประจุบวกจากหมู่เอไมด์ที่มีในโครงสร้าง ส่วน GB ผลิตได้จากกระบวนการไฮโดรไลซ์คอลลาเจนด้วยด่าง โดยต่างเข้าไปสลายหมู่เอไมด์ในสายโซ่ของคอลลาเจน และจากปฏิกิริยาดังกล่าวทำให้สายโซ่มีหมู่คาร์บอกซิลเพิ่มขึ้น จึงส่งผลให้ GB มีแสดงประจุลบมากกว่า GA [102] และที่ GE แสดงประจุบวกมากกว่า GA เนื่องจากหมู่คาร์บอกซิลที่แสดงประจุลบถูกคอนจูเกตด้วยเอธิลีนไดเอมีน ประจุลบจึงลดลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ [103] ที่รายงานว่าค่าศักย์เซต้าของเจลาตินที่ถูกดัดแปรโดยใช้เอธิลีนไดเอมีน หรือ GE มีค่าประจุบวกเพิ่มขึ้นตามอัตราส่วนของเอธิลีนไดเอมีนที่ใช้คอนจูเกต และในปี 2015 Jalaja และคณะ [104] ศึกษาเส้นใยนาโนที่ผลิตด้วยกระบวนการทางไฟฟ้าสถิตย์ (electrospinning) จากเจลาตินที่ถูกดัดแปรด้วยเอธิลีนไดเอมีน หรือ GE ซึ่งในงานวิจัยดังกล่าวพบว่า GE มีค่าศักย์เซต้าที่แสดงประจุบวกที่ได้มาจากหมู่เอมีนที่ถูกเพิ่มเข้าไปในโครงสร้าง สำหรับ GS ที่เตรียมในน้ำปราศจากไอออนมีค่าศักย์เซต้าประมาณ -6.8 โวลต์ ซึ่งมีค่าประจุลบน้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับ GB แต่ในตามปฏิกิริยาซึ่งแสดงไว้ในหัวข้อที่ 3.3.1.2 ซักซินิค แอนไฮไดรต์จะเข้าไปทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนของเจลาติน เกิดการคอนจูเกตหมู่คาร์บอกซิลิกเข้าไปในสายโซ่เจลาติน จึงควรส่งผลให้ GS มีประจุลบเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าหมู่คาร์บอกซิลิกที่คอนจูเกตบนสายโซ่เจลาติน ไม่ได้อยู่ในตำแหน่งที่สามารถวัดค่าศักย์เซต้าได้



รูปที่ 4.3 ค่าศักย์ไฟฟ้าของสารละลายเจลาติน 4 ชนิด ได้แก่ GA (●) GB (■) GE (○) และ GS (□) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก ที่ค่าความเป็นกรดต่างระหว่าง 2 ถึง 12

4.1.4 ค่ามุมสัมผัสน้ำบนฟิล์มเจลาตินตัดแปรร

การวิเคราะห์ค่ามุมสัมผัสน้ำบนพื้นผิวฟิล์มเจลาตินทั้ง 4 ชนิด จะทำให้ทราบถึงสมบัติความชอบน้ำ (hydrophilicity) และความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ของพื้นผิว ซึ่งมีความสัมพันธ์กับประจุและหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวนั้นๆ ตารางที่ 4.1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ามุมสัมผัสน้ำ กับสมบัติความชอบน้ำของพื้นผิวของวัสดุ

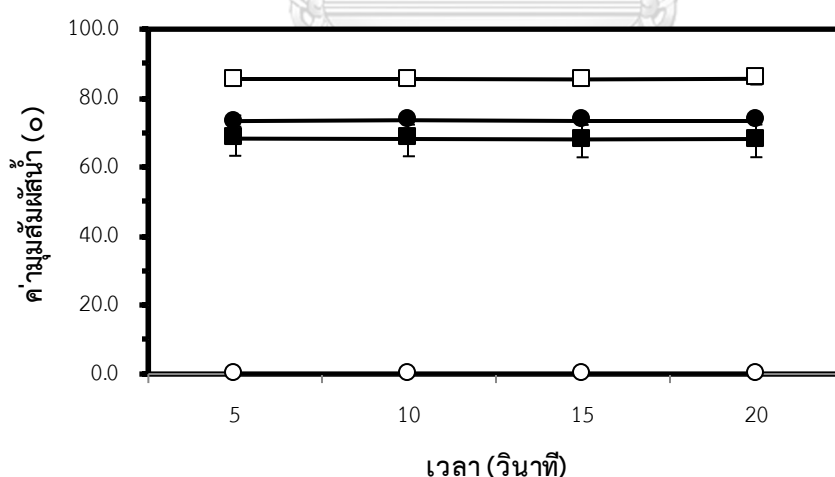
จากการศึกษาค่ามุมสัมผัสน้ำบนพื้นผิวฟิล์มเจลาตินทั้ง 4 ชนิดที่เวลา 5 10 15 และ 20 วินาที ดังแสดงในรูปที่ 4.4 พบว่า ค่ามุมสัมผัสน้ำบนฟิล์ม GA GB และ GS อยู่ในช่วง $0^\circ < \theta < 90^\circ$ ซึ่งบ่งชี้ว่าเจลาตินทั้ง 3 สูตรมีความชอบน้ำ โดย GA และ GB มีคุณสมบัติชอบน้ำจากหมู่ฟังก์ชันอะมิโนคาร์บอกซิลิก และ ไฮดรอกซิลที่อยู่ภายในโครงสร้าง [105] สำหรับ GS มีหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิลิกที่เพิ่มขึ้น จากการถูกคอนจูเกตด้วยซัคซินิคแอนไฮไดรด์ จึงแสดงสมบัติชอบน้ำเช่นกัน

GE มีค่ามุมสัมผัสน้ำ $\theta = 0^\circ$ แสดงถึงมีความชอบน้ำสูงซึ่งค่ามุมสัมผัสน้ำมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ GA ซึ่งเป็นผลมาจากการมีหมู่อะมิโนเพิ่มขึ้นจากการตัด

แปรด้วยเอธิลีนไดเอมีน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chen และคณะ ปี 2017 ที่ได้มีการดัดแปร Poly (L-lactic acid) ด้วยเอธิลีนไดเอมีนเพื่อนำไปขึ้นรูปเป็นอนุภาคที่มีโครงสร้างเป็นรูปแบบเส้นใยนาโน (nanofibrous) พบว่า Poly (L-lactid acid) ที่ดัดแปรด้วยเอธิลีนไดเอมีน ($69.19 \pm 0.18^\circ$) มีค่ามุมสัมผัสน้ำลดลงจาก Poly (L-lactid acid) ที่ไม่ได้ดัดแปร ($129.26 \pm 0.30^\circ$) อันเนื่องจากการเพิ่มหมู่เอมีโนซึ่งเป็นหมู่ที่มีความชอบน้ำเข้าไป [106] ในขณะที่ GS มีค่ามุมสัมผัสน้ำสูงกว่า GB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หมายความว่า GS มีสมบัติความชอบน้ำน้อยกว่า GB อาจเนื่องมาจากการลดลงของหมู่เอมีโนซึ่งเป็นหมู่ที่มีความชอบน้ำ (รูปที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติความชอบน้ำของพื้นผิววัสดุกับค่ามุมสัมผัสน้ำ [107]

สมบัติของพื้นผิววัสดุ	ค่ามุมสัมผัสของน้ำ ($^\circ$)
มีความชอบน้ำสูง (Superhydrophilic)	$\theta = 0^\circ$
มีความชอบน้ำ (Less strongly hydrophilic)	$0^\circ < \theta < 90^\circ$
มีความไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic)	$90^\circ \leq \theta < 150^\circ$
มีความไม่ชอบน้ำสูง (Superhydrophobic)	$\theta > 150^\circ$



รูปที่ 4.4 ค่ามุมสัมผัสน้ำบนพื้นผิวฟิล์มเจลลาตินทั้ง 4 ชนิดได้แก่ GA (●) GB (■) GE (○) และ GS (□) ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียสที่เวลา 5 10 15 และ 20 วินาที (* ค่ามุมสัมผัสน้ำวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Drop Shape Analysis)

4.1.5 ค่าความหนืดและน้ำหนักโมเลกุลของสารละลายเจลาตินตัดแปร

ความหนืด คือสมบัติความต้านทานการไหลของสารละลายพอลิเมอร์ ค่าความหนืดของสารละลายพอลิเมอร์ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยไม่ว่าจะเป็น รูปร่างโมเลกุล มวลโมเลกุล ความเข้มข้น สมบัติความชอบน้ำของพอลิเมอร์ และปฏิกิริยาภายในโมเลกุล [108] ผลการศึกษาค่าความหนืดของสารละลายเจลาตินทั้ง 4 ชนิดที่ความเข้มข้นของสารละลายเจลาตินร้อยละ 10 โดยมวล ที่ละลายในน้ำปราศจากไอออนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แสดงดังตารางที่ 4.2 พบว่าสารละลาย GA และ GB มีค่าความหนืดเท่ากับ 23.50 และ 22.90 เซนติพอยส์ ตามลำดับ ในขณะที่เจลาตินที่ถูกตัดแปร 2 ชนิดคือ GE และ GS มีค่าความหนืดลดลงเหลือ 2.84 และ 10.73 เซนติพอยส์ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า GE มีความหนืดต่ำกว่า GA ที่เป็นเจลาตินตั้งต้นอย่างมาก เมื่อพิจารณาในเชิงโครงสร้าง GE หมู่คาร์บอกซิลที่ลดลงจากการตัดแปร อาจส่งผลให้เกิดพันธะไฮโดรเจนภายในโครงสร้างระหว่างกรดอะมิโนหน่วยย่อยภายในโมเลกุลลดลง ทำให้ความหนืดลดลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jalaja และคณะ ปี 2015 [104] ที่ทำการตัดแปรเจลาตินด้วยเอทิลีนไดเอมีนสำหรับขึ้นเป็นเส้นใยนาโน (nanofiber) และรายงานว่าคุณสมบัติของเจลาตินหลังตัดแปรมีค่าลดลง เนื่องจากสูญเสียพันธะไฮโดรเจนจากการคอนจูเกตเจลาตินด้วยเอทิลีนไดเอมีน เป็นผลให้ไม่สามารถเกิดโครงสร้างเกลียวสามสาย (Triple helix) ได้ ค่าความหนืดของสารละลายเจลาตินทั้ง 4 ชนิด จะเป็นปัจจัยที่มีผลกระทบต่อ การขึ้นรูปอนุภาคด้วยเทคนิคอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (water in oil emulsion) ซึ่งจะกล่าวถึงในลำดับถัดไป

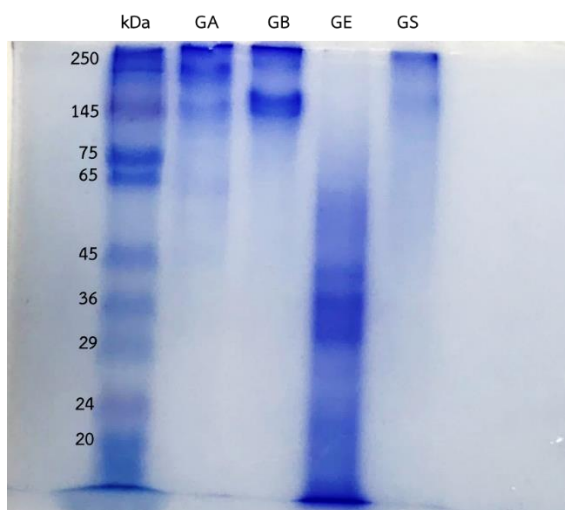
นอกจากนี้การที่ความหนืดของ GE ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ GA นั้นเป็นไปได้ว่ากระบวนการเตรียมเจลาตินที่ตัดแปรด้วยเอทิลีนไดเอมีนทำให้สายโซ่ของเจลาตินถูกไฮโดไลซ์ ทำให้ GE มีสายโซ่สั้นลง ดังนั้นจึงทำการศึกษาเพิ่มเติมว่า GE ถูกไฮโดไลซ์ไปในกระบวนการตัดแปรหรือไม่ โดยวิเคราะห์ขนาดของโมเลกุลของเจลาตินทั้ง 4 ชนิดเบื้องต้นด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยมีหลักการคือ sodium dodecyl sulfate (SDS) ซึ่งเป็นสาร anionic detergent จะเข้าไปจับกับโปรตีน ทำให้โปรตีนเป็นสายตรง จากนั้นให้กระแสไฟฟ้า โมเลกุลของสารที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปที่ขั้วบวก โดยโมเลกุลขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ช้ากว่าโมเลกุลเล็ก ขนาดโมเลกุลของเจลาตินทั้ง 4 ชนิดจะหาจากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุล ($\log MW$) และระยะการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีน (Rf) ตามคู่มือของ

Bio-Rad (ภาคผนวก ง) จากรูปที่ 4.5 พบว่า GA และ GB แสดงแถบ (band) ขนาดโมเลกุลในช่วง 171-132 กิโลดาลตัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hafidz และคณะ (2011) ที่รายงานขนาดของโมเลกุลของเจลาตินทั้งสองชนิดว่าอยู่ในช่วงประมาณ 100-220 กิโลดาลตัน นอกจากนี้ยังพบว่า แถบโปรตีนของ GE มีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วงประมาณ 52.61-33.14 กิโลดาลตัน ซึ่งมีขนาดโมเลกุลลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ GA ที่เป็นเจลาตินตั้งต้น ซึ่งคาดว่าเป็นผลจากกระบวนการปรับค่าความเป็นกรดต่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 11 N เพื่อให้ได้สภาวะที่ EDC ทำปฏิกิริยาในการคอนจูเกตของเอธิลีนไดเอมีน โดยกรดไฮโดรคลอริกที่เติมลงไปจะไปไฮโดรไลซ์เจลาตินให้สายโซ่ให้สั้นลง[109] ทำให้ความหนืดลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ GA สำหรับแถบโปรตีนของ GS ขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วงประมาณ 171.39-132.58 กิโลดาลตัน ซึ่งจัดอยู่ในช่วงเดียวกับ GB และแสดงให้เห็นว่ากระบวนการเตรียม GS ไม่เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์

ตารางที่ 4.2 ค่าความหนืดปรากฏ (Apparent viscosity) ของสารละลายเจลาตินทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ GA GB GE และ GS ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยมวลที่เตรียมในน้ำปราศจากไอออน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ชนิดของเจลาติน	ค่าความหนืด (เซนติพอยส์)
GA	23.50±0.8 ^a
GB	22.90±0.5 ^c
GE	2.84±0.0 ^b
GS	10.73±0.15 ^d

(a, b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95, $p < 0.05$ ของ GE เมื่อเปรียบเทียบกับ GA ; c, d แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95, $p < 0.05$ ของ GS เมื่อเปรียบเทียบกับ GB)



รูปที่ 4.5 ขนาดโมเลกุลของเจลาตินทั้ง 4 ชนิดที่แยกขนาดด้วยวิธี SDS-PAGE

4.2 สมบัติทางเคมีกายภาพ และชีวภาพของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาติน

เจลาตินทั้ง 4 ชนิดได้แก่ GA GB GE และ GS ได้ถูกนำมาขึ้นรูปเป็นอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนด้วยเทคนิคอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (water in oil emulsion) และเชื่อมขวางด้วย 2 วิธี ได้แก่ การเชื่อมขวางด้วยความร้อน (dehydrothermal crosslink) ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (วิธีเชื่อมขวางทางกายภาพ) [110] และการแช่ในสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 20 ชั่วโมง (วิธีเชื่อมขวางทางเคมี) การเชื่อมขวางอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินเป็นการปรับปรุงคุณสมบัติของเจลาตินให้มีความคงตัวมากขึ้น ลดการละลายน้ำ และไม่ถูกย่อยสลายไปอย่างรวดเร็วเมื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นระบบนำส่งยา วิธีการเชื่อมขวางมีผลกระทบต่อสมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินที่ได้ การเชื่อมขวางด้วยความร้อน ความร้อนจะกำจัดหมู่ไฮโดรเจน (H) และหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ออกจากโมเลกุลโปรตีน และทำให้เกิดการสร้างพันธะเอไมด์เชื่อมขวางระหว่างหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) กับหมู่เอมีน (-NH₂) ในขณะที่ H และ OH ที่ถูกกำจัดออกจะควบแน่นเป็นน้ำ 1 โมเลกุล ดังปฏิกิริยาที่แสดงในรูปที่ 2.10 ก) การเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์จะเกิดจากหมู่แอลดีไฮด์ (aldehyde; -CHO) 1 โมเลกุลสร้างพันธะกับหมู่เอมีนของสารโปรตีน 2 โมเลกุล ดังปฏิกิริยาที่แสดงในรูปที่ 2.10 ข) ในส่วนนี้ของงานวิจัย จะเป็นการวิเคราะห์สมบัติทางเคมี กายภาพ และชีวภาพของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินทั้ง 4 ชนิดที่เชื่อม

ขวางด้วย 2 วิธีที่กล่าวมาข้างต้น เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเชื่อมขวางและเลือกวิธีการเชื่อมขวางที่เหมาะสมสำหรับอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินที่จะนำไปประยุกต์ใช้เป็นระบบนำส่งยาต่อไป

4.2.1 ร้อยละผลได้และขนาดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาติน

ในส่วนนี้ของงานวิจัยได้ผลิตอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินด้วยเทคนิคอิมัลชัน ชนิดน้ำในน้ำมัน มีการปั่นกวนซึ่งเป็นแรงกลทำให้สามารถควบคุมขนาดและการกระจายตัวของอนุภาคได้ รวมถึงมีการปรับสัดส่วนของความหนืดในส่วนของวัฏภาคให้เหมาะสมสำหรับการผลิตอนุภาคทรงกลมอีกด้วย สารละลายเจลาติน GA GB และ GS ที่ใช้ในการผลิตมีความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในขณะที่ GE ได้เพิ่มความเข้มข้นเป็นร้อยละ 20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อเพิ่มค่าความหนืดของสารละลาย GE เป็น 11.6 เซนติพอยส์ ให้สามารถขึ้นรูปอนุภาคได้ในขนาดอนุภาคที่ใกล้เคียงกันกับ GA GB และ GS ความหนืดของสารละลายมีผลกระทบต่อขนาดของอนุภาคที่ได้จากการขึ้นรูปโดยเทคนิคอิมัลชัน โดยในปี 1984 Pongpaibul และคณะ [111] ได้ศึกษาความสัมพันธ์ดังกล่าว พบว่าสารละลายที่มีความหนืดมากจะทำให้มีการกระจายตัวของอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ในวัฏภาคน้ำมัน ทำให้ได้อนุภาคขนาดใหญ่

อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินที่ผลิตได้จากเทคนิคดังกล่าว จะแบ่งขนาดที่ได้ ออกเป็น 3 ช่วงคือ ขนาดใหญ่กว่า 100 ไมครอน 76-100 ไมครอน และ 32-75 ไมครอน ตารางที่ 4.3 แสดงร้อยละผลได้ของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินทั้ง 4 ชนิด และทั้ง 3 ขนาด พบว่าอนุภาคที่มีขนาดอยู่ในช่วง 32-75 ไมครอน มีร้อยละผลได้สูงสุด (ร้อยละ 36-88) และมีการกระจายตัวสม่ำเสมอ ซึ่งอนุภาคขนาดในช่วง 32-75 ไมครอนนี้เป็นขนาดอนุภาคที่ผู้วิจัยได้เลือกไปศึกษาต่อ เนื่องจากมีความเหมาะสมสำหรับการใช้งานโดยการฉีดผ่านหัวเข็มฉีดยาได้โดยไม่เกิดการอุดตัน หรือรวมตัวเป็นก้อน (aggregation)

ตารางที่ 4.3 ร้อยละผลได้ของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ GA GB GE และ GS ที่ผลิตด้วยเทคนิคอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันและคัดแยกขนาดด้วยตะแกรง

อนุภาคทรงกลม ขนาดไมครอน เจลาติน	ร้อยละผลได้ของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินที่ขนาดต่างๆ		
	>100 ไมครอน	76-100 ไมครอน	32-75 ไมครอน
GA	6.18±1.3	5.81±2.7	88.01±1.4
GB	28.38±1.6	34.98±4.4	36.64±2.8
GE	4.31±0.6	17.25±3.7	78.44±4.3
GS	22.12±6.0	20.12±9.0	43.54±5.2

4.2.2 โครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาติน

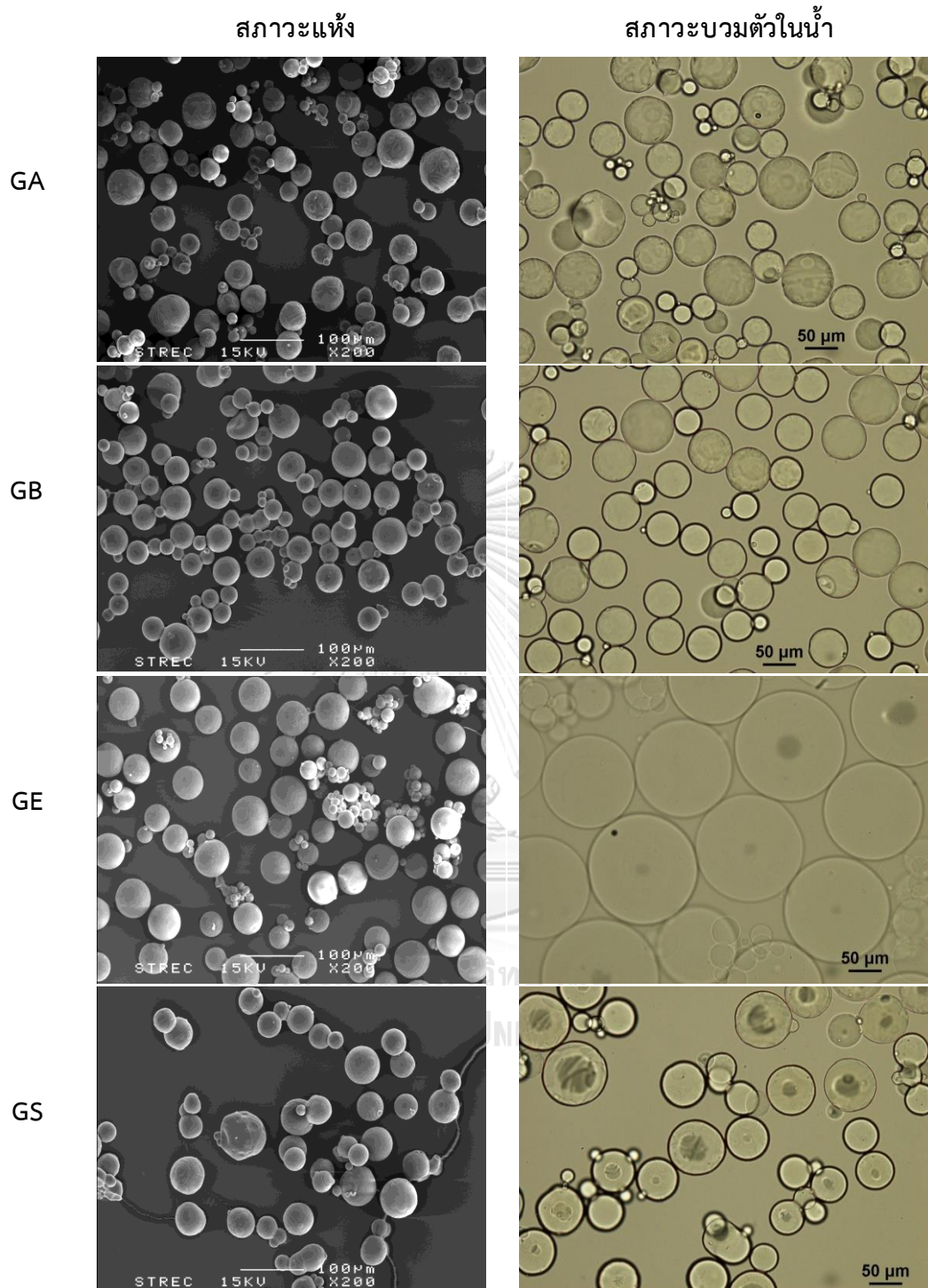
จากการวิเคราะห์โครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินทั้ง 4 ชนิดที่มีขนาดอยู่ในช่วง 32-75 ไมครอน ในสภาวะแห้งและสภาวะบวมตัวในน้ำด้วยการส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและกล้องจุลทรรศน์ตามลำดับ พบว่าอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินทั้ง 4 ชนิดที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยความร้อน และสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ มีลักษณะเป็นทรงกลม พื้นผิวเรียบ และมีขนาดอยู่ในช่วง 32-75 ไมครอน สอดคล้องกับขนาดที่คัดแยกผ่านตะแกรงดังแสดงในรูปที่ 4.6 และ 4.7 ตามลำดับ

เมื่อทำการหาค่าขนาดเฉลี่ยของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยความร้อนดังแสดงในตารางที่ 4.4 พบว่าอนุภาคขนาดไมครอนเจลาตินทั้ง 4 ชนิดในสภาวะแห้งมีขนาดเฉลี่ยอยู่ในช่วง 43-47 ไมครอน และมีขนาดเฉลี่ยในสภาวะบวมตัวในน้ำอยู่ในช่วง 73-150 ไมครอน และเมื่อคำนวณอัตราส่วนการบวมน้ำจากขนาดอนุภาคที่เปลี่ยนแปลงไป พบว่า GE มีอัตราส่วนการบวมน้ำสูงที่สุดถึง 3.1 เท่าของขนาดอนุภาคเริ่มต้น ในขณะที่ GA GB และ GS มีอัตราส่วนการบวมน้ำ 1.7 1.7 และ 1.9 ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่า GE อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

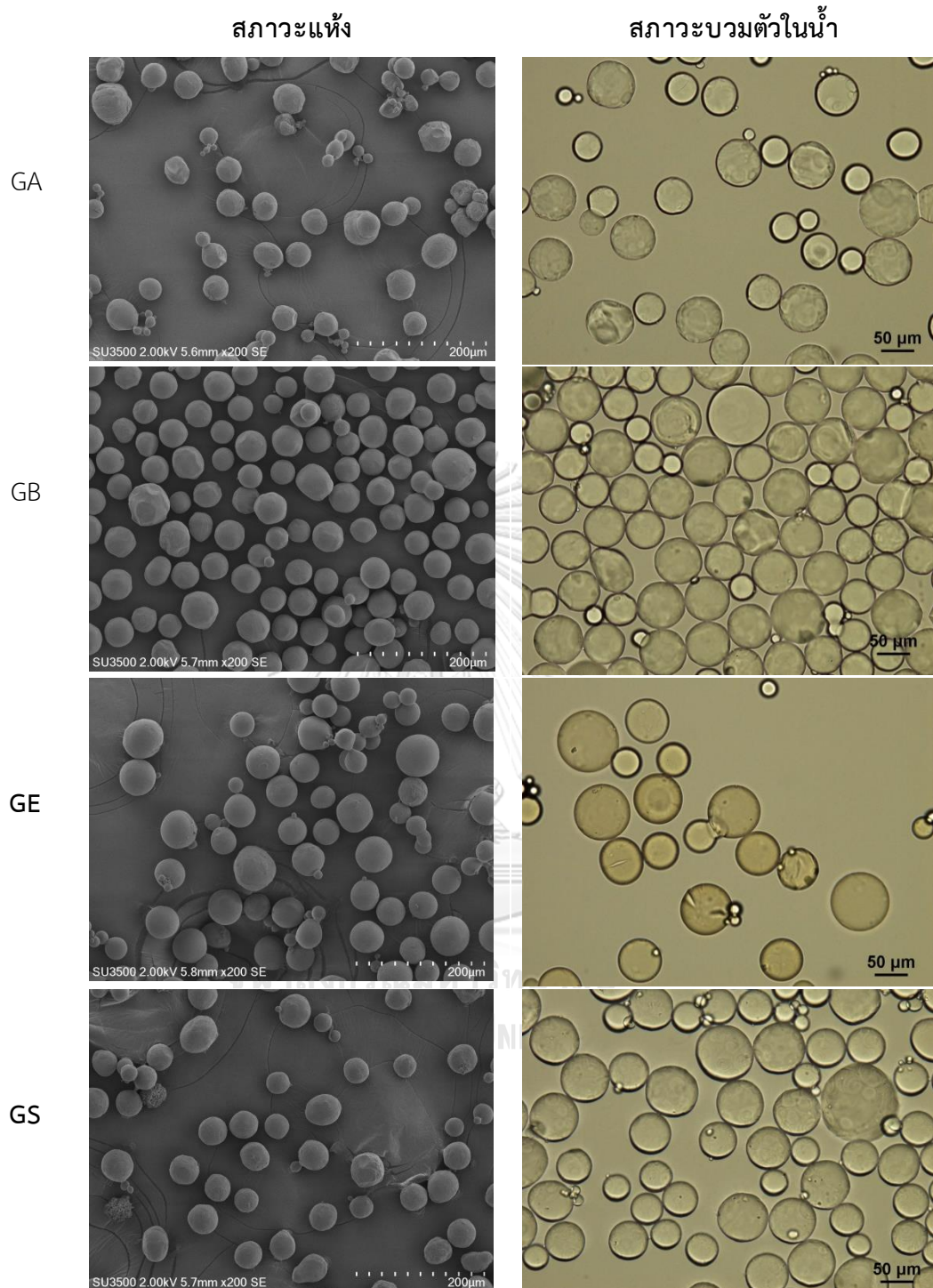
สำหรับอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ มีขนาดเฉลี่ยในสภาวะแห้งประมาณ 42-49 ไมครอน และมีขนาดเฉลี่ยในสภาวะบวมตัวในน้ำอยู่ในช่วง 66-73 ไมครอน ดังแสดงในตารางที่ 4.4 อัตราส่วนการบวมน้ำของอนุภาคทุกสูตรมีค่าใกล้เคียงกัน

อนุภาค GE ที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตาไรต์ไฮด์มีอัตราส่วนการบวมน้ำลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาค GE ที่เชื่อมขวางด้วยความร้อน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารละลายกลูตาไรต์ไฮด์มีประสิทธิภาพในการเชื่อมขวาง GE มากกว่าการใช้ความร้อน เพราะสามารถลดการละลายและการบวมตัวในน้ำของอนุภาคได้อย่างชัดเจน [112-114]





รูปที่ 4.6 ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินทั้ง 4 ชนิดได้แก่ GA GB GE และ GS ที่ได้จากการขึ้นรูปด้วยเทคนิคอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน และเชื่อมขวางด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียสในสภาวะแห้งและสภาวะบวมตัวในน้ำ วิเคราะห์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 200 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 100 ไมครอน) และกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 20 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 50 ไมครอน)



รูปที่ 4.7 ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินทั้ง 4 ชนิดได้แก่ GA GB GE และ GS ที่ได้จากการขึ้นรูปด้วยเทคนิคอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน และเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ในสภาวะแห้งและสภาวะบวมตัวในน้ำวิเคราะห์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 200 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 200 ไมครอน) และกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 20 เท่า (สเกลบาร์เท่ากับ 50 ไมครอน)

ตารางที่ 4.4 ขนาดเฉลี่ยและอัตราส่วนการบวมน้ำของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ GA GB GE และ GS ที่ได้จากการขึ้นรูปด้วยเทคนิคอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน และเชื่อมขวางด้วยความร้อนและสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ในสภาวะแห้งและสภาวะบวมตัวในน้ำ

อนุภาค ทรง กลม ขนาด ไมครอน เจลาติน	เชื่อมขวางด้วยความร้อน			เชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์		
	ขนาดเฉลี่ยของอนุภาคทรง กลมขนาดไมครอนเจลาติน (ไมครอน)		อัตราส่วน การ บวมน้ำ*	ขนาดเฉลี่ยของอนุภาคทรง กลมขนาดไมครอนเจลาติน (ไมครอน)		อัตราส่วน การบวม น้ำ*
	สภาวะแห้ง	สภาวะบวมตัว ในน้ำ		สภาวะแห้ง	สภาวะบวมตัว ในน้ำ	
GA	43.72±8.5 ^a	75.92±27.0 ^a	1.7	43.23±6.2 ^a	66.22±7.4 ^a	1.5
GB	43.53±7.8 ^c	73.56±10.9 ^c	1.7	45.37±5.9 ^c	69.62±8.4 ^c	1.5
GE	49.04±9.5 ^b	150.47±24.9 ^b	3.1	49.15±6.6 ^b	73.16±11.3 ^b	1.5
GS	47.65±9.9 ^c	89.33±33.2 ^d	1.9	46.65±5.9 ^c	67.35±10.3 ^c	1.4

(a, b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95, $p < 0.05$ ของ GE เมื่อเปรียบเทียบกับ GA ในสภาวะเดียวกัน; c, d แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95, $p < 0.05$ ของ GS เมื่อเปรียบเทียบกับ GB ในสภาวะเดียวกัน)

* อัตราส่วนการบวมน้ำ วิเคราะห์จากการเปลี่ยนแปลงขนาดของอนุภาคก่อนและหลังบวมตัวในน้ำ

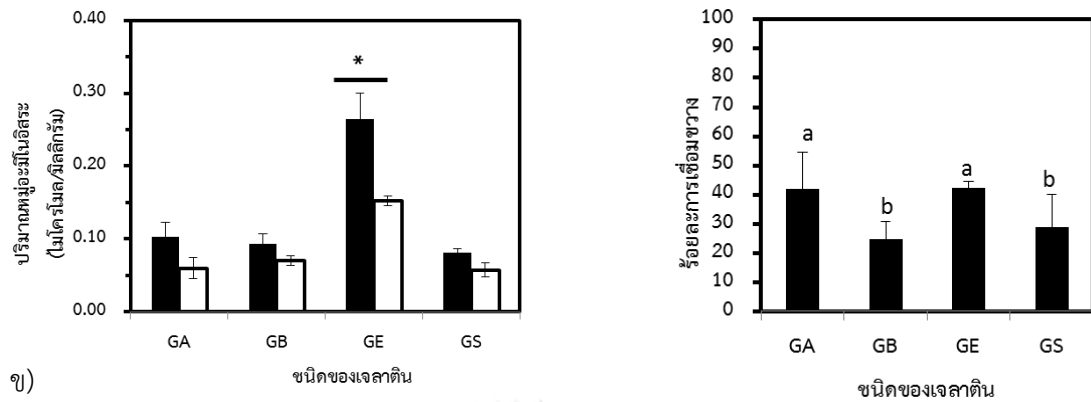
4.2.3 ร้อยละการเชื่อมขวางอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยความร้อนและสารละลายกลูตารัลดีไฮด์

เนื่องด้วยวิธีการเชื่อมขวางทั้ง 2 วิธีที่ศึกษาในงานวิจัยนี้มีการใช้หมู่อะมิโนในการเกิดปฏิกิริยาดังนั้นการวัดปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่ลดลงหลังการเชื่อมขวางด้วยวิธี TNBS จะทำให้วิเคราะห์ร้อยละการเชื่อมขวางได้ รูปที่ 4.8 ก (ซ้าย) แสดงปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินก่อนและหลังเชื่อมขวางด้วยความร้อน โดยก่อนเชื่อมขวาง GE มีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระมากที่สุดเท่ากับ 0.26 ไมโครโมล/มิลลิกรัม และ GS มีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระน้อยที่สุดเท่ากับ 0.08 ไมโครโมล/มิลลิกรัม โดยปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่มากขึ้นและลดลงมาจากการตัดแปรรด้วยเอธิลีนไดเอมีนและซัคซินิคแอนไฮไดรด์ตามที่ได้อธิบายไว้ในหัวข้อ 4.1.1 เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบ

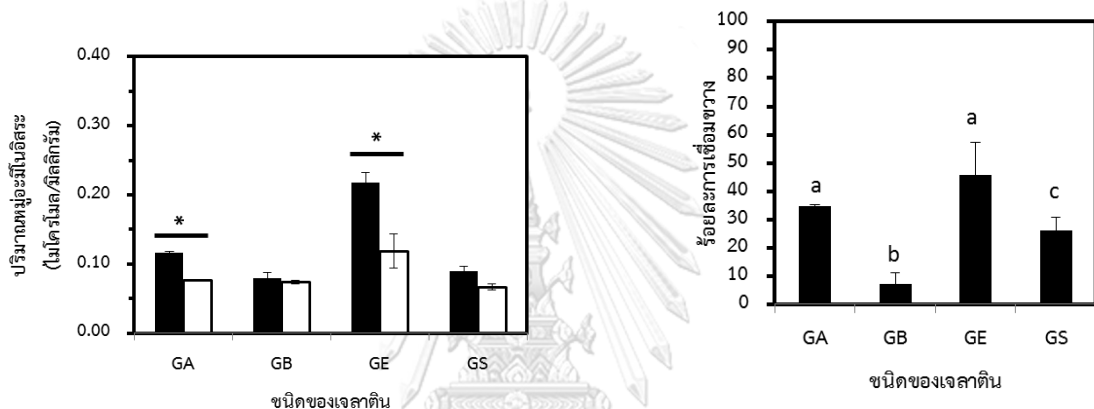
อนุภาคระหว่างก่อนและหลังเชื่อมขวางพบว่า อนุภาคเจลาตินทุกชนิด มีปริมาณอะมิโนอิสระลดลง หลังการเชื่อมขวาง และเมื่อคำนวณร้อยละการเชื่อมขวางของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่เชื่อมขวางด้วยความร้อนดังแสดงในรูปที่ 4.8 ก (ขวา) พบว่า GA และ GE เกิดการเชื่อมขวางประมาณร้อยละ 42 ถึงแม้ว่า GE จะมีหมู่อะมิโนเพิ่มขึ้นมากกว่า GA จากการถูกตัดแปรด้วย เอธิลีนไดเอมีน แต่ตำแหน่งที่สามารถเกิดปฏิกิริยาเชื่อมขวางได้อาจมีไม่มากเนื่องจากการเชื่อมขวางด้วยความร้อนจะต้องใช้หมู่คาร์บอกซิลิกและหมู่เอมีนที่อยู่ตำแหน่งใกล้เคียงกันเท่านั้นในการเกิดปฏิกิริยา ร้อยละการเชื่อมขวางของ GA และ GE จึงมีค่าไม่ต่างกัน ส่วน GB และ GS เกิดการเชื่อมขวางด้วยความร้อนได้ร้อยละ 25 และ 29 ตามลำดับ เนื่องจาก GB และ GS มีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระเริ่มต้นน้อย การเชื่อมขวางจึงเกิดได้น้อยกว่า

สำหรับอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตาไรลดีไฮด์ (รูป 4.8 ข) พบว่า แนวโน้มของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระก่อนและหลังเชื่อมขวางและร้อยละการเชื่อมขวางคล้ายคลึงกับกรณีของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยความร้อนข้างต้น โดย GE เกิดการเชื่อมขวางมากที่สุดประมาณร้อยละ 46 ในขณะที่ GB เกิดการเชื่อมขวางน้อยที่สุดเพียงร้อยละ 7 ซึ่งน่าเป็นผลจาก GB มีหมู่คาร์บอกซิลิกเป็นองค์ประกอบมาก ในขณะที่กลไกการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตาไรลดีไฮด์ เป็นการเชื่อมขวางระหว่างหมู่เอมีน นอกจากการวิเคราะห์ร้อยละการเชื่อมขวางด้วยวิธี TNBS งานวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์ประสิทธิภาพหรือความสำเร็จของการเชื่อมขวางของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินจากการศึกษาการละลายน้ำและการย่อยสลายของอนุภาคซึ่งจะกล่าวในลำดับถัดไป

ก)



ข)



รูปที่ 4.8 ก (ซ้าย) ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน เจลาตินทั้ง 4 ชนิดได้แก่ GA GB GE และ GS ก่อน (■) และหลัง (□) การเชื่อมขวางด้วยความร้อน ก (ขวา) ร้อยละการเชื่อมขวางอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน เจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยความร้อน ข (ซ้าย) ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน เจลาตินทั้ง 4 ชนิดได้แก่ GA GB GE และ GS ก่อน (■) และหลัง (□) การเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ข (ขวา) ร้อยละการเชื่อมขวางอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน เจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์

(a แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95, $p < 0.05$ ของ GE เมื่อเปรียบเทียบกับ GA; b, c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95, $p < 0.05$ ของ GS เมื่อเปรียบเทียบกับ GB; * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95, $p < 0.05$ ของอนุภาคก่อนและหลังการเชื่อมขวาง)

4.2.4 การละลายน้ำของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยความร้อนและสารละลายกลูตารัลดีไฮด์

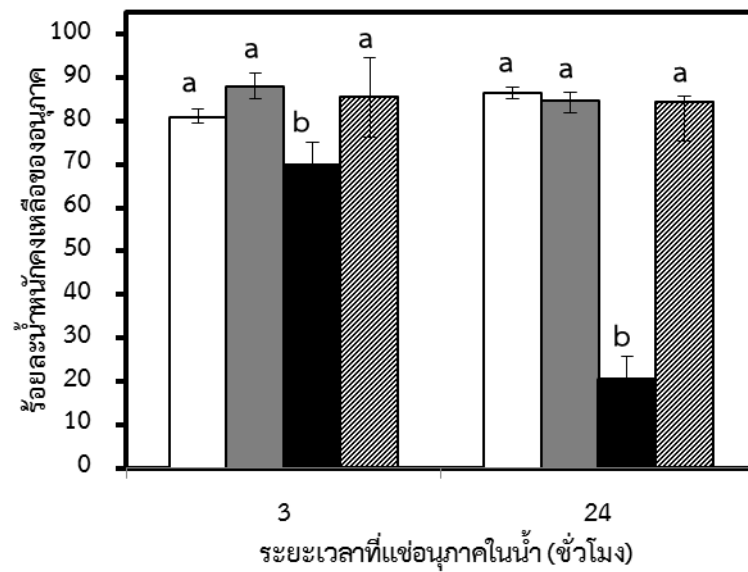
การทดลองนี้ทำโดยการนำอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินทั้ง 4 ชนิดที่เชื่อมขวางด้วยความร้อนและสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ แช่ในน้ำปราศจากไอออนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 3 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์หาน้ำหนักคงเหลือของอนุภาค น้ำหนักส่วนที่คงเหลือแสดงถึงส่วนที่ถูกเชื่อมขวางสำเร็จซึ่งจะไม่ละลายน้ำไปในช่วงเวลา 24 ชั่วโมงแรก ดังนั้น ผลการวิเคราะห์หาส่วนที่ไม่ละลายน้ำของอนุภาคนี้จึงแสดงถึงประสิทธิภาพหรือความสำเร็จของการเชื่อมขวางอนุภาคได้อีกนัยหนึ่ง จากผลการศึกษาในรูปที่ 4.9 ก) ซึ่งแสดงร้อยละน้ำหนักคงเหลือของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่เชื่อมขวางด้วยความร้อน พบว่า GA GB และ GS มีร้อยละน้ำหนักคงเหลือประมาณ 80-85 ในขณะที่ GE มีน้ำหนักคงเหลือเพียงร้อยละ 72.86 และ 24.16 ที่เวลา 3 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ การที่ GE ละลายน้ำถึงร้อยละ 75.84 (คงเหลือร้อยละ 24.16) เมื่อแช่ในน้ำเพียง 24 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าการวิธีเชื่อมขวางด้วยความร้อนไม่มีประสิทธิภาพในการเชื่อมขวางอนุภาค GE สำหรับอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ดังแสดงในรูปที่ 4.9 ข) พบว่าอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนทั้ง 4 ชนิด มีร้อยละน้ำหนักคงเหลือประมาณ 92-95 ทั้งที่เวลา 3 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์มีประสิทธิภาพช่วยลดการละลายน้ำของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินทั้ง 4 ชนิดได้

ในทางทฤษฎี การเชื่อมขวางโปรตีนด้วยการใช้ความร้อนใช้กลไกการควบแน่น (condensation) โดยกลไกดังกล่าวจะกำจัดน้ำออกจากโครงสร้างของโปรตีน 1 โมเลกุลต่อ 1 โมเลกุลของหมู่คาร์บอกซิลิกที่ทำปฏิกิริยาเชื่อมขวางกับ 1 โมเลกุลของหมู่เอมีน จึงเกิดการเชื่อมขวางระหว่างหมู่ดังกล่าวคล้ายกับปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชัน (esterification) [87, 115] ซึ่งปฏิกิริยานี้มีข้อจำกัดคือ สามารถเกิดการเชื่อมขวางได้เฉพาะในกรณีตำแหน่งหมู่คาร์บอกซิลิกกับหมู่เอมีนของโปรตีนอยู่ใกล้กันเท่านั้น ในขณะที่การเชื่อมขวางโปรตีนด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์มีกลไกการเชื่อมขวางที่เกิดจากปฏิกิริยา Schiff bases ระหว่างหมู่คาร์บอนิล (C=O) ของแอลดีไฮด์กับบิเอเล็คตรอนคู่โดดเดี่ยวของอะมิโน ϵ -amino groups ซึ่งพบในไลซีน ไฮดรอกซีไลซีน และหมู่อะมิโนที่เป็นอิสระของปลายสายเอ็น (N-terminal residue) โดยหมู่แอลดีไฮด์ 1 หมู่จะสามารถเชื่อมขวางระหว่างหมู่เอมีนของโปรตีนได้ 2 หมู่ [89] สำหรับงานวิจัยนี้ จะเห็นได้ชัดว่า สารละลายกลูตารัลดีไฮด์มีประสิทธิภาพ

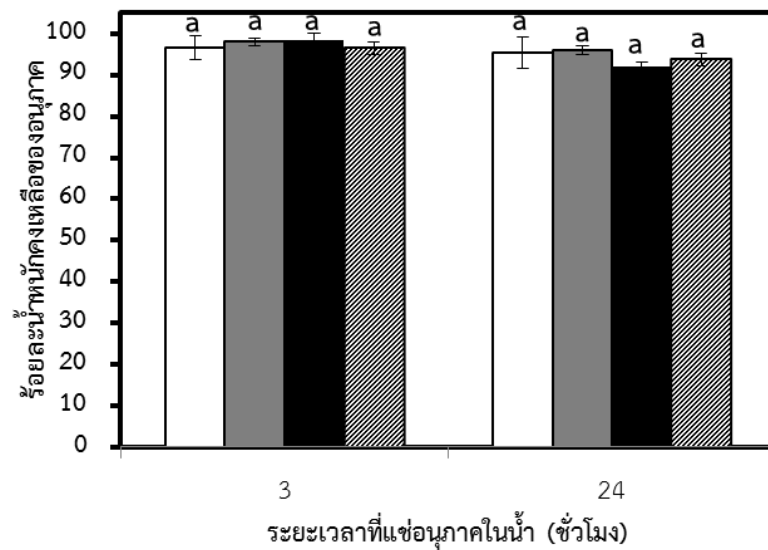
ในการเชื่อมขวางอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินทั้ง 4 ชนิด มากกว่าการใช้ความร้อน เนื่องจากเจลาตินเป็นโปรตีนที่มีปริมาณหมู่เอมีนสำหรับการเชื่อมขวางด้วยสารละลายยกลูตารัลดีไฮด์เป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ การเชื่อมขวางด้วยความร้อนจะเกิดได้เฉพาะในกรณีที่หมู่คาร์บอกซิลิกกับหมู่เอมีนของโปรตีนอยู่ใกล้กันเท่านั้น ตามที่อธิบายไปข้างต้น เมื่อพิจารณาชนิดของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาติน พบว่า GE ซึ่งเป็นเจลาตินชนิดที่ถูกดัดแปรด้วยการคอนจูเกตด้วยเอธิลีนไดเอมีนที่ตำแหน่งหมู่คาร์บอกซิล ทำให้มีปริมาณหมู่เอมีนเพิ่มขึ้น และมีหมู่คาร์บอกซิลลดลง จึงเป็นเหตุให้การเชื่อมขวางด้วยความร้อนซึ่งเชื่อมขวางระหว่างหมู่เอมีนกับหมู่คาร์บอกซิลิกที่อยู่ใกล้กันมีประสิทธิภาพต่ำ อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้สารละลายยกลูตารัลดีไฮด์ในการเชื่อมขวาง พบว่าเจลาตินทั้ง 4 ชนิดมีปริมาณหมู่เอมีนมากเพียงพอสำหรับปฏิกิริยาการเชื่อมขวาง จึงทำให้การเชื่อมขวางมีประสิทธิภาพและมีการละลายน้ำลดลง



ก)



ข)

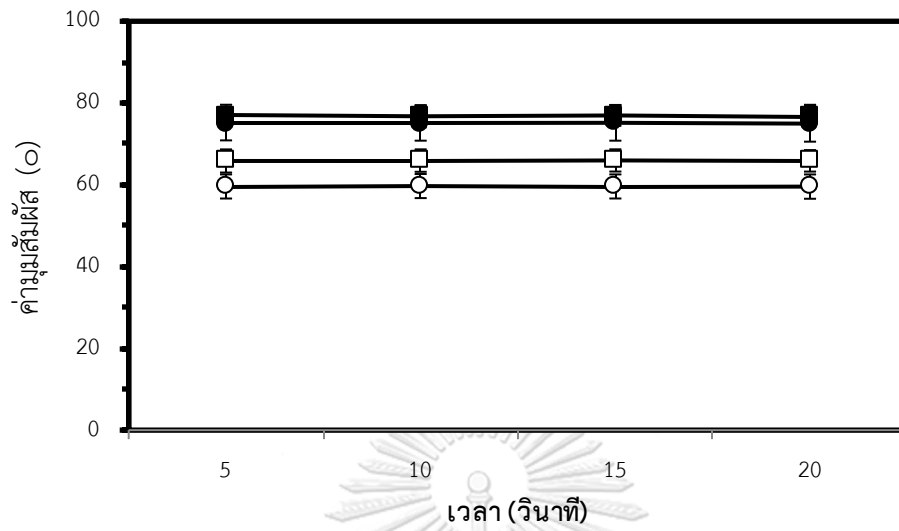


รูปที่ 4.9 ร้อยละน้ำหนักคั่งเหลือของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาติน ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ GA (□) GB (■) GE (■) และ GS (▨) ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วย ก) ความร้อนที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส ข) สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 หลังจากแช่ในน้ำที่ปราศจากไอออนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 และ 24 ชั่วโมง (a, b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95, $p < 0.05$ ของ GE เมื่อเปรียบเทียบกับ GA และ GS เมื่อเปรียบเทียบกับ GB ของระยะเวลาที่แช่อนุภาคในน้ำเท่ากัน)

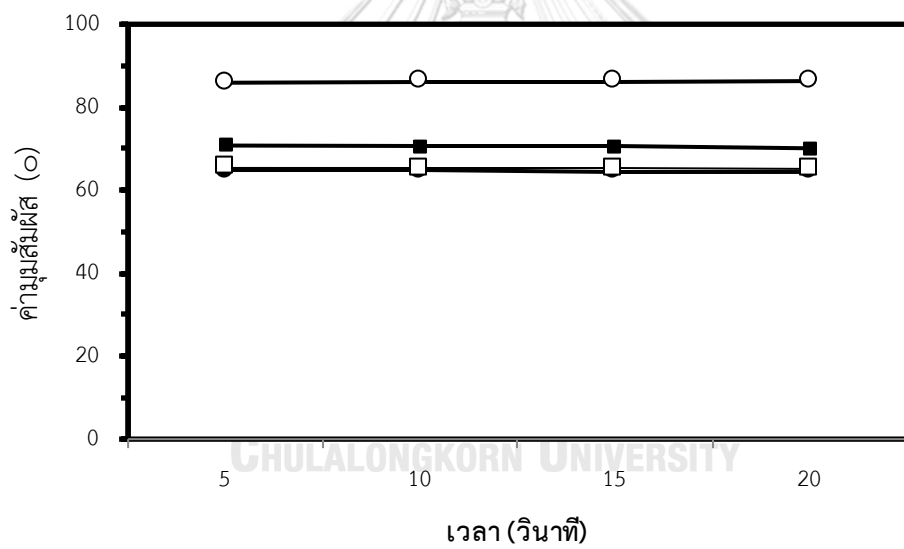
4.2.5 ค่ามุมสัมพัทธ์น้ำบนฟิล์มเจลลาตินที่เชื่อมขวางด้วยความร้อนและสารละลายกลูตารัลดีไฮด์

ผลการศึกษาค่ามุมสัมพัทธ์น้ำบนฟิล์มเจลลาตินที่เชื่อมขวางด้วยความร้อนที่แสดงในรูปที่ 4.10 ก) จะเห็นได้ว่าค่ามุมสัมพัทธ์น้ำของฟิล์มเจลลาตินทั้ง 4 ชนิดที่เวลา 0 5 10 และ 15 วินาทีอยู่ในช่วง $0^\circ < \theta < 90^\circ$ ซึ่งจัดอยู่ในวัสดุที่ชอบน้ำ โดยฟิล์ม GE มีค่ามุมสัมพัทธ์น้ำน้อยกว่าฟิล์มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือฟิล์ม GE มีความชอบน้ำสูงกว่าฟิล์มอื่น ซึ่งสอดคล้องกับผลการละลายน้ำของอนุภาค GE ที่เชื่อมขวางด้วยความร้อนที่มีการละลายสูงที่สุด สำหรับการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ของฟิล์มเจลลาตินทั้ง 4 ชนิดที่เวลา 0 5 10 และ 15 วินาทีแสดงในรูปที่ 4.10 ข) มีค่ามุมสัมพัทธ์น้ำอยู่ในช่วง $0^\circ < \theta < 90^\circ$ ซึ่งจัดอยู่ในวัสดุที่ชอบน้ำเช่นเดียวกันฟิล์มที่เชื่อมขวางด้วยความร้อน ค่ามุมสัมพัทธ์น้ำของฟิล์ม GE ที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์มีค่ามุมสัมพัทธ์น้ำมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์ม GE ที่เชื่อมขวางด้วยความร้อน สอดคล้องกับผลการละลายน้ำของอนุภาค GE ที่แสดงในหัวข้อ 4.2.4 ว่าการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์สามารถลดการละลายน้ำ (ลดสมบัติความชอบน้ำ) ของ GE ได้ และสอดคล้องกับผลร้อยละการเชื่อมขวางที่แสดงในหัวข้อ 4.2.3

ก)



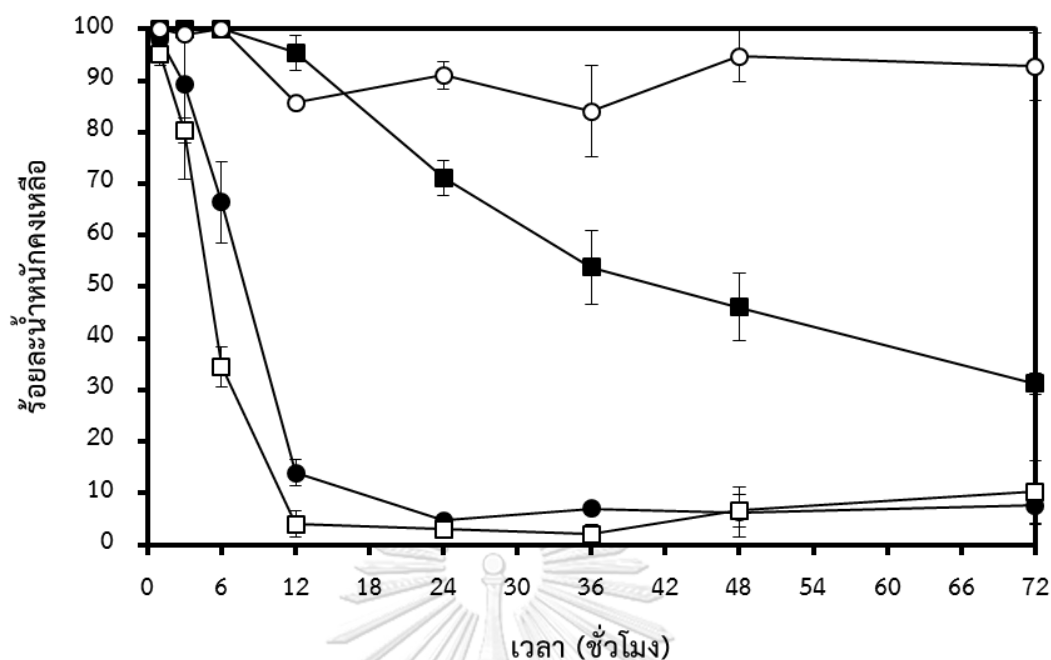
ข)



รูปที่ 4.10 ค่ามุ่มสัมพัทธ์น้ำของฟิล์มเจลาตินทั้ง 4 ชนิดได้แก่ GA (●) GB (■) GE (○) และ GS (□) ที่เชื่อมขวางด้วย ก) ความร้อน ข) สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ที่เวลา 5 10 15 และ 20 วินาที

4.2.6 ระยะเวลาการย่อยสลายทางชีวภาพของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินในระดับห้องปฏิบัติการ (In vitro biodegradability)

ร้อยละการเชื่อมขวางและการละลายน้ำของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยความร้อนและสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ พบว่าอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนที่เชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์สามารถเชื่อมขวางได้สำเร็จมากกว่าการเชื่อมขวางด้วยความร้อน เนื่องจากมีการละลายน้ำน้อยกว่า ดังนั้นในการทดสอบต่อจากนี้ไป จะเลือกอนุภาคขนาดไมครอนเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์มาศึกษาการย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ และประสิทธิภาพในการกักเก็บ และควบคุมการปลดปล่อยสาร EGCG การศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ทำในสภาวะจำลองร่างกายที่มีเอนไซม์คอลลาจีเนส (collagenase) เนื่องจากเอนไซม์คอลลาจีเนสมีความจำเพาะเจาะจงในการสลายพันธะเปปไทด์ของคอลลาเจนและเจลาตินซึ่งเป็นอนุพันธ์ของคอลลาเจน และเป็นเอนไซม์ที่พบได้ในร่างกาย [116] รูปที่ 4.11 แสดงร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินทั้ง 4 ชนิดที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ หลังจากแช่ในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนสเป็นเวลาต่างๆ พบว่า อนุภาคทุกชนิดเกิดการย่อยสลายในสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส โดยในช่วงเวลา 12 ชั่วโมงแรก GA และ GS เกิดการย่อยอย่างรวดเร็วจนเหลือน้ำหนักแห้งไม่ถึงร้อยละ 20 ของน้ำหนักเริ่มต้น ในขณะที่ GB และ GE เกิดการย่อยสลายเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (น้อยกว่าร้อยละ 15) หลังจาก 12 ชั่วโมง GB เริ่มเกิดการย่อยสลายอย่างต่อเนื่องจนถึงระยะเวลา 72 ชั่วโมง ส่วน GE ย่อยสลายอย่างช้าๆ และเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่เวลา 72 ชั่วโมง GE มีน้ำหนักแห้งคงเหลือมากที่สุดประมาณร้อยละ 92.7 ตามด้วย GB GS และ GA มีน้ำหนักแห้งคงเหลือประมาณร้อยละ 31.2 10.3 และ 7.6 ตามลำดับ การที่ GE ย่อยสลายช้าที่สุดน่าจะเป็นเพราะว่า GE เกิดการเชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์ได้มาก เพราะโครงสร้างโมเลกุลมีหมู่อะมิโนจำนวนมาก นอกจากนี้ อาจจะเนื่องมาจาก GE มีโครงสร้างที่ถูกตัดแปรจากโครงสร้างโมเลกุลเดิมของ GA ผลจากการตัดแปรดังกล่าวอาจทำให้โครงสร้างเคมีปฐมภูมิและทุติยภูมิ และขนาดของโมเลกุล GE แตกต่างจากโมเลกุล GA ซึ่งอาจมีผลให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาได้ยากขึ้น

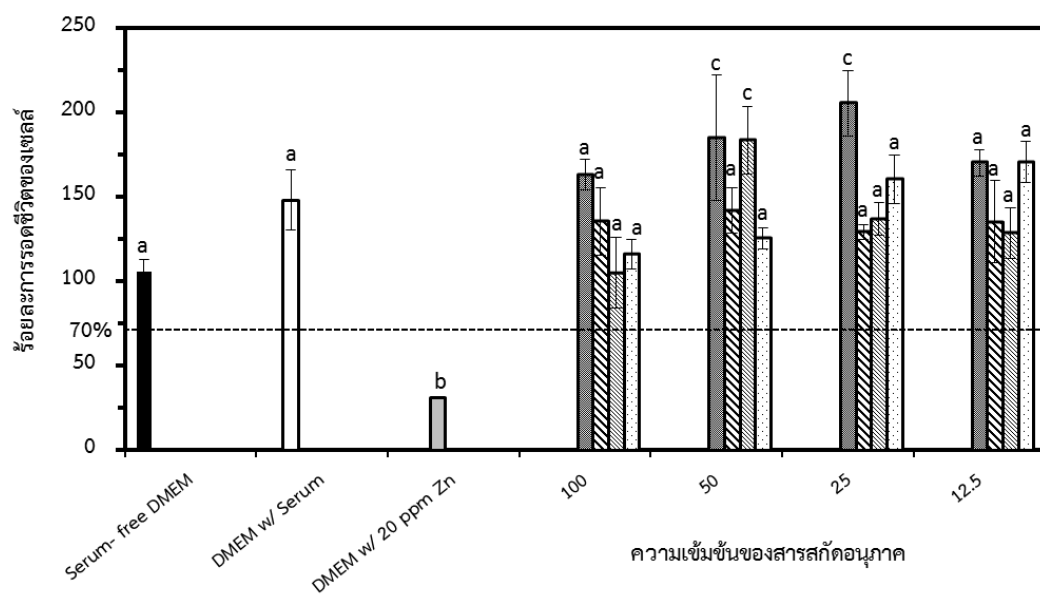


รูปที่ 4.11 ร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนของเจลาตินทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ GA (●) GB (■) GE (○) และ GS (□) ที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ภายหลังจากแช่ในเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 125 หน่วยต่อมิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

4.2.7 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาติน

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ L929 ของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ใช้วิธีการทางอ้อมตามมาตรฐาน ISO 10993 part 5 และเตรียมตัวอย่างสารสกัดตามมาตรฐาน ISO 10993 part 12 ใช้สารสกัดอนุภาคที่ความเข้มข้นเจือจางร้อยละ 100 50 25 และ 12.5 โดยสารที่ใช้สกัดอนุภาคคืออาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ไม่มีซีรัมเป็นองค์ประกอบ (serum-free DMEM) ผลจากการศึกษา แสดงเป็นร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ในกลุ่มตัวอย่างสารสกัดจากอนุภาคเทียบกับร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์กลุ่มควบคุมเชิงลบที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มีซีรัมเป็นองค์ประกอบ (DMEM w/ serum) กับเซลล์กลุ่มควบคุมเชิงบวกที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ประกอบด้วยสารละลายซิงค์อะซีเตตความเข้มข้น 20 ppm (DMEM w/ 20 ppm Zn) ดังแสดงในรูปที่ 4.12 พบว่า เซลล์ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัดจากอนุภาคทุกความเข้มข้นมีร้อยละการรอดชีวิตสูงกว่าร้อยละ 100 และสูงกว่าเซลล์กลุ่มที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ไม่มีซีรัมเป็นองค์ประกอบ ในขณะที่เซลล์กลุ่มควบคุมเชิงบวกที่

เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ประกอบด้วยสารละลายซิงค์อะซีเตต มีร้อยละการรอดชีวิตเพียงร้อยละ 30 ตามมาตรฐาน ISO10995 part 5 มีเกณฑ์กำหนดไว้ว่าร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์จะต้องไม่ต่ำกว่าร้อยละ 70 จึงจะถือว่าวัสดุไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า สารสกัดจากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินทุกสูตร ทุกความเข้มข้น ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ L929 ในระดับห้องปฏิบัติการ



รูปที่ 4.12 ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ L929 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัดจากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ GA (■) GB (▨) GE (▩) และ GS (▤) ที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (a, b และ c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95, $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ไม่มีซีรัมเป็นองค์ประกอบ (serum-free DMEM))

4.3 ประสิทธิภาพในการกักเก็บและควบคุมการปลดปล่อยสาร EGCG ของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินในระดับห้องปฏิบัติการ

4.3.1 ประสิทธิภาพในการกักเก็บสาร EGCG บนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาติน

ผลการศึกษาความสามารถในการกักเก็บสาร EGCG ของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินทั้ง 4 ชนิดที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ แสดงในตารางที่ 4.5 พบว่า อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน GS และ GB ประสิทธิภาพในการกักเก็บ EGCG (Entrapment efficiency) อยู่ที่ร้อยละ 8.5-8.9 ในขณะที่อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน GA และ GE มีประสิทธิภาพในการกักเก็บ EGCG ได้ร้อยละ 6.3 และ 3.3 ตามลำดับ โดยประสิทธิภาพในการกักเก็บสาร EGCG ของเจลาตินทั้ง 4 ชนิดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งจากผลการศึกษาสามารถอธิบายได้จากความสัมพันธ์ของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างสารในกลุ่มฟินอลกับโปรตีน (Phenolic-Protein Interaction) โดยโครงสร้างของฟินอลเป็นโครงสร้างวงแหวนเบนซีนที่ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ซึ่งสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding) กับหมู่คาร์บอกซิลิกของโปรตีน [117] แสดงดังรูปที่ 4.13 นอกจากการเกิดพันธะไฮโดรเจนแล้วยังมีแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) เกิดขึ้นระหว่างกรดอะมิโนที่มีหมู่ฟังก์ชันอะโรมาติก (Aromatic amino acid residues) เช่น ไทโรซีน (Tyrosine) ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) กับสารกลุ่มฟินอลิก (Phenolic compound) [118] เมื่อพิจารณาโครงสร้างของเจลาติน GB และ GS กับโครงสร้างของสาร EGCG ซึ่งมีโครงสร้างวงแหวนเบนซีน 3 วง จะเห็นได้ว่าโครงสร้างของ GB และ GS มีหมู่คาร์บอกซิลิกเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างมากกว่า GA และ GE ประกอบกับการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ไม่ได้ใช้หมู่คาร์บอกซิลิกในการเชื่อมขวาง จึงสนับสนุนการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของ EGCG กับหมู่คาร์บอกซิลิกของ GB และ GS ซึ่งมีผลให้อนุภาค GB และ GS มีประสิทธิภาพในการกักเก็บ EGCG สูงกว่าอนุภาค GE และ GA ที่มีหมู่คาร์บอกซิลิกน้อยกว่า โดยเฉพาะอย่างยิ่ง GE ซึ่งถูกเอธิลีนไดเอมีนคอนจูเกตที่ตำแหน่งคาร์บอกซิลิกส่งผลให้หมู่คาร์บอกซิลิกลดลง จึงมีโอกาสเกิดพันธะไฮโดรเจนดังกล่าว่น้อย ทำให้มีประสิทธิภาพในการกักเก็บ EGCG ต่ำที่สุด

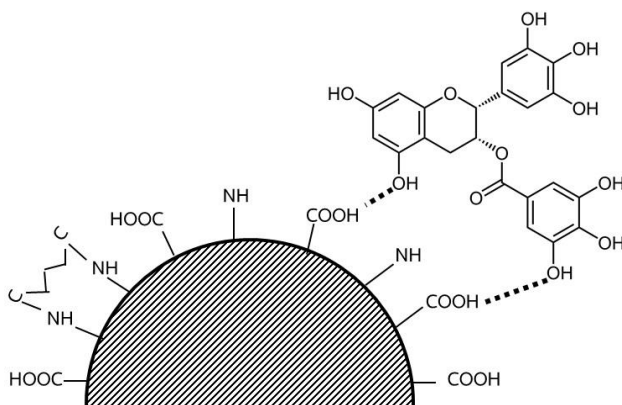
เมื่อพิจารณาปริมาณ EGCG ที่ถูกกักเก็บบนอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินทั้ง 4 ชนิดพบว่าปริมาณของ EGCG ที่ถูกกักเก็บในอนุภาคสอดคล้องกับผลประสิทธิภาพในการกักเก็บ

EGCG ช้างต้น โดยอนุภาค GB และ GS ที่มีหมู่คาร์บอกซิลิกจำนวนมาก จะมีปริมาณ EGCG ที่ถูกกักเก็บสูงประมาณ 0.48-0.51 มิลลิกรัมต่ออนุภาค 10 มิลลิกรัม ในขณะที่อนุภาค GA และ GE มีปริมาณ EGCG ที่ถูกกักเก็บเพียง 0.36 และ 0.19 มิลลิกรัมต่ออนุภาค 10 มิลลิกรัม ตามลำดับ ปริมาณดังกล่าวจัดว่าเป็นปริมาณที่ค่อนข้างมากสำหรับการนำไปฉีดรักษาแบบเฉพาะที่ ซึ่งเป็นวิธีการให้ยาที่มีค่าใช้จ่าย (dose) ของยาน้อย เนื่องจากเป็นการให้ยาที่มีการสูญเสียของยาต่ำ เมื่อเทียบกับ การรับประทานชาเขียว 1 ถ้วย จะได้รับปริมาณ EGCG 200-300 มิลลิกรัม แต่มีการสูญเสีย EGCG ก่อนจะถึงอวัยวะเป้าหมาย Leong และคณะรายงานว่าหนูที่ได้รับสาร EGCG โดยการฉีดเข้าช่องท้อง ในปริมาณ 25 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมของหนู มีอาการปวดข้อและการแสดงออกของไซโตไคน์อักเสบลดลง [63]

ตารางที่ 4.5 ประสิทธิภาพในการกักเก็บและปริมาณ EGCG ในอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน เจลาตินทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ GA GB GE และ GS ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์

อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาติน	ร้อยละของประสิทธิภาพในการกักเก็บ EGCG (Entrapment efficiency, %)	ปริมาณ EGCG ที่ถูกกักเก็บในอนุภาค (Drug loading) (มิลลิกรัม/อนุภาค 1 มิลลิกรัม)
GA	6.3±0.2 ^a	0.36±0.1 ^d
GB	8.5±0.3 ^b	0.48±0.2 ^e
GE	3.3±0.3 ^c	0.19±0.2 ^f
GS	8.9±0.4 ^b	0.51±0.2 ^e

(a,b,c, แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95, $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการกักเก็บ EGCG ของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินทั้ง 4 ชนิด; d, e, f แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95, $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ EGCG ที่ถูกกักเก็บในอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินทั้ง 4 ชนิด)



รูปที่ 4.13 การเชื่อมกันด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่คาร์บอกซิลของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินกับหมู่ไฮดรอกซิลของสาร EGCG

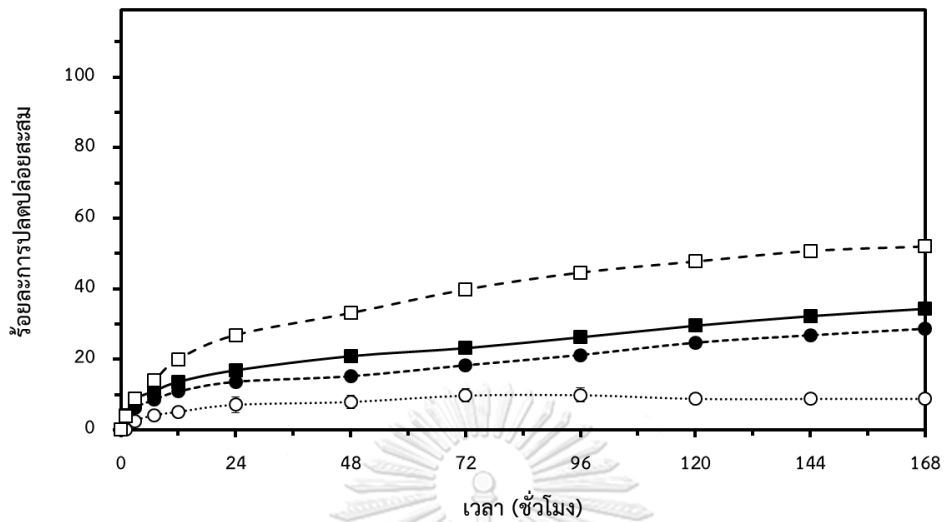
4.3.2 ประสิทธิภาพในการควบคุมการปลดปล่อยสาร EGCG ของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินในสถานะที่ไม่มีและมีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ

การศึกษาประสิทธิภาพในการควบคุมการปลดปล่อยสาร EGCG จากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินทั้ง 4 ชนิดทำในสถานะจำลองร่างกายที่ไม่มีและมีเอนไซม์คอลลาจีเนสเป็นองค์ประกอบ สถานะที่ไม่มีเอนไซม์ แสดงในรูปที่ 4.14 ก) พบว่าอนุภาคแต่ละชนิดมีการปลดปล่อย EGCG อย่างต่อเนื่อง การปลดปล่อยสาร EGCG ของอนุภาค GE เข้าสู่สภาวะคงที่ที่ร้อยละ 7.1 (Steady state) ที่เวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่อนุภาคเจลาตินอีก 3 ชนิดยังคงปลดปล่อย EGCG อย่างต่อเนื่องจนถึง 168 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่เวลา 168 ชั่วโมง อนุภาค GA GB GE และ GS มีร้อยละการปลดปล่อยสะสมอยู่ที่ 28.7 34.3 8.8 และ 52 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาอัตราการปลดปล่อยสาร EGCG จะเห็นว่า อนุภาค GS มีร้อยละการปลดปล่อยสาร EGCG สูงที่สุด ตามด้วยอนุภาค GB GA และ GE ตามลำดับ ผลการปลดปล่อยสารในสถานะที่ไม่มีเอนไซม์นี้ สามารถอธิบายได้ด้วยกลไกการบวมน้ำ (swelling) ของพอลิเมอร์และการแพร่ของสาร กลไกการบวมน้ำสามารถเกิดได้ 2 กรณีคือ กรณีที่ 1 อนุภาคมีสมบัติสามารถบวมน้ำได้อย่างไม่มีข้อจำกัด โดยน้ำสามารถเข้าไปในโครงสร้างโมเลกุลของพอลิเมอร์ ทำให้โครงสร้างเกิดการคลายตัว จนเมทริกซ์ของพอลิเมอร์ที่บวม

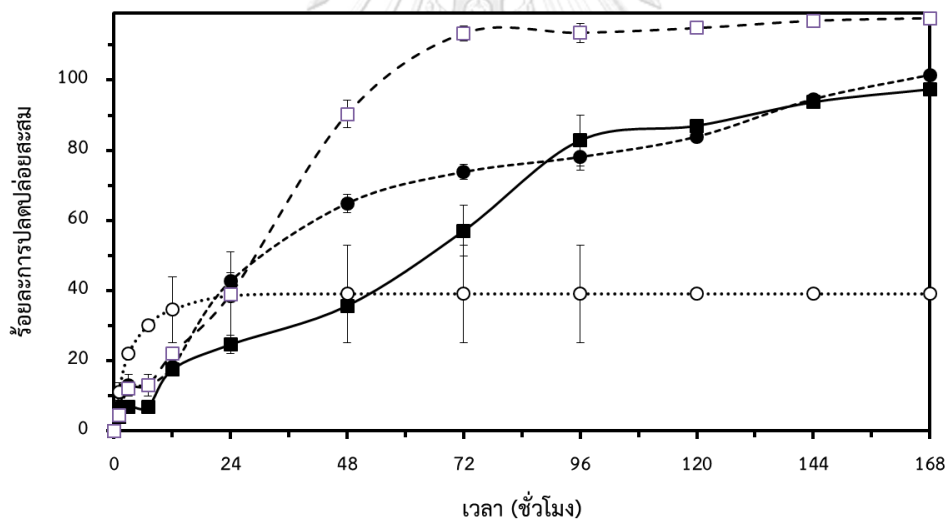
ค่อยๆสลายไป และเกิดการปลดปล่อยยา (swellable soluble matrix) ดังรูปที่ 4.15 ก) กรณีที่ 2 คืออนุภาคบวมน้ำแบบมีข้อจำกัดเนื่องด้วยการเชื่อมขวางภายในโครงสร้างเคมีของอนุภาคซึ่งมีผลต่อความสามารถในการบวมน้ำของอนุภาค ในกรณีนี้ การปลดปล่อยยาจะเกิดได้จากกลไกการแพร่ของยาผ่านอนุภาค ดังรูปที่ 4.15 ข) [119] สำหรับงานวิจัยนี้ อนุภาคเจลลาตินทั้ง 4 ชนิด ถูกเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตาไรลไฮด์ จึงมีความสามารถในการบวมน้ำได้อย่างจำกัด ทำให้การปลดปล่อยสาร EGCG ในสภาวะไม่มีเอนไซม์ มีร้อยละการปลดปล่อยสะสมไม่ถึงร้อยละ 50 ตลอดช่วงระยะเวลาการศึกษา นอกจากนี้ จะเห็นได้ว่าอนุภาค GS และ GB ซึ่งมีร้อยละการเชื่อมขวางน้อยกว่าอนุภาค GA และ GE ส่งผลให้บวมน้ำได้มากกว่า ทำให้เกิดการแพร่ของสาร EGCG ออกมาในปริมาณและอัตราเร็วมากกว่าอนุภาค GA และ GE ที่มีร้อยละการเชื่อมขวางสูงกว่า (รูป 4.6 ข)

สำหรับการปลดปล่อยสาร EGCG ของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลลาตินภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แสดงในรูปที่ 4.14 ข) พบว่าร้อยละการปลดปล่อยสะสม EGCG จากทุกอนุภาคมีค่าสูงกว่ากรณีปลดปล่อยในสภาวะไม่มีเอนไซม์ อนุภาค GA และ GB มีการปลดปล่อยสารอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการศึกษา ในขณะที่การปลดปล่อยสารจากอนุภาค GE เข้าสู่สภาวะคงที่ที่ร้อยละ 35 หลังจาก 24 ชั่วโมง ในทางตรงข้ามอนุภาค GS ปลดปล่อยสาร EGCG ทั้งหมดภายใน 72 ชั่วโมง และเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 168 ชั่วโมง อนุภาค GA และ GB มีร้อยละการปลดปล่อยสะสมสาร EGCG อยู่ที่ 100 และ 97 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาปริมาณและอัตราการปลดปล่อยสาร EGCG จะเห็นว่า อนุภาค GS ปลดปล่อยสารได้เร็วที่สุด ตามด้วยอนุภาค GA GB และ GE ตามลำดับ ผลการปลดปล่อยสาร EGCG ของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลลาตินในสภาวะที่มีเอนไซม์คอลลาจีเนส สามารถอธิบายได้ด้วยกลไกการย่อยสลายของอนุภาคด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนส ดังแสดงในรูปที่ 4.16 อนุภาค GS ปลดปล่อยยาได้เร็วที่สุดเนื่องจากมีอัตราการย่อยสลายเร็วที่สุด ในขณะที่อนุภาค GE มีอัตราย่อยสลายช้าที่สุด (รูปที่ 4.11) จึงมีการปลดปล่อยสาร EGCG ในอัตราช้าที่สุด

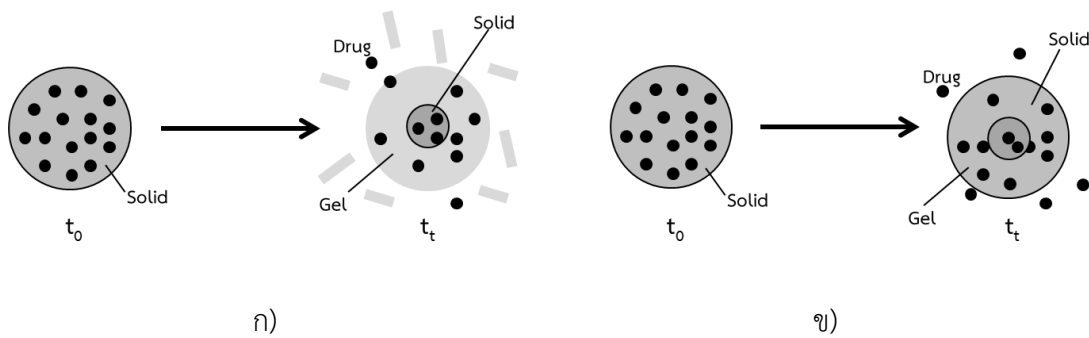
ก)



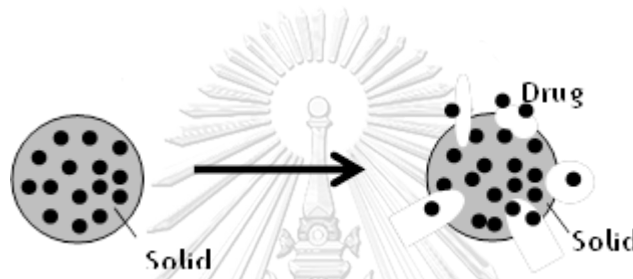
ข)



รูปที่ 4.14 ร้อยละการปลดปล่อยสะสม EGCG จากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ GA (●) GB (■) GE (○) และ GS (□) ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ก) เมื่อแช่ในสารละลาย PBS pH 7.4 ที่มีโซเดียมแอลไจเนตร้อยละ 0.01 สภาวะไม่มีเอนไซม์ และ ข) เมื่อแช่ในสารละลาย PBS pH 7.4 ที่มีโซเดียมแอลไจเนตร้อยละ 0.01 และมีเอนไซม์คอลลาจีเนสความเข้มข้น 125 หน่วยต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.15 การปลดปล่อยยาด้วยกลไกการบวมน้ำของอนุภาค (Swelling) ก) การปลดปล่อยยาเมื่ออนุภาคบวมน้ำได้อย่างไม่จำกัด ข) การปลดปล่อยยาเมื่ออนุภาคมีการเชื่อมขวางและสามารถบวมน้ำได้จำกัด [85]



รูปที่ 4.16 การปลดปล่อยยาด้วยกลไกการย่อยหรือกัดกร่อนของพอลิเมอร์ (erosion) [85]

ในการอธิบายรูปแบบและกลไกการควบคุมการปลดปล่อยสาร EGCG ของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินทั้ง 4 ชนิด จะใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์เข้ามาวิเคราะห์ข้อมูล สำหรับงานวิจัยนี้ แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่เลือกใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล ได้แก่ แบบจำลองของการปลดปล่อยยาแบบจลนศาสตร์อันดับหนึ่ง (first order kinetics) แบบจำลอง Hixson- Crowell และแบบจำลอง Ritger-Peppas & Korsmeyer-Peppas หรือ Power law

การวิเคราะห์โดยใช้แบบจำลองการปลดปล่อยยาจลนศาสตร์อันดับหนึ่ง การปลดปล่อยยาตามแบบจำลองจะวิเคราะห์เฉพาะความเข้มข้นยาที่ปลดปล่อยออกมาเทียบกับเวลาที่เปลี่ยนแปลงไป [119-121] โดยมีสมมติฐานว่าปริมาณยาที่ปลดปล่อยออกมาที่เวลาหนึ่งจะเป็นสัดส่วนกับปริมาณยาที่เหลืออยู่ในเมทริกซ์ซึ่งมีรูปแบบสมการ Noyes-Whitney (4.1)

$$\frac{dc}{dt} = K(C_s - C) \quad (4.1)$$

โดยที่	C	ความเข้มข้นของยาที่เวลา t
	C _s	ค่าการละลายของยา ณ อุณหภูมิที่ศึกษา
	t	เวลา
	K	ค่าคงที่จลนศาสตร์ลำดับหนึ่ง

อธิบายได้ในรูปแบบสมการเส้นตรงได้ดังนี้

$$\log Q_1 = \log Q_0 + \frac{K_1 t}{2.303} \quad (4.2)$$

โดยที่	Q ₁	ปริมาณยาสะสมที่ปลดปล่อย ณ เวลา t
	Q ₀	ปริมาณยาเริ่มต้น
	K ₁	ค่าคงที่การปลดปล่อยยาจลนศาสตร์อันดับหนึ่ง
	t	เวลา

เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลการปลดปล่อยสาร EGCG จากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน เจลาติน 4 ชนิดทั้งในสภาวะที่มีเอนไซม์และไม่มีเอนไซม์ด้วยแบบจำลองการปลดปล่อยยาจลนศาสตร์ อันดับหนึ่งพบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความเชื่อมั่น (Coefficient of Determinant; R²) ที่ได้มีค่าอยู่ในช่วง 0.28-0.76 ซึ่งค่าไม่เข้าใกล้ 1 (ดังตารางที่ 4.6) ซึ่งแสดงถึงความไม่เหมาะสมในการนำแบบจำลองนี้ มาอธิบายการปลดปล่อยสารของระบบนำส่งนี้ หรืออาจกล่าวได้ว่า การปลดปล่อยสาร EGCG จาก อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินไม่ได้ลดลงอย่างเป็นสัดส่วนกับปริมาณยาที่เหลือในเมทริกซ์ อนุภาคเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น [119]

การวิเคราะห์การปลดปล่อยยาด้วยแบบจำลอง Hixson-Crowell ซึ่งอธิบายไว้ว่าพื้นที่ อนุภาคจะเป็นสัดส่วนกับรากที่สามของปริมาณยาที่อยู่ในอนุภาค โดยมีสมมุติฐานว่า อัตราการ ปลดปล่อยยาจะขึ้นกับอัตราการละลายของอนุภาค โดยพื้นที่ผิวของอนุภาคลดลงจากการละลายน้ำ จึงทำให้ยาถูกปลดปล่อยออกมาจากอนุภาค และการปลดปล่อยยาไม่ได้เกิดจากการแพร่ของยาผ่าน polymeric matrix ซึ่งสามารถอธิบายได้ตามรูปแบบสมการที่ 4.3 [119]

$$W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = K_s t \quad (4.3)$$

โดยที่	W_0	ปริมาณยาเริ่มต้น
	W_t	ปริมาณยาที่เหลือ ณ เวลา t
	K_s	ค่าคงที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ผิวกับปริมาณยา
	t	เวลา

เมื่อทำการวิเคราะห์การปลดปล่อย EGCG ออกจากอนุภาคทั้งสถานะที่ไม่มีและมีเอนไซม์ เป็นองค์ประกอบพบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ความเชื่อมั่นของการปลดปล่อย EGCG มีค่าเข้าใกล้ 1 เฉพาะอนุภาค GA GB และ GS ในสถานะที่ไม่มีเอนไซม์ ซึ่งแสดงว่า แบบจำลอง Hixson-Crowell ไม่เหมาะสมในการอธิบายการปลดปล่อย EGCG ของทุกอนุภาคในงานวิจัยนี้

การวิเคราะห์ข้อมูลการปลดปล่อยสาร EGCG จากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาติน 4 ชนิดทั้งในสถานะที่มีเอนไซม์และไม่มีเอนไซม์ด้วยแบบจำลอง Ritger-Peppas & Korsmeyer-Peppas หรือ power law เป็นแบบจำลองที่นิยมใช้ในการศึกษาการปลดปล่อยยาจากตัวนำส่งยา ระบบโพลีเมอร์เมื่อไม่ทราบกลไกการปลดปล่อยหรือการปลดปล่อยยาที่เกิดขึ้นได้มากกว่า 1 กลไก ร่วมกัน [119, 122, 123] การปลดปล่อยยารูปแบบดังกล่าวสามารถอธิบายด้วยเลขชี้กำลัง (exponent) ที่เกิดจากความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณยาสะสมที่ปลดปล่อยกับเวลาตามรูปสมการที่ 4.4

$$\frac{M_i}{M_\infty} = K t^n \quad (4.4)$$

ซึ่งสามารถเขียนได้ในรูปแบบลอการิทึม

$$\left(\frac{\log M_i}{M_\infty} \right) = \log K + n \log t \quad (4.5)$$

โดยที่	M_t	ปริมาณยาที่สะสม ณ เวลา t
	M_∞	ปริมาณยาที่สะสมที่จุดสมดุล
	K	ค่าคงที่การปลดปล่อยแบบ Power Law
	t	เวลา
	n	เลขชี้กำลังการปลดปล่อย (Release exponent)

เมื่อ $n = 0.43$	รูปแบบการปลดปล่อยยาแบบ Fickian diffusion
$0.43 < n < 0.85$	รูปแบบการปลดปล่อยยาแบบ Anomalous transport
$n = 0.85$	รูปแบบการปลดปล่อยยาแบบ Case I transport
$n > 0.85$	รูปแบบการปลดปล่อยยาแบบ Super case II transport

เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลการปลดปล่อยสาร EGCG จากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน เจลาติน 4 ชนิดทั้งในสภาวะที่มีเอนไซม์และไม่มีเอนไซม์ด้วยแบบจำลอง power law ข้างต้น พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความเชื่อมั่น ที่ได้มีค่าอยู่ในช่วง 0.80-0.99 ซึ่งเข้าใกล้ 1 นั้นหมายความว่า แบบจำลอง power law มีความเหมาะสมที่จะนำมาอธิบายกลไกการปลดปล่อยสาร EGCG จากอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินในงานวิจัยนี้ เมื่อคำนวณค่าคงที่การปลดปล่อยสาร EGCG จากอนุภาค (k) และเลขชี้กำลังการปลดปล่อยสาร (n) ของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินแต่ละชนิดในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ พบว่าการปลดปล่อยสารจากอนุภาค GA GB และ GE มี $n < 0.43$ จัดเป็นการปลดปล่อยยาแบบ Fickian diffusion นั่นคือ กลไกการปลดปล่อยสารควบคุมด้วยการแพร่เป็นหลัก ในขณะที่การปลดปล่อยสารจากอนุภาค GS มีค่า $n = 0.487$ ซึ่งจัดเป็นการปลดปล่อยยาแบบ Anomalous transport หรือเป็นการปลดปล่อยยาแบบ Non Fickian diffusion หมายความว่า กลไกการแพร่กับการบวมตัวควบคุมการปลดปล่อยยา [119] สำหรับกลไกการปลดปล่อยยาจากการบวมตัวของพอลิเมอร์ (swelling controlled release) ที่เกิดร่วมกับการแพร่ เป็นการปลดปล่อยยาจากการที่น้ำเข้าไปในโมเลกุลของพอลิเมอร์ ทำให้สายโซ่ของพอลิเมอร์เกิดการคลายตัว (relaxation chain) เป็นโครงสร้างหลวมๆ ยาจึงแพร่ออกมา [124] เมื่อพิจารณาผลร้อยละการเชื่อมขวาง (หัวข้อที่ 4.2.3) อนุภาคของ GS ซึ่งมีร้อยละเชื่อมขวางน้อยสุด คาดว่าเกิดจากการบวมน้ำได้ดีทำให้ยาถูกปลดปล่อยจากอนุภาคได้เร็วเมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาค GA GB และ GE ซึ่งมีร้อยละการเชื่อมขวางสูงกว่าทำให้อนุภาคเกิดการบวมน้ำได้น้อย โครงสร้างของพอลิเมอร์จึงไม่คลายตัวให้สารแพร่ออกมา การปลดปล่อยจึงควบคุมโดยการแพร่เป็นหลัก

สำหรับสภาวะที่มีเอนไซม์คอลลาจีเนส การปลดปล่อยสารจากอนุภาค GA GB และ GS มีค่า n อยู่ในช่วง 0.526-0.678 แสดงการปลดปล่อยสารในรูปแบบ Anomalous transport แสดงถึงกลไกการปลดปล่อยยามีจากการแพร่กับการบวมตัวของพอลิเมอร์ โดยสภาวะที่มีเอนไซม์อนุภาค GA GB และ GS มีการปลดปล่อยที่เร็วขึ้นกว่าสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ ทั้งนี้เนื่องมาจากเอนไซม์ทำให้เกิดการ

ย่อยสลายของอนุภาค (erodible system) แต่การย่อยสลายที่เกิดขึ้นนี้ไม่ได้ทำปฏิกิริยารุนแรงจนเกิดการปลดปล่อยยาในรูปแบบ Super case II ($n > 1$) เนื่องจากอนุภาคถูกเชื่อมขวาง การเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์คอลลาจีเนสจึงทำให้เกิดการย่อยสลายจากพื้นผิวของอนุภาค (Surface erosion) [123] สำหรับอนุภาค GE มีค่า $n = 0.212$ จัดเป็นการปลดปล่อยยาแบบ Fickian diffusion หรือเป็นกระบวนการปลดปล่อยยาที่เกิดจากการแพร่เป็นหลัก ซึ่งเหมือนกับสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ แต่มีร้อยละการปลดปล่อยสะสมมากกว่าในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ (รูปที่ 4.11) ซึ่งเป็นเพราะเอนไซม์ไปย่อยสลายพื้นผิวอนุภาคและเร่งการปลดปล่อยยา เมื่อพิจารณาระยะเวลาการย่อยสลายของอนุภาค GE เทียบกับอนุภาคอื่นๆ (รูปที่ 4.11) จะเห็นได้ว่าอนุภาค GE มีร้อยละคงเหลืออนุภาคถึงร้อยละ 90 ซึ่งแสดงถึงการย่อยสลายได้ช้า กลไกการปลดปล่อยยาจากอนุภาค GE จึงควบคุมด้วยการแพร่เป็นหลัก



ตารางที่ 4.6 ค่าคงที่ ค่าสัมประสิทธิ์ความเข้มข้น (R^2) และเลขชี้กำลังการปลดปล่อย EGCG จากอนุภาคทรงกลมขนาดไมโครอนเจลาตินทั้ง 4 ชนิดได้แก่ GA GB GE และ GS ที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตาไรลดีไฮด์ วิเคราะห์ด้วยแบบจำลองการปลดปล่อยยาจลนศาสตร์อันดับหนึ่ง (first order kinetics) แบบจำลอง Hixson-Crowell และแบบจำลอง Ritger-Peppas & Korsmeyer-Peppas หรือ power law

ชนิดของเจลาติน	สถานะที่ศึกษา	จลนศาสตร์อันดับหนึ่ง (First order kinetics)		Hixson-Crowell		Korsmeyer-Peppas & Korsmeyer-Peppas (power law)			
		ค่าคงที่การปลดปล่อย (K_1)	ค่าสัมประสิทธิ์ความเข้มข้น (R^2)	ค่าคงที่การปลดปล่อย (K_{HC})	ค่าสัมประสิทธิ์ความเข้มข้น (R^2)	ค่าคงที่การปลดปล่อย (K_{kp})	ค่าสัมประสิทธิ์ความเข้มข้น (R^2)	เลขชี้กำลังการปลดปล่อย (n)	รูปแบบการปลดปล่อย
GA	ไม่มี	0.004	0.76	0.001	0.97	0.132	0.99	0.388	Fickian diffusion
GB	เอนไซม์	0.004	0.72	0.001	0.96	0.132	0.91	0.385	Fickian diffusion
GE		0.002	0.53	0.000	0.71	0.182	0.96	0.360	Fickian diffusion
GS		0.005	0.64	0.003	0.98	0.093	0.97	0.487	Anomalous transport
GA	มี	0.006	0.71	0.009	0.82	0.069	0.97	0.526	Anomalous transport
GB	เอนไซม์	0.007	0.81	0.010	0.92	0.036	0.97	0.655	Anomalous transport
GE		0.001	0.28	0.001	0.46	0.398	0.80	0.212	Fickian diffusion
GS		0.007	0.68	0.011	0.77	0.040	0.97	0.678	Anomalous transport

4.4 การเตรียมสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกที่บรรจุอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินนำส่ง EGCG สำหรับเป็นยาฉีตรักษาโรคข้อเสื่อม

จากหัวข้อ 2.1.4.2 ซึ่งกล่าวถึงการรักษาโรคข้อเสื่อม จะเห็นได้ว่าการรักษาโรคข้อเสื่อมจะสามารถรักษาโดยการให้ยารับประทานบรรเทาอาการปวดบวม กับการฉีตกรดไฮยาลูรอนิกหรือคอร์ติโคสเตอรอยด์เข้าบริเวณข้อต่อเพื่อฟื้นฟูการทำงาน การเคลื่อนไหวของข้อ การนำอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินมาประยุกต์นำส่งสาร EGCG ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบ และการบรรเทาปวดร่วมกับการฉีตกรดไฮยาลูรอนิกที่ช่วยฟื้นฟูการทำงานของข้อ จะช่วยลดความถี่ในการรับประทานยาแก้ปวด และลดผลข้างเคียงจากการรับประทานยาติดต่อกันเป็นเวลานาน

สำหรับกรดไฮยาลูรอนิกที่จะนำมาฉีตร่วมกับอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินนำส่งสาร EGCG นี้ได้พิจารณาจากข้อมูลของแต่ละผลิตภัณฑ์กรดไฮยาลูรอนิกที่มีการใช้ในทางการแพทย์ (ตารางที่ 4.7) จะเห็นได้ว่าแต่ละผลิตภัณฑ์มีความแตกต่าง ในด้านกระบวนการผลิต โครงสร้างและน้ำหนักโมเลกุล ในขณะที่ความเข้มข้นของเกือบทุกผลิตภัณฑ์อยู่ที่ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกที่เหมาะสมในการรักษายังไม่มีรายงานที่แน่ชัด แต่มีงานวิจัยรายงานว่า กรดไฮยาลูรอนิกน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 500,000 ดาลตัน จะเข้าไปกระตุ้น synovial fibroblast ให้ผลิตกรดไฮยาลูรอนิกได้น้อยเนื่องจากเข้าไปจับกับตัวรับสัญญาณบนผิว synovial cell ได้น้อย ในขณะที่กรดไฮยาลูรอนิกน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 500,000 ถึง 4,000,000 ดาลตัน จะเข้าไปกระตุ้นตัวรับสัญญาณ (receptor) ที่อยู่บนผิว synovial cell ได้มากจึงชักนำให้มีการสังเคราะห์กรดไฮยาลูรอนิกเพิ่มขึ้น และหากกรดไฮยาลูรอนิกมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 4,000,000 ดาลตันจะไปทำให้เกิดการกีดขวางการเข้าจับกันระหว่างโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกกับตัวรับสัญญาณที่ผิวเซลล์จึงส่งผลให้เกิดการจำกัดพื้นที่ในการเข้าจับ และไม่สามารถกระตุ้นให้เซลล์ผลิตกรดไฮยาลูรอนิกได้ [125, 126]

จากงานวิจัยกรดไฮยาลูรอนิกที่อยู่ในช่วง 500,000 ถึง 4,000,000 ดาลตัน จึงน่าจะมีความเหมาะสมสำหรับการรักษาโรคข้อเสื่อมมากที่สุด ซึ่งช่วงน้ำหนักโมเลกุลดังกล่าวตรงกับผลิตภัณฑ์กรดไฮยาลูรอนิกที่ใช้ในการฉีตรักษาโรคข้อเสื่อมในทางการแพทย์ (ตารางที่ 4.7)

ตารางที่ 4.7 ผลิตภัณฑ์กรดไฮยาลูรอนิกที่ใช้ในการฉีดรักษาโรคข้อเสื่อมในทางการแพทย์

ชื่อการค้า	สารออกฤทธิ์	ความเข้มข้น	กระบวนการผลิต	โครงสร้างโมเลกุล	น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)	จำนวนครั้งที่แนะนำให้ฉีด
Atri III	Sodium Hyaluronate	20 mg/ 2ml	การหมักของจุลชีพ	ไม่ตัดแปรรูป	2.5-3 ล้าน	3
Hyruan III	Sodium Hyaluronate	20 mg/ 2ml	การหมักของจุลชีพ	ไม่ตัดแปรรูป	3 ล้าน	3
Synvics	Hylan GF-20	16 mg/ 2ml	สกัดจากหงอนไก่ และตัดแปรรูปทางเคมี	เชื่อมขวาง	6-7 ล้าน	3
Atri	Sodium Hyaluronate	25 mg/ 2.5ml	การหมักของจุลชีพ	ไม่ตัดแปรรูป	1-1.5 ล้าน	5
Hyruan	Sodium Hyaluronate	25 mg/ 2.5ml	การหมักของจุลชีพ	ไม่ตัดแปรรูป	1 ล้าน	5
Adant Dispo	Sodium Hyaluronate	25 mg/ 2.5ml	การหมักของจุลชีพ	ไม่ตัดแปรรูป	6 แสน-1.2 ล้าน	5
Go-On	Sodium Hyaluronate	25 mg/ 2.5ml	การหมักของจุลชีพ	ไม่ตัดแปรรูป	ไม่มีข้อมูล	5
Suplasyn	Sodium Hyaluronate	25 mg/ 2.5ml	การหมักของจุลชีพ	ไม่ตัดแปรรูป	5-7 แสน	3-6
Hyalgan	Sodium Hyaluronate	20 mg/ 2ml	สกัดจากหงอนไก่	ไม่ตัดแปรรูป	5-7 แสน	3-5

เนื่องจากงานวิจัยนี้ จะทำการผลิตยาฉีดกรดไฮยาลูรอนิกร่วมกับอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาตินนำส่ง EGCG เพื่อการทดสอบเบื้องต้นในสัตว์ทดลองจึงได้สรุปข้อมูลผลิตภัณฑ์กรดไฮยาลูรอนิกที่ใช้ในการฉีดรักษาโรคข้อเสื่อมในสัตว์ดังแสดงในตารางที่ 4.8 จะเห็นได้ว่าผลิตภัณฑ์กรดไฮยาลูรอนิกที่ใช้ในสัตว์ ส่วนใหญ่มีความเข้มข้นของกรดไฮยาลูรอนิกอยู่ที่ 10 มิลลิกรัมต่อ 1 มิลลิลิตรซึ่งไม่แตกต่างกับผลิตภัณฑ์กรดไฮยาลูรอนิกที่ใช้ในคน รวมถึงน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูรอนิกที่ใช้ในสัตว์ยังอยู่ใน 500,000 ถึง 3,000,000 ดาลตันเช่นเดียวกัน

ตารางที่ 4.8 ผลิตภัณฑ์กรดไฮยาลูรอนิกที่ใช้ในการฉีดรักษาโรคข้อเสื่อมในสัตว์

ชื่อการค้า	สารออกฤทธิ์	ความเข้มข้น	กระบวนการผลิต	โครงสร้างโมเลกุล	น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)
SynVet-50	Sodium Hyaluronate	20 mg/ml	การหมักของจุลชีพ	ไม่ตัดแปรร	1.5 ล้าน
Hycoat	Sodium Hyaluronate	5 mg/ml	การหมักของจุลชีพ	ไม่ตัดแปรร	1-1.2 ล้าน
Hy-50	Sodium Hyaluronate	17 mg/ml	การหมักของลชีพ	ไม่ตัดแปรร	0.75-1 ล้าน
Map 5	Sodium Hyaluronate	20 mg/2ml	การหมักของจุลชีพ	ไม่ตัดแปรร	0.6-0.7 ล้าน
Hytryl	Sodium Hyaluronate	10 mg/ml	การหมักของจุลชีพ	ไม่ตัดแปรร	0.6 ล้าน
Legend	Sodium Hyaluronate	10 mg/ml	การหมักของจุลชีพ	ไม่ตัดแปรร	0.3-0.5 ล้าน
Hylartin V	Sodium Hyaluronate	20mg/ml	สกัดจากหองอนไก่	ไม่ตัดแปรร	3 ล้าน
Hyvisc	Sodium Hyaluronate	22 mg/2ml	สกัดจากหองอนไก่	ไม่ตัดแปรร	1.5 ล้าน
Hyalovet	Sodium Hyaluronate	20 mg/ml	สกัดจากหองอนไก่	ไม่ตัดแปรร	0.5-0.7 ล้าน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

สำหรับในงานวิจัยนี้เลือกใช้ผลิตภัณฑ์กรดไฮยาลูรอนิก Hyalovet[®] เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่นิยมใช้แพร่หลายในการฉีดรักษาโรคข้อเสื่อมในสุนัข และในส่วนของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน เจลาตินที่นำส่ง EGCG จากผลการทดลองที่พบในงานวิจัยนี้ อนุภาค GE ที่เชื่อมขวางด้วยสารละลาย กลูตารัลดีไฮด์ มีสมบัติเหมาะสมที่สุดคือ มีอัตราการย่อยสลายช้า และสามารถปลดปล่อย EGCG ได้เนิ่นนานที่สุด จึงน่าจะมีคามคงตัวมากที่สุด เมื่อนำมาผสมกับสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกเพื่อฉีดรักษาโรคข้อเสื่อมให้ออกฤทธิ์ได้เนิ่นนาน

การเตรียมสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกร่วมกับอนุภาค GE ที่นำส่ง EGCG นั้น ทำโดยนำอนุภาค GE ปริมาณ 100 มิลลิกรัม (ซึ่งมี EGCG กักเก็บอยู่ 1.9 มิลลิกรัม) ไปผสมกับสารละลายกรดไฮยาลูรอนิก Hyalovet[®] ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (รูปที่ 4.17) จะได้ยาฉีดรักษาโรคข้อเสื่อมที่

ประกอบด้วยระบบนำส่งสาร EGCG ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ ยับยั้งการทำลายกระดูกอ่อน ผิวข้อ และรักษาสมดุลการทำงานของกระดูกแข็งได้กระดูกอ่อนผิวข้อ และสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกที่มีฤทธิ์กระตุ้นการผลิตกรดไฮยาลูรอนิกของเซลล์ synovial fibroblast ในข้อ เพิ่มการหล่อลื่นและฟื้นฟูการทำงานของข้อ ที่มีความพร้อมในการทดสอบในสุนัขที่ป่วยเป็นโรคข้อเสื่อมต่อไป โดยปริมาณ EGCG ที่ถูกกักเก็บในอนุภาคดังกล่าวจัดว่าเป็นปริมาณที่ค่อนข้างมากสำหรับการนำไปฉีดรักษาแบบเฉพาะที่ ซึ่งเป็นวิธีการให้ยาที่มักใช้ปริมาณ (dose) ของยาน้อย เนื่องจากเป็นการให้ยาที่มีการสูญเสียของยาค่า เมื่อเทียบกับการรับประทานชาเขียว 1 ถ้วย จะได้รับปริมาณ EGCG 200-300 มิลลิกรัม แต่มีการสูญเสีย EGCG ก่อนจะถึงอวัยวะเป้าหมาย Leong และคณะรายงานว่าหนูที่ได้รับสาร EGCG โดยการฉีดเข้าช่องท้องในปริมาณ 25 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมของหนู มีอาการปวดข้อและการแสดงออกของไซโตไคน์อักเสบลดลง [63]



รูปที่ 4.17 อนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาติน GE นำส่ง EGCG ที่ผสมกับสารละลายกรดไฮยาลูรอนิก Hylovet[®] พร้อมใช้เป็นยาฉีดรักษาโรคข้อเสื่อมในสุนัข

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการศึกษา

ในงานวิจัยนี้ได้ผลิตเจลาตินดัดแปร 2 ชนิดจากเจลาตินชนิดเอ (GA) และเจลาตินชนิดบี (GB) ด้วยกระบวนการทางเคมี โดยเจลาตินชนิดเอถูกดัดแปรด้วยเอธิลีนไดเอมีน (GE) และเจลาตินชนิดบีถูกดัดแปรด้วยซัคซินิกแอนไฮไดรด์ (GS) ผลการศึกษาสมบัติทางเคมีและสมบัติทางกายภาพของเจลาตินเปรียบเทียบกับเจลาตินตั้งต้นที่ใช้ในการดัดแปร สรุปได้ว่าสมบัติของ GE และ GS แตกต่างจากเจลาตินตั้งต้น โดย GE มีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระมากขึ้น ในขณะที่ GS มีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระลดลง โดยที่ยังพบสเปคตรัมที่แสดงหมู่เคมีฟังก์ชันที่เป็นคุณลักษณะของเจลาตินอยู่และจากการวิเคราะห์ค่าศักย์เซต้าพบว่า GE แสดงค่าประจุบวกเพิ่มขึ้น จากการที่มีหมู่อะมิโนเพิ่มขึ้นในโครงสร้าง ซึ่งส่งผลให้ GE มีสมบัติชอบน้ำสูง เมื่อเทียบกับ GA GB และ GS

เมื่อนำเจลาตินทั้ง 4 ชนิดมาขึ้นรูปเป็นอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนด้วยเทคนิคอิมัลชันน้ำในน้ำมัน และเชื่อมขวางด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตาร์ลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 เป็นเวลา 20 ชั่วโมง อนุภาคที่ได้มีลักษณะกลม มีขนาดอยู่ในช่วง 43-49 ไมครอน และยังพบว่าอนุภาคที่เชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตาร์ลดีไฮด์มีความคงตัวและละลายในน้ำได้น้อยกว่าอนุภาคที่เชื่อมขวางด้วยความร้อน แสดงถึงความสำเร็จของการเชื่อมขวางอนุภาคเจลาตินด้วยสารละลายกลูตาร์ลดีไฮด์ นอกจากนี้ยังพบว่าอนุภาค GE ซึ่งมีหมู่อะมิโนอิสระมากกว่าการคอนจูเกตด้วยเอธิลีนไดเอมีนสามารถเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตาร์ลดีไฮด์ได้ร้อยละการเชื่อมขวางสูงที่สุด จึงทำให้อนุภาค GE มีอัตราการย่อยสลายในสภาวะจำลองร่างกายทั้งที่ไม่มีและมีเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ช้าที่สุด และมีอัตราการปลดปล่อยสาร EGCG ได้เนิ่นนานที่สุด นอกจากนี้ยังไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อทดสอบตามมาตรฐาน ISO 10993 part 5

ในงานวิจัยนี้จึงเลือกอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอน GE ที่นำส่ง EGCG ไปผสมกับสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกชื่อ Hyalovet[®] ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการฉีกรักษาโรคข้อเสื่อมในสุนัข ผู้วิจัยคาดหวังว่ายาฉีกรักษาโรคข้อเสื่อมนี้สามารถช่วยยับยั้งการอักเสบได้เนิ่นนานจากฤทธิ์ของ

EGCG ที่ปลดปล่อยจากอนุภาค GE และยังช่วยกระตุ้นการสร้างกรดไฮยาลูรอนิกของเซลล์ synovial fibroblast และช่วยหล่อลื่นเพิ่มการทำงานของข้อได้จากฤทธิ์ของสารละลายกรดไฮยาลูรอนิก การทำงานร่วมกันระหว่าง EGCG กับสารละลายกรดไฮยาลูรอนิกนี้น่าจะเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาโรคข้อเสื่อมให้ดีขึ้น ซึ่งจะมีการศึกษาทดสอบในส่วนนี้ในสุนัขที่ป่วยเป็นโรคข้อเสื่อมต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ปรับปรุงวิธีการกักเก็บสาร EGCG เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพและปริมาณ EGCG ที่กักเก็บในอนุภาคให้มากขึ้นเพื่อเพิ่มปริมาณการออกฤทธิ์ในการรักษาให้ดีขึ้น หากมีการนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ในอนาคต
2. ทำการทดสอบหาปริมาณ (dose) ของ EGCG ที่มีประสิทธิภาพสำหรับใช้เป็นยาฉีดเข้าข้อเพื่อยับยั้งการอักเสบในโรคข้อเสื่อม



รายการอ้างอิง

1. Felson, D.T., *The sources of pain in knee osteoarthritis*. Current Opinion in Rheumatology, 2005. 17(5): p. 624-628.
2. Sarzi-Puttini, P., et al., *Osteoarthritis: an overview of the disease and its treatment strategies*. Semin Arthritis Rheum, 2005. 35(1 Suppl 1): p. 1-10.
3. Fajardo, M. and P.E.D. Cesare, *Disease-Modifying Therapies for Osteoarthritis Current Status*. Drugs Aging, 2005. 22(2): p. 141-161.
4. Akmal, M., et al., *The effects of hyaluronic acid on articular chondrocytes*. The Journal of Bone and Joint Surgery. British 2005. 87-B(8): p. 1143-1149.
5. TAMER, T.M., *Hyaluronan and synovial joint: function, distribution and healing*. Interdisciplinary Toxicology, 2013. 6(3): p. 111-125.
6. Crofford, L.J., *Use of NSAIDs in treating patients with arthritis*. Arthritis Research & Therapy, 2013. 15(Supply)(S2): p. 1-10.
7. Maroon, J.C., J.W. Bost, and A. Maroon, *Natural anti-inflammatory agents for pain relief*. Surgical Neurology International, 2010. 1: p. 1-80.
8. Anand, P., et al., *Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises*. Molecular Pharmaceutics, 2007. 4(6): p. 807-818.
9. Katiyar, S.K. and C. Raman, *Green tea: a new option for the prevention or control of osteoarthritis*. Arthritis Research & Therapy, 2011. 13(4): p. 121-122.
10. DAHLBERG, L., et al., *SELECTIVE ENHANCEMENT OF COLLAGENASE-MEDIATED CLEAVAGE OF RESIDENT TYPE II COLLAGEN IN CULTURED OSTEOARTHRITIC CARTILAGE AND ARREST WITH A SYNTHETIC INHIBITOR THAT SPARES COLLAGENASE 1 (MATRIX METALLOPROTEINASE 1)*. ARTHRITIS & RHEUMATISM, 2000. 43(3): p. 673-682.
11. Mitchell, P.G., et al., *Cloning, Expression, and Type II Collagenolytic Activity of Matrix Metalloproteinase-13 from Human Osteoarthritic Cartilage*. The Journal of Clinical Investigation, 1996. 97(3): p. 761-768.

12. Kamon, M., R. Zhao, and K. Sakamoto, *Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate suppressed the differentiation of murine osteoblastic MC3T3-E1 cells*. Cell Biology International, 2010. 34(1): p. 109-116.
13. Ahmed, S., A. Pakozdi, and A.E. Koch, *Regulation of interleukin-1 beta-induced chemokine production and matrix metalloproteinase 2 activation by epigallocatechin-3 - gallate in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts*. ARTHRITIS & RHEUMATISM, 2006. 54(8): p. 2393-2401.
14. Corps, A.N., et al., *Inhibition of interleukin-1 beta-stimulated collagenase and stromelysin expression in human tendon fibroblasts by epigallocatechin gallate ester*. Matrix Biology, 2004. 23(3): p. 163-169.
15. Ratanavaraporn, J., S. Damrongsakkul, and S. Kanokpanont, *The development of injectable gelatin/silk fibroin microspheres for the dual delivery of curcumin and piperine*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2014. 25(2): p. 401-410.
16. Clyde M. Ofner, I. and W.A. Bubnis, *Chemical and Swelling Evaluations of Amino Group Crosslinking in Gelatin and Modified Gelatin Matrices*. Pharmaceutical Research, 1996. 13(12): p. 1821-1827.
17. Hori, K., et al., *Controlled-release of epidermal growth factor from cationized gelatin hydrogel enhances corneal epithelial wound healing*. Journal of Controlled Release, 2007. 118(2): p. 169-176.
18. Kimura, Y. and Y. Tabata, *Controlled release of stromal-cell-derived factor-1 from gelatin hydrogels enhances angiogenesis*. Journal of Biomaterials Science, 2010. 21(1): p. 37-51.
19. Arya, R. and V. Jain, *Osteoarthritis of the knee joint: An overview*. Journal, Indian Academy of Clinical Medicine, 2013. 14(2): p. 154-162.
20. Loeser, R.F., et al., *Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ*. ARTHRITIS & RHEUMATISM, 2012. 64(6): p. 1697-1707.
21. *Bone and Osteoarthritis*, ed. F. Bronner, et al. Vol. 4. 2007: Springer-Verlag London. XIV, 218.
22. Altman, R.D., et al., *Atlas of individual radiographic features in osteoarthritis*. Osteoarthritis and Cartilage., 1995. 3 **Supply** (A): p. 3-70.

23. SINUSAS, K., *Osteoarthritis: Diagnosis and Treatment*. American Family Physician, 2012. 85(1): p. 49-56.
24. Bailey, A.J., et al., *Biochemical and mechanical properties of subchondral bone in osteoarthritis*. Biorheology, 2004. 41(3-4): p. 349-358.
25. Day, J.S., et al., *Adaptation of subchondral bone in osteoarthritis*. Biorheology, 2004. 41(3-4): p. 359-368.
26. Pelletier, J.-P., J. Martel-Pelletier, and S.B. Abramson, *Osteoarthritis, an Inflammatory Disease: Potential Implication for the Selection of New Therapeutic Targets*. ARTHRITIS & RHEUMATISM, 2001. 44(6): p. 1237-1247.
27. Schett, G., *Joint remodelling in inflammatory disease*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2007. 66 **Suppl** 3: p. iii42-iii44.
28. Hayami, T., et al., *The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis: reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the rat anterior cruciate ligament transection model*. ARTHRITIS & RHEUMATISM, 2004. 50(4): p. 1193-1206.
29. Danks, L., et al., *Synovial macrophage-osteoclast differentiation in inflammatory arthritis*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2002. 61(10): p. 916-921.
30. Caldwell, J.R., *Intra-Articular Corticosteroids Guide to Selection and Indications for Use*. Drugs, 1996. 52(4): p. 507-514.
31. Necas, J., et al., *Hyaluronic acid (hyaluronan): a review*. Veterinarni Medicina, 2008. 53(8): p. 397-411.
32. LAURENT, T.C., U.B. LAURENT, and J.R.E. FRASER, *The structure and function of hyaluronan: An overview*. Immunology and Cell Biology, 1996. 74: p. A1-A7.
33. Kogan, G., et al., *Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications*. Biotechnology Letters, 2007. 29(1): p. 17-25.
34. Balazs, E.A. and J.L. Denlinger, *The role of hyaluronic acid in arthritis and its therapeutic use*. In: Peyron J.G. (ed.): *Osteoarthritis: Current Clinical and Fundamental Problems*. 1984: Geigy, Basle Geigy.

35. Noble, P.W., *Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair*. Matrix Biology, 2002. 21: p. 25-29.
36. Castor, C.W., R.K. Prince, and M.J. Hazelton, *Hyaluronic Acid in Human Synovial Effusions; A Sensitive Indicator of Altered Connective Tissue Cell Function During Inflammation*. ARTHRITIS & RHEUMATISM, 1966. 9(6): p. 783-794.
37. Wang, A., A. Essner, and G. Schmidig, *The Effects of Lubricant Composition on in Vitro Wear Testing of Polymeric Acetabular Components*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials 2004. 68(1): p. 45-52.
38. Brun, P., et al., *The effect of hyaluronan on CD44-mediated survival of normal and hydroxyl radical-damaged chondrocytes*. Osteoarthritis and Cartilage, 2003. 11(3): p. 208-216.
39. Balazs, E.A. and J.L. Denlinger, *Osteoarthritis: Current Clinical and Fundamental Problems*. Peyron J.G. ed. 1985 b, Rueil malmaison, France: Laboratoires Ciba-Geigy
40. Gerwin, N., C. Hops, and A. Lucke, *Intraarticular drug delivery in osteoarthritis*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2006. 58(2): p. 226-242.
41. Julovi, S.M., et al., *Inhibition of interleukin-1 beta-stimulated production of matrix metalloproteinases by hyaluronan via CD44 in human articular cartilage*. ARTHRITIS & RHEUMATISM, 2004. 50(2): p. 516-525.
42. Yasui, T., et al., *The effect of hyaluronan on interleukin-1 alpha-induced prostaglandin E2 production in human osteoarthritic synovial cells*. Agents and Actions, 1992. 37(1-2): p. 155-156.
43. Hirota, W., *Intra-articular injection of hyaluronic acid reduces total amounts of leukotriene C4, 6-keto-prostaglandin F1 alpha, prostaglandin F2 alpha and interleukin-1 beta in synovial fluid of patients with internal derangement in disorders of the temporomandibular joint*. British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 1998. 36(1): p. 35-38.
44. TAKAHASHI, K., et al., *The effects of hyaluronan on matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), interleukin-1 β (IL-1 β), and tissue inhibitor of metalloproteinase-1*

- (*TIMP-1*) gene expression during the development of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 1999. 7(2).
45. Goto, M., et al., *Intra-articular injection of hyaluronate (SI-6601D) improves joint pain and synovial fluid prostaglandin E2 levels in rheumatoid arthritis: a multicenter clinical trial.* *Clinical and Experimental Rheumatology*, 2001. 19(4): p. 377-383.
 46. Techaarpornkul, N., *EFFICACY OF INTRAARTICULAR ADMINISTRATION OF HYALURONIC ACID IN OSTEOARTHRITIS AFTER SURGICAL CORRECTION OF CANINE CRANIAL CRUCIATE LIGAMENT RUPTURE*, in *Veterinary Science*. 2014, Chulalongkorn University. p. 56.
 47. Sun, S.F., et al., *Efficacy of intra-articular hyaluronic acid in patients with osteoarthritis of the ankle: a prospective study.* *Osteoarthritis Cartilage*, 2006. 14(9): p. 867-874.
 48. Borrás-Verderaa, A., et al., *Efficacy and safety of a single intra-articular injection of 2% hyaluronic acid plus mannitol injection in knee osteoarthritis over a 6-month period.* *Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología*, 2013. 56(4): p. 274-280.
 49. Chacko, S.M., et al., *Beneficial effects of green tea: A literature review.* *Chinese Medicine*, 2010. 5(13): p. 1-9.
 50. Doss, M.X., et al., *Trapping of growth factors by catechins: a possible therapeutic target for prevention of Proliferative disease.* *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2005. 16(5): p. 259-266.
 51. Saffari, Y. and S.M.H. Sadrzadeh, *Green tea metabolite EGCG protects membranes against oxidative damage in vitro.* *Life Sciences*, 2004. 74(12): p. 1513-1518.
 52. Zhang, Y.M. and C.O. Rock, *Evaluation of epigallocatechin gallate and related plant polyphenols as inhibitors of the FabG and FabI reductases of bacterial type II fatty-acid synthase.* *The Journal of Biological Chemistry*, 2004. 279(30): p. 30994-31001.

53. JIAN, L., et al., *Protective effect of green tea against prostate cancer: a case-control study in southeast China*. International Journal of Cancer, 2004. 108(1): p. 130-5.
54. Mittal, A., et al., *EGCG down-regulates telomerase in human breast carcinoma MCF-7 cells, leading to suppression of cell viability and induction of apoptosis*. International Journal of Oncology, 2004. 24(3): p. 703-710.
55. Zhu, B.-H., et al., *(-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits growth of gastric cancer by reducing VEGF production and angiogenesis*. World Journal of Gastroenterology, 2007. 13(8): p. 1162-1169.
56. Gu, J.-W., et al., *EGCG, a major green tea catechin suppresses breast tumor angiogenesis and growth via inhibiting the activation of HIF-1 α and NF κ B, and VEGF expression*. VASCULAR CELL, 2013. 5(9): p. 1-10.
57. Kim, H.-S., et al., *Epigallocatechin gallate (EGCG) stimulates autophagy in vascular endothelial cells: a potential role for reducing lipid accumulation*. J Biol Chem, 2013. 288(31): p. 22693-22705.
58. Ahmed, S., et al., *Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits the IL-1 beta-induced activity and expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human chondrocytes*. The Journal of Pharmacology and experimental therapeutic, 2002. 308(2): p. 767-773.
59. Singh, R., et al., *Epigallocatechin-3-Gallate Inhibits Interleukin-1 beta-Induced Expression of Nitric Oxide in Human Chondrocytes Suppression of Nuclear Factor kappaB Activation by degradation of the Inhibitor of Nuclear Factor kappaB*. ARTHRITIS & RHEUMATISM, 2002. 46(8): p. 2079-2086.
60. Singh, R., N. Akhtar, and T.M. Haqqi, *Green tea polyphenol epigallocatechin-3 gallate: Inflammation and arthritis*. Life Science, 2010. 86: p. 907-918.
61. Steinmann, J., et al., *Anti-infective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea*. British Journal of Pharmacology, 2013. 168(5): p. 1059-1073.
62. Ahmed, S., *Green tea polyphenol epigallocatechin 3-gallate in arthritis: progress and promise*. Arthritis Research & Therapy, 2010. 12: p. 1-9.

63. Leong, D.J., et al., *Green tea polyphenol treatment is chondroprotective, anti-inflammatory and palliative in a mouse posttraumatic osteoarthritis model*. Arthritis Research & Therapy, 2014. 16(508): p. 1-11.
64. Morinobu, A., et al., *(-)-Epigallocatechin-3-gallate suppresses osteoclast differentiation and ameliorates experimental arthritis in mice*. ARTHRITIS & RHEUMATISM, 2008. 58(7): p. 2012-2018.
65. Lee, J.-H., et al., *Epigallocatechin-3-gallate Inhibits Osteoclastogenesis by Down-Regulating c-Fos Expression and Suppressing the Nuclear Factor- κ B Signal*. MOLECULAR PHARMACOLOGY, 2010. 77(1): p. 17-25.
66. Yun, H.-J., et al., *Epigallocatechin-3-gallate suppresses TNF- α -induced production of MMP-1 and -3 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts*. Rheumatol Int, 2008. 29(1): p. 23-29.
67. Ahmed, S., et al., *Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) differentially inhibits interleukin-1 β -induced expression of matrix metalloproteinase-1 and -13 in human chondrocytes*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2004. 308(2): p. 767-773.
68. Akhtar, N. and T.M. Haqqi, *Epigallocatechin-3-gallate suppresses the global interleukin-1 β -induced inflammatory response in human chondrocytes*. Arthritis Research & Therapy, 2011. 13(R93): p. 1-16.
69. Morrison, N.A., et al., *Gelatin alternatives for the food industry*. Progress in Colloid and Polymer Science. Vol. 114. 1999.
70. Gilsenan, P. and S.B. Ross-Murphy, *Viscoelasticity of thermoreversible gelatin gels from mammalian and piscine collagen*. Journal of Rheology, 2000. 44(4): p. 871-883.
71. Schrieber, R. and D.H. Gareis, *Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice*. Chapter 2. From Collagen to Gelatine. 2007.
72. Liu, Y., X. Liu, and X. Wang, *Biomimetic Synthesis of Gelatin Polypeptide-Assisted Noble-Metal Nanoparticles and Their Interaction Study*. Nanoscale Research Letters, 2011. 6(22).
73. Hafidz, R.N.R.M., et al., *Chemical and functional properties of bovine and porcine skin gelatin*. International Food Research Journal, 2011. 18: p. 813-817.

74. Mariod, A.A. and H.F. Adam², *REVIEW: GELATIN, SOURCE, EXTRACTION AND INDUSTRIAL APPLICATIONS*. Acta scientiarum Polonorum, Technology Alimentaria, 2013. 12(2): p. 135-147.
75. Gorgieva, S. and V. Kokol, *Biomaterials Applications for Nanomedicine*. Collagen- vs. Gelatine-Based Biomaterials and Their Biocompatibility: Review and Perspectives, ed. S. Gorgieva and V. Kokol. Vol. Edited. 2011: InTech. 458.
76. Su, K. and C. Wang, *Recent advances in the use of gelatin in biomedical research*. Biotechnology Letters, 2015. 37(11): p. 2139-2145.
77. Tabata, Y. and Y. Ikada, *Protein release from gelatin matrices*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1988. 31: p. 287-301.
78. Keenan, T.R., *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. 2003.
79. GMIA, t.m.o.t., *GELATIN HANDBOOK*. 2012: New York.
80. Elzoghby, A.O., *Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: Reviewing three decades of research*. Journal of Controlled Release, 2013. 172: p. 1075-1091.
81. Jain, K.K., *Nanobiotechnology-based drug delivery to the central nervous system*. Neurodegenerative Diseases, 2007. 4(4): p. 287-291.
82. Varde, N.K. and D.W. Pack, *Microspheres for controlled release drug delivery*. Expert Opinion on Biological Therapy, 2004. 4(1): p. 35-51.
83. Bruschi, M.L., et al., *An Overview of Recent Patents on Composition of Mucoadhesive Drug Delivery Systems*. Recent Patents on Drug Delivery & Formulation, 2015. 9: p. 79-87.
84. Yeo, Y., N. Baek, and K. Park, *Microencapsulation Methods for Delivery of Protein Drugs*. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2001. 6(4): p. 213-230.
85. Aydin, O., et al., *In vitro and in vivo evaluation of doxycycline-chondroitin sulfate/PCL microspheres for intraarticular treatment of osteoarthritis*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2015. 103B(6): p. 1238-1248.
86. Rose, J.B., et al., *Gelatin-Based Materials in Ocular Tissue Engineering*. Materials (Basel), 2014. 7(4): p. 3106-3135.

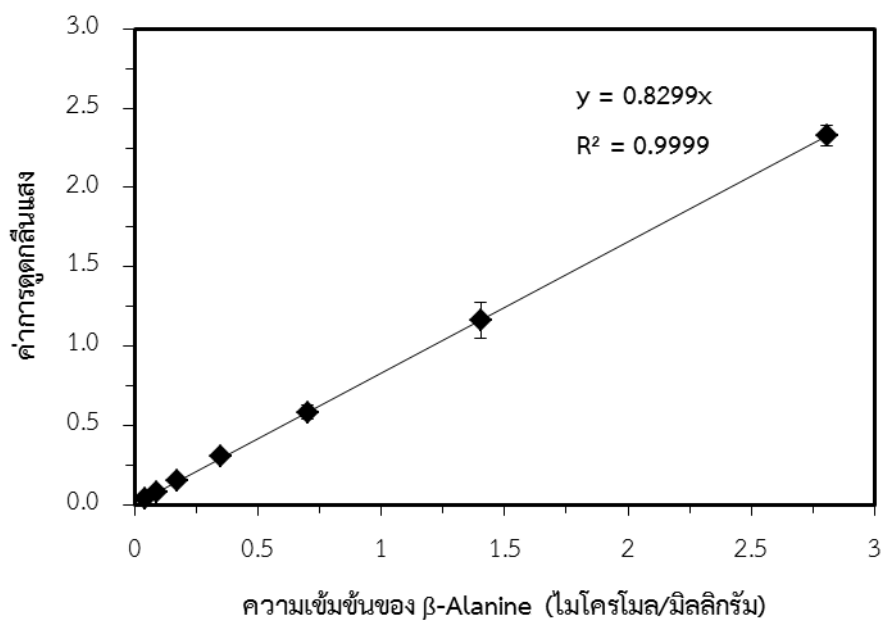
87. Haugh, M.G., et al., *Crosslinking and Mechanical Properties Significantly Influence Cell Attachment, Proliferation, and Migration Within Collagen Glycosaminoglycan Scaffolds*. TISSUE ENGINEERING: Part A, 2011: p. 1-8.
88. Reddy, N., R. Reddy, and Q. Jiang, *Crosslinking biopolymers for biomedical applications*. Trends in Biotechnology, 2015. 33(6): p. 362-369.
89. Farris, S., J. Song, and Q. Huang, *Alternative Reaction Mechanism for the Cross-Linking of Gelatin with Glutaraldehyde*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. 58(2): p. 998-1003.
90. H.G., K., *The Chemistry of Carbodiimides*. Chemical Reviews, 1953. 53(2): p. 145-166.
91. D.G., H. and K. D.E., *A method for the quantitative modification and estimation of carboxylic acid groups in proteins*. The Journal of Biological Chemistry, 1967. 242(10): p. 2447-2453.
92. Kazemzadeh-Narbat, M., et al., *Chitosan nanoparticles as adenosine carriers*. Journal of Microencapsulation, 2015. 32(5): p. 460-466.
93. Drexler, J.W. and H.M. Powell, *Dehydrothermal crosslinking of electrospun collagen*. Tissue Engineering Part C: Methods, 2011. 17(1): p. 9-17.
94. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays*. Journal of Immunological Methods, 1983. 65(1-2): p. 55-63.
95. A.Bubnis, W. and C. M.OfnerIII, *The determination of epsilon-amino groups in soluble and poorly soluble proteinaceous materials by a spectrophotometric method using trinitrobenzenesulfonic acid*. Analytical Biochemistry, 1992. 207(1): p. 129-133.
96. Habeeb, A.F.S.A., *On the Quantitative Estimation of Amino Acids by Paper Chromatography*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 1958. 10(1): p. 591-592.
97. Sripriya, R., et al., *Characterizations of polyanionic collagen prepared by linking additional carboxylic groups*. Reactive & Functional Polymers, 2011. 71: p. 62-69.

98. Hermanto, S., L.O. Sumarlin, and W. Fatimah, *Differentiation of Bovine and Porcine Gelatin Based on Spectroscopic and Electrophoretic Analysis*. Journal of Food and Pharmaceutical Science, 2013. 1: p. 68-73.
99. Chen, J.-P. and C.-H. Su, *Surface modification of electrospun PLLA nanofibers by plasma treatment and cationized gelatin immobilization for cartilage tissue engineering*. Acta biomaterialia, 2011. 7: p. 234-243.
100. Yang, Y., et al., *Novel mineralized heparin-gelatin nanoparticles for potential application in tissue engineering of bone*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2014. 25: p. 669-680.
101. Hunter, R.J., *Foundations of Colloid Science*. 2001, New York, United States: Oxford University Press: New York.
102. Tabata, Y. and Y. Ikada, *Protein release from gelatin matrices*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1998. 31: p. 287-301.
103. HOSSEINKHANI, H., et al., *In vitro transfection of plasmid DNA by different-cationized gelatin with or without ultrasound irradiation*. The Proceeding of the Japan Academy, Series B, 2001. 77: p. 161-166.
104. Jalaja, K., et al., *Fabrication of Cationized Gelatin Nanofibers by Electrospinning for Tissue Regeneration*. Royal Society of Chemistry, 2015. 109: p. 89521-89530.
105. Shi, C., et al., *Preparation and characterization of gelatin film modified by cellulose active ester*. Polymer Bulletin, 2017. 74: p. 3505-3525.
106. Chen, S., et al., *Modified poly(L-lactic acid) microspheres with nanofibrous structure suitable for biomedical application*. International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, 2017: p. 1-9.
107. Förch, R., H. Schönherr, and A.T.A. Jenkins, *Surface Design: Applications in Bioscience and Nanotechnology*. 2009. 532.
108. Al-Shammari, B., et al., *The effect of polymer concentration and temperature on the rheological behavior of metallocene linear low density polyethylene (mLLDPE) solutions*. Journal of King Saud University - Engineering Sciences, 2011. 23(1): p. 9-14.

109. GORDON, A.H., A.J.P. MARTIN, and R.L.M. SYNGE, *A STUDY OF THE PARTIAL ACID HYDROLYSIS OF SOME PROTEIN, WITH SPECIAL REFERENCE TO THE MODE OF LINKAGE OF THE BASIC AMINO-ACIDS*. *Biochemical* 1941. 35: p. 1369-1387.
110. Ozeki, M. and Y. Tabata, *In vivo degradability of hydrogels prepared from different gelatins by various cross-linking methods*. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2005. 16(5): p. 549-561.
111. Pongpaibul, Y., J.C. Price, and C.W. Whitworth, *Preparation and Evaluation of Controlled Release Indomethacin Microspheres*. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 1984. 10(10): p. 1597-1616.
112. Vandelli, M.A., et al., *Gelatin microspheres crosslinked with D,L-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation, characterisation, in vitro and in vivo studies*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001. 215: p. 175-184.
113. Ma, L., et al., *Thermal dehydration treatment and glutaraldehyde cross-linking to increase the biostability of collagen-chitosan porous scaffolds used as dermal equivalent*. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, 2003. 14(8): p. 861-874.
114. Nayak, U.Y., et al., *Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres for controlled delivery of zidovudine*. *Journal of Microencapsulation*, 2009. 26(3): p. 214-22.
115. Haugh, M.G., M.J. Jaasma, and F.J. O'Brien, *The effect of dehydrothermal treatment on the mechanical and structural properties of collagen-GAG scaffolds*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2008: p. 363-369.
116. Alipour, H., et al., *Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): A review*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2016. 6(11): p. 975-981.
117. Ozdal, T., E. Capanoglu, and F. Altay, *A review on protein-phenolic interactions and associated changes*. *Food Research International*, 2013. 51: p. 954-970.
118. Scheiner, S., T. Kar, and J. Pattanayak, *Comparison of Various Types of Hydrogen Bonds Involving Aromatic Amino Acids*. *Journal of the American Chemical Society*, 2002. 124: p. 13257-13264.
119. Bruschi, M.L., *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*. 2015: Woodhead Publishing Limited. 199.

120. Costa, P. and J.M.S. Lobo, *Modeling and comparison of dissolution profile*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2001. 13: p. 123-133.
121. Hervault, A., et al., *Doxorubicin loaded dual pH- and thermo-responsive magnetic nanocarrier for combined magnetic hyperthermia and targeted controlled drug delivery applications*. Nanoscale, 2016. 8(24): p. 12152-61.
122. Peppas, N.A., *Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers*. Pharmaceutica Acta Helvetiae, 1985. 60(4): p. 110-111.
123. Peppas, N.A. and B. Narasimhan, *Mathematical models in drug delivery: how modeling has shaped the way we design new drug delivery systems*. Journal of Controlled Release, 2014. 190: p. 75-81.
124. Lee, J.H. and Y. Yeo, *Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers*. Chemical Engineering Science, 2015. 125: p. 75-84.
125. Smith, M.M. and P. Ghosh, *The synthesis of hyaluronic acid by human synovial fibroblasts is influenced by the nature of the hyaluronate in the extracellular environment* Rheumatology International, 1987. 7: p. 113-122.
126. Maheu, E., F. Rannou, and J.-Y. Reginster, *Efficacy and safety of hyaluronic acid in the management of osteoarthritis: Evidence from real-life setting trials and surveys*. Seminars in Arthritis and Rheumatism, 2016. 45(4 Supply): p. S28-S33.

ภาคผนวก ก

กราฟมาตรฐานของ β -Alanine เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ

ภาคผนวก ข

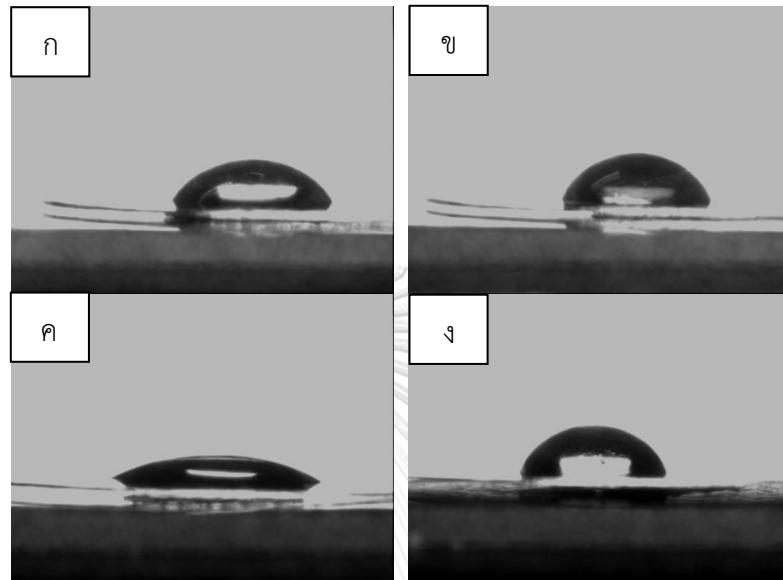
ตารางค่าศักย์เซต้าของสารละลายเจลาตินความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ที่ค่าความเป็นกรดต่างต่างๆ

ตาราง ข ค่าศักย์เซต้าของสารละลายเจลาตินความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ที่ค่าความเป็นกรดต่างต่างๆ

ชนิดของ เจลาติน	ค่าความเป็นกรดต่าง					
	pH 2	pH 4	pH 6	pH 8	pH 10	pH 12
GA	28.3±1.4	18.1±0.9	7.0±0.2	3.2±0.2	-5.6±0.4	-27.9±0.2
GB	17.0±0.3	13.2±0.3	-15.8±2.2	-20.2±0.6	-27.6±1.0	-33.8±1.6
GE	23.4±0.4	19.5±1.9	16.5±0.4	4.5±0.2	-3.8±0.2	-17.9±0.5
GS	14.3±1.0	-4.7±0.2	-6.8±1.9	-9.9±1.1	-14.7±1.3	-40.1±1.9

ภาคผนวก ค

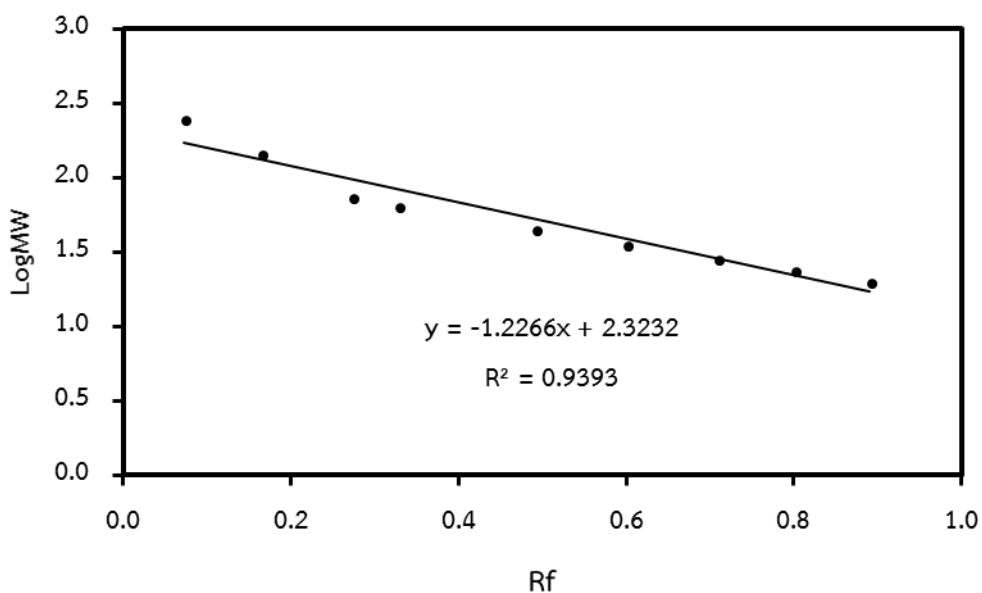
รูปทรงหยดน้ำบนฟิล์มเจลลาตินชนิดต่างๆที่ใช้วิเคราะห์ค่ามุมสัมผัส



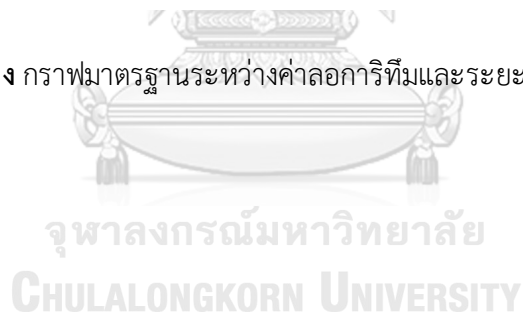
รูปที่ ค รูปทรงหยดน้ำบนฟิล์มเจลลาติน ก.) GA ข) GB ค) GE ง) GS

ภาคผนวก ง

กราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุล (logMW)
และ ระยะการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีน (Rf)



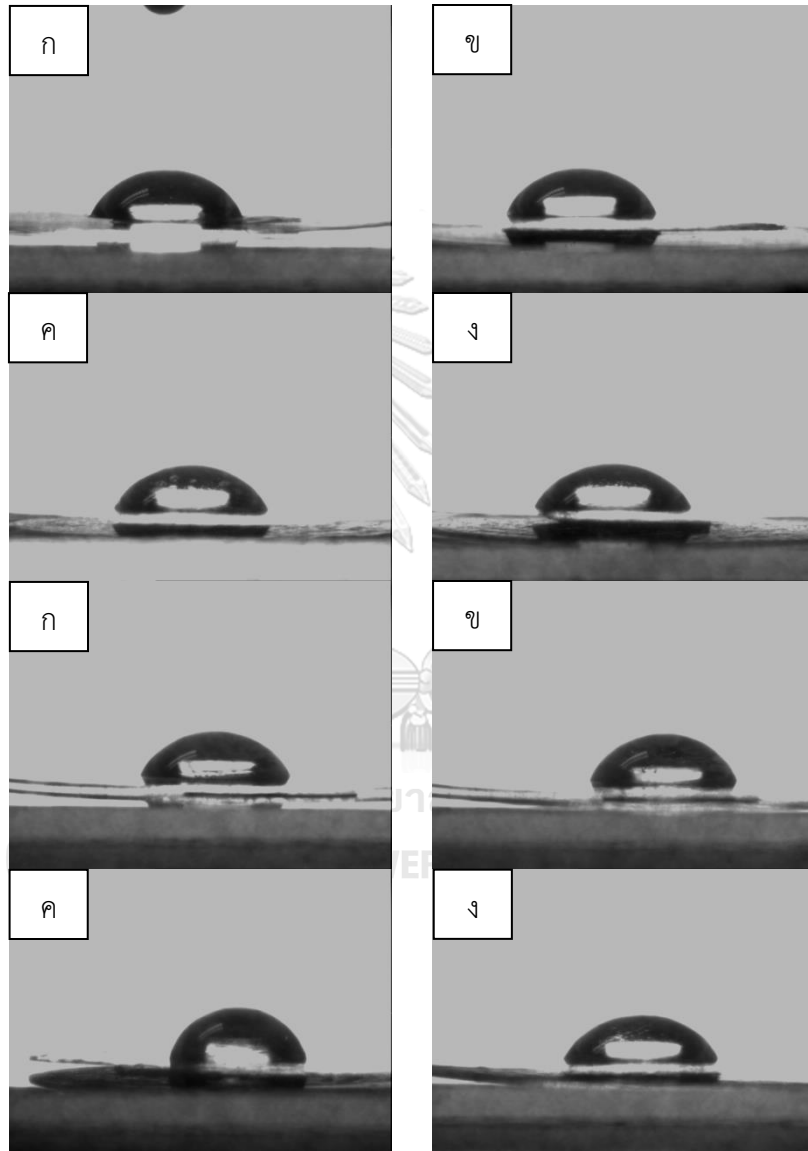
รูปที่ ง กราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการิทึมและระยะการเคลื่อนที่ของโปรตีน



ภาคผนวก จ

รูปทรงหยดน้ำบนฟิล์มเจลลาตินที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยความร้อนและสารละลาย
กลูตารัลดีไฮด์ที่ใช้วิเคราะห์หุ้มสัมผัสน้ำ

เชื่อมขวาง
ด้วยความร้อน



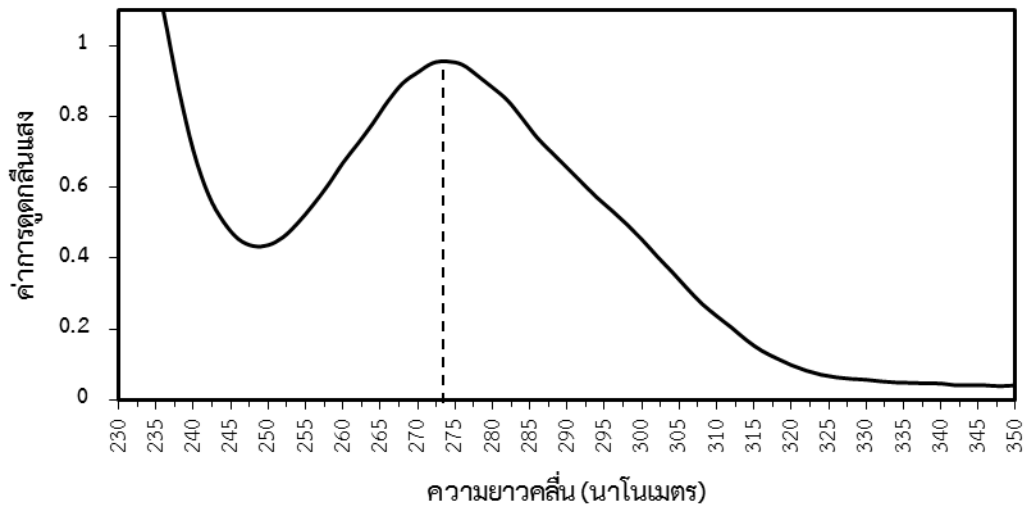
เชื่อมขวาง
ด้วยสารละลาย
กลูตารัลดีไฮด์

รูปที่ จ รูปทรงหยดน้ำบนฟิล์มเจลลาตินที่เชื่อมขวางด้วยความร้อนและสารละลายกลูตารัลดีไฮด์

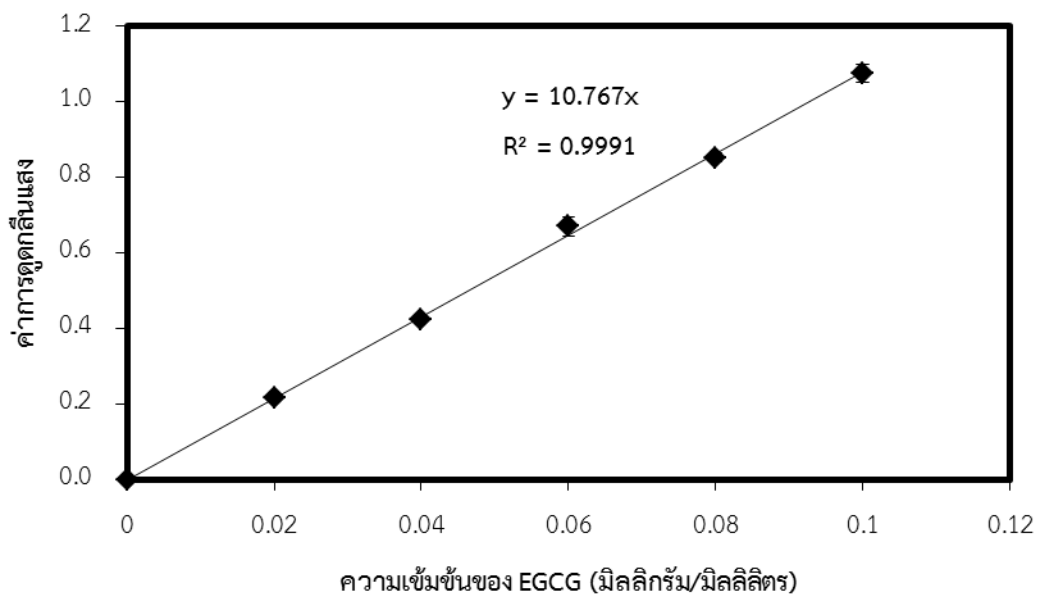
ก.) GA ข) GB ค) GE ง) GS

ภาคผนวก ฉ

กราฟสแกนความยาวคลื่นของสารละลาย EGCG ในน้ำปราศจากไอออน



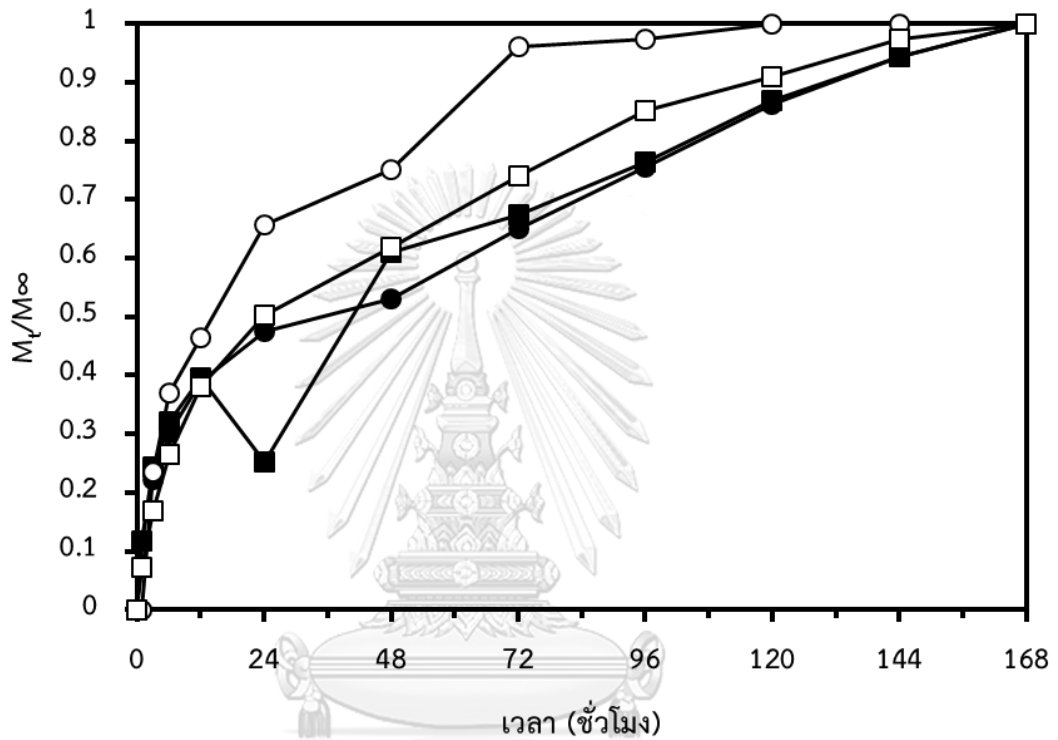
รูปที่ ฉ.1 กราฟสแกนค่าความยาวคลื่นของสารละลาย EGCG ความเข้มข้น 125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในน้ำปราศจากไอออน



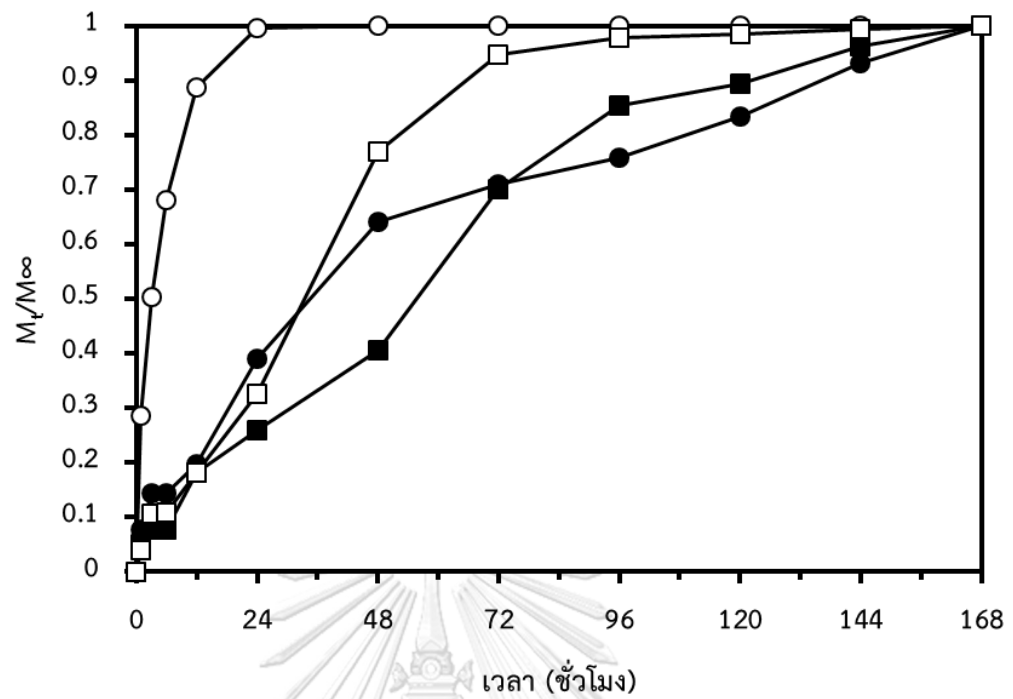
รูปที่ ฉ.2 กราฟมาตรฐานของสารละลาย EGCG ในน้ำปราศจากไอออน

ภาคผนวก ข

กราฟระหว่างปริมาณสารออกฤทธิ์สะสมที่เวลา t หารด้วยปริมาณสารออกฤทธิ์ที่ปลดปล่อยสะสมที่เวลานั้นต์ (M_t/M_∞) ต่อเวลา (t) ของการควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ (EGCG) ของอนุภาคทรงกลมขนาดไมครอนเจลาคติน



รูปที่ ข.1 กราฟระหว่างปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลา t หารด้วยปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลานั้นต์ (M_t/M_∞) ต่อเวลา (t) ของการควบคุมการปลดปล่อยสาร EGCG ภายใต้สภาวะที่ไม่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ



รูปที่ ข.2 กราฟระหว่างปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลา t หารด้วยปริมาณสารออกฤทธิ์ปลดปล่อยสะสมที่เวลานั้น (M_t/M_∞) ต่อเวลา (t) ของการควบคุมการปลดปล่อยสาร EGCG ภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์คอลลาจีเนสเป็นองค์ประกอบ

ภาคผนวก ข

เอกสารกำกับยากรดไฮยาลูรอนิค (Hyalovet) Fidia Farmaceutici S.p.A

HYALOVET® 20 ad us. vet.
Hyaluronic acid solution for horses:
Injectable solution for intra-articular administration

COMPOSITION Highly viscous aqueous solution of a defined molecular fraction of purified hyaluronic acid.
One preloaded syringe or one vial contains:
Active substance: natrii hyaluronas 20 mg Excipients: natrii chloridum, natrii dihydrogenophosphas, dinatrii phosphas dodecahydricus, Aqua q.s. ad sol. pro 2 ml

PROPERTIES / EFFECTS Hyaluronic acid is the prototype of a wide range of saccharide biopolymers (glycosaminoglycans or mucopolysaccharides), important components of all extracellular tissue structures, including cartilage and synovial fluid. The active substance of HYALOVET® is a specific hyaluronic acid fraction of defined molecular chain length (2500-3500 saccharide units) with a high degree of purity, which possesses particular biochemical, chemical-physical and pharmacological properties.
The intra-articular injection of this biological substance into the diseased horse joint results in improved joint function thanks to the normalization of the viscoelastic properties of synovial fluid and the activation of tissue repair processes in articular cartilage.

INDICATIONS Horse joint disease due to:
- osteoarthritis with or without inflammatory signs,
- acute or chronic synovitis,
- degenerative processes in articular cartilage,
- dry joint disease.
Adjuvant used in the treatment of chip fractures or sesamoid fractures.

DOSAGE / HOW TO USE THE PRODUCT 2 ml per joint (one preloaded syringe or one vial). More than one joint may be treated at the same time. If necessary the injection may be repeated after one or more weeks.

RESTRICTION OF USE
- Contraindications: There are no known contraindications
- Warnings: The injection is to be performed in strictly aseptic conditions; avoid tissue damage.

UNWANTED EFFECTS Transitory local reactions may occur sporadically.

WITHDRAWAL PERIOD None.

INTERACTIONS None known.

PARTICULAR REMARKS The product should not be used after the date indicated on the box by 'expir.'. It must be kept at room temperature (15°C-25°C) in a dry place in order to protect from moisture. Remaining solution must be discarded. Keep out of reach of children.
Swissmedic 45 449 (A), Code ATC-vet: QM09AX01

SUPPLY
- Preloaded syringe containing 2 ml, supplied with a 19-gauge needle.
- Vial containing 2 ml.

Manufacturer: Fidia Farmaceutici S.p.A. - Abano Terme (PD) Italy.
Distributor: TRB CHEMEDICA INTERNATIONAL S.A., Geneva, Switzerland.
Information update 11.2012

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวปภาวี ลิขิตเดชาโรจน์ เกิดวันที่ 24 มิถุนายน พ.ศ.2532 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ สาขาวิชาชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2554 เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต หลักสูตรวิศวกรรมชีวเวช (สหสาขาวิชา) คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2557

ผลงานวิชาการ

Likitdecharoj, P and Ratanavaraporn, J. Preparation and characterization of anionized and cationized gelatin derivatives and their microspheres for drug delivery system, Oral Presentation, The 9th Biomedical Engineering International Conference (BMEICON2016), Luang Prabang, Laos, 7-9 December, 2016.

