

อนุภาคนาโนแคลเซียมฟอสเฟตทำให้เสถียรด้วยพอลิเมอร์
ที่มีหมู่คาร์บอกซิลและการคอนจูเกตกับสารชีวโมเลกุล

Calcium Phosphate Nanoparticles Stabilized by
Carboxyl-containing Polymer and Their Conjugation
with Biomolecule

โดย

นายพงศกร บุญรอด

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2562

โครงการ อนุภาคนาโนแคลเซียมฟอสเฟตทำให้เสถียรด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่คาร์บอกซิล
และการคอนจูเกตกับสารชีวโมเลกุล

โดย นายพงศกร บุญรอด

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

- | | |
|---|------------------|
| 1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โรจน์ฤทธิ์ โจนธนาศ | ประธานกรรมการ |
| 2. อาจารย์ ดร.จัญจดา อุ่นเรืองศรี | กรรมการ |
| 3. รองศาสตราจารย์ ดร.วรวิทย์ โฮวัฒน์ | อาจารย์ที่ปรึกษา |

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรวิทย์ โฮวัฒน์)
อาจารย์ที่ปรึกษา

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)
หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่ 10 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2563

ชื่อโครงการ อนุภาคนาโนแคลเซียมฟอสเฟตทำให้เสถียรด้วยพอลิเมอร์
 ที่มีหมู่คาร์บอกซิลและการคอนจูเกตกับสารชีวโมเลกุล

ชื่อนิสิตในโครงการ นายพงศกร บุญรอด เลขประจำตัว 5933068423

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.วรวิทย์ โสเว่น

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2562

บทคัดย่อ

เป้าหมายเริ่มต้นของงานวิจัยนี้คือการพัฒนาอนุภาคนาโนแคลเซียมฟอสเฟต (CaPNPs) คอนจูเกตกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับ RANKL หรือที่เรียกว่า anti-RANKL เพื่อใช้เป็นพาหะในการนำส่ง anti-RANKL เพื่อยับยั้งการเจริญและพัฒนาการของเซลล์สลายกระดูก ขอบเขตของงานวิจัยถูกปรับให้แคบลงเนื่องจากข้อจำกัดของเวลาในการทำวิจัย งานวิจัยจึงมุ่งเน้นเพียงการสังเคราะห์ CaPNPs โดยใช้พอลิเมอร์ที่มีหมู่คาร์บอกซิลเป็นสารทำให้เสถียร ได้แก่ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC), พอลิแอสคริกแอซิด (PAA) จากนั้นจึงนำอนุภาคที่เตรียมได้ไปคอนจูเกตกับโปรตีนจำลองคือโบไวซีรัมแอลบูมิน (BSA) งานวิจัยนี้ใช้การตกตะกอนร่วมในการสังเคราะห์ CaPNPs 3 ชนิด คือ CaPNPs-CMC, CaPNPs-PAA และ CaPNPs-citrate ซึ่งเป็นอนุภาคที่ทำให้เสถียรด้วย CMC, PAA และ ไอออนซิเตรท ตามลำดับ อนุภาคทุกชนิดมีลักษณะเป็นสารแขวนลอยค่อนข้างข้นอยู่ได้ในช่วงเวลา 2-5 ชั่วโมงก่อนตกตะกอน จากการวิเคราะห์ด้วยการกระเจิงแสงแบบไดนามิกส์พบว่า CaPNPs-CMC (200 ± 7 นาโนเมตร) และ CaPNPs-PAA (345 ± 85 นาโนเมตร) มีขนาดเล็กกว่า CaPNPs-citrate (688 ± 370 นาโนเมตร). ค่าศักย์ซีต้าของ CaPNPs-CMC (-31.2 ± 0.6 มิลลิโวลต์) และ CaPNPs-PAA (-41.0 ± 0.8 มิลลิโวลต์) มีความเป็นลบมากกว่าของ CaPNPs-citrate (-15.4 ± 0.7 มิลลิโวลต์) ทำให้อนุภาคนำได้ว่าอนุภาค 2 ประเภทแรกมีเสถียรภาพมากกว่าประเภทหลัง การคอนจูเกตกับ BSA ทำให้อนุภาคเล็กลงยกเว้นในกรณีของ CaPNPs-CMC ค่าศักย์ซีต้ามีความเป็นลบลดลงหลังจากการคอนจูเกตกับ BSA การวิเคราะห์ด้วยฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโกปีช่วยยืนยันการมีอยู่ของ CMC รอบอนุภาค CaPNPs-CMC และการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่คาร์บอกซิลของ CMC บนอนุภาค CaPNPs-CMC กับหมู่แอมิโนของ BSA และจากการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงให้เห็นว่าอนุภาค CaPNPs-CMC ทั้งก่อนและหลังคอนจูเกตกับ BSA มีลักษณะเป็นทรงกลม และมีเส้นผ่านศูนย์กลางเป็น 21.02 ± 4.06 และ 30.54 ± 6.84 นาโนเมตร ตามลำดับ

คำสำคัญ: อนุภาคนาโนแคลเซียมฟอสเฟต, สารชีวโมเลกุล, การคอนจูเกตทางเคมี

Project Title Calcium Phosphate Nanoparticles Stabilized by Carboxyl-containing Polymer and Their Conjugation with Biomolecule

Student Name Mr.Phongsakorn Boonrod Student ID 5933068423

Advisor Name Associate Professor Dr. Voravee Hoven

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2019

Abstract

An original goal of this research is to develop calcium phosphate nanoparticles (CaPNPs) conjugated with a monoclonal antibody specific to RANKL or anti-RANKL to be used as anti-RANKL carriers to inhibit Osteoclastogenesis. Due to the time limitation, a scope of this research was narrowed down. The research only focused on the synthesis of CaPNPs using carboxyl-containing polymers, namely carboxymethyl cellulose (CMC) and poly(acrylic acid) (PAA) as stabilizers. The synthesized CaPNPs were then conjugated with bovine serum albumin (BSA), a model protein. By using co-precipitation method, 3 types of CaPNPs were synthesized. CaPNPs-CMC, CaPNPs-PAA, and CaPNPs-citrate are the particles stabilized by CMC, PAA, and citrate, respectively. All particles remain as opaque suspension for up to 2-5 h before precipitation. As determined by dynamic light scattering, CaPNPs-CMC (200 ± 7 nm), and CaPNPs-PAA (345 ± 85 nm) are much smaller than CaPNPs-citrate (688 ± 370 nm). The zeta potential values of CaPNPs-CMC (-31.2 ± 0.6 mV) and CaPNPs-PAA (-41.0 ± 0.8 mV) are much more negative than that of CaPNPs-citrate (-15.4 ± 0.7 mV) implying the first two are more stable than the latter. BSA conjugation caused the particles to be smaller in size, except CaPNPs-CMC. The zeta potential values became less negative as a result of BSA conjugation. Fourier transform-infrared spectroscopy can be used to confirm the presence of CMC surrounding CaPNPs-CMC and the amide bond formation between carboxyl groups of CMC on the CaPNPs-CMC and BSA. Scanning electron microscopic analysis verified that CaPNPs-CMC both before and after BSA conjugation were spherical having a diameter of 21.02 ± 4.06 and 30.54 ± 6.84 nm, respectively.

Keywords: calcium phosphate nanoparticles, biomolecule, chemical conjugation

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วรวิทย์ โฮเว่น อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่กรุณาให้ความสนับสนุน ความรู้ ความเมตตา คำแนะนำ และแนวทางในการดำเนินงานวิจัย อีกทั้งสละเวลาเพื่อให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ เป็นอย่างดียิ่งมาโดยตลอด ทำให้การวิจัยและรายงานเล่มนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โรจน์ฤทธิ์ โรจนธเนศ และอาจารย์ ดร. จัญจดา อุ่นเรืองศรีที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าในการตรวจทานแก้ไขรายงาน ตลอดจนให้คำชี้แนะและให้เกียรติเป็นคณะกรรมการในการสอบงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณนิสิตและนักวิจัย กลุ่มงานวิจัยของรองศาสตราจารย์ ดร.วรวิทย์ โฮเว่น ที่ได้ให้ความรู้เกี่ยวกับเทคนิคต่างๆ อาทิ การดูแลเครื่องมือ เอื้อเพื่ออุปกรณ์และสารเคมีที่จำเป็น วิธีการทดลอง รวมทั้งให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์ข้อมูล และให้คำแนะนำ คำปรึกษาที่ดีมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ “โครงการการเรียนรู้การสอนเพื่อเสริมประสบการณ์” คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนในการดำเนินการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบพระคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้เอื้อเพื่อเครื่องมืออุปกรณ์และสารเคมีที่จำเป็นต่างๆ ในการทำการวิจัยให้สำเร็จได้ด้วยดีและรวมถึงกำลังใจจากพ่อแม่ ครอบครัว และเพื่อนๆ น้องๆ ในภาควิชาเคมี ที่ได้ช่วยเหลืองานวิจัยนี้ผ่านลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยจะขอระลึกถึงความกรุณาของทุกท่านที่กล่าวถึงมา รวมถึงบุคคลที่มีได้กล่าวถึง ณ ที่นี้ตลอดไป

พงศกร บุญรอด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สัญลักษณ์และคำย่อ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและมูลเหตุจูงใจ.....	1
1.2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง.....	2
1.2.1 ชีววิทยาพื้นฐานของกระดูกและกระบวนการปรับแต่งกระดูก (Bone Remodeling)...	3
1.2.2 การเจริญและพัฒนาของเซลล์สลายกระดูก (osteoclastogenesis)	4
1.2.3 โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ RANKL.....	5
1.2.4 การนำส่งสารชีวโมเลกุลโดยใช้อนุภาคระดับนาโนของแคลเซียมฟอสเฟตเป็นตัวนำส่ง .6	
1.2.4.1 การสังเคราะห์อนุภาคระดับนาโนของแคลเซียมฟอสเฟตสำหรับเป็นพาหะนำส่ง	
.....	6
1.2.4.2 การเชื่อมต่อของสารชีวโมเลกุลกับอนุภาคระดับนาโนของแคลเซียมฟอสเฟต ..8	
1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	9
1.4 วัตถุประสงค์.....	12
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	12
บทที่ 2 การทดลอง	13
2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	13
2.2 สารเคมี	14
2.3 วิธีการทดลอง	15
2.3.1 การสังเคราะห์ CaPNPs.....	15
2.3.1.1 การสังเคราะห์ CaPNPs โดยใช้ CMC เป็นสารทำให้เสถียร.....	15

	หน้า
2.3.1.2 การสังเคราะห์ CaPNPs โดยใช้โซเดียมซิติเรทเป็นสารทำให้เสถียร	15
2.3.1.3 การสังเคราะห์ CaPNPs โดยใช้ PAA เป็นสารทำให้เสถียร.....	16
2.3.2 การยี้ดติด BSA บน CaPNPs.....	17
2.3.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ CaPNPs	17
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	18
3.1 การสังเคราะห์ CAPNPs.....	18
3.1.1 การสังเคราะห์ CaPNPs โดยใช้ CMC เป็นสารทำให้เสถียร.....	18
3.1.2 การสังเคราะห์ CaPNPs โดยใช้โซเดียมซิติเรทเป็นสารทำให้เสถียร	20
3.1.3 การสังเคราะห์ CaPNPs โดยใช้ PAA เป็นสารทำให้เสถียร	20
3.2 การยี้ดติด BSA บน CaPNPs.....	21
บทที่ 4 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	24
บรรณานุกรม.....	26
ประวัติผู้วิจัย.....	29

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1.1 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์ CaPNPs เชื่อมติดด้วยพันธะทางเคมีกับ anti-RANKL โดยใช้ EDC/NHS เป็นรีเอเจนต์คู่ควบ.....	2
รูปที่ 1.2 กระบวนการปรับแต่งกระดูกและการส่งสัญญาณต่างๆ.....	4
รูปที่ 1.3 การพัฒนาของเซลล์สลายกระดูก.....	5
รูปที่ 1.4 แผนภาพแสดงการทำงานของ denosumab ในการควบคุมสมดุลระหว่างกระบวนการสร้างและสลายกระดูก	6
รูปที่ 1.5 ลักษณะทั่วไปของ CaPNPs สำหรับการใช้เป็นพาหะนำส่ง	7
รูปที่ 1.6 แผนภาพแสดงอันตรกิริยาในการยึดติดสารชีวโมเลกุลกับ CaPNPs.....	8
รูปที่ 1.7 การตรึงแอนติบอดีลงบน thiol-modified CaPNPs	9
รูปที่ 1.8 HEL-Alexa488- and BSA-FITC-คอนจูเกตกับ CaPNPs.....	9
รูปที่ 1.9 การตรึงโปรตีน Avidin ลงบนพื้นผิวอนุภาคแคลเซียมฟอสเฟต	10
รูปที่ 1.10 วิธีการตรึงโปรตีน EGFP ลงบนพื้นผิวไฮดรอกซีอะพาไทต์	10
รูปที่ 1.11 การตรึงแอนติบอดีลงบน thiol-modified CaPNPs	11
รูปที่ 1.12 แผนภาพแสดงการติด BSA บน CaPNPs ที่ทำให้เสถียรด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่คาร์บอกซิล โดยใช้ EDC/NHS เป็นรีเอเจนต์คู่ควบ	12
รูปที่ 3.1 (a) สารแขวนลอยของ CaPNPs ที่ไม่ใช้ (ซ้าย) และใช้ (ขวา) CMC เป็นสารทำให้เสถียร หลังตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง, (b) แบบจำลองของ CaPNPs-CMC โดยที่ S คือ Ca ²⁺ และ * คือบริเวณที่มีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนสูงในโครงสร้างของ CMC	18
รูปที่ 3.2 FT-IR สเปกตรัมของ (a) CMC และ CaPNPs สังเคราะห์โดย (b) ใช้ และ (c) ไม่ใช้ CMC เป็นสารทำให้เสถียร.....	19
รูปที่ 3.3 FT-IR สเปกตรัมของ (a) BSA, (b) CaPNPs-CMC และ (c) CaPNPs-CMC-BSA.....	22
รูปที่ 3.4 ภาพ SEM ของ (a) CaPNPs-CMC และ (b) CaPNPs-CMC-BSA.....	23

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 ขนาดเฉลี่ยและประจุของอนุภาค CaPNPs-CMC วิเคราะห์ด้วยเทคนิค DLS	20
ตารางที่ 3.2 ขนาดเฉลี่ยและประจุของอนุภาค CaPNPs ชนิดต่างๆ ก่อนและหลังการติด BSA วิเคราะห์ด้วยเทคนิค DLS.....	22

สัญลักษณ์และคำย่อ

CaPNPs	calcium phosphate nanoparticles
RANK	receptor activator of nuclear factor kappa-B
RANKL	RANK ligand
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
NHS	N-hydroxysuccinimide
DCC	<i>N,N</i> -dicyclohexyl carbodiimide
DIC	<i>N,N</i> -diisopropylcarbodiimide
CMC	carboxymethyl cellulose
PEI	polyethylenimine
ppm	part per million
M-CSF	Macrophage colonystimulating factor
BMU	Basic Multicellular Unit
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
CSF-1	colony-stimulating factors
TNF	tumor necrosis factor
TGF-b	transforming growth factor b
OPG	Osteoprotegerin
IL-1	Interleukin-1
TNF- a	tumor necrosis factor-a,
bmp	bone morphogenetic protein
Cbfa-1	core-binding factor a-1
IGF-1	insulin-like growth factor-1
mAbs	monoclonal antibody

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและมูลเหตุจูงใจ

กระดูก (bone) เป็นอวัยวะโครงสร้างสำคัญของร่างกาย ทำหน้าที่เป็นที่ยึดเกาะของเอ็นและกล้ามเนื้อเพื่อให้ร่างกายสามารถเคลื่อนไหวได้ ป้องกันอวัยวะภายใน และทำหน้าที่ควบคุมสมดุลของแร่ธาตุต่างๆ เช่น แคลเซียมและฟอสเฟต¹ กระดูกเป็นเนื้อเยื่อที่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาผ่านกระบวนการสำคัญ 2 กระบวนการที่เกิดขึ้นอย่างสมดุลคือ การสร้างกระดูก (bone formation) และการสลายกระดูก (bone resorption) กระบวนการนี้เกิดขึ้นเพื่อซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอของกระดูก เกิดการผลัดเปลี่ยนให้เกิดกระดูกใหม่ที่มีความแข็งแรง ความยืดหยุ่นอย่างสม่ำเสมอ และยังเป็นการรักษาสมดุลของแคลเซียมและฟอสฟอรัสในร่างกาย² การสลายกระดูกเกิดขึ้นโดยเซลล์ออสติโอคลาสต์ (osteoclast) ส่วนการสร้างกระดูกใหม่เกิดขึ้นโดยเซลล์ออสติโอ بلاสต์ (osteoblast) ตามปกติทั้ง 2 กระบวนการจะเกิดขึ้นอย่างสมดุลกัน แต่หากมีการสลายกระดูกมากกว่าการสร้างกระดูกซึ่งอาจเกิดจากการที่ปริมาณแคลเซียมไม่เพียงพอต่อกระบวนการสร้างหรืออาจเกิดจากความผิดปกติของเซลล์กระดูกเองจะก่อให้เกิดความผิดปกติต่อกระดูก เช่น โรคกระดูกพรุน โรคปริทันต์ เป็นต้น²⁻³

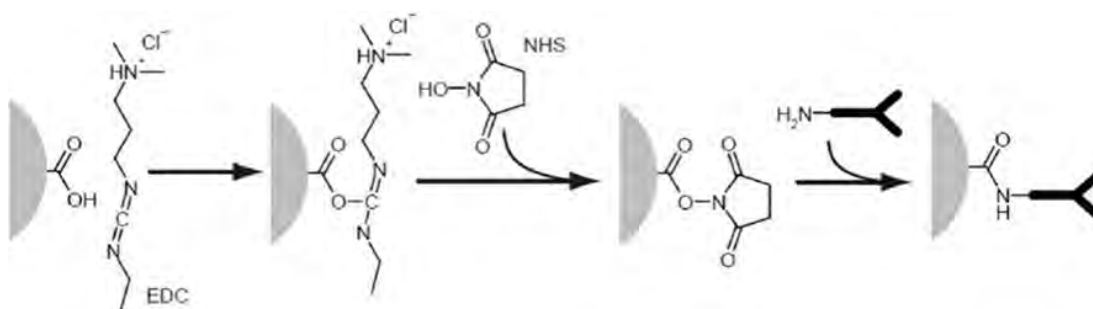
การเจริญของเซลล์สลายกระดูก (osteoclastogenesis) เริ่มต้นจากการกระตุ้นตัวรับ receptor activator of nuclear factor kappa-B (RANK) บนเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สลายกระดูก ด้วย RANK ligand (RANKL) ดังนั้นหากต้องการยับยั้งการทำงานของเซลล์สลายกระดูกสามารถทำได้โดยยับยั้งการจับกันระหว่าง RANK กับ RANKL โดยใช้ RANKL inhibitor⁴ โดยการใช้ยาหรือแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับ RANKL (anti-RANKL) แต่เนื่องจากเซลล์สลายกระดูกมีบทบาทสำคัญในการควบคุมสมดุลของกระดูกทั่วร่างกาย²⁻⁴ ดังนั้นการใช้ยาหรือแอนติบอดีที่ไม่มีความจำเพาะต่อบริเวณที่ผิดปกติ อาจทำให้เกิดผลข้างเคียงต่อบริเวณอื่นได้⁵

อนุภาคระดับนาโนของแคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate nanoparticles; CaPNPs) ถูกนำมาใช้เป็นระบบนำส่งสารชีวโมเลกุลต่างๆ ทางกายภาพอย่างแพร่หลาย เช่น ยา, ยีน, โปรตีน และแอนติบอดี⁶ เนื่องจากมีสมบัติเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อร่างกาย สามารถถูกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ นำส่งจำเพาะกับบริเวณของกระดูก (bone targeting)⁵ อีกทั้งแคลเซียมและฟอสเฟตยังเป็นส่วนประกอบหลักในกระดูกและฟันจึงมีส่วนช่วยในการเจริญของเนื้อเยื่อกระดูก³

การตรึงสารชีวโมเลกุลบนอนุภาคแคลเซียมฟอสเฟตเพื่อใช้เป็นพาหะนำส่ง (carrier) นั้นสามารถทำได้ 2 วิธี คือการดูดซับทางกายภาพ (physical adsorption) และการติดด้วยพันธะเคมี (chemical conjugation) การใช้แรงยึดเหนี่ยวทางกายภาพด้วยการดูดซับจะไม่แข็งแรงมากพอที่จะ

ยึดเหนี่ยวสารชีวโมเลกุลเมื่อเทียบกับการใช้พันธะเคมี ส่งผลให้สารชีวโมเลกุลมีโอกาสหลุดออกจากพาหะนำส่งก่อนไปถึงอวัยวะเป้าหมาย ดังนั้นการใช้พันธะเคมีในการตรึงสารชีวโมเลกุลจึงเป็นทางเลือกที่มีประสิทธิภาพมากกว่า

ผู้วิจัยสนใจที่จะนำส่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับ RANKL หรือ anti-RANKL ด้วย CaPNPs ไปยังบริเวณที่ต้องการยับยั้งการสร้างเซลล์สลายกระดูก โดยจะเชื่อมติด anti-RANKL เข้ากับ CaPNPs ที่ถูกทำให้เสถียรด้วยสารให้ความเสถียร (stabilizer) ที่เป็นพอลิเมอร์ที่มีหมู่คาร์บอกซิล เช่น คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose; CMC), พอลิแอกริลิกแอซิด (poly(acrylic acid); PAA) ด้วยพันธะเคมี ผ่านการทำปฏิกิริยาระหว่างหมู่คาร์บอกซิลของสารให้ความเสถียรที่เคลือบอยู่บนผิว CaPNPs กับหมู่เอมีนของ anti-RANKL โดยใช้ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide /N-hydroxysuccinimide; EDC/NHS) เป็นรีเอเจนต์คู่ควบ ดังแสดงในรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์ CaPNPs เชื่อมติดด้วยพันธะทางเคมีกับ anti-RANKL โดยใช้ EDC/NHS เป็นรีเอเจนต์คู่ควบ

1.2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

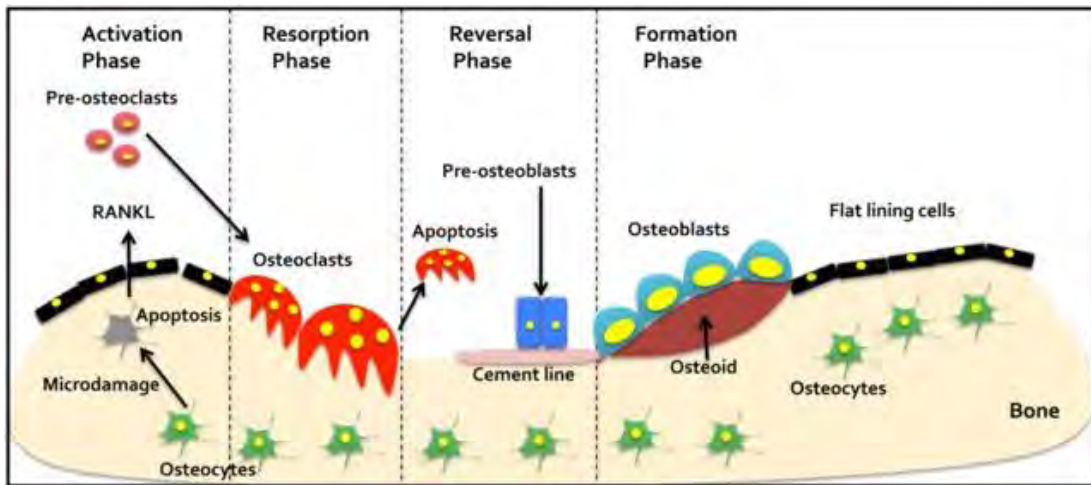
1.2.1 ชีววิทยาพื้นฐานของกระดูกและกระบวนการปรับแต่งกระดูก (Bone Remodeling) ³

กระดูกเป็นอวัยวะที่ประกอบด้วยเนื้อเยื่อกระดูก (osseous tissue) ที่มีความแข็งแรงแต่น้ำหนักเบา ซึ่งสามารถพัฒนาไปเป็นกระดูกรูปแบบที่ต่างกันไปเพื่อให้สอดคล้องกับลักษณะการทำงานและหน้าที่ของกระดูกแต่ละส่วน กระดูกเป็นโครงสร้างค้ำยันจึงจำเป็นต้องคงความแข็งแรงเพื่อให้สามารถรับแรงกด แรงดึง และน้ำหนักของร่างกายได้ ในขบวนการทางสรีรวิทยาของกระดูกจึงต้องมีกระบวนการปรับแต่งกระดูก (bone remodeling) โดยมีการสลายกระดูกเก่า (bone resorption) และมีการสร้างกระดูกใหม่ (bone formation) โดยขบวนการนี้จะเกิดขึ้นต่อเนื่องอย่างสมดุลตลอดชีวิตของมนุษย์

การปรับแต่งกระดูกเป็นกระบวนการปกติที่เกิดขึ้นเพื่อซ่อมแซมกระดูกส่วนที่สึกหรอ ทำให้เกิดการผลัดเปลี่ยนกระดูกใหม่ที่มีความแข็งแรง ทนทาน และมีความยืดหยุ่นอยู่เสมอ นอกจากนี้ยังรักษาสมดุลของแคลเซียมและฟอสฟอรัสในร่างกายผ่านทางฮอร์โมนพาราไทรอยด์ วิตามินดี และฮอร์โมนแคลซิโตนินอีกด้วย โดยการปรับแต่งกระดูกจะแบ่งออกเป็น 4 ระยะ คือ activation, resorption, reversal, formation

Activation เริ่มต้นที่หน่วยเล็กๆของกระดูกเรียกว่า Basic Multicellular Unit (BMU) โดยในเนื้อกระดูกปกติจะมีเซลล์ osteocyte แทรกอยู่โดยแต่ละเซลล์จะมีริยางค์ (filopodia) ยื่นออกไปรอบๆเป็นจำนวนมาก และเชื่อมต่อกันระหว่างเซลล์เป็นร่างแห โดยผ่านระบบท่อในกระดูก (canaliculi) **ดั่งรูปที่ 1.2** ทำหน้าที่ตรวจจับความผิดปกติ หากมีความเสียหายของกระดูกเกิดขึ้น (microdamage) จะทำให้ริยางค์ของเซลล์ถูกตัดขาด osteocyte จะส่งสัญญาณโดยการสร้าง macrophage colony stimulating factor (M-CSF) และ RANKL ซึ่งจะไปกระตุ้น osteoclast precursor ให้พัฒนาเป็น active osteoclast โดยมีลักษณะเป็น multinucleated giant cell และมีขอบเซลล์เป็นคลื่น (ruffled border) เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการย่อยสลายกระดูก ซึ่ง active osteoclast จะเกาะติดกับเนื้อกระดูกโดยอาศัย $\alpha_v\beta_3$ integrin หลังจากนั้นจะเริ่มทำการย่อยสลายกระดูกโดยการหลั่งกรดเกลือ (HCl) ก่อให้เกิด Resorption กล่าวคือการย่อยส่วนที่เป็นองค์ประกอบอนินทรีย์ (inorganic component) คือ calcium hydroxyapatite $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ และเอนไซม์ Cathepsin K ย่อยส่วนที่เป็นองค์ประกอบอินทรีย์ (organic components) คือคอลลาเจนและเมทริกซ์โปรตีนต่างๆ การสลายกระดูกนี้ใช้เวลาประมาณ 2 สัปดาห์ หลังจากนั้น osteoclast จะตาย และมีการหลั่ง BMPs (Bone Morphogenic Proteins) และไกลโคโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ ที่กระตุ้นให้เกิดกระบวนการ Reversal กล่าวคือ osteoblast precursor เจริญไปเป็น active osteoblast ซึ่งจะทำหน้าที่สร้างกระดูกขึ้นมาใหม่โดยสร้างเป็น non-mineralized matrix (osteoid) ซึ่งก็คือกระบวนการ Formation ที่ประกอบด้วย collagen type I และโปรตีนต่างๆก่อนแล้วจึงมีการสะสมแร่ธาตุ (mineralization) เช่น calcium hydroxyapatite ทำให้กระดูกมีความแข็งแรง ในระหว่างการสร้างกระดูก osteoblast บางส่วนจะเข้าไปแทรกในเนื้อกระดูกแล้วเปลี่ยนเป็น osteocyte และสร้างเครือข่ายเชื่อมกันระหว่างเซลล์เป็นร่างแหต่อไป

กระบวนการสร้างกระดูกนี้ใช้เวลานานประมาณ 3-6 เดือน และการสะสมแร่ธาตุจะเพิ่มได้มากที่สุดในช่วงระยะเวลาประมาณ 3 ปี จะเห็นได้ว่าหากมีสิ่งใดมารบกวนสมดุลในกระบวนการปรับแต่งกระดูกนี้ เช่น กระตุ้นการทำงานของ osteoclast หรือ ขัดขวางการทำงานของ osteoblast หรือทำให้กระบวนการสะสมแร่ธาตุเกิดได้ไม่เต็มที่ ส่งผลทำให้ความแข็งแรงของกระดูกลดลง และนำไปสู่โรคที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของกระดูกเช่น โรคกระดูกพรุน เป็นต้น



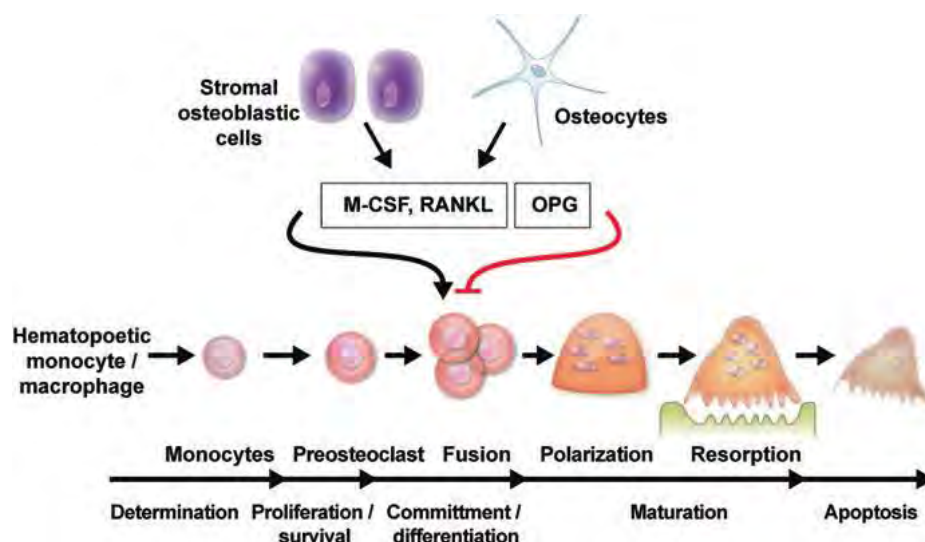
รูปที่ 1.2 กระบวนการปรับแต่งกระดูกและการส่งสัญญาณต่างๆ⁷

1.2.2 การเจริญและพัฒนาของเซลล์สลายกระดูก (osteoclastogenesis)⁸⁻⁹

การสลายกระดูกเริ่มด้วยการชักนำ osteoclast precursors ให้เข้ามาในบริเวณที่จะเกิดการสลายกระดูก โดยหน้าที่นี้ถูกควบคุมโดย osteoclasts ซึ่งพัฒนามาจาก hemopoietic stem cells ชนิดเดียวกับที่จะพัฒนาไปเป็น monocyte และ macrophage โดยการกระตุ้นของ M-CSF ร่วมกับปัจจัยเฉพาะที่ ได้แก่ RANKL, 6 (interleukin 1 , interleukin 2), colony-stimulating factors (CSF-1), tumor necrosis factor- α (TNF- α), transforming growth factor b (TGF-b) และปัจจัยเกี่ยวข้องทั้งระบบ เช่น ฮอร์โมนพาราไทรอยด์ วิตามินดี และฮอร์โมนแคลซิโตนิน จะทำให้ hemopoietic stem cells เปลี่ยนแปลงไปเป็น osteoclast progenitor cells และต่อจากนี้จะพัฒนาไปเป็น preosteoclast, inactive osteoclast, และ active osteoclast ตามลำดับ osteoclast ที่พัฒนาเต็มที่แล้ว จะมีความสามารถในการย่อยสลายกระดูก

กลไกหลักในการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของ osteoclast คือ RANK และ RANKL ซึ่งประกอบด้วยกระบวนการ osteoclast maturation หรือ osteoclastogenesis ที่ถูกควบคุมโดยโปรตีนบนผิวของ osteoblast คือ RANKL หากมีสารนี้จำนวนมากมาจับกับ osteoclast จะส่งผลให้เกิด osteoclast ที่พัฒนาเต็มที่ (matured osteoclast) มากขึ้น ในขณะที่ osteoblast ก็หลัง decoy receptor คือ osteoprotegerin (OPG) ที่จะมาจับกับ RANKL เพื่อป้องกันการเกิดปฏิสัมพันธ์กับ RANK ที่ผิวของ pre-osteoclast cells ส่งผลให้ลดจำนวน osteoclast ที่พัฒนาเต็มที่และลดการย่อยสลายกระดูก ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆที่ส่งผลกระตุ้นต่อ osteoclastogenesis เช่น ภาวะฮอร์โมนพาราไทรอยด์เกิน ภาวะขาดฮอร์โมนเพศ ภาวะที่มีไซโต

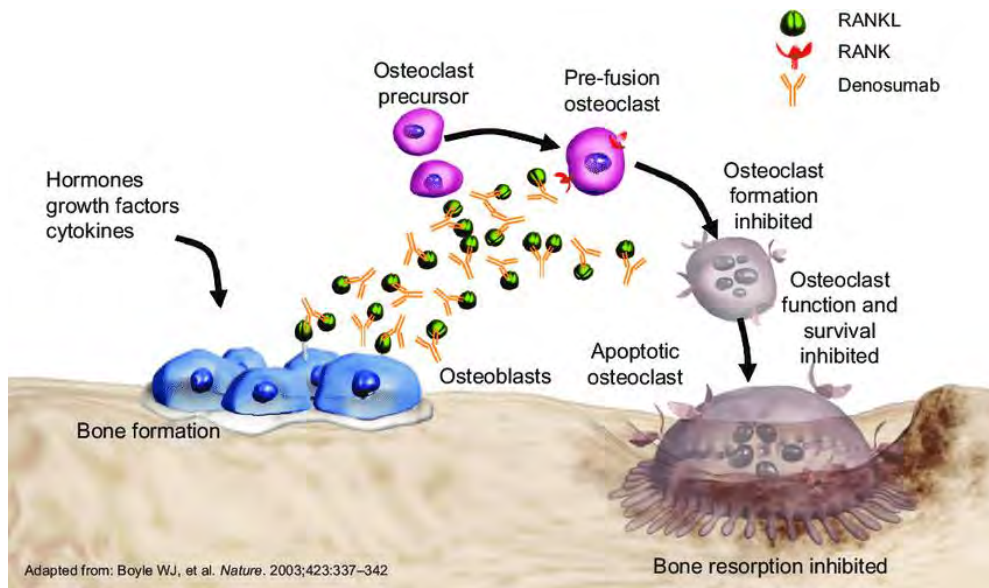
ตายน์ที่เกี่ยวกับการอักเสบ (inflammatory cytokines) เพิ่มขึ้น เช่น IL-1, TNF-a เป็นต้น กระบวนการ osteoblastogenesis ถูกควบคุมโดย bone morphogenetic protein (bmp), core-binding factor a-1 (Cbfa-1), TGF-b และ insulin-like growth factor-1 (IGF-1)



รูปที่ 1.3 การพัฒนาของเซลล์สลายกระดูก¹⁰

1.2.3 โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ RANKL

โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody ; mAbs) เป็นโปรตีนที่นำมาประยุกต์ใช้รักษาโรคได้ เนื่องจากความสามารถในการออกฤทธิ์จำเพาะต่อตำแหน่ง ซึ่งในปัจจุบันมีการพัฒนายาในกลุ่ม mAbs มาใช้ในการรักษาโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง, โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ โรคกระดูก เป็นต้น¹¹ กลไกการทำงานของ mAbs ที่จำเพาะต่อ RANKL จะเริ่มจากการที่ mAbs จับกับ RANKL ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานของ osteoclast และทำให้ลดการสลายกระดูกในที่สุด⁸ เช่น การออกฤทธิ์ของยา denosumab ซึ่งเป็น mAbs ชนิดหนึ่งโดยควบคุมสมดุลระหว่างกระบวนการสร้างและสลายกระดูก ดังรูปที่ 1.4



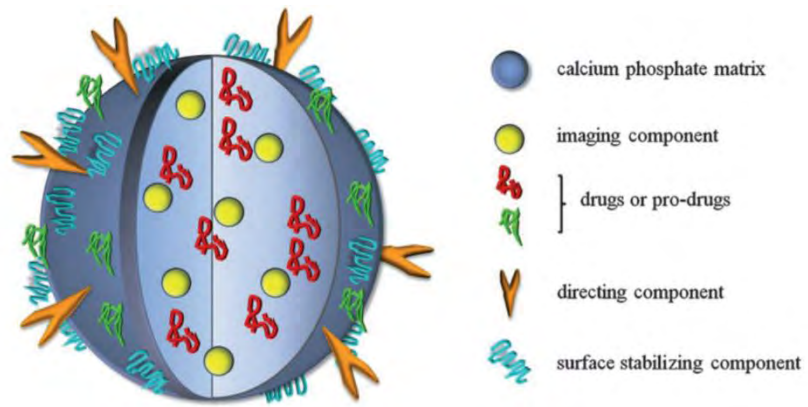
รูปที่ 1.4 แผนภาพแสดงการทำงานของ denosumab ในการควบคุมสมดุลระหว่างกระบวนการสร้างและสลายกระดูก¹²

1.2.4 การนำส่งสารชีวโมเลกุลโดยใช้อนุภาคระดับนาโนของแคลเซียมฟอสเฟตเป็นพาหะนำส่ง

ระบบนำส่งสารชีวโมเลกุลโดยใช้อนุภาคระดับนาโนได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในการประยุกต์ใช้สำหรับการนำส่งแบบจำเพาะกับเป้าหมาย ซึ่ง CaPNPs เป็นอนุภาคระดับนาโนที่ได้รับความนิยมโดยเฉพะการใช้งานรักษาโรคเกี่ยวกับกระดูก เนื่องจากสมบัติที่สามารถคงตัวอยู่ในสภาวะร่างกาย (pH 7.4) ความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อร่างกาย สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เป็นส่วนประกอบที่มีอยู่แล้วในร่างกายมนุษย์ และมีส่วนเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูกอีกด้วย^{6, 13}

1.2.4.1 การสังเคราะห์อนุภาคระดับนาโนของแคลเซียมฟอสเฟตสำหรับเป็นพาหะนำส่ง

วิธีการสังเคราะห์ CaPNPs ที่ได้รับความนิยมคือ การตกตะกอนร่วม (co-precipitation) เนื่องจากสามารถทำได้ง่ายและรวดเร็ว โดยการนำสารละลายที่มี Ca^{2+} และ PO_4^{3-} เช่น $\text{Ca}(\text{NH}_3)_2$ และ $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ เป็นต้น มาผสมกันภายใต้สภาวะที่เหมาะสม อีกปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงเมื่อนำอนุภาคที่เตรียมได้ไปใช้งานคือความเสถียรของอนุภาค เพื่อป้องกันการรวมตัวกันของอนุภาคและเพิ่มความเสถียรให้กับอนุภาค ซึ่งสามารถปรับเปลี่ยนได้ตามชนิดของสารทำให้เสถียรและตัวกลางที่อนุภาคจะถูกนำไปใช้งาน สารทำให้เสถียรในตัวกลางที่เป็นน้ำ ได้แก่ polyethylene imine (PEI), carboxymethyl cellulose (CMC) และ polyethylene glycol (PEG)¹⁴ เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถทำการดัดแปรพื้นผิวของอนุภาคให้มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ต้องการนำส่งได้โดยการเชื่อมติดกับสารนำส่งจำเพาะ (targeting agent) ผ่านการทำปฏิกิริยาเคมีระหว่างหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวอนุภาคกับสารดังกล่าว¹⁴ ดังรูปที่ 1.5



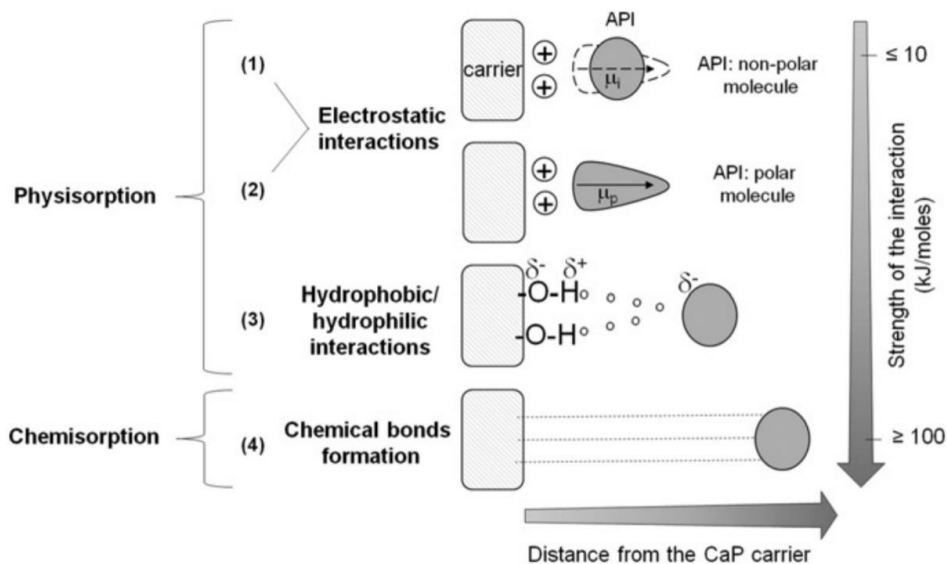
รูปที่ 1.5 ลักษณะทั่วไปของ CaPNPs สำหรับการใช้เป็นพาหะนำส่ง⁶

1.2.4.2 การเชื่อมต่อของสารชีวโมเลกุลกับอนุภาคระดับนาโนของแคลเซียมฟอสเฟต

การเชื่อมต่อสารชีวโมเลกุลบนอนุภาค CaPNPs เพื่อใช้เป็นพาหะนำส่งนั้น สามารถทำได้ 2 วิธี คือการดูดซับทางกายภาพ (physical adsorption) และการติดด้วยพันธะเคมี (chemical conjugation)¹³

การดูดซับทางกายภาพเป็นการยึดเหนี่ยวระหว่างสารชีวโมเลกุลกับพื้นผิวของ CaPNPs ด้วยพันธะที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ (covalent bond) จึงไม่แข็งแรง เช่น พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond), แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interactions), แรงดึงดูดระหว่างประจุไฟฟ้า (electrostatic forces) เป็นต้น โดยเกิดการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลข้างต้นจะขึ้นกับหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิว CaPNPs ด้วย¹⁵ เช่น กรณีที่ CaPNPs ถูกทำให้เสถียรด้วย PEI ประจุบนพื้นผิวจะเป็นบวก ส่งผลให้เกิดแรงดึงดูดระหว่างประจุไฟฟ้ากับส่วนที่เป็นประจุลบของสารชีวโมเลกุล เป็นต้น

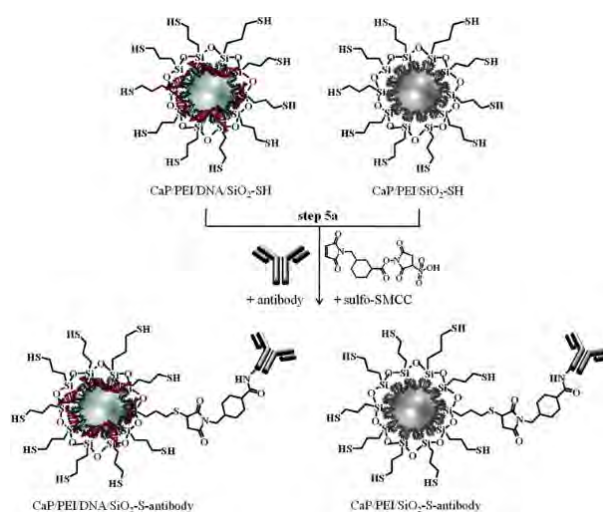
การเชื่อมติดด้วยพันธะเคมีคือการสร้างพันธะโควาเลนต์ระหว่างสารชีวโมเลกุลกับพื้นผิวของ CaPNPs ซึ่งมีความแข็งแรงและเสถียรมากกว่าจึงได้รับความนิยมในการใช้ยึดติดสารชีวโมเลกุลของระบบนำส่งยา ทั้งนี้สามารถใช้หมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวของอนุภาค เช่น คาร์บอกซิล (COOH), แอมิโน (NH₂), หรือ ไทออล (SH) ทำปฏิกิริยาสร้างพันธะโควาเลนต์กับหมู่ฟังก์ชันของสารชีวโมเลกุลที่ต้องการนำส่ง



รูปที่ 1.6 แผนภาพแสดงอันตรกิริยาในการยึดติดสารชีวโมเลกุลกับ CaPNPs¹⁶

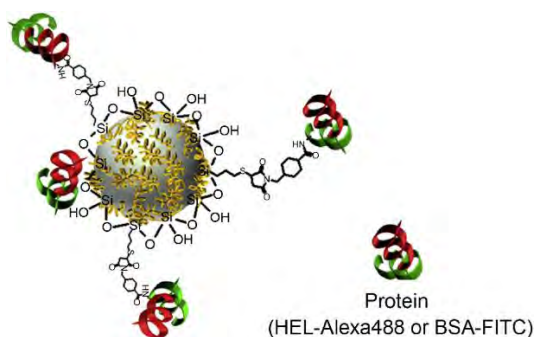
1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี ค.ศ. 2012, Kozlova และคณะ¹⁷ ตรึงแอนติบอดีลงบนพื้นผิวของ CaPNPs ที่ถูกทำให้เสถียรด้วย PEI และดัดแปรพื้นผิวให้มีหมู่ซัลไฟไฮดริล (SH) หรือหมู่เอมีโน ผ่านการทำปฏิกิริยาระหว่าง CaPNPs ที่เคลือบด้วยชั้นของซิลิกาและสารประกอบคู่ควบไซเลน (silane coupling agent) และติดแอนติบอดีด้วย sulfo-*N*-hydroxysuccinimideester sodium salt (Sulfo-SMCC) ดังรูปที่ 1.7 เพื่อใช้ในการตรวจจับเซลล์ (Cell targeting)



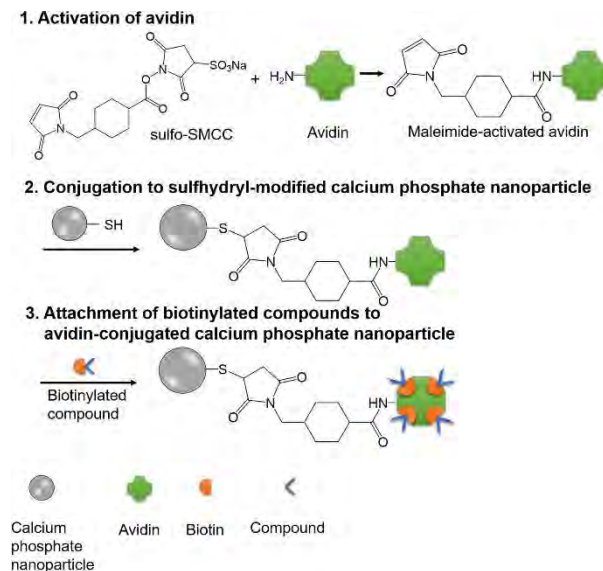
รูปที่ 1.7 การตรึงแอนติบอดีลงบน thiol-modified CaPNPs¹⁷

ในปี ค.ศ. 2014, Temchura และคณะ¹⁸ ตรึงโปรตีน Hen Egg Lysozyme (HEL) และ Bovine serum albumin (BSA) ลงบนพื้นผิวนอนุภาคแคลเซียมฟอสเฟตที่มีหมู่ซัลไฟไฮดริลที่ถูกทำให้เสถียรด้วย PEI และชั้นของซิลิกา ด้วย Sulfo-SMCC ดังแสดงในรูปที่ 1.8 เพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นอนุภาค ที่จับอย่างจำเพาะกับแอนติเจนบนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดบี (B cell)



รูปที่ 1.8 HEL-Alexa488- and BSA-FITC-คอนจูเกตกับ CaPNPs¹⁸

ในปี ค.ศ. 2017, Meer และคณะ¹⁹ ได้ตรึงโปรตีน avidin บนพื้นผิว CaPNPs โดยดัดแปรพื้นผิวของอนุภาคให้มีหมู่ซัลไฟไฮดริล ที่ทำปฏิกิริยากับโปรตีน avidin ที่ผ่านการดัดแปรให้มีหมู่ maleimide จากการทำปฏิกิริยากับ Sulfo-SMCC โปรตีน avidin ที่ติดบนผิวอนุภาคถูกใช้สำหรับการเชื่อมติดกับโปรตีน biotin ดังรูปที่ 1.9



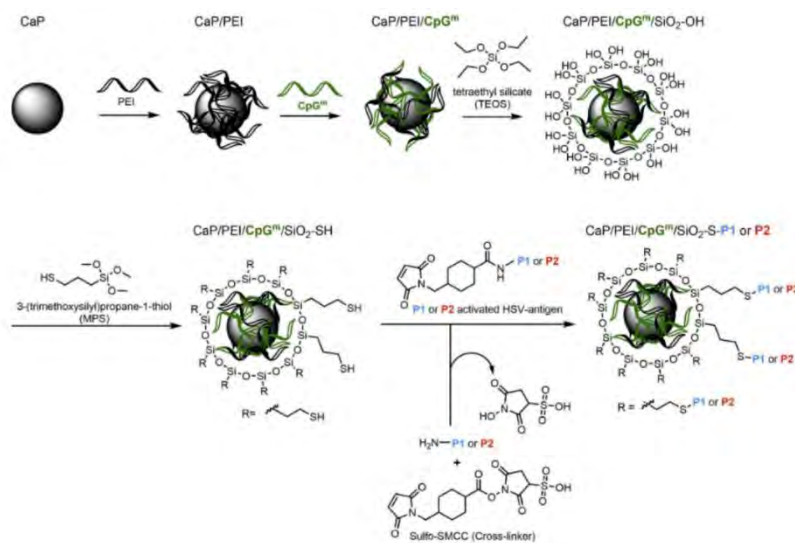
รูปที่ 1.9 การตรึงโปรตีน avidin ลงบนพื้นผิวอนุภาคแคลเซียมฟอสเฟต¹⁹

ในปี ค.ศ. 2018, Jeon และคณะ²⁰ ได้ตรึงโปรตีนชนิด enhanced green fluorescent protein (EGFP) ลงบนพื้นผิวไฮดรอกซีอะพาไทต์ผ่านปฏิกิริยาแทนที่ (substitution) โดยใช้รีเอเจนต์คู่ควบ ได้แก่ *N,N*-dicyclohexyl carbodiimide (DCC), *N,N*-diisopropylcarbodiimide (DIC), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) เป็นรีเอเจนต์คู่ควบ แสดงดังรูปที่ 1.10



รูปที่ 1.10 วิธีการตรึงโปรตีน EGFP ลงบนพื้นผิวไฮดรอกซีอะพาไทต์²⁰

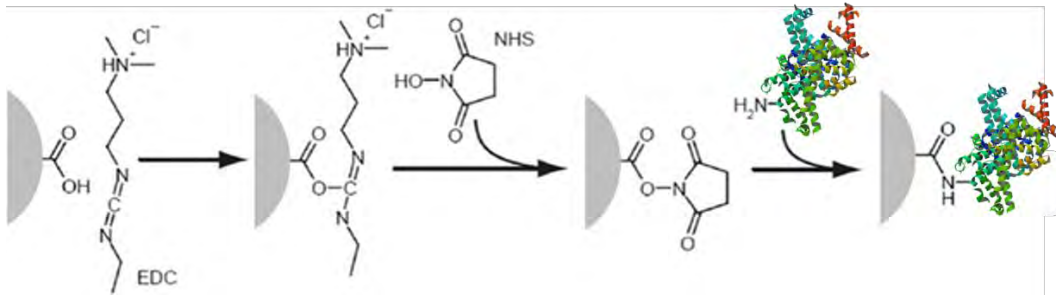
ในปี ค.ศ.2019, Kopp และคณะ²¹ ตรึงโมโนโคลนอลแอนติบอดีลงบนพื้นผิวอนุภาคแคลเซียมฟอสเฟตที่ถูกทำให้เสถียรด้วย PEI และดัดแปรพื้นผิวให้มีหมู่ซัลไฟไฮดริลผ่านการทำปฏิกิริยาระหว่างอนุภาคแคลเซียมฟอสเฟตที่เคลือบด้วยชั้นของซิลิกาและสารประกอบคู่ควบไซเลน ที่มีหมู่ไทออล จากนั้นจึงตรึงโมโนโคลนอลแอนติบอดีลงบนพื้นผิว CaPNPs โดยใช้ Sulfo-SMCC เป็นรีเอเจนต์คู่ควบ แสดงดังรูปที่ 1.11 เพื่อนำส่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีไปยังยังการแพร่กระจายของเชื้อไวรัส



รูปที่ 1.11 การตรึงแอนติบอดีลงบน thiol-modified CaPNPs²¹

จากงานวิจัยดังกล่าวมาข้างต้น การยึดติดสารชีวโมเลกุลลงบน CaPNPs ด้วยพันธะโควาเลนต์มักผ่านการทำปฏิกิริยาหลายขั้นตอน ส่วนใหญ่จะเริ่มจากการสังเคราะห์โดยใช้พอลิเมอร์เป็นสารทำให้เสถียร เช่น PEI จากนั้นจะเป็นการสร้างชั้นซิลิกาเพื่อเคลือบบนพื้นผิว แล้วจึงตามด้วยการใช้รีเอเจนต์คู่ควบในการสร้างพันธะทางเคมี งานวิจัยนี้สนใจที่จะลดขั้นตอนโดยการสังเคราะห์ CaPNPs ในสถานะที่มีสารทำให้เสถียรเป็นพอลิเมอร์กลุ่มที่มีหมู่คาร์บอกซิล เช่น CMC และ PAA ซึ่งหมู่คาร์บอกซิลบนพอลิเมอร์เหล่านี้จะสามารถสร้างพันธะโควาเลนต์กับหมู่แอมิโนของสารชีวโมเลกุลได้โดยตรง จากการใช้ EDC/NHS ซึ่งเป็นรีเอเจนต์คู่ควบสามัญที่นิยมใช้ในการตรึงสารชีวโมเลกุลในน้ำ แสดงขั้นตอนในรูปที่ 1.12 กระบวนการดังกล่าวสามารถทำได้โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสร้างชั้นซิลิกาตามที่รายงานไว้ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ จากเวลาการทำวิจัยที่มีจำกัด ผู้วิจัยได้เลือกใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นโมเลกุลจำลอง (model compound) ในการตรึงบนพื้นผิวของ CaPNPs ที่เตรียมได้ และคาดว่าจะใช้ CaPNPs ที่มีสมบัติเหมาะสมไปใช้ใน

การศึกษาการตรึง anti-RANKL เพื่อประยุกต์เป็นพาหะนำส่งเพื่อยับยั้งการสร้างเซลล์สลายกระดูกต่อไป



รูปที่ 1.12 แผนภาพแสดงการติด BSA บน CaPNPs ที่ทำให้เสถียรด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่คาร์บอกซิล โดยใช้ EDC/NHS เป็นรีเอเจนต์คู่ควบ

1.4 วัตถุประสงค์

- 1) สังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของ CaPNPs โดยใช้พอลิเมอร์ที่มีหมู่คาร์บอกซิลเป็นสารทำให้เสถียร
- 2) ศึกษาการติดสารชีวโมเลกุลบน CaPNPs ที่ทำให้เสถียรด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่คาร์บอกซิล

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้อนุภาคแคลเซียมฟอสเฟตที่ทำให้เสถียรด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่คาร์บอกซิลและสามารถยึดติดกับสารชีวโมเลกุลได้

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Fourier Transform-Infrared Spectrophotometer (FT-IR) ยี่ห้อ Thermo Scientific Nicolet 6700
2. Field Emission Scanning Electron Microscope (FE-SEM) ยี่ห้อ JEOL JSM-7610F
3. Dynamic Light Scattering ยี่ห้อ Malvern Nano ZS90
4. pH Meter) ยี่ห้อ PH-200 HM DIGITAL
5. Freeze dryer ยี่ห้อ Thermo รุ่น super modulyo
6. เครื่องชั่งละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น AE 240
7. Vortex mixer ยี่ห้อ Scientific Industries รุ่น G560E
8. Hot plate-stirrer ยี่ห้อ IKA รุ่น C-MAG HS7
9. Syringe pump ยี่ห้อ KF Technology รุ่น NE-1000 Single
10. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ยี่ห้อ Eppendorf, Germany รุ่น 5804R
11. ขวดเก็บสาร (vials) ขนาด 5, 10 และ 20 มิลลิลิตร
12. ปีกเกอร์ (beaker) ขนาด 10, 50, 100, 150, 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
13. ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 10, 25 และ 100 มิลลิลิตร
14. หลอดพลาสติกกั้นแหลม (eppendorf tube) ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร
15. หลอดไมโครเซ็นติฟิวส์ (microcentrifuge tubes)
16. กระบอกตวง (cylinder) ขนาด 100 มิลลิลิตร
17. ควอตส์คิวเวต (quartz cuvette) ขนาด 3 มิลลิลิตร
18. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 10, 100 และ 1000 ไมโครลิตร
19. ช้อนตักสาร (spatula)
20. แท่งแก้วคนสาร (stirring rod)
21. กระดาษชั่งสาร (weighing paper)

2.2 สารเคมี

1. กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid, HCl)
2. น้ำดีไอออนไนซ์ (deionized water)
3. น้ำมิลลิคิว (Milli-Q water)
4. แคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride, CaCl_2)
5. แคลเซียมไนเตรท (calcium nitrate, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$)
6. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, NaOH)
7. โซเดียมซิเตรต ไดไฮเดรต (sodium citrate dihydrate, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
8. ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (diammonium hydrogen phosphate, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$)
9. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (disodium hydrogen phosphate, Na_2HPO_4)
10. คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose; CMC) น้ำหนักโมเลกุล 90,000 กรัมต่อโมล degree of substitution เท่ากับ 0.7
11. พอลิแอคริลิกแอซิด (poly(acrylic acid); PAA, Degree of polymerization (DP) เท่ากับ 100 น้ำหนักโมเลกุล 7,206 กรัมต่อโมล
12. สารละลายแอมโมเนีย (ammonia solution, 30%(v/v))
13. โพรตีนโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin, BSA)
14. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (Phosphate Buffer Saline, PBS)
15. น้ำแข็งแห้ง (dry Ice)
16. เอ็น-ไฮดรอกซีสักซินิไมด์ (N-hydroxysuccinimide, NHS)
17. 1-เอทิล-3-(3-ไดเมทิลแอมิโนโพรพิล)คาร์โบไดอิมิด (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide; EDC)

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การสังเคราะห์ CaPNPs

2.3.1.1 การสังเคราะห์ CaPNPs โดยใช้ CMC เป็นสารทำให้เสถียร

การสังเคราะห์ทำได้โดยการตกตะกอนร่วมของสารละลาย 3 ชนิด คือ แคลเซียมไนเตรท ความเข้มข้น 18.0 มิลลิโมลาร์ ที่ถูกปรับพีเอชให้เป็น 10 ด้วยสารละลายแอมโมเนีย สารละลาย ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 10.8 มิลลิโมลาร์ และสารละลายคาร์บอกซีเมทิล เซลลูโลสความเข้มข้น 1-4 กรัมต่อลิตร เตรียมสารละลายแต่ละชนิดในน้ำมิลลิคิวเป็นปริมาตร 20 มิลลิลิตร บรรจุสารละลายแต่ละชนิดในหลอดฉีดยาขนาด 20 มิลลิลิตร จากนั้นควบคุมการฉีด สารละลายแต่ละชนิดจากหลอดฉีดยาด้วย syringe pump โดยใช้อัตราการหยด 5 มิลลิลิตรต่อนาที ลงในบีกเกอร์ขนาด 150 มิลลิลิตร บรรจุน้ำมิลลิคิวปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่ถูกกวนผสมด้วยแท่ง แม่เหล็ก ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายผสมในบีกเกอร์ไปแยกอนุภาคที่เกิดขึ้นออก ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาอนุภาคที่แยกได้ไป ล้างด้วยน้ำมิลลิคิวด้วยการปั่นเหวี่ยงอีก 3 รอบ จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น CaPNPs-CMC นำอนุภาคส่วน หนึ่งไปทำให้แห้งด้วยกระบวนการแช่เยือกแข็ง (freeze dry) เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FT-IR ส่วนที่เหลือเก็บในรูปสารละลายเพื่อนำไปใช้ต่อและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DLS และ FE-SEM

2.2.1.2 การสังเคราะห์ CaPNPs โดยใช้โซเดียมซิเตรทเป็นสารทำให้เสถียร

นำสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตรใส่ใน บีกเกอร์ขนาด 150 มิลลิลิตร จากนั้นฉีดสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 12 มิลลิลิตรด้วยลงในบีกเกอร์ข้างต้น ควบคุมการฉีดสารละลายจากหลอดฉีดยา ด้วย syringe pump ให้มีอัตราการหยดเป็น 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที และกวนด้วยแท่งแม่เหล็ก จากนั้น ปรับ พีเอชของสารละลายให้เป็น 10 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ กวน ด้วยแท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมโซเดียมซิเตรท 30 มิลลิกรัม กวนด้วย แท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง แยกอนุภาคที่เกิดขึ้นออกจากสารละลายด้วยการปั่น เหวี่ยงที่ ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำอนุภาคที่แยกได้ไปล้างด้วยน้ำ มิลลิคิวด้วยการปั่นเหวี่ยงอีก 3 รอบ จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น CaPNPs-citrate เก็บอนุภาคในรูป สารละลายเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DLS

2.2.1.3 การสังเคราะห์ CaPNPs โดยใช้ PAA เป็นสารทำให้เสถียร

เตรียมสารละลาย PAA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำมิลลิคว ซึ่งสารไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2148 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 150 มิลลิลิตร เติม 100 มิลลิลิตรของสารละลาย PAA ที่เตรียมไว้ จากนั้นฉีดสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.1055 กรัม ที่ละลายในสารละลาย PAA 10 มิลลิลิตร โดยควบคุมการฉีดสารละลายจากหลอดฉีดยาด้วย syringe pump อัตราการหยด 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที และกวนด้วยแท่งแม่เหล็ก จากนั้นปรับค่าพีเอชของสารละลายให้เท่ากับ 10 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ กวนด้วยแท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แยกอนุภาคออกจากสารละลายด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำอนุภาคที่แยกได้ไปล้างด้วยน้ำมิลลิควด้วยการปั่นเหวี่ยงอีก 3 รอบ จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น CaPNPs-PAA เก็บอนุภาคในรูปสารละลายเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DLS

2.3.2 การยัดติด BSA บน CaPNPs

ซึ่ง CaPNPs-CMC 2 มิลลิกรัมลงในหลอดพลาสติกกันแหลมที่บรรจุ PBS pH 7.4 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยการสั่นสะเทือนบน Vortex mixer ความถี่ 50 เฮิรซ์ เป็นเวลา 30 นาที เติม EDC ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ NHS ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดพลาสติกกันแหลม นำไปเขย่าด้วยการสั่นสะเทือนบน Vortex mixer ที่ความถี่ 50 เฮิรซ์ เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายผสมไปกวนต่อในบีกเกอร์ด้วยแท่งแม่เหล็กที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นแยกอนุภาคออกจากสารละลายด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำอนุภาคที่แยกได้มากระจายตัวในสารละลาย BSA ใน PBS pH 7.4 (ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปเขย่าด้วยการสั่นสะเทือนบน Vortex mixer ที่ความถี่ 50 เฮิรซ์ เป็นเวลา 5 นาที ปล่อยให้สารละลายเกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกอนุภาคออกจากสารละลายด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิน้อยกว่า 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำอนุภาคที่แยกได้ไปล้างด้วยสารละลายแช่เย็นของ PBS pH 7.4 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ และปั่นเหวี่ยงอีก 3 รอบ จะได้เป็น CaPNPs-CMC-BSA นำอนุภาคส่วนหนึ่งไปทำให้แห้งด้วยกระบวนการแช่เยือกแข็ง ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับ CaPNPs-citrate และ CaPNPs-PAA

2.3.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ CaPNPs

พิสูจน์เอกลักษณ์อนุภาค CaPNPs-CMC และ CaPNPs-CMC-BSA ที่สังเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron Microscopy; SEM) เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาของอนุภาค โดยนำตัวอย่างมาหยดลงบนกระจกสไลด์ จากนั้นรอให้แห้ง นำไปเคลือบทองคำก่อนการวิเคราะห์

วิเคราะห์ขนาดและค่าศักย์ซีต้า (zeta potential) ด้วยเทคนิคการกระเจิงแสงแบบไดนามิกส์ (Dynamic Light Scattering) ใช้แสง He-Ne laser ความยาวคลื่น 658 นาโนเมตร ที่กำหนดมุมการกระเจิงของแสงเท่ากับ 173° โดยนำอนุภาคมากระจายตัวในน้ำมิลลิควิในกรณีของอนุภาคก่อนการติด BSA และกระจายตัวใน PBS สำหรับอนุภาคหลังติด BSA โดยทำการตรวจวัดสารละลายที่มีความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

บทที่ 3

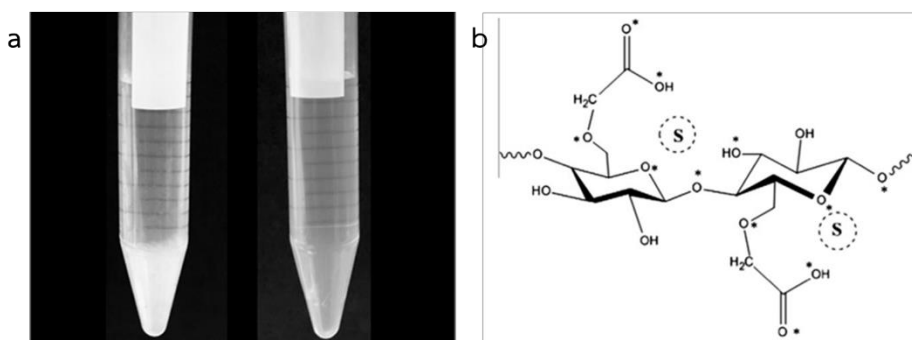
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การสังเคราะห์ CaPNPs

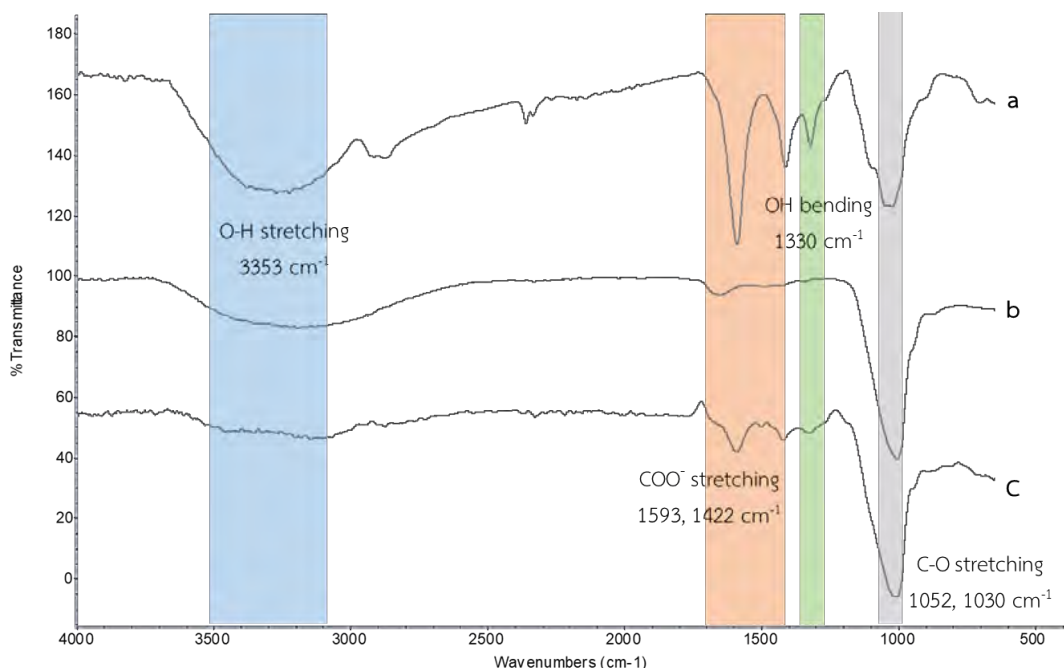
3.1.1 การสังเคราะห์ CaPNPs โดยใช้ CMC เป็นสารทำให้เสถียร

อนุภาค CaPNPs ถูกสังเคราะห์ผ่านเทคนิคการตกตะกอนร่วมระหว่างแคลเซียมไนเตรท, ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และ CMC ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารช่วยเพิ่มความเสถียร จากการทดลองพบว่าได้สารแขวนลอย (suspensions) สีขาวของอนุภาค CaPNPs-CMC ซึ่งสามารถคงตัวอยู่ในรูปสารแขวนลอยได้ 1-2 ชั่วโมงก่อนตกตะกอน ในขณะที่ CaPNPs ที่เตรียมโดยไม่ใช้ CMC เป็นสารทำให้เสถียร จะตกตะกอนภายใน 5 นาที แสดงดังรูปที่ 3.1(a)

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค FT-IR แสดงผลในรูปที่ 3.2 พบว่าสเปกตรัมของอนุภาค CaPNPs ที่สังเคราะห์โดยใช้ CMC เป็นสารทำให้เสถียร หรือ CaPNPs-CMC (รูปที่ 3.2c) ปรากฏสัญญาณ asymmetric และ symmetric C=O stretching ที่ 1593 และ 1422 cm^{-1} ตามลำดับ ของหมู่คาร์บอกซิเลต ซึ่งสอดคล้องกับพีกที่ปรากฏในสเปกตรัมของ CMC (รูปที่ 3.2a) จึงสามารถยืนยันได้ว่ามี CMC เป็นส่วนหนึ่งของ CaPNPs ทั้งนี้คาดว่าการทำงานที่เป็นสารช่วยให้เสถียรนั้นเกิดจากอันตรกิริยาระหว่างส่วนที่มีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนสูงของอะตอมของออกซิเจนในโครงสร้างของ CMC กับประจุบวกของ Ca^{2+} ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญที่ทำให้เกิดเป็นอนุภาคของ CaPNPs²² ดังรูปที่ 3.1(b) นอกจากนี้ยังพบพีกกว้างของ O-H stretching แสดงถึงการเกิดพันธะไฮโดรเจนในโครงสร้าง CMC (รูปที่ 3.2a) ซึ่งยังคงอยู่ในโครงสร้างของ CaPNPs-CMC (รูปที่ 3.2c) แต่ด้วยความเข้มของพีกที่ต่ำลง



รูปที่ 3.1 (a) สารแขวนลอยของ CaPNPs ที่ไม่ใช้ (ซ้าย) และใช้ (ขวา) CMC เป็นสารทำให้เสถียร หลังตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง, (b) แบบจำลองของ CaPNPs-CMC โดยที่ S คือ Ca^{2+} และ * คือบริเวณที่มีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนสูงในโครงสร้างของ CMC²²



รูปที่ 3.2 FT-IR สเปกตรัมของ (a) CMC, CaPNPs สังเคราะห์โดย (b) ไม้ไผ่ และ (c) ใช้ CMC เป็นสารทำให้เสถียร

จากที่ได้รายงานไปแล้วข้างต้นพบว่าการใช้สารละลาย CMC ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ยังให้ CaPNPs-CMC ที่กระจายตัวได้ดีในเบื่องต้น แต่ยังคงตกตะกอนหลังตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ผู้วิจัยจึงลองปรับเพิ่มความเข้มข้นของ CMC ขึ้นเป็น 2 เท่าคือ 4 กรัมต่อลิตร ผลปรากฏว่าอนุภาคมีขนาดลดลงเล็กน้อย จาก 217 ± 37 นาโนเมตร เป็น 200 ± 7 นาโนเมตร แต่ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของ polydispersity index (PDI) อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ค่าศักย์ซีต้ามี่ค่าติดลบเพิ่มขึ้น ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการมีปริมาณของ CMC ล้อมรอบอนุภาค CaPNPs ในสัดส่วนที่สูงขึ้น ส่งผลให้ CaPNPs-CMC มีเสถียรภาพมากขึ้น และสามารถกระจายตัวในน้ำได้ดีขึ้นจาก 2 ชั่วโมงเป็น 4-5 ชั่วโมง ในขณะที่การลดความเข้มข้นของสารละลาย CMC ลงเหลือ 1 กรัมต่อลิตร ทำให้ได้อนุภาค CaPNPs-CMC ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นเป็น 2 เท่า มีเส้นผ่านศูนย์กลางเป็น 413 ± 59 นาโนเมตร มีค่า PDI เพิ่มขึ้น แสดงถึงการกระจายขนาดที่กว้างขึ้น ในขณะที่ค่าศักย์ซีต้ามี่ค่าลดลงจากค่าของ CaPNPs-CMC ที่เตรียมโดยใช้ความเข้มข้นของ CMC เป็น 2 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองด้วย DLS แสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ขนาดเฉลี่ยและประจุของอนุภาค CaPNPs-CMC วิเคราะห์ด้วยเทคนิค DLS

[CMC] (g/L)	เส้นผ่านศูนย์กลาง (นาโนเมตร)	PDI	ค่าศักย์ซีต้า (มิลลิโวลต์)
1.0	413±59	0.44±0.08	-20.3±1.4
2.0	217±37	0.31±0.04	-23.0±1.5
4.0	200±7	0.30±0.02	-31.2±0.6

3.1.2 การสังเคราะห์ CaPNPs โดยใช้โซเดียมซิเตรทเป็นสารทำให้เสถียร

นอกจากการเตรียม CaPNPs โดยใช้ CMC เป็นสารทำให้เสถียรแล้ว ผู้วิจัยยังสนใจที่จะใช้การตกตะกอนร่วมระหว่างสารละลายแคลเซียมคลอไรด์และสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ในสถานะที่มีการเติมโซเดียมซิเตรทเป็นสารช่วยเพิ่มความเสถียร เพื่อเตรียม CaPNPs-citrate โดยคาดหวังว่าจะใช้หมู่คาร์บอกซิลของซิเตรทที่อยู่รอบนอกของอนุภาคในการติดกับโปรตีน จากผลการทดลองพบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารแขวนลอยสีขาวขุ่นของอนุภาค CaPNPs-citrate สามารถคงตัวอยู่ในรูปสารแขวนลอยได้ 3-4 ชั่วโมงก่อนตกตะกอน แต่ลักษณะของตะกอนที่กระจายตัวอยู่ในน้ำจะค่อยๆ มีขนาดใหญ่ขึ้นจากการรวมกลุ่ม จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DLS พบว่า อนุภาคมีขนาด 688 ± 370 นาโนเมตร PDI เท่ากับ 0.73 ± 0.28 และค่าศักย์ซีต้าเท่ากับ -15.4 ± 0.7 มิลลิโวลต์ ซึ่งข้อมูลสอดคล้องกับสิ่งที่สังเกตเห็นคือ อนุภาคมีขนาดใหญ่ มีการกระจายขนาดที่กว้าง และความเป็นประจุต่ำ บ่งบอกถึงความสามารถในการกระจายตัวในน้ำที่ไม่ดี ทั้งนี้หากเทียบกับ CaPNPs-CMC จะพบว่า CaPNPs-citrate มีสมบัติที่ดีกว่าทั้งในแง่ของขนาดและความเสถียรของการกระจายตัวในน้ำ ซึ่งน่าจะเป็นผลจากการที่ซิเตรทเป็นเพียงไอออนประจุลบขนาดเล็ก การทำให้อนุภาค CaPNPs เสถียร เป็นผลจากแรงผลักระหว่างประจุ (charge-charge repulsion) เท่านั้น ในขณะที่ CMC เป็นพอลิเมอร์ที่มีประจุลบ การทำให้อนุภาคของ CaPNPs เสถียร เป็นผลจากทั้งแรงผลักระหว่างประจุและ ความเกะกะของโซ่ CMC (steric stabilization) จึงมีประสิทธิภาพในการทำให้อ่อนกว่าไอออนซิเตรท

3.1.3 การสังเคราะห์ CaPNPs โดยใช้ PAA เป็นสารทำให้เสถียร

จากข้อจำกัดข้างต้นในเรื่องเสถียรภาพของการกระจายตัวในน้ำของทั้ง CaPNPs-CMC และ CaPNPs-citrate ผู้วิจัยจึงเกิดแนวคิดที่จะใช้พอลิแอคริลิกแอซิด (poly(acrylic acid); PAA) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่มีหมู่คาร์บอกซิลเป็นจำนวนมากเช่นเดียวกับ CMC มาใช้เป็นสารทำให้เสถียร ข้อดีของการใช้พอลิเมอร์สังเคราะห์คือสามารถเลือกปรับเปลี่ยนน้ำหนักโมเลกุลได้ จากการควบคุมสถานะในการสังเคราะห์ แต่เนื่องด้วยเวลาในการทำวิจัยมีจำกัด ผู้วิจัยจึงเลือกศึกษาใช้ PAA ที่มีอยู่

แล้วในห้องปฏิบัติการ ที่มีจำนวนหน่วยซ้ำ 100 หรือน้ำหนักโมเลกุล 7,206 กรัมต่อโมล ในการศึกษาเบื้องต้น จากการทดลองพบว่า CaPNPs ที่มี PAA เป็นสารทำให้เสถียรหรือ CaPNPs-PAA สามารถคงตัวอยู่ในรูปสารแขวนลอยได้ 2-3 ชั่วโมงก่อนตกตะกอน โดยมีสมบัติใกล้เคียงกับ CaPNPs-CMC จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DLS พบว่า อนุภาคมีขนาด 354 ± 58 นาโนเมตร PDI เท่ากับ 0.26 ± 0.01 และค่าศักย์ซีต้าเท่ากับ -41.0 ± 0.8 มิลลิโวลต์ จะเห็นได้ว่าขนาดอนุภาคมีขนาดใหญ่กว่า CaPNPs-CMC ที่มีขนาดเล็กที่สุด คือประมาณ 200 ± 7 นาโนเมตร แต่ CaPNPs-PAA มีค่าศักย์ซีต้าที่สูงกว่าซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อเสถียรภาพในการกระจายตัวในน้ำ และป้องกันการรวมตัวของอนุภาค นอกจากนี้ยังมีปริมาณหมู่คาร์บอกซิลที่เหมาะสมจะนำไปใช้ในการติดโปรตีนต่อไปอีกด้วย ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าจะสามารถปรับขนาด CaPNPs-PAA ให้เล็กลงและมีเสถียรภาพสูงขึ้น ซึ่งจะต้องทำการศึกษาต่อไปโดยการปรับเปลี่ยนสภาวะในการเตรียม เช่น น้ำหนักโมเลกุล และความเข้มข้นของ PAA

3.2 การยัดติด BSA บน CaPNPs

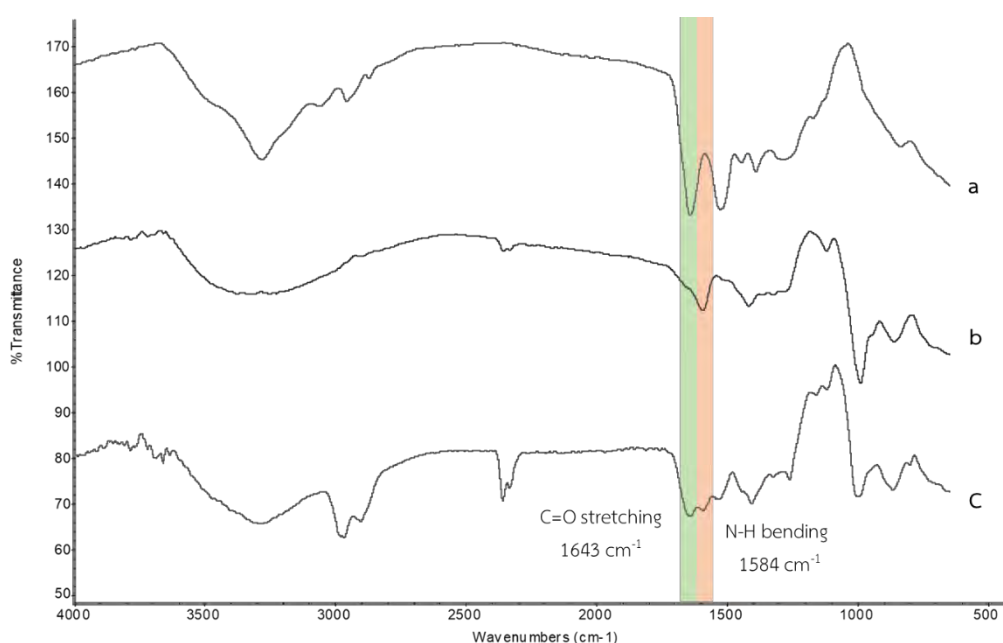
ผู้วิจัยทดลองเลือก CaPNPs-CMC, CaPNPs-citrate และ CaPNPs-PAA มาใช้ในการติดด้วย BSA ได้ผลการวิเคราะห์ขนาดและประจุของอนุภาคเปรียบเทียบก่อนและหลังการติดด้วย BSA แสดงดังผลในตารางที่ 3.2 จากข้อมูลจะพบว่าอนุภาคมีขนาดเล็กลงหลังการติดด้วย BSA ยกเว้นในกรณีของ CaPNPs-CMC ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นหลังการติด สันนิษฐานได้ว่าโซเดียมซิเตรท และ PAA อาจทำหน้าที่สารทำให้เสถียรได้ไม่ดี หรืออาจใส่ในปริมาณที่ไม่เพียงพอจึงส่งผลให้ไม่สามารถเคลือบพื้นผิวของอนุภาคทั้งหมดได้ และเนื่องจาก BSA มีส่วนของหมู่ฟังก์ชันส่วนที่มีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนสูง คือบริเวณที่มีอะตอมของออกซิเจน ไนโตรเจน ซึ่งสามารถทำหน้าที่ในลักษณะเดียวกันกับสารทำให้เสถียรจึงส่งผลให้อนุภาคมีขนาดเล็กลง ในขณะที่ PDI จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นหลังการติด BSA ทุกกรณี ซึ่งเป็นผลของ BSA ซึ่งเป็นโมเลกุลโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ทำให้การกระจายตัวในน้ำของอนุภาคลดลง ส่งผลให้มีการกระจายขนาดที่กว้างขึ้น ค่าศักย์ซีต้าที่ลดลงและมีค่าใกล้เคียงกัน ทำให้อนุมาณได้ว่าการติดของ BSA บนพื้นผิวของอนุภาค อย่างไรก็ตามค่าศักย์ซีต้าที่ต่ำแสดงถึงเสถียรภาพการกระจายตัวที่ต่ำลงด้วย ทั้งนี้การติดโปรตีนไปที่ผิวของอนุภาคส่งผลให้มีการลดลงของจำนวนหมู่คาร์บอกซิลของ CMC บนพื้นผิวของอนุภาค

จากข้อจำกัดในเรื่องเวลาในการทำวิจัย ผู้วิจัยสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค FT-IR และวิเคราะห์สัณฐานวิทยาของอนุภาคด้วยเทคนิค SEM ได้เฉพาะระบบ CaPNPs-CMC เท่านั้น ซึ่งแสดงผลในรูปที่ 3.3 และ 3.4 ตามลำดับ หากพิจารณาสเปกตรัม c ในรูปที่ 3.3 จะพบสัญญาณของ C=O stretching ที่ตำแหน่ง 1643 cm^{-1} เกิดพันธะเอไมด์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลของ CMC และ

หมู่แอมิโนของ BSA แสดงว่าติด BSA ลงบนผิวของ CaPNPs-CMC ได้ นอกจากนี้ยังพบสัญญาณของ N-H bending ที่ 1584 cm^{-1} อีกด้วย อย่างไรก็ตามสองสัญญาณดังกล่าวปรากฏขึ้นในช่วงเดียวกับ asymmetric และ symmetric C=O stretching ของหมู่คาร์บอกซิเลตในโครงสร้างของ CMC ที่ปรากฏที่ 1593 และ 1422 cm^{-1} ตามลำดับ ดังนั้นหากต้องการพิสูจน์ยืนยันการติดอย่างชัดเจนด้วยเทคนิค FT-IR จำเป็นต้องใช้การทำ subtraction เพื่อพิสูจน์ยืนยันต่อไป

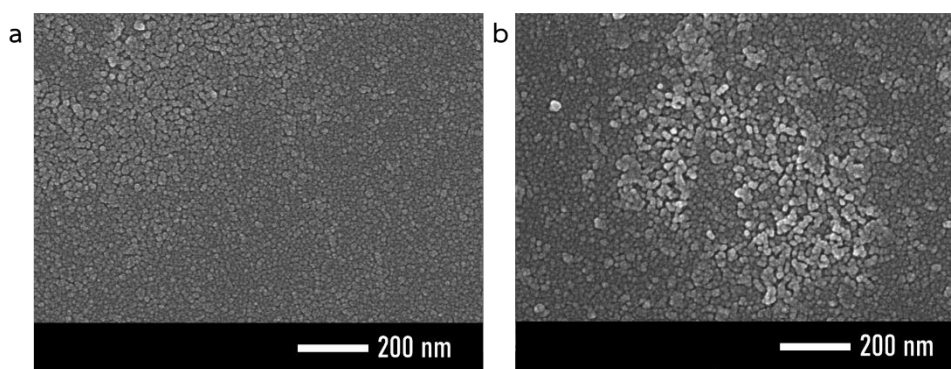
ตารางที่ 3.2 ขนาดเฉลี่ยและประจุของอนุภาค CaPNPs ชนิดต่างๆก่อนและหลังการติด BSA วิเคราะห์ด้วยเทคนิค DLS

อนุภาค	เส้นผ่านศูนย์กลาง (นาโนเมตร)	PDI	ค่าศักย์ซีต้า (มิลลิโวลต์)
CaPNPs-CMC	217 ± 37	0.31 ± 0.04	-23.0 ± 1.5
CaPNPs-CMC-BSA	444 ± 22	0.45 ± 0.07	-17.1 ± 0.7
CaPNPs-Citrate	688 ± 370	0.73 ± 0.28	-15.4 ± 0.7
CaPNPs-Citrate-BSA	240 ± 32	0.95 ± 0.07	-11.7 ± 0.6
CaPNPs-PAA	354 ± 58	0.26 ± 0.01	-41.0 ± 0.8
CaPNPs-PAA-BSA	225 ± 87	0.49 ± 0.16	-11.5 ± 0.9



รูปที่ 3.3 FT-IR สเปกตรัมของ (a) BSA, (b) CaPNPs-CMC และ (c) CaPNPs-CMC-BSA

จากการวิเคราะห์สัณฐานวิทยาของอนุภาคด้วยเทคนิค SEM (รูปที่ 3.4) พบว่าทั้ง CaPNPs-CMC และ CaPNPs-CMC-BSA มีลักษณะเป็นทรงกลม มีขนาด 21.02 ± 4.06 และ 30.54 ± 6.84 นาโนเมตร ตามลำดับ ซึ่งในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SEM ทำในสถานะแห้ง จึงเห็นอนุภาคขนาดเล็กกลมากกว่าที่วิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค DLS ซึ่งทำในสถานะอุ้มน้ำ (hydrated state) จะเห็นได้ว่าการติด BSA ลงบนผิวของอนุภาคส่งผลให้อนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้นสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DLS เฉพาะในกรณีของ CaPNPs-CMC



รูปที่ 3.4 ภาพ SEM ของ (a) CaPNPs-CMC และ (b) CaPNPs-CMC-BSA

บทที่ 4

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้สนใจสังเคราะห์อนุภาค CaPNPs สามชนิด สองชนิดแรกถูกสังเคราะห์ผ่านการตกตะกอนร่วมระหว่างแคลเซียมไนเตรทและไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต โดยใช้พอลิเมอร์ที่มีหมู่คาร์บอกซิล 2 ชนิดเป็นสารทำให้เสถียร ได้แก่ CMC และ PAA ทำให้ได้ CaPNPs-CMC และ CaPNPs-PAA ตามลำดับ เป็นผลิตภัณฑ์ CaPNPs ชนิดที่สามถูกสังเคราะห์ด้วยการตกตะกอนร่วมระหว่างแคลเซียมคลอไรด์และไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ในสภาวะที่มีการเติมโซเดียมซิเตรทเป็นสารช่วยเพิ่มความเสถียรเพื่อเตรียม CaPNPs-citrate จากการทดลองพบว่า CaPNPs-CMC และ CaPNPs-PAA สามารถกระจายตัวในน้ำได้ดีกว่า CaPNPs-citrate ซึ่งเป็นผลจากการที่ CMC และ PAA ช่วยทำให้อนุภาค CaPNPs เสถียรด้วยอิทธิพลของทั้งแรงผลักระหว่างประจุและความเกะกะของโซ่พอลิเมอร์ ในขณะที่ไอออนซิเตรทช่วยทำให้อนุภาค CaPNPs เสถียรด้วยอิทธิพลของแรงผลักระหว่างประจุเพียงอย่างเดียว จากการวิเคราะห์ขนาดของอนุภาคด้วยเทคนิค DLS พบว่า CaPNPs-CMC (200 ± 7 นาโนเมตร) และ CaPNPs-PAA (345 ± 85 นาโนเมตร) มีขนาดเล็กกว่า CaPNPs-citrate (688 ± 370 นาโนเมตร) และค่าศักย์ซีต้าของทั้ง CaPNPs-CMC และ CaPNPs-PAA ซึ่งมีค่า 41.0 ± 0.8 และ -31.2 ± 0.6 มิลลิโวลต์ ตามลำดับ มีความเป็นลบสูงกว่าของ CaPNPs-citrate ซึ่งมีค่าเพียง -15.4 ± 0.7 มิลลิโวลต์ แสดงให้เห็นถึงเสถียรภาพที่สูงกว่าของ CaPNPs-CMC และ CaPNPs-PAA หากเทียบกับ CaPNPs-citrate

จากการทดลองนำ CaPNPs ทั้งสามชนิดไปติดด้วย BSA พบว่าอนุภาคมีขนาดเล็กหลังการติดด้วย BSA ยกเว้นในกรณีของ CaPNPs-CMC ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นหลังการติด ในขณะที่ PDI จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นหลังการติด BSA ทุกกรณี ซึ่งเป็นผลของ BSA ที่ทำให้การกระจายตัวในน้ำของอนุภาคลดลง ส่งผลให้มีการกระจายขนาดที่กว้างขึ้น ค่าศักย์ซีต้าที่ลดลงและมีค่าใกล้เคียงกัน ทำให้อนุภาคนั้นได้มีการติดของ BSA บนผิวของอนุภาคเนื่องจากการที่หมู่คาร์บอกซิลถูกใช้ในการติด BSA มีปริมาณลดลง การติดตามความสำเร็จในการสังเคราะห์ CaPNPs ทั้งก่อนและหลังการติด BSA ด้วยเทคนิค FTIR และ SEM สามารถทำได้เฉพาะระบบ CaPNPs-CMC โดยพบสัญญาณ asymmetric และ symmetric C=O stretching ที่ 1593 และ 1422 cm^{-1} ตามลำดับ ของหมู่คาร์บอกซีเลตแสดงการมีอยู่ของ CMC รอบอนุภาค CaPNPs-CMC และพบสัญญาณของ C=O stretching และ N-H bending ที่ตำแหน่ง 1643 และ 1584 cm^{-1} ตามลำดับ แสดงถึงพันธะเอไมด์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลของ CMC และหมู่เอมีนของ BSA หลังการติด BSA จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SEM พบว่า CaPNPs-CMC และ CaPNPs-CMC-BSA มีลักษณะเป็นทรงกลม มีขนาด

21.02±4.06 และ 30.54±6.84 นาโนเมตร ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ในส่วนนี้แสดงให้เห็นว่าการติด BSA ลงบนผิวของอนุภาคส่งผลให้อนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้นสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DLS

จากข้อจำกัดของเวลาในการทำการวิจัย การพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคจึงทำได้ไม่สมบูรณ์ ยังขาดการวิเคราะห์โครงสร้างและความเป็นผลึกของ CaPNPs ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค XRD ขาดการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค FT-IR ของ CaPNPs-citrate และ CaPNPs-PAA ทั้งก่อนและหลังการติดด้วย BSA นอกจากนี้ยังจำเป็นต้องมีการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ CaPNPs-PAA โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลของน้ำหนักโมเลกุลของ PAA และปริมาณของ PAA ที่มีต่อเสถียรภาพของการกระจายตัวในน้ำ ขนาดและ PDI และศักย์ซีต้าของ CaPNPs-PAA รวมทั้งการวิเคราะห์สัณฐานวิทยาของ CaPNPs ทุกระบบทั้งก่อนและหลังติด BSA โดยใช้เทคนิค transmission electron microscopy (TEM) เพื่อวิเคราะห์ความหนาของชั้นสารอินทรีย์ที่เคลือบอยู่บนอนุภาค CaPNPs และขนาดที่แท้จริงของอนุภาค CaPNPs ซึ่งเป็นสารอนินทรีย์

อย่างไรก็ตามผลจากการศึกษาวิจัยเบื้องต้นนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถเตรียม CaPNPs ที่ทำให้เสถียรด้วยพอลิเมอร์ที่มีหมู่คาร์บอกซิลได้ และหมู่คาร์บอกซิลของพอลิเมอร์สามารถใช้ในการยึดติดกับ BSA ซึ่งเป็นโมเลกุลจำลองของโปรตีนได้ตามเป้าหมายเบื้องต้นที่ตั้งไว้ ทั้งนี้คาดว่าหากสามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ CaPNPs ที่มีสมบัติตามต้องการแล้ว จะสามารถนำไปใช้ในการตรึง anti-RANKL เพื่อประยุกต์เป็นพาหะนำส่ง anti-RANKL เพื่อยับยั้งการสร้างเซลล์สลายกระดูกต่อไปได้

บรรณานุกรม

1. Health, U. D. O.; Services, H. Bone health and osteoporosis: a report of the Surgeon General. *Rockville, MD: US Department of Health and Human Services, Office of the Surgeon General* **2004**, 87.
2. Feng, X.; McDonald, J. M. Disorders of Bone Remodeling. *Annu. Rev. Pathol.: Mech. Dis.* **2011**, *6*, 121-145.
3. Hadjidakis, D. J.; Androulakis, I. I. Bone remodeling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, *1092*, 385-396.
4. Bai, Y.-D.; Yang, F.-S.; Xuan, K.; Bai, Y.-X.; Wu, B.-L. Inhibition of RANK/RANKL Signal Transduction Pathway: A Promising Approach for Osteoporosis Treatment. *Med. Hypotheses* **2008**, *71*, 256-258.
5. Stapleton, M.; Sawamoto, K.; Alméciga-Díaz, C. J.; Mackenzie, W. G.; Mason, R. W.; Orii, T.; Tomatsu, S. Development of Bone Targeting Drugs. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1345.
6. Eppler, M.; Ganesan, K.; Heumann, R.; Klesing, J.; Kovtun, A.; Neumann, S.; Sokolova, V. Application of Calcium Phosphate Nanoparticles in Biomedicine. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 18-23.
7. Dole, N. S., Genetic Determinants of Skeletal Diseases: Role of MicroRNAs. PhD Thesis, University of Connecticut, Connecticut, United States, 2015. OpenCommons@UConn <https://opencommons.uconn.edu/dissertations/763> (accessed June 21, 2020).
8. Tanaka, Y.; Nakayamada, S.; Okada, Y. Osteoblasts and Osteoclasts in Bone Remodeling and Inflammation. *Inflamm Allergy Drug Targets.* **2005**, *4*, 325-328.
9. Wada, T.; Nakashima, T.; Hiroshi, N.; Penninger, J. M. RANKL–RANK Signaling in Osteoclastogenesis and Bone Disease. *Trends. Mol. Med.* **2006**, *12*, 17-25.
10. Gasser, J. A.; Kneissel, M. Bone Physiology and Biology. In *Bone Toxicology*, Springer: 2017; pp 27-94.

11. Lewiecki, E. M. Monoclonal Antibodies for the Treatment of Osteoporosis. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2013**, *13*, 183-196.
12. Lipton, A.; Smith, M. R.; Ellis, G. K.; Goessl, C. Treatment-Induced Bone Loss and Fractures in Cancer Patients Undergoing Hormone Ablation Therapy: Efficacy and Safety of Denosumab. *Clin. Med. Insights: Oncol.* **2012**, *6*, CMO. S8511.
13. Piao, Y.; Bei, H. P.; Tam, A.; Yang, Y.; Zhang, Q.; Yang, M.; Zhao, X. Calcium Phosphate Nanoparticle-Based Systems for Therapeutic Delivery. In *Theranostic Bionanomaterials*, Elsevier: 2019; pp 147-164.
14. Kopp, M. Biofunctionalisation of Calcium Phosphate Nanoparticles for Applications in Molecular Biology and Biomedicine. PhD Thesis, Universität Duisburg-Essen, Duisburg, Germany, 2018. Duisburg-Essen Publications online https://duepublico2.unidue.de/servlets/MCRFileNodeServlet/duepublico_derivate_00045665 (accessed June 25, 2020).
15. Montenegro, J.-M.; Grazu, V.; Sukhanova, A.; Agarwal, S.; Jesus, M.; Nabiev, I.; Greiner, A.; Parak, W. J. Controlled Antibody/(Bio-) Conjugation of Inorganic Nanoparticles for Targeted Delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2013**, *65*, 677-688.
16. Parent, M.; Baradari, H.; Champion, E.; Damia, C.; Viana-Trecant, M. Design of Calcium Phosphate Ceramics for Drug Delivery Applications in Bone Diseases: A Review of the Parameters Affecting the Loading and Release of the Therapeutic Substance. *J. Control Release* **2017**, *252*, 1-17.
17. Kozlova, D.; Chernousova, S.; Knuschke, T.; Buer, J.; Westendorf, A. M.; Epple, M. Cell Targeting by Antibody-Functionalized Calcium Phosphate Nanoparticles. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 396-404.
18. Temchura, V. V.; Kozlova, D.; Sokolova, V.; Überla, K.; Epple, M. Targeting and Activation of Antigen-Specific B-Cells by Calcium Phosphate Nanoparticles Loaded with Protein Antigen. *Biomaterials* **2014**, *35*, 6098-6105.

19. Van der Meer, S. B.; Knuschke, T.; Frede, A.; Schulze, N.; Westendorf, A. M.; Epple, M. Avidin-Conjugated Calcium Phosphate Nanoparticles as a Modular Targeting System for the Attachment of Biotinylated Molecules In Vitro and In Vivo. *Acta Biomater.* **2017**, *57*, 414-425.
20. Jeon, M.; Jung, S.; Park, S. Facile Covalent Bio-Conjugation of Hydroxyapatite. *New J. Chem.* **2018**, *42*, 14870-14875.
21. Kopp, M.; Aufderhorst, U. W.; Alt, M.; Dittmer, U.; Eis-Hübinger, A.-M.; Giebel, B.; Roggendorf, M.; Epple, M.; Krawczyk, A. Induction of Herpes Simplex Virus Type 1 Cell-to-cell Spread Inhibiting Antibodies by a Calcium Phosphate Nanoparticle-Based Vaccine. *Nanomedicine* **2019**, *16*, 138-148.
22. Matsumoto, T.; Zenkoh, H. A New Molecular Model for Complexation Between Carboxymethylcellulose and Alkaline—Earth Metal Ions in Aqueous Systems. *Food Hydrocoll.* **1992**, *6*, 379-386.

ประวัติผู้วิจัย

นายพงศกร บุญรอด เกิดเมื่อวันที่ 13 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2541 ที่จังหวัดนนทบุรี สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย สายสามัญ แผนกวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ จากโรงเรียน ศรีบุญยานนท์ จังหวัด นนทบุรี ในปีการศึกษา 2558 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2559 ที่อยู่ที่ สามารถติดต่อได้คือ บ้านเลขที่ 51 ตำบล ราษฎร์นิยม อำเภอลำไทรน้อย จังหวัด นนทบุรี รหัสไปรษณีย์ 11150 อีเมล phongsakorn.peam@gmail.com