

## ผลของประจุพื้นผิวของ พอลิเมอร์ไมเซลล์แบบผสมบรรจุตัวยาฟูราโซลิโดน สำหรับนำส่งไปเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งตับ

วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง<sup>1\*</sup>, พุทธิพร คงแก้ว<sup>1</sup>

<sup>1</sup> คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา 169 ถนนลงหาด บางแสน ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20131

\*ติดต่อผู้พิมพ์: วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา 169 ถนนลงหาด บางแสน ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20131

โทร. 086-5899082 อีเมล Watcharaphong@ggo.buu.ac.th

### บทคัดย่อ

ผลของประจุพื้นผิวของ พอลิเมอร์ไมเซลล์แบบผสมบรรจุตัวยาฟูราโซลิโดน สำหรับนำส่งไปเซลล์มะเร็งเต้านม และเซลล์มะเร็งตับ

วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง<sup>1\*</sup>, พุทธิพร คงแก้ว<sup>1</sup>

ว. เภสัชศาสตร์อีสาน 2563; 16(3) : 52-66

รับบทความ : 15 มกราคม 2563

แก้ไขบทความ: 12 มีนาคม 2563

ตอบรับ: 3 เมษายน 2563

ระบบนำส่งยาระดับนาโนเป็นกลยุทธ์สำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งรวมถึงลดผลข้างเคียงของการบริหารยา วัตถุประสงค์ของงานวิจัยในครั้งนี้เพื่อศึกษาผลของประจุของอนุภาคพอลิเมอร์ไมเซลล์ที่ส่งผลต่อการนำตัวยา furazolidone เข้าสู่เซลล์มะเร็ง เพื่อใช้เป็นแนวทางพัฒนาเภสัชภัณฑ์ต้านมะเร็งที่มีปัญหาการละลาย วิธีการทดลอง: ในการศึกษาทำการพัฒนาระบบนำส่ง พอลิเมอร์ไมเซลล์ (polymeric micelle) โดยเตรียมจาก poloxamer 407 และผสมกับ Hexadecyltrimethylammonium bromide(CTAB) หรือ lecithin เพื่อบรรจุยา furazolidone สำหรับนำส่งไปยังเซลล์มะเร็งเต้านม(MCF-7) และเซลล์มะเร็งตับ(HepG2) ใช้วิธีเตรียม thin-film hydration ซึ่งในแต่ละตำรับจะทำการเปรียบเทียบผลของสารลดแรงตึงผิวโดยประเมินลักษณะทางกายภาพ เช่น ขนาดอนุภาค ค่าการกระจายตัวของอนุภาคหรือความสามารถในกักเก็บตัวยา ผลการทดลอง: สัดส่วนที่เหมาะสมของสูตรตำรับทั้งประจุบวกและประจุลบ คือ อัตราส่วน ระหว่าง poloxamer 407: CTAB ที่อัตราส่วน 200 mg: 20 mg (ขนาดอนุภาค  $307.14 \pm 62.01$  นาโนเมตร, ค่าประจุพื้นผิว  $22.36 \pm 7.97$  mV และการกักเก็บตัวยา  $62.26 \pm 1.49\%$ ), และ poloxamer 407: lecithin ที่อัตราส่วน 200 mg:4 mg (ขนาดอนุภาค  $311.42 \pm 32.42$  นาโนเมตร, ค่าประจุพื้นผิว  $-22.34 \pm 1.31$  mV และการกักเก็บตัวยา  $57.47 \pm 3.14\%$ ) สูตรตำรับที่ถูกเลือกจะถูกนำมาศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและการนำสารเข้าเซลล์มะเร็ง MCF-7 และ HepG2 สรุป: จากผลข้อมูลของการทดลองพบว่าประจุพื้นผิวของระบบนำส่งยาเป็นอีกปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการรักษา โดยมะเร็งแต่ละชนิดอาจมีการตอบสนองต่อประจุพื้นผิวที่ต่างกัน เช่น เซลล์มะเร็งตับจะมีอัตราการนำสารที่มีประจุเข้าได้ดีมากกว่าเซลล์มะเร็งเต้านม อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาถึงปัจจัยที่ส่งผลต่อการนำส่งสารไปยังเซลล์มะเร็ง ซึ่งอาจต้องมีการเพิ่มการทดสอบในเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆ และทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์ปกติต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: พอลิเมอร์ไมเซลล์, ประจุบนพื้นผิว, มะเร็งเต้านม, มะเร็งตับ

## Surface Charge Effect of Furazolidone-loaded Polymeric Mixed Micelles for Delivery to Breast Cancer Cells (MCF-7) and Hepatocellular Carcinoma Cells (HepG2)

Watcharaphong Chaemsawang<sup>1\*</sup>, Putthiporn Khongkaew<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Pharmaceutical Science, Burapha University, 169 Long-Hard Bangsaen Road, Saen Sook Sub-District, Mueang District, Chonburi 20131

\* **Corresponding author:** Watcharaphong Chaemsawang, Faculty of Pharmaceutical Science, Burapha University, 169 Long-Hard Bangsaen Road, Saen Sook Sub-District, Mueang District, Chonburi 20131 Tel. +66-86-589-9082 E-mail: Watcharaphong@go.buu.ac.th

### Abstract

#### Surface Charge Effect of Furazolidone-loaded Polymeric Mixed Micelles for Delivery to Breast Cancer Cells (MCF-7) and Hepatocellular Carcinoma Cells (HepG2)

Watcharaphong Chaemsawang<sup>1\*</sup>, Putthiporn Khongkaew<sup>1</sup>

IJPS, 2020; 16(3) : 52-66

**Received:** 15 January 2020

**Revised:** 12 March 2020

**Accepted:** 3 April 2020

Nano drug delivery systems are important strategies to increase the specificity toward cancer cells as well as reduce the side effects of an administered drug. The purpose of this research was to study the effect of the charge of the polymeric micelle on the delivery of furazolidone into cancer cells. To be used as a guideline to develop anti-cancer pharmaceutical products with solubility problems. **Material and Method:** a drug delivery system was developed in the form of polymeric micelles prepared from the poloxamer 407 with Hexadecyltrimethylammonium bromide(CTAB) or lecithin, and loaded with furazolidone for delivery to breast cancer cells (MCF-7) and hepatocyte carcinoma (Hep G2) using a thin-film hydration method. Each formulation was prepared to compare the effect of the ions on the surface of two surfactants by considering the parameters of physical properties, particle size, particle size distribution and entrapment efficiency. **Results:** the results showed that optimal cationic and anionic formulations comprised the poloxamer 407: CTAB ratio of 200 mg:20 mg (particle size of about  $307.14 \pm 62.01$  nm, zeta potential  $22.36 \pm 7.97$  mV and entrapment efficiency  $62.26 \pm 1.49\%$ ), and the poloxamer 407: lecithin ratio of 200 mg:4 mg (particle size of about  $311.42 \pm 32.42$  nm, zeta potential  $-22.34 \pm 1.31$  mV and entrapment efficiency  $57.47 \pm 3.14\%$ ). The selected formulations were then evaluated for cell cytotoxicity and cellular uptake of MCF-7 and Hep G2. **Conclusion:** From the experimental data, it was found that the surface charge of the drug delivery system is a factor that affects the treatment efficiency. Each type of cancer responds differently to the surface charge. For example, liver cancer cells have a higher rate of uptake of polar-substances than breast cancer cells. However, this study is a study of factors that affect the delivery of the substance to cancer cells. It may need to be tested in other types of cancer cells and will test toxicity with normal cells in the future.

**Keywords:** Polymeric micelles, Surface charge, Breast cancer, Hepatocellular carcinoma

## บทนำ

โรคมะเร็งเป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตในประเทศไทย ซึ่งมะเร็งเต้านมเป็นสาเหตุของการเจ็บป่วยที่สำคัญทั้งในประเทศไทยและทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศกำลังพัฒนา รวมทั้งประเทศไทยพบอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งเต้านมเพิ่มสูงขึ้นเป็นอันดับแรกมากกว่ามะเร็งปากมดลูกมาเกือบสิบปี ในแต่ละปีมีผู้ป่วยมะเร็งเต้านมทั้งรายใหม่และรายเก่า ที่ได้รับการรักษาตามระบบสาธารณสุขเป็นจำนวนมาก ถือได้ว่าปัญหาที่สำคัญของสาธารณสุขไทยและทั่วโลก จากข้อมูลระบาดวิทยาพบว่าผู้ป่วยมะเร็งเต้านมรายใหม่มีจำนวนมากขึ้น 7% จากข้อมูลรายงานจากทั่วโลกและมีผู้ป่วยอายุที่ต่ำลง (Lanta *et al.*, 2019) จากข้อมูลสถาบันมะเร็งแห่งชาติประเทศไทยในปี พ.ศ. 2558 มีรายงานอุบัติการณ์มะเร็งเต้านมมากที่สุด รองลงมาคือมะเร็งลำไส้ใหญ่ และมะเร็งตับ ตามลำดับ นอกจากนี้โรคมะเร็งตับตามรายงานของกระทรวงสาธารณสุขในประเทศไทยพบว่าเป็นโรคมะเร็งที่มีอัตราการตายสูงเป็นอันดับต้น ๆ เมื่อเทียบกับโรคมะเร็งชนิดอื่น ๆ ในปัจจุบันมีการพัฒนาหาสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งมะเร็งหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็น ฟิชซสมุนไพรร หรือ สารสำคัญ ที่ได้จากการสังเคราะห์ ซึ่งหนึ่งในที่ได้รับความสนใจคือ ยาในกลุ่มยาปฏิชีวนะ เช่น norfloxacin (Carraher *et al.*, 2014; Salahuddin *et al.*, 2020) หรือ furazolidone ซึ่งยาปฏิชีวนะเหล่านี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง เนื่องจากมีกลไกการออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนหรือรบกวนสายดีเอ็นเอ ทำให้สามารถรบกวนการแบ่งตัวในเซลล์มะเร็งได้ ในการศึกษาให้มีความสนใจตัวยา furazolidone เนื่องจากเป็นยาที่มีรายงานการยับยั้งเซลล์มะเร็งที่ตีพิมพ์ปัญหาในการนำไปใช้จากค่าการละลายที่ต่ำ ทำให้ยาไม่ถูกดูดซึมหรือพัฒนาต่อยอดในรูปแบบอื่น ๆ ได้ยาก

ยา furazolidone หรือ ชื่อสามัญคือ 3-(5'-Nitrofurfuralamino)-2-oxazolidone มีน้ำหนักโมเลกุล 225.15 g/mol เป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้สำหรับรักษาโรคท้องเสียจากการติดเชื้อ ด้วยกลไกของยาจะไปจับกับสาย DNA ทำให้รบกวนการแบ่งสาย DNA และการสร้างโปรตีนของแบคทีเรีย ของแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียตายในที่สุด โดยออกฤทธิ์ครอบคลุม ทั้งเชื้อแกรมบวก แกรมลบ และโปรโตซัว เช่น *Esterichia coli*, *Staphylococcus spp*, *Salmonella enterica*, *Shigella*, *Vibrio cholerae* และ *Giardia lamblia* (Alam *et al.*, 2016; Lewkowski *et al.*, 2019) การศึกษาวิจัยรายงานถึงตัวยา furazolidone มีคุณสมบัติเบื้องต้นเป็นยาด้านมะเร็งได้ โดยพบว่า สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งตับได้ (Jin *et al.*, 2011; Deng *et al.*, 2016) โดยทำ

ให้เซลล์มะเร็งตับเกิดการตายด้วยกลไก apoptosis นอกจากนี้ยังพบฤทธิ์ในการต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาว (Leukemia) (Jiang *et al.*, 2013) อย่างไรก็ตามจากคุณสมบัติของตัวยา furazolidone ที่มีค่าการละลายเพียง 40 mg/L และ  $\log P = 0.15$  ทำให้ตัวยา furazolidone มีค่าการละลายต่ำไม่ค่อยดูดซึมพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ได้ยาก จากปัญหาที่สำคัญของ furazolidone คือเรื่องการละลายที่ค่อนข้างต่ำซึ่งการละลายนั้นจะส่งผลต่อชีวประสิทธิผลของยาในรูปแบบการกินหรือส่งผลกระทบต่อเตรียมยาในรูปแบบการบริหารอย่างอื่น โดยถ้ายามีค่าละลายที่ต่ำจะต้องใช้ขนาดยาที่มากขึ้นเพื่อให้ถึงระดับความเข้มข้นที่รักษาโรค ทำให้มีความจำเป็นต้องหาวิธีนำส่งเพื่อเพิ่มค่าการละลายและเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งไปยังเซลล์มะเร็งให้มากขึ้นเพื่อให้ไม่ต้องใช้ยาที่มีความเข้มข้นสูงจนอาจเกิดผลข้างเคียงได้ ในปัจจุบันจึงมีการพัฒนาเทคนิคการเพิ่มการละลายมากมาย (Lu and Park, 2013) เช่น micellar solubilization (Djekic, Čalija and Medarević, 2020) ซึ่งเป็นระบบที่เกิดจากการรวมตัวกันของอนุภาคระดับนาโนของแอมฟิฟิลิกโมเลกุลที่ประกอบไปด้วย 2 ส่วนคือส่วนที่ชอบน้ำจะเกิดเป็นเปลือกอยู่ด้านนอก ส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะเกิดเป็นโพรงอยู่ด้านใน (Hingmire *et al.*, 2015) ด้วยคุณสมบัติที่กล่าวมาทำช่วยเพิ่มการละลายของยาที่มีค่าการละลายน้ำต่ำ นอกจากนี้ยังควบคุมการปลดปล่อยของยา ช่วยขนส่งยาไปยังอวัยวะเป้าหมายทำให้มีประสิทธิภาพในการรักษามากขึ้น ลดการเกิดความเป็นพิษและป้องกันการทำลายจากกระบวนการสลายตัวและเมแทบอลิซึมในร่างกาย (Croy and Kwon, 2006) จากงานวิจัยของ Saxena และคณะได้มีการพัฒนาระบบนำส่งแบบไมเซลล์ ที่ประกอบไปด้วย Poloxamer เพื่อนำส่งยาที่มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง มีรายงานการวิจัยแสดงถึงระบบนำส่งแบบพอลิเมอร์ไมเซลล์สามารถเพิ่มการเข้าไปของยาในเซลล์มะเร็งได้ (Saxena and Hussain, 2013) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาผลของประจุบนพื้นผิวพอลิเมอร์ไมเซลล์ต่อการนำเข้าไปของยาไปยังเซลล์มะเร็งพบว่าประจุมีผลต่อการนำยาเข้าเซลล์มะเร็ง (Ma *et al.*, 2011) เช่น การเตรียม liposome ที่มีประจุบวกโดยใช้กรดอะมิโนและ CTAB เป็นส่วนประกอบในการเตรียมอนุภาคสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ดีกว่าระบบ liposome ที่ไม่มีการปรับประจุพื้นผิวให้เป็นประจุบวก (Pashirova *et al.*, 2019) ในส่วนของการนำ lecithin มาใช้ในการนำส่งยาได้มีการนำมาผสมกับ poloxamer 407 เพื่อเพิ่มการดูดซึมและการแพร่ผ่านยาหลายชนิด ทั้งการนำส่งเข้าผิวหนัง



หรือผ่านดวงตา (Djekic *et al.*, 2015; Mandal *et al.*, 2017) และยังสามารถนำมาเตรียมในรูปแบบไมเซลล์นำส่งสารสกัดไปยังเซลล์มะเร็งเต้านมอีกด้วย (Jin *et al.*, 2016) จะเห็นได้ว่าทั้ง Poloxamer407, CTAB และ Lecithin ซึ่งเป็นสารที่ใช้เตรียมระบบนำส่งของงานวิจัยนี้มีการนำมาใช้ในทางเภสัชกรรมอย่างหลากหลาย ซึ่งแสดงถึงความปลอดภัยและสามารถพัฒนาต่อยอดให้อยู่ในรูปแบบผลิตภัณฑ์ได้ในอนาคต อย่างไรก็ตามจะเห็นว่าการศึกษการเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งสารเข้าเซลล์มะเร็งได้รับความสนใจ แต่ก็ยังไม่ได้มีการเปรียบเทียบที่ชัดเจนว่าเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดมีปัจจัยการนำส่งสารเข้าเซลล์แตกต่างกันอย่างไร

วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้จะทำการศึกษาเพื่อหาปัจจัยในเรื่องของประจุบนพื้นผิวของระบบนำส่ง polymeric micelle ต่อการออกฤทธิ์ต้านมะเร็ง เพื่อใช้ข้อมูลเป็นแนวทางในการออกแบบระบบนำส่งทางยาต่อไปในอนาคต

## วิธีดำเนินการวิจัย

### 1. สารเคมี

อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM high glucose(L0102) และ RPMI 1640(L0500) จากบริษัท biowest (France), fetal bovine serum และ penicillin-streptomycin จากบริษัท Invitrogen (USA), furazolidone(9505), CTAB for molecular biology(H6269) และ poloxamer407 suitable for cell culture(P2443) จากบริษัท sigma Aldrich(USA) Lecithin (Lipoids S75) จากบริษัท Lipoid (Germany) และ Acetonitrile HPLC grade จากบริษัท Merck Millipore เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และ เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) สั่งซื้อจากบริษัท ATCC ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยในการศึกษานี้จะใช้เซลล์ทั้ง 2 ชนิด ในช่วง passage 20-30

### 2. ศึกษาผลของ poloxamer 407 ต่อคุณลักษณะของ polymeric micelle

ทำการเตรียม polymeric micelle ด้วยวิธีการ thin-film hydration โดยทำการเปรียบเทียบสูตรตำรับที่มี poloxamer 407 ปริมาณแตกต่างกัน คือ 50, 100, 200, 500, 750 และ 1000 มิลลิกรัม วิธีการเตรียมทำได้โดยละลาย poloxamer 407 ด้วย acetonitrile แล้วนำไประเหยแห้งให้เกิดฟิล์ม เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิตร เพื่อให้เกิดเป็นอนุภาค polymeric micelle อนุภาคที่ได้ไปลดขนาดด้วยวิธี probe sonication ที่ amplitude 40% เป็นระยะเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำมากรองผ่านตัวกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร เพื่อนำไปศึกษาคุณลักษณะ ในสูตรที่มีการบรรจุตัวยา furazolidone จะทำการชั่งตัวยา 10 มิลลิกรัม

ละลายใน acetonitrile พร้อมกับ poloxamer 407 และทำการเตรียมด้วยวิธีเดียวกันกับการเตรียมอนุภาคเปล่า ทำการประเมินขนาดและประจุพื้นผิวด้วยเครื่อง zeta sizer-nano sizer ZS

### 3. การวัดปริมาณการกักเก็บตัวยาสำคัญ (entrapment efficiency)

นำอนุภาค polymeric micelle ที่ผ่านการกรองผ่าน Syringe filter ที่รูพรุน 0.45 ไมโครเมตร เพื่อกำจัดยา furazolidone ที่ไม่ถูกกักเก็บในระบบนำส่งไมเซลล์ออก หลังจากนั้นนำสารละลายที่กรองได้ที่ประกอบไปด้วย furazolidone ที่ถูกกักเก็บในไมเซลล์ มา 1 มิลลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile จนครบ 10 มิลลิตร เพื่อทำการละลาย poloxamer407 และสกัดตัวยาสำคัญ จากนั้นจึงนำไปวัด entrapment ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer โดยใช้ความยาวคลื่นที่ 470 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เทียบกับ standard curve และคำนวณหา % entrapment efficiency จากสูตร

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

โดยทำการเปรียบเทียบกับค่าการละลายของ furazolidone 10 มิลลิกรัม ที่ไม่มีระบบ poloxamer เป็นตัวสร้างไมเซลล์

### 4. ศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิวร่วม (CTAB หรือ lecithin) ต่อคุณลักษณะของ polymeric micelle

หลังจากเลือกสัดส่วนของ poloxamer 407 ที่ดีที่สุด จะทำการนำสัดส่วนของ poloxamer มาผสมกับสารลดแรงตึงผิวร่วม ซึ่งมีทั้งชนิดประจุบวก และประจุลบ โดยทำการเตรียมอนุภาค ด้วยวิธี thin-film hydration เช่นเดียวกับ ข้อ 1

ในการศึกษาขั้นตอนนี้จะทำการใช้ปริมาณของ poloxamer 407 ที่คงที่ไว้ที่ 200 มิลลิกรัม และจะปรับสัดส่วนของ สารลดแรงตึงผิวร่วม โดยสารลดแรงตึงผิวร่วมจะทำการละลายในตัวทำละลาย 95% ethanol แล้วผสมลงในสารละลาย poloxamer 407 และยา furazolidone ก่อนการระเหยให้เกิดฟิล์ม หลังจากนั้นทำการประเมินในเรื่องของขนาด ประจุ และการกักเก็บตัวยาสำคัญ โดยใช้วิธีในข้อ 2 และ 3

### 5. การเลี้ยงเซลล์

เซลล์ที่จะทดสอบจะถูกนำมาเลี้ยง ภายใต้สภาวะ 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> และทำการเปลี่ยนอาหาร ทุก 3 วัน ทำการ sub-culture ทุก 3 - 4 วัน ด้วย สารละลาย 0.25% trypsin-0.04% EDTA

สูตรอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ชนิดต่าง ๆ

- Breast cancer (MCF-7) : DMEM + 10% Fetal bovine serum + 1%Antibiotic antimycotic + 1%Glutamax
- Hepatocellular carcinoma(HepG2) : RPMI1640 + 10% Fetal bovine serum + 1% Antibiotic antimycotic + 1%Glutamax

## 6. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

ฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทำการวิเคราะห์ด้วย Prestoblue assay โดยทำการ seed cells จำนวน 5,000 cells/well ลงใน 96 well plate incubate เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเปลี่ยนอาหารเดิมออกและเติมอาหารใหม่ที่มีตัวยา furazolidone เทียบเท่า 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาณ 200 ไมโครลิตร incubate ต่อเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการเติม prestoblue reagent ลงไป 20 ไมโครลิตร incubate เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำไปวัดด้วยเครื่อง microplate reader (Cariostar) fluorescent detector ที่ความยาวคลื่น excitation 560 นาโนเมตร และ emission 590 นาโนเมตร คำนวณ % cell viability ตามสูตรนี้ (Zhang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2011)

$$\% \text{ cells viability} = \frac{\text{absorbance of treat cells}}{\text{absorbance of control cells}} \times 100$$

ทำการศึกษาเปรียบเทียบระบบนำส่งที่บรรจุด้วยยา furazolidone ที่มีความเข้มข้นเท่ากัน โดยทำการทดสอบทั้งหมด 7 ตัวอย่าง จำนวน 3 ซ้ำ คือ

- Blank poloxamer 407 micelle
- Blank poloxamer 407-CTAB micelle
- Blank poloxamer 407-Lecithin micelle
- poloxamer 407 load furazolidone micelle
- poloxamer 407-CTAB load furazolidone micelle
- poloxamer 407-Lecithin furazolidone micelle
- Control

## 7. การทดสอบการนำส่งยาเข้าเซลล์

ทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งใน 24 well plate ให้มีปริมาณเซลล์ 50,000 cells/well นำไป incubate เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเปลี่ยนอาหารเดิมออกและเติมอาหารใหม่ที่มีตัวยา furazolidone เทียบเท่า 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับ furazolidone 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี DMSO ความเข้มข้น 1% ที่เป็นค่าการละลายสูง

ที่สุดของยา furazolidone ที่ละลายได้ ทำการ incubate เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง และ 6 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแต่ละเวลา ทำการดูดอาหารบริเวณ supernatant ออก ล้างด้วย PBS pH 7.4 อีก 3 ครั้ง เพื่อกำจัดยาที่ไม่เข้าเซลล์ออกไป หลังจากนั้นทำให้เซลล์แตก (lysate cell) โดยการเติม 1% triton-x หลุมละ 500 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เมื่อครบเวลาเติม acetonitrile 1 มิลลิลิตร เพื่อสกัดตัวยา furazolidone ออกมาจากเซลล์ นำสารละลายที่ได้กรองผ่าน Syringe filter ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร อีกครั้งเพื่อกำจัดเศษเซลล์ก่อนนำไปวิเคราะห์ปริมาณตัวยาสำคัญ

## 8. การวิเคราะห์ปริมาณยาในเซลล์ด้วยวิธี HPLC

เนื่องจากปริมาณยาที่เข้าเซลล์มีปริมาณน้อยจึงต้องใช้วิธีที่มีความละเอียดสูง โดยจะใช้วิธี HPLC (Agilent) ในการวิเคราะห์ตัวยา furazolidone ที่เข้าไปในเซลล์ โดยใช้สภาวะดังนี้

Mobile phase DI water 75%: ACN 25% volumn injection 20 ไมโครลิตร ใช้อัตราการฉีด 1.5 มิลลิลิตร/นาที วิเคราะห์ด้วย UV detector ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร ใช้ column: C 18 (Thermo)

## ผลการวิจัย

### ผลของ poloxamer 407 ต่อคุณลักษณะ polymeric micelle

ผลการทดลองการเตรียมอนุภาค polymeric micelle ด้วย poloxamer 407 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า ขนาดของอนุภาคไมเซลล์ที่เตรียมได้ที่มีขนาดเล็กที่สุดคือ สูตรที่เตรียมด้วย poloxamer 407 ปริมาณ 50 มิลลิกรัม จะมีขนาดอนุภาคอยู่ที่  $267.84 \pm 59.78$  นาโนเมตร และเมื่อบรรจุยา จะมีขนาด  $266.44 \pm 32.30$  นาโนเมตร เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ poloxamer จะเห็นว่าขนาดอนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้นจนถึง  $371.46 \pm 121.13$  นาโนเมตร ที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม ในขณะที่บรรจุตัวยาวางไรก็ตามพบว่า ตั้งแต่ความเข้มข้น ของ poloxamer มากกว่า 500 มิลลิกรัม ขึ้นไปมีค่าการกระจายตัวของอนุภาคสูง (PDI) แต่ปริมาณของ poloxamer 407 และตัวยา furazolidone ไม่ส่งผลต่อค่าพื้นผิวประจุ (zeta potential) คือ ประจุอนุภาคยังมีค่าเข้าใกล้ 0 ถึงแม้ว่าจะเพิ่มปริมาณ poloxamer 407 หรือมีการบรรจุ furazolidone ลงไป (ตารางที่ 2)



### ผลของประจุต่อคุณลักษณะของ polymeric micelle

เมื่อยาถูกกักเก็บในอนุภาคไมเซลล์จะสามารถละลายและกระจายตัวอยู่ในชั้นน้ำได้ แต่ถ้าไม่มีระบบไมเซลล์จะเห็นว่ายานา furazolidone จะไม่ละลายและตกตะกอนลงมา เทียบกับสูตรที่มี poloxamer 407 จะสามารถเพิ่มค่าการละลายให้ตัวยานา Furazolidone ได้ (ภาพที่ 1) อย่างไรก็ตามพบว่าค่าการเติมสารลดแรงตึงผิวร่วม ทั้ง lecithin และ CTAB สามารถเพิ่มค่าการละลายได้มากกว่าการใช้ poloxamer 407 เพียงอย่างเดียว โดยค่า %entrapment จะสูงกว่าการใช้ poloxamer 407 เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ทั้ง lecithin และ CTAB เองยังสามารถรบกวนประจุพื้นผิวของอนุภาคไมเซลล์ได้ โดย สูตรตำรับที่ใช้ lecithin จะมีประจุบนพื้นผิวจะมีความเป็นลบมากขึ้นเรื่อยๆเมื่อความเข้มข้นของ lecithin สูงขึ้น เช่น สูตรตำรับ 200:20 (มิลลิกรัม:มิลลิกรัม) ที่บรรจุตัวยานา furazolidone มีค่า zeta potential มีการเปลี่ยนแปลงเป็น  $-31.64 \pm 2.70$  มิลลิโวลต์ ซึ่งแตกต่างจากสูตร poloxamer เดี่ยว (ตารางที่ 1-2) ในส่วนของ CTAB ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุบวกให้ผลเช่นเดียวกัน คือ เมื่อผสมลงในสูตรตำรับไมเซลล์จะทำให้ประจุรวมของอนุภาคกลายเป็นประจุบวกมากขึ้น (ตารางที่ 2) ในขณะที่สูตร poloxamer 407 200 มิลลิกรัม มีค่า zetapotential เพียง  $-5.53 \pm 1.92$  มิลลิโวลต์ นอกจากนี้ ทั้ง lecithin และ CTAB เมื่อใส่ลงไปไม่ส่งผลให้ขนาดของอนุภาคเกิดการกระจายตัว อนุภาคยังมีขนาดใกล้เคียงกัน แต่ในสูตรตำรับที่มี lecithin ขนาดอนุภาคจะเล็กลงมากขึ้น เมื่อความเข้มข้นของ lecithin สูง ๆ ตรงข้ามกับ CTAB ที่จะมีขนาดอนุภาคจะใหญ่ขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ CTAB สูงขึ้น

หลังจากนั้น ทำการเลือกสูตรตำรับ เพื่อใช้ทดสอบกับเซลล์ต่อไป โดยทำการเปรียบเทียบทั้งหมด 3 สูตร คือ Poloxamer 407 200 มิลลิกรัม, Poloxamer 407 200 มิลลิกรัม + Lecithin 4 มิลลิกรัม และ Poloxamer 407 200 มิลลิกรัม + CTAB 20 มิลลิกรัม เนื่องจากมี ขนาดอนุภาคใกล้เคียงกัน และเป็นตัวแทนของประจุบวกและประจุลบ ที่มีค่าแตกต่างกับ 0 ใกล้เคียงกัน คือ  $-22.34 \pm 1.31$  มิลลิโวลต์ และ  $22.36 \pm 7.97$  มิลลิโวลต์

### ผลของประจุต่อการนำส่ง furazolidone ต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 ของอนุภาค polymeric micelle

จากการนำสูตรที่คัดเลือกมาทำการทดสอบกับเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด คือ มะเร็งเต้านม (MCF-7) และ มะเร็งตับ (HepG2) จะเห็นได้ว่าในส่วนของอนุภาคเปล่า สูตร poloxamer

407 เดี่ยว และ poloxamer 407 ผสม lecithin ไม่มีความเป็นพิษ แต่ สูตรที่มี CTAB สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้แม้จะยังไม่มิตัวยาสำคัญ จากข้อมูลจะเห็นว่าสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมและมะเร็งตับ เหลือเพียง  $64.85 \pm 9.27\%$  และ  $71.19 \pm 5.82\%$  ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรที่ใส่ตัวยานา furazolidone ลงไป ดังนั้น ทั้ง 3 สูตรจึงสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ โดยสูตรที่เป็นประจุบวกสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุด พบว่าการรอดชีวิตของมะเร็งเต้านมและมะเร็งตับเท่ากับ  $37.92 \pm 6.83\%$  และ  $41.76 \pm 4.76\%$  ซึ่งผลที่เกิดขึ้นน่าจะเกิดจากการที่ทั้ง CTAB และ Furazolidone มีประสิทธิภาพในการฆ่าเซลล์มะเร็ง (ภาพที่ 2)

### ผลของประจุต่อการนำส่ง furazolidone เข้าเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 ของอนุภาค polymeric micelle

การวิเคราะห์ furazolidone เข้าสู่เซลล์ (Cell uptake) จะทำการใช้เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) ในการวิเคราะห์ด้วยานา furazolidone ในเซลล์ การทดสอบความถูกต้องเบื้องต้นของวิธีวิเคราะห์ด้วยานาสำคัญ จะได้ chromatogram ของตัวยานา furazolidone มีค่า retention time อยู่ในช่วงเวลา 3.8 วินาที (ภาพที่ 3) และกราฟมาตรฐานได้สมการเส้นตรง ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ถึง 500 ไมโครกรัม ได้ค่า  $R^2 = 0.9999$

ผลการศึกษาผลของประจุต่อการ uptake ด้วยานาเข้าสู่เซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด พบว่า ที่เวลา 3 ชั่วโมง ระบบไมเซลล์ที่มีประจุบวกจะให้การนำส่งยาดีที่สุด โดยพบปริมาณยานา furazolidone ในเซลล์มะเร็งเต้านม  $1557.72 \pm 95.77$  นาโนกรัม/มิลลิลิตร และในมะเร็งตับพบ furazolidone  $2,231.67 \pm 148.56$  นาโนกรัม/มิลลิลิตร (ภาพที่ 4 และ 5) ความเข้มข้นของ furazolidone ที่พบรองลงมาคือประจุลบ และน้อยที่สุดคือไม่มีประจุ และเมื่อพิจารณาที่เวลา 6 ชั่วโมง กลับให้ผลที่แตกต่างออกไป โดยประจุลบกลับเป็นระบบไมเซลล์ที่ให้ค่าการ uptake สูงที่สุดคือ furazolidone ในเซลล์มะเร็งเต้านม  $1896.61 \pm 80.17$  นาโนกรัม/มิลลิลิตร และในมะเร็งตับพบ furazolidone  $2,374.25 \pm 250.67$  นาโนกรัม/มิลลิลิตร และจากข้อมูลจะเห็นว่าไมเซลล์ประจุบวกกลับเหลือปริมาณยานาในเซลล์ลดลง โดยพบตัวยานา furazolidone ในเซลล์มะเร็งเต้านม  $1346.15 \pm 268.97$  นาโนกรัม/มิลลิลิตร และมะเร็งตับ  $1574.25 \pm 487.05$  นาโนกรัม/มิลลิลิตร

**ตารางที่ 1** ลักษณะกายภาพของอนุภาค polymeric micelle

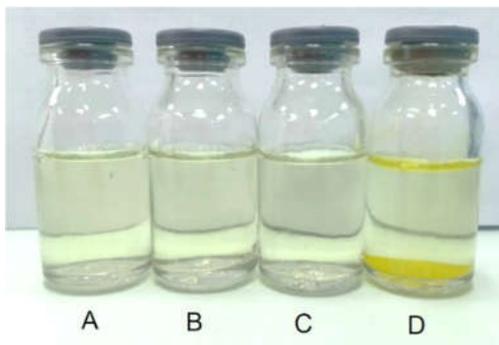
Formulation	Particle size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)	% Entrapment
Poloxamer 50 mg	267.84 ± 59.78	0.48 ± 0.22	-4.69 ± 2.94*	
Poloxamer 100 mg	314.96 ± 75.79	0.53 ± 0.14	-4.65 ± 1.86*	
Poloxamer 200 mg	341.36 ± 50.12	0.58 ± 0.13	-8.63 ± 1.05	
Poloxamer 500 mg	300.19 ± 145.90	0.73 ± 0.03	-7.44 ± 2.27	
Poloxamer 750 mg	220.30 ± 59.69	0.59 ± 0.25	-12.11 ± 0.83	
Poloxamer 1,000 mg	380.31 ± 148.14	0.72 ± 0.05	-5.99 ± 1.49	
<b>บรรจุ furazolidone</b>				ไม่พบปริมาณยาที่ละลายออกมา
Poloxamer 0 mg				
Poloxamer 50 mg	266.44 ± 32.30	0.52 ± 0.09	-5.23 ± 3.55	
Poloxamer 100 mg	300.63 ± 25.69	0.57 ± 0.04	-3.23 ± 1.55	
Poloxamer 200 mg	336.70 ± 32.42	0.48 ± 0.16	-5.53 ± 1.92	
Poloxamer 500 mg	333.20 ± 28.57	0.63 ± 0.17	-2.89 ± 0.72	
Poloxamer 750 mg	358.12 ± 112.93	0.71 ± 0.06	-5.75 ± 1.19	
Poloxamer 1,000 mg	371.46 ± 121.13	0.61 ± 0.17	-10.55 ± 8.09	

ทุกค่าเฉลี่ย ± SD (n=3)

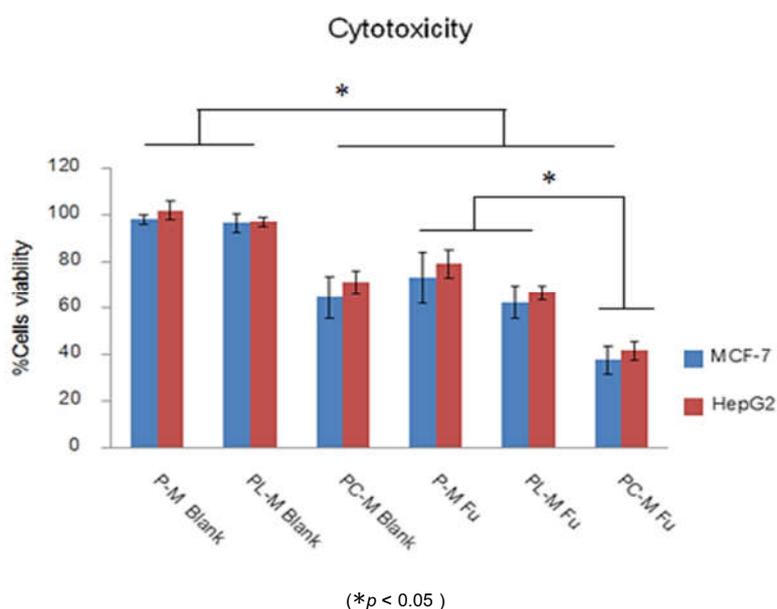
**ตารางที่ 2** ลักษณะกายภาพของอนุภาค polymeric micelle ที่เตรียมจาก poloxamer 407 ร่วมกับ Cosurfactant

Formulation (mg:mg)	Particle size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)	% Entrapment
<b>Poloxamer: Lecithin</b>				
200:0	341.36 ± 50.12	0.58 ± 0.13	-8.63 ± 1.05	
200:4	295.86 ± 78.10	0.44 ± 0.16	-14.69 ± 4.32	
200:10	260.92 ± 40.60	0.59 ± 0.17	-20.13 ± 1.62*	
200:20	201.53 ± 61.72	0.61 ± 0.06	-28.90 ± 3.19*	
<b>บรรจุ furazolidone Poloxamer: Lecithin</b>				
200:0	336.70 ± 32.42	0.48 ± 0.16	-5.53 ± 1.92	52.05 ± 7.26
200:4	311.42 ± 24.06	0.59 ± 0.13	-22.34 ± 1.31*	57.47 ± 3.14
200:10	238.10 ± 85.02	0.52 ± 0.07	-30.66 ± 1.39*	63.06 ± 5.41*
200:20	199.36 ± 52.01	0.53 ± 0.05	-31.64 ± 2.70*	65.73 ± 1.72*
<b>Poloxamer: CTAB</b>				
200:0	341.36 ± 50.12	0.58 ± 0.13	-8.63 ± 1.05	
200:4	216.03 ± 23.55*	0.51 ± 0.12	9.10 ± 4.06*	
200:10	278.92 ± 38.80	0.43 ± 0.10	11.14 ± 4.15*	
200:20	303.08 ± 18.45	0.45 ± 0.24	19.95 ± 2.07*	
<b>บรรจุ furazolidone Poloxamer: CTAB</b>				
200:0	336.70 ± 32.42	0.48 ± 0.16	-5.53 ± 1.92	52.05 ± 7.26
200:4	237.22 ± 63.09	0.52 ± 0.02	9.04 ± 3.35	59.80 ± 4.75
200:10	274.91 ± 77.90	0.49 ± 0.09	14.00 ± 8.73*	61.77 ± 3.33*
200:20	307.14 ± 62.01	0.53 ± 0.08	22.36 ± 7.97*	62.26 ± 1.49*

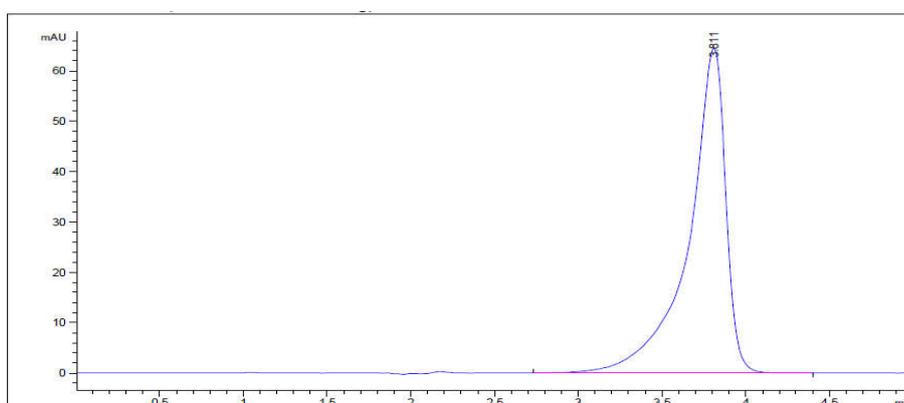
ทุกค่าเฉลี่ย ± SD (n=3) \*p &lt; 0.05 เมื่อเทียบกับสูตร poloxamer 200 มิลลิกรัม



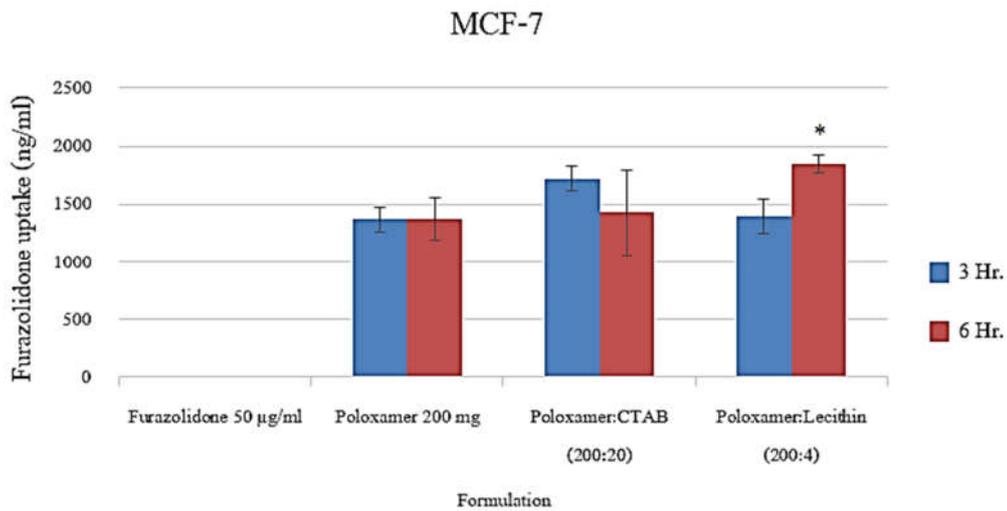
**ภาพที่ 1** ลักษณะทางกายภาพของ Furazolidone polymeric micelle  
A = Poloxamer 407 + furazolidone, B = Poloxamer 407+Lectithin + furazolidone,  
C = Poloxamer 407+CTAB + furazolidone, D : Furazolidone in water



**ภาพที่ 2** ผลการยับยั้งเซลล์มะเร็งของระบบนำส่ง Polymeric micelle  
(P-M = Poloxamer407 micelle, PL-M = Poloxamer407+Lectithin micelle, PC-M = Poloxamer407+CTAB micelle )

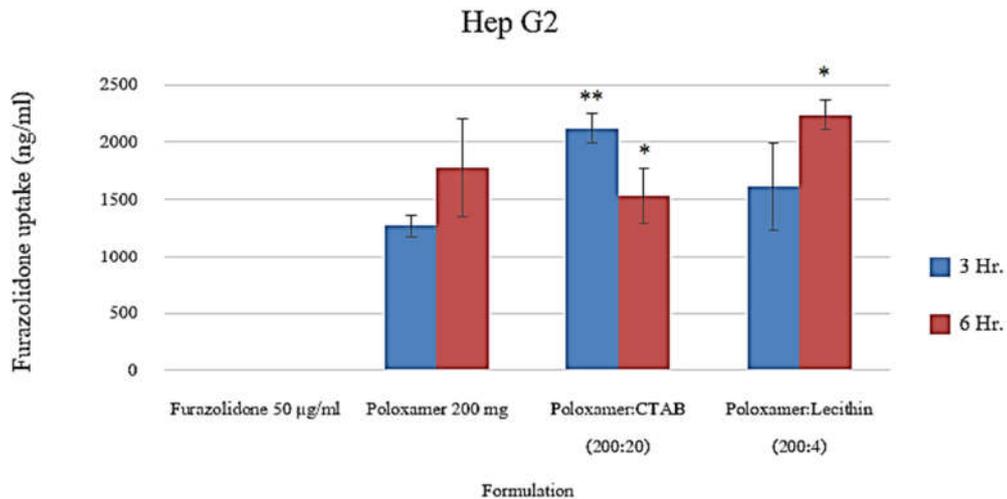


**ภาพที่ 3** Chromatogram ของ furazolidone



(\* $p < 0.05$  เปรียบเทียบระหว่าง 3 ชั่วโมง และ 6 ชั่วโมงในสูตรเดียวกัน)

ภาพที่ 4 ผลของระบบ polymeric micelle ต่อการนำยา furazolidone เข้าเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7)



(\* $p < 0.05$  เปรียบเทียบระหว่าง 3 ชั่วโมง และ 6 ชั่วโมงในสูตรเดียวกัน, \*\* $p < 0.05$  เปรียบเทียบกับสูตร poloxamer เดียวๆ ที่เวลาเดียวกัน)

ภาพที่ 5 ผลของระบบ polymeric micelle ต่อการนำยา furazolidone เข้าเซลล์มะเร็งตับ (HepG2)

## อภิปรายและสรุปผล

ผลของ poloxamer 407 ต่อการเกิดไมเซลล์ พบว่าขนาดอนุภาคและค่าการกระจายตัวของอนุภาค (PDI) มีค่าสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ poloxamer 407 เพิ่มขึ้น โดยการจัดเรียงตัวของ polymeric micelle มีลักษณะเป็นโครงสร้างสามมิติ โดยสารลดแรงตึงผิวจะจัดเรียงตัวเป็นทรงกลมและหันด้านที่ชอบน้ำ (amphiphilic) ออกมาด้านนอก ทำให้ลักษณะของไมเซลล์แสดงความมีขั้ว ส่งผลให้สามารถกระจายตัวได้ดีในน้ำ ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวหรือ poloxamer 407 จะส่งผลต่อลักษณะของรูปทรงอนุภาคของ micelle โดยความเข้มข้นของ

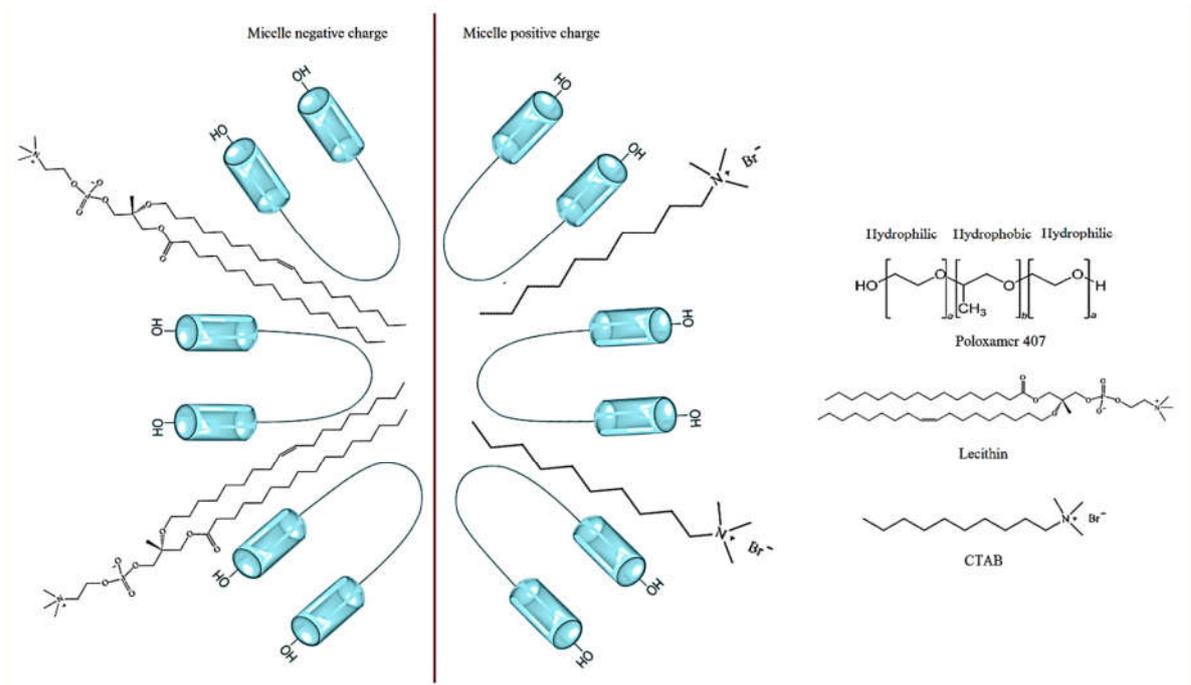
สารลดแรงตึงผิวที่มากขึ้นจะทำให้รูปทรงของอนุภาคไมเซลล์เปลี่ยนจากทรงกลมเป็นรูปแท่ง (rod) หรือแผ่น (planar sheet) ที่ใหญ่ขึ้น (Khalil and Al-hakam, 2014) จึงทำให้ความเข้มข้นของ poloxamer 407 ที่สูง ๆ มีขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้นและค่า PDI สูงขึ้น และเมื่อพิจารณาการบรรจุด้วย furazolidone สามารถสรุปได้ว่าความเข้มข้นของ poloxamer ที่สูงจะสามารถบรรจุตัวยามากกว่า เนื่องจากขนาดของอนุภาคมีขนาดใหญ่จึงมีพื้นที่ในการบรรจุตัวยามากกว่า รวมถึงยังเกิดอนุภาคไมเซลล์ได้สมบูรณ์กว่าการใช้ poloxamer ความเข้มข้นต่ำ ๆ อย่างไรก็ตาม



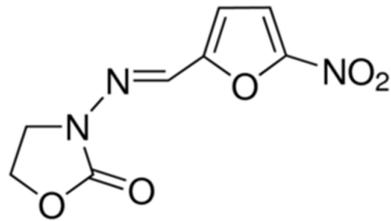
เมื่อความเข้มข้นของ poloxamer สูงมาก ๆ จะพบค่าการกักเก็บตัวยาสำคัญลดต่ำลง สาเหตุเกิดมาจากการที่ไมเซลล์เกิดการจัดเรียงตัวเป็นรูปแบบอื่นทำให้มีขนาดใหญ่ขึ้นจนไม่สามารถผ่านตัวกรองออกมาได้ ทำให้ตัวยาสำคัญติดค้างอยู่ที่ชั้นเมมเบรน จากผลการทดลองได้เลือกสูตรที่เหมาะสมที่สุด คือ ความเข้มข้นของ poloxamer 407 ปริมาณ 200 มิลลิกรัม เนื่องจากมีปริมาณการกักเก็บตัวยาได้สูง และค่า PDI ที่ต่ำ ซึ่งสื่อถึงการกระจายตัวของอนุภาคที่ดีกว่า จากการศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิวร่วม สูตรที่เตรียมระหว่างด้วย poloxamer 407 และ lecithin ที่อัตราส่วน 200:4, 200:10 และ 200:20 จะเห็นว่ายิ่งเพิ่มปริมาณ lecithin ขนาดอนุภาคยิ่งเล็กลง (ตารางที่ 2) ซึ่งผลสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าที่พบว่า การเตรียมอนุภาคนาโนพาทิเคิลโดยใช้ lecithin เป็นสารลดแรงตึงผิวในตำรับ ยังมีปริมาณ lecithin สูงขนาดอนุภาคก็จะเล็กลง (Farnia *et al.*, 2017) เกิดจากประจุลบของ lecithin เหนี่ยวนำให้เกิด electrostatic force ระหว่าง poloxamer กับ ประจุของ lecithin ทำให้เกิดการรบกวนของการจัดเรียงตัวของโมเลกุลไมเซลล์ (Dwiastuti *et al.*, 2016) ในส่วนผลของ CTAB ต่อคุณลักษณะ polymeric micelle ให้ผลแตกต่างไปจาก lecithin เนื่องจาก CTAB ไม่มีคุณสมบัติในการเกิด electrostatic force ได้เท่า lecithin ส่งผลขนาดอนุภาคไมเซลล์ที่เตรียมจาก poloxamer และ CTAB มีขนาดเล็กไม่มาก และเมื่อให้ความเข้มข้นของ CTAB สูงขึ้นจนถึงอัตราส่วน 200:10 และ 200:20 พบว่าขนาดอนุภาคกลับมีขนาดใหญ่ขึ้นทั้งในสูตรตำรับที่ใส่ตัวยา furazolidone และ อนุภาคเปล่า (ตารางที่ 2) สาเหตุสำคัญของปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นเกิดจาก โมเลกุลของ CTAB ที่ไม่ถูกดูดซับไว้ที่ผิวของอนุภาคแต่เกิดการรวมตัวเป็นชั้นที่เรียกว่า diffusion layer บริเวณพื้นผิวของอนุภาคไมเซลล์โดยจะแทรกส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic chains) เข้าไปภายในอนุภาค ส่งผลให้ขนาดอนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น แต่มีความคงตัวทางพลศาสตร์ (thermodynamic) สูงขึ้น (Pellosi *et al.*, 2016; Chaemsawang *et al.*, 2019; Mahbub *et al.*, 2019) รวมถึง lecithin มีคุณสมบัติเป็น zwitterion ion ดังนั้นเมื่อความเข้มข้นของ lecithin เพิ่มขึ้นในโครงสร้างของไมเซลล์ก็จะเกิดแรงดึงดูดเข้าหากันระหว่างโมเลกุลของ lecithin ทำให้การจัดเรียงโมเลกุลของไมเซลล์เรียงตัวแน่นขึ้น แต่ในโครงสร้างของ CTAB จะมีเพียงประจุบวกเพียงอย่างเดียวดังนั้นเมื่อความเข้มข้นของ CTAB สูงมาก ๆ จะเกิดแรงผลัก (repulsion force) ระหว่างโมเลกุลของ CTAB ทำให้การจัดเรียงตัวของไมเซลล์อยู่กันหลวม ๆ ซึ่งผลให้ขนาดโมเลกุลมีลักษณะใหญ่ขึ้น (ภาพที่ 6)

โดยลักษณะการเกิดเป็นอนุภาคพอลิเมอร์ไมเซลล์จะเกิดจาก poloxamer 407 ซึ่งเป็น nonionic triblock copolymer ที่ประกอบไปด้วยส่วนของ polyoxyethylene ซึ่งเป็นส่วนที่มีคุณสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic) บริเวณปลายสายของพอลิเมอร์ทั้ง 2 ฝั่ง และตรงกลางมีหมู่ polyoxypropylene ซึ่งไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) เมื่อเกิดไมเซลล์จะเกิดการปรับโครงสร้างให้อยู่ในรูป U-shape โดยหันปลายด้านที่ชอบน้ำออกด้านนอก และหากมีการผสมการสารลดแรงตึงผิวร่วมเช่น lecithin หรือ CTAB สารลดแรงตึงผิวนั้นจะแทรกตัวอยู่ระหว่างโครงสร้างของ poloxamer 407 โดยทั้ง Phospholipid และ CTAB จะหันด้าน alkyl group เข้าด้านในไมเซลล์และหันด้านที่มีประจุออกด้านนอก (ภาพที่ 6) และจากการทดลองไมเซลล์ที่อยู่ในสารละลาย pH 7.4 ถึงแม้ว่า lecithin จะเป็น switterion ion แต่ที่ pH 7.4 หมู่ phosphate จะแตกตัวให้ประจุลบออกมามากกว่าประจุบวก จึงเห็นค่า zeta-potential แสดงออกมาเป็นลบ ขณะที่ CTAB หมู่ quaternary amine จะแตกตัวให้ประจุบวก (Chat *et al.*, 2011; Chaemsawang *et al.*, 2019) นอกจากนี้การที่ในอนุภาคของสารลดแรงตึงผิวที่มีสายยาว (long chain hydrocarbon) อย่าง CTAB ผสมในอนุภาคจะสามารถเพิ่มคุณสมบัติในการกักเก็บตัวยาสำคัญให้สูงขึ้นรวมถึงประสิทธิภาพในการแพร่ผ่านชั้นเซลล์เมมเบรน (Bnyan *et al.*, 2018)

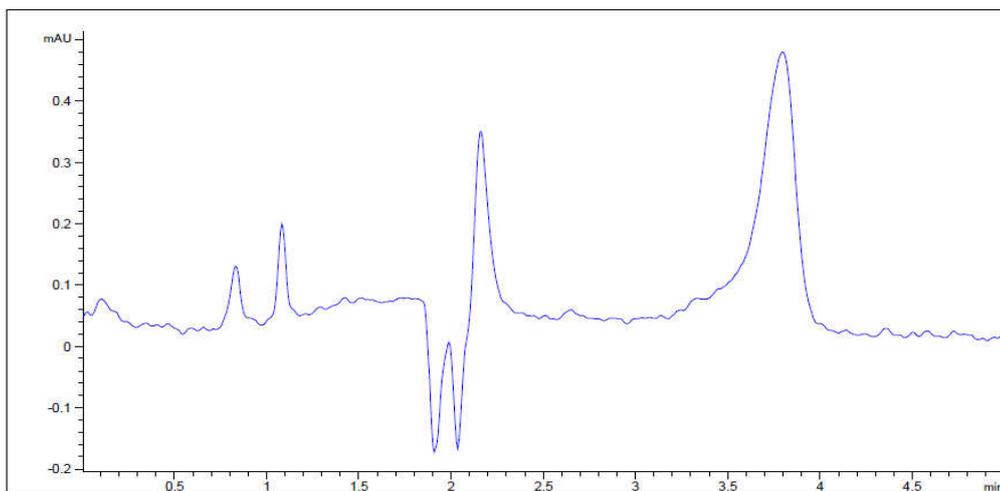
เมื่อพิจารณาในด้านผลของสารลดแรงตึงผิวร่วมต่อการกักเก็บตัวยา จะเห็นว่ายา furazolidone ซึ่งมีค่า pKa 5.12 และมีลักษณะ functional group ที่เป็น switterion ion (ภาพที่ 7) ซึ่งสามารถแตกตัวให้ทั้งประจุบวกและลบ ที่ pH 7.4 ดังนั้นในระบบไมเซลล์ที่มีประจุบวกจาก CTAB และประจุลบจาก lecithin จึงสามารถกักเก็บตัวยาได้สูงกว่าไมเซลล์ที่เตรียมจาก poloxamer เพียงอย่างเดียว เนื่องจากเกิดผลของ electrostatic force ระหว่างประจุในโมเลกุลของยากับประจุตรงข้ามของสารลดแรงตึงผิวร่วม เช่น เมื่อ furazolidone เจอกับ CTAB ในโครงสร้างของไมเซลล์ ประจุลบของ furazolidone จะเกิดแรง adhesion force กับ ประจุบวกของ CTAB ทำให้ตัวยา furazolidone ชอบที่จะอยู่ในโครงสร้างของไมเซลล์ได้สูงขึ้น โดยจะเห็นว่ายิ่งความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวร่วมมากก็ยิ่งทำให้เกิดการกักเก็บได้มากซึ่งเกิดจากการเหนี่ยวนำของประจุที่แรงขึ้น แต่เมื่อใช้เพียง poloxamer 407 เพียง ค่า zetapotential เข้าใกล้ศูนย์ หมายความว่าถึงอนุภาคไมเซลล์นั้นเกิดแรง adhesion กับสารโมเลกุลต่าง ๆ ที่มีประจุต่าง จึงทำให้ปริมาณการกักเก็บตัวยา furazolidone ไม่แตกต่างกันมากเมื่อความเข้มข้นของ poloxamer 407 เพิ่มขึ้น



ภาพที่ 6 ลักษณะการเกิด polymeric mixed micelle ระหว่าง poloxamer407 และ สารลดแรงตึงผิวร่วม



ภาพที่ 7 โครงสร้างของ furazolidone



ภาพที่ 8 chromatogram ของ furazolidone solution ในการทดสอบ cell uptake ที่ 6 ชั่วโมง

ผลการศึกษาระดับเซลล์เมื่อทำการเจือจางให้ตัวยา furazolidone มีความเข้มข้นอยู่ที่ 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เท่ากัน เมื่อทำการทดสอบกับเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด พบว่าการเพิ่มค่าการละลายด้วยระบบนำส่ง polymeric micelle สามารถเพิ่มการยับยั้งให้กับเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิดได้ โดยระบบไมเซลล์ที่มีประจุบวกจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งมากที่สุด คือ เหลือเซลล์ที่รอดชีวิต 37.92% ในเซลล์มะเร็งเต้านม และ 41.76% ในเซลล์มะเร็งตับ (ภาพที่ 2) อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาที่อนุภาคเปล่าที่ยังไม่บรรจุตัวยา furazolidone ลงไป อนุภาคเปล่าของ polymeric micelle ที่เตรียมจาก poloxamer 407 ผสมกับ CTAB ก็มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด แต่ในขณะที่ poloxamer เดี่ยว ๆ กับ poloxamer ผสมกับ lecithin ไม่มีความเป็นพิษ จากรายงานมีการกล่าวถึง CTAB สามารถเกิด catalytic แดกตัวให้ CTA<sup>+</sup> ซึ่งไปยับยั้งการทำงานของ H<sup>+</sup>-ATPase synthase ทำให้ mitochondria ของเซลล์เกิด apoptosis และยับยั้งการเกิด depolarization ของ mitochondria นอกจากนี้ CTAB สามารถไปแทนที่ phospholipid bilayer แล้วเกิดเป็นรู ทำให้เซลล์เมมเบรน (cell membrane) เกิดการรั่วและไม่คงตัวนำไปสู่การตายของเซลล์ (Kalbáčová et al., 2014; Meena et al., 2017) ดังนั้น % viability ที่ลดลงของสูตร poloxamer : CTAB (200:20) มีผลมาจากความเป็นพิษของ CTAB และเมื่อนำมาบรรจุ furazolidone ลงไปก็สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งให้สูงขึ้นมากกว่า 50%

การศึกษาผลการนำส่งยา furazolidone เข้าสู่เซลล์มะเร็ง ผลการทดลองในส่วนของการละลาย furazolidone จะพบว่าตัวยาไม่สามารถละลายในน้ำได้ต้องใช้ DMSO ช่วยเพิ่มค่าการละลาย โดยสามารถได้มากที่สุดเพียงแค่ประมาณ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อทดสอบค่ากับ uptake เข้าสู่เซลล์มะเร็ง กลับพบว่าตัวยา furazolidone เข้าสู่เซลล์ได้น้อยมากทั้งที่เวลา 3 ชั่วโมงและ 6 ชั่วโมง โดยมีค่า AUC ต่ำกว่า น้อยกว่า 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (ภาพที่ 8) เมื่อเปรียบเทียบกับระบบนำส่งไมเซลล์ จะพบว่าประจุบวกมีคุณสมบัติในการนำสารเข้าสู่เซลล์ที่ดีกว่าประจุลบและไม่มีประจุในทั้งเซลล์มะเร็งเต้านมและมะเร็งตับ จากข้อมูลเบื้องต้นที่พบคาดว่าประจุบวกเป็นปัจจัยสำคัญในการนำส่งสารโดยอาศัย electrostatic interaction ระหว่างประจุบวกของอนุภาคกับประจุลบของเซลล์เมมเบรน (Salatin and Yari Khosroushahi, 2017) อย่างไรก็ตามนอกจากเรื่องของ electrostatic แล้วการนำสารยังมีปัจจัยอีกหลาย ๆ ด้าน เช่น receptor ที่ใช้เป็น cellular target หรือระบบประจุของระบบ

นำส่งระดับนาโน (Xie et al., 2018) โดยสารที่มีประจุลบสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการพาสารเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธี endocytosis โดยเฉพาะสารที่มีประจุลบจะเกิดการ endocytosis ผ่านช่องทางที่เรียกว่า clathrin mediated endocytosis (Sokolova et al., 2013; P.R et al., 2016) เพราะเมื่อพิจารณาที่ 6 ชั่วโมง สารที่มีประจุลบกลับเกิดการ uptake ที่สูงขึ้นมากกว่ากลุ่มไม่มีประจุ ส่วนในสูตร poloxamer 407 เดี่ยว ๆ อาจเกิดการนำสารเข้าด้วยวิธี endocytosis หรือ ผ่าน active transport system ที่ไม่ได้ผ่าน receptor สำคัญในการนำสารเข้าสู่เซลล์ จึงทำอัตราการนำสารเข้าสู่เซลล์เกิดขึ้นช้ากว่าไมเซลล์ที่มีประจุ (ภาพที่ 4-5) ซึ่งมาจากผลของ endocytosis ตามที่กล่าวมา และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างประจุบวกและประจุลบที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง ไมเซลล์ประจุบวกจะมีปริมาณตัวยาลดลง เหตุผลที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากการที่ CTAB เหนี่ยวนำให้ผนังเซลล์เมมเบรน เกิดการรั่วและเริ่มตายที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งผลที่เกิดขึ้นสอดคล้องกับการทดสอบความเป็นพิษซึ่งจะเห็นวาระบบไมเซลล์ที่ทำจาก poloxamer 407 ร่วมกับ CTAB ทำให้เกิดอัตราการตายของเซลล์ได้สูง ซึ่งอาจเป็นปัจจัยที่ทำให้ค่าการ uptake ของตัวยาลดลงต่ำกว่าไมเซลล์ประจุลบ ดังนั้นจะเห็นว่าถึงแม้ประจุบวกจะมีอัตราการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดี แต่ก็มีพิษของระบบนำส่งที่สูง เมื่อเทียบกับระบบนำส่งประจุลบและไม่มีประจุที่ไม่มีความเป็นพิษกับเซลล์เท่ากับประจุบวก (Ahmed and Narain, 2013) อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาผลของประจุต่อเซลล์มะเร็งเบื้องต้น จำเป็นต้องพัฒนาศึกษาต่อไปเพื่อทราบถึงพิษของระบบนำส่งทั้ง 3 ระบบ กับเซลล์ปกติ หรือมีการพัฒนาโครงสร้างของไมเซลล์ให้มีความจำเพาะกับเซลล์มะเร็งให้มากขึ้นเช่น การนำ poloxamer ไปเชื่อมต่อกับ targeting ligand เพื่อให้ระบบนำส่งไปจับเฉพาะเซลล์มะเร็งเพื่อให้มีความจำเพาะและมีอัตราการฆ่าเซลล์มะเร็งที่รวดเร็ว

จากผลการทดลองทั้งหมด ทำให้สามารถทราบถึงกลุ่ทรูในการนำส่งยาไปยังเซลล์มะเร็ง โดยพบว่าเซลล์มะเร็งตับและมะเร็งเต้านม ชอบที่จะนำสารที่มีประจุเข้าสู่ภายในเซลล์มากกว่าสารที่ไม่มีประจุ โดยประจุบวกจะให้ผลในการนำส่งยาที่ดีที่สุด แต่อย่างไรก็ตามอาจจะต้องศึกษาความเป็นพิษของระบบนำส่งที่เป็นประจุบวกเพิ่มเติม หากพบว่ามีพิษต่อเซลล์ปกติด้วยอาจเลือกใช้ระบบนำส่งที่มีประจุลบได้เช่นกัน ดังนั้นในอนาคตหากนำองค์ความรู้นี้ไปใช้พัฒนาต่อยอดการนำส่งเคมีบำบัดตัวชนิดอื่น ๆ ก็จะสามารถประสิทธิภาพในการรักษาโรคมะเร็งได้ดียิ่งขึ้น

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 และขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่สนับสนุนเครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัย

## References

- Ahmed, M. and Narain, R. (2013). Cell line dependent uptake and transfection efficiencies of PEI-anionic glycopolymer systems. *Biomaterials*, 34, 4368-4376.
- Alam, M. I., Paget, T. and Elkordy, A. A. (2016). Formulation and advantages of furazolidone in liposomal drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 84, 139-145.
- Bnyan, R., Khan, I., Ehtezazi, T., Saleem, I., Gordon, S., O'Neill, F. and Roberts, M. (2018). Surfactant effects on lipid-based vesicles properties. *Journal of pharmaceutical sciences*, 107, 1237-1246.
- Carraher, C. E., Roner, M. R., Thibodeau, R. and Johnson, A. M. (2014). Synthesis, structural characterization, and preliminary cancer cell study results for poly(amine esters) derived from triphenyl-group VA organometallics and norfloxacin. *Inorganica Chimica Acta*, 423, 123-131.
- Chaemsawang, W., Prasongchean, W., Papadopoulos, K. I., Ritthidej, G., Sukrong, S. and Wattanaarsakit, P. (2019). The Effect of Okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) Seed Extract on Human Cancer Cell Lines Delivered in Its Native Form and Loaded in Polymeric Micelles. *International journal of biomaterials*, 2019, 9404383-9404383.
- Chat, O. A., Najar, M. H., Mir, M. A., Rather, G. M. and Dar, A. A. (2011). Effects of surfactant micelles on solubilization and DPPH radical scavenging activity of Rutin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 355, 140-149.
- Croy, S. and Kwon, G. (2006). Polymeric micelles for drug delivery. *Current pharmaceutical design*, 12, 4669-4684.
- Deng, S., Tang, S., Dai, C., Zhou, Y., Yang, X., Li, D. and Xiao, X. (2016). P21Waf1/Cip1 plays a critical role in furazolidone-induced apoptosis in HepG2 cells through influencing the caspase-3 activation and ROS generation. *Food and Chemical Toxicology*, 88, 1-12.
- Djekic, L., Čalija, B. and Medarević, Đ. (2020). Gelation behavior, drug solubilization capacity and release kinetics of poloxamer 407 aqueous solutions: The combined effect of copolymer, cosolvent and hydrophobic drug. *Journal of Molecular Liquids*, 303, 112639.
- Djekic, L., Krajisnik, D., Martinovic, M., Djordjevic, D. and Primorac, M. (2015). Characterization of gelation process and drug release profile of thermosensitive liquid lecithin/poloxamer 407 based gels as carriers for percutaneous delivery of ibuprofen. *International Journal of Pharmaceutics*, 490, 180-189.
- Dwiastuti, R., Noegrohati, S., Istyastono, E. P. and Marchaban. Year. Formulation and physical properties observations of soy lecithin liposome containing 4-n-butylresorcinol. In: AIP Conference Proceedings, 2016. AIP Publishing, 160005.
- Farnia, P., Velayati, A. A., Mollaei, S. and Ghanavi, J. (2017). Modified rifampin nanoparticles: Increased solubility with slow release rate. *International journal of mycobacteriology*, 6, 171.
- Hingmire, S., Oulkar, D. P., Utture, S. C., Ahammed Shabeer, T. P. and Banerjee, K. (2015). Residue analysis of fipronil and difenoconazole in okra by liquid chromatography tandem mass spectrometry and their food safety evaluation. *Food Chemistry*, 176, 145-151.

- Jiang, X., Sun, L., Qiu, J. J., Sun, X., Li, S., Wang, X., So, C. W. E. and Dong, S. (2013). A Novel Application of Furazolidone: Anti-Leukemic Activity in Acute Myeloid Leukemia. *PLoS ONE*, 8, e72335.
- Jin, X., Tang, S., Chen, Q., Zou, J., Zhang, T., Liu, F., Zhang, S., Sun, C. and Xiao, X. (2011). Furazolidone induced oxidative DNA damage via up-regulating ROS that caused cell cycle arrest in human hepatoma G2 cells. *Toxicology Letters*, 201, 205-212.
- Jin, X., Zhang, Y., Zhang, Z., Che, D. and Lv, H. (2016). Juglone loaded poloxamer 188/phospholipid mixed micelles evaluated in vitro and in vivo in breast cancer. *International Journal of Pharmaceutics*, 515, 359-366.
- Kalbáčková, M., Verdánová, M., Mravec, F., Halasová, T. and Pekař, M. (2014). Effect of CTAB and CTAB in the presence of hyaluronan on selected human cell types. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 460, 204-208.
- Khalil, R. A. and Al-hakam, A. Z. (2014). Theoretical estimation of the critical packing parameter of amphiphilic self-assembled aggregates. *Applied Surface Science*, 318, 85-89.
- Lanta, Q., Arveux, P. and Asselain, B. (2019). [Epidemiology and socio-cultural specificities of young women with breast cancer]. *Bull Cancer*, 106, S4-s9.
- Lewkowski, J., Rogacz, D. and Rychter, P. (2019). Hazardous ecotoxicological impact of two commonly used nitrofurantoin-derived antibacterial drugs: Furazolidone and nitrofurantoin. *Chemosphere*, 222, 381-390.
- Lu, Y. and Park, K. (2013). Polymeric micelles and alternative nanonized delivery vehicles for poorly soluble drugs. *International journal of pharmaceutics*, 453, 198-214.
- Ma, Y., Zhuang, Y., Xie, X., Wang, C., Wang, F., Zhou, D., Zeng, J. and Cai, L. (2011). The role of surface charge density in cationic liposome-promoted dendritic cell maturation and vaccine-induced immune responses. *Nanoscale*, 3, 2307-2314.
- Mahbub, S., Molla, M. R., Saha, M., Shahriar, I., Hoque, M. A., Halim, M. A., Rub, M. A., Khan, M. A. and Azum, N. (2019). Conductometric and molecular dynamics studies of the aggregation behavior of sodium dodecyl sulfate (SDS) and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) in aqueous and electrolytes solution. *Journal of Molecular Liquids*.
- Mandal, A., Bisht, R., Rupenthal, I. D. and Mitra, A. K. (2017). Polymeric micelles for ocular drug delivery: From structural frameworks to recent preclinical studies. *Journal of Controlled Release*, 248, 96-116.
- Meena, R., Kumar, S., Kumar, R., Gaharwar, U. S. and Rajamani, P. (2017). PLGA-CTAB curcumin nanoparticles: Fabrication, characterization and molecular basis of anticancer activity in triple negative breast cancer cell lines (MDA-MB-231 cells). *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94, 944-954.
- P.R, S., James, N. R., Kumar P.R, A. and K. Raj, D. (2016). Galactosylated alginate-curcumin micelles for enhanced delivery of curcumin to hepatocytes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 1-9.
- Pashirova, T. N., Zhukova, N. A., Lukashenko, S. S., Valeeva, F. G., Burilova, E. A., Sapunova, A. S., Voloshina, A. D., Mirgorodskaya, A. B., Zakharova, L. Y., Sinyashin, O. G. and Mamedov, V. A. (2019). Multi-targeted approach by 2-benzimidazolylquinoxalines-loaded cationic arginine liposomes against Cervical cancer cells in vitro. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 178, 317-328.



- Pellosi, D. S., Tessaro, A. L., Moret, F., Gaio, E., Reddi, E., Caetano, W., Quaglia, F. and Hioka, N. (2016). Pluronic® mixed micelles as efficient nanocarriers for benzoporphyrin derivatives applied to photodynamic therapy in cancer cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 314, 143-154.
- Salahuddin, N., Abdelwahab, M., Gaber, M. and Elneanaey, S. (2020). Synthesis and Design of Norfloxacin drug delivery system based on PLA/TiO<sub>2</sub> nanocomposites: Antibacterial and antitumor activities. *Materials Science and Engineering: C*, 108, 110337.
- Salatin, S. and Yari Khosroushahi, A. (2017). Overviews on the cellular uptake mechanism of polysaccharide colloidal nanoparticles. *Journal of cellular and molecular medicine*, 21, 1668-1686.
- Saxena, V. and Hussain, M. D. (2013). Polymeric mixed micelles for delivery of curcumin to multidrug resistant ovarian cancer. *Journal of biomedical nanotechnology*, 9, 1146-1154.
- Sokolova, V., Kozlova, D., Knuschke, T., Buer, J., Westendorf, A. M. and Epple, M. (2013). Mechanism of the uptake of cationic and anionic calcium phosphate nanoparticles by cells. *Acta Biomaterialia*, 9, 7527-7535.
- Wang, H., Lai, Y.-J., Chan, Y.-L., Li, T.-L. and Wu, C.-J. (2011). Epigallocatechin-3-gallate effectively attenuates skeletal muscle atrophy caused by cancer cachexia. *Cancer Letters*, 305, 40-49.
- Xie, M., Zhang, F., Liu, L., Zhang, Y., Li, Y., Li, H. and Xie, J. (2018). Surface modification of graphene oxide nanosheets by protamine sulfate/sodium alginate for anti-cancer drug delivery application. *Applied Surface Science*, 440, 853-860.
- Zhang, H. X., Du, G. H. and Zhang, J. T. (2004). Assay of mitochondrial functions by resazurin in vitro. *Acta Pharmacol Sin*, 25, 385-9.