



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

การศึกษาฤทธิ์ของสารวานิลลินต่อการป้องกันการตายของเซลล์ที่เกิดจาก ROS และผล
กระตุ้นการสมานบาดแผลในเซลล์ keratinocyte และ fibroblast

Protective effect of vanillin on ROS-induced cell death and wound healing
effect in keratinocyte and fibroblast cells

โดย

อาจารย์ ดร. ภาณุ ชุติมา สิ้นสืบผล

สนับสนุนโดย

สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต

2563

ชื่อเรื่อง : การศึกษาฤทธิ์ของสารวานิลลินต่อการป้องกันการตายของเซลล์ที่เกิดจาก ROS และผลกระตุ้นการสมานบาดแผลในเซลล์ keratinocyte และ fibroblast

ผู้วิจัย : ชุตติมา สิ้นสืบผล

สถาบัน : วิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต

ปีที่พิมพ์ : 2563

สถานที่พิมพ์ : มหาวิทยาลัยรังสิต

แหล่งที่เก็บรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ : มหาวิทยาลัยรังสิต

จำนวนหน้างานวิจัย : 26 หน้า

คำสำคัญ : เซลล์คีราติโนไซต์ เซลล์ไฟโบรบลาสต์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ การสมานแผล การเคลื่อนที่

ลิขสิทธิ์ : มหาวิทยาลัยรังสิต

บทคัดย่อ

รายงานการวิจัย เรื่อง การศึกษาฤทธิ์ของสารวานิลลินต่อการป้องกันการตายของเซลล์ที่เกิดจาก ROS และผลกระตุ้นการสมานบาดแผลในเซลล์ keratinocyte และ fibroblast เป็นการวิจัยทางห้องปฏิบัติการ (*in-vitro*) เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสาร vanillin ในการป้องกันการตายของเซลล์ผิวหนังชนิดคีราติโนไซต์และไฟโบรบลาสต์จากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาในเซลล์ไลน์ผิวหนังชนิด human keratinocyte (HaCaT) และ primary skin fibroblast โดยทำการทดสอบความเป็นพิษของสาร vanillin ต่อเซลล์ฮาแคทและไฟโบรบลาสต์ โดยวิธี MTT ทดสอบการตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิสโดยการย้อมสี acridine orange และ propidium iodide ทดสอบการเคลื่อนที่ของเซลล์โดยวิธี scratch wound healing ผลการวิจัย พบว่าสาร vanillin ที่ความเข้มข้น 0 – 500 μM ไม่มีพิษต่อเซลล์ฮาแคทและไฟโบรบลาสต์ สาร vanillin ที่ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (10, 25 และ 50 μM) ทำให้เซลล์ฮาแคทรอดชีวิตมากขึ้นจากการเหนี่ยวนำให้ตายด้วย H_2O_2 และยังพบว่าสาร vanillin ที่ความเข้มข้น 10, 25 และ 50 μM เพิ่มการเคลื่อนที่ของเซลล์ฮาแคทและไฟโบรบลาสต์ได้อีกด้วย โดยสรุป สาร vanillin สามารถป้องกันการตายของเซลล์ผิวหนังชั้นนอกชนิดฮาแคทจากสารประกอบที่มีออกซิเจนในโมเลกุล H_2O_2 ได้ และสาร vanillin สามารถเพิ่มการหายของบาดแผลได้ ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำสาร vanillin ไปพัฒนาต่อยอดเป็นเครื่องสำอางสำหรับลดการเกิดริ้วรอย เพื่อป้องกันผิวหนังเหี่ยวย่นได้

Researcher : Chutima Sinsuebpol

Institution : College of Pharmacy, Rangsit University

Year of Publication : 2020

Publisher: Rangsit University

Sources: Rangsit University

No. of pages : 26 pages

Keywords : keratinocyte, fibroblast, hydrogen peroxide, wound healing, migration

Copyrights: Rangsit University

Abstract

The research entitles “Protective effect of vanillin on ROS-induced cell death and wound healing effect in keratinocyte and fibroblast cells” is the *in-vitro* study to determine the protective effect of vanillin on H₂O₂-induced cell death on keratinocyte and fibroblast cells.

Human keratinocyte (HaCaT) and primary skin fibroblast cells were used in this study. The cytotoxicity of vanillin was examined by MTT assay. Apoptotic cell death was determined by acridine orange and propidium iodide staining. Cell migration was investigated by scratch wound healing assay. The results show that 0 – 500 µM vanillin has no cytotoxicity effect to HaCaT and fibroblast cells. This non-toxic concentration of vanillin (10, 25 and 50 µM) increased the viability of H₂O₂-induced HaCaT cell death. Furthermore, 10, 25 and 50 µM vanillin enhanced the migration of HaCaT and fibroblast cells. In conclusion, vanillin protected the H₂O₂-induced HaCaT cell death and exerts wound healing property. Vanillin should be developed to use as anti-aging in skincare product.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง การศึกษาฤทธิ์ผลของสารวานิลลินต่อการป้องกันการตายของเซลล์ที่เกิดจาก ROS และผลต่อกระตุ้นการสมานบาดแผลในเซลล์ keratinocyte และ fibroblast เป็นโครงการวิจัยที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต รหัสทุน 71/2561 ปี 2561 ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงต่อการสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ จากสถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต มา ณ ที่นี้

ชุตินา สินสืบผล

กรกฎาคม 2563



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูปภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
กรอบแนวคิดในการวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	10
กลุ่มตัวอย่าง	10
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	10
การเก็บรวบรวมข้อมูล	10
วิธีการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูล	10
บทที่ 4 ผลการวิจัย	13
บทที่ 5 สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ	22
สรุปผลการวิจัย	22
อภิปรายผล	22
ข้อเสนอแนะ	23
เอกสารอ้างอิง	24
ภาคผนวก	
ประวัติผู้วิจัย	26

สารบัญรูป

ภาพที่	หน้า
1. แสดงแหล่งของ ROS และสมดุลของระบบ	5
2. โครงสร้างของสารวานิลลิน	8
3. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (%cell viability) ของเซลล์ ผิวหนังฮาแคท และความเข้มข้นของสาร vanillin	13
4. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (%cell viability) ของเซลล์ ผิวหนังฮาแคท และความเข้มข้นของสาร hydrogen peroxide (H_2O_2)	14
5. การตายของเซลล์ฮาแคทหลังจากได้รับสาร vanillin ที่ความเข้มข้น 10 – 50 μM หลังจากการย้อมด้วยสี fluorescence ชนิด acridine orange และ propidium iodide	15
6. การรอดชีวิตของเซลล์ฮาแคทหลังจากได้รับสาร vanillin ที่ความเข้มข้น 10 – 50 μM และ H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 750 μM	16
7. การเคลื่อนที่ของเซลล์ฮาแคทหลังจากได้รับสาร vanillin ที่ความเข้มข้น 10 – 50 μM	17
8. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (%cell viability) ของเซลล์ ผิวหนังไฟโบรบลาสต์ และความเข้มข้นของสาร vanillin	18
9. การตายของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากได้รับสาร vanillin ที่ความเข้มข้น 10 – 50 μM หลังจากการย้อมด้วยสี fluorescence ชนิด acridine orange และ propidium iodide	19
10. การรอดชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากได้รับสาร vanillin ที่ความเข้มข้น 10 – 50 μM และ H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 750 μM	20
11. การเคลื่อนที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากได้รับสาร vanillin ที่ความเข้มข้น 10 – 50 μM	21

บทที่ 1

บทนำ

ความแก่ของผิวหนัง (skin aging) ซึ่งเกิดจากการทำงานของเซลล์ต่าง ๆ ในชั้นผิวหนังเสื่อมลง มีหลายสาเหตุที่นำไปสู่ความแก่หรือเสื่อมของผิวหนัง โดยเฉพาะการเกิดภาวะ oxidative stress หากเกิดขึ้นในระยะเวลาสั้นเพียงชั่วขณะนั้นจะไม่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพมากนัก หากภาวะดังกล่าวเกิดขึ้นเป็นเวลานานจะทำให้มีความเสี่ยงในการทำลายเนื้อเยื่อต่าง ๆ เช่น เยื่อหุ้มเซลล์ หรือ DNA ทำให้ผิวหนังสูญเสียความยืดหยุ่นและนำไปสู่การเกิดริ้วรอยที่ผิวหนังได้ โดยเฉพาะสารประกอบที่มีออกซิเจนในโมเลกุลหลายชนิดมีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆ สารประกอบออกซิเจนที่ไวต่อปฏิกิริยาเหล่านี้ หรือ reactive oxygen species (ROS) การเกิด ROS นั้นอาจมาจากการเผาผลาญอาหาร และสารต่าง ๆ ในร่างกาย กระบวนการสร้างพลังงาน การหายใจระดับเซลล์ กลไกการป้องกันตัวเองของร่างกายจากเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ รวมถึงรังสีอัลตราไวโอเล็ต หากร่างกายมีกระบวนการดังกล่าวที่มากเกินไป หรือการที่ร่างกายขาดสารต้านอนุมูลอิสระ (intrinsic antioxidant) จะทำให้มีการสะสมของ ROS มากขึ้น และทำให้เกิด oxidative stress ได้ ซึ่ง ROS มีผลทำให้เกิดริ้วรอยมากขึ้นอย่างช้า ๆ ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงของผิวหนังตามวัยที่จะเกิดขึ้นในทุกคน แม้ในปัจจุบันเทคโนโลยีทางการแพทย์ก้าวหน้าไปอย่างไม่หยุดยั้งในเรื่องของการรักษา ริ้วรอยที่เกิดขึ้นแต่ทั้งหมดเป็นล้วนเป็นการรักษา ริ้วรอยแบบการเกิดความบาดเจ็บต่อร่างกายและมีค่าใช้จ่ายสูง ถ้ามีวิธีป้องกัน รักษา และชะลอการเกิดริ้วรอยบนผิวหนังที่ทำให้ร่างกายไม่บาดเจ็บและลดค่าใช้จ่ายน่าจะเป็นทางเลือกที่ดีสำหรับการแก้ปัญหา ริ้วรอยบนผิว ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงจะศึกษาฤทธิ์ในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง (cell-based assay) 2 ชนิด ได้แก่ เซลล์ผิวหนังคีราติโนไซต์ และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร vanillin เพื่อตรวจสอบว่าสาร vanillin สามารถป้องกันการตายของเซลล์คีราติโนไซต์ และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ที่เกิดจากสารประกอบที่มีออกซิเจนในโมเลกุล โดยจะศึกษาสารที่ทำให้เกิด ROS คือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) นอกจากนั้นยังศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผลโดยใช้แบบจำลองการหายของบาดแผล (*in vitro* wound healing model) ของสาร vanillin ด้วยวิธี scratch assay

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ความชราของผิวหนัง (skin aging) เป็นปัญหาที่เกิดจากการทำงานของเซลล์ต่าง ๆ ในชั้นผิวหนังเสื่อมลง การเปลี่ยนแปลงของผิวหนังตามวัยที่จะเกิดขึ้นในทุกคน ที่สำคัญมีสารประกอบที่มีออกซิเจนในโมเลกุลเข้ามาเกี่ยวข้อง ซึ่งสารประกอบที่มีออกซิเจนในโมเลกุล หมายถึง สารก่อปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยอะตอมออกซิเจน (Reactive oxygen species, ROS) โดย ROS สามารถแบ่งตามลักษณะของการเป็น radical ของโมเลกุลได้ 2 ชนิด ชนิดแรกอยู่ในรูปของอนุมูลอิสระ (free radical) เช่น oxygen radical ($O_2\cdot$),

superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radical ($OH^{\cdot}$) ชนิดที่สองเป็นสารประกอบโมเลกุลที่อยู่ในรูป non-radical แต่จะมีคุณสมบัติที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา oxidation เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) การเกิด ROS นั้นอาจมาจากการเผาผลาญอาหาร สารต่าง ๆ กระบวนการสร้างพลังงาน การหายใจระดับเซลล์รวมไปถึงเกิดขึ้นในกลไกการป้องกันตัวเองของร่างกายจากเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ หากร่างกายมีกระบวนการดังกล่าวที่มากเกินไป หรือการที่ร่างกายขาดสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้มีการสะสมของ ROS มากขึ้นและทำให้เกิดภาวะเครียดที่เกิดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) ภาวะ oxidative stress หากเกิดขึ้นในระยะเวลาสั้นเพียงชั่วขณะนั้นจะไม่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพมากนัก หากภาวะดังกล่าวเกิดขึ้นเป็นเวลานานจะทำให้มีความเสี่ยงในการทำลายเนื้อเยื่อต่าง ๆ เช่น เยื่อหุ้มเซลล์ หรือ DNA ทำให้ผิวหนังสูญเสียความยืดหยุ่นและนำไปสู่การเกิดริ้วรอยได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงจะทำการศึกษาผลของสาร vanillin ต่อการป้องกันการตายของเซลล์ผิวหนังชั้นนอกและผิวหนังแท้ที่เกิดจากสารประกอบที่มีออกซิเจนในโมเลกุล โดยจะทำการศึกษาสารที่ทำให้เกิด ROS คือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิด hydroxyl radical และศึกษาผลของสาร vanillin ต่อการหายของบาดแผล ซึ่งทั้งหมดล้วนแต่เป็นสาเหตุสำคัญในขบวนการเกิดริ้วรอยอันเป็นต้นเหตุของผิวหนังเหี่ยวย่น โดยความรู้ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ถึงการนำสาร vanillin ไปใช้ในอุตสาหกรรมเวชสำอางหรือการรักษาความผิดปกติของผิวหนังได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของสาร vanillin ต่อการป้องกันการตายของเซลล์ผิวหนังชนิดเซลล์คีราติโนไซด์และเซลล์ไฟโบรบลาสต์จาก ROS
2. เพื่อศึกษาผลของสาร vanillin ต่อการเพิ่มการเคลื่อนที่ของเซลล์ผิวหนังชนิดเซลล์คีราติโนไซด์และเซลล์ไฟโบรบลาสต์

ขอบเขตของการวิจัย

ทำการศึกษถึงผลของสาร vanillin ต่อการกระตุ้นการหายของบาดแผลและผลของสาร vanillin ต่อการป้องกันการตายของเซลล์ผิวหนังจาก ROS ชนิด H_2O_2 ในเซลล์คีราติโนไซด์ที่และเซลล์ไฟโบรบลาสต์

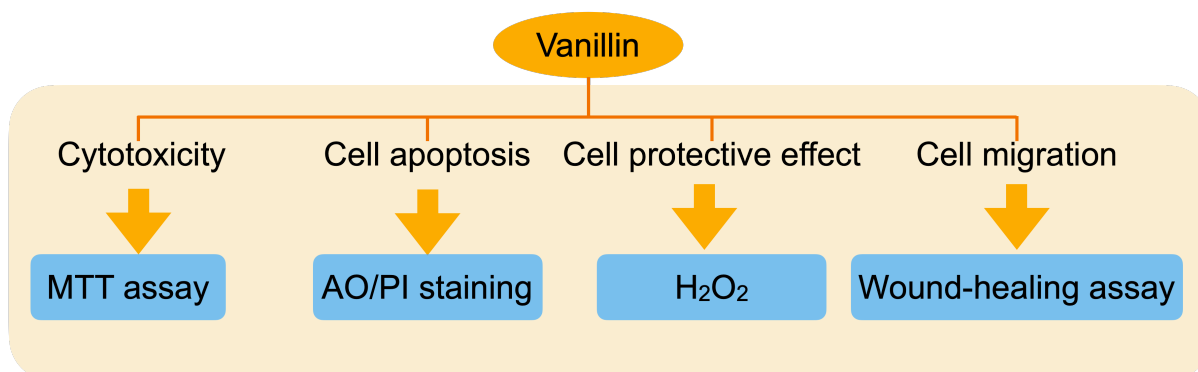
ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ทำการศึกษาในเซลล์ไลน์ 2 ชนิด คือ human keratinocyte (HaCaT) และ primary skin fibroblast (ATCC® CRL 2097, USA)

ระยะเวลาที่ดำเนินการวิจัย

12 เดือน

กรอบแนวคิดในการวิจัย



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

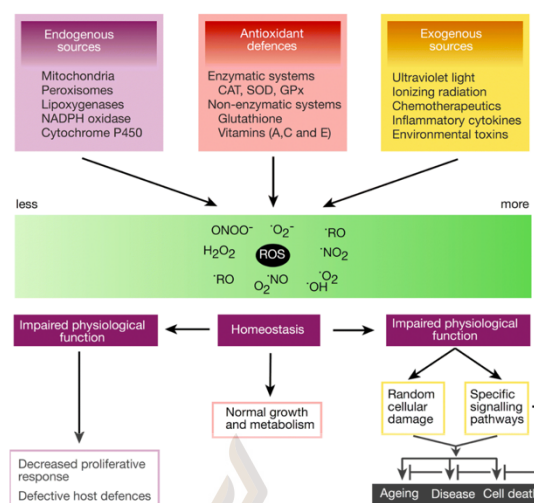
1. การนำสาร vanillin ไปใช้ในการป้องกันหรือชะลอการเกิดริ้วรอยรวมถึงการรักษาความผิดปกติของผิวหนังได้
2. การนำสาร vanillin ไปใช้ในการกระตุ้นการหายของบาดแผลทั้งทางด้านเครื่องสำอางและการรักษาความผิดปกติของผิวหนังได้
3. ได้องค์ความรู้ใหม่เรื่องการออกฤทธิ์ในการป้องกันการตายของเซลล์ผิวหนังของสาร vanillin
4. สามารถตีพิมพ์ในเอกสารทางวิชาการ (technical paper)
5. กลุ่มเป้าหมายที่จะได้รับประโยชน์คือผู้ประกอบการด้านเครื่องสำอาง

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เมื่อมีบาดแผล หรือการติดเชื้อบริเวณเนื้อเยื่อชั้นหนังกำพร้า (epidermis) ลูกกลามจนเกิดการอักเสบ จะทำให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น แลנגเกอร์ฮานเซลล์ (langerhans cells) เดนไดรติกเซลล์ (dendritic cells) เซลล์แมคโครฟาจ เม็ดเลือดขาวชนิดบีและชนิดที (B and T cells) พลาสมาเซลล์ (plasma cells) และแนทเชอรอลคิลเลอร์เซลล์ (natural killer cells ; NK cells) ถูกหลั่งออกมาเพื่อต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยจะไปมีผลในการกระตุ้นนิวโทรฟิลล์ (neutrophils) ให้ทำลายแบคทีเรีย (Nestle et al., 2009) ควบคู่ไปกับ ขบวนการผลิตไซโตไคน์ (cytokines) ที่จะไปกระตุ้น Toll-likereceptor 2 เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของ แบคทีเรีย (Kupper et al., 2004; Kobayashi et al., 2015) ซึ่งกระบวนการเหล่านี้จะกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระ (free radical) และอนุมูลที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาออกซิเจน (reactive oxygen species: ROS) เพิ่มขึ้น ซึ่งในสภาวะปกติร่างกายจะมีเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น เอนไซม์คะตะเลส (catalase) กลูตาไธโอนเพอรอกซิเดส (glutathione peroxidase) และซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) ซึ่งมีหน้าที่คอยควบคุมอนุมูลอิสระต่าง ๆ ให้อยู่ในระดับพอเหมาะ แต่ถ้าเมื่อใดที่มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในปริมาณมากเกินไปที่ระบบป้องกันจะยับยั้งได้ จะทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า “oxidative stress” ขึ้น ซึ่งจะสะสมมากขึ้นและก่อให้เกิดกระบวนการอักเสบ ทำอันตรายต่ออวัยวะและเนื้อเยื่อ รวมถึงทำให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์ในรูปแบบต่างๆ เช่น apoptosis (Swindle et al., 2015)

อนุมูลอิสระ (free radical) คือ อะตอม โมเลกุล หรือ สารประกอบที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวและไม่เสถียร จึงพยายามหาอิเล็กตรอนจากสารชีวโมเลกุลอื่นมาจับคู่เพื่อความเสถียร ทำให้เกิดความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุล ต่าง ๆ มีผลทำให้คุณสมบัติการทำงานของสารชีวโมเลกุลเปลี่ยนไป เกิดความบกพร่องของเซลล์ หรือทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย เซลล์แตกออกง่ายและตายในที่สุด โดยอนุมูลอิสระแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive oxygen species; ROS) กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive nitrogen species; RNS) และกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive chlorine species; RCS) โดยปกติในร่างกายระดับเซลล์ของมนุษย์มีอนุมูลอิสระในปริมาณน้อย ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณต่อเซลล์ ทำให้ร่างกายมีกลไกควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้สมดุลเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดอันตราย หากกลไกเหล่านี้เกิดความผิดปกติจะส่งผลให้ไม่สามารถควบคุมสมดุลของอนุมูลอิสระได้ และนำไปสู่สภาวะที่มีอนุมูลอิสระมากเกินไปจนสมดุลอันเป็นต้นเหตุทำให้เกิดโรคได้ ดังแสดงในรูปที่ 1.



รูปที่ 1 แสดงแหล่งของ ROS และสมดุลของระบบ (Li et al., 2013)

นอกจากนี้อนุมูลอิสระยังเป็นสาเหตุของการอักเสบ และถ้าเพิ่มการกระจายของเชื้อเข้าสู่ร่างกายทำให้ภูมิคุ้มกันบกพร่องและลดลง เซลล์เสื่อมหมดสภาพโดยเร็ว ในกรณีที่ร่างกายติดเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรีย และได้รับยา หรือสารเคมี หรือรังสี จนทำให้มีการอักเสบ เซลล์ทั่วไปจะตอบโต้โดยการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระหรือแอนติออกซิแดนท์ (antioxidant) ที่มีอยู่ในร่างกายมายับยั้ง หรือทำปฏิกิริยาจนทำให้อนุมูลอิสระในร่างกายลดลง แต่ถ้าปฏิกิริยาการทำลายเกิดขึ้นต่อเนื่องจนกระทั่งเซลล์ขาดกลไกหรือหมดประสิทธิภาพในการป้องกันอนุมูลอิสระ จะทำให้เกิดความไม่สมดุลในร่างกายจนทำให้เซลล์ตายในที่สุด หรือถ้าอนุมูลอิสระของออกซิเจนในร่างกายมีปริมาณมากจนร้ายกายขาดสมดุล ก็จะมีปริมาณของเสียที่เกิดจากปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันในเลือดสูงขึ้น สารต้านอนุมูลอิสระจะลดปริมาณลงจนทำให้ร่างกายไม่สามารถผลิตสารต้านอนุมูลอิสระได้ทัน

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือสารที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยา oxidation ด้วยเหตุที่ ROS เกิดขึ้นมาจากกระบวนการต่างๆในการดำรงชีวิต ดังนั้นร่างกายจึงต้องสร้างสารต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาเพื่อกำจัดและลดความรุนแรงของ ROS ที่เกิดขึ้นด้วย เช่น co-enzyme Q10 alpha-lipoic acid เป็นต้น โดยปกติแล้วการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายนั้นมีอย่างเพียงพอต่อการเกิดอนุมูลอิสระขึ้น ภายในร่างกาย แต่หากมีสภาวะผิดปกติในร่างกาย เช่น ความเครียด การนอนติดต่อกันนานๆ การรับประทานยาที่มีผลลด antioxidant enzyme หรือสภาวะโรคต่างๆ ก็อาจจะทำให้การสร้างอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นจนเสียสมดุลระหว่าง antioxidant และ อนุมูลอิสระเกิดเป็นภาวะ oxidative stress อนุมูลอิสระที่ไม่ได้ถูกกำจัดจะไปทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อทำให้เป็นต้นเหตุของการเกิดโรคต่างๆได้ เช่น เป็นต้นเหตุของ

ภาวะหลอดเลือดอุดตัน มะเร็ง Parkinson รวมถึงอาการอักเสบต่างๆ จะเห็นได้ว่าสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายนั้นมีความสำคัญในการป้องกันการเกิดโรคและความเสื่อมของร่างกายเป็นอย่างมาก

นอกจากการไปจับกับอนุมูลอิสระแล้วสารต้านอนุมูลอิสระยังมีคุณสมบัติอื่นๆร่วมด้วยเช่น ช่วยป้องกันการเกิดขึ้นของ ROS จับกับ ROS ที่เกิดขึ้นก่อนที่ ROS นั้นจะไปทำอันตรายเนื้อเยื่อต่างๆ รวมทั้งเพิ่มการแสดงออกของยีนที่ใช้สร้าง antioxidant enzyme และช่วยในการฟื้นฟูความเสียหายของเซลล์หรือเนื้อเยื่อจากการถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระ

กลไกการต้านอนุมูลอิสระ

1. Free radical scavenging สารต้านอนุมูลอิสระจะให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระและทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียรมากขึ้น เมื่อสารต้านอนุมูลอิสระได้ให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนไปแล้ว จะเกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ซึ่งมีความรุนแรงน้อยกว่าอนุมูลอิสระเดิม หรืออาจไปรวมตัวกับอนุมูลอิสระอีกโมเลกุลหนึ่งเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่เสถียร หรือมีสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่นๆมาให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนเพื่อเกิดผลิตภัณฑ์ที่เสถียร

2. Singlet oxygen quenching (1O_2) ออกฤทธิ์โดยไปยับยั้งการทำงานของ singlet oxygen โดยการเปลี่ยน 1O_2 ให้ไปอยู่ในรูป triplet oxygen (3O_2) และปล่อยพลังงานที่ได้รับ ออกไปในรูปความร้อน

3. Metal chelating โลหะหนักเช่น Fe^{2+}/Fe^{3+} และ Cu^{2+} มีผลเร่งให้เกิดปฏิกิริยา oxidation ในร่างกายซึ่งโลหะหนักดังกล่าวจะไปเร่งการเกิดอนุมูลอิสระหลายประเภทเช่น peroxy radical, hydroxyl radical และ alkyl radical รวมถึง singlet oxygen ดังนั้นการที่มีสารไปจับกับโลหะหนักเหล่านี้จะช่วยชะลอการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายได้

4. ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (enzyme inhibitor) สารประกอบฟีนอลิก (phenolics) บางชนิด เช่น flavonoids, phenolic acid และ gallates สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ lipoxygenase โดยสามารถเข้าจับกับไอออนของเหล็กซึ่งเป็น cofactor ส่งผลให้เอนไซม์ดังกล่าวไม่สามารถทำงานได้

Reactive oxygen species (ROS) และภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidative stress)

1. Reactive oxygen species (ROS) คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบและมีความไวในการทำปฏิกิริยาต่อสารอื่น โดยทั่วไป pro-oxidant จะหมายถึง ROS ซึ่งประกอบด้วย 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มที่เป็นอนุมูล (radicals) และกลุ่มที่ไม่ใช้อนุมูล (nonradical) โดยกลุ่มที่เป็นอนุมูลจะมีอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่ (unpaired electron) อย่างน้อย 1 ตัวอยู่ที่ชั้นนอกสุด ทำให้มีความไวในการทำปฏิกิริยากับสารอื่น โดยการให้หรือรับอิเล็กตรอนเพื่อให้ตัวมันเองมีความเสถียร ตัวอย่างเช่น superoxide ion radical ($O_2^{\cdot-}$),

hydroxyl radical (OH^*) และ peroxyl radical (ROO^*) ส่วนกลุ่มที่ไม่ใช่อนุมูล เช่น hydrogen peroxide (H_2O_2) และ organic peroxide (ROOH) เป็นต้น

การเกิด ROS สามารถเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุทั้งจากแหล่งภายนอกในร่างกาย เช่น รังสี อาหาร ยา มลพิษ สิ่งแปลกปลอม (xenobiotics) และ จุลชีพ หรือเกิดจากภายในร่างกาย เช่น เซลล์ เอ็นไซม์ที่ทำหน้าที่ในการสร้าง ROS ทั้งทางตรงและทางอ้อม กระบวนการหายใจโดยไมโทคอนเดรีย (mitochondria respiration) โลหะทรานสิชัน (transition metal) รวมทั้งความผิดปกติของร่างกายและโรคต่างๆ

2. ภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidative stress)

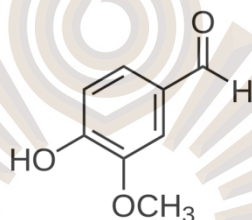
Redox reaction หรือ ปฏิกิริยา oxidation – reduction เป็นปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นทั่วไปในร่างกาย โดยปฏิกิริยา oxidation หมายถึง ปฏิกิริยาที่โมเลกุล หรืออะตอมมีการสูญเสีย อิเล็กตรอน และ ปฏิกิริยา reduction หมายถึง ปฏิกิริยาที่โมเลกุล หรืออะตอมได้รับอิเล็กตรอน โดยเรียกตัวที่ให้อิเล็กตรอนว่า reducing agent หรือ reductant และเรียกตัวรับอิเล็กตรอนว่า oxidizing agent หรือ oxidant โดยในทางชีววิทยาจะเรียก reductant ว่า antioxidant (สารต้านออกซิเดชัน) และเรียก oxidant ว่า pro-oxidant (Prior and Cao, 1999) ในร่างกายของสิ่งมีชีวิตตามปกติจะมีการควบคุมสมดุลระหว่าง oxidant และ reductant ในสภาวะที่ร่างกายมีปริมาณ oxidant มากกว่า reductant จะเกิดภาวะ oxidative stress ซึ่งทำให้เกิดความเสียหาย (oxidative damage) ตามมา (Kohen and Nyska, 2002) โดย oxidant ในที่นี้จะหมายถึง reactive oxygen species (ROS) ซึ่งจะเข้าทำปฏิกิริยากับชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น ไขมัน โปรตีน และยังเป็นสาเหตุทำให้ดีเอ็นเอถูกทำลาย ซึ่งอาจนำไปสู่การเกิดการหยุดวงจรชีวิตของเซลล์ และการตายของเซลล์ (cell cycle arrest and apoptosis)

กลไกต่อต้านภาวะ oxidative stress ของร่างกาย

ร่างกายมีกลไกต่อต้านภาวะ oxidative stress ได้แก่ กลไกในการซ่อมแซม เช่น กระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอ (Dizdaroglu et al., 2002) กลไกในการป้องกันการเกิด ROS (Kohen and Gati, 2000) เช่น การเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ xanthine oxidase และกลไกทางกายภาพ เช่น วิตามินอี (tocopherol) ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แข็งแรงมากขึ้นนอกจากนี้ยังมีกลไกของสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ได้แก่ กลุ่มเอนไซม์ที่ช่วยลดปริมาณ ROS ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase และสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ได้แก่ uric acid, glutathione, tocopherol, carotenes, ascorbic acid และสารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenol compounds) (Kohen and Nyska, 2002)

วานิลลิน (Vanillin) หรือ 4-ไฮดรอกซี-3-เมททอกซีเบนซัลดีไฮด์ (4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyde)

เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ในธรรมชาติสามารถสกัดได้จากฝักรวานิลลา (*Vanilla planifolia*) (Bezerra et al., 2016) มีสูตรโมเลกุลคือ $C_8H_8O_3$ ส่วนที่เป็น functional group คือ อัลดีไฮด์ (aldehyde) อีเทอร์ (ether) และ แอลกอฮอล์ (alcohol) ในปัจจุบัน vanillin ที่ถูกนำมาใช้ได้มาจากการบวนการสังเคราะห์ เนื่องจากวานิลลิน ที่ได้จากธรรมชาติมีราคาแพงมาก การสังเคราะห์วานิลลินเพื่อการค้าครั้งแรกตั้งต้นจากยูจีนอล (eugenol) เมื่อผ่านกระบวนการ “ไอโซเมอไรเซชัน” จะได้ ไอโซยูจีนอล (isoeugenol) และตามด้วยกระบวนการ “ออกซิเดชัน” จะได้วานิลลิน สำหรับกระบวนการสังเคราะห์วานิลลินในปัจจุบันได้จากปฏิกิริยาไรเมอร์-ไทมานน์ (Reimer-Tiemann reaction) วานิลลินสังเคราะห์มักนำมาใช้เป็นสารแต่งกลิ่นใน อาหาร เครื่องดื่ม และยา



รูปที่ 2 โครงสร้างของสารวานิลลิน

วานิลลินจัดเป็นสารประกอบในกลุ่มโพลีฟีนอลิก (polyphenolic compounds) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระต่างๆไม่ให้ไปกระตุ้นหรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยการให้อนุมูล H^+ แก่อนุมูลอิสระเหล่านั้น (Van Acker et al., 2000) นอกจากนี้สารประกอบ polyphenols ที่มีโครงสร้างของ ortho-dihydroxyl phenol อยู่ในโมเลกุลยังสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูล OH^+ ในปฏิกิริยาที่มีอนุมูลโลหะทรานซิชันคือ Fe^{2+} และ Cu^{2+} เป็นตัวเหนี่ยวนำโดยการเข้าจับกับโลหะดังกล่าวเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (complex) ได้อีกด้วย (Sanchez-Moreno et al., 2000) นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของวานิลลิน ได้แก่ ฤทธิ์ในการลดน้ำตาล ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (Tai et al., 2011) ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Yemis, et al., 2011) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชัน โดยที่ความเข้มข้น 2.5 mmol/L พบว่าสามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีนและไขมันที่ไม่โตคอนเดรียของตับได้ มีการศึกษาผลของวานิลลินต่อการเพิ่มจำนวนและกระตุ้นการส่งสัญญาณในเซลล์ผิวหนังมนุษย์ชนิดเคอราติโนไซต์ (keratinocyte) และการรอดชีวิตของเซลล์โดยการวิเคราะห์ด้วย 3-(4,5-dimethylthiazol-2-

yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide พบว่าวานิลลินไม่มีพิษต่อเซลล์ สามารถสร้างและซ่อมแซมเซลล์ผิวหนังได้ (Zhao, et al., 2017)

โดยมีการวิจัยที่เป็นหลักฐานเชิงประจักษ์พบว่าสารฟีนอลิกในวานิลลินสามารถช่วยป้องกันเซลล์จากการถูกทำลายด้วยภาวะเครียดออกซิเดชัน (Bezerra et al., 2016) รวมทั้งในทางอุตสาหกรรมวานิลลินยังใช้เป็นสารต้านการเกิดฟอง (antifoaming agent) ใช้ในตำรับยาน้ำเพื่อลดการเกิดฟองในตำรับ (Kaur & Chakraborty, 2013)



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. กลุ่มตัวอย่าง

เซลล์ไลน์ 2 ชนิด คือ human keratinocyte (HaCaT) และ primary skin fibroblast (ATCC® CRL 2097, USA)

2. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. Cell culture CO₂ incubator
2. Lamina air flow hood
3. Inverted microscope
4. Microcentrifuge
5. Autoclave
6. Fluorescence microscope
7. Water bath

3. การเก็บรวบรวมข้อมูล

ทำการวิจัยในห้องปฏิบัติการ cell culture

4. วิธีการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูล

- 4.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT และ skin fibroblast cell ของสาร vanillin โดยวิธี MTT assay

การทดสอบความเป็นพิษของสาร vanillin โดยใช้เซลล์ HaCaT และ fibroblast มีวัตถุประสงค์ในการคัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมของสาร Vanillin ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง HaCaT และ fibroblast และเพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์อื่น ๆ ในเซลล์ผิวหนัง HaCaT และ fibroblast ต่อไป โดยเตรียมเซลล์ HaCaT และ fibroblast ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ที่มีอาหารเพาะเลี้ยง บ่มในตู้อบแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเป็นอาหารเพาะเลี้ยงที่ผสมสาร vanillin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นำไปบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเติมสารละลาย MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium

bromide) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มต่อเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำสารละลาย MTT ออกและละลายผลึกฟอร์มาซาน (formazan crystal) ด้วยสารละลาย DMSO (Dimethyl Sulfoxide) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้มาแปลผลเป็นร้อยละของการรอดชีวิตของเซลล์ (% cell viability) โดยร้อยละของการรอดชีวิตของเซลล์จะเท่ากับค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่สาร vanillin ต่อดังกล่าวการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุมไม่ใส่สารทดสอบใด ๆ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ (triplicate) การคำนวณหาร้อยละของการรอดชีวิตของเซลล์ดังสมการ

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{A570 of treatment}}{\text{A570 of control}} \times 100$$

A570 of treatment คือค่าการดูดกลืนแสงของชุดที่ผสมสาร Vanillin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

A570 of control คือค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุมที่ไม่ใส่สารทดสอบใด ๆ

4.2 ผลการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสของสาร vanillin ในเซลล์ HaCaT และ fibroblast

โดยดูการตายของเซลล์ด้วยการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ acridine orange และสี propidium iodide บันทึกภาพด้วย fluorescent microscope และทำการนับจำนวนเซลล์ที่ตายแบบอะพอพโทซิส (Phiboonchaiyanan, Kiratipaiboon, & Chanvorachote, 2016) ซึ่งเป็นการทดสอบความเป็นพิษของสาร vanillin โดยใช้เซลล์ HaCaT และ fibroblast มีวัตถุประสงค์ในการคัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมของสาร Vanillin ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง HaCaT และ fibroblast และ สนับสนุนผลข้อที่ 4.1

4.3 ศึกษาฤทธิ์ของสาร vanillin ต่อการป้องกันเซลล์ผิวหนังจาก ROS

4.3.1 การหาความเข้มข้นของ ROS ที่เหมาะสมต่อการทดสอบเซลล์ HaCaT และ fibroblast

การหาความเข้มข้นของ ROS ที่เหมาะสม มีวัตถุประสงค์เพื่อนำไปทดสอบการป้องกันการตายของเซลล์ HaCaT และ fibroblast จากการเหนี่ยวนำด้วย ROS ได้แก่ H_2O_2 เตรียมเซลล์ HaCaT และ fibroblast cell lines ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม จำนวน 1×10^4 เซลล์ต่อหลุม บ่มนาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเป็นอาหารเพาะเลี้ยงที่ผสมสารละลาย H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในเซลล์เพาะเลี้ยงแต่ละหลุม บ่มต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนเซลล์กลุ่มควบคุมจะเติมอาหารเพาะเลี้ยงในปริมาณที่เท่ากัน ทำการประเมินการรอดชีวิตของเซลล์โดยวิธี MTT assay แปลผลเป็นเปอร์เซ็นต์ของการรอดชีวิตของเซลล์ โดยคำนวณเปอร์เซ็นต์ของการรอดชีวิตของเซลล์กลุ่มที่ได้รับ

H_2O_2 เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารทดสอบใด ๆ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คัดเลือกความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่ให้เซลล์เหลือรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ เพื่อนำมาศึกษาต่อไป

4.3.2 ศึกษาผลของสาร vanillin ต่อการรอดชีวิตของเซลล์ HaCaT และ fibroblast จาก ROS

ศึกษาหาความเข้มข้นและระยะเวลาของการบ่มสาร Vanillin ที่เหมาะสมต่อการป้องกันการตายของเซลล์ เตรียมเซลล์ HaCaT และ fibroblast ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม จำนวน 1×10^4 เซลล์ต่อหลุม บ่มนาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเป็นอาหารเพาะเลี้ยงที่ผสมสาร vanillin โดยใช้ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และกลุ่มควบคุมที่ไม่ผสมใส่สารใด ๆ หลังจากบ่มจึงเติม H_2O_2 ความเข้มข้นที่ได้จากการศึกษาในข้อ 4.2.1 บ่มต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการประเมินการรอดชีวิตของเซลล์โดยวิธี MTT assay แปลผลเป็นเปอร์เซ็นต์ของการรอดชีวิตของเซลล์ โดยคำนวณเปอร์เซ็นต์ของการรอดชีวิตของเซลล์กลุ่มที่ได้รับ H_2O_2 อย่างเดียวเทียบกับกลุ่มที่ใส่สาร vanillin ร่วมกับ H_2O_2 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารใด ๆ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

4.4 การศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผลในหลอดทดลอง (*in vitro*) ของสาร vanillin

การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผลโดยใช้แบบจำลองการหายของบาดแผล (*in vitro* wound healing model) ของสาร vanillin ด้วย วิธี Scratch assay เป็นการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด HaCaT และ fibroblast โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมิน ประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเติบโต และเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมบาดแผล รวมถึงการหายของบาดแผลใน *in vitro* wound healing model

4.5 ประชากร

ทำการศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยใช้เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงชนิดคิราติโนไซด์และไฟโบรบลาสต์ ทุกการศึกษาจะใช้จำนวนตัวอย่างมากกว่าหรือเท่ากับ 3

4.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

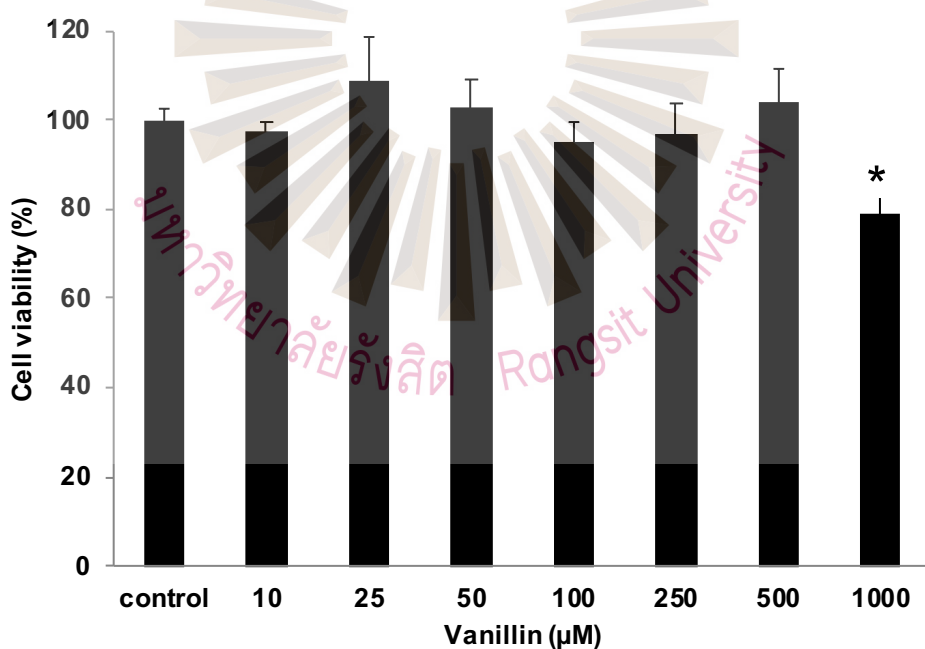
ข้อมูลผลการทดลองทั้งหมดแสดงโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา คือ mean $\pm$ standard deviation (โดยวิเคราะห์ผลแบบ triplicate) สถิติในการวิเคราะห์ข้อมูลคือ one-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($\alpha = 0.05$) และใช้ Post hoc test ในการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างข้อมูลในแต่ละกลุ่ม โดยใช้โปรแกรม SPSS

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

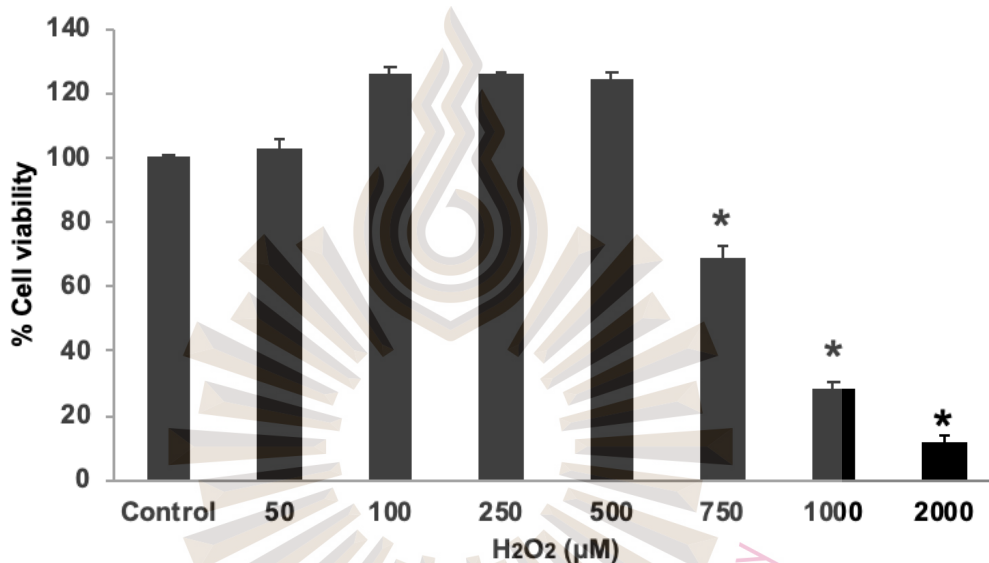
1. ผลของสาร vanillin และ hydrogen peroxide (H_2O_2) ต่อการรอดชีวิตเซลล์ผิวหนังฮาแคท โดยทำการศึกษาความเป็นพิษของสาร vanillin และ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยการใช้การวัดการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยวิธี MTT เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม สำหรับใช้ในการทดสอบฤทธิ์อื่น ๆ ต่อไป

- 1.1 ผลวิจัยพบว่าสาร vanillin ที่ความเข้มข้น 10 – 500 μM ไม่มีผลทำให้เซลล์ผิวหนังฮาแคทลดจำนวนลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร vanillin แต่ที่ความเข้มข้น 1000 μM ทำให้จำนวนเซลล์ผิวหนังฮาแคทที่รอดชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 3) ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกสาร vanillin ที่ความเข้มข้น 0 – 50 μM สำหรับการศึกษาต่อไป



รูปที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (%cell viability) ของเซลล์ผิวหนังฮาแคท และความเข้มข้นของสาร vanillin ที่ความเข้มข้น 10 – 1000 μM จากการทดสอบด้วย MTT assay (* p -value < 0.05)

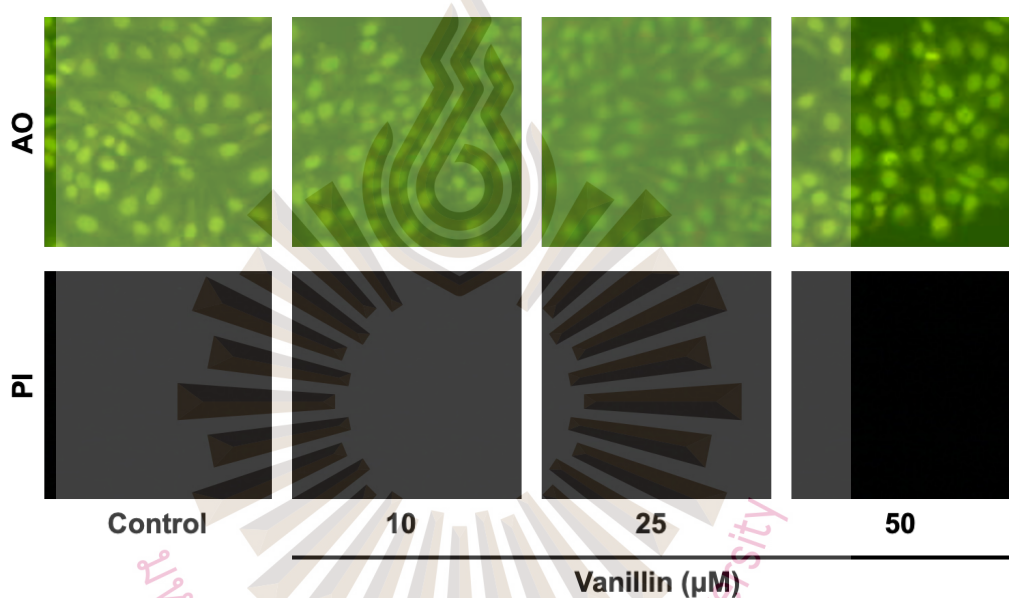
1.2 การทดสอบความเป็นพิษของสาร H_2O_2 (50 – 2000 μM) ต่อเซลล์ผิวหนังห่านาแคท ผลการศึกษาพบว่า สาร H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 50 – 500 μM ไม่มีพิษต่อเซลล์ผิวหนังห่านาแคท แต่ที่ความเข้มข้น 750 – 2000 μM ทำให้จำนวนเซลล์ผิวหนังห่านาแคทที่รอดชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4) ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ของ H_2O_2 ที่ 750 μM เพื่อทำการทดสอบฤทธิ์ของสาร vanillin ในการป้องกันการตายของเซลล์ผิวหนังห่านาแคทต่อไป



รูปที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (%cell viability) ของเซลล์ผิวหนังห่านาแคท และความเข้มข้นของสาร hydrogen peroxide (H_2O_2) ที่ความเข้มข้น 50 – 2000 μM จากการทดสอบด้วย MTT assay (* p -value < 0.05)

2. ผลต่อการตายของเซลล์ผิวหนังหยาบคาย ของสาร vanillin ที่ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยการวัดการตายของเซลล์แบบ apoptosis และ necrosis โดย การย้อมสี fluorescence ชนิด acridine orange และ propidium iodide เพื่อยืนยันว่าความเข้มข้นที่ใช้ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ สำหรับใช้ในการทดสอบฤทธิ์อื่น ๆ ต่อไป

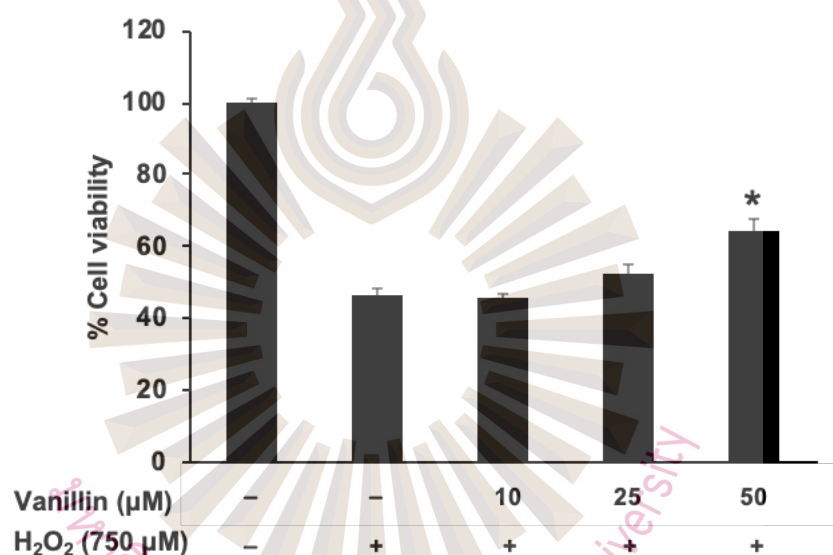
ผลวิจัยพบว่าสาร vanillin ที่ความเข้มข้น 10, 25 และ 50 μM ไม่มีผลทำให้เซลล์ผิวหนังหยาบคายตายแบบ apoptosis และ necrosis เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร vanillin (รูปที่ 5) ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกสาร vanillin ที่ความเข้มข้น 10, 25 และ 50 μM สำหรับการศึกษาต่อไป



รูปที่ 5 การตายของเซลล์ผิวหนังหยาบคายหลังจากได้รับสาร vanillin ที่ความเข้มข้น 10 – 50 μM หลังจากการย้อมด้วยสี fluorescence ชนิด acridine orange และ propidium iodide

3. ผลป้องกันการตายของเซลล์ฮาแคทจาก hydrogen peroxide (H_2O_2) ของสาร vanillin โดยการใช้การวัดการรอดชีวิตของเซลล์ โดยวิธี MTT

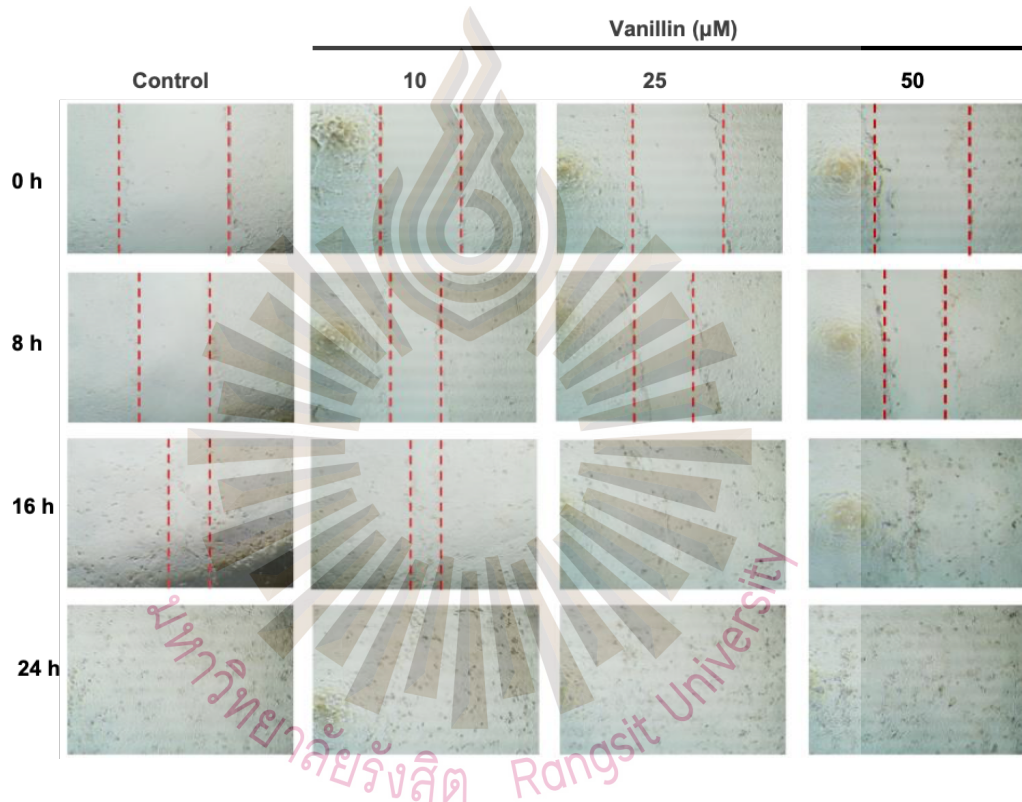
ผลวิจัยพบว่า H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 750 μM ทำให้เซลล์ตาย โดยพบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ฮาแคทเท่ากับ 46% การให้สาร vanillin ที่ความเข้มข้น 10, 25 และ 50 μM เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะให้ H_2O_2 ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ฮาแคทมากขึ้น โดยพบการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ H_2O_2 อย่างเดียวที่ vanillin ความเข้มข้น 50 μM (รูปที่ 6) ดังนั้น จากผลการวิจัยนี้สรุปได้ว่าสาร vanillin ที่ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ฮาแคท ปกป้องการตายของเซลล์จาก H_2O_2 ได้



รูปที่ 6 การรอดชีวิตของเซลล์ฮาแคทหลังจากได้รับสาร vanillin ที่ความเข้มข้น 10 – 50 μM และ H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 750 μM จากการทดสอบด้วย MTT assay (* p -value < 0.05)

4. ศึกษาความสามารถของสาร vanillin ในการเพิ่มการเคลื่อนที่ของเซลล์ฮาแคท ผู้วิจัยจึงศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์ฮาแคท โดยทำการศึกษาผลของสาร vanillin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และวัดความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์ฮาแคทโดยวิธี wound healing assay

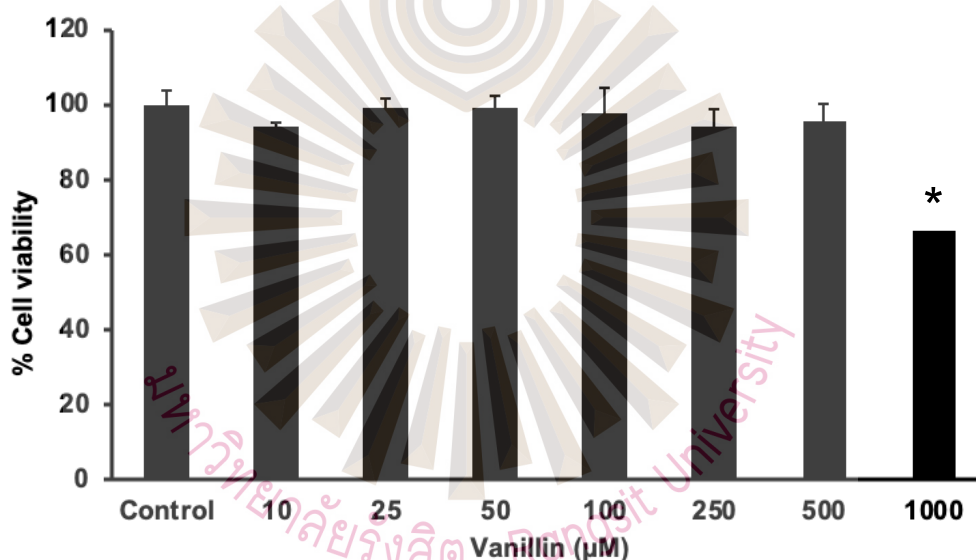
ผลวิจัยพบว่าเมื่อเซลล์ฮาแคทได้รับสาร vanillin เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีการเคลื่อนที่มากขึ้น เมื่อเทียบกับเซลล์ฮาแคทที่ไม่ได้รับสาร vanillin (รูปที่ 7) โดยสรุป สาร vanillin สามารถเพิ่มการเคลื่อนที่ของเซลล์ผิวหนังชนิดฮาแคทได้



รูปที่ 7 การเคลื่อนที่ของเซลล์ฮาแคทหลังจากได้รับสาร vanillin ที่ความเข้มข้น 10 – 50 μM เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

5. ผลของสาร vanillin ต่อการรอดชีวิตเซลล์ผิวหนังไฟโบร بلاสต์ โดยทำการศึกษาความเป็นพิษของสาร vanillin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยการใช้การวัดการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยวิธี MTT เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม สำหรับใช้ในการทดสอบฤทธิ์อื่น ๆ ต่อไป

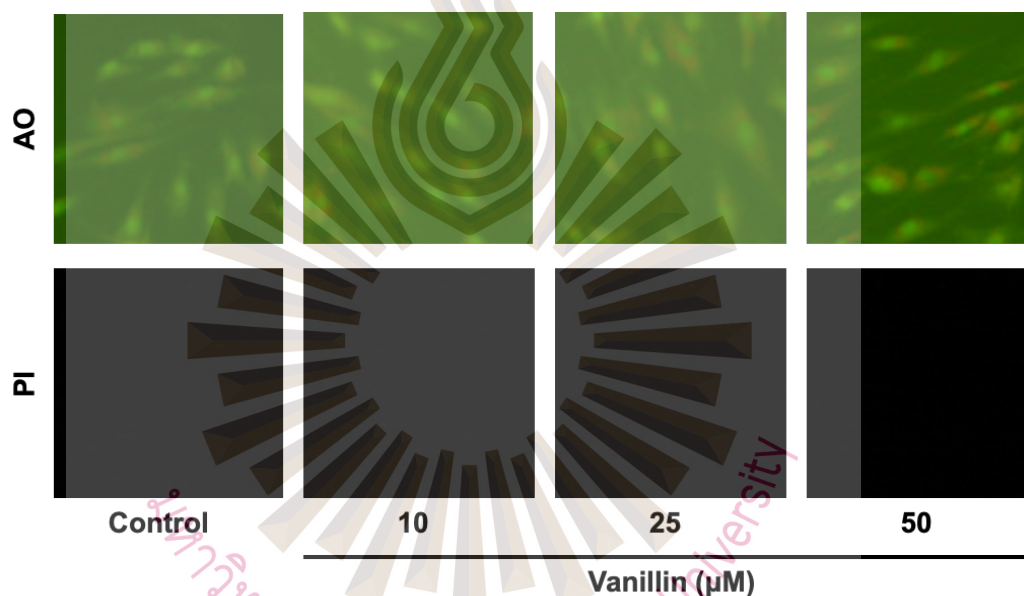
ผลวิจัยพบว่าสาร vanillin ที่ความเข้มข้น 10 – 500 μM ไม่มีผลทำให้เซลล์ผิวหนังไฟโบร بلاสต์ลดจำนวนลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร vanillin แต่ที่ความเข้มข้น 1000 μM ทำให้จำนวนเซลล์ผิวหนังไฟโบร بلاสต์ที่รอดชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 8) ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกสาร vanillin ที่ความเข้มข้น 0 – 50 μM สำหรับการศึกษาต่อไป



รูปที่ 8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (%cell viability) ของเซลล์ผิวหนังไฟโบร بلاสต์ และความเข้มข้นของสาร vanillin ที่ความเข้มข้น 10 – 1000 μM จากการทดสอบด้วย MTT assay (* p -value < 0.05)

6. ผลต่อการตายของเซลล์ผิวหนังไฟโบร بلاสต์ ของสาร vanillin ที่ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยการใช้การวัดการตายของเซลล์แบบ apoptosis และ necrosis โดย การย้อมสี fluorescence ชนิด acridine orange และ propidium iodide เพื่อยืนยันว่าความเข้มข้นที่ใช้ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ สำหรับใช้ในการทดสอบฤทธิ์อื่น ๆ ต่อไป

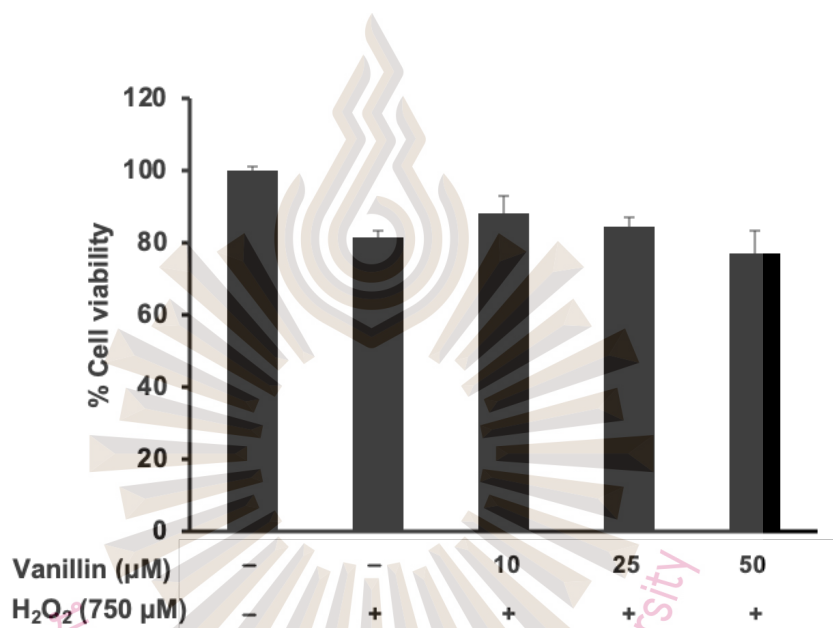
ผลวิจัยพบว่าสาร vanillin ที่ความเข้มข้น 10, 25 และ 50 μM ไม่มีผลทำให้เซลล์ผิวหนังไฟโบร بلاสต์ ตายแบบ apoptosis และ necrosis เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร vanillin (รูปที่ 9) ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกสาร vanillin ที่ความเข้มข้น 10, 25 และ 50 μM สำหรับการศึกษาต่อไป



รูปที่ 9 การตายของเซลล์ไฟโบร بلاสต์หลังจากได้รับสาร vanillin ที่ความเข้มข้น 10 – 50 μM หลังจากการย้อมด้วยสี fluorescence ชนิด acridine orange และ propidium iodide

7. ผลป้องกันการตายของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จาก hydrogen peroxide (H_2O_2) ของสาร vanillin โดยการใช้การวัดการรอดชีวิตของเซลล์ โดยวิธี MTT

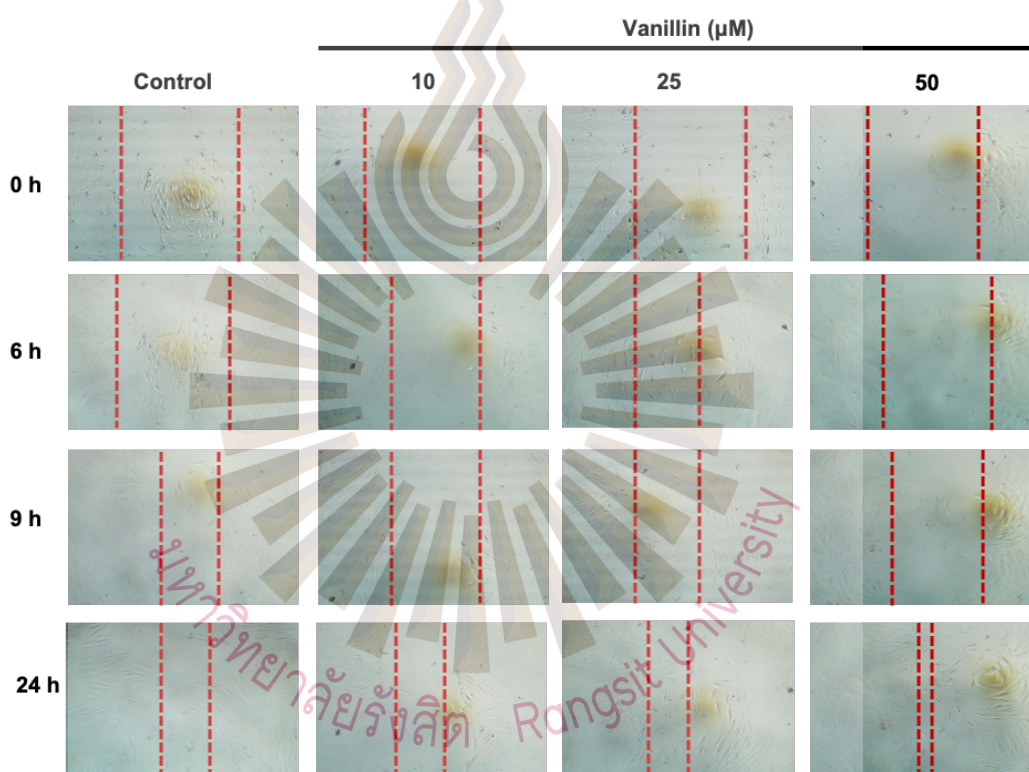
ผลวิจัยพบว่า H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 750 μM ทำให้เซลล์ตาย โดยพบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เท่ากับ 81% การให้สาร vanillin ที่ความเข้มข้น 10, 25 และ 50 μM เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนที่จะให้ H_2O_2 ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ไม่แตกต่างจากการได้รับ H_2O_2 อย่างเดียว (รูปที่ 10) ดังนั้น จากผลการวิจัยนี้สรุปได้ว่าสาร vanillin ที่ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ไม่สามารถปกป้องการตายของเซลล์จาก H_2O_2 ได้



รูปที่ 10 การรอดชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากได้รับสาร vanillin ที่ความเข้มข้น 10 – 50 μM และ H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 750 μM จากการทดสอบด้วย MTT assay (* p -value < 0.05)

8. ศึกษาความสามารถของสาร vanillin ในการเพิ่มการเคลื่อนที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ผู้วิจัยจึงศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ โดยทำการศึกษาผลของสาร vanillin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และวัดความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์โดยวิธี wound healing assay

ผลวิจัยพบว่าเมื่อเซลล์ฮาแคทได้รับสาร vanillin เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีการเคลื่อนที่มากขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ไม่ได้รับสาร vanillin (รูปที่ 11) โดยสรุป สาร vanillin สามารถเพิ่มการเคลื่อนที่ของเซลล์ผิวหนังชนิดไฟโบรบลาสต์ได้



รูปที่ 11 การเคลื่อนที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากได้รับสาร vanillin ที่ความเข้มข้น 10 – 50 µM เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผล

สรุปผลการวิจัย

สาร vanillin สามารถป้องกันการตายของเซลล์ผิวหนังชั้นนอกชนิดฮาแคทได้ โดยเพิ่มการรอดชีวิตของเซลล์จากการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายจากสารประกอบที่มีออกซิเจนในโมเลกุล H_2O_2 และสาร vanillin สามารถเพิ่มการหายของบาดแผลได้ จากการเพิ่มการเคลื่อนที่ของเซลล์ผิวหนังชนิดฮาแคทและไฟโบรบลาสต์ ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำสาร vanillin ไปพัฒนาต่อยอดเป็นเครื่องสำอางสำหรับลดการเกิดริ้วรอย เพื่อป้องกันผิวหนังเหี่ยวย่นได้

อภิปรายผลการวิจัย

สารบริสุทธิ์ รวมถึงสารสกัดจากพืชหลายชนิดมีรายงานการเพิ่มการสมานแผลได้ จากการที่สารนั้น ๆ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Artem Ataide et al., 2018) สารสกัดจากพืช *Grammatophyllum speciosum* ซึ่งพบว่ามี phenolic contents และมีฤทธิ์ antioxidant จากการทดสอบด้วย DPPH assay, ABTS Radical Scavenging Activity และ Superoxide Anion Radical Scavenging (SOSA) Determination พร้อมกับพบอีกว่า สารสกัดจากพืช *G. speciosum* สามารถเพิ่มการเคลื่อนที่ของเซลล์ฮาแคทได้ (Harikarnpakdee and Chowjarean, 2018) นอกจากนี้ยังพบรายงานของสาร curcumin ซึ่งเป็นสาระสำคัญใน *Curcuma longa* (ขมิ้น) ในการเพิ่มการเคลื่อนที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Topman, Lin, & Gefen, 2013) ซึ่งสัมพันธ์กับฤทธิ์ ROS scavenging ของ curcumin (Barchitta et al., 2019) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาถึงผลในการเพิ่มการสมานแผล โดยทดสอบการเคลื่อนที่ของเซลล์ผิวหนังทั้งชั้นนอกและชั้นใน คือ เซลล์ฮาแคทและไฟโบรบลาสต์ของสาร vanillin รวมถึงผลในการป้องกันการตายของเซลล์จากสารประกอบที่มีออกซิเจนในโมเลกุล

Vanillin จัดเป็นสารประกอบในกลุ่มโพลีฟีนอลิก (polyphenolic compounds) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระต่าง ๆ ไม่ให้ไปกระตุ้นหรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยการให้อนุมูล H^+ แก่อนุมูลอิสระเหล่านั้น (Van Acker et al., 2000) นอกจากนี้สารประกอบ polyphenols ที่มีโครงสร้างของ ortho-dihydroxyl phenol อยู่ในโมเลกุลยังสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูล $OH^•$ ในปฏิกิริยาที่มีอนุมูลโลหะทรานซิชัน คือ Fe^{2+} และ Cu^{2+} เป็นตัวเหนี่ยวนำโดยการเข้าจับกับโลหะดังกล่าวเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (complex) ได้อีกด้วย (Sanchez-Moreno et al., 2000) นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของวานิลลิน ได้แก่ ฤทธิ์ในการลดน้ำตาล (Srinivasan et al., 2008) ฤทธิ์ด้านการอักเสบ และฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (Tai et al., 2011) ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Yemis et al., 2011) ผลการศึกษานี้พบว่า สาร vanillin ในขนาดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังชนิดฮาแคท สามารถป้องกันการตายของเซลล์ผิวหนัง

ชนิดฮาแคทได้ โดยเพิ่มการรอดชีวิตของเซลล์จากการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายจาก H_2O_2 ซึ่งน่าจะเกิดจากการที่สาร vanillin มีฤทธิ์ antioxidation ดังกล่าว

การศึกษานี้ยังพบอีกว่าสาร vanillin สามารถเพิ่มการหายของบาดแผลได้ จากการเพิ่มการเคลื่อนที่ของเซลล์ผิวหนังชนิดฮาแคทและไฟโบรบลาสต์ จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบความสัมพันธ์ของการอักเสบและการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันในขั้นตอนการสมานแผล (Frey RS, 2014) โดยพบว่าการเกิด ROS บริเวณแผล ส่งผลให้กระตุ้นการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น เม็ดเลือดขาวชนิด T lymphocyte แมคโครฟาจ B lymphocyte dendritic cells เป็นต้น ซึ่งระดับ ROS ที่สูงขึ้นจะส่งผลให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันและทำลายเซลล์ตามมาได้ ดังนั้น สารที่ฤทธิ์ antioxidation รวมไปถึง vanillin จึงอาจเพิ่มการสมานแผลได้จากคุณสมบัติในการเป็น antioxidant

ข้อเสนอแนะ

ควรศึกษาถึงกลไกในการออกฤทธิ์ของสาร vanillin ในการป้องกันปกป้องการตายของเซลล์ผิวหนัง และการเพิ่มการเคลื่อนที่ในเซลล์ฮาแคทและไฟโบรบลาสต์ต่อไป เพื่อที่จะพัฒนาสาร vanillin ไปพัฒนาต่อยอดเป็นเครื่องสำอางสำหรับลดการเกิดริ้วรอย เพื่อป้องกันผิวหนังเหี่ยวย่นได้



เอกสารอ้างอิง

- Artem Ataide, J., Caramori Cefali, L., Machado Croisfelt, F., Arruda Martins Shimojo, A., Oliveira-Nascimento, L., & Gava Mazzola, P. (2018). Natural actives for wound healing: A review. *Phytotherapy Research : PTR*, 32(9), 1664–1674. <https://doi.org/10.1002/ptr.6102>
- Barchitta, M., Maugeri, A., Favara, G., Magnano San Lio, R., Evola, G., Agodi, A., & Basile, G. (2019). Nutrition and Wound Healing: An Overview Focusing on the Beneficial Effects of Curcumin. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5).
- Bezerra, D. P., Soares, A. K. N. & De Sousa, D. P. (2016). Overview of the Role of Vanillin on Redox Status and Cancer Development. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–9.
- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., & Rodriguez, H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(11), 1102–1115.
- Frey, R. S., & Malik, A. B. (2004, January). Oxidant signaling in lung cells. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, Vol. 286, pp. L1-3.
- Harikarnpakdee, S., & Chowjarean, V. (2018). *Grammatophyllum speciosum* Ethanolic Extract Promotes Wound Healing in Human Primary Fibroblast Cells. *International Journal of Cell Biology*, 2018, 7836869. <https://doi.org/10.1155/2018/7836869>
- Kaur, B., Chakraborty, D. & Kumar, B. (2013). Phenolic Biotransformations during Conversion of Ferulic Acid to Vanillin by Lactic Acid Bacteria. *Biomed Research International*, 2013, 1–6.
- Kobayashi, T., Glatz, M., Horiuchi, K., Kawasaki, H., Akiyama, H., Kaplan, D. H. & Nagao, K. (2015). Dysbiosis and *Staphylococcus aureus* Colonization Drives Inflammation in Atopic Dermatitis. *Immunity*, 42(4), 756–766.
- Kohen, R. and Gati, I. (2000). Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. *Toxicology*, 148(2-3), 149-157.
- Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*, 30(6), 620–650.

- Kupper, T.S., & Fuhlbrigge, R. C. (2004). Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nature Reviews Immunology*, 4(3), 211–222.
- Li, H., Horke, S. & Förstermann, U. (2013). Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34(6), 313–9.
- Nestle, F.O., Di Meglio, P., Qin, J.-Z., & Nickoloff, B. J. (2009). Skin immune sentinels in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 9 (10), 679–691.
- Prior, R. L., & Cao, G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods 1. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(11-12), 1173–1181.
- Sánchez-Moreno, C., Satué-Gracia, M. T., & Frankel, E. N. (2000). Antioxidant Activity of Selected Spanish Wines in Corn Oil Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5581–5587.
- Swindle, E. J., Brown, J. M., Rådinger, M., DeLeo, F. R., & Metcalfe, D. D. (2015). Interferon- γ enhances both the anti-bacterial and the pro-inflammatory response of human mast cells to *Staphylococcus aureus*. *Immunology*, 146(3), 470–485.
- Tai, S., Sun, Y., Squires, J. M., Zhang, H., Oh, W. K., Liang, C.-Z., & Huang, J. (2011). PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *The Prostate*, 71(15), 1668–1679.
- Topman, G., Lin, F.-H., & Gefen, A. (2013). The natural medications for wound healing – Curcumin, Aloe-Vera and Ginger – do not induce a significant effect on the migration kinematics of cultured fibroblasts. *Journal of Biomechanics*, 46(1), 170–174. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2012.09.015>
- Van Acker F.A., Van Acker S.A., Kramer K., Haenen G.R., Bast A., Van der Vijgh W.J. (2000). 7-mono-hydroxyethylrutoside protects against chronic doxorubicin-induced cardiotoxicity when administered only once per week. *Clinical Cancer Research*. 6(4) :1337-1341.
- Yemis, G.P., Pagotto, F., Bach, S. & Delaquis, P. (2011). Effect of vanillin, ethyl vanillin, and vanillic acid on the growth and heat resistance of *Cronobacter* species. *Journal of food protection*, 74(12), 2062–2069.
- Zhao, D., Sun, J., Sun, B., Zhao, M., Zheng, F., Huang, M. & Li, H. (2017). Intracellular antioxidant effect of vanillin, 4-methylguaiacol and 4-ethylguaiacol: three components in Chinese Baijiu. *RSC Advances*, 7(73), 46395–46405.

ประวัติผู้วิจัย



คำนำหน้า	นางสาว
ตำแหน่งทางวิชาการ	อาจารย์ ดร.
ชื่อผู้วิจัย	ชุตินา
นามสกุลผู้วิจัย	สินสืบล
ชื่อภาษาอังกฤษ	Chutima
นามสกุลภาษาอังกฤษ	Sinsuebpol
วัน/เดือน/ปี เกิด	6 กันยายน 2517
ที่อยู่ (บ้าน)	75 ซ.ลาดพร้าว 43 แขวง สามเสนนอก เขต ห้วยขวาง
จังหวัด (บ้าน)	กรุงเทพมหานคร
รหัสไปรษณีย์ (บ้าน)	10310
โทรศัพท์ (บ้าน)	-
แฟกซ์ (บ้าน)	-
ที่อยู่ (ที่ทำงาน)	วิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ถ.พหลโยธิน ต.หลักหก อ.เมือง
จังหวัด (ที่ทำงาน)	ปทุมธานี
รหัสไปรษณีย์ (ที่ทำงาน)	12000
โทรศัพท์ (ที่ทำงาน)	02-791-6000 ต่อ 1458/1429
แฟกซ์ (ที่ทำงาน)	02-791-6000 ต่อ 1403
E-Mail Address	chutima.si@rsu.ac.th

ปริญญาตรี

สาขา	เกษตรศาสตร์
ปีที่จบ	2541
สถาบัน	คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต
ประเทศ	ไทย

ปริญญาเอก

สาขา เกษัตริกรรม
 ปีที่จบ 2556
 สถาบัน คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 ประเทศ ไทย

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ

- **Sinsuebpol C**, Chatchawalsaisin J, Kulvanich P. Preparation and in vivo absorption evaluation of spray dried powders containing salmon calcitonin loaded chitosan nanoparticles for pulmonary delivery. *Drug Des Devel Ther.* 2013; 7: 861–873.
- Limsitthichaikoon S, **Sinsuebpol C**. Electrostatic Effects of Metronidazole Loaded in Chitosan-Pectin Polyelectrolyte Complexes. *Key Engineering Materials.* 2019; 819: 27-32.
- **Sinsuebpol C**, Changsan N. Effects of Ultrasonic Operating Parameters and Emulsifier System on Sacha Inchi Oil Nanoemulsion Characteristics. *J. Oleo Sci.* 2020; 69 (5): 437-448.

ผลงานวิจัยที่ได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการภายในประเทศ

- Thanawuth K, Saokham P, **Sinsuebpol C**. The effect of oil and emulsifier concentrations on the size and viscosity of of sachu inchi oil nanoemulsions. The 35th International Annual Meeting in Pharmaceutical Sciences & CU-MPU International Collaborative Research Conference. 8 March 2019. Bangkok, Thailand. (proceedings)

สาขาวิชาที่นักวิจัยเชี่ยวชาญ

- Pulmonary drug delivery
- Nanotechnology (polymer-based and lipid-based drug delivery system)