รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

การพัฒนาตำรับอนุภาคนาโนไคโตซานที่บรรจุไอโซไนอาซิดผสมกับไพราซินาไมด์ชนิดผงแห้งสำหรับสูดพ่นสู่ทางเดินหายใจ

Chitosan nanoparticle containing isoniazid and pyrazinamide as dry inhalation powder

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

โดย

อาจารย์ ดร. นฤมล ช่างสาน

สนับสนุนโดย

สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต

2563

บทคัดย่อ

การพัฒนาตำรับอนุภาคนาโนไคโตซานที่บรรจุไอโซไนอาซิดผสมกับไพราซินาไมด์ชนิดผงแห้งสำหรับสูดพ่นสู่ทางเดินหายใจเพื่อนำส่งยาต้านวัณโรคสู่ทางเดินหายใจโดยตรงเป็นการเลียนแบบการติดเชื้อวัณโรคปอดโดยธรรมชาติ ทำให้มีความเข้มข้นของยาบริเวณเซลล์เป้าหมายสูงขณะที่ลดการสัมผัสยากับเซลล์อื่นที่ไม่ใช่เป้าหมาย ลดการเมเทบอลิซึมของยาที่ตับ เพิ่มระยะเวลาการออกฤทธิ์ของยา ลดความถี่ในการบริหารยาและเพิ่มความร่วมมือในการใช้ยาของผู้ป่วยได้ งานวิจัยนี้เตรียมตำรับอนุภาคนาโนไคโตซานด้วยเทคนิคการเกิดเจลระหว่างประจุ โดยศึกษาการทำปฏิกิริยาการเชื่อมขวางระหว่างสารไตรโพลีฟอสเฟตที่มีประจุลบกับไคโตซานที่มีประจุบวกในอัตราส่วนต่างๆ และปรับความเข้มข้นของสารไตรโพลีฟอสเฟตเป็น 3 ระดับ พบว่าการเกิดอนุภาคนาโนขึ้นกับอัตราส่วนของสารไตรโพลีฟอสเฟตกับไคโตซานโดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของไตรโพลีฟอสเฟตแต่ โดยตำรับที่อัตราส่วนอัตราส่วนของสารไตรโพลีฟอสเฟตกับไคโตซานเท่ากับ 1:3 มีขนาดอนุภาคในช่วงนาโนเมตร และร้อยละการกักเก็บยาในอนุภาคอยู่ในช่วง 25-30% จึงเลือกมาพัฒนาเป็นตำรับผงแห้งต่อโดยใช้เทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ประเมินตำรับอนุภาคนาโนไคโตซานผงแห้งที่ได้ด้วยการถ่ายภาพจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด, และใช้เทคนิค DSC, XRD ร่วมกับ FT-IR เพื่อยืนยันการเกิดอันตรกิริยาระหว่างตัวยาสำคัญกับส่วนประกอบอื่นของตำรับ เมื่อนำผงแห้งทดสอบการนำส่งสู่ทางเดินหายใจแบบนอกกาย โดยใช้เครื่อง Andersen cascade impactor พบค่ามัธยฐานของขนาดละอองฝอยเท่ากับ 3.3-3.5 ไมโครเมตร, สัดส่วนอนุภาคละเอียด 30-44% และปริมาณยาที่ถูกปล่อยออกจากอุปกรณ์นำส่ง 92–95% สูตรตำรับผงแห้งมีความปลอดภัยไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงเยื่อบุทางเดินหายใจส่วนบนและส่วนล่าง เซลล์เพาะเลี้ยงแมโครฟาจในถุงลม นอกจากนี้ไม่พบการหลั่งสารไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบคืออินเตอร์ลิวคิน 1 เบตา และทูเมอร์เนโครซิสแฟคเตอร์แอลฟา และไนตริคออกไซด์ที่สร้างจากเซลล์เพาะเลี้ยงแมโครฟาจในถุงลมที่ถูกกระตุ้นด้วยอนุภาคนาโนไคโตซาน ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำส่งอนุภาคนาโนไคโตซานที่บรรจุยาต้านวัณโรคคือไอโซไนอาซิดผสมกับไพราซินาไมด์สู่ทางเดินหายใจเพื่อใช้รักษาวัณโรคปอด

Abstract

Co-loaded isoniazid and pyrazinamide chitosan nanoparticles dry powder inhalers were developed. Directly deliver antituberculosis to the alveoli is mimic to the natural route of tuberculosis infection. This strategy repurposes old drugs for direct delivery via an alternative inhalation route, following the route of tuberculosis infection. This approach provides a high concentration of drugs to target cells while minimizing exposure of the drug to non-target cells. It is non-invasive, avoids first-pass metabolism in the liver, and potentially reduces the dose requirement and the accompanying side effects. In this study, TPP was used as a non-toxic multivalent anion that can interact with chitosan by electrostatic interactions to form nanoparticles. The formulations were adjusted to five mass ratios of TPP and chitosan at three TPP concentrations. The results revealed that the ratio of TPP to chitosan had the highest impact in generating chitosan nanoparticles. The selected nanoparticle formulations (TPP: chitosan =1:3) were freeze-dried, and the obtained dry powders were characterized using SEM, DSC, XRD, and FT-IR to confirm the interaction of loaded drug and formulation excipients. The aerosolized performance of dry powders was also evaluated using the Andersen cascade impactor. A mass median aerodynamic diameter (MMAD) of 3.3–3.5 μm, % fine particle fraction (FPF) of 30–44%, and 92–95% emitted dose (ED) were obtained from all formulations. The dry powder formulations were not toxic to the respiratory tract cell lines. Furthermore, they did not provoke alveolar macrophages into producing inflammatory cytokines or nitric oxides, indicating that the formulations are safe and could potentially be used to deliver to respiratory tract for tuberculosis treatment.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องการพัฒนาตำรับอนุภาคนาโนไคโตซานที่บรรจุไอโซไนอาซิดผสมกับไพราซินาไมด์ชนิดผงแห้งสำหรับสูดพ่นสู่ทางเดินหายใจ เป็นโครงการวิจัยที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต รหัสทุน 7/2562 ปีการศึกษา 2562 และโครงการวิจัยได้รับการอนุเคราะห์ให้ใช้สถานที่อุปกรณ์และเครื่องมือในการทำวิจัยบางส่วนจากสถานวิจัยความเป็นเลิศระบบนำส่งยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณสถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต และสถานวิจัยความเป็นเลิศระบบนำส่งยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เป็นอย่างสูงต่อการสนับสนุนและอนุเคราะห์การทำวิจัยของโครงการนี้ ส่งผลให้งานวิจัยเสร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นฤมล ช่างสาน

หัวหน้าโครงการวิจัย

กันยายน 2563

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
ขอบเขตของการวิจัย	3
กรอบแนวคิดในการวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	8
สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	8
การออกแบบการวิจัย	9
ประชากรและการวิเคราะห์ข้อมูล	16
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	17
บทที่ 5 สรุป วิจารณ์ และข้อเสนอแนะ	31
เอกสารอ้างอิง	32
ภาคผนวก	
ประวัติผู้วิจัย	36

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	อัตราส่วนไตรโพลีฟอสเฟต (TPP) ต่อไคโตซาน (chitosan) ที่ความเข้มข้นของไตรโพลีฟอสเฟตต่าง ๆ	9
2	ลักษณะทางกายภาพของตำรับ IP-CNPs	17
3	wavenumber ที่สัมพันธ์กับหมู่ฟังก์ชันที่เป็นลักษณะเฉพาะของสาร	27
4	พารามิเตอร์ของตำรับแอโรโซลที่ประเมินโดยอุปกรณ์ Andersen cascade impactor	28

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ขั้นตอนต่างๆของกลไก autophagy	6
2	Andersen cascade impactor และความสัมพันธ์กับลักษณะทางกายวิภาคของท่อทางเดินหายใจของมนุษย์	13
3	แผนภาพจำลองการเรียงตัวของโมเลกุล chitosan และ TPP ในการเกิดอนุภาคนาโนไคโตซานที่อัตราส่วนระหว่าง TPP: chitosan ที่แตกต่างกัน A: เมื่อมีประจุลบส่วนเกินของ TPP (TPP: chitosan เท่ากับ 1:1 หรือ 1:2) B: เมื่อมีประจุบวกอิสระส่วนเกินของ chitosan (TPP: chitosan มากกว่า 1:3)	18
4	กราฟแสดงสหสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ chitosan กับ (A) ขนาดอนุภาค (B) zeta potential	20
5	ภาพถ่ายรูปร่างลักษณะของผงแห้ง IP-CNPs จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 5000 เท่า	21
6	รูปแบบการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ (XRD pattern) ของสารต่างๆ และตำรับผงแห้ง IP-CNPs-DP	23
7	DSC thermogram แสดงการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางความร้อนของสารต่างๆ และตำรับผงแห้ง IP-CNPs-DP	24
8	FT-IR spectra ของสารต่างๆ และตำรับผงแห้ง IP-CNPs-DP	26
9	ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ human Caucasian bronchioalveolar carcinoma (NCI-H358), เซลล์ human lung adenocarcinoma cell line (A 549) และ rat alveolar macrophage cell line (NR 8383) หลังจากสัมผัสกับตำรับ IP-CNPs-DP 1-3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ	29
10	ระดับของสาร inflammatory cytokines (IL-1β และ TNF-α) และ nitric oxide ที่ถูกสร้างจากเซลล์ rat alveolar macrophages เมื่อถูกกระตุ้นโดย IP-CNPs-DP 1-3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ, LPS จาก *E.coli* (500 ng/mL) และ negative control	30

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 1
บทนำ

วัณโรค (Tuberculosis) เป็นโรคติดเชื้อที่เป็นปัญหาด้านสาธารณสุข ข้อมูลจากองค์การอนามัยโลกปี 2561 พบว่าวัณโรคเป็นหนึ่งในสาเหตุการเสียชีวิตสูงสุดทั่วโลก 10 อันดับแรก และเป็นสาเหตุการเสียชีวิตสูงสุดที่เกิดจากการติดเชื้อเพียงชนิดเดียว (มากกว่าการเสียชีวิตจากการติดเชื้อ HIV/AIDS) ในแต่ละปียังคงพบผู้ป่วยวัณโรคเพิ่มขึ้นปีละหลายล้านคน และคาดว่ามีผู้ติดเชื้อวัณโรคระยะแฝงทั่วโลกประมาณ 1.7 พันล้านคนหรือประมาณ 23% ของประชากรโลก ซึ่งมีความเสี่ยงที่จะพัฒนาเป็นผู้ป่วยวัณโรคได้ ปัจจุบันการระบาดของวัณโรคมีความวิกฤตมากขึ้นเนื่องจากเกิดปัญหาเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (multiple drug- resistant TB; MDR-TB) องค์การอนามัยโลกจัดให้ประเทศไทยเป็น 1 ใน 14 ประเทศที่มีปัญหาวัณโรครุนแรงระดับโลก มีอัตราของวัณโรครายใหม่สูงกว่าค่าเฉลี่ยโลก 1.3 เท่า มีผู้เสียชีวิต 12,000 ราย (จากจำนวนผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ประมาณ 120,000 รายต่อปี) และการสำรวจยังพบว่าผู้ป่วยเกินกว่าครึ่งที่ไม่ได้รับการรักษา หรือเข้าถึงการรักษาอย่างล่าช้าทำให้เกิดการแพร่กระจายเชื้อในชุมชน ปัจจุบันองค์การอนามัยโลกได้กำหนดให้วัณโรคเป็นเป้าหมายการพัฒนาที่ยั่งยืนในกรอบสหประชาชาติและยุทธศาสตร์ยุติวัณโรค มีเป้าหมายลดอัตราวัณโรครายใหม่เหลือ 20 และ 10 ต่อประชากรแสนคนในปี 2573-2578 ลดการเสียชีวิตลงร้อยละ 95 และประเทศไทยได้จัดให้ปัญหาวัณโรคเป็นวาระสำคัญระดับชาติ คณะรัฐมนตรีเห็นชอบหลักการแผนยุทธศาสตร์วัณโรคระดับชาติ พ.ศ. 2560-2564 ซึ่งนับเป็นความท้าทายของประเทศไทยอย่างมากที่จะเดินไปสู่เป้าหมายที่กำหนดไว้ การพัฒนายาวัณโรครวมถึงการค้นคว้ายาใหม่ที่ใช้ในการรักษาวัณโรคให้ที่ประสิทธิภาพหรือการปรับเปลี่ยนแนวทางการรักษาของยาที่มีอยู่เดิมเพื่อให้มีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้นก็เป็นอีกหนึ่งบทบาทในการทำให้ประเทศไทยสามารถบรรลุเป้าหมายที่วางไว้ได้

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ความเป็นมาและความสำคัญของการปัญหา

วัณโรคเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* สามารถแพร่เชื้อจากคนสู่คนผ่านทางอากาศ ทั้งการไอ จาม ของผู้ป่วยวัณโรคทำให้เกิดละอองฝอย หากละอองฝอยมีขนาดใหญ่มากจะติดอยู่ที่จมูกหรือลำคอซึ่งมักไม่ก่อให้เกิดโรค แต่หากละอองฝอยมีขนาดเล็ก 1 - 5 ไมโครเมตร จะลอยและกระจายอยู่ในอากาศ ผู้อื่นสามารถรับเชื้อโดยการสูดหายใจเอาละอองฝอยที่มีเชื้อวัณโรคเข้าสู่ถุงลมในปอดซึ่งจะถูกจับกินโดยเซลล์ macrophage ที่อาศัยอยู่บริเวณนั้น อย่างไรก็ตามเชื้อวัณ

โรคมีกลไกต่อต้านการย่อยสลายเชื้อของเซลล์ macrophage โดยยับยั้งการรวมตัวของ phagosome กับ lysosome (ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายเชื้อใน phagosome) ทำให้เชื้อวัณโรคสามารถอาศัยและแบ่งตัวอยู่ภายในเซลล์ macrophage ได้ การรักษาวัณโรคในปัจจุบันใช้สูตรยามาตรฐานที่แนะนำโดยองค์การอนามัยโลกซึ่งผู้ป่วยต้องรับประทานยาหลายตัวร่วมกันระยะเวลาต่อเนื่องอย่างน้อย 6 เดือน คือการรับประทานยาต้านวัณโรคในกลุ่ม first-line antituberculosis drug คือ isoniazid, pyrazinamide, rifampicin และ ethambutol ทุกวันติดต่อกัน 2 เดือนตามด้วย isoniazid และ rifampicin ติดต่อกันอีก 4 เดือน หากพบว่ารักษาไม่ได้ผลหรือมีการดื้อยาก็จะเปลี่ยนมารับประทานยาต้านวัณโรคในกลุ่ม second-line antituberculosis drug ซึ่งมีประสิทธิภาพในการรักษาต่ำกว่าในขณะที่มีผลข้างเคียงมากกว่า จากการรับประทานยาหลายชนิดติดต่อกันเป็นระยะเวลานานและปัญหาจากผลข้างเคียงจากยาทำให้ผู้ป่วยไม่ให้ความร่วมมือในการใช้ยา รับประทานยาไม่ต่อเนื่องหรือมีการขาดยา รับยาได้ไม่ครบตามระยะเวลาของสูตรรักษา ทำให้เกิดอุบัติการณ์ดื้อยาของวัณโรคมากขึ้นทั้งวัณโรคที่ดื้อยาหลายขนาน (multidrug-resistant TB; MDR-TB) ซึ่งดื้อต่อยา isoniazid และ rifampicin พร้อมกันและอาจจะดื้อต่อยาขนานอื่นๆ ร่วมด้วย หรือวัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรงมาก (extensively drug resistant TB; XDR-TB) คือวัณโรคดื้อยาหลายขนานที่ดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolone และยารักษาวัณโรคในกลุ่ม second-line antituberculosis drug ชนิดฉีดด้วย ซึ่งวัณโรคดื้อยาทำให้การรักษาวัณโรคทำได้ยากและซับซ้อนมากขึ้นและส่งผลให้เกิดความล้มเหลวในการรักษา

ปัจจุบันมีการใช้ยาในรูปของละอองฝอย (aerosol) ในการรักษาโรคในระบบทางเดินหายใจมากขึ้นเนื่องจากยาจะถูกนำส่งเข้าสู่บริเวณปอดโดยตรงซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดพยาธิสภาพ ดังนั้นการศึกษาวิจัยการใช้ระบบนำส่งยาวัณโรคสู่ปอดซึ่งเป็นอวัยวะที่ติดมีการติดเชื้อโดยตรงแทนการรับประทานยา จึงเป็นวิธีที่ทำให้ยาเข้าถึงเป้าหมายคือบริเวณปอดส่วนล่างและมีระดับยาในปอดสูง มี onset ในการออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้เร็วและเนื่องจากถุงลมปอดมีพื้นที่ผิวมากและมีผนังบางทำให้ bioavailability ของยาในปอดสูง เลี่ยงการทำลายยาที่ตับผ่าน first pass metabolism จึงสามารถลดขนาดยาลงได้ ลดการเกิดพิษของยาในระบบไหลเวียนเลือด ทำให้ผู้ป่วยตอบสนองต่อยาได้มากขึ้น นอกจากนี้ในปอดยังมี alveolar macrophage ซึ่งมีเชื้อวัณโรคอาศัยอยู่ทำหน้าที่จับกินอนุภาคของยาที่นำส่งลงไปถึงปอดส่วนล่าง การจับกินอนุภาคยาโดย alveolar macrophage กระตุ้นให้กำจัดเชื้อได้ดีขึ้น

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

คำถามวิจัย

1. สามารถพัฒนาตำรับอนุภาคนาโนไคโตซานที่บรรจุ isoniazid ผสมกับ pyrazinamide โดยใช้เทคนิคการเกิดเจลระหว่างประจุ (ionic gelation) ได้หรือไม่
2. สามารถพัฒนาตำรับอนุภาคนาโนไคโตซานที่บรรจุ isoniazid ผสมกับ pyrazinamide ชนิดผงแห้งที่สามารถนำส่งยาสู่ทางเดินหายใจส่วนล่างได้หรือไม่
3. ตำรับอนุภาคนาโนไคโตซานที่บรรจุ isoniazid ผสมกับ pyrazinamide มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในระบบทางเดินหายใจหรือไม่และกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของเซลล์แมโครฟาจในถุงลมหรือไม่

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

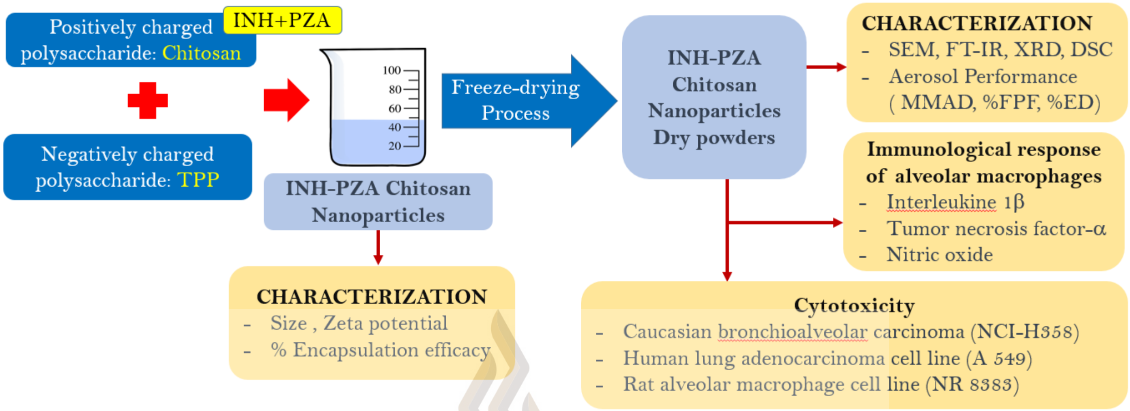
1. พัฒนาและประเมินตำรับอนุภาคนาโนไคโตซานที่บรรจุ isoniazid ผสมกับ pyrazinamide โดยใช้เทคนิคการเกิดเจลระหว่างประจุ (ionic gelation)
2. พัฒนาและประเมินตำรับอนุภาคนาโนไคโตซานที่บรรจุ isoniazid ผสมกับ pyrazinamide ชนิดผงแห้งที่สามารถนำส่งยาสู่ทางเดินหายใจส่วนล่างได้
3. ประเมินความปลอดภัยและการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของเซลล์ในระบบทางเดินหายใจต่อตำรับอนุภาคนาโนไคโตซานที่บรรจุ isoniazid ผสมกับ pyrazinamide

ขอบเขตของการวิจัย

ทำการพัฒนาและประเมินสูตรตำรับอนุภาคนาโนไคโตซานที่บรรจุยาต้านวัณโรคผสมของ isoniazid ผสมกับ pyrazinamide และทำให้อยู่ในรูปผงแห้งที่สามารถสูดพ่นสู่ทางเดินหายใจและสามารถนำส่งไปลึกถึงทางเดินหายใจส่วนล่างได้ และศึกษาความปลอดภัยของตำรับเบื้องต้นโดยทดสอบความเป็นพิษและการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของเซลล์ในระบบทางเดินหายใจ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

กรอบแนวคิดงานวิจัย



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สูตรตำรับอนุภาคนาโนไคโตซานที่บรรจุ isoniazid ผสมกับ pyrazinamide ชนิดผงแห้งสำหรับสูดพ่นสู่ทางเดินหายใจซึ่งสามารถทำวิจัยต่อยอดเปรียบเทียบความสามารถในการฆ่าเชื้อวัณโรคภายในเซลล์เทียบกับสูตรตำรับปกติ
2. องค์ความรู้ใหม่ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาตำรับอนุภาคนาโนไคโตซานที่บรรจุ isoniazid ผสมกับ pyrazinamide ชนิดผงแห้งสำหรับสูดพ่นสู่ทางเดินหายใจ
3. เป็นการปรับปรุงการใช้ยาวัณโรคเดิมในแนวทางใหม่เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการรักษามากขึ้น
4. สามารถเผยแพร่ในเอกสารทางวิชาการ (technical paper)
5. กลุ่มเป้าหมายที่จะได้รับประโยชน์คือ ผู้ป่วยวัณโรค

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 2
ทฤษฎี เอกสาร และผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วัณโรค (Tuberculosis) ยังคงเป็นโรคติดเชื้อที่เป็นปัญหาด้านสาธารณสุข ข้อมูลจากองค์การอนามัยโลกปี 2561 พบว่าวัณโรคเป็นหนึ่งในสาเหตุการเสียชีวิตสูงสุดทั่วโลก 10 อันดับแรก และเป็นสาเหตุการเสียชีวิตสูงสุดที่เกิดจากการติดเชื้อเพียงชนิดเดียว (มากกว่าการเสียชีวิตจากการติดเชื้อ HIV/AIDS) ในแต่ละปียังคงพบผู้ป่วยวัณโรคเพิ่มขึ้นปีละหลายล้านคน และคาดว่ามีผู้ติดเชื้อวัณโรคระยะแฝงทั่วโลกประมาณ 1.7 พันล้านคนหรือประมาณ 23% ของประชากรโลก ซึ่งมีความเสี่ยงที่จะพัฒนาเป็นผู้ป่วยวัณโรคได้ ประเทศไทยติดอันดับ 30 ประเทศที่มีปัญหาวัณโรคสูง ปัจจุบันการระบาดของวัณโรคมีความวิกฤตมากขึ้นเนื่องจากเกิดปัญหาเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (multiple drug-resistant TB; MDR-TB) (World health organization, 2019)

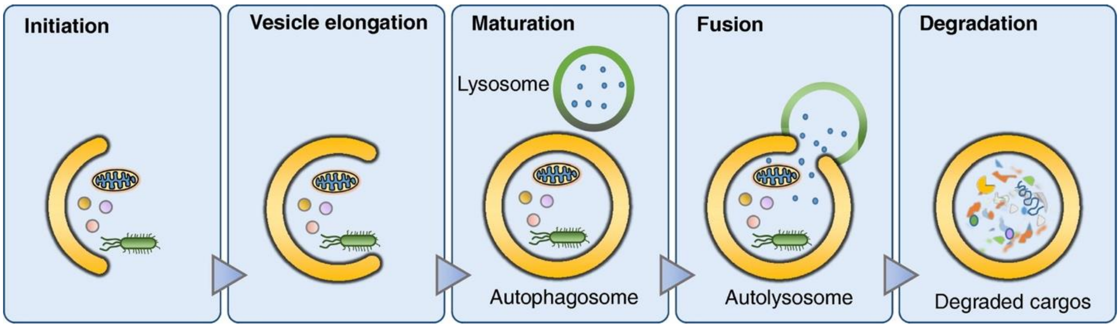
วัณโรคเกิดจากการสูดเอาเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ที่อาศัยอยู่ในละอองฝอยที่เกิดจากการไอหรือจามของผู้ป่วยวัณโรคเข้าสู่ทางเดินหายใจและตกลงในถุงลมปอด หลังจากนั้นจะถูกจับกินโดยเซลล์ macrophage ที่อาศัยอยู่บริเวณนั้น (Gupta, *et al*., 2016; Costa *et al*. 2016) เชื้อวัณโรคมีกลไกต่อต้านการย่อยสลายเชื้อของเซลล์ macrophage โดยยับยั้งการรวมตัวของ phagosome กับ lysosome (ทำหน้าที่ย่อยสลายเชื้อใน phagosome) ทำให้เชื้อวัณโรคสามารถอาศัยและแบ่งตัวอยู่ภายในเซลล์ macrophage ได้ (Moraco and Kornfield, 2014; Nakahira, *et al*., 2016) แนวทางการรักษาวัณโรคในปัจจุบันอ้างอิงจาก WHO guidelines คือบริหารยาโดยการรับประทานยาต้านวัณโรคในแนวทางที่ 1 (first-line antituberculosis drug) คือ isoniazid, pyrazinamide, rifampicin และ ethambutol ทุกวันติดต่อกัน 2 เดือนตามด้วย isoniazid และ rifampicin ติดต่อกันอีก 4 เดือน หากพบว่ารักษาไม่ได้ผลหรือมีการดื้อยาก็จะเปลี่ยนมารับประทานยาต้านวัณโรคในแนวทางที่ 2 (second-line antituberculosis drug) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการรักษาต่ำกว่าในขณะที่มีผลข้างเคียงมากกว่า (กรมควบคุมโรค, 2561) จากการรับประทานยาหลายชนิดติดต่อกันเป็นระยะเวลานานและปัญหาจากผลข้างเคียงจากยา ทำให้ผู้ป่วยไม่ให้ความร่วมมือในการใช้ยา รับประทานยาไม่ต่อเนื่องหรือมีการขาดยา รับยาได้ไม่ครบตามระยะเวลาของสูตรรักษา ทำให้เกิดอุบัติการณ์ดื้อยาของวัณโรคมากขึ้นทั้งวัณโรคที่ดื้อยาหลายขนาน (multidrug-resistant TB; MDR-TB) ซึ่งดื้อต่อยา isoniazid และ rifampicin พร้อมกันและอาจจะดื้อต่อยาขนานอื่น ๆ ร่วมด้วย หรือวัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรงมาก (Extensively drug resistant TB; XDR-TB) คือวัณโรคดื้อยาหลายขนานที่ดื้อยาในกลุ่ม fluoroquinolone และยารักษาวัณโรคทางเลือกที่ 2 ชนิดฉีดด้วย ซึ่งวัณโรคดื้อยาทำให้การรักษาวัณโรคทำได้ยากและซับซ้อนมากขึ้นและส่งผลให้เกิดความล้มเหลวใน

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

การรักษา (Pharm, *et al.*, 2015; Gupta, *et al.*, 2016; Kurz, *et al.*, 2016; Kolloili and Subbian, 2017)

Host-directed therapy เป็นแนวทางใหม่ในการฆ่าเชื้อวัณโรคที่อาศัยอยู่ในเซลล์ macrophage ทำโดยการนำส่งสารโมเลกุลขนาดเล็กที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการกระตุ้นเซลล์ macrophage ให้ตอบสนองต่อการติดเชื้อด้วยกลไกต่างๆภายในเซลล์เช่นกระตุ้นการเกิด autophagy แล้วทำให้เซลล์ macrophage สามารถฆ่าเชื้อวัณโรคที่อาศัยอยู่ภายในได้ autophagy เป็นกระบวนการสร้างสมดุลของเซลล์โดยการย่อยตัวเองของ lysosome เมื่อเซลล์พบว่ามีความเสียหายภายในเซลล์หรือเกิดการติดเชื้อภายในเซลล์ รูปที่ 1 แสดงกลไกการเกิด autophagy เริ่มจากเซลล์สร้างผนังสองชั้นห่อหุ้มส่วนประกอบที่เกิดความเสียหายหรือห่อหุ้มเชื้อโรคที่อาศัยอยู่ในเซลล์ เรียกว่า "autophagosome" และจะถูกนำส่งไปรวมตัวกับ lysosome เรียกว่า autophagolysosome ซึ่งมีสารต้านเชื้อจุลินทรีย์จำพวก antimicrobial peptide จำนวนมากกว่า phagolysosome ปกติ ทำให้เกิดการย่อยสลายส่วนประกอบของเซลล์และฆ่าเชื้อที่อยู่ภายในได้ (Nakahira, *et al.*, 2016) โดยปกติเชื้อวัณโรคที่อาศัยในเซลล์ macrophage สามารถยับยั้งกลไก autophagy ได้ แต่สามารถใช้สารโมเลกุลเล็กกระตุ้นกลไก autophagy ในเซลล์ได้ (Paik, *et al.*, 2019) เช่น Kim และคณะ (2012) พบว่า isoniazid และ pyrazinamide ซึ่งเป็นยาต้านวัณโรคในแนวทางที่หนึ่งสามารถกระตุ้นกลไก autophagy และเหนี่ยวนำให้เกิด phagosomal maturation ในเซลล์ macrophage ที่ติดเชื้อวัณโรคได้ ดังนั้นแนวทางใหม่สำหรับการรักษาวัณโรคคือการนำส่งยาต้านวัณโรคคือ isoniazid และ pyrazinamide ซึ่งมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ mycobacterial และสามารถกระตุ้นกลไก autophagy ในรูปแบบแอโรโซลผ่านทางเดินหายใจไปยังเซลล์ macrophage ในถุงลมปอดเช่นเดียวกับการเข้าสู่ร่างกายของเชื้อวัณโรค

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



รูปที่ 1 ขั้นตอนต่างๆของกลไก autophagy (Nakahira, *et al.*, 2016)

การบริหารยาสู่แอโรโซลสู่ทางเดินหายใจเป็นวิธีที่ไม่รุกล้ำร่างกาย (non-invasive) ช่วยลดขนาดยา ลดความถี่ในการบริหารยา ลดความเป็นพิษของยาทั่วร่างกาย ส่งผลให้ผู้ป่วยมีการติดตามในการใช้ยาที่ดีขึ้นและเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาได้ (Parumasivam *et al*., 2016) นอกจากนี้การห่อหุ้มตัวยาสำคัญไว้ภายในระบบอนุภาคนาโนเพิ่มศักยภาพและมีประโยชน์ในการนำส่งยาสู่ปอดเพื่อให้เกิดการจับกินของเซลล์ macrophage ได้ดี ปัจจัยหลักที่ควบคุมการนำส่งยาให้ลงไปถึงทางเดินหายใจส่วนล่างคือขนาดอนุภาคคือหากอนุภาคมีขนาดใหญ่กว่า 10 ไมโครเมตรจะเกิดการชนและติดอยู่ที่ทางเดินหายใจส่วนบน อนุภาคขนาด 0.5-5 ไมโครเมตรจะตกลงมาและเกาะติดที่บริเวณทางเดินหายใจส่วนล่างได้ หากอนุภาคขนาด 3-5 ไมโครเมตรจะอยู่ที่ conducting airway แต่ถ้าเล็กกว่า 3 ไมโครเมตรจะสามารถตกสู่บริเวณถุงลมปอดได้ ดังนั้นเฉพาะอนุภาคแอโรโซลที่มีขนาดเล็กกว่า 5 ไมโครเมตรเท่านั้นจึงจะมีประสิทธิภาพในการนำส่งอนุภาคยาไปถึงปอดส่วนล่างได้ เรียกว่า “respirable fraction” (Taylor and Kellaway, 2005)

Chitosan เป็นสารโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากธรรมชาติที่สามารถเข้ากับร่างกายได้ มีความคงตัวสูง ปลอดภัย ไม่เป็นพิษ มีคุณสมบัติชอบน้ำและสามารถย่อยสลายได้ (Liu *et al*., 2008) ยึดเกาะกับเยื่อเมือกได้ดีจึงเพิ่มระยะเวลาในการปลดปล่อยยาในทางเดินหายใจได้ chitosan สามารถทำปฏิกิริยากับ mannose receptor ของ macrophage ทำให้เพิ่มการ phagocytosis มากขึ้น (Miranda *et al*., 2018; Rawal *et al*., 2018) จากคุณสมบัติทางประจุของ chitosan คือเป็นโพลิเมอร์ประจุบวกที่สามารถทำปฏิกิริยากับสารประจุลบได้เป็นโครงสร้างอนุภาคขนาดนาโนซึ่งใช้เป็น carrier ของยาได้ (Depnath *et al*., 2018) เรียกการเกิดอนุภาคนาโนแบบนี้ว่า ionotropic gelation ซึ่งมีข้อดีคือการเตรียมตำรับไม่ต้องอาศัยสารเคมีในการทำให้เกิด cross-link จึงลดความเสี่ยงต่อการได้รับพิษจากสารเคมีและพบว่าอนุภาคนาโนที่เตรียมจาก chitosan มีความปลอดภัย ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ในระบบทางเดินหายใจ (Grenha *et al*., 2007) ในปี 2011 Pourshahab และคณะศึกษาการเตรียมตำรับอนุภาคนาโนจาก chitosan ที่มียา isoniazid โดยเทคนิคการเกิดเจลระหว่างประจุกับสารไตรโพลีฟอสเฟตซึ่งมีประจุลบเพื่อนำส่งสู่ทางเดินหายใจพบว่า MIC ต่อเชื้อ mycobacterial ของตำรับมีค่าลดต่ำลงและเมื่อเปลี่ยนเป็นผงแห้งก็สามารถทำให้ได้ขนาดที่สามารถนำส่งสู่ทางเดินหายใจส่วนล่างได้

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

1. สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1.1. สารเคมี

- Isoniazid
- Pyrazinamide
- Chitosan
- Tripolyphosphate
- Acetic acid
- Mannitol
- Acetonitrile (HPLC solvent)

1.2. เครื่องมือที่ใช้

- High speed homogenizer
- Ultrasonic bath
- HPLC (Spectra SYSTEM^{TM}, Thermo Fisher Scientific, Inc., USA)
- Hypersil™ BDS C18 Column (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA)
- Syringe filter 0.45 µm
- Zetasizer
- Freeze drier
- Andersen cascade impactor (ACI; Atlanta, GA, USA)
- Cell culture CO_2 incubator
- Laminar air flow cabinet
- Inverted microscope
- Microcentrifuge
- Ultracentrifuge
- Scanning electron microscope; SEM (MIRA3, TESCAN, Czech Republic)
- Powder X-Ray diffractometer (Siemens D 500; Siemens Analytical X-ray Instrument, Inc., Madison, WI)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

- Fourier transform-infrared spectrophotometer ; FT-IR (Nicolet 4700, Thermo Fischer Scientific, USA)
- Differential scanning calorimeter; DSC (DSC 2920, TA Instrument, Newcastle, UK)
- Microplate reader (Biohit BP 800, Helsinki, Finland)

1.3. เซลล์เพาะเลี้ยง อาหารเลี้ยงเซลล์ และชุดทดสอบ ELISA

- The human lung adenocarcinoma cell line (A549) (ATCC: CCL185, USA)
- The human Caucasian bronchioalveolar carcinoma (NCI-H358) (ECACC, UK)
- The rat lung alveolar macrophages (NR8383) (ATCC: CRL 2192, USA)
- Kaighn's modification of Ham's F-12 Medium
- RPMI 1640 medium containing 2mM Glutamine
- Quantikine RTA00 kits สำหรับ TNF-α และ Quantikine RLB00 kits สำหรับ IL-1β (R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, USA))

2. การออกแบบการวิจัย

2.1. การเตรียมตำรับอนุภาคอนุภาคนาโนไคโตซานที่บรรจุ isoniazid ผสมกับ pyrazinamide

การเตรียมตำรับอนุภาคอนุภาคนาโนไคโตซานที่บรรจุ isoniazid ผสมกับ pyrazinamide ด้วยเทคนิคการเกิดเจลแบบไอออนิก (ionic-gelation) โดยการทำปฏิกิริยาระหว่างสารประจุลบคือ tripolyphosphate กับสารประจุบวกคือ chitosan ที่อัตราส่วนต่างๆ 5 อัตราส่วน และความเข้มข้น tripolyphosphate 3 ระดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 อัตราส่วน tripolyphosphate (TPP) ต่อ chitosan (chitosan) ที่ความเข้มข้นของ tripolyphosphate ต่างๆ

อัตราส่วนระหว่าง (TPP : Chitosan)	ความเข้มข้น chitosan ที่ใช้ (%)		
	0.1%TPP	0.2%TPP	0.3%TPP
1:1	0.1	0.2	0.3
1:2	0.2	0.4	0.6
1:3	0.3	0.6	0.9
1:4	0.4	0.8	1.2
1:5	0.5	1.0	1.5

2.1.1 การเตรียมสารละลาย tripolyphosphate

- ชั่งสาร tripolyphosphate ปริมาณ 0.1, 0.2, 0.3 g ใส่ในบีกเกอร์สำหรับการเตรียมสารละลาย tripolyphosphate ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3% w/v ตามลำดับ
- ละลายและปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำ purified water
- วัด pH ด้วยเครื่อง pH meter

2.1.2 การเตรียมสารละลาย chitosan

- เตรียม stock สารละลาย chitosan ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5% w/v โดยชั่งผง chitosan ปริมาณ 0.5, 1.0 และ 1.5 กรัม ตามลำดับ โปรยลงในสารละลาย 1% acetic acid และกวนสารละลายด้วยเครื่อง magnetic stirrer จนไคโตซานละลายหมด
- เจือจางความเข้มข้นของ chitosan ตามอัตราส่วน 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 และ 1:5 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของสารละลาย chitosan ตามที่ต้องการจะนำไปใช้ในแต่ละตำรับ

2.1.3 การเตรียมยาผสมของ isoniazid กับ pyrazinamide

- บดผงยาผสมของ isoniazid กับ pyrazinamide และนำไปชั่งโดยให้มีอัตราส่วนยา isoniazid ต่อ pyrazinamide เท่ากับ 1:5 ซึ่งเป็นอัตราส่วนเดียวกับขนาดยา isoniazid และ pyrazinamide ชนิดรับประทาน (Pascual *et al*., 2018)
- นำผงยาทั้งสองชนิดมาผสมให้เข้ากันได้เป็น INH-PZA Mixture

2.1.4 การเตรียมตำรับอนุภาคนาโนไคโตซานที่บรรจุ isoniazid ผสมกับ pyrazinamide

- ชั่งผงยาผสม INH-PZA Mixture ปริมาณ 0.6 กรัมเติมลงในสารละลายไคโตซานและปั่นด้วย magnetic stirrer ต่อเนื่องจนกระทั่งผงยาละลายหมด
- ค่อยๆหยดสารละลาย tripolyphosphate ลงในสารละลาย chitosan พร้อมกับปั่นผสมด้วยเครื่อง high-speed homogenizer ขั้นตอนนี้จะเกิดเป็นอนุภาคนาโนไคโตซานบรรจุ isoniazid ผสมกับ pyrazinamide เมื่อหยดสารละลายหมดปั่นต่อไปอีก 15 นาที
- นำตำรับที่ได้ไป ultrasonicate นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

2.2. การประเมินตำรับอนุภาคนาโนไคโตซานที่บรรจุ isoniazid ผสมกับ pyrazinamide

2.2.1 การวัดขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค ค่าศักย์ซีต้า

- วัดขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค ค่าศักย์ซีต้า ด้วยเครื่อง Zetasizer
- ทำซ้ำ 3 ครั้งเพื่อหาค่าเฉลี่ย

2.2.2 วัด pH ด้วยเครื่อง pH meter

2.2.3 การหาปริมาณยาที่กักเก็บอยู่ในอนุภาคนาโนไคโตซานด้วยวิธี indirect method

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

- การหาปริมาณยาทั้งหมดในตำรับ (total drug)
  - ดูดสารละลายตัวอย่าง 20 µl ใส่ใน volumetric flask ปริมาตร 25 mL เติมสารละลาย 1% acetic acid 5 mL เพื่อละลายไคโตซานให้ปลดปล่อยตัวยาที่บรรจุอยู่ภายในออกมา แล้วปรับปริมาตรด้วย ultrapure water
  - กรองสารตัวอย่างด้วย syringe filter (0.45 µm) แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณยาด้วยเทคนิค HPLC
- การหาปริมาณที่ไม่ถูกกักเก็บอยู่ภายในอนุภาค (unentrapped drug)
  - แยกอนุภาคนาโนออกจากตำรับโดยการปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (ultracentrifuge) ที่ความเร็ว 100000 รอบ นาน 60 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
  - นำส่วนน้ำใสเหนือตะกอนไปวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาสำคัญด้วยเทคนิค HPLC

2.2.4 สภาวะสำหรับการวิเคราะห์ HPLC พร้อมกันทั้ง isoniazid และ pyrazinamide

- HPLC Detector: UV 254 nm
  - Column: Hypersil™ BDS C18 Column (150 x 4.6 mm i.d., 5 µm)
  - Mobile Phase: 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4): Acetonitrile อัตราส่วน 97:3 (v/v)
  - Retention time: 3.1 min (isoniazid) and 4.2 min (pyrazinamide)

2.2.5 การคำนวณหาร้อยละการกักเก็บของยาในอนุภาคนาโนไคโตซาน (% Entrapment Efficiency; %EE)

คำนวณโดยใช้สูตร

$$\% EE = \frac{\text{ปริมาณยา INH หรือ PZA ทั้งหมด - ปริมาณยา INH หรือ PZA ที่ไม่ถูกกักเก็บ}}{\text{ปริมาณยา INH หรือ PZA ทั้งหมด}} \times 100$$

2.3. การทำอนุภาคนาโนไคโตซานรูปแบบผงแห้ง

คัดเลือกตำรับอนุภาคไคโตซานมาทำแห้งโดยเทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze – drying) โดยมีน้ำตาลแมนนิทอลเป็นสารที่ป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง (cryoprotectant) ที่ความเข้มข้น 10% กำหนดสภาวะดังนี้คือ

- Pre-freezing อุณหภูมิ -80 $^{\circ}$C
- Primary drying อุณหภูมิ 0 $^{\circ}$C นาน 24 ชั่วโมง
- Secondary drying อุณหภูมิ 20 $^{\circ}$C นาน 2 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.4. การประเมินตำรับอนุภาคนาโนไคโตซานที่บรรจุไอโซไนอาซิดผสมกับไพราซินาไมด์ผงแห้ง

2.4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผงแห้งโดยการถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopy; SEM) โดยการเคลือบทองที่ตัวอย่างและถ่ายภาพตัวอย่างที่กำลังขยาย 5000 เท่า

2.4.2 การประเมินการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางความร้อน โดยใช้เครื่องมือ differential scanning calorimeter (DSC) โดยชั่งสารตัวอย่างใส่อะลูมิเนียมแพนแล้วปิดผนึก ให้ความร้อนที่อัตราเร่ง 10 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก 25 ถึง 300 องศาเซลเซียส

2.4.3 การศึกษาความเป็นผลึกของผงตัวอย่างโดยใช้เครื่องมือ powder X-ray diffraction (PXRD) โดยบรรจุสารตัวอย่างในช่องกระจกพื้นที่ขนาด 4 ตารางเซนติเมตร ลึก 1 มิลลิเมตร กดผิวตัวอย่างให้เรียบ บันทึกการสะท้อนกลับของรังสีเอ็กซ์ที่มุม 2θ จาก 3 ถึง 60° โดยเพิ่มครั้งละ 0.05° ทุกๆ 1 วินาที รวมเวลา 19 นาที

2.4.4 การศึกษาอันตรกิริยาของตัวยาสำคัญกับส่วนประกอบในตำรับด้วยเทคนิค Fourier transmission infrared spectroscopy (FT-IR) โดยบันทึก spectra ในช่วงความถี่ 4000-400 cm^{-1}

2.5. การประเมินความสามารถในการนำส่งตำรับอนุภาคนาโนไคโตซานที่บรรจุ isoniazid ผสมกับ pyrazinamide ผงแห้งสู่ทางเดินหายใจส่วนล่างโดย Andersen cascade impactor

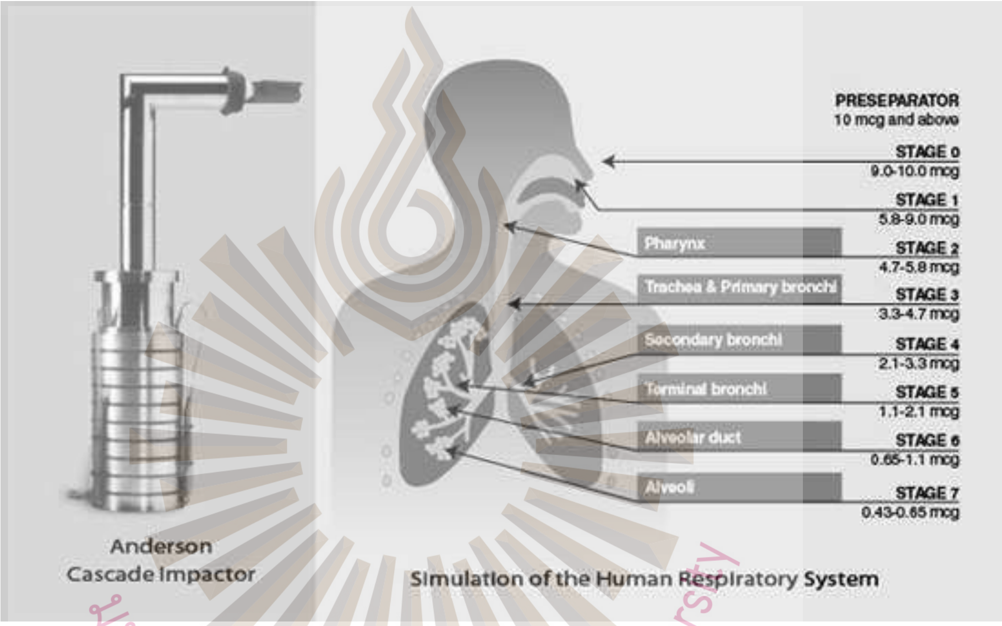
Andersen cascade impactor หรือ ACI (รูปที่ 2) เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในการประเมินการกระจายขนาดอนุภาคแอโรโซลซึ่งออกแบบจำลองให้สัมพันธ์กับลักษณะทางกายวิภาคของท่อทางเดินหายใจของมนุษย์ (Timsina, *et al.*, 1994; Hickey and Jones, 2000) ACI ประกอบด้วยชั้นเก็บตัวอย่าง 8 ชั้น โดยในแต่ละชั้นจะประกอบด้วยรูเปิดจำนวนมากที่มีขนาดแตกต่างกันโดยชั้นบนสุดจะมีรูเปิดขนาดใหญ่และรูเปิดจะค่อยๆเล็กลงในชั้นล่างลงมา อนุภาคใดๆที่ตกกระทบใน ACI ชั้นที่ 6-7 จะหมายถึงอนุภาคที่สามารถนำส่งได้ถึงถุงลมปอด

- ชั่งตัวอย่างผงแห้งหนัก 30 มิลลิกรัมบรรจุในอุปกรณ์นำส่งยาชนิดแก้วที่ออกแบบเองในห้องปฏิบัติการและต่อกับ mouth piece ของอุปกรณ์ Andersen cascade impactor (ACI) (Atlanta, GA, USA) ซึ่งต่อกับปั๊มสูญญากาศที่กำหนดความเร็วลมเป็น 60 ลิตรต่อนาที
- เปิดปั๊มเป็นเวลา 10 วินาที เพื่อให้ผงยาถูกดูดเข้าและกระจายไปยังชั้นต่างๆ บน Andersen cascade impactor
- ใช้น้ำบริสุทธิ์ชะยาที่ติดอยู่บนชั้นต่างๆลงใน volumetric flask แล้วปรับปริมาตร
- วิเคราะห์หาปริมาณยาโดยเทคนิค HPLC ตามสภาวะในข้อ 2.2.4
- นำปริมาณยาที่ติดอยู่ในชั้นต่างๆ ไปคำนวณหาค่าพารามิเตอร์

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

- *Mass median aerodynamic diameter (MMAD)* คือขนาดอนุภาคแบบแอโรไดนามิคที่มีค่า Z-value เท่ากับศูนย์
- *% Fine particle fraction (%FPF)* คือสัดส่วนผงยาที่มีขนาดอนุภาคเล็กกว่า 5 ไมโครเมตรและสามารถนำส่งสู่ทางเดินหายใจส่วนล่างได้
- *% Emitted dose (%ED)* คือปริมาณยาที่สามารถปลดปล่อยออกจากอุปกรณ์นำส่งได้

(Srichana, *et al*., 2003)



มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

รูปที่ 2 Andersen cascade impactor และความสัมพันธ์กับลักษณะทางกายวิภาคของท่อทางเดินหายใจของมนุษย์ (BUCHAN, 2011)

2.6. การประเมินความปลอดภัยของตำรับอนุภาคนาโนไคโตซานที่บรรจุ isoniazid ผสมกับ pyrazinamide ผงแห้งชนิดสูดทางเดินหายใจ

การทดสอบความเป็นปลอดภัยของอนุภาคนาโนไคโตซานบรรจุ isoniazid ผสมกับ pyrazinamide ผงแห้งต่อเซลล์ในระบบทางเดินหายใจจะทำการทดสอบความเป็นพิษของตำรับต่อเซลล์ 3 ชนิดคือ เซลล์เพาะเลี้ยง A 549 (human lung adenocarcinoma) เป็นตัวแทนของเซลล์เยื่อบุทางเดินหายใจส่วนล่าง, เซลล์เพาะเลี้ยง NCI-H358 (human Caucasian bronchioalveolar carcinoma) เป็นตัวแทนของเซลล์เยื่อบุทางเดินหายใจส่วนบน และเซลล์เพาะเลี้ยง NR8383 (rat

lung alveolar macrophage) เป็นเซลล์ที่เป็นตัวแทนของเซลล์ macrophage ที่ทำหน้าที่จับกินสิ่งแปลกปลอมในถุงลมปอดและอาจตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมโดยสร้าง inflammatory cytokine ออกมาซึ่งจะเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อปอดได้ ดังนั้นจึงต้องประเมินการตอบสนองของเซลล์ macrophage ต่อตำรับที่พัฒนาขึ้นเพื่อเป็นการประเมินความปลอดภัยเบื้องต้นด้วย

2.6.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

- เซลล์เพาะเลี้ยง A 549 (human lung adenocarcinoma) เลี้ยงในอาหาร Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium ที่มี 10% fetal bovine serum และ antibiotics (100 U penicillin และ 100 U/ml streptomycin) ในตู้บ่มเพาะที่มี 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C.

- เซลล์เพาะเลี้ยง NCI-H358 (human Caucasian bronchioalveolar carcinoma)) เลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 medium ที่มี 2mM Glutamine ที่มี 10% fetal bovine serum และ antibiotics (100 U penicillin และ 100 U/ml streptomycin) ในตู้บ่มเพาะที่มี 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C.

- เซลล์เพาะเลี้ยง NR8383 (rat lung alveolar macrophage) เลี้ยงในอาหาร Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium ที่มี 10% fetal bovine serum และ antibiotics (100 U penicillin และ 100 U/ml streptomycin) ในตู้บ่มเพาะที่มี 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C.

2.6.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay

- เตรียมเซลล์ A 549 หรือ NCI-H358 หรือ NR 8383 ความหนาแน่น 1 x 10^5 cells/mL ปริมาตร 100 µL ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม เพาะเลี้ยงบ่มในตู้อบแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

- เมื่อครบระยะเวลาเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงโดยเติมอาหารเพาะเลี้ยงใหม่ปริมาตร 100 µL

- เติมอาหารเพาะเลี้ยงที่มีตัวอย่างที่ต้องการทดสอบคือ สูตรตำรับผงแห้งที่พัฒนาได้ที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไปอีก 100 µL นำไปบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง

- ดูดอาหารเพาะเลี้ยงออก เติมอาหารเพาะเลี้ยงใหม่ 150 µL แล้วเติมสารละลาย MTT (5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 50 µL ลงไป บ่มต่อเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง

- เมื่อครบเวลาดูดสารละลาย MTT ออกแล้วเติมสารละลาย DMSO (Dimethylsulfoxide) 200 µL เพื่อละลายผลึกฟอร์มาซาน (formazan crystal) ที่ถูกสร้างขึ้นจากเซลล์ที่มีชีวิต

- วัดค่าการดูดกลืนแสงของผลึกฟอร์มาซานที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader

- นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้มาแปลผลเป็นร้อยละของการรอดชีวิตของเซลล์ (% cell viability) โดยร้อยละของการรอดชีวิตของเซลล์จะเท่ากับค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่สาร

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตัวอย่างต่อค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุมไม่ใส่สารตัวอย่างใดๆ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ (triplicate)

2.6.3 การประเมินการตอบสนองของเซลล์แมโครฟาจต่อตำรับที่พัฒนาขึ้น

2.6.3.1 ประเมินการสร้าง inflammatory cytokines (Interleukine 1β และ Tumor necrosis factor-α)

- เตรียมเซลล์ NR 8383 ความหนาแน่น 5 x 10^6 cells/mL ปริมาตร 100 µL ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม เพาะเลี้ยงบ่มในตู้อบแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

- เมื่อครบระยะเวลาเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงโดยเติมอาหารเพาะเลี้ยงใหม่ปริมาตร 100 µL

- เติมอาหารเพาะเลี้ยงที่มีตัวอย่างที่ต้องการทดสอบคือสูตรตำรับผงแห้งที่พัฒนาได้ที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไปอีก 100 µL ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 100 µL สำหรับเป็น negative control และใช้ lipopolysaccharide (LPS) ของ *E. coli* เป็น positive control ในการกระตุ้นการตอบสนองของเซลล์แมโครฟาจนำไปบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง

- วิเคราะห์ปริมาณ TNF-α หรือ IL-1β ที่สร้างขึ้นโดยใช้ ELISA assay kit (R&D Systems, MN, USA) ดังนี้

- นำ supernatant จากเซลล์ที่ทำการทดสอบ 50 µL เติมลงไปในหลุมของ ELISA assay kit บ่มไว้ 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง
- เมื่อครบเวลาล้างด้วยบัฟเฟอร์ แล้วเติม TNF-α หรือ IL-1β conjugate ปริมาตร 100 µL บ่มไว้ 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง
- เมื่อครบเวลาล้างด้วยบัฟเฟอร์ แล้วเติมสารละลาย substrate ปริมาตร 100 µL บ่ม 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
- เมื่อครบเวลาเติม stop solution ปริมาตร 100 µL
- หาปริมาณ TNF-α หรือ IL-1β โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 nm เทียบกับกราฟมาตรฐานของ TNF-α หรือ IL-1β

2.6.3.2 ประเมินการสร้าง nitric oxide

- เตรียมเซลล์ NR 8383 ความหนาแน่น 5 x 10^6 cells/mL ปริมาตร 100 µL ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม เพาะเลี้ยงบ่มในตู้อบแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

- เมื่อครบระยะเวลาเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงโดยเติมอาหารเพาะเลี้ยงใหม่ปริมาตร 100 µL

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

- เติมอาหารเพาะเลี้ยงที่มีตัวอย่างที่ต้องการทดสอบคือสูตรตำรับผงแห้งที่พัฒนาได้ที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไปอีก 100 µL ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 100 µL สำหรับเป็น negative control และใช้ lipopolysaccharide (LPS) ของ *E. coli* เป็น positive control ในการกระตุ้นการตอบสนองของเซลล์ macrophage นำไปบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง100 µL
- วิเคราะห์ปริมาณ nitric oxide โดยใช้ Griess reaction ดังนี้
  - เติม Griess reagent (1% N-(1-Napthyl)-ethylenediamine dihydrochloride and 1% sulfanilamide in 2.5% phosphoric acid) ปริมาตร 100 µL ผสมกับ supernatant จากเซลล์ที่ทำการทดสอบ 100 µL
  - หากมี nitric oxide สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูความเข้มของสีแปรผันตามปริมาณ nitric oxide และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เปรียบเทียบปริมาณกับกราฟมาตรฐานของ nitric oxide (Punthuree, *et al*., 2004)

3. ประชากร

ทำการศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro*) และศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงโดยใช้เซลล์ในทางเดินหายใจคือเซลล์เพาะเลี้ยง A 549 (human lung adenocarcinoma) เซลล์เพาะเลี้ยง NCI-H358 (human Caucasian bronchioalveolar carcinoma) และเซลล์เพาะเลี้ยง NR8383 (rat lung alveolar macrophage) ทุกการศึกษาจะใช้จำนวนตัวอย่างมากกว่าหรือเท่ากับ 3

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้สถิติเชิงพรรณนาโดยแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ร่วมกับ Analysis of variance (ANOVA) โดยใช้ Post hoc test ($p < 0.05$) ในการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างข้อมูลแต่ละกลุ่มด้วยโปรแกรม SPSS

5. การดำเนินการวิจัย

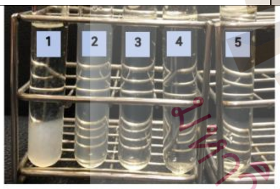
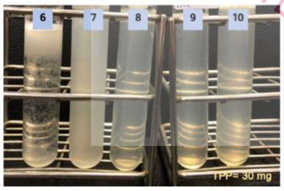
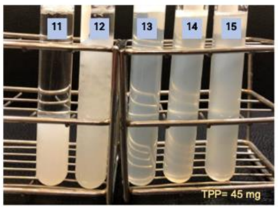
- ดำเนินการวิจัยในห้องทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการเภสัชอุตสาหกรรมและห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีเภสัชกรรม วิทยาลัยเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต
- ดำเนินการวิจัยนอกสถานที่ ณ สถานวิจัยความเป็นเลิศระบบนำส่งยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- ส่งตัวอย่างตรวจวิเคราะห์บางหัวข้อ เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยา, การเปลี่ยนแปลงสมบัติทาง ความร้อน และความเป็นผลึกที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยภายนอก

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

อนุภาคนาโนไคโตซานที่บรรจุยาผสม isoniazid และ pyrazinamide (IP-CNPs) สามารถเตรียมได้โดยใช้เทคนิคการเกิดเจลแบบไอออนิคร่วมกับการ ultrasonication อนุภาคนาโนเกิดจากการสารประจุบวกคือ chitosan ซึ่งมีตัวยาสำคัญของตำรับคือ isoniazid ผสมกับ pyrazinamide ที่อัตราส่วน 1:5 ละลายอยู่ทำปฏิกิริยากับสารประจุลบคือ tripolyphosphate (TPP) เนื่องจากอัตราส่วนของ TPP: chitosan ที่แตกต่างกันทำให้ได้คุณลักษณะของตำรับที่แตกต่างกันทั้งเรื่องของขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค ค่าศักย์ซีต้า (zeta potential) รวมถึงประสิทธิภาพการกักเก็บงานวิจัยนี้จึงศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของสารสองประจุเพื่อหาตำรับที่เหมาะสมในการพัฒนาตำรับผงแห้ง โดยปรับเปลี่ยนอัตราส่วนระหว่าง TPP: chitosan เป็น 1:1 ถึง 1:5 และปรับความเข้มข้นของสารละลาย TPP ที่ความเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับคือ 0.1, 0.2, and 0.3% w/v ทำให้ได้สูตรตำรับที่แตกต่างกัน 15 สูตร ลักษณะทางกายภาพของตำรับที่เตรียมได้ดังแสดงในตารางที่ 2.

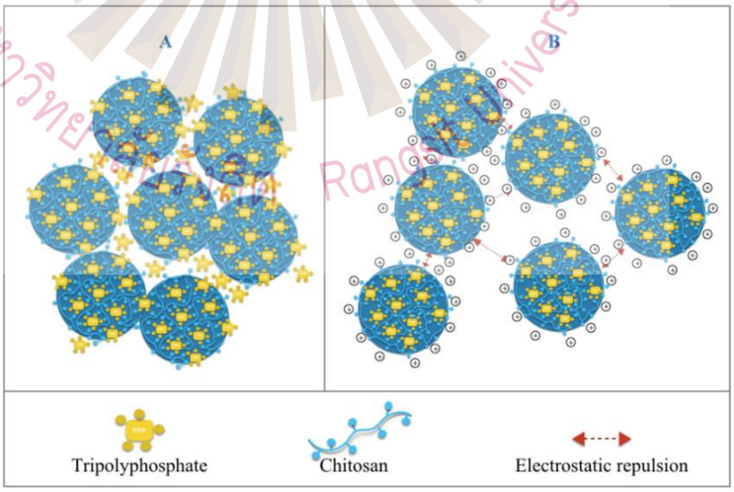
ตารางที่ 2 ลักษณะทางกายภาพของตำรับ IP-CNPs

	F	CS	Ratio	Size (nm)	PDI	Zeta	%Entrap
	1	0.1%	1:1	ตกตะกอน	ND	ND	ND
	2	0.2%	1:2	2574.5 ± 348.0	0.871 ± 0.208	12.36 ± 0.42	ND
	3	0.3%	1:3	249.7 ± 5.0	0.304 ± 0.027	25.92 ± 0.97	26.23 ± 0.28
	4	0.4%	1:4	282.0 ± 22.8	0.333 ± 0.052	36.29 ± 0.79	27.44 ± 0.75
TPP =0.1%	5	0.5%	1:5	538.8 ± 20.3	0.344 ± 0.006	37.44 ± 0.27	25.40 ± 0.13
	6	0.2%	1:1	ตกตะกอน	ND	10.13 ± 1.00	ND
	7	0.4%	1:2	ตกตะกอน	ND	16.27 ± 0.65	ND
	8	0.6%	1:3	279.4 ± 5.0	0.324 ± 0.029	29.27 ± 1.09	30.37 ± 0.15
	9	0.8%	1:4	1266.4 ± 89.5	0.547 ± 0.049	32.34 ± 0.90	27.96 ± 1.07
TPP =0.2%	10	1.0%	1:5	2263.8 ± 80.7	0.899 ± 0.065	29.27 ± 0.47	27.67 ± 0.20
	11	0.3%	1:1	ตกตะกอน	ND	7.12 ± 0.89	ND
	12	0.6%	1:2	ตกตะกอน	ND	12.57 ± 0.73	ND
	13	0.9%	1:3	576.4 ± 36.2	0.402 ± 0.031	25.36 ± 1.39	29.17 ± 0.08
	14	1.2%	1:4	2740.0 ± 297.7	1.064 ± 0.018	27.71 ± 0.90	29.46 ± 0.38
TPP =0.2%	15	1.5%	1:5	8129.0 ± 1218.9	2.934 ± 0.322	29.24 ± 0.27	25.61 ± 0.38

ขนาดอนุภาค, การกระจายขนาดอนุภาค และค่าศักย์ซีต้า (zeta potential) อนุภาคนาโนไคโตซานที่บรรจุยาผสม isoniazid และ pyrazinamide (IP-CNPs)

ผลของอัตราส่วนระหว่าง TPP: chitosan ต่อการเกิดอนุภาค IP-CNPs

อนุภาคนาโนไคโตซานสามารถเตรียมได้ที่อัตราส่วน TPP: chitosan เท่ากับ 1:3, 1:4, และ 1:5 ที่ทุกระดับความเข้มข้นของ TPP ในขณะที่ที่อัตราส่วน TPP: chitosan เท่ากับ 1:1 และ 1:2 จะเกิดการรวมกลุ่มกันของอนุภาค (aggregation) แล้วทำให้ตำรับตกตะกอน โดยสามารถอธิบายได้ดังรูปที่ 3A คือเมื่ออัตราส่วนระหว่าง TPP:Chitosan เป็น 1:1 หรือ 1:2 ประจุบวกของ chitosan จะถูกทำปฏิกิริยากับประจุลบของ TPP จนเหลือประจุบวกอิสระน้อยมาก ในขณะที่มีประจุลบส่วนเกินของ TPP ที่บริเวณผิวนอกของอนุภาคสามารถเกิดการเชื่อมขวาง (crosslink) กับประจุบวกของ chitosan ในอนุภาคอื่น ทำให้เกิดการจัดเรียงตัวในลักษณะสะพานเชื่อมต่อระหว่างอนุภาคและเกิดเป็นกลุ่มของอนุภาคและตกตะกอนลงมา สอดคล้องกับค่า zeta potential ที่มีค่าต่ำทำให้ระบบอนุภาคนาโนไม่เสถียร อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มอัตราส่วน (TPP:Chitosan) เป็น 1:3 - 1:5 ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณ chitosan ในตำรับทำให้ประจุลบของ TPP ส่วนใหญ่ถูก neutralize ด้วยประจุบวกของ chitosan และมีประจุบวกส่วนเกินของ chitosan ที่สามารถสร้างแรงผลักระหว่างอนุภาค ดังนั้นตำรับทีมีอัตราส่วน ของ TPP:chitosan สูงกว่า 1:3 จึงเหมาะสมในการสร้างอนุภาค IP-CNPs ที่คงตัวได้ (รูปที่ 3B)



รูปที่ 3 แผนภาพจำลองการเรียงตัวของโมเลกุล chitosan และ TPP ในการเกิดอนุภาคนาโนไคโตซานที่อัตราส่วนระหว่าง TPP: chitosan ที่แตกต่างกัน

A: เมื่อมีประจุลบส่วนเกินของ TPP (TPP: chitosan เท่ากับ 1:1 หรือ 1:2)

B: เมื่อมีประจุบวกอิสระส่วนเกินของ chitosan (TPP: chitosan มากกว่า 1:3)

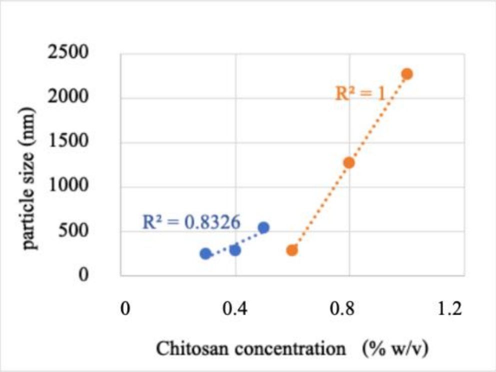
ผลของความเข้มข้นของ TPP ต่อการเกิดอนุภาค IP-CNPs

TPP เป็นสารประจุลบชนิด polyanion ที่สามารถทำปฏิกิริยากับประจุบวกบนหมู่อะมิโนของสาร chitosan ทำให้เกิดการเชื่อมขวางด้วยพันธะไอออนิก จากตารางที่ 2 พบว่าการใช้ TPP ที่ความเข้มข้น 0.2% และ 0.3% (w/v) จะทำให้ได้อนุภาค IP-CNPs ที่มีขนาดใหญ่และการกระจายของขนาดอนุภาคสูงกว่าการใช้ TPP ที่ความเข้มข้น 0.1% (w/v) TPP. นั่นคือเมื่อใช้ TPP ที่ความเข้มข้น 0.1% จะได้อนุภาค IP-CNPs ที่เล็กและมีขนาดสม่ำเสมอมากกว่า ดังนั้นตำรับทีประกอบด้วย TPP 0.1% (w/v) และ chitosan 0.3% (w/v) จะได้ตำรับที่มี อนุภาค IP-CNPs ขนาดเล็กและสม่ำเสมอมากที่สุด

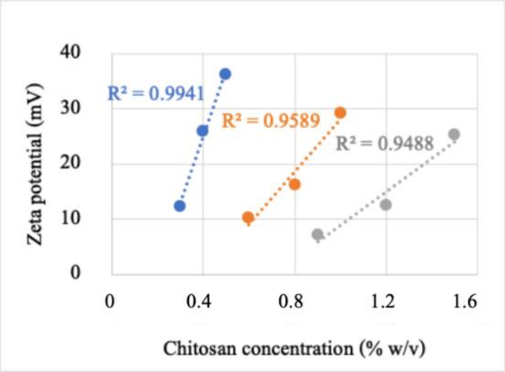
ผลของความเข้มข้นของ chitosan ต่อการเกิดอนุภาค IP-CNPs

การเพิ่มอัตราส่วนของ chitosan ในตำรับทำให้ขนาดอนุภาคที่ใหญ่ขึ้น โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2)= 0.8–1 (รูปที่ 4A) แต่ตำรับที่ใช้สาร TPP ที่ความเข้มข้น 0.3% (w/v) และอัตราส่วนของ chitosan สูงที่สุดคือ 1:5 (1.5% w/v chitosan) จะมีอนุภาคขนาดใหญ่ที่ไม่สามารถวัดขนาดได้ เนื่องจากเกินข้อจำกัดของเครื่องวัดขนาดอนุภาค (ใหญ่กว่า 6 μm) จึงไม่สามารถนำมาหาความสัมพันธ์ในกราฟรูป 4A ได้ จากข้อมูลในตารางที่ 2 พบว่าอนุภาคนาโนไคโตซานทุกตำรับแสดงประจุเป็นบวกโดยมีค่า zeta potential มากกว่า 25 mV แสดงให้เห็นถึงความคงตัวทางกายภาพที่ดีของตำรับ โดยการเพิ่มปริมาณ chitosan ทำให้อนุภาคมีประจุบวกที่เพิ่มมากขึ้น โดยเพิ่มจาก +25.92 mV เป็น +37.44 mV โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2)= 0.95–0.99 (รูปที่ 4B) แสดงให้เห็นว่าค่าศักย์ทางไฟฟ้าที่ผิวอนุภาคนั้นเป็นผลโดยตรงมาจากประจุบวกของ chitosan สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hassani (2015) นอกจากนี้การที่อนุภาคมีประจุบวกยังส่งผลให้สามารถทำปฏิกิริยากับประจุลบที่เยื่อเมือกได้ดีทำให้เพิ่มระยะเวลาให้ตำรับสัมผัสกับบริเวณที่ดูดซึมได้นานขึ้นด้วย เมื่อพิจารณาผลของร้อยละการกักเก็บของยาในอนุภาค (% entrapment efficiency; %EE) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละสูตรตำรับโดยทุกตำรับจะสามารถกักเก็บยาทั้งสองชนิดในอนุภาคได้ในช่วง 25–30% โดยพบว่าการเพิ่ม chitosan มีผลทำให้ร้อยละการกักเก็บของยาในอนุภาคลดลง เนื่องจากเมื่อมีปริมาณ chitosan เพิ่มมากขึ้นทำให้ระบบมีความหนืดสูงขึ้นและปริมาณยาที่จะกักเก็บได้น้อยลงอันเป็นผลเนื่องมาจากการละลายที่ลดลงของตัวยา

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



(A)



(B)

รูปที่ 4. กราฟแสดงสหสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ chitosan กับ (A) ขนาดอนุภาค (B) zeta potential (● TPP = 0.1% w/v, ● TPP = 0.2% w/v, ● TPP = 0.3% w/v)

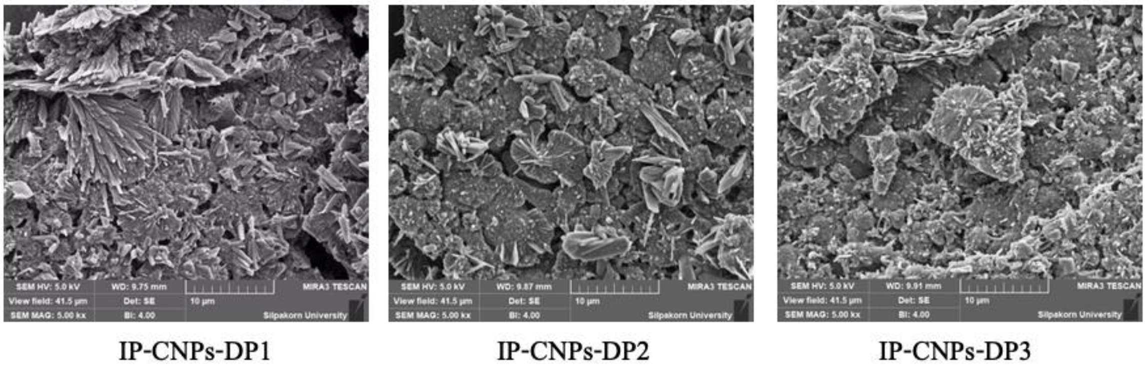
โดยสรุปตำรับที่เหมาะสมสำหรับการพัฒนาต่อเป็นตำรับผงแห้งคือตำรับที่มีอัตราส่วนของ TPP: chitosan ที่ 1:3 ที่ทุกระดับความเข้มข้นของ TPP คือตำรับหมายเลข F3, F8, และ F13 เนื่องจากทุกตำรับให้อนุภาคที่มีขนาดอยู่ในช่วงนาโนเมตรและมีค่า zeta potential เหมาะสมคือเป็นค่าบวกประมาณ 30 mV มีร้อยละการกักเก็บของยาในอนุภาคในช่วง 25–30% และเมื่อผ่านทำแห้งโดยการ freeze-dry แล้วตำรับผงแห้งที่ได้จะเรียกชื่อตำรับใหม่เป็น IP-CNPs-DP1, IP-CNPs-DP2, และ IP-CNPs-DP3 สำหรับตำรับหมายเลข F3, F8, และ F13 ตามลำดับ

ลักษณะทางกายของตำรับอนุภาคนาโนไคโตซานที่บรรจุยาผสม isoniazid และ pyrazinamide ชนิดผงแห้ง (IP-CNPs-DP)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผงแห้ง

ภาพถ่ายลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผงแห้งรูปร่างลักษณะของผงแห้ง IP-CNPs-DP จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงดังรูปที่ 5 พบว่าทั้ง 3 ตำรับมีลักษณะที่เหมือนกันคือมีผลึกลักษณะรูปเข็มปลายแหลมขนาดเล็กจำนวนมากเกาะติดอยู่บนอนุภาคขนาดใหญ่ ซึ่งผงยารูปเข็มซึ่งมีอัตราส่วนของมิติด้านยาวสูงจะสามารถนำส่งยาสู่ทางเดินหายใจได้ดีกว่ารูปร่างอื่น (Peng, 2016) ดังนั้นอนุภาคขนาดเล็กรูปเข็มน่าจะเพิ่มประสิทธิภาพในการเป็นยาสู่ปอดได้ดี

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



รูปที่ 5 ภาพถ่ายรูปร่างลักษณะของผงแห้ง IP-CNPs จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 5000 เท่า

ความเป็นผลึกของผงตัวอย่าง IP-CNPs-DP

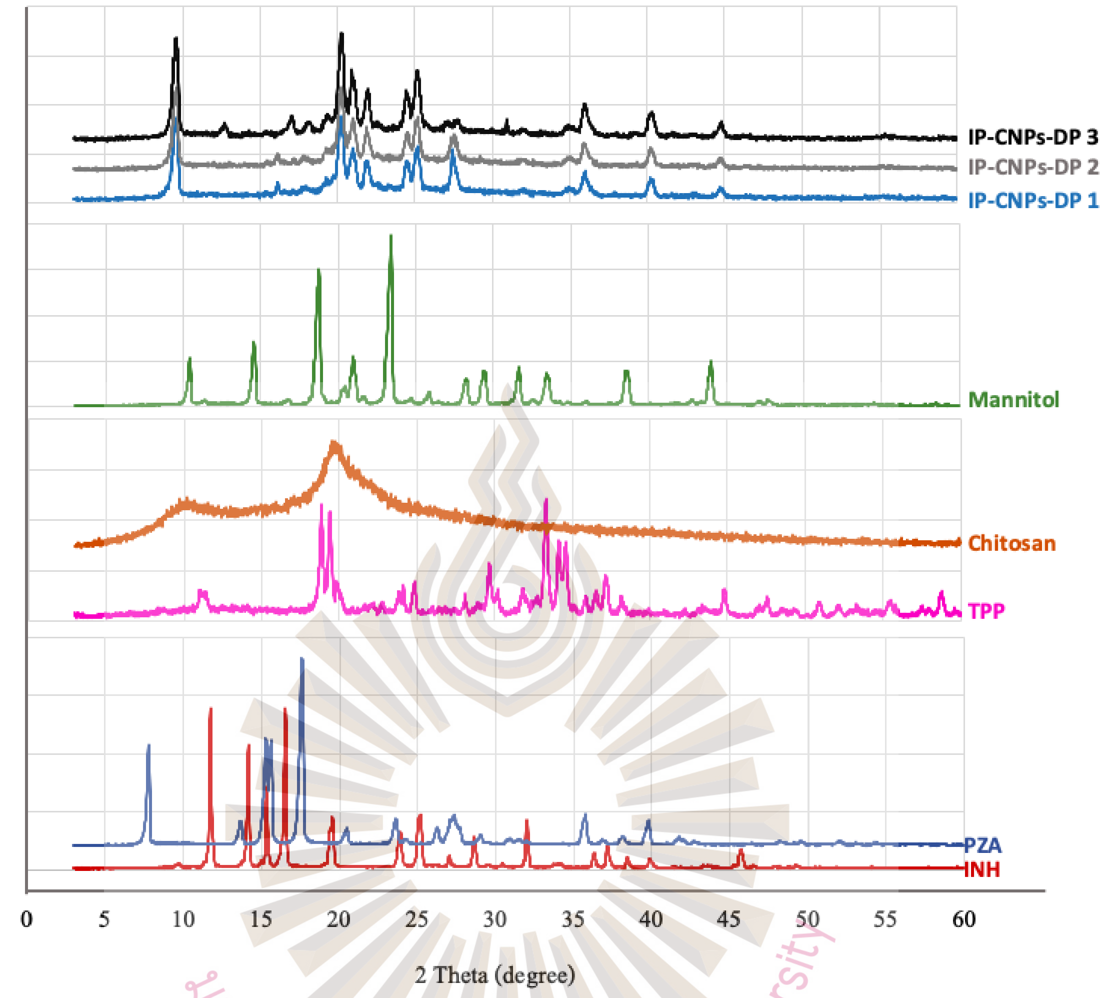
รูปแบบการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ (XRD pattern) ของสารต่างๆ และตำรับผงแห้ง IP-CNPs-DP แสดงดังรูปที่ 6 โดย XRD pattern ของ chitosan มีรูปแบบการเลี้ยวเบนเป็นแถบกว้าง (broad) และพบรูปแบบการเลี้ยวเบนที่เป็นลักษณะเฉพาะตัวของ chitosan ที่ 2θ เท่ากับ 9.8° และ 19.7° แสดงให้เห็นว่า chitosan อยู่ในรูปแบบ amorphous (Milligan, *et al.*, 2018) ส่วนสาร TPP, น้ำตาล mannitol, isoniazid (INH), และ pyrazinamide (PZA) มีลักษณะ diffractogram แสดงรูปแบบการเลี้ยวเบนที่ชัดเจน (sharp peak) แสดงถึงความเป็นผลึกของสารดังกล่าว โดยรูปแบบการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ที่ชัดเจนและเป็นเฉพาะตัวของ PZA ที่ 2θ เท่ากับ 7.90°, 15.40° และ 17.70° และอีกหลายพีคในช่วง 25–30° รูปแบบการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ที่ชัดเจนและเป็นเฉพาะตัวของ INH ที่ 2θ เท่ากับ11.70°, 14.10°, 15.6°, 16.50°, 19.6°, และ 25.2 และอีกหลายพีคในช่วง 26–30° สำหรับน้ำตาล mannitol พบรูปแบบการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ที่ชัดเจนที่ 2θ เท่ากับ 10.4°, 14.6° และ 23.4° ซึ่งตรงกับพหุสัณฐานรูปแบบ β (β-polymorphic form) ในส่วนของ XRD ของสารตัวอย่าง IP-CNPs-DP ทั้ง 3 สูตรตำรับแสดงรูปแบบการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ในลักษณะเดียวกันโดยมีความแตกต่างจากสารตั้งต้นที่ใช้ในสูตรตำรับ คือไม่ปรากฏหรือมีการลดลงของพีคที่เป็นลักษณะเฉพาะตัวของสารตั้งต้น บ่งบอกได้ถึงการเปลี่ยนแปลงรูปผลึกบางส่วนหรือการเปลี่ยนรูปแบบเป็นอสัณฐาน (amorphous) ของตัวยาสำคัญและสารที่เป็นส่วนประกอบในตำรับ ซึ่งเกิดจากการเกิดอันตรกิริยาระหว่างตัวยาสำคัญที่เก็บกักไว้ภายในกับอนุภาคไคโตซาน นอกจากนี้ตัวยาสำคัญที่ไม่ถูกเก็บกักไว้ภายในกับอนุภาคและน้ำตาล mannitol ซึ่งใช้เป็นสาร cryoprotectant ซึ่งไม่เกิดมีอันตรกิริยากับอนุภาคไคโตซานสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปแบบผลึกได้จากขั้นตอนการทำแห้งด้วยเทคนิคการ

freeze-dry [Torrado and Torrado, 2002] เมื่อพิจารณาจาก รูปแบบการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ของ IP-CNPs-DP พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปผลึกบางส่วนของน้ำตาล mannitol จากพหุสัณฐาน β เป็นพหุสัณฐาน γ โดยพบรูปแบบการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ที่ชัดเจนของน้ำตาล mannitol พหุสัณฐาน γ ที่ 2θ เท่ากับ 9.7 และ 22.2° (Sharma and Kalonia, 2004) และยังพบรูปแบบการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ที่สอดคล้องกับตัวยาสำคัญ (INH และ PZA) ที่ไม่ถูกเก็บกักไว้ภายในกับอนุภาคที่ 2θ เท่ากับ 25–30° ไม่พบรูปแบบการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ที่สอดคล้องกับสาร TPP เนื่องจาก TPP ทำปฏิกิริยากับ chitosan ในอัตราส่วนที่ทำให้ TPP ถูกทำปฏิกิริยาจนหมด

การเปลี่ยนแปลงสมบัติทางความร้อน

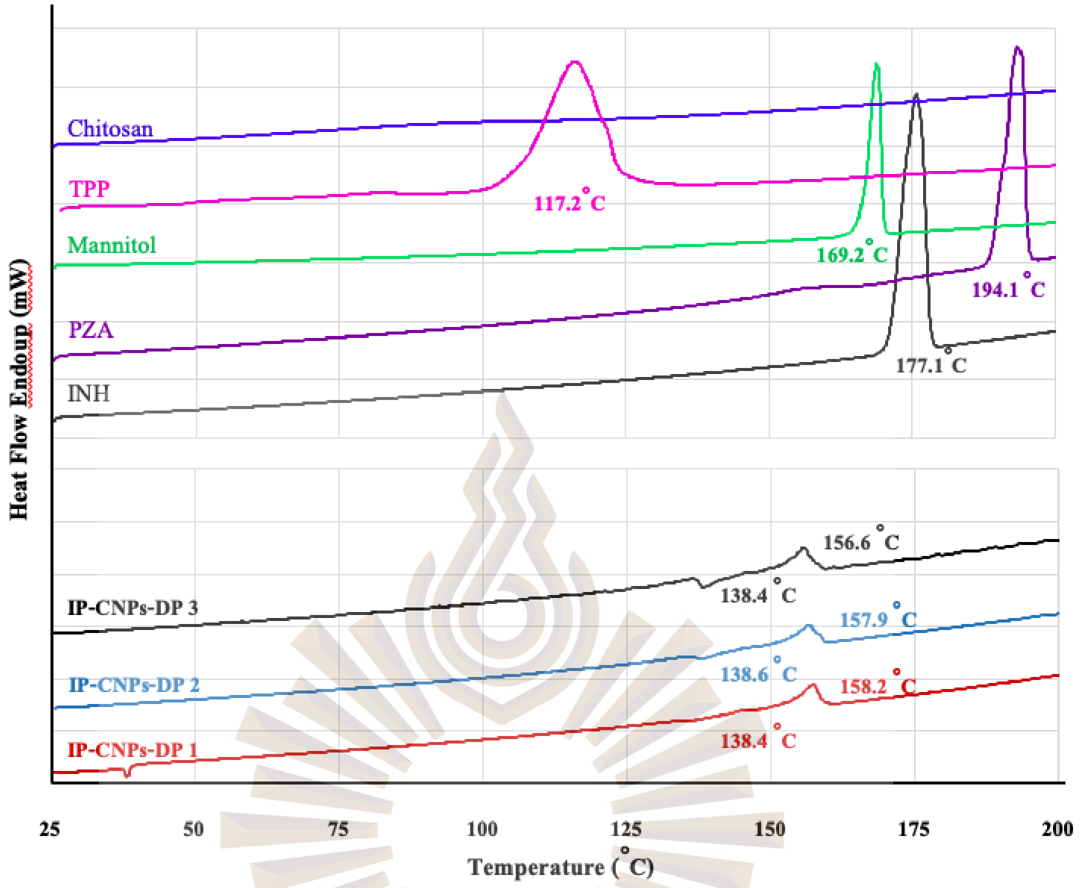
จาก DSC thermogram (รูปที่ 7) พบ endothermic melting peak ที่ชัดเจนของผงยา isoniazid, pyrazinamide, mannitol, และ tripolyphosphate ที่อุณหภูมิ 177.1°C, 194.1°C, 169.2°C, และ 117.2 °C ตามลำดับ บ่งบอกได้ถึงสถานะการเป็นผลึกของสารส่วน DSC thermogram ของสารตัวอย่าง IP-CNPs-DP แสดงผลสอดคล้องกับผล XRD คือตัวยาสำคัญที่ไม่ถูกเก็บกักไว้ภายในอนุภาคและน้ำตาล mannitol ส่วนใหญ่จะเปลี่ยนเป็นการเปลี่ยนรูปแบบเป็นอสัณฐาน โดยตำรับ IP-CNPs-DP1, IP-CNPs-DP2 และ IP-CNPs-DP3 แสดง endothermic melting peak รูปร่างกว้างที่อุณหภูมิ 158.2, 157.9 และ 156.6 °C ตามลำดับ สอดคล้องจุดหลอมเหลวของน้ำตาล mannitol พหุสัณฐาน γ อยู่ในช่วง 150–158 °C กับ (Sharma and Kalonia, 2004) แต่การที่พีคปรากฏที่อุณหภูมิต่ำลงและมีลักษณะกว้างขึ้นบ่งบอกได้ว่ามีการเจือปนของสารอื่นอยู่ด้วย โดยเฉพาะอย่างสารตัวอย่าง IP-CNPs-DP3 ซึ่งมีส่วนประกอบของchitosan และ TPP สูงสุดจะพบว่ามี endothermic melting peak ที่อุณหภูมิต่ำสุด นอกจากนี้ยังพบอุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว (glass transition temperatures; Tg) ที่ช่วงอุณหภูมิ 138.4–138.6°C ซึ่งบ่งบอกได้ว่าตัวอย่างมีรูปแบบเป็นอสัณฐานบางส่วน ไม่พบ endothermic peak ของตัวยาสำคัญที่ไม่ถูกเก็บกักใน thermogram นี้เนื่องจากความเข้มข้นที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับสารอื่นในตำรับ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



รูปที่ 6 รูปแบบการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ (XRD pattern) ของสารต่างๆ และตำรับผงแห้ง IP-CNPs-DP

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



รูปที่ 7 DSC thermogram แสดงการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางความร้อนของสารต่างๆ และตำรับผงแห้ง IP-CNPs-DP

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

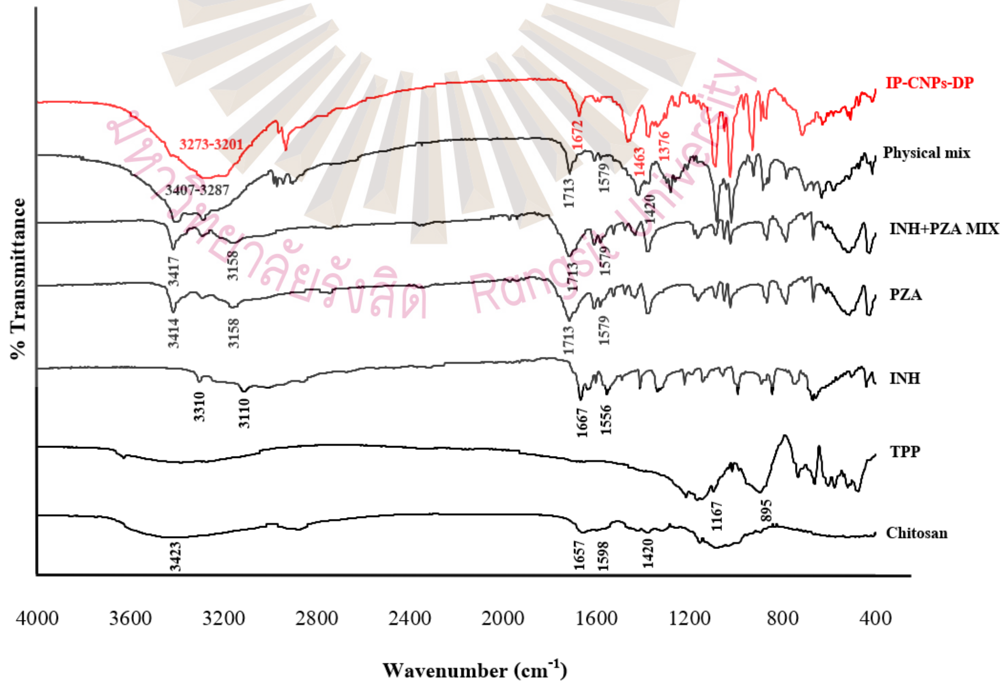
ประเมินอันตรกิริยาของตัวยาสำคัญกับส่วนประกอบในตำรับโดยศึกษาจากหมู่ฟังก์ชันของสารด้วยเทคนิค

FT-IR โดย FT-IR spectrum แสดงดังรูปที่ 8 และตารางที่ 3 แสดง wavenumber ที่สัมพันธ์กับหมู่ฟังก์ชันที่เป็นลักษณะเฉพาะของสาร สำหรับ FT-IR spectrum ของ chitosan พบ peak ของ O-H และ N-H stretching ที่ wavenumber 3423 cm^{-1} และพีคที่บริเวณ 1657 cm^{-1} และ 1598 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ C=O (stretching) และ amine group (N-H) ตามลำดับ เมื่อพิจารณา FT-IR spectrum ของ TPP พบว่ามีพีคที่ 1167 cm^{-1} และ 895 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ฟังก์ชัน P=O และ P-O-P stretching ตามลำดับ (Tsai, *et al*., 2018; Banik *et al*., 2012)

สำหรับตัวยา isoniazid พบว่ามีพีคที่ 3310 cm^{-1} สำหรับหมู่ฟังก์ชัน stretching (amine)และ 3110 cm^{-1} สำหรับหมู่ฟังก์ชัน N-H symmetrical stretching ส่วนพีคที่ 1667 cm^{-1} และ 1556 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ฟังก์ชัน C=O stretching และ N-H bending ของ secondary amide group ตามลำดับ (Poggi *et al*., 2013) และเมื่อพิจารณา FT-IR spectrum ของ pyrazinamide พบ peaks ปรากฏที่ wavenumber 3414 cm^{-1} และ 3158 cm^{-1} สำหรับ N-H stretching (amine) และ symmetrical stretching ตามลำดับ และพีคที่ wavenumber 1713 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ฟังก์ชัน C=O stretching และ 1579 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ฟังก์ชัน N-H bending (Thanwar, *et al*., 2014) FT-IR spectrum ของตัวยาทั้งสองชนิดที่ผสมกันทางกายภาพในอัตราส่วนที่ใช้ในสูตรตำรับคือ pyrazinamide: isoniazid 5:1 พบพีคในตำแหน่งเดียวกับ FT-IR spectrum ของ pyrazinamide เนื่องมาจากในยาผสมดังกล่าวมีปริมาณของ pyrazinamide มากกว่า และเมื่อนำสารที่ใช้ทั้งหมดในตำรับมาผสมกันทางกายภาพพบพีคลักษณะเฉพาะของแต่ละสารในตำแหน่ง wavenumber เดียวกันกับสารบริสุทธิ์ โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง แสดงให้เห็นว่าไม่มีอันตรกิริยาเกิดขึ้นระหว่างสารที่นำมาผสมกัน

อย่างไรก็ตามเมื่อเตรียมตำรับในรูป IP-CNPs-DP และนำมาศึกษา FT-IR พบว่าพีคที่ตำแหน่ง wavenumber 1657 cm^{-1} หายไปแต่มีพีคใหม่ที่ wavenumber 1672 cm^{-1} ปรากฏแทน ส่วนพีคของ amide II ที่ wavenumber 1598 cm^{-1} ของ chitosan พบว่าเลื่อนไปที่ 1463 cm^{-1} แสดงถึงการที่หมู่ amino เกี่ยวข้องกับการเกิดการเชื่อมขวางกับหมู่ phosphate ของ TPP ซึ่งปรากฏพีคที่แสดงถึงหมู่ P=O stretching ที่ wavenumber 1147 cm^{-1} นอกจากนี้พบว่าพีคที่ 3423 cm^{-1} ของ chitosan มีช่วงแถบที่กว้างขึ้นและเลื่อนเป็นช่วง wavenumber 3273–3201 cm^{-1} แสดงถึงการเกิดพันธะไฮโดรเจนที่เพิ่มขึ้นระหว่างหมู่ฟังก์ชัน NH_2 และ หมู่ฟังก์ชัน OH ของ chitosan

ประมวลผลรวมจากการศึกษา XRD, DSC, และ FT-IR พบว่ามีอันตรกิริยาเกิดขึ้นระหว่างตัวยาสำคัญและอนุภาคนาโนไคโตซานโดยเมื่อพิจารณาจาก รูปแบบการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ (XRD pattern) ซึ่งแสดงรูปแบบผสมของการเป็น amorphous และพีคความเป็นผลึกที่มีความชัดเจนต่ำลง ลักษณะรูปแบบ amorphous บ่งบอกถึงอันตรกิริยาเกิดขึ้นระหว่างตัวยาสำคัญและอนุภาคนาโนไคโตซานในขณะที่พีคความเป็นผลึกที่มีความชัดเจนต่ำลง เกิดจากการที่ผลึกยาที่ไม่ถูกเก็บกักและน้ำตาล mannitol บางส่วนมีการเปลี่ยนเป็น amorphous และ/หรือเปลี่ยน polymorph อื่น โดยลักษณะรูปแบบ amorphous ของ IP-CNPs-DP ยืนยันจากได้การพบอุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว (Tg) เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางความร้อนด้วย DSC นอกจากนี้การที่ผงแห้ง IP-CNPs-DP มี endothermic peak ที่มีลักษณะแถบที่กว้างขึ้น และปรากฏที่อุณหภูมิที่ต่ำลงเป็นการยืนยันซ้ำถึงลักษณะรูปแบบ amorphous ของ IP-CNPs-DP นอกจากนี้จากผลของ FT-IR ยังแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนถึงการเกิดอันตรกิริยาของตัวยาสำคัญกับอนุภาคนาโนไคโตซานเนื่องจากปรากฏว่ามีการเปลี่ยนตำแหน่ง wavenumber ของพีคหมู่ฟังก์ชันที่เกี่ยวข้องเช่น พีคของ N-H ในหมู่ amine ของสาร chitosan และตัวยาสำคัญ, พีคของหมู่ phosphate ของสาร TPP, พีคของหมู่ -OH ของสาร chitosan ไปยัง wavenumber ที่ต่ำกว่า



รูปที่ 8 FT-IR spectra ของสารต่างๆ และตำรับผงแห้ง IP-CNPs-DP

ตารางที่ 3 wavenumber ที่สัมพันธ์กับหมู่ฟังก์ชันที่เป็นลักษณะเฉพาะของสาร

Functional Group	Chitosan	TPP	INH	PZA	IP-CNPs-DP	Physical mix	INH+PZA
	Wavenumber (cm^{-1})						
O-H stretching	3423 (overlap)				3273-3201 (overlap)	3407-3287 (overlap)	
N-H stretching (amine)			3310	3414			3417
N-H stretching (symmetrical)			3110	3158	2935	2984-2902	3158
C=O stretching (primary amide)	1657		1667	1713	1672	1713	1714
N-H bending (amine)	1598		1556	1579	1463	1580	1579
O-H bending (alcohol)	1420				1453	1420	
P=O		1167			1147	1165	
P-O-P		895			891	881	

การนำส่งตำรับอนุภาคนาโนไคโตซานที่บรรจุ isoniazid ผสมกับ pyrazinamide ผงแห้ง (IP-CNPs-DP) สู่ทางเดินหายใจส่วนล่างโดย Andersen cascade impactor

Andersen cascade impactor หรือ ACI เป็นอุปกรณ์มาตรฐานที่ใช้ในการประเมินขนาดอนุภาคแอโรโซล โดยสามารถข้อมูลที่ได้สามารถนำมาคำนวณเป็นพารามิเตอร์ที่สำคัญได้ 3 ค่าคือ เส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาค mass median aerodynamic diameter หรือ MMAD เป็นขนาดอนุภาคที่มีค่า aerodynamic diameter อยู่ที่กึ่งกลางของการกระจายขนาดอนุภาคโดยน้ำหนักหรือขนาดอนุภาคที่ Z-value เท่ากับ 0, fine particle fraction (% FPF) คือร้อยละของผงยาละเอียดของยา เป็นสัดส่วนของปริมาณตัวยาสะสมที่ติดอยู่บนชั้น ACI ที่มีรูเปิดเล็กกว่า 5 µm (Changsan, *et al*., 2009) ผลการประเมินการนำส่งตำรับ IP-CNPs-DP สู่ทางเดินหายใจส่วนล่างโดย ACI แสดงดังตารางที่ 4 สำหรับตัวอย่างผงแห้ง IP-CNPs-DP ทั้งสามตำรับพบว่ามีค่า MMAD ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (*p*-value > 0.5) โดยค่า MMAD อยู่ในช่วง 3.2–3.5 µm ซึ่งค่า MMAD ที่มีค่าน้อยกว่า 5 µm บ่งบอกว่าสามารถนำส่งสู่ทางเดินหายใจส่วนล่างได้ (Rojanarat *et al*., 2011) อย่างไรก็ตามพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของ % FPF ของทั้งยา INH และ PZA ของแต่ละตำรับคือ IP-CNPs-DP 1 จะมี %FPF สูงที่สุดและ %FPF จะลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อมีปริมาณ chitosan และ TPP เพิ่มมากขึ้นในตำรับ IP-CNPs-DP 2 และ IP-CNPs-DP 3 เนื่องมาจากปริมาณ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

chitosan ที่มากขึ้นส่งผลให้เกิดการรวมกลุ่มกันของผงยาแล้วทำให้มี % FPF ลดลง ส่วน %ED อยู่ในช่วง 92–95 โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างตำรับ

ตารางที่ 4 พารามิเตอร์ของตำรับแอโรโซลที่ประเมินโดยอุปกรณ์ Andersen cascade impactor (Mean ± SD, n=3)

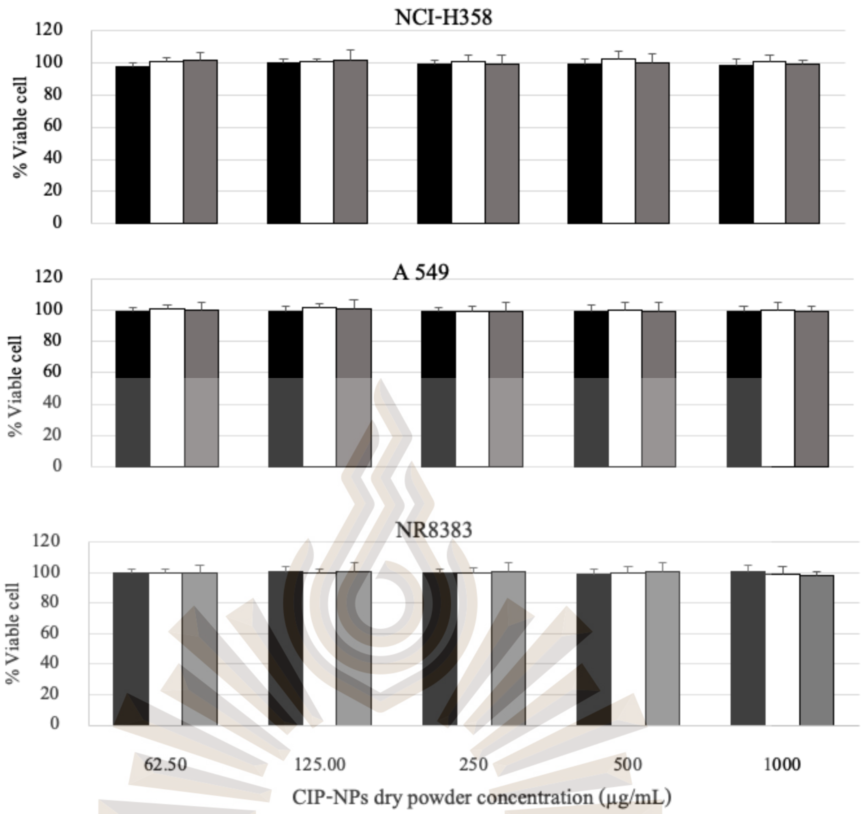
		IP-CNPs-DP 1	IP-CNPs-DP 2	IP-CNPs-DP 3
MMAD	INH	3.37 ± 0.05 μm	3.44 ± 0.16 μm	3.41 ± 0.15 μm
	PZA	3.28 ± 0.07 μm	3.39 ± 0.08 μm	3.53 ± 0.28 μm
%FPF	INH	43.95 ± 1.34	38.09 ± 1.10	35.75 ± 0.10
	PZA	41.03 ± 0.92	34.43 ± 0.34	30.81 ± 0.06
%ED	INH	93.28 ± 1.28	94.68 ± 0.72	92.03 ± 1.26
	PZA	95.03 ± 0.23	94.44 ± 3.15	92.93 ± 1.41

การประเมินความปลอดภัยของตำรับ IP-CNPs-DP ต่อเซลล์ในระบบทางเดินหายใจ

การประเมินความเป็นพิษของตำรับ IP-CNPs-DP ต่อเซลล์ในระบบทางเดินหายใจ

การทดสอบความเป็นพิษของตำรับ IP-CNPs-DP ต่อเซลล์ในระบบทางเดินหายใจเพื่อประเมินความปลอดภัยของตำรับเมื่อสัมผัสกับเซลล์ในระบบทางเดินหายใจ เซลล์ที่ใช้ในการศึกษาความเป็นพิษประกอบด้วยเซลล์ human Caucasian bronchioalveolar carcinoma (NCI-H358) ใช้เป็นตัวแทนของเซลล์เยื่อบุทางเดินหายใจส่วนบน, เซลล์human lung adenocarcinoma cell line (A 549) ใช้เป็นตัวแทนของเซลล์เยื่อบุทางเดินหายใจส่วนล่าง และเซลล์ rat alveolar macrophage cell line (NR 8383) ใช้เป็นตัวแทนของเซลล์ macrophage ในทางเดินหายใจ ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ทั้งสามชนิดเมื่อสัมผัสกับสารตัวอย่างในช่วงความเข้มข้น 62.50–1000 μg/mL แสดงดังรูปที่ 9 ซึ่งพบว่าเซลล์ในระบบทางเดินหายใจทั้งสามชนิดมีร้อยละการรอดชีวิตที่เกือบ 100% ทีทุกความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำการทดสอบ นั่นคือตำรับ IP-CNPs-DP ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงในระบบทางเดินหายใจ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



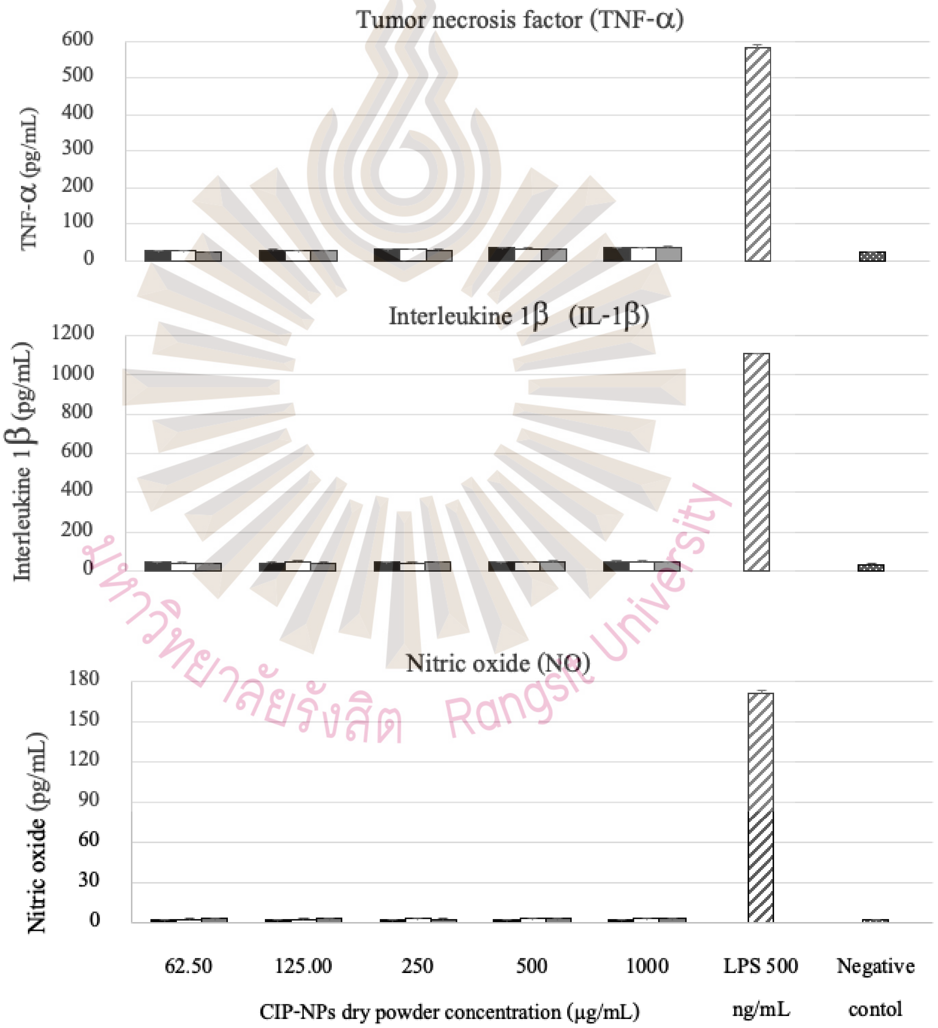
รูปที่ 9 ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ human Caucasian bronchioalveolar carcinoma (NCI-H358), เซลล์ human lung adenocarcinoma cell line (A 549) และ rat alveolar macrophage cell line (NR 8383) หลังจากสัมผัสกับตำรับ ■ IP-CNPs-DP 1, □ IP-CNPs-DP 2, และ ■ IP-CNPs-DP 3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ (mean ± SD, n=4)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

การประเมินการสร้าง inflammatory cytokines และ nitric oxide ของเซลล์ macrophage เมื่อ กระตุ้นด้วยตำรับ IPCNPs-DP

เซลล์ alveolar macrophages เป็นตัวแทนของเซลล์ macrophage ที่ทำหน้าที่จับกินสิ่งแปลกปลอมในถุงลมปอดและอาจตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมโดยสร้าง inflammatory cytokine และ nitric oxide ออกมาซึ่งจะเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อปอดได้ ดังนั้นจึงต้องประเมินการตอบสนองของเซลล์ macrophage ต่อตำรับที่พัฒนาขึ้นเพื่อเป็นการประเมินความปลอดภัยเบื้องต้นด้วย โดยการประเมินการตอบสนองของเซลล์ alveolar macrophages เมื่อถูกกระตุ้นด้วยตำรับ IP-CNPs-DP เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อเป็นการประเมินความปลอดภัยเบื้องต้นด้วย โดยมีสาร lipopolysaccharide (LPS) จากเชื้อ *E.coli* เป็น positive control.

จากรูปที่ 10 แสดงให้เห็นว่าเซลล์ alveolar macrophages สร้างสาร IL-1β, TNF-α และ NO ออกมาเพื่อตอบสนองต่อการสัมผัสกับตำรับ IP-CNPs-DP ในระดับที่ต่ำมากใกล้เคียงกับปริมาณที่พบใน negative control ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณสาร IL-1β, TNF-α, และ NO ที่ถูกสร้างจากเซลล์ alveolar macrophages เมื่อสัมผัสกับสาร LPS จาก *E.coli* ซึ่งความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ใช้ทดสอบการกระตุ้นเซลล์ alveolar macrophage สูงกว่าความเข้มข้นของ LPS จาก *E.coli* ที่ใช้ถึง 2000 เท่า แสดงให้เห็นว่าตำรับ IP-CNPs-DP ไม่กระตุ้น alveolar macrophages ให้ตอบสนองโดยการสร้างสาร inflammatory cytokines และ nitric oxide



รูปที่ 10 ระดับของสาร inflammatory cytokines (IL-1β และ TNF-α) และ nitric oxide ที่ถูกสร้างจากเซลล์ rat alveolar macrophages เมื่อถูกกระตุ้นโดย ■ IP-CNPs-DP 1, □ IP-CNPs-DP 2, และ ■ IP-CNPs-DP 3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ, LPS จาก *E.coli* (500 ng/mL) และ negative control (mean ± SD, n=4)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 5
สรุป วิจารณ์ และข้อเสนอแนะ

ตำรับอนุภาคนาโนไคโตซานที่บรรจุisoniazidผสมกับไพราซินาไมด์ผงแห้งที่เตรียมได้สามารถนำส่งสู่ทางเดินหายใจส่วนล่างเพื่อไปออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อวัณโรคที่อาศัยอยู่ที่บริเวณถุงลมปอด โดยตำรับไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อบุทางเดินหายใจรวมทั้งเซลล์แมโครฟาจซึ่งเป็นเซลล์เป้าหมาย นอกจากนี้ตำรับผงแห้งที่พัฒนาขึ้นไม่กระตุ้นเซลล์แมโครฟาจให้สร้างสาร inflammatory cytokines หรือ nitric oxide อย่างไรก็ตามแม้ว่าตำรับจะบรรจุยาต้านวัณโรค มีความปลอดภัยต่อเซลล์ในทางเดินหายใจ สามารถนำส่งสู่ถุงลมปอดได้ แต่ศักยภาพของตำรับในการฆ่าเชื้อ mycobacterium ภายในเซลล์และการกระตุ้นกลไก autophagy ยังไม่ได้รับการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับสูตรตำรับรูปแบบอื่น ซึ่งผลที่ได้จะช่วยพิสูจน์ให้เห็นข้อดีของตำรับตำรับอนุภาคนาโนไคโตซานที่บรรจุisoniazid ผสมกับไพราซินาไมด์ผงแห้งในแง่ของการลดขนาดยาและลดความถี่ในการบริหารยาเมื่อเปรียบเทียบกับยารูปแบบรับประทาน

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

เอกสารอ้างอิง

1) กรมควบคุมโรค. (2561). *แนวทางการควบคุมวัณโรคประเทศไทย พ.ศ. 2561.* กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์อักษรกราฟฟิคแอนด์ดีไซน์

2) Banik, N., Hussain, A., Ramteke, A., Sharma, H., Maji, T. (2012). Preparation and evaluation of the effect of particle size on the properties of chitosan-montmorillonite nanoparticles loaded with isoniazid. *RSC Advances*, 2, 10519-10528.

3) Buchan, B. E. (2011). Formulation studies on cysteamine for the treatment of nephropathic cystinosis. Available from OpenAIR@RGU. [online]. Available from: http://openair.rgu.ac.uk

4) Changsan, N., Chan H-K., Separovic F., Srichana T. (2009). Physicochemical characterization and stability of rifampicin liposome dry powder formulations for inhalation. *Journal of Pharmaceutical Science, 98*(2), 628-639.

5) Costa, A., Pinhero, M., Magalhaes, J., Ribeiro, R., Seabra, V., Reis, S., Sarmento, B. (2016). The formulation of nanomedicines for treating tuberculosis. *Advanced Drug Delivery Reviews, 102*, 102-115.

6) Debnath SK., Saisivam S., Debanth M., Omri A. (2018). Development and evaluation of chitosan nanoparticles based dry powder inhalation formulations of Prothionamide. *Plos One*. 1-12.

7) Grenha, A., Grainger, C., Dailey, L., Seijo, B., Martin, G., Remun a n-Lopez, Forbes, B. (2007). Chitosan nanoparticles are compatible with respiratory epithelial cells in vitro. *European Journal of Pharmaceutical Science, 31*, 73-84.

8) Gupta, A., Misra, A., Deretic, V. (2016). Targeted pulmonary delivery of inducers of host macrophage autophagy as a potential host directed chemotherapy of tuberculosis. *Advanced Drug Delivery Reviews, 102*, 10-20.

9) Hassani S., Laouini A., Fessi H., Charcosset C. (2015) Preparation of chitosan-TPP nanoparticles using microengineered membranes-Effect of parameters and encapsulation of tacrine. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Enginerring Aspects, 482*, 34-43.

10) Hickey, A., Jones, L. (2000). Particle-size analysis of pharmaceutical aerosols.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Pharmaceutical Technology, 9, 48-58.

11) Kim, J.-J., Lee, H.-M., Shin, D.-M., Kim, W., Yuk, J.-M., Jin, H. S., . . . Jo, E.-K. (2012). Host cell autophagy activated by antibiotics is required for their effective antimycobacterial dryg action. *Cell Host & Microbe, 11*(5), 457-468.

12) Kolloli, A., Subbian S. (2017). Host-directed therapeutic strategies for tuberculosis. *Frontiers in Medicine*, *4*, 1-14.

13) Kurz, S., Furin, J., Bark, C. (2016). Drug resistance TB: Challenges and Progress. *Infectious Disease Clinics of North America, 30*(2), 509-522.

14) Liu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Zhou, C., Zhang, Z. (2008). Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advance Drug Delivery Reviews, 60*, 1650-1662.

15) Milligan, KA., Winstead, C., Smith, J. (2018). Preparation and physicochemical characterization of chitosan nanoparticles for controlled delivery of oxytocin. *International Journal of Pharmaceutical Science and Research, 9*(4), 1430-1440.

16) Miranda MS., Rodrigues M., Domingues R., Torrado E., Reis R., Pedrosa J. et al. Exploring inhalable polymeric dry powders for antituberculosis drug delivery. *Material Science and Enginering C, 93,* 1090-1103.

17) Miranda, M., Rodrigues, M., Domingues, R., Torrado, E., Reis, R., Pedrosa, J., Gomes, M. (2018). Exploring inhalable polymeric dry powders for anti-tuberculosis drug delicery. *Materials Science & Engineering C, 93*, 1090-1103.

18) Moraco, AH., & Kornfield, H. (2014). Review: Cell death and autophagy in tuberculosis. *Seminars in immunology, 26*, 497-511.

19) Nakahira K., Porras MA., Choi A. (2016). Autophagy in pulmonary diseases. *American Journal of Respiratory Critical Care and Medicine, 194* (10), 1196-1207.

20) Paik, S., Kim, JK., Chung, C., Jo, E-K. (2019). Autophagy: A new strategy for host-directed therapy of tuberculosis. *Virulence, 10*(1), 448-459.

21) Parumasivam, T., Chang, R., Abdelghany, S., Ye, T., Britton, WJ, Chan, HK. (2016). Dry powder formulations for anti-tubercular therapy. *Advance Drug Delivery Reviews. 102,* 83-101.

22) Pascual-P., Carrillo-G., Hontanon-A., Martinez-P. (2018). Treatment of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Clínica (English ed.), 36, 507-516.

23) Peng, T., Lin, S., Niu, B., Wang, X., Huang, Y, Zhang, X, et al. (2016). Influence of physical properties of carrier on the performance of dry powder inhalers. *Acta Pharmaceutica Sinica B, 6*(4), 308-18.

24) Pharm, DD., Fattal, E., Tsapis, N. (2015). Pulmonary drug delivery systems for tuberculosis treatment. *International Journal of Pharmaceutics, 478*, 517-529.

25) Poggi, M., Barroso, R., Costa-Filho, A., Barbosa, H., Heloisa, BB., Pavan, F., *et al*. (2003). New Isoniazid Complexes, Promising Agents Against *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Mexico Chemical Society*, *57*(3), 198-204.

26) Pourshahab, P., Gilani, K., Moazeni, E., Eslahi, H., Fazeli, M., & Jamalifar, H. (2011). Preparation and characterization of spray dried inhalable powders containing chitosan nanoparticles for pulmonary delivery of isoniazid. *Journal of Microencapsulation, 28(7)*, 605-613.

27) Punturee, K., Wild, CP., Vinitketkumneun, U. (2004). Thai medicinal plants modulate nitric oxide and tumor necrosis factor in J774.2 mouse macrophage. *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 183-189.

28) Rawal, T., Patel, S., Butani, S. (2018). Chitosan nanoparticles as a promising approach for pulmonary delivery of bedaquiline. *European Journal of Pharmaceutical Science, 124*, 273-287.

29) Rojanarat, W., Changsan, N., Tawithong, E., Pinsuwan, S., Chan, H-K., Srichana, T. (2011) Isoniazid Proliposome Powders for Inhalation-Preparation, Characterization and Cell Culture Studies. International Journal of Molecular Science, 12, 4414-4434.

30) Sharma, V. and Kalonia, D. (2004). Effect of vacuum drying on protein-mannitol interactions: The physical state of mannitol and protein structure in the dried state. *AAPS PharmSciTech, 5*(1), 1-12.

31) Srichana, T., Suedee, R., Srisudjai, P. (2003).Application of spectrofluorometry for evaluation of dry powder inhalers in vitro, *Pharmazie, 58*, 125-129.

32) Taylor, G., & Kellaway, I. (2005). Pulmonary Drug Delivery. In A. Hillery, A. Lloyd, & J. Swarbrick, *Drug delivery and targeting for pharmacist and pharmaceutical scientists.* London and Newyork: Taylor&Francis.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

33) Thanwar, M., Dwivedi, D., Gharia, AK. (2014). The fundamental characteristics of pyrazinamide: A review. *Journal of Chemical Science, 4*(2), 110-113.

34) Torrado S and Torrado S. (2002). Characterization of physical state if mannitol after freeze-drying: effect of acetylsalicylic acid as a second crystalline cosolute. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 50*(5), 567-570.

35) Tsai, W-H., Yu, K-H., Huang, Y-C., Lee, C-I. (2018). EGFR-targeted photodynamic therapy by curcumin-encapsulated chitosan/TPP nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine, 13*, 903-916.

36) World Health Organization. Global tuberculosis report 2019-fact sheet. World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2019.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ประวัติผู้วิจัย

คำนำหน้า	นางสาว
ตำแหน่งทางวิชาการ	อาจารย์ ดร.
ชื่อผู้วิจัย	นฤมล
นามสกุลผู้วิจัย	ช่างสาน
ชื่อภาษาอังกฤษ	Narumon
นามสกุลภาษาอังกฤษ	Changsan
ที่อยู่ (บ้าน)	204/239 หมู่บ้านนันท์นรินทร์ ตำบลหลักหก อำเภอเมือง
จังหวัด (บ้าน)	ปทุมธานี
รหัสไปรษณีย์ (บ้าน)	12000
ที่อยู่ (ที่ทำงาน)	วิทยาลัยเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ถนนพหลโยธิน ตำบลหลักหก อำเภอเมือง
จังหวัด (ที่ทำงาน)	ปทุมธานี
รหัสไปรษณีย์ (ที่ทำงาน)	12000
โทรศัพท์ (ที่ทำงาน)	02-791-5555 ต่อ 1467
แฟกซ์ (ที่ทำงาน)	02-791-5555 ต่อ 1403
E-mail address	Narumon.c@rsu.ac.th

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ปริญญาตรี

สาขา	เภสัชศาสตร์ (ภ.บ.)
ปีที่จบ	2545
สถาบัน	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ประเทศ	ไทย

ปริญญาเอก

สาขา	ปริญญาดุษฎีบัณฑิต สาขาเภสัชศาสตร์
ปีที่จบ	2551
สถาบัน	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประเทศ ไทย

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ

- **Narumon Changsan** and Teerapol Srichana. 2005. Rifampicin encapsulated liposomes as dry powder inhaler. Proceeding of Pharma Indochina IV: Pharmacy in coorperation for development and integration. 301-311.
- **Narumon Changsan** and Teerapol Srichana. 2007. Factor influencing the properties of rifampicin liposome and application for dry powder inhaler. Proceeding of the 2nd IEEE International conference on Nano/Micro engineered and molecular systems. 1104-1109 (available online IEEE explore and Scopus).
- **Narumon Changsan**, Athip Nilkaeo, Pethchawan Pungrassamee, and Teerapol Srichana. 2007. Bioactivity of rifampicin encapsulated liposome delivery to the respiratory tract. Proceeding of German-Thai Symposium on Nanoscience and Nanotechnology. 275-280.
- **Narumon Changsan,** Hak-Kim Chan and Teerapol Srichana. 2007. Isoniazid proliposome for dry powder aerosols and the immunological response of alveolar macrophage. Proceeding of the Fifth Indochina Conference on Pharmaceutical Sciences: Pharmacy for sustainable development. pp 1-8.
- **Narumon Changsan,** Frances Separovic and Teerapol Srichana. 2008. The ^{2}H and ^{31}P solid state nuclear magnetic resonance used to determine the location of rifampicin and cholesterol on the liposome lipid bilayer. Proceeding on 2008 2nd IEEE International Nanoelectronics Conferences. pp. 699-703.
- **Narumon Changsan,** Frances Separovic, Hak-Kim Chan and Teerapol Srichana. 2009. Physico-chemical Characterization and Stability of Rifampicin Liposome Dry Powder Formulations for Inhalation. J. Pharm Sci. pp. 628-639.
- **Narumon Changsan,** Athip Nilkaeo, Petchawan Pungrassami and Teerapol Srichana. 2009. Monitoring safety of liposomes containing rifampicin on respiratory cell lines

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

and in vitro efficacy against *Mycobacterium bovis* in alveolar macrophage. J. Drug. Target. pp. 751-762.

- Wipaporn Rojanarat, **Narumon Changsan**, Ekawat Tawithong, Sirirat Pinsuwan, Hak-Kim Chan and Teerapol Srichana. 2011. Isoniazid proliposome powders for inhalation-Preparations, characterizations and cell culture studies. Int. J. Mol. Sci. pp 4314-4334.
- Somchai Sawatdee, Apichart Atipairin, Attawadee Sae Yoon, Teerapol Srichana and **Narumon Changsan,** Tan Suwandecha, Wirot Chanthorn and Atchara Phoem. 2018. Oral bioavailability and pharmacpkinetics of sildenafil citrate dry foam tablets in rats. pp. 1-9.
- Somchai Sawatdee, Apichart Atipairin, Attawadee Sae Yoon, Teerapol Srichana and **Narumon Changsan**. 2019. Enhanced dissolution of sildenafil citrate as dry foam tablets. Pharm. Dev. Tech. pp.1-11.
- Somchai Sawatdee, Apichart Atipairin, Attawadee Sae Yoon, Teerapol Srichana, **Narumon Changsan** and Tan Suwandecha. 2019. Formulation Development of Albendazole-Loaded Self-Microemulsifying Chewable Tablets to Enhance Dissolution and Bioavailability. Pharmaceutics. pp 1-20.
- Chutima Sinsuebpol and **Narumon Changsan**. 2020. Effects of Ultrasonic Operating Parameters and Emulsifiers Systems in Sacha Inchi Oil Nanoemulsion Characteristics. J. Oleo. Sci. 69(5). pp 437-448.

ผลงานวิจัยที่ได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการภายในประเทศ

- **Narumon Changsan** and Sucharat Limsitthichaikoon. The effects of cholesterol and non-ionic surfactants on vesicle size and size stability of deformable liposome. The 35th International Annual Meeting in Pharmaceutical Science & CU-MPU International Collaborative Research Conference. 8 March 2019. Bangkok, Thailand (proceeding)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

- Kanokporn Burapapadh, Apichai Thanakitsampan, Phennapha Soakham and **Narumon Changsan**. Effect of Drying Method on Dictyophora indusiata Mucilage Properties. 6th International Conference on Advanced Pharmaceutical Research. 28-29 March 2019. Pathumthani, Thailand

สาขาที่นักวิจัยเชี่ยวชาญ

- Pulmonary drug delivery
- Nanoparticle drug delivery

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University