



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

การพัฒนาตำรับอนุภาคนาโนสำหรับรักษาบาดแผลที่ผิวหนังจากสารสกัดเอทานอล
ของข้าวหักไรซ์เบอร์รี่

Development of nanoparticle formulation for skin wound healing from
ethanolic riceberry broken rice extract

โดย

ผศ.ดร.ภญ. ศราพร หริการภักดี

สนับสนุนโดย

สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต

2566

ชื่อเรื่อง : การพัฒนาตำรับอนุภาคนาโนสำหรับรักษาบาดแผลที่ผิวหนังจากสารสกัดเอทานอลของ
ข้าวหักไรซ์เบอร์รี่

ผู้วิจัย : ศราพร หริการภักดี

สถาบัน : วิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปีที่พิมพ์ : 2568

สถานที่พิมพ์ : มหาวิทยาลัยรังสิต

แหล่งที่เก็บรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ : มหาวิทยาลัยรังสิต จำนวนหน้างานวิจัย : 54 หน้า

คำสำคัญ : ทรานสเฟอริซม การสมานบาดแผล สารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่

ลิขสิทธิ์ : มหาวิทยาลัยรังสิต

บทคัดย่อ

รายงานการวิจัย เรื่อง การพัฒนาตำรับอนุภาคนาโนสำหรับรักษาบาดแผลที่ผิวหนังจากสารสกัดเอทานอลของข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ เป็นการวิจัยทางห้องปฏิบัติการ เพื่อพัฒนาทรานสเฟอริซมที่บรรจุสารสกัดจากข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ เพื่อเพิ่มความคงตัวให้กับสารสกัด และเพิ่มฤทธิ์ในการสมานบาดแผลของสารสกัด

ข้าวหักไรซ์เบอร์รี่เกิดขึ้นอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้จากกระบวนการสีข้าวอินทรีย์ในประเทศไทย ที่ผลิตได้หลายตันต่อปีและมีมูลค่าต่ำ มีงานวิจัยที่ตีพิมพ์ถึงสารอาหารอันทรงคุณค่าในสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ (RBE) เช่น แกมมาโอไรซานอล ปริมาณกรดไขมัน สารฟีนอลิก และสารฟลาโวนอยด์ ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารอาหารเหล่านี้สามารถนำไปใช้เป็นส่วนประกอบสำคัญในผลิตภัณฑ์ยาได้ แต่ยังไม่มีการใช้ประโยชน์จากกลไกนี้ในการสมานบาดแผล ในงานวิจัยนี้ ได้มีการพยายามพัฒนาทรานสเฟอริซมที่บรรจุสารสกัดจากข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ (T-RBE) เพื่อเพิ่มความคงตัวให้กับสารสกัด และเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด เทคโนโลยีสีเขียวถูกนำมาใช้ในการเตรียม T-RBE โดยเป็นรายแรกที่ใช้ลาโนลิน PEG-75 (สารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุ) ทำหน้าที่เป็นเองแอกติเวเตอร์ ผ่านกระบวนการโฮโมจีไนส์เซชันด้วยความเร็วสูง โดยไม่ต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ส่งผลให้ได้อนุภาคทรงกลมขนาด 256.60 ± 1.59 นาโนเมตร ศักย์ซีตาเชิงลบที่ 35.30 ± 1.26 ค่าดัชนีการกระจายตัวของอนุภาคต่ำกว่าหนึ่ง (0.25 ± 0.01 mV) และประสิทธิภาพการกักเก็บสารสำคัญคือ $65.30 \pm 2.98\%$ โดย T-RBE มีความคงตัวสูงในช่วงเวลา 3 เดือน ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์และเซลล์ HaCaT ของมนุษย์ และสามารถเพิ่มการสมานบาดแผล โดยผ่านเส้นทางการส่งสัญญาณ FAK/AKT ที่เกี่ยวกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ ลดระดับการผลิตไนโตรไซด์ และยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *S. aureus* โดยเทียบกับสารสกัด สูตรตำรับ T-RBE ช่วยให้การปลดปล่อยสารสำคัญเป็นแบบต่อเนื่อง และเพิ่มการซึมผ่านสารสำคัญผ่านผิวหนังได้อย่างมีประสิทธิภาพ เหนือกว่าสารสกัด ซึ่งชี้ให้เห็นถึงศักยภาพในการใช้ T-RBE ในระบบผิวหนังสำหรับการรักษาบาดแผลที่บกพร่องและหายช้า

Title : Development of nanoparticle formulation for skin wound healing from ethanolic riceberry broken rice extract

Researcher : Saraporn Harikarnpakdee.

Institution : College of Pharmacy

Year of Publication : 2025

Publisher: Rangsit University

Sources: Rangsit University

No. of pages : 54 pages

Keywords : Transfersomes, Wound healing, Riceberry broken rice extract

Abstract

The research entitles “Development of nanoparticle formulation for skin wound healing from ethanolic riceberry broken rice extract” is the *in-vitro* study to develop riceberry broken rice extract-loaded transfersomes for improving the extract stability, and subsequently enhanced its wound healing property.

Riceberry broken rice is inevitably generated from milling organic rice process in Thailand for several tons per year with low value. The valuable nutrients of Riceberry broken rice extract (RBE) has been published such as gamma-oryzanol, fatty acid content, phenolics and flavonoids with antioxidant activities. These can be applied as potentially active ingredients in pharmaceutical products, but its mechanisms for wound healing have not been exploited. In this research, an attempt has been made to develop RBE-loaded transfersomes (T-RBE) for improving the extract stability, and subsequently enhanced its bioactivities. The green technology was used to prepare T-RBE with the first to use PEG-75 lanolin (nonionic surfactant) as edge activator via a high speed homogenization process without the use of organic solvents, resulting in homogeneous spherical nanoparticles with sizes of 256.60 ± 1.59 nm, negative zeta potential in -35.30 ± 1.26 , polydispersity index value less than one (0.25 ± 0.01 mV), and entrapment efficiency of 65.30 ± 2.98 %. The T-RBE was highly stable over a period of 3 months, not toxic to human fibroblast and HaCaT cells, and was able to enhance wound healing via the FAK/AKT signaling pathway, decrease nitrite production levels and inhibit the growth of *S. aureus* compared to the extract. T-RBE formulation effectively sustained release of biological compounds and efficiently enhanced skin penetration over the extract, suggesting a potential use of T-RBE as dermal systems for impaired and delayed wound treatment.

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยเรื่อง การพัฒนาตำรับอนุภาคนาโนสำหรับรักษาบาดแผลที่ผิวหนังจากสารสกัดเอทานอลของข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ ขอขอบคุณ สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ได้สนับสนุนทุนการวิจัยในครั้งนี้ ส่งผลให้การวิจัยครั้งนี้ประสบความสำเร็จได้ตามวัตถุประสงค์ที่กำหนดไว้ด้วยดี

ศราพร หริการภักดี



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
กรอบแนวคิดในการวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	18
การสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่	18
วิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม (total phenolic content)	18
การควบคุมมาตรฐานของสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่	18
การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่	19
ศึกษาการทดสอบความไวต่อสารสกัดของเชื้อแบคทีเรีย	24
ศึกษาเพื่อตรวจสอบค่าการละลายและศึกษาความคงตัวทางเคมีกายภาพ	25
พัฒนาสูตรตำรับลิโปโซมบรรจุสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่	26
การศึกษาลักษณะและคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของลิโปโซมบรรจุสารสกัด	26
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล และการอภิปรายผล	28
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	44
เอกสารอ้างอิง	45
ภาคผนวก	
ประวัติผู้วิจัย	51

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. Chromatographic conditions of HPLC	29
2. Total phenolic content, antioxidant activities and enzymatic inhibitions of RBE	30
3. Chemical components of formulated T-RBE	32
4. Physicochemical properties of formulated T-RBE	32
5. Antibacterial activity, MIC and MBC (mg/ml) of RBE, T-RBE and blank-T against pathogenic bacteria	29



สารบัญรูป

ภาพที่	หน้า
1. HPLC chromatogram of (a) RBE and (b) standard protocatechuic acid (PA) at wavelength of 260 nm	30
2. The appearance of T-RBE formulation, resulting in a yellowish liquid	31
3. TEM images of Riceberry rice transfersomal formulation (T-RBE)	32
4. Evaluation of cytotoxicity and cell death following RBE and T-RBE treatment on (a) human keratinocytes (HaCaT) and (b) human primary skin fibroblast cells	34
5. Effect of RBE and T-RBE on the migration of human keratinocyte cells	36
6. Effect of RBE and T-RBE on the migration of human primary skin fibroblast cells	37
7. Effect of RBE on the expression of migratory marker proteins in human keratinocyte HaCaT cells	38
8. <i>In vitro</i> PA releasing profiles of extract solution and T-RBE within 12 h using Franz diffusion cells	39
9. The IMS image showed the cumulative amount of PA (blue) permeated through porcine skin, which was treated with PA standard, RBE and T-RBE for 24 h	40
10. % entrapment efficiency (%EE; A), mean vesicle size (B), polydispersity index (PDI) and zeta potential (C) of T-RBE after 3 months storage at 4°C, 25°C and 40°C	41
11. % protocatechuic acid of RBE solution as controlled formulation after 3 months storage at 4°C, 25°C and 40°C	42

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การสมานบาดแผลของผิวหนัง (acute wound healing) เป็นกระบวนการที่ซับซ้อนในการซ่อมแซมตัวเองของผิวหนังหลังจากได้รับบาดเจ็บ ในผิวหนังปกติ ชั้นหนังกำพร้า (epidermis) และชั้นหนังแท้ (dermis) จะทำหน้าที่สร้างเกราะก้ำบังป้องกันร่างกายจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เมื่อเกราะป้องกันนี้ถูกทำลายจะมีกระบวนการทางสรีรวิทยาเพื่อรักษาบาดแผลที่เกิดขึ้นทันที นอกจากนี้เมื่อเกิดการบาดเจ็บของผิวหนังจะมีกระบวนการทางชีวเคมีที่ซับซ้อนเกิดขึ้นเป็นขั้นตอนที่สอดคล้องกันเป็นอย่างดีเพื่อรักษาบาดแผล ซึ่งขั้นตอนการหายของแผลในขั้นตอนแรกเรียกว่า phase of coagulation หลอดเลือดเกิดการหดตัว (vasoconstriction) และมี platelets aggregation นำไปสู่การเกิด blood clot ทำให้เลือดหยุดและปกคลุมบาดแผลในระยะแรก ขั้นตอนที่สองคือ inflammatory phase เม็ดเลือดขาวจะเคลื่อนที่มาบริเวณบาดแผล ทำให้เกิดอาการ ปวด บวม แดง ร้อนบริเวณแผล เม็ดเลือดขาวจะปล่อยเอนไซม์โปรตีเอส (protease) มาย่อย cell debris, bacteria และ extracellular matrix ที่บาดแผล นอกจากนี้ macrophage ซึ่งเป็นเซลล์ที่สำคัญต่อการสมานบาดแผลจะหลั่ง growth factor ต่างๆ อีกหลายชนิดมากระตุ้นการเกิด proliferation phase ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สามของการสมานบาดแผล เกิดการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจน (collagen) โดยเพิ่มการแบ่งตัวและการเคลื่อนที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) และเซลล์คีราติโนไซต์ (keratinocyte) กระตุ้นการสร้าง extracellular matrix การสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) และการสังเคราะห์เซลล์เยื่อผิว (re-epithelialization) ขั้นตอนสุดท้ายคือ remodelling phase จะมีการเกิด collagen remodelling และมีการลดจำนวนเซลล์ต่างๆ ของบาดแผลลง (decreasing cellularity) (Guo & Di Pietro, 2010)

อย่างไรก็ตามแผลที่ไม่สามารถหายได้ตามปกติจะกลายเป็นแผลเรื้อรัง (chronic wound healing) ซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยต่างๆ เช่น แผลในผู้สูงอายุ การสูบบุหรี่ การดื่มสุรา การติดเชื้อ ภาวะการขาดสารอาหาร ตำแหน่งของแผล ภาวะโรคที่เป็นอยู่ เช่น โรคเบาหวาน โรคอ้วน โรคมะเร็ง เป็นต้น โดยปัจจัยเหล่านี้จะไปยับยั้งการสมานบาดแผลจากกลไกต่าง ๆ เช่น ทำให้ความยืดหยุ่นของหลอดเลือดลดลง ส่งผลให้ผนังหลอดเลือดฝอยฉีกขาดง่าย ทำให้การไหลเวียนเลือดและการนำออกซิเจนมายังบริเวณแผลลดลงส่งผลให้แผลอยู่ในภาวะขาดออกซิเจน (hypoxia) ทำให้ความสามารถในการสังเคราะห์คอลลาเจนของร่างกายลดลงส่งผลให้เส้นใยคอลลาเจนอ่อนแอ การทำหน้าที่ของเม็ดเลือดขาวลดลงทำให้ความสามารถในการจับกินเชื้อโรคของเม็ดเลือดขาวลดลงส่งผลให้แผลมีโอกาสติดเชื้อสูง โดยการติดเชื้อและการขาดออกซิเจนของแผลจะกระตุ้น inflammatory phase ให้ยาวนานและรุนแรงขึ้น ทำให้มีการหลั่งเอนไซม์ matrix metalloproteases (MMPs) เพิ่มขึ้น และมีการเพิ่มระดับของ reactive

oxygen species (ROS) ซึ่งจะส่งผลเสียต่อแผล รวมทั้งรบกวนการสังเคราะห์เซลล์เยื่อผิวและการสร้างหลอดเลือดฝอยอีกด้วย ซึ่งการรักษาบาดแผลไม่ได้อาจนำไปสู่การเกิดรอยโรคและรอยแผลเป็นซึ่งยากจะรักษาต่อไป (Guo & Dipietro, 2010; Sandra *et al.*, 2012; Fitzmaurice *et al.*, 2011)

แม้ในปัจจุบันเทคโนโลยีทางการแพทย์ก้าวหน้าไปอย่างไม่หยุดยั้งในเรื่องการรักษาบาดแผลที่เกิดขึ้น เช่น การใช้แผ่นปิดแผล การใช้ยาทาแผลสด (antiseptic products) รวมทั้งการใช้เลเซอร์ลดรอยแผลเป็น ซึ่งล้วนเป็นการรักษาบาดแผลที่มีค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นหากมีวิธีป้องกัน รักษา และสมานบาดแผลบนผิวหนังได้อย่างรวดเร็ว โดยทำให้ร่างกายไม่บาดเจ็บและลดค่าใช้จ่าย จึงน่าจะเป็นทางเลือกที่ดีสำหรับการป้องกันและแก้ปัญหาการเกิดแผลเรื้อรัง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้สารจากธรรมชาติซึ่งเป็นที่นิยมมากขึ้นเนื่องจากความประทับใจของผู้บริโภคที่พิจารณาผลิตภัณฑ์จากสารธรรมชาติว่าอาจจะปลอดภัยกว่าผลิตภัณฑ์จากสารสังเคราะห์ที่ใช้กันแบบดั้งเดิม นอกจากนี้ส่วนผสมจากธรรมชาติมักมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการรักษาบาดแผล โดยหนึ่งในส่วนผสมจากธรรมชาติที่เป็นที่รู้จักกันทั่วโลกคือ สารสกัดจากข้าว (*Oryza sativa* L., Poaceae) ซึ่งมีรายงานว่า มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีศักยภาพในอุตสาหกรรมอาหารและยา ทั้งนี้ประเทศไทยมีความอุดมสมบูรณ์ด้วยข้าวมีสีหลายชนิด หนึ่งในข้าวมีสีซึ่งเป็นที่นิยมและมีรายงานวิจัยสนับสนุนที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติที่เกี่ยวกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ คือ ข้าวไรซ์เบอร์รี่ (riceberry rice) (Teeranachaideekul *et al.*, 2018) โดยในขั้นตอนการสีข้าวไรซ์เบอร์รี่จะพบว่ามีข้าวหัก (broken rice) เกิดขึ้นได้ถึง 20-30% ข้าวหักนี้หมายถึง เมล็ดข้าวหักที่มีความยาวตั้งแต่ 2.5 ส่วนขึ้นไป และให้รวมถึงเมล็ดข้าวแตกเป็นซีกที่มีเนื้อที่เหลืออยู่ไม่ถึง 80% ของเมล็ด และในแต่ละฤดูการเก็บเกี่ยวจะได้ข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ (riceberry broken rice) จากการสีข้าวในปริมาณมากถึง 1,200-1,800 ตัน ข้าวหักในปริมาณมากนี้จะถูกขายในท้องตลาดด้วยราคาถูก เพื่อเป็นอาหารสัตว์ หรือเป็นวัตถุดิบสำหรับทำขนม ทำเส้นก๋วยเตี๋ยว ในงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า สารสกัดจากข้าว (riceberry rice extract) มีคุณสมบัติกระตุ้นการสมานบาดแผล (Amin *et al.*, 2015) ลดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็ง (Tan *et al.*, 2013) ลดการหลุดร่วงของเส้นผม และลดการหงอกของเส้นผมได้ (Choi *et al.*, 2014; Choi *et al.*, 2015)

ปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยในการนำส่งตัวยาหรือสารสำคัญด้วย ลิโพโซม (liposomes) มากมาย หลายการศึกษาพบว่า ลิโพโซมช่วยเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของสารสำคัญได้ เนื่องจากส่วนประกอบและโครงสร้างของลิโพโซมที่คล้ายคลึงกับผิวหนัง จึงสามารถซึมผ่านผิวหนังได้ดีกว่าระบบนำส่งชนิดอื่น (He *et al.*, 2019) นอกจากนี้ยังสามารถนำส่งตัวยาหรือสารสำคัญสู่บริเวณผิวที่มีปัญหา เช่น โรคสะเก็ดเงิน (psoriasis), ติดเชื้อรา (mycosis), บริเวณที่มีขนดก (idiopathic hirsutism) และบริเวณผิวที่มีการติดเชื้ออื่น ๆ ได้ เนื่องจากลิโพโซมสามารถกักเก็บตัวยาไว้ในถุงได้ในปริมาณสูงจึงมีประโยชน์ในการนำส่งตัวยาหรือสารสำคัญเฉพาะที่บนผิวหนัง ทำให้สามารถลดขนาดยาลง และลดการเกิดอาการระคายเคืองบริเวณผิวหนังได้ นอกจากนี้สารสำคัญหลายชนิดมีความคงตัวต่ำ เช่น เอนไซม์ โปรตีน และสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidant) เช่น วิตามินซี และวิตามินอี ลิโพโซมช่วยป้องกันสารสำคัญเหล่านี้

จากการสลายตัวในสภาวะแวดล้อมได้ (Bozzuto & Molinari, 2015) ลิโปโซมสามารถช่วยป้องกันการระเหยของน้ำ ออกจากผิวหนังโดยไขมันที่เป็นส่วนประกอบของลิโปโซมจะแผ่เป็นฟิล์มปกคลุมผิวหนังไว้ (Chauhan *et al.*, 2003) ในท้องตลาดได้มีผลิตภัณฑ์ที่มีอนุภาคนาโนเป็นระบบนำส่ง เช่น DECORTÉ Liposome, NanoVital Q10, Cosme Decorte Liposome, RATCHA Liposome Serum ซึ่งสามารถนำส่งสารสำคัญได้อย่างมีประสิทธิภาพดีกว่าตำรับแบบเก่า เช่น ครีม หรือ อิมัลชัน นอกจากนี้ยังทำให้ผลิตภัณฑ์มีความน่าสนใจและเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์อีกด้วย

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จะเป็นการพัฒนาต่อยอดเพื่อให้เกิดความสมบูรณ์ในงานวิจัย เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์รักษาบาดแผลที่มีประสิทธิภาพ ในรูปแบบลิโปโซมที่บรรจุด้วยสารสกัดจากข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ การวิจัยนี้เริ่มจากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ ที่สนับสนุนกลไกที่เกี่ยวข้องกับการรักษาบาดแผลของสารสกัดจากข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ ประกอบด้วยการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ต่อเซลล์ผิวหนังคิราติโนไซต์ และไฟโบรบลาสต์ ด้วยวิธี MTT assay นอกจากนั้นยังทำการศึกษาถึงการเพิ่มศักยภาพในการเคลื่อนที่ของเซลล์ (migration) และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่กระตุ้นโดยสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ และดูถึงการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์เมื่อมีการซ่อมแซมบาดแผลด้วยวิธี western blot analysis ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อบริเวณผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน ทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ (macrophage) ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตส (elastase) และเอนไซม์คอลลาจีเนส (collagenase) รวมทั้งทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีต่าง ๆ เพื่อเป็นข้อมูลในการนำไปใช้พัฒนาสูตรตำรับลิโปโซมบรรจุสารสกัดจากข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ต่อไป ต่อจากนั้นทำการทดสอบการปลดปล่อยตัวยาจากตำรับลิโปโซม (evaluation of drug release) โดยใช้ Franz diffusion cell การทดสอบการซึมผ่านผิวหนังของตำรับลิโปโซม (in vitro skin permeation) รวมทั้งศึกษาความคงตัวทางเคมีและทางกายภาพของสูตรตำรับลิโปโซมที่เตรียมขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีความน่าสนใจเป็นอย่างมากในการนำเศษข้าวหักซึ่งเป็นของเหลือจากการสีข้าวมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ลิโปโซมรักษาบาดแผล เป็นการเพิ่มมูลค่าสารจากธรรมชาติ และยังถือเป็นองค์ความรู้ใหม่ของการใช้สารสกัดจากข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ในการสมานบาดแผลอีกด้วย

วัตถุประสงค์

- 1) ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพโดยไม่ใช้เซลล์เพาะเลี้ยง (non cell-based assay) โดยศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส (anti-elastase activity) และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส (anti-collagenase activity) ของสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่
- 2) ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง (cell-based assay) โดยศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial activity) ที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อบริเวณผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน

- ทำการศึกษาถึงการเพิ่มศักยภาพในการเคลื่อนที่ของเซลล์ผิวหนัง (migration) และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่กระตุ้นโดยสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ รวมทั้งศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ผิวหนัง ทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ
- 3) พัฒนารับลิโพโซมใช้เฉพาะที่จากสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่สำหรับรักษาบาดแผลบริเวณผิวหนัง ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสูตรตำรับ รวมถึงการศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์

กรอบแนวคิดในการวิจัย



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ความรู้ที่ได้จากการศึกษาวิจัยนี้สามารถพัฒนาให้เกิดผลิตภัณฑ์ใหม่ในรูปแบบลิโพโซมบรรจุสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่สำหรับสมานบาดแผลที่มีประสิทธิภาพ มีความคงตัว และมีความปลอดภัย

1. ได้องค์ความรู้ใหม่เรื่องการกระตุ้นการสมานบาดแผลของเซลล์ผิวหนังคีราติโนไซต์ และไฟโบรบลาสต์
2. สามารถตีพิมพ์ในเอกสารทางวิชาการ (technical paper)
3. กลุ่มเป้าหมายที่จะได้รับประโยชน์คือ ผู้ที่สนใจ และต้องการนำงานวิจัยไปใช้ในการส่งเสริมการแปรรูปเพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรให้เป็นที่ยอมรับ รวมถึงผู้ประกอบการด้านยาและเครื่องสำอาง



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ข้าวไรซ์เบอร์รี่ (Riceberry rice)

ในประเทศไทยมีพันธุ์ข้าวจำนวนมาก และยังมีรายงานว่าข้าวมีสี (pigmented rice) มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าข้าวที่ไม่มีสี (white rice) ซึ่งประเทศไทยมีความอุดมสมบูรณ์ไปด้วยข้าวมีสีหลายชนิด หนึ่งในข้าวมีสีซึ่งเป็นที่นิยม มีกำลังผลิตที่มากพอในการทำอุตสาหกรรมเชิงพาณิชย์ และมีรายงานวิจัยสนับสนุนที่ดีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติที่เกี่ยวกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ คือ ข้าวไรซ์เบอร์รี่ (riceberry rice) (Teeranachaideekul *et al.*, 2018)

ข้าวไรซ์เบอร์รี่ (riceberry rice) เป็นข้าวเจ้า ไม่ไวแสง เมล็ดข้าวกล้องมีสีม่วงเข้ม เป็นสายพันธุ์ที่ถูกพัฒนาขึ้นมาใหม่โดยการผสมข้ามพันธุ์ระหว่าง ข้าวเจ้าหอมนิล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พันธุ์พ่อ) กับข้าวขาวดอกมะลิ 105 (ข้าวหอมมะลิ) จากสถาบันวิจัยข้าว (พันธุ์แม่) โดยเริ่มผสมพันธุ์เมื่อปี พ.ศ. 2545 ณ ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม ข้าวสายพันธุ์พิเศษสีม่วงนี้สามารถปลูกได้ตลอดทั้งปี ต้องปลูกแบบเกษตรอินทรีย์ รวมทั้งต้องปลูกในสภาพอากาศเย็น ไม่เช่นนั้นอาจส่งผลต่อสีของเมล็ดข้าว และจะทำให้คุณค่าทางโภชนาการที่มีอยู่ในข้าวไรซ์เบอร์รี่ไม่ครบถ้วนสมบูรณ์ได้ ข้าวไรซ์เบอร์รี่อุดมไปด้วยคุณค่าทางอาหารสูง โดยคุณประโยชน์ที่เด่นชัดที่สุดจะพบได้ในเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว และรำข้าว โดยมีคุณสมบัติต่อต้านอนุมูลอิสระได้ดี โดยส่วนประกอบสำคัญของสารสกัดจากข้าวสี ได้แก่ กรดฟีนอลิก (phenolic acids), ฟลาโวนอยด์ (flavonoids), แอนโทไซยานิน (anthocyanins), โปรแอนโทไซยานิน (proanthocyanins), โทโคฟีรอล (tocopherols) และ แกมมาโอไรซานอล (γ -oryzanol) นอกจากนี้ยังอุดมไปด้วยสารอาหารอื่น ๆ ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายอีกมากมายหลายชนิด ซึ่งสารอาหารเหล่านี้มีส่วนช่วยในการบำรุงร่างกาย ลดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็ง และช่วยป้องกันโรคต่างๆ ได้ นอกจากนั้นยังมีส่วนช่วยในการสร้างคอลลาเจน (collagen) ช่วยลดความเสี่ยงของผิวหนังได้อีกด้วย

ในขั้นตอนการสีข้าวไรซ์เบอร์รี่ จะพบว่าข้าวหัก (broken rice) เกิดขึ้นได้ถึง 20-30% ข้าวหักนี้หมายถึง เมล็ดข้าวหักที่มีความยาวตั้งแต่ 2.5 ส่วนขึ้นไป และให้รวมถึงเมล็ดข้าวแตกเป็นซีกที่มีเนื้อที่เหลืออยู่ไม่ถึง 80% ของเมล็ด และในแต่ละฤดูการเก็บเกี่ยวจะได้ข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ (riceberry broken rice) จากการสีข้าวในปริมาณมากถึง 1,200-1,800 ตัน ข้าวหักในปริมาณมากนี้จะถูกขายในท้องตลาดด้วยราคาถูกเพื่อเป็นอาหารสัตว์ หรือเป็นวัตถุดิบสำหรับทำขนม ทำเส้นก๋วยเตี๋ยว

จากรายงานการวิจัยพบว่า โครงสร้างที่หลากหลายและความซับซ้อนของโครงสร้าง ทำให้สารประกอบฟีนอลมีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มากมาย จึงทำให้มีการนำมาใช้ประโยชน์เกี่ยวกับผิวหนัง ดังนี้ (Dziato *et al.*, 2016)

- 1 การส่งเสริมสุขภาพตามคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) การต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) และการต้านเชื้อจุลชีพ (antimicrobial action)
- 2 การชะลอวัย (anti-aging) เช่น การฟื้นฟูเซลล์ผิว การกระตุ้นการสร้างคอลลาเจน (collagen) และอีลาสติน (elastin) ลดการสร้างเมลานิน (melanin) การป้องกันรังสียูวี เป็นต้น
- 3 รักษาอาการผดผื่นของผิวหนัง เช่น โรคสะเก็ดเงิน มะเร็งผิวหนัง ผื่นคันโรซาเซีย (rosacea) เป็นต้น
- 4 การสมานบาดแผล เช่น แผลผ่าตัด แผลเรื้อรัง แผลไฟไหม้ เป็นต้น

ในงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า สารสกัดจากข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ (riceberry broken rice extract) มีคุณสมบัติกระตุ้นการสมานบาดแผล (Amin *et al.*, 2015) ลดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็ง (Tan *et al.*, 2013) ลดการหลุดร่วงของเส้นผม และลดการหงอกของเส้นผมได้ (Choi *et al.*, 2014; Choi *et al.*, 2015; Luang-In *et al.*, 2018) Somted และคณะ (2015) ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 6 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritis* และ *Staphylococcus aureus* ของข้าวเมล็ดสีม่วง 4 ชนิด ได้แก่ ข้าวหอมล้านนา ข้าวหอมนิล ข้าวไรซ์เบอร์รี่ และข้าวเหนียวดำพันธุ์ลิ้มผิว โดยใช้วิธี agar disc diffusion ผลการวิจัยพบว่า สารสกัดแอนโทไซยานินจากข้าวเมล็ดสีม่วงแต่ละชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิด โดยเรียงลำดับเชื้อที่มีความกว้างของบริเวณยับยั้ง (inhibitory zone) มากที่สุดไปน้อยที่สุด ดังนี้ *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *salmonella enteritis*, *Enterobacter aerogenes* และ *Pseudomonas aeruginosa*

Pukdee และคณะ (2016) ศึกษาการสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่ด้วยเอทานอล 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วิธีแช่เย็น เป็นเวลา 2, 4, 6 และ 12 ชั่วโมง ผลการวิจัยพบว่า ข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่สกัดด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลโดยรวมและสารกลุ่มแอนโทไซยานินโดยรวมสูงที่สุด คือ 53.354 ± 1.373 mg GAE/g extract (milligram gallic acid equivalent/gram extract) และ 42.582 ± 2.892 mg C3G/g extract (milligram cyanidin-3-glucoside/gram extract) ตามลำดับ และเมื่อนำสารสกัดที่ได้มาทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS และ FRAP พบว่า มีค่า IC_{50} (50% inhibitory concentration) เท่ากับ 0.015 ± 0.0003 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ $2,765.766 \pm 39.844$ mg TEAC/g extract (milligram Trolox equivalent antioxidant capacity/gram extract) ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่า สารสกัดข้าวไรซ์เบอร์รี่มีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ทางยาและเครื่องสำอางได้

Teeranachaideekul และคณะ (2018) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลโดยรวม ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์โดยรวม และฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในทางยาและเครื่องสำอางของข้าวสี 5 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวสังข์หยด ข้าวมันปู ข้าวหอมนิล ข้าวไรซ์เบอร์รี่ และข้าวลิ้มผั่ว โดยสกัดทั้งเมล็ดด้วยเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ผลการวิจัยพบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลโดยรวมและสารประกอบฟลาโวนอยด์โดยรวมของข้าวทั้ง 5 สายพันธุ์อยู่ในช่วง 128-322 mg GAE/g extract และ 86-341 mg CE/g extract (milligram catechin equivalent/gram extract) ตามลำดับ รวมถึงมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH และ ABTS นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) ยับยั้งการสร้าง AGEs (glycation end products) สามารถดูดซับรังสียูวี และมีความปลอดภัยต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblasts) ของมนุษย์ โดยพบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การรอดชีวิตของเซลล์สูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

Boonpisuttinant และคณะ (2019) ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากกลีบและรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ โดยใช้วิธีสกัด 3 แบบ คือ ต้มด้วยน้ำ แช่ด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และบ่มด้วยเชื้อรา *Saccharomyces cerevisiae* var. *burgundy* ผลการวิจัยพบว่า องค์ประกอบทางเคมีที่พบโดยส่วนใหญ่ในสารสกัดจากกลีบและรำข้าวที่ได้จากการสกัดทั้งสามแบบ คือ สารกลุ่มแซนโทน (xanthones) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) โดยสารสกัดรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่บ่มด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* var. *burgundy* มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และการจับกับโลหะ (metal chelating capacity) เมื่อทดสอบด้วยวิธี ferrous ion chelating สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับวิตามินซี และกรดเอทิลีนไดอะมีนเตตราอะซิติก (ethylenediamine tetraacetic acid; EDTA) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.25 ± 0.02 และ 0.22 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อทดสอบด้วยวิธี ferric thiocyanate พบว่า สารสกัดรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ต้มด้วยน้ำ มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) และจากการทดสอบ ด้วยวิธี Dapachrome พบว่า สารสกัดรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่บ่มด้วย *Saccharomyces cerevisiae* var. *burgundy* สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.11 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Acute wound healing

โดยทั่วไปในคนปกติที่แข็งแรง เวลาเกิดบาดแผล (มีการบาดเจ็บต่อผิวหนังถึงชั้น dermis) จะมีกลไกการหายของแผลเกิดขึ้นได้เองโดยธรรมชาติ ซึ่งจะมีขั้นตอนการหายของแผลดังนี้ (phase of wound healing) (Cohen *et al.*, 1999; Dang *et al.*, 2003; Guo & Dipietro, 2010)

1. Phase of coagulation เมื่อมีบาดแผลเกิดขึ้น จะมีการฉีกขาดของเส้นเลือด ทำให้เกิด bleeding ร่างกายจะมีปฏิกิริยาต่อเส้นเลือดทำให้เกิด vasoconstriction และมี platelets aggregation ซึ่งเกิดขึ้นได้โดยอาศัย chemical substance จากเซลล์ที่เกิด injury เป็นตัวกระตุ้น นำไปสู่การเกิด blood clot (coagulation cascade) ซึ่งมี coagulation factor ต่าง ๆ รวมด้วย ใน blood clot จะ

ประกอบด้วย fibrin ซึ่งอยู่ในรูปของ meshwork ทำให้เลือดหยุดและจะปกคลุมบาดแผลในระยะแรก นอกจากนี้ยังจะเป็น frame work ให้เซลล์ต่างๆในขบวนการของ wound healing เข้ามา ถ้า fibrin meshwork ไม่สมบูรณ์ ก็จะมีผลต่อ wound healing ได้ platelets นอกจากจะเป็นเซลล์เริ่มต้นของขบวนการ wound healing แล้วโดยการเกิด aggregation ตัวมันเองยังมีการปล่อย cytokine ต่างๆมากระตุ้นทำให้กระบวนการของ wound healing ดำเนินต่อไปด้วย เช่น platelet – derived growth factor (PDGF), Transforming growth factor (TGF), fibroblast growth factor -2 (FGF-2) เป็นต้น

2. Inflammatory phase เริ่มเกิดขึ้นภายใน 10-30 นาที หลังจากเกิดบาดแผล ซึ่งจะมีการเกิด vasodilation, increased capillary permeability, complement activation, white blood cell (PMN, monocyte) migration ทำให้เกิดอาการ บวม แดง ร้อน ที่บริเวณแผล เมื่อ white blood cell มาที่แผล ก็จะทำลาย cell debris, bacteria และ extracellular matrix ที่ Injured โดยการปล่อย enzyme protease มาย่อย นอกจากนี้แมคโครฟาจซึ่งเป็นเซลล์ที่สำคัญต่อ wound healing ยังหลั่ง growth factor ต่างๆ อีกหลายตัวมากระตุ้นการเกิด proliferation เช่น angiogenesis, epithelialization, fibroblast proliferation, migration และ collagen synthesis เป็นต้น

3. Proliferation phase บาดแผลจะมีการเกิด granulation tissue, angiogenesis, wound contracture และ epithelialization ซึ่งจะมีเซลล์ต่างๆเข้ามาแทนที่ inflammatory cell การสร้าง granulation tissue ความหมายคือการมี new extracellular matrix เกิดขึ้น ส่วนใหญ่ก็คือคอลลาเจน ซึ่งถูกสร้างโดยไฟโบรบลาสต์ โดยมี cytokine มาเป็นตัวกระตุ้นทำให้เกิด fibroblast proliferation, fibroblast migration และ collagen synthesis นอกจากนี้ในกระบวนการสร้างคอลลาเจน ยังมีสารต่างๆ ที่มีความสำคัญต่อกระบวนการนี้ เช่น วิตามินซี เหล็ก และออกซิเจน ซึ่งเป็น co-factor สำคัญในการเกิด hydroxylation ของ proline และ lysine เป็นต้น

การเกิด angiogenesis ซึ่งถูกกระตุ้นโดยแมคโครฟาจ และภาวะ tissue hypoxia โดยแมคโครฟาจ ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในทุกกระบวนการของ wound healing จะหลั่งสารพวก transforming growth factor มากระตุ้น endothelial cell สร้างเส้นเลือดใหม่เกิดขึ้น

การเกิด wound contraction เซลล์ไฟโบรบลาสต์นอกจากจะสร้างคอลลาเจน และ extracellular matrix อื่นๆแล้ว ยังมีบทบาทสำคัญในการเกิด wound contracture โดยตัวมันเองจะเคลื่อนไปที่ขอบของแผล และเปลี่ยนเป็น myofibroblast ซึ่งจะมีพลังในการดึงขอบแผลเข้าหากัน ในแผลที่ปล่อยให้หายเองจะมี wound contraction มากกว่าในแผลที่เย็บปิด (primary closure)

การเกิด epithelialization เซลล์คีราติโนไซต์ หรือ epithelial cell จะเคลื่อนที่มาจากกลุ่ม granulation tissue โดยที่การเคลื่อนที่และการแบ่งตัวจะมาจากบริเวณขอบแผล และในส่วนของ skin appendage (hair follicle, sebaceous gland, sweat gland) ที่ยังหลงเหลืออยู่ในบาดแผล โดยการกระตุ้นของ growth factor ต่างๆ ที่หลั่งจากแมคโครฟาจ เช่น fibroblast growth factor, insulin-like growth factor, epidermal growth factor เป็นต้น นอกจากนี้ epithelialization ยังเกิดได้ดีในแผลที่

มี moist wound environment และเกิดได้ถ้ามี necrotic tissue และ scab ขวางอยู่ epithelial cell จะแบ่งตัวและเคลื่อนที่มาปกคลุม granulation tissue จนหมด ถึงจะหยุดกระบวนการซึ่งเรียกกระบวนการนี้ว่า contract inhibition

4. Remodelling phase หรือ maturation phase เป็นระยะสุดท้ายของกระบวนการ wound healing ซึ่งจะเริ่มประมาณ 20 วัน หลังการเกิดบาดแผลและดำเนินต่อไปได้ ตั้งแต่หลายเดือนไปจนถึงหลายปี ขึ้นอยู่กับบาดแผลนั้นๆ เช่น ตำแหน่ง, ระยะเวลาการหายของแผล, ความรุนแรงของบาดแผล ระยะนี้แผลจะมีความแข็งแรงขึ้น (increase tensile strength) โดยมีการเกิด collagen cross link และมีการลดจำนวนเซลล์ต่างๆของบาดแผลลง (decreasing cellularity) ซึ่งช่วงนี้แผลเป็น (scar) จะมีเลือดมาเลี้ยงลดลง การสร้างคอลลาเจนลดลง และมีการทำลายของคอลลาเจนมากขึ้น จนถึงภาวะสมดุลของการสร้างและทำลายคอลลาเจนทำให้แผลเป็นนิ่มลง, แบนลง, เรียบ และมีสีจาง ซึ่งกระบวนการเหล่านี้ถูกควบคุมโดยเซลล์แมโครฟาจ สำหรับแผลเป็นที่ mature แล้ว ความแข็งแรงก็ไม่เกิน 80% ของผิวหนังปกติ และเป็นส่วนที่ไม่มี sebaceous, sweat gland, hair follicle จึงทำให้มีการแห้งและแตกง่ายกว่าผิวหนังปกติ

Chronic wound healing

Chronic wound healing หรือ non-healing ulcer เกิดจากที่แผลไม่สามารถหายตามกระบวนการของ acute wound healing ได้แต่จะมีการหยุดที่ phase ใด Phase หนึ่ง ดังนี้ มี prolonged หรือ repeated ของ inflammatory phase ซึ่งอาจเกิดจากมี infection, มี repeated trauma หรือมี necrotic tissue เหลืออยู่ ทำให้มีการกระตุ้น PMN และเซลล์แมโครฟาจ หลั่งเอนไซม์โปรตีเอสอยู่ตลอดเวลา ทำให้มีการทำลายของ extracellular matrix (ECM) ต่างๆ และเกิดการ degrade ของ growth factor ทำให้เกิดความผิดปกติและผิดปกติของขั้นตอน proliferative phase ไม่สามารถเกิด granulation tissue formation หรือ epithelialization ได้ นอกจากนี้ chronic wound fluid ก็มีคุณสมบัติแตกต่างตรงกันข้ามกับ acute wound fluid คือใน acute wound fluid จะมี pro-inflammatory cytokines (TNF-2 และ IL-1) สูงสุดใน 2-3 วัน หลังจากเกิดบาดแผลและจะลดลงอย่างมากในระยะต่อมา ซึ่งกระบวนการหายของแผลก็จะดำเนินไปตามปกติ ส่วนใน chronic wound fluid จะมีระดับ pro-inflammatory cytokines อยู่ในปริมาณที่สูงอยู่ตลอดเวลา และใน acute wound fluid ก็จะมี growth factor เช่น PDGF, IL-6, TGF-2, TGF- β จำนวนมาก เพื่อ กระตุ้นขั้นตอน proliferate phase ตรงกันข้ามกับ chronic wound fluid ซึ่งมี growth factor เหล่านี้ปริมาณที่น้อย และยังมีเอนไซม์ matrix metalloprotease (MMPS) ซึ่งไปทำลาย extracellular matrix และทำลาย growth factor ด้วย ทำให้กระบวนการหายของแผลผิดปกติ ดังนั้นการควบคุม exudate ใน chronic wound จึงมีความสำคัญในการรักษาแผล (Cohen *et al.*, 1999; Dang *et al.*, 2003; Guo & Dipietro, 2010)

การหายของแผลมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการ

1. **อายุ** ผู้สูงอายุมีภาวะเสี่ยงต่อการติดเชื้อเนื่องจากร่างกายของผู้สูงอายุ จะตอบสนองต่อการอักเสบได้ลดลง ผนังหลอดเลือดหนาตัว ความยืดหยุ่นของหลอดเลือดลดลง ทำให้การไหลเวียนเลือดและการนำออกซิเจนมายังบริเวณแผลลดลง และ ความสามารถในการสังเคราะห์คอลลาเจนของร่างกายลดลง ทำให้เส้นใยคอลลาเจนอ่อนแอ ทำให้เพิ่มความเสี่ยงในการติดเชื้อ และทำให้การหายของแผลช้าลง
2. **ภาวะโภชนาการ** การได้รับสารอาหารที่เป็นประโยชน์อย่างเพียงพอ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน วิตามิน เหล็ก จะทำให้เซลล์ต่างๆของร่างกายทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ร่างกายมีภูมิคุ้มกันต้านเชื้อโรค และช่วยส่งเสริมให้แผลหายเร็วขึ้น สารอาหารที่ช่วยในการส่งเสริมการหายของแผล เช่น
 - 2.1 โปรตีน เป็นองค์ประกอบสำคัญของเนื้อเยื่อ ช่วยส่งเสริมการสร้างเนื้อเยื่อที่สึกหรอ และเป็นส่วนประกอบของเม็ดเลือดแดงที่นำออกซิเจนไปยังบริเวณแผล ถ้าขาดโปรตีนจะทำให้การสังเคราะห์คอลลาเจนลดลง ความแข็งแรงของแผลลดลง และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเสียไป การจับกินเชื้อโรคของเม็ดเลือดขาวเสื่อมลง ทำให้การทำหน้าที่ของ leucocyte ลดลง ทำให้แผลติดเชื้อง่าย และการหายของแผลช้าลง
 - 2.2 คาร์โบไฮเดรตและไขมัน เป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ต่างๆ เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์ไฟโบรบลาสต์ ถ้าร่างกายขาดสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตและ ไขมัน ร่างกายจะดึงโปรตีนที่สะสมไว้มาใช้ ทำให้โปรตีนที่จะใช้ในการส่งเสริมการหายของแผลลดลง ทำให้การหายของแผลช้า และเสี่ยงต่อการเกิดการติดเชื้อมากขึ้น
 - 2.3 วิตามินและเหล็ก จะเกี่ยวข้องกับการหายของแผล วิตามินซี มีความจำเป็นในการสร้างคอลลาเจน และมีบทบาทสำคัญช่วยในการหายของแผล วิตามินเอ ช่วยในการสร้างเยื่อผิว ช่วยในการหายของแผล สังกะสีและธาตุเหล็ก ช่วยในการสร้างคอลลาเจน สร้างภูมิคุ้มกันต้านโรค ช่วยในการทำหน้าที่ของเม็ดเลือดแดงในการนำออกซิเจนไปยังเนื้อเยื่อ ถ้าขาดวิตามินและเหล็กดังกล่าว จะทำให้ผนังหลอดเลือดฝอยฉีกขาดง่าย การทำหน้าที่ของเม็ดเลือดขาวลดลง การสังเคราะห์เส้นใยคอลลาเจนน้อยลง ทำให้การเรียงตัวใหม่ของคอลลาเจนใช้เวลานานขึ้น ทำให้การหายของแผลช้าลง และเนื้อเยื่อที่สร้างใหม่ไม่แข็งแรง
3. **การสูบบุหรี่** สารพิษในบุหรี่ เช่น นิโคติน คาร์บอนมอนนอกไซด์ จะรบกวนกระบวนการหายของแผล โดยนิโคตินทำให้หลอดเลือดหดตัว ทำให้เลือดไปเลี้ยงบริเวณแผลลดลง และยับยั้งการสังเคราะห์เซลล์เยื่อผิวบริเวณบาดแผล คาร์บอนมอนนอกไซด์จะจับกับฮีโมโกลบินจนแน่น เรียกว่าคาร์บอกซีฮีโมโกลบิน ทำให้ฮีโมโกลบินไม่สามารถปล่อยออกซิเจนให้แก่เนื้อเยื่อได้

ตามปกติ บริเวณแผลจึงได้รับออกซิเจนน้อย ทำให้แผลหายช้า การสูบบุหรี่เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญที่ทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อน เกี่ยวกับการหายของแผล

4. **การติดเชื้อ** ทำให้รบกวนกระบวนการหายของแผล ทั้งนี้ปัจจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น ชนิดและจำนวนของเชื้อโรค ภาวะภูมิคุ้มกันของร่างกาย
5. **โรคที่เป็นอยู่และการรักษา** เช่น

5.1 โรคมะเร็ง ผู้ป่วยโรคมะเร็งที่ได้รับการรักษาโดยรังสีรักษาและเคมีบำบัด จะทำให้หลอดเลือดแดงถูกทำลาย เลือดจึงมาเลี้ยงบริเวณแผลลดลง และมีการทำลายเนื้อเยื่อปกติ รวมทั้งยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และการสังเคราะห์คอลลาเจน ทำให้การสร้างเนื้อเยื่อใหม่ถูกรบกวน ภูมิคุ้มกันโรคของร่างกายถูกกด ระยะเวลาการอักเสบของแผลจึงนานขึ้น ทำให้แผลหายช้า

5.2 โรคเบาหวาน ผู้ป่วยโรคเบาหวานมีระดับน้ำตาลในเลือดสูง ทำให้ความสามารถในการจับกินเชื้อโรคของเม็ดเลือดขาวลดลง แผลมีโอกาสดติดเชื้อสูง ทำให้รบกวนการหายของแผล โดยรบกวนการสังเคราะห์คอลลาเจน และการสร้างหลอดเลือดฝอย ทำให้หลอดเลือดฝอยอ่อนแอ ฉีกขาดง่าย

6. **การได้รับเลือดและออกซิเจนของเนื้อเยื่อบริเวณแผล** การที่เนื้อเยื่อได้รับเลือดไปเลี้ยงอย่างเพียงพอ เป็นสิ่งสำคัญในการนำสารอาหารไปเลี้ยงเนื้อเยื่อ สร้างภูมิคุ้มกันโรค สังเคราะห์คอลลาเจน สร้างเยื่อผิวหนัง เพื่อซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอหรือถูกทำลาย ผู้ป่วยที่มีภาวะเสียเลือด มี hypovolemia จะมีผลทำให้การหายของแผลช้าลง
7. **ตำแหน่งของแผล** มีความเกี่ยวข้องกับระยะเวลาการหายของแผล เนื่องจากตำแหน่งที่ต่างกันจะมีปริมาณเลือดมาเลี้ยงต่างกัน เช่น แผลบริเวณข้อเท้า ข้อเข่า ข้อศอก เป็นตำแหน่งที่มีเลือดมาเลี้ยงน้อยกว่าบริเวณอื่น และบริเวณดังกล่าวมีการ เคลื่อนไหวมาก จึงรบกวนกระบวนการหายของแผล บริเวณที่มีเลือดมาเลี้ยงมาก เช่น ใบหน้า ลำคอ แผลจะหายเร็วกว่า
8. **สิ่งแปลกปลอมในแผล** เช่น มีสิ่งแปลกปลอมตกค้าง ทำให้เป็นแหล่งอาหารของแบคทีเรีย ทำให้เชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดี รบกวนกระบวนการหายของแผล เนื่องจากการทำงานของเม็ดเลือดขาวถูกขัดขวาง ระยะเวลาการอักเสบนานมากขึ้น ทำให้แผลหายช้า

การติดเชื้อบริเวณผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน

การติดเชื้อที่ผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน (skin and soft tissue infections, SSTIs) พบได้บ่อยในทางเวชปฏิบัติ มีหลายสาเหตุและหลายอาการแสดง การติดเชืวดังกล่าวเป็นได้ตั้งแต่ชั้นหนังกำพวด (epidermis) ชั้นหนังแท้ (dermis) พังผืด (fascia) เนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง (subcutaneous tissue) และชั้นกล้ามเนื้อ (muscle) ซึ่งความรุนแรงจะเพิ่มขึ้นตามลำดับ เชื้อที่พบเป็นสาเหตุส่วนใหญ่ ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* และเชื้อชนิดอื่นๆ ในกลุ่มของ

Staphylococcus และ *Streptococcus* อาจพบสาเหตุมาจากแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Pseudomonas aeruginosa* รวมถึงเชื้อชนิดอื่นๆ เช่น *Enterococcus* spp., *Clostridium* spp. เชื้อรา (fungi) (Ki & Rotstein, 2008) และ *Bacillus cereus* (Michelotti & Bodansky, 2015) นอกจากนี้ยังพบว่า *Staphylococcus epidermidis* ซึ่งเป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) บริเวณผิวหนังและเยื่อเมือก เป็นเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic pathogens) สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infections) แต่ไม่ก่อให้เกิดความรุนแรง (Otto, 2009) โดยแบคทีเรียดังกล่าวสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อบริเวณผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน เช่น ฝีหนอง (abscess) แผลเบาหวาน (diabetes) เซลล์เนื้อเยื่ออักเสบ (cellulitis) โรคแบคทีเรียกินเนื้อ (necrotizing fasciitis) แผลติดเชื้อจากการผ่าตัด เป็นต้น แบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Pseudomonas aeruginosa* เป็นเชื้อฉวยโอกาสที่เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน ก่อให้เกิดการติดเชื้อที่รุนแรง และเป็นหนึ่งในสาเหตุที่พบบ่อยที่สุดของภาวะการติดเชื้อ โดยแบคทีเรียดังกล่าวสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อบริเวณผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน เช่น โรคแบคทีเรียกินเนื้อ (necrotizing fasciitis) แผลติดเชื้อจากการผ่าตัด เป็นต้น (Leong *et al.*, 2018)

มีรายงานวิจัยพบว่า สารกลุ่มฟลาโวนอยด์บางชนิด เช่น ฟลาโวนอล (flavonols) ฟลาโวน (flavones) ฟลาเวน (flavanes) โดยเฉพาะชาลโคน (chalcones) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียแรงกว่ายาในท้องตลาดที่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน 6 เท่า และอนุพันธ์สังเคราะห์ของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์บางตัวมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียดีอย่างทั้งแกรมบวกและแกรมลบ รวมถึง *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* แรงกว่ายาในท้องตลาดที่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน 20-80 เท่า (Farhadi *et al.*, 2019)

ฤทธิ์ด้านการอักเสบ

เซลล์แมคโครฟาจ (macrophage) มีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบ โดยจะถูกกระตุ้นโดยตรงจากเชื้อโรค (recognizing pathogens) หรือไซโตไคน์ (cytokines) จากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นจะหลั่งเอนไซม์และสารชักนำการอักเสบ ได้แก่ inducible nitric oxide synthase (iNOS) สำหรับการสร้างไนตริกออกไซด์ (NO) และ cyclooxygenase-2 (COX-2) สำหรับการสร้างพรอสตาแกลนดิน, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) และ interleukin-8 (IL-8) โดยไนตริกออกไซด์ จัดเป็นสารสื่อกลางการอักเสบที่สำคัญในกระบวนการอักเสบ ไนตริกออกไซด์มีผลทำให้เกิดภาวะหลอดเลือดขยายตัว เพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของผนังหลอดเลือด ทำให้เกิดอาการบวมในบริเวณที่มีการอักเสบ ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของไนตริกออกไซด์ นับเป็นแนวทางสำคัญในการควบคุมและบรรเทาการอักเสบ การใช้ยาหรือสารเคมีเพื่อยับยั้งการอักเสบแผนปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นยาในกลุ่ม NSAIDs และ steroids (Alderton *et al.*, 2001; Chumseng *et al.*, 2010)

HaCaT cell lines

เป็น immortalized human epithelial cell line ซึ่งถูกพัฒนาขึ้นจากผิวหนังผู้ใหญ่ โดยในปี พ.ศ. 2542 Boukamp และคณะ นำ epithelial cells จากเซลล์เยื่อผิวหนังจากขอบของเนื้องอกส่วนหลัง ด้านบนจากผู้ป่วยชายอายุ 62 ปี ที่ป้องกันการสัมผัสกับแสงแดดโดยตรง โดย HaCaT cell lines มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับเซลล์คีราติโนไซต์ของมนุษย์ เนื่องจาก HaCaT cell lines จะมีโปรตีนบนผิวเซลล์ เช่น K1, K10, Involucrin และ filagrin ซึ่งโปรตีนเหล่านี้เป็นตัวบ่งชี้ของเซลล์คีราติโนไซต์ของมนุษย์ นอกจากนี้ยังพบว่า DNA fingerprint ของ HaCaT cell lines มีรูปแบบไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเลี้ยง HaCaT cell lines ในระยะยาว ดังนั้นจึงเป็นที่ยอมรับในการใช้ HaCaT cell lines เพื่อเป็นตัวแทนของเซลล์คีราติโนไซต์ในหลอดทดลอง (Boukamp *et al.*, 1988) ดังตัวอย่างที่มีรายงานศึกษาวิจัยที่ใช้ HaCaT cell lines มาตรวจสอบการเพิ่มคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดคีราติโนไซต์เพื่อรักษาความสามารถในการสร้างใหม่และฟื้นฟูเซลล์ผิวหนังของสารวานิลลิน (Taboonpong *et al.*, 2017) และสารสกัดว่านเพชรหึง (Chowjarean *et al.*, 2018)

การเคลื่อนที่ของเซลล์ผิวหนัง keratinocytes โดยการทำงานของโมเลกุลนำส่งสัญญาณ

การถ่ายโอนสัญญาณหรือการแปรสัญญาณ (signal transduction) ในเซลล์ เป็นกระบวนการทางเคมีหรือทางกายภาพ โดยเป็นลำดับการทำงานหรือลำดับเหตุการณ์ในระดับโมเลกุล ที่โมเลกุลส่งสัญญาณ (signaling molecules) จะเริ่มทำงานจากหน่วยรับ (receptors) ซึ่งมีผลให้เซลล์ตอบสนองหรือเปลี่ยนการทำงาน ความเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากการจับของลิแกนด์ (ligands) กับหน่วยรับ จะก่อลำดับการส่งสัญญาณ (signaling cascade) ซึ่งเป็นลำดับเหตุการณ์ทางเคมีชีวภาพตามวิถีการส่งสัญญาณ (signaling pathway) ต่าง ๆ เช่น การอยู่รอดของเซลล์ (cell viability) การแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) การเคลื่อนที่ของเซลล์ (cell migration) จากงานวิจัยพบว่า การเคลื่อนที่ของเซลล์ผิวหนังคีราติโนไซต์ในกระบวนการสมานบาดแผลมีความเกี่ยวข้องกับโปรตีนนำส่งสัญญาณ (signaling proteins) 2 ชนิด คือ

Focal adhesion kinase (FAK) เป็นโปรตีนที่ไม่จัดอยู่ในกลุ่มของ tyrosine kinase receptor ทำหน้าที่เหนี่ยวนำสัญญาณภายในเซลล์ มีการแสดงออกในเซลล์หลายชนิด เมื่อมีการกระตุ้นที่หน่วยรับ จะส่งผลกระทบการทำงานของ FAK ทำให้เกิดกระบวนการทางชีววิทยา เช่น การเคลื่อนที่ของเซลล์ การเพิ่มจำนวนเซลล์ การอยู่รอดของเซลล์ การเกาะติดของเซลล์ (cell adhesion) การรุกรานของเซลล์ (cell invasion) นอกจากนี้ FAK ยังมีบทบาทสำคัญในกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อหลังได้รับบาดเจ็บ มีการอธิบายถึงหน้าที่ของ FAK ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการสร้างพอลิเมอร์ของ F-actin และการหมุนเวียนของโมเลกุล focal adhesions (FAs) ซึ่งจำเป็นสำหรับการสร้างรูปร่างและการเคลื่อนที่ของเซลล์ผิวหนัง (Serrels *et al.*, 2007; Zhao & Guan, 2011) จากรายงานวิจัยพบว่า FAK มีการแสดงออกหรือทำงานเพิ่มขึ้นในคีราติโนไซต์ที่กำลังเคลื่อนที่ในการทดลองกับเซลล์เพาะเลี้ยงแบบชั้นเดียว

(monolayer) (Gates *et al.*, 1994; Romer *et al.*, 1994) การศึกษาที่มีจำนวนมากขึ้นพบว่า FAK กระตุ้นให้เกิดการทำงานในลำดับถัดไป เช่น กระตุ้น ATP-dependent tyrosine kinase (Akt), mitogen-activated protein kinase (MAPK) หรือกระตุ้นยีนในกลุ่ม Ras เช่น Member A (RhoA) และ Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1) รวมทั้งกระตุ้นโปรตีนที่ควบคุมการแบ่งเซลล์ หรือ Cdc42 ซึ่งล้วนมีบทบาทในการปรับรูปร่าง และการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Zhao & Guan, 2011; Sulzmaier *et al.*, 2014) กระบวนการต่างๆจะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์มีการเคลื่อนที่ โดยพบว่า Rac1 จะกระตุ้นการสร้างไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ยื่นออกมาภายนอกเซลล์ (lamellipodia และ filopodia) เพื่อเป็นตัวขับเคลื่อนให้เซลล์สามารถเคลื่อนที่ได้ (Nobes & Hall, 1999; Etienne-Manneville & Hall, 2002) ส่วน RhoA มีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้าง FAs และการหดตัวของเส้นใย actin (Etienne-Manneville & Hall, 2002)

ATP-dependent tyrosine kinase (Akt) หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า protein kinase B (PKB) เป็น serine/threonine kinase ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการหลายอย่างภายในเซลล์ เช่น การอยู่รอดของเซลล์ การเมแทบอลิซึมของเซลล์ (cell metabolism) การเพิ่มจำนวนเซลล์ และการเคลื่อนที่ของเซลล์ผ่าน PI3K/Akt signaling pathway โดย Akt จะถูกดึงมายังบริเวณพลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) และถูกกระตุ้นให้ทำงานด้วยการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) Akt ที่ถูกกระตุ้นจะทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการกระตุ้นและยับยั้งโมเลกุลเป้าหมายต่างๆที่อยู่ภายในเซลล์ มีรายงานการศึกษาผลของสารสกัด *Centella asiatica* ในการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของคีราติโนไซต์ ผ่านทาง FAK/Akt, ERK และ p38 MAPK signaling pathways พบว่า สารสกัด *Centella asiatica* ชักนำการเติมหมู่ฟอสเฟตให้แก่ FAK และ Akt เช่นเดียวกับ ERK และ p38 MAPK มีผลทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของคีราติโนไซต์ (Singhorn *et al.*, 2018) งานวิจัยของ Jai Yu และคณะ (2010) ระบุว่า PI3K-Akt pathway มีความเกี่ยวข้องกับการควบคุม actin cytoskeleton และการเคลื่อนที่ของเซลล์ และพบว่า MicroRNA-205 ส่งเสริมการส่งสัญญาณของ Akt อีกทั้งมีผลให้คีราติโนไซต์บริเวณกระจกตาเชื่อมติดกันได้เร็วมากขึ้น

ลิโปโซม (liposomes)

ลิโปโซม (liposomes) คืออนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่าระดับไมครอน (submicron) มีลักษณะเป็นถุงกลมๆของสารไขมัน โดยสารไขมันเหล่านี้เป็นสารชนิดแอมฟิพาติก (amphipathic) กล่าวคือมีทั้งกลุ่มมีขั้ว (polar) ชอบน้ำและกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำในโมเลกุล (hydrophobic) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นไขมันประเภท phospholipids ทั้งจากธรรมชาติ และสังเคราะห์ขึ้น เช่น phosphatidyl-choline (lecithin), phosphatidyl-ethanolamine, phosphatidyl-glycerol และ phosphatidyl-inositol เป็นต้น เมื่อผสมลงในสารละลายน้ำ โมเลกุลของสารไขมันประเภท phospholipids สามารถจัดเรียงตัวเป็นชั้นสลับกับชั้นโมเลกุลของน้ำในสารละลายน้ำได้เพราะโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยทั้งส่วนมีขั้ว (polar) ชอบน้ำ (hydrophilic) และส่วนที่ไม่มีขั้ว (nonpolar) ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) เมื่ออยู่ในน้ำจะจัดเรียงตัว

โดยนำส่วนที่มีหัวหรือมีประจุหันออกหาโมเลกุลน้ำ ในขณะที่เดียวกันจะเอาส่วนที่ไม่มีหัวหันเข้าหาส่วนที่ไม่มีหัวของโมเลกุลพวกเดียวกัน โดยจะอยู่ในลักษณะของการเรียงตัวเป็นแถวของโมเลกุลไขมันซ้อนกันเป็นผนังสองชั้นหรือ lipid bilayer หากลิโปโซมมี lipid bilayer เพียงชั้นเดียว จะจัดเป็นลิโปโซมประเภท unilamellar bilayer vesicles (ULVs) หากลิโปโซมมี lipid bilayer มากกว่าหนึ่งชั้น (โดยมีชั้นของสารละลายน้ำกั้นอยู่ระหว่างผนังสองชั้น) จะจัดเป็นลิโปโซมประเภท multilamellar bilayer vesicles (MLVs) ตัวยาหรือสารสำคัญที่มีคุณสมบัติชอบน้ำจะกักเก็บอยู่ในส่วนของชั้นที่มีหัว ส่วนตัวยาหรือสารสำคัญที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำจะแทรกอยู่ใน lipid bilayer โดยทั่วไปตัวยาหรือสารสำคัญที่มีคุณสมบัติชอบน้ำจะถูกกักเก็บในลิโปโซมได้มากกว่าพวกที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ

การประยุกต์ใช้ลิโปโซมเพื่อช่วยเพิ่มความคงตัวของสารสำคัญทางเวชสำอาง

สารสำคัญทางเวชสำอางบางชนิดมีความคงตัวต่ำ เช่น เอนไซม์ โปรตีน และสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidant) เช่น วิตามินซี และวิตามินอี ลิโปโซมช่วยป้องกันสารสำคัญเหล่านี้จากการสลายตัวในสภาวะแวดล้อม (Bozzuto & Molinari, 2015) loele และคณะ (2005) ศึกษาการสลายตัวจากแสง (photodegradation) ของ retinoic acid (tretinoin และ isotretinoin) ที่เตรียมในรูปแบบของสารละลายเอทานอลและลิโปโซม โดยใช้แสงจากหลอดซีนอน (xenon lamp) ในช่วงความยาวคลื่น 300-800 นาโนเมตร จากการศึกษาพบว่า tretinoin ในรูปแบบของสารละลายเอทานอล สลายตัวเป็น 13-cis-retinoic acid และ isotretinoin acid สลายตัวเป็น 9-cis-retinoic acid อย่างรวดเร็ว แล้ว 13-cis-retinoic จึงค่อยๆ เปลี่ยนเป็น 9-cis-retinoic acid อย่างช้าๆ แต่ tretinoin และ isotretinoin ในรูปแบบลิโปโซมมีความคงตัวมากกว่า

การประยุกต์ใช้ลิโปโซมเพื่อช่วยเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของสารสำคัญ

จากส่วนประกอบและโครงสร้างของลิโปโซมที่คล้ายคลึงกับผิวหนัง จึงสามารถซึมผ่านผิวหนังได้ดีกว่าระบบนำส่งชนิดอื่น (He *et al.*, 2019) Padamwar และ Pokharkar เตรียมลิโปโซมที่เก็บกัก vitamin E acetate โดยวิธีการฉีดด้วยเอทานอล (ethanol injection method) แล้วนำไปเตรียมต่อในรูปแบบเจล จากการศึกษาการสะสมของ vitamin E acetate ในผิวหนังหนูโดยใช้ Franz Diffusion cell พบว่า สูตรตำรับที่ประกอบด้วยลิโปโซมให้การสะสมของ vitamin E acetate ในผิวหนังมากกว่าสูตรที่ไม่มีลิโปโซมถึง 7 เท่า และเมื่อเปรียบเทียบลิโปโซมของ vitamin E acetate ที่เตรียมในรูปแบบเจลกับเจลเปล่า และ vitamin E acetate ในรูปแบบครีมที่มีขายในท้องตลาด พบว่าลิโปโซมในรูปแบบเจลให้การสะสมของ vitamin E acetate ในผิวหนังที่มากกว่า 6 และ 4 เท่าตามลำดับ

การประยุกต์ใช้ลิโปโซมเพื่อช่วยกักเก็บน้ำในผิวหนัง

ลิโปโซมสามารถช่วยป้องกันการระเหยของน้ำออกจากผิวหนังโดยไขมันที่เป็นส่วนประกอบของลิโปโซมจะแผ่เป็นฟิล์มปกคลุมผิวหนังไว้ (Chauhan *et al.*, 2003) Betz และคณะศึกษาผลของลิโปโซมที่มีต่อการรักษาความชุ่มชื้นของผิวหนัง โดยการเปรียบเทียบลิโปโซมที่เตรียมจากฟอสโฟลิปิดที่ได้จากไข่และถั่วเหลือง ทำการทดสอบที่ท้องแขนของอาสาสมัคร 10 คน อายุระหว่าง 24-32 ปี จากการศึกษาพบว่าลิโปโซมที่เตรียมจากฟอสโฟลิปิดที่ได้จากไข่มีประสิทธิภาพในการรักษาความชื้นบนผิวหนังมนุษย์ที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับลิโปโซมที่เตรียมจากฟอสโฟลิปิดที่ได้จากถั่วเหลือง และการลดฟอสโฟลิปิดในลิโปโซมลงจะลดประสิทธิภาพในการรักษาความชื้นบนผิวหนังมนุษย์ นอกจากนี้ยังพบว่าลิโปโซมที่เตรียมจากฟอสโฟลิปิดที่ได้จากไข่และถั่วเหลืองที่มีความเข้มข้นของไขมัน 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์มีประสิทธิภาพในการเพิ่มความชื้นบนผิวหนังหลังจากการใช้

การประยุกต์ใช้ลิโปโซมเพื่อลดการระคายเคืองจากสารสำคัญทางเวชสำอาง

การกักเก็บสารสำคัญที่ก่อให้เกิดการระคายเคืองไว้ในลิโปโซมจะช่วยลดการสัมผัสของสารกับผิวหนัง (Chauhan *et al.*, 2003) และควบคุมการปลดปล่อยสารสำคัญให้อยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง (Kaur *et al.*, 2007) จึงช่วยลดการระคายเคืองลงได้ Perugini และคณะศึกษาความสามารถในการลดการระคายเคืองของ glycolic acid เมื่อพัฒนาให้อยู่ในรูปของลิโปโซมและไมโครสเฟียร์ (microsphere) โดยจากการศึกษาพบว่า ลิโปโซมสามารถควบคุมการปลดปล่อย glycolic acid ให้ช้าลงได้ โดยสัดส่วนระหว่าง glycolic acid และไขมันที่ดีที่สุด คือ 5 ต่อ 1 ในหน่วยอัตราส่วน โมลาร์ (molar ratios) ไมโครสเฟียร์ที่เตรียมจากไคโตแซน (chitosan) ไม่สามารถควบคุมการปลดปล่อยของ glycolic acid ได้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1 การสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่

โดยการนำเมล็ดของข้าวไรซ์เบอร์รี่มาบดลดขนาด แห่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วนข้าวไรซ์เบอร์รี่ต่อเอทิลแอลกอฮอล์เท่ากับ 1:9 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ทำการ sonicate อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40°C นำสารสกัดที่ได้มาทำให้แห้ง โดยการระเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator คำนวณหาปริมาณสารสกัดจากข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ที่ได้ (% yield) (Peanparkdee, Patrawart, & Iwamoto, 2019) และนำสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ที่ได้มาศึกษาต่อไป การคำนวณหา % yield ดังสมการ

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่}}{\text{น้ำหนักแห้งของข้าวหักไรซ์เบอร์รี่}} \times 100$$

2 วิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม (total phenolic content) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method

วิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method โดยนำสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่มาละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม เติมน Folin-Ciocalteu reagent ลงไปในสารละลายของสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อมาเติม Na_2CO_3 ความเข้มข้น 10% (w/v) เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง อัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 765 nm คำนวณค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานของสารละลาย gallic acid แปลผลแสดงในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของ gallic acid ต่อน้ำหนักกรัมของสารตัวอย่าง (mg GAE/g extract) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (Kanlayavattanakul, Lourith, & Chaikul, 2016)

3 การควบคุมมาตรฐานของสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่

ทำการศึกษาพัฒนาวิธีวิเคราะห์ เพื่อหาปริมาณสารสำคัญ (marker) ในสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) (Chen *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2015) และทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ตาม AOAC international guidelines for validation of botanical identification methods

- (1) การควบคุมมาตรฐานโดยใช้การวิเคราะห์หาปริมาณกรดโปรโตคาเทอจิก (protocatechuic acid) โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)
- (2) การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำในสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่โดยการไตเตรทด้วยวิธี Karl Fischer (Karl Fischer titration)

4 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่

4.1 ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพโดยไม่ใช้เซลล์ (non cell-based assay)

(1) ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ elastase

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ elastase ของสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ในหลอดทดลองดัดแปลงจากวิธีการทดสอบของ Thring และคณะ (2009) โดยประเมินการยับยั้งการตัด substrate คือ N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide (AAPVN) ด้วยเอนไซม์ elastase จากเซลล์ตับของหมู ความเข้มของการดูดกลืนแสงที่ลดลงบ่งบอกถึงความสามารถการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ elastase ซึ่งมีวิธีการเตรียมดังนี้ เตรียมสารละลาย tris-HCl buffer ความเข้มข้น 0.2 M, pH 8.0 เพื่อละลาย substrate เตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution) ของเอนไซม์ porcine pancreatic elastase (PPE) ความเข้มข้น 10 µg/mL ในน้ำปราศจากเชื้อ เตรียมสารละลาย substrate AAPVN ความเข้มข้น 1.6 mM ในสารละลาย tris-HCl buffer เตรียมสารละลายเจือจางของสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในตัวทำละลายที่เหมาะสม แล้วนำสารละลายสารตัวอย่างบ่มกับเอนไซม์ elastase เป็นเวลา 15 นาทีในอุณหภูมิ 37 °C ก่อนเติม substrate เพื่อเริ่มปฏิกิริยา บ่มเป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต (UV absorbance) ที่ความยาวคลื่น 390 nm และใช้ epigallocatechin-3-gallate (EGCG) เป็นสารควบคุมชนิดบวก (positive control) ส่วนสารควบคุมชนิดลบ (negative control) ใช้ตัวทำละลาย อ่านผลและบันทึกค่าการดูดกลืนแสง การแปลผลเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ elastase (% inhibition) การคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ elastase ดังสมการ

$$\%inhibition = \frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}} \times 100$$

$A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวทำละลาย

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง หรือ EGCG

เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ elastase จากนั้นนำสมการเส้นตรงของสารตัวอย่างที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ elastase ได้ 50% (IC₅₀) เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์ elastase ของสารตัวอย่าง และสารมาตรฐาน EGCG

(2) ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ collagenase

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ collagenase ได้ดัดแปลงจากวิธีการทดสอบของ Thring และคณะ (2009) โดยประเมินการยับยั้งการตัด substrate คือ N-[3-(2-Furyl) acryloyl]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) ด้วยเอนไซม์ collagenase type IV จาก clostridium histolyticum โปรตีนสังเคราะห์ FALGPA นี้จำเพาะเจาะจงกับการตัดด้วยเอนไซม์ collagenase เท่านั้น ความเข้มของการดูดกลืนแสงที่ลดลงบ่งบอกถึงความสามารถการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ collagenase ซึ่งมีวิธีการเตรียมดังนี้ เตรียมสารละลาย tricine buffer ความเข้มข้น 50 mM, pH 7.5 เตรียมสารละลายเอนไซม์ collagenase

type IV จาก *clostridium histolyticum* ความเข้มข้น 2 U/mL ในสารละลาย tricine buffer เตรียมสารละลาย substrate FALGPA ความเข้มข้น 2 mM ในสารละลาย tricine buffer เตรียมสารละลายเจือจางของสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในตัวทำละลายที่เหมาะสม ปิเปตสารละลาย tricine buffer 25 μ L สารละลายตัวอย่าง 25 μ L และเอนไซม์ collagenase 25 μ L ใส่ในภาตหลุมชนิด 96 หลุม นำไปบ่มเป็นเวลา 15 นาที ปิเปตสารละลาย FALGPA 100 μ L ใส่ตามลงไปหลุม ทิ้งไว้นาน 20 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต (UV absorbance) ที่ความยาวคลื่น 340 nm และใช้ epigallocatechin-3-gallate (EGCG) เป็น positive control ส่วน negative control ใช้ตัวทำละลายอ่านผลและบันทึกค่าการดูดกลืนแสง แปลผลเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ collagenase (% inhibition) โดยคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ collagenase ดังสมการ

$$\%inhibition = \frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}} \times 100$$

$A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวทำละลาย

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง หรือ EGCG

เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ collagenase จากนั้นนำสมการเส้นตรงของสารตัวอย่างที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ collagenase ได้ 50% (IC50) เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์ collagenase ของสารตัวอย่าง และสารมาตรฐาน EGCG

(3) การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay

ทดสอบโดยเตรียมสารละลายเจือจางของสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย และเตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 100 μ M โดยละลาย DPPH 0.0020 g ด้วยเอทานอลจนครบ 50 mL ปิเปตสารละลายของสารสกัดข้าว 100 μ L ใส่ลงหลุมใน microplate จากนั้นปิเปตสารละลาย DPPH 100 μ L ใส่ตามลงไป นำ microplate ที่หยอดสารเรียบร้อยแล้วไปอบที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต (UV absorbance) ที่ความยาวคลื่น 520 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน (% inhibition) แล้วนำมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและ % inhibition จากนั้นนำสมการเส้นตรงของสารสกัดที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันได้ 50% (IC50) เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวและสารมาตรฐานอ้างอิง (Tachibana *et al.*, 2001)

(4) การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี 2,2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6 sulfonic acid) (ABTS) assay

เตรียมสารละลาย ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)) ความเข้มข้น 7mM โดยละลายสาร ABTS ที่ชั่งอย่างแม่นยำ 0.0188 g ด้วย DI water จนครบ 5 mL โดยใช้ volumetric flask ขนาด 5 mL เตรียมสารละลาย $K_2S_2O_8$ ความเข้มข้น 2.45 mM โดยละลายสาร $K_2S_2O_8$ ที่ชั่งอย่างแม่นยำ 0.0066 g ด้วย DI water จนครบ 10 mL โดยใช้ volumetric flask ขนาด 10 mL ผสม ABTS 4 mL กับ $K_2S_2O_8$ 6 mL เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 18 ชม. จากนั้นเจือจางสารละลายด้วยเอทานอล 25 เท่า ได้เป็น ABTS working solution เตรียมสารละลายเจือจางของสารสกัดข้าวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เช่น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 และ 1.56 $\mu\text{g/mL}$ โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม ปิเปตสารละลายของสารสกัดข้าวความเข้มข้นต่าง ๆ 20 μL ใส่ในถาดชนิด 96 หลุม และปิเปตสารละลาย ABTS working solution 180 μL ใส่ตามลงไป ในถาดชนิด 96 หลุม นำถาด 96 หลุมที่หยอดสารเรียบร้อยแล้วไปบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิห้อง 25°C ในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต (UV absorbance) ในเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Microplate reader) ที่ความยาวคลื่น 750 nm คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน (% inhibition) เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและ %inhibition จากนั้นนำสมการเส้นตรงที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของสารสกัดข้าวที่สามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันได้ 50% (IC50) เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดข้าวและสารมาตรฐานอ้างอิง (Harikarnpakdee & Chowjarean, 2018)

4.2 ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพโดยใช้เซลล์ (cell-based assay)

(1) การเพาะเลี้ยงเซลล์

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ของผิวหนังโดยใช้เซลล์ไลน์ชนิด HaCaT (human keratinocyte cells) และ human primary skin fibroblast cells ในอาหารเพาะเลี้ยงชนิด dulbecco's modified eagle medium (DMEM) ที่เติม 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), สารละลายยาเพนิซิลลิน (100 U/mL) และสเตรปโตมัยซิน (100 U/mL) บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบจานเดี่ยวเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 100 mm นำไปบ่มในตู้บ่มแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37°C ในอากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5% (v/v) เพื่อทำการศึกษาต่อไป

(2) การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ โดยใช้เซลล์ HaCaT และ human primary skin fibroblast cells มีวัตถุประสงค์ในการคัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และนำไปทดสอบฤทธิ์อื่น ๆ ต่อไป โดยเตรียมเซลล์ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม จำนวน 1×10^4 เซลล์ต่อหลุม ที่มีอาหารเพาะเลี้ยง บ่มในตู้บ่มแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเป็น

อาหารเพาะเลี้ยงที่ผสมสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่และสารเทียบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นำไปบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเติมสารละลาย 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ความเข้มข้น 0.5 mg/mL ปริมาตร 100 μ L ต่อหลุม บ่มต่อเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำสารละลาย MTT ออกและละลายผลึกฟอร์มาซาน (formazan crystal) ด้วยสารละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 100 μ L วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้มาแปลผลเป็นเปอร์เซ็นต์ของการรอดชีวิตของเซลล์ (% cell viability) โดยเปอร์เซ็นต์ของการรอดชีวิตของเซลล์จะเท่ากับค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่สารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่และสารเทียบต่อค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุมที่ไม่ใส่สารทดสอบใด ๆ (untreated control) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (triplicate) การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของการรอดชีวิตของเซลล์ ดังสมการ

$$\% \text{ cell viability} = \frac{\text{A of treatment}}{\text{A of untreated control}} \times 100$$

A of treatment คือค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มที่ผสมสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่

A of untreated control คือค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารทดสอบใด ๆ

(3) การศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการเคลื่อนที่ (migration) ของเซลล์โดยสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่

ศึกษาพฤติกรรมการเคลื่อนที่ (migration) ของเซลล์ โดยสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ ซึ่งเป็นการศึกษาในเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงชนิดคิราติโนไซด์ และ human primary skin fibroblast cells โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมผิวหนัง ภายหลังจากเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดคิราติโนไซด์ หรือ human primary skin fibroblast cells จำนวน 5,000 เซลล์ต่อหลุม ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C สภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ใน CO₂ incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ปลาย tip ขูดเส้นพาดขวางผ่านกลางหลุมของจานเลี้ยงเซลล์ เพื่อให้เกิดช่องว่าง (artificial wound) ล้างเอาเซลล์ที่หลุดออกจากการขีดออกไป แล้วนำเซลล์เพาะเลี้ยงไปบ่มกับสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ที่ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ บันทึกภาพเซลล์เพาะเลี้ยงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่เวลา 0, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ฤทธิ์กระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์โดยสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ จะประเมินจากการลดลงของพื้นที่ซึ่งเป็นที่ว่างตามรอยขีดด้วยการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ใส่สารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่) โดยใช้โปรแกรม Image J

(4) ศึกษาความสามารถของสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ต่อการเพิ่มระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์คิราติโนไซด์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ western blot analysis

เมื่อเห็นการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนในการกระตุ้นการหายหรือสมานของแผลที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์คิราติโนไซด์ หลังจากที่เซลล์ได้รับสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่แล้ว ผู้วิจัยทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ ด้วยวิธี western blot analysis โดยโปรตีนที่เกี่ยวข้องคือ AKT และ FAK โดยเตรียมเซลล์ HaCaT ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม จำนวน

5×10^4 เซลล์ต่อหลุม บ่มในตู้อบแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเป็นอาหารเพาะเลี้ยงที่ผสมสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ ที่ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ บ่มต่อเป็นระยะเวลานาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาล้างเซลล์ด้วย phosphate buffered saline (PBS) แล้วนำเซลล์มาย่อยในสารละลายบัฟเฟอร์ (lysis buffer) ที่เย็น เพื่อให้เซลล์แตก โดยบ่มบนน้ำแข็งนาน 45 นาที นำโปรตีนที่ผ่านการย่อยแล้วมาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วย BCA protein assay kit ทำการแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) หลังจากแยกโปรตีนจะทำการย้ายโปรตีน (protein transfer) จากเจลสู่แผ่นเมมเบรน nitrocellulose ขนาด $0.45 \mu\text{m}$ จากนั้นทำการ blocking เพื่อป้องกันการเกิด non-specific โปรตีนอื่น ๆ เข้ามาจับกับแผ่นเมมเบรน ด้วย non - fat dry milk ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และมีการติดตามผลโดยการ probe เมมเบรน เพื่อหาโปรตีน AKT, phosphorylation-AKT, FAK, phosphorylation-FAK และ beta-actin ด้วยแอนติบอดีที่เฉพาะเจาะจงกับโปรตีนดังกล่าว แต่ละชนิด เป็นเวลา 12 ชั่วโมงที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลานำเมมเบรนมาล้างสองครั้งด้วย สารละลาย TBST เป็นเวลา 10 นาที และบ่มด้วยแอนติบอดีชนิดที่ 2 (horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง และใส่ super signal west pico chemiluminescence substrate วัดการเรืองแสงของโปรตีนแต่ละชนิด และทำการวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของการเรืองแสงของโปรตีนแต่ละชนิด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การประเมินผลการแสดงออกของโปรตีน AKT, phosphorylation-AKT, FAK, phosphorylation-FAK จะเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารทดสอบใด ๆ กับกลุ่มที่ใส่สารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ สังเกตการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีน ถ้าสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่มีความสามารถในการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนความหนาของ band จะเข้มข้น แปลผลเป็นระดับของโปรตีนสัมพันธ์ (relative protein level) โดยคำนวณอัตราส่วนของระดับโปรตีนของกลุ่มที่ใส่สารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ต่อระดับโปรตีนของกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารทดสอบใด ๆ

(5) การศึกษาผลของสารสกัดต่อการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ (NO) ภายในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร lipopolysaccharide (LPS)

นำเซลล์แมคโครฟาจ (RAW 264.7) มาเลี้ยงในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 โดยให้มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 1×10^5 เซลล์ ต่อหลุมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน CO_2 incubator ที่มี CO_2 5% และอุณหภูมิ 37°C จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดเดิมออก และเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดละลายอยู่ในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ส่วนกลุ่มควบคุมได้รับเฉพาะสาร DMSO (0.5% v/v) ในการทดลองนี้จะใช้สาร L-N G-nitroarginine methyl ester (L-NAME) ที่ความเข้มข้น $2 \mu\text{M}$ เป็นสารมาตรฐาน โดยในแต่ละหลุมจะเติมสาร LPS ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเซลล์เท่ากับ 100 ng/mL เพื่อกระตุ้นการสร้าง NO จากเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) จากนั้นนำไปเลี้ยงใน CO_2 incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการตรวจวัดปริมาณของ NO ที่สร้าง

ขึ้นจากเซลล์แมคโครฟาจ ในรูปของ nitrite โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อเซลล์มาทำปฏิกิริยากับ Griess reagent จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน กับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะ vehicle (0.5% DMSO) โดยคำนวณค่าที่ได้ในรูป % of control โดยให้กลุ่มควบคุมมีปริมาณ nitrite เป็น 100%

5 ศึกษาการทดสอบความไวต่อสารสกัดของเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial susceptibility test)

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984

: *Escherichia coli* ATCC 25922

: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27533

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร Tryptic soy agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเก็บไว้ในตู้เย็น

5.1 ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion (ตามวิธีของ Kirby-Bauer)

(1) เตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.1-10 mg/mL โดยเจือจางลงครึ่งละ 2 เท่าด้วยน้ำ

(2) เตรียมแผ่นกระดาษกรอง (paper disc) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mL นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 30 นาที

(3) ปิเปตเชื้อทดสอบที่เจือจางแล้วจำนวน 100 μ L ลงบนผิวหน้าอาหาร Mueller-Hinton agar (MHA) เคลือบให้ทั่วด้วยแท่งแก้วสามเหลี่ยม และทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 5 นาที

(4) ใช้ปากคีบปลดเชื้อคิบบ paper disc วางบนอาหารโดยให้แผ่น paper disc ห่างกัน 15-20 mm โดยห่างจากขอบจานอาหาร 15 mm

(5) ปิเปตสารละลายตัวอย่างจำนวน 10 μ L หยดลงบน paper disc และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(6) อ่านและบันทึกผลโดยใช้ vernier caliper วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง รอบ paper disc ทั้งหมด 3 ครั้ง และคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

5.2 หาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (minimum inhibitory concentration; MIC) โดยวิธี broth microdilution

(1) เตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.1-10mg/mL โดยเจือจางครึ่งละ 2 เท่าด้วยน้ำ

(2) ปิเปตสารละลายตัวอย่างจำนวน 20 μ L ลงใน 96 well plate และเติม MHB ลงไปจำนวน 80 μ L

(3) เติมเชื้อที่เจือจางแล้วจำนวน 100 μL ตามลงไปและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

(4) เมื่อครบเวลาให้เติมสารละลาย resazurin (ความเข้มข้น 0.04 % (w/v) จำนวน 20 μL ลงในแต่ละหลุม และนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

(5) อ่านผลและบันทึกค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ โดยสังเกตการเปลี่ยนสีของ resazurin ซึ่งมีสีน้ำเงิน หากมีการเจริญของเชื้อสีของ resazurin จะเปลี่ยนเป็นสีชมพู

(6) ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ (โดยเลือกค่า MIC ที่เหมือนกันอย่างน้อย 2 ซ้ำ)

5.3 ทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (minimum bactericidal concentration; MBC) ด้วยวิธี drop plate

(1) ปิเปตอาหารที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อจากการหาค่า MIC จำนวน 5 μL ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA และปล่อยให้แห้ง

(2) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(3) อ่านผลและบันทึกค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ไม่มีโคโลนีของเชื้อบนอาหาร ทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อยืนยันผล

6 ศึกษาเพื่อตรวจสอบค่าการละลายของสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ในตัวทำละลายต่าง ๆ และศึกษาความคงตัวทางเคมีกายภาพ (physicochemical property) ของสารละลายสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ที่ได้

ทำการตรวจสอบค่าการละลายของสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ ในตัวทำละลายต่าง ๆ เช่น น้ำ, polyethylene glycol 400, glycerine, propylene glycol และ butylene glycol รวมถึงส่วนผสมของตัวทำละลายเหล่านี้กับน้ำในอัตราส่วนต่าง ๆ เพื่อคัดเลือกตัวทำละลายหรือตัวทำละลายผสมที่เหมาะสมเพื่อนำสารละลายของสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่มาศึกษาความคงตัวทางเคมีกายภาพ โดยจะเลือกตัวทำละลายที่สามารถละลายสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ได้มากที่สุด นำตัวทำละลายที่ผ่านการคัดเลือกมาเตรียมเป็นสารละลายสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ในความเข้มข้นที่สูงพอและคาดว่าสูตรตำรับที่ได้ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนัง (arbitrary concentration) นำสารละลายที่ได้มาทดสอบความคงตัวทางเคมีกายภาพด้วยวิธี heating-cooling cycle ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง สลับกับอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อครบ 6 รอบ นำมาประเมินความคงตัว การประเมินความคงตัวทางกายภาพ ได้แก่ สี ความหนืด และการตกตะกอน ส่วนการประเมินความคงตัวทางเคมีจะทำการประเมิน ค่าความเป็นกรดต่าง (pH), วิเคราะห์หาปริมาณสารเทียบ (marker) ด้วยเทคนิค HPLC โดยจะเปรียบเทียบกับค่าเริ่มต้น ทำการคัดเลือกตัวทำละลายผสมและความเข้มข้นของสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ที่ให้ความคงตัวทางเคมีกายภาพที่ดีที่สุด มาพัฒนาเป็นสูตรตำรับลิโพโซมสำหรับผิวหนังของสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่

7 พัฒนาสูตรตำรับลิโปโซมบรรจุสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่

ทำโดยการศึกษาริมาณของส่วนประกอบไขมันในสูตรตำรับ โดยส่วนประกอบไขมันในสูตรตำรับ เช่น lecithin surfactant และ mineral oil เพื่อหาระดับความเข้มข้นของสารให้มีความเหมาะสมในสูตรตำรับลิโปโซม รวมทั้งศึกษากระบวนการเตรียมลิโปโซม โดยหาจำนวนรอบปั่น และเวลาที่ใช้ในการปั่น ผสมด้วยเครื่อง homogenizer ที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ลิโปโซมที่มีขนาดตามต้องการ นำสารละลายสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่จากข้อ 7.5 มาบรรจุในสูตรตำรับลิโปโซมที่เตรียมได้ ปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของสารสกัดข้าวให้เหมาะสม ทำการคัดเลือกสูตรตำรับที่เหมาะสมโดยดูจากขนาดของลิโปโซมที่ได้ %entrapment efficiency ค่า pH ของระบบ เพื่อนำสูตรที่ผ่านการคัดเลือกมาศึกษาต่อไป

8 การศึกษาลักษณะและคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของลิโปโซมบรรจุสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่

(1) การตรวจสอบลักษณะรูปร่าง (morphology) ของลิโปโซม

ตรวจสอบลักษณะรูปร่าง (morphology) ของลิโปโซม ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope, TEM)

(2) การประเมินคุณลักษณะต่าง ๆ ของลิโปโซม (characterization of Riceberry broken rice extract loaded liposome formulation)

การวัดขนาด การกระจายขนาด และประจุของลิโปโซม โดยวัดขนาดอนุภาค (size) การกระจายขนาด (polydispersity index, PDI) และศักย์ซีตาร์ (zeta potential) โดยใช้เครื่อง Zetasizer Nano ZS จำนวนตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

(3) การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ (marker) ในสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ที่กักเก็บในลิโปโซมโดยวิธี HPLC (entrapment efficiency)

วิธีเตรียม โดยนำลิโปโซมที่กักเก็บสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ มาละลายด้วย 0.1% Triton® x-100 ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่า vortex® แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm นาน 10 นาที ดูดสารละลายใส ด้านบน นำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

(4) การทดสอบการปลดปล่อยตัวยาจากตำรับลิโปโซม (in vitro of drug release)

วิธีเตรียม นำลิโปโซมที่กักเก็บสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ สูตรที่ดีที่สุด ทดสอบโดยใช้ dialysis bag (molecular weight cut off, MWCO 3500 Da)

(a) แช่ dialysis bag ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไปล้างซ้ำอีกครั้งด้วยน้ำกลั่น

(b) ใส่ตัวอย่างจำนวน 1 กรัม และ phosphate buffer (pH 6.8) ลงใน dialysis bag แล้วนำมายึดกับอุปกรณ์สำหรับทดสอบ

- (c) บรรจุ phosphate buffer (pH 6.8) จำนวน 200 มิลลิลิตร ลงใน chamber และปั่นตลอดเวลาด้วยความเร็ว 50 รอบต่อนาที คงระดับอุณหภูมิที่ 37 ± 0.5 องศาเซลเซียส
- (d) เก็บตัวอย่างจำนวน 2 มิลลิลิตร ที่เวลา 15, 30 นาที 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 และ 12 ชั่วโมง พร้อมทั้งใส่ phosphate buffer (pH 6.8) คืนกลับไปในปริมาตรเท่ากับที่ดูดออกมา
- (e) นำตัวอย่างที่เก็บ ณ เวลาต่าง ๆ ไปหาปริมาณสารสำคัญ โดยดำเนินการตามวิธีในหัวข้อการควบคุมมาตรฐานของสารสกัด

(5) การทดสอบการซึมผ่านผิวหนังของตำรับลิโปโซม (in vitro skin permeation)

วิธีเตรียม นำลิโปโซมที่กักเก็บสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ สูตรที่ดีที่สุด มาทดสอบการซึมผ่านทางผิวหนังด้วยเครื่อง Franz diffusion cell โดยใช้หนังหมู (porcine skin) เป็นตัวแทนของผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม สุ่มเก็บตัวอย่างทุก 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญที่ปลดปล่อยด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

(6) การประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพของสูตรตำรับลิโปโซม (evaluation of bioactivity)

วิธีเตรียม นำลิโปโซมที่กักเก็บสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ สูตรที่ดีที่สุด มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพดังนี้

- (a) ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์คีราติโนไซต์ และเซลล์ไฟโบรบลาสต์
- (b) ศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการเคลื่อนที่ (migration) ของเซลล์คีราติโนไซต์ และเซลล์ไฟโบรบลาสต์
- (c) ศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) ของเซลล์คีราติโนไซต์
- (d) ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ (NO) ภายในเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร lipopolysaccharide (LPS)
- (e) ศึกษาการทดสอบความไวต่อสูตรตำรับของเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial susceptibility test)

(7) ศึกษาความคงตัวทางกายภาพและเคมี ของสูตรตำรับลิโปโซมบรรจุสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ สูตรที่ดีที่สุด โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน ประเมินความคงตัวที่เวลา 0, 1, 2 และ 3 เดือน โดยประเมินคุณลักษณะต่าง ๆ ของลิโปโซม ได้แก่ สี ค่าพีเอช (pH) ความหนืด การตกตะกอน ขนาดอนุภาค (size) การกระจายขนาด (polydispersity index, PDI) และศักย์ซีตาร์ (zeta potential) ของลิโปโซม และวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ (marker) ด้วยเทคนิค HPLC โดยจะเปรียบเทียบกับค่าเริ่มต้น

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล และการอภิปรายผล

1.The analysis of Riceberry broken rice extract (RBE)

- Analysis of phenolic acids in RBE by HPLC
- Determination of total phenolic content by Folin-Ciocalteu method

The study was conducted to develop an analytical method to quantify protocatechuic acid (marker) in RBE using high performance liquid chromatography (HPLC) technique. Chromatographic conditions were used as shown in Table 1. and the HPLC chromatogram of protocatechuic acid (PA) is shown in Figure 1. The study found that RBE contained protocatechuic acid of 2.426 mg/g extract.

The study found that RBE contained a total phenolic content of 324.50 ± 4.62 mg gallic acid equivalent (mg GAE/g extract) as shown in Table 2.

Table 1. Chromatographic conditions of HPLC

Chromatographic conditions			
Column	Inertsil [®] ODS-3 (i.d., 5 μ m, 4.6 x 150 mm)		
Column oven	25 °C		
Flow rate	1 mL/minutes		
Injection volume	10 μ L/mL		
Wavelength	260 nm		
Elution	Gradient elution		
	Time (min)	Acetonitrile	0.1% v/v Formic acid
	0	10	90
	20	20	80
	60	10	90
Retention time	15 minutes		
Run time	60 minutes		
Detection	UV/DAD		

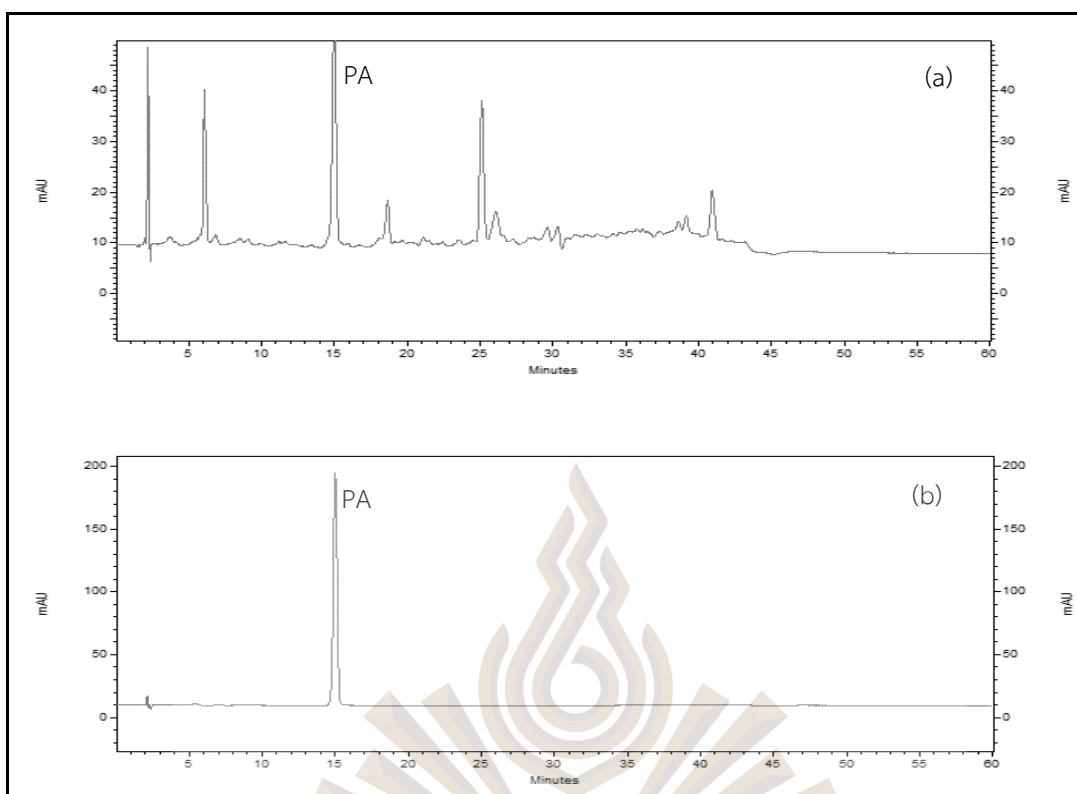


Figure 1. HPLC chromatogram of (a) RBE and (b) standard protocatechuic acid (PA) at wavelength of 260 nm.

2. Study of the biological activity of RBE without using cell culture (non cell-based assay)

- Inhibitory effect on collagenase and elastase enzymes
- Antioxidant activity by ABTS reducing activity
- Antioxidant activity by DPPH radical scavenging activity

Table 2. Total phenolic content, antioxidant activities and enzymatic inhibitions of RBE

Sample/Test	TPC ^a	DPPH ^b	ABTS ^b	Anticollagenase ^c	Antielastase ^c
RBE	324.50 ± 4.62	82.59 ± 0.42	391.0 ± 0.07	142.71 ± 0.96	33.61 ± 0.59
Ascorbic acid	ND	9.23 ± 0.09	66.67 ± 0.47	ND	ND
EGCG	ND	ND	ND	28.20 ± 0.00	23.10 ± 0.00
Quercetin	ND	ND	ND	ND	61.86 ± 1.07

^a Total phenolic content (TPC) was reported as mg of gallic acid equivalent (GAE)/g.

^b DPPH radical scavenging activity and ABTS reducing activity were represented as 50% of inhibitory concentration (IC_{50}) in $\mu\text{g/mL}$.

^c Anticollagenase and antielastase were represented as 50% of inhibitory concentration (IC_{50}) in $\mu\text{g/mL}$.

EGCG = Epigallocatechin gallate

ND = not determined

This study found that RBE has collagenase enzyme inhibitory activity with IC_{50} value of 142.71 ± 0.96 mg/mL and EGCG standard substance has IC_{50} value of 28.20 ± 0.00 mg/mL, while elastase enzyme inhibitory activity was found to have IC_{50} value of 33.61 ± 0.59 mg/mL and EGCG standard substance has IC_{50} value of 23.10 ± 0.00 mg/mL as shown in Table 2.

RBE had DPPH free radical scavenging activity with IC_{50} value of 82.59 mg/mL, while vitamin C standard had IC_{50} value of 9.23 mg/mL. For the antioxidant activity by ABTS method, RBE compound had IC_{50} value of 391.0 ± 0.07 mg/mL and vitamin C standard compound had IC_{50} value of 66.67 ± 0.47 mg/mL as shown in Table 2.

3. Preparation of transfersome formulation

To improve RBE stability and its appearance, Riceberry rice transfersomal formulation (T-RBE) was performed using all ingredients demonstrated in Table 3, resulting in a yellowish liquid (Figure 2). The T-RBE displayed a miscellaneous and soft Riceberry rice scent. The physicochemical characterization of formulated T-RBE was investigated and shown in Table 4. The particle size had a range of 253.0 ± 37.4 nm, with a low polydispersity index ($PDI = 0.23 \pm 0.07$) and negatively charged surface due to phospholipids. The pH value of obtained transfersome was relatively neutral and viscosity was quite a low value. The entrapment efficiency was approximately $63.68 \pm 1.45\%$.



Figure 2. The appearance of T-RBE formulation, resulting in a yellowish liquid

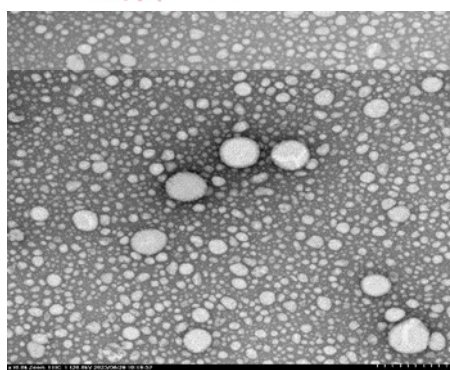
Table 3. Chemical components of formulated T-RBE

Components	Amount (%)
RBE	0.5
Mineral oil	0.6
Soybean lecithin	0.6
PEG-75 lanolin	0.06
PG	10
Deionized water qs. to	100

Table 4. Physicochemical properties of formulated T-RBE

Parameters	Initial
Size (nm)	256.60 $\pm$ 1.59
Polydispersity index (Pdl)	0.25 $\pm$ 0.01
Zeta potential (mV)	-35.30 $\pm$ 1.26
pH	5.89 $\pm$ 0.14
Viscosity (cP)	2.64 $\pm$ 0.06
Entrapment efficiency (%)	65.30 $\pm$ 2.98

Physicochemical characterization of formulated nanoparticles showed a transmission electron microscope (TEM) image of T-RBE as a spherical particle, multinuclear structure, non-aggregated with uniform and homogenous distribution which is characteristic morphology for vesicular systems (Figure 3).

**Figure 3.** TEM images of Riceberry rice transfersomal formulation (T-RBE)

4. Effect of RBE and transfersome (T-RBE) on the viability and death of human keratinocyte (HaCaT) and human primary skin fibroblast cells

The cytotoxicity of RBE and T-RBE was first investigated in human keratinocyte (HaCaT) and human primary skin fibroblast cells. RBE at a concentration ranging from 10 to 50 $\mu\text{g/mL}$ has no cytotoxic effect on both cells. Taken together, blank-T and T-RBE (10 – 50 $\mu\text{g/mL}$ of RBE) show no toxicity to both cells. Moreover, cells were subjected to staining with Hoechst 33342/PI fluorescence dye for apoptotic or necrotic screening. There was no chromosomal condensation, and necrotic (PI-stained cell) has been found. The results confirm that RBE and T-RBE at 10 – 50 $\mu\text{g/mL}$ were safe for human keratinocyte and primary skin fibroblast cells (Figure 4). Therefore, this range of concentration was used for further experiments.

5. RBE and transfersome (T-RBE) enhance wound healing in human keratinocyte (HaCaT) and human primary skin fibroblast cells

The scratch migration experiment has been employed to assess the wound healing characteristics of RBE and T-RBE. The RBE at 10 – 50 $\mu\text{g/mL}$ enhanced the migration of HaCaT cells at 18 and 24 h relative to the control group. The T-RBE at concentrations of 10 – 50 $\mu\text{g/mL}$ enhanced the migration of HaCaT cells at 18 h in comparison to RBE. A similar response has been observed in human primary skin fibroblast cells after 12 and 18 h of treatment. The results demonstrated that RBE enhances wound healing in human keratinocyte and primary skin fibroblast cells. T-RBE possesses superior wound healing properties compared to RBE (Figure 5– 6).

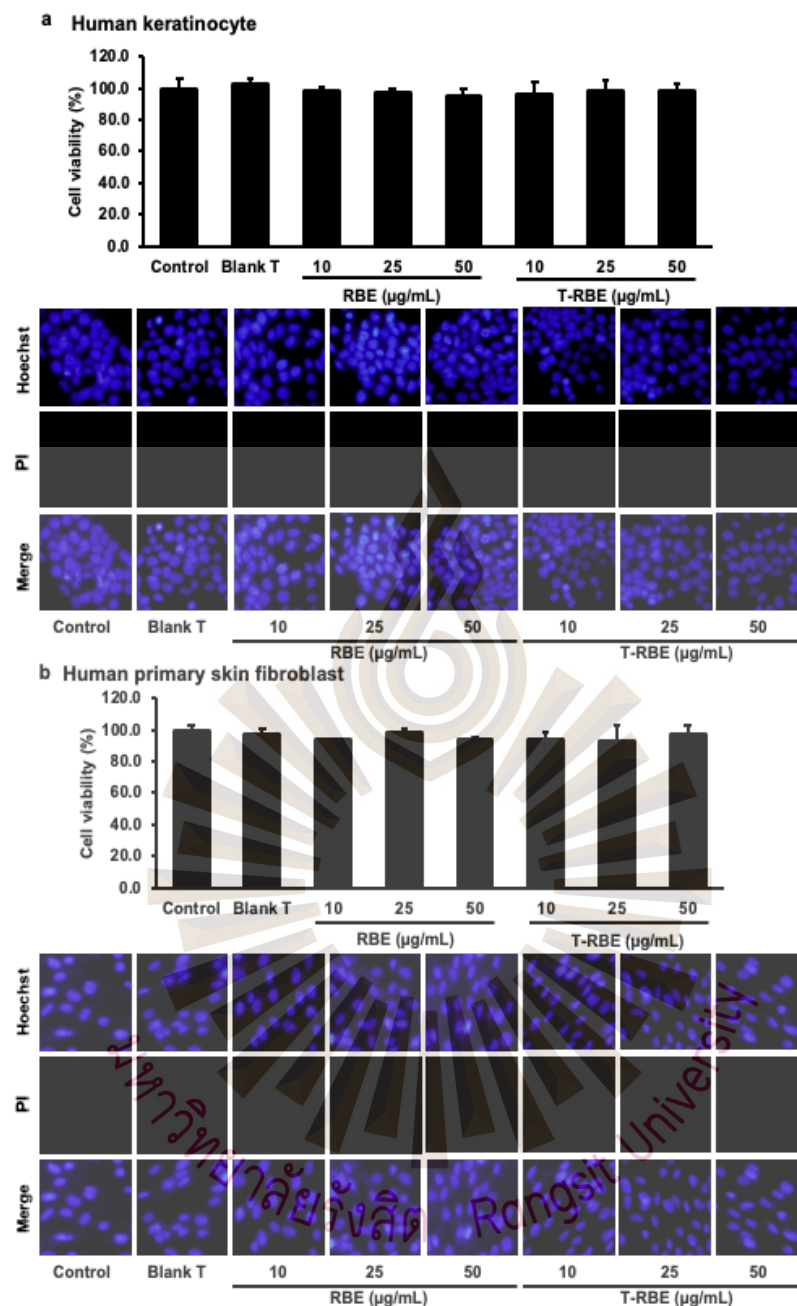


Figure 4. Evaluation of cytotoxicity and cell death following RBE and T-RBE treatment on (a) human keratinocytes (HaCaT) and (b) human primary skin fibroblast cells. Cell viability was assessed by MTT assay following treatment with RBE (10 – 50 µg/mL) and T-RBE (10 – 50 µg/mL of RBE) for 24 h. The data is expressed as the mean ± SD (n = 3). **p* < 0.05 indicates a statistically significant difference from the control group. Detection of apoptosis and necrosis was conducted using Hoechst 33342 and propidium iodide (PI) staining following treatment with RBE (10 – 50 µg/mL) and T-RBE (10 – 50 µg/mL of RBE) for 24 h.

6. RBE increases migration marker protein expression in human keratinocyte (HaCaT) cells

The FAK/AKT pathway serves as the primary mechanism for cell migration; consequently, the expression levels of FAK/AKT proteins were assessed in HaCaT cells. The phosphorylation levels of the active forms of FAK (p-FAK) and AKT (p-AKT) were examined. The RBE treatment at concentrations of 25 and 50 $\mu\text{g/mL}$ resulted in an elevation of p-FAK levels in comparison to the control group. The level of p-AKT was elevated following RBE treatment at concentrations ranging from 10 to 50 $\mu\text{g/mL}$. The results indicate that RBE enhances wound healing via the FAK/AKT signaling pathway (Figure 7).

7. Anti-inflammatory activity

Nitric oxide (NO) is well known to be one of the major regulators of wound healing. However, excessive NO production was demonstrated to play a critical role in the pathogenesis of inflammation and can lead to cellular death and tissue damage in high amounts by reacting with reactive oxygen species. Therefore, inhibition of NO production is an important strategy for the screening of anti-inflammatory formulation. The effects of RBE, blank-T and T-RBE on NO production were assessed by Griess assay for evaluating the decrease in nitrite production levels. In the present study, these formulations exert anti-inflammatory effects in LPS induced RAW 264.7 macrophage dose dependent manner. T-RBE decreased NO levels by 0.61 times as much as TA in LPS-stimulated RAW 264.7 cells and showed the strongest anti-inflammatory effect at the highest dose administered (1.0 mg/mL). T-RBE had a significantly higher anti-inflammatory effect than RBE at every concentration (* $p < 0.05$), whereas blank-T showed the lowest percentage of NO inhibition.

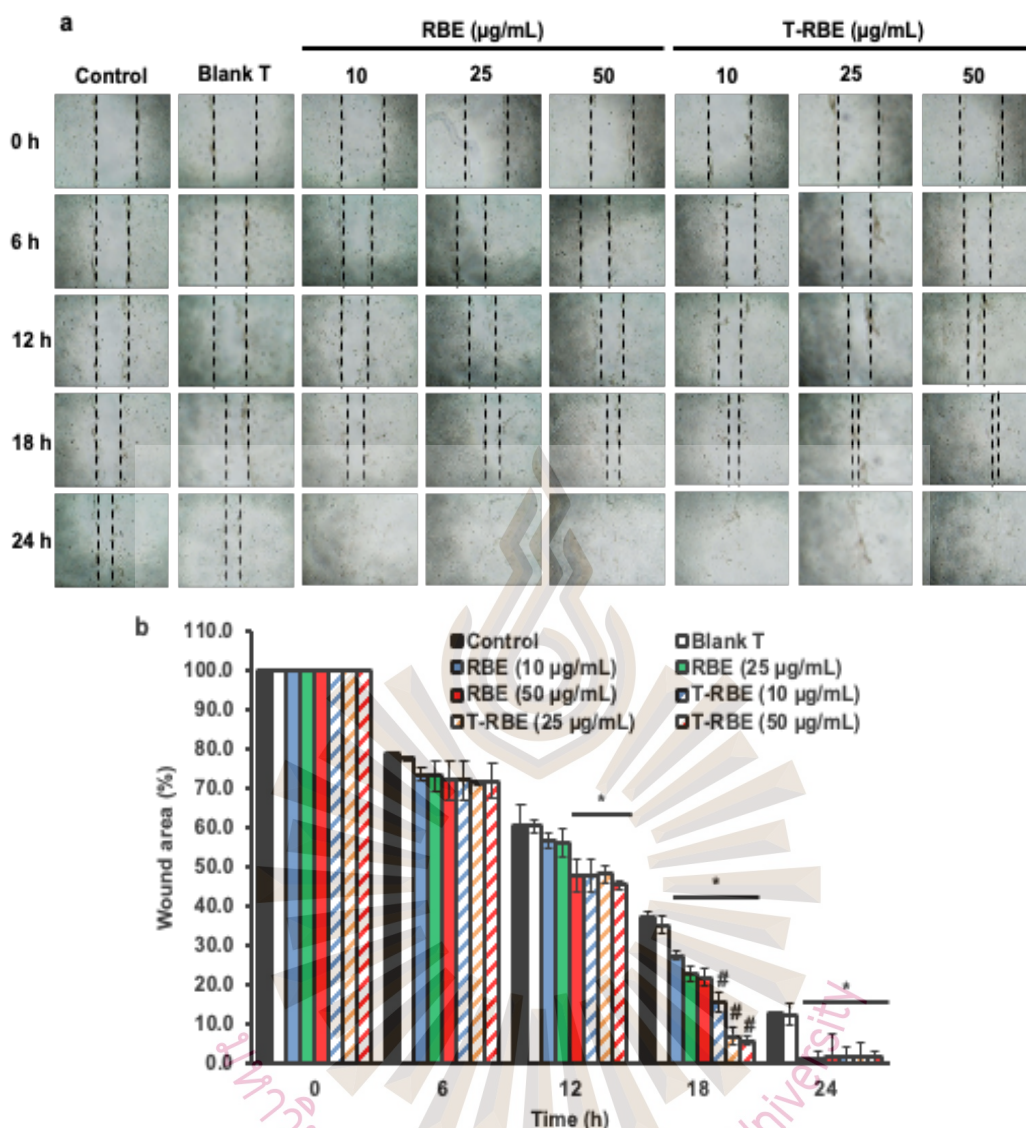


Figure 5. Effect of RBE and T-RBE on the migration of human keratinocyte cells. Cell migration was evaluated using a scratch wound healing assay after treatment with RBE (10 – 50 $\mu\text{g/mL}$) and T-RBE (10 – 50 $\mu\text{g/mL}$ of RBE) for 24 h. (a) The wound area was imaged with an inverted microscope at 0, 6, 12, 18, and 24 time intervals. (b) The percentage of wound area at each time point has been computed in relation to the area at 0 hours. The data is shown as the mean $\pm$ standard deviation ($n = 3$). $*p < 0.05$ denotes a statistically significant difference from the control group. $^{\#}p < 0.05$ signifies a statistically significant difference from the RBE at the similar concentration.

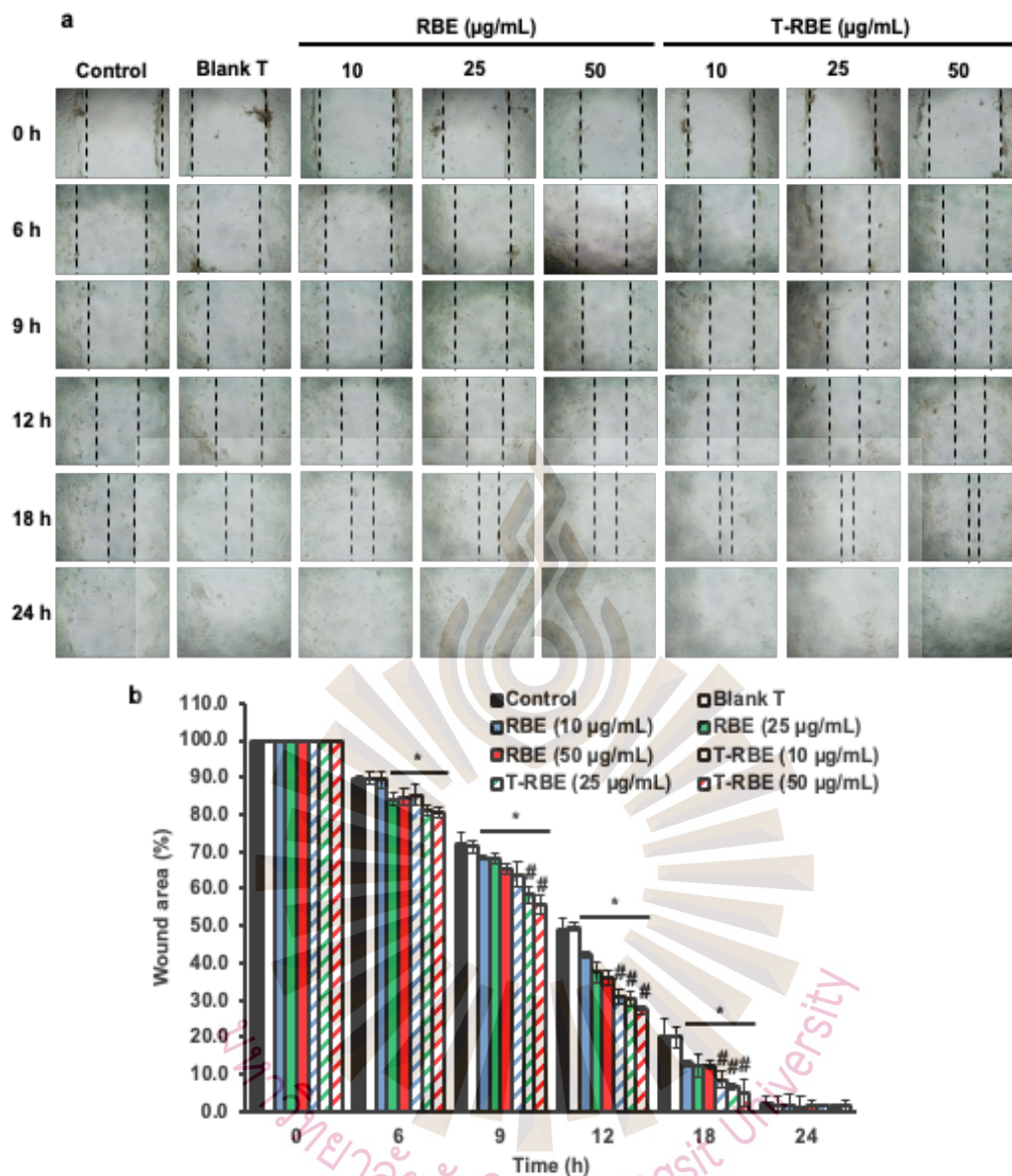


Figure 6. Effect of RBE and T-RBE on the migration of human primary skin fibroblast cells. Cell migration was evaluated using a scratch wound healing assay after treatment with RBE (10 – 50 $\mu\text{g/mL}$) and T-RBE (10 – 50 $\mu\text{g/mL}$ of RBE) for 24 h. (a) The wound area was imaged with an inverted microscope at 0, 6, 9, 12, 18, and 24 time intervals. (b) The percentage of wound area at each time point has been computed in relation to the area at 0 hours. The data is shown as the mean $\pm$ standard deviation ($n = 3$). * $p < 0.05$ denotes a statistically significant difference from the control group. # $p < 0.05$ signifies a statistically significant difference from the RBE at the similar concentration.

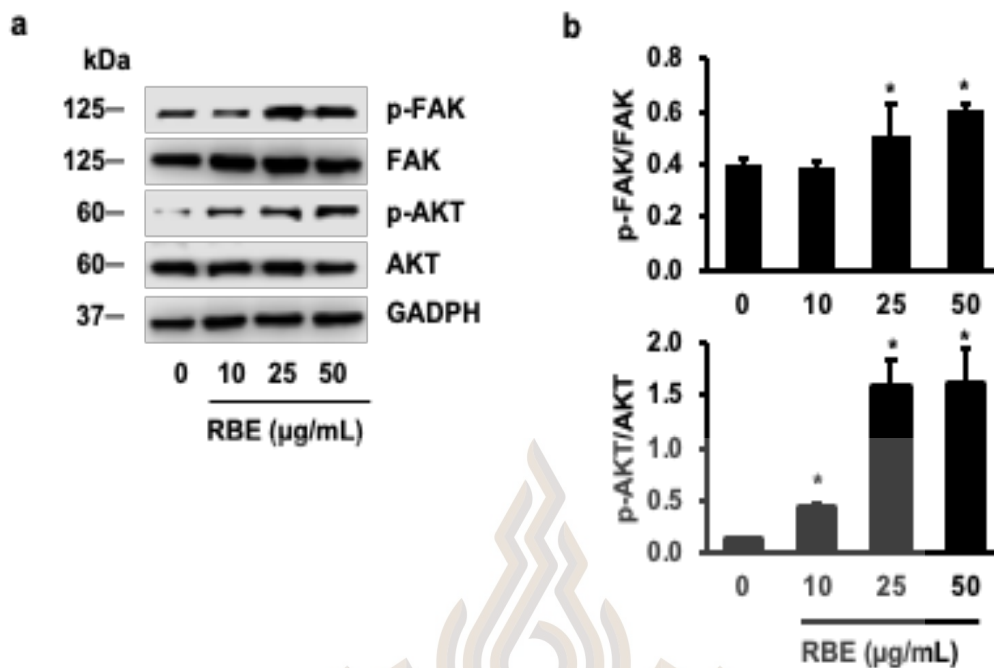


Figure 7. Effect of RBE on the expression of migratory marker proteins in human keratinocyte HaCaT cells. (a) Cellular migratory protein markers FAK, phosphorylated FAK, AKT, and phosphorylated AKT were assessed using Western blot analysis following treatment with RBE (10 – 50 µg/mL) and T-RBE (10 – 50 µg/mL of RBE) for 48 h. (b) The relative expression of p-FAK/FAK and p-AKT/AKT was quantified and depicted as the relative protein level. * $p < 0.05$ indicates a statistically significant disparity from the control group.

8. Microbiological studies of RBE, T-RBE and blank-T

The potential antibacterial activity of RBE, T-RBE and blank-T against pathogenic bacteria was evaluated and shown in Table 5. These substances produced significant zones of inhibition only against *S. aureus* ATCC 25923, with no zone of inhibition against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27533. These results exhibited antibacterial activity against *S. aureus* ATCC 25923 with inhibition zones ranging from 8.67-9.0 mm. The MIC and MBC values of RBC against *S. aureus* ATCC 25923 were 50 and 200 mg/mL.

Table 5. Antibacterial activity, MIC and MBC (mg/ml) of RBE, T-RBE and blank-T against pathogenic bacteria

Organisms	Inhibition			MIC/MBC (mg/mL)
	blank-			RBE
	RBE	T-RBE	T	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	+	+	—	50/200
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	—	—	—	nd
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27533	—	—	—	nd

9. In vitro release study

In vitro PA release of RBE solution and T-RBE was evaluated via dialysis membrane with Franz diffusion apparatus using pH 7.4 as release medium. The releasing profile (Figure 8) demonstrated that RBE solution was released simultaneously of 97.18% within 5 h, whereas T-RBE provided prolonged - controlled release pattern with 41.60% burst effect within 30 min. Nonetheless, improved gradual release of PA from T-RBE was achieved as 72.30% within 12 h. The release of therapeutic agents from pharmaceutical dosage form is important for therapeutic efficacy. The absence of lag time and the rapid release of therapeutic agents in the initial phase will greatly promote healing. Subsequently, the controlled release will further enhance the efficacy of the treatment (Potisuwan *et al.*, 2023).

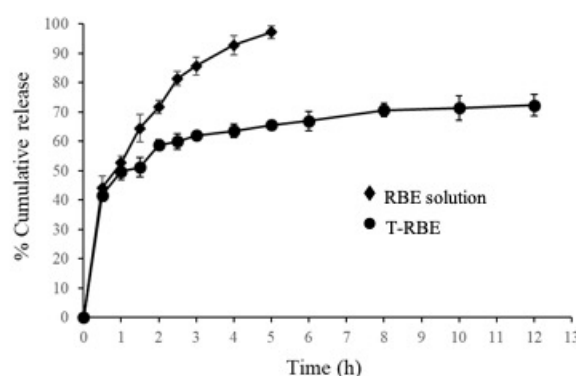


Figure 8. In vitro PA releasing profiles of extract solution and T-RBE within 12 h using Franz diffusion cells.

From the past research, Transfersome has been reported a burst effect during the first hours upon administration. Considering that a small breakage of the lipid bilayer was occurred due to the vesicle deformation taking place during the permeation, allowing a partial release of the drug located in the core (Omar *et al.*, 2019).

10. Porcine skin permeabilization

In order to investigate the potency of T-RBE on transdermal delivery, skin penetration was performed using ex vivo porcine skin. Imaging mass microscope (IMS) analysis was employed to observe a cumulative amount of PA that transported across porcine skin of PA standard, RBE and T-RBE. Figure 9 showed that PA standard can penetrate well into porcine skin. It was also observed that T-RBE showed a higher amount of accumulated PA on the skin compared to RBE.

Additionally, the permeability of T-RBE was greater and deeper than RBE at 24 h. This result indicated that skin penetration of formulated T-RBE was noticeably enhanced compared to those of extract. According to the ex vivo skin permeation study, T-RBE possibly enhanced the efficiency of the extract by increasing permeability. This result is due to the presence of PEG-75 lanolin acting as an edge activator in the formulation. PEG-75 lanolin is a nonionic surfactant which provides flexibility to the vesicles, prevent rupture, and allows the vesicles to deform and penetrate skin pores (Nayak and Tippavajhala, 2020).

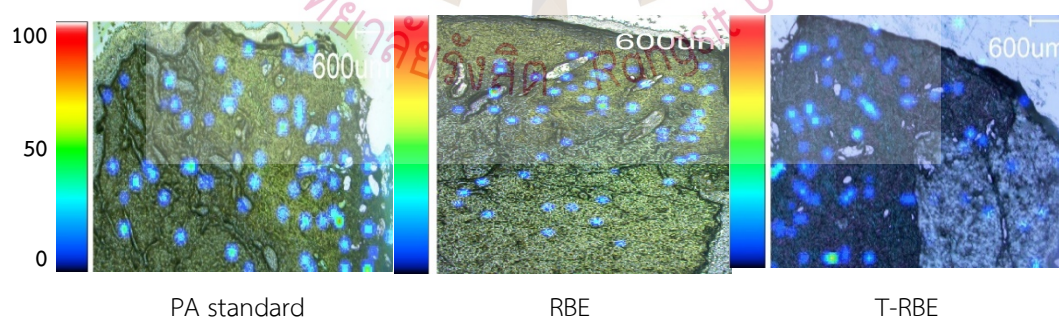
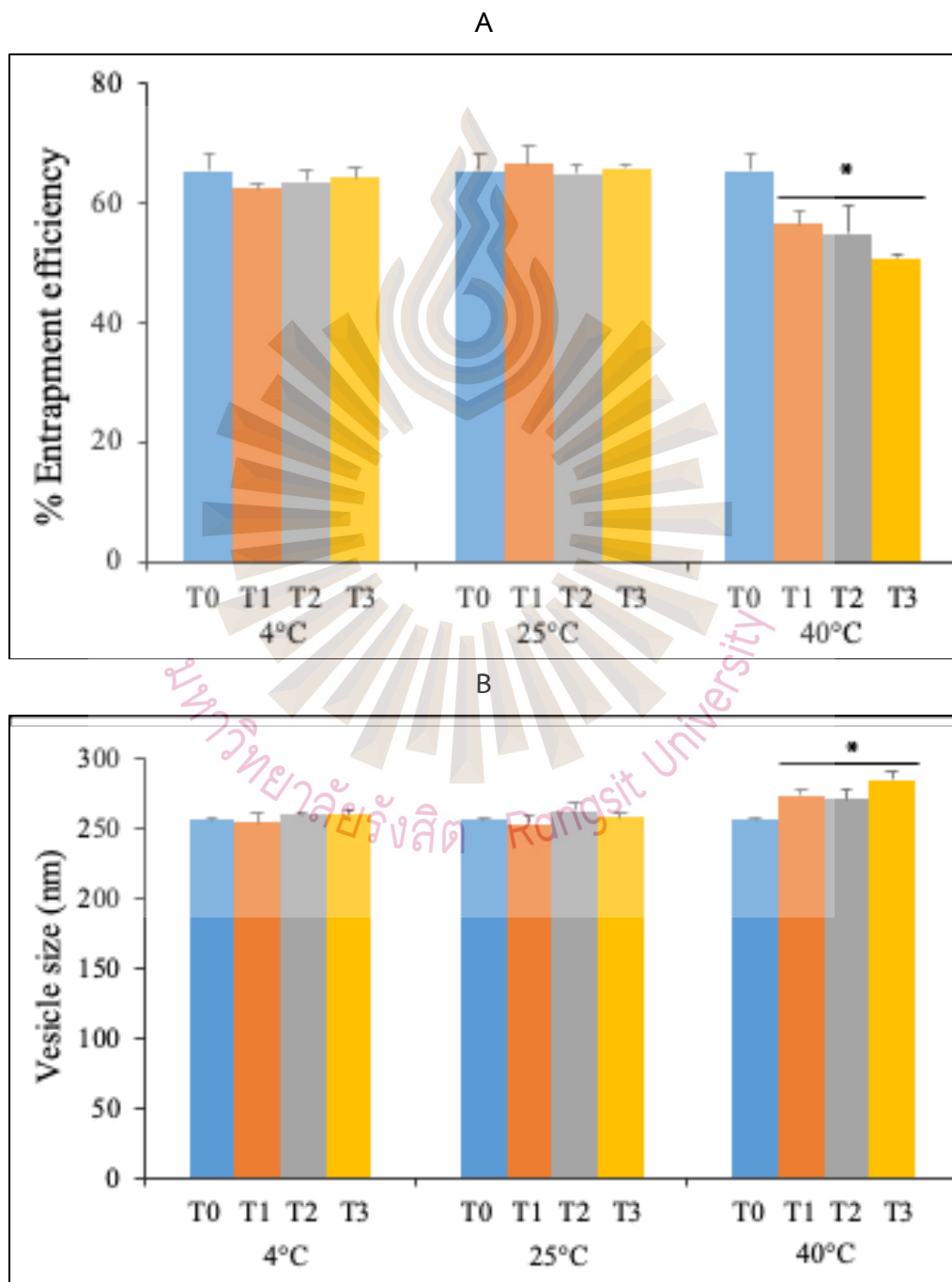


Figure 9. The IMS image showed the cumulative amount of PA (blue) permeated through porcine skin, which was treated with PA standard, RBE and T-RBE for 24 h. PA was detected at 153.02 m/z.

Previous research suggested that the penetration of the formulation through the skin is forced by a osmotic gradient that is caused by the different water content between the relatively dehydrated skin surface and the aqueous viable epidermis. A lipid formulation applied in the surface of the skin avoids evaporation and, consequently, dehydration, allowing transfersomes to reach deeper layers of the skin (Fernández-García *et al.*, 2020).



C

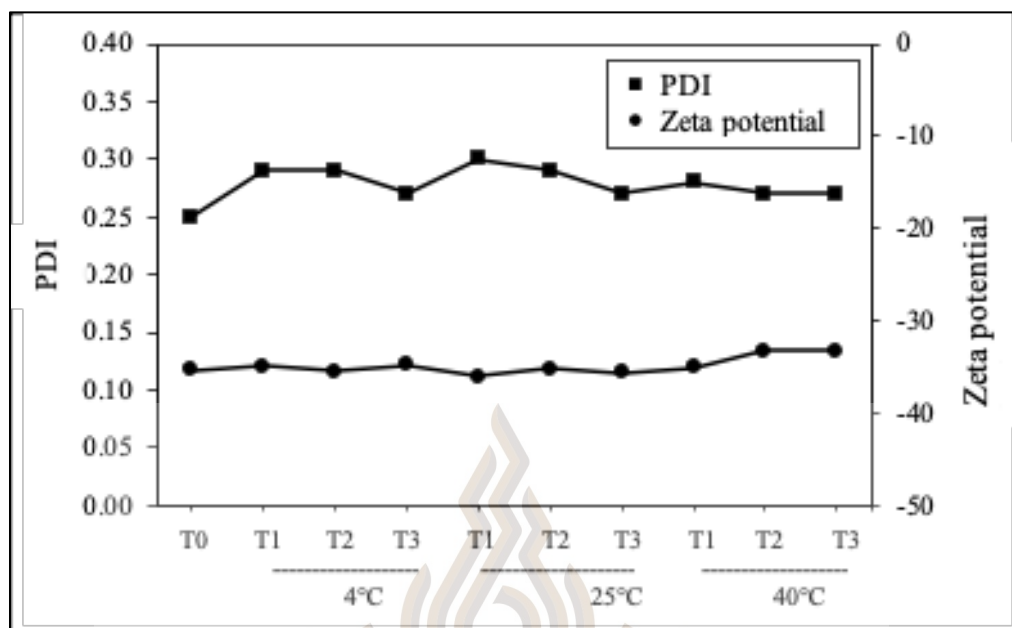


Figure 10. % entrapment efficiency (%EE; A), mean vesicle size (B), polydispersity index (PDI) and zeta potential (C) of T-RBE after 3 months storage at 4°C, 25°C and 40°C. (Results presented as a mean $\pm$ S.D, n=3).

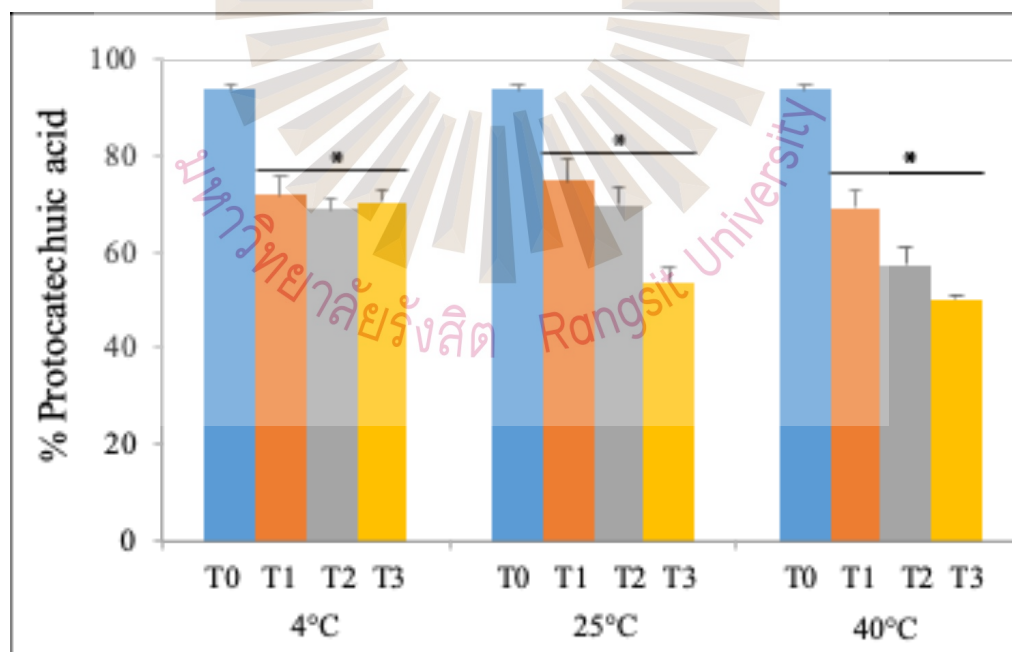


Figure 11. % protocatechuic acid of RBE solution as controlled formulation after 3 months storage at 4°C, 25°C and 40°C. (Results presented as a mean $\pm$ S.D, n=3).

The stability study was performed at different temperatures as per the ICH guidelines and to identify any possible change in the vesicular structure of transfersomes and leaking out of active substance from it. Optimized transfersome formulation (T-RBE) was selected for stability studies. The vesicular suspension was kept in sealed vials (10ml) for 3 months to study its stability in terms of %EE, vesicle size, PDI and zeta potential at refrigerator temperature ($4^{\circ}\text{C}/60 \pm 5\%\text{RH}$), room temperature ($25^{\circ}\text{C}/60 \pm 5\%\text{RH}$) and accelerated temperature ($40^{\circ}\text{C}/75 \pm 5\%\text{RH}$). The pH and viscosity of the obtained vesicles were also investigated. T-RBE formulation stored at 4°C and 25°C showed no color change, no sedimentation and resist the aggregation and fusion. Furthermore, it showed a non-significant ($p > 0.05$) change in %EE, vesicle size, zeta potential and polydispersity as shown in figure 10A-10C. However, T-RBE stored at 40°C showed slight precipitation which could be easily redispersed on gentle shaking. In addition, it showed a significant change from initial time ($*p < 0.05$) in %EE and vesicle size. It was observed that %EE decreases at these time intervals, and %EE was seen to decrease with each raise of the temperature, as in accelerated temperature (40°C) when %EE was determined at 0, 1, 2, and 3 months, then it was found to be 65.30 ± 2.98 , 56.51 ± 1.94 , 54.84 ± 4.53 and 50.75 ± 0.50 , respectively. Significant decrease in %EE was detected representing leakage of major constituents from transfersomes. It was also found that vesicle size was increased with the raise of temperature and time intervals. At these time intervals in 40°C , vesicle size was found to be 256.60 ± 1.59 , 273.73 ± 4.05 , 270.70 ± 6.50 and 285.37 ± 6.53 , respectively. Increasing the size of T-RBE stored at 40°C could be possibly attributed to the aggregation and fusion of vesicles at this temperature. Therefore, T-RBE formulation stored at the 4°C and 25°C showed an enhanced stability as the %EE and vesicle size did not change during and till the end of the storage study. No considerable change was seen in PDI and zeta potential at accelerated temperature (Figure 10C). Additionally, there was no significant change in pH characteristic (5.05-5.93) of T-RBE in stability testing. However, the viscosity of T-RBE was slightly decreased at 40°C (1.43-1.83) compared to 4°C and 25°C (2.05-2.64), which is probably due to the presence of precipitation in the formulation. Moreover, the chemical stability of RBE solution (controlled formulation) has also been investigated. Major constituent of RBE (PA) was used as marker for the quantitative analysis by using HPLC. It was noted that the PA content in RBE solution significantly decreased from initial time at all temperatures after the stability study ($*p < 0.05$) as shown in figure 11. These results

probably caused by the beneficial of transfersome delivery system, therefore, a nanocoating of those herbal ingredients protects the active chemicals from degradations and thus enhance the stability and efficacy (Opatha *et al.*, 2020; Pradeep & Kumar, 2018). These results all suggested that the obtained vesicles were physiochemically stable. It could be concluded from the stability study that keeping vesicles at 4°C and 25°C is the best to minimize problems associated with instability issues.



บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

The objective of the present research was to develop RBE-loaded transfersomes (T-RBE) for improving the extract stability, and subsequently enhanced its molecular mechanisms and bioactivities in order to increase the value of Riceberry broken rice. RBE showed high total phenolic content together with increasing expression of migration protein marker (FAK/AKT), and exhibited important biological properties such as anticollagenase, antielastase and antioxidant activities. These findings refer to a potential alternative natural agent for wound healing products. The green technology can be used to produce transfersomes from PEG-75 lanolin as edge activator without use organic solvent. When compared with the extract, it was found that T-RBE formulation exhibited significant anti-inflammatory effect in RAW 264.7 macrophage cells and effective wound healing in human keratinocyte (HaCaT) and human primary skin fibroblast cells. Furthermore, formulated T-RBE are highly stable and have a prolonged release. Then, T-RBE can also enhance the potency of RBE on wound healing. On the basis of this study, we suggest that T-RBE could potentially be applied as a promising active ingredient in the treatment of impaired wound.

เอกสารอ้างอิง

- Alderton, W.K., Cooper, C.E., & Knowles, R.G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*, 57, 593-615.
- Amin, Z.M., Koh, S.P., Yeap, S.K., Hamid, N.S., Tan, C.P., & Long, K. (2015). Efficacy study of broken rice maltodextrin in *in vitro* wound healing assay. *BioMed Research International*, 687-694.
- Betz, G., Aeppli, A., Menshutina, N., & Leuenberger, H. (2005). In vivo comparison of various liposome formulations for cosmetic application. *International Journal of Pharmaceutics*, 296(1-2), 44-54.
- Boonpisuttinant, K., Udompong, S., & Boonbai, R. (2019). Tyrosinase inhibition and antioxidant activities of Riceberry rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Engineering and Applied Sciences*, 14(special issue), 6127-6130. <https://doi.org/10.36478/jeasci.2019.6127.6130>
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., & Fusenig, N. E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of Cell Biology*, 106(3), 761-771.
- Bozzuto, G., & Molinari, A. (2015). Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine*, <https://doi.org/10.2147/IJN.S68861>.
- Chauhan, A.S., Sridevi, S., Chalasani, K.B., Jain, A.K., Jain, S.K., Jain, N.K., & Diwan, P.V. (2003). Dendrimer-mediated transdermal delivery: enhanced bioavailability of indomethacin. *Journal of Controlled Release*, 90, 335-343.
- Chen, G., Mo, L., Lin, F., Zhang, X., Liu, J., Wang, H., & Yang, C. (2016). Development, validation and application of an HPLC method for reduced vitamin C qualification in HBOCs solution. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 44(2), 456-461.
- Choi, J.S., Jeon, M.H., Moon, W.S., Moon, J.N., Cheon, E.J., & Kim, J.W. (2014). In vivo hair growth-promoting effect of rice bran extract prepared by supercritical carbon dioxide fluid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 37, 44-53.
- Choi, J.S., Park, J.B., Moon, W.S., Moon, J.N., Son, S.W., & Kim, M.R. (2015). Safety and efficacy of rice bran supercritical CO₂ extract for hair growth in androgenic

- alopecia: A 16-week double-blind randomized controlled trial. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 38, 1856-1863.
- Chowjarean, V., Nimmannit, U., Chaotham, C., Eaknai, W., Sucontphunt, A., Phiboonchaiyanan, P.P., & Chanvorachote, P. (2018). *Grammatophyllum speciosum* extract potentiates stemness in keratinocyte cells. *Chiang Mai Journal of Science*, 45(1), 237–248.
- Chumseng, S., Itthipanichpong, C., Ruangrunsi, N., Chansriniyom, C., & Limpanasithikul, W. (2010). Effects of the hexane extract from *Glycosmis parva* on LPS-induced macrophage activation. *Journal of Basic and Applied Pharmacology*, 32(1), 184-187.
- Cohen, I.K., Diegelmann, R.F., Yager, D.R., Wornum, III. I.L., Graham, M.F., & Crossland, M.C. (1999). *Schwartz principles of surgery*. 7th Edition: wound care and wound healing. PP 263-290.
- Dang, C., Chiasoo, T.K., Longaker, M.T., & Lorenz, H.P. (2003). Acute wound healing: An overview. *Clinics in Plastic Surgery*. 30(1), PP 1-13.
- Dziato, M., Mierziak, J., Korzun, U., Preisner, M., Szopa, J., & Kulma, A. (2016). The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. *International journal of Molecular Sciences*, 17(2), 160. <https://doi.org/10.3390/ijms17020160>
- Eaknai, W., Bunwatcharaphansakun, P., Phungbun, C., Jantimaporn, A., Chaisri, S., Boonrungsiman, S., Nimmannit, U., & Khongkow, M. (2022). Ethanolic fenugreek extract: Its molecular mechanisms against skin aging and the enhanced functions by nanoencapsulation. *Pharmaceuticals*, 15, 254. <https://doi.org/10.3390/ph15020254>
- Etienne-Manneville, S., & Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature*, 420 (6916), 629-635. <https://doi.org/10.3390/ijms17020160>
- Farhadi, F., Khameneh, B., Iranshahi, M., & Iranshahy, M. (2019). Antibacterial activity of flavonoids and their structure–activity relationship: An update review. *Phytotherapy Research*, 33(1), 13-40. doi:10.1002/ptr.6208
- Fernández-García, R., Lalatsab, A., Statlsb, L., Bolás-Fernández, F., Ballesteros, M.P., Serrano, D.R. (2020). Transfersomes as nanocarriers for drugs across the skin: Quality by design from lab to industrial scale. *International Journal of Pharmaceutics*, 573, 118817. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118817>

- Fitzmaurice, S.D., Sivamani, R.K., & Isseroff, R.R. (2011). Antioxidant Therapies for Wound Healing: A Clinical Guide to Currently Commercially Available Products. *Skin Pharmacology and Physiology*, 24, 113–126.
- Gates, R. E., King Jr, L. E., Hanks, S. K., & Nanney, L. B. (1994). Potential role for focal adhesion kinase in migrating and proliferating keratinocytes near epidermal wounds and in culture. *Cell Growth and Differentiation: American Association for Cancer Research*, 5(8), 891-900.
- Guo, S., & DiPietro, L.A. (2010). Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research*, 89(3), 219-229.
- He, H., Lu, Y., Qi, J., Zhu, Q., Chen, Z., & Wu, W. (2019). Adapting liposomes for oral drug delivery. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.06.005>.
- Ioele, G., Cione, E., Risoli, A., Genchi, G., & Ragno, G. (2005). Accelerated photostability study of tretinoin and isotretinoin in liposome formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 293, 251-260.
- Kanlayavattanakul, M., Lourith, N., & Chaikul, P. (2016). Jasmine rice panicle: A safe and efficient natural ingredient for skin aging treatments. *Journal of Ethnopharmacology*, 193, 607-616.
- Kaur, I.P., Kapila, M., & Agrawal, R. (2007). Role of novel delivery systems in developing topical antioxidants as therapeutics to combat photoageing. *Ageing Research Reviews*, 6(4), 271-288.
- Ki, V., & Rotstein, C. (2008). Bacterial skin and soft tissue infections in adults: a review of their epidemiology, pathogenesis, diagnosis, treatment and site of care. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 19(2), 173-184. <https://doi:10.1155/2008/846453>
- Lee, K. J., Oh, Y. C., Cho, W. K., & Ma, J. Y. (2015). Antioxidant and anti-inflammatory activity determination of one hundred kinds of pure chemical compounds using offline and online screening HPLC assay. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Volume 2015, Article ID 165457, <https://dx.doi.org/10.1155/2015/165457>

- Luang-In, V., Yotchaisarn, M., Somboonwatthanakul, I., & Deeseenthum, S. (2018). Bioactivities of organic riceberry broken rice and crude riceberry rice oil. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42(3), 161-168.
- Michelotti, F., & Bodansky, H. J. (2015). *Bacillus cereus* causing widespread necrotising skin infection in a diabetic person. *Practical diabetes*, 32(5), 169-170a. <https://doi.org/10.1002/pdi.1950>
- Nayak, D., & Tippavajhala, V.K. (2020). A comprehensive review on preparation, evaluation and applications of deformable liposomes. *International Journal of Pharmaceutical Research*, 20(1), 186-205. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2020.112878.13997>
- Nobes, C. D., & Hall, A. (1999). Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *The Journal of Cell Biology*, 144(6), 1235-1244. [doi:10.1083/jcb.144.6.1235](https://doi.org/10.1083/jcb.144.6.1235)
- Omar, M.M., Hasan, O.A., & Sisi, A.M.E. (2019). Preparation and optimization of lidocaine transferosomal gel containing permeation enhancers: a promising approach for enhancement of skin permeation. *International Journal of Nanomedicine*, 14: 1551–1562. <https://doi.org/10.2147/IJN.S201356>
- Opatha, S.A.T., Titapiwatanakun, V., & Chutoprapat, R. (2020). Transfersomes: A promising nanoencapsulation technique for transdermal drug delivery. *Pharmaceutics*, 12, 855. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12090855>
- Otto, M. (2009). *Staphylococcus epidermidis*: the accidental pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 7(8), 555-567. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2182>
- Padamwar, M.N., & Pokharkar, V.B. (2006). Development of vitamin loaded topical liposomal formulation using factorial design approach: Drug deposition and stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 320(2006), 37-44.
- Peanparkdee, M., Patrawart, J., & Iwamoto, S. (2019). Effect of extraction conditions on phenolic content, anthocyanin content and antioxidant activity of bran extracts from Thai rice cultivars. *Journal of Cereal Science*, 86, 86–91. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.01.011>
- Perugini, P., Genta, I., Pavanetto, F., Conti, B., Scalia, S., & Baruffini, A. (2000). Study on glycolic acid delivery by liposomes and microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, 196(1), 51-61.

- Potisuwan, S., Apichatwatana, N., & Rujivipat, S. (2023). Improved skin permeation of transferosomes containing *Eulophia macrobulbon* extract. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 229, 113474. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113474>
- Pradeep, C., & Kumar, T.B. (2018). Herbal novel drug delivery systems and transfersomes. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 8(3), 162-168. <http://dx.doi.org/10.22270/jddt.v8i3.1772>
- Pukdee, W., Kumar, N., Chaiwut, P., & Sripisut, T. (2016). Development of Riceberry extract for antioxidant activity. In *Mae Fah Luang University International Conference & A Kaleidoscope of Traditional and Complementary Medicines International Conference*, November, 139-146.
- Romer, L. H., McLean, N., Turner, C. E., & Burridge, K. (1994). Tyrosine kinase activity, cytoskeletal organization, and motility in human vascular endothelial cells. *Molecular Biology of the Cell*, 5(3), 349-361. <https://doi:10.1091/mbc.5.3.349>
- Sandra, C.B., José, A.M., João, C.M., & Artur, C.P. (2012). Characterization of potential elastase inhibitor-peptides regulated by a molecular switch for wound dressings applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 50, 107-114.
- Serrels, B., Serrels, A., Brunton, V. G., Holt, M., McLean, G. W., Gray, C. H., & Frame, M. C. (2007). Focal adhesion kinase controls actin assembly via a FERM-mediated interaction with the Arp2/3 complex. *Nature Cell Biology*, 9(9), 1046-1056.
- Singkhorn, S., Tantisira, M. H., Tanasawet, S., Hutamekalin, P., Wongtawatchai, T., & Sukketsiri, W. (2018). Induction of keratinocyte migration by ECa 233 is mediated through FAK/Akt, ERK, and p38 MAPK signaling. *Phytotherapy Research*, 32(7), 1397-1403. <https://doi:10.1002/ptr.6075>
- Somted, P., Peeraphunth, S., Amnueysit, K., & Amnueysit, P. (2015). Antibacterial activity of purple rice extracts on growth inhibition of human pathogenic bacteria [Conference poster]. In *Proceedings of 53rd Kasetsart University Annual Conference, 3-6 February 2015, Kasetsart University, Thailand. Smart Agriculture" The Future of Thailand". Plants, Animals, Veterinary Medicine, Fisheries, Agricultural Extension and Home Economics, Kasetsart University*, 574-581.
- Sulzmaier, F. J., Jean, C., & Schlaepfer, D. D. (2014). FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nature Reviews Cancer*, 14(9), 598-610.

- Taboonpong, S., Kiratipaiboon, C., Phiboonchaiyanan, P. P., Junthongjin, P., Trithossadech, P., & Chanvorachote, P. (2017). Vanillin increases stem cell signal and cell adhesion in keratinocytes. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41(2).
- Tachibana, Y., Kikuzaki, H., Lajis, N. H., & Nakatani, N. (2001). Antioxidative activity of carbazoles from *Murraya koenigii* leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5589-5594.
- Tan, B.L., Norhaizan, M.E., Suhaniza, H.J., Lai, C.C., Norazalina, S., & Roselina, K. (2013). Antioxidant properties and antiproliferative effect of brewers' rice extract (temukut) on selected cancer cell lines. *International Food Research Journal*, 20, 2117-2124.
- Teeranachaideekul, V., Wongrakpanich, A., Leanpolchareanchai, J., Thirapanmethee, K., & Sirichaovanichkarn, C. (2018). Characterization, biological activities and safety evaluation of different varieties of Thai pigmented rice extracts for cosmetic applications. *Pharmaceutical Sciences Asia*, 45(3), 140-153.
- Thring, T. S., Hili, P., & Naughton, D. P. (2009). Anti-collagenase, anti-elastase and antioxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9(1), 27.
- Yongsanguanchai, N., Pongrakhananon, V., Mutirangura, A., Rojanasakul, Y., & Chanvorachote, P. (2015). Nitric oxide induces cancer stem cell-like phenotypes in human lung cancer cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 308(2), C89-100. <https://doi:10.1152/ajpcell.00187.2014>
- Yu, J., Peng, H., Ruan, Q., Fatima, A., Getsios, S., & Lavker, R. M. (2010). MicroRNA-205 promotes keratinocyte migration via the lipid phosphatase SHIP2. *The FASEB Journal*, 24(10), 3950-3959. <https://doi:10.1096/fj.10-157404>
- Zhao, X., & Guan, J. L. (2011). Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(8), 610-615. <https://doi:10.1016/j.addr.2010.11.001>

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล ศราพร हरिकर्णักดี
Miss Saraporn Harikarnpakdee
2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.
3. หน่วยงาน ภาควิชาเภสัชอุตสาหกรรม วิทยาลัยเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต อ.เมือง จ.ปทุมธานี
รหัสไปรษณีย์ 12000
โทรศัพท์ 02-9972222 ต่อ 1421,1422 โทรสาร 02-9972222 ต่อ 1403
E-mail: saraporn.h@rsu.ac.th
4. ประวัติการศึกษา
ปริญญาตรี ภ.บ. มหาวิทยาลัยรังสิต 2536
ปริญญาโท ภ.ม. (เภสัชกรรม) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2539
ปริญญาเอก ภ.ด. (เภสัชกรรม) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2545
5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ
สาขาวิชาเครื่องสำอาง
 - Skin aging
 - Skin stem cell research
 - การทดสอบการระคายเคืองและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง
 สาขาวิชาเทคโนโลยี
 - การผลิตยาเม็ด
 - การพัฒนาระบบนำส่งยาโดยใช้นาโนเทคโนโลยี
6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ
 - 6.1 หัวหน้าโครงการวิจัย/ผู้ร่วมวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย (ภายในประเทศ)
 - 6.1.1. การเพิ่มคุณสมบัติเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์คีราติโนไซด์โดยสาร gastrodin
 - 6.1.2. การเพิ่มคุณสมบัติเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์คีราติโนไซด์โดยสาร isovitexin
 - 6.1.3. การทดสอบความปลอดภัยและประสิทธิภาพของเครื่องสำอางผสมอนุภาคนาโน สารสกัดมะขามป้อม
 - 6.1.4. การทดสอบการระคายเคืองและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์เซรัมบำรุงผิวจากโปรตีนไหม
 - 6.1.5. การทดสอบการระคายเคืองของโปรตีนกาวไหม

- 6.1.6. การทดสอบการระคายเคืองและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ชะลอวัยผสมเซรีซิน จากรังไหม
- 6.1.7. การทดสอบการระคายเคืองและประสิทธิภาพของครีมบำรุงรอบดวงตาและผิวหนังผสมเซรีซินจากรังไหม
- 6.1.8. การทดสอบการระคายเคืองและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ด้านริ้วรอยที่มีส่วนผสมสารสกัดสมุนไพรว่านสาวหลงและว่านเพชรหึงจากพื้นที่โครงการพระราชดำริเขาหินซ้อน
- 6.1.9. การทดสอบการระคายเคืองและสำรวจความพึงพอใจของผลิตภัณฑ์ครีมบำรุงผิวหนังและครีมทาตัวสำหรับนำส่งสารสำคัญทางผิวหนังที่ผสมอนุภาคนาโน สตรัท รักเจอร์ลิปิดแครีเออร์จากไขอ้อย
- 6.1.10. การทดสอบการระคายเคืองและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์รองพื้นสูตรน้ำผสม อนุภาคนาโนของสารสกัดสมุนไพร; เปลือกทับทิมและบัวบกที่มีคุณสมบัติบำรุง ผิว เพิ่มความชุ่มชื้น ป้องกันแสงแดด
- 6.1.11. การทดสอบการระคายเคืองและประสิทธิภาพของแผ่นแปะผิวสมุนไพรนาโนลด ฝ้า
- 6.1.12. การทดสอบการระคายเคืองของผลิตภัณฑ์ชะลอวัยผสมอนุภาคนาโนจากสารสกัดลูกช้ด
- 6.1.13. การทดสอบการระคายเคืองและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์เซรั่มชะลอวัยที่มีส่วนผสมสารสกัดสมุนไพรว่านเพชรหึงจากพื้นที่โครงการพระราชดำริเขาหินซ้อน

6.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : (ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุนย้อนหลังไม่เกิน 5 ปี)

Chowjarean V, **Harikarnpakdee S**, Phiboonchaiyanan PP. Grammatophyllum speciosum Ethanolic Extract Inhibits Proliferation and Migration of Non-small Cell Lung Cancer Cells through Focal Adhesion Kinase/AKT/ β -Catenin-Dependent Pathway. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. 2024; 15(4): 332-340.

Phiboonchaiyanan PP, **Harikarnpakdee S**, Songsak T, Chowjarean V, In Vitro Evaluation of Wound Healing, Stemness Potentiation, Antioxidant Activity, and Phytochemical Profile of Cucurbita moschata Duchesne Fruit Pulp Ethanolic Extract. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 2024, 9288481.

- Pongsathit M, Chowjarean V, Phiboonchaiyanan PP, Sadabpod K, Harikarnpakdee S. (2022). Antioxidant and antibacterial properties of hydroalcoholic riceberry rice extract. *Interprofessional Journal of Health Sciences*. 2022; 20(1-2), 43-56.
- Chowjarean V, Phiboonchaiyanan PP, **Harikarnpakdee S**. Skin Brightening Efficacy of *Grammatophyllum speciosum*: A Prospective, Split-Face, Randomized Placebo-Controlled Study. *Sustainability*. 2022; 14(24):16829.
- Phiboonchaiyanan PP, Puthongking P, Chawjarean V, **Harikarnpakdee S**, Sukprasansap M, Chanvorachote P, Priprem A, Govitrapong P. Melatonin and its derivative disrupt cancer stem-like phenotypes of lung cancer cells via AKT downregulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2021 Aug 16. doi: 10.1111/1440-1681.13572. Epub ahead of print. PMID: 34396568.
- Chowjarean, V., Phiboonchaiyanan, P. P., **Harikarnpakdee, S.**, and Tengamnuay, P. (2019). A natural skin anti-ageing serum containing pseudobulb ethanolic extract of *Grammatophyllum speciosum*: a randomized double-blind, placebo-controlled trial. *International journal of cosmetic science*, 41(6), 548-557.
- Harikarnpakdee, S.**, and Chowjarean, V. (2018). *Grammatophyllum speciosum* ethanolic extract promotes wound healing in human primary fibroblast cells, *International journal of cell biology*, Volume 2018, Article ID 7836869.
- Harikarnpakdee, S.**, and Chuchote, C. (2018). Oviposition deterrent efficacy and characteristics of a botanical natural product, *Ocimum gratissimum* (L.) oil-alginate beads, against *Aedes aegypti* (L.). *The scientific world journal*, Volume 2018, Article ID 3127214.
- Chowjarean, V., Sucontphunt, A., Vchirawongkwin, S., Charoonratana, T., Songsak, T., **Harikarnpakdee, S.**, and Tengamnuay, P. (2018). Validated RP-HPLC method for quantification of gastrodin in ethanolic extract from the pseudobulbs of *Grammatophyllum speciosum* Blume. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 22(2), 219-226.
- Harikarnpakdee, S.**, and Sucontphunt, A. (2017). Development of oil-in-water microemulsion of *Ocimum gratissimum* essential oil for anti-acne topical

delivery system. The 24th conference of the international federation of societies of cosmetic chemists, October 23-25, Seoul, Korea.

Sucontphunt, A., and **Harikarnpakdee, S.** (2017). A comparative study of eco-friendly liposomes preparation using propylene glycol, butylene glycol or isoprene glycol as a replacement for harmful organic solvent. The 24th conference of the international federation of societies of cosmetic chemists, October 23-25, Seoul, Korea.

Harikarnpakdee, S., and Chuchote C. (2018). Development of oil-in-water microemulsion of *Psidium guajava* essential oil for anti-acne topical delivery system. The 30th IFSCC Congress, September 18-21, Munich, Germany.

