

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2556

โครงการวิจัยรหัส ว-ท(พ-ท(ค)156.55)
ผลของอนุภาคนาโนคาร์บอนต่อลิพิดมอนอเลเยอร์
Interaction of carbon nanoparticle on lipid monolayer

หัวหน้าโครงการ
ผศ.ดร. จิรศักดิ์ วงศ์เอกบุตร
ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Abstract

In the environment, the process of combustion is the dominant pathway through which mankind continuously injects particles into the atmosphere at the present time. Recent toxicology studies suggest that the combustion-generated carbon nanoparticles (CNPs) may be toxic in pulmonary surfactant (PS) that serves as the first biological barrier in the respiratory system. However, the understanding of how CNPs perturb PS is still unclear. In the present work, we report on coarse-grained molecular dynamics simulations of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) lipid monolayers in the presence of C_{60} fullerenes. Our simulations show that fullerenes can easily penetrate into the monolayer and stay in the lipid hydrocarbon chain region throughout the simulation, in agreement with free energy calculations. Fullerene affected both structural and dynamic properties of the lipid monolayer. Surface tension/area isotherms of the monolayer were changed only slightly by fullerenes. However, the perturbation on the physical structure of monolayer became major at high concentration of fullerene, due to fullerene aggregation. At high compression (area per molecule of 0.48 nm^2) the monolayer was unstable and collapsed forming a bilayer in the water phase. On the other hand at low compression, we observed the formation of pores, with direct contact between water and the vapor phase. Our results illustrate potentially harmful effects of CNPs on respiratory system and also the mechanism of how CNPs disturb pulmonary surfactant, which would be related to the translocation of nanoparticle from the lung to the blood circular.

บทคัดย่อ

ในสิ่งแวดล้อม การบวนการเผาไหม้ที่เกิดขึ้นปลดปล่อยอนุภาคและฝุ่นละอองออกสู่ชั้นบรรยากาศตลอดเวลา ซึ่งในการศึกษาด้านพิษวิทยาพบว่าอนุภาคนาโนคาร์บอนนาโน อาจเป็นพิษต่อเยื่อหุ้มปอดซึ่งเป็นอวัยวะแรกของระบบการหายใจ ทั้งนี้ความรู้และความเข้าใจเกี่ยวกับการรบกวนของอนุภาคนาโนคาร์บอนต่อเยื่อหุ้มปอดยังมีน้อยมาก ดังนั้นในงานวิจัยนี้ เราจึงศึกษาปัญหาดังกล่าวโดยใช้แบบจำลองพลวัตของโมเลกุลในระดับหยาบของชั้นไขมันเดี่ยว และโมเลกุลของฟลูออรีน จากผลการทดลองพบว่าอนุภาคนาโนคาร์บอนสามารถทะลุเข้าไปในชั้นไขมันเดี่ยว และอยู่ในชั้นส่วนที่ไม่ชอบน้ำของชั้นไขมันได้โดยง่าย ซึ่งสอดคล้องกับผลการคำนวณพลังงานอิสระของระบบ นอกจากนี้ยังพบว่าการเปลี่ยนแปลงของสมบัติทางกายภาพและโครงสร้างของไขมันชั้นเดี่ยว(เช่นการเกิดรูรั่ว และการม้วนพับของชั้นไขมันเดี่ยว) รวมถึงการเปลี่ยนแปลงของค่าไอโซเทอมของแรงดึงดูดกับพื้นที่ต่อหนึ่งโมเลกุล เมื่อมีฟลูออรีนจำนวนมากแทรกอยู่ โดยการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับการจับตัวเป็นกลุ่มของฟลูออรีน ดังนั้นจากผลการทดลองจึงสรุปว่าอนุภาคนาโนคาร์บอนมีผลทำให้อาจเป็นอันตรายต่อเยื่อหุ้มปอด และอาจมีนำสู่การเคลื่อนที่เข้าไปในระบบกระแสเลือดผ่านทางปอดได้

กิติกรรมประกาศ

โครงการนี้สำเร็จได้ด้วยดีเพราะผู้วิจัยได้รับเงินทุนสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เป็นระยะต่อเนื่อง 2 ปี และความช่วยเหลือจากนิสิตที่ปริญญาระดับมหาบัณฑิตศึกษา นางสาวนิลลดา นิโชะ และ นางสาวพรรณศิริ บุญน้อย ในการรวบรวม และวิเคราะห์ข้อมูล ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิและผู้เชี่ยวชาญทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์สละเวลาให้ข้อมูล อันเป็นประโยชน์และให้ความอนุเคราะห์

จิรศักดิ์ วงศ์เอกบุตร

สารบัญ

บทที่ 1 บทนำ

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

บทที่ 3 วิธีวิจัย

บทที่ 4 ผลการวิจัย

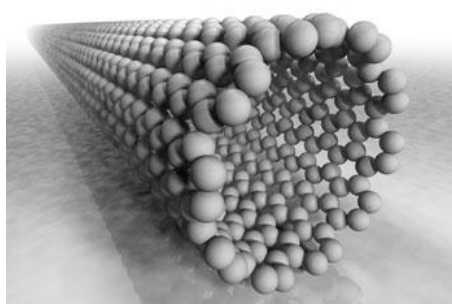
บทที่ 5 สรุป วิเคราะห์ และข้อเสนอแนะ

บทที่ 6 เอกสารและสิ่งอ้างอิง

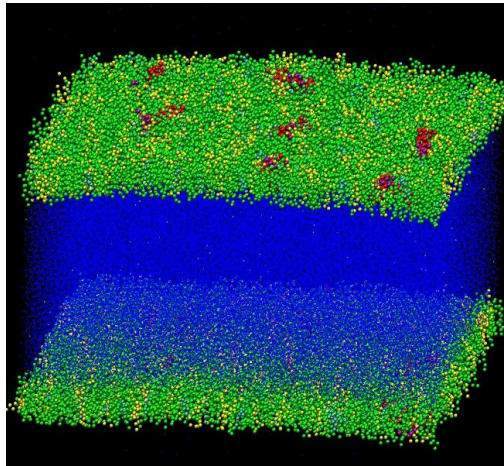
บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันมลภาวะสำคัญที่ก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศโดยมีแหล่งกำเนิดมาจากการจราจรที่คับคั่งในเมืองใหญ่อย่างกรุงเทพมหานครนั้น เป็นปัญหาที่สำคัญอย่างยิ่งสำหรับประเทศไทย เพราะนอกเหนือจากสารที่เป็นพิษ เช่น โลหะหนักและก๊าซพิษ ก็ยังมีฝุ่นละอองขนาดเล็กจำนวนมากที่มีต้นเหตุมาจากการเผาไหม้แบบไม่สมบูรณ์ของเครื่องยนต์จันทระทั้งปล่อยออกมาสู่ชั้นบรรยากาศ ซึ่งอนุภาคเหล่านี้จะสามารถเข้าสู่ร่างกายได้จากการสูดหายใจ โดยทั่วไปร่างกายของคนเรานั้นจะมีระบบการกรองฝุ่นละอองเหล่านี้ได้ดีระดับหนึ่ง แต่ในกรณีอนุภาคที่มีขนาดเล็กมากๆ ในระดับนาโนเมตรนั้น ร่างกายของคนเราไม่มีระบบป้องกันที่ดีพอที่จะสามารถกรองหรือดักจับได้ ส่งผลให้อนุภาคขนาดเล็กสามารถทะลุผ่านระบบการกรองของร่างกายเข้าไปยังปอดได้ ประกอบกับการพัฒนาของนาโนเทคโนโลยีในยุคปัจจุบันซึ่งมีความสนใจที่จะนำอนุภาคนาโนไปพัฒนาและใช้ประโยชน์ในหลากหลายด้าน เช่น เป็นอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ การนำส่งยา อื่นๆ จนไม่คำนึงถึงผลกระทบของสุขภาพ ในปัจจุบันเรายังมีความรู้ไม่มากพอที่จะเข้าใจถึงผลเสียของอนุภาคนาโน ดังนั้นจึงยังไม่ได้ใช้วิธีที่ดีพอในการป้องกันอันตรายที่อาจเกิดจากอนุภาคนาโน

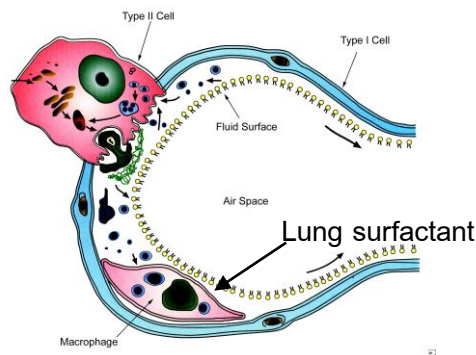


รูปที่ 1 Nanomaterials เช่น nanosilver and carbon nanotubes อาจจะถูกห้ามจาก electronic equipment



รูปที่ 2 ตัวอย่างของระบบของ lipid monolayer โดย helices สีแดงเป็น hydrophobic peptides, สีเขียวเป็นชั้นของ lipid และ สีน้ำเงิน เป็นชั้นของ น้ำ และ สีดำเป็นส่วนของสูญญากาศ

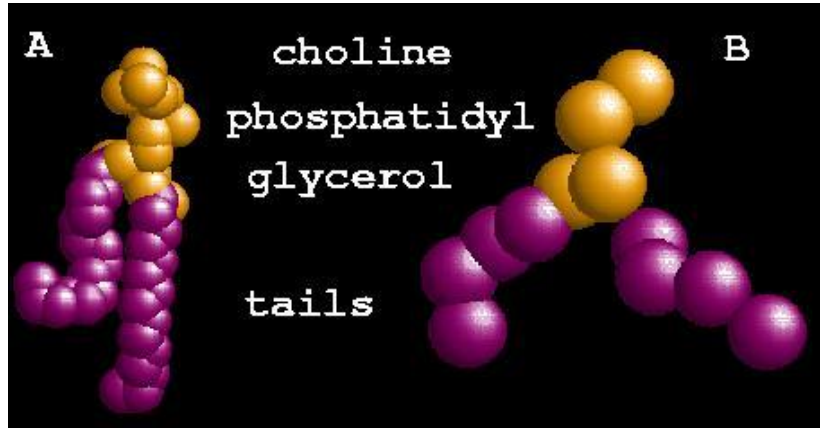
ดังนั้นกลุ่มของข้าพเจ้าจึงได้สนใจที่จะศึกษาผลกระทบของอนุภาคคาร์บอนนาโนต่อlipid monolayer (รูปที่ 2) ซึ่ง lipid monolayer นี้เป็นลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของถุงลมภายในปอด ดังแสดงให้เห็นในรูปที่ 3 ซึ่งเป็นด้านแรกที่จะเจอกับอนุภาคเล็กๆนี้หรือเรียกว่า lung surfactant ดังนั้นการศึกษา interaction ระหว่าง lipid monolayer กับอนุภาคคาร์บอนนาโน (carbon nanoparticle) นั้นจะช่วยให้เรารู้และเข้าใจถึงกลไกการแพร่ของอนุภาคคาร์บอนผ่าน lipid monolayer รวมไปถึงการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของlipid monolayer เนื่องจากการไปแทรกตัวอยู่ของอนุภาคคาร์บอนในระหว่างกลางในโมเลกุลของlipids การเข้าใจถึงความรู้เหล่านี้ไม่เพียงแต่ช่วยให้รู้ถึงอันตรายของอนุภาคคาร์บอนเท่านั้น แต่ยังช่วยให้เราพัฒนาเทคนิคการนำส่งยารักษาโรคโดยใช้อนุภาคนาโนเป็นตัวกลางอีกด้วย ซึ่งสำหรับการพัฒนาเทคโนโลยีในอนาคตนั้น มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องใช้ความรู้พื้นฐานเหล่านี้เพื่อนำไปต่อยอดและพัฒนาขึ้นมาเป็นองค์ความรู้ใหม่



รูปที่ 3 แบบจำลองของ alveolus ซึ่งมี lung surfactant อยู่ด้านในซึ่งมีประกอบด้วย lipid monolayer

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

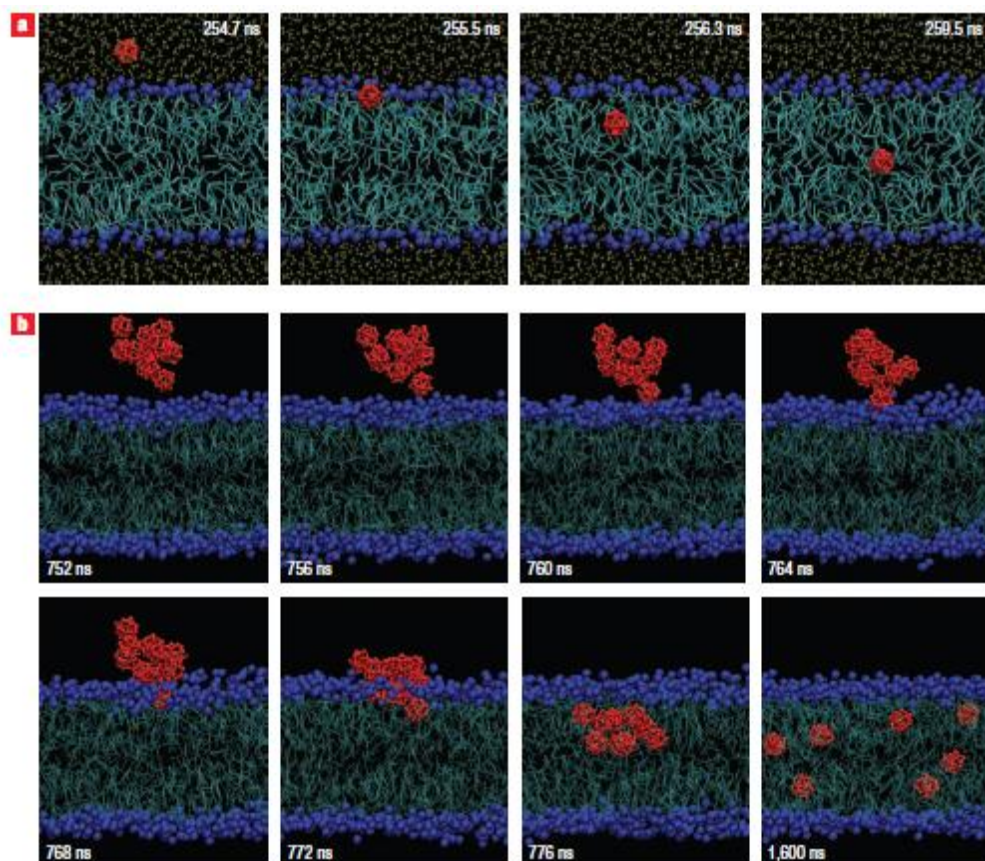


รูปที่ 1 เปรียบเทียบ ระหว่าง all-atom lipid(A) and coarse-grained lipid model(B)

[<http://md.chem.rug.nl/~marrink/science.html>]

ช่วงเวลากว่าสิบปีที่ผ่านมา coarse-grained molecular dynamics simulation(รูปที่ 1) [Marrink et al., J Phys. Chem. B 2004][Chu et al. Mol. Sim. 2006] ได้รับความสนใจ และถูกนำพัฒนามาใช้ในการศึกษาระบบในระดับนาโนเป็นอย่างมากเนื่องจากข้อจำกัดของในการคำนวณของระบบแบบ all-atom molecular dynamics simulation ซึ่งไม่สามารถนำมาใช้อธิบายปรากฏการบางอย่างซึ่งเกิดขึ้นในช่วงของlong time scale and large system size [Chang et al., J phys chem. B 2006] โดยแบบจำลองcoarse-grained ที่ได้รับความนิยมอย่างมากได้ออกแบบและพัฒนาโดย Prof. S. Marrink [Marrink J Phys. Chem. B 2004] [Marrink J Phys. Chem. B 2007][Monticelli J. Chem. Th. Comp., 2008] ซึ่งแบบจำลองนี้ได้ถูกนำมาใช้กับระบบของlipid bilayer ตลอดจนถึง protein และต่อมาก็ได้นำมาประยุกต์ใช้ศึกษาแบบจำลองของlipid monolayerโดยกลุ่มของ Prof. Tieleman [Bauokina et al., Langmuir 2007]. จากผลของการทำแบบจำลองนั้นเป็นที่น่าพอใจเพราะสามารถใช้ศึกษาและอธิบาย thermodynamics properties and phases ต่างๆ ของ lipid monolayerได้ นอกจากนั้นในกลุ่มวิจัยของ Prof. Tieleman ก็ได้มีการพัฒนาโมเดลของ carbon nanoparticle โดยมี Dr. L. Montecelli และ ข้าพเจ้าเป็นผู้ทำวิจัยหลัก ซึ่งได้ใช้แบบจำลองทางโมเลกุลนี้ในการศึกษาเกี่ยวกับการInteractions ของ

carbon nanoparticles กับ lipid bilayer และได้ตีพิมพ์ในวารสาร Nature nanotechnology [Wong-ekkabut et al., Nature Nanotech., 2008] ซึ่งค่อนข้างเป็นที่ยอมรับอย่างมากในกลุ่มงานวิจัยด้านนาโนเทคโนโลยีโดยผลงานฉบับนี้ได้รับการอ้างอิงถึง 31 ครั้ง ภายในระยะเวลาเกือบสองปี ที่ผ่านมาโดยการศึกษาชิ้นนี้ได้เน้นที่จะศึกษาถึงผลกระทบของ carbon nanoparticle ต่อ lipid bilayer (รูปที่ 2) และผลการทำแบบจำลองแสดงให้เห็นว่า carbon nanoparticle สามารถเคลื่อนที่ผ่านเข้าสู่ bilayer ได้โดยง่ายเป็นลักษณะของแบบ passive transport ทั้งที่ carbon nanoparticle จะอยู่ในรูปของ aggregated form นอกจากนี้ผลของแบบจำลองได้แสดงต่อให้เห็นอีกว่า carbon nanoparticle เมื่อแทรกตัวในชั้นของ bilayer นั้นโดยไม่ก่อให้เกิดความเสียหายบน lipid membrane แม้ว่า carbon nanoparticle ที่แทรกตัวนั้นจะมีเป็นจำนวนมาก(no physical damage of lipid bilayer from high concentration of C60)



รูปที่ 2 การแทรกตัวของ carbon nanoparticle (ลูกบอลสีแดง) ผ่านเข้าไปใน lipid bilayer ลูกบอลสีเทาน้ำเงิน[Wong-ekkabut et al., Nature Nanotech 2008]

และในหนึ่งปีถัดมาผลจากแบบจำลองนี้ก็ได้รับการพิสูจน์และยืนยันด้วยผลการทดลอง[Wang et al., chemphyschem, 2009] ถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาระบบของcarbon nanoparticle กับ lipid bilayerไปแล้ว แต่ระบบของ monolayer นั้นยังไม่ได้มีการศึกษามากนัก โดยเมื่อไม่นานมานี้ กลุ่มของ A. Violi [Choe et al., Biophysics J, 2008] ได้ใช้ all-atom simulation ศึกษาการInteracting between carbon nanoparticle กับ lipid monolayer และดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้นเกี่ยวกับข้อจำกัดของ all-atom simulation ซึ่งการคำนวณนั้นค่อนข้างละเอียดและใช้เวลานาน จึงอาจจะไม่สามารถศึกษาดynamics และequilibrium properties ได้ เพราะไม่มีsampling ที่มากพอ ซึ่งจะค่อนข้างยากในการนำมาเปรียบเทียบกับผลการทดลองจริง ดังนั้นการศึกษาที่ใช้ coarse-grained model นั้น จะช่วยเพิ่มความแม่นยำและถูกต้องในการคำนวณ และในการศึกษานี้จะให้เห็นคุณสมบัติของlipid monolayer ที่จะเปลี่ยนแปลงเนื่องจาก carbon nanoparticle และจะให้เห็นปรากฏการณ์ต่างๆก่อนที่ทำการทดลองจริงในห้องทดลอง และจะได้ความรู้ที่ได้มาเป็นข้อมูลในการศึกษาต่อผลกระทบของอนุภาคนาโนต่อปอด ทั้งนี้อาจรวมไปถึงการนำความรู้ที่ได้นั้นไปประยุกต์ใช้กับนาโนเทคโนโลยีในอนาคตซึ่งเกี่ยวกับด้านการนำส่งยาผ่านทางถุงลมปอดโดยมี carbon nanoparticles เป็นตัวกลางโดยองค์ความรู้เหล่านี้มีความสำคัญและจำเป็นอย่างมากกับการพัฒนาเทคโนโลยีในยุคต่อไป

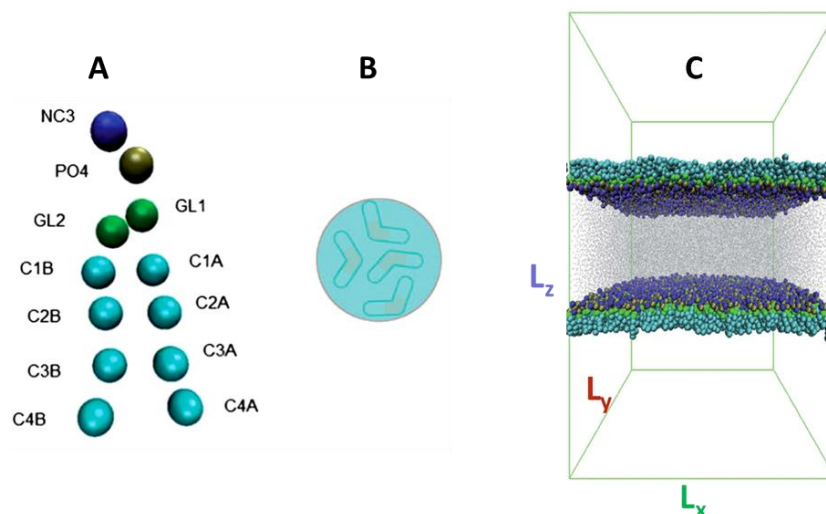
บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การจำลองระบบ (General system setup)

ในงานวิจัยนี้ใช้แบบจำลองเชิงโมเลกุลที่เป็น coarse-grained model ประกอบด้วยโครงสร้างไขมันชั้นเดียว(lipid monolayer) ที่มีฟอสโฟลิปิดชื่อว่า Dipalmitoyl-phosphatidylcholine(DPPC) เป็นองค์ประกอบ โดยมีน้ำคั่นกลางระหว่างไขมันชั้นเดียว ดังแสดงรูปภาพที่ 1 การศึกษาผลฟลูเออรินในโครงสร้างไขมันชั้นเดียวทำได้โดยการใส่ฟลูเออรินที่ความเข้มข้นต่างๆคือ 0%, 10%, 20% และ 30% ข้อมูลดังกล่าวแสดงในตารางที่ 1 ในการจำลองโครงสร้างของไขมันชั้นเดียวและฟลูเออรินจะจำกัดให้มีปริมาตรคงที่ โดยปรับเปลี่ยนขนาดกล่องของระบบนั้นคือพื้นที่ต่อโมเลกุลไขมันตั้งแต่ $0.48 - 0.68 \text{ nm}^2$ และสามารถแบ่งขอบเขตของโครงสร้างไขมันชั้นเดียวได้เป็น 3 สถานะ คือ liquid-expanded (LE) phase ที่มี pore , liquid-expanded (LE) phase และ liquid-condensed (LC) phase

จากนั้นคำนวณเพื่อลดพลังงาน(energy minimization) และ ทำการคำนวณโดยใช้เทคนิค molecular dynamics simulation เป็นเวลา 500-1000 นาโนวินาที ด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ประสิทธิภาพสูง แล้วนำผลมาคำนวณที่เพื่อวิเคราะห์หาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ และเปรียบเทียบผลจากการคำนวณกับการทดลองที่ทำได้



รูปที่ 1 (A) โมเลกุลไขมัน DPPC (B)โมเลกุลของน้ำ และ (C) โครงสร้างของระบบไขมันชั้นเดียว

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนโมเลกุลของระบบ (* แทนระบบที่ใช้เวลาในการจำลอง 10 μ s)

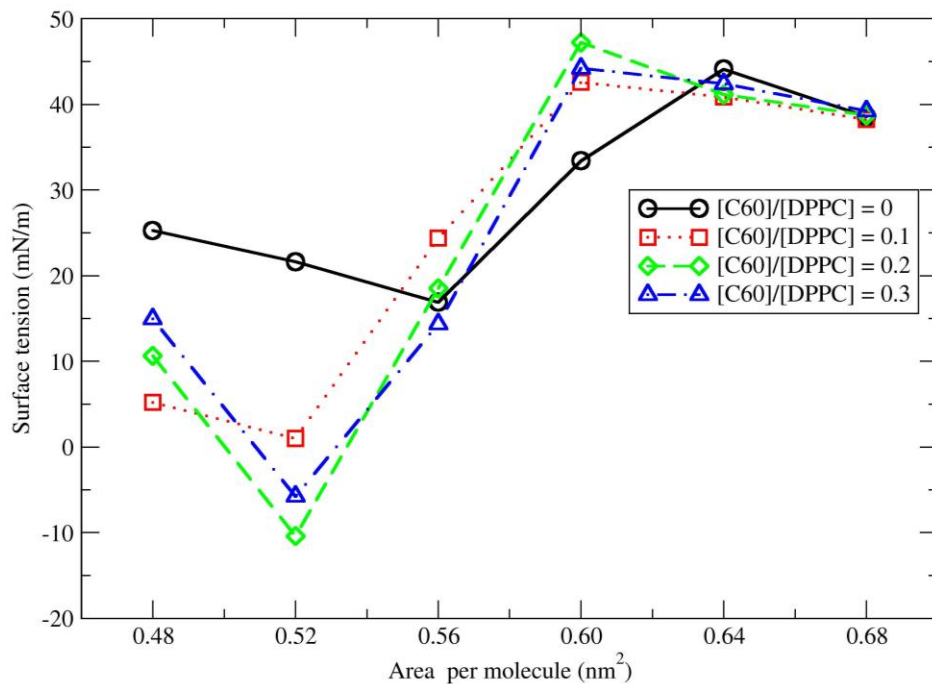
Concentration of fullerene	Components of molecules			The box size of system (nm ²)					
	DPPC	Fullerene	Water	0.48	0.52	0.56	0.60	0.64	0.68
No fullerene	800	-	26416	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	3200	-	105664	✓	-	-	-	-	-
10%	728	72	26416	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	2912	288	105664	✓	-	-	-	-	-
20%	664	136	26416	✓*	✓*	✓	✓	✓	✓
	2656	544	105664	✓*	-	-	-	-	-
30%	616	184	26416	✓*	✓*	✓	✓	✓	✓
	2464	736	105664	✓*	-	-	-	-	-

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

4.1 ผลของฟลูออรีนในโครงสร้างไขมันชั้นเดียว

การศึกษาผลของฟลูออรีนในไขมันชั้นเดียว สามารถวิเคราะห์ได้จากแรงตึงผิว (surface tension) เนื่องจากเป็นตัวแปรสำคัญในการกำหนดสมบัติเชิงโครงสร้างของไขมันชั้นเดียว เพื่อศึกษาลักษณะดังกล่าว เราได้จำลองระบบที่มีจำนวนโมเลกุลเท่ากับ 400 โมเลกุลต่อไขมันชั้นเดียว และมีความเข้มข้นของฟลูออรีนเท่ากับ 0%, 10%, 20% และ 30% โดยมีพื้นที่ต่อโมเลกุล A เท่ากับ 0.48, 0.52, 0.56, 0.60, 0.64 และ 0.68 nm² ข้อมูลดังกล่าวแสดงไว้ในตารางที่ 1



รูปที่ 1 แสดง Tension-area isotherm ของไขมันชั้นเดียวเมื่อมีฟลูออรีน [C60]/[DPPC] ที่ความเข้มข้นต่างๆ

แรงตึงผิว γ_m ของไขมันชั้นเดียวคำนวณได้จากแรงตึงผิวเฉลี่ยทั้งหมดของระบบ ซึ่งมาจากผลต่างของความดันที่ผิวด้านข้างของกล่อง P_L และความดันภายในกล่อง P_N ดังสมการ

$$\gamma_m = \langle (P_N - P_L) \cdot L_Z \rangle / 2 \quad (1)$$

เมื่อ L_z คือขนาดของกล่องในทิศทางแกน Z และ P_L มีค่าเท่ากับ $(P_{xx} + P_{yy})/2$ และสัญลักษณ์แบรคเกตหมายถึงค่าเฉลี่ยของเวลาทั้งหมดในระบบ [Bauokina et al., Langmuir 2007].

จากรูปที่ 1 แต่ละจุดของ Tension-area isotherm ได้จากการจำลองระบบที่ใช้เวลาอย่างน้อย $5 \mu s$ พบว่าค่าแรงตึงผิวของระบบที่มีไขมันชั้นเดียวบริสุทธิ์สอดคล้องกับการศึกษาของ [Bauokina et al., Langmuir 2007]. นั่นคือโครงสร้างของไขมันชั้นเดียวที่ขนาดพื้นที่ต่างๆจะมีลักษณะรูปร่างแบน โดยมีค่าแรงตึงผิวมากที่สุดที่พื้นที่ต่อโมเลกุล 0.64 nm^2 เท่ากับ $44.01 \pm 0.01 \text{ mN/m}$ และค่าน้อยสุดที่พื้นที่ต่อโมเลกุล 0.56 nm^2 เท่ากับ $16.09 \pm 0.03 \text{ mN/m}$ ซึ่งค่าเหล่านี้สามารถแบ่งขอบเขตไขมันชั้นเดียวได้เป็น 3 สถานะคือ

1. liquid-expanded (LE) phase ที่มี pore (0.68 nm^2)
2. liquid-expanded (LE) phase ($0.56\text{-}0.64 \text{ nm}^2$)
3. liquid-condensed (LC) phase ($0.48\text{-}0.52 \text{ nm}^2$)

สำหรับระบบไขมันชั้นเดียวที่มีฟลูออรีน ค่าแรงตึงผิวมากที่สุดจะอยู่ที่พื้นที่ต่อโมเลกุลเท่ากับ 0.60 nm^2 และค่าน้อยสุดอยู่ที่พื้นที่ต่อโมเลกุลเท่ากับ 0.52 nm^2 และแบ่งขอบเขตไขมันชั้นเดียวได้เป็น 3 สถานะได้เช่นกัน คือ

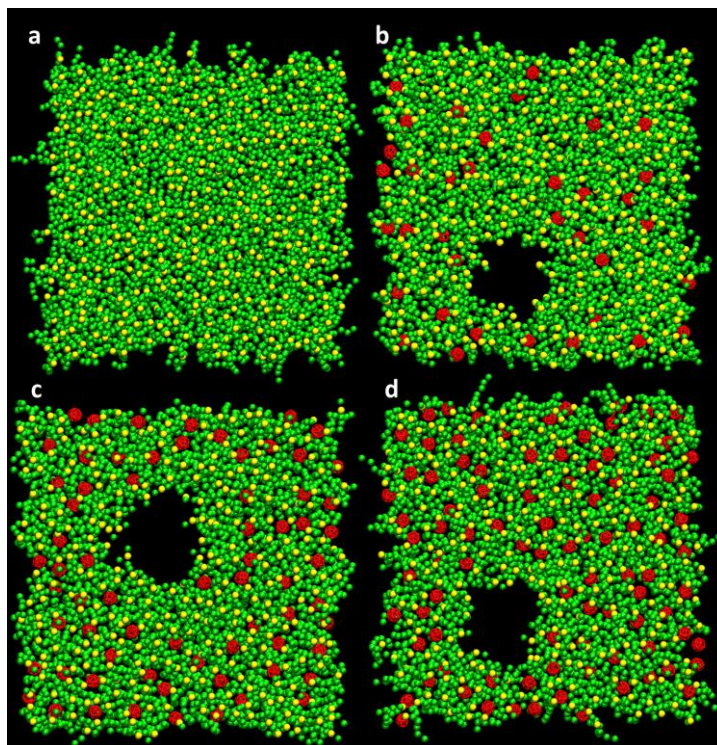
1. liquid-expanded (LE) phase ที่มี pore ($0.64\text{-}0.68 \text{ nm}^2$)
2. liquid-expanded (LE) phase ($0.52\text{-}0.60 \text{ nm}^2$)
3. liquid-condensed (LC) phase (0.48 nm^2)

เมื่อขนาดพื้นที่ต่อโมเลกุลของระบบมากกว่า 0.54 nm^2 โครงสร้างไขมันชั้นเดียวจะมีลักษณะรูปร่างแบนและฟลูออรีนจะเข้าไปกระจายตัวในบริเวณส่วนหางของไขมัน (lipid tail) นอกจากนี้ระบบที่มีพื้นที่ต่อโมเลกุลเท่ากับ 0.64 nm^2 และ 0.68 nm^2 พบว่าเกิดรูรั่ว (pore formation) ที่ไขมันชั้นเดียวซึ่งแสดงในรูปที่ 2 แต่สำหรับระบบที่มีพื้นที่ต่อโมเลกุลเท่ากับ 0.52 nm^2 ในกรณีที่มีความเข้มข้นของฟลูออรีนเท่ากับ 20% และ 30% ทำให้ผลของค่าแรงตึงผิวของฟลูออรีนและไขมันชั้นเดียวมีค่าลดลงจนติดลบ ส่งผลให้โครงสร้างของไขมันชั้นเดียวไม่เสถียร [Bauokina et al., Langmuir 2007]. และเกิดการโค้งงอ (bend) ซึ่งแอมพลิจูดของการโค้งนั้นจะมากขึ้นตามความเข้มข้นของฟลู

เลอริน อย่างไรก็ตามการเกิดลักษณะดังกล่าวไม่ได้ทำให้ไขมันชั้นเดียวเกิดการยุบตัวลง (collapse)

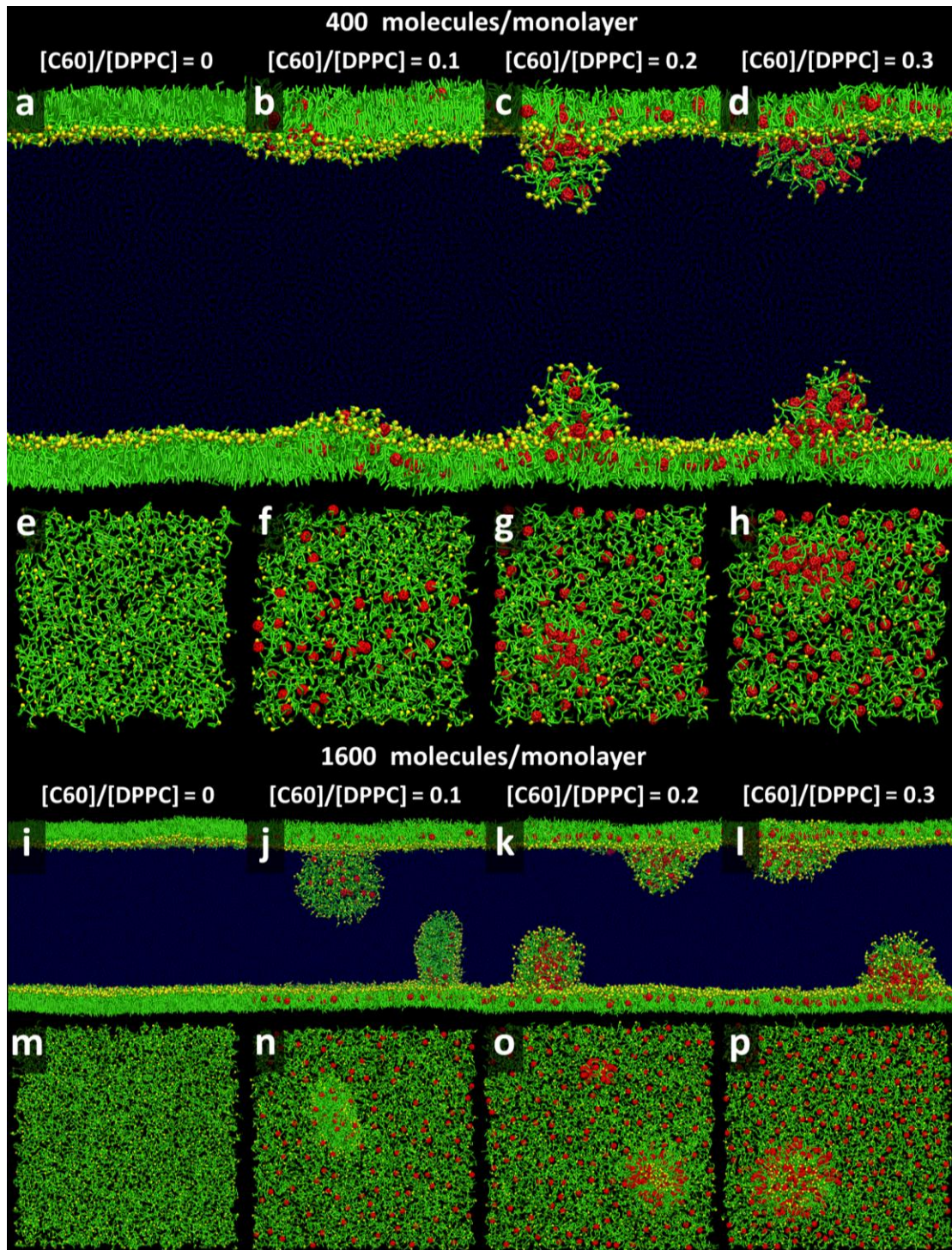
ในกรณีที่พื้นที่ต่อโมเลกุลเท่ากับ 0.48 nm^2 พบว่าโมเลกุลไขมันเคลื่อนที่ออกไปอยู่ในเฟสของน้ำ จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ไขมันชั้นเดียวยุบตัวลง แล้วเกิดการทบกัน (fold) เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างเป็นไขมันสองชั้น (lipid bilayer) ลักษณะดังกล่าวเกิดในระบบที่มีความเข้มข้นของฟลูเลอรินเท่ากับ 20% และ 30% ดังแสดงรูปภาพที่ 3 หลังจากโมเลกุลไขมันเรียงตัวเป็นสองชั้นแล้ว แรงดึงดูดจะมีค่าเพิ่มขึ้นดังแสดงในรูปที่ 1

การศึกษากลไกการยุบตัวของไขมันชั้นเดียวที่เกิดจากขนาดของระบบนั้น เราได้จำลองระบบขนาดใหญ่ที่มีจำนวนโมเลกุลเท่ากับ 1600 โมเลกุลต่อไขมันชั้นเดียวโดยมีพื้นที่ต่อโมเลกุลเป็น 0.48 nm^2 และมีความเข้มข้นของฟลูเลอรินเท่ากับ 0%, 10%, 20% และ 30% พบว่าไขมันสองชั้นเกิดการทบกันในระบบที่มีฟลูเลอรินเท่านั้นดังรูปที่ 3 เมื่อเทียบกับระบบที่มีขนาดเล็ก นั่นคือมีจำนวนโมเลกุลเพียง 400 โมเลกุลต่อไขมันชั้นเดียว พบว่า ในกรณีที่มีความเข้มข้นของฟลูเลอริน 0.1 มีการเกิดลักษณะไขมันสองชั้นอย่างรวดเร็ว และมีรูปร่างเป็นครึ่งวงรี (semielliptical) โดยทิศทางนั้นเกือบจะตั้งฉากกับไขมันชั้นเดียว แต่สำหรับระบบที่มีความเข้มข้นเป็น 20% และ 30% ไขมันสองชั้นมีรูปร่างเป็นครึ่งวงกลม (hemisphere) ดังรูปภาพที่ 3



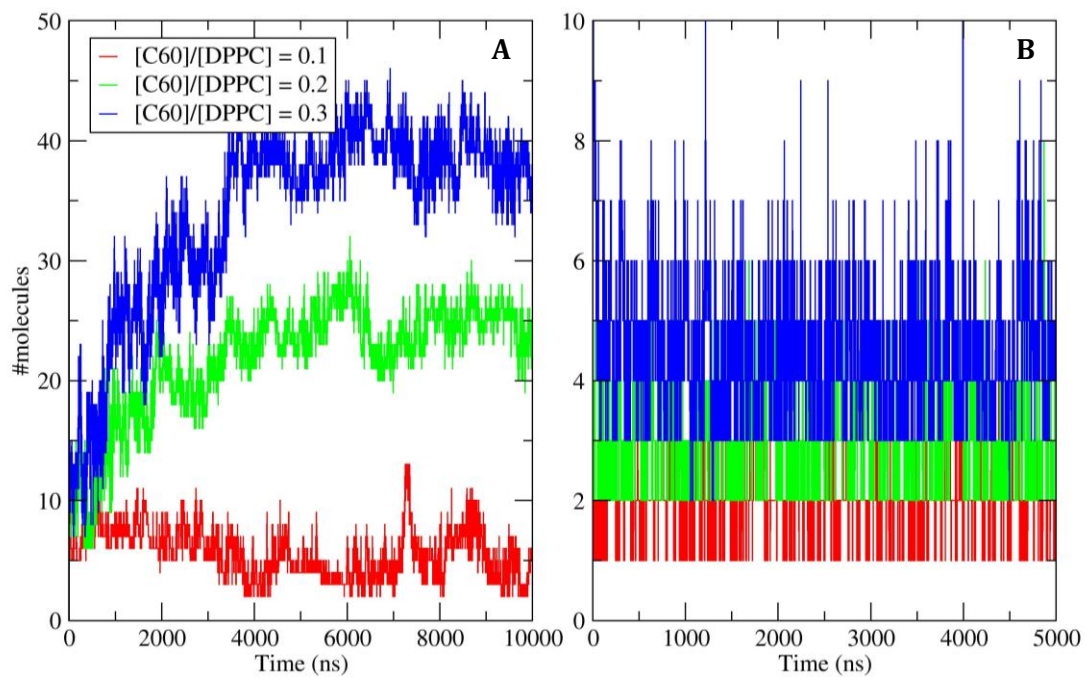
รูปที่ 2 แสดงการเกิดรูรั่ว (pore formation) ในระบบที่มีพื้นที่ต่อโมเลกุลเท่ากับ 0.64 nm^2 ที่

ความเข้มข้นของฟลูออรีนต่างๆ (a) 0%, (b) 10%, (c) 20% และ (d) 30% สีเขียวแทน
โมเลกุลไขมัน DPPC, สีเหลืองแทนส่วนหัวของไขมัน, สีแดงแทนฟลูออรีน

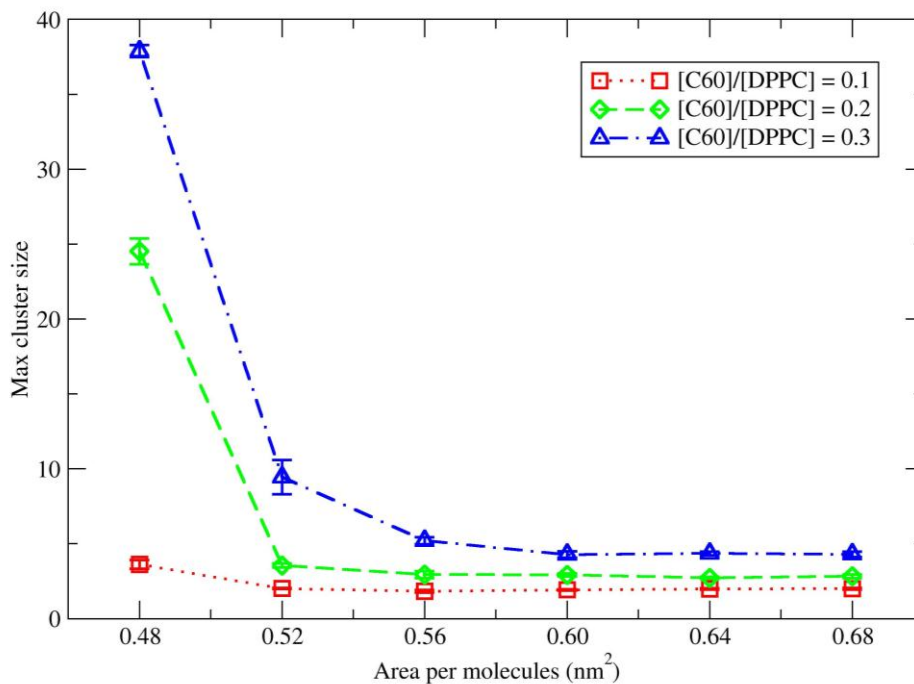


รูปที่ 3 แสดงระบบไขมันชั้นเดียวที่พื้นที่ต่อโมเลกุลเท่ากับ 0.48 nm^2 ที่ความเข้มข้นของฟลูออรีน 0%, 10%, 20% และ 30% โดยมีจำนวนโมเลกุลต่างๆ (a-h) 400 โมเลกุลต่อไขมันชั้นเดียว, (i-p) 1600 โมเลกุลต่อไขมันชั้นเดียว สีแดงแทนฟลูออรีน, สีเขียวแทนโมเลกุลไขมัน และสีน้ำเงินแทนโมเลกุลน้ำ

4.2 การรวมกลุ่มฟูลเลอร์ในไขมันชั้นเดียว (The Aggregation of Fullerenes in Monolayer)



รูปที่ 4 แสดงการรวมกลุ่มฟูลเลอร์ขนาดใหญ่ซึ่งเป็นฟังก์ชันของเวลาในระบบที่มีความเข้มข้นของฟูลเลอร์ 0%, 10%, 20% และ 30% ที่พื้นที่ต่อโมเลกุลเท่ากับ (A) 0.48 nm^2 (B) 0.60 nm^2

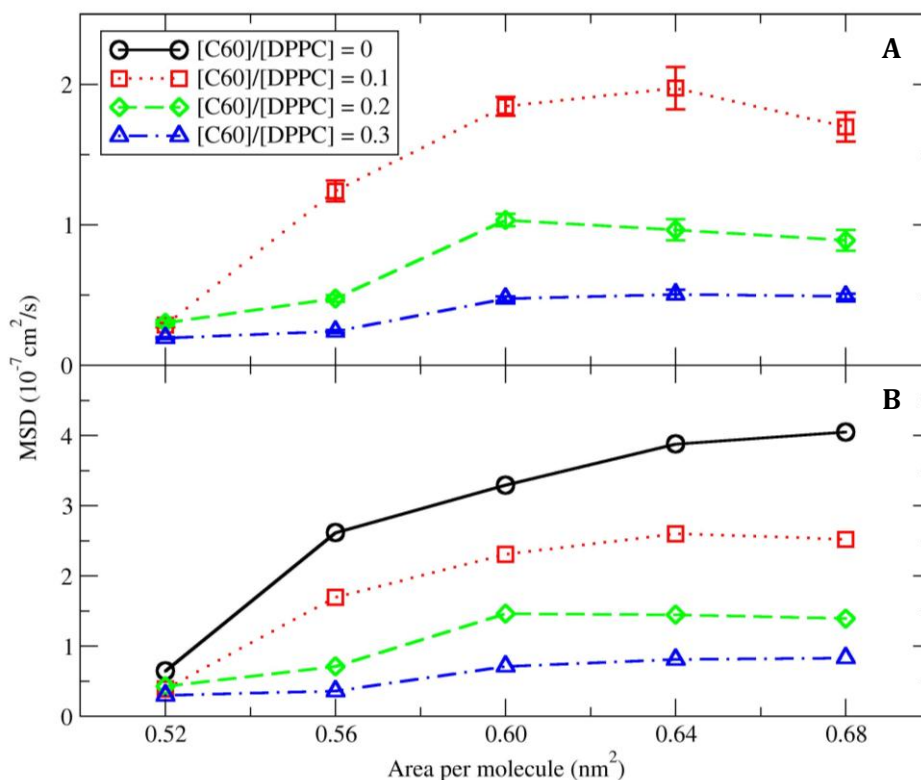


รูปที่ 5 ค่าเฉลี่ยของกลุ่มฟลูออรีนขนาดใหญ่ที่เป็นฟังก์ชันตามพื้นที่ต่อโมเลกุลไขมัน

การพิจารณาพฤติกรรมของฟลูออรีนในไขมันชั้นเดียว สังเกตได้จากการรวมกลุ่มฟลูออรีนขนาดใหญ่ดังรูปภาพที่ 4 ซึ่งคำนวณได้จากระยะห่างที่น้อยสุดระหว่างฟลูออรีนโดยเลือกระยะห่าง (cutoff-distance) เท่ากับ 0.5 nm. พบว่า ในช่วงแรกๆฟลูออรีนจะรวมกลุ่มกันอย่างรวดเร็ว เมื่อเวลาผ่านไป 5 μ s ทำให้โครงสร้างเสถียร ในกรณีที่เป็นสถานะ LE phase ที่พื้นที่ต่อโมเลกุล 0.60 nm² กลุ่มฟลูออรีนค่อนข้างเสถียรในระบบที่มีความเข้มข้นของฟลูออรีนมาก ([C60]/[DPPC] = 0.3) และเราได้คำนวณค่าเฉลี่ยของกลุ่มฟลูออรีนขนาดใหญ่ที่เสถียรดังรูปภาพที่ 5 จากผลที่ได้พบว่าพบค่าเฉลี่ยจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของฟลูออรีน นั่นคือที่ความเข้มข้น 30% จะมีค่าเฉลี่ยของกลุ่มฟลูออรีนมากที่สุด และค่าดังกล่าวจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อไขมันชั้นเดียวเปลี่ยนสถานะจาก LC เป็น LE phase

4.3 สัมประสิทธิ์การแพร่ในระนาบ (The Diffusion Coefficient)

ค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ด้านข้าง(D) (lateral Diffusion) ของโมเลกุลไขมันสามารถคำนวณได้จากระยะทางเฉลี่ยกำลังสอง (Mean square displacement, MSD) ของโมเลกุลที่เป็นฟังก์ชันของเวลา ตามความสัมพันธ์ของไอส์ไตน์ $\langle r^2 \rangle = 4Dt$



รูปที่ 6 แสดงสัมประสิทธิ์การแพร่ของ (A) ฟลูออรีน และ (B) ไขมัน DPPC ที่เป็นฟังก์ชันของพื้นที่ต่อโมเลกุล

จากรูปภาพที่ 6 แสดงถึงค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ด้านข้างของไขมันชั้นเดียวสำหรับระบบที่มีไขมันบริสุทธิ์พบว่า ค่าดังกล่าวจะเพิ่มขึ้นตามจำนวนพื้นที่ต่อโมเลกุล อีกทั้งผลที่ได้ยังสอดคล้องกับการทดลองของ [Bauokina et al., Langmuir 2007] แต่ในกรณีไขมันชั้นเดียวที่มีสถานะ LE phase พบว่าค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ลดลงเมื่อมีฟลูออรีนแทรกตัวอยู่ในไขมันชั้นเดียว อย่างไรก็ตาม ผลที่ได้จากระบบที่อยู่ในสถานะ LC phase ($A=0.48 \text{ nm}^2$) พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์การแพร่มากขึ้นตามความเข้มข้นของฟลูออรีน

ในการพิจารณาการเคลื่อนที่ของฟลูออรีน เราได้คำนวณสัมประสิทธิ์การแพร่ของฟลูออรีนในช่วงเวลายาวๆ พบว่า หากเปลี่ยนความเข้มข้นของฟลูออรีนและพื้นที่ของระบบ โมเลกุลไขมันยังคงมีพฤติกรรมที่เหมือนกันในทุกๆระบบ สังเกตได้จากการที่ฟลูออรีนนั่นเคลื่อนไหวช้ากว่าโมเลกุลไขมันดังแสดงรูปที่ 6

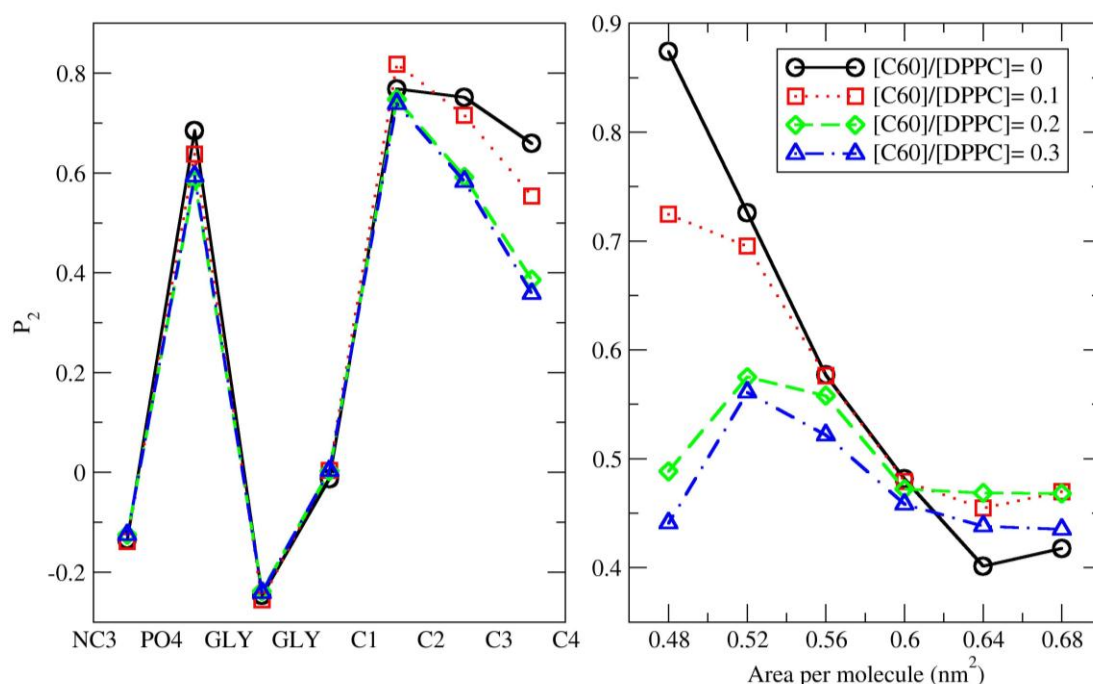
4.5 ความเป็นระเบียบของโมเลกุลไขมัน (Lipid bond order parameter)

พันธะของโมเลกุลไขมันมีความยืดหยุ่นและมีโครงสร้างที่ขึ้นกับความยาวของสายไฮโดรคาร์บอน ค่าความเป็นระเบียบของพันธะระหว่างอนุภาคที่เป็น coarse grain (CG) หาได้จากสมการดังนี้

$$P_2 = \frac{1}{2} \langle 3 \cos^2 \theta - 1 \rangle \quad (2)$$

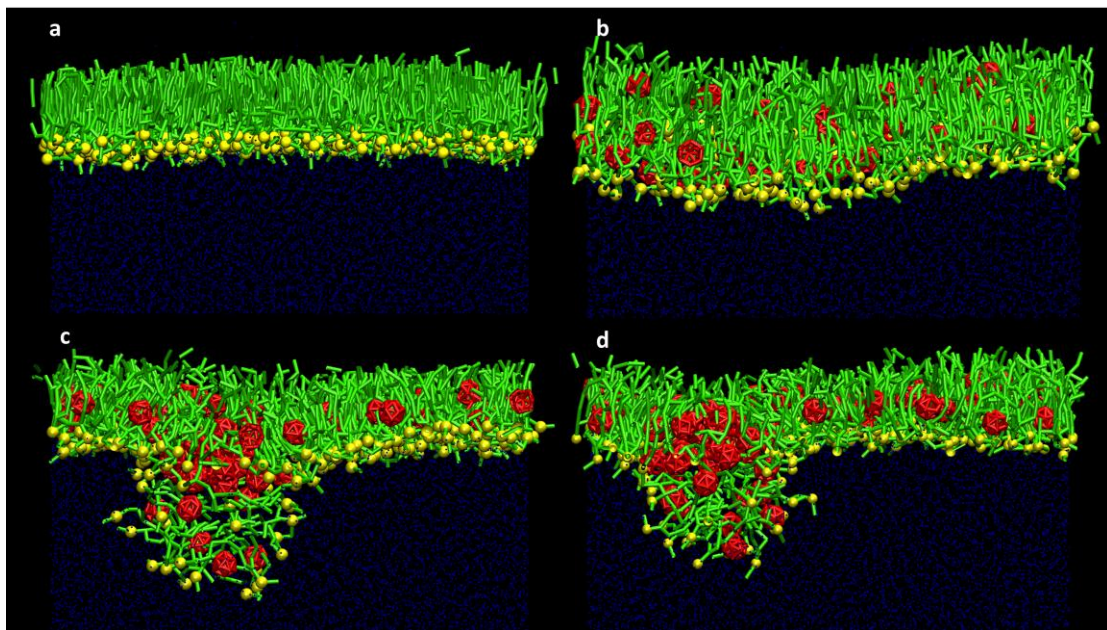
เมื่อ θ คือมุมระหว่างทิศทางของพันธะและไขมันสองชั้น

ไขมันสองชั้นที่วางตัวในแนวเดียวกันมีค่า P_2 เท่ากับ 1 ในทางตรงข้ามที่ไม่อยู่ในแนวเดียวกันจะมีค่า P_2 เท่ากับ -0.5 และการวางตัวแบบสุ่ม P_2 เท่ากับ 0 ดังนั้นความเป็นระเบียบของพันธะระหว่างอนุภาค CG ที่ประกอบด้วยโมเลกุลไขมัน DPPC ซึ่งมีทั้งส่วนที่เป็นหัวและส่วนที่เป็นสายไฮโดรคาร์บอนแสดงไว้ในรูปที่ 7



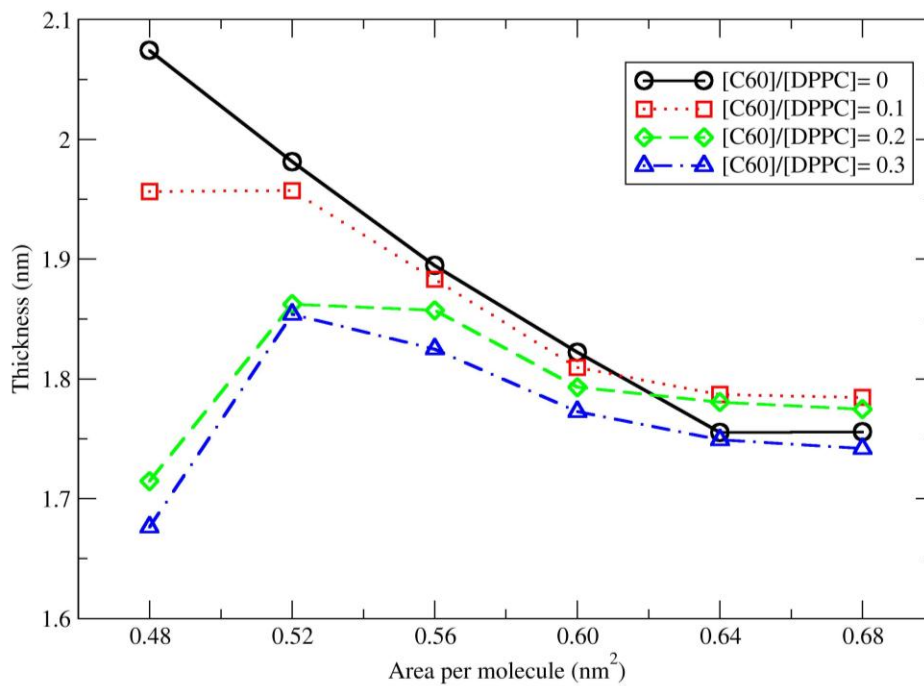
รูปที่ 7 (A) ค่าความเป็นระเบียบของพันธะระหว่างอนุภาค coarse-grain ที่พื้นที่ต่อโมเลกุล เท่ากับ 0.48 nm^2 (B) ค่าเฉลี่ยของความเป็นระเบียบของพันธะระหว่าง C1-C2, C2-C3 และ C3-C4 ที่เป็นฟังก์ชันของพื้นที่ต่อโมเลกุลต่างๆ

เนื่องจากฟลูเลอรินชอบอยู่บริเวณส่วนหางของไขมัน ทำให้ตำแหน่งส่วนหัวของโมเลกุลไขมันเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเมื่อมีความเข้มข้นของฟลูเลอรินต่างกัน ดังนั้นการแทรกตัวของฟลูเลอรินในไขมันชั้นเดียวสามารถสังเกตได้ในบริเวณส่วนหางของไขมัน โดยเฉพาะโมเลกุลสุดท้ายที่อยู่ในสายไฮโดรคาร์บอน ดังแสดงรูปที่ 7 พบว่า เมื่อความเข้มข้นของฟลูเลอรินมากขึ้นทำให้ค่าความเป็นระเบียบของไขมันลดลง จากผลดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้านี้ แสดงถึงอนุภาคนาโนสามารถยับยั้งการเปลี่ยนสถานะของไขมันชั้นเดียว [Lin, et al., Nanoscale, 2014] จากรูปที่ 8 แสดงให้เห็นว่าส่วนหางของไขมันไม่ยื่นออกในทิศทางของเมมเบรน แต่จะไปหุ้มโมเลกุลของฟลูเลอรินแทน เนื่องจากมีความเป็น strong dispersion interaction [Zhang et al., PLOSONe, 2013] และยังทำให้ความหนาของไขมันชั้นเดียวลดลงด้วย ดังแสดงในรูปที่ 9



รูปที่ 8 ภาพถ่ายของแบบจำลองไขมันชั้นเดียวที่มีความเข้มข้นของฟลูเลอรินต่างๆ

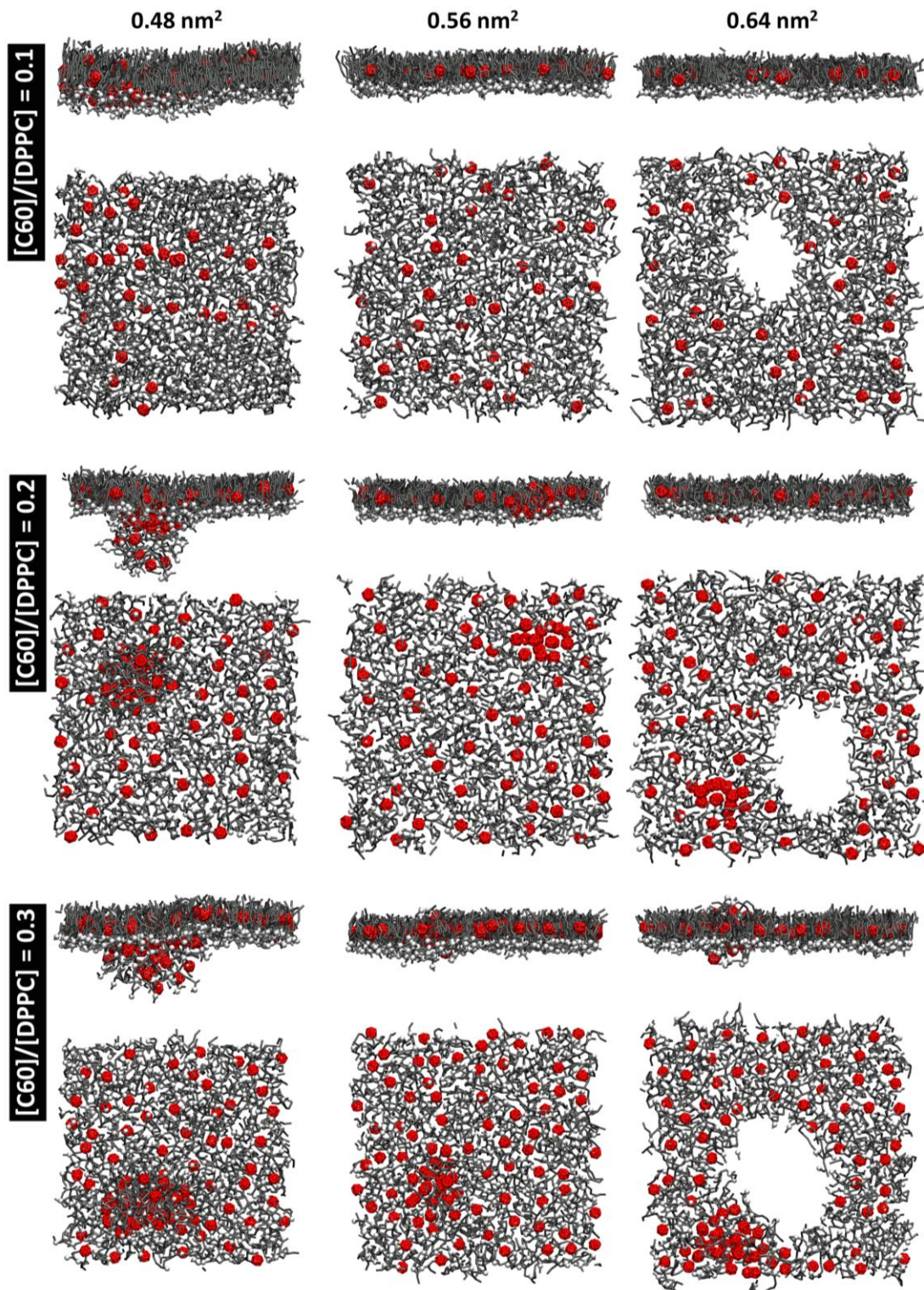
(A) 0%, (B) 10%, (C) 20% และ (D) 30%



รูปที่ 9 แสดงความหนาของไขมันชั้นเดียว ที่มาจากระยะห่างระหว่างจุดศูนย์กลางมวลของ NC3 และ C4A ในโมเลกุลไขมัน DPPC ที่เป็นฟังก์ชันของพื้นที่ต่อโมเลกุล โดยความเข้มข้นของฟลูออรีนเท่ากับ 0%, 10%, 20% และ 30%

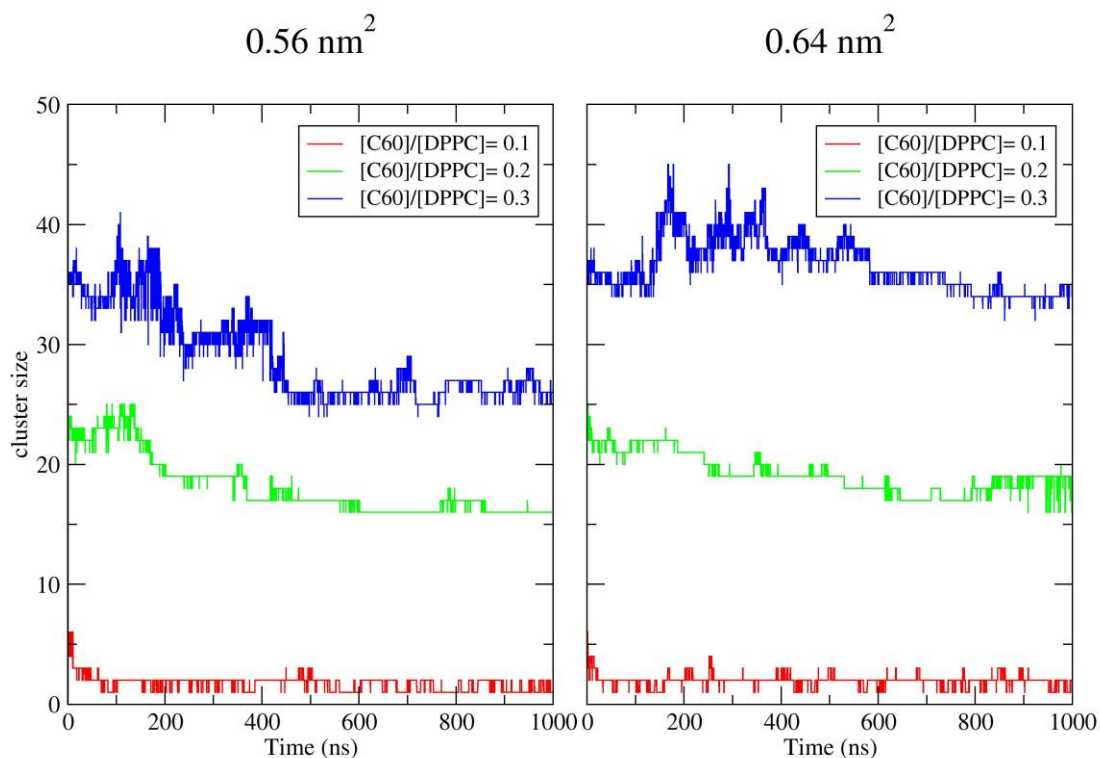
4.6 การเปลี่ยนโครงสร้างของไขมันสองชั้นเป็นไขมันชั้นเดียว (Bilayer-monolayer transitions)

พิจารณาการเปลี่ยนโครงสร้างจากไขมันสองชั้นเป็นไขมันชั้นเดียวจากการขยายขนาดของระบบ ทำได้โดยเปลี่ยนขนาดของกล่องในแนวแกน x (L_x) และแกน y (L_y) ในอัตราที่เท่ากัน และให้ขนาดของกล่องในแนวแกน z (L_z) มีค่าคงที่ กรณีระบบที่มีพื้นที่ 0.48 nm^2 ที่มีความเข้มข้นของฟลูออรีนต่างๆ ถูกขยายให้มีพื้นที่เพิ่มขึ้นเป็น 0.56 และ 0.64 nm^2 ด้วยอัตรา 0.264 nm/ns เมื่อระบบดังกล่าวขยายจนถึงขนาดพื้นที่ที่ต้องการแล้ว จึงใช้เวลาในการจำลอง $1 \mu\text{s}$ เพื่อให้ระบบเข้าสู่ภาวะสมดุล และให้ขนาดกล่องของระบบมีค่าคงที่



รูปที่ 10 ภาพถ่ายของระบบที่มีพื้นที่ต่อโมเลกุล 0.48 nm² ถูกขยายให้มีพื้นที่ต่อโมเลกุลเท่ากับ 0.56 nm² และ 0.64 nm² และเวลาในการจำลอง 1 μ s ระบบมีจำนวนโมเลกุล 400 โมเลกุล ต่อไขมันชั้นเดียวด้วยอัตราความเข้มข้นฟลูออรีนที่ 0, 0.1, 0.2 และ 0.3 สัญลักษณ์สี วงกลมสีขาวคือส่วนหัวของไขมัน สีเทาคือส่วนหางของไขมัน และสีแดงคือฟลูออรีน และโมเลกุลของน้ำไม่ได้แสดงไว้

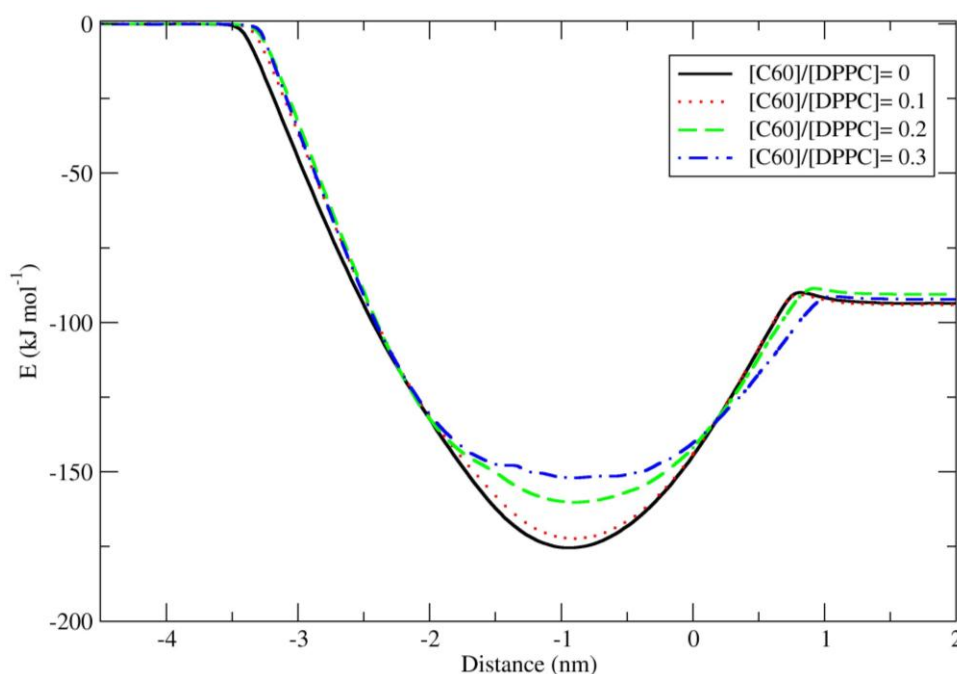
จากรูปที่ 10 แสดงกลไกการเปลี่ยนโครงสร้างของไขมันสองชั้นเป็นไขมันชั้นเดียวที่ความเข้มข้นของฟลูออรีนต่ำๆ และแสดงให้เห็นว่าฟลูออรีนเคลื่อนย้ายไปอยู่ในไขมันชั้นเดียว อย่างไรก็ตาม กรณีที่ระบบมีความเข้มข้นของฟลูออรีนสูงๆ กลุ่มฟลูออรีนนั้นจะกระจายตัวไม่รวมกลุ่มกันเพียงเล็กน้อย และถูกล้อมรอบด้วยโมเลกุลของไขมันซึ่งสังเกตได้จากรูปที่ 11 นอกจากนี้ลักษณะรูปร่างของไขมันชั้นเดียวเกิดได้ในระบบที่มีพื้นที่ต่อโมเลกุลไขมันเป็น 0.64 nm^2 เท่านั้น ยกเว้นระบบที่มีความเข้มข้นฟลูออรีนเท่ากับ 30% ที่พื้นที่ต่อโมเลกุลไขมัน 0.56 nm^2 พบว่าฟลูออรีนมีการรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนขนาดใหญ่ ซึ่งก่อให้เกิดลักษณะดังกล่าวในไขมันชั้นเดียวได้ จากผลที่ได้แสดงให้เห็นกลไกการแทรกตัวของกลุ่มฟลูออรีนในไขมันชั้นเดียวนั่นเอง



รูปที่ 11 แสดงกลุ่มของฟลูออรีนขนาดใหญ่ที่เป็นฟังก์ชันของเวลาในระบบที่ถูกขยายที่พื้นที่ต่อโมเลกุลเป็น 0.56 nm^2 และ 0.64 nm^2

4.7 Potential of mean force(PMF) profile

ในส่วนนี้เป็นการศึกษาพลังงานอิสระ (free energy) ของการเคลื่อนย้ายตำแหน่งฟลูออรีนจากสุญญากาศผ่านไขมันชั้นเดียวเข้าไปยังเฟสของน้ำ การคำนวณจะใช้ระเบียบวิธี umbrella sampling เพื่อให้ได้ PMF profiles ของฟลูออรีนที่ โดยพิจารณา ระบบที่มีความเข้มข้นของฟลูออรีนเป็น 0%, 10%, 20% และ 30% ซึ่งผลที่ได้คือ ค่าพลังงานต่ำสุด จะอยู่ในสถานะไขมันชั้นเดียว โดยระยะห่างระหว่างฟลูออรีนกับ PO4 ของโมเลกุลไขมัน DPPC มีค่าเท่ากับ -0.9 nm ดังแสดงรูปที่ 12



รูปที่ 12 แสดง Potential of mean force ของการเคลื่อนย้ายของฟลูออรีนจากสุญญากาศ ($z < -3.0$ nm) ผ่านไขมันชั้นเดียว ($-3.0 < z < 0.8$ nm) เข้าไปในน้ำ ($z > 0.8$ nm) ที่เป็นฟังก์ชันของระยะห่างจุดศูนย์กลางมวล Z ระหว่างฟลูออรีน และ PO4 ของไขมัน DPPC

ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าฟลูออรีนชอบเข้าไปกระจายตัวในไขมันชั้นเดียว โดยแต่ละระบบที่มีความเข้มข้นฟลูออรีนเป็น 0%, 10%, 20% และ 30% ให้ค่า free energy ของฟลูออรีนที่เคลื่อนย้ายจากสุญญากาศไปยังไขมันชั้นเดียว ($\Delta G_{\text{vacuum-monolayer}}$) เท่ากับ -175.4, -172.3, -160.2 และ -152.0 kJ/mol ตามลำดับและ

ค่า free energy ของฟลูออรีนที่เคลื่อนย้ายจากน้ำไปยังไขมันชั้นเดียว ($\Delta G_{\text{water-monolayer}}$) เท่ากับ -81.8, -78.3, -69.6 และ -59.8 kJ/mol ตามลำดับ ดังนั้นการเพิ่มความเข้มข้นของฟลูออรีนทำให้พลังงานอิสระมีค่ามากขึ้น และ energy barrier ที่เกิดขึ้นจากการเคลื่อนย้ายฟลูออรีนในเฟสของน้ำไปยังไขมันชั้นเดียวสามารถพิจารณาได้ในบริเวณพื้นที่ interface กันระหว่างน้ำกับไขมันชั้นเดียว ซึ่งค่า energy barrier ลดลงเมื่อความเข้มข้นของฟลูออรีนมากขึ้นดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงค่าของพลังงานอิสระในการเคลื่อนย้ายฟลูออรีนจากสุญญากาศไปยังไขมันชั้นเดียว, จากไขมันชั้นเดียวไปยังน้ำ และจากน้ำไปบริเวณส่วนหัวของโมเลกุลไขมัน

Free Energy (kJ/mol)	[C60]/[DPPC] ratios			
	0	0.1	0.2	0.3
$\Delta G_{\text{vacuum-monolayer}}$	-175.4	-172.3	-160.2	152.0
$\Delta G_{\text{water-monolayer}}$	-81.8	-78.3	-69.6	-59.8
$\Delta G_{\text{water-lipid head}}$	3.7	3.3	2.0	0.7

บทที่ 5

สรุป วิจารณ์ และข้อเสนอแนะ

ผลของฟลูออรีนในไขมันชั้นเดียวสามารถศึกษาได้จากแบบจำลองเชิงโมเลกุลที่เป็น coarse-grained model ผลจากการศึกษาพบว่าฟลูออรีนสามารถเข้าไปแทรกตัวในไขมันชั้นเดียวและชอบที่จะอยู่ในบริเวณส่วนหางของโมเลกุลไขมัน (lipid tail) การรวมกลุ่มของฟลูออรีนทำให้โครงสร้างไขมันชั้นเดียวเกิดการยุบตัว แล้วเปลี่ยนโครงสร้างเป็นไขมันสองชั้นซึ่งลักษณะดังกล่าวเกิดใน LC phase ในทางกลับกัน พบว่าโครงสร้างไขมันชั้นเดียวที่มีฟลูออรีนเกิด pore formation ใน LE phase จากผลดังกล่าวสามารถนำมาเป็นข้อมูลในการศึกษาผลกระทบของอนุภาคนาโนในปอด และอาจรวมไปถึงการนำไปประยุกต์ใช้กับนาโนเทคโนโลยีในอนาคต ที่เกี่ยวกับการนำส่งยาผ่านถุงลมปอดโดยมีอนุภาคนาโนคาร์บอนเป็นตัวกลาง โดยองค์ความรู้เหล่านี้ยังเป็นแนวทางในการพัฒนาเทคโนโลยีต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

1. S.J. Marrink, A.H. de Vries, A.E. Mark, Coarse grained model for semi-quantitative lipid simulations. *J. Phys. Chem. B*, **108**, 750-760, 2004
2. S.J. Marrink, H.J. Risselada, S. Yefimov, D.P. Tieleman, A.H. de Vries., The MARTINI forcefield: coarse grained model for biomolecular simulations., *J. Phys. Chem. B*, **111**, 7812-7824, 2007
3. J.-W. Chu, S. Izvekov, and G. A. Voth, "The Multiscale Challenge for Biomolecular Systems: Coarse-grained Modeling," *Mol. Sim.* **32**, 211-218 2006.
4. L. Monticelli, S.K. Kandasamy, X. Periole, R.G. Larson, D.P. Tieleman, S.J. Marrink., The MARTINI coarse-grained force field: extension to proteins. *J. Chem. Th. Comp.*, **4**, 819-834, 2008.
5. R. Chang., and A. Violi.. Insights into the effect of combustion generated carbon nanoparticles on biological membranes: a computer simulation. *J. Phys. Chem. B*. **110**, 5073–5083, 2006.
6. S. Baoukina, L. Monticelli, S.J. Marrink, D.P. Tieleman., The pressure-area isotherm of a lipid monolayer from molecular dynamics simulations., *Langmuir*, **23**, 12617-12623, 2007
7. J. Wong-ekkabut, S. Baoukina, W. Triampo, I-M. Tang, D. P. Tieleman, and L. Monticelli, Computer simulation study of fullerene translocation through lipid membranes, *Nature Nanotechnology*, **3**, 363-368, 2008
8. Z. Wang and S. Yang, Effects of Fullerenes on Phospholipid Membranes: A Langmuir Monolayer Study *chemphyschem*, **10**, 2284 – 2289, 2009
9. S. Choe, R. Chang, J. Jeon, A. Violi, Molecular Dynamics Simulation Study of a Pulmonary Surfactant Film Interacting with a Carbonaceous Nanoparticle, *Biophys. J.* **95**, 4102–4114, 2008

10. Lin, X.; Bai, T.; Zuob, Y. Y.; Gu, G., Promote potential applications of nanoparticles as respiratory drug carrier: insights from molecular dynamics simulations, *Nanoscale*, **6**, 2759-2767, 2014.
11. Zhang, S.; Mu, Y.; Zhang, J. Z.; Xu, W., Effect of self-assembly of fullerene nanoparticles on lipid membrane, *Plos One*, **8** (10), e77436, 2013