

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1. บทนำ

#### 1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

ปัจจุบันมีผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งมากขึ้นเรื่อย ๆ หลังการผ่าตัดผู้ป่วยเหล่านี้จะได้รับการรักษาโรคมะเร็งต่อโดยการให้ยาต้านมะเร็งในปริมาณมากผ่านทางเส้นเลือด ถึงแม้ว่ายาดังกล่าวจะสามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ แต่ก็จะทำให้ทำลายเซลล์ปกติได้ด้วยทำให้เกิดผลข้างเคียงซึ่งอาจมีอันตรายถึงชีวิตเช่นเกิดผลข้างเคียงในตับ, ไต, หัวใจ และอื่น ๆ อีกมาก ในปัจจุบันมีทางเลือกใหม่ในการให้ยาต้านมะเร็งโดยการให้ยาเฉพาะในส่วนที่เป็นมะเร็ง วิธีนี้ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าสามารถลดผลข้างเคียงได้ นอกจากนั้นการให้ยาในวิธีนี้ยังสามารถบำบัดมะเร็งที่อวัยวะบางส่วนซึ่งไม่สามารถบำบัดได้โดยวิธีปกติได้ดี เช่น ในสมอง เป็นต้น หลักการให้ยาต้านมะเร็งด้วยวิธีนี้คือยาจะถูกห่อหุ้มด้วยโพลิเมอร์ ซึ่งโพลิเมอร์มีลักษณะเป็นรูพรุนเพื่อให้ยาสามารถแพร่ออกมาได้ ซึ่งการแพร่และระยะเวลาการแพร่ของยาสามารถควบคุมได้ด้วยลักษณะโครงสร้างของรูพรุนและส่วนประกอบทางเคมีของโพลิเมอร์วิธีการนี้ทำให้ยาอยู่ในตัวผู้ป่วยได้นานขึ้นและได้รับการควบคุมดีมากยิ่งขึ้น โดยทั่วไปกลไกการควบคุมการปล่อยยาจะเกิดจากการควบคุมการแพร่ (Diffusion) และการออกแบบรูพรุนของโพลิเมอร์ซึ่งจะไปมีผลกับความสามารถของยาในการผ่านโพลิเมอร์และความเร็วในการแพร่ นอกจาก Diffusion แล้ว การสลายตัวของโพลิเมอร์ (degradation) ยังมีผลต่ออัตราการแพร่แต่ก็มีโพลิเมอร์บางชนิดที่จะปล่อยยาต่อเมื่อโพลิเมอร์นั้นอยู่ในสภาวะที่เหมาะสม ตัวอย่างเช่น Pluronic gel

สำหรับงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการนำเอา Pluronic F-127 ที่มีชื่อทางการค้าว่า Poloxamer มาใช้ในการปลดปล่อยยาต้านมะเร็งที่มีชื่อว่า Doxorubicin สำหรับ Poloxamer เป็นโพลิเมอร์ชนิด Tri-block copolymer (ABA) ซึ่งมีองค์ประกอบคือ ส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) คือ Poly(ethylene oxide) (PEO) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) คือ Poly(Propylene oxide) (PPO) ประกอบกันเป็น PEO-PPO-PEO มีมวลโมเลกุล 12600 ความสามารถในการละลายและความไม่มีพิษของ Poloxamer ทำให้มีความเหมาะสมสำหรับใช้ในการปลดปล่อยยาในร่างกายมนุษย์ สามารถย่อยสลายได้เองในร่างกายมนุษย์ และสามารถกำจัดออกจากร่างกายได้ด้วยระบบขับถ่าย แต่โพลิเมอร์ชนิดนี้มีข้อเสียคือ Pluronic F-127 สลายตัวได้เร็วเกินไป แต่เนื่องจากการนำระบบการปลดปล่อยยามาใช้นั้นควรมีคุณสมบัติในการให้ยาได้ยาวนาน เพื่อลดความถี่ในการให้

ยาสำหรับผู้ป่วย ซึ่งการยืดเวลาของระบบการปลดปล่อยยานี้ อาจทำได้โดยการผสมเจล Pluronic F-127 เข้ากับโพลิเมอร์ตัวอื่นๆ หรือที่เรียกว่า Grafted polymer เพื่อช่วยให้ระบบการปลดปล่อยยานี้ อยู่ในร่างกายมนุษย์ได้นานขึ้นและยังคงคุณสมบัติเดิมของเจล Pluronic F-127 ที่มีความเหมาะสมในการใช้เป็นตัวส่งยาเอาไว้

ในงานวิจัยนี้จึงได้มีการนำไคโตซานมาสังเคราะห์เป็นโคโพลิเมอร์กับ Pluronic F-127 เพื่อทำให้เกิดเป็น Pluronic F-127 grafted Chitosan copolymer โดยที่ไคโตซานจะเป็น backbone เรียกว่า Polymer matrix เนื่องจากไคโตซานมีคุณสมบัติสามารถย่อยสลายได้เองภายในร่างกาย ไม่เป็นอันตรายหาได้ง่ายและมีอัตราการย่อยสลายช้า (degradation rate) ดังนั้นโครงสร้างที่เป็นเมทริกซ์ของไคโตซานจะช่วยทำให้การสลายตัวของเจล Pluronic F-127 ช้าลงและสามารถทำให้ปลดปล่อยยา Doxorubicin ได้นานขึ้น ในการให้ยาด้วยวิธีนี้ยา Doxorubicin จะผสมกับ Pluronic ในลักษณะของเหลวที่อุณหภูมิต่ำ เมื่อส่วนผสมนี้ฉีดเข้าไปส่วนที่เป็นมะเร็งของคนไข้ Pluronic จะกลายเป็นเจลที่อุณหภูมิร่างกาย ดังนั้นคนไข้จึงไม่ต้องรับการผ่าตัดเพื่อฝังโพลิเมอร์ในส่วนที่เป็นมะเร็ง โมเลกุลของยาก็จะแพร่ออกมาจากรูพรุนอย่างช้าๆ ในลักษณะที่ถูกควบคุมเพื่อให้ยาอยู่ในร่างกายเป็นเวลานาน ดังนั้นคนไข้จึงไม่มีความจำเป็นที่จะได้รับยาบ่อยครั้ง โดยในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ Pluronic grafted Chitosan copolymer จะศึกษาถึงจลนศาสตร์ของการปลดปล่อยยา Doxorubicin จากเจล Pluronic-Chitosan (copolymer) และผลของยา Doxorubicin ที่มีผลต่อ copolymer ชนิดนี้ โดยจะเน้นศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการปลดปล่อยยา รวมทั้งสร้างเป็นสมการทางคณิตศาสตร์ขึ้นมาเพื่อทำนายการปลดปล่อยยา Doxorubicin

## 1.2 งานวิจัยที่ผ่านมา

จากงานวิจัยของ Thomas Freir และคณะ ที่ได้ทำการศึกษาลักษณะการสลายตัวของ Chitosan films ที่มี N-acetylation โดยศึกษาลักษณะการสลายตัวของ Chitosan films ด้วยวิธีทางชีวภาพ (biodegradation) ภายนอกในร่างกายมนุษย์ (In vitro) ในสารละลาย PBS (Phosphate Buffer Solution) ที่มีค่า pH เท่ากับ 7.4 และอุณหภูมิ 37 °C พบว่าการสลายตัวของ Chitosan films จะเกิดได้ประมาณ 50% ของฟิล์มเริ่มต้น ภายในระยะเวลา 4 สัปดาห์ และการสลายตัวจะเกิดได้น้อยลงเมื่อมีเปอร์เซ็นต์ของ acetylation สูงขึ้น นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาสมบัติความเป็น biocompatible (ความสามารถในการสลายตัวทางชีวภาพ) ของ Chitosan films ซึ่งพบว่า cell viability จะลดลง เมื่อมีเปอร์เซ็นต์ของ acetylation สูงขึ้น

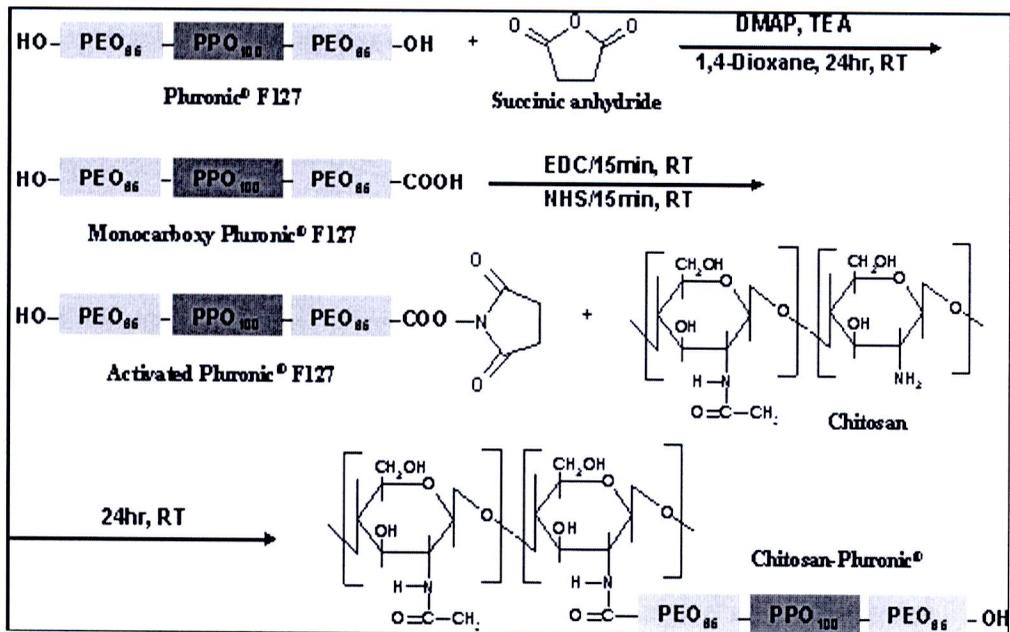
สำหรับในงานวิจัยของธีรยุทธและคณะ ที่ศึกษาเจล Pluronic® F-127 เพื่อใช้เป็นตัวปลดปล่อยยา Doxorubicin พบว่า Pluronic® F-127 มีคุณสมบัติในการเปลี่ยนกลับไปกลับมาได้ตาม

อุณหภูมิ (Thermoreversible) นั่นคือ จะมีสถานะเป็นของเหลวที่อุณหภูมิต่ำ ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) และจะเป็นเจลที่สถานะอุณหภูมิร่างกายของมนุษย์ ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ส่วนเวลาในก่อดัวเป็นเจลของ Pluronic<sup>®</sup> F-127 จะแปรผกผันกับความเข้มข้นของเจล ลักษณะของการละลายของเจล Pluronic<sup>®</sup> F-127 เป็นไปตามอัตราการละลายอันดับที่ 0 (Zero<sup>th</sup> order rate) ในช่วง 90% แรกของการละลายของเจลทั้งหมด และอัตราการละลายของเจลจะแปรผกผันกับความเข้มข้นของเจล เมื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของพื้นที่หน้าตัดเจลโดยใช้เครื่อง SEM และ TEM พบว่า เจลจะมีลักษณะคล้ายรังผึ้ง โดยไมเซลล์ของเจล Pluronic<sup>®</sup> F-127 จะเรียงต่อกันเป็นร่างแห โดยที่ขนาดของไมเซลล์จะแปรผกผันกับความเข้มข้นของเจล ส่วนความหนาแน่นของไมเซลล์จะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของเจล เมื่อผสมยา Doxorubicin เข้ากับเจล Pluronic<sup>®</sup> F-127 พบว่า ยาไม่มีผลต่อเวลาที่ใช้ในการละลายเจลและลักษณะของการละลายของเจล แต่พบว่าอัตราการละลายของเจลจะเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อย อัตราการปลดปล่อยยา Doxorubicin จากเจล Pluronic<sup>®</sup> F-127 เป็นไปตามอัตราการละลายของเจล โดยลักษณะของกราฟความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ซึ่งแสดงว่า กระบวนการปลดปล่อยยา Doxorubicin ขึ้นกับการละลายของเจลเป็นหลัก นั่นคือ เจล Pluronic<sup>®</sup> F-127 ใช้กลไกการละลายหรือกลไกการย่อยสลายทางชีวภาพ (Biodegradation) ในการปลดปล่อยยา [2]

จากคุณสมบัติของ Pluronic<sup>®</sup> F-127 ที่ย่อยสลายได้เร็ว จึงมีการนำ Pluronic<sup>®</sup> F-127 มาสังเคราะห์กับโพลิเมอร์ชนิดอื่น เพื่อช่วยเพิ่มเวลาในการ release ของยาให้มากขึ้น เช่น ในงานวิจัยของ K.Y. Cho และคณะ ที่ศึกษา poloxamer graft hyaluronic acid (hyaluronic acid มีลักษณะโครงสร้างคล้ายกับไคโตซานแต่ต่างกันตรงที่ hyaluronic acid มีหมู่ฟังก์ชัน COOH แทนหมู่ NH<sub>2</sub> ในไคโตซาน) และศึกษาการ release ของยา ciprofloxacin จาก copolymer ชนิดนี้ โดยที่ graft copolymer เตรียมได้จากการ coupling ระหว่าง monoamine-terminated poloxamer (MATP) กับ hyaluronic acid (HA) โดยใช้ coupling reagent คือ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) และ N-hydroxysuccinimide (NHS) โดยที่เกิดปฏิกิริยาระหว่างหมู่ amine ของ poloxamer และหมู่ carboxyl ของ HA และจากการวัดค่า absorbance โดยใช้เครื่อง FTIR และ H-NMR spectroscopy พบว่าปฏิกิริยาระหว่าง poloxamer กับ hyaluronic acid เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ และจากการวัดอุณหภูมิการเกิดเจล พบว่า การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของการเกิดเจลจะขึ้นอยู่กับปริมาณของ HA และความเข้มข้นของ poloxamer โดยที่ถ้ามีปริมาณของ HA และ ciprofloxacin มาก อุณหภูมิการเกิดเจลก็จะสูงตามไปด้วย ทำให้ต้องใช้พลังงานมากขึ้น การที่อุณหภูมิของการเกิดเจลสูงอาจมีสาเหตุมาจาก hydrophilic ของ HA และ ciprofloxacin จะไปขัดขวางการรวมตัวของ hydrophobic ของ poloxamer และถ้า HA มีค่าเกิน 15% wt จะไม่เกิด reversible sol-gel transition ใน graft polymer ในส่วนต่อไปเป็นการศึกษาการ release ของยา ciprofloxacin จาก copolymer gel ซึ่งจากการทดลองพบว่า อัตราการ release ของ ciprofloxacin ขึ้นอยู่กับปริมาณของ HA โดยที่เมื่อ

บรรจุ ciprofloxacin ใน poloxamer พบว่า ciprofloxacin สามารถ release ได้หมดภายใน 3 ชั่วโมง แต่เมื่อเปลี่ยนมาบรรจุใน copolymer gel พบว่า ciprofloxacin จะสามารถ release ได้หมดภายใน 5 ชั่วโมง แสดงว่า เมื่อเพิ่มปริมาณของ HA มากขึ้น อัตราการ release ของ ciprofloxacin ก็จะน้อยลง ทำให้ ciprofloxacin สามารถอยู่ในระบบได้นานขึ้น ซึ่งการที่อัตราการ release น้อยลง อาจมีสาเหตุมาจากคุณสมบัติที่หนืดและเหนียวของ HA [4]

ต่อมาได้มีการทำการวิจัยเพื่อศึกษาการนำ Pluronic® F-127 มาสังเคราะห์กับไคโตซานเพื่อพัฒนา copolymer ที่จะนำไปใช้ในระบบการปลดปล่อยยา โดย Ho Jin Chung และคณะได้ทำการทดลองสังเคราะห์ copolymer ระหว่าง Chitosan-Pluronic® F-127 ด้วยวิธี EDC/NHS method และศึกษาคุณสมบัติความเป็น Thermoreversible ของ copolymer Chitosan-Pluronic® F-127 สำหรับการสังเคราะห์ Chitosan-Pluronic® F-127 ด้วยวิธี EDC/NHS method เป็นการสังเคราะห์ polymer โดยใช้ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) และ N-hydroxysuccinimide (NHS) เป็น coupling agent สำหรับการสังเคราะห์ Chitosan-Pluronic® F-127 จะแบ่งการสังเคราะห์ออกเป็น 2 ส่วน ซึ่งส่วนแรกคือการสังเคราะห์ monocarboxy Pluronic® F-127 (MP) หลังจากนั้นจึงนำ MP ที่ได้ไปทำปฏิกิริยากับ Chitosan โดยใช้ EDC และ NHS เป็น coupling agent ดังสมการ



รูปที่ 1 แสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์ Pluronic grafted Chitosan copolymer

หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปแยกออกจาก reagent ส่วนเกิน โดยทำการ dialyzed ผ่าน membrane (Molecular weight cut off 20,000) เป็นเวลา 3 วัน ทำการตรวจสอบว่าปฏิกิริยาการ graft ระหว่าง Chitosan-Pluronic® F-127 เกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์โดยใช้เครื่อง HMNR และ FTIR และจากการทดสอบการละลายทำให้ทราบว่า Chitosan-Pluronic® F-127 สามารถละลายได้ในน้ำและกรดอ่อน และยังคงสมบัติการก่อรูปเป็นเจลแบบย้อนกลับได้ตามอุณหภูมิ (Thermoreversible gelation) โดยลักษณะการก่อรูปเป็นเจล จะเปลี่ยนจากสารละลายไปเป็นเจลจะเพิ่มมากขึ้นตามอุณหภูมิ และที่ความเข้มข้นเดียวกันอุณหภูมิในการเกิดเจลของสารละลาย Chitosan-Pluronic® F-127 จะสูงกว่าค่าของสารละลาย Pluronic® F-127 เพียงอย่างเดียวเนื่องจาก hydrophilic ของ Chitosan จะรบกวนการรวมตัวของกลุ่ม hydrophobic ของ Pluronic® F-127 นอกจากนี้อุณหภูมิในการเกิดเจลของสารละลาย Chitosan-Pluronic® F-127 จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณของ Pluronic และ Chitosan ในการสังเคราะห์ และสมบัติการก่อรูปเป็นเจลของ Chitosan-Pluronic® F-127 copolymer จะไม่เกิดขึ้นเลยเมื่อมีเปอร์เซ็นต์ของ Chitosan ใน copolymer มากกว่า 17% (w/w) [5]

จากงานวิจัยของ ธนา และคณะเป็นการศึกษาการสังเคราะห์เจล Pluronic F-127 grafted Chitosan Copolymer ที่ใช้เป็นตัวปลดปล่อยยา Doxorubicin จากการทดลองสามารถสรุปผลการศึกษาออกมาได้ดังนี้ วิธีที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ Pluronic F-127 grafted Chitosan Copolymer คือ วิธี EDC/NHS และ เจล Copolymer ที่สังเคราะห์ได้ยังคงมีคุณสมบัติในการเปลี่ยนกลับไปมาได้ตามอุณหภูมิ (Thermoreversible) คือ สารจะมีสถานะเป็นของเหลวที่อุณหภูมิต่ำ (2-4 °C) และเป็นเจลเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (37 °C), ลักษณะการก่อตัวเป็นเจลของ Copolymer โดยตัวแปรที่มีผลการก่อตัวเป็นเจลของ copolymer ที่ศึกษาคือ ความเข้มข้นของเจล, ปริมาณ Chitosan ใน copolymer ในกรณีที่ปริมาณของ Chitosan ใน copolymer มีค่าคงที่ เวลาในการเกิดเจลของ copolymer จะแปรผกผันกับความเข้มข้นของเจล, ในกรณีที่ความเข้มข้นของสารละลายคงที่ เวลาในการเกิดเจลของ Copolymer จะแปรผกผันกับปริมาณของ Chitosan ใน Copolymer, ลักษณะโครงสร้างของเจล Pluronic F-127 grafted Chitosan Copolymer มีลักษณะคล้ายรังผึ้งโดยมีไมเซลล์เรียงต่อกันเป็นร่างแห เช่นเดียวกับโครงสร้างของเจล Pluronic F-127 ในกรณีที่ปริมาณของ Chitosan ใน Copolymer มีค่าคงที่ ขนาดของไมเซลล์จะแปรผกผันกับความเข้มข้นของสารละลาย ส่วนความหนาแน่นของไมเซลล์จะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของเจล Copolymer, ในกรณีที่ความเข้มข้นของสารละลายคงที่ ขนาดของไมเซลล์ไม่แตกต่างกัน ส่วนความหนาแน่นของไมเซลล์แปรผกผันกับปริมาณ Chitosan ใน Copolymer, ลักษณะการสลายตัวของเจล Copolymer มีลักษณะเป็นการเสื่อมสลายที่ผิวของโพลิเมอร์ หรืออาจเป็นไปได้ทั้งการละลายและการเสื่อมสลายที่ผิวของโพลิเมอร์, ในกรณีที่ปริมาณของ Chitosan ใน Copolymer มีค่าคงที่ อัตราการสลายตัวของเจลจะแปรผกผันกับความเข้มข้นของสารละลาย, ในกรณีที่ความเข้มข้นของสารละลายคงที่ อัตรา

การสลายตัวของเจลจะแปรผกผันกับปริมาณของ Chitosan ใน Copolymer, เมื่อผสมยา Doxorubicin เข้ากับเจล ความสามารถในการกักเก็บยาของ Copolymer จะแปรผันตรงกับปริมาณของ Chitosan ใน Copolymer นอกจากนั้นปริมาณของ Chitosan ที่มากขึ้นทำให้เจล copolymer ปลดปล่อยยาได้นานขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากเมื่อนำไปใช้จริง, อัตราส่วนของ Copolymer ที่เหมาะสมที่สุดในงานวิจัยนี้ คือ Copolymer ที่ประกอบด้วย Chitosan 10% w/w และมีความเข้มข้น 30%w/w ในน้ำ, กระบวนการปลดปล่อยยา Doxorubicin ขึ้นอยู่กับการสลายตัวของเจล คือเป็นไปตามอัตราการปลดปล่อยอันดับที่ 0 (Zero<sup>th</sup> order rate) หรือที่เรียกว่า กระบวนการ Biodegradation

### 1.3 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาถึงวิธีในการสังเคราะห์ Pluronic grafted Chitosan copolymer โดยวิธี EDC/NHS
2. ศึกษาถึงลักษณะทางกายภาพของ grafted copolymer เช่น thermoreversible property, อุณหภูมิในการเกิดเจล, ความเป็นพิษของเจล และการสลายตัวของเจล
3. หาอัตราส่วนของ Pluronic<sup>®</sup> F-127 และ Chitosan ที่เหมาะสมในการปลดปล่อยยา Doxorubicin โดยการพิจารณาจากเวลาในการสลายตัว และ ลักษณะการปลดปล่อยยา
4. ทำนายอัตราการปลดปล่อยยาด้วยสมการทางคณิตศาสตร์ (Mathematical Model) โดยใช้หลักการปลดปล่อยยาด้วยการละลาย (Dissolution) หรือการย่อยสลายทางชีวภาพ (Biodegradation)

### 1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

1. ศึกษาการสังเคราะห์ Pluronic<sup>®</sup> F-127 grafted Chitosan copolymer และหาอัตราส่วนของ Pluronic<sup>®</sup> F-127 และ Chitosan ที่เหมาะสมโดยการพิจารณาจากโครงสร้างเจล, การขึ้นรูปเจล, อุณหภูมิการเกิดเจล ความเป็นพิษของเจล และเวลาในการสลายตัวของเจล
2. เปรียบเทียบสมบัติต่างๆของ Pluronic<sup>®</sup> F-127 grafted Chitosan copolymer ที่ความเข้มข้น 25% (w/w) และ 30% (w/w) โดยมีปริมาณไคโตซานในโคโพลิเมอร์ 0% (w/w), 5% (w/w), 10% (w/w) และ 15% (w/w)
3. พิจารณาลักษณะและอัตราการปลดปล่อยยา Doxorubicin จากเจล copolymer นี้

## 1.5 ประโยชน์ของงานวิจัย

1. สามารถเลือกอัตราส่วนของ Pluronic<sup>®</sup> F-127 และ Chitosan ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการปลดปล่อยยารักษามะเร็ง Doxorubicin ได้
2. เรียนรู้สมบัติต่างๆของ Pluronic<sup>®</sup> F-127 grafted Chitosan copolymer ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน
3. เรียนรู้ลักษณะและอัตราการปลดปล่อยยา Doxorubicin จากเจล Pluronic<sup>®</sup> F-127 grafted Chitosan copolymer
4. สามารถทำนายลักษณะและอัตราการปลดปล่อยยาได้จากสมการทางคณิตศาสตร์
5. สามารถนำผลการทดลองและข้อสรุปไปใช้เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาระบบการปลดปล่อยยาใหม่เพื่อใช้ในทางการแพทย์ต่อไป