

การศึกษาฤทธิ์ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการเป็นพิษของเซลล์
และการแสดงออกของยีนคอลลาเจนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3

นางสาวชุลีปราง แดนลาดแก้ว

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2554

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

EVALUATION OF GOLD NANOPARTICLES EFFECT ON CYTOTOXICITY
AND COLLAGEN GENES EXPRESSION IN NIH-3T3 FIBROBLAST

Miss Chuleepang Danladkaew

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การศึกษาฤทธิ์ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการ
เป็นพิษของเซลล์และการแสดงออกของยีนคอลลาเจนใน
เซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3

โดย

นางสาวชุลีปราง แตนลาดแก้ว

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์การแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ นายแพทย์ ดร. อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ โศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. อภิวัฒน์ มุทิรางกูร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ นายแพทย์ ดร. อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์)

..... กรรมการ
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ประวิตร อัครวานนท์)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ณิชฎิิตา ชวนเกริกกุล)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(เภสัชกรหญิง ดร. รวีวรรณ มณีรัตน์โชติ)

ชูลีปราง แตนลาดแก้ว : การศึกษาฤทธิ์ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการเป็นพิษของเซลล์และการแสดงออกของยีนคอลลาเจนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 (Evaluation of Gold nanoparticles effect on Cytotoxicity and Collagen Genes Expression in NIH-3T3 Fibroblast Cell) อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก : นพ. ดร. อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์, 74 หน้า.

ที่มาของงานวิจัย : ปัจจุบันอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรได้ถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมของเครื่องสำอางอย่างแพร่หลาย โดยมีกล่าวอ้างถึงคุณสมบัติของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรว่าสามารถช่วยในการต้านริ้วรอยโดยการฟื้นฟูเนื้อเยื่อผิว ต้านอนุมูลอิสระ และ เพิ่มการสร้างคอลลาเจน แต่ยังไม่ม้งานวิจัยพิสูจน์แน่ชัดถึงผลดังกล่าว

ผลการทดลอง: ทางผู้วิจัยได้ศึกษาผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงพบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีความเป็นพิษต่อเซลล์โดยขึ้นกับปริมาณและระยะเวลาที่ได้รับสาร โดยอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ ลดการแสดงออกยีนคอลลาเจนชนิด Col1a1 Col1a2 และ Col3a1 ซึ่งพบมากในผิวหนัง และมีฤทธิ์เพิ่มสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ แต่ทั้งนี้เซลล์ก็มีกลไกการตอบสนองต่อสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นโดยมีการสร้างเอนไซม์ NADH/ NADPH ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน

สรุปผลการทดลอง: จากความรู้ที่ได้พบว่า ผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อความเป็นพิษ การแบ่งตัวของเซลล์ การเกิดอนุมูลอิสระ และการแสดงออกของยีนคอลลาเจนขึ้นอยู่กับปริมาณและระยะเวลาที่ได้รับสาร จึงควรพิจารณาปัจจัยดังกล่าวถึงความปลอดภัยในการนำอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรไปประยุกต์ใช้ในเครื่องอุปโภคในชีวิตประจำวัน

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์.....ลายมือชื่อนิสิต.....
ปีการศึกษา 2554..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์.....

5274865330 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS : Gold nanoparticles/ Fibroblast/ Cell viability/ Cell proliferation/
Reactive oxygen species (ROS)/ Collagen expression

CHULEEPANG DANLADKAEW : EVALUATION OF GOLD NANOPARTICLES
EFFECT ON CYTOTOXICITY AND COLLAGEN GENES EXPRESSION IN NIH-
3T3 FIBROBLAST CELL. ADVISOR: AMORNPUN SEREEMASPUN, M.D.,
Ph.D., 74 pp.

Background: Gold nanoparticles (AuNPs) have been commonly used in many cosmetic products. Commercial advertisements for AuNPs tend to promote that AuNPs aid in anti-aging, recovery of cell structure, anti-oxidant and up-regulated collagen expression. However, effects by AuNPs have been not scientifically proven.

Results: In this study, it is demonstrated that AuNPs exhibit a toxic effect on NIH-3T3 fibroblast and this effect is time and dose dependent. In addition, AuNPs also show the ability to inhibit cell proliferation, down-regulate major collagen types in human skin (Col1a1, Col1a2 and Col3a1) and stimulate ROS generation. It is also found that NIH-3T3 fibroblasts response to ROS by generating NADH/NADPH which plays an important role in antioxidant mechanism.

Conclusion: From the experiments, the effects of AuNPs on cytotoxicity, cell proliferation, ROS generation and expression of collagen gene depend on the amount of AuNPs as well as the time of exposure. Hence, these factors should be thoroughly considered in order to evaluate safety of AuNPs in regard to their formulations in commonly used products.

Field of Study : Medical Science..... Student's Signature

Academic Year : 2011..... Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ที่ต้องไว้อย่างสมบูรณ์เพราะได้รับคำแนะนำทั้งทางด้านวิชาการ ความเอื้อเฟื้อเพื่อดำเนินเครื่องมือ วัสดุดิบ และสถานที่สำหรับทำงานวิจัย อีกทั้งยังได้รับความช่วยเหลือแนะแนวทางในการทำวิจัยจากผู้ทรงคุณวุฒิในด้านต่างๆ ดังต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ นายแพทย์ ดร. อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก คอยให้คำปรึกษา แนะนำ ตรวจสอบ ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในทุกๆ เรื่อง

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. อภิวัฒน์ มุทิตรากร ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ และสถานที่ จนเสร็จสิ้นงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. สัมชาย พยุงภร ที่ช่วยสอนเทคนิคการทำแลปและยังเป็นพี่ปรึกษาในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณอาจารย์คณาจารย์ท่านอื่นๆ ที่ช่วยประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ต่างๆ เพื่อเตรียมความพร้อมในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ นางสาวสุปราณี บุรณประดิษฐ์ นางสาวณัฐนิชา ห่วงงาม และ นางสาวนันทพร อังศุพิทยา ที่ให้ความช่วยเหลือเอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ ตลอดจนให้คำแนะนำในการทำวิจัย

ขอขอบคุณนางสาวพรสุรีย์ พงษ์สุชาติ นายวีรวัฒน์ ก่อเกียรติสกุล นางอรุณา กาเนิดสินธุ์ นางสาวนารีธร อุดมทองสุข นางสาวชนิษฐา สุขเสิศ นายธีระเดช ชมหวาม นายชฎานนท์ งามเบญจวงค์ นางสาวศิวาพร นิลใย และนายวิษณุ ชัยรัตน์ ที่คอยให้กำลังใจ ความช่วยเหลือ และคำแนะนำที่ดีเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ ครอบครัว “แดนลาดแก้ว” ที่ให้การสนับสนุน คอยดูแล ให้คำแนะนำ และอยู่เคียงข้างเป็นกำลังใจให้ตลอดมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	๗
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	๘
กิตติกรรมประกาศ	๙
สารบัญ	๗
สารบัญตาราง	๘
สารบัญภาพ	๙
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	๑๐
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางงานวิจัย	1
คำถามของงานวิจัย	6
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	6
คำสำคัญ	6
รูปแบบงานวิจัย	6
ผลและประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย	6
บทที่ 2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
คอลลาเจน	7
นาโนเทคโนโลยี	8
วิธีการดำเนินงานวิจัย	15
การสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร	15
การตรวจสอบคุณสมบัติของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ได้	16
การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3	17
การศึกษารูปร่างลักษณะของเซลล์	18
การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์	19
การศึกษาผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์	21
การศึกษาเพื่อดูผลต่อการเกิดของสารอนุมูลอิสระของเซลล์	23
การศึกษาผลอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการแสดงออกของยีนคอลลาเจนด้วย วิธี Real time RT-PCR	24
ลำดับขั้นตอนวิธีการวิจัย	28
การวิเคราะห์ข้อมูล	32
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	33

	หน้า
การสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร.....	33
ผลการศึกษาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะของ เซลล์.....	35
ผลการศึกษาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการมีชีวิตของเซลล์.....	38
ผลการศึกษาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการแบ่งตัวของเซลล์.....	41
ผลการศึกษาผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการเกิดอนุมูลอิสระของเซลล์ .	44
ผลศึกษาผลอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการแสดงออกของยีนคอลลาเจนด้วย วิธี Real time.....	46
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย ข้อจำกัดในงานวิจัย และแนวทางการศึกษาต่อใน	
อนาคต.....	56
อภิปรายผล.....	56
สรุปผลการวิจัย.....	63
ข้อจำกัดในงานวิจัย.....	64
แนวทางการศึกษาต่อในอนาคต.....	65
รายการอ้างอิง.....	66
ภาคผนวก.....	71
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	74

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงชนิดของคอลลาเจนและตำแหน่งที่พบ.....	3
2	แสดงถึงชีวนาโนเทคโนโลยี (Nanobiotechnology) และวัสดุทางนาโน (Nanomaterial) ที่ถูกนำมาผลิต พัฒนา โดยบริษัททางการแพทย์ต่างๆ.....	9
3	แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ Real-time PCR	26
4	สรุปการแสดงออกของยีน Col1a1 ในเซลล์ NIH-3T3 fibroblast ที่ได้รับอนุภาคทองคำ ระดับนาเมตรที่ความเข้มข้นต่างๆกัน ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง.....	49
5	สรุปการแสดงออกของยีน Col1a2 ในเซลล์ NIH-3T3 fibroblast ที่ได้รับอนุภาคทองคำ ระดับนาเมตรที่ความเข้มข้นต่างๆกัน ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง.....	52
6	สรุปการแสดงออกของยีน Col3a1 ในเซลล์ NIH-3T3 fibroblast ที่ได้รับอนุภาคทองคำ ระดับนาเมตรที่ความเข้มข้นต่างๆกัน ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง.....	55

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 โครงสร้างพื้นฐานของสายคอลลาเจนที่พันกันในรูปแบบ(Triple-helical structure).....	1
2 แสดงการสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรจากสารละลาย H _{Au} Cl ₄ และ Sodium citrate Dihydrate ด้วยปฏิกิริยา Reduction ในอุณหภูมิที่เหมาะสม.....	15
3 เครื่อง UV/Vis Spectrophotometer	16
4 แสดงอุปกรณ์และเครื่องที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์.....	17
5 แสดงกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่ใช้ในการถ่ายภาพเซลล์.....	18
6 แสดงเครื่อง Microplate reader ที่ใช้ในการวัดค่าดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์.....	20
7 แสดงเครื่อง Flow cytometer ที่ใช้ในการวัดหาความเข้มของสี CFSE ที่อยู่ในเซลล์..	22
8 แสดงเครื่อง StepOnePlus™ ที่ใช้ในการทำ Real-time PCR.....	27
9 แสดงเซลล์ในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม.....	30
10 แสดงเซลล์ในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม	30
11 แสดงขั้นตอนการศึกษาผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3	31
12 แสดงคุณสมบัติของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ได้	34
13 แสดงรูปร่างลักษณะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 หลังจากได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	36
14 แสดงรูปร่างลักษณะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 หลังจากได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง.....	37
15 แสดงร้อยละความอยู่รอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 หลังจากได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ 24 ชั่วโมง.....	39
16 แสดงร้อยละความอยู่รอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 หลังจากได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ 48 ชั่วโมง.....	40
17 แสดงผลการศึกษาการแบ่งตัวของเซลล์โดยดูจากร้อยละการติดสี CFSE ภายในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 หลังจากที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ 24 ชั่วโมง.....	42
18 แสดงผลการศึกษาการแบ่งตัวของเซลล์โดยดูจากร้อยละการติดสี CFSE ภายในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 หลังจากที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ 24 ชั่วโมง.....	43

19	แสดงผลการศึกษาการเกิดอนุมูลอิสระของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 ‘ หลังจากที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ 1 ชั่วโมง.....	45
20	แสดงผลการศึกษาการแสดงออกของยีน Col1a1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 หลังจากที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ 24 ชั่วโมง.....	47
21	แสดงผลการศึกษาการแสดงออกของยีน Col1a1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 หลังจากที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ 48 ชั่วโมง.....	48
22	แสดงผลการศึกษาการแสดงออกของยีน Col1a2 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 หลังจากที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ 24 ชั่วโมง.....	50
23	แสดงผลการศึกษาการแสดงออกของยีน Col1a2 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 หลังจากที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ 48 ชั่วโมง.....	51
24	แสดงผลการศึกษาการแสดงออกของยีน Col3a1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 หลังจากที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ 24 ชั่วโมง.....	53
25	แสดงผลการศึกษาการแสดงออกของยีน Col3a1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 หลังจากที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ 48 ชั่วโมง.....	54
26	แสดงผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีผลต่อระดับของ NADH และ NADPH ภายในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3	60
27	กลไกความเป็นไปได้ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีผลต่อการแสดงออกของยีนคอลลาเจนภายในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3.....	62

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AuNPs	Gold Nanoparticles
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic acid
Col1a1	Collagen type 1 alpha 1
Col1a2	Collagen type 1 alpha 1
Col3a1	Collagen type 3 alpha 1
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
DCF	2',7'-dichlofluorescein
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EMC	Extracellular Matrix
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
Real-time RT-PCR	Real-time Reverse transcription polymerase chain reaction
ROS	Reactive oxygen species
RNA	Ribonucleic acid
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
H2DCFDA	2', 7'-dichlofluorescein-diacetate

H2DCF	non-fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein
PBS	Phosphate buffered saline
TEM	Transmission electron microscopy

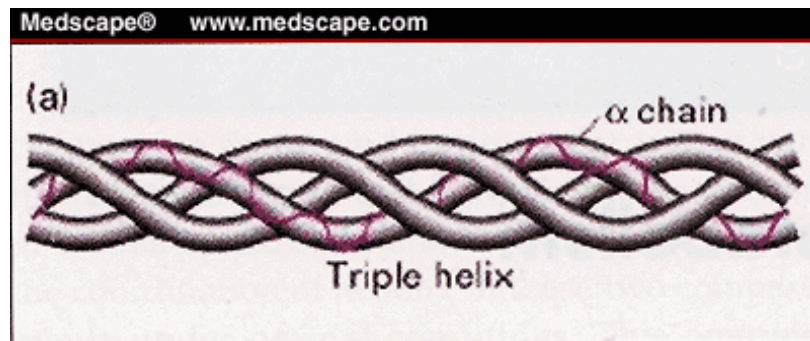
บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

คอลลาเจน (Collagen) เป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดในร่างกาย ประมาณ 30% ของโปรตีนทั้งหมด โดยพบมากในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective Tissue) เช่น ผิวหนัง กระดูก กระดูกอ่อน เส้นเอ็น นอกจากนี้ยังพบคอลลาเจนแทรกยังผ่านในทุกอวัยวะ Parenchymal อีกด้วย⁽¹⁻²⁾ เนื่องจากคอลลาเจนมีลักษณะโครงสร้างโมเลกุลเป็นเส้นใยกระจายตัวอยู่ในสารองค์ประกอบนอกเซลล์ (Extracellular Matrix ; ECM) คอลลาเจนจึงทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของเนื้อเยื่อช่วยเพิ่มความแข็งแรง (Strength) ความสมบูรณ์ (Integrity) ให้แก่อวัยวะ เมื่อเนื้อเยื่อได้รับบาดเจ็บ คอลลาเจนยังมีบทบาทการในฟื้นฟูบาดแผล (Wound Healing) และคืนโครงสร้าง (Restore structure) ทำให้เนื้อเยื่อสามารถกลับมาทำงานได้ดังเดิม⁽³⁾

โดยทั่วไปแล้วโครงสร้างของคอลลาเจนจะเป็นสายโพลีเปปไทด์ (Polypeptide) สามสายพันกันเป็นเกลียว โดยเรียกสายโพลีเปปไทด์ว่า alpha-chain (α -chain) และเรียกการพันลักษณะนี้ว่า "Triple helical structure" ซึ่งในสาย α -chains จะมีลำดับกรดอะมิโน Gly-X-Y ซ้ำกันไปเรื่อยๆจนเป็นสายยาว (Repeat sequence)⁽⁴⁾



รูปที่ 1: แสดงโครงสร้างพื้นฐานของสายคอลลาเจนที่พันกันในรูปแบบ (Triple-helical structure)⁽¹⁾

นอกจากนี้คอลลาเจนยังมีลักษณะที่จำเพาะคือ เป็นโปรตีนที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนชนิด Proline, Alanine และ Lysine ในปริมาณสูงเพื่อใช้ในการปรับเปลี่ยนของโครงสร้างของคอลลาเจนในขั้น Post-translational เพื่อให้ทำให้เกิดความหลากหลายโครงสร้างและนำไปใช้ในงานที่ต่างกันไป⁽⁵⁾ ปัจจุบันคอลลาเจนในมนุษย์ถูกค้นพบมากกว่า 20 ชนิด โดยจะจำแนกตามชนิดของยีนที่ถูกถอดรหัส ตำแหน่งที่พบ และลักษณะโครงสร้างเส้นใยของคอลลาเจน ดังแสดงใน ตารางที่ 1

ตารางที่ 1: แสดงชนิดของคอลลาเจนและตำแหน่งที่พบ⁽⁶⁾

Table 1 Vertebrate collagens^a

Type	Class	Composition	Distribution ^b	Pathology ^c
I	Fibrillar	$\alpha 1[I]_2\alpha 2[I]$	Abundant and widespread: dermis, bone, tendon, ligament	OI, Ehlers-Danlos syndrome, osteoporosis
II	Fibrillar	$\alpha 1[II]_3$	Cartilage, vitreous	Osteoarthritis, chondrodysplasias
III	Fibrillar	$\alpha 1[III]_3$	Skin, blood vessels, intestine	Ehlers-Danlos syndrome, arterial aneurysms
IV	Network	$\alpha 1[IV]_2\alpha 2[IV]$ $\alpha 3[IV]\alpha 4[IV]\alpha 5[IV]$ $\alpha 5[IV]_2\alpha 6[IV]$	Basement membranes	Alport syndrome
V	Fibrillar	$\alpha 1[V]_3$ $\alpha 1[V]_2\alpha 2[V]$ $\alpha 1[V]\alpha 2[V]\alpha 3[V]$	Widespread: bone, dermis, cornea, placenta	Ehlers-Danlos syndrome
VI	Network	$\alpha 1[VI]\alpha 2[VI]\alpha 3[VI]^d$ $\alpha 1[VI]\alpha 2[VI]\alpha 4[VI]$	Widespread: bone, cartilage, cornea, dermis	Bethlem myopathy
VII	Anchoring fibrils	$\alpha 1[VII]_2\alpha 2[VII]$	Dermis, bladder	Epidemolysis bullosa acquisita
VIII	Network	$\alpha 1[VIII]_3$ $\alpha 2[VIII]_3$ $\alpha 1[VIII]_2\alpha 2[VIII]$	Widespread: dermis, brain, heart, kidney	Fuchs endothelial corneal dystrophy
IX	FACIT ^e	$\alpha 1[IX]\alpha 2[IX]\alpha 3[IX]$	Cartilage, cornea, vitreous	Osteoarthritis, multiple epiphyseal dysplasia
X	Network	$\alpha 1[X]_3$	Cartilage	Chondrodysplasia
XI	Fibrillar	$\alpha 1[XI]\alpha 2[XI]\alpha 3[XI]$	Cartilage, intervertebral disc	Chondrodysplasia, osteoarthritis
XII	FACIT	$\alpha 1[XII]_3$	Dermis, tendon	—
XIII	MACIT	—	Endothelial cells, dermis, eye, heart	—
XIV	FACIT	$\alpha 1[XIV]_3$	Widespread: bone, dermis, cartilage	—
XV	MULTIPLEXIN	—	Capillaries, testis, kidney, heart	—
XVI	FACIT	—	Dermis, kidney	—
XVII	MACIT	$\alpha 1[XVII]_3$	Hemidesmosomes in epithelia	Generalized atrophic epidermolysis bullosa
XVIII	MULTIPLEXIN	—	Basement membrane, liver	Knobloch syndrome
XIX	FACIT	—	Basement membrane	—
XX	FACIT	—	Cornea (chick)	—
XXI	FACIT	—	Stomach, kidney	—
XXII	FACIT	—	Tissue junctions	—
XXIII	MACIT	—	Heart, retina	—
XXIV	Fibrillar	—	Bone, cornea	—
XXV	MACIT	—	Brain, heart, testis	Amyloid formation?
XXVI	FACIT	—	Testis, ovary	—
XXVII	Fibrillar	—	Cartilage	—
XXVIII ^f	—	—	Dermis, sciatic nerve	Neurodegenerative disease?

นาโนเทคโนโลยี (Nanotechnology) คือ เทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการศึกษา การจัดการ การสร้างการวิเคราะห์ และประยุกต์ใช้วัสดุที่มีขนาดเล็กมากๆ ในระดับนาโนเมตร (ประมาณ 1-100 นาโนเมตร) รวมถึงการออกแบบหรือการประดิษฐ์เครื่องมือเพื่อใช้สร้าง หรือวิเคราะห์วัสดุในระดับที่เล็กมากๆ เช่น วัสดุนาโน (ท่อนาโน เส้นใยนาโน และอนุภาคนาโน) ซึ่งมีโครงสร้างของวัสดุ ที่มีคุณสมบัติพิเศษ ทั้งทางด้านฟิสิกส์ เคมี หรือชีวภาพ ต่างไปจากสาร เดิมที่มีขนาดใหญ่⁽⁷⁻⁹⁾ และในปัจจุบันจึงมีการนำนาโนเทคโนโลยีมาประยุกต์ใช้ในหลากหลาย สาขา เช่น ด้านอุตสาหกรรมเทคโนโลยีคอมพิวเตอร์ เทคโนโลยีชีวภาพและทางการแพทย์ เป็นต้น

อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (Gold nanoparticles, AuNPs) เป็นอนุภาคของโลหะใน ระดับนาโนที่มีความเสถียรสูงชนิดหนึ่ง⁽¹⁰⁾ และมีคุณสมบัติทางกายภาพที่เฉพาะตัว เช่น Surface topography, Surface chemistry, Surface energy มีความสามารถในการนำไฟฟ้าได้ดี สามารถเร่งปฏิกิริยาเคมี นำไปประยุกต์ใช้งานได้ง่ายและหลากหลาย สามารถเตรียมให้ ห้องปฏิบัติการได้ และปลอดภัยกับสิ่งมีชีวิต⁽¹¹⁾ ปัจจุบันอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรได้ถูก นำมาใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมความงาม ในหลายโรงงานทั่วโลกนิยมนำอนุภาคทองคำ ระดับนาโนเมตรมาเป็นส่วนผสมของเครื่องสำอางชนิดต้านริ้วรอย⁽¹²⁾ โดยมีบทความและ โฆษณากล่าวอ้างถึงสรรพคุณของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรดังนี้⁽¹³⁻¹⁷⁾

- สามารถซึมลึกเข้าไปในเซลล์ได้เนื่องจากอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีขนาดเล็ก
- สามารถขนส่งสารออกฤทธิ์เข้าสู่เซลล์ผิวได้
- เพิ่มการดูดซึมของคอลลาเจน, สารอาหาร และ สารออกฤทธิ์ต่างๆ
- เพิ่มการเมตาบอลิซึมของผิวหนัง
- ช่วยในการฟื้นฟูของเนื้อเยื่อผิว
- ทำให้เส้นใยโครงผิวแข็งแรงขึ้น
- เพิ่มความกระชับและยืดหยุ่นของผิวหนัง
- ช่วยลดและชะลอการเกิดริ้วรอยเหี่ยวย่น
- มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ
- ช่วยในระบบการหมุนเวียนของเลือด
- ลดการสร้างเมลานิน

ปัจจุบันมีงานวิจัยมากมายที่ศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร เช่น อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรไปช่วยในการสานเส้นใยคอลลาเจน ซึ่งจะทำให้คอลลาเจนมีความแข็งแรงมากขึ้นโดยที่ไม่ทำให้คุณสมบัติของคอลลาเจนเปลี่ยนแปลงไป⁽¹⁸⁾ และยังมีงานวิจัยเกี่ยวกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการแสดงออกคอลลาเจน เช่น เมื่ออนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรรูปแท่งปมกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหัวใจแล้วจะทำให้มีการแสดงออกของยีนคอลลาเจนชนิด type I ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ลดลง⁽¹⁹⁾ หรือเมื่อฉีดอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรให้หนูทดลองพบว่า มีการแสดงออกของยีนคอลลาเจนชนิด type I และ type III ในตับเพิ่มขึ้น⁽²⁰⁾ ซึ่งจากผลการทดลองยังไม่สอดคล้องกันว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนคอลลาเจนจริงหรือไม่ และยังไม่ทราบว่าปัจจัยใดของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่จะส่งผลต่อการแสดงออกของคอลลาเจน ดังนั้นการศึกษานี้จึงทำการศึกษาผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ โดยจะดูการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ ความเป็นพิษต่อเซลล์ การแบ่งตัวของเซลล์ การเกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ และการแสดงออกของยีนคอลลาเจน

คำถามของงานวิจัย (Research Question)

อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรจะมีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ การแบ่งเซลล์ การเกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ และการแสดงออกของยีนคอลลาเจนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์หรือไม่ โดยผลดังกล่าวจะขึ้นอยู่กับระยะเวลาและปริมาณของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่เซลล์ไฟโบรบลาสต์หรือไม่

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Objectives)

1. เพื่อการศึกษาความเป็นพิษของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์
2. เพื่อการศึกษาผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์
3. เพื่อการศึกษาผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการเกิดอนุมูลอิสระของเซลล์ไฟโบรบลาสต์
4. เพื่อการศึกษาผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการแสดงออกของยีนคอลลาเจนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์

คำสำคัญ (Keywords)

Gold nanoparticles
Fibroblast
Cell viability
Cell proliferation
Reactive oxygen species (ROS)
Collagen expression

รูปแบบงานวิจัย (Research Design)

การวิจัยเชิงทดลอง (Experimental Research)

ผลและประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย (Expected Benefits and Application)

เพื่อนำมาซึ่งความรู้เกี่ยวกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการเปลี่ยนแปลงและการแสดงออกของยีนคอลลาเจนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ โดยนำความรู้ที่ได้มาเผยแพร่ให้แก่ประชาชนทั่วไปได้ทราบถึงความปลอดภัยและผลที่จะได้รับเมื่อนำไปใช้ในการอุปโภคบริโภค

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

คอลลาเจน (Collagen)

คอลลาเจน (Collagen) เป็นโปรตีนที่พบได้มากที่สุดในร่างกาย (30% ของโปรตีนทั้งหมด) ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective Tissue) เช่น ผิวหนัง กระดูก เส้นเอ็นที่ยึดระหว่างกล้ามเนื้อและกระดูก นอกจากนี้ยังพบคอลลาเจนแทรกยังผ่านในทุกอวัยวะ Parenchymal อีกด้วย เนื่องจากคอลลาเจนมีลักษณะโครงสร้างโมเลกุลเป็นเส้นใย (Fibrillar structure) กระจายตัวอยู่ในสารที่ช่วยก่อกำเนิดเซลล์ (Extracellular matrix) และทำหน้าที่ช่วยเพิ่มความแข็งแรง (Strength) , ความสมบูรณ์ (Integrity) , เป็นโครงสร้างของเนื้อเยื่อ (Structure) เมื่อเนื้อเยื่อได้รับบาดเจ็บ คอลลาเจนยังมีหน้าที่ในการซ่อมแซมบาดแผล (Wound healing) , ฟื้นฟูโครงสร้าง (Restore structure)) ทำให้เนื้อเยื่อสามารถกลับมาทำงานได้ดังเดิม⁽²⁻³⁾

โครงสร้างของคอลลาเจนจะเป็นสายโพลีเปปไทด์สามสายพันกันเป็นเกลียว โดยเรียกการพันลักษณะนี้ว่า “Triple helical structure” ปัจจุบันนี้ได้มีคอลลาเจนยีนมากกว่า 20 ชนิดที่ถูกค้นพบ ซึ่งคอลลาเจนแต่ละชนิดจะถูกจำแนกตาม ความซับซ้อน (complexity), ความหลากหลายของโครงสร้าง (diversity), การตัดแต่งสารพันธุกรรม (splice variant), การตกแต่งโปรตีน (presence of additional), การทำงาน (Function) และ การถอดรหัสของยีนที่จำเพาะ (encoding form specific genes)⁽²⁻³⁾

ในผิวหนังหรือเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของมนุษย์พบคอลลาเจนชนิด Type I และ Type III collagen มากที่สุด โดยในผิวหนังที่อ่อนเยาว์นั้นจะประกอบไปด้วย Type I และ Type III collagen 80 และ 15% ตามลำดับ⁽²¹⁻²²⁾ ปัจจุบันทราบดีกันแล้วว่าคอลลาเจนมีบทบาทที่สำคัญในกระบวนการชรา โดยมีการวิจัยทั้ง *in vivo* และ *in vitro* พบว่าในคนที่อายุมากขึ้นจะมีปริมาณของ Type I collagen และ Type III ที่ลดลง⁽²³⁻²⁴⁾ ซึ่งผิวหนังที่มีความชราจะพบคอลลาเจนที่มีลักษณะเส้นใยที่หนา (thickened fibril), มีการรวมกลุ่มกันคล้ายเส้นเชือก (rope-like bundles) และการจัดเรียงตัวของเส้นใยไม่เป็นระเบียบ เมื่อเทียบกับผิวหนังที่ดูอ่อนเยาว์⁽²³⁾

ปัจจุบันจึงมีสินค้ามากกว่า 1,000 ในท้องตลาดที่บรรจุคอลลาเจนและสารที่ช่วยเพิ่มคอลลาเจนในในสินค้า เช่น โลชั่นสำหรับทาผิวและผิว, สารบำรุงสำหรับเล็บ, เจลสำหรับเพิ่มความกระชับ และ สารที่ใช้ฉีดเพื่อป้องกันการเกิดริ้วรอยเป็นต้น⁽³⁾

นาโนเทคโนโลยี (Nanotechnology)

นาโนเทคโนโลยี (Nanotechnology) คือ เทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการศึกษา การจัดการ การสร้าง การวิเคราะห์ และประยุกต์ใช้วัสดุที่มีขนาดเล็กมากๆ ในระดับนาโนเมตร (ประมาณ 1-100 นาโนเมตร) ซึ่งเทียบเท่ากับระดับอะตอมหรือโมเลกุล ซึ่งจะมีคุณสมบัติพิเศษ ทั้งทางด้านฟิสิกส์ เคมี หรือชีวภาพที่เฉพาะตัวและแตกต่างจากสารเดิมที่มีขนาดใหญ่ รวมถึง การออกแบบหรือการประดิษฐ์เครื่องมือเพื่อใช้สร้างหรือวิเคราะห์วัสดุในระดับที่เล็กมากๆ เช่น ท่อนาโน เส้นใยนาโน แท่งนาโน แผ่นฟิล์มนาโน และอนุภาคนาโน และปัจจุบันมีการนำนาโน เทคโนโลยีมาประยุกต์ใช้ในหลากหลายสาขา เช่น ด้านอุตสาหกรรม เทคโนโลยีคอมพิวเตอร์ เทคโนโลยีชีวภาพ เป็นต้น รวมทั้งด้านการแพทย์ (Nanomedicine) ซึ่งนำวัสดุนาโนมา ประยุกต์ใช้ในงานดังต่อไปนี้⁽²⁵⁻²⁸⁾

- อนุภาคนาโนเมตรเพื่อการวินิจฉัยและตรวจคัดกรองทางการแพทย์
- หุ่นยนต์เล็กระดับนาโนเมตรเพื่อช่วยตรวจหาพยาธิสภาพ (nanorobotics)
- พัฒนาอนุภาคนาโนเมตรเพื่อทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณของเซลล์
- ใช้ขนส่งยาเข้าสู่ร่างกาย
- พัฒนาอุปกรณ์สำหรับการขนส่งยาเข้าสู่ร่างกาย
- ยีนบำบัด (Gene therapy)
- วิศวกรรมเนื้อเยื่อและการพัฒนาโครงสร้างสังเคราะห์โดยเทคนิคทางนาโนชีววิทยา
- หาลำดับเบสของสารชีวโมเลกุลโดยผ่านวัสดุที่มีช่องเล็กระดับนาโนเมตร
- แยกและสกัดชีวโมเลกุลและเซลล์
- ใช้เป็นส่วนผสมของสินค้าประเภท อาหาร เครื่องสำอาง สารกันแดด และยาปฏิชีวนะ

จากประโยชน์ข้างต้นจะเห็นว่าวัสดุนาโนสามารถนำไปประยุกต์ใช้งานได้อย่าง กว้างขวาง ปัจจุบันบริษัททางการแพทย์ต่างๆจึงนำวัสดุนาโนมาผลิตพัฒนา และบางส่วนได้ถูก จัดจำหน่ายออกสู่ท้องตลาด ดังแสดงใน ตารางที่ 2

ตารางที่ 2: ตารางแสดงถึงชีวนาโนเทคโนโลยี (Nanobiotechnology) และวัสดุทางนาโน (Nanomaterial) ที่ถูกนำมาผลิต พัฒนา โดยบริษัททางการแพทย์ต่างๆ⁽²⁹⁾

Technology	Companies	Platform ^a
SPM	Hitachi High Technologies (London, UK)	Electron-beam lithography (on market)
	Imago Scientific Instruments (Madison, WI)	Leap atom probe microscope (on market)
	Veeco (Woodbury, NY)	Near-field scanning optical microscope (on market)
Arrays	Affymetrix (Santa Clara, CA)	High-density oligonucleotide (GeneChip) arrays (on market)
	BioForce Nanosciences (Ames, IA)	Nanoarrays – 10,000-fold smaller than conventional arrays (on market)
	Nanogen (San Diego, CA)	Oligonucleotide arrays with polarized features (on market)
	Nanolink (Chicago, IL)	Dip-pen nanolithography system (on market)
Molecular tags	Dendritic Nanotechnologies (Mt. Pleasant, MI)	Dendrimers (on market)
	Evident Technologies (available through Ocean Optics, Dunedin, FL, USA)	Semiconductor nanocrystal quantum dots (on market)
	Genicon Sciences (San Diego, CA)	Two-color microarray tool kit; resonance light-scattering detection and imaging instrument
	NanoPlex (Mountain View, CA)	Nano-bar-codes particle kit (on market)
	Nanosphere (Chicago, IL)	Gold nanoparticle probes and detection system
	Quantum Dot (Hayward, CA)	Quantum-dot conjugates (streptavidin, protein A, biotin) (on market)
Microfluidics	Caliper Technologies (Mountain View, CA)	Microfluidics (LabChip; on market)
	Fluidigm (South San Francisco, CA)	Multilayer soft lithography microfluidics
	NanoStream (Pasadena, CA)	High-throughput screening platforms
	Surface Logix (Brighton, MA)	High-throughput screening platforms using soft lithography and biosurface chemistry
Therapeutics	Alnis Biosciences (Emeryville, CA)	Polyfunctional nanoparticles
	ALZA (Mountain View, CA)	Lipid nanoparticles with polyethylene glycol coating; Doxil (doxorubicin liposome) on the market
	NanoCrystal Technologies (King of Prussia, PA)	NanoMill technology for creating nanocrystals
	NanoMed Pharmaceuticals (Kalamazoo, MI)	Nanotemplate engineering for drug and vaccine delivery systems
	Alnis Biosciences (Emeryville, CA)	Polyfunctional nanoparticles
	StarPharma (Melbourne, Australia)	VivoGel anti-HIV dendrimer (phase I)
Drug delivery	Advecus Life Sciences (West Vancouver, BC, Canada)	NanoCure system for delivery of anticancer drugs across blood-brain barrier
	BioDelivery Sciences (Newark, NJ)	BioOral nanocochleates cigar-shaped structures comprised of lipid bilayers
	BioSante Pharmaceuticals (Lincolnshire, IL)	Nanoparticulate platform (CAP) for drug delivery (phase I)
	C-Sixty (Houston, TX)	Fullerene-based drug delivery
	CytImmune Sciences (College Park, MD)	Tumor necrosis factor bound to colloidal gold nanocrystals for targeting tumors; vector with docking site for gene therapy
	NanoCarrier (Chiba, Japan)	NanoCap micellar nanoparticle for water-insoluble drugs (under development)
	NanoBio (Ann Arbor, MI)	Antimicrobial nanoemulsions (phase II)
	NanoSpectra Biosciences (Houston, Texas)	Nanoshells for optical therapies
	Targesome (Palo Alto, CA)	Injectable nanospheres for therapeutic or diagnostic agents
	Tissue engineering	AngstroMedica (Newton, MA)
NanoMateria (Chicago, IL)		Nanostructured material for heart, cartilage and nerve regeneration
pSiMedica (The Malverns, UK)		BioSilicon for bone implants
Biosensors	Agilent (Palo Alto, CA)	Nanopore sequencing (in collaboration with Harvard University)
	454 Life Sciences (Branford, CT)	PicoTiter sequencing plate
	US Genomics (Woburn, MA)	Single-strand DNA sequencing
	Nanomix (Emeryville, CA)	Nanotube chemical/biosensors

^aLocations are in United States unless otherwise stated.

วัสดุนาโนชนิดหนึ่งที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลาย คือ อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (Gold nanoparticles, AuNPs) เป็นอนุภาคของโลหะหนักที่มีขนาด อยู่ในช่วง 1-100 นาโนเมตร มีคุณสมบัติทางการภาพที่เฉพาะตัว เช่น Surface topography, Surface chemistry, Surface energy มีความสามารถในการนำไฟฟ้าได้ดี สามารถเร่งปฏิกิริยาเคมี นำไปประยุกต์ใช้งานได้ง่ายและหลากหลาย สามารถเตรียมให้ห้องปฏิบัติการได้ และปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิต⁽¹¹⁾

ปัจจุบันอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมความงาม ในหลายโรงงานทั่วโลกนิยมนำอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมาเป็นส่วนผสมของเครื่องสำอางชนิดต้านริ้วรอย⁽¹²⁾ ซึ่งปัจจุบันยังไม่มีงานวิจัยทางวิชาการที่มาสสนับสนุนสรรพคุณของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเมื่อนำไปใช้เป็นเครื่องสำอางว่ามีคุณสมบัติในการต้านริ้วรอยดังกล่าวอ้างและมีความปลอดภัยเพียงพอเมื่อนำไปใช้เป็นเครื่องสำอางหรือไม่

ปัจจุบันมีรายงานที่ศึกษาความเป็นพิษของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อร่างกาย ดังนี้

ในปี ค.ศ. 2005 Shukla และคณะได้ศึกษาความเป็นพิษ (Cytotoxicity) และการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองระบบภูมิคุ้มกัน (Immunogenicity) ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อเม็ดเลือดขาวชนิด Macrophages ซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีความสำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน โดยจะทำหน้าที่จับกินสิ่งแปลกปลอม หลังไซโตไคน์ที่ช่วยกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และทำหน้าที่เป็น Antigen-presenting cells ในระบบภูมิคุ้มกันอีกด้วย จากผลการทดลองพบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ช่วยลดการสร้าง Reactive oxygen และ nitrite species ไม่ทำให้เม็ดเลือดขาวหลั่ง Proinflammatory cytokines ($TNF-\alpha$, $IL1-\beta$) ผลการศึกษาจากกล้อง Atomic Force microscopy (AFM) พบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์โดยผ่านกลไก Pinocytosis และจากการศึกษาด้วยกล้อง Confocal-laser-scanning microscopy (CFLSM) และ Transmission electron microscopy (TEM) พบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร มีการจับกลุ่มรวมกันใน Lysosomal bodies บริเวณ Perinuclear fashion ซึ่งทางผู้จัดทำได้สรุปว่า อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (Noncytotoxicity) ไม่กระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Nonimmunogenic) ปลอดภัยกับสิ่งมีชีวิต (biocompatible properties) และยืนยันว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรสามารถนำไปประยุกต์ใช้งานทางด้าน Nanoimmunology, Nanomedicine และ Nanobiotechnology ได้⁽³⁰⁾

ในปี ค.ศ 2006 Pernodet และคณะ ได้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ที่ใช้ Citrate เป็นตัวรีดิวซ์ที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ กัน โดยได้ทำการทดสอบ อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ขนาด 13 ± 1.4 นาโนเมตร ที่ความเข้มข้น 0 – 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังมนุษย์เนื่องจากผิวหนังเป็นด่านแรกของร่างกายที่เจอกับสิ่งแวดล้อมภายนอก จากนั้นจึงนำมาศึกษาด้วยกล้อง AFM, CFLSM และ TEM พบว่าเส้นใย actin เป็นสิ่งแรกที่ได้รับผลกระทบจากอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร โดยมีปริมาณของเส้นใย actin ลดลงซึ่งจะมีผลต่อความมีชีวิตรอดของเซลล์ ซึ่งมีผลต่อการแผ่ของเซลล์ (Spread), การยึดเกาะของเซลล์ (Adhesion), การเจริญเติบโตของเซลล์ (Growth) และเช่นเดียวกับสารองค์ประกอบนอกเซลล์ (Extracellular matrix; ECM) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงและสร้างโปรตีนลดลง ซึ่งผู้วิจัยสรุปว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรทำให้คุณสมบัติภายในของเซลล์ถูกทำลายไป และสามารถทำให้เกิดปัญหาต่อสุขภาพตามมาต่อไปได้⁽³¹⁾

ในปี ค.ศ. 2008 Li และคณะ ได้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ที่ใช้ Citrate เป็นตัวรีดิวซ์ ซึ่งอนุภาคระดับนาโนเมตรที่ใช้ทดสอบมีขนาด 20 นาโนเมตร และความเข้มข้น 0.1, 0.5, and 1 นาโนโมลล่า โดยทดสอบกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากปอดมนุษย์ (MRC-5 human fetal lung fibroblast cell line) เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และจึงนำมาศึกษารูปร่างของเซลล์ด้วย TEM พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร พบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรจะจับกลุ่มกันอยู่ใน Vesicle ที่ Cytosal ที่ใกล้กับนิวเคลียสของเซลล์ และจากการทดสอบ Cell proliferation และ Cell death โดยวิธี Trypan blue exclusion assay พบว่าจะเซลล์จะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตและมีจำนวนลดลงที่ความเข้มข้น 1 nm และที่ความเข้มข้นนี้ยังทำให้เกิด Reactive oxygen species; ROS มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และการทดสอบโดย PCR array พบว่าที่ความเข้มข้น 1 นาโนโมลล่า DNA ถูกทำลายและ ยีนที่ทำหน้าที่ซ่อมแซม DNA ถูกลดการทำงานลง ซึ่งทางคณะผู้วิจัยได้สรุปว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์โดยลดการแสดงออกยีนที่ควบคุมการเกิด Cell cycle นอกจากนี้ยังมีผลต่อ Oxidative stress ของเซลล์ และยีนที่เกี่ยวข้องอีกด้วย⁽³²⁾

ปี ค.ศ. 2009 Qu และคณะ ได้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ที่ใช้ Citrate เป็นตัวรีดิวซ์ ซึ่งอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร มีขนาด 20 นาโนเมตร และความเข้มข้น 10, 50, 100, 200 และ 300 ไมโครโมลล่ากับเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังมนุษย์ (human dermal fibroblasts–fetal; HDF-f) เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay พบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ที่ความเข้มข้นสูงสุด 300 นาโนเมตร ไม่ได้เป็น

สาเหตุทำให้เซลล์ตาย แต่มีผลกระทบต่อรูปร่างของเซลล์ HDF-f เมื่อความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรสูงขึ้น⁽³³⁾

ปี ค.ศ 2010 Larese และคณะ ได้ศึกษาการดูดซึมของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเข้าสู่ผิวหนังมนุษย์โดยเลือกใช้ผิวหนัง 2 ประเภทคือ ผิวหนังปกติ (Intact human skin) และผิวหนังที่ได้รับบาดเจ็บ (Damaged human skin) โดยใช้วิธี Franz diffusion methods ซึ่งจะทา 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร ของสารละลายที่มีอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงบนชั้นเนื้อที่มาจากบริเวณหน้าท้อง เมื่อผ่านไป 24 ชั่วโมงจึงนำมาวัดปริมาณการดูดซึมอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร พบว่ามีปริมาณอนุภาคบริเวณที่ได้รับสารละลาย 0.5 มิลลิลิตร ปริมาณ 60.8 ± 25.3 นาโนกรัมต่อตารางเซนติเมตร และ 55.2 ± 27.3 นาโนกรัมต่อตารางเซนติเมตร และได้รับสารละลาย 1.5 มิลลิลิตร ปริมาณ 214.0 ± 43.7 นาโนกรัมต่อตารางเซนติเมตร และ 187.7 ± 50.2 นาโนกรัมต่อตารางเซนติเมตรของผิวหนังและผิวหนังที่ได้รับบาดเจ็บตามลำดับ โดยใช้เครื่อง Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่อยู่ในผิว และจากการทดลองด้วยเครื่อง TEM พบอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเข้าไปอยู่ในชั้นผิว Epidermis และ Dermis โดยสรุปการทดลองว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรสามารถผ่านผิวหนังมนุษย์ได้โดยการทดลองวิธี in vitro diffusion cell system⁽³⁴⁾

ปัจจุบันมีรายงานที่ศึกษาความสัมพันธ์ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรกับยีนคอลลาเจนดังนี้

ปี ค.ศ. 2008 Sisco และคณะ ได้สร้างโมเดลของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากหัวใจหนูที่ถูกปรับปรุงโครงสร้างโดย Collagen type I เพื่อให้เกิดการ Remodeling ไปเป็น Myofibroblast โดยโมเดลการทดสอบนี้จะนำมาทดสอบด้วยอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรรูปร่างแท่ง (อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรรูปร่างแท่ง) (ยาว 392 ± 93 นาโนเมตร, กว้าง 22 ± 3 นาโนเมตร) เพื่อดูความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น จากผลการทดลองพบว่าของ อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรรูปร่างแท่ง ไม่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ และไม่มีความแตกต่างในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ใส่ อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรรูปร่างแท่ง สารที่เป็นองค์ประกอบนอกเซลล์ (Extracellular matrix; ECM) และ Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่สำคัญในการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจและการ Remodeling เมื่อนำมาเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนโดยวิธี Real-time PCR พบว่า β -actin, α -smooth muscle actin, และ Collagen type I มีการแสดงออกในกลุ่มที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรรูปร่างแท่ง ลดลง โดยทางผู้วิจัยได้สรุปว่าอนุภาคทองคำระดับนาโน

เมตรรูปแท่งสามารถนำไปประยุกต์เป็น Therapeutic agent ในการรักษาโรค Cardiac fibrosis และ Wound healing ต่อไปได้⁽¹⁹⁾

ปี ค.ศ. 2009 Cho และคณะ ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน และกลไกทางอณูชีววิทยาของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีขนาดแตกต่างกัน โดยคณะผู้วิจัยได้ทำการได้ทำการฉีดอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรขนาด 4 และ 100 นาโนเมตรในหนู BALB/c mice (4.26 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว) หลังจากฉีดไปแล้ว 30 นาทีจึงทำการตัดตัวของหนูออกมาเพื่อหาพยาธิสภาพและนำมาดูการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนโดยใช้ Microarray พบว่าที่ขนาดของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรขนาด 4 nm มีการแสดงออกของยีนคอลลาเจนชนิด Col1a2 ลดลง 1.03 เท่า และมีการแสดงออกของ Col3a1 เพิ่มขึ้น 1.69 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ขนาดของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรขนาด 100 นาโนเมตร มีการแสดงออกของ Col1a2 และ Col3a1 เพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุม 2.08 และ 3.34 ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรขนาด 4 และ 100 นาโนเมตร มีผลต่อชีววิทยาต่อเนื้อเยื่อตับหนูและการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนในกลุ่ม Apoptosis, Cell cycle, Inflammation และ Metabolic Process ไปในทางเดียวกัน⁽³⁵⁾

ปี ค.ศ. 2009 Mironava และคณะ ได้ศึกษาการปัจจัยที่มีผลต่อการนำอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเข้าสู่เซลล์ เช่น ระยะเวลาที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร, ขนาดของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร และความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร โดยในการทดลองได้เลือกอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ขนาด 13 นาโนเมตร ที่ความเข้มข้น 0-189 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 45 นาโนเมตร ที่ความเข้มข้น 0-26 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำการทดสอบกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังมนุษย์โดยเลือกเก็บข้อมูลเป็นเวลา 6 วัน การศึกษา กลไกการนำเข้าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรของเซลล์ศึกษาโดยใช้เครื่อง Scanning Electron Microscopy; SEM จากผลการทดลองพบว่าที่อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ขนาด 13 นาโนเมตรมีการนำอนุภาคเข้าสู่เซลล์โดยวิธี Phagocytosis และที่อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรขนาด 45 นาโนเมตร มีการนำอนุภาคเข้าสู่เซลล์โดยวิธี Clatherin-mediated endocytosis นอกจากนี้แล้วยังพบความเสียหายของ Cytoskeleton filament หลังจากได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรและจะถูกสร้างขึ้นใหม่หลังจากนำอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรออกไป เช่นเดียวกับ Extracellular matrix (ECM) proteins, Collagen และ Fibronectin ที่มีจำนวนลดลงในเซลล์ แต่ในทางตรงกันข้าม Actin หรือ Beta-tubulin protein นั้นไม่พบความเปลี่ยนแปลง ทางผู้จัดทำยังพบว่าในเซลล์ที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรนั้นมีอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ลดลง ซึ่งทางผู้จัดทำได้ตั้งข้อสันนิษฐานว่าเกิดจากจำนวน Vacuoles ใน

เซลล์ที่เพิ่มขึ้น และจากทดลองสุดท้ายพบว่าการทำงานของเซลล์สามารถกลับมาได้อย่างเดิม เมื่อ อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรถูกกำจัดออกไป⁽³⁶⁾

ปี ค.ศ. 2009 Balasubramanian และคณะ ได้ศึกษาการกระจายตัวของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรขนาด 20 นาโนเมตร ที่ถูกฉีดเข้าหลอดเลือดดำของหนูไปยังอวัยวะต่างๆ และสารคัดหลั่งของร่างกาย โดยเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อมากกว่า 25 อวัยวะ, อูจจาระ และ ปัสสาวะ มาวิเคราะห์การกระจายตัวด้วย ICP-MS analysis หลังจากนั้นนำตับและม้ามมาสกัดเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงของยีน จากผลการทดลองพบว่าหลังจากฉีดอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเข้าสู่หลอดเลือด พบการกระจายตัวของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ตับ ($49.4 \pm 50.4-72.2 \pm 40.5$ นาโนกรัมต่อกรัม) และม้าม ($8.4 \pm 5.0-9.5 \pm 6.4$ นาโนกรัมต่อกรัม) อย่างรวดเร็วและพบการรวมกลุ่มอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ตับและม้ามตลอดระยะเวลาที่ทดลอง (2 เดือน) หนึ่งเดือนหลังจากฉีดอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร พบว่ามีปริมาณอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรในปัสสาวะและอุจจาระลดลงแต่พบการรวมกลุ่มกันของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ไต (5.5 ± 2.5 นาโนกรัมต่อกรัม) และถุงอัณฑะ(มากถึง 0.6 ± 0.1 นาโนกรัมต่อกรัม) มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในอวัยวะอื่นๆเช่นปอดพบการรวมกลุ่มของอนุภาคหลังจากฉีดไปแล้วหนึ่งวันและลดลงอย่างรวดเร็วภายในหนึ่งสัปดาห์ แต่ไม่พบการกระจายตัวของอนุภาคไปยังสมอง จากการศึกษากการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนหลังจากได้รับ อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรไปแล้ว 2 เดือนพบว่า ยีนคอลลาเจนชนิด Col1a1 และ Col1a2 มีการแสดงออกในเซลล์ตับลดลงจากกลุ่มควบคุม 2.5 ± 0.1 และ 2.2 ± 0.0 เท่าตามลำดับ และ Col1a1 มีการแสดงออกในเซลล์ตับและม้ามลดลงจากกลุ่มควบคุมไป 1.7 ± 0.1 เท่าเช่นกัน⁽²⁰⁾

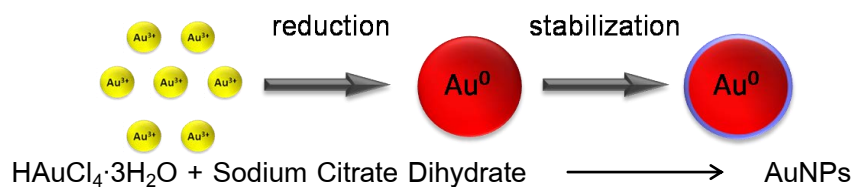
บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

ก่อนทำการสังเคราะห์ให้ทำความสะอาดเครื่องแก้ว, เทอร์โมมิเตอร์ และ magnetic bar ด้วย ด้วย aqua regia ($\text{HCl} : \text{HNO}_3 = 3:1$) หลังจากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่น และนำไปทำให้แห้งก่อนนำไปใช้งาน

ขั้นตอนการสังเคราะห์อนุภาคระดับนาโนเมตร เริ่มจากปิเปตสารละลาย 1% hydrogen tetrachloraurate (III) trihydrate ($\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร กับน้ำ MilliQ ปริมาณ 34 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 150 มิลลิลิตร และปิเปต 0.0202 มิลลิโมล trisodium citrate dehydrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 12 มิลลิลิตร กับน้ำ MilliQ ปริมาณ 3 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร อีกขวดหนึ่ง ต้มสารละลายทั้งคู่บน hot plate stirrer โดยใช้ magnetic bar ช่วยกวนตลอดเวลา เมื่อถึงอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส นำขวดที่มีสารละลาย trisodium citrate dihydrate เทใส่ขวดที่มี hydrogen tetrachloraurate (III) trihydrate อย่างรวดเร็ว จนเมื่ออุณหภูมิ 85 – 95 องศาเซลเซียสสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองอ่อนเป็นสีน้ำเงินเข้ม (deep blue) จนกระทั่งสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีแดง (wine red) ต้มต่ออีกประมาณ 2 ชั่วโมงและทิ้งไว้ให้เย็น เก็บอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ได้ในภาชนะป้องกันแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



รูปที่ 2: แผนภาพแสดงการสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรจากสารละลาย HAuCl_4 และ Sodium citrate Dihydrate ด้วยปฏิกิริยา Reduction ในอุณหภูมิที่เหมาะสม

การตรวจสอบคุณสมบัติของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ได้

นำอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ได้ไปตรวจสอบคุณสมบัติตามหัวข้อต่างๆดังนี้

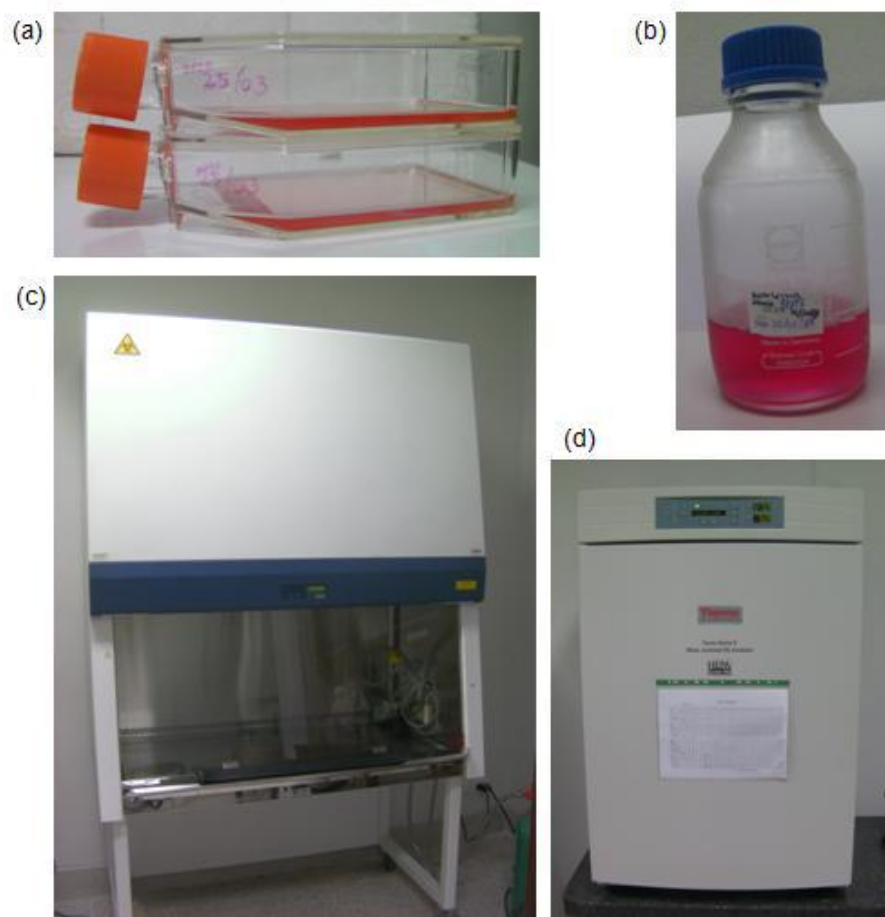
1. Transmission electron microscope (TEM) ที่ 100 กิโลโวลท์
 - 1.1 เพื่อหาขนาดอนุภาค
 - 1.2 ตรวจสอบรูปร่าง
 - 1.3 ดูการกระจายตัวของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร
2. UV-vis spectroscopy ที่ 520 นาโนเมตร เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติการดูดกลืนแสง



รูปที่ 3: แสดงเครื่อง UV/Vis Spectrophotometer

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 จะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่เติม NaHCO_3 (3.7 กรัม), 10% fetal bovine serum และ 1% antibiotic โดยเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5% CO_2



รูปที่ 4: แสดงอุปกรณ์และเครื่องที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์

- (a) ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์
- (b) อาหารเลี้ยงเซลล์: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
- (c) ตู้ปลอดเชื้อสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์
- (d) ตู้บ่มเชื้อสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์

การศึกษารูปร่างลักษณะของเซลล์

การศึกษารูปร่างลักษณะของเซลล์นั้นจะศึกษาโดยการนำเซลล์ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงเพื่อเปรียบเทียบรูปร่างลักษณะของเซลล์ปกติ (เซลล์ในกลุ่มควบคุม) กับเซลล์ที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ซึ่งโดยปกติแล้วเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 จะมีรูปร่างเป็นทรงกระสวยยึดเกาะกับพื้นผิวของขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ เมื่อมีความผิดปกติเกิดขึ้น เซลล์จะมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไป เช่น มีรูปร่างลึบแบน หรือเปลี่ยนเป็นทรงกลม และเมื่อเซลล์เกิดการตายเซลล์จะหลุดจากพื้นผิวของขวดเพาะเลี้ยงเซลล์และลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์



รูปที่ 5: แสดงกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่ใช้ในการถ่ายภาพเซลล์

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

ศึกษาโดยใช้ PrestoBlue™ Reagent (Molecular Probes, Invitrogen) ซึ่งเป็นสารที่ใช้วัดความสามารถในการมีชีวิตและการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่ง PrestoBlue™ Reagent เป็นน้ำยาที่มีหลักการดัดแปลงมาจากสารที่มีชื่อว่า Resazurin solution ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการตรวจวัดเอนไซม์ mitochondrial dehydrogenase ที่พบเฉพาะในเซลล์ที่มีชีวิต ในขณะที่เซลล์ที่ตายแล้วไม่สามารถที่จะสร้างเอนไซม์นี้ออกมาได้

หลักการของ PrestoBlue™ Reagent คือ PrestoBlue™ Reagent เป็นสารที่มีสีน้ำเงิน เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาและสามารถถูกรีดักชันด้วย Mitochondrial dehydrogenase ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีชมพู และนำไปวัดค่า excitation และ emission แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ 560 และ 590 ตามลำดับด้วยเครื่อง Microplate reader จึงนำไปคำนวณหาเพื่อหาค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (% Cell viability)

$$\% \text{ Cell viability} = \frac{\text{Fluorescence treatment} \times 100}{\text{Fluorescence control}}$$

Fluorescence treatment = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ได้รับสาร

Fluorescence control = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์



รูปที่ 6: แสดงเครื่อง Microplate reader ที่ใช้ในการวัดค่าดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนต์

การศึกษาผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์

ศึกษาโดยวิธีการ CFSE assay เป็นการศึกษาเพื่อติดตามการแบ่งตัวของเซลล์ หลักการ CFSE assay คือ เมื่อย้อมเซลล์ด้วยสี CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) (Molecular Probes, Invitrogen, USA) ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีสี และ non-fluorescent เมื่อ CFSE ผ่านเข้าสู่เซลล์ หมู่ acetate จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ Esterases ที่อยู่ในเซลล์ ได้ Fluorescent carboxyfluorescein succinimidyl ester และหลังจากนั้น ที่หมู่ Succinimidyl ester ของสารจะจับกับ Intracellular amines เพื่อให้สี Fluorescent คงอยู่ในเซลล์ได้ดียิ่งขึ้น เมื่อเวลาผ่านไปเซลล์ที่มีการแบ่งตัวความเข้มของสี CFSE ภายในเซลล์ก็จะลดลง ในขณะที่เซลล์ที่ตายหรือไม่มีการแบ่งตัวนั้นจะมีความเข้มของสี CFSE ในเซลล์เท่าเดิม โดยจะตรวจวัดปริมาณของสีด้วยเครื่อง Flow cytometer โดยขั้นแรกนำเซลล์ที่จะนำไปใช้ในการทดลองมาล้างด้วย PBS 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำไปผสมกับ CFSE solution 3 ไมโครลิตร เขย่าในที่มืด 4 นาที หลังจากนั้นให้หยุดปฏิกิริยาด้วย FBS 100 ไมโครลิตร ล้างด้วย PBS สองครั้ง จึงละลายกลับด้วย Working DMEM และใช้เซลล์ที่ย้อมเสร็จแล้วไปใช้ในการทดลองต่อไป โดยการวัดปริมาณความเข้มของ CFSE ที่อยู่ในเซลล์โดยใช้เครื่อง Flow cytometer จึงนำไปคำนวณหาเพื่อหาค่าร้อยละของการติดสี CFSE ภายในเซลล์ต่อไป (% CFSE intensity)

$$\% \text{ CFSE intensity} = \frac{\text{Intensity treatment} \times 100}{\text{Intensity control}}$$

Intensity treatment = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ได้รับสาร

Intensity control = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์



รูปที่ 7: แสดงเครื่อง Flow cytometer ที่ใช้ในการวัดหาความเข้มของสี CFSE ที่อยู่ในเซลล์

การศึกษาเพื่อดูผลต่อการเกิดของสารอนุมูลอิสระของเซลล์

ศึกษาโดยวิธีการ Reactive oxygen species (ROS) assay เป็นวิธีที่ตรวจวัดปริมาณของ ROS ที่เกิดขึ้น โดยมีหลักการคือ ย้อมเซลล์ด้วยสาร 2', 7'-dichlorofluorescein-diacetate (H₂DCFDA)(Molecular Probes, Invitrogen, USA) ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีสี และ non-fluorescent เมื่อ H₂DCFDA ผ่านเข้าสู่เซลล์หุ้ม acetate จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ esterases ที่อยู่ในเซลล์ ได้สารประกอบ non-fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (H₂DCF) และจะถูกเปลี่ยน 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) ตามปริมาณที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ซึ่งจะนำไปวัดปริมาณการเกิดที่ 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader ในการทดลองนั้นจะย้อมเซลล์ด้วยสี H₂DCFDA (0.1 ไมโครโมล) 100 ไมโครลิตร incubate 30 นาที ล้างด้วย PBS 2 รอบ และใส่อนุภาคทองคำระดับนาโนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงไปเพื่อกระตุ้นการสร้างสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น โดยวัดปริมาณสีฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ 520 นาโนเมตร ทุก 10 นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงนำไปคำนวณหาเพื่อหาค่าร้อยละของการเกิดของอนุมูลอิสระของเซลล์ต่อไป (% ROS Generation)

$$\% \text{ ROS Generation} = \frac{\text{Fluorescence treatment} \times 100}{\text{Fluorescence control}}$$

Fluorescence treatment = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ได้รับสาร

Fluorescence control = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์

การศึกษาผลอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการแสดงออกของยีนคอลลาเจนด้วยวิธี Real time RT-PCR

หลักการของreal time PCR SYBR

แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ขั้นตอนการสกัด RNA

ดูดมีเดียและสารที่ใช้ทดสอบออกจากเซลล์ เติมสารละลาย TRIZOL 1 มิลลิลิตร แล้วดูดขึ้นลงหลาย ๆ ครั้งจนสารละลายเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติมสารละลาย Chloroform 0.2 มิลลิลิตร นำไปปั่นตกที่ 12000 g 2-8 องศาเซลเซียส 15 นาที แยกส่วนใสไปไว้ในหลอดใหม่แล้วเติมสารละลาย Isopropyl alcohol 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วจึงนำไปปั่นตกที่ 12000 g 2-8 องศาเซลเซียส 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง แล้วล้างตะกอน RNA ที่ได้ด้วยสารละลาย 75% ethanol 1 มิลลิลิตร นำไป เขย่าและปั่นตกที่ 7500 g 2-8 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง และตั้งตะกอน RNA ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วจึงละลายกลับตะกอน RNA ด้วย DEPC water 15 ไมโครลิตร และไปต้มที่ 55-60 องศาเซลเซียส 10 นาที และสารละลาย RNA ที่ได้ไปวัดความเข้มข้นด้วย Nanodrop spectrophotometer ที่ 260 และ 280 นาโนเมตร ซึ่งค่าความเข้มข้นของ RNA ที่ได้ควรมีค่าอยู่ในช่วง 1.8-2.0 จากนั้นจึงนำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

2. การกำจัด DNA ปนเปื้อน

นำ RNA ที่มีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร มา 1 ไมโครลิตร เติม 10X Reaction buffer (with $MgCl_2$) 1 ไมโครลิตร, DEPC water 7 ไมโครลิตร, DNaseI 10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง เติม 25 mM EDTA 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส 10 นาที เมื่อผ่านการทำลาย DNase แล้วจึงนำ RNA ที่ได้ไปใช้ในการสังเคราะห์ cDNA

3. ขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA

การสังเคราะห์ cDNA ได้ใช้ชุดน้ำยา ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, USA) ซึ่งแบ่งออกเป็นสองขั้นตอนคือ

ขั้นแรก ใส่ RNA 1 ไมโครลิตร , DEPC water 3 ไมโครลิตร และ oligo(d)T 1 ไมโครลิตร ไปรวมกันและนำไป incubate ที่ 70 องศาเซลเซียส 5 นาทีและหลังจากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จึงนำไปปั่นตกด้วย Microcentrifuge เป็นเวลา 10 นาที

ขั้นตอนที่สอง ใส่ ImProm-II™ 5X Reaction Buffer 4.0 ไมโครลิตร, MgCl₂ 4.0 ไมโครลิตร, PCR Nucleotide Mix 1.0 ไมโครลิตร, Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor 0.5 ไมโครลิตร, ImProm-II™ Reverse Transcriptase 1.0 ไมโครลิตร, Nuclease-Free Water 4.5 ไมโครลิตร รวมกับสารละลายในขั้นแรกและนำไปปฏิกิริยาที่ 25 องศาเซลเซียส 5 นาที 42 องศาเซลเซียส 60 นาที และ 70 องศาเซลเซียส 15 นาที

4. ขั้นตอนการทำ Real-time RT-PCR

สำหรับขั้นตอนการทำ Real time RT-PCR ได้ใช้ชุดน้ำยา EXPRESS SYBR® GreenER™ qPCR SuperMixes and Two-Step qRT-PCR Kits (Invitrogen, USA) โดยนำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้ 1 ไมโครลิตร ผสมกับ EXPRESS SYBR GreenER™ qPCR SuperMix Universal 10 ไมโครลิตร, 10 µM Forward Primer 0.4 ไมโครลิตร, 10 µM Reverse Primer 0.4 ไมโครลิตร, ROX Reference Dye (25 µM) 0.4 ไมโครลิตร และปรับระดับด้วย Ultrapure water จนมีปริมาตร 20 ไมโครลิตร

หลังจากนั้นจึงนำไป amplify ตามสภาวะต่อไปนี โดยใช้ Fast cycling program ของเครื่อง StepOne Plus™ (Applied Biosystems, USA) เริ่มจาก Pre-denature ที่ 95 องศาเซลเซียส 20 วินาที หลังจากนั้นทำ 40 cycles ที่ 95 องศาเซลเซียส 1 วินาที 60 องศาเซลเซียส 20 วินาที และตรวจวัดการเรืองแสงของ SYBR ขณะที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

โดยหลักการทำงานของ SYBR คือ SYBR จะเป็นสีฟลูออเรสเซนต์ซึ่งสามารถเข้าไปจับกับ Minor-groove ของ Double-stranded DNA ได้ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตจะทำให้เกิดการเรืองแสงขึ้น เมื่อถึงช่วง Denature ดีเอ็นเอจะหลุดออกเป็นสายเดี่ยวทำให้ SYBR หลุดออกจึงทำให้การเปล่งแสงลดลง ดังนั้นเมื่อมีการเพิ่มของจำนวนสายดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR จึงจะทำให้ SYBR มีการเปล่งแสงเพิ่มขึ้นและสามารถนำมาคำนวณหาจำนวนของ PCR product ได้ ซึ่งในการทดลองนี้เราได้คำนวณเปรียบเทียบปริมาณ PCR product ที่

เกิดขึ้นของกลุ่มทดลองที่ใส่อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรและกลุ่มซึ่งไม่ใส่อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรโดยใช้วิธี Relative quantitative (RQ)

ซึ่งการคำนวณหาค่า RQ จะคำนวณจากค่า Cycle threshold (Ct) ซึ่งเป็นค่าของจำนวนรอบของ PCR ที่สามารถเริ่มจับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของ SYBR ได้ โดยสามารถคำนวณเพื่อหาค่า RQ ได้ตามสมการดังต่อไปนี้

$$\Delta Ct \text{ calibrator} = Ct (\text{Negative control}) - Ct (\text{Endogenous control ของ Negative control})$$

$$\Delta Ct \text{ sample} = Ct(\text{Sample}) - Ct (\text{Endogenous control ของ Sample})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ sample} - \Delta Ct \text{ calibrator}$$

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

ซึ่งในที่นี้เครื่อง StepOne Plus™ ที่ใช้ในการทดลองจะคำนวณค่า RQ ออกมาให้เรียบร้อยแล้ว

การหาว่าการแสดงออกของยีนเมื่อเทียบกับกลุ่ม Negative control ว่ามีการแสดงออกมากขึ้นหรือน้อยลงเป็นกี่เท่า นั้น สามารถคำนวณได้จาก สมการดังต่อไปนี้

$$\text{Fold change} = \text{Log}_{10}(RQ)$$

การออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองในครั้งนี้ ใช้ฐานข้อมูล mRNA ของ Mus musculus จาก <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> โดยมีข้อมูลดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 : แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ Real-time PCR

Gene	primer sequences	Gene databases
GAPDH- FWD GAPDH- REV	5' TCC AGG AGC GAG ACC CCA CT 3' 5' ACC CGT TTG GCT CCA CCC TT 3'	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_008084.2
Col1a1- FWD Col1a1- REV	5' CCC TGG TCC TCG AGG TCG CA3' 5'TTC TTG CGG CTG CCT TCG GG 3'	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_007742.3
Col1a2- FWD Col1a2- RED	5' CTC ATA CAG CCG CGC CCA GG 3' 5' GGT GAT GTT CTG TGA AGC ACG GTT G 3'	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_007743.2
Col3a1- FWD Col3a1- REV	5' CCT GCA GGA CCC ACT GGC AGT T 3' 5' GGT TGC CAG GAG AAC CAC TGT TGC 3'	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_009930.2



รูปที่ 8: แสดงเครื่อง StepOnePlus™ ที่ใช้ในการทำ Real-time PCR

ลำดับขั้นตอนการวิจัย

1. สำหรับการทดลองเพื่อดูผลความเป็นพิษต่อเซลล์

เลี้ยงเซลล์จำนวน 10^4 เซลล์ ในอาหารปริมาตร 45 ไมโครลิตรต่อหนึ่งหลุม ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม (96-well plate) จากนั้นบ่มในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. สำหรับการทดลองเพื่อดูผลต่อการเกิดของสารอนุมูลอิสระของเซลล์

เลี้ยงเซลล์จำนวน 5×10^4 เซลล์ ในอาหารปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหนึ่งหลุม ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม (96-well plate) จากนั้นบ่มในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. สำหรับการทดลองเพื่อดูผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์ ผลต่อการแสดงออกของยีนคอลลาเจน และการศึกษารูปร่างลักษณะของเซลล์

เลี้ยงเซลล์จำนวน 5×10^5 เซลล์ ในอาหารปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่อหนึ่งหลุม ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม (24-well plate) จากนั้นบ่มในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

แบ่งชุดการทดลองเป็น 4 กลุ่ม

1. กลุ่มควบคุมผลลบ คือกลุ่มเซลล์ที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ตามปกติ
2. กลุ่มควบคุมผลบวก คือกลุ่มเซลล์ที่ได้รับสาร DMSO เพื่อให้เซลล์เกิดความผิดปกติสำหรับการทดลองเพื่อดูความเป็นพิษต่อเซลล์และการแบ่งตัวของเซลล์ และ Calcium oxalate ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร สำหรับการทดลองเพื่อดูการเกิดอนุมูลอิสระของเซลล์
3. กลุ่มควบคุมสารที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร
4. กลุ่มเซลล์ที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ความเข้มข้น 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

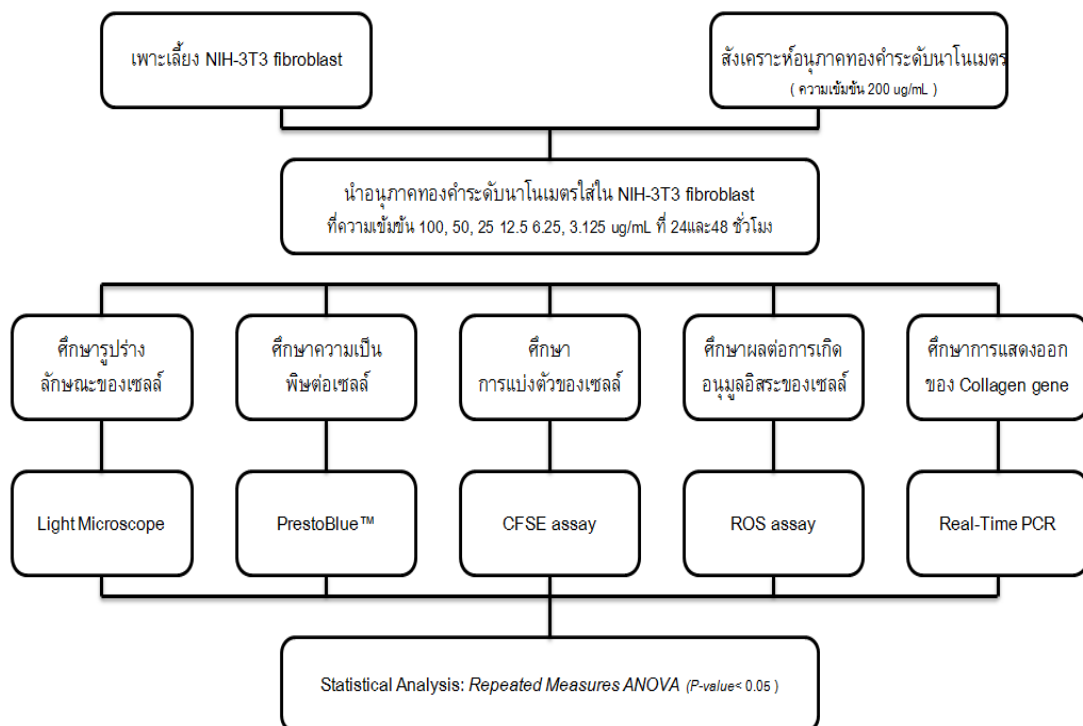


รูปที่ 9: แสดงเซลล์ในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม



รูปที่ 10: แสดงเซลล์ในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม

ปมเลี้ยงเซลล์กับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วย PrestoBlue™ Reagent ศึกษาต่อการเกิดของสารอนุมูลอิสระของเซลล์ด้วย DCFH-DA ศึกษาสำหรับการทดลองเพื่อดูผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์ด้วย CFSE และ ผลต่อการแสดงออกของยีนคอลลาเจนด้วย Real-time PCR โดยขั้นตอนที่แสดงในขั้นตอนข้างต้น ดังแสดงใน รูปที่ 10



รูปที่ 11 : แสดงขั้นตอนการศึกษาผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลเป็นค่า Mean±SD โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนเมื่อมีการวัดซ้ำ: Repeated Measured ANOVA เพื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ทดลองกับกลุ่มควบคุม โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism5 เวอร์ชัน 5.0.1 โดยความแตกต่างจะมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อมีค่า p-value ≤ 0.05

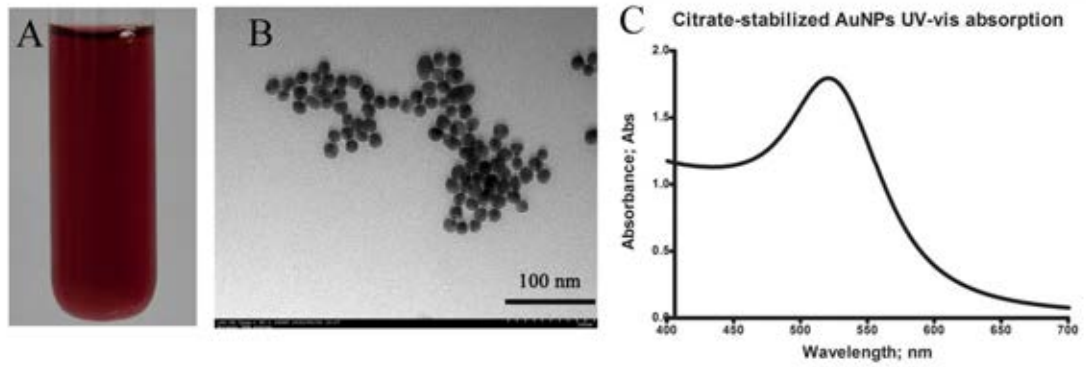
บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. การสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ถูกสังเคราะห์นั้นจะถูกนำไปตรวจสอบคุณสมบัติเช่น ขนาด รูปร่าง การกระจายตัว และคุณสมบัติการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Transmission Electron Microscopy (TEM) และ UV-Vis Spectrophotometer พบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีรูปร่างเป็นทรงกลม อยู่กระจายตัวกัน โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยอยู่ที่ 15-20 นาโนเมตร และมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ที่ 520.5 นาโนเมตรซึ่งค่านี้มีความสัมพันธ์กับสีแดงของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่เราสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งถ้าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติ เช่น เกิดการรวมกลุ่มกันของอนุภาคจะทำให้สีของสารละลายเปลี่ยนไป คือเปลี่ยนจากสีแดงไปเป็นสีม่วง ซึ่งก็จะสัมพันธ์กับค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงด้วยเช่นกัน ดังแสดงในรูปที่ 12

นอกจากนี้การสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรแต่ละครั้งต้องมีการนำไปตรวจสอบคุณสมบัติก่อนนำมาใช้เสมอ ซึ่งผลที่ได้พบว่าคุณสมบัติของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ทำการสังเคราะห์ในแต่ละครั้งมีค่าเหมือน หรือใกล้เคียงกันทุกครั้ง ซึ่งแสดงถึงว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ขึ้นมาใช้ในแต่ละการทดลองนั้นมีคุณสมบัติที่ไม่แตกต่างกัน



รูปที่ 12: แสดงคุณสมบัติของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ได้

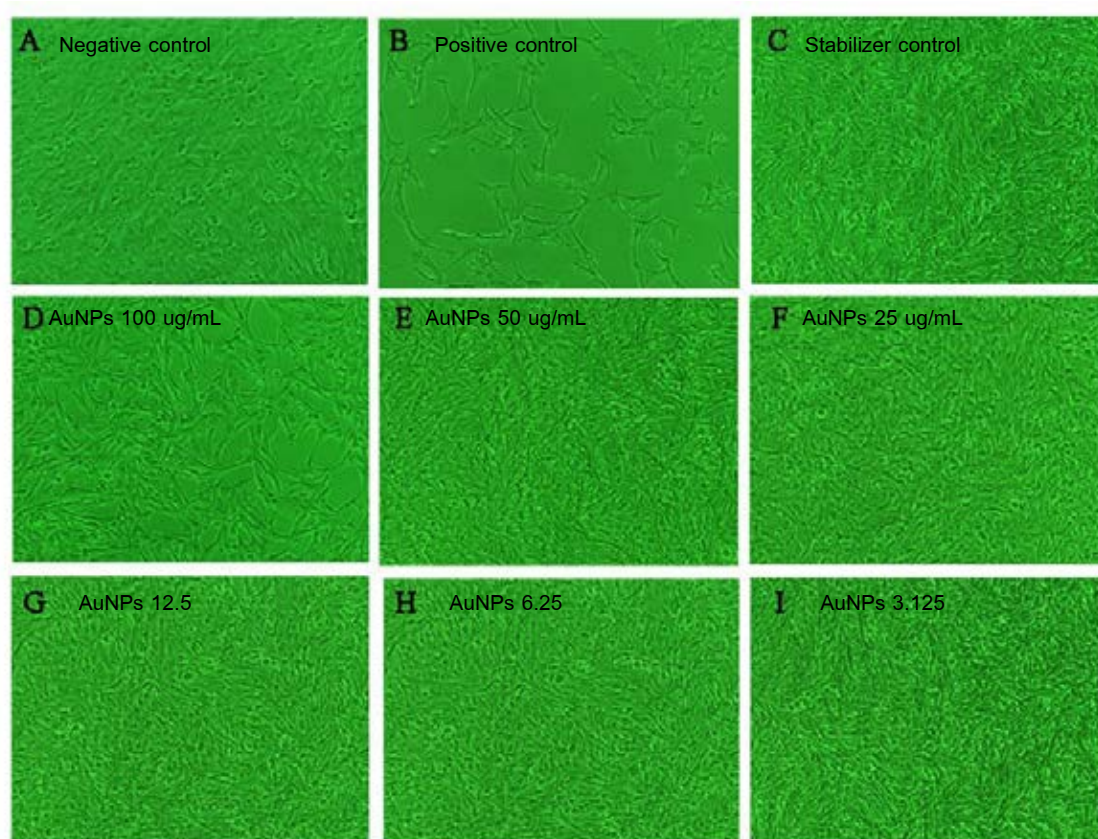
- (a) อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเมื่อมองด้วยตาเปล่า
- (b) ผลจากการทดสอบอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
- (c) ผลของการวัดค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ความยาวคลื่น 520.5 นาโนเมตร

2. ผลการศึกษาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะของเซลล์

ในการศึกษาได้ถ่ายภาพการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะของเซลล์หลังจากได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (treated cells) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (Negative control group) ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ซึ่งจะมีค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เท่ากับ 100

2.1 ผลจากอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อรูปร่างของเซลล์ที่ 24 ชั่วโมง

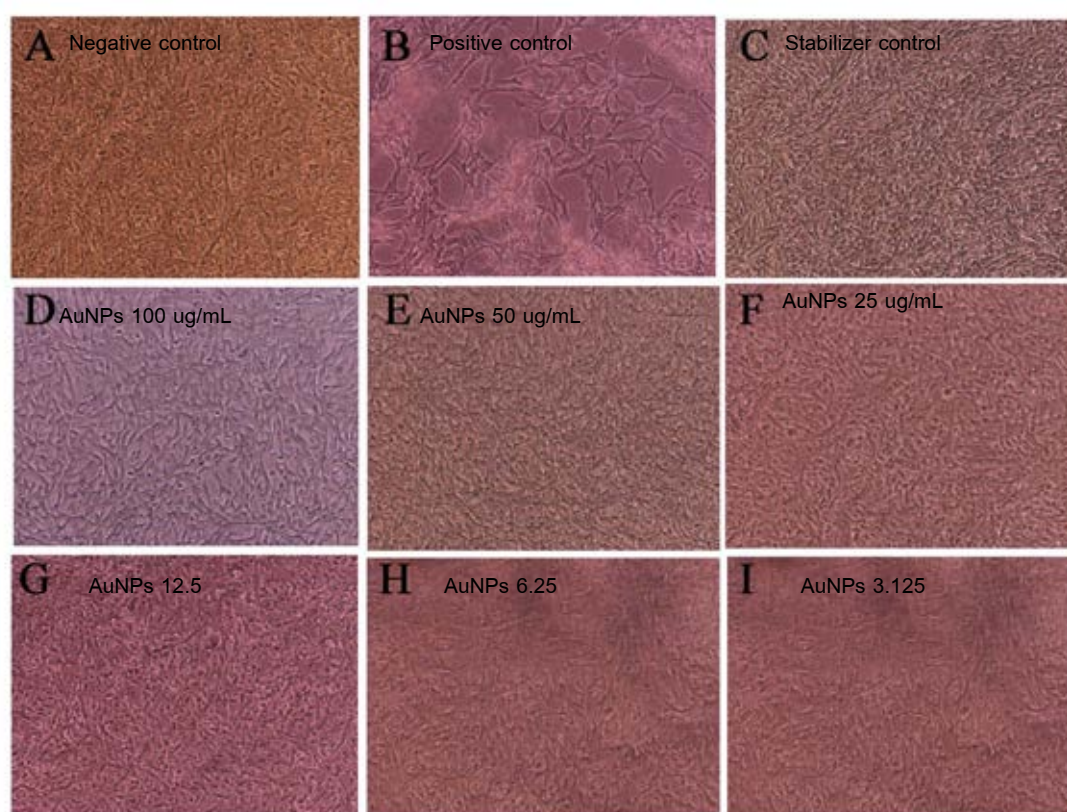
การศึกษาเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 ที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ความเข้มข้น 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าที่อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีรูปร่างของเซลล์เป็นรูปกระสวย แต่ก็ยังมีลักษณะที่ไม่สมบูรณ์คือ มีขนาดเล็ก และลีบแบน เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนสำหรับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ความเข้มข้นอื่น ๆ นั้น ไม่มีความเปลี่ยนแปลงใดๆ เกิดขึ้น



รูปที่ 13: แสดงรูปร่างลักษณะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 หลังจากได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ความเข้มข้น 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2 ผลจากอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อรูปร่างของเซลล์ที่ 48 ชั่วโมง

การศึกษาเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 ที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ความเข้มข้น 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าที่อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีรูปร่างของเซลล์เป็นรูปกระสวย แต่ก็ยังมีลักษณะที่ไม่สมบูรณ์คือ มีขนาดเล็ก และลีบแบน เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมส่วนสำหรับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ความเข้มข้นอื่น ๆ นั้นไม่มีความเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น



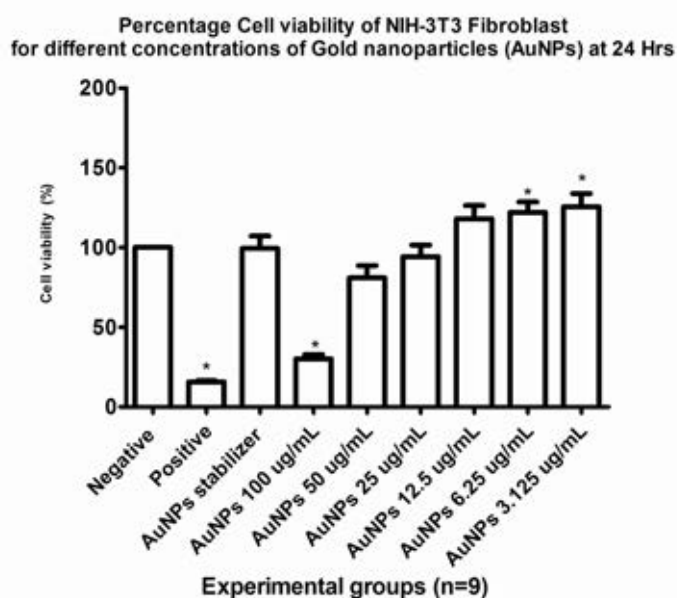
รูปที่ 14: แสดงรูปร่างลักษณะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 หลังจากได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ความเข้มข้น 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3. ผลการศึกษาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการมีชีวิตของเซลล์

ในการศึกษาได้ทดสอบความเป็นพิษของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อเซลล์ด้วยน้ำยา PrestoBlue™ แล้วนำมาคำนวณหาร้อยละความอยู่รอดของเซลล์ โดยจะนำมาเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (Negative control group) ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ซึ่งเซลล์ที่ไม่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรจะมีร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เท่ากับ 100

3.1 ผลการศึกษาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการมีชีวิตของเซลล์ที่ 24 ชั่วโมง

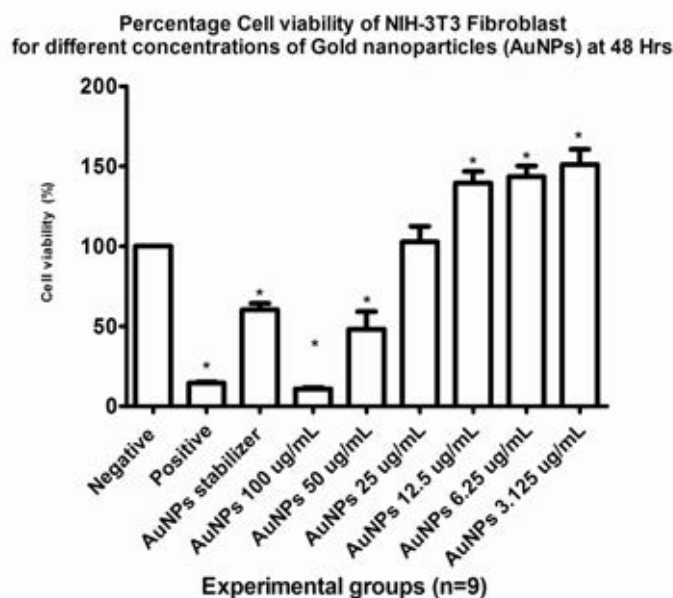
ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อบ่มเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 ด้วยอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าที่ความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีค่าร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์ลดลงจาก 100.0 ± 0 เป็น 30.16 ± 7.81 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ในทางตรงข้ามที่ความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ 3.125 และ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีค่าร้อยละความอยู่รอดของเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 125.5 ± 24.9 และ 122.0 ± 19.46 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับกับผลจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างลักษณะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่พบว่าเมื่อบ่มเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไปจะทำให้จำนวนเซลล์มีชีวิตมีแนวโน้มลดลง



รูปที่ 15: แสดงร้อยละความอยู่รอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 หลังจากได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ 24 ชั่วโมง ใช้ความเข้มข้นที่ทดสอบ 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

3.2 ผลการศึกษาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการมีชีวิตของเซลล์ที่ 48 ชั่วโมง

ผลการศึกษาการความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อบ่มเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 ด้วยอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าที่ความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีค่าร้อยละความอยู่รอดของเซลล์ลดลงจาก 100.0 ± 0 เป็น 48.15 ± 32.91 และ 10.75 ± 2.6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ตามลำดับ แต่ในทางตรงข้ามที่ความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ 3.125, 6.25, 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีค่าร้อยละความอยู่รอดของเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 151.0 ± 28.76 , 143.39 ± 20.22 และ 139.76 ± 21.8 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับกับผลจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างลักษณะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่พบว่าเมื่อบ่มเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไปจะทำให้จำนวนเซลล์มีชีวิตมีแนวโน้มลดลง



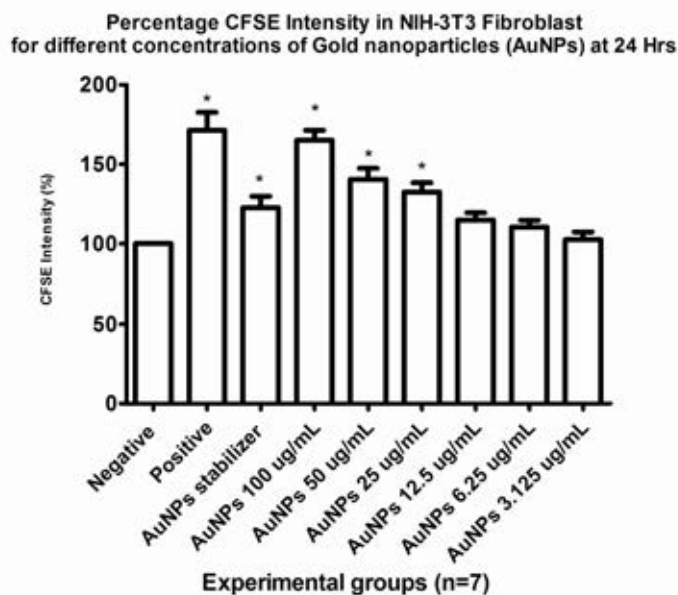
รูปที่16: แสดงร้อยละความอยู่รอดของเซลล์ไฟโรบลาสต์ NIH-3T3 หลังจากได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ 48 ชั่วโมง ใช้ความเข้มข้นที่ทดสอบ 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

4. ผลการศึกษาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการแบ่งตัวของเซลล์

ในการศึกษาได้ทดสอบผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์เมื่อได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ด้วยวิธี CFSE แล้วนำมาคำนวณหาร้อยละการติดสีของ CFSE ภายในเซลล์ โดยจะนำมาเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (Negative control group) ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ซึ่งเซลล์กลุ่มที่ไม่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรจะมีร้อยละการติดสี CFSE ภายในเซลล์เท่ากับ 100

4.1 ผลการศึกษาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการแบ่งตัวของเซลล์ที่ 24 ชั่วโมง

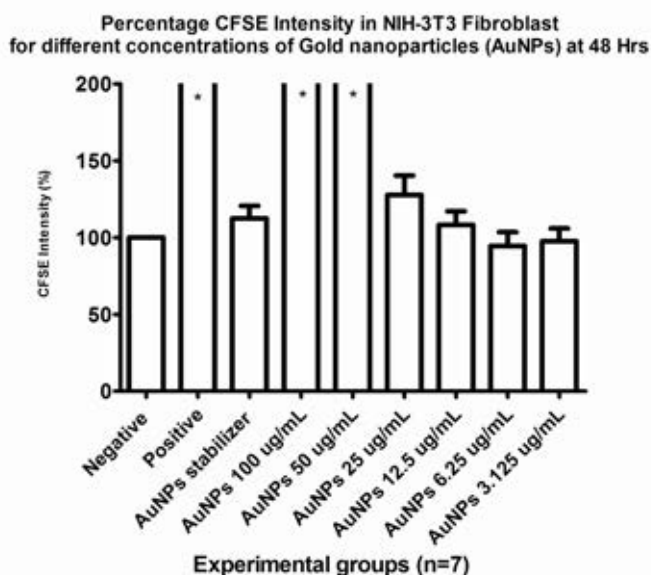
ผลการศึกษาการแบ่งตัวของเซลล์เมื่อบ่มเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 ด้วยอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าที่ความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีค่าร้อยละของการติดสี CFSE ภายในเซลล์มากกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งมีค่าการติดสี CFSE ร้อยละ 100.0 ± 0 เป็น 132.41 ± 15.71 , 140.45 ± 18.53 และ 165.03 ± 16.43 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ตามลำดับ และที่ความเข้มข้นอื่นๆ ไม่พบนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับกับผลจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างลักษณะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่พบว่าเมื่อบ่มเลี้ยง NIH-3T3 fibroblast อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไปจะทำให้มีการแบ่งตัวของเซลล์ลดลง



รูปที่ 17: แสดงผลการศึกษาการแบ่งตัวของเซลล์โดยดูจากร้อยละการติดสี CFSE ภายในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 หลังจากที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ 24 ชั่วโมง ใช้ความเข้มข้นที่ทดสอบ 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

4.2 ผลการศึกษาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการแบ่งตัวของเซลล์ที่ 48 ชั่วโมง

ผลการศึกษาการแบ่งตัวของเซลล์เมื่อบ่มเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 ด้วยอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าที่ความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีค่าร้อยละของการติดสี CFSE ภายในเซลล์มากกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งมีค่าการติดสี CFSE ร้อยละ 100.0 ± 0 เป็น 329.1 ± 265.85 และ 526.91 ± 283.12 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ตามลำดับ และที่ความเข้มข้นอื่นๆ ไม่พบนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับกับผลจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างลักษณะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่พบว่าเมื่อบ่มเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไปจะทำให้มีการแบ่งตัวของเซลล์ลดลง



รูปที่ 18: แสดงผลการศึกษาการแบ่งตัวของเซลล์โดยดูจากร้อยละการติดสี CFSE ภายในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 หลังจากที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ 48 ชั่วโมง ใช้ความเข้มข้นที่ทดสอบ 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

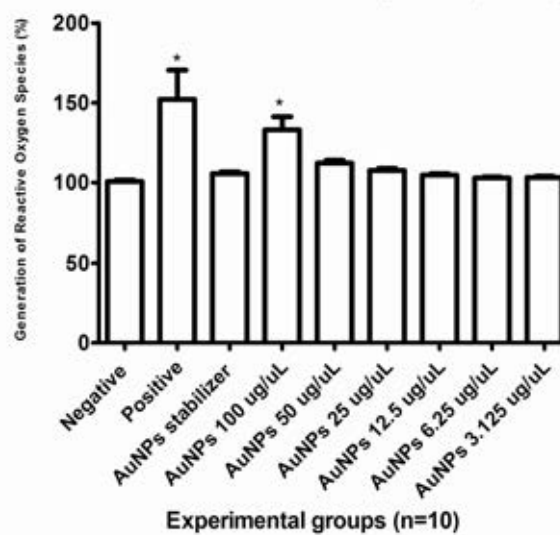
5. ผลการศึกษาผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการเกิดอนุมูลอิสระของเซลล์

ในการศึกษาผลต่อการเกิดอนุมูลอิสระของเซลล์เมื่อได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อ ด้วยวิธี DCFH-DH แล้วนำมาคำนวณหาร้อยละการการเกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ โดยจะนำมาเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (Negative control group) ที่เวลา 1 ชั่วโมงซึ่งเซลล์กลุ่มที่ไม่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรจะมีค่าร้อยละการเกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์เท่ากับ 100

5.1 ผลการศึกษาผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการเกิดอนุมูลอิสระของเซลล์ที่ 1 ชั่วโมง

ผลการศึกษาการเกิดอนุมูลอิสระของเซลล์เมื่อบ่มเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 ด้วยอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าที่ความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีค่าร้อยละการเกิดอนุมูลอิสระของเซลล์มากกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งมีการเกิดอนุมูลอิสระ ร้อยละ 100.6 ± 3.31 เป็น 133.5 ± 25.88 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ตามลำดับ และที่ความเข้มข้นอื่นๆ ไม่พบนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับกับผลจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างลักษณะของเซลล์เซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่พบว่าเมื่อบ่มเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ความเข้มข้นสูงจะทำให้เกิดอนุมูลอิสระของเซลล์เพิ่มมากขึ้น

Percentage of Reactive Oxygen Species generation in NIH-3T3 Fibroblast for different concentrations of Gold nanoparticles (AuNPs) at 1 Hrs



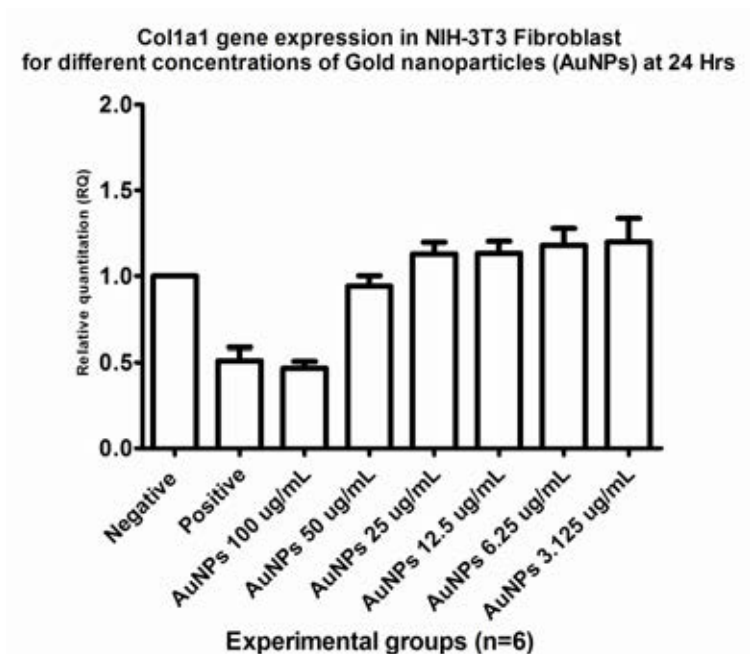
รูปที่ 19: แสดงผลการศึกษาการเกิดอนุมูลอิสระของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 หลังจากที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ 1 ชั่วโมง ใช้ความเข้มข้นที่ทดสอบ 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

**6. ผลศึกษาผลอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการแสดงออกของยีนคอลลาเจน
ด้วยวิธี Real time RT- PCR**

ในการศึกษาได้ทดสอบเพื่อดูการแสดงออกของยีนคอลลาเจน ชนิด Collagen 1 alpha 1 (Col1a1), Collagen 1 alpha 2 (Col1a2) และ Collagen 3 alpha 1 (Col3a1) โดยใช้ยีน Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GADPH) ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมภายใน ด้วยวิธี Real time RT-PCR โดยจะนำเซลล์กลุ่มที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมาเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มที่ไม่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (Negative control group) ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ซึ่งเซลล์กลุ่มที่ไม่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรจะมีค่า Relative quantitative (RQ) เท่ากับ 1

6.1 ผลการศึกษาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการแสดงออกของยีนคอลลาเจน ชนิด Col1a1 ที่ 24 ชั่วโมง

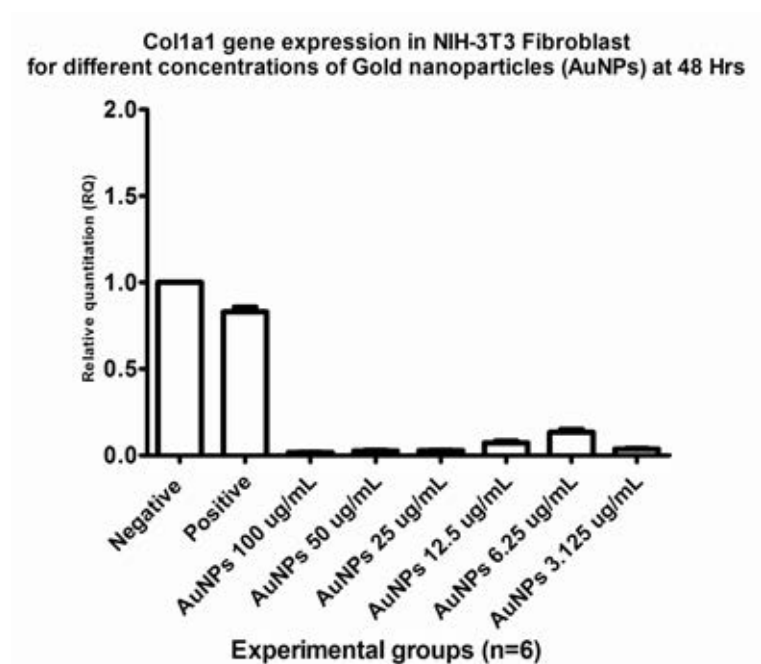
ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน Col1a1 เมื่อบ่มเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 ด้วยอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าที่ความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรทุกตัวมีค่า Relative quantitative (RQ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งมีการแสดงออกเท่ากับ 1 ± 0 เป็น 1.199 ± 0.55 , 1.18 ± 0.42 , 1.133 ± 0.26 , 1.129 ± 0.29 , 0.941 ± 0.26 และ 0.46 ± 0.17 หรือเปลี่ยนแปลงคิดเป็น 0.08, 0.07, 0.05, 0.05, -0.03 และ -0.33 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมตามลำดับ พบว่าเมื่อบ่มอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่ 24 ชั่วโมง ทำให้มีการแสดงออกของยีน Col1a1 ลดลง



รูปที่ 20: แสดงผลการศึกษาการแสดงออกของยีน Col1a1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 หลังจากที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ 24 ชั่วโมง ใช้ความเข้มข้นที่ทดสอบ 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

6.2 ผลการศึกษาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการแสดงออกของยีนคอลลาเจน ชนิด Col1a1 ที่ 48 ชั่วโมง

ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน Col1a1 เมื่อบ่มเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 ด้วยอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าที่ความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรทุกตัวมีค่า Relative quantitative (RQ) ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งมีการแสดงออกเท่ากับ 1 ± 0 เป็น 0.035 ± 0.02 , 0.134 ± 0.06 , 0.073 ± 0.04 , 0.028 ± 0.01 , 0.025 ± 0.02 และ 0.017 ± 0 หรือเปลี่ยนแปลงคิดเป็น -1.45, -0.87, -1.14, -1.55, -1.59 และ -1.78 เท่าของกลุ่มควบคุมตามลำดับ พบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเมื่อบ่มกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 เป็นเวลา 48 ชั่วโมงทำให้มีการแสดงออกของยีน Col1a1 ลดลง



รูปที่ 21: แสดงผลการศึกษาการแสดงออกของยีน Col1a1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 หลังจากที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ 48 ชั่วโมง ใช้ความเข้มข้นที่ทดสอบ 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 4: สรุปการแสดงออกของยีน Col1a1 ในเซลล์ NIH-3T3 fibroblast ที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาเมตรที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

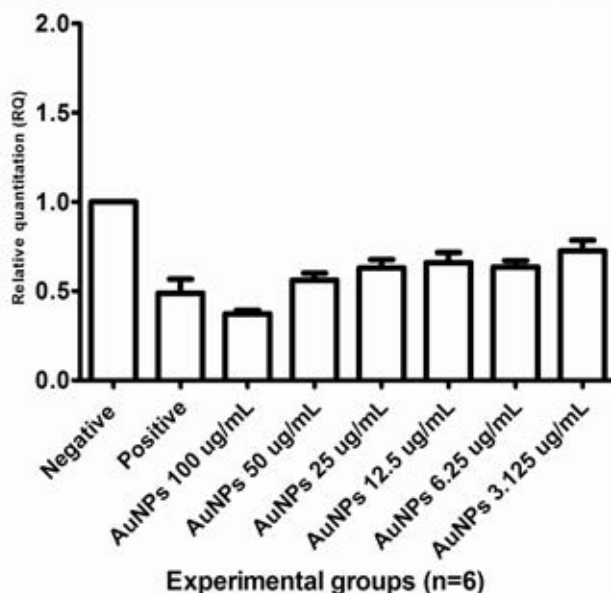
		Expression at 24 hrs			Expression at 48 hrs		
Groups	Gene	RQ*	SD*	Log10***	RQ*	SD*	Log10***
Positive Control	Col1a1	0.511	0.29	-0.29	0.829	0.12	-0.08
AuNPs 100 ug/mL		0.468	0.17	-0.33	0.017	0	-1.78
AuNPs 50 ug/mL		0.941	0.26	-0.03	0.026	0.02	-1.59
AuNPs 25 ug/mL		1.129	0.29	0.05	0.028	0.01	-1.55
AuNPs 12.5 ug/mL		1.133	0.26	0.05	0.073	0.04	-1.14
AuNPs 6.25 ug/mL		1.180	0.42	0.07	0.134	0.06	-0.87
AuNPs 3.125 ug/mL		1.199	0.55	0.08	0.035	0.02	-1.45

* RQ = Relative quantitative; ** SD =Standard deviation; *** log10 = $\log_{10}RQ$ = Fold change

6.3 ผลการศึกษาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการแสดงออกของยีนคอลลาเจนชนิด Col1a2 ที่ 24 ชั่วโมง

ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน Col1a2 เมื่อป้อนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 ด้วยอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าที่ความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรทุกตัวมีค่า Relative quantitative (RQ) ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งมีการแสดงออกเท่ากับ 1 ± 0 เป็น 0.725 ± 0.25 , 0.635 ± 0.15 , 0.659 ± 0.22 , 0.630 ± 0.19 , 0.562 ± 0.17 และ 0.372 ± 0.09 หรือเปลี่ยนแปลงคิดเป็น -0.14, -0.2, -0.18, -0.2, -0.25 และ -0.43 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมตามลำดับ พบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเมื่อป้อนกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงทำให้มีการแสดงออกของยีน Col1a2 ลดลง

Col1a2 gene expression in NIH-3T3 Fibroblast for different concentrations of Gold nanoparticles (AuNPs) at 24 Hrs

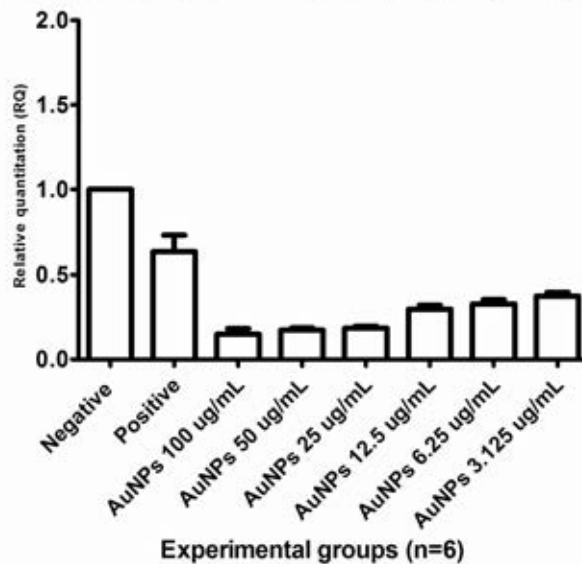


รูปที่ 22: แสดงผลการศึกษาการแสดงออกของยีน Col1a2 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 หลังจากที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ 24 ชั่วโมง ใช้ความเข้มข้นที่ทดสอบ 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

6.4 ผลการศึกษาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการแสดงออกของยีนคอลลาเจนชนิด Col1a2 ที่ 48 ชั่วโมง

ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน Col1a2 เมื่อป้อนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 ด้วยอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าที่ความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรทุกตัวมีค่า Relative quantitative (RQ) ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งมีการแสดงออกเท่ากับ 1 ± 0 เป็น 0.375 ± 0.09 , 0.328 ± 0.09 , 0.297 ± 0.06 , 0.216 ± 0.06 , 0.174 ± 0.06 และ 0.149 ± 0.14 หรือเปลี่ยนแปลงคิดเป็น -0.43 , -0.48 , -0.53 , -0.67 , -0.76 และ -0.83 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมตามลำดับ พบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเมื่อป้อนกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 เป็นเวลา 48 ชั่วโมงทำให้มีการแสดงออกของยีน Col1a2 ลดลง

Col1a2 gene expression in NIH-3T3 Fibroblast for different concentrations of Gold nanoparticles (AuNPs) at 48 Hrs



รูปที่ 23: แสดงผลการศึกษาการแสดงออกของยีน Col1a2 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 หลังจากที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ 48 ชั่วโมง ใช้ความเข้มข้นที่ทดสอบ 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

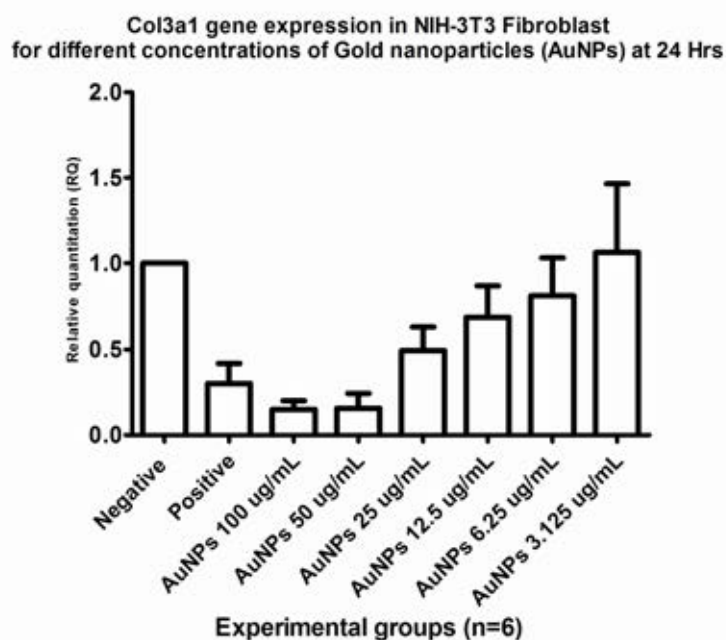
ตารางที่ 5: สรุปการแสดงออกของยีน Col1a2 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 ที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาเมตรที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

		Expression at 24 hrs			Expression at 48 hrs		
Groups	Gene	RQ*	SD*	Log10***	RQ*	SD*	Log10***
Positive Control	Col1a2	0.488	0.33	-0.31	0.631	0.38	-0.20
AuNPs 100 ug/mL		0.372	0.09	-0.43	0.149	0.14	-0.83
AuNPs 50 ug/mL		0.562	0.17	-0.25	0.174	0.06	-0.76
AuNPs 25 ug/mL		0.630	0.19	-0.20	0.216	0.06	-0.67
AuNPs 12.5 ug/mL		0.659	0.22	-0.18	0.297	0.10	-0.53
AuNPs 6.25 ug/mL		0.635	0.15	-0.20	0.328	0.09	-0.48
AuNPs 3.125 ug/mL		0.725	0.25	-0.14	0.375	0.09	-0.43

* RQ = Relative quantitative; ** SD =Standard deviation; *** log10 = $\log_{10}RQ$ = Fold change

6.5 ผลการศึกษาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการแสดงออกของยีนคอลลาเจนชนิด Col3a1 ที่ 24 ชั่วโมง

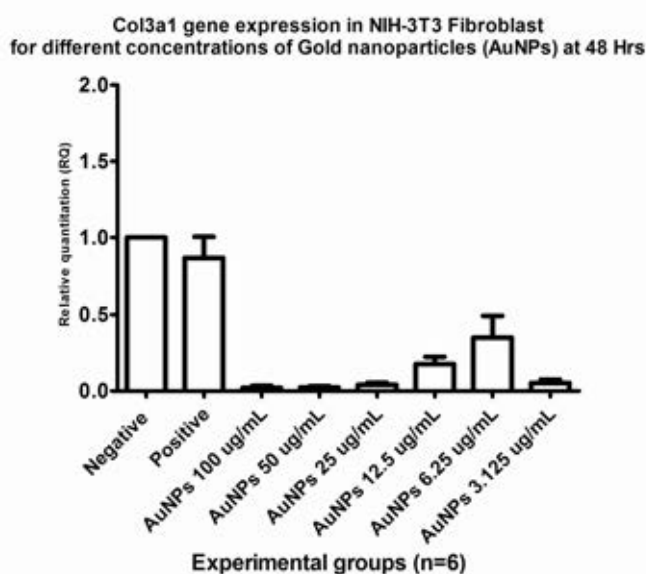
ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน Col3a1 เมื่อบ่มเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 ด้วยอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าที่ความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรทุกตัวมีค่า Relative quantitative (RQ) ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งมีการแสดงออกเท่ากับ 1 ± 0 เป็น 1.063 ± 1.45 , 0.809 ± 0.83 , 0.683 ± 0.58 , 0.494 ± 0.42 , 0.156 ± 0.2 และ 0.15 ± 0.15 หรือเปลี่ยนแปลงคิดเป็น 0.03, -0.09, -0.17, -0.31, -0.81 และ -0.82 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมตามลำดับ พบว่าเมื่อบ่มอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 ที่ความเข้มข้น 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่ 24 ชั่วโมงทำให้มีการแสดงออกของยีน Col3a1 ลดลง



รูปที่ 24: แสดงผลการศึกษาการแสดงออกของยีน Col3a1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 หลังจากที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ 24 ชั่วโมง ใช้ความเข้มข้นที่ทดสอบ 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

6.6 ผลการศึกษาอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการแสดงออกของยีนคอลลาเจน ชนิด Col3a1 ที่ 48 ชั่วโมง

ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน Col3a1 เมื่อบ่มเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 ด้วยอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าที่ความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรทุกตัวมีค่า Relative quantitative (RQ) ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งมีการแสดงออกเท่ากับ 1 ± 0 เป็น 0.053 ± 0.08 , 0.035 ± 0.43 , 0.175 ± 0.21 , 0.041 ± 0.05 , 0.023 ± 0.03 และ 0.021 ± 0.03 หรือเปลี่ยนแปลงคิดเป็น -1.28, -0.46, -0.76, -1.39, -1.63 และ -1.69 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมตามลำดับ เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมตามลำดับ พบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเมื่อบ่มกับเซลล์ NIH-3T3 fibroblast เป็นเวลา 48 ชั่วโมงทำให้มีการแสดงออกของยีน Col3a1 ลดลง



รูปที่ 25: แสดงผลการศึกษาการแสดงออกของยีน Col3a1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 หลังจากที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ 48 ชั่วโมง ใช้ความเข้มข้นที่ทดสอบ 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 6: สรุปการแสดงออกของยีน Col3a1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 ที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาเมตรที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

		Expression at 24 hrs			Expression at 48 hrs		
Groups	Genes	RQ*	SD*	Log10***	RQ*	SD*	Log10***
Positive Control	Col3a1	0.301	0.33	-0.52	0.867	0.53	-0.06
AuNPs 100 ug/mL		0.150	0.15	-0.82	0.021	0.03	-1.69
AuNPs 50 ug/mL		0.156	0.20	-0.81	0.023	0.03	-1.63
AuNPs 25 ug/mL		0.494	0.42	-0.31	0.041	0.05	-1.39
AuNPs 12.5 ug/mL		0.683	0.58	-0.17	0.175	0.21	-0.76
AuNPs 6.25 ug/mL		0.809	0.83	-0.09	0.350	0.43	-0.46
AuNPs 3.125 ug/mL		1.063	1.45	0.03	0.053	0.08	-1.28

* RQ = Relative quantitative; ** SD =Standard deviation; *** log10 = $\log_{10}RQ$ = Fold change

บทที่ 5

อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย ข้อจำกัดในงานวิจัย และแนวทางการศึกษาต่อในอนาคต

อภิปรายผลการวิจัย

ปัจจุบันอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรได้ถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมของเครื่องสำอางอย่างแพร่หลาย มีการโฆษณาและกล่าวอ้างถึงคุณสมบัติของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรว่าสามารถช่วยในการต้านริ้วรอยโดยการฟื้นฟูเนื้อเยื่อผิว ต้านอนุมูลอิสระ และ เพิ่มการสร้างคอลลาเจน และยังไม่มีความวิตกกังวลที่สนับสนุนข้อความดังกล่าวอ้าง จึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้ เพื่อทดสอบสมมุติฐานคุณสมบัติดังกล่าวของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรว่าเป็นจริงดังกล่าวอ้างหรือไม่

จากผลการศึกษาผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ 24 และ 48 ชั่วโมงโดยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงพบว่าที่อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีผลทำให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 มีลักษณะที่ไม่สมบูรณ์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมคือ เซลล์มีขนาดเล็ก มีการหดตัวของเซลล์ และกระจายตัวน้อยลง ซึ่งการทดลองนี้ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Pernodet *et al.* (2006)⁽³¹⁾ ซึ่งได้ทำการทดสอบเพื่อดูความเป็นพิษของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของผิวหนังมนุษย์ พบว่า Actin stressed fibers ในเซลล์ที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรหายไป และส่งผลให้เกิดผลกระทบอื่นๆ ตามมา เช่น ทำให้เซลล์ขาดกระจายตัว มีคุณสมบัติในการยึดเกาะ และ การเจริญเติบโตลดลง นอกจากนี้แล้วยังมีการศึกษาวิจัยของ Mironava *et al.* (2009)⁽³⁶⁾ ที่ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของผิวหนังมนุษย์ที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรขนาด 13 และ 45 nm ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด Confocal พบว่า Cytoskeleton filament ของเซลล์ถูกทำลายไป และเมื่อศึกษาด้วยวิธี Western blot พบว่ามีระดับของ Extracellular matrix protein , Collagen และ Fibronectin ลดลง ในขณะที่ระดับโปรตีนของ Actin และ Beta-tubulin ไม่มีการเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ยังพบว่าอนุภาคทองคำรวมกลุ่มกันอยู่ใน Vacuoles ขนาดใหญ่ ซึ่งเชื่อว่าจำนวนของ Vacuoles ที่พบในเซลล์อาจจะเป็นสาเหตุหลักของการที่ Cytoskeleton ถูกทำลาย จนทำให้เซลล์มีการหดตัวของพื้นที่เซลล์และการเคลื่อนที่ของเซลล์ลดลง

จากงานวิจัยข้างต้นพบว่าการศึกษาความเปลี่ยนแปลงของรูปร่างและขนาดของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีคุณสมบัติดังที่ถูก

กล่าวอ้างเพื่อในไปใช้ในเครื่องสำอางหรือไม่ ทางผู้วิจัยจึงต้องทำการทดสอบสมมุติฐานด้วยวิธีการอื่นและได้ผลการทดสอบดังต่อไปนี้

การศึกษาเพื่อหาความเป็นพิษของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 ด้วยน้ำยา PrestoBlue™ โดยน้ำยานี้จะมีหลักการทำงานเช่นเดียวกับวิธี MTT assay ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการใช้ศึกษาความสามารถในการมีชีวิตรอดของเซลล์ ทั้ง MTT และ PrestoBlue™ จะตรวจวัด enzyme activity ของ mitochondrial dehydrogenase ได้แก่ NADH และ NADPH ที่พบเฉพาะในเซลล์ที่มีชีวิต ในขณะที่เซลล์ที่ไม่มีชีวิตจะไม่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์เหล่านี้ได้ (Marquis *et al.*, 2009)⁽³⁷⁾ จากนั้นจึงนำมาคำนวณหาร้อยละความอยู่รอดของเซลล์ต่อไป

ผลการศึกษาเพื่อหาความเป็นพิษของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 ที่ 24 ชั่วโมงพบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรทำให้ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่อนุภาคทองคำระดับนาโนที่ความเข้มข้น 3.125 และ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรทำให้เซลล์มีร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เพิ่มมากขึ้น และเมื่อเพิ่มเวลาบ่มเซลล์เป็น 48 ชั่วโมง พบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเพียง 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก็มีผลทำให้ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ลดลง และเช่นเดียวกันในขณะที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกลับทำให้เซลล์มีร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความอยู่รอดของเซลล์ เซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 ขึ้นกับระยะเวลาที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร และ ปริมาณของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ได้รับ

ก่อนหน้าการศึกษาของ Sabella *et al.* (2011)⁽³⁸⁾ ซึ่งทำการทดสอบความอยู่รอดของเซลล์ HeLa ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูก และเซลล์ U937 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว พบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีผลทำให้ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ลดลงโดยขึ้นอยู่กับระยะเวลาและปริมาณของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ได้รับ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Kamnerdsin *et al.* (2009)⁽³⁹⁾ เมื่อทดสอบ HeLa ที่อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยวิธี MTT พบว่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ลดลงหลังบ่มกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเป็นเวลา 3 วัน อย่างไรก็ตามในการศึกษาของ Qu *et al.* (2009)⁽³³⁾ พบว่าเมื่อทดสอบหาร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT พบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลล่า ไม่ได้เป็นสาเหตุทำให้เซลล์ HDF-f ซึ่งเป็นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของผิวหนังมนุษย์ตาย แต่มีผลกระทบต่อรูปร่างของเซลล์เมื่อความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น เช่นเดียวกับการศึกษาของ Yang *et al.* (2010)⁽⁴⁰⁾ พบว่าเมื่อทดสอบด้วยวิธี MTT ในเซลล์ HDF-f เช่นกัน พบว่าร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ไม่มีความแตกต่างกันในระหว่าง

กลุ่มที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรกับกลุ่มควบคุม และจากผลการทดลองในครั้งนี้ ไม่มีงานวิจัยใดก่อนหน้าที่พบความสัมพันธ์ผกผันของปริมาณอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ได้รับต่อความอยู่รอดของเซลล์ (dose-dependent inverse relationship) มาก่อน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าความเป็นพิษต่อเซลล์ และ/หรือ การแบ่งตัวของเซลล์ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์เป็นสำคัญ

ในการศึกษาเพื่อดูผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 โดยใช้วิธีย้อมสีเซลล์ด้วยสี CFSE เพื่อติดตามการแบ่งตัวของเซลล์ เมื่อเซลล์เกิดการแบ่งตัว สี CFSE ที่ติดอยู่กับเซลล์ก็จะถูกจางลงตามจำนวนของเซลล์ที่ถูกแบ่งตัวออกไป ซึ่งเซลล์ที่ติดสีมากหมายถึงการที่เซลล์มีการแบ่งตัวน้อยลง เช่นเดียวกันหากเซลล์มีการติดสีที่จางก็หมายถึงว่าเซลล์มีการแบ่งตัวมากขึ้นเอง (Lyons *et al.*, 1994)⁽⁴¹⁾ และหลังจากนั้นจึงนำมาคำนวณเพื่อหาค่าร้อยละการความเข้มของสี CFSE ที่พบในเซลล์ต่อไป

ผลการศึกษาเพื่อดูผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีผลต่อการแบ่งเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 พบว่าที่ 24 ชั่วโมง ที่อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และที่ 48 ชั่วโมงที่ความเข้มข้นของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละการติดสีของ CFSE มากกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งหมายความว่าที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวน้อยลง แต่ความเข้มข้นอื่นๆ การแบ่งตัวของเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาและปริมาณของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ได้รับมีผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Li *et al.* (2008)⁽³²⁾ พบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากปอดของตัวอ่อนมนุษย์ โดยพบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรจะมีผลเปลี่ยนแปลงวงจรเซลล์และการซ่อมแซม DNA ที่เสียหาย และมีการศึกษาของ Bhattacharya *et al.* (2004)⁽⁴²⁾ พบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ HUVEC โดยมีกลไกที่ไปยับยั้ง VEGF165 ซึ่งเป็น Heparin binding growth factor ทำให้เกิดการเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง

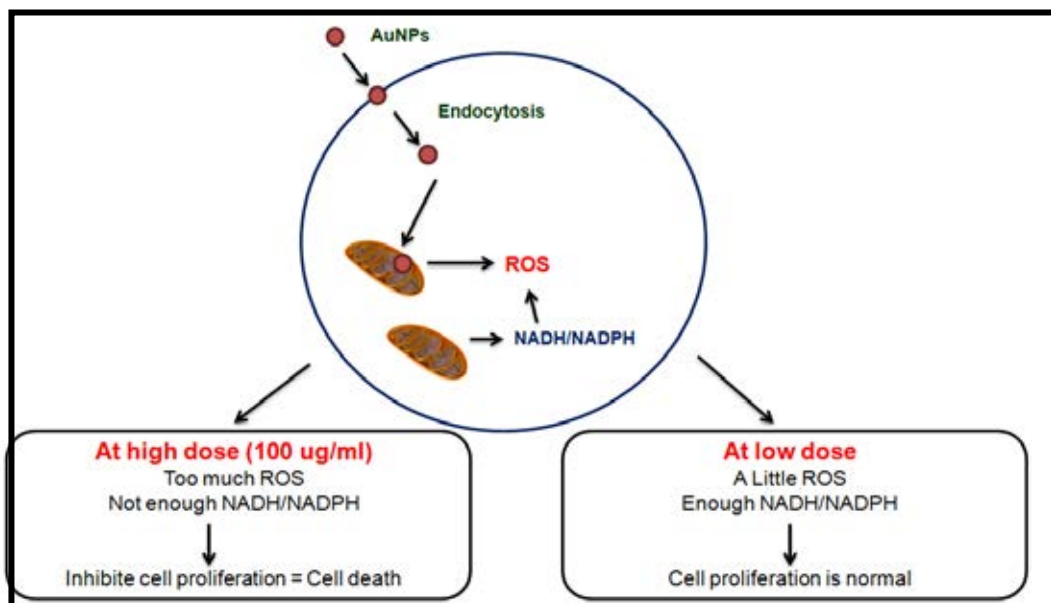
แต่ทั้งนี้ม้งานวิจัยรายงานของ Pagliacci *et al.* (1993)⁽⁴³⁾ และ Sims *et al.* (2009)⁽⁴⁴⁾ กล่าวว่า การถูกกระตุ้นของ MTT ด้วย Mitochondrial dehydrogenase นั้นนอกจากขึ้นอยู่กับปริมาณของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นแล้ว อาจจะยังขึ้นอยู่กับจำนวนของไมโทคอนเดรียในเซลล์ หรือ การทำงานของไมโทคอนเดรียที่สร้าง Mitochondrial dehydrogenase ที่เพิ่มขึ้น

จากการทดลองเพื่อหาความเป็นพิษและผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการแบ่งเซลล์พบว่า ที่ความเข้มข้น 3.125, 6.25, 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์เพิ่มมากขึ้น แต่มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เท่าเดิม อาจจะบ่งบอกได้ว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีผลต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียที่สร้าง Mitochondrial dehydrogenase ที่เพิ่มขึ้น ได้แก่ NADH และ NADPH ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองตัวมีผลต่อการทำงานของเกี่ยวข้องกับเซลล์ คือช่วยในการต้านสารอนุมูลอิสระของเซลล์ และปริมาณของ NADH ยังขึ้นอยู่กับปริมาณของ ROS (Reactive oxygen species) ที่ถูกสร้างขึ้นจากไมโทคอนเดรียอีกด้วย⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾

บทความทบทวนวรรณกรรมของ Unfried *et al.* (2007)⁽⁴⁸⁾ กล่าวว่า ผลที่อาจจะเกิดขึ้นในเซลล์ที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร เช่น การเจริญเติบโตของเซลล์ กลไกการอักเสบ และการตายของเซลล์นั้น เกิดขึ้นจาก ROS ที่ถูกสร้างขึ้น และ สัญญาณของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นเป็นลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pan *et al.* (2009)⁽⁴⁹⁾ พบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ทำให้เกิด Oxidative stress นั้นเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เซลล์ตาย และอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรยังทำให้เกิดความเสียหายขึ้นในไมโทคอนเดรียอีกด้วย

จากการศึกษาผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการเกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 หลังจากบ่มเซลล์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์มีการสร้าง ROS เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ความเข้มข้นอื่นไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าปริมาณของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ได้รับมีผลต่อการเกิด ROS และมีผลทำให้เกิดการตายของเซลล์

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้สร้าง ROS จากอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรจะทำให้การสร้างเอนไซม์ NADH และ NADPH เพิ่มขึ้นเพื่อเป็นกลไกตอบสนองต่อการเกิดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นและหากมีการสร้าง ROS มากเกินกว่าที่กลไกการต้านอนุมูลอิสระของเซลล์ทำงานก็อาจจะเป็นสาเหตุทำให้เซลล์เกิดความเสียหายได้ (Unfried *et al.*, 2007)⁽⁴⁸⁾ ซึ่งกลไกดังกล่าว แสดงในรูปที่ 26



รูปที่ 26: แสดงผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีผลต่อระดับของ NADH และ NADPH ภายในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3

นอกจากนี้ทางผู้วิจัยยังได้ศึกษาผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการแสดงออกของยีนคอลลาเจน 3 ชนิดคือ Collagen1alpha 1 (Col1a1), Collagen1alpha 2 (Col1a2) และ Collagen3alpha1 (Col3a1) ซึ่งเป็นชนิดของคอลลาเจนที่พบมากที่สุดผิวหนัง Van der Rest *et al.* (1991)⁽⁵⁰⁾ พบว่าที่ 24 และ 48 ชั่วโมงมีการแสดงออกของคอลลาเจนทุกชนิดลดลงจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นการแสดงออกของ Col1a1 เมื่อป้อนด้วยอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเท่านั้นที่มีการแสดงออกลดลงซึ่งอาจจะเกิดจากการที่ Col1a1 เป็นโปรตีนชนิดหลักที่สร้างในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และเป็นโปรตีนที่มีมากที่สุด⁽⁵¹⁾ ดังนั้นเซลล์อาจจะมีการกลไกอื่นที่เข้ามาควบคุมเพื่อให้เซลล์สามารถสร้างคอลลาเจนชนิด Col1a1 ได้เหมือนเดิม และนอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอื่นที่กล่าวว่าการแสดงออกของ Col1a1 หลังจากได้รับสารกระตุ้นเช่น UV หรือ ROS จะลดลงขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่ได้รับสาร⁽⁵²⁻⁵³⁾ จึงทำให้ที่ 24 ชั่วโมงอาจจะยังไม่เห็นความเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน Col1a1

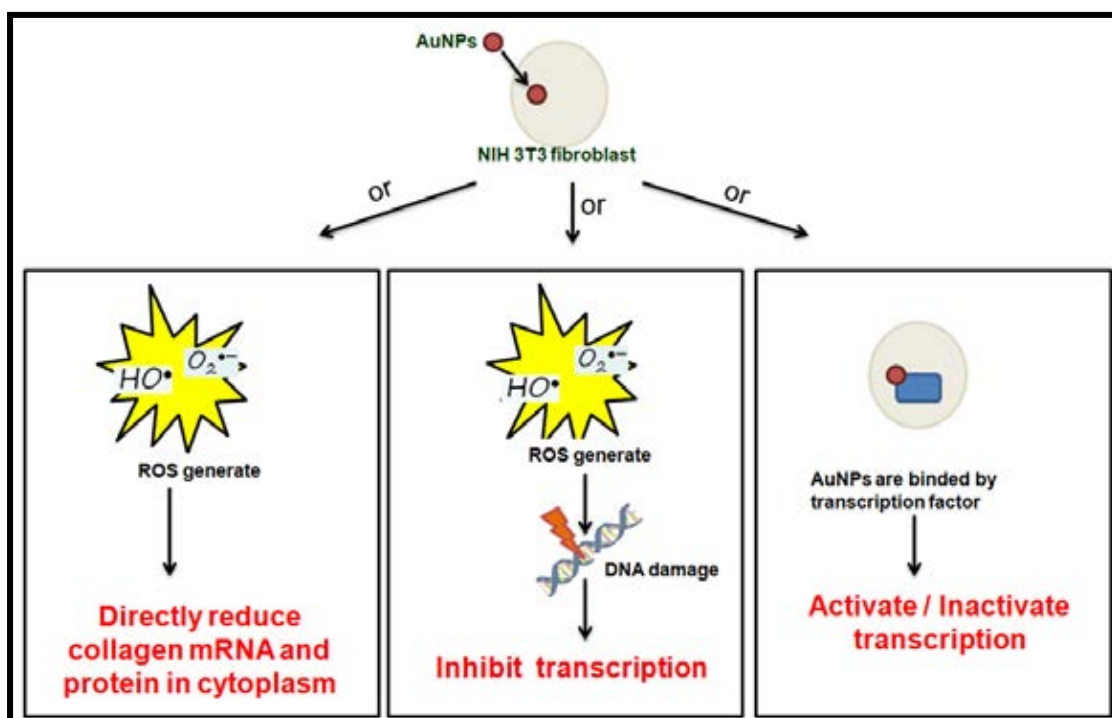
จากผลการทดลองเพื่อดูการแสดงออกของยีนคอลลาเจนหลังจากได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรในงานนี้ มีผลการทดลองสอดคล้องกับงานของ Balasubramanian *et al.* (2010)⁽²⁰⁾ ที่ได้ศึกษาผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการแสดงออกของยีนด้วย Microarray พบว่าเมื่อฉีดอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรเข้าสู่เส้นเลือดของหนู ทำให้มีการ

แสดงออกของยีนคอลลาเจน ชนิด Col1a1 และ Col1a2 ที่ดับและม้ามลดลง เช่นเดียวกับ การศึกษาของ Cho *et al.* (2009)⁽³⁵⁾ ซึ่งได้ศึกษาผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการ แสดงออกของยีนด้วย Microarray เช่นเดียวกัน พบว่าเมื่อฉีดอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร เข้าสู่เส้นเลือดของหนู ทำให้มีการแสดงออกของคอลลาเจน ชนิด Col1a2 ที่ดับลดลง แต่ในขณะที่ Col3a1 มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยผลจากงานวิจัยนี้สามารถ สรุปได้ว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรทำให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 มีการแสดงออกของ ยีนคอลลาเจนลดลง ขึ้นอยู่กับเวลาและปริมาณของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ได้รับ

จากผลการศึกษาเพื่อดูผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการแสดงออกของ คอลลาเจนพบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีผลทำให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3 มีการ แสดงออกของยีนคอลลาเจนลดลง อาจเกิดจากกลไกดังต่อไปนี้

1. อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีต่อการเพิ่มของระดับอนุมูลอิสระภายในเซลล์ทำให้ มีการแสดงออกของยีน Collagen ลดลงโดยตรง
โดยมีงานศึกษาของ Siwik *et al.* (2001)⁽⁵⁴⁾ พบว่าสารอนุมูลอิสระมีผลลดระดับ mRNA ของ Procollagen a1(I), a2(I) และ a1(III) โดยจะมีผลทำให้มีการสร้างของ คอลลาเจนลดลง เช่นเดียวกับการศึกษาของ Tanaka *et al.* (1992)⁽⁵⁵⁾ ที่พบว่าสาร อนุมูลอิสระมีผลทำให้มีการแสดงออกของยีนคอลลาเจนลดลงเช่นกัน
2. อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีต่อการเพิ่มของระดับอนุมูลอิสระภายในเซลล์ซึ่ง ทำให้เกิดความเสียหายต่อ DNA จึงไปยับยั้งการถอดรหัสของยีนภายในเซลล์
จากงานศึกษาของ Chompoosor *et al.* (2010)⁽⁵⁶⁾ พบว่าอนุภาคทองคำระดับ นาโนเมตรมีผลต่อการเกิดของสารอนุมูลอิสระซึ่งทำให้เกิดความเสียหายต่อ DNA ภายในเซลล์แต่ทั้งนี้การเกิดของสารอนุมูลอิสระไม่มีผลต่อการทำของไมโทคอนเด รียภายในเซลล์ ซึ่งการเกิดความเสียหายของ DNA ภายในเซลล์นั้นอาจจะมีผลทำ ให้เซลล์มีการถอดรหัสยีนภายในเซลล์ลดลงและทำให้มีการแสดงออกของยีน คอลลาเจน ลดลงตามลำดับ
3. อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรผ่านเข้าสู่เซลล์และมีผลไปยับยั้ง transcription factor ที่อยู่ภายในเซลล์
Yang *et al.* (2008)⁽⁴⁰⁾ ได้ตั้งสมมุติฐานไว้ว่า เนื่องจากอนุภาคทองคำระดับนา โนเมตรมีขนาดเล็ก จึงทำให้สามารถผ่านเข้าสู่นิวเคลียส ซึ่งอาจจะผลต่อ กระบวนการ ถอดรหัส และแปลรหัส ภายในเซลล์เนื่องจากอนุภาคทองคำระดับนา

โนเมตรสามารถเกิดปฏิกิริยากับ transcription factor ภายในเซลล์ได้ แสดงดังในรูปที่ 26



รูปที่ 27: กลไกความเป็นไปได้ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่มีผลต่อการแสดงออกของยีนคอลลาเจนภายในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH-3T3

จากผลงานวิจัยในครั้งนีพบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ความเข้มข้นมากกว่า 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นพิษและมีผลทำให้มีการแบ่งตัวของเซลล์ลดลง โดยทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นภายในเซลล์ นอกจากนี้แล้วยังมีผลทำให้การแสดงออกของยีนคอลลาเจนชนิด Col1a1 Col1a2 และ Col3a1 ซึ่งพบมากในผิวหนังลดลง

ความรู้ที่ได้จากการทดลองพบว่า ผลของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อความเป็นพิษของเซลล์ การแบ่งตัวของเซลล์ การเกิดอนุมูลอิสระของเซลล์ และการแสดงออกของยีนคอลลาเจนขึ้นอยู่กับระยะเวลาและปริมาณที่ได้รับสาร โดยควรพิจารณาถึงปัจจัยดังกล่าวเมื่อนำอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรไปประยุกต์ใช้ในสินค้าอุปโภคบริโภคในชีวิตประจำวัน

สรุปผลงานวิจัย

1. งานวิจัยค้นพบว่าความเป็นพิษของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรขึ้นอยู่กับปริมาณและระยะเวลาที่เซลล์ได้รับ
2. งานวิจัยพบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ความเข้มข้นสูงมีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์
3. อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ความเข้มข้นสูงทำให้เซลล์มีการสร้างสารอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น
4. เซลล์มีสร้างเอนไซม์ NADH/NADPH ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อตอบสนองการเกิดอนุมูลอิสระจากอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร
5. งานวิจัยค้นพบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรทำให้มีการแสดงออกของยีนคอลลาเจนชนิด Col1a1 Col1a2 และ Col3a1 ซึ่งพบมากในผิวหนังลดลง

ข้อจำกัดของงานวิจัย

1. เซลล์ NIH-3T3 fibroblast ที่ใช้ในการทดลองไม่ได้เป็นเซลล์ที่มาจากมนุษย์
2. การศึกษานี้เป็นเพียงการศึกษาการตอบสนองของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรในระยะสั้น ซึ่งในการทดลองครั้งต่อไปควรเพิ่มระยะเวลาในการทดสอบเพื่อดูผลในระยะยาว
3. การศึกษาครั้งนี้ไม่ได้วัดปริมาณโปรตีนคอลลาเจนในเซลล์ที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร
4. การศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ดูผลของ Post-translation modification เช่นอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีผลต่อการช่วย Cross-linking ของคอลลาเจนในเซลล์หรือไม่
5. อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่จำหน่ายอยู่ในท้องตลาดมีขนาด ตัว stabilizer ที่หลากหลาย และมีการปรับปรุงพื้นที่ผิวของอนุภาคทองคำด้วยสารอื่นๆ ดังนั้นจึงอาจจะทำให้ผลการทดสอบที่ออกมามีความแตกต่างกัน

แนวทางการศึกษาต่อในอนาคต

1. ศึกษาฤทธิ์ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อคอลลาเจน
 - 1.1 ศึกษาผลของอนุภาคทองคำต่อการแสดงออกของคอลลาเจนในเซลล์เกี่ยวพันชนิดอื่น เช่น เซลล์กระดูก เซลล์ผิวหนัง
 - 1.2 ศึกษาผลของอนุภาคทองคำต่อไกลโก Post-translational ของคอลลาเจน เช่น ผลของอนุภาคทองคำต่อการสานร่างแหของคอลลาเจน (Collagen Cross-linking)

2. ศึกษาฤทธิ์ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการเกิดอนุมูลอิสระ
 - 2.1 ศึกษาปัจจัยภายในของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการเกิดอนุมูลอิสระ เช่น ขนาดของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ชนิดของสารที่ใช้ในการปรับปรุงพื้นที่ผิวของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร
 - 2.2 ศึกษาปัจจัยภายนอกของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อการเกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ เช่น ปริมาณที่ได้รับ ระยะเวลาที่ได้รับ เนื้อเยื่อที่ได้รับ

3. ศึกษา NADH และ NADPH ว่ามีบทบาทสำคัญอย่างไรในเซลล์ที่ได้รับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร

4. ศึกษาฤทธิ์ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรต่อเซลล์เมื่อได้รับอนุภาคทองคำระยะนาโนเมตรเป็นระยะเวลานาน

รายการอ้างอิง

- [1] Brodsky B, Persikov AV. Molecular Structure of the Collagen Triple Helix. Advances in Protein Chemistry. 2005; 70:301-339.
- [2] Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens-structure, function, and biosynthesis. Advanced Drug Delivery Reviews. 2003; 55(12):1531-46.
- [3] Diegelmann RF. Collagen Metabolism. Wounds. 2001;13(5):177-182.
- [4] Koide T, Nagata K. Collagen Biosynthesis Collagen. Topics in Current Chemistry. 2005 ; 247:85-114.
- [5] Vuorio E, De Crombrughe B. The Family of Collagen Genes. Annual Review of Biochemistry. 1990; 59(1):837-72.
- [6] Shoulders MD, Raines RT. Collagen Structure and Stability. Annual Review of Biochemistry. 2009; 78(1):929-58.
- [7] Powell MC, Kanarek MS. Nanometerial Heath Effects-Part 2: Uncertainties and Recommendations for the Future. Wisconsin medical journal.2006; 105(3):18-23.
- [8] Roco MC. Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. Current Opinion in Biotechnology. 2003; 14(3):337-46.
- [9] Powell MC, Kanarek MS. Nanometerial Heath Effects-Part 1: Background and Current Knowledge. Wisconsin medical journal. 2006; 105(2):16-20.
- [10] Zhou J, Ralston J, Sedev R, Beattie DA. Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, structure and colloid stability. Journal of Colloid and Interface Science. 2009; 331(2):251-62.
- [11] Baptista P, Pereira E, Eaton P, Doria G, Miranda A, Gomes I, et al. Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2008; 391(3):943-50.
- [12] Taylor BW. Colloidal Gold as an Anti-Aging Skin Care Product [Online]. (n.d.). Available from: <http://ezinearticles.com/?Colloidal-Gold-as-an-Anti-Aging-Skin-Care-Product&id=900743> [2011, April 3]
- [13] Taylor BW. Colloidal Gold and Expression Wrinkles [Online]. (n.d.). Available from: <http://ezinearticles.com/?Colloidal-Gold-and-Expression-Wrinkles&id=892255> [2011, April 3]

- [14] Nano Gold. In beauty care compositions [Online]. (n.d.). Available from:
<http://www.bradolinegroup.com/nano.html> [2011, April 3]
- [15] Anti-wrinkle cosmetic composition [Online]. (n.d.). Available from:
<http://www.freshpatents.com/-dt20090528ptan20090136595.php#getpdf>
[2011, April 3]
- [16] Cosmetics delivery system [Online]. (n.d.). Available from:
<http://www.aznaturals.com/cosmeticdeliv.pdf> [2011, April 3]
- [17] How Safe And Effective Are Gold Facials? [Online]. (n.d.). Available from:
<http://www.suite101.com/content/how-safe-and-effective-are-gold-facials-a279475> [2011, April 3]
- [18] Fathi-Azarbayjani A, Qun L, Chan YW, Chan SY. Novel vitamin and gold-loaded nanofiber facial mask for topical delivery. AAPS PharmSciTech. 2010; 11(3):1164-70.
- [19] Sisco PN, Wilson CG, Mironova E, Baxter SC, Murphy CJ, Goldsmith EC. The Effect of Gold Nanorods on Cell-Mediated Collagen Remodeling. Nano Letters. 2008; 8(10):3409-12.
- [20] Balasubramanian SK, Jittiwat J, Manikandan J, Ong C-N, Yu LE, Ong W-Y. Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats. Biomaterials. 2010; 31(8):2034-42.
- [21] Appling WD, O'Brien WR, Johnston DA, Duvic M. Synergistic enhancement of type I and III collagen production in cultured fibroblasts by transforming growth factor- β and ascorbate. FEBS Letters. 1989; 250(2):541-4.
- [22] Brincat M, Kabalan S, Studd JW, Moniz CF, de Trafford J, Montgomery J. A study of the decrease of skin collagen content, skin thickness, and bone mass in the postmenopausal woman. Obstetrics and gynecology. 1987; 70(6):840-5.
- [23] Baumann L. Skin ageing and its treatment. The Journal of Pathology. 2007; 211(2):241-51.
- [24] Mays PK, Bishop JE, Laurent GJ. Age-related changes in the proportion of types I and III collagen. Mechanisms of Ageing and Development. 1988; 45(3):203-12.

- [25] Emerich DF, Thanos CG. Nanotechnology and medicine. Expert Opinion on Biological Therapy. 2003; 3(4):655-63.
- [26] Jain KK. Nanomedicine: Application of Nanobiotechnology in Medical Practice. Medical Principles and Practice. 2008 ;17(2):89-101.
- [27] Salata O. Applications of nanoparticles in biology and medicine. Journal of Nanobiotechnology. 2004; 2(1).
- [28] Nohynek GJ, Dufour EK, Roberts MS. Nanotechnology, Cosmetics and the Skin: Is There a Health Risk?. Skin Pharmacology and Physiology. 2008; 21(3):136-49.
- [29] Mazzola L. Commercializing nanotechnology. Nature Biotechnology. 2003;21(10):1137-43.
- [30] Shukla R, Bansal V, Chaudhary M, Basu A, Bhonde RR, Sastry M. Biocompatibility of Gold Nanoparticles and Their Endocytotic Fate Inside the Cellular Compartment: A Microscopic Overview. Langmuir. 2005; 21(23):10644-54.
- [31] Pernodet N, Fang X, Sun Y, Bakhtina A, Ramakrishnan A, Sokolov J, et al. Adverse Effects of Citrate/Gold Nanoparticles on Human Dermal Fibroblasts. Small. 2006; 2(6):766-73.
- [32] Li JJ, Zou L, Hartono D, Ong CN, Bay BH, Lanry Yung LY. Gold Nanoparticles Induce Oxidative Damage in Lung Fibroblasts In Vitro. Advanced Materials. 2008; 20(1):138-42.
- [33] Qu Y, Lü X. Aqueous synthesis of gold nanoparticles and their cytotoxicity in human dermal fibroblasts–fetal*. Biomedical Materials. 2009;4(2).
- [34] Larese Filon F, Crosera M, Adami G, Bovenzi M, Rossi F, Maina G. Human skin penetration of gold nanoparticles through intact and damaged skin. Nanotoxicology. 2011; 5(4):493-501.
- [35] Cho W-S, Kim S, Han BS, Son WC, Jeong J. Comparison of gene expression profiles in mice liver following intravenous injection of 4 and 100 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. Toxicology Letters. 2009; 191(1):96-102.
- [36] Mironava T, Hadjiargyrou M, Simon M, Jurukovski V, Rafailovich MH. Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery: Effect of size, concentration and exposure time. Nanotoxicology. 2010; 4(1):120-37.

- [37] Marquis BJ, Love SA, Braun KL, Haynes CL. Analytical methods to assess nanoparticle toxicity. Analyst. 2009; 134(3).
- [38] Sabella S, Brunetti V, Vecchio G, Galeone A, Maiorano G, Cingolani R, et al. Toxicity of citrate-capped AuNPs: an in vitro and in vivo assessment. Journal of Nanoparticle Research. 2011; 13(12):6821-35.
- [39] Kamnerdsin O, Korkiatsakul V, Rakphetmanee K, Rojanathanes R, Chirathaworn C, Sereemasapun A. Influence of Gold Nanoparticles on Intracellular Organelles and Cell Viability in Hela Cells. Drug Metabolism Reviews. 2009; 41:95-6.
- [40] Yang Y, Qu Y, Lü X. Global Gene Expression Analysis of the Effects of Gold Nanoparticles on Human Dermal Fibroblasts. Journal of Biomedical Nanotechnology. 2010; 6(3):234-46.
- [41] Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. Journal of Immunological Methods. 1994; 171(1):131-7.
- [42] Bhattacharya R, Mukherjee P, Xiong Z, Atala A, Soker S, Mukhopadhyay D. Gold Nanoparticles Inhibit VEGF165-Induced Proliferation of HUVEC Cells. Nano Letters. 2004; 4(12):2479-81.
- [43] Pagliacci MC, Spinozzi F, Migliorati G, Fumi G, Smacchia M, Grignani F, et al. Genistein inhibits tumour cell growth in vitro but enhances mitochondrial reduction of tetrazolium salts: A further pitfall in the use of the MTT assay for evaluating cell growth and survival. European Journal of Cancer. 1993; 29(11):1573-7.
- [44] Sims J, Plattner R. MTT assays cannot be utilized to study the effects of STI571/Gleevec on the viability of solid tumor cell lines. Cancer Chemotherapy and Pharmacology. 2009; 64(3):629-33.
- [45] Ying W. NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in Cellular Functions and Death: Regulation and Biological Consequences. Antioxidant & Redox signaling. 2008;10(2).
- [46] Olek RA, Ziolkowski W, Kaczor JJ, Greci L, Popinigis J, Antosiewicz J. Antioxidant Activity of NADH and Its Analogue - An In Vitro Study. Journal of Biochemistry and Molecular Biology. 2003; 37(4).
- [47] Kirsch M, De Groot H. NAD(P)H, a directly operating antioxidant?. The FASEB Journal. 2001 July 1, 2001;15(9):1569-74.

- [48] Unfried K, Albrecht C, Klotz L-O, Von Mikecz A, Grether-Beck S, Schins RPF. Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms. Nanotoxicology. 2007;1(1):52-71.
- [49] Pan Y, Leifert A, Ruau D, Neuss S, Bornemann J, Schmid G, et al. Gold Nanoparticles of Diameter 1.4 nm Trigger Necrosis by Oxidative Stress and Mitochondrial Damage. Small. 2009; 5(18):2067-76.
- [50] Van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. The FASEB Journal. 1991;5(13):2814-23.
- [51] Mori K, Hatanochi A, Ueki H, Olsen A, Jmenez SA. The transcription of human $\alpha 1(I)$ procollagen gene (COL1A1) is suppressed by tumour necrosis factor- α through proximal short promoter elements : evidence for suppression mechanisms mediated by two nuclear-factorbinding sites. Biochemical Journal. 1996; 319:811-16.
- [52] Zaw KK, Yokoyama Y, Abe M, Ishikawa O. Catalase restores the altered mRNA expression of collagen and matrix metalloproteinases by dermal fibroblasts exposed to reactive oxygen species. European Journal of Dermatology. 2006; 16(4):375-9.
- [53] Südel KM, Venzke K, Mielke H, Breitenbach U, Mundt C, Jaspers S, et al. Novel Aspects of Intrinsic and Extrinsic Aging of Human Skin: Beneficial Effects of Soy Extract. Photochemistry and Photobiology. 2005; 81(3):581-7.
- [54] Siwik DA, Pagano PJ, Colucci WS. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. American journal of physiology- cell physiology. 2000; 280(C53-C60).
- [55] Tanaka H, Okada T, Konishi H, Tsuji T. The effect of reactive oxygen species on the biosynthesis of collagen and glycosaminoglycans in cultured human dermal fibroblasts. Archives of Dermatological Research. 1993; 285(6):352-5.
- [56] Chompoosor A, Saha K, Ghosh PS, Macarthy DJ, Miranda OR, Zhu Z-J, et al. The Role of Surface Functionality on Acute Cytotoxicity, ROS Generation and DNA Damage by Cationic Gold Nanoparticles. Small. 2010;6(20):2246-9.

ภาคผนวก

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. Biohazard Laminar Flow (Greentechplus)
2. Microcentrifuge (Labnet, Liolab)
3. Vortex mixer (Liolab)
4. Filter Tip (Neptune)
5. Microtube (Axygen)
6. Centrifuge tube (Corning)
7. 24-well plate (Corning)
8. 96-well plate (Corning)
9. 96-well reaction plate (Microamp)
10. Centrifuge tube 15ml (Corning)
11. Centrifuge tube 50 ml (Corning)
12. Spectrophotometer (Biorad: model smart spec™ 3000)
13. CO₂ incubator (ThermoForma)
14. Real-time PCR machine (Applied Biosystems: StepOnePlus™)
15. Autoclave (Selecta: model presoclave 75)
16. pH meter (Becthai)
17. PrestoBlue™ Cell viability Reagent (MolecularProbes: Invitrogen, USA)
18. H₂DCFDA (H₂-DCF, DCF) (MolecularProbes: Invitrogen, USA)
19. CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit (MolecularProbes: Invitrogen, USA)
20. DNase I, RNase-free (Fermentas, USA)
21. ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, USA)
22. EXPRESS SYBR® GreenER™ qPCR SuperMixes and Two-Step qRT-PCR Kits (Invitrogen, USA)
23. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma, USA)
24. Fetal Bovine Serum (Hyclone, USA)
25. Pen-Strep (Hyclone)
26. Hydrogen tetrachroaurate (Sigma, USA)
27. Sodium citrate (Merck, Germany)

การเตรียมสารเคมี

1. Stocking 1% Hydrogen tetrachroaurate

HAuCl ₃ .3H ₂ O	1	กรัม
DI water	100	มิลลิลิตร

2. Stocking 0.0202 nM Sodium citrate

C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O	257	มิลลิกรัม
DI water	50	มิลลิลิตร

3. Phosphate buffer saline

KCl	0.2	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.2	กรัม
NaCl	8.0	กรัม
Na ₂ HPO ₄	1.15	กรัม

เติมน้ำ DI water จนถึง 1,000 มิลลิลิตร และปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 7.0 - 7.4

4. Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) Medium

1. ละลายผง DMEM ด้วยน้ำ 900 มิลลิลิตร
2. เติม Na₂HCO₃ 3.7 กรัม
3. ปรับ pH ด้วย HCl
4. ปรับระดับของน้ำให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

5. กรองและเติม Fetal Bovine Serum และ Pen-Strep ด้วยอัตราส่วน 10:1

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวชุลีปราง แตนลาดแก้ว เกิดเมื่อวันที่ 4 ธันวาคม พ.ศ. 2529 โดยมีภูมิลำเนาที่ จังหวัดลำปาง เป็นบุตรคนแรกของ นายทรงศักดิ์ และ นางจันทร์เพ็ญ แตนลาดแก้ว

ประวัติการศึกษา

- ปี พ.ศ. 2545 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมปลายที่ โรงเรียนอรุโณทัย ลำปาง
- ปี พ.ศ. 2548 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมปลายที่ โรงเรียนบุญวาทย์วิทยาลัย ลำปาง
- ปี พ.ศ. 2552 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) จากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ปัจจุบัน กำลังศึกษาอยู่ในระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ แขนงอณูชีววิทยาและพันธุศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย