

หัวข้อคุณสมบัติ	การพัฒนาอนุภาคนาโนที่เป็นสารยับยั้งเอนไซม์อะโรมาเทสจากพืชเพื่อทำให้เกิดลักษณะเพศผู้ในปาล์มวาลาย	
ผู้เขียน	ว่าที่ร้อยตรีทงศักดิ์ สัสดีแพง	
ปริญญา	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์นาโนและเทคโนโลยีนาโน)	
คณะกรรมการที่ปรึกษา	ผศ.น.สพ. ดร.สุรัช พิกุลแก้ว	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	รศ.ภญ.ดร.ศิริพร โอโกโนกิ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ผศ.สพ.ญ.ดร.วาสนา ไชยศรี	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การผลิตปลาเพศผู้ ถูกพิจารณาว่ามีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทย การจัดการสิ่งหนึ่งที่มีส่วนทำให้เกิดการเจริญเติบโตด้านนี้ คือ เทคโนโลยีการผลิตลูกปลาเพศเดียวโดยใช้วิธีการยับยั้งเอนไซม์อะโรมาเทสเพื่อทำให้เกิดลักษณะเพศผู้ ดังนั้น พืชไทยจำนวน 22 ชนิดที่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะโรมาเทส ประกอบด้วยพืชที่ถูกนำมาใช้ในการรักษามะเร็งเต้านม และ/หรือ มะเร็งรังไข่ หรือมีรายงานว่าเป็นตัวกระตุ้นฮอร์โมนเอสโตรเจน ได้นำมาทดสอบสกัดด้วยเอทานอลและทำการตรวจสอบ ผลการศึกษาพบว่า เพกา (*Oroxylum indicum* L.) มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะโรมาเทสได้สูงสุดในการตรวจวัดด้วยระบบไมโครโซมจากปลานิล โดยสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตจากเปลือกเพกาแสดงความเป็นพิษเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นต่อเซลล์มะเร็งที่ไวต่อฮอร์โมนเพศหญิงทั้งชนิด HepG2 และ MCF-7 นอกจากนี้ ผลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ชี้ให้เห็นว่าองค์ประกอบหลักของสารสกัดดังกล่าว คือ ไครซิน อย่างไรก็ตาม ไครซินเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ ดังนั้น เพื่อเพิ่มการละลายน้ำของไครซินจึงพัฒนาไครซินให้มีขนาดอนุภาคนาโนโดยใช้โพลิเมอร์ชนิดต่างๆ ได้แก่ ไฮดรอกซีโพรพิลเบต้าไซคลอเดกตริน (เอชพีบีซีดี), พอลลอกซามเมอร์ เอฟหกแปด, พอลลอกซามเมอร์ เอฟหนึ่งสองเจ็ด, พอลิแลคติกโคไกลโคลิกแอซิด (พีแอลจีเอ) และระบบนำส่งไบโโลโซม โดยศึกษาพร้อมกับการใช้สารลดแรงตึงผิวเพื่อเพิ่มการละลาย

ผลการศึกษาพบว่าสัดส่วนเหมาะสมของเอชพีบีซีดีร่วมกับสารลดแรงตึงผิวร่วมกับทวินแปดสิบ ทำให้เกิดไครซินขนาดอนุภาคนาโนที่มีประสิทธิภาพการกักเก็บของสาร, ค่าประจุไฟฟ้า, และค่า

การกระจายตัว 100% , 8.68 ± 2.24 นาโนเมตร และ 0.04 ± 0.0 ตามลำดับ ส่วนการใช้ฟอลลอกซาเมอร์ เอฟหกแปดที่สัดส่วนเหมาะสมร่วมกับทวินแปดสิบ ทำให้เกิดโครชินขนาดอนุภาคนาโนที่มีประสิทธิภาพการกักเก็บของสาร, ค่าประจุไฟฟ้า, และค่าการกระจายตัว 100% , 12.71 ± 4.10 นาโนเมตร และ 0.14 ± 0.0 ตามลำดับ ในขณะที่การใช้ฟอลลอกซาเมอร์ เอฟหนึ่งสองเจ็ดที่สัดส่วนเหมาะสมร่วมกับทวินแปดสิบ ทำให้เกิดโครชินขนาดอนุภาคนาโนที่มีประสิทธิภาพการกักเก็บของสาร, ค่าประจุไฟฟ้า, และค่าการกระจายตัว 100% , 11.74 ± 3.22 นาโนเมตร และ 0.05 ± 0.0 ตามลำดับ ยังพบอีกว่า การใช้อะซิโตนเป็นตัวทำละลายโครชินหรือเอธานอลในขั้นตอนการเตรียมก็สามารถทำให้เกิดโครชินขนาดอนุภาคนาโนได้ไม่แตกต่างกัน สิ่งที่น่าสนใจในการพัฒนาโครชินขนาดอนุภาคนาโนทั้งสามระบบดังกล่าว คือ อนุภาคนาโนที่บรรจุโครชินมีขนาดค่อนข้างใหญ่กว่าขนาดของกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้บรรจุโครชิน ส่วนการใช้พีแอลจีเอที่สัดส่วนเหมาะสมร่วมกับทวินแปดสิบทำให้เกิดโครชินขนาดอนุภาคนาโนที่มีประสิทธิภาพการกักเก็บของสาร, ค่าประจุไฟฟ้า, และค่าการกระจายตัว $56.99 \pm 4.55\%$, 205.00 ± 59.69 นาโนเมตร และ 0.12 ± 0.0 ตามลำดับ นอกจากนี้ พบว่าสัดส่วนของยาต่อโฟลิเมอร์ที่ใช้มีบทบาทสำคัญต่อขนาดอนุภาคนาโนในการพัฒนายาโพลีโนไมเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ และสัดส่วนที่เหมาะสมของโครชินร่วมกับน้ำดี โคลเลสเตอรอล และสแปนแปดสิบ ทำให้เกิดโครชินโพลีโนไมโซมที่มีประสิทธิภาพการกักเก็บของสาร, ค่าประจุไฟฟ้า, และค่าการกระจายตัว $93.64 \pm 2.6\%$, 184.70 ± 80.12 นาโนเมตร และ 0.32 ± 0.0 ตามลำดับ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าชนิดและสัดส่วนของสารลดแรงตึงผิวที่นำมาใช้เป็นจุดสำคัญในการพัฒนาขนาดอนุภาคนาโนที่บรรจุโครชินและส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการกักเก็บโครชินในระบบไบโโลโซม

อย่างไรก็ตามพบว่า เอชพีบีซีดีร่วมกับทวินแปดสิบของโครชิน ที่ความเข้มข้นน้อยกว่าหรือเท่ากับ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงความเป็นพิษต่ำต่อการพัฒนาการของไข่ปลาหม้าลาย เป็นไปได้ว่า โครชินขนาดอนุภาคนาโนที่พัฒนาขึ้นโดยใช้เอชพีบีซีดีสามารถนำส่งสารโครชินได้เร็วกว่าระบบอื่นในต้นทุนการผลิตที่ต่ำ ดังนั้น โครชินขนาดอนุภาคนาโนที่พัฒนาขึ้นโดยใช้เอชพีบีซีดีระดับความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จึงถูกนำมาศึกษาการทำให้เกิดลักษณะเพศผู้ในปลาหม้าลายโตเต็มวัยเพศเมีย ผลการศึกษาทั้งหมดพบว่าระบบนำส่งสารโครชินขนาดอนุภาคนาโนที่พัฒนาโดยใช้เอชพีบีซีดีส่งผลการพัฒนารังไข่และมีผลต่อการเกิดลักษณะภายนอกแบบเพศผู้ของปลาหม้าลาย ผลการศึกษานี้เป็นผลการศึกษาเบื้องต้นของการใช้สารธรรมชาติที่ทำให้มีขนาดอนุภาคนาโนเพื่อทำให้เกิดลักษณะเพศผู้ในปลาหม้าลาย ซึ่งในการศึกษาในอนาคตจะได้ศึกษาเพิ่มเติมถึงประสิทธิภาพการทำให้เกิดลักษณะเพศผู้ในกลุ่มประชากรของปลาชนิดอื่นต่อไป

Dissertation Title Development of Plant Aromatase Inhibitor Nanoparticles for Masculinization of Zebrafish (*Danio rerio*)

Author Acting Sub Lt. Tanongsak Sassa-deepaeng

Degree Doctor of Philosophy (Nanoscience and Nanotechnology)

Advisory Committee Assistant Professor Dr. Surachai Pikulkaew Advisor
 Associate Professor Dr. Siriporn Okonogi Co-advisor
 Assistant Professor Dr. Wasana Chaisri Co-advisor

ABSTRACT

Male fish production has been regarded as important role for aquaculture in Thailand. One of the management to contribute this growth is the monosex fingerlings production technology through aromatase inhibitory activity for fish masculinization. Therefore, the 22 Thai plants, involved inhibiting activity of aromatase including for healing breast cancer and/or ovarian cancer or claimed as testosterone booster, were extracted by using ethanol and then investigated. It was found that *Oroxylum indicum* L. possess highest inhibitory activity on aromatase of tilapia microsome system. Ethyl acetate fraction of *O.indicum* also shows the high dose-dependent cytotoxicity both in HepG2 and MCF-7. Furthermore, the data from characterization by HPLC indicated that chrysin is the major component of this fraction. However, chrysin is practically insoluble in water. To increase water solubility of chrysin, nanoparticles of chrysin were developed by using hydroxypropylbetacyclodextrin (HP β CD), poloxamer F68, poloxamer F127, polylactic-co-glycolic acid (PLGA) and bilosome system. The effect of surfactant on enhancing the solubility was also studied.

It was found that, at the proper ratio of HP β CD associated with tween80, the nanoparticles of chrysin were obtained with EE%, Z-Average particle size, and polydispersion index (PDI) of 100%, 8.68 ± 2.24 nm and 0.04 ± 0.0 , respectively. The

proper ratio of poloxamer F68 associated with tween 80 was obtained with EE%, Z-Average particle size and PDI of 100%, 12.71 ± 4.10 nm and 0.14 ± 0.0 , respectively. The proper ratio of poloxamer F127 associated with tween80 was obtained with %EE, Z-Average particle size and PDI of 100%, 11.74 ± 3.22 nm and 0.05 ± 0.0 , respectively. It was also found that no significant difference between ethanol and acetone used as a solvent for chrysin dissolution in the preparation process. Interestingly, the three systems of these polymeric micelles revealed that the size of chrysin nanoparticle was slightly larger than that of empty micelles. At the proper ratio of PLGA (50:50) associated with tween 80, the chrysin loaded PLGA was obtained with EE%, Z-Average particle size and PDI of $56.99 \pm 4.55\%$, 205.00 ± 59.69 nm and 0.12 ± 0.0 , respectively. Additionally, it was also found that the ratio of drug to polymer play an important role in the size of the developed drug loaded micelles significantly. At proper ratio of chrysin to bile salt, cholesterol and span 80, the chrysin loaded bilosome was obtained with EE%, Z-Average particle size and PDI of $93.64 \pm 2.60\%$, 184.70 ± 80.12 nm and 0.32 ± 0.0 , respectively. The results demonstrate that the types of surfactants and the ratio of chrysin to surfactants are critical points in the size of chrysin loaded bilosome development and entrapment efficiency.

However, HP β CD associated with tween 80 of chrysin at concentration of ≤ 100 ng/mL showed low toxicity on zebrafish eggs development. It can be suggested that HP β CD associated with tween 80 can delivery chrysin into the eggs and released chrysin from nanoparticle faster than the other system with cost effectiveness. Therefore, the chrysin loaded HP β CD at concentration of 10 ng/mL and 100 ng/mL were selected for study the effect of chrysin on adult female zebrafish masculinization. The overall results demonstrated that chrysin loaded HP β CD were affected to ovarian development and gross appearance of male characteristics. These results are preliminary study of the effect of natural compound entrapped into nanoparticles on masculinization in zebrafish. Further study on the *in vivo* study of this nanoparticles efficacy of masculinization on other fish model will be investigated.