

## การศึกษาความเป็นพิษต่อผิวหนังของซีโอไลต์ในรูปแบบอนุภาคนาโนโดยใช้แบบทดสอบ เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง

สกลเทพ ศรีรักษ์, สุพัตรา ปรศุพัฒนา, ธีระศักดิ์ ดำรงรุ่งเรือง และ อรุณศรี ปรีเปรม

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น

### บทคัดย่อ

นาโนซีโอไลต์ (nanozeolite) เป็นสารประกอบที่เกิดจากการเชื่อมต่อระหว่างซิลิกอนและอะลูมิเนียมในรูปแบบโครงข่ายสามมิติ มีความสามารถเป็นตัวดูดซับและแลกเปลี่ยนไอออน จึงมีแนวโน้มนำมาใช้เพื่อกักเก็บสารสำคัญในเครื่องสำอาง ซึ่งต้องได้รับการศึกษาถึงความปลอดภัยก่อนที่จะมีผลตออกสู่ท้องตลาด การศึกษานี้จึงทำการทดสอบความเป็นพิษของนาโนซีโอไลต์ต่อเซลล์มะเร็งอีพิเดอร์มอยด์เคอราติโนไซต์จากมนุษย์ (human epidermoid carcinoma keratinocyte cell, A431) และเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากหน้าผากมนุษย์ (human forehead fibroblast cell, HFF) ในการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ ใช้ข้อมูลที่ได้จากระบบอิเล็กทรอนิกส์ เตรียมสารละลายนาโนซีโอไลต์โดยใช้คลื่นเหนือเสียงช่วยในการกระจายตัว จนได้สารละลายที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 % (w/v) ทดสอบโดยเติมสารละลายนาโนซีโอไลต์ลงในเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงทั้งสองชนิด ติดตามผลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของนาโนซีโอไลต์ที่ทำให้เกิดการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ร้อยละ 50 ของจำนวนเซลล์ทั้งหมด (the half maximal inhibitory concentration,  $IC_{50}$ ) เท่ากับ 0.08 % (w/v) ซึ่งจะนำมาใช้เป็นข้อมูลสำคัญในการเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสม เพื่อประโยชน์ต่อการพัฒนาตำรับสำหรับเภสัชภัณฑ์หรือเครื่องสำอางต่อไป

**Keywords:** zeolite, nanoparticles, skin toxicity, cell culture

\*Corresponding author:

สุพัตรา ปรศุพัฒนา

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

E-mail: psupatra@kku.ac.th

## **Real-time cellular analysis for skin toxicity testing of nanozeolites by using human cell culture model**

**Sakolthep Srirak<sup>1</sup>, Supatra Porasuphatana<sup>1\*</sup>, Teerasak Damrongrungruang<sup>2</sup> and Aroonsri Priprem<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

<sup>2</sup>Faculty of Dentistry, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

### **ABSTRACT**

Nanoparticles using in human must be fully assessed for their safety. Nanozeolites, an aluminosilicate crystalline with a 3-dimensioned porous structure, is considered a good absorbent and ion exchanger which might be applied for use as a reservoir to entrap active ingredients of cosmetic products. Aim of this study was to investigate cytotoxicity of nanozeolites on human epidermoid carcinoma (A431) and human forehead fibroblast cell (HFF). Skin toxicity test of nanozeolites was performed by using real-time xCELLigence impedance analysis. In this study nanozeolites was ultrasonically dispersed to obtain clear solution with various concentrations at 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 % (w/v) and tested with A431 cells and HFF cells. Viable cells were monitored during the period of 24-h exposure by using the xCELLigence. Following real-time analysis, the half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) determined based on dose-response curves derived by xCELLigence measurement was found to be 0.08% (w/v). Results demonstrated the application of real time analysis for cellular viability and showed the IC<sub>50</sub> value of nanozeolites at 0.08 % (w/v). This leads to a safety zone determination of using nanozeolites as a particle carrier for pharmaceutical and/or cosmetic products.

\*Corresponding author:

Supatra Porasuphatana

Faculty of Pharmaceutical Science, Khon Kaen University

E-mail: psupatra@kku.ac.th

## บทนำ

ซีโอไลต์ เป็นสารที่เกิดขึ้นได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี และสามารถเกิดขึ้นได้เองจากธรรมชาติในรูปของแร่ธาตุ โดยมีชื่อทางเคมี คือ Zeolites (CAS register numbers 1318-02-1 ; EINECS 215-283-8) ซึ่งประกอบไปด้วยอะตอมของซิลิกอน หรืออะลูมิเนียมหนึ่งอะตอม และออกซิเจนสี่อะตอม ( $\text{SiO}_4$  หรือ  $\text{AlO}_4$ ) สร้างพันธะกันเป็นรูปสามเหลี่ยมสี่หน้า (tetrahedral) โดยอะตอมของซิลิกอนหรืออะลูมิเนียมอยู่ตรงกลางล้อมรอบด้วยอะตอมของออกซิเจนที่มุมทั้งสี่ ซึ่งโครงสร้างสามเหลี่ยมสี่หน้านี้จะเชื่อมต่อกันที่มุม (ใช้ออกซิเจนร่วมกัน) ทำให้ซีโอไลต์เป็นผลึกแข็ง เป็นรูพรุนและช่องว่างหรือโพรงที่ต่อเชื่อมกันอย่างเป็นระเบียบในสามมิติ จึงทำให้ซีโอไลต์มีความสามารถในการทำหน้าที่เป็นตัวดูดซับที่ดี และเมื่อทำให้มีขนาดเล็กในระดับนาโนเมตรก็จะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวทำให้เสริมคุณสมบัติดูดซับ<sup>1</sup> จึงเล็งเห็นว่านาโนซีโอไลต์น่าจะนำมาใช้เป็นส่วนผสมของเครื่องสำอางเพื่อกักเก็บสารสำคัญ แล้วเตรียมให้อยู่ในรูปแบบผลิตภัณฑ์พร้อมใช้ในรูบบานาโน แต่จำเป็นต้องมีการศึกษาความปลอดภัยอย่างแน่ชัดเสียก่อน

ปัจจุบันอนุภาคนาโนเป็นระบบนำส่งสารสำคัญที่ได้รับความสนใจนำมาประยุกต์ใช้เพื่อช่วยในการนำส่งเวชสำอางในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของสารสำคัญ และปรับปรุงลักษณะของผลิตภัณฑ์ให้น่าใช้มากขึ้น ในด้านข้อมูลความเป็นพิษทางผิวหนังของซีโอไลต์นั้น มีการทดสอบโดยวิธีการปิดบนผิวหนังมนุษย์ (Patch test) โดยให้สัมผัสกับยาน้ำแวนตะกอนที่มีซีโอไลต์เป็นส่วนประกอบอยู่ร้อยละ 1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ไม่พบการเกิดปฏิกิริยาใดขึ้นที่ผิวหนังมนุษย์ และมีการศึกษาความไวของผิวหนังต่อการได้รับสัมผัสซีโอไลต์ในหนูตะเภา ผลที่ได้ไม่พบความไวของผิวหนังหนูตะเภาต่อการได้รับสัมผัส

ซีโอไลต์ ถึงแม้ว่าจะไม่พบข้อมูลความเป็นพิษของซีโอไลต์ต่อผิวหนัง แต่ก็ยังไม่สามารถบ่งบอกการเกิดพิษต่อผิวหนังได้ถ้าหากว่ามีการซึมผ่านของซีโอไลต์ลงไปสู่ผิวหนังชั้นต่างๆ<sup>2</sup> โดยเฉพาะการนำมาพัฒนาเป็นอนุภาคนาโนที่ทำให้ซีโอไลต์มีโอกาสซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนังชั้นต่างๆ ได้

เนื่องจากว่าผลิตภัณฑ์ที่จะนำมาใช้กับผิวหนังต้องได้รับการทดสอบพิษต่อผิวหนัง เพื่อรับรองว่าผลิตภัณฑ์นั้นมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคก่อนที่จะมีการผลิตออกสู่ท้องตลาด วิธีการที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนัง มีวิธีการทดสอบหลายวิธี วิธีดั้งเดิมคือการใช้สัตว์ทดลอง ได้แก่ กระต่าย หรือ หนูตะเภา<sup>3</sup> แต่เพื่อหลีกเลี่ยงข้อจำกัดทางด้านจริยธรรม และข้อจำกัดในการแปรผลมาสู่มนุษย์ รวมทั้งข้อห้ามใช้สัตว์ทดลองในการทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนังของผลิตภัณฑ์ที่จะนำมาใช้กับผิวหนัง เพื่อการจำหน่ายตามข้อกำหนดการค้าระหว่างประเทศของกลุ่มประเทศในสหภาพยุโรป (European Union) ซึ่งได้กำหนดยกเลิกการใช้สัตว์ทดลองอย่างเด็ดขาดสำหรับการทดสอบวัตถุอันตราย ในเดือนมีนาคม พ.ศ.2552 เป็นต้นมา<sup>4</sup> จึงได้มีการพัฒนาวิธีการทดสอบความเป็นพิษของผิวหนัง โดยใช้เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงทดแทนการทดสอบโดยใช้สัตว์ทดลอง

การประเมินความเป็นพิษต่อผิวหนังจะพิจารณาจากความสามารถของสารทดสอบในการลดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (cell viability) ในการทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนังในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงในการทดสอบ ชนิดของเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการทดสอบนั้นได้มีการนำเซลล์ผิวหนังมาเพื่อพัฒนา ได้แก่ เซลล์เคอราติโนไซต์ (Keratinocyte cell) ซึ่งเป็นเซลล์ผิวหนังที่อยู่ในชั้นหนังกำพร้า และ เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Fibroblast cell) ซึ่งเป็นเซลล์ผิวหนังที่อยู่ในชั้นหนังแท้ ทำให้ใช้เซลล์เค

อราดิโนไซต์แทนผิวหนังในชั้นหนังกำพร้า และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ แทนผิวหนังในชั้นหนังแท้ โดยเครื่องมือที่ใช้ทดสอบคือ ระบบเอ็กซ์เซลลิเจนซ์ (xCELLigence system) ซึ่งเป็นทางเลือกใหม่ในการวิเคราะห์เซลล์ ทำการติดตามและตรวจดูการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของเซลล์ตามเวลาจริง (real time)

งานวิจัยชิ้นนี้ได้ทำทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนังของนาโนซีโอไลต์ โดยใช้เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงในการทดสอบแทนการใช้สัตว์ทดลอง โดยมุ่งหวังที่จะเป็นส่วนหนึ่งในการประเมินความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำคัญในการเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการพัฒนาตำรับที่มีการใช้ซีโอไลต์เป็นส่วนประกอบต่อไปในอนาคต

## วิธีดำเนินการวิจัย

### เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

การทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนังของนาโนซีโอไลต์ ได้ใช้วิธีการทดสอบโดยใช้เครื่องมือที่ใช้วัด คือ RTCA sp instrument รุ่น The xCELLigence system (Roche Applied Science And Bioscience, USA) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ใช้ตรวจวิเคราะห์เซลล์ในลักษณะการติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่มีชีวิตทุกช่วงเวลาแบบเวลาจริง (real time) อุปกรณ์ที่ใช้ประกอบไปด้วย E-Plate 96 คือ ถาดที่ใช้เลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยทองคำบริเวณก้นหลุมเพื่อนำสัญญาณไฟฟ้าวางอยู่บนอุปกรณ์ RTCA SP Station ซึ่งจะอยู่ในตู้บ่ม CO<sub>2</sub> incubator (Waterjacket CO<sub>2</sub> Incubator, USA) และใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ RTCA software ในการรวม วิเคราะห์และแสดงข้อมูล โดยจะแสดงผลออกในรูปแบบของค่า cell index (CI) ซึ่งการติดตามการเปลี่ยนแปลงจะสามารถทำได้อย่างต่อเนื่อง โดยการวัดความต้านทานที่เกิดขึ้นโดยอาศัยอุปกรณ์ RTCA SP Station ที่มีอิเล็กโทรดรับสัญญาณความต้านทานบรรจุอยู่ เมื่อทำการเพาะเลี้ยง

เซลล์ทดสอบในถาดเลี้ยงเซลล์ (E-plate 96) ที่เคลือบด้วยทองคำบริเวณก้นหลุม เมื่อมีเซลล์เกาะอยู่ก้นหลุมของถาดเลี้ยงเซลล์จะมีแรงต้านทานเกิดขึ้น โดยแรงต้านที่เกิดขึ้นแปรผันตามจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่เกาะอยู่ โดยหลักการการทำงานจะมีการปล่อยกระแสไฟฟ้า 20 มิลลิโวลต์ ไปบนถาดที่ใช้เลี้ยงเซลล์ที่เคลือบด้วยทองคำบริเวณก้นหลุม การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับเซลล์จะเป็นผลให้เกิดการเปลี่ยนกระแสไฟฟ้า และจะแสดงค่าความสัมพันธ์ในรูปแบบของกราฟ โดยเส้นกราฟจะแสดงถึงการติดตามการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์ตลอดเวลา และแสดงค่าความสัมพันธ์ออกมาเป็นกราฟ โดยแกน x แสดงเวลาเป็นนาที่ ส่วนแกน y แสดงค่า CI<sup>6</sup>

### เซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ทดสอบ

เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากหน้าผากมนุษย์ (human forehead fibroblast cell, HFF) ได้รับความอนุเคราะห์จากสาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ก่อนทำการศึกษาได้ทดสอบหาจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบ พบว่าปริมาณเซลล์ตั้งต้นที่เหมาะสม คือ  $5 \times 10^3$  เซลล์ต่อหลุม ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dubecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, USA) ที่ผสม 10% fetal bovine serum (FBS, BioWhittaker, USA) และ 1% penicillin-streptomycin (BioWhittaker, USA)

เซลล์มะเร็งอีพิเดอร์มอยด์เคอราติโนไซต์จากมนุษย์ (human epidermoid carcinoma cell, A431) จาก American Type Culture Collection (ATCC) ก่อนทำการศึกษาได้ทดสอบหาจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบ พบว่าปริมาณเซลล์ตั้งต้นที่เหมาะสม คือ  $3 \times 10^3$  เซลล์ต่อหลุม โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dubecco's Modified Eagle Medium (DMEM, JR Scientific, USA) ที่ผสมด้วย 10% fetal bovine serum (FBS, BioWhittaker, USA) และ 1% penicillin-streptomycin (BioWhittaker, USA)

## สารเคมี

ซีโอไลต์ ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เกิดจากการสังเคราะห์โดยกระบวนการทางเคมี มีรูพรุนขนาดกลาง และมีขนาดของอนุภาคในระดับนาโนเมตร จากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยละลายและเจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dubecco's Modified Eagle Medium (DMEM) กำหนดความเข้มข้นสุดท้ายที่ใช้ทดสอบ คือ 0.05 0.1 0.2 0.3, 0.4 และ 0.5 % (w/v) และทำการเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนการทดสอบ

## การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

เตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง HFF และ A431 ใน E-plate 96 ในอาหารเลี้ยง DMEM (10% FBS, 1% penicillin-streptomycin) โดยมีจำนวนเซลล์  $5 \times 10^3$  เซลล์ต่อหลุม และ  $3 \times 10^3$  เซลล์ต่อหลุมตามลำดับ นำไปวางบนอุปกรณ์ส่วน RTCA SP station ที่อยู่ในตู้บ่ม CO<sub>2</sub> incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (5% CO<sub>2</sub>) เมื่อเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงจนเข้าสู่ระยะ log phase ซึ่งติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์โดยระบบอิเล็กทรอนิกส์ (xCELLigence system) จะทำการเติมสารละลายนาโนซีโอไลต์ที่ละลายและเจือจางด้วย DMEM จนมีความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) ดังนี้ 0.05 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 % (w/v) ในปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม หลังการเทอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกแล้ว โดยหลุมที่เป็นกลุ่มควบคุม (control) เติมนเฉพาะ DMEM โดยทำการทดลองซ้ำ 4 ครั้ง (n=4) ติดตามการเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

## ผลการศึกษา

การศึกษานี้ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษต่อผิวหนังของนาโนซีโอไลต์ที่ได้จากการสังเคราะห์จากกระบวนการทางเคมี โดยใช้เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง 2 ชนิด คือ A431 และ HFF ในการทดสอบ ความความ

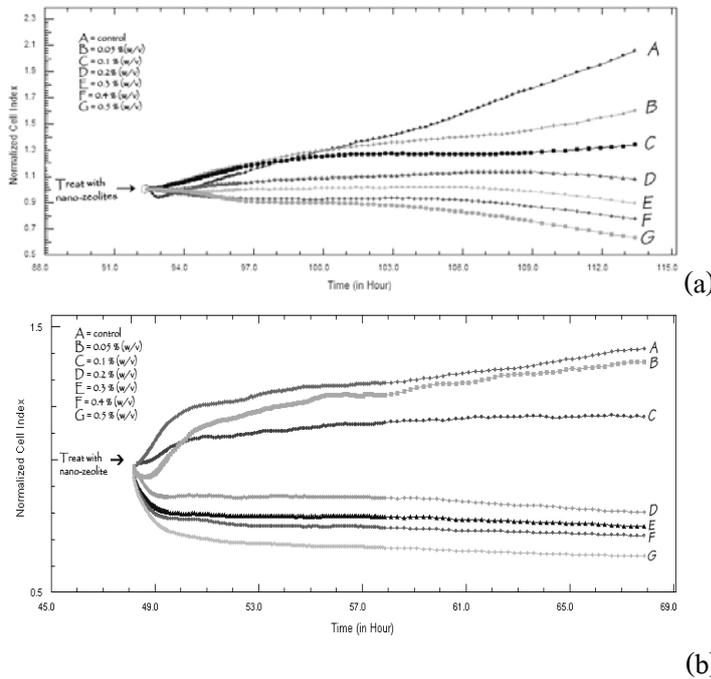
เข้มข้นของนาโนซีโอไลต์ที่ใช้ทดสอบ คือ 0.05 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 % (w/v) เครื่องมือที่ใช้คือ ระบบอิเล็กทรอนิกส์ (xCELLigence system) ซึ่งเป็นเครื่องมือเป็นที่ใช้ในการวิเคราะห์เซลล์แบบเวลาจริง ระบบจะติดตามและตรวจดูการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของเซลล์ในทุกช่วงเวลาทำการทดสอบ

ผลการศึกษาพบว่าเมื่อมีการบ่มเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารละลายนาโนซีโอไลต์ขนาดต่างๆ และได้มีการติดตามดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เกิดขึ้นในต่อเนื่องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง รูปที่ 1 แสดงค่า CI ของเซลล์ทั้งสองชนิดที่ได้รับการทดสอบสารมีแนวโน้มลดต่ำลง (เส้นกราฟ B-G) เมื่อเปรียบเทียบกับค่า CI ของกลุ่มควบคุม (เส้นกราฟ A) ซึ่งแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์แบบปกติที่ไม่ได้รับสัมผัสสารทดสอบใดๆ และเมื่อเปรียบเทียบค่า CI ของเซลล์ที่ได้รับสัมผัสกับสารละลายนาโนซีโอไลต์จะมีความลดต่ำลงมากขึ้นเมื่อสารละลายนาโนซีโอไลต์มีความเข้มข้นที่สูงมากขึ้น ซึ่งค่า CI จากกราฟนี้สามารถสรุปได้ว่า เมื่อสารละลายนาโนซีโอไลต์มีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น ก็จะส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงเพิ่มมากขึ้นจากการลดจำนวนลงของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่

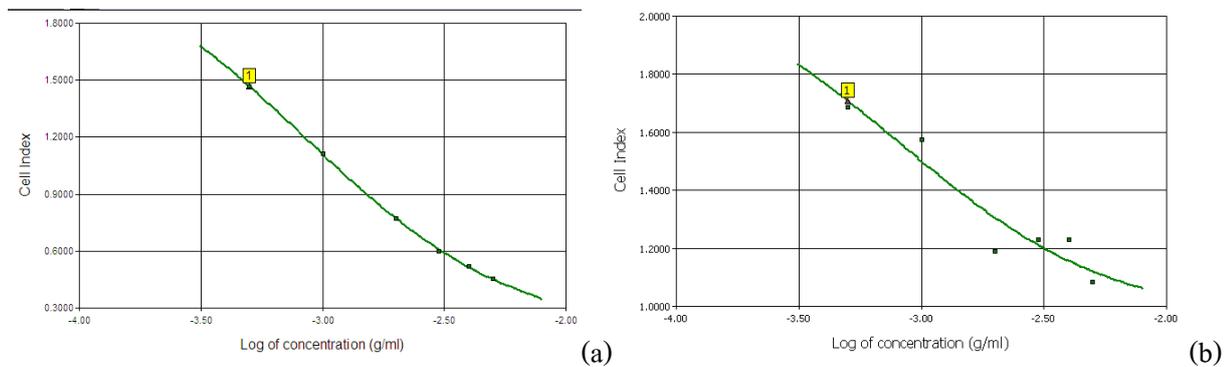
ที่ความเข้มข้นของนาโนซีโอไลต์ตั้งแต่ 0.2%(w/v) ขึ้นไป (เส้น D-G) พบการตายของเซลล์ A431 เป็นไปอย่างช้าๆ ตลอดช่วงของการบ่มเพาะเซลล์ ในขณะที่การตายของเซลล์ HFF ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.2%(w/v) ขึ้นไปพบการลดลงของจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงแรก และการตายของเซลล์ผิวหนังทั้งสองชนิดมีลักษณะความเป็นพิษที่สัมพันธ์กับขนาด (dose-response toxicity) อย่างชัดเจน และจากการศึกษานี้สามารถหาค่าความเข้มข้นของนาโนซีโอไลต์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ร้อยละ 50 ของเซลล์ทั้งหมด (IC<sub>50</sub>) ได้เท่ากับ 0.08 % (w/v) จากการคำนวณด้วยโปรแกรม RTCA software ซึ่งเป็นค่า

เดียวกันที่ได้จากการทดสอบด้วยเซลล์ A431 และเซลล์ HFF ดังแสดงในรูปที่ 2 อธิบายถึงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ทั้งสองชนิดที่แสดงถึงจำนวน

เซลล์ที่มีชีวิตลดต่ำลง เมื่อได้รับการสัมผัสกับนาโนซีโอไลต์ที่ความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น



ภาพที่ 1 ค่า Cell index แสดงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ทุกช่วงเวลา โดย xCELLigence system (a) แสดงการติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ A431 (b) แสดงการติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ HFF



ภาพที่ 2 ค่า IC<sub>50</sub> ของนาโนซีโอไลต์ เมื่อสัมผัสกับเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (a) แสดงค่า IC<sub>50</sub> ของนาโนซีโอไลต์ เมื่อสัมผัสกับเซลล์ A431 (b) แสดงค่า IC<sub>50</sub> ของนาโนซีโอไลต์ เมื่อสัมผัสกับเซลล์ HFF

**สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา**

การศึกษาครั้งนี้เป็นการทดสอบความเป็นพิษทางผิวหนังของนาโนซีโอไลต์ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้เป็นนาโนซีโอไลต์ที่เกิดจากการสังเคราะห์ทางเคมี โดยการเลือกใช้เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงในการทดสอบเพื่อ

ทดแทนการใช้สัตว์ทดลอง วิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนังโดยใช้เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงนั้นเริ่มมีมาตั้งแต่อดีต และมีการพัฒนาใช้เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงในการทดสอบพิษต่อผิวหนังเพื่อลดข้อจำกัดในการแปลผลจากสัตว์มาสู่มนุษย์และเพื่อให้ได้ผลในการทดสอบ

ที่ดีที่สุด พบว่าการใช้เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงสามารถนำมาใช้ทำนาย และให้ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนังที่สอดคล้องกับการทดสอบโดยใช้สัตว์ทดลอง<sup>7</sup> ดังนั้นการใช้เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงเพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนังจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีศักยภาพเพียงพอที่จะนำมาใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนัง เพื่อทดแทนการใช้สัตว์ทดลองได้

เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงที่เลือกใช้ในการศึกษาครั้งนี้มี 2 ชนิด คือ เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากหน้าผากมนุษย์ และเซลล์มะเร็งอิพิเดอร์มอยด์เคอราติโนไซต์จากมนุษย์ ซึ่งเป็นเซลล์ผิวหนังที่พบมากที่สุด ในผิวหนังชั้นหนังแท้และชั้นหนังกำพร้าตามลำดับ ซึ่งผิวหนังในชั้นหนังกำพร้าเป็นชั้นผิวหนังที่อยู่นอกสุดซึ่งเป็นด่านแรกในการสัมผัสกับสารเคมีโดยตรง และในการศึกษาครั้งนี้ทดสอบสารที่มีขนาดเล็กในระดับนาโนเมตร อาจสามารถซึมผ่านลึกลงไปสู่ผิวหนังในชั้นหนังแท้ได้ จึงเลือกใช้เซลล์ทั้งสองชนิดในการทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนัง ซึ่งเป็นเปรียบเสมือนเป็นตัวแทนของผิวหนังทั้งในชั้นหนังกำพร้าและหนังแท้ เครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบ คือ ระบบเอ็กซ์เซลลิเจนซ์ (xCELLigence system) ซึ่งเป็นทางเลือกใหม่ในการวิเคราะห์เซลล์ ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับวิธี Methyl tetrazolium 3-[4, 5-Dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้วัดการอยู่รอดของเซลล์แบบ end point measurement ส่วนวิธีการวัดโดยระบบเอ็กซ์เซลลิเจนซ์จะทำให้เห็นจุดที่เซลล์เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงได้ชัดเจนกว่า โดยในการทำงานระบบจะวัดความต้านทานที่เกิดขึ้น และแปลงสัญญาณจากความต้านทานไฟฟ้าที่เกิดขึ้นภายในถาดเลี้ยงเซลล์ โดยแรงต้านที่เกิดขึ้นแปรผันตามจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่เกาะอยู่ ทำให้สามารถติดตามผลการทดสอบแบบเวลาจริงได้อย่างแม่นยำและต่อเนื่อง หลังจากเซลล์สัมผัสสารได้ทุกช่วงเวลา ตั้งแต่เริ่มการ

สัมผัสสารไปจนครบเวลาทดสอบ ซึ่งวิธี MTT assay จะวัดการอยู่รอดของเซลล์ที่จุดสิ้นสุดการทดสอบเท่านั้น นอกจากนี้ยังสามารถแก้ปัญหาเรื่องสีของสารทดสอบรบกวนในการวัดการมีชีวิตรอดของเซลล์แบบวิธี MTT assay ได้อีกด้วย โดยก่อนการทดสอบความเป็นพิษของสาร ได้มีการทดสอบรูปแบบการแบ่งตัวของเซลล์ทั้งสองเพื่อกำหนดจำนวนเซลล์ที่เหมาะสม และเพื่อให้ได้ค่า CI ที่เหมาะสม

ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นข้อมูลสำคัญของวัตถุพิษ ซึ่งจากการศึกษาทำให้ทราบถึงค่า  $IC_{50}$  ของนาโนซีโอไลต์เท่ากับ 0.08% (w/v) จากการทดสอบเซลล์ทั้งสองชนิด แต่เซลล์ทั้งสองมีลักษณะการตายแตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 1 เนื่องจากว่าเซลล์ HFF เมื่อรับสัมผัสกับสารทดสอบที่ความเข้มข้น 0.2%(w/v) จะสังเกตเห็นการตายอย่างรวดเร็ว ส่วนใน A431 เมื่อรับสัมผัสกับสารทดสอบที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไปอย่างช้าๆ ไม่เห็นความแตกต่างอย่างชัดเจนเช่นเซลล์ HFF เนื่องจากว่า A431 เป็นเซลล์ที่อยู่ในชั้นผิวหนังกำพร้า ซึ่งเป็นชั้นผิวหนังที่อยู่อกสุดและสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมโดยตรง ดังนั้นเซลล์ A431 จึงทนต่อการรับสัมผัสของสารได้มากกว่าเซลล์ HFF ซึ่งเป็นเซลล์ที่อยู่ในผิวหนังชั้นหนังแท้ซึ่งอยู่ลึกลงมาได้ผิวหนังชั้นหนังกำพร้า แต่เมื่อนำมาคำนวณหา  $IC_{50}$  โดยโปรแกรม RTCA software ซึ่งโปรแกรมจะนำค่า CI ที่สูงที่สุดในกราฟแต่ละเส้นมาคำนวณ ทำให้ค่า  $IC_{50}$  ที่ได้ใกล้เคียงกัน คือ เท่ากับ 0.08 % (w/v) นอกจากนี้ผลการทดสอบจากเซลล์ทั้งสองชนิดให้ผลเหมือนกัน คือ เมื่อนาโนซีโอไลต์มีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นก็จะส่งผลเกิดพิษต่อเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงเพิ่มมากขึ้นทำให้ทราบถึงความเข้มข้นที่ปลอดภัยที่ไม่ก่อให้เกิดพิษทางผิวหนัง และเป็นข้อพิจารณาในการเลือกความเข้มข้นของนาโนซีโอไลต์ เพื่อที่จะนำไปใช้ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์พร้อมใช้ในรูปแบบอนุภาคนาโนต่อไปในอนาคต

นอกจากนี้การเลือกใช้เซลล์ผิวหนังที่อาจเป็นตัวแทน  
ชั้นความลึกของผิวหนังที่แตกต่างกันเช่นในการศึกษา  
ครั้งนี้ จะช่วยให้เห็นภาพการตอบสนองที่ใกล้เคียง  
ผิวหนังจริงของมนุษย์ได้มากขึ้น

การศึกษาความเป็นพิษในรูปแบบเวลาจริง (real  
time) นับเป็นวิธีการที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อการศึกษาการ  
เปลี่ยนแปลงของเซลล์ในระหว่างที่มีการสัมผัสสาร  
ทดสอบ ทั้งการเปลี่ยนแปลงของการแบ่งตัวเพื่อเพิ่ม  
จำนวนเซลล์ (cell proliferation) เมื่อวิธีการนี้ถูก  
นำมาใช้ในการศึกษาความเป็นพิษก็สามารถช่วยให้การ  
สังเกตความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารทดสอบมีความ  
ถูกต้องแม่นยำมากขึ้น

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงาน  
คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.วิไล  
รัตน์ ลื่อนันต์ศักดิ์ศิริ สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชา  
วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความ  
อนุเคราะห์เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากหน้าผากมนุษย์  
(human forehead fibroblast cell, HFF)ขอขอบพระคุณ  
ผศ. ดร. พิบูลย์ พันธุ์ คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สาร  
สังเคราะห์นาโนซีโอไลต์สำหรับงานวิจัยครั้งนี้ และ  
ขอขอบคุณบริษัท Roche Applied Science And  
Bioscience ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่อง RTCA sp  
instrument รุ่น xCELLigence system ในงานวิจัยนี้

### เอกสารอ้างอิง

1. Song W, Justice RE, Jones CA, *et al.* Synthesis, Characterization, and Adsorption Properties of Nanocrystalline ZSM-5. *Langmuir* 2004;20:8301-06.
2. Fruijtier-Pölloth C. The safety of synthetic zeolites used in detergents. *Arch Toxicol* 2009;83:23-35.
3. Draize JH, Woodard G, Calvery HO. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;82:377-90.
4. Chunthapong J, Canton I, Kemp EH, *et al.* A 3D skin tissue-engineering model for inflammatory and toxicity testing. *Eur Cell Mater* 2008;16:42.
5. Maria P. *In vitro* cultured human skin cells as alternative to animals for skin irritancy screening. *Int J Cosmetic Sci* 1992;14:245-64.
6. Urcan E, Haertel U, Styllou M, *et al.* Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. *Dent Mater* 2009;26:51-8.
7. Lee JK, Kim DB, Kim JI, *et al.* *In vitro* cytotoxicity tests on cultured human skin fibroblasts to predict skin irritation potential of surfactants. *Toxicol In Vitro* 2000;14:345-49.