

Thesis Title	The Entrapment of Natural Peptides in Nanoparticles for Scar Treatment	
Author	Ms. Charinya Chankhampan	
Degree	Doctor of Philosophy (Pharmacy)	
Thesis Advisory Committee	Prof. Dr. Aranya Manosroi	Advisor
	Prof. Dr. Jiradej Manosroi	Co-advisor
	Prof. Dr. Yoshiaki Kawashima	Co-advisor
	Asst. Prof. Dr. Kassara Pattamapun	Co-advisor

ABSTRACT

This study aimed to develop optimum transdermal delivery systems for peptide enzymes from natural sources loaded in nanocarrier for scar treatment. Low cytotoxic elastic niosomal formulation loaded with salmon calcitonin (a model peptide) which composed of Tween 61, cholesterol and edge activators was developed. The 5% mole sodium cholate (NaC) elastic niosome appeared to be the most appropriate niosomal system to load the peptide because of its high elasticity and low cytotoxicity on human skin fibroblasts. Both calcitonin loaded in elastic and non-elastic niosomes did not only show higher chemical stability at high storage temperatures, but also superior transdermal absorption in comparing to calcitonin in solution. Papain and bromelain, the protease enzymes from *Carica papaya* latex and pineapple (*Ananas comosus*) fruits were extracted and purified by the simple precipitation with 95% ethanol and the saturated ammonium sulfate, respectively. The molecular weight of the extracted enzymes was compared with their standards and the protein marker by SDS-PAGE. The purity of papain and bromelain of the extracted enzymes determined by HPLC were 82.31 and 38.03%, respectively. The physicochemical properties including solubility and stability in various reagents of the extracted

enzymes were similar to their standards. The standard and extracted papain exhibited higher antioxidant activity than bromelain both in free radical scavenging (SC_{50}) and lipid peroxidation inhibition (IPC_{50}) activity. However, the extracted papain showed lower antioxidant activity than the standard papain. All protease enzymes at 25 $\mu\text{g/ml}$ did not only show no cytotoxicity, but also exhibited an interesting relative MMP-2 stimulation on human skin fibroblasts. The extracted papain gave the highest MMP-2 stimulatory activity at 2.10 folds of the control which were higher than the standard papain, the standard and extracted bromelain of 1.04, 1.31 and 1.24 times, respectively. The papain and bromelain loaded in 5% mole sodium cholate (NaC) elastic niosome were developed. They gave the vesicular sizes in the range of 109.5 to 143.9 nm with the negative zeta potential of -14.7 to -30.1 mv. The morphology of the niosomes was in spherical shape with unilamellar structure observed under TEM microscope. The elastic niosomes did not only improve the entrapment efficiency of the enzymes over the non-elastic niosomes, but also reduced the toxicity on skin human fibroblasts. The MMP-2 stimulatory activity of papain and bromelain was still existing similar to their free enzymes even they were loaded in elastic niosomes. The relative MMP-2 stimulation of the standard papain, extracted papain, standard bromelain and extracted bromelain loaded in elastic niosomes were 1.26, 1.34 1.09 and 1.20 for the pro MMP-2 and 1.26, 1.41, 1.01 and 1.03 for the active MMP-2, respectively in comparing to the control. The extracted papain loaded in elastic niosomes gave superior characteristics (low cytotoxicity and high MMP-2 stimulation) to other enzymes. The elastic niosomes can enhance the chemical stability of the extracted papain, by exhibiting higher remaining contents than the free enzyme and that loaded in non-elastic niosomes when kept at various temperatures (4 ± 2 , 27 ± 2 and 45 ± 2 °C) for 8 weeks. The standard papain loaded in PLGA nanospheres prepared by the water-oil-water emulsion solvent evaporation method (ESE) gave superior characteristics (small particle size and low polydispersity index) to the emulsion solvent diffusion in water method (ESD). The morphology of the nanospheres loaded with papain prepared by the ESE method exhibited spherical shape and smooth surface investigated by SEM and TEM. The encapsulation efficiency of papain in the nanospheres by the ESE method was about 2 times higher than those by the ESD method. The release profile of papain from the PLGA

nanospheres of the ESD and ESE methods indicated the 2 phases with an initial rapid phase of 6 h and followed by the slow release phase of 48 h. Papain loaded in the nanospheres prepared by the ESD method showed more rapid initial release than those by the ESE method. The blank PLGA nanospheres from the two methods did not show any cytotoxicity in human skin fibroblasts, while the free papain gave toxicity more than the loaded papain of 1.5 times. Papain loaded in PLGA nanospheres prepared by the ESE method was more chemical stable than the free papain of 8 and 3 times when kept at 4 ± 2 and 25 ± 2 °C for 6 weeks, respectively. The gels incorporated with papain loaded in non-elastic niosomes (GNN), elastic niosomes (GEN) and PLGA nanospheres (GPN) were developed. These formulations were investigated for physicochemical characteristics and transdermal penetration through rat skin by Franz diffusion cells. The vesicular sizes of all niosomes and nanospheres in the gel formulations were in the range of 220.7 to 520.2 nm. Papain loaded in elastic niosomes and incorporated in gel exhibited the accumulate amounts and fluxes in the whole rat skin and in the receiving solution more than those from gel containing papain loaded in non-elastic niosomes, PLGA nanospheres and in solution. The calculated PII values of all gel formulations containing papain in rabbit skin irritation closed patch test were in the range of 0.00-0.44 indicating of no irritation, except gel containing free papain (PII = 0.78, slight irritation). GEN gave superior chemical stability to gel containing free papain (GS) of 1.13, 1.29 and 1.35 times when stored at 4 ± 2 , 27 ± 2 and 45 ± 2 °C after 3 months, respectively. After 28 day application by the hypertrophic scar model in rabbit ears, the scar applied with GEN exhibited the percentage reduction of hypertrophic scars at 29.17% which was higher than gel base, GS, and GNN of 10.20, 2.73 and 2.31 times, respectively, but slightly lower than commercial product of 1.10 times. This study has demonstrated the potential of niosomes, especially the elastic niosomes, for the enhancement of rat skin transdermal absorption and the improvement of scar reduction in rabbit ear model of papain which will be beneficial for topical application in scar treatment.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การเก็บกักเปปไทด์จากธรรมชาติในอนุภาคนาโน เพื่อใช้รักษาแผลเป็น	
ผู้เขียน	นางสาว จริญญา จันทร์คำป็น	
ปริญญา	วิทยาศาสตร์ดุสิตบัณฑิต (เภสัชศาสตร์)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ศ. ดร. อรัญญา มโนสร้อย ศ. ดร. จีระเดช มโนสร้อย ศ. ดร. โยชียากิ คาวาชิมา ผศ. ดร. เกษรา ปัทมพันธ์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาระบบนำส่งผ่านผิวหนังที่เหมาะสมของเปปไทด์เอนไซม์จากธรรมชาติที่เก็บกักในอนุภาคนาโนเพื่อรักษาแผลเป็น โดยพัฒนานาโนไอโซมแบบยึดหยุ่นที่มีความเป็นพิษต่ำที่ประกอบด้วยทวิน 61, คอเลสเตรอลและสารในกลุ่มเอคจ์แอ็คทีเวเตอร์ โดยมีแคลซิโทนินเป็นเปปไทด์ต้นแบบ พบว่านาโนไอโซมแบบยึดหยุ่นที่ประกอบด้วย 5% โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) มีความเหมาะสมที่สุดสำหรับเก็บกักเปปไทด์เนื่องจากมีความยืดหยุ่นสูงและมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของผิวหนังมนุษย์ต่ำ นอกจากนี้ทั้งนาโนไอโซมแบบยึดหยุ่นและไม่ยึดหยุ่นยังเพิ่มความคงตัวของเคมีเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงและการดูดซึมผ่านผิวหนังเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายแคลซิโทนิน สกัดปาเปนและโบรมีเลนซึ่งเป็นเอนไซม์โปรติเอสที่มีอยู่ในยางมะละกอ (*Carica papaya*) และผลสับประรด (*Ananas comosus*) ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วย 95% เอทานอลและแอมโมเนียมอะซิเตต ตามลำดับ เปรียบเทียบมวลโมเลกุลของเอนไซม์ที่สกัดได้กับสารมาตรฐานเอนไซม์และโปรตีนมาตรฐานด้วยวิธีโซเดียมโดดีซิลซัลเฟต พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงพบว่าปาเปน

และโบรมิเลนที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์ 82.31 และ 38.03% ตามลำดับ เอนไซม์สกัดมีสมบัติทางกายภาพและเคมี (การละลายและความคงตัวในสารเคมีต่างๆ) คล้ายกับเอนไซม์มาตรฐาน เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันพบว่าทั้งปาเปนมาตรฐานและปาเปนสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันได้ดีกว่าโบรมิเลนมาตรฐานและ โบรมิเลนสกัด แต่ปาเปนสกัดมีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันต่ำกว่าปาเปนมาตรฐาน เอนไซม์โปรตีนเอสทุกตัวไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แต่มีฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์เมทริกซ์เมตาโลโปรตีนเนส-2 (MMP-2) ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของผิวหนังมนุษย์ ปาเปนสกัดมีฤทธิ์กระตุ้น MMP-2 สูงกว่ากลุ่มควบคุม ปาเปนมาตรฐาน โบรมิเลนมาตรฐานและโบรมิเลนสกัด 2.10, 1.04, 1.31 และ 1.24 เท่า ตามลำดับ เมื่อเก็บกักปาเปนและ โบรมิเลนในนีโอโซมแบบยึดหยุ่นพบว่ามีความหนาแน่น 109.5 ถึง 143.9 นาโนเมตรและค่าศักย์ซีต้าเป็นลบ (-14.7 ถึง -30.1 มิลลิโวลต์) และมีรูปร่างกลมที่ประกอบด้วยผนังชั้นเดียวเมื่อวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน นอกจากนี้โอโซมแบบยึดหยุ่นจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเก็บกักเอนไซม์ได้มากกว่านีโอโซมแบบไม่ยึดหยุ่นแล้วยังช่วยลดความเป็นพิษต่อเซลล์อีกด้วย เมื่อเก็บกักเอนไซม์ในนีโอโซมแบบยึดหยุ่นแล้วยังคงมีฤทธิ์กระตุ้น MMP-2 เช่นเดียวกับเอนไซม์ที่ไม่ถูกเก็บกัก โดยปาเปนมาตรฐาน ปาเปนสกัด โบรมิเลนมาตรฐานและโบรมิเลนสกัดที่เก็บกักในนีโอโซมแบบยึดหยุ่นมีฤทธิ์กระตุ้น pro MMP-2 เท่ากับ 1.26, 1.34, 1.09 และ 1.20 และกระตุ้น active MMP-2 เท่ากับ 1.26, 1.41, 1.01 และ 1.03 เท่าของกลุ่มควบคุมตามลำดับ ดังนั้นปาเปนสกัดที่เก็บกักในนีโอโซมแบบยึดหยุ่นจึงมีสมบัติ (ความเป็นพิษต่ำและฤทธิ์กระตุ้น MMP-2 สูง) เหนือกว่าเอนไซม์อื่นๆ นีโอโซมแบบยึดหยุ่นเพิ่มความคงตัวของเอนไซม์ให้ปาเปนสกัดโดยมีปริมาณเอนไซม์ที่เหลืออยู่มากกว่าเอนไซม์ที่ไม่ถูกเก็บกักและเอนไซม์ที่เก็บกักในนีโอโซมแบบไม่ยึดหยุ่นเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ (4 ± 2 , 27 ± 2 และ 45 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ส่วนปาเปนมาตรฐานที่เก็บกักในฟิเอลจีเอนาโนสเฟียร์ที่เตรียมด้วยวิธีการระเหยของตัวทำละลายในอิมัลชันของน้ำในน้ำมันในน้ำ (emulsion solvent evaporation, ESE) มีลักษณะเป็นอนุภาคขนาดเล็กและมีการกระจายของขนาดอนุภาคต่ำกว่าเมื่อเตรียมด้วยวิธีการแพร่ของตัวทำละลายของอิมัลชัน (emulsion solvent diffusion, ESD) อนุภาคที่เตรียมได้มีรูปร่างกลมและผิวเรียบเมื่อวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและส่องผ่าน ปาเปนมาตรฐานสามารถเก็บกักในนาโนสเฟียร์ที่เตรียมด้วยวิธี ESE ได้มากกว่าวิธี ESD

เป็น 2 เท่า อย่างไรก็ตามการปลดปล่อยปาเปนจากนาโนสเฟียร์จากการเตรียมทั้ง 2 วิธีมีลักษณะเป็นสองเฟส โดยใน 6 ชั่วโมงแรกมีการปลดปล่อยแบบทันที จากนั้นจึงค่อยๆปลดปล่อยเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แต่ปาเปนที่เก็บกักในนาโนสเฟียร์ที่เตรียมด้วยวิธี ESE ถูกปลดปล่อยในระยะแรกได้เร็วกว่าจากวิธี ESD อนุภาคนาโนสเฟียร์เปล่าจากการเตรียมทั้ง 2 วิธีไม่เป็นพิษต่อเซลล์ในขณะที่ปาเปนที่ไม่ถูกเก็บกักเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่าปาเปนที่ถูกเก็บกัก 1.5 เท่า นอกจากนี้ปาเปนที่เก็บกักในนาโนสเฟียร์ที่เตรียมด้วยวิธี ESE มีความคงตัวทางเคมีมากกว่าปาเปนที่ไม่ถูกเก็บกัก 8 และ 3 เท่าเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ± 2 และ 27 ± 2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 สัปดาห์ตามลำดับ จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพและเคมีรวมทั้งประสิทธิภาพการซึมผ่านหนังหนูของเจลที่มีส่วนผสมของปาเปนเก็บกักในนีโอโซมแบบไม่ยึดหยุ่น (GNN) ปาเปนเก็บกักในนีโอโซมแบบยึดหยุ่น (GEN) และปาเปนเก็บกักในพีแอลจีเอนาโนสเฟียร์ (GPN) พบว่าอนุภาคของนีโอโซมและนาโนสเฟียร์ที่อยู่ในเจลมีขนาด 220.7 ถึง 520.2 นาโนเมตร และ GEN สามารถซึมผ่านหนังหนูได้ดี โดยมีปริมาณสะสมและอัตราเร็วในการซึมผ่านในหนังหนูและในส่วนรีซีฟเวอร์มากกว่า GNN, GPN และปาเปนที่ไม่ถูกเก็บกัก (GS) ดำรับเจลทุกตำรับไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังระคาย โดยมิต่ำ PII (primary irritation index) ในช่วง 0.00-0.44 ยกเว้น GS ที่ก่อให้เกิดความระคายเคืองเล็กน้อย (PII = 0.78) นอกจากนี้ GEN ยังมีความคงตัวมากกว่า GS เป็น 1.13, 1.29 และ 1.35 เท่าเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ± 2 , 27 ± 2 และ 45 ± 2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 เดือน หลังจากทาแผลเป็นของหูกระคายเป็นเวลา 28 สัปดาห์พบว่าแผลเป็นที่ทำด้วย GEN สามารถลดรอยแผลเป็นได้ 29.17% ซึ่งมีฤทธิ์ดีกว่าเจลเบส GS และ GNN เป็น 10.20, 2.73 และ 2.31 เท่า ตามลำดับแต่มีฤทธิ์ต่ำกว่าผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด 1.10 เท่า การศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของนีโอโซมโดยเฉพาะนีโอโซมแบบยึดหยุ่นในการเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังและการลดรอยแผลเป็นในหูกระคายของปาเปนได้ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์เพื่อใช้สำหรับผิวหนังในการรักษาแผลได้