

การศึกษาขนาดที่เหมาะสมของไคโตแซนนานโนพาร์ทิเคิล
สำหรับการนำส่งวัสดุเชิงทางชุมก

เอกชัย คำเกลี้ยง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทด้านภาษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
สาขาวิชาภาษาอังกฤษและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะภาษาศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

พ.ศ. 2556

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี



**STUDY OF OPTIMAL SIZE OF CHITOSAN NANOPARTICLES FOR
NASAL VACCINE DELIVERY**

EKACHAI DUMKLIANG

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF PHARMACY
MAJOR IN PHARMACEUTICAL AND NATURAL PRODUCTS
FACULTY OF PHARMACEUTICAL SCIENCES
UBON RATCHATHANI UNIVERSITY
YEAR 2013
COPYRIGHT UBON RATCHATHANI UNIVERSITY**



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ปริญญา เกสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเกษตรศาสตร์และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์

เรื่อง การศึกษาขนาดที่เหมาะสมของไก่โตแซนนาโนพาร์ติเคิลสำหรับการนำส่งวัสดุทางชุมชน

ผู้วิจัย นายเอกชัย คำเกลี้ยง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

教授 Dr. ดร. ชุดินันท์ ประสีทธิ์กุริปะชา อาจารย์ที่ปรึกษา

ดร. วิษณุ คงมาลัย กรรมการ

ดร. วิษณุ ศิลาอ่อน กรรมการ

รองศาสตราจารย์ ดร. วันดี รังสิวจิตรประภา กรรมการ

ดร. ศรีรัตน์ จันต์คำ กรรมการ

ดร. มนต์ วิโรจน์แสงทอง กรรมการ

教授 Dr. ดร. ชุดินันท์ ประสีทธิ์กุริปะชา คณบดี

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี รับรองแล้ว

教授 Dr. ดร. ชุดินันท์ ประสีทธิ์กุริปะชา

(รองศาสตราจารย์ ดร. อุทิศ อินทร์ประสีทธิ์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

ปฏิบัติราชการแทนอธิการบดี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ปีการศึกษา 2556

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอรับขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุดินันท์ ประสาทีภูริปราชากา
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือในการจัดทำวิทยานิพนธ์
รวมถึงการตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จเป็นรูปเล่ม ได้อย่างสมบูรณ์ ของราย
ขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. วันดี วงศ์วิจิตรประภา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ให้คำปรึกษา และ
คำแนะนำในการดำเนินการวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอรับขอบพระคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ได้ให้การสนับสนุน
อุปกรณ์ สารเคมี ตลอดจนทุนวิจัยเพื่อจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ผู้วิจัยขอรับขอบพระคุณอาจารย์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ได้
กรุณาถ่ายทอดความรู้ด้านต่างๆ ทำให้ผู้วิจัยสามารถนำความรู้ที่ได้รับ มาประยุกต์ใช้ในการทำ
วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ขอบขอบคุณเจ้าหน้าที่และนักวิชาศาสตร์ และเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ นักศึกษา
คณะเภสัชศาสตร์ ที่อ่านวยความสะดวกและให้การช่วยเหลือในการจัดทำวิทยานิพนธ์ สุดท้ายนี้
ขอบขอบพระคุณบิค่า นารดา บุพารีที่คอยให้กำลังใจ ให้คำปรึกษา ตลอดระยะเวลาทั้งหมดทั้งหมดทุกๆ
และงานสุข ตลอดทั้งให้การสนับสนุนในด้านต่างๆ แก่ผู้วิจัยตลอดมา

100%
(นายเอกชัย คำกลิ้ง)

ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

ชื่อเรื่อง : การศึกษาขนาดที่เหมาะสมของไอโคโตแซนนาในพาร์ทิเคิลสำหรับการนำส่งวัคซีนทางช่องมูก

โดย : เอกชัย คำเกลียง

ชื่อปริญญา : เกษตรศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา : เกษตรภัณฑ์และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

ประธานกรรมการที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริปิริชา

ศัพท์สำคัญ : ไอโคโตแซนนาในพาร์ทิเคิล การนำส่งวัคซีนทางช่องมูก โอลัลบูมิน การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่เยื่อบุผิว การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในกระแสเลือด

ไอโคโตแซนนาในพาร์ทิเคิลเป็นระบบนำส่งวัคซีนทางช่องมูกที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งขนาดของอนุภาคเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการนำส่ง และเสริมถูกที่กระตุ้นภูมิคุ้มกัน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาขนาดที่เหมาะสมของไอโคโตแซนนาในพาร์ทิเคิลสำหรับการนำส่งวัคซีนทางช่องมูก โดยใช้โอลัลบูมินเป็นแอนติเจนต้นแบบ เตรียมตัวรับไอโคโตแซนนาในพาร์ทิเคิล ด้วยวิธี ionotropic gelation ปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลายไอโคโตแซน ตั้งแต่ 1-3 mg/mL และสัดส่วนโดยมวลของการเกิดอันตรกิริยะระหว่างไอโคโตแซนกับ sodium tripolyphosphate (TPP) ตั้งแต่ 3:1 - 5:1 ได้ตัวรับไอโคโตแซนนาในพาร์ทิเคิล จำนวน 9 ตัวรับ ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของไอโคโตแซนนาในพาร์ทิเคิล ด้วยการวัดขนาดและประจุที่ผิวนุภาควิเคราะห์การกักเก็บและ การบรรจุแอนติเจนในไอโคโตแซนนาในพาร์ทิเคิล และการปลดปล่อยแอนติเจนที่ pH ต่างๆ ด้วยวิธี BCA Protein Assay ทดสอบความคงตัวทางกายภาพของไอโคโตแซนนาในพาร์ทิเคิล และความคงตัวของแอนติเจนที่กักเก็บในไอโคโตแซนนาในพาร์ทิเคิล ด้วยวิธี SDS-PAGE คัดเลือกตัวรับที่มีขนาดอนุภาคต่างกัน คือ ขนาดเล็ก ($< 500 \text{ nm}$) ขนาดกลาง ($500 - 1,000 \text{ nm}$) และขนาดใหญ่ ($1,000 - 5,000 \text{ nm}$) เพื่อประเมินถูกที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันของไอโคโตแซนนาในพาร์ทิเคิลในหมู่ทดลอง โดยให้โอลัลบูมิน ทางช่องมูก ปริมาณ $20 \mu\text{g}$ ปริมาตร $20 \mu\text{L}$ ในสัปดาห์ที่ 0, 3 และ 6 และฉ่าหนูในสัปดาห์ที่ 9 ของทดลอง เก็บตัวอย่างเลือด มูลน้ำลาย น้ำด้างโพรงช่องมูก และน้ำด้างช่องคลอด ประเมินการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ humoral immune response (HIR) จากระดับ Immunoglobulin G (IgG) ในชีรัมซึ่งเป็น systemic immune response และระดับ secretory Immunoglobulin A (sIgA)

ในนุ่ล น้ำลาย สารคัดหลั่งบริเวณเยื่อบุโพรงจมูกและเยื่อบุช่องคลอด ซึ่งเป็น mucosal immune response และประเมินการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ cell-mediated immune response (CMIR) จากระดับ Interleukin-4 (IL-4) และ Interferon- γ (IFN- γ) ที่หลั่งจาก splenocytes เมื่อเทียบกับสารละลายโอลวัลบูมินด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ผลการวิจัยพบว่าสารละลายไคโตไซด์ความเข้มข้นเท่ากับ 3 mg/mL ทำให้ตัวรับมีความคงตัวทางกายภาพ และเมื่อเพิ่มสัดส่วนโดยมวลของไคโตไซด์ต่อ TPP เท่ากับ 3:1, 4:1 และ 5:1 จะได้ออนุภาคที่มีประจุที่ผิวอนุภาคเป็นบวก และมีขนาดใหญ่ขึ้น คือ ขนาดเด็ก (249.67 ± 29.6 nm) ขนาดกลาง (559 ± 17.21 nm) และขนาดใหญ่ ($1,240 \pm 62.45$ nm) ตามลำดับ แต่การกักเก็บและการบรรจุแอนติเจนของไคโตไซด์นาโนพาร์ทิเคิลมีค่าลดลง คือ ร้อยละของการกักเก็บแอนติเจน เท่ากับ 76.49 ± 4.72 , 68.52 ± 6.01 และ 66.77 ± 7.95 ตามลำดับ และร้อยละของการบรรจุแอนติเจน มีค่าเท่ากับ 31.62 ± 1.52 , 27.61 ± 1.68 และ 27.03 ± 1.27 ตามลำดับ การปลดปล่อยแอนติเจนจากไคโตไซด์นาโนพาร์ทิเคิลมีลักษณะคล้ายคลึงกัน คือ ปลดปล่อยแอนติเจนได้ดีที่ pH 4.5 โดยมีค่าร้อยละของการปลดปล่อยแอนติเจนในวันที่ 2 เท่ากับ 86.62 ± 1.52 , 85.20 ± 1.44 และ 83.02 ± 1.36 ตามลำดับ ส่วนการปลดปล่อยแอนติเจนที่ pH 6.8 และ pH 7.4 มีค่าลดลง เมื่อเทียบไคโตไซด์นาโนพาร์ทิเคิลในรูปทรงแห้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 3 เดือน พบว่าทั้งสามขนาดมีความคงตัวทางกายภาพ และแอนติเจนที่กักเก็บไม่เสียสภาพ ผลการศึกษาฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันของไคโตไซด์นาโนพาร์ทิเคิลที่กักเก็บโอลวัลบูมิน เมื่อเทียบกับสารละลายโอลวัลบูมิน พบว่าไคโตไซด์นาโนพาร์ทิเคิลทั้งสามขนาดสามารถเสริมฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบ HIR ได้ดีกว่าสารละลายโอลวัลบูมิน โดยประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของไคโตไซด์นาโนพาร์ทิเคิลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบแนวโน้มของระดับ IgA ในน้ำลาย สารคัดหลั่งจากเยื่อบุโพรงจมูก และเยื่อบุช่องคลอดที่เพิ่มขึ้นตามขนาดอนุภาคที่ลดลง ไคโตไซด์นาโนพาร์ทิเคิลสามารถเสริมฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบ CMIR ได้ดีกว่าสารละลายโอลวัลบูมินเช่นกันโดยไคโตไซด์นาโนพาร์ทิเคิลขนาดเด็ก และขนาดกลาง สามารถกระตุ้นการหลัง IL-4 และ IFN- γ ได้ดีกว่าขนาดใหญ่

งานวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่า ไคโตไซด์นาโนพาร์ทิเคิลขนาดเด็ก และขนาดกลางเป็นขนาดอนุภาคที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเป็นระบบนำส่งวัคซีนทางจมูกมากกว่าอนุภาคขนาดใหญ่เนื่องจากมีคุณสมบัติทางกายภาพที่ดี มีประจุที่ผิวอนุภาคเป็นบวกสามารถกักเก็บแอนติเจนได้สูง มีการปลดปล่อยแอนติเจนได้ดีที่ pH 4.5 แอนติเจนที่กักเก็บไม่เสียสภาพ ระบบนำส่งมีความคงตัวทางกายภาพและสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบ HIR ทั้ง mucosal immune response และ systemic immune response และสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบ CMIR ได้ดีอีกด้วย

ABSTRACT

TITLE : STUDY OF OPTIMAL SIZE OF CHITOSAN NANOPARTICLES FOR
NASAL VACCINE DELIVERY

BY : EKACHAI DUMKLIANG

DEGREE : MASTER OF PHARMACY

MAJOR : PHARMACEUTICAL AND NATURAL PRODUCTS

CHAIR : ASST. PROF. CHUTINUN PRASITPURIPRECHA, Ph.D.

KEYWORDS : CHITOSAN NANOPARTICLES / NASAL VACCINE DELIVERY /
OVALBUMIN / MUCOSAL IMMUNE RESPONSE / SYSTEMIC IMMUNE
RESPONSE

Chitosan nanoparticles are potential system for nasal vaccine delivery. The important factor that influences the efficacy of delivery system and immune response is size of particles. The objective of this research was to study of the optimal size of chitosan nanoparticles encapsulated with ovalbumin (OVA) as model antigen for nasal vaccine delivery. Chitosan nanoparticles were prepared by ionotropic gelation method with changing of chitosan concentrations from 1-3 mg/mL and the mass ratio of chitosan to sodium tripolyphosphate (TPP) from 3:1 to 5:1. Nine formulas were examined for physicochemical properties such as size and zeta potential of particles, entrapment efficiency, loading and releasing capacity by BCA Protein Assay, stability of antigen and nanoparticles by SDS-PAGE. Three formulas represented small (< 500 nm), medium (500 – 1,000 nm) and large size (1,000 – 5,000 nm) of chitosan nanoparticles encapsulated with ovalbumin were evaluated for *in vivo* immunostimulating activity related to ovalbumin solution by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). 20 µL of each formula containing 20 µg of ovalbumin were intranasal given to Balb/c mice at the week of 0, 3, 6 and killed at the week of 9. Blood, feces, saliva, nasal lavage and vaginal lavage were selected. Humoral immune response (HIR) was evaluated from Immunoglobulin G (IgG) levels in serum as systemic immune response and secretory Immunoglobulin A (sIgA) levels in fecal extract, saliva, nasal lavage and vaginal lavage as mucosal immune response. Cell-mediated immune response

(CMIR) was evaluated from splenocyteInterleukin-4 (IL-4) and Interferon- γ (IFN- γ). The results showed that formulas composed of 3 mg/mLchitosan were stable. When the mass ratio of chitosan to sodium tripolyphosphate (TPP) was increased from 3:1, 4:1 and 5:1, the sizes of chitosan nanoparticles were also increased from small (249.67 ± 29.6 nm), medium (559 ± 17.21 nm) and large size ($1,240 \pm 62.45$ nm). But the percentages of entrapment efficiency (76.49 ± 4.72 , 68.52 ± 6.01 and 66.77 ± 7.95) and loading capacity (31.62 ± 1.52 , 27.61 ± 1.68 and 27.03 ± 1.27) were decreased, respectively. The antigen releasing capacity from nanoparticles of these three formulas were all better at pH 4.5 than pH 6.8 and pH 7.4. The percentages of releasing capacity in pH 4.5 within 2 days were 86.62 ± 1.52 , 85.20 ± 1.44 and 83.02 ± 1.36 , respectively. After kept those lyophilized formulas at 4°C for 3 months, they were still stable both antigen and chitosan nanoparticles. The result of immunostimulating activity exhibited that chitosan nanoparticles encapsulated with ovalbumin stimulated HIRbetter than ovalbumin solution. But there were no significantly difference between the particles sizes. However, the trends of sIgA levels in small and medium size were found to increase in saliva, nasal lavage and vaginal lavage. CMIR immunostimulating activity of chitosan nanoparticles encapsulated with ovalbumin was also more than ovalbumin solution. Small and medium size of nanoparticles had IL-4 and IFN- γ level more than large size.

In conclusion, the optimal sizes of chitosan nanoparticles for nasal vaccine delivery are small and medium sizes. Because they had better physicochemical property such as positive surface charge, high entrapment efficiency, high releasing capacity especially at pH 4.5 and good stability both of antigen and delivery system. Moreover, they also stimulated HIR both mucosal immune response and systemic immune response and CMIR.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์ และอักษรย่อ	ช
บทที่	ช
1 บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญของบัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 สมมุติฐานของการวิจัย	3
1.4 ขอบเขตการวิจัย	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
2 บททวนวรรณกรรม	
2.1 การนำเสนอวัสดุทางมนุษย์	7
2.1.1 ศรีวิทยาของช่องมนุษย์	7
2.1.2 การนำเสนอสารผ่านเยื่อบุมนุษย์	9
2.1.3 การตอบสนองทางภูมิคุ้นกันต่อการนำเสนอวัสดุทางมนุษย์	10
2.1.4 ข้อดีและข้อจำกัดของการนำเสนอวัสดุทางมนุษย์	14
2.2 ไอโคไซด์นาพาร์ทิเคลกับการนำเสนอวัสดุทางมนุษย์	17
2.2.1 ไอโคไซด์	17
2.2.2 การนำเสนอวัสดุทางมนุษย์ด้วยไอโคไซด์นาโนพาร์ทิเคล	18
2.2.3 การเตรียมไอโคไซด์นาโนพาร์ทิเคล	20
2.3 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของอนุภาคนำเสนอ กับคุณสมบัติการเป็นแอดเจนท์	25

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.3.1 สารกระดุ้นภูมิคุ้มกัน	26
2.3.2 ระบบนำส่ง	26
2.3.4 รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของอนุภาคนำเสนอส่งกับฤทธิ์กระดุ้นภูมิคุ้มกันของวัสดุชีน	26
2.4 แอนติเจนและการให้วัสดุชีนทางชุมภกในสัตว์ทดลอง	32
2.4.1 แอนติเจน	32
2.4.2 การให้วัสดุชีนทางชุมภกในสัตว์ทดลอง	32
3 ระเบียบวิธีวิจัย	
3.1 สารเคมี	34
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์	34
3.3 สัตว์ทดลอง	35
3.4 วิธีดำเนินการวิจัย	35
3.4.1 การตั้งค่ารับໄโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคล	35
3.4.2 การประเมินคุณลักษณะของໄโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคล	36
3.4.3 การคัดเลือกตัวรับໄโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคล เพื่อนำส่งวัสดุชีนทางชุมภก	39
3.4.4 การทดลองฤทธิ์กระดุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง	39
3.5 การวิเคราะห์ผลเชิงสถิติ	42
4 ผลการวิจัย	
4.1 คุณสมบัติทางกายภาพของໄโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคล	43
4.2 การกักเก็บและการบรรจุแอนติเจนในໄโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคล	45
4.3 การปลดปล่อยแอนติเจนที่กักเก็บในໄโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคล	45
4.4 ความคงตัวทางกายภาพของระบบนำส่งและ ความคงตัวของแอนติเจนที่กักเก็บในໄโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคล	48
4.5 การคัดเลือกตัวรับໄโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคล เพื่อนำส่งวัสดุชีนทางชุมภก	50

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.6 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ humeral immune response	51
4.7 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ cell - mediated immune response	54
5 อภิปรายผลการวิจัย	57
6 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	
6.1 สรุปผลการวิจัย	69
6.2 ข้อเสนอแนะ	70
เอกสารอ้างอิง	71
ภาคผนวก	
ก การเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเซลล์	84
ข การเตรียม splenocytes	89
ค สูตรการคำนวณที่เกี่ยวข้อง	91
ง กราฟนาฬิกาน	95
จ พยาธิสภาพของสัตว์ทดลอง	99
ประวัติผู้วิจัย	106

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ตัวอย่างวัสดุที่นำส่งทางจมูก	16
2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของอนุภาคนำส่งวัสดุกับ ฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันของวัสดุที่ให้ทางจมูกสัตว์ทดลอง	30
3.1 ส่วนประกอบของคำรับໄโคトイเดชนนาโนพาร์ทิเคล	36
4.1 คุณสมบัติทางกายภาพของໄโคトイเดชนนาโนพาร์ทิเคลที่กักเก็บแอนติเจน	44
4.2 การกักเก็บและบรรจุแอนติเจนของໄโคトイเดชนนาโนพาร์ทิเคล	45
ค.1 ค่าสัมประสิทธิ์ของระดับความเชื่อมั่นทางสถิติ	94

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1.1 แผนผังแสดงขอบเขตงานวิจัย	6
2.1 กายวิภาคของมูก	7
2.2 รูปแบบการนำส่งสารผ่านเยื่อบุมูก	9
2.3 การนำส่งแอนติเจนของ nasal associated lymphoid tissue (NALT) บริเวณ respiratory region	11
2.4 การนำส่ง antigen ผ่าน M-cells และกระบวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน	12
2.5 การกระตุ้นและตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของ mucosal immune response บริเวณเยื่อบุผิวต่างๆ	14
2.6 โครงสร้างของไคโตแซน	17
2.7 การเตรียมไคโตแซนนานาโน/ไมโครพาร์ทิเคิลด้วยวิธี ionotropic gelation	20
2.8 โครงสร้างและประจุของ sulfate, citrate, tripolyphosphate และไคโตแซน	21
2.9 ตำแหน่งการอันตรกิริยาระหว่างไคโตแซนกับ TPP	22
2.10 การกักเก็บแอนติเจนของไคโตแซนนานาโนพาร์พาร์ทิเคิลด้วยเทคนิคต่างๆ	22
2.11 ปัจจัยที่มีผลต่อการออกฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันของวัคซีน	25
4.1 การปลดปล่อยแอนติเจนที่กักเก็บในไคโตแซนนานาโนพาร์ทิเคิล คำรับที่ 7 (CS:TPP เท่ากับ 3:1)	46
4.2 การปลดปล่อยแอนติเจนที่กักเก็บในไคโตแซนนานาโนพาร์ทิเคิล คำรับที่ 8 (CS:TPP เท่ากับ 4:1)	46
4.3 การปลดปล่อยแอนติเจนที่กักเก็บในไคโตแซนนานาโนพาร์ทิเคิล คำรับที่ 9 (CS:TPP เท่ากับ 5:1)	47
4.4 ความคงตัวทางกายภาพของไคโตแซนนานาโนพาร์ทิเคิลที่กักเก็บแอนติเจนในรูปผงแห้ง	49
4.5 SDS-PAGE ของโอลูบูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนานาโนพาร์ทิเคิลที่เก็บในรูปผงแห้ง	50
4.6 ระดับ OVA specific IgG titer ในชีรัมของหนูทดลอง	51
4.7 ระดับ OVA specific sIgA titer ในน้ำลายของหนูทดลอง	52
4.8 ระดับ OVA specific sIgA titer ในน้ำด่างช่องคลอด น้ำด่างโพรงมูก น้ำลาย และสารสกัดจากมูลของหนูทดลอง	53

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.9 ระดับ IL-4 ที่หลั่งจาก splenocytes ของหนูทดลองกลุ่มต่างๆ	55
4.10 ระดับ IFN- γ ที่หลั่งจาก splenocytes ของหนูทดลองกลุ่มต่างๆ	56
4.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการคูณกเลินแสงและความเข้มข้นของโอลูบูมิน ในสารละลาย acetic acid ความเข้มข้น 1 % w/v	96
4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการคูณกเลินแสงและความเข้มข้นของโอลูบูมิน ใน PBS pH 4.5	96
4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการคูณกเลินแสงและความเข้มข้นของโอลูบูมิน ใน PBS pH 6.8	97
4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการคูณกเลินแสงและความเข้มข้นของโอลูบูมิน ใน PBS pH 7.4	97
4.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการคูณกเลินแสงและความเข้มข้นของ IL-4	98
4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการคูณกเลินแสงและความเข้มข้นของ IFN- γ	99
4.1 น้ำหนักของหนูทดลองแต่ละกลุ่ม	100
4.2 พยาธิวิทยาทางภาคของตัวอย่างหนูทดลองกลุ่ม I	101
4.3 พยาธิวิทยาทางภาคของตัวอย่างหนูทดลองกลุ่ม II	102
4.3 พยาธิวิทยาทางภาคของตัวอย่างหนูทดลองกลุ่ม III	103
4.3 พยาธิวิทยาทางภาคของตัวอย่างหนูทดลองกลุ่ม IV	104
4.3 พยาธิวิทยาทางภาคของตัวอย่างหนูทดลองกลุ่ม V	105

คำอธิบายสัญลักษณ์ และอักษรย่อ

สัญลักษณ์ และอักษรย่อ	ความหมาย
%	เปอร์เซ็นต์
% w/w	ร้อยละ โดยมวลของสารตัวอ่อนย่าง (กรัม) ที่ละลายในมวลสารละลายทั้งหมด 100 กรัม
% w/v	ร้อยละ โดยมวลต่อปริมาตรสัดส่วนมวลสารตัวอ่อนย่าง (กรัม) ที่ละลายในปริมาตรสารละลายทั้งหมด 100 มิลลิลิตร
°A	องศาครอโน
°C	องศาเซลเซียส
μg	ไมโครกรัม
μL	ไมโครลิตร
μm	ไมโครเมตร
cm ²	ตารางเซนติเมตร
cm ³	ลูกบาศก์เซนติเมตร
g	(1) น้ำหนัก เป็น กรัม (2) แรงหน่วยวัสดุคูณย์กลาง มีค่าเท่ากับ 9.8 เมตรต่อวินาที ²
kDa	กิโลดาตตัน
kg	กิโลกรัม
IFN-γ	อินเตอเฟอรอน แกรมมา (interferon gamma)
TNF-α	ทูเมอร์ เนค โคซิส แฟรคเตอร์ แอลfa (tumor necrosis factor alpha)

คำอธิบายสัญลักษณ์ และอักษรย่อ (ต่อ)

ສัญลักษณ์	ແລະ ອັກນຍໍອ	ຄວາມໝາຍ
IL		ອິນເທອຣລູກືດ (interleukin)
mg		ມີລັກຮັນ
mL		ມີລັກຕົກ
mM		ມີລັກໂນຄວ້າ
mm		ມີລັກເມຕຽ
mV		ມີລັກໄວສດ
N		ນອຣນອດ
nm		ນາໂນເມຕຽ
rpm		ຄວາມເງື່ອງອຸບດ້ອນາທີ

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัจจุบัน

การติดเชื้อในร่างกายประมาณ 80% ของการติดเชื้อทั้งหมด อาศัยเยื่อบุผิวเป็นช่องทางรับเชื้อ (Ozsoy et al., 2009) ซึ่งปากและจมูก (oronasal) เป็นเยื่อบุผิวที่รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายได้ง่ายร่างกายจึงมี secretory immunoglobulin A (sIgA) เป็นกลไกสำคัญในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่บริเวณเยื่อบุผิว (mucosal immune response) เพื่อยับยั้งและทำลายเชื้อบริเวณเยื่อบุผิว ก่อนที่เชื้อจะเข้าสู่ร่างกาย การให้วัคซีนด้วยการฉีด (injected vaccination) เป็นวิธีการหลักในการให้วัคซีน ซึ่งไม่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันบริเวณเยื่อบุผิวในระดับที่ป้องกันการติดเชื้อ กระตุ้นเพียงแต่ภูมิคุ้มกันในกระแสเดือด (systemic immune response) จึงมีประสิทธิภาพการป้องกันการติดเชื้อทางเยื่อบุผิวต่ำ แต่การนำส่งวัคซีนทางเยื่อบุผิว เช่น การให้วัคซีนชนิดกินและการให้วัคซีนทางจมูก สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งบริเวณเยื่อบุผิว และภูมิคุ้มกันในกระแสเดือดได้ โดยพบว่าการให้วัคซีนทางจมูกมีประสิทธิภาพสูงกว่าการให้วัคซีนชนิดกิน เนื่องจากมีการทำลายแอนติเจนจากภูมิคุ้มกันได้ดีกว่า นอกจากรูปแบบการให้วัคซีนทางจมูกยังมีข้อดีหลายประการ เช่น วิธีการบริหารยาทำได้ง่าย ผู้ป่วยสามารถใช้ได้เอง เป็นต้น ดังเช่นที่พับใน Flu Mist® ซึ่งเป็นวัคซีนป้องกันไข้หวัดใหญ่ที่ให้ทางจมูก โดยเป้าหมายการนำส่งวัคซีนทางจมูก คือ microfold-cell (M-cell) บริเวณ nasal-associated lymphoid tissue (NALT) เนื่องจาก M-cell ทำหน้าที่นำส่งแอนติเจนสู่เซลล์ภูมิคุ้มกันได้เยื่อบุผิว นำไปสู่การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน อุปสรรคของการนำส่งวัคซีนทางจมูก คือ การกำจัดวัคซีนออกจากเยื่อบุอย่างรวดเร็วจากกลไก mucocilliar clearance ซึ่งกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากเยื่อบุจมูกในเวลาประมาณ 15-20 นาที การคุ้ชชิ่มผ่านเยื่อบุผิวจึงไม่ดีเท่าที่ควร และวัคซีนเป็นโปรตีนแอนติเจนขนาดใหญ่และมีข้าว ทำให้การนำส่งผ่านเยื่อบุผิวเกิดได้ยาก อีกทั้งการนำส่งผ่าน M cell จะเกิดขึ้นได้ดีก็ต่อเมื่อสารนิขนาดเล็กกว่า 1 ไมโครเมตร (Csaba et al., 2009)

รูปแบบการนำส่งวัคซีนทางจมูกมีหลายรูปแบบ ทั้งรูปแบบสารละลาย และระบบอนุภาคนำส่ง (particulate vaccine delivery system) โดยระบบอนุภาคนำส่งมีข้อดีเหนือกว่า การนำส่งในรูปสารละลาย คือ สามารถป้องกันการทำลายแอนติเจนจากเอนไซม์ในช่องจมูก และถูกนำส่งด้วย antigen presenting cells (APCs) ได้ดีกว่า สามารถควบคุมการปลดปล่อยแอนติเจน

จากอนุภาค ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันสัมผัสกับแอนติเจนนานขึ้น จึงมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันสูงขึ้น วัคซีนที่อยู่ในรูปอนุภาคขนาดนาโนเมตร จึงนำส่งแอนติเจนให้เซลล์ทางภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าวัคซีนในรูปอิฐะประมาณ 1,000-10,000 เท่า (Mohanam et al., 2010) ปัจจุบันมีการพัฒนาระบบอนุภาคนำส่งทางช่องมูกหลายชนิด โดยไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลเป็นระบบอนุภาคนำส่งที่มีประสิทธิภาพระบบหนึ่ง เนื่องจากไคโตแซนมีประจุเป็นบวก จึงสามารถยึดเกาะกับเยื่อบุผิวและสารเมือกบริเวณเยื่อบุผิว ซึ่งมีประจุเป็นลบได้ เรียกคุณสมบัติดังกล่าวว่า mucoadhesive นอกจากนี้ไคโตแซนสามารถกระตุ้นการเปิดซ่อนว่าระหว่างเซลล์ ไม่เป็นพิษ เข้ากับร่างกาย (biocompatibility) และถ่ายตัวได้ภายในร่างกาย (biodegradability) จึงมีการศึกษาการนำส่งวัคซีนทางช่องมูกด้วยไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลค่อนข้างมาก โดยเฉพาะชิ้นยูนิตวัคซีน (subunit vaccine) ของโรคติดเชื้อทางเยื่อบุผิว เช่น วัคซีนป้องกันไข้หวัดใหญ่ และไวรัสตับอักเสบ บี เพื่อเสริมฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันของแอนติเจน เพราะแอนติเจนมีคุณสมบัติกระตุ้นภูมิคุ้มกันค่อนข้างสูง และขาดคุณสมบัติ mucoadhesive (Baudner et al., 2010; Kang et al., 2009) อีกทั้งปัจจุบันมีเพียง Alum และ MF-59 ที่เป็นสารเสริมฤทธิ์ หรือ แอดจูแวนต์ (adjuvant) ที่ได้รับอนุญาตให้ใช้ในมนุษย์ ซึ่งสารดังกล่าว มีข้อจำกัดด้านผลข้างเคียงค่อนข้างสูง และมีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับเยื่อบุผิว (Peek et al., 2008) ด้วยเหตุนี้ จึงมีแนวโน้มในการพัฒนาไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลเพื่อใช้ในการนำส่งวัคซีนทางช่องมูกกันอย่างแพร่หลาย

ขนาดของอนุภาคนำส่งเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการนำส่งวัคซีนทางช่องมูก หัวใจของการนำส่ง คือความสามารถในการเข้าสู่เยื่อบุผิว และไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ NALT ได้ ปัจจุบันยังไม่ทราบขนาดของอนุภาคที่เหมาะสมในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันทางช่องมูก เนื่องจากมีความแตกต่างของระบบนำส่ง ชนิดของแอนติเจน และการประเมินฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยทั่วไปพบว่าขนาดของอนุภาคไคโตแซนที่น้อยกว่า 5 μm สามารถผ่านเยื่อบุผิว และกระตุ้นภูมิคุ้มกันหลังให้วัคซีนทางช่องมูกแก่สัตว์ทดลอง ได้ทั้ง mucosal immune response และ systemic immune responses (Kang et al., 2009) แต่จากการรายงานการวิจัยของ Nagamoto et al. (2004) พบว่าการนำส่งโดยอนุภาคช่องมูก ด้วยอนุภาคไคโตแซนที่มีขนาดเล็กกว่า 400 nm และ 1,000 nm สามารถกระตุ้น systemic immune response ทั้ง IgG และ IgA ได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยไม่ได้ประเมินผลของขนาดอนุภาคนำส่งต่อการกระตุ้น mucosal immune response ผลการทดลองในหลอดทดลอง (*in vitro*) พบว่าการนำส่งแอนติเจนผ่านเยื่อบุผิวและ การนำส่งให้ APCs ของนาโนพาร์ทิเคิลเกิดขึ้นได้ดีกว่า ไมโครพาร์ทิเคิล การพัฒนาระบบนำส่งวัคซีนทางช่องมูกในปัจจุบันจึงมุ่งพัฒนาคำรับที่มีขนาดนาโนเมตรค่อนข้างมาก เช่น การนำส่งวัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบ บี ทางช่องมูกด้วยไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาด $220 \pm 28 \text{ nm}$ ประจุที่ผิว $+17.45 \pm 2.82 \text{ mV}$ สามารถกระตุ้น systemic immune

response ในกระแสเลือด และ mucosal immune response ในสารคัดหลั่งภายในจมูก ช่องคลอด และทางเดินอาหาร (Mangal et al., 2011) การนำส่งวัคซีนทางจมูกสามารถนำส่งแอนติเจนไปปั้งเยื่อบุผิวบริเวณอื่น โดยอาศัยกลไกของระบบนำเหลืองและระบบไหลเวียนโลหิตของเยื่อบุผิวที่เรียกว่า common mucosal immune system (CMIS) โดยการนำส่งแอนติเจนไปปั้งเยื่อบุผิวต่างๆ ด้วย APCs ซึ่งประสิทธิภาพในการทำงาน ชนิด ปริมาณและการกระจายตัวของ APCs แต่ละบริเวณมีความแตกต่างกัน อีกทั้งความสามารถในการกัดกีบ และนำส่งอนุภาคขึ้นกับปั้งจักษ์ต่างๆ หลาຍอย่าง เช่น ชนิด และขนาดของอนุภาคนำส่งวัคซีน (Kobiasi et al., 2012; Park and Babensee, 2012) จึงมีความเป็นไปได้ที่ขนาดของโคโตไซด์ในพาร์ทิเคิลที่ใช้ในการนำส่งวัคซีนทางจมูก จะกระตุ้นภูมิคุ้มกันในเยื่อบุผิวแต่ละบริเวณได้แตกต่างกัน

เนื่องจากยังไม่มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของขนาดโคโตไซด์ในพาร์ทิเคิลที่ใช้นำส่งวัคซีนทางจมูกต่อฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันบริเวณเยื่อบุผิว ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้ทราบที่มีขนาดของโคโตไซด์ในพาร์ทิเคิลที่เหมาะสมสำหรับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งชนิด mucosal immune responses และ systemic immune response เมื่อนำส่งวัคซีนทางจมูก โดยงานวิจัยนี้ใช้อวัลบูมิน (Ovalbumin; OVA) เป็นแอนติเจนต้นแบบ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาขนาดที่เหมาะสมของโคโตไซด์ในพาร์ทิเคิลสำหรับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งชนิด mucosal immune response และ systemic immune response เมื่อนำส่งวัคซีนทางจมูกของสัตว์ทดลอง

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

โคโตไซด์ในพาร์ทิเคิลที่มีขนาดเล็กสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งชนิด mucosal immune response และ systemic immune response ได้ดีกว่าโคโตไซด์ในพาร์ทิเคิลที่มีขนาดใหญ่ เมื่อนำส่งวัคซีนทางจมูกของสัตว์ทดลอง

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาขนาดไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่เหมาะสมสำหรับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเมื่อนำส่งวัคซีนทางช่องปากในสัตว์ทดลอง โดยใช้อาวลูบูมินเป็นแอนติเจนต้นแบบ มีขอบเขตการวิจัยดังนี้

1.4.1 ตั้งค่ารับให้ได้ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดต่างๆ ด้วยวิธี ionotropic gelation โดยปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของไคโตแซน และสัดส่วนการเกิดอันตรกิริยาของไคโตแซนต่อ sodium tripolyphosphate (TPP)

1.4.2 ประเมินคุณสมบัติของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล

1.4.2.1 วัดขนาดและประจุที่พิวอนุภาค ด้วยเทคนิค dynamic light scattering (DLS) และ laser doppler electrophoresis (LDE) ตามลำดับ

1.4.2.2 วิเคราะห์การกักเก็บ (entrapment efficiency: EE) และการบรรจุแอนติเจน (loading capacity: LC) ของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล ด้วยวิธี bicinchoninic acid (BCA) protein assay

1.4.2.3 ทดสอบการปลดปล่อยแอนติเจนที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล ที่ pH และเวลาต่าง ๆ ด้วยวิธี BCA protein assay

1.4.2.4 ทดสอบความคงตัวของแอนติเจนที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล โดยใช้ sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

1.4.2.5 ทดสอบความคงตัวทางกายภาพของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล ด้วยการประเมินจากการเปลี่ยนแปลงของขนาดและประจุที่พิวอนุภาค

1.4.3 คัดเลือกตัวรับไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล จำนวน 3 ตัวรับ ที่มีคุณสมบัติตามเกณฑ์ดังนี้

1.4.3.1 มีขนาดอนุภาคน้อยกว่า 5 μm โดยมีขนาดอยู่ในช่วงอนุภาค 3 ขนาด คือ ขนาดใหญ่ (1,000 – 5,000 nm) ขนาดกลาง (500 – 1,000 nm) และขนาดเล็ก (< 500 nm) และ มีประจุที่พิวอนุภาคเป็นบวก

1.4.3.2 มีปริมาณการกักเก็บ และบรรจุแอนติเจนสูง

1.4.3.3 มีการปลดปล่อยแอนติเจนสูงที่ pH 4.5 ซึ่งเป็น pH ภายใน lysosome ของ antigen presenting cells (APCs)

1.4.3.4 มีความคงตัวของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล และแอนติเจนที่กักเก็บในตัวรับ

1.4.4 ทดสอบฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล ทั้ง 3 ตัวรับ เมื่อให้ทางจมูกแก่สัตว์ทดลอง ด้วยเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ดังนี้

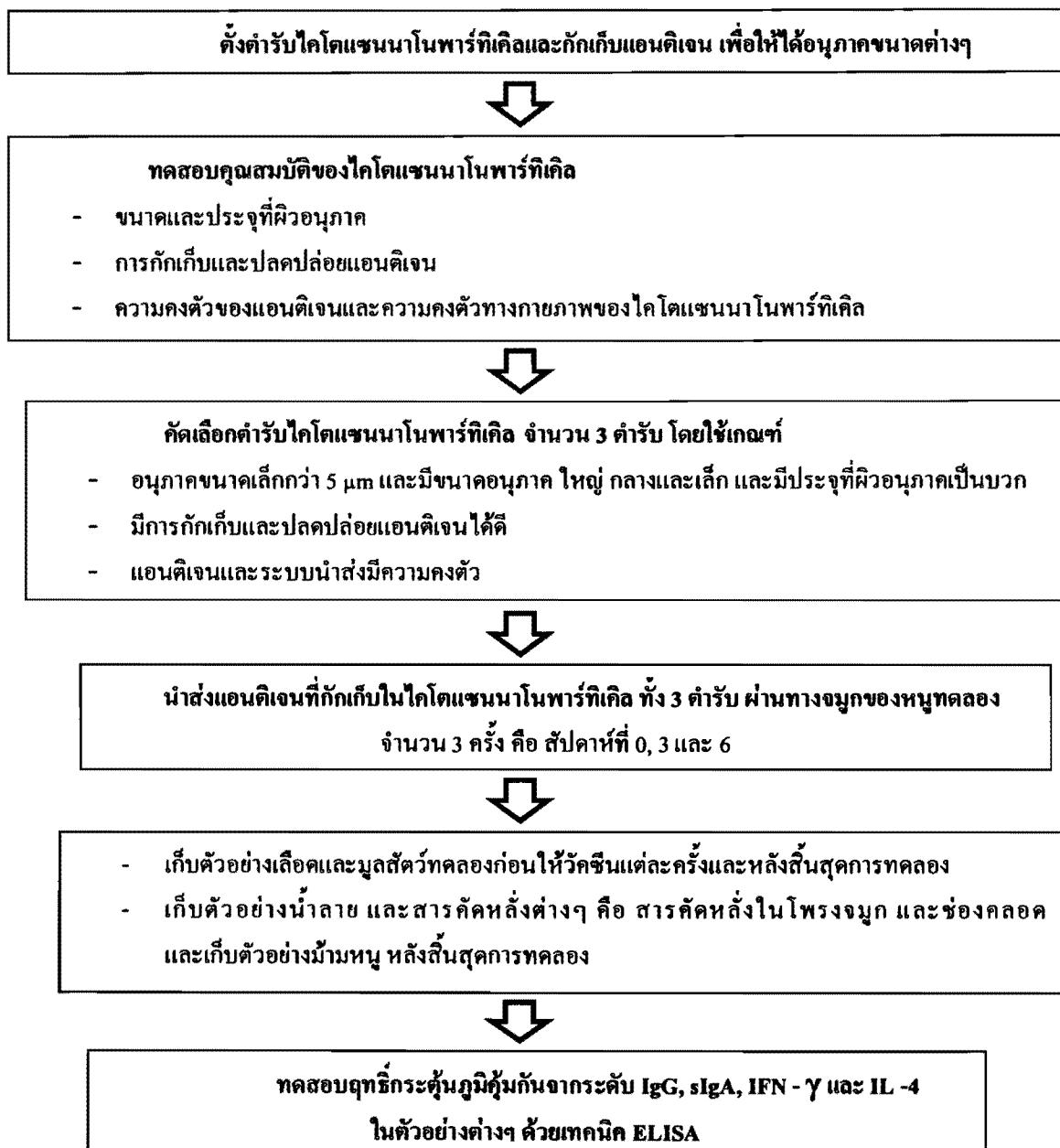
1.4.4.1 Systemic immune response โดยศึกษา humoral immune response (HIR) จากระดับ IgG และศึกษา cell-mediated immune response (CMIR) จากระดับ IFN- γ และ IL -4 ในเชื้อรัม

1.4.4.2 Mucosal immune response โดยศึกษา humoral immune response จากระดับ sIgA ในน้ำลาย มูต สารคัดหลังจากซองกลอต และสารคัดหลังในเยื่อบุโพรงจมูกของสัตว์ทดลอง

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ตัวรับไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่มีขนาดเหมาะสมในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันสำหรับการนำส่งวัคซีนทางจมูก

แผนผังแสดงขั้นตอนเบ่งงานวิจัย



ภาพที่ 1.1 แผนผังแสดงขั้นตอนเบ่งงานวิจัย

บทที่ 2

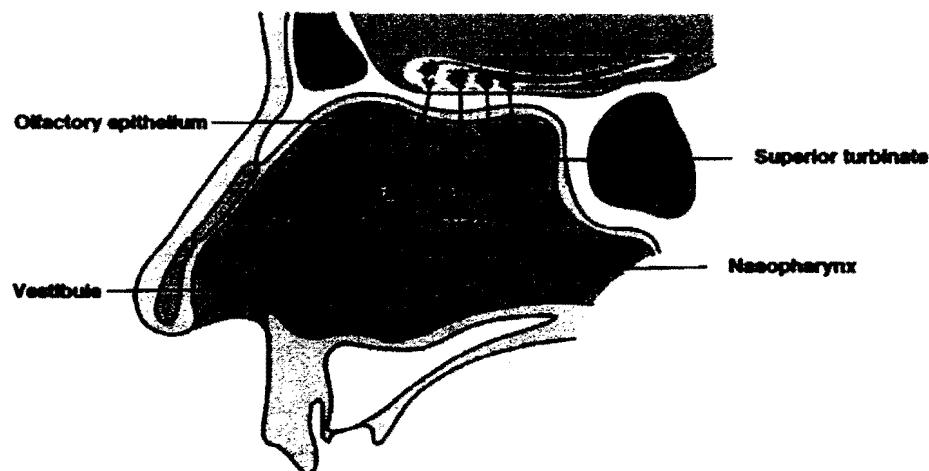
ทบทวนวรรณกรรม

2.1 การนำส่งวัสดุขึ้นทางจมูก

2.1.1 สรีริวิทยาของช่องจมูก

จมูกเป็นส่วนแรกของการเดินทางไปที่อวัยวะร่างกายและเป็นจุดเริ่มต้นของการไหลเวียนอากาศในระบบทางเดินหายใจ โดยจมูกทำหน้าที่กรองสิ่งแปลกปลอม เพิ่มอุณหภูมิ และความชื้นก่อนอากาศผ่านเข้าสู่ปอด ช่องจมูกมีลักษณะเป็นโพรงเปิดและทอดยาวไปถึงคอหอย (nasopharynx) ภายในโพรงจมูกถูกแบ่งเป็น 2 ช่อง ซึ่งด้วยผนังกันที่เรียกว่า nasal septum โพรงจมูกของมนุษย์แต่ละข้างมีพื้นที่ผิวประมาณ 160 cm^2 มีปริมาตรรวมประมาณ $15-20 \text{ cm}^3$ และถูกปักคุุนด้วยสารเมือก (mucus) ซึ่งประกอบด้วยสารคัดหลังชนิดต่างๆ รวมทั้ง sialic acid ทำให้สารเมือกมีสภาพเป็นกรด pH มีค่าอยู่ระหว่าง 5.0 - 6.8 กรณีของการติดเชื้อทางเยื่อบุจมูก pH ของสารเมือกจะลดลงต่ำกว่า 6.5 เพื่อขับยุงการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพภายในช่องจมูก (Csaba et al., 2009a) นอกจากนี้สารเมือกยังประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดที่สามารถทำลาย หรือขับยุงการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมได้

โครงสร้างภายในช่องจมูกแบ่งย่อยออกไปตามความแตกต่างด้านกิจวิภาคและหน้าที่ของแต่ละส่วนคือ nasal vestibule และ atrium, respiratory region และ olfactory region

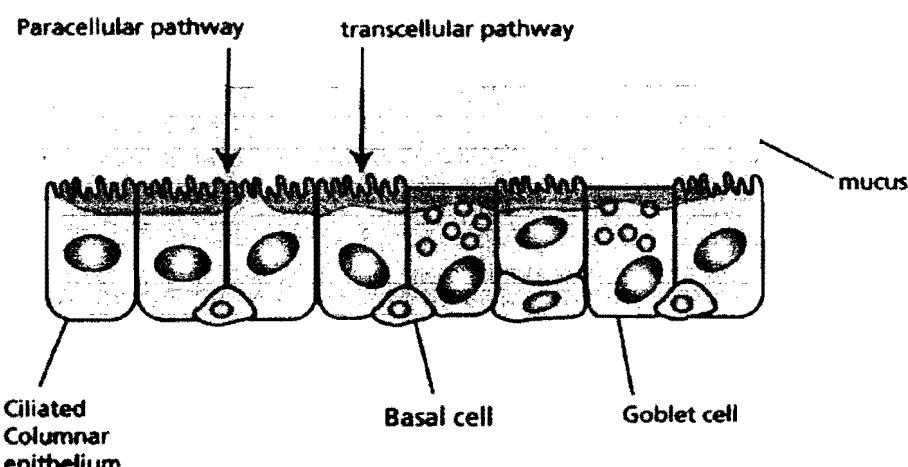


ภาพที่ 2.1 กิจวิภาคของจมูก (Grassin-Delyle et al., 2012)

ส่วน nasal vestibule และ atrium เป็นส่วนแรกของจมูกที่สามารถผ่านเข้าสู่ร่างกาย ถูกปกคลุมด้วยเซลล์เยื่อบุผิวนิด stratified squamous และ transitional non-ciliated epithelial cells มีพื้นที่ผิวและหลอดเดือดไหลเวียนน้อย ทำให้มีการส่งสารผ่านเยื่อบุบริเวณนี้น้อย จึงเป็นส่วนที่ไม่สำคัญสำหรับระบบนำส่งยาทางจมูก

ส่วน respiratory region เป็นส่วนที่มีพื้นผิวมากที่สุดของจมูก จากการที่ผนังค้านข้างของช่องจมูกมีส่วนโครงสร้างที่ยกตัวสูงขึ้น ทำให้เกิดเป็นร่อง เรียกว่า nasal turbinate ซึ่งช่วยเพิ่มพื้นที่ผิว เชลล์เยื่อบุผิวส่วนนี้ประกอบด้วย pseudostratified columnar epithelial cells, columnar epithelial cells, basal และ goblet cells โดยเซลล์เยื่อบุผิวเชื่อมต่อกับเซลล์ข้างเคียงด้วย tight junctions ควบคุมการผ่านเข้าออกของสารระหว่างเซลล์ (paracellular transport) โดยเยื่อบุผิวประกอบด้วย columnar epithelial cells ซึ่งมีการเรียงตัวอย่างแน่นหนา และมีไมโครวิลล์ (microvilli) จำนวนมาก ซึ่งพัดโบกสั่งเปลกปลอนที่ยึดติดกับสารเมือก (mucus) ออกจากทางเดินหายใจส่วนบน เรียกระบบทั้งสิ่งเปลกปลอนดังกล่าวว่า mucocilliar clearance ค่าการกำจัดสิ่งเปลกปลอนออกจากเยื่อบุจมูกมีค่าประมาณ 15-20 นาที ทำให้เกิดการนำส่งสารผ่านเยื่อบุผิวได้ยาก ต่างจาก pseudostratified columnar epithelial cells บริเวณ nasal turbinate ที่เรียกว่า microfold cells (M cells) ซึ่งมีการจัดเรียงตัวแบบหลวমๆ เชลล์ค่อนข้างบาง มี microvilli น้อย อีกทั้งสามารถส่งผ่านสิ่งเปลกปลอนได้ดีโดยเฉพาะสารที่มีขนาดนาโนเมตร และการที่มี goblet cell สร้างสารเมือกอยู่น้อย ทำให้โอกาสที่สารจะผ่านขึ้นเมือกไปปัจจุบันเยื่อบุจมูกได้ง่าย อีกทั้งได้เยื่อบุผิวบริเวณดังกล่าวมีหลอดเดือดมาเลี้ยงเป็นจำนวนมาก จึงนำส่งสารไปยัง systemic system ได้ดี หลอดเดือดบริเวณดังกล่าวไม่ผ่าน portal vein จึงหลีกเลี่ยงการเกิด first pass metabolism ของยาได้เหตุนี้บริเวณ respiratory region จึงเป็นบริเวณที่ใช้นำส่งยาทางจมูกทั้งเพื่อออกฤทธิ์ทั้งแบบ local และ systemic system (Kang et al., 2009)

ส่วนของ olfactory region อยู่ทางด้านบนของช่องจมูก มีพื้นที่ผิวเพียง 200-400 mm² ประกอบด้วย columnar epithelial cells ที่มี receptor สำหรับรับกลิ่น โดยเซลล์ดังกล่าวเชื่อมต่อกับระบบประสาทส่วน olfactory bulb ทำให้เหมาะสมในการนำส่งยาที่ออกฤทธิ์โดยตรงที่สมองเนื่องจากยานี้ถูกขัดขวางจาก blood brain barrier (Chugh et al., 2009)



ภาพที่ 2.2 รูปแบบการนำส่งสารผ่านเยื่อบุจมูก (Amidi et al., 2010)

2.1.2 การนำส่งสารผ่านเยื่อบุจมูก

การนำส่งสารผ่านเยื่อบุจมูกมีสองช่องทาง คือ transcellular pathway และ paracellular pathway การที่สารจะผ่านตัวยกໄก่ในนั้น ขึ้นอยู่กับขนาดและความมีข้อของสาร (Amidi et al., 2010) ดังนี้

2.1.2.1 Transcellular pathway เป็นการนำส่งสารผ่านเซลล์เยื่อบุผิวโดยตรง มี 2 กลไกหลัก คือ

1) Transcellular passive diffusion เป็นการแพร่ผ่านเซลล์เยื่อบุผิวโดยตรง สารที่ผ่านเซลล์ด้วยวิธีนี้ต้องไม่มีข้อ ต้องไม่แตกตัวให้ประจุภายในช่องจมูกที่มี pH 5.0 – 6.8 และขนาดเล็กกว่า 1 kDa หากสารมีขนาดใหญ่ขึ้นจะทำให้การคุกซึมสารผ่านเยื่อบุคล่อง (Grassin-Delye et al., 2012)

2) Endocytic process เป็นกลไกการนำส่งอนุภาคที่เกิดขึ้นบริเวณ M-cell ของเยื่อบุผิว ขนาดที่เหมาะสมในการนำส่งผ่าน M-cell ของทางเยื่อบุเดินอาหารและเยื่อบุจมูก ความมีขนาดเล็กกว่า 10 μm และ 1 μm ตามลำดับ อย่างไรก็ตามพบว่าขนาดอนุภาคที่เล็กลงสามารถเพิ่มความสามารถในการนำส่งสารผ่าน M-cell ได้ (Kammona et al., 2011; Rajapaksa et al., 2010)

2.1.2.2 Paracellular pathway เป็นการผ่านของสารทางช่องว่างระหว่างเซลล์ ซึ่งเป็นกลไกหลักในการนำส่งสารที่มีข้อและมีขนาดใหญ่ เช่น สารกลุ่มโปรตีนหรือวัคซีน การนำส่งผ่านเยื่อบุจมูกที่มีการเรียงตัวอย่างหนาแน่นเป็นไปได้ยากเมื่อเทียบกับเซลล์เยื่อบุจมูก บริเวณ respiratory region ซึ่งมี M-cell เป็นองค์ประกอบและมีการเรียงตัวอย่างหลวমๆ

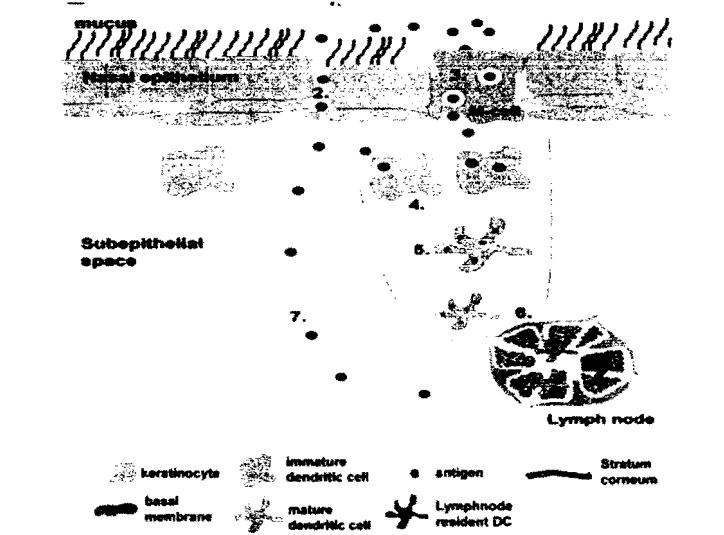
มีช่องระหว่างเซลล์ประมาณ $3.9 - 8.4 \text{ } \mu\text{m}$ และการที่ช่องว่างระหว่างเซลล์สามารถถูกกระตุ้นให้ขยายออกได้ทำให้สามารถนำส่งสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น โปรตีนหรือเปปไทด์ได้ จึงมีการพัฒนาระบบน้ำส่งทางจมูก ที่สามารถกระตุ้นการเปิดช่องว่างระหว่างเซลล์ได้ เช่น การใช้สารพิษเช่น cholera toxin หรือการนำส่งสารด้วยระบบนำส่ง เช่น โคโตแซนเป็นสารที่มีคุณสมบัติกระตุ้นการเปิดช่องว่างระหว่างเซลล์ได้ โดยพบว่าอนุภาคโคโตแซนที่มีขนาดเด็กกว่า $5 \text{ } \mu\text{m}$ สามารถนำส่งวัคซีนผ่านเยื่อทางจมูกและกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ (Kammoan et al., 2011; Kang et al., 2009) การทดลองใน Caco-2 cell monolayer พบว่าโคโตแซนนาโนพาร์ทิคิลสามารถเพิ่มการเปิดช่องว่างระหว่างเซลล์ได้ดีขึ้น เมื่อจากพื้นที่ผิวของโคโตแซนนาโนพาร์ทิคิลมากกว่าโคโตแซนในโครงพาร์ทิคิล จึงสนับสนุนเยื่อบุจมูกและกระตุ้นการเปิดช่องว่างระหว่างเซลล์ได้มากกว่า (Hafner et al., 2009)

นอกจากนี้พบว่าขนาดของอนุภาคยังมีผลต่อการนำส่งสารผ่านเยื่อบุจมูกเข้าสู่กระแสเลือด โดยอนุภาคขนาดนาโนเมตรสามารถนำส่งสารผ่านเยื่อบุผิวและเข้าสู่กระแสเลือดได้ดีกว่าอนุภาคขนาดไมโครเมตร เช่น รายงานการวิจัยของ Desai et al. (1997) พบว่าอนุภาคขนาด 100 nm สามารถผ่าน Caco-2 cell monolayer ได้ดีกว่าอนุภาคขนาด $1 \text{ } \mu\text{m}$ และ $10 \text{ } \mu\text{m}$ ถึง 2.5 และ 6 เท่า เมื่อเทียบโดยน้ำหนัก และเพิ่มขึ้นเป็น 2.7×10^3 และ 6.7×10^6 เท่า เมื่อเทียบจากจำนวนอนุภาคตามลำดับ ต่อมา Viva et al. (2005) ที่ใช้ระบบนำอนุภาคสั่ง PLA-PEG ขนาด $200, 1500, 5000$ และ 10000 nm ซึ่งติดต่อกันด้วยสารกัมมันตภาพรังสีแล้วให้ทางจมูกสัตว์ทดลอง พบว่าอนุภาคขนาด 200 nm สามารถผ่านเยื่อบุจมูกเข้าสู่กระแสเลือดได้ดีกว่าอนุภาคขนาดใหญ่

2.1.3 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันจากการนำส่งวัคซีนทางจมูก

เยื่อบุผิวเป็นช่องทางหลักที่เชื่อมเข้าสู่ร่างกาย จึงมีกลไกป้องกันทางภูมิคุ้มกันทั้งกลไกการป้องกันแบบไม่จำเพาะต่อชนิดของสิ่งแปรปรวน ได้แก่ การทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคด้วยเอนไซม์และ pH รวมถึง mucocilliar clearance และกลไกป้องกันที่จำเพาะบริเวณเยื่อบุผิวที่สำคัญ คือ secretory IgA (sIgA) ในสารเมือก ทำหน้าที่ขับยับยั้งการเจริญเติบโตและทำลายเชื้อก่อโรคก่อนจะเข้าสู่ร่างกาย ดังนั้น sIgA จึงเป็น “first-line of defense” ในการป้องกันการติดเชื้อทางเยื่อบุผิว (Kang et al., 2009) sIgA สร้างจากเนื้อเยื่อน้ำเหลืองที่เรียกว่า mucosal associated lymphoid tissue (MALT) เนื้อเยื่อน้ำเหลืองเหล่านี้มีโครงสร้างและลักษณะการทำงานที่คล้ายกันทั่วร่างกาย คือ ประกอบด้วย M cells จำนวนมาก โดย M cells มีคุณสมบัติต่างจาก epithelium cells ทั่วไป มีการจัดเรียงตัวแบบหลวমๆ เซลล์ค่อนข้างบาง

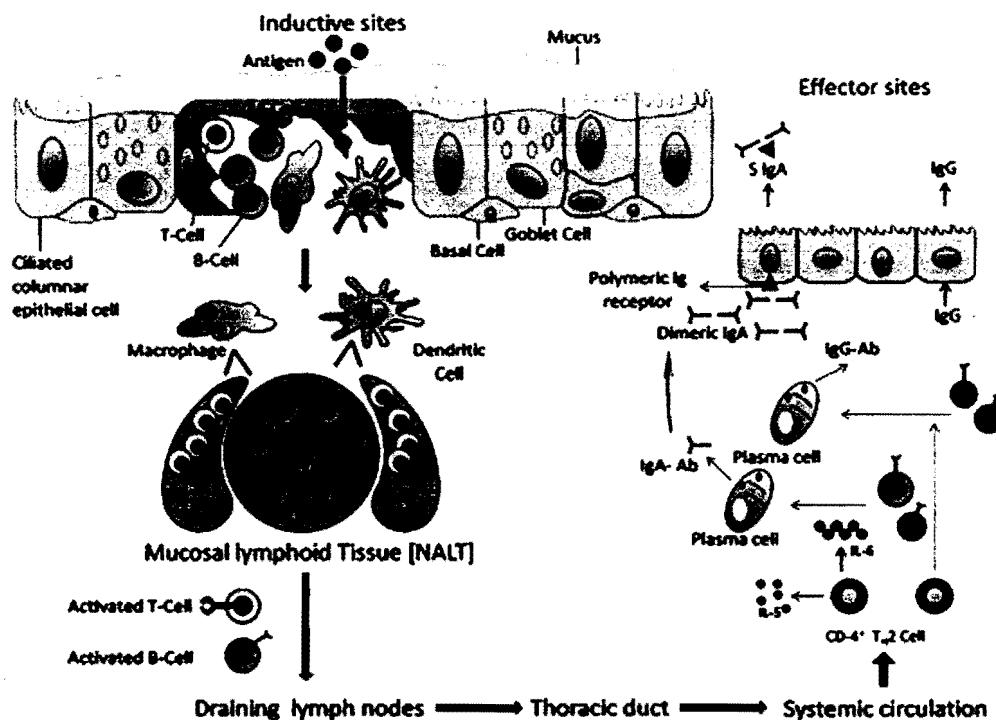
มี microvilli น้อบ สามารถ uptake สารต่างๆ ได้ดี อีกทั้งมีเอนไซม์ภายในเซลล์น้อบ ทำให้เซลล์บริเวณดังกล่าวสามารถนำส่งแอนติเจนเข้าสู่ร่างกายได้โดยไม่ถูกทำลายแอนติเจนด้วยเอนไซม์



ภาพที่ 2.3 การนำส่งแอนติเจนของ nasal associated lymphoid tissue (NALT) บริเวณ respiratory region (Slutter et al., 2011)

ได้เยื่อบุผิวบริเวณ M cells ขังประกอบด้วย T lymphocytes และ B lymphocytes, antigen presenting cells (APCs) ชนิดต่างๆ เช่น dendritic cell และ macrophages เป็นต้น การนำส่ง แอนติเจนของ APCs นอกจากนำส่งแอนติเจนให้ lymphocytes บริเวณได้เยื่อบุจมูกแล้ว การนำส่ง แอนติเจนของ APCs ผ่านระบบน้ำเหลือง (lymphatic system) และระบบไหลเวียนโลหิต ทำให้เกิดการนำส่งแอนติเจนจากบริเวณหนึ่งไปยังอวัยวะหรือเนื้อเยื่อน้ำเหลืองอีกบริเวณหนึ่งได้ เรียก ระบบสั่งต่อแอนติเจนบริเวณเยื่อบุผิวคั่งกล่าวว่า “common mucosal immune system” (CMIS) ซึ่งเป็นลักษณะการนำส่งแอนติเจนที่พบเฉพาะในเยื่อบุโดยไม่พบในระบบอื่น (Sato and Kiyono, 2012) เนื้อเยื่อน้ำเหลืองมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและการกระจายตัวให้มีความจำเพาะกับลักษณะ ทางกายวิภาคที่บริเวณเยื่อบุผิวนั้นๆ เช่น gut-associated lymphoid tissue (GALT) ในระบบ ทางเดินอาหาร bronchus associated lymphoid tissue บริเวณหลอดลม nasal-associated lymphoid tissue (NALT) ซึ่งพบบริเวณทางเดินอาหารและทางเดินหายใจส่วนบน (Jabbal-Gill, 2010) นอกจากรอบ NALT บริเวณ respiratory region แล้ว ยังพบ NALT ในส่วนของ nasopharynx และ oropharynx คือ lingual tonsil, palatine tonsil, nasopharyngeal tonsil (adenoid) เรียกกลุ่มนี้ว่า

น้ำเหลืองนี้ว่า Waldeyer's ring อันเป็นบริเวณที่มีบทบาทสำคัญในการป้องกันการติดเชื้อทางปากและช่องจมูก (oronasal infection) (Lavelle, 2005)



ภาพที่ 2.4 การนำส่ง antigen ผ่าน M-cells และกระบวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Gupta et al., 2011)

การกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะบริเวณเยื่อบุจมูก สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

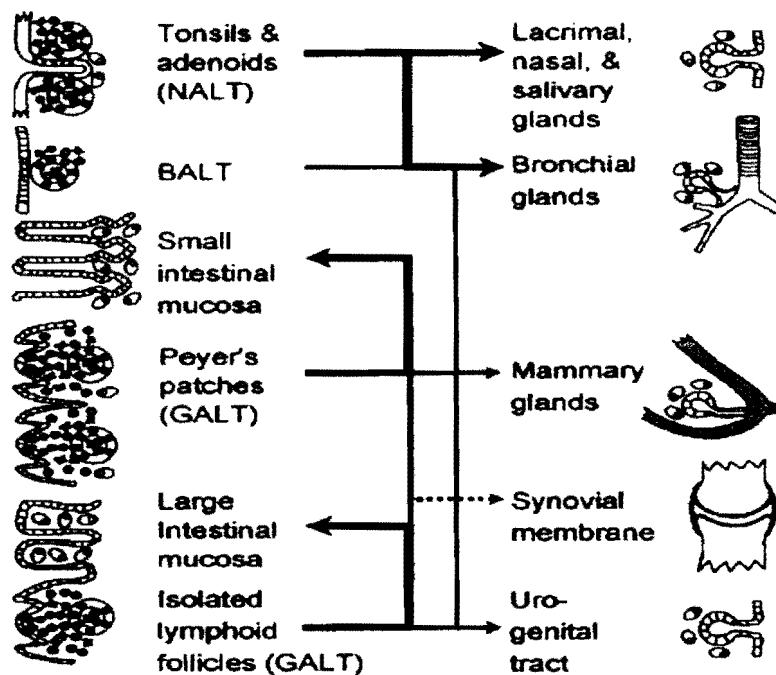
2.1.2.1 Systemic immune response สามารถแบ่งย่อยออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1) Cell-mediated immune response (CMIR) เป็นการตอบสนองของเซลล์ทางภูมิคุ้มกัน โดยทั่วไปให้ความสำคัญกับ T lymphocytes หลังถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจน ซึ่งทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และมีหลังไว้ໄโคน์ชนิดต่างๆ เพื่อกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน เช่น การกระตุ้น CD4⁺ helper T lymphocyte type II จะสร้าง IL-4 ซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวนและการสร้างแอนติบอดีของ B lymphocytes ส่วนการกระตุ้น CD4⁺ helper T lymphocyte type I และ CD8⁺ cytolytic T lymphocyte จะสร้าง IFN-γ ซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้นทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ของ T lymphocytes และการหล่อสารจาก cytotoxic T lymphocyte เพื่อทำลาย

เซลล์ที่ติดเชื้อชนิด intracellular pathogens การทำงานของ IL-4 และ IFN- γ เป็นแบบ negative feedback ทำให้การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเป็นไปอย่างสมดุล อย่างไรก็ตามการติดเชื้อบางชนิด กระตุ้น IFN- γ เพียงอย่างเดียว ก็สามารถกำจัดเชื้อก่อโรคได้ก่อนที่จะมีการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี (Mestecky et al., 2010) นอกจากนี้หลังจาก T lymphocytes ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจน จะมี T lymphocytes ส่วนหนึ่งทำหน้าที่จดจำชนิดของแอนติเจนนั้นๆ ไว้เรียกว่า memory T lymphocytes เมื่อ memory T lymphocytes ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนชนิดเดิมจะเกิดการตอบสนองที่รุนแรงและรวดเร็วกว่าการถูกกระตุ้นครั้งแรก

2) Humoral immune response (HIR) เป็นผลจากการตอบสนองของ B lymphocytes ต่อแอนติเจน ทำให้เกิดการสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนชนิดนั้น ชนิดของ แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนและมีความสำคัญต่อการติดเชื้อในร่างกาย คือ IgG ซึ่งพบมาก ในสารน้ำภายในร่างกาย และมีบทบาทสำคัญในการต้านเชื้อโรคชนิด extracellular pathogens โดยการกระตุ้น B lymphocytes ผ่านกลไกของ CD4 $^+$ helper T lymphocyte ที่เรียกว่า T dependent pathway ทำให้ B lymphocytes บางส่วนจดจำชนิดของแอนติเจนไว้ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจน ชนิดเดิมก็สามารถกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่รุนแรงและรวดเร็วว่าครั้งแรก เรียกเซลล์ชนิดเดิมว่า memory B lymphocytes ในขณะที่แอนติเจนกระตุ้น B lymphocytes ได้โดยตรงที่เรียกว่า T independent pathway ไม่ทำให้เกิด memory B lymphocytes

2.1.2.2 Mucosal immune response เป็นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันบริเวณเยื่อบุผิว มีกลไกหลัก คือ กระตุ้น B lymphocytes ให้สร้างแอนติบอดี IgA และหลังออกนอกร่างกายไปยังบริเวณเยื่อบุผิว เรียกว่า sIgA มีโครงสร้างเป็น polymeric form ทำให้สามารถต่อภาวะกรดค้าง และการทำลายของเอนไซม์ได้สูงกว่า IgG และ IgA ที่พบใน systemic immune response ซึ่งมีโครงสร้างเป็น monomeric form (Mestecky et al., 2010) ทั้งนี้เนื่องจากกลไกการนำส่ง แอนติเจนและบริเวณที่ตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ต่างกัน ทำให้ระดับการเปลี่ยนแปลงของ sIgA และ IgA ไม่สัมพันธ์กัน (Kozlowski et al., 2002) และจากกลไกของ CMIS ทำให้การนำส่ง แอนติเจน ทางช่องทางภูมิคุ้มกันบริเวณเยื่อบุผิวบริเวณอื่นได้ ดังภาพที่ 2.4



ภาพที่ 2.5 การกระตุ้นและตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของ mucosal immune response บริเวณเยื่อบุผิว ต่างๆ (Brandtzaeg et al., 2007)

2.1.4 ข้อดีและข้อจำกัดของการนำส่งวัคซีนทางช่องมูก

2.1.4.1 ข้อดีของการนำส่งวัคซีนทางช่องมูก

การติดเชื้อภายในร่างกายประมาณ 80% ของโรคติดเชื้อทั้งหมดมักได้รับเชื้อก่อโรคทางผ่านเยื่อบุผิว ซึ่งบริเวณดังกล่าวมี IgA เป็นภูมิคุ้มกันหลักในการทำลายและป้องกันการติดเชื้อก่อนที่จะเข้าสู่ร่างกาย แต่การให้วัคซีนแบบนี้ด กระตุ้นเพียง IgG ซึ่งเป็นแอนติบอดีหลักในการทำลายเชื้อก่อโรคในเลือดหลังเกิดการติดเชื้อ ไม่สามารถกระตุ้น sIgA ในระดับที่สามารถป้องกันการติดเชื้อได้ ตรงข้ามกับการนำส่งวัคซีนทางเยื่อบุผิวที่สามารถกระตุ้นได้ทั้ง sIgA และ IgG โดยช่องทางที่นิยมนำส่งวัคซีนทางเยื่อบุผิวคือ การให้วัคซีนทางช่องมูกและการให้วัคซีนชนิดกิน แม้การนำส่งวัคซีนบริเวณโดยริเวณหนึ่งจะสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันบริเวณเยื่อบุผิวบริเวณอื่นได้ แต่พบว่าการให้วัคซีนทางช่องมูกสามารถลดปริมาณแอนติเจนที่ใช้ลงถึงสี่เท่าเมื่อเทียบกับการให้วัคซีนชนิดกิน (Kang et al., 2009) เนื่องจากการให้วัคซีนทางช่องมูกมีการทำลายแอนติเจนจากเอนไซม์และภาวะกรดน้อยกว่า และยังไม่ผ่าน first pass metabolism เมื่อทำการให้วัคซีนชนิดกิน และข้อจำกัดในการพัฒนาวัคซีนทางเยื่อบุผิวที่สำคัญคือ mucosal tolerance ซึ่งเป็นผลมาจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันบริเวณ MALT ที่ลดลงตามอายุที่เพิ่มขึ้น แต่พบว่าการลดลงของเซลล์

ทางภูมิคุ้มกันของ NALT มากกว่า GALT และการทำงานที่ลดลงของ NALT ไม่นิยมสำคัญต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ดังเช่นกรณีของวัคซีนไข้หวัดใหญ่ที่นำส่งทางจมูกที่สามารถใช้ในผู้สูงอายุได้ (Ozsoy et al., 2009; Fujihashi and Kiyono, 2009) ทำให้การให้วัคซีนทางจมูกมีข้อดีเหนือ การให้วัคซีนชนิดกิน นอกจากนี้ยังพบว่าการนำส่งวัคซีนทางจมูก กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีกว่า การให้วัคซีนทางช่องคลอด (vaginal immunization) และทางทวารหนัก (rectal immunization) อีกด้วย (Koziowski et al., 2002)

นอกจากการนำส่งวัคซีนทางจมูกมีข้อดีด้านประสิทธิภาพเหนือกว่า การให้วัคซีนด้วยการฉีดและการกินแล้ว การให้วัคซีนทางจมูกเป็นวิธีที่ง่ายในการบริหารยา ผู้บริหารยาไม่จำเป็นต้องได้รับการฝึกหัดมากนัก ผู้ป่วยสามารถบริหารยาได้เอง สามารถให้วัคซีนแก่ผู้ป่วยหลายรายในคราวเดียว การบริหารยาไม่ก่อให้เกิดความเจ็บปวด ช่วยเพิ่มความร่วมมือในการรับวัคซีนของผู้ป่วย อีกทั้งไม่รบกวนการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ไม่ก่อให้เกิดการติดเชื้อจากการฉีดวัคซีน และการผลิตวัคซีนไม่จำเป็นต้องใช้กระบวนการการปราศจาก เชื้อ (sterile manufacturing process) (Borges et al., 20010; Lubben et al., 2001)

2.1.4.2 ข้อจำกัดในการนำส่งวัคซีนทางจมูก

ข้อจำกัดที่สำคัญของการนำส่งวัคซีนทางจมูก คือ อัตราการซึมผ่านของวัคซีนซึ่งเป็นสารชีวโมเลกุลมีขนาดใหญ่ จึงผ่านเยื่อบุจมูกได้ค่อนข้างน้อย เนื่องจากเยื่อบุผิวที่เรียงตัวอย่างหนาแน่น อัตราการกำจัดยาจากเยื่อบุจมูกที่รวดเร็วจาก mucocilliar clearance จนวัคซีนไม่ถูกนำส่งผ่านเยื่อบุผิวมาข้างหลังของระบบภูมิคุ้มกัน การนำส่งวัคซีนทางจมูกจึงจำเป็นต้องอาศัยสาร หรือระบบนำส่งที่เป็น mucoadhesive adjuvant อีกทั้งการทำลายโปรตีนแอนติเจนของเอนไซม์ protease และ peptidase ทำให้ปริมาณโปรตีนที่ผ่านเยื่อบุผิวจมูกลดลง เช่น กรณีที่พนใน calcitonin หรือ insulin เป็นต้น (Arora et al., 2002) แอนติเจนซึ่งเป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่า 1 kDa สามารถผ่านเยื่อบุผิวได้ประมาณ 10% นอกจากนี้ปริมาณวัคซีนที่นำส่งทางจมูกในมนุษย์จะต้องไม่เกิน 200 μL ต่อครั้ง เพื่อไม่ให้วัคซีนผ่านไปยังทางเดินอาหารหรือเข้าสู่ปอด ทำให้ขนาดวัคซีนที่ได้รับไม่คลาดเคลื่อน (Grassin-Delyle et al., 2012) การที่ซ่องจมูกมีส่วนของ olfactory region ที่สามารถนำส่งสารไปยังระบบประสาทส่วนกลางโดยตรง ดังนั้นการนำส่งทางจมูกอาจมีผลข้างเคียงต่อระบบประสาท เช่น กรณีของ Nasalflu ซึ่งเป็นวัคซีนไข้หวัดใหญ่ชนิด inactivated influenza vaccine ที่ heat labile enterotoxin (LT) ของเชื้อ *Escherichia coli* (*E.coli*) เป็นแอดจูแวนต์ (adjuvant) ซึ่งเป็นวัคซีนที่ให้ทางจมูก ชนิดแรกที่ได้จำหน่ายในตลาดปี 2000 ในประเทศไทยและสวิตเซอร์แลนด์ แต่ถูกถอนออกจากตลาดในปี 2001 เนื่องจากพบว่า LT เป็นพิษต่อ olfactory nerves ทำให้เกิดความผิดปกติของระบบประสาทที่เรียกว่า “Bell’s palsy”

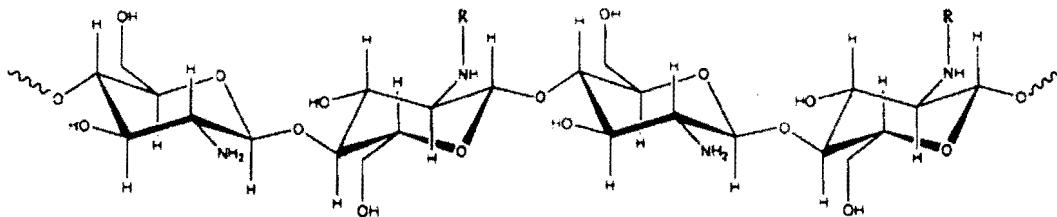
“syndrome” นอกจากนี้ความรู้ที่เกี่ยวข้องกับการนำส่งวัคซีนทางช่องจมูกยังมีอย่างจำกัด ทำให้การนำส่งวัคซีนทางช่องจมูกยังไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร (Amorij et al., 2012)

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างวัคซีนที่นำส่งทางช่องจมูก (Grassin-Delyle et al., 2012; Jabbal-Gill, 2010)

ชื่อวัคซีน	ชื่อบริษัท	สถานะการวิจัยและพัฒนา	ชื่อของวัคซีน
Nasalflu	Berna Biotech	ถอนจากตลาดปี 2001	Seasonal influenza
FluMist	Astra-Zeneca	จำหน่ายปี 2003	Seasonal influenza
NASOVAC	Serum Institute of India	จำหน่ายปี 2010	H1N1 swine influenza
Live-attenuated influenza vaccine	BioDiam	Clinical phase 2	Seasonal influenza และ pandemic influenza
Norovirus vaccine	Ligocysts	Clinical phase 2	Norovirus
MED1534	Astra-Zenega	Clinical phase 1	Parainfluenza virus type 3/Respiratory syncytial virus
MED1560	Astra-Zenega	Clinical phase 1	Parainfluenza virus type 3
FluVac	Avir Green Hills Biotechnology AG	Clinical phase 1	Seasonal influenza
DeltaFLu	Avir Green Hills Biotechnology AG	Clinical phase 1	Pandemic influenza
NiflusomeVac	NasVax	Clinical phase 1	Influenza
Influenza and diphtheria vaccine	OptiNose	Clinical phase 1	Influenza และ diphtheria
Influenza vaccine	Solvay	Clinical phase 1	Influenza
Influenza vaccine	Vaxin	Clinical phase 1	Influenza

2.2 ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคลกับการนำส่งรักษาทางช่องมูก

2.2.1 ไคโตแซน



ภาพที่ 2.6 โครงสร้างของไคโตแซน โดย R แทน acetyl หรือ H ซึ่งมีผลต่อ degree of acetylation (Morris et al., 2010)

ไคโตแซน (chitosan) เป็นสารกลุ่ม Polyaminosaccharide ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา alkaline deacetylation ของไคตินที่พบในเปลือกหุ้ง ปู แมลง รวมถึงเห็ดราบางชนิด โครงสร้าง polyaminosaccharide เกิดจาก β (14)-D-glucosamine และ N-acetyl D-glucosamine ต่อกันแบบสุ่ม ไคโตแซนแต่ละโมเลกุลประกอบด้วยหมู่อะมิโน (amino group, -NH₂) 1 หมู่และหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, -OH) 2 หมู่ ไคโตแซนเป็นค่างอ่อน (weak base) มีค่า pKa ประมาณ 6.5 แสดงประจุเป็นบวกจาก NH₂ ที่รับโปรตอน (protonization) เป็น NH₃⁺ ไม่คล้ายในตัวทำละลายที่มี pH เป็นกลาง ความสามารถในการละลายของไคโตแซนขึ้นกับปัจจัยหลายประการ เช่น อุณหภูมิ pH ความเข้มข้น รวมถึงชนิดของตัวทำละลาย ตัวทำละลายที่นิยมใช้คือ 1 % w/v acetic acid (Pillai et al., 2009)

การที่ไคโตแซนมีประจุบวกจากหมู่อะมิโน ทำให้สามารถเกิดพันธะไฮdroเจน (hydrogen bond) กับหมู่คาร์บอฟิลิก (carboxylic group, -COOH) ของโปรตีน หรือคีอีเอ็นเอ ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, -OH) ซึ่งประจุเป็นลบได้ดี อีกทั้งช่วยเพิ่มความคงตัวให้โปรตีน จึงเป็นพอลิเมอร์ที่มีการศักยภาพและพัฒนาเป็นระบบนำส่งโปรตีนอย่างแพร่หลาย โดยไคโตแซนมักใช้เป็นระบบนำส่งโปรตีนผ่านเยื่อบุผิวเนื้องจากประจุบวกของไคโตแซนสามารถเกิดอันตริกิริยา กับ salicilic acid ในสารเมือกที่มีประจุลบ และเยื่อบุผิวที่มีประจุลบจากหมู่ฟอสเฟต (phosphate group, PO₄³⁻) จึงช่วยลด mucocilliar clearance และเพิ่มเวลาคุตซ์ซึมบริเวณเยื่อบุผิวได้ เรียกคุณสมบัติดังกล่าวว่า mucoadhesive property นอกจากนี้ไคโตแซนยังเกิดยันตริกิริยา กับหมู่คาร์บอฟิลิกของ ZO-1 occludin ซึ่งเป็นโปรตีนที่ควบคุมการเปิด/ปิดช่องระหว่างเซลล์ (tight junction) ทำให้ช่องระหว่างเซลล์ปิดออก สารจึงผ่านช่องระหว่างเซลล์มากขึ้น

(Villasaliu et al., 2010) นอกจากนี้ ไอโคตแซนยังมีคุณสมบัติที่ดีหลายประการ เช่น มีความเป็นพิษต่ำ lethal dose 50% (LD 50) มากกว่า 1,500 mg/kg และ 1,600 mg/kg เมื่อให้โดยการกินในหนู rat และ mice ตามลำดับ เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่า ไอโคตแซนที่ความเข้มข้นมากกว่า 3.2 mg/mL ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิด Caco-2 การให้ไอโคตแซนทางจมูกของหนู rat ที่ความเข้มข้น 0.125, 0.25 และ 1% w/v ไม่พนความผิดปกติของเยื่อจมูกที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 1% และเมื่อให้ไอโคตแซน 0.25% w/v ทางจมูกในหนูตะเภา (guinea pig) ข้างละ 50 μ L นาน 28 วัน ไม่พนความผิดปกติของเนื้อเยื่อจมูก และจากการประเมินการเข้ากันกับเม็ดเลือดแดง โดยติดตาม การแตกของเม็ดเลือดแดง (haemolysis) พบว่า ไอโคตแซนไม่มีผลต่อการแตกของเม็ดเลือดแดง เมื่อประเมินความปลดปล่อยของไอโคตแซนในคน ไม่พนอาการไม่พึงประสงค์ในผู้ที่รับประทาน ไอโคตแซนติดต่อ กันทุกวัน วันละ 4.5 g และ ไม่พนอาการแสดง (symptom) ในผู้ที่รับประทาน ไอโคตแซน 6.57 g/วัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ไอโคตแซนสามารถถลายตัวได้ด้วยกลไกทางชีวภาพ (biodegradability) เมื่อรับประทานสามารถย่อยด้วยเอนไซม์และการหลักของจุลินทรีย์ ในทางเดินอาหาร (Baldrick et al., 2010) เมื่อถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย ไอโคตแซนสามารถย่อยด้วย เอนไซม์หลายชนิดจาก macrophages เช่น lysozymes และ chitinases ได้เป็นสารกลุ่ม amino sugar และถูกกำจัดอย่างสมบูรณ์ในร่างกาย โดยไม่ก่อให้เกิดอาการแพ้ หรือต่อต้านจากร่างกาย จึงจัดเป็น สารที่เข้ากันร่างกาย (biocompatible) ด้วยเหตุนี้จึงจัดว่า ไอโคตแซนเป็นสารช่วยทางเภสัชกรรม ที่ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย การเตรียมไอโคตแซน เพื่อใช้ในทางเภสัชกรรมมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง และกำจัดสิ่งปนเปื้อนออก ทำให้ไอโคตแซนเป็นสารที่ไม่กระตุ้นให้เกิดอาการแพ้ในผู้ที่แพ้อาหาร ทะเล (Muzzarelli, 2010)

2.2.2 การนำส่งวัคซีนทางจมูกด้วยไอโคตแซนโนพาร์ทิคล

วัคซีนชนิดชิบยูนิต (subunit vaccine) เป็นวัคซีนที่มีการพัฒนาอย่างรวดเร็วและ มีการศึกษาอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน โดย subunit vaccine เป็นโปรตีนแอนติเจนที่มีขนาดใหญ่ และไม่มีคุณสมบัติยืดเกาะเยื่อบุผิว จึงผ่านเยื่อบุจมูกได้ดีน้อย ทำให้การนำส่ง subunit vaccine ทางจมูกจำเป็นต้องอาศัยระบบนำส่งที่มีคุณสมบัติเพิ่มการยืดเกาะเยื่อบุผิว และเพิ่มการนำส่ง แอนติเจนผ่านเยื่อบุจมูก (Kang et al., 2009) จากรายงานการวิจัยของ Boonyo et al. (2007) พบว่า การนำส่งแอนติเจนที่คล้ายในสารละลาย ไอโคตแซนสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ได้ดีกว่าแอนติเจน ที่คล้ายในสารละลายน้ำเกลือ (normal saline solution) เมื่อให้ทางจมูกหนูทดลอง เนื่องจาก ไอโคตแซนมีคุณสมบัติเพิ่มการนำส่งสารผ่านเยื่อบุจมูกดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น แต่สารคัดหลั่ง ภายในโพรงจมูกซึ่งประกอบด้วย เอนไซม์และกรดที่มีฤทธิ์ในการทำลายโปรตีน การกัดเกรบ แอนติเจนในอนุภาค ไอโคตแซนจึงช่วยป้องกันการทำลายแอนติเจนจากเอนไซม์ และกรดในช่องจมูก

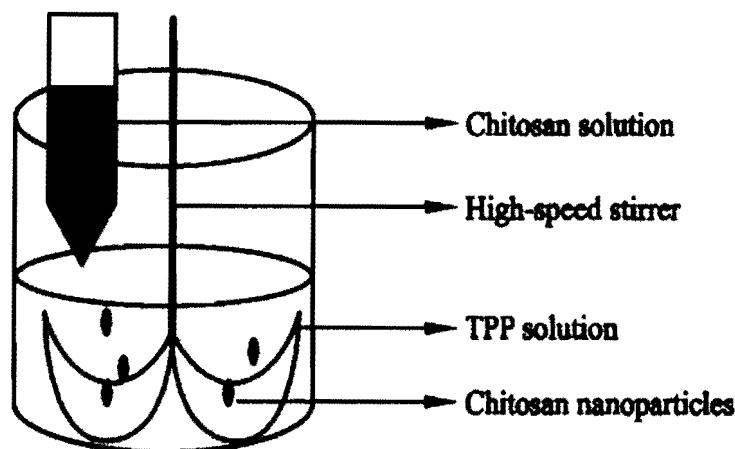
ได้ดีกว่าการให้แอนติเจนที่ละลายในสารละลายไคโตแซน อีกทั้ง M cell ของเยื่อบุจมูกสามารถนำส่งแอนติเจนในรูปอนุภาคที่ขนาดนาโนเมตรได้ดีกว่าในแอนติเจนรูปสารละลาย จึงทำให้การกักเก็บแอนติเจนในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลนำส่งวัคซีนผ่านเยื่อบุจมูกได้ดีกว่า แอนติเจนที่ละลายในไคโตแซน เช่น รายงานการวิจัยของ Shahnaz et al. (2012) ซึ่งเปรียบเทียบค่าชีวประสิทธิผล (bioavailability) ในการนำส่ง leuprolide acetate ทางจมูกด้วยไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล และในรูปแบบสารละลาย เทียบกับการฉีด leuprolide acetate เข้าสู่เส้นเลือดดำ (intravenous injection) พบร่วมกันการนำส่งสารที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลมีค่า bioavailability สูงกว่าการให้ในรูปสารละลาย โดยมีค่าชีวประสิทธิผลเท่ากับ 4.3 % และ 2.0 % ตามลำดับ นอกจากนี้อนุภาคขนาดนาโนเมตรยังถูกส่งนำเข้าเซลล์ทางภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆ เช่น lymphocytes, dendritic cell, macrophages เป็นต้น ได้ดีกว่าในรูปสารละลาย จึงช่วยเพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้ง HIR และ CMIR ได้ (Dobrovolskaia et al., 2008) อีกทั้งการที่แอนติเจนถูกกักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล แอนติเจนจะถูกปลดปล่อยอย่างช้าๆ ทำให้เซลล์ทางภูมิคุ้มกันสัมผัสกับแอนติเจนนานขึ้น จึงเพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันอย่างไรก็ตาม การควบคุมการปลดปล่อยแอนติเจนออกจากอนุภาคทำได้ยาก แต่มีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลเป็นวัคซีนที่ให้เพียงครั้งเดียวโดยไม่จำเป็นต้องมีการกระตุนซ้ำ

สำหรับขนาดที่เหมาะสมในการนำส่งยาหรือวัคซีนทางจมูกนั้น ยังไม่ทราบแน่ชัดจากการทบทวนวรรณกรรมของ Kang et al. (2009) พบร่วมกับไคโตแซนขนาด 5 μm สามารถนำส่งผ่านเยื่อบุผิวและกระดูกภูมิคุ้มกันเมื่อวัคซีนทางจมูกในหนูทดลองได้ และขนาดอนุภาคที่เล็กระดับนาโนเมตรสามารถนำส่งวัคซีนผ่านเยื่อบุผิวได้ ปัจจุบันจึงมีการศึกษาระบบนำส่งวัคซีนทางจมูกที่ขนาดอนุภาคระดับนาโนเมตรจำนวนมาก (Rice-Ficht et al., 2010) liposome เป็นระบบนำส่งอีกรูปแบบหนึ่งที่มีการนำมาใช้เพื่อนำส่งวัคซีนทางจมูก แต่พบว่าไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลซึ่งเป็น polymeric nanoparticle เป็นระบบที่กักเก็บแบบ nanosphere ทำให้กักเก็บแอนติเจนได้มากกว่าและมีความคงตัวของระบบสูงกว่า liposome ซึ่งเป็นการกักเก็บแบบ nanocapsule (Tiyaboonchai, 2003) อีกทั้งไขมันที่มีประจุบวก (cationic lipid) ยังมีความเป็นพิษค่อนข้างสูง ต่างจากไคโตแซนที่เป็นพอลิเมอร์ประจุบวกที่ไม่เป็นพิษ (non-toxic cationic polymer) ทำให้ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลเป็นระบบนำส่งวัคซีนทางจมูกที่มีข้อดีเหนือกว่า liposome (Khatri et al., 2008)

2.2.3 การเตรียมไคโตแซนนาในพาร์ทิเคล

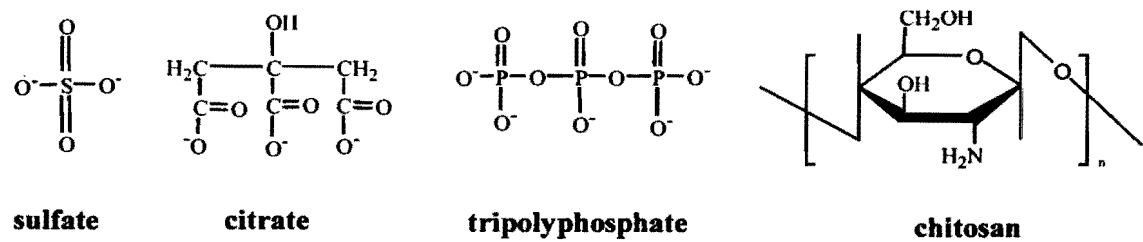
การเตรียมไคโตแซนในโครพาร์ทิเคลเพื่อนำส่งยาและวัสดุชีวภาพทางปากมีการศึกษาอย่างขวางๆ ทำให้ทราบปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติของอนุภาคนำส่ง เมื่อพบข้อดีของอนุภาคนำส่ง ระดับนาโนเมตรว่ามีข้อดีเหนือกว่าระดับไมโครเมตร จึงมีการปรับเปลี่ยนปัจจัยบางประการจากวิธีการเตรียมแบบดั้งเดิม เพื่อใช้เตรียมไคโตแซนนาในพาร์ทิเคล วิธีการเตรียมไคโตแซนนาในพาร์ทิเคลและในโครพาร์ทิเคลมีหลายวิธี เช่น emulsion cross-linking, emulsion-droplet coalescence, ionotopic gelation รวมถึงการดักแปลงโครงสร้างทางเคมีของไคโตแซน (Chemically modified chitosan method) เพื่อให้ไคโตแซนสามารถเกิดอนุภาคนำส่งได้เอง (self-assembling) สำหรับการเตรียมอนุภาคนำส่งด้วยวิธี emulsion cross-linking และ emulsion-droplet coalescence ไม่สามารถใช้ในการนำส่งโปรตีนแอนติเจนได้ เนื่องจากวิธีดังกล่าว มีผลต่อความคงตัวของโปรตีนจากการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการเตรียม สำหรับการดักแปลงโครงสร้างทางเคมีของไคโตแซน เมมสามารถใช้เตรียมอนุภาคเพื่อนำส่งโปรตีนได้ แต่เป็นเทคนิคที่ค่อนข้างยุ่งยาก จึงมีการนำมาใช้ในปัจจุบันค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับวิธี ionotropic gelation ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย ไม่จำเป็นต้องดักแปลงโครงสร้างของโปรตีนหรือแอนติเจน ไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ และไม่ใช้สารที่เป็นอันตรายต่อร่างกายในการเตรียม อีกทั้งวิธีดังกล่าวมีการใช้อยู่่เดิมในระดับอุตสาหกรรม ทำให้เทคนิค ionotropic gelation เป็นวิธีที่นิยมใช้การเตรียมไคโตแซนนาใน/ไมโครพาร์ทิเคลเพื่อนำส่งโปรตีน และแอนติเจน (Chenguang et al., 2007; Tiyaboonchai, 2003)

2.2.3.1 การเตรียมไคโตแซนนาในพาร์ทิเคลด้วยวิธี ionotropic gelation

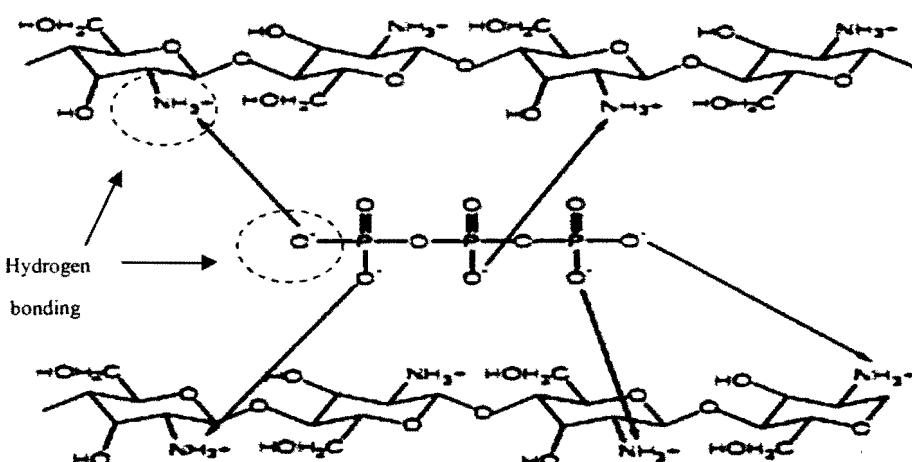


ภาพที่ 2.7 การเตรียมไคโตแซนนาใน/ไมโครพาร์ทิเคลด้วยวิธี ionotropic gelation (Chenguang et al., 2007)

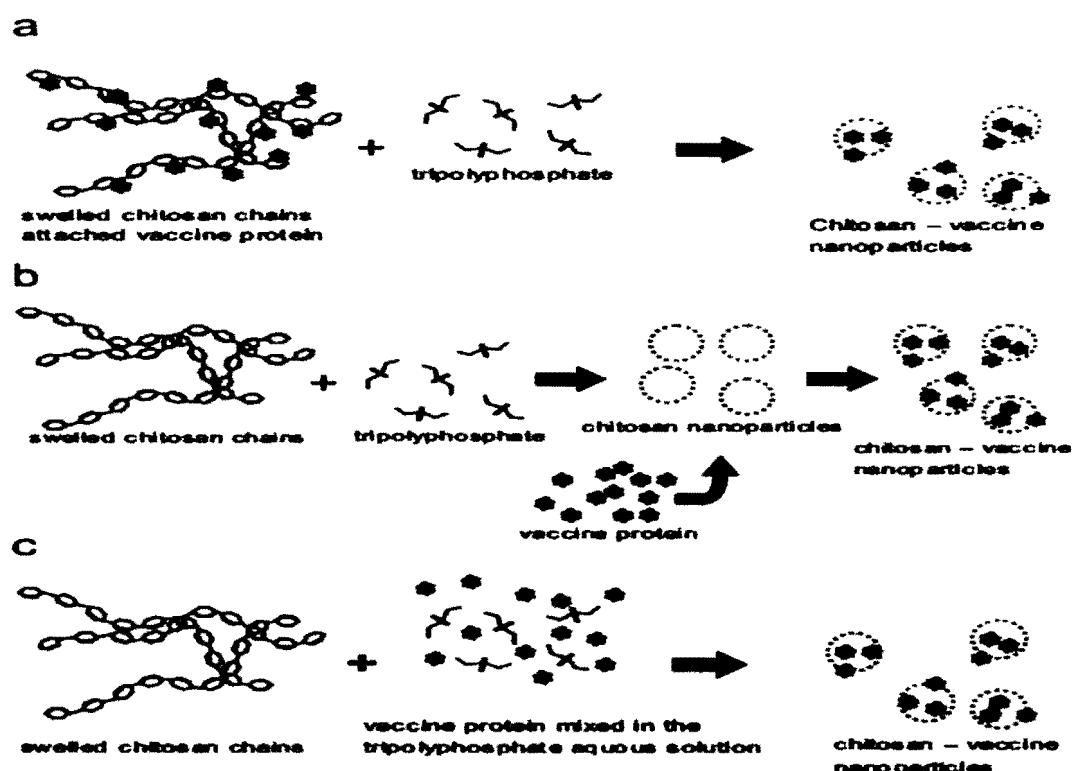
วิธี ionotropic gelation เป็นการเตรียมอนุภาคโดยอาศัยการเกิดอันตรกิริยาของประจุชนิดตรงข้ามกัน (electrostatic interaction) โดยกรณีของไคโตไซด์ในโพรพาร์ทิกเลล เตรียมโดยปั่นสารละลายไคโตไซด์ในกรด酢ติก (acetic acid) เจือจางด้วยความเร็วคงที่จากนั้นหยดสารละลายที่มีประจุลบ (anion) ทำอันตรกิริยากับประจุบวก (cation) ของไคโตไซด์ซึ่งปั่นผสมให้เข้ากันอยู่ตลอดเวลา สารที่มีประจุลบที่นิยมใช้คือ tripolyphosphate (TPP) เนื่องจากให้ประจุลบมาก เกิดอันตรกิริยากับไคโตไซด์ได้ง่ายและรวดเร็วเมื่อเทียบกับ sulfate และ citrate อีกทั้งไม่เป็นพิษต่อร่างกาย (Shu and Zhu, 2002) การกักเก็บโปรตีนหรือแอนติเจนทำได้โดยเติมในไคโตไซด์ TPP ก่อนเตรียมอนุภาคนำส่ง (incorporation) หรือเตรียมอนุภาคนำส่งก่อนแล้วนำมาผสมกับโปรตีนหรือแอนติเจนอีกครั้ง (incubation) ทั้งนี้ incorporation ทำให้ได้ขนาดอนุภาคที่มีขนาดเล็กและ มีความคงตัวของระบบที่ดีกว่าการเตรียมแบบ incubation อย่างไรก็ตาม incubation เป็นวิธีเตรียมที่ง่ายและมีการปลดปล่อยโปรตีนออกจากอนุภาคได้รวดเร็วกว่า สำหรับการนำส่งวัสดุชีวทางชุมชนพบว่า การเตรียมแบบ incorporation โดยผสมแอนติเจนกับ TPP ก่อนเตรียมอนุภาค ทำให้ไคโตไซด์หุ้มแอนติเจนได้ดีกว่าการผสมแอนติเจนกับไคโตไซด์และการเตรียมแบบ incubation ทำให้ไคโตไซด์ที่ผิวนอกเยื่อหุ้มชุมชนกัดกร่อนได้ดี ไคโตไซด์ในพาร์ทิกเลลที่เตรียมจากการผสมแอนติเจนกับ TPP จึงกระตุ้นภูมิคุ้มกันจากการให้วัสดุชีวทางชุมชนได้ดีกว่าการเตรียมแบบอื่น (Kim and Kang, 2008)



ภาพที่ 2.8 โครงสร้างและประจุของ sulfate, citrate, tripolyphosphate และไคโตไซด์ (Shu and Zhu, 2002)



ภาพที่ 2.9 คำແນ່ງການເກີດອັນຕຽບກິບຮະຫວ່າງໄຄໂໂಡແຫນກັບ TPP (Lee, 2004)



ภาพที่ 2.10 การກັກເກີນແອນຕີເຈນຂອງໄຄໂໂດແຫນນາໂນພາຣ໌ທີເຄີດຕົວຢ່າງຕ່າງໆ (Kim and Kang, 2008)

- ເຖິງກັກ incorporation ໂດຍພສມແອນຕີເຈນໃນໄຄໂໂດແຫນກ່ອນເຕີມຕໍ່າຮັນ
- ເຖິງກັກ incubation ໂດຍນຳແອນຕີເຈນກັບໄຄໂໂດແຫນນາໂນພາຣ໌ທີເຄີດ
- ເຖິງກັກ incorporation ໂດຍພສມແອນຕີເຈນໃນ TPP ກ່ອນເຕີມຕໍ່າຮັນ

2.2.3.2 ปัจจัยการเตรียมไคโตแซนนาโนพาร์ทิคูลที่มีผลต่อคุณสมบัติของอนุภาคนำส่ง

1) มวลโมเลกุล (Molecular weight; Mw) และ Deacetylation degree (DD) ของไคโตแซน

ค่า DD เป็นค่าที่แสดงร้อยละของหมู่อะมิโน (amino group) ที่ให้ประจุบวกของไคโตแซน หมู่ฟังก์ชันดังกล่าวเป็นส่วนที่เกิดอันตรักษิริยา กับประจุลบของ TPP และโปรตีน อนุภาคที่เตรียมจากไคโตแซนที่มีค่า DD สูง จะกักเก็บโปรตีนได้ดี แต่อัตราการปลดปล่อยโปรตีนค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับไคโตแซนที่มีค่า DD ต่ำกว่า สำหรับมวลโมเลกุลของไคโตแซน มีอิทธิพลต่อการกักเก็บและปลดปล่อยสารในลักษณะเดียวกัน โดยการที่มีมวลโมเลกุลเพิ่มขึ้น เป็นการเพิ่มหมู่ฟังก์ชันของไคโตแซน (Xu and Du, 2003; Gan and Wang, 2007) นอกจากนี้จากการงาน การวิจัยของ Gan et al. (2005) พบว่า ขนาดและประจุที่ผิวนูภาคเพิ่มขึ้นตามมวลโมเลกุลของไคโตแซนที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นการนำส่งวัสดุทางชุมชนซึ่งต้องการอนุภาคนำส่งที่มีขนาดเล็กและปลดปล่อยแอนติเจนได้ดี จึงนิยมใช้ไคโตแซนที่มีมวลโมเลกุลต่ำ (Low molecular weight chitosan)

2) ความเข้มข้นของไคโตแซน

ความเข้มข้นของไคโตแซนมีผลต่อนาดและประจุที่ผิวนูภาค และความสามารถในการกักเก็บสารของอนุภาค เมื่อกำหนดให้ TPP ที่ใช้ในการเกิดอันตรักษิริยาคงที่ หากใช้ความเข้มข้นของไคโตแซนต่ำ มีผลให้เกิดการตกตะกอนของ TPP เนื่องจากไคโตแซน ไม่เพียงพอในการเกิดอันตรักษิริยา กับ TPP จึงมี TPP เหลือจากการทำงานปฎิกริยา กรณีที่ความเข้มข้นของไคโตแซนมากเกินพอด้วยว่าการเกิดอนุภาคมีปริมาณน้อย เนื่องจากความหนืดที่เพิ่มขึ้น ตามความเข้มข้นไปขัดขวางการเกิดพันธะ เช่น จากรายงานการวิจัยวิจัยของ Xu and Du. (2003) จึงหากความเข้มข้นของไคโตแซนที่เหมาะสมในเตรียมนาโนพาร์ทิคูล พบร่วงความเข้มข้น 1 mg/mL ถึง 3 mg/mL เป็นช่วงที่มีความเหมาะสมในการเกิดอันตรักษิริยา โดยขนาดและประจุที่ผิวนูภาคเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของไคโตแซนที่เพิ่มขึ้น และพบว่าความเข้มข้นของไคโตแซน ตั้งแต่ 4 mg/mL จนไป มีความหนืดสูง ขัดขวางการเกิดอันตรักษิริยา นอกจากนี้ยังพบว่าความหนืดที่เพิ่มขึ้น ยังขัดขวางการกักเก็บสารของอนุภาค เช่นเดียวกับการทดลองของ Gan and Wang (2007) พบร่วงความสามารถกักเก็บสารลดลงจาก 88.3% เป็น 61.3% เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไคโตแซน จาก 1 mg/mL เป็น 3 mg/mL สำหรับการปลดปล่อยสารของอนุภาคจากรายงานการวิจัยของ Xu and Du (2003) พบร่วงอนุภาคที่เตรียมจากไคโตแซนความเข้มข้น 1 mg/mL ปลดปล่อยสารได้ดีกว่า ไคโตแซนความเข้มข้น 2 mg/mL ทั้งนี้เนื่องจากอนุภาคที่เตรียมจากความเข้มข้น 1 mg/mL มีร้อยละการกักเก็บเท่ากับ 61.0 แต่ที่ความเข้มข้น 2 mg/mL มีร้อยละการกักเก็บเท่ากับ 54.4 การที่มีปริมาณ

สารที่กักเก็บสูงกว่าทำให้แรงขึ้นระหว่างประจุของโปรตีนกับไคโตแซนนีความแรงต่ำ อีกทั้งอนุภาคที่เตรียมได้จากไคโตแซนความเข้มข้นต่ำมีขนาดเล็ก จึงมีพื้นที่ผิวโดยปริมาตรสูง จะเกิดการปลดปล่อยสารออกมายได้อย่างรวดเร็ว และมากกว่าอนุภาคที่เตรียมจากไคโตแซน ความเข้มข้นสูงซึ่งมีการกักเก็บแอนติเจนน้อยกว่า

3) สัดส่วนการเกิดอันตรภิษัยระหว่างไคโตแซนต่อ TPP

ความเข้มข้นของ TPP ที่ให้ผลดีและนิยมใช้เตรียมไคโตแซนนานาในพาร์ทิเคล คือ 1 mg/mL (Xu and Du, 2003; Gan et al., 2007) จากการศึกษาของ Gan et al. (2007) โดยเตรียมนาโนพาร์ทิเคลจากการเพิ่มสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP ตั้งแต่ 3:1 จนถึง 7:1 พบว่า เมื่อเพิ่มสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP ร้อยละการกักเก็บโปรตีนลดลงจากร้อยละ 61.1 เป็น 49.2 เนื่องจากการลดปริมาณ TPP ทำให้ pH ระหว่างการเตรียมคำรับลดลง การแสดงประจุลบของโปรตีนจึงลดลง ทำให้การเกิดอันตรภิษัยของโปรตีนกับไคโตแซนลดลง ปริมาณการกักเก็บโปรตีนจึงลดลง แต่การปลดปล่อยโปรตีนจากอนุภาค พบว่า ลดลงตามสัดส่วนไคโตแซนต่อ TPP ที่เพิ่มขึ้น เช่นจากรายงานการวิจัยของ Kim and Kang (2008) ที่เตรียมนาโนพาร์ทิเคลจากสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP ตั้งแต่ 1:1 จนถึง 6:1 พบว่า สัดส่วนที่ 3:1 ให้ขนาดที่เล็กและมีค่าประจุที่ผิวอนุภาคมากที่สุด โดยในช่วงสัดส่วนไคโตแซนต่อ TPP เท่ากับ 1:1 ถึง 3:1 ขนาดของอนุภาคจะลดลงตามสัดส่วนไคโตแซนต่อ TPP ที่เพิ่ม แต่มีค่าประจุที่ผิวของอนุภาคเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มสัดส่วนไคโตแซนต่อ TPP มากกว่า 3:1 พบว่า ขนาดและประจุที่ผิวอนุภาคเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนไคโตแซนต่อ TPP ที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Gan et al. (2005) ซึ่งใช้สัดส่วนการทำอันตรภิษัยของไคโตแซนต่อ TPP ในสัดส่วนโดยมวลตั้งแต่ 3:1 จนถึง 8:1 พบว่า ขนาดและประจุอนุภาคเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนไคโตแซนต่อ TPP ที่เพิ่มขึ้น

4) แรงที่ให้ระหว่างเกิดอันตรภิษัย

แรงที่ให้ระหว่างการเกิดอันตรภิษัยระหว่างไคโตแซนกับ TPP โดยทั่วไปใช้แรงจากการปั่นสารละลาย จากรายงานการวิจัยของ Fan et al. (2012) พบว่า เมื่อปั่นสารละลายที่ความเร็ว 200-800 rpm ทำให้ได้ขนาดอนุภาคที่สม่ำเสมอ คือ มีค่าดัชนีการกระจายขนาดของอนุภาค (polydispersity index; PDI) น้อยกว่า 0.05 แต่เมื่อเพิ่มความเร็วเข้าไปถึง 1,000 rpm พบว่า แรงเฉือน (shear force) จากการปั่นสารละลายทำให้ออนุภาคที่ได้ไม่คงตัว เกิดรวมตัวของอนุภาค ทำให้ออนุภาคไม่สามารถกระจายตัวในน้ำกระถางยาได้ (vehicle) จึงเกิด aggregation อย่างไรก็ตามมีรายงานการวิจัยหลายฉบับที่ใช้ความเร็ว 1,000 rpm หรือสูงกว่าในการเตรียมไคโตแซนนานาในพาร์ทิเคล โดยไม่เกิด aggregation ทั้งนี้อาจมีผลจากปัจจัยอื่นร่วมด้วย รายงานการวิจัยดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Tsai et al. (2005) ซึ่งพบว่าการเพิ่มแรง

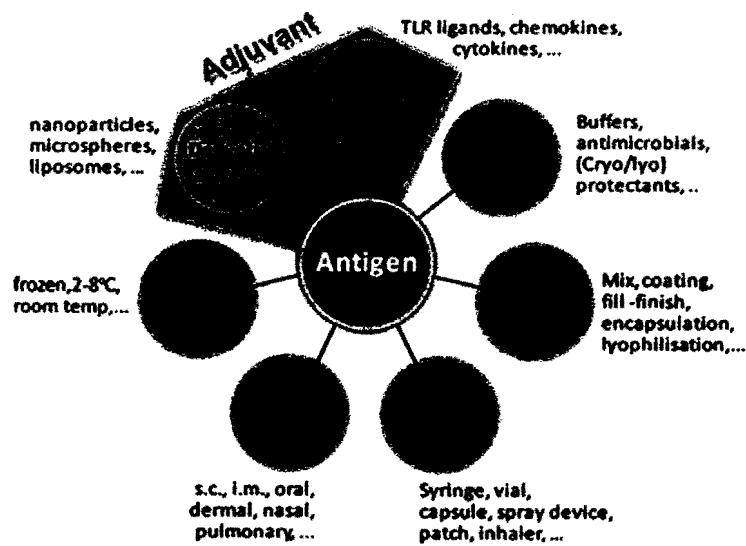
ปั่นทำให้ได้ขนาดอนุภาคที่เล็กลง แต่การกระจายขนาดของอนุภาคเพิ่มขึ้นตามแรงปั่นที่เพิ่มขึ้น ต่างจากการให้แรงระหว่างเกิดอันตรายริยาภายในได้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic) ซึ่งขนาดและการกระจายขนาดของอนุภาคลดลงตามขนาดของแรงจากคลื่นเสียงที่เพิ่มขึ้น

5) ความเป็นกรดของสารละลายไคโตแซน

โดยทั่วไป pH ของสารละลายไคโตแซนที่นิยมใช้ในเตรียมนาโนพาร์ทิเคิล คือ 3 - 4 เนื่องจากสามารถต้านให้ไคโตแซนแตกง่ายในภาวะ pH ต่ำ ได้ดี อนุภาคที่เตรียมได้จึงมีขนาดเล็ก (Kim and Kang, 2008) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Fan et al. (2011) พบว่า pH ที่เหมาะสมในการเตรียมนาโนพาร์ทิเคิลควรต่ำกว่า 4.5 ถ้า pH สูงขึ้นปริมาณนาโนพาร์ทิเคิลที่ได้จะลดลง หาก pH เกิน 5.2 จะได้ไม่โครงสร้างเดิมแน่นอน

นอกจากปัจจัยที่กล่าวข้างต้นพบว่ามีปัจจัยอีกหลายปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล ที่เตรียมด้วยเทคนิค ionotropic gelation ส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับแรงที่ให้ขณะเตรียมตัวรับ เช่น อุณหภูมิ และการให้แรงจากภายนอกในรูปแบบต่างๆ ซึ่งมีผลต่อการเกิดอันตรายริยาระหว่างไคโตแซนกับ TPP (Fan et al., 2012)

2.3 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดอนุภาคนำส่งกับแอดจูแวนท์



ภาพที่ 2.11 ปัจจัยที่มีผลต่อฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันของวัคซีน (Amorij et al., 2012)

นอกจากนิคและช่องทางการให้วัคซีนแล้ว แอดจูแวนท์ (adjuvant) หรือสารเสริมฤทธิ์ กระตุ้นภูมิคุ้มกัน เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อประสิทธิภาพของวัคซีน สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ตามกลไกการเสริมฤทธิ์ คือ

2.3.1 สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immunostimulant) เป็นสารที่ออกฤทธิ์กระตุ้นต่อเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันโดยตรง ทำให้เกิดการตอบสนองต่อแอนติเจนเพิ่มขึ้น ตัวอย่างเช่น cytokine, cholera toxin และ *E. coli* heat-labile enterotoxin เป็นต้น และจากการทดลองแบบ *in vitro* ของ Pattani et al. (2009) พบว่า ไอโคトイเดนนาโนพาร์ทิคิลขนาด 371 nm มีค่าการกระจายขนาดของอนุภาค เท่ากับ 0.698 มีฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของ splenocytes

2.3.2 ระบบนำส่ง (Delivery system) เป็นระบบนำส่งวัคซีนที่สามารถนำส่งแอนติเจนให้กับเซลล์ทางภูมิคุ้มกันในลักษณะที่เหมาะสม ช่วยเสริมฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันของวัคซีนให้ดีขึ้น ทั้งจากการเพิ่มปริมาณแอนติเจนที่ถูกนำส่งยังเซลล์ทางภูมิคุ้มกัน และการเพิ่มระยะเวลาในการสัมผัสแอนติเจนของเซลล์ทางภูมิคุ้มกัน ตัวอย่าง เช่น mineral salt, liposome, micro-nanoparticles เป็นต้น (Amorij et al., 2012) เมื่อนุภาคนำส่งขนาดเล็กจะทำให้สามารถนำส่ง แอนติเจนไปยังบริเวณต่างๆ ได้ดีกว่าอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ แต่นอกจากปริมาณของแอนติเจนแล้ว ยังพบปัจจัยร่วมอื่นๆ อีกหลายปัจจัย ที่มีผลต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ทำให้ไม่สามารถสรุปได้อ่าย ข้อเสนอว่า อนุภาคขนาดเล็กสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ (Yan et al., 2013)

2.3.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของอนุภาคนำส่งกับฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันของวัคซีน

ปัจจุบันระบบนำส่งวัคซีนขนาดไมโคร/นาโนเมตรเป็นระบบนำส่งที่มีการศึกษาวิจัยกันอย่างเพร่่หายา โดยผลการศึกษาแบบ *in vitro* พบว่า ขนาดของอนุภาคมีผลต่อการเสริมฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน และควบคุมกลไกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ โดยการนำส่ง แอนติเจนด้วยระบบนำส่งที่มีขนาดอนุภาค 20-200 nm จะถูกนำส่งเข้าสู่ APCs ด้วยกลไก endocytosis จะมีผลกระตุ้น CMIR เป็นหลัก หากระบบนำส่งมีอนุภาคขนาดใหญ่ตั้งแต่ 500 nm - 5 μm จะถูกนำส่งเข้าสู่เซลล์ด้วยกลไก phagocytosis ซึ่งจะมีผลกระตุ้น HIR เป็นหลัก (Marie-Luce et al., 2011; Oyewumi et al., 2010) โดยงานวิจัยอื่นๆ ก็พบความสัมพันธ์ที่สอดคล้องของขนาด อนุภาคนำส่งวัคซีนกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน เมื่อทำการทดลองแบบ *in vitro* เช่นกัน

Yue et al. (2010) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของอนุภาค ไอโคトイเดน ต่อการหล่อไส้トイคัพน์จาก macrophages โดยใช้อนุภาค 3 ขนาด คือ 430 nm, 1.9 μm และ 4.8 μm ผลการวิจัยพบว่า อนุภาคขนาด 430 nm มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิด CMIR โดยกระตุ้น

การหลัง IFN- γ , TNF- α และ IL-12 ได้ดีกว่าขนาดอนุภาคระดับในโครเมตร ต่างจากระดับ IL-10 ซึ่งเพิ่มความขนาดของอนุภาคที่เพิ่มขึ้น ซึ่งผลของ IL-10 จะทำให้เกิดการกระตุ้นการหลัง IL-4 นำไปสู่การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ HIR ได้ การที่อนุภาคน้ำเล็กสามารถนำส่งแอนติเจนเข้าเซลล์มากกว่าอนุภาคน้ำใหญ่ เนื่องจากขนาดอนุภาคระดับนาโนเมตรสามารถผ่านเข้าเซลล์ได้ด้วยวิธี endocytosis ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Koppolu and Zaharoff (2013) ซึ่งกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย bovine serum albumin (BSA) ที่กักเก็บในอนุภาคไคโตแซนขนาด 300 nm, 1 μm และ 3 μm ผลการวิจัยพบว่า ขนาดอนุภาคมีผลต่อการแบ่งตัวของ CD4+ helper T-lymphocyte โดยอนุภาคน้ำใหญ่สามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ได้ดีกว่าอนุภาคน้ำเล็ก แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ชนิด CD8+ cytolytic T-lymphocyte

Kanchan and Panda (2007) ทดสอบฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันของ macrophage หลังได้รับ hepatitis B surface antigen (HBsAg) ที่กักเก็บในอนุภาค polylactide ขนาดอนุภาคใหญ่ ($2 \mu\text{m} - 8 \mu\text{m}$) และอนุภาคน้ำเล็ก ($200 \text{ nm} - 600 \text{ nm}$) พบว่าอนุภาคน้ำเล็ก สามารถกระตุ้นการหลัง IFN- γ ได้ดี และอนุภาคน้ำใหญ่ สามารถกระตุ้น IL-4 ได้ดี เมื่อศึกษากลไกการกักเก็บแอนติเจนเข้าสู่เซลล์ โดยการติดสารเรืองแสงที่อนุภาคน้ำส่งและแอนติเจน พบร่วมกัน ขนาดเล็ก สามารถเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธี endocytosis ได้อย่างรวดเร็ว ในขณะที่อนุภาคน้ำส่งขนาดใหญ่ ไม่พบการเข้าสู่เซลล์ แต่พบร่วมกับการเกาะติดพื้นผิวเซลล์ของอนุภาคน้ำใหญ่ และมีการปลดปล่อยแอนติเจนจากอนุภาคน้ำส่งไปกระตุ้นเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน ลักษณะการนำส่งแอนติเจนดังกล่าวคล้ายคลึงกับกลไกการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อ intracellular pathogens และ extracellular pathogens ที่กระตุ้น IFN- γ และ IL-4 ได้ดีตามลำดับ

รายงานการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการนำส่งแอนติเจนทางจมูกด้วยระบบอนุภาคนำส่งใน ex vivo และ in vivo ยังมีค่อนข้างน้อย และไม่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างขนาดอนุภาคนำส่งกับการเสริมฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันเมื่อให้วัคซีนทางจมูกในร่างกายได้อย่างชัดเจน ผลการวิจัยบางส่วนยังไม่สอดคล้องกัน (ตารางที่ 2.2) อาทิเช่น

Slutter and Jiskoot (2010) พบร่วมกับ N-trimethyl chitosan (TMC) ขนาด 278 nm และประจุบวกที่ผิวอนุภาคเป็นนาโน ถูกนำส่งเข้าสู่ dendritic cell ได้ดีกว่า ไอวัลูมินในรูปสารละลาย โดยไอวัลูมินถูกนำเข้าเซลล์ในส่วน lysosome ของเซลล์ เมื่อให้วัคซีนทางจมูกแก่สัตว์ทดลอง พบร่วมกับ N-trimethyl chitosan เกาะติดเขื่อนผิวได้นานกว่าในรูปแบบสารละลาย โดยไอวัลูมินที่กักเก็บในอนุภาค N-trimethyl chitosan เกาะติดเขื่อนผิวในเยื่อบุจมูกได้ดีกว่า ไอวัลูมินในรูปสารละลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$)

Jung et al. (2001) ศึกษาขนาดที่เหมาะสมของ Sulfobutylated poly(vinyl alcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles เพื่อนำส่งวัคซีนป้องกันบาดทะยัก (tetanus toxoid; TT) โดยอนุภาคขนาดประมาณ 100 nm, 500 nm และมากกว่า 1000 nm แก่หนู mice ชนิด Balb/c ทางจมูกและปาก ผลการวิจัยพบว่า อนุภาคขนาดนาโนเมตรคือ 100 nm และ 500 nm สามารถกระตุ้น IgA และ IgG ในชีรัมได้ดีกว่าอนุภาคขนาดในโครเมตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้ง การให้ทางปากและจมูก แต่ไม่พบร่วมแตกต่างของระดับ IgA และ IgG ระหว่างอนุภาคขนาด 100 nm และ 500 nm ต่างจากผลการศึกษาของ Gutierrez et al. (2002) ซึ่งนำส่ง BSA ที่กักเก็บในอนุภาค poly(D,L-lactic-co-glycolic) acid ทางจมูก พบร่วมอนุภาคขนาด 1,000 nm สามารถกระตุ้น IgG ในชีรัมได้ดีกว่าอนุภาคขนาด 500 nm และ 200 nm ตามลำดับ

Krishnakumar et al. (2012) ศึกษาการนำส่ง hepatitis B surface antigen (HBsAg) ทางจมูก โดยกักเก็บแอนติเจนในอนุภาคของ poly(vinyl alcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide) ซึ่งเคลือบด้วย trimethyl chitosan chloride (TMC) ทำให้ได้ออนุภาคที่มีประจุที่ผิวเป็นบวกและมีขนาดต่างๆ จำนวน 3 ขนาด คือ 729 nm, 445 nm และ 274 nm ตามลำดับ ผลการวิจัยพบว่าอนุภาคที่เคลือบด้วย TMC ถูกนำส่งเข้าสู่ dendritic cell ได้ดีกว่าอนุภาค poly(vinyl alcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide) ที่มีประจุที่ผิวเป็นลบ โดยอนุภาคที่ถูกเคลือบด้วย TMC ทั้ง 3 ขนาด มีปริมาณการนำส่งแอนติเจนที่เข้าสู่ dendritic cell ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อนำมาให้ในสัตว์ทดลอง โดยประเมินการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มจากการดับ IgG ในชีรัมและ sIgA ในน้ำลายและสารคัดหลังทางจมูกและซ่องคลอค พบร่วมอนุภาค 729 nm และ 445 nm สามารถกระตุ้น IgG และ sIgA ได้ดีกว่าอนุภาคขนาด 274 nm โดยอนุภาคขนาด 729 nm และ 445 nm มีการปลดปล่อยแอนติเจนไกล์เดียวกัน คือ ประมาณร้อยละ 90 ของแอนติเจนที่กักเก็บทั้งหมด ส่วนอนุภาคขนาด 274 nm มีการปลดปล่อยแอนติเจนได้น้อย ประมาณร้อยละ 20 ของแอนติเจนที่กักเก็บทั้งหมด จึงทำให้อนุภาคขนาด 274 nm กระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ต่ำกว่าอนุภาคที่มีขนาด 445 nm และ 729 nm ดังนั้น การปลดปล่อยแอนติเจนจากระบบนำส่งจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันที่นอกเหนือจากขนาดของอนุภาคนำส่ง

Nagamoto et al. (2004) นำส่งวัคซีนทางจมูกหนู rat ที่กักเก็บในอนุภาคไคโตแซนขนาด 0.4 μm, 1 μm และ 3 μm ผลการวิจัยพบว่า อนุภาคขนาด 0.4 μm และ 1 μm กระตุ้นระดับ IgA ในชีรัมได้สูงกว่าอนุภาคขนาด 3 μm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) แต่ไม่พบร่วมแตกต่างของระดับ IgG หลังให้ไอวัลบูนินที่กักเก็บในอนุภาคไคโตแซนทั้ง 3 ขนาดทางจมูกในหนูทดลอง ปัจจุบันมีเพียงรายงานการวิจัยนี้ที่ศึกษาในสัตว์ทดลองโดยศึกษาผลของขนาดอนุภาคไคโตแซนในการนำส่งวัคซีนทางจมูก โดยอธิบายความสัมพันธ์ของขนาด

อนุภาค ไคโตแซนต่อการตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบ systemic immune response แต่ไม่ได้อธิบายถึง พลของขนาดอนุภาค ไคโตแซนต่อการตอบสนองแบบ mucosal immune response ซึ่งเป็นกลไกหลัก ในการป้องกันการติดเชื้อบริเวณเยื่อบุผิว

อย่างไรก็ตามจากการวิจัยของ Kobiasi et al. (2012) พบว่า อนุภาค ไคโตแซนขนาด ใหญ่ 4.5 μm ถูกกักเก็บเข้าเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน ได้ดีกว่าอนุภาค ไคโตแซนขนาดเล็ก 200 nm และปริมาณการเข้าสู่เซลล์ของอนุภาค มีความแตกต่างกันตามชนิดของเซลล์ และขนาดของอนุภาค แต่พบว่าอนุภาคขนาดเล็ก 200 nm สามารถนำส่งแอนติเจนจากการฉีดบริเวณฝ่าเท้าหมุดลงไปยัง popliteal lymph nodes บริเวณขาหลังของหมุดลง ได้ดีกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ 4.5 μm สอดคล้อง กับรายงานการวิจัยวิจัยของ Henriksen-Lacey et al. (2011) ซึ่งพบว่า liposome ขนาดเล็ก ($< 1 \mu\text{m}$) สามารถนำส่งแอนติเจนไปยังอวัยวะน้ำเหลืองต่างๆ ได้ดีกว่าอนุภาคที่มีขนาดใหญ่กว่า ทั้งอนุภาค ขนาดกลาง ($1 \mu\text{m}$) ใหญ่ ($2 \mu\text{m}$) และใหญ่พิเศษ ($> 3 \mu\text{m}$) ตามลำดับ ซึ่งพบว่าอนุภาคขนาดเล็ก สามารถกระตุ้น IL-10 ซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้นการหลัง IL-4 ได้ดีกว่าอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ และอนุภาค ขนาดกลางสามารถกระตุ้น IFN- γ ได้ดีกว่าอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ Vila et al. (2005) พบว่า การนำส่งแอนติเจนจากบริเวณเยื่อบุ粘膜 ไปยังอวัยวะต่างๆ ขึ้นกับขนาดอนุภาคนำส่งและระบบ นำส่งแอนติเจนของร่างกายที่มีความจำเพาะกับอวัยวะนั้น โดยอนุภาคที่มีขนาดนาโนเมตรถูกนำส่ง ไปกักเก็บได้มากในบริเวณต่อมน้ำเหลือง ระบบทางเดินอาหาร ปอด น้ำมัน และตับ ตามลำดับ จาก รายงานการวิจัยของ He et al. (2010) พบว่าหลังการฉีด ไคโตแซน nano-particle ที่เคลือบเข้าสู่เส้นเลือดดำ โดยตรง อนุภาคที่มีขนาดเล็กถูกนำส่งไปยังอวัยวะต่างๆ ได้ดีกว่าอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Krishakumar et al. (2012) ซึ่งพบว่าอนุภาคนำส่งวัคซีนขนาดเล็ก มีแนวโน้มกระตุ้นภูมิคุ้มกันบริเวณเยื่อบุผิว ได้ดีกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ ซึ่งนักวิชาชีวนิคและขนาด ของระบบนำส่งวัคซีนแล้ว ชนิดและปริมาณของ APCs บริเวณที่ได้รับแอนติเจน และระบบ การนำส่งและกักเก็บแอนติเจนของอวัยวะต่างๆ ที่มีความแตกต่างกัน อาจทำให้การตอบสนองของ ระบบภูมิคุ้มกันบริเวณเยื่อบุผิวแต่ละบริเวณแตกต่างกันได้ (Kobilasi et al., 2012; Park and Babensee, 2012)

ตารางที่ 2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของอนุภาคนำเสนอวัสดุที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันของวัคซีนที่ให้ทางชุมชนกับตัววัสดุ

ขนาดนำส่ง	ขนาดอนุภาค (nm)	แม่นติจัน	การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน	เอกสารอ้างอิง
การนำส่งวัคซีนทางชุมชนด้วยอนุภาคขนาดใหญ่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าอนุภาคขนาดเล็ก				
Poly(D,L-lactic-co-glycolic) acid (PLGA) nanoparticles	1,000 nm, 500 nm และ 200 nm	BSA	การนำส่งวัคซีนด้วยอนุภาคขนาด 1,000 nm กระตุ้นภูมิคุ้มกัน IgG ในผู้รับ ได้ดีกว่าอนุภาคขนาด 500 nm และ 200 nm ตามลำดับ	Gutierrez et al. (2002)
Polypropylene sulfides nanoparticles	200 nm และ 30 nm	OVA	การนำส่งวัคซีนด้วยอนุภาคขนาด 200 nm spanning systemic immune response ได้ดีกว่าอนุภาคขนาด 30 nm เมื่อประเมิน systemic immune response จากการดับ IgG และระดับ IgA ในผู้รับ และ mucosal immune response จากการดับ sIgA ในผู้ล่าຍ น้ำลายหลอดลม (bronchoalveolar lavage) ผู้ล่าຍ และมูสต์คลิฟท์	Stano et al. (2012)
การนำส่งวัคซีนทางชุมชนที่มีพนักงานเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกัน				
Chitosan nanoparticles	400 nm, 1 μm และ 3 μm	OVA	การนำส่งวัคซีนด้วยอนุภาค ทั้ง 3 ขนาด กระตุ้นภูมิคุ้มกัน IgG ในผู้รับได้ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ	Nagamoto et al. (2004)
Liposome	1,000 nm, 400 nm และ 100 nm	TT	การนำส่งวัคซีนทั้ง 3 ขนาด กระตุ้น IgG ในผู้รับได้ไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ	Tafaghodi et al. (2007)

ตารางที่ 2.2 งานวิจัยที่ศึกษาความต้านทานพันธุ์ระหว่างน้ำดูดของอนุภาค nano ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายที่ทำทางชั้นตัวที่หก (๗๐)

ชนิด nano	ขนาดอนุภาค (nm)	แอนติเจน	การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน	เอกสารอ้างอิง
การนำส่วน tửของภูมิคุ้มกันผ่านทางชั้นตัวที่หก				
TMC coated PLGA nanoparticles	274 nm, 445 nm และ 729 nm	HBsAg	การนำส่วน tửของภูมิคุ้มกันผ่านทางชั้นตัวที่หกของอนุภาค nano สำหรับภูมิคุ้มกัน	Krishnakumar et al. (2012)
การนำส่วน tửของภูมิคุ้มกันผ่านทางชั้นตัวที่หกของอนุภาค nano สำหรับภูมิคุ้มกัน				
Chitosan nanoparticles	400 nm, 1 μm และ 3 μm	OVA	การนำส่วน tửของภูมิคุ้มกันผ่านทางชั้นตัวที่หกของอนุภาค nano สำหรับภูมิคุ้มกัน ได้แก่ IgA ในชีรีม IgA ไคติกิว่าอนุภาค nano 3 μm	Nagamoto et al. (2004)
Liposome	1,000 nm, 400 nm และ 100 nm	TT	การนำส่วน tửของภูมิคุ้มกันผ่านทางชั้นตัวที่หกของอนุภาค nano 100 nm สำหรับภูมิคุ้มกัน IgA ในน้ำเสื้อ ไคติกิว่าอนุภาค nano 400 nm และ 1,000 nm	Tafaghodi et al. (2007)
Sulfobutylated poly(vinyl alcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles	100 nm, 500 nm และ 1 μm	TT	การนำส่วน tửของภูมิคุ้มกันผ่านทางชั้นตัวที่หกของอนุภาค nano 100 nm สำหรับภูมิคุ้มกัน IgA ในน้ำเสื้อ ไคติกิว่าอนุภาค nano 500 nm และขนาดใหญ่กว่า 1 μm	Jung et al. (2001)

2.4 แอนติเจนและการให้วัคซีนทางจมูกในสัตว์ทดลอง

2.4.1 แอนติเจน

แอนติเจนที่ใช้เป็นแอนติเจนต้นแบบในการพัฒนาระบบนำส่งวัคซีนทางจมูก มีหลายชนิด เช่น วัคซีนป้องกันบาดทะยัก (tetanus toxoid ; TT), วัคซีนป้องกันคอตีบ (diphtheria toxoid; DT), bovine serum albumin (BSA) และ โอลูบูมิน (ovalbumin; OVA) (Kang et al., 2009) ถึงแม้ว่า tetanus toxoid และ diphtheria toxoid จะสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดี แต่แอนติเจนที่ถูกทดสอบเป็น toxoid ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นในรูปโปรตีนเชิงช้อน ทำให้แอนติเจนที่ได้นักมีชีนส่วนอื่น เป็นเพียง อีกทั้งการที่ต้องผ่านกระบวนการสกัดหลากหลายขั้นตอน ทำให้แอนติเจนมีความคงตัวต่ำ ต่างจาก BSA และ โอลูบูมินซึ่งอยู่ในรูปโปรตีโนิสระ แต่เนื่องจาก BSA มีความสามารถตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ดีจึงใช้ในการศึกษาการต่อต้านทางภูมิคุ้มกันต่างๆ ส่วน โอลูบูมินซึ่งกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ ไม่ดีนัก ถูกใช้ในการศึกษาความสามารถในการเสริมฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันของระบบนำส่ง หรือแอคเคจวนท์ (Cohen and Bernstein, 1996) โดยพบว่าการให้โอลูบูมินปริมาณ 20 µg ทางจมูกโดยใช้ N-trimethyl chitosan nanoparticles เป็นระบบนำส่งในรูปแบบ nasal drop เมื่อให้ทางจมูกทุก 3 สัปดาห์ เป็นจำนวน 3 ครั้ง สามารถกระตุ้นการเพิ่มระดับ sIgA, IgG และ cell-mediated immune response ได้ (Slutter and Jiskoot, 2010)

2.4.2 การให้วัคซีนทางจมูกในสัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองขนาดเล็กที่นำมาใช้ทดสอบการนำส่งยา หรือวัคซีนทางจมูก มีหลายชนิด เช่น กระต่าย หนู rat และหนู mice เป็นต้น แต่พบว่าผนังกั้นช่องจมูกของหนู rat ปิดไม่สนิท ทำให้มีช่องว่างระหว่างช่องจมูก และพบช่องต่อระหว่างช่องจมูกกับช่องปาก (nasal palatine tract) ทำให้ขนาดยาที่ให้ทางจมูกมีความคลาดเคลื่อน (Harkema et al., 2006) อีกทั้งความแตกต่างทางพันธุกรรมมีผลต่อการแสดงออกทางภูมิคุ้มกันค่อนข้างมาก การทดลองส่วนใหญ่จึงนิยมใช้หนู mice ชนิด inbred ซึ่งมีลำดับพันธุกรรมใกล้เคียงกัน จึงช่วยลดความแตกต่างภายในการทดลองและทำให้ได้ผลการทดลองได้ชัดเจนและใช้จำนวนสัตว์ทดลองน้อยกว่าชนิด outbred เช่น กระต่าย หนูตะเภา (guinea pigs) หนูแรท (rat) รวมถึงหนู mice ชนิด outbred บางสายพันธุ์ (Frank and Griffin, 2002) สำหรับหนู mice ชนิด inbred ที่นิยมใช้ทดสอบฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันจาก วัคซีน ทางจมูก ก็อ หนูสายพันธุ์ Balb/c เนื่องจากสามารถเห็นผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ชัดเจน ทั้งการเพิ่มระดับ sIgA, IgG และ cell-mediated immune-response (Slutter and Jiskoot, 2010) นอกจากนี้พบว่า หนูเพศเมียตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าเพศผู้ อีกทั้งมีความก้าวกระวนห้ออยกว่าหนูเพศผู้ สามารถเลี้ยงรวมกันเป็นกลุ่มได้ จึงนิยมใช้หนูเพศเมียสายพันธุ์ Balb/c ในการทดสอบฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันของวัคซีน ซึ่งมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันคล้ายคลึงกับการตอบสนองในคน

(Zaman et al., 2013) โดยหนู mice ตัวเต็มวัย อายุ 6-8 สัปดาห์ มีช่องจมูกยาวประมาณ 5 cm ความจุรวม 32 cm³ พื้นที่ผิวน้ำ 280 cm² พื้นที่ส่วนใหญ่ของช่องจมูก คือ ส่วน respiratory region ประมาณร้อยละ 48 ของพื้นที่ทั้งหมด อยู่ลึกจากจมูกประมาณ 0.2 cm (Gross, 1982) ปริมาณรวมของวัคซีนที่ให้ทางจมูกต้องไม่เกิน 50 μL เพื่อป้องกันวัคซีนส่วนเกินเข้าสู่ปอดและทางเดินอาหาร (Hobson et al., 2003)

การนำสลบที่ใช้ในหนู mice โดยทั่วไปใช้การรวมสลบ (inhalatory anesthesia) ด้วย ether ซึ่งมีข้อเสียคือ therapeutic index ต่ำและระยะเวลาการออกฤทธิ์สั้น ปัจจุบันจึงมีการใช้ sevoflurane ซึ่งมีความปลอดภัยสูงและมีระยะเวลาการออกฤทธิ์นานกว่า ether อย่างไรก็ตาม การนำสลบโดยใช้สารดังกล่าวไม่เหมาะสมในการนำสลบหนูเพื่อทำการให้วัคซีนทางจมูกเนื่องจาก ether มีผลต่อการดูดซึมผ่านเยื่อบุจมูกและ sevoflurane มีผลต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสัตว์ทดลอง สารนำสลบที่นิยมใช้ในหนูทดลองเพื่อให้วัคซีนทางจมูกคือ ketamine (80 – 100 mg/kg) ผสม xylazine (8-16 mg/kg) ให้โดยการฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal injection; IP) ซึ่งไม่เพบรายงานการรบกวนการดูดซึมสารทางเยื่อบุจมูกหรือมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน ทั้งนี้ ketamine มีฤทธิ์นำสลบได้ดี แต่ฤทธิ์ลดความเจ็บปวดน้อย จึงจำเป็นต้องผสม xylazine เพื่อเสริมฤทธิ์ลดปวด โดยระยะเวลาออกฤทธิ์นำสลบของ ketamine/xylazine ประมาณ 60-120 นาที และฤทธิ์ลดความเจ็บปวดประมาณ 20-30 นาที แต่การนำสลบอาจทำให้เกิดการสำลัก และอาเจียน ของสัตว์ทดลอง จึงควรคงน้ำและอาหารอย่างน้อย 2-4 ชั่วโมง ก่อนการนำสลบ (Flecknell, 2009; Green et al., 1981)

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 สารเคมี

Acrylamide/Bis Acrylamide 29:1 (AccuGelTM, National diagnostics, England), BCA protein assay reagent A (Thermo scientific, Germany), Bovine serum albumin (BSA) (Sigma, USA), Chitosan (CS) MW 100 kDa 95 % DD (Seafresh, Thailand), Fetal bovine serum (GibcoTM, Invitrogen, USA), Horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat anti-mouse IgG (Invitrogen, USA), Horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat anti-mouse IgA (Invitrogen, USA), Ketamine hydrochloride (Gedeon Richter, Hungary), Mouse IFN- γ ELISA kits (BD OptEIATM, BD Biosciences, USA), Mouse IL-4 ELISA kits (BD OptEIATM, BD Biosciences, USA), Ovalbumin (OVA) grade V 44kDa (Sigma, USA), Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) (Sigma, USA), Pilocarpine (Sigma, USA), Penicillin/streptomycin solution (GibcoTM, Invitrogen, USA), Protein ladder (BenchMarkTM, Invitrogen, USA), RPMI-1640 (GibcoTM, Invitrogen, USA), Silver staining kit(AMRESCO, USA), Sodium dodecyl sulfate (Ajax chemical, Australia), Sodium tripolyphosphate (TPP) (Sigma, USA), TMB ELISA substrate (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) (Invitrogen, USA), Trypsin inhibitor (Invitrogen, USA), Xylazine hydrochloride (LBS laboratory, Thailand)

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

Double beam spectrophotometer (UV-2101PC, Shimadsu, Japan), Freeze dryer (Martin Christ GmbH, Osterode am Harz, Germany), Gel electrophoresis set (Mini-PROTEAN[®]3Cell, Bio-Rad, USA), Microplate reader (MRX Revelation, Dynex Technologies, USA), Particle size analyzer (Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments, UK), Ultracentrifuge (OptimaTM L-100K ultracentrifuge, Beckman, UK)

3.3 สัตว์ทดลอง

หนู mice พันธุ์ Balb/c เพศเมีย อายุ 5-6 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 20-25 g จำนวน 30 ตัว จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล หนูถูกเลี้ยงที่ห้องสัตว์ทดลองของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อย่างน้อย 1 สัปดาห์ก่อนการทดลอง โดยให้อาหารสำเร็จรูป ตามมาตรฐานของสำนักสัตว์ทดลอง และดื่มน้ำตลอดเวลา เปรี้ยงอาหารและน้ำดื่มน้ำทุก 2 วัน เปรี้ยงวัสดุรองนอนทุก 3 วัน สภาพที่ใช้ในการเลี้ยง คือ อุณหภูมิ $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ความชื้นสัมพัทธ์ 55-60% ระยะเวลาที่สัมผัสแสง คือ มีแสง 12 ชั่วโมง และปิดไฟ 12 ชั่วโมง หนูถูกคงอาหารและน้ำ ก่อนให้วัคซีน 2 ชั่วโมง (Mangal et al., 2011) โดยการทดลองในสัตว์ทดลอง ได้รับอนุมัติการใช้สัตว์ทดลองจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี (Ethics committee) (ID 3/2555/thesis)

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

ส่วนที่ 1 การคัดเลือกตัวรับไคโตแซนนาโนพาร์ทิคิลเพื่อนำส่งวัคซีนทางชุมชน

3.4.1 การตั้งตัวรับไคโตแซนนาโนพาร์ทิคิล

เตรียมไคโตแซนนาโนพาร์ทิคิลด้วยวิธี ionotropic gelation คัดแปลงจากวิธีของ Kim and Kang (2008) โดยละลายไคโตแซนใน 1% w/v acetic acid ที่ปรับ pH เป็น 3.5 ด้วย 1 N NaOH จากนั้นหยด TPP ความเข้มข้น 1 mg/mL ลงไปในสารละลายไคโตแซนซึ่งปั่นด้วย magnetic stirrer ความเร็ว 1000 rpm ตลอดเวลา และปรับเปลี่ยนความเข้มข้น ปริมาณไคโตแซน และปริมาณ TPP เพื่อให้ได้ไคโตแซนนาโนพาร์ทิคิลตัวรับต่างๆ ดังตารางที่ 3.1

กักเก็บโอลบูมิน (ovalbumin; OVA) โดยเติมโอลบูมินใน TPP ก่อนทำปฏิกิริยา กับสารละลายไคโตแซน ความเข้มข้นสุดท้ายของโอลบูมินหลังเตรียมตัวรับเป็น 0.5 mg/mL ปั่นทึ้งไว้ 1 ชั่วโมง จากนั้นเก็บไคโตแซนนาโนพาร์ทิคิล ด้วยการปั่นเหวี่งที่ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 30 นาที เก็บส่วนตะกอน (precipitate) และส่วนสารละลายใส่ด้านบน (supernatant) นำอนุภาค ในส่วนตะกอนมากระจายตัวใน phosphate buffer (PBS) pH 7.4 เพื่อใช้ทดสอบต่อไป อนุภาค อีกส่วนหนึ่งนำไปทำให้อoze ในรูปทรงแห้งด้วยวิธี freeze-drying ตามวิธีของ Prego et al. (2010) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้ทดสอบความคงตัวและฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลองต่อไป

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของคำรับไคโটแซนนาโนพาร์ทิคิล จำนวน 9 คำรับ

คำรับที่	1	2	3	4	5	6	7	8	9
สัดส่วนโดยมวล ไคโটแซนต่อ TPP	3:1			4:1			5:1		
ความเข้มข้นของ ไคโটแซน (mg/mL)	1	2	3	1	2	3	1	2	3
ปริมาณสารละลายน้ำ ไคโটแซน (mL)	31.5	25.2	21	33.6	28	24	35	30	26.25
ปริมาณ TPP (mL) ความเข้มข้น 1 mg/mL	10.5	16.8	21	28	14	18	7	12	15.75
ปริมาณ OVA (mg)	21	21	21	21	21	21	21	21	21
ปริมาตรรวม (mL)	42	42	42	42	42	42	42	42	42

3.4.2 การประเมินคุณสมบัติของไคโটแซนนาโนพาร์ทิคิล

3.4.2.1 คุณสมบัติทางกายภาพของไคโಟแซนนาโนพาร์ทิคิล

การประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของไคโটแซนนาโนพาร์ทิคิล ทำโดยวัดขนาดและประจุที่ผิวนูภาค วิธีทดลองคัดแปลงจากวิธีของ Csaba et al. (2009b) โดยกระเจยอนุภาคในน้ำปราศจาก ไอออน (deionized water; DI) ที่กรองผ่านแม่เบรนขนาด $0.2 \mu\text{m}$ วัดขนาดและประจุที่ผิวนูภาคด้วยเครื่อง particle size analyzer ซึ่งใช้เทคนิค photo correlation spectroscopy (PCS) ของอนุภาคที่เคลื่อนที่แบบ Brownian ที่อุณหภูมิ 25°C และมีค่ามุกการวัดการกระจายของแสง (angle detection) เท่ากับ 90° ทำซ้ำสามครั้งในแต่ละคำรับ แสดงผลของขนาดอนุภาคในรูปค่าเฉลี่ยของอนุภาค และค่าเฉลี่ยของการกระจายตัวของขนาดอนุภาค (polydispersion index; PDI) และแสดงผลค่าประจุที่ผิวนูภาคในรูปชนิดและค่าประจุทางไฟฟ้าเฉลี่ย โดยคำนวณจากค่า electrophoretic mobility

3.4.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณแอนติเจนที่กักเก็บ และบรรจุในไคโಟแซนนาโนพาร์ทิคิล

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนบนผิวนูภาคโดยวิธี BCA protein assay คัดแปลงจากวิธีของ Walker (2002) ทำโดยเตรียม working reagent (WR) จาก BCA protein assay reagent A กับสารละลายน้ำ cupric sulfate (5X hydrated) 40 mg/mL ในสัดส่วน 50:1 โดยปริมาตร ผสม WR

1 mL กับสารละลายน้ำมีความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 50 μL บ่มที่อุณหภูมิ 60°C นาน 30 นาที ทั้งไว้จนมีอุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดซึมแสงที่ความยาวคลื่น 562 nm ด้วยเครื่อง double beam spectrophotometer สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดซึมแสง และความเข้มข้นของสารละลายน้ำมี เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณไอลูบูมิน

1) การกักเก็บแอนติเจน (encapsulation efficiency: EE) โดยใช้หลักการวิเคราะห์ทางอ้อม (indirect method) (Sadeghi et al., 2008a) โดยหาปริมาณโปรตีนที่กักเก็บได้จากปริมาณโปรตีนทั้งหมดหักลบด้วยโปรตีนที่เหลือในชั้น supernatant การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทำโดยวิธี BCA assay และคำนวณหาร้อยละของการกักเก็บแอนติเจน (% encapsulation efficiency: % EE) จากสมการ

$$\% \text{EE} = [(A-B)/A] \times 100 \quad (3.1)$$

เมื่อ A คือ ปริมาณแอนติเจนทั้งหมดที่ใช้เตรียมสำรอง (mg)

B คือ ปริมาณแอนติเจนที่วิเคราะห์ได้จากชั้น supernatant (mg)

2) การบรรจุแอนติเจน (loading capacity: LC) คือ ความสามารถในการบรรจุแอนติเจนในสำรอง แสดงค่าเป็นร้อยละการบรรจุแอนติเจน (% loading capacity: % LC) ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยมวลของแอนติเจนที่กักเก็บได้ในสำรองต่อน้ำหนักของสำรองดังสมการ (Borges et al., 2008)

$$\% \text{LC} = [(A-B)/C] \times 100 \quad (3.2)$$

เมื่อ A คือ ปริมาณแอนติเจนทั้งหมดที่ใช้เตรียมสำรอง (mg)

B คือ ปริมาณแอนติเจนที่วิเคราะห์ได้จากชั้น supernatant
ทั้งหมด (mg)

C คือ น้ำหนักของไคลโตเซนนาโนพาร์ทิเคิลหลังเตรียม
ในรูปผงแห้ง (mg)

3.4.2.3 การปลดปล่อยแอนติเจนที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคล

การทดสอบการปลดปล่อยไอโววัลบูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคลที่ pH และเวลาต่างๆ ดังแปลงจากวิธีของ Mangal et al (2011) โดยนำไอโววัลบูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคล น้ำหนัก 1 mg มากระชายตัวใน PBS ที่ pH 7.4, 6.8 และ 4.5 ปริมาตร 1.5 mL ซึ่งผสาน sodium azide 0.01 % w/w เพื่อยับยั้งการเริ่มต้นโดยของเชื้อจุลชีพ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เข้าด้วยความเร็ว 50 rpm จากนั้นนำมาปั่นเหมี่ยงที่ 14,000 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 30 นาที แยกส่วน supernatant น้ำวิเคราะห์หาปริมาณแอนติเจนด้วยวิธี BCA protein assay วิเคราะห์การปลดปล่อยแอนติเจนจากไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคล ที่เวลา 1, 3, 6 และ 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บตัวอย่าง ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน และเก็บแอนติเจนที่ปลดปล่อยบางส่วน เพื่อทดสอบความคงตัวของแอนติเจนต่อไป

3.4.2.4 การทดสอบความคงตัว

1) การทดสอบความคงตัวทางกายภาพของระบบนำส่ง โดยประเมินจากการเปลี่ยนแปลงขนาดและประจุที่ผิวนูภาค ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2.1 ทึ้งก่อนและหลังการเตรียมในรูปผงแห้งในภาชนะที่ปิดสนิท และเก็บพันแสง ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 3 เดือน (Grenha et al., 2005)

2) การทดสอบความคงตัวของแอนติเจนที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคล ทึ้งก่อนและหลังการเตรียมในรูปผงแห้งที่เวลาต่างๆ นำไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคลที่กักเก็บไอโววัลบูมินมากระชายตัวใน pH 4.5 เพื่อให้เกิดการปลดปล่อยแอนติเจน นำไอโววัลบูมินที่ถูกปลดปล่อยมาวิเคราะห์ความคงตัวด้วยเทคนิค sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ซึ่งดังแปลงจากวิธีของ Lameiroet et al. (2006) ภายใต้ความต่างศักยไฟฟ้า 125 mV บนแผ่น 7.5% SDS-polyacrylamide gel โดยใช้ BenchMark™ protein ladder ขนาด 10-220 kDa เป็นตัวเทียบขนาดโปรตีน และใช้ไอโววัลบูมินที่ละลายใน PBS pH 7.4 เป็น positive control ข้อมูลในโปรตีนที่แยกได้ด้วย silver staining kit โดยแช่แผ่นเจลใน fixative solution แล้วบ่มแผ่นเจลที่ได้ใน sensitizer solution นาน 2 นาที ข้อมูลเจลด้วย silver stain solution ทึ้งไว้ 20 นาที แล้วทำการปฏิกริยาด้วย developer solution จนเห็นແฉบุโปรตีนอย่างชัดเจน จึงหยุดปฏิกริยาด้วย stop solution เปรียบเทียบขนาดของແฉบุโปรตีนตัวอย่างกับ positive control และ protein ladder

3.4.3 การคัดเลือกตัวรับไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลเพื่อนำส่งวัสดุชีนทางชุมชน

คัดเลือกตัวรับไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วงอนุภาค 3 ขนาด คือ ขนาดใหญ่ ($1,000 - 5,000 \text{ nm}$) ขนาดกลาง ($500 - 1,000 \text{ nm}$) และขนาดเล็ก ($< 500 \text{ nm}$) เพื่อเป็นตัวแทนของขนาดอนุภาคแต่ละช่วงขนาดอนุภาค ช่วงขนาดละ 1 ตัวรับ เกษท์ในการคัดเลือกตัวรับให้ได้จำนวน 3 ตัวรับ คือ เป็นตัวรับที่มีความคงตัวทางกายภาพ มีปริมาณ การกักเก็บและบรรจุแอนติเจนสูง มีการปลดปล่อยแอนติเจนที่ pH 4.5 ในปริมาณสูงและ มีการปลดปล่อยเพียงเดือนน้อยที่ pH 6.8 และ 7.4 โดยไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล และแอนติเจน ที่กักเก็บในตัวรับมีความคงตัวลดลง

ส่วนที่ 2 การประเมินฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันหลังให้วัสดุชีนทางชุมชนในสัตว์ทดลอง

3.4.4 การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง

3.4.4.1 การให้วัสดุชีนในสัตว์ทดลอง

แบ่งหนูทดลองเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว แต่ละกลุ่มให้ได้รับวัสดุชีนทางชุมชน ดังนี้

กลุ่ม I ได้รับสารละลายโอลบูมินปริมาณ $20 \mu\text{g}$ ใน PBS pH 7.4

กลุ่ม II ได้รับโอลบูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดใหญ่

กลุ่ม III ได้รับโอลบูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดกลาง

กลุ่ม IV ได้รับโอลบูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดเล็ก

กลุ่ม V ไม่ได้รับสารใด ๆ

โดยกระจายไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลในน้ำประชาจากไออ่อน สารที่ให้ทางชุมชนทุกกลุ่มทดลองถูกปรับให้มีปริมาตร $20 \mu\text{L}$ และแบ่งให้ทางชุมชน ข้างละ $10 \mu\text{L}$ หนูที่ได้ โอลบูมิน ที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล จะได้รับโอลบูมินในปริมาณที่เท่ากันทุกตัว คือ $20 \mu\text{g}$

การให้วัสดุชีนทางชุมชนคัดแบ่งจากวิธีของ Hobson et al. (2003) ทำโดย สลบหนูด้วย 2% ketamine ผสม 0.2% xylazine ทาง intraperitoneal injection (IP injection) ปริมาณ 0.1 mL แล้วจับหนูนอนหงาย ใช้ไมโครไปเป็ตสอดเข้าทางรูช่องคลีก 0.2 cm เพื่อให้วัสดุชีน และ ให้นอนในท่าดังกล่าว 5 นาที ให้วัสดุชีนเข้าในสัปดาห์ที่ 3 และ 6 และซ้ำหนูในสัปดาห์ที่ 9

ของการทดลอง ประเมินผลข้างเคียงของการได้รับวัคซีน จากการประเมินพยาธิวิทยา宏观 (gross pathology) จากรูปร่าง ขนาด และสีของปอด ตับ ม้าม และไห ซึ่งเป็นอวัยวะสำคัญที่มีการสะสมของโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคลสูง (He et al., 2010) และวัดการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักหุ่นทดลองหลังได้รับวัคซีนทุกสัปดาห์ โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมกลุ่มที่ V (Makidon et al., 2008)

3.4.4.2 การเก็บตัวอย่าง

1) เก็บตัวอย่างเดือดจาก tail vein ทุก 3 สัปดาห์ โดยเก็บตัวอย่างเดือดประมาณ 0.2 ml ต่อตัว ทิ้งให้แข็งตัวข้ามคืน (overnight) ที่อุณหภูมิ 4°C แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 20 นาที เก็บชิ้นที่อุณหภูมิ -20°C

2) เก็บตัวอย่างมูลหมูทุก 3 สัปดาห์ โดยแยกหมูในกรงเลี้ยงเดี่ยว ระหว่างเวลา 15.00 น. ถึง 9.00 น. แล้วสูบน้ำเก็บตัวอย่างมูลมา 20 ก้อนต่อหุ่นหนึ่งตัว นำตัวอย่างที่ได้มากระชาบทัวใน PBS pH 7.4 ที่ผสม trypsin inhibitor ความเข้มข้น 0.1% w/v และ sodium azide ความเข้มข้น 0.01% w/v ให้ได้ความเข้มข้นของมูลหมู 0.5 g/mL จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเบี้ยว vertex mixer และปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 30 นาที แยกส่วน supernatant เก็บที่อุณหภูมิ-20°C (Moschos et al., 2005)

3) เก็บตัวอย่างน้ำลายเมื่อสิ้นสุดการทดลอง โดยกระตุนหุ่นด้วย pilocarpine โคลบิวชี IP injection ขนาด 2.5 µg ต่อน้ำหนักตัวหุ่นหนึ่งกรัม เก็บตัวอย่างในช่วง 20 นาทีแรก อุ่นตัวอย่างที่อุณหภูมิ 56°C นาน 15 นาที แยกส่วน supernatant ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที

4) เก็บตัวอย่างน้ำล้างช่องคลอด (vaginal lavage) ในสัปดาห์สุดท้ายของการทดลองโดยการสวนล้างด้วยสารละลาย bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 1 % w/v ใน PBS pH 7.4 ปริมาตร 50 µLสวนล้างซ้ำๆ ด้วยสารละลายเดิน 9 ครั้ง

5) เก็บตัวอย่างน้ำล้างโพรงจมูก (nasal lavage) โดยนำหุ่นด้วยการฉีด ketamine ผสม xylazine ขนาดมากกว่า 200 mg และ 16 mg ต่อน้ำหนักตัวหุ่นหนึ่งกรัม ตามลำดับ ตัดคอหุ่นล้างโพรงจมูกหุ่นซ้ำๆ ด้วยสารละลาย BSA ความเข้มข้น 1 % w/v ใน PBS pH 7.4 ปริมาตร 200 µL ผ่านทางรูจมูกหุ่นและหลอดคลื่น ทำซ้ำ 3 ครั้ง

ตัวอย่างน้ำลาย น้ำล้างช่องคลอด และน้ำล้างโพรงจมูก ถูกเก็บที่อุณหภูมิ -20°C โดยใช้ phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) ความเข้มข้น 100 mM เป็น protein inhibitor (Mangal et al., 2011)

3.4.4.3 การทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ humoral immune response

การวิเคราะห์ปริมาณ IgG และ sIgA ด้วยแปลงจากวิธีการของ Slutter et al., 2010 โดยละลายไอโววัลนูมินใน carbonate buffer pH 9.5 ให้ได้ความเข้มข้น 100 µg/mL เติมสารละลายไอโววัลนูมินลงใน 96 well plate หลุมละ 100 µL บ่มที่อุณหภูมิ 4°C นาน 24 ชั่วโมง ล้างออกด้วย Tween 20 ความเข้มข้น 0.05% w/v ใน PBS (PBST) จำนวน 2 ครั้ง แล้วเคลือบด้วย BSA ความเข้มข้น 1 % w/v ใน PBS pH 7.4 (เพื่อ block non-specific protein) ปริมาตร 300 µL บ่มที่ อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 2 ครั้ง เติมสารละลายตัวอย่าง แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง แล้วเติม horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat antimouse IgG สำหรับวัดระดับ IgG ในซีรัมและ horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat antimouse IgA สำหรับวัดระดับ IgA ในน้ำนมและสารคัดหลั่งต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST จำนวน 3 และ 5 ครั้งในการวิเคราะห์ IgG และ sIgA ตามคำตั้ง จากนั้นเติม TMB ELISA substrate ทึ้งไว้ 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 2 M H₂SO₄ ปริมาตร 100 µL วัดค่าการคูณกลืน แสงที่ 450 nm และคงผลของระดับ IgG และ sIgA ในรูปของ antibody titer โดยใช้ค่า logarithm ของ dilution factor ที่มีค่ามากที่สุด และมีค่าการคูณกลืนแสดงสูงกว่า background (Frey et al., 1998) ตามสูตรการคำนวณในภาคผนวก (ค.4)

3.4.3.4 การทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ cell-mediated immune response

แยก splenocytes จากน้ำนมหนูทดลองให้เป็นเซลล์เดียว โดยตัดแปลงจากวิธีการของ Brousseau et al. (1999) ด้วยการกรูดน้ำนมผ่าน sieve sterile และกำจัดเม็ดเดือดแดงด้วย ACK lysing buffer (ภาคผนวก ข) เลี้ยงเซลล์ที่ได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ complete RPMI-1640 medium ที่ผสม 1% penicillin/streptomycin solution โดยปรับความหนาแน่นของเซลล์ เท่ากับ 10^6 cell/mL เติมเซลล์ลงใน 96 well culture plates หลุมละ 100 µL และเติมไอโววัลนูมินความเข้มข้น 2 mg/mL หลุมละ 100 µL บ่มที่ 37°C 5% CO₂ นาน 3 วัน และปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 1,500 rpm นาน 10 นาที เก็บ supernatant เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ IFN-γ และ IL-4 ด้วย ELISA kits

1) การวิเคราะห์ปริมาณ IFN-γ โดยเติม capture IFN-γ antibody ใน 96 well plate หลุมละ 100 µL บ่มที่อุณหภูมิ 4°C นาน 24 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง แล้วเคลือบด้วย 10% FBS ใน PBS pH 7.0 หลุมละ 300 µL บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติม standard IFN-γ หรือตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติม detection antibody ที่ผสมเอนไซม์ peroxidase (biotinylated mouse IFN-γ+ streptavidin horseradish peroxidase) บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 7 ครั้ง

จากนั้นเติม TMB ELISA substrate ทึ้งไว้ 15 นาที หยดปฎิกริยาด้วย 2 M H₂SO₄ ปริมาตร 100 μL อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm คำนวณหาปริมาณ IFN-γ ในตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของ standard IFN-γ

2) การวิเคราะห์ปริมาณ IL-4 โดยเติม capture IL-4 antibody ใน 96 well plate หลุมละ 100 μL บ่มที่อุณหภูมิ 4°C นาน 24 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เดลีก็อบด้วย 10% fetal serum albumin (FBS) ละลายใน PBS pH 7.0 หลุมละ 300 μL บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติม standard IL-4 หรือตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติม detection antibody ที่ผสมเอนไซม์ peroxidase (biotinylated mouse IL-4 + streptavidin horseradish peroxidase) บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 5 ครั้ง จากนั้นเติม TMB ELISA substrate ทึ้งไว้ 15 นาที หยดปฎิกริยาด้วย 2 M H₂SO₄ ปริมาตร 100 μL อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm คำนวณหาปริมาณ IL-4 ในตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของ standard IL-4

3.4.5 การวิเคราะห์ผลเชิงสถิติ

ผลการทดลองแสดงในรูป mean ± SEM และวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วย one-way analysis of variance (ANOVA) ร่วมกับ Tukey's post test ยอมรับระดับความแตกต่างทางสถิติอย่างนัยสำคัญที่ p-value < 0.05 (*), p-value < 0.01 (**) และ p-value < 0.001 (***)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ส่วนที่ 1 การคัดเลือกตัวรับไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคลเพื่อนำส่งวัสดุชีนทางชุมก

4.1 คุณสมบัติทางกายภาพของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคล

การเตรียมตัวรับไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคลด้วยวิธี ionotropic gelation เพื่อให้ได้ออนุภาคที่มีประจุที่ผิวเป็นบวก และมีขนาดน้อยกว่า 5 μm โดยปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของไคโตแซน และสัดส่วนโดยมวลระหว่างไคโตแซนกับ TPP ได้ตัวรับจำนวน 9 ตัวรับ (ตารางที่ 3.1) และกักเก็บไอลูมินชั่งเป็นแอนติเจนในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคล ด้วยเทคนิค incorporation นั้น

ผลการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ ดังตารางที่ 4.1 พบว่าไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคล ตัวรับที่ 1-6 ซึ่งเตรียมจากสารละลายไคโตแซนความเข้มข้น 1 mg/mL และ 2 mg/mL จะเกิดการรวมตัวของอนุภาค ทำให้เกิดอนุภาคขนาดใหญ่ ขนาดไม่สม่ำเสมอ และไม่สามารถกระจายตัวอยู่ในน้ำกระสายยา (vehicle) ได้ เรียกอันตรกิริยาดังกล่าวว่า aggregation ซึ่งการเกิด aggregation พนอย่างรวดเร็วหลังเตรียมตัวรับ ยกเว้นตัวรับที่ 6 ซึ่งเตรียมจากสารละลายไคโตแซนความเข้มข้น 2 mg/mL โดยใช้สัดส่วนไคโตแซนต่อ TPP เท่ากับ 5:1 ทำให้ได้ออนุภาคขนาด $482.00 \pm 15.72 \text{ nm}$ อย่างไรก็ตามหลังการเก็บอนุภาคที่ 4 °C ในเวลาไม่เกิน 6 ชั่วโมงหลังเตรียมตัวรับ จะพบการ aggregation ส่วนไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคลตัวรับที่ 7-9 ซึ่งเตรียมจากสารละลายไคโตแซน ความเข้มข้น 3 mg/mL เมื่อเพิ่มสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP มีผลทำให้ออนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น คือ ขนาดของอนุภาคของสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP เท่ากับ 3:1, 4:1 และ 5:1 มีค่า $205.33 \pm 21.46 \text{ nm}$, $493.33 \pm 41.58 \text{ nm}$ และ $1,166.67 \pm 156.85 \text{ nm}$ ตามลำดับ และเมื่อเตรียมในรูปผงแห้ง จะทำให้ออนุภาคมีขนาดเพิ่มขึ้นเป็น $249.67 \pm 29.6 \text{ nm}$, $559.33 \pm 17.21 \text{ nm}$ และ $1,240.00 \pm 62.45 \text{ nm}$ ตามลำดับ และมีค่าการกระจายขนาดของอนุภาค (poly dispersity index) เท่ากับ 0.248 ± 29.6 , 0.389 ± 0.139 และ 0.361 ± 0.089 ตามลำดับ

เมื่อวัดประจุที่ผิวอนุภาค พบว่า ตัวรับที่ 7-9 มีประจุที่ผิวอนุภาคเป็นบวก กล่าวคือ มีค่าประจุที่ผิวอนุภาคระหว่าง 21 – 37 mV และค่าการกระจายขนาดของอนุภาคอยู่ระหว่าง 0.24 – 0.39 และภายนอกการเตรียมในรูปผงแห้ง พบว่า ค่าประจุที่ผิว และค่าการกระจายขนาดของอนุภาคเพิ่มขึ้นอยู่ระหว่าง 27 – 39 mV และค่าการกระจายขนาดของอนุภาคอยู่ระหว่าง 0.41 – 0.49

ตารางที่ 4.1 คุณสมบัติทางกายภาพของ "โคเตชนาในพาร์ทิคลัต์ก้าร์แบบเดินตีบิน (n = 3)

ตัวอย่างที่	CS Conc.	CS:TPP	ขนาดอนุภาค (nm)		ค่าการกระจายขนาด		ค่าประจุไฟฟ้าอนุภาค (mV)	
			ก้อน	หลัง	ก้อน	หลัง	ก้อน	หลัง
1	1	3:1	Aggregate	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2	1	4:1	Aggregate	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
3	1	5:1	Aggregate	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
4	2	3:1	Aggregate	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
5	2	4:1	Aggregate	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
6	2	5:1	482 ± 15.72	Aggregate	0.472 ± 0.034	N/A	10.31 ± 1.48	N/A
7	3	3:1	205.33 ± 21.46	248.67 ± 29.6	0.244 ± 0.021	0.413 ± 0.048	21.33 ± 0.78	27.87 ± 0.67
8	3	4:1	493.33 ± 41.58	559.33 ± 17.21	0.389 ± 0.130	0.470 ± 0.038	37.70 ± 0.85	38.67 ± 1.55
9	3	5:1	1,166.67 ± 158.85	1,240.00 ± 62.45	0.361 ± 0.089	0.488 ± 0.080	34.50 ± 5.07	36.44 ± 1.72

หมายเหตุ CS Conc. หมายถึง ความเข้มข้นของสารละลายไคโตเซน

CS:TPP หมายถึง สัดส่วนโดยมวลของไคโตเซนและ TPP

N/A หมายถึง ไม่ทุกหน่วยใช้ในการวิเคราะห์ผล (not applicable)

Aggregate หมายถึง การรวมกลุ่มของอนุภาค ทำให้ออนุภาคไม่สามารถเคลื่อนย้ายในน้ำได้

4.2 การกักเก็บ และการบรรจุแอนติเจนของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคล

ผลการกักเก็บและการบรรจุแอนติเจนของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคล แสดงในตารางที่ 4.2 พบว่า เมื่อเพิ่มสัดส่วนการเกิดอันตรายขึ้นของไคโตแซนต่อ TPP ทำให้ร้อยละของการกักเก็บ และร้อยละของการบรรจุแอนติเจนมีค่าลดลง คือ สัดส่วน โคลยมมวลของไคโตแซนต่อ TPP ของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคล คำรับที่ 7, 8 และ 9 มีค่าร้อยละของการกักเก็บลดลง เท่ากับ 76.49 ± 4.72 , 68.52 ± 6.01 และ 66.77 ± 7.95 ตามลำดับ ส่วนร้อยละของการบรรจุแอนติเจน มีค่าเท่ากับ 31.62 ± 1.52 , 27.61 ± 1.68 และ 27.03 ± 1.27 ตามลำดับ

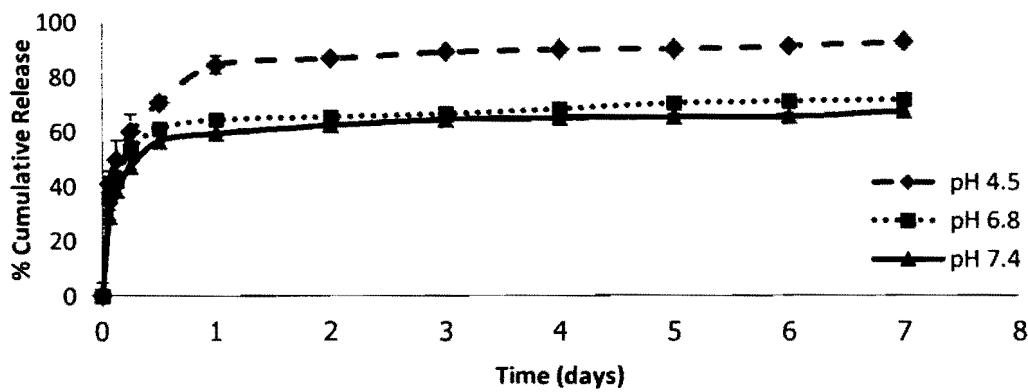
ตารางที่ 4.2 การกักเก็บ และการบรรจุแอนติเจนของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคล ($n = 3$)

ตัวบ่งชี้	CS:TPP	ร้อยละของการกักเก็บ	
		แอนติเจน	แอนติเจน
7	3:1	76.49 ± 4.72	31.62 ± 1.52
8	4:1	68.52 ± 6.01	27.61 ± 1.68
9	5:1	66.77 ± 7.95	27.03 ± 1.27

เมื่อ CS:TPP คือ สัดส่วน โคลยมมวลของไคโตแซนต่อ TPP

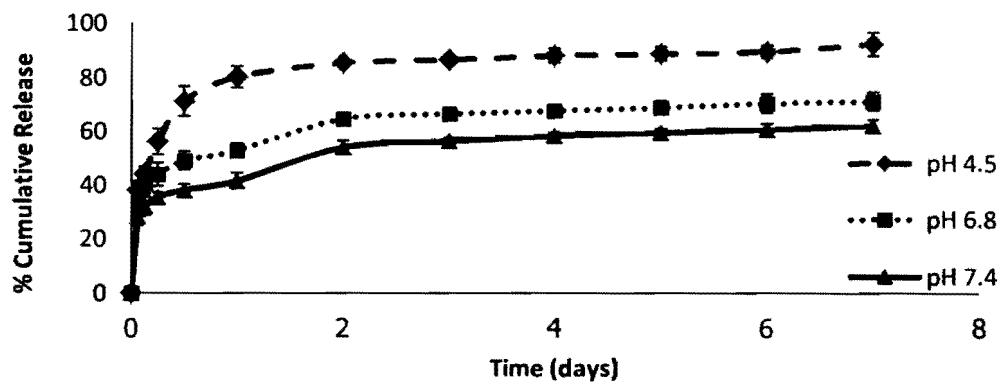
4.3 การปอดปล่อยแอนติเจนที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคล

ผลการปอดปล่อยแอนติเจนที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคลของคำรับที่ 7 - 9 ใน phosphate buffer (PBS) ที่ pH ต่างๆ กัน คือ pH 7.4, 6.8 และ 4.5 แสดงในภาพที่ 4.1 – 4.3



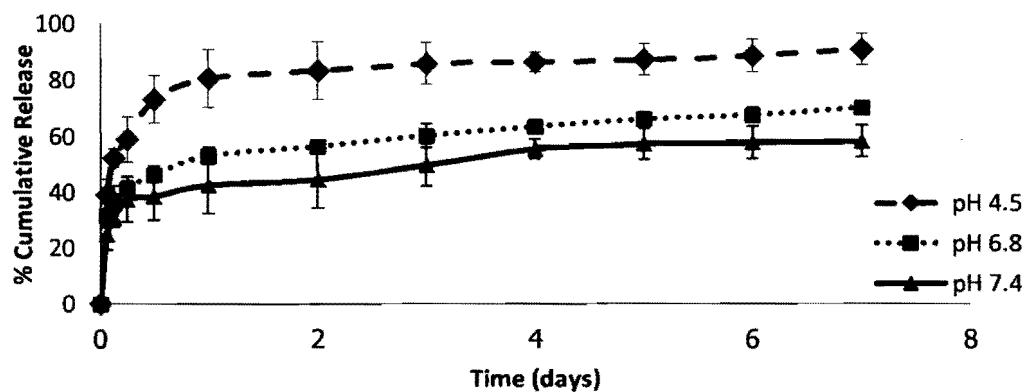
ภาพที่ 4.1 การปลดปล่อยยาอนติเจนที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล ตัวรับที่ 7 (CS:TPP เท่ากับ 3:1) ใน phosphate buffer ที่ pH ต่างๆกัน ($n=3$) อุณหภูมิ 37°C , 50 rpm

จากภาพที่ 4.1 พบว่า การปลดปล่อยยาอนติเจนที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล ตัวรับที่ 7 (CS:TPP เท่ากับ 3:1) ซึ่งอนุภาคมีขนาดเล็ก ใน PBS ที่ pH 4.5 ในวันที่ 2 และวันสุดท้ายของการทดลองมีค่าเท่ากับ ร้อยละ 86.62 ± 1.52 และ 92.34 ± 1.42 ตามลำดับ ส่วนใน PBS ที่ pH 6.8 และ 7.4 มีการปลดปล่อยยาอนติเจนในวันที่ 2 ร้อยละ 48.63 ± 1.87 และ 43.49 ± 3.32 และ มีการปลดปล่อยยาอนติเจนในวันสุดท้ายของการทดลอง เท่ากับ ร้อยละ 62.64 ± 4.20 และ 55.41 ± 9.17 ตามลำดับ



ภาพที่ 4.2 การปลดปล่อยยาอนติเจนที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล ตัวรับที่ 8 (CS:TPP เท่ากับ 4:1) ใน phosphate buffer ที่ pH ต่างๆกัน ($n=3$) อุณหภูมิ 37°C , 50 rpm

จากภาพที่ 4.2 พบว่าการปลดปล่อยยาอนติเจนที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล ตำรับที่ 8 (CS:TPP เท่ากับ 4:1) ซึ่งอนุภาคมีขนาดกลาง ใน PBS ที่ pH 4.5 ในวันที่ 2 และวันสุดท้ายของการทดลองมีค่าเท่ากับ ร้อยละ 85.20 ± 1.44 และ 92.13 ± 4.37 ตามลำดับ ส่วนใน PBS ที่ pH 6.8 และ 7.4 มีการปลดปล่อยยาอนติเจนในวันที่ 2 ร้อยละ 64.15 ± 1.94 และ 53.77 ± 2.52 และ มีการปลดปล่อยยาอนติเจนในวันสุดท้ายของการทดลอง เท่ากับ ร้อยละ 70.86 ± 3.38 และ 61.76 ± 2.16 ตามลำดับ



ภาพที่ 4.3 การปลดปล่อยยาอนติเจนที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล ตำรับที่ 9 (CS:TPP เท่ากับ 5:1) ใน phosphate buffer ที่ pH ต่างๆ กัน ($n=3$) อุณหภูมิ 37°C , 50 rpm

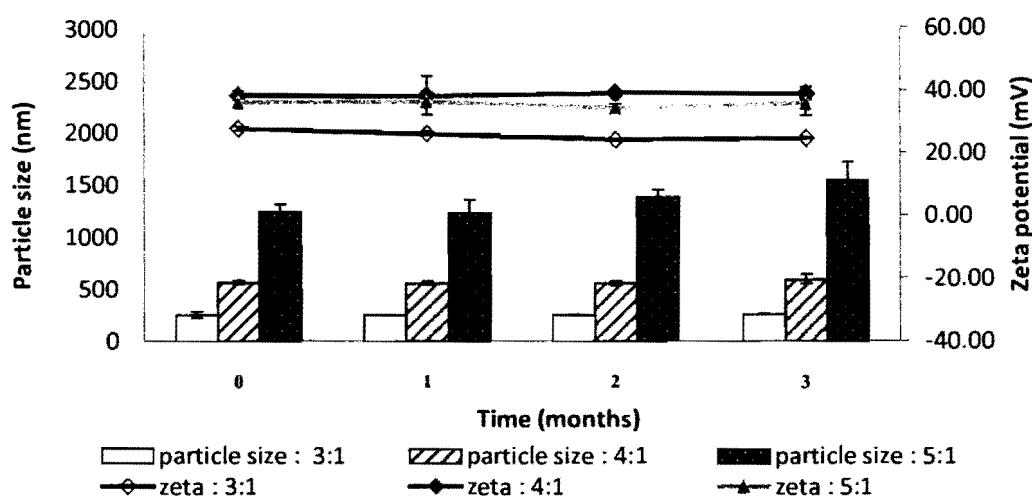
จากภาพที่ 4.3 พบว่าการปลดปล่อยยาอนติเจนที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล ตำรับที่ 9 (CS:TPP เท่ากับ 5:1) ซึ่งอนุภาคมีขนาดใหญ่ ใน PBS ที่ pH 4.5 ในวันที่ 2 และวันสุดท้ายของการทดลองมีค่าเท่ากับ ร้อยละ 83.02 ± 1.36 และ 90.50 ± 2.41 ตามลำดับ ส่วนใน PBS ที่ pH 6.8 และ 7.4 มีการปลดปล่อยยาอนติเจนในวันที่ 2 ร้อยละ 56.22 ± 2.08 และ 44.39 ± 10.28 และ มีการปลดปล่อยยาอนติเจนในวันสุดท้ายของการทดลอง เท่ากับ ร้อยละ 69.89 ± 1.93 และ 57.94 ± 5.58 ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบการปลดปล่อยยาอนติเจนที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล ทั้ง 3 ตำรับ พบว่า การปลดปล่อยยาอนติเจนมีลักษณะคล้ายคลึงกัน คือ มีอัตราการปลดปล่อยอย่างรวดเร็วในวันแรกของการทดลอง และเริ่มคงที่ในวันที่ 2 จนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง อย่างไรก็เดียวกับการปลดปล่อยยาไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลใน PBS ที่ pH 4.5 ได้ดีกว่า pH 6.8 และ 7.4 ตามลำดับ

4.4 ความคงตัวทางกายภาพของระบบนำส่ง และความคงตัวของแอนติเจนที่กักเก็บในไคโตแซน นาโนพาร์ทิเคล

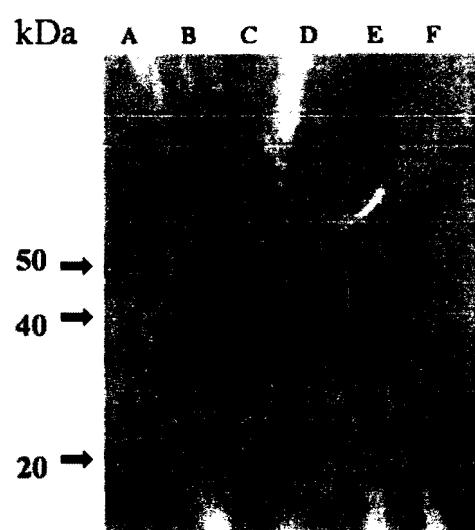
ผลการประเมินความคงตัวทางกายภาพของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคล ตัวรับที่ 7 (CS:TPP เท่ากับ 3:1), ตัวรับที่ 8 (CS:TPP เท่ากับ 4:1) และ ตัวรับที่ 9 (CS:TPP เท่ากับ 5:1) ที่เก็บในรูปทรงแห้งที่อุณหภูมิ 4°C นาน 3 เดือน พบว่า ผงแห้งของทุกตัวรับสามารถกระจายตัวในน้ำปราศจากไอออนได้สมบูรณ์ และไม่พนการเกิด aggregation ผลความคงตัวทางกายภาพของระบบนำส่งที่ประเมินจากการเปลี่ยนแปลงขนาดของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคลเทียบกับขนาดของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคลหลังเตรียมในรูปแบบผงแห้งใหม่ๆ (เดือนที่ 0 ของการทดลอง) แสดงในภาพที่ 4.4 พบว่า ทุกตัวรับจะมีขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้นเล็กน้อย เมื่อเวลาผ่านไป โดยเมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน อนุภาคตัวรับที่ 7 (3:1) มีขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้นจาก 248.67 ± 29.6 nm เป็น 255.00 ± 2.64 nm อนุภาคตัวรับที่ 8 (4:1) มีขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้นจาก 559.33 ± 17.21 nm เป็น 585.00 ± 46.130 nm และอนุภาคตัวรับที่ 9 (5:1) มีขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้นจาก $1,240.00 \pm 62.45$ nm เป็น $1,536.67 \pm 170.10$ nm ตามลำดับ

ส่วนประจุที่พิวอนุภาคของทุกตัวรับ เมื่อเวลาผ่านไป ยังคงมีค่าเป็นบวก (ภาพที่ 4.4) โดยเมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน การเปลี่ยนแปลงประจุที่พิวอนุภาคของทุกตัวรับมีค่าลดลงเล็กน้อย ค่าประจุที่พิวอนุภาคของตัวรับที่ 7 (3:1) มีค่าลดลงจาก 27.87 ± 0.67 mV เป็น 24.63 ± 0.21 mV ค่าประจุที่พิวอนุภาคของตัวรับที่ 8 (4:1) มีค่าลดลงน้อยมาก จาก 38.67 ± 1.55 mV เป็น 38.66 ± 6.22 mV และค่าประจุที่พิวอนุภาคของตัวรับที่ 9 (5:1) มีค่าลดลงน้อย จาก 36.44 ± 1.72 เป็น 35.77 ± 2.74 mV ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า การกระจายขนาดของอนุภาคทั้งสามตัวรับมีค่าน้อยกว่า 0.5 แสดงว่า ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคลในรูปทรงแห้ง มีความคงตัวทางกายภาพที่อุณหภูมิ 4 °C เมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน



ภาพที่ 4.4 ความคงตัวทางกายภาพของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่กักเก็บแอนติเจนในรูปผงแห้ง ของตัวรับที่ 7 (CS:TPP เท่ากับ 3:1), ตัวรับที่ 8 (CS:TPP เท่ากับ 4:1) และ ตัวรับที่ 9 (CS:TPP เท่ากับ 5:1) เมื่อกีบที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 3 เดือน

เมื่อทดสอบความคงตัวของโอลูบูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลและ กีบไว้ในรูปผงแห้ง ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 3 เดือน ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบร่วงแอนติเจนทั้ง 3 ตัวรับ ให้แยกโปรตีนเพียงแค่เดียว และมีขนาดเท่ากับโอลูบูมินที่ละลายใน PBS pH 7.4 โดยมีขนาดประมาณ 44 kDa (ภาพที่ 4.5) แสดงให้เห็นว่าโอลูบูมินที่กักเก็บในไคโตแซน นาโนพาร์ทิเคิลและกีบไว้ในรูปผงแห้งที่อุณหภูมิ 4 °C ไม่เกิดการเสียสภาพของโอลูบูมิน เมื่อเวลา ผ่านไป 3 เดือน



ภาพที่ 4.5 SDS-PAGE ของไอวัลบูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่เก็บในรูปทรงเหล็กที่อุณหภูมิ 4°C นาน 3 เดือน

4.5 การคัดเลือกคำรับปีโคโคนาโนพาร์ทิเคิล เพื่อนำส่งวัสดุชิ้นงานชุมชน

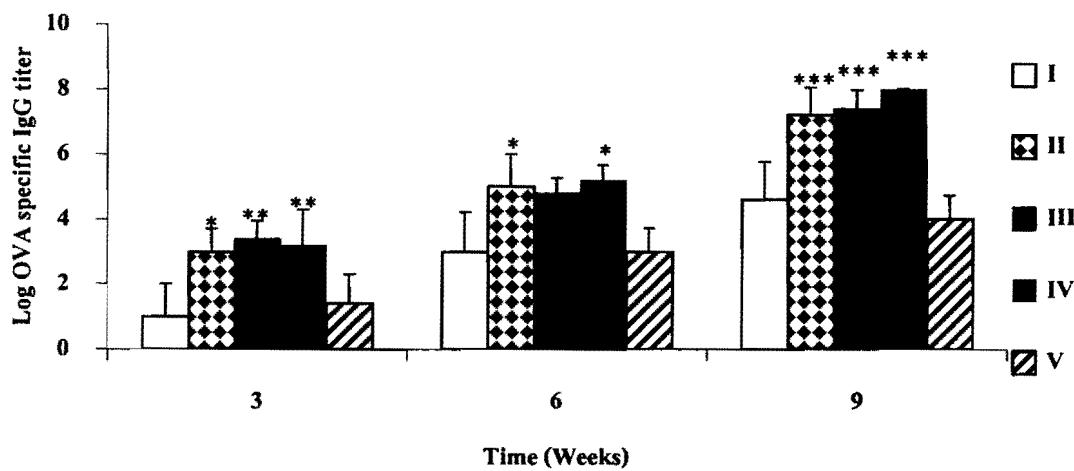
จากผลการวิจัยข้างต้น จึงคัดเลือกตัวรับไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคล จำนวน 3 ตัวรับ เป็นตัวรับที่เตรียมจากสารละลายไคโตแซน จากความเข้มข้น 3 mg/mL และมีสัดส่วนการเกิดอันตรายร้ายของไคโตแซนค่อ TPP เท่ากัน 3:1 (ตัวรับที่ 7), 4:1 (ตัวรับที่ 8) และ 5:1 (ตัวรับที่ 9) ทำให้ได้อนุภาคหลังเครื่ยนในรูปทรงแห้ง ที่มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วงอนุภาค 3 ขนาด คือ อนุภาคขนาดเล็ก ($249.67 \pm 29.6 \text{ nm}$) อนุภาคขนาดกลาง ($559.33 \pm 17.21 \text{ nm}$) และอนุภาคขนาดใหญ่ ($1,240.00 \pm 62.45 \text{ nm}$) ตามลำดับ ซึ่งไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคลทั้ง 3 ตัวรับ มีปริมาณการกักเก็บและ การบรรจุแอนติเจนสูง สามารถปลดปล่อยแอนติเจนได้ดีที่ pH 4.5 ซึ่งเป็น pH ภายใน lysosome ของเซลล์ทางภูมิคุ้มกัน โดยมีการปลดปล่อยแอนติเจนเพียงเล็กน้อยที่ pH 6.8 และ 7.4 ซึ่งเป็น pH ภายในเยื่อบุโพรงจมูกและสารน้ำภายในร่างกาย (body fluids) ทำให้แอนติเจนถูกนำส่งสู่เซลล์

ทางภูมิคุ้มกันได้ในปริมาณมาก ไม่สูญเสียไปในระหว่างการนำส่ง นอกจากรายที่ 3 ไอโคโนพาร์ทีเคิลทั้ง 3 ตัวรับ ยังเป็นระบบนำส่งที่มีความคงตัวทางกายภาพ รวมทั้งแอนติเจน (โอวัลบูมิน) ที่ถูกเก็บในไอโคโนพาร์ทีเคิลมีความคงตัว ดังนั้นจึงใช้ไอโคโนพาร์ทีเคิลทั้ง 3 ตัวรับนี้ ในการทดสอบฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลองต่อไป

ส่วนที่ 2 การประเมินฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันหลังให้วัคซีนทางชุมชนในสัตว์ทดลอง

4.6 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ humoral immune response

ผลการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ humoral immune response ของหนูทดลอง เมื่อให้โอวัลบูมินที่ถูกเก็บในไอโคโนพาร์ทีเคิลขนาดต่างๆ ทางชุมชน โดยประเมินจากระดับ IgG ในเชริร์น และ sIgA ในสารคัดหลั่งบริเวณเยื่อบุต่างๆ ได้ผลแสดงดังภาพที่ 4.6 – 4.8



ภาพที่ 4.6 ระดับ OVA specific IgG ในเชริร์นของหนูทดลอง ($n = 6$) เมื่อให้วัคซีนทางชุมชน ครั้งที่ 1 (สัปดาห์ที่ 3) ครั้งที่ 2 (สัปดาห์ที่ 6) และครั้งที่ 3 (สัปดาห์ที่ 9)

เมื่อ กลุ่ม I คือ หนูที่ได้รับโอวัลบูมินในรูปสารละลาย

กลุ่ม II คือ หนูที่ได้รับโอวัลบูมินที่ถูกเก็บในไอโคโนพาร์ทีเคิลขนาดใหญ่

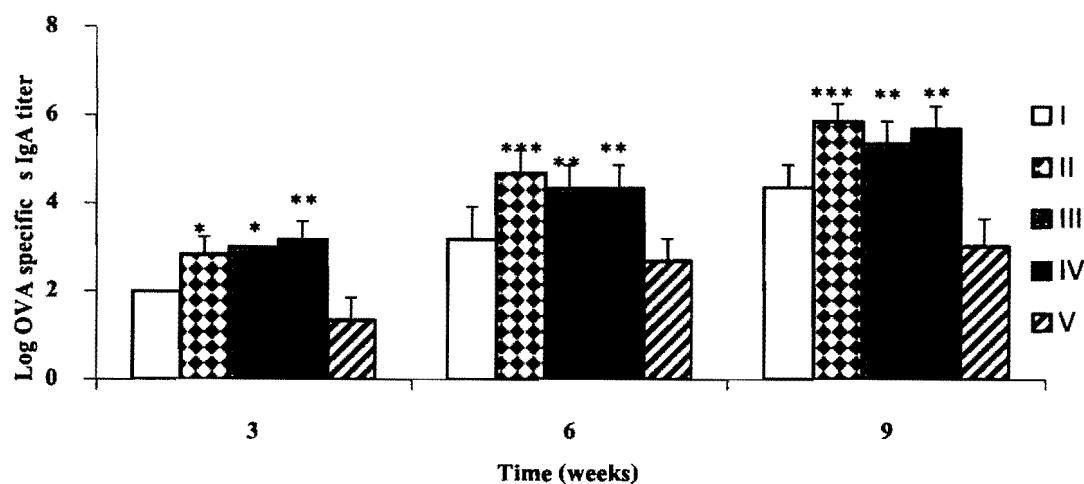
กลุ่ม III คือ หนูที่ได้รับโอวัลบูมินที่ถูกเก็บในไอโคโนพาร์ทีเคิลขนาดกลาง

กลุ่ม IV คือ หนูที่ได้รับโอวัลบูมินที่ถูกเก็บในไอโคโนพาร์ทีเคิลขนาดเล็ก

กลุ่ม V คือ หนูที่ไม่ได้รับสารใดๆ ทางชุมชน

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ และ *** $p < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม I)

จากภาพที่ 4.6 พบว่าหลังให้วัคซีนครั้งที่ 1 ระดับ IgG ในชีรัมของหนูทดลองที่ได้รับ โอลบูมินที่กักเก็บในไก่โดยแซนนาโนพาร์ทิเคิลทุกกลุ่ม สูงกว่าในชีรัมหนูทดลองที่ได้รับ โอลบูมินในรูปสารละลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยไม่พบความแตกต่างของระดับ IgG ระหว่างหนูทดลองที่ได้รับโอลบูมินในรูปสารละลายและหนูทดลองที่ไม่ได้รับโอลบูมิน และหลังให้วัคซีนครั้งที่ 2 และครั้งที่ 3 พบว่าระดับภูมิคุ้มกันทุกกลุ่มเพิ่มขึ้น โดยลักษณะการเพิ่ม การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเป็นลักษณะเดียวกันกับระดับภูมิคุ้มกันหลังให้วัคซีนครั้งที่ 1 เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า ระดับ IgG ในชีรัมของหนูทดลองที่ได้รับโอลบูมินที่กักเก็บ ในไก่โดยแซนนาโนพาร์ทิเคิลทุกกลุ่ม มีค่าสูงกว่าในหนูทดลองที่ได้รับโอลบูมินในรูปสารละลาย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างของระดับ IgG ระหว่างหนูทดลอง ที่ได้โอลบูมินที่กักเก็บในไก่โดยแซนนาโนพาร์ทิเคิลแต่ละขนาดทดลองการทดลอง

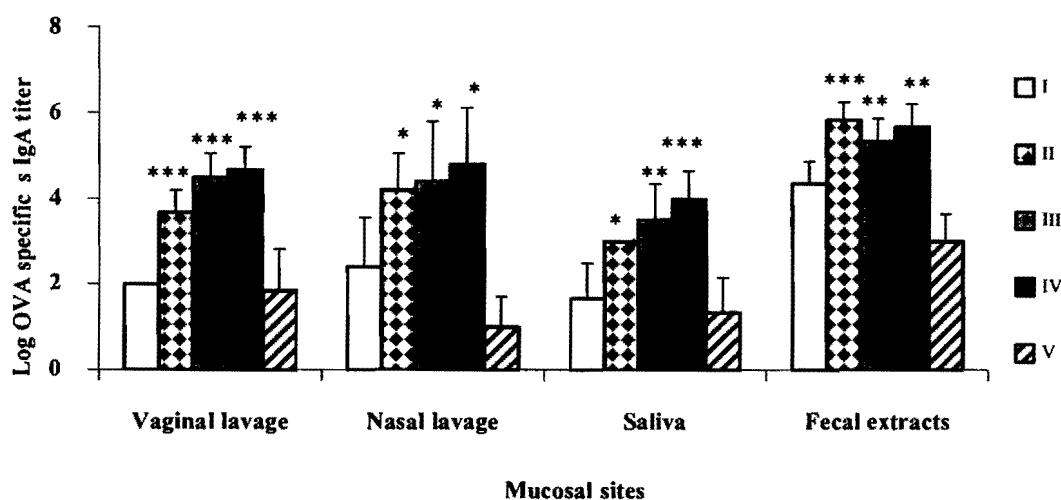


ภาพที่ 4.7 ระดับ OVA specific sIgA ในน้ำเหลืองหนูทดลอง ($n = 6$) เมื่อให้วัคซีนทางช่องปาก ครั้งที่ 1 (สัปดาห์ที่ 3) ครั้งที่ 2 (สัปดาห์ที่ 6) และครั้งที่ 3 (สัปดาห์ที่ 9)

เมื่อ กลุ่ม I คือ หนูที่ได้รับโอลบูมินในรูปสารละลาย
กลุ่ม II คือ หนูที่ได้รับโอลบูมินที่กักเก็บในไก่โดยแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดใหญ่
กลุ่ม III คือ หนูที่ได้รับโอลบูมินที่กักเก็บในไก่โดยแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดกลาง
กลุ่ม IV คือ หนูที่ได้รับโอลบูมินที่กักเก็บในไก่โดยแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดเล็ก
กลุ่ม V คือ หนูที่ไม่ได้รับสารเคมีทางช่องปาก

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ และ *** $p < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม I)

จากภาพที่ 4.7 พบว่าหลังให้วัคซีนครั้งที่ 1 ระดับ sIgA ในมูกของหนูทดลองที่ได้รับ โอลบูมินที่กักเก็บในไก่โดยแซนนาโนพาร์ทิเคิลทุกกลุ่ม มีระดับสูงกว่ามูลของหนูทดลองที่ได้รับ โอลบูมินในรูปสารละลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) หลังให้วัคซีนครั้งที่ 2 และครั้งที่ 3 พบว่าระดับภูมิคุ้มกันทุกกลุ่มเพิ่มขึ้น โดยลักษณะการเพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน เป็นลักษณะเดียวกันกับระดับภูมิคุ้มกันหลังให้วัคซีนครั้งที่ 1 เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า ระดับ sIgA ในมูกของหนูทดลองที่ได้รับ โอลบูมินที่กักเก็บในไก่โดยแซนนาโนพาร์ทิเคิลทุกกลุ่ม มีค่าสูง กว่าในหนูทดลองที่ได้รับ โอลบูมินในรูปสารละลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ทั้งนี้ ไม่พบความแตกต่างของระดับ sIgA ในมูลสัตว์หนูทดลองที่ได้โอลบูมินที่กักเก็บในไก่โดยแซนนาโนพาร์ทิเคิลแต่ละขนาดทดลอง



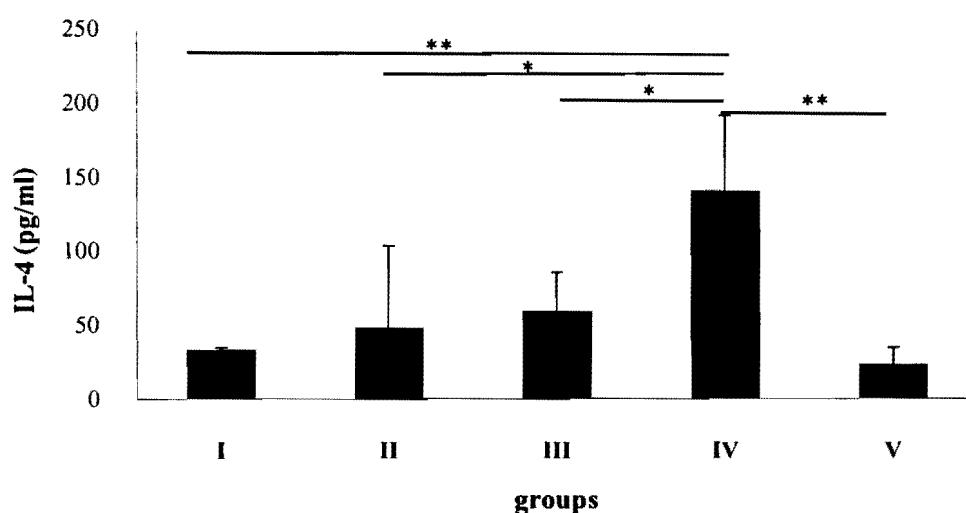
ภาพที่ 4.8 ระดับ OVA specific sIgA ในน้ำด้ามช่องคลอด น้ำด้ามโพรงจมูก น้ำลาย และสารสะัด จากมูกของหนูทดลอง ($n = 6$) เมื่อให้วัคซีนทางจมูก ในสัปดาห์ที่ 9 ของการทดลอง เมื่อ กลุ่ม I คือ หนูที่ได้รับ โอลบูมินในรูปสารละลาย กลุ่ม II คือ หนูที่ได้รับ โอลบูมินที่กักเก็บในไก่โดยแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดใหญ่ กลุ่ม III คือ หนูที่ได้รับ โอลบูมินที่กักเก็บในไก่โดยแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดกลาง กลุ่ม IV คือ หนูที่ได้รับ โอลบูมินที่กักเก็บในไก่โดยแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดเล็ก กลุ่ม V คือ หนูที่ไม่ได้รับสารเคมีทางจมูก
(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ และ *** $p < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม I)

จากภาพที่ 4.8 พบว่า นอกจากการให้โอลูมินทางจมูก จะสามารถกระตุ้น IgA ในนูกลของหนูทดลองแล้ว ยังสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในเยื่อนุช่องคลอด เยื่อนุโพรงจมูก และน้ำลายได้ทั้งนี้พบว่าระดับ IgA จากตัวอย่างสารคัดหลังจากเยื่อนุผิวทุกบริเวณของหนูทดลองที่ได้รับโอลูมินที่กักเก็บไว้โดยแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาด มีระดับสูงกว่าหนูทดลองที่ได้รับโอลูมินในรูปสารละลายอย่างนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของระดับ IgA ระหว่างหนูทดลองที่ได้รับโอลูมินที่กักเก็บไว้โดยแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดต่างๆ กัน อย่างไรก็ตามพบว่า IgA ที่พบในนูกลของหนูทดลองมีระดับสูงกว่า IgA จากตัวอย่างสารคัดหลังในบริเวณเยื่อนุผิวอื่น และพบว่าระดับ IgA ในน้ำลายของคลอด น้ำลายโพรงจมูก และน้ำลาย มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามขนาดของอนุภาคที่ลดลง โดยไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าวในนูกลสัตว์ทดลอง

ผลการประเมินการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ humoral immune response จากระดับ IgG ในชีรัม และ IgA ในสารคัดหลังบริเวณเยื่อนุผิวต่างๆ ของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่กักเก็บโอลูมิน พบว่า ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลทั้ง 3 ตัวรับ สามารถเสริมฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ เมื่อเทียบกับการให้สารละลายโอลูมิน โดยอนุภาคของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลทั้ง 3 ขนาด มีประสิทธิภาพในการเสริมฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบ humoral immune response ได้ไม่แตกต่างกัน

4.7 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ cell - mediated immune response

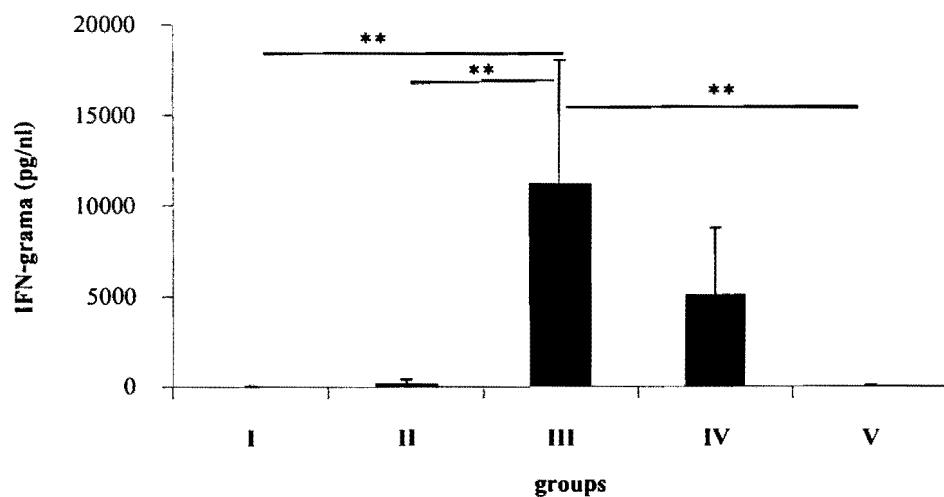
ผลการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ cell - mediated immune response ของหนูทดลอง เมื่อให้โอลูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาพาร์ทิเคิลขนาดต่างๆ ทางจมูก โดยประเมินจากระดับ IL-4 และ IFN- γ ที่หลังจากเซลล์ม้าม (splenocytes) ของหนูทดลอง พบร่วมกับหนูทดลองที่ได้รับโอลูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล มีระดับของ IL-4 และ IFN- γ สูงกว่าหนูทดลองที่ได้รับโอลูมินในรูปสารละลาย ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.9 – 4.10



ภาพที่ 4.9 ระดับ IL-4 ที่หลั่งจาก splenocytes ของหนูทดลองกลุ่มต่างๆ เมื่อให้วัคซีนทางชุมก ($n = 4$) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ และ *** $p < 0.001$)

เมื่อ กลุ่ม I คือ หนูที่ได้รับโอลบูมินในรูปสารละลาย
กลุ่ม II คือ หนูที่ได้รับโอลบูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดใหญ่
กลุ่ม III คือ หนูที่ได้รับโอลบูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดกลาง
กลุ่ม IV คือ หนูที่ได้รับโอลบูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดเล็ก

จากการที่ 4.9 พบว่า ขนาดของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล มีผลต่อระดับ IL-4 โดยขนาดของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่เพิ่มขึ้น จะทำให้ระดับ IL-4 ลดลง หนูทดลองที่ได้รับโอลบูมินที่กักเก็บไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดเล็ก (กลุ่ม IV) มีระดับ IL-4 (139.59 ± 51.02 pg/mL) สูงกว่าหนูที่ได้รับโอลบูมินที่กักเก็บไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดกลาง (กลุ่ม III) (58.95 ± 26.12 pg/mL) และไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดใหญ่ (กลุ่ม II) (47.68 ± 55.76 pg/mL) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม หนูทดลองที่ได้รับโอลบูมินที่กักเก็บไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลทั้ง 3 ตำรับ มีระดับ IL-4 สูงกว่าหนูทดลองที่ได้รับสารละลายโอลบูมิน ซึ่งมีระดับ IL-4 เท่ากับ 32.48 ± 2.05 pg/mL



ภาพที่ 4.10 ระดับ IFN- γ ที่หลังจาก splenocytes ของหนูทดลองกลุ่มต่างๆ เมื่อให้วัคซีนทางจนูก ($n = 4$) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ และ *** $p < 0.001$)

เมื่อ กลุ่ม I คือ หนูที่ได้รับโควัลบูมินในรูปสารละลาย

กลุ่ม II คือ หนูที่ได้รับโควัลบูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดใหญ่

กลุ่ม III คือ หนูที่ได้รับโควัลบูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดกลาง

กลุ่ม IV คือ หนูที่ได้รับโควัลบูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดเล็ก

กลุ่ม V คือ หนูที่ไม่ได้รับสารใดๆ ทางจนูก

จากการที่ 4.10 พนว่า ขนาดของ ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล มีผลต่อระดับ IFN- γ หนูที่ได้รับโควัลบูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดกลาง (กลุ่ม III) มีระดับ IFN- γ $(11,205.97 \pm 6,777.84 \text{ pg/mL})$ สูงกว่า หนูที่ได้รับโควัลบูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดเล็ก (กลุ่ม IV) $5,094.51 \pm 3,660.45 \text{ pg/mL}$ และขนาดใหญ่ (กลุ่ม II) $210.83 \pm 3,660.45 \text{ pg/mL}$ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) โดยระดับ IFN- γ ของหนูทดลองที่ได้รับสารละลายโควัลบูมิน (กลุ่ม I) มีระดับ IFN- γ เพียง $33.36 \pm 4.83 \text{ pg/mL}$

ผลการประเมินการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ cell - mediated immune response จาก ระดับ IL-4 และ IFN- γ ที่หลังจากเซลล์ม้าม (splenocytes) ของหนูทดลองที่ได้รับโควัลบูมิน ที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดต่างๆ พนว่า ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลสามารถ เสริมถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบ cell - mediated immune response ได้ เมื่อเทียบกับการให้สารละลายโควัลบูมิน โดยไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดเล็ก และขนาดกลาง สามารถกระตุ้น การหลัง IL-4 และ IFN- γ ได้ดีกว่าไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดใหญ่

บทที่ ๕

อภิปรายผลการวิจัย

ไอโคดเซนนาโนในพาร์ทิเคลเป็นระบบนำส่งวัคซีนทางช่องปากที่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากคุณสมบัติของไอโคดเซนเป็นพอลิเมอร์ที่พบตามธรรมชาติที่ไม่มีความเป็นพิษ สามารถช่วยเพิ่มการยึดเกาะและการส่งผ่านเขื่อนบุผิวของแอนติเจนได้ อีกทั้งการกักเก็บแอนติเจนภายในไอโคดเซนนาโนพาร์ทิเคลสามารถป้องกันการทำลายแอนติเจนจากออกไซน์ และภาวะความเป็นกรดจากสารคัดหลั่งในบริเวณเขื่อนบุผิวได้ (Kang et al., 2009) โดยเทคนิคการเตรียมตัวรับไอโคดเซนนาโนพาร์ทิเคลสำหรับนำส่งวัคซีนทางช่องปากมีอยู่ด้วยกันหลายวิธี แต่วิธี ionotropic gelation เป็นวิธีที่นิยมใช้ค่อนข้างมาก เนื่องจากสามารถเตรียมได้ง่าย สารที่ใช้ในการเตรียมไม่เป็นพิษต่อร่างกาย และไม่มีผลต่อความคงตัวของแอนติเจน ไอโคดเซนนาโนพาร์ทิเคลที่เตรียมจากวิธี ionotropic gelation เกิดจากอันตรกิริยะระหว่างประจุบวกของไอโคดเซนและประจุลบของ sodium tripolyphosphate (TPP) การปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของไอโคดเซน และสัดส่วนการทำอันตรกิริยาระหว่างไอโคดเซนและ TPP จะทำให้ได้ไอโคดเซนนาโนพาร์ทิเคลที่มีคุณสมบัติทางกายภาพที่แตกต่างกัน ส่วนการกักเก็บแอนติเจนในไอโคดเซนนาโนพาร์ทิเคล ใช้หลักการของการเกิดอันตรกิริยะระหว่างประจุลบของแอนติเจน และประจุบวกของไอโคดเซน ซึ่งแอนติเจนเป็นโปรตีนที่มีประจุลบ จึงสามารถเปลี่ยนชนิดของแอนติเจนที่จะกักเก็บในไอโคดเซนนาโนพาร์ทิเคลได้ (Tiyaboonchai, 2003)

งานวิจัยนี้ใช้อวัลbumin เป็นแอนติเจนต้นแบบ โดยเตรียมตัวรับไอโคดเซนนาโนพาร์ทิเคล ด้วยการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลายน้ำไอโคดเซน เป็น 1, 2 และ 3 mg/mL ซึ่งมีรายงานการวิจัยที่ใช้ความเข้มข้นนี้ในการเตรียมไอโคดเซนนาโนพาร์ทิเคลเพื่อกักเก็บโปรตีน (Gan and Wang, 2007; Xu and Du, 2003) จากการทดลองพบว่า ตัวรับของไอโคดเซนนาโนพาร์ทิเคลที่เตรียมจากสารละลายน้ำไอโคดเซนความเข้มข้น 1 mg/mL และ 2 mg/mL มีความไม่คงตัวเกิด aggregation ของตัวรับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mohammadpourdounighi et al. (2010)

ชั่งพนกการ aggregate ของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคลที่กักเก็บ *Naja naja oxiana* snake venom ที่เตรียมจากสารละลายไคโตแซนความเข้มข้นน้อยกว่า 1.5 mg/mL ทั้งนี้เนื่องจากการเตรียมไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคลจากสารละลายไคโตแซนที่มีความเข้มข้นต่ำ จะทำให้ได้ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคลนิ่มค่าประจุที่ผิวอนุภาคน้อย แรงผลักระหว่างอนุภาคไม่เพียงพอสำหรับการป้องกันการเกาะกลุ่มของอนุภาค และการกระกระจายตัวในน้ำกระสายยา (vehicle) ทำให้ระบบไม่มีความคงตัว เรียกกลไกการเกิดความไม่คงตัวดังกล่าวว่า aggregation โดยทั่วไป ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคลที่มีความคงตัว เมื่อยู่ในรูป nanosuspension ควรมีประจุบวกที่ผิวอนุภาคสูงกว่า + 30 mV เพื่อให้แรงผลักที่เกิดจากประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาคมีมากเพียงพอที่จะป้องกันมิให้เกิดการรวมตัวของแต่อนุภาค และทำให้ออนุภาคยังสามารถกระกระจายตัวอยู่ได้ในน้ำกระสายยา (vehicle) (Du et al., 2009)

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้สารละลายไคโตแซนความเข้มข้น 3 mg/mL ชั่งให้ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคลที่มีความคงตัว ผลของการเตรียมคำรับไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคลโดยใช้ความเข้มข้นของสารละลาย ไคโตแซน 3 mg/mL โดยปรับเปลี่ยนสัดส่วนไคโตแซนต่อ TPP พบว่า ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคลที่เตรียมได้ มีขนาดและประจุที่ผิวอนุภาคเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนไคโตแซนที่เพิ่มขึ้น โดยคำรับที่ใช้สัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP เท่ากับ 3:1 และ 4:1 โดยมีขนาดอนุภาคเพิ่มจาก 205.33 ± 21.46 nm เป็น 493.33 ± 41.58 nm และมีประจุที่ผิวอนุภาคเพิ่มจาก 21.33 ± 0.78 mV เป็น 37.70 ± 0.85 mV ตามลำดับ เนื่องจากไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคล มีไคโตแซนซึ่งเป็นสารที่ให้ประจุบวกเป็นองค์ประกอบหลัก ดังนั้นการเพิ่มสัดส่วนไคโตแซนในการเตรียมคำรับ จึงทำให้ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคลที่เตรียมได้มีขนาดและประจุที่ผิวอนุภาคเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Kim and Kang (2008) ที่พบว่าสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP เท่ากับ 3:1 ทำให้ได้ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคลขนาดเล็ก และมีค่าประจุที่ผิวอนุภาคสูงกว่าไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคลที่เตรียมจากสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP ในสัดส่วนที่สูงกว่า และหลังให้ hepatitis B surface antigen (HBsAg) ที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคลคำรับดังกล่าวทางจมูกสัตว์ทดลอง พบว่า สามารถกระตุนระดับ IgG ได้ และสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Prego et al. (2010) ชั่งพบว่า ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคลที่เตรียมจากสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP เท่ากับ 4:1 เพื่อใช้น้ำส่าง HBsAg ด้วยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ทำให้ได้ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคลขนาดเล็ก และมีประจุที่ผิวอนุภาคสูงกว่าไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคลที่เตรียมจากสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP เท่ากับ 5:1 โดยขนาดของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคลที่เตรียมได้จากสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP เท่ากับ 5:1 มีค่าเท่ากับ $1,166.67 \pm 158.85$ nm และมีประจุที่ผิวอนุภาคเท่ากับ 34.50 ± 5.23 mV เหตุผลของการที่ไคโตแซน

นาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมจากสัดส่วน CS : TPP เท่ากับ 5:1 มีค่าประจุที่ผิวต่ำกว่าไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมจากสัดส่วน 4:1 อาจเนื่องมาจากการที่ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมจากสัดส่วน CS : TPP เท่ากับ 5:1 มีร้อยละการกักเก็บไอโววัลบูมินในอนุภาคสูงกว่า (ร้อยละ 68.52) ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมจากสัดส่วน 4:1 (ร้อยละ 66.77) การกักเก็บโปรตีนซึ่งมีประจุเป็นลบในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล จะทำให้อนุภาคมีประจุบวกที่ผิวอนุภาคลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Gan and Wang, 2007) อย่างไรก็ตาม ยังมีความแตกต่างจากรายงานการวิจัยของ Grenha et al. (2005) ที่พบว่า การปรับสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP เพิ่มขึ้นจาก 5:1 เป็น 6:1 ทำให้ร้อยละการกักเก็บโปรตีนในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลลดลงจากร้อยละ 81 เป็นร้อยละ 65 ซึ่งทำให้ประจุที่ผิวของอนุภาคเพิ่มตามสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP ที่เพิ่มขึ้น

สำหรับความสม่ำเสมอของขนาดอนุภาคในตัวรับ สามารถประเมินได้จากค่าการกระจายขนาดของอนุภาค โดยค่าการกระจายขนาดที่น้อยกว่า 0.5 หมายถึงไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมได้มี homogeneity สูง (Kouchak et al., 2012) จากผลการทดลองพบว่าไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมจากสารละลายไคโตแซนความเข้มข้น 3 mg/mL มีค่าการกระจายขนาดของอนุภาคเท่ากับ 0.244 ± 0.021 , 0.389 ± 0.130 และ 0.361 ± 0.089 เมื่อเพิ่มสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP เป็น 3:1, 4:1 และ 5:1 ตามลำดับ ดังนั้นการกระจายขนาดของอนุภาค ซึ่งมี homogeneity ทุกตัวรับ

การกักเก็บไอโววัลบูมินในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลเตรียมจากสารละลายไคโตแซนความเข้มข้น 3 mg/mL พบว่า การกักเก็บลดลงจากร้อยละ 76.49 ± 4.72 เป็น 68.52 ± 6.01 และ 66.77 ± 7.95 เมื่อเพิ่มสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP จาก 3:1 เป็น 4:1 และ 5:1 ตามลำดับ สอดคล้องกับผลการวิจัยของ Gan and Wang (2007) ซึ่งพบว่าแอนติเจนสามารถแสดงประจุลบได้ดีในสารละลาย TPP ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นเบส การลดปริมาณ TPP ในตัวรับ ทำให้ความเป็นเบสในขั้นตอนการเตรียมตัวรับลดลง ทำให้แอนติเจนแสดงประจุลบลดลง การเกิดอันตรายร้ายแรงประจุลบของโปรตีนกับประจุบวกของไคโตแซนซึ่งลดลง การกักเก็บแอนติเจนของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลซึ่งลดลงเมื่อลดปริมาณ TPP ในตัวรับ

การบรรจุแอนติเจนพบว่า ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมจากสัดส่วนโดยมวลไคโตแซนต่อ TPP ในสัดส่วน 3:1, 4:1 และ 5:1 มีการบรรจุแอนติเจนลดลงจากร้อยละ 33.92 ± 1.89 , 27.38 ± 1.33 และ 27.10 ± 1.49 ตามลำดับ สอดคล้องกับที่พบในงานวิจัยของ Grenha et al. (2005) ซึ่งกักเก็บอินซูลิน (insulin) ในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลลดลง เมื่อเพิ่มสัดส่วนไคโตแซนต่อ TPP จาก 5:1 เป็น 6:1 ซึ่งมีการบรรจุลดลงจากร้อยละ 29.8 ± 1.4 เป็นร้อยละ 22.3 ± 1.6 เนื่องจาก

การกักเก็บแอนติเจนและปริมาณของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลลดลง จึงทำให้การบรรจุแอนติเจนในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลลดลงตามสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP ที่เพิ่มขึ้น

เนื่องจากระบบนำส่งและโปรตีนแอนติเจนซึ่งอยู่ในรูป nanosuspension มีความคงตัวต่ำ จึงมีการเตรียมตัวรับในรูปผงแห้ง เพื่อเพิ่มความคงตัวของระบบนำส่ง และเพิ่มระยะเวลาการเก็บรักษาตัวอย่าง เช่น freeze drying เป็นวิธีการทั่วไปที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างโปรตีนและวัคซีน ให้อยู่ในรูปผงแห้ง แต่เนื่องจากภาวะ freezing stress และ drying stress มีผลต่อความคงตัวของระบบอนุภาคนำส่ง จนอาจนำไปสู่การ aggregation แต่พบว่ากลูโคส (glucose) ซึ่งมีอัลดาเลย์น้ำ จะมีโครงสร้างเป็น amorphous matrix จึงช่วยป้องกันการเกิด aggregation ในขั้นตอน freeze drying ได้ จึงมีการใช้สารละลายกลูโคสเพื่อเพิ่มความคงตัวให้อนุภาคระหว่างขั้นตอน freeze drying (cryoprotectant) (Abdelwahed et al., 2006) โดยงานวิจัยนี้ใช้สารละลายกลูโคสความเข้มข้น 2.5% w/v เป็น cryoprotectant เพื่อเพิ่มความคงตัว ความเข้มข้นของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่ใช้คือ 2 mg/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่นิยมใช้ในการเตรียมอนุภาคไคโตแซนในรูปผงแห้งด้วยวิธี freeze drying (Hirsjarvi, 2008; Prego et al., 2010) หลังเตรียมตัวรับในรูปผงแห้งพบว่า อนุภาคมีขนาดเพิ่มขึ้น มีประจุบวกที่ผิวอนุภาคเพิ่มขึ้น และค่าดัชนีการกระจายขนาดของอนุภาคเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับก่อนการเตรียมในรูปผงแห้ง เนื่องจากมีการทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างไคโตแซนและ TPP ในระหว่างขั้นตอน freeze drying ทำให้มีการปลดปล่อยแอนติเจนออกจากอนุภาคไคโตแซน เป็นผลให้ประจุบวกที่ผิวอนุภาคเพิ่มขึ้น และขนาดของอนุภาคใหญ่ขึ้น โดยการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวทำให้ขนาดอนุภาคในตัวรับแตกต่างกันมากขึ้น ค่าดัชนีการกระจายขนาดของอนุภาค จึงเพิ่มขึ้น (Hafner et al., 2011) อีกทั้งรายงานพบว่าไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมจากสารละลายไคโตแซนความเข้มข้น 3 mg/mL ภายหลังการเตรียมในรูปผงแห้ง โดยผงยาที่เตรียมได้ทุกตัวรับสามารถกระจายตัวได้อย่างสมบูรณ์ในน้ำปราศจากไอออน ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมจากสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP เท่ากับ 3:1, 4:1 และ 5:1 มีขนาดอนุภาคหลังการเตรียมในรูปผงแห้งเพิ่มขึ้นเป็น 248.67 ± 29.6 nm, 559.33 ± 17.21 nm และ $1,240.00 \pm 62.45$ nm โดยมีค่าการกระจายขนาดของอนุภาคเท่ากับ 0.413 ± 0.048 , 0.470 ± 0.038 และ 0.488 ± 0.08 ตามลำดับ ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลทุกตัวรับแสดงประจุที่ผิวอนุภาคเป็นบวก และมี homogeneity

สำหรับคุณสมบัติที่จำเป็นของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลสำหรับการนำส่งวัคซีนทางช่องปาก คือ มีขนาดอนุภาคน้อยกว่า 5 μm เพื่อให้สามารถผ่านเยื่อช่องปากไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้ง systemic immune response และ mucosal immune response ได้ (Kang et al., 2009) จากรายงานการวิจัยแบบ *in vitro* พบว่า ขนาดอนุภาคขนาดน้อยกว่า 500 nm, 500 nm ถึง 1,000 nm และ

1,000 nm ถึง 5,000 nm มีความสามารถในการผ่านเยื่อบุผิวและกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้แตกต่างกัน (Rajapaksa et al., 2010; Oyewumi et al., 2010) งานวิจัยนี้จึงคัดเลือกไคโตแซนนาในพาร์ทิเคลที่มีขนาดอยู่ในช่วงดังกล่าว เพื่อทดสอบฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) ผลการเตรียมตัวรับไคโตแซนนาในพาร์ทิเคลที่เตรียมจากสารละลายไคโตแซนความเข้มข้น 3 mg/mL ด้วยสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP เท่ากับ 3:1, 4:1 และ 5:1 ทำได้ไคโตแซนนาในพาร์ทิเคลขนาดเด็ก (248.67 ± 29.6 nm) ขนาดกลาง (559.33 ± 17.21 nm) และขนาดใหญ่ ($1,240.00 \pm 62.45$ nm) ตามลำดับ จึงเลือกไคโตแซนนาในพาร์ทิเคลทั้ง 3 ตัวรับ เพื่อทดสอบฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันจากการนำส่งวัคซีนทางช่องปากในหนูทดลองต่อไป

การนำส่งวัคซีนทางช่องปากระบบนำส่งต้องผ่านบริเวณเยื่อบุโพรงช่องปาก ซึ่งมี pH ประมาณ 6.8 (Harikarnpakdee et al., 2006) ก่อนจะเข้าสู่กระแสเลือดซึ่งมี pH 7.4 จากนั้นระบบนำส่งจะถูกจับกินโดย antigen presenting cells (APCs) และถูกนำส่งยัง lysosome ซึ่งมี pH 4.5-5.0 ภายในเซลล์ทำให้เกิดการปลดปล่อยแอนติเจนจากผลของ pH และการย่อยไคโตแซนจากเอนไซม์ต่างๆ ภายใน lysosome (Mao et al., 2005) ดังนั้นการปลดปล่อยแอนติเจนของระบบนำส่งวัคซีนทางช่องปากที่ดี จึงไม่ควรปลดปล่อยแอนติเจนที่ pH 6.8 และ 7.4 ซึ่งเป็น pH ภายในเยื่อบุช่องปากและสารน้ำภายในร่างกาย (body fluids) เพื่อไม่ให้เกิดการสูญเสียแอนติเจนระหว่างการนำส่งผ่านเยื่อบุช่องปากและกระแสเลือด ทำให้แอนติเจนที่ถูกเก็บในไคโตแซนนาในพาร์ทิเคลถูกนำส่งยัง APCs ได้ในปริมาณมาก โดยกลไกการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเกิดจาก APCs นำส่งแอนติเจน ให้ T-lymphocytes และ B-lymphocytes ดังนั้น ไคโตแซนนาในพาร์ทิเคลที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดี จะต้องสามารถปลดปล่อยแอนติเจนภายใน APCs ค่อนข้างสมบูรณ์ เพื่อให้แอนติเจนที่ APCs นำส่งให้ T-lymphocytes และ B-lymphocytes มีปริมาณมาก

ผลการวิจัยพบว่า การปลดปล่อยแอนติเจนจากไคโตแซนนาในพาร์ทิเคลทั้ง 3 ตัวรับ มีลักษณะคล้ายคลึงกัน คือ แอนติเจนถูกปลดปล่อยอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการทดลอง และปลดปล่อยอย่างช้าๆ จนกระทั่งคงที่ในช่วงท้ายของการทดลอง ลักษณะการปลดปล่อยของแอนติเจนจากอนุภาคไคโตแซนใน PBS ดังกล่าวเกิดจากกลไกที่แตกต่างกันของการปลดปล่อย แอนติเจนในแต่ละช่วง โดยการปลดปล่อยในช่วงแรกเกิดจากแอนติเจนที่ถูกเก็บในบริเวณผิวของอนุภาคเป็นหลัก ซึ่งทำให้การปลดปล่อยสามารถเกิดขึ้นได้ง่ายและอย่างรวดเร็ว เรียกการปลดปล่อยช่วงนี้ว่า initial burst release หลังจากนั้นแอนติเจนจะถูกปลดปล่อยเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนกระทั่งคงที่ เรียกการปลดปล่อยช่วงนี้ว่า steady state release ซึ่งเป็นผลจากการปลดปล่อยแอนติเจนที่อยู่ในชั้น matrix ของอนุภาค การปลดปล่อยแอนติเจนเกิดทางรูปธูรุนของอนุภาค ซึ่งกลไกการปลดปล่อยดังกล่าวเกิดขึ้นได้ยาก และเกิดขึ้นได้ไม่สมบูรณ์ ทำให้ต้องใช้เวลาในการปลดปล่อยค่อนข้างนาน

และยังคงมีแอนติเจนหลงเหลือในอนุภาค ไคโตแซน ปริมาณการปลดปล่อยจึงไม่ถึง 100% ของปริมาณแอนติเจนที่กักเก็บ (Agnihotri et al., 2004)

การศึกษาผลของ pH ต่อการปลดปล่อยแอนติเจนของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล พบว่า การที่ไอวัลบูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลปลดปล่อยใน pH 4.5 ได้ดีกว่า pH 6.8 และ 7.4 ตามลำดับ เนื่องจาก pH ที่ลดลง ทำให้แรงขึ้นของพันธะไไซโอดีเจนระหว่างไคโตแซนกับ TPP ลดลง อนุภาคจึงเกิดการบวมตัว (swelling) ทำให้แอนติเจนที่ถูกกักเก็บภายในไคโตแซน นาโนพาร์ทิเคิลถูกปลดปล่อยทางรูพรุนของอนุภาค ได้ง่าย (Dudhani and Kosaraju, 2010; Keawchanoon and Yoksan, 2011) อีกทั้ง pH ที่ลดลงทำให้โปรตีนซึ่งมีคุณสมบัติเป็น amphoteric compound แสดงประจุเป็นบวกมากขึ้น ทำให้เกิดแรงผลักระหว่างประจุบวกไคโตแซนกับประจุโปรตีนแอนติเจน (Mao et al., 2005)

นอกจากนี้พบว่า การปลดปล่อยไอวัลบูมินจากไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมจากสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP เท่ากับ 3:1 มีการปลดปล่อยดีกว่าแอนติเจนสัดส่วน 4:1 และ 5:1 ตามลำดับ เนื่องจากไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมจากสัดส่วนไคโตแซนต่อ TPP ต่ำ มีปริมาณการบรรจุแอนติเจนสูง ทำให้แรงขึ้นของพันธะไไซโอดีเจนกับไคโตแซนน้อย ทำให้ การปลดปล่อยแอนติเจนเกิดขึ้นได้ง่าย (Xu and Du, 2003) นอกจากนี้การใช้สัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP ต่ำ ทำให้ได้ออนุภาคที่มีขนาดเล็ก ซึ่งมีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรอนุภาคสูง การปลดปล่อยไอวัลบูมินจากผิวไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลเกิดขึ้นได้ง่ายกว่าไคโตแซน นาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมจากสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP สูงกว่า (Gan and Wand, 2007)

ด้วยเหตุดังกล่าวข้างต้น ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลทั้ง 3 ตำรับ จึงมีการปลดปล่อยไอวัลบูมินได้ใน PBS pH 4.5 ได้ดีกว่า ใน pH 6.8 และ 7.4 และการปลดปล่อยแอนติเจน จากไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่มีขนาดเล็กเกิดได้ดีกว่าไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดกลางและใหญ่ ตามลำดับ โดยลักษณะการปลดปล่อยไอวัลบูมินจากไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลทั้ง 3 ตำรับ ใน pH 4.5 พบว่า ช่วงแรกเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและเริ่มคงที่ในวันที่ 2 ของการทดลอง โดยวันที่ 7 ของการทดลอง พบร้า มีการปลดปล่อยไอวัลบูมินจากอนุภาคประมาณร้อยละ 90 ของปริมาณไอวัลบูมินทั้งหมดที่กักเก็บในไคโตแซนพาร์ทิเคิล ดังนั้นไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลทั้ง 3 ตำรับ จึงมีลักษณะการปลดปล่อยที่เหมาะสมในการนำส่งวัสดุทางมนุษย์ อย่างไรก็ตามการปลดปล่อยไอวัลบูมินจากไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว และสนับสนุน กว่าที่พนการทดลองนี้ เนื่องจากภายในร่างกายมีเอนไซม์และสภาพต่างๆ ที่ช่วยในการปลดปล่อยไอวัลบูมิน

การประเมินความคงตัวของระบบนำส่งวัสดุชีวภาพในไก่โดยใช้ตัวอย่างน้ำดื่มของไก่เป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการนำส่งสารผ่านเยื่อบุ และประจุที่ผิวนุภาคซึ่งบอกรถึงความคงตัวของตัวรับหลังกระจายผงชาในน้ำกระสายยา (vehicles) ผลการวิจัยหลังเก็บไก่โดยใช้น้ำดื่มในรูปแบบแห้งที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 3 เดือน พบว่า ประจุที่ผิวนุภาคลดลงเมื่อเทียบกับประจุที่ผิวนุภาคหลังเตรียมเสร็จใหม่ เนื่องจากหมู่อะมิโนของไก่โดยแซนที่หลงเหลือจากการเกิดอันตราริบิกับ TPP (residual amino group) ถูกดึงไป protonation และคุณภาพซึ่งมีประจุลบจากหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group,-OH) สามารถเกิดพันธะไทด์เรagenกับหมู่อะมิโนอิสระของไก่โดยแซน จึงทำให้ค่าประจุที่ผิวนุภาคลดลง อีกทั้งการเกิดอันตราริบิกจะทำลายกลูโคสกับไก่โดยแซน สามารถเกิดได้ทั้งไก่โดยแซนนาโนพาร์ทิคลอนุภาคเดียวกัน และระหว่างอนุภาค ทำให้ขนาดของอนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น (Lee, 2004) สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Hafnaer et al. (2011) ซึ่งเก็บอนุภาคไก่โดยแซนที่กักเก็บ melatonin ในรูปแบบแห้งที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 7 เดือน พบว่าอนุภาคมีขนาดเพิ่มขึ้น และค่าประจุที่ผิวนุภาคลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับหลังเตรียมเสร็จใหม่ การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพของอนุภาคไก่โดยแซนเป็นผลมาจากการซึมที่หลงเหลือในตัวรับและอุณหภูมิที่เก็บรักษาตัวรับ ซึ่งพบว่า อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 5°C ช่วยป้องกันการเสียสภาพของตัวรับได้

แม้การกักเก็บแอนติเจนในไก่โดยแซนนาโนพาร์ทิคลจะซึ่งเตรียมด้วยวิธี ionotropic gelation จะช่วยป้องกันการเสียสภาพของโปรตีน (protein denaturation) จากการที่ไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) ในการเตรียมตัวรับ อย่างไรก็ตาม pH อุณหภูมิ และแรงจากการปั่นเหวี่ยงสารละลายจะมีผลต่อการซึมของแอนติเจนในตัวรับ รวมถึงปัจจัยในการเตรียมอีกด้วย ทั้งนี้โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structures) ของแอนติเจนมีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติ immunogenicity ทั้งนี้หากเกิดหากแต่หักของโครงสร้างปฐมภูมิ จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขนาดโปรตีน และเพิ่มจำนวนแอนติเจนเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ทำให้สามารถใช้ประเมินโครงสร้างปฐมภูมิของแอนติเจนซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งจากเทคนิคดังกล่าวได้ ต่างจากเทคนิคการวัดค่าการดูดซึมแสงของโปรตีนโดยอาศัยการทำปฏิกิริยาการสารทดสอบกับครดอมิโน เช่น วิธี BCA protein assay ซึ่งไม่สามารถบอกถึงความคงตัวของแอนติเจนได้ (Bilati et al., 2005; Walker, 2002) การประเมินความคงตัวของโปรตีน แอนติเจนที่กักเก็บในไก่โดยแซนนาโนพาร์ทิคลที่เตรียมในรูปแบบแห้งและเก็บไว้ที่ 4°C นาน 3 เดือน พบว่า แอนติเจนที่แยกได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE มีขนาดเท่ากับไอลบูมินก่อนเตรียมตัวรับ คือ มีขนาดเท่ากับ 44 kDa และคงให้เห็นว่า ไอลบูมินที่กักเก็บในไก่โดยแซนนาโนพาร์ทิคลมีความคงตัวและมีคุณสมบัติ immunogenicity ตลอดการงานวิจัย

จากการประเมินคุณลักษณะของไอโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลทั้ง 3 ตัวรับพบว่า ไอโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลทุกตัวรับ มีขนาดอนุภาคในช่วงที่งานวิจัยนี้ต้องการศึกษา即ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันทางนูก และสามารถปลดปล่อยแอนติเจนได้ดีที่ pH 4.5 โดยมีการปล่อยแอนติเจนที่ pH 6.8 และ 7.4 เพียงเล็กน้อย โดยไอโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่กักเก็บโอลัมนูมินมีความคงตัวทางกายภาพ และ โอลัมนูมินที่กักเก็บภายในไอโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลในรูปแบบห้องที่ 4 °C ไม่เกิดการเสียสภาพ เมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน จึงเลือกใช้ไอโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลทั้ง 3 ตัวรับในการทดสอบฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันหลังให้วัคซีนทางนูกแก่สัตว์ทดลอง

การนำส่งวัคซีนทางนูกสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดจำเพาะทั้ง humoral immune response (HIR) และ cell – mediated immune response ซึ่งวัสดุประสงค์หลักในการนำส่งวัคซีนทางนูก คือ การกระตุ้น HIR แบบ mucosal immune response ซึ่งเป็นกลไกหลักในการป้องกันและทำลายเชื้อจุลชีพก่อโรคก่อนที่เชื้อจะเข้าสู่ร่างกาย ด้วยการหลัง IgA บริเวณเยื่อบุผิว และยังสามารถกระตุ้น systemic immune response ด้วย IgG ในกระแสเลือด เพื่อทำลายเชื้อจุลชีพก่อโรคหลังเข้าสู่ร่างกาย ดังจากการให้วัคซีนแบบฉีดที่กระตุ้นเพียง IgG ในกระแสเลือดเท่านั้น (Look et al., 2010) โดยการป้องกันการติดเชื้อจุลชีพ อาศัยการทำงานร่วมกันของ HIR และ CMIR ในการทำลายเชื้อจุลชีพชนิด extracellular pathogens และ intracellular pathogens ตามลำดับ อีกทั้ง CMIR เป็นกลไกการตอบสนองระดับเซลล์ ทำให้หลังไอโคตี้บันที่สำคัญชนิดต่างๆ เพื่อกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน โดยใช้ตอคบันที่สำคัญ ได้แก่ IL-4 และ IFN- γ ซึ่ง IL-4 มีบทบาทกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวของ CD4⁺ helper T lymphocyte type II (Th-2) และ B lymphocytes และกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีจาก B lymphocytes เพื่อทำลาย extracellular pathogens สำหรับ IFN- γ มีบทบาทในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ของ CD4⁺ helper T lymphocyte type II (Th-2) และการหลังสารจาก cytotoxic T- lymphocyte เพื่อทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อชนิด intracellular pathogens (Cauley and Lefrancois, 2013) อย่างไรก็ตามพบว่าการหลัง IL-4 ที่มากเกินไป ทำให้เกิด immunoglobulin class switching ซึ่งมีการสร้าง IgE ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดอาการแพ้เพิ่มมากขึ้น และการหลัง IFN-γ ที่มากเกินไปกระตุ้นให้เกิดอาการไข้ และการหลังกระรังของกล้ามเนื้อร่างกายซึ่งมีกลไก negative feedback ระหว่าง IL-4 และ IFN-γ เพื่อให้การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเป็นไปอย่างสมดุล โดยการเพิ่มของระดับ IL-4 และ IFN-γ ตามสัดส่วนที่เหมาะสม (Thakur et al., 2012) ด้วยอย่างเช่น รายงานการวิจัยของ Okamoto et al. (2007) ที่ให้ influenza hemagglutinin ที่กักเก็บใน poly(γ -glutamic acid) nanoparticles แก่หนูทดลองด้วยการฉีด subcutaneous พบว่า การปรับเพิ่มขนาด influenza hemagglutinin จะทำให้ระดับ IL-4 และ IFN-γ ที่หลังจาก splenocytes เพิ่มขึ้น โดย IFN-γ จะมีระดับสูงกว่าระดับของ IL-4 ไม่ว่าจะให้ influenza hemagglutinin แก่หนูทดลองขนาดใดก็ตาม

ดังนั้นการประเมินฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันหลังให้วัคซีนทางจมูกในหนูทดลอง จึงประเมิน HIR จาก IgG ในชีรัมและ rIgA จากสารคัดหลังบริเวณเยื่อบุต่างๆ และ CMIR จากระดับ IL-4 และ IFN- γ

การประเมินฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลองเมื่อน้ำส่างโอลูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคลขนาดต่างๆ ทางจมูก เปรียบเทียบกับหนูที่ได้สารละลายโอลูมินใน PBS pH 7.4 และหนูทดลองที่ไม่ได้รับสารใดๆ ทางจมูก งานนี้ทำการเก็บตัวอย่างและประเมินระดับภูมิคุ้มกันชนิดจำเพาะ และประเมินผลข้างเคียงและการไม่พึงประสงค์จากการได้รับวัคซีนทางจมูก จากการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสัตว์ทดลองทุกสัปดาห์ ตั้งแต่ก่อนให้วัคซีนและสิ้นสุดการทดลอง ผลการวิจัยไม่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักสัตว์ทดลองทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับหนูทดลองที่ไม่ได้รับสารใดๆ ทางจมูก เมื่อสิ้นสุดการทดลองมีการประเมินพยาธิวิทยา宏观 (gross pathology) จากรูปร่าง ขนาด และสีของปอด ตับ ปัสสาวะ ของหนูทดลองที่ได้รับโอลูมินทางจมูกเทียบกับหนูทดลองที่ไม่ได้รับสารใดๆ ทางจมูก ผลการวิจัยไม่พบความแตกต่างทางพยาธิสภาพ (ภาคผนวก ๑) จึงสรุปได้ว่าการให้ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคลที่กักเก็บโอลูมินทางจมูก ไม่ทำให้เกิดผลข้างเคียงและการอันไม่พึงประสงค์ (Makidon et al., 2008)

ผลการวิจัยพบว่า หนูทดลองที่ได้รับโอลูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคลทางจมูก สามารถกระตุ้นระดับ IgG ได้ดีกว่าโอลูมินในรูปสารสารละลายตลอดการทดลอง สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Vila et al. (2004) ซึ่งพบว่า tetanus toxoid (TT) ที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคล ขนาดประมาณ 350-370 nm มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีกว่า TT ในรูปสารละลาย เนื่องจากอนุภาคไคโตแซนน์มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเปิด tight junction และเพิ่มการยึดเกาะเยื่อบุจมูก ทำให้ระยะเวลาการนำส่งสารเพิ่มขึ้น อีกทั้งการนำส่งวัคซีนผ่าน M cells บริเวณ NALT ในรูปแบบอนุภาคนำส่ง เกิดได้ดีกว่าในรูปแบบสารละลาย ทำให้การนำส่งโอลูมินทางจมูกด้วยไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคล สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกระแสเลือดได้ดีกว่าสารละลายโอลูมิน

อย่างไรก็ตาม ไม่พบความแตกต่างระหว่างของระดับ OVA specific IgG ที่พบจาก การกระตุ้นภูมิคุ้มกันทางจมูกด้วยโอลูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคลทั้ง ๓ ตัวรับ จึงสรุปได้ว่า ขนาดของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคลที่ใช้ในการนำส่งโอลูมินทางจมูกไม่มีผลต่อ การกระตุ้นภูมิคุ้มกัน สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Naganoto et al. (2004) ที่ไม่พบความแตกต่างของระดับ IgG จากกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนู rat ทางจมูกจากโอลูมินที่กักเก็บในอนุภาคไคโตแซนขนาด 400 nm, 1 μm และ 3 μm แต่รายงานการวิจัยวิจัยของ Naganoto et al.

(2004) ไม่มีการศึกษาความสัมพันธ์ของขนาด ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลต่อ mucosal immune response ซึ่งเป็นกลไกหลักในการป้องกันการติดเชื้อผ่านบริเวณเยื่อบุผิว

สำหรับการตรวจพบ OVA specific IgG ในหนูที่ไม่ได้รับวัคซีน เนื่องจากแอนติบอดีที่สร้างขึ้นจากการได้รับโอลูบูมินเป็นชนิด polyclonal antibody จึงอาจเกิดปฏิกิริยาข้ามกับแอนติบอดีชนิดอื่นได้ อีกทั้งห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองชนิดอนามัยเข้ม (strict hygienic conventional) อาจทำให้หนูทดลองสัมผัสกับแอนติเจนชนิดอื่นที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ โอลูบูมิน จึงทำให้ตรวจพบ OVA specific IgG ในหนูที่ไม่ได้รับโอลูบูมิน สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Borges et al. (2008) ซึ่งตรวจพบ IgG, sIgA และ cytokine ต่อ HBsAg จากตัวอย่างของหนูทดลองที่ไม่ได้รับ HBsAg ทางจมูกด้วยเทคนิค ELISA โดยมีระดับไม่แตกต่างจากสัตว์ทดลองที่ได้รับแอนติเจนในรูปสารละลายทางจมูกแต่การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้งในหนูทดลองได้รับแอนติเจนในรูปสารละลาย และหนูที่ไม่ได้รับแอนติเจน มีระดับต่ำกว่าหนูทดลองที่รับแอนติเจนที่กัดเกร็บในอนุภาค alginate coated chitosan nanoparticles อย่างน้อยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับที่พบในงานวิจัยนี้

นอกจากการนำส่างวัคซีนทางจมูกจะสามารถกระตุ้น sIgA บริเวณเยื่อบุจมูกที่ได้รับวัคซีนโดยตรงแล้ว ยังสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันบริเวณเยื่อบุอื่นๆ ได้ เช่น เยื่อบุทางเดินอาหาร เยื่อบุทางเดินปัสสาวะ และอวัยวะสืบพันธุ์ เช่นที่พบในรายงานการวิจัยของ Shim et al. (2007) โดยศึกษาการนำส่าง Shigella ribosome ทางจมูก ซึ่งสามารถตรวจพบ sIgA ได้ทั้งระบบทางเดินอาหาร จากตัวอย่างน้ำลายและน้ำสีน้ำเงินที่รับแอนติเจนที่กัดเกร็บในอนุภาค พร่องจมูกและปอด ระบบทางเดินปัสสาวะ และอวัยวะสืบพันธุ์จากน้ำลายช่องคลอด

ผลการวิจัยพบว่า สามารถตรวจพบระดับ sIgA ในน้ำลาย พร่องจมูก น้ำลาย มูล และน้ำลายช่องคลอดของสัตว์ทดลองที่ได้รับโอลูบูมินที่กัดเกร็บใน ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล โดยมีระดับ OVA specific sIgA สูงกว่าที่พบในหนูทดลองที่ได้รับสารละลายโอลูบูมินทางจมูก ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างของระดับภูมิคุ้มกันระหว่างหนูทดลองที่ได้โอลูบูมินที่กัดเกร็บใน ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่มีขนาดต่างกันทั้ง 3 ตำรับ เช่นเดียวกับผลการวิจัยที่พบในการกระตุ้น systemic immune response แต่พบแนวโน้มของการกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งในน้ำลายช่องคลอด น้ำลาย พร่องจมูก และน้ำลาย ที่เพิ่มขึ้นตามขนาดของ ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Krishnakumar et al. (2012) ที่นำส่าง HBsAg ที่กัดเกร็บใน TMC-coated PLGA nanoparticles ทางจมูกหนู rat โดยอนุภาคนำส่างมีขนาดเท่ากับ 276 nm, 445 nm และ 729 nm ผลการวิจัยพบว่า อนุภาคมีการปลดปล่อยแอนติเจนไกล์เคียงกัน มีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันบริเวณเยื่อบุผิวเพิ่มขึ้น เมื่อขนาดของระบบนำส่างที่ลดลง เนื่องจากอนุภาคที่มีขนาดเล็กสามารถนำส่างแอนติเจนไปยัง

ที่พบในสัปดาห์สุดท้ายของการทดลอง และสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Henriksen-Lacey et al. (2011) ที่ให้แอนติเจนที่กักเก็บในไลโปโซม (liposome) ขนาดต่างๆ ในสัตว์ทดลอง พบว่า อนุภาคขนาดเล็กมีความสามารถในการนำส่งแอนติเจนไปยังม้ามได้ดีกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ จึง กระตุ้น การหลัง IL-10 จาก splenocytes ได้ดีกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ โดย IL-10 มีฤทธิ์กระตุ้นการ ทำงานของ CD4⁺ helper T-lymphocyte type II ทำให้เกิดการหลัง IL-4 เพิ่มขึ้นได้

อย่างไรก็ตาม รายงานการวิจัยแบบ *in vitro* ของ Kanchan et al. (2007) ชี้พบร่วมกันว่าอนุภาค polylactide (PLA) ขนาดใหญ่ (2-8 μm) สามารถกระตุ้นการหลัง IL-4 จาก macrophages ได้ดีกว่า อนุภาค PLA ขนาดเล็ก (200-600 nm) ทั้งนี้พบร่วมกันว่าอนุภาคขนาดใหญ่ไม่ได้อุดกักเก็บเข้าสู่เซลล์ แต่การกระตุ้นภูมิคุ้มกันเกิดจากแอนติเจนที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคนำส่งไปกระตุ้นเซลล์ ทางภูมิคุ้มกันโดยตรง การที่อนุภาคขนาดใหญ่มีการปลดปล่อยแอนติเจนช้ากว่าอนุภาคขนาดเล็ก จึงทำให้แอนติเจนมีเวลากระตุ้นเซลล์ทางภูมิคุ้มกันได้นานกว่า ต่างจากผลการวิจัยนี้ที่พบร่วมกัน ไอโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลทั้ง 3 ตำรับ มีการปลดปล่อยแอนติเจนใกล้เคียงกัน จึงไม่พบความสัมพันธ์ ในลักษณะเดียวกับรายงานการวิจัยของ Kanchan et al. (2007) แต่การที่ไอโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล ขนาดเล็กซึ่งถูกนำส่งทางมนุษย์ไปยังอวัยวะทางภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าไอโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล ขนาดใหญ่ จึงทำให้ปริมาณของแอนติเจนที่สัมผัสเซลล์ทางภูมิคุ้มกันที่นำส่งด้วยไอโคโตแซนนาโน พาร์ทิเคิลขนาดเล็กมากกว่าไอโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดใหญ่ จึงกระตุ้นภูมิคุ้มกันการหลัง IL-4 ได้ดีกว่า และให้ผลการทดลองแตกต่างจากการทดลองแบบ *in vitro* ของ Kanchan et al. (2007)

เนื้อเยื่อน้ำเหลืองได้ดีกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ (Kobiasi et al., 2012) อ่างไรก็ตามไม่พบความสัมพันธ์ ดังกล่าวในมูลสัตว์ทดลอง เนื่องจากระดับ IgA มูลสัตว์ทดลองทั้งชนิดที่จำเพาะและไม่จำเพาะ ต่อโอลูบูมินมีปริมาณสูงเมื่อเทียบกับตัวอย่างจากบริเวณเยื่อบุอุ้น

การประเมินการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ cell-mediated immune response (CMIR) หลังให้วัคซีน ผลการประเมินระดับ IFN- γ ที่หลังจาก splenocytes ของหมูทดลองที่ได้รับ โอลูบูมินที่กักเก็บในไกโটแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดต่างๆ ทางزنก พนว่าหมูที่ได้รับไกโटแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดเล็ก และขนาดกลางมีระดับ IFN- γ สูงกว่าหมูทดลองที่ได้รับไกโ�แซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดใหญ่และสารละลายโอลูบูมิน ซึ่งเป็นผลจากไกโটแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดเล็ก และขนาดกลางที่สามารถนำส่ง โอลูบูมินผ่านเยื่อบุช่องปากไปยังม้าม ได้ดีกว่าไกโটแซนนาขนาดใหญ่ และสารละลาย ผลการวิจัยสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Vila et al. (2005) ที่ศึกษานำส่ง tetanus toxoid (TT) ซึ่งกักเก็บในอนุภาค PLA-PEG ขนาด 200 nm, 1.5 μm , 5 μm และ 10 μm ตามลำดับ พนว่าอนุภาคขนาดเล็กถูกนำส่งไปยังม้ามและอวัยวะน้ำเหลืองต่างๆ ได้ดีกว่าอนุภาคขนาดใหญ่และ TT ในรูปสารละลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

นอกจากท่อน้ำที่อนุภาคนำส่งขนาดเล็กสามารถนำส่งแอนติเจนยังอวัยวะน้ำเหลืองได้ดีแล้ว ยังพนว่าอนุภาคขนาดเล็กสามารถกระตุ้นการทำงานของ APCs ได้ดีกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ ดังรายงานการวิจัยแบบ *in vitro* ของ Yue et al. (2010) ซึ่งพนว่า อนุภาคไกโটแซนนาเดลิกถูกกักเก็บเข้าสู่ macrophages ได้ดีกว่าอนุภาคไกโটแซนนาขนาดใหญ่ ทำให้อนุภาคที่มีขนาด 0.43 μm และ 1.9 μm ถูกนำส่งเข้าเซลล์ได้ดีกว่าอนุภาคขนาด 4.8 μm ทำให้อนุภาคขนาดเล็กสามารถกระตุ้นการทำงานของ IFN- γ ได้สูงกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ และสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Krishnakumar et al., (2012) ซึ่งพนว่า TMC-coated PLGA nanoparticles ขนาดเล็กสามารถนำส่ง HBs Ag ให้กับ dendritic cell ได้ดีกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ นอกจากอนุภาคนำส่งขนาดเล็กสามารถกระตุ้นการทำงานของ CTL จากรูปแบบการหลัง IFN- γ จาก splenocytes ได้ดีกว่าอนุภาคขนาดใหญ่แล้ว ยังพนว่าอนุภาคขนาดเล็กสามารถกระตุ้น cytotoxic T-lymphocyte (CTL) ในกระแสเลือด ได้ดีกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ เช่นที่พนวในรายงานการวิจัยของ Joshi et al. (2013) ซึ่งพนว่า อนุภาค poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) ขนาดเล็กสามารถนำส่งโอลูบูมินให้แก่ dendritic cell ได้ดีกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ และเมื่อให้ฉีดวัคซีนแบบ IP injection ในหมูทดลองพบว่า อนุภาคขนาดเล็กสามารถเพิ่มปริมาณ CD8 $^{+}$ CTL ในกระแสเลือดได้มากกว่าอนุภาคขนาดใหญ่

สำหรับการหลัง IL-4 จาก splenocytes พนว่าหมูทดลองที่ได้รับโอลูบูมินที่กักเก็บในไกโ�แซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดเล็กทางزنก สามารถกระตุ้นการหลัง IL-4 ได้ดีกว่าโอลูบูมินที่กักเก็บในไกโ�แซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดใหญ่และสารละลาย โอลูบูมิน สอดคล้องกับระดับ IgG

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการวิจัย

ไอโคไซด์นาโนพาร์ทิคิลที่มีขนาดเล็ก ($< 500 \text{ nm}$) และขนาดกลาง ($500 - 1,000 \text{ nm}$) เป็นขนาดอนุภาคที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเป็นระบบนำส่งวัสดุชีนทางชีวภาพมากกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ ($1,000 - 5,000 \text{ nm}$) โดยอนุภาคไอโคไซด์นาโนพาร์ทิคิลขนาดเล็กและขนาดกลางจะมีคุณสมบัติทางกายภาพที่ดี มีประจุที่ผิวนูภาคเป็นบวก สามารถกักเก็บแอนติเจนได้สูง มีการปลดปล่อยแอนติเจนได้ดีที่ $\text{pH} 4.5$ ซึ่งเป็น pH ใน lysosome ของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย แอนติเจนที่กักเก็บไม่เสียสภาพ และระบบนำส่งมีความคงตัวทางกายภาพ

การเตรียม载体ไอโคไซด์นาโนพาร์ทิคิลให้ได้ขนาดที่เหมาะสม เมื่อใช้ไอโววัลูมิน เป็นแอนติเจนต้นแบบ เตรียมด้วยวิธี ionotropic gelation โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายไอโคไซด์นาโนพาร์ทิคิล 3 mg/mL และสัดส่วนโดยมวลของการเกิดอันตรายระหว่างไอโคไซด์นาโนพาร์ทิคิลกับ sodium tripolyphosphate (TPP) เท่ากัน $3:1$ และ $4:1$ จะทำให้ได้ระบบนำส่งที่มีอนุภาคไอโคไซด์นาโนพาร์ทิคิลขนาดเล็ก ($249.67 \pm 29.6 \text{ nm}$) และอนุภาคขนาดกลาง ($559.33 \pm 17.21 \text{ nm}$) ตามลำดับ

การเสริมฤทธิ์กระบวนการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบ humoral immune response ที่ประเมินจากระดับ IgG ในชีรัมซึ่งเป็น systemic immune response และระดับ IgA ในน้ำลาย สารคัดหลั่งบริเวณเยื่อบุโพรงจมูก และเยื่อบุช่องคลอด ซึ่งเป็น mucosal immune response ของไอโคไซด์นาโนพาร์ทิคิลขนาดต่างๆ เมื่อเทียบกับขนาดเดียวกันของสารคัดหลั่งบริเวณเยื่อบุโพรงจมูก และเยื่อบุช่องคลอด พบว่า ไอโคไซด์นาโนพาร์ทิคิลทั้ง 3 ขนาด สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบ humoral immune response ได้แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบ cell-mediated immune response นั้น ไอโคไซด์นาโนพาร์ทิคิลขนาดเล็ก และขนาดกลาง มีประสิทธิภาพในการเสริมฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบ cell-mediated immune response โดยกระตุ้นการหลัง IL-4 และ IFN- γ ได้ดีกว่าไอโคไซด์นาโนพาร์ทิคิลขนาดใหญ่ จึงเหมาะสมสำหรับแอนติเจนที่เป็นเชื้อจุลทรรศน์ intracellular pathogens เช่น ไวรัส เป็นต้น

ดังนั้น ไอโคไซด์นาโนพาร์ทิคิลขนาดเล็กและขนาดกลาง เป็นขนาดอนุภาคที่เหมาะสม จึงมีแนวโน้มที่จะนำไปพัฒนาเป็นระบบต้นแบบสำหรับนำส่งวัสดุชีนทางชีวภาพคือไปได้ในอนาคต

6.2 ข้อเสนอแนะ

การเตรียมไคโตแซนนาในพาร์ทิเคลล์ด้วยวิธี ionotropic gelation เป็นการกักเก็บแอนติเจนของไคโตแซนนาในพาร์ทิเคลล์ที่เกิดจากอันตราริริยาของแอนติเจนซึ่งเป็นสารประเททโปรดีนที่มีประจุเป็นลบ กับประจุบวกของไคโตแซน ทำให้สามารถเปลี่ยนโอลูบูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาในพาร์ทิเคลล์เป็นแอนติเจนชนิดอื่นได้โดยไม่ต้องปรับเปลี่ยนโครงสร้างของแอนติเจน จึงสามารถประยุกต์ใช้กับวัคซีนที่มีอยู่เดิมได้ง่าย และสามารถใช้สำหรับนำส่งวัคซีนชนิดโปรดีน ชั้บยูนิต (subunit vaccine) ซึ่งเป็นชนิดของวัคซีนใหม่ที่มีแนวโน้มของการพัฒนาแก้ไขอย่างมาก เนื่องจากวัคซีนชนิดชั้บยูนิตมีผลข้างเคียงน้อยเมื่อเทียบกับวัคซีนชนิดดั้งเดิม ทั้งวัคซีนชนิดเชื้อตาย (killed vaccine) และ ชนิดเชื้อมีชีวิตอ่อนฤทธิ์ (live attenuated vaccine) แต่การที่วัคซีนชนิดชั้บยูนิต มีคุณสมบัติ immunogenicity ต่ำ จึงเป็นข้อจำกัดในการนำมาใช้ประโยชน์ ซึ่งการกักเก็บวัคซีนชนิดชั้บยูนิตในไคโตแซนนาในพาร์ทิเคลล์เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถช่วยเสริมฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันของวัคซีนชนิดชั้บยูนิตได้ อย่างไรก็ตามการปรับเปลี่ยนชนิด หรือ ขนาดของแอนติเจนที่กักเก็บในไคโตแซนนาในพาร์ทิเคลล์ ทำให้ไคโตแซนนาในพาร์ทิเคลล์ที่ได้มีขนาดแตกต่างไปจากขนาดของไคโตแซนนาในพาร์ทิเคลล์ที่กักเก็บโอลูบูมิน จึงจำเป็นต้องปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลายไคโตแซน และสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP ในสูตรคำรับ เพื่อให้ได้ไคโตแซนนาในพาร์ทิเคลล์ขนาดน้อยกว่า 1,000 nm จากรายงานการวิจัยในปัจจุบันพบว่า การนำส่งวัคซีนทางจมูก มีประสิทธิภาพในการป้องกันติดเชื้อทางเยื่อบุผิวหนังกว่าการให้วัคซีนแบบฉีด ทั้งในการป้องโรคที่เกิดในมนุษย์และสัตว์ โดยงานวิจัยนี้ได้ทำการทดลองในหนู mice ซึ่งมีโครงสร้างของจมูกและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันคล้ายคลึงกับมนุษย์ และสุกร (Barnnard, 2010) ทำให้สามารถใช้ผลการวิจัยนี้ในการพัฒนาระบบน้ำส่งวัคซีนทางจมูกด้วยไคโตแซนนาในพาร์ทิเคลล์สำหรับป้องกันโรคติดเชื้อทางเยื่อบุผิวในมนุษย์และสุกร ได้ เช่น วัคซีนป้องกันไข้หวัดใหญ่ วัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบ ชนิด บี ในมนุษย์ และโรคหิวต์สุกร (classical swine fever) เป็นต้น หากต้องการนำส่งวัคซีนทางจมูกในสัตว์ชนิดอื่น จำเป็นต้องทำการประเมินฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ชนิดนั้นๆ

เอกสารอ้างอิง

ເອກສານອ້າງອີງ

- Abdelwahed, W. and et al. "Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations", Advanced Drug Delivery Reviews. 58: 1688-1713, 2006.
- Acevedo, R. and et al. "Intranasal administration of proteoliposome-derived cochleates from *Vibrio cholerae* O1 induce mucosal and systemic immune responses in mice", Methods. 49: 309-315, 2009.
- Agnihotri, S.A. and et al. "Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery", Journal of Controlled Release. 100: 5-28, 2004.
- Amidi, M. and et al. "Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens", Advanced Drug Delivery Reviews. 62: 59-82, 2010.
- Amidi, M. and et al. "Preparation and characterization of protein-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles as nasal delivery system", Journal of Controlled Release. 111: 107-116, 2006.
- Amorij, J.P. and et al. "Towards tailored vaccine delivery: needs, challenges and perspectives", Journal of Controlled Release. 161(2): 363-376, 2012.
- Arora, P., Sharma, S. and Garg, S. "Permeability issues in nasal drug delivery", Drug Discovery Today. 8(18): 967-975, 2002.
- Baldrick, P. "The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient", Regulatory Toxicology and Pharmacology. 56: 290-299, 2010.
- Barnnard, D.L. "Animal models for the study of influenza pathogenesis and therapy", Antiviral Research. 82: A110-122, 2010.
- Baudner, B.C. and O'Hagan D.T. "Bioadhesive delivery systems for mucosal vaccine delivery", Journal of Drug Targeting. 18(10): 752-770, 2010.
- Bhumkar, D.R. and Pokharkar, V.B. "Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: a technical note", AAPSPharmSciTech. 7(2): E1-6, 2006.

ເອກສາຮ້າງອີງ (ຕ່ອ)

- Bilati, U., Allemann, E. and Doelker, E. "Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles", European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 59: 375-388, 2005.
- Boonyo, W. and et al. "Chitosan and trimethyl chitosan chloride (TMC) as adjuvants for inducing immune responses to ovalbumin in mice following nasal administration", Journal of Controlled Release. 121: 168-175, 2007.
- Borges, O. and et al. "Immune response by nasal delivery of hepatitis B surface antigen and codelivery of a CpG ODN in alginate coated chitosan nanoparticles", European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 69: 405-416, 2008.
- Borges, O. and et al. "Mucosal vaccines: recent progress in understanding the natural barriers", Pharmaceutical Research. 27(2): 211-223, 2010.
- Boonyo, W. and et al. "Chitosan and trimethyl chitosan chloride (TMC) as adjuvants for inducing immune responses to ovalbumin in mice following nasal administration", Journal of Controlled Release. 121: 168-175, 2007.
- Brandtzaeg, P. "Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces", Vaccine. 25: 5467-5484, 2007.
- Brousseau, P. and et al. Manual of immunological methods. Boca Raton: CRC press, 1999.
- Cauley, L.S. and Lefrancois, L. "Guarding the perimeter: protection of the mucosa by tissue resident memory T cells", Mucosal Immunology. 6(1): 14-23, 2013.
- Chenguang, L. and et al. "Preparations, characterizations and applications of chitosan-based nanoparticles", Journal of Ocean University of China. 6(3): 237-243, 2007.
- Chugh, Y., Kapoor, P. and Kapoor A.K. "Intranasal drug delivery: a novel approach", Indian Journal of Otolaryngol Head Neck Surgery. 61: 90-94, 2009.
- Cohen, S., and Bernstein, H. Microparticulate systems for the delivery of proteins and vaccines. New York: Marcel Dekker, 1996.
- Csaba, N., Garcia-Fuentes, M. and Alonso, M.J. "Nanoparticles for nasal vaccination", Advanced Drug Delivery Reviews. 61: 140-157, 2009a.

ເອກສາຣອ້າງອີງ (ຕ່ອ)

- Csaba, N. and et al. "Ionically crosslinked chitosan/tripolyphosphate nanoparticles for oligonucleotide and plasmid DNA delivery", International Journal of Pharmaceutics. 382: 205-214, 2009b.
- Desai, M.P. and et al. "The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent", Pharmaceutical Research. 14: 1568-1573, 1997.
- Dobrovolskaia, M.A. and et al. "Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution", Molecular Pharmaceutics. 5(4): 487-495, 2008.
- Du, W.J. And et al. "Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions", Carbohydrate Polymers. 75: 385-389, 2009.
- Dudhani, A.R. and Kosaraju, S.L. "Bioadhesive chitosan nanoparticles:preparation and characterization", Carbohydrate Polymers. 81: 243-251, 2010.
- Durrani, Z. and et al. "Intranasal immunization with a plant virus expressing a peptide from HIV-1 gp41 stimulates better mucosal and systemic HIV-1-specific IgA and IgG than oral immunization", Journal of Immunological Methods. 220: 93-103, 1998.
- Fan, W. and et al. "Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 90:21-27, 2012.
- Flecknell, P. Laboratory animal anaesthesia third edition. Amsterdam: Academic press, 2009.
- Frank, J. and Griffin, T. "A strategic approach to vaccine development: animal models, monitoring vaccine efficacy, formulation and delivery", Advanced Drug Delivery Reviews. 54: 851-861,2002.
- Frey, A., Canzio, J.D. and Zurakowski, D. "A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays", Journal of Immunological Methods. 221: 35-41, 1998.
- Fujihashi, K. and Kiyono, H. "Mucosal immunosenescence: new developments and vaccines to control infectious diseases", Trends in Immunology. 30(7): 334-343, 2009.

ເອກສາຮອງອີງອີງ (ຕໍ່ອ)

- Gan, G. and et al. "Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan - TPP nanoparticles intended for gene delivery", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 44: 65-73, 2005.
- Gan, Q. and Wang, T. "Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier-systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 59: 24-34, 2007.
- Grassin-Delyle, S. and et al. "Intranasal drug delivery: an efficient and non-invasive route for systemic administration", Pharmacology and Therapeutics. 134: 366-379, 2012.
- Green, C. and et al. "Ketamine alone and combined with diazepam or xylazine in laboratory animals: a 10 year experience", Laboratory Animals. 15: 163-170, 1981.
- Grenha, A. and et al. "Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery", European Journal of Pharmaceutical Sciences. 25: 427-437, 2005.
- Gross, E.A. and et al. "Comparative morphometry of the nasal cavity in rat and mice", Journal of Anatomy. 135(1): 83-88, 1982.
- Gupta, N.K. and et al. "Development and characterization of chitosan coated polycaprolactone nanoparticulate system for effective immunization against influenza", Vaccine. 29: 9026-9037, 2011.
- Gutierrez, I. and et al. "Size dependent immune response after subcutaneous, oral and intranasal administration of BSA loaded nanospheres", Vaccine. 21: 67-77, 2002.
- Hafner, A. and et al. "Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles: physicochemical characterisation and permeability through Caco-2 cell monolayers", International Journal of Pharmaceutics. 381: 205-213, 2009.
- Hafner, A. and et al. "Short- and long-term stability of lyophilised melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles", Chem Pharm Bull. 59(9): 1117-1123, 2011.
- Harikarnpakdee, S. and et al. "Spray-dry mucoadhesive microspheres: preparation and transport through nasal cell monolayer", AAPSPharmSciTech. 7(1): E1-10, 2006.

ເອກສາຮອ້ານອີງ (ຕ່ອ)

- Harkema, J.R., Carey, S. and Wagner, J.G. "The nose revisited: a brief review of the comparative Structure, function, and toxicologic pathology of the nasal epithelium", Toxicologic Pathology. 34: 252-269, 2006.
- He, C. and et al. "Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles", Biomaterials. 31: 3657-3666, 2010.
- Henderson, A. and et al. "Mucosal immunization with liposome-nucleic acid adjuvants generates effective humoral and cellular immunity", Vaccine. 29: 5304-5312, 2011.
- Henriksen-Lacey, M., Devitt, A. and Perrie, Y. "The vesicle size of DDA: TDB liposomal adjuvants plays a role in the cell-mediated immune response but has no significant effect on antibody production", Journal of Controlled Release. 154(2): 131-137, 2011.
- Hirano, T. and et al. "Kinetics of mouse antibody and lymphocyte responses during intranasal vaccination with a lipooligosaccharide-based conjugate vaccine", Immunology Letters. 107: 131-139, 2006.
- Hirsjarvi, S. Preparation and characterization of poly(Lactic Acid) nanoparticles for pharmaceutical use. Doctor's thesis. Finland: University of Helsinki, 2008.
- Hobson, P. and et al. "Mucosal immunization with DNA vaccines", Methods. 31: 217-224, 2003.
- Hoven, V.P. and et al. "Surface-charged chitosan: Preparation and protein adsorption", Carbohydrate Polymers. 68: 44-53, 2007.
- Illum, L. "Nasal drug delivery -Recent developments and future prospects", Journal of Controlled Release. 161(2): 254-63, 2012
- Irache, M.J. and et al. "Nanomedicine: novel approaches in human and veterinary therapeutics", Veterinary Parasitology. 180: 47-71, 2011.
- Jabbal-Gill, I. "Nasal vaccine innovation", Journal of targeting. 18(10): 771-788, 2010.
- Jadhav, K.R. and et al. "Nasal drug delivery system-factors affecting and applications", Current Drug Therapy. 2: 27-38, 2007.

ເອກສາຮ່ວງອີງ (ຕ່ອ)

- Joo, H.M. and et al. "Quantitative analysis of influenza virus-specific B cell memory generated by different routes of inactivated virus vaccination", Vaccine. 28: 2186-2194, 2010.
- Joshi, V.B., Geary, S.M. and Salaem, A.K. "Biodegradable particles as vaccine delivery systems : size matters", The AAPS Journal. 15(1): 85-94, 2013.
- Jung, T. and et al. "Tetanus toxoid loaded nanoparticles from sulfobutylated poly(vinyl alcohol)-graft-poly(lactide-co- glycolide): evaluation of antibody response after oral and nasal application in mice", Pharmaceutical Research. 18(3): 352-360, 2001.
- Kammona, O. and et al. "Nanocarrier aided nasal vaccination: an experimental and computational approach", Industrial and Engineering Chemistry Research. 50: 590-601, 2011.
- Kanchan, V. and Panda, K.A. "Interactions of antigen loaded polylactide particles with macrophages and their correlation with the immune response", Biomaterials. 28: 5344-5357, 2007.
- Kang, M.L., Cho, C.S. and Yoo, H.S. "Application of chitosan microspheres for nasal delivery of vaccines", Biotechnology Advances. 27: 857-865, 2009.
- Keawchaoon, L. and Yoksan, R. "Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 84: 163-171, 2011.
- Khatri, K. and et al. "Plasmid DNA loaded chitosan nanoparticles for nasal mucosal immunization against hepatitis B", International Journal of Pharmaceutics. 354: 235-241, 2008.
- Kim, B. and Kang, I. "Evaluation of the effects of biodegradable nanoparticles on a vaccine delivery system using AFM, SEM, and TEM", Ultramicroscopy. 108: 1168-1173, 2008.
- Kobiasi, M.A. and et al. "Control of size dispersity of chitosan biopolymer microparticles and nanoparticles to influence vaccine trafficking and cell uptake", Journal of Biomedical Materials Research Part A. 100(7): 1859-1867, 2012.

ເອກສາຣ໌ນອິງ (ຕໍ່ອ)

- Koppolu, B. and Zaharoff, D.A. "The effect of antigen encapsulation in chitosan particles on uptake, activation and presentation by antigen presenting cells", Biomaterials. 34: 2359-2369, 2013.
- Kouchak, M. and et al. "Effect of different molecular weights of chitosan on preparation and characterization of insulin loaded nanoparticles by ion gelation method", International Journal of Drug Development and Research. 4(2): 271-277, 2012.
- Kozlowski, P.A. and et al. "Differential induction of mucosal and systemic antibody responses in women after nasal, rectal, or vaginal immunization: influence of the menstrual cycle", The Journal of Immunology. 169: 566-547, 2002.
- Krishnakumar, D. and et al. "Evaluation of mucoadhesive nanoparticle based nasal vaccine", Journal of Pharmaceutical Investigation. 42:315-326, 2012.
- Lameiro, M.H. and et al. "Incorporation of a model protein into chitosan-bile salt microparticles", International Journal of Pharmaceutics. 312: 119-130, 2006.
- Lavelle, E.C. "Generation of improved mucosal vaccines by induction of innate immunity", Cellular and molecular life sciences. 62: 2750-2770, 2005.
- Lee, D.W. Engneered chitosans for drug detoxification: preparation, characterization and drug uptake studies. Doctor's Thesis. Florida: University of Florida, 2004.
- Look, M. and et al. "Application of nanotechnologies for improved immune response against infectious diseases in the developing world", Advanced Drug Delivery Reviews. 62: 378-393, 2010.
- Lubben, I.M. and et al. "Chitosan for mucosal vaccination", Advanced Drug Delivery Reviews. 52: 139-144, 2001.
- Makidon, P.E. and et al. "Pre-clinical evaluation of a novel nanoemulsion-based hepatitis B mucosal vaccine", Plosone. 3(8): e2954, 2008.
- Mangal, S. and et al. "Pharmaceutical and immunological evaluation of mucoadhesive nanoparticles based delivery system(s) administered intranasally", Vaccine. 29(31): 4953-4962, 2011.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Mao, S. and et al. "Uptake and transport of PEG-graft-trimethyl-chitosan copolymer-insulin nanocomplexes by epithelial cells", Pharmaceutical Research. 22(12): 2058-2068, 2005.
- Marie-Luce, D.T. and et al. "Particulate vaccines: on the quest for optimal delivery and immune response", Drug Discovery Today. 16 (13): 569-582, 2011.
- Meeusen, E.N. "Exploiting mucosal surfaces for the development of mucosal vaccines", Vaccine. 29: 8506-8511, 2011.
- Mestecky, J. and et al. "Antibody-mediated protection and the mucosal immune system of the genital tract: relevance to vaccine design", Journal of Reproductive Immunology. 85: 81-85, 2010.
- Mishara, N., and et al. "Recent advances in mucosal delivery of vaccines: role of mucoadhesive/biodegradable polymeric carriers", Exper Opinion. 20(5): 661-679, 2010.
- Mohammadpourdounighi, N. and et al. "Preparation of chitosan nanoparticles containing *Naja naja oxiana* snake venom", Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. 6: 137-143, 2010.
- Mohanan, D. and et al. "Administration routes affect the quality of immune responses : a cross-sectional evaluation of particulate antigen-delivery systems", Journal of Controlled Release. 147: 342-349, 2010.
- Morris, G.A. and et al. "Polysaccharide drug delivery systemsbased on pectin and chitosan", Biotechnology and Genetic Engineering Reviews. 27: 257-284, 2010.
- Morris G.A. and et al. "The effect of prolonged storage at different temperatures on the particle sizedistribution of tripolyphosphate (TPP)-chitosan nanoparticles", Carbohydrate Polymers. 84: 1430-1434, 2011.
- Moschos, S.A. and et al. "Comparative immunomodulatory properties of a chitosan-MDP adjuvant combination following intranasal or intramuscular immunization", Vaccine. 23: 1923-1930, 2005.

ເອກສາຣອ້າງອີງ (ຕ່ອ)

- Muzzarelli, R.A. "Chitins and chitosans as immunoadjuvants and non-allergenic drug carriers", Marine Drugs. 8(2): 292-312, 2008.
- Nagamoto, T. and et al. "Novel chitosan particles and chitosan-coated emulsions inducing immune response via intranasal vaccine delivery", Pharmaceutical Research. 27(4): 671-674, 2004.
- Okamoto, S and et al. "Influenza hemagglutinin vaccine with poly(γ -glutamic acid) nanoparticles enhances the protection against influenza virus infection through both humoral and cell-mediated immunity", Vaccine. 25: 8270-8278, 2007.
- Oyewumi, M.O. and et al. "Nano-microparticles as immune adjuvants: correlating particle sizes and the resultant immune responses", Expert Review of Vaccines. 9(9): 1095-1107, 2010.
- Ozsoy, Y., Gungor, S. and Cevher, E. "Nasal delivery of high molecular weight drugs", Molecules. 14: 3754-3779, 2009.
- Park, J. and Babensee, J.E. "Differential function effect of biomaterial on dendritic maturation", Acta Biomaterialia. 8: 3606-3617, 2012.
- Pattani, A. and et al. "Immunological Effects and Membrane Interactions of Chitosan Nanoparticles", Molecular Pharmaceutics. 6(2): 345-352, 2009.
- Pavot, V. and et al. "New insights in mucosal vaccine development", Vaccine. 30: 142-154, 2012.
- Peek, L., Middaugh, C.R. and Berkland, C. "Nanotechnology in vaccine delivery", Advanced Drug Delivery Reviews. 60: 915-928, 2008.
- Pillai, C.K.S., Paul, W. and Sharma, C.P. "Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation", Progress in Polymer Science. 34: 641-678, 2009.
- Prego, C. and et al. "Chitosan-based nanoparticles for improving immunization against hepatitis B infection", Vaccine. 28: 2607-2614, 2010.
- Rajapaksa, T.E. and et al. "Claudin 4-targeted protein incorporated into PLGA nanoparticle can mediate M cell targeted delivery", Journal of Controlled Release. 142: 196-205, 2010.

ເອກສາຮອ້າງອີງ (ຕ່ອ)

- Rice-Ficht, A.C. and et al. "Polymeric particles in vaccine delivery", Current Opinion in Microbiology. 13: 106-112, 2010.
- Sadeghi, A.M.M. and et al. "Preparation, characterization and antibacterial activities of chitosan,N-trimethyl chitosan (TMC) and N-diethylmethyl chitosan (DEMC) nanoparticles loaded with insulin using both the ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation methods", International Journal of Pharmaceutics. 355: 299-306, 2008a.
- _____. "Permeation enhancer effect of chitosan and chitosan derivatives: comparison of formulations as soluble polymers and nanoparticulate systems on insulin absorption in Caco-2 cells", European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 70: 270-278, 2008b.
- Sato, S. and Kiyono, H. "The mucosal immune system of the respiratory tract", Current Opinion in Virology. 2: 225-232, 2012.
- Scherließ, R. and Trows, S. "Novel formulation concept for particulate uptake of vaccines via the nasal associated lymphoid tissue", Procedia in Vaccinology. 4: 113-119, 2011.
- Shahiwala, A., Vyas, T.K. and Amiji, M.M. "Nanocarriers for systemic and mucosal vaccine delivery", Recent Patents on Drug Delivery and Formulation. 1: 1-9, 2007.
- Shahnaz, G. and et al. "Thiolated chitosan nanoparticles for the nasal administration of leuprolide: Bioavailability and pharmacokinetic characterization", International Journal of Pharmaceutics. 428: 164-170, 2012.
- Shim, D. and et al. "Efficacy of poly[di(sodium carboxylatophenoxy)phosphazene] (PCPP) as mucosal adjuvant to induce protective immunity against respiratory pathogens", Vaccine. 28: 2311-2317, 2010.
- Shim, D. and et al. "Immunogenicity and protective efficacy offered by a ribosomal-based vaccine from *Shigella flexneri* 2a", Vaccine. 25: 4828-4836, 2007.
- Shu, X.Z. and Zhu, K.J. "Controlled drug release properties of ionically cross-linked chitosan beads: the influence of anion structure", International Journal of Pharmaceutics. 233: 217-225, 2002.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Slutter, B. and et al. "Adjuvant effect of cationic liposomes and CpG depends on administration route", Journal of Controlled Release. 154: 123-130, 2011.
- Slutter, B. and et al. "Mechanistic study of the adjuvant effect of biodegradable nanoparticles in mucosal vaccination", Journal of Controlled Release. 138(2): 113-121, 2009.
- Slutter, B. and Jiskoot, W. "Dual role of CpG as immune modulator and physical crosslinker in ovalbumin loaded N-trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles for nasal vaccination", Journal of Controlled Release. 148: 117-121, 2010.
- Stano, A. and et al. "Nanoparticle size influences the magnitude and quality of mucosal immune responses after intranasal immunization", Vaccine. 30: 7541-7546, 2012.
- Stano, A. and et al. "PPS nanoparticles as versatile delivery system to induce systemic and broad mucosal immunity after intranasal administration", Vaccine. 29: 804-812, 2011.
- Sui, Z. and et al. "Cross-protection against influenza virus infection by intranasal administration of M1-based vaccine with chitosan as an adjuvant", Vaccine. 28: 7690-7698, 2010.
- Tafaghodi, M., Jaafari, M.R. and Nikouzadeh, A. "Evaluation of systemic and mucosal immune responses following the nasal immunization by various sizes of liposomes encapsulated with tetanus toxoid", Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 9(4): 223-230, 2007.
- Thakur, A. and et al. "Immune marker and correlates of protection for vaccine induced immune responses", Vaccine. 30: 2407-2420, 2012.
- Tiyaboonchai, W. "Chitosan nanoparticles: a promising system for drug delivery", Naresuan University Journal. 11(3): 51-66, 2003.
- Tsai, M.L., Bai, S.W. and Chen, R.S. "Cavitation effects versus stretch effects resulted in different size and poly dispersity of ionotropic gelation chitosan-sodium tripolyphosphate nanoparticle", Carbohydrate Polymers. 71: 448-457, 2008.
- Tsai, M.L. and et al. "The storage stability of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles in a phosphate buffer", Carbohydrate Polymers. 84(2): 756-761, 2010.
- Vila, A. and et al. "PLA-PEG particles as nasal protein carriers: the influence of the particle size", International Journal of Pharmaceutics. 292: 43-52, 2005.

ເອກສາຮ້າງອີງ (ຕ່ອ)

- Villasaliv, D. and et al. "Tight junction modulation by chitosan nanoparticles: Comparison with chitosan solution", International Journal of Pharmaceutics. 400: 183-193, 2010.
- Vujanic, A. and et al. "Mucosal vaccination : Lung versus nose", Veterinary Immunology and Immunopathology. 148: 172-177, 2012.
- Walker, J.M. The Protein Protocols Handbook. 2nd Edition. New jersey: Humana Press, 2002.
- Wang, J.J. and et al. "Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers", International Journal of Nanomedicine. 6: 765-774, 2011.
- Wei, C. and et al. "Immunogenicity and protective efficacy of orally or intranasally administered recombinant *Lactobacillus casei* expressing ETEC K99", Vaccine. 28(24): 4113-4118, 2010.
- Wen, Z.S. and et al. "Chitosan nanoparticles act as an adjuvant to promote both Th1 and Th2 immune response induced by ovalbumin in mice", Marine Drugs. 9: 1038-1055, 2011.
- Xu, Y. and Du, Y. "Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles", International Journal of Pharmaceutics. 250: 215-226, 2003.
- Yan, Z.Gu, W. and Xu, Z.P. "Re-considering how particle size and other properties of antigen-adjuvant complexes impact on the immune responses", Journal of Colloid and Interface Science. 395: 1-10, 2013.
- Yue, H. and et al. "Particle size affects the cellular response in macrophages", European Journal of Pharmaceutical Sciences. 41: 650–657, 2010.
- Zaman, M., Chandrudu, S. and Toth, I. "Strategies for intranasal delivery of vaccines", Drug Delivery and Translational Research. 3: 100-109, 2013.

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเซลล์

1 การตั้งตัวรับโอลูมินีทีก็เก็บใน ไคโตแซนนาโนพาร์ทิ Kul

1.1 Acetic acid ความเข้มข้น 1 % w/v pH -3.5 (1 L)

Glacial acetic acid	1	mL
น้ำปราศจากไออกอน	950	mL
ผสมทึ้งหมุนให้เข้ากัน แล้วปรับ pH เท่ากับ 3.5 ด้วย 1 N NaOH		
ปริมาตรตัวน้ำปราศจากไออกอนจนครบ 1,000 mL		

2 BCA assay

2.1 BCA reagent B

Cupric sulfate (5X hydrated)	0.4	g
น้ำปราศจากไออกอน	10	mL

2.2 BCA working reagent

BCA reagent A (Thermo scientific, Germany)	50	mL
BCA reagent B	1	mL
ผสมให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ในภาชนะทึบแสง ที่อุณหภูมิ 4 °C		

3 การทดสอบการปลดปล่อยแอนติเจนจากอนุภาคไคโตแซนนาโนพาร์ทิ Kul

3.1 Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 (1 L)

Disodium hydrogen phosphate	2.39	g
Potassium dihydrogen phosphate	0.19	g
Sodium chloride	8.00	g
น้ำปราศจากไออกอน	850	mL
ผสมทึ้งหมุนให้เข้ากัน แล้วปรับ pH เท่ากับ 7.4 ด้วย 1 N NaOH แล้วปรับปริมาตรตัวน้ำปราศจากไออกอนจนครบ 1,000 mL		

3.2 Phosphate buffer saline (PBS) pH 6.8 (1 L)

Disodium hydrogen phosphate	11.05	g
Glacial acetic acid	953.5	µL
น้ำปราศจากไออกอน	850	mL

ผสมทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วปรับ pH เท่ากับ 6.8 ด้วย 1 N NaOH แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไออกอนจนครบ 1,000 mL

3.3 Phosphate buffer saline (PBS) pH 4.5 (1 L)

Potassium dihydrogen phosphate	6.8	g
น้ำปราศจากไออกอน	850	mL

ผสมทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วปรับ pH เท่ากับ 4.5 ด้วย 1 N NaOH แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไออกอนจนครบ 1,000 mL

4 การทดสอบความคงตัวของแอนติเจนที่กักเก็บในไคโตแซนนานในพาร์ทิคล

4.1 Separating gel buffer (400 mL)

Tris HCl	18.15	g
10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)	4	mL
น้ำปราศจากไออกอน	380	mL
ปรับ pH ให้ได้ 8.8 ด้วย 1 N NaOH		
ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไออกอนจนครบ	400	mL
เก็บ Separating gel buffer ที่อุณหภูมิ 4 °C		

4.2 Stacking gel buffer (200 mL)

Tris HCl	3	g
10% SDS	2	mL
น้ำปราศจากไออกอน	150	mL
ปรับ pH ให้ได้ 6.8 ด้วย 1 N NaOH		
ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไออกอนจนครบ	200	mL
เก็บ Stacking gel buffer ที่อุณหภูมิ 4 °C		

4.3 10X running buffer (500 mL)

Tris HCl	15	g
10% SDS	10	mL
Glycine	72	g
น้ำปราศจากไออกอน	450	mL
ปรับ pH ให้ได้ 8.8 ด้วย 1 N NaOH		
ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไออกอนจนครบ	500	mL

เก็บ 10X running buffer ที่อุณหภูมิ 4 °C

4.4 Sample buffer (20 mL)

Stacking gel buffer	12	mL
10% SDS	4	mL
Glycerol	3	mL
Bromophenol blue	50	mg
2-mercaptoethanol	1	mL

เก็บ Sample buffer ที่อุณหภูมิ 4 °C

5 การเลี้ยงเซลล์ splenocytes

5.1 Incomplete RPMI 1640 medium (1 L)

RPMI 1640 medium	1	ซอง
น้ำกั้น	1	L
Sodium bicarbonate	2	g

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 และกรองผ่าน membrane 0.22 μm

เก็บ incomplete RPMI 1640 medium ในสภาวะปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 4 °C

5.2 10% Fetal bovine serum (100 mL)

Inactivated Fetal Bovine serum	10	mL
PBS pH 7.0	90	mL

เก็บ 10% fetal bovine serum ในสภาวะปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 4 °C

5.3 Complete RPMI 1640 medium (100 mL)

Inactivated Fetal Bovine serum	10	mL
Incomplete RPMI 1640 medium	89	mL

เก็บ complete RPMI 1640 medium ในสภาวะปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 4 °C

5.4 Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 (1 L)

Sodium phosphate	1.44	g
Potassium phosphate	0.24	g
Sodium chloride	8	g
Potassium chloride	0.2	g
น้ำกั้น	1	L

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 และกรองผ่าน membrane 0.22 μm
เก็บ PBS pH 7.4 ในสภาวะปิดอุ่นที่อุณหภูมิ 4 °C

5.5 ACK lysing buffer (1 L)

Ammonium chloride	8.3	g
Sodium bicarbonate	1.0	g
Disodium EDTA	0.036	g
น้ำกลั่น	1	L

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 และกรองผ่าน membrane 0.22 μm
เก็บ ACK lysing buffer ในสภาวะปิดอุ่นที่อุณหภูมิ 4 °C

6 การวิเคราะห์ IgG, sIgA, IL-4 และ IFN-γ

6.1 0.1 M sodium carbonate pH 9.5 (1 L)

Sodium hydrogen carbonate	7.13	g
Disodium carbonate	1.59	g
น้ำประจุออกไอออน	1	L

ปรับ pH ให้ได้ 9.5 ด้วย 1 N NaOH

6.2 Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.0 (1 L)

Disodium hydrogen phosphate	11.6	g
Potassium dihydrogen phosphate	2	g
Sodium chloride	80	g
Potassium chloride	2	g
น้ำประจุออกไอออน	1	L

ปรับ pH ให้ได้ 7.0 ด้วย 1 N NaOH

นำ phosphate buffer saline ที่ได้ไป autoclave และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

6.3 0.05% Tween 20 (1 L)

Tween 20	0.5	mL
PBS pH 7.0	999.5	mL

เก็บ 0.05% Tween 20 ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

ภาคผนวก ข
การเตรียม *splenocytes*

1 การเก็บตัวอย่างม้ามและแยก splenocytes คัดแปลงจากวิธีการของ Broussecau et al. (1998)

- 1.1 ฉ่านูนให้ด้วยอั่งสับด้วยการฉีด ketamine ผสม xylazine มากกว่า 200 mg และ 16 mg ต่อ น้ำหนักตัวหนูหนึ่งกิโลกรัมตามลำดับ โดยการฉีดทางช่องท้อง (intraperitoneal injection; IP)
- 1.2 จับหนูนอนตะแคงซ้าย และใช้กรรไกรตัดแยกม้ามออกมา เช่นใน completed RPMI 1640 เก็บตัวอย่างม้ามที่อุณหภูมิ 4 °C
- 1.3 ครุค ม้ามผ่าน 70 µm nylon sieve sterile จนได้ cell suspension ใน completed RPMI 1640
- 1.4 ปั่นเหวี่ยง cell suspension ที่ 1,500 rpm นาน 10 นาที อุณหภูมิ 4 °C
- 1.5 เติม ACK lysing buffer และปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 rpm นาน 10 นาที อุณหภูมิ 4 °C ทำซ้ำ 2 ครั้ง เพื่อทำลายเม็ดเลือดแดง และแยก splenocytes
- 1.6 เติม incompleted RPMI 1640 และปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 rpm นาน 10 นาที อุณหภูมิ 4 °C ทำซ้ำ 3 ครั้ง และเก็บ cell stock ใน completed RPMI 1640 ปริมาตร 2 mL
- 1.7 ทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ตัวชี้วิธี trypan blue dry method และนับเซลล์ตัวชี้ hematocytometer คำนวณหา % viability จากสูตร

$$\% \text{ viability} = (A/B) \times 100 \quad (\text{ข.1})$$

เมื่อ A คือ จำนวนเซลล์มีชีวิตที่นับได้

B คือ จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่นับได้

เซลล์ที่จะนำไปใช้ทดสอบการหลังใช้ได้คั้นต้องมี % viability มากกว่า 80 %

ภาคผนวก ก
สูตรการคำนวณที่เกี่ยวข้อง

1 การประเมินคุณสมบัติทางกายภาพด้วยเครื่อง particle size analyzer

1.1 การหาขนาดอนุภาค

$$r = \frac{kT}{3\pi v D} \quad (ค.1)$$

เมื่อ r คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาค

k คือ ค่าคงที่ของ Boltzmann เท่ากับ 1.38×10^{-23} จูล/เคลวิน

T คือ อุณหภูมิสัมบูรณ์ (absolute temperature)

v คือ ความหนืดของสารละลายน้ำ (viscosity)

D คือ ตัวมั่งคะที่ของการแพร่ (diffusion coefficient)

1.2 การหาประจุที่พิวอนุภาค

$$UE = \frac{2e z f(Ka)}{3v} \quad (ค.2)$$

เมื่อ z คือ ค่าประจุที่พิวอนุภาค (zeta potential)

UE คือ Electrophoretic mobility

e คือ Dielectric constant ของ medium ที่ใช้คำประจุ

v คือ ความหนืดของสารละลายน้ำ (viscosity)

$f(ka)$ คือ ค่าคงที่ของ Henry ของน้ำปราศจากไอก้อน เท่ากับ 1.5

1.3 การกระจายขนาดของอนุภาค

$$PDI = \frac{D(0.9) - D(0.1)}{D(0.5)} \quad (\text{ค.3})$$

เมื่อ PDI คือ ค่าการกระจายขนาดของอนุภาค (poly dispersity index; PDI)

D(0.9) คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของขนาดอนุภาคที่ 90 % ของอนุภาคทั้งหมด

D(0.1) คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของขนาดอนุภาคที่ 10 % ของอนุภาคทั้งหมด

D(0.5) คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของขนาดอนุภาคที่ 50 % ของอนุภาคทั้งหมด

2 การคำนวณค่า Cutoff point ที่สูงกว่า background ที่ $p < 0.05$

$$\text{Cutoff point} = \frac{\sum X}{n} + SD \sqrt{t + (1/n)} \quad (\text{ค.4})$$

เมื่อ x คือ ค่าที่วัดได้จาก background แต่ละตัวอย่าง

n คือ จำนวนตัวอย่าง background

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของ background

$\sqrt{t + (1/n)}$ คือ สัมประสิทธิ์ของระดับความเชื่อมั่นทางสถิติ (corresponding to confidence levels); f

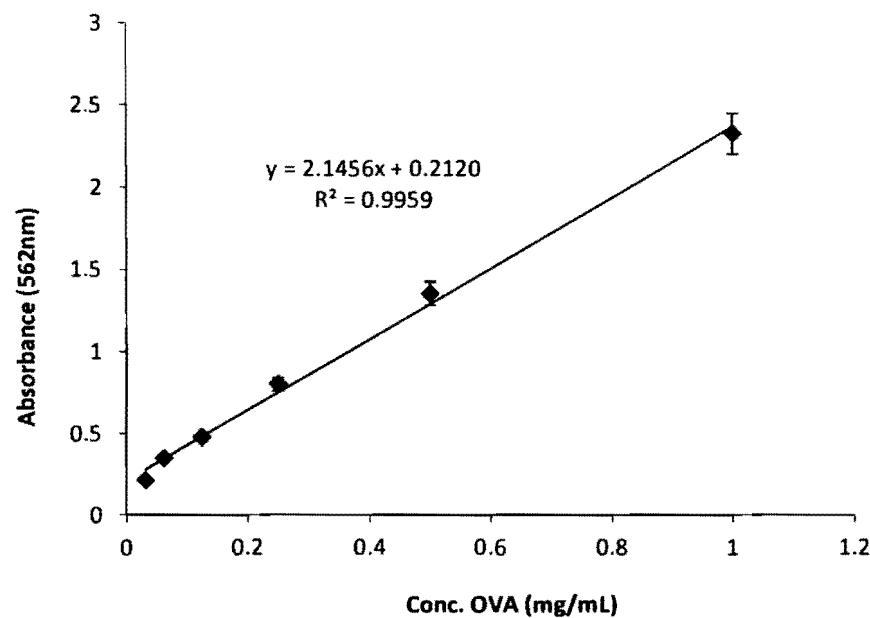
ตารางที่ ค.1 ค่าสัมประสิทธิ์ของระดับความเชื่อมั่นทางสถิติ (Frey et al., 1998)

Standard deviation multipliers (f) for calculation of cutoffs

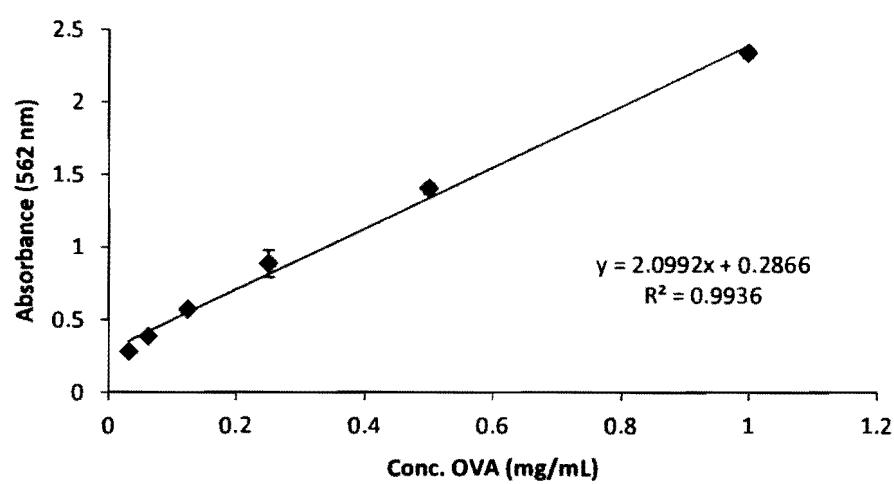
Number of Controls (n)	Confidence level ($1 - \alpha$)				
	95.0%	97.5%	99.0%	99.5%	99.9%
2	7.733	15.562	38.973	77.962	389.823
3	3.372	4.968	8.042	11.460	25.783
4	2.631	3.558	5.077	6.530	11.420
5	2.335	3.041	4.105	5.044	7.858
6	2.177	2.777	3.635	4.355	6.366
7	2.077	2.616	3.360	3.963	5.567
8	2.010	2.508	3.180	3.712	5.076
9	1.960	2.431	3.053	3.537	4.744
10	1.923	2.373	2.959	3.408	4.507
11	1.893	2.327	2.887	3.310	4.328
12	1.869	2.291	2.829	3.233	4.189
13	1.850	2.261	2.782	3.170	4.078
14	1.833	2.236	2.743	3.118	3.987
15	1.819	2.215	2.711	3.074	3.912
16	1.807	2.197	2.683	3.037	3.848
17	1.797	2.181	2.658	3.005	3.793
18	1.787	2.168	2.637	2.978	3.746
19	1.779	2.156	2.619	2.953	3.704
20	1.772	2.145	2.602	2.932	3.668
25	1.745	2.105	2.542	2.852	3.535
30	1.727	2.079	2.503	2.802	3.452

ภาคผนวก ๔
กราฟมาตรฐาน

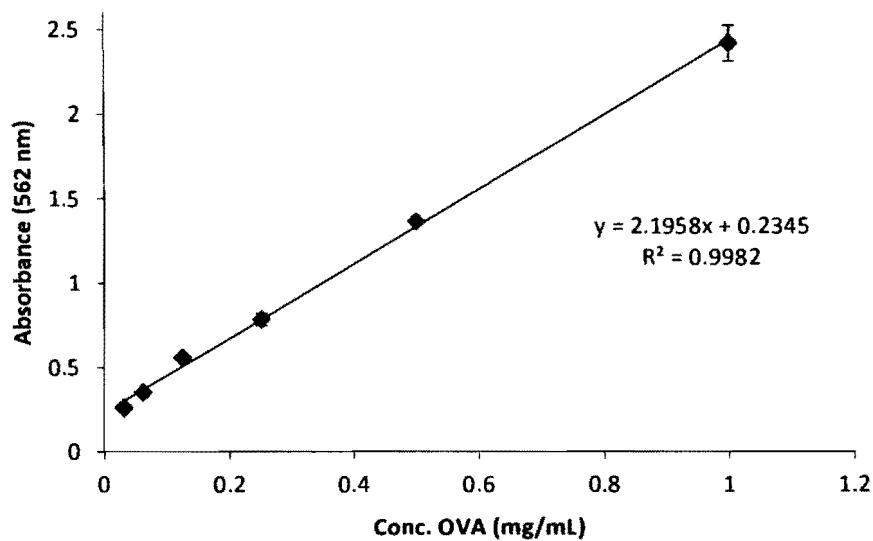
1 กราฟมาตรฐานของปริมาณโอลูมินีทีวิเคราะห์ด้วยวิธี BCA assay



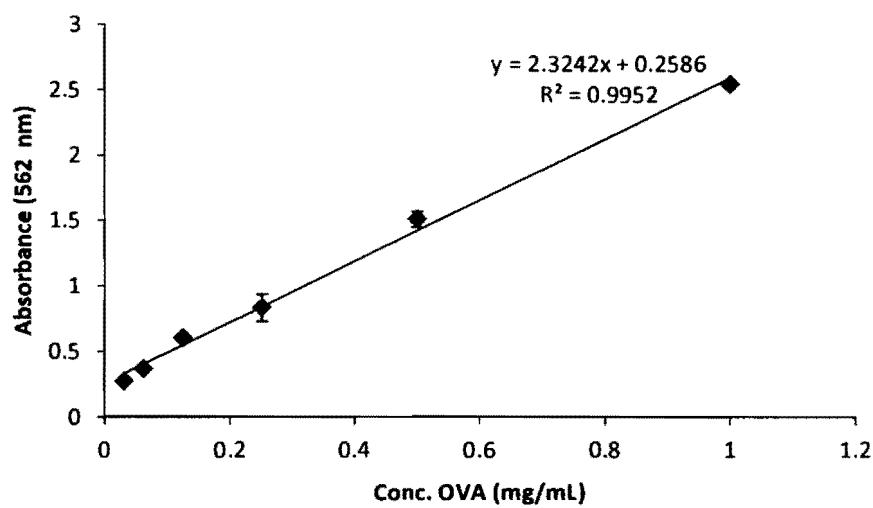
ภาพที่ 4.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของโอลูมินี
ในสารละลายน้ำ acetic acid ความเข้มข้น 1% w/v



ภาพที่ 4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของโอลูมินี
ใน PBS pH 4.5

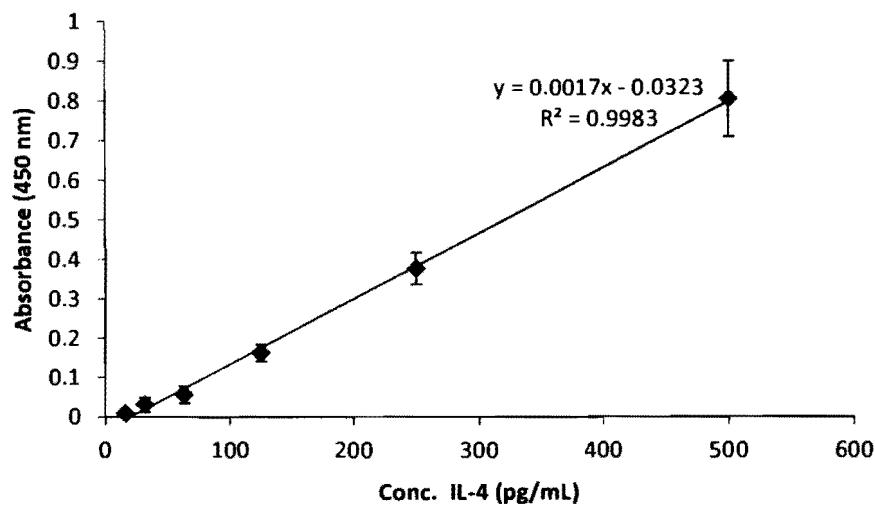


ภาพที่ 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของโอลูบูมินใน PBS pH 6.8

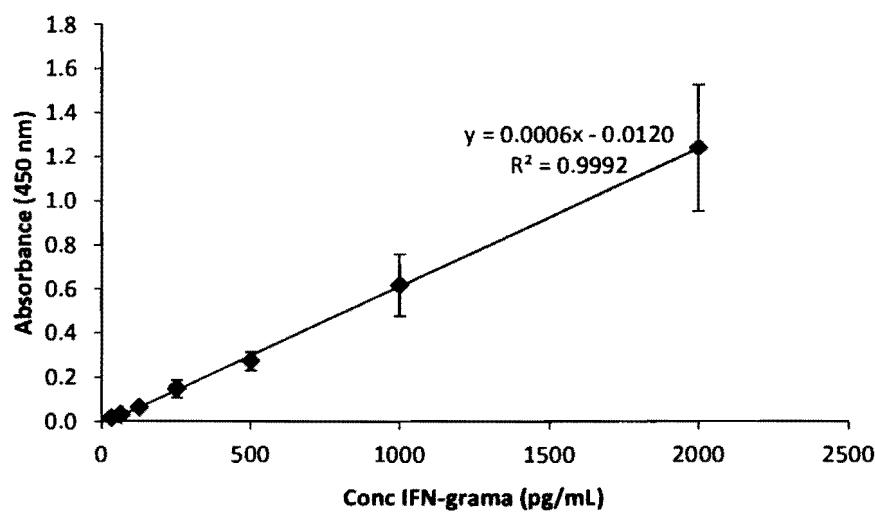


ภาพที่ 4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของโอลูบูมินใน PBS pH 7.4

2 กราฟมาตรฐานของความเข้มข้นของไอก็อกซ์ทีไคน์ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA



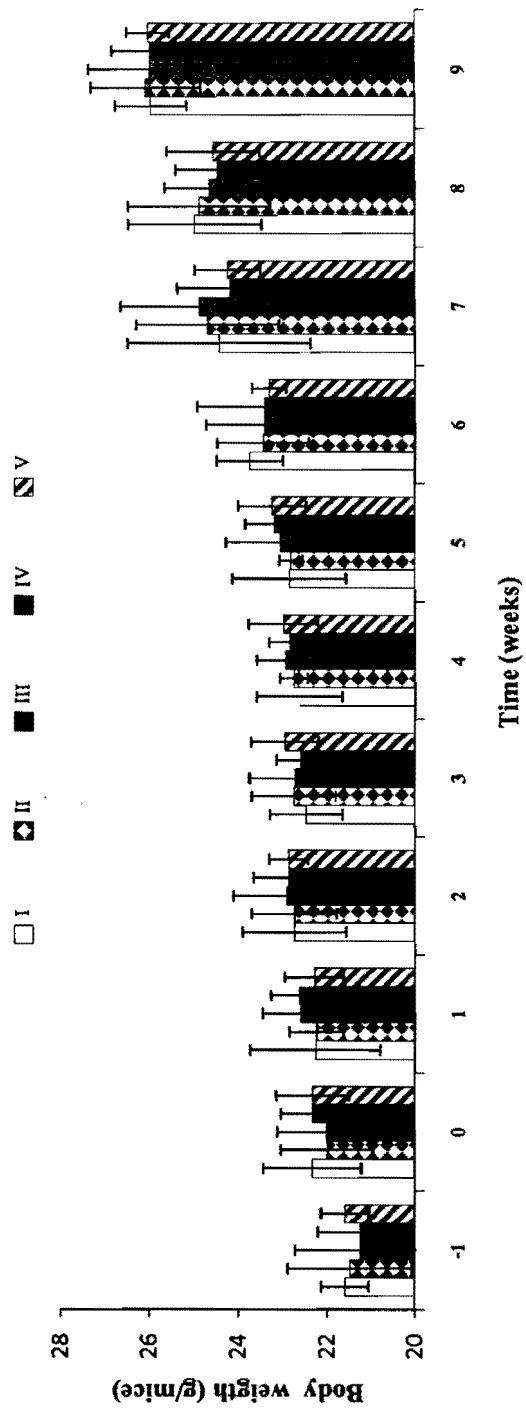
ภาพที่ ๑.๕ กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการคูณก้อนแสงและความเข้มข้นของสารมาตรฐาน IL-4



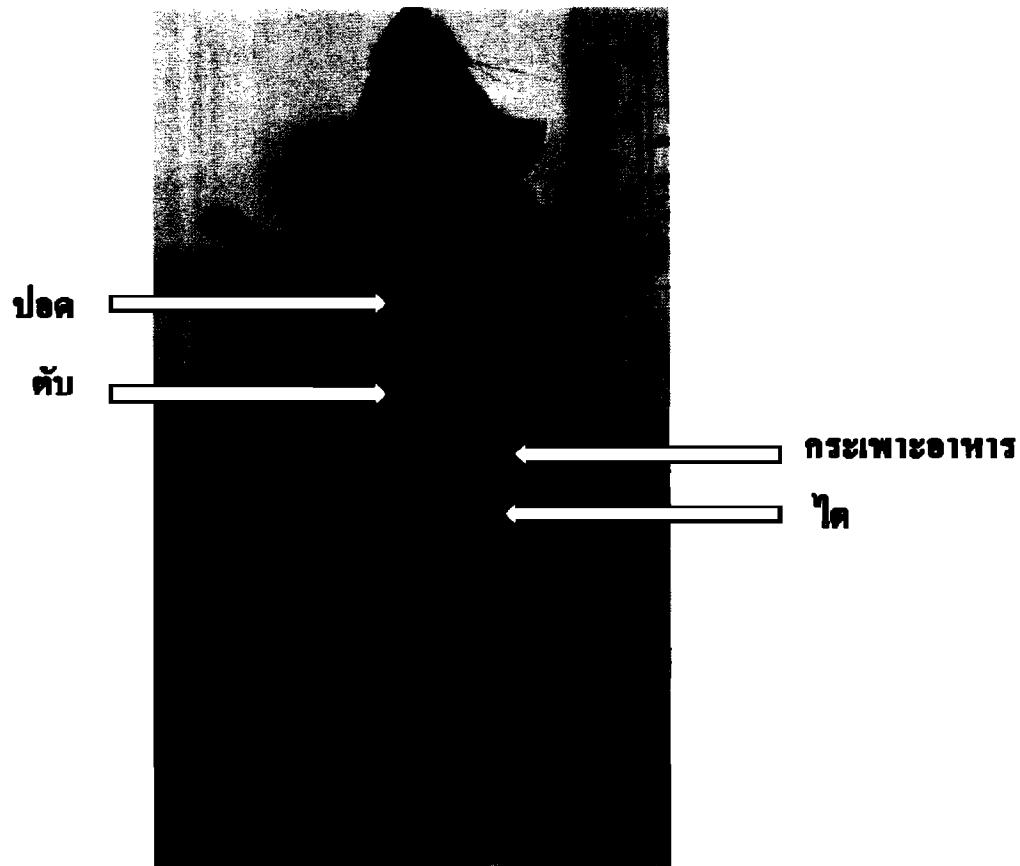
ภาพที่ ๑.๖ กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการคูณก้อนแสงและความเข้มข้นของสารมาตรฐาน IFN-γ

ภาคผนวก จ
พยาธิสภาพของสัตว์ทดลอง

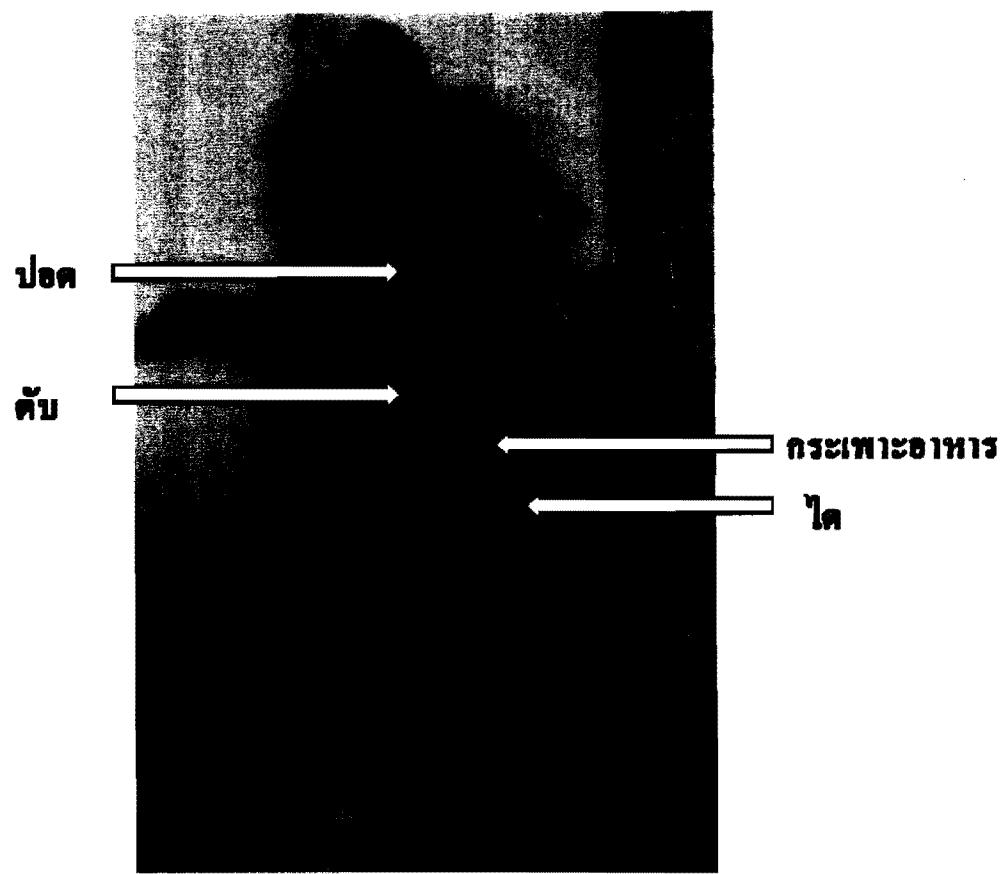
1 การเปลี่ยนแปลงนำพาทุกๆ ด้าน



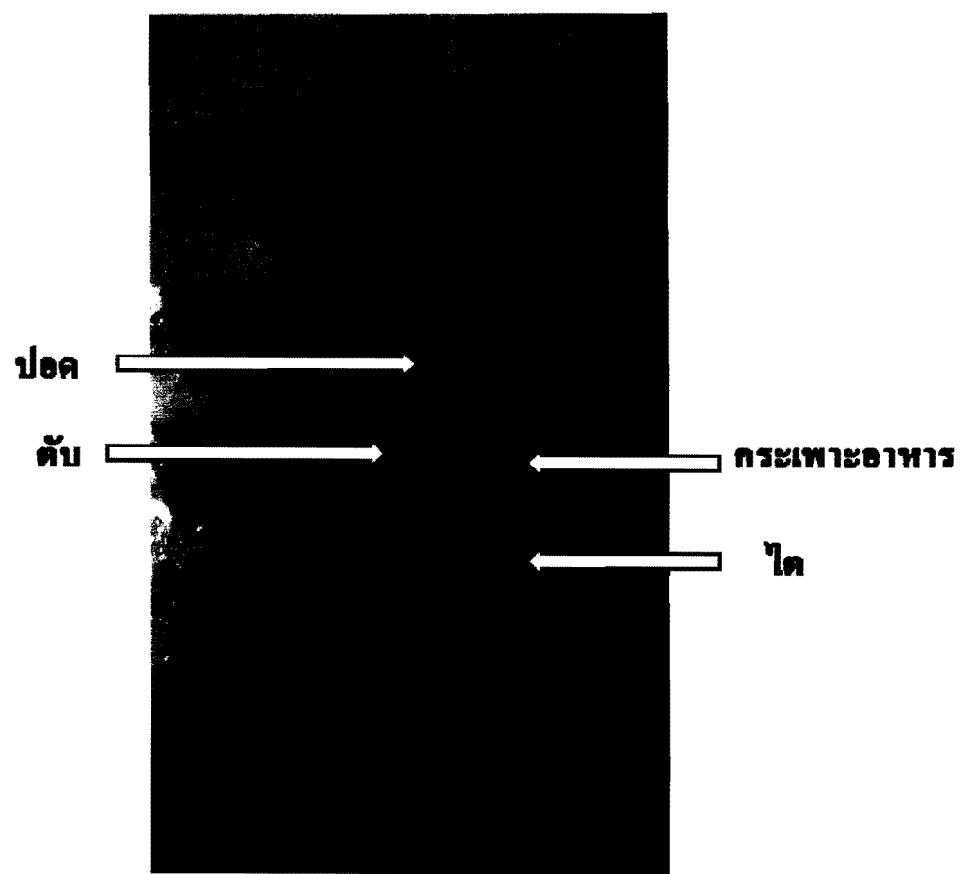
2 พยาธิวิทยาทางภาคของหนูทดลองหลังสิ้นสุดการทดลอง



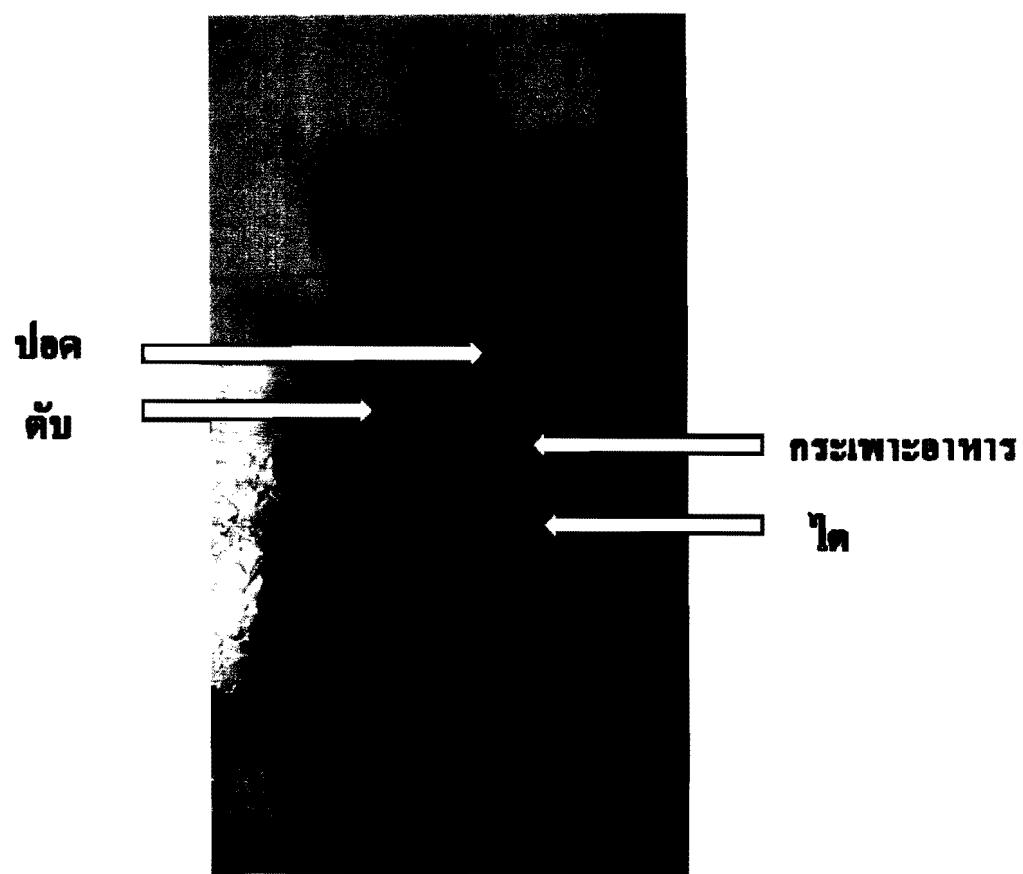
ภาพที่ จ.2 พยาธิวิทยาทางภาคของตัวอย่างหนูทดลองกลุ่ม I



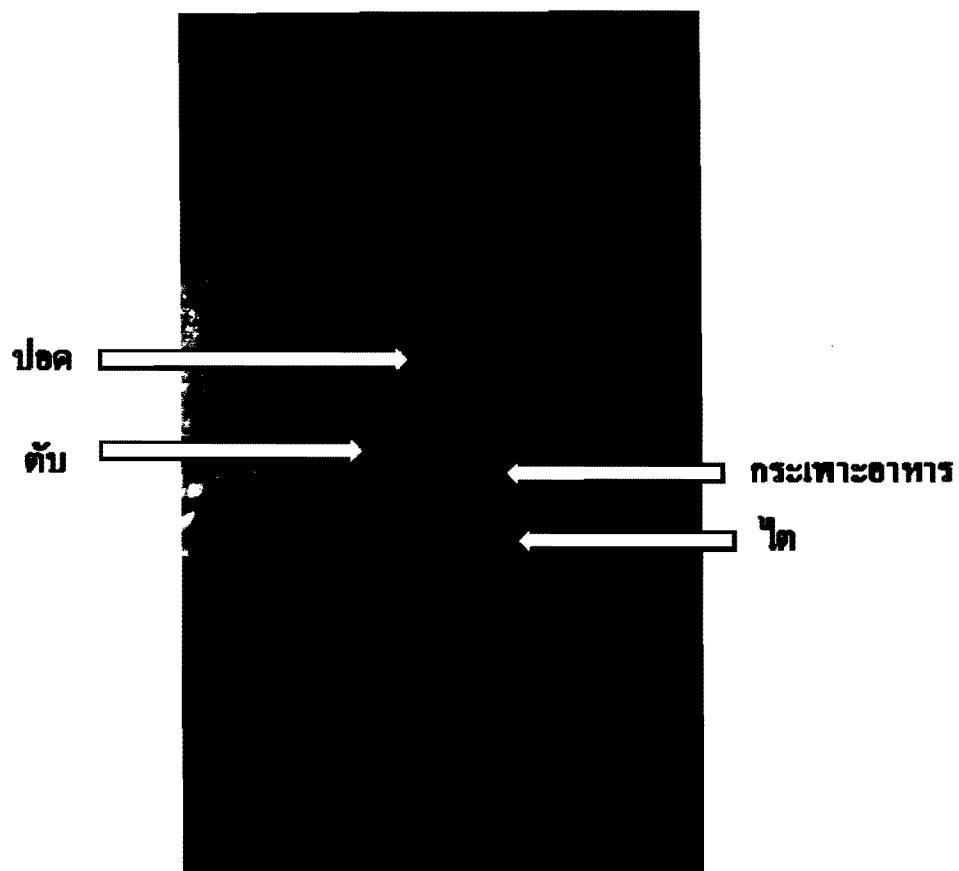
ภาพที่ จ.3 พยาธิวิทยาทางภาคของตัวอย่างหนูทดลองกลุ่มที่ II



ภาพที่ จ.4 พยาธิวิทยาทางภาคของตัวอย่างหนูทดลองกลุ่ม III



ภาพที่ ๑.๕ พยาธิวิทยาทางภาคของตัวอย่างหดคล่องกู้ม IV



ภาพที่ ๑.๖ พยาธิวิทยา mechanics of a wedge specimen with a V-grooved base

ประวัติผู้วจัย

ชื่อ เอกชัย คำเกลี้ยง
ประวัติการศึกษา มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนทุ่งสง อําเภอทุ่งสง
จังหวัดนนทบุรี ปี พ.ศ. 2546
ที่อยู่ปัจจุบัน เกษ็ชศาสตร์บัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 2)
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
16 หมู่ 6 ตำบลนาโน อำเภอทุ่งสง จังหวัด
นครศรีธรรมราช