บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

สามารถสังเคราะห์อนุพันธ์ไคโตซานคือ methylated N-(4-N,N-dimethylaminobenzyl) chitosan (TM-Bz-CS) ที่มีหมู่ trimethyl และ benzyl ที่แตกต่างกัน 3 ตัวได้สำเร็จ คือ TM_{57}-Bz_{43}-CS, TM_{47}-Bz_{43}-CS และ TM_{57}-Bz_{18}-CS อนุพันธ์ไคโตซานที่สังเคราะห์ได้ทั้ง 3 ตัวนี้จะมีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดีที่ pH ที่กว้างกว่า ไคโตซานเบส ที่สามารถละลายน้ำได้เฉพาะที่ pH ต่ำกว่า 6.5 คุณสมบัติทางกายภาพฟิสิกส์ของอนุพันธ์ไคโตซานที่เตรียมได้ ศึกษาโดยใช้ IR spectra และ ^{1}H-NMR spectra ผลของการนำส่งยีนเข้าเซลล์และความเป็นพิษต่อเซลล์ และปัจจัยที่มีผลต่อการนำส่งยีน เช่น N/P ratio, particle size, surface charge, pH ของ culture medium, serum และ morphology สามารถสรุปได้ดังนี้

1. ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของ Plasmid DNA/อนุพันธ์ไคโตซานคอมเพล็กซ์

ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของ Plasmid DNA/อนุพันธ์ไคโตซานคอมเพล็กซ์ที่อัตราส่วนต่างๆ โดยหาอัตราส่วนที่เกิดสารประกอบเชิงซ้อนสมบูรณ์โดยวิธี gel retardation assay พบว่า N/P ratio ที่เกิดคอมเพล็กส์สมบูรณ์ ของไคโตซานเบสและอนุพันธ์ไคโตซาน ดังนี้ TM_{47}-Bz_{43}-CS เกิดคอมเพล็กส์สมบูรณ์ ที่ N/P ratio เท่ากับ 1.5 TM_{57}-Bz_{43}-CS และ TM_{57}-Bz_{18}-CS เกิดคอมเพล็กส์สมบูรณ์ที่ N/P ratio เท่ากับ 3 ส่วนไคโตซานเบสเกิดคอมเพล็กส์สมบูรณ์ ที่ N/P ratio เท่ากับ 4 ผลการทดลองที่ได้นี้ชี้ให้เห็นว่า การเติมหมู่ dimethylaminobenzyl กับโครงสร้างของ ไคโตซานนี้ จะทำให้การจับกันระหว่าง Plasmid DNA/อนุพันธ์ไคโตซานคอมเพล็กซ์ ดีขึ้น เมื่อหมู่ dimethylaminobenzyl เพิ่มขึ้น จาก 18 เป็น 43 N/P ratio ที่เกิดคอมเพล็กส์สมบูรณ์เปลี่ยนจาก 3 เป็น 1.5 สามารถอธิบายได้ว่า การที่มีหมู่ dimethylaminobenzyl เป็นการเพิ่มส่วน hydrophobic อาจทำให้แรงในการจับกันระหว่างพอลิเมอร์กับ DNA แบบ hydrophobic interaction เพิ่มขึ้น นอกจากนี้อาจเกิด charge-neutralized DNA segments ขึ้นได้ ซึ่งทั้งสอบเหตุผลนี้จึงทำให้การเพิ่มหมู่ dimethylaminobenzyl ส่งผลให้เกิด gene condensation มากขึ้น

2 การวัดขนาดอนุภาคของ pDNA/chitosan complex

เตรียม pDNA/chitosan complex ที่อัตราส่วนต่างๆ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15-30 นาที เพื่อให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่สมบูรณ์ นำสารละลายที่ได้ไปวัดขนาดอนุภาคและประจุบนพื้นผิวด้วยเครื่อง Zetasizer ผลของขนาดอนุภาค พบว่า ทุก N/P ratio ของอนุพันธ์ไคโตซานที่สังเคราะห์ได้จะมีขนาดอยู่ในระดับนาโน และที่ N/P ratio ที่เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่สมบูรณ์จะมีขนาดอนุภาคที่ใหญ่ที่สุด และเล็กลงเมื่อ N/P ratio มากขึ้นทั้งนี้เป็นเพราะว่าเมื่อพอลิเมอร์เพิ่มขึ้น DNA

condensation จะมากขึ้นด้วยส่งผลให้ขนาดเล็กลง และประจุบนพื้นที่ผิวอนุภาคนั้นพบว่า ที่ N/P ratio ก่อนที่จะเกิดคอมเพล็กส์สมบูรณ์จะมีประจุเป็นลบ ที่ N/P ratio ที่เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่สมบูรณ์จะมีประจุเท่ากับศูนย์ และที่ N/P ratio หลังจากที่จะเกิดคอมเพล็กส์สมบูรณ์จะมีประจุเป็นบวกมากขึ้น ซึ่งก็สอดคล้องกับผลของขนาดอนุภาคที่มีขนาดเล็กลง

3. ตรวจสอบรูปร่างของคอมเพล็กซ์ด้วย Atomic Force Microscope (AFM)

ดูรูปร่างและลักษณะของคอมเพล็กซ์ของอนุพันธ์ไคโตซาน/DNA โดยใช้เครื่อง AFM พบว่า รูปร่างและลักษณะของอนุพันธ์ไคโตซานคือ TM_{57}-Bz_{43}-CS/DNA ที่ N/P ratio 23 จะมีรูปร่างทรงกลมขนาดเล็กคล้ายกับของคอมเพล็กซ์ของ PEI/DNA ส่วนรูปร่างและลักษณะของอนุพันธ์ไคโตซานคือ TM_{57}-Bz_{43}-CS/DNA ที่ N/P ratio 3 จะมีลักษณะไม่เป็นทรงกลมและขนาดใหญ่ ซึ่งสอดคล้องกับผลของการวัดขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง Zetasizer

4. ทดสอบประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนในเซลล์เพาะเลี้ยง

นำอนุพันธ์ไคโตซานที่เตรียมได้มาคอมเพล็กซ์กับ plasmid DNA ที่อัตราส่วนต่าง ๆ นำมาทดสอบการนำส่งยีนเข้าเซลล์เพาะเลี้ยงคือ เซลล์ Huh 7 แล้วนำเซลล์มาตรวจสอบการแสดงออกของยีนคือโปรตีนที่ผลิต enhanced green fluorescent protein (EGFP) โดยตรวจนับจำนวนเซลล์ที่ผลิต EGFP (จะเรืองแสงสีเขียวภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนส์) หลังจากให้สารที่ทดสอบเป็นเวลา 3 วัน ผลที่ได้พบว่า ประสิทธิภาพการแสดงออกของยีน จะขึ้นอยู่กับ ค่า N/P ratios จะมีลักษณะคล้ายกับรูประฆังคว่ำกล่าวคือเมื่อค่า N/P ratio เพิ่มขึ้นประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนจะสูงขึ้นถึงจุดสูงสุดและจะค่อยๆลดลงเมื่อ N/P ratio เพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากเมื่อเพิ่ม N/P ratio อีกมีผลทำให้เพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์ดังนั้น ประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนจึงลดลง สามารถจัดลำดับประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนสูงสุดไปต่ำสุดได้ดังนี้ TM_{57}-Bz_{43}-CS > TM_{47}-Bz_{43}-CS > TM_{57}-Bz_{18}-CS โดย TM_{57}-Bz_{43}-CS มีประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนสูงกว่า ไคโตซานเบส 8.4 เท่า TM_{47}-Bz_{43}-CS มีประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนสูงกว่าไคโตซานเบส 6.3 เท่า ส่วน TM_{57}-Bz_{18}-CS มีประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนต่ำกว่าไคโตซานเบส 0.7 เท่า การที่ TM_{57}-Bz_{43}-CS ให้การแสดงออกของยีนที่สูงที่สุด นี้เป็นเพราะว่าการมีหมู่ dimethylaminobenzyl เป็นการเพิ่มส่วน hydrophobic อาจทำให้แรงในการจับกันระหว่างพอลิเมอร์กับ DNA แบบ hydrophobic interaction เพิ่มขึ้น ทำให้ DNA จับกับพอลิเมอร์แน่นขึ้น นอกจากหมู่ dimethylaminobenzyl แล้ว ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า ส่วนของปริมาณ trimethyl substitutes (TM) ก็ส่งผลกับการแสดงออกของยีน โดยปริมาณ TM มากขึ้น การแสดงออกของยีนก็สูงขึ้นด้วย (TM_{57}-Bz_{43}-CS > TM_{47}-Bz_{43}-CS)

เนื่องจาก pH และ serum มีผลต่อประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนของไคโตซาน ดังนั้น จึงทำการศึกษาผลของ pH และ serum ต่อประสิทธิภาพการแสดงออกของยีน ของ อนุพันธ์ไคโตซาน

คือ TM_{57}-Bz_{43}-CS โดยศึกษาที่ N/P ratio ที่ให้การแสดงออกของยีนสูงที่สุด กล่าวคือ TM_{57}-Bz_{43}-CS ศึกษาที่ N/P ratio 23 เปรียบเทียบกับ ไคโตซานเบส ศึกษาที่ N/P ratio 4 โดยศึกษาที่ pH 6.5 และ pH 7.4 ผลการทดสอบพบว่าประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนของ TM_{57}-Bz_{43}-CS ที่ pH 6.5 ไม่แตกต่างจาก pH 7.4 ซึ่งต่างจากประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนของไคโตซานเบส พบว่าที่pH 6.5 ประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนสูงกว่าที่ pH 7.4 และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนระหว่าง TM_{57}-Bz_{43}-CS กับไคโตซานเบส พบว่า TM_{57}-Bz_{43}-CS มีประสิทธิภาพในการนำส่งยีนและเกิดการแสดงออกของยีนสูงกว่าไคโตซานเบสทั้ง pH 6.5 และ pH 7.4 ส่วนผลของ serum พบว่า เมื่อใส่ 10 % serum ในอาหารเลี้ยงเซลล์ พบว่าประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนของ TM_{57}-Bz_{43}-CS ต่ำว่า เมื่อไม่ใส่ serum ผลการทดลองนี้เกิดขึ้นเช่นเดียวกับ PEI ชี้ให้เห็นว่า TM_{57}-Bz_{43}-CS ไม่เหมาะที่จะให้ทางการฉีดเข้าหลอดเลือดดำ เหมาะสำหรับให้ทาง อื่น ๆ เช่น ใต้ผิวหนัง ทางจมูกหรือทางรับประทาน เป็นต้น

5. ทดสอบความเป็นพิษของอนุพันธ์ไคโตซานที่สังเคราะห์ และ CS/ pDNA complexes

5.1 ศึกษาความเป็นพิษของอนุพันธ์ไคโตซานที่สังเคราะห์

ศึกษาความเป็นพิษของอนุพันธ์ไคโตซานที่สังเคราะห์โดยวิธี MTT assay ในเซลล์ Huh7 ผลของความเป็นพิษของอนุพันธ์ไคโตซาน ไคโตซานเบส และ PEI เรียงลำดับจากน้อยไปมากได้ดังนี้ CS < TM_{43}-CS < TM_{57}-Bz_{18}-CS < TM_{57}-Bz_{43}-CS < TM_{47}-Bz_{43}-CS < PEI แสดงให้เห็นว่า การเพิ่มหมู่ dimethylaminobenzyl และ trimethyl substitutes (TM) จะทำให้ ความเป็นพิษของพอลิเมอร์ต่อเซลล์เพิ่มขึ้น

5.2 ศึกษาความเป็นพิษของ CS/ pDNA complexes

ผลการทดลองพบว่า plasmid DNA เปล่า ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ผลของ pDNA/CS derivatives complexes ที่ N/P ต่างๆ ต่อค่าเปอร์เซนต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์ (% relative viability) ของเซลล์ Huh7 ผลการทดสอบพบว่า ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์ ของ pDNA/CS derivatives complexes complexes จะลดลงเมื่อ N/P ratio สูงขึ้น และพบว่าค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์ pDNA/CS derivatives complexes เรียงลำดับดังนี้ TM_{57}-Bz_{18}-CS/DNA > TM_{47}-Bz_{43}-CS/DNA > TM_{57}-Bz_{43}-CS/DNA แสดงให้เห็นว่า การเพิ่มหมู่ dimethylaminobenzyl และ trimethyl substitutes (TM) จะทำให้ ความเป็นพิษของพอลิเมอร์ต่อเซลล์เพิ่มขึ้น และที่ N/P ratio ที่ให้การแสดงออกของยีนสูงที่สุด จะให้ความเป็นพิษต่ำ การเพิ่ม ปริมาณพอลิเมอร์มากขึ้นส่งผลให้เซลล์ตายมากขึ้นดังนั้นการแสดงออกของยีนจึงลดลงเมื่อ N/P ratio เพิ่มขึ้น