

49355203 : สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ชีวภาพ

คำสำคัญ : การนำส่งเอสไออาร์เอ็นเอ / ไคโตซานรูปเกลือ / การหยุดการแสดงออกของยีน

สิริรัตน์ วงศ์ภูประเสริฐ : การศึกษาชนิดของรูปเกลือและน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานต่อประสิทธิภาพการนำส่ง siRNA เข้าสู่เซลล์. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ญญ.ผศ.ดร.ศุภนิษฐ์ เตชะอาภรณ์กุล , ญญ.รศ.ดร.อวยพร อภิรักษ์ธำรง และ ญญ.รศ.ดร.ปราณีต โอปณะโสภิต. 105 หน้า.

เอสไออาร์เอ็นเอเป็นอาร์เอ็นเอสายคู่ขนาดสั้นๆ มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ 21 นิวคลีโอไทด์ ยับยั้งการแสดงออกของยีนอย่างจำเพาะเจาะจง โดยจับและเหนี่ยวนำให้เอนไซม์อาร์เอ็นเอเป่าหายถูกทำลาย การทำงานนี้จะเกิดภายในเซลล์ จึงต้องอาศัยตัวพาในการนำส่งเอสไออาร์เอ็นเอเข้าสู่เซลล์ ไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ประจุบวกชนิดหนึ่งที่สามารถละลายได้ภายในร่างกายและสามารถนำมาใช้เป็นตัวพาในการนำส่งเอสไออาร์เอ็นเอได้ แต่ข้อจำกัดของไคโตซานคือมีการละลายน้ำต่ำในพีเอชที่เป็นกลางและประสิทธิภาพในการนำส่งเอสไออาร์เอ็นเอเข้าสู่เซลล์ต่ำ เพื่อเพิ่มการละลายและประสิทธิภาพในการนำส่ง จึงใช้ไคโตซานรูปเกลือในการทดลอง การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีน และความเข้ากันได้ของเซลล์เพาะเลี้ยง ได้แก่ ชนิดของรูปเกลือต่างๆ ของไคโตซาน (ไคโตซานไฮโดรคลอไรด์ ไคโตซานแลคเตต ไคโตซานแอสพาเตต และ ไคโตซานกลูตาเมต), น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน (20, 45, 200 และ 460 kDa) และ อัตราส่วนประจุระหว่างหมู่ะมิโนของพอลิเมอร์ต่อหมู่ฟอสเฟตของเอสไออาร์เอ็นเอ (N/P ratio) เซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ศึกษาการนำส่งเอสไออาร์เอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน green fluorescence protein (GFP) คือ stable human cervical carcinoma (stable HeLa cell lines) ซึ่งสามารถสร้างโปรตีน GFP ได้ตลอดเวลา ผลการศึกษาพบว่าไคโตซานทุกรูปเกลือ และทุกน้ำหนักโมเลกุลสามารถยับยั้งการสร้างโปรตีน GFP ของเซลล์เพาะเลี้ยง ที่ระดับแตกต่างกันขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุล พบว่าไคโตซานน้ำหนักโมเลกุลต่ำ คือ 20 และ 45 kDa มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีน GFP ได้สูงกว่าไคโตซานน้ำหนักโมเลกุลสูง คือ 200 และ 460 kDa พบในไคโตซานทุกรูปเกลือ ยกเว้นไคโตซานแลคเตต ที่ทุกน้ำหนักโมเลกุลให้ค่าประสิทธิภาพในการนำส่งเอสไออาร์เอ็นเอต่ำใกล้เคียงกัน และไคโตซานไฮโดรคลอไรด์ที่น้ำหนักโมเลกุล 45 kDa กับ 460 kDa ประสิทธิภาพในการนำส่งเอสไออาร์เอ็นเอให้ผลพอๆกัน เมื่อเปรียบเทียบชนิดของรูปเกลือไคโตซาน พบว่าประสิทธิภาพในการนำส่งเอสไออาร์เอ็นเอขึ้นอยู่กับอัตราส่วน N/P ratio โดยไคโตซานไฮโดรคลอไรด์ ไคโตซานแลคเตต ไคโตซานแอสพาเตต และ ไคโตซานกลูตาเมต แสดงประสิทธิภาพสูงสุด ที่อัตราส่วนดังนี้ 8 ($34.2 \pm 0.5\%$), 16 ($14.6 \pm 1.5\%$), 64 ($32.4 \pm 4.7\%$) และ 64 ($25.8 \pm 1.1\%$) ตามลำดับ รวมทั้งมีความเป็นพิษต่อ HeLa stable cells ค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับพอลิเอทิลีนอิมิน

สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีการศึกษา 2551

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 1. 2. 3.

49355203 : MAJOR : BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES

KEY WORD : siRNA DELIVERY / CHITOSAN SALTS / GENE SILENCING

SIRIRAT WONGKUPASERT : THE EFFECT OF SALT FORM AND MOLECULAR WEIGHT OF CHITOSAN FOR EFFICIENCY ON siRNA DELIVERY INTO CELL.

THESIS ADVISORS : ASST.PROF. SUNEI TECHAARPORNKUL, Ph.D., ASSOC.PROF. AUAYPORN APIRAKARAMWONG, Ph.D., AND ASSOC.PROF. PRANEET OPANASOPIT, Ph.D.105 pp.

Short interfering RNA (siRNA) is a double stranded RNA (dsRNA) consisting of 21 nucleotides. siRNA inhibits gene expression specifically by binding and inducing target mRNA degradation. These mechanisms occur within a cell so vectors are important for siRNA delivery into cell. Chitosan (CS) is a biodegradable polymer with high positive charge and can be used as a vector in siRNA delivery. However the major drawback of CS is low solubility in neutral pH and low transfection efficiency. To improve the solubility and transfection efficiency, CS salt forms were used in this experiment. The purpose of this study was to investigate the effect of salt forms of CS (CS-hydrochloride (CS-H), CS-lactate (CS-L), CS-aspartate (CS-A) and CS-glutamate (CS-G)) and molecular weight (MW) of CS (20, 45, 200 and 460 kDa) and N/P ratio (charge ratio between amino groups of CS and phosphate groups of siRNA) for siRNA gene silencing efficiency and cytotoxicity. The human cervical carcinoma stable cells (HeLa stable cells), constitutively expressing green fluorescent protein (GFP) gene were used to study the delivery of siRNA targeting GFP. The results revealed that all CS salt forms were able to silence the GFP gene. The silencing efficiency depend on MW. The low MW CS (20 and 45 kDa) showed higher gene silencing efficiency than the high MW (200 and 460 kDa), observed in CS-H, CS-A and CS-G with an exception of CS-L which had low gene silencing efficiency in all MW and CS-H MW 45 show comparable efficiency to CS-H MW 460. In comparison to CS salt forms, the maximum gene silencing efficiency was found in different N/P ratios. CS-H/siRNA, CS-L/siRNA, CS-A/siRNA and CS-G/siRNA complexes showed maximum gene silencing efficiencies at N/P ratios of 8 ($34.2 \pm 0.5\%$), 16 ($14.6 \pm 1.5\%$), 64 ($32.4 \pm 4.7\%$) and 64 ($25.8 \pm 1.1\%$), respectively. Cytotoxicity results showed that all CS/siRNA complexes had cytotoxicity lower than polyethylenimine (PEI, 25 kDa).

Program of Biopharmaceutical Sciences Graduate School, Silpakorn University Academic Year 2008

Student's signature

Thesis advisors' signature 1. 2. 3.