46353902: สาขาวิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม
คำสำคัญ: เกลือไคโตซาน/ การนำส่งยีน/ ประสิทธิภาพในการนำส่งยีน

วัลลภ วีชะรังสรรค์: ผลของเกลือไคโตซานต่อประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองสำหรับการนำส่งยีน (EFFECT OF CHITOSAN SALTS ON *IN VITRO* TRANSFECTION EFFICIENCY FOR GENE DELIVERY) อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์: รศ.ดร.ปราณีต โอปณะโสภิต, รศ.ดร.ธนะเศรษฐ์ ง้าวหิรัญพัฒน์ และ ผศ.ดร.อวยพร อภิรักษ์อร่ามวง. 148 หน้า.

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของเกลือไคโตซานต่อประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง โดยศึกษาความสามารถในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับพลาสมิดดีเอนเอ ประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์ และความเป็นพิษในเซลล์ COS-1 (Green monkey fibroblast) และ CHO-K1 (Chinese hamster ovary) เกลือไคโตซานที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ ไคโตซานอะซีเตต ไคโตซานแอสพาเตต ไคโตซานกลูตาเมต ไคโตซานไฮโดรคลอไรด์ และไคโตซานแลคเตต ที่เตรียมจากการพ่นแห้งและจากการละลายไคโตซานในสารละลายกรด โดยใช้ไคโตซานน้ำหนักโมเลกุล 20, 45, 200 และ 460 kDa นำเกลือไคโตซานมาเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนกับพลาสมิดดีเอนเอ pSVβ-gal และ pcDNA3-CMV-Luc ในอัตราส่วนระหว่างไคโตซานกับพลาสมิดดีเอนเอ (N/P) ต่างๆ กัน ผลการศึกษาพบว่าสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไคโตซานกับพลาสมิดดีเอนเอที่เตรียมเกลือไคโตซานจากการพ่นแห้งและจากการละลายไคโตซานในสารละลายกรด เกิดสารประกอบเชิงซ้อนสมบูรณ์ที่อัตราส่วน N/P มากกว่า 4 และ 2 ตามลำดับ จากการศึกษาประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์ พบว่าเกลือไคโตซานที่เตรียมจากการพ่นแห้งมีประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมทั้งในเซลล์ COS-1 และ CHO-K1 จากการศึกษาผลของสภาวะต่างๆ ต่อประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์พบว่า pH ของตัวกลางในการนำส่งยีนมีผลต่อประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์อย่างมีนัยสำคัญ จึงได้ควบคุมสภาวะการศึกษาที่ pH เท่ากันคือ 6.5 โดยใช้ไคโตซานที่เตรียมจากการละลายไคโตซานในสารละลายกรดศึกษาผลของเกลือไคโตซานต่อประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์ CHO-K1 ผลการศึกษาพบว่าเกลือไคโตซานชนิดต่างๆ มี ประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์ขึ้นกับชนิดของเกลือ น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน และอัตราส่วน N/P โดยเกลือไคโตซานต่างกันให้ประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์สูงสุดที่อัตราส่วน N/P ต่างกัน ไคโตซานไฮโดรคลอไรด์ ไคโตซานแลคเตต ไคโตซานอะซีเตต ไคโตซานแอสพาเตต และไคโตซานกลูตาเมตมีประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์สูงสุดที่อัตราส่วน N/P เท่ากับ 12, 12, 8, 6 และ 6 ตามลำดับ ประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่ออัตราส่วน N/P เพิ่มขึ้น ไคโตซานน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (20 และ 45 kDa) มีประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์สูงกว่าไคโตซานน้ำหนักโมเลกุลสูง (200 และ 460 kDa) จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ COS-1 และ CHO-K1 พบว่าสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเกลือไคโตซานกับพลาสมิดดีเอนเอมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ จากการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเกลือไคโตซานมีความสามารถในการนำส่งยีนเข้าเซลล์ และมีศักยภาพในการเป็นตัวพายีนที่ปลอดภัย

สาขาวิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีการศึกษา 2550
ลายมือชื่อนักศึกษา…….....
ลายมือชื่ออาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์
1)……2)……..3)…… …..

46353902: MAJOR: PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY
KEY WORDS: CHITOSAN SALT/ GENE DELIVERY/ TRANSFECTION EFFICIENCY
WANLOP WEECHARANGSAN: EFFECT OF CHITOSAN SALTS ON *IN VITRO* TRANSFECTION EFFICIENCY FOR GENE DELIVERY. THESIS ADVISORS: ASSOC. PROF. PRANEET OPANASOPIT, Ph.D., ASSOC. PROF. TANASAIT NGAWHIRUNPAT, Ph.D., ASST. PROF. AUAYPORN APIRAKARAMWONG, Ph.D. 148 pp.

The aim of this research was to investigate the effect of chitosan salts (CS) on *in vitro* transfection efficiency for gene delivery. CS was investigated for their DNA complexing ability with plasmid DNA, their transfection efficiency, and cytotoxicity in COS-1 (Green monkey fibroblast) and CHO-K1 (Chinese hamster ovary) cells. CS with various chitosan molecular weights (MW 20, 45, 200 and 460 kDa) including chitosan acetate (CAc), chitosan aspartate (CAs), chitosan glutamate (CGl), chitosan hydrochloride (CHy) and chitosan lactate (CLa) were prepared by spray drying and by dissolving chitosan base with acidic solutions. CS were formed a complex with pSVβ-gal or pcDNA3-CMV-Luc at various N/P ratios. Chitosan/DNA complexes prepared from spray dried chitosan salts and CS solution were completely formed at N/P ratios above 4 and 2, respectively. Spray dried chitosan salts yielded transfection efficiency not significantly different from naked DNA in both COS-1 and CHO-K1 cells. Optimization of transfection condition showed that pH of transfection medium significantly affected the transfection efficiency. Therefore, transfection condition was controlled at the same pH (6.5). CS solution was used to investigate the effect of the salt form of chitosan on the transfection efficiency in CHO-K1 cells. The results showed that the transfection efficiency of CS/DNA complexes depended on the salt form and MW of chitosan, and the N/P ratio of CS/DNA complexes. Of different CS, maximum transfection efficiencies were found in different N/P ratios. CHy/DNA, CLa/DNA, CAc/DNA, CAs/DNA and CGl/DNA complexes showed maximum transfection efficiencies at N/P ratios of 12, 12, 8, 6, and 6, respectively. The transfection efficiency had a tendency to increase as the N/P ratio increased. Low chitosan MW (20 and 45 kDa) had higher transfection efficiency than high chitosan MW (200 and 460 kDa). Cytotoxicity results showed that all CS/DNA complexes had low cytotoxicity. In conclusion, all CS had effective transfection efficiencies. This study suggests that CS have the potential to be used as safe gene delivery vectors.

Program of Pharmaceutical Technology, Graduate School, Silpakorn University

Student's signature…….....…..

Thesis Advisor's signature 1) ……..…2)……..……3)……..……..