

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

สารเคมีและวิธีการทดลอง

สารเคมี

รายการ	บริษัท
Poly(DL-lactic-co-glycolic acid)(PLGA)	LACTEL Absorbable Polymers International (Pelham, AL, USA)
Pluronic®F-127	Invitrogen Molecular Probes, Inc. (Carlsbad, CA, USA)
Coumarin-6	Polysciences, Inc. (Warrington, PA, USA).
Dialysis membrane , MW cut off= 10,000	Spectrum Laboratory Products Inc. (Rancho Dominguez, CA, USA)
RPMI 1640 medium	American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)
HL-60 (Promyeloblast ของ acute promyelocytic leukemia)	American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)
Molt-3 (T-lymphoblast ของ acute lymphoblastic leukemia)	American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)
Molt-4 (T-lymphoblast ของ acute lymphoblastic leukemia)	American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)
U937 (Histiocytic lymphoma)	American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)
A549 (Lung adenocarcinoma cell)	American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)
Anti-human CD11 a	Ancell (Bayport, MN, USA)
Phorbol 12-myristate-13-acetate(PMA)	BIOMOL International, L.P. (Plymouth Meeting, PA)
Phosphate Buffered Saline	Thermo Scientific HyClone® Logan, UT, USA)
Fetal Bovine Serum	Thermo Scientific HyClone® Logan, UT, USA)

รายการ	บริษัท
LysoTracker® Red DND-99	Invitrogen Molecular Probes, Inc. (Carlsbad, CA, USA)
dextran, Texas Red®, 10,000 MW	Invitrogen Molecular Probes, Inc. (Carlsbad, CA, USA)
Sulfo-NHS (N-hydroxysulfosuccinimide)	Pierce Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
Penicillin-Streptomycin	Thermo Scientific HyClone® Logan, UT, USA)
1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride	Pierce Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
cIBR peptide ส่วนแรก	สังเคราะห์ขึ้นภายในแลปของที่ปรึกษาโครงการ Prof. Teruna J Siahhan ณ ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยแคนซัส
cIBR peptide ส่วนหลัง	Peptide 2.0 Inc.(Chatilly,VA,USA)
I domain ของ LFA-1	สังเคราะห์ขึ้นภายในแลปของที่ปรึกษาโครงการ Prof. Teruna J Siahhan ณ ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยแคนซัส
4% paraformaldehyde	Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA)
2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester (BCECF, AM)	Invitrogen Molecular Probes, Inc. (Carlsbad, CA, USA)
Dialysis cassette (MW.CO 10k)	Pierce Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
Doxorubicin HCL	Woo-Shin Medics, Co., Korea

เครื่องมือ

1. Analytical balance (Percisca, Switzerland)
2. Autoclave (Huxlex, Hung Lin Medical instrument, Taiwan)
3. Ultracentrifuge (Sorval Super21 , Dupont, USA)
4. Laminar flow biological cabinet (NUAIRE, USA)
5. Light microscope (Olympus CK2, Japan)
6. Magnetic stirrer (Variomag, Germany)
7. pH meter (HANNA Instrument, Portugal)
8. Microplate Reader (Model680,BioRad, Japan)
9. Flow cytometry (FACScans,Becton-Dickinson,USA)
10. Fluorescence microscope (Olympus, Japan)
11. High Performance Liquid Chromatography (Aligent 1200,Agilent technologies, USA)
12. Vortex (Super-mixer, Lab-line Instrument Inc, USA)
13. Photon Correlation Spectroscopy (ZetaPALS, Brookhaven instrument Inc.,USA)
14. HPLC controller (SCL-10A, SHIMADZ,USA)
15. Liquid Chromatograph (LC-10AT VP, SHIMADZU, USA)
16. UV-Vis (220 nm) detedtor (SPD-10A, SHIMADZU, USA)
17. HPLC injector (SIL-10A XL SHIMADZU, USA)
18. HPLC degasser (DGU-14A, SHIMADZU, USA)
19. FITC filter set (Nikon Eclipse 80i microscope, Nikon, Lake Placid, NY, USA,)
20. กล้อง Orca ER (Hamamatsu, Inc., Bridgewater, NJ, USA)

21. **Metamorph, version 6.2 (Universal Imaging Corp., West Chester, PA, USA)**
22. **UV-Visible spectrometry (Perkin-Elmer, Japan)**

วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมนาโนพาร์ทิเคิล

ทำการเตรียมนาโนพาร์ทิเคิลที่เก็บกัก coumarin-6 ซึ่งเป็นสารเรืองแสง ด้วยวิธี solvent displacement⁽³⁸⁾ โดยมีวิธีพอสังเขปดังนี้คือ ละลาย PLGA ใน acetone (18 mg/ml) ที่มี coumarin-6 (50 µg/ml) ละลายอยู่ แล้ว จากนั้นจึงถ่ายเทสู่เฟสน้ำที่มี 0.1% Pluronic[®] F-127-COOH (25 ml) อย่างช้าๆ ขณะปั่นด้วยความเร็ว 300 rpm การก่อตัวของนาโนพาร์ทิเคิลจะเกิดขึ้นทันทีเนื่องจากการที่ acetone ระเหยออกอย่างรวดเร็ว ส่วนสารลดแรงตึงผิวที่มากเกินไปจะถูกกำจัดโดยวิธี dialysis ในสารละลาย 0.2% mannitol เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.2 การคอนจูเกตนาโนพาร์ทิเคิลกับ cIBR

ทำการปรับค่าความเป็นกรดด่างของนาโนพาร์ทิเคิลที่มี Pluronic[®] F-127-COOH เป็นส่วนประกอบ (2.2 mg/ml) ด้วย 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES; pH 6.5) จากนั้นบ่มนาโนพาร์ทิเคิลด้วย 100 mM 1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride (EDC) และ 50 mM N-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS) เป็นเวลา 15 นาที ปลอຍให้หมู่คาร์บอกซิลส่วนปลายของสาย Pluronic[®] F-127-COOH ที่บริเวณผิวของนาโนพาร์ทิเคิลทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนส่วนปลายของสายเปปไทด์ cIBR (170 µM) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 12 ชั่วโมง ทำการเก็บคอนจูเกตนาโนพาร์ทิเคิลโดยการปั่นเหวี่ยง (13,000 rpm 10 นาที) และล้างด้วยน้ำ DI 3 ครั้ง ประเมินขนาดและประจุของนาโนพาร์ทิเคิลและ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิล โดยวิธี dynamic light scattering (ZetaPALS, Brookhaven instrument Inc.) หาปริมาณ cIBR อิสระที่ไม่ได้ถูกทำปฏิกิริยาด้วย gradient reversed phase HPLC (SHIMADZU) โดยใช้ C₁₈ คอลัมน์ เครื่อง HPLC ประกอบด้วย ตัวควบคุมระบบ (SCL-10A SHIMADZU) HPLC (LC-10AT VP SHIMADZU) ตัวฉีดอัตโนมัติที่ตั้งค่าปริมาตรไว้ที่ 10 µl (SIL-10A XL SHIMADZU) เครื่องไล่ก๊าซ (DGU-14A SHIMADZU) autosampler และเครื่องตรวจวัด UV-Vis (220 nm) (SPD-10A SHIMADZU) ระบบ HPLC-UV ถูกควบคุมด้วยคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคลที่ติดตั้งซอฟต์แวร์ SHIMADZU class VP ไว้ ทุกกระบวนการแยก

ดำเนินการโดยใช้ Vydac® HPLC คอลัมน์โปรตีนและคอลัมน์เปปไทด์ C₁₈ ทำ Gradient elution ด้วยอัตราการไหลคงที่ที่ 1 ml/นาที, ตั้งแต่ 100% A ถึง 0% A (สอดคล้องกับ 0% B ถึง 100% B) เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วย isocratic elution ที่ 100% B เป็นเวลา 3 นาที Mobile phase ที่ใช้ประกอบด้วย (A) acetonitrile-น้ำ (5:95) ซึ่งมี 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) (B) acetonitrile-น้ำ (90:10, v/v) ซึ่งมี 0.1% TFA ในขั้นตอนสุดท้ายของการวิเคราะห์แต่ละครั้ง คอลัมน์จะถูกทำให้อยู่ในสภาพที่สมดุลใหม่ที่อัตราการไหล 1 ml/min เป็นเวลา 13 นาทีด้วยสารละลาย A ความหนาแน่นของเปปไทด์บนผิวของนาโนพาร์ทิเคิลคำนวณได้จากพื้นที่ผิวทั้งหมดที่สมมติฐานจากการกระจายขนาดอนุภาคแบบปกติ (Gaussian Distribution)

3.3 การศึกษาผลของ PMA ต่อระดับการแสดงออกของ LFA-1 บนผิวเซลล์

ทำการกระตุ้น Molt-3 cell line (1×10^6 cells/ml) ด้วย 0.4 μ M PMA เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง เซลล์อีกกลุ่มที่ความเข้มข้นเท่ากันและไม่ถูกกระตุ้นใช้เป็นกลุ่มควบคุม รูปแบบความสามารถในการจับกันสูงของ LFA-1 ระบุได้จากการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง LFA-1 และ ICAM-1 บน Molt-3 cells ซึ่งแสดงด้วยการเกาะกลุ่มกันของ Molt-3 cells ที่เห็นได้จากกล้องจุลทรรศน์ เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของ LFA-1 บน Molt-3 cells ทำโดยการบ่มเซลล์ทั้งที่ได้รับและไม่ได้รับ PMA ด้วย anti-LFA-1-FITC (0, 0.05 และ 0.1 mg/ml) ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 45 นาที ทำการกำจัดแอนติบอดีอิสระโดยการล้างเซลล์ด้วย PBS และการปั่นเหวี่ยง (2,500 rpm, 1.5 นาที) 3 ครั้ง ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนส์ของเซลล์วิเคราะห์ได้โดย flow cytometry นอกจากนี้ความจำเพาะเจาะจงของ anti-LFA-1-FITC ตรวจสอบได้โดยการบ่มกับ A549 cells ที่มีการแสดงออกของ ICAM-1 แต่ไม่มีการแสดงออกของ LFA-1 และ Molt-3 cells ที่มีการแสดงออกทั้ง LFA-1 และ ICAM-1 เซลล์ทั้งคู่ถูกบ่มด้วย 0.4 μ M PMA ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นจึงเติม anti-LFA-1-FITC (0.05 mg/ml) ลงในเซลล์และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 45 นาที ทำการล้างและปั่นเหวี่ยงเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้ง (2,500 rpm, 1.5 นาที) ตรวจวัดความเข้มแสงฟลูออเรสเซนส์ของ Molt-3 cells ด้วยเครื่อง FACscan flow cytometer ทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยซอฟต์แวร์ Cell Quest (BD)

3.4 ศึกษาการจับและนำเข้าของ cIBR-NP และนาโนพาร์ทิเคิล เข้าสู่ Molt-3 cells

Molt-3 cells (1×10^6 cells/ml) ที่ถูกกระตุ้นด้วย PMA ถูกถ่ายเทสู่ 96 well-plate (200 μ l/well) โดยมี CaCl_2 (1.5 mM) อยู่ด้วย แล้วบ่มด้วย cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลหรือนาโนพาร์ทิเคิลที่เก็บกัก coumarin-6 (2.2 mg/ml, 90 μ l) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 5, 15, 20 และ 35 นาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยง (2,200 rpm, 4°C, 1 นาที) เพื่อที่จะล้าง 3 ครั้งโดยใช้ PBS เย็น และคงรูปเซลล์ด้วย 4% paraformaldehyde ทำการวัดความเข้มแสงฟลูออเรสเซนส์ด้วยเครื่อง FACscan flow cytometer การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยซอฟต์แวร์ Cell Quest (BD) เพื่อตรวจสอบผลของความเข้มข้นของนาโนพาร์ทิเคิลต่อการนำนาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์ จึงถ่าย Molt-3 cells (1×10^6 cells/ml, 100 μ l) ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีเซรัมลงใน 96 well-plate ที่มี CaCl_2 (1.5 mM) อยู่ แล้วบ่มด้วย cIBR-NP (70 μ l/well) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที ในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (0.08, 0.16, 0.33, 0.66, 1.31, 2.63, 5.25 และ 10.50 mg/ml) ล้างเซลล์ด้วย PBS เย็น 3 ครั้งโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 นาที วัดความเข้มแสงฟลูออเรสเซนส์ด้วยเครื่อง FACscan flow cytometer ทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยซอฟต์แวร์ Cell Quest (BD)

3.5 การยับยั้งการจับของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลกับ Molt-3 cells โดย cIBR อิสระและ I domain ของ LFA-1

- การยับยั้งการจับของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลกับ Molt-3 cells โดย cIBR อิสระ

LFA-1 บน Molt-3 (4×10^4 cells/ml) ถูกกระตุ้นด้วย PMA (0.4 mM) เป็นเวลา 20 ชั่วโมง เดิมเซลล์ลงใน 96-well plate (100 μ l) ที่มี CaCl_2 (1.5 mM) ทำการบ่มเซลล์กับ cIBR อิสระความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (0.0, 0.31, 0.63, 1.2 และ 2.5 mg/ml, 80 μ l) ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 40 นาที เพื่อป้องกันการจับกันระหว่าง LFA-1 กับ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลหรือนาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีเป้าหมาย จากนั้นบ่มเซลล์ด้วย cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลหรือนาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีเป้าหมาย (2.2 mg/ml, 80 μ l) ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 40 นาที ล้างเซลล์ด้วย PBS เย็น 3 ครั้งโดยการปั่นเหวี่ยง (2,200 rpm, 1 นาที, 4°C), คงรูปเซลล์ด้วย 4% paraformaldehyde และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FACscan flow cytometer ทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยซอฟต์แวร์ Cell Quest (BD)

- การยับยั้งการจับของ cIBR-NP ด้วย I-domain ของ LFA-1

ทำการละลาย I domain ของ LFA-1 ในน้ำเป็นความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (0, 0.31, 0.63 1.25 และ 2.50 mg/ml) แล้วผสมกับสารแขวนตะกอน cIBR-นาโนพาร์ทิเคิล (2.1 mg/ml, 80 μ l) ในหลอด micro-centrifuge บ่มสารผสมของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลกับ I domain ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม Molt-3 cells (1×10^6 cells/ml) ปริมาตร 100 μ l ลงในสารผสมแล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 40 นาที เพื่อให้เกิดการจับของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลกับ LFA-1 ของเซลล์ ส่วน cIBR-NP และ I domain อีกระดุกล้างด้วย PBS 3 ครั้ง คงรูปเซลล์ด้วย 4% paraformaldehyde การจับของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลกับเซลล์วัดได้จากการวิเคราะห์ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนส์ด้วยเครื่อง FACScan flow cytometer การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยซอฟต์แวร์ Cell Quest (BD)

3.6 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการจับและการนำเข้าสู่เซลล์ของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิล

เติม Molt-3 cells (1.1×10^6 cells/ml) ลงใน 96 well plate (100 μ l /well) และบ่มด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีเซรัมที่มี 1.5 mM CaCl_2 ที่อุณหภูมิ 4 °C และที่ 37 °C เป็นเวลา 40 นาที ต่อด้วยการบ่มกับ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิล (2.2 mg/ml, 90 μ l/well) เป็นเวลา 5, 15, 25, 35 และ 45 นาที จากนั้นล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้งและคงรูปเซลล์ด้วย 4% paraformaldehyde การที่เซลล์นำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์ตรวจสอบได้จากค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนส์ด้วยเครื่อง FACScan flow cytometer วิเคราะห์ข้อมูลด้วยซอฟต์แวร์ Cell Quest (BD)

3.7 Fluorescent microscopy ของ Molt-3 cells ในการศึกษาการจับและนำเข้าสู่ของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลและนาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีเป้าหมาย

กระตุ้น Molt-3 cells (1×10^6 cells/ml) โดยใช้ 0.4 μ M PMA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมเซลล์ลงใน 8-well plate ที่มี CaCl_2 (1.5 mM) ทำการบ่ม cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลหรือนาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีเป้าหมาย (2.2 mg/ml, 90 μ l/well) กับเซลล์เป็นเวลา 5, 15, 30 นาทีและ 1 ชั่วโมงที่ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 °C ส่วนนาโน

พาร์ทิเคิลที่ไม่ได้จับกับเซลล์ถูกกำจัดโดยการล้างด้วย PBS เป็น 3 ครั้งและคงรูปเซลล์ด้วย 4% paraformaldehyde การเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ของนาโนพาร์ทิเคิลวัดโดยใช้เครื่อง FITC filter set (Nikon Eclipse 80i microscope สำหรับ epifluorescence) จับภาพ micrograph ด้วยกล้อง Orca ER (Hamamatsu, Inc., Bridgewater, NJ) และวิเคราะห์โดย Metamorph, version 6.2 (Universal Imaging Corp., West Chester, PA)

3.8 Lysosomal trafficking ของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลใน Molt-3 cells

กระตุ้น Molt-3 cells (1×10^6 cells/ml) ด้วย $0.4 \mu\text{M}$ PMA เป็นเวลา 20 ชั่วโมง เซลล์ถูกล้างและกระจายตัวใน Texas red dextran (Mw 10,000, lysine fixable, 1 mg/ml) ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีเซรัมและบ่มที่ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีเซรัม 3 ครั้ง จากนั้นจึงบ่มในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีเซรัมที่ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อไล่สีย้อมไปที่ lysosome จากนั้นเติมเซลล์ลงใน 8 well plate ที่มี CaCl_2 (1.5 mM) แล้วเติม cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลหรือนาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีเป้าหมาย ($100 \mu\text{l}$, 2.2 mg/ml) ลงไปในเซลล์และบ่มที่ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที กำจัดนาโนพาร์ทิเคิลออกโดยการล้าง 3 ครั้งด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีเซรัม จากนั้นบ่มเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีเซรัมในแต่ละช่วงเวลา (30 นาที, 1 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมง, 3 ชั่วโมง, 4 ชั่วโมง, 6 ชั่วโมง, 8 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง) ล้างเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที และคงรูปเซลล์ด้วย 4% paraformaldehyde ทำการตรวจวัดการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนส์ของนาโนพาร์ทิเคิลและไลโซโซมโดยใช้ FITC และ rhodamine filter set ตามลำดับ (Nikon Eclipse 80i microscope สำหรับ epifluorescence) จับภาพไมโครกราฟโดยใช้กล้อง Orca ER (Hamamatsu, Inc., Bridgewater, NJ) วิเคราะห์ Co-localizations ของนาโนพาร์ทิเคิลกับไลโซโซมโดย Metamorph, version 6.2 (Universal Imaging Corp., West Chester, PA)

3.9 การยับยั้งการเกาะติดของ Molt-3 cells กับ epithelial cells ของปอด (A549) ด้วย cIBR-นาโนพาร์ทิเคิล

ทำการบ่ม A549 cells (80,000 cells/ml) ด้วยจะถูกเพาะเลี้ยงด้วย TNF γ (1,000 U/ml) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงเพื่อกระตุ้นการแสดงออกของ ICAM-1 ส่วน LFA-1 บน Molt-3 cells ถูกกระตุ้นด้วย 0.4 μ M PMA ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเซรัมเป็นเวลา 20 ชั่วโมง ทำการบ่ม Molt-3 cells ด้วย 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester (BCECF, AM) 5 μ l, 2 mM ใน 20 ml ของ PBS ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้งและ resuspend ใน PBS 5 ml (ความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์ คือ 5.5×10^5 cells/ml) จากนั้นจึงถ่าย Molt-3 cells ลง 96-well plate (200 μ l/well) และบ่มด้วย cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน (0.0, 0.38, 0.75 และ 1.50 mg/ml) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดการจับและการเข้าเซลล์ของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิล จากนั้นถ่าย Molt-3 cells ลงไปบ่มใน 8 well plate กับ A549 cells เพื่อให้เกิดอันตรกิริยาระหว่าง ICAM-1 บน A549 cells และ LFA-1 บน Molt-3 cells ที่อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO₂ เป็นเวลา 45 นาที ส่วน Molt-3 cells ที่ไม่มีการจับถูกล้างด้วย PBS เข็น 3 ครั้งและคงรูปเซลล์ด้วย 4% paraformaldehyde ส่วน Molt-3 cells ที่จับกับ A549 cells ถูกวัดโดยการนับ Molt-3 cells ที่มี การจับ ด้วย Nikon Eclipse 80i microscope สำหรับ epifluorescence

3.10 ศึกษาผลของเซรัมต่อการจับและนำเข้าของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลโดย Molt-3 cells

เตรียม Molt-3 cells ให้อยู่ใน RPMI-1640 ที่ไม่มีเซรัมหรือ RPMI-1640 ที่มี 10% FBS (100 μ l/well) เติม CaCl₂ (1.5 mM) ลงไปเพื่อเพิ่มการจับ cIBR กับ LFA-1 บ่มเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองแบบที่ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลบรรจุ coumarin-6 (2.1 mg/ml, 80 μ l) ไป กระจายใน RPMI-1640 ที่ไม่มีเซรัมหรือ RPMI-1640 ที่มี 10% FBS อยู่ แล้วเติมลงในเซลล์และบ่มเป็นเวลา 5, 15, 25, และ 35 นาที หลังจากบ่มจึงล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้งโดยการปั่นเหวี่ยง (2,200 rpm 1 นาที) และคงรูปเซลล์ด้วย 4% paraformaldehyde ทำการวัดและเปรียบเทียบความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซลล์โดยใช้ เครื่อง FACScan flow cytometer วิเคราะห์ข้อมูลด้วยซอฟต์แวร์ Cell Quest (BD) และเพื่อตรวจสอบว่าแท้จริง

แล้วการยับยั้งการนำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าเซลล์เนื่องมาจากเซรัมหรือไม่ สารละลาย BSA (0, 0.31, 0.63, 1.25 และ 2.50 mg/ml) ถูกผสมกับสารแขวนตะกอน cIBR-นาโนพาร์ทิเคิล (2.1 mg/ml, 80 μ l) ในหลอด micro-centrifuge สารผสมของ cIBR- นาโนพาร์ทิเคิลและ BSA ถูกบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากบ่มจึงเติม 100 μ l Molt-3 cells (1×10^6 cells/ml) ลงในสารผสมและบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 40 นาที เพื่อให้เกิดการจับ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลกับ LFA-1 ของเซลล์ ส่วน cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลอิสระและ BSA ที่เหลือถูกล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ก่อรูปเซลล์ด้วย 4% paraformaldehyde การจับกันของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลกับเซลล์วัดจากความเข้มแสงฟลูออเรสเซนส์โดยใช้เครื่อง FACScan flow cytometer ทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยซอฟต์แวร์ Cell Quest (BD)

3.11 การตรวจสอบการแสดงออกของ LFA-1 บนผิวเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่แตกต่างกันทั้ง 4 ชนิด โดยใช้

Flow cytometry

หลักการของ Flow cytometry

Flow cytometry คือ การตรวจนับหรือวัดลักษณะจำเพาะของ particles หรือ cells ที่กำลังไหลผ่านลำแสงเป็นแถวเรียงเดียว โดยลักษณะที่สามารถนับหรือวัดได้โดยตรง คือ cell size และ granularity ส่วนลักษณะชนิดอื่นๆ เช่น surface markers และ intracellular markers จำเป็นจะต้องใช้การย้อมด้วยสี fluorescence หรือ immuno-fluorescence จึงจะสามารถทำการตรวจนับหรือวัดได้ ข้อจำกัดของ cells หรือ particles ที่จะสามารถใช้ flow cytometer ทำการศึกษาได้ จะต้องเป็น free particles แขนงลอยอยู่ใน fluid เท่านั้น solid tumors หรือ tissues จะต้องถูกทำให้แยกออกเป็น cells เดี่ยวๆ ก่อนจึงจะสามารถตรวจสอบด้วยวิธีนี้ได้

ขั้นตอนการเตรียมเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้ง 4 ชนิด (HL-60, Molt-3, Molt-4 และ U937) สำหรับย้อมเซลล์และตรวจวัดค่า Fluorescence intensity ด้วยเครื่อง Flow cytometer มีวิธีการดังนี้คือ ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสถานะที่มีการกระตุ้นการแสดงออกของ LFA-1 โดยการบ่มเซลล์กับ Phorbol-12-

myristate-13-acetate (PMA) ที่ความเข้มข้น 0.4 μM เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้วทำการเก็บเซลล์ และปั่นล้างเซลล์ด้วย Phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) ที่ 1,700 rpm เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนับจำนวนเซลล์โดยใช้ Trypan blue exclusion ที่ความเข้มข้น 0.2% คำนวณปริมาณเซลล์ แบ่งเซลล์ใส่ลงในหลอดทดลอง ในจำนวนเซลล์ 2.0×10^5 cells/ml ทำการ block nonspecific binding โดยใช้ AB serum แล้วบ่มไว้ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาจึงทำการย้อมเซลล์ด้วย Anti LFA-1-FITC โดยใช้ความเข้มข้น 1:100 เมื่อครบเวลา ทำการปั่นล้าง 2 ครั้ง ด้วย 1% BSA-PBS ที่ 3,000 rpm 2 นาที จากนั้นจึงเติม 1% Paraformaldehyde ลงในทุกหลอด (250 μL) ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปวัดค่า Fluorescence intensity ด้วยเครื่อง Flow cytometer (FACScan, BD)

3.12 การแสดงการจับกันของนาโนพาร์ทิเคิลและ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งสี่ชนิด

HL-60, Molt-4, Molt-3 และ U937 cells (1×10^6 cells/ml) ที่ถูกกระตุ้นด้วย PMA ถูกถ่ายเทสู่ 96 well-plate (200 μL /well) โดยมี CaCl_2 (1.5 mM) อยู่ แล้วบ่มด้วย cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลหรือนาโนพาร์ทิเคิลที่บรรจุ coumarin-6 (2.2 mg/ml, 90 μL) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 5, 30, 60 และ 90 นาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยง (2,200 rpm, 4°C, 1 นาที) เพื่อที่จะล้าง 3 ครั้งโดยใช้ PBS เย็น และคงรูปเซลล์ด้วย 4% paraformaldehyde ทำการวัดความเข้มแสงฟลูออเรสเซนส์ด้วยเครื่อง FACscan flow cytometer การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยซอฟต์แวร์ Cell Quest (BD) เพื่อตรวจสอบผลของความเข้มข้นของนาโนพาร์ทิเคิลต่อการนำนาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์

3.13 Fluorescent microscopy ของ leukemic cell lines และนาโนพาร์ทิเคิล

กระตุ้น HL-60, Molt-4, Molt-3 และ U937 cells (1×10^6 cells/ml) โดยใช้ 0.4 μM PMA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมเซลล์ลงใน 8-well plate ที่มี CaCl_2 (1.5 mM) ทำการบ่ม cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลหรือนาโนพาร์ทิเคิล (2.1 mg/ml, 90 μL) กับเซลล์เป็นเวลา 5, 30, 60 และ 90 นาที ที่ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 °C ส่วนนาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่ได้จับกับเซลล์ถูกกำจัดโดยการล้างด้วย PBS 3 ครั้ง และคงรูปเซลล์ด้วย 4% paraformaldehyde การปลดปล่อยแสงฟลูออเรสเซนส์ของนาโนพาร์ทิเคิลวัดโดยใช้เครื่อง FITC filter set (Nikon Eclipse 80i

microscope สำหรับ epifluorescence) จับภาพ micrograph ด้วยกล้อง Orca ER (Hamamatsu, Inc., Bridgewater, NJ) และวิเคราะห์โดย Metamorph, version 6.2 (Universal Imaging Corp., West Chester, PA)

3.14 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการนำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งสี่ชนิด

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งทั้งสี่ชนิดคือ HL-60, Molt-4, Molt-3 และ U937 cells (1.1×10^6 cells/ml) ลงใน 96 well plate (100 μ l /well) และบ่มด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีเซรัมที่มี 1.5 mM CaCl_2 ที่อุณหภูมิ 4 °C และที่ 37 °C เป็นเวลา 40 นาที ต่อจากนั้นจึงทำการเติม cIBR-นาโนพาร์ทิเคิล (2.2 mg/ml, 90 μ l/well) และทำการบ่มเป็นเวลา 5, 30, 60 และ 90 นาที จากนั้นล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้งและคงรูปเซลล์ด้วย 4% paraformaldehyde การที่เซลล์นำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์ตรวจสอบได้จากค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนส์ด้วยเครื่อง FACscan flow cytometer วิเคราะห์ข้อมูลด้วยซอฟต์แวร์ Cell Quest (BD)

3.15 Cytotoxicity test

เป็นการทดลองเพื่อการศึกษาถึงผลของระบบนำส่งที่พัฒนาขึ้นมามีเป็นระบบนำส่งที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งหรือไม่ โดยทำการทดลองดังนี้กระตุ้น HL-60, Molt-4, Molt-3 และ U937 cells (1×10^6 cells/ml) โดยใช้ 0.4 μ M PMA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมเซลล์ลงใน 96-well plate ที่มี CaCl_2 (1.5 mM) บรรจุอยู่ในทุกหลุม จากนั้นเติมทำการ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลหรือนาโนพาร์ทิเคิลที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 15.6 μ g/ml - 8.0 mg/ml ลงในแต่ละหลุม จากนั้นจึงทำการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเติม MTS(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium), (Promega, Madison, WI) ลงไปในแต่ละหลุมแล้วจึงบ่มเซลล์ที่ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 nm เพื่อทำการตรวจสอบค่า cell viability

3.16 การศึกษาการกักเก็บและการปลดปล่อยตัวยา doxorubicin จากระบบนำส่งยา cIBR -นาโนพาร์ทิเคิล

เนื่องจาก doxorubicin ที่มีนั้นอยู่ในรูปของเกลือ (doxorubicin HCl) ซึ่งไม่ค่อยละลายในตัวทำละลายที่ใช้เตรียมระบบนำส่งยาดังนั้นจึงต้องทำการสกัดให้อยู่ในรูปที่สามารถละลายในตัวทำละลายได้โดยอาศัย

วิธีการสกัดแบบ acid –base extraction ซึ่งจะต้องทำให้สารละลาย doxorubicin นั้นแห้งโดยการระเหยเอาตัวทำละลายออก จากนั้นจึงทำการเติม Triethylamine เพื่อจับเอา HCl ออกจาก doxorubicin จากนั้นจึงทำการสกัดเอา doxorubicin มาอยู่ในชั้นของ Methylene chloride แล้วจึงทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกเพื่อนำตัวยามากักเก็บในระบบนำส่งยา PLGA นาโนพาร์ทิเคิล ตามขั้นตอนที่กล่าวมาข้างต้น

หลังจากที่ทำการเตรียม doxorubicin- loaded cIBR- นาโนพาร์ทิเคิลเรียบร้อยแล้วจึงนำมาศึกษา รูปแบบการปลดปล่อยตัวยา doxorubicin ในระบบนำส่งยาที่สังเคราะห์ขึ้นมาในสภาวะที่ pH 4 และ pH 7 โดยใช้ phosphate buffer เป็นตัวกลางในการศึกษา (500 ml) และใช้ dialysis cassette (MW.CO= 10K) บรรจุ doxorubicin- loaded cIBR- นาโนพาร์ทิเคิลไว้ข้างในปริมาตร 1 ml ในการศึกษา โดยจะแบ่งช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ที่ 0, 5, 10, 15, 30, 60, 120, 720 นาที และ 24 ชั่วโมงในวันแรก จากนั้นจึงทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 10 วัน ซึ่งแต่ละครั้งที่เก็บตัวอย่างนั้นจะนำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงโดย UV-Visible spectrometry (Perkin-Elmer, Japan) ที่ 480 nm. ซึ่งจะพิจารณาหาปริมาณ doxorubicin ที่ถูกกักเก็บในระบบนำส่งยาจาก standard curve ที่เตรียมในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0 – 0.12 mg/ml

3.17 การวิเคราะห์เชิงสถิติ

การประเมินค่าทางสถิติของข้อมูลแสดงโดยการใช้การวิเคราะห์ค่าการเปลี่ยนแปลง (one-way ANOVA). Newman–Keuls ใช้ทดสอบ post-hoc เพื่อประเมินนัยสำคัญของค่าความแตกต่าง ใช้ *t*-test เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของข้อมูล 2 กลุ่ม ในทุกกรณีหากมีค่า $p < 0.05$ ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95%