

บทที่ 4

ผลการศึกษาวิจัยและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการทดลอง

4.1 การเตรียมและการศึกษาลักษณะของนาโนพาร์ติเคิล

ทำการเตรียมนาโนพาร์ติเคิลด้วยวิธีการแทนที่ตัวทำละลาย นาโนพาร์ติเคิลเตรียมได้จาก PLGA ที่สามารถเก็บกักสีย้อมที่ไม่ละลายน้ำ ในการศึกษาที่ใช้ coumarin-6 เป็นตัวบ่งชี้เรืองแสง พบว่าได้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของนาโนพาร์ติเคิลวัดโดย dynamic light scattering มีขนาดประมาณ 200 nm ตามที่ต้องการ และมีค่าการกระจายของอนุภาคต่ำซึ่งแสดงถึงการเตรียมอนุภาคได้ขนาดที่ใกล้เคียงกันมาก (Polydisperse index (PI) ~0.08) ใช้ modified Pluronic® F-127 ซึ่งมีหมู่คาร์บอกซิลิกที่ส่วนปลายทำให้ได้นาโนพาร์ติเคิลที่มีประจุบนผิวอนุภาคเป็นลบ ค่า zeta potential ประมาณ -22.5 mV (ตารางที่ 7) ซึ่งสูงพอที่จะทำให้เกิดความคงตัวทางไฟฟ้าสถิตย สามารถลดการเกาะกลุ่มกันและคงขนาดอนุภาคได้ หมู่คาร์บอกซิลิกอิสระบนสารลดแรงดึงผิวที่อยู่บนผิวของอนุภาคจะมีประโยชน์ในการคอนจูเกตของเปปไทด์ที่ใช้ไปสู่เป้าหมาย ตารางที่ 7 แสดงคุณสมบัติของระบบนำส่งยาที่ไม่มีเป้าหมายและ cIBR คอนจูเกต นาโนพาร์ติเคิล

	Effective diameter (nm)	Polydispersity Index	Zeta potential value (mV)
	[mean ± S.D.]	[mean ± S.D.]	[mean ± S.D.]
NP	199 ± 8.0	0.08 ± 0.04	-22.5 ± 1.4
cIBR-NP	248 ± 10	0.08 ± 0.05	-25.7 ± 1.8

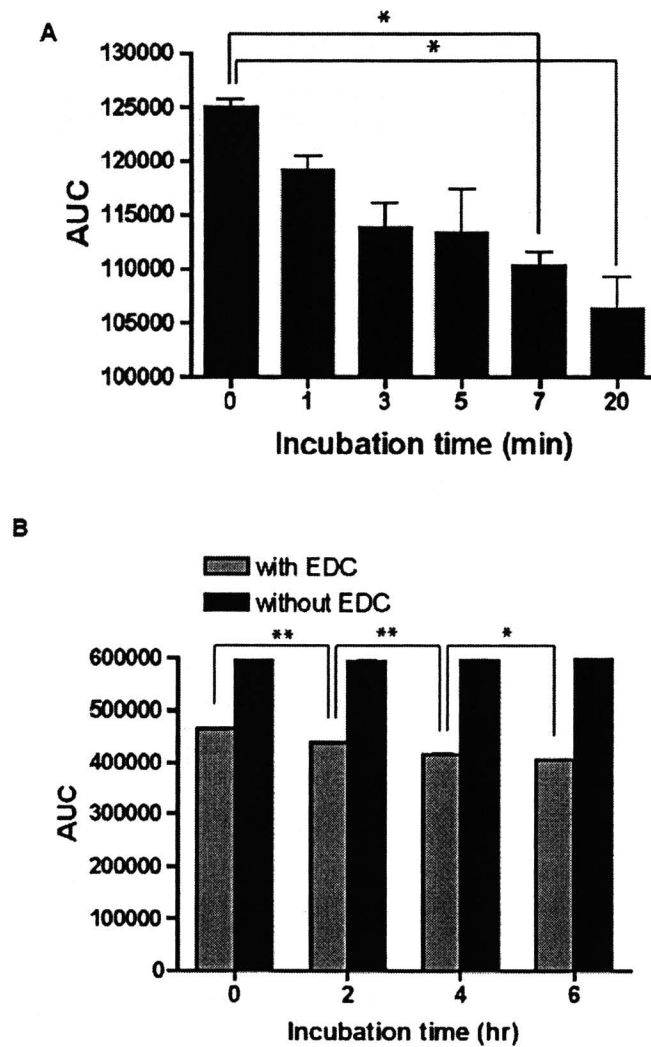
36

4.2 การคอนจูเกตของ cIBR เปปไทด์กับ PLGA นาโนพาร์ทิเคิล

cIBR peptide กับหมู่คาร์บอกซิลิกที่ส่วนปลายของ modified Pluronic® F-127 ที่จับกันด้วยพันธะ โควาลেনซ์บนผิวของนาโนพาร์ทิเคิลโดยใช้ปฏิกิริยา carbodiimide ⁽¹⁸⁾ เมื่อทำการวัดประสิทธิภาพในการคอนจูเกตโดยการวัดลิแกนด์ที่ไม่ถูกคอนจูเกตที่ยังเหลืออยู่ในตัวกลางของปฏิกิริยา พบว่าปริมาณของ cIBR เปปไทด์ที่วัดด้วย RP-HPLC นั้นมีการลดลงระหว่างเกิดปฏิกิริยา (0-20 ชั่วโมง) (รูปที่ 5A) ค่าความหนาแน่นของเปปไทด์บนผิวนาโนพาร์ทิเคิลหลังเกิดปฏิกิริยาหาค่าได้จากการวิเคราะห์หาเปปไทด์บนผิวนุภาคโดยตรง ค่าความหนาแน่นถูกวัดโดยอ้างถึงพื้นที่ผิวทั้งหมดสมมติตามการกระจายขนาดอนุภาคแบบ Gaussian distribution (ตารางที่ 8) ปฏิกิริยาการคอนจูเกตยังเกิดได้โดยไม่มี EDC เพื่อศึกษาการ absorb (อันตรกิริยา electrophilic และ hydrophobic) ของเปปไทด์ cIBR บนผิวนาโนพาร์ทิเคิล นั้นจะเห็นได้จากการหายไปของ EDC (มีคุณสมบัติที่ชอบไฟฟ้าและไม่ชอบน้ำ) ซึ่งจะช่วยให้สังเกตการ absorb ของ cIBR เปปไทด์กับนาโนพาร์ทิเคิล ผลแสดงให้เห็นว่าการดูดซับเปปไทด์เกิดน้อยมากเนื่องจากปริมาณของเปปไทด์ที่ไม่ถูกคอนจูเกตในตัวกลางของปฏิกิริยาซึ่งวิเคราะห์โดย RP-HPLC ไม่ลดลงเมื่อบ่มเปปไทด์กับนาโนพาร์ทิเคิลโดยไม่มีการกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลิก (รูปที่ 5B)

ตารางที่ 8 แสดงความหนาแน่นของเปปไทด์ cIBR บนผิวของอนุภาคนาโนพาร์ทิเคิล

	Effective diameter (nm)	Total surface area	Surface cIBR
	[mean ± S.D.]	[m ² /g of PLGA]	[pmol/cm ²]
cIBR-NP	248	18.1	-39.0 ± 9.6



รูปที่ 5 (A) ปริมาณเปปไทด์ cIBR ใน supernatant ที่ลดลงตามเวลาการบ่มซึ่งเป็นการบ่งชี้ถึงการคอนจูเกตกับนาโนพาร์ทิเคิล

(B) ผลของ EDC ต่อปฏิกิริยาการคอนจูเกต ปริมาณเปปไทด์ในตัวกลางของปฏิกิริยาไม่ลดลงระหว่างที่เกิดปฏิกิริยาโดยไม่มี EDC แสดงถึงความสำคัญของ EDC ต่อการเชื่อมต่อลิแกนด์ ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. (n=3), ** แสดง $p < 0.001$ และ * แสดง $p < 0.01$

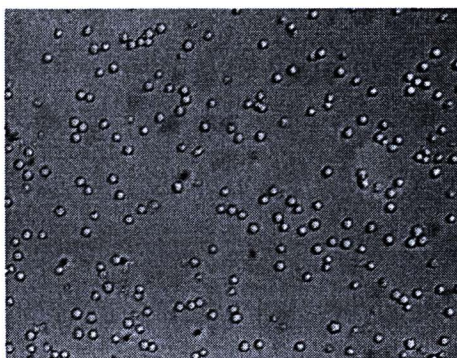
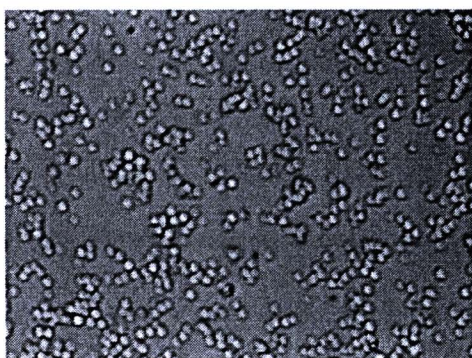
4.3 ผลของ PMA ต่อ ระดับการแสดงออกของ LFA-1 บนผิวเซลล์

เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่า Molt-3 cells เกิดการเกาะกลุ่มกันภายหลังการบ่มด้วย PMA (รูปที่ 6) แม้ว่าจะมีการเกาะกลุ่มของ Molt-3 cells เกิดขึ้นเมื่อไม่มี PMA บ้างก็ตาม แต่จะเห็นได้ชัดเจนว่า PMA จะกระตุ้น Molt-3 cells ให้เกิดกลุ่มขนาดใหญ่ขึ้นมากกว่าเดิมมาก ส่วนกลไกของ PMA ในการช่วยให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของ Molt-3 cells นั้นคือการเปลี่ยนรูปร่างของ LFA-1 โดย PMA จะเพิ่ม avidity ของ LFA-1 ผ่านโปรตีน rhoA ซึ่งทำหน้าที่เป็น transducer ภายในเซลล์เป็นการกระตุ้น protein kinase C นำไปสู่การกระตุ้น integrin ได้ตรวจสอบการรวมตัวของเซลล์ โดยวิธี Immunofluorescence flow cytometry เพื่อตรวจสอบปริมาณของ LFA-1 บน Molt-3 cells ซึ่งพบว่าไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อมีการกระตุ้นด้วย PMA เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ถูกกระตุ้นแสดงถึงว่า PMA ไม่ได้เหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มแสดงออกของ LFA-1 (รูปที่ 7) ผลนี้ยังพบได้ในเซลล์ที่มี LFA-1 อื่นๆ⁽²¹⁾ โดยเซลล์ที่เป็นตัวควบคุมคือ A549 มีการแสดงออกของ ICAM-1 แต่ไม่มีการแสดงออกของ LFA-1 เมื่อ A549 ถูกกระตุ้นด้วย PMA ตามเวลาที่กำหนด หลังจากนั้นจึงได้ทำการตรวจสอบการแสดงออกของ LFA-1 โดยอาศัย anti-LFA-1-FITC ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนส์ซึ่งวัดโดย flow cytometry นั้นมีค่าน้อยมากเมื่อเทียบกับ Molt-3 cells (รูปที่ 8)

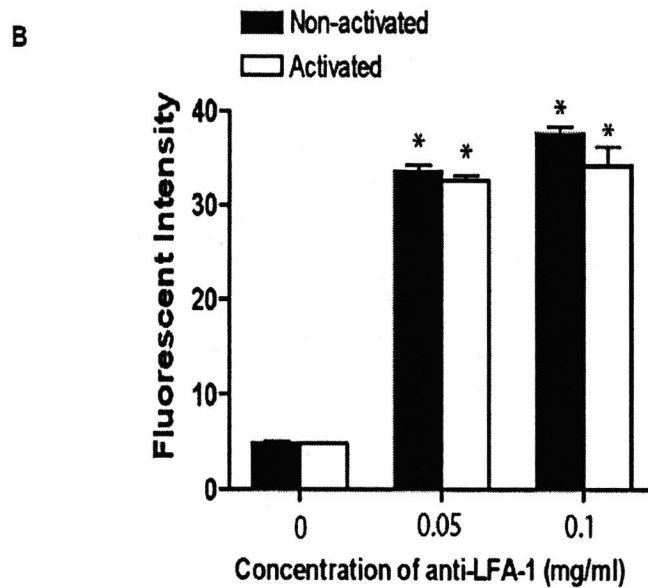
A

Molt-3 cells stimulated by PMA

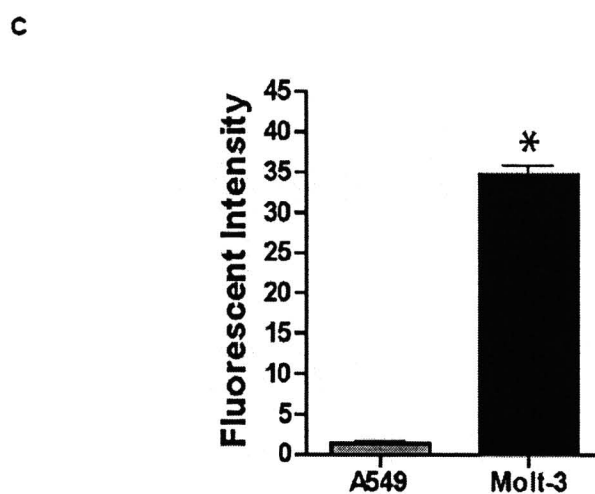
Molt-3 cells Without PMA



รูปที่ 6 ผลของ PMA ต่อการเกาะติดระหว่างเซลล์ชนิดเดียวกันของ Molt-3 cells การเกาะกลุ่มของ Molt-3 cells เป็นผลจากการกระตุ้น LFA-1 จับกับ ICAM-1 ที่อยู่บน Molt-3 cells อื่น



รูปที่ 7 การกระตุ้น LFA-1 โดย PMA ไม่แสดง LFA-1 บน Molt-3 cells แต่เปลี่ยนโครงสร้างของ LFA-1



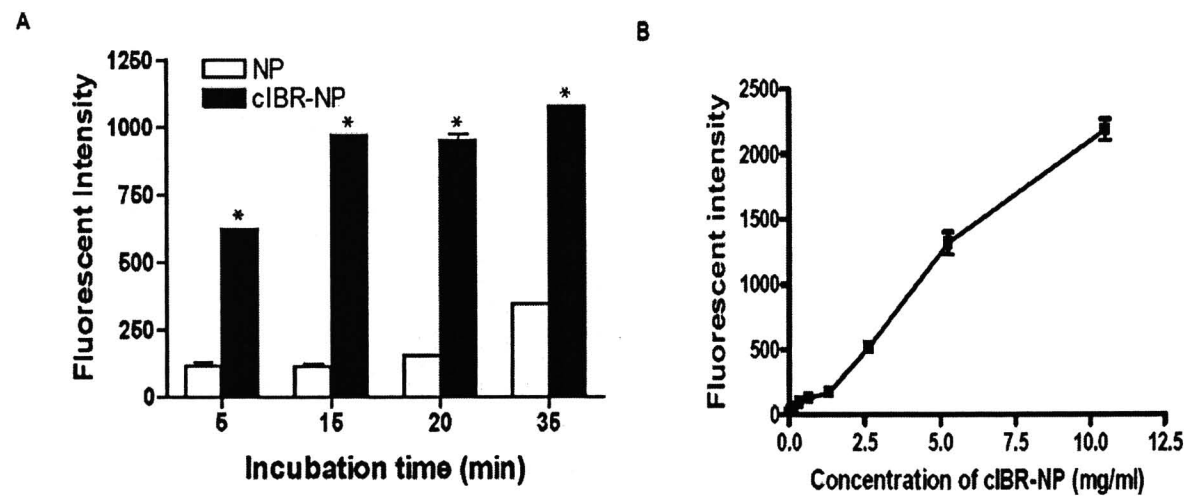
รูปที่ 8 ความจำเพาะเจาะจงของ anti-LFA-1-FITC ต่อ LFA-1 ในการศึกษาการแสดงออกของ LFA-1 ซึ่ง

แสดงออกถึงความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่มีเพียงเล็กน้อยเมื่อบ่มกับเซลล์ที่ไม่มี LFA-1 (A549 cells)

ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. (n = 3) * แสดง $p < 0.001$

4.4 การจับและการนำเข้าสู่ของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิล และนาโนพาร์ทิเคิล เข้าสู่ Molt-3 cells

การจับและนำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์โดย Molt-3 cells ตรวจสอบโดย flow cytometry ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 9 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลถูกนำเข้าสู่เซลล์มากกว่านาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีเป้าหมาย ส่วน Molt-3 cells ที่วิเคราะห์โดย flow cytometry แสดงความเข้มแสงฟลูออเรสเซนส์สูงกว่า 5 เท่าเมื่อเทียบกับนาโนพาร์ทิเคิลที่มีเป้าหมาย การนำนาโนพาร์ทิเคิลทั้งสองแบบเข้าสู่เซลล์เพิ่มขึ้นตามเวลาที่ผ่านไป แต่ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนส์สำหรับ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลมีค่ามากกว่า ผลการทดลองเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่า cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลจับกับ Molt-3 cells เร็วกว่าและในปริมาณที่มากกว่าเมื่อเทียบกับนาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีเป้าหมาย ยิ่งกว่านี้การนำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์ยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร เห็นได้จากที่อุณหภูมิ 37 °C การนำนาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของนาโนพาร์ทิเคิล

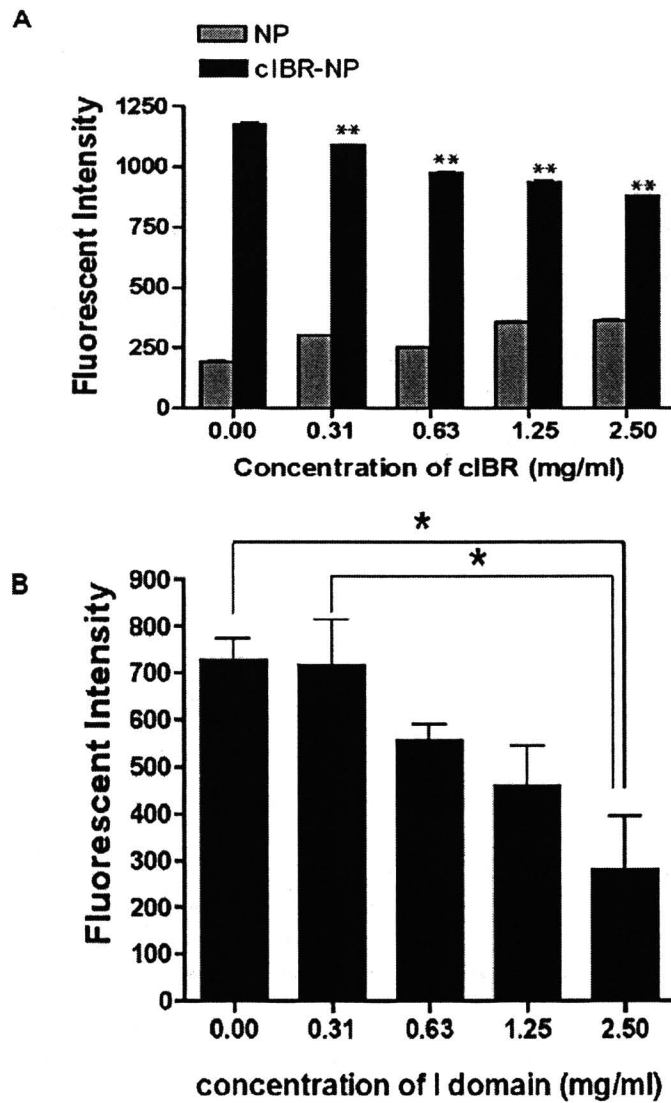


รูปที่ 9 (A) Molt-3 cells นำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์มากกว่านาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีเป้าหมายอย่างมีนัยสำคัญที่ทุกจุดเวลาการบ่ม การนำส่ง cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์เพิ่มขึ้นตามเวลาและความเข้มข้นที่พบที่เวลา 15 นาที แสดง receptor-mediated endocytosis

(B) ผลของความเข้มข้นต่อการนำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์ ซึ่งเมื่อความเข้มข้นของนาโนพาร์ทิเคิลเพิ่มขึ้นการนำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์ก็เพิ่มขึ้น ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. (n = 3) * แสดง $p < 0.001$

4.5 การยับยั้งการจับของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลกับ Molt-3 cells โดย cIBR อีสระ และ I domain ของ LFA-1

ในการศึกษาการยับยั้งการจับของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลด้วย cIBR อีสระ ทำได้จากการตรวจสอบได้โดยการบ่ม Molt-3 cells ด้วยเปปไทด์ cIBR อีสระก่อนแล้วตามด้วย cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลหรือนาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีเป้าหมาย ค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนส์ของเซลล์ที่บ่มด้วย cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) เมื่อเทียบกับเซลล์ที่บ่มด้วยนาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีเป้าหมาย (รูปที่ 10A) ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการจับของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลกับ LFA-1 บน Molt-3 cells จะถูกขัดขวางด้วยเปปไทด์ cIBR ผลเหล่านี้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าเกิดการจับอย่างจำเพาะเจาะจงระหว่าง cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลและ LFA-1 บน Molt-3 cells ในขณะที่การจับของนาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีเป้าหมายเกิดน้อยมาก และสามารถพิจารณาว่าเป็นแบบไม่จำเพาะเจาะจง เพื่อสนับสนุนคำกล่าวนี้ การทดลองให้ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลจับกับ I domain ของ LFA-1 ก่อนทำการบ่มกับ Molt-3 cells ซึ่งคาดว่า I domain จะจับกับ cIBR บนนาโนพาร์ทิเคิลที่มีเป้าหมาย และป้องกันการจับของนาโนพาร์ทิเคิลที่มีเป้าหมายกับ LFA-1 บน Molt-3 cells ผลการทดลองนี้แสดงถึงความเข้มข้นของ I domain ของ LFA-1 ที่เพิ่มขึ้นแต่การจับของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลกลับลดลงอย่างสอดคล้องกัน (รูปที่ 10B) การจับของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลลดลงเป็นประมาณ 60 % เมื่อใช้ I domain 2.5 mg/ml บ่มกับ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลก่อนที่ทำการบ่มกับ Molt-3 เทียบกับที่ไม่เติม I domain ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นการจับกันอย่างจำเพาะของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลต่อ I domain ของ LFA-1 การจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงนี้อธิบายได้โดยความจริงที่ว่าเปปไทด์ cIBR มีลำดับ PRGG เหลื่อมซ้อนกันกับโครงสร้าง β -turn ของ D_1 ของ ICAM-1 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ใช้จับของ LFA-1^(19,20) Anderson และ Siahaan ได้แสดงการจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงของเปปไทด์ cIBR และแสดงถึงการจับกันของ cIBR-FITC กับ sLFA-1 ว่าสามารถถูกยับยั้งโดย anti-CD11a antibody ซึ่งชี้ถึงการจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงของ cIBR ต่อ I domain ของ LFA-1



รูปที่ 10 (A) การนำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าเซลล์ Molt-3 ลดลงตามความเข้มข้นของเปปไทด์ cIBRอิสระ

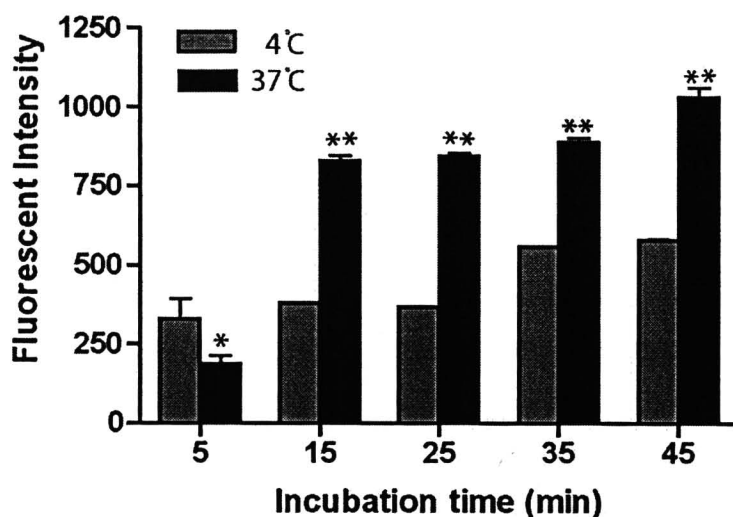
แสดงถึงการจับของ cIBR ต่อ Molt-3 cells ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. (n = 3) * แสดง $p < 0.001$

(B) การนำcIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าเซลล์ Molt-3 ถูกยับยั้งเมื่อมี I domain อิสระของLFA-1 การ

ยับยั้งนี้ขึ้นกับความเข้มข้น ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. (n = 3) * แสดง $p < 0.01$

4.6 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการจับและการนำเข้าสู่เซลล์ของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิล

ทำการบ่ม Molt-3 cells กับ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลที่อุณหภูมิ 4 °C และ 37 °C เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการนำนาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์และตรวจสอบว่ากลไกในการนำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่ Molt-3 cells ด้วยวิธี endocytosis หรือไม่ โดยการนำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์นั้นสามารถวิเคราะห์ได้จากความเข้มแสงฟลูออเรสเซนส์ของอนุภาคที่อยู่ภายในเซลล์ ซึ่งผลการศึกษาพบว่าค่าความเข้มแสงลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่อุณหภูมิ 4°C (รูปที่ 11) แสดงถึงการนำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและยังสามารถกล่าวได้ว่าด้วยวิธีการใช้พลังงานแบบ endocytosis เนื่องจากที่อุณหภูมิ 4°C เซลล์ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ การเข้าสู่เซลล์ของนาโนพาร์ทิเคิลเป็นแบบ passive ไม่จำเพาะเจาะจง จึงไม่เกิด endocytosis พบว่าที่อุณหภูมิ 37°C ค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนส์ของเซลล์ที่บ่มด้วย cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเพิ่มขึ้นมากเมื่อเวลาช่วงเริ่มต้นของการบ่ม (5-15 นาที) และอัตราการเพิ่มขึ้นของความเข้มแสงจะลดลงที่เวลาต่อมา การลดลงของอัตราการเพิ่มขึ้นของความเข้มแสงบ่งชี้ถึงความอิ่มตัวของการขนส่ง cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลและแสดงถึงกลไก receptor mediated endocytosis ในทางตรงกันข้าม ที่อุณหภูมิต่ำการนำอนุภาคเข้าสู่เซลล์น้อยกว่าเมื่อเวลาตั้งแต่ 15 นาที แต่ค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนส์มีอัตราเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยเฉพาะในเวลาช่วงหลังของการบ่ม (25-35 นาที) แสดงว่าที่อุณหภูมิต่ำใช้เวลานานกว่าในการนำเข้าสู่เซลล์



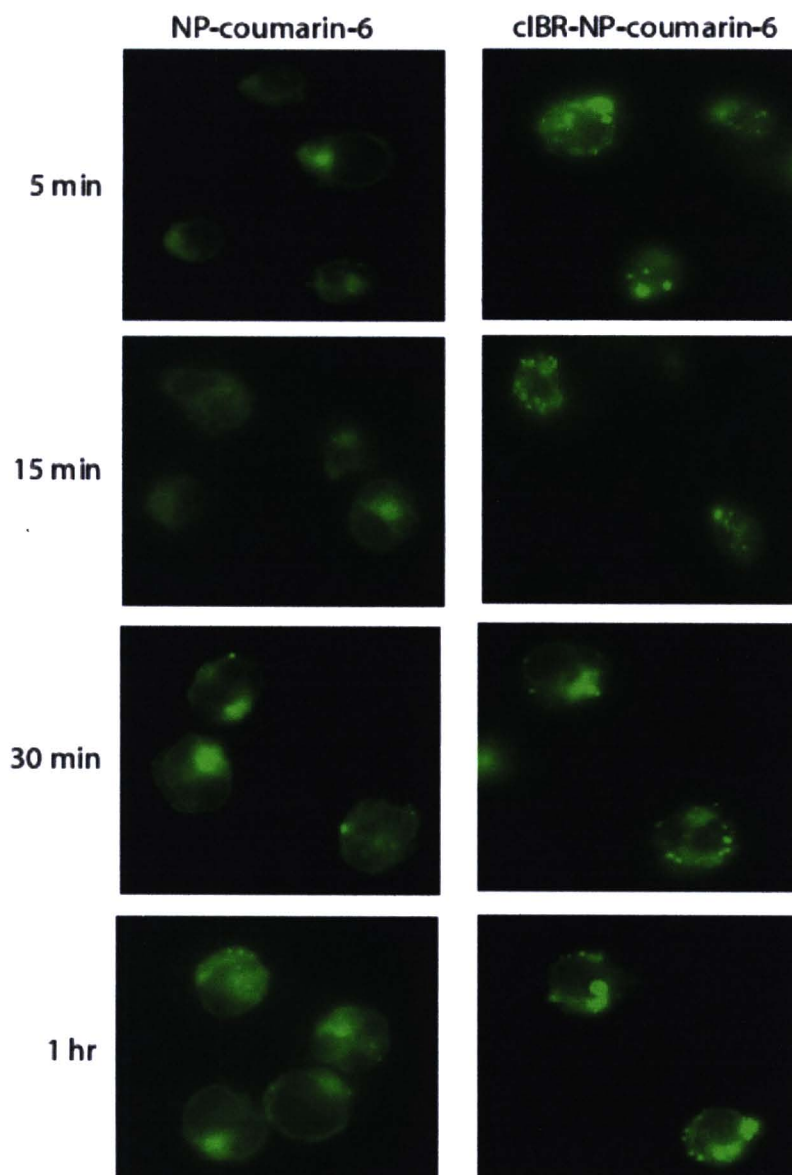
รูปที่ 11 ผลของอุณหภูมิต่อการนำนาโนพาร์ทิเคิลเข้าเซลล์ เมื่ออุณหภูมิลดลงการนำนาโนพาร์ทิเคิลเข้า เซลล์

ก็ลดลง ผลนี้แสดงถึง receptor-mediated endocytosis ของนาโนพาร์ทิเคิล ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$

S.D. (n = 3) ** แสดง $p < 0.001$ และ * แสดง $p < 0.01$

4.7 Fluorescent microscopy ของ Molt-3 cells ในการศึกษาการจับและนำเข้าของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลและนาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีเป้าหมาย

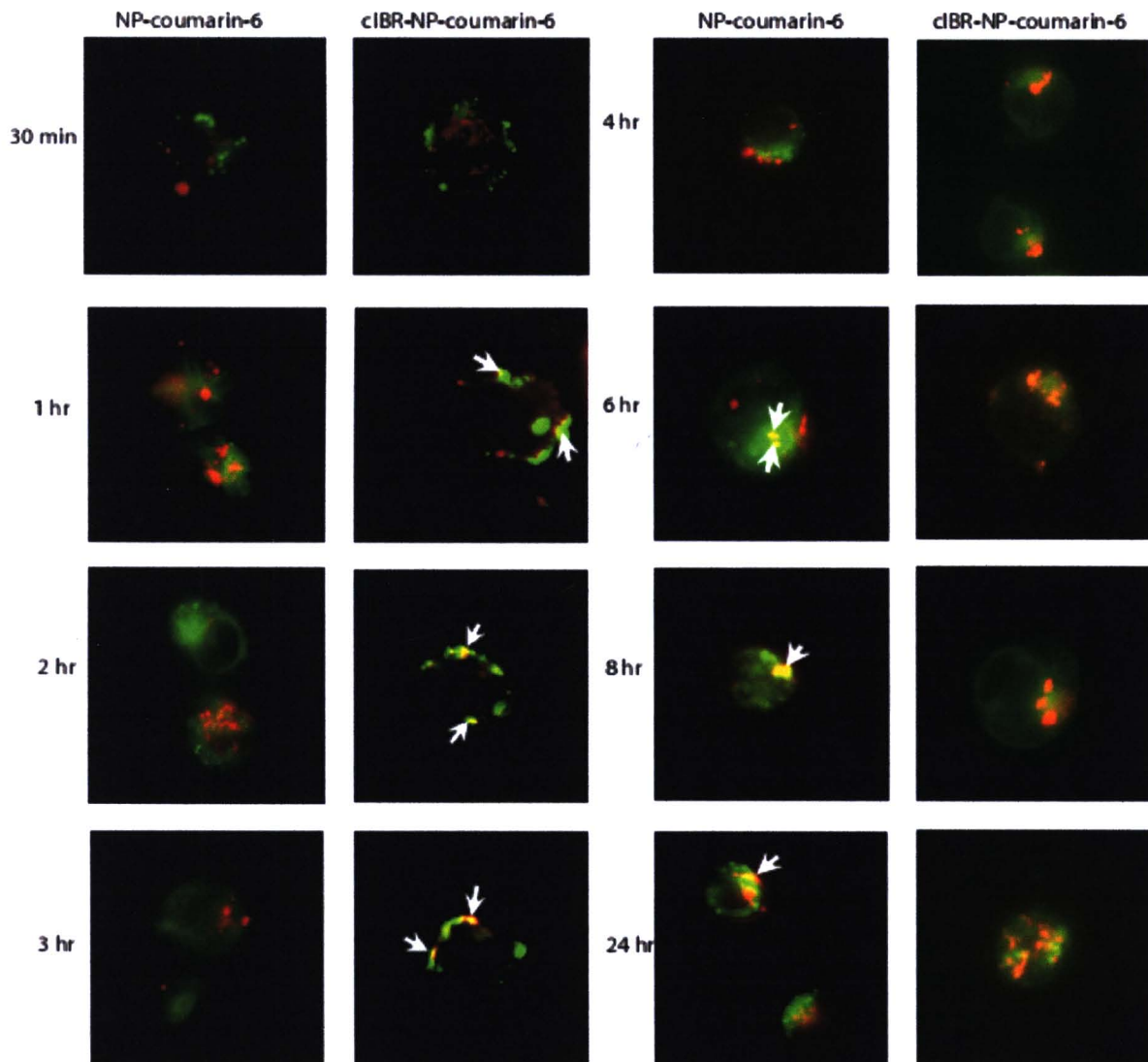
ทำการตรวจสอบการนำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลและนาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีเป้าหมายเข้าสู่เซลล์ Molt-3 โดย fluorescent microscopy ซึ่งภาพที่ได้สามารถแสดงให้เห็นอย่างเป็นรูปธรรมว่า cIBR เปปไทด์นั้นสามารถเป็นส่วนช่วยในการเพิ่มความสามารถในการนำส่งของระบบนำส่งยาได้อย่างจำเพาะเจาะจงมากขึ้น เมื่อเทียบกับระบบนำส่งยาที่ไม่มีเปปไทด์ ซึ่งพิจารณาได้จากความเข้มแสงฟลูออเรสเซนส์ในรูปที่ 12 จะเห็นได้ว่าความเข้มแสงของเซลล์ที่มี cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลนั้นจะมีความเข้มมากกว่าของนาโนพาร์ทิเคิลไม่มีเป้าหมาย เมื่อพิจารณาถึงระยะเวลาในการบ่มนั้นพบว่าเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นความเข้มแสงก็เพิ่มขึ้นด้วย และเป็นที่สังเกตว่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนส์ของเซลล์ที่บ่มด้วย cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลนั้นเมื่อเวลาผ่านไปความเข้มแสงจะไม่ต่างกันมากซึ่งผลเหล่านี้สนับสนุนข้อมูลการนำเข้าเซลล์ของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลวัดโดย flow cytometry แสดงการจับและเข้าเซลล์ของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลที่เร็วและเกิดความอึดตัวของการนำเข้าเซลล์



รูปที่ 12 การนำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิล (เขียว) เข้า Molt-3 cells มากกว่านาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีเป้าหมายที่แต่ละ
 เวลาการบ่มแสดงโดยภาพจากกล้องฟลูออเรสเซนซ์

4.8 Lysosomal trafficking ของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลใน Molt-3 cells

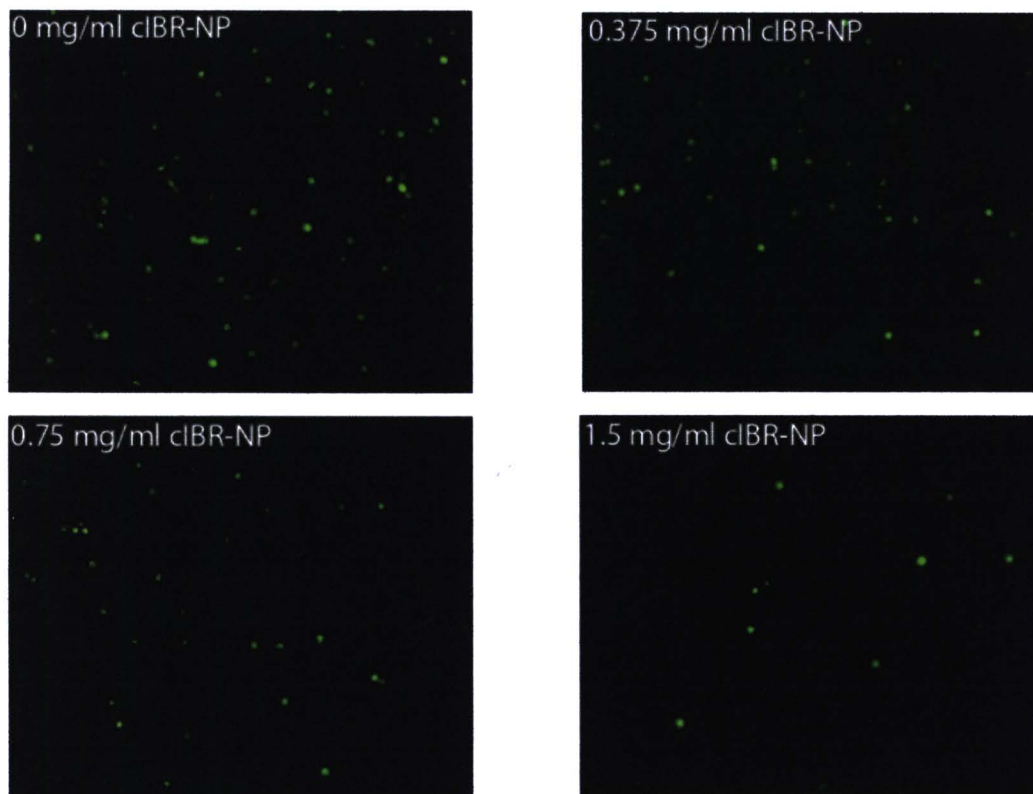
เพื่อติดตามการนำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลและนาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์ ส่วนของไลโซโซมของเซลล์ Molt-3 ถูกย้อมด้วย Texas red-dextran ซึ่งสามารถตรึงไลซีนที่อยู่ภายในไลโซโซมได้ เมื่อมีการบ่ม cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลหรือนาโนพาร์ทิเคิลซึ่งบรรจุสีย้อมเรืองแสงสีเขียวกับเซลล์ จะเกิดการ localization ภายในเซลล์ ของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลหรือนาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีเป้าหมายทำการติดตามการเรืองแสงสีเขียวซึ่งเป็นการ บ่งชี้ของการเกิด co-localization ที่เวลาแตกต่างกัน (รูปที่ 11) การ co-localization ของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิล กับถุงไลโซโซมสังเกตพบครั้งแรกที่ชั่วโมงที่ 1 และหายไปชั่วโมงที่ 4 และ co-localization ของนาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีเป้าหมายกับไลโซโซมแสดงที่เวลาการบ่มที่นานกว่า (4 ชั่วโมง) และคงอยู่ในไลโซโซมจนครบ 24 ชั่วโมง co-localization ของนาโนพาร์ทิเคิลกับไลโซโซมที่เวลาที่ยาวนานกว่า แสดงถึงว่านาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีเปปไทด์ถูกจับและเข้าสู่เซลล์ช้ากว่า รวมทั้งไม่เกิด lysosomal escape ซึ่งอาจส่งผลให้สารที่ถูกบรรจุอยู่ในอนุภาคเกิดการทำลายโดยเอนไซม์ในไลโซโซมได้ ขณะที่ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิล นั้นพบการเกิด lysosomal escape ที่เวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งผลการทดลองนี้คาดว่า การสลายตัวของยาโดยเอนไซม์และกรดอาจน้อยลงเมื่อถูกเก็บกักใน cIBR-นาโนพาร์ทิเคิล



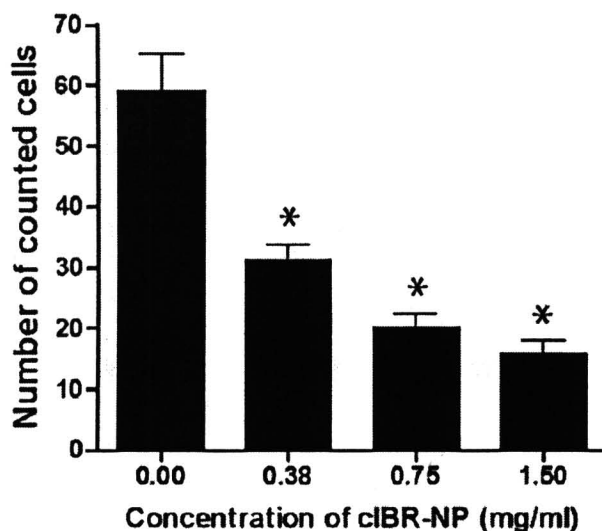
รูปที่ 13 Intracellular trafficking ของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลและนาโนพาร์ทิเคิลต่อส่วนของไลโซโซมของ Molt-3 cells การ co-localization (ฟลูออเรสเซนซ์เหลือง) ของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลกับไลโซโซม ที่ 1 ชั่วโมงและหายไป 4 ชั่วโมง ขณะที่ co-localization ของนาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีเป้าหมายกับไลโซโซมที่ 4 ชั่วโมงและคงอยู่ในเซลล์จนครบ 24 ชั่วโมง

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

การที่ leukocyte แทรกเข้าสู่ endothelial tissues นั้นต้องอาศัยอันตรกิริยาระหว่าง LFA-1 และ ICAM-1 ซึ่งเปปไทด์ cIBR นั้นสามารถยับยั้งอันตรกิริยาดังกล่าวได้โดยการจับกับ LFA-1 ทำให้ LFA-1 นั้นลดประสิทธิภาพในการจับกับ ICAM-1^(11, 14, 16) ในการศึกษาี้ได้ทำการตรวจสอบอันตรกิริยาของ LFA-1 บนเซลล์ Molt-3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย PMA กับ ICAM-1 ที่แสดงออกบน lung carcinomic epithelial cells (A549) ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α มีผลในการเกาะติดเซลล์แบบหลายชนิดด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์ ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แสดงให้เห็นถึงการเกาะติดของเซลล์ Molt-3 ที่ย้อมด้วยสีย้อมเรืองแสงสีเขียวและเซลล์ A549 ที่ไม่ได้ย้อมสีใดๆ(รูปที่ 14) พบว่าการบ่ม cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลกับเซลล์ Molt-3 ก่อนที่จะบ่มกับเซลล์ A549 เพื่อประเมินผลของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลในการยับยั้งการเกาะติดของเซลล์ที่มี ICAM-1 บนผิวเซลล์ พบว่า cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลสามารถยับยั้งการเกาะระหว่าง 2 เซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าที่ความเข้มข้นของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิล สูงขึ้นความสามารถในการยับยั้งก็สูงขึ้นด้วย (รูปที่ 15) โดยพบว่า ที่ความเข้มข้นสูงสุดของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลจำนวนเซลล์ที่เกาะต่ำกว่าประมาณ 73% เมื่อเทียบกับจำนวนของการเกาะติดที่ไม่มีระบบนำส่งยาดังกล่าว ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลสามารถจับกับ LFA-1 ของเซลล์ Molt-3 และยับยั้งความสามารถของ LFA-1 integrins ในการจับกับ ICAM-1 บนเซลล์ A549 ผลการศึกษานี้แสดงประสิทธิภาพของเปปไทด์ cIBR แม้ว่าจะถูกคอนจูเกตในรูปของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิล ยังสามารถยับยั้งการเกาะติดของเซลล์ต่างชนิดกัน ซึ่งอาจนำไปสู่การป้องกันการนำสัญญาณภายในเซลล์ของการอักเสบและการตอบสนองของภูมิคุ้มกันได้



รูปที่ 14 ไมโครกราฟแสดงการเกาะติดของ Molt-3 cells (เขียว) กับ A549 cells (ไม่มีสี) หลังจากได้รับ cIBR-
นาโนพาร์ติเคิลที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นผลยับยั้งการจับระหว่าง LFA-1 บน Molt-3 และ ICAM-1
บน A549 cells

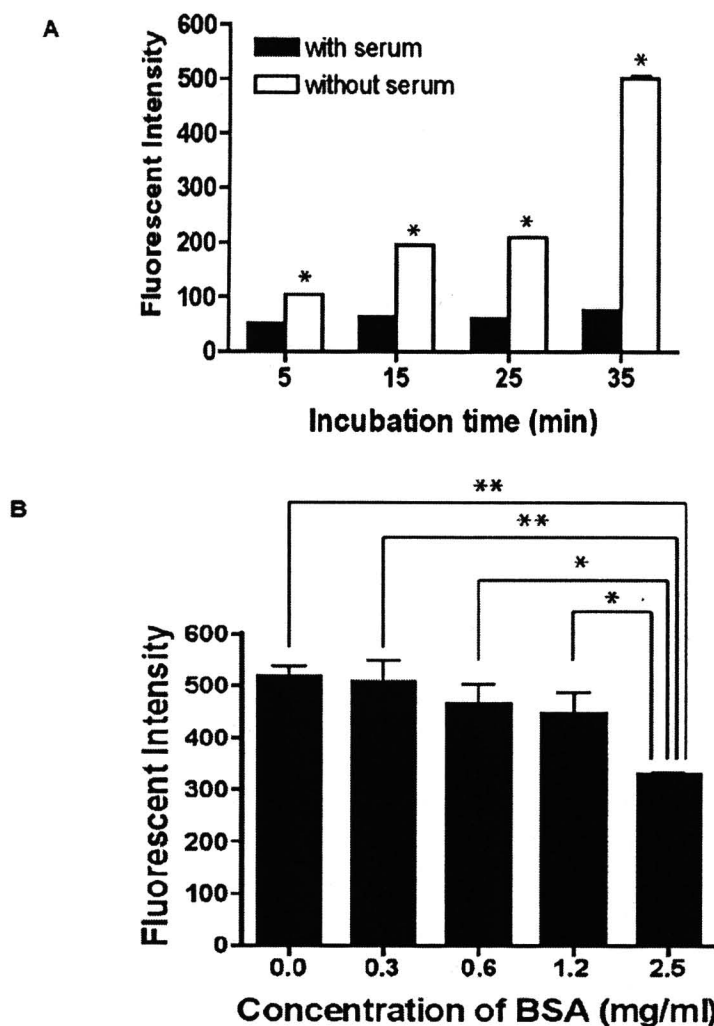


รูปที่ 15 cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลยับยั้งการเกาะติดของเซลล์ต่างชนิดกันระหว่าง Molt-3 และ A549 cells การลดลงของเซลล์ Molt-3 ที่จับกับ A549 cells เมื่อได้รับ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลแสดงถึงการยับยั้งของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลต่ออันตรกิริยาระหว่าง Molt-3 และ A549 cells ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. (n = 3) * แสดง $p < 0.001$ เปรียบเทียบกับ 0 mg/ml ของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิล

4.10 ผลของเซรัมต่อการจับและนำเข้าสู่ของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลโดย Molt-3 cells

ผลจากการศึกษาในการเตรียม cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10 % FBS เพื่อสังเกตผลของเซรัมต่อการเข้าสู่เซลล์ของนาโนพาร์ทิเคิล จากผลการวิเคราะห์ flow cytometry พบว่าการนำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าเซลล์ Molt-3 นั้นถูกยับยั้งอย่างเห็นได้ชัด โดยผลที่ได้มีน้อยกว่า 85% ของการนำนาโนพาร์ทิเคิลเข้าเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีเซรัม (รูปที่ 16A) ผลการทดลองนี้แสดงถึง serum opsonisation ต่อนาโนพาร์ทิเคิลที่มีประจุลบ⁽²³⁾ เพื่อสนับสนุนการสังเกตนี้ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลถูกปล่อยให้จับกับ bovine serum albumin (BSA) ในแต่ละความเข้มข้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 °C ตามด้วยการบ่มกับ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเป็นเวลา 40 นาทีที่อุณหภูมิ 37 °C ซึ่งพบว่าเมื่อมี BSA นั้นการนำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าเซลล์

ลดลง 36% (รูปที่ 16B) ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสนับสนุนแนวความคิดที่เกี่ยวกับการยับยั้งการนำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์โดยเซรัม ซึ่งกลไกการยับยั้งนี้ยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป



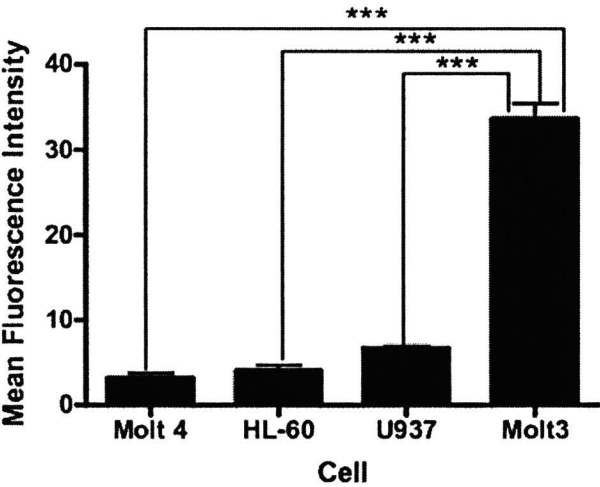
รูปที่ 16 (A) ผลของเซรัมต่อการนำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์ การนำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์โดย

Molt-3 cells ถูกยับยั้งเมื่อมีการปรากฏของ BSA ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. ($n = 3$) * แสดง $p < 0.001$

(B) การนำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์โดย Molt-3 cells ที่ได้รับ BSA ก่อนลดลงแสดงการสนับสนุนการยับยั้งของเซรัมต่อการนำนาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์ ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. ($n = 3$) ** แสดง $p < 0.001$ และ * แสดง $p < 0.05$

4.11 การตรวจสอบการแสดงออกของ LFA-1 บนผิวเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่แตกต่างกันทั้ง 4 ชนิด

การตรวจสอบการแสดงออกของ LFA-1บนผิวเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดนั้น เพื่อเป็นการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของของ LFA-1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ HL-60 (promyeloblastic cell line) , Molt-3 cells (lymphoblastic cell line), Molt-4 (lymphoblastic cell line) และ U937 (promonocytic cell line) ซึ่งตรวจสอบโดยใช้หลักการ Immunofluorescence โดยการย้อม LFA-1 บนผิวเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วย anti-LFA-1-FITC และตรวจสอบความเข้มของการเรืองแสง (Fluorescence Intensity) ด้วยเครื่อง Flow cytometer ซึ่งจะแปลผลออกมาเป็นค่า mean fluorescence intensity (MFI) จากผลการทดลองดังกล่าวนี้แสดงให้เห็นว่า Molt-3 มีการแสดงออกของ LFA-1 บนผิวเซลล์มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดอื่นที่ใช้ในการตรวจสอบ (รูปที่ 17)



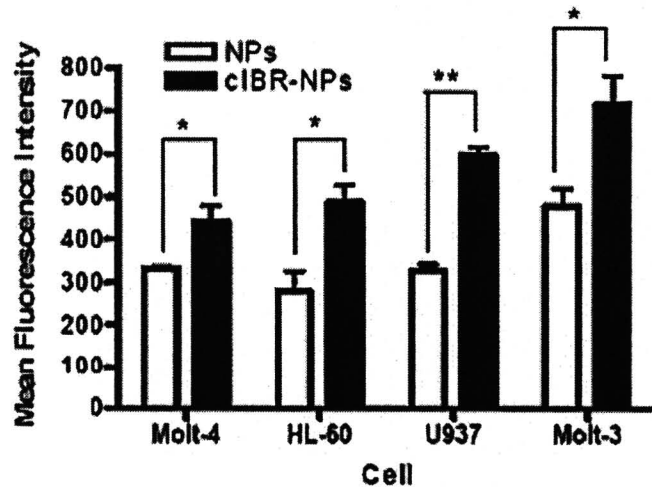
รูปที่17 การเปรียบเทียบการแสดงออกของ LFA-1 บนผิวเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้ง 4 ชนิด ข้อมูลแสดงเป็น

ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. (n = 3) *** แสดง $p < 0.001$

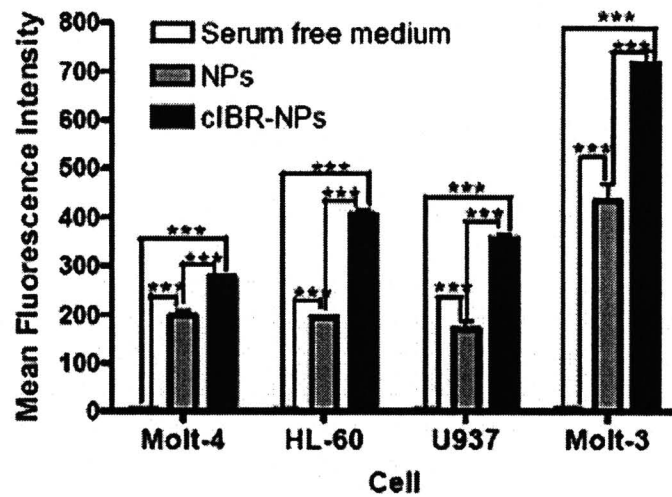
4.12 การจับและนำเข้าของนาโนพาร์ทิเคิลและcIBR-นาโนพาร์ทิเคิลกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งสี่ชนิด

จากการศึกษาการจับและนำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์โดย Molt-3 cells จากการทดลองข้างต้นตามผลการทดลองแสดงในรูปที่ 9 นั้นแสดงให้เห็นว่า cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลถูกนำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Molt-3 มากกว่านาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีเป้าหมาย และการนำนาโนพาร์ทิเคิลทั้งสองแบบเข้าสู่เซลล์เพิ่มขึ้นตามเวลาที่ผ่านไป ซึ่งในการทดลองนี้ได้นำเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่แตกต่างกันทั้ง 4 ชนิดมาใช้ในการทดลอง เพื่อศึกษาความแตกต่างระหว่างชนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาวการจับและนำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่มีความแตกต่างกัน ในขั้นตอนการทดลองนี้ผู้ทำการทดลองได้ศึกษาการเข้าจับของระบบนำส่งยาบนผิวเซลล์และการนำระบบนำส่งยาทั้งสองชนิด คือ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิล และ นาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีเป้าหมาย โดยเซลล์มะเร็งทั้งสี่ชนิด และมีการศึกษาผลการจับและการนำส่งยาในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งสี่ชนิด ณ ช่วงเวลาต่างๆ ซึ่งผลที่ได้จาก Flow cytometry ได้แสดงให้เห็นว่าการจับและการนำเข้าของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลในทั้งสี่เซลล์นั้นมีค่าสูงกว่า การจับและการนำเข้าของนาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีเป้าหมายในทุกเซลล์มะเร็งที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 18A) จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า cIBR เปปไทด์นั้นสามารถถูกนำมาใช้เป็น Targeting molecule เพื่อเป็นส่วนที่นำระบบนำส่งเข้าสู่เซลล์เป้าหมายอย่างจำเพาะเจาะจง อีกทั้งผลการศึกษายังได้แสดงให้เห็นถึงความเร็วในการจับและนำเข้าของcIBR-นาโนพาร์ทิเคิลนั้นเร็วกว่าการจับและการนำเข้าของนาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีเป้าหมายในเซลล์มะเร็งทั้งสี่ชนิดอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่18B) นอกจากนี้จากผลการศึกษายังได้แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างการจับและการนำเข้าของระบบนำส่งยา กับเวลาในการบ่มระบบนำส่งยากับเซลล์มะเร็ง กล่าวคือ เมื่อระยะเวลาในการบ่มระบบนำส่งยากับเซลล์มะเร็งเพิ่มมากขึ้น การจับและการนำเข้าของระบบนำส่งยาโดยเซลล์มะเร็งเพิ่มมากขึ้นด้วย (รูปที่19)

A

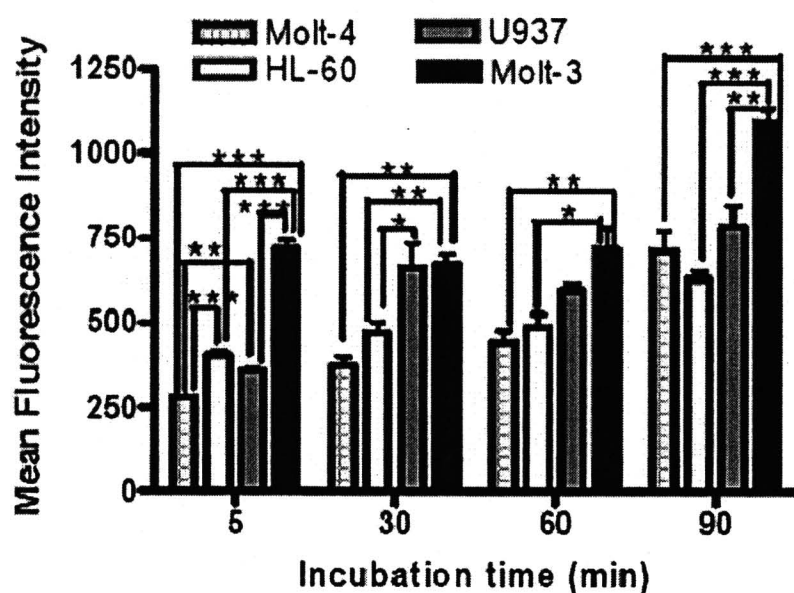


B



รูปที่ 18 (A) ผลการเปรียบเทียบระหว่างการนำเข้า cIBR นาโนพาร์ทิเคิล กับ นาโนพาร์ทิเคิล โดยเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งสี่ชนิด

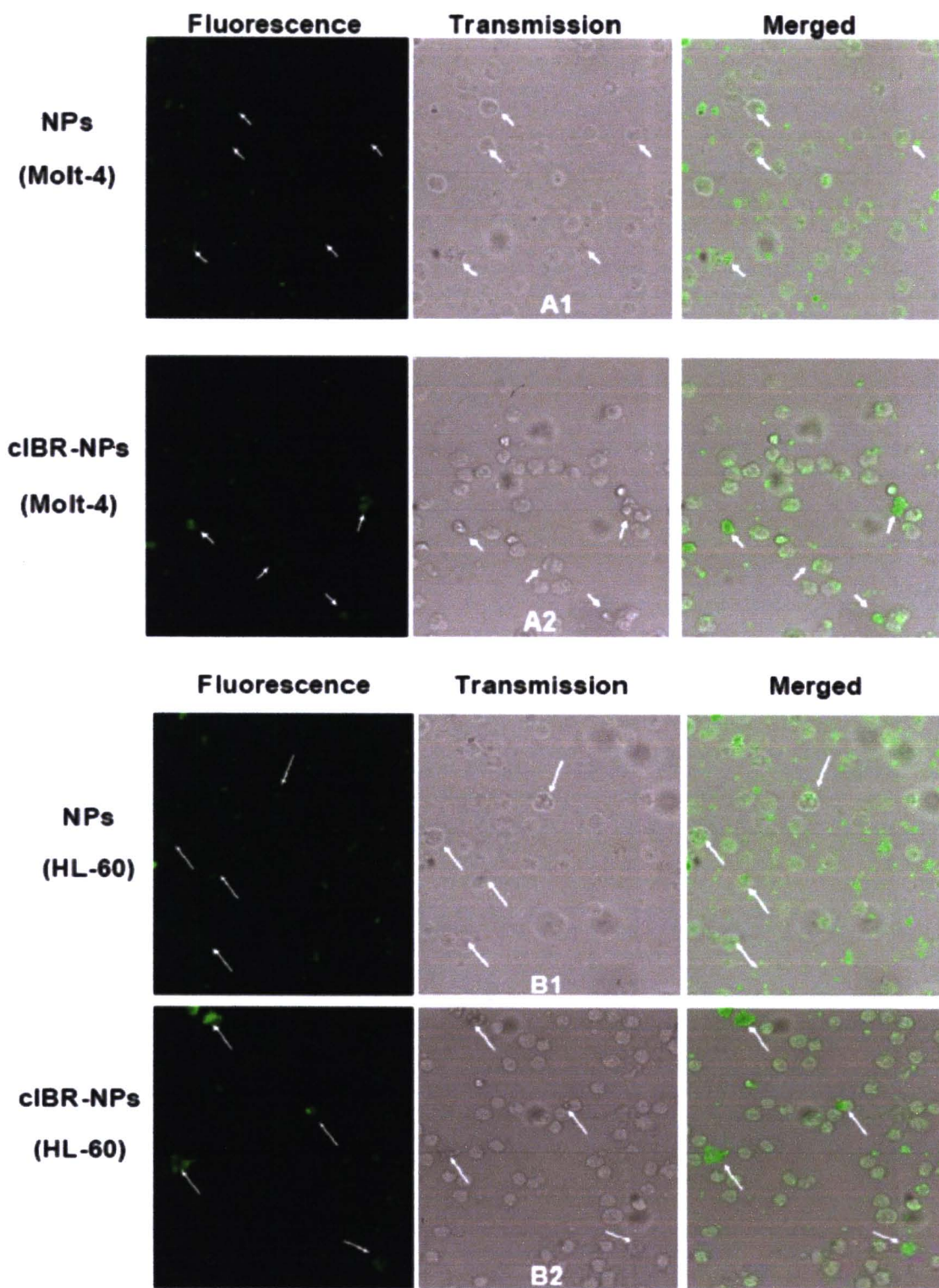
(B) ผลแสดงความสามารถในการนำเข้าของ cIBR นาโนพาร์ทิเคิล ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งสี่ชนิดที่เวลา 5 นาที เปรียบเทียบกับการนำเข้าของนาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีเป้าหมายและเซลล์มะเร็งที่ไม่ได้มีการนำเข้า cIBR นาโนพาร์ทิเคิลข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ยค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. (n = 3) *แสดง $p < 0.05$, แสดง $p < 0.01$ และ*** แสดง $p < 0.001$



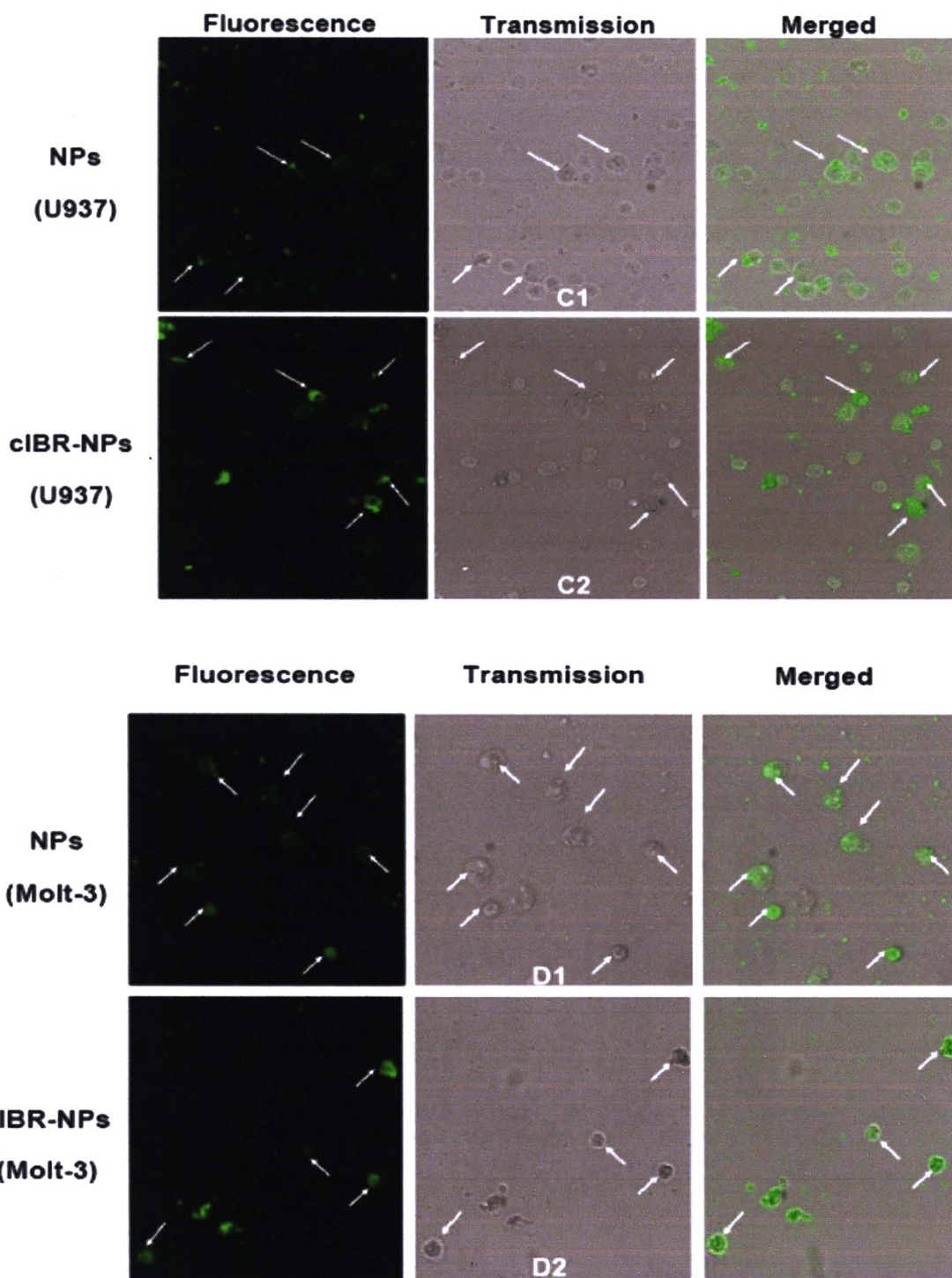
รูปที่ 19 ผลการจับและนำเข้าสู่ของระบบนำส่งยาการนำเข้าสู่ของ cIBR นาโนพาร์ทิเคิลโดยเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่เวลา 5, 15, 30, 60 และ 90 นาที ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ยค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. ($n = 3$) *แสดง $p < 0.05$, แสดง $p < 0.01$ และ*** แสดง $p < 0.001$

4.13 Fluorescent microscopy ของ leukemic cell lines และนาโนพาร์ทิเคิล

ทำการตรวจสอบการนำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลและนาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีเป้าหมายเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้ง 4 ชนิด โดยใช้การส่องดูด้วยกล้องฟลูออเรสเซนส์ ซึ่งพบว่าความเข้มของการเรืองแสงในเซลล์ที่นำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์ทั้ง 4 ชนิดนั้นมีความเข้มสูงกว่านาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีเป้าหมายที่ถูกนำเข้าไปในเซลล์ชนิดเดียวกัน แสดงให้เห็นว่า cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลสามารถเป็นตัวนำสู่เป้าหมายต่อการจับและการนำเข้าสู่ของเซลล์ที่มีการแสดงออกของ LFA-1 บนผิวเซลล์อย่างชัดเจน (รูปที่ 20) อีกทั้งยังแสดงให้เห็นความเกี่ยวข้องของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิล และนาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีเป้าหมายกับผลของลิแกนด์เปปไทด์ที่เป็นตัวนำสู่เป้าหมายต่อการจับและการนำเข้าสู่เซลล์ของนาโนพาร์ทิเคิลเห็นได้อย่างชัดเจนบนรูปเหล่านี้



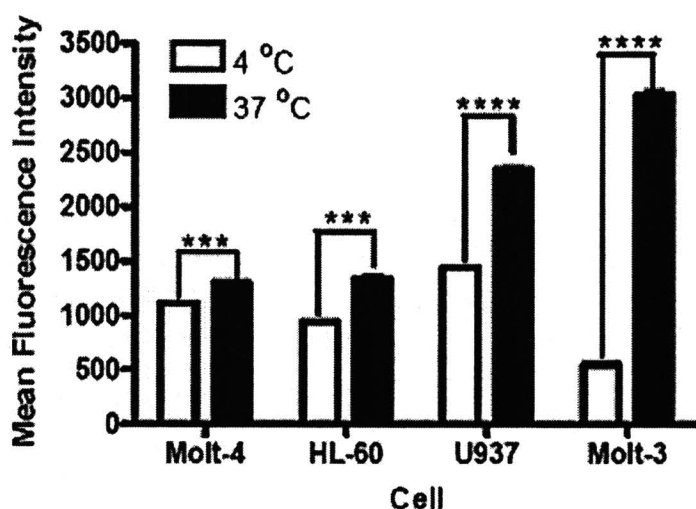
รูปที่ 20 Fluorescent micrographs (A1) Molt-4 cells บ่มกับ นาโนพาร์ติเคิลที่ไม่มีเป้าหมาย, (A2) Molt-4 cells บ่มกับcIBR-นาโนพาร์ติเคิล (B1) HL-60 cells บ่มกับนาโนพาร์ติเคิลที่ไม่มีเป้าหมาย (B2) HL-60 cells บ่มกับcIBR-นาโนพาร์ติเคิล



รูปที่ 20 (ต่อ) Fluorescent micrographs (C1) U937 cells บ่มกับนาโนพาร์ติเคิลที่ไม่มีเป้าหมาย (C2) U937 cells บ่มกับcIBR-นาโนพาร์ติเคิล (D1) Molt-3 cells บ่มกับนาโนพาร์ติเคิลที่ไม่มีเป้าหมาย และ (D2) Molt-3 cells บ่มกับcIBR-นาโนพาร์ติเคิล โดยที่ลูกศรสีขาวชี้ให้เห็นการจับของระบบนำส่งยา ทั้งสองชนิดในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งสองชนิด ซึ่งทุกรูปถ่ายภายใต้กำลังขยาย 10 เท่า

4.14 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการนำ cIBR - นาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งสี่ชนิด

เพื่อประเมินอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีผลต่อความสามารถของเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิดในการนำอนุภาค cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์มะเร็ง โดยศึกษาในสภาวะที่อุณหภูมิต่างกัน 2 อุณหภูมิ คือ 4°C และ 37°C จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ที่อุณหภูมิ 37°C นั้น เซลล์ทั้ง 4 ชนิดมีความสามารถในการนำอนุภาค cIBR-นาโนพาร์ทิเคิล เข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (รูปที่ 21) แสดงให้เห็นว่าการนำอนุภาค cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์ทั้ง 4 ชนิดนั้น อุณหภูมิถือเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการนำเข้าอนุภาคเข้าสู่เซลล์ ซึ่งแสดงถึงการขนส่งอนุภาคดังกล่าวเข้าสู่เซลล์ทั้ง 4 นั้นเป็นแบบที่ต้องใช้พลังงานทั้งหมดซึ่งสามารถพิสูจน์โดยอ้อมได้ว่าการจับและการนำเข้าของระบบนำส่งยาดังกล่าวนั้นเป็นแบบ receptor endocytosis โดยพบว่าความแตกต่างของการนำอนุภาคเข้าสู่เซลล์ที่อุณหภูมิ 4°C และ 37°C เกิดมากที่สุดกับเซลล์ Molt-3 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของ LFA-1 สูงที่สุด แต่พบความแตกต่างน้อยกว่าเซลล์อื่นๆ



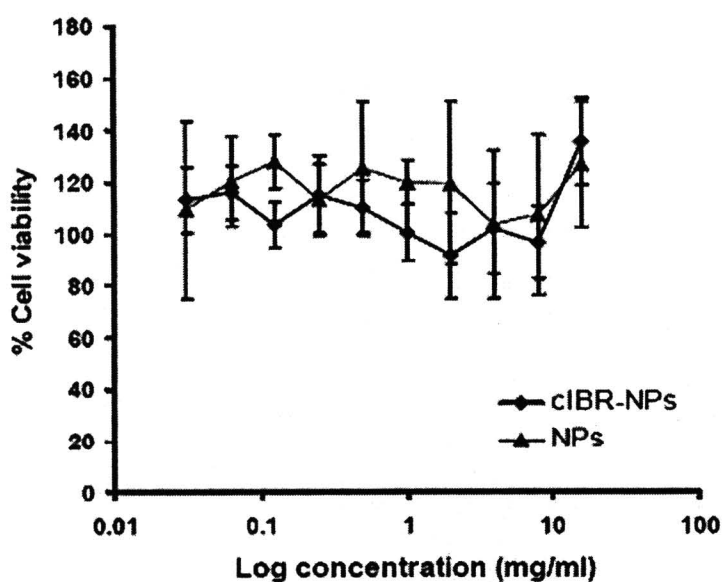
รูปที่ 21 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการจับและนำ cIBR นาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งสี่ชนิด

ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ยค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D. (n = 3) *** แสดง $p < 0.001$ และ **** แสดง $p < 0.0001$

4.15 Cytotoxicity Test

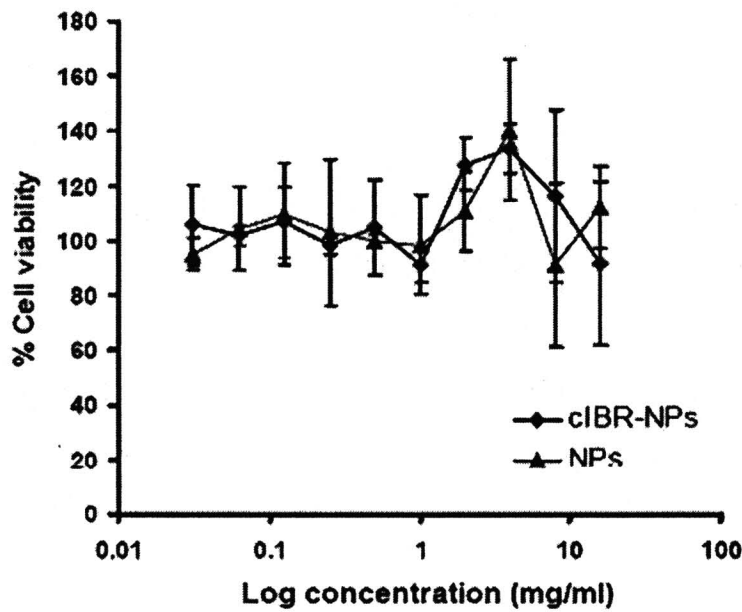
เพื่อทำการตรวจความปลอดภัยของระบบนำส่งยาที่สังเคราะห์ขึ้นมานั้นว่ามีความปลอดภัยต่อการนำมาใช้เป็นระบบนำส่งยาหรือไม่ คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการตรวจความเป็นพิษของระบบนำส่งยาต่อเซลล์มะเร็งทั้งสี่ชนิด ผลที่ได้ตามรูปที่ 22 (A-D) กล่าวได้คือระบบนำส่งยาทั้งสองชนิดนั้นมีความปลอดภัย ไม่มีพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้งสี่ชนิด ซึ่งพิจารณาได้จากค่า cell viability ในแต่ละระบบนำส่งยาสำหรับแต่ละเซลล์นั้นค่อนข้างที่จะมีค่าตั้งแต่ 85 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปในทุกเซลล์ แม้ที่ความเข้มข้นของระบบนำส่งยาที่สูงขึ้น ค่า cell viability ก็ยังคงสูงเท่ากับที่ค่าความเข้มข้นต่ำ

A. (Molt-4)



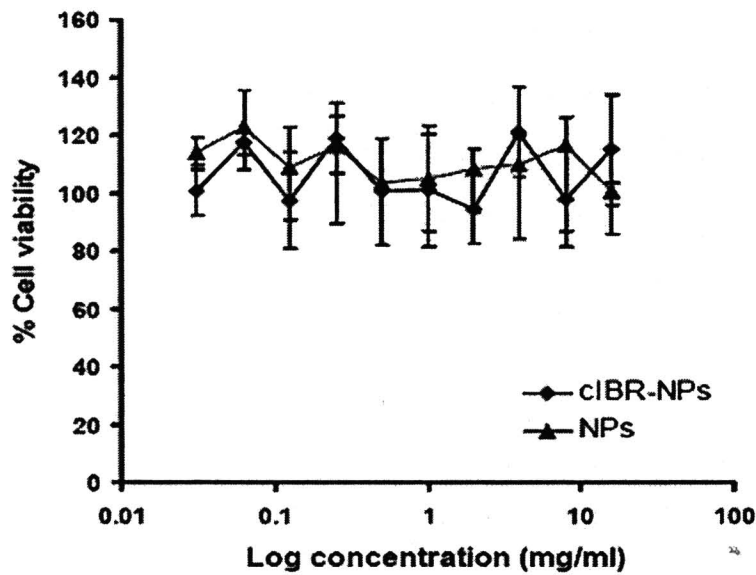
รูปที่ 22 (A) ผล cytotoxicity test ในเซลล์ Molt-4

B. (HL-60)



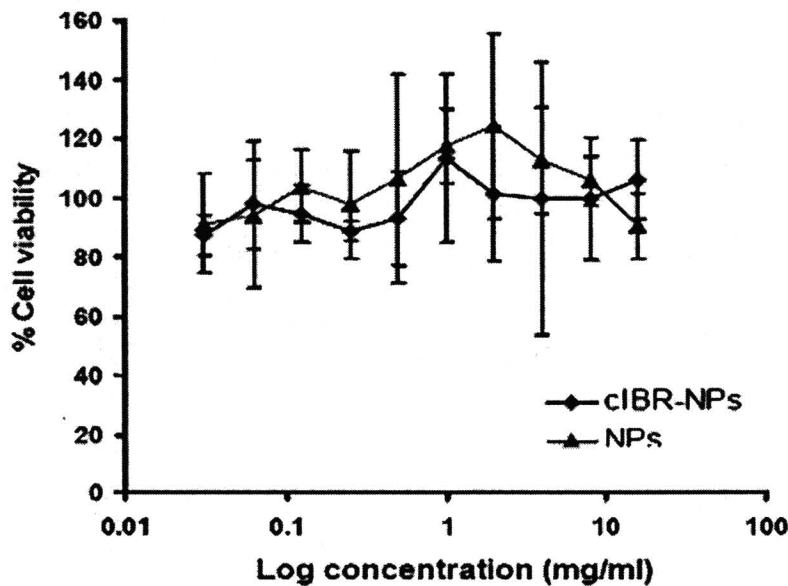
รูปที่ 22 (B) ผล cytotoxicity test ในเซลล์ HL-60

C. (U937)



รูปที่ 22 (C) ผล cytotoxicity test ในเซลล์ U937

D. (Molt-3)

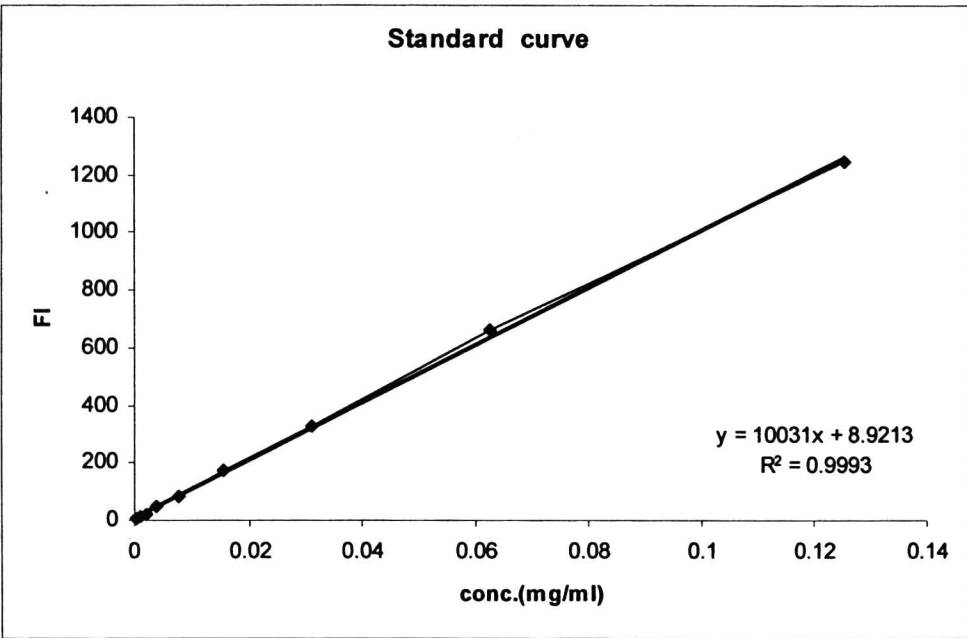


รูปที่ 22 (D) ผล cytotoxicity test ในเซลล์ Molt-3

4.16 ศึกษาการกักเก็บและการปลดปล่อยตัวยา doxorubicin จากระบบนำส่งยา cIBR -นาโนพาร์ทิเคิล

จากผลการศึกษาการกักเก็บยาต้านมะเร็ง doxorubicin เมื่อพิจารณาการกักเก็บยาในระบบนำส่งยา cIBR-นาโนพาร์ทิเคิล พบว่าระบบดังกล่าวนี้สามารถกักเก็บตัวยาก่อนและหลังการคอนจูเกตโดยการเทียบความเข้มข้นของ doxorubicin จาก standard curve ที่เตรียมได้ (รูปที่ 23) คิดเป็น 50.14 เปอร์เซ็นต์ และ 21.92 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 9) ซึ่งพิจารณาคิดเป็น 42.36 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับปริมาณยาที่ถูกกักเก็บก่อนที่จะมีการคอนจูเกตกับเปป-ไทด์ ทั้งนี้เนื่องจาก doxorubicin ที่ใช้อยู่ในรูป HCl แม้ว่าจะทำการเตรียมให้อยู่ในรูปของ free base อาจมีบางส่วนที่อยู่ในรูปของเกลืออยู่ ระบบนำส่งยาที่สังเคราะห์นั้นเป็นระบบนำส่งยาที่น่าจะเหมาะสำหรับ Hydrophobic drug มากกว่า จึงทำให้ปริมาณยาของ doxorubicin ที่ถูกกักเก็บจึงมีปริมาณที่ไม่สูง และขนาดของอนุภาคเมื่อมีการกักเก็บยาทั้งก่อนและหลังการคอนจูเกตเป็น 222.1 ± 1.7 และ 256.6 ± 5.8 nm (ตารางที่ 10) โดยขนาดอนุภาคที่เตรียมได้จะค่อนข้างสม่ำเสมอ เมื่อพิจารณาถึงการปลดปล่อยตัวยาในตุ๊กกลางที่ phosphate buffer pH 4 (รูปที่ 24) พบว่าที่ 24 ชั่วโมงแรกเกิดการปลดปล่อยตัวยาคิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์จากปริมาณยาที่ถูกกักเก็บไว้ทั้งหมด (burst effect) หลังจากนั้นจึงพบว่าลักษณะการ

ปลดปล่อยตัวยาจะเป็นแบบค่อยๆปลดปล่อย ในขณะที่เดียวกันเมื่อพิจารณาการปลดปล่อยของตัวยาใน
 ตัวกลาง pH 7.4 (รูปที่ 25) พบว่าการปลดปล่อยของตัวยานั้นมีลักษณะแนวโน้มน้ำคล้ายกับการปล่อยปลดตัวยา
 ที่ pH 4 กล่าวคือที่ 24 ชั่วโมงแรกพบการปลดปล่อยตัวยาออกมาคิดเป็น 40 เปอร์เซ็นต์หลังจากนั้นจึงมีการ
 ปลดปล่อยตัวยาอย่างช้าๆถึง 9 วัน ซึ่งเป็นเวลาสุดท้ายของการศึกษา



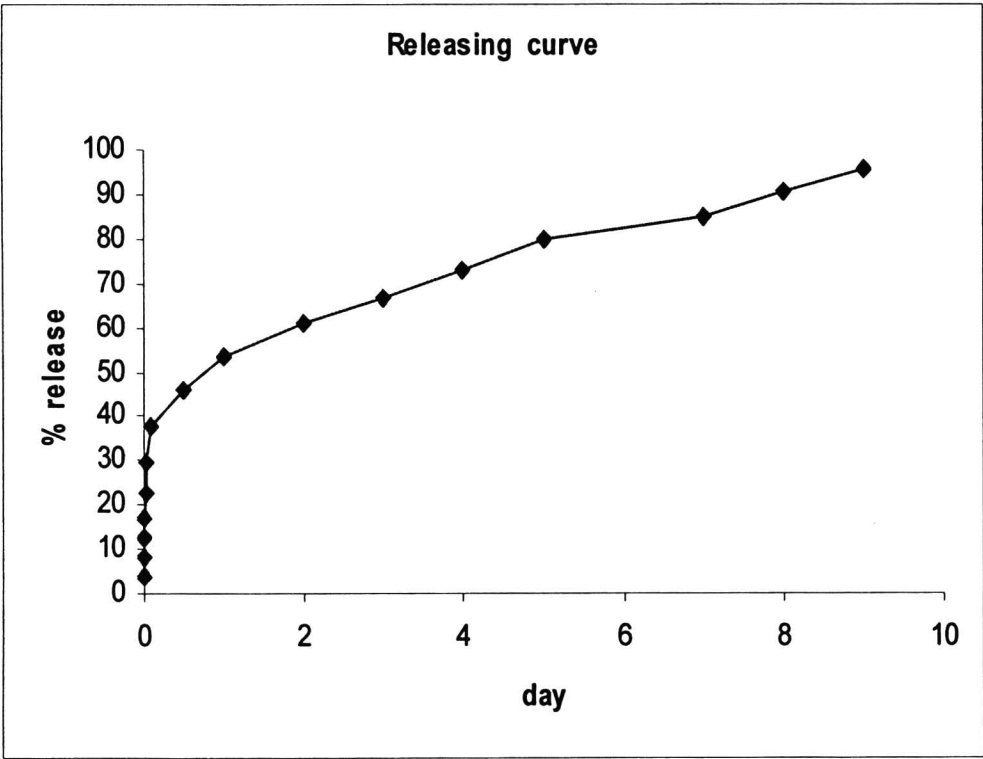
รูปที่ 23 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ doxorubicin กับค่า Fluorescence intensity ที่นำมาใช้ในการหาปริมาณยาที่ถูกกักเก็บในระบบนำส่งยา

ตารางที่ 9 แสดงค่า Fluorescence intensity ของตัวยาที่กักเก็บในระบบนำส่งยาทั้งก่อนและหลังที่ทำการคอนจูเกต

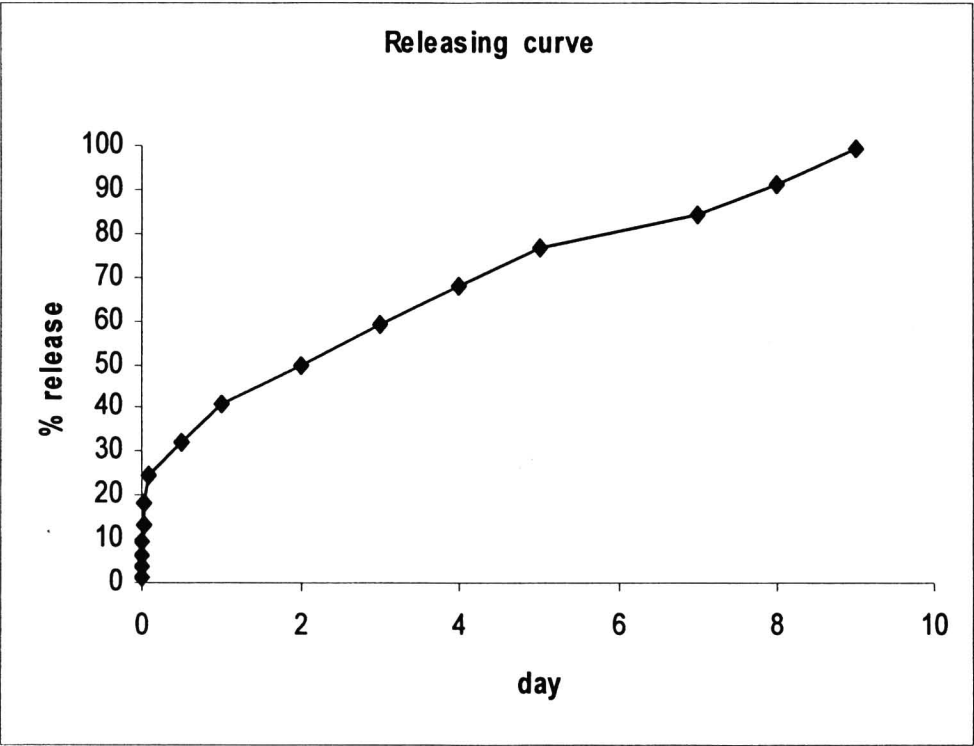
ตัวอย่างที่	Fluorescence intensity	
	ก่อน	หลัง
1	759.315	654.847
2	811.613	586.623
3	620.735	550.059
ค่าเฉลี่ย	706.996	620.735
% entrapment efficiency	50.14	21.92

ตารางที่ 10 แสดงขนาดและประจุบนผิวของอนุภาคทั้งก่อนและหลังการทำปฏิกิริยา

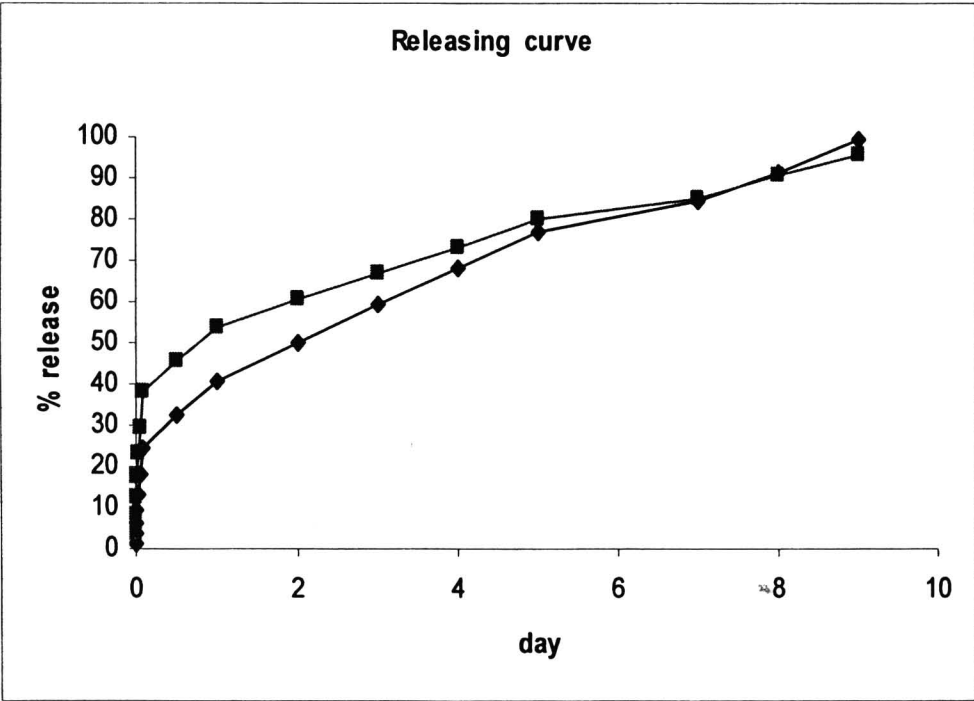
	ก่อนคอนจูเกต	หลังคอนจูเกต
Size(nm.)	222.1	256.6
PDI	0.100	0.135
SD	1.7	5.8
Charge (mV)	-28.50	-30.13
SD	2.17	1.37



รูปที่ 24 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อย Doxorubicin จากระบบนำส่งยา กับ ระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจสอบ ใน Phosphate buffer pH 4



รูปที่ 25 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อย Doxorubicin จากระบบนำส่งยา กับระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจสอบ ใน Phosphate buffer pH 7.4



รูปที่ 26 การแสดงการเปรียบเทียบการปลดปล่อยด้วยที่ pH 4 (■) และที่ pH 7.4 (◆)