บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การเตรียมและการศึกษาลักษณะของนาโนพาร์ทิเคิล

จากผลการเตรียมนาโนพาร์ทิเคิลด้วยวิธีการแทนที่ตัวทำละลาย นาโนพาร์ทิเคิลเตรียมได้จาก PLGA มีขนาดประมาณ 200-250 นาโนเมตร โดยที่มีดัชนีค่าการกระจายตัวของอนุภาคค่อนข้างแคบซึ่งถือได้ว่าอนุภาคนาโนที่เตรียมได้นั้นมีขนาดสม่ำเสมอ โดยที่ประจุของอนุภาควัดจากค่า zeta potential นั้นมีค่าเป็นลบค่อนข้างสูง ซึ่งสามารถทำนายถึงความคงตัวของระบบได้ว่าจะมีลักษณะที่ค่อนข้างจะคงตัวเป็นอย่างดี เนื่องจากที่จะลดการเกาะกลุ่มกันและคงขนาดอนุภาค

5.2 การคอนจูเกตของ cIBR เปปไทด์กับ PLGA นาโนพาร์ทิเคิล

จากการศึกษาการคอนจูเกต cIBR peptide กับหมู่คาร์บอกซิลิกที่เกิดจากการ modified Pluronic® F-127 ด้วยพันธะโควาเลนซ์บนผิวของนาโนพาร์ทิเคิลโดยอาศัยปฏิกิริยา carbodiimide นั้นในการศึกษานี้ได้ทำการวัดประสิทธิภาพในการคอนจูเกตโดยการวัดปริมาณเปปไทด์ที่ไม่ถูกคอนจูเกตที่เหลืออยู่ในตัวกลางของการเกิดปฏิกิริยา โดยใช้เวลาในการเกิดการสร้างพันธะที่เวลาตั้งแต่ 0-20 ชั่วโมงโดยปริมาณของ cIBR เปปไทด์ที่เหลืออยู่เป็นตัวบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของการเกิดปฏิกิริยาได้ในระดับหนึ่ง กล่าวคือ ยิ่งเวลาในการเกิดปฏิกิริยามากขึ้นเท่าได้ จำนวนเปปไทด์ในส่วนของ supernatant ก็ยิ่งลดลงซึ่งบ่งบอกได้ว่าเกิดการสร้างพันธะโควาเลนซ์ระหว่างเปปไทด์และหมู่คาร์บอกซิลิกที่ปลายของ modified Pluronic® F-127 มากขึ้นเท่านั้น อาจทำให้สรุปได้ว่า ระยะเวลาในการบ่มการเกิดปฏิกิริยาถือเป็นปัจจัยหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเกิดปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดการสร้างพันธะโควาเลนซ์ที่เกิดขึ้นในการศึกษาดังกล่าวนี้ แต่เมื่อดูถึงการเก็บกักตัวยาซึ่งใส่ยาพร้อมกับการฟอร์มอนุภาค การบ่มระหว่างการทำปฏิกิริยาเป็นเวลานานอาจทำให้ยาถูกปลดปล่อยออกมาได้ก่อน

อีกทั้งยังได้สังเกตการเกิดปฏิกิริยาการคอนจูเกตโดยไม่มี EDC เพื่อศึกษาผลการ adsorb (อันตรกิริยา electrophilic และ hydrophobic) ของเปปไทด์ cIBR ซึ่งสามารถพิจารณาได้จากการหายไปของ cIBR เปปไทด์ ซึ่งจะใช้ช่วยสังเกตการเกิด adsorb ของเปปไทด์บนผิวของนาโนพาร์ทิเคิล ผลแสดงให้เห็นว่าเมื่อไม่มี EDC ซึ่งเป็นสารที่ช่วยทำให้เกิดการสร้างพันธะระหว่างเปปไทด์และหมู่คาร์บอกซิลิกที่ส่วนปลายของ modified Pluronic® F-127 นั้นพบปริมาณ cIBR เปปไทด์แทบจะไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเปปไทด์ที่ใส่เข้ามาในช่วงเริ่มต้น ในทางกลับกัน เมื่อทำการบ่มปฏิกิริยาโดยอาศัย EDC นั้นพบว่า cIBR เปปไทด์ นั้นลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับในตอนเริ่มต้นปฏิกิริยา ซึ่งจากการสังเกตผลในการทดลองนี้อาจทำให้สรุปได้ว่า ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่าง เปปไทด์และหมู่คาร์บอกซิลิกที่ส่วนปลายของ modified Pluronic® F-127 นั้น เป็นปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดการสร้างพันธะโควาเล้นท์ โดยแทบจะไม่มีผลของการ adsorb ของเปปไทด์บนผิวอนุภาคเข้ามาเกี่ยวข้อง และการสร้างพันธะโควาเล้นท์ดังกล่าวนั้นจะไม่สามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติจำเป็นต้องอาศัย EDC มาช่วยทำให้เกิดปฏิกิริยาในการสร้างพันธะ

5.3 ผลของ PMA ต่อระดับการแสดงออกของ LFA-1 บนผิวเซลล์

จากการศึกษาผลของ PMA ที่ใช้ในการกระตุ้น LFA-1 บนผิวเซลล์มะเร็งนั้นพบว่า PMA นั้นจะเพิ่ม avidity ของ LFA-1 ทำให้มีความสามารถในการจับกับลิแกนด์ได้มากขึ้น ซึ่งการเพิ่ม avidity ของ LFA-1 นั้นจะอาศัยโปรตีน rhoA ซึ่งทำหน้าที่เป็น transducer ภายในเซลล์ของการกระตุ้น protein kinase C นำไปสู่การกระตุ้น integrin และการรวมตัวของเซลล์ แต่ไม่มีผลในการเพิ่มปริมาณของการแสดงออกของ LFA-1 บนผิวเซลล์มะเร็ง

5.4 ศึกษาการจับและนำเข้าของ cIBR-NP และนาโนพาร์ทิเคิล เข้าสู่ Molt-3 cells

จากศึกษาการจับและนำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าเซลล์มะเร็งนั้นผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลถูกนำเข้าเซลล์มากกว่านาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มี cIBR และการนำนาโนพาร์ทิเคิลทั้งสองแบบเข้าสู่เซลล์เพิ่มขึ้นตามเวลาที่ผ่านไป แต่เป็นที่น่าสนใจว่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนส์สำหรับ cIBR-นา

โนพาร์ทิเคิลยังคงมีค่ามากกว่านาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีเป้าหมายทุกช่วงเวลาที่ทำการทดลอง ผลการทดลองเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่า cIBR เปปไทด์นั้นเป็นส่วนที่ช่วยเพิ่มความจำเพาะเจาะจงในการนำเข้าของระบบนำส่งยาสู่เซลล์ที่มีการแสดงออกของ LFA-1 บนผิวเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ ทั้งในด้านความเร็วและปริมาณในการนำเข้าของระบบนำส่งยา cIBR-นาโนพาร์ทิเคิล ยิ่งไปกว่านั้นจากการทดลองนี้ยังสามารถสรุปได้ว่าการนำเข้าของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลโดยเซลล์มะเร็งนั้นแปรผันตามระยะเวลา (Time dependent) การนำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าเซลล์นั้นจากการทดลองนี้ยังแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลนั้นมีผลต่อการนำเข้าเซลล์ (concentration dependent)

5.5 การยับยั้งการจับของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิล กับ Molt-3 cells โดย cIBR อิสระ และ I domain ของ LFA-1

ในการทดลองนี้ได้ทำการยับยั้งการจับของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลด้วย cIBR อิสระ และ I domain ของ LFA-1 ซึ่งเป็นส่วนที่ใช้จับกับ D1 ใน ICAM-1 ซึ่งเป็นส่วนที่เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ cIBR จากผลการทดลองทั้งสองนี้ชี้ให้เห็นได้ว่าการจับกันระหว่าง cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลและ LFA-1 บน Molt-3 cell นั้นเป็นแบบจำเพาะเจาะจง เพราะการยับยั้งการจับกันระหว่าง cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลและ LFA-1 บนผิวเซลล์ที่เกิดขึ้นนั้นต้องอาศัยลิแกนด์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับ LFA-1 มาทำการยับยั้งจึงจะทำให้เกิดการจับกันระหว่าง cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลและ LFA-1 ดังผลที่แสดงในการทดลองที่กล่าวมาข้างต้น

5.6 ผลของอุณหภูมิต่อการจับและการนำเข้าสู่เซลล์ของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิล

เป็นการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการนำนาโนพาร์ทิเคิลเข้าเซลล์และตรวจสอบว่ากลไกในการนำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่ Molt-3 cells ด้วยวิธี endocytosis หรือไม่นั้น ผลการศึกษาได้แสดงถึงการนำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ โดยการใช้พลังงานแบบ endocytosis เนื่องจากที่อุณหภูมิ 4 °C ไม่เกิด endocytosis และไม่มีการใช้พลังงานยิ่งกว่านี้ ค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนส์ของเซลล์ที่บ่มด้วย cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลที่อุณหภูมิ 37 °C เพิ่มขึ้นมากเมื่อเวลาช่วงเริ่มต้นการบ่มและอัตราการเพิ่มขึ้นของความ

เข้มแสงจะลดลงที่เวลาหลังจาก 5 นาที การลดลงของอัตราความเข้มแสงที่เพิ่มขึ้นบ่งชี้ถึงความอิ่มตัวของการขนส่ง cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลและแสดงถึงกลไก receptor mediated endocytosis ในทางตรงกันข้าม ที่อุณหภูมิต่ำการนำเข้าเซลล์มีค่าน้อย ค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนส์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆในเวลาช่วงหลังของการบ่ม (25-35 นาที) แสดงว่าที่อุณหภูมิต่ำใช้เวลานานกว่าในการนำเข้าเซลล์

5.7 Fluorescent microscopy ของ Molt-3 cells ในการศึกษาการจับและนำเข้าของcIBR-นาโนพาร์ทิเคิลและนาโนพาร์ทิเคิล

ภาพที่ได้สามารถแสดงให้เห็นอย่างเป็นรูปธรรมว่า cIBR เปปไทด์นั้นสามารถเป็นส่วนช่วยในการเพิ่มความสามารถในการนำส่งของระบบนำส่งยาได้อย่างจำเพาะเจาะจงมากขึ้นเมื่อเทียบกับระบบนำส่งยาที่ไม่มีเปปไทด์เห็นได้อย่างชัดเจนบนรูปเหล่านี้ แสงฟลูออเรสเซนส์ของนาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีเป้าหมายจับและเข้าสู่เซลล์มีค่าน้อยมากเทียบกับนาโนพาร์ทิเคิลที่มีเป้าหมายซึ่งสามารถพิสูจน์ได้ว่า cIBR เปปไทด์สามารถนำมาใช้เป็นตัวนำส่งระบบนำส่งยาไปยัง LFA-1 ที่อยู่บนผิวเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนส์ของเซลล์เมื่อบ่มกับนาโนพาร์ทิเคิลมีค่าเพิ่มขึ้นตามเวลาที่บ่มและมีค่ามากที่สุดที่เวลาที่นานที่สุดด้วย (time dependent) ผลเหล่านี้ยืนยันข้อมูลการนำเข้าเซลล์ของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลวัดโดย flow cytometry แสดงการจับและเข้าเซลล์ของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลที่เร็วและความอิ่มตัวของการนำเข้าเซลล์

5.8 Lysosomes Trafficking ของ cIBR-นาโนพาร์ทิ

เพื่อติดตามการนำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลและนาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์ ส่วนของไลโซโซมของเซลล์ Molt-3 ถูกย้อมด้วย Texas red-dextran ซึ่งสามารถตรึงไลซีนที่พบในไลโซโซมได้โดยจะเห็นเป็นสีแดง โดยที่ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิล หรือนาโนพาร์ทิเคิลบรรจุสีย้อมเรืองแสงสีเขียว ซึ่งการแสดงผลของ co-localization จะให้ผลเห็นสีเหลือง ผลการทดลองนี้อาจสรุปได้ว่าการสลายตัวของยาโดยเอนไซม์และกรดอาจน้อยลงเมื่อถูกเก็บกักใน cIBR-นาโนพาร์ทิเคิล ทั้งนี้พบว่าที่ 24 ชั่วโมงนั้นยังคงไม่พบปรากฏการณ์ lysosomal escape ใน นาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มี cIBR ในทางกลับกันเกิดปรากการณ์ lysosomal escape ของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิล

ที่เวลา 4 ชั่วโมงซึ่งถือว่าเป็นข้อได้เปรียบในการนำมาพัฒนาเป็นระบบนำส่งยาที่นอกจากจะช่วยเพิ่มความจำเพาะเจาะจงในการนำส่งยาแล้วยังสามารถช่วยป้องกันการสลายตัวโดยเอนไซม์ที่อยู่ในไลโซโซมจากการเกิด ปรากฏการณ์ lysosomal escape

5.9 การยับยั้งการเกาะติดของ Molt-3 cells กับ epithelial cells ของปอดด้วย cIBR-นาโนพาร์ทิเคิล

จากข้อมูลที่ชี้ให้เห็นว่าการที่ leukocyte แทรกเข้าสู่ endothelial tissues ต้องอาศัยอันตรกิริยาระหว่าง LFA-1 และ ICAM-1 ซึ่งในการศึกษานี้ได้ใช้ประโยชน์จากข้อมูลดังกล่าวมาใช้พิสูจน์ความจำเพาะเจาะจงของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิล ต่อ LFA-1 บนผิวเซลล์มะเร็ง กล่าวคือ เซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 นั้นมีการแสดงออกของ ICAM-1 บนผิวเซลล์มาก แต่ในทางกลับกันนั้นมีการแสดงออกของ LFA-1 บนผิวเซลล์น้อยมาก ส่วนเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวนั้นมีการแสดงออกของ LFA-1บนผิวเซลล์มาก ดังนั้นเซลล์ทั้งสองชนิดสามารถจับกันโดยอาศัย อันตรกิริยาระหว่าง LFA-1 และ ICAM-1 แต่ถ้าหากเปปไทด์ cIBR สามารถยับยั้งอันตรกิริยาดังกล่าวได้นั้นจะสามารถสรุปได้ว่า เปปไทด์ cIBR สามารถยับยั้งอันตรกิริยาได้ทั้งแบบเซลล์ชนิดเดียวกันและเซลล์ต่างชนิดกัน ผลการศึกษานี้แสดงประสิทธิภาพของ cIBR แม้ว่าจะอยู่ในรูปของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลยังสามารถยับยั้งการเกาะติดของเซลล์แบบต่างชนิดกันซึ่งอาจนำไปสู่การป้องกันการนำสัญญาณภายในเซลล์ของการอักเสบและการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน และยังสามารถพิสูจน์ได้อีกว่า cIBR มีความสามารถที่จะเป็นส่วนที่เพิ่มการนำส่งของระบบนำส่งยาให้มีความจำเพาะเจาะจงมากขึ้น

5.10 ผลของเซรั่มต่อการจับและนำเข้าของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลโดย Molt-3 cells

การนำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าเซลล์ Molt-3 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเซรั่ม 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการนำเข้าของระบบนำส่งยาถูกยับยั้งอย่างเห็นได้ชัด โดยพบว่ายิ่งความเข้มข้นของเซรั่มเพิ่มขึ้นประสิทธิภาพในการนำระบบนำส่งยาเข้าสู่เซลล์ยิ่งลดลง ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าเซรั่มนั้นมีผลรบกวนการนำเข้าของระบบนำส่งยาอย่างมีนัยสำคัญ โดยอาจเกิดจากผลของการเกิด opsonization บนผิวอนุภาคโดยเซรั่มซึ่งกลไกการยับยั้งนี้ยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

5.11 ระดับการแสดงออกของ LFA-1 บนผิวเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่แตกต่างกันทั้ง 4 ชนิด

การตรวจสอบการแสดงออกของ LFA-1บนผิวเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดนั้น เพื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของของ 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) โดยผลจากการตรวจสอบพบว่าเซลล์ Molt-3 นั้นมีการแสดงออกของ LFA-1 สูงที่สุดเมื่อเทียบกับเซลล์อื่นที่ใช้ในการศึกษา โดยที่การแสดงออกของ LFA-1 บนผิวเซลล์มะเร็ง HL-60, Molt-4 และ U937 นั้นไม่ค่อยมีผลแตกต่างกันเท่าไหร่ ทั้งนี้แม้ว่า Molt-3 และ Molt-4 แม้จะมาจากแหล่งเดียวกันนั้นแต่ระดับการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ก็แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งปัจจัยที่ทำให้เกิดความแตกต่างนั้นยังต้องการการศึกษาอย่างละเอียดต่อไปในอนาคต

5.12 การจับและนำเข้าของนาโนพาร์ทิเคิลและ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลโดยเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งสี่ชนิด

จากการศึกษาการจับและนำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าเซลล์โดย Molt-3 cells จากการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่า cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลถูกนำเข้าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Molt-3 มากกว่านาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีเป้าหมาย และการนำนาโนพาร์ทิเคิลทั้งสองแบบเข้าสู่เซลล์เพิ่มขึ้นตามเวลาที่ผ่านไป ซึ่งในการทดลองนี้ได้นำเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่แตกต่างกันทั้ง 4 ชนิดมาใช้ในการทดลอง ดังนั้นจึงเป็นการศึกษาที่น่าสนใจอย่างยิ่งในการศึกษาการจับและนำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่มีความแตกต่างกันในการศึกษา ซึ่งผลที่ได้นั้นแสดงให้เห็นว่าการจับและการนำเข้าของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลในทั้งสี่เซลล์นั้นมีค่าสูงกว่า การจับและการนำเข้าของนาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีเป้าหมายในทุกเซลล์มะเร็งที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสนับสนุนผลการทดลองต่างๆที่ผ่านมานั้นว่า cIBR เปปไทด์นั้นสามารถถูกนำมาใช้เป็น Targeting molecule เพื่อเป็นส่วนที่นำระบบนำส่งยาสู่เซลล์เป้าหมายอย่างจำเพาะเจาะจงโดยเฉพาะเซลล์ที่มีการแสดงออกสูงของ LFA-1 อีกทั้งผลการศึกษายังได้แสดงให้เห็นถึงความเร็วในการจับและนำเข้าของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลนั้นเร็วกว่าการจับและการนำเข้าของนาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีเป้าหมายในเซลล์มะเร็งทั้งสี่

ชนิดอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้จากผลการศึกษายังได้แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างการจับและการนำเข้าของระบบนำส่งยา กับเวลาในการบ่มระบบนำส่งยากับเซลล์มะเร็ง กล่าวคือ เมื่อระยะเวลาในการบ่มระบบนำส่งยากับเซลล์มะเร็งเพิ่มมากขึ้น การจับและการนำเข้าของระบบนำส่งยาโดยเซลล์มะเร็งเพิ่มมากขึ้นด้วย (Time dependent) ซึ่งสรุปได้ว่าแม้เซลล์เป้าหมายจะต่างชนิดกันแต่แนวโน้มในการนำเข้าของระบบนำส่งยานั้นเป็นไปในทิศทางเดียวกัน

เมื่อนำผลการศึกษาในทั้งสองหัวข้อคือ ระดับการแสดงออกของ LFA-1 บนผิวเซลล์แต่ละชนิดมาพิจารณาร่วมกับผลการศึกษาการนำเข้าของระบบนำส่งยานั้นได้แสดงข้อมูลที่น่าสนใจว่า เซลล์ที่มีระดับการแสดงออกของ LFA-1 ที่สูงนั้นการจับและการนำเข้าของ cIBR- นาโนพาร์ทิเคิลนั้นก็สูงกว่าเซลล์อื่นอย่างชัดเจน ซึ่งยังช่วยสนับสนุนได้ว่า cIBR นั้นมีความจำเพาะเจาะจงในการจับกับ LFA-1

5.13 Fluorescent microscopy ของ leukemic cell lines และนาโนพาร์ทิเคิล

การทดสอบนี้ถือได้ว่าเป็นการตรวจสอบในเชิงคุณภาพ กล่าวคือแสดงให้เห็นความเกี่ยวข้องของ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิล และนาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีเป้าหมายกับผลของลิแกนด์เปปไทด์ที่เป็นตัวสู่เป้าหมายต่อการจับและการนำเข้าเซลล์ของนาโนพาร์ทิเคิล ให้เห็นได้อย่างชัดเจนจากรูปเหล่านี้ ซึ่งพบว่าความเข้มของการเรืองแสงในเซลล์ที่นำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าเซลล์ทั้ง 4 ชนิดนั้นมีความเข้มสูงกว่านาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่มีเป้าหมายที่ถูกนำเข้าในเซลล์ชนิดเดียวกัน แสดงให้เห็นว่า cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลสามารถเป็นตัวนำสู่เป้าหมายต่อการจับและการนำเข้าของเซลล์ที่มีการแสดงออกของ LFA-1 บนผิวเซลล์อย่างชัดเจน ซึ่งยังคงมีแนวโน้มเป็นไปตามการทดลองที่ผ่านมา

5.14 ผลของอุณหภูมิต่อการนำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งสี่ชนิด

เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการนำนาโนพาร์ทิเคิลเข้าเซลล์และตรวจสอบว่ากลไกในการนำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่ เซลล์มะเร็งทั้งสี่ชนิดด้วยวิธี endocytosis หรือไม่นั้น ผลการศึกษาได้แสดงถึงการนำ cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและด้วยวิธี endocytosis เนื่องจากที่ 4 องศาเซลเซียสเซลล์จะไม่

เกิดการ endocytosis เพราะเซลล์ไม่สามารถใช้พลังงานได้ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนั้น เซลล์ทั้ง 4 ชนิดมีความสามารถในการนำอนุภาค cIBR-นาโนพาร์ทิเคิล เข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่าการนำอนุภาค cIBR-นาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เซลล์ทั้ง 4 ชนิดนั้น อุณหภูมิถือเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการนำเข้าอุภาคเข้าสู่เซลล์ (temperature dependent) ซึ่งสนับสนุนว่าการขนส่งอนุภาคดังกล่าวเข้าสู่เซลล์ทั้ง4 นั้นเป็นแบบที่ต้องใช้พลังงานทั้งหมด (energy dependent) ซึ่งอาจกล่าวอ้างได้ว่าเป็นการนำเข้าสู่เซลล์แบบ receptor mediated endocytosis

5.15 Cytotoxicity Test

เพื่อทำการตรวจความปลอดภัยของระบบนำส่งยาที่สังเคราะห์ขึ้นมานั้นว่ามีความปลอดภัยต่อการนำมาใช้เป็นระบบนำส่งยาหรือไม่ ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าระบบนำส่งยาทั้งสองชนิดนั้นมีความปลอดภัยไม่มีพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้งสี่ชนิดแม้ที่ความเข้มข้นสูงสุดก็ตาม

5.16 ศึกษาการกักเก็บและการปลดปล่อยตัวยา doxorubicin จากระบบนำส่งยา cIBR -นาโนพาร์ทิเคิล

จากผลการศึกษาการกักเก็บยาต้านมะเร็ง doxorubicin พบว่าระบบยาดังกล่าวนั้นสามารถกักเก็บตัวยาได้ไม่สูงนักและยิ่งลดลงเมื่อมีการคอนจูเกตกับเปปไทด์ ทั้งนี้เนื่องจากdoxorubicin ทั้งนี้เนื่องจาก doxorubicin ที่ใช้อยู่ในรูป HCl แม้ว่าจะทำการเตรียมให้อยู่ในรูปของ free base อาจมีบางส่วนที่อยู่ในรูปของเกลืออยู่ ระบบนำส่งยาที่สังเคราะห์นั้นเป็นระบบนำส่งยาที่น่าจะเหมาะสำหรับ Hydrophobic drug มากกว่า จึงทำให้ปริมาณยาของ doxorubicin ที่ถูกกักเก็บจึงมีปริมาณที่ไม่สูงจึงทำให้ปริมาณยาของ doxorubicin ที่ถูกกักเก็บจึงมีปริมาณที่ไม่สูงและระยะเวลาที่ทำการคอนจูเกตนั้นใช้ระยะเวลา 20 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาจากลักษณะการปลดปล่อยตัวยาที่ 24 ชั่วโมงพบว่าจะมีการปลดปล่อยตัวยาออกมา 40 เปอร์เซ็นต์ซึ่งสามารถช่วยอธิบายได้ว่าเหตุใดหลังจากการคอนจูเกตนั้นปริมาณยาที่ถูกกักเก็บจึงลดลง ส่วนขนาดของอนุภาคเมื่อมีการกักเก็บยานั้นจะมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเทียบกับระบบนำส่งยาที่ไม่ได้กักเก็บยาจากผลการทดลองข้างต้น ซึ่งอนุภาคที่เตรียมได้นั้นจะมีขนาดค่อนข้างสม่ำเสมอ เมื่อพิจารณาถึงการปลดปล่อยตัวยาในตัวกลางทั้งที่ pH 4

และ pH 7 พบว่าที่ 24 ชั่วโมงแรกเกิดการปลดปล่อยตัวยาออกมามากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์จากปริมาณยาที่ถูกกักเก็บไว้ทั้งหมด (burst effect) หลังจากนั้นจึงพบว่าลักษณะการปลดปล่อยตัวยาจะเป็นแบบค่อยๆปลดปล่อย ซึ่งปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นนี้อาจเป็นเพราะเนื่องจากคุณสมบัติของตัวยาที่มีความชอบในการละลายในน้ำมากกว่าซึ่งตัวกลางที่ใช้ศึกษานั้นเป็น Phosphate buffer จึงทำให้ถูกปลดปล่อยออกมาจากระบบนำส่งยาได้ดีกว่าตามผลการทดลองที่แสดงให้เห็น ทั้งนี้อาจสรุปได้ว่าระบบนำส่งยาที่สังเคราะห์ขึ้นมานั้นเป็นระบบนำส่งยาที่น่าจะเหมาะสำหรับตัวยาที่มีคุณสมบัติเป็น Hydrophobic drug มากกว่า Hydrophilic drug