บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

สารเคมี

Acrylamide/Bis Acrylamide 29:1 (AccuGel™, National diagnostics, England), BCA protein assay reagent A (Thermo scientific, Germany), Bovine serum albumin (BSA) (Sigma, USA), Chitosan (CS) MW 100 kDa95 % DD (Seafresh, Thailand), Fetal bovine serum (Gibco™, Invitrogen, USA), Horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat anti-mouse IgG (Invitrogen, USA), Horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat anti-mouse IgA (Invitrogen, USA), Ketamine hydrochloride (Gedeon Richter, Hungary), Mouse IFN-γ ELISA kits (BD OptEIA™, BD Biosciences, USA), Mouse IL-4 ELISA kits (BD OptEIA™, BD Biosciences, USA), Ovalbumin (OVA) grade V 44kDa (Sigma, USA), Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) (Sigma, USA), Pilocarpine (Sigma, USA), Penicillin/streptomycin (Gibco™, Invitrogen, USA), Protein ladder (BenchMark™, Invitrogen, USA), RPMI-1640 (Gibco™, Invitrogen, USA), Silver staining kit(AMRESCO, USA), Sodium dodecyl sulfate (Ajax chemical, Autralia), Sodium tripolyphosphate (TPP) (Sigma, USA), TMB ELISA substrate (3,3′,5,5′-tetramethylbenzidine) (Invitrogen, USA), Trypsin inhibitor (Invitrogen, USA), Xylazine hydrochloride (LBS laboratory, Thailand)

เครื่องมือและอุปกรณ์

Double beam spectrophotometer (UV-2101PC, Shimadsu, Japan), Freeze dryer (Martin Christ GmbH, Osterode am Harz, Germany), Gel electrophoresis set (Mini-PROTEAN®3Cell, Bio-Rad, USA), Microplate reader (MRX Revelation, Dynex Technologies, USA), Particle size analyzer (Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments, UK), Ultracentrifuge (Optima™ L-100K ultracentrifuge, Beckman, UK)

สัตว์ทดลอง

หนู mice พันธุ์ Balb/c เพศเมีย อายุ 5-6 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 20-25 g จำนวน 30 ตัว จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล หนูถูกเลี้ยงที่ห้องสัตว์ทดลองของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อย่างน้อย 1 สัปดาห์ก่อนการทดลอง โดยให้อาหารสำเร็จรูปตามมาตรฐาน

ของสำนักสัตว์ทดลอง และดื่มน้ำตลอดเวลา เปลี่ยนอาหารและน้ำดื่มทุก 2 วัน เปลี่ยนวัสดุรองนอนทุก 3 วัน สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยง คือ อุณหภูมิ 23 ± 2°C ความชื้นสัมพัทธ์ 55-60%ระยะเวลาที่สัมผัสแสง คือ มีแสง 12 ชั่วโมง และปิดไฟ 12 ชั่วโมง หนูถูกงดอาหารและน้ำก่อนให้วัคซีน 2 ชั่วโมง (Mangal et al., 2011)โดยการทดลองในสัตว์ทดลอง ได้รับอนุมัติการใช้สัตว์ทดลองจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี (Ethics committee) (ID 3/2555/thesis)

วิธีดำเนินการวิจัย

ส่วนที่ 1 การคัดเลือกตำรับไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลเพื่อนำส่งวัคซีนทางจมูก

1. การตั้งตำรับไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล

เตรียมไคโตแซนนาโนพาร์ติเคิลด้วยวิธี Ionotropic gelation ดัดแปลงจากวิธีของ Kim and Kang (2008) โดยละลายไคโตแซนใน 1% w/v acetic acid ที่ปรับ pH เป็น 3.5 ด้วย 1 N NaOH จากนั้นหยด TPP ความเข้มข้น 1 mg/mL ลงไปในสารละลายไคโตแซนซึ่งปั่นด้วย magnetic stirrer ความเร็ว 1000 rpm ตลอดเวลา และปรับเปลี่ยนความเข้มข้น ปริมาณไคโตแซน และปริมาณ TPP เพื่อให้ได้ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลตำรับต่างๆ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของตำรับไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล จำนวน 9 ตำรับ

ตำรับที่	1	2	3	4	5	6	7	8	9
สัดส่วนโดยมวล ไคโตแซนต่อ TPP	3:1			4:1			5:1		
ความเข้มข้นของไคโตแซน (mg/mL)	1	2	3	1	2	3	1	2	3
ปริมาณสารละลายไคโตแซน (mL)	31.5	25.2	21	33.6	28	24	35	30	26.25
ปริมาณ TPP (mL) ความเข้มข้น 1 mg/mL	10.5	16.8	21	28	14	18	7	12	15.75
ปริมาณ OVA (mg)	21	21	21	21	21	21	21	21	21
ปริมาตรรวม (mL)	42	42	42	42	42	42	42	42	42

กักเก็บโอวัลบูมิน (ovalbumin, OVA) โดยเติมโอวัลบูมินใน TPP ก่อนทำปฏิกิริยากับสารละลายไคโตแซน ความเข้มข้นสุดท้ายของโอวัลบูมินหลังเตรียมตำรับเป็น 0.5mg/mL ปั่นทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง จากนั้นเก็บไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 30 นาที เก็บส่วนตะกอน (precipitate) และส่วนสารละลาย (supernatant) นำอนุภาคในส่วนตะกอนมากระจายตัวใน phosphate buffer (PBS) pH 7.4 เพื่อใช้ทดสอบต่อไป อนุภาคอีกส่วนหนึ่งนำไปทำให้อยู่ในรูปผงแห้งด้วยวิธี freeze–drying ตามวิธีของ Prego et al. (2010) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้ทดสอบความคงตัวและฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลองต่อไป

2. การประเมินคุณสมบัติของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล

2.1 คุณสมบัติทางกายภาพของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล

การประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล ทำโดยวัดขนาดและประจุที่ผิวอนุภาค วิธีทดลองดัดแปลงจากวิธีของ Csaba et al. (2009b) โดยกระจายอนุภาคในน้ำปราศจากไอออน (deionized water; DI) ที่กรองผ่านเมมเบรนขนาด0.2 µm วัดขนาดและประจุที่ผิวอนุภาคด้วยเครื่อง particle size analyzer ซึ่งใช้เทคนิค photo correlation spectroscopy (PCS) ของอนุภาคที่เคลื่อนที่แบบ Brownian ที่อุณหภูมิ 25°C และมีค่ามุมการวัดการกระเจิงของแสง (angle detection) เท่ากับ 90° ทำซ้ำสามครั้งในแต่ละตำรับ แสดงผลของขนาดอนุภาคในรูปค่าเฉลี่ยของอนุภาค และดัชนีการกระจายตัวของขนาดอนุภาค (polydispersion index ; PDI) และแสดงผลค่าประจุที่ผิวอนุภาคในรูปชนิดและค่าประจุทางไฟฟ้าเฉลี่ย โดยคำนวณจากค่า electrophoretic mobility

2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณแอนติเจนที่กักเก็บ และบรรจุในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล

การวิเคราะห์หาปริมาณโอวัลบูมินด้วยวิธี BCA protein assay ดัดแปลงจากวิธีของ Walker (2002) ทำโดยเตรียม working reagent (WR) จาก BCA protein assay reagent A กับสารละลาย cupric sulfate (5X hydrated) 40 mg/mL ในสัดส่วน 50:1 โดยปริมาตร ผสม WR 1 mL กับสารละลายโอวัลบูมินความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 50 µL บ่มที่อุณหภูมิ 60°C นาน 30 นาที ทิ้งไว้จนมีอุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 nm ด้วยเครื่อง double beam spectrophotometer สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของสารละลายโอวัลบูมิน เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณโอวัลบูมิน

2.2.1 การกักเก็บแอนติเจน (encapsulation efficiency: EE)

โดยใช้หลักการวิเคราะห์ทางอ้อม (indirect method) (Sadeghi et al., 2008a) โดยหาปริมาณโปรตีนที่กักเก็บได้จากปริมาณโปรตีนทั้งหมดหักลบด้วยโปรตีนที่เหลือในชั้น supernatant การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทำโดยวิธี BCA assay และคำนวณหาร้อยละของการกักเก็บแอนติเจน (% encapsulation efficiency: % EE) จากสมการ

$$\% \text{ EE} = [(A-B)/A] \times 100$$

เมื่อ A คือ ปริมาณแอนติเจนทั้งหมดที่ใช้เตรียมตำรับ (mg)
B คือ ปริมาณแอนติเจนที่วิเคราะห์ได้จากชั้น supernatant (mg)

2.2.2 การบรรจุแอนติเจน (loading capacity: LC)

ความสามารถในการบรรจุแอนติเจนในตำรับ แสดงค่าเป็นร้อยละการบรรจุแอนติเจน (% loading capacity: % LC) ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยมวลของแอนติเจนที่กักเก็บได้ในตำรับต่อน้ำหนักของตำรับดังสมการ (Borges et al., 2008)

$$\% \text{ LC} = [(A-B)/C] \times 100$$

เมื่อ A คือ ปริมาณแอนติเจนทั้งหมดที่ใช้เตรียมตำรับ (mg)
B คือ ปริมาณแอนติเจนที่วิเคราะห์ได้จากชั้น supernatant ทั้งหมด (mg)
C คือ น้ำหนักของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลหลังเตรียมในรูปผงแห้ง (mg)

2.3 การปลดปล่อยแอนติเจนที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล

การทดสอบการปลดปล่อยโอวัลบูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล ที่ pH และเวลาต่างๆ ดัดแปลงจากวิธีของ Mangal et al (2011) โดยนำโอวัลบูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลน้ำหนัก 1 mg มากระจายตัวใน PBS ที่ pH 7.4, 6.8 และ 4.5 ปริมาตร 1.5 mL ซึ่งผสม sodium azide 0.01 % w/w เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 50 rpm จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 30 นาที แยกส่วน supernatant มาวิเคราะห์หาปริมาณแอนติเจนด้วยวิธี BCA protein assay วิเคราะห์การปลดปล่อยแอนติเจนจากไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล ที่เวลา 1, 3, 6 และ12 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บตัวอย่าง ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน และเก็บแอนติเจนที่ปลดปล่อยบางส่วน เพื่อทดสอบความคงตัวของแอนติเจนต่อไป

2.4 การทดสอบความคงตัว

2.4.1 การทดสอบความคงตัวทางกายภาพของระบบนำส่ง

โดยประเมินจากการเปลี่ยนแปลงขนาดและประจุที่ผิวอนุภาค ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1 ทั้งก่อนและหลังการเตรียมในรูปผงแห้งในภาชนะที่ปิดสนิท และเก็บพ้นแสง ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 3 เดือน (Grenha et al., 2005)

2.4.2 การทดสอบความคงตัวของแอนติเจนที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล

ทั้งก่อนและหลังการเตรียมในรูปผงแห้งที่เวลาต่างๆ นำไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่กักเก็บโอวัลบูมินมากระจายตัวใน pH 4.5 เพื่อให้เกิดการปลดปล่อยแอนติเจน นำโอวัลบูมินที่ถูกปลดปล่อยมาวิเคราะห์ความคงตัวด้วยเทคนิค sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Lameiroet et al.(2006) ภายใต้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 125 mV บนแผ่น 7.5% SDS-polyacrylamide gel โดยใช้ BenchMark™ protein ladder ขนาด 10-220 kDa เป็นตัวเทียบขนาดโปรตีน และใช้โอวัลบูมินที่ละลายใน PBS pH 7.4 เป็น positive control ย้อมแถบโปรตีนที่แยกได้ด้วย silver staining kit โดยแช่แผ่นเจลใน fixative solution แล้วบ่มแผ่นเจลที่ได้ใน sensitizer solution นาน 2 นาที ย้อมเจลด้วย silver stain solution ทิ้งไว้ 20 นาที แล้วทำปฏิกิริยาด้วย developer solution จนเห็นแถบโปรตีนอย่างชัดเจน จึงหยุดปฏิกิริยาด้วย stop solution เปรียบเทียบขนาดของแถบโปรตีนตัวอย่างกับ positive control และ protein ladder

3. การคัดเลือกตำรับไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล เพื่อนำส่งวัคซีนทางจมูก

คัดเลือกตำรับไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วงอนุภาค 3 ขนาด คือ ขนาดใหญ่ (1,000 – 5,000 nm) ขนาดกลาง (500 – 1,000 nm) และขนาดเล็ก (< 500 nm) เพื่อเป็นตัวแทนของขนาดอนุภาคแต่ละช่วงขนาดอนุภาคละ 1 ตำรับ เกณฑ์ในการคัดเลือกตำรับให้ได้จำนวน 3 ตำรับ คือ เป็นตำรับที่มีความตัวทางกายภาพ มีปริมาณการกักเก็บและบรรจุแอนติเจนสูง มีการปลดปล่อยแอนติเจนที่ pH 4.5 เป็นหลัก มีการปลดปล่อยเพียงเล็กน้อยที่ pH 6.8 และ 7.4 และต้องมีความคงตัวของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล และแอนติเจนที่กักเก็บในตำรับ ตลอดการทดลอง

ส่วนที่ 2 การประเมินฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันหลังให้วัคซีนทางจมูกในสัตว์ทดลอง

1. การให้วัคซีนในสัตว์ทดลอง

แบ่งหนูทดลองเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว แต่ละกลุ่มให้ได้รับวัคซีนทางจมูก ดังนี้

กลุ่ม I ได้รับสารละลายโอวัลบูมินปริมาณ 20 μg ใน PBS pH 7.4

กลุ่ม II ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดใหญ่

กลุ่ม III ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดกลาง

กลุ่ม IV ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดเล็ก

กลุ่ม V ไม่ได้รับสารใด ๆ

กระจายไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลในน้ำปราศจากไอออน สารที่ให้ทางจมูกทุกกลุ่มทดลองถูกปรับให้มีปริมาตร 20 μL และแบ่งให้ทางจมูก ข้างละ 10 μL หนูที่ได้โอวัลบูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล จะได้รับโอวัลบูมินในปริมาณที่เท่ากันทุกตัว คือ 20 μg

การให้วัคซีนทางจมูกดัดแปลงจากวิธีของ Hobson et al. (2003) ทำโดยสลบหนูด้วย 2% ketamine ผสม 0.2% xylazine ทาง intraperitoneal injection (IP injection) ปริมาณ 0.1 mL แล้วจับหนูนอนหงาย ใช้ไมโครไปเปตสอดเข้าทางรูจมูกลึก 0.2 cm เพื่อให้วัคซีน และให้นอนในท่าดังกล่าว 5 นาที ให้วัคซีนซ้ำในสัปดาห์ที่ 3 และ 6 และฆ่าหนูในสัปดาห์ที่ 9 ของการทดลอง ประเมินผลข้างเคียงของการได้รับวัคซีน จากการประเมินพยาธิวิทยามหภาค (gross pathology) จากรูปร่าง ขนาด และสีของปอด ตับ ม้าม และไต ซึ่งเป็นอวัยวะสำคัญที่มีการสะสมของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลสูง (He et al., 2010) และวัดการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักหนูทดลองหลังได้รับวัคซีนทุกสัปดาห์ โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมกลุ่มที่ V (Makidon et al., 2008)

2. การเก็บตัวอย่าง

- เก็บตัวอย่างเลือดจาก tail vein ทุก 3 สัปดาห์ โดยเก็บตัวอย่างเลือดประมาณ 0.2 ml ต่อตัว ทิ้งให้แข็งตัวข้ามคืน (overnight) ที่อุณหภูมิ 4°C แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 20 นาที เก็บซีรัมที่อุณหภูมิ -20°C
- เก็บตัวอย่างมูลหนูทุก 3 สัปดาห์ โดยแยกหนูในกรงเลี้ยงเดี่ยว ระหว่างเวลา 15.00 น. ถึง 9.00 น. แล้วสุ่มเก็บตัวอย่างมูลมา 20 ก้อนต่อหนูหนึ่งตัว นำตัวอย่างที่ได้มากระจายตัวใน PBS pH 7.4 ที่ผสม trypsin inhibitor ความเข้มข้น 0.1% w/v และ sodium azide ความเข้มข้น 0.01% w/v ให้ได้ความเข้มข้นของมูลหนู 0.5 g/mL จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า vertex mixer และปั่น

เหวี่ยงที่ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 30 นาที แยกส่วน supernatant เก็บที่อุณหภูมิ-20°C (Moschos et al., 2005)

- เก็บตัวอย่างน้ำลายเมื่อสิ้นสุดการทดลอง โดยกระตุ้นหนูด้วย pilocarpineโดยวิธี IP injection ขนาด 2.5 µg ต่อน้ำหนักตัวหนูหนึ่งกรัม เก็บตัวอย่างในช่วง 20 นาทีแรก อุ่นตัวอย่างที่อุณหภูมิ 56°C นาน 15 นาที แยกส่วน supernatant ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที

- เก็บตัวอย่างน้ำล้างช่องคลอด (vaginal lavage) ในสัปดาห์สุดท้ายของการทดลองโดยการสวนล้างด้วยสารละลาย bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 1 % w/v ใน PBS pH 7.4 ปริมาตร 50 µLสวนล้างซ้ำๆ ด้วยสารละลายเดิม 9 ครั้ง

- เก็บตัวอย่างน้ำล้างโพรงจมูก (nasal lavage)โดยฆ่าหนูด้วยการฉีด ketamine ผสม xylazine ขนาดมากกว่า 200 mgและ 16 mg ต่อน้ำหนักตัวหนูหนึ่งกิโลกรัมตามลำดับ ตัดคอหนูล้างโพรงจมูกหนูซ้ำๆ ด้วยสารละลาย BSA ความเข้มข้น 1 % w/v ใน PBS pH 7.4 ปริมาตร 200 µL ผ่านทางรูจมูกหนูและหลอดลม ทำซ้ำ 3 ครั้ง

- ตัวอย่างน้ำลาย น้ำล้างช่องคลอด และน้ำล้างโพรงจมูก ถูกเก็บที่อุณหภูมิ-20˚C โดยใช้ phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) ความเข้มข้น 100 mM เป็น protein inhibitor (Mangal et al., 2011)

3. การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง

3.1 การทดสอบการตอบสองทางภูมิคุ้มกันแบบ Humoral immune response

การวิเคราะห์ปริมาณ IgG และ sIgA ดัดแปลงจากวิธีการของ Slutter et al., 2010 โดยละลายโอวัลบูมินใน carbonate buffer pH 9.5 ให้ได้ความเข้มข้น 100 µg/mL เติมสารละลายโอวัลบูมินลงใน 96 well plate หลุมละ 100 µL บ่มที่อุณหภูมิ 4°C นาน 24 ชั่วโมง ล้างออกด้วย Tween 20 ความเข้มข้น 0.05% w/v ใน PBS (PBST) จำนวน 2 ครั้ง แล้วเคลือบด้วย BSA ความเข้มข้น 1 % w/v ใน PBS pH 7.4 (เพื่อ block non-specific protein) ปริมาตร 300 µL บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 2 ครั้ง เติมสารละลายตัวอย่าง แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง แล้วเติม horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat antimouse IgG สำหรับวัดระดับ IgG ในซีรัมและ horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat antimouse IgA สำหรับวัดระดับ IgA ในมูลและสารคัดหลั่งต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST จำนวน 3 และ 5 ครั้งในการวิเคราะห์ IgG และ sIgA ตามลำดับ จากนั้นเติม

TMB ELISA substrate ทิ้งไว้ 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 2 M H_2SO_4 ปริมาตร 100 µL วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm แสดงผลของระดับ IgG และ sIgA ในรูปของ antibody titer โดยใช้ค่า logarithm ของ dilution factor ที่มีค่ามากที่สุด และมีค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่า background (Frey et al., 1998)

3.2 การทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ Cell-mediated immune response

แยก splenocytes จากม้ามหนูทดลองให้เป็นเซลล์เดี่ยว โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Brousseau et al. (1999) ด้วยการครูดม้ามผ่าน sieve sterile และกำจัดเม็ดเลือดแดงด้วย ACK lysing buffer (ภาคผนวก ข) เลี้ยงเซลล์ที่ได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ complete RPMI-1640 medium ที่ผสม 1% penicillin/streptomycin solution โดยปรับความหนาแน่นของเซลล์ เท่ากับ10^6 cell/ml เติมเซลล์ลงใน 96 well culture plates หลุมละ 100 µL และเติมโอวัลบูมินความเข้มข้น 2 mg/mL หลุมละ 100 µL บ่มที่ 37°C 5% CO_2 นาน 3 วัน แล้วปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 1,500 rpm นาน 10 นาที เก็บ supernatant เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ IFN-γ และ IL-4 ด้วย ELISA kits

3.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณ IFN-γ

เติม capture IFN-γ antibody ใน96 well plate หลุมละ 100 µL บ่มที่อุณหภูมิ 4°C นาน 24 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง แล้วเคลือบด้วย 10% FBS ใน PBS pH 7.0 หลุมละ 300 µL บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติม standard IFN-γ หรือตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติม detection antibody ที่ผสมเอนไซม์ peroxidase (biotinylated mouse IFN-γ+ streptavidin horseradish peroxidase) บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 7 ครั้ง จากนั้นเติม TMB ELISA substrate ทิ้งไว้ 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 2 M H_2SO_4 ปริมาตร 100 µL อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm คำนวณหาปริมาณ IFN-γ ในตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของ standard IFN-γ

3.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณ IL-4

เติม capture IL-4 antibody ใน96 well plate หลุมละ 100 µL บ่มที่อุณหภูมิ 4°C นาน 24 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง แล้วเคลือบด้วย 10% fetal serum albumin (FBS)ใน PBS pH 7.0 หลุมละ 300 µL บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติม standard IL-4 หรือตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติม detection

antibody ที่ผสมเอนไซม์ peroxidase (biotinylated mouse IL-4 + streptavidin horseradish peroxidase) บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 5 ครั้ง จากนั้นเติม TMB ELISA substrate ทิ้งไว้ 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 2 M H_2SO_4 ปริมาตร 100 µL อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm คำนวณหาปริมาณ IL-4 ในตัวอย่างโดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของ standard IL-4

4. การประเมินความปลอดภัย และความเป็นพิษ (Hayakawa *et al.*, 1990)

- บันทึกน้ำหนักหนูทดลอง ทั้งกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม หลังการให้วัคซีนทางจมูกครั้งที่ 1, 2 และ 3 ในสัปดาห์ที่ 0, 3 และ 6 ของการทดลอง เปรียบเทียบความแตกต่างของน้ำหนักหนูทดลองทุกกลุ่มการทดลอง
- ผ่าซากชันสูตรตรวจหาพยาธิสภาพระดับมหภาคที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (gross lesions) ของอวัยวะภายในที่สำคัญ เช่น ปอด ตับ ไต กระเพาะอาหาร โดยพิจารณาตำแหน่ง รูปร่าง สี ขนาดของอวัยวะต่างๆ หลังสิ้นสุดการทดลอง

5. การวิเคราะห์ผลเชิงสถิติ

แสดงผลการทดลองในรูป mean ± SEM และวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วย one-way analysis of variance (ANOVA) ร่วมกับ Tukey's post test ยอมรับระดับความแตกต่างสถิติอย่างนัยสำคัญที่ p-value < 0.05 (*), p-vale < 0.01 (**) และ p-value < 0.001 (***)