

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### ส่วนที่ 1 การคัดเลือกตำรับโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลเพื่อนำส่งวัคซีนทางจมูก

##### 1. คุณสมบัติทางกายภาพของโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล

การเตรียมตำรับโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลด้วยวิธี ionotropic gelation เพื่อให้ได้อนุภาคที่มีประจุที่ผิวเป็นบวก และมีขนาดน้อยกว่า 5  $\mu\text{m}$  โดยปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของโคโตแซน และสัดส่วนโดยมวลระหว่างโคโตแซนกับ TPP ได้ตำรับจำนวน 9 ตำรับ (ตารางที่ 2) และกักเก็บโวลูมินซึ่งเป็นแอนติเจนในโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล ด้วยเทคนิค incorporation นั้น

ผลการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ ดังตารางที่ 3 พบว่าโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลตำรับที่ 1-6 ซึ่งเตรียมจากสารละลายโคโตแซนความเข้มข้น 1 mg/mL และ 2 mg/mL จะเกิดการรวมตัวของอนุภาค ทำให้เกิดอนุภาคขนาดใหญ่ ขนาดไม่สม่ำเสมอ และไม่สามารถกระจายตัวอยู่ในน้ำกระสายยา (vehicle) ได้ เรียกอันตรกิริยาดังกล่าวว่า aggregation ซึ่งการเกิด aggregation พบอย่างรวดเร็วหลังเตรียมตำรับ ยกเว้นตำรับที่ 6 ซึ่งเตรียมจากสารละลายโคโตแซนความเข้มข้น 2 mg/mL โดยใช้สัดส่วนโคโตแซนต่อ TPP เท่ากับ 5:1 ทำให้ได้อนุภาคขนาด  $482.00 \pm 15.72$  nm อย่างไรก็ตามหลังการเก็บอนุภาคที่ 4 °C ในเวลาไม่เกิน 6 ชั่วโมงหลังเตรียมตำรับ จะพบการ aggregation

ส่วนโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลตำรับที่ 7-9 ซึ่งเตรียมจากสารละลายโคโตแซน ความเข้มข้น 3 mg/mL เมื่อเพิ่มสัดส่วนโดยมวลของโคโตแซนต่อ TPP มีผลทำให้อนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น คือ ขนาดของอนุภาคของสัดส่วนโดยมวลของโคโตแซนต่อ TPP เท่ากับ 3:1, 4:1 และ 5:1 มีค่าเท่ากับ  $205.33 \pm 21.46$  nm,  $493.33 \pm 41.58$  nm และ  $1,166.67 \pm 156.85$  nm ตามลำดับ และเมื่อเตรียมในรูปผงแห้ง จะทำให้อนุภาคมีขนาดเพิ่มขึ้นเป็น  $249.67 \pm 29.6$  nm,  $559.33 \pm 17.21$  nm และ  $1,240.00 \pm 62.45$  nm ตามลำดับ และมีค่าการกระจายขนาดของอนุภาค (polydispersity index) เท่ากับ  $0.248 \pm 29.6$ ,  $0.389 \pm 0.139$  และ  $0.361 \pm 0.089$  ตามลำดับ

เมื่อวัดประจุที่ผิวอนุภาค พบว่า ตำรับที่ 7-9 มีประจุที่ผิวอนุภาคเป็นบวก กล่าวคือ มีค่าประจุที่ผิวอนุภาคระหว่าง 21 – 37 mV และค่าการกระจายขนาดของอนุภาคอยู่ระหว่าง 0.24 – 0.39 และภายหลังการเตรียมในรูปผงแห้ง พบว่า ค่าประจุที่ผิว และค่าการกระจายขนาดของอนุภาคเพิ่มขึ้นอยู่ระหว่าง 27 – 39 mV และค่าการกระจายขนาดของอนุภาคอยู่ระหว่าง 0.41 – 0.49

ตารางที่ 3 คุณสมบัติทางกายภาพของโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่กักเก็บแอนติเจน (n = 3 )

ตำรับที่	CS Conc. (mg/mL)	CS:TPP	ขนาดอนุภาค (nm)		ค่าการกระจายขนาด		ค่าประจุที่ผิวอนุภาค (mV)	
			ก่อน lyophilization	หลัง lyophilization	ก่อน lyophilization	หลัง lyophilization	ก่อน lyophilization	หลัง lyophilization
1	1	3:1	Aggregate	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2	1	4:1	Aggregate	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
3	1	5:1	Aggregate	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
4	2	3:1	Aggregate	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
5	2	4:1	Aggregate	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
6	2	5:1	482 ± 15.72	Aggregate	0.472 ± 0.034	N/A	10.31 ± 1.48	N/A
7	3	3:1	205.33 ± 21.46	248.67 ± 29.6	0.244 ± 0.021	0.413 ± 0.048	21.33 ± 0.78	27.87 ± 0.67
8	3	4:1	493.33 ± 41.58	559.33 ± 17.21	0.389 ± 0.130	0.470 ± 0.038	37.70 ± 0.85	38.67 ± 1.55
9	3	5:1	1,166.67 ± 158.85	1,240.00 ± 62.45	0.361 ± 0.089	0.488 ± 0.80	34.50 ± 5.07	36.44 ± 1.72

เมื่อ	CS Conc.	หมายถึง ความเข้มข้นของสารละลายโคโตแซน
	CS : TPP	หมายถึง สัดส่วนโดยมวลของโคโตแซนและ TPP
	N/A	หมายถึง ไม่ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ผล (not applicable)
	Aggregate	หมายถึง การรวมกลุ่มของอนุภาค ทำให้อนุภาคไม่สามารถกระจายในน้ำกระสายยาได้

## 2. การกักเก็บ และการบรรจุแอนติเจนของโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล

ผลการกักเก็บและการบรรจุแอนติเจนของโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล แสดงในตารางที่ 4 พบว่า เมื่อเพิ่มสัดส่วนการเกิดอันตรกิริยาของโคโตแซนต่อ TPP ทำให้ร้อยละของการกักเก็บและร้อยละของการบรรจุแอนติเจนมีค่าลดลง คือ สัดส่วนโดยมวลของโคโตแซนต่อ TPP ของโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล ตำรับที่ 7, 8 และ 9 มีค่าร้อยละของการกักเก็บลดลง เท่ากับ  $76.49 \pm 4.72$ ,  $68.52 \pm 6.01$  และ  $66.77 \pm 7.95$  ตามลำดับ ส่วนร้อยละของการบรรจุแอนติเจน มีค่าเท่ากับ  $31.62 \pm 1.52$ ,  $27.61 \pm 1.68$  และ  $27.03 \pm 1.27$  ตามลำดับ

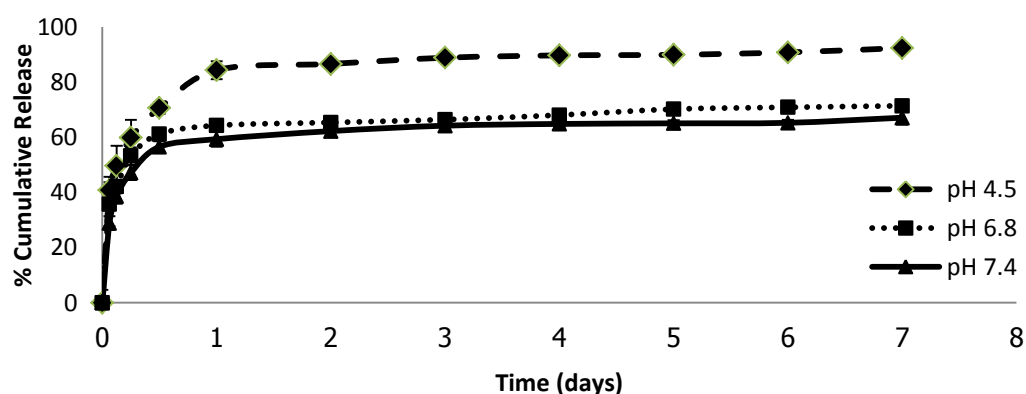
ตารางที่ 4 การกักเก็บ และการบรรจุแอนติเจนของโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล (n = 3)

ตำรับที่	CS:TPP	ร้อยละของการกักเก็บ แอนติเจน	ร้อยละของการบรรจุ แอนติเจน
7	3:1	$76.49 \pm 4.72$	$31.62 \pm 1.52$
8	4:1	$68.52 \pm 6.01$	$27.61 \pm 1.68$
9	5:1	$66.77 \pm 7.95$	$27.03 \pm 1.27$

เมื่อ CS:TPP คือ สัดส่วนโดยมวลของโคโตแซน ต่อ TPP

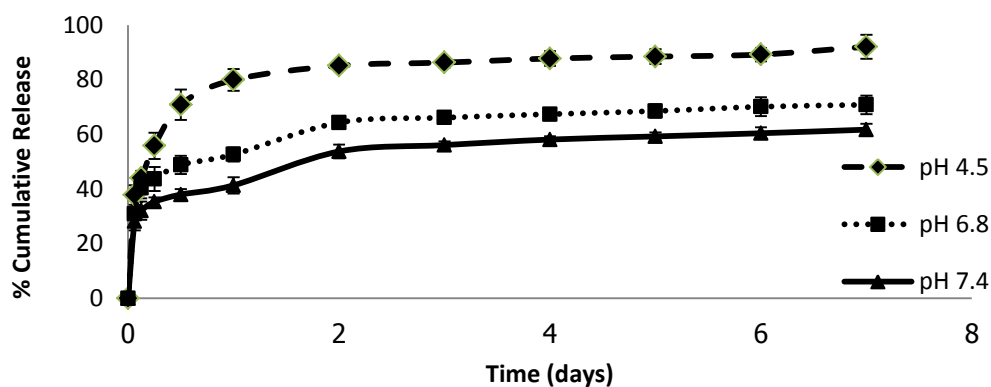
## 3. การปลดปล่อยแอนติเจนที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล

ผลการปลดปล่อยแอนติเจนที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลของตำรับที่ 7 - 9 ใน phosphate buffer (PBS) ที่ pH ต่างๆ กัน คือ pH 7.4, 6.8 และ 4.5 แสดงในรูปที่ 12 - 14



รูปที่ 12 การปลดปล่อยแอนติเจนที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล ตำรับที่ 7

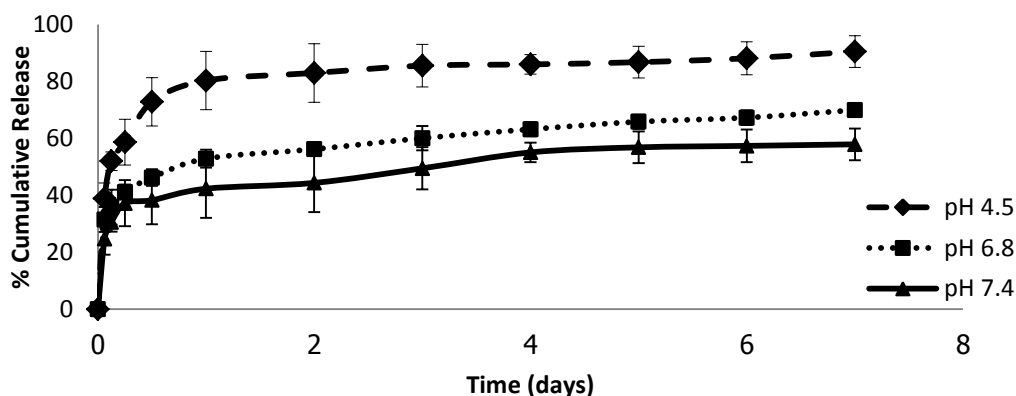
(CS:TPP เท่ากับ 3:1) ใน phosphate buffer ที่ pH ต่างๆกัน (n=3) อุณหภูมิ 37°C, 50 rpm จากรูปที่ 12 พบว่า การปลดปล่อยแอนติเจนที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล ตำรับที่ 7 (CS:TPP เท่ากับ 3:1) ซึ่งอนุภาคมีขนาดเล็ก ใน PBS ที่ pH 4.5 ในวันที่ 2 และวันสุดท้ายของการทดลองมีค่าเท่ากับ ร้อยละ  $86.62 \pm 1.52$  และ  $92.34 \pm 1.42$  ตามลำดับ ส่วนใน PBS ที่ pH 6.8 และ 7.4 มีการปลดปล่อยแอนติเจนในวันที่ 2 ร้อยละ  $48.63 \pm 1.87$  และ  $43.49 \pm 3.32$  และมีการปลดปล่อยแอนติเจนในวันสุดท้ายของการทดลอง เท่ากับ ร้อยละ  $62.64 \pm 4.20$  และ  $55.41 \pm 9.17$  ตามลำดับ



รูปที่ 13 การปลดปล่อยแอนติเจนที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล ตำรับที่ 8

(CS:TPP เท่ากับ 4:1) ใน phosphate buffer ที่ pH ต่างๆกัน (n=3) อุณหภูมิ 37°C, 50 rpm

จากรูปที่ 13 พบว่าการปลดปล่อยแอนติเจนที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลตำรับที่ 8 (CS:TPP เท่ากับ 4:1) ซึ่งอนุภาคมีขนาดกลาง ใน PBS ที่ pH 4.5 ในวันที่ 2 และวันสุดท้ายของการทดลองมีค่าเท่ากับ ร้อยละ  $85.20 \pm 1.44$  และ  $92.13 \pm 4.37$  ตามลำดับ ส่วนใน PBS ที่ pH 6.8 และ 7.4 มีการปลดปล่อยแอนติเจนในวันที่ 2 ร้อยละ  $64.15 \pm 1.94$  และ  $53.77 \pm 2.52$  และมีการปลดปล่อยแอนติเจนในวันสุดท้ายของการทดลอง เท่ากับ ร้อยละ  $70.86 \pm 3.38$  และ  $61.76 \pm 2.16$  ตามลำดับ



**รูปที่ 14** การปลดปล่อยแอนติเจนที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล ตำรับที่ 9 (CS:TPP เท่ากับ 5:1) ใน phosphate buffer ที่ pH ต่างๆกัน (n=3) อุณหภูมิ 37°C, 50 rpm

จากรูปที่ 14 พบว่าการปลดปล่อยแอนติเจนที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลตำรับที่ 9 (CS:TPP เท่ากับ 5:1) ซึ่งอนุภาคมีขนาดใหญ่ ใน PBS ที่ pH 4.5 ในวันที่ 2 และวันสุดท้าย ของการทดลองมีค่าเท่ากับ ร้อยละ  $83.02 \pm 1.36$  และ  $90.50 \pm 2.41$  ตามลำดับ ส่วนใน PBS ที่ pH 6.8 และ 7.4 มีการปลดปล่อยแอนติเจนในวันที่ 2 ร้อยละ  $56.22 \pm 2.08$  และ  $44.39 \pm 10.28$  และมีการปลดปล่อยแอนติเจนในวันสุดท้ายของการทดลอง เท่ากับ ร้อยละ  $69.89 \pm 1.93$  และ  $57.94 \pm 5.58$  ตามลำดับ

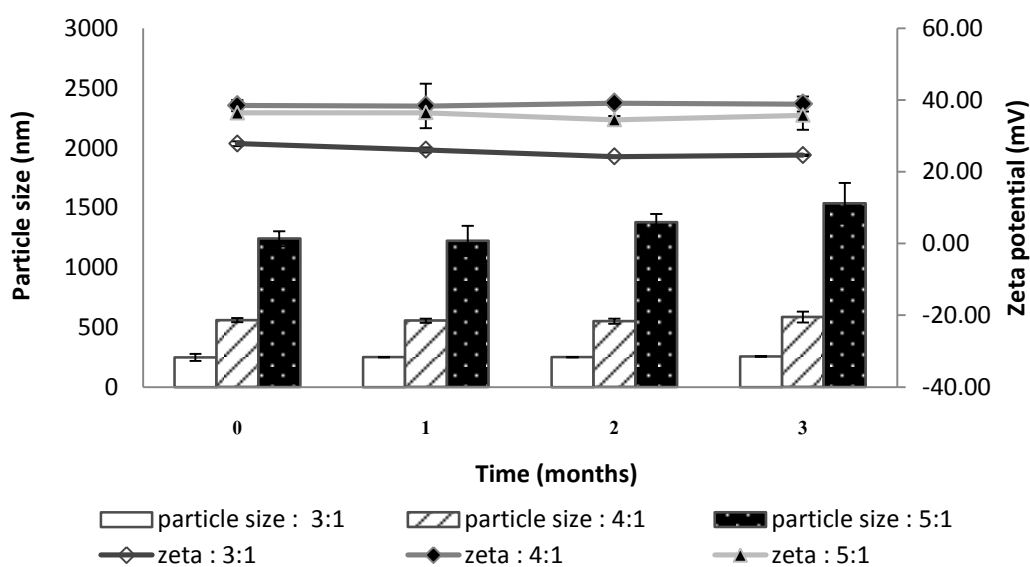
เมื่อเปรียบเทียบการปลดปล่อยแอนติเจนที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลทั้ง 3 ตำรับ พบว่า การปลดปล่อยแอนติเจนมีลักษณะคล้ายคลึงกัน คือ มีอัตราการปลดปล่อยอย่างรวดเร็วในวันแรกของการทดลอง และเริ่มคงที่ในวันที่ 2 จนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง อย่างไรก็ตามแอนติเจนถูกปลดปล่อยจากไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลใน PBS ที่ pH 4.5 ได้ดีกว่า pH 6.8 และ 7.4 ตามลำดับ

#### 4. ความคงตัวของกายภาพของระบบนำส่ง และความคงตัวของแอนติเจนที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล

ผลการประเมินความคงตัวของกายภาพของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล ตำรับที่ 7 (CS:TPP เท่ากับ 3:1), ตำรับที่ 8 (CS:TPP เท่ากับ 4:1) และ ตำรับที่ 9 (CS:TPP เท่ากับ 5:1) ที่เก็บในรูปแบบแห้งที่อุณหภูมิ 4°C นาน 3 เดือน พบว่า ผงแห้งของทุกตำรับสามารถกระจายตัวในน้ำปราศจากไอออนได้สมบูรณ์ และไม่พบการเกิด aggregation ผลความคงตัวของกายภาพของระบบนำส่งที่ประเมินจากการเปลี่ยนแปลงขนาดของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลเทียบกับขนาดของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลหลังเตรียมในรูปแบบผงแห้งใหม่ๆ (เดือนที่ 0 ของการทดลอง) แสดงในรูปที่ 15 พบว่า ทุกตำรับจะมีขนาด

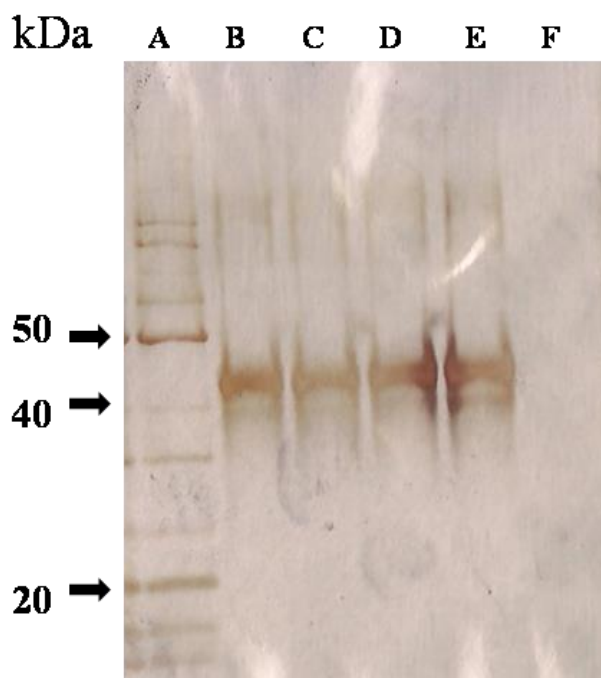
อนุภาคใหญ่ขึ้นเล็กน้อย เมื่อเวลาผ่านไป โดยเมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน อนุภาคตำรับที่ 7 (3:1) มีขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้นจาก  $248.67 \pm 29.6$  nm เป็น  $255.00 \pm 2.64$  nm อนุภาคตำรับที่ 8 (4:1) มีขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้นจาก  $559.33 \pm 17.21$  nm เป็น  $585.00 \pm 46.130$  nm และอนุภาคตำรับที่ 9 (5:1) มีขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้นจาก  $1,240.00 \pm 62.45$  nm เป็น  $1,536.67 \pm 170.10$  nm ตามลำดับ

ส่วนประจุที่ผิวอนุภาคของทุกตำรับ เมื่อเวลาผ่านไป ยังคงมีค่าเป็นบวก (รูปที่ 15) โดยเมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน การเปลี่ยนแปลงประจุที่ผิวอนุภาคของทุกตำรับมีค่าลดลงเล็กน้อย ค่าประจุที่ผิวอนุภาคของตำรับที่ 7 (3:1) มีค่าลดลงจาก  $27.87 \pm 0.67$  mV เป็น  $24.63 \pm 0.21$  mV ค่าประจุที่ผิวอนุภาคของตำรับที่ 8 (4:1) มีค่าลดลงน้อยมาก จาก  $38.67 \pm 1.55$  mV เป็น  $38.66 \pm 6.22$  mV และค่าประจุที่ผิวอนุภาคของตำรับที่ 9 (5:1) มีค่าลดลงน้อย จาก  $36.44 \pm 1.72$  เป็น  $35.77 \pm 2.74$  mV ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าค่าการกระจายขนาดของอนุภาคทั้งสามตำรับมีค่าน้อยกว่า 0.5 แสดงว่าโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลในรูปผงแห้ง มีความคงตัวทางกายภาพที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  เมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน



**รูปที่ 15** ความคงตัวทางกายภาพของโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่กักเก็บแอนติเจนในรูปผงแห้งของตำรับที่ 7 (CS:TPP เท่ากับ 3:1), ตำรับที่ 8 (CS:TPP เท่ากับ 4:1) และ ตำรับที่ 9 (CS:TPP เท่ากับ 5:1) เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 3 เดือน

เมื่อทดสอบความคงตัวของโอวัลบูมินที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล และเก็บไว้ในรูปผงแห้ง ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 3 เดือน ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่า แอนติเจนทั้ง 3 ตำรับให้แถบโปรตีนเพียงแถบเดียว และมีขนาดเท่ากับโอวัลบูมินที่ละลายใน PBS pH 7.4 โดยมีขนาดประมาณ 44 kDa (รูปที่ 16) แสดงให้เห็นว่าโอวัลบูมินที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล และเก็บไว้ในรูปผงแห้งที่อุณหภูมิ 4°C ไม่เกิดการเสียสภาพของโอวัลบูมิน เมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน



**รูปที่ 16** SDS-PAGE ของโอวัลบูมินที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่เก็บในรูปผงแห้งที่อุณหภูมิ 4°C นาน 3 เดือน

- เมื่อ A คือ protein ladder  
 B คือ positive control  
 C คือ โอวัลบูมินที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลตำรับที่ 7 (CS:TPP 3:1)  
 D คือ โอวัลบูมินที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลตำรับที่ 8 (CS:TPP 4:1)  
 E คือ โอวัลบูมินที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลตำรับที่ 9 (CS:TPP 5:1)

F คือ blank

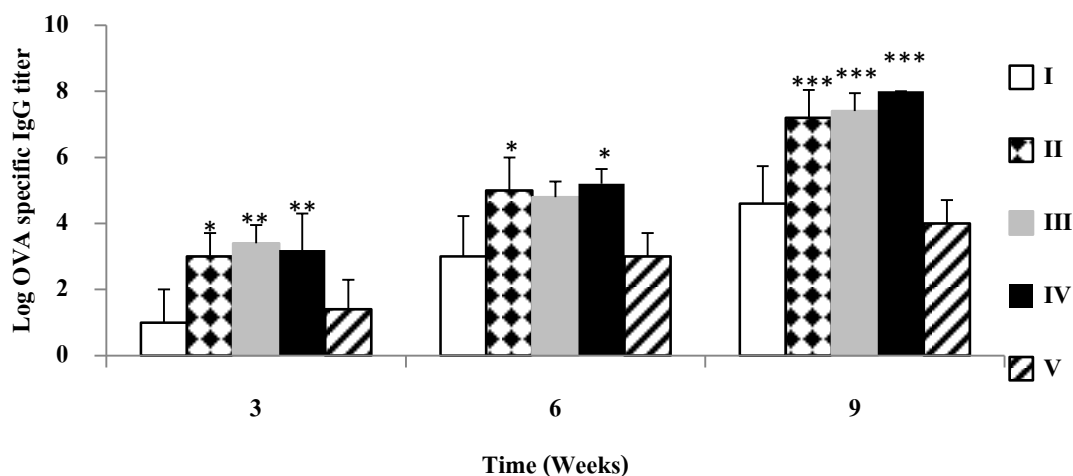
## 5. การคัดเลือกตำรับโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล เพื่อนำส่งวัคซีนทางจุมูก

จากผลการวิจัยข้างต้น จึงคัดเลือกตำรับโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล จำนวน 3 ตำรับ เป็นตำรับที่เตรียมจากสารละลายโคโตแซน จากความเข้มข้น 3 mg/mL และมีสัดส่วนการเกิดอันตรกิริยาของโคโตแซนต่อ TPP เท่ากับ 3:1 (ตำรับที่ 7), 4:1 (ตำรับที่ 8) และ 5:1 (ตำรับที่ 9) ทำให้ได้อนุภาคหลังเตรียมในรูปผงแห้ง ที่มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วงอนุภาค 3 ขนาด คือ อนุภาคขนาดเล็ก ( $249.67 \pm 29.6$  nm) อนุภาคขนาดกลาง ( $559.33 \pm 17.21$  nm) และอนุภาคขนาดใหญ่ ( $1,240.00 \pm 62.45$  nm) ตามลำดับ ซึ่งโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลทั้ง 3 ตำรับ มีปริมาณการกักเก็บและการบรรจุแอนติเจนสูง สามารถปลดปล่อยแอนติเจนได้ดีที่ pH 4.5 ซึ่งเป็น pH ภายใน lysosome ของเซลล์ทางภูมิคุ้มกัน โดยมีการปลดปล่อยแอนติเจนเพียงเล็กน้อยที่ pH 6.8 และ 7.4 ซึ่งเป็น pH ภายในเยื่อโพรงจุมูกและสารน้ำภายในร่างกาย (body fluids) ทำให้แอนติเจนถูกนำส่งสู่เซลล์ทางภูมิคุ้มกันได้ปริมาณมาก ไม่สูญเสียไปในระหว่างการนำส่ง นอกจากนี้โคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลทั้ง 3 ตำรับ ยังเป็นระบบนำส่งที่มีความคงตัวทางกายภาพ รวมทั้งแอนติเจน (โอวัลบูมิน) ที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลมีความคงตัว ดังนั้นจึงใช้โคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลทั้ง 3 ตำรับนี้ ในการทดสอบฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลองต่อไป

## ส่วนที่ 2 การประเมินฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันหลังให้วัคซีนทางจุมูกในสัตว์ทดลอง

### 1. การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ humoral immune response

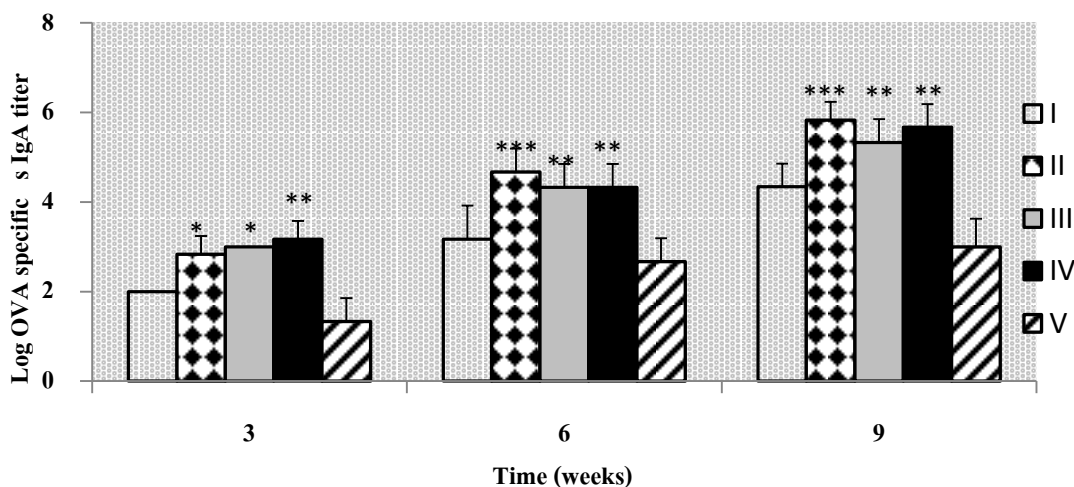
ผลการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ humoral immune response ของหนูทดลอง เมื่อให้โอวัลบูมินที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดต่างๆ ทางจุมูก โดยประเมินจากระดับ IgG ในซีรัม และ sIgA ในสารคัดหลั่งบริเวณเยื่อต่างๆ ได้ ผลแสดงดังรูปที่ 17 – 19



รูปที่ 17 ระดับ OVA specific IgG ในซีรัมของหนูทดลอง (n = 6) เมื่อให้วัคซีนทางจมูก ครั้งที่ 1 (สัปดาห์ที่ 3) ครั้งที่ 2 (สัปดาห์ที่ 6) และครั้งที่ 3 (สัปดาห์ที่ 9)

- เมื่อ กลุ่ม I คือ หนูที่ได้รับโอวัลบูมินในรูปแบบสารละลาย  
 กลุ่ม II คือ หนูที่ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดใหญ่  
 กลุ่ม III คือ หนูที่ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดกลาง  
 กลุ่ม IV คือ หนูที่ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดเล็ก  
 กลุ่ม V คือ หนูที่ไม่ได้รับสารใดๆ ทางจมูก  
 (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  และ \*\*\*  $p < 0.001$  เมื่อเทียบกับกลุ่ม I)

จากรูปที่ 17 พบว่าหลังให้วัคซีนครั้งที่ 1 ระดับ IgG ในซีรัมของหนูทดลองที่ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลทุกกลุ่ม สูงกว่าในซีรัมหนูทดลองที่ได้รับโอวัลบูมินในรูปแบบสารละลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยไม่พบความแตกต่างของระดับ IgG ระหว่างหนูทดลองที่ได้รับโอวัลบูมินในรูปแบบสารละลาย และหนูทดลองที่ไม่ได้รับโอวัลบูมิน และหลังให้วัคซีนครั้งที่ 2 และครั้งที่ 3 พบว่าระดับภูมิคุ้มกันทุกกลุ่มเพิ่มขึ้น โดยลักษณะการเพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเป็นลักษณะเดียวกันกับระดับภูมิคุ้มกันหลังให้วัคซีนครั้งที่ 1 เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า ระดับ IgG ในซีรัมของหนูทดลองที่ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลทุกกลุ่ม มีค่าสูงกว่าในหนูทดลองที่ได้รับโอวัลบูมินในรูปแบบสารละลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ ) ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างของระดับ IgG ระหว่างหนูทดลองที่ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลแต่ละขนาดตลอดการทดลอง

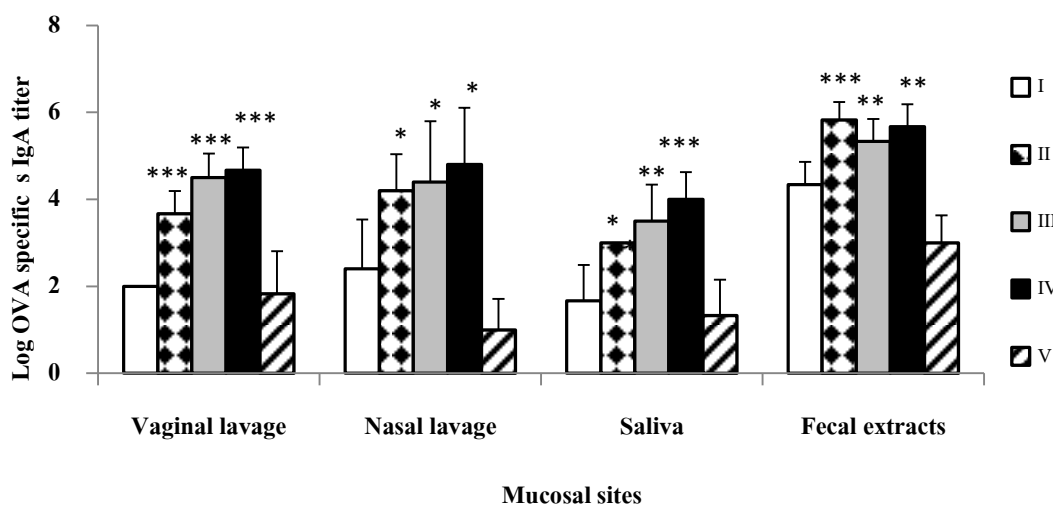


รูปที่ 18 ระดับ OVA specific sIgA ในมูลของหนูทดลอง (n = 6) เมื่อให้วัคซีนทางจมูก ครั้งที่ 1 (สัปดาห์ที่ 3) ครั้งที่ 2 (สัปดาห์ที่ 6) และครั้งที่ 3 (สัปดาห์ที่ 9)

- เมื่อ กลุ่ม I คือ หนูที่ได้รับโอวัลบูมินในรูปแบบสารละลาย  
 กลุ่ม II คือ หนูที่ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทีเคิลขนาดใหญ่  
 กลุ่ม III คือ หนูที่ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทีเคิลขนาดกลาง  
 กลุ่ม IV คือ หนูที่ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทีเคิลขนาดเล็ก  
 กลุ่ม V คือ หนูที่ไม่ได้รับสารใดๆ ทางจมูก

(\* p < 0.05, \*\* p < 0.01 และ \*\*\* p < 0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่ม I)

จากรูปที่ 18 พบว่าหลังให้วัคซีนครั้งที่ 1 ระดับ sIgA ในมูลของหนูทดลองที่ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทีเคิลทุกกลุ่ม มีระดับสูงกว่ามูลของหนูทดลองที่ได้รับโอวัลบูมินในรูปแบบสารละลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p < 0.05) หลังให้วัคซีนครั้งที่ 2 และครั้งที่ 3 พบว่าระดับภูมิคุ้มกันทุกกลุ่มเพิ่มขึ้น โดยลักษณะการเพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน เป็นลักษณะเดียวกันกับระดับภูมิคุ้มกันหลังให้วัคซีนครั้งที่ 1 เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า ระดับ sIgA ในมูลของหนูทดลองที่ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทีเคิลทุกกลุ่ม มีค่าสูงกว่าในหนูทดลองที่ได้รับโอวัลบูมินในรูปแบบสารละลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p < 0.01) ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างของระดับ sIgA ในมูลสัตว์หนูทดลองที่ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทีเคิลแต่ขนาดตลอดการทดลอง



รูปที่ 19 ระดับ OVA specific sIgA ในน้ำล้างช่องคลอด น้ำล้างโพรงจมูก น้ำลาย และสารสกัดจากมูลของหนูทดลอง (n = 6) เมื่อให้วัคซีนทางจมูก ในสัปดาห์ที่ 9 ของการทดลอง

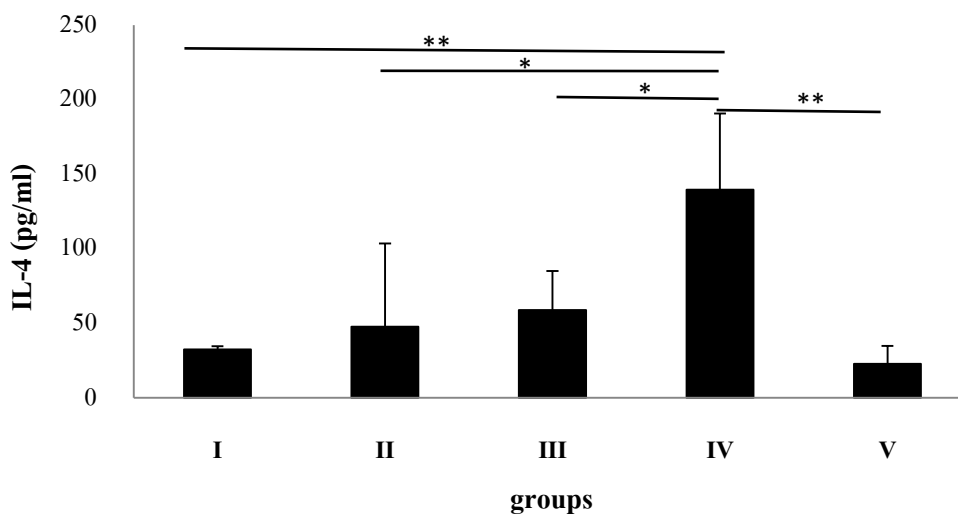
- เมื่อ กลุ่ม I คือ หนูที่ได้รับโอวัลบูมินในรูปแบบสารละลาย  
 กลุ่ม II คือ หนูที่ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดใหญ่  
 กลุ่ม III คือ หนูที่ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดกลาง  
 กลุ่ม IV คือ หนูที่ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดเล็ก  
 กลุ่ม V คือ หนูที่ไม่ได้รับสารใดๆ ทางจมูก  
 (\* p < 0.05, \*\* p < 0.01 และ \*\*\* p < 0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่ม I)

จากรูปที่ 19 พบว่า นอกจากการให้โอวัลบูมินทางจมูก จะสามารถกระตุ้น sIgA ในมูลของหนูทดลองแล้ว ยังสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในเยื่อช่องคลอด เยื่อโพรงจมูก และน้ำลายได้ ทั้งนี้พบว่าระดับ sIgA จากตัวอย่างสารคัดหลั่งจากเยื่อผิวทุกบริเวณของหนูทดลองที่ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลทุกขนาด มีระดับสูงกว่าหนูทดลองที่ได้รับโอวัลบูมินในรูปแบบสารละลายอย่างน้อยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของระดับ sIgA ระหว่างหนูทดลองที่ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดต่างๆ กัน อย่างไรก็ตามพบว่า sIgA ที่พบในมูลหนูทดลองมีระดับสูงกว่า sIgA จากตัวอย่างสารคัดหลั่งในบริเวณเยื่อผิวอื่น และพบว่าระดับ sIgA ในน้ำล้างช่องคลอด น้ำล้างโพรงจมูก และน้ำลาย มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามขนาดของอนุภาคที่ลดลง โดยไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าวในมูลสัตว์ทดลอง

ผลการประเมินการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ humoral immune response จากระดับ IgG ในซีรัม และ sIgA ในสารคัดหลั่งบริเวณเยื่อเมือกต่างๆ ของโคโตแซนนาโนพาร์ทีเคิลที่กักเก็บโอวัลบูมิน พบว่า โคโตแซนนาโนพาร์ทีเคิลทั้ง 3 ตัวรับ สามารถเสริมฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ เมื่อเทียบกับการให้ สารละลายโอวัลบูมิน โดยอนุภาคของโคโตแซนนาโนพาร์ทีเคิลทั้ง 3 ขนาด มีประสิทธิภาพในการ เสริมฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบ humoral immune response ได้ไม่แตกต่างกัน

## 7. การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ cell - mediated immune response

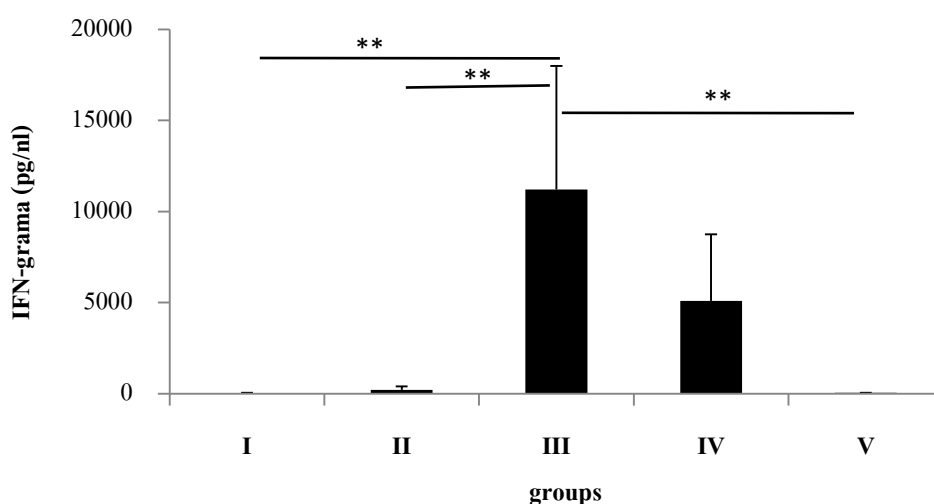
ผลการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ cell - mediated immune response ของหนูทดลอง เมื่อให้โอวัลบูมินที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทีเคิลขนาดต่างๆ ทางจมูก โดยประเมินจากระดับ IL-4 และ IFN- $\gamma$  ที่หลังจากเซลล์ม้าม (splenocytes) ของหนูทดลอง พบว่า หนูทดลองที่ได้รับโอวัลบูมินที่ กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทีเคิล มีระดับของ IL-4 และ IFN- $\gamma$  สูงกว่าหนูทดลองที่ได้รับโอวัลบูมินใน รูปสารละลาย ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 20 - 21



รูปที่ 20 ระดับ IL-4 ที่หลังจาก splenocytes ของหนูทดลองกลุ่มต่างๆ เมื่อให้วัคซีนทางจมูก (n = 4) (\* p < 0.05, \*\* p < 0.01 และ \*\*\* p < 0.001)

- เมื่อ กลุ่ม I คือ หนูที่ได้รับโอวัลบูมินในรูปสารละลาย  
 กลุ่ม II คือ หนูที่ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทีเคิลขนาดใหญ่  
 กลุ่ม III คือ หนูที่ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทีเคิลขนาดกลาง  
 กลุ่ม IV คือ หนูที่ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทีเคิลขนาดเล็ก  
 กลุ่ม V คือ หนูที่ไม่ได้รับสารใดๆ ทางจมูก

จากรูปที่ 20 พบว่า ขนาดของโคโตแซนนาโนพาร์ทีเคิล มีผลต่อระดับ IL-4 โดยขนาดของโคโตแซนนาโนพาร์ทีเคิลที่เพิ่มขึ้น จะทำให้ระดับ IL-4 ลดลง หนูทดลองที่ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บโคโตแซนนาโนพาร์ทีเคิลขนาดเล็ก (กลุ่ม IV) มีระดับ IL-4 ( $139.59 \pm 51.02$  pg/mL) สูงกว่าหนูที่ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บโคโตแซนนาโนพาร์ทีเคิลขนาดกลาง (กลุ่ม III) ( $58.95 \pm 26.12$  pg/mL) และโคโตแซนนาโนพาร์ทีเคิลขนาดใหญ่ (กลุ่ม II) ( $47.68 \pm 55.76$  pg/mL) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม หนูทดลองที่ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บโคโตแซนนาโนพาร์ทีเคิลทั้ง 3 ตำรับ มีระดับ IL-4 สูงกว่าหนูทดลองที่ได้รับสารละลายโอวัลบูมิน ซึ่งมีระดับ IL-4 เท่ากับ  $32.48 \pm 2.05$  pg/mL



**รูปที่ 21** ระดับ IFN- $\gamma$  ที่หลั่งจาก splenocytes ของหนูทดลองกลุ่มต่างๆ เมื่อให้วัคซีนทางจมูก (n = 4) (\* p < 0.05, \*\* p < 0.01 และ \*\*\* p < 0.001)

- เมื่อ กลุ่ม I คือ หนูที่ได้รับโอวัลบูมินในรูปสารละลาย  
 กลุ่ม II คือ หนูที่ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทีเคิลขนาดใหญ่  
 กลุ่ม III คือ หนูที่ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทีเคิลขนาดกลาง  
 กลุ่ม IV คือ หนูที่ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทีเคิลขนาดเล็ก  
 กลุ่ม V คือ หนูที่ไม่ได้รับสารใดๆ ทางจมูก

จากรูปที่ 21 พบว่า ขนาดของโคโตแซนนาโนพาร์ทีเคิลมีผลต่อระดับ IFN- $\gamma$  หนูที่ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทีเคิลขนาดกลาง (กลุ่ม III) มีระดับ IFN- $\gamma$  ( $11,205.97 \pm$

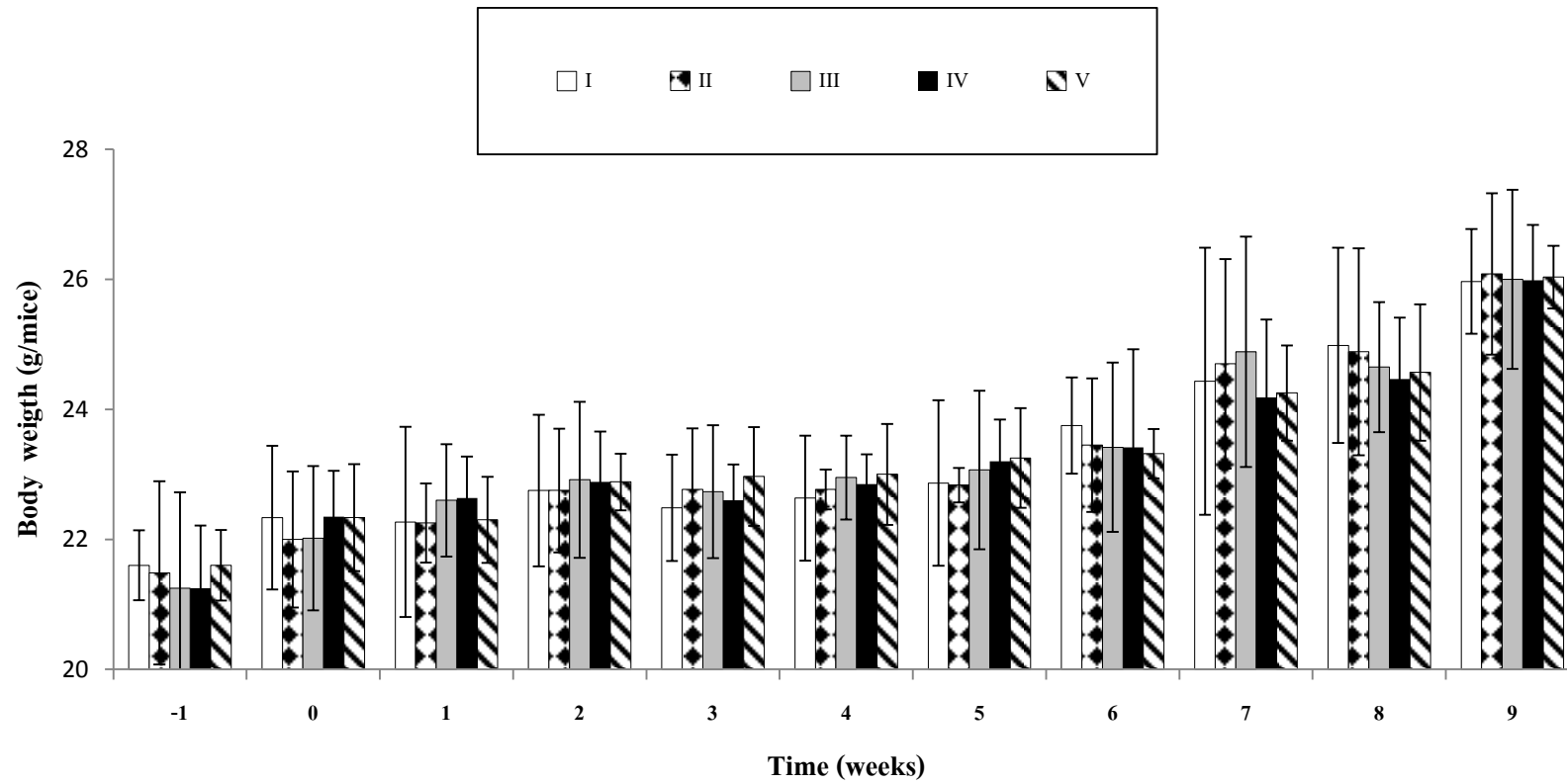
6,777.84 pg/mL) สูงกว่าหนูที่ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทีเคิลขนาดเล็ก (กลุ่ม IV)  $5,094.51 \pm 3,660.45$  pg/mL และขนาดใหญ่ (กลุ่ม II)  $210.83 \pm 3,660.45$  pg/mL อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) โดยระดับ IFN- $\gamma$  ของหนูทดลองที่ได้รับสารละลายโอวัลบูมิน (กลุ่ม I) มีระดับ IFN- $\gamma$  เพียง  $33.36 \pm 4.83$  pg/mL

ผลการประเมินการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ cell - mediated immune response จากระดับ IL-4 และ IFN- $\gamma$  ที่หลังจากเซลล์ม้าม (splenocytes) ของหนูทดลองที่ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทีเคิลขนาดต่างๆ พบว่า โคโตแซนนาโนพาร์ทีเคิลสามารถเสริมฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบ cell - mediated immune response ได้ เมื่อเทียบกับการให้สารละลายโอวัลบูมิน โดยโคโตแซนนาโนพาร์ทีเคิลขนาดเล็ก และขนาดกลาง สามารถกระตุ้นการหลั่ง IL-4 และ IFN- $\gamma$  ได้ดีกว่าโคโตแซนนาโนพาร์ทีเคิลขนาดใหญ่

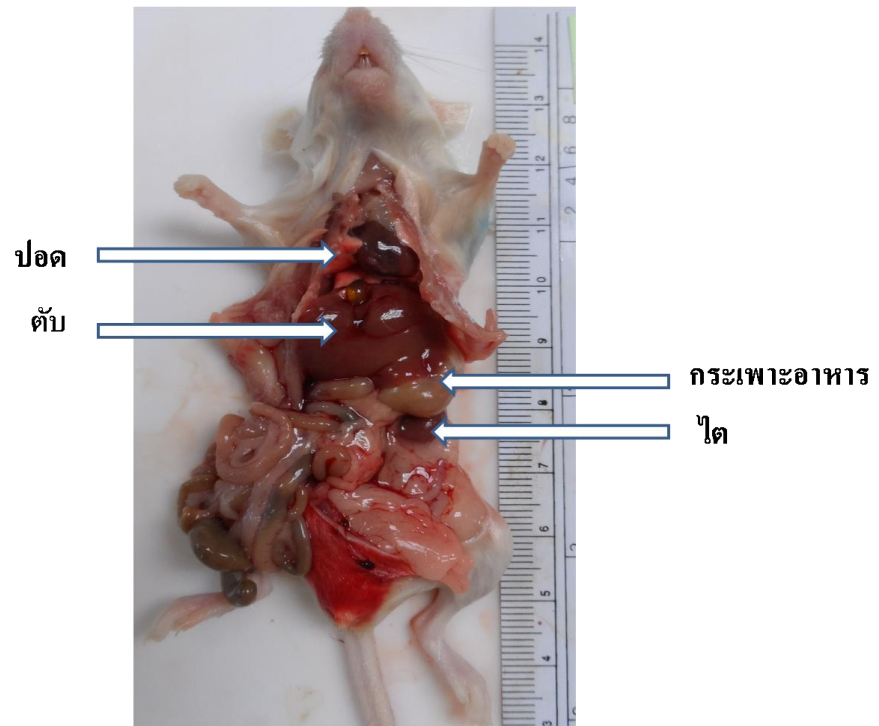
#### 8. การประเมินความปลอดภัยและผลเกือบเรื้อรัง (sub-chronic toxicity)

การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของหนูทดลองแต่ละกลุ่ม ( $n=6$ ) ภายหลังจากให้วัคซีนครั้งที่ 1, 2 และ 3 ในสัปดาห์ที่ 0, 3 และ 6 ของการทดลอง โดยเปรียบเทียบความแตกต่างทุกกลุ่มการทดลองกับกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ V ในสัปดาห์เดียวกัน ผลการวิจัยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 22)

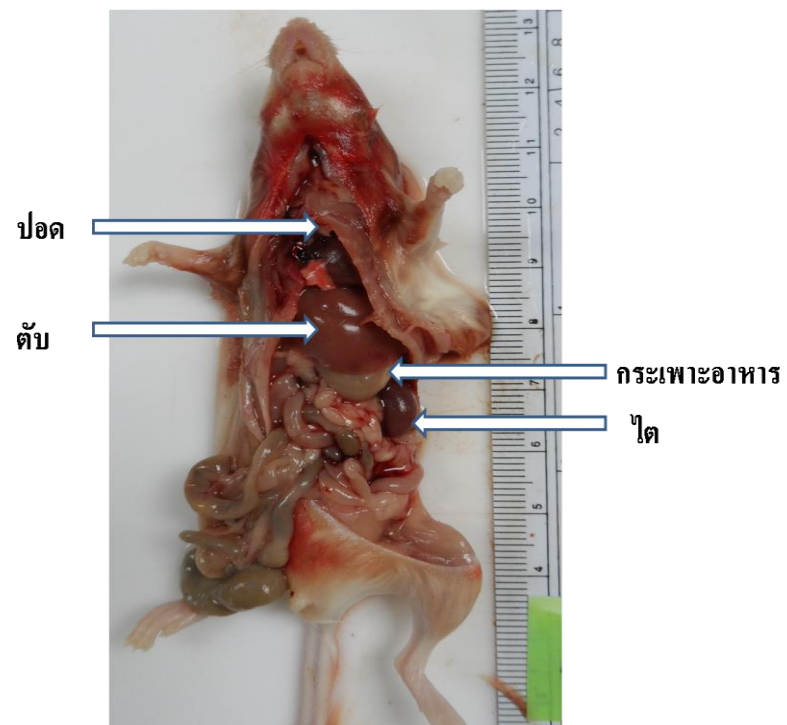
เมื่อผ่าซากชันสูตรตรวจหาพยาธิสภาพระดับมหภาค พบว่าอวัยวะภายในที่สำคัญ เช่น ปอด ตับ ไต กระเพาะอาหาร โดยพิจารณาตำแหน่ง รูปร่าง สี ขนาดของอวัยวะต่างๆ หลังสิ้นสุดการทดลองของหนูทุกกลุ่มมีลักษณะปกติ (รูปที่ 23-27)



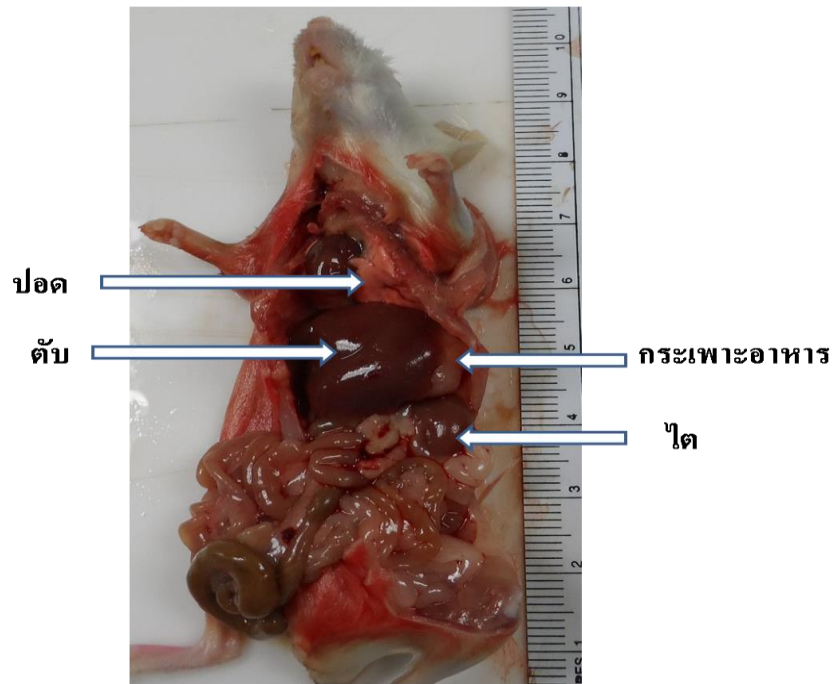
รูปที่ 22 น้ำหนักเฉลี่ยของหนูทดลองแต่ละกลุ่ม (n=6) หลังการให้วัคซีนทางจมูกครั้งที่ 1, 2 และ 3 ในสัปดาห์ที่ 0, 3 และ 6 ของการทดลอง (\* p < 0.05)



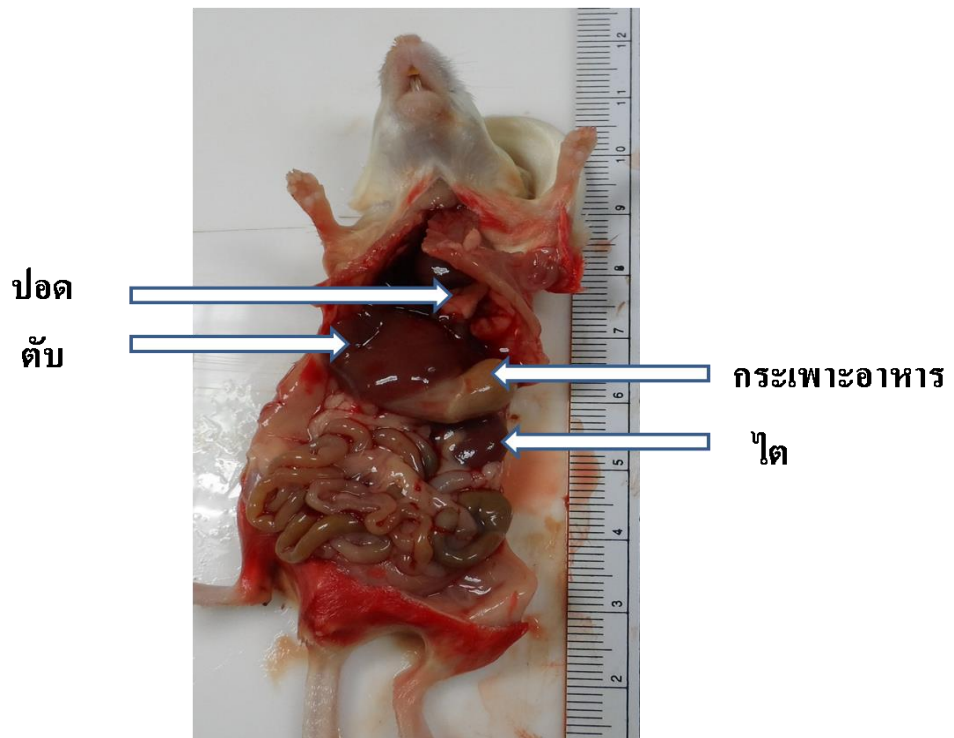
รูปที่ 23 พยาธิวิทยามหภาคของหนูทดลองกลุ่มที่ I



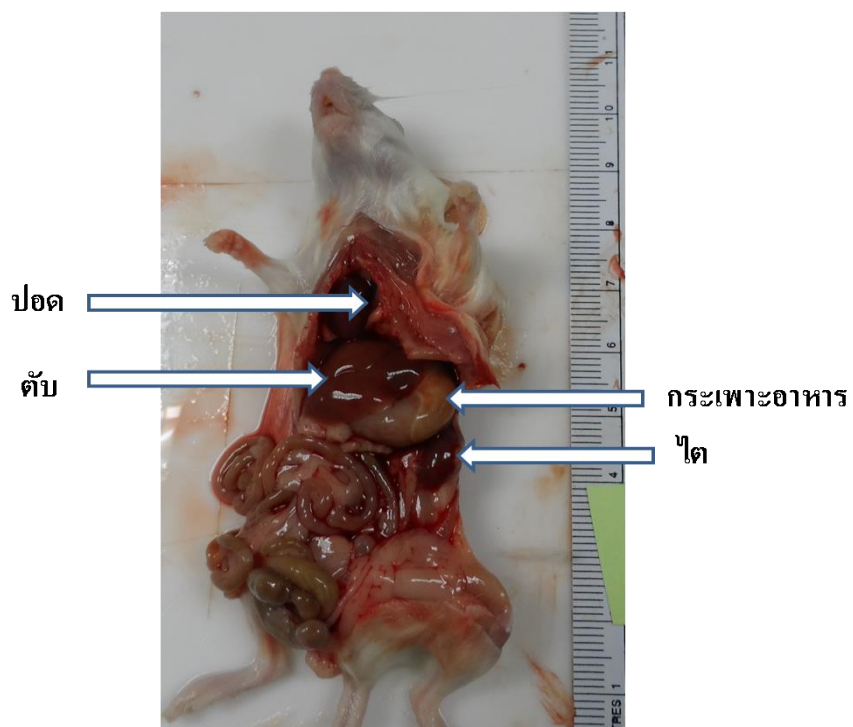
รูปที่ 24 พยาธิวิทยามหภาคของหนูทดลองกลุ่มที่ II



รูปที่ 25 พยาธิวิทยามหาคของหนูทดลองกลุ่มที่ III



รูปที่ 26 พยาธิวิทยามหาคของหนูทดลองกลุ่มที่ IV



รูปที่ 27 พยาธิวิทยาamacของหนูทดลองกลุ่มที่ V