# บทที่ 5
# อภิปรายผลการวิจัย

ไคโตแซนนาโนโนพาร์ทิเคิลเป็นระบบนำส่งวัคซีนทางจมูกที่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากคุณสมบัติของไคโตแซนเป็นพอลิเมอร์ที่พบตามธรรมชาติที่ไม่มีความเป็นพิษ สามารถช่วยเพิ่มการยึดเกาะและการส่งผ่านเยื่อบุผิวของแอนติเจนได้ อีกทั้งการกักเก็บแอนติเจนภายในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลสามารถป้องกันการทำลายแอนติเจนจากเอนไซม์ และภาวะความเป็นกรดจากสารคัดหลั่งในบริเวณเยื่อบุผิวได้ (Kang et al., 2009) โดยเทคนิคการเตรียมตำรับไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลสำหรับนำส่งวัคซีนทางจมูกมีอยู่ด้วยกันหลายเทคนิค แต่เทคนิค ionotropic gelation เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ค่อนข้างมาก เนื่องจากสามารถเตรียมได้ง่าย สารที่ใช้ในการเตรียมไม่เป็นพิษต่อร่างกาย และไม่มีผลต่อความคงตัวของแอนติเจน ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมจากเทคนิค ionotropic gelation เกิดจากอันตรกิริยาระหว่างประจุบวกของไคโตแซนและประจุลบของ Sodium tripolyphosphate (TPP) การปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของไคโตแซน และสัดส่วนการทำอันตรกิริยาระหว่างไคโตแซนและ TPP จะทำให้ได้ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่มีคุณสมบัติทางกายภาพที่แตกต่างกัน ส่วนการกักเก็บแอนติเจนในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล ใช้หลักการของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างประจุลบของแอนติเจน และประจุบวกของไคโตแซน ซึ่งแอนติเจนเป็นโปรตีนที่มีประจุลบ จึงสามารถเปลี่ยนชนิดของแอนติเจนที่จะกักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลได้ (Tiyaboonchai, 2003)

งานวิจัยนี้ใช้โอวัลบูมินเป็นแอนติเจนต้นแบบ โดยเตรียมตำรับไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลด้วยการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลายไคโตแซน เป็น 1, 2 และ 3 mg/mL ซึ่งมีรายงานการวิจัยที่ใช้ความเข้มข้นนี้ในการเตรียมไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลเพื่อกักเก็บโปรตีน (Gan and Wang , 2007; Xu and Du, 2003) จากการทดลองพบว่า ตำรับของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมจากสารละลายไคโตแซนความเข้มข้น 1 mg/mL และ 2 mg/mL มีความไม่คงตัว เกิด aggregation ของตำรับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mohammadpourdounighi et al. (2010) ซึ่งพบการ aggregate ของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่กักเก็บ *Naja naja oxiana* snake venom ที่เตรียมจากสารละลายไคโตแซนความเข้มข้นน้อยกว่า 1.5 mg/mL ทั้งนี้เนื่องจากการเตรียมไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลจากสารละลายไคโตแซนที่มีความเข้มข้นต่ำ จะทำให้ได้ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลมีค่าประจุที่ผิวอนุภาคน้อย แรงผลักระหว่างอนุภาคไม่เพียงพอสำหรับการป้องกันการเกาะกลุ่มของอนุภาค และการกระจาย

ตัวในตัวกลาง (continuous medium) ทำให้ระบบไม่มีความคงตัว เรียกกลไกการเกิดความไม่คงตัวดังกล่าวว่า aggregation โดยทั่วไปไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่มีความคงตัว เมื่ออยู่ในรูป nanosuspension ควรมีประจุบวกที่ผิวอนุภาคสูงกว่า + 30 mV เพื่อให้แรงผลักที่เกิดจากประจุไฟฟ้าที่ผิวอนุภาคมีมากเพียงพอที่จะป้องกันมิให้เกิดการรวมตัวของแต่ละอนุภาค และทำให้อนุภาคยังสามารถกระจายตัวอยู่ได้ในน้ำกระสายยา (vehicle) (Du et al., 2009)

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้สารละลายไคโตแซนความเข้มข้น 3 mg/ml ซึ่งให้ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคลที่มีความคงตัว ผลของการเตรียมตำรับไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลโดยใช้ความเข้มข้นของสารละลาย ไคโตแซน 3 mg/mL โดยปรับเปลี่ยนสัดส่วนไคโตแซนต่อ TPP พบว่า ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมได้ มีขนาดและประจุที่ผิวอนุภาคเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนไคโตแซนที่เพิ่มขึ้น โดยตำรับที่ใช้สัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP เท่ากับ 3:1 และ 4:1 โดยมีขนาดอนุภาคเพิ่มจาก 205.33 ± 21.46 nm เป็น 493.33 ± 41.58 nm และมีประจุที่ผิวอนุภาคเพิ่มจาก 21.33 ± 0.78 mV เป็น 37.70 ± 0.85 mV ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Kim and Kang (2008) ที่พบว่าสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP เท่ากับ 3:1 ทำให้ได้ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดเล็ก และมีค่าประจุที่ผิวอนุภาคสูงกว่าไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมจากสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP ในสัดส่วนที่สูงกว่า และหลังให้ Heptatitis B antigen (HBAg) ที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลตำรับดังกล่าวทางจมูกสัตว์ทดลอง พบว่า สามารถกระตุ้นระดับ IgG ได้ และสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Prego et al. (2010) ซึ่งพบว่า การเตรียมไคโตแซนนาโน พาร์ทิเคิลสำหรับนำส่ง HBAg ด้วยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ จากสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP เท่ากับ 4:1 ทำให้ได้ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดเล็ก และมีประจุที่ผิวอนุภาคสูงกว่าไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมจากสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP เท่ากับ 5:1 สำหรับผลการวิจัยของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมได้จากสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP เท่ากับ 5:1 มีขนาดอนุภาค เท่ากับ 1,166.67 ± 158.85 nm และประจุที่ผิวอนุภาคเท่ากับ 34.50 ± 5.23 mV การที่มีค่าประจุที่ผิวต่ำกว่าอนุภาคที่เตรียมได้จากสัดส่วน 4:1 เนื่องจากมีปริมาณการกักเก็บและการบรรจุโอวัลบูมินในอนุภาคค่อนข้างมาก ซึ่งการกักเก็บที่โปรตีนซึ่งมีประจุเป็นลบในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล ทำให้อนุภาคมีประจุบวกที่ผิวอนุภาคลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Gan and Wang, 2007) ดังนั้นปริมาณการกักเก็บโอวัลบูมินในไคโตแซนนาโน

พาร์ทิเคิลที่เตรียมได้จากสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP เท่ากับ 5:1 จึงมีผลให้ประจุที่ผิวต่ำกว่าอนุภาคที่เตรียมจากสัดส่วน 4:1

สำหรับความสม่ำเสมอของขนาดอนุภาคในตำรับ สามารถประเมินได้จากค่าดัชนีการกระจายขนาดของอนุภาค โดยค่าดัชนีการกระจายขนาดที่น้อยกว่า 0.5 ถือว่าไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมได้มี homogeneity สูง (Kouchak et al., 2012) ดังนั้นอนุภาคที่เตรียมจากสารละลายไคโตแซนความเข้มข้น 3 mg/mL จึงมี homogeneity ทุกตำรับ

การกักเก็บโอวัลบูมินในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลเตรียมจากสารละลายไคโตแซนความเข้มข้น 3 mg/mL พบว่า การกักเก็บลดลงจากร้อยละ 76.49 ± 4.72 เป็น 68.52 ± 6.01 และ 66.77 ± 7.95 เมื่อเพิ่มสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP จาก 3:1 เป็น 4:1 และ 5:1 ตามลำดับ สอดคล้องกับผลการวิจัยของ Gan and Wang (2007) ซึ่งพบว่าแอนติเจนสามารถแสดงประจุลบได้ดีในสารละลาย TPP ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นเบส การลดปริมาณ TPP ในตำรับ ทำให้ความเป็นเบสในขั้นตอนการเตรียมตำรับลดลง ทำให้แอนติเจนแสดงประจุลบลดลง การเกิดอันตรกิริยาระหว่างประจุลบของโปรตีนกับประจุบวกของไคโตแซนจึงลดลง การกักเก็บแอนติเจนของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลจึงลดลงเมื่อลดปริมาณ TPP ในตำรับ

การบรรจุแอนติเจนพบว่า ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมจากสัดส่วนโดยมวลไคโตแซนต่อ TPP ในสัดส่วน 3:1, 4:1 และ 5:1 มีการบรรจุแอนติเจนลดลงจากร้อยละ 33.92 ±1.89, 27.38 ± 1.33 และ 27.10 ± 1.49 ตามลำดับ สอดคล้องกับที่พบในงานวิจัยของ Grenha et al. (2005) ซึ่งกักเก็บอินซูลิน (insulin) ในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลลดลง เมื่อเพิ่มสัดส่วนไคโตแซนต่อ TPP จาก 5:1 เป็น 6:1 ซึ่งมีการบรรจุลดลงจากร้อยละ 29.8 ± 1.4 เป็นร้อยละ 22.3 ± 1.6 เนื่องจากการกักเก็บแอนติเจนและปริมาณของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลลดลง จึงทำให้การบรรจุแอนติเจนในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลลดลงตามสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP ที่เพิ่มขึ้น

เนื่องจากระบบนำส่งและโปรตีนแอนติเจนซึ่งอยู่ในรูป nanosuspension มีความคงตัวต่ำ จึงมีการเตรียมตำรับในรูปผงแห้ง เพื่อเพิ่มความคงตัวของระบบนำส่ง และเพิ่มระยะเวลาการเก็บรักษาตัวอย่าง เช่น freeze drying เป็นวิธีการทั่วไปที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างโปรตีนและวัคซีนให้อยู่ในรูปผงแห้ง แต่เนื่องจากภาวะ freezing stress และ drying stress มีผลต่อความคงตัวตัวของระบบอนุภาคนำส่ง จนอาจนำไปสู่การ aggregation แต่พบว่ากลูโคส (glucose) ซึ่งเมื่อละลายน้ำ จะมี

โครงสร้างเป็น amorphous matrix จึงช่วยป้องกันการเกิด aggregation ในขั้นตอน freeze drying ได้ จึงมีการใช้สารละลายกลูโคสเพื่อเพิ่มความคงตัวให้อนุภาคระหว่างขั้นตอน freeze drying (cryoprotectant) (Abdelwahed et al., 2006) โดยงานวิจัยนี้ใช้สารละลายกลูโคสความเข้มข้น 2.5% w/v เป็น cryoprotectant เพื่อเพิ่มความคงตัวให้อนุภาคไคโตแซนความเข้มข้น 2 mg/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่นิยมใช้ในการเตรียมอนุภาคไคโตแซนในรูปผงแห้งด้วยวิธี freeze drying (Hirsjarvi, 2008; Prego et al., 2010) หลังเตรียมตำรับในรูปผงแห้งพบว่า อนุภาคมีขนาดเพิ่มขึ้น มีประจุบวกที่ผิวอนุภาคเพิ่มขึ้น และค่าดัชนีการกระจายขนาดของอนุภาคเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับก่อนการเตรียมในรูปผงแห้ง เนื่องจากมีการทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างไคโตแซนและ TPP ในระหว่างขั้นตอน freeze drying ทำให้มีการปลดปล่อยแอนติเจนออกจากอนุภาคไคโตแซน เป็นผลให้ประจุบวกที่ผิวอนุภาคเพิ่มขึ้น และขนาดของอนุภาคใหญ่ขึ้น โดยการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวทำให้ขนาดอนุภาคในตำรับแตกต่างกันมากขึ้น ค่าดัชนีการกระจายขนาดของอนุภาคจึงเพิ่มขึ้น (Hafner et al., 2011) อย่างไรก็ตามพบว่าไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมจากสารละลายไคโตแซนความเข้มข้น 3 mg/mL ภายหลังการเตรียมในรูปผงแห้ง โดยผงยาที่เตรียมได้ทุกตำรับสามารถกระจายตัวได้อย่างสมบูรณ์ในน้ำปราศจากไอออน ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมจากสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP เท่ากับ 3:1, 4:1 และ 5:1 มีขนาดอนุภาคหลังการเตรียมในรูปผงแห้งเพิ่มขึ้นเป็น 248.67 ± 29.6 nm, 559.33 ± 17.21 nm และ 1,240.00 ± 62.45 nm ตามลำดับ ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลทุกตำรับแสดงประจุที่ผิวอนุภาคเป็นบวก และมี homogeneity

สำหรับคุณสมบัติที่จำเป็นของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลสำหรับการนำส่งวัคซีนทางจมูก คือ มีขนาดอนุภาคน้อยกว่า 5 μm เพื่อให้สามารถผ่านเยื่อบุจมูกไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้ง systemic immune response และ mucosal immune response ได้ (Kang et al., 2009) จากรายงานงานวิจัยแบบ *in vitro* พบว่า ขนาดอนุภาคขนาดน้อยกว่า 500 nm, 500 nm ถึง 1,000 nm และ 1,000 ถึง 5,000 nm มีความสามารถในการผ่านเยื่อบุผิวและกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้แตกต่างกัน (Rajapaksa et al., 2010; Oyewumi et al., 2010) งานวิจัยนี้จึงคัดเลือกไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่มีขนาดอยู่ในช่วงดังกล่าวเพื่อทดสอบฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง *in vivo* ผลการเตรียมตำรับไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมจากสารละลายไคโตแซนความเข้มข้น 3 mg/mL ด้วยสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP เท่ากับ 3:1, 4:1 และ 5:1 ทำได้ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดเล็ก (248.67 ± 29.6 nm) ขนาดกลาง

(559.33 ± 17.21 nm) และขนาดใหญ่ (1,240.00 ± 62.45 nm) ตามลำดับ จึงเลือกไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลทั้ง 3 ตำรับ เพื่อทดสอบฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันจากการนำส่งวัคซีนทางจมูกในหนูทดลองต่อไป

การนำส่งวันซีนทางจมูกระบบนำส่งต้องผ่านบริเวณเยื่อบุโพรงจมูก ซึ่งมี pH ประมาณ 6.8 (Harikarnpakdee et al., 2006) ก่อนจะเข้าสูกระแสเลือดซึ่งมี pH 7.4 จากนั้นระบบนำส่งจะถูกจับกินโดย Antigen presenting cells (APCs) และถูกนำส่งยัง lysosome ซึ่งมี pH 4.5-5.0 ภายในเซลล์ ทำให้เกิดการปลดปล่อยแอนติเจนจากผลของ pH และการย่อยไคโตแซนจากเอนไซม์ต่างๆ ภายใน lysosome (Mao et al., 2005) ดังนั้นการปลดปล่อยแอนติเจนของระบบนำส่งวัคซีนทางจมูกที่ดีจึงไม่ควรปลดปล่อยแอนติเจนที่ pH 6.8 และ 7.4 ซึ่งเป็น pH ภายในเยื่อบุจมูกและสารน้ำภายในร่างกาย (body fluids) เพื่อไม่ให้เกิดการสูญเสียแอนติเจนระหว่างการนำส่งผ่านเยื่อบุจมูกและกระแสเลือด ทำให้แอนติเจนที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลถูกนำส่งยัง APCs ได้ในปริมาณมาก โดยกลไกการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเกิดจาก APCs นำส่งแอนติเจน ให้ T-lymphocytes และ B-lymphocytes ดังนั้นไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดี จะต้องสามารถปลดปล่อยแอนติเจนภายใน APCs ค่อนข้างสมบูรณ์ เพื่อให้แอนติเจนที่ APCs นำส่งให้ T-lymphocytes และ B-lymphocytes มีปริมาณมาก

ผลการวิจัยพบว่า การปลดปล่อยแอนติเจนจากไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลทั้ง 3 ตำรับ มีลักษณะคล้ายคลึงกัน คือ แอนติเจนถูกปลดปล่อยอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการทดลอง และปลดปล่อยอย่างช้าๆ จนกระทั่งคงที่ในช่วงท้ายของการทดลอง ลักษณะการปลดปล่อยของแอนติเจนจากอนุภาคไคโตแซนใน PBS ดังกล่าวเกิดจากกลไกที่แตกต่างกันของการปลดปล่อยแอนติเจนในแต่ละช่วง โดยการปลดปล่อยในช่วงแรกเกิดจากแอนติเจนที่กักเก็บบริเวณผิวของอนุภาคเป็นหลัก ซึ่งทำให้การปลดปล่อยสามารถเกิดขึ้นได้ง่ายและอย่างรวดเร็ว เรียกการปลดปล่อยช่วงนี้ว่า initial burst release หลังจากนั้นแอนติเจนจะถูกปลดปล่อยเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนกระทั่งคงที่ เรียกการปลดปล่อยช่วงนี้ว่า steady state release ซึ่งเป็นผลจากการปลดปล่อยแอนติเจนที่อยู่ในชั้น matrix ของอนุภาค การปลดปล่อยแอนติเจนเกิดทางรูพรุนของอนุภาค ซึ่งกลไกการปลดปล่อยดังกล่าวเกิดขึ้นได้ยาก และเกิดขึ้นได้ไม่สมบูรณ์ ทำให้ต้องใช้เวลาในการปลดปล่อยค่อนข้างนาน และยังคงมีแอนติเจนหลงเหลือ

ในอนุภาคไคโตแซน ปริมาณการปลดปล่อยจึงไม่ถึง 100% ของปริมาณแอนติเจนที่กักเก็บ (Agnihotri et al., 2004)

การศึกษาผลของ pH ต่อการปลดปล่อยแอนติเจนของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล พบว่าการที่โอวัลบูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลปลดปล่อยใน pH 4.5 ได้ดีกว่า pH 6.8 และ 7.4 ตามลำดับ เนื่องจาก pH ที่ลดลง ทำให้แรงยึดเหนี่ยวของพันธะไฮโดเจนระหว่างไคโตแซนกับ TPP ลดลง อนุภาคจึงเกิดการบวมตัว (swelling) ทำให้แอนติเจนที่ถูกกักเก็บภายในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลถูกปลดปล่อยทางรูพรุนของอนุภาคได้ง่าย (Dudhani and Kosaraju, 2010; Keawchanoon and Yoksan, 2011) อีกทั้ง pH ที่ลดลงทำให้โปรตีนซึ่งมีคุณสมบัติเป็น amphoteric compound แสดงประจุเป็นบวกมากขึ้น ทำให้เกิดแรงผลักระหว่างประจุบวกไคโตแซนกับประจุโปรตีนแอนติเจน (Mao et al., 2005)

นอกจากนี้พบว่า การปลดปล่อยโอวัลบูมินจากไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมจากสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP เท่ากับ 3:1 มีการปลดปล่อยดีกว่าแอนติเจนสัดส่วน 4:1 และ 5:1 ตามลำดับ เนื่องจากไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมจากสัดส่วนไคโตแซนต่อ TPP ต่ำ มีปริมาณการบรรจุแอนติเจนสูง ทำให้แรงยึดเหนี่ยวระหว่างโอวัลบูมินกับไคโตแซนน้อย ทำให้การปลดปล่อยแอนติเจนเกิดขึ้นได้ง่าย (Xu and Du, 2003) นอกจากนี้การใช้สัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP ต่ำ ทำให้ได้อนุภาคที่มีขนาดเล็ก ซึ่งมีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรอนุภาคสูง การปลดปล่อยโอวัลบูมินจากผิวไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลเกิดขึ้นได้ง่ายกว่าไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมจากสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนต่อ TPP สูงกว่า (Gan and Wand, 2007)

ด้วยเหตุนี้ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลทั้ง 3 ตำรับ จึงการปลดปล่อยโอวัลบูมิลได้ใน PBS pH 4.5 ได้ดีกว่า ใน pH 6.8 และ 7.4 และการปลดปล่อยแอนติเจนจากไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่มีขนาดเล็กเกิดได้ดีกว่าไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดกลางและใหญ่ ตามลำดับ โดยลักษณะการปลดปล่อยโอวัลบูมินจากไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลทั้ง 3 ตำรับ ใน pH 4.5 พบว่าช่วงแรกเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและเริ่มคงที่ในวันที่ 2 ของการทดลอง โดยวันที่ 7 ของการทดลองพบว่า มีการปลดปล่อยโอวัลบูมินจากอนุภาคประมาณร้อยละ 90 ของปริมาณโอวัลบูมินทั้งหมดที่กักเก็บในไคโตแซนพาร์ทิเคิล ดังนั้นไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลทั้ง 3 ตำรับ จึงมีลักษณะการปลดปล่อยที่เหมาะสมในการนำส่งวัคซีนทางจมูก อย่างไรก็ตามการปลดปล่อยโอวัลบูมินจากไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะเกิดขึ้นได้

อย่างรวดเร็ว และสมบูรณ์กว่าที่พบการทดลองนี้ เนื่องจากภายในร่างกายมีเอนไซม์และสภาพต่างๆ ที่ช่วยในการปลดปล่อยโอวัลบูมิน

การประเมินความคงตัวของระบบนำส่งวัคซีนด้วยไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล ให้ความสำคัญที่ขนาดของอนุภาค เนื่องจากเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการนำส่งสารผ่านเยื่อบุ และประจุที่ผิวอนุภาค ซึ่งบอกถึงความคงตัวของตำรับหลังกระจายผงยาในน้ำกระสายยา (vehicles) ผลการวิจัยหลังเก็บไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่กักเก็บโอวัลบูมินในรูปผงแห้งที่อุณหภูมิ 4 ˚C นาน 3 เดือน พบว่า ประจุที่ผิวอนุภาคลดลงเมื่อเทียบกับประจุที่ผิวอนุภาคหลังเตรียมเสร็จใหม่ เนื่องจากหมู่อะมิโนของไคโตแซนที่หลงเหลือจากการเกิดอันตรกิริยากับ TPP (residual amino group) ถูกดึงโปรตอน (deprotonation) และกูลโคสซึ่งมีประจุลบจากหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group,-OH) สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่อะมิโนอิสระของไคโตแซน จึงทำให้ค่าประจุที่ผิวอนุภาคลดลง อีกทั้งการเกิดอันตรกิริยาระหว่างกลูโคสกับไคโตแซน สามารถเกิดได้ทั้งไคโตแซน นาโนพาร์ทิเคิลอนุภาคเดียวกัน และระหว่างอนุภาค ทำให้ขนาดของอนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น (Lee, 2004) สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Hafnaer et al. (2011) ซึ่งเก็บอนุภาคไคโตแซนที่กักเก็บ melatonin ในรูปแห้งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ˚C นาน 7 เดือน พบว่าอนุภาคมีขนาดเพิ่มขึ้น และค่าประจุที่ผิวอนุภาคลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับหลังเตรียมเสร็จใหม่ การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพของอนุภาคไคโตแซนเป็นผลมาจากความชื้นที่หลงเหลือในตำรับและอุณหภูมิที่เก็บรักษาตำรับ ซึ่งพบว่า อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 5˚C ช่วยป้องกันการเสียสภาพของตำรับได้

แม้การกักเก็บแอนติเจนในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลซึ่งเตรียมด้วยเทคนิค ionotropic gelation จะช่วยป้องกันการเสียสภาพของโปรตีน (protein denaturation) จากการที่ไม่ใช้ทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) ในการเตรียมตำรับ อย่างไรก็ตาม pH อุณหภูมิ และแรงจากการปั่นเหวี่ยงสารละลายขณะเตรียมตำรับ รวมถึงปัจจัยในการเตรียมอื่นๆ มีผลต่อความคงตัวของแอนติเจนในตำรับ (Lameiro et al., 2006) ทั้งนี้โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structures) ของแอนติเจนมีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติ immunogenicity ทั้งนี้หากเกิดหากแตกหักของโครงสร้างปฐมภูมิ จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขนาดโปรตีน และเพิ่มจำนวนแถบโปรตีนเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ทำให้สามารถใช้ประเมินโครงสร้างปฐมภูมิของแอนติเจน ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งจากเทคนิคดังกล่าวได้ ต่างจากเทคนิคการวัดค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนโดยอาศัยการทำปฏิกิริยาการสารทดสอบกับ

กรดอะมิโน เช่น วิธี BCA protein assay ซึ่งไม่สามารถบอกถึงความคงตัวของแอนติเจนได้ (Bilati et al., 2005; Walker, 2002) การประเมินความคงตัวของโปรตีนแอนติเจนที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมในรูปผงแห้งและเก็บไว้ที่ 4°C นาน 3 เดือน พบว่า แถบโปรตีนที่แยกได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE มีขนาดเท่ากับโอวัลบูมินก่อนเตรียมตำรับ คือ มีขนาดเท่ากับ 44 kDa แสดงให้เห็นว่าโอวัลบูมินที่กักเก็บในไคแซนนาโนพาร์ทิเคิลมีความคงตัวและมีคุณสมบัติ immunogenicity ตลอดการงานวิจัย

จากการประเมินคุณลักษณะของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลทั้ง 3 ตำรับ พบว่า ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลทุกตำรับ มีขนาดอนุภาคในช่วงที่งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันทางจมูก และสามารถปลดปล่อยแอนติเจนได้ดีที่ pH 4.5 โดยมีการปล่อยแอนติเจนที่ pH 6.8 และ 7.4 เพียงเล็กน้อย โดยไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่กักเก็บโอวัลบูมินมีความคงตัวทางกายภาพ และโอวัลบูมินที่กักเก็บภายในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลในรูปผงแห้งที่ 4 °C ไม่เกิดการเสียสภาพ เมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน จึงเลือกใช้ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลทั้ง 3 ตำรับในการทดสอบฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันหลังให้วัคซีนทางจมูกแก่สัตว์ทดลอง

การนำส่งวัคซีนทางจมูกสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดจำเพาะทั้ง humoral immune response (HIR) และ cell mediated immune response (CMIR) ซึ่งวัตถุประสงค์หลักในการนำส่งวัคซีนทางจมูก คือ การกระตุ้น HIR แบบ mucosal immune response ซึ่งเป็นกลไกหลักในการป้องกันและทำลายเชื้อจุลชีพก่อโรคก่อนที่เชื้อจะเข้าสู่ร่างกาย ด้วยการหลั่ง sIgA บริเวณเยื่อบุผิว และยังสามารถกระตุ้น systemic immune response ด้วย IgG ในกระแสเลือด เพื่อทำลายเชื้อจุลชีพก่อโรคหลังเข้าสู่ร่างกาย ต่างจากการให้วัคซีนแบบฉีดที่กระตุ้นเพียง IgG ในกระแสเลือดเท่านั้น (Look et al., 2010) โดยการป้องกันการติดเชื้อจุลชีพ อาศัยการทำงานร่วมกันของ HIR และ CMIR ในการทำลายเชื้อจุลชีพชนิด extracellular pathogens และ intracellular pathogens ตามลำดับ อีกทั้ง CMIR เป็นกลไกการตอบสนองระดับเซลล์ ทำให้หลั่งไซโตคัยน์ชนิดต่างๆ เพื่อกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน โดยไซโตคัยน์ที่สำคัญ ได้แก่ IL-4 ซึ่งกระตุ้นแบ่งตัว และการสร้างแอนติบอดี และ IFN- $\gamma$ ซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้นทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ของ T-lymphocytes และการหลั่งสารจาก cytotoxic T- lymphocyte เพื่อทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อชนิด extracellular pathogens การทำงานของ IL-4 และ IFN-$\gamma$ เป็นแบบ negative feedback ทำให้การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเป็นไปอย่างสมดุล

(Cauley and Lefrancois, 2013; Thakur et al., 2012) ดังนั้นการประเมินฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันหลังให้วัคซีนทางจมูกในหนูทดลอง จึงประเมิน HIR จาก IgG ในซีรัมและ sIgA จากสารคัดหลั่งบริเวณเยื่อบุต่างๆ และ CMIR จากระดับ IL-4 และ IFN-$\gamma$

การประเมินฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลอง เมื่อนำส่งโอวัลบูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดต่างๆ ทางจมูก เปรียบเทียบกับหนูที่ได้สารละลายโอวัลบูมินใน PBS pH 7.4 และหนูทดลองที่ไม่ได้รับสารใดๆ ทางจมูก จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างและประเมินระดับภูมิคุ้มกันชนิดจำเพาะ และประเมินผลข้างเคียงและอาการไม่พึงประสงค์จากการได้รับวัคซีนทางจมูกจากการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสัตว์ทดลองทุกสัปดาห์ ตั้งแต่ก่อนให้วัคซีนและสิ้นสุดการทดลอง ผลการวิจัยไม่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักสัตว์ทดลองทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับหนูทดลองที่ไม่ได้รับสารใดๆ ทางจมูก เมื่อสิ้นสุดการทดลองมีการประเมินพยาธิวิทยามหภาค (gross pathology) จากรูปร่าง ขนาด และสีของปอด ตับ ม้าม และไต ของหนูทดลองที่ได้รับโอวัลบูมินทางจมูกเทียบกับหนูทดลองที่ไม่ได้รับสารใดๆ ทางจมูก ผลการวิจัยไม่พบความแตกต่างทางพยาธิสภาพ จึงสรุปได้ว่าการให้ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่กักเก็บโอวัลบูมินทางจมูก ไม่ทำให้เกิดผลข้างเคียงและอาการอันไม่พึงประสงค์ (Makidon et al., 2008)

ผลการวิจัยพบว่า หนูทดลองที่ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลทางจมูกสามารถกระตุ้นระดับ IgG ได้ดีกว่าโอวัลบูมินในรูปสารสารละลายตลอดการทดลอง สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Vila et al. (2004) ซึ่งพบว่า tetanus toxoid (TT) ที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล ขนาดประมาณ 350-370 nm มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีกว่า TT ในรูปสารละลาย เนื่องจากอนุภาคไคโตแซนมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเปิด tight junction และเพิ่มการยึดเกาะเยื่อบุจมูก ทำให้ระยะเวลาการนำส่งสารเพิ่มขึ้น อีกทั้งการนำส่งวัคซีนผ่าน M cells บริเวณ NALT ในรูปแบบอนุภาคนำส่ง เกิดได้ดีกว่าในรูปแบบสารละลาย ทำให้การนำส่งโอวัลบูมินทางจมูกด้วยไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกระแสเลือดได้ดีกว่าสารละลายโอวัลบูมิน

อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างระหว่างของระดับ OVA specific IgG ที่พบจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันทางจมูกด้วยโอวัลบูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลทั้ง 3 ตำรับ จึงสรุปได้ว่าขนาดของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่ใช้ในการนำส่งโอวัลบูมินทางจมูกไม่มีผลต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Naganoto et al. (2004) ที่ไม่พบความแตกต่างของระดับ IgG จาก

กระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนู rat ทางจมูกจากโอวัลบูมินที่กักเก็บในอนุภาคไคโตแซนขนาด 400 nm, 1 μm และ 3 μm แต่รายงานการวิจัยวิจัยของ Naganoto et al. (2004) ไม่มีการศึกษาความสัมพันธ์ของขนาดไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลต่อ mucosal immune response ซึ่งเป็นกลไกหลักในการป้องกันการติดเชื้อผ่านบริเวณเยื่อบุผิว

สำหรับการตรวจพบ OVA specific IgG ในหนูที่ไม่ได้รับวัคซีน เป็นผลจาการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับแอนติบอดีชนิดอื่น สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Borges et al. (2008) ซึ่งตรวจพบ IgG, sIgA และ cytokine ต่อ HBsAg จากตัวอย่างของหนูทดลองที่ไม่ได้รับ HBsAg ทางจมูกด้วยเทคนิค ELISA โดยมีระดับไม่แตกต่างจากสัตว์ทดลองที่ได้รับแอนติเจนในรูปสารละลายทางจมูก แต่การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้งในหนูทดลองได้รับแอนติเจนในรูปสารละลาย และหนูที่ไม่ได้รับแอนติเจนมีระดับต่ำกว่าหนูทดลองที่รับแอนติเจนที่กับเก็บในอนุภาค alginate coated chitosan nanoparticles อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับที่พบในงานวิจัยนี้

นอกจากการนำส่งวัคซีนทางจมูกจะสามารถกระตุ้น sIgA บริเวณเยื่อบุจมูกที่ได้รับวัคซีนโดยตรงแล้ว ยังสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันบริเวณเยื่อบุอื่นๆ ได้ เช่น เยื่อบุทางเดินอาหาร เยื่อบุทางเดินปัสสาวะ และอวัยวะสืบพันธุ์ เช่นที่พบในรายงานการวิจัยของ Shim et al. (2007) โดยศึกษาการนำส่ง Shigella ribosome ทางจมูก ซึ่งสามารถตรวจพบ sIgA ได้ทั้งระบบทางเดินอาหารจากตัวอย่างน้ำลายและมูลสัตว์ทดลอง ระบบทางเดินหายใจจากตัวอย่างน้ำล้างโพรงจมูกและปอด ระบบทางเดินปัสสาวะ และอวัยวะสืบพันธุ์จากน้ำล้างช่องคลอด

ผลการวิจัยพบว่า สามารถตรวจพบระดับ sIgA ในน้ำล้างโพรงจมูก น้ำลาย มูล และน้ำล้างช่องคลอดของสัตว์ทดลองที่ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล โดยมีระดับ OVA specific sIgA สูงกว่าที่พบในหนูทดลองที่ได้รับสารละลายโอวัลบูมินทางจมูก ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างของระดับภูมิคุ้มกันระหว่างหนูทดลองที่ได้โอวัลบูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่มีขนาดต่างกันทั้ง 3 ตำรับ เช่นเดียวกับผลการวิจัยที่พบในการกระตุ้น systemic immune response แต่พบแนวโน้มของการกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งในน้ำล้างช่องคลอด น้ำล้างโพรงจมูก และน้ำลาย ที่เพิ่มขึ้นตามขนาดของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Krishnakumar et al. (2012) ที่นำส่ง HBsAg ที่กักเก็บใน TMC-coated PLGA nanoparticles ทางจมูกหนู rat โดยอนุภาคนำส่งมีขนาดเท่ากับ 276 nm, 445 nm และ 729 nm ผลการวิจัยพบว่าอนุภาคมีการ

ปลดปล่อยแอนติเจนใกล้เคียงกัน มีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันบริเวณเยื่อบุผิวเพิ่มขึ้นเมื่อขนาดของระบบนำส่งที่ลดลง เนื่องจากอนุภาคที่มีขนาดเล็กสามารถนำส่งแอนติเจนไปยังเนื้อเยื่อน้ำเหลืองได้ดีกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ (Kobiasi et al., 2012) อย่างไรก็ตามไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าวในมูลสัตว์ทดลอง เนื่องจากระดับ sIgA มูลสัตว์ทดลองทั้งชนิดที่จำเพาะและไม่จำเพาะต่อโอวัลบูมินมีปริมาณสูงเมื่อเทียบกับตัวอย่างจากบริเวณเยื่อบุอื่น

การประเมินการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ cell-mediated immune response (CMIR) หลังให้วัคซีน ผลการประเมินระดับ IFN-γ ที่หลั่งจาก splenocytes ของหนูทดลองที่ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดต่างๆ ทางจมูก พบว่าหนูที่ได้รับไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดเล็ก และขนาดกลางมีระดับ IFN-γ สูงกว่าหนูทดลองที่ได้รับไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดใหญ่และสารละลายโอวัลบูมิน ซึ่งเป็นผลจากไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดเล็กและขนาดกลางที่สามารถนำส่งโอวัลบูมินผ่านเยื่อบุจมูกไปยังม้ามได้ดีกว่าไคโตแซนขนาดใหญ่และสารละลาย ผลการวิจัยสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Vila et al. (2005) ที่ศึกษานำส่ง tetanous toxoid (TT) ซึ่งกักเก็บในอนุภาค PLA-PEG ขนาด 200 nm, 1.5 μm, 5 μm และ 10 μm ตามลำดับ พบว่าอนุภาคขนาดเล็กถูกนำส่งไปยังม้ามและอวัยวะน้ำเหลืองต่างๆ ได้ดีกว่าอนุภาคขนาดใหญ่และ TT ในรูปสารละลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

นอกจากที่อนุภาคนำส่งขนาดเล็กสามารถนำส่งแอนติเจนยังอวัยวะน้ำเหลืองได้ดีแล้ว ยังพบว่าอนุภาคขนาดเล็กสามารถกระตุ้นการทำงานของ antigen presenting cells (APCs) ได้ดีกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ ดังรายงานการวิจัยแบบ *in vitro* ของ Yue et al. (2010) ซึ่งพบว่าอนุภาคไคโตแซนขนาดเล็กถูกกักเก็บเข้าสู่ macrophages ได้ดีกว่าอนุภาคไคโตแซนขนาดใหญ่ ทำให้อนุภาคที่มีขนาด 0.43 μm และ 1.9 μm ถูกนำส่งเข้าเซลล์ได้ดีกว่าอนุภาคขนาด 4.8 μm ทำให้อนุภาคขนาดเล็กสามารถกระตุ้นการหลั่ง IFN-γ ได้สูงกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ และสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Krishnakumar et al., (2012) ซึ่งพบว่า TMC-coated PLGA nanoparticles ขนาดเล็กสามารถนำส่ง HBs Ag ให้กับ dendritic cell ได้ดีกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ นอกจากอนุภาคนำส่งขนาดเล็กสามารถกระตุ้นการหลั่ง IFN- γ จาก splenocytes ได้ดีกว่าอนุภาคขนาดใหญ่แล้ว ยังพบว่าอนุภาคขนาดเล็กสามารถกระตุ้น cytotoxic T-lymphocyte (CTL) ในกระแสเลือดได้ดีกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ เช่นที่พบในรายงานการวิจัยของ Joshi et al. (2013) ซึ่งพบว่า อนุภาค Poly (lactide-co-

glycolide) (PLGA) ขนาดเล็กสามารถนำส่งโอวัลบูมินให้แก่ dendritic cell ได้ดีกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ และเมื่อให้ฉีดวัคซีนแบบ Intraperitoneal injection ในหนูทดลองพบว่า อนุภาคขนาดเล็กสามารถเพิ่มปริมาณ $CD8^+$ cytolytic T-lymphocyte ในกระแสเลือดได้มากกว่าอนุภาคขนาดใหญ่

สำหรับการหลั่ง IL-4 จาก splenocytes พบว่า หนูทดลองที่ได้รับโอวัลบูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดเล็กทางจมูก สามารถกระตุ้นการหลั่ง IL-4 ได้ดีกว่าโอวัลบูมินที่กักเก็บในไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดใหญ่และสารละลายโอวัลบูมิน สอดคล้องกับระดับ IgG ที่พบในสัปดาห์สุดท้ายของการทดลอง และสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Henriksen-Lacey et al. (2011) ที่ให้แอนติเจนที่กักเก็บในไลโปโซม (liposome) ขนาดต่างๆในสัตว์ทดลอง พบว่า อนุภาคขนาดเล็กมีความสามารถในการนำส่งแอนติเจนไปยังม้ามได้ดีกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ จึงกระตุ้นการหลั่ง IL-10 จาก splenocytes ได้ดีกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ โดย IL-10 มีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของ $CD4^+$ helper T-lymphocyte type II ทำให้เกิดการหลั่ง IL-4 เพิ่มขึ้นได้

อย่างไรก็ตาม รายงานการวิจัยแบบ *in vitro* ของ Kanchan et al. (2007) ซึ่งพบว่าอนุภาค polylactide (PLA) ขนาดใหญ่ (2-8 μm) สามารถกระตุ้นการหลั่ง IL-4 จาก macrophages ได้ดีกว่าอนุภาค PLA ขนาดเล็ก (200-600 nm) ทั้งนี้พบว่าอนุภาคขนาดใหญ่ไม่ได้ถูกกักเก็บเข้าสู่เข้าเซลล์ แต่การกระตุ้นภูมิคุ้มกันเกิดจากแอนติเจนที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคนำส่งไปกระตุ้นเซลล์ทางภูมิคุ้มกันโดยตรง การที่อนุภาคขนาดใหญ่มีการปลดปล่อยแอนติเจนช้ากว่าอนุภาคขนาดเล็ก จึงทำให้แอนติเจนมีเวลากระตุ้นเซลล์ทางภูมิคุ้มกันได้นานกว่า ต่างจากผลการวิจัยนี้ที่พบว่าไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลทั้ง 3 ตำรับ มีการปลดปล่อยแอนติเจนใกล้เคียงกัน จึงไม่พบความสัมพันธ์ในลักษณะเดียวกับรายงานการวิจัยของ Kanchan et al. (2007) แต่การที่ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดเล็กซึ่งถูกนำส่งทางจมูกไปยังอวัยวะทางภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดใหญ่ จึงทำให้ปริมาณของแอนติเจนที่สัมผัสเซลล์ทางภูมิคุ้มกันที่นำส่งด้วยไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดเล็กมากกว่าไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาดใหญ่ จึงกระตุ้นภูมิคุ้มกันการหลั่ง IL-4 ได้ดีกว่า และให้ผลการทดลองแตกต่างจากการทดลองแบบ *in vitro* ของ Kanchan et al. (2007)