

ห้องสมุดกลางวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



E47321

# การนำแร่ใยหินออกซิเจนเข้าสู่มวลแร่โครไฟต์โดยใช้เลเซอร์

นางสาวศุภกัญญา ตันตระกูล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเอกวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเกษตรกรรม ภาควิชาเกษตรกรรม

คณะเกษตรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



600254807

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



E47321

การนำส่งสารด้านออกซิเดชันเข้าสู่เซลล์แมคโครฟาจโดยใช้ลิโปโซม

นางสาวศุภกัญญา ตันตระบัณฑิตย์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชกรรม ภาควิชาเภสัชกรรม

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



4 8 7 6 6 0 8 0 3 3

CELLULAR DELIVERY OF ANTIOXIDANTS TO MACROPHAGES  
BY LIPOSOMES

Miss Suphakanya Tantrabundit

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Pharmaceutics

Department of Pharmacy

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

|                          |                                                                  |
|--------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Thesis Title             | CELLULAR DELIVERY OF ANTIOXIDANTS TO<br>MACROPHAGES BY LIPOSOMES |
| By                       | Miss Suphakanya Tantrabundit                                     |
| Field of Study           | Pharmaceutics                                                    |
| Thesis Principal Advisor | Assistant Professor Nontima Vardhanabhuti, Ph.D.                 |
| Thesis Co-advisor        | Assistant Professor Wacharee Limpanasithikul, Ph.D.              |

---

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in  
Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....*Pornpen Pramyothin*..... Dean of the Faculty of  
Pharmaceutical Sciences  
(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....*Uthai Suwanakoot*..... Chairman  
(Associate Professor Uthai Suwanakoot, Ph.D.)

.....*Nontima V.*..... Thesis Principal Advisor  
(Assistant Professor Nontima Vardhanabhuti, Ph.D.)

.....*Wacharee Lim*..... Thesis Co-advisor  
(Assistant Professor Wacharee Limpanasithikul, Ph.D.)

.....*Nonglukana Sriubolmas*..... Member  
(Associate Professor Nonglukana Sriubolmas, Ph.D.)

.....*Waraporn Suwakul*..... Member  
(Associate Professor Waraporn Suwakul, Ph.D.)

ศุภกัญญา ตันตระกูล: การนำส่งสารต้านออกซิเดชันเข้าสู่เซลล์แมโครฟาจโดยใช้ลิโปโซม. (CELLULAR DELIVERY OF ANTIOXIDANTS TO MACROPHAGES BY LIPOSOMES) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.นนทิมา วรธนะภูติ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร.วัชร ลิมปณิสติกุล, 104 หน้า.

**E 47321**

แมโครฟาจเป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในการกำจัดจุลชีพ โดยการกินและการหลั่งสารที่มีพิษต่อเชื้อโรค เช่น ไนตริกออกไซด์และอนุมูลอิสระอื่นๆ การสร้างอนุมูลอิสระที่มากเกินไปทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อของร่างกาย และนำไปสู่การเกิดพยาธิสภาพที่รุนแรงได้ สารต้านออกซิเดชันอาจช่วยบรรเทาปัญหาเหล่านี้ได้ เนื่องจากสารต้านออกซิเดชันมีลักษณะทางเคมีกายภาพที่ไม่เหมาะสมหลายประการ ทำให้การนำสารเหล่านี้เข้าสู่เซลล์แมโครฟาจโดยตรงทำได้ยาก การศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินว่าลิโปโซมเป็นระบบที่เหมาะสมในการนำส่งสารต้านออกซิเดชันเข้าสู่เซลล์แมโครฟาจหรือไม่ สารต้านออกซิเดชันที่นำมาใช้คือ แอลฟา-โทโคเฟอรอลและเอ็น-อะเซทิลซิสเทอีน ซึ่งเป็นสารต้นแบบสำหรับสารที่ไม่ชอบน้ำและสารที่ชอบน้ำตามลำดับ โดยทำการศึกษาผลในการเติมสารต้านออกซิเดชันในลิโปโซมต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์แมโครฟาจชนิด J774A.1 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของส่วนประกอบของลิโปโซมและการใช้ลิพิดที่ให้ประจุลบ 2 ชนิด คือ ไดเซทิลฟอสเฟตและฟอสฟาทีดิลกลีเซอรอลเดิมลงในผนังของลิโปโซม ในปริมาณ 10 โมลเปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงเซลล์ J774A.1 ร่วมกับสารต้านออกซิเดชัน ลิโปโซมเปล่า หรือลิโปโซมที่บรรจุสารต้านออกซิเดชัน รวมทั้งการให้สารละลายสารต้านออกซิเดชันร่วมกับลิโปโซมชนิดต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นกระตุ้นเซลล์ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววัดผลการสร้างไนตริกออกไซด์โดยใช้ปฏิกิริยากริสต์ โดยใช้กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์เพียงอย่างเดียวเป็นกลุ่มควบคุม แล้วเปรียบเทียบผลยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในแต่ละกลุ่ม พบว่าการมีสารต้านออกซิเดชันไม่ว่าจะอยู่ในลิโปโซม หรืออยู่ร่วมกับลิโปโซมเปล่าไม่ทำให้การยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์เพิ่มขึ้นจากเซลล์ที่ได้รับลิโปโซมเปล่า ในทางตรงกันข้ามการมีสารต้านออกซิเดชันทั้งสองชนิดกลับมีผลการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ของลิโปโซมเปล่า ซึ่งทั้งลิโปโซมที่มีประจุลบและไม่มีประจุก็ให้ผลเช่นเดียวกัน นอกจากนี้การบรรจุเอ็น-อะเซทิลซิสเทอีนในลิโปโซมที่มีประจุลบทำให้เกิดพิษอย่างรุนแรงกับเซลล์ แต่การให้เอ็น-อะเซทิลซิสเทอีนกับลิโปโซมเปล่าที่มีประจุลบหรือการให้ลิโปโซมประจุลบที่มีเอ็น-อะเซทิลซิสเทอีนบรรจุอยู่โดยไม่มีเอ็น-อะเซทิลซิสเทอีนอิสระอยู่ภายนอกไม่ทำให้เกิดพิษกับเซลล์ เมื่อศึกษาโดยใช้ลิโปโซมที่มีส่วนประกอบของไดเซทิลฟอสเฟตและสารละลายแคลซินซีให้เห็นว่าลิโปโซมที่ประกอบด้วยไดเซทิลฟอสเฟตที่มีเอ็น-อะเซทิลซิสเทอีนอยู่ภายในอาจทำให้เกิดพิษต่อเซลล์โดยการทำให้เอ็น-อะเซทิลซิสเทอีนอิสระเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้น อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาที่ละเอียดขึ้นเพื่อหากลไกที่แท้จริง จากผลการทดลองโดยรวมชี้ให้เห็นว่า เมื่อใช้ลิโปโซมร่วมกับสารต้านออกซิเดชันอาจทำให้เกิดผลด้านขึ้นเนื่องจากลิโปโซมมีผลในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์อยู่แล้ว ดังนั้นลิโปโซมจึงไม่ใช่ระบบที่ดีในการนำส่งสารต้านออกซิเดชันเข้าสู่เซลล์แมโครฟาจ

ภาควิชา เกษตรกรรม

สาขาวิชา เกษตรกรรม

ปีการศึกษา 2551

ลายมือชื่อนิสิต.....ศุภกัญญา ตันตระกูล

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....



## 4876608033 : MAJOR PHARMACY

KEY WORD: ANTIOXIDANTS / LIPOSOMES / MACROPHAGES / NITRIC OXIDE

SUPHAKANYA TANTRABUNDIT: CELLULAR DELIVERY OF  
ANTIOXIDANTS TO MACROPHAGES BY LIPOSOMES. THESIS PRINCIPAL  
ADVISOR: ASST. PROF. NONTIMA VARDHANABHUTI, Ph.D. THESIS  
COADVISOR: ASST. PROF. WACHAREE LIMPANASITHIKUL, Ph.D. 104 pp.

E47321

Macrophages play a predominant role in eliminating invading microorganisms by phagocytosis and secretion of cytotoxic substances such as nitric oxide (NO) and other free radicals. Excessive production of these radicals can cause oxidative damages to surrounding host tissues, which lead to severe pathological conditions. Antioxidants may help to alleviate these problems. Due to several disadvantages in the physicochemical properties of antioxidants, a feasible delivery system for intracellular delivery of these molecules to macrophages is desirable. The aim of this study was to investigate whether liposomes would be a good candidate for intracellular delivery of antioxidants to macrophage cells.  $\alpha$ -Tocopherol and *N*-acetylcysteine (NAC) were used as models for lipophilic and hydrophilic antioxidants in the study, respectively. The effects of incorporation of antioxidants into liposomes on NO production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated J774A.1 cells were investigated. Effects of liposome composition and inclusion of negatively charged lipids [dicetylphosphate (DCP) and phosphatidylglycerol] at 10 mol% into liposome bilayers were also examined. J774A.1 macrophage cells were incubated in the presence of antioxidants, blank liposomes, or antioxidant-loaded liposomes, as well as in the co-existence of free antioxidants and liposome preparations for 24 hr., followed by cell stimulation using 0.125  $\mu$ g/ml LPS for another 24 hr. NO production was detected by Griess reaction. NO production from LPS-stimulated J774A.1 cells was used as the baseline control. The inhibitory effect of the treatment on NO production was compared among the treatments. The results suggested that the presence of antioxidants, either encapsulated in or co-incubated with liposomes, did not have any synergistic nor additive effect with liposomes. On the contrary, the inhibitory effect on NO production seen with blank liposomes was reduced by both antioxidants. Both neutral and negatively charged liposomes gave comparable results. In addition, NAC-loaded negatively charged liposomes in the presence of free NAC, but not co-incubation of NAC solution with blank liposomes or NAC-loaded negatively charged liposomes without free NAC, exerted severe cytotoxic effect on J774A.1 cells. Further investigation with liposomes containing DCP and calcein solution indicated that NAC-encapsulated negatively charged liposomes might cause cytotoxicity by increasing free NAC uptake into the cells. However, a more refined experiment would be necessary to establish the exact mechanism. Due to the intrinsic inhibitory effect of liposomes on NO production, the overall results of this study indicated that an antagonistic effect might occur if liposomes were used concomitantly with antioxidants. Thus, liposomes might not be a good candidate for antioxidant delivery into the macrophage cells.

Department: Pharmacy

Field of study: Pharmaceutics

Academic year: 2008

Student's signature: ..... *Suphakanya T.* .....

Principal Advisor's signature: ..... *Nontima V.* .....

Co-advisor's signature: ..... *Wacharee W.* .....

## ACKNOWLEDGEMENTS

First of all, I would like to express my gratitude to my advisor Assistant Professor Nontima Vardhanabhuti, Ph.D., for suggesting the main topic of this study and for providing excellent working facilities. I am most grateful for her scientific guidance as well as for her advice, constant enthusiasm, and encouragement, all of which made the completion of this study possible.

I would like to express my appreciation and grateful thanks to my co-advisor, Assistant Professor Wacharee Limpanasithikul, Ph.D., for her valuable suggestion, support and kindness.

I thank most sincerely the reviewers of this thesis: Associate Professor Uthai Suvanakoot, Ph.D., the chairman of my thesis examination committee, as well as other committee members. I am grateful to Associate Professor Nongluksna Sriubolmas, Ph.D., for her constructive criticism and for giving me valuable suggestions. I am grateful to Associate Professor Waraporn Suwakul, Ph.D. for spending her valuable time and suggestion for the analytical methods and for the Thermo Hypersil® BDS column used in this study.

I am very grateful to Assistant Professor Pol. Lt. Walaisiri Muangsiri, Ph.D., for spending her valuable time and suggestion for the analytical method by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). I am very grateful to Dusadee Charnvanich for spending her valuable time and suggestion for experimental designs.

I appreciate the Pharmacokinetics Research Unit for allowing me to use the HPLC system. I would like to express my thanks to the Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and to Associate Professor Parkpoom Tengamnuay, Ph.D., for the use of cell culture laboratories.

Special thanks are extended to the support and grants from the Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, the Graduate School, Chulalongkorn University, and Mahasarakham University. Also, I would like to thank all staff members of Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences and Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for their support and encouragement.

Finally, greatest thanks to my family for their everlasting love, understanding, encouragement, and continued support during the course of my education.



# CONTENTS

|                                                                                                                 | Page |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ABSTRACT (THAI).....                                                                                            | iv   |
| ABSTRACT (ENGLISH) .....                                                                                        | v    |
| ACKNOWLEDGEMENTS.....                                                                                           | vi   |
| CONTENTS.....                                                                                                   | vii  |
| LIST OF TABLES.....                                                                                             | ix   |
| LIST OF FIGURES.....                                                                                            | x    |
| ABBREVIATIONS.....                                                                                              | xii  |
| CHAPTER                                                                                                         |      |
| I INTRODUCTION.....                                                                                             | 1    |
| II LITERATURE REVIEW .....                                                                                      | 6    |
| Activated macrophages in immune response.....                                                                   | 6    |
| Antioxidants.....                                                                                               | 13   |
| Liposomes for macrophage targeting.....                                                                         | 16   |
| III MATERIALS AND METHODS.....                                                                                  | 19   |
| Materials.....                                                                                                  | 19   |
| Equipment.....                                                                                                  | 20   |
| Methods.....                                                                                                    | 22   |
| Maintenance of J774A.1 cells.....                                                                               | 22   |
| Determination of optimal cell density and lipopolysaccharide<br>concentration for J774A.1 cell stimulation..... | 22   |
| Determination of optimal antioxidant concentrations for NO inhibition<br>in LPS-stimulated J774A.1 cells.....   | 23   |
| Preparation of liposomes.....                                                                                   | 25   |
| Determination of TOC and NAC encapsulation efficiencies in<br>liposomes.....                                    | 27   |
| Effects of antioxidant/liposome treatments on NO production of<br>J774A.1 cells.....                            | 29   |
| Effect of liposomes composition on cellular uptake by J774A.1 cells....                                         | 31   |
| Effect of NAC-load negatively charged liposomes on cell viability.....                                          | 32   |



**Page**

|                                                                                                                       |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Effect of negatively charged liposomes on membrane permeability of<br>a model water-soluble compound.....             | 33  |
| Statistical analysis.....                                                                                             | 34  |
| IV RESULTS.....                                                                                                       | 35  |
| Determination of optimal cell density and lipopolysaccharide concentration<br>for J774A.1 cell stimulation.....       | 35  |
| Determination of optimal antioxidant concentrations for NO inhibition in<br>LPS-stimulated J774A.1 cells.....         | 36  |
| Effects of blank liposomes on NO production in LPS-stimulated J774A.1<br>cells.....                                   | 39  |
| Effects of antioxidant-loaded liposomes on NO production in LPS-<br>stimulated J774A.1 cells.....                     | 44  |
| Effects of co-incubation of blank liposomes and antioxidants on NO<br>production in LPS-stimulated J774A.1 cells..... | 49  |
| Effects of liposome composition on cellular uptake by J774A.1 cells.....                                              | 53  |
| Effect of NAC-loaded negatively charged liposomes on cell viability.....                                              | 54  |
| Effect of negatively charged liposomes on membrane permeability of<br>a model water-soluble compound.....             | 55  |
| V DISCUSSION.....                                                                                                     | 57  |
| VI CONCLUSIONS.....                                                                                                   | 62  |
| REFERENCES.....                                                                                                       | 63  |
| APPENDICES.....                                                                                                       | 69  |
| VITA.....                                                                                                             | 104 |

LIST OF TABLES

| Table                                                      | Page |
|------------------------------------------------------------|------|
| 1    Some cytokines secreted by activated macrophages..... | 10   |



## LIST OF FIGURES

| Figure                                                                                                     | Page |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1 Multiple receptors in phagocytic recognition of apoptotic cells and pathogens.....                       | 8    |
| 2 Schematic diagram of LPS-induced signaling pathway of the host inflammatory response in macrophages..... | 11   |
| 3 Mechanisms of antioxidants in protection of cellular oxidative stress .....                              | 14   |
| 4 Effects of cell density and LPS concentration on NO production in J774A.1 cells.....                     | 35   |
| 5 Effect of TOC concentration on NO production in LPS-stimulated J774A.1 cells.....                        | 37   |
| 6 Effect of TOC concentration on cell viability of J774A.1 cells by MTT assay.....                         | 37   |
| 7 Effect of NAC concentration on NO production in LPS-stimulated J774A.1 cells.....                        | 38   |
| 8 Effect of NAC concentration on cell viability of J774A.1 cells by MTT assay.....                         | 39   |
| 9 Effect of PC/CH liposome concentration on NO production in LPS-stimulated J774A.1 cells.....             | 40   |
| 10 Effect of PC/CH liposome concentration on cell viability of J774A.1 cells by MTT assay.....             | 40   |
| 11 Effect of PC/CH/DCP liposome concentration on NO production in LPS-stimulated J774A.1 cells.....        | 41   |
| 12 Effect of PC/CH/DCP liposome concentration on cell viability of J774A.1 cells by MTT assay.....         | 42   |
| 13 Effect of PC/CH/PG liposome concentration on NO production in LPS-stimulated J774A.1 cells.....         | 43   |
| 14 Effect of PC/CH/PG liposome concentration on cell viability of J774A.1 cells by MTT assay.....          | 43   |
| 15 Inhibitory effect of TOC-loaded PC liposomes on NO production in LPS-stimulated J774A.1 cells.....      | 45   |

| <b>Figure</b> | <b>Page</b>                                                                                                                                   |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 16            | Inhibitory effect of TOC-loaded PC/DCP liposomes on NO production in LPS-stimulated J774A.1 cells.....46                                      |
| 17            | Inhibitory effect of TOC-loaded PC/PG liposomes on NO production in LPS-stimulated J774A.1 cells..... 46                                      |
| 18            | Inhibitory effect of NAC-loaded PC/CH liposomes on NO production in LPS-stimulated J774A.1 cells..... 48                                      |
| 19            | Effect of NAC-loaded PC/CH/DCP liposomes on cell viability of J774A.1 cells by MTT assay.....48                                               |
| 20            | Effect of NAC-loaded PC/CH/PG liposomes on cell viability of J774A.1 cells by MTT assay..... 49                                               |
| 21            | Inhibitory effect of co-incubation with blank PC liposomes and TOC dispersion on NO production in LPS-stimulated J774A.1 cells.....50         |
| 22            | Inhibitory effect of co-incubation with blank PC/DCP liposomes and TOC dispersion on NO production in LPS-stimulated J774A.1 cells..... ..50  |
| 23            | Inhibitory effect of co-incubation with blank PC/PG liposomes and TOC dispersion on NO production in LPS-stimulated J774A.1 cells.....51      |
| 24            | Inhibitory effect of co-incubation with blank PC/CH liposomes and NAC solution on NO production in LPS-stimulated J774A.1 cells .....52       |
| 25            | Inhibitory effect of co-incubation with blank PC/CH/DCP liposomes and NAC solution on NO production in LPS-stimulated J774A.1 cells..... ..52 |
| 26            | Inhibitory effect of co-incubation with blank PC/CH/PG liposomes and NAC solution on NO production in LPS-stimulated J774A.1 cells..... 53    |
| 27            | Effect of type of liposomes and contact time on intracellular uptake of calcein in J774A.1 cells..... 54                                      |
| 28            | Effect of NAC-loaded PC/CH/DCP liposomes without free NAC on cell viability of J774A.1 cells by MTT assay..... 55                             |
| 29            | Effect of PC/CH/DCP liposomes on intracellular uptake of calcein solution in J774A.1 cells.....56                                             |



## ABBREVIATIONS

|                |                                                          |
|----------------|----------------------------------------------------------|
| ANOVA          | analysis of variance                                     |
| °C             | degree Celsius                                           |
| CV             | coefficient of variation                                 |
| CH             | cholesterol                                              |
| DCP            | dicetylphosphate                                         |
| DMEM           | Dulbecco's Modified Eagle's Medium                       |
| DMSO           | dimethyl sulphoxide                                      |
| et al.         | <i>et alii</i> , 'and others'                            |
| FBS            | fetal bovine serum                                       |
| g              | gram                                                     |
| GSH            | glutathione                                              |
| hr             | hour                                                     |
| HPLC           | high performance liquid chromatography                   |
| IFN- $\gamma$  | interferon-gamma                                         |
| IL             | interleukins                                             |
| LPS            | lipopolysaccharide                                       |
| mg             | milligram                                                |
| min            | minute                                                   |
| ml             | milliliter                                               |
| n              | sample size                                              |
| NAC            | <i>N</i> -acetylcysteine                                 |
| NO             | nitric oxide                                             |
| NOS            | nitric oxide synthase                                    |
| pH             | the negative logarithm of the hydrogen ion concentration |
| PA             | phosphatidic acid                                        |
| PBS            | phosphate buffer                                         |
| PC             | phosphatidylcholine                                      |
| PG             | phosphatidylglycerol                                     |
| PS             | phosphatidylserine                                       |
| R <sup>2</sup> | coefficient of determination                             |

|               |                                 |
|---------------|---------------------------------|
| RES           | reticuloendothelial system      |
| S.D.          | standard deviation              |
| TGF- $\beta$  | transforming growth factor-beta |
| TLR           | Toll-like receptor              |
| TOC           | $\alpha$ -tocopherol            |
| TNF- $\alpha$ | tumor necrosis factor-alpha     |
| UV            | ultraviolet                     |
| $\mu\text{g}$ | microgram                       |
| $\mu\text{m}$ | micrometer                      |