



รายงานฉบับสมบูรณ์ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้ ประเภทเงินอุดหนุน
การวิจัยจากรัฐบาลประจำปีงบประมาณ 2560

แผนงานวิจัยเรื่อง

การศึกษาและพัฒนาแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์เพื่อใช้เป็นสารเสริมฤทธิ์วัคซีน
Study and development of mannan oligosaccharides for vaccine adjuvants

จัดทำโดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.พัชรี ฤทธิประจักษ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุวัฒน์ ผดุงรส

อาจารย์ ดร.นำพล อินสิน

คณะทันตแพทยศาสตร์ และคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันสารเสริมฤทธิ์ที่ผ่านการรับรองและได้รับใบอนุญาตให้ใช้ได้ของคนนั้นยังคงมีปัญหาในการใช้งาน คือ ไม่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้ได้ในทิศทางที่ต้องการได้อย่างเหมาะสม ไม่สามารถใช้ได้กับวัคซีนทุกชนิด และมีคุณสมบัติทางเคมีที่ไม่สามารถเข้ากันได้กับแอนติเจนบางชนิด ดังนั้นการพัฒนาสารเสริมฤทธิ์ชนิดใหม่จึงเป็นปัจจัยสำคัญช่วยในการพัฒนาวัคซีนให้ประสบความสำเร็จ จากปัญหาดังกล่าวข้างต้น แผนงานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายหลักในการพัฒนาสารเสริมฤทธิ์วัคซีนชนิดใหม่ เพื่อให้มีทางเลือกมากขึ้นในการนำไปใช้ประโยชน์ในการป้องกันและรักษาโรค ซึ่งคณะผู้วิจัยมีความสนใจในการศึกษาและพัฒนาสารแมนแนนอลิโกแซคคาไรด์เนื่องเป็นสารคาร์โบไฮเดรตธรรมชาติ สามารถถูกย่อยสลายได้ในร่างกายและไม่มีเมตาโบไลต์ที่เป็นพิษ และสามารถกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากหลักฐานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแมนแนนของเชื้อรา *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นเชื้อราไม่ก่อโรค (non-pathogenic fungi) และ *Candida spp.* ซึ่งเป็นเชื้อราที่พบได้ในร่างกายมนุษย์ (commensal fungi) มีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังมีหลักฐานแสดงว่าแมนแนนที่มีโครงสร้างแตกต่างกันจะสามารถกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้แตกต่างกันด้วย ผลผลิตหลักที่จะได้จากแผนงานวิจัยนี้ คือ ชนิดแมนแนนที่สามารถกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้คณะผู้วิจัยมีความคาดหวังว่าการร่วมมือกันระหว่างสหสาขาวิชาในแผนงานวิจัยนี้ จะสามารถพัฒนาองค์ความรู้และนวัตกรรมเพื่อก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดทางการแพทย์ และเพื่อสร้างสมดุลทางเศรษฐกิจของประเทศไทยในอนาคต

สารบัญ

| | |
|---|----|
| กิตติกรรมประกาศ..... | 0 |
| บทคัดย่อ | 2 |
| บทนำ | 12 |
| วัตถุประสงค์แผนงานวิจัย..... | 14 |
| โครงการย่อยที่ 1 คุณสมบัติความเป็นสารเสริมฤทธิ์วัคซีนของแมนแนนจากเชื้อราในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน | 15 |
| บทนำ | 16 |
| ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย | 16 |
| ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง..... | 17 |
| วัตถุประสงค์โครงการ | 22 |
| ขอบเขตของโครงการวิจัย | 22 |
| ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 22 |
| วิธีดำเนินการวิจัย | 23 |
| การทดสอบในห้องปฏิบัติการ (<i>in vitro</i>) | 23 |
| การเตรียมเชื้อรา <i>S. cerevisiae</i> และ <i>Candida</i> spp. | 23 |
| การเตรียมเดนไดรติกเซลล์ที่พัฒนาจากเซลล์ไขกระดูก (Bone marrow-derived dendritic cell)..... | 23 |
| การแยกแมนแนนจากผนังเซลล์ของยีสต์ | 23 |
| การกระตุ้นเดนไดรติกเซลล์ในห้องปฏิบัติการและการวัดผลการตอบสนอง | 23 |
| การทดสอบในสัตว์ทดลอง | 24 |
| การวิเคราะห์ทางสถิติ | 25 |
| ผลการวิจัย..... | 26 |
| การคัดเลือกสายพันธุ์ของ <i>S. cerevisiae</i> ที่สามารถกระตุ้นการตอบสนองของเดนไดรติกเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ | 26 |
| การศึกษาการตอบสนองของเดนไดรติกเซลล์ต่อแมนแนน (mannan) ที่มีโครงสร้างแตกต่างกัน | 29 |
| ศึกษาความเป็นสารเสริมฤทธิ์ของแมนแนนโครงสร้างต่างๆ ในสัตว์ทดลอง | 32 |
| การทดสอบการตอบสนองของเดนไดรติกเซลล์ต่อแมนแนนของเชื้อรา <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> และ <i>C. dubliniensis</i> | 35 |
| การทดสอบการตอบสนองของเดนไดรติกเซลล์ต่อแมนแนน | 38 |
| การทดสอบความสามารถของแมนแนนในการกระตุ้นการตอบสนองของ T cell ในสัตว์ทดลอง | 41 |

| | |
|--|----|
| อภิปราย / วิจารณ์ผลการทดลอง | 42 |
| โครงการย่อยที่ 2 การพิสูจน์สูตรโครงสร้างของแมนแนนอลิโกแซคคาไรด์ที่มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันจากเชื้อราแซคคาโรไมซีสและแคนดิดา..... | 44 |
| บทนำ | 45 |
| ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย | 45 |
| ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง..... | 46 |
| วัตถุประสงค์โครงการ | 50 |
| ขอบเขตการวิจัย | 51 |
| ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... | 51 |
| วิธีดำเนินการวิจัย | 52 |
| Acetylation ของแมนแนนอลิโกแซคคาไรด์..... | 52 |
| Acetolysis ของแมนแนนอลิโกแซคคาไรด์..... | 52 |
| Decetylation ของแมนแนนอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นที่ผ่านการ acetolysis..... | 52 |
| การทำบริสุทธิ์สารแมนแนนอลิโกแซคคาไรด์ | 52 |
| พิสูจน์สูตรโครงสร้างของแมนแนนอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy | 52 |
| ผลการวิจัย | 54 |
| การศึกษาโครงสร้างของน้ำตาลแมนโนสด้วยเทคนิค NMR spectroscopy..... | 54 |
| การพิสูจน์สูตรโครงสร้างของแมนแนนจากเชื้อรา <i>Saccharomyces</i> | 60 |
| การพิสูจน์สูตรโครงสร้างของแมนแนนจากเชื้อรา <i>Candida</i> | 70 |
| อภิปราย / วิจารณ์ผลการทดลอง | 90 |
| โครงการย่อยที่ 3 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนคอมพอลิเมอร์ของเหล็กออกไซด์-ซิลิกา-แมนแนน | 92 |
| เพื่อใช้เป็นสารเสริมฤทธิ์วัคซีน | 92 |
| บทนำ | 93 |
| ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย | 93 |
| ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง..... | 94 |
| วัตถุประสงค์โครงการ | 98 |
| ขอบเขตของโครงการวิจัย | 98 |
| ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 98 |
| วิธีดำเนินการวิจัย | 99 |
| การสังเคราะห์อนุภาคซิลิกาโดยวิธี Sol gel..... | 99 |

| | |
|---|-----|
| การสังเคราะห์อนุภาคนาโนคอมพอสิตของเหล็กออกไซด์และซิลิกา (S-SPION) | 99 |
| การทดสอบความเป็นพิษ การกระตุ้นของเซลล์โดยวิธี ELISA และการกระตุ้น cell maturation ของอนุภาคนาโนคอมพอสิตเหล็กออกไซด์-ซิลิกา-แมนแนน (S-SPION-MN)..... | 100 |
| การทดสอบการเข้าเซลล์ของอนุภาคนาโนคอมพอสิต S-SPION-MN | 101 |
| ผลการวิจัย | 102 |
| การวิเคราะห์เอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนคอมพอสิต S-SPION และ S-SPION-MN..... | 102 |
| ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ | 104 |
| ศึกษาการกระตุ้นเซลล์ด้วยอนุภาคแมนแนน | 105 |
| ศึกษาการนำเข้าสู่เซลล์ภายใต้การเหนี่ยวนำด้วยแม่เหล็กภายนอก | 107 |
| อภิปราย / วิจัยผลการทดลอง | 108 |
| สรุปและเสนอแนะ | 110 |
| บรรณานุกรม | 111 |
| ประวัตินักวิจัย | 116 |
| ภาคผนวก | 124 |

สารบัญตาราง

| | |
|--|-----|
| ตารางที่ 1 การทดสอบความมีชีวิตของเดนไดรติกเซลล์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแมนแนนของเชื้อราแคนดิดา (mean \pm SD %)..... | 35 |
| ตารางที่ 2 แสดงโปรแกรมอนุหนุมิสำหรับการเตรียมอนุภาคนาโนคอมพอสิตของเหล็กออกไซด์และซิลิกา..... | 99 |
| ตารางที่ 3 Properties of synthesized nanocomposites | 103 |

สารบัญภาพ

| | |
|--|----|
| รูปที่ 1 แสดงขั้นตอนการสร้าง N-linked mannan ในผนังเซลล์ของเชื้อรา <i>S. cerevisiae</i> ซึ่งการเติมแมนโนสในแต่ละขั้นตอน จะถูกควบคุมด้วยยีนต่างชนิดกัน (44, 45)..... | 21 |
| รูปที่ 2 ชนิดของไซโตไคน์มีผลต่อการเปลี่ยนสภาพของ naïve CD4 T lymphocyte..... | 26 |
| รูปที่ 3 แสดงโครงสร้างแมนแนนในผนังเซลล์ของ <i>S. cerevisiae</i> สายพันธุ์ wild type (wt), och1Δ, van1Δ, mnn2Δ, mnn5Δ, mnn4Δ และ mnn1Δ ซึ่งโครงสร้างนี้ผู้วิจัยคาดคะเนจากการทำงานของยีนแต่ละชนิด..... | 27 |
| รูปที่ 4 การแสดงออกของยีนในเดนไดรติกเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแมนแนนจาก <i>S. cerevisiae</i> | 28 |
| รูปที่ 5 การทดสอบความมีชีวิตของเดนไดรติกเซลล์..... | 29 |
| รูปที่ 6 การหลังไซโตไคน์จากเดนไดรติกเซลล์ | 31 |
| รูปที่ 7 การแสดงออกของ maturation marker ของเดนไดรติกเซลล์ | 32 |
| รูปที่ 8 แสดงสัดส่วนของ T cell และ B cell ในหนูที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยสารเสริมฤทธิ์แมนแนน | 33 |
| รูปที่ 9 แสดงสัดส่วนของ T cell และ B cell ในหนูที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยสารเสริมฤทธิ์แมนแนน | 34 |
| รูปที่ 10 ผลของแมนแนนต่อเปอร์เซ็นต์ของเดนไดรติกเซลล์..... | 36 |
| รูปที่ 11 ผลของแมนแนนต่อ maturation ของเดนไดรติกเซลล์ | 37 |
| รูปที่ 12 ผลของแมนแนนต่อการผลิตไซโตไคน์ของเดนไดรติกเซลล์ | 38 |
| รูปที่ 13 ผลของแมนแนนต่อความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์ของเดนไดรติกเซลล์ | 39 |
| รูปที่ 14 ผลของแมนแนนต่อ maturation ของเดนไดรติกเซลล์ | 40 |
| รูปที่ 15 ผลของแมนแนนต่อการผลิตไซโตไคน์ของเดนไดรติกเซลล์ | 41 |
| รูปที่ 16 การตอบสนองของ T cell ต่อแมนแนนของเชื้อราแคนดิดา..... | 42 |
| รูปที่ 17 แสดงโครงสร้างของแมนแนนออลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากผนังเซลล์ของ <i>S. cerevisiae</i> | 46 |
| รูปที่ 18 แสดง 1D ¹ H NMR ของแมนแนนในตัวทำละลายชนิด D ₂ O และ 2D ¹ H- ¹ H TOCSY ส่วนในรูปเล็ก (inset) เป็น ¹³ C anomeric HSQC ของแมนแนน | 47 |
| รูปที่ 19 แสดงกรรมวิธีทางเคมีในการศึกษาชนิดของพันธะที่เชื่อมต่อกันระหว่างแมนโนสด้วยปฏิกิริยา methylation และ acetylation ตามลำดับ..... | 48 |

| | |
|---|----|
| รูปที่ 20 แสดง ^1H และ ^{13}C chemical shift ของแมนแนนอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดได้จาก <i>Candida kefyr</i> IFO 0586..... | 48 |
| รูปที่ 21 แสดง 2D-HOHAHA spectra ในบริเวณสัญญาณของแอนโนมอริก โปรตอน (anomeric proton) ของแมนแนนที่ได้จาก <i>C. famata</i> และ <i>C. saitoana</i> | 49 |
| รูปที่ 22 แสดง DQF-COSY spectra ของแมนแนนที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -(1,6) ได้จากปฏิกิริยา acetolysis โดย ^1H NMR spectra ทางด้านขวาแสดงสัญญาณ cross-peaks..... | 50 |
| รูปที่ 23 แสดงโครงสร้างเคมีของ D-mannoside และ pentaacetyl- α -D-mannoside | 54 |
| รูปที่ 24 ^1H NMR spectrum ของ D-mannoside ที่ไม่ผ่านการปรับปรุงหมู่ไฮดรอกซิล (600 MHz, D_2O) | 55 |
| รูปที่ 25 แสดงปฏิกิริยา acylation ของ D-mannoside โดยใช้ acetic anhydride | 55 |
| รูปที่ 26 แสดง ^1H NMR spectrum ของ penta-O-acetyl- α -D-mannoside (400 MHz, CDCl_3) | 56 |
| รูปที่ 27 แสดง ^{13}C NMR spectrum ของ penta-O-acetyl- α -D-mannoside (100 MHz, CDCl_3) | 57 |
| รูปที่ 28 แสดง COSY spectrum ของ penta-O-acetyl- α -D-mannoside (400 MHz, CDCl_3)..... | 58 |
| รูปที่ 29 แสดง HSQC spectrum ของ penta-O-acetyl- α -D-mannoside (400 MHz, CDCl_3)..... | 59 |
| รูปที่ 30 แสดง HMBC spectrum ของ penta-O-acetyl- α -D-mannoside (400 MHz, CDCl_3)..... | 60 |
| รูปที่ 31 แสดง ^{13}C NMR spectrum ของอลิโก-แมนแนนจากเชื้อรา <i>Saccharomyces</i> ชนิด MNN2 Δ (400 MHz, D_2O)..... | 61 |
| รูปที่ 32 แสดงปฏิกิริยา acylation ของอลิโก-แมนแนนจากเชื้อรา <i>Saccharomyces</i> ชนิด MNN2 Δ โดยใช้ propionic anhydride | 61 |
| รูปที่ 33 แสดงปฏิกิริยา acylation ของอลิโก-แมนแนนจากเชื้อรา <i>Saccharomyces</i> ชนิด MNN2 Δ โดยใช้ acetic anhydride | 62 |
| รูปที่ 34 ปฏิกิริยา acetolysis เพื่อใช้ในการในการแยกแมนแนนอลิโกแซคคารีไรต์ | 63 |
| รูปที่ 35 แสดงโครงสร้างทางเคมีที่คาดการณ์ของอลิโก-แมนแนนที่ใช้ในการศึกษาในงานวิจัยนี้..... | 64 |
| รูปที่ 36 แสดง ^1H NMR spectrum ของอลิโก-แมนแนนชนิด MNN2 Δ (400 MHz, D_2O)..... | 65 |
| รูปที่ 37 แสดง COSY spectrum ของอลิโก-แมนแนนชนิด MNN2 Δ (400 MHz, D_2O) | 65 |
| รูปที่ 38 แสดง ^{13}C NMR spectrum ของอลิโก-แมนแนนชนิด MNN2 Δ (100 MHz, D_2O)..... | 66 |
| รูปที่ 39 แสดง ^{13}C NMR spectrum ของอลิโก-แมนแนนชนิด WT (100 MHz, D_2O)..... | 67 |

| | | |
|-----------|--|----|
| รูปที่ 40 | แสดง ^{13}C NMR spectrum ของออลิโก-แมนแนนชนิด OCH1 Δ (100 MHz, D ₂ O) | 67 |
| รูปที่ 41 | แสดง ^{13}C NMR spectrum ของออลิโก-แมนแนนชนิด VAN1 Δ (100 MHz, D ₂ O)..... | 68 |
| รูปที่ 42 | แสดง ^{13}C NMR spectrum ของออลิโก-แมนแนนชนิด MNN1 Δ (100 MHz, D ₂ O)..... | 68 |
| รูปที่ 43 | แสดง ^{13}C NMR spectrum ของออลิโก-แมนแนนชนิด MNN5 Δ (100 MHz, D ₂ O)..... | 69 |
| รูปที่ 44 | แสดง ^{13}C NMR spectrum ในช่วง δ 55-120 ppm เปรียบเทียบของออลิโก-แมนแนนทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ MNN5 Δ , MNN1 Δ , MNN2 Δ , VAN1 Δ , OCH1 Δ และ WT (100 MHz, D ₂ O)..... | 69 |
| รูปที่ 45 | แสดง ^{13}C NMR spectrum ในช่วง δ 95-105 ppm เปรียบเทียบของออลิโก-แมนแนนทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ MNN5 Δ , MNN1 Δ , MNN2 Δ , VAN1 Δ , OCH1 Δ และ WT (100 MHz, D ₂ O)..... | 70 |
| รูปที่ 46 | แสดง GPC chromatogram ของ <i>C. krusei</i> mannan..... | 71 |
| รูปที่ 47 | แสดงน้ำหนักโมเลกุลของ <i>C. krusei</i> mannan..... | 71 |
| รูปที่ 48 | แผนผังแสดงขั้นตอนการปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีของแมนแนน | 72 |
| รูปที่ 49 | แสดงการตรวจสอบองค์ประกอบเบื้องต้นของ <i>C. krusei</i> mannan..... | 73 |
| รูปที่ 50 | แสดงการตรวจสอบองค์ประกอบของ <i>C. krusei</i> mannan fraction 21-41 | 73 |
| รูปที่ 51 | แสดงการตรวจสอบองค์ประกอบของ <i>C. krusei</i> mannan fraction 43-63 | 74 |
| รูปที่ 52 | แสดง ^{13}C NMR spectrum (100 MHz, D ₂ O) ของแมนแนนจาก <i>C. krusei</i> | 74 |
| รูปที่ 53 | แสดง ^1H NMR spectrum (400 MHz, D ₂ O) ของแมนแนนจาก <i>C. krusei</i> | 75 |
| รูปที่ 54 | ^1H NMR spectrum (400 MHz, D ₂ O) ของแมนแนนขนาดเล็ก (mannan-oligosaccharide) ที่ผ่านผ่านปฏิกิริยาเคมีและผ่านการทำให้บริสุทธิ์ | 76 |
| รูปที่ 55 | แสดง GPC chromatogram ของ <i>C. glabrata</i> mannan | 76 |
| รูปที่ 56 | แสดงน้ำหนักโมเลกุลของ <i>C. glabrata</i> mannan..... | 77 |
| รูปที่ 57 | แสดงการตรวจสอบองค์ประกอบเบื้องต้นของ <i>C. glabrata</i> mannan | 78 |
| รูปที่ 58 | แสดงการตรวจสอบองค์ประกอบของ <i>C. glabrata</i> mannan fraction 24, 53-63..... | 78 |
| รูปที่ 59 | แสดง ^{13}C NMR spectrum (100 MHz, D ₂ O) ของแมนแนนจาก <i>C. glabrata</i> | 79 |
| รูปที่ 60 | แสดง ^1H NMR spectrum (400 MHz, D ₂ O) ของแมนแนนจาก <i>C. glabrata</i> | 79 |
| รูปที่ 61 | แสดง GPC chromatogram ของ <i>C. tropicalis</i> mannan | 80 |
| รูปที่ 62 | แสดงน้ำหนักโมเลกุลของ <i>C. tropicalis</i> mannan..... | 80 |
| รูปที่ 63 | แสดงการตรวจสอบองค์ประกอบเบื้องต้นของ <i>C. tropicalis</i> mannan | 81 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| รูปที่ 64 | แสดงการตรวจสอบองค์ประกอบของ <i>C. tropicalis</i> mannan fraction 21-35..... | 82 |
| รูปที่ 65 | แสดงการตรวจสอบองค์ประกอบของ <i>C. tropicalis</i> mannan fraction 37-49, 61-65 | 82 |
| รูปที่ 66 | แสดง ¹³ C NMR spectrum (100 MHz, D ₂ O) ของแมนแนนจาก <i>C. tropicalis</i> | 83 |
| รูปที่ 67 | แสดง ¹ H NMR spectrum (400 MHz, D ₂ O) ของแมนแนนจาก <i>C. tropicalis</i> | 84 |
| รูปที่ 68 | แสดง GPC chromatogram ของ <i>C. tropicalis</i> mannan | 85 |
| รูปที่ 69 | แสดงน้ำหนักโมเลกุลของ <i>C. tropicalis</i> mannan | 85 |
| รูปที่ 70 | แสดงการตรวจสอบองค์ประกอบเบื้องต้นของ <i>C. albicans</i> mannan..... | 87 |
| รูปที่ 71 | แสดงการตรวจสอบองค์ประกอบของ <i>C. albicans</i> mannan fr. 21-27, 33-49..... | 87 |
| รูปที่ 72 | แสดงการตรวจสอบองค์ประกอบของ <i>C. albicans</i> mannan fr. 51-67 | 87 |
| รูปที่ 73 | แสดง ¹³ C NMR spectrum (100 MHz, D ₂ O) ของแมนแนนจาก <i>C. albicans</i> | 88 |
| รูปที่ 74 | แสดง ¹ H NMR spectrum (400 MHz, D ₂ O) ของแมนแนนจาก <i>C. albicans</i> | 89 |
| รูปที่ 75 | แสดง ¹ H NMR spectrum (400 MHz, D ₂ O) ของแมนแนนทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> , และ <i>C. krusei</i> ระหว่างช่วง 5.70–4.90 ppm | 89 |
| รูปที่ 76 | โครงสร้างของแมนแนน (A) <i>C. albicans</i> , (B) <i>C. tropicalis</i> , (C) <i>C. glabrata</i> , (D) <i>C. krusei</i> . 91 | |
| รูปที่ 77 | การเตรียมอนุภาคแมนแนนแบบ nanogel โดยการดัดแปรโครงสร้างของแมนแนน (55)..... | 94 |
| รูปที่ 78 | กระบวนการถ่ายภาพต่อม่านน้ำเหลืองโดยใช้คอมพอสิตเหล็กออกไซด์-แมนแนนที่มีความจำเพาะต่อ macrophage (59)..... | 96 |
| รูปที่ 79 | ภาพถ่ายจากกล้อง TEM ของอนุภาคนาโนคอมพอสิตเหล็กออกไซด์-ซิลิกาที่มีขนาด (A) 100 nm และ (B) 200 nm | 97 |
| รูปที่ 80 | กระบวนการเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันของแมนแนน (60)..... | 97 |
| รูปที่ 81 | ภาพ FESEM แสดงลักษณะอนุภาคนาโนคอมพอสิต S-SPION ที่สังเคราะห์ได้ ด้วยปริมาณสาร Fe(acac) ₃ ต่างกัน โดย a) 10 mg, b) 20 mg, c) 60, d) 180 mg. | 102 |
| รูปที่ 82 | แสดงกราฟ a) XRD pattern และ b) magnetization curves..... | 103 |
| รูปที่ 83 | ปริมาณการรอดของเซลล์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยอนุภาคต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่างกัน โดยการทำปฏิกิริยาที่เวลา a) 6 ชั่วโมง b) 12 ชั่วโมง c) 24 ชั่วโมง d) 48 ชั่วโมง..... | 104 |
| รูปที่ 84 | ผล ELISA โดยการกระตุ้นเซลล์ที่เวลา 24 ชั่วโมง..... | 105 |
| รูปที่ 85 | ผล ELISA โดยการกระตุ้นเซลล์ที่เวลา 48 ชั่วโมง..... | 106 |
| รูปที่ 86 | กราฟแสดง MFI เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยอนุภาคต่างๆ ที่เวลา a) 24 ชั่วโมง b) 48 ชั่วโมง | 107 |

| | |
|--|-----|
| รูปที่ 87 แสดงปริมาณการ uptake อนุภาคแมนแนน S-SPION-MN ของเซลล์..... | 107 |
| รูปที่ 88 ภาพแสดงการ uptake อนุภาคแมนแนน S-SPION-MN ของเซลล์โดยการศึกษาภายใต้กล้อง confocal fluorescent microscopy: DAPI และ CellMask Deep Red แสดงนิวเคลียสและเซลล์เมมเบรน FITC แสดงอนุภาคแมนแนน S-SPION-MN | 108 |

บทนำ

โรคที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันหลายชนิด เช่น โรคติดเชื้อ โรคมะเร็ง และภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง ยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขระดับประเทศและระดับโลก ทำให้เกิดการสูญเสียประชากรและสมรรถนะทางด้านเศรษฐกิจ กลยุทธ์สำคัญในการลดปัญหาดังกล่าว ได้แก่ การให้วัคซีนกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเพื่อการป้องกัน (prophylaxis vaccine) และรักษาโรค (therapeutic vaccine) การพัฒนาวัคซีนในปัจจุบันมุ่งเน้นไปที่การใช้แอนติเจนที่มีความจำเพาะต่อโรคมะเร็งใช้เป็นวัคซีน หรือที่เรียกว่า “subunit vaccine” ซึ่งวัคซีนชนิดนี้จะมีประสิทธิภาพและความปลอดภัยสูง อย่างไรก็ตาม subunit vaccine ไม่มีความสามารถเพียงพอในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ ดังนั้นเพื่อเป็นการเพิ่มศักยภาพในการทำงานของ subunit vaccine จึงจำเป็นต้องผสมสารเสริมฤทธิ์ (adjuvant) เพื่อช่วยให้ subunit vaccine สามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ อย่างมีประสิทธิภาพ (1, 2) สารเสริมฤทธิ์มีประโยชน์สำคัญอื่น ๆ อีกหลายประการ ได้แก่ ช่วยกำหนดทิศทางการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ช่วยลดปริมาณแอนติเจนทำให้สามารถผลิตวัคซีนได้ปริมาณมากขึ้น ช่วยลดจำนวนครั้งในการให้วัคซีน สามารถใช้เป็นระบบนำส่งวัคซีนไปยังเซลล์หรือบริเวณเป้าหมายได้ และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของวัคซีนในประชากรบางกลุ่ม เช่น เด็ก คนชรา และ ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง (immunocompromised patient) (3, 4)

ในปัจจุบันสารเสริมฤทธิ์ที่ผ่านการรับรองและได้รับใบอนุญาตให้ใช้ได้ของคนนั้น ยังคงมีปัญหาในการใช้งาน คือ ไม่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้ได้ในทิศทางที่ต้องการได้อย่างเหมาะสม ไม่สามารถใช้ได้กับวัคซีนทุกชนิด และมีคุณสมบัติทางเคมีที่ไม่สามารถเข้ากันได้กับแอนติเจนบางชนิด (1, 5) ดังนั้นการพัฒนาสารเสริมฤทธิ์ชนิดใหม่จึงเป็นปัจจัยสำคัญช่วยในการพัฒนาวัคซีนให้ประสบความสำเร็จ จากปัญหาดังกล่าวข้างต้น แผนงานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายหลักในการพัฒนาสารเสริมฤทธิ์วัคซีนชนิดใหม่ เพื่อให้มีทางเลือกมากขึ้นในการนำไปใช้ประโยชน์ในการป้องกันและรักษาโรค ซึ่งคณะผู้วิจัยมีความสนใจในการศึกษาและพัฒนาสารแมนแนนออกลิโกแซคคาไรด์เนื่องเป็นสารคาร์โบไฮเดรตธรรมชาติ สามารถถูกย่อยสลายได้ในร่างกายและไม่มีเมตาโบไลต์ที่เป็นพิษ และสามารถกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากหลักฐานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแมนแนนของเชื้อรา *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นเชื้อราไม่ก่อโรค (non-pathogenic fungi) และ *Candida spp.* ซึ่งเป็นเชื้อราที่พบได้ในร่างกายมนุษย์ (commensal fungi) มีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังมีหลักฐานแสดงว่าแมนแนนที่มีโครงสร้างแตกต่างกันจะสามารถกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้แตกต่างกันด้วย

คณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบเบื้องต้น โดยเริ่มจากการสืบค้นในฐานข้อมูล *Saccharomyces genome database* พบว่ามี *S. cerevisiae* ที่มีการตัดยีนเดี่ยว (single gene deletion) แต่ละยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการเติมแมนโนสในแต่ละขั้นตอน จาก yeast deletion library ซึ่งการตัดยีนดังกล่าวจะส่งผลให้ *S. cerevisiae* mutant แต่ละสายพันธุ์มีโครงสร้างของแมนแนนในผนังเซลล์ที่แตกต่างกัน เพิ่มความหลากหลายของโครงสร้างแมนแนนใน *S. cerevisiae* จากนั้นผู้วิจัยได้ทำการทดลองโดยผู้วิจัยนำเชื้อราไปทำให้ตายหรือหมดฤทธิ์ด้วยความร้อน เพื่อให้ผนังเซลล์ได้ทำปฏิกิริยากับเดนไดรติกเซลล์โดยตรง และไม่มีสารอื่นมารบกวน และนำเชื้อราที่ตายด้วยความร้อนมากระตุ้นการตอบสนองของเดนไดรติกเซลล์ในห้องปฏิบัติการ จากผลการทดลองเบื้องต้นพบว่าเชื้อรา *S. cerevisiae* ต่างสายพันธุ์ ซึ่งคณะผู้วิจัยคาดว่าน่าจะมีโครงสร้างแมนแนนต่างกัน ให้ผลการกระตุ้นเดนไดรติกเซลล์แตกต่างกัน ต่อมาคณะผู้วิจัยได้ทำการยืนยันการทดลองโดยใช้เชื้อราแคนดิดาต่างชนิดกัน ซึ่งผู้วิจัยคาดเช่นเดียวกันว่าน่าจะมีโครงสร้างของแมนแนนแตกต่างกัน และต่างจากเชื้อรา *S. cerevisiae* จากผลการทดสอบพบว่าเชื้อราแคนดิดาต่างชนิดกันมีผลต่อการกระตุ้นเดนไดรติกเซลล์แตกต่างกัน

จากผลการศึกษาเบื้องต้นดังกล่าว คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะขยายการศึกษาและพัฒนางานวิจัยทางด้านสารเสริมฤทธิ์วัคซีนชนิดแมนแนน โดยแผนงานวิจัยนี้ประกอบด้วยโครงการย่อย 3 โครงการดังนี้

1) โครงการย่อยที่ 1 คุณสมบัตินี้มีความเป็นสารเสริมฤทธิ์วัคซีนของแมนแนนจากเชื้อราในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน โครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อสารแมนแนนทั้งในระดับเซลล์ และในสัตว์ทดลอง เพื่อคัดเลือกชนิดแมนแนนที่มีคุณสมบัตินี้มีความเป็นสารเสริมฤทธิ์วัคซีนที่มีประสิทธิภาพ

2) โครงการย่อยที่ 2 การพิสูจน์สูตรโครงสร้างของแมนแนนออลิโกแซคคาไรด์ที่มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันจากเชื้อราแซคคาโรไมซีสและแคนดิดา โครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของแมนแนน ซึ่งผ่านการทดสอบจากโครงการย่อยที่ 1 ว่ามีฤทธิ์ในการกระตุ้นเดนไดรติกเซลล์ โดยผู้วิจัยจะอาศัยกรรมวิธีทางเคมีและทางเทคนิค NMR spectroscopy ในการพิสูจน์สูตรโครงสร้าง โดยข้อมูลที่ได้จะช่วยทำให้ทราบถึงลักษณะโครงสร้างที่จำเป็นในการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และเข้าใจกลไกการตอบสนองได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งมีความสำคัญอย่างยิ่งในการพัฒนาสารเสริมฤทธิ์วัคซีนที่มีประสิทธิภาพ

3) โครงการย่อยที่ 3 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนคอมพอสิตของเหล็กออกไซด์-ซิลิกา-แมนแนนเพื่อใช้เป็นสารเสริมฤทธิ์วัคซีน จากหลักฐานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าออลิโกแซคคาไรด์ที่อยู่ในรูปอนุภาค (particulate form) จะมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าในรูปของสารละลาย (soluble form) (6, 7) ดังนั้นโครงการนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาประสิทธิภาพของสารเสริมฤทธิ์วัคซีนชนิดแมนแนน และเพื่อสร้างต้นแบบสารเสริมฤทธิ์วัคซีนชนิดแมนแนนให้สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดในการใช้งานทางคลินิกได้ในอนาคต

ผลผลิตหลักที่จะได้ร่วมกันจากทั้ง 3 โครงการ คือ ต้นแบบสารเสริมฤทธิ์วัคซีนชนิดแมนแนนที่สามารถกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้คณะผู้วิจัยมีความคาดหวังว่าการร่วมมือกันระหว่างสหสาขาวิชาในแผนงานวิจัยนี้ จะสามารถพัฒนาองค์ความรู้และนวัตกรรมเพื่อก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดทางการแพทย์ และเพื่อสร้างสมดุลทางเศรษฐกิจของประเทศไทยในอนาคต

วัตถุประสงค์แผนงานวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาคุณสมบัติความเป็นสารเสริมฤทธิ์ของแมนแนนอลิโกแซคคาไรด์ที่ในการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน
- 2) เพื่อพิสูจน์โครงสร้างของแมนแนนอลิโกแซคคาไรด์ที่มีคุณสมบัติความเป็นสารเสริมฤทธิ์วัคซีน
- 3) เพื่อพัฒนาประสิทธิภาพของสารเสริมฤทธิ์วัคซีนชนิดแมนแนนอลิโกแซคคาไรด์โดยการปรับเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของอนุภาค

โครงการย่อยที่ 1

คุณสมบัติความเป็นสารเสริมฤทธิ์วัคซีนของแมนแนนจากเชื้อราในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

Vaccine adjuvanticity of fungal-derived mannan in the immune responses

หัวหน้าโครงการย่อย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.พัชรี ฤทธิ์ประจักษ์
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

สารเสริมฤทธิ์วัคซีน (vaccine adjuvant) คือสารที่ทำหน้าที่เพิ่มประสิทธิภาพในการกระตุ้นการตอบสนองและกำหนดทิศทางการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน สารเสริมฤทธิ์วัคซีนยังมีประโยชน์อื่น ได้แก่ ช่วยลดปริมาณการใช้แอนติเจน ช่วยลดจำนวนครั้งในการให้วัคซีน สามารถใช้เป็นระบบนำส่งวัคซีนไปยังเซลล์หรือบริเวณเป้าหมายได้ และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของวัคซีนในประชากรบางกลุ่ม เช่น เด็ก คนชรา และ ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง (immunocompromised patient) (3, 4)

สารเสริมฤทธิ์นิยมนำมาผสมใน subunit vaccine ซึ่งเป็นวัคซีนที่มีความจำเพาะและปลอดภัยสูง แต่ขาดความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน การเติมสารเสริมฤทธิ์ในวัคซีนชนิดนี้จึงเป็นกลยุทธ์สำคัญในการช่วยให้วัคซีนสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ สารเสริมฤทธิ์มีหลายกลุ่ม เช่น mineral salts, emulsion, microbial derivatives, cytokines, immune stimulating complexes (ISCOM), particulate compounds, และ carbohydrate เป็นต้น (4, 8) ซึ่งสารเสริมฤทธิ์แต่ละกลุ่มมีความสามารถในการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแตกต่างกัน ดังนั้นการเลือกสารเสริมฤทธิ์ให้เหมาะกับชนิดของวัคซีนจึงเป็นกลยุทธ์สำคัญในการพัฒนาวัคซีนให้ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ปัจจุบันสารเสริมฤทธิ์ที่ผ่านการรับรองและได้รับใบอนุญาตให้ใช้ได้ของคนนั้น มีเพียง 5 ชนิด (2, 9-12) ได้แก่ alum, MF59, AS03, AS04 และ virosomes อย่างไรก็ตามสารเสริมฤทธิ์ดังกล่าวยังมีข้อจำกัดในการทำงาน คือ ไม่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ในทิศทางที่ต้องการได้อย่างเหมาะสม (1, 5) และมีคุณสมบัติทางเคมีที่ไม่สามารถเข้ากันได้กับแอนติเจนบางชนิด

ดังนั้นการพัฒนาสารเสริมฤทธิ์จึงเป็นปัจจัยสำคัญช่วยในการพัฒนาวัคซีนป้องกัน (prophylaxis vaccine) และรักษาโรค (therapeutic vaccine) ให้ประสบความสำเร็จ

สารเสริมฤทธิ์กลุ่มคาร์โบไฮเดรตเป็นที่เริ่มศึกษากันมากขึ้น เนื่องจากคาร์โบไฮเดรตเป็นสารธรรมชาติสามารถถูกย่อยสลายได้ในร่างกายและไม่มีเมตาโบไลต์ที่เป็นพิษ และสามารถกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ แมนแนนเป็นสายออลิโกแซคคาไรด์ของน้ำตาลแมนโนสที่พบได้ในธรรมชาติรวมทั้งในผนังเซลล์ของเชื้อรา พบว่าแมนแนนของเชื้อรา *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นเชื้อราไม่ก่อโรค (non-pathogenic fungi) และ *Candida* ซึ่งเป็นเชื้อราที่พบได้ในร่างกายมนุษย์ (commensal fungi) สามารถกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (humoral immunity) และภูมิคุ้มกันแบบอาศัย T cell (T cell-mediated immunity) ผ่านเดนไดรติกเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (13) จากคุณสมบัติดังกล่าว ผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการศึกษาและพัฒนาสารเสริมฤทธิ์วัคซีนชนิดแมนแนนจากผนังเซลล์ของเชื้อรา *S. cerevisiae* และ *Candida* (14) จากการสืบค้นในฐานข้อมูล *Saccharomyces genome database* พบว่ามี *S. cerevisiae* ที่มีการตัดยีนเดี่ยว (single gene deletion) แต่ละยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการเติมแมนโนสในแต่ละขั้นตอน จาก yeast deletion library ซึ่งการตัดยีนดังกล่าวจะส่งผลให้ *S. cerevisiae* mutant แต่ละสายพันธุ์มีโครงสร้างของแมนแนนในผนังเซลล์ที่แตกต่างกัน เพิ่มความหลากหลายของโครงสร้างแมนแนนใน *S. cerevisiae* ส่วนในเชื้อราแคนดิดา ผู้วิจัยจะอาศัยความแตกต่างของโครงสร้างแมนแนนในธรรมชาติจากเชื้อราแคนดิดาแต่ละชนิดเพื่อใช้ในการเลือกใช้เป็นสารเสริมฤทธิ์วัคซีนอย่างเหมาะสม

ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบเบื้องต้นเพื่อดูการตอบสนองของเดนไดรติกเซลล์ต่อผนังเซลล์ของเชื้อรา *S. cerevisiae* และ *Candida spp.* ที่ผู้วิจัยคาดว่าจะมีโครงสร้างของแมนแนนแตกต่างกัน โดยการทดสอบเบื้องต้นนี้ ผู้วิจัยนำเชื้อราไปทำให้ตายหรือหมดฤทธิ์ด้วยความร้อน เพื่อให้ผนังเซลล์ได้ทำปฏิกิริยากับเดนไดรติกเซลล์โดยตรง และไม่มีสารอื่น ๆ มารบกวน จากผลการทดลองพบว่า เชื้อรา *S. cerevisiae* ต่างสายพันธุ์ และ

Candida spp. ต่างชนิดกัน กระตุ้นการตอบสนองของเดนไดรติกเซลล์แตกต่างกัน ดังนั้นในโครงการย่อยนี้ ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ที่จะขยายการศึกษาโดยการเพิ่มจำนวนสายพันธุ์ของ *S. cerevisiae* และชนิดของเชื้อราแคนดิดา และนำแมนแนนจากผนังเซลล์ของเชื้อราดังกล่าวมาทดสอบในห้องปฏิบัติการเพื่อดูการตอบสนองของเดนไดรติกเซลล์ซึ่งเป็นเซลล์เป้าหมายของสารเสริมฤทธิ์วัคซีน และศึกษาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะในสัตว์ทดลอง ซึ่งองค์ความรู้จากงานวิจัยนี้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาสารเสริมฤทธิ์ในวัคซีนชนิดได้ในอนาคต

บททวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

วัคซีนเป็นชีววัตถุ (biological substance) ที่สามารถชักนำให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อโรค หรือแอนติเจนแต่ละชนิดได้อย่างจำเพาะ เป้าหมายการทำงานของวัคซีน คือ กระตุ้นและเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน (immune system) ในร่างกายเพื่อต่อต้านเชื้อโรคหรือแอนติเจน ดังนั้นวัคซีนจึงเป็นกลยุทธ์สำคัญในการป้องกัน (prophylaxis vaccine) และรักษา (therapeutic vaccine) โรคติดเชื้อมาเป็นระยะเวลายาวนานจนถึงปัจจุบัน นอกจากนี้วัคซีนยังถูกพัฒนามาใช้ในการรักษาโรคทางระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ ด้วย ได้แก่ โรคหอบหืด โรคภูมิแพ้ (allergy) และโรคภูมิคุ้มกันตอบสนองต่อเนื้อเยื่อตัวเอง (autoimmune disease) วัคซีนแบบดั้งเดิมทำได้โดยการนำเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคมารักษาให้อ่อนฤทธิ์ลง (live-attenuated pathogen) ถึงแม้ว่าวัคซีนชนิดนี้จะมีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคติดเชื้อได้ดี อย่างไรก็ตามยังมีข้อจำกัดสำคัญ คือไม่สามารถประยุกต์ใช้ได้กับเชื้อโรคทุกชนิด และมีโอกาสก่อให้เกิดผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายได้ (adverse effect) จากองค์ประกอบต่างๆ ของเชื้อ หรือสารที่เชื้อผลิตขึ้น ปัจจุบันจึงมีการพัฒนาวัคซีนที่เรียกว่า “subunit vaccine” เตรียมโดยใช้เพียงแอนติเจนที่มีความจำเพาะมาเป็นวัคซีน เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และสารพันธุกรรม เป็นต้น ทำให้วัคซีนชนิดนี้มีความจำเพาะ และความปลอดภัยสูง อย่างไรก็ตาม subunit vaccine ไม่มีความสามารถเพียงพอในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ ดังนั้นเพื่อเป็นการเพิ่มศักยภาพในการทำงานของ subunit vaccine จึงจำเป็นต้องผสมสารเสริมฤทธิ์ (adjuvant) เพื่อช่วยให้ subunit vaccine สามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ อย่างมีประสิทธิภาพ (1, 2) สารเสริมฤทธิ์มีประโยชน์สำคัญอื่น ๆ อีกหลายประการ ได้แก่ ช่วยกำหนดทิศทางการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ช่วยลดปริมาณแอนติเจนทำให้สามารถผลิตวัคซีนได้ปริมาณมากขึ้น ช่วยลดจำนวนครั้งในการให้วัคซีน ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของวัคซีนในคนชรา และสามารถใช้เป็นระบบนำส่งวัคซีนไปยังเซลล์หรือบริเวณเป้าหมายได้ (3, 4)

สารเสริมฤทธิ์มีหลายกลุ่ม เช่น mineral salts, emulsion, microbial derivatives, cytokines, immune stimulating complexes (ISCOM), particulate compounds, และ carbohydrate เป็นต้น (4, 8) ซึ่งสารเสริมฤทธิ์แต่ละกลุ่มมีความสามารถในการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแตกต่างกัน ดังนั้นการเลือกสารเสริมฤทธิ์ให้เหมาะกับชนิดของวัคซีนจึงเป็นกลยุทธ์สำคัญในการพัฒนาวัคซีนให้ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ปัจจุบันสารเสริมฤทธิ์ที่ผ่านการรับรองและได้รับใบอนุญาตให้ใช้ได้มีคนนั้น มีเพียง 5 ชนิด (2, 9-12) ได้แก่

1) Alum อยู่ในกลุ่มของ mineral salts ประกอบด้วย aluminum phosphate หรือ aluminum hydroxide alum เป็นสารเสริมฤทธิ์ชนิดแรกที่ถูกนำมาใช้ในวัคซีนหลายชนิด

2) MF59 เป็นสารเสริมฤทธิ์จำพวก oil-in water emulsion ประกอบด้วย squalene, polysorbate 80 และ sorbitan trioleate MF59 นิยมใช้ในวัคซีนไข้หวัดใหญ่ (influenza vaccine)

3) AS03 เป็น oil-in water emulsion ประกอบด้วย squalene, tween 80 และ α -tocopherol AS03 มักถูกผสมในวัคซีนไข้หวัดใหญ่เช่นเดียวกับ MF59

4) AS04 พัฒนามาจากการนำ alum มาผสมกับ MPL (3'-O-deacylated monophosphoryl lipid A) ปัจจุบัน AS04 ใช้ถูกใช้ในวัคซีนไวรัสตับอักเสบบี (hepatitis B virus)

5) Virosomes เป็น liposomes ที่ประกอบด้วย lipids และ hemagglutinin ใช้ผสมในวัคซีนไข้หวัดใหญ่ และไวรัสตับอักเสบบี A

อย่างไรก็ตามสารเสริมฤทธิ์ดังกล่าวยังมีข้อจำกัด คือ จะกระตุ้นการตอบสนองของ humoral immunity ซึ่งเป็นการตอบสนองโดยการสร้างแอนติบอดีได้ดีเท่านั้น แต่ไม่สามารถกระตุ้นการทำงานของ cell-mediated immunity ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (1, 5) ซึ่งกลไกการต่อต้านโรคติดเชื้อหลายชนิด เช่น วัณโรค HIV มาลาเรีย และ เชื้อรา เป็นต้น และกลไกต่อต้านเซลล์มะเร็งจำเป็นต้องอาศัยภูมิคุ้มกันชนิด cell-mediated immunity เป็นหลัก ดังนั้นการพัฒนาสารเสริมฤทธิ์จึงเป็นปัจจัยสำคัญช่วยให้การพัฒนาวัคซีนประสบความสำเร็จ กลไกการทำงานของสารเสริมฤทธิ์ คือ กระตุ้น PRRs (Pathogen Recognition Receptors) (1, 4, 8, 15) ซึ่ง PRRs จะเป็นตัวรับสัญญาณ (receptor) ที่มีความสำคัญในการรับรู้ (recognition) และกระตุ้นการตอบสนองของ innate immunity โดย PRRs จะจับกับ PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเชื้อจุลินทรีย์ และส่งสัญญาณกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันเกิดการตอบสนอง(16) กลไกการทำงานอื่น ๆ ของสารเสริมฤทธิ์ที่ช่วยเสริมการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกัน ได้แก่ เพิ่มอัตราการจับกิน ย่อยสลายและนำเสนอแอนติเจน และกระตุ้นการหลั่ง chemokines ช่วยให้ดึงดูดเซลล์ภูมิคุ้มกันเข้ามาทำงานในบริเวณที่มีการนำส่งวัคซีนมากขึ้น(15) นอกจากนี้สารเสริมฤทธิ์บางชนิดยังสามารถส่งเสริมกลไก cross-presentation ซึ่งจะช่วยให้กระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิด CTLs (cytotoxic lymphocytes) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (17)

เดนไดรติกเซลล์ (Dendritic cell หรือ DC) เป็น innate immune cell ที่ทำหน้าที่เป็น APC (antigen presenting cell) เดนไดรติกเซลล์มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการตอบสนองของ adaptive immunity ซึ่งเดนไดรติกเซลล์จะมีการแสดงออกของ PRRs หลากหลายชนิด ทำให้สามารถรับรู้และถูกกระตุ้นด้วย PAMPs ได้หลากหลาย สัญญาณจาก PAMPs/PRRs ที่ต่างชนิดกันจะทำให้มีการตอบสนองของเดนไดรติกเซลล์แตกต่างกัน ส่งผลให้เกิดการตอบสนองของ adaptive immunity ต่างชนิดกัน ตัวอย่างเช่น สัญญาณจาก TLR-4, TLR-5, TLR-3, TLR-7 และ TLR-9 จะกระตุ้นเดนไดรติกเซลล์หลั่ง IL-12 ส่งผลให้ทีลิมโฟไซต์พัฒนาเป็น Th1 (T helper 1) ซึ่งจะต่อต้านเชื้อกลุ่ม intracellular pathogen ได้ดี สัญญาณจาก TLR-2 จะกระตุ้นเดนไดรติกเซลล์ให้หลั่ง IL-4 และ IL-10 ทำให้ทีลิมโฟไซต์พัฒนาเป็น Th2 (T helper 2) ซึ่งเป็นกลไกในการต่อต้านเชื้อหนองพยาธิได้ และสัญญาณจาก Dectin-1 จะมีผลต่อการหลั่ง IL-6 และ IL-23 ของเดนไดรติกเซลล์ ทำให้ทีลิมโฟไซต์พัฒนาเป็น Th17 (T helper 17) ซึ่งจะทำหน้าที่ต่อต้านเชื้อกลุ่ม extracellular pathogen เป็นต้น (18) โดยสรุป กล่าวคือการรับสัญญาณผ่าน PRRs ในเดนไดรติกเซลล์มีความสำคัญในการกำหนดทิศทางการตอบสนองของ adaptive immunity ทำให้ร่างกายสามารถต่อต้านเชื้อโรคได้อย่างเหมาะสมและมีประสิทธิภาพ (19) ดังนั้นเดนไดรติกเซลล์จึงเป็นเซลล์เป้าหมายหลักของการนำส่งแอนติเจนในวัคซีนและการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสารเสริมฤทธิ์ (20, 21)

สารเสริมฤทธิ์กลุ่มคาร์โบไฮเดรตเป็นที่เริ่มศึกษากันมากขึ้น เนื่องจากคาร์โบไฮเดรตเป็นสารธรรมชาติ สามารถถูกย่อยสลายได้ในร่างกายและไม่มีเมตาโบไลต์ที่เป็นพิษ (14) คาร์โบไฮเดรตเป็น PAMPs ที่สามารถจับกับ PRRs กลุ่ม CLRs (C-type lectins) และ TLRs (Toll-like receptors) ซึ่งจะส่งสัญญาณไปกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ และยังสามารถกระตุ้นการตอบสนองของ adaptive immunity ได้หลายชนิด(22) ปัจจุบันคาร์โบไฮเดรตหลายชนิดถูกนำมาพัฒนาเป็นสารเสริมฤทธิ์ เช่น กลูแคน (glucan) ไคติน (chitin) ไคโตซาน (chitosan) และ กลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่สกัดจากผนังเซลล์ของเชื้อ

Mycobacterium เป็นต้น(14) เบต้ากลูแคน (β -glucan) เป็นสารเสริมฤทธิ์ที่มีการศึกษาเป็นจำนวนมาก พบว่าเบต้ากลูแคนมีความสามารถในการกระตุ้นคอมพลีเมนต์ (complement) และเหนี่ยวนำทำให้เกิดการสลายของเซลล์ (cell lysis) ดังนั้นกลูแคนจึงถูกนำมาพัฒนาเป็นสารเสริมฤทธิ์ในวัคซีนสำหรับรักษาโรคมะเร็ง เพื่อหวังผลให้เซลล์มะเร็งถูกทำลายได้โดยกระบวนการคอมพลีเมนต์ (23-25) muramyl dipeptide และ trehalose-6-6-dimycolate เป็นคาร์โบไฮเดรตที่สกัดจากผนังเซลล์ของเชื้อ Mycobacterium ที่ถูกนำมาศึกษาเพื่อใช้เป็นสารเสริมฤทธิ์สำหรับวัคซีนวัณโรคในสัตว์ทดลอง พบสารทั้งสองชนิดนี้มีคุณสมบัติสามารถกระตุ้นการอักเสบและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ดี (14) อย่างไรก็ตามสารทั้งสองชนิดยังมีความเป็นพิษสูง (26, 27) โดยเฉพาะ trehalose-6-6-dimycolate (TDM) สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดแกรนูโลมา (granuloma) ทั้งในหนูเมาส์ หนูตะเภา และ กระจ่าง(27-29)

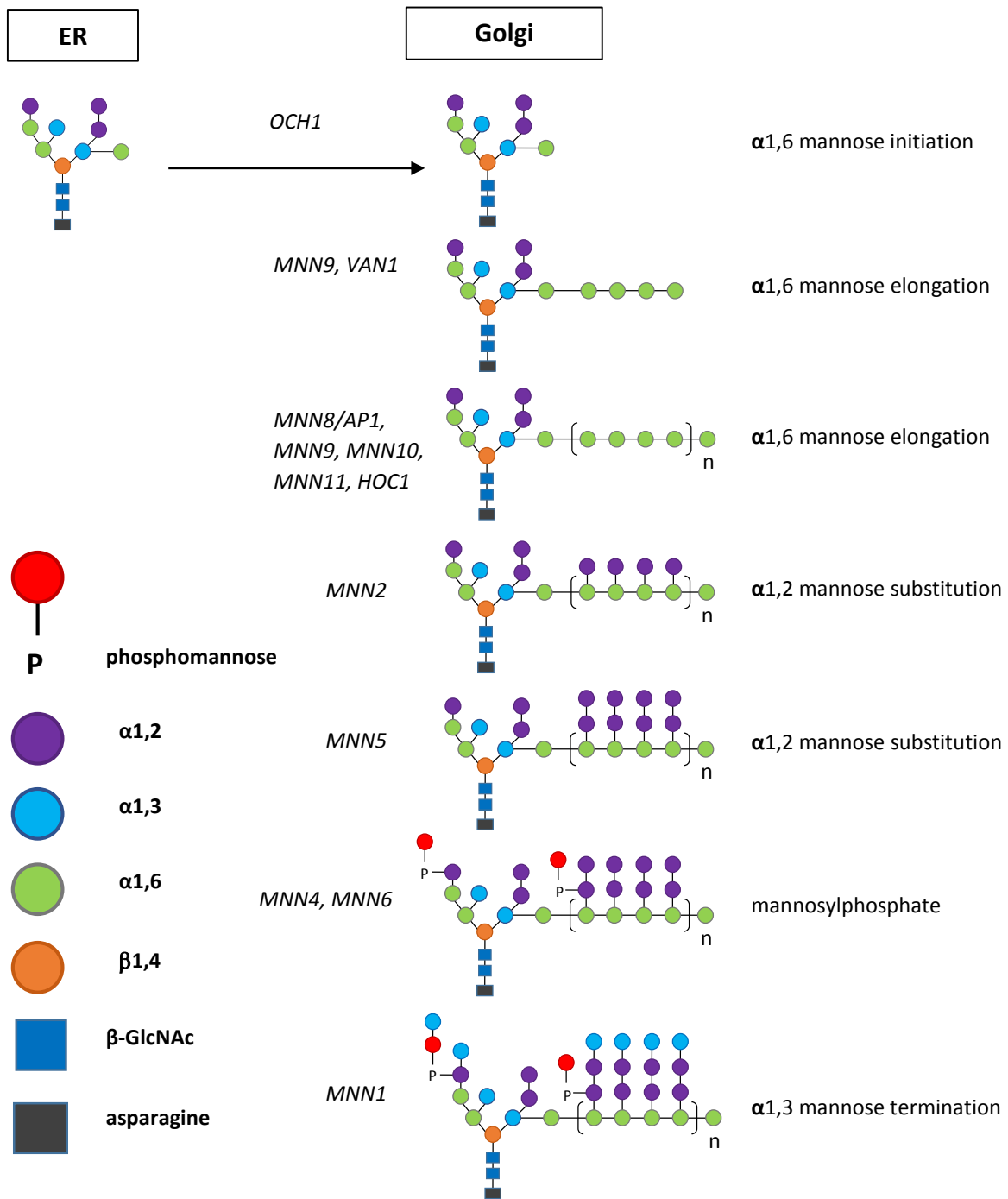
ผนังเซลล์ของเชื้อรา มีองค์ประกอบหลักเป็นคาร์โบไฮเดรตโพลิเมอร์ 3 ชนิด ได้แก่ แมนแนน (mannan) กลูแคน (glucan) และไคติน (chitin) ซึ่งจะมีสัดส่วนและโครงสร้างแตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อรา (30) แมนแนน เป็นคาร์โบไฮเดรตโพลิเมอร์ที่เรียงตัวอยู่ชั้นนอกสุดของผนังเซลล์ แมนแนนสามารถจับกับ PRRs ได้หลายชนิด เช่น TLR-2, TLR-4, dectin, DC-SIGN, mannose receptor, mincle, Fc γ R และ langerin เป็นต้น (13) ทั้งนี้ความจำเพาะต่อ PRRs แต่ละชนิดขึ้นอยู่กับโครงสร้างของแมนแนน ตัวอย่างเช่น จากการศึกษาในหนูที่ไม่มียีนส์ dectin-2 พบว่าหนูชนิดนี้จะไม่มีความไวต่อการติดเชื้อ *C. albicans* มากกว่า *Cryptococcus neoformans* (31) และยังมีการศึกษาพบว่า mincle เป็น PRRs ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Malassezia* spp. และ *C. albicans* (32) นอกจากโครงสร้างแมนแนนจะมีผลต่อการจับกับ PRRs แล้ว โครงสร้างของแมนแนนที่แตกต่างกันยังมีผลต่อการตอบสนองของเดนไดรติกเซลล์ด้วย เช่น เชื้อรา *Candida albicans* ที่ไม่มีโครงสร้าง β -1,2 mannan มีผลทำให้เดนไดรติกเซลล์มีการหลั่งไซโตไคน์ชนิด TNF- α , IL-6 และ IL-12 เพิ่มมากขึ้น (33) และ โครงสร้าง N-linked mannan ในผนังเซลล์ของเชื้อรา *C. albicans* จะกระตุ้นเดนไดรติกเซลล์ให้หลั่ง IL-6 ได้ดีกว่า โครงสร้าง O-linked mannan และ phosphomannan (34) เป็นต้น

Saccharomyces cerevisiae เป็นเชื้อราชนิดที่ไม่ก่อโรค (non-pathogenic fungi) ที่ถูกนำมาศึกษาสำหรับใช้นำส่งแอนติเจนพร้อมทั้งทำหน้าที่เป็นสารเสริมฤทธิ์ในวัคซีน ในปี 1984 Mc aleer และคณะประสบความสำเร็จในการนำ whole recombinant *S. cerevisiae* มาใช้เป็นวัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบบีในหนูเมาส์ และลิง (35) ต่อมาในปี 2001 Stubbs และคณะได้นำ recombinant *S. cerevisiae* มาใช้เป็นวัคซีนป้องกันมะเร็งในหนูเมาส์ โดยการตัดต่อยีนส์โปรตีนแอนติเจนของเซลล์มะเร็งที่ลิโมนา (E.G7) เข้าไปใน *S. cerevisiae* แล้วนำมากระตุ้นเดนไดรติกเซลล์ พบว่าสามารถกระตุ้นเดนไดรติกเซลล์ให้เกิด maturation ได้ดี และเพิ่มการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-12 ในเดนไดรติกเซลล์ และเมื่อนำ whole recombinant *S. cerevisiae* ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E.G7 ฉีดเข้าในหนู พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนและการตอบสนองของ CTLs ได้ดี และสามารถลดขนาดของมะเร็งได้ (36) ซึ่งการศึกษาทั้งสองดังกล่าวข้างต้น ใช้ *S. cerevisiae* ที่มีชีวิต (lived yeast) เพื่อนำส่งแอนติเจนและกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ในระยะต่อมาการศึกษาของ Franzusoff และคณะ พบว่า whole recombinant *S. cerevisiae* ที่ตายด้วยความร้อน (heat-killed yeast) มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดีเทียบเท่ากับ *S. cerevisiae* ที่มีชีวิต และสามารถใช้เป็นวัคซีนรักษาโรคมะเร็ง squamous cell carcinoma ได้ (37) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอื่นๆ ที่ใช้ whole recombinant *S. cerevisiae* ที่ตายด้วยความร้อนมาใช้เป็นวัคซีน เช่น วัคซีนรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Colon carcinoma) (38) และวัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis C virus) (39) เป็นต้น ถึงแม้ว่าการใช้ whole recombinant *S. cerevisiae* ที่ตายด้วยความร้อนเป็นวัคซีนประสบความสำเร็จในสัตว์ทดลอง แต่การนำมาใช้จริงในคนยังมีข้อจำกัดอยู่บางประการเช่น ความเสี่ยงในการเกิดผลข้างเคียง ความร้อนที่ใช้ในการทำให้ยีสต์ตายอาจทำให้เกิดการเสียหายของโปรตีน

แอนติเจนบางชนิด เช่น กลุ่มโปรตีนที่ไวต่อความร้อน และการตัดต่อยีนและความสำเร็จในการแสดงออกของโปรตีนแอนติเจนบางชนิดอาจใช้เวลานาน หรืออาจไม่สามารถทำได้อย่างมีประสิทธิภาพ เป็นต้น

การใช้ความร้อนสูง 60-120 องศาเซลเซียสทำให้เชื้อราตายหรือหมดฤทธิ์ (inactivation) เชื้อจะไม่สามารถเพิ่มจำนวนและสร้างหรือผลิตสารใดๆ แต่เชื้อยังคงสภาพเดิม (37) ดังนั้นผนังเซลล์จึงเป็นตัวสำคัญในการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นแล้วว่า แมนแนนเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของเชื้อราที่อยู่ด้านนอกสุด แมนแนนจึงเป็นส่วนแรกที่จับกับ PRRs ที่อยู่บนเดนไดรติกเซลล์ และกระตุ้นเดนไดรติกเซลล์ให้มีการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์และหลั่งไซโตไคน์ชนิดต่าง ๆ ที่สามารถกระตุ้นการตอบสนองของ adaptive immunity จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการนำแมนแนนที่สกัดจาก *S. cerevisiae* ไปปรับเปลี่ยนพันธะ โดยทำให้เกิดปฏิกิริยา oxidization หรือ reduction เพื่อให้ใช้ติดกับโปรตีนแอนติเจนและนำส่งเป็นวัคซีน พบว่าสามารถกระตุ้นการเกิด maturation ของเดนไดรติกเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (40) โดย oxidized mannan จะสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองแบบ Th1 (T helper 1) (41) และสามารถกระตุ้นการผลิต IgA ได้ดี (42) ส่วน reduced mannan จะเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองแบบ Th2 (T helper 2) (43)

ปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างแมนแนน และการนำแมนแนนมาใช้สำหรับเป็นสารเสริมฤทธิ์ยังมีไม่มากนัก อาจเป็นเพราะในธรรมชาติ แมนแนนไม่มีโครงสร้างที่หลากหลายเมื่อเทียบกับกลูแคน คณะผู้วิจัยได้ทำการค้นหาข้อมูลใน Saccharomyces genome database พบว่ามีกลุ่มยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างแมนแนนในผนังเซลล์ของ *S. cerevisiae* ซึ่งกระบวนการของการเติมแมนโนส (mannosylation) แต่ละขั้นตอนนั้นจะอาศัยการควบคุมของยีนแตกต่างกัน (44, 45) (รูปที่ 1) โดย *OCH1* เป็นยีนที่ควบคุมการเติมแมนโนสตัวแรกที่ตำแหน่ง α -1,6 *MNN9* และ *VAN1* เป็นยีนลำดับถัดมาที่ควบคุมการสร้างสายน้ำตาลที่เป็นแกนหลัก (mannose backbone) ซึ่งจะเติมแมนโนสที่ตำแหน่ง α -1,6 ต่อเนื่องเพื่อเพิ่มความยาวของสาย (elongation) จากนั้นสายน้ำตาลแมนโนสจะถูกต่อกิ่งออกไป โดย *MNN2* เป็นยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการเติมแมนโนสแถวแรกถัดจากสายแกนหลัก ที่ตำแหน่ง α -1,2 และ *MNN5* จะเป็นยีนที่ควบคุมการเติมแมนโนสแถวที่ 2 ที่ตำแหน่ง α -1,2 จากนั้น *MNN1* จะทำหน้าที่ควบคุมการเติมแมนโนสตัวสุดท้าย (terminal mannose) ที่ตำแหน่ง α -1,3 (44, 45)



รูปที่ 1 แสดงขั้นตอนการสร้าง N-linked mannan ในผนังเซลล์ของเชื้อรา *S. cerevisiae* ซึ่งการเติมแมนโนสในแต่ละขั้นตอน จะถูกควบคุมด้วยยีนต่างชนิดกัน (44, 45)

โดยการอาศัยประโยชน์จากฐานข้อมูลดังกล่าว ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาการตอบสนองของเดนไดรติกเซลล์ และระบบภูมิคุ้มกันต่อ *S. cerevisiae* ที่มีการตัดยีนเดี่ยว (single gene deletion) แต่ละยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการเติมแมนโนสในแต่ละขั้นตอน จาก yeast deletion library ซึ่งการตัดยีนดังกล่าวจะส่งผลให้

S. cerevisiae mutant แต่ละสายพันธุ์มีโครงสร้างของแมนแนนในผนังเซลล์ที่แตกต่างกัน เพิ่มความหลากหลายของโครงสร้างแมนแนน

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยได้ขยายขอบเขตการทดลอง โดยใช้แมนแนนของเชื้อรา *Candida* มาทดสอบด้วย เนื่องจากแมนแนนของ *Candida* มีความซับซ้อน และแตกต่างจากแมนแนนของ *S. cerevisiae* ผู้วิจัยจึงคาดหวังแมนแนนของ *Candida* ว่าน่าจะสามารถกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ดี ซึ่งองค์ความรู้จากงานวิจัยนี้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาสารเสริมฤทธิ์ในวัคซีนชนิดคาร์โบไฮเดรต

วัตถุประสงค์โครงการ

- 1) เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของ *S. cerevisiae* และชนิดของเชื้อราแคนดิดา ที่สามารถกระตุ้นการตอบสนองของเดนไดรติกเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ
- 2) เพื่อศึกษาการตอบสนองของเดนไดรติกเซลล์ต่อแมนแนน (mannan) ที่มีโครงสร้างแตกต่างกัน
- 3) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแมนแนนชนิดต่าง ๆ ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะในสัตว์ทดลอง

ขอบเขตของโครงการวิจัย

พัฒนาสารเสริมฤทธิ์วัคซีนชนิดแมนแนนจาก *S. cerevisiae* ที่มีการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเติมน้ำตาลแมนโนส ซึ่งมีผลทำให้เกิดโครงสร้างแมนแนนที่แตกต่างกัน และจากเชื้อราแคนดิดาชนิดต่าง ๆ โดยจะเริ่มจากการคัดเลือกสายพันธุ์ของ *S. cerevisiae* และ เชื้อราแคนดิดาที่สามารถกระตุ้นการตอบสนองของเดนไดรติกเซลล์ในห้องปฏิบัติการได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากนั้นจะทำการสกัดแมนแนนจากผนังเซลล์ของเชื้อราที่คัดเลือก และนำแมนแนนที่สกัดได้มาทดสอบคุณสมบัติความเป็นสารเสริมฤทธิ์วัคซีน โดยการวัดตอบสนองของเดนไดรติกเซลล์ในห้องปฏิบัติการ และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะในสัตว์ทดลอง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) สารเสริมฤทธิ์วัคซีนชนิดแมนแนน
- 2) การเผยแพร่องค์ความรู้ทางวิชาการในวารสารระดับนานาชาติ

วิธีดำเนินการวิจัย

การทดสอบในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*)

การเตรียมเชื้อรา *S. cerevisiae* และ *Candida spp.*

เชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ BY4741 wild type และ mutants ที่ไม่มียีนเดี่ยวชนิด *och1Δ*, *mnn1Δ*, *mnn2Δ*, *mnn4Δ*, *mnn5Δ*, และ *van1Δ* เชื้อราแคนดิดาชนิด *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* และ *C. parapsilosis* จะถูกนำมาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ชนิดเหลว บ่มที่ 30°C และเขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 15-17 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อมาเจือจางให้ได้ค่า O.D. ที่ 600 nm = 0.1 และทำการเลี้ยงในสภาวะข้างต้นจนได้ค่า O.D. ที่ อยู่ใน log phase นำยีสต์ที่ได้มาล้างด้วย PBS ที่ปราศจากเชื้อ จำนวน 3 ครั้ง เตรียมเชื้อจำนวน 1×10^8 เซลล์ ใน PBS 1 มิลลิลิตร ต้มด้วยความร้อน 100 °C เป็นเวลา 10 นาที และนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การเตรียมเดนไดรติกเซลล์ที่พัฒนาจากเซลล์ไขกระดูก (Bone marrow-derived dendritic cell)

เตรียมเซลล์ไขกระดูกจากกระดูกขาหน้าและขาหลังของหนูเมาส์ นำเซลล์ไขกระดูกที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI ที่มี 10% Fetal bovine serum (FBS) ยาปฏิชีวนะ penicillin 10 units/ml และ streptomycin 10 µg/ml และเติมไซโตไคน์ GM-CSF และ IL-4 อย่างละ 10 ng/ml เพื่อเหนี่ยวนำให้เป็นเดนไดรติกเซลล์ เพาะเซลล์ไขกระดูกจำนวน 1×10^6 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 มิลลิลิตร ในจานเพาะเชื้อขนาด 24-well และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในภาวะที่มี CO₂ ปริมาณ 5% เป็นเวลา 7 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์และไซโตไคน์ทุกๆ 2 วัน

การแยกแมนแนนจากผนังเซลล์ของยีสต์

นำยีสต์ 100 กรัมมาแขวนลอยในสารละลายซิเตรต (citrate buffer) ที่มีความเข้มข้น 0.1 M ปริมาณ 50 มิลลิลิตร autoclave ที่อุณหภูมิ 120 °C เป็นเวลานาน 90 นาที รอให้เย็น แล้วปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 5000 rpm นาน 10 นาที นำส่วนใส (supernatant) ที่ได้ผสมกับสารละลาย Fehling's ในสัดส่วน 1:1 กวนทิ้งไว้ในอุณหภูมิ 4 °C นาน 18-24 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 5000 rpm นาน 10 นาที ละลายตะกอนในกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 3N ปริมาณ 8 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้หยดลงในสารละลายเมทานอลอะซิเตท (methanol : acetic acid = 8 : 1) ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ปั่นแยกตะกอน นำตะกอนที่ได้มาละลายในกรดไฮโดรคลอริก แล้วล้างด้วยสารละลายเมทานอลอะซิเตทจนได้ตะกอนสีขาว ละลายตะกอนในน้ำที่ปราศจากเชื้อ แล้วนำไป dialyze ในน้ำที่ปราศจากเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (46, 47) วัดความเข้มข้นของแมนโนสด้วยวิธี phenol-sulfuric acid (48)

การกระตุ้นเดนไดรติกเซลล์ในห้องปฏิบัติการและการวัดผลการตอบสนอง

- การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเชิงปริมาณ (Quantitative PCR)

นำเดนไดรติกเซลล์ที่พัฒนาจากเซลล์ไขกระดูกมากระตุ้นด้วยยีสต์ที่ตายด้วยความร้อนนาน 2, 4 และ 6 ชั่วโมง หรือด้วยแมนแนนนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์มาสกัด RNA และนำ RNA ที่ได้ไปทำปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบย้อนกลับ (reverse transcriptase-PCR) เพื่อให้ได้สาย cDNA จากนั้นนำ cDNA มาวิเคราะห์การแสดงออกของยีนชนิด *il1a* (IL-1 α), *il1b* (IL-1 β), *il4* (IL-4), *il6* (IL-6), *il10* (IL-10), *il12p35* (IL-12p35), *il12p40* (IL-12p40), *il15* (IL-15), *il23* (IL-23), *ifng* (IFN- γ), *ifna* (IFN- α), *ifnb* (IFN- β), *tnfa*

(TNF- α), tgfb (TGF- β) และ gapdh (GAPDH) ด้วยเทคนิค Real-time PCR และคำนวณหา relative mRNA expression โดยใช้ค่า Δcp

- การวิเคราะห์ maturation ของเดนไดรติกเซลล์

นำเดนไดรติกเซลล์ที่พัฒนาจากเซลล์ไขกระดูกมากระตุ้นด้วยยีสต์ที่ตายด้วยความร้อนนาน 24 ชั่วโมง หรือด้วยแมนแนนนาน 48 ชั่วโมง มาย้อมดูโปรตีนบนผิวเซลล์ชนิด CD11c, CD80, CD86 และ MHC class II วิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของโปรตีนด้วย Flow cytometry

- การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณไซโตไคน์

นำส่วนใส (supernatant) ที่ได้จากการกระตุ้นเดนไดรติกเซลล์ด้วยยีสต์ที่ตายด้วยความร้อนนาน 24 ชั่วโมง หรือด้วยแมนแนนนาน 48 ชั่วโมงมาวัดปริมาณไซโตไคน์ชนิด IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, IFN- γ ด้วยเทคนิค ELISA

- การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay โดยการกระตุ้นเดนไดรติกเซลล์ที่พัฒนามาจากไขกระดูกด้วยแมนแนนในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสาร 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ซึ่งเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่จะมี Mitochondrial Reductase สามารถเปลี่ยนสาร MTT (สีเหลือง) ไปเป็น Formazan (สีม่วง)

การทดสอบในสัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลอง

การเตรียมไขกระดูกใช้หนูเมาส์สายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย อายุ 5-6 สัปดาห์ ส่วนการทดสอบการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลองใช้หนูเมาส์สายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย อายุ 7-8 สัปดาห์ การเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลองเป็นไปตามการกำกับดูแลจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทางวิทยาศาสตร์ ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในส่วนการทดลองเบื้องต้นดำเนินการภายใต้ protocol no. 1573005

การกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง และการวัดผลการฉีดกระตุ้นหนูเมาส์

นำโปรตีน OVA ของไก่ (chicken ovalbumin) ปริมาณ 20 $\mu\text{g/ml}$ ผสมกับแมนแนน 1 mg ใน PBS 100 μl ฉีดเข้าสัตว์ทดลองทางใต้ผิวหนัง โดยทำการฉีดในวันที่ 0 และวันที่ 7 และเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อในวันที่ 14 โดยแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง ดังนี้

| | |
|----------------------------|---|
| กลุ่มที่ 1 (กลุ่มควบคุมลบ) | ได้รับโปรตีน OVA (ovalbumin) |
| กลุ่มที่ 2 | ได้รับโปรตีน OVA ร่วมกับแมนแนนชนิด <i>wt</i> |
| กลุ่มที่ 3 | ได้รับโปรตีน OVA ร่วมกับแมนแนนชนิด <i>mnn1Δ</i> |
| กลุ่มที่ 4 | ได้รับโปรตีน OVA ร่วมกับแมนแนนชนิด <i>mnn2Δ</i> |
| กลุ่มที่ 5 | ได้รับโปรตีน OVA ร่วมกับแมนแนนชนิด <i>och1Δ</i> |

เก็บต่อมน้ำเหลืองจากหนูที่ได้รับการฉีดกระตุ้นดังกล่าวข้างต้น และนำมาแยกเซลล์ต่อมน้ำเหลืองจากนั้นนำเซลล์ไปย้อมด้วยแอนติบอดีติดสีฟลูออเรสเซนต์ที่จำเพาะต่อโมเลกุล B220, CD3, CD4, CD8, CD44, CD62L และทำการวิเคราะห์ด้วย flow cytometry

การกระตุ้นการตอบสนองของ T cell ในหลอดทดลองทำโดยนำเซลล์ต่อมน้ำเหลืองปริมาณ 2×10^6 เซลล์/ปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์ 500 μ l กระตุ้นด้วย OVA ปริมาณ 200 μ g/ml เป็นเวลานาน 48 ชม. จากนั้นเก็บ supernatant และนำไปทดสอบชนิดของไซโตไคน์ด้วยเทคนิค ELISA

การวิเคราะห์ทางสถิติ

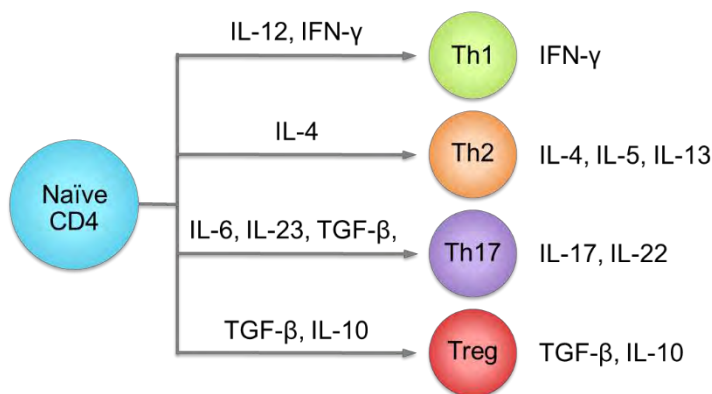
วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติโดยใช้ One-way ANOVA และ post-hoc Tukey HSD test

ผลการวิจัย

การคัดเลือกสายพันธุ์ของ *S. cerevisiae* ที่สามารถกระตุ้นการตอบสนองของเดนไดรติกเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

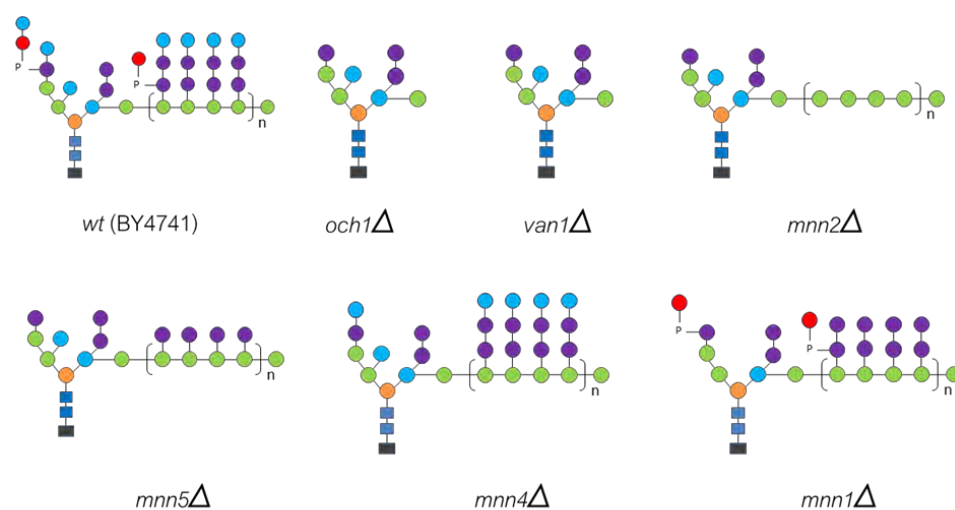
เดนไดรติกเซลล์ (Dendritic cell หรือ DC) เป็นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immune system) ที่ทำหน้าที่เป็นแอนติเจนพรีเซนติงเซลล์ หรือ APC (antigen presenting cell) เดนไดรติกเซลล์จะจับกิน ย่อยสลาย และนำเสนอแอนติเจนเพื่อกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive immune system) นอกจากนี้เดนไดรติกเซลล์ยังสามารถหลั่งสารกระตุ้น และควบคุมทิศทางการตอบสนองของ T cell ได้ด้วย ดังนั้นเดนไดรติกเซลล์จึงเป็นเซลล์เป้าหมายหลักของการนำส่งแอนติเจนในวัคซีนและการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสารเสริมฤทธิ์

T cell แบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ CD4 และ CD8 T cell ซึ่งทำหน้าที่ต่างกัน เมื่อ CD4 T cell ถูกกระตุ้นจะเปลี่ยนสภาพเป็น effector เซลล์ที่เรียกว่า “T helper cell หรือ Th” ในขณะเดียวกันเมื่อ CD8 T cell ถูกกระตุ้น จะเปลี่ยนสภาพเป็น effector เซลล์ที่เรียกว่า “Cytotoxic T lymphocyte หรือ CTL” การแปรสภาพของ T cell ทั้งสองชนิดขึ้นอยู่กับสัญญาณการกระตุ้นและไซโตไคน์จากแอนติเจนพรีเซนติงเซลล์ โดยไซโตไคน์สำคัญที่มีผลต่อการแปรสภาพของ CD4 T cell แสดงไว้ดังรูปที่ 2 ส่วนไซโตไคน์ที่สำคัญมีผลต่อการแปรสภาพของ CD8 T cell ได้แก่ IFN- γ และ IL-15



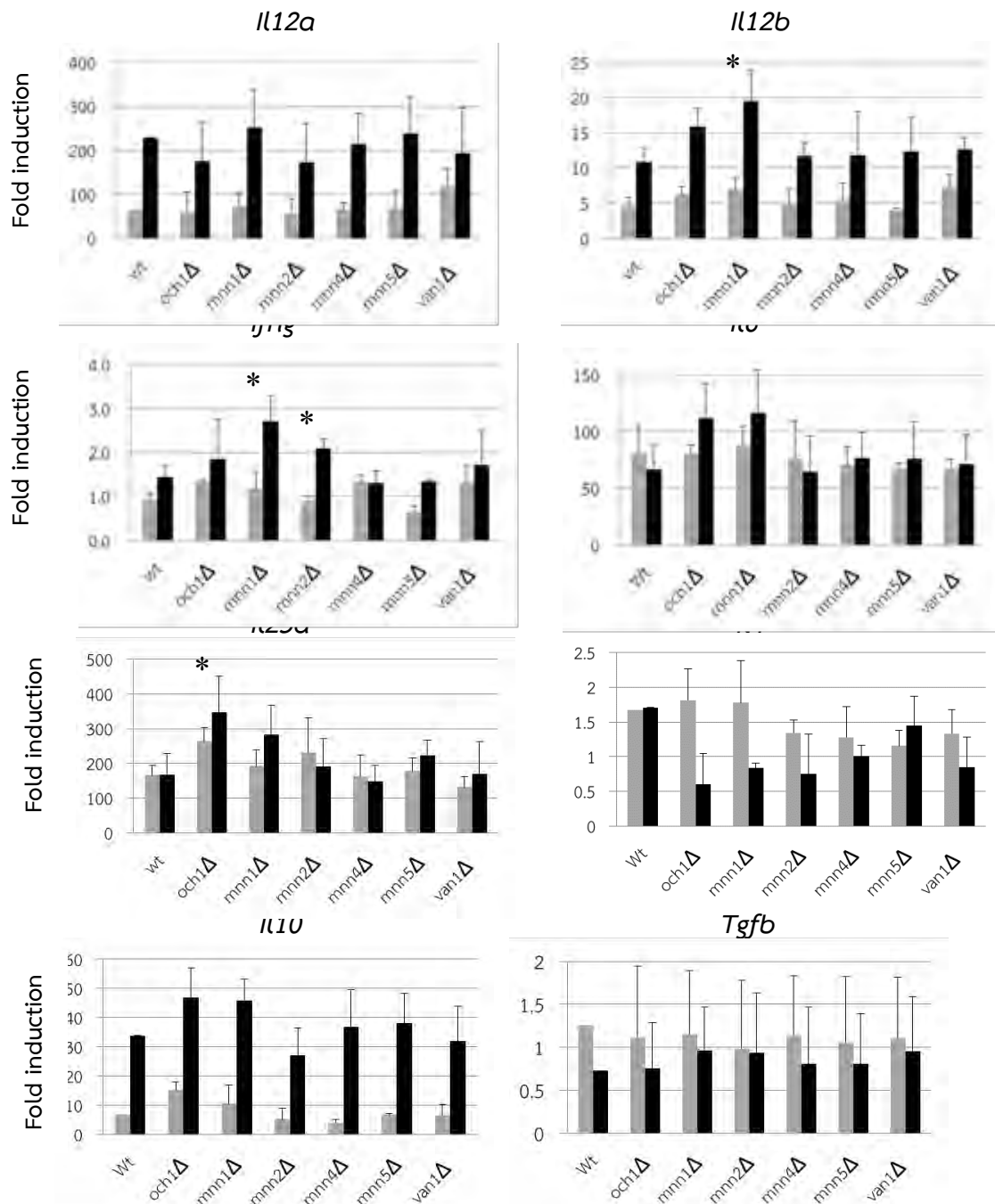
รูปที่ 2 ชนิดของไซโตไคน์มีผลต่อการเปลี่ยนสภาพของ naïve CD4 T lymphocyte

แมนแนน คือ พอลิเมอร์ของน้ำตาลแมนโนส ซึ่งเรียงตัวอยู่ชั้นนอกสุดของผนังเซลล์ของเชื้อรา เดนไดรติกเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแมนแนนจะมีความสามารถในการกระตุ้นการตอบสนองของ T cell โดยแมนแนนที่มีโครงสร้างต่างกัน จะสามารถกระตุ้นเดนไดรติกเซลล์ให้ตอบสนองแตกต่างกัน โครงการนี้ผู้วิจัยใช้ *S. cerevisiae* ที่มีการตัดยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการเติมแมนโนสในแต่ละขั้นตอน ซึ่งการตัดยีนดังกล่าวจะส่งผลให้ *S. cerevisiae* mutant แต่ละสายพันธุ์มีโครงสร้างของแมนแนนในผนังเซลล์ที่แตกต่างกัน (รูปที่ 3) เพื่อหาสารเสริมฤทธิ์ชนิดคาร์โบไฮเดรตชนิดใหม่



รูปที่ 3 แสดงโครงสร้างแมนแนนในผนังเซลล์ของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ wild type (wt), *och1Δ*, *van1Δ*, *mnn2Δ*, *mnn5Δ*, *mnn4Δ* และ *mnn1Δ* ซึ่งโครงสร้างนี้ผู้วิจัยคาดคะเนจากการทำงานของยีนแต่ละชนิด

ผู้วิจัยทำการคัดเลือกสายพันธุ์ของ *S. cerevisiae* โดย inactivate *S. cerevisiae* สายพันธุ์ wild type (wt) (กลุ่มควบคุม), *och1Δ*, *mnn1Δ*, *mnn2Δ*, *mnn4Δ*, *mnn5Δ*, และ *van1Δ* ด้วยความร้อน 100°C เป็นเวลา 10 นาที ซึ่งยีสต์จะไม่สามารถหลังสารชนิดอื่นๆ มากระตุ้นเดรนไตรติกเซลล์ นอกจากนี้ผู้วิจัยคาดว่าแมนแนนที่เรียงตัวอยู่ชั้นนอกสุดในผนังเซลล์ของยีสต์ จะทำหน้าที่หลักในการกระตุ้นเดรนไตรติกเซลล์ หลังจาก inactivate ยีสต์แล้ว ผู้วิจัยการกระตุ้นเดรนไตรติกเซลล์ที่พัฒนาจากไซกระดุกด้วยยีสต์ดังกล่าว เป็นเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเซลล์ที่ถูกกระตุ้นและนำมาวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *Il12a*, *Il12b*, *Ifng*, *Il6*, *Il23*, *Il4*, *Il10* และ *Tgfb* ด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 การแสดงออกของยีนเนเตนเตรตทกเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแมนแนนจาก *S. cerevisiae* กระตุ้นเดนไดรติกเซลล์ด้วย *S. cerevisiae* สายพันธุ์ wild type (wt), och1Δ, mnn1Δ, mnn2Δ, mnn4Δ, mnn5Δ, และ van1Δ เป็นเวลา 3 (กราฟแท่งสีเทา) และ 6 ชั่วโมง (กราฟแท่งสีดำ); $N = 5$; ใช้สถิติ student t-test, $*P \leq 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม wt

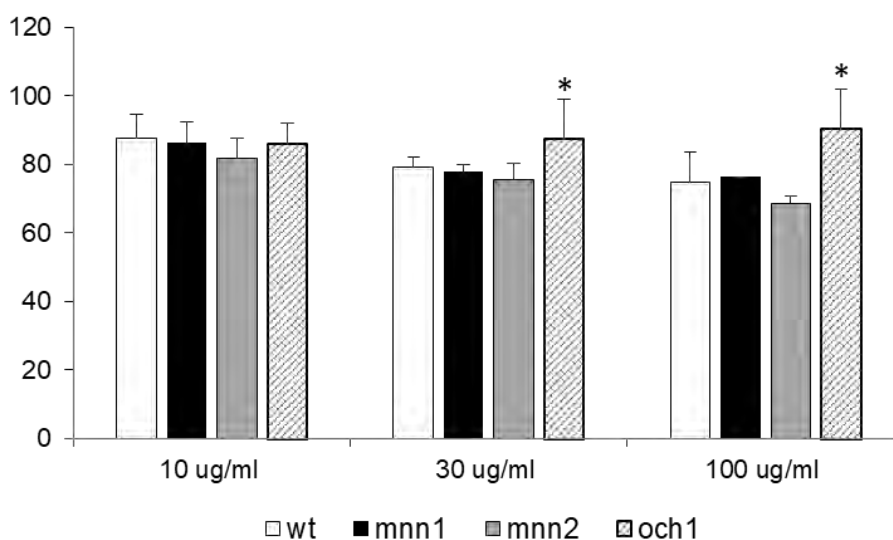
จากผลการทดลองในระดับยีนพบว่ายีสต์สายพันธุ์ och1Δ, mnn1Δ และ mnn2Δ สามารถกระตุ้นเดนไดรติกเซลล์ได้ โดยพบการเพิ่มขึ้นของยีน *Il23a*, *Il12b* และ *Ifng* ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม wt โดยไซโตไคน์ IL-23 มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของ Th17 ซึ่งมีความสำคัญในการต้านเชื้อก่อโรคลุ่ม extracellular pathogen ส่วน IL-12 และ IFN- γ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของ Th1 ซึ่งมีความสำคัญในการต้านเชื้อก่อโรคลุ่ม intracellular pathogen นอกจากนี้ IFN- γ ยังมีผลต่อการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงสภาพและการทำงาน CTLs

ซึ่งทำหน้าที่กำจัด intracellular pathogen โดยเฉพาะไวรัส ดังนั้นผู้วิจัยจึงคัดเลือกสายพันธุ์ดังกล่าวมาเพื่อสกัดแมนแนนและศึกษาต่อไป

การศึกษาการตอบสนองของเดนไดรติกเซลล์ต่อแมนแนน (mannan) ที่มีโครงสร้างแตกต่างกัน

ผู้วิจัยสกัดแมนแนนจากผนังเซลล์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ *wt*, *och1Δ*, *mnn1Δ* และ *mnn2Δ* โดยนำยีสต์ 100 กรัมมาแขวนลอยในสารละลายซิเตรท (citrate buffer) ที่มีความเข้มข้น 0.1 M ปริมาณ 50 มิลลิลิตร autoclave ที่อุณหภูมิ 120 °c เป็นเวลานาน 90 นาที รอให้เย็น แล้วปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 5000 rpm นาน 10 นาที นำส่วนใส (supernatant) ที่ได้ผสมกับสารละลาย Fehling's ในสัดส่วน 1:1 กวนทิ้งไว้ในอุณหภูมิ 4 °c นาน 18-24 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 5000 rpm นาน 10 นาที ละลายตะกอนในกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 3N ปริมาณ 8 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้หยดลงในสารละลายเมทานอลอะซิติก (methanol : acetic acid = 8 : 1) ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ปั่นแยกตะกอน นำตะกอนที่ได้มาละลายในกรดไฮโดรคลอริก แล้วล้างด้วยสารละลายเมทานอลอะซิติกจนได้ตะกอนสีขาว ละลายตะกอนในน้ำที่ปราศจากเชื้อ แล้วนำไป dialyze ในน้ำที่ปราศจากเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (46, 47) วัดความเข้มข้นของแมนแนนด้วยวิธี phenol-sulfuric acid (48)

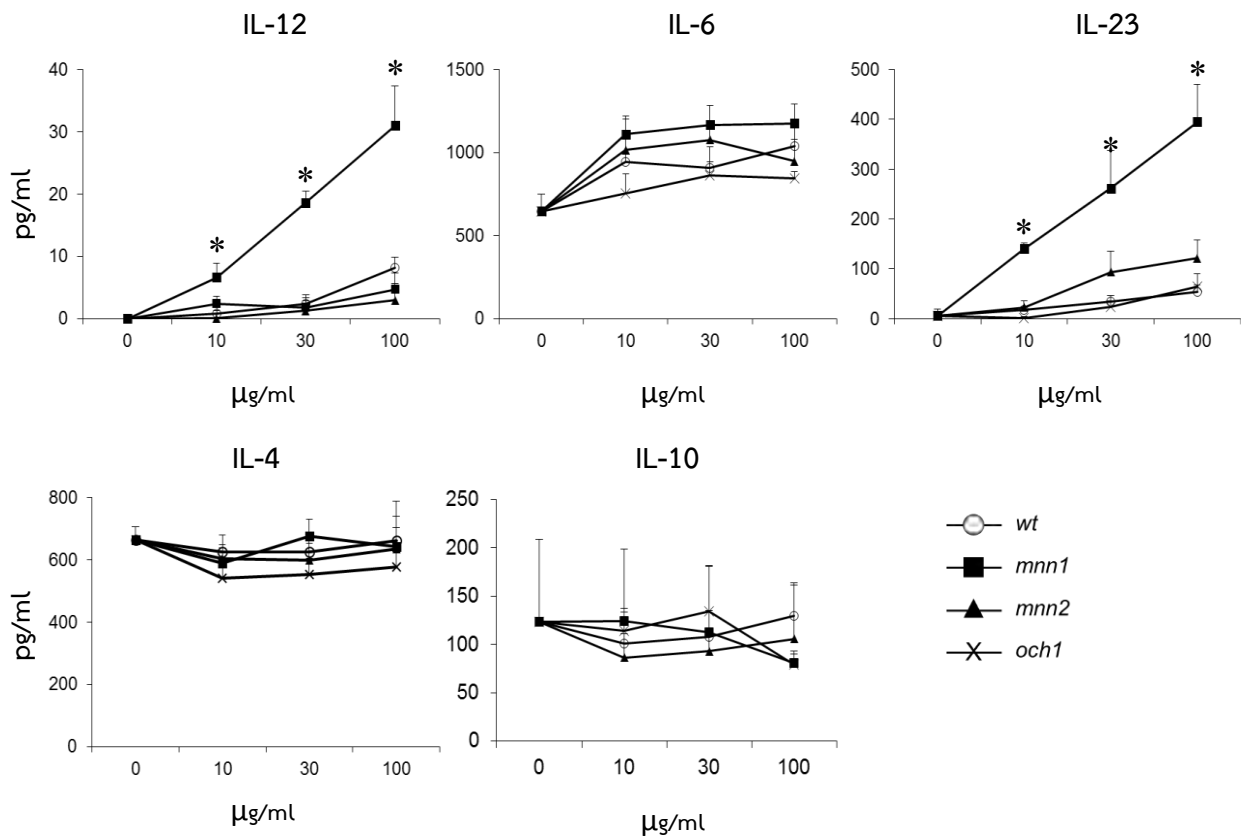
เมื่อได้แมนแนนในรูปสารละลาย ผู้วิจัยกระตุ้นเดนไดรติกเซลล์ที่พัฒนามาจากไขกระดูกด้วยแมนแนนสกัดจากผนังเซลล์ของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ *wt*, *mnn1Δ*, *mnn2* และ *och1Δ* ที่ความเข้มข้น 10, 30 และ 100 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจวัดความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability test) ด้วย MTT (รูปที่ 5) พบว่า ที่ความเข้มข้น 10 และ 30 µg/ml เดนไดรติกเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นจากแมนแนนทุกโครงสร้างมีชีวิตรอดอยู่ในช่วง 80-90% โดยที่ความเข้มข้น 30 µg/ml เดนไดรติกเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแมนแนนชนิด *och1Δ* จะมีชีวิตรอดมากกว่าเซลล์ที่ถูกกระตุ้นแมนแนนชนิดอื่นๆ ส่วนที่ความเข้มข้น 100 µg/ml เดนไดรติกเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยแมนแนนชนิด *wt*, *mnn1Δ*, *mnn2* มีชีวิตรอดอยู่ในช่วง 68-75% ส่วนเดนไดรติกเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแมนแนนชนิด *och1Δ* มีชีวิตรอดถึง 90%



รูปที่ 5 การทดสอบความมีชีวิตของเดนไดรติกเซลล์

นำเดนไดรติกเซลล์มากระตุ้นด้วยแมนแนนที่สกัดจากผนังเซลล์ของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ wt, *mnn1Δ*, *mnn2Δ* และ *och1Δ* โดยใช้ความเข้มข้นของแมนแนนที่ 10, 30 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ จากนั้นตรวจวัดความมีชีวิตของเซลล์ MTT; $N = 5$; ใช้สถิติ One-way ANOVA; $*P \leq 0.05$ เมื่อเทียบกับทุกกลุ่ม

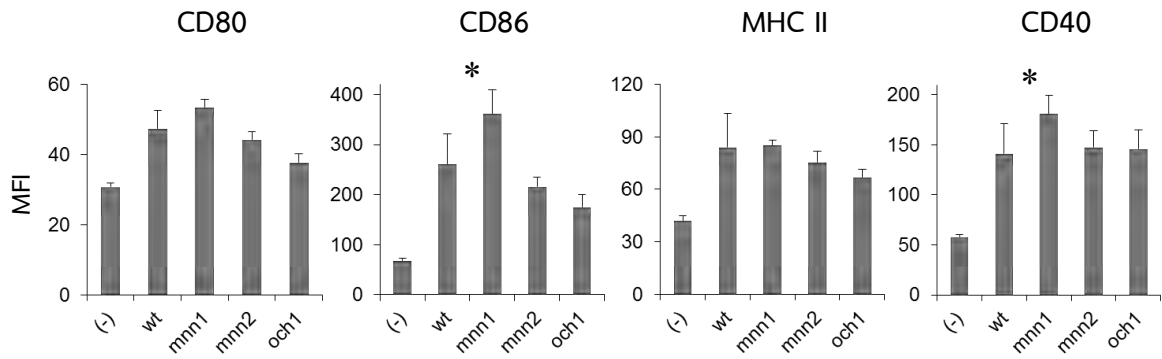
ต่อมาผู้วิจัยทำการกระตุ้นเดนไดรติกเซลล์ที่พัฒนามาจากไขกระดูกด้วยแมนแนนสกัดจากผนังเซลล์ของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ wt, *mnn1Δ*, *mnn2* และ Δ *och1Δ* และเก็บ supernatant ที่เวลา 24 เพื่อตรวจวัดไซโตไคน์ชนิด IL-23 และกระตุ้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อตรวจวัดไซโตไคน์ชนิด IL-12, IL-6, IL-4 และ IL-10 (รูปที่ 6) จากผลการทดลองพบว่าแมนแนนที่สกัดจาก *S. cerevisiae* สายพันธุ์ *mnn1Δ* มีความสามารถในการกระตุ้นเดนไดรติกเซลล์ให้หลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-12 และ IL-23 เมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์สายพันธุ์อื่นๆ



รูปที่ 6 การหลั่งไซโตไคน์จากเดนไดรติกเซลล์

นำเดนไดรติกเซลล์มากระตุ้นด้วยแมนแนนที่สกัดจากผนังเซลล์ของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ wt, *mnn1Δ*, *mnn2Δ* และ *och1Δ* โดยใช้ความเข้มข้นของแมนแนนที่ 10, 30 และ 100 µg/ml จากนั้นวัดระดับไซโตไคน์ใน supernatant ด้วยเทคนิค ELISA; $N = 5$; ใช้สถิติ One-way ANOVA; * $P \leq 0.05$ เมื่อเทียบกับทุกกลุ่ม

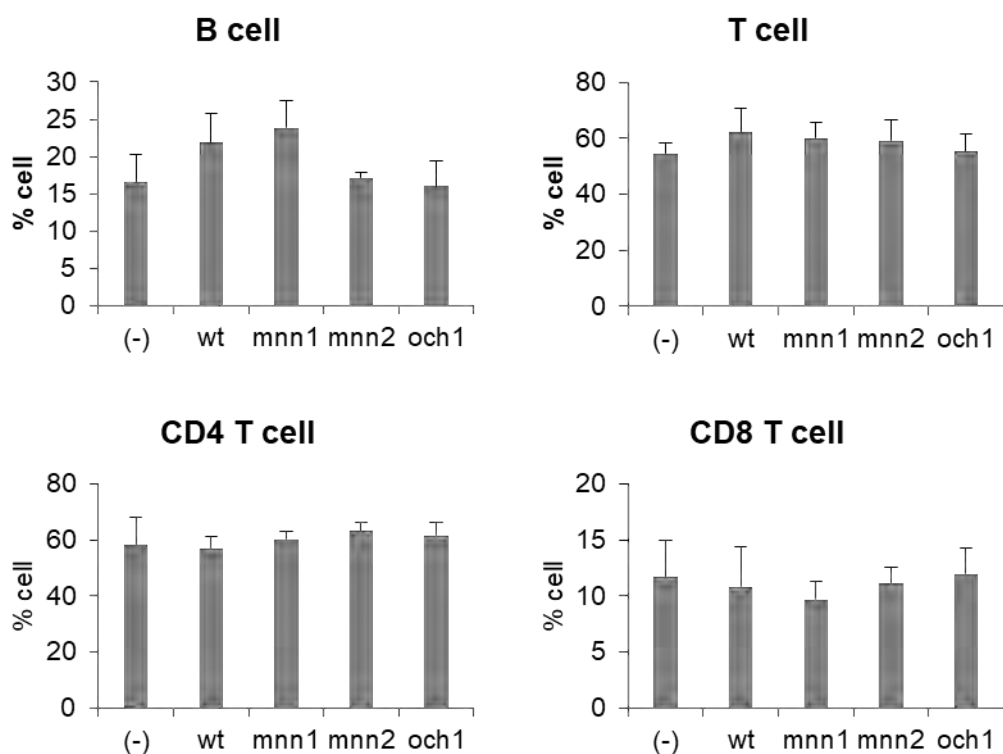
จากผลการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์แสดงให้เห็นว่า แมนแนนที่ความเข้มข้น 10 และ 30 µg/ml แสดงความเป็นพิษต่ำ (รูปที่ 5) อย่างไรก็ตามจากผลการทดสอบการผลิตไซโตไคน์ของเดนไดรติกเซลล์พบว่า แมนแนนที่ความเข้มข้น 30 µg/ml สามารถกระตุ้นเดนไดรติกเซลล์ให้หลั่งไซโตไคน์ได้ดีกว่าที่ความเข้มข้น 10 µg/ml (รูปที่ 6) ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกแมนแนนที่ความเข้มข้น 30 µg/ml มาทำการทดสอบ maturation ของเดนไดรติกเซลล์ โดยกระตุ้นเดนไดรติกเซลล์ที่พัฒนามาจากไขกระดูกด้วยแมนแนนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และวัดการแสดงออกของ maturation marker ชนิด CD80, CD86, MHC class II และ CD40 (รูปที่ 7) โดยพบว่า แมนแนนที่สกัดจากยีสต์สายพันธุ์ *mnn1Δ* สามารถกระตุ้นเดนไดรติกเซลล์ได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับยีสต์สายพันธุ์ *mnn2Δ* และ *och1Δ*



รูปที่ 7 การแสดงออกของ maturation marker ของเดนไดรติกเซลล์ นำเดนไดรติกเซลล์ที่กระตุ้นด้วยแมนแนนที่สกัดจากผนังเซลล์ของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ wt, mnn1Δ, mnn2 และ Δ och1Δ โดยใช้ความเข้มข้นของแมนแนนที่ 30 μg/ml วัดการแสดงออกของ CD80, CD86, MHC class II และ CD40 ด้วย Flow Cytometry และวิเคราะห์ผล; N = 5; ใช้สถิติ One-way ANOVA; *P ≤ 0.05 เมื่อเทียบกับทุกกลุ่ม

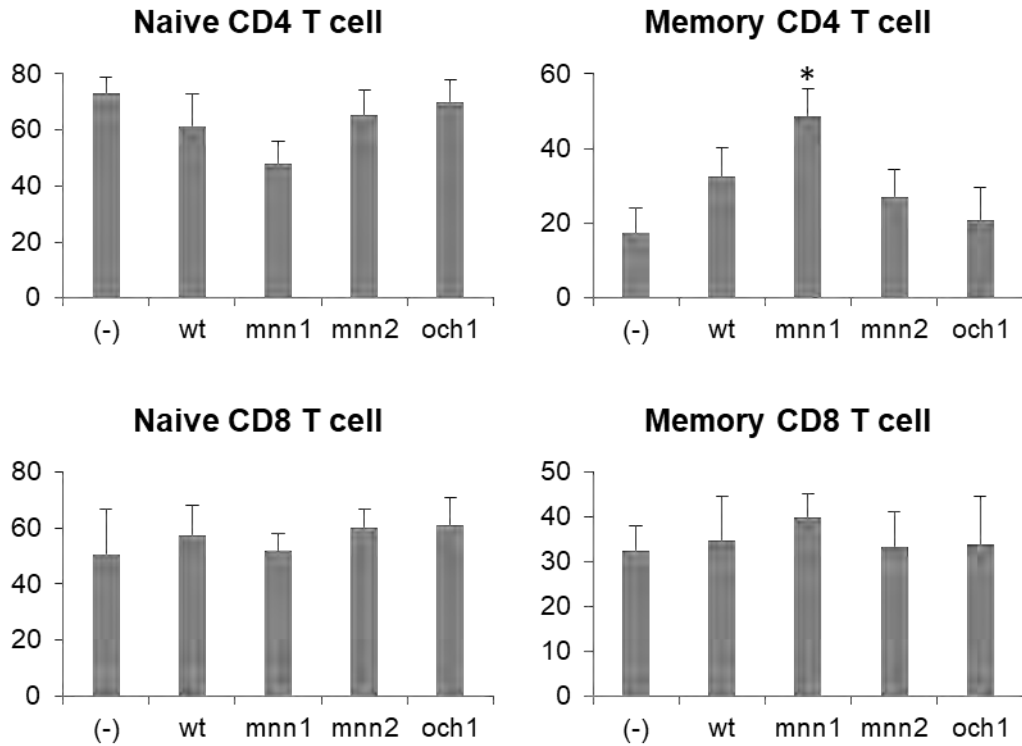
ศึกษาความเป็นสารเสริมฤทธิ์ของแมนแนนโครงสร้างต่างๆ ในสัตว์ทดลอง

จากผลการทดลองในหลอดทดลอง (*in vitro*) ข้างต้นพบว่า แมนแนนที่สกัดจากผนังเซลล์ของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ mnn1Δ มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการตอบสนองของเดนไดรติกเซลล์ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับยีสต์สายพันธุ์อื่นๆ ผู้วิจัยจึงทำการทดสอบคุณสมบัติความเป็นสารเสริมฤทธิ์ของแมนแนนในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) โดยใช้แอนติเจน คือ โปรตีน OVA จากไก่ (chicken oval albumin) ปริมาณ 20 μg/ml ผสมกับแมนแนนปริมาณ 1 mg ใน PBS 100 μl ฉีดเข้าใต้ผิวหนังของหนูเม้าส์ ในวันที่ 0 และ วันที่ 7 จากนั้นในวันที่ 14 เก็บต่อมน้ำเหลือง และแยกเซลล์มาวิเคราะห์สัดส่วนของ T cell (CD3⁺), B cell (B220⁺), CD4 T cell (CD3⁺CD4⁺) และ CD8 (CD3⁺CD8⁺) ด้วยเทคนิค flow cytometry จากผลการทดลองไม่พบความแตกต่างในสัดส่วนของ T cell และ B cell ระหว่างทุกกลุ่มการทดลอง (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 แสดงสัดส่วนของ T cell และ B cell ในหนูที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยสารเสริมฤทธิ์แมนแนน หนุมมาสที่ได้รับ OVA (20 $\mu\text{g/ml}$) ผสมกับแมนแนน (1 mg) ใน PBS 100 μl ผ่านทางการฉีดใต้ผิวหนังสัปดาห์ละ 1 ครั้ง จำนวน 2 สัปดาห์ ในวันที่ 7 หลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้าย ทำการเก็บต่อมน้ำเหลือง และแยกเซลล์ นำเซลล์มาแยกด้วยแอนติบอดีติดสีฟลูออเรสเซนต์ที่จำเพาะต่อ CD3, CD4, CD8 และ B220 และวิเคราะห์ด้วย flow cytometry; กลุ่มการทดลองได้แก่ กลุ่มควบคุม (ได้รับ OVA อย่างเดียว) และ กลุ่มการทดลองที่ได้รับ OVA ร่วมกับแมนแนนที่แยกจาก *S. cerevisiae* สายพันธุ์ wt, mnn1 Δ , mnn2 และ Δ och1 Δ ; $N = 5$; ใช้สถิติ One-way ANOVA

ในการทดลองเดียวกันได้ทำการตรวจวิเคราะห์สัดส่วน naive T cell คือ T cell ที่ไม่เคยได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่จำเพาะ และ memory T cell คือ T cell จดจำแอนติเจน สามารถตอบสนองได้เร็วขึ้นเมื่อได้รับแอนติเจนตัวเดิมในครั้งถัดไป และมีอายุยืนยาว การแยก T cell ทั้งสองกลุ่มนี้สามารถทำได้โดยใช้ marker CD44 และ CD62L ในการแยก โดย naive T cell = CD44^{lo}CD62^{hi} และ memory T cell = CD44^{hi}CD62^{lo} (**รูปที่ 9**) จากผลการทดลองพบว่า แมนแนนที่แยกจาก *S. cerevisiae* สายพันธุ์ mnn1 Δ สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ memory CD4 T cell มากกว่ากลุ่มควบคุม และแมนแนนชนิดอื่นๆ ได้อย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 9 แสดงสัดส่วนของ T cell และ B cell ในหนูที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยสารเสริมฤทธิ์แมนแนน หนูเมาส์ได้รับ OVA (20 $\mu\text{g/ml}$) ผสมกับแมนแนน (1 mg) ใน PBS 100 μl ผ่านทางการฉีดใต้ผิวหนังสัปดาห์ละ 1 ครั้ง จำนวน 2 สัปดาห์ ในวันที่ 7 หลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้าย ทำการเก็บต่อมน้ำเหลือง และแยกเซลล์ นำเซลล์มาย้อมด้วยแอนติบอดีติดสีฟลูออเรสเซนต์ที่จำเพาะต่อ CD3, CD4, CD8 และ B220 และวิเคราะห์ด้วย flow cytometry; กลุ่มการทดลองได้แก่ กลุ่มควบคุมลบ (ได้รับ OVA อย่างเดียว) และ กลุ่มการทดลองที่ได้รับ OVA ร่วมกับแมนแนนที่แยกจาก *S. cerevisiae* สายพันธุ์ wt, *mnn1* Δ , *mnn2* และ Δ *och1* Δ ; N = 5; ใช้สถิติ One-way ANOVA; *P \leq 0.05 เมื่อเทียบกับทุกกลุ่ม

นอกเหนือจากการทดลองดังกล่าวทั้งหมดข้างต้น คณะผู้วิจัยได้ทำการผลิตแมนแนนทุกชนิดให้กับโครงการที่ 2 เพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์โครงสร้างคาร์โบไฮเดรต และผลิตแมนแนนชนิด *mnn1* Δ ให้กับโครงการที่ 3 เพื่อนำไปสังเคราะห์อนุภาคแมนแนน

การทดสอบการตอบสนองของเดนไดรติกเซลล์ต่อแมนแนนของเชื้อรา *C. albicans*, *C. parapsilosis* และ *C. dubliniensis*

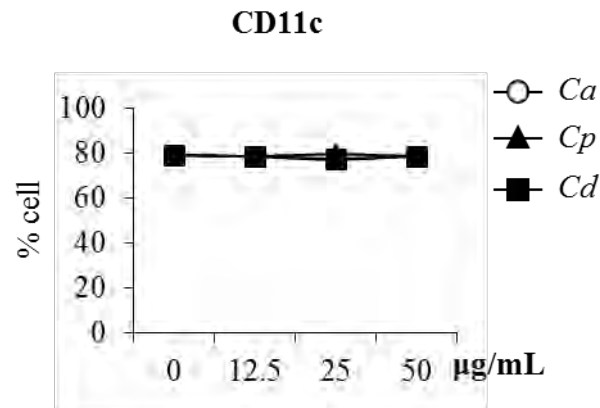
นำเดนไดรติกเซลล์ที่พัฒนาจากไขกระดูก (bone marrow-derived DCs) มากระตุ้นด้วยแมนแนนที่สกัดจากเชื้อรา *C. albicans*, *C. parapsilosis* และ *C. dubliniensis* ด้วยความเข้มข้น 12.5, 25 และ 50 $\mu\text{g/mL}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ (ตารางที่ 1) พบว่าแมนแนนมีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ (เดนไดรติกเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น) ซึ่งโดยปกติแล้ว เมื่อเดนไดรติกเซลล์ถูกกระตุ้น จะมีเซลล์บางส่วนตายหลังจาก 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม แมนแนนจากเชื้อทั้ง 3 ชนิด ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญต่อความมีชีวิตของเซลล์

ตารางที่ 1 การทดสอบความมีชีวิตของเดนไดรติกเซลล์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแมนแนนของเชื้อราแคนดิดา (mean \pm SD %)

| <i>Candida species</i> | Mannan concentration ($\mu\text{g/mL}$) | | |
|------------------------|---|-------------------|--------------------|
| | 12.5 | 25 | 50 |
| <i>C. albicans</i> | 78.16 \pm 3.57* | 75.70 \pm 8.60* | 68.61 \pm 10.80* |
| <i>C. parapsilosis</i> | 76.26 \pm 5.12* | 79.35 \pm 3.09* | 79.83 \pm 8.75* |
| <i>C. dubliniensis</i> | 71.42 \pm 7.24* | 76.83 \pm 8.27* | 73.39 \pm 7.87* |

* $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ comparison with the negative control (100.00 \pm 10.47 %)

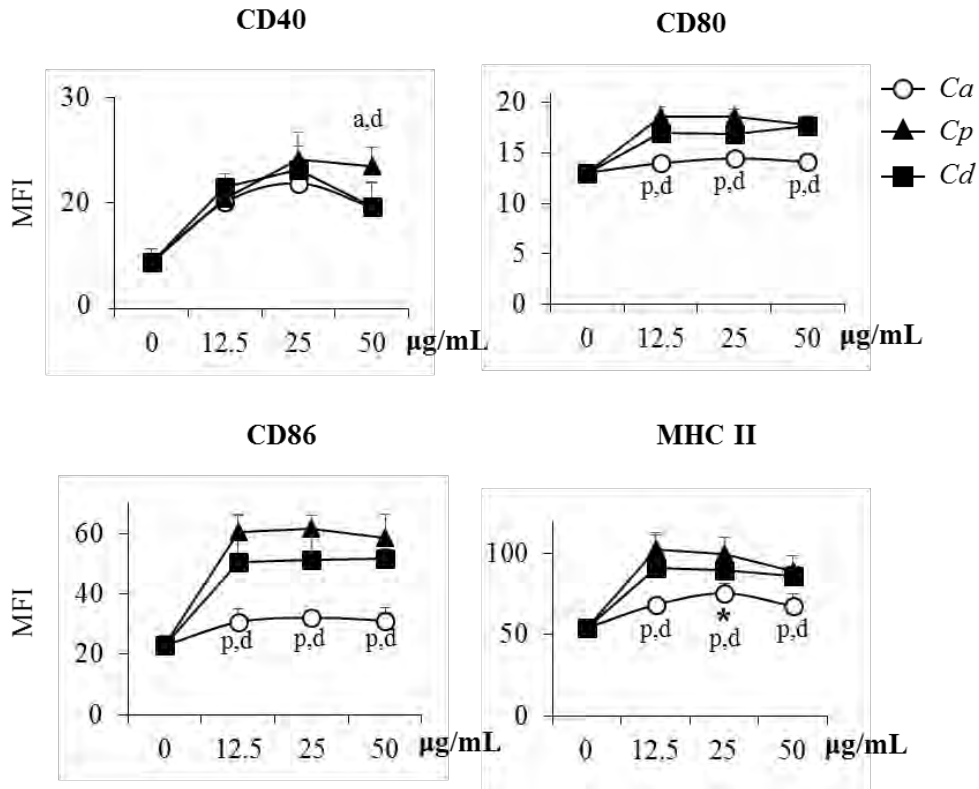
ต่อมาผู้วิจัยตรวจสอบผลของแมนแนนต่อสัดส่วนของเดนไดรติกเซลล์ โดยดูเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD11c ซึ่งเป็น marker ของเดนไดรติกเซลล์ พบว่าแมนแนนจากเชื้อราทั้งสามชนิดไม่มีผลต่อสัดส่วนของเดนไดรติกเซลล์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 10)



รูปที่ 10 ผลของแมนแนนต่อเปอร์เซ็นต์ของเดนไดรติกเซลล์

นำเดนไดรติกเซลล์ที่พัฒนาจากไขกระดูกมากระตุ้นด้วยแมนแนนที่สกัดจากเชื้อรา *C. albicans*, *C. parapsilosis* และ *C. dubliniensis* ด้วยความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำเซลล์มาย้อมด้วยแอนติบอดีต่อโมเลกุล CD11c และนำมาวิเคราะห์ด้วย flow cytometry; $N = 5$

เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของ maturation marker ได้แก่ CD40, CD80, CD86 และ MHC class II (รูปที่ 11) พบว่าแมนแนนที่สกัดจาก *C. parapsilosis* และ *C. dubliniensis* กระตุ้นเดนไดรติกเซลล์ได้ดีกว่าแมนแนนที่สกัดจาก *C. albicans*

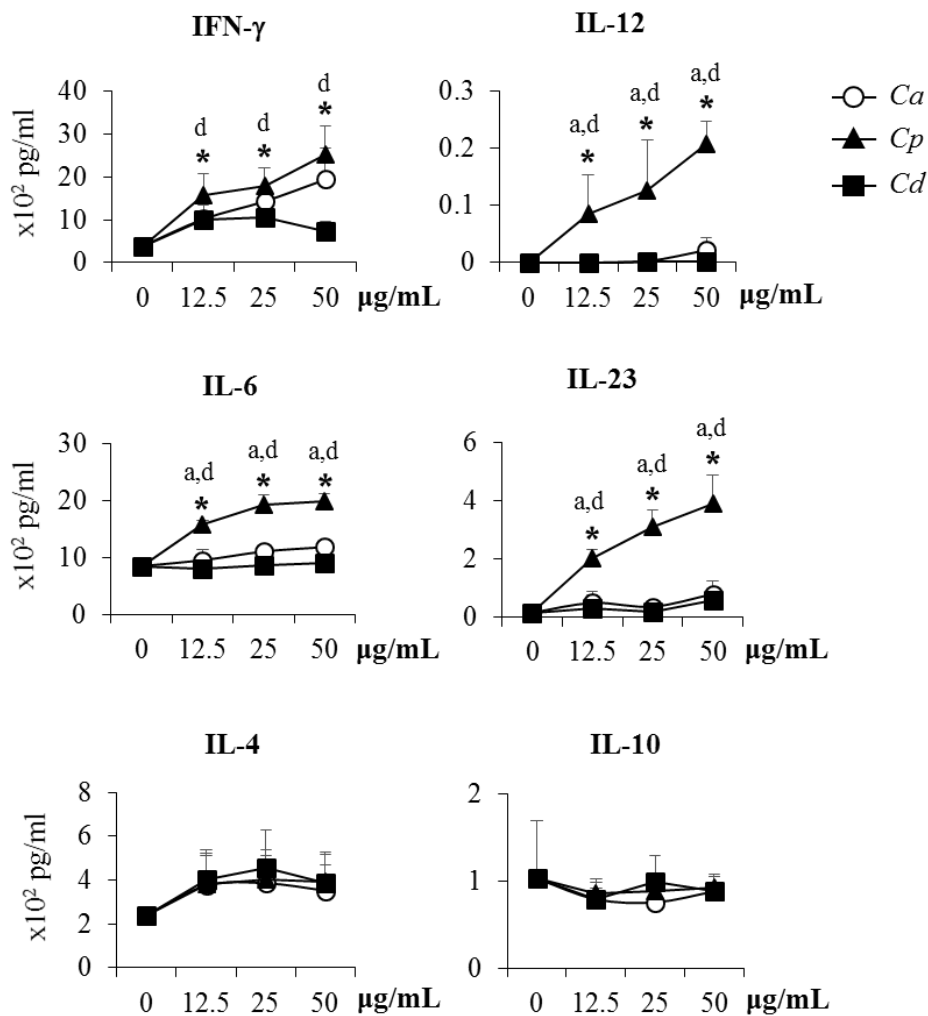


รูปที่ 11 ผลของแมนแนนต่อ maturation ของเดนไดรติกเซลล์

นำเดนไดรติกเซลล์ที่พัฒนาจากไขกระดูกมากระตุ้นด้วยแมนแนนที่สกัดจากเชื้อรา *C. albicans*, *C. parapsilosis* และ *C. dubliniensis* ด้วยความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำเซลล์มาย้อมด้วยแอนติบอดีต่อโมเลกุล CD40, CD80, CD86 และ MHC class II และนำมาวิเคราะห์ด้วย flow cytometry; $N = 5$; $P \leq 0.05$, ^p มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับแมนแนนที่สกัดจาก *C. parapsilosis*, ^d มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับแมนแนนที่สกัดจาก *C. parapsilosis*

เมื่อนำ supernatant ของเดนไดรติกเซลล์มาตรวจวัดการผลิตไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ และการต้านการอักเสบ (**รูปที่ 12**) พบว่าแมนแนนของ *C. parapsilosis* สามารถกระตุ้นการผลิตไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบชนิด IFN- γ และ IL-12 ซึ่งมีความสำคัญในการตอบสนองของ T cell ชนิด T helper 1 (Th1) โดย Th1 เป็นเซลล์ที่มีความสำคัญในการต้านเชื้อกลุ่ม intracellular microbe เช่น เชื้อวัณโรค เป็นต้น นอกจากนี้ IFN- γ ยังมีความสำคัญต่อการกระตุ้นการทำงานของ natural killer cell (NK cell) และ cytotoxic T cell (CTL) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีความสำคัญในการต้านเชื้อ intracellular microbe และเชื้อไวรัส แมนแนนของ *C. parapsilosis* ยังสามารถกระตุ้นการผลิตไซโตไคน์ชนิด IL-6 และ IL-23 ซึ่งมีความสำคัญในการตอบสนองของ T cell ชนิด Th17 โดย Th17 เป็นเซลล์ที่มีความสำคัญในการต้านเชื้อกลุ่ม extracellular microbe เช่น

Cryptococcus และ *Neisseria* เป็นต้น ที่สำคัญแมนแนนของเชื้อ *C. parapsilosis* ไม่มีผลต่อการผลิตไซโตไคน์ต้านการอักเสบชนิด IL-4 และ IL-10



รูปที่ 12 ผลของแมนแนนต่อการผลิตไซโตไคน์ของเดนไดรติกเซลล์

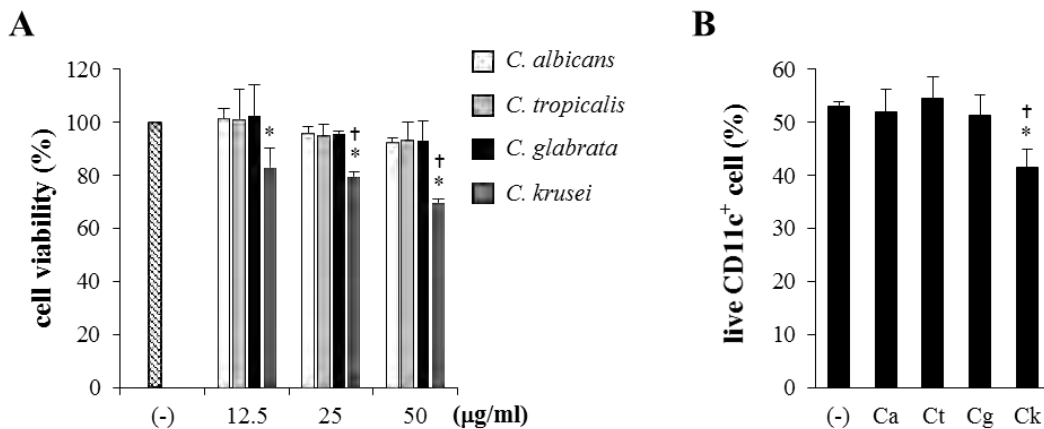
นำเดนไดรติกเซลล์ที่พัฒนาจากไขกระดูกมากระตุ้นด้วยแมนแนนที่สกัดจากเชื้อรา *C. albicans*, *C. parapsilosis* และ *C. dubliniensis* ด้วยความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นเก็บ supernatant มาตรวจวัดชนิดและปริมาณของไซโตไคน์; $N = 5$; $P \leq 0.05$, * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับแมนแนนที่สกัดจาก *C. parapsilosis*, ^d มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับแมนแนนที่สกัดจาก *C. parapsilosis*

จากผลการทดลองพบว่าแมนแนนที่สกัดจากเชื้อ *C. parapsilosis* มีประสิทธิภาพสูงในการกระตุ้นการตอบสนอง และการทำงานของเดนไดรติกเซลล์

การทดสอบการตอบสนองของเดนไดรติกเซลล์ต่อแมนแนน

เนื่องจากการทดสอบต้องทำหลายความเข้มข้น และใช้แมนแนนหลายชนิด และการสกัดแมนแนนต้องใช้เวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงต้องแยกทดสอบชนิดแมนแนนโดยใช้แมนแนนของ *C. albicans* เป็น

กลุ่มควบคุมในการเปรียบเทียบ การทดลองนี้ เคนไดรติกเซลล์ได้รับกระตุ้นด้วยแมนแนนที่สกัดจากเชื้อรา *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* และ *C. krusei* ด้วยความเข้มข้น 12.5, 25 และ 50 $\mu\text{g/mL}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ พบว่าแมนแนนของ *C. krusei* มีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ และแมนแนนอีก 3 ชนิด (รูปที่ 13A) เมื่อนำเคนไดรติกเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแมนแนนที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/mL}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาตรวจวัดเปอร์เซ็นต์ของเคนไดรติกเซลล์ (เซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD11c) พบว่าแมนแนนของ *C. krusei* มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์ของเคนไดรติกเซลล์ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับผลทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ (รูปที่ 13B)

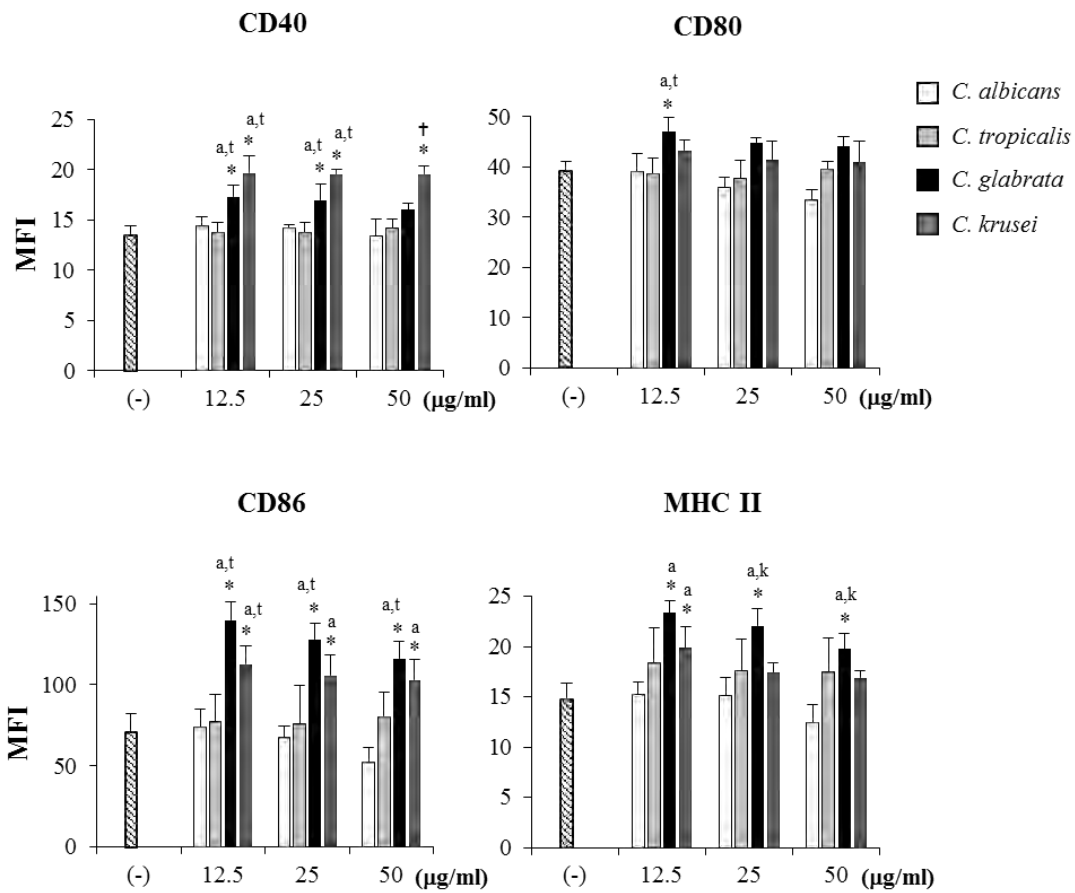


รูปที่ 13 ผลของแมนแนนต่อความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์ของเคนไดรติกเซลล์

A. นำเคนไดรติกเซลล์ที่พัฒนาจากไขกระดูกมากระตุ้นด้วยแมนแนนที่สกัดจากเชื้อรา *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* และ *C. krusei* ด้วยความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำเซลล์มาตรวจวัดความมีชีวิตด้วยเทคนิค MTT; $N = 5$; $P \leq 0.05$, * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ, † มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับแมนแนนของเชื้อราทุกกลุ่ม

B. นำเคนไดรติกเซลล์ที่พัฒนาจากไขกระดูกมากระตุ้นด้วยแมนแนนที่สกัดจากเชื้อรา *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* และ *C. krusei* ด้วยความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/mL}$ เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำเซลล์มาย้อมด้วยแอนติบอดีต่อโมเลกุล CD11c และนำมาวิเคราะห์ด้วย flow cytometry; $N = 5$; $P \leq 0.05$, * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ, † มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับแมนแนนของเชื้อราทุกกลุ่ม

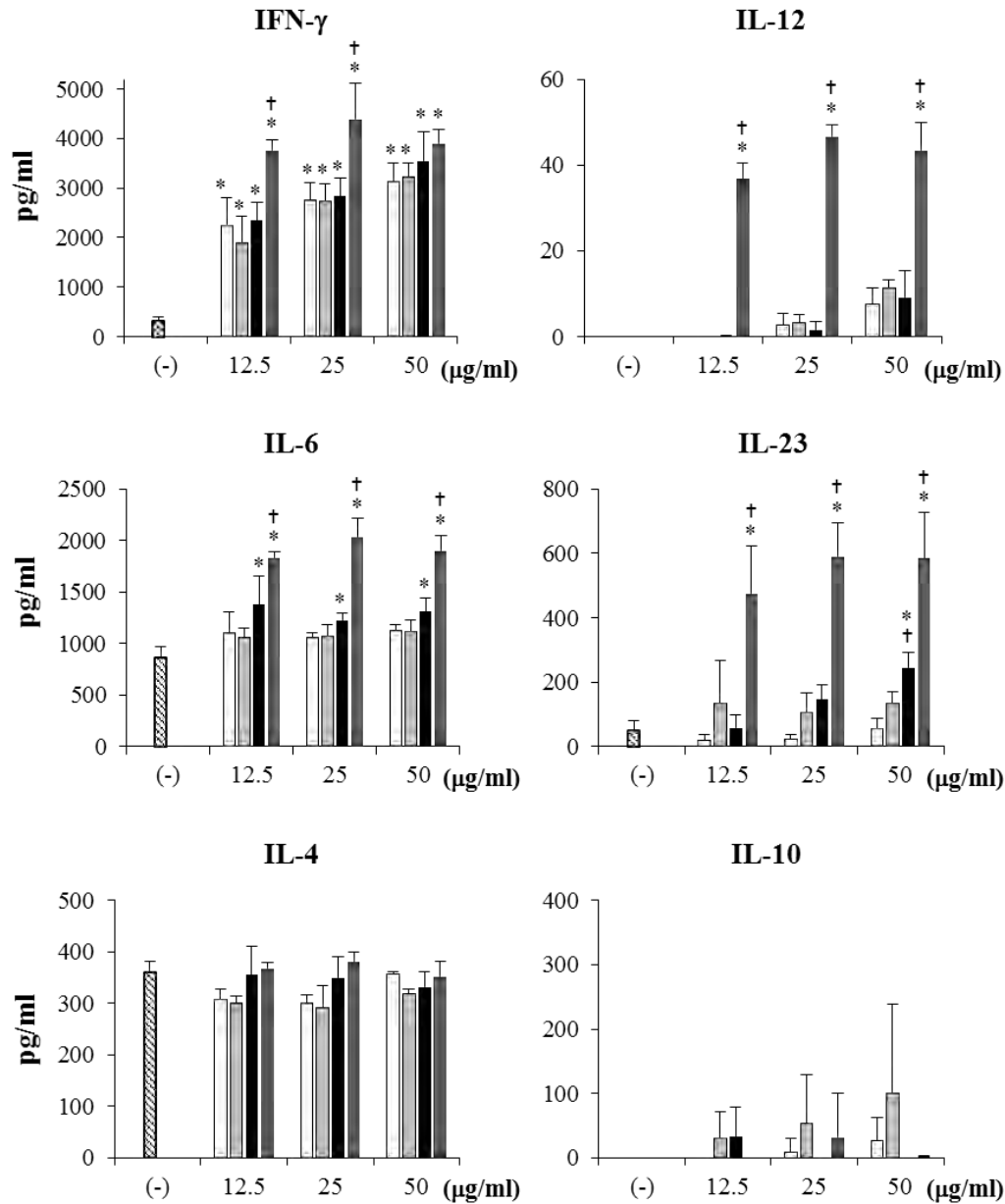
ในการทดลองถัดมา ผู้วิจัยทำการตรวจสอบเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD40, CD80, CD86 และ MHC class II (รูปที่ 14) พบว่าแมนแนนที่สกัดจาก *C. krusei* และ *C. glabrata* กระตุ้นการแสดงออกของ CD40 และ CD86 ได้ดีกว่าแมนแนนที่สกัดจาก *C. albicans* และ *C. tropicalis* นอกจากนี้แมนแนนที่สกัดจาก *C. glabrata* กระตุ้นการแสดงออกของ CD80 และ MHC class II ได้ดีที่สุด



รูปที่ 14 ผลของแมนแนนต่อ maturation ของเดนไดรติกเซลล์

นำเดนไดรติกเซลล์ที่พัฒนาจากไขกระดูกมากระตุ้นด้วยแมนแนนที่สกัดจากเชื้อรา *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* และ *C. krusei* ด้วยความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำเซลล์มาย้อมด้วยแอนติบอดีต่อโมเลกุล โมเลกุล CD40, CD80, CD86 และ MHC class II และนำมาวิเคราะห์ด้วย flow cytometry; $N = 5$; $P \leq 0.05$, ^a มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับแมนแนนที่สกัดจาก *C. albicans*, ^t มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับแมนแนนที่สกัดจาก *C. tropicalis*, ^k มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับแมนแนนที่สกัดจาก *C. krusei*

เมื่อนำ supernatant ของเดนไดรติกเซลล์มาตรวจวัดการผลิตไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ และการต้านการอักเสบ (รูปที่ 15) พบว่าแมนแนนของ *C. krusei* ให้ผลคล้ายคลึงกับแมนแนนของ *C. parapsilosis* สามารถกระตุ้นการผลิตไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบชนิด IFN- γ , IL-12, IL-6 และ IL-23 ได้ดีที่สุดใน และมีผลต่อการผลิตไซโตไคน์ต้านการอักเสบชนิด IL-4 และ IL-10

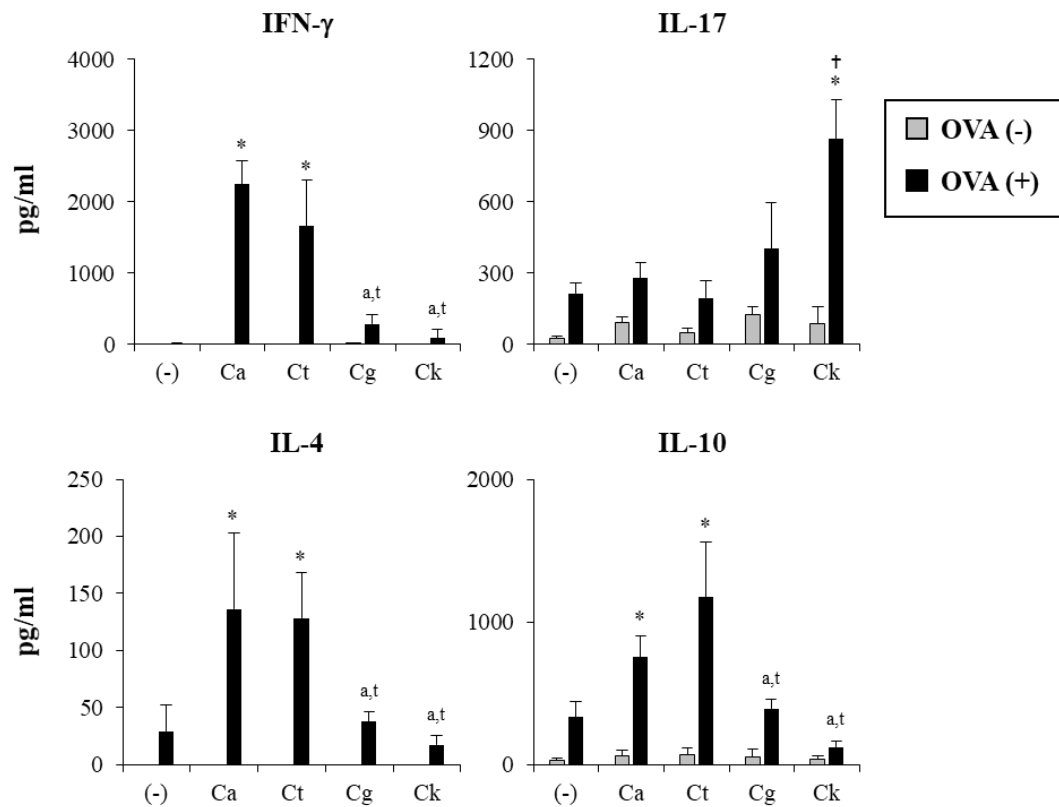


รูปที่ 15 ผลของแมนแนนต่อการผลิตไซโตไคน์ของเดนไดรติกเซลล์
นำเดนไดรติกเซลล์ที่พัฒนาจากไขกระดูกมากระตุ้นด้วยแมนแนนที่สกัดจากเชื้อรา *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* และ *C. krusei* ด้วยความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นเก็บ supernatant มาตรวจวัดชนิดและปริมาณของไซโตไคน์; $N = 5$; $P \leq 0.05$, * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม, † มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับแมนแนนของเชื้อราทุกกลุ่ม

การทดสอบความสามารถของแมนแนนในการกระตุ้นการตอบสนองของ T cell ในสัตว์ทดลอง

เพื่อทดสอบคุณสมบัติความเป็นสารเสริมฤทธิ์ของแมนแนนในสัตว์ทดลอง ผู้วิจัยได้ทำการฉีดสารแมนแนนร่วมกับโปรตีนแอนติเจนชนิด Ovalbumin หรือ OVA ในหนูเมาส์ผ่านทางใต้ผิวหนัง จากนั้นนำต่อมน้ำเหลืองของหนูเมาส์มาบดแยกเซลล์ แล้วนำเซลล์ที่ได้มากระตุ้นซ้ำด้วยโปรตีน OVA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเก็บ supernatant ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์มาตรวจวัดไซโตไคน์ IFN- γ , IL-17, IL-4 และ IL-10 เพื่อใช้บ่งชี้ว่ามี

การตอบสนองของ T helper (Th) 1, Th17, Th2 และ regulatory T cell ตามลำดับ (รูปที่ 16) จากผลการทดลองพบว่าแมนแนนที่แยกจากผนังเซลล์ของ *C. albicans* และ *C. tropicalis* สามารถกระตุ้น T cell หลังไซโตไคน์ชนิด IFN- γ , IL-4 และ IL-10 ได้ดี แมนแนนที่แยกจากผนังเซลล์ของ *C. krusei* สามารถกระตุ้น T cell ให้หลัง IL-17 ส่วนแมนแนนจาก *C. glabrata* ไม่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการตอบสนองของ T helper cell



รูปที่ 16 การตอบสนองของ T cell ต่อแมนแนนของเชื้อราแคนดิดา

หนูเมาส์ได้รับ OVA (20 μ g/ml) ผสมกับแมนแนน (1 mg) ใน PBS 100 μ l ผ่านทางการฉีดใต้ผิวหนังสัปดาห์ละ 1 ครั้ง จำนวน 2 สัปดาห์ ในวันที่ 7 หลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้าย ทำการเก็บต่อน้ำเหลือง และแยกเซลล์ นำเซลล์มากระตุ้นด้วย OVA (250 μ g/ml); กลุ่มการทดลองได้แก่ กลุ่มควบคุมลบ (ได้รับ OVA อย่างเดียว) และ กลุ่มการทดลองที่ได้รับ OVA ร่วมกับแมนแนนที่สกัดจากเชื้อรา *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* และ *C. krusei* จาก; N = 5; ใช้สถิติ One-way ANOVA

อภิปราย / วิจารณ์ผลการทดลอง

องค์ประกอบหลักในวัคซีน ได้แก่ แอนติเจน (โปรตีน หรือเปปไทด์) และสารเสริมฤทธิ์ (adjuvants) ซึ่งการให้แอนติเจนเพียงอย่างเดียวไม่สามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ ดังนั้นการพัฒนาวัคซีนให้ได้ประสิทธิผลดี จึงจำเป็นต้องมีสารเสริมฤทธิ์ที่ช่วยกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันให้ทำงานอย่างมีประสิทธิภาพ (49) สารเสริมฤทธิ์เป็นตัวสำคัญในการส่งสัญญาณให้ภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immunity) รับรู้ว่ามีสิ่งแปลกปลอมเข้ามา นอกจากนี้สารเสริมฤทธิ์ยังเป็นตัวสำคัญในการกำหนดทิศทางการ

ตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive immunity) ผ่านทางการกระตุ้นการทำงานของภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (49)

เซลล์เป้าหมายหลักของการนำส่งวัคซีน และการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสารเสริมฤทธิ์ ได้แก่ เดนไดรติกเซลล์ ซึ่งเป็นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด เดนไดรติกเซลล์ทำหน้าที่หลักเป็น APC ซึ่งจะจับกิน ย่อยสลาย และนำเสนอแอนติเจนให้แก่ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ และเดนไดรติกเซลล์จะมีการแสดงออกของ PRRs หลากหลายชนิด ทำให้สามารถรับรู้และถูกกระตุ้นด้วย PAMPs ได้หลากหลาย ซึ่งสัญญาณจาก PRRs บน เดนไดรติกเซลล์มีความสำคัญในการทำงานของเดนไดรติกเซลล์ในการกระตุ้นและกำหนดทิศทางการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (1, 22) นอกจากนี้เดนไดรติกเซลล์ยังเป็นเซลล์สำคัญที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะให้สร้างระบบความจำ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการติดเชื้อซ้ำได้ (50)

ในงานวิจัยนี้คณะผู้วิจัยได้ทดสอบความเป็นสารเสริมฤทธิ์ของแมนแนนที่สกัดจากผนังเซลล์ของเชื้อรา *S. cerevisiae* สายพันธุ์ต่างๆ ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าโครงสร้างของแมนแนนแตกต่างกัน จากผลการทดลองพบว่าแมนแนนที่สกัดจาก *S. cerevisiae* สายพันธุ์ *mnn1Δ* ให้ผลดีที่สุดในการกระตุ้นเดนไดรติกเซลล์ให้หลั่งไซโตไคน์ที่กระตุ้นการอักเสบ (pro-inflammatory cytokine) ชนิด IL-12 และ IL-23 ได้ดี ซึ่ง IL-12 มีความสำคัญในการกระตุ้น Th1 ซึ่งเป็น T cell ที่สำคัญในการกำจัดเชื้อ intracellular และ extracellular pathogens ส่วน IL-23 มีความสำคัญในการกระตุ้น Th17 ซึ่งเป็น T cell ที่สำคัญในการกำจัดเชื้อ extracellular pathogens (51) เมื่อผู้วิจัยทำการฉีดกระตุ้นหนูเมาส์โดยใช้แมนแนนเป็นสารเสริมฤทธิ์ ผู้วิจัยไม่พบความแตกต่างของสัดส่วนของ B cell และ T cell รวมถึง CD4 และ CD8 T cell ทั้งนี้เนื่องจากผู้วิจัยตรวจวัดในระยะที่เป็น contraction phase ของระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งในระยะนี้ effector T cell จะเกิด apoptosis โดยธรรมชาติ เนื่องจากร่างกายจะควบคุมไม่ให้มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันมากเกินไปจนเกิดอันตรายต่อร่างกาย (51) ดังนั้นผู้วิจัยจึงยังต้องทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อตรวจวัดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะใน effector phase จะได้เห็นความเปลี่ยนแปลงของชนิดของเซลล์ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

อย่างไรก็ตามใน contraction phase จะมีเซลล์ภูมิคุ้มกันบางส่วนพัฒนาไปเป็น memory cell (51) ทำให้ผู้วิจัยสามารถตรวจวัดความแตกต่างของ memory T cell ได้ ซึ่งพบว่า แมนแนนที่สกัดจาก *S. cerevisiae* สายพันธุ์ *mnn1Δ* สามารถกระตุ้นให้ CD4 T cell พัฒนาไปเป็น memory T cell ได้มากที่สุด ซึ่งการมี memory T cell ที่มากขึ้นจะสามารถป้องกันการติดเชื้อได้ดี (2) ดังนั้น แมนแนนที่สกัดจาก *S. cerevisiae* สายพันธุ์ *mnn1Δ* จึงมีแนวโน้มที่มีคุณสมบัติของสารเสริมฤทธิ์วัคซีนที่ต้องการ

ส่วนการทดสอบความเป็นสารเสริมฤทธิ์ของแมนแนนที่สกัดจากผนังเซลล์ของเชื้อรา *Candida* สปีชีส์ต่างๆ ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าโครงสร้างของแมนแนนแตกต่างกัน พบว่าแมนแนนที่สกัดจาก *C. parasilosis* *C. dubliniensis* และ *C. krusei* สามารถกระตุ้น maturation ของเดนไดรติกเซลล์ดี และยังสามารถเหนี่ยวนำให้เดนไดรติกเซลล์หลั่งไซโตไคน์ที่กระตุ้นการอักเสบ (pro-inflammatory cytokine) ได้หลายชนิดในปริมาณที่สูงหลาย อย่างไรก็ตามแมนแนน ที่สกัดจาก *C. parasilosis* *C. dubliniensis* ได้ปริมาณน้อย ผู้วิจัยจึงเลือกแมนแนนที่สกัดจาก *C. krusei* มาทดสอบคุณสมบัติความเป็นสารเสริมฤทธิ์ในสัตว์ทดลอง โดยพบว่า แมนแนนที่สกัดจาก *C. krusei* เท่านั้นที่สามารถกระตุ้นการตอบสนองของ Th17 ซึ่งเป็น T cell ที่สำคัญในการกำจัดเชื้อ extracellular pathogens ทั้งแบคทีเรีย และเชื้อรา (51) ผู้วิจัยจึงมีความสนใจนำแมนแนนที่สกัดจาก *C. krusei* ไปพัฒนาเพื่อใช้เป็นสารเสริมฤทธิ์วัคซีนเพื่อใช้ป้องกันรักษาโรคติดเชื้อ extracellular pathogens ที่มีความสำคัญในประเทศไทย เช่น เชื้อ *Leptospira* ซึ่งทำให้เกิดโรคฉี่หนู เป็นต้น

โครงการย่อยที่ 2

การพิสูจน์สูตรโครงสร้างของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันจาก
เชื้อราแซคคาโรไมซีสและแคนดิดา

Characterization of immunogenic mannan oligosaccharides from
Saccharomyces and Candida

หัวหน้าโครงการย่อย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุวัฒน์ ผดุงรส
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารสกัดจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (natural product) ที่สกัดได้จากพืช สัตว์หรือจุลินทรีย์เป็นงานวิจัยที่มีความท้าทายเป็นอย่างมาก เนื่องจากโดยทั่วไปแล้ว สารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมี โครงสร้างทางเคมีที่ซับซ้อนและสารที่แยกได้จากการทำบริสุทธิ์นั้นมีปริมาณน้อย ซึ่งเทคนิคที่เป็นที่นิยมอย่าง แพร่หลายของนักวิจัยทางผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คือ เทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ให้ข้อมูลได้อย่างลึกซึ้ง สามารถแสดงผลถึงการเชื่อมต่อกันของอะตอมถึง ในระดับสามมิติ ซึ่งนับว่าเป็นข้อได้เปรียบเป็นอย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์ด้วยวิธีอื่น (1) ในกรณี ที่สารที่สนใจศึกษาเป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตเช่น สารประเภทโพลีแซคคาไรด์หรือออลิโกแซคคาไรด์ การ พิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีก็ยิ่งเป็นการศึกษาที่มีความซับซ้อนมากขึ้นไปอีก เนื่องจากสารประกอบ คาร์โบไฮเดรตเหล่านั้นประกอบขึ้นมาจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายชนิดและยังมีโอกาสเกิดพันธะไกลโคไซด์ได้ หลากหลายรวมถึงสเตอริโอเคมีที่ต่างกันของพันธะเหล่านั้นด้วย แม้ว่าการพิสูจน์โครงสร้างของสารประกอบ คาร์โบไฮเดรตจะเป็นงานที่ซับซ้อน (2-5) แต่ก็เป็นที่สนใจของนักวิจัยจำนวนมาก เนื่องจากมีสารประกอบ คาร์โบไฮเดรตหลายชนิดมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจและได้รับการศึกษาโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค NMR spectroscopy ยกตัวอย่างเช่น β -(1,3) glucans เป็นออลิโกแซคคาไรด์ซึ่งประกอบไปด้วยน้ำตาลกลูโคสในสาย โซ่หลักยึดต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ชนิด β ที่ตำแหน่ง 1 และ 3 สกัดได้จากจุลินทรีย์และสาหร่ายทะเล พบว่ามี ฤทธิ์ในการกระตุ้น natural killer (NK) cells, T-cells และ nuclear factor- κ B (NF- κ B) (6-8) นอกจากนี้ ยังมี heparin และ heparan sulfate ซึ่งเป็นออลิโกแซคคาไรด์ประเภท glycosaminoglycan (GAG) โดยสาย โซ่หลักประกอบไปด้วยพันธะชนิด α -(1,4) ระหว่าง uronic acid และ glucosamine ซึ่งออลิโกเมอร์ของ heparin และ heparan sulfate นี้มีความเป็นกรดสูงมากและถูกนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารป้องกันการแข็งตัว ของเลือด (anticoagulant) (9-11)

ในแผนงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยมีความสนใจในการพัฒนาสารเสริมฤทธิ์วัคซีน (vaccine adjuvant) ที่มา จากแมนแนนออลิโกแซคคาไรด์ซึ่งสกัดได้จากผนังเซลล์ของเชื้อราแซคคาโรไมซีสและแคนดิดา (*Saccharomyces* and *Candida*) โดยแมนแนนที่ได้จากผนังเซลล์ของเชื้อรานี้เป็นออลิโกแซคคาไรด์ที่ ประกอบไปด้วยโมเลกุลของน้ำตาลแมนโนสยึดต่อกันด้วยพันธะ α -(1,6) ในสายโซ่หลัก (12) โครงการวิจัยย่อยที่ 1 ได้ศึกษาการตัดยีนเดี่ยว (single gene deletion) แต่ละยีนของ *S. cerevisiae* ทำให้ได้สายพันธุ์ของ *S. cerevisiae* mutant ที่มีโครงสร้างของแมนแนนในผนังเซลล์ที่แตกต่างกันออกไป ส่งผลให้สามารถในการผลิต แมนแนนออลิโกแซคคาไรด์ที่มีโครงสร้างหลากหลาย จากผลการทดสอบเบื้องต้นต่อการตอบสนองของเดนไดรติก เซลล์ พบว่าแมนแนนออลิโกแซคคาไรด์ที่มาจากเชื้อราต่างชนิดกัน ส่งผลต่อการตอบสนองของเดนไดรติก เซลล์ได้แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตาม ในขณะนี้ยังขาดข้อมูลของโครงสร้างทางเคมีของแมนแนนออลิโกแซคคาไรด์ที่ใช้ในการศึกษา

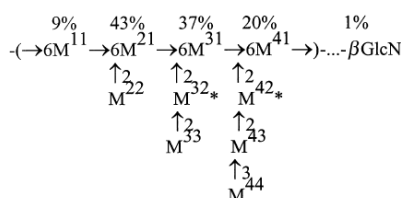
ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ที่จะพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของแมนแนน ซึ่งผ่านการทดสอบ เบื้องต้นจากห้องปฏิบัติการโดยโครงการย่อยที่ 1 ว่ามีฤทธิ์ในการตอบสนองของเดนไดรติกเซลล์ โดยผู้วิจัยจะ อาศัยกรรมวิธีทางเคมีและทางเทคนิค NMR spectroscopy ในการพิสูจน์สูตรโครงสร้าง โดยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า ข้อมูลที่ได้จะช่วยให้เกิดความเข้าใจต่อลักษณะโครงสร้างที่จำเป็นในการกระตุ้นเดนไดรติกเซลล์ และเข้าใจกลไก การตอบสนองได้ดียิ่งขึ้น ท้ายที่สุดจึงส่งผลให้สามารถพัฒนาสารเสริมฤทธิ์วัคซีนที่มีประสิทธิภาพได้

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาโครงสร้างของแมนแนนอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จาก *Saccharomyces*

Hounsell และคณะ (13) รายงานการพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของแมนแนนอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดผนังเซลล์ของ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ Sc500 ซึ่งมีฤทธิ์ต่อ antibody ของผู้ป่วยที่เป็นโรค Crohn คณะผู้วิจัยเริ่มจากการวิเคราะห์โครงสร้างโดยใช้ NMR spectroscopy จากนั้นจึงย่อยแมนแนนให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยสารละลายเบสอัลคาไลด์ ย่อยแมนแนนให้เป็นสายสั้นๆด้วยสารละลายกรดและ acetolysis จากนั้นผู้วิจัยจึงนำแมนแนนสายสั้นๆที่ได้จากการย่อยไปทดสอบฤทธิ์กระตุ้น antigen ด้วยเทคนิค ELISA โดยพบว่าแมนแนนที่มีลำดับเป็น α -Man(1,3) α -Man(1,2) มีฤทธิ์สูงสุด

Bock และคณะ (14) รายงานการพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของแมนแนนอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดผนังเซลล์ของ *Saccharomyces cerevisiae* ที่เป็นสารสกัดหยาบไม่ผ่านการจำกัดโปรตีนออกก่อน โดยใช้เทคนิค NMR spectroscopy ที่ความถี่สูงถึง 750 MHz (high field NMR spectroscopy) จึงทำให้คณะผู้วิจัยได้ข้อมูลที่มีคุณภาพสูงมากโดยสามารถหาอัตราส่วนของสายโซ่กิ่งเทียบกับสายโซ่ตรงของแมนแนน โดยผู้วิจัยใช้เทคนิค ^1H , ^{13}C , COSY, TOCSY, ROESY, ^1H - ^{13}C HMQC, ^1H - ^{13}C HMQC-TOCSY, ^1H - ^{13}C HMBC ในการวิเคราะห์ (รูปที่ 17)



M is α -D-mannopyranosyl residue.

* indicates the presence of the following substituents at O6:

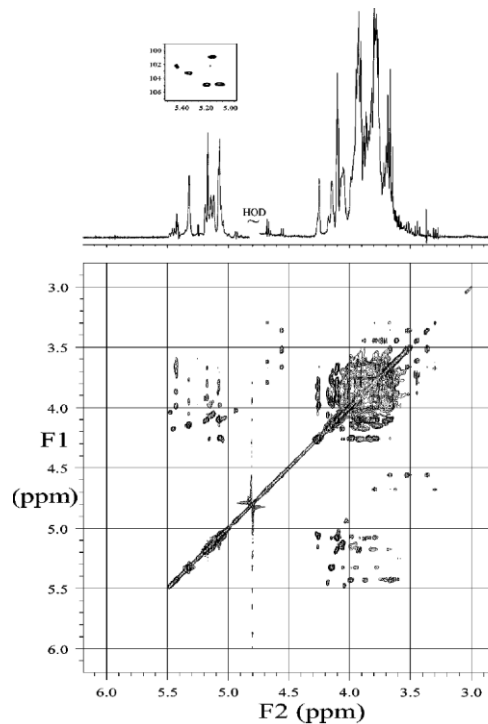
for mannan-1 (M1): 30% H, 20% P, 20% $\text{M}^{11}\text{P} \rightarrow$, 30% $\text{M}^{22}\text{P} \rightarrow 3\text{M}^{21}\text{P} \rightarrow$;

for mannan-2 (M2): 30% H, 70% P;

for mannan-3 (M3): H

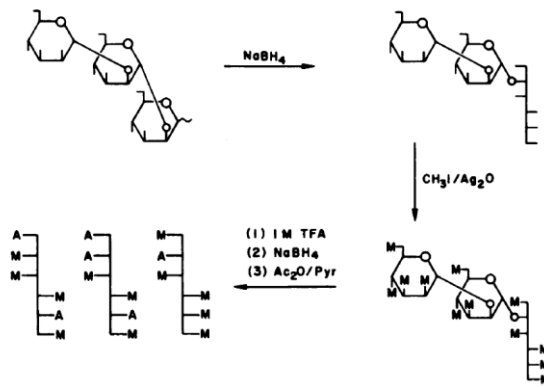
รูปที่ 17 แสดงโครงสร้างของแมนแนนอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากผนังเซลล์ของ *S. cerevisiae*

Ballou และคณะ (15) ใช้กระบวนการทางเคมีของปฏิกิริยา acetolysis ในการย่อยแมนแนนอลิโกแซคคาไรด์ของ *Saccharomyces cerevisiae* จำนวน 2 สายพันธุ์ (238C และ brewer's yeast strain) ให้เป็นสายที่สั้นลงและทดสอบฤทธิ์การกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยพบว่าการย่อยในสภาวะกรดของแมนแนนที่ต่อกันด้วยพันธะ α -(1,6) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแมนแนนสายสั้นๆ ได้แก่ mannan-tetraose, mannan-triose, mannan-biose และ mannose (รูปที่ 18)



รูปที่ 18 แสดง 1D ^1H NMR ของแมนแนนในตัวทำละลายชนิด D_2O และ 2D ^1H - ^1H TOCSY ส่วนในรูปเล็ก (inset) เป็น ^{13}C anomeric HSQC ของแมนแนน

Raschke และคณะ (16) ศึกษาองค์ประกอบและโครงสร้างของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากผนังเซลล์ของเชื้อรา *Saccharomyces* จำนวน 4 สายพันธุ์ได้แก่ *Saccharomyces italicus*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces chevalieri* และ *Saccharomyces carlsbergensis* โดยใช้ปฏิกิริยา acetolysis เพื่อย่อยให้เป็นแมนแนนสายโซ่ที่สั้นลง โดยได้ผลิตภัณฑ์เป็น mannan-tetraose, mannan-triose, mannan-biose และ mannose จากนั้นจึงทำการศึกษาถึงพันธะระหว่างแมนโนสด้วยปฏิกิริยา methylation จากนั้นจึงรีดิวซ์ให้เป็น mannitol ต่อด้วยปฏิกิริยา acetylation แล้วจึงวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gas chromatography และ mass spectroscopy จากรูปที่ 19 จะพบว่าแมนโนสที่อยู่ด้านปลายของสาย ทั้งด้าน non-reducing และ reducing end จะสามารถเกิดปฏิกิริยาเอซิลเลชันได้เพียงครั้งเดียว ต่างจากแมนโนสที่อยู่กลางสายโซ่ จะเกิดเอซิลเลชันได้ 2 ครั้ง แต่หากเป็นแมนโนสที่มีสายโซ่กิ่ง ก็จะมีเอซิลเลชันได้มากกว่า 2 ครั้ง ขึ้นอยู่กับจำนวนโซ่กิ่ง ซึ่งผลิตภัณฑ์เอซิลเลชันที่ได้นี้จะให้ผล mass spectroscopy ที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่ต่างกัน คณะผู้วิจัยจึงสามารถวิเคราะห์อัตราส่วนของโซ่กิ่งต่อสายโซ่หลักได้



รูปที่ 19 แสดงกรรมวิธีทางเคมีในการศึกษาชนิดของพันธะที่เชื่อมต่อกันระหว่างแมนโนสด้วยปฏิกิริยา methylation และ acetylation ตามลำดับ

การศึกษาโครงสร้างของแมนแนนอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จาก *Candida*

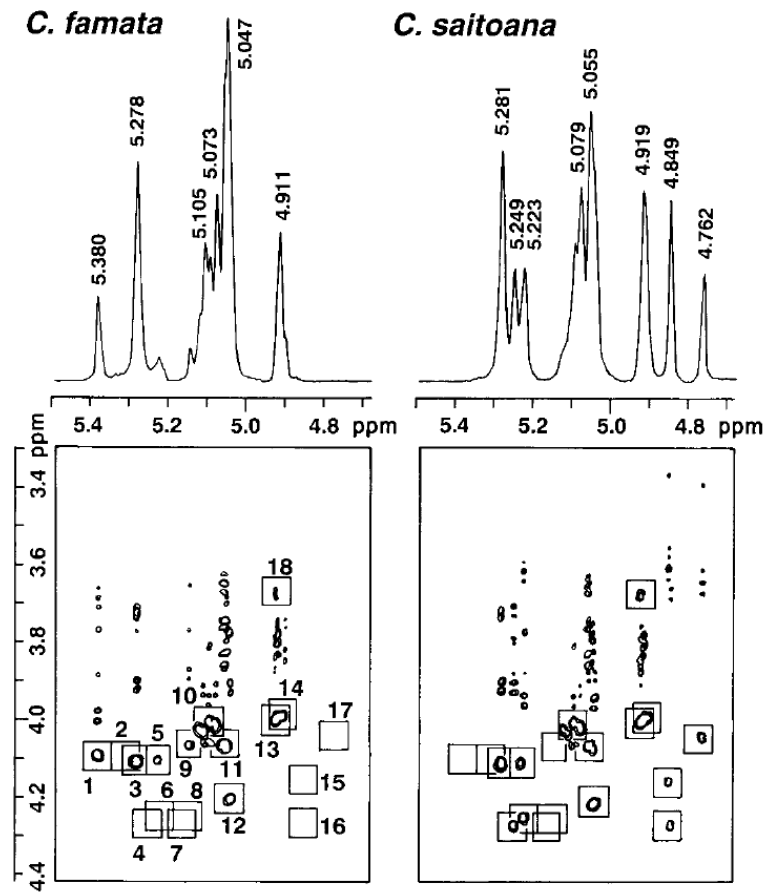
Suzuki และคณะ (17) รายงานการพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของแมนแนนอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากเชื้อรา *Candida kefyr* IFO 0586 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะมีความเข้าใจถึงโครงสร้างทางเคมีของแมนแนนที่มีผลต่อกลไกการตอบสนองของระหว่าง host และ parasite โดยคณะผู้วิจัยใช้ ^1H , ^{13}C NMR spectroscopy โดยเฉพาะเทคนิค 2D-HSQC, 2D-HOHAHA ในการพิสูจน์สูตรโครงสร้างของแมนแนนและพบว่าแมนแนนมีลักษณะโครงสร้างเป็น comb-like structure โดยมีสายโซ่ตรงเป็นแมนโนสที่มีพันธะแบบ α -(1,6) ส่วนสายโซ่กิ่งเป็นแมนโนสที่ต่อกันด้วยพันธะแบบ α -(1,2) ดังรูปที่ 20

| Structure | Chemical shift (ppm) | | | |
|--|----------------------|---------|--------------|---------|
| | H-1 (H-2) | | C-1 (C-2) | |
| $[\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Manp}\text{-(1}\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Manp}\text{-(1}\rightarrow]_n$ | 5.099 | 5.065 | 99.20 | 99.16 |
| ↑ | (4.027) | (3.989) | (79.43) | (79.43) |
| $\alpha\text{-D-Manp}$ | 5.054 | 5.270 | 102.94 | 101.48 |
| ↑ | (4.073) | (4.112) | (70.98) | (79.14) |
| $\alpha\text{-D-Manp}$ | | 5.054 | | 102.94 |
| | | (4.073) | | (70.98) |

รูปที่ 20 แสดง ^1H และ ^{13}C chemical shift ของแมนแนนอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดได้จาก *Candida kefyr* IFO 0586

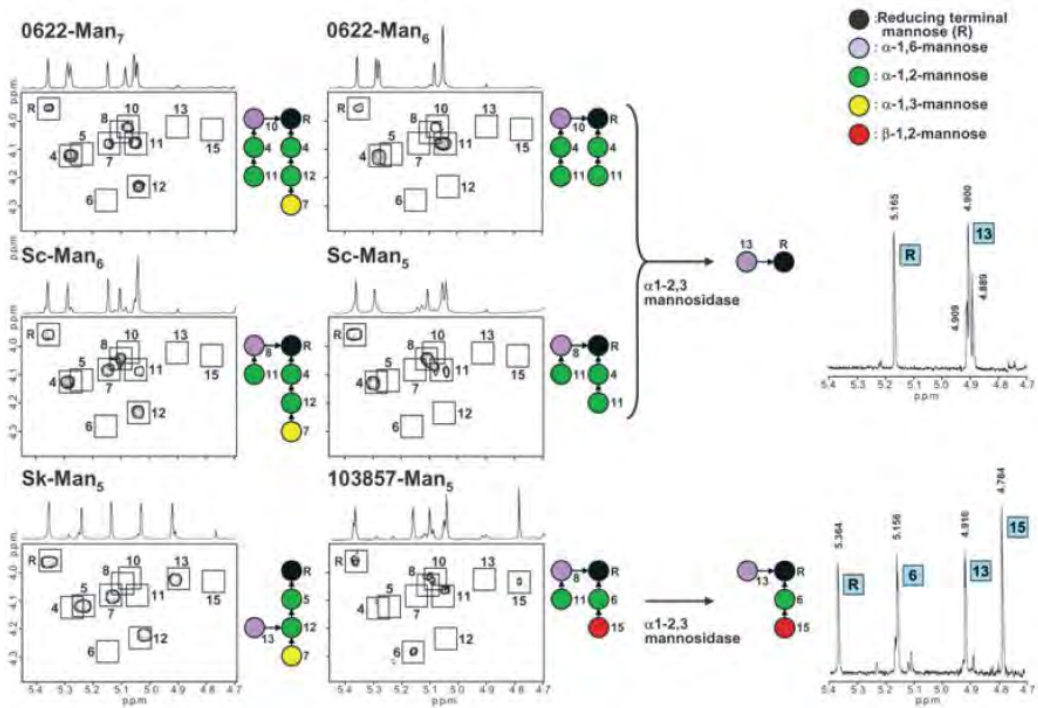
Shibata และคณะ (18) รายงานถึงการศึกษาโครงสร้างของแมนแนนอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จาก *Candida famata* และ *Candida saitoana* ด้วยปฏิกิริยา acetolysis และ 1D/2D NMR spectroscopy โดยเฉพาะเทคนิค 2D-HOHAHA ผลการศึกษาพบว่าแมนแนนที่ได้จาก *C. saitoana* ประกอบไปด้วยแมนโนสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -(1,2) แต่ในขณะที่ไม่พบในแมนแนนที่ได้มาจาก *C. famata* จากนั้นจึงนำผลิตภัณฑ์

ที่ได้จากการ acetolysis ไปศึกษาการยับยั้ง factor 9 serum ด้วยเทคนิค ELISA ซึ่งพบว่าแมนแนนที่ได้จาก *Candida saitoana* มีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงกว่าแมนแนนจาก *Candida famata* ถึง 20 เท่า (รูปที่ 21)



รูปที่ 21 แสดง 2D-HOHAHA spectra ในบริเวณสัญญาณของแอนโนมอริก โปรตอน (anomeric proton) ของแมนแนนที่ได้จาก *C. famata* และ *C. saitoana*

นอกจากนั้น Shibata และคณะ (19) ยังได้ศึกษาถึงแมนแนนซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของ *C. glabrata* จำนวน 3 สายพันธุ์ได้แก่ NBRC 0005, NBRC 0622, NBRC 103857 โดยที่ *C. glabrata* นั้นเป็นเชื้อราที่ก่อให้เกิดอาการติดเชื้อและยากต่อการรักษา มักทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตโดยเฉพาะในกรณีผู้ป่วยอ่อนแอ ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาแมนแนนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ โดยพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของแมนแนนต่อความสามารถในการดื้อยา antifungal ชนิด azole จากข้อมูล ^1H NMR และ methylation ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก acetolysis ของ *C. glabrata* ทั้ง 3 สายพันธุ์แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างเด่นชัด โดยในกรณีของ NBRC 103857 พบแมนโนสเชื่อมกันแบบพันธะ β -(1,2) บนสายโซ่กิ่งปริมาณมากแต่ในทางกลับกันสำหรับสายพันธุ์ NBRC 0005 และ NBRC 0622 พบแมนโนสเชื่อมกันแบบพันธะ β -(1,2) บนสายโซ่กิ่งเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (รูปที่ 22) ส่วนผลการทดสอบการดื้อยานั้น พบว่าสายพันธุ์ NBRC 103857 ซึ่งมีแมนโนสเชื่อมกันแบบพันธะ β -(1,2) บนสายโซ่กิ่งจำนวนมาก มีการตอบสนองต่อ antifungal drug มากที่สุด งานวิจัยนี้จึงเป็นตัวอย่างหนึ่งของการเข้าใจและทราบถึงโครงสร้างทางเคมีของแมนแนนซึ่งส่งผลต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ



รูปที่ 22 แสดง DQF-COSY spectra ของแมนแนนที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -(1,6) ได้จากปฏิกิริยา acetolysis โดย ^1H NMR spectra ทางด้านขวาแสดงสัญญาณ cross-peaks

วัตถุประสงค์โครงการ

เพื่อพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันจากเชื้อราแซคคาโรไมซีสและแคนดิดา

ขอบเขตการวิจัย

โครงการวิจัยนี้จะพัฒนากรรมวิธีทางเคมีเช่น acylation และ acetolysis เพื่อใช้ในการย่อยแมนแนนอลิโกแซคคาไรด์ให้เป็นสายที่สั้นลง จากนั้นจึงผ่านการทำให้บริสุทธิ์ แล้วจึงใช้เทคนิค Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของแมนแนน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบโครงสร้างทางเคมีของแมนแนนอลิโกแซคคาไรด์ที่มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันจากเชื้อราแซคคาโรไมซีสและแคนดิดา ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาในการออกแบบสารเสริมฤทธิ์วัคซีน

วิธีดำเนินการวิจัย

Acetylation ของแมนแนนอลิโกแซคคาไรด์

แมนแนนอลิโกแซคคาไรด์ที่มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันจากเชื้อราแซคคาโรไมซีสและแคนดิดา ที่ได้จากโครงการย่อยที่ 1 นำมาให้ความร้อนในตัวทำละลายพริดีนและอะซิติกแอนไฮไดรด์โดยใช้อ่างน้ำร้อนเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ซึ่งระหว่างนี้จะสังเกตเห็นได้ว่าแมนแนนอลิโกแซคคาไรด์ที่เกิดปฏิกิริยาอะเซทิลเลชันจะเริ่มละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับตัวทำละลายพริดีนเนื่องจากมีความเป็นขี้ของโมเลกุลลดลง จากนั้นเมื่อครบเวลาที่กำหนดไว้ จึงระเหยตัวทำละลายพริดีนออกโดยใช้เครื่องระเหยภายใต้ความดันสุญญากาศ ณ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งจะได้ของผสมลักษณะขุ่นเหนียว

Acetolysis ของแมนแนนอลิโกแซคคาไรด์

นำของผสมที่ได้มาเติมอะซิติกแอนไฮไดรด์ กรดอะซิติกและกรดซัลฟิวริกเข้มข้นตามลำดับ จากนั้นจึงให้ความร้อนที่ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 13 ชั่วโมงเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอะเซทิลเลชันที่สมบูรณ์ เมื่อครบเวลาที่กำหนดจึงปรับความเป็นกรดด้วยพริดีน จากนั้นจึงระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยภายใต้ความดันสุญญากาศ ณ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นละลายสารเหลืออยู่หลังจากระเหยแล้ว ด้วยคลอโรฟอร์มและน้ำกลั่น สกัดโดยใช้กรวยแยกและสกัดซ้ำด้วยคลอโรฟอร์มอีกครั้ง แล้วจึงนำชั้นของตัวทำละลายคลอโรฟอร์มทั้งหมดมากำจัดน้ำที่หลงเหลืออยู่ด้วยโซเดียมซัลเฟต จึงนำไประเหยแห้ง ทำยที่สุดกำจัดความชื้นที่หลงเหลืออยู่ด้วยการทำ azeotropic distillation กับโทลูอีน

Decetylation ของแมนแนนอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นที่ผ่านการ acetolysis

ใส่ตัวทำละลายเมทานอลลงในแมนแนนอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นที่ผ่านการ acetolysis จากขั้นที่ 1 หากละลายได้ไม่สมบูรณ์ต้องอุ่นให้ความร้อนเล็กน้อยด้วยอ่างน้ำร้อนจนของผสมละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นจึงค่อยๆเติมสารละลายแบเรียมเมททอกไซด์ ($Ba(OMe)_2$) ในเมทานอล ที่ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที ซึ่งจะสังเกตเห็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นแยกชั้นออกมา จากนั้นจึงเติมน้ำแข็งแห้ง ($solid\ CO_2$) เพื่อทำลายแบเรียมเมททอกไซด์ที่เหลืออยู่ จากนั้นจึงระเหยตัวทำละลายทั้งหมดให้แห้ง

การทำบริสุทธิ์สารแมนแนนอลิโกแซคคาไรด์

ทำบริสุทธิ์สารแมนแนนอลิโกแซคคาไรด์ด้วย column chromatography โดยใช้ Sephadex หรือ Biogel P-2 เป็นวัสดุภาคคงที่ โดยเติมน้ำกลั่นลงไปละลาย แมนแนนอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการระเหยแห้งในขั้นที่ 2 ปริมาณเล็กน้อย จากนั้นนำไปเซนติฟิวส์เพื่อนำเฉพาะสารละลายส่วนใสไปทำบริสุทธิ์ โดยใช้ column chromatography โดยใช้ sephadex G-25 หรือ Biogel P-2 เป็นวัสดุภาคคงที่ และชะคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่นด้วยอัตราเร็วประมาณ 20 mL ต่อชั่วโมง และตรวจสอบปริมาณของแมนแนนอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้ในแต่ละแฟรคชันด้วยเทคนิค phenol-sulfuric acid

พิสูจน์สูตรโครงสร้างของแมนแนนอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy

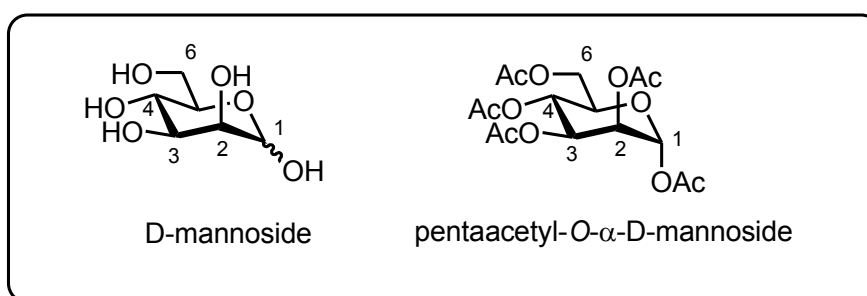
นำแมนแนนอลิโกแซคคาไรด์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มาละลายด้วยตัวทำละลาย deuterated solvents โดยเตรียมความเข้มข้นดังนี้ สำหรับการทดลอง 1H NMR ใช้ตัวอย่างที่ความเข้มข้น 3-10 mg/ 0.7 mL ส่วนการทดลอง ^{13}C NMR ใช้ตัวอย่างที่ความเข้มข้น 15-25 mg/ 0.7 mL โดยใช้เครื่อง Bruker NMR spectrometer

ณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้ความถี่ 400 MHz สำหรับ ^1H NMR spectroscopy และความถี่ 100 MHz สำหรับ ^{13}C NMR spectroscopy โดยเริ่มจากจากเก็บข้อมูล 1D experiment จากนั้นจึงเก็บข้อมูล 2D experiment ยกตัวอย่างเช่น COSY, HMBC, HSQC ซึ่งข้อมูลทั้งหมดที่รวบรวมได้ จะนำมาวิเคราะห์เพื่อพิสูจน์โครงสร้างของแมนแนนออลิโกแซคคาไรด์ในที่สุด

ผลการวิจัย

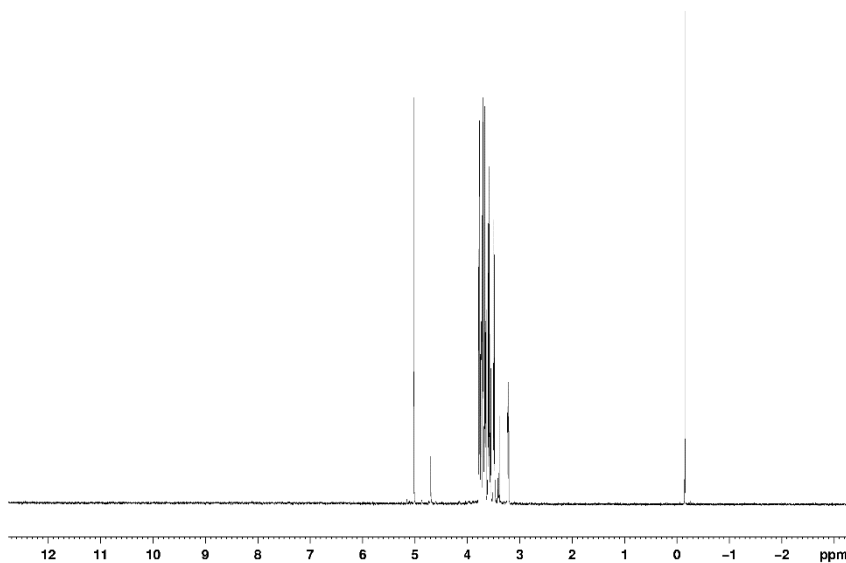
การศึกษาโครงสร้างของน้ำตาลแมนโนสด้วยเทคนิค NMR spectroscopy

เนื่องจากโครงสร้างของแมนแนนอลิโกแซคคาร์ไรด์มีโครงสร้างที่ซับซ้อนและการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค NMR นั้นควรเริ่มจากมอนอเมอร์น้ำตาลแมนโนสซึ่งจะทำให้ทราบถึงสัญญาณ NMR โดยคร่าวๆ แต่อย่างไรก็ตามสัญญาณของ ^1H และ ^{13}C NMR ของอลิโกแซคคาร์ไรด์ โดยเฉพาะสัญญาณโปรตอนมักจะมีค่า chemical shift ที่ใกล้เคียงกันมาก ซึ่งเทคนิคที่นิยมใช้ในการขยายความแตกต่างของสัญญาณคือการปรับปรุงหมู่แทนที่ไฮดรอกซิลของคาร์โบไฮเดรตด้วยหมู่อะเซทิล (acetylation) ซึ่งความสามารถในการดึงอิเล็กตรอนของหมู่อะเซทิลนี้จะทำให้สัญญาณโปรตอนเลื่อนไปทางตำแหน่ง downfield เมื่อเทียบกับสัญญาณที่ไม่ผ่านการปรับปรุงหมู่แทนที่ (รูปที่ 23)



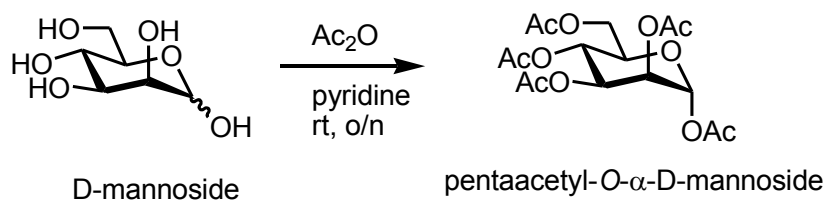
รูปที่ 23 แสดงโครงสร้างเคมีของ D-mannoside และ pentaacetyl- α -D-mannoside

จากรูปที่ 24 เป็น ^1H NMR spectrum ของ D-mannoside¹ ซึ่งไม่ผ่านการปรับปรุงโครงสร้าง จะพบว่าสัญญาณของโปรตอนจะซ้อนทับกันอยู่ในช่วง δ 3.00–4.00 ppm แม้ว่าจะใช้เครื่อง NMR ซึ่งมีสนามแม่เหล็กสูงถึง 600 MHz ก็ตาม ทำให้ผู้วิจัยวางแผนที่จะศึกษาโครงสร้างของมอนอเมอร์แมนโนสที่ผ่านการปรับปรุงหมู่ไฮดรอกซิลเป็นหมู่อะเซทิลในเบื้องต้น



รูปที่ 24 ^1H NMR spectrum ของ D-mannoside ที่ไม่ผ่านการปรับปรุงหมู่ไฮดรอกซิล (600 MHz, D_2O)¹

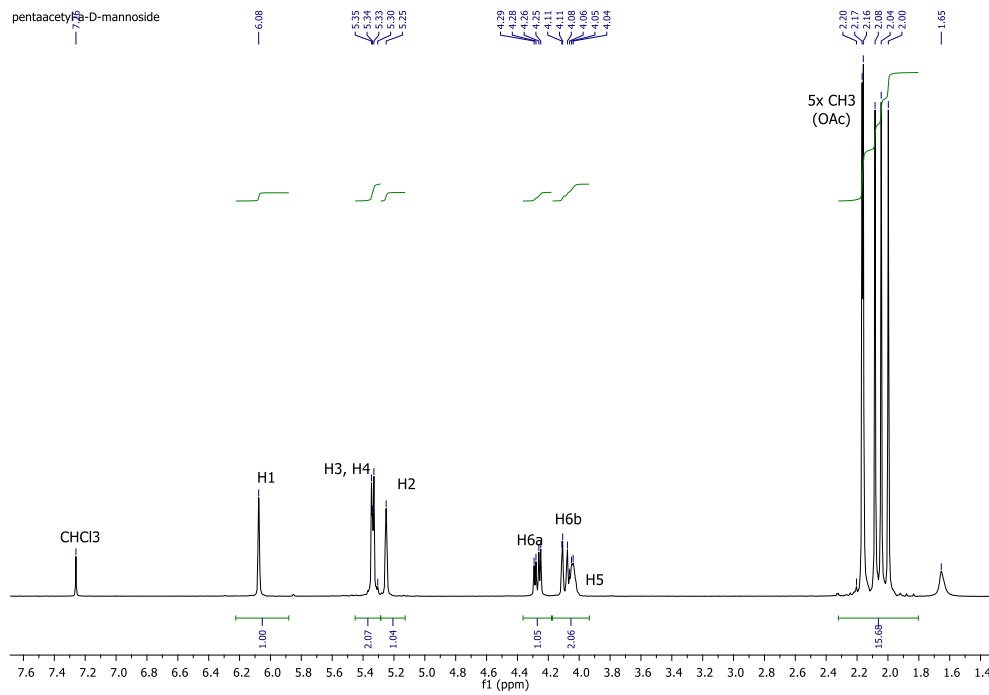
ทำปฏิกิริยา acylation ของสารประกอบคาร์โบไฮเดรตโดย ในสถานะที่ปราศจากความชื้น (anhydrous conditions) และใช้ acetic anhydride เป็น acylating agent โดยมี pyridine ทำหน้าที่เป็นทั้งเบสและเป็นตัวทำละลาย (รูปที่ 25)



รูปที่ 25 แสดงปฏิกิริยา acylation ของ D-mannoside โดยใช้ acetic anhydride

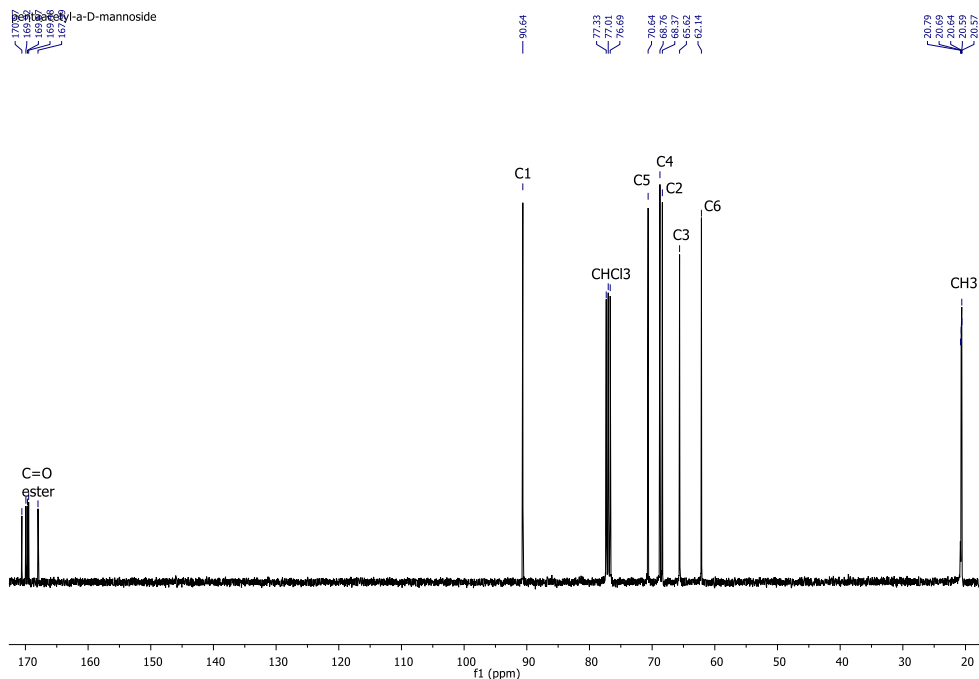
ผู้วิจัยศึกษา NMR spectroscopy ของ penta-O-acetyl- α -D-mannoside โดยใช้เทคนิค ^1H NMR ใช้เครื่องมือที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยให้ผลการทดลองเป็นที่น่าพอใจ กล่าวคือสัญญาณโปรตอนทั้ง 7 โปรตอนบนวงไพราโนสของน้ำตาลแมนโนส แยกออกจากกันอย่างชัดเจน (รูปที่ 26) หลังจากการใช้ข้อมูลอื่นจากการทดลองด้วยเทคนิค 2D NMR spectroscopy ทำให้สามารถวิเคราะห์สัญญาณเป็นไปตามรูปภาพที่ 2 โดยพบว่าสัญญาณซึ่ง downfield มากที่สุดคือ ที่ δ 6.08 ppm เป็นสัญญาณของ H1 ซึ่งเป็น anomeric proton และมีสัญญาณที่ซ้อนทับใกล้เคียงกันอยู่เพียงคู่เดียวคือ H3, H4 ที่จำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติม ส่วนสัญญาณที่ δ 2.00–2.20 ppm เป็นของหมู่อะเซทิลทั้ง 5 หมู่

¹ Database resources of the National Center for Biotechnology Information



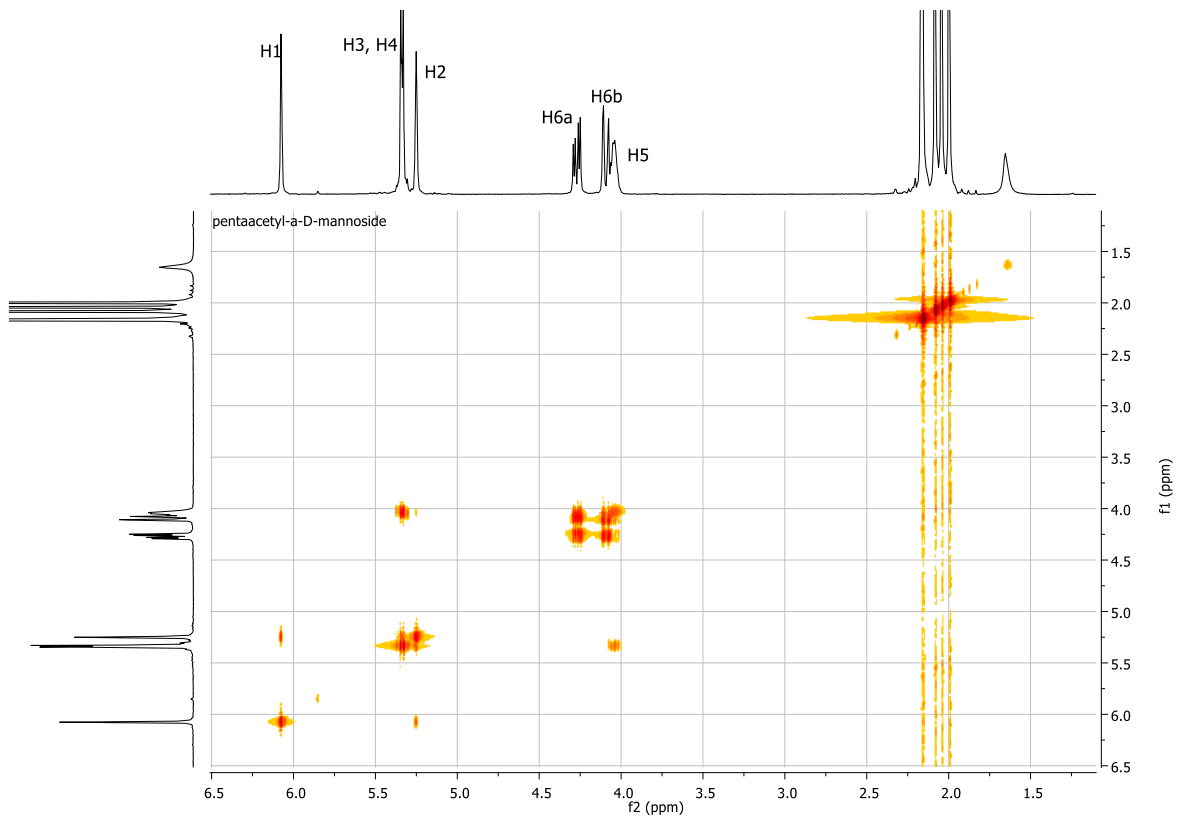
รูปที่ 26 แสดง ^1H NMR spectrum ของ penta-O-acetyl- α -D-mannoside (400 MHz, CDCl_3)

จากนั้นจึงทำการทดลองด้วยการวัดสัญญาณ ^{13}C NMR ซึ่งให้ผลเป็นที่น่าพอใจเช่นเดียวกัน (รูปที่ 27) กล่าวคือสามารถระบุสัญญาณทุกสัญญาณได้ ยกตัวอย่างเช่น สัญญาณที่ downfield ที่สุด ณ δ 90.64 ppm เป็นสัญญาณของคาร์บอนที่ตำแหน่ง anomeric (C1) ส่วนสัญญาณที่ δ 62.14 ppm ซึ่งเป็นสัญญาณที่ upfield สูงที่สุดบนวงไพราโนสเป็นสัญญาณของคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 (C6) ซึ่งเป็นคาร์บอนที่ต่ออยู่กับไพรมารีแอลกอฮอล์ ส่วนสัญญาณที่ δ 20.57–20.79 ppm และ δ 167.09–170.87 ppm เป็นของหมู่อะเซทิลทั้ง 5 หมู่



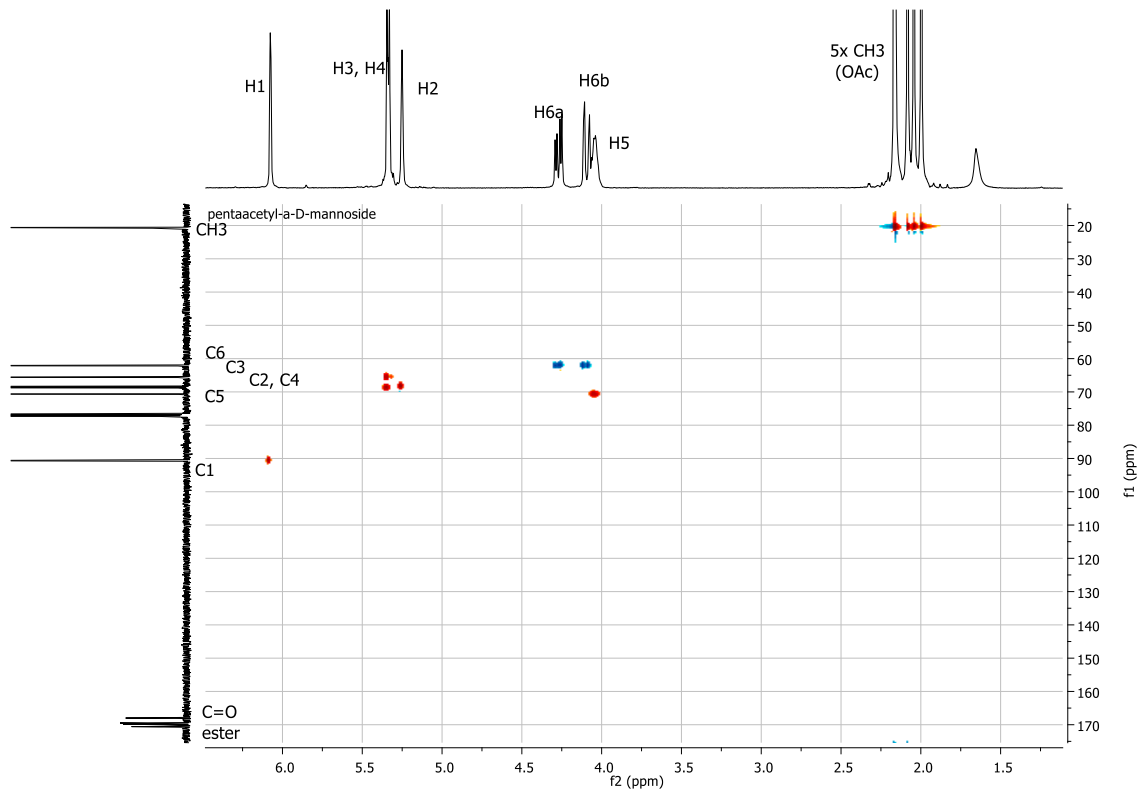
รูปที่ 27 แสดง ¹³C NMR spectrum ของ penta-O-acetyl- α -D-mannoside (100 MHz, CDCl₃)

ผู้วิจัยได้ศึกษาต่อโดยใช้เทคนิค 2D NMR spectroscopy เพื่อเป็นการยืนยันในการระบุโครงสร้างด้วยเทคนิค 1D NMR spectroscopy ของ ¹H, ¹³C spectroscopy ก่อนหน้านี้นี้ โดยเริ่มจากเทคนิค COSY ซึ่งเป็นเทคนิคที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนที่อยู่ข้างเคียงกันในระยะไม่เกิน 3 พันธะ (3-bond coupling) โดยจากรูปที่ 28 จะพบว่าข้อมูลที่ได้สอดคล้องและสนับสนุนการระบุสัญญาณของเทคนิค ¹H NMR ยกตัวอย่างเช่น พบ cross-signal (δ 5.26, 6.10 ppm) ระหว่าง H1 และ H2 ซึ่งยืนยันว่าโปรตอนทั้งคู่เป็น vicinal proton บนวงไพราโนส หรือพบ cross-signal (δ 4.10, 4.27 ppm) ระหว่าง H6a และ H6b ซึ่งยืนยันว่าโปรตอนทั้งคู่เป็น geminal proton อยู่บนคาร์บอนตำแหน่งเดียวกัน (C6)



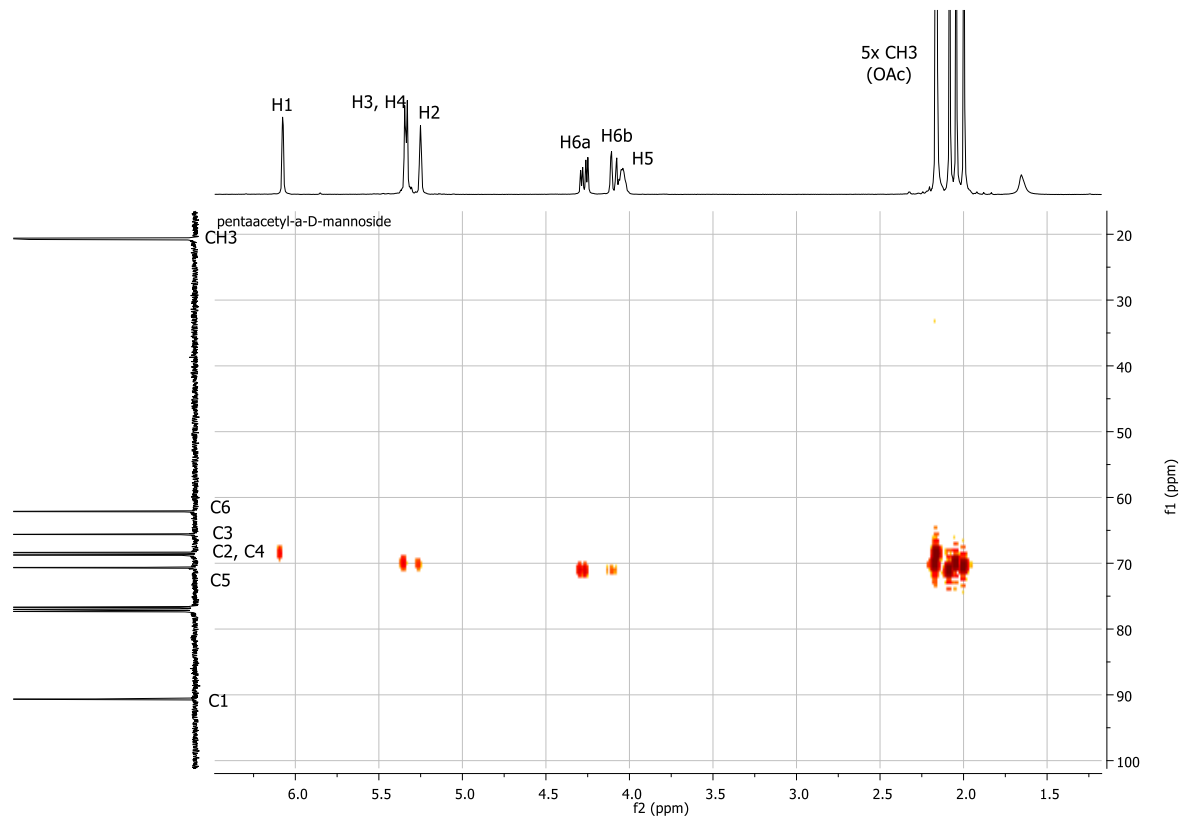
รูปที่ 28 แสดง COSY spectrum ของ penta-O-acetyl- α -D-mannoside (400 MHz, CDCl_3)

รูปที่ 29 แสดงสเปกตรัมของ HSQC experiment ซึ่งเป็นเทคนิค 2D NMR spectroscopy ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนและคาร์บอนที่อยู่ติดกัน (1-bond coupling) โดยพบว่าข้อมูลที่ได้สอดคล้องและสนับสนุนการระบุสัญญาณของเทคนิค ^{13}C NMR เช่นกัน ตัวอย่างเช่น พบ cross-signal (δ 6.08, 90.96 ppm) ระหว่าง H1 และ C1 ซึ่งยืนยันถึงการระบุชนิดของคาร์บอนบน ^{13}C NMR หรือพบ cross-signal (δ 4.27, 61.78 ppm และ 4.09, 61.78 ppm) ระหว่าง H6a และ H6b กับ C6 ซึ่งยืนยันว่าโปรตอนทั้งคู่เป็น geminal proton อยู่บนคาร์บอนตำแหน่งเดียวกัน (C6) นอกจากนี้เทคนิค HSQC ซึ่งเป็นเทคนิคชนิด phase-sensitive experiment ยังให้ข้อมูลเพิ่มเติมจากสีของสัญญาณ cross-signal กล่าวคือ หากเป็น positive-phase correlation จะแสดงสัญญาณ cross-signal เป็นสีส้ม (สีขึ้นอยู่กับการ set up ของเครื่องมือ) ซึ่งจะเป็นสัญญาณของหมู่ CH หรือ CH_3 แต่หากเป็น negative-phase correlation จะแสดงสัญญาณ cross-signal เป็นสีฟ้าและเป็นสัญญาณของหมู่ CH_2



รูปที่ 29 แสดง HSQC spectrum ของ penta-O-acetyl- α -D-mannoside (400 MHz, CDCl_3)

รูปที่ 30 แสดงสเปกตรัมของ HMBC experiment ซึ่งเป็นเทคนิค 2D NMR spectroscopy ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนและคาร์บอนที่อยู่ห่างกัน (long range coupling) โดยจากรูปภาพพบว่าข้อมูลที่ได้สอดคล้องและสนับสนุนการระบุสัญญาณของเทคนิค ^{13}C NMR ยกตัวอย่างเช่น พบ cross-signal (δ 6.08, 68.07 ppm) ระหว่าง H1 และ C2 ซึ่งยืนยันถึงการระบุชนิดของคาร์บอนบน ^{13}C NMR หรือพบ cross-signal (δ 4.27, 70.64 ppm) ระหว่าง H6a กับ C5 เป็นต้น

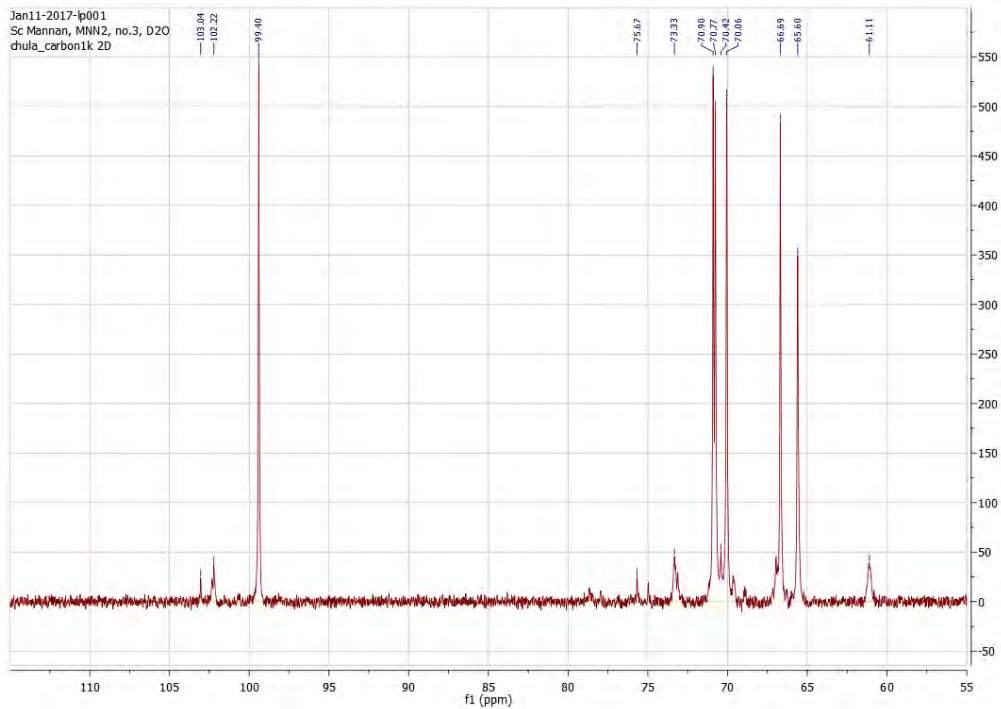


รูปที่ 30 แสดง HMBC spectrum ของ penta-O-acetyl- α -D-mannoside (400 MHz, CDCl_3)

การพิสูจน์สูตรโครงสร้างของแมนแนนจากเชื้อรา *Saccharomyces*

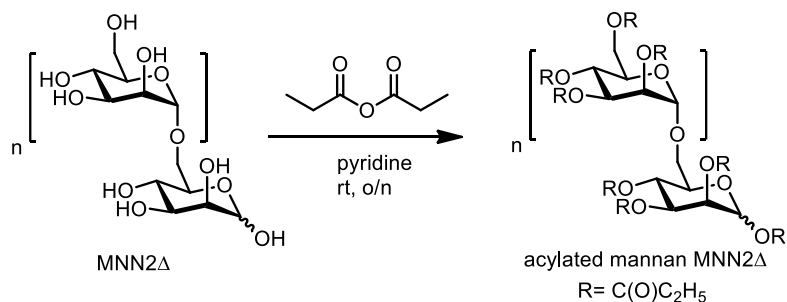
ศึกษาปฏิกิริยา acylation เพื่อใช้ในการในการแยกแมนแนนจาก *Saccharomyces*

ผู้วิจัยได้รับบออลิโก-แมนแนนของเชื้อรา *Saccharomyces* ชนิด MNN2 Δ จากกลุ่มวิจัยของ ผศ.ดร.พัชรี ฤทธิ์ประจักษ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จากข้อมูลงานวิจัยก่อนหน้านี้ คาดว่ามีโครงสร้างหลักที่มีการเชื่อมต่อกันของแมนโนสด้วยพันธะแบบ $\alpha(1,6)$ ผู้วิจัยจึงหาโครงสร้างเบื้องต้นด้วยเทคนิค ^{13}C NMR ดังรูปที่ 31 ซึ่งจะเห็นได้ว่าโครงสร้างมีความเป็นเนื้อเดียวกันสูง (homogeneous) จึงเหมาะสำหรับนำมาใช้ศึกษาหาโครงสร้างด้วยเทคนิค NMR ต่อไป



รูปที่ 31 แสดง ^{13}C NMR spectrum ของโอลิโก-แมนแนนจากเชื้อรา *Saccharomyces* ชนิด MNN2 Δ (400 MHz, D₂O)

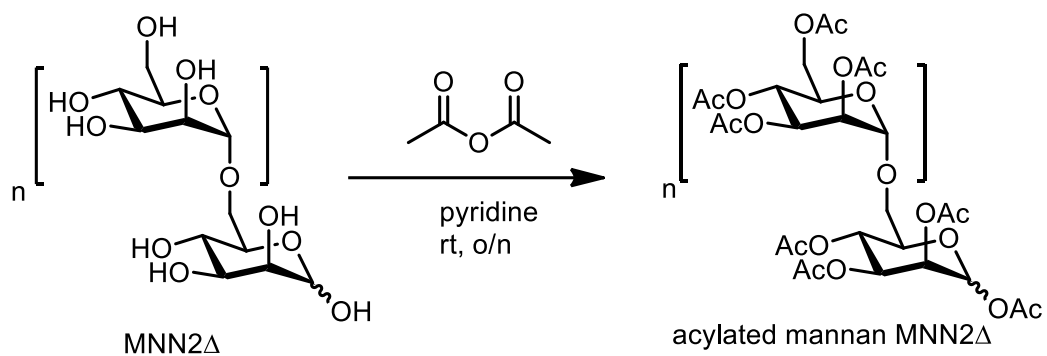
จากนั้นผู้วิจัยจึงวางแผนดัดแปลงโครงสร้างของหมู่ไฮดรอกซิลด้วยหมู่อะเซทิล แต่เนื่องจากบริษัทขายสารเคมีได้แจ้งให้ทราบว่า acetic anhydride ซึ่งเป็นสารที่จำเป็นต้องใช้นั้น ไม่สามารถนำเข้ามาขายในประเทศไทยได้ เนื่องจากเป็นสารตั้งต้นที่ใช้ในการผลิตยาเสพติด จำเป็นต้องขออนุญาตจากองค์การอาหารและยา ก่อน และจะใช้เวลาหลายเดือน ทางกลุ่มวิจัยจึงหันมาใช้ propionic anhydride ซึ่งเป็นสารประเภท anhydride เหมือนกันแต่โครงสร้างมีสายคาร์บอนเพิ่มขึ้นมาหนึ่งอะตอม ซึ่งพบว่าผลการ acetylation ด้วย propionic anhydride นั้นให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นของผสมจำนวนมากคาดว่าเกิดจากการเข้าทำปฏิกิริยาที่ไม่สมบูรณ์ของ propionic anhydride ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่าเมื่อเทียบกับ acetic anhydride (รูปที่ 32)



รูปที่ 32 แสดงปฏิกิริยา acylation ของโอลิโก-แมนแนนจากเชื้อรา *Saccharomyces* ชนิด MNN2 Δ โดยใช้ propionic anhydride

ดังนั้นในขณะนี้คณะผู้วิจัยได้ทำปฏิกิริยา acylation ของโอลิโก-แมนแนนใหม่อีกครั้ง โดยกลับมาใช้ acetic anhydride เป็น acylating agent แทน โดยนำโอลิโก-แมนแนนมาให้ความร้อนในตัวทำละลายพริดีน

และอะซิติกแอนไฮไดรต์โดยใช้อ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งระหว่างนี้จะสังเกตเห็นได้ว่าโอลิโก-แมนแนนที่เกิดปฏิกิริยาอะเซติลเลชันจะเริ่มละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับตัวทำละลายพิริดีนเนื่องจากมีความเป็นขั้วของโมเลกุลลดลง จากนั้นเมื่อครบเวลาที่กำหนดไว้ จึงระเหยตัวทำละลายพิริดีนออกโดยใช้เครื่องระเหยภายใต้ความดันสูญญากาศซึ่งจะได้ของผสมลักษณะขุ่นเหนียว (รูปที่ 33)

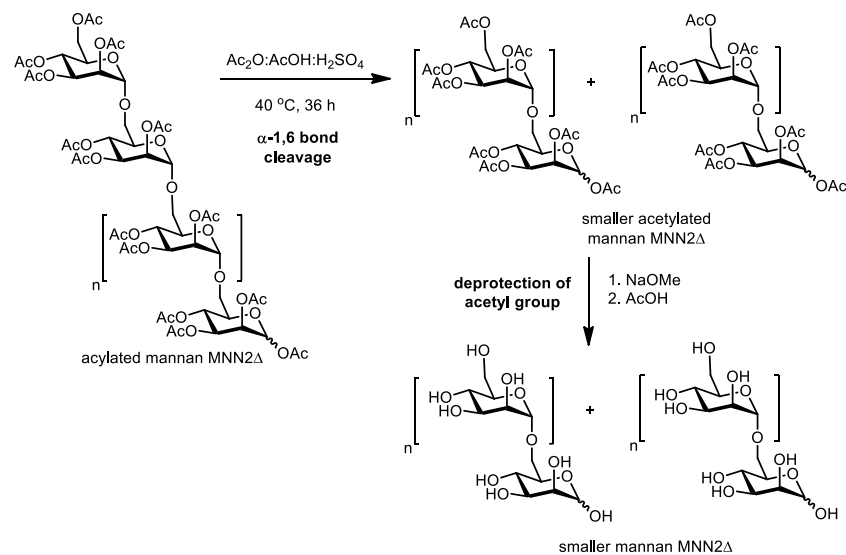


รูปที่ 33 แสดงปฏิกิริยา acylation ของโอลิโก-แมนแนนจากเชื้อรา *Saccharomyces* ชนิด MNN2Δ โดยใช้ acetic anhydride

ศึกษาปฏิกิริยา acetolysis เพื่อใช้ในการในการแยกแมนแนนจาก *Saccharomyces*

นำของผสมอลิโก-แมนแนนจากเชื้อรา *Saccharomyces* ชนิด MNN2 Δ ที่ผ่านปฏิกิริยา acylation ข้างต้นมาทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในสภาวะกรด ให้ความยาวของสายโซ่สั้นลง โดยเติมของผสม อะซิติกแอนไฮไดรด์/ กรดอะซิติก/กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (100:100:1, v/v/v) จากนั้นจึงให้ความร้อนที่ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 36 ชั่วโมงเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอะเซตโตไลซิสที่สมบูรณ์ เมื่อครบเวลาที่กำหนดจึงปรับ pH ให้เป็นกลางด้วย เบสพิริดีน ระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยภายใต้ความดันสุญญากาศ จากนั้นสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม และล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วจึงนำชั้นของตัวทำละลายคลอโรฟอร์มทั้งหมดมากำจัดน้ำที่หลงเหลืออยู่ด้วย โซเดียมซัลเฟต จึงนำไประเหยแห้ง ที่ยที่สุดกำจัดความชื้นที่หลงเหลืออยู่ด้วยการทำ azeotropic distillation กับโทลูอีน ซึ่งในขั้นตอนนี้จะเป็นการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยกรด ตัดสายโซ่ออลิโก-แมนแนนชนิด $\alpha(1,6)$ บนสายโซ่หลักของอลิโก-แมนแนน (รูปที่ 34)

จากนั้นนำของผสมที่ผ่านปฏิกิริยา acetolysis มาละลายด้วยเมทานอลและอุ่นให้ความร้อนเล็กน้อย ด้วยอ่างน้ำร้อนจนของผสมละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นจึงค่อยๆเติมสารละลายโซเดียมเมททอกไซด์ (NaOMe) ที่ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงเติม 50% กรดอะซิติกเพื่อทำลายโซเดียมเมททอกไซด์ ที่เหลืออยู่ จากนั้นจึงระเหยตัวทำละลายทั้งหมดให้แห้ง ในขั้นตอนนี้จะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นออลิโก-แมนแนนชนิดสายสั้นและหมู่ปกป้องอะเซทิลได้ถูกปลดออกหมดแล้ว



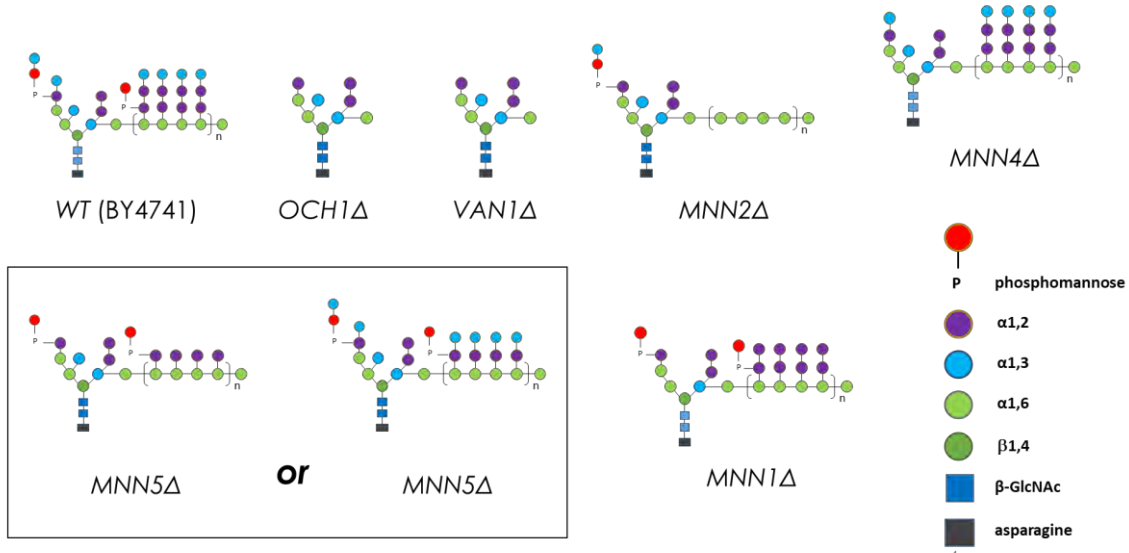
รูปที่ 34 ปฏิกิริยา acetolysis เพื่อใช้ในการในการแยกแมนแนนอลิโกแซคคาร์ไรด์

ศึกษาเทคนิค chromatography ในการแยกแมนแนนจาก *Saccharomyces*

เติมน้ำกลั่นลงไปละลาย ออลิโก-แมนแนนจากเชื้อรา *Saccharomyces* ชนิด MNN2 Δ ที่ได้ผ่านการย่อยให้มีขนาดเล็กลงในขั้นที่ผ่านมา จากนั้นนำไปเซนต์ริฟส์เพื่อนำเฉพาะสารละลายส่วนใสไปทำบริสุทธิ์ โดยใช้ column chromatography โดยใช้ Bio-Gel P-2 เป็นวัสดุภาคคงที่ และชะคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่นด้วยอัตราเร็วประมาณ 10 mL ต่อชั่วโมง และตรวจสอบปริมาณของออลิโก-แมนแนนที่ได้ในแต่ละแฟรคชันด้วยเทคนิค phenol-sulfuric acid

วิเคราะห์โครงสร้างของแมนแนนจาก *Saccharomyces* ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy
 จากการทบทวนวรรณกรรม คณะผู้วิจัยมีสมมติฐานถึงโครงสร้างของโอลิโก-แมนแนนที่ใช้ในการศึกษา
 ครั้งนี้ตามรูปที่ 35

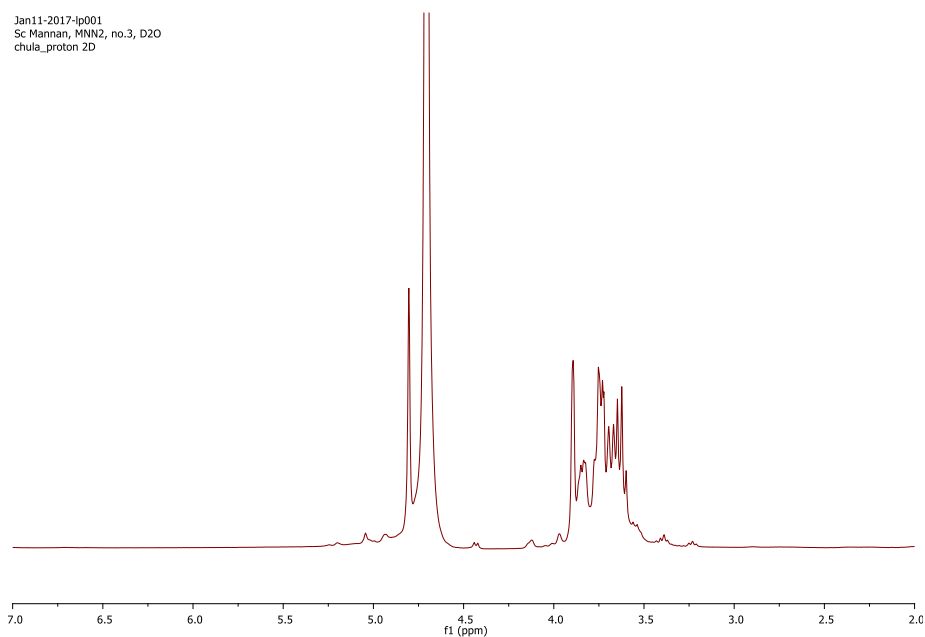
Predicted mannan structures



รูปที่ 35 แสดงโครงสร้างทางเคมีที่คาดการณ์ของโอลิโก-แมนแนนที่ใช้ในการศึกษาในงานวิจัยนี้

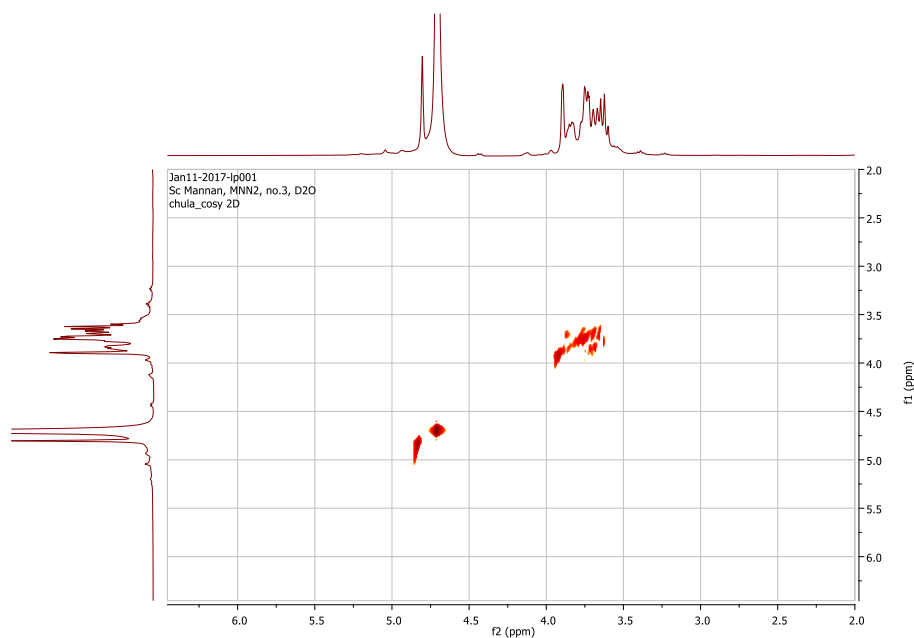
ผู้วิจัยเริ่มจากการศึกษา NMR spectroscopy ของ โอลิโก-แมนแนนจากเชื้อรา *Saccharomyces* ชนิด MNN2Δ ที่ผ่านการย่อยให้มีขนาดเล็กลง โดยใช้เทคนิค ^1H NMR (รูปที่ 36) ซึ่งแสดงสัญญาณออกเป็น 2 กลุ่มคือสัญญาณแอนโนเมอริกโปรตอน ที่ δ 4.25–4.75 ppm และสัญญาณโปรตอนที่เหลือบนวงไพราโนสของน้ำตาลแมนโนสที่ δ 3.50–3.85 ppm นอกจากนั้นยังพบสัญญาณของน้ำ (DOH, H₂O; δ 4.75 ppm) ขนาดใหญ่ที่บริเวณตำแหน่งแอนโนเมอริก

Jan11-2017-1p001
Sc Mannan, MNN2, no.3, D2O
chula_proton 2D



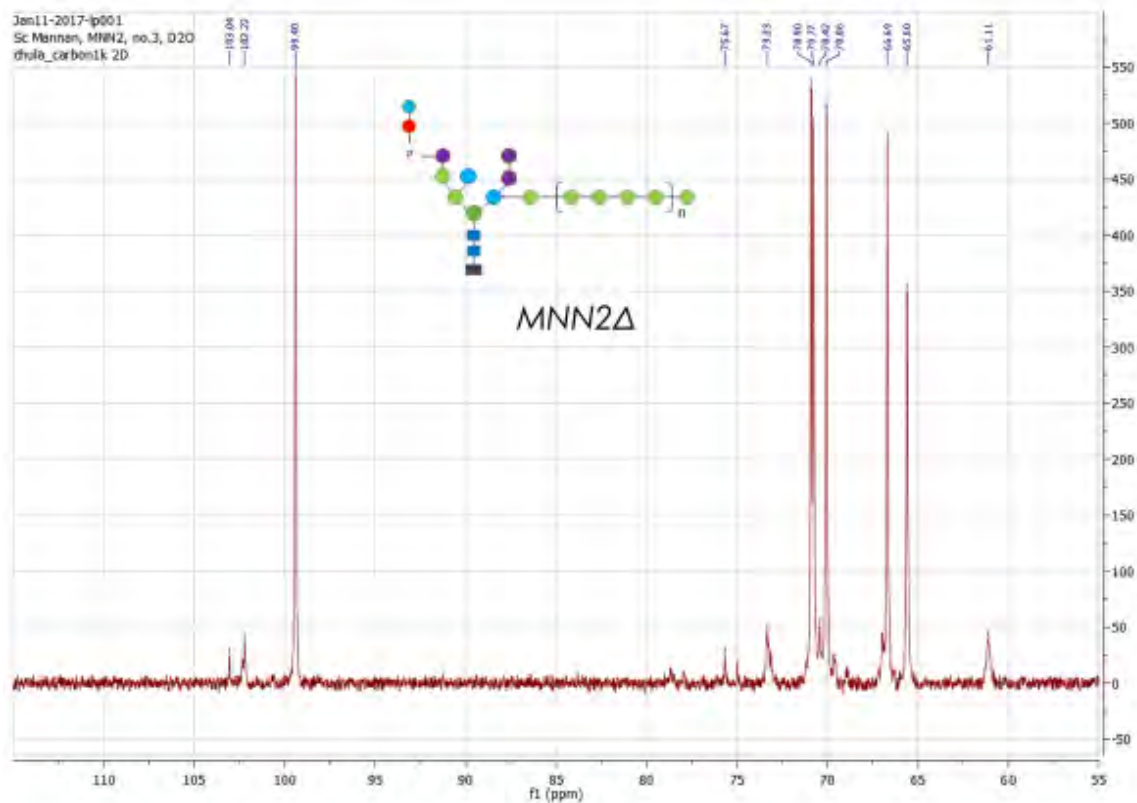
รูปที่ 36 แสดง ^1H NMR spectrum ของออลิโก-แมนแนนชนิด MNN2 Δ (400 MHz, D₂O)

จากนั้นศึกษาออลิโก-แมนแนนจากเชื้อรา *Saccharomyces* ชนิด MNN2 Δ ด้วยเทคนิค COSY (รูปที่ 37) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ ^1H NMR spectrum เนื่องจากพบสัญญาณ cross-signal ระหว่างโปรตอนที่ตำแหน่งแอนโนเมอริก (δ 4.25–4.75 ppm) และโปรตอนบนวงแหวนไพราโนสของน้ำตาลแมนโนส (δ 3.50–3.85 ppm)



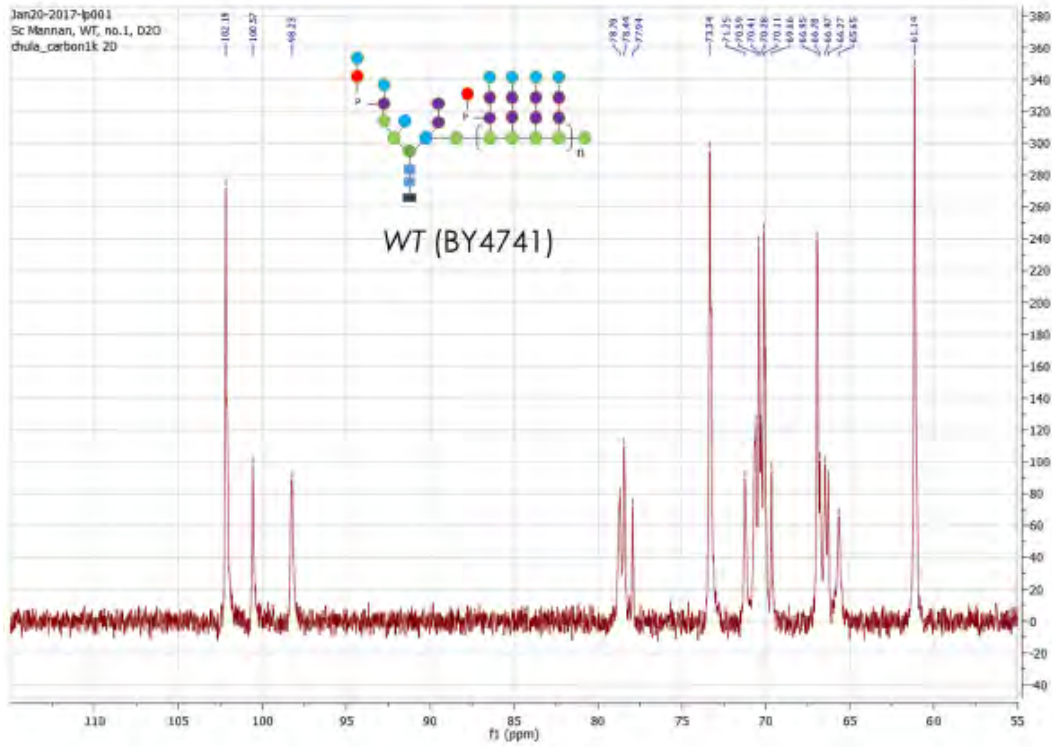
รูปที่ 37 แสดง COSY spectrum ของออลิโก-แมนแนนชนิด MNN2 Δ (400 MHz, D₂O)

เนื่องจากสัญญาณ ^1H NMR spectroscopy ที่ได้ให้ข้อมูลทางโครงสร้างอย่างจำกัด อันเนื่องมาจากการซ้อนทับกันของสัญญาณโปรตอนบนวงแหวนไพราโนสของแมนแนน ผู้วิจัยจึงใช้เทคนิค ^{13}C NMR spectroscopy ในการศึกษาทางโครงสร้างและพบว่าโครงสร้างมีความเป็นเนื้อเดียวกันสูง (homogeneous) โดยสังเกตได้จากปรากฏการณ์คาร์บอนทั้ง 6 ตำแหน่งได้แก่ แอนโนเมอริก โปรตอนที่ δ 99.40 ppm และโปรตอนอีก 5 ตำแหน่งบนวงไพราโนสได้แก่ 70.90, 70.77, 70.06, 66.69 และ 65.60 ppm ตามลำดับ (รูปที่ 38)

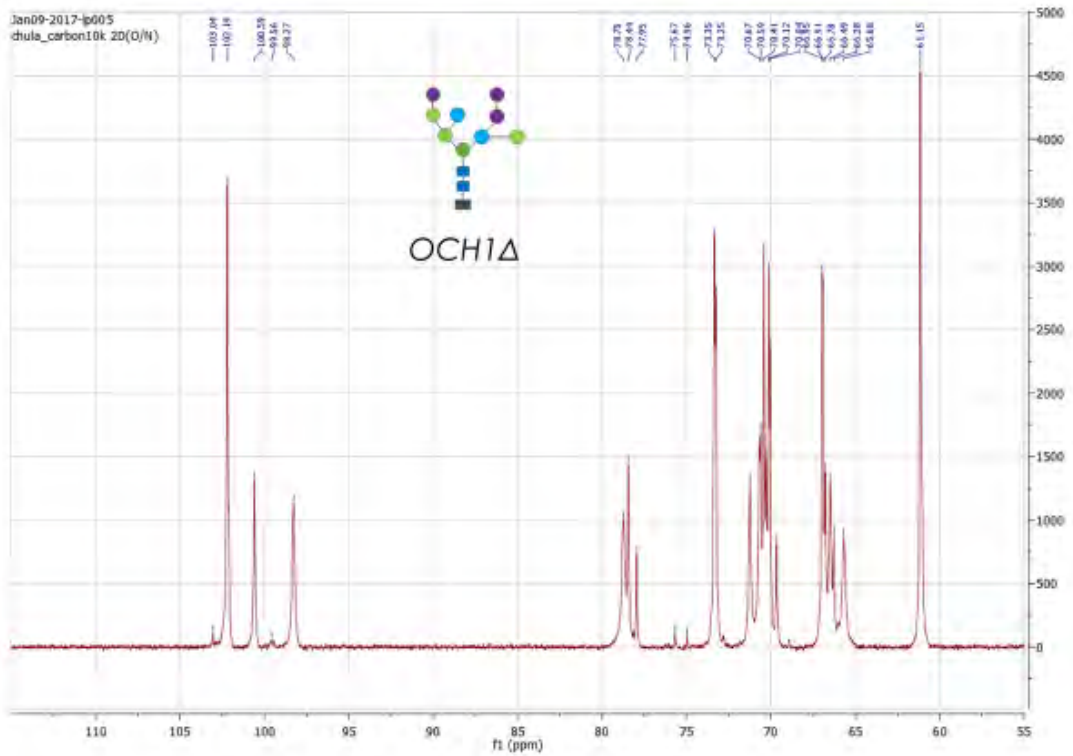


รูปที่ 38 แสดง ^{13}C NMR spectrum ของออลิโก-แมนแนนชนิด MNN2 Δ (100 MHz, D₂O)

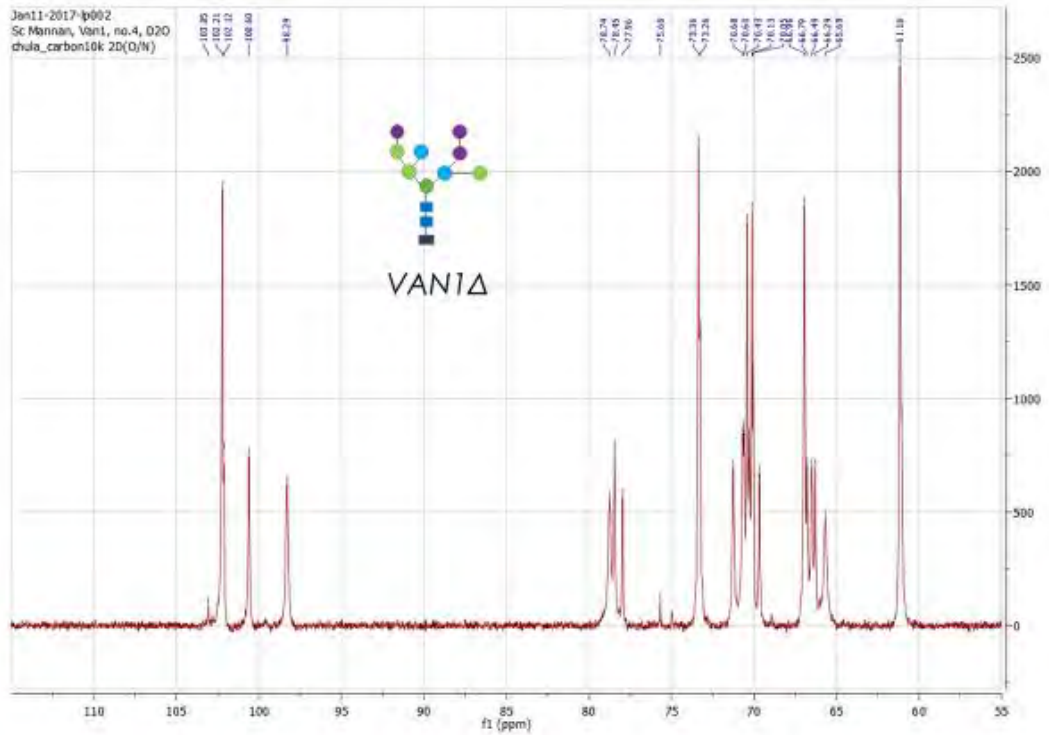
ดังนั้นผู้วิจัยจึงใช้เทคนิค ^{13}C NMR spectroscopy ในการศึกษาทางโครงสร้างทางเคมีเบื้องต้นของออลิโก-แมนแนนอีก 5 ชนิดที่เหลือได้แก่ WT, OCH1 Δ , VAN1 Δ , MNN1 Δ และ MNN5 Δ (รูปที่ 39–43)



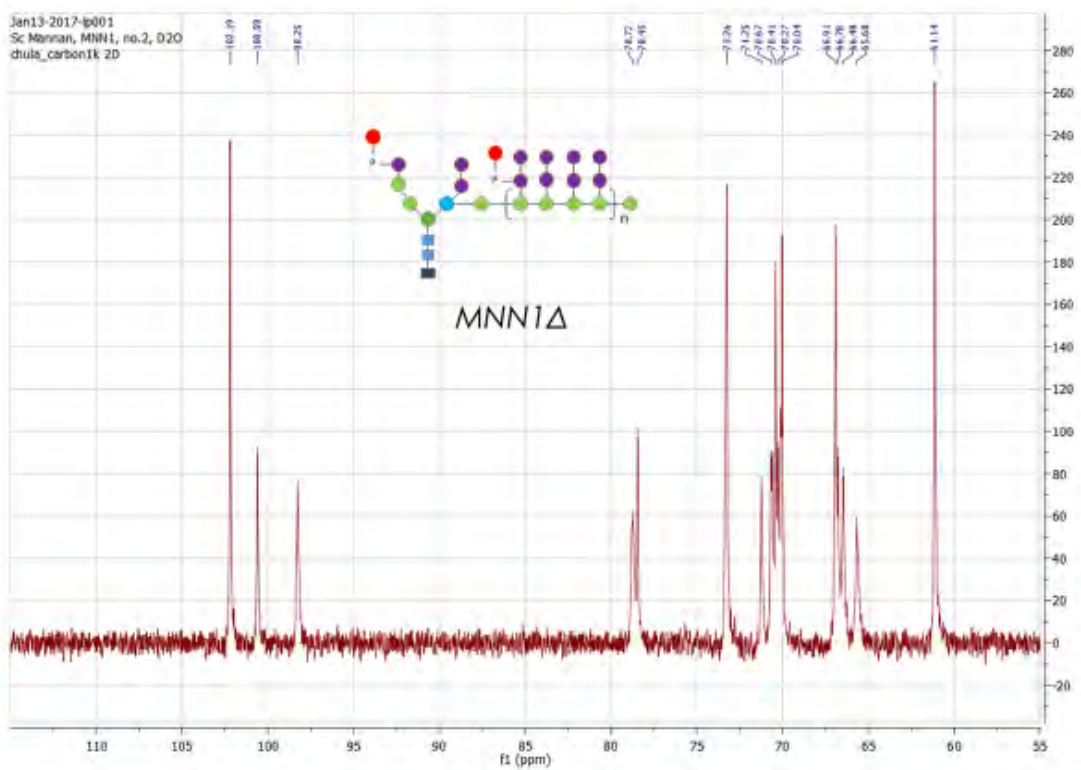
รูปที่ 39 แสดง ^{13}C NMR spectrum ของออลิโก-แมนแนนชนิด WT (100 MHz, D_2O)



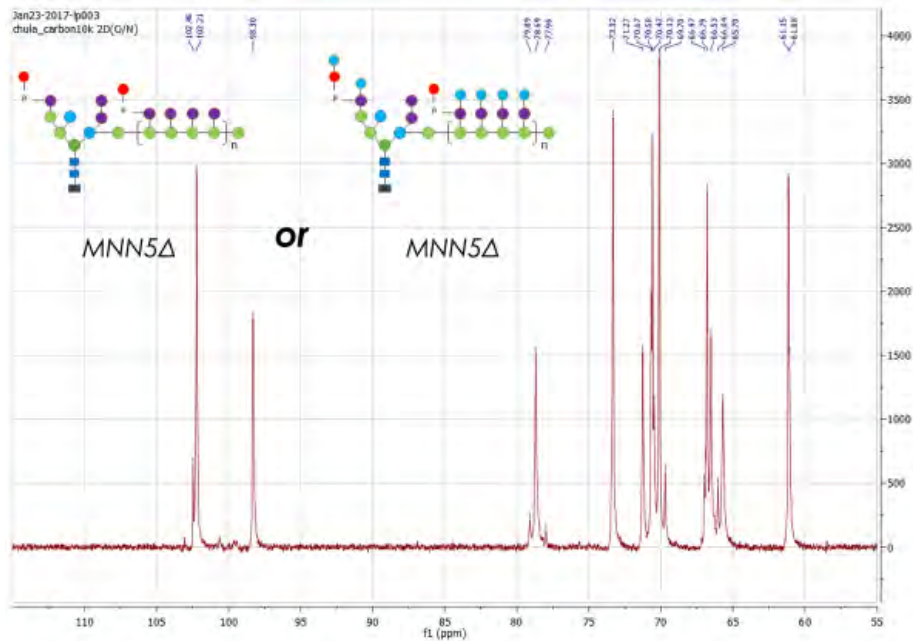
รูปที่ 40 แสดง ^{13}C NMR spectrum ของออลิโก-แมนแนนชนิด OCH1Δ (100 MHz, D_2O)



รูปที่ 41 แสดง ^{13}C NMR spectrum ของออลิโก-แมนแนนชนิด VAN1 Δ (100 MHz, D₂O)

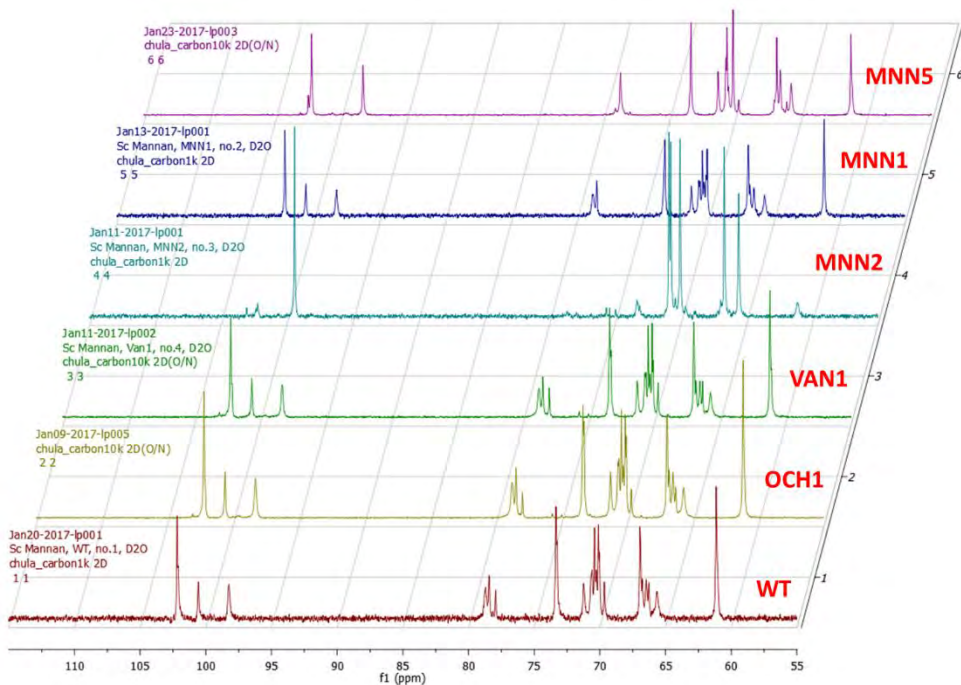


รูปที่ 42 แสดง ^{13}C NMR spectrum ของออลิโก-แมนแนนชนิด MNN1 Δ (100 MHz, D₂O)



รูปที่ 43 แสดง ^{13}C NMR spectrum ของออลิโก-แมนแนนชนิด $\text{MNN5}\Delta$ (100 MHz, D_2O)

เมื่อพิจารณาเปรียบ ^{13}C NMR spectrum ในช่วง δ 55-120 ppm เปรียบเทียบของออลิโก-แมนแนนทั้ง 6 ชนิดได้แก่ $\text{MNN5}\Delta$, $\text{MNN1}\Delta$, $\text{MNN2}\Delta$, $\text{VAN1}\Delta$, $\text{OCH1}\Delta$ และ WT (รูปที่ 44) จะสังเกตเห็นว่าสัญญาณคาร์บอนของออลิโก-แมนแนนชนิด $\text{VAN1}\Delta$, $\text{OCH1}\Delta$ และ WT มีลักษณะสัญญาณโดยรวมที่ใกล้เคียงกันมาก ซึ่งแตกต่างจากสัญญาณของ $\text{MNN5}\Delta$, $\text{MNN1}\Delta$ และ $\text{MNN2}\Delta$ อย่างชัดเจน



รูปที่ 44 แสดง ^{13}C NMR spectrum ในช่วง δ 55-120 ppm เปรียบเทียบของออลิโก-แมนแนนทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ $\text{MNN5}\Delta$, $\text{MNN1}\Delta$, $\text{MNN2}\Delta$, $\text{VAN1}\Delta$, $\text{OCH1}\Delta$ และ WT (100 MHz, D_2O)

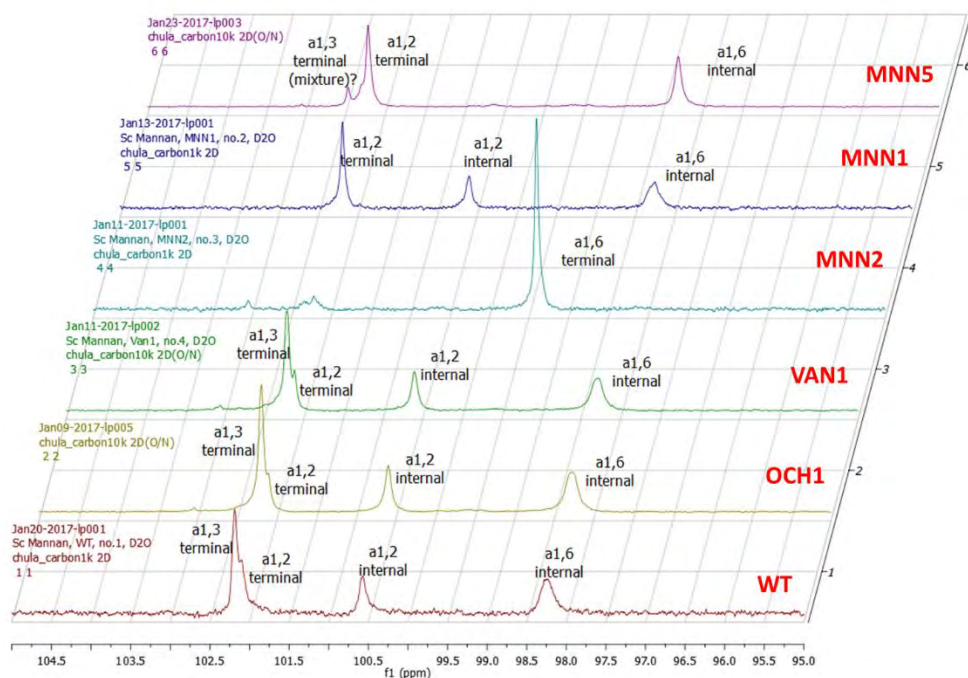
จากการพิจารณาเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่มีมาก่อน จึงสามารถสรุปพันธะไกลโคไซด์ของโอลิโก-แมนแนนทั้ง 6 ชนิดได้แก่ MNN5 Δ , MNN1 Δ , MNN2 Δ , VAN1 Δ , OCH1 Δ และ WT (รูปที่ 45) ได้ดังนี้

โอลิโก-แมนแนนชนิด VAN1 Δ , OCH1 Δ และ WT ประกอบไปด้วยพันธะ $\alpha(1,3)$ ที่อยู่ปลายสายโซ่, พันธะ $\alpha(1,2)$ ที่อยู่ปลายสายโซ่และพันธะ $\alpha(1,6)$ ที่อยู่ภายในสายโซ่

โอลิโก-แมนแนนชนิด MNN2 Δ ประกอบไปด้วยพันธะ $\alpha(1,6)$ ที่อยู่ปลายสายโซ่

โอลิโก-แมนแนนชนิด MNN1 Δ ประกอบไปด้วยพันธะ $\alpha(1,2)$ ที่อยู่ปลายสายโซ่, พันธะ $\alpha(1,2)$ ที่อยู่ในสายโซ่และพันธะ $\alpha(1,6)$ ที่อยู่ภายในสายโซ่ ไม่พบพันธะ $\alpha(1,3)$

โอลิโก-แมนแนนชนิด MNN5 Δ ประกอบไปด้วยพันธะ $\alpha(1,2)$ ที่อยู่ปลายสายโซ่และพันธะ $\alpha(1,6)$ ที่อยู่ในสายโซ่และมีพันธะ $\alpha(1,3)$ ที่อยู่ปลายสายโซ่เพียงเล็กน้อย



รูปที่ 45 แสดง ^{13}C NMR spectrum ในช่วง δ 95-105 ppm เปรียบเทียบของโอลิโก-แมนแนนทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ MNN5 Δ , MNN1 Δ , MNN2 Δ , VAN1 Δ , OCH1 Δ และ WT (100 MHz, D₂O)

ซึ่งข้อมูลทางโครงสร้างทางเคมีของโอลิโก-แมนแนนที่ได้นั้น สอดคล้องกับโครงสร้างทางเคมีที่คาดการณ์ไว้ก่อนหน้านี้ (รูปที่ 35)

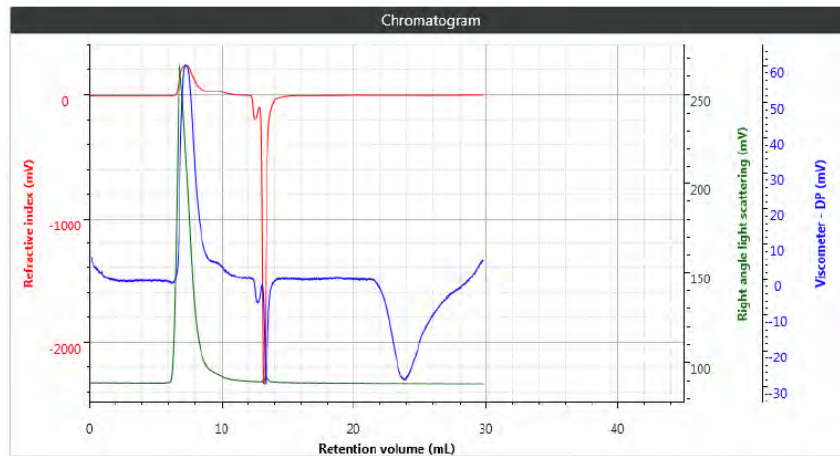
การพิสูจน์สูตรโครงสร้างของแมนแนนจากเชื้อรา *Candida*

1) การพิสูจน์สูตรโครงสร้างของแมนแนนจากเชื้อรา *C. krusei*

วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแมนแนนจาก *C. krusei*

ผู้วิจัยนำแมนแนนที่สกัดจากผนังเซลล์ของเชื้อรา *C. krusei* มาวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิค gel permeation chromatography (GPC) โดยเครื่อง GPC ที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นเครื่องรุ่น Malvern Omnisec

ที่มีส่วนตรวจวัดเป็น light scattering เตรียมตัวอย่างโดยใช้ mannan ความเข้มข้น 4 mg/mL ปริมาตร 50 μ L จากนั้นจึงชะด้วย 10 mM PBS pH 7.4 ที่อัตราไหล (flow rate) 1 mL/min โดย GPC column ที่ใช้ในงานวิเคราะห์นี้เป็นชนิด spherical high purity 5 μ m silica SEPAX column โครมาโตแกรมจากเทคนิค GPC แสดงดัง รูปที่ 46



รูปที่ 46 แสดง GPC chromatogram ของ *C. krusei* mannan

น้ำหนักโมเลกุลของ *C. krusei* mannan ที่ได้จากการตรวจวัดคือ 169,400 g/mol หรือประมาณ 169 kDa ดังแสดงในรูปที่ 47

| Results by sample and peak | |
|----------------------------|---|
| Parameter | Inj. 1 C. krusei 11/4/2561... Peak 1 |
| RV (mL) | 7.37 |
| Mw (g/mol) | 169,400 |
| Mw/Mn | 1.965 |
| IVw (dL/g) | 0.1829 |
| Rh(n) _w (nm) | 7.274 |
| Frac. of sample (%) | 100 |
| Recovery (%) | 133.1 |
| RI peak (mV·mL) | 373.4 |
| UV peak (mV·mL) | 20.83 |
| RALS peak (mV·mL) | 204.7 |
| LALS peak (mV·mL) | 140.2 |
| DP peak (mV·mL) | 81.54 |
| MALS peak (mV·mL) | N/C |

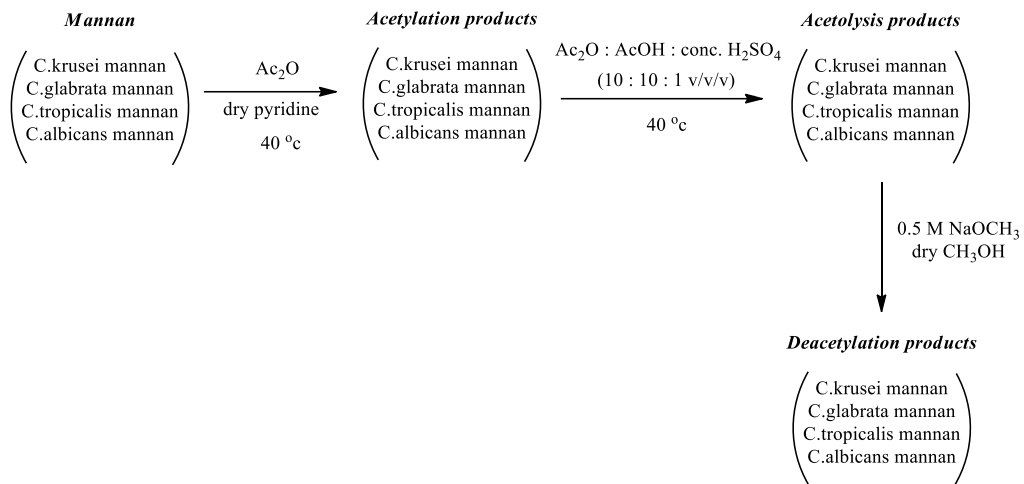
| Result statistics | | |
|-------------------|-------------------------------------|-------------|
| Parameter | Results from C. krusei, injection 1 | |
| | Peak 1 | |
| | Mean | Percent RSD |
| RV (mL) | 7.37 | 0 |
| Mw (g/mol) | 169,400 | 0 |
| Recovery (%) | 133.1 | 0 |

ของ *C. krusei* mannan

การปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีของแมนแนนจาก *C. krusei*

ปฏิกิริยา acylation และ acetolysis เพื่อใช้ในการในการแยกแมนแนน

ขั้นตอนทั่วไปของการปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีและย่อยแมนแนนให้มีขนาดเล็กลงโดยเป็นการตัดที่พันธะ α -(1,6) โดยเริ่มจากการทำปฏิกิริยา acylation เป็นการปกป้องหมู่ไฮดรอกซิลของแมนแนนจากนั้นจึงทำปฏิกิริยา acetolysis ในสภาวะกรด ซึ่งเป็นปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในสภาวะไม่รุนแรง จากนั้นจึงปรับ pH ให้เป็นกลางและปลดหมู่ปกป้อง acetyl ในสภาวะเบสดังรูปที่ 48 จากนั้นจึงนำไปทำบริสุทธิ์เพื่อศึกษาโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค NMR ต่อไป



รูปที่ 48 แผนผังแสดงขั้นตอนการปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีของแมนแนน

ปฏิกิริยา acetylation โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ให้ความร้อน round bottom flask และ magnetic bar ภายใต้สภาวะสุญญากาศ แล้วชั่ง *C. krusei* mannan 373 mg เติม anhydrous pyridine 5 mL และ Ac₂O 5 mL แล้ว stir ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน พบว่าสารละลายมีสีขาวขุ่น คาดว่าเกิดจากการที่ *C. krusei* mannan ยังไม่ละลายในตัวทำละลาย pyridine

2. เมื่อตั้งปฏิกิริยาผ่านไป 21 ชั่วโมง พบว่าสารละลายยังคงเป็นของผสม ขุ่นและมีสีน้ำตาลอ่อน จึงใส่ anhydrous formamide 4 mL เพื่อให้สารตั้งต้น *C. krusei* mannan ละลาย พบว่าของผสมละลายรวมเป็นเนื้อเดียวกัน เป็นสีเหลืองเข้มใส จึงตั้งปฏิกิริยาต่อไปอีก 30 ชั่วโมง ได้สารละลายมีสีน้ำตาลเข้มขึ้น จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยการระเหยภายใต้สภาวะสุญญากาศที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยใส่ toluene เป็น co-solvent เพื่อให้ pyridine ระเหยออกจนหมด ได้ crude เป็นของเหลว syrup สีน้ำตาลเข้ม

ปฏิกิริยา acetolysis โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. นำ crude ที่ได้จากขั้น acetylation ใส่ Ac₂O 5 mL, AcOH 5 mL และ conc. H₂SO₄ 0.5 mL ตามลำดับ แล้วทำการ stir ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน

2. เมื่อผ่านไป 17 ชั่วโมง จึงทำการหยุดปฏิกิริยาและ work up โดยทำการหยดลงของผสมลงใน DI water ที่เย็น แล้วสกัดด้วย chloroform (x4) แล้วนำชั้น chloroform ที่ได้มาสกัดด้วย DI water (x1), sat. NaHCO₃ (x3), DI water (x2), sat. NaCl (x2) ตามลำดับ จากนั้นใส่ Na₂SO₄ ดูดความชื้น แล้วนำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งได้ crude เป็นของเหลวสีน้ำตาลเข้มหนัก 1.0303 g

ปฏิกิริยา deacetylation โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. นำ crude ที่ได้จากขั้น acetolysis มา azeotrope ด้วย CH₃CN และ toluene (x3) เพื่อกำจัดความชื้นที่หลงเหลืออยู่กับสาร จากนั้นปิด septum เสียบล็อกโป่งอาร์กอน แล้วเติม anhydrous CH₃OH ได้สารละลายใสสีเหลืองเข้มและพบว่ามิของแข็งบางส่วนไม่ละลายแม้ว่าจะใส่ anhydrous CH₃OH เพิ่มขึ้นถึง 30 mL แล้วก็ตาม

2. เติม 0.5 M NaOCH₃ 3 mL (drop wise) แล้ว stir ที่อุณหภูมิห้อง overnight

3. หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม Dowex resin โดยปรับ pH ให้อยู่ในช่วงประมาณ 5-6 แล้วกรอง Dowex resin ออก ล้างด้วย CH₃OH แล้วนำของเหลวที่กรองได้ไประเหยแห้ง จะได้ crude เป็นของแข็งสีน้ำตาลหนัก 171 mg

การแยกแมนแนนจาก *Candida krusei* ที่ผ่านการย่อยให้บริสุทธิ์

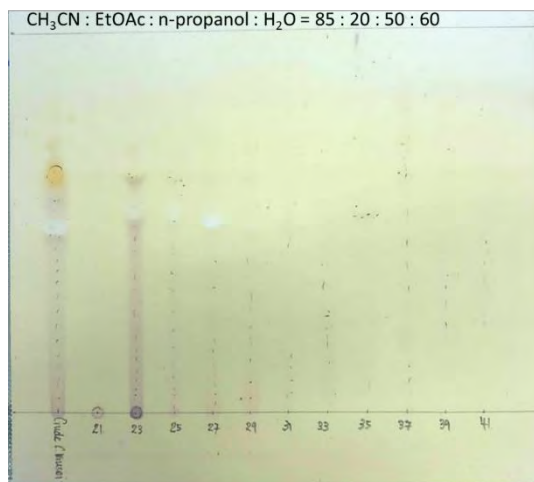
1. ละลาย crude ด้วย DI water จากนั้นกรองตะกอนส่วนที่ไม่ละลายออก แล้ว load crude บน Biogel P2 column ซะคอลัมน์ด้วยน้ำบริสุทธิ์ โดยเก็บ fraction ละ 6 mL รวมทั้งหมด 95 fractions

2. ตรวจสอบองค์ประกอบเบื้องต้นของแต่ละ fraction โดยปิเปตสารละลาย 100 µL ใส่ Eppendorf แล้วระเหยด้วยเครื่อง centrifugal evaporator เพื่อเพิ่มความเข้มข้น จากนั้นใส่ DI water 5 µL แล้ว spot scan 1 µL (x1) ลงบนแผ่น TLC ดังรูปที่ 49

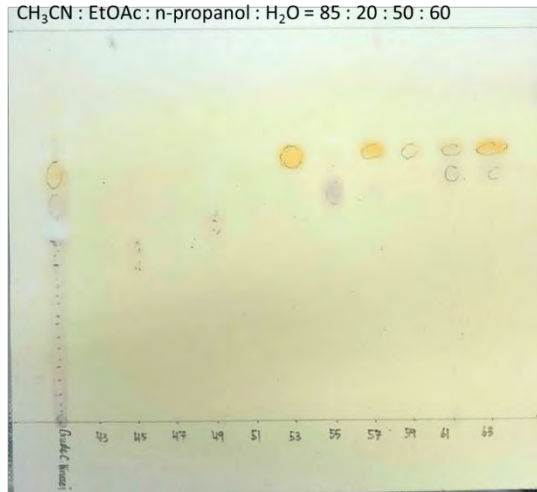


รูปที่ 49 แสดงการตรวจสอบองค์ประกอบเบื้องต้นของ *C. krusei* mannan

3. เลือก fraction ที่พบแมนแนนมาทดสอบ TLC โดยเลือกช่วง fraction 21-63 แล้วทำการ develop TLC ด้วย ระบบ CH₃CN : EtOAc : n-propanol : H₂O = 85 : 20 : 50 : 60 ดังรูปที่ 50, 51



รูปที่ 50 แสดงการตรวจสอบองค์ประกอบของ *C. krusei* mannan fraction 21-41



รูปที่ 51 แสดงการตรวจสอบองค์ประกอบของ *C. krusei* mannan fraction 43-63

จากผล TLC พบว่า fraction ที่มีแมนแนนเป็นองค์ประกอบนั้นแบ่งเป็นสองช่วงคือ Fr.1 (รวมกันจาก fr.23,25,27,29) และ Fr.2 (fr.55) นำของผสมทั้งสองไป lyophilized ให้แห้งเพื่อใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลและศึกษาโครงสร้างด้วยเทคนิค NMR (^1H , ^{13}C) ต่อไป

วิเคราะห์โครงสร้างของแมนแนนจาก *C. krusei* ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy

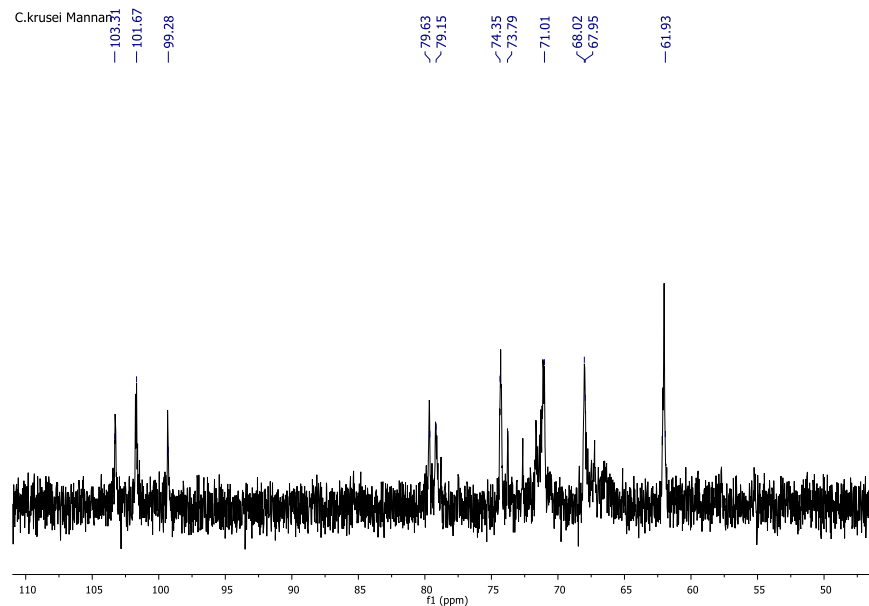
นำแมนแนนที่สกัดจากผนังเซลล์เชื้อรา *C. krusei* มาวิเคราะห์โครงสร้างด้วย NMR ได้ผล ดังรูปที่ 52

สัญญาณ ^{13}C NMR ที่

103.31 ppm: แอนนอมอริก คาร์บอน (C1) ของ terminal non-reducing

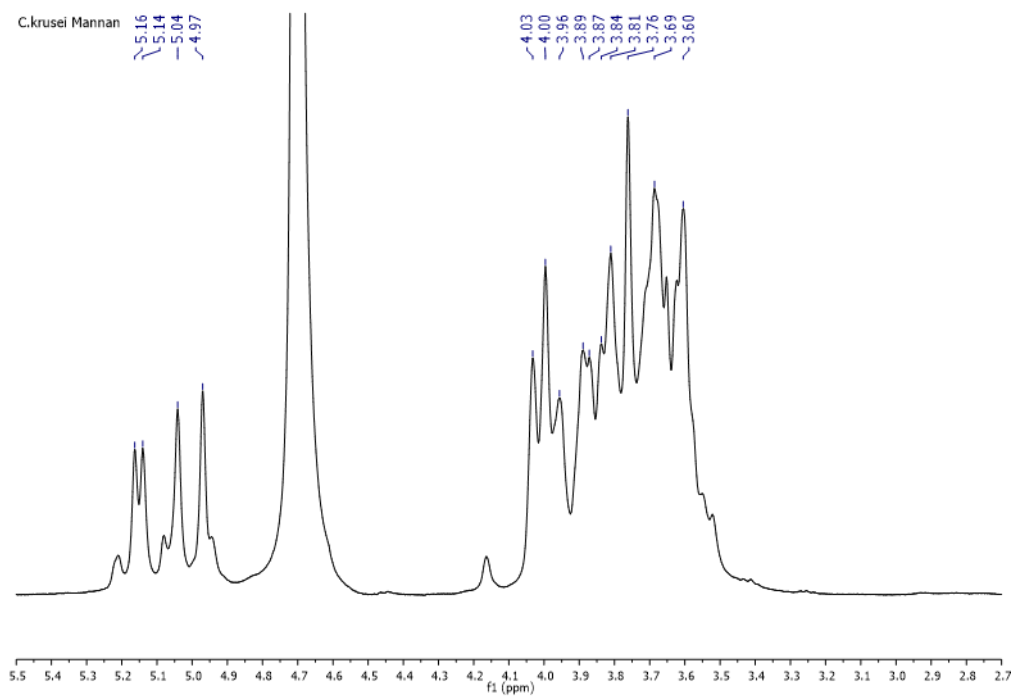
101.76 ppm: แอนนอมอริก คาร์บอน (C1) ของ 2-substituted mannose

99.28 ppm: แอนนอมอริก คาร์บอน (C1) ของ 2,6-disubstituted mannose



รูปที่ 52 แสดง ^{13}C NMR spectrum (100 MHz, D_2O) ของแมนแนนจาก *C. krusei*

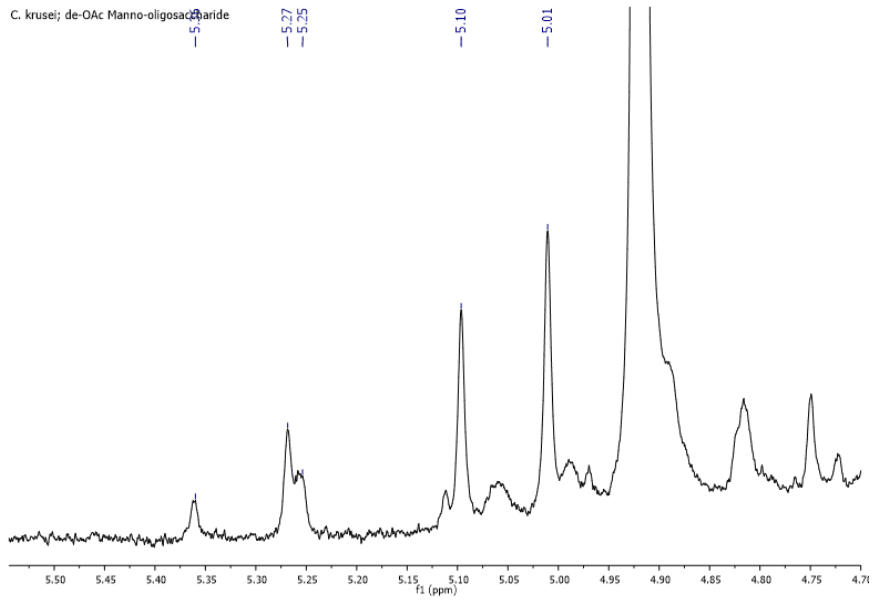
ส่วนการวิเคราะห์ด้วย ^1H NMR นั้น สัญญาณซับซ้อนเกินไป (รูปที่ 53) ไม่สามารถนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ได้ และเมื่อพยายามศึกษาโดยใช้เทคนิค 2D NMR ก็ได้สัญญาณที่มีความเข้มต่ำคาดว่าเนื่องจากขีดจำกัดของเครื่อง NMR ที่ภาควิชาเคมี ซึ่งเป็นเครื่องที่มีความถี่ 400 MHz ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงต้องนำแมนแนนไปย่อยให้มีขนาดเล็กลงก่อน จากนั้นจึงศึกษาโครงสร้างต่อไป



รูปที่ 53 แสดง ^1H NMR spectrum (400 MHz, D_2O) ของแมนแนนจาก *C. krusei*

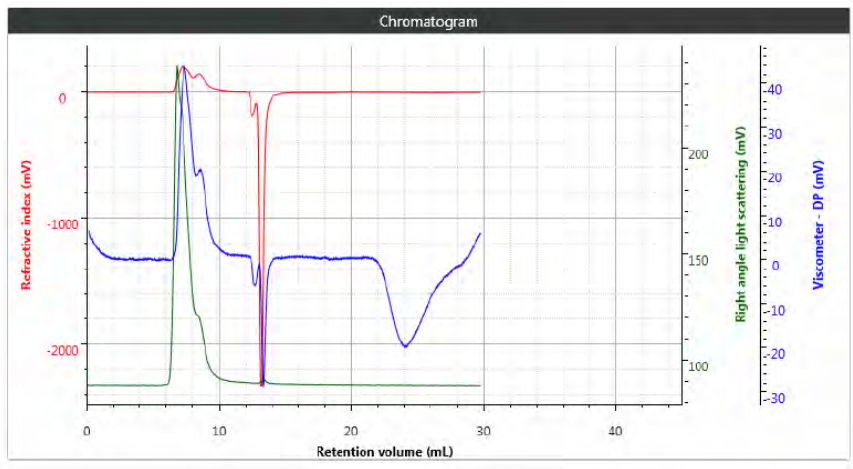
เมื่อนำแมนแนนมาย่อยให้มีขนาดเล็กลง โดยผ่านปฏิกิริยาเคมีและผ่านการทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นจึงนำมาวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมี (รูปที่ 54) โดยพบสัญญาณที่

- 5.36 ppm: แอนนอมอริก โปรตอน (H1) ของ non-reducing end
- 5.27 ppm: แอนนอมอริก โปรตอน (H1) ของ α -1,2-linked, and reducing end
- 5.01 ppm: แอนนอมอริก โปรตอน (H1) ของ reducing end



รูปที่ 54 ^1H NMR spectrum (400 MHz, D₂O) ของแมนแนนขนาดเล็ก (mannan-oligosaccharide) ที่ผ่านปฏิกิริยาเคมีและผ่านการทำให้บริสุทธิ์

2) การพิสูจน์สูตรโครงสร้างของแมนแนนจากเชื้อรา *C. glabrata*
 วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแมนแนนจาก *C. glabrata*
 โครมาโตแกรมจากเทคนิค GPC แสดงดังรูปที่ 55



รูปที่ 55 แสดง GPC chromatogram ของ *C. glabrata* mannan

น้ำหนักโมเลกุลของ *C. glabrata* mannan ที่ได้จากการตรวจวัดคือ 157,700 g/mol หรือประมาณ 158 kDa ดังแสดงในรูปที่ 56

| Results by sample and peak | |
|--------------------------------|-------------------------------|
| Parameter | Inj. 1 C. glabrata 11/4/25... |
| | Peak 1 |
| RV (mL) | 7.28 |
| Mw (g/mol) | 157,700 |
| Mw/Mn | 1.844 |
| IVw (dL/g) | 0.1452 |
| Rh(η) _w (nm) | 6.542 |
| Frac. of sample (%) | 100 |
| Recovery (%) | 133.2 |
| RI peak (mV·mL) | 373.8 |
| UV peak (mV·mL) | 23.65 |

| Result statistics | | |
|-------------------|---------------------------------------|-------------|
| Parameter | Results from C. glabrata, injection 1 | |
| | Peak 1 | |
| | Mean | Percent RSD |
| RV (mL) | 7.28 | 0 |
| Mw (g/mol) | 157,700 | 0 |
| Recovery (%) | 133.2 | 0 |

รูปที่ 56 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของ *C. glabrata* mannan

การปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีของแมนแนนจาก *Candida glabrata*

ปฏิกิริยา acetylation โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ให้ความร้อน round bottom flask และ magnetic bar ภายใต้สภาวะสุญญากาศ แล้วชั่ง *C. glabrata* mannan 555 mg เติม anhydrous formamide 5 mL (จากการทดลองก่อนหน้านี้พบว่าพิริดีนเป็นตัวทำละลายที่ไม่เหมาะสม) จนละลายเป็นเนื้อเดียวกันและเติม anhydrous pyridine 5 mL, Ac₂O 5 mL แล้ว stir ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน

2. เมื่อตั้งปฏิกิริยาผ่านไป 24 ชั่วโมง ได้สารละลายมีสีน้ำตาลเข้มขึ้น จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยการระเหยภายใต้สภาวะสุญญากาศที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้ toluene เป็น co-solvent เพื่อให้ pyridine ระเหยออกจนหมด ได้ crude เป็นของเหลว syrup สีน้ำตาลเข้ม

ปฏิกิริยา acetolysis โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. นำ crude ที่ได้จากขั้น acetylation ใส่ Ac₂O 5 mL, AcOH 5 mL และ conc. H₂SO₄ 0.5 mL ตามลำดับ แล้วทำการ stir ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน

2. เมื่อผ่านไป 15 ชั่วโมง จึงทำการหยุดปฏิกิริยาและ work up โดยทำการหยดลงของผสมลงใน DI water ที่เย็น แล้วสกัดด้วย chloroform (x4) แล้วนำชั้น chloroform ที่ได้มาสกัดด้วย DI water (x1), sat. NaHCO₃ (x3), DI water (x2), sat. NaCl (x2) ตามลำดับ จากนั้นใส่ Na₂SO₄ ดูดความชื้น แล้วนำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งได้ crude เป็นของเหลวสีน้ำตาลเข้มหนัก 986 mg

ปฏิกิริยา deacetylation โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. นำ crude ที่ได้จากขั้น acetolysis มา azeotrope ด้วย CH₃CN และ toluene (x3) เพื่อกำจัดความชื้นที่หลงเหลืออยู่กับสาร จากนั้นปิด septum เสียบลูกโป่งอาร์กอน แล้วเติม anhydrous CH₃OH 15 mL ได้สารละลายขุ่นสีน้ำตาลอ่อน

2. เติม 0.5 M NaOCH₃ 1 mL (drop wise) ได้สารละลายใสขึ้น แล้ว stir ที่อุณหภูมิห้อง overnight

3. หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม Dowex resin โดยปรับ pH ให้อยู่ในช่วงประมาณ 5-6 แล้วกรอง Dowex resin ออก ล้างด้วย CH₃OH แล้วนำของเหลวที่กรองได้ไประเหยแห้ง จะได้ crude เป็นของแข็งสีน้ำตาลหนัก 988 mg

การแยกแมนแนนจาก *Candida glabrata* ที่ผ่านการย่อยให้บริสุทธิ์

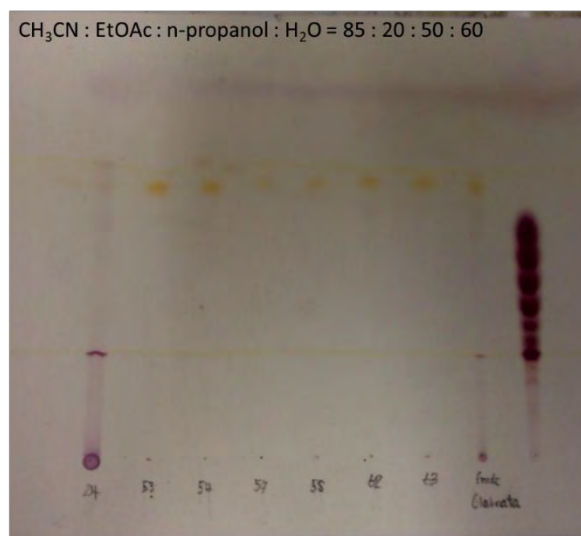
1. ละลาย crude ด้วย DI water จากนั้นกรองตะกอนส่วนที่ไม่ละลายออก แล้ว load crude บน Biogel P2 column ซะคอลัมน์ด้วยน้ำบริสุทธิ์ โดยเก็บ fraction ละ 6 mL รวมทั้งหมด 95 fractions

2. ตรวจสอบองค์ประกอบเบื้องต้นของแต่ละ fraction โดยปิเปตสารละลาย 100 μ L ใส่ Eppendorf แล้วระเหยด้วยเครื่อง centrifugal evaporator เพื่อเพิ่มความเข้มข้น จากนั้นใส่ DI water 5 μ L แล้ว spot scan 1 μ L (x4) เนื่องจากสารละลายที่ได้มีความเข้มข้นต่ำมาก จึงต้อง spot ลงบนแผ่น TLC ถึง 4 ครั้ง ดังรูปที่ 57



รูปที่ 57 แสดงการตรวจสอบองค์ประกอบเบื้องต้นของ *C. glabrata* mannan

3. เลือก fraction ที่มีแมนแนนมาทดสอบ TLC โดยเลือกช่วง fraction 23-30 (fr.24 เป็นตัวแทน), 51-64 แล้ว develop TLC ด้วย ระบบ $\text{CH}_3\text{CN} : \text{EtOAc} : \text{n-propanol} : \text{H}_2\text{O} = 85 : 20 : 50 : 60$ โดยใช้ของผสม malto-oligosaccharide (เลขขวามือสุด) เป็น marker เปรียบเทียบ ดังรูปที่ 58

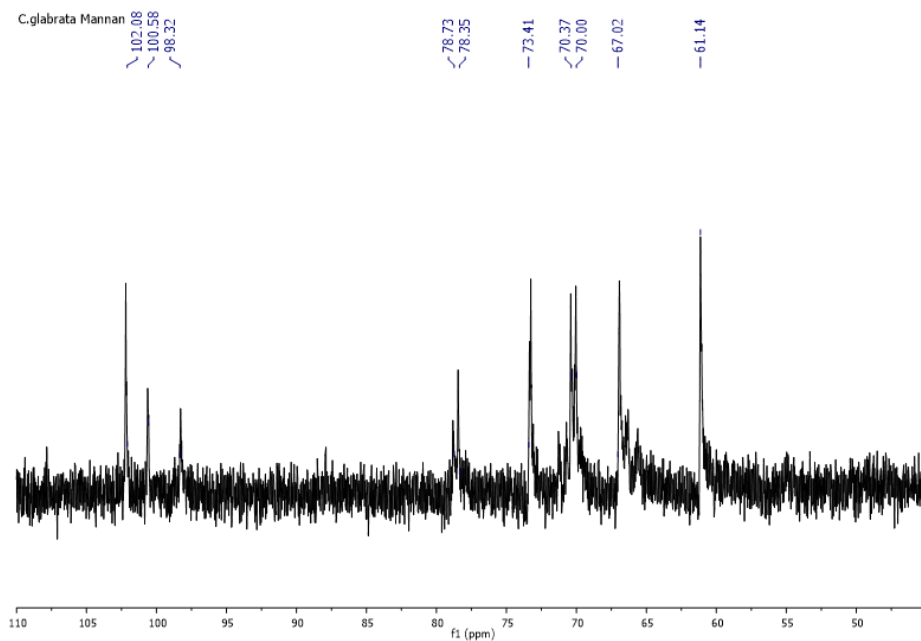


รูปที่ 58 แสดงการตรวจสอบองค์ประกอบของ *C. glabrata* mannan fraction 24, 53-63

จากผล TLC พบว่า fraction ที่มีแมนแนนเป็นองค์ประกอบ คือ Fr.1 (fr.20-30) นำของผสมไป lyophilized ให้แห้งเพื่อใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลและศึกษาโครงสร้างด้วยเทคนิค NMR (^1H , ^{13}C) ต่อไป

วิเคราะห์โครงสร้างของแมนแนนจาก *C. glabrata* ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy

นำแมนแนนที่สกัดจากผนังเซลล์ของเชื้อรา *C. glabrata* มาวิเคราะห์โครงสร้างด้วย NMR (รูปที่ 59) ได้ผลดังนี้

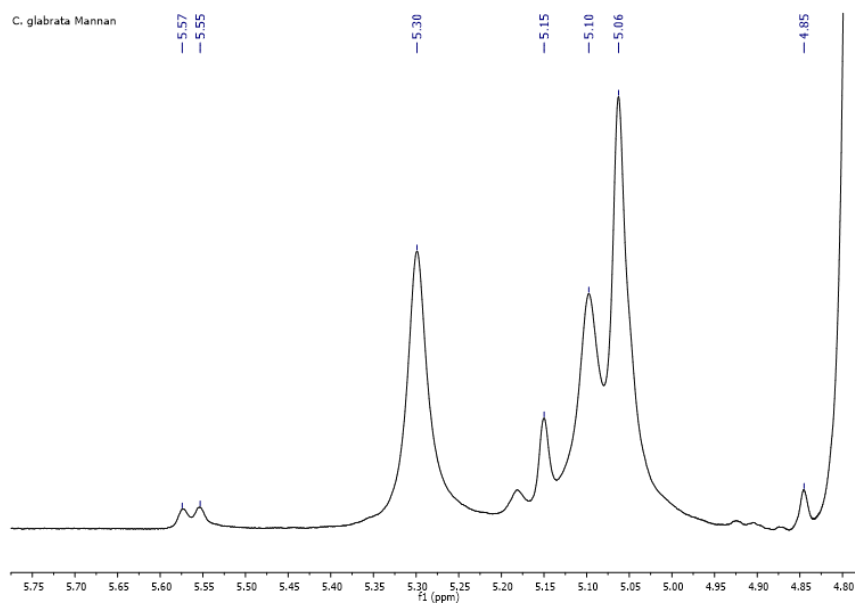


รูปที่ 59 แสดง ^{13}C NMR spectrum (100 MHz, D_2O) ของแมนแนนจาก *C. glabrata*

นำแมนแนนที่สกัดจากผนังเซลล์ของเชื้อรา *C. glabrata* มาวิเคราะห์โครงสร้างด้วย NMR (รูปที่ 60) ได้ผลดังนี้ สัญญาณ ^1H NMR ที่

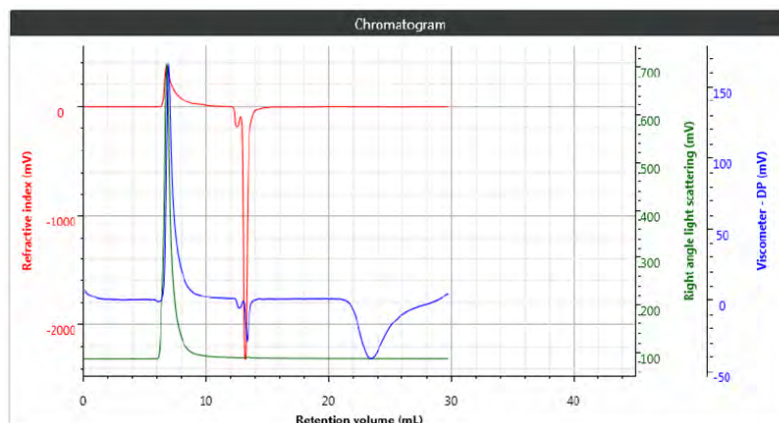
5.57, 5.55, 5.30, 5.15, 5.10 และ 5.06 ppm: แอนนอมอริก โปรตอน (H1) ของ α -linked mannose

4.85 ppm: แอนนอมอริก โปรตอน (H1) ของ β -linked mannose



รูปที่ 60 แสดง ^1H NMR spectrum (400 MHz, D_2O) ของแมนแนนจาก *C. glabrata*

3) การพิสูจน์สูตรโครงสร้างของแมนแนนจากเชื้อรา *C. tropicalis*
 วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแมนแนนจาก *C. tropicalis*
 โครมาโตแกรมจากเทคนิค GPC แสดงดังรูปที่ 61



รูปที่ 61 แสดง GPC chromatogram ของ *C. tropicalis* mannan

น้ำหนักโมเลกุลของ *C. tropicalis* mannan ที่ได้จากการตรวจวัดคือ 387,300 g/mol หรือประมาณ 387 kDa ดังแสดงในรูปที่ 62

| Results by sample and peak | |
|----------------------------|--|
| Parameter | Inj. 1 C. tropicalis 11/4/2... Peak 1 |
| RV (mL) | 6.85 |
| Mw (g/mol) | 387,300 |
| Mw/Mn | 1.722 |
| IVw (dL/g) | 0.2687 |
| Rh(η)w (nm) | 11.3 |
| Frac. of sample (%) | 100 |
| Recovery (%) | 129.2 |
| RI peak (mV·mL) | 362.7 |
| UV peak (mV·mL) | 11.37 |
| RALS peak (mV·mL) | 422.4 |
| LALS peak (mV·mL) | 313.9 |
| DP peak (mV·mL) | 117.8 |
| MALS peak (mV·mL) | N/C |

| Result statistics | | |
|-------------------|---|-------------|
| Parameter | Results from C. tropicalis, injection 1 | |
| | Peak 1 | |
| | Mean | Percent RSD |
| RV (mL) | 6.85 | 0 |
| Mw (g/mol) | 387,300 | 0 |
| Recovery (%) | 129.2 | 0 |

มเลกุลของ *C. tropicalis* mannan

การปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีของแมนแนนจาก *C. tropicalis*
 ปฏิกริยา acetylation โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ให้ความร้อน round bottom flask และ magnetic bar ภายใต้สภาวะสุญญากาศ แล้วชั่ง *C. tropicalis* mannan 396 mg เติม anhydrous formamide 4 mL จนละลายเป็นเนื้อเดียวกันและเติม anhydrous pyridine 5 mL และ Ac₂O 5 mL แล้ว stir ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน

2. เมื่อตั้งปฏิกิริยาผ่านไป 18 ชั่วโมง ได้สารละลายมีสีน้ำตาลเข้มขึ้น จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยการระเหยภายใต้สภาวะสุญญากาศที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้ toluene เป็น co-solvent เพื่อให้ pyridine ระเหยออกจนหมด ได้ crude เป็นของเหลว syrup สีน้ำตาลเข้ม

ปฏิกิริยา acetylation โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. นำ crude ที่ได้จากขั้น acetylation ใส่ Ac_2O 5 mL, AcOH 5 mL และ conc. H_2SO_4 0.5 mL ตามลำดับ แล้วทำการ stir ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน

2. เมื่อผ่านไป 20 ชั่วโมง จึงทำการหยุดปฏิกิริยาและ work up โดยทำการหยดลงของผสมลงใน DI water ที่เย็น แล้วสกัดด้วย chloroform (x4) แล้วนำชั้น chloroform ที่ได้มาสกัดด้วย DI water (x1), sat. NaHCO_3 (x3), DI water (x2), sat. NaCl (x2) ตามลำดับ จากนั้นใส่ Na_2SO_4 ดูดความชื้น แล้วนำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งได้ crude เป็นของเหลวสีน้ำตาลเข้มหนัก 903 mg

ปฏิกิริยา deacetylation โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. นำ crude ที่ได้จากขั้น acetylation มา azeotrope ด้วย CH_3CN และ toluene (x3) เพื่อกำจัดความชื้นที่หลงเหลืออยู่กับสาร จากนั้นปิด septum เสียบล็อกโป่งอาร์กอน แล้วเติม anhydrous CH_3OH 15 mL ได้สารละลายขุ่นสีน้ำตาลอ่อน

2. เติม 0.5 M NaOCH_3 1 mL (drop wise) ได้สารละลายใสขึ้น แล้ว stir ที่อุณหภูมิห้อง overnight

3. หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม Dowex resin โดยปรับ pH ให้อยู่ในช่วงประมาณ 5-6 แล้วกรอง Dowex resin ออก ล้างด้วย CH_3OH แล้วนำของเหลวที่กรองได้ไประเหยแห้ง จะได้ crude เป็นของแข็งสีน้ำตาล ซึ่งสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าว่ามีปริมาณน้อย หนักเพียง 92 mg คาดว่าเกิดจากการเกิดปฏิกิริยาที่ไม่สมบูรณ์ของขั้นตอนแรกในการเกิด acetylation

การแยกแมนแนนจาก *C. tropicalis* ที่ผ่านการย่อยให้บริสุทธิ์

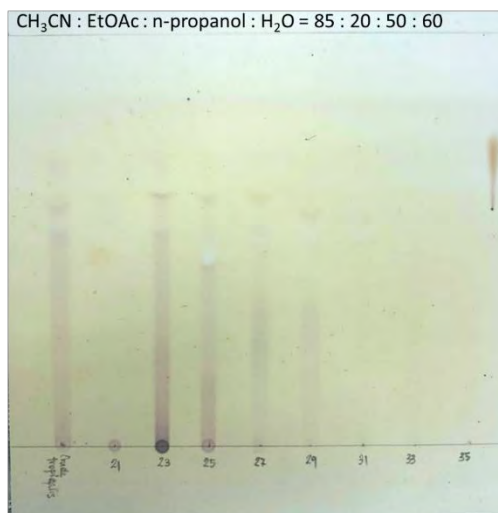
1. ละลาย crude ด้วย DI water จากนั้นกรองตะกอนส่วนที่ไม่ละลายออก แล้ว load crude บน Biogel P2 column ซะคอลัมน์ด้วยน้ำบริสุทธิ์ โดยเก็บ fraction ละ 6 mL รวมทั้งหมด 95 fractions

2. ตรวจสอบองค์ประกอบเบื้องต้นของแต่ละ fraction โดยเปิดสารละลาย 50 μL ใส่ Eppendorf แล้วระเหยด้วยเครื่อง centrifugal evaporator เพื่อเพิ่มความเข้มข้น จากนั้นใส่ DI water 5 μL แล้ว spot scan 1 μL (x2) เนื่องจากสารละลายที่ได้มีความเข้มข้นต่ำมาก จึงต้องสปีดลงบนแผ่น TLC 2 ครั้ง ดังรูปที่ 63

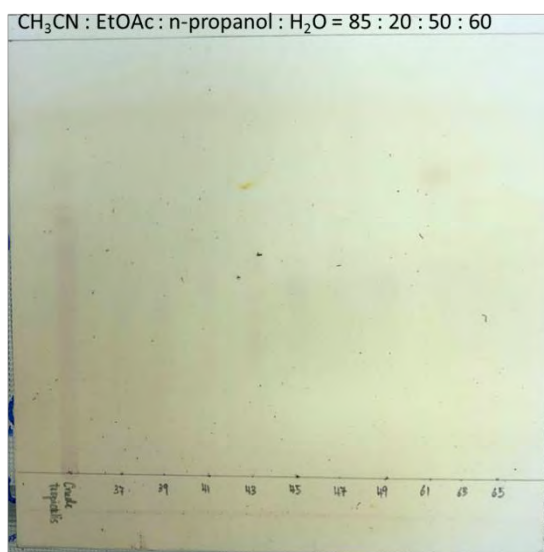


รูปที่ 63 แสดงการตรวจสอบองค์ประกอบเบื้องต้นของ *C. tropicalis* mannan

3. เลือก fraction ที่มีแมนแนนมาทดสอบ TLC โดยเลือกช่วง fraction 21-49 และช่วง fraction 61-65 แล้ว develop TLC ด้วย ระบบ $\text{CH}_3\text{CN} : \text{EtOAc} : \text{n-propanol} : \text{H}_2\text{O} = 85 : 20 : 50 : 60$ ดังรูปที่ 64-65



รูปที่ 64 แสดงการตรวจสอบองค์ประกอบของ *C. tropicalis* mannan fraction 21-35



รูปที่ 65 แสดงการตรวจสอบองค์ประกอบของ *C. tropicalis* mannan fraction 37-49, 61-65

จากผล TLC พบว่า fraction ที่มีแมนแนนเป็นองค์ประกอบ คือ Fr.1 (fr.23,25,27,29) นำของผสมไป lyophilized ให้แห้งเพื่อใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลและศึกษาโครงสร้างด้วยเทคนิค NMR (^1H , ^{13}C) ต่อไป

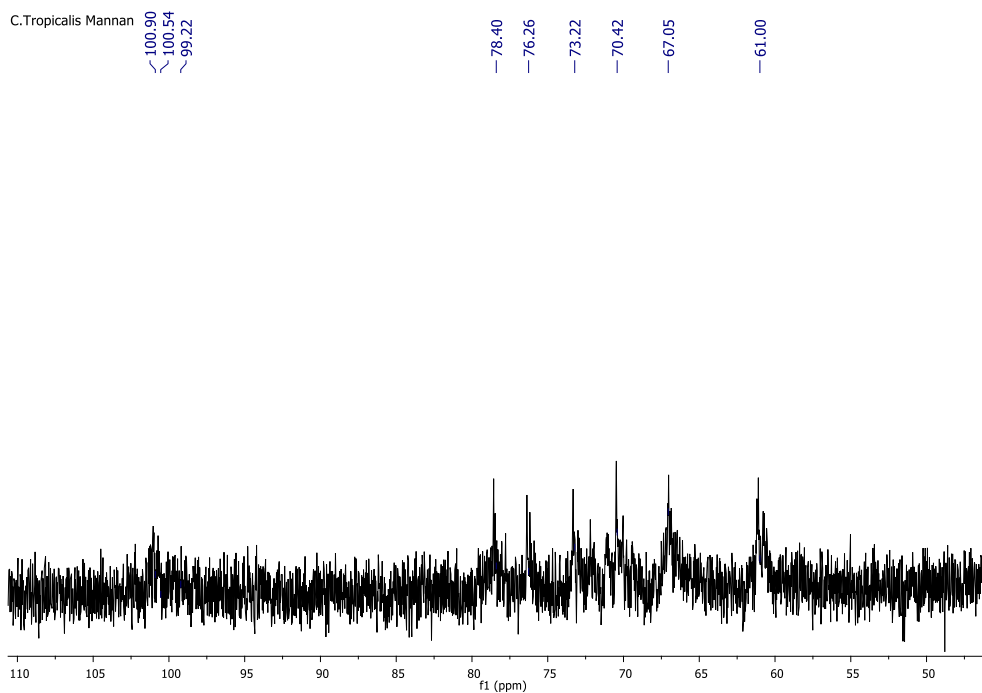
วิเคราะห์โครงสร้างของแมนแนนจาก *C. tropicalis* ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy

นำแมนแนนที่สกัดจากผนังเซลล์ของเชื้อรา *C. tropicalis* มาวิเคราะห์โครงสร้างด้วย NMR (รูปที่ 66-67) ได้ผลดังนี้; สัญญาณ ^{13}C NMR ที่

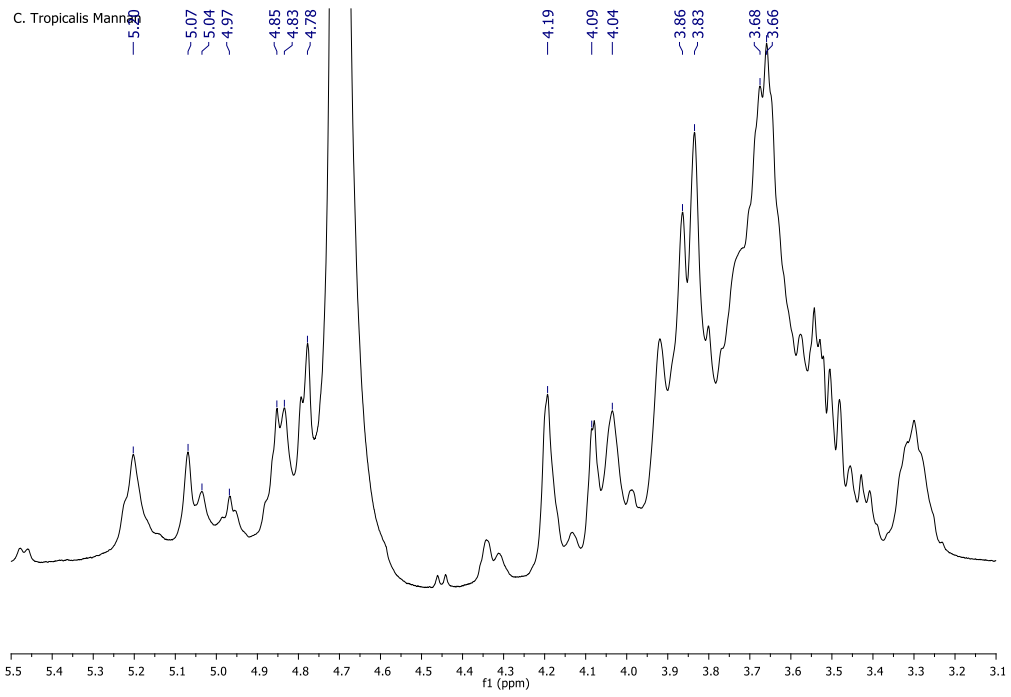
100.90 ppm: แอนนอมอริก คาร์บอน (C1) ของ α -1,3-linked mannose

100.54 ppm: แอนนอมอริก คาร์บอน (C1) ของ α -1,2-linked mannose

99.22 ppm: แอนนอมอริก คาร์บอน (C1) ของ α -1,6-linked mannose

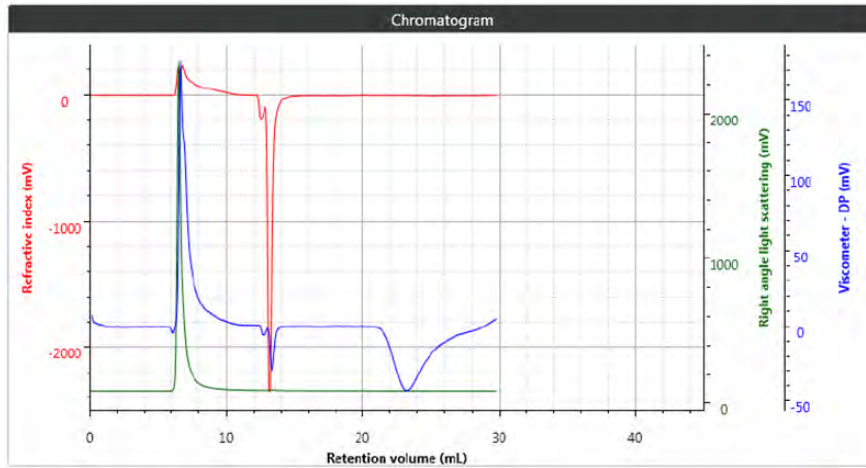


รูปที่ 66 แสดง ^{13}C NMR spectrum (100 MHz, D_2O) ของแมนแนนจาก *C. tropicalis*



รูปที่ 67 แสดง ^1H NMR spectrum (400 MHz, D_2O) ของแมนเนนจาก *C. tropicalis*

4) การพิสูจน์สูตรโครงสร้างของแมนแนนจากเชื้อรา *C. albicans*
 วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแมนแนนจาก *C. albicans*
 โครมาโตแกรมจากเทคนิค GPC แสดงดังรูปที่ 68



รูปที่ 68 แสดง GPC chromatogram ของ *C. tropicalis* mannan

น้ำหนักโมเลกุลของ *C. albicans* mannan ที่ได้จากการตรวจวัดคือ 925,400 g/mol หรือประมาณ 925 kDa ดังแสดงในรูปที่ 69

| Results by sample and peak | |
|----------------------------|--------------------------------|
| Parameter | Inj. 1 C. albicans 11/4/25,... |
| | Peak 1 |
| RV (mL) | 6.813 |
| Mw (g/mol) | 925,400 |
| Mw/Mn | 4.491 |
| IVw (dL/g) | 0.3159 |
| Rh(η)w (nm) | 14.53 |
| Frac. of sample (%) | 100 |
| Recovery (%) | 123.3 |
| RI peak (mV·mL) | 346.1 |
| UV peak (mV·mL) | 12.48 |
| RALS peak (mV·mL) | 940.5 |
| LALS peak (mV·mL) | 719.8 |
| DP peak (mV·mL) | 132.4 |
| MALS peak (mV·mL) | N/C |

| Result statistics | | |
|-------------------|---------------------------------------|-------------|
| Parameter | Results from C. albicans, injection 1 | |
| | Peak 1 | |
| | Mean | Percent RSD |
| RV (mL) | 6.813 | 0 |
| Mw (g/mol) | 925,400 | 0 |
| Recovery (%) | 123.3 | 0 |

อง *C. tropicalis* mannan

การปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีของแมนแนนจาก *C. albicans*

ปฏิกิริยา acetylation โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ให้ความร้อน round bottom flask และ magnetic bar ภายใต้สภาวะสุญญากาศ แล้วชั่ง *C. albicans* mannan 210 mg เติม anhydrous formamide 4 mL จนละลายเป็นเนื้อเดียวกันและเติม anhydrous pyridine 5 mL และ Ac₂O 5 mL แล้ว stir ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน
2. เมื่อตั้งปฏิกิริยาผ่านไป 20 ชั่วโมง ได้สารละลายมีสีน้ำตาลเข้มขึ้น จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยการระเหย ภายใต้สภาวะสุญญากาศที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้ toluene เป็น co-solvent เพื่อให้ pyridine ระเหยออกจนหมด ได้ crude เป็นของเหลว syrup สีน้ำตาลเข้ม

ปฏิกิริยา acetolysis โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. นำ crude ที่ได้จากขั้น acetylation ใส่ Ac₂O 5 mL, AcOH 5 mL และ conc. H₂SO₄ 0.5 mL ตามลำดับ แล้วทำการ stir ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน
2. เมื่อผ่านไป 17 ชั่วโมง จึงทำการหยุดปฏิกิริยาและ work up โดยทำการหยดลงของผสมลงใน DI water ที่เย็น แล้วสกัดด้วย chloroform (x4) แล้วนำชั้น chloroform ที่ได้มาสกัดด้วย DI water (x1), sat. NaHCO₃ (x3), DI water (x2), sat. NaCl (x2) ตามลำดับ จากนั้นใส่ Na₂SO₄ ดูดความชื้น แล้วนำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งได้ crude เป็นของเหลวสีน้ำตาลเข้มหนัก 358 mg

ปฏิกิริยา deacetylation โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. นำ crude ที่ได้จากขั้น acetolysis มา azeotrope ด้วย CH₃CN และ toluene (x3) เพื่อกำจัดความชื้นที่หลงเหลืออยู่กับสาร จากนั้นปิด septum เสียบล็อกไปอาร์กอน แล้วเติม anhydrous CH₃OH 10 mL ได้สารละลายขุ่นสีน้ำตาลอ่อน
2. เติม 0.5 M NaOCH₃ 1 mL (drop wise) ได้สารละลายใสขึ้น แล้ว stir ที่อุณหภูมิห้อง overnight
3. หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม Dowex resin โดยปรับ pH ให้อยู่ในช่วงประมาณ 5-6 แล้วกรอง Dowex resin ออก ล้างด้วย CH₃OH แล้วนำของเหลวที่กรองได้ไประเหยแห้ง จะได้ crude เป็นของแข็งสีน้ำตาล ซึ่งสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าว่ามีปริมาณน้อย หนักเพียง 72 mg คาดว่าเกิดจากการเกิดปฏิกิริยาที่ไม่สมบูรณ์ของขั้นตอนแรกในการเกิด acetylation

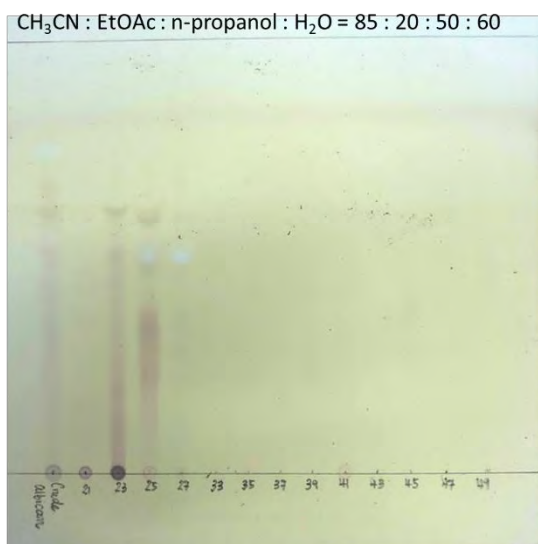
การแยกแมนแนนจาก *C. albicans* ที่ผ่านการย่อยให้บริสุทธิ์

1. ละลาย crude ด้วย DI water จากนั้นกรองตะกอนส่วนที่ไม่ละลายออก แล้ว load crude บน Biogel P2 column ซะคอลัมน์ด้วยน้ำบริสุทธิ์ โดยเก็บ fraction ละ 6 mL รวมทั้งหมด 95 fractions
2. ตรวจสอบองค์ประกอบเบื้องต้นของแต่ละ fraction โดยปิเปตสารละลาย 100 µL ใส่ Eppendorf แล้วระเหยด้วยเครื่อง centrifugal evaporator เพื่อเพิ่มความเข้มข้น จากนั้นใส่ DI water 5 µL แล้ว spot scan 1 µL (x2) เนื่องจากสารละลายที่ได้มีความเข้มข้นต่ำมาก จึงต้องสปอตลงบนแผ่น TLC 2 ครั้ง ดังรูปที่ 70

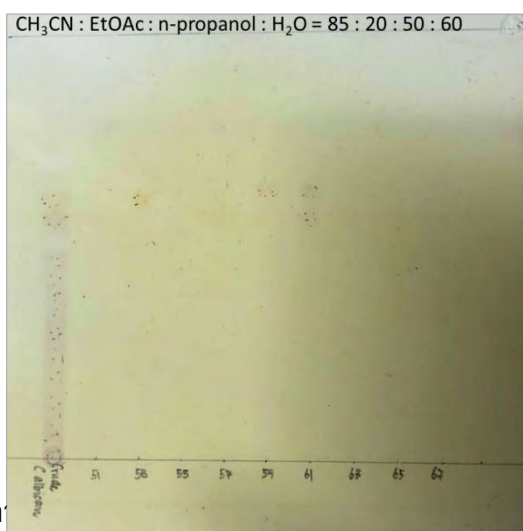


รูปที่ 70 แสดงการตรวจสอบองค์ประกอบเบื้องต้นของ *C. albicans* mannan

3. เลือก fraction ที่มีแมนแนนมาทดสอบ TLC โดยเลือกช่วง fraction 21-27 และช่วง fraction 33-67 แล้ว develop TLC ด้วย ระบบ $\text{CH}_3\text{CN} : \text{EtOAc} : \text{n-propanol} : \text{H}_2\text{O} = 85 : 20 : 50 : 60$ ดังรูปที่ 71-72



รูปที่ 71 แสดงการตรวจสอบองค์ประกอบของ *C. albicans* mannan fr. 21-27, 33-49



รูปที่ 72 แสดงการตรวจสอบองค์ประกอบของ *C. albicans* mannan fr. 51-67

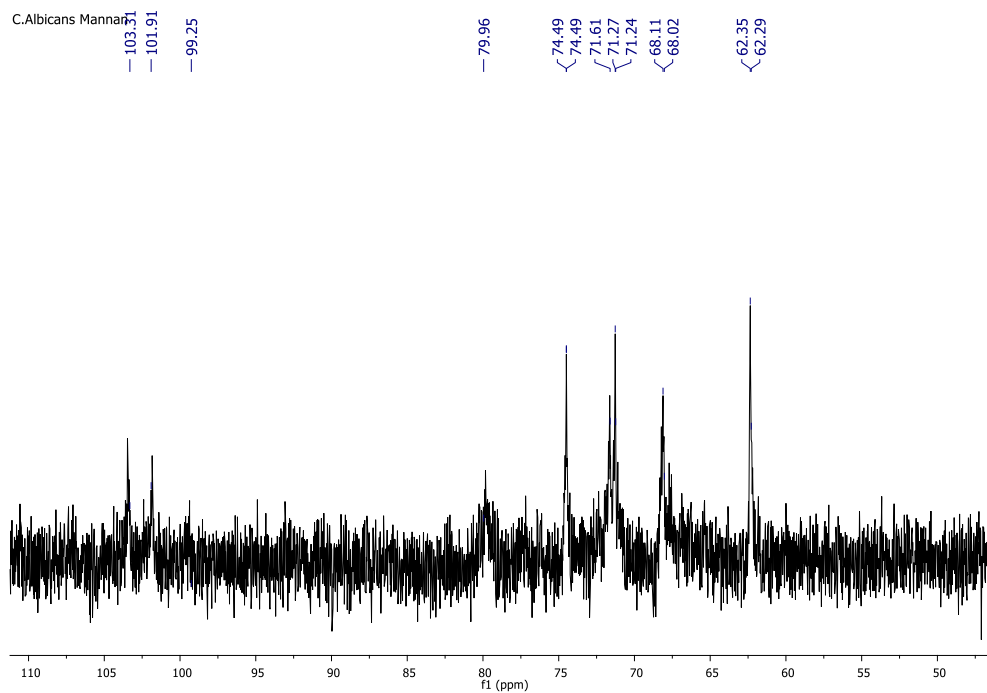
จากผล TLC พบว่า fraction ที่มีแมนแนนเป็นองค์ประกอบ คือ Fr.1 (fr.23,25,27) นำของผสมไป lyophilized ให้แห้งเพื่อใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลและศึกษาโครงสร้างด้วยเทคนิค NMR (^1H , ^{13}C) ต่อไป

วิเคราะห์โครงสร้างของแมนแนนจาก *C. albicans* ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy

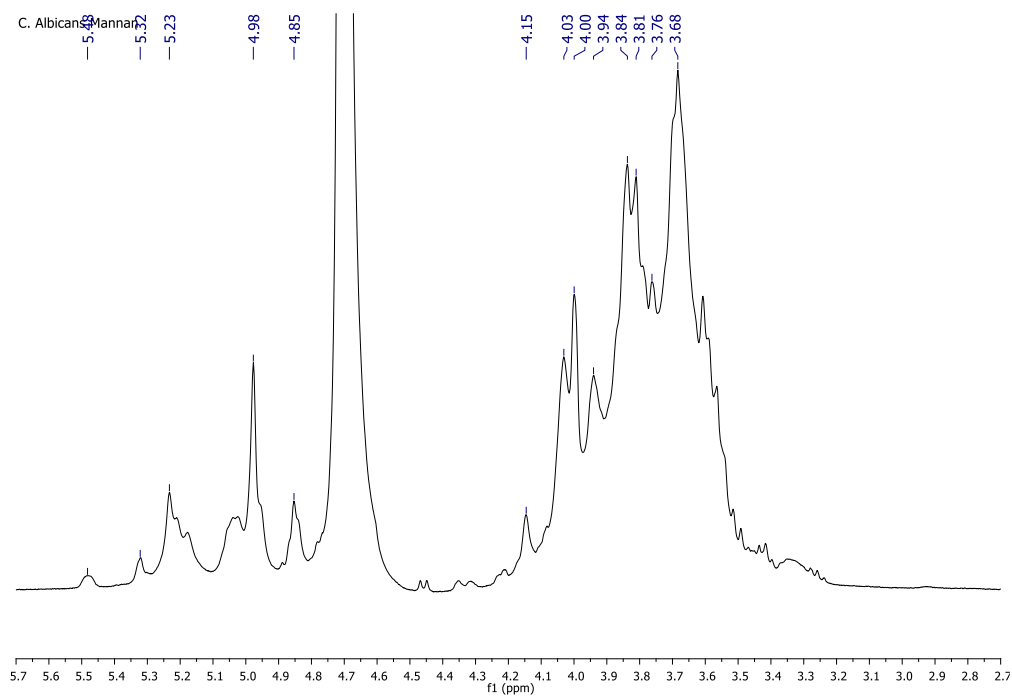
นำแมนแนนที่สกัดจากผนังเซลล์ของเชื้อรา *C. albicans* มาวิเคราะห์โครงสร้างด้วย NMR (รูปที่ 73, 74) ได้ผลดังนี้; สัญญาณ ^{13}C NMR ที่

103.31 ppm: แอนโนมอริก คาร์บอน (C1) ของ α -1,3-linked mannose

101.91 ppm: แอนนอมอริก คาร์บอน (C1) ของ α -1,2-linked mannose
 99.25 ppm: แอนนอมอริก คาร์บอน (C1) ของ α -1,6-linked mannose



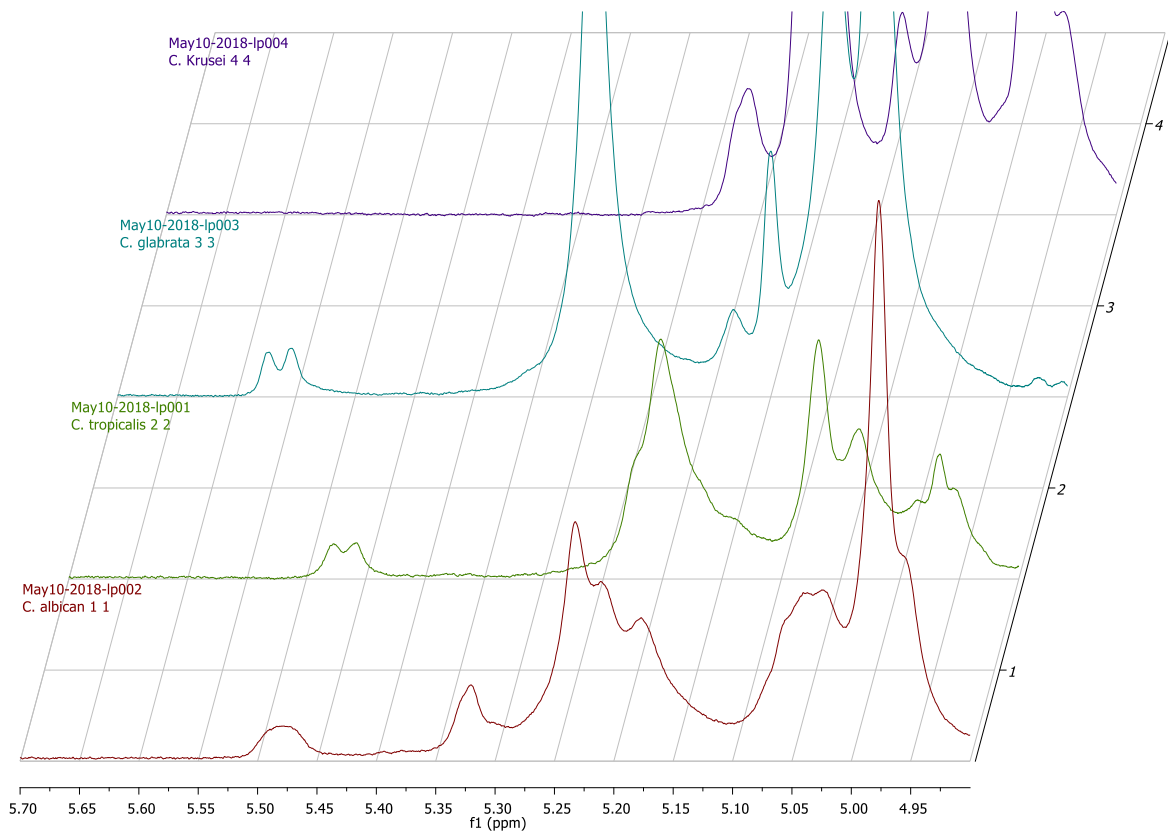
รูปที่ 73 แสดง ^{13}C NMR spectrum (100 MHz, D_2O) ของแมนแนนจาก *C. albicans*



รูปที่ 74 แสดง ^1H NMR spectrum (400 MHz, D_2O) ของแมนแนนจาก *C. albicans*

หากพิจารณาสัญญาณของ ^1H NMR เปรียบเทียบกันระหว่างแมนแนนทั้ง 4 ชนิดนั้น (รูปที่ 75) สอดคล้องกับโครงสร้างที่รายงานมาก่อนหน้านี้

1. สัญญาณบริเวณ 5.60–4.90 ppm เป็นสัญญาณของแอนนอเมอริกโปรตอน α -linked mannose มีความ down field สูงของแมนแนนทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *C. albicans* (5.48 ppm), *C. tropicalis* (5.48 และ 5.46 ppm) และ *C. glabrata* (5.57 และ 5.58 ppm) นั้นบ่งชี้ถึงหมู่ phosphodiester 1,2-linked mannose ที่มีอยู่ในโครงสร้าง
2. การที่ไม่พบสัญญาณ down field จาก ^1H NMR จากแมนแนนของ *C. krusei* นี้ สอดคล้องกับโครงสร้างที่เสนอแนะ
3. ตรวจพบสัญญาณ ^1H NMR ของแมนแนนที่มีพันธะ α -1,2-linkage บริเวณ down field เช่น *C. albicans* (5.32 ppm), *C. tropicalis* (5.20 ppm), *C. glabrata* (5.30 ppm) และ *C. krusei* (5.21, 5.16, 5.14 ppm)



รูปที่ 75 แสดง ^1H NMR spectrum (400 MHz, D_2O) ของแมนแนนทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, และ *C. krusei* ระหว่างช่วง 5.70–4.90 ppm

อภิปราย / วิจารณ์ผลการทดลอง

ในการทดลองที่ผ่านมา ผู้วิจัยได้ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของออลิโก-แมนแนนที่ได้จากเชื้อราแซคคาโรไมซีสทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ MNN5 Δ , MNN1 Δ , MNN2 Δ , VAN1 Δ , OCH1 Δ และ WT โดยเริ่มจากการทำปฏิกิริยา acylation และ acetolysis เพื่อย่อยให้ออลิโก-แมนแนนมีขนาดเล็กลง จากนั้นทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Gel Chromatography ได้ออลิโก-แมนแนนที่มีความบริสุทธิ์มากเพียงพอที่จะศึกษาทางโครงสร้างด้วยเทคนิค NMR spectroscopy และได้ข้อมูลเบื้องต้นมาว่า จากออลิโก-แมนแนนที่ได้จากเชื้อราแซคคาโรไมซีสทั้ง 6 ชนิดนั้น สามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มที่มีโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกันโดยใช้พันธะไกลโคไซด์ในการพิจารณา ได้แก่

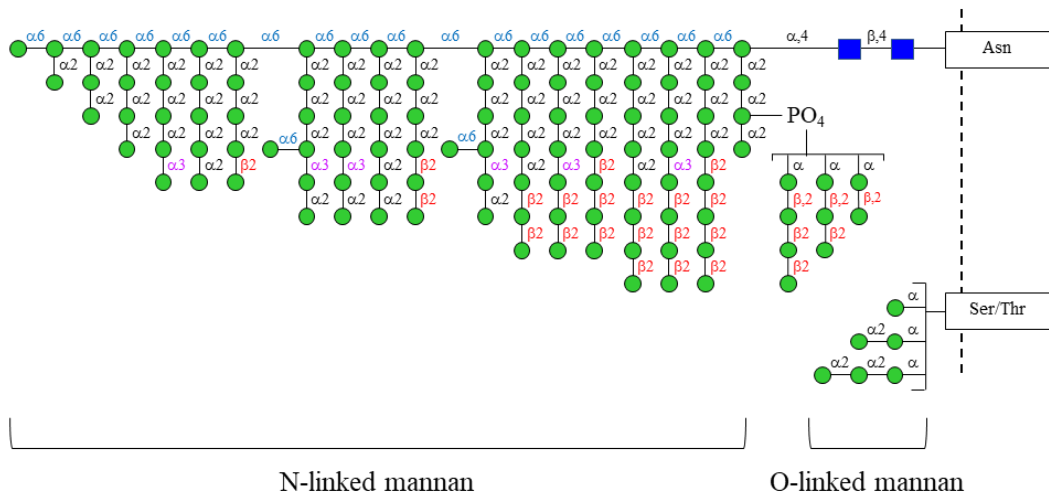
1. ออลิโก-แมนแนนชนิด VAN1 Δ , OCH1 Δ และ WT ประกอบไปด้วยพันธะ $\alpha(1,3)$ ที่อยู่ปลายสายโซ่, พันธะ $\alpha(1,2)$ ที่อยู่ปลายสายโซ่และพันธะ $\alpha(1,6)$ ที่อยู่ภายในสายโซ่
2. ออลิโก-แมนแนนชนิด MNN2 Δ ประกอบไปด้วยพันธะ $\alpha(1,6)$ ที่อยู่ปลายสายโซ่
3. ออลิโก-แมนแนนชนิด MNN1 Δ ประกอบไปด้วยพันธะ $\alpha(1,2)$ ที่อยู่ปลายสายโซ่, พันธะ $\alpha(1,2)$ ที่อยู่ภายในสายโซ่และพันธะ $\alpha(1,6)$ ที่อยู่ภายในสายโซ่ ไม่พบพันธะ $\alpha(1,3)$
4. ออลิโก-แมนแนนชนิด MNN5 Δ ประกอบไปด้วยพันธะ $\alpha(1,2)$ ที่อยู่ปลายสายโซ่และพันธะ $\alpha(1,6)$ ที่อยู่ภายในสายโซ่และมีพันธะ $\alpha(1,3)$ ที่อยู่ปลายสายโซ่เพียงเล็กน้อย

เชื้อราแคนดิดาที่ศึกษามีจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* และ *Candida albicans* โดยผ่านกระบวนการย่อยและวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีพบว่า

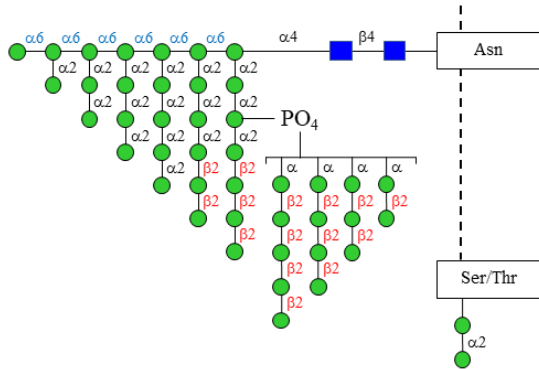
1. ขนาดความยาวของสายโซ่เรียงตามลำดับคือ *C. albicans* (925 kDa), *C. tropicalis* (387 kDa), *C. glabrata* (158 kDa) และ *C. krusei* (169 kDa)
2. *C. albicans*, *C. tropicalis* และ *C. glabrata* มีหมู่ phosphodiester ต่อเชื่อมกับแมนโนสแบบพันธะ $\alpha(1,2)$
3. แมนแนนจากเชื้อทั้ง 4 ชนิด เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ $\alpha(1,2)$, $\alpha(1,6)$ เป็นหลัก

จากการทบทวนวรรณกรรมและผลการวิเคราะห์ คณะผู้วิจัยเสนอโครงสร้างของแมนแนนที่แยกได้จากผนังเซลล์เชื้อรา *Candida* ดังนี้ (A) *C. albicans*³⁶ (B) *C. tropicalis*³⁷ (C) *C. glabrata*^{48,49} และ (D) *C. krusei*⁵⁰ ดังรูปที่ 76

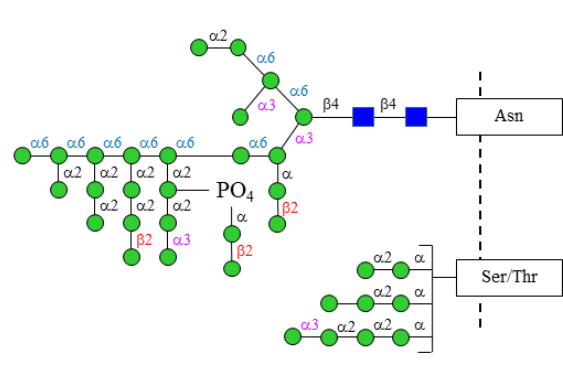
A *C. albicans*



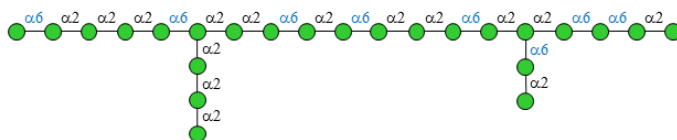
B *C. tropicalis*



C *C. glabrata*



D *C. krusei*



รูปที่ 76 โครงสร้างของแมนแนน (A) *C. albicans*, (B) *C. tropicalis*, (C) *C. glabrata*, (D) *C. krusei*

โครงการย่อยที่ 3

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนคอมโพสิตของเหล็กออกไซด์-ซิลิกา-แมนแนน

เพื่อใช้เป็นสารเสริมฤทธิ์วัคซีน

Synthesis of nanocomposites of iron oxide-silica-mannan for vaccine

หัวหน้าโครงการย่อย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นำพล อินสิน
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

แมนแนนอลิโกแซคคาไรด์หรือโมเลกุลสายสั้นของน้ำตาลแมนโนสที่ได้จากการสกัดจากผนังเซลล์ของเชื้อราบางชนิด แสดงคุณสมบัติที่ดีในการเป็นสารเสริมฤทธิ์วัคซีน (Vaccine adjuvants) แต่ในการนำไปใช้กระตุ้นการตอบสนองของเซลล์ พบว่าแมนแนนที่เป็นโมเลกุลอิสระแสดงสมบัติในการกระตุ้นเซลล์ที่ต่ำกว่าแมนแนนที่อยู่ในรูปอนุภาค โดยเฉพาะอนุภาคที่มีขนาดระดับนาโนเมตร เนื่องจากปัจจัยหลายประการ อาทิ การเพิ่มความเข้มข้นของแมนแนนจำเพาะบริเวณรอบเซลล์ (local concentration) เปลี่ยนแปลงกระบวนการนำแมนแนนเข้าสู่เซลล์ เป็นต้น ด้วยเหตุนี้ จึงมีผู้สนใจการนำแมนแนนมาประกอบเป็นอนุภาคนาโนขนาดต่างๆ

อนุภาคนาโนอินทรีย์สองชนิดที่มีการนำมาใช้กับระบบทางชีวภาพอย่างกว้างขวาง ได้แก่ อนุภาคซิลิกาและอนุภาคนาโนของเหล็กออกไซด์ เนื่องจากอนุภาคเหล่านี้มีความเป็นพิษต่ำต่อเซลล์เมื่อเทียบกับวัสดุอนินทรีย์ชนิดอื่น ๆ โดยอนุภาคนาโนของเหล็กออกไซด์ชนิดแมกนีไทต์ เป็นอนุภาคนาโนที่มีสมบัติแม่เหล็กแบบซูเปอร์พาราแมกเนติก (superparamagnetic) หรือสมบัติการถูกดูดเข้าหาสนามแม่เหล็กอย่างรุนแรงเมื่อมีสนามแม่เหล็ก แต่จะไม่แสดงสมบัติแม่เหล็กภายนอกสนามแม่เหล็ก ด้วยสมบัตินี้ ทำให้อนุภาคนาโนของเหล็กออกไซด์ได้ถูกนำมาใช้กับระบบทางชีวภาพและทางการแพทย์อย่างหลากหลาย อาทิเช่น การนำส่งยาด้วยแรงแม่เหล็ก การใช้อนุภาคแม่เหล็กในการจับและแยกสารชีวโมเลกุลที่สนใจ และการใช้เป็น contrast agent ในการถ่ายภาพด้วยเทคนิค MRI ซึ่งใช้เหล็กออกไซด์ที่เคลือบด้วยอลิโกแซคคาไรด์ชนิด dextran ที่สามารถใช้ในระดับคลินิก สำหรับซิลิกา เป็นวัสดุที่มีความเสถียรในสภาวะแวดล้อมทางชีวภาพ สามารถปรับขนาดของอนุภาคได้หลายช่วง และสามารถดัดแปรพื้นผิวได้หลากหลายด้วยปฏิกิริยาทางเคมีกลุ่ม silane coupling แบบต่าง ๆ นาโนคอมพอสิตของอนุภาคสองชนิดนี้จึงมีคุณสมบัติที่น่าสนใจกับการประยุกต์ใช้งานในระบบชีวภาพ รวมทั้งในการกระตุ้นการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน

การนำอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์และซิลิกามาสร้างนาโนคอมพอสิตกับแมนแนนจึงมีความน่าสนใจเนื่องจากมีแนวโน้มที่จะทำให้แมนแนนแสดงสมบัติเป็นสารเสริมฤทธิ์วัคซีนที่ดีขึ้นแล้ว การมีซิลิกาที่พื้นผิวจะทำให้สามารถปรับลักษณะทางเคมีบนพื้นผิวได้อย่างหลากหลาย อาทิเช่น การเพิ่มหมู่ฟังก์ชันชนิดต่าง ๆ ในการยึดเกาะโปรตีนเพื่อเพิ่มความจำเพาะต่อเซลล์เป้าหมาย พอลิเมอร์ที่ช่วยเพิ่มความเสถียร หรือสีย้อมเพื่อใช้ในการติดตามอนุภาค สำหรับเหล็กออกไซด์ สามารถช่วยในการตรวจวัดด้วยสัญญาณแม่เหล็ก และการย้อมติดสีบางชนิดอย่างจำเพาะแล้ว เหล็กออกไซด์ยังมีศักยภาพในการเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งอนุภาคไปยังบริเวณเป้าหมายโดยใช้แรงจากสนามแม่เหล็กภายนอกด้วย นอกจากนี้ อนุภาคนาโนของเหล็กออกไซด์และซิลิกายังสามารถปรับเปลี่ยนขนาดได้ในช่วงกว้าง ซึ่งขนาดที่แตกต่างกันจะมีผลต่อการตอบสนองต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและการเข้าสู่เซลล์ที่แตกต่างกัน และเป็นปัจจัยสำคัญที่ต้องพิจารณาในการเลือกใช้สารเสริมฤทธิ์วัคซีนแต่ละชนิด

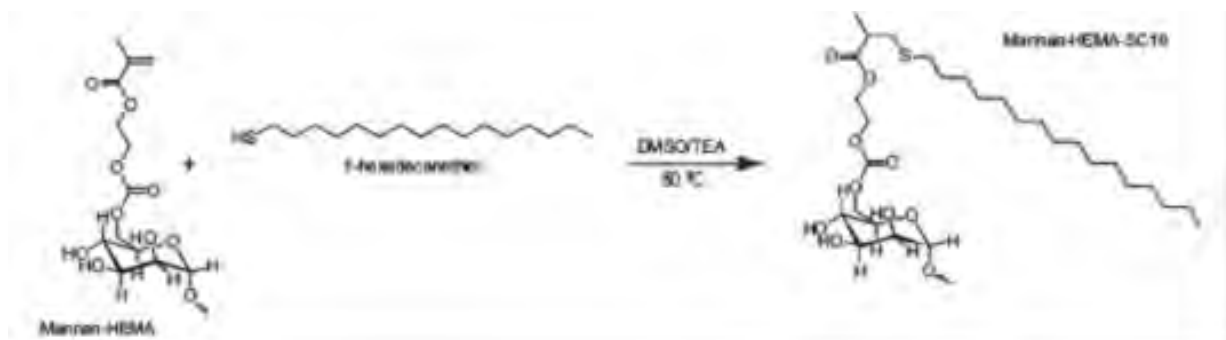
อย่างไรก็ตาม การนำอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์และซิลิกามาสร้างคอมพอสิตกับแมนแนนยังไม่มีการศึกษามาก่อน และพบว่าที่ผ่านมากการสร้างคอมพอสิตของแมนแนนกับอนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ และคอมพอสิตของอลิโกแซคคาไรด์กับอนุภาคซิลิกา อาศัยแรงระหว่างโมเลกุลที่ค่อนข้างอ่อนแอ อาทิเช่น การผสมทางกายภาพ การใช้แรงระหว่างประจุ และการใช้อันตรกิริยาของโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic attraction) เป็นต้น ทำให้คอมพอสิตที่เกิดขึ้นมีความเสถียรต่ำ และอาจเป็นสาเหตุให้ประสิทธิภาพในการกระตุ้นเซลล์ของแมนแนนต่ำกว่าที่ควรจะเป็นไปได้ นอกจากนี้ คอมพอสิตที่เกิดขึ้น ยังไม่สามารถสังเคราะห์ให้มีขนาดอนุภาคสม่ำเสมอและมีขนาดช่วง 400 นาโนเมตร ซึ่งมีการรายงานว่าเป็นช่วงที่จำเพาะต่อ dendritic cell ในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจึงเสนอแนวทางในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนคอมพอสิตของเหล็กออกไซด์-ซิลิกา-แมน

แมน โดยใช้แรงยึดเหนี่ยวระหว่างส่วนประกอบทั้งสามชนิดให้มีความแข็งแรงระดับพันระเคมี ทำให้ได้คอมพอลิเมอร์ที่มีความเสถียรต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น และ pH ได้ดีขึ้น และในวิธีการนี้สามารถปรับขนาดของอนุภาคนาโนคอมพอลิเมอร์ได้ โดยเฉพาะสามารถปรับให้มีขนาดในช่วง 100-200 นาโนเมตร และจะทำการศึกษาความสามารถในการเสริมฤทธิ์วัคซีนของอนุภาคที่สังเคราะห์ให้ขึ้นไป เพื่อให้ได้อนุภาคที่มีประสิทธิภาพสูงในการเสริมฤทธิ์วัคซีน

บททวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดจากเชื้อราบางชนิด แสดงความสามารถในการกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันผ่านเดนไดรติกเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (52) นอกจากนี้ การจัดเรียงตัวของแมนแนนในรูปของอนุภาคหรือการนำแมนแนนมาติดที่ผิวของอนุภาค ทำให้การตอบสนองของภูมิคุ้มกันมีประสิทธิภาพมากขึ้น เช่น การใช้อนุภาคนาโนของ poly(**E**-caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(**E**-caprolactone) ขนาด 136.9 นาโนเมตรที่เคลือบด้วย mannan สามารถเพิ่มการตอบสนองของ humoral immunity ได้ เนื่องมาจากอนุภาคนาโนที่มีความจำเพาะต่อเดนไดรติกเซลล์ (53) ซึ่งปรากฏการณ์นี้ คล้ายคลึงกับที่พบในพอลิแซคคาไรด์อื่น ๆ เช่น β -glucan ที่อยู่ในรูปอนุภาคระดับไมครอนมีความสามารถในการเสริมภูมิคุ้มกันได้ดีกว่า β -glucan ที่เกิดจากการตกตะกอนอย่างอิสระ เนื่องจากสามารถกระจายตัวได้อย่างเสถียรกว่าและเกิดการ phagocytosis โดย macrophage ได้มากกว่า (54) ด้วยศักยภาพเหล่านี้ ทำให้มีการศึกษาถึงการสังเคราะห์และจัดเรียงโมเลกุลแมนแนนและพอลิแซคคาไรด์ในรูปของอนุภาคนาโนและอนุภาคระดับไมครอนอย่างกว้างขวาง

การสร้างอนุภาคนาโนของแมนแนน มีแนวทางในการเตรียมได้หลายรูปแบบ อาทิเช่น การตัดแปรรายแมนแนนด้วยหมู่ metacrylate ก่อนที่จะทำการต่อกับโมเลกุล 1-hexadecanethiol ที่มีลักษณะเป็นสายยาวไม่มีขั้ว ทำให้เกิดโมเลกุลที่มีลักษณะผสมของส่วนมีขั้วและไม่มีขั้วซึ่งสามารถจัดเรียงตัวเป็น nanogel หรือ micelle ที่มีขนาดอนุภาค 100-500 nm (55-57) การตัดแปรรวมโมเลกุลแมนแนนดังแสดงในรูปที่ 77 และมีการรายงานต่อมาถึงความปลอดภัยและความเข้ากันได้ของอนุภาคชนิดนี้เมื่อกระจายเข้าสู่เลือด เนื่องจากมีอัตราการกิริยากับโปรตีนในเลือดเพียงเล็กน้อย และไม่มี การเปลี่ยนแปลงขนาดของอนุภาคเมื่อปล่อยทิ้งไว้ (56) อย่างไรก็ตาม การที่อนุภาคถูกสร้างขึ้นด้วย hydrophobic interaction และมีลักษณะเป็น micelle เช่นนี้ อาจมีการเปลี่ยนแปลงหรือสูญเสียลักษณะการเป็นอนุภาคนาโนได้เมื่อความเข้มข้นเปลี่ยนแปลง ดังเช่นในโมเลกุลนี้ ต้องทำการรักษาความเข้มข้นให้สูงกว่า 0.04-0.02 mg/mL (55) และยังไม่มีการศึกษาถึงความสามารถในการเสริมฤทธิ์วัคซีนเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของแมนแนนเช่นนี้

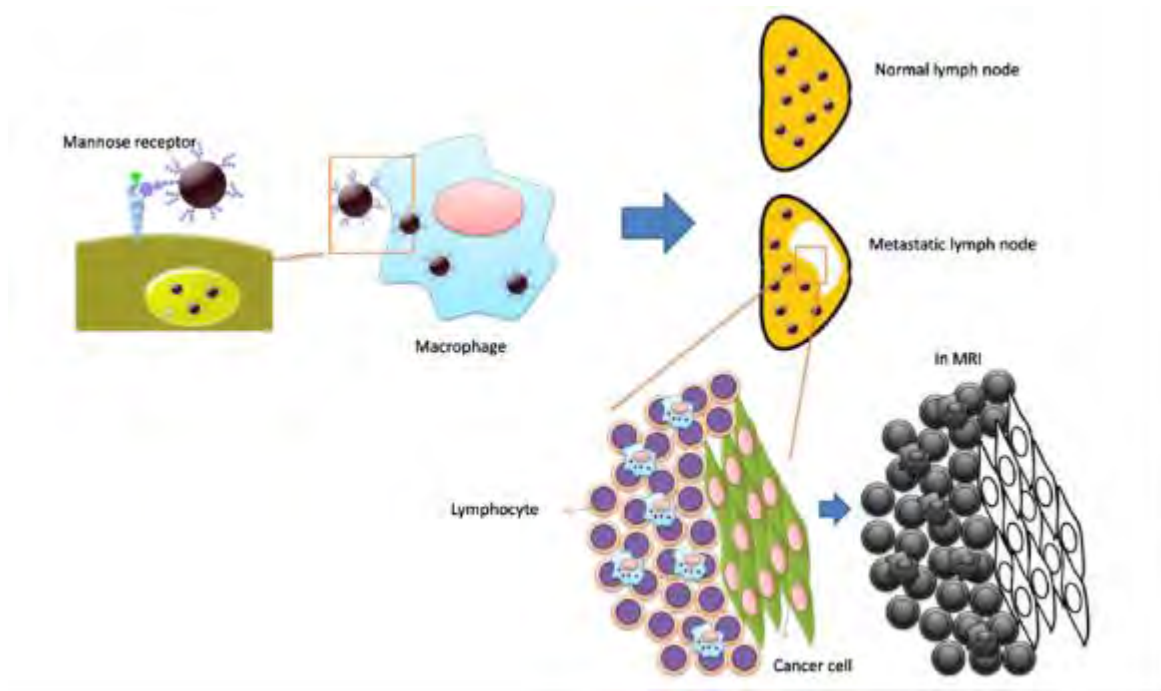


รูปที่ 77 การเตรียมอนุภาคแมนแนนแบบ nanogel โดยการตัดแปรรวมโครงสร้างของแมนแนน (55)

นอกจากนี้ อนุภาคนาโนของแมนแนนอีกลักษณะหนึ่ง ได้แก่ การใช้แมนแนนไปติดอยู่ที่บนผิวของของอนุภาคนาโนชนิดต่าง ๆ อาทิเช่น พอลิเมอร์ชนิด poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (58) และพอลิเมอร์ชนิด poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) (2) ซึ่งมีความเข้ากันได้ดีกับสิ่งมีชีวิต ทำให้ได้อนุภาคขนาด 100-200 นาโนเมตร ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์เป้าหมายมากขึ้น อย่างไรก็ตาม แรงแยัดเกาะระหว่างอนุภาคประเภทนี้ ยังใช้แรงแยัดเกาะแบบอ่อน และไม่มีพันธะระหว่างแมนแนนและอนุภาค ทำให้แมนแนนหลุดจากอนุภาคได้ง่าย และขนาดของอนุภาคที่ได้อย่ายังไม่มีควมสม่ำเสมอโดยกระจายตัวอยู่ในช่วงกว้าง และไม่สามารถปรับเปลี่ยนขนาดได้ง่ายนัก

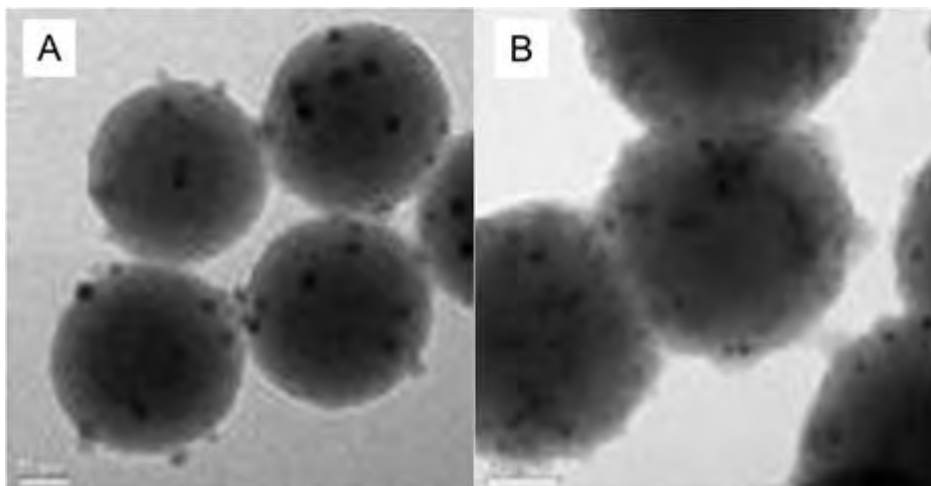
สำหรับอนุภาคนาโนอินทรีย์ซึ่งมีโครงสร้างที่เสถียรและคงรูปได้สูงกว่าอนุภาคพอลิเมอร์ ได้มีการนำอนุภาคนาโนของเหล็กออกไซด์มาสร้างคอมพอสิตร่วมกับแมนแนน (59, 60) เนื่องจากอนุภาคเหล็กออกไซด์มีสมบัติซูเปอร์พาราแมกเนติกที่ทำให้สนามแม่เหล็กของโมเลกุลน้ำรอบอนุภาคมีการเปลี่ยนแปลง ทำให้สามารถตรวจปริมาณและติดตามอนุภาคได้โดยใช้เทคนิค MRI เมื่ออนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ถูกเคลือบด้วย mannann จะมุ่งเป้าไปที่ macrophage ซึ่งมี mannose receptor ในบริเวณของต่อมน้ำเหลือง ทำให้สามารถเห็นภาพต่อมน้ำเหลืองในรูปจาก MRI กระบวนการใช้งานคอมพอสิตของอนุภาคเหล็กออกไซด์-แมนแนนนี้ ดังแสดงในรูปที่ 78 งานวิจัยเหล่านี้ เป็นตัวอย่างของการใช้สมบัติที่เสริมกันของส่วนประกอบทั้งสอง ทำให้ได้แนวทางการใช้งานที่หลากหลายขึ้น นอกจากนี้ อนุภาคนาโนเหล็กออกไซด์ยังสามารถนำไปใช้งานด้านการเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งยาและชีวโมเลกุลไปยังอวัยวะเป้าหมายได้โดยใช้แรงจากสนามแม่เหล็กภายนอกอีกด้วย รวมทั้งเหล็กออกไซด์ยังมีความเป็นพิษต่ำ ทำให้ในโครงการวิจัยนี้ สนใจที่จะนำเหล็กออกไซด์มาใช้เป็นส่วนประกอบของอนุภาคนาโนคอมพอสิตสำหรับยึดเกาะแมนแนน

อย่างไรก็ตาม อนุภาคนาโนของเหล็กออกไซด์มีข้อจำกัดในการปรับเปลี่ยนขนาด เนื่องจากอนุภาคที่มีขนาดใหญ่เกินกว่า 50 นาโนเมตรจะสูญเสียความเป็นซูเปอร์พาราแมกเนติก และจะง่ายต่อการเกาะเป็นกลุ่มและตกตะกอนแยกออกจากบัฟเฟอร์ ทำให้การปรับเปลี่ยนขนาดเป็นไปได้ยาก เนื่องจากขนาดของอนุภาคนาโนคอมพอสิตมีความสำคัญ อาทิเช่น มีการรายงานว่าอนุภาคของสารเสริมฤทธิ์วัคซีนที่มีขนาด 20-200 นาโนเมตร จะจำเพาะต่อเดนไดรติกเซลล์ ในขณะที่อนุภาคที่มีขนาดใหญ่กว่า 500 นาโนเมตรจะจำเพาะต่อ macrophage (61) และอนุภาคขนาด 230 นาโนเมตรในการกระตุ้นที่แรง (61) เป็นต้น ทำให้ความสามารถในการปรับเปลี่ยนขนาดของคอมพอสิตมีความสำคัญ โครงการวิจัยนี้ จึงเสนอแนวทางในการนำซิลิกาซึ่งเป็นวัสดุนาโนอินทรีย์ที่มีความเป็นพิษต่ำ ปรับเปลี่ยนขนาดได้ง่าย และสามารถดัดแปรพื้นผิวได้ด้วยปฏิกิริยา silane coupling ที่หลากหลาย ทำให้สามารถพัฒนาและดัดแปรพื้นผิวของอนุภาคนาโนคอมพอสิตให้เหมาะสมได้ต่อไป



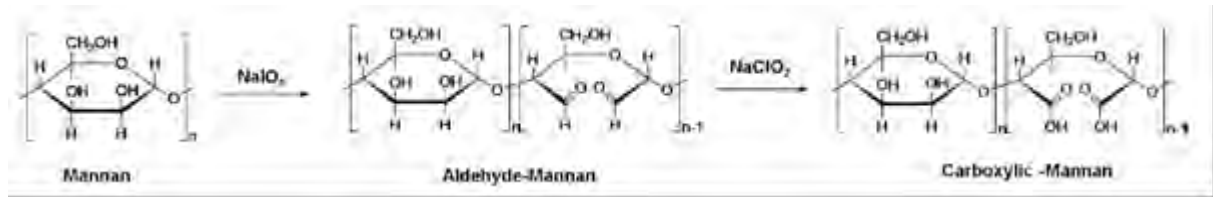
รูปที่ 78 กระบวนการถ่ายภาพต่อมน้ำเหลืองโดยใช้คอมพอลิเมอร์ไฮดรอกซี-แมนแนนที่มีความจำเพาะต่อ macrophage (59)

ในการออกแบบการสังเคราะห์นาโนคอมพอลิเมอร์ของไฮดรอกซี-ซิลิกา-แมนแนนในโครงการวิจัยนี้ จะสร้างคอมพอลิเมอร์ที่มีความเสถียรต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น pH และชนิดของบัฟเฟอร์ที่มากขึ้นกว่าที่มีการรายงานมา โดยจะเปลี่ยนจากการใช้แรงระหว่างโมเลกุลแบบอ่อน เช่น hydrophobic interaction และแรงระหว่างประจุ มาเป็นการสร้างพันธะเคมีระหว่างส่วนประกอบต่าง ๆ ของนาโนคอมพอลิเมอร์ ซึ่งน่าจะทำได้ อนุภาคที่สามารถนำแมนแนนเข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้ในปริมาณที่สูงกว่า และให้ความสามารถในเสริมฤทธิ์วัคซีน ได้มากกว่า ดังเช่นที่เคยมีการรายงานถึงปรากฏการณ์นี้ในอนุภาค PLGA-mannan ซึ่งการสร้างคอมพอลิเมอร์ด้วยพันธะที่แข็งแรงส่งผลให้มีปริมาณแมนแนนที่พื้นผิวอนุภาคสูงและเข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้ดี (61) ในการศึกษาเบื้องต้น ได้ทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนคอมพอลิเมอร์ของไฮดรอกซี-ซิลิกาโดยกระบวนการ sol-gel ได้ อนุภาคที่มีขนาดสม่ำเสมอแสดงในรูปที่ 79



รูปที่ 79 ภาพถ่ายจากกล้อง TEM ของอนุภาคนาโนคอมพอสิตเหล็กออกไซด์-ซิลิกาที่มีขนาด (A) 100 nm และ (B) 200 nm

สำหรับการยึดเกาะแมนแนนลงบนอนุภาค วิธีหนึ่งที่โครงการวิจัยนี้จะทำการศึกษาอาศัยการดัดแปรหมู่ฟังก์ชันของแมนแนนบางส่วน เพื่อให้แมนแนนมีหมู่ฟังก์ชัน carboxylic (60) ที่จะสามารถสร้างพันธะกับหมู่ amino บนพื้นผิวของนาโนคอมพอสิตเหล็กออกไซด์-ซิลิกาได้ กระบวนการเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันของแมนแนนดังแสดงในรูปที่ 80



รูปที่ 80 กระบวนการเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันของแมนแนน (60)

จากการออกแบบการสังเคราะห์ข้างต้น ผู้วิจัยคาดว่าอนุภาคนาโนคอมพอสิตที่ได้จะมีคามเสถียรสูงและบรรจุแมนแนนได้ในปริมาณที่สูง ทำให้การกระตุ้นภูมิคุ้มกันเกิดได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง และอนุภาคสามารถทำการปรับเปลี่ยนขนาดและพื้นผิวได้ ทำให้มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นระบบ สารเสริมฤทธิ์วัคซีนที่มีประสิทธิภาพในอนาคต

วัตถุประสงค์โครงการ

- 1) สามารถสังเคราะห์อนุภาคนาโนคอมพอสิตระหว่างอนุภาคนาโนแม่เหล็ก-ซิลิกา-แมนแนนที่มีโครงสร้างที่เสถียรต่อสภาวะแวดล้อมทางชีวภาพ
- 2) ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของอนุภาคแมนแนนที่เตรียมขึ้น
- 3) ศึกษาความสามารถในการกระตุ้นเซลล์ของอนุภาคแมนแนนที่เตรียมขึ้น
- 4) ศึกษาความสามารถในการเข้าสู่เซลล์ภายใต้การเหนี่ยวนำแม่เหล็กของอนุภาคแมนแนนที่เตรียมขึ้น

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะศึกษาและพัฒนาวิธีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนคอมพอสิตของเหล็กออกไซด์-ซิลิกา-แมนแนน โดยแต่ละองค์ประกอบยึดเหนี่ยวกันด้วยพันธะเคมีเพื่อเพิ่มความเสถียรของอนุภาค โดยแมนแนนที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้ จะใช้แมนแนนที่การผลิตขายเชิงพาณิชย์ และนำมาผ่านกระบวนการเพิ่มหมู่ฟังก์ชันให้สามารถยึดเกาะกับอนุภาคนาโนคอมพอสิตได้อย่างแข็งแรง จากนั้นทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเครื่องมือต่าง ๆ เพื่อพิสูจน์ว่าได้อนุภาคคอมพอสิตที่มีสมบัติตามต้องการ จากนั้นจะทำการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติการเป็นสารเสริมฤทธิ์วัคซีนของอนุภาคนาโนคอมพอสิตที่สังเคราะห์ขึ้นกับแมนแนนในรูปแบบโมเลกุลอิสระ เพื่อแสดงว่าอนุภาคนาโนคอมพอสิตเพิ่มคุณสมบัติเสริมฤทธิ์วัคซีนให้กับแมนแนน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ด้านวิชาการ ได้ทราบถึงอันตรกิริยาระหว่างแมนแนน เหล็กออกไซด์ และซิลิกาในการเตรียมวัสดุอนุภาคนาโนคอมพอสิตที่มีความเสถียรสูง ตลอดจนเพิ่มความเข้าใจในกระบวนการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของแมนแนนเมื่ออยู่ในรูปของอนุภาคนาโน และสามารถเผยแพร่ผลงานทางวิชาการ
- 2) ด้านเศรษฐกิจ/พาณิชย์และอุตสาหกรรม ได้ต้นแบบและวิธีการในการเตรียมอนุภาคนาโนคอมพอสิตของแมนแนนที่มีประสิทธิภาพในการเป็นเป็นสารเสริมฤทธิ์วัคซีน

วิธีดำเนินการวิจัย

การสังเคราะห์อนุภาคซิลิกาโดยวิธี Sol gel

อนุภาคซิลิกาสามารถสังเคราะห์ได้โดยการผสมเอทานอล (EtOH) ปริมาตร 45 มิลลิลิตร น้ำปราศจากไอออน (DI water) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH₄OH) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และ Tetraorthosilicate (TEOS) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร คนทิ้งไว้เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารที่ได้ไปล้างด้วยเอทานอลโดยการปั่นเหวี่ยงจน pH เป็นกลางแล้วนำสารที่ได้ไปอบแห้ง โดยขนาดของอนุภาคซิลิกาที่สังเคราะห์ได้ขึ้นกับอัตราส่วนโดยปริมาตรของเอทานอลและน้ำ DI

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนคอมพอสิตของเหล็กออกไซด์และซิลิกา (S-SPION)

นำอนุภาคซิลิกาที่สังเคราะห์ได้จากวิธี sol gel จำนวน 100 มิลลิกรัม ผสมกับน้ำ DI ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำสารไป sonicate เป็นเวลา 30 นาที จนผงซิลิกากระจายตัวได้ดี หลังจากนั้นนำ Fe(acac)₃ จำนวน 10, 20, 60, 180 มิลลิกรัม มาผสมกับสารละลายซิลิกาข้างต้น ในภาชนะขวดก้นกลมขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมตัวทำละลาย Tetraethylene glycol จำนวน 10 กรัมลงไป จากนั้นค่อย ๆ ให้ความร้อนตามขั้นตอนที่แสดงในตารางที่ 1 หลังจากนั้นนำสารที่ได้ไปล้างด้วยอะซิโตนจำนวน 3 ครั้ง แล้วนำสารไปอบแห้งต่อไป

ตารางที่ 2 แสดงโปรแกรมอุณหภูมิสำหรับการเตรียมอนุภาคนาโนคอมพอสิตของเหล็กออกไซด์และซิลิกา

| อันดับ | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | ช่วงเวลา (ชั่วโมง) | สถานะ |
|--------|----------------------------|-----------------------|--------------|
| 1 | 110 | 0.10 | สุญญากาศ |
| 2 | 110 | 1.00 | สุญญากาศ |
| 3 | 210 | 0.25 | แก๊สไนโตรเจน |
| 4 | 210 | 2.00 | แก๊สไนโตรเจน |
| 5 | 300 | 0.20 | บรรยากาศ |
| 6 | 300 | 1.00 | บรรยากาศ |

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนคอมพอสิตของเหล็กออกไซด์-ซิลิกา-แมนแนน (S-SPION-MN)

- การตัดแปรพื้นผิวอนุภาคให้เป็นหมู่เอมีน)S-SPION-NH₂(

นำอนุภาคนาโนคอมพอสิตเหล็กออกไซด์และซิลิกาที่สังเคราะห์ได้จากขั้นตอนข้างต้น จำนวน 200 มิลลิกรัม มาผสมในสารละลายเฮกเซน ปริมาตร 10 มิลลิตร จากนั้นผสมสาร APTES ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงไป แล้วคนทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง สารละลายที่ได้ถูกนำไปกรองและล้างด้วย เฮกเซน ปริมาตร 10 มิลลิตร จำนวน 2 ครั้ง และล้างด้วยเอทานอล ปริมาตร 10 มิลลิตร จำนวน 1 ครั้ง และนำสารที่ได้ไปอบแห้ง

- การติดโมเลกุลแมนแนนบนผิวอนุภาค S-SPION-NH₂) S-SPION-MN(

นำอนุภาคนาโนคอมพอสิตเหล็กออกไซด์และซิลิกาที่มีพื้นผิวเป็นหมู่เอมีน มาทำปฏิกิริยากับสารแมนแนนในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้ปฏิกิริยา EDC/NHS coupling และมีน้ำ DI เป็นตัวทำละลาย หลังจากนั้นทำการคนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปล้างด้วยน้ำ DI 3 ครั้ง และนำสารที่ได้ไปอบจนแห้ง

การทดสอบความเป็นพิษ การกระตุ้นของเซลล์โดยวิธี ELISA และการกระตุ้น cell maturation ของอนุภาคนาโนคอมพอสิตเหล็กออกไซด์-ซิลิกา-แมนแนน (S-SPION-MN)

นำสารคอมพอสิตที่สังเคราะห์ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เดนไดติก โดยวิธี MTT assay ซึ่งเป็นการทดสอบอัตราการเกิดปฏิกิริยาเมตาบอลิซึมของเซลล์ ซึ่งให้ผลโดยตรงถึงปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่รอด ในการทดลองนี้ได้เลี้ยงเซลล์เดนไดติกใน 96 หลุม มีปริมาณเซลล์จำนวน 200,000 เซลล์ต่อหลุม และมีปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์เท่ากับ 200 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยในอาหารเลี้ยงเซลล์จะประกอบด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ FBS 100 U ต่อ มิลลิตร penicillin และ 100 ไมโครกรัมต่อ มิลลิตร streptomycin, 0.2 มิลลิโมลาร์ L-glutamax 10 นาโนกรัมต่อ มิลลิตร recombinant murine GM-CSF และ 10 นาโนกรัมต่อ มิลลิตร recombinant murine IL-4 เซลล์ได้ถูกเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะกับภาตเลี้ยงเซลล์ หลังจากนั้นใส่อนุภาคนาโนคอมพอสิตที่สังเคราะห์ได้ลงหลุมละ 20 ไมโครลิตรแล้วทิ้งไว้เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วเติมสาร MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazolium bromide) ปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วทิ้งไว้ในที่มืด 1 ชั่วโมง ก่อนนำมาล้างด้วย 100 ไมโครลิตร PBS สองรอบแล้วเติม 150 ไมโครลิตร DMSO จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ด้วย microplate reader

ทดสอบการกระตุ้นของเซลล์โดยใช้เทคนิคของแซนวิช ELISA ซึ่งใช้หลักการจับแบบแม่กุญแจและลูกกุญแจของแอนติบอดีกับแอนติเจน ซึ่งในงานนี้ได้ทดสอบกับสารหลัง cytokine ชนิด TNF- α , IL-1- β , IL-6, IL-23, IFN- γ โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร

การศึกษา cell maturation ของเซลล์นั้นใช้วิธี flow cytometry โดยเซลล์จะถูกกระตุ้นเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เซลล์จะถูกบ่มด้วย antibody CD80 CD86 และ MHCII ซึ่งเป็นตัวชี้วัดในการ maturation ของเซลล์

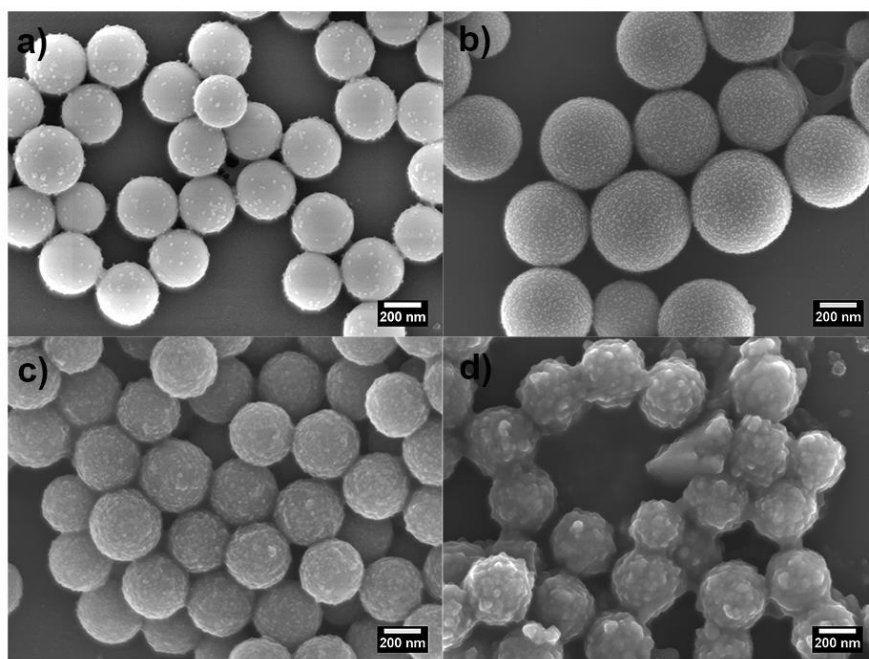
การทดสอบการเข้าเซลล์ของอนุภาคนาโนคอมพอลิเมอร์ S-SPION-MN

เซลล์ได้ถูกเพาะเลี้ยงบนแผ่นซิลิกา ใน 12 หลุม โดยในแต่ละหลุมมีเซลล์จำนวน 1,000,000 เซลล์ ในสารเลี้ยงเชื้อ RPMI ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นได้ใส่สารอนุภาคนาโนคอมพอลิเมอร์ที่ถูกย้อมด้วยสี FITC ลงไปโดยมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 นาโนกรัมต่อเซลล์ แล้วศึกษาการเข้าเซลล์ที่เวลา 15 นาที และ 3 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบระหว่างสารที่ทดสอบภายใต้สภาวะแม่เหล็กภายนอกกับสารที่ไม่ได้ถูกเหนี่ยวนำด้วยแม่เหล็ก เมื่อครบเวลาก็นำไปล้างเซลล์ด้วย 500 ไมโครลิตร PBS 3 ครั้ง แล้วทำการย้อมสีเมมเบรนด้วย CellMask Deep red เป็นเวลา 5 นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส แล้วทำการ fix เซลล์ ด้วย 4 เปอร์เซ็นต์ paraformaldehyde เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำมาล้างด้วย PBS แล้วย้อมสีของนิวเคลียสด้วย DAPI เป็นเวลา 5 นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างด้วย PBS อีก 4 ครั้ง ก่อนเติม 500 ไมโครลิตร PBS รอบสุดท้าย แล้วนำไปส่องด้วยกล้อง Confocal Fluorescence microscopy เพื่อดูการเข้าเซลล์ นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาโดยใช้ flow cytometry เพื่อนำผลที่ได้มาประกอบกัน

ผลการวิจัย

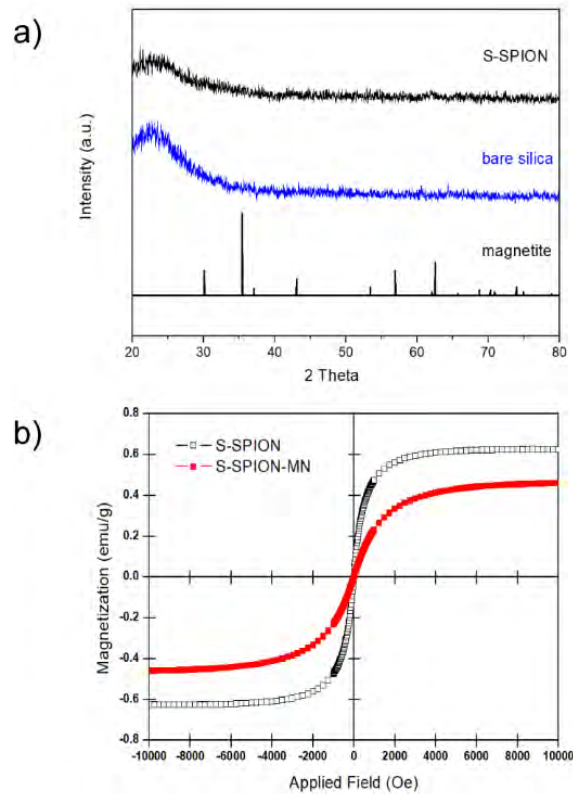
การวิเคราะห์เอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนคอมพอสิต S-SPION และ S-SPION-MN

อนุภาค S-SPION ที่สังเคราะห์ได้ถูกนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้นด้วยเทคนิค Field Emission Scanning Electron Microscopy (FE-SEM) ดังแสดงในรูปที่ 81 พบว่าลักษณะอนุภาคที่ได้มีลักษณะเป็นทรงกลม พื้นผิวปกคลุมด้วยอนุภาคขนาดเล็กของอนุภาคแม่เหล็ก โดยเมื่อเพิ่มปริมาณสารตั้งต้น $\text{Fe}(\text{acac})_3$ จะพบว่าปริมาณอนุภาคแม่เหล็กเพิ่มมากขึ้นด้วย จากผล FESEM ผู้วิจัยได้เลือกในการใช้ปริมาณของ $\text{Fe}(\text{acac})_3$ 10 g เพราะอนุภาคที่ได้มีพื้นที่ผิวมาก ซึ่งจะทำให้มีพื้นที่เหลือและสามารถนำไปตัดแปรพื้นผิวได้ในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 81 ภาพ FESEM แสดงลักษณะอนุภาคนาโนคอมพอสิต S-SPION ที่สังเคราะห์ได้ ด้วยปริมาณสาร $\text{Fe}(\text{acac})_3$ ต่างกัน โดย a) 10 mg, b) 20 mg, c) 60, d) 180 mg.

นอกจากนี้อนุภาคที่สังเคราะห์ ได้ถูกนำไปวิเคราะห์ด้วย XRD แต่ทั้งนี้เนื่องจากอนุภาคแม่เหล็กมีปริมาณน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคซิลิกา ทำให้กราฟ XRD ไม่สามารถบ่งบอกความแตกต่างได้ดังแสดงในรูปที่ 82



รูปที่ 82 แสดงกราฟ a) XRD pattern และ b) magnetization curves

หลังจากการตัดแปรพื้นผิวด้วยสารแมนแนนแล้ว อนุภาคนาโนคอมพอสิต S-SPION-MN ยังคงแสดงคุณสมบัติของความเป็น superparamagnetic แต่ทั้งนี้ค่า magnetization ได้ลดลงจากอนุภาค S-SPION ซึ่งเป็นผลมาจากการบดบังของสารแมนแนน ทั้งนี้การยืนยันการติดสารแมนแนนที่ผิวอนุภาคนั้นสามารถยืนยันได้ด้วยการเปลี่ยนแปลงของประจุตั้งแสดงในตารางที่ 2 พบว่าประจุได้เพิ่มความเป็นบวกมากขึ้นเนื่องจากแมนแนนได้มาบดบังประจุลบของอนุภาค S-SPION

ตารางที่ 3 Properties of synthesized nanocomposites

| Samples | Size (nm) ^a | PDI ^a | Zeta potential (mV) ^a | Amount of Fe ($\mu\text{g}/\text{mg}$ particle) ^b | Mannan concentration ($\mu\text{g}/\text{mg}$ particle) ^c |
|------------|------------------------|-------------------|----------------------------------|---|---|
| S-SPION | 693.23 \pm 25.62 | 0.157 \pm 0.085 | -39.17 \pm 2.33 | 19.27 | N/A |
| S-SPION-MN | 930.70 \pm 37.77 | 0.395 \pm 0.077 | -3.88 \pm 0.13 | N/A | 98 |

^a Hydrodynamic size, PDI, and zeta potential were measured by Zetasizer

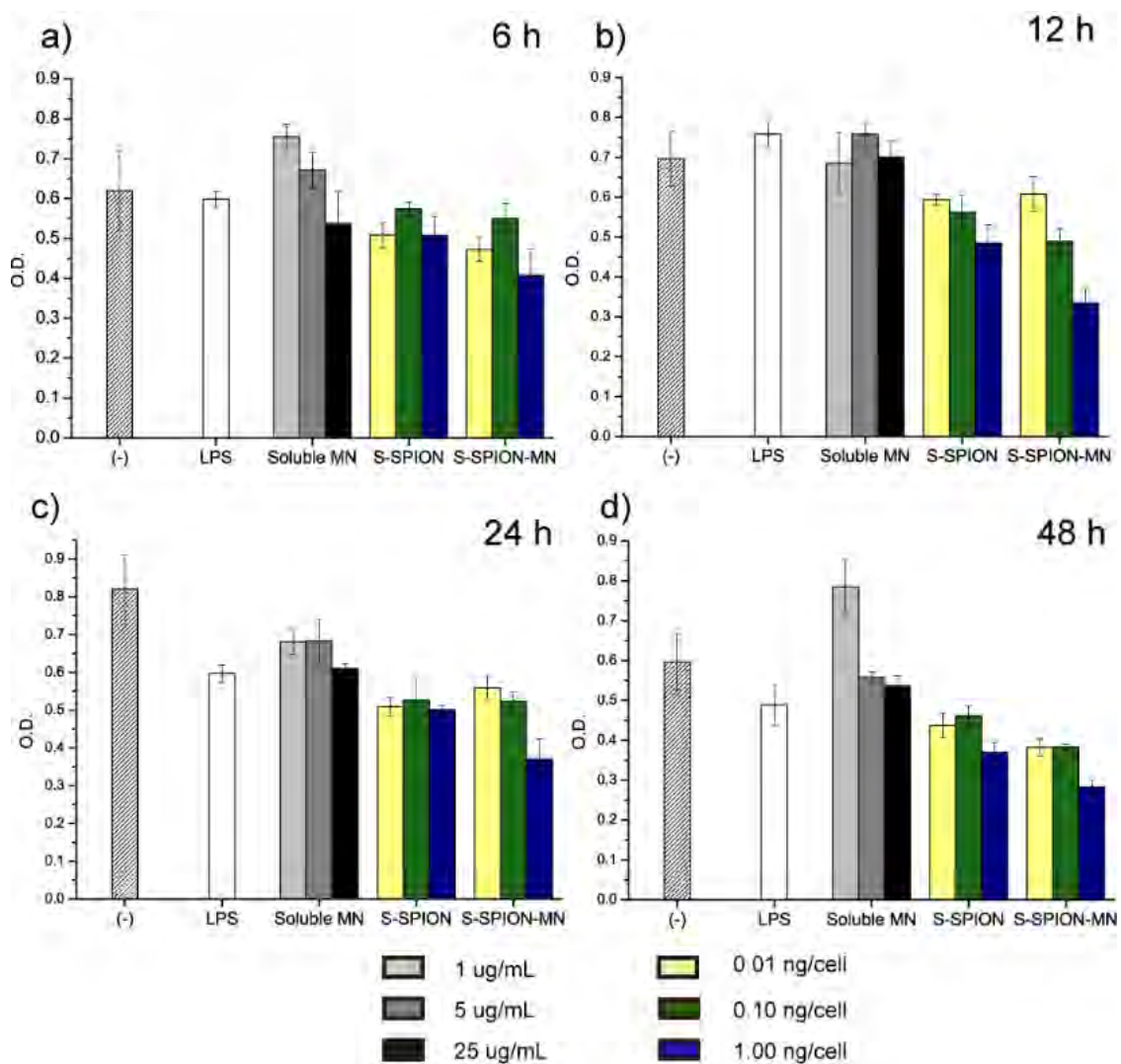
^b Content of iron was determined by ICP-OES analysis

^c Mannan content was measured by using sulfuric acid-phenol colorimetric assay

N/A not applicable

ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

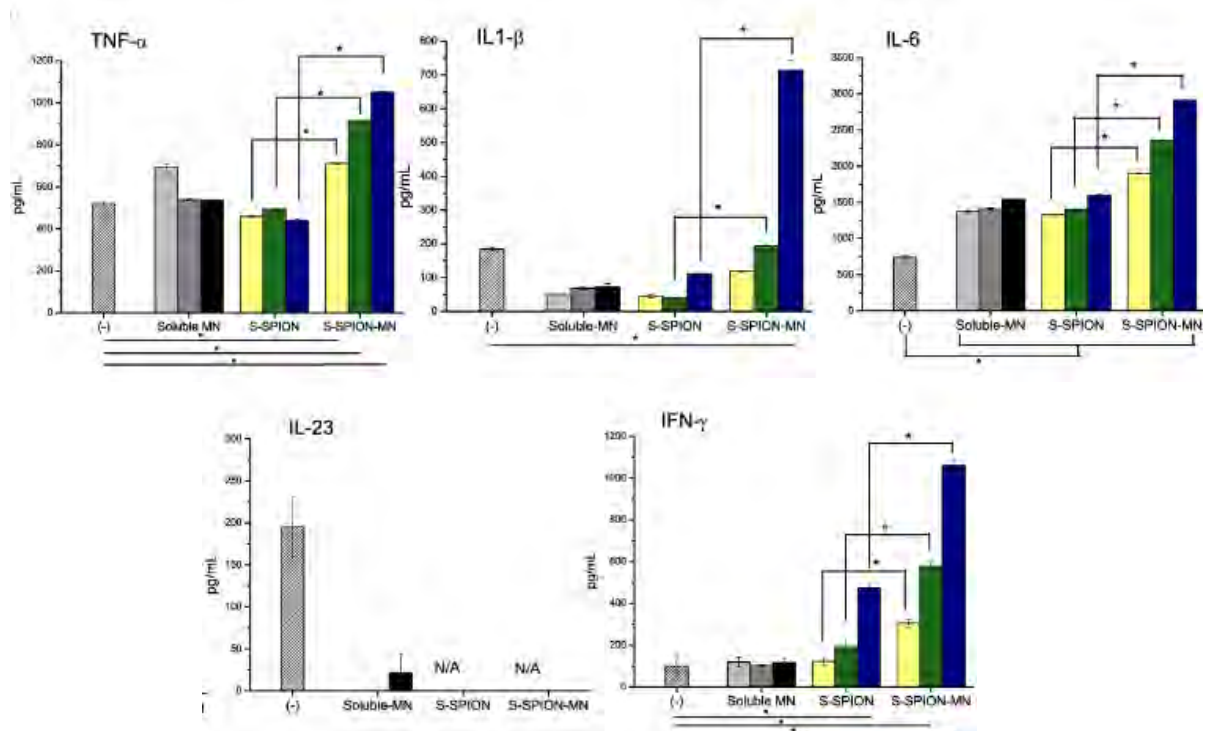
อนุภาคนาโนคอมพอสิต S-SPION และ S-SPION-MN ได้ถูกนำมาวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์เดนไดติก โดยการทดลองได้ศึกษาที่เวลา 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 83 จากผลการทดลองพบว่าที่เวลา 6 ชั่วโมง ปริมาณการมีชีวิตรอดของเซลล์นั้นสูงเมื่อถูกกระตุ้นด้วยอนุภาคแมนแนนหรือ S-SPION-MN โดยเทียบกับอนุภาค S-SPION แต่จะสังเกตได้ว่าที่เวลา 12 ชั่วโมงนั้นปริมาณการรอดชีวิตเซลล์นั้นลดลงอย่างเห็นได้ชัด แต่ปริมาณการตายนั้นคงที่ ที่เวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นที่เวลา 48 ชั่วโมง การรอดของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย S-SPION-MN ลดลงไปประมาณ 50% เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม negative ทั้งนี้การที่เซลล์ลดจำนวนลงไป อาจจะเป็นเหตุจากการที่เซลล์โดนกระตุ้นได้ดีจากการที่มีแมนแนนทำหน้าที่เป็นตัวจับกับเซลล์



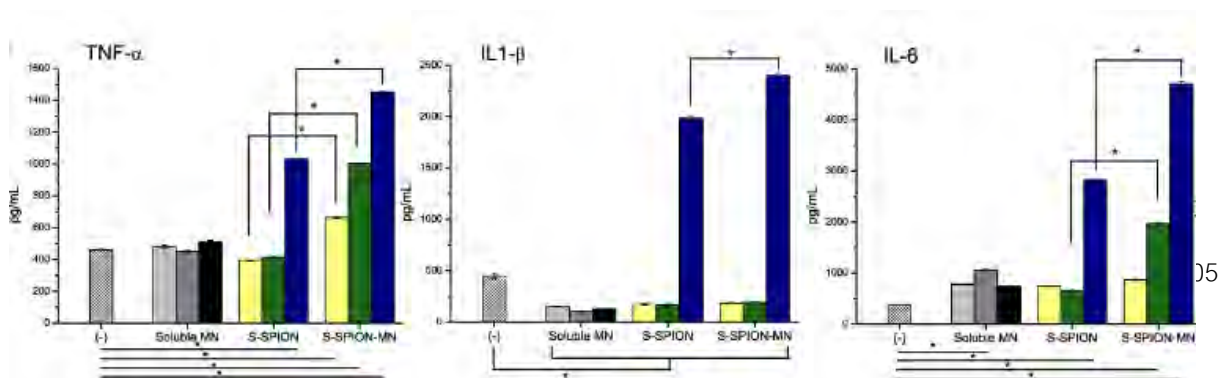
รูปที่ 83 ปริมาณการรอดของเซลล์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยอนุภาคต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่างกัน โดยการทำปฏิกิริยาที่เวลา a) 6 ชั่วโมง b) 12 ชั่วโมง c) 24 ชั่วโมง d) 48 ชั่วโมง

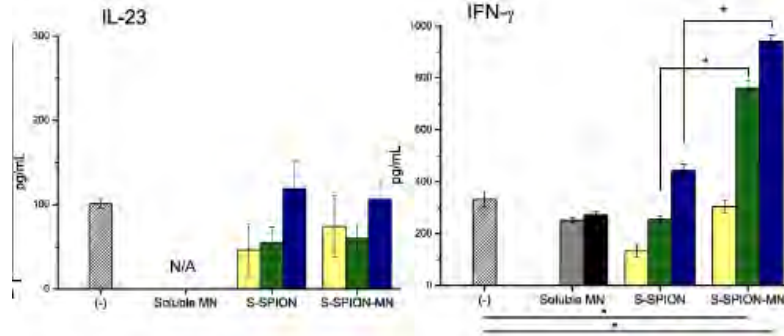
ศึกษาการกระตุ้นเซลล์ด้วยอนุภาคแมนแนน

การทดลองการกระตุ้นของเซลล์จะช่วยยืนยันว่า การที่เซลล์ตายมากขึ้นนั้นเกิดจากการที่เซลล์ถูกกระตุ้นมาก ดังนั้นการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า เซลล์ได้มีการหลั่งสาร cytokine ชนิดต่าง ๆ ออกมาในปริมาณสูงเมื่อเทียบกับ negative control โดยเฉพาะเมื่อใช้ S-SPION-MN ในปริมาณเท่ากับ 1 ng particle/cell ดังแสดงในรูปที่ 84-85 และสังเกตเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้นเดียวกันของอนุภาค S-SPION-MN สามารถกระตุ้นการหลั่ง cytokine ได้มากกว่าอนุภาค S-SPION ซึ่งไม่มีแมนแนนปกคลุม ดังนั้นการที่มีแมนแนนเป็นองค์ประกอบสามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์ได้ดียิ่งขึ้น



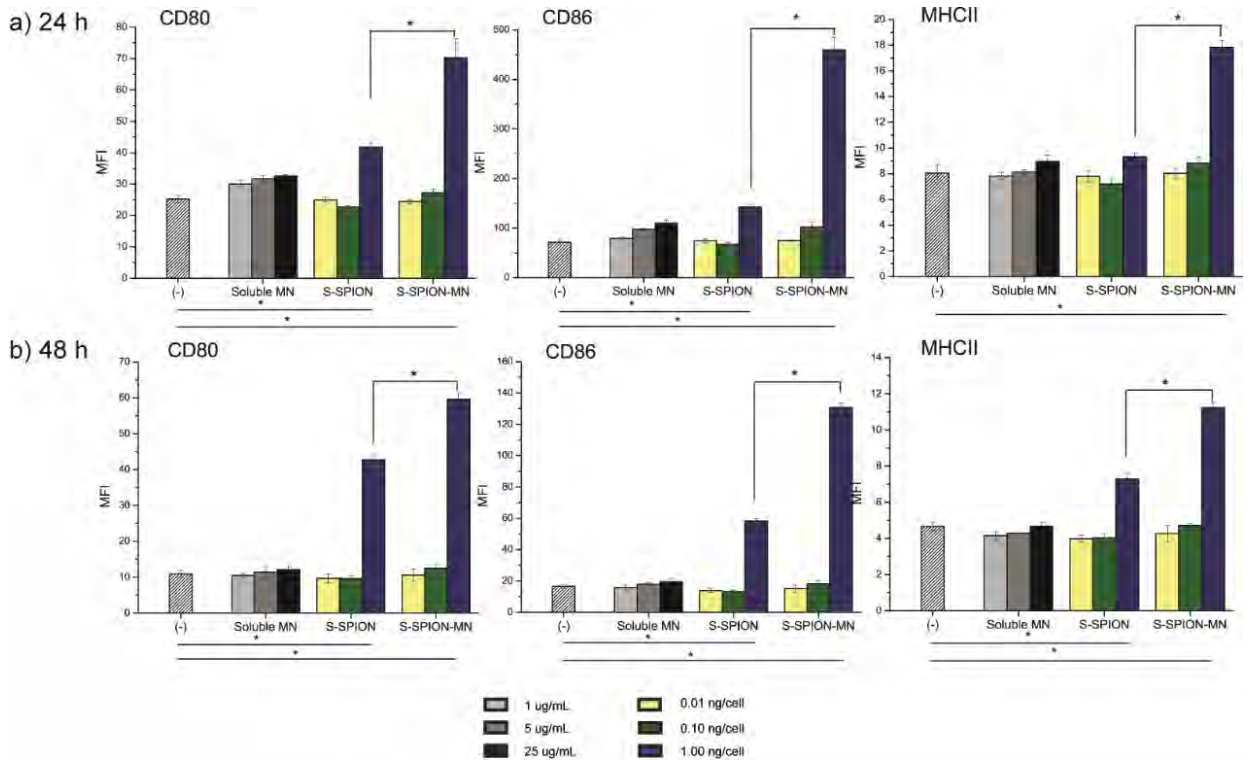
รูปที่ 84 ผล ELISA โดยการกระตุ้นเซลล์ที่เวลา 24 ชั่วโมง





รูปที่ 85 ผล ELIZA โดยการกระตุ้นเซลล์ที่เวลา 48 ชั่วโมง

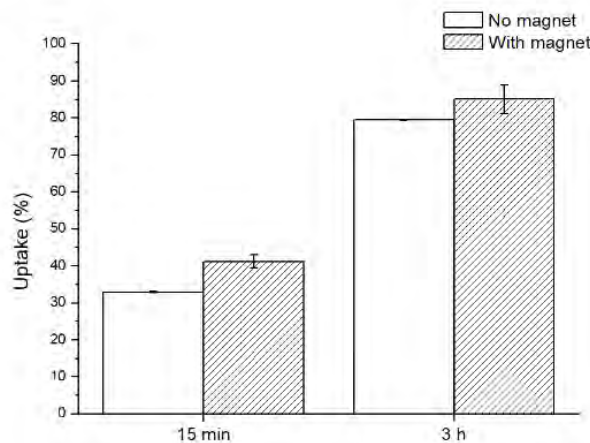
นอกจากการกระตุ้นการหลั่ง cytokine ของเซลล์ซึ่งมีผลต่อการทำงานในระบบภูมิคุ้มกันแล้ว กระบวนการเกิด maturation ของเซลล์ก็มีความจำเป็นอย่างยิ่งในการทำหน้าที่กระตุ้น T cell ต่อไป ดังนั้นผล mean fluorescent intensity (MFI) จากเทคนิค flow cytometry (รูปที่ 86) จึงช่วยแสดงให้เห็นว่าเซลล์นั้นเกิดการ maturation ได้ดีที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยการถูกกระตุ้นด้วยอนุภาคแมนแนน S-SPION-MN ที่ความเข้มข้น 1 ng particle/cell



รูปที่ 86 กราฟแสดง MFI เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยอนุภาคต่างๆ ที่เวลา a) 24 ชั่วโมง b) 48 ชั่วโมง

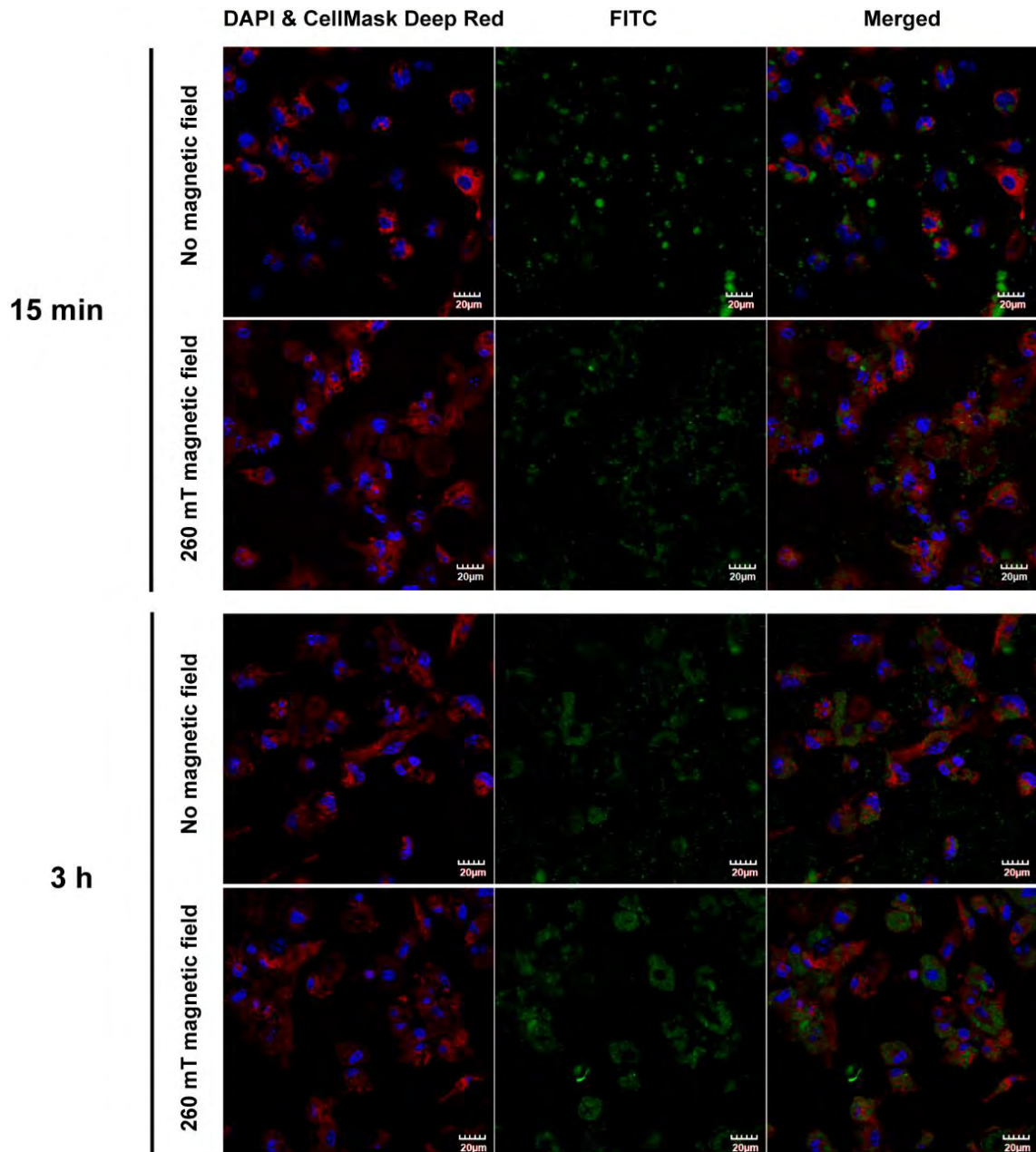
ศึกษาการนำเข้าสู่เซลล์ภายใต้การเหนี่ยวนำด้วยแม่เหล็กภายนอก

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาผลของการมีอนุภาคแม่เหล็กเป็นองค์ประกอบ โดยศึกษา cell uptake ภายใต้การใช้เทคนิค Flow Cytometry ซึ่งผลการทดลอง (รูปที่ 87) ได้ศึกษาที่เวลา 15 นาที และเวลา 3 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอนุภาคแมนแนนภายใต้การเหนี่ยวนำด้วยแม่เหล็กภายนอก สามารถช่วยการ uptake ได้ดีขึ้น เมื่อเทียบกับการ uptake ของเซลล์โดยไม่มีแม่เหล็กเหนี่ยวนำ



รูปที่ 87 แสดงปริมาณการ uptake อนุภาคแมนแนน S-SPION-MN ของเซลล์

นอกจากนี้ผลจากกล้อง confocal fluorescent microscopy ยังช่วยยืนยันการ uptake ของเซลล์ โดยจากรูปที่ 88 จะเห็นได้ชัดว่าที่เวลา 15 นาที อนุภาคแมนแนนถูกจับเข้าไปในเซลล์ได้มากภายใต้การเหนี่ยวนำด้วยแม่เหล็กภายนอก แต่ที่เวลา 3 ชั่วโมง ผลของการมีอนุภาคแม่เหล็กเห็นได้ไม่ชัดเจน ทั้งนี้เนื่องมาจากการมีแมนแนนเป็นองค์ประกอบซึ่งทำหน้าที่ในการจับกับเซลล์



รูปที่ 88 ภาพแสดงการ uptake อนุภาคแมนแนน S-SPION-MN ของเซลล์โดยการศึกษาภายใต้กล้อง confocal fluorescent microscopy: DAPI และ CellMask Deep Red แสดงนิวเคลียสและเซลล์เมมเบรน FITC แสดงอนุภาคแมนแนน S-SPION-MN

อภิปราย / วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการศึกษาพบว่าอนุภาคแมนแนนมีความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกันได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคที่ไม่มีแมนแนนเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแมนแนนสามารถจับกับเซลล์เมมเบรนได้ดี และยังช่วยกระตุ้นการหลั่ง cytokine และ การ maturation ของเซลล์ ซึ่งเป็นการทำให้เซลล์มีความพร้อมในการกระตุ้น T-cell ต่อไป นอกจากนี้การที่อนุภาคแมนแนนมีอนุภาคแม่เหล็กเป็น

องค์ประกอบ ยังทำให้อนุแมนแนนไปยังเซลล์เป้าหมายได้เร็วขึ้นภายใต้การเหนี่ยวนำของแม่เหล็กภายนอก
ดังนั้นการที่อนุภาคทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพนั้นเนื่องมาจากองค์ประกอบของแมนแนนและอนุภาคแม่เหล็ก
ที่มีคุณสมบัติความเป็น superparamagnetic

สรุปและเสนอแนะ

แผนงานวิจัยนี้คณะผู้วิจัยได้ใช้สหสาขาวิชาความรู้เพื่อศึกษาแมนแนนที่สกัดจากเชื้อรา *Saccharomyces* และ *Candida* พบว่าแมนแนนที่นำมาใช้ทดสอบในแผนงานนี้ มีโครงสร้างที่แตกต่างกัน ซึ่งส่งผลต่อการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิดเดนไดรติกเซลล์ และ T cell ที่แตกต่างกัน นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังทำนำแมนแนนจาก *S. cerevisiae* ชนิด MNN 1 Δ ซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดี มาพัฒนาเป็นอนุภาคแมนแนน คณะผู้วิจัยได้สังเคราะห์และพัฒนาอนุภาคแมนแนน ที่มีสมบัติความเป็นแม่เหล็ก เพื่อใช้เป็นสารเสริมฤทธิ์วัคซีนได้สำเร็จ โดยเบื้องต้นผลการกระตุ้นเซลล์และ cell maturation แสดงให้เห็นว่าอนุภาคที่สังเคราะห์ขึ้นนั้นสามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์ได้ดี และผู้วิจัยได้เล็งเห็นถึงความเป็นไปได้ของการนำอนุภาคแมนแนนมาใช้ในการทดลองระดับคลินิก แต่ทั้งนี้เพื่อยืนยันความสามารถในการกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิด T cell ได้และการนำไปใช้ได้จริงนั้น ยังคงต้องการการทดลองในระดับที่ซับซ้อนมากขึ้นต่อไป

บรรณานุกรม

1. Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity*. 2010;33(4):492-503.
2. Rappuoli R, Mandl CW, Black S, De Gregorio E. Vaccines for the twenty-first century society. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(12):865-72.
3. Sinyakov MS, Dror M, Lublin-Tennenbaum T, Salzberg S, Margel S, Avtalion RR. Nano- and microparticles as adjuvants in vaccine design: success and failure is related to host natural antibodies. *Vaccine*. 2006;24(42-43):6534-41.
4. Guy B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(7):505-17.
5. Plotkin SA. Correlates of protection induced by vaccination. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17(7):1055-65.
6. Stier H, Ebbeskotte V, Gruenwald J. Immune-modulatory effects of dietary Yeast Beta-1,3/1,6-D-glucan. *Nutr J*. 2014;13:38.
7. Qi C, Cai Y, Gunn L, Ding C, Li B, Kloecker G, et al. Differential pathways regulating innate and adaptive antitumor immune responses by particulate and soluble yeast-derived beta-glucans. *Blood*. 2011;117(25):6825-36.
8. Rey-Ladino J, Ross AG, Cripps AW, McManus DP, Quinn R. Natural products and the search for novel vaccine adjuvants. *Vaccine*. 2011;29(38):6464-71.
9. Keitel W, Couch R, Bond N, Adair S, Van Nest G, Dekker C. Pilot evaluation of influenza virus vaccine (IVV) combined with adjuvant. *Vaccine*. 1993;11(9):909-13.
10. Glueck R. Pre-clinical and clinical investigation of the safety of a novel adjuvant for intranasal immunization. *Vaccine*. 2001;20 Suppl 1:S42-4.
11. Garcon N. Preclinical development of AS04. *Methods Mol Biol*. 2010;626:15-27.
12. Garcon N, Vaughn DW, Didierlaurent AM. Development and evaluation of AS03, an Adjuvant System containing alpha-tocopherol and squalene in an oil-in-water emulsion. *Expert Rev Vaccines*. 2012;11(3):349-66.
13. Brown GD. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. *Annual review of immunology*. 2011;29:1-21.
14. Petrovsky N, Cooper PD. Carbohydrate-based immune adjuvants. *Expert Rev Vaccines*. 2011;10(4):523-37.
15. Reed SG, Orr MT, Fox CB. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat Med*. 2013;19(12):1597-608.
16. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801.

17. Schnurr M, Orban M, Robson NC, Shin A, Braley H, Airey D, et al. ISCOMATRIX adjuvant induces efficient cross-presentation of tumor antigen by dendritic cells via rapid cytosolic antigen delivery and processing via tripeptidyl peptidase II. *J Immunol.* 2009;182(3):1253-9.
18. Pulendran B, Tang H, Manicassamy S. Programming dendritic cells to induce T(H)2 and tolerogenic responses. *Nat Immunol.*11(8):647-55.
19. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:563-604.
20. Roy RM, Klein BS. Dendritic cells in antifungal immunity and vaccine design. *Cell Host Microbe.* 2012;11(5):436-46.
21. Steinman RM. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:1-22.
22. Mahla RS, Reddy MC, Prasad DV, Kumar H. Sweeten PAMPs: Role of Sugar Complexed PAMPs in Innate Immunity and Vaccine Biology. *Front Immunol.* 2013;4:248.
23. Xia Y, Vetvicka V, Yan J, Hanikyrova M, Mayadas T, Ross GD. The beta-glucan-binding lectin site of mouse CR3 (CD11b/CD18) and its function in generating a primed state of the receptor that mediates cytotoxic activation in response to iC3b-opsonized target cells. *J Immunol.* 1999;162(4):2281-90.
24. Hong F, Hansen RD, Yan J, Allendorf DJ, Baran JT, Ostroff GR, et al. Beta-glucan functions as an adjuvant for monoclonal antibody immunotherapy by recruiting tumoricidal granulocytes as killer cells. *Cancer Res.* 2003;63(24):9023-31.
25. Xiang D, Sharma VR, Freter CE, Yan J. Anti-tumor monoclonal antibodies in conjunction with beta-glucans: a novel anti-cancer immunotherapy. *Curr Med Chem.* 2012;19(25):4298-305.
26. Vosika GJ, Cornelius DA, Bennek JA, Sadlik JR, Gilbert CW. Immunologic and toxicologic study of disaccharide tripeptide glycerol dipalmitoyl: a new lipophilic immunomodulator. *Mol Biother.* 1990;2(1):50-6.
27. Russell DG. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat Rev Microbiol.* 2007;5(1):39-47.
28. Moore VL, Myrvik QN, Kato M. Role of cord factor (trehalose-6,6'-dimycolate) in allergic granuloma formation in rabbits. *Infect Immun.* 1972;6(1):5-8.
29. Saito R, Tanaka A, Sugiyama K, Azuma I, Yamamura Y. Adjuvant effect of cord factor, a mycobacterial lipid. *Infect Immun.* 1976;13(3):776-81.
30. Free SJ. Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Adv Genet.* 2013;81:33-82.
31. Saijo S, Ikeda S, Yamabe K, Kakuta S, Ishigame H, Akitsu A, et al. Dectin-2 recognition of alpha-mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*. *Immunity.* 2010;32(5):681-91.
32. Yamasaki S, Matsumoto M, Takeuchi O, Matsuzawa T, Ishikawa E, Sakuma M, et al. C-type lectin Mincle is an activating receptor for pathogenic fungus, *Malassezia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2009;106(6):1897-902.

33. Ueno K, Okawara A, Yamagoe S, Naka T, Umeyama T, Utena-Abe Y, et al. The mannan of *Candida albicans* lacking beta-1,2-linked oligomannosides increases the production of inflammatory cytokines by dendritic cells. *Medical mycology*. 2013;51(4):385-95.
34. Cambi A, Netea MG, Mora-Montes HM, Gow NA, Hato SV, Lowman DW, et al. Dendritic cell interaction with *Candida albicans* critically depends on N-linked mannan. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(29):20590-9.
35. McAleer WJ, Buynak EB, Maigetter RZ, Wampler DE, Miller WJ, Hilleman MR. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature*. 1984;307(5947):178-80.
36. Stubbs AC, Martin KS, Coeshott C, Skaates SV, Kuritzkes DR, Bellgrau D, et al. Whole recombinant yeast vaccine activates dendritic cells and elicits protective cell-mediated immunity. *Nature medicine*. 2001;7(5):625-9.
37. Franzusoff A, Duke RC, King TH, Lu Y, Rodell TC. Yeasts encoding tumour antigens in cancer immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther*. 2005;5(4):565-75.
38. Wansley EK, Chakraborty M, Hance KW, Bernstein MB, Boehm AL, Guo Z, et al. Vaccination with a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing a tumor antigen breaks immune tolerance and elicits therapeutic antitumor responses. *Clin Cancer Res*. 2008;14(13):4316-25.
39. Habersetzer F, Baumert TF, Stoll-Keller F. GI-5005, a yeast vector vaccine expressing an NS3-core fusion protein for chronic HCV infection. *Curr Opin Mol Ther*. 2009;11(4):456-62.
40. Sheng KC, Pouniotis DS, Wright MD, Tang CK, Lazoura E, Pietersz GA, et al. Mannan derivatives induce phenotypic and functional maturation of mouse dendritic cells. *Immunology*. 2006;118(3):372-83.
41. McKenzie IF, Apostolopoulos V, Lees C, Xing PX, Lofthouse S, Osinski C, et al. Oxidised mannan antigen conjugates preferentially stimulate T1 type immune responses. *Vet Immunol Immunopathol*. 1998;63(1-2):185-90.
42. Stambas J, Pietersz G, McKenzie I, Cheers C. Oxidised mannan as a novel adjuvant inducing mucosal IgA production. *Vaccine*. 2002;20(7-8):1068-78.
43. Katsara M, Yuriev E, Ramsland PA, Tselios T, Deraos G, Lourbopoulos A, et al. Altered peptide ligands of myelin basic protein (MBP87-99) conjugated to reduced mannan modulate immune responses in mice. *Immunology*. 2009;128(4):521-33.
44. Corbacho I, Olivero I, Hernandez LM. A genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* nonessential genes involved in mannosyl phosphate transfer to mannoprotein-linked oligosaccharides. *Fungal Genet Biol*. 2005;42(9):773-90.
45. Dean N. Asparagine-linked glycosylation in the yeast Golgi. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1426(2):309-22.
46. Faille C, Mackenzie DW, Michalski JC, Poulain D. Evaluation of an enzyme immunoassay using neoglycolipids constructed from *Candida albicans* oligomannosides to define the specificity of anti-mannan antibodies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1992;11(5):438-46.

47. Kocourek J, Ballou CE. Method for fingerprinting yeast cell wall mannans. *J Bacteriol.* 1969;100(3):1175-81.
48. Masuko T, Minami A, Iwasaki N, Majima T, Nishimura S, Lee YC. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Anal Biochem.* 2005;339(1):69-72.
49. Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G. Mechanisms of action of adjuvants. *Front Immunol.* 2013;4:114.
50. Constantino J, Gomes C, Falcao A, Cruz MT, Neves BM. Antitumor dendritic cell-based vaccines: lessons from 20 years of clinical trials and future perspectives. *Transl Res.* 2016;168:74-95.
51. Abbas A.K. LAH, Pillai S. . *Cellular and Molecular Immunology.* Elsevier. 2018;9th Edition.
52. Brown GD. Innate Antifungal Immunity: The Key Role of Phagocytes. In: Paul WE, Littman DR, Yokoyama WM, editors. *Annual Review of Immunology, Vol 29.* Annual Review of Immunology. 29:2011. p. 1-21.
53. Gou M, Dai M, Li X, Yang L, Huang M, Wang Y, et al. Preparation of mannan modified anionic PCL-PEG-PCL nanoparticles at one-step for bFGF antigen delivery to improve humoral immunity. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces.* 2008;64(1):135-9.
54. Hunter KW, Gault RA, Berner MD. Preparation of microparticulate beta-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for use in immune potentiation. *Letters in Applied Microbiology.* 2002;35(4):267-71.
55. Ferreira SA, Coutinho PJG, Gama FM. Self-Assembled Nanogel Made of Mannan: Synthesis and Characterization. *Langmuir.* 2010;26(13):11413-20.
56. Ferreira SA, Oslakovic C, Cukalevski R, Frohm B, Dahlback B, Linse S, et al. Biocompatibility of mannan nanogel-safe interaction with plasma proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects.* 2012;1820(7):1043-51.
57. Ferreira SA, Pereira P, Sampaio P, Coutinho PJG, Gama FM. Supramolecular assembled nanogel made of mannan. *Journal of Colloid and Interface Science.* 2011;361(1):97-108.
58. Wu G, Zhou F, Ge L, Liu X, Kong F. Novel Mannan-PEG-PE Modified Bioadhesive PLGA Nanoparticles for Targeted Gene Delivery. *Journal of Nanomaterials.* 2012.
59. Hieu V-Q, Yoo M-K, Jeong H-J, Lee H-J, Muthiah M, Rhee JH, et al. Targeted delivery of mannan-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles to antigen-presenting cells for magnetic resonance-based diagnosis of metastatic lymph nodes in vivo. *Acta Biomaterialia.* 2011;7(11):3935-45.
60. Vu-Quang H, Muthiah M, Kim Y-K, Cho C-S, Namgung R, Kim WJ, et al. Carboxylic mannan-coated iron oxide nanoparticles targeted to immune cells for lymph node-specific MRI in vivo. *Carbohydrate Polymers.* 2012;88(2):780-8.
61. Lu F, Mencia A, Bi L, Taylor A, Yao Y, HogenEsch H. Dendrimer-like alpha-D-glucan nanoparticles activate dendritic cells and are effective vaccine adjuvants. *Journal of Controlled Release.* 2015;204:51-9.

ประวัตินักวิจัย

1. ผศ.ทญ.ดร. พัชรี ฤทธิ์ประจักษ์

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาว พัชรี ฤทธิ์ประจักษ์
(ภาษาอังกฤษ) Patcharee Ritprajak

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำ
ตำแหน่งวิชาการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์

หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
34 ถนนอังรีดูนังต์ ปทุมวัน 10330
โทรศัพท์ 02-218-8680 โทรศัพท์มือถือ 083-056-2854 โทรสาร 02-218-8680
Email : Patcharee.R@chula.ac.th

ประวัติการศึกษา

2545: ปริญญาทันตแพทยศาสตรบัณฑิต คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2551: Ph.D. Tokyo Medical and Dental University ประเทศญี่ปุ่น
2552-2554: Postdoctoral research fellowship, Cutaneous Biology Research Center,
Massachusetts General Hospital/Harvard Medical School, Boston, MA ประเทศสหรัฐอเมริกา

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

ภูมิคุ้มกันวิทยา

ผลงานตีพิมพ์

1. Nguyen TNY, Padungros P, Wongsrisupphakul P, Sa-Ard-Iam N, Mahanonda R, Matangkasombut O, Choo MK, and Ritprajak P. Cell wall mannan of *Candida krusei* mediates dendritic cell apoptosis and orchestrates Th17 polarization via TLR-2/MyD88-dependent pathway. *Sci Rep.* 2018;8(1):17123.

2. Nguyen TNY, Matangkasombut O, and **Ritprajak, P.** Differential dendritic cell responses to cell wall mannan of *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, and *Candida dubliniensis*. *J Oral Sci.* 2018;60(4):557-66.
3. Saengruengrit C, **Ritprajak P***, Wanichwecharungruang S, Sharma A, Salvan G, Zahn DRT, and Insin N. The combined magnetic field and iron oxide-PLGA composite particles: Effective protein antigen delivery and immune stimulation in dendritic cells. *J Colloid Interface Sci.* 2018;520:101-11. (***Co-corresponding author**)
4. Chawalitpong S, Chokchaisiri R, Suksamrarn A, Katayama S, Mitani T, Nakamura S, Athamneh AA, **Ritprajak P**, Leelahavanichkul A, Aeimlapa R, Charoenphandhu N, and Palaga T. Cyperenoic acid suppresses osteoclast differentiation and delays bone loss in a senile osteoporosis mouse model by inhibiting non-canonical NF-kappaB pathway. *Sci Rep.* 2018;8(1):5625.
5. Amornwachirabodee K, Tantimekin N, Pan-In P, Palaga T, Pienpinijtham P, Pipattanaboon C, Sukmanee T, **Ritprajak P**, Charoenpat P, Pitaksajjakul P, Ramasoota P, and Wanichwecharungruang S. Oxidized Carbon Black: Preparation, Characterization and Application in Antibody Delivery across Cell Membrane. *Sci Rep.* 2018;8(1):2489.
6. Injumba W, **Ritprajak P**, Insin N. Size-dependent cytotoxicity and inflammatory responses of PEGylated silica-iron oxide nanocomposite size series. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.* 2017;427:60-6.
7. Ajkidkarn P, **Ritprajak P**, Injumba W, Porntaveetus T, Insin N. Synthesis, characterization, drug release and transdermal delivery studies of magnetic nanocubes coated with biodegradable poly(2-(dimethyl amino)ethyl methacrylate). *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.* 2017;427:235-40.
8. Nedumpun T, Wongyanin P, Sirisereewan C, **Ritprajak P**, Palaga T, Thanawongnuwech R, et al. Interleukin-1 receptor antagonist: an early immunomodulatory cytokine induced by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol.* 2017;98(1):77-88.
9. Hayakawa M, Hayakawa H, Petrova T, **Ritprajak P**, Sutavani RV, Jimenez-Andrade GY, et al. Loss of Functionally Redundant p38 Isoforms in T Cells Enhances Regulatory T Cell Induction. *J Biol Chem.* 2017;292(5):1762-72.
10. Nedumpun T, **Ritprajak P***, Suradhat S. Generation of potent porcine monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) by modified culture protocol. *Vet Immunol Immunopathol.* 2016;182:63-8. (***Corresponding author**)
11. Manokawinchoke J, **Ritprajak P**, Osathanon T, Pavasant P. Estradiol induces osteoprotegerin expression by human dental pulp cells. *Odontology.* 2016;104(1):10-8.
12. **Ritprajak P**, Azuma M. Intrinsic and extrinsic control of expression of the immunoregulatory molecule PD-L1 in epithelial cells and squamous cell carcinoma. *Oral Oncology.* 2015;51(3):221-8.

13. Manokawinchoke J, **Ritprajak P**, Osathanon T, Pavasant P. Estradiol induces osteoprotegerin expression by human dental pulp cells. *Odontology*. 2014.
14. Osathanon T, **Ritprajak P**, Nowwarote N, Manokawinchoke J, Giachelli C, Pavasant P. Surface-bound orientated Jagged-1 enhances osteogenic differentiation of human periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A*. 2013;101(2):358-67.
15. Caballero-Franco C, Choo MK, Sano Y, **Ritprajak P**, Sakurai H, Otsu K, et al. Tuning of Protein Kinase Circuitry by p38 alpha Is Vital for Epithelial Tissue Homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(33):23788-97.
16. **Ritprajak P**, Hayakawa M, Sano Y, Otsu K, Park JM. Cell type-specific targeting dissociates the therapeutic from the adverse effects of protein kinase inhibition in allergic skin disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(23):9089-94.
17. **Ritprajak P**, Hashiguchi M, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Azuma M. Antibodies against B7-DC with differential binding properties exert opposite effects. *Hybridoma (Larchmt)*. 2012;31(1):40-7.
18. Cao YJ, Zhang L, **Ritprajak P**, Tsushima F, Youngnak-Piboonratanakit P, Kamimura Y, et al. Immunoregulatory Molecule B7-H1 (CD274) Contributes to Skin Carcinogenesis. *Cancer Research*. 2011;71(14):4737-41.
19. Cao YJ, Zhang L, Kamimura Y, **Ritprajak P**, Hashiguchi M, Hirose S, et al. B7-H1 Overexpression Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition and Accelerates Carcinogenesis in Skin. *Cancer Research*. 2011;71(4):1235-43.
20. **Ritprajak P**, Hashiguchi M, Tsushima F, Chalermarp N, Azuma M. Keratinocyte-associated B7-H1 directly regulates cutaneous effector CD8+ T cell responses. *J Immunol*. 2010;184(9):4918-25.
21. Kobori H, Hashiguchi M, Piao J, Kato M, **Ritprajak P**, Azuma M. Enhancement of effector CD8+ T-cell function by tumour-associated B7-H3 and modulation of its counter-receptor triggering receptor expressed on myeloid cell-like transcript 2 at tumour sites. *Immunology*. 2010;130(3):363-73.
22. Azuma M, **Ritprajak P**, Hashiguchi M. Topical application of siRNA targeting cutaneous dendritic cells in allergic skin disease. *Methods Mol Biol*. 2010;623:373-81.
23. **Ritprajak P**, Hashiguchi M, Azuma M. Topical application of cream-emulsified CD86 siRNA ameliorates allergic skin disease by targeting cutaneous dendritic cells. *Mol Ther*. 2008;16(7):1323-30.
24. Hashiguchi M, Kobori H, **Ritprajak P**, Kamimura Y, Kozono H, Azuma M. Triggering receptor expressed on myeloid cell-like transcript 2 (TLT-2) is a counter-receptor for B7-H3 and enhances T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(30):10495-500.

2. ผศ.ดร. ภาณุวัฒน์ ผดุงรส

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย)

นายภาณุวัฒน์ ผดุงรส

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ)

Mr. Panuwat Padungros

ตำแหน่งปัจจุบัน

อาจารย์ประจำ

หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก

ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปทุมวัน กทม. 10330

โทรศัพท์ 02-218-7582

โทรสาร 02-254-1309

Email panuwat.p@chula.ac.th

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2542-2546

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 1) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2548-2555

ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เคมีอินทรีย์) Purdue University

ประเทศสหรัฐอเมริกา

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

การสังเคราะห์สารประกอบคาร์โบไฮเดรตด้วยการกรวมวิธีทางเคมีอินทรีย์

การพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบคาร์โบไฮเดรต

ผลงานตีพิมพ์

1. Sriwarom, P.; **Padungros, P.**; Vilaivan, T. Synthesis and DNA/RNA binding properties of conformationally constrained pyrrolidiny PNA with a tetrahydrofuran backbone deriving from deoxyribose *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 7058–7065.

2. Short, K. M.; Wei, A.; **Padungros, P.** Lithium Naphthalenide *e-EROS Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis.* **2014**, 1–6.

3. Chivangkul, T.; Pengprecha, S.; **Padungros, P.**; Siraleartmukul, K.; Prasongsuk, S.; Muangsin, N. Enhanced water-solubility and mucoadhesion of N,N,N-trimethyl-N-gluconate-N-homocysteine thiolactone chitosan *Carbohydr. Polym.* **2014**, *108*, 224–231.

4. **Padungros, P.**; Wei, A. Practical Synthesis of Aromatic Dithiocarbamates *Synth. Commun.* **2014**, *44*, 2336–2343.

5. **Padungros, P.**; Fan, R.-H.; Casselman, M. D.; Cheng, G.; Khatri, H. R.; Wei, A. Synthesis and Reactivity of 4'-Deoxypentenoyl Disaccharides *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 4878–4891.

6. **Padungros, P.**; Alberch, L.; Wei, A. Glycosyl Dithiocarbamates: β -Selective Couplings without Auxiliary Groups *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 2611–2624.

7. **Padungros, P.**; Alberch, L.; Wei, A. Glycal Assembly by the in Situ Generation of Glycosyl Dithiocarbamates *Org. Lett.* **2012**, *14*, 3380–3383.

3. ผศ.ดร. นำพล อินสิน

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ห้อง 1314 อาคารมหามกุฏ
เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

โทรศัพท์: (02)-218-7620

โทรศัพท์มือถือ: (081)-659-9111

โทรสาร: (02)-218-7598

Email: numpon.i@chula.ac.th

ประวัติการศึกษา:

Massachusetts Institute of Technology

Cambridge, MA

Ph.D. in Chemistry (Inorganic Chemistry), กุมภาพันธ์ 2011

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กรุงเทพฯ

วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมี) (เกียรตินิยมอันดับ 1) พฤษภาคม 2003

ประสบการณ์ทำงาน:

อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กุมภาพันธ์ 2011 – ปัจจุบัน

กรุงเทพฯ

ผู้ช่วยวิจัย, Bawendi Research Group, MIT

กันยายน 2004 – พฤศจิกายน 2010

Cambridge, MA

Advisor: Professor Mounji G. Bawendi

รางวัล:

รางวัลประกาศเกียรติคุณ ผลงานประดิษฐ์คิดค้น เนื่องในวันนักประดิษฐ์ ประจำปี 2561 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

ผลงานตีพิมพ์:

1. McKee T.D.; Grandi, P.; Mok, W.; Alexandrakis, G.; Insin, N.; Zimmer, J.P.; Bawendi, M.G.; Boucher, Y.; Breakefield, X.O. and Jain, R.K. Degradation of Fibrillar Collagen in a Human Melanoma Xenograft Improves the Efficacy of an Oncolytic Herpes Simplex Virus Vector. *Cancer Research* **2006**, *66*, 2509-2513.
2. Insin, N.; Tracy, J.B.; Lee, H.; Zimmer, J.P.; Westervelt, R.M. and Bawendi, M.G. Incorporation of Iron Oxide Nanoparticles and Quantum Dots into Silica Microspheres. *ACS Nano* **2008**, *2*, 197-202.
3. Stylianopoulos, T; Poh, M. Z.; Insin, N.; Bawendi, M.G.; Fukumura, D.; Munn, L.L. and Jain, R.K. Diffusion of Particles in the Extracellular Matrix: the Effect of Repulsive Electrostatic Interactions. *Biophysical Journal*, **2010**, *99*, 1342-1349.
4. Popovic, Z.; Liu, W.; Chauhan, V.P.; Lee, J.; Wong, C.; Greytak, A.B.; Insin, N.; Nocera, D.G.; Fukumura, D.; Jain, R.K. and Bawendi, M.G. Nanoparticle size series for *in vivo* imaging, *Angewandte Chemie International Edition*, **2010**, *49*, 8649-8652.
5. Choi, H.S.; Ashitate Y.; Lee, J. H.; Kim, S. H.; Matsui, A.; Insin, N.; Bawendi, M.G.; Semmler-Behnke, M.; Frangioni, J.V.; and Tsuda, A. Rapid Translocation of Nanoparticle from the Lung Airspaces to the Body, *Nature Biotechnology*, **2010**, *28*, 1300-1303.
6. Wei, H.; Insin, N.; Lee, J.; Han, H.-S.; Cordero, J.; Liu, W.; Bawendi, M.; Compact Zwitterion-Coated Iron Oxide Nanoparticles for Biological Applications, *Nano Letter*, **2012**, *12*, 22-25.
7. Yang, B.; Dissayabutra, T.; Ungjaroenwathana, W.; Tosukhowong, P.; Srisa-Art, M.; Supaprom, T.; Insin, N.; and Chanchai, B. Calcium Oxalate Crystallization Index (COCI): an Alternative Method for Distinguishing Nephrolithiasis Patients from Healthy Individuals, *Annals of Clinical & Laboratory Science*, **2014**, *44*, 262-271.
8. Tree-Udom, T.; Seemork, J.; Shigyou, K.; Hamada, T.; Sangphech, N.; Palaga, T.; Insin, N.; Pan-In, P.; and Wanichwecharungruang S. Shape Effect on Particle-Lipid Bilayer Membrane Association, Cellular Uptake, and Cytotoxicity, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2015**, *7*, 23993-24000.
9. Tree-Udom, T.; Thamyongkit, P.; Wiratkasem, N.; Chanchao, C.; Palaga, T.; Insin, N.; Rengpipat, S.; Pienpinijtham, P.; and Wanichwecharungruang, S. Harmonization of upconverting nanocrystals and photosensitizer for antimicrobial application, *RSC Adv.*, **2015**, *5*, 102416-102423
10. Injumba, W.; Ritprajak, P.; Insin, N. Size-dependent Cytotoxicity and Inflammatory Responses of PEGylated Silica-Iron Oxide Nanocomposite Size Series. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **2017**, *427*, 60-66
11. Ajkidkarn, P.; Injumba, W.; Ritprajak, P.; Insin, N. Synthesis, Characterization, Drug Release and Transdental Delivery Studies of Magnetic Nanocubes coated with Biodegradable Poly(2-

(dimethyl amino)ethyl methacrylate). *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **2017**, 427, 54-59

12. Chanhom, P.; Charoenlap, N.; Tomapatanaget, B.; Insin, N. Colloidal titania-silica-iron oxide nanocomposites and the effect from silica thickness on the photocatalytic and bactericidal activities. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **2017**, 427, 235-240

13. Apilux, A.; Siangproh, W.; Insin, N.; Chailapakul, O.; Prachayasittikul, V. Paper-based thioglycolic acid (TGA)-capped CdTe QDs devices for rapid screening test of organophosphorus and carbamate insecticides. *Analytical Methods*, **2017**, 9(3), 519-527

14. Saengruengrit, C.; Ritprajak, P.; Wanichwecharungruang, S.; Sharma, A.; Salvan, G.; Zahn, D.R.T.; Insin, N. The combined magnetic field and iron oxide-PLGA composite particles: Effective protein antigen delivery and immune stimulation in dendritic cells. *Journal of Colloid and Interface Science*, **2018**, 520, 101-111

15. Chanhom, P.; Charoenlap, N.; Manipuntee, C.; Insin, N. Metalloporphyrins-sensitized titania-silica-iron oxide nanocomposites with high photocatalytic and bactericidal activities under visible light irradiation *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **2019**, 475, 602-610

16. Injumba, W.; Khotavivattana, T.; Insin, N. Synthesis of peroxy-functionalized magnetic mesoporous silica for epoxidation of vinyl acetate *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **2019**, 475, 579-585

สิทธิบัตร:

1. Chan, Y.; Zimmer, J.P.; Insin, N.; Tracy, J.B.; and Bawendi, M.G. Microspheres Including Nanoparticles. Patent Cooperation Treaty (PCT) Application Number US0525593, filed July 20, 2005.

2. Liu, W.; Allen, P.; Insin, N.; and Bawendi, M. G. Copolymer-Associated Nanomaterial. U.S. Application Number 12/857,430, filed August 16, 2010

3. Bawendi, M.G.; Han, H.S.; Insin N. and Wei, H. Compact Nanoparticles For Biological Applications US patent No. 9078920, on July 14, 2015

ภาคผนวก

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

| | |
|----------|--------------------|
| br | broad signal |
| δ | chemical shift |
| d | doublet |
| dd | doublet of doublet |

| | |
|----------|-------------------------------|
| DMF | <i>N,N</i> -dimethylformamide |
| dt | doublet of triplet |
| equiv | equivalent |
| ESI | electrospray ionization |
| <i>J</i> | coupling constant |
| m | multiplet |
| m/z | mass-to-charge ratio |
| MS | mass spectrometry |
| DTC | diethyldithiocarbamate |
| NMR | nuclear magnetic resonance |
| o/n | overnight |
| p | para |
| ppm | part per million |
| rt | room temperature |
| s | singlet |
| TLC | thin layer chromatography |