การนำส่งสารต้านออกซิเดชันเข้าสู่เซลล์แมคโครฟาจโดยใช้ลิโพโซม

นางสาวศุภกัญญา ตันตระบัณฑิตย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชกรรม ภาควิชาเภสัชกรรม
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4876608033

CELLULAR DELIVERY OF ANTIOXIDANTS TO MACROPHAGES BY LIPOSOMES

Miss Suphakanya Tantrabundit

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Pharmaceutics
Department of Pharmacy
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2008
Copyright of Chulalongkorn University

512061

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

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

..... Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences

(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Associate Professor Uthai Suvanakoot, Ph.D.)

..... Thesis Principal Advisor

(Assistant Professor Nontima Vardhanabhuti, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor

(Assistant Professor Wacharee Limpanasithikul, Ph.D.)

..... Member

(Associate Professor Nongluksna Sriubolmas, Ph.D.)

..... Member

(Associate Professor Waraporn Suwakul, Ph.D.)

ศุภกัญญา ตันตระบัณฑิตย์: การนำส่งสารต้านออกซิเดชันเข้าสู่เซลล์แมคโครฟาจโดยใช้ลิโพโซม. (CELLULAR DELIVERY OF ANTIOXIDANTS TO MACROPHAGES BY LIPOSOMES) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.นนทิมา วรรธนะภูติ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร.วัชรี ลิมปนสิทธิกุล, 104 หน้า.

แมคโครฟาจเป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในการกำจัดจุลชีพ โดยการกินและการหลั่งสารที่มีพิษต่อเชื้อโรค เช่น ไนตริกออกไซด์และอนุมูลอิสระอื่นๆ การสร้างอนุมูลอิสระที่มากเกินไปทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อของร่างกาย และนำไปสู่การเกิดพยาธิสภาพที่รุนแรงได้ สารต้านออกซิเดชันอาจช่วยบรรเทาปัญหาเหล่านี้ได้ แต่เนื่องจากสารต้านออกซิเดชันมีลักษณะทางเคมีกายภาพที่ไม่เหมาะสมหลายประการ ทำให้การนำสารเหล่านี้เข้าสู่เซลล์แมคโครฟาจโดยตรงทำได้ยาก การศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินว่าลิโพโซมเป็นระบบที่เหมาะสมในการนำส่งสารต้านออกซิเดชันเข้าสู่เซลล์แมคโครฟาจหรือไม่ สารต้านออกซิเดชันที่นำมาใช้ คือ แอลฟา-โทโคเฟอรอลและเอ็น-อะเซททิลซิสเทอีน ซึ่งเป็นสารต้นแบบสำหรับสารที่ไม่ชอบน้ำและสารที่ชอบน้ำตามลำดับ โดยทำการศึกษาผลในการเติมสารต้านออกซิเดชันในลิโพโซมต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์แมคโครฟาจชนิด J774A.1 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโพโพลีแซคคาไรด์ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของส่วนประกอบของลิโพโซมและการใช้ลิพิดที่ให้ประจุลบ 2 ชนิด คือ ไดเซทิลฟอสเฟสและฟอสฟาทิดิลกลีเซอรอลเติมลงในผนังของลิโพโซม ในปริมาณ 10 โมลเปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงเซลล์ J774A.1 ร่วมกับสารต้านออกซิเดชัน ลิโพโซมเปล่า หรือลิโพโซมที่บรรจุสารต้านออกซิเดชัน รวมทั้งการให้สารละลายสารต้านออกซิเดชันร่วมกับลิโพโซมชนิดต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นกระตุ้นเซลล์ด้วยไลโพโพลีแซคคาไรด์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววัดผลการสร้างไนตริกออกไซด์โดยใช้ปฏิกิริยากริสส์ โดยใช้กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยไลโพโพลีแซคคาไรด์เพียงอย่างเดียวเป็นกลุ่มควบคุม แล้วเปรียบเทียบผลยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในแต่ละกลุ่ม พบว่าการมีสารต้านออกซิเดชันไม่ว่าจะอยู่ในลิโพโซม หรืออยู่ร่วมกับลิโพโซมเปล่าไม่ทำให้การยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์เพิ่มขึ้นจากเซลล์ที่ได้รับลิโพโซมเปล่า ในทางตรงกันข้ามการมีสารต้านออกซิเดชันทั้งสองชนิดกลับมีผลลดการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ของลิโพโซมเปล่า ซึ่งทั้งลิโพโซมที่มีประจุลบและไม่มีประจุก็ให้ผลเช่นเดียวกัน นอกจากนี้การบรรจุเอ็น-อะเซททิลซิสเทอีนในลิโพโซมที่มีประจุลบทำให้เกิดพิษอย่างรุนแรงกับเซลล์ แต่การให้เอ็น-อะเซททิลซิสเทอีนกับลิโพโซมเปล่าที่มีประจุลบหรือการให้ลิโพโซมประจุลบที่มีเอ็น-อะเซททิลซิสเทอีนบรรจุอยู่โดยไม่มีเอ็น-อะเซททิลซิสเทอีนอิสระอยู่ภายนอกไม่ทำให้เกิดพิษกับเซลล์ เมื่อศึกษาโดยใช้ลิโพโซมที่มีส่วนประกอบของไดเซทิลฟอสเฟสและสารละลายแคลซีนชี้ให้เห็นว่าลิโพโซมที่ประกอบด้วยไดเซทิลฟอสเฟสที่มีเอ็น-อะเซททิลซิสเทอีนอยู่ภายในอาจทำให้เกิดพิษต่อเซลล์โดยการทำให้เอ็น-อะเซททิลซิสเทอีนอิสระเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้น อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาที่ละเอียดขึ้นเพื่อหากลไกที่แท้จริง จากผลการทดลองโดยรวมชี้ให้เห็นว่า เมื่อใช้ลิโพโซมร่วมกับสารต้านออกซิเดชันอาจทำให้เกิดผลด้านขึ้นเนื่องจากลิโพโซมมีผลในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์อยู่แล้ว ดังนั้นลิโพโซมจึงไม่ใช่ระบบที่ดีในการนำส่งสารต้านออกซิเดชันเข้าสู่เซลล์แมคโครฟาจ

ภาควิชา เภสัชกรรม ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา เภสัชกรรม ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา 2551 ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

4876608033 : MAJOR PHARMACY
KEY WORD: ANTIOXIDANTS / LIPOSOMES / MACROPHAGES / NITRIC OXIDE
SUPHAKANYA TANTRABUNDIT: CELLULAR DELIVERY OF ANTIOXIDANTS TO MACROPHAGES BY LIPOSOMES. THESIS PRINCIPAL ADVISOR: ASST. PROF.NONTIMA VARDHANABHUTI, Ph.D. THESIS COADVISOR: ASST. PROF.WACHAREE LIMPANASITHIKUL, Ph.D., 104 pp.

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

Department: Pharmacy Student's signature: Suphakanya T.
Field of study: Pharmaceutics Principal Advisor's signature: Nontima V.
Academic year: 2008 Co-advisor's signature: Wacharee Li

ACKNOWLEDGEMENTS

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

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

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

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

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

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

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

CONTENTS

Page

ABSTRACT (THAI).....iv

ABSTRACT (ENGLISH).....v

ACKNOWLEDGEMENTS.....vi

CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....ix

LIST OF FIGURES.....x

ABBREVIATIONS.....xii

CHAPTER

I INTRODUCTION.....1

II LITERATURE REVIEW.....6

Activated macrophages in immune response.....6

Antioxidants.....13

Liposomes for macrophage targeting.....16

III MATERIALS AND METHODS.....19

Materials.....19

Equipment.....20

Methods.....22

Maintenance of J774A.1 cells.....22

Determination of optimal cell density and lipopolysaccharide concentration for J774A.1 cell stimulation.....22

Determination of optimal antioxidant concentrations for NO inhibition in LPS-stimulated J774A.1 cells.....23

Preparation of liposomes.....25

Determination of TOC and NAC encapsulation efficiencies in liposomes.....27

Effects of antioxidant/liposome treatments on NO production of J774A.1 cells.....29

Effect of liposomes composition on cellular uptake by J774A.1 cells...31

Effect of NAC-load negatively charged liposomes on cell viability.....32

Page

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

LIST OF TABLES

Table **Page**

1 Some cytokines secreted by activated macrophages.....10

LIST OF FIGURES

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

Figure **Page**

16 Inhibitory effect of TOC-loaded PC/DCP liposomes on NO production in LPS-stimulated J774A.1 cells.....46

17 Inhibitory effect of TOC-loaded PC/PG liposomes on NO production in LPS-stimulated J774A.1 cells..... 46

18 Inhibitory effect of NAC-loaded PC/CH liposomes on NO production in LPS-stimulated J774A.1 cells..... 48

19 Effect of NAC-loaded PC/CH/DCP liposomes on cell viability of J774A.1 cells by MTT assay.....48

20 Effect of NAC-loaded PC/CH/PG liposomes on cell viability of J774A.1 cells by MTT assay..... 49

21 Inhibitory effect of co-incubation with blank PC liposomes and TOC dispersion on NO production in LPS-stimulated J774A.1 cells.....50

22 Inhibitory effect of co-incubation with blank PC/DCP liposomes and TOC dispersion on NO production in LPS-stimulated J774A.1 cells..... ..50

23 Inhibitory effect of co-incubation with blank PC/PG liposomes and TOC dispersion on NO production in LPS-stimulated J774A.1 cells.....51

24 Inhibitory effect of co-incubation with blank PC/CH liposomes and NAC solution on NO production in LPS-stimulated J774A.1 cells 52

25 Inhibitory effect of co-incubation with blank PC/CH/DCP liposomes and NAC solution on NO production in LPS-stimulated J774A.1 cells..... ..52

26 Inhibitory effect of co-incubation with blank PC/CH/PG liposomes and NAC solution on NO production in LPS-stimulated J774A.1 cells..... 53

27 Effect of type of liposomes and contact time on intracellular uptake of calcein in J774A.1 cells..... 54

28 Effect of NAC-loaded PC/CH/DCP liposomes without free NAC on cell viability of J774A.1 cells by MTT assay..... 55

29 Effect of PC/CH/DCP liposomes on intracellular uptake of calcein solution in J774A.1 cells.....56

ABBREVIATIONS

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

RES	reticuloendothelial system
S.D.	standard deviation
TGF-β	transforming growth factor-beta
TLR	Toll-like receptor
TOC	α-tocopherol
TNF-α	tumor necrosis factor-alpha
UV	ultraviolet
μg	microgram
μm	micrometer