ผลของสูตรตำรับต่อการนำส่งโพรพิลไธโอยูราซิลลิโปโซมเข้าสู่เซลล์แมคโครฟาจชนิด ยู-937

นางสาวอุษณา พัวเพิ่มพูลศิริ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชกรรม ภาควิชาเภสัชกรรม
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-1494-7

FORMULATION EFFECTS ON DELIVERY OF PROPYLTHIOURACIL LIPOSOMES TO U-937 MACROPHAGE CELLS

Miss Utsana Puapermpoonsiri

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy
Department of Pharmacy
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2002
ISBN 974-17-1494-7

Thesis Title	Formulation effects on delivery of propylthiouracil liposomes to U-937 macrophage cells
By	Miss Utsana Puapermpoonsiri
Field of study	Pharmacy
Thesis Advisor	Nontima Vardhanabhuti, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph.D.

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

Boonyong Tantisira
.....Dean of Faculty of Pharmaceutical Sciences
(Associate Professor Boonyong Tantisira, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

Porntip Nimmannitya
..... Chairman
(Associate Professor Porntip Nimmannitya, M.Sc. in Pharm.)

N. Vardhanabhuti
..... Thesis Advisor
(Nontima Vardhanabhuti, Ph.D.)

Vimolmas Lipipun
.....Thesis Co-advisor
(Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph.D.)

Surachai Unchern
..... Member
(Assistant Professor Surachai Unchern, Ph.D.)

Wacharee
..... Member
(Assistant Professor Wacharee Limpanasithikul, Ph.D.)

อุษณา พัวเพิ่มพูลศิริ: ผลของสูตรตำรับต่อการนำส่งโพรพิลไธโอยูราซิลลิโปโซมเข้าสู่เซลล์แมคโครฟาจชนิด ยู-937. (FORMULATION EFFECTS ON DELIVERY OF PROPYLTHIOURACIL LIPOSOMES TO U-937 MACROPHAGE CELLS) **อาจารย์ที่ปรึกษา: อ. ดร. นนทิมา วรรธนะภูติ, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: รศ. ดร. วิมลมาศ ลิปิพันธ์, 81 หน้า.** ISBN 974-17-1494-7.

แมคโครฟาจเป็นเซลล์เป้าหมายสำหรับโรคติดเชื้อหลายชนิดเช่น ลิชมาเนียสิสและวัณโรค การลดการทำงานของแมคโครฟาจยังมีประโยชน์ในการรักษาภาวะที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบได้อีกด้วย ดังนั้นการนำส่งยาเข้าสู่แมคโครฟาจโดยตรงจึงมีประโยชน์ทางการรักษา การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาปัจจัยของสูตรตำรับที่ส่งผลต่อบทบาทของลิโปโซมในการเป็นระบบนำยาเข้าสู่แมคโครฟาจโดยใช้โพรพิลไธโอยูราซิลซึ่งมีผลในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์เป็นยาต้นแบบ ลิโปโซมที่ใช้ในการศึกษาเตรียมขึ้นโดยวิธีฟิล์มไฮเดรชันและลดขนาดด้วยการกรองผ่านเมมเบรนที่ทำจากโพลีคาร์บอเนตขนาด 100 นาโนเมตร ได้ทำการศึกษาผลของลิพิดที่ให้ประจุลบที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ ฟอสฟาทิดิลเซอรีน ฟอสฟาทิดิลกลีเซอรอล ไดเซทิลฟอสเฟต และคอเลสเตอรอล โดยใช้ปริมาณของประจุลบและคอเลสเตอรอล 10 และ 30 โมลเปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อนำเซลล์แมคโครฟาจชนิดยู-937 ที่ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตรเลี้ยงร่วมกับลิโปโซมเปล่าและโพรพิล-ไธโอยูราซิลลิโปโซมที่ความเข้มข้นของลิพิดเป็น 0.075 และ 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยไม่เติมและเติมสารละลายโพรพิลไธโอยูราซิล โดยใช้ผลในการยับยั้งการแบ่งเซลล์ที่คิดจากเปอร์เซนต์ของจำนวนเซลล์ทั้งหมดเทียบกับกลุ่มควบคุมเป็นตัวบอกถึงการเข้าสู่เซลล์ของลิโปโซม พบว่าประจุที่ผิวของลิโปโซมไม่ใช่ปัจจัยเดียวที่เป็นตัวกำหนดการเข้าสู่เซลล์ของลิโปโซม การเติมฟอสฟาทิดิลเซอรีน และฟอสฟาทิดิลกลีเซอรอลเพิ่มการยับยั้งการแบ่งเซลล์ในขณะที่ไดเซทิลฟอสเฟตไม่ให้ผลนี้ คอเลสเตอรอลลดความสามารถในการยับยั้งการแบ่งเซลล์ที่เกิดจากลิโปโซมที่มีประจุลบจากฟอสฟาทิดิลเซอรีนแต่ไม่มีผลต่อลิโปโซมชนิดอื่นๆ การกักเก็บโพรพิลไธโอยูราซิลในลิโปโซมไม่เพิ่มผลในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์เมื่อเทียบกับผลที่เกิดจากลิโปโซมเปล่า อย่างไรก็ตามพบการเสริมฤทธิ์ระหว่างลิโปโซมเปล่ากับสารละลายของโพรพิลไธโอยูราซิล การเพิ่มความเข้มข้นของลิโปโซมไม่เพิ่มผลในการยับยั้งการแบ่งเซลล์หรือทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ ยกเว้นในกรณีของลิโปโซมที่เตรียมจากฟอสฟาทิดิลโคลีนและฟอสฟาทิดิลกลีเซอรอลซึ่งพบว่าผลในการยับยั้งการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้น ดังนั้นปัจจัยของสูตรตำรับจึงมีนัยสำคัญในการเปลี่ยนแปลงผลทางชีววิทยาที่เกิดจากลิโปโซม จากการศึกษาเบื้องต้นถึงกลไกในการนำส่งยาของลิโปโซมเข้าสู่เซลล์แมคโครฟาจชนิดยู-937 โดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนต์ดีเควนชิงไม่พบหลักฐานว่าลิโปโซมที่เตรียมจากฟอสฟาทิดิลโคลีนเข้าสู่เซลล์โดยกระบวนการรวมตัวกับผนังเซลล์ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกที่ลิโปโซมมีปฏิสัมพันธ์กับเซลล์ การทราบถึงกลไกดังกล่าวจะให้ความเข้าใจที่ชัดเจนว่าลิโปโซมเพิ่มฤทธิ์ของยาได้อย่างไรและจะมีประโยชน์ในการพัฒนาระบบตัวพาโดยใช้ลิโปโซมต่อไป

ภาควิชา เภสัชกรรม
สาขาวิชา เภสัชกรรม
ปีการศึกษา 2545

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4276614233MAJOR; PHARMACY
KEYWORD: PROPYLTHIOURACIL / LIPOSOMES / DELIVERY / MACROPHAGE

UTSANA PUAPERMPOONSIRI: FORMULATION EFFECTS ON DELIVERY OF PROPYLTHIOURACIL LIPOSOMES TO U-937 MACROPHAGE CELLS. THESIS ADVISOR: NONTIMA VARDHANABHUTI, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. VIMOLMAS LIPIPUN, Ph.D. 81 pp. ISBN 974-17-1494-7.

Macrophages are prominent targets for several intracellular diseases such as leishmaniasis and tuberculosis. Moderation of macrophage functions can also be of therapeutic value in certain inflammatory conditions. Intracellular delivery of drugs to macrophages is thus of therapeutic value. The aim of this study was to explore the effects of formulation factors on role of liposomes as a drug carrier system for macrophages. Propylthiouracil (PTU) which possesses an antiproliferative activity was used as model drug. Liposomes were prepared by film-hydration method followed by extrusion through 100 nm polycarbonate membranes. The effects of three different negatively charged lipids (phosphatidylserine, PS; phosphatidylglycerol, PG; dicetylphosphate, DCP) and cholesterol (CH) were investigated. The negatively-charged lipids and CH were included at 10 and 30 mol%, respectively. Blank and PTU liposomes (0.075 and 0.15 mg/mL total lipid) were incubated with the human monocyte/macrophage U-937 cells (cell density 1 x 10^5 cells/mL) in the absence and presence of additional PTU. The antiproliferative activity, defined as percentage of total cells compared to the control, was used as evidence for liposome uptake. The results suggest that surface charge was not the sole determinant of liposome uptake. Inclusion of PS and PG, but not DCP, increased the antiproliferation of PC liposomes. Inclusion of CH significantly reduced the antiproliferation of PC/PS liposomes, but not other liposomes. Entrapment of PTU in liposomes did not enhance the antiproliferation seen with blank liposomes. However, synergism was observed when blank liposomes were co-administered with PTU solution. Increase in liposome concentrations did not increase the antiproliferation nor show any sign of cytotoxicity for most formulations tested, except for PC/PG where increased antiproliferation was seen. Thus, formulation factors were significant in modifying biological effects introduced by liposomes. Preliminary study by fluorescence dequenching technique showed no evidence that PC liposomes underwent fusion with the U-937 cells. Further study would be necessary to elucidate the mechanisms by which these liposomes interacted with the U-937 cells. Such mechanisms would give insights into how liposomes enhanced drug effects and be helpful in development of liposomal drug carrier systems.

Department Pharmacy
Field of study Pharmacy
Academic year 2002

Student's signature Utsana Puapermpoonsiri
Advisor's signature N. Vardhanabhuti
Co-advisor's signature Vimolmas Lipipun

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere appreciation and gratitude to my advisor, Dr. Nontima Vardhanabhuti, for her guidance, kindness, and encouragement. I deeply admire and respect Dr. Vardhanabhuti as a scientist and a mentor.

I also like to thank Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph.D., my co-advisor, for her guidance, support, and kindness.

I would also like to thank the thesis committee for their valuable suggestions and helpful discussions.

I am deeply thankful to Assistant Professor Chanchai Hosanguan for his contribution in statistical analysis and to Associate Professor Uthai Suvanakoot, Ph.D., for his kind help in gas chromatographic analysis. Also, I would like to acknowledge Dr. Kitti Torrungruang for his assistance in the fluorescence microscopy as well as Assistant Professor. Pimchai Chaiyen, Ph.D., for her support in chromatographic techniques.

Very special thanks go to Drs. Somjin Ratanasathien, Carl T. Hanks, and Russell Taichman for kind provision of the cell lines used in this study.

I am satisfied to thank Drs. Nusara Piyapolrunroj and Wiyada Akarawut for their valuable suggestions and kindness.

My appreciation goes to Rattana Rattanatraiphop, Warisada Sila-On, Yaowaret Sumanon, all my friends, and other persons whose names have not been mentioned for their friendship and valuable help.

Above all, I would like to express my deepest gratitude to my parents for their unconditional encouragement, care, love, and support given to me throughout the years.

I am thankful to Pharmaceutical Biotechnology Research Unit and Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences for the provision of facilities in cell culture experiments.

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

CONTENTS

LIST OF TABLES

TABLE **PAGE**

LIST OF FIGURES

FIGURE **PAGE**

LIST OF FIGURES (Continued)

FIGURE **PAGE**

LIST OF ABBREVIATIONS

a_m	=	molar absorptivity
ANOVA	=	analysis of variance
CF	=	carboxyfluorescein
CH	=	cholesterol
CHEMS	=	cholesteryl hemisuccinate
CL	=	conventional liposome
DCP	=	dicetylphosphate
DDAB	=	dimethyl-dioctadecyl ammonium bromide
DMEM	=	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMRIE	=	1,2-dimyristyloxyethyl ammonium bromide
DOPE	=	dioleoylphosphatidyl ethanolamine
DORIE	=	1,2-dioleyloxypropyl-3-dimethyl-hydroxyethyl ammonium bromide
DOSPA	=	2,3-dioleoyloxy-N-(2(spermine carboxamido)-ethyl)-N,N-dimethyl-1-propanaminium fluoroacetate
DOTAP	=	1,2-dioleoyloxy-3-(trimethylammonio) propane
DOTMA	=	N-{1-(2,3-dioleoyloxy)propyl}-N,N,N-trimethyl ammonium chloride
DPPC	=	dipalmitoyl phosphatidylcholine
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	=	fetal bovine serum
GM1	=	monosialoganglioside
HPI	=	hydrogenated phosphatidylinositol
HSD	=	Tukey's Honestly Significant Difference
LCL	=	long circulating liposome
μg	=	microgram
μm	=	micrometer
μM	=	micromolar
μmol	=	micromole
mg	=	milligram
mL	=	milliliter
mM	=	millimolar
mmol	=	millimole
MW	=	molecular weight

LIST OF ABBREVIATIONS (Continued)

nm	=	nanometer
N	=	normality
OA	=	oleic acid
PA	=	phosphatidic acid
PBS	=	phosphate buffer
PC	=	phosphatidylcholine
PE	=	phosphatidylethanolamine
PEG-DSPE	=	polyethylene glycol conjugated with distearoyl PE
PG	=	phosphatidylglycerol
PS	=	phosphatidylserine
PTU	=	propylthiouracil
RES	=	reticuloendothelial system
S.D.	=	standard deviation
Tc	=	phase transition temperature