

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในหนูกับจักรของเตตานีสท์ออกซอสต์ไมโครแคปซูล  
ที่มีหนึ่งเป็นเลขที่หนังสือและคาร์บอกซีเมทิลไคติน

นาง สุชาดา เนตรสุวรรณ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาดตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาเภสัชกรรม

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2535

ISBN 974-582-020-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018704

117161149

**IMMUNE RESPONSE IN MICE PRODUCED BY LECITHIN AND CARBOXYMETHYL CHITIN  
WALLED TETANUS TOXOID MICROCAPSULES**

**Mrs. Suchada Natesuwon**

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements**

**for the Degree of Master of Education**

**Department of Pharmacy**

**Graduate School**

**Chulalongkorn University**

**1992**

**ISBN 974-582-020-2**

**Copyright of yhe Graduate School, Chulalongkorn University**

Thesis Title : IMMUNE RESPONSE IN MICE PRODUCED BY LECITHIN AND  
CARBOXYMETHYL CHITIN WALLED TETANUS TOXOID  
MICROCAPSULES.

By : Mrs. Suchada Natesuwon

Department : Pharmacy

Thesis Advisor : Associate Professor Ubonthip Nimmannit, Ph.D.

---

Accepted by the Graduate School, Chulalong University in  
Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

*Thanon Vajrabhaya*  
.....Dean of Graduate School  
(Professor Thevorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee

*R. Dhumma-upakorn*  
.....Chairman  
(Associate Professor Rawadee Dhummaupakorn,  
M.Eng. in Nuclear Tech.)

*Ubonthip Nimmannit*  
.....Thesis Advisor  
(Associate Professor Ubonthip Nimmannit, Ph.D.)

*Preeya Atmiyanan* Member  
(Associate Professor Preeya Atmiyanan,  
Docteur en Pharmacie)

*Duangchit Panomvana* Member  
(Associate Professor Duangchit Panomvana Na Ayudhya, Ph.D.)

สุชาดา เนตรสุวรรณ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในหนูถีบจักรของเตตานัสทอกซอยดไมโครแคปซูลที่มีผนังเป็นเลซิทีนและคาร์บอกซีเมทิลไคติน (IMMUNE RESPONSE IN MICE PRODUCED BY LECITHIN AND CARBOXYMETHYL CHITIN WALLED TETANUS TOXOID MICROCAPSULES) อ.ท.ปริกษา : รศ.ดร.อุบลเทพย นิมมานนิตย์, ๑๙๑ หน้า. ISBN 974-582-020-2

ในการเตรียมเตตานัสทอกซอยดไมโครแคปซูลชนิดออกฤทธิ์นานโดยวิธีอันเตอร์เฟซียลโพลีเมอร์เซชัน ใช้เลซิทีนบริสุทธิ์จากไข่แดง และคาร์บอกซีเมทิลไคตินเป็นผนังเมมเบรน ไมโครแคปซูลที่เตรียมขึ้นจะถูกแยกขนาดโดยไซเทกนิกของแรงหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง ทำให้แยกไมโครแคปซูลออกได้เป็น 3 ตำรับคือ A, B และ C ตามลำดับ

ในการเปรียบเทียบความแรงของเตตานัสทอกซอยด ใต้วงหนูถีบจักรออกเป็น 8 กลุ่ม ๆ ละ 140 ตัว ฉีดกระตุ้นด้วยสารละลายฟอสเฟตพีเพอร์ พีเอช 7.4, เตตานัสทอกซอยด(TT), เตตานัสทอกซอยดไมโครแคปซูล เอ(TTMA) เตตานัสทอกซอยดไมโครแคปซูล บี(TTMB), เตตานัสทอกซอยดไมโครแคปซูล ซี(TTMC), ส่วนผสมของ TT และ TTMA, TT และ TTMB, TT และ TTMC ตามลำดับ พบว่า เตตานัสทอกซอยดสามารถป้องกันหนูจากเตตานัสทอกซินไคระหว่างวันที่ 7-90 เท่านั้น ขณะที่เตตานัสทอกซอยดไมโครแคปซูลสามารถป้องกันหนูไคระหว่างวันที่ 15-180 โดยที่ TTMB สามารถป้องกันหนูจากเตตานัสทอกซินไคตที่สุด เมื่อเทียบกับ TTMA และ TTMC

การหาระดับภูมิคุ้มกันในหนูถีบจักรโดยวิธีฮีแมกกลูตินเนชัน (HEMAGGLUTINATION) ซึ่งทำโดยการแบ่งกลุ่มและฉีดกระตุ้นหนูเช่นเดียวกับวิชาความแรง จากผลการทดลองพบว่า ตำรับเตตานัสทอกซอยดเดี่ยว ๆ มีระดับภูมิคุ้มกันสูงเกินกว่า 1.0 ยูนิต คอมิลลิลิตร ระหว่างวันที่ 30-75, ตำรับ TTMA ระหว่างวันที่ 75-120, ตำรับ TTMB ระหว่างวันที่ 30-180 และตำรับ TTMC ระหว่างวันที่ 30-90 เมื่อใช้ส่วนผสมของเตตานัสทอกซอยดกับเตตานัสทอกซอยดไมโครแคปซูลในอัตราส่วน 1:1 ในการฉีดกระตุ้นหนูจักร พบว่าตำรับที่ได้จากส่วนผสมของ TT และ TTMB ให้ผลดีที่สุด ( $P > 0.05$ ) มีระดับภูมิคุ้มกันสูงจนถึงแคว้นที่ 15-180.



ภาควิชา.....เภสัชกรรม.....  
สาขาวิชา.....เภสัชกรรม.....  
ปีการศึกษา.....2535.....

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

## C375118 : MAJOR PHARMACEUTICS

KEY WORD : LECITHIN/CARBOXYMETHYL CHITIN/TETANUS TOXOID/MICROCAPSULES

SUCHADA NATESUWON : IMMUNE RESPONSE IN MICE PRODUCED BY LECITHIN AND CARBOXYMETHYL CHITIN WALLED TETANUS TOXOID MICROCAPSULES. THESIS

ADVISOR : ASSO.PROF.UBONTHIP NIMMANNIT, Ph.D. 191 pp.

ISBN 974-582-020-2

Long acting tetanus toxoid microcapsules were prepared by modified interfacial deposition technique using purified egg yolk lecithin and carboxy methyl chitin as wall materials. The microcapsules were separated by centrifugal technique and the size distribution were divided in to three groups as A,B, and C respectively.

To compare the potency of the tetanus toxoid microcapsules as a long acting tetanus toxoid with a conventional one; eight groups of mice, each group of 140 mice were immunized with 1-8 formular samples: phosphate buffer saline solution pH 7.4 (PBS pH 7.4), tetanus toxoid (TT), tetanus toxoid microcapsule A (TTMA), tetanus toxoid microcapsules B (TTMB), tetanus toxoid microcapsules C (TTMC), mixture of TT and TTMA, mixture of TT and TTMB, mixture of TT and TTMC respectively. Tetanus toxoid could completely protect the mice from tetanus toxin only during day 7-90. The protection by tetanus toxoid microcapsules started from day 15 until 180. TTMB gave the best protection when compared with TTMA and TTMC.

To determine the titers level after immunized with tetanus toxoid preparations, the hemagglutination technique was performed. Eight groups of mice were immunized as same as potency test. The results showed that vaccination with TT alone, the protective levels that higher than 1.0 unit/ml were obtained from day 30 and last long only until day 75. While with TTMA, the level was during day 75-120, and TTMB was during day 30-180, and TTMC was during day 30-90.

Tetanus toxoid and tetanus toxoid microcapsules were mixed by using equal volume and used for immunization. It has been shown that the mixture of TT and TTMB gave the best immune response. ( $P > 0.05$ ) The protective level persisted during day 15-180.

ภาควิชา.....เภสัชกรรม.....

สาขาวิชา.....เภสัชกรรม.....

ปีการศึกษา.....2535.....

ลายมือชื่อนิติ..........

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..........

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

### Acknowledgement

I would like to express my sincere gratitude to my thesis advisor, Associate Professor Dr. Ubonthip Nimmannit for her valuable advises, guidance and encouragement throughout this study. Her patience, kindness and understanding are also deeply appreciated.

A special thank is extended to Associate Professor Supawat Chutiwong, M.D., Ph.D. for permission in using the laboratory section of The Thai Red Cross Society, Science Division.

Greatful appreciation is expressed to Professor Praphan Phanupak M.D., Ph.D. for his valuable advise and gaidance.

Special thanks are expressed to Mrs. Karnchana Leelasiri for providing Standard Tetanus Immunoglobulin.

A special acknowledgement is given to Professor Dr. Tomasu Kondo for providing wall materials for the microcapsules preparations.

A special thank is also extended to Mr. Thamnu Chantorn for providing the tetanus toxoid for this experiment.

Sincere thanks are expressed to Miss Noppawan Janejai, Miss Chanida Pongsanguansin, Miss Bussaba Polpakdee my fellow research students for useful help.

Greatful appreciation is also expressed to all staffs in the Department of Pharmacy, Chulalongkorn University and The Thai Red Cross Society, Science Division and for their assistance.

A special appreciation is also given to the Graduate School, Chulalongkorn University of granting partial financial support to fulfill this investigation.

Finally, the love and encouragement given to me by my parents are invaluable.

## CONTENTS

	Page
Abstract (THAI).....	IV
Abstract (ENGLISH).....	V
ACKNOWLEDGEMENT.....	VI
CONTENTS.....	VII
Index of table.....	VIII
Index of Figure.....	XI
CHAPTER	
I    INTRODUCTION.....	1
PURPOSE OF THE STUDY.....	42
APPLICATION FOR THE STUDY.....	43
II   MATERIALS AND METHODS.....	44
III  RESULTS AND DISCUSSION.....	63
IV   CONCLUSION.....	119
REFERENCES.....	122
APPENDICES.....	132
CURRICULUM VITAE.....	191

## Index of Tables

	Page
Table 1 Equilibrium partition coefficient of Hexamethylene Diamine in organic solvent systems.....	9
Table 2 Wall thickness of oil-containing Gelatin-Gum arabic microcapsules.....	30
Table 3 Contingency table.....	59
Table 4 ANOVA table.....	62
Table 5 The cumulative percentage undersize distribution of TTMA.....	67
Table 6 The cumulative percentage undersize distribution of TTMB.....	68
Table 7 The cumulative percentage undersize distribution of TTMC.....	69
Table 8 No. of survived mice and determination of LD <sub>50/m1</sub> of tetanus toxin.....	75
Table 9 No. of survived mice immunized with TTMA ,TTMB, TTMC, and TT .....	78
Table 10 No. of survived mice immunized with TT+TTMA, TT+TTMB, TT+TTMC, and PBS pH7.4 .....	80
Table 11 No. of survived mice in first month.....	83
Table 12 ANOVA table of survived mice during day 0-30.....	84
Table 13 Pairs of tetanus toxoid preparations that are significantly difference in no. of survived mice during day 0-30.....	85
Table 14 No. of survived mice during day 45-90.....	86
Table 15 ANOVA table of survived mice during day 45-90.....	87



Table 16 No. of survived mice during day 105-180.....	88
Table 17 ANOVA table of survived mice during day 105-180.....	89
Table 18 Pairs of tetanus toxoid preparations that are significantly difference in no. of survived mice during day 105-180.....	90
Table 19 The mean titers in mice that immunized with TT, TTMA, TTMB, and TTMC.....	98
Table 20 The mean titers in mice that immunized with TT+TTMA, TT+TTMB, TT+TTMC and PBSpH 7.4.....	99
Table 21 Mice's titers in first month.....	102
Table 22 ANOVA table of mice'titers during day 0-30.....	103
Table 23 Pairs of tetanus toxoid preparations that are significantly difference in titers level of mice during day 0-30.....	104
Table 24 Mice's titers during day 45-90.....	105
Table 25 ANOVA table if mice's titers during day 45-90.....	106
Table 26 Pairs of tetanus toxoid preparations that are significantly difference in titers of mice during day 45-90.....	107
Table 27 Mice's titers during day 105-180.....	108
Table 28 ANOVA table of mice's titers during day 105-180.....	109
Table 29 Pairs of tetanus toxoid preparations that are significantly difference in titers levels of mice during day 105-180.....	110
Table 30 Space suggest for the routine housing of common laboratory animals.....	133

Table 31 Contingency table of survived mice in first month.....	138
Table 32 Contingency table of survived mice during days 45-90.....	139
Table 33 Contingency table of survived mice during days 105-180....	140
Table 34 ANOVA table of survived mice in first month.....	143
Table 35 ANOVA table of survived mice during days 45-90.....	147
Table 36 ANOVA table of survived mice during days 105-180.....	149
Table 37 Contingency table of mice's titers in first month .....	154
Table 38 Contingency table of mice's titers during days 45-90.....	155
Table 39 Contingency table of mice's titers during days 105-180....	156
Table 40 ANOVA table of mice's titers in first month.....	159
Table 41 ANOVA table of mice's titers during days 45-90.....	164
Table 42 ANOVA table of mice's titers during days 105-180.....	168
Table 43 F-ratio for 0.5 and 0.1 level of significance.....	173
Table 44 Significant Studentized Range for 5 % and 1 % Level New Multiple range test.....	174

## Index of Figures

	Page
Figure 1 Various structure of microcapsules.....	3
Figure 2 Dependence of nonequilibrium partition coefficient of piperazine.....	11
Figure 3 A section of electron micrograph of a negatively- stained multilamellar liposomes.....	14
Figure 4 Chemical structure of phospholipids used to prepare liposomes.....	15
Figure 5 Dihexadecyl dimethyl ammonium chloride.....	16
Figure 6 Assemblies form by lipid amphiphiles.....	17
Figure 7 Carboxymethyl chitin.....	20
Figure 8 Effect of stirring on the size distribution of microcapsules.....	23
Figure 9 Effect of the concentration of sorbitan trioleate on the size distribution of microcapsules at constant stirring..	24
Figure 10 Size distributiion curve of poly(phthaloyl piperazine), poly(hexamethylene sebacomide) and poly(diethyl ether piperazine) microcapsules.....	25
Figure 11 Size distribution curves of poly(diethyl ether piperazine) microcapsules prepared at 30° C and 3 C.....	27
Figure 12 Passive hemagglutination test.....	37
Figure 13 Couple reaction with tyrosyl side chain.....	39
Figure 14 Structure of lecithin and carboxymethyl chitin walled tetanus toxoid microcapsules by interfacial polymerization technique.....	64

Figure 15 The cumulative percent undersizes distribution curves of tetanus toxoid microcapsules.....	70
Figure 16 Scanning electron micrograph of tetanus toxoid microcapsules.....	72
Figure 17 Structure of lecithin.....	73
Figure 18 The comparison between number of survived mice in potency testing of TT, TTMA, and TT+TTMA.....	82
Figure 19 The comparison between number of survived mice in potency testing of TT, TTMB, and TT+TTMB.....	91
Figure 20 The comparison between number of survived mice in potency testing of TT, TTMC, and TT+TTMC.....	93
Figure 21 The comparison between number of survived mice in potency testing of TT, TT+TTMA, TT+TTMB, and TT+TTMC.....	95
Figure 22 The comparison between number of survived mice in potency testing of TTMA, TTMB, and TTMC.....	96
Figure 23 The comparison between titers in mice that immunized with TT, TTMA, and TT+TTMA.....	101
Figure 24 The comparison between titers in mice that immunized with TT, TTMB, and TT+TTMB.....	112
Figure 25 The comparison between titers in mice that immunized with TT, TTMC, and TT+TTMC.....	113
Figure 26 The comparison between titers in mice that immunized with TT+TTMA, TT+TTMB, and TT+TTMC.....	115