Thesis Title Production and Biochemical Characterization of Low Molecular Weight Chitosan Polysulfate

Author Miss Jiraporn Suwan

Degree Doctor of Philosophy (Biochemistry)

Thesis Advisory Commitee

Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert	Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Preeyanat Vongchan	Member
Assoc. Prof. Dr. Siriwan Ongchai	Member
Assit. Prof. Dr. Puttinan Meepowpan	Member
Prof.Dr. Robert J. Linhardt	Member

ABSTRACT

The preparation, and biochemical characterization of low molecular weight chitosan polysulfate (LMWCPS) are investigated herein. The first element of this work involves the preparation and study of its anticoagulation activity. The novel low molecular weight chitosan polysulfate (MW 5,120-20,247 Da) was prepared by the depolymerization of chitosan with papain (EC. 3.4.22.2). Sulfonation of depolymerized products was performed using chlorosulfonic acid in *N,N*-dimethylformamide under semi-heterogeneous conditions. Structures of the products

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

were characterized by FT-IR, ^{1}H NMR, and ^{13}C NMR, respectively. The present study focused on the mechanism of anticoagulant activity of chitosan polysulfate. Anticoagulant activity was investigated by an activated partial thromboplastin assay, thrombin time, prothrombin time, and thromboelastography. Surface plasmon resonance also provided valuable data to understand the relationship between the molecular binding of sulfated chitosan with either antithrombin III and heparin cofactor II, which are both important blood clotting regulators. These results show that the principal mechanism by which this chitosan polysulfate exhibits anticoagulant activity is mediated through heparin cofactor II. Moreover, the interaction depends on the molecular weight of the polysaccharide.

The second part of this work involves the chondroprotective action of LMWCPS. We investigated the effects of LMWCPS on metabolism and gene expression involved in anabolic and catabolic activities of human chondrocyte and synovial fibroblast metabolism in response to interleukin-1η#(IL-1η). Porcine cartilage explants were treated for three days with LMWCPS in the presence or absence of recombinant human IL-1η (rhIL-1η) and tested for released hyaluronan (HA) in culture media and remained uronic acid in explants as a marker of cartilage degradation. Confluent human chondrocyte (chondrosarcomas; SW1353), primary human articular chondrocytes and primary human synovial fibroblasts were treated for 24 h. with LMWCPS in the presence or absence of rhIL-1η. The releasing of HA in the culture medium was measured by ELISA-based assay. Gene expression of HA synthase (HAS) was determined by semi-quantitative RT-PCR. The results showed that LMWCPS inhibited IL-1η enhanced matrix breakdown of the cartilage explants. It suppressed uronic acid loss from the tissue, but had no significant effect on

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

inhibition of the release HA to the medium. LMWCPS significantly increased HAS gene expression, suggesting the ability to enhance anabolic activity.

To address this, we examined the effect of LMWCPS on gene expression of cyclooxygenases (COXs), inducible nitric oxide synthase (iNOS) in human articular chondrocyte and human synovial fibroblast. Our results first demonstrated that LMCPS (>1μg/mL) significantly downregulated IL-1-η induced gene expression of iNOS, COX1, COX2 in human synovial fibroblast, but not human articular chondrocyte. These results suggested that beneficial effect of LMWCPS on arthritis therapy via anti-inflammatory action may be associated with the suppression of COX-2, iNOS mRNA expression in human synovial fibroblast.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การผลิตและการหาลักษณะเฉพาะทางชีวเคมีของไคโตซานพอลิซัลเฟตที่มีขนาดโมเลกุลต่ำ

ผู้เขียน นางสาว จิราภรณ์ สุวรรณ

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ	ประธานกรรมการ
รศ.ดร. ปรียานาถ วงศ์จันทร์	กรรมการ
รศ.ดร. ศิริวรรณ องค์ไชย	กรรมการ
ผศ.ดร. พุฒินันท์ มีเผ่าพันธ์	กรรมการ
Prof.Dr. Robert J.Linhardt	กรรมการ

บทคัดย่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ความสำคัญในผลิตและการหาลักษณะเฉพาะทางชีวเคมีของไคโตซานพอลิซัลเฟต ที่มีขนาดโมเลกุลต่ำ โดยในส่วนแรกของการศึกษามุ่งเน้นที่การสังเคราะห์และการหาลักษณะเฉพาะทางชีวเคมีในการต้านการแข็งตัวของเลือด การผลิตไคโตซานพอลิซัลเฟตที่มีขนาดโมเลกุลต่ำแบบใหม่ ที่มีขนาดตั้งแต่ 5,120-20,247 กิโลดาลตันนั้นอาศัยการลดขนาดสายพอ

ลิเมอร์ของไคโตซานด้วยเอนไซม์ปาเปน (EC.3.4.22.2) จากนั้นดัดแปลงด้วยการเติมหมู่ซัลเฟ ตแบบสุ่ม โดยใช้กรดคลอโรซัลโฟนิกในสารละลายไดเมทิลฟอร์มาไมด์ในสภาวะที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีอินฟราเรดสเปคโตรเมทรี และ ^{1}H NMR ^{13}C NMR การศึกษาครั้งนี้ทำให้เกิดความเข้าใจกลไกยับยั้งการแข็งตัวของเลือดในสารไคโตซานพอลิซัลเฟต ด้วยวิธี แอคติเวทเตดพาร์เชียลธรอมโบพลาสติน (activatedpartialthromboplastin), ธรอมบินไทม์ (thrombin time), โปรธรอมบินไทม์ (prothrombin time) และ ธรอมโบอีลาสโทรกราฟฟี่ (thromboelastrography) และปฏิสัมพันธ์ระหว่างไคโตซานพอลิซัลเฟตที่มีขนาดโมเลกุลต่ำกับโปรตีนสำคัญในกระบวนการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด ได้แก่ แอนตี้ธรอมบินทรี (antithrombin III) และ เฮพารินโคแฟคเตอร์ ทู (Heparin cofactor II) ซึ่งพบว่ากลไกยับยั้งการแข็ งตัวของเลือดของไคโตซานพอลิซัลเฟตที่มีขนาดโมเลกุลต่ำ มาจากการเข้าจับกับ เฮพารินโคแฟคเตอร์ ทู (Heparin cofactor II) และขึ้นอยู่กับขนาดของโมเลกุล

การศึกษา ในส่วนที่สอง มุ่งเน้น การศึกษาลักษณะเฉพาะทางชีวเคมี ของไคโตซานพอลิซัลเฟตที่มีขนาดโมเลกุลต่ำใน การปกป้องกระดูก อ่อนผิวข้อ โดยศึกษาผลของ ไคโตซานพอลิซัลเฟตที่มีขนาดโมเลกุลต่ำ ต่อกระบวนการ เมตาบอลิสมที่ถูกกระตุ้นด้วยอินเตอลิวคิน -1เบต้า (IL-1η0 ในการแสดงออกของยีน เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ สร้างและสลาย ของเซลล์ในเซลล์กระดูก อ่อนผิวข้อ ของมนุษย์ และ เซลล์ สร้างเส้นใยในไขข้อของมนุษย์ ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร อินเตอลิวคิน -1เบต้า ชิ้นกระดูกอ่อนของหมูถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี ในสภาวะที่มีและไม่มีอินเตอลิวคิน -1เบต้า เป็นเวลา 3วัน เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์มาวิเคราะห์ระดับไฮยาลูโรแนนและ วิเคราะห์ระดับยูโรนิคแอซิดที่เหลือในชิ้นกระดูกของหมู เพื่อสังเกตการเสื่อมสลายของชิ้นกระดูก เซลล์มะเร็งกระดูก เซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อของมนุษย์ และ เซลล์สร้างเส้นใยในไขข้อของมนุษย์ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เซลล์ที่มี ไคโตซานพอลิซัลเฟตที่มีขนาดโมเลกุลต่ำ ในสภาวะที่มีและไม่มี กระตุ้นด้วยสาร อินเตอลิวคิน-1เบต้า เป็นเวลา 24ชั่วโมง เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์มาวิเคราะห์ระดับไฮยาลูโรแนนโดยเทคนิค ELISA เซลล์ถูกนำมาสกัดอาร์เอนเอ (RNA) เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนของเอนไซม์สร้างไฮยาลูโรแนน ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR ไคโตซานพอลิซัลเฟตที่มีขนาดโมเลกุลต่ำ ยับยั้งการสลายยูโรนิคแอซิดในชิ้นกระดูกอ่อนของหมูได้แต่ไม่มีผลยับยั้งการปล่อยสารไฮยาลูโรแนนในน้ำเลี้ยงสอดคล้องต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณเอ็มอาร์เอนเอของยีนของเอนไซม์สร้างไฮยาลูโรแนนที่แสดงให้เห็นถึงการส่งเสริมด้านการสร้าง

การศึกษาผลของ ไคโตซานพอลิซัลเฟตที่มีขนาดโมเลกุลต่ำ ต่อการแสดงออกของยีนของเอนไซม์สร้างคอกซ์ (COXs)และ ยีนของเอนไซม์สร้างไนตริกออกไซด์(iNOS) ทดสอบใน เซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อของมนุษย์ และ เซลล์สร้างเส้นใยในไขข้อของมนุษย์ที่มี ไคโตซานพอลิซัลเฟตที่มีขนาดโมเลกุลต่ำ ในสภาวะที่มีและไม่มี กระตุ้นด้วยสาร อินเตอลิวคิน-1เบต้า ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ไคโตซานพอลิซัลเฟตที่มีขนาดโมเลกุลต่ำ ที่ความเข้มข้นมากกว่า 1 σg/mL ไคโตซานพอลิซัลเฟตที่มีขนาดโมเลกุลต่ำสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนดังกล่าวได้เฉพาะในเซลล์สร้างเส้นใยในไขข้อของมนุษย์ แต่ไม่มีผลต่อ เซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อของมนุษย์ จากการศึกษาดังกล่าวก็บ่งชี้ให้เห็นถึงแนวโน้มที่ไคโตซานพอลิซัลเฟตที่มีขนาดโมเลกุลต่ำ เป็นสารปกป้องกระดูก โดยน่าจะผ่านการยับยั้งการอักเสบที่เกี่ยวข้องกับการลดการแสดงออกของยีนสร้างคอกซ์ 2(COX2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved