



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาระบบตัวนำส่งยารูปทรงกลมที่สร้างขึ้นจากดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการนำส่งยาเคมีบำบัด
ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม

DNA nanosphere as a drug delivery system to inhibit growth of breast cancer cells

อ.ดร. อนุตตรา อุดมประเสริฐ

อ.ดร. ธเนศ กังสักรศิลป์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2558A10802359

สัญญาเลขที่ 85/2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาระบบตัวนำส่งยารูปทรงกลมที่สร้างขึ้นจากดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการนำส่งยาเคมีบำบัด
ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม

DNA nanosphere as a drug delivery system to inhibit growth of breast cancer cells

อ.ดร. อนุตตรา อุดมประเสริฐ

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

อ.ดร. ธเนศ กังสักรศิลป์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

กรกฎาคม 2559

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 85/2558

บทคัดย่อ

การรักษาโรคมะเร็งด้วยการใช้ยาเคมีบำบัดเป็นการใช้สารเคมีเพื่อควบคุมหรือยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง อย่างไรก็ตามสารเคมีเหล่านั้นไม่สามารถแยกแยะความแตกต่างระหว่างเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติได้ ทำให้การรักษาด้วยวิธีดังกล่าวมีผลข้างเคียงเกิดขึ้นกับผู้ป่วย นอกจากนี้ยาเคมีบำบัดแต่ละชนิดยังมีคุณสมบัติทางเคมีที่แตกต่างกัน เช่น การละลายน้ำ ความคงตัว ซึ่งส่งผลต่อประสิทธิภาพในการรักษา จึงมีการคิดค้นวิธีในการนำส่งตัวยาไปยังเซลล์มะเร็งเป้าหมายเท่านั้นเพื่อช่วยในการลดปัญหาดังกล่าว รวมถึงลดผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากการใช้ยาเคมีบำบัด วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ เพื่อทำการพัฒนาระบบตัวนำส่งยารูปทรงกลมโดยสร้างขึ้นจากดีเอ็นเอ (DNA sphere) ด้วยเทคนิค DNA origami ซึ่งตัวนำส่งยาดังกล่าวจะมีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเป้าหมายและสามารถควบคุมการปลดปล่อยตัวยาออกสู่ภายนอกเมื่อได้รับการกระตุ้น ทำการออกแบบและสร้างโครงสร้าง DNA sphere แล้วนำโครงสร้างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gel electrophoresis และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope; TEM) จากผลการทดลองพบว่าสามารถสร้างโครงสร้าง DNA sphere ได้ตามที่ออกแบบไว้ นอกจากนี้ทำการวิเคราะห์การปิด-เปิดของโครงสร้าง DNA sphere ด้วยเทคนิค fluorescence resonance energy transfer (FRET) พร้อมทั้งทดสอบการบรรจุภายในตัวนำส่งโดยใช้อนุภาคนาโนของทองคำ (gold nanoparticle; AuNP) เป็นตัวแทนของยาที่จะทำการบรรจุโดยวิเคราะห์ผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ TEM

คำสำคัญ: ดีเอ็นเอโอริกามิ, อนุภาคนาโนของดีเอ็นเอ, ระบบนำส่งยาแบบมีเป้าหมาย, มะเร็งเต้านม

ABSTRACT

Chemotherapy is a medical treatment which chemotherapeutic agents are used to inhibit or destroy cancer cells. These chemotherapeutic drugs can cause some side effects since they could not distinguish between cancer cells and normal cells. Moreover, the efficiency of the treatment partially depends on chemical properties of these drugs, such as solubility and stability of drugs. To reduce some difficulties and side effects of chemotherapeutic agents, a targeted drug delivery system has been developed. The objective of this study is to construct a DNA sphere by DNA origami technique for using as a drug carrier. This nanocarrier is designed to be specific for a breast cancer cell and to be able to trigger release a drug inside the DNA sphere. After design and construction, the DNA sphere was analyzed by gel electrophoresis and transmission electron microscope (TEM). The results showed that the nanosphere was constructed as designed. In addition, open and closed configurations of the DNA sphere were characterized using fluorescence resonance energy transfer (FRET) technique. Also, drug loading was tested by using gold nanoparticle (AuNP) as a drug and then the nanostructure was verified by TEM.

Keywords: DNA origami, DNA nanoparticle, targeted drug delivery, breast cancer

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
บทคัดย่อ	2
ABSTRACT	3
บทนำ	7
วิธีการทดลอง	17
ผลการทดลอง	20
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	26
ข้อเสนอแนะ	28
บรรณานุกรม	29
ภาคผนวก	34
ประวัติคณะผู้วิจัย	40

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 เทคนิคดีเอ็นเอโอริกามิ (DNA Origami)	13
รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ DNA aptamer เพื่อให้ตัวนำส่งยาเปิดออก	15
รูปที่ 3 โครงสร้าง DNA sphere ที่สามารถปิด-เปิดได้เมื่อได้รับการกระตุ้น	20
รูปที่ 4 agarose gel electrophoresis ที่ย้อมด้วย ethidium bromide	21
รูปที่ 5 ภาพถ่ายโครงสร้าง DNA sphere แบบเปิด (open structure) จากกล้องจุลทรรศน์ TEM	21
รูปที่ 6 ภาพถ่ายโครงสร้าง DNA sphere แบบปิด (closed structure) จากกล้องจุลทรรศน์ TEM	22
รูปที่ 7 การทดลองควบคุมกลุ่ม control (ซ้าย) และกลุ่ม only dyes (ขวา) สำหรับการวิเคราะห์สัญญาณ FRET	22
รูปที่ 8 ผลการทดลองการวิเคราะห์สัญญาณ FRET ของกลุ่มการทดลองควบคุม	23
รูปที่ 9 ผลการทดลองการวิเคราะห์สัญญาณ FRET ของโครงสร้าง DNA sphere ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	24
รูปที่ 10 ภาพ DNA sphere ก่อนการบรรจุ AuNP จากกล้องจุลทรรศน์ TEM	25
รูปที่ 11 ภาพ DNA sphere หลังการบรรจุ AuNP จากกล้องจุลทรรศน์ TEM	25

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

DNA	deoxyribonucleic acid
AuNP	gold nanoparticle
TEM	transmission electron microscope
FRET	fluorescence resonance energy transfer
PLGA	poly(lactic-co-glycolic acid)
MNPs	magnetic nanoparticles
SLNs	solid lipid nanoparticles

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

มะเร็งเป็นหนึ่งในโรคร้ายแรงที่คร่าชีวิตผู้คนเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก ทางกระทรวงสาธารณสุขเปิดเผยว่าขณะนี้มีคนตายด้วยโรคมะเร็งเกือบปีละ 8 ล้านคน โดยมีแนวโน้มจำนวนผู้ป่วยและเสียชีวิตจากมะเร็งเพิ่มขึ้นในทุกประเทศ จากข้อมูลของกระทรวงสาธารณสุขยังแสดงให้เห็นว่า ในประเทศไทยนั้นโรคมะเร็งเป็นสาเหตุการตายอันดับ 1 ติดต่อกันมาเป็นเวลาหลายปีแล้วและมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่จำนวนผู้เสียชีวิตจากโรคเบาหวานหรือเอตส์ในปีเดียวกันนั้นมีแนวโน้มลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนผู้เสียชีวิตในปี พ.ศ. 2549 และ พ.ศ. 2553 (สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ กระทรวงสาธารณสุข, 2553) ทั้งนี้โรคมะเร็งที่พบในผู้ป่วยชายมากที่สุด คือ มะเร็งตับและมะเร็งปอด ส่วนโรคมะเร็งที่พบในผู้ป่วยหญิงมากที่สุด คือ มะเร็งเต้านมและมะเร็งปากมดลูก

การเกิดหรือสาเหตุของโรคมะเร็งนั้นยังไม่พบเป็นที่แน่ชัด ซึ่งทั้งนี้เซลล์มะเร็ง คือ เซลล์ที่มีการเจริญที่ผิดไปจากเซลล์ปกติ โดยจะมีการแบ่งตัวที่อยู่เหนือการควบคุมของร่างกาย อีกทั้งยังสามารถรุกรานไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียงหรือแม้กระทั่งแพร่กระจายไปยังส่วนอื่น ๆ ของร่างกายได้ การรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งนั้นสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การผ่าตัด การใช้รังสีบำบัด หรือการใช้เคมีบำบัดขึ้นกับหลาย ๆ ปัจจัยร่วม เช่น บริเวณที่เกิดโรค ระยะของโรคที่ตรวจพบ หรือสภาวะร่างกายของผู้ป่วยเอง เป็นต้น จริง ๆ แล้วคำว่าเคมีบำบัดนั้นหมายความถึงการรักษาโรคด้วยสารเคมี แต่ในปัจจุบันเมื่อพูดถึงการใช้เคมีบำบัด โดยทั่ว ๆ ไปจะหมายความถึงการใช้สารเคมีหรือยาในการรักษาโรคมะเร็ง การใช้เคมีบำบัดนั้นเป็นหนึ่งในวิธีที่นิยมใช้ในการรักษาโรคมะเร็งอย่างมากโดยยาหรือสารเคมีที่ใช้จะเข้าไปควบคุมหรือยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง แต่ในขณะเดียวกันยาหรือสารเคมีที่ใช้นั้นก็ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเซลล์มะเร็งกับเซลล์ปกติได้ ทำให้ส่งผลกระทบต่อเซลล์ร่างกายปกติที่มีการแบ่งตัวเร็วเช่นกัน (Wang, 2012) เช่น เซลล์ในไขกระดูก เซลล์ในเยื่อบุทางเดินอาหาร ผลข้างเคียงที่เกิดจากการใช้ยาเคมีบำบัด เช่น อาการไออย่างรุนแรง คออักเสบ คลื่นไส้ อาเจียน อาจมีเลือดออกที่เหงือก จมูก มีอาการเขียวช้ำ อ่อนเพลีย หรือผมร่วง เป็นต้น (Heath, 2008) โดยอาการต่าง ๆ จะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสภาวะร่างกายของผู้ป่วย ชนิดและปริมาณของยาที่ได้รับ ซึ่งอาการข้างเคียงต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นนั้นเป็นสิ่งที่ทำให้ผู้ป่วยหวาดกลัวไม่ยอมรับการรักษาด้วยวิธีดังกล่าว ทั้งยังทำให้ผู้ป่วยเกิดความท้อแท้ที่จะสู้กับโรคมะเร็ง ยาเคมีบำบัดที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งมีมากกว่า 100 ชนิด แต่ละชนิดก็มีคุณสมบัติทางเคมี ประสิทธิภาพในการรักษา และผลข้างเคียงของยาแตกต่างกันไป นอกเหนือจากปัญหาความเป็นพิษของยาเคมีบำบัดที่มีต่อเซลล์ปกติแล้วยังพบปัญหาด้านอื่น ๆ ของการใช้ยาเคมีบำบัดอีก เช่น ยาเคมีบำบัดส่วนใหญ่ไม่ละลายน้ำ มีความคงตัวต่ำหรืออาจถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็วภายในเซลล์ ทำให้สามารถออกฤทธิ์ได้น้อย หรืออาจก่อให้เกิดการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ ทำให้การรักษาที่เกิดขึ้นไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควรจะเป็น ในปัจจุบันมีงานวิจัยทางการแพทย์จำนวนมากที่ต้องการจะลดปัญหาและผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากการใช้ยาเคมีบำบัดในการรักษาโรคมะเร็งเพื่อให้การรักษาเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด หนึ่งในวิธีการแก้ปัญหาดังกล่าวคือการพยายามคิดค้นวิธีในการนำส่งตัวยาไปยังเซลล์มะเร็งเป้าหมาย ซึ่งวัตถุประสงค์

ของงานวิจัยในครั้งนี้คณะผู้วิจัยต้องการที่จะทำการศึกษาเพื่อพัฒนาระบบตัวนำส่งยาที่สร้างขึ้นจากดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเต้านมเป้าหมาย และสามารถควบคุมการปลดปล่อยยาออกสู่ภายนอกได้เมื่อได้รับการกระตุ้น คณะผู้วิจัยจะทำการออกแบบและสร้างตัวนำส่งยา เพื่อใช้ในการนำส่งยาเคมีบำบัด 5-fluorouracil (5-FU) และ tamoxifen ที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และ MDA-MB-231 ซึ่งผลการวิจัยนี้น่าจะมีส่วนช่วยในการลดผลข้างเคียงและปัญหาต่าง ๆ ในการรักษาโรคมะเร็งที่เกิดจากการใช้ยาเคมีบำบัด นอกเหนือจากนี้ยังช่วยในการป้องกันการถูกทำลายของตัวยาในระหว่างการเดินทางไปยังเซลล์มะเร็งเป้าหมายอีกด้วย ทำให้การรักษาโรคมะเร็งนั้นมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น โดยหากว่างานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ ระบบตัวนำส่งยาที่ได้จะสามารถนำไปดัดแปลงเพื่อใช้ในการนำส่งยาเคมีบำบัดชนิดอื่นเพื่อการรักษาโรคมะเร็งชนิดต่าง ๆ ได้อีกด้วย ทั้งยังสามารถนำไปใช้ในการนำส่งยาหรือโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น siRNA เพื่อการรักษาโรคที่นอกเหนือจากมะเร็ง พร้อมกันนั้นยังสามารถดัดแปลงให้ตัวนำส่งยานี้มีหน้าที่เพิ่มเติมได้มากกว่าการนำส่งยาเพียงอย่างเดียว เช่น การนำเอาโมเลกุลที่จะใช้ในการติดตามคูบริเวนท์ที่พบเซลล์มะเร็งติดไปกับตัวนำส่งยาได้ด้วย

วัตถุประสงค์ของการทดลอง

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อพัฒนาระบบตัวนำส่งยาในการรักษาโรคมะเร็ง โดยการสร้างตัวนำส่งยาที่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเป้าหมาย และสามารถควบคุมการปลดปล่อยยาที่ไปยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ซึ่งคณะผู้วิจัยจะทำการออกแบบและสร้างตัวนำส่งยาจากดีเอ็นเอด้วยเทคนิคดีเอ็นเอออริกามิ (DNA origami) (Rothemund, 2006) ตัวนำส่งยาที่สร้างขึ้นนั้นจะมีลักษณะคล้ายทรงกลมที่สามารถปิด-เปิดได้ตามแนวเส้นผ่านศูนย์กลาง สามารถควบคุมการปิด-เปิดเมื่อได้รับการกระตุ้นจากเซลล์มะเร็งเป้าหมาย (controlled release system)

ขอบเขตของการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ กลุ่มผู้วิจัยจะทำการออกแบบและสร้างระบบตัวนำส่งยาที่สร้างขึ้นจากโมเลกุลดีเอ็นเอเป็นโครงสร้างทรงกลมที่สามารถเปิดออกได้ในแนวเส้นผ่านศูนย์กลาง ทำการวิเคราะห์โครงสร้างที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope; TEM) ทดสอบการปิด-เปิดตัวนำส่งโดยใช้เทคนิค Fluorescence resonance energy transfer (FRET) ทดสอบการบรรจุยาโดยใช้อนุภาคนาโนของทองคำ (gold nanoparticle; AuNP) เป็นตัวแทนของยาที่จะบรรจุภายในตัวนำส่ง วิเคราะห์ผลการทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

ทฤษฎี สมมติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ในปัจจุบันมีการค้นคว้าวิจัยมากมายเพื่อที่จะพัฒนาระบบนำส่งยา (drug delivery system) เนื่องจากพบว่าการรักษาที่ไม่ได้ประสิทธิภาพนั้นอาจเกิดจากการที่ตัวยาไม่สามารถเข้าถึงเซลล์เป้าหมายได้มากเพียงพอ แต่หากเพิ่มปริมาณยาหรือสารเคมีที่จะใช้ในการรักษาก็อาจทำให้เกิดอาการข้างเคียงตามมามากยิ่งขึ้น ซึ่งในบางกรณีอาจทำให้เสียชีวิตได้ มีงานวิจัยทางการแพทย์ที่พยายามหาวิธีเพื่อทำให้การรักษาโรคมะเร็งด้วยยาเคมีบำบัดนั้นมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ไม่ว่าจะเป็นการค้นคว้าหาหรือสารเคมีชนิดใหม่ ๆ ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญหรือทำลายเซลล์มะเร็งแต่ในขณะเดียวกันก็ไม่ทำให้เกิดผลข้างเคียงใด ๆ ต่อเซลล์ปกติ ทั้งนี้การศึกษาวิจัยในลักษณะนี้นั้นทำได้ยากและใช้เวลาในการศึกษาวิจัยค่อนข้างนาน จึงมีการพยายามที่จะหาวิธีในการใช้ยารักษาโรคมะเร็งที่มีอยู่ในปัจจุบันให้ได้ประสิทธิภาพและสามารถลดผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นได้มากที่สุด ทำให้มีการเสนอแนวคิดในการพัฒนาระบบตัวนำส่งยาหรือพาหนะที่จะนำพาตัวยาไปยังเซลล์เป้าหมายเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา โดยยาเคมีบำบัดจะถูกกักเก็บอยู่ภายในโครงสร้างขนาดเล็กหรือที่เรียกว่า ตัวนำส่งยา (drug carriers) ซึ่งสามารถควบคุมการเคลื่อนที่ของตัวนำส่งเพื่อให้เดินทางไปยังเซลล์หรืออวัยวะเป้าหมายเท่านั้น ทำให้การนำส่งยามีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้การที่ตัวยาถูกกักเก็บไว้ภายในตัวนำส่งก็จะช่วยป้องกันไม่ให้ตัวยาถูกทำลายหรือกำจัดออกจากร่างกายโดยระบบภูมิคุ้มกัน (reticuloendothelial system) อีกทั้งยังสามารถออกแบบให้ตัวนำส่งยามีระบบในการควบคุมการปลดปล่อยยาออกสู่ภายนอกเมื่อมีความต้องการ ทำให้ยาสามารถออกฤทธิ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น สามารถนำส่งยาให้เข้าถึงเซลล์เป้าหมายได้มากขึ้น ซึ่งจะช่วยให้ปริมาณยาที่ต้องใช้ลดน้อยลง ทั้งยังช่วยลดความเป็นพิษของยาที่อาจเกิดขึ้นกับเซลล์ปกติ มีการนำวัสดุหลากหลายชนิดมาใช้ในการสร้างตัวนำส่งยา ไม่ว่าจะเป็นสารชีวโมเลกุล เช่น ลิพิด หรือสารสังเคราะห์ เช่น พอลิเมอร์ต่าง ๆ ซึ่งแต่ละชนิดนั้นก็มีความสมบัติ กลไกการทำงาน ข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกันไป อย่างไรก็ตามคุณสมบัติหนึ่งที่สำคัญของวัสดุที่จะนำมาใช้ในการสร้างตัวนำส่งยานั้น คือ ต้องไม่มีความเป็นพิษต่อร่างกาย (biocompatibility) และสามารถย่อยสลายได้โดยไม่ทำให้เกิดการตกค้างอยู่ในร่างกาย (biodegradability)

ดีเอ็นเอเป็นชีวโมเลกุลอีกชนิดหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจนำเอามาประยุกต์ใช้กับงานทางด้านนาโนเทคโนโลยี ซึ่งดีเอ็นเอเป็นโมเลกุลที่มีความสมบัติเฉพาะตัวมากมาย เช่น ขนาดของโมเลกุลอยู่ในระดับนาโนเมตร มีความคงทนในระดับหนึ่ง มีโครงสร้างเฉพาะตัวเป็นเกลียวคู่สองสายที่จับคู่กันอย่างจำเพาะด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสคู่สม (complementary base pairing) ทำให้ดีเอ็นเอมีความสามารถในการประกอบตัวเองขึ้น (self-assembly) เป็นโครงสร้างตามที่มีการออกแบบไว้ได้อย่างแม่นยำ เป็นต้น ปัจจุบันมีการนำดีเอ็นเอนาโนเทคโนโลยี (DNA nanotechnology) มาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในเชิงการแพทย์เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศมหาอำนาจอย่างสหรัฐอเมริกา จีน ญี่ปุ่น หรือประเทศในแถบยุโรปต่างก็ให้ความสนใจและทำการศึกษาวิจัยทางด้านนี้กันอย่างแพร่หลาย คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะนำเอาดีเอ็นเอนาโนเทคโนโลยีเข้ามาใช้ในการสร้างระบบนำส่งยา เนื่องด้วยดีเอ็นเอก็เป็นชีวโมเลกุลชนิดหนึ่งที่พบได้ทั่วไปในร่างกายของสิ่งมีชีวิต ทำให้ตัวนำส่งยาที่สร้างขึ้นจากดีเอ็นเอนั้นไม่น่าจะแสดงความเป็นพิษใด ๆ ต่อร่างกาย

(biocompatibility) และถูกย่อยสลายได้โดยไม่มีการตกค้างอยู่ภายในร่างกาย (biodegradable) ซึ่งเป็นคุณสมบัติสำคัญที่ตัวนำส่งยาที่ดีควรมี โดยจะมีการออกแบบให้ตัวนำส่งยาที่สร้างขึ้นจากดีเอ็นเอนี้สามารถเข้าถึงเซลล์เป้าหมายได้อย่างจำเพาะโดยการดัดแปลงตัวนำส่งด้วย DNA aptamer ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์เป้าหมายและสามารถควบคุมการปลดปล่อยตัวยาออกสู่ภายนอกเมื่อได้รับการกระตุ้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาโรคมะเร็งด้วยวิธีเคมีบำบัดให้ดียิ่งขึ้น พร้อมทั้งช่วยลดผลข้างเคียงของการใช้ยาเคมีบำบัด ทั้งนี้ระบบนำส่งยาดังกล่าวจะสามารถนำไปดัดแปลงเพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็งชนิดอื่น ๆ หรือใช้ในการนำส่งยาและโมเลกุลขนาดเล็กต่าง ๆ เพื่อใช้ในการรักษาโรคอื่น ๆ ได้อีกด้วย นอกเหนือจากนั้นยังสามารถดัดแปลงให้ตัวนำส่งยานี้มีหน้าที่หรือความสามารถอื่นได้อีก เช่น การติดตั้งโมเลกุลที่ใช้ในการติดตามการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งไปกับตัวนำส่งยาดังกล่าว เป็นต้น

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review)

ปัจจุบันมีการนำเอาเทคโนโลยี ซึ่งเป็นการใช้เทคโนโลยีในระดับนาโนเมตร (nanometer scale) เข้ามาใช้ในการแพทย์เพิ่มมากขึ้นหรือที่เรียกกันว่า nanomedicine ไม่ว่าจะเป็นทางด้าน การวินิจฉัยโรค การตรวจรักษา การติดตามผลการรักษา การป้องกันโรค รวมไปถึงการทำความเข้าใจกับลักษณะทางพยาธิสรีรวิทยาของโรคต่าง ๆ (pathophysiology) ทั้งนี้ nanomedicine ยังอาจหมายความรวมถึงการทำให้ตัวยามีความคงตัวอยู่และไม่ถูกกำจัดออกจากร่างกายเร็วเกินไป (sustained delivery of therapeutic agents) การขนส่งยาไปยังเซลล์หรือเนื้อเยื่อเป้าหมายอย่างจำเพาะเจาะจง การขนส่งตัวยาที่ไม่ละลายน้ำ หรือชีวโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ รวมทั้งช่วยลดผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นจากการใช้ยาเคมีบำบัด (Farokhzad, 2009; Shi, 2010; Goldberg, 2007) กล่าวโดยสรุปก็คือ nanomedicine เป็นการนำเอาเทคโนโลยีเข้ามาประยุกต์ใช้เพื่อให้การตรวจวินิจฉัย ป้องกัน และรักษาโรคเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด และจากปัญหาที่พบในการใช้ยาเคมีบำบัดเพื่อรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งดังที่ได้กล่าวไปแล้วนั้น จึงมีผู้เสนอแนวคิดในการออกแบบ nanocarrier หรือตัวนำส่งยาที่มีขนาดเล็กในระดับนาโนเมตรที่จะใช้ในการเก็บกักตัวยาไว้ภายในเพื่อการนำส่งไปยังบริเวณเป้าหมาย ซึ่งนอกจากจะช่วยป้องกันอันตรายที่อาจเกิดขึ้นกับเซลล์ปกติแล้ว ยังสามารถช่วยลดปัญหาในเรื่องของการละลายตัวยาที่ไม่ละลายน้ำ ช่วยลดปัญหาในเรื่องความคงตัวของยา ทำให้ยาไม่ถูกกำจัดหรือทำลายก่อนที่ตัวยาจะเดินทางไปยังเซลล์ที่ต้องการการรักษาเมื่อเทียบกับการใช้ยาโดยไม่มีตัวนำส่ง (free drugs) พร้อมทั้งยังสามารถช่วยให้การนำส่งยาไปยังบริเวณที่ต้องการเกิดขึ้นได้อย่างจำเพาะเจาะจงมากยิ่งขึ้น nanocarriers ที่นำมาใช้สำหรับขนส่งยานั้นได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องด้วยการใช้พาหนะที่เหมาะสมในการขนส่งยามีแนวโน้มว่าจะสามารถทำให้การส่งยามีประสิทธิภาพและสามารถถูกนำเข้าไปในเซลล์ได้ดีขึ้น ซึ่ง nanocarriers ที่มักนำมาใช้ในการขนส่งยาชนิดต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นยาที่เป็นโมเลกุลขนาดเล็ก (small-molecule drugs), เปปไทด์, โปรตีนและกรดนิวคลีอิก มักจะถูกสร้างขึ้นจากลิพิดและพอลิเมอร์ ทั้งนี้มีงานวิจัยเบื้องต้นที่แสดงให้เห็นว่า nanoparticles (NPs) นั้นสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการขนส่งยาและช่วยลดผลข้างเคียงได้ เนื่องจากการขนส่งที่แม่นยำมากขึ้นและยังช่วยให้ตัวยาถูกนำเข้าไปใช้ในเซลล์ได้ดี

ยิ่งขึ้น (Mishra, 2013) นอกเหนือจากนั้นยังมีการรายงานว่า การนำส่งยาโดยผ่านระบบตัวนำส่งยายังอาจช่วยลดปัญหาในการเกิดการดื้อยา (drug resistance) ที่มักพบในการใช้ยาเคมีบำบัดทั่วไปที่เกิดจากการที่เซลล์สร้าง pump ขึ้นที่ผิวเซลล์เพื่อใช้ในการกำจัดยาออกนอกเซลล์ได้ (Heath, 2008; Moorthi, 2011) เนื่องจากตัวนำส่งยาที่ใช้จะถูกรับเข้าสู่เซลล์ผ่านทาง endocytosis ซึ่งจะไม่ต้องผ่าน glycoprotein P ซึ่งเป็น pump ที่อยู่บนผิวเซลล์

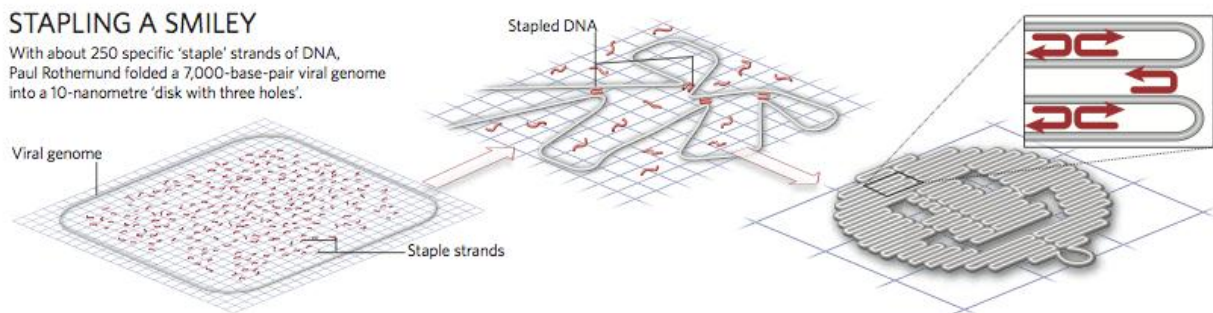
ในปัจจุบันนี้มีการพัฒนา nanocarriers ขึ้นในหลาย ๆ รูปแบบจากวัสดุหลากหลายชนิด โดยตัวนำส่งยาที่ได้รับความนิยมและมีการค้นคว้าวิจัยกันอย่างกว้างขวางมักจะถูกสร้างขึ้นจากลิพิด ได้แก่ ไลโปโซม (liposome) ซึ่งเป็น artificial phospholipid vesicles โดยหลัก ๆ แล้วไลโปโซมจะช่วยในการละลายของตัวยาที่มีปัญหาในการละลายน้ำ ลดปัญหาในการกระจายตัวของยา ทำให้การขนส่งยาเข้าสู่เนื้องอกนั้นเกิดขึ้นได้ดีกว่ายาที่ไม่มีตัวพา (Zamboni, 2005) อย่างไรก็ตามการใช้ไลโปโซมยังมีปัญหาในการเคลื่อนย้ายยาระหว่างตัวนำส่งไปให้กับเซลล์เนื้องอกและการถูกกำจัดออกจากร่างกายอย่างรวดเร็วโดย phagocytes (Chadha, 2008) ทำให้ไลโปโซมไปสะสมที่บริเวณเนื้องอกได้น้อย จึงมีการค้นคว้าเอา polyethylene glycol (PEG) มาปกคลุมที่ผิวด้านนอกของไลโปโซมเพื่อช่วยให้ระยะเวลาในการคงอยู่ในระบบไหลเวียนโลหิต (circulation time) ยาวนานขึ้น และทำให้เกิดการสะสมของยาภายในเนื้องอกได้ดีขึ้น (Khan, 2010) แต่ก็ยังคงพบว่าการใช้ PEG มาปกคลุมที่ผิวด้านนอกของไลโปโซมนั้น ทำให้เกิด steric hindrance ระหว่างตัวนำส่งและเซลล์เนื้องอก ทำให้การที่เนื้องอกจะรับเอาตัวนำส่งยาเข้าไปในเซลล์ (tumor cellular uptake) นั้นลดต่ำลงอย่างมาก นอกเหนือจากนี้ยังมีการนำเอาพอลิเมอร์มาใช้เป็นตัวนำส่งยาเช่นกัน poly(lactic-co-glycolic acid) หรือ PLGA เป็น biocompatible polymer ชนิดหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในระบบการนำส่งยาและ tissue engineering อย่างกว้างขวาง (Chen, 2000) มีศักยภาพในการใช้งานต่าง ๆ ทั้งในการเข้าถึงเป้าหมายแบบจำเพาะ การ imaging การวินิจฉัยโรค และการรักษา (Sahoo, 2003; Acharya, 2011) มีคณะผู้วิจัยได้ทำการค้นคว้าเพื่อสร้างระบบนำส่งยาด้วยอนุภาคนาโน (nanoparticles) ซึ่งประกอบไปด้วยแกนที่เป็น PLGA ซึ่งไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และมีเปลือกหุ้มโดยรอบของแกนเป็น glycol chitosan (GC) ซึ่งมีประจุเป็นบวก เพื่อใช้ในการนำส่งดีเอ็นเอที่บรรจุอยู่ภายในผ่าน transdermal เข้าไปสู่ epidermis โดยใช้ gene gun (Lee, 2010) แต่ข้อเสียของการใช้เทคนิค gene gun bombardment คือการสะสมของอนุภาคทองคำ (gold particles) ที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ในร่างกาย (non-biodegradable) ซึ่งอาจก่อให้เกิดผลเสียในระยะยาวตามมา (Lee, 2008) นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาระบบตัวนำส่งยาโดยนำเอาคุณสมบัติของแม่เหล็กเข้ามาช่วย เรียกว่า magnetic nanoparticles (MNPs) เพื่อใช้ในการควบคุมตัวนำส่งยาให้ไปยังเซลล์เป้าหมายได้อย่างแม่นยำ เช่น อนุภาคนาโนของ superparamagnetic iron oxide (Fe_3O_4) แต่ทั้งนี้ MNPs แสดงความเป็นพิษกับระบบ *in vivo* ทำให้มีข้อจำกัดในการนำไปใช้ในระดับคลินิก (clinical use) (Mattheolabakis, 2012) ในปัจจุบันนี้ยังมีระบบตัวนำส่งยาอีกหลายชนิดที่ได้รับความสนใจและมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เช่น พอลิเมอร์สังเคราะห์ที่สามารถย่อยสลายได้ (synthetic biodegradable polymers) ลิพิด พอลิแซคคาไรด์ (Chadha, 2008) solid lipid nanoparticles (SLNs) (Mattheolabakis, 2012) dendrimers (Chadha, 2008; Mattheolabakis, 2012) หรือ resealed erythrocytes (Jangde, 2011) ถึงแม้ว่าการนำเอาอนุภาคนาโนมา

ใช้เป็นพาหนะในการนำส่งยานั้นจะมีประสิทธิภาพในการนำส่งยาที่สูง แต่ปัญหาหลักที่พบคืออนุภาคนาโนนั้น ไม่มี biocompatibility และยังไม่สามารถที่จะดัดแปลงพื้นผิวด้านนอกของอนุภาคให้มีความหลากหลายทางหน้าที่ (multi-functional activity) ได้มากนัก เช่น การนำเอา bioactive โมเลกุลอื่น ๆ พวกดีเอ็นเอ หรือ โปรตีนมาติดที่ผิวด้านนอกเพื่อใช้ในการระบุถึงเป้าหมายของตัวนำส่งยา เนื่องจากไม่มีหมู่ฟังก์ชัน (functional groups) ที่จะสามารถทำการดัดแปลง (modified) ได้ (Lee, 2010) ถึงแม้ว่าอนุภาคนาโนของโลหะ (metal nanoparticles) ที่ถูกนำมาใช้เป็นพาหนะในการนำส่งยานั้นจะมีความเป็น biocompatibility และ chemically inert แต่ก็สามารถตกค้างอยู่ภายในร่างกายได้นานหลังจากที่ได้รับเข้าไป และการสะสมภายในร่างกายเป็นเวลานานก็อาจจะนำไปสู่ความเป็นพิษ (toxicity) ต่อร่างกายได้เช่นกัน (Wang, 2012)

ทั้งนี้ดีเอ็นเอก็เป็นชีวโมเลกุลชนิดหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจและมีการนำมาใช้ใน งานทางด้านนาโนเทคโนโลยี เกิดเป็นศาสตร์แขนงใหม่ที่มีชื่อเรียกว่า structural DNA nanotechnology โดยเป็นการนำเอา โมเลกุลดีเอ็นเอมาใช้ในการสร้างสิ่งต่าง ๆ ในระดับนาโนเมตรโดยอาศัยความสามารถในการประกอบตัวเอง (self-assembly) ของดีเอ็นเอที่เกิดจากการจับคู่กันอย่างจำเพาะเจาะจงของเบสคู่สม (complementary base pairing) ทำให้สามารถควบคุมและออกแบบการจับกันของดีเอ็นเอสายเดี่ยวเป็นดีเอ็นเอสายคู่ได้ (structural programmability) และเมื่อรวมกับคุณสมบัติอื่น ๆ ของดีเอ็นเอ เช่น การมีปลายเหนียว (sticky-ended cohesion) การเกิด junction การใช้เอนไซม์ที่มีในธรรมชาติต่าง ๆ เช่น ligase และ nuclease ช่วย ในการเชื่อมต่อหรือตัดแต่งโมเลกุลตามต้องการ พร้อมทั้งประยุกต์เข้ากับหลักในการออกแบบโครงสร้าง จะทำให้สามารถออกแบบและสร้างโครงสร้างที่มีความซับซ้อนกว่าโครงสร้างเกลียวคู่ของดีเอ็นเอในธรรมชาติที่มีความแม่นยำในระดับนาโนเมตรได้ (complex DNA nanostructures) นอกจากนั้นโมเลกุลดีเอ็นเอยังมีหมู่ฟังก์ชันที่สามารถทำปฏิกิริยาเพื่อเชื่อมต่อกับชีวโมเลกุลชนิดต่าง ๆ หรืออนุภาคนาโนได้อีกด้วย ทำให้เราสามารถออกแบบและสร้างโครงสร้างที่มีขนาดระดับนาโนเมตรเพื่อใช้ในการนำส่งยาได้อย่างแม่นยำและ เนื่องจากดีเอ็นเอเป็นชีวโมเลกุลที่พบได้ในธรรมชาติ ทำให้ดีเอ็นเอมีคุณสมบัติในด้าน biocompatibility และ biodegradability ซึ่งเป็นหนึ่งในคุณสมบัติที่สำคัญที่ตัวนำส่งยาควรมี เนื่องจากต้องไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษขึ้นในสิ่งมีชีวิต (Schuller, 2011) จากงานวิจัยเมื่อไม่นานมานี้ได้แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างขนาดใหญ่ของดีเอ็นเอ (DNA macromolecules) ไม่แสดงความเป็นพิษใด ๆ ต่อเซลล์ ทั้งยังไม่มีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (immunogenicity) (Jiang, 2012)

ในปี 2006 เมื่อ Rothemund ได้เผยแพร่เทคนิคในการนำเอาดีเอ็นเอมาใช้ในการสร้างโครงสร้างระดับนาโนเมตรขนาดใหญ่ ซึ่งมีชื่อเรียกว่า ดีเอ็นเอโอริกาไม (DNA origami) โดยจะมีดีเอ็นเอสังเคราะห์สายสั้น ๆ ประมาณ 250 เส้นหรือที่เรียกว่า staple strands มาใช้ในการกำหนดการม้วนพับของดีเอ็นเอสายยาว (scaffold strand) ของพลาสมิดดีเอ็นเอ M13mp18 ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่มีความยาวถึง 7,249 เบส (รูปที่ 2) เพื่อให้เกิดเป็นโครงสร้างต่าง ๆ ตามที่มีการออกแบบไว้ (Rothemund, 2006) ซึ่งเทคนิคนี้ได้รับความนิยมอย่างมาก ทำให้เกิดการสร้างสรรค์ทั้งแบบสองมิติและสามมิติจากโมเลกุลดีเอ็นเอมากมาย

หลากหลายรูปแบบ เช่น สี่เหลี่ยม ดาว แผนที่อเมริกาเหนือ กล่องทรงลูกบาศก์ แจกัน รูปทรงกลม และ nanorobot (Rothemund, 2006; Andersen, 2009; Han, 2011; Douglas, 2012)



(<http://www.nature.com/news/2010/100310/pdf/464158a.pdf>)

รูปที่ 1 เทคนิคดีเอ็นเอออริกามิ (DNA Origami)

คุณสมบัติหนึ่งของตัวนำส่งยาที่ดัดนั้นก็คือ ต้องมีความคงตัวหรือเสถียรใน extracellular space และใน cytoplasm ของเซลล์นานเพียงพอที่จะทำงานอย่างที่ถูกกำหนดไว้ (Schuller, 2011) มีรายงานการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าโครงสร้าง DNA origami นั้นจะไม่ถูกทำลายเมื่อบ่มรวมกับ cell lysate (Mei, 2011) หรือเมื่อนำเอาโครงสร้าง DNA origami ไปบ่มรวมกับ endonucleases หลาย ๆ ชนิด เช่น DNase I, T7 endonuclease I, T7 exonuclease, Escherichia coli endonuclease I, Lambda exonuclease, and Msel restriction endonuclease ก็พบว่าโครงสร้าง DNA origami มีความคงตัวสูงกว่า duplex plasmid DNA มาก (Castro, 2011) จากรายงานการวิจัยเมื่อไม่นานมานี้แสดงให้เห็นว่าโครงสร้าง tetrahedral cages ที่สร้างจากดีเอ็นเอมีความเสถียรไม่ถูกทำลายด้วย endonucleases หลายชนิด (Keum, 2009) และยังพบว่าหลังจากเข้าสู่ภายในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammalian cells) แล้วนั้นยังคงรูปร่างลักษณะเดิมได้นานอย่างน้อย 48 ชั่วโมง (Walsh, 2011) อีกทั้งยังสามารถทำหน้าที่เป็นตัวขนส่ง CpG oligonucleotides ซึ่งทำหน้าที่ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Weiner, 1997) ในเซลล์ macrophage-like RAW264.7 ได้อีกด้วย (Li, 2011) นอกจากนั้นยังมีการนำเอาโครงสร้าง RNA hairpins มาใช้ในการกระตุ้นให้เกิด apoptosis ขึ้นภายในเซลล์มะเร็ง (Venkataraman, 2011) หรือสามารถใช้เป็น color-coded labels กับการทดลองแบบ in situ experiments ในเซลล์หลาย ๆ ชนิด (Choi, 2010) Douglas และคณะได้รายงานการสร้าง DNA nanorobot ที่สามารถตอบสนองต่อตัวกระตุ้นที่อยู่บนผิวเซลล์เมมเบรนและเกิดการกระตุ้นให้เปลี่ยนแปลงโครงสร้างแบบมีเงื่อนไข เพื่อใช้ในการนำส่งโมเลกุลโปรตีนที่บรรจุอยู่ภายใน (Douglas, 2012) นอกจากนั้น Chang และคณะได้แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้โครงสร้างระดับนาโนเมตรที่สร้างขึ้นจากดีเอ็นเอ (DNA nanostructure) ในการนำส่งยาเคมีบำบัด doxorubicin โดยใช้ aptamer-conjugated DNA icosahedra ที่แสดงให้เห็นว่าสามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Chang, 2011) ทั้งนี้ก็มีการ

นำโครงสร้าง DNA origami มาใช้ในการนำส่งยา doxorubicin เพื่อยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเช่นกัน (Jiang, 2012)

เนื่องด้วยมีการรายงานว่า ขนาดของตัวนำส่งยาเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการนำส่งยาไปยังเซลล์เป้าหมาย (Gratton, 2008; Champion, 2008; Wang, 2010) จากการศึกษาพบว่าอนุภาคนาโนที่มีขนาด hydrodynamic radius เล็กกว่า 5 นาโนเมตรหรือมีขนาดมวลโมเลกุลน้อยกว่า 50 กิโลดาลตัน (kDa) จะถูกกำจัดออกนอกร่างกายอย่างรวดเร็วผ่านทาง glomerular filtration (Chrastina, 2011) ในขณะที่ตัวนำส่งยาที่มีขนาดใหญ่กว่า 10 นาโนเมตรนั้นจะสามารถหลบเลี่ยงจากการเกิด single-pass renal clearance ได้ (Heath, 2008) นอกจากนี้ตัวนำส่งยาที่มีขนาดเล็กกว่า 100 นาโนเมตร เช่น polymeric micelle จะสามารถเข้าไปสะสมอยู่ที่เนื้องอก (tumor) มากกว่าไลโปโซมที่มีขนาดใหญ่ (Sutton, 2007) แต่ทั้งนี้ตัวนำส่งยาที่มีขนาดใหญ่กว่า 100 นาโนเมตรก็จะทำให้การแทรกซึมผ่านเนื้องอกเกิดขึ้นได้ไม่ดี (Wang, 2012) เพราะฉะนั้นการควบคุมขนาดของตัวนำส่งยาก็มีความสำคัญต่อการที่ร่างกายจะตอบสนองต่อยา (pharmacokinetics), การกระจายตัวของยาภายในเซลล์ (biodistribution), การสะสมของยาในเนื้องอก (tumor accumulation) และการเคลื่อนที่เข้าสู่เนื้องอก (tumor penetration) (Zauner, 2001; Rejman, 2004; Heath, 2008) คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะสร้างระบบตัวนำส่งยาโดยการนำเอาโครงสร้าง DNA origami รูปทรงกลม ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 42 นาโนเมตรที่มีการออกแบบและสร้างโดย Han และคณะ (Han, 2011) มาดัดแปลงเพื่อให้สามารถปิด-เปิดได้บริเวณแนวเส้นผ่านศูนย์กลาง ทั้งนี้เมื่อพิจารณาจากขนาดของตัวนำส่งยาที่เหมาะสม ซึ่งควรต้องมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ระหว่าง 10-100 นาโนเมตร (Heath, 2008; Wang, 2012) แล้วนั้นจึงทำให้เลือกโครงสร้างรูปทรงกลมของ Han เพราะมีขนาดอยู่ในช่วงดังกล่าว

นอกเหนือจากขนาดของตัวนำส่งยาแล้วอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ คือ ประจุบนพื้นผิวของตัวนำส่งยา โดยตัวนำส่งรูปทรงกลมที่จะสร้างขึ้นนี้มีประจุลบเนื่องจากสร้างขึ้นจากโมเลกุลดีเอ็นเอ ถึงแม้ว่าตัวนำส่งยาที่มีประจุบวกจะถูกรับเข้าสู่เซลล์เนื้องอกได้อย่างรวดเร็ว แต่ก็ส่งผลให้มีการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันภายในเซลล์ (Wang, 2012) ทำให้ตัวนำส่งยาที่มีประจุลบหรือเป็นกลางนั้นได้รับความนิยมมากกว่า เมื่อนำมาใช้ในการรักษาในระดับคลินิก (Gratton, 2008) อีกทั้งตัวนำส่งยาที่มีประจุเป็นลบหรือเป็นกลางยังช่วยลดการเกิด nonspecific interaction กับโปรตีนหรือเซลล์ต่าง ๆ ได้อีกด้วย (Heath, 2008)

ตัวนำส่งยาบางชนิดถูกออกแบบให้มีระบบในการควบคุมการปลดปล่อยยา (controlled release) ซึ่งอาจอาศัยการทำลายพันธะเคมี (cleavage of a chemical bond) ระหว่างตัวนำส่งและยาโดยวิธีต่าง ๆ เช่น (i) hydrolysis (ii) เอนไซม์ที่อยู่ภายในและภายนอกเซลล์ หรือ (iii) เอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์เท่านั้น (Heath, 2008) อัตราการปลดปล่อยยาออกจากอนุภาคนาโนของพอลิเมอร์ (polymeric nanoparticles) นั้นขึ้นกับหลาย ๆ ปัจจัย เช่น การแพร่ของยาผ่าน nanoparticle matrix ออกไปด้านนอก การย่อยสลายของ nanoparticle matrix (erosion) และการละลายของยา นั่นคือความสามารถในการละลาย การแพร่ และการย่อยสลายดังกล่าวเป็นตัวควบคุมการปลดปล่อยยา (Mattheolabakis, 2012) ระบบการนำส่งยาด้วย

อนุภาคนาโนที่ถูกพัฒนาขึ้นมาในรุ่นแรก ๆ นั้นได้มีการนำมาใช้บ้างแล้ว เช่น Doxil (Ortho Biotech) ซึ่งเป็น PEGylated liposome สำหรับการขนส่งยาเคมีบำบัด doxorubicin แต่ก็พบว่าทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเนื้องอก (anti-tumor activity) เกิดขึ้นได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น เนื่องด้วยการปลดปล่อยตัวยา doxorubicin ออกจากไลโปโซมเป็นไปอย่างเชื่องช้า (Allen, 2005) หรืออาจใช้การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ของสารละลายเป็นตัวกระตุ้นการปลดปล่อยยาออกสู่ภายนอก เช่น Carcel และคณะ นำเอา ยาเคมีบำบัด 5-FU มาเชื่อมต่อกับ silsesquioxane ซึ่งจะสามารถปลดปล่อยยาออกมาได้เมื่อค่า pH ลดต่ำลง แต่จะไม่เกิดการปลดปล่อยยาออกสู่ภายนอกถ้าค่า pH เป็นกลางหรือเบส (Giret, 2013) ในปี 2009 Andersen และคณะได้ทำการสร้างกล่องดีเอ็นเอทรงลูกบาศก์ขึ้นจากดีเอ็นเอด้วยเทคนิค DNA origami ที่สามารถควบคุมการปิด-เปิดของฝาได้ โดยใช้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวเป็นกุญแจที่ใช้ในการเปิดกล่อง (Andersen, 2009) และในปี 2012 ก็มีรายงานการสร้าง logic-gated DNA nanorobot ที่สามารถควบคุมการปิด-เปิดได้ โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนที่อยู่บนผิวเซลล์กับ DNA aptamer ที่ติดอยู่บนตัวนำส่ง (Douglas, 2012) โดยในงานวิจัยครั้งนี้คณะผู้วิจัยจะทำการออกแบบให้ตัวนำส่งยาทรูทงกลมนั้นสามารถปิด-เปิดได้เมื่อได้รับการกระตุ้น ดังเช่นไดอะแกรมในรูปที่ 3 โดยจะใช้ DNA aptamer (เส้นสีน้ำเงิน) ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์ที่สามารถจับกับโปรตีนหรือโมเลกุลขนาดเล็ก (วงกลมสีแดง) ได้อย่างจำเพาะ (Jayasena, 1999) เป็นตัวรับสัญญาณจากโปรตีนที่พบว่ามีการแสดงออกมากผิดปกติในเซลล์มะเร็ง (over-expression) เมื่อไม่ได้รับสัญญาณ DNA aptamer จะจับอยู่กับดีเอ็นเอสายเดี่ยว (เส้นสีส้ม) ที่อยู่บริเวณรอยต่อของตัวนำส่งยาทรูทงกลม เมื่อมีสัญญาณหรือเมื่อพบโปรตีนดังกล่าว จะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสามมิติของ DNA aptamer เพื่อเข้าจับกับโปรตีนนั้น ทำให้ DNA aptamer หลุดออกจากดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เคยจับกันอยู่ ทำให้ตัวนำส่งยาเปิดออก และปลดปล่อยตัวยาออกสู่ภายนอกได้



รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ DNA aptamer เพื่อให้ตัวนำส่งยาเปิดออก (Douglas, 2012)

โดยในการวิจัยครั้งนี้คณะผู้วิจัยเลือกทำการทดสอบระบบตัวนำส่งยาที่สร้างขึ้นกับเซลล์มะเร็งเต้านมสองชนิด คือ MCF-7 และ MDA-MB-231 ซึ่งจากการค้นคว้างานวิจัยที่มีก่อนหน้าพบว่า เซลล์มะเร็งเต้านม

MCF-7 จะมีการแสดงออกของโปรตีน Mucin-1 ที่เยื่อหุ้มเซลล์มากกว่าปกติ ในขณะที่เซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 จะพบการแสดงออกของโปรตีน Mucin-1 ได้น้อยมาก (Croce *et al.*, 2003) ทำให้คณะผู้วิจัยเลือกใช้เซลล์มะเร็งเต้านมทั้งสองชนิดดังกล่าวเป็นโมเดลสำหรับการทดสอบความจำเพาะของระบบตัวนำส่งยาที่สร้างขึ้น ซึ่งน่าจะช่วยให้การนำส่งยาไปยังเซลล์มะเร็งเป้าหมายมีความจำเพาะมากยิ่งขึ้น

ถึงแม้ว่าในปัจจุบันนี้จะเริ่มมีผู้ให้ความสนใจการค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาระบบนำส่งยาเพิ่มมากขึ้น แต่งานวิจัยทางด้านนี้ยังคงอยู่ในระยะเริ่มต้น ยังต้องการการค้นคว้าทดลองและการบูรณาการความรู้ในแขนงวิชาต่าง ๆ เช่น ชีวเคมี เคมี ฟิสิกส์ วัสดุศาสตร์ เกษศาสตร์และการแพทย์ เป็นต้น เพื่อให้สามารถนำไปใช้ได้จริง ทั้งนี้มีการพัฒนาตัวนำส่งยาที่สร้างขึ้นจากวัสดุต่าง ๆ ซึ่งแต่ละชนิดก็มีทั้งข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไปดังที่ได้กล่าวไปบ้างแล้วข้างต้น คณะผู้วิจัยมีความสนใจที่จะนำเอาโมเลกุลดีเอ็นเอมาใช้ในการสร้างตัวนำส่งยาโดยใช้เทคนิค DNA origami เนื่องจากดีเอ็นเอเป็นชีวโมเลกุลชนิดหนึ่งที่พบในธรรมชาติ ดังนั้นจึงไม่มีความเสี่ยงทางด้านสุขภาพ คือสามารถเข้ากันได้ดีกับร่างกายและยังสามารถย่อยสลายได้ภายในร่างกาย (health risk) ไม่เหมือนกับระบบนำส่งยาที่สร้างขึ้นจากอนุภาคโลหะ ทั้งยังไม่มีผลกระทบต่อสุขภาพของโครงสร้างด้านนอกได้อย่างแม่นยำด้วย antibodies หรือเปปไทด์ ซึ่งในงานวิจัยครั้งนี้คณะผู้วิจัยเลือกที่จะใช้ DNA aptamer เพื่อช่วยในการบอกลิงเซลล์เป้าหมายที่ต้องการนำส่งยา เนื่องจากความจำเพาะที่มากกว่าความทนทานที่สูงกว่า และราคาต้นทุนการผลิตที่ถูกกว่าของ DNA aptamer เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ antibodies และเพื่อเป็นการพิสูจน์แนวคิดดังกล่าวนี้คณะผู้วิจัยจึงเลือกที่จะทำการทดสอบในเบื้องต้นนี้กับการนำส่งยาเคมีบำบัด 5-FU และ tamoxifen ที่ใช้ในการรักษามะเร็งเต้านม โดยจะใช้เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และ MDA-MB-231 เป็นเซลล์มะเร็งเป้าหมายที่จะใช้ในการทดสอบ โดย DNA aptamer ที่ใช้นั้นจะมีความจำเพาะต่อโปรตีนที่พบมากเป็นพิเศษบนผิวของเซลล์มะเร็งเป้าหมายและในขณะเดียวกันก็ยังทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการปิด-เปิดของตัวนำส่งเพื่อปล่อยยาออกสู่ภายนอกอีกด้วย ซึ่งถ้าหากว่าการพัฒนาตัวนำส่งยานี้ประสบความสำเร็จจะสามารถดัดแปลงตัวนำส่งยานี้ให้มีความจำเพาะและใช้ในการรักษาโรคมะเร็งชนิดอื่น ๆ ได้อีกด้วย ทั้งยังสามารถนำส่งยาหรือโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น siRNA เพื่อใช้ในการรักษาโรคอื่น ๆ ได้เช่นกัน นอกเหนือจากนั้นตัวนำส่งยานี้ยังสามารถนำไปใช้ในการวิจัยต่อยอดเพื่อให้มีความสามารถหรือหน้าที่อื่น ๆ ที่มากกว่าการนำส่งยา เช่น การติดโมเลกุลที่จะใช้ในการติดตามดูบริเวณที่พบเซลล์มะเร็ง เป็นต้น

วิธีการทดลอง

การทำงานวิจัยในครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาระบบนำส่งยาที่สร้างขึ้นจากดีเอ็นเอไปยังเซลล์มะเร็งเป้าหมาย โดยจะเริ่มจากการออกแบบตัวนำส่งยา การสร้างและวิเคราะห์ตัวนำส่งยา การทดสอบการปิด-เปิดตัวนำส่งยา และการทดสอบการบรรจุยาภายในตัวนำส่งโดยใช้อนุภาคนาโนของทองคำ (gold nanoparticle; AuNP) เป็นตัวแทนของยาที่จะทำการบรรจุ

(1) การออกแบบตัวนำส่งยา

ทำการออกแบบตัวนำส่งยาโดยนำเอาโครงสร้าง DNA origami รูปทรงกลม (DNA sphere) ที่มีกรายงานรูปแบบการเกิด crossover ของ staple strand เพื่อยึด scaffold ให้เกิดเป็นโครงสร้าง sphere ไว้แล้ว (Han, 2011) มาทำการ align ลำดับเบสของ M13 ลงไปใหม่ เพื่อให้ได้ลำดับเบสของ staple strand ที่จะนำไปสังเคราะห์ต่อไป (ภาคผนวก)

ทำการออกแบบระบบที่จะใช้ในการเปิด-ปิดโครงสร้าง DNA sphere บริเวณรอยต่อตามแนวเส้นผ่านศูนย์กลาง โดยใช้ DNA aptamer เป็นตัวล็อก ซึ่ง aptamer ดังกล่าวจะสามารถตอบสนองต่อโปรตีนที่อยู่บนผิวของเซลล์มะเร็ง เพื่อใช้ในการควบคุมโครงสร้าง DNA sphere ให้เปิดหรือปิด

(2) การสร้างตัวนำส่งยา

ทำการสั่งซื้อพลาสมิดดีเอ็นเอ M13 (Bayou Biolab, USA) เพื่อใช้เป็น scaffold และสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (IDT DNA, Singapore) เพื่อใช้เป็น staple strands ตามที่ได้ออกแบบไว้ ทำการสร้างตัวนำส่งโดยนำดีเอ็นเอที่เป็นองค์ประกอบทั้งหมดนั้นมาใส่รวมกันในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE/Mg²⁺ (40 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM acetic acid, 2 mM EDTA, 12.5 mM magnesium acetate) โดยใช้อัตราส่วนของ M13 ต่อ staple strands เท่ากับ 1:1 1:2 และ 1:5 เพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสม แล้วนำไปใส่ในเครื่อง thermocycler เพื่อทำการ anneal โดยใช้อุณหภูมิและระยะเวลาดังนี้ ลดอุณหภูมิจาก 68 °C ไปยัง 25 °C ด้วยอัตราเร็วเท่ากับ 0.6 °C ต่อนาที หลังจากนั้นลดอุณหภูมิจาก 25 °C ไปยัง 4 °C ด้วยอัตราเร็วเท่ากับ 1 °C ต่อนาที

(3) การวิเคราะห์ตัวนำส่งยาด้วยเทคนิค gel electrophoresis

ทำการเตรียม DNA sphere ที่ความเข้มข้น 10 nM โดยอัตราส่วนระหว่าง M13 : staple strand เท่ากับ 1:2 นำโครงสร้างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 1.5% agarose gel ใช้กระแสไฟฟ้า 70 โวลต์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำเจลที่ได้ไปย้อมด้วย ethidium bromide

(4) การวิเคราะห์ตัวนำส่งยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ TEM

ทำการเตรียม DNA sphere ที่ความเข้มข้น 10 nM โดยอัตราส่วนระหว่าง M13 : staple strand เท่ากับ 1:2 นำโครงสร้างที่ได้ไปหยดลงบน negatively-glow discharged carbon-coated grid เป็นเวลา 3 นาที แล้วย้อมสีด้วย 0.7% uranyl acetate ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ TEM รุ่น FEI Tecnai G2 TWIN ที่ 120 kV และถ่ายภาพด้วยกล้องถ่ายภาพแบบ CCD

(5) การวิเคราะห์ตัวนำส่งยาด้วยเทคนิค fluorescence resonance energy transfer (FRET)

สำหรับการทดลองควบคุมทั้งสองกลุ่ม ทำการ anneal ดีเอ็นเอเองค์ประกอบทั้งหมด ที่ความเข้มข้น 100 nM ด้วยเครื่อง thermocycler โดยใช้อุณหภูมิและระยะเวลาดังนี้ ลดอุณหภูมิจาก 68 °C ไปยัง 25 °C ด้วยอัตราเร็วเท่ากับ 0.6 °C ต่อนาที หลังจากนั้นลดอุณหภูมิจาก 25 °C ไปยัง 4 °C ด้วยอัตราเร็วเท่ากับ 1 °C ต่อนาที ก่อนนำไปตรวจวัดสัญญาณ FRET ด้วยเครื่อง spectrofluorimeter ทำการกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 520 nm และติดตามการเรืองแสงที่ความยาวคลื่น 540-800 nm ใช้ slid width เท่ากับ 10 nm

ทำการเตรียม DNA sphere ที่ความเข้มข้น 25 nM โดยอัตราส่วนระหว่าง M13 : staple strand เท่ากับ 1:2 พร้อมด้วย DNA สายเดี่ยวที่ติดอยู่กับ Cy3 และ Cy5 โดยการ annealing ในเครื่อง thermocycler เช่นเดียวกับการเตรียมกลุ่มควบคุมในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE/Mg²⁺ (40 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM acetic acid, 2 mM EDTA, 12.5 mM magnesium acetate) หลังจากนั้นทำบริสุทธิ์โครงสร้างที่ได้ด้วย Amicon Ultra-0.5 mL ก่อนนำไปตรวจวัดสัญญาณ FRET ด้วยเครื่อง spectrofluorimeter ทำการกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 520 nm และติดตามการเรืองแสงที่ความยาวคลื่น 540-800 nm ใช้ slid width เท่ากับ 10 nm

(6) การเตรียม ssDNA-modified AuNP

ทำการเตรียม ssDNA-modified AuNP โดยเริ่มจากใช้ 200 μM thiolated ssDNA (5' HS-TTTTT 3') 6 μL เติมลงในสารละลาย AuNP (Ted Pella, USA) 100 μL เขย่าด้วย vortex เป็นเวลา 2 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม 5.5 M NaCl จนได้ความเข้มข้นเกลือเท่ากับ 0.11 M นำสารละลายที่ได้ไป vortex แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมงก่อนนำไปเติมสารละลาย NaCl เพื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.52 M หลังจากตั้งสารละลายที่ได้ที่อุณหภูมิห้องต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงด้วย Optima Max-XP benchtop ultracentrifuge ที่ความเร็ว 21600 r/min เป็นเวลา 15 นาที โดยใช้ Beckman Coulter Konical vial เพื่อเก็บแยกอนุภาค ssDNA-modified AuNP เติมน้ำกลั่นลงไปแทนที่ปริมาตรของของเหลวที่ถูกแยกออกไป

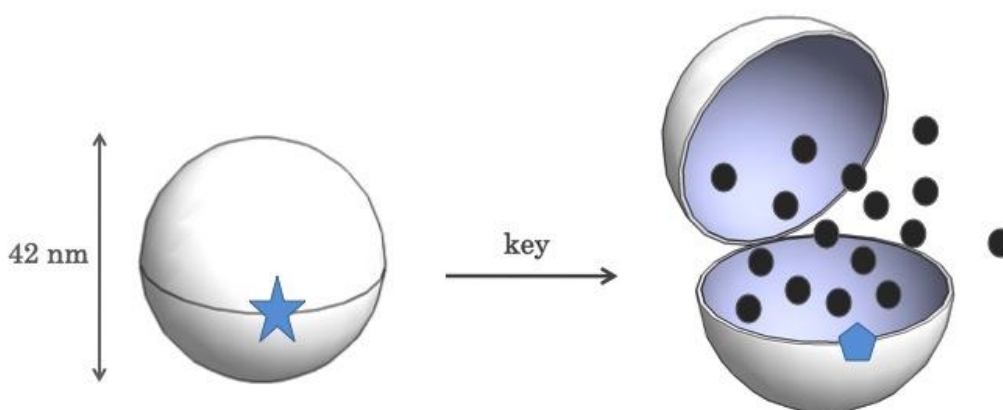
(7) การทดสอบการบรรจุภายในตัวนำส่ง

ทำการทดสอบการบรรจุ ssDNA-modified AuNP ลงใน DNA sphere โดยทำการ anneal โครงสร้าง DNA sphere 10 nM ในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE/Mg²⁺ (40 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM acetic acid, 2 mM EDTA, 12.5 mM magnesium acetate) ร่วมกับ ssDNA-modified AuNP ด้วยเครื่อง thermocycler โดยใช้อุณหภูมิและระยะเวลาดังนี้ ลดอุณหภูมิจาก 68 °C ไปยัง 25 °C ด้วยอัตราเร็วเท่ากับ 0.6 °C ต่อนาที หลังจากนั้นลดอุณหภูมิจาก 25 °C ไปยัง 4 °C ด้วยอัตราเร็วเท่ากับ 1 °C ต่อนาที ก่อนนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ TEM

ผลการทดลอง

(1) การออกแบบตัวนำส่งยา

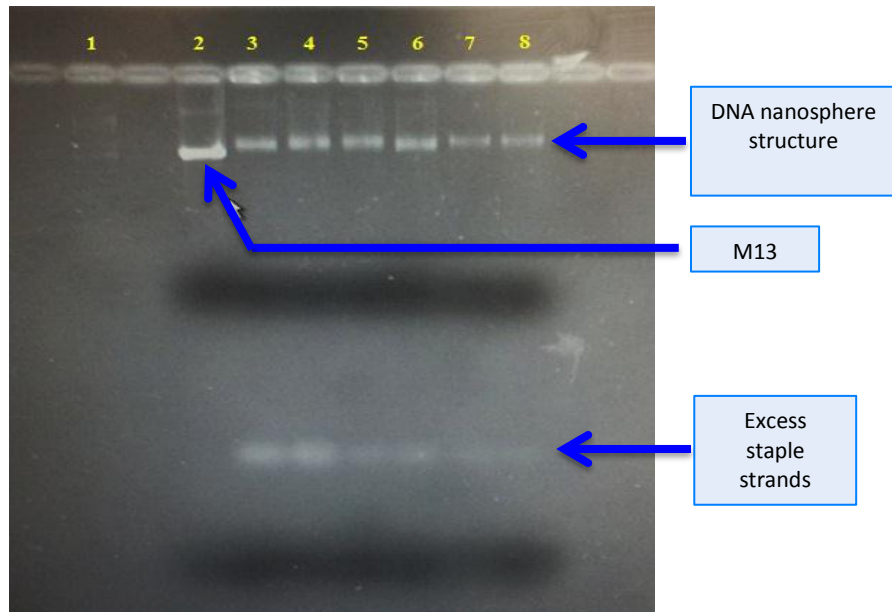
โครงสร้าง DNA origami รูปทรงกลม (DNA sphere) ที่สามารถปิด-เปิดได้ตรงบริเวณรอยต่อตามแนวเส้นผ่านศูนย์กลาง ดังรูปที่ 3 ซึ่งใช้รูปแบบในการ crossover ของ staple strands ตามแบบของ Han และคณะ (Han, 2011) เมื่อทำการ align ลำดับเบสของ M13 ลงไปใหม่ จะทำให้ได้ลำดับเบสของ staple strands ชุดใหม่ที่จะใช้ในการสร้างโครงสร้างดังกล่าว ดังแสดงในภาคผนวก นอกจากนี้ ในการควบคุมการปิด-เปิด ออกแบบให้ใช้ MUC-1 aptamer ซึ่งเป็น DNA aptamer ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน Mucin-1 เป็นตัวควบคุมการปิด-เปิด เพื่อให้ตัวนำส่งยานี้ตอบสนองต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 เท่านั้น แต่จะไม่ตอบสนองต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 เนื่องด้วยความแตกต่างของการแสดงออกของโปรตีน Mucin-1 ของเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งสองชนิด (Croce *et al.*, 2003)



รูปที่ 3 โครงสร้าง DNA sphere ที่สามารถปิด-เปิดได้เมื่อได้รับการกระตุ้น

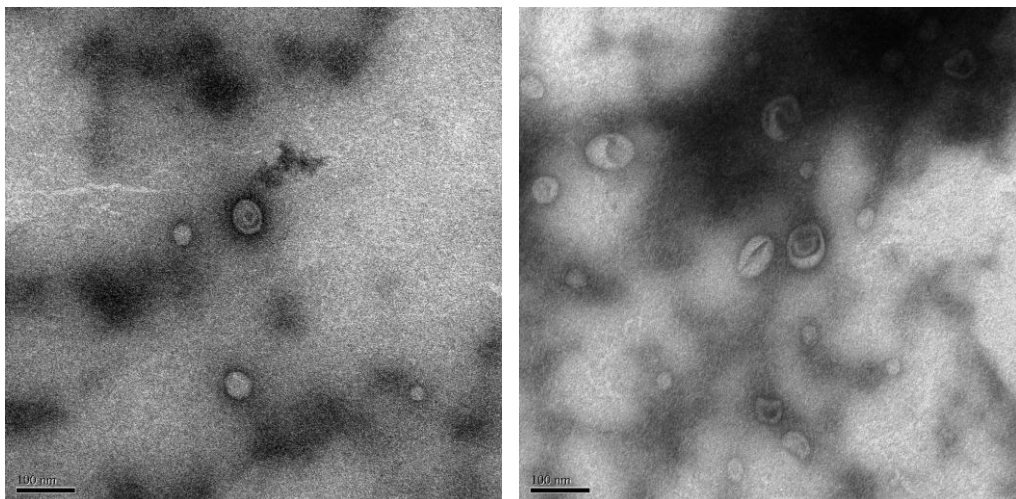
(2) การสร้างและวิเคราะห์ตัวนำส่งยา

หลังจากทำการสร้างโครงสร้าง DNA sphere โดยการ annealing ในเครื่อง thermocycler แล้ว นำโครงสร้าง DNA sphere ที่ได้เมื่อใช้อัตราส่วนของ M13 ต่อ staple strands ต่าง ๆ กัน ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 1.5% agarose gel ใช้กระแสไฟฟ้า 70 โวลต์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำเจลที่ได้ไปย้อมด้วย ethidium bromide ได้ผลการทดลอง ดังรูปที่ 4

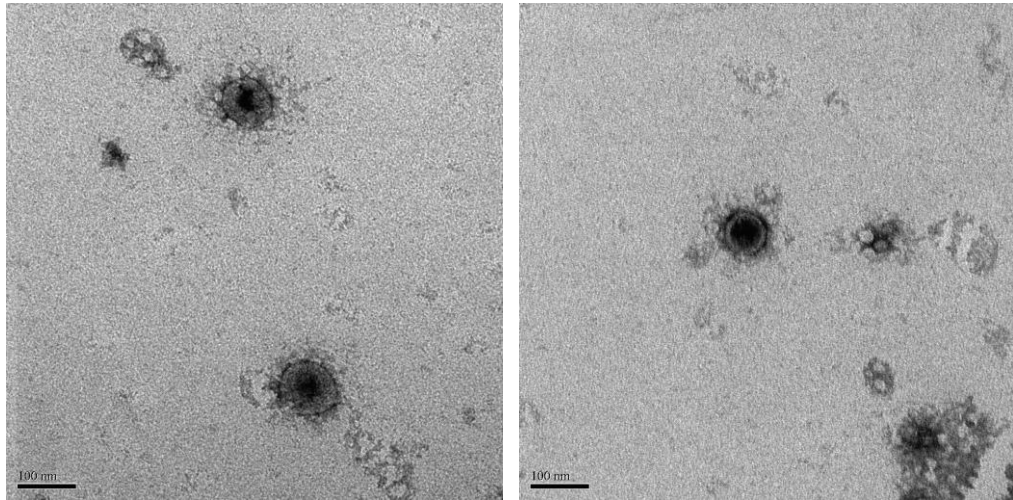


รูปที่ 4 agarose gel electrophoresis ที่ย้อมด้วย ethidium bromide (lane 1 – 1kb DNA ladder; lane 2 – M13; lane 3 – open sphere at 1:5 ratio; lane 4 – closed sphere at 1:5 ratio; lane 5 – open sphere at 1:2 ratio, lane 6 – closed sphere at 1:2 ratio; lane 7 – open sphere at 1:1 ratio and lane 8 – closed sphere at 1:1 ratio)

ผลการวิเคราะห์โครงสร้าง DNA sphere ที่สร้างขึ้นด้วยกล้องจุลทรรศน์ TEM ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 5 และ 6



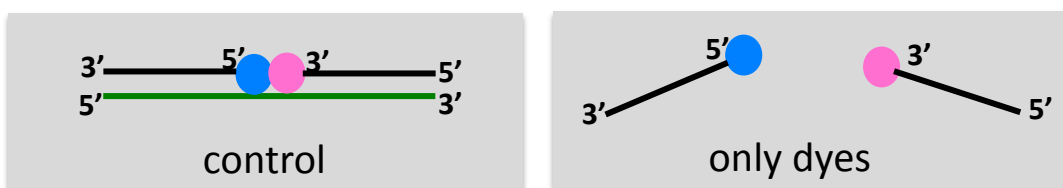
รูปที่ 5 ภาพถ่ายโครงสร้าง DNA sphere แบบเปิด (open structure) จากกล้องจุลทรรศน์ TEM (กำลังขยาย 25,000 เท่า)



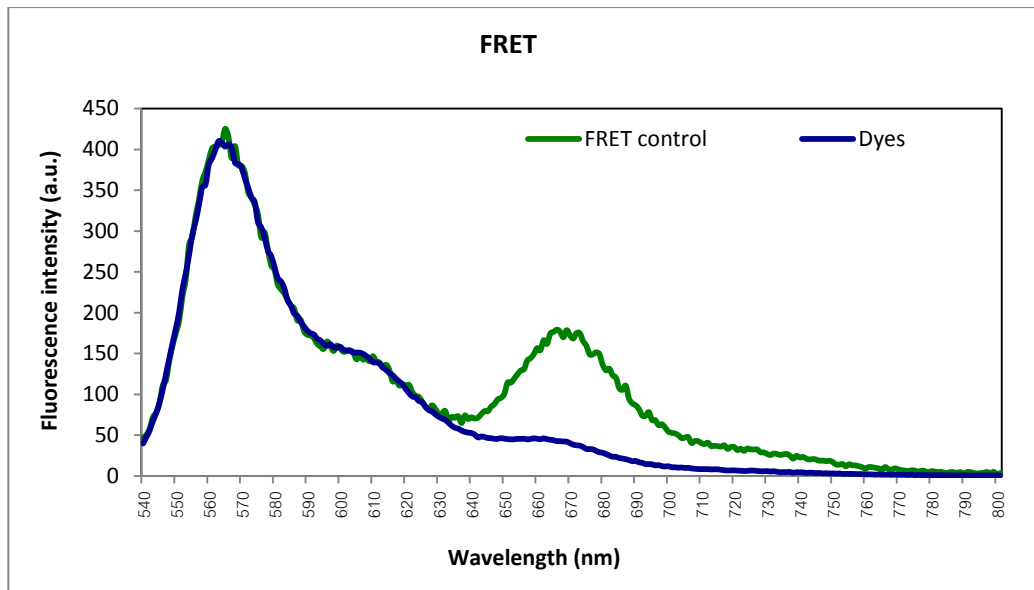
รูปที่ 6 ภาพถ่ายโครงสร้าง DNA sphere แบบปิด (closed structure) จากกล้องจุลทรรศน์ TEM (กำลังขยาย 25,000 เท่า)

(3) การทดสอบการปิด-เปิดตัวนำส่งยา

สำหรับการทดลองควบคุมจะมีสองกลุ่มการทดลอง โดยกลุ่มที่ 1 คือกลุ่ม control ที่ประกอบด้วย ดีเอ็นเอสามเส้น และกลุ่มที่ 2 คือกลุ่ม only dyes ที่ประกอบด้วยดีเอ็นเอสองเส้น ดังรูปที่ 7 เมื่อนำทั้งสองกลุ่มการทดลองไปวิเคราะห์การเกิดสัญญาณ FRET ด้วยเครื่อง spectrofluorimeter ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 8

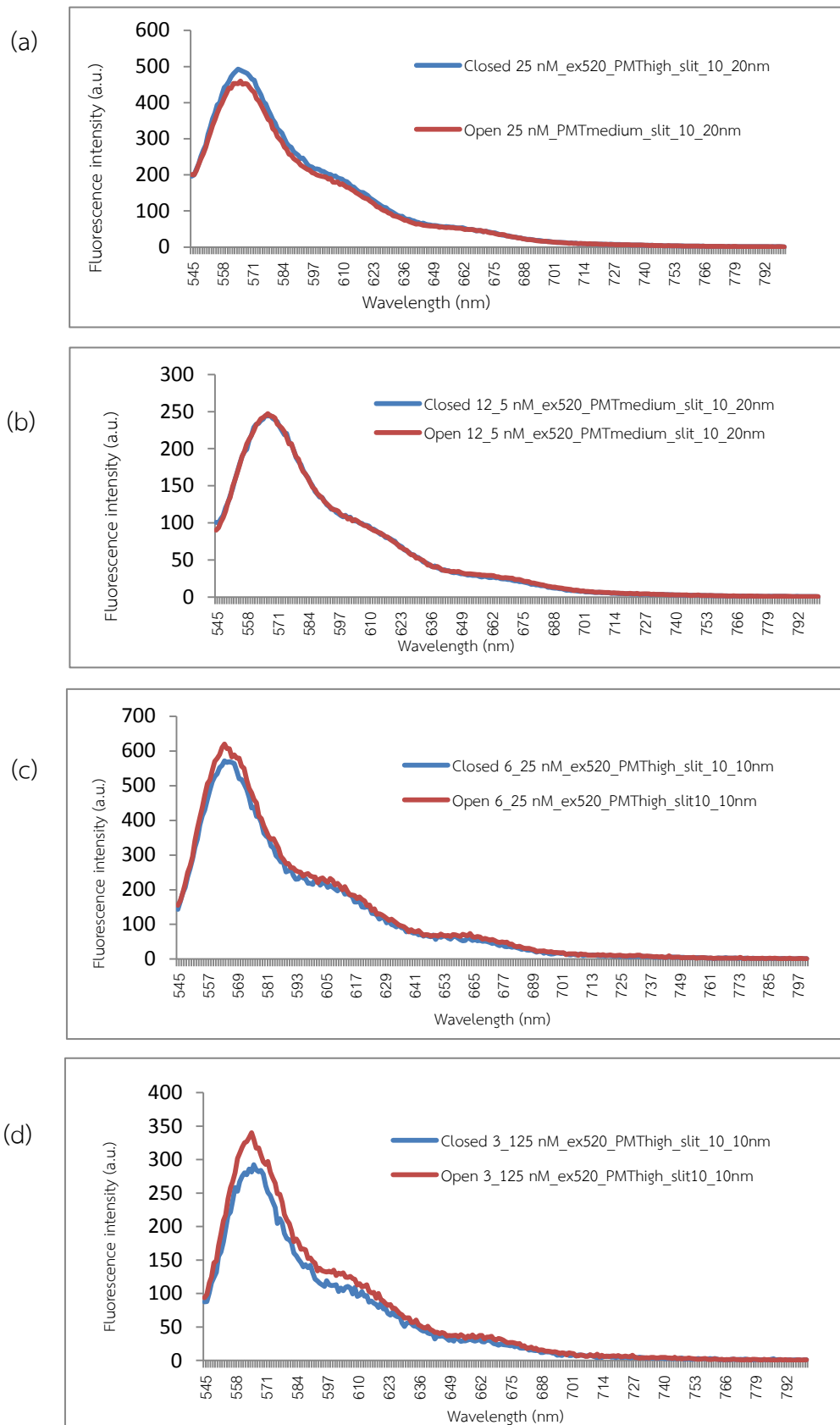


รูปที่ 7 การทดลองควบคุมกลุ่ม control (ซ้าย) และกลุ่ม only dyes (ขวา) สำหรับการวิเคราะห์สัญญาณ FRET



รูปที่ 8 ผลการทดลองการวิเคราะห์สัญญาณ FRET ของกลุ่มการทดลองควบคุม

หลังจากนั้นนำสภาวะที่ใช้กับการทดลองควบคุมนี้ไปใช้ในการทดสอบโครงสร้าง DNA sphere ที่มีการดัดแปลงด้วยโมเลกุลเรืองแสง คือ Cy3 และ Cy5 ซึ่งจากการวิเคราะห์สัญญาณ FRET ของโครงสร้าง DNA sphere ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้ผลดังรูปที่ 9

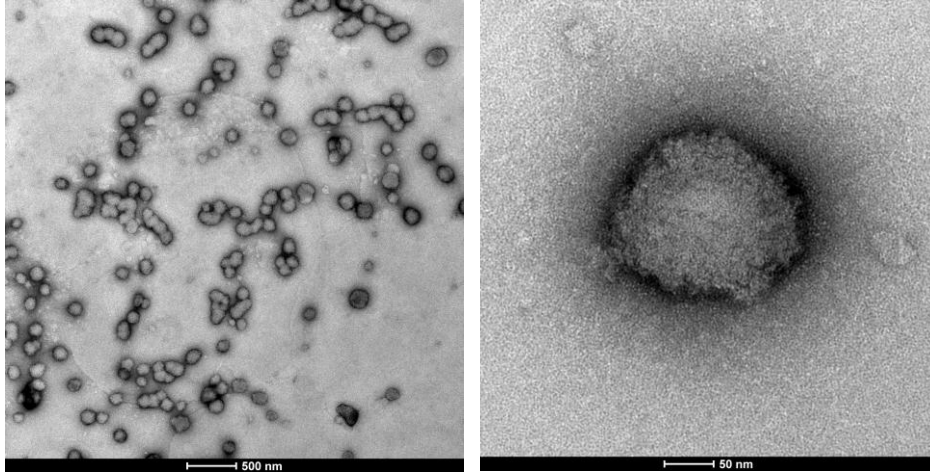


รูปที่ 9 ผลการทดลองการวิเคราะห์สัญญาณ FRET ของโครงสร้าง DNA sphere ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

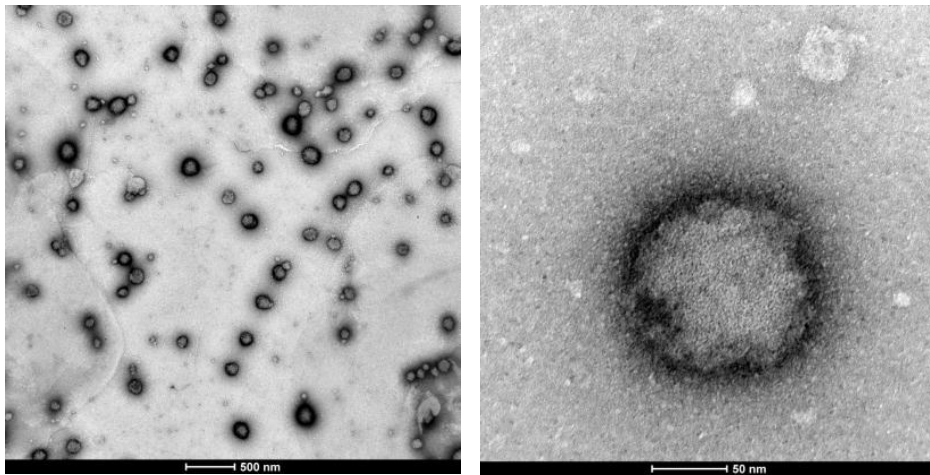
(a) 25 nM (b) 12.5 nM (c) 6.25 nM และ (d) 3.125 nM

(4) การทดสอบการบรรจุยาในตัวนำส่ง

ผลการวิเคราะห์การบรรจุยาโดยใช้ AuNP เป็นตัวแทนของยาภายในโครงสร้าง DNA sphere ที่สร้างขึ้นด้วยกล้องจุลทรรศน์ TEM ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 10 และ 11



รูปที่ 10 ภาพ DNA sphere ก่อนการบรรจุ AuNP จากกล้องจุลทรรศน์ TEM



รูปที่ 11 ภาพ DNA sphere หลังการบรรจุ AuNP จากกล้องจุลทรรศน์ TEM

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

อภิปรายผลการทดลอง

การทำงานวิจัยในครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาระบบนำส่งยาที่สร้างขึ้นจากดีเอ็นเอไปยังเซลล์มะเร็งเป้าหมาย โดยจะเริ่มจากการออกแบบตัวนำส่งยา การสร้างและวิเคราะห์ตัวนำส่งยา การทดสอบการปิด-เปิดตัวนำส่งยา และการทดสอบการบรรจุยาภายในตัวนำส่งโดยใช้อนุภาคนาโนของทองคำ (gold nanoparticle; AuNP) เป็นตัวแทนของยาที่จะทำการบรรจุ

สำหรับการออกแบบตัวนำส่งยานั้น ทำโดยการนำเอารูปแบบการ crossover ของ staple strands ที่ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างรูปทรงกลม (DNA sphere) ที่มีการเรียงยวไว้แล้วโดย Han และคณะ (Han, 2011) มาใช้ เมื่อทำการ align ลำดับเบสของ M13 ลงไปก็จะได้ลำดับเบสของ staple strands ซึ่งเป็นเบสคู่สมกับ M13 ที่ตำแหน่งต่าง ๆ ออกมา และทำการปรับแก้ staple strand ในบางตำแหน่งเพื่อให้มีระบบปิด-เปิดด้วย aptamer ที่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเมื่อได้รับการกระตุ้น โดยใช้ MUC-1 aptamer ซึ่งเป็น DNA aptamer ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน Mucin-1 เป็นตัวควบคุมการปิด-เปิด เพื่อทำให้ตัวนำส่งยานี้ตอบสนองต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 เท่านั้น แต่จะไม่ตอบสนองต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 เนื่องด้วยความแตกต่างของการแสดงออกของโปรตีน Mucin-1 ของเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งสองชนิด (Croce *et al.*, 2003)

หลังจากทำการ anneal โครงสร้าง DNA sphere แล้วจึงนำไปทำการวิเคราะห์โครงสร้างที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค gel electrophoresis จากผลการทดลองพบว่า ทั้งสามอัตราส่วนของ M13 ต่อ staple strand ที่ใช้นั้นมี band หลักที่ชัดเจนเกิดขึ้น 1 ตำแหน่งซึ่งมีขนาดของโครงสร้างใหญ่กว่า M13 เพียงอย่างเดียว แสดงให้เห็นว่า โครงสร้างที่เกิดขึ้นนั้นมีลักษณะเดียวกัน และพบอีก band ทางด้านล่างของเจล ที่เกิดจากกลุ่มของ staple strand ที่มากเกินไป ซึ่งปริมาณที่พบสอดคล้องกับอัตราส่วนที่ใช้ กล่าวคือ ขนาดของ band ที่ใช้อัตราส่วน 1:5 จะมีขนาดใหญ่ที่สุด รองลงมาคืออัตราส่วน 1:2 และ 1:1 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองที่ได้ พบว่าการใช้อัตราส่วน 1:2 ให้ผลที่ไม่แตกต่างกันมากนักกับอัตราส่วน 1:5 ทำให้หลังจากนี้คณะผู้วิจัยจะใช้อัตราส่วน 1:2 สำหรับการสร้างโครงสร้างดังกล่าว

นอกจากการวิเคราะห์โครงสร้างที่ได้ด้วย gel electrophoresis แล้วนั้น โครงสร้างที่เกิดขึ้นยังถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) จากผลการทดลองพบโครงสร้าง DNA sphere ในทั้งสองลักษณะคือ แบบเปิด (open sphere) และแบบปิด (closed sphere) โดยมีขนาดที่ใกล้เคียงกับขนาดที่ออกแบบไว้ คือประมาณ 50 nm ทั้งนี้ การย้อมสีด้วย uranyl acetate อาจส่งผลต่อโครงสร้างของ DNA sphere และเนื่องจากโครงสร้างที่เกิดจาก DNA มีความยืดหยุ่นจึงทำให้ภาพที่เห็นมีลักษณะไม่กลมชัดเจน

ในการทดสอบการปิด-เปิดตัวนำส่งยา ในขั้นแรกนี้คณะผู้วิจัยจะทำการทดสอบการปิด-เปิดโดยอาศัยการเกิด strand displacement ก่อนที่จะเปลี่ยนเป็นการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระหว่าง

DNA aptamer และโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์มะเร็งเป้าหมาย โดยใช้เทคนิค fluorescence energy transfer (FRET) ในการติดตามการปิด-เปิดของตัวนำส่งยา ซึ่งทำโดยใช้สารเรืองแสง (fluorescence) สองชนิดคือ Cy3 และ Cy5 ติดไว้ที่บริเวณรอยต่อทั้งสองฝั่งของตัวนำส่งที่จะเกิดการปิด-เปิด แล้วติดตามด้วยเครื่อง spectrofluorimeter หากตัวนำส่งยาปิดอยู่จะทำให้โมเลกุลของ Cy3 และ Cy5 เข้ามาอยู่ใกล้กันทำให้เกิดสัญญาณ FRET ขึ้น แต่ถ้าหากตัวนำส่งยาเปิดอยู่จะทำให้โมเลกุลของ Cy3 และ Cy5 อยู่ห่างกันซึ่งจะไม่เกิดการถ่ายเทพลังงานระหว่างสองโมเลกุล ทำให้ไม่พบสัญญาณ FRET เกิดขึ้น ซึ่งก่อนที่จะทำการทดลองกับโครงสร้างจริง คณะผู้วิจัยได้ทำการทดลองกับชุดควบคุมก่อนเพื่อทดสอบการเกิดสัญญาณ FRET ระหว่าง Cy3 และ Cy5 ที่ติดอยู่ที่ปลายสายของ staple strands ที่ถูกเลือกมา โดยจะมีการออกแบบดีเอ็นเอสายเดี่ยวอีกหนึ่งเส้น (เส้นสีเขียว) ให้มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับ staple strands (เส้นสีดำ) ที่มี Cy3 (วงกลมสีเขียว) และ Cy5 (วงกลมสีฟ้า) ติดอยู่ เมื่อดีเอ็นเอทั้งสามเส้นจับกันด้วยเบสคู่สมแล้วนั้นจะทำให้ Cy3 และ Cy5 เข้ามาอยู่ใกล้กัน ดังแสดงในรูปที่ 7 ซึ่งจะมีสัญญาณ FRET เกิดขึ้น แต่ในทางกลับกันหากไม่มีเส้นดีเอ็นเอสีเขียวเป็นตัวเชื่อม staple strands ทั้งสองสายที่มี Cy3 และ Cy5 ติดอยู่นั้นจะไม่เข้ามาอยู่ใกล้กัน ซึ่งจะไม่พบสัญญาณ FRET เกิดขึ้น

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าในกลุ่ม control คือมีดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ทำหน้าที่ในการยึดให้ Cy3 และ Cy5 เข้ามาอยู่ใกล้กันนั้น มีสัญญาณของ FRET เกิดขึ้น คือเห็นการเรืองแสงที่ความยาวคลื่น 655 nm แต่ในกลุ่ม dyes only ที่ไม่มีดีเอ็นเอสายเดี่ยวมาทำให้ Cy3 และ Cy5 เข้ามาอยู่ใกล้กันนั้น ไม่มีสัญญาณของ FRET เกิดขึ้น คือไม่มีการเรืองแสงเกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 655 nm แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำเอาดีเอ็นเอที่มีการติดฉลากด้วย Cy3 และ Cy5 ทั้งสองเส้นดังกล่าวไปใช้ในการ anneal โครงสร้าง DNA sphere แล้วทดสอบการปิด-เปิดของโครงสร้างด้วยการวิเคราะห์สัญญาณของ FRET ที่เกิดขึ้นเมื่อใช้ DNA sphere ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (25 nM, 12.5 nM, 6.25 nM และ 3.125 nM) ยังไม่พบว่ามีสัญญาณของ FRET เกิดขึ้นในความเข้มข้นใด ๆ ซึ่งอาจเกิดขึ้นจากตำแหน่งของ Cy3 และ Cy5 ที่อยู่บนโครงสร้าง DNA sphere เมื่อเกิดเป็น closed sphere นั้นยังไม่เข้ามาอยู่ใกล้กันมากพอ หรืออาจเกิดจากการที่ทั้งสองโมเลกุลอยู่คนละฝั่งของเกลียวดีเอ็นเอเมื่ออยู่ในรูปแบบ closed sphere จึงทำให้ไม่พบการเกิด FRET ขึ้น

ในการทดสอบการบรรจุภายในตัวนำส่ง ในขั้นแรกนี้คณะผู้วิจัยใช้ gold nanoparticles (AuNPs) เป็นตัวแทนของยาที่จะนำมาบรรจุไว้ภายใน เพื่อให้ง่ายต่อการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ TEM โดยนำเอาดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่มีหมู่ thiol (-SH) ที่ปลาย 5' (5' HS-TTTTT 3') มาทำการห่อหุ้ม AuNP ไว้ก่อน เพื่อป้องกันการเกิด non-specific interaction ระหว่าง AuNP และ DNA sphere แล้วจึงทำการ anneal โครงสร้างเมื่อมี ssDNA-modified AuNP อยู่ด้วย นำโครงสร้างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ TEM จากผลการทดลองยังไม่พบ AuNP ภายในโครงสร้าง DNA sphere ซึ่งอาจจะเกิดจากขนาดของโครงสร้าง DNA sphere ที่ค่อนข้างเล็ก (ประมาณ 50 nm) และขนาดของ ssDNA-modified AuNP ที่เมื่อถูกห่อหุ้มด้วยดีเอ็นเอจะมีขนาดใหญ่กว่า AuNP เพียงอย่างเดียว ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ AuNP ขนาด 5 nm ทั้งนี้เมื่อห่อหุ้มด้วยดีเอ็นเอเพื่อป้องกัน non-specific interaction แล้วนั้น อาจจะทำให้ ssDNA-modified AuNP

เข้าไปรวมกันอยู่ภายในโครงสร้าง DNA sphere เกิดได้ยากขึ้น เนื่องจากทั้ง ssDNA-modified AuNP และ DNA sphere มีประจุลบเช่นเดียวกัน

สรุปผลการทดลอง

1. ตัวนำส่งยาที่สร้างขึ้นจากดีเอ็นเอด้วยเทคนิค DNA origami เป็นรูปทรงกลม (DNA sphere) ได้ถูกสร้างขึ้นตามที่ได้ออกแบบไว้ ซึ่งสามารถอยู่ในรูปแบบเปิด (open sphere) และปิด (closed sphere) เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย gel electrophoresis และกล้องจุลทรรศน์ TEM
2. การวิเคราะห์โครงสร้าง DNA sphere แบบเปิดและปิดด้วยเทคนิค FRET ยังไม่พบการเกิดสัญญาณ FRET ขึ้นตามที่ได้ออกแบบไว้
3. ยังไม่พบ AuNP ภายในโครงสร้าง DNA sphere เมื่อทำการบรรจุ ssDNA-modified AuNP

ข้อเสนอแนะ

1. สำหรับการวิเคราะห์โครงสร้าง DNA sphere ในรูปแบบปิดและเปิดด้วยเทคนิค FRET นั้น ควรทำการตรวจสอบตำแหน่งของ Cy3 และ Cy5 ที่อยู่บน DNA sphere ด้วยการจำลองโครงสร้างในคอมพิวเตอร์ เพื่อให้การกำหนดตำแหน่งของ Cy3 และ Cy5 เข้ามาอยู่ใกล้กันเมื่ออยู่ในรูป closed sphere มีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น
2. สำหรับการบรรจุ AuNP ภายในโครงสร้าง DNA sphere อาจแก้ไขได้โดยการนำเอาดีเอ็นเอสายเดี่ยวมาติดที่ผิวด้านนอกของ AuNP โดยให้สายดีเอ็นเอยื่นออกไป แล้วใช้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวอีกสายที่มีลำดับเบสเป็นเบสคู่สมกันติดไว้ภายในโครงสร้าง DNA sphere เพื่อให้เกิดการจับกันระหว่างดีเอ็นเอทั้งสองเส้น ซึ่งน่าจะช่วยให้ AuNP สามารถเข้าไปอยู่ภายในโครงสร้างดังกล่าวได้

บรรณานุกรม

- Acharya, S. and Sahoo, S. K. 2011. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. *Advanced Drug Delivery Reviews.*, 63: 170-183.
- Allen, T. M., Mumbengegwi, D. R. and Charrois, G. J. 2005. Anti-CD 19-targeted liposomal doxorubicin improves the therapeutic efficacy in murine B-cell lymphoma and ameliorates the toxicity of liposomes with varying drug release rates. *Clin. Cancer. Res.* 11(9): 3567-3573.
- Andersen, E. S., Dong, M., Nielsen, M. M., Jahn, K., Subramani, R., Mamdouh, W., Golas, M. M., Sander, B., Stark, H., Oliveira, C. L. P., Pedersen, J. S., Birkedal, V., Besenbacher, F., Gothelf, K. V. and Kjems, J. 2009. Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid. *Nature*, 459: 73-77.
- Castro, C. E., Kilchherr, F., Kim, D. N., Shiao, E. L., Wauer, T., Wortmann, P., Bathe, M. and Dietz, H. 2011. A Primer to Scaffolded DNA Origami. *Nat. Methods.*, 8: 221-229.
- Chadha, R., Kapoor, V. K., Thakur, D., Kaur, R., Arora, P. and Jain, D. V. S. 2008. Drug Carrier Systems for Anticancer Agents: A Review. *Journal of Scientific & Industrial Research.*, 67: 185-197.
- Champion, J. A., Walker, A. and Mitragotri, S. 2008. Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. *Pharm. Res.*, 25: 1815-1821.
- Chang, M., Yang, C. S. and Huang, D. M. 2011. Aptamer-conjugated DNA icosahedral nanoparticles as a carrier of doxorubicin for cancer therapy. *ACS Nano.* 5(8): 6156-6163.
- Chen, G., Ushida, T. and Tateishi, T. 2000. Hybrid biomaterials for tissue engineering: a preparative method for PLA or PLGA-collagen hybrid sponges. *Adv. Mater.*, 12: 455-457.
- Choi, H. M. T., Chang, J. Y., Trinh, L. A., Padilla, J. E., Frase, S. E. and Pierce, N. A. 2010. Programmable In Situ Amplification for Multiplexed Imaging of mRNA Expression. *Nat. Biotechnol.*, 28: 1208-1212.
- Chrastina, A., Massey, K. A. and Schnitzer, J. E. 2011. Overcoming in vivo barriers to targeted nanodelivery. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 3: 421-437.

- Cohen, I. 2004. Endometrial pathologies associated with postmenopausal tamoxifen treatment. *Gynecologic Oncology*, 94: 256-266.
- Croce, M. V., Rua, C. E., Rabassa, M. E., Gendler, S. J. and Amada S. E. 2003. Patterns of MUC1 tissue expression defined by an anti-MUC1 cytoplasmic tail monoclonal antibody in breast cancer. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 51: 781–788.
- Douglas, S. M., Bachelet, I. and Church, G. M. 2012. A Logic-Gated Nanorobot for Targeted Transport of Molecular Payloads. *Science*, 335: 831-834.
- Farokhzad, O. C. and Langer, R. 2009. Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano*, 3: 16-20.
- Fisher, B., Costantino, J. P., Wickerham, D. L., et al. 1998. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National surgical adjuvant breast project P-1 study. *Journal of the National Cancer Institute*, 90(18): 1371-1388.
- Fisher, B., Dignam, J., Bryant, J. and Wolmark, N. 2001. Five versus more than five years of tamoxifen for lymph node-negative breast cancer: updated findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-14 randomized trial. *J. Natl. Cancer Inst.*, 93: 684-690.
- Giret, S., Theron, C., Gallud, A., Maynadier, M., Gary-Bobo, M., Garcia, M., Wong Chi Man, M. and Carcel, C. 2013. A Designed 5-Fluorouracil-Based Bridged Silsesquioxane as an autonomous Acid-Triggered Drug-Delivery System. *Chemistry*. DOI: 10.1002/chem.201301081.
- Goldberg, M., Langer, R. and Jia, X. 2007. Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 18: 241-268.
- Gorin, M. B., Day, R., Costantino, J. P., et al. 1998. Long-term tamoxifen citrate use and potential ocular toxicity. *American Journal of Ophthalmology*, 125(4): 493-501.
- Gratton, S. E. A., Ropp, P. A., Pohlhaus, P. D., et al. 2008. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105: 11613-11618.
- Han, D., Pal, Suchetan, Nangreave, J., Deng, Z., Liu, Y. and Yan, H. 2011. DNA Origami with Complex Curvatures in Three-Dimensional Space. *Science*, 332: 342-346.

- Hayashi, S., Eguchi, H., Tanimoto, K., Yoshida, T., Omoto, Y., Inoue, A., Yosida, N. and Yamaguchi, Y. 2003. The expression and function of estrogen receptor α and β in human breast cancer and its clinical application. *Endocrine-Related Cancer*. 10: 193-202.
- Heath, J. R. and Davis, M. E. 2008. Nanotechnology and Cancer. *Annu. Rev. Med.*, 59: 251-265.
- Heidelberger, C., Chaudhuri, N. K., Danneberg, P., Mooren, D., Griesbach, L., Duschinsky, R., Schnitzer, R. J., Plevin, E. and Scheiner, J. 1957. Fluorinated Pyrimidines, A New Class of Tumour-Inhibitory Compounds. *Nature*. 179: 663-666.
- Jangde, R. 2011. An Overview of Resealed Erythrocyte for Cancer Therapy. *Asian J. Res. Pharm. Sci.*, 1 (4): 83-92.
- Jayasena, S. D. 1999. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin. Chem*. 45(9): 1628-1650.
- Jiang, Q., Song, C., Nangreave, J., Liu, X., Lin, L., Qiu, D., Wang, Z., Zou, G., Liang, X., Yan, H. and Ding, B. 2012. DNA Origami as a Carrier for Circumvention of Drug Resistance. *JACS*, 134: 13396-13403.
- Jordan, V. C. 2004. Selective estrogen receptor modulation: concept and consequences in cancer. *Cancer Cell*, 5: 207-213.
- Keum, J. W. and Bermudez, H. 2009. Enhanced Resistance of DNA Nanostructures. *Chem. Commun.*, 45: 7036-7038.
- Khan, D. R. 2010. The Use of Nanocarriers for Drug Delivery in Cancer Therapy. *Journal of Cancer Science & Therapy*. 2(3): 58-62.
- Lee, P., Peng, S., Su, C., Mi, F., Chen, H., Wei, M., et al. 2008. The use of biodegradable polymeric nanoparticles in combination with a low-pressure gene gun for transdermal DNA delivery. *Biomaterials*, 29: 742-751.
- Lee, P., Hsu, S., Tsai, J., Chen, F., Huang, P., Ke, C., Liao, Z., Hsiao, C., Lin, H. and Sung, H. 2010. Multifunctional core-shell polymeric nanoparticles for transdermal DNA delivery and epidermal Langerhans cells tracking. *Biomaterials*, 31: 2425-2434.
- Li, J., Pei, H., Zhu, B., Le Liang, L., Min Wei, M., Yao He, Y., Nan Chen, N., Di Li, D., Qing Huang, Q. and Fan, C. 2011. Self-Assembled Multivalent DNA Nanostructures for Noninvasive

- Intracellular Delivery of Immunostimulatory CpG Oligonucleotides. *ACS Nano*. 5(11): 8783-8789.
- Longley, D. B., Harkin, D. P. and Johnston, P. G. 2003. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer*. 3(5): 330-338.
- Mattheolabakis, G., Rigas, B., Constantinides, P. P. 2012. Nanodelivery Strategies in Cancer Chemotherapy. *Nanomedicine*, 7(10): 1577-1590.
- Mei, Q., Wei, X., Su, F., Liu, Y., Youngbull, C., Johnson, R., Lindsay, S., Yan., H. and Meldrum, D. 2011. Stability of DNA Origami Nanoarrays in Cell Lysate. *Nano Lett.*, 11: 1477-1482.
- Mishra, D., Hubenak, J. R. and Mathur, A. B. 2013. Nanoparticle systems as tools to improve drug delivery and therapeutic efficacy. *J. Biomed. Mater. Res. A*. doi: 10.1002/jbm.a.34642.
- Moorthi, C., Manavalan, R. and Kathiresan, K. 2011. Nanotherapeutics to Overcome Conventional Cancer Chemotherapy Limitations. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 14(1): 67-77.
- Mustafa, S., Walker, A., Bennett, G. and Wigmore, P. M. 2008. 5-Fluorouracil chemotherapy affects spatial working memory and newborn neurons in the adult rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 28(2): 323-330.
- Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I. S., et al. 2004. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin-and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J.*, 377: 159-169.
- Rothemund, P. W. K. 2006. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*, 440: 297-302.
- Sahoo, S. K. and Labhasetwar, V. 2003. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discov. Today.*, 3: 655-663.
- Schuller, V. J., Heidegger, S., Sandholzer, N., Nickels, P. C., Suhartha, N. A., Endres, S., Bourquin, C. and Liedl, T. 2011. Cellular Immunostimulation by CpG-Sequence-Coated DNA Origami Structures. *ACS Nano.*, 5 (12): 9696-9702.
- Shi, J., Votruba, A. R., Farokhzad, O. C. and Langer, R. 2010. Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: From discovery to applications. *Nano Lett.*, 10: 3223-3230.

- Sutton, D., Nasongkla, N., Blanco, E., et al. 2007. Functionalized micellar systems for cancer targeted drug delivery. *Pharmaceut. Res.*, 24: 1029-1046.
- Venkataraman, S., Dirks, R. M., Ueda, C. T. and Pierce, N. A. 2011. Selective Cell Death Mediated by Small Conditional RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107: 16777-16782.
- Vogel, V. G., Costantino, J. P., Wickerham, D. L., et al. 2006. Effects of tamoxifen vs raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes. *JAMA*, 295(23): 2727-2741.
- Walsh, A. S., Yin, H., Erben, C. M., Wood, M. J. A. and Turberfield, A. J. 2011. DNA Cage Delivery to Mammalian Cells. *ACS Nano.*, 5: 5427-5432.
- Wang, M. and Thanou, M. 2010. Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacol. Res.*, 62: 90-99.
- Wang, A. Z., Langer, R. and Farokhzad, O. C. 2012. Nanoparticle Delivery of Cancer Drugs. *Annu. Rev. Med.*, 63: 185-198.
- Weiner, G. J., Liu, H., Wooldridge, J. E., Dahle, C. E. and Krieg, A. M. 1997. Immunostimulatory oligonucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94(20): 10833-10837.
- Wigmore, P. M., Mustafa, S., El-Beltagy, M., Lyons, L., Umka, J. and Bennett, G. 2010. Effects of 5-FU. *Adv. Exp. Med. Biol.* 678: 157-164.
- Yurke, B., Turberfield, A. J., Mills, A. P., Simmel, F. C. & Neumann, J. L. 2000. A DNA-fuelled molecular machine made of DNA. *Nature.* 406: 605-608.
- Zamboni, W. C. 2005. Liposomal, nanoparticle, and conjugated formulation of anticancer agents. *Clin. Cancer Res.*, 11: 8230-
- Zauner, W., Farrow, N. A. and Haines A. M. R. 2001. In vitro uptake of polystyrene microspheres: effect of particle size, cell line and cell density. *J. Control. Release*, 71: 39-51.

ภาคผนวก

ลำดับเบสของ staple strand (5' → 3')

NORTH 65-Cy5 (41) Cy5 – CCTTTAATTGTATCGGTTTATCAGCTTGCTTTCTGGTAATA

North-1 (40) TTCCATTAAATTAAGGGATTTTAGACAGGGAGATAGAAC

North-2 (40) CCTTCTGACCCAGCCCTCATAGTTAGCGTAATGAGGAAGT

North-3 (39) CAGGGCGATGGAGCTAAACAGGAGGCCGACGGGTAAAAT

North-4 (39) ACGTAATGCCATGGTTTAATTTCAACTTTAACCGTCTAT

North-5 (31) AATGAATCGGCCAACGTGGACTCCAACGTCA

North-6 (37) AAGGGCGAAAAATCATTGTGATCGTGCCAGCTGCATT

North-7 (50) CCAACCTAAAACGGCTTTGAGGACTAAAGACTTTTTTCACGATCTAAAGTT

North-8 (48) TAAGAACTGGCTAACGAGTAGTAAATTGGGCTTGAGACTACGAAGGCA

North-9 (36) ATAAATATCGGGAAACCTGATTACCTTATGCGATTT

North-10 (41) GCGAAAGAGACGAGAACACCAGCATTATCTGCGGAATCGTC

NORTH-5 (50) TTGTCGTCTTTCCAGACGTTAGTAAATGAGCAACGGCTACAGAGAAAGAG

North-12 (29) ACTGCCCGCTTTCCAGTTCATTGAATCCC

North-13 (46) CCTCAAATGCTTTGCTCCTTTTGATAAGAGGGGATGTGCTGCAAGG

North-15 (33) CGATTAAGTTGGGTAATTAATTGCGTTGCGCTC

North-16 (40) TGCATCTGCCTACGCCAGCTGGCGAAAGGGTCATTTTTGC

North-17 (31) GGATGGCTTATAGATACATTCATCGTAACCG

North-18 (32) CAATTCTAGATGGGCGTCGCAAATGGTGGCAT

NORTH-4 (44) TCATCTTTGACGCGAAAGACAGCATCGGAACGAGGGTAATTTTC

North-20 (50) GGAAGAAAAATCTATTCAGTGAATAAGGCTTGCCCTATACTAAAAACAC

North-21 (32) TGGATAGCGTCCAATAACCAGTCAGGACGTTG

North-22 (44) GATTATACTAACAAGCTGCTCACGTTAAGTAAAATGTTTAGAC

NORTH-3 (48) ATTTTGCTAAACAACCTTTCAACAGTTTCGTCACCCTCAGCACCCCAGC

North-24 (50) AATAGAAAGGAACAACCTAAAGGAATTGCGCTGAGGCTTGACAGAGATTTGT

North-25 (43) ATCATCGCTTCGACAAGAACCACAGTTTTTTGCAAAAGAAGTT

North-26 (50) TTGCCAGAGGGTAAATCAAAAATCAGGTCTTTACCCTGACCAGACCGGAA

North-27 (48) GCAAACCTCAACAGATCTGGTGCTGTAGCTCAACATGTTTTTCTGCGA

North-28 (48) ACGAGTAGACCTGTTTAGCTATATGCTGAAAAGGTCAATAATTTAGTT
 North-29 (35) TGACCATGAGCTTAATTGCTGAGTCAGGATTAGAG
 North-30 (26) AGTACCTTTAATTAACAGTTCAGAA
 North-31 (36) AACGAGAATGACCAGGTAATATAAAACGAACTAACG
 North-32 (49) GAACAACATTATTGGATATTCATTACCCAAATCAACGCAAGCGCGAAAC
 North-33 (50) AAAGTACAACGGGGAGTTAAAGGCCGCTTTTTCGCGGATCAGCGGAGTGAG
 NORTH-2 (22) TGACAACAACCATCGCGACCTG
 North-35 (44) CTCCATGTCCAGGCGCATAGGCACCACAAGACGACGATAAAAAAC
 North-36 (34) CAAAATAGCGAGAGGCAGAAAGATTCATCAGTTG
 North-37 (53) AGATTTAGGAATTGGCTGACCTTCATCAAGAGTAATCCTGATAAATTGTGTCCG
 North-38 (58) AAATCCGCCACGCATAACCGATATATTCGGTGAATAATAATTTTTTTCACGTTGAAA
 North-39 (50) AGTAATAAAAGGGACATTCTGGCCAACAAACGGTACGCCAGAAGTTGGAA
 North-40 (44) TCAGAGCGGGCCACTACGTGAAGAACGCGCGGGGAGAGGCGGT
 North-41 (50) TTGCGTATTGGGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACACGCCAGGGTT
 North-42 (49) TTCCCAGTCACGACGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATAGTTTGAG
 North-43 (47) GGGACGACATAGGTTACGTTGGTGTACTAATAGTATGGGGACCGTAT
 North-44 (35) CGGCCTCACAACCTGTTGGGAAGGTTGTAAAACGAC
 North-45 (28) GGCCAGTGCCAAGACGAGCCGGAAGCAT
 North-46 (37) AAAGTGAAAGCCTGCGCCATCCAGTTTGGAAACAAGA
 North-47 (48) GTCCACTATTAAACCATCACCCAAATCAAGTTTTTGAGCACGTATAAC
 North-48 (50) GTGCTTTCCTCTCTTGAGAAGTGTTTTTATAATCAGTCAGTCACACGACC
 NORTH-6 (37) CATTGGCAGATTCACGAGGCCACCGAGTAATATGGTT
 North-50 (44) GCTTTGACTGGGGTTCGAGGTGCTGTTGTGGGTGGTTTTTCTTTT
 North-51 (31) CACCAGTGAGACGGGCTCAAAGAATAGCCC
 North-52 (49) GAGATAGGGTTGAGCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCAATGCGCCGCTA
 NORTH-7 (55) CAGGGCGCGTACAAGAGTCTGTCCATCACGCAAATTAATCAATCGTCTGAAATGG
 NORTH-8 (38) TACCTACATTTTGACGACCGTTGTAGCAATAACACCCG
 North-55 (44) CCGCGCTTTAAAGGGAGCCCCCTATAAAAACAGCTGATTGCCCT
 North-56 (50) TCACCGCCTGGTGTATCCGCTCACAATTCACACAACATCTTGCATGCC

North-57 (27) TGCAGGTCGACTCTAAGCGCCATTTCGC
 North-58 (36) CATTACAGGCTGCGGGAAGATCGCACTCCCGGCGGAT
 North-59 (43) TGACCGTAAGTAGCATTTTCGGATTGCGCGATTTCAACAGTTGA
 North-60 (35) TTCCAATAAATATGCAACTAATTTTAATTCGAGC
 North-61 (27) TTCAAAGCGAACTATTATAGTCAGAAG
 North-62 (36) CAAAGCGGATTGCATTTACCTTCAACTAATGCAGAT
 North-63 (50) ACATAACGCCAAAAGGACAGATGAACGGTGTACAGATACTTAGCCGGAAC
 FILL-IN-64 (37) GAGGCGCAGACCTTGATACCGATAGTTGCGCCGACAA
 NORTH-1 (22) TGCCTGAGTAGAAGAGGCGCTG
 North-67 (44) GCAAGTGTGCGCGAACGTGGCGCTGTTTGAGAGTTGCAGCAAGC
 North-68 (30) GGTCCACGCTGGCATAGTAAGAGCAACT
 North-69 (27) ATCATAACCCTCGTCAAAAAGATTAAG
 North-70 (29) AGGAAGCCCGTAATCATGGTCATAGCTGT
 North-71 (38) TTCCTGTGTGAAATCCCTGAGATGGTGGTTCCGAAATC
 North-72 (53) GGCAAATCCCTGATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCAGCGGTACGCTGCGCG
 North-73 (59) TAACCACCCTTCTTTGATTAGTAATAACATCACTGCAACAGGAAAAACGCTCATGGAAA
 North-74 (40) TCGGCCTTGCGAGGTGAATTTCTTAAACAGGGTCAATCAT
 North-75 (39) AAGGGAACCGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGACTCAAACCTA
 North-76 (51) GGGAAAGAAAGAACTGACCAACTTTGAAAGAGGAATTACGAGGTTTGCCCCA
 North-77 (22) GCAGGCGAAAATCAGAAAGGAA
 North-78 (48) GGTACCGAGCTCGAATTCGAAAGACTTCAAATATCGCGAGTACGGTGT
 North-79 (43) CTGGAAGTTTTCTGGTGCCGAAACCAGGCAAGAGGATCCCCG
 North-80 (34) CGGCACCGCTCATTCCATGTATTTGGGCTCCGTG
 North-81 (19) GGAACAAAAGCCAGCTTTC
 SOUTH 65-2* (14) TAAAGCATCACCTT – Cy3
 South-1 (40) TTATCATTTTACAGTGCCCGTATAAACAGTAACGCCTGTA
 South-2 (40) GCATTCCACAAAAGCGTAAGAATACGTGGCTTGAGTAACA
 South-3 (39) CCATCTTTTCGGGGTCAGTGCCTTGAGTAGCGGAACAAA
 South-4 (39) GAAACCACCACAATATATGTGAGTGAATATTAGCGTTTG

South-5 (31) AAATTCATATGGTTTAGGCATTTTCGGTCAT
 South-6 (37) AGCCCCCTTAACCTTGCTTCTGTGCAATCAATAGA
 South-7 (50) TTATCATCATATCCCGAACGTTATTAATTTTAAAAGTACAGACAATATTT
 South-8 (48) ATTAATTTTCCCTTTTAAATGGAAACAGTACATAAATGAAGGAGCGGAA
 South-9 (36) AAGCCTGTAAAGTTTATTTGTAAATCGTCGCTATTA
 South-10 (41) TATCAGATATTTGAATTACCTTTTAGAATAATTAAGTAGAAA
 South-11 (50) TTGAATGGCTATTAGTCTTTAATGCGCGGTATTAATCCTTTGTCCTGAT
 South-12 (29) GCAAAGACACCACGGAATTAGTATCATAT
 South-13 (46) GCGTTATACAAAAACAATAGATAAGTCTGATAATTGAGCGCTAAT
 South-15 (33) ATCAGAGAGATAACCCCAACATATAAAAAGAAAC
 South-16 (40) TTTCCAGAGCCCCTGAACAAAGTCAGAGGGACAAGAAAAA
 South-17 (31) TAATATCCCATTACCGCGCCTAACGAGCGTC
 South-18 (32) AACCTTTACCAACGCCAATAGCAAGCTAGCG
 South-19 (50) AATATAATCCTAGACTTTACAAACAATTCGACAACCTCAACTGATAGCCCT
 South-20 (50) GATAGCTTAGATTAATTAATTACATTTAACAATTTGATGGCAATTCATC
 South-21 (32) ATAAACACCGGAATCATCCTTGAAAACATAGC
 South-22 (44) TGGATTATCATCAAGAAAACAAAAGACGAAGGCGTTAAATAAGA
 SOUTH-4 (22) GGATTTAGAAGTATTGATTGTT
 SOUTH-3 (50) AGATAAAACAGAGGTGAGGCGGTCAGTCAACTAATAGATTAGAACCAACC
 South-25 (43) ATATCAAATTTCAATTACCTGAATCATTTAATGGTTTGAAATA
 South-26 (50) CCGACCGTGTGACAGTAGGGCTTAATTGAGAATCGCCATATGACGACAATA
 South-27 (48) AACAACATGTTTACAGATGTAGAAACCAATCAATAATCGGCTCAAGCCGT
 South-28 (48) TTTTATTTAGATATAGAAGGCTTAGCGAGGCGTTTAAATCTCATCGTA
 South-29 (35) GGAATCATCCTAATTTACGAGCCTAATGCAGAACG
 South-30 (26) CGCCTGTTTATCTTCTTACCAGTATA
 South-31 (36) AAGCCAACGCTCAAATAAATCTGAGAAGAGTCAATA
 South-32 (49) GTGAATTTATCAAAGCAAAGAAGATGATGAAACAAAACCTTCTGAATTA
 South-33 (50) TGGAAGGAATTGAGCCGTCATAGATAATACATTTGAAACCACCAGCAGA
 South-35 (44) ATTGCGTAAATACCAAGTTACAGCTTAGTATTTTAGTTAATTTTC

South-36 (34) ATCTTCTGACCTAAATAGGTCTGAGAGACTACCT
 South-37 (48) TTTTAACCTCCGAAATCGCGCAGAGGCGAATTATTCAATTATTAGCAC
 SOUTH-2 (55) GTAAAACAGAAATCTAAAATATCTTTAGGTGCACTAAATTAACACCGCCTGCAAC
 SOUTH-1 (37) GCTGAGAGCCAGCAGAATTGAGGAAGGTTATAAAGAA
 SOUTH-5 (50) ACTGAGTTTCGTCACCAGTACAACTACTAATGCCCCCTGCCTGGTAATA
 South-40 (44) AGTTTTAACATAATCAAATCATTTCATCCCAGCGCCAAAGACAA
 South-41 (50) AAGGGCGACATAAACGTAGAAAATACATACATAAAGGTGGACAAGAATTG
 South-42 (49) AGTTAAGCCCAATAACATTAGACGGGAGAATTAAGTGAACACTAATTTG
 South-43 (47) CCAGTTACAATTTTATCCTGAATCCCGACTTGCGGCTACAAAATAAA
 South-44 (35) CAGCCATAAAAAACAGGGAAGCGTAAGAGCAAGAA
 South-45 (28) ACAATGAAATAGCTAAGACTCCTTATTA
 South-46 (37) CGCAGTATGTTAGCTCAACCTTGCCTTTAGCGTCAGA
 South-47 (48) CTGTAGCGCGTCCGGAACCAGAGCCACCACCGACTTTTGATGATAC
 South-48 (50) AGGAGTGTACTATTTTCGGAACCTATTATTCTGAAACACATGTACCGTAAC
 SOUTH-7 (13) TTCAGGGATAGCA
 SOUTH-6 (22) TGAAAGTATTAAGAGAAGCGTC
 South-50 (44) ATACATGGACCGCCTCCCTCAGTCAAGTGATTGAGGGAGGGAAG
 South-51 (31) GTAAATATTGACGGAATAGCAGCACCGTAAT
 South-52 (49) CAGTAGCGACAGAAAGCCGCCACCCTCAGAACCGCCAAGTCTCTGAATT
 South-53 (50) TACCGTTCCAGTGCTGAGACTCCTCAAGAGAAGGATTACACCACCCTCATT
 South-54 (50) CCACCCTCAGAACCGCCACCCTCAGAGCAGGATTAGCGGGGTTTCAAGATG
 South-55 (44) GAAAGCGCCCCTCAGAGCCACCCATCGAATTATTCATTAAAGGT
 South-56 (50) GAATTATCACCAACGGAATACCCAAAAGAACTGGCATGATAATAGCTATC
 South-57 (27) TTACCGAAGCCCTTAGCAGCCTTTACA
 South-58 (36) GAGAGAATAACATTTATTTATCCCAATCTGCTATTT
 South-59 (43) TGCACCCAGGAGTTTTGAAGCCTAAGAACTCCGGCTCATCGA
 South-60 (35) GAACAAGGTCTTTCTTATCATAAAGGTAAAGTAA
 South-61 (27) TTCTGTCCAGACTTAACAACGCCAACA
 South-62 (36) TGTAATTTAGGCAGCAAATAGTTGGGTTATATAACT

South-63 (50) ATATGTAAATGCTAACGGATTGCGCTGATTGCTTTGGATTTTCAGGTTTA
 South-64 (50) ACGTCAGATGACAGTTGGCAAATCAACAGTAGAAAGGCAAATGAAAAATC
 SOUTH-8 (47) CGTACTCAGGAGGTTTAGTACCGCCCGTCGAGAGGGTTGATGGCCTT
 South-67 (44) GATATTC AACACCAGAGCCGCTACCATGACTTGAGCCATTTGG
 South-68 (30) GAATTAGAGCCATCGCAAGACAAAGAACGC
 South-69 (27) GAGAAACTTTTTAGGCATTTTCGAGC
 South-70 (29) CAGTAATAAAGTTACCAGAAGGAAACCGA
 South-71 (38) GGAAACGCAATAATGTCACCTAGCAAGGCCGAAACGT
 South-72 (50) CACCAATGAAACACCCTCAGAGCCGCCACCAGAACCCAAACGAATGGATC
 South-73 (50) TTCATTAAAGCTTGCTCAGTACCAGGCGGATAAGTGCACCCTCAGAACCG
 South-74 (40) GCCCGGAATAACCCTCAATCAATATCTGGTATATACAGTA
 South-75 (39) ACAGTACCTTTTGAGGCAGGTCAGACGATTATAAGTATA
 South-76 (51) TGACAGGAGGTTACATCGGGAGAAACAATGATGCAAATCCAAGCAAATCA
 South-77 (22) CCAGTAGCACCATCGCCAGCAT
 South-78 (48) AAGCAGATAGCCGAACAAGAGAATATAAAGTACCGACATCCAAGAACG
 South-79 (43) GGTATTAACCTTTAACGTCAAAAATGAAAATTTTAAGAAAAGT
 South-80 (34) CGATTTTTTGCAAGTACCGCATATTCTTAAATCA
 South-81 (19) AGATTAGTCAAATAAGAAA
 Lock-1 (41) GGCATGTG AGTGCCACCAGAACAATATTACCGCCAGCCATT
 Lock-2 (42) ACGGCTTG ATTATTTAAACATCGCCATTA AAAATACCGAACG
 Lock-3 (31) CCGTGCTG TGTATCACATCTCCAAAAAAAAG
 Lock-4 (31) TGGCGTTT TGTATGGGAGCCCAATAGGAACC
 Lock-5 (42) CAGCTGTA GCTCCAAAAGGAGGCTGAACCTCAAATATCAAGG
 Key-1 (16) GTGGCACTCACATGCC
 Key-2 (16) TAAATAATCAAGCCGT
 Key-3 (16) GTGATACACAGCACGG
 Key-4 (16) CCCATACAAAACGCCA
 Key-5 (21) CTCCTTTTGGAGCTACAGCTG