



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาระบบตัวนำส่งยารูปทรงกลมที่สร้างขึ้นจากดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการนำส่งยาเคมีบำบัด

ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม

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

อ.ดร. อนุตตรา อุดมประเสริฐ

ผศ.ดร. ธเนศ กังสักรศิลป์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2559A10802078

สัญญาเลขที่ 54/2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาระบบตัวนำส่งยารูปทรงกลมที่สร้างขึ้นจากดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการนำส่งยาเคมีบำบัด
ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม

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

อ.ดร. อนุตตรา อุดมประเสริฐ

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ผศ.ดร. ธเนศ กังสักรศิลป์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

พฤษภาคม 2561

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 54/2559

บทคัดย่อ

ผลข้างเคียงจากการรักษาที่ผู้ป่วยโรคมะเร็งได้รับจากการใช้ยาเคมีบำบัดนั้นส่วนใหญ่เกิดมาจากการที่สารเคมีเหล่านั้นไม่สามารถแยกแยะความแตกต่างระหว่างเซลล์ปกติกับเซลล์มะเร็งได้ ทำให้เกิดผลข้างเคียงขึ้น เช่น คลื่นไส้ อาเจียน ผอมร่วง เป็นต้น เพื่อที่จะช่วยลดปัญหาดังกล่าวจึงมีการคิดค้นระบบนำส่งยาที่จะช่วยให้ยาเคมีบำบัดเหล่านั้นถูกส่งไปยังเซลล์มะเร็งเป้าหมายได้อย่างจำเพาะมากขึ้น นอกจากนี้จะช่วยลดผลข้างเคียงที่จะเกิดกับผู้ป่วยแล้วระบบนำส่งยาไปยังเป้าหมายอย่างจำเพาะนี้น่าจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการรักษาโรคมะเร็งได้อีกด้วย วัตถุประสงค์ของงานวิจัยชิ้นนี้ คือ เพื่อทำการพัฒนาระบบตัวนำส่งยาที่มีความจำเพาะกับเซลล์มะเร็งเป้าหมาย โดยตัวนำส่งยานี้สร้างขึ้นจากดีเอ็นเอเป็นรูปทรงกลม (DNA sphere) โดยอาศัยเทคนิคที่เรียกว่า ดีเอ็นเอออริกามิ (DNA origami) หลังจากทำการออกแบบและสร้างโครงสร้าง DNA sphere ที่สามารถปิด-เปิดได้ตามแนวรอยต่อของทรงกลมและสามารถเปิดได้เมื่อถูกกระตุ้น เมื่อนำโครงสร้างที่ได้นี้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคต่าง ๆ พบว่า โครงสร้าง DNA sphere มีลักษณะเป็นทรงกลมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใกล้เคียงกับที่ได้ออกแบบไว้ หลังจากนั้นนำโครงสร้างที่ได้มาทดสอบการบรรจุยา โดยเริ่มจากการใช้ gold nanoparticles (AuNPs) เป็นตัวแทนของยา พบว่า สามารถทำการบรรจุ AuNPs เข้าไปภายในโครงสร้างได้ ต่อมาทำการทดสอบการบรรจุยา doxorubicin และการปลดปล่อยยาออกจากโครงสร้าง โดยพบว่าโครงสร้าง DNA sphere สามารถบรรจุยาได้ประมาณ 66.86% และสามารถปลดปล่อยยาได้ประมาณ 18.13% เมื่อทำการบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE/Mg²⁺ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นอกจากนี้ มีการนำเอา MUC-1 aptamer เข้ามาใช้ในการดัดแปลงโครงสร้าง DNA sphere เพื่อที่จะทำให้โครงสร้างดังกล่าวมีความจำเพาะกับเซลล์มะเร็งเป้าหมาย ทั้งนี้ คณะผู้วิจัยเลือกใช้เซลล์มะเร็งเต้านมสองชนิด คือ เซลล์ MDA-MB-231 และเซลล์ MCF-7 เพื่อที่จะทดสอบความจำเพาะของตัวนำส่งต่อเซลล์เป้าหมาย จากผลการทดสอบการแสดงออกของโปรตีน Mucin-1 ของเซลล์ทั้งสองชนิดทั้งในระดับ mRNA และในระดับโปรตีนจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR เทคนิค Western blot และเทคนิค immunofluorescence staining ที่แสดงให้เห็นว่าเซลล์ MCF-7 มีการแสดงออกของโปรตีน Mucin-1 ที่สูงกว่าเซลล์ MDA-MB-231 อย่างมาก และจากผลการทดสอบการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยเซลล์มะเร็งเป้าหมายโดยทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค fluorescence resonance energy transfer (FRET) ก็พบว่า โครงสร้าง DNA sphere สามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นดังกล่าวได้ตามที่ออกแบบไว้ ทั้งนี้ คณะผู้วิจัยยังได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการนำส่งยา doxorubicin ของโครงสร้าง DNA sphere ที่มีการดัดแปลงด้วย MUC-1 aptamer ไปยังเซลล์มะเร็งเป้าหมาย MCF-7 ซึ่งพบว่า ตัวนำส่งดังกล่าวมีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเป้าหมาย และสามารถนำส่งยาเพื่อทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้ยาเพียงอย่างเดียว

คำสำคัญ: ดีเอ็นเอออริกามิ, อนุภาคนาโนของดีเอ็นเอ, ระบบนำส่งยาแบบมีเป้าหมาย, มะเร็งเต้านม

ABSTRACT

Side effects, such as dizziness, nausea, and hair loss, from chemotherapy are major obstacles of medical treatment for cancer since chemotherapeutic agents could not distinguish between normal cells and cancer cells. To reduce these side effects of chemotherapeutic agents and improve therapeutic efficiency, a targeted drug delivery system has been developed. The objective of this study is to construct a nanocarrier in a spherical shape from DNA (DNA sphere) using DNA origami technique. Structure of DNA sphere has been characterized using several methods. Results showed that the DNA sphere formed with desired size and shape. Next, gold nanoparticles (AuNPs) were used as a model drug for loading inside the DNA sphere. TEM images revealed that AuNPs could be loaded inside the nanocarrier. Drug loading and releasing capacities of DNA sphere using doxorubicin were also investigated. After 48-hour incubation in TAE/Mg²⁺ buffer, the efficiencies of doxorubicin loading and release of DNA nanocarrier are 66.86% and 18.13%, respectively. To make the targeted drug delivery system, MUC-1 aptamer, which is specific to Mucin-1 protein, was modified onto the DNA sphere. Two breast cancer cells, MDA-MB-231 and MCF-7, were utilized to test this specificity. The expressions of Mucin-1 protein in these two cancer cells were examined using PCR, Western blot, and immunofluorescence staining. These results confirmed that Mucin-1 proteins are over-expressed in MCF-7 cells but they are not over-expressed in MDA-MB-231 cells. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) was used to determine the opening process of the DNA sphere. The FRET results exhibit that DNA sphere could be opened when triggered by MCF-7 cell lysate only. Furthermore, the doxorubicin-loaded aptamer-modified DNA sphere also exhibits high specificity to target cancer cells and higher efficiency compared to free doxorubicin.

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

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
บทคัดย่อ	2
ABSTRACT	3
บทนำ	7
วิธีการทดลอง	17
ผลการทดลอง	26
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	38
ข้อเสนอแนะ	41
บรรณานุกรม	42
ภาคผนวก	47
ประวัติคณะผู้วิจัย	52

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 เทคนิคดีเอ็นเอออริกามิ (DNA Origami)	13
รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ DNA aptamer เพื่อให้ตัวนำส่งยาเปิดออก	15
รูปที่ 3 โครงสร้าง DNA sphere ที่สามารถปิด-เปิดได้เมื่อได้รับการกระตุ้น	17
รูปที่ 4 การบรรจุ AuNPs เข้าไปภายในโครงสร้าง DNA sphere	20
รูปที่ 5 การปิด-เปิดของโครงสร้าง DNA sphere เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย KEY	23
รูปที่ 6 การปิด-เปิดของโครงสร้าง DNA sphere เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย cell lysate ของ MDA-MB-231 (ซ้าย) และ cell lysate ของ MCF-7 (ขวา)	24
รูปที่ 7 กลไกการควบคุมการเปิด-ปิดของโครงสร้างดีเอ็นเอออริกามิรูปทรงกลม	26
รูปที่ 8 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ที่ย้อมด้วย EB	27
รูปที่ 9 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค dynamic light scattering	27
รูปที่ 10 ภาพถ่ายโครงสร้าง DNA sphere แบบเปิด (open structure) จากกล้องจุลทรรศน์ TEM	28
รูปที่ 11 ภาพถ่ายโครงสร้าง DNA sphere แบบปิด (closed structure) จากกล้องจุลทรรศน์ TEM	28
รูปที่ 12 ภาพถ่ายโครงสร้าง DNA sphere จากกล้องจุลทรรศน์ AFM	29
รูปที่ 13 ภาพ DNA sphere ภายหลังจากบรรจุ AuNP จากกล้องจุลทรรศน์ TEM	29
รูปที่ 14 เปอร์เซ็นต์การบรรจุยา doxorubicin ภายในตัวนำส่ง	30
รูปที่ 15 เปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยยา doxorubicin ของตัวนำส่ง	31
รูปที่ 16 ปริมาณ mRNA ของโปรตีน MUC-1 ที่มีการแสดงออกในเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งสองชนิด	31
รูปที่ 17 ปริมาณโปรตีน MUC-1 ที่มีการแสดงออกในเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งสองชนิด	32
รูปที่ 18 การแสดงออกของโปรตีน MUC-1 ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งสองชนิด	32
รูปที่ 19 ผลการวิเคราะห์การปิด-เปิดของโครงสร้าง DNA sphere เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย KEY	33
รูปที่ 20 ผลการวิเคราะห์การปิด-เปิดของโครงสร้าง DNA sphere เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย cell lysate ของเซลล์ MDA-MB-231	34
รูปที่ 21 ผลการวิเคราะห์การปิด-เปิดของโครงสร้าง DNA sphere เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย cell lysate ของเซลล์ MCF-7	35
รูปที่ 22 ผลการวิเคราะห์การเข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านมทั้งสองชนิดของตัวนำส่งยา	36
รูปที่ 23 การมีชีวิตรอดของเซลล์ MDA-MB-231	36
รูปที่ 24 การมีชีวิตรอดของเซลล์ MCF-7	37

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

DNA	deoxyribonucleic acid
AuNPs	gold nanoparticles
DLS	dynamic light scattering
AFM	atomic force microscope
TEM	transmission electron microscope
FRET	fluorescence resonance energy transfer
EB	ethidium bromide

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

มะเร็งเป็นหนึ่งในโรคร้ายแรงที่คร่าชีวิตผู้คนเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก ทางกระทรวงสาธารณสุขเปิดเผยว่าขณะนี้มีคนตายด้วยโรคมะเร็งเกือบปีละ 8 ล้านคน โดยมีแนวโน้มจำนวนผู้ป่วยและเสียชีวิตจากมะเร็งเพิ่มขึ้นในทุกประเทศ จากข้อมูลของกระทรวงสาธารณสุขยังแสดงให้เห็นว่า ในประเทศไทยนั้นโรคมะเร็งเป็นสาเหตุการตายอันดับ 1 ติดต่อกันมาเป็นเวลาหลายปีแล้วและมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่จำนวนผู้เสียชีวิตจากโรคเบาหวานหรือเอตส์ในปีเดียวกันนั้นมีแนวโน้มลดลงเมื่อเปรียบเทียบจากจำนวนผู้เสียชีวิตในปี 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 นอกเหนือจากปัญหาความเป็นพิษของยาเคมีบำบัดที่มีต่อเซลล์ปกติแล้วยังพบปัญหาอื่น 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 การนำเอาโมเลกุลที่จะใช้ในการติดตามคูบริเวณที่พบเซลล์มะเร็งติดไปกับตัวนำส่งยาได้ด้วย

วัตถุประสงค์ของการทดลอง

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อพัฒนาระบบตัวนำส่งยาเคมีบำบัด ในการรักษาโรคมะเร็งเต้านม โดยการสร้างตัวนำส่งยาที่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเป้าหมาย และสามารถปลดปล่อยยาเพื่อไปยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม ซึ่งคณะผู้วิจัยทำการออกแบบและสร้างตัวนำส่งยารูปทรงกลมจากดีเอ็นเอโดยอาศัยเทคนิคดีเอ็นเอโอริกามิ (DNA origami; Rothemund, 2006)

ขอบเขตของการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ กลุ่มผู้วิจัยทำการออกแบบและสร้างระบบตัวนำส่งยาที่สร้างขึ้นจากโมเลกุลดีเอ็นเอเป็นโครงสร้างทรงกลมที่สามารถเปิด-ปิดได้ในแนวเส้นผ่านศูนย์กลาง และสามารถควบคุมการเปิด-ปิดตัวนำส่งยาได้เมื่อได้รับการกระตุ้นจากเซลล์มะเร็งเป้าหมายเพื่อให้มีการปลดปล่อยยาออกมายับยั้งการเจริญ และนำระบบตัวนำส่งยาที่ได้ไปศึกษาถึงความจำเพาะในการนำส่งยาและปลดปล่อยยาเปรียบเทียบกับระหว่างเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และ MDA-MB-231 โดยในงานวิจัยนี้ใช้ยาเคมีบำบัด doxorubicin เป็นตัวยาต้นแบบสำหรับการทดลอง พร้อมทั้งศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของยาเคมีบำบัด doxorubicin เมื่อมีการใช้และไม่มีการใช้ตัวนำส่งยา

ทฤษฎี สมมติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ในปัจจุบันมีการค้นคว้าวิจัยมากมายเพื่อที่จะพัฒนาระบบนำส่งยา (drug delivery system) เนื่องจากพบว่าการรักษาที่ไม่ได้ประสิทธิภาพนั้นอาจเกิดจากการที่ตัวยาไม่สามารถเข้าถึงเซลล์เป้าหมายได้มากเพียงพอ แต่หากเพิ่มปริมาณยาหรือสารเคมีที่จะใช้ในการรักษาก็อาจทำให้เกิดอาการข้างเคียงตามมามากยิ่งขึ้น ซึ่งในบางกรณีอาจทำให้เสียชีวิตได้ มีงานวิจัยทางการแพทย์ที่พยายามหาวิธีเพื่อทำให้การรักษาโรคมะเร็งด้วยยาเคมีบำบัดนั้นมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ไม่ว่าจะเป็นการค้นคว้าหาหรือสารเคมีชนิดใหม่ ๆ ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญหรือทำลายเซลล์มะเร็งแต่ในขณะเดียวกันก็ไม่ทำให้เกิดผลข้างเคียงใด ๆ ต่อเซลล์ปกติ ทั้งนี้การศึกษาวิจัยในลักษณะนี้นั้นทำได้ยากและใช้เวลาในการศึกษาวิจัยค่อนข้างนาน จึงมีการพยายามที่จะหาวิธีในการใช้ยารักษาโรคมะเร็งที่มีอยู่ในปัจจุบันให้ได้ประสิทธิภาพและสามารถลดผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นได้มากที่สุด ทำให้มีการเสนอแนวคิดในการพัฒนาระบบตัวนำส่งยาหรือพาหนะที่จะนำพาตัวยาไปยังเซลล์เป้าหมายเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา โดยยาเคมีบำบัดจะถูกกักเก็บอยู่ภายในโครงสร้างขนาดเล็กหรือที่เรียกว่า ตัวนำส่งยา (drug carriers) ซึ่งสามารถควบคุมการเคลื่อนที่ของตัวนำส่งยาเพื่อให้เดินทางไปยังเซลล์หรืออวัยวะเป้าหมายเท่านั้น ทำให้การนำส่งยามีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้การที่ตัวยาถูกกักเก็บไว้ภายในตัวนำส่งก็จะช่วยป้องกันไม่ให้ตัวยาถูกทำลายหรือกำจัดออกจากร่างกายโดยระบบภูมิคุ้มกัน (reticuloendothelial system) อีกทั้งยังสามารถออกแบบให้ตัวนำส่งยามีระบบในการควบคุมการปลดปล่อยยาออกสู่ภายนอกเมื่อมีความต้องการ ทำให้ยาสามารถออกฤทธิ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น สามารถนำส่งยาให้เข้าถึงเซลล์เป้าหมายได้มากขึ้น ซึ่งจะช่วยให้ปริมาณยาที่ต้องใช้ลดน้อยลง ทั้งยังช่วยลดความเป็นพิษของยาที่อาจเกิดขึ้นกับเซลล์ปกติ มีการนำวัสดุหลากหลายชนิดมาใช้ในการสร้างตัวนำส่งยา ไม่ว่าจะเป็นสารชีวโมเลกุล เช่น ลิพิด หรือสารสังเคราะห์ เช่น พอลิเมอร์ต่าง ๆ ซึ่งแต่ละชนิดนั้นก็มีความสมบัติ กลไกการทำงาน ข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกันไป อย่างไรก็ตามคุณสมบัติหนึ่งที่สำคัญของวัสดุที่จะนำมาใช้ในการสร้างตัวนำส่งยานั้น คือ ต้องไม่มีความเป็นพิษต่อร่างกาย (biocompatibility) และสามารถย่อยสลายได้โดยไม่ทำให้เกิดการตกค้างอยู่ภายในร่างกาย (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 การนำส่งยาโดยผ่านระบบตัวนำส่งยาอาจช่วยลดปัญหาในการเกิดการดื้อยา (drug resistance) ที่มักพบในการใช้ยาเคมีบำบัดทั่วไปที่เกิดจากการที่เซลล์สร้าง pump ขึ้นที่ผิวเซลล์เพื่อใช้ในการกำจัดยาออกนอกเซลล์ได้ (Heath, 2008; Moorthi, 2011) เนื่องจากตัวนำส่งยาที่ใช้จะถูกรับเข้าสู่เซลล์ผ่านทาง endocytosis ซึ่งจะไม่ต้องผ่าน glycoprotein P ซึ่งเป็น pump ที่อยู่บนผิวเซลล์

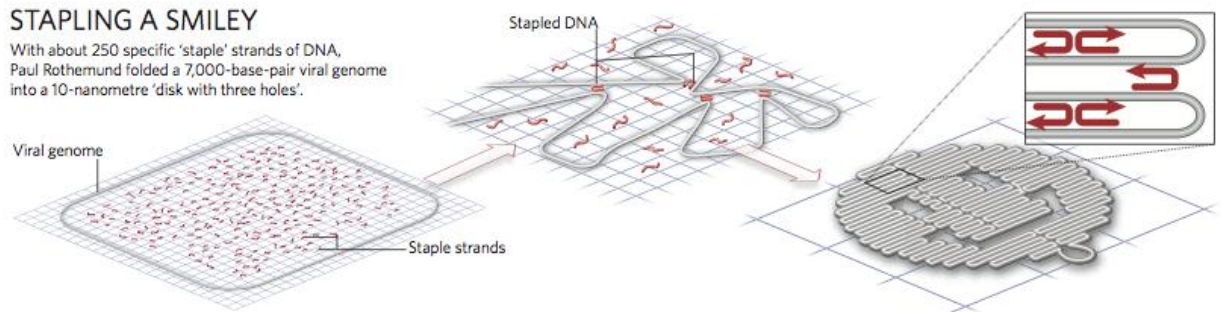
ในปัจจุบันนี้มีการพัฒนา nanocarriers ขึ้นในหลาย ๆ รูปแบบจากวัสดุหลากหลายชนิด โดยตัวนำส่งยาที่ได้รับความนิยมและมีการค้นคว้าวิจัยกันอย่างกว้างขวางมักจะถูกสร้างขึ้นจากลิพิด ได้แก่ ไลโปโซม (liposome) ซึ่งเป็น artificial phospholipid vesicles โดยหลัก ๆ แล้วไลโปโซมจะช่วยในการละลายของตัวยาที่มีปัญหาในการละลายน้ำ 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) มีคณะผู้วิจัยได้ทำการค้นคว้าเพื่อสร้างระบบนำส่งยาดด้วยอนุภาคนาโน (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 แต่ปัญหาหลักที่พบคืออนุภาคนาโนนั้นไม่มี biocompatibility และยังไม่สามารถที่จะดัดแปลงพื้นผิวด้านนอกของอนุภาคให้มีความหลากหลายทางหน้าที่ (multi-functional activity) ได้มากนัก เช่น การนำเอา bioactive โมเลกุลอื่น ๆ พวกดีเอ็นเอ หรือโปรตีนมาติดที่ผิวด้านนอกเพื่อใช้ในการระบุถึงเป้าหมายของตัวนำส่งยา เนื่องจากไม่มีหมู่ฟังก์ชัน (functional groups) ที่จะสามารถทำการดัดแปลง (modified) ได้ (Lee, 2010) ถึงแม้ว่าอนุภาคนาโนของโลหะ (metal nanoparticles) ที่ถูกนำมาใช้เป็นพาหนะในการนำส่งยานั้นจะมีความเป็น biocompatibility และ chemically inert แต่ก็สามารถตกค้างอยู่ภายในร่างกายได้นานหลังจากที่ได้รับเข้าไป และการสะสมภายในร่างกายเป็นเวลานานก็อาจจะนำไปสู่ความเป็นพิษ (toxicity) ต่อร่างกายได้เช่นกัน (Wang, 2012)

ทั้งนี้ดีเอ็นเอก็เป็นชีวโมเลกุลชนิดหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจและมีการนำมาใช้ในงานทางด้านนาโนเทคโนโลยี เกิดเป็นศาสตร์แขนงใหม่ที่มีชื่อเรียกว่า structural DNA nanotechnology โดยเป็นการนำเอาโมเลกุลดีเอ็นเอมาใช้ในการสร้างสิ่งต่าง 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 ช่วยในการเชื่อมต่อหรือตัดแต่งโมเลกุลตามต้องการ พร้อมทั้งประยุกต์เข้ากับหลักในการออกแบบโครงสร้าง จะทำให้สามารถออกแบบและสร้างโครงสร้างที่มีความซับซ้อนกว่าโครงสร้างเกลียวคู่ของดีเอ็นเอในธรรมชาติที่มีความแม่นยำในระดับนาโนเมตรได้ (complex DNA nanostructures) นอกจากนั้นโมเลกุลดีเอ็นเอยังมีหมู่ฟังก์ชันที่สามารถทำปฏิกิริยาเพื่อเชื่อมต่อกับชีวโมเลกุลชนิดต่าง ๆ หรืออนุภาคนาโนได้อีกด้วย ทำให้เราสามารถออกแบบและสร้างโครงสร้างที่มีขนาดระดับนาโนเมตรเพื่อใช้ในการนำส่งยาได้อย่างแม่นยำและเนื่องจากดีเอ็นเอเป็นชีวโมเลกุลที่พบได้ในธรรมชาติ 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 1) เพื่อให้เกิดเป็นโครงสร้างต่าง ๆ ตามที่มีการออกแบบไว้ (Rothemund, 2006) ซึ่งเทคนิคนี้ได้รับความนิยมอย่างมากมาย ทำให้เกิดการสร้างสรรค์ทั้งแบบสองมิติและสามมิติจากโมเลกุลดีเอ็นเอมากมาย

หลากหลายรูปแบบ เช่น สี่เหลี่ยม ดาว แผ่นที่อเมริกาเหนือ 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 ที่สามารถตอบสนองต่อตัวกระตุ้นที่อยู่บนผิวเซลล์มะเร็งและเกิดการกระตุ้นให้เปลี่ยนแปลงโครงสร้างแบบมีเงื่อนไข 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)

เนื่องด้วยมีการรายงานไว้ว่า 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) โดยในงานวิจัยครั้งนี้คณะผู้วิจัยจะทำการออกแบบให้ตัวนำส่งยาทรูปรังกลมนั้นสามารถปิด-เปิดได้เมื่อได้รับการกระตุ้น ดังเช่นไดอะแกรมในรูปที่ 2 โดยจะใช้ DNA aptamer (เส้นสีน้ำเงิน) ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์ที่สามารถจับกับโปรตีนหรือโมเลกุลขนาดเล็ก (วงกลมสีแดง) ได้อย่างจำเพาะ (Jayasena, 1999) เป็นตัวรับสัญญาณจากโปรตีนที่พบว่ามีการแสดงออกมากผิดปกติในเซลล์มะเร็ง (over-expression) เมื่อไม่ได้รับสัญญาณ DNA aptamer จะจับอยู่กับดีเอ็นเอสายเดี่ยว (เส้นสีส้ม) ที่อยู่บริเวณรอยต่อของตัวนำส่งยาทรูปรังกลม เมื่อมีสัญญาณหรือเมื่อพบโปรตีนดังกล่าว จะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสามมิติของ DNA aptamer เพื่อเข้าจับกับโปรตีนนั้น ทำให้ DNA aptamer หลุดออกจากดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เคยจับกันอยู่ ทำให้ตัวนำส่งยาเปิดออก และปลดปล่อยตัวยาออกสู่ภายนอกได้



รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ DNA aptamer เพื่อทำให้ตัวนำส่งยาเปิดออก (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) ทำให้คณะผู้วิจัย

เลือกใช้เซลล์มะเร็งเต้านมทั้งสองชนิดดังกล่าวเป็นโมเดลสำหรับการทดสอบความจำเพาะของระบบตัวนำส่งยาที่สร้างขึ้น ซึ่งน่าจะช่วยให้การนำส่งยาไปยังเซลล์มะเร็งเป้าหมายมีความจำเพาะมากยิ่งขึ้น

ถึงแม้ว่าในปัจจุบันนี้จะมีผู้ให้ความสนใจในการค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาระบบนำส่งยาเพิ่มมากขึ้นแต่งานวิจัยทางด้านนี้ยังคงอยู่ในระยะเริ่มต้น ยังต้องการการค้นคว้าทดลองและการบูรณาการความรู้ในแขนงวิชาต่าง ๆ เช่น ชีวเคมี เคมี ฟิสิกส์ วัสดุศาสตร์ เกษศาสตร์และการแพทย์ เป็นต้น เพื่อให้สามารถนำไปใช้ได้จริง ทั้งนี้มีการพัฒนาตัวนำส่งยาที่สร้างขึ้นจากวัสดุต่าง ๆ ซึ่งแต่ละชนิดก็มีทั้งข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไปดังที่ได้กล่าวไปบ้างแล้วข้างต้น คณะผู้วิจัยมีความสนใจที่จะนำเอาโมเลกุลดีเอ็นเอมาใช้ในการสร้างตัวนำส่งยาโดยใช้เทคนิค DNA origami เนื่องด้วยว่าดีเอ็นเอเป็นชีวโมเลกุลชนิดหนึ่งที่พบในธรรมชาติ ดังนั้นจึงไม่มีความเสี่ยงทางด้านสุขภาพ (health risk) คือสามารถเข้ากันได้ดีกับร่างกายและยังสามารถย่อยสลายได้ภายในร่างกาย ไม่เหมือนกับระบบนำส่งยาที่สร้างขึ้นจากอนุภาคโลหะ ทั้งยังไม่มีผลกระทบต่อสุขภาพของตัวนำส่งยาอีกด้วย นอกจากนี้ยังสามารถที่จะทำการดัดแปลงพื้นผิวของโครงสร้างด้านนอกได้อย่างแม่นยำด้วย antibodies หรือเปปไทด์ ซึ่งในงานวิจัยครั้งนี้คณะผู้วิจัยเลือกที่จะใช้ DNA aptamer เพื่อช่วยในการบอกลิงเซลล์เป้าหมายที่ต้องการนำส่งยา เนื่องจากความจำเพาะที่มากกว่าความทนทานที่สูงกว่า และราคาต้นทุนการผลิตที่ถูกลงกว่าของ DNA aptamer เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ antibodies และเพื่อเป็นการพิสูจน์แนวคิดดังกล่าวนี้คณะผู้วิจัยจึงเลือกที่จะทำการทดสอบในเบื้องต้นนี้กับการนำส่งยาเคมีบำบัด doxorubicin ที่ใช้ในการรักษามะเร็งเต้านม โดยจะใช้เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และ MDA-MB-231 เป็นเซลล์มะเร็งเป้าหมายที่จะใช้ในการทดสอบ โดย DNA aptamer ที่ใช้นั้นจะมีความจำเพาะต่อโปรตีนที่พบมากเป็นพิเศษบนผิวของเซลล์มะเร็งเป้าหมายและในขณะเดียวกันก็ยังทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการปิด-เปิดของตัวนำส่งเพื่อปล่อยยาออกสู่ภายนอกอีกด้วย ซึ่งถ้าหากว่าการพัฒนาตัวนำส่งยานี้ประสบความสำเร็จจะสามารถดัดแปลงตัวนำส่งยานี้ให้มีความจำเพาะและใช้ในการรักษาโรคมะเร็งชนิดอื่น ๆ ได้อีกด้วย ทั้งยังสามารถนำส่งยาหรือโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น siRNA เพื่อใช้ในการรักษาโรคอื่น ๆ ได้เช่นกัน นอกเหนือจากนั้นตัวนำส่งยานี้ยังสามารถนำไปใช้ในการวิจัยต่อยอดเพื่อให้ความสามารถหรือหน้าที่อื่น ๆ ที่มากกว่าการนำส่งยา เช่น การติดโมเลกุลที่จะใช้ในการติดตามดูบริเวณที่พบเซลล์มะเร็ง เป็นต้น

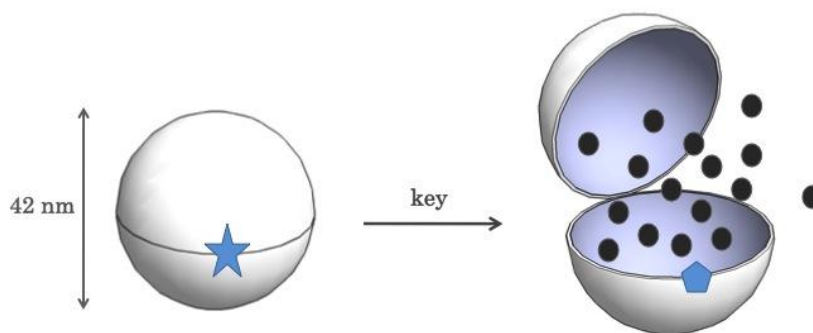
วิธีการทดลอง

การทำงานวิจัยในครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาระบบนำส่งยารูปทรงกลมที่สร้างขึ้นจากดีเอ็นเอไปยังเซลล์มะเร็งเป้าหมาย โดยจะเริ่มจากการออกแบบตัวนำส่งยา การสร้างและวิเคราะห์ตัวนำส่งยา การทดสอบการปิด-เปิดตัวนำส่งยา การทดสอบการบรรจุยาภายในตัวนำส่งโดยใช้อนุภาคนาโนของทองคำ (gold nanoparticles; AuNPs) เป็นตัวแทนของยาที่จะทำการบรรจุ การบรรจุยาโดยใช้ยาเคมีบำบัด doxorubicin และทำการทดสอบประสิทธิภาพการนำส่งยา ตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม โดยทำการทดลองเปรียบเทียบในมะเร็งเต้านมสองชนิด คือ MCF-7 และ MDA-MB-231 ที่เป็นเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีและไม่มี การแสดงออกของโปรตีน MUC-1 ตามลำดับ

(1) การออกแบบตัวนำส่งยา

ทำการออกแบบตัวนำส่งยาเป็นโครงสร้างดีเอ็นเอโอริกามีรูปทรงกลม (DNA sphere) ซึ่งมีการรายงานรูปแบบการเกิด crossover ของ staple strand เพื่อยึด scaffold (M13mp18) ให้เกิดเป็นโครงสร้าง sphere ไว้แล้ว (Han, 2011) มาทำการ align ลำดับเบสของ M13mp18 ลงไปใหม่ เพื่อให้ได้ลำดับเบสของ staple strand ที่จะนำไปสังเคราะห์ต่อไป (ภาคผนวก)

ทำการออกแบบระบบที่จะใช้ในการเปิด-ปิดโครงสร้าง DNA sphere บริเวณรอยต่อตามแนวเส้นผ่านศูนย์กลาง ดังแสดงในรูปที่ 3 โดยใช้ DNA aptamer เป็นตัวล็อก ซึ่ง aptamer ดังกล่าวจะสามารถตอบสนองต่อโปรตีนที่อยู่บนผิวของเซลล์มะเร็ง เพื่อใช้ในการควบคุมโครงสร้าง DNA sphere ให้เปิดหรือปิด



รูปที่ 3 โครงสร้าง DNA sphere ที่สามารถปิด-เปิดได้เมื่อได้รับการกระตุ้น

(2) การสร้างตัวนำส่งยา

ทำการสั่งซื้อพลาสมิดดีเอ็นเอ M13mp18 (Bayou Biolab, USA) ซึ่งเป็นพลาสมิดสายเดี่ยวเส้นยาว เพื่อใช้เป็น scaffold และสังเคราะห์ดีเอ็นเอเส้นสั้น ๆ (IDT DNA, Singapore) เพื่อใช้เป็น staple strands ตามที่ได้ออกแบบไว้ ทำการสร้างตัวนำส่งโดยนำดีเอ็นเอที่เป็นองค์ประกอบทั้งหมดนั้นมาใส่รวมกันใน

สารละลายบัฟเฟอร์ 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 เก็บสารละลายตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ก่อนนำไปทำการวิเคราะห์โครงสร้างที่ได้ต่อไป

(3) การวิเคราะห์ตัวนำส่งยาด้วยเทคนิค gel electrophoresis

ทำการเตรียมโครงสร้างดีเอ็นเอโอริกามีโดยการ anneal ดังที่กล่าวในหัวข้อที่ (2) ข้างต้นที่ความเข้มข้น 10 nM นำโครงสร้างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 1.5% agarose gel ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE (0.5X) ที่มี 16 mM MgCl₂ ภายใต้สภาวะแบบ native conditions ใช้กระแสไฟฟ้า 70 โวลต์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำเจลที่ได้ไปย้อมด้วย ethidium bromide

(4) การวิเคราะห์ตัวนำส่งยาด้วยเทคนิค dynamic light scattering (DLS)

ทำการเตรียมโครงสร้างดีเอ็นเอโอริกามีโดยการ anneal ดังที่กล่าวในหัวข้อข้างต้นที่ความเข้มข้น 25 nM นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปทำการกรองด้วย 0.45 µm PES filter เพื่อกำจัดฝุ่นละอองก่อนนำไปทำการวิเคราะห์ ทำการวิเคราะห์โครงสร้างที่ได้ด้วยเครื่อง Malvern Zetasizer NanoZS90 วัดที่ scattering angle เท่ากับ 90° หลังจากนั้นใช้ ALV software สำหรับการคำนวณค่า hydrodynamic radius และ size distribution

(5) การวิเคราะห์ตัวนำส่งยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM)

ทำการเตรียมโครงสร้างดีเอ็นเอโอริกามีโดยการ anneal ดังที่กล่าวในหัวข้อข้างต้นที่ความเข้มข้น 10 nM 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

(6) การวิเคราะห์ตัวนำส่งยาด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (Atomic Force Microscope; AFM)

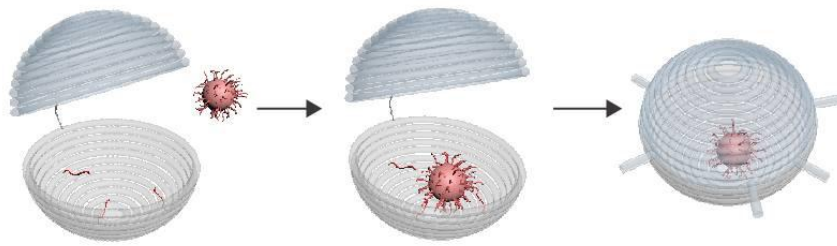
ทำการเตรียมโครงสร้างดีเอ็นเอโอริกามีโดยการ anneal ดังที่กล่าวในหัวข้อข้างต้นที่ความเข้มข้น 10 nM นำโครงสร้างที่ได้ไปหยดลงบน freshly cleaved mica เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วทำให้แห้ง นำไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ AFM (Veeco) ด้วย tapping in air mode โดยใช้ ScanAsyst-Air silicon nitride cantilever ที่ scan rate เท่ากับ 1 Hz

(7) การเตรียม ssDNA-modified AuNPs

ทำการเตรียม ssDNA-modified AuNPs โดยเริ่มจากการรีดิวซ์ thiolated poly-T ssDNA (5' HS-TTTTT 3') ด้วย tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) ในน้ำ แล้วทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ G25 (GE Healthcare) หลังจากนั้นนำ thiolated ssDNA ที่ผ่านการรีดิวซ์แล้วเติมลงในสารละลาย AuNPs (Ted Pella, USA) ที่อัตราส่วน ssDNA : AuNPs เท่ากับ 100 : 1 ใน 1X PBS เขย่าด้วย vortex เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเติม NaCl จนได้ความเข้มข้นเกลือสุดท้ายเท่ากับ 0.3 M นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงและทำการแยกส่วนใสทิ้งไป ทำการล้าง ssDNA-modified AuNPs ด้วย 0.1 M PBS 4 ครั้งเพื่อล้างเอา ssDNA ที่ไม่ติดกับ AuNPs ออกไป ทำการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของ ssDNA-modified AuNPs ที่ได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 nm

(8) การทดสอบการบรรจุ AuNPs ภายในตัวนำส่ง

ทำการทดสอบการบรรจุ ssDNA-modified AuNPs ลงในโครงสร้างดีเอ็นเอโอริกามีรูปทรงกลม ดังรูปที่ 4 โดยทำการ anneal โครงสร้าง DNA sphere ที่มี staple strand ที่เชื่อมต่อกับ poly-A ssDNA สำหรับจับกับ ssDNA-modified AuNPs ที่ความเข้มข้น 10 nM ในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE/Mg²⁺ (40 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM acetic acid, 2 mM EDTA, 12.5 mM magnesium acetate) นำโครงสร้างดีเอ็นเอโอริกามีที่ได้ไปป้อนร่วมกับ ssDNA-modified AuNPs และ lock strand ด้วยเครื่อง thermocycler โดยทำการ anneal จาก 45 °C ไปยัง 25 °C ในเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำโครงสร้างที่ได้ไปทำบริสุทธิ์ด้วย agarose gel electrophoresis ตัด band ที่ได้ใส่ลงใน Freeze 'N Squeeze DNA gel extraction spin column ทำการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 x g เป็นเวลา 3 นาที ก่อนนำไปตรวจสอบด้วยกล้อง TEM



รูปที่ 4 การบรรจุ AuNPs เข้าไปภายในโครงสร้าง DNA sphere

(9) การทดสอบการบรรจุยา doxorubicin ภายในตัวนำส่ง

ทำการทดสอบการบรรจุยา doxorubicin ภายในตัวนำส่งยา โดยทำการ anneal โครงสร้าง DNA sphere 2.5 nM ในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE/Mg²⁺ (40 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM acetic acid, 2 mM EDTA, 12.5 mM magnesium acetate) ด้วยเครื่อง thermocycler โดยใช้อุณหภูมิและระยะเวลาดังนี้ ลดอุณหภูมิจาก 68 °C ไปยัง 25 °C ด้วยอัตราเร็วเท่ากับ 0.6 °C ต่อนาที หลังจากนั้นลดอุณหภูมิจาก 25 °C ไปยัง 4 °C ด้วยอัตราเร็วเท่ากับ 1 °C ต่อนาที นำโครงสร้าง DNA sphere ไปป้อนร่วมกับสารละลาย doxorubicin ความเข้มข้น 2 mg/mL ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที แยกตะกอน (pellet) และส่วนใส (supernatant) ออกจากกัน นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader เพื่อหาปริมาณยา doxorubicin ที่ไม่ถูกบรรจุอยู่ในโครงสร้าง DNA sphere นำค่าที่ได้มาใช้ในการคำนวณหาความสามารถในการบรรจุยา (loading capacity) ของโครงสร้างตามวิธีที่มีรายงานก่อนหน้านี้ (Jiang et al., 2012) ดังสมการด้านล่าง

$$D_{in} = D_{total} - D_{free} \quad (1)$$

$$\% \text{ loading capacity} = (D_{in} / D_{total}) \times 100\% \quad (2)$$

เมื่อ D_{in} คือ ปริมาณของยา doxorubicin ที่บรรจุอยู่ในโครงสร้าง DNA sphere

D_{total} คือ ปริมาณของยา doxorubicin ตั้งต้นที่ใช้ทำการบรรจุ

D_{free} คือ ปริมาณของยา doxorubicin ที่เหลืออยู่ในสารละลาย (supernatant)

(10) การทดสอบการปลดปล่อยยา doxorubicin ของตัวนำส่ง

ทำการเตรียมโครงสร้าง DNA sphere ที่มียา doxorubicin บรรจุอยู่ตามวิธีการในข้อที่ (10) แล้วนำโครงสร้างที่ได้ไปทดสอบการปลดปล่อยของยา doxorubicin โดยทำการบ่มโครงสร้างดังกล่าวในสารละลาย

บัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบกำหนดเวลาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที แยกตะกอน (pellet) และส่วนใส (supernatant) ออกจากกัน นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader เพื่อหาปริมาณยา doxorubicin ที่ถูกปลดปล่อยออกจากโครงสร้าง DNA sphere นำค่าที่ได้มาใช้ในการคำนวณหาอัตราเร็วในการปลดปล่อยยา (release rate) ของโครงสร้าง ดังสมการด้านล่าง

$$\text{Release rate} = D_{\text{out}} / \text{the length of time (minute)} \quad (3)$$

เมื่อ D_{out} คือ ปริมาณยา doxorubicin ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากโครงสร้าง DNA sphere

(11) การทดสอบการแสดงออกของโปรตีน MUC-1 ในเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิด

a. ตรวจสอบการแสดงออกในระดับ mRNA

ทำการตรวจสอบการแสดงออกในระดับ mRNA ของโปรตีน MUC-1 ซึ่งเป็นหนึ่งใน biomarker สำคัญที่พบในเซลล์มะเร็งเต้านม ทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 และ MCF-7 ใน 6-cm petri dish ปริมาณ 1×10^6 เซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C ที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการสกัดแยก RNA โดยใช้ GF-1 Total RNA Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) ตรวจวัดปริมาณ Total RNA ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร นำ RNA ที่ได้จากแต่ละตัวอย่างไปทำ reverse transcription โดยใช้ RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) และใช้ hexamer primers แบบสุ่ม ทำการ reverse transcription ในปริมาตร 20 uL ที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วทำการหยุดปฏิกิริยาโดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 10 นาที ทำการหาปริมาณการแสดงออกของยีนที่สนใจด้วยเทคนิค real-time PCR โดยนำ complementary DNA หรือ cDNA ที่ได้ไปใช้ในการทำ PCR ซึ่งมีลำดับเบสของ primer ดังนี้ Forward: 5'-GAAAGA ACTACGGG CAGCTGG-3' และ Reverse: 5'-CAAGTTGGCAGAAGTGGCTGC-3' (ขนาด 203 bp) และใช้ β -actin เป็น internal control ซึ่งมีลำดับเบสของ primer ดังนี้ Forward: 5'-CGAGGCCAGAGCAAGAGAG-3' และ Reverse: 5'-CTCGTAGATGGGCACAGTGTG-3' (ขนาด 334 bp) สภาวะที่ใช้ในการทำ PCR คือ 95 °C for 2 minutes, 30 cycles of 95 °C for 30 seconds, 55 °C for 30 seconds and 72 °C for 45 seconds, and 72 °C for 5 minutes ทำการตัดแยก PCR product ที่ได้ด้วย 1% agarose gel และย้อมสีด้วย ethidium bromide นอกจากนี้ทำการเพิ่มจำนวน cDNA ด้วย qRT-PCR โดยใช้ SYBR green PCR master mix (FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) from Roche) ใช้วิธี $\Delta\Delta\text{Ct}$ ในการคำนวณหาปริมาณการแสดงออกของยีนเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

b. ตรวจสอบการแสดงออกในระดับโปรตีน

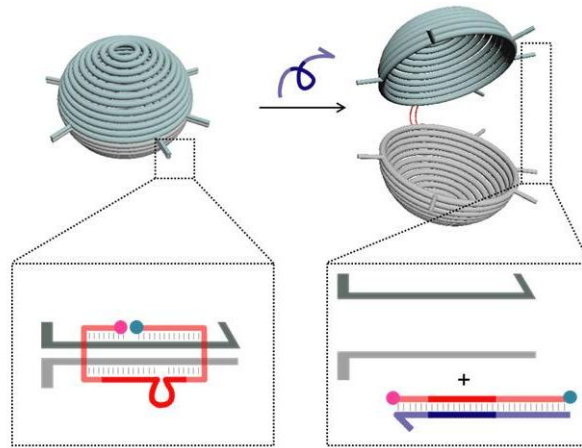
ทำการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน MUC-1 ในเซลล์มะเร็งเต้านม ทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 และ MCF-7 ใน 6-cm petri dish ปริมาณ 1×10^6 เซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ที่มี $5\% \text{ CO}_2$ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการสกัดโปรตีนจากเซลล์ด้วยสารละลาย lysis buffer ที่มี protease inhibitors (pH 7.4) นำตะกอนเซลล์ไปทำการ lyse ใน TENT lysis buffer (50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM NaF, 1% (v/v) TritonX-100, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM PMSF) นำ lysate ที่ได้ไปทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นทำการตรวจวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay นอกจากนั้นทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot โดยเริ่มจากการรันเจล SDS-PAGE โดยโหลดโปรตีนปริมาณ 40 mg ใน 8% polyacrylamide gel ทำการรันเจลแล้วย้ายโปรตีนไปยัง nitrocellulose membrane ด้วย Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) พร้อมทั้ง block membrane ด้วย 5% BSA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมงเพื่อป้องกัน nonspecific binding site หลังจากนั้นทำการตรวจสอบด้วย primary antibody โดยใช้ mouse anti-mucin1 (Cell Signaling Technology, Denvers, MA, USA) บ่มร่วมกับ membrane ที่อุณหภูมิ 4°C ข้ามคืน หลังจากล้างสารละลาย primary antibody ออกแล้ว ทำการบ่ม membrane ร่วมกับ secondary antibody โดยใช้ rabbit anti-mouse antibody ที่มีการติดฉลากด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำการตรวจวัดสัญญาณของ ECL ที่เกิดขึ้นโดยใช้ G-box chemiluminescence ในการทดลองนี้ใช้ β -actin เป็น internal control

c. ตรวจสอบด้วยเทคนิค immunofluorescence staining

ทำการตรวจสอบโปรตีน MUC1 ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 และ MCF-7 ด้วยเทคนิค immunocytochemistry เริ่มจากทำการเลี้ยงเซลล์ใน 12-well plate ที่ความหนาแน่น 10,000 cells/well สำหรับเซลล์ MDA-MB-231 และ 20,000 cells/well สำหรับเซลล์ MCF-7 หลังจากทำการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการล้างเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS จำนวน 2 ครั้งแล้วทำการ fixed ด้วย 4% paraformaldehyde ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที และทำการ block เซลล์ในสารละลายบัฟเฟอร์ PBS ที่มี 20% FBS เป็นเวลา 30 นาที ทำการตรวจสอบโปรตีน MUC1 โดยใช้ mouse anti-mucin1 antibody เป็น primary antibody และใช้ secondary antibody เป็น FITC-conjugated anti-mouse antibody นอกจากนั้นทำการ counterstain เซลล์ด้วย Hoechst 33342 (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) และ phalloidin หลังจากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปวิเคราะห์และถ่ายภาพด้วย Live Cell Fluorescence Imaging System (Olympus, Japan)

(12) การวิเคราะห์การปิด-เปิดของตัวนำส่งยาเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเทคนิค fluorescence resonance energy transfer (FRET)

ทำการออกแบบให้โครงสร้าง DNA sphere ให้สามารถควบคุมการปิด-เปิดได้เมื่อได้รับการกระตุ้น โดยออกแบบให้มีเส้นดีเอ็นเอสายเดี่ยวบริเวณรอยต่อตามแนวเส้นผ่านศูนย์กลางยื่นออกมา 5 บริเวณจากทรงกลมครึ่งล่างและทรงกลมครึ่งบน ดังแสดงในรูปที่ 5 ซึ่งดีเอ็นเอสายเดี่ยวจากทรงกลมครึ่งบนและทรงกลมครึ่งล่างที่บริเวณเดียวกันนั้นไม่สามารถจับคู่กันได้ เนื่องจากลำดับเบสไม่ได้เป็นเบสคู่สมกัน ครึ่งทรงกลมทั้งสองจะถูกปิดกลายเป็นทรงกลมได้ก็ต่อเมื่อมีดีเอ็นเอสายเดี่ยวอีกสายที่ทำหน้าที่เป็น “LOCK” (เส้นสีแดง) ซึ่งมีลำดับเบสเป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวจากทรงกลมครึ่งบนและครึ่งล่างที่จะจับกันแบบจำเพาะและทำให้กลายเป็นโครงสร้างทรงกลมแบบปิด ทั้งนี้ มีการแทรกลำดับเบสของ DNA aptamer ซึ่งสามารถจับจำเพาะกับโปรตีน MUC1 ที่อยู่บนผิวของเซลล์มะเร็งเข้าไปในลำดับเบสของสายดีเอ็นเอที่ทำหน้าที่เป็น LOCK เพื่อใช้ในการควบคุมโครงสร้าง DNA sphere ให้เปิดหรือปิดเมื่อได้รับการกระตุ้น

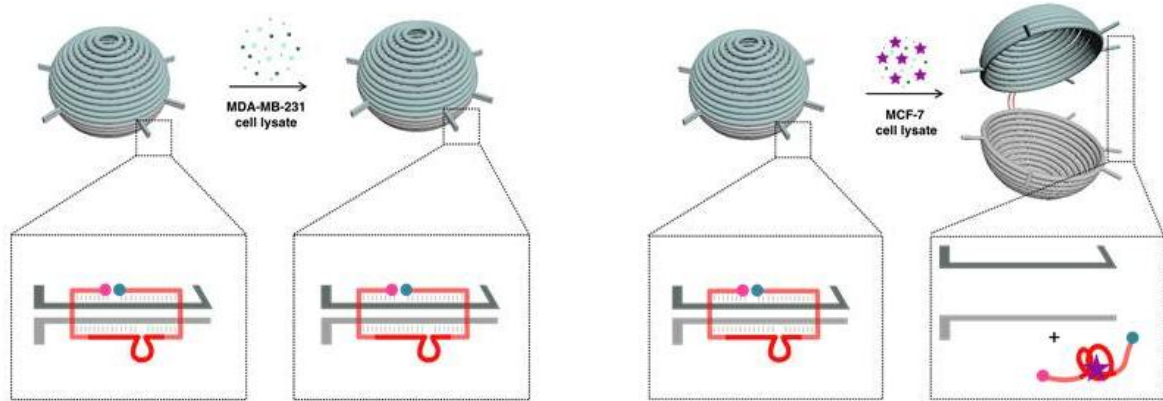


รูปที่ 5 การปิด-เปิดของโครงสร้าง DNA sphere เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย KEY

ทำการเตรียมโครงสร้าง DNA sphere โดยการ anneal ดังที่กล่าวในหัวข้อข้างต้นที่ความเข้มข้น 25 nM ทั้งนี้มีการติดฉลากสารเรืองแสงให้กับ LOCK (เส้นสีแดง) โดยติดสารเรืองแสง Cy3 ที่ปลายด้าน 3' และติดสารเรืองแสง C5 ที่ปลายด้าน 5' หลังจากนั้นทำบริสุทธิ์โครงสร้างที่ได้ด้วยคอลัมน์ Amicon Ultra-0.5 mL แล้วนำโครงสร้างดีเอ็นเอโริกามิที่ได้ไปตรวจวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ด้วยเครื่อง spectrofluorimeter ทำการกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 520 nm และติดตามการเรืองแสงที่ความยาวคลื่น 540-800 nm ใช้ slit width เท่ากับ 10 nm ทำการเติม “KEY” ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่มีลำดับเบสเป็นเบสคู่สมกับ LOCK ลงไปป่มร่วมกันและทำการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่เกิดขึ้นเทียบกับเวลา

หลังจากการทดสอบการเปิดของโครงสร้าง DNA sphere โดยการกระตุ้นด้วย KEY แล้วก็ทำการทดสอบการเปิดของโครงสร้างโดยการกระตุ้นด้วย cell lysate ของเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 และ

MCF-7 โดยทำการทดลองดังนี้ ทำการเตรียมโครงสร้าง DNA sphere ดังที่กล่าวมาข้างต้นเช่นเดียวกับการทดสอบ KEY แต่เปลี่ยนจากการเติม KEY เป็นการเติม cell lysate ที่ได้จากเซลล์แต่ละชนิดลงไป แล้วติดตามการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่เกิดขึ้นเทียบกับเวลา ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 การปิด-เปิดของโครงสร้าง DNA sphere เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย cell lysate ของ MDA-MB-231 (ซ้าย) และ cell lysate ของ MCF-7 (ขวา)

(13) การทดสอบประสิทธิภาพการนำส่งยาของตัวนำส่ง

a. การทดสอบการเข้าสู่เซลล์ของตัวนำส่ง

ทั้งนี้มีการออกแบบเพื่อทำการติดตามการเรืองแสงให้กับโครงสร้าง DNA sphere ด้วยการดัดแปลง staple strand เส้นหนึ่งให้มีส่วนของดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ด้านปลายมี biotin ติดอยู่และยื่นออกมาด้านนอกของโครงสร้าง และทำการดัดแปลงโครงสร้างตัวนำส่งด้วย aptamer ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน MUC-1 ทำการเตรียมโครงสร้าง DNA sphere โดยการ anneal ดังที่กล่าวในหัวข้อข้างต้น หลังจากนั้นทำบริสุทธิ์โครงสร้างที่ได้ด้วยคอลัมน์ Amicon Ultra-0.5 mL เพื่อกำจัด staple strand ส่วนเกินออก แล้วนำโครงสร้างที่ได้ไปบ่มร่วมกับ streptavidin-coated quantum dot (strept-QD) ทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ที่ความหนาแน่น 100,000 cells/well หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการบ่มเซลล์ร่วมกับโครงสร้าง DNA sphere เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการล้างเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS จำนวน 3 ครั้ง แล้วทำการ fixed เซลล์ด้วย 3.7% formaldehyde ใน PBS ก่อนนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค Flow cytometry

b. การทดสอบประสิทธิภาพของการนำส่งยาของตัวนำส่ง

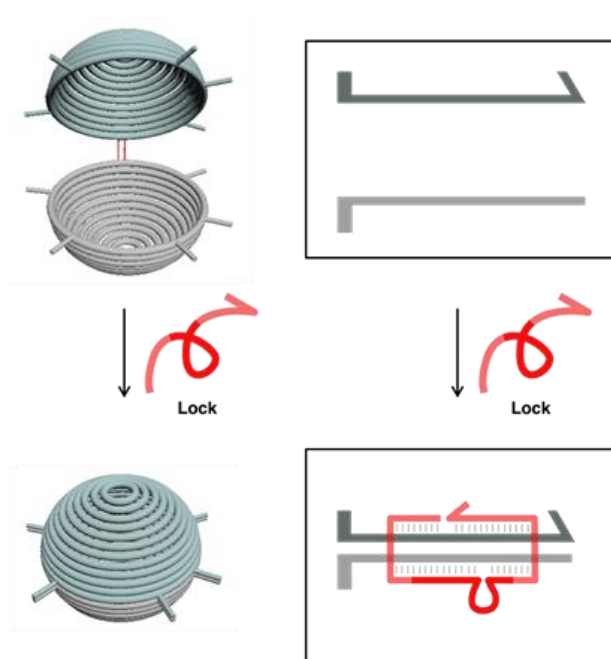
ทำการทดสอบประสิทธิภาพของการนำส่งยา doxorubicin ของตัวนำส่ง DNA sphere ที่มีการดัดแปลงด้วย aptamer ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน MUC-1 ด้วยการทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ (cell viability assay) ทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 โดยใช้ 96-well plate ที่ความหนาแน่น 3,500 cells/well ใน DMEM ที่มี 10% FBS, 100 U/mL penicillin และ 100 ug/mL streptomycin ที่อุณหภูมิ

37 °C ที่มี 5% CO₂ ข้ามคืน ทำการบ่มเซลล์ร่วมกับ โครงสร้าง DNA sphere ที่มียา doxorubicin บรรจุอยู่ในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (0.75 – 50 uM) ตามวิธีการในข้อที่ (10) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเซลล์ไปตรวจสอบความมีชีวิตรอดด้วย MTT assay

ผลการทดลอง

(1) ผลการออกแบบตัวนำส่งยา

โครงสร้างดีเอ็นเอโอริกามีรูปทรงกลม (DNA sphere) ที่สามารถปิด-เปิดได้ตรงบริเวณรอยต่อตามแนวเส้นผ่านศูนย์กลาง ดังรูปที่ 7 ซึ่งใช้รูปแบบในการ crossover ของ staple strands ตามแบบของ Han และคณะ (Han, 2011) เมื่อทำการ align ลำดับเบสของ M13 ลงไปใหม่ จะทำให้ได้ลำดับเบสของ staple strands ชุดใหม่ที่จะใช้ในการสร้างโครงสร้างดังกล่าว ดังแสดงในภาคผนวก นอกจากนี้ ในการควบคุมการปิด-เปิด มีการออกแบบให้ใช้ 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)

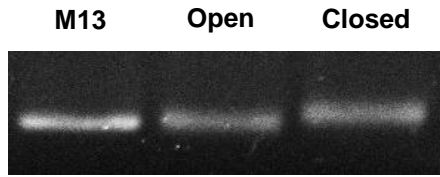


รูปที่ 7 กลไกการควบคุมการเปิด-ปิดของโครงสร้างดีเอ็นเอโอริกามีรูปทรงกลม

(2) ผลการสร้างและวิเคราะห์ตัวนำส่งยา

a. ผลการวิเคราะห์ตัวนำส่งยาด้วยเทคนิค gel electrophoresis

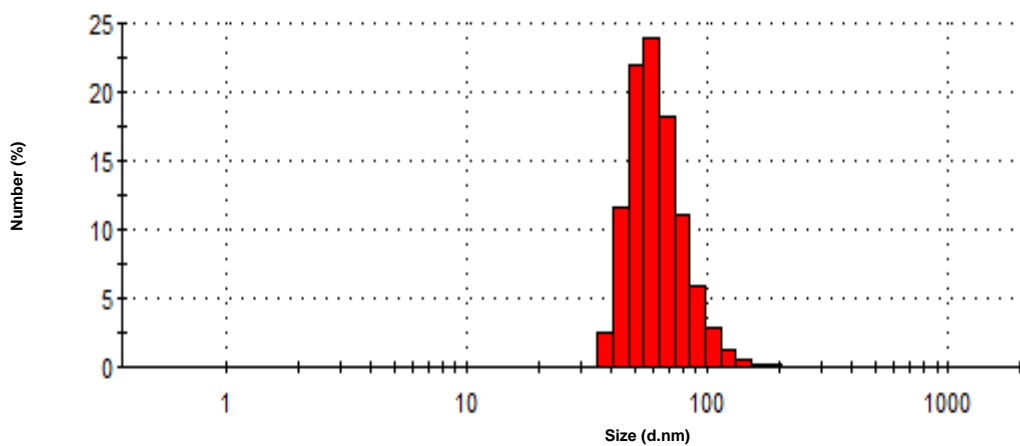
หลังจากทำการสร้างโครงสร้าง DNA sphere โดยการ annealing ในเครื่อง thermocycler แล้วย้นำโครงสร้าง DNA sphere ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 1.5% agarose gel ใช้กระแสไฟฟ้า 70 โวลต์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วย่นำเจลที่ได้ไปย้อมด้วย ethidium bromide (EB) ได้ผลการทดลอง ดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ที่ย้อมด้วย EB (lane 1 – M13; lane 2 – open sphere; lane 3 – closed sphere)

b. ผลการวิเคราะห์ตัวนำส่งยาด้วยเทคนิค dynamic light scattering (DLS)

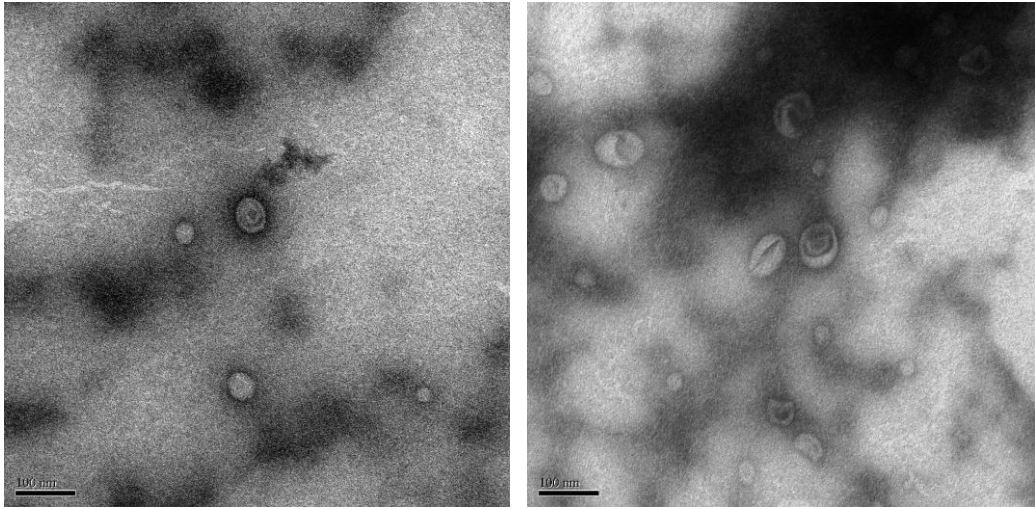
หลังจากทำการสร้างโครงสร้าง DNA sphere โดยการ annealing ในเครื่อง thermocycler แล้วย้นำโครงสร้าง DNA sphere ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค dynamic light scattering (DLS) ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 9 จะเห็นได้ว่าโครงสร้าง DNA sphere มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโดยเฉลี่ยประมาณ 70 นาโนเมตร ซึ่งจากผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้เป็นค่า hydrodynamic radius ที่มักจะมีค่ามากกว่าความเป็นจริงเล็กน้อย



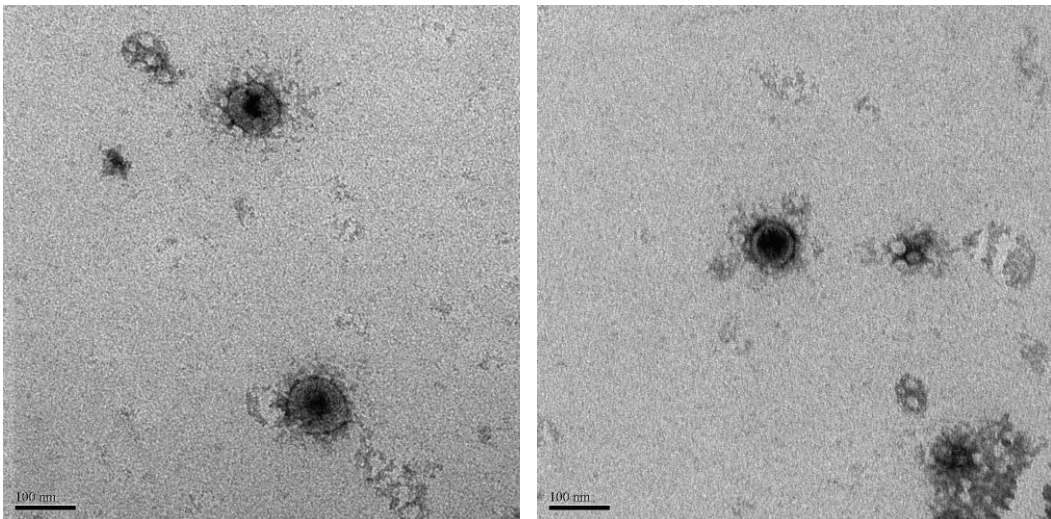
รูปที่ 9 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค dynamic light scattering

c. ผลการวิเคราะห์ตัวนำส่งยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM)

ผลการวิเคราะห์โครงสร้าง DNA sphere ที่สร้างขึ้นด้วยกล้องจุลทรรศน์ TEM ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 10 และรูปที่ 11



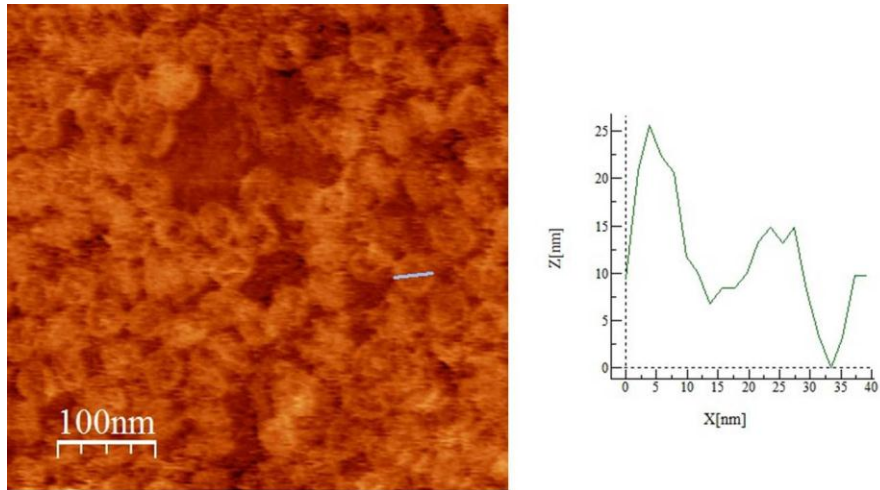
รูปที่ 10 ภาพถ่ายโครงสร้าง DNA sphere แบบเปิด (open structure) จากกล้องจุลทรรศน์ TEM (กำลังขยาย 25,000 เท่า)



รูปที่ 11 ภาพถ่ายโครงสร้าง DNA sphere แบบปิด (closed structure) จากกล้องจุลทรรศน์ TEM (กำลังขยาย 25,000 เท่า)

d. ผลการวิเคราะห์ตัวนำส่งยาด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (Atomic Force Microscope; AFM)

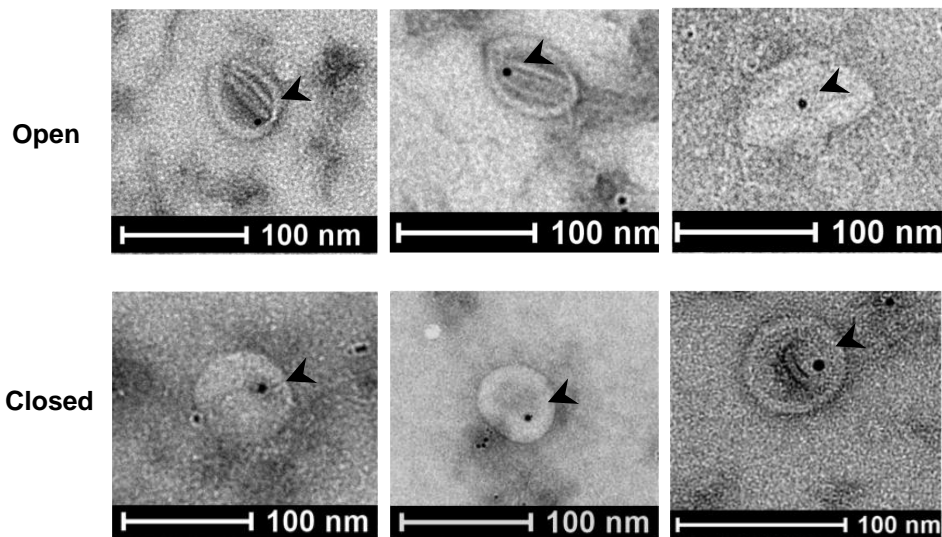
ผลการวิเคราะห์โครงสร้าง DNA sphere ที่สร้างขึ้นด้วยกล้องจุลทรรศน์ AFM ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 12



รูปที่ 12 ภาพถ่ายโครงสร้าง DNA sphere จากกล้องจุลทรรศน์ AFM

(3) ผลการทดสอบการบรรจุภายในตัวนำส่ง

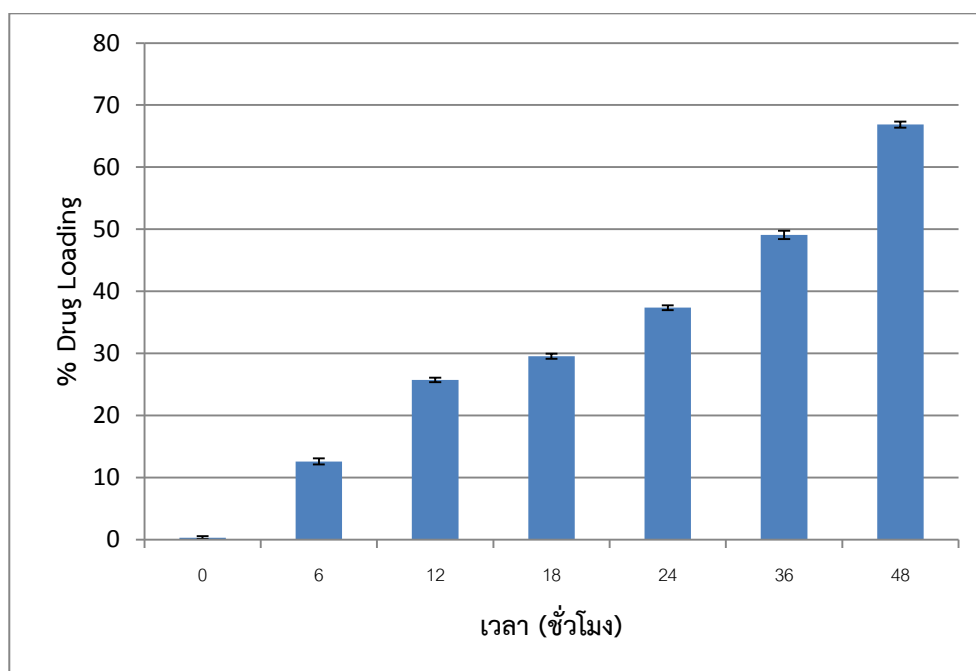
จากการทดสอบการบรรจุภายในตัวนำส่งโดยใช้ AuNP เป็นตัวแทนของยาที่จะถูกบรรจุเข้าไปภายในโครงสร้าง ทำการตัดแปลง AuNP ด้วยการตรึงดีเอ็นเอสายเดี่ยวไว้ที่ผิวด้านนอกของ AuNP ซึ่งดีเอ็นเอสายเดี่ยวดังกล่าวจะมีลำดับเบสที่เป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ยื่นออกมาอยู่ภายในโครงสร้าง DNA sphere ผลการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ TEM ดังแสดงในรูปที่ 13



รูปที่ 13 ภาพ DNA sphere ภายหลังจากบรรจุ AuNP จากกล้องจุลทรรศน์ TEM

(4) การทดสอบการบรรจุยา doxorubicin ภายในตัวนำส่ง

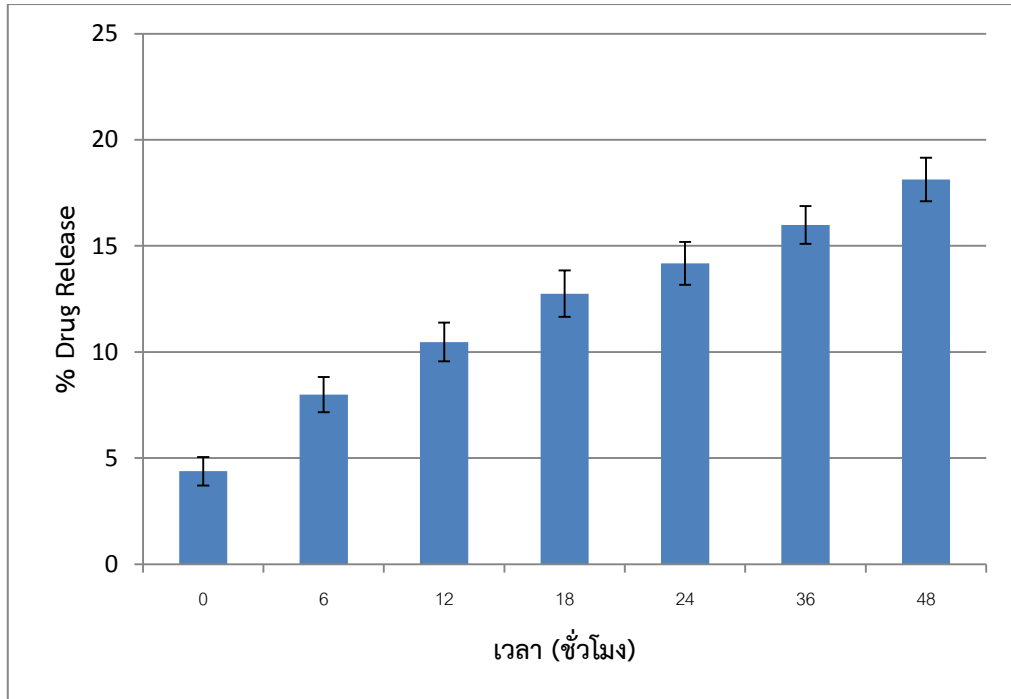
จากการทดสอบการบรรจุยา doxorubicin ภายในตัวนำส่ง โดยทำการบ่มโครงสร้าง DNA sphere (2.5 nM) ร่วมกับยา doxorubicin (2 mM) ในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE/Mg²⁺ ที่เวลาต่าง ๆ นำไปทำการปั่นเหวี่ยงแยกสารละลายส่วนใสไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร เพื่อหาปริมาณของยา doxorubicin ที่เหลือจากการบรรจุเข้าไปในโครงสร้าง นำค่าที่ได้ไปคำนวณเพื่อหาเปอร์เซ็นต์การบรรจุยา (% drug loading) นำมาพลอตกราฟดังแสดงในรูปที่ 14



รูปที่ 14 เปอร์เซ็นต์การบรรจุยา doxorubicin ภายในตัวนำส่ง

(5) การทดสอบการปลดปล่อยยา doxorubicin ของตัวนำส่ง

จากการทดสอบการปลดปล่อยยา doxorubicin ของตัวนำส่ง โดยทำการบ่มโครงสร้าง DNA sphere ที่ผ่านการบรรจุยา doxorubicin ในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE/Mg²⁺ ที่เวลาต่าง ๆ แล้วนำไปทำการปั่นเหวี่ยงแยกสารละลายส่วนใสไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร เพื่อหาปริมาณของยา doxorubicin ที่ถูกปล่อยออกจากโครงสร้าง นำค่าที่ได้ไปคำนวณเพื่อหาเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยยา (% drug release) นำมาพลอตกราฟดังแสดงในรูปที่ 15

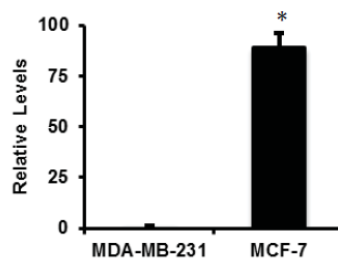


รูปที่ 15 เปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยยา doxorubicin ของตัวนำส่ง

(6) การทดสอบการแสดงออกของโปรตีน MUC-1 ในเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิด

a. ตรวจสอบการแสดงออกในระดับ mRNA

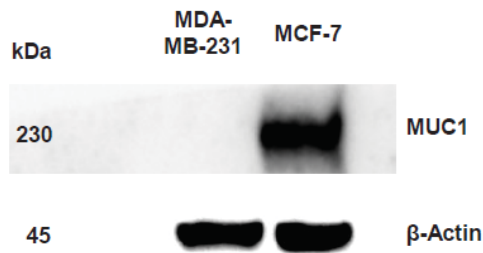
จากการตรวจสอบการแสดงออกของ mRNA ของโปรตีน MUC-1 ในเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งสองชนิด คือ เซลล์ MDA-MB-231 และเซลล์ MCF-7 ด้วยเทคนิค real-time PCR แสดงให้เห็นว่า เซลล์ MCF-7 มีการแสดงออกของ mRNA ของโปรตีน MUC-1 ที่สูงมากเมื่อเทียบกับเซลล์ MDA-MB-231 ดังแสดงในรูปที่ 16



รูปที่ 16 ปริมาณ mRNA ของโปรตีน MUC-1 ที่มีการแสดงออกในเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งสองชนิด

b. ตรวจสอบการแสดงออกในระดับโปรตีน

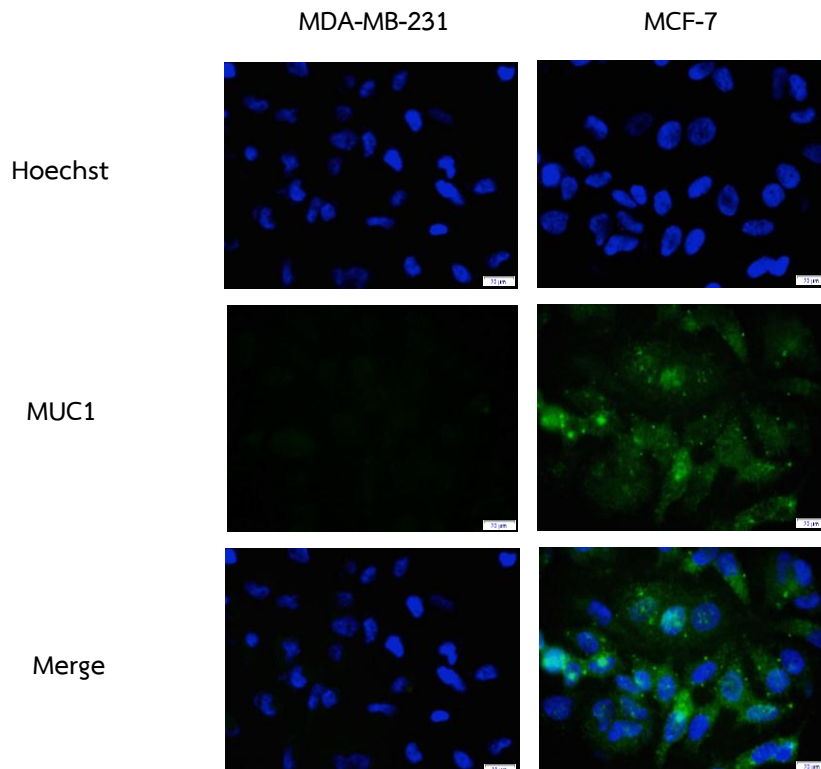
จากการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน MUC-1 ในเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งสองชนิด คือ เซลล์ MDA-MB-231 และเซลล์ MCF-7 ด้วยเทคนิค Western blot แสดงให้เห็นว่า เซลล์ MCF-7 มีการแสดงออกของโปรตีน MUC-1 ที่สูงมากเมื่อเทียบกับเซลล์ MDA-MB-231 ดังแสดงในรูปที่ 17



รูปที่ 17 ปริมาณโปรตีน MUC-1 ที่มีการแสดงออกในเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งสองชนิด

c. ตรวจสอบด้วยเทคนิค immunofluorescence staining

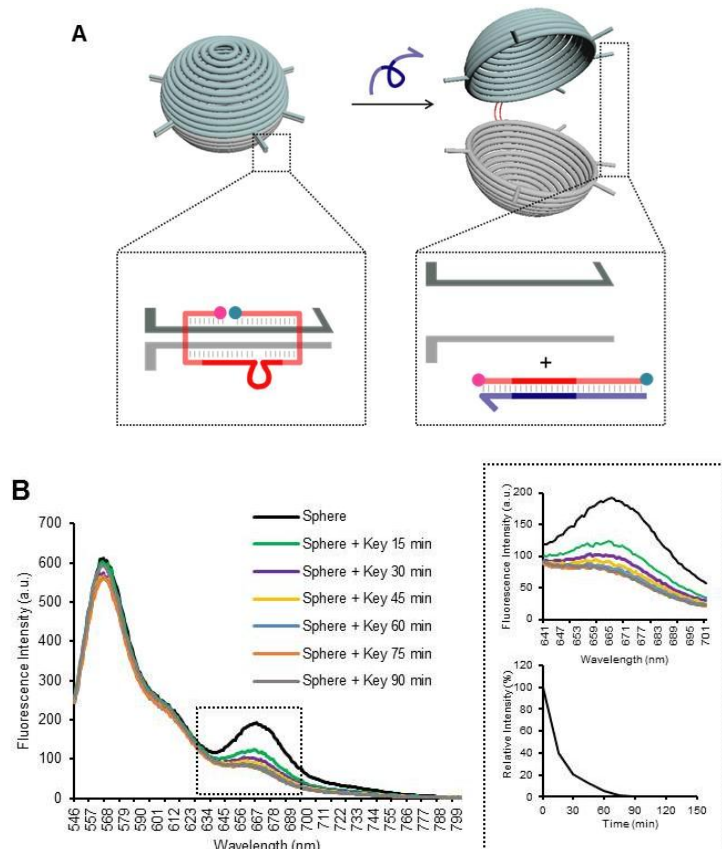
จากการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน MUC-1 ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งสองชนิด คือ เซลล์ MDA-MB-231 และเซลล์ MCF-7 ด้วยเทคนิค immunofluorescence staining แสดงให้เห็นว่า เซลล์ MCF-7 มีการแสดงออกของโปรตีน MUC-1 ที่สูงมากเมื่อเทียบกับเซลล์ MDA-MB-231 ดังแสดงในรูปที่ 18



รูปที่ 18 การแสดงออกของโปรตีน MUC-1 ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งสองชนิด

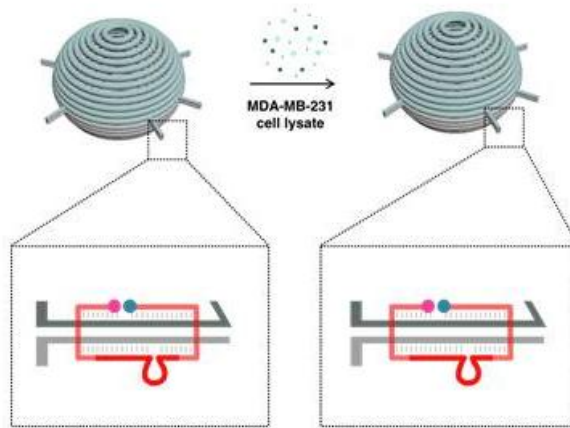
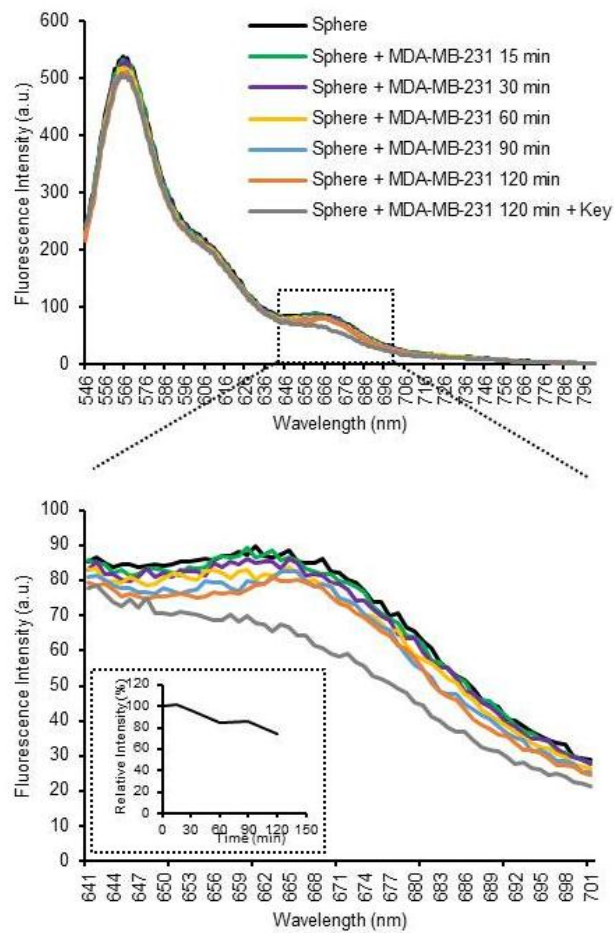
(7) ผลการวิเคราะห์การปิด-เปิดของตัวนำส่งยาเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยเทคนิค fluorescence resonance energy transfer (FRET)

จากการวิเคราะห์การปิด-เปิดของโครงสร้าง DNA sphere เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย KEY ด้วยเทคนิค FRET พบว่า KEY ที่เติมลงไปนั้นสามารถทำให้โครงสร้าง DNA sphere จากเริ่มต้นที่เป็นทรงกลมแบบปิดนั้นเปิดออกได้ เนื่องจากพบการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ กล่าวคือ พบว่าการเกิด FRET ลดน้อยลงจากค่าเริ่มต้นเมื่อมีการเติม KEY ลงไป และค่อย ๆ ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป ดังแสดงในรูปที่ 19



รูปที่ 19 ผลการวิเคราะห์การปิด-เปิดของโครงสร้าง DNA sphere เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย KEY

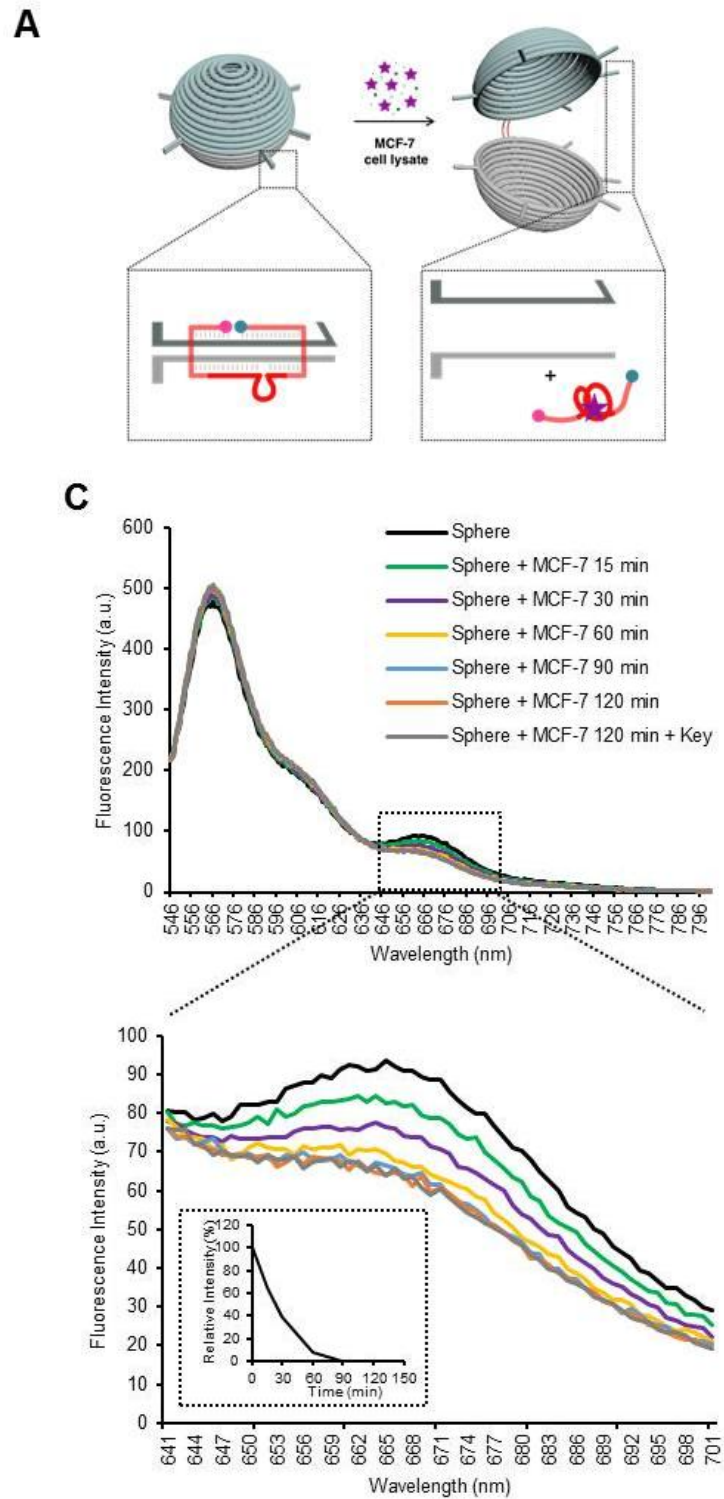
จากการวิเคราะห์การปิด-เปิดของโครงสร้าง DNA sphere เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย cell lysate ของเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ด้วยเทคนิค FRET พบว่า cell lysate ที่เติมลงไปนั้นไม่สามารถทำให้โครงสร้าง DNA sphere จากเริ่มต้นที่เป็นทรงกลมแบบปิดนั้นเปิดออกได้ เนื่องจากไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ กล่าวคือ พบว่าการเกิด FRET ไม่ลดน้อยลงจากค่าเริ่มต้นเมื่อมีการเติม cell lysate ของเซลล์ MDA-MB-231 ลงไป และไม่ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป แต่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์เมื่อมีการเติม KEY ลงไป ดังแสดงในรูปที่ 20

B**D**

รูปที่ 20 ผลการวิเคราะห์การปิด-เปิดของโครงสร้าง DNA sphere เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย cell lysate ของเซลล์ MDA-MB-231

จากการวิเคราะห์การปิด-เปิดของโครงสร้าง DNA sphere เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย cell lysate ของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ด้วยเทคนิค FRET พบว่า cell lysate ที่เติมลงไปนั้นสามารถทำให้โครงสร้าง DNA sphere จากเริ่มต้นที่เป็นทรงกลมแบบปิดนั้นเปิดออกได้ เนื่องจากพบการ

เปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ กล่าวคือ พบว่าการเกิด FRET ลดน้อยลงจากค่าเริ่มต้นเมื่อมีการเติม cell lysate ของเซลล์ MCF-7 ลงไป และค่อย ๆ ลดลงเมื่อเวลาผ่านไปจนเท่ากับการเติม KEY ลงไป ดังแสดงในรูปที่ 21

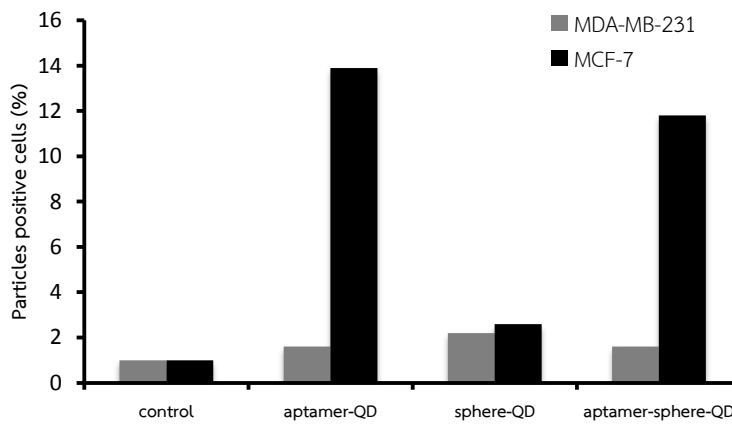


รูปที่ 21 ผลการวิเคราะห์การปิด-เปิดของโครงสร้าง DNA sphere เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย cell lysate ของเซลล์ MCF-7

(8) การทดสอบประสิทธิภาพการนำส่งยาของตัวนำส่ง

a. การทดสอบการเข้าสู่เซลล์ของตัวนำส่ง

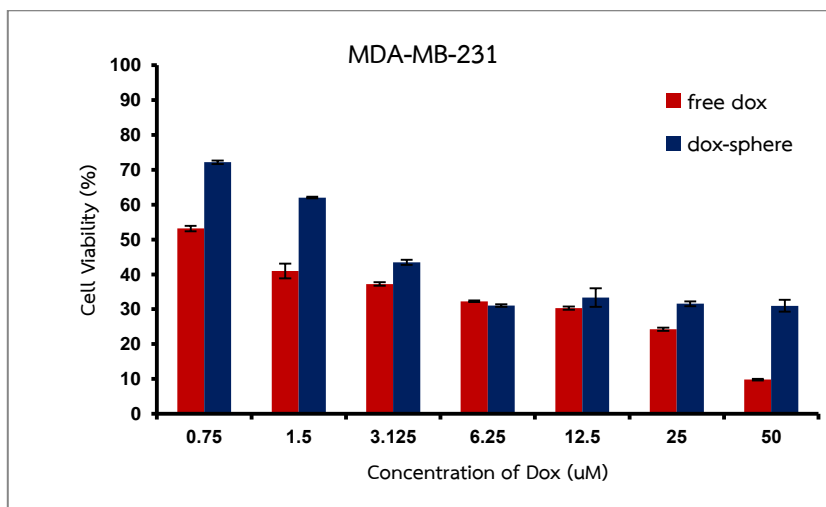
จากการทดสอบการเข้าสู่เซลล์ของตัวนำส่ง เมื่อมีการติดฉลากโครงสร้าง DNA sphere ด้วยควอนตัมดอท (quantum dot; QD) และตัดแปลงด้วย aptamer ที่จำเพาะต่อโปรตีน MUC-1 หลังจากบ่มโครงสร้างดังกล่าวร่วมกับเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งสองชนิดแล้วนั้น นำไปวิเคราะห์ผลที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค flow cytometry จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ตัวนำส่งยาที่มีการตัดแปลงด้วย aptamer นั้นจะสามารถเข้าสู่เซลล์ MCF-7 ที่มีการแสดงออกของโปรตีน MUC-1 ได้มากกว่าเซลล์ MDA-MB-231 ดังแสดงในรูปที่ 22



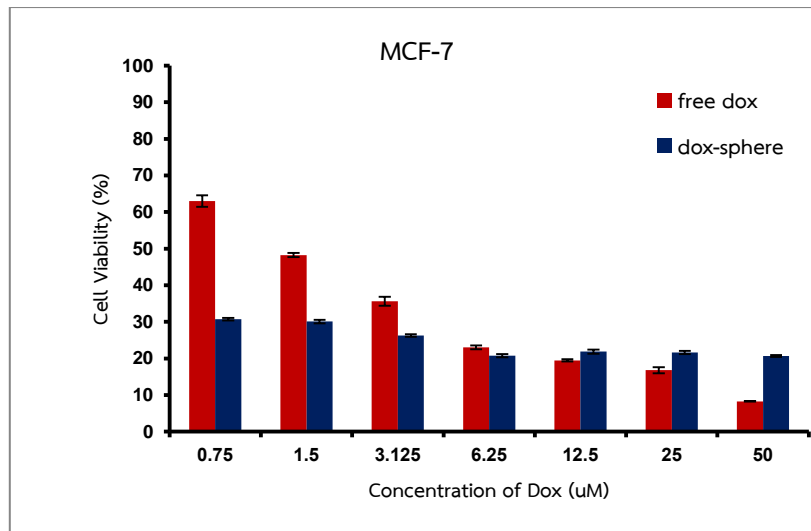
รูปที่ 22 ผลการวิเคราะห์การเข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านมทั้งสองชนิดของตัวนำส่งยา

b. การทดสอบประสิทธิภาพของการนำส่งยาของตัวนำส่ง

จากการทดสอบประสิทธิภาพของการนำส่งยา doxorubicin ของโครงสร้าง DNA sphere ที่มีการตัดแปลงด้วย aptamer ที่จำเพาะต่อโปรตีน MUC-1 เมื่อทำการบ่มร่วมกับเซลล์มะเร็งเต้านมสองชนิด คือ MDA-MB-231 และ MCF-7 ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 23 และรูปที่ 24 ตามลำดับ



รูปที่ 23 การมีชีวิตรอดของเซลล์ MDA-MB-231



รูปที่ 24 การมีชีวิตรอดของเซลล์ MCF-7

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า การใช้ DNA sphere ที่มีการดัดแปลงด้วย aptamer เป็นตัวนำส่งยา doxorubicin นั้น สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ซึ่งมีการแสดงออกที่มากกว่าปกติของโปรตีน MUC-1 ได้ดีกว่าเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ซึ่งมีการแสดงออกของโปรตีน MUC-1 ที่น้อยมาก นั่นแสดงให้เห็นว่า ตัวนำส่งยาที่สร้างขึ้นนั้นมีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเป้าหมายและทำให้การนำส่งยาเพื่อยับยั้งการเจริญของเซลล์มีประสิทธิภาพมากขึ้น

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

อภิปรายผลการทดลอง

การทำงานวิจัยในครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาระบบนำส่งยาที่สร้างขึ้นจากดีเอ็นเอไปยังเซลล์มะเร็งเป้าหมาย โดยเริ่มต้นจากการออกแบบตัวนำส่งยา การสร้างและวิเคราะห์ตัวนำส่งยา แล้วนำไปทำการทดสอบต่าง ๆ ดังนี้ การทดสอบการบรรจุยาภายในตัวนำส่งโดยใช้อนุภาคนาโนของทองคำ (gold nanoparticle; AuNP) เป็นตัวแทนของยาที่จะทำการบรรจุ การทดสอบการบรรจุและปลดปล่อยยา doxorubicin การทดสอบการแสดงออกของโปรตีน MUC-1 ซึ่งจะใช้เป็น biomarker สำหรับเซลล์มะเร็งเป้าหมาย การทดสอบการปิด-เปิดตัวนำส่งยาเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย KEY และ cell lysate ที่ได้จากเซลล์มะเร็งเป้าหมาย และการทดสอบประสิทธิภาพการนำส่งยาของตัวนำส่งยาที่สร้างขึ้น

สำหรับการออกแบบตัวนำส่งยานั้น ทำโดยการนำเอารูปแบบการ crossover ของ staple strands ที่ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างรูปทรงกลม (DNA sphere) ที่มีการเรียงตัวไว้แล้วโดย Han และคณะ (Han, 2011) มาใช้ เมื่อทำการ align ลำดับเบสของ M13 ลงไปก็จะได้ลำดับเบสของ staple strands ซึ่งเป็นเบสคู่สมกับ M13 ที่ตำแหน่งต่าง ๆ ออกมา และทำการปรับแก้ staple strand ในบางตำแหน่งเพื่อให้มีระบบปิด-เปิดของโครงสร้างทรงกลมตามแนวรอยต่อ ซึ่งออกแบบให้มีดีเอ็นเอสายเดี่ยวยื่นออกมาจากครึ่งทรงกลมด้านล่างและครึ่งทรงกลมด้านบนที่บริเวณเดียวกันทั้งหมด 5 บริเวณเพื่อใช้ในการปิด-เปิดโครงสร้าง ทั้งนี้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ยื่นออกมาในบริเวณเดียวกันนั้นจะไม่สามารถเข้าจับกันได้ด้วยเบสคู่สม ต้องอาศัยดีเอ็นเอสายเดี่ยวอีกเส้นหนึ่ง ที่เรียกว่า LOCK ซึ่งมีลำดับเบสเป็นเบสคู่สมกับทั้งสองเส้น ทำให้เมื่อมีการเติม LOCK ลงไปจะทำให้โครงสร้างอยู่ในรูปแบบปิด (closed sphere) หลังจากทำการ anneal โครงสร้าง DNA sphere แล้วจึงนำไปทำการวิเคราะห์โครงสร้างที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคต่าง ๆ ได้แก่ gel electrophoresis, dynamic light scattering (DLS), กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope; TEM) และกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (atomic force microscope; AFM) ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคต่าง ๆ นั้นพบว่า โครงสร้าง DNA sphere มีลักษณะเป็นทรงกลมและมีขนาดใกล้เคียงกับที่ออกแบบไว้

ในการทดสอบการบรรจุยาภายในตัวนำส่ง ในขั้นแรกนี้คณะผู้วิจัยใช้ gold nanoparticles (AuNPs) เป็นตัวแทนของยาที่จะนำมาบรรจุไว้ภายใน เพื่อให้ง่ายต่อการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ TEM โดยนำเอา poly-Ts ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่มีหมู่ thiol (-SH) ที่ปลาย 5' มาทำการตรึงลงบน AuNPs (5 nm) ส่วนโครงสร้าง DNA sphere นั้นก็มีการดัดแปลง staple strand ให้มีส่วนของดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่มีลำดับเบสเป็น poly-As ยื่นออกมาจากโครงสร้างอยู่ภายในทรงกลมเพื่อให้สามารถจับกันกับ poly-Ts ที่อยู่บน AuNPs ได้ด้วยเบสคู่สม หลังจาก anneal โครงสร้าง DNA sphere และทำการบ่มร่วมกับ poly-T-modified AuNPs แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ TEM จะเห็นว่ามี AuNPs อยู่ภายในโครงสร้าง DNA sphere ตามที่ได้ออกแบบไว้ แสดงให้เห็นว่าสามารถทำการบรรจุ AuNPs ลงในโครงสร้าง DNA sphere ได้

หลังจากนั้น ทำการทดสอบการบรรจุยา doxorubicin เข้าไปภายในโครงสร้าง DNA sphere ซึ่งจะเห็นว่า ยา doxorubicin นั้นจะถูกบรรจุเข้าสู่โครงสร้างเพิ่มมากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป โดยจะสามารถบรรจุได้ประมาณ 66.86% หรือคิดเป็นปริมาณยาเท่ากับ 133.72 ug เมื่อทำการบ่มร่วมกับโครงสร้าง 0.25 pmol เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นั่นคือ โครงสร้าง DNA sphere 1 mol สามารถบรรจุยา doxorubicin ได้เท่ากับ 92×10^4 mol (อัตราส่วนของ DNA sphere ต่อ doxorubicin เท่ากับ 1:920000) นอกจากนั้นยังทำการทดสอบการปลดปล่อยยา doxorubicin ออกจากโครงสร้าง DNA sphere โดยใช้โครงสร้าง DNA sphere ที่ผ่านการบรรจุยาเป็นเวลา 48 ชั่วโมงมาทำการทดลอง พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป ยา doxorubicin จะค่อย ๆ ถูกปลดปล่อยออกจากโครงสร้าง ซึ่งสามารถปล่อยออกมาได้เพียง 18.13% หรือคิดเป็นปริมาณยาเท่ากับ 24.24 ug เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เนื่องด้วยงานวิจัยนี้ต้องการสร้างตัวนำส่งยาไปยังเซลล์มะเร็งเป้าหมาย คณะผู้วิจัยจึงทำการดัดแปลงโครงสร้าง DNA sphere ด้วย aptamer เพื่อที่จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเมื่อได้รับการกระตุ้น โดยใช้ MUC-1 aptamer ซึ่งเป็น DNA aptamer ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน Mucin-1 เป็นตัวควบคุมการปิด-เปิดโดยนำเอา aptamer เข้าไปแทรกไว้เป็นส่วนหนึ่งของ LOCK ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่จะทำให้โครงสร้างอยู่ในรูปแบบ closed sphere เพื่อให้ตัวนำส่งยานี้ตอบสนองต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 เท่านั้น แต่จะไม่ตอบสนองต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 เนื่องด้วยความแตกต่างของการแสดงออกของโปรตีน Mucin-1 ของเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งสองชนิด (Croce *et al.*, 2003)

ก่อนที่จะทำการทดลองการปิด-เปิดของโครงสร้าง DNA sphere เมื่อได้รับการกระตุ้นจากเซลล์มะเร็งเป้าหมาย คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาทดลองเพื่อดูการแสดงออกของโปรตีน Mucin-1 ของเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งสองชนิด โดยพบว่า เซลล์ MCF-7 มีการแสดงออกของโปรตีน Mucin-1 ที่สูงกว่าเซลล์ MDA-MB-231 เป็นอย่างมากในทุกๆระดับการแสดงออก ไม่ว่าจะเป็นในระดับ mRNA ที่ดูได้จากผลการทำ PCR หรือในระดับโปรตีนที่ดูได้จากผลการทำ Western blot และผลการทำ immunofluorescence staining ที่แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนถึงความแตกต่างของระดับการแสดงออกของโปรตีน Mucin-1 ในเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งสองชนิด นั่นคือ โปรตีน Mucin-1 น่าจะเป็น biomarker ที่ดีที่สามารถนำมาใช้ในการทดสอบความจำเพาะของตัวนำส่งที่มีต่อเซลล์เป้าหมาย

ในการทดสอบการปิด-เปิดตัวนำส่งยา ในขั้นแรกคณะผู้วิจัยทำการทดสอบการปิด-เปิดโดยอาศัยการเกิด strand displacement ก่อนที่จะเปลี่ยนเป็นการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระหว่าง DNA aptamer และโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์มะเร็งเป้าหมาย โดยใช้เทคนิค fluorescence energy transfer (FRET) ในการติดตามการปิด-เปิดของตัวนำส่งยา ซึ่งทำโดยใช้สารเรืองแสง (fluorescence) สองชนิด คือ Cy3 และ Cy5 ติดไว้ที่ปลาย 3' และปลาย 5' ของ LOCK เมื่อโครงสร้างอยู่ในรูปแบบปิด สารเรืองแสงทั้งสองโมเลกุลจะอยู่ใกล้กันทำให้เกิดสัญญาณ FRET ขึ้น แต่เมื่อมีการเติม KEY ซึ่งในการทดลองเบื้องต้นนี้จะใช้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับ LOCK ทั้งเส้นเพื่อทำให้ LOCK หลุดออกจากโครงสร้างและโครงสร้างอยู่ในรูปแบบเปิด (open sphere) ที่จะส่งผลให้สัญญาณของ FRET ลดน้อยลง โดยผลการทดลองที่

ได้เป็นไปตามที่ได้ออกแบบไว้ นั่นคือ เมื่อเริ่มต้นการทดลองโครงสร้างอยู่ในรูปแบบ closed sphere ซึ่งพบว่ามีสัญญาณ FRET เกิดขึ้น และเมื่อมีการเติม KEY ลงไปส่งผลให้โครงสร้างเกิดการเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูปแบบ open sphere ซึ่งก็พบว่ามีสัญญาณ FRET ค่อย ๆ ลดน้อยลงตามเวลาที่ผ่านไป

หลังจากนั้น จึงทำการทดสอบการปิด-เปิดของโครงสร้างกับเซลล์มะเร็งเต้านมสองชนิด โดยเลือกใช้เซลล์ MDA-MB-231 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน Mucin-1 น้อย และเซลล์ MCF-7 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน Mucin-1 มาก กล่าวคือ เซลล์ MDA-MB-231 น่าจะไม่ส่งผลให้โครงสร้างอยู่ในรูปแบบ open sphere ได้ ในขณะที่เซลล์ MCF-7 จะส่งผลให้โครงสร้างอยู่ในรูปแบบ open sphere ได้ ในการทดลองนี้คณะผู้วิจัยเลือกใช้ cell lysate ของเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดเป็นตัวกระตุ้นการเปิดของโครงสร้าง DNA sphere โดยทำการทดลองเช่นเดิมแต่เปลี่ยนจากการใช้ KEY เป็นการใส่ cell lysate จากผลการทดลองที่ได้พบว่า เมื่อเติม cell lysate ของ MDA-MB-231 ลงไป ไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเกิดขึ้น สัญญาณของ FRET ไม่ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป แต่เมื่อมีการเติม KEY ลงไปนั้นทำให้เห็นการลดลงของสัญญาณของ FRET เกิดขึ้นได้ และเมื่อเติม cell lysate ของ MCF-7 ลงไป ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างขึ้น สัญญาณของ FRET ค่อย ๆ ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป และเมื่อเติม KEY ลงไปนั้นก็ไม่ได้เห็นการลดลงของสัญญาณของ FRET เพิ่มมากขึ้น ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้เป็นไปตามที่ออกแบบไว้ กล่าวคือ โครงสร้าง DNA sphere ที่สร้างขึ้นสามารถเปิดออกได้เมื่อได้รับการกระตุ้น

นอกจากนั้น ทำการทดสอบการเข้าสู่เซลล์มะเร็งเป้าหมายของโครงสร้าง DNA sphere ที่มีการดัดแปลงด้วย MUC-1 aptamer เพื่อให้โครงสร้างตัวนำส่งมีความจำเพาะกับเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ซึ่งจะมีการแสดงออกที่มากกว่าปกติของโปรตีน Mucin-1 จากการทดลองจะเห็นได้ว่าการดัดแปลงตัวนำส่งยาด้วย aptamer นั้นสามารถทำให้ตัวนำส่งยาเข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้อย่างจำเพาะมากขึ้น โดยดูได้จากการที่พบโครงสร้าง DNA sphere ในเซลล์ MCF-7 มากกว่าเซลล์ MDA-MB-231 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้กล่าวถึงก่อนหน้า และสุดท้ายทำการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งสองชนิดเมื่อใช้ตัวนำส่งยาที่มีการดัดแปลงด้วย MUC-1 aptamer ที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเป้าหมาย (เซลล์ MCF-7) จากผลการทดลองพบว่า การนำส่งยา doxorubicin โดยใช้ตัวนำส่งยาที่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเป้าหมายนั้นสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเป้าหมายได้และยังได้ประสิทธิภาพที่ดีกว่าการใช้ยา doxorubicin อิสระ กล่าวคือ ใช้ความเข้มข้นยา doxorubicin ที่ต่ำกว่าก็ทำให้สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ MCF-7 ได้ดีกว่า จากผลการทดลองทั้งหมดจะเห็นได้ว่า โครงสร้าง DNA sphere ที่สร้างขึ้นเป็นตัวนำส่งยานี้สามารถนำมาใช้ในการนำส่งยา doxorubicin ไปยังเซลล์มะเร็งเต้านมเป้าหมาย (เซลล์ MCF-7) ได้อย่างจำเพาะเมื่อทำการดัดแปลงโครงสร้างดังกล่าวด้วย MUC-1 aptamer ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน Mucin-1 ที่มีการแสดงออกอย่างมากบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์มะเร็งเต้านมเป้าหมาย ส่งผลให้การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเป้าหมายมีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อเทียบกับการใช้ยา doxorubicin อิสระ

สรุปผลการทดลอง

1. สามารถสร้างตัวนำส่งยาขึ้นจากดีเอ็นเอด้วยเทคนิค DNA origami เป็นรูปทรงกลม (DNA sphere) ตามที่ได้ออกแบบไว้ ซึ่งสามารถอยู่ในรูปแบบเปิด (open sphere) และปิด (closed sphere) เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคต่าง ๆ ดังนี้ gel electrophoresis, dynamic light scattering (DLS), กล้องจุลทรรศน์ TEM และกล้องจุลทรรศน์ AFM
2. สามารถทำการบรรจุ AuNPs เข้าไปภายในโครงสร้าง DNA sphere ที่สร้างขึ้น
3. สามารถทำการบรรจุและปลดปล่อยยา doxorubicin ภายในโครงสร้าง DNA sphere ที่สร้างขึ้น
4. โครงสร้าง DNA sphere ที่สร้างขึ้นสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเมื่อมีการกระตุ้นได้
5. โครงสร้าง DNA sphere ที่มีการตัดแปลงด้วย MUC-1 aptamer สามารถตอบสนองต่อเซลล์มะเร็งเต้านมเป้าหมาย (เซลล์ MCF-7) ได้อย่างจำเพาะ
6. โครงสร้าง DNA sphere ที่มีการตัดแปลงด้วย MUC-1 aptamer และบรรจุยา doxorubicin สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมเป้าหมาย (เซลล์ MCF-7) ได้อย่างจำเพาะและมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้ยา doxorubicin อิสระ

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการทดสอบความเป็นพิษของโครงสร้าง DNA sphere ที่มีต่อเซลล์
2. ควรมีการทดลองเพิ่มเติมกับเซลล์ปกติ (normal cell) ด้วย

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-1	TTCCATTAAATTAAGGGATTTTAGACAGGGAGATAGAAC
north-2	CCTTCTGACCCAGCCCTCATAGTTAGCGTAATGAGGAAGT
north-3	CAGGGCGATGGAGCTAACAGGAGGCCGACGGGTAAAAT
north-4	ACGTAATGCCATGGTTTAATTTCAACTTTAACCGTCTAT
north-5	AATGAATCGGCCAACGTGGACTCCAACGTCA
north-6	AAGGGCGAAAAATCATTGTGATCGTGCCAGCTGCATT
north-7	CCAACCTAAAACGGCTTTGAGGACTAAAGACTTTTTACGATCTAAAGTT
north-8	TAAGAAGTGGCTAACGAGTAGTAAATTGGGCTTGAGACTACGAAGGCA
north-9	ATAAATATCGGGAAACCTGATTACCTTATGCGATTT
north-10	GCGAAAGAGACGAGAACCAGCATTATCTGCGGAATCGTC
north-11	TTGTCGTCTTTCCAGACGTTAGTAAATGAGCAACGGCTACAGAGAAAGAG
north-12	ACTGCCCGCTTTCCAGTTCATTGAATCCC
north-13	CCTCAAATGCTTTGCTCCTTTTGATAAGAGGGGATGTGCTGCAAGG
north-14	CGATTAAGTTGGGTAATTAATTGCGTTGCGCTC
north-15	TGCATCTGCCTACGCCAGCTGGCGAAAGGGTCATTTTTGC
north-16	GGATGGCTTATAGATACATTCATCGTAACCG
north-17	CAATTCTAGATGGGCGTCGCAAATGGTGGCAT
north-18	TCATCTTTGACGCGAAAGACAGCATCGGAACGAGGGTAATTTTC
north-19	GGAAGAAAAATCTATTCAGTGAATAAGGCTTGCCCTATACACTAAAACAC
north-20	TGGATAGCGTCCAATAACCAGTCAGGACGTTG
north-21	GATTATACTAACAAAGCTGCTCACGTTAAGTAAATGTTTAGAC
north-22	ATTTTGCTAAACAACCTTCAACAGTTTCGTCACCCTCAGCACCCCAGC
north-23	AATAGAAAGGAACAACCTAAAGGAATTGCGCTGAGGCTTGACAGAGATTTGT
north-24	ATCATCGCTTCGACAAGAACCACAGGTTTTTGCAAAAGAAGTT
north-25	TTGCCAGAGGGTAAATCAAAAATCAGGTCTTTACCCTGACCAGACCGGAA
north-26	GCAAACCTCCAACAGATCTGGTGCTGTAGCTCAACATGTTTTTCTGCGA
north-27	ACGAGTAGACCTGTTTAGCTATATGCTGAAAAGGTCAATAATTTAGTT
north-28	TGACCATGAGCTTAATTGCTGAGTCAGGATTAGAG
north-29	AGTACCTTTAATTAACAGTTCAGAA
north-30	AACGAGAATGACCAGGTAATATAAAACGAACTAACG
north-31	GAACAACATTATTGGATATTCATTACCCAAATCAACGCAAGCGCGAAAC
north-32	AAAGTACAACGGGGAGTTAAAGGCCGCTTTTGCGGGATCAGCGGAGTGAG
north-33	TGACAACAACCATCGCGACCTG
north-34	CTCCATGTCCAGGCGCATAGGCACCACAAGACGACGATAAAAAC

north-35	CAAAATAGCGAGAGGCAGAAAGATTCATCAGTTG
north-36	AGATTTAGGAATTGGCTGACCTTCATCAAGAGTAATCCTGATAAATTGTGTCG
north-37	AAATCCGCCACGCATAACCGATATATTCGGTCTGAATAATAATTTTTTTCACGTTGAAA
north-38	AGTAATAAAAGGGACATTCTGGCCAACAAACGGTACGCCAGAAGTTGGAA
north-39	TCAGAGCGGGCCACTACGTGAAGAACGCGCGGGGAGAGGCGGT
north-40	TTGCGTATTGGGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACACGCCAGGGTT
north-41	TTCCCAGTCACGACGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATAGTTTGAG
north-42	GGGACGACATAGGTTACGTTGGTGTACTAATAGTATGGGGACCGTAT
north-43	CGGCCTCACAACCTGTTGGGAAGGTTGTAAAACGAC
north-44	GGCCAGTGCCAAGACGAGCCGGAAGCAT
north-45	AAAGTGTAAGCCTGCGCCATCCAGTTTGAACAAGA
north-46	GTCCACTATTAACCATCACCCAAATCAAGTTTTTGAGCACGTATAAC
north-47	GTGCTTTCCTCTCTTGAGAAGTGTTTTATAATCAGTCAGTCACACGACC
north-48	CATTGGCAGATTCACGAGGCCACCGAGTAATATGGTT
north-49	GCTTTGACTGGGGTCGAGGTGCTGTTGTGGGTGGTTTTTCTTTT
north-50	CACCAGTGAGACGGGCTCAAAGAATAGCCC
north-51	GAGATAGGGTTGAGCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCAATGCGCCGCTA
north-52	CAGGGCGCGTACAAGAGTCTGTCCATCACGCAAATTACTCAATCGTCTGAAATGG
north-53	TACCTACATTTTGACGACCGTTGTAGCAATAACACCCG
north-54	CCGCGCTTTAAAGGGAGCCCCCTATAAAAACAGCTGATTGCCCT
north-55	TCACCGCCTGGTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATCTTGCATGCC
north-56	TGCAGGTCGACTCTAAGCGCCATTTCGC
north-57	CATTCAGGCTGCGGGAAGATCGCACTCCCGGCGGAT
north-58	TGACCGTAAGTAGCATTTCGGATTGCGCGATTTCAACAGTTGA
north-59	TTCCAATAAATATGCAACTAATTTTAATTCGAGC
north-60	TTCAAAGCGAACTATTATAGTCAGAAG
north-61	CAAAGCGGATTGCATTTACCTTCAACTAATGCAGAT
north-62	ACATAACGCCAAAAGGACAGATGAACGGTGTACAGATACTTAGCCGGAAC
north-63	GAGGCGCAGACCTTGATAACCGATAGTTGCGCCGACAA
north-64	CCTTTAATTGTATCGGTTTATCAGCTTGCTTTCTGGTAATA
north-65	TGCCTGAGTAGAAGAGGCGCTG
north-66	GCAAGTGTGCGCGAACGTGGCGCTGTTTGAGAGTTGCAGCAAGC
north-67	GGTCCACGCTGGCATAGTAAGAGCAACACT
north-68	ATCATAACCCTCGTCAAAAAGATTAAG
north-69	AGGAAGCCCATAATCATGGTCATAGCTGT
north-70	TTCCTGTGTGAAATCCCTGAGATGGTGGTTCCGAAATC
north-71	GGCAAAATCCCTGATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCAGCGGTACGCTGCGCG

north-72	TAACCACCCCTTCTTTGATTAGTAATAACATCACTGCAACAGGAAAAACGCTCATGGAAA
north-73	TCGGCCTTGCAGGTGAATTTCTTAAACAGGGTCAATCAT
north-74	AAGGGAACCGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGACTCAAATA
north-75	GGGAAGAAAGAACTGACCAACTTTGAAAGAGGAATTACGAGGTTTGCCCCA
north-76	GCAGGCGAAAATCAGAAAGGAA
north-77	GGTACCGAGCTCGAATTCGAAAGACTTCAAATATCGCGAGTACGGTGT
north-78	CTGGAAGTTTTCTGGTGCCGGAACCAGGCAAGAGGATCCCCG
north-79	CGGCACCGCTCATTCCATGTATTTGGGCTCCGTG
north-80	GGAACAAAAGCCAGCTTTC
Lock 1_north	AAACCAGGGATCAACTGCAAATTCAGAACAATATTACCGCCAGCCATT
Lock 2_north	ATTATTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
Lock 3_north	AAACCAGGGATCAACTGCAAATTATCTCCAAAAAAG
Lock 4_north	TGTATGGTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
Lock 5_north	GCTCCAAAAGGAGTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
south-1	TTATCATTTTACAGTGCCCGTATAAACAGTAACGCCTGTA
south-2	GCATTCCACAAAAGCGTAAGAATACGTGGCTTGAGTAACA
south-3	CCATCTTTTCGGGGTCAGTGCCCTGAGTAGCGGAACAAA
south-4	GAAACCACCACAATATATGTGAGTGAATATTAGCGTTTG
south-5	AAATTCATATGGTTTAGGCATTTTCGGTCAT
south-6	AGCCCCCTTAACCTTGCTTCTTGTCACAATCAATAGA
south-7	TTATCATCATATCCCGAACGTTATTAATTTTAAAAGTACAGACAATATTT
south-8	ATTAATTTTCCCTTTTAAATGGAAACAGTACATAAATGAAGGAGCGGAA
south-9	AAGCCTGTAAAGTTTATTTGTAATCGTCGCTATTA
south-10	TATCAGATATTTGAATTACCTTTTAGAATAATTACTAGAAA
south-11	TTGAATGGCTATTAGTCTTTAATGCGCGGTATTAATCCTTTGTCCTGAT
south-12	GCAAAGACACCACGGAATTAGTATCATAT
south-13	GCGTTATACAAAAACAATAGATAAGTCCTGATAATTGAGCGCTAAT
south-14	ATCAGAGAGATAACCCCAACATATAAAAGAAAC
south-15	TTTCCAGAGCCCCTGAACAAAGTCAGAGGGACAAGAAAAA
south-16	TAATATCCCATTACCGCGCTAACGAGCGTC
south-17	AACCTCTTACCAACGCCAATAGCAAGCTAGCG
south-18	AATATAATCCTAGACTTTACAAACAATTCGACAACCTCAACTGATAGCCCT
south-19	GATAGCTTAGATTAATTAATTACATTTAACAAATTTGATGGCAATTCATC
south-20	ATAAACACCGGAATCATCCTTGAAAACATAGC
south-21	TGGATTATCATCAAGAAAACAAAAGACGAAGGCGTTAAATAAGA
south-22	GGATTTAGAAGTATTGATTGTT
south-23	AGATAAAACAGAGGTGAGGCGGTCAGTCAACTAATAGATTAGAACCAACC

south-24	ATATCAAATTTCAATTACCTGAATCATTTAATGGTTTCAAATA
south-25	CCGACCGTGTGCAGTAGGGCTTAATTGAGAATCGCCATATGACGACAATA
south-26	AACAACATGTTTCAGATGTAGAAACCAATCAATAATCGGCTCAAGCCGT
south-27	TTTTATTTAGATATAGAAGGCTTAGCGAGGCGTTTAAATCTCATCGTA
south-28	GGAATCATCCTAATTTACGAGCCTAATGCAGAACG
south-29	CGCCTGTTTATCTTCTTACCAGTATA
south-30	AAGCCAACGCTCAAATAAATCTGAGAAGAGTCAATA
south-31	GTGAATTTATCAAAGCAAAGAAGATGATGAAACAAAACCTTCTGAATTA
south-32	TGGAAGGAATTGAGCCGTCAATAGATAATACATTTGAAACCACCAGCAGA
south-33	GCTGAGAGCCAGCAGAATTGAGGAAGGTTATAAAGAA
south-34	ATTGCGTAAATACCAAGTTACAGCTTAGTATTTTAGTTAATTTTC
south-35	ATCTTCTGACCTAAATAGGTCTGAGAGACTACCT
south-36	TTTTAACCTCCGAAATCGCGCAGAGGCGAATTATTCAATTATTAGCAC
south-37	GTAAAACAGAAATCTAAAATATCTTTAGGTGCACTAAATTAACACCGCCTGCAAC
south-38	ACTGAGTTTCGTCACCAGTACAACTACTAATGCCCCCTGCCTGGTAATA
south-39	AGTTTTAACATAATCAAATCATTTCATCCCAGCGCCAAAGACAA
south-40	AAGGGCGACATAAACGTAGAAAATACATACATAAAGGTGGACAAGAATTG
south-41	AGTTAAGCCCAATAACATTAGACGGGAGAATTAAGTGAACACTAATTTG
south-42	CCAGTTACAATTTTATCCTGAATCCCGACTTGCGGCTACAAAATAAA
south-43	CAGCCATAAAAAACAGGGGAGCGTAAGAGCAAGAA
south-44	ACAATGAAATAGCTAAGACTCCTTATTA
south-45	CGCAGTATGTTAGCTCAACCTTGCCTTTAGCGTCAGA
south-46	CTGTAGCGCGTTCGGGAACCAGAGCCACCACCGGACTTTTTGATGATAC
south-47	AGGAGTGTACTATTTTCGGAACCTATTATTCTGAAACACATGTACCGTAAC
south-48	TGAAAGTATTAAGAGAAGCGTC
south-49	ATACATGGACCGCCTCCCTCAGTCAAGTGATTGAGGGAGGGGAAG
south-50	GTAATATTGACGGAATAGCAGCACCGTAAT
south-51	CAGTAGCGACAGAAAGCCGCCACCCTCAGAACCAGCAAGTCTCTGAATT
south-52	TACCGTTCCAGTGCTGAGACTCCTCAAGAGAAGGATTCACCACCCTCATT
south-53	TTCAGGGATAGCA
south-54	CCACCCTCAGAACCAGCCACCCTCAGAGCAGGATTAGCGGGGTTTCAGAATG
south-55	GAAAGCGCCCCTCAGAGCCACCATCGAATTATTCATTAAAGGT
south-56	GAATTATCACCAACGGAATACCCAAAAGAAGTGGCATGATAATAGCTATC
south-57	TTACCGAAGCCCTTAGCAGCCTTTACA
south-58	GAGAGAATAACATTTATTTATCCCAATCTGCTATTT
south-59	TGCACCCAGGAGGTTTTGAAGCCTAAGAAGTCCGGCTCATCGA
south-60	GAACAAGGTCTTTCCTTATCATAAAGGTAAAGTAA

south-61	TTCTGTCCAGACTTAACAACGCCAACA
south-62	TGTAATTTAGGCAGCAAATAGTTGGGTTATATAACT
south-63	ATATGTAAATGCTAACGGATTGCGCTGATTGCTTTGGATTTTCAGGTTTA
south-64	ACGTCAGATGACAGTTGGCAAATCAACAGTAGAAAGGCAAATGAAAAATC
south-65	TAAAGCATCACCTT
south-66	CGTACTCAGGAGGTTTTAGTACCGCCCGTCGAGAGGGTTGATGGCCTT
south-67	GATATTCAACCACCAGAGCCGCTACCATGACTTGAGCCATTTGG
south-68	GAATTAGAGCCATCGCAAGACAAAGAACGC
south-69	GAGAAAACTTTTTAGGCATTTTCGAGC
south-70	CAGTAATAAAGTTACCAGAAGGAAACCGA
south-71	GGAAACGCAATAATGTCACCTAGCAAGGCCGAAACGT
south-72	CACCAATGAAACACCCTCAGAGCCGCCACCAGAACCCAAACGAATGGATC
south-73	TTCATTAAGCTTGCTCAGTACCAGGCGGATAAGTGCACCCTCAGAACCG
south-74	GCCCGGAATAACCCTCAATCAATATCTGGTATATACAGTA
south-75	ACAGTACCTTTTGAGGCAGGTCAGACGATTATAAGTATA
south-76	TGACAGGAGGTTACATCGGGAGAAACAATGATGCAAATCCAAGCAAATCA
south-77	CCAGTAGCACCATCGCCAGCAT
south-78	AAGCAGATAGCCGAACAAGAGAATATAAAGTACCGACATCCAAGAACG
south-79	GGTATTAACCTTTAACGTCAAAAATGAAAATTTTAAGAAAAGT
south-80	CGATTTTTTGCAAGTACCGCATATTCTTAAATCA
south-81	AGATTAGTCAAATAAGAAA
Lock 1_south	AGTGCCACTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
Lock 2_south	AAACCAGGGATCAACTGCAAATTAACATCGCCATTAAAAATACCGAACG
Lock 3_south	TGTATCACTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
Lock 4_south	AAACCAGGGATCAACTGCAAATTAGCCCAATAGGAACC
Lock 5_south	AAACCAGGGATCAACTGCAAATTGCTGAACCTCAAATATCAAGG
LOCK	TTTTTTTTTTTGCAGTTGATCCTTTGGATACCCTGGTTTTTTTTTTTTTTTT
KEY	AAAAAAAAAAAAAAAAACCAGGGTATCCAAAGGATCAACTGCAAAAAAAAAA
LOCK_FRET	Cy5 -TTTTTTTTTTTGCAGTTGATCCTTTGGATACCCTGGTTTTTTTTTTTTTTTT- Cy3
south-5_polyA	AAATTCATATGGTTTTAGGCATTTTCGGTCATTAAAAAAAAAAAAAAAAAA
south-61_polyA	TTCTGTCCAGACTTAACAACGCCAACTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
south-81_polyA	AGATTAGTCAAATAAGAATTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA