บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

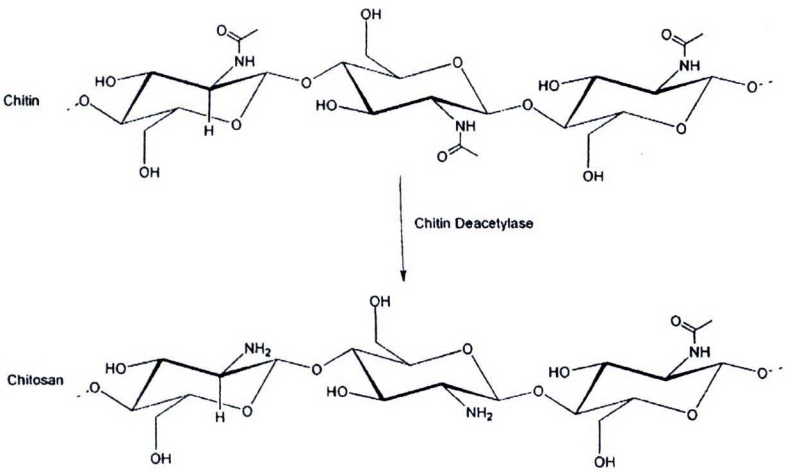
ปัจจุบันสถานการณ์วิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสังคมโลกได้มีการพัฒนาก้าวไปอย่างรวดเร็ว การปรับตัวให้เข้ากับกระแสความเปลี่ยนแปลง โดยเฉพาะพัฒนาการด้านเทคโนโลยีเพื่อเพิ่มพูนขีดความสามารถการแข่งขันของประเทศจัดว่ามีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง นาโนเทคโนโลยี (Nanotechnology) เป็นอีกเทคโนโลยีที่จะช่วยพัฒนาวิทยาศาสตร์และช่วยยกระดับความเป็นอยู่ของประชากรทั่วโลกให้ดีขึ้นในอนาคต เช่นเดียวกับเทคโนโลยีชีวภาพ (Biotechnology) ที่ได้มีการพัฒนาจนเกิดความก้าวหน้าอย่างมากมายในช่วงหลายสิบปีที่ผ่านมา ทำให้ความรู้ความเข้าใจทางด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล (Molecular biology) ซึ่งเป็นอีกสาขาวิชาหนึ่งที่มีความเจริญรุดหน้าอย่างรวดเร็วมีการประยุกต์ใช้กันอย่างแพร่หลายในหลากหลายสาขาวิชา ประกอบกับความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการเกิดโรคในระดับยีนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงวิธีการบำบัดรักษาโรคโดยมุ่งเน้นที่การรักษาโรคที่ต้นเหตุมากกว่าการบำบัดตามอาการ สามารถกล่าวได้ว่าการบำบัดรักษาโรคด้วย DNA จัดเป็นอีกแขนงหนึ่งที่สำคัญของนาโนเทคโนโลยีเพื่อประโยชน์ในทางการแพทย์หรือนาโนเทคโนโลยีในสาขาชีวภาพ (nano biotechnology)[1-2] เนื่องจาก DNA ที่ต้องการใช้บำบัดโดยธรรมชาติเป็นสารที่มีขนาดโมเลกุลที่ใหญ่และมีประจุเป็นลบจากหมู่ฟอสเฟตจำนวนมากทำให้การนำ DNA เดี่ยวๆเข้าสู่เซลล์เป้าหมายแต่เพียงอย่างเดียวไม่สามารถประสบความสำเร็จได้ จึงมีความจำเป็นในการเลือกใช้ตัวพา DNA ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาเชิงซ้อนหรือเก็บกัก DNAไว้ภายในมาใช้การพัฒนาระบบนำส่งแทน โดยมีข้อจำกัดที่การนำส่งเข้าสู่เซลล์ สารประกอบที่เตรียมได้ต้องมีขนาดอยู่ในช่วงระดับนาโนเมตรและมีความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์เป้าหมายที่ต้องการรักษาโรค กล่าวได้ว่าแนวทางการทำการบำบัดรักษาโรคด้วย DNAจำเป็นต้องอาศัยเทคโนโลยีการประกอบและผลิต DNA และตัวพายีนโดยการประกอบกันจากการเรียงตัวของอนุภาคขนาดเล็ก เช่น โมเลกุลของสารเข้าด้วยกันด้วยความแม่นยำในระดับนาโนเมตร เพื่อให้เกิดเป็นตัวพา DNA ที่มีคุณสมบัติใหม่หรือมีความพิเศษขึ้น

การพัฒนาวิธีนำส่ง DNA ที่มีประสิทธิภาพไปที่เซลล์เป้าหมายถือเป็นสิ่งสำคัญในการบำบัดรักษาโรคทางพันธุกรรมและโรคที่เป็นภายหลังโดยการบำบัดด้วยยีนในร่างกาย เทคนิคในการนำส่ง DNA เข้าเซลล์นั้นมีหลายวิธีคือ ทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพ ตัวพาที่ประสบความสำเร็จในการนำส่งยีนจากภายนอกเซลล์ให้ไปที่เซลล์เป้าหมายสามารถแบ่งได้เป็นสองกลุ่มใหญ่ๆ คือตัวพาที่เป็นไวรัสและที่ไม่ใช่ไวรัส โดยทั่วไปพบว่าตัวพาที่เป็นไวรัสนี้จะมีประสิทธิภาพในการถ่ายโอน DNA เข้าเซลล์สูงกว่าแต่ก็เหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมและ

ก่อให้เกิดมะเร็ง ตัวพาที่เป็นไวรัสพบว่าจะเหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่ายกายทำให้ไม่มีการแสดงออกของยีนเมื่อบริหารยีนซ้ำ จากข้อจำกัดเหล่านี้ทำให้ตัวพาที่ไม่ใช่ไวรัสเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจมากขึ้นและมีแนวโน้มนิยมมากขึ้น แม้ว่าประสิทธิภาพในการถ่ายยีนจะต่ำกว่าตัวพาชนิดไวรัสก็ตาม ข้อดีเหนือตัวพาชนิดไวรัสคือมีพิษต่ำกว่า มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันน้อย เตรียมได้ง่ายกว่า น่าจะเป็นตัวพาในอุดมคติสำหรับการบำบัดรักษาโรคด้วย DNA แต่จนถึงขณะนี้ระบบตัวพาชนิดที่ไม่ใช่ไวรัสได้มีการพัฒนาหลายรูปแบบบางระบบสามารถเข้าสู่การศึกษาวิจัยทางคลินิกแล้ว แต่ข้อเสียของตัวพาชนิดที่ไม่ใช่ไวรัสคือ ระยะเวลาการแสดงออกของยีนที่ต้องการนั้นจะสั้นกว่า[3]

ตัวพาที่ไม่ใช่ไวรัสที่นิยมใช้มีทั้งชนิดที่เป็นลิโพโซมประจุบวกและพอลิเมอร์ประจุบวก ปัจจุบันได้มีการค้นคว้าหาพอลิเมอร์ชนิดใหม่ที่สามารถนำส่งยีนได้อย่างมีประสิทธิภาพซึ่งก็น่าจะเป็นพอลิเมอร์ที่มีประจุบวก[4] เพราะสามารถเกิดคอมเพล็กซ์กับ DNA ซึ่งมีประจุลบได้ พอลิเมอร์ประจุบวกตัวแรกที่นำมาใช้เป็นตัวพา DNA คือกลุ่ม polyamino acid ที่นิยมใช้คือ polylysine (PLL)[5] พอลิเมอร์ประจุบวกกลุ่มอื่นๆ ที่มีรายงานใช้เป็นตัวพา DNA เข้าเซลล์ได้ เช่น poly(N-alkyl-4-vinylpyridinium), polyamidoamine dendrimers (PAMAM) หรือ starburst dendrimer[6], polyethyleneimine (PEI)[7], poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate), chitosan และ collagen พบว่าพอลิเมอร์ กลุ่มนี้แม้ว่าจะไม่มี ligands ตัวพอลิเมอร์อย่างเดียวก็สามารถนำส่งยีนเข้าเซลล์และให้การแสดงออกของยีนได้คล้ายกับลิโพโซมประจุบวก

ไคโตซานเป็นสารพอลิเมอร์ธรรมชาติเตรียมได้โดยการทำปฏิกิริยา deacetylation ของสารไคติน (รูปที่ 1) ซึ่งพบมากในเปลือกกุ้ง หอย กระดองปูที่เป็นของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเล ไคโตซานมีคุณสมบัติเหมาะสมหลายประการในการประยุกต์ใช้ในทางเภสัชกรรม ทั้งในแง่ความปลอดภัย มีความเป็นพิษต่ำ ความเข้ากันได้กับสารในร่างกายมนุษย์ สามารถสลายตัวได้ง่ายตามธรรมชาติ และไม่ก่อให้เกิดมลภาวะเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ทั้งยังช่วยลดปัญหามลภาวะเนื่องจากสามารถลดปริมาณของเสียจากอุตสาหกรรมอาหารทะเล[8-9] ไคโตซานเป็นสารพอลิเมอร์ที่มีประจุบวกสามารถเข้ากันได้กับสารอื่นที่มีประจุบวก แต่อาจเกิดอัตรกิริยากับสารที่มีประจุลบได้ทำให้สามารถประยุกต์ใช้สารไคโตซานและอนุพันธ์ของสารไคโตซานในการเป็นสารช่วยในการผลิตยาในรูปแบบต่างๆ มีการนำไคโตซานในการเป็นสารช่วยในการตอกยาเม็ด สารก่อฟิล์ม เจล และเตรียมตำรับยาเตรียมเพื่อใช้สำหรับควบคุมการปลดปล่อยยาให้ออกฤทธิ์นาน เช่นเตรียมให้อยู่ในรูปไมโคร/นาโนปาร์ติเคิล ใช้สำหรับเป็นตัวพายาและสารชีวภาพ เช่น เปปไทด์ โปรตีน และ ยีน เป็นต้น[10-13] การที่ไคโตซานได้รับความนิยมนำมาใช้เป็นตัวพายาและสารชีวภาพ ทั้งนี้เนื่องจากไคโตซานมีคุณสมบัติ recognized mucoadhesivity และมีความสามารถในการเพิ่มการซึมผ่านเมมเบรนของสารโมเลกุลใหญ่ นอกจากการให้ไคโตซานนาโนพาติเคิลในรูปแบบฉีดเพื่อนำส่งยาสู่อวัยวะเป้าหมายที่ต้องการและการให้ทางตาแล้ว ยังได้มีการพัฒนาเพื่อให้ยาเพปไทด์หรือโปรตีนทางรับประทาน ทางจมูก และทางผิวหนัง เป็นต้น[14-15]



รูปที่ 1 แสดงสูตรโครงสร้างของไคตินและไคโตซาน

ไคโตซานเป็นพอลีแซคคาไรด์จากธรรมชาติซึ่งมีโครงสร้างประกอบด้วยโมเลกุลของหน่วยกลูโคสเชื่อมต่อกันเป็นเส้นตรงที่อะตอมคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และ 4 [(1-4)-2-amino-2-deoxy-β-D-glucose] หน่วยย่อยของไคโตซาน คือ D-glucosamine ไคโตซานมีคุณสมบัติที่ดีคือสามารถเข้าได้กับสารในร่างกาย (biocompatibility) มีความเป็นพิษต่ำ ราคาไม่แพง และสามารถสลายตัวได้ (biodegradation) นอกจากนี้ไคโตซานยังมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (มีค่า pKa 6.5) แต่ละลายได้ดีในสารละลายกรดอ่อน (pH 1-6) เช่น กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก เป็นต้น[16] ลักษณะเด่นของสารชนิดนี้คือสามารถแตกตัวให้ประจุบวกสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีขนาดในระดับนาโนเมตรกับดีเอ็นเอซึ่งมีประจุลบได้ มีรายงานการใช้ไคโตซานในการจับกับยีนและนำส่งยีนเข้าเซลล์[17-22] N-alkylated chitosan สามารถนำส่งยีนได้ดีกว่าไคโตซานเบส เพิ่มการแสดงออกของยีนในเซลล์เพาะเลี้ยง[23] แต่รายงานการใช้อนุพันธ์ไคโตซานในรูปที่ละลายน้ำดีนั้นมีรายงานน้อยมาก มีเพียงรายงานเดียวที่ใช้ Trimethylated chitosans[24] ซึ่งอนุพันธ์ที่ได้มีความสะดวกในการใช้งานสามารถละลายน้ำได้ และอนุพันธ์ไคโตซานประจุบวกนี้จึงมีแนวโน้มที่จะใช้เป็นตัวพายีนเข้าสู่เซลล์เป้าหมายที่ต้องการได้ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อหาอนุพันธ์ของไคโตซานชนิดละลายน้ำดี เป็นตัวนำส่งยีนเข้าเซลล์และให้ผลการแสดงออกของยีนที่ดี โดยศึกษาความเป็นไปได้และปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการแสดงออกของยีน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสังเคราะห์อนุพันธ์ไคโตซานสำหรับนำส่งยีน และประเมินคุณสมบัติทางการภาพฟิสิกส์ของพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้
2. เพื่อศึกษาปัจจัยต่างๆ เช่น อัตราส่วนพอลิเมอร์ต่อยีน ผลของการเติมหมู่ที่ชอบน้ำ (degree of quaternization) และไม่ชอบน้ำ (degree of hydrophobic substitution) ในโครงสร้างของอนุพันธ์ไคโตซาน ต่อประสิทธิภาพในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ และความเป็นพิษต่อเซลล์

เป้าหมาย

เพื่อพัฒนาไคโตซานจากแหล่งผลิตในประเทศไทยอย่างเป็นระบบเพื่อให้ได้อนุพันธ์ไคโตซานประจุบวกที่ละลายน้ำได้ดี มีพิษต่ำและมีประสิทธิภาพในการนำส่งยีนเข้าเซลล์สูง สามารถนำอนุพันธ์ไคโตซานที่มีประโยชน์เหล่านี้มาผลิตในระดับอุตสาหกรรม เป็นการเพิ่มมูลค่าเพิ่มของไคโตซาน สามารถนำไปสู่การผลิตในเชิงพาณิชย์ และทดแทนการนำเข้าไคโตซานและอนุพันธ์จากต่างประเทศ สามารถเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมไทย

ประโยชน์ที่ได้รับ

1. สามารถนำอนุพันธ์ของไคโตซานชนิดละลายน้ำได้ มาประยุกต์ใช้เป็นตัวนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์
2. ทราบปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพเคมีของอนุพันธ์ของไคโตซานในด้านความสามารถในการจับกับยีน และคุณสมบัติของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้น
3. ทราบปัจจัยที่มีผลต่อการแสดงออกของยีนในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ ของอนุพันธ์ของไคโตซาน เช่น ประจุ ขนาดของอนุภาค อัตราส่วนพอลิเมอร์ต่อยีน เป็นต้น