

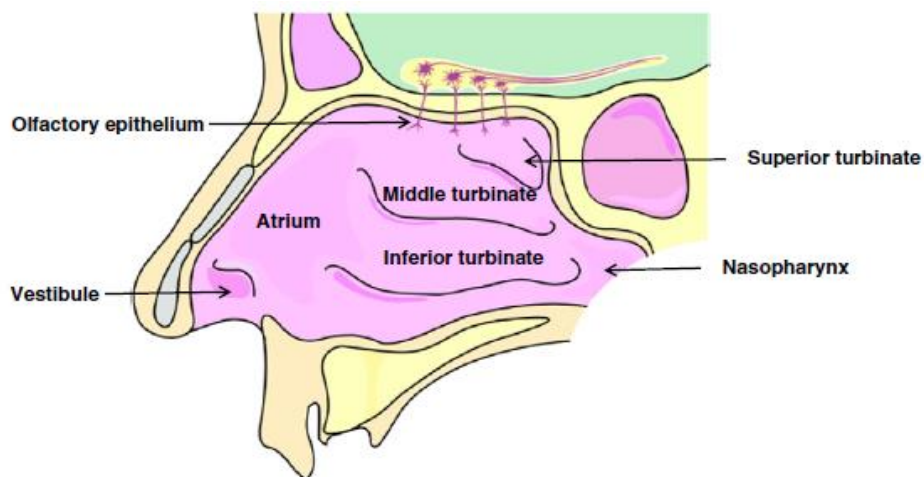
บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

สรีรวิทยาของช่องจมูก

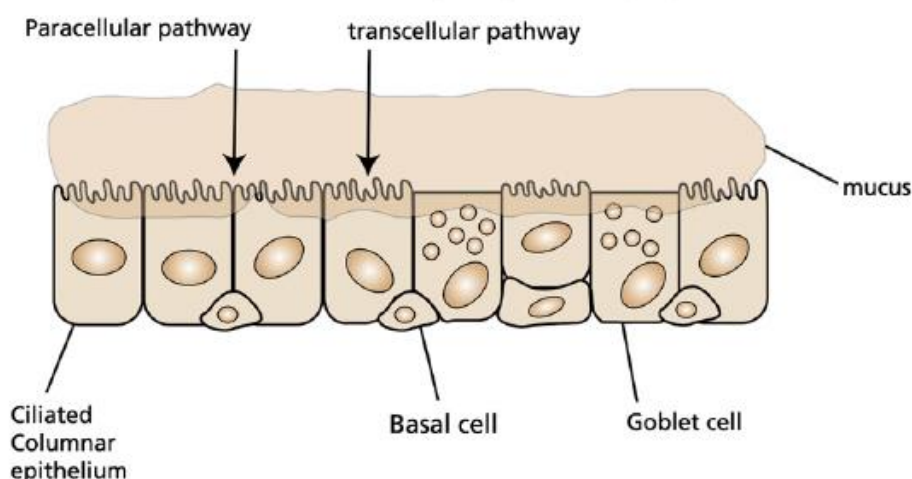
จมูกเป็นส่วนแรกของทางเดินหายใจที่อากาศเข้าสู่ร่างกายและเป็นจุดเริ่มต้นของการไหลเวียนอากาศในระบบทางเดินหายใจ โดยจมูกทำหน้าที่กรองสิ่งแปลกปลอม เพิ่มอุณหภูมิและความชื้นก่อนอากาศผ่านเข้าสู่ปอด ช่องจมูกเป็นโพรงเปิดและทอดยาวไปถึงคอหอย (nasopharynx) ภายในโพรงจมูกถูกแบ่งเป็น 2 ช่อง ซึ่งด้วยผนังกันที่เรียกว่า nasal septum โพรงจมูกของมนุษย์แต่ละข้างมีพื้นที่ผิวประมาณ 160 cm² มีปริมาตรรวมประมาณ 15-20 cm³ และถูกปกคลุมด้วยสารเมือก (mucus) ซึ่งประกอบด้วยสารคัดหลั่งชนิดต่างๆ รวมทั้ง sialic acid ทำให้สารเมือก มีสภาพเป็นกรด pH มีค่าอยู่ระหว่าง 5.0-6.8 กรณีของการติดเชื้อทางเยื่อจมูก pH ของสารเมือก จะลดลงต่ำกว่า 6.5 เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคภายในช่องจมูก (Csaba et al., 2009a) นอกจากนี้สารเมือกยังประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดที่สามารถทำลาย หรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค หรือสิ่งแปลกปลอมได้ โครงสร้างภายในช่องจมูกแบ่งย่อยออกไปตามความแตกต่างด้านกายวิภาค และหน้าที่ของ แต่ละส่วน คือ nasal vestibule และ atrium, respiratory region และ olfactory region

ส่วน nasal vestibule และ atrium เป็นส่วนแรกของจมูกที่อากาศผ่านเข้าสู่ร่างกาย ถูกปกคลุมด้วยเซลล์เยื่อผิวชนิด stratified squamous และ transitional non-ciliated epithelial cells มีพื้นที่ผิวและหลอดเลือดไหลเวียนน้อย ทำให้มีการส่งผ่านสารผ่านเยื่อบริเวณนี้เกิดขึ้นน้อย จึงเป็นส่วนที่ไม่สำคัญสำหรับระบบนำส่งยาทางจมูก



รูปที่ 1 กายวิภาคของจมูก (Grassin-Delyle et al., 2012)

ส่วน respiratory region เป็นส่วนที่มีพื้นผิวมากที่สุดของจมูก จากการที่ผนังด้านข้างของช่องจมูก มีส่วนโครงสร้างที่ยกสูงขึ้น ทำให้เกิดเป็นร่องเรียกว่า nasal turbinate จึงช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวเซลล์เยื่อบุผิวส่วนนี้ประกอบด้วย pseudostratified columnar epithelial cells, columnar epithelial cells, basal และ goblet cells โดยเซลล์เยื่อบุผิวเชื่อมต่อกับเซลล์ข้างเคียงด้วย tight junctions ควบคุมการผ่านเข้าออกสารระหว่างเซลล์ (paracellular transport) โดยเยื่อบุผิวที่ประกอบด้วย columnar epithelial cells ซึ่งมีการเรียงตัวอย่างแน่นหนา และมีไมโครวิลไล (microvilli) ซึ่งพัดโบกสิ่งแปลกปลอมที่ยึดติดกับสารเมือก (mucus) ออกจากทางเดินหายใจส่วนบนจำนวนมาก เรียกระบบขจัดสิ่งแปลกปลอมดังกล่าวว่า mucocilliar clearance ค่าการกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากเยื่อบุจมูกมีค่าประมาณ 15-20 นาที ทำให้เกิดการนำส่งสารผ่านเยื่อบุผิวได้ยาก ต่างจาก pseudostratified columnar epithelial cells บริเวณ nasal turbinate ที่เรียกว่า microfold cells (M cells) ซึ่งมีการจัดเรียงตัวแบบหลวมๆ เซลล์ค่อนข้างบาง มี microvilli น้อย อีกทั้งสามารถส่งผ่านสิ่งแปลกปลอมได้ดีโดยเฉพาะสารที่มีขนาดนาโนเมตร และการที่มี goblet cell สร้างสารเมือกอยู่น้อย ทำให้โอกาสที่สารจะผ่านชั้นเมือกไปยังเซลล์เยื่อบุจมูกได้ง่าย อีกทั้งได้เยื่อผิวบริเวณดังกล่าวมีหลอดเลือดมาเลี้ยงเป็นจำนวนมาก จึงนำส่งสารไปยัง systemic system ได้ดี หลอดเลือดบริเวณดังกล่าวไม่ผ่าน portal vein จึงหลีกเลี่ยงการเกิด first pass metabolism ของยาได้เหตุนี้บริเวณ respiratory region จึงเป็นบริเวณที่ใช้นำส่งยาทางจมูกทั้งเพื่อออกฤทธิ์แบบ local และ systemic system (Kang et al.,2009)



รูปที่ 2 รูปแบบการนำส่งสารผ่านเยื่อบุจมูก (Amidi et al., 2010)

ส่วนของ olfactory region อยู่ทางด้านบนของช่องจมูก มีพื้นที่ผิวเพียง 200-400 mm³ ประกอบด้วย columnar epithelial cells ที่มี receptor สำหรับรับกลิ่น โดยเซลล์ดังกล่าวต่อกับระบบประสาทส่วน olfactory bulb ทำให้เหมาะในการนำส่งยาที่ออกฤทธิ์โดยตรงที่สมองเนื่องจากยาไม่ถูกขัดขวางจาก blood brain barrier (Chugh et al., 2009)

การนำส่งสารผ่านเยื่อจมูก

การนำส่งสารผ่านเยื่อจมูกมีสองช่องทาง คือ transcellular pathway และ paracellular pathway การที่สารผ่านด้วยกลไกใดนั้นขึ้นอยู่กับขนาดและความมีขั้วของสาร (Amidi et al., 2010) ดังนี้

1. Transcellular pathway เป็นการนำส่งสารผ่านเซลล์เยื่อจมูกโดยตรง มีสองกลไกหลัก คือ

1.1 Transcellular passive diffusion เป็นการแพร่ผ่านเซลล์เยื่อจมูกโดยตรง สารที่ผ่านเซลล์ด้วยวิธีนี้ต้องไม่มีขั้ว โดยสารต้องไม่แตกตัวให้ประจุภายในช่องจมูก pH 5.0 – 6.8 และขนาดเล็กกว่า 1 kDa พบว่า ขนาดสารที่ใหญ่ขึ้นทำให้การดูดซึมสารผ่านเยื่อจมูกลดลง (Grassin-Delye et al., 2012)

1.2 Endocytic process เป็นกลไกการนำส่งอนุภาคที่เกิดขึ้นบริเวณ M-cell ของเยื่อจมูก ขนาดที่เหมาะสมในการนำส่งผ่าน M-cell ของทางเยื่อจมูกและเยื่อจมูกควรมีขนาดเล็กกว่า 10 µm และ 1 µm ตามลำดับ อย่างไรก็ตามพบว่าขนาดอนุภาคที่เล็กลงสามารถเพิ่มความสามารถการนำส่งสารผ่าน M-cell ได้ (Kammona et al., 2011; Rajapaksa et al., 2010)

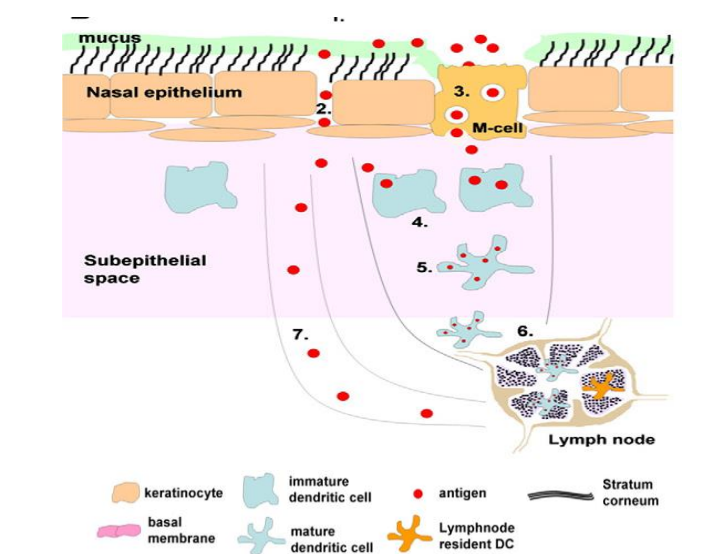
2. Paracellular pathway เป็นการผ่านของสารทางช่องว่างระหว่างเซลล์ ซึ่งกลไกหลังในการนำส่งสารที่มีขั้วและมีขนาดใหญ่ เช่น สารกลุ่มโปรตีน หรือวัคซีน การนำส่งผ่านเยื่อจมูกซึ่งมีการเรียงตัวอย่างหนาแน่นเป็นไปได้ยาก เมื่อเทียบกับเซลล์เยื่อจมูกบริเวณ respiratory region ซึ่งมี M-cell เป็นองค์ประกอบและมีการเรียงตัวอย่างหลวมๆ มีช่องว่างระหว่างเซลล์ประมาณ 3.9-8.4 Å และการที่ช่องว่างระหว่างเซลล์สามารถถูกกระตุ้นให้ขยายออกได้ ทำให้สามารถนำส่งสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น โปรตีน หรือ เปปไทด์ได้ จึงมีการพัฒนาระบบนำส่งทางจมูกที่สามารถกระตุ้นการเปิดช่องว่างระหว่างเซลล์ได้เช่น การใช้สารพิษเช่น cholera toxin หรือ การนำส่งสารด้วยระบบนำส่งเช่น ไคโตแซน เป็นสารที่มีคุณสมบัติกระตุ้นการเปิดช่องว่างระหว่างเซลล์ได้ โดยพบว่าอนุภาคไคโตแซนที่มีขนาดเล็กกว่า 5 µm ที่นำส่งวัคซีนผ่านเยื่อทางจมูกและกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ (Kammona et al., 2011; Kang et al., 2009) การทดลองใน Caco-2 cell monolayer พบว่าขนาดอนุภาคนำส่งขนาดนาโนเมตรเพิ่มการเปิดช่องว่างระหว่างเซลล์ได้ดีขึ้น เนื่องจากพื้นที่ผิวของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลมีมากกว่าไคโตแซน

ไมโครพาร์ทิเคิล จึงสัมพันธ์กับเยื่อเมือกและกระตุ้นการเปิดช่องว่างระหว่างเซลล์ได้ดีกว่า (Hafner et al., 2009)

นอกจากนี้พบว่าขนาดของอนุภาคยังมีผลการนำส่งสารผ่านเยื่อเมือกเข้าสู่กระแสเลือด โดยอนุภาคขนาดนาโนเมตรสามารถนำส่งสารผ่านเยื่อเมือกและเข้าสู่กระแสเลือดได้ดีกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ไมโครเมตร เช่นการทดลองของ Desai et al.(1997) พบว่าอนุภาคขนาด 100 nm สามารถผ่าน Caco-2 cell monolayer ได้ดีกว่าขนาด 1 μm และ 10 μm ถึง 2.5 และ 6 เท่าเมื่อเทียบโดยน้ำหนักและเพิ่มขึ้นเป็น 2.7×10^3 และ 6.7×10^6 เท่า เมื่อเทียบจากจำนวนอนุภาคตามลำดับ สอดคล้องกับการทดลองของ Viva et al. (2005) โดยใช้ระบบนำอนุภาคส่ง PLA-PEG ขนาด 200, 1500, 5000 และ 10000 nm ซึ่งติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีแล้วให้ทางจุ่มสัตว์ทดลอง พบว่าอนุภาคขนาด 200 nm สามารถผ่านเยื่อเมือกเข้าสู่กระแสเลือดได้ดีกว่าอนุภาคขนาดใหญ่

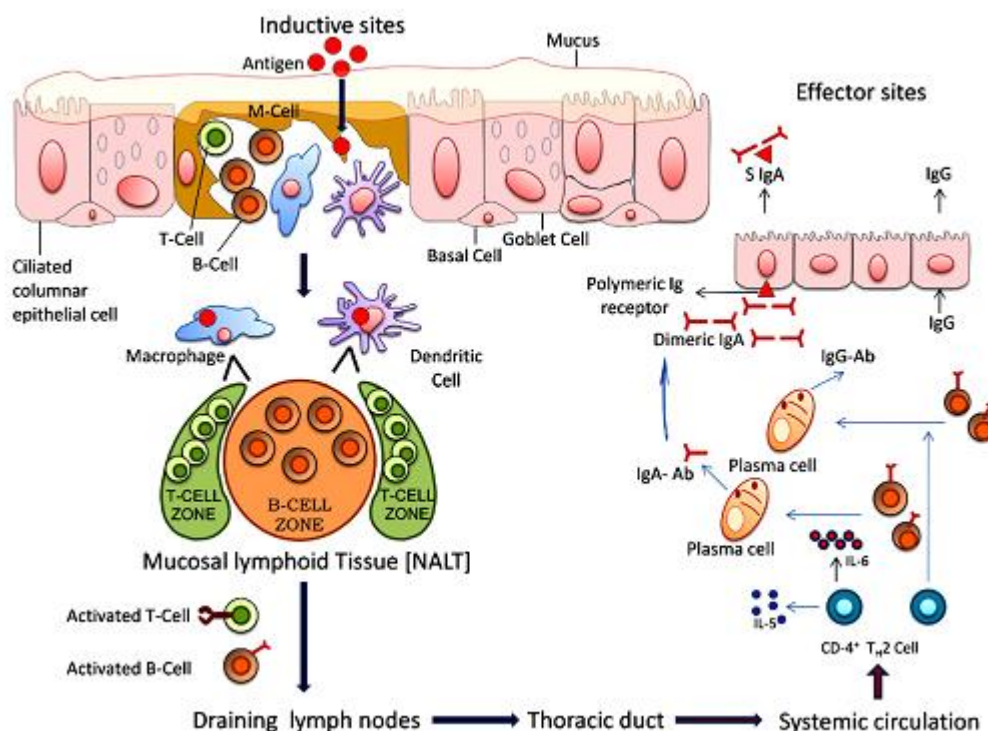
การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการนำส่งวัคซีนทางจุ่ม

เยื่อเมือกเป็นช่องทางหลักที่เชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่ร่างกาย จึงมีกลไกป้องกันทางภูมิคุ้มกันทั้งกลไกการป้องกันแบบไม่จำเพาะต่อชนิดของสิ่งแปลกปลอม ได้แก่ การทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยเอนไซม์และ pH รวมถึง mucocilliar clearance และกลไกป้องกันที่จำเพาะบริเวณ เยื่อเมือกที่สำคัญคือ secretory IgA (sIgA) ในสารเมือกทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญเติบโตและทำลายเชื้อโรคก่อนเข้าสู่ร่างกาย ดังนั้น sIgA จึงเป็น “first-line of defense” ในการป้องกันการติดเชื้อทางเยื่อเมือก (Cauley and Lefrancois, 2013) sIgA สร้างจากเนื้อเยื่อน้ำเหลืองที่เรียกว่า mucosal associated lymphoid tissue (MALT) เนื้อเยื่อน้ำเหลืองเหล่านี้มีโครงสร้างและลักษณะการทำงานที่คล้ายกันทั่วร่างกาย คือ ประกอบด้วย microfold cells (M cells) จำนวนมาก โดย M cells มีคุณสมบัติต่างจาก epithelium cells ทั่วไปที่มีการจัดเรียงตัวแบบหลวมๆ เซลล์ค่อนข้างบางมี microvilli น้อย สามารถ uptake สารต่างๆ ได้ดี อีกทั้งมีเอนไซม์ภายในเซลล์น้อย ทำให้เซลล์บริเวณดังกล่าวสามารถนำส่งแอนติเจนเข้าสู่ร่างกายได้โดยไม่ทำลายแอนติเจน



รูปที่ 3 การนำส่งแอนติเจนของ nasal associated lymphoid tissue (NALT)
บริเวณ respiratory region (Slutter et al., 2011)

ได้เยื่อเมือกบริเวณ M cells ยังประกอบด้วย T lymphocyte และ B lymphocyte, antigen presenting cells (APCs) ชนิดต่างๆ เช่น dendritic cell และ macrophages เป็นต้น การนำส่งแอนติเจนของ APCs นอกจากนำส่งแอนติเจนให้ lymphocytes บริเวณใต้เยื่อเมือกแล้ว การนำส่งแอนติเจนของ APCs ผ่านระบบน้ำเหลือง (lymphatic system) และระบบเลือดไหลเวียนจำนวนมาก ทำให้การนำส่งแอนติเจนจากบริเวณหนึ่งไปยังอวัยวะ/เนื้อเยื่อน้ำเหลืองอีกบริเวณหนึ่งได้ เรียกระบบส่งต่อแอนติเจนบริเวณเยื่อเมือกดังกล่าวว่า “common mucosal immune system (CMIS) ซึ่งเป็นลักษณะการนำส่งแอนติเจนที่พบเฉพาะของเยื่อเมือกโดยไม่พบในระบบอื่น (Sato and Kiyono, 2012) เนื้อเยื่อน้ำเหลืองมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและการกระจายตัวให้มีความจำเพาะกับลักษณะทางกายวิภาคที่บริเวณเยื่อเมือกนั้นๆ ดังเช่น gut-associated lymphoid tissue (GALT) ในระบบทางเดินอาหาร bronchus associated lymphoid tissue บริเวณหลอดลม nasal-associated lymphoid tissue (NALT) ซึ่งพบบริเวณทางเดินอาหารและทางเดินหายใจส่วนบน (Jabbal-Gill, 2010) นอกจากพบ NALT บริเวณ respiratory region แล้วยังพบ NALT ในส่วนของ nasopharynx และ oropharynx คือ lingual tonsil, palatine tonsil, nasopharyngeal tonsil (adenoid) เรียกกลุ่มเนื้อเยื่อน้ำเหลืองนี้ว่า Waldeyer's ring อันเป็นบริเวณที่มีบทบาทสำคัญในการป้องกันการติดเชื้อทางปากและจมูก (oronasal infection) (Lavelle, 2005)



รูปที่ 4 การส่งผ่าน antigen ผ่าน M-cells และกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน
(Gupta et al., 2011)

การกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะบริเวณจมูกสามารถแบ่งได้เป็นสองกลุ่ม คือ

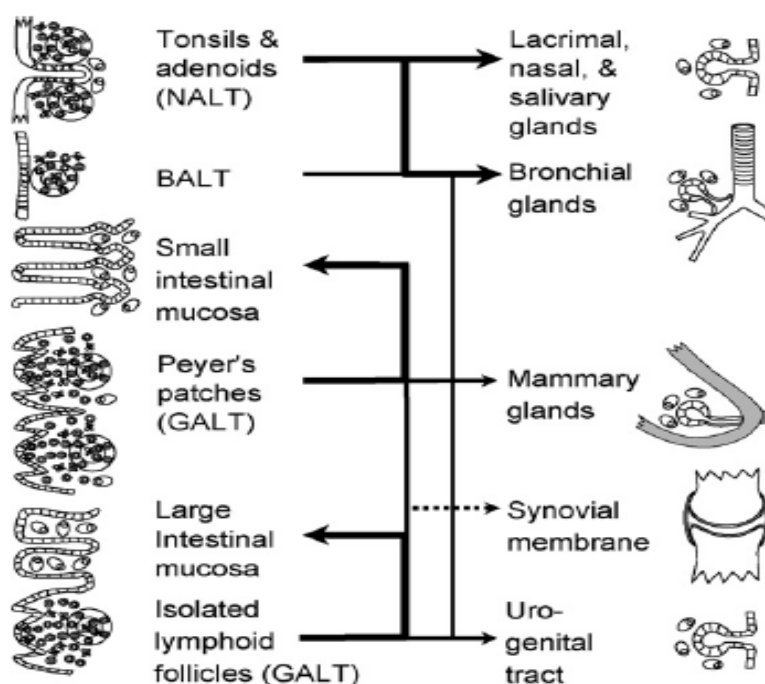
1. Systemic immune response สามารถแบ่งย่อยออกเป็น 2 กลไก ดังนี้

1.1 Cell-mediated immune response (CMIR) เป็นการของเซลล์ทางภูมิคุ้มกัน โดยทั่วไปให้ความสำคัญกับ T lymphocytes หลังถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจน ซึ่งทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และมีหลัไซโตคัยนชนิดต่างๆ เพื่อกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน เช่น การกระตุ้น $CD4^+$ helper T-lymphocyte type II สร้าง IL-4 ซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวนและการสร้างแอนติบอดีของ B-lymphocyte ส่วนการกระตุ้น $CD4^+$ helper T-lymphocyte type I และ $CD8^+$ cytolytic T-lymphocyte ให้สร้าง IFN- γ ซึ่งฤทธิ์กระตุ้นทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ของ T lymphocyte และการหลั่งสารจาก cytotoxic T lymphocyte เพื่อทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อชนิด extracellular pathogens การทำงานของ IL-4 และ IFN- γ เป็นแบบ negative feedback ทำให้การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเป็นไปอย่างสมดุล อย่างไรก็ตามการติดเชื้อบางชนิดกระตุ้น IFN- γ เพียงอย่างเดียวสามารถกำจัดเชื้อโรคได้ ก่อนที่จะมีการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี (Mestecky et al., 2010) นอกจากนี้หลังจาก T lymphocytes ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจน จะมี T lymphocyte ส่วนหนึ่งที่ทำหน้าที่จดจำชนิดของ

แอนติเจนชนิดนั้นๆ ไว้ เรียกว่า memory T lymphocytes เมื่อ memory T lymphocytes ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนชนิดเดิม จึงเกิดการตอบสนองที่รุนแรงและรวดเร็วกว่าการถูกกระตุ้นครั้งแรก

1.2 Humoral immune response (HIR) เป็นผลจากการตอบสนองของ B-lymphocyte ต่อแอนติเจน ทำให้เกิดการสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนชนิดนั้น ชนิดแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนและมีความสำคัญต่อการติดเชื้อในร่างกายคือ คีโมโกลบูลินจี (immunoglobulin G; IgG) ซึ่งพบมากในสารน้ำภายในร่างกาย โดยมีบทบาทสำคัญในทำลายเชื้อโรคชนิด intracellular pathogens ภายหลังเกิดการติดเชื้อเข้าสู่ร่างกาย โดยการกระตุ้น B lymphocytes ผ่านกลไกของ CD4⁺ helper T-lymphocyte ที่เรียกว่า T-dependent pathway ทำให้ B lymphocytes บางส่วนจดจำชนิดของแอนติเจนไว้ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนชนิดดังกล่าวซ้ำ จะเกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่รุนแรงและรวดเร็วครั้งแรก เรียกเซลล์ชนิดดังกล่าวว่า memory B lymphocytes ขณะที่การแอนติเจนกระตุ้น B lymphocytes โดยตรงที่เรียกว่า T-independent pathway ไม่ทำให้เกิด memory B lymphocytes

2. Mucosal immune response เป็นผลการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันบริเวณเยื่อเมือก มีกลไกหลักคือการกระตุ้น B lymphocyte ให้สร้างแอนติบอดีชนิดคีมูโกลบูลิน เอ (immunoglobulin A; IgA) และหลั่งออกนอกร่างกายไปยังบริเวณเยื่อเมือก เรียกว่า secretory IgA (sIgA) โดย sIgA มีโครงสร้างเป็น polymeric form ทำให้สามารถทนต่อภาวะกรดต่าง และการทำลายของเอนไซม์สูงกว่าแอนติบอดีที่พบใน IgG และ IgA จาก systemic immune response ซึ่งมีโครงสร้างเป็น monomeric form (Mestecky et al., 2010) ทั้งนี้เนื่องจากกลไกการนำส่งแอนติเจนและบริเวณที่ตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ต่างกันทำให้ระดับการเปลี่ยนแปลงของ sIgA และ IgA ไม่สัมพันธ์กัน (Kozlowski et al., 2002) และจากกลไกของ CMIS ทำให้การนำส่งแอนติเจนทางจมูกสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันบริเวณเยื่อเมือกบริเวณอื่นได้ ดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 Regionalization of the mucosal B-cell system (Brandizaeg et al., 2007)

ข้อดีและข้อจำกัดของการนำส่งวัคซีนทางจมูก

1. ข้อดีของการนำส่งวัคซีนทางจมูก

ประมาณ 80% ของโรคติดเชื้อทั้งหมดได้รับเชื้อโรคทางเยื่อเมือก ซึ่งบริเวณดังกล่าวมี sIgA เป็นภูมิคุ้มกันหลักในการทำลายและป้องกันการติดเชื้อเข้าสู่ร่างกาย แต่การให้วัคซีนแบบฉีดกระตุ้นเพียง IgG ซึ่งเป็นแอนติบอดีหลักในการทำลายเชื้อโรคในเลือดหลังเกิดการติดเชื้อ ไม่สามารถกระตุ้น sIgA ในระดับที่ป้องกันการติดเชื้อได้ ตรงข้ามกับการนำส่งวัคซีนทางเยื่อเมือกที่สามารถกระตุ้นได้ทั้ง sIgA และ IgG โดยช่องทางที่นิยมนำส่งวัคซีนทางเยื่อเมือก คือ การให้วัคซีนทางจมูกและการให้วัคซีนชนิดกิน แม้การนำส่งวัคซีนบริเวณใดบริเวณหนึ่งจะสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันบริเวณเยื่อเมือกบริเวณอื่นได้ แต่พบว่าการให้วัคซีนทางจมูก สามารถลดปริมาณแอนติเจนที่ใช้ลงถึงสี่เท่า เมื่อเทียบกับการให้วัคซีนชนิดกิน (Kang et al., 2009) เนื่องจากการให้วัคซีนทางจมูกมีการทำลายแอนติเจนจากเอนไซม์และภาวะกรดน้อยกว่า และยังไม่ผ่าน first pass metabolism เหมือนการให้วัคซีนชนิดกิน และข้อจำกัดในการพัฒนาวัคซีนทางเยื่อเมือกที่สำคัญคือ mucosal tolerance ซึ่งเป็นผลมาจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันบริเวณ MALT ที่ลดลงตามอายุที่เพิ่มขึ้น แต่พบว่าการลดลงของเซลล์ทางภูมิคุ้มกันของ NALT ซ้ำกว่า GALT และการทำงานของ NALT ไม่มีนัยสำคัญต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ดังเช่นกรณีของวัคซีนไข้หวัดใหญ่ที่นำส่งทางจมูกที่สามารถใช้ในผู้สูงอายุได้ (Ozsoy et al.,

2009; Fujihashi and Kiyono, 2009) ทำให้การให้วัคซีนทางจมูกมีข้อดีเหนือการให้วัคซีนชนิดกิน นอกจากนี้ยังพบว่าการนำวัคซีนทางจมูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าการให้วัคซีนทางช่องคลอด (vaginal immunization) และทางทวารหนัก (rectal immunization) อีกด้วย (Koziowski et al., 2002)

นอกจากการนำส่งวัคซีนทางจมูกมีข้อดีด้านประสิทธิภาพเหนือกว่าการให้วัคซีนด้วยการฉีด และให้วัคซีนชนิดกินแล้ว การให้วัคซีนทางจมูกเป็นวิธีที่ง่ายในการบริหารยา ผู้บริหารยาไม่จำเป็นต้องได้รับการฝึกทักษะมากนัก ผู้ป่วยสามารถบริหารยาได้เอง สามารถให้วัคซีนแก่ผู้ป่วยหลายรายในคราวเดียว ผู้ป่วยสามารถบริหารยาได้เอง การบริหารยาไม่ก่อให้เกิดความเจ็บปวดช่วยเพิ่มความร่วมมือในการรับวัคซีนของผู้ป่วย อีกทั้งไม่รบกวนการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ไม่ก่อให้เกิดการติดเชื้อจากการฉีดวัคซีนและการผลิตวัคซีนไม่จำเป็นต้องใช้กระบวนการปราศจากเชื้อ (sterile manufacturing process) (Borges et al., 2009; Lubben et al., 2001)

2. ข้อจำกัดในการนำส่งวัคซีนทางจมูก

ข้อจำกัดที่สำคัญของการนำส่งวัคซีนทางจมูก คือ อัตราการซึมผ่านของวัคซีน ซึ่งเป็นสารชีวโมเลกุลมีขนาดใหญ่มาก จึงผ่านเยื่อจมูกได้ค่อนข้างน้อย เนื่องจากเยื่อจมูกที่เรียบตัวอย่างหนาแน่น อัตราการกำจัดยาจากเยื่อจมูกที่รวดเร็วจาก mucocilliar clearance จนวัคซีนไม่ถูกนำส่งผ่านเยื่อจมูกไปยังเซลล์ทางภูมิคุ้มกัน การนำส่งวัคซีนทางจมูกจึงจำเป็นต้องอาศัยสารหรือระบบนำส่งที่เป็น mucoadhesive adjuvant อีกทั้งการทำลายโปรตีนแอนติเจนของเอนไซม์ protease และ peptidase ทำให้ปริมาณโปรตีนที่ผ่านเยื่อจมูกลดลง เช่น กรณีที่พบใน calcitonin หรือ insulin เป็นต้น (Arora et al., 2002) แอนติเจนซึ่งเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลใหญ่กว่า 1 kDa สามารถผ่านเยื่อจมูกได้ประมาณ 10% นอกจากนี้ปริมาณวัคซีนที่นำส่งทางจมูกในคนจะต้องไม่เกิน 200 μ L ต่อครั้ง เพื่อไม่ให้วัคซีนผ่านไปยังทางเดินอาหารหรือเข้าสู่ปอด ทำให้ขนาดวัคซีนที่ได้รับไม่คลาดเคลื่อน (Grassin-Delye et al., 2012) การที่ช่องจมูกมีส่วนของ olfactory region ที่สามารถนำส่งสารไปยังระบบประสาทส่วนกลางโดยตรง ดังนั้นการนำส่งทางจมูกอาจมีผลข้างเคียงต่อระบบประสาท เช่น กรณีของ Nasalflu ซึ่งเป็นวัคซีนไข้หวัดใหญ่ชนิด inactivated influenza vaccine มี heat labile enterotoxin (LT) ของเชื้อ *E.coli* เป็นแอดจูแวนท์ (adjuvant) ซึ่งเป็นวัคซีนที่ให้ทางจมูกที่ได้ออกสู่ท้องตลาดชนิดแรกในปี 2000 ในประเทศเยอรมันและสวีตเซอร์แลนด์ แต่ถูกถอนออกจากตลาดในปี 2001 เนื่องจากพบว่า LT เป็นพิษต่อ olfactory nerves ทำให้เกิดความผิดปกติของระบบประสาทที่เรียกว่า "Bell's palsy syndrome" นอกจากนี้ความรู้ที่เกี่ยวข้องกับการนำส่งวัคซีนทางจมูกยังมีอย่างจำกัดทำให้การนำส่งวัคซีนทางจมูกยังไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร (Amorij et al., 2012)

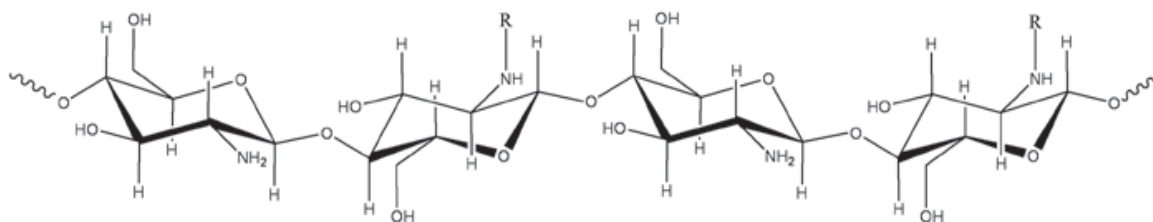
ตารางที่ 1 ตัวอย่างวัคซีนที่นำส่งทางจมูก (Grassin-Delyle et al., 2012; Jabbal-Gill, 2010)

ชื่อวัคซีน	ข้อบ่งใช้	สถานะการวิจัย และพัฒนา	บริษัท
Nasalflu	Seasonal influenza	ถอนจากตลาดปี 2001	Berna Biotech
FluMist	Seasonal influenza	วางขาย ปี 2003	Astra-Zenega
NASOVAC	H1N1 swine influenza	วางขาย ปี 2010	Serum Institute of India
Live-attenuated influenza vaccine	Seasonal influenza และ pandemic influenza	Clinical phase 2	BioDiam
Norovirus vaccine	Norovirus	Clinical phase 1/2	Ligocytis
MED1534	Parainfluenza virus type 3/Respiratory syncytial virus	Clinical phase 1	Astra-Zenega
MED1560	Parainfluenza virus type 3	Clinical phase 1	Astra-Zenega
FluVac	Seasonal influenza	Clinical phase 1	Avir Green Hills Biotechnology AG
DeltaFLu	Pandemic influenza	Clinical phase 1	Avir Green Hills Biotechnology AG
NiflusomeVac	Influenza	Clinical phase 1	NasVax
Influenza and diphtheria vaccine	Influenza และ diphtheria	Clinical phase 1	OptiNose
Influenza vaccine	Influenza	Clinical phase 1	Solvay
Influenza vaccine	Influenza	Clinical phase 1	Vaxin

ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลกับการนำส่งวัคซีนทางจมูก

1. ไคโตแซน

ไคโตแซน (chitosan) เป็นสารกลุ่ม Polyaminosaccharide ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา alkaline deacetylation ของไคตินที่พบในเปลือกกุ้ง ปู แมลง รวมถึงเห็ดราบางชนิด โครงสร้าง Polyaminosaccharide เกิดจาก β (14)-D-glucosamine และ N-acetyl D-glucosamine ต่อกันแบบ สุ่ม ไคโตแซนแต่ละโมเลกุลประกอบด้วยหมู่เอมิโน (amino group, $-\text{NH}_2$) 1 หมู่และหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, $-\text{OH}$) 2 หมู่ ไคโตแซนเป็นด่างอ่อน (weak base) มีค่า pKa ประมาณ 6.5 แสดงประจุเป็นบวกจาก NH_2 ที่รับโปรตอน (protonization) เป็น NH_3^+ ไม่ละลายในตัวทำละลายที่ pH เป็นกลาง ความสามารถในการละลายของไคโตแซนขึ้นกับหลายปัจจัยเช่น อุณหภูมิ pH ความเข้มข้น รวมถึงชนิดของตัวทำละลายตัวทำละลายที่นิยมใช้คือ 1 % w/v acetic acid (Pillai et al., 2009)



รูปที่ 6 โครงสร้างของไคโตแซน โดย R แทน acetyl หรือ H ซึ่งมีผลต่อ degree of acetylation (Morris et al., 2010)

การที่ไคโตแซนมีประจุบวกจากหมู่ amine ทำให้สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) กับหมู่คาร์บอกซิลิก (carboxylic group, $-\text{COOH}$) ของโปรตีน หรือดีเอ็นเอที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, $-\text{OH}$) ซึ่งประจุเป็นลบได้ดี อีกทั้งช่วยเพิ่มความคงตัวให้กับโปรตีน จึงเป็นพอลิเมอร์ ที่มีการศึกษาและพัฒนาเป็นระบบนำส่งโปรตีนอย่างแพร่หลาย โดยไคโตแซนมักถูกใช้เป็นระบบนำส่งโปรตีนผ่านเยื่อจมูก เนื่องจากประจุบวกของไคโตแซนสามารถเกิดอันตรกิริยากับ saliaic acid ในสารเมือกที่มีประจุลบ และเยื่อจมูกที่มีประจุลบจากหมู่ฟอสเฟต (phosphate group, PO_4^{3-}) จึงช่วยลด mucocilliar clearance และเพิ่มเวลาดูดซึมบริเวณเยื่อจมูกได้ เรียกคุณสมบัติดังกล่าวว่า mucoadhesive property นอกจากนี้ไคโตแซนยังเกิดอันตรกิริยากับ COOH ของ ZO-1 occludin ซึ่งเป็นโปรตีนที่ควบคุมการเปิด/ปิดช่องว่างระหว่างเซลล์ (tight junction) ทำให้ช่องว่างระหว่างเซลล์เปิดออกสารจึงผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์มากขึ้น (Vilasaliu et al., 2010) นอกจากนี้ไคโตแซนยังมี

คุณสมบัติที่ดีหลายประการ เช่น มีความเป็นพิษต่ำ LD 50 > 1,500 mg/kg และ 1,600 mg/kg เมื่อให้โดยการกินในหนู rat และ mice ตามลำดับ เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่า ไคโตแซนที่ความเข้มข้นมากกว่า 3.2 mg/ml ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ Caco-2 การให้ไคโตแซนทางจมูกของหนู rat ที่ความเข้มข้น 0.125, 0.25 และ 1% w/v ไม่พบความผิดปกติของเยื่อจมูกที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 1% และเมื่อให้ไคโตแซน 0.25% w/v ทางจมูกในหนูตะเภา (guinea pig) ช้างละ 50 μ L นาน 28 วัน ไม่พบความผิดปกติของเนื้อเยื่อจมูก และจากการประเมินการเข้ากันกับเม็ดเลือดแดง โดยติดตามการแตกของเม็ดเลือดแดง (haemolysis) พบว่าไคโตแซนไม่มีผลต่อการแตกของเม็ดเลือด เมื่อประเมินความปลอดภัยของไคโตแซนในคน ไม่พบอาการอื่นไม่พึงประสงค์ในผู้ที่รับประทานไคโตแซนติดต่อกันทุกวัน วันละ 4.5 g และไม่พบอาการแสดง (symptom) ผู้ที่รับประทานไคโตแซน 6.57 g/วัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (Baldrick, 2010)

ไคโตแซนสลายตัวได้ด้วยกลไกทางชีวภาพ (biodegradability) เมื่อให้ทางปากสามารถย่อยด้วยเอนไซม์และการหมักของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร (Baldrick et al., 2010) เมื่อถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายสามารถย่อยด้วยเอนไซม์หลายชนิดจาก macrophages เช่น lysozymes และ chitinases ได้เป็นสารกลุ่ม amino sugar และถูกกำจัดอย่างสมบูรณ์ในร่างกาย โดยไม่ก่อให้เกิดอาการแพ้หรือต่อต้านจากร่างกาย จึงจัดเป็นสารที่เข้ากันกับร่างกาย (biocompatible) ด้วยเหตุนี้จึงจัดว่าไคโตแซนเป็นสารช่วยทางเภสัชกรรมที่ไม่มีความเป็นพิษต่อร่างกาย การเตรียมไคโตแซนเพื่อใช้ในทางเภสัชกรรมมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและกำจัดสิ่งปนเปื้อนออก ทำให้ไคโตแซนเป็นสารที่ไม่กระตุ้นให้เกิดอาการแพ้ในผู้ที่แพ้อาหารทะเล (Muzzarelli, 2010)

2. การนำส่งวัคซีนทางจมูกด้วยไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล

วัคซีนชนิดซับยูนิต (subunit vaccine) เป็นวัคซีนที่มีการพัฒนาอย่างรวดเร็วและมีการศึกษาอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน โดย subunit vaccine เป็นโปรตีนแอนติเจนที่ไม่มีคุณสมบัติยึดเกาะเยื่อเมือก จึงจำเป็นต้องอาศัยระบบนำส่งที่เพิ่มการซึมผ่านเยื่อเมือก พบว่าการนำส่งวัคซีนร่วมกับสารละลายไคโตแซน ช่วยเพิ่มปริมาณของวัคซีนผ่านเยื่อเมือก ระบบภูมิคุ้มกันจึงได้รับปริมาณแอนติเจนและมีการตอบสนองมากขึ้น เมื่อเตรียมไคโตแซนในรูปอนุภาคเพื่อใช้นำส่งวัคซีน พบข้อดีที่เหนือกว่าการให้วัคซีนร่วมกับสารละลายไคโตแซน คือ สามารถป้องกันการถูกทำลายโปรตีนแอนติเจนจากเอนไซม์และกรดภายในช่องจมูก และสามารถนำส่งสารผ่านเยื่อเมือกได้ดีกว่าสารละลาย เช่น งานวิจัยของ Shahnaz et al. (2012) พบว่าเมื่อเปรียบเทียบค่าชีวประสิทธิผล (bioavailability) ในการนำส่ง leuprolide acetate ทางจมูกด้วยไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล และในรูปแบบสารละลายเทียบกับการฉีด leuprolide acetate ในรูปสารละลายเข้าสู่เส้นเลือดดำ (intravenous injection) พบว่าการ

นำส่งสารในด้วยโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล มีค่า bioavailability สูงกว่าการให้ในรูปแบบสารละลาย โดยมีค่าเท่ากับ 4.3 % และ 2.0 % ตามลำดับ นอกจากนี้อนุภาคนาโนเมตรยังถูกนำเข้าสู่เซลล์ทางภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆ เช่น lymphocytes, dendritic cell, macrophages เป็นต้น ง่ายกว่าในรูปแบบสารละลาย จึงช่วยให้เพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้ง HIR และ CMIR ได้ (Dobrovolskaia et al., 2008) การแอนติเจนที่เก็บในโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลจะถูกปลดปล่อยอย่างช้าๆ ทำให้เซลล์ภูมิคุ้มกันสัมผัสกับแอนติเจนนานขึ้น จึงเพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน อย่างไรก็ตามการควบคุมการปลดปล่อยแอนติเจนออกจากอนุภาคทำได้ยาก แต่มีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลเป็นวัคซีนที่ให้เพียงครั้งเดียว โดยไม่จำเป็นต้องมีการกระตุ้นซ้ำ

สำหรับขนาดที่เหมาะสมในการนำส่งยา หรือวัคซีนทางจมูกนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด อย่างไรก็ตามพบว่าขนาดอนุภาคโคโตแซนขนาด 5 μm สามารถนำส่งผ่านเยื่อจมูกและกระตุ้นภูมิคุ้มกันเมื่อวัคซีนทางจมูกในหนู mice ได้ (Kang et al., 2009) และขนาดอนุภาคที่เล็กระดับนาโนเมตรสามารถนำส่งวัคซีนผ่านเยื่อผิวได้ดีขึ้น ปัจจุบันจึงมีการศึกษาระบบนำส่งวัคซีนทางจมูกที่ขนาดอนุภาคระดับนาโนเมตรจำนวนมาก (Rice-Ficht et al., 2010) liposome เป็นอีกระบบนำส่งหนึ่งที่มีการใช้เพื่อนำส่งวัคซีนทางจมูก แต่พบว่าโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล ซึ่งเป็น polymeric nanoparticle เป็นระบบที่กักเก็บแบบ nanosphere ทำให้กักเก็บยาได้มากกว่า และมีความคงตัวของระบบสูงกว่า liposome ซึ่งเป็นการกักเก็บแบบ nanocapsule (Tiyaboonchai, 2003) อีกทั้งไขมันที่มีประจุบวก (cationic lipid) ยังมีความเป็นพิษค่อนข้างสูง ต่างจากโคโตแซนเป็นพอลิเมอร์ประจุบวกที่ไม่เป็นพิษ (non-toxic cationic polymer) ทำให้โคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลเป็นระบบนำส่งวัคซีนทางจมูกที่มีข้อดีเหนือกว่า liposome (Khatri et al., 2008)

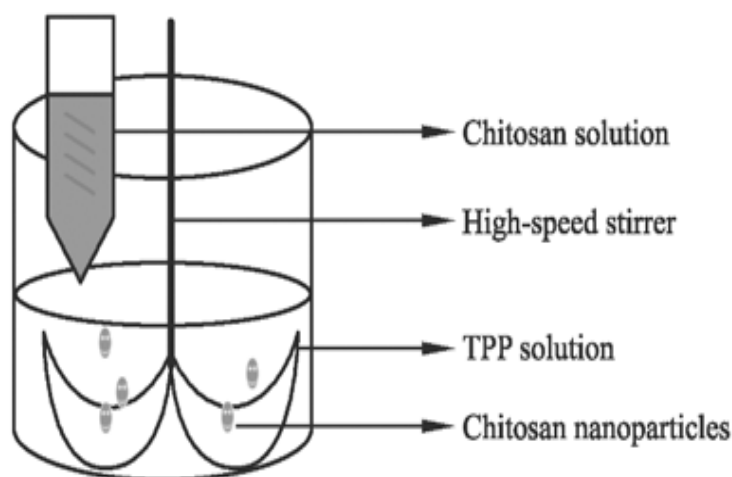
3. การเตรียมโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล

การเตรียมโคโตแซนไมโครพาร์ทิเคิลเพื่อนำส่งยาและวัคซีนทางปากมีการศึกษากันอย่างยาวนาน ทำให้ทราบปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติของอนุภาคนำส่ง เมื่อพบข้อดีของอนุภาคนำส่งระดับนาโนเมตร ว่ามีข้อดีเหนือกว่าระดับไมโครเมตร จึงมีการปรับเปลี่ยนปัจจัยบางอย่างจากวิธีการเตรียมดั้งเดิมเพื่อเตรียมโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล วิธีการเตรียมโคโตแซนนาโน/ไมโครพาร์ทิเคิลมีด้วยกันหลายวิธีเช่น emulsion cross-linking, emulsion-droplet coalescence, ionotopic gelation รวมถึงการดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีของโคโตแซน (Chemically modified chitosan method) เพื่อให้โคโตแซนสามารถเกิดอนุภาคนำส่งได้เอง (self-assembling) สำหรับการเตรียมอนุภาคนำส่งด้วยวิธี emulsion cross-linking และ emulsion-droplet coalescence ไม่สามารถใช้ในการนำส่งโปรตีนแอนติเจนได้ เนื่องจากวิธีการดังกล่าวมีผลต่อความคงตัวของโปรตีน จากการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ใน

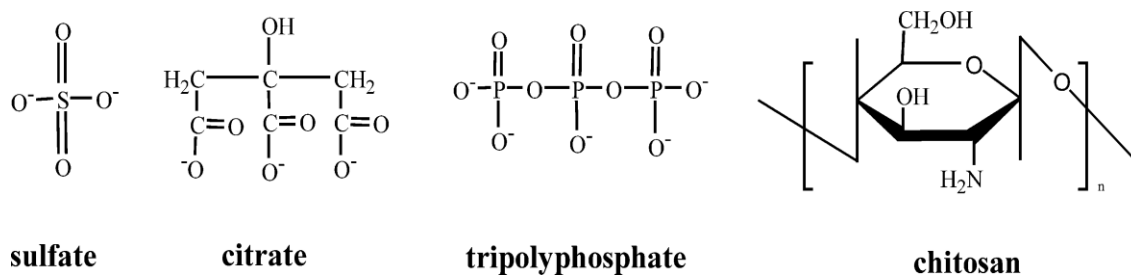
การเตรียมสำหรับการดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีของไคโตแซน แม้สามารถใช้เตรียมอนุภาคเพื่อนำส่งโปรตีนได้ดี แต่ด้วยวิธีการที่ค่อนข้างยุ่งยาก จึงมีการนำมาใช้ในปัจจุบันค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับวิธี ionotropic gelation ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย ไม่จำเป็นต้องดัดแปลงโครงสร้างของโปรตีน หรือแอนติเจน ไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ และไม่ใช้สารที่เป็นอันตรายต่อร่างกายในการเตรียม อีกทั้งเทคนิคดังกล่าวมีการใช้อยู่เดิมในระดับอุตสาหกรรม ทำให้วิธี ionotropic gelation เป็นวิธีที่นิยมใช้การเตรียมไคโตแซนนาโน/ไมโครพาร์ทิเคิลเพื่อนำส่งโปรตีนและแอนติเจน (Chenguang et al. ,2007)

3.1 การเตรียมไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลวิธี ionotropic gelation

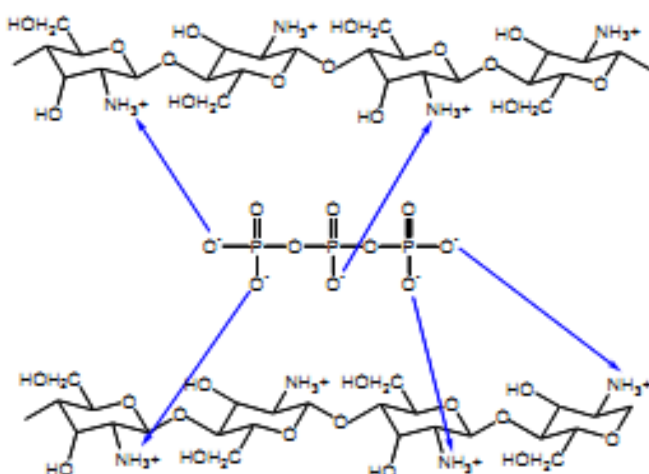
วิธี ionotroic gelation เป็นการเตรียมอนุภาคโดยอาศัยการเกิดอันตรกิริยาของประจุชนิดตรงข้ามกัน (electrostatic interaction) โดยกรณีของไคโตแซนนาโน/ไมโครพาร์ทิเคิลเตรียมโดยปั่นสารละลายไคโตแซนในกรดอะซิติก (acetic acid) เจือจางด้วยความเร็วคงที่ จากนั้นหยดสารละลายที่มีประจุลบ (anion) ทำอันตรกิริยากับประจุบวก (cation) ของไคโตแซนซึ่งปั่นผสมให้เข้ากันอยู่ตลอดเวลา สารที่มีประจุลบที่นิยมใช้คือ tripolyphosphate (TPP) เนื่องจากให้ประจุลบมาก เกิดอันตรกิริยากับไคโตแซนได้ง่ายและรวดเร็ว เมื่อเทียบกับ sulfate และ citrate อีกทั้งไม่เป็นพิษต่อร่างกาย (Shu and Zhu,2002)



รูปที่ 7 การเตรียมไคโตแซนนาโน/ไมโครพาร์ทิเคิลด้วยวิธี ionotropic gelation
(Chenguang et al., 2007)

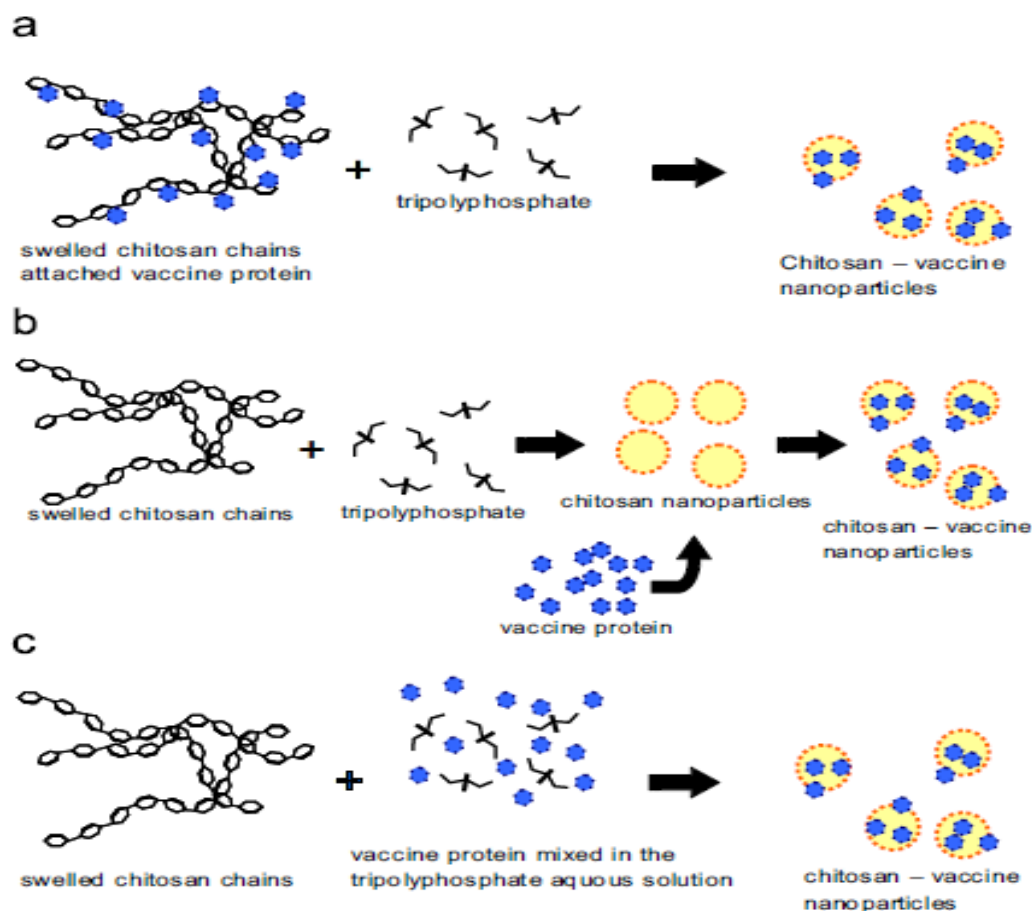


รูปที่ 8 โครงสร้างและประจุของ sulfate, citrate, tripolyphosphate และไคโตแซน
(Shu and Zhu ,2002)



รูปที่ 9 ตำแหน่งการอันตรกิริยาระหว่างไคโตแซนกับ TPP (Lee, 2004)

การผสมโปรตีนหรือแอนติเจน ทำได้โดยเติมในไคโตแซน หรือ TPP ก่อนเตรียมอนุภาคนำส่ง (incorporation) หรือเตรียมอนุภาคนำส่งก่อนแล้วนำมาผสมกับโปรตีนหรือแอนติเจนอีกครั้ง (incubation) ทั้งนี้ incorporation ทำให้ได้ขนาดอนุภาคที่มีขนาดเล็ก และมีความคงตัวของระบบที่ดีกว่าการเตรียมแบบ incubation อย่างไรก็ตาม incubation เป็นวิธีเตรียมที่ง่ายและมีการปลดปล่อยโปรตีนออกจากอนุภาคได้รวดเร็วกว่า สำหรับการนำส่งวัคซีนทางจมูกพบว่าการเตรียมแบบ incorporation โดยผสมแอนติเจนกับ TPP ก่อนเตรียมอนุภาค ทำให้ไคโตแซนหุ้มแอนติเจนดีกว่าการผสมแอนติเจนกับไคโตแซน และการเตรียมแบบ incubation ทำให้ไคโตแซนที่ผิวอนุภาคยึดเกาะกับเยื่อจมูกได้ดี ไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมจากการผสมแอนติเจนกับ TPP จึงกระตุ้นภูมิคุ้มกันจากการให้วัคซีนทางจมูกได้ดีกว่าการเตรียมแบบอื่น (Kim and Kang, 2008)



รูปที่ 10 วิธีการกักเก็บแอนติเจนของไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลด้วยเทคนิคต่างๆ

(Kim and Kang, 2008)

- เทคนิค incorporation โดยผสมแอนติเจนในไคโตแซนก่อนเตรียมตัวรับ
- เทคนิค incubation โดยบ่มแอนติเจนกับไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิล
- เทคนิค incorporation โดยผสมแอนติเจนใน TPP ก่อนเตรียมตัวรับ

3.2 ปัจจัยการเตรียมไคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลที่มีผลต่อคุณสมบัติของอนุภาคนำส่ง

3.2.1 มวลโมเลกุล (Molecular weight ; Mw) และ Deacetylation degree (DD) ของไคโตแซน

ค่า DD เป็นตัวบ่งชี้ร้อยละของหมู่ฟังก์ชันที่ให้ประจุบวกของไคโตแซน หมู่ฟังก์ชันดังกล่าวเป็นส่วนที่เกิดอันตรกิริยากับประจุลบของ TPP และโปรตีน อนุภาคที่เตรียมจากไคโตแซนที่มี DD สูง จึงกักเก็บโปรตีนได้ดี แต่อัตราการปลดปล่อยโปรตีนค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับไคโตแซนที่มีค่า DD ต่ำกว่า สำหรับมวลโมเลกุลของไคโตแซนมีอิทธิพลต่อการกักเก็บและปลดปล่อยสารในลักษณะเดียวกัน

โดยการที่มีมวลโมเลกุลเพิ่มขึ้นเป็นการเพิ่มหมู่ฟังก์ชันของไคโตแซน (Xu and Du, 2003; Gan and Wang, 2007) นอกจากนี้จากการทดลองของ Gan et al. (2005) ยังพบว่าขนาดและประจุที่ผิวอนุภาคเพิ่มขึ้นตามมวลโมเลกุลของไคโตแซนที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นการนำส่งวัคซีนทางจมูกซึ่งต้องการอนุภาคนำส่งที่มีขนาดเล็กและปลดปล่อยแอนติเจนได้ดีจึงนิยมใช้ไคโตแซนที่มีมวลโมเลกุลต่ำ (Low molecular weight chitosan)

3.2.2 ความเข้มข้นของไคโตแซน

ความเข้มข้นของไคโตแซนมีผลต่อขนาดประจุที่ผิวอนุภาค และความสามารถในการกักเก็บสารของอนุภาค เมื่อกำหนดให้ TPP ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาคงที่ หากใช้ความเข้มข้นของไคโตแซนต่ำมีผลให้เกิดการตกตะกอนของ TPP เนื่องจากไคโตแซนไม่เพียงพอในการเกิดอันตรกิริยากับ TPP จึงมี TPP เหลือจากการทำปฏิกิริยา กรณีที่ความเข้มข้นของไคโตแซนมากเกินไป พบว่าการเกิดอนุภาคมีปริมาณน้อย เนื่องจากความหนืดที่เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นขัดขวางการเกิดพันธะเช่นที่พบในงานวิจัยของ Xu and Du. (2003) ซึ่งหาความเข้มข้นของไคโตแซนที่เหมาะสมในเตรียมนาโนพาร์ติเคิล พบว่าช่วงความเข้มข้น 1 mg/ml ถึง 3 mg/mL เป็นช่วงที่มีความเหมาะสมในการเกิดอันตรกิริยา โดยขนาดและประจุที่ผิวของอนุภาคเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของไคโตแซนที่เพิ่มขึ้น และพบว่าความเข้มข้นของไคโตแซนตั้งแต่ 4 mg/mL ขึ้นไป มีความหนืดสูง จึงขัดขวางการเกิดอันตรกิริยา นอกจากนี้ยังพบว่าความหนืดที่เพิ่มขึ้น ยังขัดขวางการกักเก็บสารของอนุภาค เช่นเดียวกับการทดลองของ Gan and Wang (2007) พบว่าความสามารถกักเก็บสารลดลงจาก 88.3% เป็น 61.3% เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไคโตแซนจาก 1 mg/mL เป็น 3 mg/mL สำหรับการปลดปล่อยสารของอนุภาคจากการทดลองของ Xu and Du (2003) พบว่าอนุภาคที่เตรียมจากไคโตแซนความเข้มข้น 1 mg/mL ปลดปล่อยสารได้ดีกว่าไคโตแซนความเข้มข้น 2 mg/mL ทั้งนี้เนื่องจากอนุภาคที่เตรียมจากไคโตแซนความเข้มข้น 1 mg/mL มีการกักเก็บสาร 61.0% แต่ที่ความเข้มข้น 2 mg/mL กักเก็บสารได้ 54.4% การที่มีปริมาณสารที่กักเก็บสูงกว่า แรงยึดเหนี่ยวระหว่างประจุของโปรตีนกับไคโตแซนจึงมีความแรงต่ำ อีกทั้งอนุภาคที่เตรียมได้จากไคโตแซนความเข้มข้นต่ำมีขนาดเล็ก จึงมีพื้นที่ผิวโดยปริมาตรสูง จึงเกิดการปลดปล่อยสารออกมาได้อย่างง่ายรวดเร็วและมากกว่าอนุภาคที่เตรียมจากไคโตแซนความเข้มข้นสูงซึ่งมีการกักเก็บแอนติเจนน้อยกว่า

3.2.3 สัดส่วนการเกิดอันตรกิริยาระหว่างไคโตแซนกับ TPP

ความเข้มข้นของ TPP ที่ให้ผลดีและนิยมใช้การเตรียมไคโตแซนนาโนพาร์ติเคิล คือ 1 mg/mL (Ku and Du, 2003; Gan et al., 2007) จากการศึกษาของ Gan et al. (2007) โดยเตรียมนาโนพาร์ติเคิลจากการเพิ่มสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนกับ TPP ตั้งแต่ 3 ต่อ 1 จนถึง 7 ต่อ 1 พบว่าเมื่อ

เพิ่มสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนกับ TPP การกักเก็บโปรตีนจะลดลงจาก 61.1% เป็น 49.2% เนื่องจากการลดปริมาณ TPP ทำให้ pH ของตำรับระหว่างการเตรียมตำรับลดลง การแสดงประจุลบของโปรตีนจึงลดลง ทำให้การเกิดอันตรกิริยากับไคโตแซนลดลง ปริมาณการกักเก็บโปรตีนจึงลดลง แต่การปลดปล่อยโปรตีนจากอนุภาคพบว่า ลดลงตามสัดส่วนไคโตแซนของ TPP ที่เพิ่มขึ้น เช่นที่พบในการศึกษาของ Kim and Kang (2008) เพื่อเตรียมนาโนพาร์ทิเคิลจากสัดส่วนโดยมวลของไคโตแซนกับ TPP ตั้งแต่ 1 ต่อ 1 จนถึง 6 ต่อ 1 พบว่าสัดส่วนที่ 3 ต่อ 1 ให้ขนาดที่เล็กและมีค่าประจุที่ผิวอนุภาคมากที่สุด โดยในช่วงสัดส่วนไคโตแซนต่อ TPP เป็น 1 ต่อ 1 ถึง 3 ต่อ 1 ขนาดของอนุภาคลดลง แต่มีค่าประจุที่ผิวของอนุภาคเพิ่มขึ้นเมื่อลดสัดส่วนไคโตแซนต่อ TPP ในทางกลับกันเมื่อเพิ่มสัดส่วนต่ำกว่า 3:1 พบว่า ขนาดของและประจุที่ผิวอนุภาคเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนไคโตแซนต่อ TPP ที่เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับการศึกษาของ Gan et al. (2005) ซึ่งมีขนาดและประจุที่ผิวอนุภาคตั้งแต่สัดส่วนการทำอันตรกิริยาของไคโตแซนกับ TPP ในสัดส่วนโดยมวลตั้งแต่ 3:1 จนถึง 8:1 พบว่าขนาดและประจุอนุภาคเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนไคโตแซนต่อ TPP ที่เพิ่มขึ้น

3.2.4 แรงที่ให้ระหว่างเกิดอันตรกิริยา

แรงที่ให้ระหว่างการเกิดอันตรกิริยาระหว่างไคโตแซนกับ TPP โดยทั่วไปใช้การปั่น จากการศึกษาของ Fan et al. (2011) พบว่าเมื่อปั่นที่ความเร็ว 200-800 rpm ทำให้ได้ขนาดอนุภาคที่สม่ำเสมอ ค่า PDI น้อยกว่า 0.05 แต่เมื่อเพิ่มความเร็วกว่า 1,000 rpm พบว่าเกิด aggregation จากแรงเฉือน (shear force) ทำให้อนุภาคที่เกิดขึ้นไม่คงตัว อย่างไรก็ตามพบว่ามีการวิจัยหลายฉบับที่ใช้ความเร็ว 1,000 rpm หรือสูงกว่าในการเตรียมโดยไม่เกิด aggregation ทั้งนี้อาจมีผลจากปัจจัยอื่นร่วมด้วย งานวิจัยดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tsai et al. (2005) ซึ่งพบว่าการเพิ่มแรงปั่นได้ขนาดอนุภาคที่เล็กลง แต่การกระจายขนาดของอนุภาคเพิ่มขึ้นตามแรงปั่นที่เพิ่มขึ้น ต่างจากการให้แรงระหว่างเกิดอันตรกิริยาภายใต้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic) ซึ่งขนาดและการกระจายขนาดของอนุภาคลดลงตามขนาดของแรงจากคลื่นเสียงที่เพิ่มขึ้น

3.2.5 ความเป็นกรดของสารละลายไคโตแซน

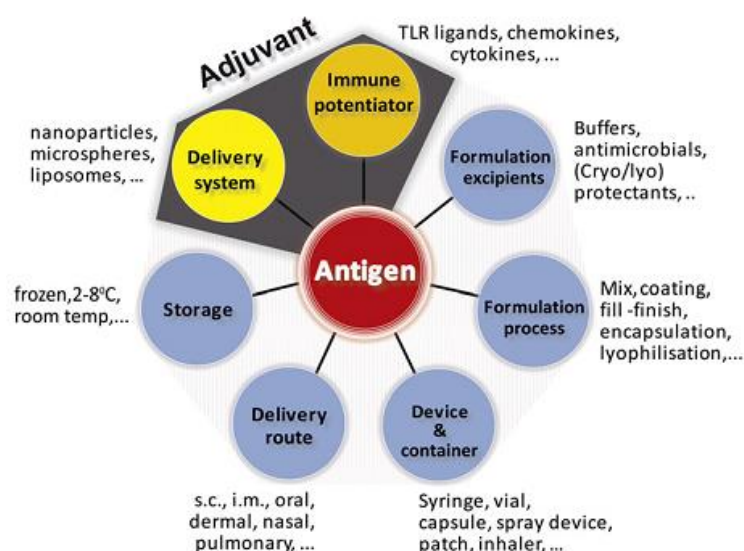
โดยทั่วไป pH ของสารละลายไคโตแซนที่นิยมใช้ในเตรียมนาโนพาร์ทิเคิล คือ 3-4 เนื่องจากสามารถกระตุ้นให้ไคโตแซนเกิด protonization ได้ดี อนุภาคที่เตรียมได้จึงมีขนาดเล็ก (Kim and Kang, 2008) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Fan et al. (2011) พบว่า pH ที่เหมาะสมในการเตรียมนาโนพาร์ทิเคิลควรต่ำกว่า 4.5 หาก pH สูงขึ้นปริมาณนาโนพาร์ทิเคิลที่ได้จะลดลง หาก pH เกิน 5.2 จะได้ไมโครพาร์ทิเคิลแทน

นอกจากปัจจัยที่กล่าวข้างต้นพบว่า มีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการเตรียมโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลด้วยเทคนิค ionotropic gelation แล้วมีผลต่อคุณสมบัติของอนุภาค ส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับแรงที่ทำให้ขณะเตรียมตำรับ เช่น อุณหภูมิ และการให้แรงจากภายนอกในรูปแบบต่างๆ ซึ่งมีผลต่อการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโคโตแซนกับ TPP (Fan et al., 2011)

ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดอนุภาคนำส่ง กับ แอดจูแวนท์

นอกจากชนิดและช่องทางการให้วัคซีนแล้ว แอดจูแวนท์ (adjuvant) หรือ สารเสริมฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อประสิทธิภาพของวัคซีน สามารถแบ่งออกเป็นสองกลุ่มตามกลไกการเสริมฤทธิ์ คือ

1. **สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immuostimulant)** เป็นสารที่ออกฤทธิ์กระตุ้นต่อเซลล์ภูมิคุ้มกันโดยตรงทำให้เกิดการตอบสนองต่อแอนติเจนเพิ่มขึ้น ตัวอย่างเช่น cytokine , cholera toxin และ *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin เป็นต้นจากการทดลองแบบ *in vitro* พบว่าโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลมีคุณสมบัติเป็น immuostimulant โดยโคโตแซนโคโตแซนนาโนพาร์ทิเคิลขนาด 371 nm, ดัชนีการกระจายขนาดของอนุภาค (polydispersion index; PDI) เท่ากับ 0.698 มีฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของ spleenocytes (Pattani et al., 2009)



รูปที่ 11 ปัจจัยที่มีผลต่อฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันของวัคซีน (Amorij et al., 2012)

2. ระบบนำส่ง (Delivery system) เป็นระบบนำส่งวัคซีนที่สามารถนำส่งแอนติเจนให้กับเซลล์ทางภูมิคุ้มกันในลักษณะที่เหมาะสม ช่วยให้ฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันของวัคซีนดีขึ้น ทั้งจากการเพิ่มปริมาณแอนติเจนนำส่งยังเซลล์ทางภูมิคุ้มกัน เพิ่มระยะเวลาในการสัมผัสแอนติเจนของเซลล์ทางภูมิคุ้มกัน ตัวอย่าง เช่น Mineral salt, liposome, micro-nanoparticles เป็นต้น (Amorij et al., 2012) แม้อนุภาคนำส่งขนาดเล็กจะทำให้สามารถนำส่งแอนติเจนไปยังบริเวณต่างๆ ได้ดีกว่าอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ แต่นอกจากปริมาณของแอนติเจนแล้วยังพบปัจจัยร่วมอื่นๆ อีกหลายปัจจัยที่มีผลต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ทำให้ไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจนว่าอนุภาคขนาดเล็กสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ (Yan et al., 2013)

รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ระหว่างขนาดอนุภาคนำส่ง กับ ฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันของวัคซีน

ปัจจุบันระบบนำส่งวัคซีนขนาดไมโคร/นาโนเมตรเป็นระบบนำส่งที่มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย จากการศึกษาระบบ in vitro ทำให้ยอมรับกันโดยทั่วไปว่าขนาดอนุภาคนำส่งมีผลต่อการเสริมฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันและควบคุมกลไกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน โดยพบว่า การนำส่งแอนติเจนเข้าสู่ APCs ด้วยระบบนำส่งมีขนาด 20-200 nm ถูกนำส่งเข้าเซลล์ด้วยการ endocytosis จะกระตุ้น CMIR เป็นหลัก ถ้าอนุภาคขนาดใหญ่ตั้งแต่ 500 nm-5 μ m ถูกนำส่งเข้าสู่เซลล์ด้วยการ phagocytosis มีผลกระตุ้น HIR เป็นหลัก (Marie-Luce et al., 2011; Oyewumi et al., 2010) โดยหลายงานวิจัยให้พบความสัมพันธ์ของขนาดอนุภาคส่งวัคซีนกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเมื่อทำการทดลองแบบ in vitro ที่สองคล้อยกันเช่น

Yue et al. (2010) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของอนุภาคโคโตแซน 430 nm, 1.9 μ m และ 4.8 μ m ต่อการหลั่งไซโตไคน์จาก macrophages พบว่าอนุภาคขนาด 430 nm การตอบสนองแบบ CMIR จากการกระตุ้นการหลั่ง IFN- γ , TNF- α และ IL-12 ได้ดีกว่าขนาดอนุภาคระดับไมโครเมตร ตรงกันข้ามกับระดับ IL-10 เพิ่มขึ้นตามขนาดที่เพิ่ม โดยผลของ IL-10 คือกระตุ้นการหลั่ง IL-4 อันนำไปสู่การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ HIR แม้อนุภาคขนาดเล็กจากสามารถนำส่งแอนติเจนเข้าเซลล์มากกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ก็ตาม ทั้งนี้เนื่องจากขนาดอนุภาคระดับนาโนเมตรผ่านเข้าเซลล์ด้วยวิธี endocytosis ซึ่งสอดคล้องกับทดลองของ Koppolu and Zaharoff (2013) ซึ่งกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย bovine serum albumin (BSA) ที่กักเก็บในอนุภาคโคโตแซนขนาด 300 nm, 1 μ m และ 3 μ m พบว่าขนาดอนุภาคผลต่อการแบ่งตัวของ CD4+ T helper lymphocyte โดยอนุภาคขนาดใหญ่สามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ได้ดีกว่าอนุภาคขนาดเล็ก แต่ไม่มีความแตกต่างของแบ่งเซลล์ชนิด CD8+ cytolytic T lymphocyte อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของอนุภาคโคโตแซนขนาดต่างๆ

Kanchan and Panda (2007) ทดสอบฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันของ magrophage หลังได้รับ hepatitis B surface antigen (HBsAg) ที่กักเก็บในอนุภาค polylactide ขนาดอนุภาคใหญ่ (2 μm – 8 μm) และอนุภาคขนาดเล็ก (200 nm – 600 nm) พบว่าอนุภาคขนาด 200 nm – 600 nm สามารถกระตุ้นการหลั่ง IFN- γ ได้ดี และอนุภาคขนาด 2 μm – 8 μm สามารถกระตุ้น IL-4 ได้ดี และเมื่อพิจารณากลไกการกักเก็บแอนติเจนเข้าสู่เซลล์โดยการติดสารเรืองแสงที่อนุภาคนำส่งและแอนติเจน พบว่าอนุภาคนำส่งแอนติเจนขนาดเล็กสามารถเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธี endocytosis ได้อย่างรวดเร็ว ขณะที่อนุภาคขนาดใหญ่ไม่พบการกักเก็บเข้าสู่เซลล์ของอนุภาคนำส่ง แต่พบว่าอนุภาคเกาะติดพื้นผิวของเซลล์ และมีการปลดปล่อยแอนติเจนจากอนุภาคไปกระตุ้นเซลล์ทางภูมิคุ้มกัน ลักษณะการนำส่งแอนติเจนดังกล่าวคล้ายคลึงกับการตอบสนองของภูมิคุ้มกันของ extracellular pathogens และ intracellular pathogens ซึ่งกระตุ้น IFN- γ และ IL-4 ได้ดีตามลำดับ

การศึกษาแบบ ex vivo และ in vivo ในการนำส่งแอนติเจนทางจมูกด้วยระบบอนุภาคนำส่งมีค่อนข้างน้อยและไม่สามารถอธิบายผลของความสัมพันธ์ระหว่างขนาดอนุภาคนำส่งกับการเสริมฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันเมื่อให้วัคซีนทางจมูกในร่างกายได้อย่างชัดเจน และผลการวิจัยบางส่วนไม่สอดคล้องกัน เช่น Slutter and Jiskoot (2010) พบว่าโอวัลบูมินที่กักเก็บในอนุภาค N-trimethyl chitosan (TMC) ขนาด 278 nm และประจุที่ผิวอนุภาคเป็นบวกถูกนำส่งเข้าสู่ dendritic cell ได้ดีกว่าโอวัลบูมินในรูปสารละลาย โดยโอวัลบูมินถูกนำเข้าสู่เซลล์ใน lysosomal ของเซลล์ เมื่อให้วัคซีนทางจมูกแก่สัตว์ทดลองพบว่าโอวัลบูมินที่กักเก็บในอนุภาค N-trimethyl chitosan เกาะติดเยื่อเมือกได้นานกว่าในรูปแบบสารละลาย โดยพบว่าโอวัลบูมินที่กักเก็บในอนุภาคนำส่งกระตุ้น sIgA ในเยื่อเมือกสูงกว่าในรูปแบบสารละลายอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$)

Jung et al. (2001) ทำการศึกษาขนาดที่เหมาะสมของ Sulfobutylated poly(vinylalcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles เพื่อนำส่งวัคซีนป้องกันบาดทะยัก (tetanus toxoid; TT) ขนาดประมาณ 100 nm, 500 nm และมากกว่า 1000 nm แก่หนู mice พันธุ์ BALB/c ทางจมูก และปรากฏว่า อนุภาคขนาดนาโนเมตรทั้ง 100 nm และ 500 nm สามารถกระตุ้น IgA และ IgG ในซีรัมสูงกว่าอนุภาคขนาดไมโครเมตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งการให้ทางปากและจมูก แต่ไม่พบความแตกต่างของ IgA และ IgG ระหว่างอนุภาคขนาด 100 nm และ 500 nm ทั้งการให้ทางจมูกและปาก ต่างจากผลการศึกษาของ Gutierrez et al. (2002) ซึ่งนำส่ง BSA ที่กักเก็บในอนุภาค poly (D,L-lactic-co-glycolic) acid ทางจมูก พบว่าอนุภาคขนาด 1,000 nm สามารถกระตุ้น IgG ในซีรัมได้ดีกว่าอนุภาคขนาด 500 nm และ 200 nm ตามลำดับ

Krishakumar et al. (2012) ได้ศึกษาการนำส่ง Hepatitis B surface antigen (HBsAg) ทางจมูกโดยกักเก็บแอนติเจนในอนุภาคของ poly(vinylalcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide) ซึ่ง

เคลือบด้วย TMC ทำให้ได้อนุภาคที่มีประจุที่ผิวเป็นบวกสามขนาดคือ 729 nm, 445 nm และ 274 nm ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าอนุภาคที่เคลือบด้วย TMC ถูกนำส่งเข้าสู่ dendritic cell ได้ดีกว่าอนุภาค poly(vinylalcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide) ที่มีประจุที่ผิวเป็นลบ โดยอนุภาคที่ถูกเคลือบด้วย TMC ทั้งสามขนาดมีปริมาณการนำส่งแอนติเจนที่เข้าสู่ dendritic cell ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อให้ในสัตว์ทดลองโดยประเมินระดับภูมิคุ้มกันจากระดับ IgG ในซีรัมและ sIgA จากน้ำลายและสารคัดหลั่งทางจมูกและช่องคลอด พบว่าอนุภาค 729 nm และ 445 nm สามารถกระตุ้น IgG และ sIgA ได้ดีกว่าอนุภาคขนาด 274 nm ทั้งนี้เป็นผลเนื่องจากอนุภาคขนาดเล็กมีการปลดปล่อยแอนติเจนได้ประมาณร้อยละ 20 ของแอนติเจนที่กักเก็บทั้งหมด แต่อนุภาคขนาด 729 nm และ 445 nm ที่มีการปลดปล่อยแอนติเจนใกล้เคียงกันคือประมาณร้อยละ 90 ของแอนติเจนที่กักเก็บทั้งหมด และเมื่อพิจารณาฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันของแอนติเจนที่นำส่งด้วยอนุภาคขนาด 729 nm และ 445 nm พบแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของภูมิคุ้มกันตามขนาดระบบนำส่งที่ลดลงทั้ง systemic immune response และ mucosa immune response จะเห็นได้ว่านอกจากขนาดของอนุภาคแล้ว ชนิดของระบบนำส่ง ประจุที่ผิวอนุภาค และการปลดปล่อยแอนติเจน

Nagamoto et al. (2004) ให้ส่งวัคซีนทางจมูกหนู rat ที่กักเก็บในอนุภาคโคโตแซนขนาด 0.4 μ m, 1 μ m และ 3 μ m พบว่าอนุภาคทั้งสามขนาดกระตุ้นระดับ IgG และ IgA ในซีรัมได้ไม่แตกต่างกัน งานวิจัยนี้เป็นเพียงงานวิจัยเดียวที่พบการศึกษาผลของขนาดการนำส่งวัคซีนทางจมูกด้วยอนุภาคโคโตแซนในสัตว์ทดลอง ซึ่งอธิบายความสัมพันธ์ของขนาดอนุภาคโคโตแซนต่อการตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบ systemic immune response แต่ไม่ได้อธิบายถึงผลของขนาดอนุภาคโคโตแซนต่อการตอบสนองแบบ mucosal immune response ซึ่งเป็นกลไกหลักในการป้องกันการติดเชื้อบริเวณเยื่อเมือก

อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยของ Kobiasi et al. (2012) พบว่าอนุภาคโคโตแซนขนาด 4.5 μ m ถูกกักเก็บเข้าเซลล์ทางภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าอนุภาคโคโตแซนขนาด 200 nm และปริมาณการกักเก็บอนุภาคนำส่งเข้าสู่เซลล์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันตามชนิดของเซลล์และขนาดของอนุภาค แต่พบว่าอนุภาคขนาด 200 nm สามารถนำส่งแอนติเจนจากการฉีดบริเวณฝ่าเท้าหนูทดลองไปยัง popliteal lymph nodes บริเวณขาหลังของหนูทดลองได้ดีกว่าอนุภาคขนาด 4.5 μ m สอดคล้องกับงานวิจัยของ Henriksen-Lacey et al. (2011) ซึ่งพบว่า Liposome ขนาดเล็ก (< 1 μ m) สามารถนำส่งแอนติเจนไปยังอวัยวะนำเหลืองต่างๆ ได้ดีกว่าอนุภาคที่มีขนาดใหญ่กว่า ทั้งอนุภาคขนาดกลาง (1 μ m) ใหญ่ (2 μ m) และใหญ่พิเศษ (> 3 μ m) ตามลำดับ ซึ่งพบว่าอนุภาคขนาดเล็กสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกัน IL-10 ซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่ง IL-4 ได้สูงกว่าอนุภาคอื่นที่มีขนาดใหญ่กว่า และพบว่าอนุภาคขนาดกลางสามารถกระตุ้น IFN- γ ได้ดีกว่าอนุภาคที่มีขนาดใหญ่กว่า Vila et al. (2005) พบว่าการนำส่งแอนติเจนจากบริเวณเยื่อจมูกไปยังอวัยวะต่างๆ ขึ้นขนาดอนุภาคนำส่งและระบบนำส่ง

แอนติเจนของร่างกายที่มีความจำเพาะกับอวัยวะนั้น โดยอนุภาคที่มีขนาดระดับนาโนเมตรถูกนำส่งไปกักเก็บได้มากในบริเวณต่อมน้ำเหลือง ระบบทางเดินอาหาร ปอด ม้าม และตับตามลำดับ และจากการศึกษาของ He et al. (2010) พบว่าหลังฉีดโคแซนนาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่เส้นเลือดดำโดยตรงอนุภาคที่มีขนาดเล็กสามารถนำส่งไปยังอวัยวะต่างๆ ได้ดีกว่าอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Krishakumar et al. (2012) ซึ่งพบว่าอนุภาคนำส่งวัคซีนขนาดเล็กมีแนวโน้มกระตุ้นภูมิคุ้มกันบริเวณเยื่อปิวได้ดีกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ นอกจากนี้ชนิดและขนาดของระบบนำส่งวัคซีนแล้ว ชนิดและปริมาณของ APCs บริเวณที่ได้รับแอนติเจนและระบบการนำส่งและกักเก็บแอนติเจนของอวัยวะต่างๆ มีความแตกต่างกันทำให้อาจทำให้การตอบสนองของภูมิคุ้มกันบริเวณเยื่อปิวแต่ละบริเวณที่แตกต่างกัน (Kobilasi et al, 2012)

แอนติเจนและการให้วัคซีนทางจมูกในสัตว์ทดลอง

1. แอนติเจน

แอนติเจนที่ใช้เป็นแอนติเจนต้นแบบในการพัฒนาระบบนำส่งวัคซีนทางจมูกมีหลายชนิด เช่น วัคซีนป้องกันบาดทะยัก (tetanus toxoid ; TT), วัคซีนป้องกันคอตีบ (diphtheria toxoid; DT), bovine serum albumin (BSA) และโอวัลบูมิน (ovalbumin; OVA) (Kang et al., 2009) แม้ tetanus toxoid และ diphtheria toxoid จะสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดี แต่สารทั้งสองเป็นสารพิษที่แบคทีเรียสร้างขึ้นในรูปโปรตีนเชิงซ้อน ทำให้แอนติเจนที่ได้มักมีชิ้นส่วนอื่นปนเปื้อน อีกทั้งการที่ต้องผ่านขบวนการสกัดหลายขั้นตอนทำให้แอนติเจนมีความคงตัวต่ำ ต่างจาก BSA และโอวัลบูมินซึ่งอยู่ในรูปโปรตีนอิสระ แต่เนื่องจาก BSA มีความสามารถตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ดี จึงใช้ในการศึกษาหลักการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่างๆ ส่วนโอวัลบูมินซึ่งกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ไม่ดีนัก ถูกใช้ในการศึกษาความสามารถในการเสริมฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันของระบบนำส่ง หรือแอดจูแวนท์ โดยพบว่าการใช้โอวัลบูมินขนาด 20 µg ทางจมูกโดยใช้ N-trimethyl chitosan nanoparticles เป็นระบบนำส่งในรูปแบบ nasal drop เมื่อให้ทางจมูกทุก 3 สัปดาห์เป็นเวลาสามครั้งสามารถกระตุ้นการเพิ่มระดับ sIgA, IgG และ cell-mediated immune response ได้ (Slutterand Jiskoot , 2010)

2. การให้วัคซีนทางจมูกในสัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองขนาดเล็กที่มีการใช้ทดสอบการนำส่งยาหรือวัคซีนทางจมูกมีหลายชนิด เช่น กระต่าย หนู rat และหนู mice เป็นต้น แต่พบว่าผนังช่องจมูกของหนู rat ปิดไม่สนิททำให้มีช่องว่างระหว่างช่องจมูก และพบช่องต่อระหว่างช่องจมูกกับช่องปาก (nasal palatine tract) ทำให้ขนาดยาที่

ให้ทางจมูกมีความคลาดเคลื่อน (Harkema et al., 2006) อีกทั้งความแตกต่างทางพันธุกรรมมีผลต่อการแสดงออกทางภูมิคุ้มกันค่อนข้างมาก การทดลองส่วนใหญ่จึงนิยมใช้หนู mice ชนิด inbred ซึ่งมีลำดับพันธุกรรมใกล้เคียงกัน จึงช่วยลดความแตกต่างภายในกลุ่มการทดลองและทำให้ได้ผลการทดลองได้ชัดเจนและใช้สัตว์จำนวนน้อยกว่าสัตว์ทดลองชนิด outbred เช่น กระจ่าง หนูตะเภา (guinea pigs) หนู rat รวมถึงหนู mice ชนิด outbred บางสายพันธุ์สำหรับหนู mice ชนิด inbred ที่นิยมใช้ทดสอบฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันจากวัคซีนทางจมูกคือหนูสายพันธุ์ BALB/c เนื่องจากสามารถเห็นผลกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ชัดเจนทั้งการเพิ่มระดับ sIgA, IgG และ cell-mediated immune-response (Slutter and Jiskoot, 2010) นอกจากนี้พบว่าหนูเพศเมียตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าเพศผู้ อีกทั้งมีความก้าวร้าวน้อยกว่าหนูเพศผู้ สามารถเลี้ยงรวมกันเป็นกลุ่มได้ (Frank and Griffin, 2002) จึงนิยมใช้หนูเพศเมียสายพันธุ์ BALB/c ในการทดสอบฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันของวัคซีน ซึ่งมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันหลังได้รับวัคซีนทางจมูกคล้ายคลึงกับที่พบในคน (Zaman et al., 2013) โดยหนู mice ตัวเต็มวัยอายุ 6-8 สัปดาห์ มีช่องจมูกยาวประมาณ 5 cm. ความจุรวม 32 cm³ พื้นที่ผิวรวม 280 cm² พื้นที่ส่วนใหญ่ของช่องจมูกคือส่วน respiratory region ประมาณร้อยละ 48 ของพื้นที่ทั้งหมด อยู่ลึกจากรูจมูกประมาณ 0.2 cm (Gross, 1982) ปริมาตรรวมของวัคซีนที่ให้ทางจมูกต้องไม่เกิน 50 µL เพื่อป้องกันวัคซีนส่วนเกินเข้าสู่ปอดและทางเดินอาหาร (Hobson et al., 2003)

การนำสลบที่ใช้ในหนู mice โดยทั่วไปใช้การรมสลบ (inhalator anesthesia) ด้วย ether ซึ่งมีข้อเสียคือ therapeutic index ต่ำและระยะเวลาการออกฤทธิ์สั้น ปัจจุบันจึงมีการใช้ sevoflurane ซึ่งมีความปลอดภัยสูงและระยะเวลาการออกฤทธิ์นานกว่า ether อย่างไรก็ตามการนำสลบโดยใช้สารดังกล่าวไม่เหมาะสมในการนำสลบหนูเพื่อทำการให้วัคซีนทางจมูก เนื่องจาก ether มีผลต่อการดูดซึมผ่านเยื่อจมูกและ sevoflurane มีผลต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสัตว์ทดลองสารนำสลบที่นิยมใช้ในหนูทดลองเพื่อให้วัคซีนทางจมูกคือ ketamine (80 – 100 mg/kg) ผสม xylazine (8-16 mg/kg) ให้โดยการฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal injection; IP) ซึ่งไม่พบรายงานการรบกวนการดูดซึมสารทางเยื่อจมูกและผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน ทั้งนี้ ketamine มีฤทธิ์นำสลบได้ดี แต่ฤทธิ์ลดความเจ็บปวดน้อย จึงจำเป็นต้องผสม xylazine เพื่อเสริมฤทธิ์ลดปวด โดย ketamine/xylazine เวลาออกฤทธิ์นำสลบ 60-120 นาที และฤทธิ์ลดความเจ็บปวดประมาณ 20-30 นาทีโดยการนำสลบมันทำให้เกิดการอาเจียนของสัตว์ทดลองจึงควรงดน้ำและอาหารอย่างน้อย 2-4 (Flecknell, 2009; Green et al., 1981)