

เทคนิคไมโครนีเดิลส์สำหรับการนำส่งดีเอ็นเอผ่านทางผิวหนัง

บุณณดา กมรปฐมกุล¹และ ธนะเศรษฐ์ จ้าวหิรัญพัฒน์^{2*}

Received: 3 March 2015

Accepted: 12 May 2015

บทคัดย่อ

การรักษาด้วยยีนบำบัดในปัจจุบันได้รับความนิยมอย่างกว้างขวางในวงการแพทย์ยีนบำบัดอาศัยหลักการการนำส่งดีเอ็นเอที่มีฤทธิ์ในการรักษาเข้าสู่เซลล์และเนื้อเยื่อเพื่อให้ออกฤทธิ์ตามต้องการ ได้มีการใช้พลาสมิดดีเอ็นเอรักษาโรคทางผิวหนังโดยมีการทดสอบและพัฒนาทางคลินิกสำหรับโรคผิวหนังที่มีความผิดปกติทางพันธุกรรม เช่น โรคมะเร็งผิวหนัง โรคสะเก็ดเงิน และภาวะปลายประสาทอักเสบในผู้ป่วยโรคเบาหวาน เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาวัคซีนรูปแบบใหม่โดยใช้ดีเอ็นเอวัคซีนซึ่งเป็นเทคโนโลยีใหม่ที่น่าสนใจเนื่องจากมีข้อได้เปรียบที่เหนือกว่าวัคซีนแบบดั้งเดิมหลายประการ ผิวหนังเป็นอวัยวะที่มีความเหมาะสมสำหรับการนำส่งวัคซีนเนื่องจากเป็นเป้าหมายที่มีความหนาแน่นของเซลล์ที่สามารถนำเสนอแอนติเจนเพื่อให้เกิดการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปริมาณมาก ซึ่งได้แก่ เซลล์แลงเกอร์ฮาน (Langerhans cells) ในชั้นอีพิตีเดอริสและเซลล์เดนไดรติก (dendritic cells) ในชั้นเดอร์มิส การนำส่งยาทางผิวหนังเป็นทางเลือกหนึ่งในการบริหารยาเข้าสู่ร่างกายที่มีข้อได้เปรียบมากมายและยังเหมาะสำหรับการฉีดวัคซีนเพื่อประยุกต์ในการป้องกันโรค อย่างไรก็ตามผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียมซึ่งเป็นผิวหนังชั้นนอกสุดที่ทำหน้าที่ป้องกันการซึมผ่านของสารเป็นข้อจำกัดในการนำส่งโมเลกุลยาเข้าสู่ผิวหนังโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่และสารพันธุกรรมไม่สามารถนำส่งได้ในปริมาณที่มากเพียงพอต่อการออกฤทธิ์จึงได้มีการพัฒนาไมโครนีเดิลส์เพื่อใช้แทงผ่านผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียมสำหรับเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งสารผ่านผิวหนัง ไมโครนีเดิลส์มีลักษณะคล้ายเข็มที่มีขนาดเล็กผ่านศูนย์กลางในระดับไมโครเมตร ข้อดีของไมโครนีเดิลส์ ได้แก่ ความสามารถในการแทงผ่านผิวหนังโดยทำความเสียหายต่อผิวหนังน้อยที่สุด ไม่ทำให้เจ็บปวด ใช้งานง่าย สามารถผลิตได้ในปริมาณมาก และมีราคาไม่แพงในบทความนี้ได้สรุปข้อมูลพื้นฐานโดยย่อและยกตัวอย่างการศึกษาวิจัยไมโครนีเดิลส์สำหรับใช้นำส่งดีเอ็นเอผ่านทางผิวหนัง ใช้ในการรักษาโรคทางพันธุกรรม และเป็นวัคซีน

คำสำคัญ: ไมโครนีเดิลส์การนำส่งดีเอ็นเอทางผิวหนังดีเอ็นเอวัคซีนการซึมผ่าน

วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน 2558; 11(2): 16-30

¹ นักศึกษาปริญญาเอกหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิตสาขาเทคโนโลยีเภสัชกรรมคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร จังหวัดนครปฐม 73000

² ปร.ด. (เภสัชศาสตร์) รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรมคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร จังหวัดนครปฐม 73000

* **ติดต่อผู้พิมพ์:** ธนะเศรษฐ์ จ้าวหิรัญพัฒน์ ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร จังหวัดนครปฐม 73000 E-mail: ngawhirunpat_t@su.ac.th

Microneedle Techniques for DNA Transdermal Delivery

Boonnada Pamornpathomkul¹ and Tanasait Ngawhirunpat^{2*}

Abstract

Currently, gene therapy has been the popular approach in the medical fields. Gene therapy relies on the use of DNA as a medicine involving the insertion of the therapeutic DNA into cells and tissue to treat a disease. Plasmid DNA based skin therapies are being tested and clinically developed for the treatment of genetic skin disorders such as, skin cancers, psoriasis and diabetic neuropathy. Moreover, a new approach to vaccination is currently being investigated with the concept of DNA vaccines. This new technology is interesting due to its advantages over the traditional vaccines. Skin is an optimal compartment for vaccine delivery, because of its high density of immunologic antigen-presenting cells residing both within the epidermis and dermis including Langerhans cells and dermal dendritic cells, respectively. Transdermal drug delivery offers an advantageous of drug administration and vaccine for prophylactic applications. However, the formidable barrier properties of the uppermost layer of the skin, the stratum corneum, impose significant limitations for successful delivery of the therapeutic molecules particularly the macromolecules and genetic materials. Microneedle has been proposed as a strategy to breach the stratum corneum barrier function in order to facilitate an effective transport of the molecules across the skin. Microneedles are needle-like structures with the diameters in the size order of microns. The major advantage of microneedle is their ability to pierce the skin in a minimally invasive and painless way, easy to use, large scale production, and inexpensive cost. This article summarized briefly the basics and examples of microneedles application for transdermal of DNA, for genetic diseases and vaccines.

Keywords: microneedle, transdermal DNA delivery, skin, permeation

IJPS 2015; 11(2): 16-30

¹ Graduate student (Ph.D program in Pharmaceutical Technology), Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhon Pathom Province 73000

² Ph.D. (Pharmaceutical Sciences), Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhon Pathom Province 73000

* **Corresponding Author:** Tanasait Ngawhirunpat, Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhon Pathom 73000 E-mail: ngawhirunpat_t@su.ac.th

บทนำ

เทคโนโลยีเกี่ยวกับการนำส่งดีเอ็นเอได้รับความสนใจโดยมีการศึกษาและพัฒนาอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้เนื่องจากดีเอ็นเอเป็นสารพันธุกรรมที่มีการนำมามีประยุกต์ทางด้านการแพทย์และเภสัชกรรมอย่างกว้างขวาง เช่น การวินิจฉัยและแก้ไขความผิดปกติทางพันธุกรรม การนำเทคนิคทางดีเอ็นเอมาใช้ในการผลิตยารักษาโรค การใช้ดีเอ็นเอเป็นวัคซีนเพื่อป้องกันและรักษาโรค (Shedlock and Weiner, 2000) ในปัจจุบันการนำส่งดีเอ็นเอผ่านทางผิวหนังได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากการบริหารดีเอ็นเอผ่านทางผิวหนังมีข้อได้เปรียบหลายประการ เช่น ลดการทำลายดีเอ็นเอในร่างกายเหมาะสมสำหรับใช้กระตุ้นภูมิคุ้มกันหรือบำบัดโรคทางผิวหนัง สามารถใช้ดีเอ็นเอในปริมาณน้อย และเพิ่มการยอมรับของผู้ป่วย เป็นต้น (Kim et al., 2012) อย่างไรก็ตามการบริหารยาผ่านทางผิวหนังยังคงมีข้อจำกัดเกี่ยวกับการนำส่งดีเอ็นเอผ่านผิวหนัง ชั้นนอกสุดหรือชั้นสตราตัมคอร์เนียม (stratum corneum) ซึ่งเป็นตัวกั้นการซึมผ่านของสารต่าง ๆ เข้าสู่ผิวหนัง (Naik et al., 2000) ดังนั้นจึงมีผู้ศึกษาวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการนำส่งดีเอ็นเอผ่านผิวหนังมากขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เทคนิคไมโครนีเดิลส์ซึ่งเป็นเข็มที่มีขนาดเล็กในระดับไมครอนที่สามารถช่วยเพิ่มการซึมผ่านของสารที่มีมวลโมเลกุลขนาดใหญ่รวมถึงดีเอ็นเอได้ (Kim et al., 2014; Schleef, 2005)

ยีนบำบัด

ยีนบำบัดเป็นการรักษาโรคที่มีความผิดปกติทางพันธุกรรมโดยการเปลี่ยนถ่ายดีเอ็นเอปกติให้แก่ผู้ป่วยที่มีดีเอ็นเอผิดปกติเพื่อให้ผู้ป่วยมีดีเอ็นเอปกติในการนำไปใช้เป็นต้นแบบแทนดีเอ็นเอที่บกพร่อง การบำบัดด้วยยีนสามารถทำได้โดยการติดต่อลำดับหน่วยย่อยที่มีความผิดปกติภายในสายของดีเอ็นเอให้เป็นลำดับยีนที่ถูกต้องสำหรับรักษาโรคที่ต้องการ

สายดีเอ็นเอที่ได้เรียกว่ารีคอมบีแนนต์ดีเอ็นเอซึ่งเป็นส่วนที่นำมาใช้รักษาผู้ป่วย เมื่อนำส่งรีคอมบีแนนต์ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เป้าหมายของผู้ป่วย เซลล์เป้าหมายจะสามารถผลิตโปรตีนได้ปกติตามที่กำหนดโดยลำดับยีนที่ต้องการ (Walker and Jones, 2003; Schleef, 2005) การโอนถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์เป้าหมายให้มีประสิทธิภาพจำเป็นต้องอาศัยตัวนำหรือเวกเตอร์ (vector) โดยทั่วไปนิยมใช้ไวรัสเป็นตัวนำเนื่องจากไวรัสมีความสามารถในการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังนิยมใช้ตัวนำสังเคราะห์ (synthetic vector) เช่น โพลีเมอร์ เดนไดรเมอร์ หรืออนุภาคไขมันเพื่อเพิ่มความสามารถในการนำส่งดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เป้าหมายอีกด้วย (Ibraheem et al., 2014)

ดีเอ็นเอและดีเอ็นเอวัคซีน

ดีเอ็นเอหรือดีออกซีไรโบนิวคลีอิก แอซิด (Deoxyribonucleic acid; DNA) เป็นสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่ทำหน้าที่เก็บข้อมูลสำคัญที่สามารถสืบทอดต่อไปยังลูกหลานโดยไม่ถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหรือหน้าที่ไป มีการควบคุมการทำงานของดีเอ็นเอทุกขั้นตอนเพื่อรักษาความถูกต้องในการถ่ายทอดข้อมูล (Calladine et al., 2004; Walker and Jones, 2003) ดีเอ็นเอจัดเป็นสารประกอบประเภทหนึ่งของกรดนิวคลีอิกที่ประกอบด้วยพอลิเมอร์ของนิวคลีโอไทด์สองสายพันกันเป็นเกลียวเฮลิคัล โดยนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอประกอบด้วยน้ำตาลเพนโทสนิดดีออกซีไรโบส กรดฟอสโฟริก และไนโตรจีนัสเบสชนิดเพียวรีน ได้แก่ อะดีนีน (adenine) และกัวนีน (guanine) และชนิดไพริมิดีน ได้แก่ ไทมิน (thymine) และไซโทซีน (cytosine) ดีเอ็นเอเป็นแหล่งเก็บข้อมูลทางพันธุกรรมที่อาศัยการถ่ายทอดข้อมูลออกไปโดยอยู่ในรูปของเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ด้วยกระบวนการถอดรหัส (transcription) ซึ่งจะมีกระบวนการแปลรหัส (translation) จากอาร์เอ็นเอเป็นโปรตีนสำหรับทำหน้าที่และควบคุม

การทำงานต่าง ๆ ภายในร่างกาย ดีเอ็นเอหรือยีนเป็นเพียงตัวเก็บข้อมูลแต่ไม่สามารถทำหน้าที่ใด ๆ ในเซลล์ได้ต้องแสดงออกมาในรูปของโปรตีนชนิดต่าง ๆ เพื่อเป็นโครงสร้างและช่วยในการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต (Fitzgerald-Hayes and Frieda, 2010; Watson, 2003)

นอกจากการวิจัยเกี่ยวกับการรักษาโรคต่าง ๆ ด้วยยีนบำบัดแล้วยังมีการพัฒนาวัคซีนเพื่อใช้ป้องกันโรคในรูปแบบของดีเอ็นเอวัคซีน วัคซีนในระยะเริ่มแรกเป็นการนำเชื้อมาทำให้ตายหรืออ่อนฤทธิ์เท่านั้น ในปัจจุบัน มีการนำเทคโนโลยีรีคอมบีแนนต์ดีเอ็นเอมาช่วยในการพัฒนาดีเอ็นเอวัคซีน โดยอาศัยความรู้ทางชีวโมเลกุลเพื่อใช้ทดแทนวัคซีนดั้งเดิมที่มีข้อจำกัดในด้านประสิทธิภาพการป้องกันโรค ความรวดเร็วในการผลิต ความคงตัว รวมถึงข้อจำกัดในการรับวัคซีนแบบดั้งเดิมในกลุ่มผู้ป่วยบางกลุ่ม (Koprowski and Weiner, 1998; Liu, 2003; Schleef, 2005) ดีเอ็นเอวัคซีนเป็นวัคซีนที่ได้จากการสร้างรหัสทางพันธุกรรมในรูปของสายดีเอ็นเอ จากนั้นฉีดดีเอ็นเอวัคซีนเข้าเซลล์ร่างกายเพื่อให้เซลล์สร้างโปรตีนที่มีรหัสพันธุกรรมในการป้องกันโรคตามต้องการได้ (Li et al., 2012) ดีเอ็นเอวัคซีนมีข้อได้เปรียบหลายประการเมื่อเปรียบเทียบกับวัคซีนแบบดั้งเดิม ได้แก่ ดีเอ็นเอวัคซีนสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ทั้งชนิดสารน้ำหรือชนิดแอนติบอดี (Humoral-mediated immunity) และชนิดเซลล์ (Cell-mediated immunity) ส่งผลให้ดีเอ็นเอวัคซีนสามารถป้องกันโรคต่าง ๆ ทั้งจากไวรัส แบคทีเรีย และปรสิต รวมทั้งใช้รักษาโรคมะเร็งได้ ในขณะที่วัคซีนดั้งเดิมสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้เฉพาะชนิดสารน้ำ (Donnelly et al., 2005; Pereira et al., 2014) ดีเอ็นเอวัคซีนไม่ก่อให้เกิดการติดเชื้อไวรัสในผู้ป่วยบางรายที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ มีความคงตัวสูง สามารถเก็บที่อุณหภูมิห้องได้เป็นระยะเวลานาน สามารถเตรียมดีเอ็นเอวัคซีนให้มีสารพันธุกรรมหลากหลายเพื่อกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อ

หลายโรคได้ในการฉีดเพียงครั้งเดียว กระบวนการผลิตไม่ซับซ้อนสามารถผลิตได้รวดเร็วกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวัคซีนแบบดั้งเดิม (Ferraro et al., 2011; Kim et al., 2012) อย่างไรก็ตามพบว่าการทดลองดีเอ็นเอวัคซีนในมนุษย์ยังมีข้อจำกัดเกี่ยวกับความปลอดภัยในระยะยาวและประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้ในระดับสูงเพียงพอที่จะนำมาใช้ในทางคลินิกสำหรับการป้องกันหรือรักษาโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Pereira et al., 2014) ดังนั้นการประยุกต์ดีเอ็นเอวัคซีนสำหรับป้องกันหรือรักษาโรคในมนุษย์ยังต้องศึกษาเพิ่มเติม เช่น วิธีการเพิ่มประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของดีเอ็นเอวัคซีนการออกแบบดีเอ็นเอวัคซีนให้มีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันหรือรักษาโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเทคนิคการนำส่งดีเอ็นเอวัคซีนเข้าสู่เนื้อเยื่อหรือบริเวณเป้าหมาย

อวัยวะหรือเนื้อเยื่อเป้าหมายในการนำส่งดีเอ็นเอวัคซีนเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญเพื่อให้ดีเอ็นเอวัคซีนสามารถออกฤทธิ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผิวหนังเป็นอวัยวะที่เหมาะสมสำหรับการนำส่งดีเอ็นเอวัคซีนเพื่อออกฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันในการป้องกันโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากผิวหนังประกอบด้วยเซลล์แลงเกอร์ฮาน (Langerhans cells) ในชั้นอีพิเดอร์มิสและเซลล์เดนไดรติก (dendritic cells) ในชั้นเดอร์มิส (Sparber et al., 2010) เซลล์ทั้งสองชนิดเป็น antigen presenting cellsซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยแอนติเจนเป็นโปรตีนสายสั้น ๆ และจับกับ Major histocompatibility complex (MHC) เพื่อนำเสนอบนผิวเซลล์ให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทำงานเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันสำหรับป้องกันโรคชนิดต่าง ๆ ได้ (Kim et al., 2014) ดังนั้นการนำส่งดีเอ็นเอวัคซีนทางผิวหนังซึ่งมี antigen presenting cells จำนวนมากจึงมีข้อได้เปรียบในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าการบริหารวัคซีนเข้าร่างกายในทางอื่น เช่น การฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular injection) เนื่องจากเซลล์

กล้ามเนื้อมีเซลล์ที่มีคุณสมบัติในการเป็น antigen presenting cells ในปริมาณน้อย (Schleef, 2005)

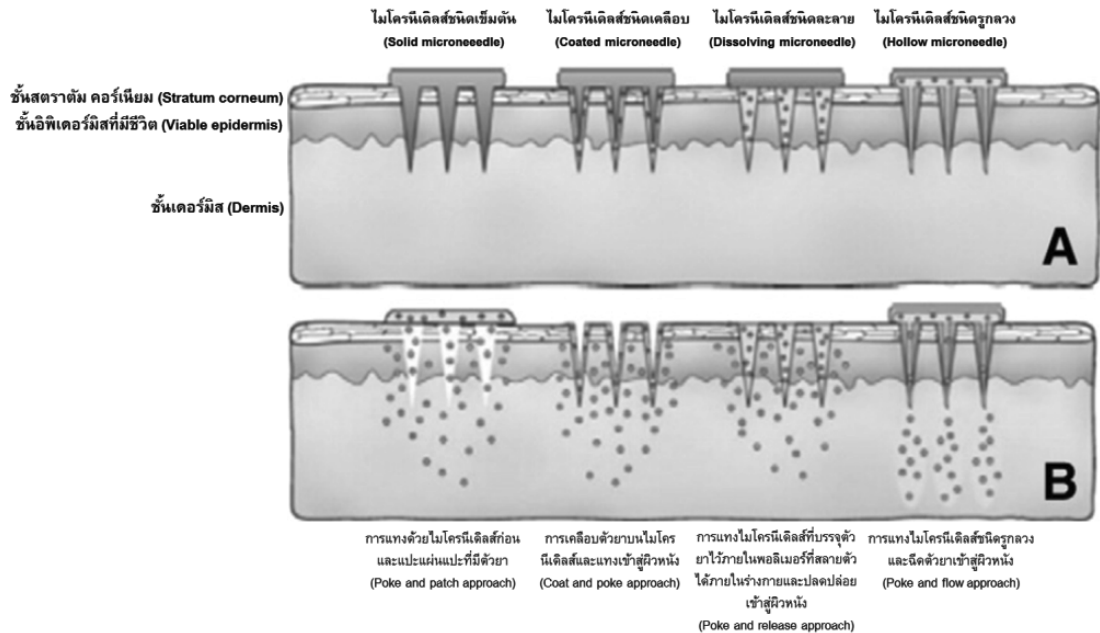
ข้อจำกัดในการนำส่งดีเอ็นเอผ่านผิวหนัง

ผิวหนังเป็นอวัยวะที่ปกคลุมร่างกายเพื่อช่วยป้องกันไม่ให้สารต่าง ๆ ที่มีอันตรายเข้าสู่ร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งผิวหนังชั้นบนสุดหรือชั้นสตราตัมคอร์เนียมซึ่งประกอบด้วยเซลล์เคอราติโนไซต์ (keratinocytes) โดยจะผลิตสารเคอราทิน (keratin) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ช่วยให้โครงสร้างผิวหนังแข็งแรงและมีความยืดหยุ่นจึงเป็นชั้นสำคัญที่ช่วยป้องกันสิ่งแปลกปลอมจากภายนอกไม่ให้เข้าสู่ร่างกาย (Jhawat et al., 2013) ดังนั้นผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียมจึงเป็นปัญหาหลักในการนำส่งดีเอ็นเอในปริมาณที่มากเพียงพอเข้าสู่ร่างกายเพื่อออกฤทธิ์รักษาหรือป้องกันโรค ข้อจำกัดของการนำส่งดีเอ็นเอผ่านผิวหนังมีหลายประการ ได้แก่ การสลายตัวของดีเอ็นเอจากการทำลายของเอนไซม์เอ็นโดนิวคลีเอส (endonuclease) ในผิวหนังและเอ็กโซนิวคลีเอส (exonuclease) ในผิวหนัง (Barry et al., 2004) โมเลกุลของดีเอ็นเอมีขนาดใหญ่โดยดีเอ็นเอบางชนิดอาจมีขนาดใหญ่ได้มากถึง 3000 กิโลดาลตันขึ้นไป โดยปกติผิวหนังจะยอมให้สารที่มีขนาดไม่เกิน 500 ดาลตันซึมผ่านได้ ดังนั้นจึงมีความพยายามในการคิดค้นและทดลอง

เทคนิคต่าง ๆ เช่น การใช้ gene gun, jet injection, อิเล็กโทรพอเรชัน, ซอนอพอรีซิส หรือไมโครนีเดิลส์ เป็นต้น เพื่อช่วยเพิ่มปริมาณของการนำส่งดีเอ็นเอให้มีเพียงพอที่จะออกฤทธิ์รักษาหรือป้องกันโรคได้ (Ibraheem et al., 2014; MacLaughlin and Rolland, 2003)

ไมโครนีเดิลส์ (Microneedle)

ไมโครนีเดิลส์ คือ เข็มที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็กในระดับไมโครเมตร ส่วนใหญ่มีความยาวไม่เกิน 1 มิลลิเมตร ไมโครนีเดิลส์มีข้อดีในการนำส่งยาที่มีขนาดโมเลกุลขนาดใหญ่เข้าสู่ผิวหนังโดยเป็นเทคนิคที่ไม่ทำให้เจ็บปวด สามารถใช้ได้ง่าย สะดวก และราคาไม่แพงอย่างไรก็ตาม การใช้ไมโครนีเดิลส์อาจก่อให้เกิดการระคายเคืองได้ในผู้ป่วยบางราย (Haq, 2009) ปัจจุบัน มีการวิจัยและพัฒนาการใช้ไมโครนีเดิลส์เพื่อเพิ่มการนำส่งยาหรือสารที่มีมวลโมเลกุลขนาดใหญ่รวมถึงดีเอ็นเอเข้าสู่ผิวหนัง โดยไมโครนีเดิลส์ทำหน้าที่แทงผ่านผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียมเพื่อนำส่งตัวยาหรือก่อให้เกิดรูส่งผลช่วยเพิ่มการซึมผ่านของสารเข้าสู่ผิวหนัง การประยุกต์ใช้ไมโครนีเดิลส์สำหรับการนำส่งผิวหนังที่นิยมใช้มี 4 แบบ (รายละเอียดแสดงในรูปที่ 1) ได้แก่



รูปที่ 1 A) ชนิดของไมโครนีเดิลส์มี 4 ชนิดได้แก่ ไมโครนีเดิลส์ชนิดเข็มตันชนิดเคลือบ ชนิดละลาย และชนิดรูกลวง B) วิธีการนำส่งตัวยาเข้าสู่ผิวหนังของไมโครนีเดิลส์ (ดัดแปลงจาก Kim et al., 2012a)

1. การแทงด้วยไมโครนีเดิลส์ก่อนและแปะแผ่นแปะที่มีตัวยา (Poke and patch approach)

เทคนิคนี้ใช้ไมโครนีเดิลส์ชนิดเข็มตัน (solid microneedle) ซึ่งส่วนมากผลิตโดยใช้วัสดุที่มีความแข็งและตัน เช่น สแตนเลส ไทเทเนียม โพลีเมอร์ ชนิดโพลีคาร์บอเนต หรือแก้ว เป็นต้น เทคนิค poke and patch เป็นการใช้ไมโครนีเดิลส์ชนิดเข็มตันแทงเข็มเข้าไปในผิวหนังจากนั้นดึงเข็มออกจะเกิดรูในชั้นผิวหนัง จากนั้นจึงแปะแผ่นตัวยาหรือสารที่ต้องการบนผิวหนัง ตัวยาจะค่อย ๆ ซึมผ่านเข้าไปในชั้นผิวหนังโดยอาศัยการแพร่ (passive diffusion) (van der Maaden et al., 2014; Indermun et al., 2014; Tuan-Mahmood et al., 2013)

2. การเคลือบตัวยากับไมโครนีเดิลส์และแทงเข้าสู่ผิวหนัง (Coat and poke approach)

วิธีนี้ใช้หลักการเคลือบไมโครนีเดิลส์ (coated microneedle) ด้วยสารที่ต้องการ โดยส่วนใหญ่ใช้เข็มชนิดเดียวกับไมโครนีเดิลส์ชนิดเข็มตันแต่แตกต่างกันในขั้นตอนการให้ตัวยา โดยเคลือบยาที่ต้องการบนเข็มไมโครนีเดิลส์ก่อนเมื่อแทงเข็มเข้าไปในผิวหนังตัวยาที่เคลือบบนเข็มจะหลุดออกจากเข็มเข้าไปอยู่ในเนื้อเยื่อของผิวหนัง หลังจากนั้นตัวยาจะค่อย ๆ ถูกปลดปล่อยและดูดซึมต่อไป (Gill and Prausnitz, 2007)

3. การแทงไมโครนีเดิลส์ที่บรรจุตัวยาไว้ในพอลิเมอร์ที่ละลายตัวได้ภายในร่างกายและปลดปล่อยเข้าสู่ผิวหนัง (Poke and release approach)

การนำส่งตัวยาดังวิธีนี้ใช้ไมโครนีเดิลส์ชนิดละลาย (dissolving microneedle) ซึ่งนิยม

เตรียมจากโพลิเมอร์ชนิดที่สามารถเข้ากันได้กับร่างกายและมีความปลอดภัยเช่นโพลิแล็กติกแอซิด (polylactic acid) โพลิไกลิโกลิกแอซิด (polyglycolic acid) โพลิแล็กติกโคไกลิโกลิกแอซิด (polylactic-co-glycolic acid) โพลิไวนิลไพร์โรลิโดน (polyvinylpyrrolidone) โซเดียมไฮยาลูโรเนต (sodium hyaluronate) คอนดรอยตินซัลเฟต (chondroitin sulphate) และคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) เป็นต้นตัวยาจะถูกผสมรวมเข้าไปในโพลิเมอร์ที่ใช้ผลิตเป็นเข็ม หลังจากแทงไมโครนีเดิลส์เข้าไปในผิวหนังเข็มจะสัมผัสกับของเหลวในชั้นผิวหนังและเกิดการละลายค่อย ๆ ปลดปล่อยตัวยาเข้าสู่ผิวหนัง

4. การแทงไมโครนีเดิลส์ชนิดรูกลวง และฉีดตัวยาเข้าสู่ผิวหนัง (Poke and flow approach)

วิธีการนี้ใช้ไมโครนีเดิลส์ชนิดรูกลวง (hollow microneedle) ซึ่งอาศัยหลักการคล้ายเข็มฉีดยาแต่เข็มมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางในระดับไมโครเมตรซึ่งเล็กกว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเข็มฉีดยาทั่วไปทำให้เจ็บปวดน้อยกว่าสารละลายที่มีตัวยาจะถูกนำส่งผ่านรูเข็มเข้าสู่ชั้นในของผิวหนังโดยตรง(McCrudden MTC et al., 2015; Indermun et al., 2014; Tuan-Mahmood et al., 2013)

การใช้เทคนิคไมโครนีเดิลส์มีประสิทธิภาพในการนำส่งตัวยาหรือดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่เข้าสู่ผิวหนังได้ นอกจากนี้ไมโครนีเดิลส์ยังสามารถใช้ได้ง่าย สะดวก และมีผลข้างเคียงน้อยเทคนิคการประยุกต์ใช้ไมโครนีเดิลส์สำหรับการนำส่งดีเอ็นเอที่ได้รับความนิยมในปัจจุบัน ได้แก่ เทคนิคการเคลือบไมโครนีเดิลส์ (coated microneedle) เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สามารถใช้งานได้ง่ายสะดวก พบปัญหาด้านความไม่คงตัวหรือการสลายตัวของดีเอ็นเอน้อยหากเลือกใช้สารร่วมในตำรับได้อย่างเหมาะสม (Van der Maaden et al., 2012) Kendall ได้ทำการเคลือบวัคซีน herpes simplex virus type 2 surface glycoprotein

D2 (HSV-2-gD2) บนไมโครนีเดิลส์และนำส่งโดยใช้อุปกรณ์ช่วยนำส่ง การใช้อุปกรณ์ช่วยนำส่งสามารถใช้ได้ง่ายและสะดวกเพียงแค่อัดแผ่นไมโครนีเดิลส์ที่ด้านปลายของอุปกรณ์ช่วยนำส่ง จากนั้นทาบและกดอุปกรณ์ช่วยนำส่งด้านที่มีแผ่นไมโครนีเดิลส์กับผิวหนังบริเวณที่ต้องการแผ่นไมโครนีเดิลส์จะถูกผลักออกมาจากอุปกรณ์ช่วยนำส่ง ไมโครนีเดิลส์จะแทงเข้าไปในผิวหนังหลังจากนั้นดีเอ็นเอวัคซีนจะถูกปลดปล่อยเข้าสู่ผิวหนังทันทีภายในเวลาไม่ถึง 1 นาที (Chen et al., 2010; Kendall, 2014) โดยอุปกรณ์ช่วยนำส่งสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ เทคนิคนี้ช่วยให้ผู้ป่วยสามารถนำกลับไปใช้เองที่บ้านได้โดยไม่ต้องอาศัยเทคนิคของผู้ชำนาญการในการฉีดยา

Yan และคณะได้ทำการศึกษานำส่งดีเอ็นเอทางผิวหนังโดยใช้มอเตอร์ในการควบคุมการทำงานของไมโครนีเดิลส์ชนิดเข็มตันโดยอุปกรณ์นี้มีข้อดีที่สามารถกำหนดความยาวเข็ม ความเร็วและความดันน้ำหนักรองแรงกดได้เมื่อเปรียบเทียบกับไมโครนีเดิลส์ชนิดลูกกลิ้งแบบดั้งเดิม ซึ่งการศึกษานี้ช่วยยืนยันว่าการนำส่งดีเอ็นเอทางผิวหนังโดยใช้อุปกรณ์ไมโครนีเดิลส์ที่ทำงานโดยใช้มอเตอร์มีประสิทธิภาพในการนำส่งดีเอ็นเอและเกิดการแสดงออกของยีนทางผิวหนัง (Yan et al., 2014)

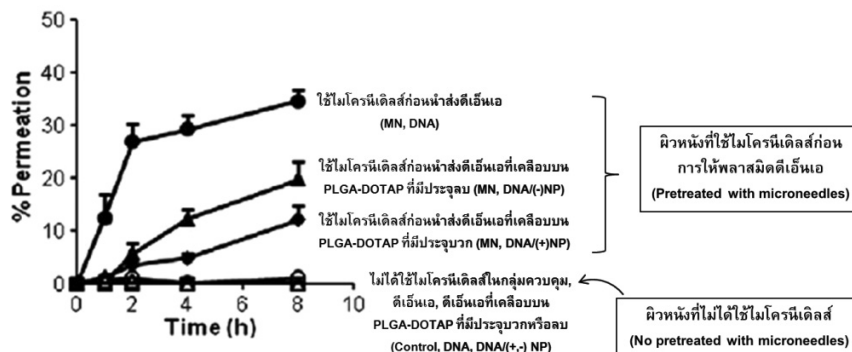
ตัวอย่างงานวิจัยการนำไมโครนีเดิลส์ประยุกต์ในการนำส่งดีเอ็นเอทางผิวหนัง

Kumar และคณะ ได้ศึกษาการนำส่งพลาสมิดดีเอ็นเอที่เคลือบบนอนุภาค poly (lactic-co-glycolic acid)(PLGA)-DOTAP ที่มีประจุบวกหรือลบทางผิวหนังโดยใช้ลูกกลิ้งไมโครนีเดิลส์ชนิดเข็มตันที่มีชื่อการค้าว่า Dermaroller® โดยเปรียบเทียบการซึมผ่านของพลาสมิดดีเอ็นเอเดี่ยว ๆ หรือ พลาสมิดดีเอ็นเอที่เคลือบบนอนุภาค PLGA-DOTAP ที่มีประจุบวกหรือลบใน *in vitro* ผ่านผิวหนังหนู BALB/c mice เปรียบเทียบระหว่างผิวหนังที่ใช้และไม่ใช้ไมโครนีเดิลส์

ก่อนการให้พลาสมิติเอ็นเอ พบว่าทั้งพลาสมิติเอ็นเอเดี่ยว ๆ และพลาสมิติเอ็นเอที่เคลือบบนอนุภาค PLGA-DOTAP ที่มีประจุบวกหรือลบสามารถซึมผ่านผิวหนังได้หลังจากใช้ไมโครนีเดิล ในขณะที่พลาสมิติเอ็นเอทุกกลุ่มไม่สามารถซึมผ่านผิวหนังได้ หากไม่ใช้ไมโครนีเดิลก่อนการให้พลาสมิติเอ็นเอ (รายละเอียดแสดงในรูปที่ 2) (Kumar et al., 2012)

นอกจากนี้ Yan และคณะ ได้ทำการศึกษาการนำส่งพลาสมิติเอ็นเอชนิด plasmid enhance green fluorescent protein-luciferase (pEGFP-Luc) หรือตำรับพลาสมิติเอ็นเอชนิดที่ผสมกับลิโปเฟกตามีน 2000 (pEGFP-Luc lipoplexes) ทางผิวหนังเพื่อให้เกิดการแสดงออกของยีนโดยใช้ไมโครนีเดิลชนิดเข็มตันที่มีขนาดความยาวเข็ม 0.5 มิลลิเมตร ระยะเวลาในการใช้ไมโครนีเดิล 30 วินาทีซึ่งสามารถควบคุมการทำงานโดยใช้มอเตอร์โดยได้เปรียบเทียบการใช้เทคนิคไมโครนีเดิลก่อนหรือหลังใส่ pEGFP-Luc การนำส่งโดยใช้เข็มขนาด 31 G (0.28×12 mm) ฉีดตำรับ pEGFP-Luc เข็มละ 1 ไมโครลิตรเข้าใต้ผิวหนัง 100 ครั้ง และฉีดตำรับ pEGFP-Luc เข็มละ 16 ไมโครลิตรเข้าใต้ผิวหนัง 6 ครั้งพบว่าตำรับ pEGFP-Luc และตำรับ pEGFP-Luc lipoplexes ไม่มีการแสดงออกของยีนลูซิเฟอเรสเมื่อไม่ใช้เทคนิคเพิ่มการซึมผ่านทางกายภาพใด ๆ เช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามตำรับ pEGFP-Luc ที่ใช้เทคนิคเพิ่มการซึมผ่านพบระดับการแสดงออกของยีนลูซิเฟอเรสเรียง

ลำดับจากสูงสุดไปต่ำสุด ดังนี้ ตำรับ pEGFP-Luc ที่ใช้เทคนิคไมโครนีเดิลหลังการให้ pEGFP-Luc การนำส่งตำรับ pEGFP-Luc โดยใช้การฉีดครั้งละ 1 ไมโครลิตรเข้าใต้ผิวหนัง 100 ครั้ง การใช้เทคนิคไมโครนีเดิลก่อนการให้ตำรับ pEGFP-Luc และการฉีด pEGFP-Luc ครั้งละ 16 ไมโครลิตรเข้าใต้ผิวหนัง 6 ครั้ง (รายละเอียดแสดงในรูปที่ 3) จากนั้นนักวิจัยได้ศึกษาเพื่อยืนยันว่าไมโครนีเดิลมีประสิทธิภาพในการนำส่ง pEGFP-Luc เข้าสู่ผิวหนัง Sprague Dawley rats เพศผู้อายุ 8 สัปดาห์ โดยถ่ายภาพผิวหนังหนูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนซ์หลังจากนำส่งตำรับ pEGFP-Luc เปรียบเทียบระหว่างใช้และไม่ใช้ไมโครนีเดิล พบว่าผิวหนังหนูที่ไม่ได้ใช้ไมโครนีเดิลไม่พบการแสดงออกของยีนเป็นโปรตีนสีเขียว ในขณะที่ผิวหนังหนูที่ใช้ไมโครนีเดิลมีการแสดงออกของโปรตีนสีเขียวโดยเฉพาะอย่างยิ่งในผิวหนังชั้นอีพิตีเลียส ดังนั้นผิวหนังชั้นอีพิตีเลียสจึงเป็นบริเวณหลักที่มีการแสดงออกของยีน (Yan et al., 2014) พบว่าตำรับ pEGFP-Luc และตำรับ pEGFP-Luc lipoplexes ไม่มีการแสดงออกของยีนลูซิเฟอเรสเมื่อไม่ใช้เทคนิคเพิ่มการซึมผ่านทางกายภาพใด ๆ เช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามตำรับ pEGFP-Luc ที่ใช้เทคนิคไมโครนีเดิลหลังการให้ pEGFP-Luc มีการแสดงออกของยีนลูซิเฟอเรสสูงที่สุด (Yan et al., 2014)



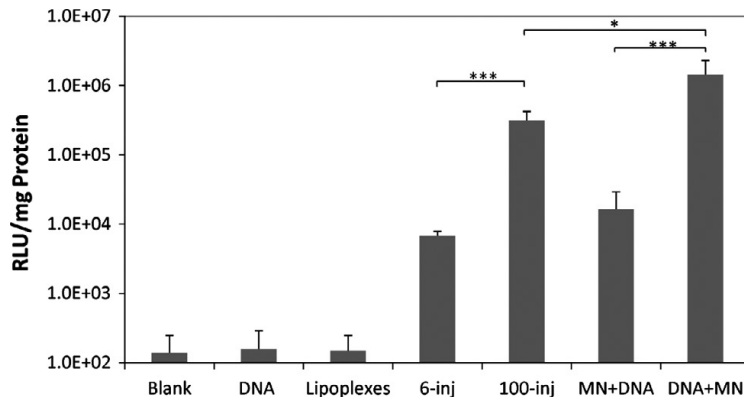
รูปที่ 2 กราฟที่ plot ระหว่างปริมาณการซึมผ่านของพลาสมิดดีเอ็นเอในผิวหนัง BALB/c mice และเวลาพบว่าพลาสมิดดีเอ็นเอเดี่ยว ๆ และพลาสมิดดีเอ็นเอที่เคลือบบน PLGA-DOTAP ที่มีประจุลบหรือบวกสามารถซึมผ่านผิวหนังได้หลังจากใช้ไมโครนีเดิลส์ (โดย +/- NP คือ อนุภาคนาโนหรือสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างพลาสมิดดีเอ็นเอและ PLGA-DOTAP ที่มีประจุลบหรือบวก) (ดัดแปลงจาก Kumar et al., 2012)

ตัวอย่างงานวิจัยการนำไมโครนีเดิลส์สำหรับประยุกต์ในการนำส่งดีเอ็นเอวัคซีนทางผิวหนัง มีดังนี้

1. การนำส่งดีเอ็นเอวัคซีนสำหรับป้องกันการติดเชื้อ herpes simplex virus type 2

ในประเทศกำลังพัฒนาการติดเชื้อ herpes simplex virus type 2 (HSV-2) เป็นการติดเชื้อทางเพศสัมพันธ์ที่พบได้บ่อยที่สุดและเป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคเริมที่บริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ (Cattamanchi et al., 2008) นอกจากนี้ HSV-2 ยังเป็นสาเหตุของการเกิดโรคเริมในเด็กแรกเกิดซึ่งอาจพบได้น้อยแต่หากเกิดแล้วจะส่งผลให้การพัฒนาาระบบประสาทและสมองผิดปกติอย่างถาวร Chen และคณะได้ทำการศึกษาการนำส่งดีเอ็นเอวัคซีน herpes simplex virus type 2 surface glycoprotein D2 (HSV-2-gD2) โดยเคลือบดีเอ็นเอวัคซีน HSV-2-gD2 ติดสีวาวแสงโรดามีน (Rhodamine) บนไมโครนีเดิลส์ (Nanopatch™) เพื่อนำส่งทางผิวหนัง BALB/cmice อายุ 5-6 สัปดาห์ พบว่าดีเอ็นเอวัคซีน HSV-2-gD2-fluo-

rescent dye สามารถเข้าสู่ผิวหนัง BALB/cmice ได้ทั้งชั้นอิมมูโนเจนิกและเดอริมาซึ่งเป็นชั้นที่มีเซลล์แลงเกอร์ฮานและเซลล์เดนไดรติกตามลำดับ โดยเซลล์ทั้ง 2 ชนิดนี้มีคุณสมบัติเป็น professional antigen presenting cells ซึ่งจะทำหน้าที่ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้เป็นอย่างดีนอกจากนั้นคณะผู้วิจัยได้ทำการทดลองเพื่อยืนยันประสิทธิภาพของดีเอ็นเอวัคซีนโดยนำส่งดีเอ็นเอวัคซีน HSV-2-gD2 ซึ่งใช้เป็นแอนติเจนเข้าสู่ผิวหนัง BALB/cmice โดยการเคลือบบนเข็มไมโครนีเดิลส์ (Nanopatch™) พบว่าการนำส่งดีเอ็นเอวัคซีน HSV-2-gD2 มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนสูงที่สุดและมีอัตราการรอดชีวิตของ BALB/cmice ต่อเชื้อไวรัส herpes simplex type 2 เท่ากันกับการบริหารวัคซีนเข้ากล้ามเนื้อซึ่งใช้ปริมาณดีเอ็นเอวัคซีนลดลง 10 เท่า ที่สามารถช่วยลดต้นทุนในการผลิตวัคซีนป้องกันการติดเชื้อ herpes simplex virus type 2 ได้อีกด้วย (Chen et al., 2010)



รูปที่ 3 กราฟ plot ระหว่างค่าการแสดงออกของยีนลูซิเฟอเรสในผิวหนัง BALB/c mice กลุ่มต่าง ๆ เมื่อให้ pEGFP-Luc ปริมาณ 10 ไมโครกรัม

โดย blank คือ กลุ่มควบคุมที่ไม่มี pEGFP-Luc

DNA คือ กลุ่มที่ใส่สารละลายที่มี pEGFP-Luc ลงบนผิวหนัง

Lipoplexes คือ กลุ่มที่ใส่สารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง pEGFP-Luc กับ Lipofectamine

6-inj คือ กลุ่มที่ฉีด pEGFP-Luc เข้าชั้นหนังแท้จำนวน 6 เข็ม

100-inj คือ กลุ่มที่ฉีด pEGFP-Luc เข้าชั้นหนังแท้จำนวน 100 เข็ม

MN+DNA คือ กลุ่มที่ใช้ไมโครนีเดิลแทงผ่านผิวหนังก่อนการให้ pEGFP-Luc

DNA+MN คือ กลุ่มที่ให้ pEGFP-Luc ก่อนการใช้ไมโครนีเดิล

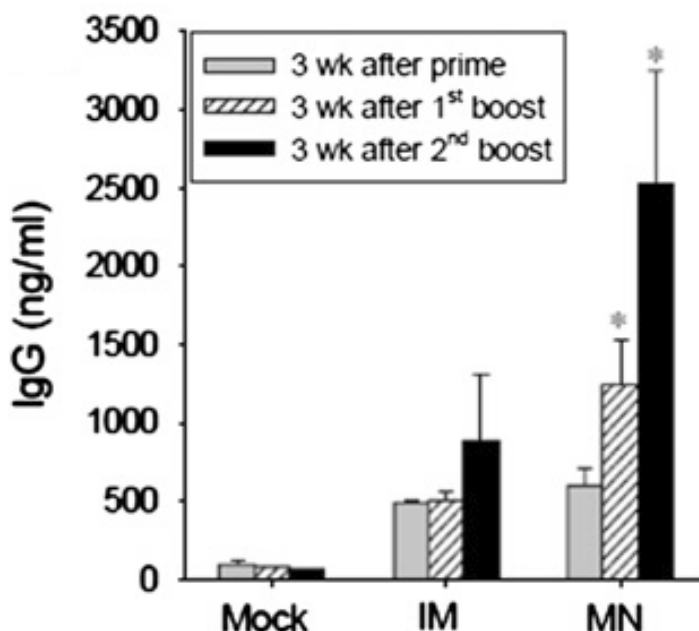
2. การนำส่งดีเอ็นเอวัคซีนสำหรับป้องกันโรคไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1

โรคไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 เป็นโรคที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ H5N1 ซึ่งพบการติดเชื้อได้ในสัตว์ปีกและระบาดสู่มนุษย์ได้ โดยโรคไข้หวัดนกสายพันธุ์ต่าง ๆ พบการระบาดได้ทั่วโลกซึ่งก่อให้เกิดอาการรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิต (Kim et al., 2012; World Health Organization, 2013) วิธีการที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดขณะนี้สำหรับการป้องกันการติดเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 คือ การให้วัคซีนเพื่อสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคในปี ค.ศ. 2009 มีการระบาดของไข้หวัดนกซึ่งการผลิตวัคซีนแบบดั้งเดิมนิยมใช้เทคนิคการทำให้เชื้ออ่อนฤทธิ์โดยวิธีการนี้ใช้ระยะเวลาในการผลิตนานถึง 6-7 เดือนหลังจากการระบุชนิดและแยกเชื้อได้ เนื่องจากการติดเชื้อไข้หวัดนกในแต่ละครั้งจะมีการระบาดของ

สายพันธุ์ที่แตกต่างกันหรืออาจเป็นสายพันธุ์ใหม่จึงไม่สามารถเตรียมวัคซีนไว้ล่วงหน้าได้ ดีเอ็นเอวัคซีนจึงมีความเหมาะสมสำหรับการนำมาใช้เป็นวัคซีนสำหรับป้องกันโรคไข้หวัดนกเนื่องจากดีเอ็นเอวัคซีนสามารถผลิตได้ง่ายและรวดเร็วในปริมาณมากโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย มีราคาไม่แพง มีความคงตัว และมีความปลอดภัย Kim และคณะได้ทำการทดสอบสมมติฐานที่ว่าดีเอ็นเอวัคซีนไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 เมื่อให้ทางผิวหนังเปรียบเทียบกับระหว่างการใช้ไมโครนีเดิลกับการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ การบริหารดีเอ็นเอวัคซีนทางใดจะสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีกว่ากัน โดยใช้ดีเอ็นเอวัคซีนไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ขนาด 3 ไมโครกรัมเท่ากันทดสอบใน BALB/c mice เพศเมียอายุ 6-8 สัปดาห์คณะผู้วิจัยยังได้ศึกษาการตอบสนองของภูมิคุ้มกันจากค่าแอนติบอดีชนิด IgG โดยเปรียบเทียบ 3 กลุ่มตัวอย่าง

ซึ่งได้แก่ กลุ่มที่เคลือบสารละลายดีเอ็นเอวัคซีนบนเข็มไมโครนีเดิลส์ (MN) กลุ่มที่ฉีดดีเอ็นเอวัคซีนเข้าทางกล้ามเนื้อ (IM) และกลุ่มที่เคลือบสารละลายที่ไม่มีดีเอ็นเอวัคซีนบนเข็มไมโครนีเดิลส์ (Mock) จากผลการศึกษาระดับการตอบสนองของแอนติบอดีชนิด IgG ที่จำเพาะกับ H5N1 virus hemagglutinin พบว่าหลังจากฉีดเข็มแรกทั้งกลุ่มที่ใช้ MN และ IM พบระดับการตอบสนองใกล้เคียงกันและมีค่าสูงกว่ากลุ่ม Mock ซึ่งแสดงว่าทั้งสองกลุ่มสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีกว่ากลุ่ม Mock หลังจากฉีดเข็ม 2 และ 3 พบว่าระดับ IgG ของกลุ่ม MN มีค่าสูงกว่าทั้งกลุ่ม IM และ Mock อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (รายละเอียดแสดงในรูปที่ 4) คณะผู้วิจัยชุดนี้ยังศึกษา

ประสิทธิภาพในการป้องกันไวรัส H5N1 โดยการให้เชื้อไวรัส H5N1 ปริมาณ 200 pfu เข้าทางจมูกกับกลุ่มทดลองทั้ง 3 กลุ่ม ผลการทดลองพบว่าหลังการให้เชื้อไวรัส H5N1 กลุ่มที่ใช้ MN มีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 67% และสัตว์ทดลองมีชีวิตรอดนานกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม IM และ Mock สามารถสรุปได้ว่าเมื่อวัคซีนชนิดและขนาดเดียวกันดีเอ็นเอวัคซีนใช้หัวด้นกสายพันธุ์ H5N1 ที่เคลือบบนเข็มไมโครนีเดิลส์ แสดงการตอบสนองที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของไวรัสได้สูงกว่าจึงมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้มากกว่า และสามารถป้องกันเชื้อไวรัส H5N1 ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการบริหารวัคซีนโดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (Kim et al., 2012)



รูปที่ 4 กราฟ plot ระหว่าง IgG antibody ของกลุ่มควบคุมที่เคลือบสารละลายที่ไม่มีดีเอ็นเอวัคซีนบนเข็มไมโครนีเดิลส์ (Mock) กลุ่มที่ฉีดดีเอ็นเอวัคซีนเข้าทางกล้ามเนื้อ (IM) และกลุ่มที่เคลือบสารละลายดีเอ็นเอวัคซีนบนเข็มไมโครนีเดิลส์ (MN) ภายหลังการให้ดีเอ็นเอวัคซีน avian H5 influenza โดยหลังจากฉีดเข็ม 2 และ 3 พบว่าระดับ IgG ของกลุ่ม MN มีค่าสูงกว่าทั้งกลุ่ม IM และ Mock อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Kim et al., 2012)

3. การนำส่งดีเอ็นเอวัคซีนสำหรับรักษาโรคอัลไซเมอร์

โรคอัลไซเมอร์จัดเป็นภาวะสมองเสื่อมชนิดหนึ่งที่พบได้บ่อยที่สุด สมมติฐานหนึ่งที่ได้รับค่านิยมและเชื่อว่าเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคอัลไซเมอร์คือ สมมติฐานแอมิลอยด์ (amyloid hypothesis) ซึ่งเชื่อว่าการสะสมของแอมิลอยด์บีตา (amyloid beta; A β) เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคอัลไซเมอร์เนื่องจากยีน apolipoprotein E (APOE) ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรมของโรคอัลไซเมอร์ทำให้เกิดการสร้างแอมิลอยด์บีตาในสมองจำนวนมากคาดการณ์ว่าการสะสมของแอมิลอยด์บีตาทำให้มีอาการทางคลินิกของโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's association, 2013) Kim และคณะได้ทำการนำส่งดีเอ็นเอวัคซีน (pTarget-Ig-A β -Fc) ซึ่งเป็นแอนติเจนที่ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายตอบสนองโดยสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะออกมาทำลายแอมิลอยด์บีตาที่มีจำนวนมากผิดปกติ คณะผู้วิจัยได้ใช้ PMA (pH-responsive polyelectrolyte multilayer assembly) ซึ่งเป็นการเคลือบสารหลายชนิดให้เป็นชั้นๆ โดยมีคุณสมบัติไวต่อการตอบสนองด้วยค่าพีเอช ซึ่งประกอบด้วยโพลีโดปามีนเฮฟารินอัลบูมินและแมนโนสเคลือบบนผิวของเข็มไมโครนีเดิล จากนั้นเคลือบด้วยสารประกอบเชิงซ้อนของ pTarget-Ig-A β -Fc กับโพลีเอธิลีนไมน์ (polyethylenimine) อีกชั้นหนึ่งพบว่า การนำส่งดีเอ็นเอวัคซีน (pTarget-Ig-A β -Fc) แบบ *in vivo* ทางผิวหนัง BALB/c mice เพศเมียอายุ 7 สัปดาห์ ให้ผลการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพในการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะออกมาทำลายแอมิลอยด์บีตาซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ได้ นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการบริหารดีเอ็นเอวัคซีนโดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection) (Kim et al., 2014)

สรุปผลการวิจัย

การนำส่งดีเอ็นเอทางผิวหนังมีความสำคัญในการใช้บำบัดและป้องกันโรคเนื่องจากดีเอ็นเอเป็นสารพันธุกรรมที่ช่วยในการรักษาที่สาเหตุของโรค ดีเอ็นเอวัคซีนเป็นวัคซีนชนิดใหม่ที่มีข้อได้เปรียบหลายประการเมื่อเปรียบเทียบกับวัคซีนชนิดดั้งเดิม ผิวหนังเป็นอวัยวะที่สามารถเข้าถึงได้ง่ายและมี antigen presenting cells จำนวนมากซึ่งเป็นข้อได้เปรียบในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายสำหรับการนำส่งดีเอ็นเอวัคซีนเพื่อการป้องกันโรค แต่เนื่องจากข้อจำกัดหลักเกี่ยวกับการนำส่งดีเอ็นเอเข้าสู่ผิวหนังและการแสดงออกเป็นโปรตีนที่ไม่เพียงพอต่อการออกฤทธิ์รักษาจึงเป็นเหตุผลสำคัญที่ยังมีข้อจำกัดในการใช้ การนำเทคนิคไมโครนีเดิลส์มาใช้จะสามารถเพิ่มการนำส่งดีเอ็นเอทางผิวหนังได้ โดยพบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งดีเอ็นเอเข้าสู่ผิวหนังและมีการแสดงออกของยีนได้ดี นอกจากนี้มีการศึกษาการใช้ไมโครนีเดิลส์นำส่งดีเอ็นเอวัคซีนสำหรับป้องกันและรักษาโรคพบว่ามีประสิทธิภาพดีในสัตว์ทดลอง เช่น ป้องกันการติดเชื้อ herpes simplex virus type 2 ป้องกันโรคไขหวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ป้องกันเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ป้องกันการติดเชื้อไวรัสเฮซพีวี ป้องกันโรคฝีดาษ และรักษาโรคอัลไซเมอร์เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังไม่พบการศึกษาการนำส่งดีเอ็นเอโดยการใช้ไมโครนีเดิลส์ในมนุษย์ การใช้เทคนิคไมโครนีเดิลส์จึงเป็นเทคนิคที่ได้รับความสนใจศึกษาและมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาและป้องกันโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

Referarece

- Alzheimer's association. Basics of alzheimer's disease [pamphlet]. Alzheimer's association; 2013.
- Barry ME, Gonzalez DP, Orson FM, McKenzie GJ, Petry GR, Barry MA. Role of Endogenous Endonucleases and Tissue Site in Transfection and CpG-Mediated Immune Activation after Naked DNA Injection. *Hum Gene Ther* 2004;10(15): 2461-80.
- Cattamanchi A, Posavad CM, Wald A, Baine Y, Moses J, Higgins TJ, et al. Phase I Study of a Herpes Simplex Virus Type 2 (HSV-2) DNA Vaccine Administered to Healthy, HSV-2-Seronegative Adults by a Needle-Free Injection System. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15(11):1638-43.
- Chen X, Kask AS, Crichton ML, McNeilly C, Yukiko S, Dong L, et al. Improved DNA vaccination by skin-targeted delivery using dry-coated densely-packed microprojection arrays. *J Control Release* 2010;148(3):327-33.
- CalladineCR, Drew H, Luisi B, Travers A. Understanding DNA: The Molecule and How it Works. San Diego: *Elsevier Academic Press*; 2004.
- Donnelly JJ, Wahren B, Liu MA. DNA Vaccines: Progress and Challenges. *J Immunol* 2005;175(2):633-9.
- Ferraro B, Morrow MP, Hutnick NA, Shin TH, Lucke CE, Weiner DB. Clinical Applications of DNA Vaccines: Current Progress. *Clin Infect Dis* 2011;53(3):296-302.
- Fitzgerald-Hayes M, Frieda R. DNA and biotechnology. Burlington: Elsevier Academic Press; 2010.
- Gill HS, Prausnitz MR. Coated microneedles for transdermal delivery. *J Control Release* 2007;117(2): 227-237.
- Haq MI, Smith E, John DN, Kalavala M, Edwards C, Anstey A, et al. Clinical administration of microneedles: skin puncture, pain and sensation. *Biomed Microdevices* 2009; 11(1):35-47.
- Ibraheem D, Elaissari A, Fessi H. Gene therapy and DNA delivery systems. *Int J Pharm* 2014;459(1–2):70-83.
- Indermun S, Luttge R, Choonara YE, Kumar P, du Toit LC, Modi G, et al. Current advances in the fabrication of microneedles for transdermal delivery. *J Control Release* 2014;185(0):130-8.
- Jhawar VC, Saini V, Kamboj S, Maggon N. Transdermal Drug Delivery Systems: Approaches and Advancements in Drug Absorption through Skin. *Int J Pharm Sci Rev Res* 2013;20(1): 47-56
- Kendall M. Demo: A needle-free vaccine patch that's safer and way cheaper. [Video file]. 2013Jun [cited 2014Nov2];Available from: URL:http://www.ted.com/talks/mark_kendall_demo_a_needle_free_vaccine_patch_that_s_safer_and_way_cheaper#
- Kim NW, Lee MS, Kim KR, Lee JE, Lee K, Park JS, et al. Polyplex-releasing microneedles for enhanced cutaneous delivery of DNA vaccine. *J Control Release* 2014;

- 179(0):11-7.
- Kim Y-C, Park JH, Prausnitz MR. Microneedles for drug and vaccine delivery. *Adv Drug Deliver Rev* 2012a;64(14):1547-68.
- Kim Y-C, Song JM, Lipatov AS, Choi SO, Lee JW, Donis RO, et al. Increased immunogenicity of avian influenza DNA vaccine delivered to the skin using a microneedle patch. *Eur J Pharm Biopharm* 2012b; 81(2): 239-247.
- Kim Y-C, Suh H, Shin J. Microneedle patches for vaccine delivery. *Clin Exp Vaccine Res* 2014;3(1):42-9.
- Koprowski H, Weiner DB. DNA Vaccination/ Genetic Vaccination. Berlin: Springer; 1998.
- Kumar A, Wongsanan P, Sandoval MA, Li X, Zhu S, Cui Z. Microneedle-mediated transcutaneous immunization with plasmid DNA coated on cationic PLGA nanoparticles. *J Control Release* 2012;163(2):230-9.
- Li L, Saade F, Petrovsky N. The future of human DNA vaccines. *J Biotechnol* 2012;162 (2-3):171-82.
- Liu MA. DNA vaccines: a review. *J Int Med* 2003;253(4):402-10.
- MacLaughlin F, Rolland A. Pharmaceutical Gene Delivery Systems. In: Rolland A, Sullivan SM, editors. Device-Mediated Gene Delivery: A Review. United States of America: CRC Press; 2003. p. 245-77.
- McCrudden MTC, McAlister E, Courtenay AJ, González-Vázquez P, Singh TRR, Donnelly RF. Microneedle applications in improving skin appearance. *Exp Dermatol* 2015 (in press).
- Naik A, Kalia YN, Guy RH. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. *Pharm Sci Technol To* 2000; 3(9):318-26.
- Pereira VB, Zurita-Turk M, Saraiva TDL, De Castro CP, Souza BM, Agresti PM et al. DNA Vaccines Approach: From Concepts to Applications. *World J Vaccine* 2014; 4(2):50-71.
- Schleef M. DNA Pharmaceuticals: Formulation and Delivery in Gene Therapy, DNA Vaccination and Immunotherapy. Germany: *The Federal Republic of Germany*; 2005.
- Shedlock DJ, Weiner DB. DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *J Leukoc Biol* 2000;68(6): 793-806.
- Sparber F, Tripp CH, Hermann M, Romani N, Stoitzner P. Langerhans cells and dermal dendritic cells capture protein antigens in the skin: Possible targets for vaccination through the skin. *Immunobiology* 2010; 215(9-10):770-9.
- Tuan-Mahmood TM, McCrudden MTC, Torrisi BM, McAlister E, Garland MJ, Singh TRR, et al. Microneedles for intradermal and transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Sci* 2013;50(5):623-37.
- van der Maaden K, Jiskoot W, Bouwstra J. Micro-needle technologies for (trans)dermal drug and vaccine delivery. *J Control Release* 2012;161(2):645-55.

- van der Maaden K, Sekerdag E, Jiskoot W, Bouwstra J. Impact-Insertion Applicator Improves Reliability of Skin Penetration by Solid Microneedle Arrays. *AAPS J* 2014;16(4):681-4.
- Walker R, Jones S. *Genes & DNA*. Boston, Kingfisher; 2003.
- Watson J. *DNA : the secret of life*. New York: Alfred A. Knopf; 2003.
- World Health Organization. Influenza at the human-animal interface [pamphlet]. World Health Organization; 2013.
- Yan G, Arelly N, Farhan N, Lobo S, Li H. Enhancing DNA delivery into the skin with a motorized microneedle device. *Eur J Pharm Sci* 2014;52:215-22.