



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การสังเคราะห์และประเมินฤทธิ์ต้านมะเร็งของอนุพันธ์
5-คลอโร-2-ไฮดรอกซี เบนซาไมด์ เพื่อให้มีฤทธิ์เป็นยาต้านมะเร็ง

Synthesis and Evaluation of Anticancer Activity of 5-Chloro-2-
Hydroxy Benzamide Derivative as Potential Anticancer Agent

เภสัชกรหญิง ดร. อนงค์ ตีระวนิชพงศ์
หัวหน้าโครงการวิจัย

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๑

รหัสโครงการ 256106A1080023

สัญญาเลขที่ 85/2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

กลไกการตายแบบอะพอโทซิสโดยสารอนุพันธ์
ของ Aeroplysinin-1 ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก

Apoptosis mechanism by Aeroplysinin-1 derivative

in human cervical cancer cell lines

เภสัชกรหญิง ดร. อนงค์ ตีระวนิชพงศ์

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุน
รัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่าน
สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 85/2561

Acknowledgment

This work was financially supported by the Research grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (grant no. 85/2561)

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มุ่งเน้นไปที่การออกแบบและพัฒนาโครงสร้างของสารเพื่อให้มีฤทธิ์เป็นยาต้านมะเร็งแบบจำเพาะเจาะจง (targeted therapy) ในกลุ่ม small molecules ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่มีผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์ ซึ่งจะส่งผลให้เซลล์ตายในที่สุด โดยงานวิจัยนี้เลือกอนุพันธ์ Aeroplysinin-1 และ Fluorosalan มาเป็นสารต้นแบบในการพัฒนาโดยใช้กระบวนการ Computer-Aided Drug Design (CADD) ช่วย ทำให้ได้สารสังเคราะห์ใหม่ที่มีลักษณะเป็นของแข็งมีจุดหลอมเหลวที่ 208.7 °C ผลจากการตรวจสอบและพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีด้วยเครื่องมือทาง spectroscopy ได้แก่ infrared, nuclear magnetic resonance และ mass spectrometers สอดคล้องกับโครงสร้างของ 5-bromo-N-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxybenzamide ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 360.13 และมีสูตรโมเลกุล คือ $C_{14}H_9BrF_3NO_2$ การทดสอบฤทธิ์ด้านการเติบโตในเซลล์มะเร็งปากมดลูก 2 ชนิด (CaSki และ SiHa) ของสาร 5-bromo-N-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxybenzamide (A1B4) พบว่าความเข้มข้นที่ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง 50 % (half maximal inhibitory concentration; IC_{50}) ใน CaSki และ SiHa cells มีค่าเท่ากับ 0.6 ± 4.2 และ $15.8 \pm 6.3 \mu M$ ตามลำดับ ในขณะที่สารเปรียบเทียบกับ doxorubicin มีค่า IC_{50} ใน CaSki และ SiHa cells เท่ากับ $0.9 \pm 0.06 \mu M$ และ $1.6 \pm 0.08 \mu M$ ตามลำดับ สำหรับการทดสอบความเป็นพิษใน human keratinocyte cell line (HaCaT) พบว่าที่ความเข้มข้นมากกว่า 400 $\mu g/ml$ สารนี้ทำให้ HaCaT cells หยุดการเจริญเติบโตเพียง 30 % ซึ่งแตกต่างจาก doxorubicin ที่ทำให้การเจริญเติบโตของ HaCaT cells ลดลง 50 % ที่ความเข้มข้นต่ำระดับ $10.36 \pm 2.4 \mu g/ml$ ผลของการศึกษาถึงกลไกการตายแบบ apoptosis พบว่าสารนี้ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ทำให้วัฏจักรเซลล์หยุดอยู่ในระยะ G2 และ S ทำให้เซลล์หดตัว เยื่อหุ้มเซลล์มีลักษณะเป็นถุงนิวเคลียสรวมตัวกันแน่น โครมาตินเกาะกลุ่ม DNA ถูกย่อยเป็นชิ้นเล็กๆ มีการเพิ่มระดับ ROS ในเซลล์ เซลล์สูญเสียความต่างศักย์ที่ Mitochondria และกระตุ้นเอนไซม์ Caspase-3 ซึ่งแสดงถึงการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายผ่านกระบวนการ apoptosis ข้อมูลจากงานวิจัยทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่า สารใหม่นี้ มีฤทธิ์ต้านมะเร็งแบบจำเพาะเจาะจง มีฤทธิ์ดี ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติต่ำและเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งตายแบบ apoptosis ซึ่งผลวิจัยนี้สามารถนำไปเป็นต้นแบบของการพัฒนายาใหม่ในอนาคตที่ประหยัดค่าใช้จ่ายและลดเวลาในการพัฒนาและวิจัยลงอย่างมีนัยสำคัญ

คำสำคัญ ยาต้านมะเร็งแบบมุ่งเป้า อนุพันธ์ของ Aeroplysinin-1, สาร Fluorosalan,
กลไกการตายแบบอะพอโตซิส

Abstract

This research is aimed to design and develop the new, small molecule anticancer agent as targeted therapy which acts as enzyme inhibitor in cell proliferation and result in cell death. Aeroplysinin-1 derivative and Fluorosalan were selected as lead compounds with the use of computer-aided drug design process. The synthesized compound was a crystalline solid with melting point of 208.7 °C. Its structure was characterized by spectroscopic methods via infrared, nuclear magnetic resonance and mass spectroscopy and revealed that it was 5-bromo-*N*-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxybenzamide with molecular weight of 360.13 and molecular formula as $C_{14}H_9BrF_3NO_2$. The anticancer activity of 5-bromo-*N*-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxybenzamide (A1B4) was performed in two human cervical cell lines (CaSki and SiHa). The results showed that its half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) in CaSki and SiHa cells were 0.6 ± 4.2 and 15.8 ± 6.3 μ M respectively, compared to those of doxorubicin which were 0.9 ± 0.06 μ M and 1.6 ± 0.08 μ M, respectively. The cytotoxicity study in human keratinocyte cell lines (HaCaT) showed that at concentration over 400 μ M, this compound inhibited only 30% of cell growth while doxorubicin gave an IC_{50} of 10.36 ± 2.4 μ M. A study of apoptosis mechanism revealed that the compound was able to inhibit DNA synthesis, stopped cell cycle in G2 and S phases, caused cell shrinkage, plasma membrane blebbing, nuclear and chromatin condensation, DNA fragmentation, cell ROS level increasing, mitochondria membrane leaking, and activating of caspase-3. These results indicated that cell death was induced through the apoptosis process. The results from overall studies indicated that the compound which is designed to act as targeted therapy, possessed anticancer activity in the same level as doxorubicin but was far less toxic. The compound was also able to induce cell death through apoptosis mechanism. The results from this research can be used as a prototype of cancer drug development in the future. The process also saved the cost of new drugs development and significantly reduces research time.

Keywords: Targeted therapy, Aeroplysinin-1 derivative, Fluorosalan, Apoptosis

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
Acknowledgement	ข
บทคัดย่อ	ค
Abstract	ง
สารบัญเรื่อง	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ฅ
คำอธิบายสัญลักษณ์	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์	2
สมมติฐานการวิจัย	3
กรอบแนวคิดการวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 วิธีการดำเนินการวิจัย	4
เครื่องมือและอุปกรณ์	5
วิธีดำเนินงานวิจัย	6
การออกแบบและจำลองโครงสร้างยาโดยใช้คอมพิวเตอร์	6
การสังเคราะห์สารอนุพันธ์ 5-chloro-2-hydroxybenzamide	6
การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง	7
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ	8
บทที่ 3 ผลการวิจัย	10
ผลการออกแบบโครงสร้างจากสารต้นแบบ (Lead compound)	10
ผลการทำ Computer-Aided Drug Design	11

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
ผลการสังเคราะห์สาร	12
ผลการตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์	13
การหาจุดหลอมเหลว	13
ผลการตรวจสอบโครงสร้างทางเคมี โดยใช้เทคนิคทาง spectroscopy	14
ผลการตรวจสอบโครงสร้างทางเคมี โดยใช้เทคนิค	
Infrared (IR) spectrometry	14
ผลการตรวจสอบโครงสร้างทางเคมี โดยใช้เทคนิค	
¹ H-Nuclear Magnetic Resonance spectrometry	15
ผลการตรวจสอบโครงสร้างทางเคมี โดยใช้เทคนิค	
¹³ C-Nuclear Magnetic Resonance spectrometry	17
ผลการตรวจสอบโครงสร้างทางเคมี โดยใช้เทคนิค Mass spectrometer	18
ผลการตรวจสอบธาตุอะตอมที่เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างเคมี	
โดยใช้เทคนิค elemental analysis	19
ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการเติบโตของเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ	
(CaSki cells, SiHa cells และ HaCaT cells)	19
อภิปรายผลการทำวิจัย	25
สรุปและเสนอแนะ	27
เอกสารอ้างอิง	28
ประวัติผู้วิจัย	30

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงผลของ conformation ของ IMD-0354 ที่เกิด interaction บริเวณ active site	11
ตารางที่ 2 แสดงผลของ conformation ของ 5-chloro- <i>N</i> -(2-chlorophenyl)-2-hydroxyl benzamide (design 1) ที่เกิด interaction บริเวณ active site	11
ตารางที่ 3 แสดงผลของ conformation ของ 5-chloro-2-hydroxy- <i>N</i> -(3-hydroxyphenyl) Benzamide (design 2) ที่เกิด interaction บริเวณ active site	12
ตารางที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง wavenumber (cm ⁻¹) กับ หมู่ฟังก์ชันทางเคมีของ 3-chloro- <i>N</i> -(2-chlorophenyl)-2 hydroxybenzamide	14
ตารางที่ 5 แสดงค่า chemical shifts และ coupling pattern ของ protons ในโครงสร้างของ 3-chloro- <i>N</i> -(2-chlorophenyl)-2 hydroxybenzamide	16
ตารางที่ 6 แสดงองค์ประกอบของธาตุไนโมเลกุล	19
ตารางที่ 7 แสดงเปอร์เซ็นต์ของเซลล์มะเร็ง CaSki ในระยะต่างๆจากการย้อม nuclear DNA ด้วยวิธี DAPI	20
ตารางที่ 8 แสดงเปอร์เซ็นต์ของเซลล์มะเร็ง SiHa ในระยะต่างๆจากการย้อม nuclear DNA ด้วยวิธี DAPI	20
ตารางที่ 9 แสดงค่า IC ₅₀ (μM) ของ design 1 และ Doxorubicin	24

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงรูป Hemocytometer และตำแหน่งของช่องที่นับเซลล์	8
รูปที่ 2 การพัฒนาโครงสร้างสารโดยใช้ IMD 0354 เป็น lead	10
รูปที่ 3 โครงสร้างสารที่ออกแบบ 5-chloro- <i>N</i> -(2-chlorophenyl)-2-hydroxybenzamide (design 1) และ 5-chloro-2-hydroxy- <i>N</i> -(3-hydroxyphenyl)benzamide (design 2)	10
รูปที่ 4 แสดงแผนผังการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ benzamide	12
รูปที่ 5 แสดงจุดหลอมเหลวของ 5-chloro- <i>N</i> -(2-chlorophenyl)-2-hydroxybenzamide ใน DSC graph	13
รูปที่ 6 Infrared spectrum ของสาร 3-chloro- <i>N</i> -(2-chlorophenyl)-2 hydroxybenzamide	14
รูปที่ 7 ¹ H-NMR spectrum (ppm) ของ 3-chloro- <i>N</i> -(2-chlorophenyl)-2 hydroxybenzamide (design 1) ช่วง 0 – 11 ppm ในสารละลาย DMSO- <i>d</i> ₆	15
รูปที่ 8 แสดงจำนวน protons ในโครงสร้างของ 3-chloro- <i>N</i> -(2-chlorophenyl)-2-Hydroxybenzamide	16
รูปที่ 9 แสดงตำแหน่งของ carbons ใน ¹³ C-NMR spectrum (ppm) ของ 3-chloro- <i>N</i> -(2-chlorophenyl)-2-hydroxybenzamide (design 1) ใน DMSO- <i>d</i> ₆ ช่วง 0 - 200 ppm	17
รูปที่ 10 รูปแสดงการแตกหักของ 5-chloro- <i>N</i> -(2-chlorophenyl)-2 hydroxybenzamide ใน mass spectrum	18
รูปที่ 11 แสดงการแตกหักของโครงสร้างใน mass spectrum	18
รูปที่ 12 แสดงลักษณะรูปร่างและการติดสีแบบ bright field และ fluorescence ของ เซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki	21
รูปที่ 13 รูปที่ 13 แสดงลักษณะรูปร่างและการติดสีแบบ bright field และ fluorescence ของ เซลล์มะเร็งปากมดลูก SiHa	22
รูปที่ 14 แสดงความสัมพัทธ์ของสาร design 1 (a) ที่ความเข้มข้นต่างๆกับจำนวน SiHa cells, CaSki cells และ HaCaT cells ที่ยังมีชีวิต เทียบกับ doxorubicin (b)	23

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย

(Lists of Abbreviations)

IKK β	= inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta
NF-KB	= Nuclear Transcription factor kappa-B
4KIK	= Human I κ B kinase beta
K-252A	= (9S-(9 α ,10 β ,12 α))-2,3,9,10,11,12-hexahydro-10-hydroxy-10-(methoxycarbonyl)-9-methyl-9,12-epoxy-1H-diindolo [1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pyrrolo[3,4-i][1,6]benzodiazocin-1-one
IR	= Infrared
NMR	= Nuclear Magnetic resonance
TMS	= Tetramethylsilane
DSC	= Differential Scanning Calorimetry
CaSki	= human cervical cancer cell lines
SiHa	= human cervical cancer cell lines
HaCaT	= human keratinocyte cell lines
MTT	= (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

บทนำ (Introduction)

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

มะเร็งเป็นโรคสำคัญที่ก่อให้เกิดปัญหาแก่สาธารณสุขของประชาชนในหลายประเทศ แม้จะมีการพัฒนาความก้าวหน้าทางการแพทย์และเทคโนโลยีแล้ว (1-4) จากข้อมูลขององค์การอนามัยโลก (WHO) พบว่ามีอุบัติการณ์ของประชากรที่เกิดโรคมะเร็งนี้ประมาณ 6 ล้านคนต่อปี และในปี ค.ศ. 2012 มีอุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งสูงถึง 14 ล้านคนและมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆในอนาคต (3-6) ในปี ค.ศ. 2015 โรคมะเร็งยังเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตของประชากรทั่วโลกถึง 8.8 ล้าน คิดเป็น 14.6% ของผู้เสียชีวิตทั้งหมด (7-8)

ปัจจุบันได้มีการพัฒนายาที่ใช้รักษามะเร็งกลุ่มใหม่ที่มุ่งเน้นไปที่การรักษาแบบจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็ง (Targeted Therapy) ซึ่งเป็นการรักษาด้วยการกำหนดเป้าหมายให้ยาออกฤทธิ์จำเพาะเจาะจงและยับยั้ง genes หรือ proteins ในกระบวนการส่งสัญญาณระดับเซลล์ที่เป็นต้นเหตุของการเจริญเติบโตและแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง ยากลุ่มใหม่นี้ตัวยาจะมีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งมากขึ้น และเป็นอันตรายต่อเซลล์ปกติน้อยลง ทำให้ผลข้างเคียงจากยาที่เกิดจากการไปทำลายเซลล์ปกติของร่างกายส่วนอื่นๆลดลง ดังนั้นผลข้างเคียงจะเกิดขึ้นน้อยกว่าการให้เคมีบำบัด (9-14) แต่ปัญหาหลักของการใช้รักษามะเร็งกลุ่มใหม่นี้คือ ในเซลล์มะเร็งบางชนิดไม่มี genes หรือ proteins ที่เป็นเป้าหมายของยา การที่ยายังมีราคาค่อนข้างแพง และต้องใช้ยากกลุ่มนี้ร่วมกับยาเคมีหรือการรักษาวิธีอื่นในการรักษามะเร็งหลายชนิด (10-15)

จากปัญหาข้างต้นดังกล่าวมาจะเห็นได้ว่ายังคงมีความจำเป็นในการพัฒนารักษา มะเร็งที่มีประสิทธิภาพจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็ง โดยที่ตัวยามีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติน้อย และมีความปลอดภัยต่อผู้ใช้มากขึ้นรวมทั้งราคาไม่แพงเกินไป ด้วยเหตุนี้ ผู้วิจัยจึงได้มุ่งทำการวิจัย โดยการพัฒนาารักษามะเร็งแบบมุ่งเป้าที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็ง เพื่อให้ได้ยาที่มี ประสิทธิภาพสูง มีความปลอดภัย และมีราคาถูก โดยหวังว่ายาที่พัฒนาขึ้นมาจะช่วยลดปัญหา ข้างต้นดังกล่าวไม่มากนักน้อย

อะพอพโทซิส (อังกฤษ: Apoptosis) เป็นรูปแบบหนึ่งของการตายของเซลล์แบบที่มีการโปรแกรมไว้แล้ว (programmed cell death) ของสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับชุดของ ปฏิกริยาทางชีวเคมีซึ่งทำให้เซลล์ตายอย่างมีลักษณะที่เฉพาะ หรือกล่าวอย่างจำเพาะคือเป็นชุด ของปฏิกริยาทางชีวเคมีที่ทำให้เซลล์มีสัญญาณวิทยาเปลี่ยนแปลงหลายรูปแบบ เช่น การบวมของ เซลล์ (blebbing) , การเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์เช่นการเหี่ยวของเซลล์, นิวเคลียสแตกเป็น ชิ้นส่วน, โครมาตินหนาตัวขึ้น, และดีเอ็นเอแตกเป็นท่อน กระบวนการกำจัดเศษซากเซลล์ก็จะไม่

ทำให้เกิดการกระตุ้นให้เนื้อเยื่อข้างเคียงเกิดความเสียหายซึ่งต่างจากการตายแบบการตายเฉพาะส่วนหรือเนโครซิส (necrosis)

จากการศึกษาค้นคว้าสารธรรมชาติทางทะเลที่ค้นพบฤทธิ์ต่างๆ พบว่า aeroplysinin-1 เป็นสารธรรมชาติทางทะเลที่ได้จากฟองน้ำทะเล *Aplisina aerophoba* มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีวะวิทยา เป็นต้น และมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของ aeroplysinin-1 และอนุพันธ์ว่าออกฤทธิ์แบบจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็งผ่านกลไกของ NF- κ B pathway (16-22)

ด้วยเหตุนี้ ผู้วิจัยจึงได้นำสาร Aeroplysinin-1 มาเป็น Lead ในการพัฒนาด้วยกระบวนการออกแบบด้วยคอมพิวเตอร์ (computer-aided drug design) และสังเคราะห์สารที่ออกแบบใหม่และนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในเซลล์มะเร็งปากมดลูก จากนั้น ทำการศึกษาดูกลไกการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตาย (apoptosis) ของสารใหม่

ซึ่งผลจากการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ในการพัฒนายาต้านมะเร็งแบบมุ่งเป้าที่ออกฤทธิ์จำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติ ช่วยลดผลข้างเคียงของยาและมีความปลอดภัยต่อผู้ป่วยที่ให้อารักษามะเร็งในอนาคต

วัตถุประสงค์

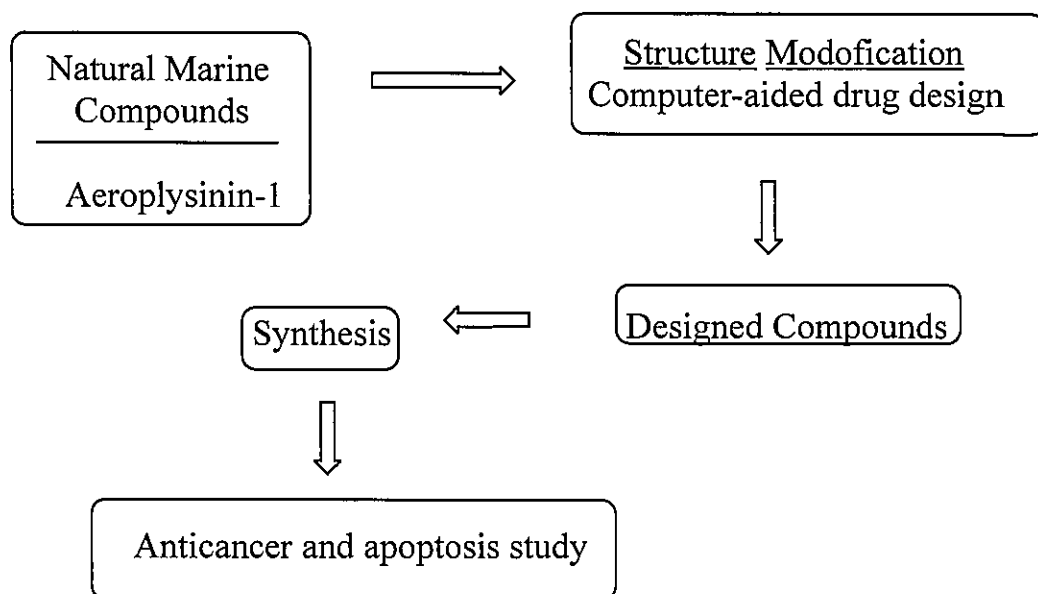
เพื่อสังเคราะห์ ทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสารอนุพันธ์ aeroplysinin-1 ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก และศึกษากลไกการตายแบบอะพอโทซิส

ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

1. ทฤษฎี สมมุติฐาน

สารที่ออกแบบและสังเคราะห์ได้จะมีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

2. กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย



โดยการนำเอาโครงสร้างของ aeropylsinin-1 มาเป็นสารต้นแบบ (lead compound) ในการพัฒนาโครงสร้าง ทำการสังเคราะห์และพิสูจน์โครงสร้างสารที่ออกแบบใหม่นี้ จากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสารที่สังเคราะห์ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก และศึกษากลไกการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตาย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น ด้านวิชาการ ด้านนโยบาย ด้านเศรษฐกิจ/พาณิชย์ ด้านสังคมและชุมชน รวมถึงการเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ได้เสนอแนวทางใหม่ในการพัฒนาสารด้วยกระบวนการทางคอมพิวเตอร์ช่วยในการออกแบบ
2. ได้พัฒนาโครงสร้างสารจาก aeropylsinin-1 เพื่อพัฒนาเป็นสารต้นแบบของยาที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง
3. เพื่อพัฒนาสารที่สามารถออกฤทธิ์แบบจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็ง (targeted therapy)
4. เพื่อลดขั้นตอนการสังเคราะห์ ระยะเวลา ต้นทุน และ ค่าใช้จ่าย ในการพัฒนายาใหม่ให้เข้าสู่ขั้นตอนทางคลินิกได้เร็วขึ้น
5. สามารถนำองค์ความรู้ใหม่ๆ ไปประยุกต์ใช้ในด้านการศึกษาและด้านเทคโนโลยีชีวภาพได้
6. สามารถตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานวิจัยลงในวารสารวิชาการระดับชาติหรือนานาชาติในฐานข้อมูล TCI หรือ SJR หรือ ICI

การนำไปใช้ประโยชน์

ด้านการศึกษา วิจัย การแพทย์และสาธารณสุข และด้านสังคมและชุมชน

ผู้ที่นำประโยชน์ไปใช้

ผู้ใช้	การใช้ประโยชน์
หน่วยงานการศึกษาทั้งภาครัฐและเอกชน	สามารถนำความรู้มาใช้ทางด้านการเรียนการสอนและพัฒนาการใช้ประโยชน์จากฐานข้อมูลทรัพยากรในเชิงลึก
หน่วยงานวิจัยทั้งภาครัฐและเอกชน	ได้รับความรู้และวิทยาการใหม่ในการพัฒนาและนำข้อมูลไปใช้ในทางลึก
หน่วยงานสาธารณสุขด้านการแพทย์ ผู้ป่วยมะเร็ง	- ได้ยาใหม่ที่มีประสิทธิภาพดี มีผลในการรักษาสูง มีความปลอดภัย สามารถรักษาโรคได้อย่างเห็นผล - ลดต้นทุนในการนำเข้ายา และลดค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาผู้ป่วยมะเร็ง

วิธีการดำเนินการวิจัย (Materials and Methods)

1. เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย

1.1. คอมพิวเตอร์

Notebook PC, Processor Core(TM) i5-3210 M CPU @2.50GHz with 4 GB of RAM,
Microsoft Windows 7 Ultimate

Notebook PC, Processor Core(TM) i5-5200U CPU @2.20 GHz with 4 GB of RAM,
Microsoft Windows 10

1.2. โปรแกรม

AutoDock 4.0

Cygwin64

ChemDraw Ultra 12.0

Chem3D Ultra 12.0

1.3. เครื่องมือและอุปกรณ์

Glass chromatography column (Sigma-Aldrich, USA)

Magnetic bar (Fisher Scientific, USA)

Magnetic stirrer (Fisher Scientific, USA)

TLC tank (Fisher Scientific, USA)

TLC plates (Merck, Germany)

Nitrogen gas

UV lamp (254/365nm 6-Watt 230V 50Hz 0.12Amps, Cambridge, UK)

Rotary evaporator (254/365nm, Buchi Thailand Ltd.)

Fourier-Transform Infrared spectroscopy (Thermo Spectra-Tech, P/N 700-0085,
Ver3.9 10/01, Shelton, USA and APW1200202, Becthai Thailand)

Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer, 400 MHz (Bruker, Germany)

Mass Spectrometer (Bruker, Germany)

Analytical balance (Sartorius, Switzerland)

Centrifuge (Thermo Fisher, USA)

Inverted microscope (Olympus CKX41, USA)

Biohazardous Hood Type 2A (Telstar, Spain)

Humidified incubator 37 °C, 5% CO₂ (Mitre 4000 Serie, Contherm[®], NZ)
Vortex (vertex-2 genie, Scientific Industries, USA)
Water bath 37°C (WiseBath™, Korea)
Pipette gun (Biohit Midi Plus, SARTORIUS)
Serological pipette, 5ml, 10 ml (SPL Life Sciences, Korea)
Auto Pipette, 1000 µl, 200 µl, 10 µl, 2 µl (RAININ)
Well slide chamber (SPL Life Sciences, Korea)
Multichannel Pipettes (Research Plus, Eppendorf[®], USA)
Reagent Reservoir (SPL Life Sciences, Korea)
Plastic ware (Glasslock, USA)
25 cm², 75 cm² Cell culture flask (SPL Life Sciences, Korea)
96 well plate (SPL Life Sciences, Korea)
Surfactant-free cellulose acetate syringe filter 0.2 µM (Minisart[®], Sartorius, Germany)
Microplate reader (Versa Max, USA)
High speed refrigerated micro centrifuge (MX-307 Tomy Koky, JAPAN)
Hemocytrometer, cover slide (Boeco, Germany)
Autoclave (Systec, Germany)
Electrophoresis power supply (Fisher Scientific, USA)
Eppendorf BioSpectrometer[®] basic spectrophotometer (Eppendorf[®], Germany)
Heat box (Thermo Fisher, USA)
Microcentrifuge tube 1.5 ml (Thermo Fisher[®], USA)
Parafilm M film (Sigma-Aldrich, USA)
UV Gel documentation system (Bio rad, USA)
Horizontal gel tray (Fisher Scientific, USA)

1.2 สารเคมี

5-Bromo salicylic acid (Sigma-Aldrich, USA)
3-(Trifluoromethyl) aniline (Sigma-Aldrich, USA)
Sodium sulphate anhydrous crystal (Carlo Erba, Italy)
Sodium chloride (Carlo Erba, Italy)

Sodium bicarbonate (Ajax, USA)
Methanol (Avanter Performance Materials, USA)
Ethyl acetate (Ajax, USA)
Hexane (Avanter Performance Materials, USA)
Silica gel 1.07734.2500 (Merck, Germany)
Dichloromethane (Labscan, USA)
Dimethyl sulfoxide *d*₆ (Sigma-Aldrich, USA)
Chloroform-*d* (Sigma-Aldrich, USA)
Deuteriated water, D₂O (Sigma-Aldrich, USA)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco[®], USA)
Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco[®], USA)
Penicillin Streptomycin (Gibco[®], USA)
HEPES, free acid (Hyclone[™], USA)
Sodium pyruvate 100 mM solution (Hyclone[™], USA)
10 X Phosphate Buffered saline pH 7.4 (PBS) (Vivantis Inc. USA)
0.25% Trypsin-EDTA (Invitrogen, U.S.A)
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (invitrogen[™])
70% Ethanol (Fluka, Germany)
Dimethyl sulphoxide (DMSO) for MTT assay (Carlo Erba, France)
Dimethyl sulphoxide (DMSO) Ultra pure (VivantisInc, USA)
Trypan Blue Stain 0.4% (Gibco[™], USA)
Cell culture freezing medium (Gibco[®], USA)
5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide
(JC-1) (Invitrogen, USA)
2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA) (Life Technologies, USA)
2.5% Glutaraldehyde (Sigma-Aldrich, USA)
Ribonuclease A (VivantisInc,USA)
4', 6-daimidino-2-phenylindole (DAPI) (AppliChem, USA)
Propidium Iodide [1mg/mL] (Invitrogen, USA)
Glycerol (Sigma-Aldrich, USA)

Blood and cell culture DNA mini kit (Qiagen, Germany)
Agarose powder (VWR Life Science, USA)
SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen, USA)
1X Tris/Borate/EDTA buffer (TBE buffer) (Thermo Fisher[®], USA)
6X DNA Loading dye (Fermentas[®], USA)
GeneRuler 1Kb DNA ladder (Fermentas, USA)
Isopropanol (Fluka, Germany)
TE buffer (Sigma-Aldrich, USA)

2. วิธีดำเนินงานวิจัย

2.1 การเตรียมโครงสร้างในโปรแกรมคอมพิวเตอร์

2.1.1 การเตรียมและคัดเลือกโครงสร้างชีวโมเลกุลเป้าหมาย คือ เอนไซม์ IKK kinase β (IKK β) โดยการเลือกและนำโครงสร้าง 3 มิติ ของ targeted molecule คือ enzyme IKK β จากฐานข้อมูล (4KIK, Human Ikb kinase beta, <http://www.rcsb.org/pdb/>) ที่จับกับ ligand ที่อยู่ในฐานข้อมูลในรูปแบบ .pdb file มาเตรียมเป็น .pdbqt file เพื่อใช้ในการ docking

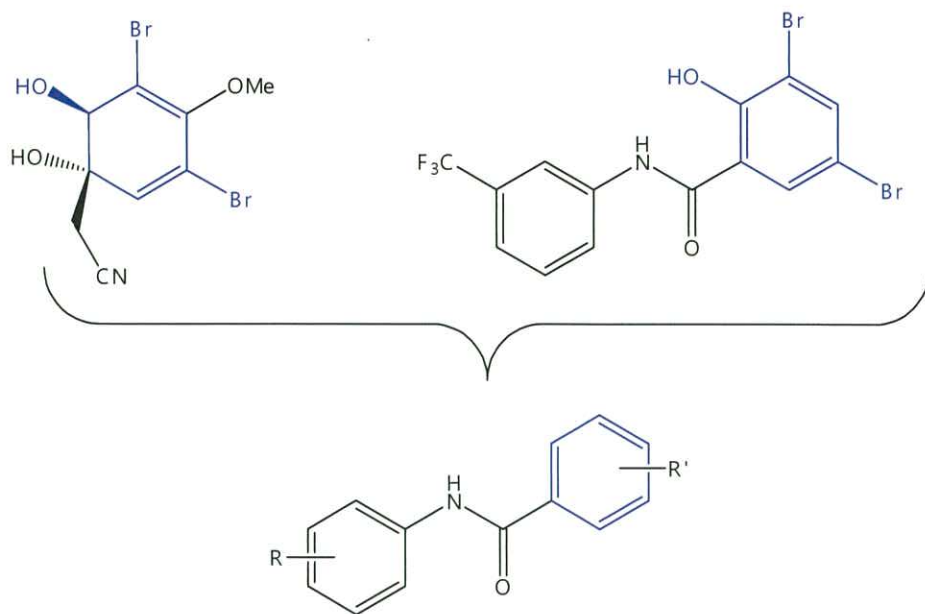
2.1.2 เตรียม ligand ที่จะใช้ในการ docking

a. เตรียมโครงสร้าง 2 มิติ และ 3 มิติ ของสารที่ออกแบบด้วยโปรแกรม Chem 3D ทำการ minimize energy ด้วย MM2 บันทึกเป็นไฟล์ Protein dat bank (.pdb)

b. นำโครงสร้าง ligand ที่เตรียมไว้จาก a. มาใช้ในโปรแกรม Autodock 4.0 เพื่อทำการ docking และหาค่าความแรงในการจับกับเอนไซม์ IKK β และรายงานผลเป็นค่า binding energy (ประกอบด้วย intermolecular energy และ torsional energy) และ docking energy (ประกอบด้วย intermolecular energy และ internal energy) โดยรายงาน conformation ที่มี binding energy และ docking energy เป็นลบมากที่สุด

2.2 การออกแบบสารใหม่

โดยการใช้โครงสร้างของอนุพันธ์ aeropylsinin-1 และ fluorosalan มาเป็นสารต้นแบบ (lead compounds) ในการออกแบบ โดยสารที่ออกแบบใหม่นี้ จัดเป็นสารในกลุ่ม amide

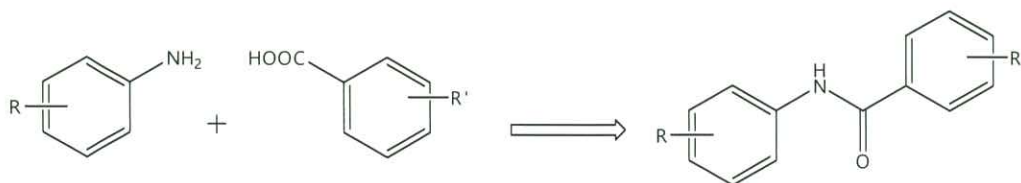


รูปที่ 1 แนวทางการออกแบบสารใหม่จาก Aeropylsinin-1 และ Fluorosalan

จากนั้น นำโครงสร้างสารใหม่ที่ได้ออกแบบนี้ ไปทำตามขั้นตอน 2.1

2.3. การสังเคราะห์สารที่ได้รับการคัดเลือก

จะใช้ปฏิกิริยาเคมี คือ amidation จากสารตั้งต้น คือ amines และ carboxylic acids ได้เป็นอนุพันธ์ amides ของสารที่ได้ออกแบบไว้ ปฏิกิริยาแสดงดังรูปข้างล่าง



รูปที่ 2 Amidation reaction ระหว่าง amine และ carboxylic acid

การสังเคราะห์สาร

1. ชั่งสารอนุพันธ์ carboxylic acid จำนวน 5.14 mmol ใส่ใน round bottom flask ขนาด 100 mL
2. เติม toluene 15 mL ลงใน flask จากนั้นทำให้อุณหภูมิลดลงจนถึง 0 °C

3. เติม oxalyl chloride (0.64 mL, 7.20 mmol) ตามด้วย dimethylformamide 2-3 หยด ปล่อยให้สารละลายผสมนี้ทำปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 0 °C นาน 20 นาที
4. จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิจนสารละลายถึงจุดเดือด และทำปฏิกิริยาแบบ reflux อีก 1.5 ชั่วโมงภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน
5. ระบายเอาตัวทำละลายออกแล้ว แล้วเติม dichloromethane 5 mL ลงใน flask ที่มีของแข็งเหลืออยู่
6. เติมสารละลายผสมของ amine (7.71 mmol) และ triethylamine (0.72 mL, 5.14 mmol) ที่ละลายอยู่ใน dichloromethane 10 mL ลงใน flask ปล่อยให้สารละลายทำปฏิกิริยากันภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนข้ามคืนหรือ 24 ชั่วโมง
7. เติม dichloromethane 100 mL ลงในสารละลาย และทำการกำจัดสารปนเปื้อนที่ไม่ต้องการด้วย 1 M NaOH จำนวน 30 mL 1 ครั้ง ตามด้วย น้ำ 100 mL อีก 3 ครั้ง
8. นำชั้น dichloromethane ไปกำจัดน้ำที่เหลือติดอยู่ด้วย anhydrous MgSO₄ จากนั้น ระบายเอา dichloromethane ออกด้วยเครื่อง rotary evaporator

การแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วย column chromatography

นำสารที่ได้จากข้อ 2.5 ไปแยกสิ่งปนเปื้อนที่ค้างค้างและทำให้ได้สารบริสุทธิ์มากขึ้นด้วยวิธีการ column chromatography โดยใช้ hexane : dichloromethane ในอัตราส่วน 4 : 6 เป็น mobile phase หลังจากระบายสารละลายที่รองรับได้จาก column แล้ว นำสารที่เหลืออยู่ใน flask ไปตรวจสอบโครงสร้างในขั้นตอนต่อไป

2.4 การพิสูจน์โครงสร้างของสารที่สังเคราะห์ได้

โดยใช้เครื่องมือทาง spectroscopy ต่างๆ ดังนี้

2.7.1 Infrared Spectroscopy (IR) เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันในโครงสร้างเคมีของสารตั้งต้นเทียบกับสารใหม่

2.7.2 Nuclear Magnetic Resonance (NMR) เพื่อดูจำนวนและตำแหน่งของ protons ในโครงสร้างสารใหม่เทียบกับสารตั้งต้น

2.7.3 Mass Spectrometer (MS) เพื่อหา molecular weight และดูการแตกหักของโครงสร้างสารใหม่ที่สังเคราะห์ได้

2.5 การทดสอบฤทธิ์ด้านการเติบโตของเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT assay

2.5.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์ปกติ (CaSki cells, SiHa cells และ HaCaT cells)

นำเซลล์ CaSki cells, SiHa cells และ HaCaT cells จำนวน 2×10^5 cell/ml มาเลี้ยงใน 75 cm^2 cell culture flask ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM นำไปบ่มในตู้ humidified incubator อุณหภูมิ 37°C ที่มี $5\% \text{ CO}_2$ เป็นเวลา 2-3 วัน จนเซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นประมาณ 10 เท่า และมีจำนวนเซลล์ประมาณ 1×10^6 cells/ml ก่อนนำเซลล์ไป subculture เพื่อใช้ในการทดลองต่อไปได้

การทำ subculture

- ใช้ปิเปตดูดอาหารเก่าออก
- ล้างชั้นเซลล์ด้วย PBS Buffer pH 7.4 ประมาณ 6-8 ml ดูด PBS ออกทิ้ง
- เติม 0.25% Trypsin-EDTA 1 ml
- นำไปบ่มในตู้ humidified incubator อุณหภูมิ 37°C ที่มี $5\% \text{ CO}_2$ ประมาณ 1-2 นาที เพื่อให้เซลล์หลุดออกเป็นเซลล์เดี่ยว จะได้เป็นสารละลายขุ่นๆ
- เติม complete media 9 ml เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ 0.25% Trypsin-EDTA
- ดูดชั้นลงหลายๆครั้งจนสังเกตเห็น Flask เป็นสีใส
- ทำการนับเซลล์แล้วคำนวณปริมาตรเพื่อให้ได้เซลล์เริ่มต้น 1×10^5 cells/ml
- ดูดเซลล์จาก Flask เก่า (ปริมาตรที่คำนวณได้) ออกมาใส่ Flask ใหม่
- เลี้ยงเซลล์เริ่มต้นที่ 1×10^5 cells/ml ด้วย DMEM บ่มในตู้ Incubator ภายใต้อุณหภูมิ 37°C , มี CO_2 5% เป็นเวลา 2-3 วัน

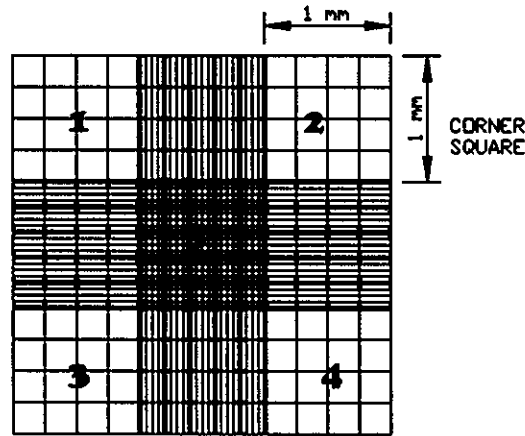
การนับเซลล์

หลังจาก trypsinized จนได้เป็นเซลล์เดี่ยวแล้ว เซลล์ที่จะนำไปใช้ในการทดลองต้องเป็นเซลล์มีชีวิต $> 98\%$ ซึ่งจะทำการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell count) ด้วยสี trypan blue มีรายละเอียดดังนี้ นำเซลล์ดังกล่าวมา $10 \mu\text{l}$ หยดลงบนแผ่นพาราฟิล์ม ผสมกับสี 0.4% trypan blue $10 \mu\text{l}$ ใช้ autopipette ดูดชั้นลงผสมให้เข้ากัน ดูดเซลล์ที่ย้อมสีแล้วมาหยดลงบน hemocytometer ที่มี cover slide ปิดอยู่ นำไปนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตภายใต้กล้อง Inverted microscope โดยนับเซลล์ที่มีชีวิตในช่อง 5 ช่อง คือ ช่องบนซ้าย ล่างซ้าย บนขวา ล่างขวา และช่องตรงกลาง ดังรูปที่ 3 โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะไม่ติดสีน้ำเงินของ trypan blue เนื่องจากสีมีประจุเป็น

ลบ ไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ที่มีชีวิตเข้าไปได้ ส่วนเซลล์ที่ไม่มีชีวิตจะติดสีน้ำเงิน
จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต สามารถคำนวณได้จากสูตรดังนี้

$$\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (cells/ml)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้} \times \text{dilution factor} \times 10^4}{\text{จำนวนช่องที่นับ}}$$

(dilution factor = 2, นับ hemocytometer 5 ช่อง)



รูปที่ 3 แสดงรูป Hemocytometer และตำแหน่งของช่องที่นับเซลล์

2.6 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกและเซลล์ปกติ (Cytotoxicity assay) ขั้นตอนการเตรียมเซลล์

เตรียมเซลล์เริ่มต้นที่ความเข้มข้น 2×10^5 cells/ml ลงใน 96 well plate ในปริมาตร 100 μ l/well แล้วบ่มในตู้ humidified incubator อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO_2 นาน 24 ชั่วโมง นำเซลล์มาทดสอบกับสาร A1B4 ที่ความเข้มข้น 0 - 500 μM เปรียบเทียบกับ Doxorubicin (DOX) (Positive control) ที่ความเข้มข้น 0 - 25 μM นาน 48 ชั่วโมง

ขั้นตอนการวิเคราะห์เซลล์มีชีวิตด้วยเทคนิค MTT assay

เลี้ยงเซลล์ใน 96 well plate ไปปั่นตกด้วยเครื่อง High speed refrigerated micro centrifuge ที่ 5000 rpm 5 นาที เทส่วน supernatant ทิ้ง ให้เหลือแต่ส่วน pellet เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM (non-Phenol red) ลงไป 100 μL /well หยดสาร MTT ที่มีความเข้มข้น 5 g/L, 10 μL /well ลงใน 96 well plate นำไปบ่มในตู้ humidified incubator อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO_2 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นตกด้วยเครื่อง high speed refrigerated micro centrifuge ที่ 5000 rpm

5 นาที เทส่วน supernatant ทิ้ง ให้เหลือแต่ส่วน pellet ละลายตะกอนด้วย DMSO ปริมาตร 80 $\mu\text{L}/\text{well}$ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ช่วงคลื่น 570 nm และแปลผลด้วยโปรแกรม SoftMax Pro 6.3 จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหา % cell viability โดยใช้สูตรดังนี้

$$\% \text{ cell viability} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของ sample} \times 100}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของ control}}$$

2.7 การศึกษาการตายของเซลล์ (apoptosis)

2.7.1 ศึกษาลักษณะทาง morphology ของ DNA โดย DAPI staining

เตรียมเซลล์เริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1×10^5 cells/ml ใน 8 well slide chamber ปริมาตร 500 $\mu\text{L}/\text{well}$ แล้วบ่มในตู้ humidified incubator อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO_2 นาน 24 ชั่วโมง นำเซลล์มาทดสอบกับสารที่ความเข้มข้น IC50, IC80 และ control นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำ slide ซึ่งมีเซลล์เกาะมา ย้อมสี fluorescence ทำการ fix เซลล์ใน 8 well slide chamber ด้วย 2.5% glutaraldehyde pH 7.4 ปริมาตร 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ นาน 1 ชั่วโมง on ice ดูดทิ้งแล้วล้างด้วย PBS 1 ครั้ง จากนั้นทำลาย RNA ด้วย 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNaseA ปริมาตร 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ พร้อมด้วย DAPI [5 $\mu\text{g}/\text{ml}$] 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ ปกป้องด้วยอุณหภูมิ 25°C ในที่มืด นาน 10 นาที แล้วดูดออก ล้างด้วย PBS 2 ครั้ง หยด mounting solution (1:9 ; PBS : Glycerol) และ ปิดด้วย cover slip จากนั้นปิดขอบด้วยน้ำยาทาเล็บ แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย fluorescent microscopy กำลังขยาย 100 เท่า โดย DAPI มี excitation/emission ที่ 358/461 nm บันทึกภาพแบบสุ่ม 3 ตำแหน่งต่อ 1 slide และในแต่ละตำแหน่งแสดงภาพ 2 แบบ คือ bright field และ DAPI การวิเคราะห์ข้อมูล โดยนับเซลล์จำนวน 200 เซลล์ แบบสุ่ม เพื่อนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์เซลล์ โดยเซลล์มีชีวิตจะพบนิวเคลียสติดสีฟ้าเนียน ขณะที่เซลล์ตายจะพบนิวเคลียสติดสีฟ้าไม่เรียบเนียน แต่เป็นหย่อม ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง

2.7.2 ศึกษาวัฏจักรเซลล์ (cell cycle) โดย PI-staining

เตรียมเซลล์เริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1×10^5 cells/ml โดยเลี้ยงใน 12 well plate ปริมาตร 1000 $\mu\text{L}/\text{well}$ แล้วบ่มในตู้ humidified incubator อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO_2 นาน 24 ชั่วโมง นำเซลล์มาทดสอบกับสารที่ความเข้มข้น IC50, IC80 และ control นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS 1 ครั้ง ใส่ 0.25% Trypsin-EDTA 500 μL . เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำเซลล์ใส่ลงใน Eppendorf บั่นตกตะกอนที่ 3000 rpm 5 นาที ทิ้ง Supernatant และเติม PBS 300 μL และ

absolute ethanol 700 μ l. บ่มที่อุณหภูมิ -4°C ในที่มีมืด 30 นาที ล้างด้วย PBS 1 ครั้ง เติม 50 $\mu\text{g/ml}$ PI + 50 $\mu\text{g/ml}$ RNase A บ่มที่ 25°C ในที่มีมืด 30 นาที นำไปวิเคราะห์ด้วย Flow Cytometry

2.7.3 วัดระดับ ROS (อนุมูลอิสระ) ภายในเซลล์โดย DCFH-DA staining

การวิเคราะห์ด้วย Flow cytometry

เตรียมเซลล์เริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1×10^5 cells/ml โดยเลี้ยงใน 12 well plate ปริมาตร 1000 $\mu\text{l/well}$ แล้วบ่มในตู้ humidified incubator อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO_2 นาน 24 ชั่วโมง นำเซลล์มาทดสอบกับสารที่ความเข้มข้น IC_{50} , IC_{80} และ control นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS 1 ครั้ง ใส่ 0.25% Trypsin-EDTA 500 μl . เติมหอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อหยุดปฏิกิริยา 500 μl ดูดเซลล์ใส่ลงใน eppendorf ปั่นตกตะกอนที่ 3000 rpm 2 นาที ทิ้ง supernatant และเติม PBS 1 ml + DCFH-DA (5 μM) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที ปั่นตกตะกอนที่ 3000 rpm 30 วินาที และเติม PBS 500 μl จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย flow cytometry

การวิเคราะห์ด้วย Fluorescent microscopy

เตรียมเซลล์เริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1×10^5 cells/ml โดยเลี้ยงใน 8 well slide chamber ปริมาตร 500 $\mu\text{l/well}$ แล้วบ่มเซลล์ในตู้ humidified incubator อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO_2 นาน 24 ชั่วโมง นำเซลล์มาทดสอบกับสาร A1B4 และ doxorubicin ที่ความเข้มข้น IC_{50} , IC_{80} และ control นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำ slide ซึ่งมีเซลล์เกาะอยู่มาย้อมสี DCFH-DA (5 μM) นาน 30 นาที ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง หยด PBS และปิดด้วย cover slip จากนั้นปิดขอบด้วยน้ำยาทาเล็บแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย fluorescence microscopy กำลังขยาย 40 เท่า โดย DCFH-DA มี excitation/emission ที่ 504/529 nm ทำการบันทึกภาพแบบส้อม 5 ตำแหน่ง ต่อ 1 slide และในแต่ละตำแหน่งแสดงภาพ 2 แบบ คือ Bright field และ DCF

2.7.4 วัดความต่างศักย์ที่เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียด้วย โดย JC-1 staining

การ วิเคราะห์ด้วย Flow cytometry

เตรียมเซลล์เริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1×10^5 cells/ml โดยเลี้ยงใน 12 well plate ปริมาตร 1000 $\mu\text{l/well}$ แล้วบ่มในตู้ humidified incubator อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO_2 นาน 24 ชั่วโมง นำเซลล์มาทดสอบกับสารที่ความเข้มข้น IC_{50} , IC_{80} และ control นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS 1 ครั้ง ใส่ 0.25% Trypsin-EDTA 500 μl . เติมหอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อหยุดปฏิกิริยา 500 μl ดูดเซลล์ใส่ลงใน eppendorf ปั่นตกตะกอนที่ 3000 rpm 2 นาที ทิ้ง supernatant และเติม PBS 1 ml + JC-1 (5 μM) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที ปั่นตกตะกอนที่ 3000 rpm 30 วินาที และเติม PBS 500 μl จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย flow cytometry

การวิเคราะห์ด้วย Fluorescent microscopy

เตรียมเซลล์เริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1×10^5 cells/ml โดยเลี้ยงใน 8 well slide chamber ปริมาตร 500 $\mu\text{l/well}$ แล้วบ่มเซลล์ในตู้ humidified incubator อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO_2 นาน

24 ชั่วโมง นำเซลล์มาทดสอบกับสาร A1B4 และ doxorubicin ที่ความเข้มข้น IC_{50} , IC_{80} และ control นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำ slide ซึ่งมีเซลล์เกาะอยู่มาล้างด้วย JC-1 (5 μ M) นาน 30 นาที ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง หยอด PBS และปิดด้วย cover slip จากนั้นปิดขอบด้วยน้ำยาทาเล็บแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย fluorescence confocal microscopy ทำการบันทึกภาพ แบบสุ่ม 5 ตำแหน่งต่อ 1 slide และในแต่ละตำแหน่งแสดงภาพ 2 แบบ คือ JC-aggregates, JC-monomers

2.7.5 วัด caspase 3 activity โดย FITC Rabbit Anti-Active Caspase-3

เตรียมเซลล์เริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1×10^5 cells/ml โดยเลี้ยงใน 12 well plate ปริมาตร 1000 μ l/well แล้วบ่มในตู้ humidified incubator อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO₂ นาน 24 ชั่วโมง นำเซลล์มาทดสอบกับสารที่ความเข้มข้น IC_{50} , IC_{80} และ control นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS 1 ครั้ง ใส่ 0.25% Trypsin-EDTA 500 μ l เติมหอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อหยุดปฏิกิริยา 500 μ l ล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง เติม BD Cytofix/Cytoperm 500 μ l นำไปบ่มในน้ำแข็ง 20 นาที ล้างเซลล์ด้วย BD Perm/Wash 500 μ l 2 ครั้ง เติม FITC Rabbit Anti-Active Caspase-3 บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ล้างด้วย Wash buffer 1000 μ l เติม Wash Buffer 500 μ l นำไปวิเคราะห์ด้วย flow Cytometry

2.8 การแสดงข้อมูลและการวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ($n = 3$) การทดลองความเป็นพิษต่อเซลล์ เขียนกราฟโดยใช้โปรแกรม microcal origin 6.0 แสดงผลเป็นค่า mean \pm standard error of mean (SEM) การเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลสองชุดใช้ unpaired Student's t-test และการเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลมากกว่าสองชุดใช้ one-way ANOVA ตามด้วย Fisher test โดยค่า p value < 0.05 แสดงว่ามีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

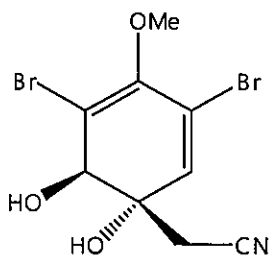
ผลการวิจัย

(Results)

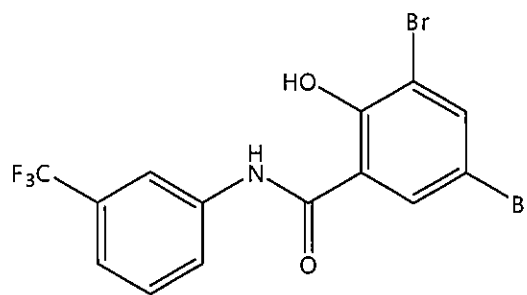
1. การคัดเลือกสารต้นแบบ (Lead Identification)

จากการทบทวนวรรณกรรมเพื่อหาสารธรรมชาติทางทะเลที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พบว่า สารธรรมชาติทางทะเล คือ Aeroplysinin-1 ได้มีรายงานการพัฒนาโครงสร้างและฤทธิ์ต้านมะเร็ง ซึ่งเกิดผ่านกระบวนการส่งสัญญาณเข้าเซลล์ (cell signaling pathway) และผ่าน IKK kinase beta (IKK- β) enzyme โดย IKK- β enzyme นี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ถ้า IKK- β enzyme ถูกรบกวนหรือถูกยับยั้งการทำงานจะส่งผลให้เซลล์มะเร็งหยุดการเจริญเติบโตไปด้วย ดังนั้น งานวิจัยนี้ จึงได้เลือก IKK- β enzyme ซึ่งมีข้อมูลของโครงสร้างอยู่ในฐานข้อมูลที่เป็น protein databank นี้ มาเป็นเป้าหมายของการออกแบบยา

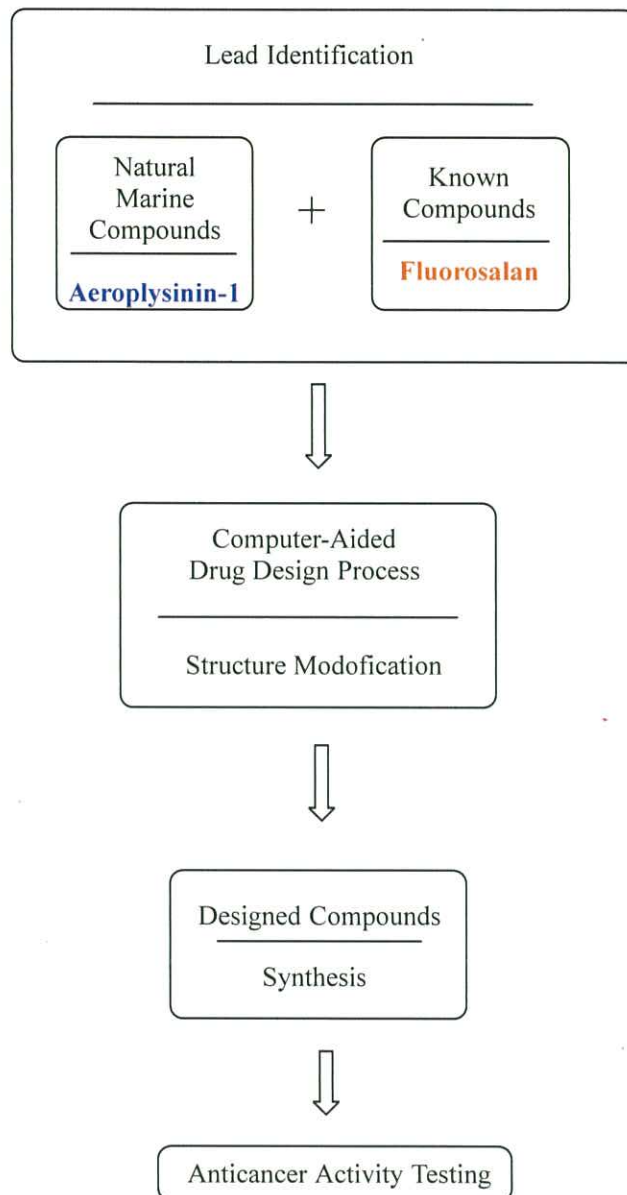
นอกจากนี้ ผู้วิจัยค้นพบความเชื่อมโยงของโครงสร้างสารที่มีรายงานว่าสามารถยับยั้ง IKK- β enzyme เช่นเดียวกัน คือ Fluorosalan จึงได้นำสารนี้ มาเป็น lead ของการออกแบบยา ร่วมกับสาร aeroplysinin-1 ดังรูปที่ 4



Aeroplysinin-1



Fluorosalan



รูปที่ 4 กรอบแนวคิดที่แสดงถึงขอบเขตงานวิจัยที่ปรับเปลี่ยน

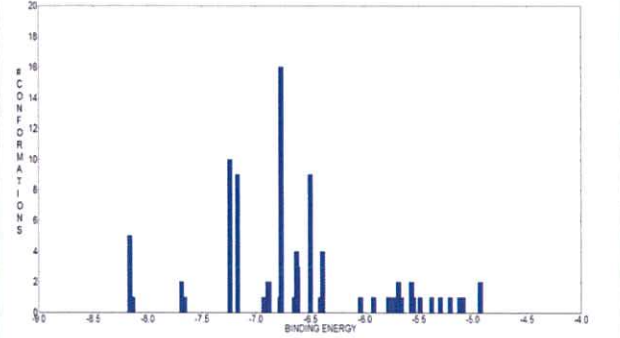
2. Computer-Aided Drug Design

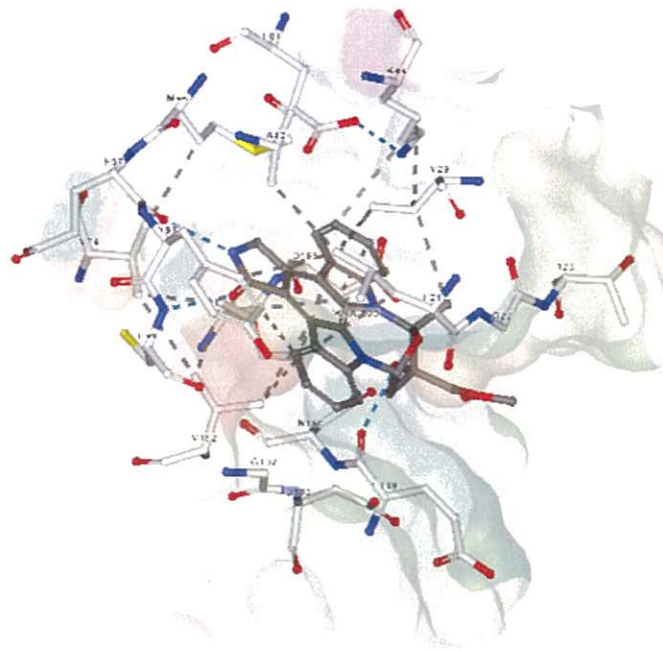
2.1 Validation of Target Molecule

การใช้ targeted molecule จากฐานข้อมูล protein data bank โดยเฉพาะในลักษณะ ligand-enzyme complex จะทำการตรวจสอบความถูกต้องเพื่อดูความคงตัวของ enzyme และความจำเพาะเจาะจงของ ligand ในการจับกับ enzyme ในที่นี้ จะใช้ ligand ในการทำ validate คือคือ K_25A โดยยอมรับค่า RMSD < 2Å° และจากการทำ validate ของ IKK-β รหัส 4KIK ได้กลุ่ม cluster สูงสุดมีจำนวนสมาชิก 16% และพบว่าโครงสร้าง 3 มิติของสมาชิกใน cluster สูงสุดที่ได้จากการ docking แตกต่างจากโครงสร้าง 3 มิติของ ligand ที่อยู่ในผลึก (Crystal pose) โดย

มีค่า RMSD เท่ากับ 0.43 (ตารางที่ 1) ผู้วิจัยจึงเลือกใช้โครงสร้าง enzyme IKK kinase beta จากผลึกรหัส 4KIK เป็นต้นแบบในการออกแบบสารด้วยคอมพิวเตอร์

ตารางที่ 1 การ Validate เอนไซม์ IKK kinase beta (IKK- β)

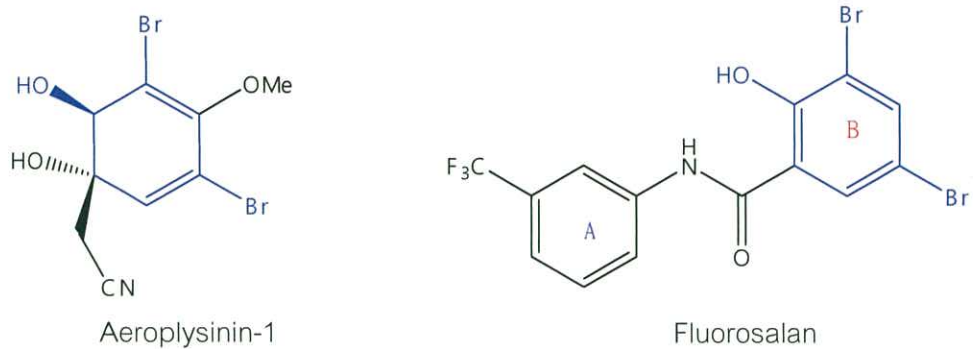
PDB Code	Cluster	Binding Energy (Kcal/mol)	% สมาชิกใน cluster สูงสุด	RMSD (A°)
4KIK		-6.77	16	0.43



รูปที่ 5 แสดงการจับกันของ K-252A กับ 4KIK enzyme แบบ 3 มิติ

2.2 Design of Target Compound

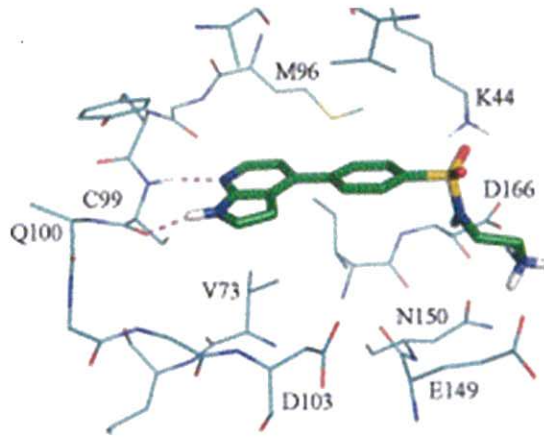
จากโครงสร้างของ lead compounds ที่มีความเหมือนกัน ดังรูปข้างล่างนี้



รูปที่ 6 แสดงความเหมือนกันของโครงสร้าง (Structure similarity); Fluorosalan และอนุพันธ์ของ Aeroplysinin-1

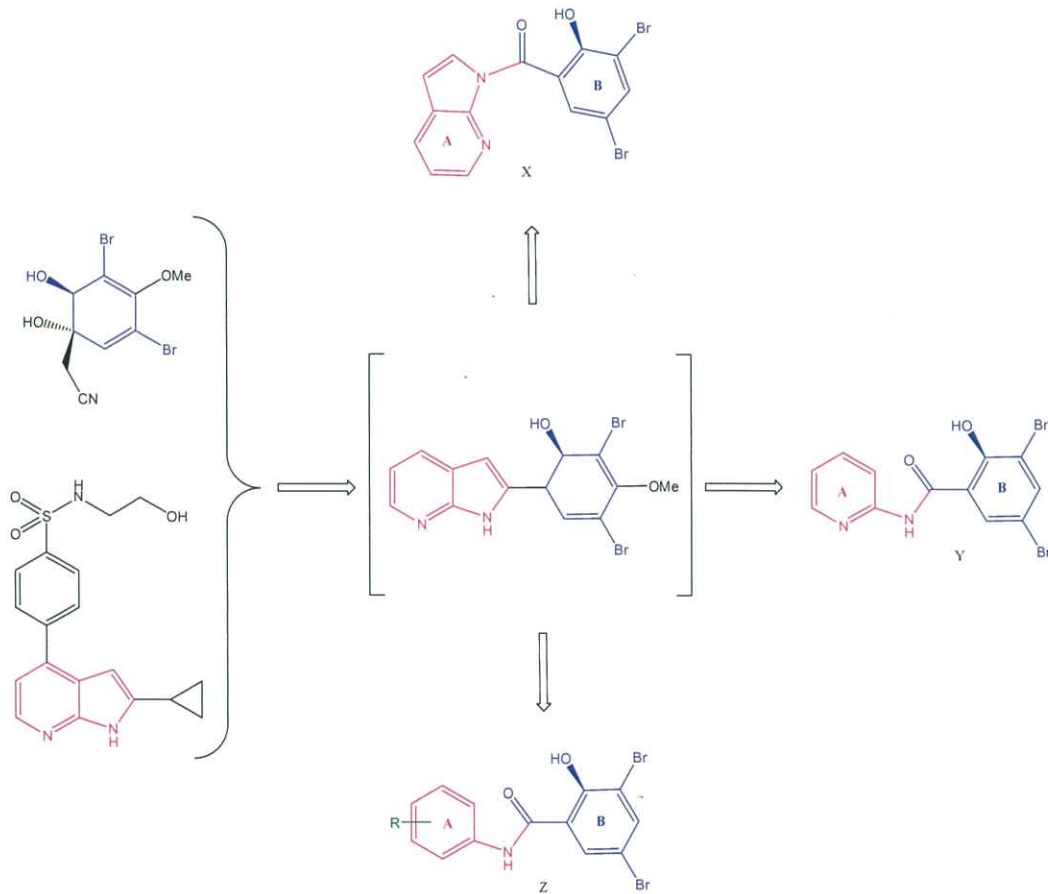
จะเห็นว่า โครงสร้างของ Aeroplysinin-1 จะมีส่วนที่เหมือนกับโครงสร้างส่วนของ ring B ใน Fluorosalan และการที่สารทั้งสองตัว แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ enzyme IKK beta ดังนั้นโครงสร้างส่วนที่เหมือนกันดังกล่าว น่าจะมีส่วนในการจับและออกฤทธิ์ต่อ enzyme ผู้วิจัยจึงนำส่วนนี้ มาเป็นส่วนหนึ่งของโครงสร้างที่ออกแบบใหม่ เมื่อพิจารณาในส่วนอื่นของโครงสร้าง ต่อ พบว่า Fluorosalan มีส่วนของ ring A ในขณะที่ Aeroplysinin-1 ไม่มีส่วนนี้ ผู้วิจัยจึงต้องการปรับเปลี่ยนส่วนของ ring A นี้ เพื่อให้สารสามารถจับและออกฤทธิ์ต่อ enzyme ได้ดีกว่าเดิม

จากรายงานของ Liddle J et al (39-40) ที่แสดงส่วนของโครงสร้างสาร 7-Azaindole ที่เกิด hydrogen bond กับ enzyme IKK kinase beta (รูปที่ 7) ตรง N atom ที่ตำแหน่ง 7 กับ CYS99 และ MET 111 ผู้วิจัยจึงได้นำข้อมูลนี้มาปรับเปลี่ยนในส่วน A โดยเชื่อมต่อกับส่วน B ด้วยพันธะ amide เช่นในโครงสร้าง Fluorosalan และตรวจสอบสารที่ออกแบบในโปรแกรมคอมพิวเตอร์โดยใช้การเกิดพันธะกับ amino acid CYS 99 ในการเลือกสารมาสังเคราะห์อีกประเด็นหนึ่ง



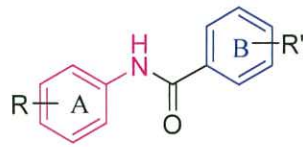
รูปที่ 7 โครงสร้าง 4-Phenyl-7-azaindole เกิด hydrogen bond กับ CYSS 99 (Liddle et al, 39)

จากการพัฒนาโครงสร้างสารที่ได้ออกแบบไว้ในรายงานฉบับสมบูรณ์ของงานวิจัย วช 60 (เพิ่มเติม) ดังแผนภาพข้างล่างนี้ และได้สารใหม่ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งดี



การพัฒนาและออกแบบโครงสร้างสารใหม่: วช 60 (เพิ่มเติม)

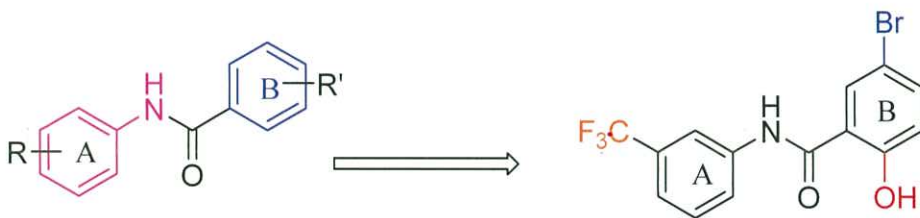
ในงานวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาและปรับปรุงโครงสร้างสารใหม่จากแผนผังข้างบนดังรูปที่ ข้างล่างนี้



โดยส่วน A จะเป็นส่วนของ Fluorosalan ที่คาดว่าจะเพิ่ม affinity และ/หรือฤทธิ์ของสาร และเป็นส่วนที่มี amine ในโมเลกุล เพื่อใช้ในการทำปฏิกิริยากับ carboxylic acid ขณะที่ส่วน B จะยังคงคล้ายกับ Aeropylsinin-1 และ Fluorosalan จากนั้นนำไปศึกษาค่า parameters ต่างๆ ในโปรแกรมคอมพิวเตอร์

ผลจากการศึกษาสารที่ออกแบบใหม่โดยใช้คอมพิวเตอร์เข้าช่วย พบว่าสาร A1B4 ให้ผลดีที่สุดเทียบกับ lead compounds ดังแสดงไว้ในตารางที่ 7 โดยโครงสร้างจะจับบริเวณ active site โดยเกิดพันธะไฮโดรเจนที่ตำแหน่งกรดอะมิโน CYS99 ได้ค่า predicted K_i เท่ากับ 27.57 μM และค่าแรงในการจับเท่ากับ -6.22 Kcal/mol

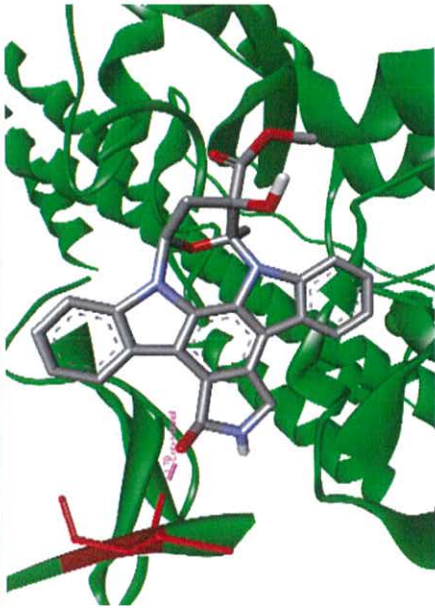
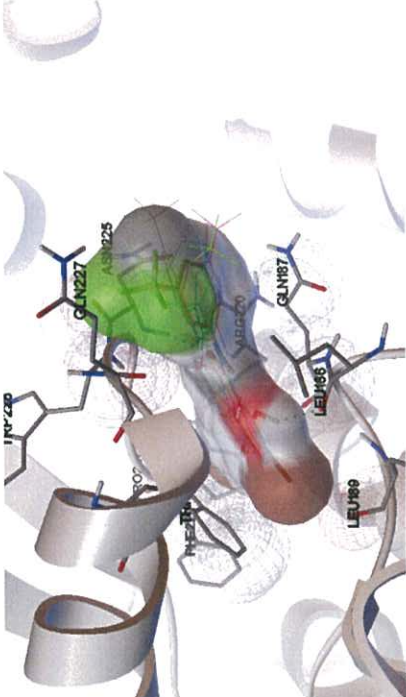
โครงสร้างสารที่ออกแบบและให้ค่าดีที่สุดแสดงดังข้างล่างนี้

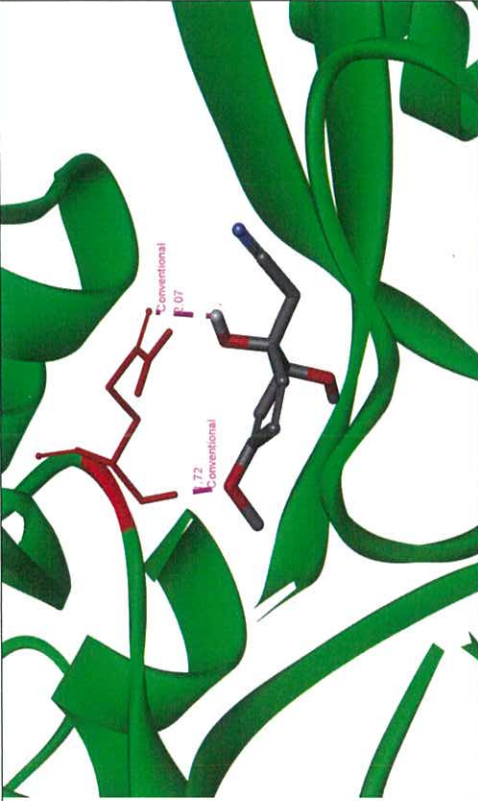
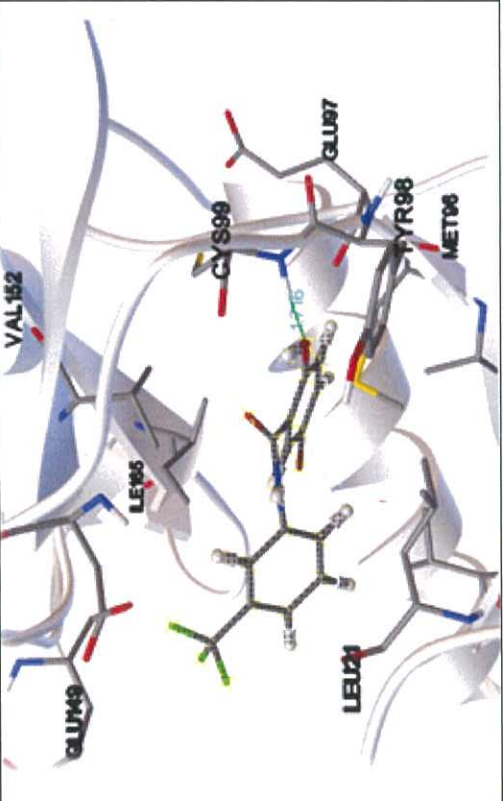


สารใหม่ที่เลือกไปสังเคราะห์ (A1B4)

ข้อมูลที่รวบรวมจากโปรแกรมคอมพิวเตอร์ สำหรับสารใหม่ พบว่าสารใหม่นี้ มีค่าน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 360.13 มีสูตรโมเลกุล คือ $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{BrF}_3\text{NO}_2$ มีชื่อทางเคมีว่า 5-bromo-2-hydroxy-N-(3-(trifluoromethyl)phenyl)benzamide

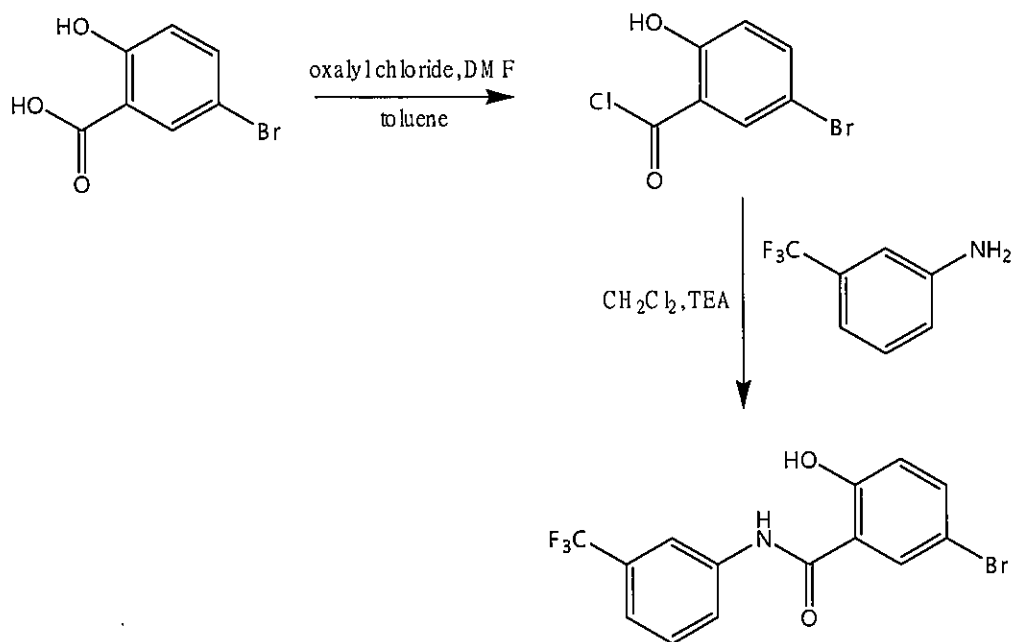
ตารางที่ 2 แสดง Conformation ที่เกิด Interaction บริเวณ Active site

Compound	Order Conformation	Docked pose	BE	Ki	Bonding
K_252A	10		-7.24	4.93	1 H-Bond (CYS99)
Fluorosalan	46		-5.67	70.18	1 H-Bond (CYS99)

Compound	Order Conformation	Docked pose	BE	Ki	Bonding
Aeropylsinin -1	57		-5.21	152.96	closely interaction
A1B4	30		-6.22	27.57	1 H-Bond (CYS99) 1.716 Å°

3. การสังเคราะห์สาร 5-bromo-N-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxybenzamide (A1B4)

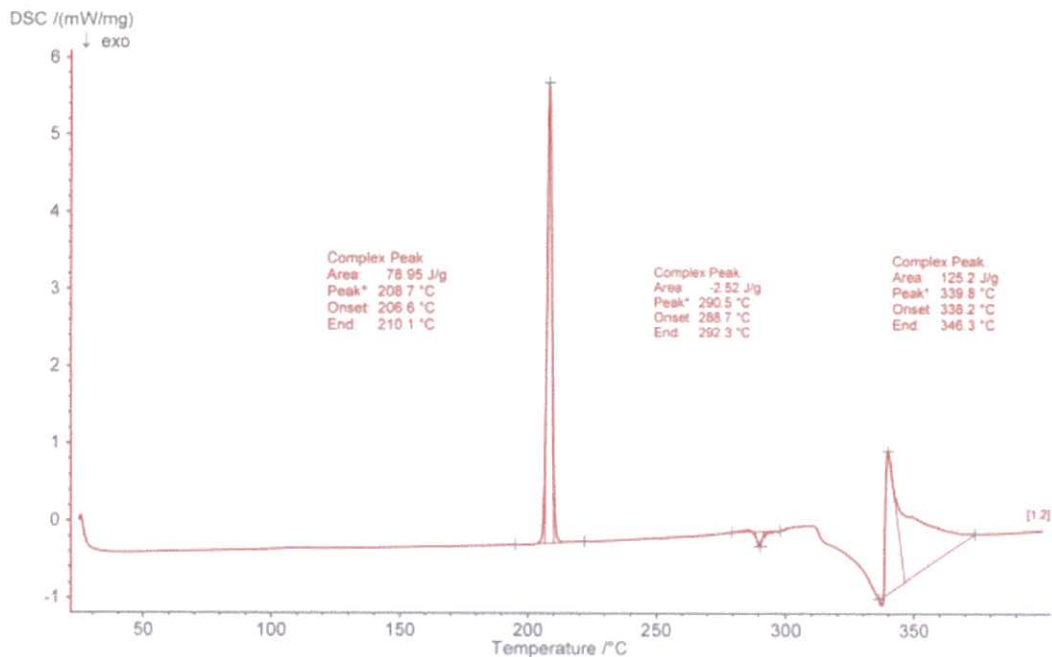
จะได้สารที่เหลือน้อยใน flask มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว หนัก 650 มิลลิกรัม คิดเป็น 29.50 % yield จากสารตั้งต้นโดยใช้ปฏิกิริยา ดังรูปข้างล่างนี้



รูปที่ 8 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาร 5-bromo-N-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxybenzamide (A1B4)

4. การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของสาร 5-bromo-N-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxybenzamide (A1B4)

สารบริสุทธิ์ที่แยกได้ด้วย column chromatography มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว จาก DSC graph มีจุดหลอมเหลวอยู่ที่ 208.7 °C ดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 แสดงการดูดกลืนพลังงานขณะเปลี่ยนสถานะของสาร 5-bromo-N-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxybenzamide (A1B4)

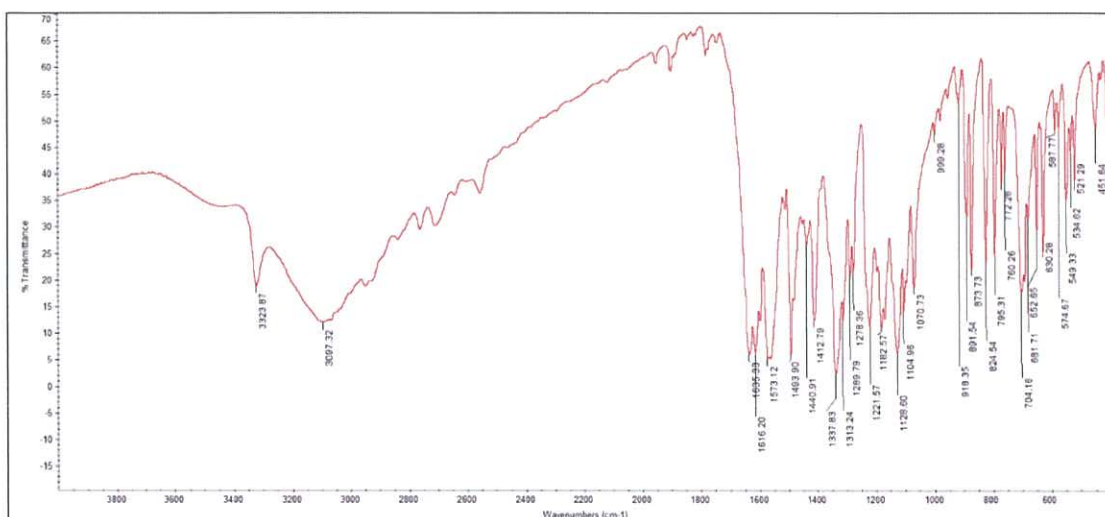
5. การพิสูจน์โครงสร้างสาร 5-bromo-N-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxybenzamide (A1B4) ด้วยวิธีการทาง spectroscopy

หลังจากแยกสารที่สังเคราะห์ได้ให้บริสุทธิ์ด้วย column chromatography แล้ว สารที่ได้นำมาตรวจสอบโครงสร้างด้วยเครื่องมือทาง spectroscopy ได้แก่ Infrared Spectroscopy, Nuclear Magnetic Spectroscopy และ Mass Spectroscopy

5.1 การพิสูจน์โครงสร้างของสาร 5-bromo-N-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxybenzamide (A1B4) ด้วยเครื่อง Infrared Spectrometer

เมื่อนำไปตรวจหาโครงสร้างด้วยเครื่อง infrared spectroscopy เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของหมู่ที่เกี่ยวข้องในการเกิดพันธะ amide พบว่า ใน IR spectrum ของสาร 5-bromo-N-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxybenzamide (A1B4) นี้ มีหมู่ NH ที่ตำแหน่ง wavenumber $3,323.87 \text{ cm}^{-1}$ ในแบบ single peak ซึ่งเป็นลักษณะของ secondary amine (รูปที่ 10) และไม่ปรากฏ peak ในลักษณะ doublet ของ primary amine ซึ่งพบในสารตั้งต้น คือ 3-trifluoromethyl aniline (A1) และ พบ หมู่ C=O amide ที่ wavenumbers $1,635.33$ และ $1,616.20 \text{ cm}^{-1}$ ในขณะที่หมู่ C=O ของ

carboxylic acid ของ 3-bromo salicylic acid จะพบ wavenumber $1,669.04\text{ cm}^{-1}$ นอกจากนี้ ยังไม่ปรากฏ หมู่ OH ของ carboxylic acid ใน IR spectrum ของสารสังเคราะห์ 5-bromo-*N*-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxybenzamide (A1B4) นี้เช่นกัน จากการเปลี่ยนแปลงใน IR spectra ดังกล่าวข้างต้น แสดงให้เห็นว่า หมู่ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ด้วยปฏิกิริยา amidation คือ หมู่ primary amine ของ 3-trifluoromethyl aniline (A1) และ หมู่ carboxylic acid ของ 3-bromo-salicylic acid (B4) ได้เป็น สาร 5-bromo-*N*-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxybenzamide ซึ่ง เป็น amide derivative ตามที่ได้ตั้งสมมุติฐานไว้จริง



รูปที่ 10 Infrared Spectrum (cm^{-1}) ของ 5-bromo-*N*-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxybenzamide (A1B4)

ตารางที่ 3 แสดงค่า wavenumber ของ functional groups ที่มีในโครงสร้าง A1B4

Wavenumber (cm ⁻¹)	characteristic	Attributed to
3,323.87	Singlet, medium	N-H stretching, secondary amide
3,097.32	Multiplet, weak	=C-H, aromatic
1,635.33, 1,573.12	Singlet, strong	C=O stretching, secondary amide Amide I and amide II bands
1,440.91, 1,493.90	Triplet, medium	C=C, aromatic
1,412.79	Singlet, medium	C-N stretching
1,221.57, 795.31	Singlet, strong	C-F
1,128.60	Doublet, strong	C-O

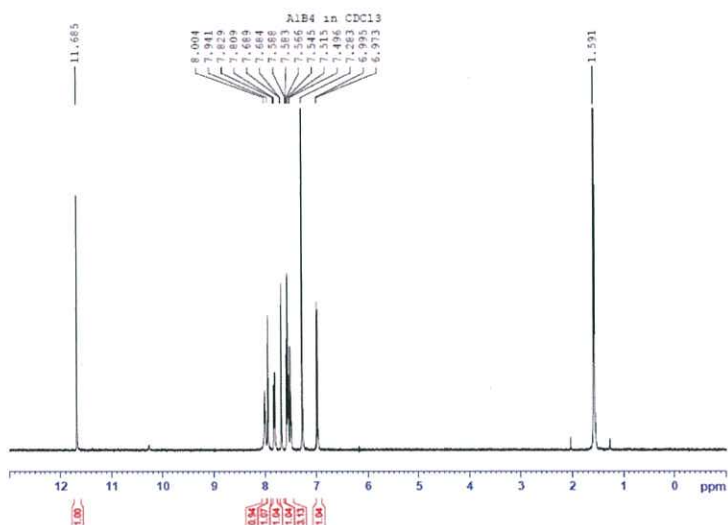
5.2 การพิสูจน์โครงสร้างของสาร 5-bromo-N-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxybenzamide (A1B4) ด้วยเครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectrometer

จากการนำสารสังเคราะห์ที่ได้ไปตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิค nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy เพื่อตรวจสอบชนิดและจำนวน protons ที่มีในโครงสร้าง ผลที่ได้เป็นดังนี้

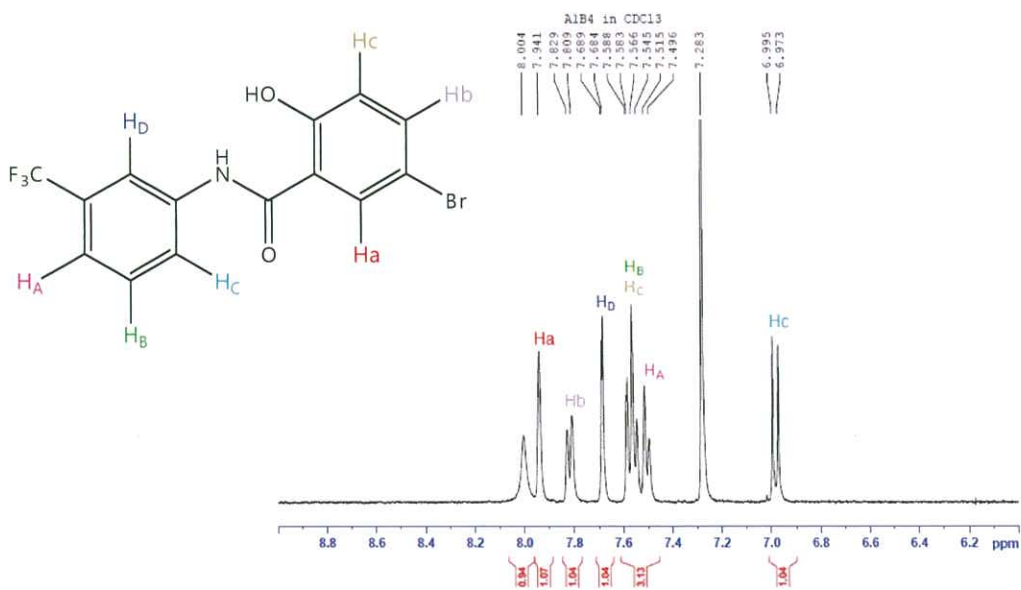
5.2.1 ¹H-NMR spectrum ของสาร 5-bromo-N-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxyl benzamide (A1B4)

¹H-NMR spectrum ของสาร 5-bromo-N-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxybenzamide (A1B4) ในตัวทำละลาย คือ chloroform-d ในช่วง 0-12 ppm (ดังรูปที่ 12 และ 13) และตารางที่ 4 จาก ¹H-NMR spectrum โดย peak ที่ 11.684 ppm มีลักษณะ singlet และอยู่ในช่วง downfield เป็น peak ของ NH ของ secondary amide ขณะที่ peak ของ aromatic OH จะพบที่ 8.004 ppm เป็น singlet ที่มีลักษณะ broad เนื่องจาก inductive effect กับ amide carbonyl และ aromatic system

และ peaks ช่วง 6.9-8.0 ppm อีก 7 protons เป็นของ aromatic protons ของทั้งสองวง ตำแหน่ง peaks จำนวนและชนิดของ protons แสดงในตารางที่ 4



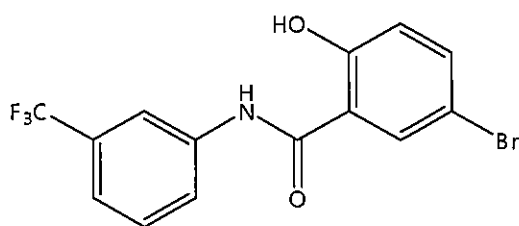
รูปที่ 11 $^1\text{H-NMR}$ Spectrum (ppm) ของ 5-bromo-N-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxybenzamide (A14) ช่วง 0-12 ppm



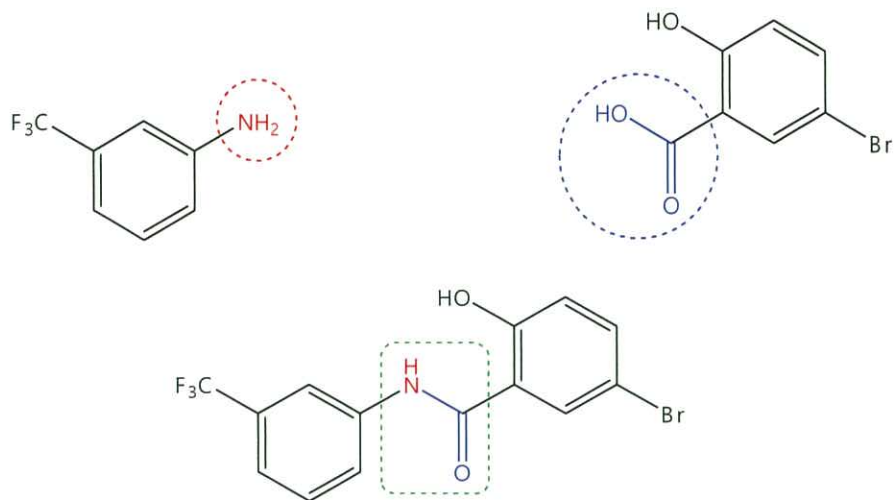
รูปที่ 12 $^1\text{H-NMR}$ Spectrum (ppm) ของ 5-bromo-N-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxybenzamide (A1B4) ช่วง 6.2-8.8 ppm

ตารางที่ 4 แสดงค่าของ $^1\text{H-NMR}$ Spectrum (ppm) ของ 5-bromo-N-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxybenzamide (A1B4) ช่วง 0-12 ppm

Assigned Hs	Chemical shifts(ppm)	Characteristics
NH	11.685	S
OH	8.004	S, broad
H _A	7.515 7.496	d, $J = 19$ Hz
H _B	7.588 7.583 7.566	d, $J = 5$ Hz d, $J = 22$ Hz
H _C	7.566 7.545	d, $J = 21$ Hz
H _D	7.689 7.684	d, $J = 5$ Hz
Ha	7.941	d, $J = 6$ Hz
Hb	7.829 7.809	d, $J = 20$ Hz
Hc	6.995 6.973	d, $J = 22$ Hz



รูปที่ 13 โครงสร้างของ 5-bromo-N-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxybenzamide (A1B4)

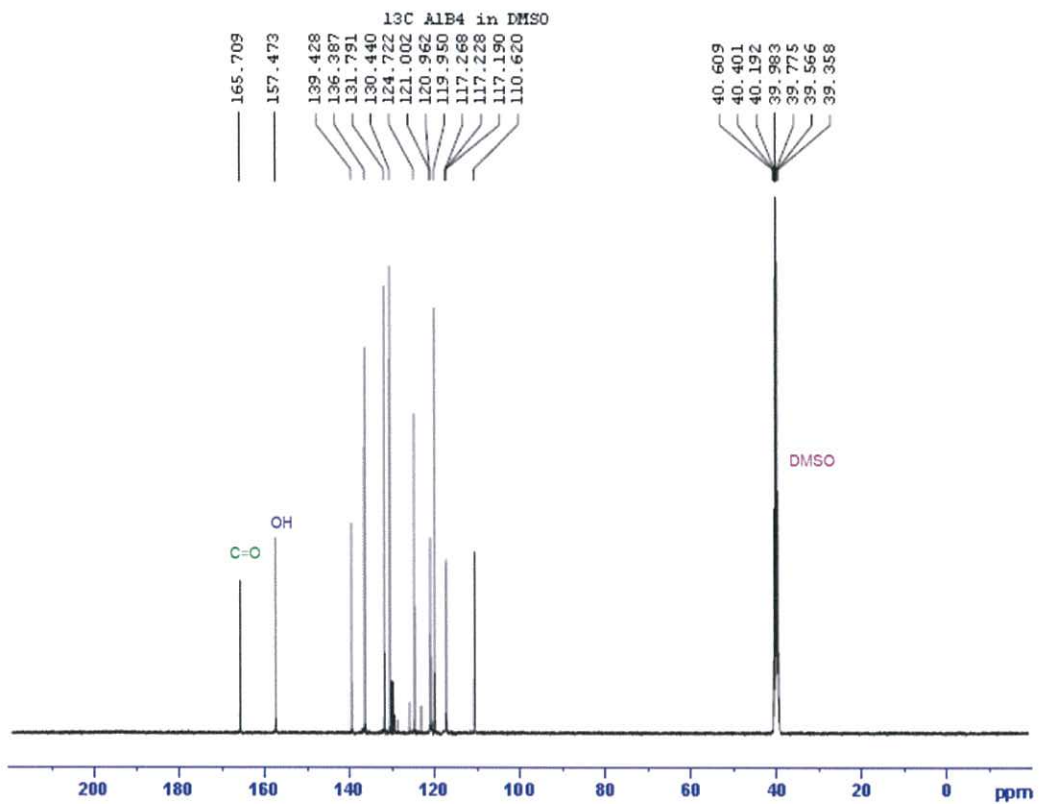


รูปที่ 14 แสดงส่วนของ functional groups ในสารตั้งต้น A1 และ B4 ที่เกี่ยวข้องในการเกิดพันธะ amide ของสารใหม่

เมื่อวิเคราะห์ $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารที่สังเคราะห์ได้ (รูปที่ 11) จะพบ H peaks เท่ากับ 5 peaks ที่ chemical shifts ดังนี้ 6.810 ppm ของ Ha, 7.203 ppm ของ Hb, 6.765 ppm ของ Hc , 6.860 ppm Hd และ 5.568 ppm จำนวน 2 protons ซึ่งเป็นของหมู่ amine จะเห็นได้ว่าไม่พบ peaks ของ OH และ peak ที่เป็น 2 protons ของ หมู่ primary amine แสดงให้เห็นว่า สารตั้งต้นทั้ง 2 สารทำปฏิกิริยากันให้สารใหม่ คือ A1B4 ที่มีจำนวน protons สอดคล้องกับโครงสร้างที่ได้ออกแบบไว้

4.2.1 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ของสาร 5-bromo-*N*-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxyl benzamide (A1B4)

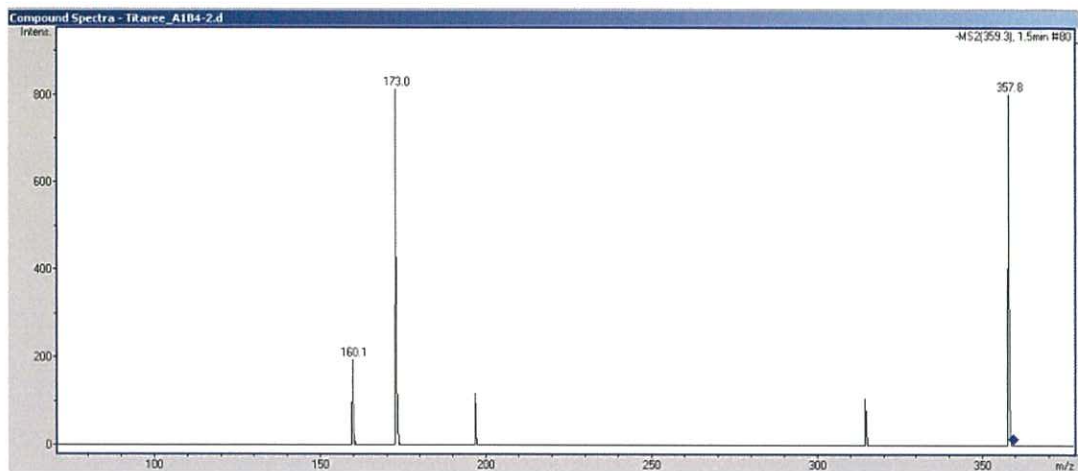
$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ของ 5-bromo-*N*-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxylbenzamide (A1B4) แสดงดังรูปที่ 13 ซึ่ง peaks ของ carbons ที่เด่นๆ ได้แก่ carbonyl carbon ซึ่งจะพบที่ตำแหน่ง downfield มากที่สุดใน spectrum คือ ที่ 165.709 ppm และ carbon ตำแหน่งที่ 1 ที่มีหมู่แทนที่เป็น หมู่ hydroxyl จะพบ peak ที่เกิด downfield เช่นกัน คือ ที่ 157.473 ppm สำหรับ peaks ที่เหลือจะเป็นของ carbons ที่เป็นของ aromatic rings โดย peaks ช่วง 40 ppm จะเป็นของ DMSO- d_6



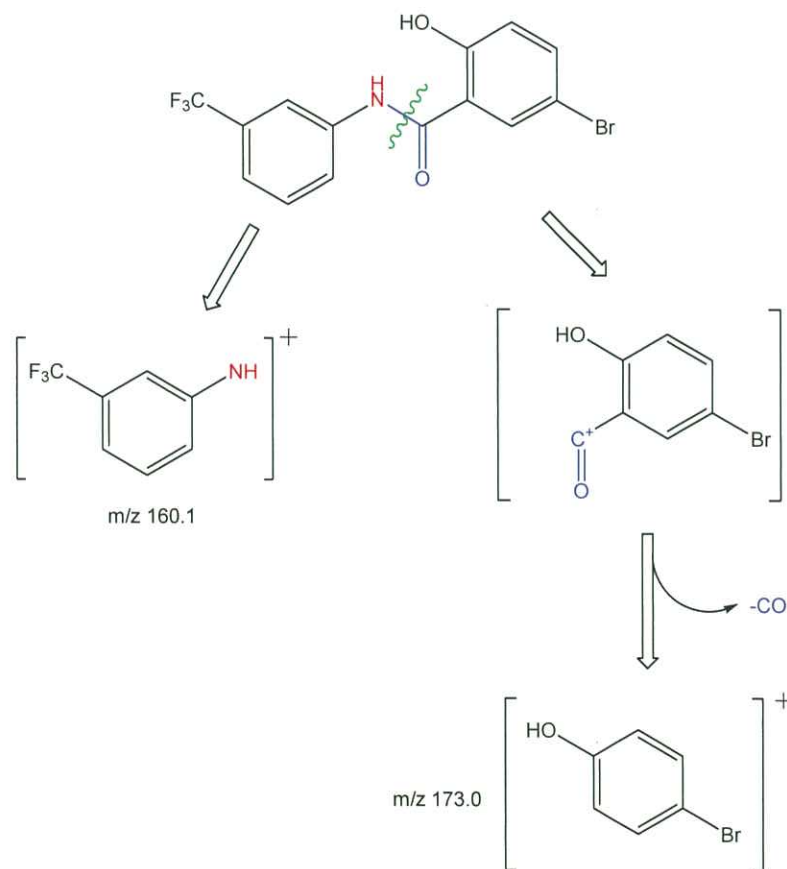
รูปที่ 15 ^{13}C -NMR spectrum ของ 5-bromo-*N*-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxyl benzamide (A1B4)

4.3 การพิสูจน์โครงสร้างของสาร 5-bromo-*N*-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxy benzamide (A1B4) ด้วยเครื่อง Mass Spectrometer (MS)

Mass spectra ของสาร 5-bromo-*N*-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-Hydroxyl benzamide (A1B4) ที่สังเคราะห์ ในรูปที่ 14 จะพบ peaks ที่แสดงส่วนของโมเลกุลที่ $m/z = 359.98$ (M.W. = 360.13) การแตกหักในโครงสร้างของสาร ซึ่งเกิดจากการแตกของพันธะ amide ทำให้ได้ peaks ที่เป็น fragment ของ 3-trifluoromethyl cation ที่ $m/z = 160.12$ ส่วน 173.01



รูปที่ 16 Mass spectrum (ppm) ของ 5-bromo-N-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxybenzamide (A1B4)



รูปที่ 17 แสดง fragmentation pattern ของสาร 5-bromo-N-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxybenzamide (A1B4)

ผลจากเครื่องมือทาง spectroscopy ทั้ง 3 ชนิด ยืนยันว่า โครงสร้างของสารที่สังเคราะห์ได้ เป็นโครงสร้างของสาร 5-bromo-N-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxylbenzamide (A1B4) จริง

5. การวิเคราะห์หาธาตุที่เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างของสาร 5-bromo-N-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxylbenzamide (A1B4) ด้วยวิธี elemental analysis

จากสูตรโมเลกุลของสาร สามารถคำนวณมวลของธาตุที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของสาร เป็นร้อยละต่อมวลทั้งหมดในโมเลกุล โดยวิธีการที่เรียกว่า elemental analysis ได้ผลดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณองค์ประกอบของธาตุในโมเลกุลของ 5-bromo-N-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxylbenzamide (A1B4)

ธาตุที่เป็นองค์ประกอบ	Calculation (%)	Found (%)
C	46.69	46.59 ± 0.04
H	2.52	2.65 ± 0.02
N	3.89	3.96 ± 0.04

พบว่าผลที่ได้มีความใกล้เคียงอย่างมีนัยสำคัญกับธาตุที่เป็นองค์ประกอบของในโครงสร้าง

6. การทดสอบฤทธิ์ด้านการเติบโตของเซลล์มะเร็งของสาร 5-bromo-N-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxybenzamide (A1B4)

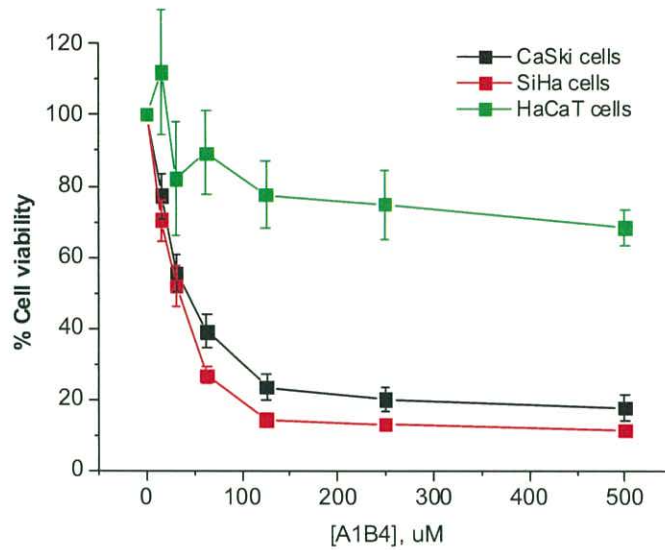
6.1 การทดสอบความเป็นพิษของสาร A1B4 ด้วยเทคนิค MTT

การทดสอบฤทธิ์ของสาร A1B4 ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (human cervical cancer cell lines: CaSki และ SiHa cells) และเซลล์ปกติจากผิวหนังที่ไม่ใช่เซลล์มะเร็ง (human keratinocyte cell line: HaCaT cell) โดยเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นให้เกาะพื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วบ่มเซลล์กับสาร A1B4 ความเข้มข้น 0-500 μ M และ doxorubicin (DOX) ความเข้มข้น 0-25 μ M (positive control) และ 0.5% DMSO (negative control) ใน 96 well plate เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นประเมินรูปร่างของเซลล์ ลักษณะเยื่อหุ้มเซลล์ ลักษณะไซโตพลาซึม ลักษณะการเกาะที่

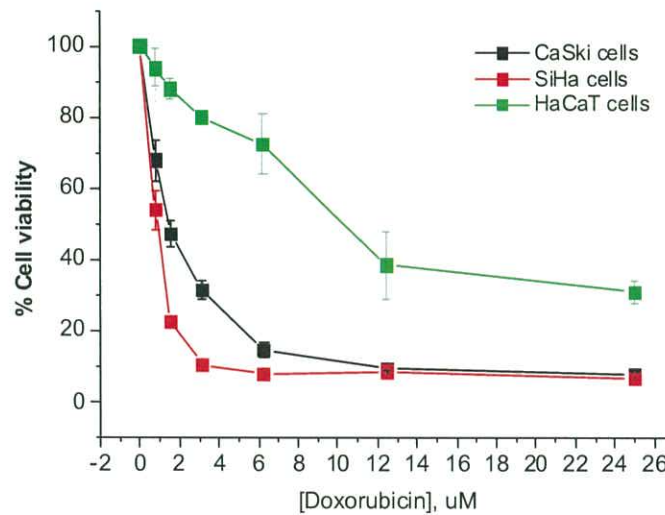
พื้นผิว เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ลอย ภายใต้กล้อง stereoscope และนำมาวิเคราะห์หาจำนวนการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT

เมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้อง microscope พบว่าในกลุ่มที่บ่มด้วย 0.5% พบเซลล์มีลักษณะปกติ เขี่ยดัวเป็นรูปกระสวย เยื่อหุ้มเซลล์และไซโตพลาซึมเรียบ และมีจำนวนเซลล์เกาะพื้นมากกว่า 90% เมื่อได้รับการเขย่าแรงๆ เซลล์ยังคงไม่หลุดจากพื้นผิว แตกต่างจากกลุ่มเซลล์ที่บ่มด้วยสาร A1B4 และสาร doxorubicin พบเซลล์มีรูปร่างกลม เยื่อหุ้มเซลล์เป็นถุงน้ำ (bleb) และไซโตพลาซึมขรุขระ ลักษณะการเกาะพื้นผิวไม่แน่น พบเซลล์ลอยจำนวนมาก เมื่อเขย่าเบาๆ เซลล์หลุดจากพื้นผิวได้ง่าย และเมื่อนำมาวิเคราะห์หาจำนวนการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT พบว่าเซลล์ที่บ่มด้วยสาร A1B4 B และ doxorubicin มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตลดลงตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้นแตกต่างจากกลุ่มที่บ่มด้วย 0.5% DMSO อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ซึ่งผลการนับเซลล์มีชีวิตด้วยเทคนิค MTT มีความสัมพันธ์กับการศึกษาลักษณะของเซลล์ด้วยกล้อง microscope

ประสิทธิภาพของสาร A1B4 ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก พบว่าสาร A1B4 ที่ความเข้มข้น 5 μM เริ่มยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ และความเข้มข้นของสาร A1B4 ที่ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ CaSki ลดลง 20, 50 และ 80 (inhibitory concentration; IC_{20} , IC_{50} และ IC_{80}) มีค่าเท่ากับ 16 ± 8.8 , 42 ± 4.2 และ 170 ± 27.4 μM และประสิทธิภาพของสาร A1B4 D ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ SiHa พบว่าสาร A1B4 ที่ความเข้มข้น 5 μM เริ่มยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ และความเข้มข้นของสาร A1B4 ที่ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง 20, 50 และ 80 (inhibitory concentration; IC_{20} , IC_{50} และ IC_{80}) มีค่าเท่ากับ 16 ± 5.2 , 32 ± 6.3 และ 86 ± 22.4 μM ตามลำดับ ในขณะที่สาร DOX มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.9 ± 0.06 μM และ 1.6 ± 0.08 ในเซลล์ CaSki และ SiHa ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า สาร A1B4 นั้นมีความเป็นพิษน้อยมากต่อเซลล์ปกติ HaCaT โดยที่ความเข้มข้น > 400 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีผลให้เซลล์ HaCaT ลดลงเพียงเล็กน้อย (30%) (รูปที่ 16 และ 17)



รูปที่ 18 แสดงประสิทธิภาพของสาร A1B4 ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์ CaSki, SiHa และ HaCaT ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN \pm SEM (N=3)



รูปที่ 19 แสดงประสิทธิภาพของ Doxorubicin (Dox) ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์ CaSki, SiHa และ HaCaT ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN \pm SEM (N=3)

6.2 การศึกษาลักษณะทาง morphology ของ DNA โดย DAPI staining

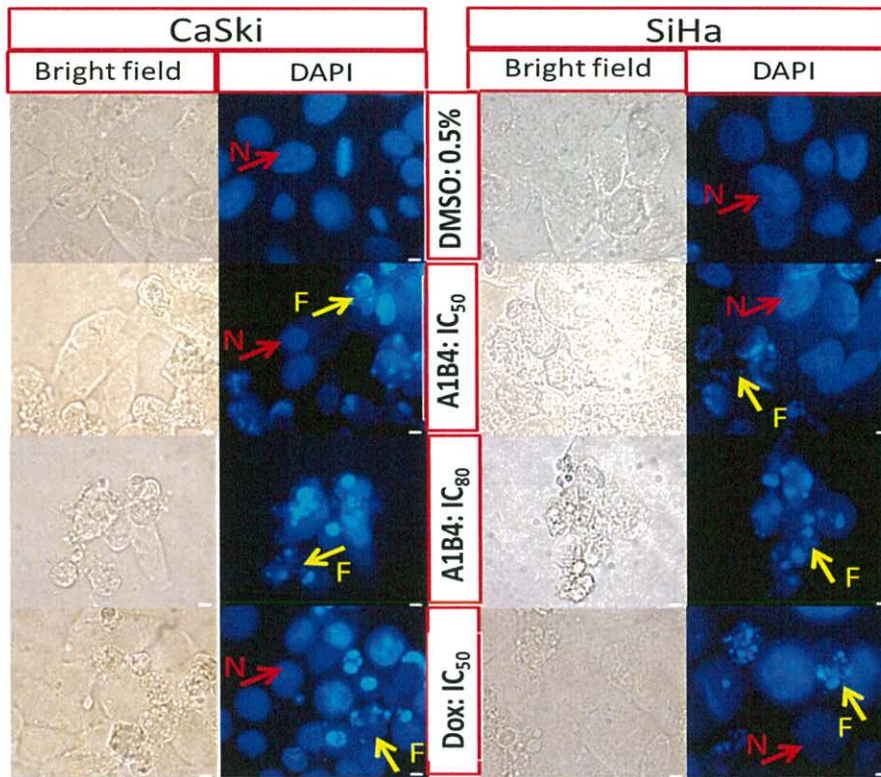
การทดสอบฤทธิ์ของสาร A1B4 ต่อการเกิด nuclear fragmentation โดยเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้น 1×10^5 cells/ml ให้เกาะบน 8 well slide chamber นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มด้วยสาร A1B4

และ doxorubicin ที่ความเข้มข้น IC_{50} , IC_{80} และ 0.5% DMSO (negative control) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำ slide ที่มีเซลล์เกาะอยู่ย้อมด้วย DAPI ซึ่งสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ และศึกษาลักษณะนิวเคลียสภายใต้กล้อง fluorescence microscopy ซึ่ง DAPI มีเป้าหมายที่ nucleic acid เมื่อถูก excitation ด้วยแสงความยาวคลื่น 340 nm จะ emission ได้แสงสีฟ้า (488 nm) เซลล์ที่มีชีวิตจะพบลักษณะการติดสี DAPI กระจายอย่างสม่ำเสมอ (homogenous) ตลอดทั้งนิวเคลียส ในขณะที่ apoptotic cell จะมีการรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนของเส้นใยโครมาติน (chromatin condensation) จึงติดสีฟ้าของ DAPI หนาแน่น และมีนิวเคลียสขนาดเล็กกว่าปกติ และเมื่อพบการแตกของนิวเคลียส (nuclear fragmentation) จึงพบการติดสีแบบกระจายเป็นหย่อมๆ

เมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์จาก bright field ในกลุ่มที่บ่มด้วย 0.5% DMSO พบว่าเซลล์มีลักษณะเหยียด เยื่อหุ้มเซลล์เรียบมีขอบเขตชัดเจน ลักษณะนิวเคลียสของเซลล์จากการติดสี DAPI พบว่าเซลล์ทั้งหมด (100%) มีนิวเคลียสติดสีฟ้าของ DAPI แบบเรียบเนียนสม่ำเสมอ ซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์ปกติ ในทางตรงข้ามเซลล์ที่บ่มด้วยสาร A1B4 และ doxorubicin พบเซลล์ส่วนมากมีลักษณะเซลล์กลม ไม่เหยียด เยื่อหุ้มเซลล์เป็นตุ่มพอง (bleb) ซ้ำยโตพลาสมขรุขระ และมีจำนวนของเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ผลจากการนับเซลล์ CaSki แบบสุ่มในกลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด A1B4 (IC_{50} และ IC_{80}) พบเซลล์ปกติ $20.5 \pm 3.4\%$ และ $2 \pm 0.2\%$ ขณะเดียวกันพบเซลล์ติดสีฟ้า (DAPI) เป็นหย่อมๆ (nuclear fragmentation) เป็นจำนวน $79.5 \pm 6.3\%$ และ $98 \pm 9.5\%$ ตามลำดับ ผลจากการนับเซลล์ SiHa แบบสุ่มในกลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด A1B4 (IC_{50} and IC_{80}) พบเซลล์ปกติ $54.5 \pm 5.4\%$ และ $45.5 \pm 8.1\%$ ขณะเดียวกันพบเซลล์ติดสีฟ้า (DAPI) เป็นหย่อมๆ (nuclear fragmentation) เป็นจำนวน $45.5 \pm 3.9\%$ และ $54.5 \pm 7.2\%$ ตามลำดับ ผลจากการนับเซลล์ CaSki และ SiHa แบบสุ่มในกลุ่มที่บ่มด้วยสาร doxorubicin พบเซลล์ปกติมีนิวเคลียสติดสีฟ้าแบบเรียบเนียนสม่ำเสมอ $81.5 \pm 4.8\%$ และ $56.5 \pm 4.4\%$ ขณะที่เซลล์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสติดสีฟ้า (DAPI) เป็นหย่อมๆ (nuclear fragmentation) เป็นจำนวนถึง $18.5 \pm 2.3\%$ และ $43.5 \pm 8.5\%$ ตามลำดับ (ตารางที่ 6 และรูปที่ 20)

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์เซลล์ในระยะต่าง ๆ ที่ป่มด้วยสาร A1B4 และ doxorubicin จากการย้อมนิวเคลียสด้วย DAPI, * = $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

	CaSki cells		SiHa cells	
	% Normal cells (homogenous DAPI)	% Apoptotic cells (fragment DAPI)	%Normal cells (homogenous DAPI)	% Apoptotic cells (fragment DAPI)
DMSO 0.5%	100	0	100	0
A1B4 IC ₅₀	54.5 ± 12.7*	45.5 ± 9.8*	56.5 ± 8.3*	43.5 ± 15.9*
A1B4 IC ₈₀	35.5 ± 10.5*	64.5 ± 22.9*	30.5 ± 9.4*	69.5 ± 27.7*
Dox IC ₅₀	51.5 ± 14.2*	48.5 ± 7.4*	41.5 ± 13.9*	58.5 ± 8.7*

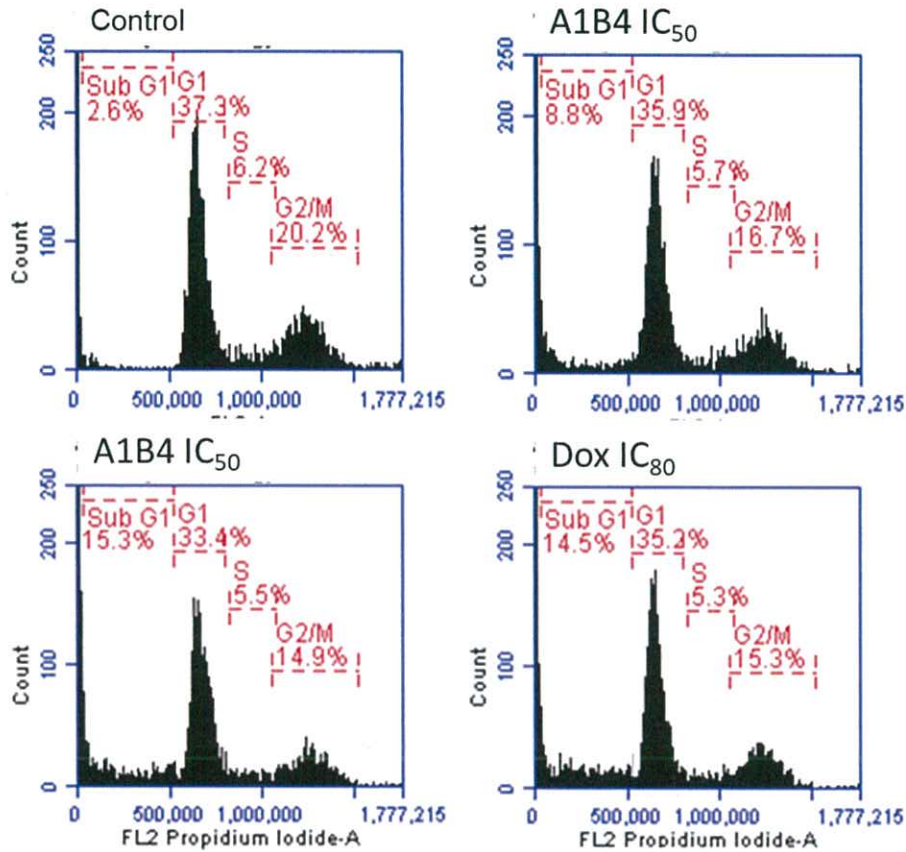


รูปที่ 20 แสดงลักษณะเซลล์และนิวเคลียสจากกล้องจุลทรรศน์ ย้อมนิวเคลียสด้วยสี DAPI, N = normal, F = nuclear fragmentation, scale bar = 10 μ m

6.3 การศึกษาวัฏจักรเซลล์ (cell cycle) โดย PI-staining

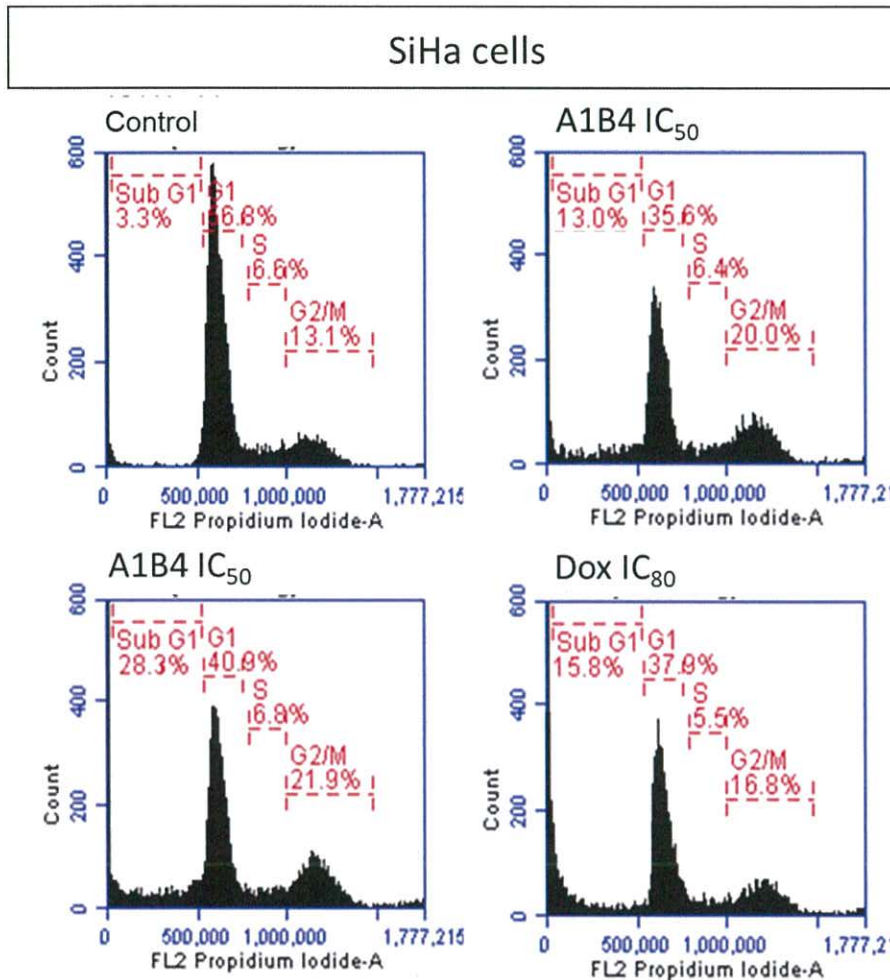
การแยกเซลล์ระยะต่างๆ ของวัฏจักรเซลล์ โดย Flow cytometer พบว่า สาร A1B4 และ Dox มีประสิทธิภาพ หยุด cell cycle ของ CaSki cells ที่ระยะ G1 ทำให้เซลล์สะสมที่ระยะ Sub G1 (hypodiploid) และสะสมเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นสารสกัดเพิ่มขึ้น สาร A1B4 ที่ความเข้มข้น IC₅₀, IC₈₀ และ สาร doxorubicin IC₅₀ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้เซลล์สะสมใน Sub G1 เท่ากับ 8.8%, 15.3% และ 14.5% ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีเซลล์สะสมใน Sub G1 เท่ากับ 2.6% (รูปที่ 21) ผลการทดลองพบว่าการเพิ่มเซลล์ในระยะ sub-G1 แสดงให้เห็นว่าเซลล์หยุดแบ่งตัวในระยะ G1 ส่งผลให้มีการสะสมเซลล์ระยะ sub-G1 (apoptotic cells) เพิ่มมากขึ้นซึ่งสอดคล้องกับจำนวนเซลล์ที่ตายเพิ่มขึ้น

CaSki cells



รูปที่ 21 แสดงวัฏจักรเซลล์ในระยะต่าง ๆ ของ CaSki cells ที่บ่มด้วยสาร A1B4 ที่ความเข้มข้น IC₅₀, IC₈₀ และ สาร doxorubicin IC₅₀ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ย้อมด้วยสี Propidium iodide และวิเคราะห์โดย Flow cytometry

สาร A1B4 และ doxorubicin มีประสิทธิภาพ หยุด cell cycle ของ SiHa cells ที่ระยะ G1 ทำให้เซลล์สะสมที่ระยะ Sub G1 (hypodiploid) และสะสมเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นสารสกัดเพิ่มขึ้น สาร A1B4 ที่ความเข้มข้น IC₅₀, IC₈₀ และ สาร doxorubicin IC₅₀ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้เซลล์สะสมใน Sub G1 เท่ากับ 13%, 28.3% และ 15.8% ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีเซลล์สะสมใน Sub G1 เท่ากับ 3.3% (รูปที่ 22) ผลการทดลองพบว่าการเพิ่มเซลล์ในระยะ sub-G1 แสดงให้เห็นว่าเซลล์หยุดแบ่งตัวในระยะ G1 ส่งผลให้มีการสะสมเซลล์ระยะ sub-G1 (apoptotic cells) เพิ่มมากขึ้นซึ่งสอดคล้องกับจำนวนเซลล์ที่ตายเพิ่มขึ้น

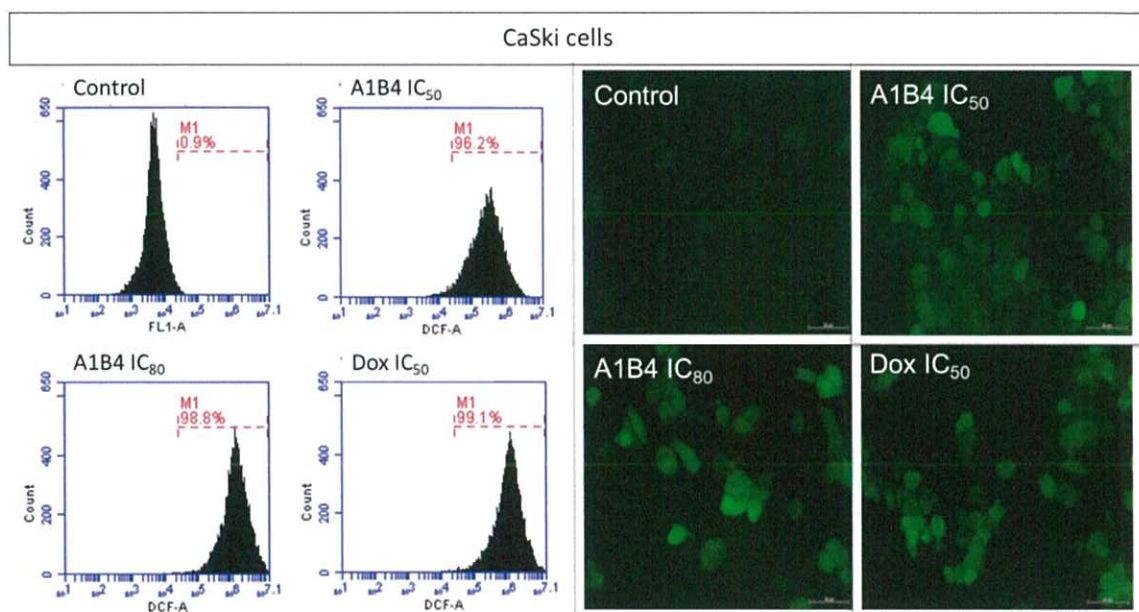


รูปที่ 22 แสดงวัฏจักรเซลล์ในระยะเวลาต่าง ๆ ของ SiHa cells ที่บ่มด้วยสาร A1B4 ที่ความเข้มข้น IC₅₀, IC₈₀ และ สาร doxorubicin IC₅₀ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ย้อมด้วยสี Propidium iodide และวิเคราะห์โดย Flow cytometry

6.4 การวัดระดับ ROS (อนุมูลอิสระ) ภายในเซลล์โดย DCFH-DA staining

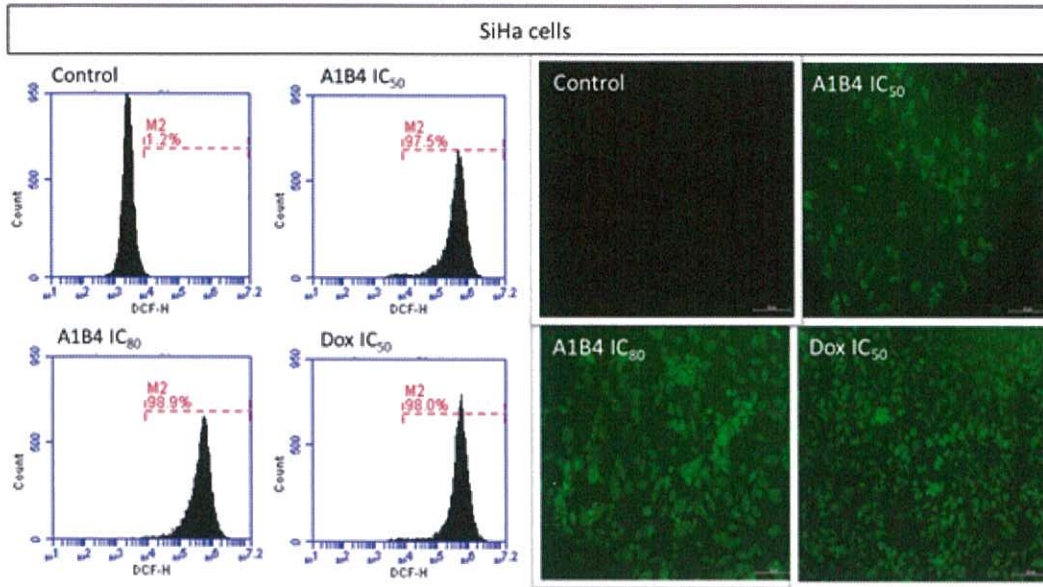
ความเป็นพิษของสาร A1B4 มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของระดับ ROS ภายในเซลล์ การวิเคราะห์หาระดับ ROS โดยวิธีการย้อมสี DCFH-DA อาศัยการทำงานของเอนไซม์ Esterase ภายในเซลล์โดยเปลี่ยนสาร DCFH-DA เป็น DCFH ซึ่งเป็นสารไม่เรืองแสง (Non-fluorescence) ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์จะเปลี่ยน DCFH เป็น DCF ซึ่งเป็นสารเรืองแสง (Fluorescence) โดยค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescent intensity) ของ DCF จะบ่งบอกถึงระดับ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ ผลการทดลองโดย Flow cytometry พบว่า สาร A1B4 ที่ความเข้มข้น IC₅₀, IC₈₀ และ สาร doxorubicin

IC₅₀ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้เซลล์ CaSki มีระดับอนุมูลอิสระภายในเซลล์สูงมากขึ้น โดยมีค่าความเข้มแสงของ DCF เท่ากับ 96.2%, 98.8% และ 99.1% ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีมีค่าความเข้มแสงของ DCF เท่ากับ 0.9% (รูปที่ 23) และสอดคล้องกับผลการศึกษาด้วย Fluorescence microscopy พบว่า กลุ่มควบคุมไม่มีสัญญาณการเรืองแสงภายในเซลล์ ขณะที่กลุ่มที่ป่มด้วยสาร A1B4 ที่ความเข้มข้น IC₅₀, IC₈₀ และ สาร doxorubicin IC₅₀ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีสัญญาณการเรืองแสงสีเขียวภายในเซลล์ (รูปที่ 23)



รูปที่ 23 แสดงการเรืองแสงของ DCF (สีเขียว) ภายในเซลล์ CaSki (ซ้าย) ข้อมูลเชิงปริมาณวัดโดย Flow cytometry (ขวา) ข้อมูลเชิงคุณภาพโดย Fluorescence microscopy, scale bar = 20 uM

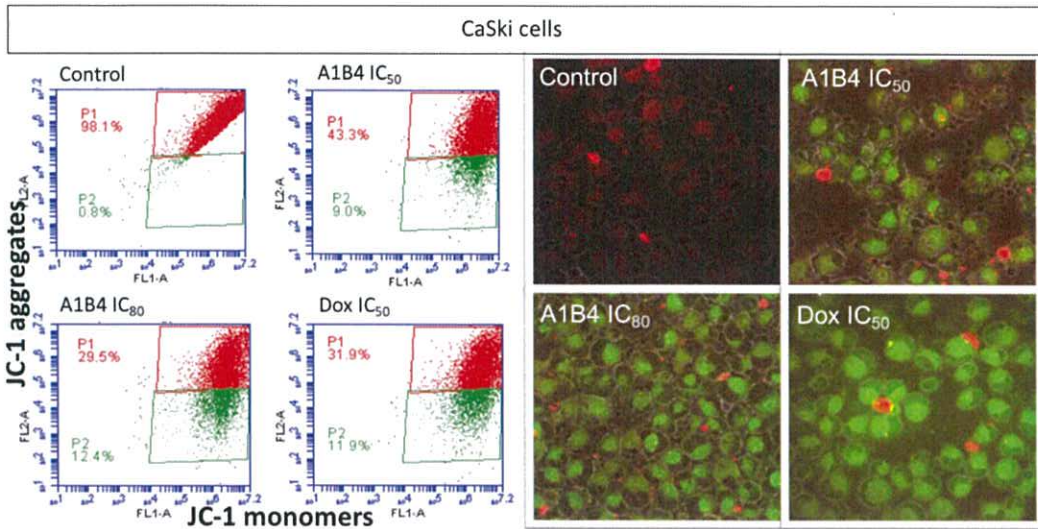
สาร A1B4 ที่ความเข้มข้น IC₅₀, IC₈₀ และ สาร doxorubicin IC₅₀ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้เซลล์ SiHa มีระดับอนุมูลอิสระภายในเซลล์สูงมากขึ้น โดยมีค่าความเข้มแสงของ DCF เท่ากับ 97.5%, 98.9% และ 98.0% ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีมีค่าความเข้มแสงของ DCF เท่ากับ 1.2% (ภาพที่ 4) และสอดคล้องกับผลการศึกษาด้วย Fluorescence microscopy พบว่า กลุ่มควบคุมไม่มีสัญญาณการเรืองแสงภายในเซลล์ ขณะที่กลุ่มที่ป่มด้วยสาร A1B4 ที่ความเข้มข้น IC₅₀, IC₈₀ และ สาร doxorubicin IC₅₀ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีสัญญาณการเรืองแสงสีเขียวภายในเซลล์ (รูปที่ 24)



รูปที่ 24 แสดงการเรืองแสงของ DCF (สีเขียว) ภายในเซลล์ SiHa (ซ้าย) ข้อมูลเชิงปริมาณวัดโดย Flow cytometry (ขวา) ข้อมูลเชิงคุณภาพโดย Fluorescence microscopy, scale bar = 50 uM

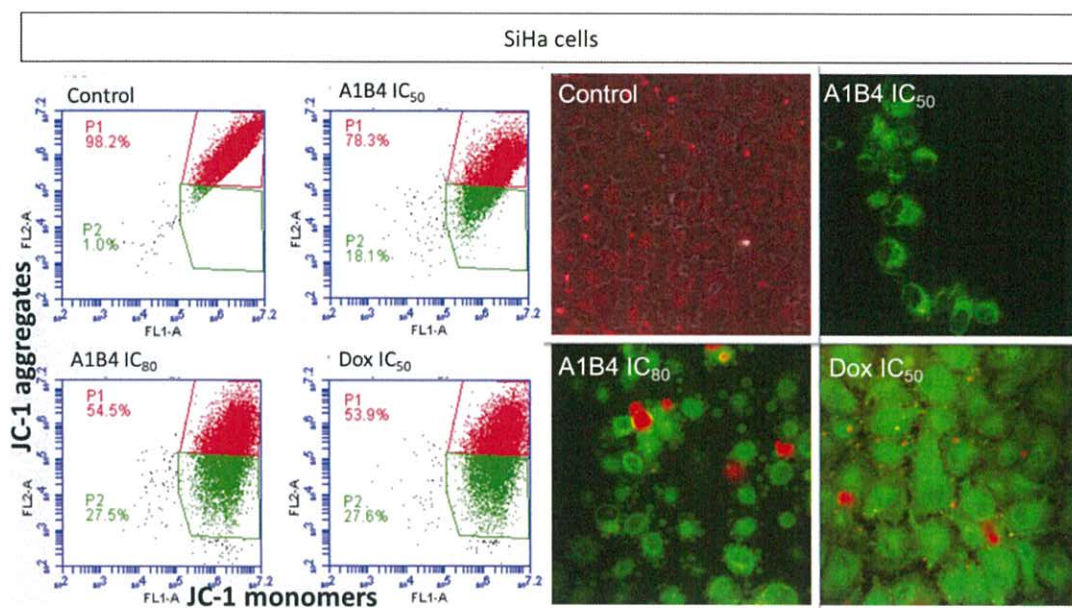
6.5 การวัดความต่างศักย์ที่เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียด้วย โดย JC-1 staining

เซลล์กลุ่มควบคุมมีความต่างศักย์ที่เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย สี JC-1 จะอยู่ในรูป JC-1 aggregate ให้การเรืองแสงสีแดง (Red fluorescence spectrum; ~590 nm) แต่ในเซลล์ที่เกิด Apoptosis เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียสูญเสียความต่างศักย์ สี JC-1 จะอยู่ในรูป JC-1 monomer ให้การเรืองแสงสีเขียว (Green fluorescence spectrum; ~529 nm) ผลการทดลองพบว่าเซลล์ CaSki ที่บ่มด้วยสาร A1B4 ที่ความเข้มข้น IC_{50} , IC_{80} และ สาร doxorubicin IC_{50} เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบจำนวนเซลล์ในรูปของ JC-1 monomer ให้การเรืองแสงสีเขียวเพิ่มขึ้นถึง 9, 12.4 และ 11.9 % ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีเพียง 0.8% ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาด้วย Fluorescence confocal microscopy พบว่าในกลุ่มควบคุมสี JC-1 อยู่ในรูป JC-1 aggregates เซลล์ให้การเรืองแสงสีแดง ในขณะที่กลุ่มที่บ่มด้วยสาร A1B4 และกลุ่มที่บ่มด้วย DOX พบว่าสี JC-1 อยู่ในรูป JC-1 monomers ให้การเรืองแสงสีเขียว (รูปที่ 25)



รูปที่ 25 แสดงความต่างศักย์ที่เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียของเซลล์ CaSki จากการติดสี JC-1 (ซ้าย) ข้อมูลเชิงปริมาณวัดโดย Flow cytometry: P1 และ P2 แสดงถึงเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่เรืองแสงสีแดง และสีเขียวตามลำดับ (ขวา) ข้อมูลเชิงคุณภาพโดย Fluorescence microscopy

เซลล์ SiHa ที่บ่มด้วยสาร A1B4 ที่ความเข้มข้น IC_{50} , IC_{80} และ สาร doxorubicin IC_{50} เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบจำนวนเซลล์ในรูปของ JC-1 monomer ให้การเรืองแสงสีเขียวเพิ่มขึ้นถึง 18.1, 2.5 และ 27.6 % ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีเพียง 1.0% ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาด้วย Fluorescence confocal microscopy พบว่าในกลุ่มควบคุมสี JC-1 อยู่ในรูป JC-1 aggregates เซลล์ให้การเรืองแสงสีแดง ในขณะที่กลุ่มที่บ่มด้วยสาร A1B4 และกลุ่มที่บ่มด้วย doxorubicin พบว่าสี JC-1 อยู่ในรูป JC-1 monomers ให้การเรืองแสงสีเขียว (รูปที่ 26)

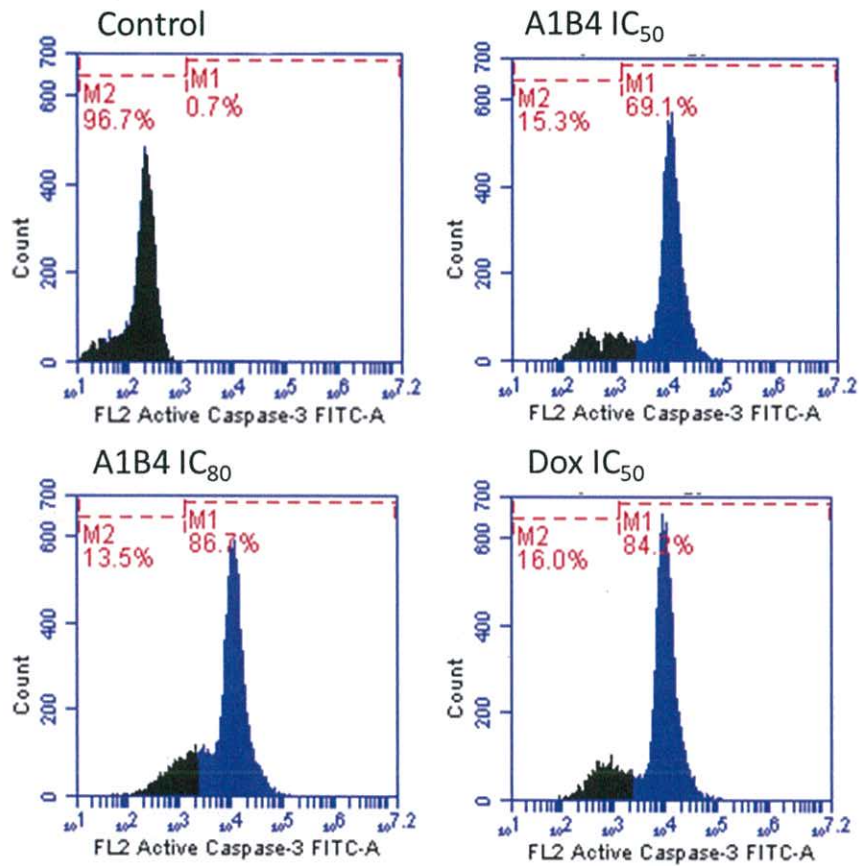


รูปที่ 26 แสดงความต่างศักย์ที่เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียของเซลล์ SiHa จากการติดสี JC-1 (ซ้าย) ข้อมูลเชิงปริมาณวัดโดย Flow cytometry: P1 และ P2 แสดงถึงเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่เรืองแสงสีแดง และสีเขียวตามลำดับ (ขวา) ข้อมูลเชิงคุณภาพโดย Fluorescence microscopy

6.6 การวัด caspase 3 activity โดย FITC Rabbit Anti-Active Caspase-3

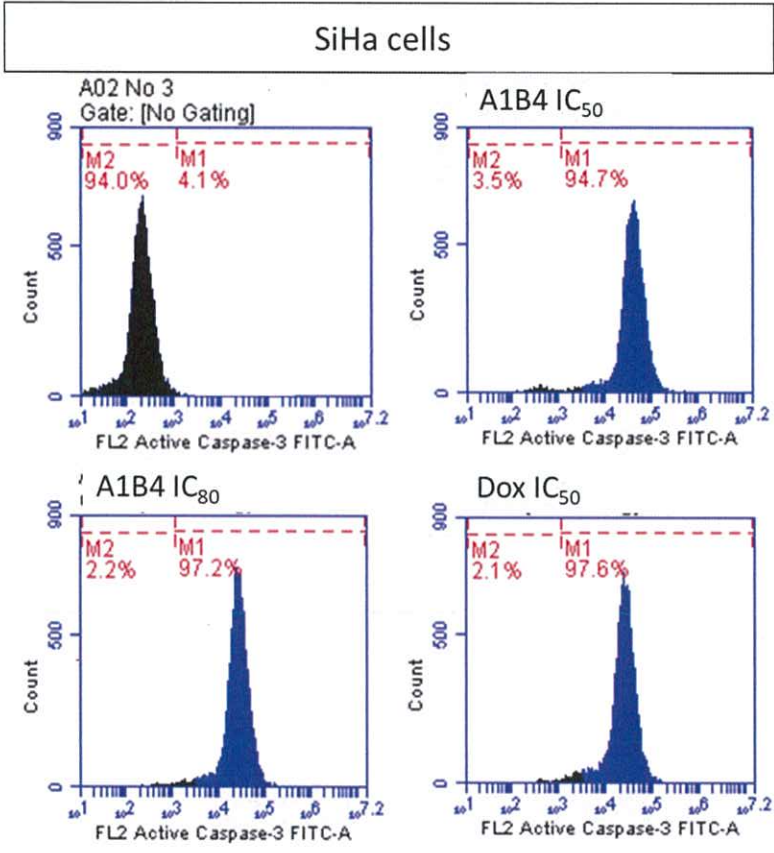
เซลล์ปกติพบ Caspase-3 ในรูป pro-enzyme ขนาด 32 kDa เมื่อเซลล์เกิด apoptosis จะเกิด active caspase-3 ขนาด 17-22 kDa ซึ่งสามารถจับกับ antibody ที่ต่อกับสารเรืองแสง (FITC Rabbit Anti-Active Caspase-3) ผลการทดลองพบว่ากลุ่มเซลล์ CaSki ที่ป่มด้วยสาร A1B4 ที่ความเข้มข้น IC₅₀, IC₈₀ และ สาร doxorubicin IC₅₀ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบจำนวนเซลล์ที่จับกับ antibody-active caspase-3 ให้การเรืองแสงเพิ่มขึ้นถึง 69.1, 86.7 และ 84.2 % ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีเพียง 0.7% (รูปที่ 27)

CaSki cells



รูปที่ 27 แสดง active caspase-3 จับกับ antibody ที่ติดกับสารเรืองแสง (FITC Rabbit Anti- Active Caspase-3), เซลล์ CaSki ถูกย้อมด้วย Caspase-3 antibody และวิเคราะห์โดย Flow cytometry: M1 แสดงถึงเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มี active caspase-3

เซลล์ SiHa ที่บ่มด้วยสาร A1B4 ที่ความเข้มข้น IC₅₀, IC₈₀ และ สาร doxorubicin IC₅₀ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบจำนวนเซลล์ที่จับกับ antibody-active caspase-3 ให้การเรืองแสงเพิ่มขึ้นถึง 94.7, 97.2 และ 97.6 % ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีเพียง 4.1% (รูปที่ 28)



รูปที่ 28 แสดง active caspase-3 จับกับ antibody ที่ต่อกับสารเรืองแสง (FITC Rabbit Anti- Active Caspase-3), เซลล์ SiHa ถูกย้อมด้วย Caspase-3 antibody และวิเคราะห์โดย Flow cytometry: M1 แสดงถึงเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มี active caspase-3

อภิปราย/วิจารณ์ผลการวิจัย

(Discussion)

งานวิจัยครั้งนี้เป็นงานวิจัยที่มุ่งเน้นไปที่การพัฒนาตัวยาต้านมะเร็งกลุ่มใหม่ คือ กลุ่ม small molecule ของการรักษามะเร็งแบบจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็ง หรือ targeted therapy โดยเลือกอนุพันธ์ของสาร aeropylsinin-1 และ fluorosalan มาเป็นสารต้นแบบ (lead compound) ในการพัฒนา โดยมีเป้าหมายในการออกฤทธิ์ที่เอนไซม์ IKB kinase beta (IKK- β) ซึ่งในขบวนการพัฒนายาต้านมะเร็งนี้ ผู้วิจัยได้นำเอาเทคนิคการออกแบบยาโดยใช้กระบวนการทางคอมพิวเตอร์ (Computer-aided drug design) มาใช้ในระดับขั้นตอนการออกแบบยา ซึ่งขั้นตอนนี้สามารถทำได้ในงานวิจัยครั้งนี้เนื่องจากเป้าหมาย คือ enzyme IKB kinase beta (IKK- β) มีอยู่ในฐานข้อมูลของ protein data bank ทำให้สามารถจำลองจุดออกฤทธิ์ (active site simulation) ของสารและการจับกันของสารกับ enzyme ในโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ได้ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากกระบวนการทางคอมพิวเตอร์ของสารต้นแบบและสารที่ออกแบบ จะถูกนำมาพิจารณาและเปรียบเทียบเพื่อดูโอกาสและความเป็นไปได้ว่าสารที่ออกแบบ จะมีแนวโน้มเป็นสารที่มีฤทธิ์มากน้อยเพียงใด ซึ่งขั้นตอนนี้สามารถจำลองโมเลกุลได้หลากหลายและทำซ้ำๆ ได้ จนกว่าจะได้สารที่คาดว่าจะมีฤทธิ์ดี และในงานวิจัยนี้ ได้สารที่มาจากกระบวนการนี้ คือ 5-bromo-N-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxybenzamide (A1B4) จากนั้นเลือกกระบวนการสังเคราะห์ที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของสารนี้ โดยวิธีการที่เรียกว่า retro synthesis จากโครงสร้างของ 5-bromo-N-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxybenzamide (A1B4) พบว่ามีพันธะ amide อยู่ในโมเลกุลซึ่งสามารถเลือกกระบวนการสังเคราะห์ด้วยปฏิกิริยา amidation โดยใช้สารตั้งต้น คือ 3-trifluoromethyl aniline และ 3-bromosalicylic acid

หลังจากผ่านกระบวนการทำสารให้บริสุทธิ์ด้วย column chromatography แล้ว สารที่ได้จะนำมาตรวจสอบโครงสร้างว่าเป็นสารเดียวกับที่ได้ออกแบบไว้หรือไม่ ด้วยกระบวนการทาง spectroscopy คือ Infrared spectroscopy, ^1H และ ^{13}C -NMR spectroscopy, mass spectroscopy และ CHN analysis โดย IR spectrum จะบอกถึงการเปลี่ยนแปลงของ functional groups ที่เกี่ยวข้องในการทำปฏิกิริยา สำหรับ ^1H และ ^{13}C -NMR spectrum จะบอกถึงตำแหน่ง ชนิดและจำนวนของ protons และ carbons ที่มีในโมเลกุลและสัมพันธ์กันอย่างไรในโครงสร้าง ส่วน mass spectrum จะบอกถึงมวลของโครงสร้างสารและการแตกหักของโครงสร้างซึ่งจะให้มวลประจุที่สัมพันธ์กับส่วนที่เกิดจากการแตกหัก ท้ายที่สุด CHN analysis เป็นการวิเคราะห์ถึง atoms ที่เป็นองค์ประกอบในโครงสร้าง คือ carbon, hydrogen, nitrogen, oxygen, halogen และ atoms อื่นที่มีในโครงสร้าง ซึ่งผลจาก

spectroscopy and elemental analysis สอดคล้องกับโครงสร้างของสาร 5-bromo-N-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-hydroxybenzamide (A1B4) มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 360.13 และมีสูตรโมเลกุล คือ $C_{14}H_9BrF_3NO_2$ โดยมีจุดหลอมเหลวที่ $208.7^\circ C$ และเป็นสารสังเคราะห์ชนิดใหม่ ซึ่งพัฒนาโครงสร้างจากสารต้นแบบ Aeroplysin-1 และ Fluorosalan ตามที่ได้ออกแบบไว้

การศึกษาประสิทธิภาพของสาร A1B4 ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก 2 ชนิด คือ CaSki และ SiHa cell lines พบว่าสารยับยั้งการเติบโตของ SiHa cells ได้ดีกว่า CaSki cells ซึ่งอาจเนื่องมาจากจำนวน HPV genome copies ใน CaSki cells (600 copies of HPV per cell) มากกว่าใน SiHa cells (1-2 copies of HPV per cell) ซึ่ง HPV copies ในเซลล์นั้นมีความสัมพันธ์กับการเกิด mutation ของ p53 gene (tumor suppressor gene) ซึ่งกระตุ้นการทำงานของ transcription factor เช่น E2F และ NF- κ B ทำให้มีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน สร้างหลอดเลือดใหม่ ยับยั้งการตายแบบ apoptosis และมีการแสดงออกของยีนกลุ่ม anti-apoptosis เช่น Bcl-2, Bcl-x1, FLIP จากผลของ MTT assays แสดงให้เห็นว่า สาร A1B4 ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก และออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ทำให้วัฏจักรเซลล์หยุดอยู่ในระยะ G2 และ S และเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายผ่านกระบวนการ apoptosis ในการวิจัยนี้พบว่าสาร A1B4 มีพิษน้อยมากต่อ HaCaT cells ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์เพาะเลี้ยงที่ไม่ได้เกิดจากเซลล์มะเร็ง (human non-cancer cell lines) แสดงให้เห็นว่า HaCaT cells กับ CaSki cells และ SiHa cells ซึ่งเป็น epithelium cells นั้นมีการส่งสัญญาณการอยู่รอดที่แตกต่างกัน ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า สาร A1B4 นั้นเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก แต่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

การศึกษากลไกการตายแบบ apoptosis ของสาร A1B4 ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งปากมดลูกตายนั้น พบว่าสาร A1B4 กระตุ้นให้เกิดสัญญาณ apoptosis ภายในเซลล์ ส่งผลทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเฉพาะ คือ เซลล์หดตัว (cell shrinkage) เยื่อหุ้มเซลล์มีลักษณะเป็นถุง (plasma membrane blebbing) นิวเคลียสรวมตัวกันแน่น (nuclear condensation) โครมาตินเกาะกลุ่ม (chromatin condensation) DNA ถูกย่อยเป็นชิ้นเล็กๆ (DNA fragmentation) และในระยะสุดท้ายส่วนของเซลล์มีการแตกย่อยเป็นชิ้นเล็กๆ เรียก apoptotic bodies ซึ่งหากอยู่ในร่างกาย ส่วนของ apoptotic bodies จะถูกกำจัดโดยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ macrophage จึงไม่เกิดการกระจายของพยาธิสภาพไปยังเซลล์ข้างเคียง คือไม่ทำให้เกิดการอักเสบเหมือนกับการตายแบบ necrosis ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์จากการศึกษาด้วย microscopy เหมือนกับที่กล่าวมาข้างต้น แต่เป็นการทดสอบในหลอดทดลอง (in vitro) ซึ่งเซลล์ไม่ถูกกำจัดโดยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ดังนั้นเซลล์ที่เกิด apoptosis ในการทดลองครั้งนี้อาจพัฒนาต่อไป

เป็น late apoptosis และ necrosis ได้ การศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าของ Aeroplysin-1 พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Colon cancer cells) กระตุ้นการตายแบบ Apoptosis ผ่านทางการยับยั้งสัญญาณ Wnt/Beta-catenin และกระตุ้นเอนไซม์ Caspase-3

สาร A1B4 ทำให้เกิดการแตกของ DNA ซึ่งเป็นการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Quantitative analysis) และคุณภาพ (Qualitative analysis) จากการย้อมด้วยสี Propidium และ DAPI ตามลำดับ กลไกในระดับ โมเลกุลพบว่าสาร A1B4 เพิ่มระดับ ROS ในเซลล์ โดยทั่วไป ROS มีผลกระตุ้นให้เซลล์มีชีวิต หรือให้เซลล์ตายได้ ซึ่งเป็นการส่งสัญญาณแบบ Redox และเซลล์มะเร็งใช้ ROS ในการส่งสัญญาณเพื่อให้เซลล์มีชีวิตรอด ดังนั้นเซลล์มะเร็งจึงมีระดับ ROS สูงกว่าในเซลล์ปกติ เมื่อได้รับยาต้านมะเร็งในขนาดความเข้มข้นเท่ากัน พบว่าเซลล์มะเร็งจะมีระดับ ROS ที่เป็นพิษต่อเซลล์สูงกว่าในเซลล์ปกติ ถ้าในเซลล์มี ROS มาก เซลล์จะอยู่ในภาวะ Oxidative stress ซึ่งก่อให้เกิดการส่งสัญญาณการตายได้ การหาระดับ ROS ภายในเซลล์ที่สามารถเปลี่ยนจากเซลล์มีชีวิตให้เป็นเซลล์ที่สร้างสัญญาณการตายนั้น เป็นกลยุทธ์ใหม่ในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็ง นอกจากนี้เพิ่มระดับ ROS ในเซลล์ มีผลทำให้มีการทำลายโปรตีนใน Respiratory electron transport chain มีการรั่วของอิเล็กตรอน เหนี่ยวนำให้สูญเสียความต่างศักย์ที่เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย (Mitochondria depolarization) ทำให้ไมโทคอนเดรียบวม เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียเกิดรอยรั่ว Mitochondria permeability transition pore (PTP) สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงนี้ได้จากการย้อมไมโทคอนเดรียด้วยสี JC-1 ซึ่งเป็น lipophilic cation เมื่อเซลล์สูญเสียความต่างศักย์ สี JC-1 จะสะสมในรูปแบบ JC-1 monomer เมื่อ PTP เปิด จะมีโปรตีน Apoptogenic factors เช่น Cytochrome C รั่วออกมาจากไมโทคอนเดรียเข้าสู่ไซโตซอล กระตุ้นให้ Effector caspases ทำงาน และเหนี่ยวนำให้เซลล์มีการตายแบบ Apoptosis โดยเอนไซม์ Caspases (Cysteine aspartyl-specific proteases) ในส่วนที่เป็น Effector caspases ได้แก่ Caspase-3 เมื่อถูกกระตุ้นให้ทำงานจะย่อยโปรตีนโครงสร้างต่างๆ ได้แก่ actin, fodrin, และ lamin ทำให้เซลล์หดตัวมีขนาดเล็กลง (Shrinkage) นอกจากนี้ Caspase-3 ยังส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ Caspase-activated DNase ทำให้เกิด DNA fragmentation การศึกษานี้ได้แสดงถึงสาร A1B4 และ doxorubicin สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งปากมดลูกเกิด Apoptosis ผ่าน ROS, สูญเสียความต่างศักย์ที่ Mitochondria และกระตุ้นเอนไซม์ Caspase-3

สาร A1B4 มีประสิทธิภาพในระดับหลอดทดลอง (in vitro) ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ ขณะเดียวกัน สาร A1B4 มีพิษน้อยมากต่อเซลล์ปกติ ซึ่งแสดงถึงการมี cytoselectivity ของสาร และการที่สารนี้ออกฤทธิ์จำเพาะมุ่งเป้าที่เซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติ (targeted therapy) จึงลดผลข้างเคียงและความเป็นพิษต่อเซลล์ทั่วไปลงและมีความปลอดภัยสูงกว่า

ยาเคมีบำบัดแบบเดิม โดยการพัฒนายาต้านมะเร็งแบบมุ่งเป้าโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ช่วยในงานวิจัยนี้ เป็นแนวทางในการพัฒนายาใหม่ที่ให้ผลเร็วถือเป็นจุดเริ่มต้นและเป็นต้นแบบของงานวิจัยที่ลดต้นทุน งบประมาณและเวลาในการวิจัย ซึ่งผลงานวิจัยเมื่อพัฒนาเป็นยาต่อไปในอนาคตแล้วสามารถลดค่าใช้จ่ายในรักษา สร้างความเข้มแข็งในเชิงพาณิชย์และอุตสาหกรรม และความเข้มแข็งและแข่งขันในด้านการแพทย์ได้

สรุปและเสนอแนะ

ข้อเสนอแนะ

1. ควรออกแบบสารหลากหลาย series และเลือกสารใน series ที่สามารถสังเคราะห์ได้มาเริ่มวิจัยในขั้นต่อไป
2. ควรมีการทบทวนเพื่อหา lead compounds ไว้มากกว่า 1 สาร เพื่อความคล่องตัวในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างในขั้นตอนการออกแบบ
3. ควรสังเคราะห์สารให้ได้ผลผลิตในปริมาณมากเพียงพอในครั้งเดียวเพื่อความสะดวกและรวดเร็วในการใช้พิสูจน์โครงสร้างและทดสอบฤทธิ์ต่อเนื้องอก
4. ควรระวังการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการ
5. การใช้ความเข้มข้นของโปรตีน เช่น ซีรัมอัลบูมิน ในปริมาณที่สูง อาจก่อให้เกิดการตกตะกอนเมื่อเติม MTT solvent
6. ควรทดสอบฤทธิ์สารในเซลล์มะเร็งหลากหลายชนิด
7. ควรมีการศึกษากลไกการตายแบบอะพอโทซิสในสารที่แสดงฤทธิ์ด้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

ปัญหา

1. ไม่สามารถสังเคราะห์สารตั้งต้นและสารที่จำเป็นต้องใช้ในการสังเคราะห์ได้ เนื่องจากสารบางตัวไม่อนุญาตให้นำเข้าในประเทศ
2. ไม่สามารถสังเคราะห์สารได้ เนื่องจากปฏิกิริยา amidation ระหว่างสารตั้งต้นเกิดช้าและได้สารใหม่น้อยมากไม่เพียงพอต่อการนำไปทดสอบขั้นต่อไป
3. ไม่สามารถทดสอบฤทธิ์ของสารได้ เนื่องจากสารที่สังเคราะห์ได้ ตกตะกอนในตัวกลางที่ใช้ทดสอบฤทธิ์
4. ไม่สามารถสังเคราะห์และทดสอบฤทธิ์สารหลายตัวพร้อมกันได้ เนื่องจากสารตั้งต้นซื้อหาได้ยาก ง่ายต่างกัน และต้องรอการนำเข้าประมาณ 60-90 วัน ทำให้งานล่าช้าไปด้วย

เอกสารอ้างอิง

(References)

1. "Defining Cancer". <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>. Cited; May 24, 2018.
2. "Cancer Fact sheet N°297". February 2014.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Cited; May 24, 2018.
3. "The top 10 causes of death Fact sheet N°310". May 2014.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>. Cited; May 24, 2018.
4. *World Cancer Report 2014*. World Health Organization. 2014. pp. Chapter 1.1. ISBN 9283204298. Cited; May 24, 2018.
5. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11
6. Plummer M, de Martel C, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Franceschi S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Health*. 2016 Sep; 4(9):e609-16. doi: 10.1016/S2214-109X(16)30143-7.
7. Cancer Facts & Figures 2018, American Cancer Society,
<https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2018.html> Cited; May 24, 2018.
8. GBD 2015 Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016 Oct; 388 (10053):1659-1724.
9. Waggoner, Steven E. "Cervical Cancer". *The Lancet* 2003. 361 (9376): 2217-25. doi: 10.1016/S0140-6736(03)13778-6.
10. Lind M.J., M.J. "Principles of cytotoxic chemotherapy". *Medicine* 2008, 36 (1): 19 - 23. doi:10.1016/j.mpmed.2007.10.003

11. National Cancer Institute (Dec 2012). "Targeted Cancer Therapies". <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/targeted>
12. Abramson, R. 2017. Overview of Targeted Therapies for Cancer. *My Cancer Genome*
<https://www.mycancergenome.org/content/molecular-medicine/overview-of-targeted-therapies-for-cancer/> (Updated August 1).
13. Understanding Targeted Therapy <https://www.cancer.net/navigating-cancer-care/how-cancer-treated/personalized-and-targeted-therapies/understanding-targeted-therapy>.
14. Florian R. G, Lars E, Tim F. G, Jin M P, Zhi-Wei L, Laurence J. E, Martin F. K, and Michael Karin. IKK β Links Inflammation and Tumorigenesis in a Mouse Model of Colitis-Associated Cancer. *Cell* 2007, Vol. 118, 285 - 296.
15. Hacker H, Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE* 2006;2006:re13.
16. Yanting Z, Rena G. L, Peiyan L, Eun Y C, Samusi A, Arif H, Xinghuan W, Xuefeng L and Han C. D. Targeting IKK kinase β /NF- κ B signaling in human prostate cancer by a novel IKK kinase β inhibitor CmpdA. *Mol Cancer Ther.* 2016 Jul; 15(7): 1504 - 1514.
17. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:49–62
18. Scheidereit C. IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene* 2006;25:6685–705.
19. Angustias P, Manuel N, Cristian SC, Ana B and Angel R. Context-Dependent Role of IKK β in Cancer. *Genes* 2017, 8, 376; doi:10.3390.
20. Gamble, Kathryn McIntosh, Rebecca Scott, Ka Ho Ho, Robin Plevin, and Andrew Paul. *Inhibitory kappa B kinases as targets for pharmacological regulation* *Br J Pharmacol.* 2012 Feb; 165(4): 802–819. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01608.x

21. Dung-Fang Lee and Mien-Chie Hung. Advances in Targeting IKK and IKK-Related Kinases for Cancer Therapy. *Clin Cancer Res.* 2008 Sep 15; 14(18): 5656–5662. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0123
22. Helen M. B, John W, Zukang F, Gary Gd, Bhat T. N, Helge W, Ilya N. S and Philip E. B. The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Res.* 2000 Jan 1; 28(1): 235–242.
23. Rose PW1, Bi C, Bluhm WF, Christie CH, Dimitropoulos D, Dutta S, Green RK, Goodsell DS, Prlic A, Quesada M, Quinn GB, Ramos AG, Westbrook JD, Young J, Zardecki C, Berman HM, Bourne PE. The RCSB Protein Data Bank: new resources for research and education. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41(Database issue):D475-82. doi: 10.1093/nar/gks1200.
24. Awanish K, Drug Development Strategies. in *Anticandidal Agents*, 2017.
25. David Cavalla, *Chemoinformatics Software Programs. The Practice of Medicinal Chemistry (Fourth Edition)*, 2015.
26. Fuqiang Ban, Kush Dalal, Huifang Li, Eric LeBlanc, Paul S. Rennie, and Artem Cherkasov. Best Practices of Computer-Aided Drug Discovery: Lessons Learned from the Development of a Preclinical Candidate for Prostate Cancer with a New Mechanism of Action. *J. Chem. Inf. Model.*, 2017, 57 (5), pp 1018-1028. DOI: 10.1021/acs.jcim.7b00137
27. Yu W, MacKerell AD Jr. Computer-Aided Drug Design Methods. *Methods Mol Biol.* 2017;1520:85-106. doi: 10.1007/978-1-4939-6634-9_5.
28. García-Vilas JA, Martínez-Poveda B, Quesada AR, Medina MÁ. Aeropylsinin-1, a Sponge-Derived Multi-Targeted Bioactive Marine Drug. *Mar Drugs.* 2016;14(1):1-12.
29. Martínez-Poveda B, García-Vilas JA, Cardenas C, Melgarejo E, Quesada AR, Medina MA. The Brominated Compound Aeropylsinin-1 Inhibits Proliferation and the Expression of Key ProInflammatory Molecules in Human Endothelial and Monocyte Cells. *PLoS One.* 2013;8(1):e55203.
30. Teeyapant R, Woerdenbag H, Kreis P, Hacker J, Wray V, Witte L, et al. Antibiotic and Cytotoxic Activity of Brominated Compounds from the Marine Sponge *Verongia aerophoba*. *Z Naturforsch C.* 1993;48(11-12):939-45.

31. Su J.H, et al. Towards the Small and the Beautiful: A Small Dibromotyrosine Derivative from *Pseudoceratina* sp. Sponge Exhibits Potent Apoptotic Effect through Targeting IKK/NF- κ B Signaling Pathway *Mar Drugs*. 2013;11:3168-85.
32. Martínez-Poveda B, Rodríguez-Nieto S, García-Caballero M, Medina M, Quesada A. The antiangiogenic compound aerophysinin-1 induces apoptosis in endothelial cells by activating the mitochondrial pathway. *Mar Drugs*. 2012;10 (9): 2033-46.
33. P.R. Twentyman & M. Luscombe. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br. J. Cancer*. 1987, 56, 279-285.
34. Alley MC, Scudiere DA, Monks A, Czerwinski M, Shoemaker R, Boyd MR. Validation of an automated microculture tetrazolium assay (MTA) to assess growth and drug sensitivity of human tumor cell lines. *Proc Am Assoc Cancer Res*. 1986; 27: 389-91
35. Morgan DML. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. *Methods Mol Biol*. 1998; 79: 179-84.
36. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev*. 2005; 11: 127-52.
37. van Meerloo J, Kaspers GJL, Cloos J. Cell sensitivity assays: The MTT assay. *Methods Mol Biol*. 2011; 731: 237-45.
38. Liddle J, et al. 4-Phenyl-7-azaindoles as potent and selective IKK2 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009, 1;19(9):2504-8.
doi: 10.1016/j.bmcl.2009.03.034.
39. Liddle J, Bamborough P, Barker M D, Campos S, Chung C W, Cousins R P, Faulder P, Heathcote M L, Hobbs H, Holmes D S, Ioannou C, Ramirez-Molina C, Morse M A,
40. Osborn R, Payne J J, Pritchard J M, Rumsey W L, Tape D T, Vicentini G, Whitworth C, Williamson R A. 4-Phenyl-7-azaindoles as potent, selective and bioavailable IKK2 inhibitors demonstrating good in vivo efficacy. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012, 15;22(16):5222-6. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.06.065.