

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

22

รายงาน

โครงการวิจัย

ศึกษาความสามารถในการยับยั้งการขับยาในกลุ่ม anthracyclines
ออกนอกเซลล์โดย P-glycoprotein ด้วยโมเลกุลธรรมชาติในเซลล์
มะเร็ง K562 ที่ดื้อต่อยา doxorubicin

ผู้วิจัย

ดร. สำรี มั่นเขตต์กรณ์

นายไพบุลย์ เรืองพัฒน์พงษ์

นางชัชชนก เลิศชุตินาท

หัวหน้าโครงการ

ผู้ร่วมวิจัย

ผู้ร่วมวิจัย

Lab. Physical Chemistry, Molecular and Cellular Biology

Faculty of Science, Burapha University

ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน ประเภท
อุดหนุนทุนวิจัย ปีงบประมาณ 2542 มหาวิทยาลัยบูรพา

- 3 ม.ค. 2544

143199

AQ 0000410

คำประกาศกิตติคุณ

โครงการวิจัยเรื่องการศึกษาความสามารถการยับยั้งการขับยาในกลุ่ม antracyclines ออกนอกเซลล์โดย P-glycoprotein ที่ดื้อต่อยา doxorubicin ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน ประเภทอุดหนุนทุนวิจัย ปีงบประมาณ 2542 มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยนี้ได้ทำการวิจัยที่ Lab. Physical Chemistry, Molecular and Cellular Biology คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ

1. น.ส. วีน่า นงเยาว์
2. น.ส. จีระประภา หะมณี

ที่ได้ร่วมทำการทดลองบางส่วน

บทคัดย่อ

การดื้อยาแบบ MDR เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้การรักษามะเร็งด้วย เคมีรักษามีประสิทธิภาพต่ำหรือไม่ได้ผล กลยุทธ์ในการแก้ปัญหาการดื้อยาคือ การทำให้ความเข้มข้นของยาภายในเซลล์สูงขึ้น โดยการ (1) ออกแบบ หรือ เลือกโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพในการต้านมะเร็งสูง และ ไม่ถูกขับออกนอกเซลล์โดย P-glycoprotein (2) ตรวจสอบเลือกโมเลกุลที่สามารถยับยั้งการทำงานของ (inhibitor) ของ P-glycoprotein และ (3) ตรวจสอบเลือกโมเลกุลที่มีผลต่อ ระบบพลังงานของเซลล์ โดยเฉพาะต่อ mitochondria ของเซลล์ MDR

ในการศึกษานี้พบว่า โมเลกุล dextrans ที่มีขนาดโมเลกุล 6000 Da 60000 Da 110000 500000 Da และ 1,000,000 Da ไม่ยับยั้งการทำงานของ P-glycoprotein ทั้งในการศึกษาทาง จลศาสตร์ และการศึกษาพิษ ร่วมกับ pirarubicin โมเลกุล qinghaosu ได้แก่ artemisinin , dihydroartemisinin และ artesunate มีคุณสมบัติต้านมะเร็งชนิด K562 โดยสามารถยับยั้งการ เพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ดื้อต่อยาได้เท่ากับเซลล์ที่ไวต่อยา โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $15 \pm 5 \mu M$, $1 \pm 0.2 \mu M$, $1 \pm 0.3 \mu M$ และ ค่า RF เท่ากับ 2, 1, และ 1.4 สำหรับ artemisinin, dihydroartemisinin, artesunate ตามลำดับ qinghaosu ทั้ง 3 โมเลกุล สามารถยับยั้งการทำงานของ P-glycoprotein ได้น้อยมาก แต่สามารถเสริมฤทธิ์ของ pirarubicin และ doxorubicin ได้ดีมาก และ ให้ผลเท่ากันทั้งใน THP และ doxorubicin ความเข้มข้นของโมเลกุล ที่ทำให้ค่า IC_{50} ของ pirarubicin ลดลงไป 50% ($\beta_{0.5}$) มีค่าดังนี้ $0.8 \pm 0.06 \mu M$, $0.13 \pm 0.06 \mu M$, $0.16 \pm 0.01 \mu M$ สำหรับ artemisinin, dihydroartemisinin, artesunate ตามลำดับ

สารบัญคำย่อ

MDR	multidrug resistance
P-gp	P-glycoprotein
ATP	adenosine triphosphate
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide
DNA	Deoxyribonucleic acid

สารบัญ

บทที่ 1 บทนำ.....	3
1.1 โครงสร้างและการทำงานของ P-GLYCOPROTEIN.....	3
1.2 กลยุทธ์ในการพิชิต MDR.....	6
บทที่ 2.....	8
2.1 CELL CULTURE.....	8
2.2 การทดสอบพิษของโมเลกุล ANTHRACYCLINES ต่อเซลล์.....	8
2.3 การเตรียมสารละลาย.....	10
2.4 การศึกษาจลศาสตร์การสะสมของโมเลกุล ANTHRACYCLINES ในเซลล์.....	10
2.4.1 การวัดปริมาณ ANTHRACYCLINES ที่สอดอยู่ระหว่างคู่เบสของ DNA ภายในNUCLEUS ของเซลล์.....	11
2.4.2 การวัดความเร็วเริ่มต้น (INITIAL RATE OF UPTAKE) ของการซึมผ่านเมมเบรนของโมเลกุล ANTHRACYCLINES.....	12
2.4.3 การวัดความเร็วในการปั๊มโมเลกุล ANTHRACYCLINES (ACTIVE EFFLUX) ออกนอกเซลล์โดย P-GLYCOPROTEIN.....	12
บทที่ 3.....	21
3.1 ผลของ DEXTRANS ต่อประสิทธิภาพของยา PIRARUBICIN.....	21
3.1.1 ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ P-GLYCOPROTEIN.....	21
3.1.2 ทดสอบการออกฤทธิ์เสริมกับยา PIRARUBICIN.....	24
สรุปผลการทดลอง.....	24
3.2 ความสามารถของ QINGHOASU ต่อการยับยั้งการตั๋วยา.....	25
3.2.1 พิษของ ARTEMISININ และสารอนุพันธ์ ต่อเซลล์ มะเร็งเม็ดเลือด K562.....	27
3.2.2 การออกฤทธิ์เสริมกับ PIRARUBICIN และ DOXORUBICIN.....	27

3.2.3 ความสามารถในการยับยั้งการขับ PIRARUBICIN และ DOXORUBICIN ออกนอกเซลล์.....	28
สรุปผลการทดลอง.....	28
เอกสารอ้างอิง.....	33

บทที่ 1 บทนำ

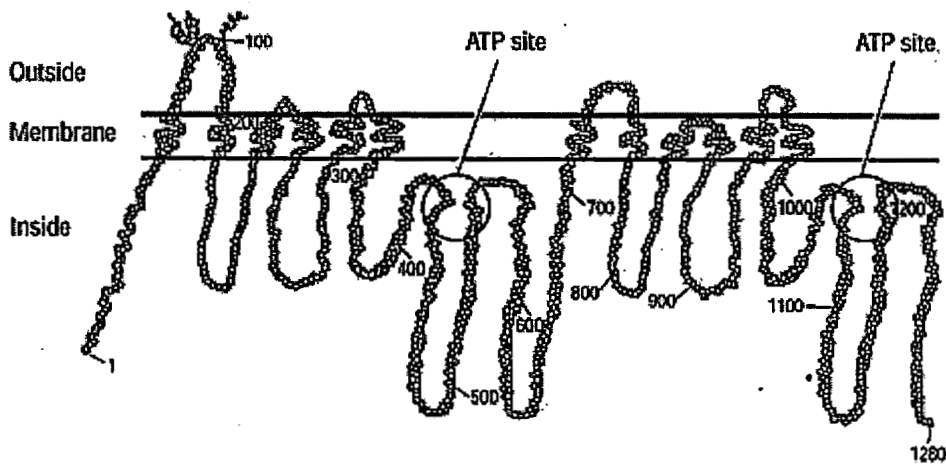
การดื้อยาแบบ multidrug resistance (MDR) เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้การรักษาโรคด้วยยาล้มเหลว ปรากฏการณ์การดื้อยาแบบ MDR ที่ได้รับการศึกษาอย่างมากคือการดื้อยาในมะเร็งในเนื้องอกที่เรีย ในเชื้อพลาสมาโมเดียม ในเอดส์ ใน โรค cystic fibrocyste และในโรคเบาหวาน เป็นต้น [1] ลักษณะการแสดงออกของเซลล์ MDR คือมีการสะสมของยาภายในเซลล์ต่ำ และเซลล์ MDR จะแสดงการดื้อต่อยาอีกหลายชนิด โดยไม่มีความสัมพันธ์ทั้งทางโครงสร้างทางเคมี และวิธีการออกฤทธิ์ของโมเลกุล ทั้งที่ไม่เคยได้รับมาก่อน สาเหตุของการดื้อยาแบบ MDR มีดังต่อไปนี้ (1) มีการปั๊มยาหรือโมเลกุลที่เป็นพิษจากภายในเซลล์ออกนอกเซลล์ โดยเซลล์ MDR จะสร้างเมมเบรนโปรตีน เช่น P-glycoprotein (P-gp) และ multidrug resistance associated protein (MRP) (2) เพิ่มขบวนการดักจับยาภายในออร์แกเนลล์ของเซลล์ เช่น lysosome และ Golgi bodies และขับออกนอกเซลล์ด้วยขบวนการ exocytosis (3) เพิ่มขบวนการซ่อมแซม DNA (4) เพิ่มความเป็นเบสในไซโตพลาสซึมทำให้ยาสะสมได้น้อยลง (5) โปรแกรมการตายของเซลล์ผิดปกติ [2-4] อย่างไรก็ตามปัญหาหลักของการดื้อยาแบบ MDR เกิดจากการปั๊มยาออกนอกเซลล์ของเมมเบรนโปรตีน

1.1 โครงสร้างและการทำงานของ P-glycoprotein

Julino and Ling ค้นพบว่าในเซลล์ Chinese hamster ovary ที่ดื้อต่อยา Colchicin จะมี P-glycoprotein ที่มีมวลโมเลกุล 170 kDa อยู่ที่ plasma membrane แต่ไม่พบในเซลล์ชนิดเดียวกันที่ไวต่อยา Colchicin [5]

Chen et al. และ Gros et al. พบว่า P-glycoprotein จะถูกควบคุม การผลิตโดยยีนส์ *mdr* [6-7] ทั้งในเซลล์ Prokaryote และ เซลล์ Eukaryote โดยในคนพบว่ามียีนส์ *mdr* อยู่ 2 ชนิดคือ *mdr-1* และ *mdr-2* โดยยีนส์ทั้งสองทำหน้าที่ควบคุมการผลิตโปรตีนที่คล้าย คลึงกัน แต่เฉพาะโปรตีนที่ถูกควบคุมการผลิตจากยีนส์ *mdr-1* เท่านั้นที่ทำหน้าที่ขับยาออกนอกเซลล์

P-glycoprotein ในคนมีขนาดโมเลกุลโดยเฉลี่ยประมาณ 170 kDa ประกอบด้วย กรดอะมิโน จำนวน 1280 โมเลกุล (รูปที่1) โดยแบ่งเป็น 2 subunits ที่คล้ายกัน แต่ละ subunit ประกอบด้วย 6 transmembrane domains และ 1 ATP binding site



รูปที่ 1 โครงสร้างของ P-glycoprotein

จากการวิเคราะห์โดยใช้ Antibodies ที่มีความจำเพาะต่อ P-glycoprotein พบว่ามีโปรตีน ชนิดนี้อยู่ในเซลล์ของเนื้อเยื่อปกติ เช่น ต่อมหมวกไต ตับ ปอด ม้าม ลำไส้ และหลอดเลือดฝอยในสมอง [8-11] ทำให้ตั้งสมมติฐานได้ว่า P-glycoprotein ทำหน้าที่ป้องกัน อวัยวะเหล่านี้จากสารพิษซึ่งเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่เราจำเป็นต้องมีความเข้าใจถึงการทำงานของ P-glycoprotein ปัจจุบันขบวนการที่ P-glycoprotein ขับยาออกนอกเซลล์ยังไม่ได้รับการพิสูจน์ Mankhetkorn *et al.* และ Lankelma *et al.* ได้พบว่า P-glycoprotein ขับโมเลกุล Anthracyclines ออกนอกเซลล์ ด้วยขบวนการ cooperative และ P-glycoprotein มี 2 binding sites สำหรับ Anthracycline [12-13] ที่ตรงข้ามกับ transportor อื่นๆ ในกลุ่ม ABC ซึ่งมีความจำเพาะต่อ Substrate แต่ละชนิด แต่ P-glycoprotein สามารถที่จะขับหรือขนถ่ายโมเลกุลที่หลากหลายอีกทั้งโมเลกุลเหล่านั้น ไม่มีความสัมพันธ์ทางโครงสร้างเคมีต่อกันเลย จึงเป็นเรื่องที่เข้าใจยากที่เอ็นไซม์ชนิดหนึ่ง แต่มีความจำเพาะต่อ substrate ที่กว้างขวางเช่น Anthracyclines

Vinca-alkaloids Actinomycin D, Cyclic และ Linear peptides และ Hydrophobic และ Amphiphilic compounds เช่น Verapamil Puromycin และ cyclosporin A เป็นต้น [14-15]

P-glycoprotein จัดอยู่ในกลุ่ม active transportor ABC (ATP-binding cassette) P-gp ขับยาออกนอกเซลล์ด้วยขบวนการที่ใช้พลังงานจาก ATP [16-17] ทำให้ความเข้มข้น ของยาใน เซลล์ไม่เพียงพอที่หยุดยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ ในเซลล์ MDR มีความต้องการพลังงานเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งทั่วไป เนื่องจากขบวนการปั๊มของ P-gp และพบว่า เซลล์ สามารถสร้าง ATP ได้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น ในเซลล์ *Ehr/adr* พบว่ามีการสังเคราะห์ ATP เพิ่มขึ้น [18] อันเนื่องจากมีเพิ่มขบวนการหายใจระดับเซลล์และ glycolysis ซึ่งสอดคล้องกับการที่ เซลล์ต้องใช้ด้าน Gradient ความเข้มข้นของ doxorubicin ภายในเซลล์ที่ต่ำเมื่อเทียบกับภายนอกเซลล์

ถ้าต้องการแก้ปัญหาการดื้อยาแบบ MDR อย่างมีเหตุมีผลจะต้องทำการ (1) ศึกษาการทำงานหรือธรรมชาติของเซลล์ดื้อยาเปรียบกับเซลล์ที่ไวต่อยา และเซลล์ปกติ (2) ศึกษาการทำงานของเมมเบรนโปรตีนที่ทำหน้าที่ปั๊มยาออกนอกเซลล์ในเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งจะช่วยให้ทราบถึงข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปตรวจเลือกโมเลกุลต้าน MDR ซึ่งหมายถึงโมเลกุล ที่เป็นพิษต่อเซลล์ MDR แต่ไม่ถูกปั๊มออกนอกเซลล์ หรือ โมเลกุลที่สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนเมมเบรนที่ทำหน้าที่ขับยาออกนอกเซลล์ โดยวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของยาด้านมะเร็งภายใน เซลล์

ในการศึกษานี้ได้เลือกศึกษาในเซลล์ MDR ชนิด K562/*adr* ซึ่งมีการสร้าง P-gp กลยุทธ์ในการเพิ่มความเข้มข้นของยาภายในเซลล์ MDR ถ้าพิจารณาถึงลักษณะการแสดงของเซลล์ MDR พบว่า

(1) ความเข้มข้นของยาภายในเซลล์ต่ำจนทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ต่ำ " ประสิทธิภาพของยาขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของยาที่สะสม อยู่ที่เป้าหมายออกฤทธิ์"

(2) การที่เซลล์ MDR สามารถต้านความแตกต่างของความเข้มข้นของยาระหว่างภายนอกเซลล์และภายในเซลล์ เนื่องมาจากการปั๊มยาของ P-gp ซึ่งต้องใช้ ATP "สถานภาพพลังงานของเซลล์ MDR จะต้องมีการใช้พลังงานสูงกว่าในเซลล์ปกติหรือในเซลล์ที่ไวต่อยา" การสังเคราะห์ ATP ภายในเซลล์มีอยู่ 2 ขบวนการคือ glycolysis ที่เกิดขึ้นใน cytoplasm โดยสารตั้งต้นที่เป็น glucose จะถูกเปลี่ยนเป็น pyruvate ซึ่งขบวนการนี้มีการสร้าง 2 mole ATP และขบวนการ oxidative phosphorylation ซึ่งเกิดในเมมเบรนด้านในของไมโทคอนเดรียซึ่งให้ 30 mole ATP ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญของเซลล์

1.2 กลยุทธ์ในการพิชิต MDR

กลยุทธ์ในการพิชิตเซลล์ MDR โดยการใช้โมเลกุล Inhibitor หรือ การรักษาร่วมระหว่างยาต้านมะเร็งและโมเลกุลที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของยาต้านมะเร็ง สามารถทำได้โดย (1) ตรวจสอบเลือกโมเลกุลยับยั้งที่เป็นซับสเตรทของ P-gp โดยตรง (2) ตรวจสอบเลือกโมเลกุลที่สามารถเปลี่ยนแปลงสถานภาพพลังงานของไมโทคอนเดรียของเซลล์ MDR โดยเฉพาะโมเลกุลที่มีความสามารถในการลดความต่างศักย์เมมเบรนของไมโทคอนเดรีย

จึงได้ทำการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ P-glycoprotein โดยโมเลกุล dextrans ที่มีขนาดมวลโมเลกุล 6000 Da 60000 Da 110000 Da 500000 Da และ 1000000 Da และโมเลกุล qinghoasu ได้แก่ artemisinin, dihydroartemisinin และ artesunate โดยพบว่า qinghoasu มีประสิทธิภาพในการเสริมฤทธิ์ของ Pirarubicin และ Doxorubicin สูงมากเฉพาะในเซลล์ที่ไวต่อยา K562/adr โดยไม่มีผลต่อเซลล์ที่ไวต่อยา เมื่อเทียบกับ inhibitor ที่เป็นที่รู้จักกันแพร่หลายอย่าง Verapamil และ Cyclosporine A ทั้งที่ qinghoasu มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ P-glycoprotein ต่ำมากมาก และพบอีกว่า โมเลกุล qinghoasu มีคุณสมบัติในการลดความต่างศักย์เมมเบรนของไมโทคอนเดรีย ทำให้ระดับ ATP ของเซลล์ต่ำลง จากการศึกษาทำให้สามารถเสนอกกลยุทธ์ใหม่ที่สำคัญ ที่จะสามารถพิชิต

ปัญหาการดื้อยาแบบ MDR ได้คือการตรวจเลือกโมเลกุลที่ออกฤทธิ์จำเพาะต่อไมโทคอนเดรีย
ของเซลล์ดื้อยา เช่น qinghoasu เป็นต้น

บทที่ 2

วิธีการทดลอง และวัสดุที่ใช้ในการทดลอง

2.1 Cell culture

เซลล์มะเร็งชนิด Erythromyeogenous leukemic cell (K562) ทั้งชนิดที่ไวและดื้อต่อยา Adriamycin ถูกเลี้ยง ในอาหารชนิด RPMI 1640 โดยเติม 10 % calf serum และ 1% Penicillin-Streptomycin บ่มในตู้บ่มที่ควบคุมความเข้มข้นของ CO₂ โดยปรับอุณหภูมิให้มีค่า 37 องศาเซลเซียส ความชื้น 95% และความเข้มข้นของ CO_{2(g)} 5 %

การเตรียมเซลล์เริ่มต้นในการเลี้ยง 10⁵ เซลล์ ต่อ มิลลิลิตร โดยเซลล์จะเจริญเข้าสู่ระยะ exponential phase ในระยะเวลา 72 ชั่วโมงซึ่งจะได้เซลล์ที่มีความเข้มข้นประมาณ 0.8-1 x 10⁶ เซลล์ ต่อ มิลลิลิตร และถ้าเตรียมเซลล์ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 5 x 10⁵ เซลล์ ต่อ มิลลิลิตร เซลล์จะเจริญเข้าสู่ระยะ exponential phase ในระยะเวลา 24 ชั่วโมงซึ่งจะได้เซลล์ที่มีความเข้มข้นประมาณ 0.8-1 x 10⁶ เซลล์ ต่อ มิลลิลิตร การนับจำนวนเซลล์ทำโดยใช้ hemocytometer

ปริมาณของเซลล์ตายทดสอบโดยการดำเนินการซึมเข้าสู่เซลล์ของโมเลกุล Trypan Blue โดยเซลล์ที่ตายแล้วจะสูญเสียความสามารถในการกั้นแยก Trypan Blue ตลอดระยะเวลาในการทดลองนี้พบเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ก่อนการทดลองแต่ละชุดไม่เกิน 1.2 ± 1%

2.2 การทดสอบพิษของโมเลกุล anthracyclines ต่อเซลล์

เซลล์ที่มีความเข้มข้น 5 x 10⁴ เซลล์ ต่อ มิลลิลิตร ถูกบ่มในอาหารเลี้ยงชนิด RPMI 1640 ที่มีปริมาตรสุทธิ 1 มิลลิลิตร โดยเติมความเข้มข้นของโมเลกุลที่ต้องการทดสอบเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แล้วนำไป บ่มในตู้บ่มที่ควบคุมความเข้มข้นของ CO₂ โดยปรับอุณหภูมิให้มีค่า 37 องศาเซลเซียส ความชื้น 95% และความเข้มข้นของ CO_{2(g)} 5 % เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ หรือปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตทดสอบโดยเติม 120 µL MTT (0.833 g/l) แล้วนำไปบ่มต่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำเซลล์ไปปั่นแยกและล้างตะกอนเซลล์

ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 1 ครั้ง เก็บตะกอนเซลล์และเติม 200 μL DMSO แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์คำนวณได้จากความสัมพันธ์ต่อไปนี้

$$\%IC = 100 \left\{ \frac{D.O._{(control)} - D.O._{(drug)}}{D.O._{(control)} - D.O._{(5 \times 10^4)}} \right\} \quad (1)$$

เมื่อ $D.O._{(control)}$ = จำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ ต่อ มิลลิลิตร โดยเลี้ยงในอาหารที่ไม่มียา

$D.O._{(drug)}$ = จำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ ต่อ มิลลิลิตร โดยเลี้ยงในอาหารที่มียา

ประสิทธิภาพของโมเลกุลแสดงโดยค่า IC_{50} ซึ่งหมายถึงความเข้มข้นของโมเลกุลที่ทดสอบที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ 50 %

Resistance Factor (RF) นิยามจากสัดส่วนของ IC_{50} ของเซลล์ที่ต่อยาต่อ IC_{50} ของเซลล์ที่ไวต่อยา

ประสิทธิภาพของโมเลกุลในการยับยั้งการทำงานของ P-glycoprotein เซลล์ที่มีความเข้มข้น 5×10^4 เซลล์ ต่อ มิลลิลิตร ถูกบ่มในอาหารเลี้ยงชนิด RPMI 1640 ที่มีปริมาตรสุทธิ 1 มิลลิลิตร โดยเติมความเข้มข้นของ pirarubicin หรือ doxorubicin และโมเลกุลที่ต้องการทดสอบเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แล้วนำไป บ่มในตู้บ่มที่ควบคุมความเข้มข้นของ CO_2 โดยปรับอุณหภูมิให้มีค่า 37 องศาเซลเซียส ความชื้น 95% และความเข้มข้นของ $CO_2(g)$ 5 % เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ประสิทธิภาพของโมเลกุลในการยับยั้งการทำงานของ P-glycoprotein ทำให้ระดับความเข้มข้นของยาภายในเซลล์สูง ใช้สัญลักษณ์ β คำนวณได้จากความสัมพันธ์ต่อไปนี้

$$\beta = \left(\frac{IC_{50R} - IC_{50RI}}{IC_{50R} - IC_{50S}} \right)$$

IC_{50R} คือความเข้มข้นของ anthracycline ที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ต่อยาได้ 50 %

IC_{50RI} คือความเข้มข้นของ anthracycline ที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ต่อยาได้ 50 % เมื่อมีโมเลกุลที่ยับยั้งการทำงานของ P-glycoprotein

IC_{50s} คือความเข้มข้นของ anthracycline ที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ไว ยาได้ 50 %

2.3 การเตรียมสารละลาย

สารละลายบัฟเฟอร์ HEPES-Na⁺ ประกอบด้วย NaCl 132 mM, KCl 3.5 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1.5 mM, HEPES 20 mM และ Glucose 5 mM ละลายในน้ำกลั่น 2 ครั้งโดยมีค่าความต้านทาน -18 MΩ ปรับ pH เป็น 7.3 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสด้วยสารละลาย NaOH 0.1 N

สารละลาย Anthracyclines เข้มข้นประมาณ 10⁻⁴ M ถูกเตรียมก่อนใช้งานและวัดความเข้มข้นด้วย Spectrophotometer รุ่น UV-2501 PC Shimadzu โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (Molar extinction coefficient) ที่ 480 นาโนเมตร เท่ากับ 11500 mol⁻¹.cm⁻¹.L

2.4 การศึกษาจลศาสตร์การสะสมของโมเลกุล anthracyclines ในเซลล์

การศึกษานี้ทำโดยใช้เทคนิค Spectrofluorometry ซึ่งเทคนิคนี้มีความแม่นยำสูงและมีประสิทธิภาพสูงทำให้สามารถวัดความเข้มข้นของยาที่เรืองแสง ในเซลล์โดยไม่ทำลายเซลล์และสมดุลย์ของระบบ

เทคนิค fluorescence นี้ตั้งอยู่บนพื้นฐานของการสังเกตการเรืองแสงของโมเลกุล Anthracyclines ซึ่งความเข้มของสัญญาณการเรืองแสงจะลดลง (Quenching) เมื่อโมเลกุล Anthracyclines เข้าไปสอดอยู่ระหว่างคู่เบสของ DNA โดยพบว่าการเกิด Quenching จะเกิดอย่างรวดเร็วทั้งในกรณีของ DNA ที่อยู่ในรูปของสารละลายและใน Isolated nucleus ของเซลล์

Fezard *et al.* [19-21] พบว่าโมเลกุล Anthracyclines ในรูป neutral สามารถซึมผ่าน (passive diffusion) เข้าไปในเซลล์ และปฏิกิริยาระหว่าง Anthracyclines และ liposomes หรือเซลล์ที่ไม่มี nucleus เช่น palletes และเม็ดเลือดแดง ไม่ปรากฏการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณการเรืองแสงของ Anthracyclines แต่พบว่ปฏิกิริยาระหว่าง Anthracyclines และ DNA ทำให้

สัญญาณการเรืองแสงดับ (Quenching) อย่างรวดเร็วทั้งในกรณีของ DNA ที่อยู่ในรูปของสารละลายและใน Isolated nucleus ของเซลล์ เช่นในกรณีของ DNA ที่อยู่ในรูปของสารละลาย จะเกิดภายในเวลา ต่ำกว่า 1 วินาที ในกรณีของ Isolated nucleus ของเซลล์จะเกิดภายในเวลา 10-15 วินาที แต่ในกรณีที่ เป็น Intact cell ที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ ที่มี Anthracyclines สัญญาณการเรืองแสงของโมเลกุลจะลดลงช้ากว่าอย่างมีนัยสำคัญทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของ Anthracyclines

การซึมผ่านของโมเลกุล Anthracyclines ไปยัง nucleus ถูกทำให้ช้าลงเนื่องจากมีเมมเบรนเป็นตัวจำกัด (limiting step) การลดลงของสัญญาณการเรืองแสงต่อเวลาคือความเร็วในการซึมผ่านของโมเลกุล Anthracyclines ผ่านเมมเบรนของเซลล์

2.4.1 การวัดปริมาณ Anthracyclines ที่สอดอยู่ระหว่างคู่เบสของ DNA ภายใน nucleus ของเซลล์

ให้ F_0 คือความเข้มของสัญญาณการเรืองแสงของ Anthracyclines ที่เวลา $t=0$ ซึ่งแสดงถึงความเข้มข้นของ Anthracyclines ที่เติมลงใน cuvette ที่บรรจุสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีเซลล์แขวนลอยอยู่ กวนให้สม่ำเสมอและควบคุมอุณหภูมิให้เท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ของเครื่อง spectrofluorometer (LS50B, Perkin Elmer)

ในกรณีของเซลล์ที่ไวต่อยาหรือเซลล์ที่ดื้อต่อยา สัญญาณการเรืองแสง ต่อเวลา $F=f(t)$ จะลดลงและคงที่ในที่สุด ซึ่งหมายถึงระบบ anthracyclines-cells จะเข้าสู่ภาวะคงที่ (steady-state) โดยความเข้มของสัญญาณการเรืองแสงเท่ากับ F_n

การลดลงของสัญญาณการเรืองแสงของ anthracyclines แสดงถึงปริมาณของ anthracyclines โดยรวมที่เข้าไปสอดอยู่ระหว่างคู่เบสของ DNA ภายใน nucleus ของเซลล์ ใช้สัญลักษณ์ C_n

$$C_n = \frac{C_T(F_0 - F_n)}{F_0} \quad (2)$$

เมื่อ C_T คือความเข้มข้นของ anthracyclines ที่เติมลงไปในการละลายที่มีเซลล์

ระบบ anthracyclines-cells เข้าสู่สภาวะสมดุล (equilibrium state) โดยเติม 0.01 % (v/v) ของสารละลาย Triton X-100 เพื่อ permeable plasma membrane ซึ่งที่สภาวะสมดุลนี้ ความเข้มข้นของสัญญาณการเรืองแสงใช้สัญลักษณ์ F_N และความเข้มข้นของ anthracyclines รวมใน nucleus คือ C_N

$$C_N = \frac{C_T(F_0 - F_N)}{F_N} \quad (3)$$

2.4.2 การวัดความเร็วเริ่มต้น (initial rate of uptake) ของการซึมผ่านเมมเบรนของ โมเลกุล anthracyclines

ความเร็วของการซึมผ่านเมมเบรนเข้าสู่ภายในเซลล์เริ่มต้น หาได้จากความชันของ กราฟการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสัญญาณการเรืองแสงต่อเวลา (รูปที่ 4)

$$(V^+)_{t=0} = \left(\frac{dF}{dt}\right)_{t=0} \left(\frac{C_T}{F_0}\right) \quad (4)$$

ซึ่งสามารถเขียนความสัมพันธ์ได้ดังนี้

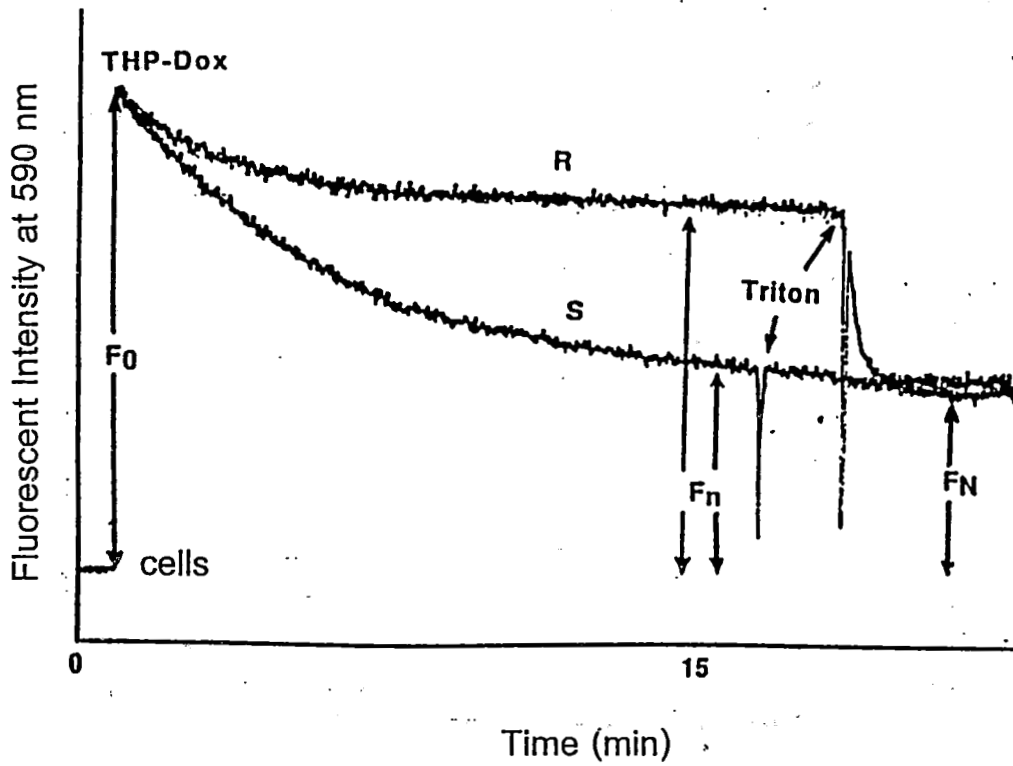
$$(V^+)_{t=0} = K_+ n C_T \quad (5)$$

ซึ่ง K_+ คือ rate constant of uptake

n คือ จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร

2.4.3 การวัดความเร็วในการปั๊มโมเลกุล anthracyclines (active efflux) ออกนอกเซลล์ โดย P-glycoprotein

โมเลกุล anthracyclines ซึมเข้าสู่ภายในเซลล์แบบ passive diffusion และถูกปั๊มออกนอกเซลล์โดย P-glycoprotein ในกรณีของโมเลกุลในกลุ่ม anthracyclines ดังที่กล่าวแล้วข้างต้นพบว่าที่สภาวะคงที่ โมเลกุลยาที่อยู่ภายนอกเซลล์ โมเลกุลยาสระที่อยู่ภายใน cytoplasm ของเซลล์ และโมเลกุลที่เข้าไปสอดอยู่ระหว่างคู่เบสของ DNA จะอยู่ในรูปสมดุล ทำให้ตั้งสมมุติ



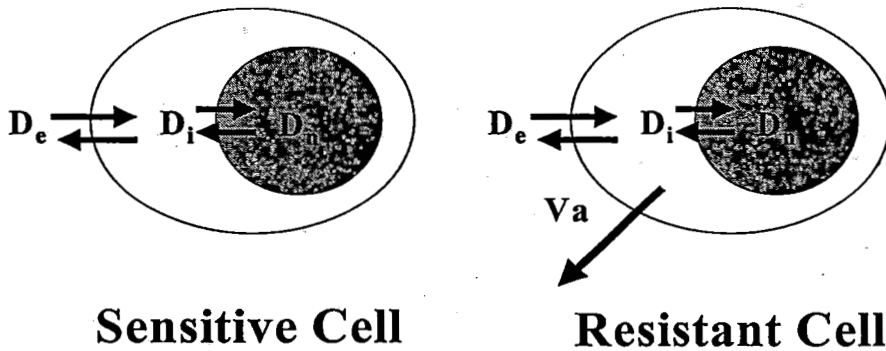
รูปที่ 4 จลศาสตร์การเข้าสู่เซลล์ที่ไวต่อยาและดื้อต่อยาของ Pirarubicin

การลดลงของสัญญาณการเรืองแสงที่ 590 นาโนเมตร ที่เวลาต่าง ๆ ของ Pirarubicin ในสารละลายที่มีเซลล์ที่ไวและดื้อต่อยา ความเข้มข้นของ Pirarubicin ที่เข้าไปสอดอยู่ระหว่างคู่เบสของ DNA ในสภาวะคงที่ (C_n) และสภาวะสมดุล (C_N) คำนวณได้ดังนี้

$$C_n = \frac{C_T(F_0 - F_n)}{F_0}$$

$$C_N = \frac{C_T(F_0 - F_N)}{F_N}$$

ฐานได้ว่าโมเลกุลของอิสระที่อยู่ภายใน cytoplasm ของเซลล์เป็น substrate ของ P-glycoprotein (รูปที่ 5)



Sensitive Cell

Resistant Cell

At Steady-state

$$V^+ + V^- = 0$$

$$V^+ + V^- + V_a = 0$$

รูปที่ 5 Model ของระบบการ incorporation ของ anthracyclines โดยแบ่งเซลล์ออกเป็น 3 compartments ได้แก่ extracellular cytoplasm และ nucleus

ในการศึกษานี้ได้คิดวิธีวัด ความเร็วในการบ่มยาโดย P-glycoprotein 2 วิธี คือการวัดโดยทางอ้อมและการวัดการทำงานของ P-glycoprotein โดยตรง

2.4.3.1 การวัดความเร็วในการบ่มยาโดย P-glycoprotein โดยทางอ้อม

วิธีการศึกษานี้ตั้งอยู่บนพื้นฐานการสังเกตต่อไปนี้

(1) neutral form (D^0) ของโมเลกุล anthracyclines จะซึมผ่าน plasma membrane เข้าสู่เซลล์แบบ passive diffusion

(2) Flux ของการซึมเข้าเซลล์ (F_+) ประกอบด้วย passive composition (J_+^0) ซึ่งอธิบายด้วย

Frick's law

$$F_+ = J_+^0 = P_+^0 [D_e^0] \quad (6)$$

ซึ่ง P_+^0 คือค่า permeability of membrane สำหรับโมเลกุลที่อยู่ในรูป neutral

D_e^0 คือความเข้มข้นของโมเลกุล anthracyclines อิสระที่อยู่ในรูป neutral ภายนอก เซลล์

(3) Flux ของการซึมออกนอกเซลล์ (F_-) ประกอบด้วย passive composition ของโมเลกุลใน รูป neutral (J_-^0) และ active composition (F_a)

$$F_- = J_-^0 = P_-^0 [D_i^0] + F_a \quad (7)$$

ซึ่ง P_-^0 คือค่า permeability of membrane สำหรับโมเลกุลที่อยู่ในรูป neutral

D_i^0 คือความเข้มข้นของโมเลกุล anthracyclines อิสระที่อยู่ในรูป neutral ภายใน cytoplasm

ซึ่งสามารถเขียนได้ว่า

$$P_+^0 = P_-^0 = P^0 \quad (8)$$

ที่สภาวะคงที่ Flux ซึมเข้ามีค่าเท่ากับ Flux ซึมออกซึ่งสามารถเขียนได้ว่า

$$P^0 (D_e^0)_s = [P^0 (D_i^0)_s + F_a] \quad (9)$$

ค่า active flux มีค่าเท่ากับ

$$F_a = P^0 [(D_e^0)_s - (D_i^0)_s] \quad (10)$$

ความเร็วในการปั๊มยาออกนอกเซลล์โดย P-glycoprotein มีค่าเท่ากับผลคูณของ Flux กับพื้นที่ ผิวทั้งหมดที่เกิดการแลกเปลี่ยน (S_T) ซึ่งความเร็วในการปั๊มโมเลกุล anthracyclines ที่สภาวะ คงที่สามารถเขียนได้ดังสมการที่ 11

$$(V_a)_s = (S_T P^0) [(D_e^0)_s - (D_i^0)_s] \quad (11)$$

พื้นที่ผิวทั้งหมดที่เกิดการแลกเปลี่ยน (S_T) มีค่าเท่ากับผลคูณของพื้นที่ผิวของหนึ่งเซลล์คูณ ด้วยจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร (n) สมการที่ 11 จึงสามารถเขียนใหม่ได้ดังนี้

$$(V_a)_s = (SnP^0)[(D_e^0)_s - (D_i^0)_s] \quad (12)$$

จากสมการที่ 12 เป็นสมการที่มีตัวแปรที่ไม่ทราบค่าอยู่ 2 พจน์คือ V_a และ SP^0

แต่ SP^0 สามารถคำนวณได้จากความเร็วเริ่มต้นในการซึมเข้าสู่เซลล์ $((V_+)_t=0)$ ของโมเลกุล anthracyclines

$$SP^0 = \frac{(V_+)_{t=0}}{n(D_e^0)_{t=0}} \quad (13)$$

ความเร็วในการปั๊มยาออกนอกเซลล์โดย P-glycoprotein มีค่าเท่ากับ

$$(V_a)_s = (V_+)_{t=0} \left[\frac{(D_e^0)_s - (D_i^0)_s}{(D_e^0)_{t=0}} \right] \quad (14)$$

เนื่องจากในการทดลองนี้ได้ควบคุมค่า pH ภายนอกเซลล์ (pH_e) ให้เท่ากับ pH ภายในเซลล์ (pH_i) ดังนั้น

$$\frac{[(D_e^0)_s - (D_i^0)_s]}{(D_e^0)_{t=0}} = \frac{[(C_e)_s - (C_i)_s]}{(C_e)_{t=0}} \quad (15)$$

ขอสังเกตในการทดลองนี้ $[C_e]_{t=0} = C_T$ ทำให้

$$(V_a)_s = k_+ n (C_e - C_i) \quad (16)$$

ในทางปฏิบัติ (รูปที่ 4)

ความเข้มข้นของ anthracyclines ที่อยู่นอกเซลล์สามารถคำนวณได้จากสมการที่ (17)

$$(C_e)_s = (C_T - C_n) \quad (17)$$

ความเข้มข้นของโมเลกุล anthracyclines อิสระที่อยู่ใน cytoplasm สามารถคำนวณได้จากสมการที่ (18)

$$(C_i)_s = \left(\frac{C_E}{C_N} \right) C_n \quad (18)$$

เมื่อ C_E คือความเข้มข้นของ anthracyclines อิสระภายนอกเซลล์ที่สภาวะสมดุล

2.4.3.2 การวัดความเร็วในการปั๊มยาโดยการวัดการทำงานของ P-glycoprotein โดยตรง

เซลล์ดื้อยาถูกบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES- Na^+ ที่มี 10 mM NaN_3 และไม่มี glucose ในสภาวะนี้ หลังจากบ่มเซลล์นาน 30 นาที ปริมาณ ATP ภายในเซลล์ จะมีปริมาณไม่เพียงพอที่จะทำให้ P-glycoprotein ทำงาน การซึมของโมเลกุล anthracyclines เข้าสู่เซลล์ดื้อยาที่ไม่มีพลังงานเหมือนกับเซลล์ที่ไวต่อยา ซึ่งความเข้มข้นของ anthracyclines ที่เข้าไปสอดระหว่างคู่เบสของ DNA ใน nucleus (C_n) ที่สภาวะคงที่คำนวณได้จาก

$$C_n' = C_T \frac{(F_0 - F_n')}{F_0} \quad (19)$$

เมื่อระบบเข้าสู่สภาวะคงที่ จึงเติม 5 mM glucose มีผลทำให้สัญญาณการเรืองแสงมีความเข้มเพิ่มขึ้นและเข้าสู่สภาวะคงที่ให้สัญญาณลักษณะ F_n ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณ anthracyclines ที่ถูกขับออกนอกเซลล์อันเนื่องมาจากกิจกรรมของ P-glycoprotein สามารถยืนยันได้จากการที่ความเข้มข้นของ anthracyclines ที่สอดอยู่ระหว่างคู่เบสใน DNA ภายใน nucleus หลังจากเติม glucose มีค่าเท่ากับการทดลองในชุดควบคุม คือเซลล์ถูกบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES- Na^+ ที่ไม่มี NaN_3 และมี 5 mM glucose ซึ่งความเข้มข้นของ anthracyclines ที่สอดอยู่ระหว่างคู่เบสของ DNA ที่สภาวะคงที่คำนวณจาก

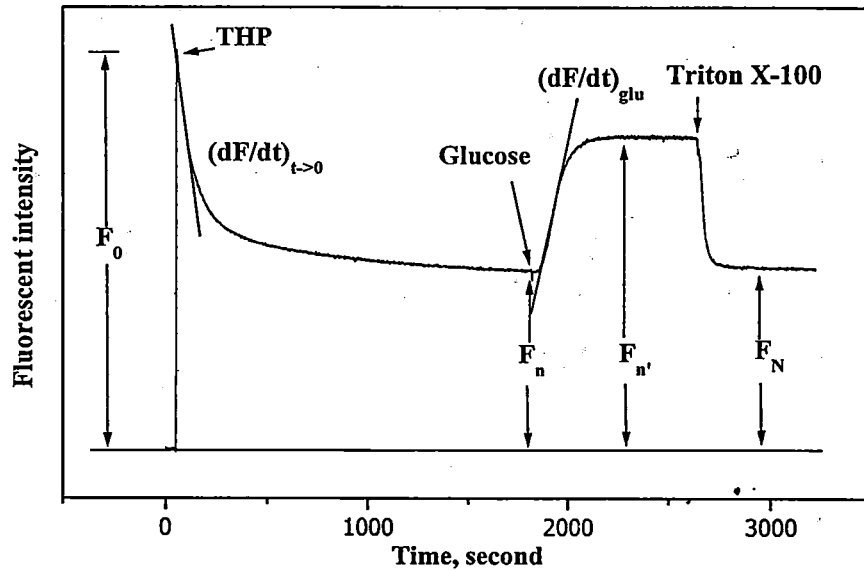
$$C_n = \frac{C_T (F_0 - F_n)}{F_0}$$

ความเร็วในการปั๊มยาออกนอกเซลล์ โดย P-glycoprotein (V_a) คำนวณได้จากความชัน

$\left(\frac{dF}{dt}\right)_{glucose}$ ของกราฟ $F = f(t)$ ดังแสดงในรูปที่ 6

$$V_a = \left(\frac{dF}{dt}\right)_{glucose} \frac{C_T}{F_0} \quad (20)$$

เมื่อเติม Triton X-100 (ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.01 %) มีผลทำให้ permeable membrane ระบบเข้าสู่ภาวะสมดุล ความเข้มข้นของ anthracyclines ที่สอดอยู่ระหว่างคู่เบสของ DNA ที่สภาวะคงที่คำนวณจาก



รูปที่ 6 จลศาสตร์การเข้าสู่เซลล์และการถูกขับของยา pirarubicin ออกนอกเซลล์โดย P-glycoprotein บ่มเซลล์ด้วยยา 10^6 /มิลลิลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี 10 mM NaN_3 ไม่มี glucose ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เดิมสารละลายที่ทราบความเข้มข้นของ pirarubicin แล้วติดตามการลดลงของสัญญาณการเรืองแสงที่ 590 นาโนเมตร เมื่อระบบเข้าสู่สภาวะคงที่ จึงเติม 5 mM glucose รอจนระบบเข้าสู่สมดุลใหม่จึงเติม Triton X-100

$$C_N = \frac{C_T(F_0 - F_N)}{F_N}$$

โดยสรุปการคำนวณความเร็วของการปั๊มยาออกนอกเซลล์โดย P-glycoprotein โดยตรงนั้นทำได้การยับยั้งการทำงานของ P-glycoprotein โดยการยับยั้งการสังเคราะห์ ATP และทำให้ P-glycoprotein ทำงานอีกครั้งโดยการเติม glucose ซึ่งแสดงดังในรูปที่ 7

ในชุดการทดลองนี้ ความเข้มข้นของโมเลกุลอิสระใน cytoplasm (C_i) ของ anthracyclines เป็น substrate ของ P-glycoprotein ซึ่งมีค่าเท่ากับ ความเข้มข้นของ anthracyclines ภายนอกเซลล์ (C_e') ก่อนเติม glucose

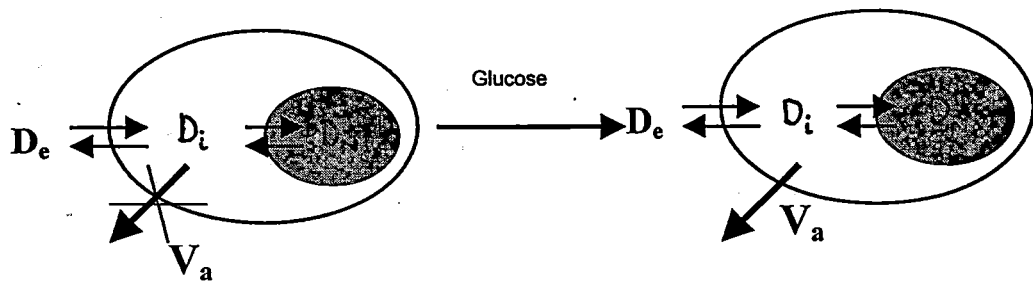
$$C_i = C_e' = C_T - C_n \quad (21)$$

ซึ่งสามารถเขียนความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วในการปั๊มยาออกนอกเซลล์โดย P-glycoprotein ดังนี้

$$V_a = k_a n C_i \quad (22)$$

เมื่อ k_a คือค่าคงที่ของความเร็วในการปั๊มยาออกนอกเซลล์โดย P-glycoprotein

n คือจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 7 ภาพแสดงการทำงานของ P-glycoprotein ในเซลล์ดื้อยาที่ไม่มีพลังงาน และในเซลล์ดื้อยาที่ไม่มีพลังงานหลังจากเติม glucose

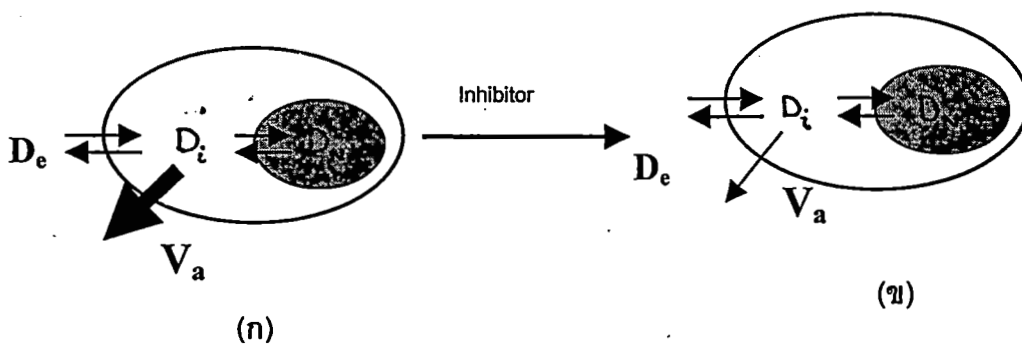
2.4.4 การยับยั้งการปั๊มยาออกนอกเซลล์ของ P-glycoprotein ด้วยโมเลกุลต่าง ๆ

การศึกษาผลของโมเลกุลต่อการทำงานของ P-glycoprotein กระทำโดยเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีเซลล์ดื้อยาพร้อมกับ anthracycline $1 \mu\text{M}$ เมื่อระบบเข้าสู่สภาวะคงที่ จึงเติมโมเลกุลที่ทดสอบลงไปรอจนระบบเข้าสู่สภาวะสมดุลใหม่ (รูปที่ 8) ซึ่งสัญญาณความเข้มแสงที่สภาวะสมดุลใหม่นี้ให้สัญญาณการเรืองแสงเท่ากับ F'_n และความเข้มข้นของ anthracycline รวมที่สะสมใน nucleus ของเซลล์มีค่าเท่ากับ

$$C'_n = \frac{C_T(F_0 - F'_n)}{F_0} \quad (23)$$

ประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของ P-glycoprotein (α) คำนวณได้จากความสัมพันธ์

$$\alpha = \left(\frac{C_N - C'_n}{C_N - C_n} \right) \quad (24)$$



รูปที่ 8 ภาพแสดงการทำงานของ P-glycoprotein ในเซลล์ดื้อยาที่ไม่มี inhibitor และในเซลล์ดื้อยาที่มี inhibitor

บทที่ 3

ผลการทดลอง

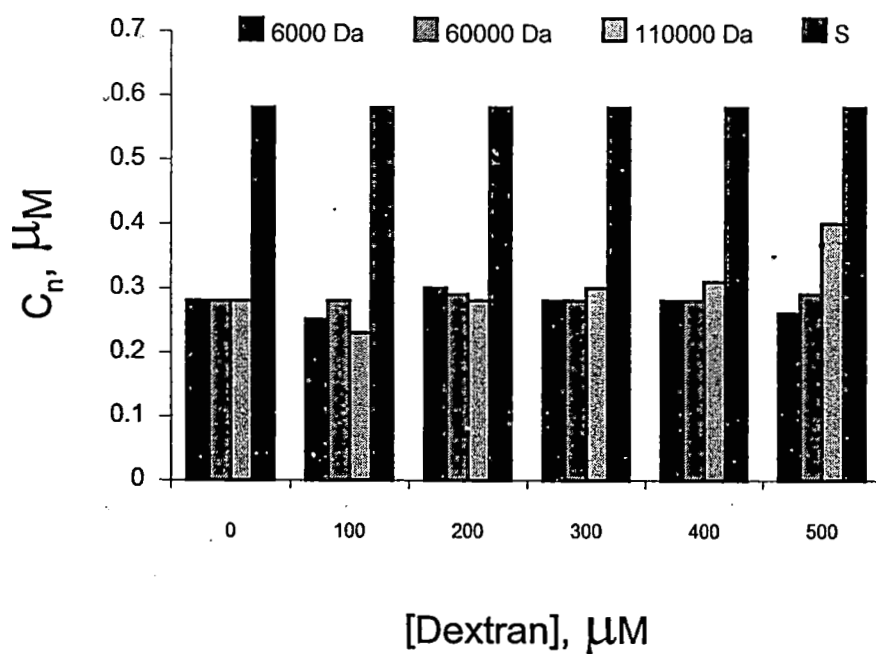
3.1 ผลของ Dextrans ต่อประสิทธิภาพของยา pirarubicin

Dextran derivatives เช่น carboxymethyl benzylamide dextran (CMBD) สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งชนิด HBL 100 โดยออกฤทธิ์ยับยั้งขบวนการ autocrine growth [22-23] โดย CMBD จะยับยั้งการทำงานของ Fibroblast growth factors (FGFs) ซึ่งมีบทบาทที่สำคัญเกี่ยวกับการเกิดมะเร็งและการกระจายของเซลล์มะเร็งใน *in vivo* Liu Wu *et al.* รายงานว่า dextrans สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของยา vinblastine โดย โมเลกุล dextran ยับยั้งการขับยา vinblastine ออกนอกเซลล์ CHRC5 [24]

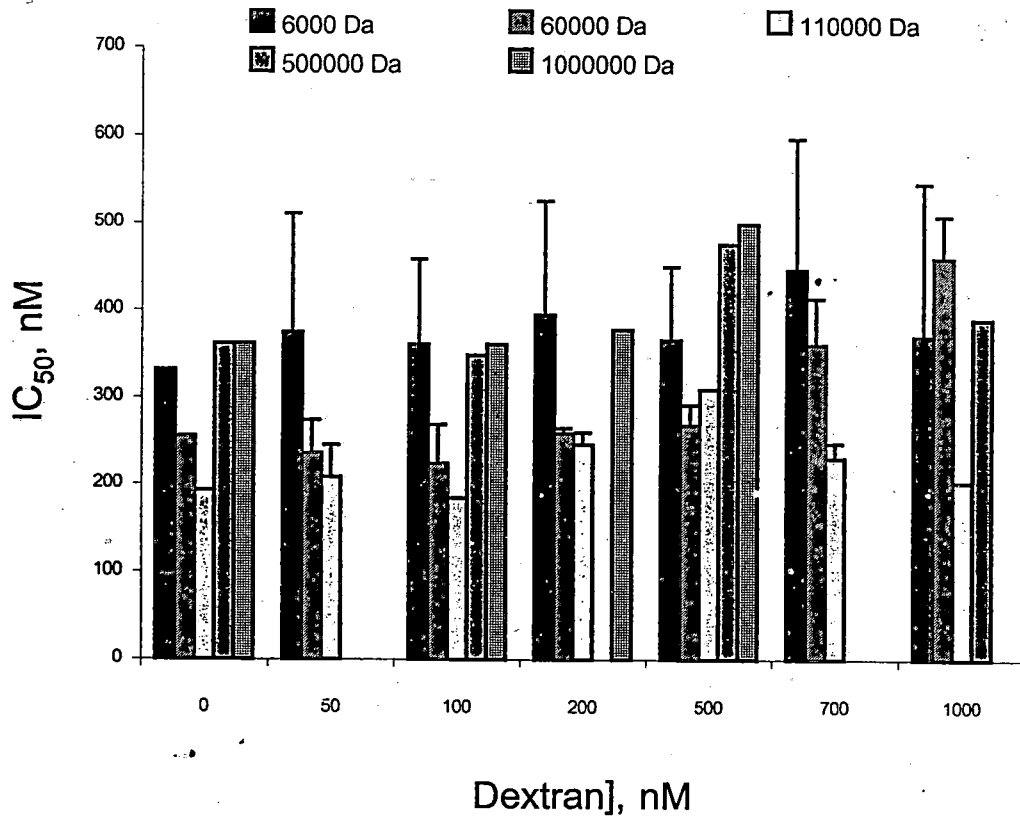
ในการศึกษานี้จึงได้ทำการศึกษาถึงความสามารถในการต้านมะเร็งและความสามารถในการยับยั้งการขับยา pirarubicin ออกนอกเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด K562/*adr* โดย P-glycoprotein ของโมเลกุล dextran ที่มีขนาดมวลโมเลกุล 6000 Da, 60000 Da, 110000 Da 500000 Da และ 1000000 Da

3.1.1 ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ P-glycoprotein

Dextran ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่คือ 500000 Da และ 1000000 Da มีค่าการละลายน้ำต่ำมากและดูดกลืนแสงในช่วง 420 นาโนเมตรจึงทำให้ไม่สามารถวัดความสามารถในการยับยั้งการขับยา pirarubicin โดย P-glycoprotein ได้เนื่องจากข้อจำกัดของเทคนิคการศึกษา dextran ที่มีขนาดมวลโมเลกุล 6000 Da, 60000 Da และ 110000 Da ไม่มีผลในการยับยั้งการทำงานของ P-glycoprotein ถึงแม้ว่าความเข้มข้นของ dextran ทั้งสามโมเลกุลจะเพิ่มสูงถึง 500 μM (รูปที่ 9)



รูปที่ 9 ความเข้มข้นของ pirarubicin ที่สะสมภายในนิวเคลียสของเซลล์ K562/adr เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโมเลกุล dextran เปรียบเทียบกับเซลล์ K562 (S) (ดูรายละเอียดการทดลองในบทที่ 2)



รูปที่ 10 การเปลี่ยนแปลงของประสิทธิภาพของ pirarubicin (IC₅₀) ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด K562/adr ในสภาวะที่เซลล์ถูกบ่มกับ pirarubicin โดยมีโมเลกุล dextran ร่วมด้วย

143199

615.58

ศ 698A

พ - 2

3.1.2 ทดสอบการออกฤทธิ์เสริมกับยา pirarubicin

โมเลกุล dextran เดี่ยว ๆ ไม่ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง K562 และ K562/*adr* ในทางตรงข้ามกลับกระตุ้นให้เซลล์ทั้งสองชนิดเพิ่มจำนวนได้มากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ dextran เพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญในทุกโมเลกุลที่ทดสอบ เมื่อเติม dextran ร่วมกับยา pirarubicin พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ dextran สูงขึ้นจะทำให้ค่า IC_{50} ของยา pirarubicin เพิ่มขึ้น ในทุกโมเลกุล dextran ที่ทำการศึกษา (รูปที่ 10)

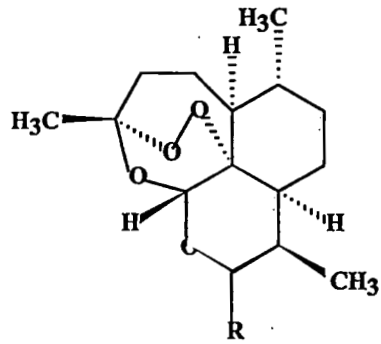
สรุปผลการทดลอง

โมเลกุล dextran ที่ศึกษาในครั้งนี้ไม่ยับยั้งการทำงานของ P-glycoprotein ในทางตรงกันข้ามโมเลกุลทั้งหมดออกฤทธิ์ตรงข้ามกับ pirarubicin

3.2 ความสามารถของ Qinghoasu ต่อการยับยั้งการดื้อยา

Qinghoasu หรือ artemisinin (รูปที่ 11) เป็นสกัดจากสมุนไพรจีน (qinghoasu) ซึ่งใช้รักษาไข้ในตำหรับยาจีนแผนโบราณมานานหลายศตวรรษ artemisinin เป็นยาต้านมาเลเรียที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และยังพบว่ามีศักยภาพในการต้านเชื้อ *Plasmodium falciparum* ที่ดื้อต่อยา Chloroquine Quinine Halofantrine และ Mefloquine ได้ [25-26] การศึกษาการดื้อยาใน parasites ยังมีความไม่ชัดเจนอยู่มาก แต่ที่ยอมรับกันทั่วไปคือการดื้อยาแสดงออกโดยมีปริมาณสะสมยาใน parasites ต่ำ Krogstadt *et al.* [27] รายงานถึงการบ่มยา Chloroquine โดย *plasmodium falciparum* และ Martin *et al.* [28] รายงานว่า verapamil สามารถยับยั้งการบ่มยาของ *plasmodium* ที่ดื้อยา และโมเลกุลหลายชนิดที่ยับยั้งการขับยาออกนอกเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาแบบ MDR สามารถยับยั้งการบ่มยาในเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมีปรสิตที่ดื้อต่อยา ได้

ลักษณะการดื้อยาของ *Plasmodium falciparum* มีความสัมพันธ์กับการดื้อยาแบบ MDR ในเซลล์มะเร็ง โดยพบปริมาณความเข้มข้นของยาภายในเซลล์ต่ำ และสามารถยับยั้งได้ด้วย verapamil นอกจากนี้ยังพบว่าในเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ *Plasmodium falciparum* ที่ดื้อยา จะมีการสร้างโปรตีน Pgh-1 ซึ่งควบคุมโดยยีน *pfmdr-1* ซึ่งมีความคล้ายกับ P-glycoprotein ในเซลล์มะเร็งถึง 54 % แต่หน้าที่ของ Pgh-1 [29-30] ยังไม่ได้รับการศึกษามากนัก อย่างไรก็ตามมีความเป็นไปได้สูงมากที่ Pgh-1 ทำงานคล้ายกับ P-glycoprotein คือขับสารที่เป็นพิษออกนอกเซลล์ การศึกษาที่จะทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญคือการศึกษาการออกฤทธิ์ของโมเลกุลยาในกลุ่มที่ออกฤทธิ์ต้าน parasites ที่ดื้อยา โดยศึกษากับเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาแบบ MDR



R.	compound
O	Artemisinin
OH	dihydroartemisinin
CH ₂ CO(CH ₂) ₂ COOH	Artesunate

รูปที่ 11 โครงสร้างเคมีของโมเลกุล qinghoasu

3.2.1 พิษของ artemisinin และสารอนุพันธ์ ต่อเซลล์ มะเร็งเม็ดเลือด K562

การศึกษาพิษของ artemisinin และสารอนุพันธ์เปรียบเทียบกับยาต้านมะเร็งในกลุ่ม anthracyclines แสดงในตารางที่ 1 เป็นที่น่าสนใจพบว่า qinghoasu ทั้งสามโมเลกุลสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง เม็ดเลือดชนิด K562 ที่ไวและดื้อต่อยา doxorubicin ได้ใกล้เคียงกัน คือ Resistance factor มีค่าใกล้เคียงกับ 1 โดย เมื่อเทียบในเซลล์ที่ไวต่อยา artesunate และ dihydroartemisinin มีประสิทธิภาพสูงกว่า Artemisinin ถึง 15 เท่า และมีประสิทธิภาพน้อยกว่า pirarubicin และ doxorubicin 58 เท่า แต่พบว่าจะมีความสามารถในการต้านเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาใกล้เคียงกันกับ pirarubicin และ doxorubicin

3.2.2 การออกฤทธิ์เสริมกับ pirarubicin และ doxorubicin

Anthracyclines เป็นยาต้านมะเร็งที่ดีที่สุดกลุ่มหนึ่งที่ใช้ในคลินิก ปัญหาที่สำคัญคือพบว่า เป็นสับสเตรตของ P-glycoprotein และ MRP1-protein ประสิทธิภาพของยาต้านมะเร็งในกลุ่มนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณของยาที่สะสมอยู่ในตำแหน่งเป้าหมายการออกฤทธิ์ของยา โมเลกุล qinghoasu ทั้งสามชนิดออกฤทธิ์เสริมกับ pirarubicin และ doxorubicin เฉพาะในเซลล์ที่ดื้อต่อยา K562/adr แต่ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของ pirarubicin และ doxorubicin ในเซลล์ที่ไวต่อยา K562 ดังแสดงในรูปที่ 12 โดย artemisinin dihydroartemisinin และ artesunate ออกฤทธิ์เสริมกับ pirarubicin และ doxorubicin ดีพอ ๆ กันและดีมากกว่า verapamil และ cyclosporin A โดยความเข้มข้นของโมเลกุล artemisinin dihydroartemisinin และ artesunate ที่สามารถลดค่า IC₅₀(R) ของ pirarubicin และ doxorubicin ได้ 50 % มีค่าเท่ากับ $0.86 \pm 0.03 \mu\text{M}$ $0.08 \pm 0.04 \mu\text{M}$ $0.16 \pm 0.01 \mu\text{M}$ $1 \pm 0.5 \mu\text{M}$ และ $2 \pm 1 \mu\text{M}$ สำหรับ artemisinin dihydroartemisinin artesunate cyclosporin A และ verapamil ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า โมเลกุล qinghoasu สามารถเพิ่มฤทธิ์ของยา Pirarubicin และ Doxorubicin ได้มีประสิทธิภาพสูงกว่า verapamil ทั้งที่พิษของ Vearapamil และ Artemisinin ต่อเซลล์ K562 /adr มีค่าใกล้เคียงกัน

3.2.3 ความสามารถในการยับยั้งการขับ pirarubicin และ doxorubicin ออกนอกเซลล์

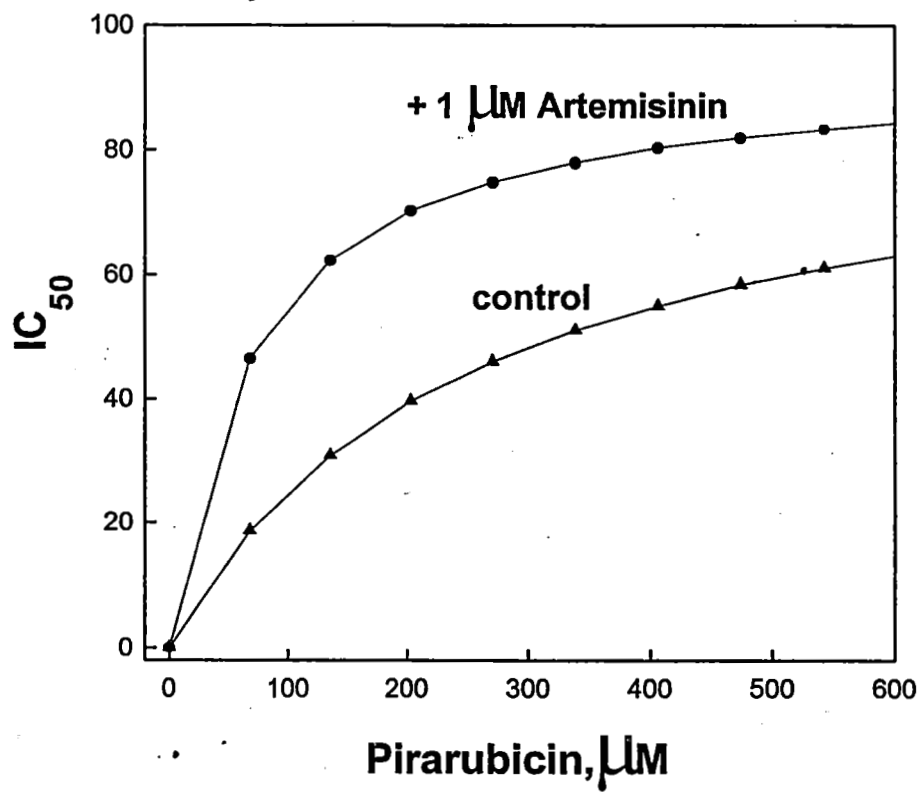
โมเลกุลในกลุ่ม qinghoasu นี้สามารถยับยั้งการขับยาออกนอกเซลล์ของ P-gp ได้ในระดับต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับ Verapamil และ Cyclosporin A โดยพบว่าความเข้มข้นของโมเลกุลที่สามารถยับยั้งการทำงานของ P-gp ได้ 50% มีค่าสูงตั้งแต่ 250 μM ขึ้นไปดังแสดงในรูปที่ 13

สรุปผลการทดลอง

โมเลกุล qinghoasu มีศักยภาพสูงมากที่จะนำมาเป็นยาที่ใช้ร่วมกับยาต้านมะเร็งเพื่อแก้ปัญหาการดื้อยา เนื่องจากการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับเภสัชวิทยาของ qinghoasu พบว่าโมเลกุลกลุ่มนี้มีพิษในระดับต่ำ [31-32] ประสิทธิภาพของโมเลกุล qinghoasu ในการเสริมฤทธิ์กับยา Pirarubicin และ Doxorubicin เป็นระดับ ไมโครโมลาร์ ซึ่งดีกว่า cyclosporin A และ Vearapamil มาก การเสริมฤทธิ์นี้ไม่น่าจะเป็นผลมาจากการที่โมเลกุลยับยั้งการทำงานของ P-gp โดยตรง ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาถึงการออกฤทธิ์ของโมเลกุล ซึ่งพบว่าโมเลกุล qinghoasu ทั้งสามได้แก่ สำหรับ artemisinin dihydroartemisinin และ artesunate ออกฤทธิ์ต่อไมโทคอนเดรียมีผลทำให้ความต่างศักย์เมมเบรนของไมโทคอนเดรียลดลง และระดับความเข้มข้นของ ATP ภายในเซลล์ต่ำลง (การศึกษาของ Paiboon Reungpattanapong and Samlee Mankhetkorn ซึ่งในระหว่างส่งไปตีพิมพ์)

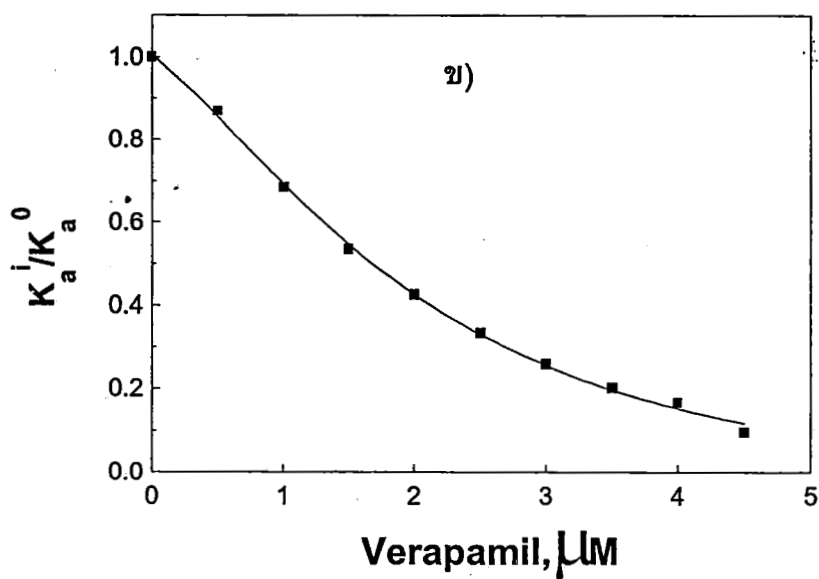
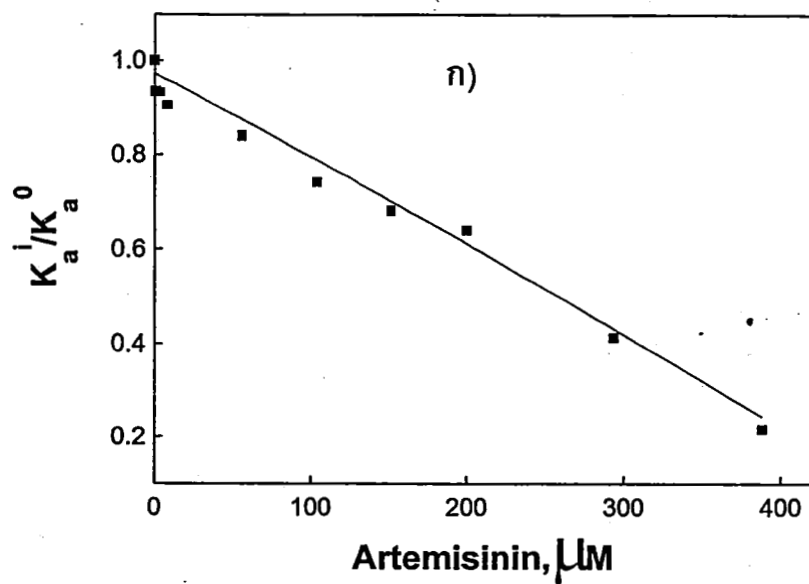
โมเลกุล	IC ₅₀ (S), μM	Resistant factor
pirarubicin	0.001 \pm .000	40
doxorubicin	0.048 \pm .002	250
artemisinin	15 \pm 5	2
dihydroartemisinin	1 \pm 0.2	1
artesunate	1 \pm 0.3	1.4
verapamil	45 \pm 4	0.7

ตารางที่ 1. ประสิทธิภาพของโมเลกุลในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด K562 (IC₅₀(S)) และ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือด K562/adr (RF)



รูปที่ 12. ประสิทธิภาพของยา pirarubicin ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง

K562/*adr* (▲) pirarubicin อย่างเดียว และ (●) pirarubicin + 1 μM Artemisinin



รูปที่ 13. ความสามารถในการยับยั้งการขับยา pirarubicin ออกนอกเซลล์ของ P-glycoprotein
 ก) Artemisinin ข) Verapamil

โมเลกุล	$\beta_{0.5}$ μM	
	Pirarubicin	Doxorubicin
Artemisinin	0.86	0.8
Dihydroartemisinin	0.083	0.19
Artesunate	0.86	0.19
Cyclosporin A	1	1.5
Verapamil	1	2

ตารางที่ 2. ประสิทธิภาพของโมเลกุลในการเพิ่มประสิทธิภาพของยา pirarubicin และ doxorubicin ขึ้นเป็น 50% ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด K562/adr

เอกสารอ้างอิง

- [1] Saves and Masson J.M. (1998) Mechanisms of resistance to xenobiotics in human therapy, *Cell.Mol. Life. Sci*, 54, 405-426.
- [2] Mankhetkorn S., Teodori E., Scapecchi S. and Garnier-Suillerot A. (1996) Study of P-glycoprotein functionality in living resistant K562 cells after photolabeling with a verapamil analogue, *Biochem. Pharmacology* 52, 213-217.
- [3] Masuda H., Ozols R.F., Lai G.m., Fojo A., Rothenberg M.and Hamilton T.C. (1988) Increased in DNA repair as mechanism of acquired resistance to cis-diamine dichloroplatinum (II) in human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res.* 48: 5713-5716.
- [4] Simon S.M. and Schindler M. (1994) Cell biological mechanisms of multidrug resistance in tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 3497-3504.
- [5] Juliano R.L. and Ling V. (1976) Surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants, *Biochem. biophys. Acta*, 455: 152-162.
- [6] Chen C.J., Chin J.E., Ueda K., Clark D., Pastan I., Gottesman M.M. and Roninson I.B. (1986) Internal duplication and homology with bacterial transport protein in the *mdr-1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistance, code for P-glycoprotein, *Cell*, 47: 381-389.
- [7] Gros P., Croop J. and Housman D.E. (1986) Mamalian multidrug resistance gene: Complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport protein, *Cell*, 47: 371-380.
- [8] Fojo A.T., Ueda K., Salmon D.J., Poplack D.G., Gottesman M.M. and Pastan I. (1987) Expression of multidrug-resistance (*mdr-1*) gene in human tumors and tissues, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 265-269.

- [9] Cordon-cardo C., O'brien J.P., boccia J., casals D., Berlino J.R. and Melamed M.R. (1990) Expression of the multidrug resistance gene product (P-gp) in human normal and tumor tissues, *J. Histochem. Cytochem.* 38: 1277-1287.
- [10] Bremer S., Hoof T., Busche M., Scholt B., Riordan J.R., Maass G. and Tummer B. (1992) Quantitative expression patterns of multidrug-resistance P-glycoprotein (mdr-1) and differentially spliced cystic-fibrosis transmembrane-conductance regulator mRNA transcripts in human epithelia, *Eur. J. Biochem.*, 206: 137-149.
- [11] Hamada H. and Tsuruo T. (1988) characterization of ATPase activity of M(r) 170000 to 180000 membrane glycoprotein (P-glycoprotein) associated with multidrug resistance in K 562/ADM cells, *Cancer Res.* 48: 4926-4932.
- [12] Spoelstra E.C., Westerrhoff H.V., pinedo H.M., Dekker H. and Lankelma J., The multidrug-resistance-reverser verapamil interferes with cellular P-glycoprotein-mediated pumping of daunorubicin as non-competing substrate, *Eur. J. Biochem.*, 221: 363-373, 1994
- [13] Mankhetkorn S., Dubru F., Hesschenbrouck J., Fiallo M. and Garnier-Suillerot A. (1996) Relation among the resistance factor, kinetics of uptake, and kinetics of the P-glycoprotein-mediated efflux of doxorubicin, daunorubicin, 8-(S)-fluoridarubicin and idarubicin in multidrug-resistant K562 cells, *Mol. Pharmacol*, 49, 532-539.
- [14] Barrand R.M., Rhodes T., Center M.S. and Twentyman P.R. (1993) Chemosensitization and drug accumulation effect of cyclosporin A, PSC-83 and verapamil in human MDR large cell lung cancer cells expressing a 190 kDa membrane protein distinct from P-glycoprotein, *Eur. J. Cancer* 29A: 408-415.

- [15] Pearce H.L., Safa A.R., Bach N.J., Winter M.A., Cirtain M.C. and Back W.T., (1989) Essential features of the P-glycoprotein pharmacophore as defined by series of reserpine analogs that modulate multidrug resistance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5128-5132.
- [16] Gottestman M.M. and Pastan I. (1993) Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu.Rev.Biochem.*, 62, 385-427.
- [17] Bradley G., Juranka P.F. and Ling V. (1988) Mechanism of multidrug resistance. *Biochem Biophys Acta*, 948, 87-128.
- [18] Broxterman and Pinedo H.M. (1991) Energy metabolism in multidrug resistant tumor cells: a review. *J. cell Pharmacol.* 2, 239-247.
- [19] Frezard F. and Garnier-Suillerot A. (1991) Comparison of the membrantransport of anthracycline derivatives in drug-resistant and drug-sensitive K562 cells. *Eur. J. Biochem*, 196, 483-491.
- [20] Tarasuik J., Frezard F., Gattegno L. and Garnier-Suillerot A. (1989) Anthracycline incorporation in human lymphocytes. Kinetics of uptake and nuclear incorporation. *Biochem. Biophys Acta.* 1013, 109-117.
- [21] Frezard F. and Garnier-Suillerot A. (1991) Determination of the osmotic active drug concentration in the cytoplasm of anthracycline-resistant and -sensitive K562 cells. *Biochem. Biophys Acta.* 1091, 29-35.
- [22] Powis G., Seewald M. and Hoke M. (1992) Inhibition of growth factor binding intracellular Ca²⁺ signaling by dextran sulfates of different sizes and degrees of sulfation. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 30, 483-486.

- [23] Bagheri-Yarmand R., Liu J.F., Ledoux D., Morere J.F. and Crepin M. (1997) Inhibition of human breast epithelial HBL 100 cell proliferation by dextran derivative (CMDB7) with the FGF2 Autocrine loop. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 239, 424-428.
- [24] Liu Z., Wu X.Y. and Bendayan R. (1999) In vitro investigation of ionic polysaccharide microspheres for simultaneous delivery of chemosensitizer and antineoplastic agent to multidrug resistant cells. *J. Pharmaceutical Science*. 88, 412-418.
- [25] Hassan A.M., Bjorkman A, Landbergren-Lindgren A and Ashton M. (1992) The effect of artemisinin, its derivatives and mefloquine against chloroquine-resistant strains of *plasmodium falciparum* in vitro. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86, 365-367.
- [26] Klayman D.L. (1985) Qinghaosu (artemisinin): An antimalarial drug from China. *Science (Wash DC.)* 228, 1049-1055.
- [27] Krogstad DJ., Gluzman IY., Kyle DE., Odula AM. and Martin S.K., (1987) Efflux of chloroquine from *plasmodium falciparum*: mechanism of chloroquine resistance, *Science*, 238, 1283-85.
- [28] Martin SK., Oduola AMJ. and Milhous WK., 1987, Reversal of chloroquine resistance in *plasmodium falciparum* by verapamil, *Science*, 235: 890-901.
- [29] Foote S.J., Thompson J.K., Cowman A.F. and Kemp D.J. (1989) Amplification of the multidrug resistance gene in some Chloroquine-resistant isolates of *Plasmodium falciparum*. *Cell* 57, 921-930.
- [30] Cowman A.F., Karez S., Galatis D. and Culvenor J.G. (1991) A P-glycoprotein homologue of *plasmodium falciparum* is localized on the digestive vacuole. *J. Cell Biol.* 113, 1033-1042.

[31] Kararli TT (1995) Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharma Drug Disp.* 16, 351-380.

[32] Aston M, Sy N.D., Hong N.V., Gordi T, Hai T., Huong D.X., Nieu N.T. and Cog L.D. (1998) Artemisinin kinetics and dynamics during oral and rectal treatment of uncomplicated malaria. *Clin Pharmacol Ther*, 63, 482-493.