บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญ และที่มาของปัญหา

เมลาโทนินเป็นฮอร์โมนร่างกายที่สร้างและหลั่งจากต่อมไพเนียลในสมองเป็นหลัก มีหน้าที่ควบคุมวัฏจักรของร่างกาย เกี่ยวข้องกับการนอน ระบบสืบพันธุ์ ระบบประสาท ระบบต่อมไร้ท่อ และระบบภูมิคุ้มกัน (Brzezinski, 1997) มีความปลอดภัยสูงไม่พบรายงานการเกิดพิษที่รุนแรงแม้ในขนาดที่สูงถึง 800 mg/kg (Vijayalaxmi et al., 2002) ข้อมูลการศึกษาทั้งในหลอดทดลอง และสัตว์ทดลองพบว่าเมลาโทนินสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และลดการถูกทำลายของเซลล์ได้ (Reiter et al., 1996, 1997; 2000; 2001) มีการศึกษาการใช้เมลาโทนินในโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคมะเร็ง ซึ่งพบผลยับยั้งการแบ่งตัวของ เซลล์ไลน์มะเร็งหลายชนิด (Vijayalaxmi et al., 2002) และการศึกษาทางคลินิกในผู้ป่วยมะเร็ง พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการรักษามะเร็ง โดยการใช้เมลาโทนินร่วมกับการรักษามาตรฐาน จะลดความเสี่ยงในการเสียชีวิตลงได้ร้อยละ 34 (Mills et al., 2005) เนื่องจาก ภายใต้ภาวะ inflammatory จะมีอนุมูลอิสระทั้งแบบ Reactive oxygen species (ROS) และ Reactive nitrogen species (RNS) เกิดขึ้นมากมายเช่นเดียวกับช่วงการรักษามะเร็งด้วยเคมีบำบัด ซึ่งจะชักนำให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเซลล์ (oxidative stress) ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของเมลาโทนินจะสามารถลดภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเซลล์ (oxidative stress) จึงลดอาการข้างเคียงจากการรักษา ปัจจุบันกลุ่มวิจัยเมลาโทนิน มหาวิทยาลัยขอนแก่น กำลังศึกษาวิจัยทางคลินิก 2 เรื่อง เกี่ยวกับการใช้เมลาโทนินร่วมกับการรักษามาตรฐานในผู้ป่วยมะเร็งระยะแพร่กระจาย 4 ชนิด (MRG5080037) และในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี (MRG-OSMEO505S083) เนื่องจากมีรายงานว่าเมลาโทนินสามารถเสริมฤทธิ์ของการรักษามะเร็ง ในเรื่องการลดอาการไม่พึงประสงค์จากเคมีบำบัด ผลยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง (Lissoni et al., 1996; 1997; 1999; 2002) แต่เมลาโทนินยังมีปัญหาในเรื่องเภสัชจลนศาสตร์คือมีชีวประสิทธิผล (bioavailability) ต่ำเนื่องจากหลังการให้แบบรับประทานประมาณจะมีปริมาณเมลาโทนินในกระแสเลือดเพียง 20 % และก่อนที่ยาเข้ากระแสเลือดจะมีอัตราเมตาโบลิซึมของยาในแต่ละบุคคลผ่าน cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) ในแต่ละบุคคลต่างกันถึง 25 เท่า (Waldhauser et al., 1984; Semak 2008; Suzen, 2007) การตอบสนองต่อเมลาโทนินจึงไม่เป็นไปตามขนาดยาที่เหมาะสม กลุ่มวิจัยมีโครงการศึกษาดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีของสารเมลาโทนิน เพื่อสังเคราะห์อนุพันธ์เมลาโทนินใหม่ที่มีฤทธิ์ดีกว่าสารเมลาโทนินต้นแบบ แต่อนุพันธ์ที่ที่พัฒนาขึ้นได้ยังไม่ข้อมูลศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งในเบื้องต้นผ่านทางกลไกภูมิคุ้มกัน ดังนั้นโครงการนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งในเบื้องต้นผ่านทางกลไกภูมิคุ้มกันของอนุพันธ์เมลาโทนินเทียบกับเมลาโทนินต้นแบบ จึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง ซึ่งปัจจุบันยังไม่มีอนุพันธ์เมลาโทนินในข้อบ่งใช้เพื่อเสริมฤทธิ์การต้านมะเร็ง และลดอาการข้างเคียงของเคมีบำบัด โดยทำการศึกษาในเซลล์ไลน์มะเร็งชนิด solid tumor และ liquid tumor

คือ เซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ ซึ่งเป็นมะเร็งที่พบมากที่สุดเป็นอันดับ 1 ในผู้ป่วยมะเร็งเพศชาย ในประเทศไทย (NCI, Thailand, 2011) และเซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาว หากพบอนุพันธ์เมลาโทนินที่มีคุณสมบัติที่มีประโยชน์ในการต้านอนุมูลอิสระและต้านมะเร็ง และมีคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ที่ดีขึ้น สามารถกำหนดขนาดยาที่ออกฤทธิ์ จะเกิดประโยชน์ในการพัฒนายาเพื่อใช้เสริมฤทธิ์การต้านมะเร็ง และลดอาการข้างเคียงของเคมีบำบัดในผู้ป่วยมะเร็ง และข้อมูลการศึกษานี้เป็นส่วนสำคัญในการใช้ประกอบเพื่อยื่นขอจดลิขสิทธิ์

สมมุติฐานของการศึกษา

สมมุติฐานของการศึกษาในโครงการวิจัยนี้คือ อนุพันธ์เมลาโทนินที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีน่าจะมีผลต่อการกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันที่ได้จากกระแสเลือดคน (Human Peripheral blood mononuclear cells : hPBMCs) ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ของระบบภูมิคุ้มกัน และการทำให้เซลล์มะเร็งถูกชักนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสได้ดียิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

- ศึกษาฤทธิ์เสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของอนุพันธ์เมลาโทนิน โดยศึกษาการเพิ่มจำนวนเซลล์ภูมิคุ้มกันที่ได้จากกระแสเลือดคน (Peripheral blood mononuclear cells : hPBMCs)
- ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งและการชักนำขบวนการอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งของอนุพันธ์เมลาโทนิน

ขอบเขตของการศึกษา

เป็นการวิจัยในห้องปฏิบัติการ โดยศึกษาการตอบสนองของเซลล์ภูมิคุ้มกันและเซลล์ไลน์มะเร็งเพาะเลี้ยงของคนต่ออนุพันธ์เมลาโทนิน โดยการตรวจวัด

- การเพิ่มจำนวนของเซลล์ hPBMCs (Proliferation assay)
- การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Anti-proliferation of cancer cells)
- การชักนำให้เกิดขบวนการอะพอพโทซิส (Apoptosis induction)

บทที่ 2
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยการลดลงของ growth factor หรือ เมื่อเกิดความเสียหายต่อ DNA (DNA damage) และภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) แล้วมีผลต่อโปรตีน Bcl-2 ที่ควบคุมการหลั่ง cytochrome c หลังจากนั้น cytochrome c จะถูกปลดปล่อยจากไมโตคอนเดรียสู่ไซโตพลาสม โปรตีน Bcl-2 เป็น B-cell leukemia/lymphoma-2 family proteins ที่ประกอบด้วยโปรตีนที่ทำหน้าที่ทั้งต้านการเกิดอะพอพโทซิส (anti- apoptotic members) และทำให้เกิดอะพอพโทซิส (pro-apoptotic members) ผ่าน intrinsic pathway โดยเริ่มจากโปรตีนที่หยุดการเกิดอะพอพโทซิสเรียกว่า Anti-apoptotic member (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1) เข้าจับกับ pro-apoptotic Bcl-2 family members ได้แก่ BAX และ BAK หรือ BH3-only proteins (BIM, BID, PUMA, NOXA และ BAD) ส่วน pro-apoptotic members จะเสริมการเกิดอะพอพโทซิสโดยกระตุ้นการหลั่ง cytochrome c โดยโปรตีนชนิด BH3-family proteins ไปจับและกระตุ้นให้เกิดการรวมตัว (oligomerization) ของโปรตีน BAX และ BAK ที่ไมโตครอนเดรียทำให้ไมโตครอนเดรียเกิดรูที่เมมเบรนชั้นนอก และหลั่ง cytochrome c (Bruin and Medema, 2008) หลังจากนั้น cytochrome c ไปจับกับ Apaf-1 และ pro-caspase-9 ได้เป็นโมเลกุลเชิงซ้อนเรียกว่า apoptosome ที่ไปกระตุ้น caspase-9, caspase-3 สามารถชักนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส ในลักษณะที่เกิดการแตกของนิวเคลียส (Sun et al., 2004)

กลไกการเกิดอะพอพโทซิสผ่าน extrinsic pathway เกิดจากการกระตุ้นผ่าน death receptor เช่น TNF (tumor necrosis factor) family, Fas, TNF-R1, TRAIL-R (Özören and Deiry, 2003) TRAIL death receptor (TRAIL-R) จะถูกจับจาก TRAIL ลิแกนด์ที่อยู่นอกเซลล์ ทำให้เกิด การรวมตัว (oligomerization) ของโปรตีนชักนำสัญญาณการตาย (death-inducing signaling complex; DISC) กับ FADD (Fas-associated death domain) และ pro-caspase-8 หลังจากนั้น pro-caspase-8 จะถูกกระตุ้นเป็น caspase-8 และชักนำให้เกิดการกระตุ้น caspase-3 ต่อไป และเกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสในที่สุด นอกจากนี้การกระตุ้น caspase-8 จะไปกระตุ้น Bid ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำให้เกิดอะพอพโทซิส (proapoptotic member of Bcl-2 family protein) ใน intrinsic หรือ mitochondrial apoptotic pathway ตัว truncated Bid (tBid) จะเคลื่อนย้ายไปที่ไมโตคอนเดรียทำให้เกิดการหลั่ง cytochrome c โดยเกิดปฏิกิริยากับ Bax และ Bak ที่สามารถขยายสัญญานการเกิดอะพอพโทซิสผ่านวิถีของ death receptor

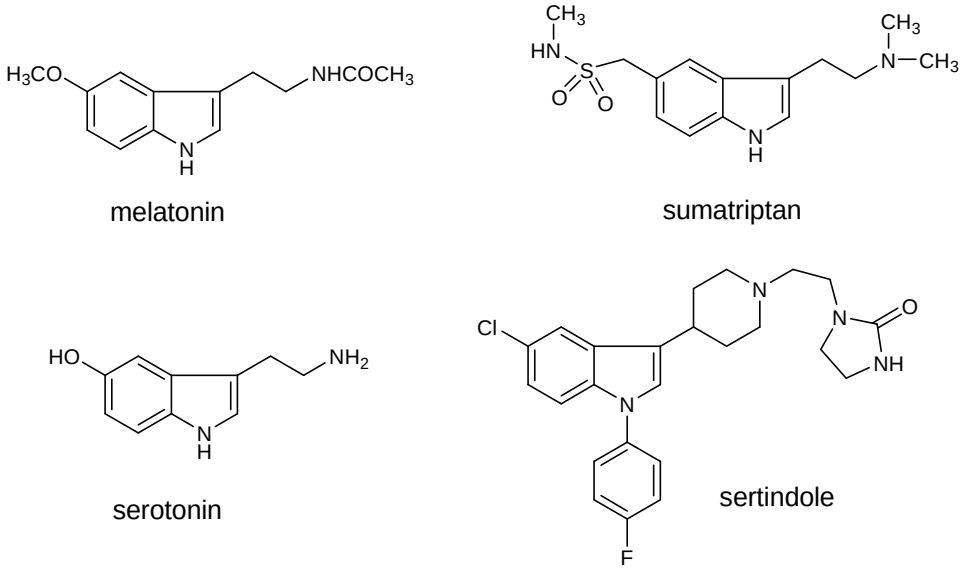
ดังนั้นการเกิดการชักนำการตายแบบอะพอพโทซิสผ่าน death receptor (TRAIL-R) จะมีการเชื่อมระหว่าง death receptor (ซึ่งเป็น extrinsic) pathway และ mitochondrial (intrinsic) pathway (Kelley and Ashkenazi, 2004; Mahalingam et al., 2008)

นอกจากนี้เชื่อว่าระบบภูมิคุ้มกันสามารถกำจัดมะเร็งโดยอาศัย T-cells และ NK cells ภายใต้การควบคุมของเซลล์ T-helper cells (Th) โดยการหลั่งซัยโตคัยน์ที่จำเพาะต่อเซลล์เป้าหมาย การเพิ่มและปรับสมดุลการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน โดยเพิ่มจำนวนเซลล์ลิมโฟซัยต์ การหลั่งสารซัยโตคัยส์และเคโมคัยส์ รวมทั้งการเข้าทำลายเซลล์ที่ผิดปกติโดยตรง แม้ว่า กลไกฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารเมลาโทนินยังไม่เป็นที่สรุปแน่ชัด แต่จากการศึกษาฤทธิ์เมลาโทนินในการกระตุ้น apoptosis ของเซลล์มะเร็งในหนูแสดงให้เห็นกลไกการออกฤทธิ์น่าจะเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (Blask et al., 2005) เมลาโทนินมีผลยับยั้งการสร้าง proinflamatory cytokines หลายตัวผ่านทาง NF-kB ในหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดการเสียหายของดีเอ็นเอด้วยภาวะเครียดอ็อกซิเดชั่น (Oxidative and nitrosative DNA damage) (Laothong et al., 2010) ในภาวะปกติระบบภูมิคุ้มกันจะสมดุลโดยการสั่งการ(Immune regulation) ของกลุ่มเซลล์ T regulatory cells (Tr) ประกอบด้วย CD4+ CD25++ FoxP3^{+} Tr (natural Tr), CD4+ CD25+ Tr (Tr1), CD4+ CD25+ helper T cell (Th3) และ CD8+ CD25+ cytotxic T cell (Tc) มีหน้าที่หลั่งซัยโตคัยส์กลุ่ม suppressive cytokines IL-10 และ TGF-α เพื่อลดบทบาท (immunosuppression) การทำงานของเซลล์ CD4+ T helper 1 (Th1), CD4+ T helper 2 (Th2), M2 Macrophage (M2) และ natural killer T cell (NKT) ให้น้อยลง

หนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดดีเอ็นเอเสียหายด้วยภาวะเครียดออกซิเดชั่น (Oxidative and nitrosative DNA damage) เมื่อได้รับเมลานิน จะมีผลยับยั้งการสร้าง proinflamatory cytokines หลายตัวผ่านทาง NF-kB (Laothong et al., 2010) ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ระบุว่าหนูที่ถูกชักนำให้เกิดมะเร็งตับ (hepatocellular tumor-promoting) เมื่อมีการให้เมลาโทนินเสริมจะช่วยลดภาวะเครียดออกซิเดชั่น ลงได้ (Nishimura, et al. 2010) เมลาโทนินมีผลโดยการจับที่ตัวรับเมลาโทนินชนิดที่ 1 (MT1) และ ตัวรับเมลาโทนินชนิดที่ 2 (MT2) (Witt-Enderby, et al 2006) มีผลยับยั้ง adenylyl cyclase ทำให้ linoleic acid uptake ลดลง และเพิ่มการสลายตัวของ calmodulin และการจับกับ nuclear orphan receptor (RZR/ROR) มีผลทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวลดลง มีรายงานเกี่ยวกับเมลาโทนินที่ระบุว่าสามารถกระตุ้นการสร้างซัยโตคัยน์ เช่น แกมมาอินเตอฟีรอน (γ-IFN) และอินเตอร์ลูคินส์ (IL) ชนิดต่างๆ ซึ่งมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน (Brzezinski et al., 1997; Gianoulia-Karantana et al., 2006) เมลาโทนิมีผลทำให้ PBMC มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนไม่น้อยกว่า 69 ยีน โดย 46 ยีนมีการแสดงออกมากขึ้น (up regulation) เช่น transcription factor genes, homeo box A4 (*HOXA4*), forkhead box O1A (*FOXO1A*), transcription elongation factor B (*SIII*), polypeptide 3 (*TCEB3*), and peroxisome proliferative activated receptor delta (*PPARD*) ส่วนอีก 23 ยีนมีการแสดงออกน้อยลง (down regulation) เช่น PHD finger protein 15 (*PHF15*) and zinc finger protein 33a (*ZNF33A*) (Ha, et al. 2006) เมื่อ PBMC ถูกกระตุ้นด้วยสาร lipopolysaccharide (LPS stimulated PBMC) เมลาโทนินมีผลช่วยบรรเทาการอักเสบได้ โดยลดการแสดงออกของยีนซึ่งเกี่ยวข้องกับการอักเสบ ในกลุ่ม

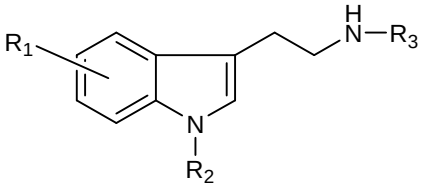
chemokine subfamily genes เช่น ยีน CCL2/MCP1, CCL3/MIP1α CCL4/MIP1β, CCL5/RANTES, CCL8/MCP2, CCL20/MDC และ CCL22/MIP3α ทำให้ระดับ CCL2 and CCL5 มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Park, et al. 2007) มีการศึกษาที่ระบุว่าเซลล์มะเร็งหลายชนิดมีการตอบสนองต่อเมลาโทนิน เช่นในมะเร็งต่อมลูกหมากการได้รับเมลาโทนินมีผลให้การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวกับรอบเวลา (oscillatory circadian rhythm genes) เช่น ยีน *Dbp, Per2* กลับสู่สภาพเหมาะสม (resynchronization) (Hynes, et al. 2010)

เมลาโทนินเป็นสารกลุ่ม tryptamine ซึ่งใกล้เคียงกับยาที่ใช้อยู่ในปัจจุบันหลายตัวได้แก่ serotonin, sumatriptan และ sertindole แสดงดังในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของ melatonin และสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียง

การ แทนที่หมู่ OCH_3 ตรง aromatic ring ในเมลาโทนินด้วยหมู่อื่นๆ รวมถึงการเพิ่มหรือลดจำนวนคาร์บอนระหว่าง indole group และ side chain amine ส่งผลให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเปลี่ยนแปลงไปทั้งเพิ่มขึ้นและลดลง (Reiter et al., 2003; 2007) การจับกับ melatonin receptor เปลี่ยนไป (Morishima et al., 1998) มีหลักฐานที่แสดงว่ากลุ่ม methoxy และ amino มีความสำคัญต่อการจับกับรีเซฟเตอร์ของเมลาโทนิน และการแทนที่ที่ตำแหน่งที่ 2 ของ indole ring สามารถเสริมฤทธิ์การจับกับรีเซฟเตอร์ของเมลาโทนินได้ดีขึ้น (Suzen, 2007) จากข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าการดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีของสารเมลาโทนิน มีโอกาสได้อนุพันธ์ใหม่ที่มีฤทธิ์ดีกว่าสารเมลาโทนินต้นแบบ แต่การศึกษาเกี่ยวกับการ ดัดแปลงโครงสร้างทางเคมียังมีการศึกษาน้อย กลุ่มผู้วิจัยจึงมีโครงการศึกษาดัดแปลงโครงสร้างตรงตำแหน่งหมู่แทนที่ตรงตำแหน่ง aromatic ring, หมู่ indole N-atom และตรง side chain amine ดังแสดงในรูปที่ 2



R_1 = OCH_3, OH, OAc, OBz, etc.

R_2 = H, CH_3, $CH_2C_6H_5$, C_6H_5, etc.

R_3 = H, $COCH_3$, $COCH_2CH_3$, COC_6H_5, etc.

รูปที่ 2 แสดงตำแหน่งที่จะทำการดัดแปลงโครงสร้าง เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งในเบื้องต้น

จากข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าการดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีของสารเมลาโทนิน มีโอกาสได้อนุพันธ์ใหม่ที่มีฤทธิ์ดีกว่าสารเมลาโทนินต้นแบบ แต่การศึกษาเกี่ยวกับการ ดัดแปลงโครงสร้างทางเคมียังมีการศึกษาน้อย อนุพันธ์ที่ ที่พัฒนาขึ้นได้ยังไม่ข้อมูลศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งในเบื้องต้นผ่านทางกลไกภูมิคุ้มกันเทียบกับเมลาโทนินต้นแบบ ดังนั้นโครงนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งในเบื้องต้นผ่านทางกลไกภูมิคุ้มกันของอนุพันธ์เมลาโทนินเทียบกับเมลาโทนินต้นแบบ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งคาดว่าหากพบอนุพันธ์เมลาโทนินที่มีคุณสมบัติที่มีประโยชน์ในการต้านอนุมูลอิสระและต้านมะเร็ง และมีคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ที่ดีขึ้น จะเกิดประโยชน์ในการพัฒนายาเพื่อใช้เสริมฤทธิ์การต้านมะเร็ง และลดอาการข้างเคียงของเคมีบำบัดในผู้ป่วยมะเร็งต่อไป

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

โครงการวิจัยได้ผ่านการพิจารณาคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยทำวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เลขที่ HE532109

1. สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ และสถานที่ทำการวิจัย

1.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเซลล์ทดสอบ ได้แก่ RPMI medium 1640; RPMI-1640 (GIBCO, Invitrogen Corporation, USA), DMEM medium (GIBCO, Invitrogen Corporation, USA), Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany), Penicillin-streptomycin (GIBCO, Invitrogen Corporation, USA), Fetal Bovine Serum (GIBCO, Invitrogen Corporation, USA), Fetal calf serum (J R Scientific, USA), 0.25% Trypsin-EDTA (1X) (GIBCO, Invitrogen Corporation, USA), Ficoll-PaqueTM PLUS (GE Healthcare, Sweden), Trypan blue (JR Scientific, Inc., USA), DMSO, MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) (Amresco LLC, Ohio, USA).

1.2 วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือ

วัสดุอุปกรณ์ในการศึกษาพิษต่อ เซลล์ ได้แก่ Sterile 25 cm^2 canted neck tissue culture (430168, Corning Inc., USA), ตู้บ่ม CO_2 incubator (Procell, Jencons-PLS, USA), เครื่องปั่นเหวี่ยง (5220, KUBOTA, Japan) และเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (5922, KUBOTA, Japan), LAF cabinet (ESCO, class II BSC, USA), Sterile flat bottom 96-well plate (NUNCLON D SI, Nunc, USA), Microplate reader (Anthos 2010, Germany), Hemocytometer (Brightline Improved Neubauer 0.1 mm deep, BOECO, Germany), กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Eclipse TS 100, Nikon, Japan), Sterile flat bottom 24-well plate (Costar 3524, Corning Inc., USA), Microscope slide (Sail Brand, ประเทศไทย), Cover slip ขนาด 18×18 mm^2 (Menzel-Glaser, Germany), กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ชนิดหัวกลับ (CKX41, Olympus, Japan), เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดความเร็วรอบสูง (MiniSpin, eppendorf, USA), เครื่อง UV-Vis spectrophotometer (UV-1700 PharmaSpec, SHIMADZU, Japan), อ่างบ่มความร้อน (Dry bath incubator, Major Science, Taiwan), เครื่องกำเนิดไฟฟ้า (Power supply รุ่น MP-300N, Major Science, Taiwan)

1.3 สถานที่ทำการวิจัย

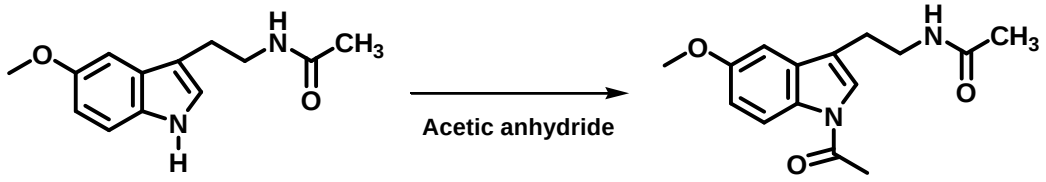
คณะเทคนิคการแพทย์ และ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

2. การเตรียมสารอนุพันธ์ที่ใช้ในการศึกษา

สารอนุพันธ์เมลาโทนิน มีวิธีการเตรียม ดังนี้ ชั่งเมลาโทนินใส่ใน round bottom flask และปิดด้วย guard column ที่บรรจุด้วย $CaCl_2$ เพื่อป้องกันความชื้น หลังจากนั้นจะ ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาภายในระบบปิด โดยใช้ ก๊าซไนโตรเจนบรรจุในลูกโป่งครอบไว้เหนือ guard colum อีกชั้นหนึ่ง จากนั้น นำสารละลาย Pyridine หรือ CH_2Cl_2 1 mL ละลายเมลาโทนินในขวด และนำสารละลายแช่บนอ่างน้ำแข็ง จึงค่อยๆเติม Acid chloride ชนิดต่างๆ เป็นเวลามากกว่า 15 นาที จึงตั้งปฏิกิริยาต่อไปที่อุณหภูมิห้อง และทำการตรวจสอบติดตามการเกิดปฏิกิริยาด้วยวิธีการ Thin layer chromatography

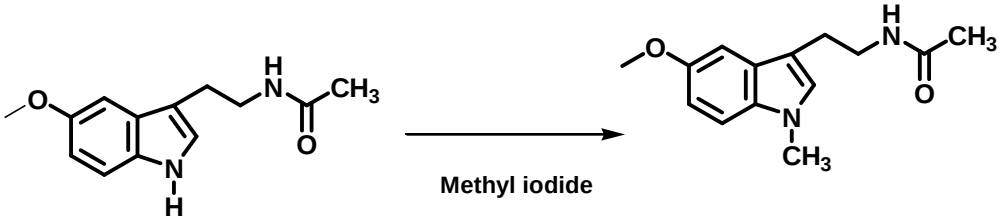
เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์จะทำการ หยุดปฏิกิริยาด้วยวิธีการ liquid-liquid extraction ระหว่างน้ำกลั่น 50 mL และ 10% methanol in dichloromethane 50 mL ทำการสกัด 3 ครั้ง เก็บชั้นสารอินทรีย์ไว้ นำไปเติม $NaSO_4$ anhydrous เพื่อดูดน้ำส่วนเกิน และกำจัด $NaSO_4$ โดยการกรองด้วยกระดาษกรอง สารจากการกรองจะนำไปทำให้เข้มข้นด้วยเครื่อง rotary evaporator และคำนวณหาน้ำหนักของสารหยาบ หลังจากนั้นจึงนำสารหยาบดังกล่าวมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการ open column chromatography (CC) ด้วยตัวชะความเข้มข้นต่างๆ โดยจะเริ่มจากสารชะที่มีความมีขั้วต่ำเช่น 100% hexane สารผสมระหว่าง hexane: ethyl acetate ในอัตราส่วนต่างๆ ,100% ethyl acetate ไปจนถึง methanol บางอนุพันธ์อาจมีการเติม 4-dimethylaminopyridine (DMAP) เพื่อเร่งปฏิกิริยา โดยกระบวนการสังเคราะห์ต่างๆ ทำเช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น โดยมีรายละเอียดการสังเคราะห์แต่ละอนุพันธ์ดังนี้

2.1 Acetyl melatonin



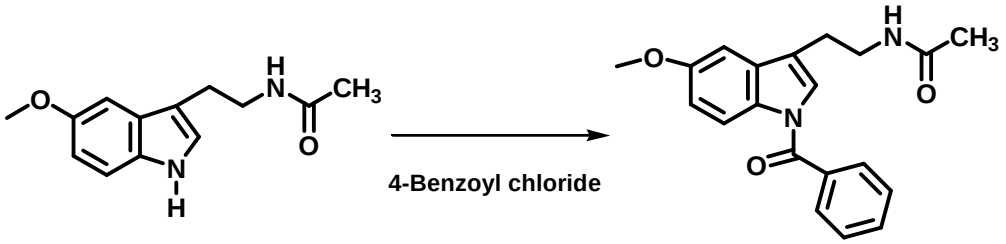
Melatonin (232) **(274)**

2. N-Methyl melatonin



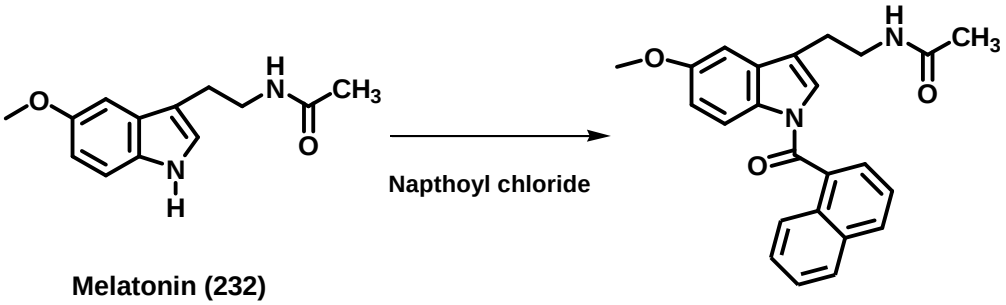
Melatonin (232) **N-methyl melatonin (246)**

3. Benzoyl melatonin



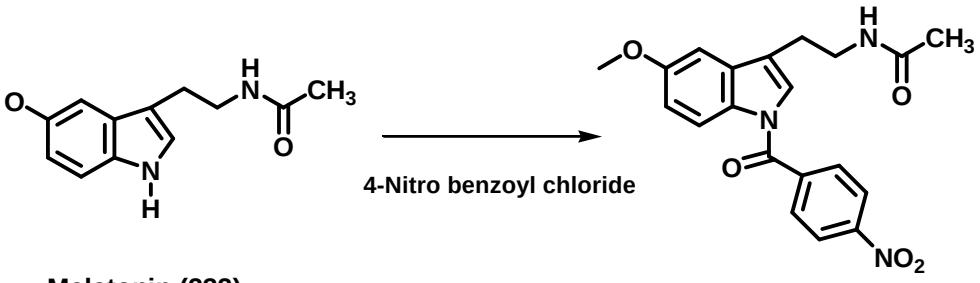
Melatonin (232) **(336)**

4. Napthoyl melatonin



Melatonin (232)

5. 4-Nitro benzoyl melatonin



Melatonin (232) **(381)**

3. การตรวจกรองความเป็นพิษหรือการรอดชีวิตต่อเซลล์ทดสอบ

ตรวจความเป็นพิษหรือการรอดชีวิตของเซลล์ ด้วยวิธี MTT โดย MTT จะถูกเปลี่ยนเป็นผลึกสีม่วงของ formazan โดยกิจกรรมภายในเซลล์ของเซลล์ที่มีชีวิต และสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้หลังจากละลายผลึกด้วย DMSO เซลล์ที่ใช้ศึกษาครั้งนี้เป็นเซลล์ภูมิคุ้มกันที่ได้จากกระแสเลือดคน (Human Peripheral blood mononuclear cells : hPBMCs) และเซลล์มะเร็งลำไส้ (HCT-116) และมะเร็งเม็ดเลือดเขาว (U937) ก่อนถูกทดสอบเซลล์จะถูก บ่มใน 5% CO2 incubator อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเมลาโทนินและอนุพันธ์แต่ละชนิดจะถูกปิเปต ลงในแต่ละหลุม และทดสอบเป็นเวลา 21 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลาย MTT (20 µl = 5 mg/ml) หลังจากนั้น 3 ชั่วโมง สารละลาย MTT จะถูกดูดออกและเหลือผลึก formazan ที่สามารถละลายได้ใน DMSO แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 555 nm เทียบกับ

background ที่ 650 nm ทั้งนี้ทำการ ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และคำนวณร้อยละการเกิดพิษต่อเซลล์หรือการรอดของเซลล์ (% cytotoxicity และ % viability) จากสมการ

$$\text{cytotoxicity} = [A_{control} - A_{test}]\times 100 / [(A_{control}]$$

$$\text{viability} = [A_{test} / A_{control}]\times 100]$$

A_{test} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ NR ในเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารสกัดหยาบของข่าคม

$A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ NR ในเซลล์ที่ไม่ได้ทดสอบด้วยสารสกัด และมีปริมาณของ DMSO ใน

4. การวัดการตายแบบอะพอพโทซิส ด้วย Flow cytometry analysis

วิธีย้อมสีฟลูออเรสเซนส์ได้แก่ annexin V-FITC และ propidium iodide (Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC, eBioscienccce) ซึ่งมีคุณสมบัติพิเศษในการย้อมติดโครงสร้างของเซลล์ที่แตกต่างตำแหน่งกัน โดยสี annexin V-FITC จะไปติดฟอสฟาทิดิลเซอร์รีน (phosphatidyl serine; PS) ของเซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส ทั้งระยะแรก (early stage of apoptosis) และระยะท้าย (late stage of apoptosis) ส่วนเซลล์ที่ตายในอะพอพโทซิสระยะท้าย หรือ ตายผ่านกลไกเนโครซิส เซลล์เมมเบรนจะสูญเสียสภาพ (loose of membrane permeation) ทำให้สี propidium iodide สามารถผ่านเข้าเซลล์เพื่อไปย้อม DNA ของเซลล์ตายได้ รูปแบบการตายของเซลล์สามารถตรวจสอบได้โดยใช้เครื่องมือ Flow cytometer หลังจากเซลล์ถูกกระตุ้นโดยสารเมลาโทนินและอนุพันธ์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์จะถูกล้าง แล้วย้อมตามขั้นตอนของชุดน้ำยา ด้วยสี annexin V และ propidium iodide สีละ 15 นาทีที่อุณหภูมิห้องและป้องกันแสง เมื่อครบกำหนดเวลานำเซลล์ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ Flow cytometer (BD FACSCanto II, USA)

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)

ผลการศึกษาถูกรายงานเป็นค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (±SD) วิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของข้อมูล โดยใช้ One-way ANOVA (Single factor)

บทที่ 4
ผลการศึกษาและการอภิปรายผลการวิจัย

4.1 คุณสมบัติการละลายของสารอนุพันธ์เมลาโทนิน

อนุพันธ์เมลาโทนินที่สังเคราะห์ได้มีทั้งหมด 5 ตัว คือ Melatonin acetate (ACT-MLT), N-methyl melatonin (N-MET-MLT), Benzoyl melatonin (BENZ-MLT), Naphthoyl melatonin (NAP-MLT) และ 4-nitro benzoyl melatonin (4-NITRO-MLT) ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งอนุพันธ์แต่ละตัวมีค่าการละลายใน culture media with 1% DMSO ที่แตกต่างกัน โดยพบว่า MLT, ACT-MLT และ N-MET-MLT มีค่าการละลาย >1mM ในขณะที่อนุพันธ์อื่นมีค่าการละลายที่ต่ำกว่า คือ <200 μM เนื่องจากหมู่แทนที่ที่เป็น bulky group ทำให้ค่าการละลายของอนุพันธ์ลดลง

ตารางที่ 1 สารอนุพันธ์เมลาโทนินที่สังเคราะห์ได้

Names	Structure	Solubility
Melatonin (MLT)		> 1 mM
Melatonin acetate (ACT-MLT)		> 1 mM
N-methyl melatonin (N-MET-MLT)		> 200 μM
Benzoyl melatonin (BENZ-MLT)		> 200 μM
Naphthoyl melatonin (NAP-MLT)		> 200 μM

4-nitro benzoyl melatonin (4-NITRO-MLT)		> 200 µM

4.2 คุณสมบัติของเซลล์ไลน์ที่ใช้ในการศึกษา

อนุพันธ์เมลาโทนินถูกนำมาทดสอบถึงผลความเป็นพิษและการ เพิ่มจำนวนของเซลล์ภูมิคุ้มกัน รวมทั้ง การยับยั้งการเจริญเติบโต และการชัก นำให้เกิดขบวนการอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็ง ซึ่งเซลล์ ภูมิคุ้มกัน ที่นำมาศึกษา คือ เซลล์ภูมิคุ้มกันที่ได้จากกระแสเลือดคน (Peripheral blood mononuclear cells : hPBMCs) ที่สกัดมาจากเลือดของอาสาสมัครสุขภาพดี และเซลล์ไลน์มะเร็งที่นำมาศึกษา คือ เซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้ Human colorectal carcinoma (HCT-116) และมะเร็งเม็ดเลือดขาว Human Human myelomonocytic lymphoma cell line (U937) โดยมีสภาวะการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ชนิดของเซลล์ทดสอบ และสภาวะในการเลี้ยง

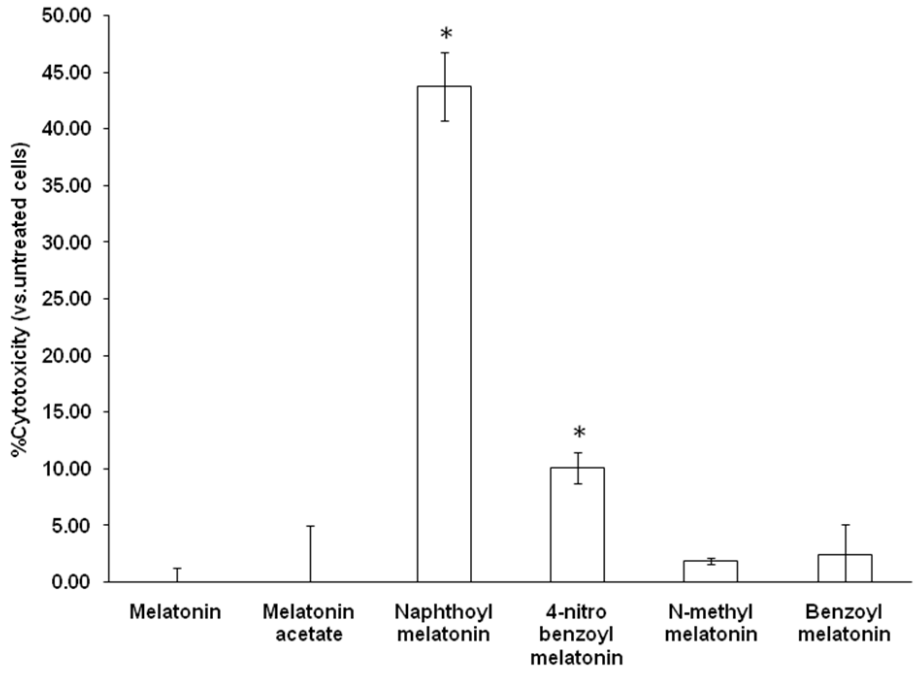
Cell types	Culture condition
Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (hPBMCs)	Cultured in RPMI medium Incubated at 37 °C in a humidified 5% CO_2 atmosphere
Human colorectal carcinoma (HCT-116)	Cultured in DMEM medium Incubated at 37 °C in a humidified 5% CO_2 atmosphere
Human Human myelomonocytic lymphoma cell line (U937)	Cultured in RPMI medium Incubated at 37 °C in a humidified 5% CO_2 atmosphere

4.3 ความเป็นพิษของอนุพันธ์เมลาโทนินต่อ เซลล์ภูมิคุ้มกัน (Immunotoxicity assay)

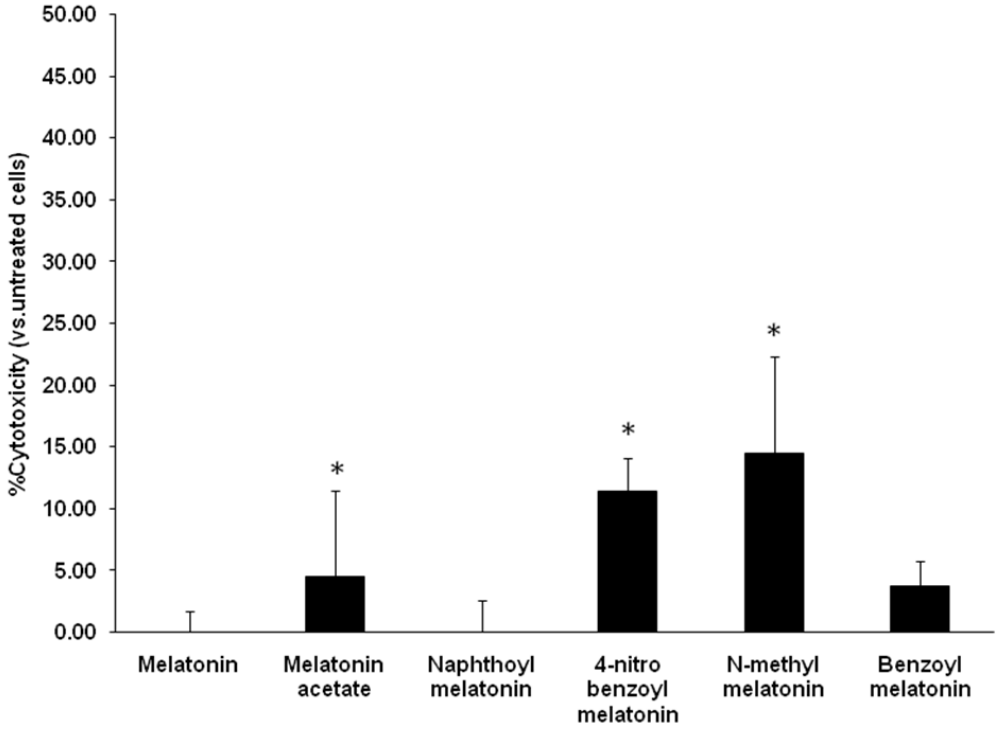
เนื่องจากการให้ยาจะต้องผ่านเข้าสู่กระแสเลือดก่อนจะไปสู่อวัยวะเป้าหมาย การศึกษาความเป็นพิษต่อระบบภูมิคุ้มกัน โดยดูพิษต่อเซลล์ภูมิคุ้มกันที่ได้จากกระแสเลือดคน (Peripheral blood mononuclear cells : hPBMCs) เป็นการจำลองสภาพให้ใกล้เคียงกับร่างกาย เนื่องจากเป็นเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันมีหน้าที่สำคัญต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และเป็นเซลล์สำคัญที่สามารถใช้เป็นแบบจำลองเพื่อศึกษาความเป็นพิษของสาร ดังนั้นการศึกษาความเป็นพิษต่อระบบภูมิคุ้มกันของ เมลาโทนินและอนุพันธ์ จะสามารถระบุถึงความเป็นพิษของสารเมื่อให้ต่อร่างกาย และเป็นข้อมูลประกอบในการพิจารณาการพัฒนาสารเพื่อใช้ในทางยาต่อไป

เพื่อศึกษา ความเป็นพิษของอนุพันธ์ เมลาโทนิน ต่อเซลล์ภูมิคุ้มกัน จึงศึกษาการ ยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเซลล์ภูมิคุ้มกันของอนุพันธ์เมลาโทนิน ผลการศึกษาพบว่า เมลาโทนินไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ภูมิคุ้มกัน ทั้งความเข้มข้น 1 μM และ 1 mM แต่สำหรับอนุพันธ์เมลาโทนิ น พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ภูมิคุ้มกันมากกว่าเมลาโทนิน โดย NAP-MLT ที่ความเข้มข้น 1 μM มีความเป็นพิษต่อเซลล์ภูมิคุ้มกันมากที่สุด โดยทำให้จำนวนของเซลล์ภูมิคุ้มกัน ตายประมา ณ 44% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 3a) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นจนถึง 1 mM พบว่าความเป็นพิษของอนุพันธ์ทุกตัว <15% (รูปที่ 3b) ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า อนุพันธ์เมลาโทนินมีความเป็นพิษต่อ เซลล์ภูมิคุ้มกันต่ำ โดยระดับความเป็นพิษ จะสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของอนุพันธ์ ความเป็นพิษของอนุพันธ์ที่มี bulky group จะสูงกว่า

(a)



(b)



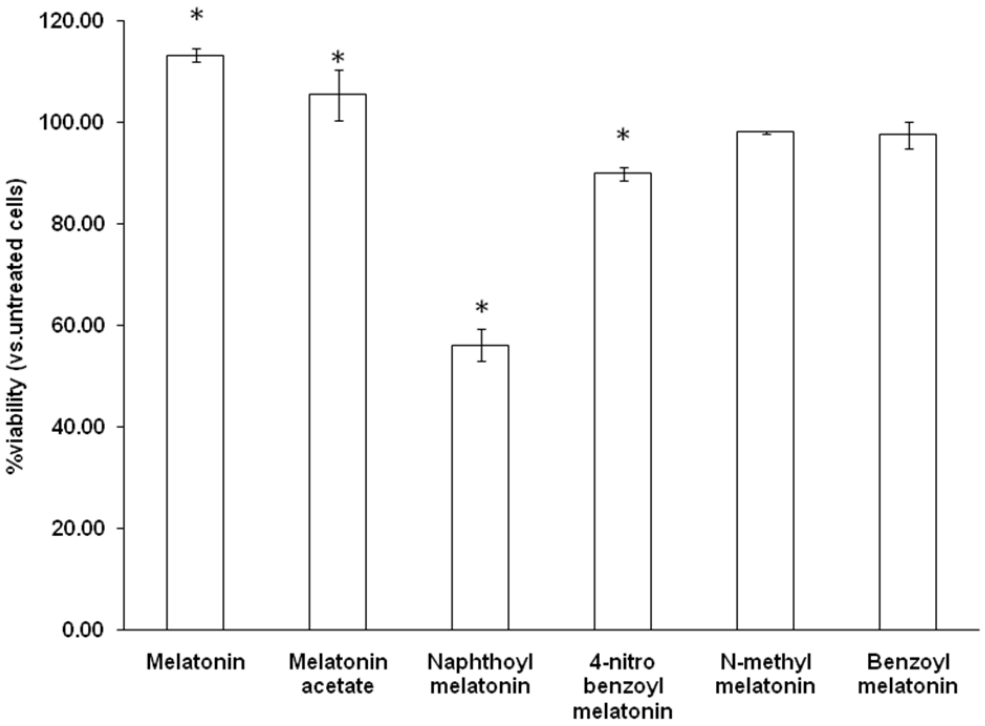
รูปที่ 3 ผลการทดสอบการตาย (%Cytotoxicity) ด้วยวิธี MTT assay ที่ 24 ชั่วโมง ของเซลล์ภูมิคุ้มกัน เมื่อได้รับเมลาโทนินและอนุพันธ์ความเข้มข้น (a) 1 μM (b) 1 mM *แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารเมลาโทนินหรืออนุพันธ์เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (p-value < 0.05)

4.4 การชักนำการเพิ่มจำนวนของเซลล์ภูมิคุ้มกัน (Immune cell proliferation induction assay)

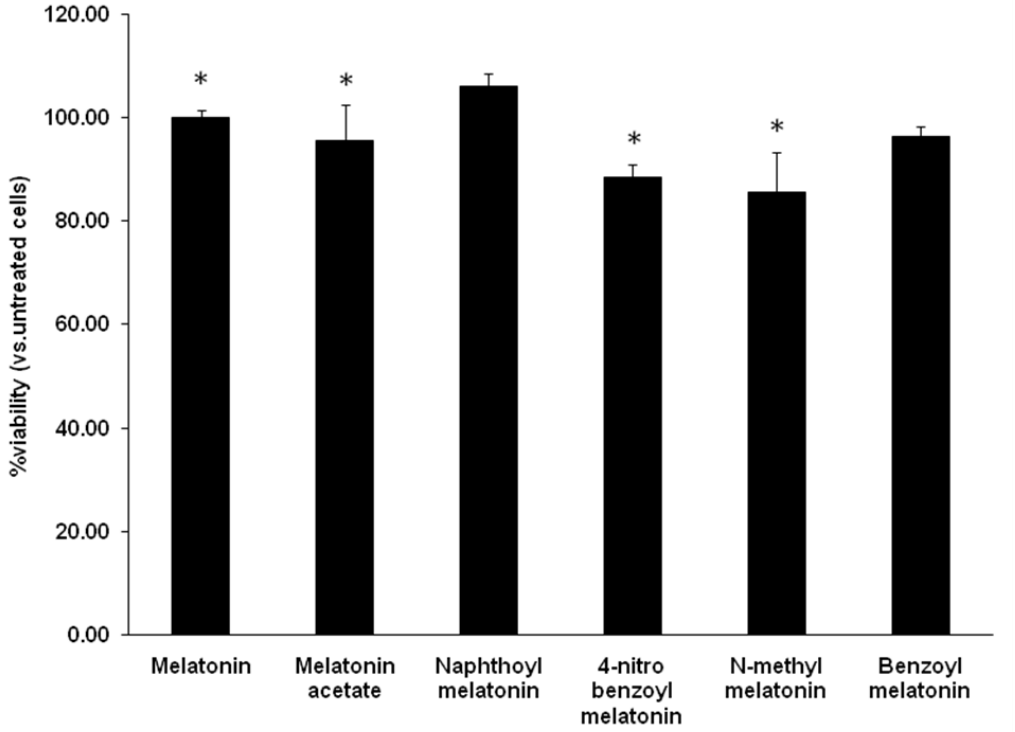
เพื่อศึกษาฤทธิ์เสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของอนุพันธ์เมลาโทนิน จึงศึกษาการเพิ่มจำนวนเซลล์ภูมิคุ้มกันที่ได้จากกระแสเลือดคน (Peripheral blood mononuclear cells : hPBMCs) ผลการศึกษาพบว่า เมลาโทนินสามารถเพิ่มจำนวน hPBMCs ได้ที่ความเข้มข้น 1 μM (113.2% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ 100%) สำหรับอนุพันธ์เมลาโทนิน ที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่า ACT-MLT อนุพันธ์เดียวเท่านั้น ที่สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ hPBMCs ได้ (105.4%) (รูปที่ 4a) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอนุพันธ์ถึง 1 mM พบว่าเมลาโทนินและอนุพันธ์ทั้งหมดไม่เพิ่มจำนวนเซลล์ hPBMCs ยกเว้น NAP-MLT ที่เพิ่มจำนวนได้ 106.1% (รูปที่ 4b)

ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า การชักนำการเพิ่มจำนวนของเซลล์ hPBMCs กับปริมาณที่ให้และชนิดของอนุพันธ์ และผลการเพิ่มจำนวนของเซลล์ hPBMCs ของเมลาโทนิน สัมพันธ์กับผลการศึกษาที่พบว่าเมลาโทนินขนาด 1 pM – 1 μM เพิ่มจำนวน PBMC ได้ (Kuhlwein & Irwin, 2001)

(a)



(b)



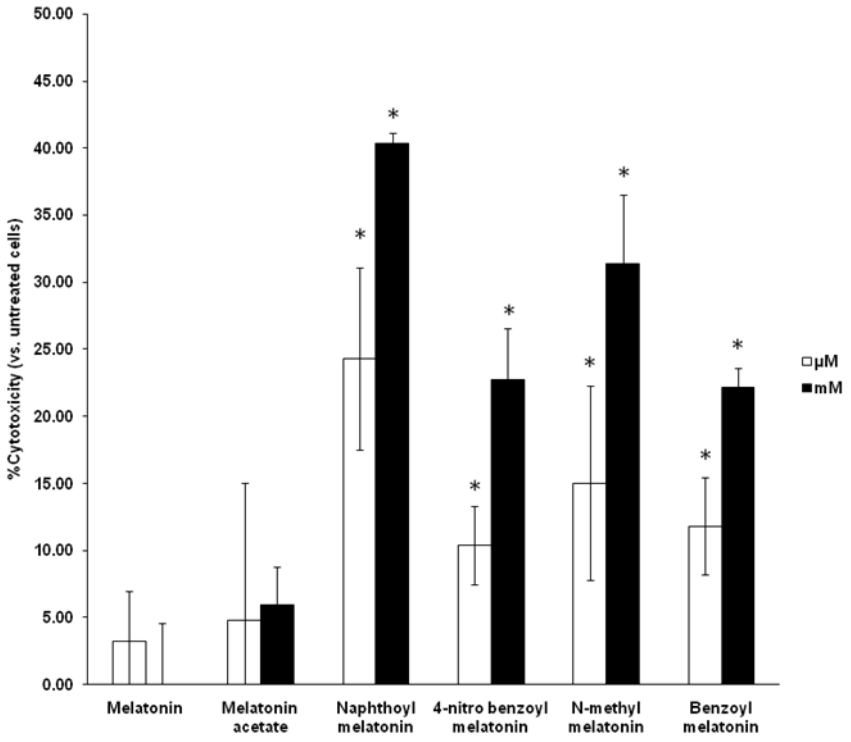
รูปที่ 4 ผลการทดสอบการรอด (%Viability) ด้วยวิธี MTT assay ที่ 24 ชั่วโมง ของเซลล์ภูมิคุ้มกัน เมื่อได้รับเมลาโทนินและอนุพันธ์ความเข้มข้น (a) 1 μM (b) 1 mM *แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารเมลาโทนินหรืออนุพันธ์

เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (p-value < 0.05)เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (p-value < 0.05)

4.5 อนุพันธ์เมลาโทนิน ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้คน HCT-116 (Anti-proliferation of HCT-116 cancer cells)

เมลาโทนินมีผลในการฆ่าเซลล์ ไลน์มะเร็งลำไส้คน HCT-116 ได้น้อย (≤3.24±3.7%) ซึ่งผลที่ได้แตกต่างจากการศึกษาของ Garcia-Navarro ปี 2007 และคณะ ซึ่งทำการศึกษาผลของเมลาโทนินในเซลล์ลำไส้ ชนิด HT-29 โดยพบว่าเมลาโทนินให้ผลในการยับยั้งการโตของเซลล์มะเร็งที่ IC_{50} = 1.3±0.1 mM (Garcia-Navarro, et al. 2007) นอกจากนี้การศึกษานี้ พบการฆ่ามะเร็งลำไส้เพิ่มมากขึ้นโดยอนุพันธ์เมลาโทนิน โดยพบว่า NAP-MLT มีฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งมากที่สุด (24.3±6.8 และ 40.3±0.8%) และรองลงมา คือ N-MET-MLT, 4-NITRO-MLT และ BENZ-MLT ตามลำดับ แต่พบการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้น้อย ที่สุดโดย ACT-MLT (<5.9±2.8) (รูปที่ 5)

ผลการศึกษา ครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าอนุพันธ์เมลาโทนิน ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ได้มากกว่าเมลาโทนินต้นแบบ และการยับยั้งการเติบโตนั้น สัมพันธ์กับระดับปริมาณของอนุพันธ์ โดยอนุพันธ์ที่มี หมู่แทนที่เป็น bulky group จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้มากกว่า ซึ่งอาจเกิดจากความสามารถในการละลายในไขมัน (lipophilicity) มากขึ้น จึงทำให้ผ่านเข้าเซลล์ได้มากกว่าเมลาโทนินต้นแบบ

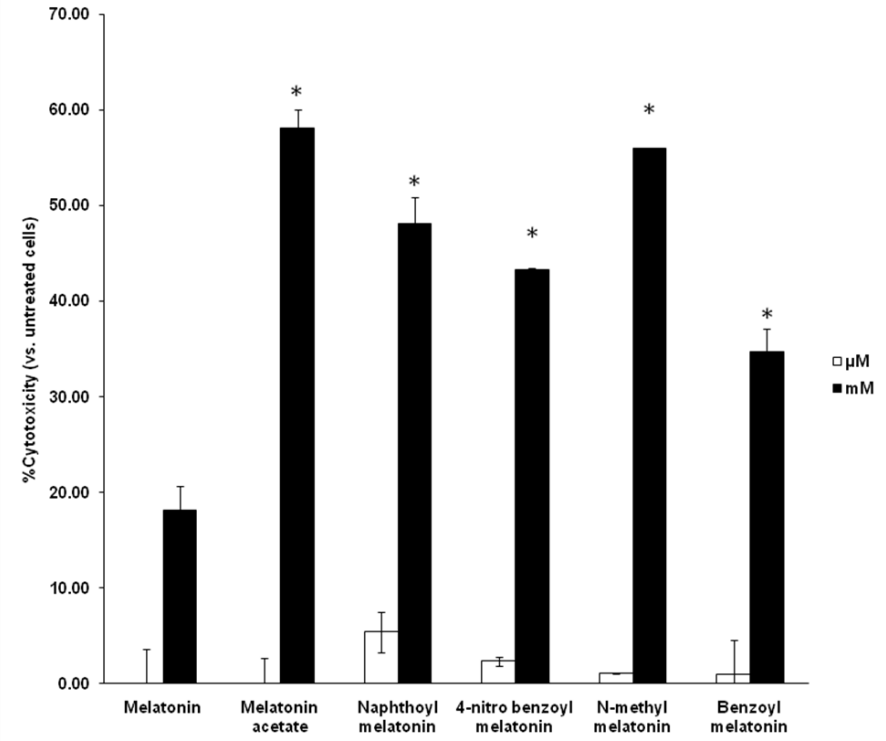


รูปที่ 5 ผลการทดสอบการตาย (%Cytotoxicity) ด้วยวิธี MTT assay ที่ 24 ชั่วโมง ของเซลล์มะเร็งลำไส้ HCT-116 เมื่อได้รับเมลาโทนินและอนุพันธ์ความเข้มข้น 1 μM และ 1 mM

*แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารเมลาโทนินหรืออนุพันธ์ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (p-value < 0.05)

4.6 อนุพันธ์เมลาโทนิน ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาวคน U937 (Anti-proliferation of U937 cancer cells)

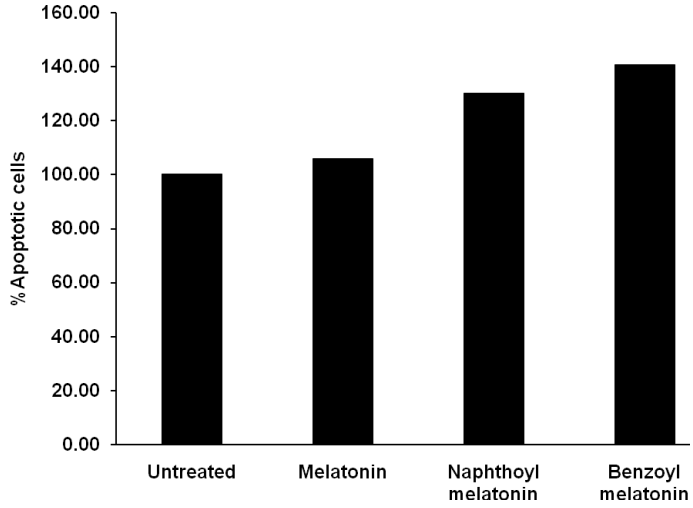
จากผลการศึกษาพบว่า เมลาโทนินมีผลในการ ยับยั้งการเจริญเติบโต เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวประมาณ 18% ที่ความเข้มข้น 1 mM โดยผลการศึกษาสนับสนุนการศึกษาของ Buyukavci ปี 2006 และคณะ ที่พบว่าเมลาโทนินความเข้มข้น 1 mM มีผลในการฆ่าเซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (CMK, Jurkat และ MOLT-4) จากฤทธิ์ในการเป็น pro-oxidant ของเมลาโทนิน (Buyukavci et al., 2006) การศึกษานี้ยัง พบการตายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมากขึ้น (34.6±2.4 – 58.1±2.0) หลังจากได้รับ ACT-MLT, N-MET-MLT, NAP-MLT, 4-NITRO-MLT และ BENZ-MLT ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 1 mM ส่วนที่ความเข้มข้นต่ำกว่า คือ 1 μM) พบการฆ่าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ≤5.4% (รูปที่ 6) ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าการ ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง เม็ดเลือดขาวสัมพันธ์กับปริมาณของอนุพันธ์



รูปที่ 6 ผลการทดสอบเปอร์เซ็นต์การตาย (%Cytotoxicity) ด้วยวิธี MTT assay ที่ 24 ชั่วโมง ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 เมื่อได้รับเมลาโทนินและอนุพันธ์ที่ความเข้มข้น 1 μM และ 1 mM *แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารเมลาโทนินหรืออนุพันธ์ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (p-value < 0.05)

4.7 อนุพันธ์เมลาโทนิน ชักนำให้เกิดอะพอพโทซิส ของเซลล์ไลน์มะเร็งลำไส้คน HCT-116 (HCT-116 Apoptosis induction)

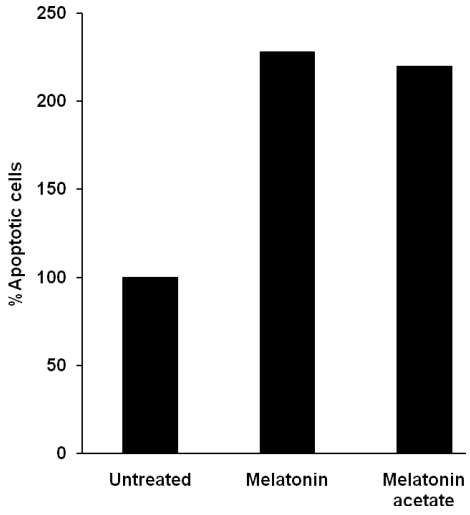
จากผลการศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ ที่ได้ผลว่าอนุพันธ์กลุ่มที่มีการแทนที่เมลาโทนินด้วยหมู่ bulky group (NAP-MLT และ BENZ-MLT) มีค่า cytotoxicity สูงเทียบกับเมลาโทนินต้นแบบ ดังนั้นจึงนำมาศึกษาหา การชักนำให้เกิดขบวนการอะพอพโทซิส ของอนุพันธ์ พบว่าเมลาโทนิน (1 μM) มีผลฆ่าเซลล์มะเร็งลำไส้โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส 5.9% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่การตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งลำไส้เพิ่มมากขึ้นถึง 30.1% และ 40.6% เมื่อได้รับอนุพันธ์เมลาโทนิน NAP-MLT และ BENZ-MLT ตามลำดับ (รูปที่ 7) การศึกษานี้จึงสรุปได้ว่า การแทนที่เมลาโทนินด้วยหมู่ bulky group มีผลในการเพิ่มฤทธิ์การชักนำ เกิดขบวนการอะพอพโทซิสในมะเร็งสำไส้ได้



รูปที่ 7 ผลการทดสอบเปอร์เซ็นต์การตายแบบอะพอพโทซิส (%Apoptosis) ด้วยวิธี Flow cytometry ที่ 24 ชั่วโมง ของเซลล์มะเร็งสำไส้ HCT-116 เมื่อได้รับเมลาโทนินและอนุพันธ์ที่ความเข้มข้น 1 μM *แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารเมลาโทนินหรืออนุพันธ์ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (p-value < 0.05)

4.8 อนุพันธ์เมลาโทนิน ชักนำให้เกิดอะพอพโทซิส ของเซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาวคน U937 (U937 Apoptosis induction)

จากผลการศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว การศึกษานี้จึงเลือกอนุพันธ์ที่มีค่า cytotoxicity สูง คือ ACT-MLT มาศึกษาหากลไกการชักนำให้เกิดขบวนการอะพอพโทซิสต่อ เพื่อเทียบกับเมลาโทนินต้นแบบ ผลการศึกษาพบว่า เมลาโทนิน (1 mM) มีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสเพิ่มขึ้น 127.8% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยพบ การเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส เช่นเดียวกันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว CMK ที่ความเข้มข้น 0.01 mM (~50%) โดยกลไกในการเพิ่ม การตายแบบอะพอพโทซิส นั้นอาจเกิดจากฤทธิ์ pro-oxidant (Buyukavci et al., 2006) และ/หรือการเพิ่ม activity ของ caspase-3 และ caspase-9 (Bejarano et al., 2009) นอกจากนี้ ยังพบว่าผลการชักนำการตายแบบอะพอพโทซิส ของอนุพันธ์เมลาโทนิน ความเข้มข้น 1 mM ของ ACT-MLT ไม่แตกต่างจากเมลาโทนิน โดยมีผลชักนำการตายแบบอะพอพโทซิสเพิ่มขึ้น 119.6% (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 ผลการทดสอบการตายแบบอะพอพโทซิส (%Apoptosis) ด้วยวิธี Flow cytometry ที่ 24 ชั่วโมง ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 เมื่อได้รับเมลาโทนินและอนุพันธ์ความเข้มข้น 1 mM *แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารเมลาโทนินหรืออนุพันธ์ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (p-value < 0.05)

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

กลุ่มวิจัยมีโครงการศึกษาดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีของสารเมลาโทนิน เพื่อสังเคราะห์อนุพันธ์เมลาโทนินใหม่ที่มีฤทธิ์ดีกว่าสารเมลาโทนินต้นแบบ แต่อนุพันธ์ที่ที่พัฒนาขึ้นได้ยังไม่ข้อมูลศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งในเบื้องต้นผ่านทางกลไกภูมิคุ้มกัน ดังนั้นโครงการนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งในเบื้องต้นผ่านทางกลไกภูมิคุ้มกันของอนุพันธ์เมลาโทนินเทียบกับเมลาโทนินต้นแบบ โดยอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้มี 5 ชนิด คือ Melatonin acetate (ACT-MLT), N-methyl melatonin (N-MET-MLT), Benzoyl melatonin (BENZ-MLT), Naphthoyl melatonin (NAP-MLT) และ 4-nitro benzoyl melatonin (4-NITRO-MLT) ที่มีค่าการละลายที่ต่างกัน โดยอนุพันธ์ที่มีการแทนที่ด้วย bulky group จะให้ค่าการละลายที่ต่ำ อนุพันธ์ทั้ง 5 ชนิด ได้ถูกนำมาศึกษาถึงฤทธิ์ต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ภูมิคุ้มกัน การชักนำการเพิ่มจำนวนของเซลล์ภูมิคุ้มกัน การยับยั้งการเจริญเติบโต และการชักนำให้เกิดขบวนการอะพอพโทซิส ต่อเซลล์มะเร็ง ลำไส้และเม็ดเลือดขาว ซึ่งผลการศึกษาสามารถสรุปได้ ดังนี้

1. ความเป็นพิษของอนุพันธ์ต่อ เซลล์ภูมิคุ้มกัน สัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของอนุพันธ์ โดยอนุพันธ์ที่มีความเป็น bulky group จะมีความเป็นพิษมากกว่า โดยเฉพาะ NAP-MLT (1 μM) ที่มีความเป็นพิษสูงที่สุด
2. การชักนำการ เพิ่มจำนวน ของเซลล์ภูมิคุ้มกัน สัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของอนุพันธ์ โดยพบว่า ACT-MLT (1 μM) และ NAP-MLT (1 mM) สามารถเพิ่มจำนวนของเซลล์ภูมิคุ้มกันได้ ซึ่งการเพิ่มจำนวน ของเซลล์ภูมิคุ้มกันน่าจะมีประโยชน์ในการต้านมะเร็งต่อไป
3. อนุพันธ์เมลาโทนินทั้ง 5 ชนิด ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ลำไส้ได้มากกว่าเมลาโทนินต้นแบบ และการยับยั้งการเติบโตนั้น สัมพันธ์กับปริมาณของอนุพันธ์ที่ให้ โดยอนุพันธ์ที่มี หมู่แทนที่เป็น bulky group มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้มากกว่าอนุพันธ์อื่น และการแทนที่เมลาโทนินด้วยหมู่ bulky group นี้มีผลในการด้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้โดยการชักนำ เกิดขบวนการอะพอพโทซิส
4. อนุพันธ์เมลาโทนินทั้ง 5 ชนิด ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง เม็ดเลือดขาวได้มากกว่าเมลาโทนินต้นแบบ และการยับยั้งการเติบโตนั้นสัมพันธ์กับปริมาณของอนุพันธ์ที่ให้ โดยพบว่า ACT-MLT มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมากที่สุด โดยผ่านการชักนำ เกิดขบวนการอะพอพโทซิส

จากผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน ทั้งในแง่ความเป็นพิษต่อเซลล์ภูมิคุ้มกันและการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน รวมถึงผลในการต้านมะเร็งลำไส้และมะเร็งเม็ดเลือดขาว พบว่าสารอนุพันธ์เมลาโทนินที่น่าจะนำไปทำการศึกษาต่อถึงกลไกในการควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและเสริมฤทธิ์ในการ

ต้านมะเร็ง คือ ACT-MLT และ NAP-MLT เพื่อพัฒนาเป็นยาเพื่อใช้เสริมฤทธิ์การต้านมะเร็ง และลดอาการข้างเคียงของเคมีบำบัดในผู้ป่วยมะเร็ง แต่อย่างไรก็ตามข้อจำกัดด้านปัจจัยความสามารถการละลายยังมีความสำคัญ

เอกสารอ้างอิง

Bejarano I, Redondo PC, Espino J *et al*. Melatonin induces mitochondrial-mediated apoptosis in human myeloid HL-60 cells. J Pineal Res 2009; 46(4): 392-400.

Blask DE, Dauchy RT, Saue LA. Putting cancer to sleep at night: the neuroendocrine/circadian melatonin signal. Endocrine 2005; 27: 179–88.

Bruin EC, Medema JP. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. Cancer Treat Rev 2008; 34(8): 737-749.

Brzezinski, A. Melatonin in humans. N Engl J Med 1997; 336:186-95.

Buyukavci M, Ozdemir O, Buck S *et al*. Melatonin cytotoxicity in human leukemia cells: relation with its pro-oxidant effect. Fundam Clin Pharmacol 2006; 20(1): 73-9.

Garcia-Navarro A, Gonzalez-Puga C, Escames G *et al*. Cellular mechanisms involved in the melatonin inhibition of HT-29 human colon cancer cell proliferation in culture. J Pineal Res 2007; 43(2): 195-205.

Hynes BJ, Huang W, Reiter RJ, Ahmad N. Melatonin resynchronizes dysregulated circadian rhythm circuitry in human prostate cancer cells. J Pineal Res 2010; 49: 60-8.

Kelley SK, Ashkenazi A. Targeting death receptors in cancer with Apo2L/TRAIL. Curr. Opinion in Pharmacol 2004; 4: 333–339.

Kuhlwein E, Irwin M. Melatonin modulation of lymphocyte proliferation and Th1/Th2 cytokine expression. J Neuroimmunol 2001; 117(1-2): 51-7.

Laothong U, Pinlaor P, Hiraku Y, et al. Protective effect of melatonin against *Opisthorchis viverini*- induced oxidative and nitrosative DNA damage and liver injury in hamsters. J Pineal Res 2010 (Doi: 10.1111/j.1600-079X.2010.00792.x)

Lissoni P, Barni S, Mandala M *et al*. Decreased toxicity and increased efficacy of cancer chemotherapy using the pineal hormone melatonin in metastatic solid tumour patients with poor clinical status. Eur J Cancer 1999; 35: 1688-92.

Lissoni P, Paolorossi F, Tancini G *et al*. Is there a role for melatonin in the treatment of neoplastic cachexia? Eur J Cancer 1996; 32A: 1340-3.

Lissoni P, Tancini G, Barni S *et al*. Treatment of cancer chemotherapy-induced toxicity with the pineal hormone melatonin. Support Care Cancer 1997; 5: 126-9.

Lissoni P. Is there a role for melatonin in supportive care? Support Care Cancer 2002; 10: 110-6.

Mahalingam D, Szegezdi E, Keane M, de Jong S, Samali A. TRAIL receptor signaling and modulation: Are we on the right TRAIL? Cancer Treat Rev 2009; 35(3): 280-288.

Mills E, Wu P, Seely D, Guyatt G. Melatonin in the treatment of cancer: a systematic review of randomized controlled trials and meta-analysis. J Pineal Res 2005; 39: 360-6.

National Cancer Institute, Department of Medical Services, Ministry of Public Health, Thailand. Hospital-Based Cancer Registry 2011. ISBN 978-974-422-659-4.

Özören N, Deiry WSE. Cell surface death receptor signaling in normal and cancer cells. Semin Cancer Biol 2003; 13(2): 135–147.

Park HJ, Kim HJ, Ra J, et al. Melatonin inhibits lipopolysaccharide-induced CC chemokine subfamily gene expression in human peripheral blood mononuclear cells in a microarray analysis. J Pineal Res 2007; 43: 121–9.

Reiter R, Tang L, Garcia JJ, Munoz-Hoyos A. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. Life Sci 1997; 60: 2255-71.

Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D, Tan DX, Burkhardt S. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. Ann N Y Acad Sci 2001; 939: 200-15.

Reiter RJ, Tan DX, Acuna-Castroviejo D, et al: Melatonin: Mechanisms and actions as an antioxidant. Curr Topics Biophys 2000; 24: 171-83.

Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J. and Czarnocki Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implication in human. Acta Biochemical Polonica 2003; 50: 1129-46.

Reiter RJ, Tan DX, Terron MP, Flores LJ. and Czarnocki Z. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. Acta Biochemical Polonica 2007; 54: 1-9.

Reiter RJ. Functional aspects of the pineal hormone melatonin in combating cell and tissue damage induced by free radicals. Eur J Endocrinol 1996; 134: 412-20.

Semak I, Korik E, Antonova M, Wortsman J, Slominski A. Metabolism of melatonin by cytochrome P450s in rat liver mitochondria and microsomes. J Pineal Res 2008; 45: 515–23.

Sun SY, Hail N, Lotan R. Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention. J. Natl. Cancer Inst 2004; 96(9): 662-672.

Suzen S. Antioxidant activities of synthetic indole derivatives and possible activity mechanisms. Top Heterocycl Chem 2007; 11: 145-78.

Vijayalaxmi CRT, Reiter R.J. and Herman TS. Melatonin: From Basic Research to Cancer Treatment Clinics. J. Clin. Oncol 2002; 20: 2575-601.

Walhauser F. Bioavailability of oral melatojin in humans. Neuroendocrinology 1984; 39: 307.

Witt-Enderby PA, Radio NM, Doctor JS, Davis VL. Therapeutic treatments potentially mediated by melatonin receptors: potential clinical uses in the prevention of osteoporosis, cancer and as an adjuvant therapy. J Pineal Res 2006; 41: 297–305.

ภาคผนวก

ก. ประวัตินักวิจัย

นางนุจรี ประทีปะวณิช จอห์นส (Nutjaree Pratheepawanit Johns) หัวหน้าโครงการวิจัย

รองศาตราจารย์ระดับ 9

หน่วยงาน : สาขาเภสัชกรรมคลินิก คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40002

โทรศัพท์: 0-4320-2378 โทรสาร: 0-4320-2305 e-mail: pnutja@kku.ac.th

สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ

- Quality of life assessment
- Melatonin activity, specifically in cancer

นายสหพัฒน์ บรัศว์รักษ์ (Mr. Sahapat Barusrux) ผู้ร่วมวิจัย

รองศาตราจารย์ระดับ 9

หน่วยงาน : กลุ่มวิชา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40002

โทรศัพท์: 0-4320-2089 โทรสาร: 0-4320-2089 e-mail: sahapat@kku.ac.th

สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ

- Human Immunology and Human genetic
- Human virology
- Biological activity screening such as intracellular oxidation, Anticancer activity

น.ส. นาถธิดา วีระปรียากูร (Ms. Natthida Weerapreeyakul) ผู้ร่วมวิจัย

รองศาตราจารย์ระดับ 9

หน่วยงาน : สาขาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40002

โทรศัพท์: 0-4320-2305 โทรสาร: 0-4320-2305 e-mail: natthida@kku.ac.th หรือ nweera@hotmail.com

สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ

- Biological activity screening such as antioxidation and tyrosinase inhibition

- Anticancer activity (Bioreduction/Cytotoxicity/Apotosis induction/ Alkylating activity)
- Prodrug design and development

น.ส. เพลินทิพย์ ภูทองกิ่ง (Ms. Ploenthip Puthongking) ผู้ร่วมวิจัย

อาจารย์ระดับ 7

หน่วยงาน : สาขาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40002

โทรศัพท์: 0-4320-2305 โทรสาร: 0-4320-2305 e-mail: pploenthip@gmail.com

สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ

- Chemistry and natural chemistry

นางสาวปรียาภรณ์ พลายมี (Ms. Preeyaporn Plaimee) ผู้ร่วมวิจัย

นักศึกษาระดับปริญญาเอก หลักสูตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิจัยและพัฒนาเภสัชภัณฑ์

หน่วยงาน : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40002

โทรศัพท์: 0-4320-2378 โทรสาร: 0-4320-2379 e-mail: pplaimee@gmail.com

ข. การนำเสนอผลงานวิจัยระดับนานาชาติ

1. The First International Biomedical Sciences Conference "BMS Research Driving Collaborative ONE ASEAN". 8 – 10 February 2012, Khon Kaen, Thailand. (poster presentation)

2. The 4th International Conference on Nutrition and Physical Activity (NAPA) in Aging, Obesity and Cancer. 14 – 17 August 2013, Pattaya, Chonburi, Thailand. (poster presentation).

3. ร่างผลงานวิจัยเพื่อตีพิมพ์

SAFETY OF MELATONIN DERIVATIVES ON PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL

Panchad, P.[1,2], Plaimee, .P[1,2], Barusrux, S.[2,3*], Weerapreeyakul, N.[2], Puthongking, P.[2], Johns, N.P.[2]

[1] Graduate School, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University,
[2] Melatonin Research Group, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen,
[3] Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories (CMDL), Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand.
e-mail: sahapat@kku.ac.th

Abstract

Introduction: The anti-cancer effect of melatonin is involved in its antioxidant property, apoptosis induction, inhibition of angiogenesis and metastasis, etc. Previous studies reported that melatonin exert these effects via melatonin receptors. To improve these melatonin's properties, this study aims to synthesize melatonin derivatives and investigate the safety of compounds on human normal cells.

Method: The *N*-substitution melatonin analogs were synthesized with various acid chloride such as benzoyl chloride, naphtoyl chloride and acetic anhydride. Solubility testing was performed in culture media and dimethyl sulfoxide (DMSO). Moreover, safety testing was determined by using MTT assay on human peripheral blood mononuclear cell (PBMC).

Result: Three of melatonin derivatives were synthesized include acetyl melatonin, benzoyl melatonin and naphtoyl melatonin. Only acetyl melatonin can soluble at 1 mM in culture media with 1% DMSO. Therefore, acetyl melatonin was selected for the safety test. Acetyl melatonin at 1 µM – 1 mM non-significantly changed of PBMC viability (95% - 105% when compared to control, $p > 0.05$). Furthermore, these effect of acetyl melatonin on PBMC is non-significant different from melatonin ($p > 0.05$).

Conclusion: Only acetyl melatonin was tested for safety in this study because the solubility property of synthesized compound is major factor to concern. From this result showed that acetyl melatonin seems to be the most potential compound with safe to normal cells and should be further performed in cancer study.

Key words: melatonin, acetyl melatonin, safety testing, PBMC

The First International Biomedical Sciences Conference "BMS Research Driving Collaborative ONE ASEAN". 8 – 10 February 2012, Khon Kaen, Thailand. (poster presentation)

EFFECT OF MELATONIN DERIVATIVES ON HUMAN IMMUNE CELLS

Preeyaporn Plaimee[1,2], Sahapat Barusrux[2,3]*,
Natthida Weerapreeyakul[2], Ploenthip Puthongking[2], Nutjaree Pratheepawanit Johns[2]

[1] Graduate School, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand,
[2] Melatonin Research Group, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand,
[3] Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories (CMDL), Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand.
*correspondence author E-mail: sahapat@kku.ac.th

Immunomodulation effects of melatonin have been previously reported by activation or regulation of the cellular immune responses and functions. However, low bioavailability of melatonin and large differences in metabolism among individuals have given clinically uncontrollable pharmacological concentrations. Therefore, this study has synthesized melatonin derivatives aiming to investigate their effect on human immune cells for improving of melatonin's immunostimulation properties. Five *N*-substitution melatonin analogs were synthesized with various acid chlorides. Human peripheral blood mononuclear cell (PBMC) was used as a model for screening of cytotoxicity effect using MTT assay. Five melatonin derivatives were synthesized including melatonin acetate (ACT-MLT), N-methyl melatonin (N-MET-MLT), benzoyl melatonin (BENZ-MLT), naphthoyl melatonin (NAP-MLT) and 4-nitro benzoyl melatonin (4-NITRO-MLT). Almost all derivatives at 1 μM and 1 mM showed cytotoxicity less than 15% against PBMC except 1 μM NAP-MLT that showed the highest cytotoxicity (44%), while melatonin was found to have no cytotoxicity. It was found that 1 μM melatonin enhanced PBMC proliferation 1.13 times to the control group. Interestingly, similar proliferative effects were observed for 1 μM ACT-MLT and 1 mM NAP-MLT (1.05 and 1.06 times to control group, respectively). Among 5 synthesized melatonin derivatives, the acetate form showed most potential as it was nontoxic to the cells with enhancement effect on PBMC proliferation. Further immunomodulation study will be performed to support its clinical use.

The 4th International Conference on Nutrition and Physical Activity (NAPA) in Aging, Obesity and Cancer. 14 – 17 August 2013, Pattaya, Chonburi, Thailand. (poster presentation).

Melatonin derivatives inhibit human colon cancer cells growth via apoptosis induction

Preeyaporn Plaimee[1], Sahapat Barusrux[1,2]*, Natthida Weerapreeyakul[1,3], Ploenthip Puthongking[1], Nutjaree Pratheepawanit Johns[1]

[1] Melatonin Research Group, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand,

[2] Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories (CMDL), Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand.

[3] Center for Research and Development of Herbal Health Product (CRD-HHP), Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

*correspondence author: Sahapat Barusrux, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand, Fax/Tel 66 43 202089, E-mail: sahapat@kku.ac.th

Abstract

Anti-cancer activity of melatonin has been previously reported in many cancers. However, low bioavailability of melatonin and large differences in metabolism among individuals have given clinically uncontrollable pharmacological concentrations. Therefore, this study has synthesized melatonin derivatives aiming to investigate their effect for improving of anti-cancer property of melatonin in colon cancer cell line, the highest incidence in Thailand. Five *N*-substitution melatonin analogs were synthesized with various acid chlorides. Human colon cancer cell line, HCT-116 was used for screening of cytotoxicity effect using MTT assay and apoptosis induction by flow analysis. Five melatonin derivatives were synthesized including melatonin acetate (ACT-MLT), N-methyl melatonin (N-MET-MLT), benzoyl melatonin (BENZ-MLT), naphthoyl melatonin (NAP-MLT) and 4-nitro benzoyl melatonin (4-NITRO-MLT). All derivatives at 1 μM and 1 mM showed higher cytotoxicity (5.9 ± 2.8 − 40.3±0.8%) than melatonin (≤3.24±3.7%). NAP-MLT at 1 mM had the highest effect against colon cancer cells and followed by N-MET-MLT, 4-NITRO-MLT, BENZ-MLT and ACT-MLT respectively. The apoptosis was increased to 30.1% and 40.6% after treated with NAP-MLT and BENZ-MLT, respectively. While, melatonin (1 μM) increased apoptotic cells death only 5.9% as compared to untreated group. Melatonin derivatives exert an anti-cancer activity over melatonin parent form on HCT-116 colon cancer cells by their cytotoxic activity and apoptosis induction. The mechanism of anti-cancer action by melatonin derivatives requires further investigation before application in combination with standard treatment in cancer patients.