

รายงานฉบับสมบูรณ์

การศึกษาการนำส่งยาต้านมะเร็งของนาโนพาร์ทิเคิลชนิดมุ่งสู่เป้าหมายและฤทธิ์ยับยั้ง  
การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านม

A study of anti-cancer drug delivery and anti-metastatic effect of targeted nanoparticles in  
breast cancer cells

รหัสโครงการ  
SCH-NR2014-843

นางสาวชุตตา จิตตสุโก  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

รายงานฉบับสมบูรณ์

การศึกษาการนำส่งยาต้านมะเร็งของนาโนพาร์ทิเคิลชนิดมุ่งสู่เป้าหมายและฤทธิ์ยับยั้ง  
การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านม

A study of anti-cancer drug delivery and anti-metastatic effect of targeted nanoparticles in  
breast cancer cells

นางสาวชอุดา จิตตสุโก  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

วันเริ่มต้นโครงการ 1 ตุลาคม พ.ศ.2557  
วันสิ้นสุดโครงการ 30 กันยายน พ.ศ.2558

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก  
ศูนย์ประสานงานนักเรียนทุนรัฐบาลทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี  
กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี  
และสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

ปี พ.ศ. ที่ได้รับทุน 2557

### บทคัดย่อ

CXCR4 เป็นตัวรับคีโมไคน์ที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการทางชีววิทยาภายในเซลล์หลายประการได้แก่ chemotaxis, invasion และ adhesion ซึ่งกระบวนการเหล่านี้เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ใน การศึกษานี้ผู้วิจัยสังเคราะห์นาโนพาร์ทิเคิล LFC131-DOX-NPs เพื่อเป็นระบบนำส่งยามุ่งเป้าไปที่ CXCR4 วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือเพื่อประเมินผลการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมของ LFC131-NPs และการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ จากผลการศึกษาพบว่าเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด BT-549-Luc มีการ แสดงออกของ CXCR4 จำนวนมากเมื่อทดสอบด้วยวิธี immunofluorescence ที่ microscopy และ flow cytometry นาโนพาร์ทิเคิลชนิด LFC131-DOX-NPs จับกับเซลล์และเข้าสู่ภายในเซลล์ได้มากกว่าและเร็วกว่านา โนพาร์ทิเคิลที่ไม่ได้ควบคู่กับเปปไทด์ จากการศึกษาด้วย MTT assay พบว่า LFC131-DOX-NPs และ LFC131- NPs มีฤทธิ์ anti-proliferative effect หลังได้รับนาโนพาร์ทิเคิล 24, 72 และ 120 ชั่วโมงแบบ dose dependent และ LFC131-NPs ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์จากการเหนี่ยวนำด้วย SDF-1 $\alpha$  แบบ dose dependent ดังนั้น LFC131-NPs อาจสามารถพัฒนาไปเป็นสารต้านการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านมได้

### Abstract

CXCR4 possesses a critical role in several different intracellular events such as chemotaxis, invasion and adhesion, which are associated with metastasis of cancer cell. We have recently fabricated LFC131-DOX-NPs as CXCR4 targeted drug delivery system. The purpose of this study was to investigate the inhibitory effect of LFC131-NPs on breast cancer cell migration and proliferation. The expression of CXCR4 was detected by immunofluorescence microscopy and flow cytometry. The binding and internalization of LFC131-DOX-NPs were higher and more rapidly compared to the unconjugated NPs. MTT assays demonstrated anti-proliferative effect for both LFC131-DOX-NPs and LFC131-NPs in 24, 72 and 120 h incubation. LFC131-NPs blocked SDF-1 $\alpha$  induced migration of BT-549-Luc cells in a dose-dependent manner. Thus, LFC131-NPs might be an effective anti-metastatic agent for breast cancer.

**Keywords:** CXCR4, LFC131, PLGA, nanoparticle, migration

## สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทนำ	9
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	10
การทบทวนวรรณกรรม	10
การออกแบบการวิจัย	13
ขอบเขตการวิจัย	13
ระเบียบวิธีการวิจัย	14
วิธีการดำเนินการวิจัย	14
ผลการทดลอง	19
สรุปผล	35
ปัญหาและอุปสรรค	35
บรรณานุกรม	35

## สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของ FC131	12
รูปที่ 2 การแสดงออกของ CXCR4 บนผิวเซลล์	20
รูปที่ 3 แสดงการจับและนำ LFC131-DOX-NPs และ DOX-NPs เข้าสู่ภายในเซลล์	21
รูปที่ 4 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ fluorescence แสดงการจับและการนำเข้าของ DOX-NPs และ LFC131-DOX-NPs เข้าสู่ภายในเซลล์	22-23
รูปที่ 5 แสดง colocalization ของ DOX-NPs และ LFC131-DOX-NPs กับ LysoTracker Green	24-25
รูปที่ 6 แสดงการมีชีวิตรอดของเซลล์หลังจากการให้ DOX, LFC131-DOX-NPs หรือ DOX-NPs	27
รูปที่ 7 แสดงการมีชีวิตรอดของเซลล์ BT-549-Luc หลังจากการให้ LFC131, LFC131-NPs หรือ NPs	28
รูปที่ 8 แสดงการทดสอบการตรวจสอบการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยใช้ Annexin V-FITC	29-31
รูปที่ 9 แสดงผลของ LFC131, LFC131-NPs และ NPs ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์	32

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติของนาโนพาร์ทิเคิล	19
ตารางที่ 2 แสดงค่า IC50 ของ doxorubicin, LFC131-DOX-NPs และ DOX-NPs	26

**บทนำ**

มะเร็งเต้านมเป็นมะเร็งที่พบบ่อยที่สุดและเป็นสาเหตุการเสียชีวิตจากมะเร็งในผู้หญิง การเสียชีวิตจากมะเร็งเต้านมไม่ได้มาจากก้อนมะเร็งที่เต้านมแต่มาจากการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังอวัยวะอื่นที่สำคัญ การแพร่กระจายของมะเร็ง (metastasis) หมายถึงการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังอวัยวะต่าง ๆ ทั่วร่างกาย ได้แก่ กระดูก ตับ ต่อม้ำเหลือง ปอด และสมอง ประมาณร้อยละ 20-30% ของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น

มะเร็งเต้านมในระยะแรก ๆ มีอุบัติการณ์แพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง[1] การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านมเป็นกระบวนการที่ประกอบด้วยหลายขั้นตอน เริ่มจากเซลล์มะเร็งรุกรานผ่าน extracellular matrix (ECM) ผ่านผนังหลอดเลือดเข้าไปสู่ระบบไหลเวียนโลหิตและระบบน้ำเหลือง จากนั้นออกจากระบบไหลเวียนไปฝังตัวที่หลอดเลือดแคปิลารีที่อวัยวะอื่น ๆ และแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่อรอบ ๆ การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านมอาจเกิดขึ้นหลังจากการผ่าตัดก้อนมะเร็งออกไปแล้วได้ในระยะเวลาหลายปี การป้องกันและรักษาการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านมโดยวิธีดั้งเดิมยังไม่ประสบความสำเร็จ ดังนั้นการพัฒนาหรือระบบนำส่งยาใหม่ที่สามารถป้องกันการแพร่กระจายของเซลล์ได้จึงเป็นสิ่งที่ต้องการอย่างเร่งด่วน

CXCR4 เป็นตัวรับคีโมไคน์ชนิดหนึ่งที่มีบทบาทหลายประการในการสื่อสารภายในเซลล์และระหว่างเซลล์ ได้แก่ chemotaxis, invasion และ adhesion ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในร่างกาย Muller และคณะรายงานว่า CXCR4 แสดงออกบนผิวของเซลล์มะเร็งเต้านมหลายชนิด นอกจากนี้ยังพบที่ก้อนมะเร็งเต้านม (malignant breast tumor) และเซลล์มะเร็งที่แพร่กระจายออกไปอีกด้วย คีโมไคน์ที่จับกับ CXCR4 คือ SDF-1 $\alpha$  หลังออกมาจากต่อมน้ำเหลือง ไชกระดูก ปิต และตับ ซึ่งเป็นอวัยวะที่มักพบการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง[2] ในเซลล์มะเร็งเต้านม เมื่อ SDF-1 $\alpha$  มาจับกับ CXCR4 แล้วจะกระตุ้นการเกิด actin polymerization ตามมาด้วยการเกิด chemotaxis และการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านม การป้องกันอันตรกิริยาระหว่าง SDF-1 $\alpha$  และ CXCR4 ลดการเกิดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านมไปสู่ต่อมน้ำเหลืองและปอดในหนูอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าอันตรกิริยาระหว่าง SDF-1 $\alpha$  กับ CXCR4 มีบทบาทสำคัญต่อการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านม ดังนั้น CXCR4 จึงเป็นเป้าหมายสำคัญในการป้องกันการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านม

Tamamura และคณะ รายงานว่าเปปไทด์ FC131 [(cyclo)(D-Tyr-Arg-Arg-L-3-(2-naphthyl)alanine-Gly)] มีฤทธิ์เป็น CXCR4 antagonist ที่มีความแรงสูง โดยพัฒนามาจาก pharmacophore ของเปปไทด์ T140 ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่ยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ของเชื้อไวรัส HIV ต้านเซลล์มะเร็ง และโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์[3] จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ การปรับโครงสร้างลิแกนด์ และการทำ computational modeling พบว่า D-Tyr1, Arg3 และ Nal4 ใน FC131 เป็นโครงสร้างที่จำเป็นของลิแกนด์ต่อการจับกับ CXCR4[4] มีรายงานว่ามีการสังเคราะห์สารที่มีฤทธิ์ antagonist ต่อ CXCR4 ในรูปที่เป็นเปปไทด์ชนิดสายตรง โดยมี Arg1-Arg2-Nal3 อยู่ในโครงสร้าง พบว่าเปปไทด์ชนิดนี้มีความชอบจับกับ CXCR4 อย่างมีนัยสำคัญและมีฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยสังเคราะห์เปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 4 ตัวและมีโครงสร้างสายตรง Tyr1-Arg2-Arg3-Nal4-Gly5 ชื่อ LFC131 เลียนแบบมาจากเปปไทด์ที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวนชื่อ FC131 เปปไทด์นี้ถูกนำมาใช้เป็นลิแกนด์ในการนำส่งนาโนพาร์ทิเคิลที่เตรียมจาก PLGA และกักเก็บยาต้านมะเร็งไว้ภายใน ไปสู่เซลล์ที่มีการแสดงออกของ CXCR4 หมู่คาร์บอกซิลของนาโนพาร์ทิเคิลชนิด PLGA สามารถควบคู่ (conjugate) กับหมู่เอมีนของเปปไทด์ LFC131 ได้

การเกิด oligomerization ของตัวรับคีโมไคน์มีความสำคัญมากต่อการส่งสัญญาณภายในเซลล์ Vila Coro และคณะรายงานว่า CXCR4 เกิด dimerization เมื่อจับกับ SDF-1 $\alpha$  และการเกิด dimerization นี้จำเป็นต่อการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของเซลล์[5] การป้องกันอันตรกิริยาระหว่าง CXCR4 กับ SDF-1 $\alpha$  อาจป้องกันการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้จากการจับของลิแกนด์ในรูป multivalent โดยลิแกนด์ในรูปแบบ multivalent ประกอบด้วยลิแกนด์จำนวนมากที่ควบคู่กับโครงสร้างหลัก สามารถจับกับตัวรับในรูป oligomeric

ได้ครั้งละหลาย ๆ โมเลกุลในคราวเดียว ในการศึกษาที่เปปไทด์ LFC131 ถูกนำมาควบคุมกับนาโนพาร์ทิเคิลที่ทำจาก PLGA ที่กักเก็บยา doxorubicin ไว้ภายใน สมมติฐานงานวิจัยคือ LFC131 จะสามารถนำนาโนพาร์ทิเคิลไปยังตัวรับ CXCR4 บนผิวเซลล์มะเร็งได้และยับยั้งอันตรกิริยาระหว่าง CXCR4 กับ SDF-1 $\alpha$  และเปลี่ยนแปลงผลทางชีววิทยาในเซลล์มะเร็งเต้านม

### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาระบบนำส่งยาที่สามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งและฆ่าเซลล์มะเร็งในคราวเดียวกัน
2. เพื่อศึกษาการนำส่งยาด้านมะเร็งของนาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่ภายในเซลล์มะเร็งเต้านม
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านมของนาโนพาร์ทิเคิล
4. เพื่อศึกษาฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งของนาโนพาร์ทิเคิล

### การทบทวนวรรณกรรม

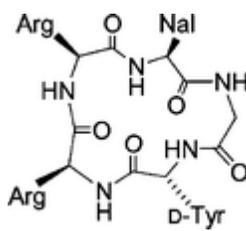
1. อันตรกิริยาของตัวรับ CXCR4 กับลิแกนด์ CXCL12 มีบทบาทสำคัญต่อการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านม  
การจับของลิแกนด์ของ CXCR4 ต่อตัวรับ CXCR4 นำไปสู่การนำส่งสัญญาณ (signaling cascade) ต่อโปรตีนอื่น ๆ ที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง [6-9] การแสดงออกของตัวรับซีโมไคน์ เช่น CXCR4 มีความสัมพันธ์กับสมบัติการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านม Muller และคณะแสดงให้เห็นว่าระดับของ CXCR4 ในมะเร็งเต้านมระยะแพร่กระจายสูงกว่าในเซลล์ปกติ [10] ข้อสรุปนี้ชี้ให้เห็นว่าจำนวนของ CXCR4 บนผิวเซลล์มะเร็งสัมพันธ์กับการเสียชีวิตของผู้ป่วยที่เกิดจากการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ผลการศึกษาใน *in vivo* ชี้ให้เห็นว่าเมื่อยับยั้งอันตรกิริยาระหว่าง CXCR4 กับลิแกนด์ CXCL12 การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งลดลงอย่างมีนัยสำคัญ [10] นอกจากนี้ Kato และคณะพบว่าการแสดงออกของ CXCR4 ในมะเร็งเต้านมที่ได้รับการผ่าตัดเต้านมออกไปแล้วสัมพันธ์กับระดับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลือง [11] อีกการศึกษาหนึ่งพบว่าเซลล์มะเร็งเต้านมที่แพร่กระจายไปยังปอดมีระดับของ CXCR4 สูงมากเมื่อเทียบกับเซลล์มะเร็งที่ไม่ได้แพร่กระจาย แสดงให้เห็นถึงบทบาทที่สำคัญของ CXCR4 ในการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านม [12] ผลการศึกษาเหล่านี้ยืนยันโดยการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่ายีนที่ควบคุมการแสดงออกของ CXCR4 มีการ upregulate ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่แพร่กระจายไปยังกระดูก [13] นอกจากนี้ในการศึกษาอีกการศึกษาหนึ่งพบว่าการ knockdown การแสดงออกของยีน CXCR4 ในเซลล์มะเร็งเต้านมสามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านมใน *in vitro* ได้อย่างมีนัยสำคัญ [14]

### 2. สารประกอบที่มีโครงสร้างเลียนแบบลิแกนด์ของ CXCR4 แสดงฤทธิ์ antagonist ต่อ CXCR4

เนื่องจาก CXCR4 มีบทบาทสำคัญต่อการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง รวมถึงการเข้าสู่เนื้อเยื่อของไวรัส HIV จึงมีการศึกษาสารประกอบที่สามารถจับกับ CXCR4 และป้องกันการจับของลิแกนด์ตามธรรมชาติ ในปี ค.ศ.1998 Tamamura และคณะรายงานการสังเคราะห์ antagonist ต่อ CXCR4 อย่างเฉพาะเจาะจงชื่อว่า T140 ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 14 ตัว และแสดงฤทธิ์ต้านการติดเชื้อของไวรัส HIV โดยการเลียนแบบโครงสร้างของ CXCL12 [15-17] จากการศึกษาดังกล่าวได้มีการปรับปรุงโครงสร้างของสารประกอบ T140 โดย

การแทนที่กรดอะมิโนที่มีความเป็นต่างด้วยกรดอะมิโนที่ไม่เป็นต่างเพื่อลดประจุบวกในโมเลกุล ได้สารประกอบใหม่ที่มีสมบัติเหมือนเดิมแต่มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยลงและมีเสถียรภาพในซีรัมมากขึ้น เปปไทด์นี้ชื่อว่า TN14003 Liang และคณะ ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านมในสัตว์ทดลอง พบว่า TN14003 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านมโดยยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์และนอกจากนั้นยังสามารถใช้เป็นเครื่องมือวินิจฉัยว่าตัวอย่างเซลล์มะเร็งในทางคลินิกมีปริมาณ CXCR4 มากพอที่อาจอยู่ในระยะแพร่กระจายหรือไม่ [18]

ในปีค.ศ. 2005 Tamamura และคณะรายงานว่ากรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อการจับของเปปไทด์ T140 ต่อ CXCR4 ได้แก่ Arg2, Nal3, Tyr5, and Arg14 จึงได้ลดจำนวนกรดอะมิโนที่ไม่จำเป็นต่อการจับกับ CXCR4 ลง และสังเคราะห์เปปไทด์ใหม่ที่เป็น cyclic peptide ขึ้นชื่อว่า FC131 ดังรูปที่ 1 โดยมีฤทธิ์ antagonistic ต่อ CXCR4 และฤทธิ์ต้านเชื้อของไวรัส HIV ที่เทียบเท่ากับ T140



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของ FC131

### 3. การส่งสัญญาณผ่าน CXCL12–CXCR4

การจับของ CXCL12 กับ CXCR4 กระตุ้นให้เกิดการนำส่งสัญญาณในทางชีวเคมีหรือที่เรียกว่า signaling pathway ได้หลายทาง Vila-Coro และคณะรายงานว่าเมื่อ CXCL12 จับกับ CXCR4 แล้วจะกระตุ้นให้เกิด dimerization ของตัวรับ [19] นอกจากนี้ยังมีหลักฐานที่แสดงว่าการจับกลุ่มรวมตัวกันของตัวรับเพื่อให้การนำส่งสัญญาณมีประสิทธิภาพที่สุดนั้น CXCR4 ต้องเข้าไปอยู่ใน lipid raft ของเซลล์เมมเบรน [20-21] เมื่อ CXCR4 ถูก activate แล้วจะเข้าไปรวมตัวกับโปรตีนชื่อ  $G\alpha_i$  และเข้าไปเติมหมู่ฟอสเฟตที่ c-terminus ของ tyrosine จากนั้นสารประกอบเชิงซ้อน CXCR4-CXCL12 จะถูกนำพาเข้าไปในเซลล์ (internalization) จากผิวเซลล์ด้วยกลไกที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ G-protein-coupled receptor kinases ตามด้วยการจับกับ  $\beta$ -arrestin [22-24] การนำพาตัวรับเข้าสู่เซลล์นอกจากจะทำให้การส่งสัญญาณ (signaling) หยุดลงแล้วการเกิด endocytosis ของ CXCR4 ยังจำเป็นต่อการกระตุ้นการส่งสัญญาณอื่น ๆ เช่นการเกิด chemotaxis ตัวรับ CXCR4 ที่ internalize เข้าไปภายในเซลล์แล้วอาจกลับมาแสดงที่ผิวเซลล์ได้อีกครั้ง Wysoczynski และคณะพบว่า heparin สามารถยับยั้งการ internalization ของ CXCR4 ได้ [25]

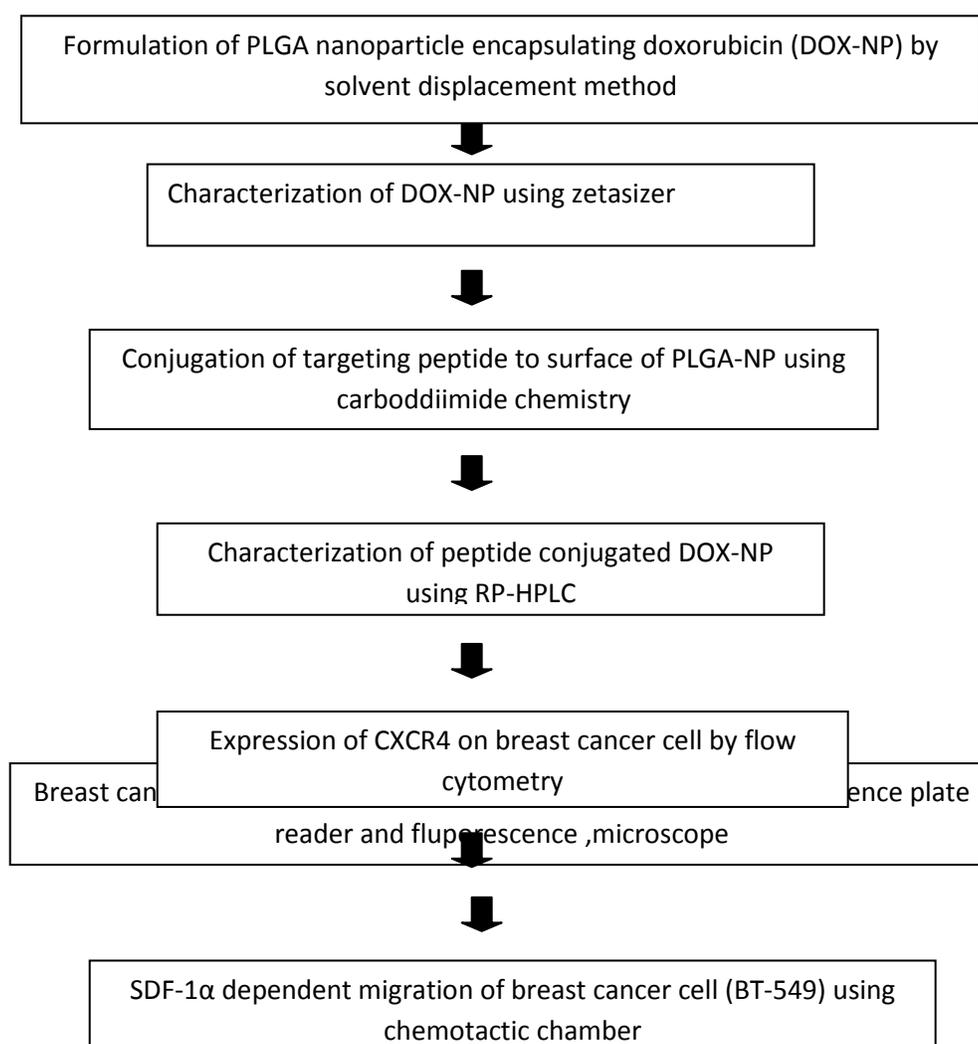
4. ผลของ CXCR4–CXCL12 signaling ต่อการเจริญเติบโตและการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง

คีโมไคน์หลายชนิดมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ทั้งในทางที่เพิ่มหรือลด มีรายงานว่า CXCL12 กระตุ้นการเจริญเติบโตและการมีชีวิตรอดของเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์เม็ดเลือด นอกจากนี้ยังพบว่า CXCL12 กระตุ้นการเจริญเติบโตและการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งบางชนิด [26-27] เซลล์มะเร็งบางชนิดเช่นมะเร็งต่อมลูกหมากหลัง CXCL12 และอันตรกิริยาระหว่าง CXCL12 กับ CXCR4 ควบคุมการเจริญเติบโตและการมีชีวิตรอดของเซลล์ [24] CXCL12 สำคัญต่อการชีวิตรอดของ glioma และ glioblastoma cell อย่างไรก็ตามเซลล์มะเร็งส่วนมากไม่ตอบสนองด้านการเจริญเติบโตหรือการชีวิตรอดต่อการกระตุ้นด้วย CXCL12

### การออกแบบการวิจัย

ในการทดสอบประสิทธิภาพของ LFC131-NPs ในเซลล์จะมีการแสดงผลของกลุ่มควบคุม มีการทำซ้ำ และนำค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานมาทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมทางสถิติโดยใช้โปรแกรม Graphpad Prism เพื่อสรุปและอภิปรายผลการศึกษา

### ขอบเขตการวิจัย



## ระเบียบวิธีวิจัย

### **กรอบแนวคิด ทฤษฎี ที่เกี่ยวข้องและนำมาใช้สนับสนุนการวิจัย (Theory)**

นาโนพาร์ทิเคิลมีข้อดีเหนือระบบนำส่งยาระดับนาโนเมตรชนิดอื่นได้แก่ สามารถเก็บกักตัวยาคได้ในจำนวนมากและป้องกันตัวยาคไม่ให้เสื่อมสลายก่อนที่จะถูกปลดปล่อยในอวัยวะเป้าหมายและป้องกันการเกิดพิษเมื่อเทียบกับการใช้ยาต้านมะเร็งโดยฉีดเข้าสู่ร่างกายโดยตรง สามารถควบคุมอัตราเร็วในการปลดปล่อยตัวยาคออกจากระบบนำส่งได้โดยการกำหนดชนิดของพอลิเมอร์ที่ใช้ในการเตรียมนาโนพาร์ทิเคิล นอกจากนี้นาโนพาร์ทิเคิลยังเหมาะสมในการใช้ควบคู่กับลิแกนด์บนผิวเนื่องจากมีหมู่ฟังก์ชันที่หลากหลายทำให้สามารถเลือกปฏิกิริยาทางเคมีที่เหมาะสมกับหมู่ฟังก์ชันของลิแกนด์ได้ นาโนพาร์ทิเคิลที่มีขนาดต่ำกว่า 500 นาโนเมตรสามารถเข้าสู่ภายในเซลล์ได้เมื่อจับกับตัวรับบนผิวเซลล์โดยกระบวนการ endocytosis เมื่อนาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่ภายในเซลล์จะปลดปล่อยตัวยาคที่กักเก็บอยู่ภายในโดย 2 กลไกหลักได้แก่ การปลดปล่อยตัวยาคออกมาจากผิวหน้าของนาโนพาร์ทิเคิลด้วยการแพร่ (diffusion) และการปลดปล่อยตัวยาคออกมาจากภายในแกนกลางของนาโนพาร์ทิเคิลเมื่อเกิดการสลายตัวของพอลิเมอร์ที่ใช้ในการสังเคราะห์นาโนพาร์ทิเคิล เมื่อลิแกนด์ที่ conjugate อยู่บนผิวของนาโนพาร์ทิเคิลจับกับตัวรับบนผิวเซลล์จะทำให้ลิแกนด์ตามธรรมชาติของตัวรับไม่สามารถจับกับตัวรับบนผิวเซลล์ได้ จึงยับยั้งผลที่เกิดจาก signaling cascade อันเกิดจากอันตรกิริยาของลิแกนด์กับตัวรับได้

กรอบแนวคิดของงานวิจัยนี้คือเซลล์มะเร็งเต้านมไม่สามารถเคลื่อนที่ไป metastasis ที่อวัยวะอื่นได้เนื่องจากตัวรับ CXCR4 ถูกกีดขวางไม่ให้จับกับ CXCL12 ซึ่งเป็นลิแกนด์ที่ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งไปสู่อวัยวะอื่น ๆ นอกจากนั้นนาโนพาร์ทิเคิลที่เข้าสู่ภายในเซลล์มะเร็งเต้านมจะปลดปล่อยตัวยาคและฆ่าเซลล์มะเร็งให้ตายไปพร้อม ๆ กัน ทำให้ยับยั้งความรุนแรงของโรคได้

## วิธีดำเนินการวิจัย (Method)

### **1. การเตรียมนาโนพาร์ทิเคิลจากพอลิเมอร์ PLGA และกักเก็บยา doxorubicin (DOX-NPs)**

นำยา doxorubicin HCl ปริมาณ 4 mg มาละลายใน 0.1N NaOH ปริมาตร 500  $\mu$ L เพื่อเปลี่ยน doxorubicin HCl ให้อยู่ในรูป doxorubicin free base ผสมสารละลายยาที่ได้ในสารละลายพอลิเมอร์ PLGA ความเข้มข้น 15 mg/mL ใน acetone นำสารละลายปริมาตร 2.5 mL หยดลงในสารละลาย 0.1% sodium carboxymethyl cellulose (SCMC) ปริมาตร 15 mL ภายใต้การกวนที่ 545 รอบต่อนาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บนาโนพาร์ทิเคิลที่ได้ด้วยอัตราเร็ว 15,308 g เป็นเวลา 10 นาทีและเพื่อกำจัด doxorubicin ส่วนที่ไม่ได้กักเก็บในนาโนพาร์ทิเคิลออกไป สำหรับนาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่ได้กักเก็บตัวยาค (NPs) เตรียมโดยวิธีเดียวกันแต่ไม่มีการผสมสารละลายยาในสารละลายพอลิเมอร์

### **2. การควบคุมเปปไทด์ LFC131 บนผิวของ NPs และ DOX-NPs**

DOX-NPs ที่เตรียมได้จะมี SCMC เคลือบที่ผิวหน้า ทำการควบคู่เปปไทด์ LFC131 กับ SCMC บนผิวของนาโนพาร์ทิเคิลโดยกระจาย DOX-NPs ใน MES pH 6.5 และบ่มกับ 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride (EDC) ความเข้มข้น 100 mM และ *N*-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS) ความเข้มข้น 50 mM เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่อกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลของ SCMC บนนาโนพาร์ทิเคิล จากนั้นปั่นเหวี่ยงนาโนพาร์ทิเคิลที่ 15,308 g เพื่อกำจัด EDC/sulfo-NHS ส่วนเกินออกจากนั้นกระจายนาโนพาร์ทิเคิลกลับในน้ำปราศจากไอออน และ PBS pH 7.4 เติมน้ำเปปไทด์ LFC131 ปริมาณ 200  $\mu\text{g}$  ลงไปในนาโนพาร์ทิเคิล ปล่อยให้หมู่คาร์บอกซิลของ SCMC บนผิวของนาโนพาร์ทิเคิลทำปฏิกิริยา carbodiimide กับหมู่เอมีนของเปปไทด์ LFC131 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปั่นเหวี่ยงนาโนพาร์ทิเคิลที่ควบคู่กับเปปไทด์แล้วที่ 15,308 g เป็นเวลา 10 นาที และล้างอีกสามครั้งด้วยน้ำปราศจากไอออน การควบคู่เปปไทด์กับนาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่ได้กักเก็บยาทำด้วยวิธีเดียวกัน

### 3. การเลี้ยงเซลล์

เลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านม (BT-549-Luc) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ผสม 10% fetal bovine serum และ penicillin ความเข้มข้น 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ streptomycin ความเข้มข้น 0.1 mg/mL ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5%CO<sub>2</sub>

### 4. การแสดงออกของ CXCR4 บนผิวเซลล์ BT-549-Luc

นำเซลล์ BT-549-Luc ความเข้มข้น  $8 \times 10^5$  cells/mL ออกจาก flask เลี้ยงเซลล์และ fix เซลล์ด้วย 4% para-formaldehyde ใน PBS ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที ล้างเซลล์ด้วย PBS และ block การดูดซับที่ไม่เฉพาะเจาะจงต่อสารอื่น ๆ ด้วยการบ่มเซลล์กับ 1% bovine serum albumin (BSA) เป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง บ่มเซลล์กับ PE human anti-CD184 (CXCR4) antibody ความเข้มข้น 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  หรือ PE anti-human IgG Fc antibody ที่ความเข้มข้น 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์สามรอบด้วย 1% BSA และกระจายเซลล์ใน PBS วิเคราะห์หาความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์โดยใช้ FACSCanto™ flow cytometer (BD Biosciences, USA)

การแสดงออกของ CXCR4 บนผิวเซลล์ BT-549-Luc ได้รับการยืนยันโดยการใช้เทคนิค immunofluorescence microscopy โดยการเลี้ยงเซลล์ BT-549-Luc ใน 8-well-cell culture chamber slide ล้างเซลล์ด้วย PBS และ fix ด้วย 4% para-formaldehyde ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที บ่มเซลล์กับสารละลาย 1% BSA เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ตามด้วย human anti-CD184 (CXCR4) antibody (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) หรือ PE anti-human IgG Fc antibody (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ 3 ครั้งด้วยสารละลาย 1% BSA ถ่ายภาพเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ยี่ห้อ Nikon Eclipse TS100-F และประมวลผลด้วยโปรแกรม NIS-Elements, version 4.0 software.

### 5. การจับและการนำนาโนพาร์ทิเคิล LFC131-DOX-NPs และ DOX-NPs เข้าไปในเซลล์ BT-549-Luc

การจับและการนำนาโนพาร์ทิเคิลเข้าไปในเซลล์ ศึกษาโดยใช้ UV-Vis spectroscopy เพาะเลี้ยงเซลล์ใน 96-well plate ความเข้มข้น 80,000 cells/mL กระทั่งเซลล์เติบโตจนครบ 100 confluent ใช้เวลา 48 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกและล้างเซลล์ด้วย PBS 1 ครั้ง จากนั้นบ่มเซลล์กับ LFC131-DOX-NPs หรือ DOX-NPs ที่กระจายในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ไม่มีซีรัม ความเข้มข้น 2 mg/mL ปริมาตร 100  $\mu\text{L}$  และบ่มเป็นเวลา 5, 15, 30, 60 และ 120 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาล้างนาโนพาร์ทิเคิลออกจากด้วย PBS จำนวน

3 ครั้งและละลายเซลล์ด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) วัดการดูดกลืนแสงของ doxorubicin ที่ความยาวคลื่น 482 นาโนเมตร ซึ่งบ่งบอกการจับหรือการนำนาโนพาร์ทิเคิลเข้าไปในเซลล์ด้วยเครื่อง UV-Vis spectroscopy microplate reader (Biochrom Anthos Zenyth 200 Microplate Reader, UK)

นอกจากนี้นำเทคนิค fluorescence microscopy มาใช้เพื่อเป็นการยืนยันผลการศึกษาการจับและการนำเข้าของ DOX-NPs และ LFC131-DOX-NPs สู่ภายในเซลล์ BT-549-Luc เซลล์ เพาะเลี้ยงเซลล์ BT-549-Luc ใน 8-well cell culture chamber slide จากนั้นบ่ม DOX-NPs หรือ LFC131-DOX-NPs กับเซลล์เป็นเวลา 5, 15, 30, 60 และ 120 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5%CO<sub>2</sub> เมื่อครบเวลาล้างนาโนพาร์ทิเคิลออกด้วย PBS และ fix เซลล์ด้วย 4% paraformaldehyde ย้อมนิวเคลียสของเซลล์ด้วย DAPI dihydrichloride ความเข้มข้น 2 µg/mL บ่มเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และล้างออก 3 ครั้งด้วย PBS จากนั้นถ่ายภาพเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ Nikon Eclipse TS100-F และประมวลผลด้วยโปรแกรม NIS-Elements, version 4.0 software

#### 6. การติดตาม LFC131-DOX-NPs ในเอนโดโซมหรือไลโซโซมของเซลล์

เพาะเลี้ยงเซลล์ BT-549-Luc ใน 8-well cell culture chamber slide นำอาหารเลี้ยงเซลล์ออกและล้างเซลล์ด้วย PBS เติม LFC131-DOX-NPs หรือ DOX-NPs ความเข้มข้น 2 mg/mL เป็นเวลา 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5%CO<sub>2</sub> ล้างเซลล์ 3 ครั้งด้วย PBS และบ่มเซลล์กับ LysoTracker Green DND26 (100 µM) เป็นเวลา 30 นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส fix เซลล์ด้วย 4% para-formaldehyde เป็นเวลา 10 นาที และถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ประมวลผลด้วยโปรแกรม NIS

#### 7. การประเมินอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์และการเพิ่มจำนวนของเซลล์

ความเป็นพิษของ LFC131-NPs และ NPs ถูกประเมินโดยวิธี MTT assay นำเซลล์ BT-549-Luc มาเพาะเลี้ยงใน 96-well plate ที่ความหนาแน่น 8,000 cells/well รอจนเซลล์ครบ 100 confluent เติม LFC131, LFC131-NPs และ NPs ในความเข้มข้นต่าง ๆ บ่มกับเซลล์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดย negative control คือเซลล์ที่ไม่ได้บ่มกับสารตัวอย่างใด ๆ หลังจากที่บ่มเซลล์กับนาโนพาร์ทิเคิลหรือเปปไทด์แล้ว ล้างนาโนพาร์ทิเคิลหรือเปปไทด์ออกแล้วบ่มต่อกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมเป็นเวลา 24, 72 และ 120 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้งและบ่มเซลล์กับสารละลาย MTT ความเข้มข้น 0.5 mg/mL เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์และ MTT ออก ละลาย formazan product ที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ด้วย DMSO วัดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ formazan ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และที่ 650 นาโนเมตรเพื่อ normalize การดูดกลืนแสงของผงฝุ่นหรือรอยขีดข่วนของ plate คำนวณร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยการหารค่าการดูดกลืนแสงของ formazan ในเซลล์ที่บ่มกับสารตัวอย่างหารด้วยค่าการดูดกลืนแสงของ formazan ในเซลล์ที่ไม่มีตัวอย่างใด ๆ (control) หากมี formazan มาก ค่าการดูดกลืนแสงจะมาก แสดงถึงการมีชีวิตรอดของเซลล์ที่มาก

$$\% \text{cell viability} = \frac{\text{Absorbance } 550 \text{ nm}_{\text{sample}} - \text{Absorbance } 650 \text{ nm}_{\text{sample}}}{\text{Absorbance } 550 \text{ nm}_{\text{control}} - \text{Absorbance } 650 \text{ nm}_{\text{control}}} \times 100$$

#### 8. การประเมิน apoptosis โดยใช้ Annexin V-FITC และ propidium iodide (PI)

ประเมินว่าการตายของเซลล์เกิดจาก apoptosis หรือไม่โดยใช้ชุดทดสอบ Annexin V-FITC และ propidium iodide (PI) บ่มเปปไทด์ LFC131 ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1 และ 0.2 mg/mL, LFC131-NPs และ NPs ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 4 mg/mL เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส 5%CO<sub>2</sub> จากนั้นล้างสารตัวอย่างออกและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์และบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 และ 72 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้ง และย้อมเซลล์ด้วย Annexin V-FITC และ propidium iodide ถ่ายภาพเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์และประมวลผลด้วยโปรแกรม NIS

### 9. การประเมินการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของโครมาตินด้วย Hoechst 33342

การย้อมนิวเคลียสด้วย Hoechst 33342 เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วโดยอาศัยหลักการของการตรวจวัดลักษณะของ chromatin ในเซลล์ที่ตายด้วย apoptosis สี Hoechst 33342 จะย้อมติด chromatin ของเซลล์ที่ตายด้วย apoptosis ได้สว่างกว่าเซลล์ที่ไม่ได้ตายด้วย apoptosis หรือเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ นอกจากนี้ยังสามารถเห็นโครมาตินของเซลล์ที่ตายเนื่องจาก apoptosis มีการหดตัว (compaction) และแตกออกเป็นชิ้น ๆ (fragmentation) ในการศึกษาการย้อมเซลล์ด้วย Hoechst 33342 มีจุดมุ่งหมายเพื่อยืนยันการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ที่บ่มกับสารตัวอย่าง กรทดลองเริ่มจากการบ่มเปปไทด์ LFC131 ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1 และ 0.2 mg/mL, LFC131-NPs และ NPs ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 4 mg/mL เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส 5%CO<sub>2</sub> ใน 96-well plate กับเซลล์ BT-549-Luc จากนั้นล้างสารตัวอย่างออกและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์และบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง fix เซลล์ด้วย 4% para-formaldehyde ล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้ง เติม Hoechst 33342 ความเข้มข้น 1 µg/mL ปริมาตร 100 µL บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์เพื่อกำจัด Hoechst 33342 ส่วนเกิน และนำเซลล์ไปถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ประมวลผลด้วยโปรแกรม NIS

### 10. Chemtaxis assay

Chemotaxis assay ทำโดยบ่มเซลล์ BT-549-Luc ที่ความเข้มข้น  $1 \times 10^5$  เซลล์/มิลลิลิตร กับ เปปไทด์ LFC131 ความเข้มข้น 0.05, 0.1 และ 0.5 mg/mL, LFC131-NPs และ NPs ความเข้มข้น 2 mg/mL หรืออาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO<sub>2</sub> ล้างเซลล์และกระจายเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม จากนั้นนำเซลล์ที่ผ่านการบ่มกับตัวอย่างและล้างมาแล้วมา 0.2 มิลลิลิตร ใส่ลงใน upper chamber ของ Transwell 24 well cell culture ซึ่งมีลักษณะเป็น chamber ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.5 มิลลิเมตร แผ่น membrane ทำจาก polycarbonate ขนาดรูพรุน 8.0 µm นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมผสมกับ SDF-1α ความเข้มข้น 300 ng/mL ใส่ลงใน lower chamber สำหรับ negative control เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมและไม่ใส่ SDF-1α ลงไปใน lower chamber จากนั้นบ่มเซลล์ใน chamber เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO<sub>2</sub> เมื่อครบเวลาเช็คผิวด้านบนของ upper chamber เพื่อนำเซลล์ที่ไม่ได้เคลื่อนที่ผ่านลงไปยังด้านล่างของ upper chamber ออก จากนั้น fix เซลล์ที่เกาะอยู่ด้านล่างของ upper chamber ด้วย 4% para-formaldehyde และย้อมสีเซลล์ด้วย 0.1% crystal violet จากนั้นถ่ายภาพเซลล์ที่กำลังขยาย x200 และ นับจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนที่ลงมายังด้านล่างของ upper chamber ด้วยโปรแกรม ImageJ คำนวณค่า migration index

$$\text{Migration index} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่เคลื่อนที่ผ่าน transwell chamber}}{\text{จำนวนเซลล์ในกลุ่ม negative control ที่เคลื่อนที่ผ่าน transwell chamber}}$$

## 11. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในแต่ละการทดลองมีการทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง และในแต่ละครั้งมีตัวอย่าง 3 ตัวอย่าง วิเคราะห์ค่าทางสถิติของข้อมูลที่ได้จากแต่ละการศึกษาโดยใช้ analysis of variance (one-way ANOVA) .ใช้ Newman-Kuels ในการทดสอบ post-hoc test เพื่อประเมินความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ในการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของสองกลุ่ม ใช้ *t*-test ทดสอบ ทำการทดสอบโดยใช้โปรแกรม Graphpad Prism 5.0 ยอมรับค่าความแตกต่างทางสถิติเมื่อ  $p < 0.05$

จากวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

ข้อ 1 เพื่อพัฒนาระบบนำส่งยาที่สามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งและฆ่าเซลล์มะเร็งในคราวเดียวกัน แสดงได้ดังผลการทดลองโดยรวมทั้งหมดได้แก่ คุณสมบัติเฉพาะของระบบนำส่งยาที่เหมาะสม มีค่าอยู่ในช่วง 100-1000 nm จากผลการทดลองตรวจพบว่าเปปไทด์สามารถควบคู่ (conjugate) อยู่บนนาโนพาร์ทิเคิลได้ นาโนพาร์ทิเคิลที่ควบคู่กับเปปไทด์ (targeted nanoparticles) จับกับเซลล์ที่มีการแสดงออกของตัวรับ CXCR4 ได้ดีกว่านาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่ได้ควบคู่กับเปปไทด์ (untargeted nanoparticles) นาโนพาร์ทิเคิลสามารถนำส่งยา มะเร็งไปยังเซลล์เป้าหมายได้ จากการศึกษาฤทธิ์ของนาโนพาร์ทิเคิลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง และนาโนพาร์ทิเคิลสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์จากการเหนี่ยวนำของ SDF-1 $\alpha$  ได้

ข้อ 2 เพื่อศึกษาการนำส่งยาด้านมะเร็งของนาโนพาร์ทิเคิลเข้าสู่ภายในเซลล์มะเร็งเต้านม แสดงได้ดังผลการทดลองการแสดงออกของตัวรับ CXCR4 บนผิวเซลล์มะเร็งเต้านม การจับและการนำเข้านาโนพาร์ทิเคิลเข้าไปสู่ภายในเซลล์มะเร็งเต้านม เปรียบเทียบกับนาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่ได้ควบคู่กับเปปไทด์

ข้อ 3 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านมของนาโนพาร์ทิเคิล แสดงได้ดังผลการทดลองของการทดสอบ chemotaxis assay ซึ่งเป็นการจำลองสภาวะการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งไปสู่อีกอวัยวะหนึ่งด้วยการเหนี่ยวนำของ SDF-1 $\alpha$

ข้อ 4 เพื่อศึกษาฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งของนาโนพาร์ทิเคิล แสดงได้จากผลการทดสอบ MTT assay และ apoptosis assay ซึ่งเป็นการหาอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ และกลไกในการตายของเซลล์หลังจากการบ่มกับนาโนพาร์ทิเคิลที่ควบคู่กับเปปไทด์ และเปรียบเทียบกับนาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่ได้ควบคู่กับเปปไทด์

### ผลการทดลอง

#### 1. คุณสมบัติของนาโนพาร์ทิเคิลที่กักเก็บตัวยาด้านมะเร็งและ conjugate กับเปปไทด์ที่จับกับ CXCR4

คุณสมบัติของนาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่ได้ควบคู่ (NPs) นาโนพาร์ทิเคิลที่ควบคู่กับเปปไทด์ (LFC131-NPs) นาโนพาร์ทิเคิลที่กักเก็บยา doxorubicin (DOX-NPs) และ นาโนพาร์ทิเคิลที่กักเก็บยา doxorubicin และควบคู่กับเปปไทด์ (LFC131-DOX-NPs) แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติของนาโนพาร์ทิเคิลชนิดต่าง ๆ

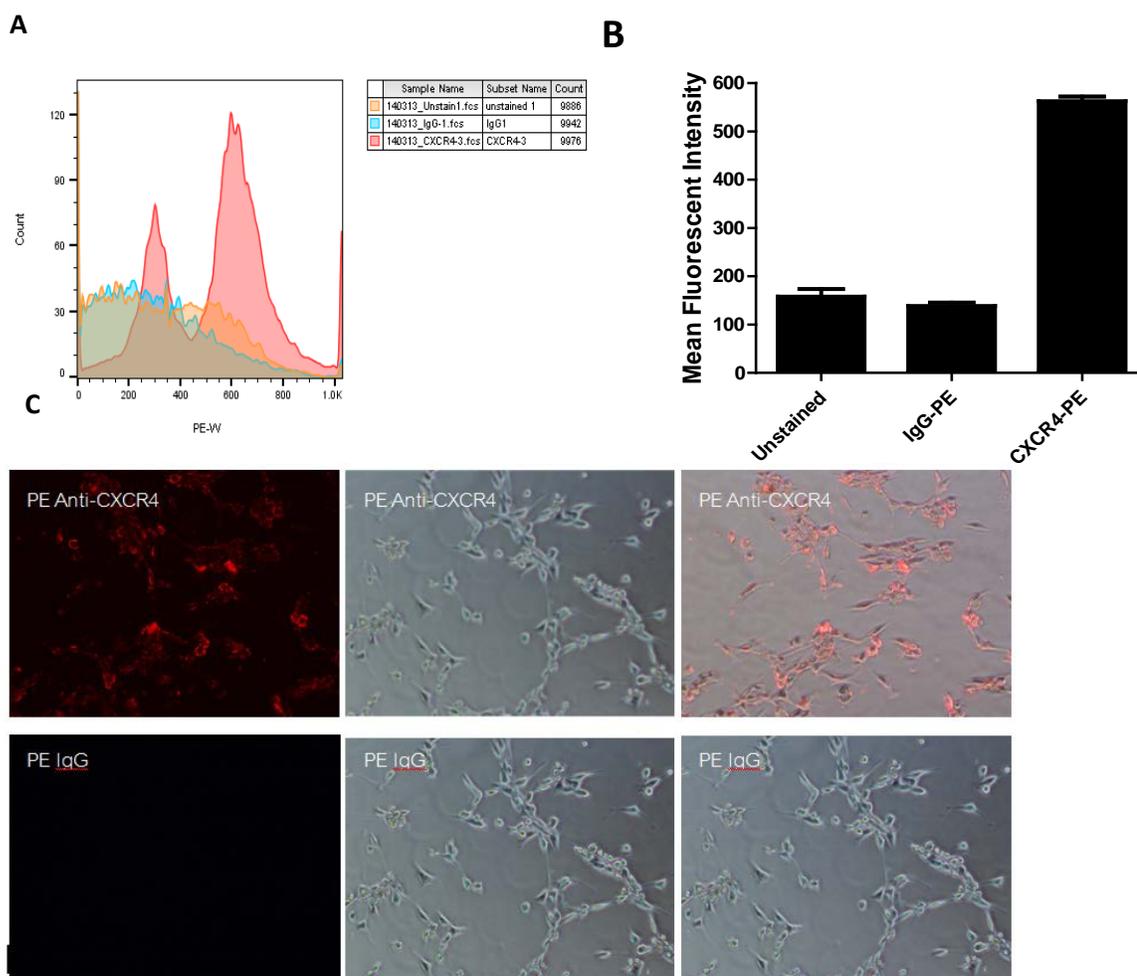
	Effective diameter (nm) [Mean $\pm$ SD]	Polydispersity [Mean $\pm$ SD]	Zeta potential value (mV) [Mean $\pm$ SD]
NPs	194.1 $\pm$ 4.7	0.241 $\pm$ 0.013	-76.3 $\pm$ 3.4

LFC131-NPs	305.8±11.4	0.416±0.038	-53.1±4.0
DOX-NPs	231.9±2.1	0.267±0.015	-39.9±1.2
LFC131-DOX-NPs	311.9±19.7	0.396±0.050	-44.5±2.456

ประสิทธิภาพในการกักเก็บยา doxorubicin ของ LFC131-DOX-NPs และ DOX-NPs คือ  $65.2 \pm 0.8\%$  และ  $75.9 \pm 0.4\%$  ตามลำดับ ประสิทธิภาพในการควบคุมไปโตด์บนผิวของ LFC131-DOX-NPs และ LFC131-NPs เท่ากับ  $74.6 \pm 2.9\%$  และ  $68.3 \pm 1.6\%$  ตามลำดับ

## 2. การแสดงออกของ CXCR4 บนเซลล์ BT-549-Luc

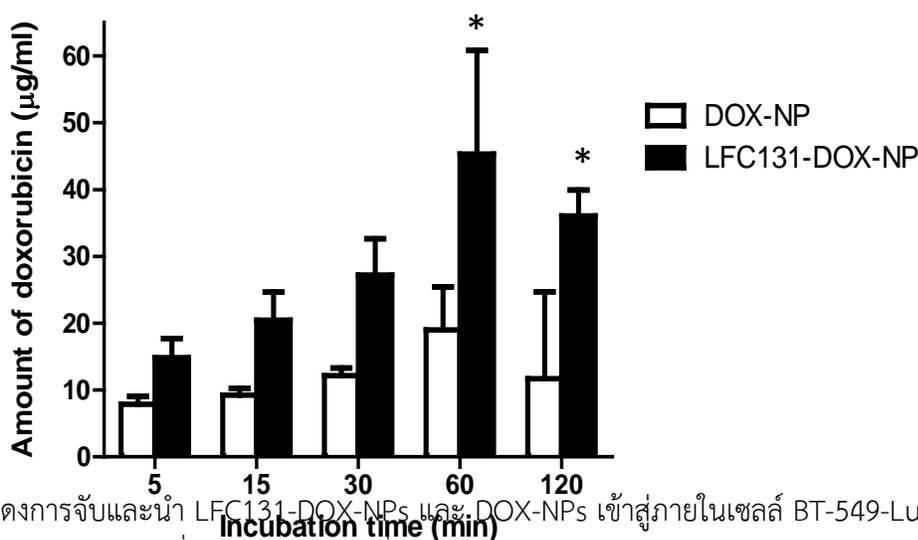
จากการประเมินการแสดงออกของ CXCR4 บนผิวเซลล์โดยเทคนิค flow cytometry พบว่าเซลล์ BT-549-Luc มีการแสดงออกของ CXCR4 ที่ผิวเซลล์มาก เห็นได้จากการจับของ anti-CXCR4 antibody บนผิวเซลล์ที่มากกว่าตัวควบคุมคือ IgG อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 2A และ 2B) และจากการถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ พบการว่า anti-CXCR4 antibody จับบนผิวเซลล์มากกว่า IgG เช่นกัน จึงเป็นการยืนยันว่า BT-549-Luc มี CXCR4 บนผิวเซลล์จำนวนมากเหมาะที่จะนำมาศึกษาระบบนำส่งยามุ่งเป้าไปที่ CXCR4 ต่อไป



รูปที่ 2 การแสดงออกของ CXCR4 บนผิวเซลล์ BT-549-Luc (A) ฮิสโตแกรมของการแสดงออกของ CXCR4 บนเซลล์ BT-549-Luc ประเมินโดยเทคนิค flow cytometry (B) ค่าเฉลี่ยการเรืองแสงของเซลล์ที่บ่มด้วย PE-anti-CXCR4 และ PE-IgG วิเคราะห์โดยเทคนิค flow cytometry (C) ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ของเซลล์ที่บ่มด้วย PE-anti-CXCR4 และ PE-IgG

## 2. การจับและนำ LFC131-DOX-NPs เข้าเซลล์ BT-549-Luc

ประสิทธิภาพในการจับและนำนาโนพาร์ทิเคิลที่กักเก็บด้วย doxorubicin เข้าสู่ภายในเซลล์ ทั้งชนิดมุ่งเป้า (LFC131-DOX-NPs) และไม่ได้มุ่งเป้า (DOX-NPs) แสดงในรูปที่ 3 จากผลการศึกษาพบว่า LFC131-DOX-NPs จับกับเซลล์ BT-549-Luc ได้มากกว่าและในอัตราที่เร็วกว่าในระยะเวลากการบ่มที่ 5, 15, 30, 60 และ 120 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ LFC131-DOX-NPs จับกับเซลล์มากขึ้นเรื่อย ๆ ตามระยะเวลาที่บ่ม จนกระทั่งถึง 1 ชั่วโมงอัตราการจับลดลงและมีแนวโน้มคงที่ที่ 2 ชั่วโมง ในทางตรงกันข้าม DOX-NPs จับกับเซลล์ในปริมาณที่ไม่แตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลา แสดงให้เห็นว่า LFC131-DOX-NPs จับกับเซลล์เร็วกว่าและในปริมาณที่มากกว่า



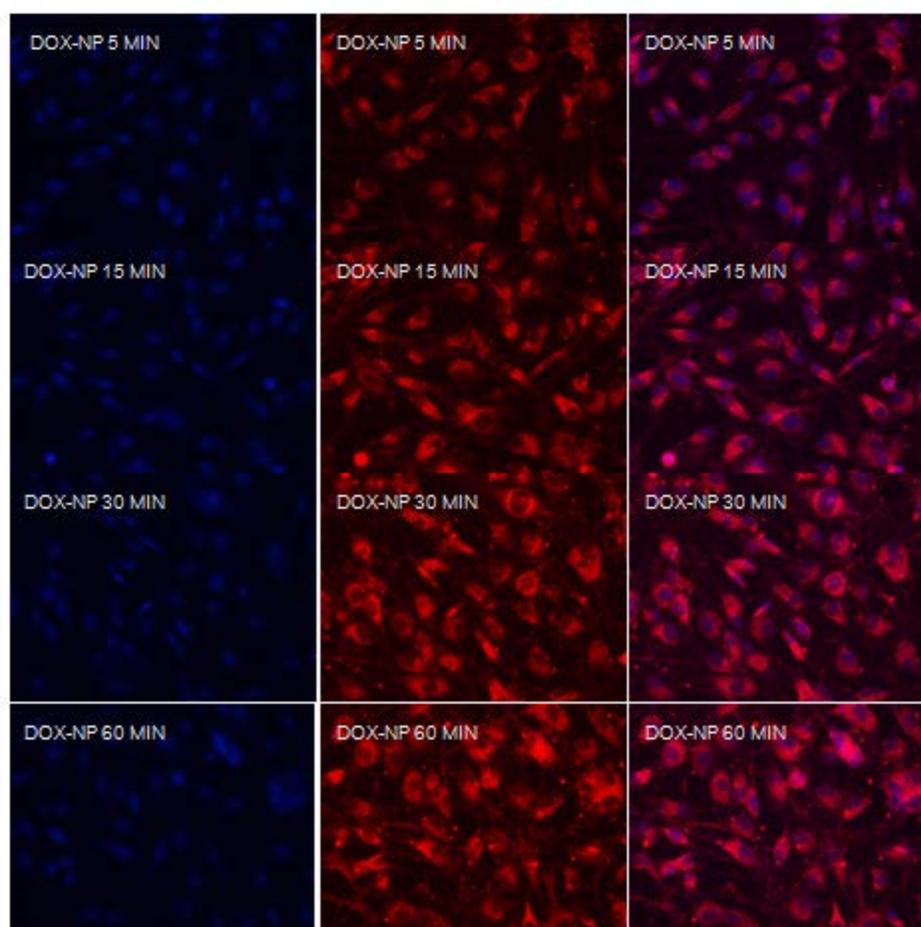
รูปที่ 3 แสดงการจับและนำ LFC131-DOX-NPs และ DOX-NPs เข้าสู่ภายในเซลล์ BT-549-Luc

\*แสดง  $p$  value < 0.01 เมื่อเปรียบเทียบกับที่ 5 นาที

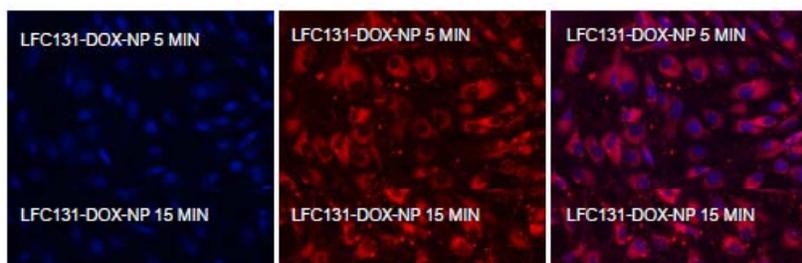
## 3. การจับและนำ LFC131-DOX-NPs เข้าเซลล์ BT-549-Luc ด้วยการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

จากภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ดังแสดงในรูปที่ 4 พบว่า LFC131-DOX-NPs จับกับเซลล์ BT-549-Luc ได้มากกว่า DOX-NPs ที่เวลา 5, 15, 30, 60 และ 120 นาที

A



B



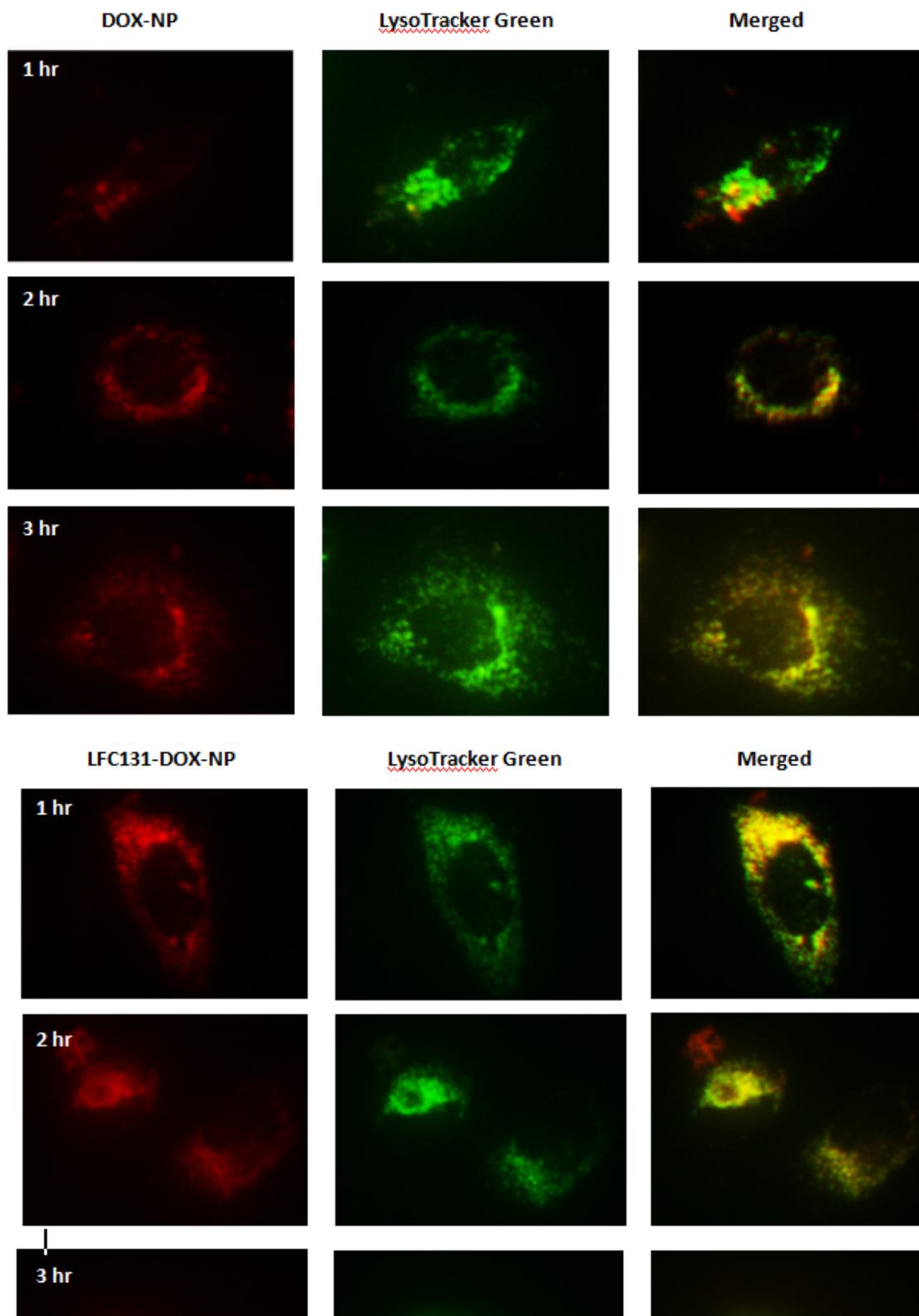
รูปที่ 4 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ fluorescence แสดงการจับและการนำเข้า (A) DOX-NPs และ (B) LFC131-DOX-NPs สู່ภายในเซลล์ BT-549-Luc

## 5. การติดตามนาโนพาร์ทิเคิลภายในเซลล์

จากเทคนิค colocalization ของ doxorubicin ที่ถูกกักเก็บอยู่ภายในนาโนพาร์ทิเคิลกับ LysoTracker Green ซึ่งใช้ย้อมสีเอนโดโซม หรือไลโซโซมซึ่งเป็นออร์แกเนลล์ที่มีความเป็นกรดพบว่า LFC131-DOX-NPs เข้าไปภายในเซลล์ในช่วงเวลาที่ 1, 2 และ 3 หลังการบ่มเซลล์กับนาโนพาร์ทิเคิล ภายหลังจากการบ่มเซลล์กับ LFC131-DOX-NPs เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบนาโนพาร์ทิเคิลภายในเอนโดโซม จากการซ้อนภาพถ่ายของนาโนพาร์ทิเคิลและเอนโดโซมเข้าด้วยกัน ในขณะที่ DOX-NPs กระจายทั่วไปในไซโตพลาสซึมหรืออาจเป็นที่ผิวเซลล์เนื่องจากพบ colocalization ในปริมาณเพียงเล็กน้อย ภายหลังจากบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า colocalization ของนาโน

พาร์ทิเคิลกับเอนโดโซมและไลโซโซมลดลง และนาโนพาร์ทิเคิลกระจายไปทั่วเซลล์มากขึ้น แสดงถึงการ escape ของนาโนพาร์ทิเคิลออกจากเอนโดโซมก่อนที่จะเข้าไปอยู่ในไลโซโซม ในทางตรงกันข้ามพบปริมาณ colocalization ของ DOX-NPs กับเอนโดโซมไลโซโซมมากขึ้นในช่วง 3 ชั่วโมงหลังการบ่ม (รูปที่ 5) การ escape ของ LFC131-DOX-NPs มีข้อดีคืออาจทำให้นาโนพาร์ทิเคิลและตัวยากทำละลายจากความเป็นกรดและเอนไซม์ในไลโซโซมน้อยลง

A



รูปที่ 5 แสดง clocalization ของ (A) DOX-NPs และ (B) LFC131-DOX-NPs กับ LysoTracker Green เมื่อบ่มนาโนพาร์ทิเคิลกับเซลล์ BT-549-Luc เป็นเวลา 1, 2 และ 3 ชั่วโมง

#### 6. ผลของ LFC131-DOX-NPs, DOX-NPs, LFC131-NPs และ NPs ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์และการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเต้านม

หลังจากที่บ่มนาโนพาร์ทิเคิลทั้งสี่ชนิดกับเซลล์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นบ่มเซลล์ต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์จนครบ 24 ชั่วโมงพบอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ดังแสดงในรูปที่ 6 จากกราฟแสดงว่า LFC131-DOX-NPs และ DOX-NPs ทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ คือ 22% และ 29% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเมื่อทดสอบด้วยนาโนพาร์ทิเคิลที่ความเข้มข้นสูงสุดคือ 2 mg/ml โดย LFC131-DOX-NPs มีปริมาณ doxorubicin ที่กักเก็บอยู่เท่ากับ 173.3  $\mu\text{g/ml}$  และ DOX-NPs มี doxorubicin ที่กักเก็บอยู่เท่ากับ 202.7  $\mu\text{g/ml}$  ค่า IC<sub>50</sub> ของ DOX ที่กักเก็บใน LFC131-DOX-NPs, DOX-NPs และ DOX ในรูปแบบสารละลายเท่ากับ 13.1, 10.5 และ 4.3  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ

จากนั้นบ่มเซลล์ต่อจนครบ 72 และ 120 ชั่วโมงและประเมินอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ ผลการทดสอบพบว่า การเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ได้รับ LFC131-DOX-NPs, DOX-NPs และ DOX ในสารละลายลดลงอย่างชัดเจน LFC131-DOX-NPs มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์สูงกว่า DOX-NPs จากการประเมินค่า IC<sub>50</sub> ของ DOX ที่กักเก็บในนาโนพาร์ทิเคิลพบว่า LFC131-DOX-NPs มีค่า IC<sub>50</sub> ต่ำกว่า DOX-NPs คือ 4.7  $\mu\text{g/ml}$  กับ 4.9  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ ค่า IC<sub>50</sub> ของ DOX ในสารละลายเท่ากับ 0.3  $\mu\text{g/ml}$  หลังการบ่มจนครบ 120 ชั่วโมง พบว่าค่า IC<sub>50</sub> ของยา DOX ที่กักเก็บใน LFC131-DOX-NPs, DOX-NPs และ DOX ในรูปสารละลายเท่ากับ 2.4  $\mu\text{g/ml}$ , 2.6  $\mu\text{g/ml}$  และ 0.16  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ ค่า IC<sub>50</sub> ของ LFC131-NPs, NPs และ LFC131 แสดงในตารางที่ 2

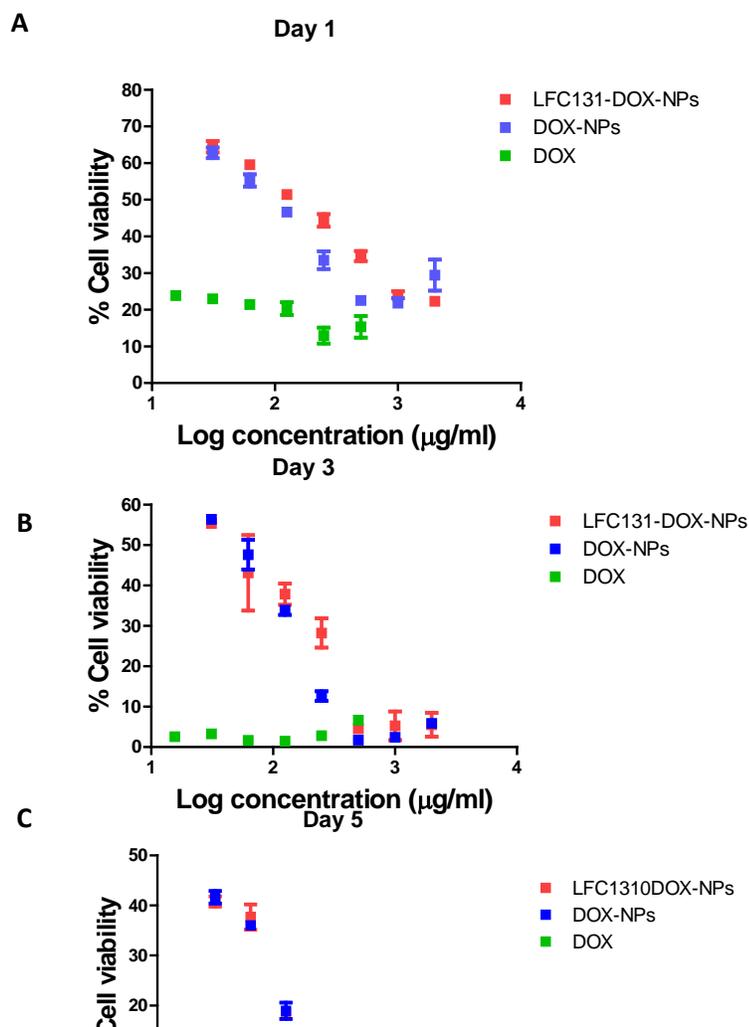
ตารางที่ 2 แสดงค่า IC<sub>50</sub> ของ doxorubicin, LFC131-DOX-NPs และ DOX-NPs ด้วย MTT assay

	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	Day 1	Day 3	Day 5
DOX	8.5	0.6	0.3
LFC131-DOX-NPs	151.5	54.4	27.6
DOX-NPs	103.6	48.6	25.9

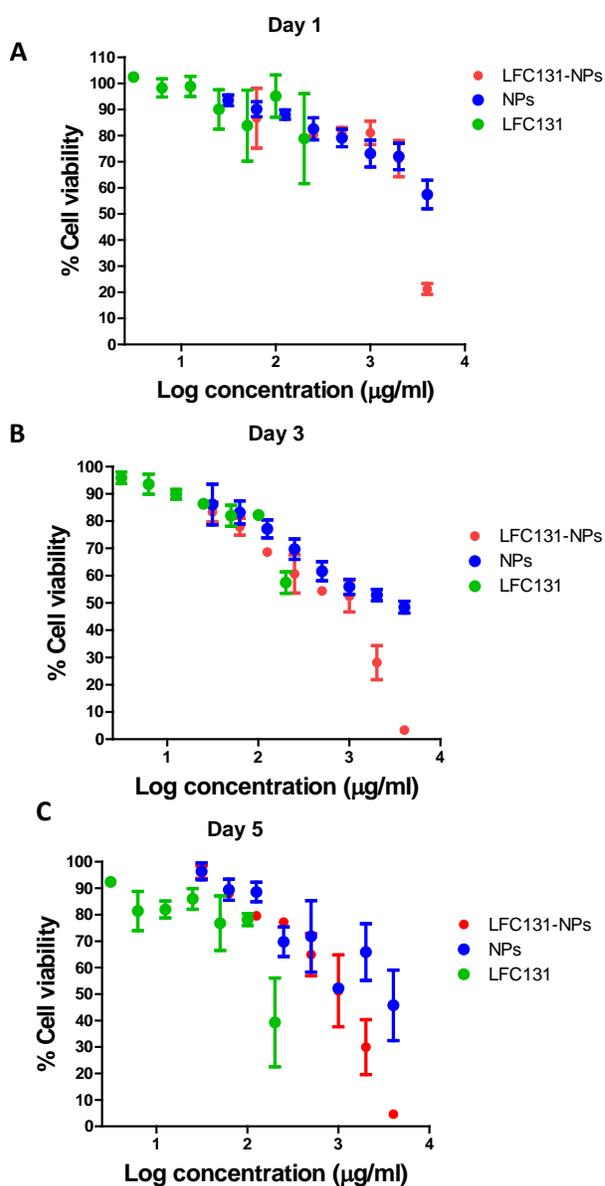
LFC131	734.5	286.9	173.7
LFC131-NPs	2,487	528.1	804.5
NPs	3,966	1,438	1,968

### 7. ผลของ LFC131, LFC131-NPs และ NPs ต่ออัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์

ผลของนาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่ได้กักเก็บยา และเปปไทด์ต่ออัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ประเมินจาก MTT assay จากการทดสอบพบว่าเมื่อเซลล์ BT-549-Luc ได้รับ LFC131-NPs, NPs และ LFC131 ทำให้อัตราการรอดชีวิตลดลงตามความเข้มข้นของสารดังแสดงในรูปที่ 7 อัตราการมีชีวิตรอดของ BT-549-Luc ที่ได้รับ LFC131-NPs และ NPs ที่ขนาด 4 mg/ml และ LFC131 ที่ขนาด 0.2 mg/ml เป็นเวลา 2 ชั่วโมงและเซลล์ถูกบ่มต่อจนครบ 24 ชั่วโมงพบว่าม้อัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 21.2%, 57.4% และ 78.8% ตามลำดับ ค่า IC<sub>50</sub> ของเปปไทด์ LFC131 ที่ควบคุมอยู่บนนาโนพาร์ทิเคิลและเปปไทด์ในสารละลายเท่ากับ 175.9  $\mu\text{g/ml}$  และ 1,954  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ เมื่อบ่มครบ 72 ชั่วโมง อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ที่ได้รับ LFC131-NPs, NPs ที่ความเข้มข้น 4 mg/ml และ LFC131 ที่ความเข้มข้น 0.2 mg/ml ลดลงเหลือ 3.4% , 48.4% และ 57.5% ตามลำดับ หลังจากบ่มครบ 72 ชั่วโมง ค่า IC<sub>50</sub> ของ LFC131 ที่ควบคุมบน LFC131-NPs และ LFC131 ในสารละลายเท่ากับ 35.3  $\mu\text{g/ml}$  และ 426.5  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ หลังจากบ่มครบ 120 ชั่วโมง อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ที่ได้รับ LFC131-NPs, NPs และเปปไทด์ LFC131 เท่ากับ 4.6%, 45.8% และ 39.3% ค่า IC<sub>50</sub> ของ LFC131 ที่ควบคุมบน LFC131-NPs และเปปไทด์ LFC131 เท่ากับ 56.3  $\mu\text{g/ml}$  และ 233.9  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ ค่า IC<sub>50</sub> ของนาโนพาร์ทิเคิลทุกชนิดแสดงในตารางที่ 2



รูปที่ 6 แสดงการมีชีวิตรอดของเซลล์หลังจากการให้ DOX, LFC131-DOX-NPs หรือ DOX-NPs เซลล์ได้รับ DOX (8-250  $\mu\text{g/ml}$ ), LFC131-NPs (30-2000  $\mu\text{g/ml}$ ) และ NPs (30-2000  $\mu\text{g/ml}$ ) เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง และ บ่มต่อเป็นเวลา (A) 24 ชั่วโมง (B) 72 ชั่วโมง และ (C) 120 ชั่วโมง



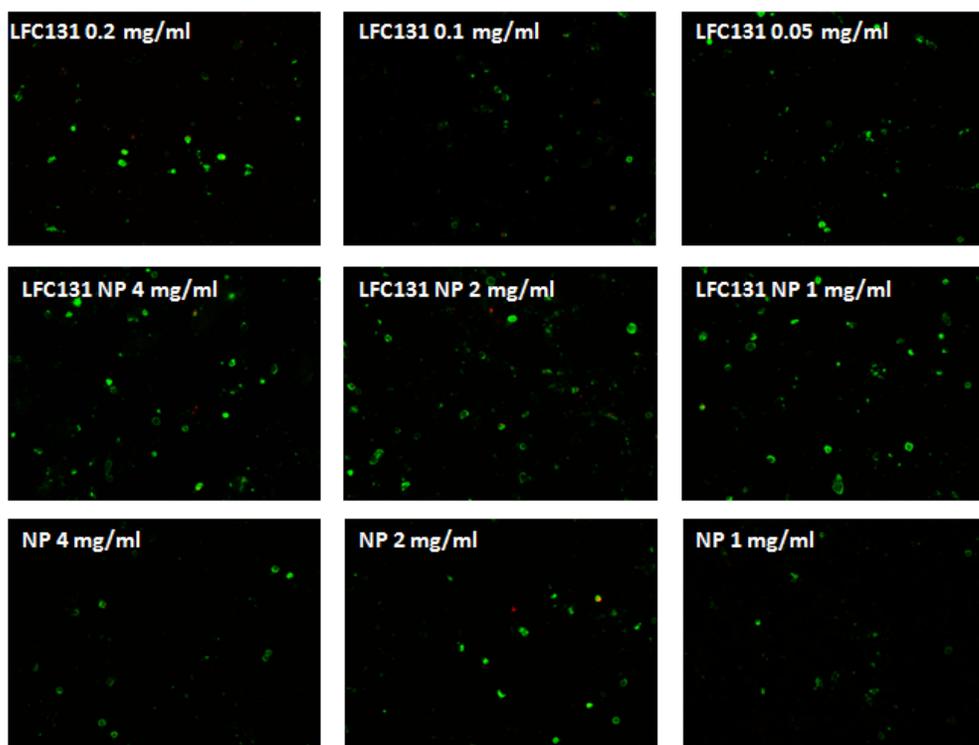
รูปที่ 7 แสดงการมีชีวิตรอดของเซลล์ BT-549-Luc หลังจากได้รับ LFC131 (3-200  $\mu\text{g/ml}$ ), LFC131-NPs (20-4000  $\mu\text{g/ml}$ ) และ NPs (30-4000  $\mu\text{g/ml}$ ) เป็นเวลา 2 ชั่วโมงและบ่มติดต่อกัน (A) 24 ชั่วโมง (B) 72 ชั่วโมง และ (C) 120 ชั่วโมง

## 8. การเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis โดย LFC131-NPs

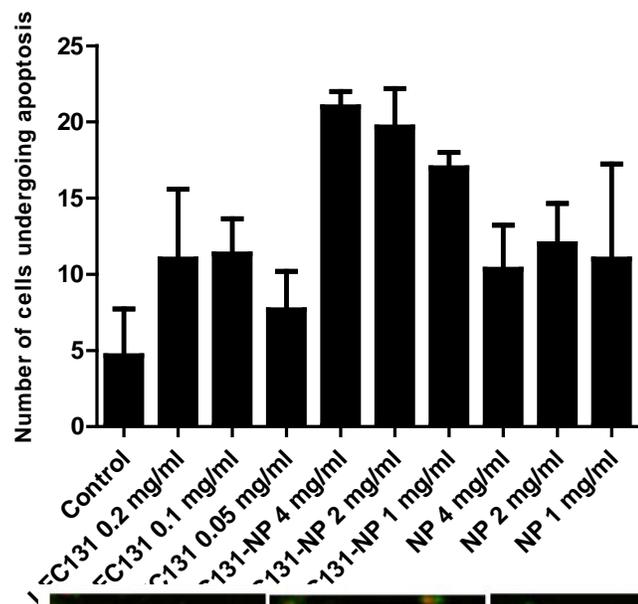
เซลล์ที่ได้รับเปปไทด์ LFC131 และ LFC131-NPs และ NPs ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ถูกย้อมด้วย Annexin V-FITC และ propidium iodide และวิเคราะห์โดยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ หลังจากได้รับนาโนพาร์ทิเคิลหรือเปปไทด์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ที่ได้รับนาโนพาร์ทิเคิลทั้งหมดย้อมติด Annexin V-FITC และส่วนใหญ่ไม่ติด propidium iodide แสดงว่าเซลล์อยู่ในช่วง apoptosis ขั้นต้น (รูป 8A) เซลล์ที่ได้รับ LFC131-NPs มีการตายแบบ apoptosis มากกว่าเซลล์ที่ได้รับเปปไทด์หรือ NPs (รูป 8B) ผลการศึกษาดังกล่าวสนับสนุนฤทธิ์ anti-proliferative effect ของ LFC131-NPs ที่ศึกษาโดย MTT assay หลังได้รับนาโนพาร์ทิเคิลหรือเปปไทด์เป็นเวลา 3 วัน เซลล์ย้อมติดทั้ง Annexin V-FITC และ propidium iodide แสดงว่าเกิดการตายแบบ apoptosis ในระยะหลัง (รูปที่ 8C)

นอกจากนี้เซลล์ที่เกิดการตายแบบ apoptosis ยังพบ nuclear condensation และ DNA fragmentation จากการย้อมนิวเคลียสด้วย Hoechst และถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ดังแสดงในรูป 8D จะเห็นว่านิวเคลียสของเซลล์กลุ่มควบคุมไม่มี segmentation และ fragmentation เลย ในขณะที่เซลล์ที่ได้รับ LFC131-NPs มี fragmented nuclei จำนวนมากกว่าเซลล์ที่ได้รับ LFC131 และ NPs จากผลการศึกษารูปได้ ว่า LFC131-NPs ที่ความเข้มข้นสูง ๆ สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการตายโดย apoptosis ได้

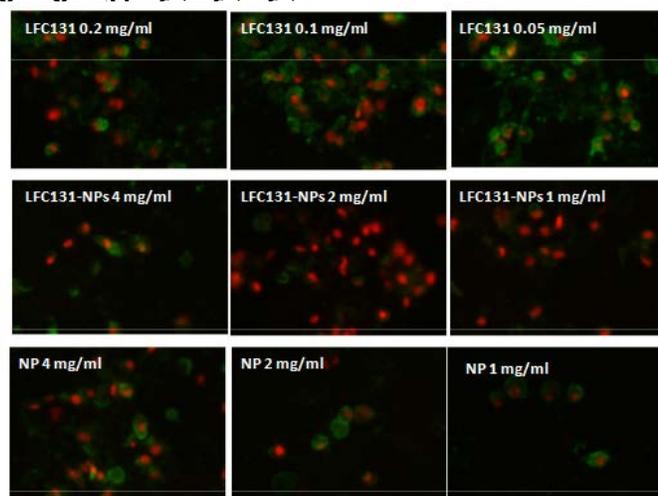
A

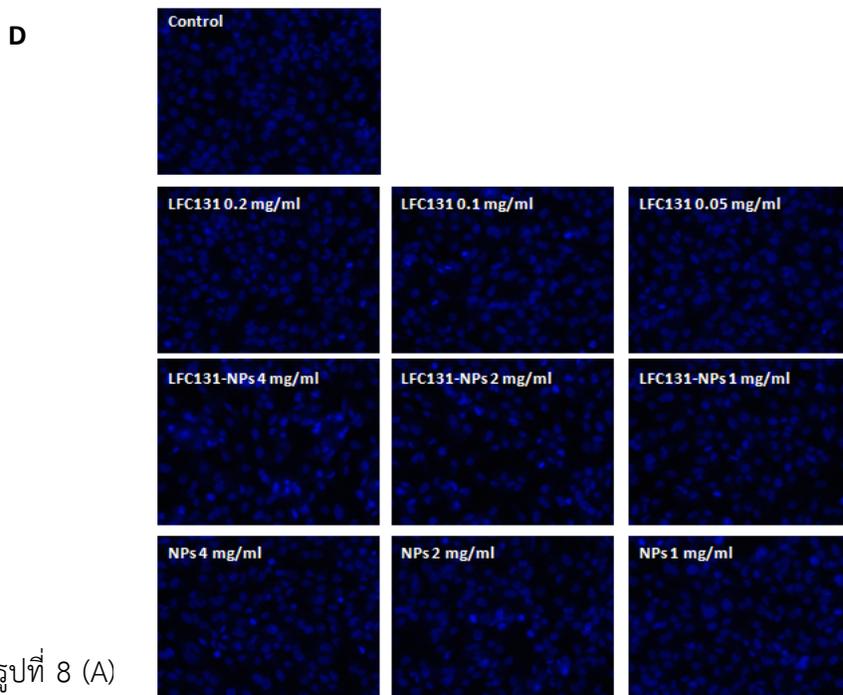


B



C





รูปที่ 8 (A) ดยใช้ Annexin V-FITC หลังจาก ที่เซลล์ได้รับ LFC131 (0.05, 0.1, และ 0.2 mg/ml), LFC131-NPs (1, 2 และ 4 mg/ml) และ NPs (1, 2 และ 4 mg/ml) (B) จำนวนเซลล์ที่เกิดการตายแบบ apoptosis หลังได้รับ LFC131, LFC131-NPs และ NPs ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (C) แสดงการตรวจสอบการตายของเซลล์แบบ apoptosis จาก Annexin V-FITC/PI หลังได้รับ LFC131 (0.05, 0.1 และ 0.2 mg/ml), LFC131-NPs (1, 2 และ 4 mg/ml) และ NPs (1, 2, และ 4 mg/ml) (D) แสดงการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของนิวเคลียสหลังได้รับ LFC131, LFC131-NPs และ NPs จากการย้อมด้วย Hoechst 33342

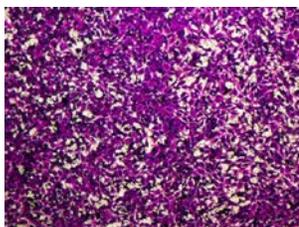
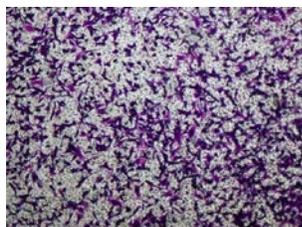
## 9. ผลของ LFC131, LFC131-NPs และ NPs ต่อการเคลื่อนที่ของ BT-549-Luc โดยการเหนี่ยวนำของ SDF-1 $\alpha$

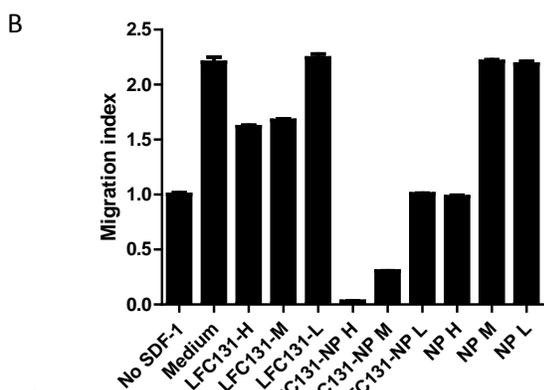
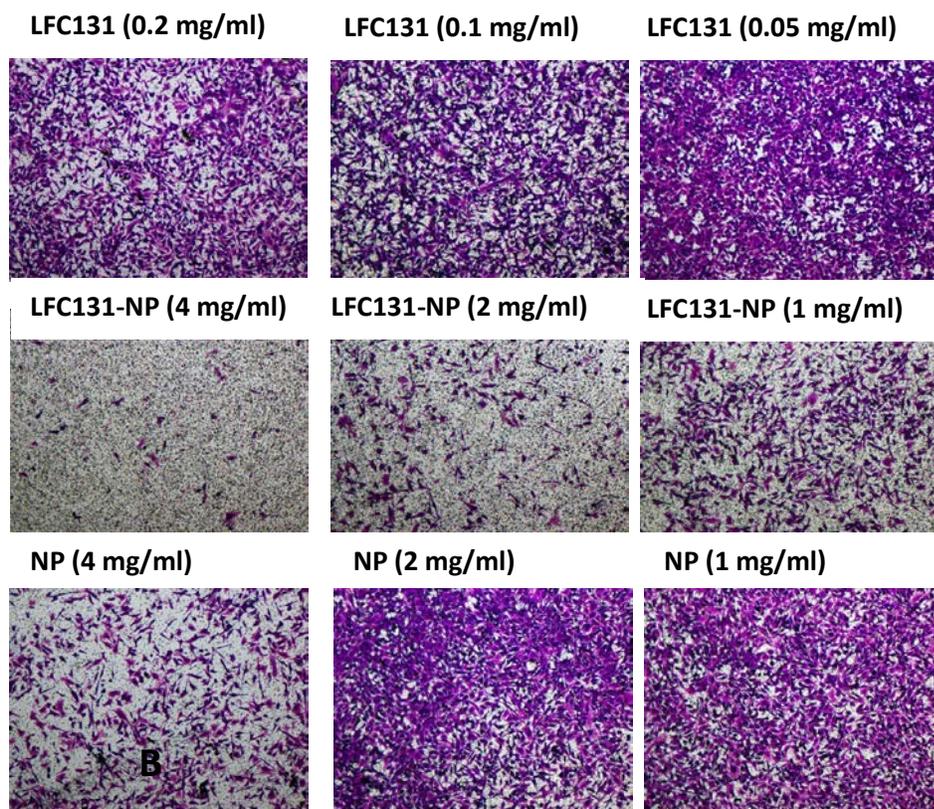
ผลการศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์พบว่า SDF-1 $\alpha$  ที่ความเข้มข้น 300 ng/ml สามารถกระตุ้นให้เซลล์ BT-549 สามารถเคลื่อนที่ได้ การให้ LFC131-NPs กับเซลล์ล่วงหน้า ทำให้ลดจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนที่ไปตามการเหนี่ยวนำของ SDF-1 $\alpha$  ได้ (รูปที่ 9) คาดว่าอาจเกิดจากการจับของ LFC131-NPs ที่ CXCR4 บนผิวเซลล์ จำนวนเซลล์ที่เคลื่อนที่ลดลงถึง 98.7% เมื่อเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับนาโนพาร์ทิเคิล และพบว่า NPs ลดการเคลื่อนที่ของเซลล์ได้เพียง 55%

**A**

**NO SDF-1 $\alpha$**

**Untreated**





รูปที่ 9 (A) แสดงผลของ LFC131, LFC131-NPs และ NPs ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ BT-549-Luc หลังการเหนี่ยวนำด้วย SDF-1 $\alpha$  (B) แสดงค่า Migration index คือจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนที่หลังได้รับสารตัวอย่างหารด้วยจำนวนเซลล์ที่เคลื่อนที่ของกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วย SDF-1 $\alpha$

### อภิปรายผลการทดลอง

ตัวรับ CXCR4 เป็นหนึ่งในตัวรับคีโมไคน์ที่มีการแสดงออกมากที่สุดในเซลล์มะเร็ง การนำส่งสัญญาณภายในเซลล์ผ่านการจับของ SDF-1 $\alpha$  กับ CXCR4 เหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) การเคลื่อนที่ (migration) การรุกราน (invasion) และการแพร่กระจาย (metastasis) ของเซลล์มะเร็งไปยังอวัยวะอื่น

ๆ รวมถึงการส่งเสริมการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) ในก้อนมะเร็งด้วย ในการศึกษานี้พบการแสดงออกของ CXCR4 บนเซลล์มะเร็งเต้านม BT-549-Luc แสดงให้เห็นว่าเซลล์ชนิดนี้มีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นเซลล์ต้นแบบสำหรับการศึกษานำส่งยามะเร็งชนิดมุ่งสู่เป้าหมายได้ ระบบนำส่งยามุ่งสู่เป้าหมายในอุดมคติคือระบบนำส่งยาที่สามารถจับกับตัวรับบนเซลล์เป้าหมายได้อย่างเฉพาะเจาะจง และสะสมอยู่ในเซลล์เป้าหมาย การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า LFC131-DOX-NPs สามารถจับและนำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเต้านม BT-549-Luc ได้มากกว่า DOX-NPs ที่ไม่ได้ควบคุมกับ targeting ligand การจับและนำ LFC131-DOX-NPs เข้าสู่เซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการบ่มเซลล์กับนาโนพาร์ทิเคิลเพิ่มขึ้น ผลการศึกษานี้ได้รับการยืนยันจากการศึกษาการจับและนำเข้าสู่เซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ซึ่งยืนยันว่า LFC131-DOX-NPs จับและเข้าสู่เซลล์ได้มากกว่าและเร็วกว่า DOX-NPs โดยทั่วไป ตัวรับ CXCR4 จะถูกนำเข้าไปสู่ภายในเซลล์ (internalization) หลังจากจับกับ SDF-1 $\alpha$  ผ่านทางเอนโดไซโทซิส ถึงแม้ว่ามีการศึกษา pathway ของกระบวนการเอนโดไซโทซิสของ CXCR4 ภายในเซลล์ BT-549 ไม่มากนักแต่พบว่า CXCR4 ถูกเอนโดไซโทซิสไปยังเอนโดโซม และไลโซโซมในเซลล์ชนิดอื่น ๆ หลายชนิด [28-33] ในการศึกษาพบการเกิด co-localization ระหว่าง LFC131-DOX-NPs กับ LysoTracker Green แสดงให้เห็นว่า LFC131-DOX-NPs เข้าไปสู่ภายในเซลล์ BT-549-Luc และอาจเป็นไปได้ว่าเป็นการนำเข้าสู่เซลล์แบบ receptor-mediated endocytosis เนื่องจากพบว่านาโนพาร์ทิเคิลเข้าไปในเอนโดโซมหรือไลโซโซม แต่หลังการบ่มเซลล์กับ LFC131-DOX-NPs เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า colocalization ของ LFC131-DOX-NPs กับเอนโดโซมลดลงและพบการเรืองแสงของ DOX กระจายไปทั่วทั้งเซลล์ แสดงให้เห็นว่า LFC131-DOX-NPs อาจออกไปจากเอนโดโซมและยังคงอยู่ในไซโตพลาสซึม ในทางตรงกันข้าม DOX-NPs ที่ไม่ได้ควบคุมกับเปปไทด์ LFC131 มี colocalization เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการบ่มเซลล์กับนาโนพาร์ทิเคิลเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่า DOX-NPs อาจเข้าไปสู่ภายในเอนโดโซมและไม่ได้ออกจากเอนโดโซม แต่เข้าไปยังเอนโดโซมระยะสุดท้าย (late endosomes) และไลโซโซมตามลำดับ การที่ LFC131-DOX-NPs ออกจากเอนโดโซมและเข้าไปอยู่ในไซโตพลาสซึม ช่วยป้องกันไม่ให้ตัวยานานาโนพาร์ทิเคิลสลายตัวหากเดินทางไปในไลโซโซม ซึ่งเป็นสถานะที่มีกรดและเอนไซม์จำนวนมาก

การเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเป็นขั้นตอนสำคัญก่อนการรุกรานและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ใน การศึกษานี้ ผู้วิจัยพบว่า SDF-1 $\alpha$  เหนี่ยวนำการเคลื่อนที่ของเซลล์ BT-549-Luc ได้ และการเคลื่อนที่ของเซลล์ ถูกขัดขวางเมื่อเซลล์ได้รับ LFC131-NPs โดยฤทธิ์ในการยับยั้งสัมพันธ์กับความเข้มข้นของนาโนพาร์ทิเคิล LFC131-NPs ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ได้มากกว่าเปปไทด์ LFC131 ในรูปอิสระ และมากกว่านาโนพาร์ทิเคิลที่ไม่ได้ควบคุมกับ LFC131 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเข้มข้น 2 mg/mL LFC131-NPs มีความเป็นพิษต่อเซลล์เล็กน้อยซึ่งน่าจะมีผลต่อการศึกษากการเคลื่อนที่ของเซลล์เพียงเล็กน้อย LFC131-NPs อาจยับยั้งอันตรกิริยาระหว่าง CXCR4 กับลิแกนด์ โดยการไปแย่งจับที่ binding site ของ SDF-1 $\alpha$  และการเหนี่ยวนำให้เกิดการนำเข้าสู่ตัวรับ CXCR4 เข้าไปภายในเซลล์ การที่เซลล์จับกับ LFC131-NPs และนำนาโนพาร์ทิเคิลเข้าไปภายในเซลล์ทำให้จำนวนตัวรับ CXCR4 บนผิวเซลล์ลดลง ดังนั้นจึงลดอันตรกิริยาระหว่าง SDF-1 $\alpha$  กับตัวรับ CXCR4 ได้ นอกจากนี้ ผลการยับยั้งของ LFC131-NPs ที่สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์ LFC131 ในรูปอิสระอาจมาจากการเพิ่มความชอบจับ (binding affinity) ที่มาจาก multivalent interaction ระหว่างเปปไทด์ LFC131 บนผิวของนาโนพาร์ทิเคิลกับตัวรับ CXCR4 ที่จัดเรียงตัวในรูป multivalent บนผิวเซลล์ BT-549-Luc

ในการประเมินผลการรักษามะเร็งของ LFC131-NPs ต่อเซลล์ BT-549-Luc ผู้วิจัยนำเซลล์มาบ่มกับเปปไทด์ LFC131, LFC131-NPs และ NPs ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24, 72, และ 120 ชั่วโมง และวัดเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดและการเพิ่มจำนวนของเซลล์โดยวิธี MTT assay ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า LFC131-NPs มีค่า IC50 สูงกว่า NPs ภายหลังจากบ่มเซลล์กับนาโนพาร์ทิเคิล และเปปไทด์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงว่า LFC131-NPs มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่า NPs เมื่อเวลาในการบ่มนานขึ้น LFC131-NPs ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ภายหลังจากบ่ม LFC131-NPs เป็นเวลา 72 และ 120 ชั่วโมง ค่า IC50 ของ LFC131-NPs ต่ำกว่าของ NPs อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีรายงานฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ของ CXCR4 antagonist ในเซลล์มะเร็ง การขัดขวางการจับของ SDF-1 $\alpha$  กับตัวรับ CXCR4 โดย CXCR4 antagonist ลดการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปอด มะเร็งเม็ดเลือดขาว และมะเร็งต่อมลูกหมาก แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการจับและการส่งสัญญาณผ่านทาง SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 ในการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง [34-39] การยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งโดย CXCR4 antagonist อธิบายได้จากการยับยั้ง pro-survival pathway ต่าง ๆ จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าเปปไทด์ d-Arg3Fc131 ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ pituitary adenoma โดยการกระตุ้นการเติมหมู่ฟอสเฟตของ ERK12 และ Akt ใน phosphatidylinositol 3-kinase pathway สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของ LFC131-NPs ต่อการเพิ่มจำนวนยังคงต้องศึกษาต่อไป อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาพบว่า LFC131-NPs เพิ่มจำนวน apoptotic cells อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม LFC131 และ NPs ซึ่งเพิ่มจำนวน apoptotic cells เพียงเล็กน้อย โดยสรุปผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า LFC131-NPs สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพและเหนี่ยวนำการเกิด apoptosis ใน *in vitro* ผลของการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ของ LFC131-NPs อาจเกี่ยวข้องกับการเพิ่มความชอบในการจับของ multivalent LFC131 บนผิวของนาโนพาร์ทิเคิลเมื่อเปรียบเทียบกับ LFC131 ในรูปอิสระในสารละลาย

โดยสรุป เปปไทด์ LFC131 ในรูปสายตรง (linear peptide) สามารถนำมาใช้เป็น targeting moiety ในการนำส่งนาโนพาร์ทิเคิลที่กักเก็บยา doxorubicin ต่อเซลล์มะเร็งเต้านม BT-549-Luc ได้ LFC131-NPs ปรับเปลี่ยนหน้าที่ทางชีวภาพที่สำคัญบางอย่างของเซลล์ BT-549-Luc ที่มีความสำคัญต่อการเคลื่อนที่และการมีชีวิตรอดของเซลล์ ดังนั้น แนวคิดในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งเต้านมจากอันตรกิริยาระหว่าง SDF-1 $\alpha$  และ CXCR4 โดยการใช้ LFC131-NPs พร้อมการนำส่งและปลดปล่อยยาต้านมะเร็งอาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษามะเร็งเต้านมต่อไป

### **สรุปผล**

นาโนพาร์ทิเคิลที่ควบคู่กับ LFC131 สามารถมุ่งสู่เป้าหมายคือ CXCR4 บนเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด BT-549-Luc โดยแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งและการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งตามการเหนี่ยวนำของ SDF-1 $\alpha$  ผลการวิจัยดังกล่าวบรรลุวัตถุประสงค์ ทำให้ได้ระบบนำส่งยามุ่งสู่เป้าหมายชนิดใหม่ งานวิจัยนี้จะเผยแพร่ผ่านการตีพิมพ์ลงวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

### **ปัญหาและอุปสรรค**

### **บรรณานุกรม**

1. Scully, O. J.; Bay, B. H.; Yip, G.; Yu, Y., Breast cancer metastasis. *Cancer Genomics Proteomics* **2012**, *9* (5), 311-20.
2. Luker, K. E.; Luker, G. D., Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer. *Cancer Lett* **2006**, *238* (1), 30-41.
3. Tamamura, H.; Tsutsumi, H.; Masuno, H.; Fujii, N., Development of low molecular weight CXCR4 antagonists by exploratory structural tuning of cyclic tetra- and pentapeptide-scaffolds towards the treatment of HIV infection, cancer metastasis and rheumatoid arthritis. *Curr Med Chem* **2007**, *14* (1), 93-102.
4. Kobayashi, K.; Oishi, S.; Hayashi, R.; Tomita, K.; Kubo, T.; Tanahara, N.; Ohno, H.; Yoshikawa, Y.; Furuya, T.; Hoshino, M.; Fujii, N., Structure-activity relationship study of a CXC chemokine receptor type 4 antagonist, FC131, using a series of alkene dipeptide isosteres. *J Med Chem* **2012**, *55* (6), 2746-57.
5. Vila-Coro, A. J.; Rodriguez-Frade, J. M.; Martin De Ana, A.; Moreno-Ortiz, M. C.; Martinez, A. C.; Mellado, M., The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *FASEB J* **1999**, *13* (13), 1699-7
6. Feng, Z.; Dubyak, G. R.; Lederman, M. M.; Weinberg, A., Cutting edge: human beta defensin 3--a novel antagonist of the HIV-1 coreceptor CXCR4. *J Immunol* **2006**, *177* (2), 782-6.
7. Nishizawa, K.; Nishiyama, H.; Oishi, S.; Tanahara, N.; Kotani, H.; Mikami, Y.; Toda, Y.; Evans, B. J.; Peiper, S. C.; Saito, R.; Watanabe, J.; Fujii, N.; Ogawa, O., Fluorescent imaging of high-grade bladder cancer using a specific antagonist for chemokine receptor CXCR4. *Int J Cancer* **2010**, *127* (5), 1180-7.
8. Manu, K. A.; Shanmugam, M. K.; Rajendran, P.; Li, F.; Ramachandran, L.; Hay, H. S.; Kannaiyan, R.; Swamy, S. N.; Vali, S.; Kapoor, S.; Ramesh, B.; Bist, P.; Koay, E. S.; Lim, L. H.; Ahn, K. S.; Kumar, A. P.; Sethi, G., Plumbagin inhibits invasion and migration of breast and gastric cancer cells by downregulating the expression of chemokine receptor CXCR4. *Mol Cancer* **2011**, *10*, 107.
9. Ma, W. F.; Du, J.; Fu, L. P.; Fang, R.; Chen, H. Y.; Cai, S. H., Phenotypic knockout of CXCR4 by a novel recombinant protein TAT/54R/KDEL inhibits tumors metastasis. *Mol Cancer Res* **2009**, *7* (10), 1613-21.
10. Muller, A.; Homey, B.; Soto, H.; Ge, N.; Catron, D.; Buchanan, M. E.; McClanahan, T.; Murphy, E.; Yuan, W.; Wagner, S. N.; Barrera, J. L.; Mohar, A.; Verastegui, E.; Zlotnik, A., Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* **2001**, *410* (6824), 50-6.

11. Kato, M.; Kitayama, J.; Kazama, S.; Nagawa, H., Expression pattern of CXC chemokine receptor-4 is correlated with lymph node metastasis in human invasive ductal carcinoma. *Breast Cancer Res* **2003**, *5* (5), R144-50.
12. Helbig, G.; Christopherson, K. W., 2nd; Bhat-Nakshatri, P.; Kumar, S.; Kishimoto, H.; Miller, K. D.; Broxmeyer, H. E.; Nakshatri, H., NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *J Biol Chem* **2003**, *278* (24), 21631-8.
13. Kang, Y.; Siegel, P. M.; Shu, W.; Drobnjak, M.; Kakonen, S. M.; Cordon-Cardo, C.; Guise, T. A.; Massague, J., A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* **2003**, *3* (6), 537-49.
14. Chen, Y.; Stamatoyannopoulos, G.; Song, C. Z., Down-regulation of CXCR4 by inducible small interfering RNA inhibits breast cancer cell invasion in vitro. *Cancer Res* **2003**, *63* (16), 4801-4.
15. Tamamura, H.; Omagari, A.; Oishi, S.; Kanamoto, T.; Yamamoto, N.; Peiper, S. C.; Nakashima, H.; Otaka, A.; Fujii, N., Pharmacophore identification of a specific CXCR4 inhibitor, T140, leads to development of effective anti-HIV agents with very high selectivity indexes. *Bioorg Med Chem Lett* **2000**, *10* (23), 2633-7.
16. Tamamura, H.; Sugioka, M.; Odagaki, Y.; Omagari, A.; Kan, Y.; Oishi, S.; Nakashima, H.; Yamamoto, N.; Peiper, S. C.; Hamanaka, N.; Otaka, A.; Fujii, N., Conformational study of a highly specific CXCR4 inhibitor, T140, disclosing the close proximity of its intrinsic pharmacophores associated with strong anti-HIV activity. *Bioorg Med Chem Lett* **2001**, *11* (3), 359-62.
17. Tamamura, H.; Xu, Y.; Hattori, T.; Zhang, X.; Arakaki, R.; Kanbara, K.; Omagari, A.; Otaka, A.; Ibuka, T.; Yamamoto, N.; Nakashima, H.; Fujii, N., A low-molecular-weight inhibitor against the chemokine receptor CXCR4: a strong anti-HIV peptide T140. *Biochem Biophys Res Commun* **1998**, *253* (3), 877-82.
18. Liang, Z.; Wu, T.; Lou, H.; Yu, X.; Taichman, R. S.; Lau, S. K.; Nie, S.; Umbreit, J.; Shim, H., Inhibition of breast cancer metastasis by selective synthetic polypeptide against CXCR4. *Cancer Res* **2004**, *64* (12), 4302-8.
19. Vila-Coro, A. J.; Rodriguez-Frade, J. M.; Martin De Ana, A.; Moreno-Ortiz, M. C.; Martinez, A. C.; Mellado, M., The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *FASEB J* **1999**, *13* (13), 1699-710.

20. Manes, S.; Lacalle, R. A.; Gomez-Mouton, C.; del Real, G.; Mira, E.; Martinez, A. C., Membrane raft microdomains in chemokine receptor function. *Semin Immunol* **2001**, *13* (2), 147-57.
21. Nguyen, D. H.; Taub, D., CXCR4 function requires membrane cholesterol: implications for HIV infection. *Journal of immunology* **2002**, *168* (8), 4121-6.
22. Ganju, R. K.; Brubaker, S. A.; Meyer, J.; Dutt, P.; Yang, Y.; Qin, S.; Newman, W.; Groopman, J. E., The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. *J Biol Chem* **1998**, *273* (36), 23169-75.
23. Cheng, Z. J.; Zhao, J.; Sun, Y.; Hu, W.; Wu, Y. L.; Cen, B.; Wu, G. X.; Pei, G., beta-arrestin differentially regulates the chemokine receptor CXCR4-mediated signaling and receptor internalization, and this implicates multiple interaction sites between beta-arrestin and CXCR4. *J Biol Chem* **2000**, *275* (4), 2479-85.
24. Sun, Y. X.; Wang, J.; Shelburne, C. E.; Lopatin, D. E.; Chinnaiyan, A. M.; Rubin, M. A.; Pienta, K. J.; Taichman, R. S., Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo. *J Cell Biochem* **2003**, *89* (3), 462-73.
25. Wysoczynski, M.; Reca, R.; Ratajczak, J.; Kucia, M.; Shirvaikar, N.; Honczarenko, M.; Mills, M.; Wanzeck, J.; Janowska-Wieczorek, A.; Ratajczak, M. Z., Incorporation of CXCR4 into membrane lipid rafts primes homing-related responses of hematopoietic stem/progenitor cells to an SDF-1 gradient. *Blood* **2005**, *105* (1), 40-8.
26. Zhou, Y.; Larsen, P. H.; Hao, C.; Yong, V. W., CXCR4 is a major chemokine receptor on glioma cells and mediates their survival. *J Biol Chem* **2002**, *277* (51), 49481-7.
27. Bonavia, R.; Bajetto, A.; Barbero, S.; Pirani, P.; Florio, T.; Schettini, G., Chemokines and their receptors in the CNS: expression of CXCL12/SDF-1 and CXCR4 and their role in astrocyte proliferation. *Toxicol Lett* **2003**, *139* (2-3), 181-9.
28. Sun, Y.; Mao, X.; Fan, C.; Liu, C.; Guo, A.; Guan, S.; Jin, Q.; Li, B.; Yao, F.; Jin, F., CXCL12-CXCR4 axis promotes the natural selection of breast cancer cell metastasis. *Tumour Biol* **2014**, *35* (8), 7765-73.

29. Hattermann, K.; Holzenburg, E.; Hans, F.; Lucius, R.; Held-Feindt, J.; Mentlein, R., Effects of the chemokine CXCL12 and combined internalization of its receptors CXCR4 and CXCR7 in human MCF-7 breast cancer cells. *Cell Tissue Res* **2014**, *357* (1), 253-66.
30. Busillo, J. M.; Benovic, J. L., Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim Biophys Acta* **2007**, *1768* (4), 952-63.
31. Wendt, M. K.; Cooper, A. N.; Dwinell, M. B., Epigenetic silencing of CXCL12 increases the metastatic potential of mammary carcinoma cells. *Oncogene* **2008**, *27* (10), 1461-71.
32. Dong, C. Z.; Tian, S.; Choi, W. T.; Kumar, S.; Liu, D.; Xu, Y.; Han, X.; Huang, Z.; An, J., Critical role in CXCR4 signaling and internalization of the polypeptide main chain in the amino terminus of SDF-1 $\alpha$  probed by novel N-methylated synthetically and modularly modified chemokine analogues. *Biochemistry* **2012**, *51* (30), 5951-7.
33. Haribabu, B.; Richardson, R. M.; Fisher, I.; Sozzani, S.; Peiper, S. C.; Horuk, R.; Ali, H.; Snyderman, R., Regulation of human chemokine receptors CXCR4. Role of phosphorylation in desensitization and internalization. *J Biol Chem* **1997**, *272* (45), 28726-31.
34. Fahham, D.; Weiss, I. D.; Abraham, M.; Beider, K.; Hanna, W.; Shlomai, Z.; Eizenberg, O.; Zamir, G.; Izhar, U.; Shapira, O. M.; Peled, A.; Wald, O., In vitro and in vivo therapeutic efficacy of CXCR4 antagonist BKT140 against human non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* **2012**, *144* (5), 1167-1175 e1.
35. Cho, B. S.; Zeng, Z.; Mu, H.; Wang, Z.; McQueen, T.; Protopopova, M.; Cortes, J.; Marszalek, J. R.; Peng, S. B.; Ma, W.; Davis, R. E.; Thornton, D. E.; Andreeff, M.; Konopleva, M., Anti-leukemia activity of the novel peptidic CXCR4 antagonist LY2510924 as monotherapy and in combination with chemotherapy. *Blood* **2015**.
36. Uy, G. L.; Rettig, M. P.; Motabi, I. H.; McFarland, K.; Trinkaus, K. M.; Hladnik, L. M.; Kulkarni, S.; Abboud, C. N.; Cashen, A. F.; Stockerl-Goldstein, K. E.; Vij, R.; Westervelt, P.; DiPersio, J. F., A phase 1/2 study of chemosensitization with the CXCR4 antagonist plerixafor in relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood* **2012**, *119* (17), 3917-24.
37. Beider, K.; Darash-Yahana, M.; Blaier, O.; Koren-Michowitz, M.; Abraham, M.; Wald, H.; Wald, O.; Galun, E.; Eizenberg, O.; Peled, A.; Nagler, A., Combination of imatinib with CXCR4 antagonist BKT140 overcomes the protective effect of stroma and targets CML in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* **2014**, *13* (5), 1155-69.

38. Porvasnik, S.; Sakamoto, N.; Kusmartsev, S.; Eruslanov, E.; Kim, W. J.; Cao, W.; Urbanek, C.; Wong, D.; Goodison, S.; Rosser, C. J., Effects of CXCR4 antagonist CTCE-9908 on prostate tumor growth. *Prostate* **2009**, *69* (13), 1460-9.
39. Vianello, F.; Villanova, F.; Tisato, V.; Lympieri, S.; Ho, K. K.; Gomes, A. R.; Marin, D.; Bonnet, D.; Apperley, J.; Lam, E. W.; Dazzi, F., Bone marrow mesenchymal stromal cells non-selectively protect chronic myeloid leukemia cells from imatinib-induced apoptosis via the CXCR4/CXCL12 axis. *Haematologica* **2010**, *95* (7), 1081-9.

## ภาคผนวก

### ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวชูด้า จิตตสุโก  
(ภาษาอังกฤษ) Miss Chuda Chittasupho
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 5001 00030 33 5
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (องครักษ์)  
เลขที่ 63 หมู่ 7 ถ.รังสิต-นครนายก ต.องครักษ์ อ.องครักษ์ จ.นครนายก 26120  
โทรศัพท์ 037-395094-5 ต่อ 1608 โทรสาร 037-395096  
E-mail address: chuda@swu.ac.th
5. ประวัติการศึกษา  
Ph.D. Pharmaceutical Chemistry, The University of Kansas Dec, 2010

M.Sc. Pharmaceutical Chemistry, The University of Kansas May, 2009

เภสัชศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (เกียรตินิยมอันดับ 1) 2003

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

- การเตรียมระบบนำส่งยาสู่เป้าหมาย (targeting drug delivery system) และการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในเซลล์

7. ผลงานวิจัยที่ผ่านมา

1. Chittasupho, C, Thongnopkoon, T, Kewsuwan, P. (2016) Surface modification of Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles using sodium carboxymethyl cellulose as colloidal stabilizer. *Current Drug Delivery* 13 (1), 95-104.
2. Chittasupho, C, Lirdpramamongkol, K, Kewsuwan, P, Sarisuta, N. (2014) Targeted delivery of doxorubicin to A549 lung cancer cells by CXCR4 antagonist conjugated PLGA nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 88 (2), 529-538.
3. [Chittasupho, C](#), [Sestak, J](#), [Shannon, L](#), [Siahaan, TJ](#), [Vines, CM](#), Berkland, C. (2014) Hyaluronic Acid Graft Polymers Displaying Peptide Antigen Modulate Dendritic Cell Response *in Vitro*. *Molecular Pharmaceutics* 11(1)
4. Phongpradist, R, Chittasupho, C, Intasai, N, Siahaan, TJ, Berkland, C, Charoenkwan, P, Anuchapreeda, S, Ampasavate, C. (2013) Biodegradable Nanoparticles Surface Modification Techniques with cIBR peptide Targeting to LFA-1 expressing leukemic cells. *J. Nanotechnol. Eng. Med.* 3(4)
5. Chittasupho, C, Jaturanpinyo, M, Mangmool S. (2013) Pectin nanoparticle enhances cytotoxicity of methotrexate against hepG2 cells. *Drug Del.* 20(1), 1-9
6. Chittasupho, C. (2012) Multivalent ligand: design principle for targeted therapeutic delivery approach. *Ther Deliv.* 3(10), 1173-1189
7. Chittasupho, C, [Siahaan, T.J.](#), [Charlotte MV.](#), [Berkland, C.](#) (2011) [Autoimmune therapies targeting costimulation and emerging trends in multivalent therapeutics. Ther Deliv. 2\(7\), 873-889](#)
8. Chittasupho, C., Shannon, L., Siahaan, T.J., Vines, C.M., Berkland, C., (2010) Nanoparticles Targeting Dendritic Cell Surface Molecules Effectively Block T cell Conjugation and Shift Response. *ACS Nano*, 5(3), 1693-1702.
9. Chittasupho, C., Manikwar, P., Krise, J.P., Siahaan, T.J., Berkland, C. (2010) cIBR effectively targets nanoparticles to LFA-1 on acute lymphoblastic T cells. *Molecular Pharmaceutics*, 7:146-55.

10. Phongpradist, R., Chittasupho, C., Okonogi, S., Siahaan, T., Anuchapreeda, S., Ampasavate, C., Berkland C. (2010) LFA-1 on leukemic cells as a target for therapy or drug delivery. *Curr Pharm Des.* 16: 2321-30.
11. Chittasupho, C., Xie, S., Baoum, A., Yakovleva, T., Siahaan, T.J., Berkland, C. (2009) ICAM-1 targeting of doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles to lung epithelial cells. *Eur J Pharm Sci.* 37: 141-50.
12. Vimolmangkang, S., Sitthithawirn, W., Vannavanich D., Keattikunpairoj, S., Chittasupho, C. (2009) Productivity and quality of volatile oil extracted from *Mentha spicata* and *M. arvensis* var. *piperascens* grown by a hydroponic system using the deep flow technique. *Nat Med*, 18
13. Zhang, N., Chittasupho, C., Duangrat, C., Siahaan, T.J., Berkland, C. (2008) PLGA nanoparticle-peptide conjugate effectively targets intercellular cell-adhesion molecule-1. *Bioconjug Chem.*, 19: 145-152.