

การสังเคราะห์สารประกอบคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ (Mahanine) อาร์จินีนเปปไทด์คอนจูเกตเพื่อใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

Synthesis of Arginine-Rich Peptide-Conjugated Carbazole Alkaloid (Mahanine) to Suppress the Growth of Cancer Cells

จริยา ร่มสายหยุด¹



บทคัดย่อ

คาร์บาโซลแอลคาลอยด์ ได้แก่ Mahanine เป็นสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น การป้องกันโรคมองเสื่อม การต้านการอักเสบ และต้านการเกิดโรคมะเร็ง ในการวิจัยในครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ทำการสังเคราะห์สารประกอบคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ (Mahanine) อาร์จินีนเปปไทด์คอนจูเกตโดยใช้วิธีการสังเคราะห์บนนิวคลีโอไทด์ของแข็ง โดยเริ่มต้นจากโครงสร้างหลักของ Mahanine ผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ มะเร็งเต้านมและมะเร็งปากมดลูกได้ดีเยี่ยมโดยไม่ทำลายเซลล์ปกติ

คำสำคัญ : คาร์บาโซลแอลคาลอยด์ การสังเคราะห์เปปไทด์โดยใช้วิธี solid phase การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

ABSTRACT

Carbazole alkaloids, especially mahanine, belong to a privileged class of compounds possessing various biological activities, including anti-Alzheimer, anti-inflammatory and anti-cancer properties. In this research, the researcher synthesized arginine-rich peptide-conjugated carbazole alkaloid (mahanine) using solid phase peptide synthesis (SPPS), which started from a mahanine core structure. The compounds showed excellent cytotoxicity against colon cancer cells, breast cancer cells and cervical cancer cells, without damaging normal cell lines.

Keywords : carbazole alkaloid, solid phase peptide synthesis, anti-cancer

¹ Lecturer, Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University.

บทนำ

โรคมะเร็ง คือ กลุ่มของโรคที่เกิดเนื่องจากเซลล์ของร่างกายมีความผิดปกติที่ DNA หรือสารพันธุกรรม ซึ่งส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโต และแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ได้รวดเร็วกว่าปกติ ทำให้เกิดก้อนเนื้อผิดปกติ ในที่สุดก็จะทำให้เกิดการตายของเซลล์ในก้อนเนื้อนั้น ถ้าเซลล์พวกนี้เกิดอยู่ในอวัยวะใดก็จะเรียกชื่อมะเร็ง ตามอวัยวะนั้น เช่น มะเร็งปอด มะเร็งสมอง มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก มะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งต่อมน้ำเหลือง และมะเร็งผิวหนัง เป็นต้น โรคมะเร็งเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตอันดับต้น ๆ ของคนทั่วโลกคิดเป็น 13% ของการเสียชีวิตทั้งหมด ซึ่งมีจำนวนมากกว่าผู้ที่เสียชีวิตด้วยโรคเอดส์ วัณโรค และมาลาเรีย รวมกัน โรคมะเร็งที่พบ 5 อันดับแรกของโลก ได้แก่ มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งกระเพาะอาหาร และมะเร็งต่อมลูกหมาก องค์การอนามัยโลกคาดการณ์ว่าในปี ค.ศ. 2030 จะมีผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งเพิ่มมากขึ้นเป็น 21.4 ล้านคน และคาดว่าจะมีผู้เสียชีวิตประมาณ 13 ล้านคน (Cancer Facts and Figures, 2016)

สำหรับประเทศไทย โรคมะเร็งถือว่าเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตอันดับหนึ่งของคนไทย รองลงมาคืออุบัติเหตุและโรคหัวใจ ตามลำดับ ซึ่งข้อมูลล่าสุดจากกระทรวงสาธารณสุข พบว่า คนไทยเสียชีวิตจากโรคมะเร็งประมาณ 60,000 คนต่อปี หรือเฉลี่ยชั่วโมงละเกือบ 7 ราย โดยมีสาเหตุจากการเสียชีวิตจากโรคมะเร็ง 5 อันดับแรก ได้แก่ มะเร็งตับและท่อน้ำดี มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก และมะเร็งปากมดลูก ซึ่งเมื่อจำแนกตามเพศ จะพบว่าในเพศชาย มีจำนวนผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็ง 5 อันดับแรก ได้แก่ มะเร็งตับและท่อน้ำดี มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก มะเร็งช่องปากและคอหอย และมะเร็งเม็ดเลือดขาว ส่วนในเพศหญิง มีจำนวนผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็ง 5 อันดับแรก ได้แก่ มะเร็งตับและท่อน้ำดี มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (Thailand Human Papillomavirus and Related Cancers, 2016)

แนวทางในการรักษาโรคมะเร็ง

แนวทางในการรักษาโรคมะเร็ง มีหลายรูปแบบ ซึ่งในการวางแผนการรักษาให้พิจารณาจากระยะของโรคมะเร็งที่เป็นสุขภาพโดยรวม รวมทั้งความต้องการของผู้ป่วยด้วย เช่น การผ่าตัดเพื่อนำก้อนเนื้อออกออกถือว่าเป็นการรักษาที่ได้ผลดี แต่โอกาสที่จะผ่าตัดเพื่อเอาก้อนเนื้อออกออกได้หมดนั้นเป็นไปได้ยาก รวมถึงการมีเลือดออกภายหลังการผ่าตัดซึ่งถือเป็นภาวะแทรกซ้อนสำคัญที่ต้องเฝ้าระวัง นอกจากนี้ถ้าผ่าตัดได้ไม่หมด จะสามารถทำให้ก้อนเนื้อออกมีการเจริญเติบโตขึ้นมาใหม่ได้อีกในภายหลัง (Lin et al., 2014)

การผ่าตัดเพื่อเปลี่ยนถ่ายอวัยวะที่เป็นโรคมะเร็ง เป็นวิธีที่ได้ผลดี แต่มีข้อเสียคือ ผู้ป่วยที่ได้รับการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะจะต้องได้รับยากภูมิคุ้มกันและยาป้องกันการต่อต้านของร่างกายต่ออวัยวะใหม่ ยาเหล่านี้มีความเสี่ยงและผลข้างเคียงโดยเฉพาะเพิ่มโอกาสเสี่ยงในการติดเชื้อ

รังสีรักษา เป็นการรักษาโดยใช้รังสีพลังงานสูง เช่น เอกซเรย์ไปทำลายเซลล์มะเร็งและทำให้ก้อนเนื้อออกนั้นยุบลง การฉายรังสีจากภายนอก (External radiation) เป็นการนำรังสีจากแหล่งกำเนิดรังสีภายนอกเข้าไปทำลายเซลล์มะเร็งที่อยู่ภายในร่างกาย แต่การรักษาวิธีนี้ไม่สามารถใช้รังสีในปริมาณที่สูงมากได้เนื่องจากจะทำให้เนื้อที่อยู่รอบๆ เซลล์มะเร็งถูกทำลายไปด้วย การรักษาวิธีนี้เพื่อลดขนาดของก้อนมะเร็งและช่วยลดอาการปวด แต่ไม่สามารถรักษามะเร็งให้หายขาดได้ และไม่สามารถช่วยให้ผู้ป่วยมีชีวิตอยู่ยืนยาวขึ้นได้ ผลข้างเคียงของรังสีรักษา เช่น ผิวหนังอักเสบเหมือนถูกแสงแดดบริเวณที่เป็นตำแหน่งฉายรังสีคลื่นไส้ อาเจียน อ่อนเพลีย อาการเหล่านี้จะค่อยๆ หายไปหลังหยุดการรักษา

ยาเคมีบำบัด มักใช้วิธีฉีดเข้าเส้นเลือดดำ เมื่อยาเข้าสู่กระแสเลือดจะกระจายไปทั่วร่างกาย เป็นประโยชน์สำหรับผู้ป่วยโรคมะเร็งในระยะที่กระจายไปที่อื่น ยาที่น่าจะใช้ได้ผลดีที่สุดคือ Doxorubicin (Adriamycin), 5-fluorouracil และ cisplatin แต่การศึกษาส่วนใหญ่ไม่ได้บ่งบอกว่ายาเหล่านี้ช่วยให้ผู้ป่วยมีชีวิตอยู่ได้นานขึ้น ปัจจุบันการรักษาโรคมะเร็งด้วยเคมี

บำบัดเริ่มเข้าสู่ทางตันเพราะพิษจากผลข้างเคียงของยาเคมีบำบัด เช่น แสบปาก การรับรสลดลง ผม่วิ่ง เพิ่มโอกาสเสี่ยงต่อการติดเชื้อ เลือดออกง่าย เป็นจำเลือดเกล็ดเลือดลดลง นอกจากนี้ยังสามารถทำอันตรายต่อเนื้อเยื่อปกติด้วย จึงได้เกิดแนวทางการรักษาโดยแพทย์ทางเลือกโดยการพัฒนาสกัดแยกสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ รวมถึงการปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารจากผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเพื่อให้มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ดีขึ้นโดยไม่ทำลายเซลล์ปกติ เพื่อทดแทนการหรือลดการใช้ยาทางเภสัชกรรม

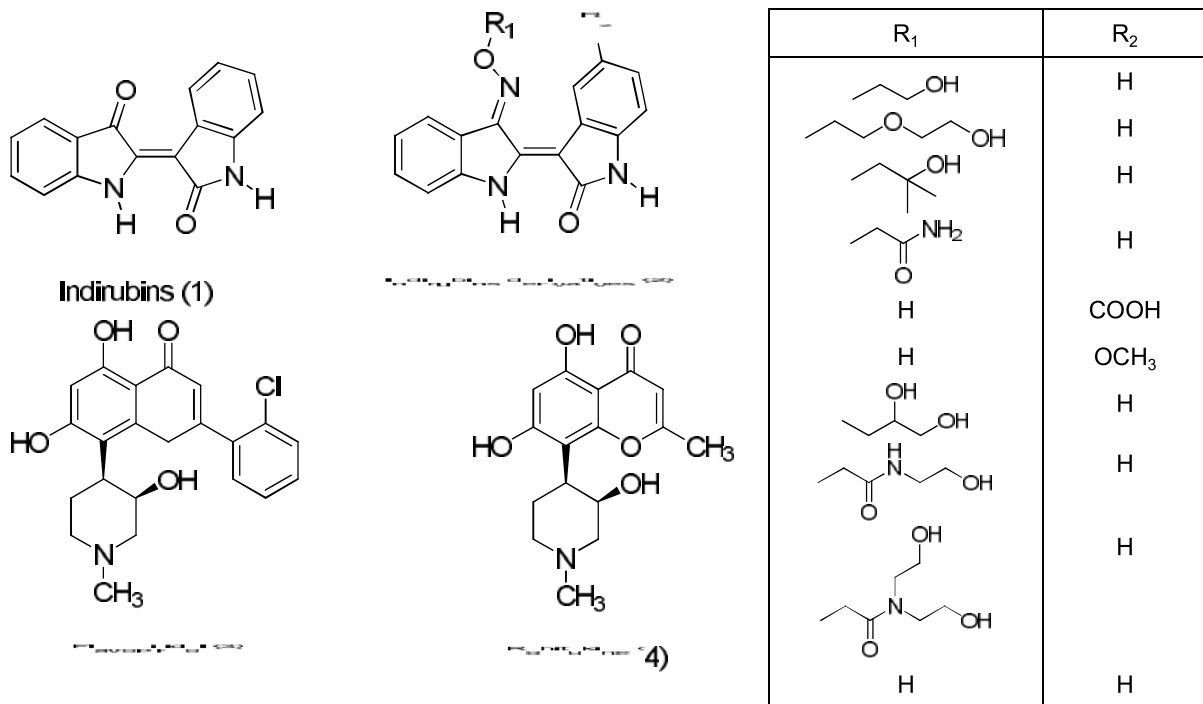
สารสกัดจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกับการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

Indirubins (1) และอนุพันธ์ (2) เป็นสารสกัดจากสมุนไพรจีนจากต้น *Danggui Longhui Wan* ซึ่งได้มีการพัฒนาไปเป็นยาเพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเรื้อรัง (Leclerc et al., 2001)

Flavopiridol (3) เป็น flavonoid ที่สกัดแยกได้จากพืชพื้นเมืองของประเทศอินเดียมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ดีโดยเฉพาะมะเร็งที่ต่อมน้ำเหลือง มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งลำไส้ใหญ่ และมะเร็งกระเพาะอาหาร โดยกลไกการทำงานนั้น Flavopiridol (3) จะไปยับยั้งการทำงานของไคเนสส์ (Kinase) ในวัฏจักรการแบ่งเซลล์ในระยะ G1/S และ G2/M ซึ่งในปัจจุบันนี้ ได้มีการพัฒนาและวิจัย Flavopiridol (3) ทางคลินิกต่อไป (Patel et al., 1998)

Rohitukine (4) เป็นสารที่สกัดแยกได้จาก *Amoora rohituka*, *Dysoxylum binectariferum*

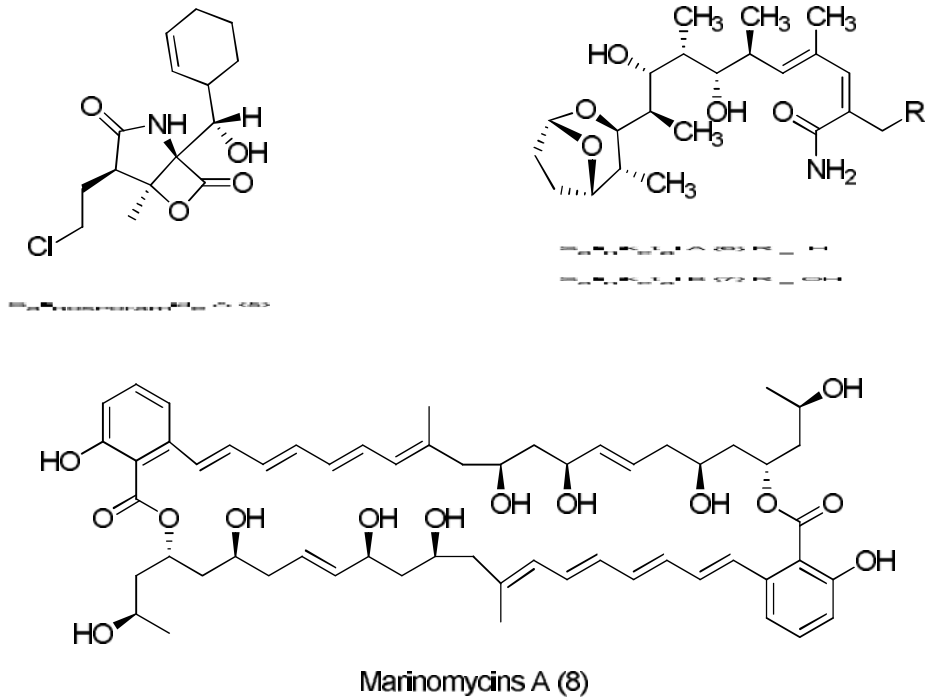
และ *Schumanniohyton problematicum* มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ สร้างภูมิคุ้มกัน และยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง โดยเฉพาะมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Mohana et al., 2015) สูตรโครงสร้างของสาร (1)-(4) แสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารสกัดจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่สกัดได้จากจุลินทรีย์ทางทะเล เช่น Salinosporamide A (5), Saliniketol A (6), Saliniketol B (7) และ marinomycins A (8) เป็น proteasome ที่มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโต

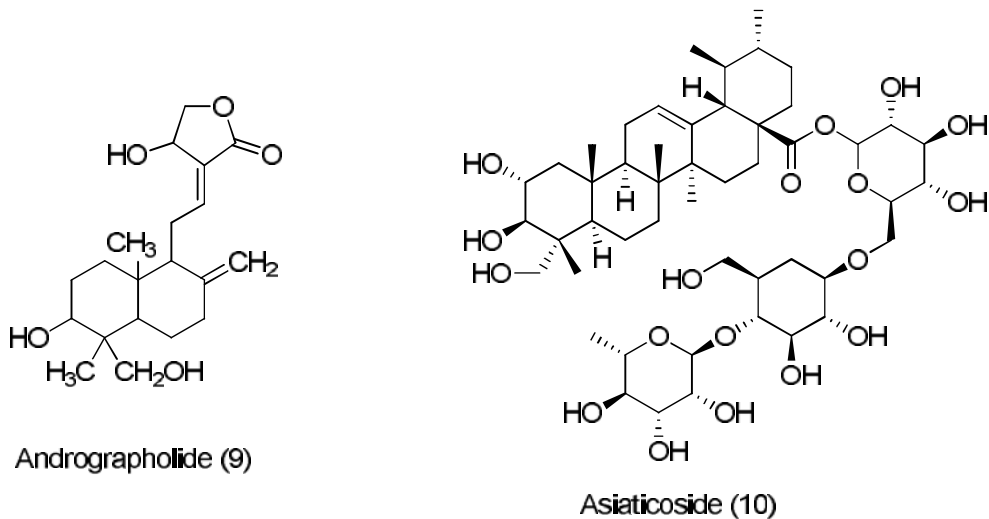
ของเซลล์มะเร็งปอด และมะเร็งเต้านมที่ดี (Nicolaou et al., 2007) ตอนนี้ได้มีการพัฒนาเข้าสู่ขั้นตอนการทดลองทางคลินิก ซึ่งได้มีการพัฒนาไปเป็นยาในการรักษาโรคมะเร็งต่อไป (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารที่สกัดได้จากจุลินทรีย์ทางทะเล

ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่พบในประเทศไทย และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง เช่น ฟ้าทะลายโจรมีสารสำคัญคือ Andrographolide (9), บัวบกมีสารสำคัญคือ Asiaticoside (10) ซึ่งมีฤทธิ์

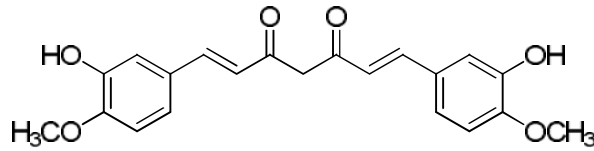
ช่วยให้แผลเรื้อรังหายเร็วขึ้น เพิ่มภูมิคุ้มกัน และสามารถรักษา มะเร็งปากมดลูกได้ (ภาพที่ 3) (Astha et al., 2011)



ภาพที่ 3 สารสกัดจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่พบได้ในประเทศไทย

นอกจากนี้ยังมีพืชที่มีสารสำคัญ คือ Curcumin (11) มีฤทธิ์ต้านการออกซิไดซ์ และต้านการอักเสบที่รุนแรง สามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งผิวหนัง มะเร็งลำไส้ใหญ่

มะเร็งกระเพาะอาหาร มะเร็งลำไส้เล็ก มะเร็งรังไข่ และยังมีฤทธิ์ต้านไวรัส แบคทีเรีย และเชื้อราอีกด้วย ดังแสดงในภาพที่ 4 (Julie, 2009)

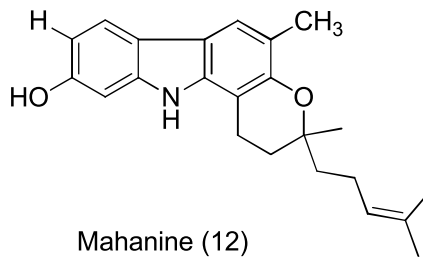


Curcumin (11)

ภาพที่ 4 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ Curcumin (11)

หอมแขก มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Murraya koenigii* (L.) Spreng. อยู่ในวงศ์ Rutaceae เป็นไม้พุ่มตามลำต้นไม่มีหนาม เมื่อขยี้ใบจะมีกลิ่นฉุนจัด ดอกออกเป็นช่อตามยอดและซอกใบ ดอกเล็ก กลีบดอก 5 กลีบ สีขาวเขียว ผลกลมมีสีดำตามป่าดิบชื้น ป่าเบญจพรรณ

ป่าละเมาะชายทะเล สรรพคุณ ใบ ใช้สำหรับแก้ปวดท้อง เป็นยาบำรุง แก้ปวดฟัน นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยพบว่าสารแอลคาลอยด์ ที่พบในใบหอมแขก เช่น Mahanine (12) สามารถช่วยต้านความจำที่ลดลงเนื่องมาจากความชราได้ (Kaushik et al., 2014)



Mahanine (12)

ภาพที่ 5 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ Mahanine (12)

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ Mahanine (12) ในด้านการต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งและทำการสังเคราะห์เปปไทด์ที่มีหมู่ guanidine เป็นองค์ประกอบแล้วนำไปคอนจูเกต หรือเชื่อมต่อกับโครงสร้างหลักของ Mahanine เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในด้านการต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งโดยไม่ทำลายเซลล์ปกติ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ประเภทของข้อมูล ข้อมูลที่ได้มาจากการนำผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้มาวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโคปี เช่น

1.1) Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของโมเลกุลโดยเครื่องรุ่น Bruker AVANCE 400 spectrometer operating (400 MHz) ค่า Chemical shift (δ) รายงานในหน่วย ppm และค่า coupling constants (J) รายงานในหน่วย Hz ตัวทำละลายที่ใช้ คือ $CDCl_3$, CD_3OD และ $DMSO-d^6$

1.2) Mass Spectroscopy (MS) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักของโมเลกุลวัดโดยเครื่องรุ่น Finnigan LC-Q mass spectrometer

1.3) Infrared Spectroscopy (IR) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชันของโมเลกุลรุ่น PerkinElmer FT-IR Spectrum 400 spectrometer (ATR)

2. วิธีเก็บข้อมูล มีขั้นตอนดังนี้

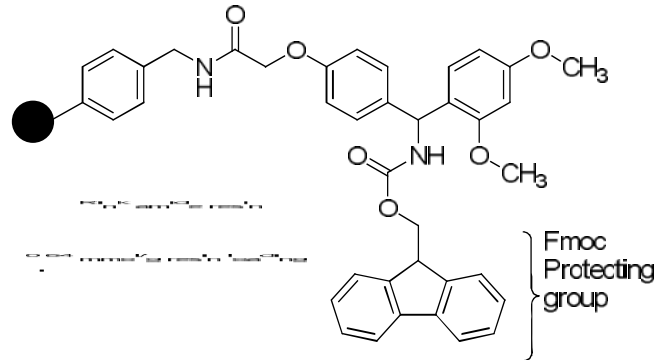
- การสังเคราะห์เปปไทด์โดยใช้เทคนิค solid Phase Peptide Synthesis (SPPS)
- การนำเปปไทด์ที่สังเคราะห์ได้มาเชื่อมต่อกับแอลคาลอยด์ (Mahanine, (12)) ที่สกัดแยกได้จากต้นหอมแขกโดยใช้ปฏิกิริยา coupling
- นำสารที่สังเคราะห์ได้ (21) และ (22) มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

3. วิธีการสังเคราะห์

3.1) การสังเคราะห์เปปไทด์โดยใช้เทคนิค Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS)

การสังเคราะห์เปปไทด์สำหรับงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ใช้เรซินชนิด Rink amide resin (ภาพที่ 6) เนื่องจากเป็นเรซินที่มีราคาถูก เมื่อใช้งานเสร็จแล้ว สามารถตัดสายเปปไทด์ที่ต้องการออกจากเรซินได้ง่าย โดยใช้

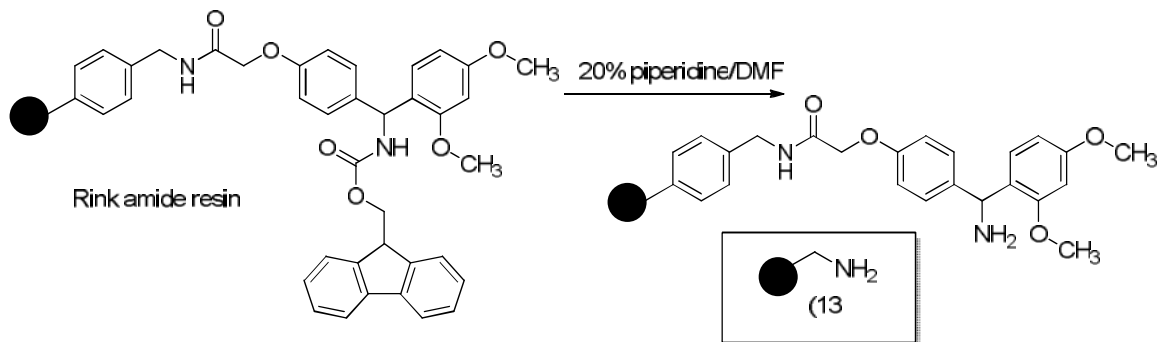
สารเคมีที่มีฤทธิ์เป็นกรด เช่น 20% TFA ใน dichloromethane (DCM)



ภาพที่ 6 แสดงสูตรโครงสร้างของ Rink amide resin

เนื่องจากเรซินชนิดนี้มี Fmoc-protecting group อยู่ในโครงสร้างด้วย ทำให้ก่อนผู้วิจัยจะเริ่มการสังเคราะห์ต้องมีการทำ Fmoc-deprotection โดยใช้ 20% piperidine/DMF

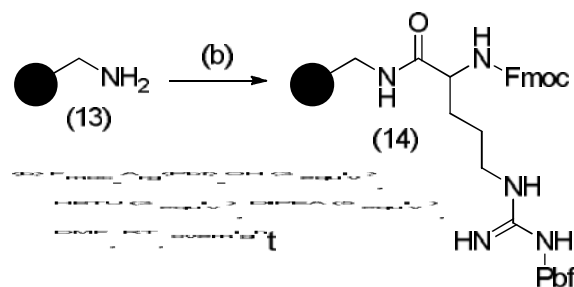
ก) Fmoc-deprotection from Rink amide resin



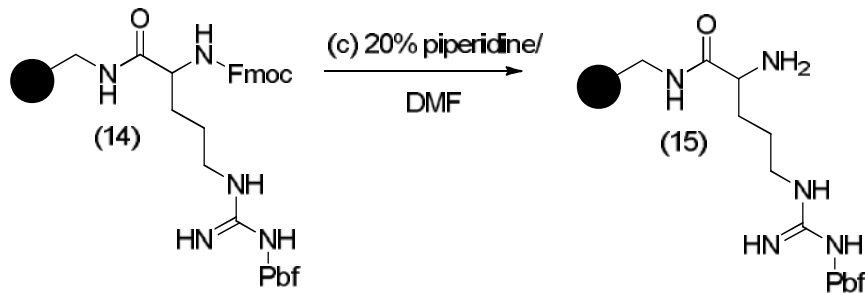
นำ Rink amide resin จำนวน 500 มก. (0.32 mmol) ใส่ในหลอดทดลอง แซ่ด้วย dichloromethane (DCM) 2 mL เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้เรซิน (polymer) ขยายตัวเต็มที่ จากนั้นเติม 20% piperidine/DMF 1 mL เขย่าหลอดทดลองเป็นเวลา 20 นาที แล้วกรองสารละลายออก ล้างเรซินด้วยเมทานอล และ

dichloromethane (DCM) (ทำซ้ำสลับกัน 3 รอบ) นำไปทำให้แห้งในระบบสุญญากาศ จะได้เรซิน (13) ที่พร้อมใช้งาน

ข) Coupling reaction of resin (1) and the first amino acid (Fmoc-Arg(Pbf)-OH)



ใส่ *N,N*-Dimethyl formamide (DMF) 2 mL และ DIPEA (1.60 mmol, 5 equiv) ลงในเรซิน (13) 500 มก. (0.32 mmol) จากนั้นเติม *N,N,N',N'*-Tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl) uranium hexafluorophosphate, (HBTU) (0.96 mmol, 3 equiv) ซึ่งผสมกับกรดอะมิโน Fmoc-Arg(Pbf)-OH (0.96 mmol, 3 equiv) ใน DMF 2 mL



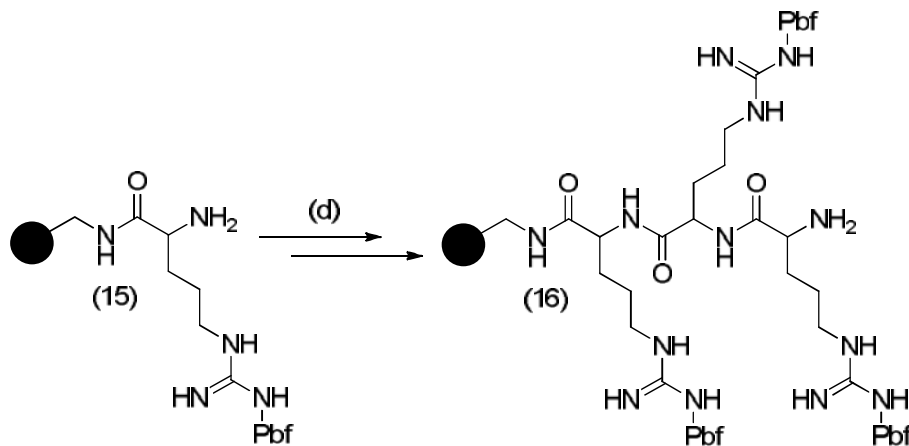
ใส่ 20% piperidine/DMF 1 mL ลงในหลอดทดลองที่บรรจุเรซิน 500 มก. (14) (0.32 mmol) เขย่าหลอดทดลองเป็นเวลา 20 นาที แล้วกรองเอาสารละลายที่ไม่ต้องการออก ล้างเรซินด้วยเมทานอล

เขย่าหลอดทดลองที่อุณหภูมิห้อง overnight จากนั้นกรองเอาสารละลายที่ไม่ต้องการออก ทำการล้างเรซินด้วยเมทานอล และ dichloromethane (DCM) นำผลิตภัณฑ์ (14) ไปทำให้แห้งโดยเข้าสู่สุญญากาศ

ค) Removal of Fmoc from resin (14)

และ dichloromethane (DCM) (ทำซ้ำ 3 รอบ) ไปทำให้แห้งโดยเข้าสู่สุญญากาศ จะได้เรซิน (15)

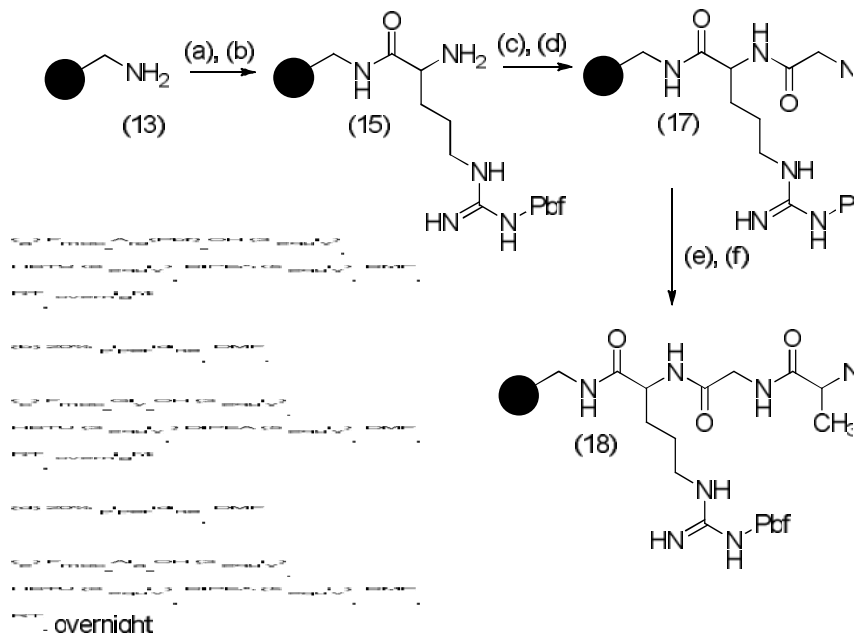
ง) Coupling reaction of (amino acid)_n เมื่อ n = 2, 3 ตามลำดับ



นำเรซิน (15) 500 มก. (0.32 mmol) มาทำการทดลองซ้ำด้วยปฏิกิริยา (ข) และ (ค) สลับกันไปเรื่อยๆ โดยการนำ Fmoc-Arg(Pbf)-OH (0.96 mmol, 3 equiv) เข้าไปเชื่อมต่อกับเรซิน (15) จนได้สายเปปไทด์ซึ่งมีลำดับของกรดอะมิโนตามต้องการ จากนั้นกรองเอา

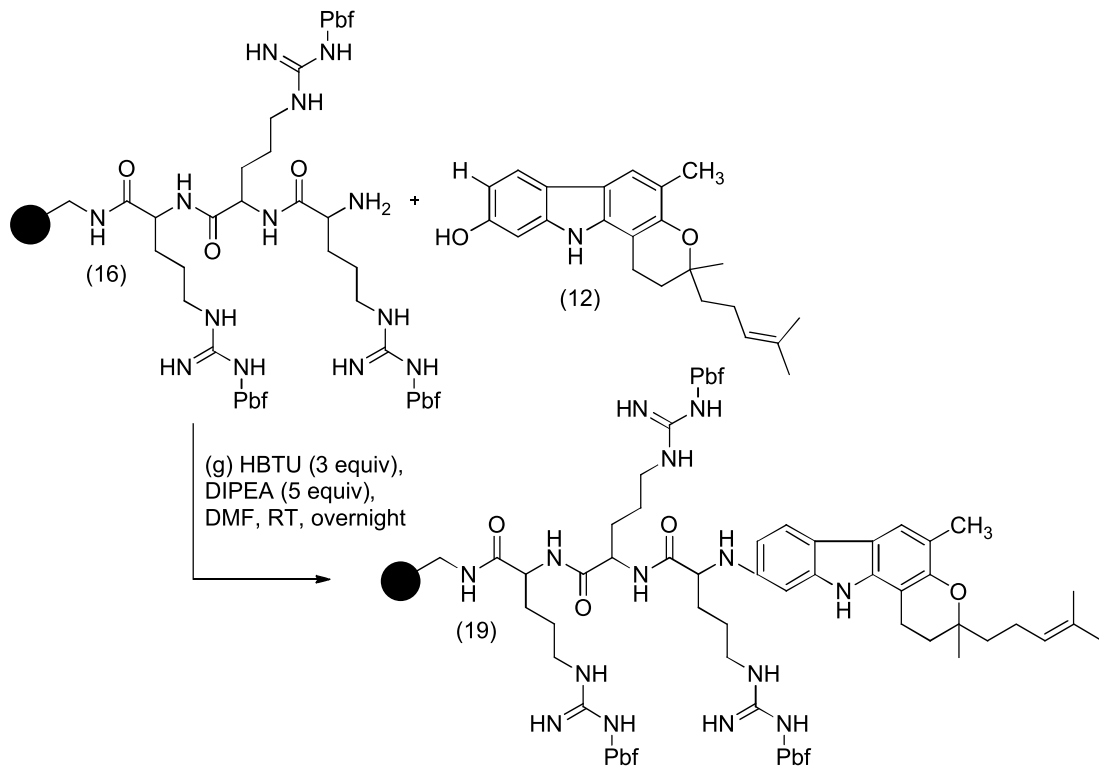
สารละลายที่ไม่ต้องการออก ทำการล้างเรซินด้วยเมทานอล และ dichloromethane (DCM) นำไปทำให้แห้งโดยเข้าสู่สุญญากาศจะได้ผลิตภัณฑ์ (16)

จ) การสังเคราะห์สายเปปไทด์ชนิดที่สอง



ในการสังเคราะห์สายเปปไทด์ชนิดที่สอง (18) ให้ทำการทดลองซ้ำ โดยเริ่มจากขั้นตอน (ก)-(ง) แต่เปลี่ยนลำดับของกรดอะมิโน เป็น Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gly-OH และ Fmoc-Ala-OH ตามลำดับ

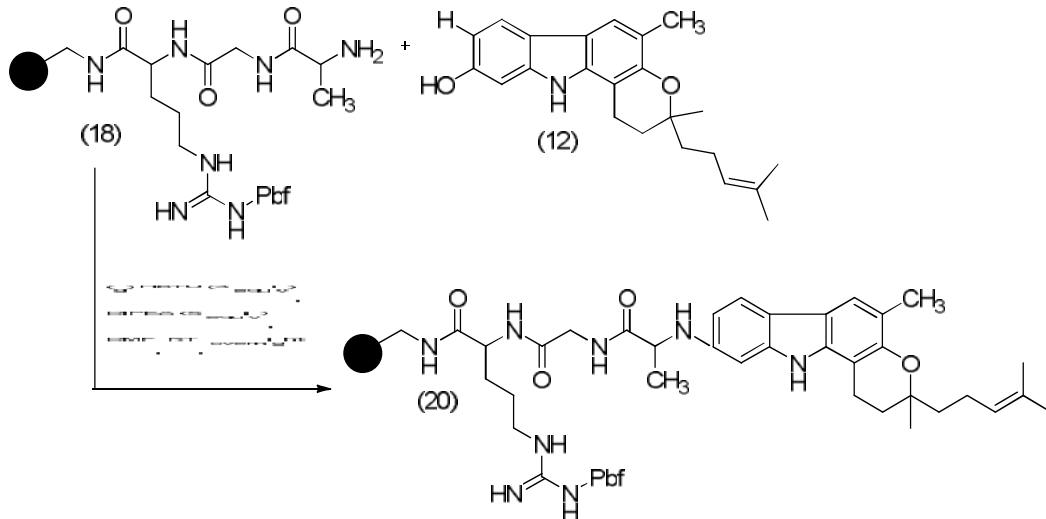
ฉ) Coupling reaction of tripeptide (16) with Mahanine (12)



ใส่ *N,N*-Dimethyl formamide (DMF) 2 mL และ DIPEA (1.60 mmol, 5 equiv) ลงในเรซิน (16) 500 มก. (0.32 mmol) จากนั้นเติม *N,N,N',N'*-Tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate, (HBTU) (0.96 mmol, 3 equiv) ซึ่งผสมกับ Mahanine (12) (0.96 mmol, 3 equiv) ใน DMF 2 mL เขย่าหลอดทดลองที่อุณหภูมิห้อง overnight จากนั้นกรองเอาสารละลายที่ไม่ต้องการออก ทำการล้างเรซินด้วยเมทานอล และ

dichloromethane (DCM) นำผลิตภัณฑ์ (19) ไปทำให้แห้งโดยเข้าตู้สุญญากาศ

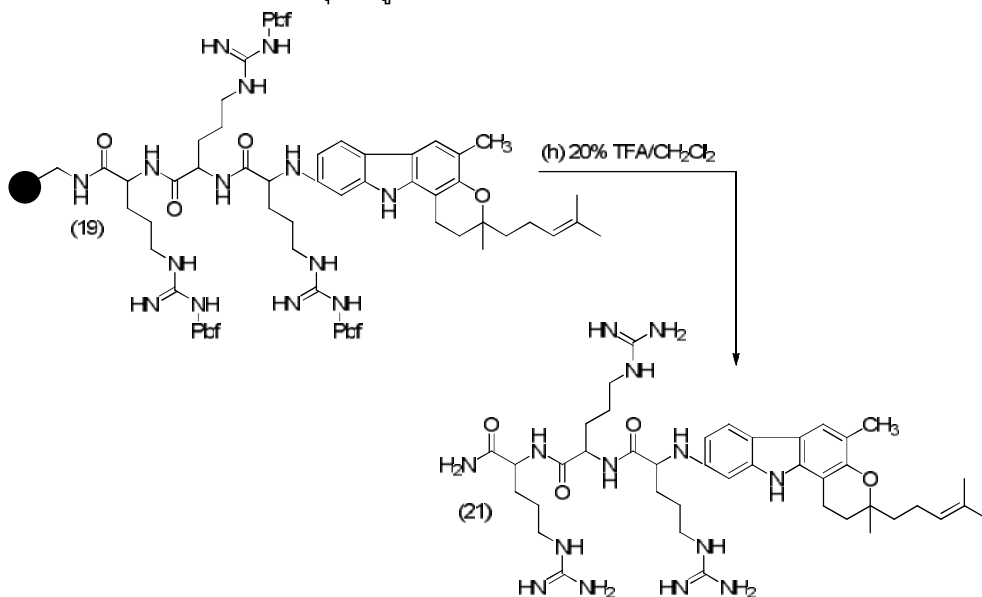
ข) Coupling reaction of tripeptide (18) with Mahanine (12)



ใส่ *N,N*-Dimethyl formamide (DMF) 2 mL และ DIPEA (1.60 mmol, 5 equiv) ลงในเรซิน (18) 500 มก. (0.32 mmol) จากนั้นเติม *N,N,N',N'*-Tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate, (HBTU) (0.96 mmol, 3 equiv) ซึ่งผสมกับ Mahanine (12) (0.96 mmol, 3 equiv) ใน DMF 2 mL เขย่าหลอดทดลองที่อุณหภูมิห้อง

overnight จากนั้นกรองเอาสารละลายที่ไม่ต้องการออก ทำการล้างเรซินด้วยเมทานอล และ dichloromethane (DCM) นำผลิตภัณฑ์ (20) ไปทำให้แห้งโดยเข้าตู้สุญญากาศ

ข) Cleavage reaction



ผลการวิจัย

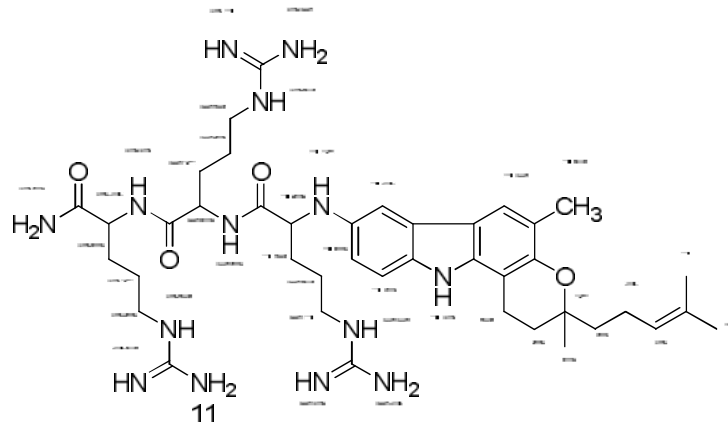
1. การสังเคราะห์และการวิเคราะห์สูตรโครงสร้าง

1.1) การสังเคราะห์เปปไทด์โดยเทคนิค solid phase peptide synthesis

ในการสังเคราะห์เปปไทด์สามารถทำได้หลายวิธี เช่น solution phase และ solid phase technique ซึ่งในงานวิจัยครั้งนี้ได้เลือกการสังเคราะห์แบบ solid phase เนื่องจากมีข้อดีคือ สามารถทำการสังเคราะห์สายเปปไทด์ได้เปอร์เซ็นต์ของผลิตภัณฑ์สูง ลดการเกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ ประหยัดเวลาในการแยกสารตัวกลาง (ไม่ต้องใช้ column chromatography) ทำให้สามารถสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ได้ในเวลาอันรวดเร็ว นอกจากนี้เรซินที่ใช้ในงานวิจัยนี้จะเป็นชนิด rink

amide resin เนื่องจากเมื่อทำการสังเคราะห์สายเปปไทด์จนได้ลำดับของกรดอะมิโนตามต้องการแล้ว เรายังสามารถตัดสายเปปไทด์ออกจากเรซินได้ง่าย โดยใช้ 20% trifluoroacetic acid (TFA)/ dichloromethane (DCM) รวมถึงการทำ deprotection ของ protecting group ต่างๆ ได้ภายในขั้นตอนเดียว

ในการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของเปปไทด์ (21) และ (22) สามารถยืนยันสูตรโครงสร้างได้โดยอาศัยเครื่องมือทางสเปกโตรสโคปี เช่น Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR), Mass Spectroscopy (MS) และ Infrared Spectroscopy (IR) เป็นต้น ซึ่งจะแสดงผล ดังนี้



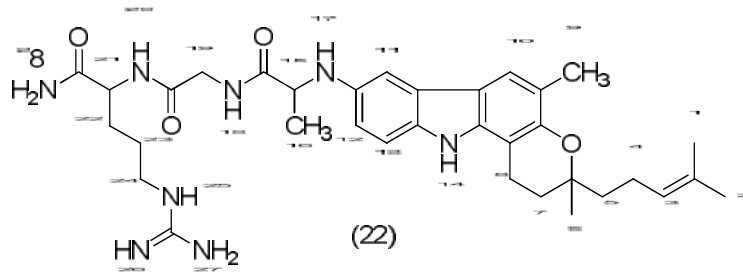
(21)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): 1.51 (3H, s, CH_3 -6), 1.72 (3H, s, CH_3 -1), 1.82 (3H, s, CH_3 -2), 1.67-2.90 (26H, m, CH_2 -4, CH_2 -5, CH_2 -8, CH_2 -9, CH_2 -19, CH_2 -20, CH_2 -21, CH_2 -27, CH_2 -28, CH_2 -29, CH_2 -36, CH_2 -37, CH_2 -38), 2.15 (3H, s, CH_3 -10), 3.56 (1H, m, CH-18), 4.53 (1H, m, CH-34), 4.55 (1H, m, CH-26), 5.20 (1H, m, CH-3), 6.72 (1H, s, CH-14), 6.74 (1H, d, $J = 0.8$ Hz, CH-16), 7.41 (1H, d, $J = 0.8$ Hz, CH-15), 7.70 (1H, s, CH-12), 8.01-

10.40 (13H, br m, NH-13, NH-17, NH-25, NH-22, NH-23, NH_2 -24, NH-30, NH-31, NH_2 -32, NH-39, NH-40, NH_2 -11, NH_2 -35).

IR: V_{max} 3275, 2958, 2880, 1761, 1635 cm^{-1} .

ESMS (+ve): m/z (%rel. intensity): 818.04 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100).



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): 1.41 (3H, s, CH₃-16), 1.50 (3H, s, CH₃-6), 1.70 (3H, s, CH₃-1), 1.82 (3H, s, CH₃-2), 1.67-2.85 (14H, m, CH₂-4, CH₂-5, CH₂-7, CH₂-8, CH₂-22, CH₂-23, CH₂-24), 2.15 (3H, s, CH₃-9), 3.74 (1H, m, CH-15), 4.09 (2H, m, CH₂-19), 4.53 (1H, m, CH-21), 5.20 (1H, m, CH-3), 6.70 (1H, s, CH-11), 6.74 (1H, d, $J = 0.8$ Hz, CH-12), 7.41 (1H, d, $J = 0.8$ Hz, CH-13), 7.72 (1H, s, CH-10), 8.03-11.20 (9H, br m, NH-14, NH-17, NH-20, NH₂-28, NH-25, NH-26, NH₂-27).

IR: V_{max} 3272, 2960, 2890, 1759, 1635 cm^{-1} .

ESMS (+ve): m/z (%rel. intensity): 633.81 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100).

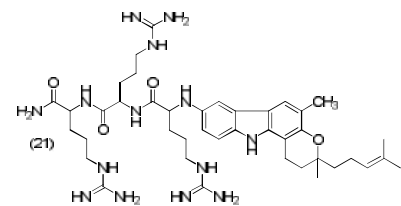
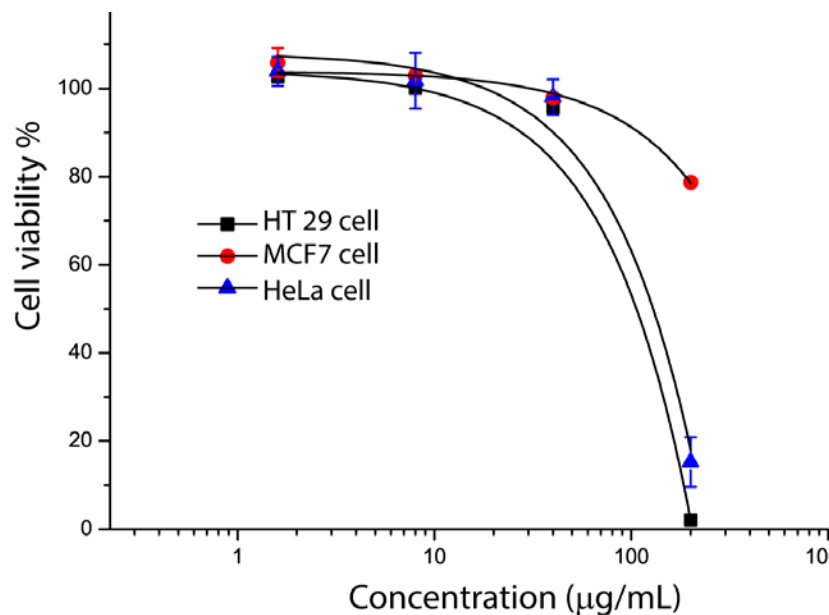
2. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Anticancer activity)

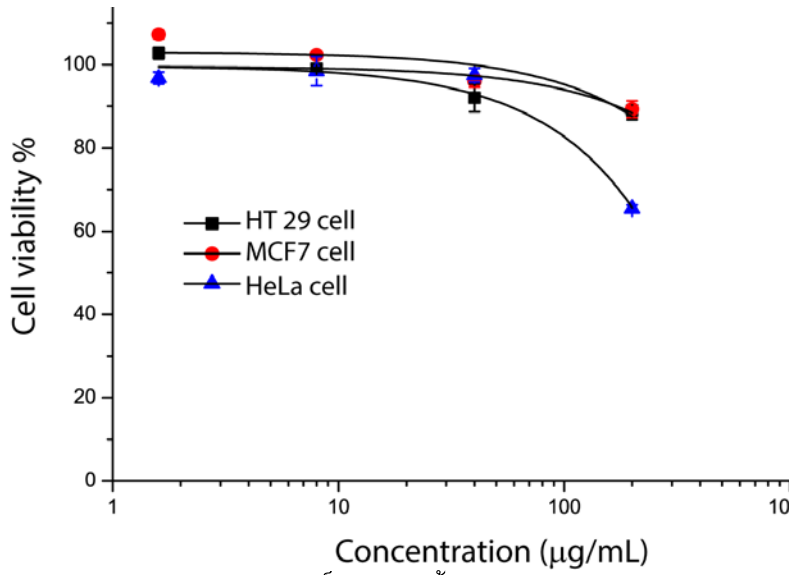
นำผลิตภัณฑ์ (21) และ (22) ไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

เซลล์ที่ใช้ในการทดลอง

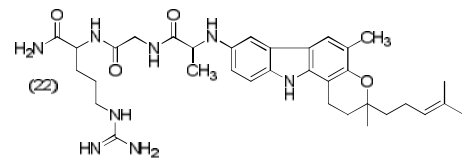
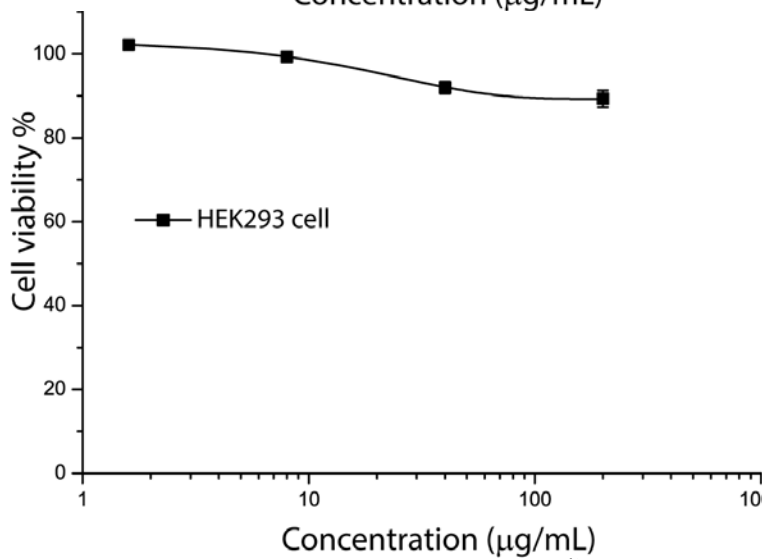
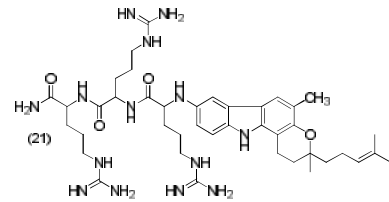
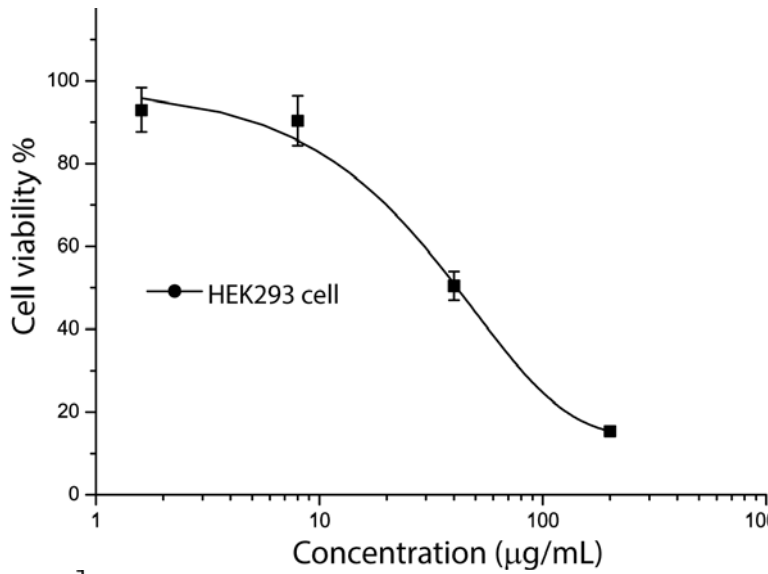
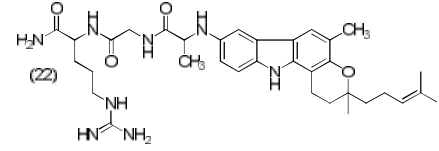
HT29	เซลล์มะเร็งลำไส้
MCF-7	เซลล์มะเร็งเต้านม
HeLa	เซลล์มะเร็งปากมดลูก
HEK 293	เซลล์ไต (normal cell)

2.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง





2.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ปกติ



2.3 การวิเคราะห์ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของสารประกอบ carbazole alkaloid (Mahanine) peptide conjugate กับคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง สำหรับสารที่เป็นตัวควบคุม (control) หมายถึงเซลล์มะเร็งที่มีการเจริญเติบโตและได้รับอาหารตามปกติ ไม่ได้มีการเติมสารที่เป็นยา หรือสารสังเคราะห์ลงไป

จากผลของการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่า สารประกอบ carbazole alkaloid (Mahanine) peptide conjugate (21) มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ทั้งเซลล์มะเร็งลำไส้, เซลล์มะเร็งเต้านม และเซลล์มะเร็งปากมดลูกมากขึ้น เมื่อความเข้มข้นของสารประกอบ (21) เพิ่มมากขึ้น และเมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพกับเซลล์ปกติ พบว่า สารประกอบ (21) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ปกติได้เช่นกัน ซึ่งอาจมีผลมาจากโครงสร้างของสารประกอบมีหมู่ guanidine มากเกินไป

ในขณะที่สารประกอบ carbazole alkaloid (Mahanine) peptide conjugate (22) มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ทั้งเซลล์มะเร็งลำไส้, เซลล์มะเร็งเต้านม และเซลล์มะเร็งปากมดลูกมากขึ้น เมื่อความเข้มข้นของสารประกอบ (22) เพิ่มมากขึ้น แต่ไม่ทำลายเซลล์ปกติ

สรุปและวิจารณ์ผล

การสังเคราะห์สารประกอบ carbazole alkaloid (Mahanine) peptide conjugate (21) และ (22) สามารถทำได้โดยการสังเคราะห์เปปไทด์โดยตรง โดยใช้เทคนิค Solid Phase Peptide Synthesis ซึ่งเป็นเทคนิคที่ดี ประหยัดเวลาสามารถทำให้สังเคราะห์เปปไทด์ได้ในระยะเวลาสั้น โดยที่ไม่ต้องผ่านกระบวนการทำโครมาโตกราฟี รวมถึงการสังเคราะห์วิธีนี้ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ในปริมาณสูงเพียงพอต่อความต้องการนำไปคอนจูเกตกับ carbazole alkaloid (Mahanine)

เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (anticancer activity) พบว่า carbazole alkaloid (Mahanine) peptide conjugate (21) เป็นสารประกอบที่มีหมู่ guanidine จำนวนมาก ทำให้

โมเลกุลมีความมีขั้วสูง ซึ่งมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง โดยถ้ามีหมู่ guanidine มากเกินไปจะสามารถฆ่าเซลล์ทุกเซลล์ได้ (ทั้งเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ)

ส่วนสารประกอบ carbazole alkaloid (Mahanine) peptide conjugate (22) เป็นสารประกอบที่มีสายเปปไทด์ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน เช่น Arginine, Glycine และ Alanine ตามลำดับ ทำให้โมเลกุลมีความมีขั้วที่พอเหมาะที่จะแพร่ผ่านผนังเซลล์ และมีหมู่ guanidine ภายในโมเลกุลหนึ่งหมู่ ซึ่งเป็นหมู่ที่มีความสำคัญในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง เช่น เซลล์มะเร็งลำไส้, มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งเต้านม โดยไม่ทำลายเซลล์ปกติ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก ศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ สุขสำราญ และรองศาสตราจารย์ บุญเอก ยิ่งยงณรงค์กุล ที่ได้ช่วยให้คำปรึกษา แนะนำ ปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่อย่างยิ่ง รวมถึงสารเคมีที่ได้ใช้ในงานวิจัยในครั้งนี้ ผู้วิจัยตระหนักถึงความตั้งใจจริงในความทุ่มเทของอาจารย์ทั้งสองท่านเป็นอย่างยิ่ง

ขอขอบคุณผู้ทรงคุณวุฒิ ผู้เชี่ยวชาญทุกท่านที่สละเวลาในการตรวจทานแก้ไขในข้อบกพร่อง ตรวจทานความถูกต้องของภาษาของงานวิจัยฉบับนี้

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณคุณตฤณฤกษ์ ฤกษ์ฤกษ์ แต่บิดา มารดา และครอบครัว รวมถึงผู้มีพระคุณทุกท่านที่คอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจจนงานวิจัยในครั้งนี้ได้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

ผู้วิจัยหวังว่า งานวิจัยฉบับนี้จะมีประโยชน์เพื่อช่วยในการพัฒนาปรับปรุงหาโครงสร้างยาที่มีประสิทธิภาพต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Astha, V., Harish, P., Neeta, S. (2011) Andrographolide: A New Plant-Derived Antineoplastic Entity on Horizon. *Evid-Based Compl. Alt*: 1.
- Cancer Facts and Figures. 2016. Special Section: Cancer in Asian Americans, Native Hawaiians, and Pacific Islanders: 25.
- Julie, S. J. (2009) Anti-inflammatory Properties of Curcumin, a Major Constituent of *Curcuma longa*: A Review of Preclinical and Clinical Research. *Altern. Med. Rev.* 14 (2): 141.
- Kaushik, B., Arup, K. B., Rakshamani, T., Suman, K. S., Bikas, C. P., Chandrima, S., Chitra, M. 2014. Mahanine, a novel mitochondrial complex-III inhibitor induces G0/G1 arrest through redox alteration-mediated DNA damage response and regresses glioblastoma multiforme. *Am. J. Cancer Res.* 4 (6): 629.
- Leclerc, S., Garnier, M., Hoessel, R., Markos, D., Bibb, J. A., Snyder, G. L., Greengard, P., Biernati, J., Wui, Y. Z., Mandelkowi, E. M., Eisenbrand, G., Meijer, L. 2001. Indirubins Inhibit Glycogen Synthase Kinase-3b and CDK5/P25, Two Protein Kinases Involved in Abnormal Tau Phosphorylation in Alzheimer's Disease. *J. Biol. Chem.* 276 (1): 251.
- Lin, C. C., Mariotto, A. B., Siegel, R. L., Stein, K. D., Kramer, J. L., Alteri, R., Robbins, A. 2014. Cancer Treatment and Survivorship Statistics, Cancer Treatment and Survivorship Statistics: 252.
- Mohana K. P., Amitava, S., Ravikanth, G., Uma, S. R., Pradeep, T. (2015) Ambient ionization mass spectrometry imaging of rohitukine, a chromone anti-cancer alkaloid, during seed and seedling development in *dysoxylum binectariferum hook.f* (meliaceae). *J. Plant. Physiol. Pathol.* 2 (5): 86.
- Nicolaou, K. C., Nold, A. L., Miburn, R. R., Schindler, C. S., Cole, K. P., Yamaguchi, J. (2007) Total Synthesis of Marinomycins A-C and of Their Monomeric Counterparts Monomarinomycin A and iso Monomarinomycin A. *J. Am. Chem. Soc.* 129 (6): 1760.
- Patel, V., Senderowicz, A. M., Pinto, D., Tadashi, I., Mark, R., Leticia, Q. M., Ensley, J. S., Edward, A., S., Gutkind J. S. (1998) Flavopiridol, a Novel Cyclin-dependent Kinase Inhibitor, Suppresses the Growth of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas by Inducing Apoptosis. *J. Clin. Invest.* 102(9): 1674.
- Thailand Human Papillomavirus and Related Cancers. 2016. ICO Information Centre on HPV and Cancer: 1.