



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การนำส่งยาต้านมะเร็งร่วมกับสารยับยั้ง NF-KB
แนวทางใหม่เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการรักษามะเร็งด้วยเคมี
บำบัด

โดย ดร.มนตรี จาตุรันต์ภิญโญ

มิถุนายน พ.ศ. 2556

สัญญาเลขที่ MRG5480077

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การนำส่งยาต้านมะเร็งร่วมกับสารยับยั้ง NF- κ B
แนวทางใหม่เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการรักษามะเร็งด้วยเคมี
บำบัด

ผู้วิจัย สังกัด

ดร.มนตรี จาตุรันต์ภิญโญ

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

Project Code : MRG5480077

Project Title : Co-delivery of anticancer drug and NF- κ B inhibitor : A novel strategy to improve chemotherapeutic effect for cancer treatment

Investigator : Dr.Montree Jaturanpinyo Faculty of Pharmacy, Mahidol University

E-mail Address : montree.jat@mahidol.ac.th

Project Period : June 15, 2011 – June 14, 2013

NF- κ B is a key signaling pathway in human cancer. Combining a NF- κ B inhibitor and an anticancer drug is an attractive approach for cancer treatment. However, separating the administration of the anticancer drug and NF- κ B inhibitor is uncontrollable in terms of drug distribution and quantity towards the specific site of action. Therefore, co-delivery of these compounds in a particulate carrier system constructed with the identical composition would overcome this obstruction. This study thus aimed to develop liposomes for co-delivery of doxorubicin (DOX) and BAY11-7085 (BAY), an NF- κ B inhibitor. Their physicochemical characteristics were investigated in terms of entrapment efficiency, size, zeta potential, and stability. Liposomes entrapping BAY were prepared with various lipid compositions and drug-to-lipid ratios by using either the thin film (TF) or reverse phase evaporation (REV) method, and subsequently reduced in size by extrusion through a 200 nm membrane. The results demonstrated that the entrapment efficiency of BAY in liposomes prepared by TF was higher than those prepared by REV. Inclusion of cholesterol, reduction of drug-to-lipid ratio, and saturation of lipid chains were found to decrease drug entrapment. The highest entrapment at 60% was achieved in liposomes prepared by TF and constructed with SPC (Phospholipon 90G) at the drug-to-lipid ratio of 1:20. The obtained liposomes were neutral with diameters of 170 nm. This formulation was further loaded with DOX using the pH gradient technique, yielding ultimate co-entrapment efficiency for DOX and BAY at 90% and 40%, respectively. Subsequently, the evaluation of the cytotoxic effect in cancer cell lines, including SK-Hep-1, HepG2 and A549, of the developed formulation was carried out by using an MTT assay. The results revealed that BAY exhibited the strongest inhibitory effect on the cell viability of SK-Hep-1 due to its high level of basal NF- κ B. The combination of the two compounds was found to enhance the cytotoxic effect toward SK-Hep-1. Liposomal formulations entrapping BAY or DOX either administered alone or in a co-delivery manner exhibited similar tendency to free drugs with comparable or more improved efficacy. Consequently, the most potent cytotoxic effect was observed in SK-Hep-1 cells treated with liposomes co-delivering BAY and DOX. In conclusion, these results clearly demonstrate that liposomes co-entrapping BAY and DOX can be successfully prepared. The treatment of model cancer cells with liposomes co-delivering BAY and DOX suggests the feasibility to use them as a novel approach to improve the chemotherapeutic effect.

Keywords: NF- κ B inhibitor, BAY 11-7085, Doxorubicin, Liposome, Co-delivery

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5480077

ชื่อโครงการ : การนำส่งยาต้านมะเร็งร่วมกับสารยับยั้ง NF-KB แนวทางใหม่เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการรักษามะเร็งด้วยเคมีบำบัด

ชื่อนักวิจัย : ดร.มนตรี จาตุรันตภิญโญ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

อีเมล : montree.jat@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 15 มิถุนายน 2554 – 14 มิถุนายน 2556

NF-KB เป็นกลไกสำคัญเกี่ยวกับเกิดมะเร็งในมนุษย์ ดังนั้นการใช้สารยับยั้ง NF-KB ร่วมกับยาต้านมะเร็งชนิดอื่นๆ จึงเป็นแนวทางการรักษามะเร็งที่น่าสนใจ อย่างไรก็ตามการบริหารยาต้านมะเร็งแยกกับสารยับยั้ง NF-KB นั้น ควบคุมได้ยากทั้งในเรื่องของการกระจายยาในร่างกายที่แตกต่างกัน และปริมาณของยาแต่ละชนิดที่ไปสู่บริเวณเป้าหมายที่ต้องการรักษา การบริหารยาร่วมกันในระบบอนุภาคที่ใช้เป็นตัวพาในการนำส่งยาน่าจะเป็นทางออกในการเอาชนะอุปสรรคเหล่านี้ได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาไลโปโซมในการนำส่ง doxorubicin (DOX) ร่วมกับ BAY11-7085 (BAY) ซึ่งเป็นสารยับยั้ง NF-KB ลักษณะทางกายภาพและเคมีของไลโปโซมถูกตรวจสอบในด้านประสิทธิภาพในการกักเก็บยา, ขนาดอนุภาค, ศักย์ซีตา และความคงตัวของอนุภาค ไลโปโซมที่ใช้เก็บกัก BAY ถูกเตรียมขึ้นโดยศึกษาถึงหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้องทั้งส่วนประกอบของไขมันที่ใช้ สัดส่วนของปริมาณยาต่อไขมัน โดยใช้วิธีการเตรียมคือ thin film (TF) หรือ reverse phase evaporation (REV) และลดขนาดด้วย extrusion ผ่านแผ่นกรองขนาด 200 นาโนเมตร ผลการทดลองพบว่าการเตรียมไลโปโซมด้วยวิธี TF มีประสิทธิภาพในการกักเก็บ BAY ในไลโปโซมมากกว่าวิธี REV ตำรับที่ใช้โคเลสเตอรอลเป็นส่วนประกอบ การลดสัดส่วนปริมาณยาต่อไขมัน และการใช้ไขมันอิ่มตัวเป็นส่วนประกอบในการเตรียมล้วนเป็นปัจจัยลดประสิทธิภาพการกักเก็บยาในไลโปโซม จากการเตรียมไลโปโซมด้วยไขมันไม่อิ่มตัว SPC (Phospholipon 90G) ที่สัดส่วนยาต่อไขมัน 1:20 ด้วยวิธี TF ให้ไลโปโซมที่มีประสิทธิภาพการกักเก็บยาสูงสุดคือ 60% ไลโปโซมที่ได้เป็นกลาง มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 170 นาโนเมตร เมื่อนำตำรับนี้มาใช้ในการเก็บกัก DOX ด้วยวิธี pH gradient พบว่าระดับยาทั้งสองชนิดที่สามารถเก็บกักร่วมกันได้ของ DOX และ BAY คือ 90% และ 40% ตามลำดับ จากนั้นไลโปโซมที่เตรียมได้ถูกนำมาศึกษาถึงความเข้ากันได้กับเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด คือ SK-Hep-1, HepG2 และ A549 ด้วยวิธี MTT พบว่า BAY มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการรอดชีวิตของ SK-Hep-1 เนื่องจากลักษณะของ SK-Hep-1 ที่มีระดับ NF-KB พื้นฐานสูง การให้ยาร่วมกันพบว่าเสริมประสิทธิภาพความเป็นพิษต่อเซลล์ SK-Hep-1 ไลโปโซมเก็บกัก BAY และ DOX ทั้งในรูปแบบเดี่ยว และแบบบริหารยาร่วมกันทั้งสองชนิดให้ผลการยับยั้งเซลล์มะเร็งที่มีแนวโน้มเหมือนกับการบริหารยาที่ไม่ได้ถูกเก็บกักในไลโปโซม ด้วยประสิทธิภาพที่เท่าเทียมหรือมากกว่า โดยการบริหารไลโปโซมที่เก็บกัก BAY และ DOX ร่วมกันมีความเป็นพิษต่อเซลล์ SK-Hep-1 มากที่สุด ผลที่ได้จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นได้ชัดเจนว่า การเก็บกัก BAY และ DOX ร่วมกันในไลโปโซม สามารถเตรียมขึ้นได้ และการรักษาเซลล์มะเร็งด้วยการบริหารไลโปโซมที่เก็บกัก BAY ร่วมกับไลโปโซมที่เก็บกัก DOX มีความเป็นไปได้ที่จะใช้เป็นแนวทางใหม่ในการเพิ่มประสิทธิภาพให้แกการรักษาด้วยเคมีบำบัด

คำหลัก: สารยับยั้ง NF-KB, BAY 11-7085, Doxorubicin, ไลโปโซม, การนำส่งร่วม

Contents

Abstract	i
บทคัดย่อ	ii
Contents	iii
Executive summary	iv
Introduction	1
Objective	8
Materials and Methods	9
Results and Discussion	17
Conclusion	59
References	60
Output of Research	66

Executive summary

มะเร็งเป็นโรคในอันดับต้นที่คร่าชีวิตของประชากรทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย แม้ว่าอัตราการตายจากโรคมะเร็งในปัจจุบันจะมีแนวโน้มที่ลดลง เนื่องจากเทคโนโลยีทางการแพทย์ในการรักษา และการพัฒนายาใหม่ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น แต่การรักษาโรคมะเร็งโดยเคมีบำบัดยังมีปัญหาและอุปสรรคมาก เช่น ความเป็นพิษของยาต้านมะเร็งต่อระบบร่างกาย และการดื้อของเซลล์มะเร็งต่อยาที่ใช้รักษา จากรายงานการศึกษาวิจัยพบว่าในเซลล์มะเร็งหลายชนิดมีการระดับทำงานของ NF-KB signaling pathway ที่ผิดปกติ การทำงานของ NF-KB มีผลต่อคุณสมบัติที่สำคัญของเซลล์มะเร็งโดยการกระตุ้นให้เกิดการถอดรหัสพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการเพิ่มจำนวน (Proliferation) การเปลี่ยนแปลงกลไก apoptosis การรุกรานเข้าไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียง และการแพร่กระจายของเซลล์ไปยังบริเวณอื่น และการสร้างเส้นเลือดใหม่บริเวณที่เกิดโรค (angiogenesis) อีกทั้ง NF-KB ยังเป็นกลไกที่สำคัญต่อการดื้อของเซลล์มะเร็งต่อยาต้านมะเร็งที่ใช้รักษา โดยเฉพาะยาต้านมะเร็งในกลุ่ม Vinca alkaloids และ topoisomerase inhibitors เช่น Vincristin Vinblastin SN38 และ Doxorubicin เนื่องจากยาต้านมะเร็งเหล่านี้จะกระตุ้นให้เกิดการทำงานของ NF-KB ส่งผลให้เกิดการถอดรหัสของพันธุกรรมที่เพิ่มความสามารถในการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง และทนต่อยาต้านมะเร็งที่ให้ได้ การยับยั้งการทำงานของ NF-KB ด้วย NF-KB inhibitor ร่วมกับการให้ยาต้านมะเร็งพบว่าส่งผลให้เซลล์มะเร็งตอบสนองต่อยาต้านมะเร็งได้ดีขึ้น ทำให้สามารถลดขนาด และลดผลข้างเคียงจากการรักษาได้ ซึ่งแนวทางการรักษานี้เป็นเป้าหมายใหม่ที่น่าสนใจในการพัฒนาการรักษาโรคมะเร็งให้เกิดประสิทธิผล และเป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วยได้ อย่างไรก็ตามการนำ NF-KB inhibitor มาใช้ร่วมกับยาต้านมะเร็งนั้น อาจจำเป็นต้องพิจารณาถึงความเป็นพิษ และผลต่อเซลล์ปกติอื่นซึ่งอาศัยการทำงานของ NF-KB signaling pathway ในกลไกการทำงานต่าง ๆ เช่นกัน การให้ยาต้านมะเร็งร่วมกับ NF-KB inhibitors เข้าสู่ระบบร่างกายแยกจากกันนั้น ยาแต่ละชนิดมีเภสัชจลนศาสตร์ที่แตกต่างกัน ทำให้ไม่สามารถควบคุมการกระจายตัว และปริมาณยาทั้งสองชนิดในเซลล์เป้าหมายได้ในระดับที่ต้องการได้ ดังนั้นอาจส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติอื่น รวมถึงผลการรักษาที่ไม่มีประสิทธิผล

ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการศึกษา และพัฒนาระบบนำส่งยาที่สามารถนำส่งยาต้านมะเร็ง และ NF-KB inhibitor ร่วมกันเพื่อให้ไปสู่เป้าหมายที่กำหนด โดยสามารถควบคุมได้ทั้งความจำเพาะต่อเป้าหมาย และปริมาณของสารที่ส่งร่วมกันได้ ซึ่งจากการสืบค้นยังไม่พบรายงานการวิจัยในการศึกษาเรื่องดังกล่าว ในการศึกษาที่ใช้ไลโปโซมซึ่งเป็นระบบนำส่งยาที่เป็นที่ยอมรับ และใช้ในการแพทย์ปัจจุบัน เป็นตัวพาเพื่อนำส่งยา Doxorubicin ซึ่งเป็นยาต้านมะเร็งต้นแบบ เนื่องจากเป็นยาต้านมะเร็งที่ใช้อย่างแพร่หลาย ร่วมกับ NF-KB inhibitor คือ BAY 11-7085 เป็นต้นแบบ โดยอ้างอิงจากผลการศึกษาในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงเบื้องต้น ซึ่งให้ผลการฆ่าเซลล์มะเร็งร่วมกับ DOX ได้ดี จากนั้นนำระบบนำส่งยาที่เตรียมได้มาทำการศึกษาศักยภาพในการฆ่าเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ในหลอดทดลอง ซึ่งผลสัมฤทธิ์ และองค์ความรู้ที่ได้ ทางผู้วิจัยคาดหวังว่าจะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาต้นแบบวิธีการรักษาโรคมะเร็งแบบใหม่ ซึ่งสามารถลดผลข้างเคียง และความเป็นพิษของยาต้านมะเร็ง อีกทั้งเสริมฤทธิ์ และเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาได้มากยิ่งขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งจำนวนมากต่อไป

Introduction

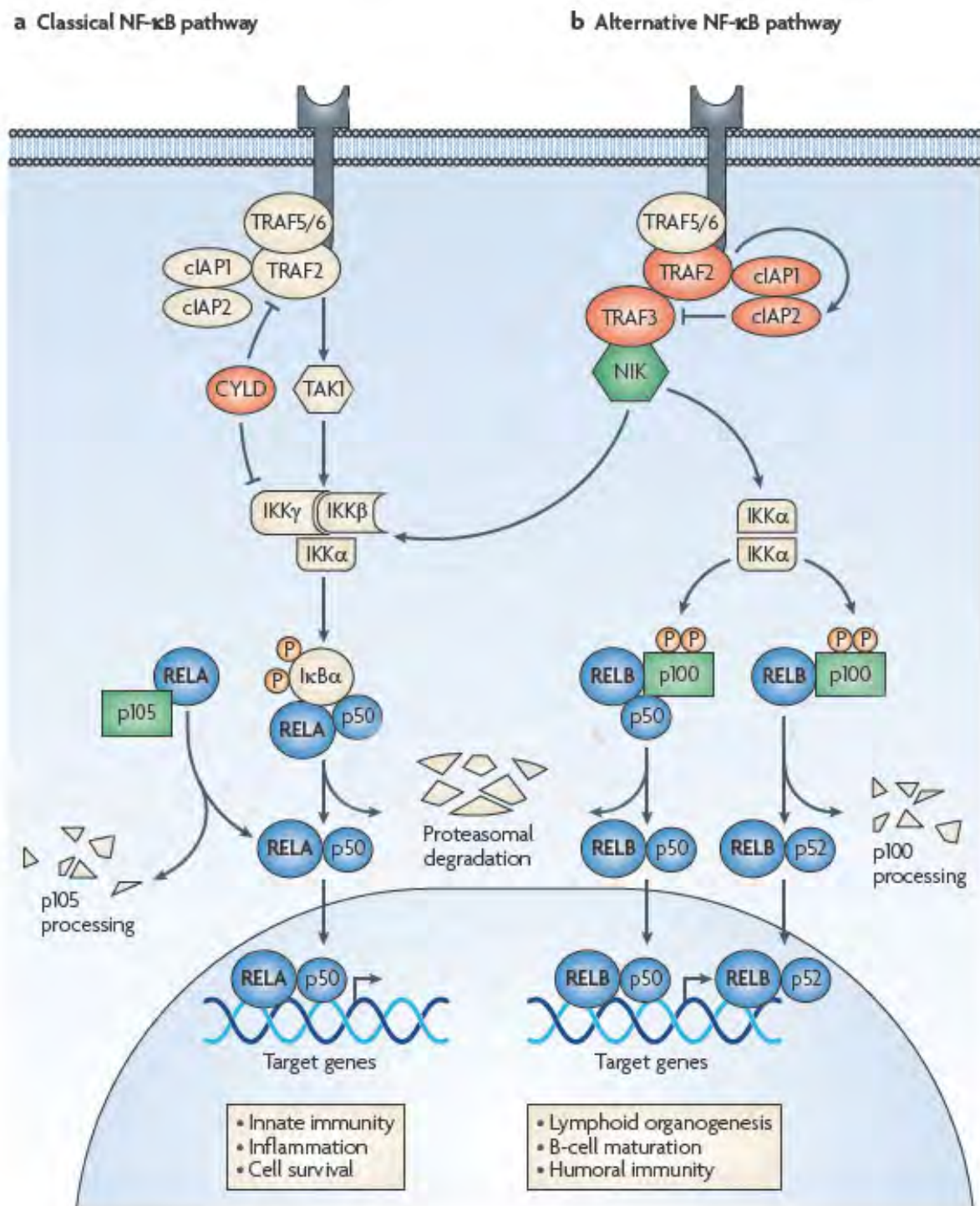
ระหว่างการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ปกติไปเป็นเซลล์มะเร็งนั้น มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติหลายประการภายในเซลล์ เช่น ความสามารถในการเพิ่มจำนวน (proliferation) โดยการเปลี่ยนแปลงกลไก apoptosis การรุกรานเข้าไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียง และการแพร่กระจายของเซลล์ไปยังบริเวณอื่น นอกจากนี้เซลล์มะเร็งยังกระตุ้นให้เกิดการสร้างเส้นเลือดใหม่บริเวณที่เกิดโรค เนื่องจากเซลล์มะเร็งต้องการสารอาหารในการเจริญเติบโตมากกว่าเซลล์ปกติ คุณสมบัติที่เปลี่ยนแปลงไปจากเซลล์ปกตินี้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของ cell signaling pathways ซึ่งควบคุมวงจรชีวิตของเซลล์ โดยหนึ่งใน pathways ที่ในปัจจุบันมีความสำคัญต่อการเกิดโรคคือ NF- κ B (1)

1.1 NF- κ B signaling pathways (2)

NF- κ B เป็น transcription factor ประกอบขึ้นจากกลุ่มของโปรตีน 5 กลุ่ม คือ p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- κ B1) และ p52/p100 (NF- κ B2) โดยกลุ่ม NF- κ B โปรตีน มีคุณสมบัติโครงสร้างโดยรวมที่เกิดจากการเรียงตัวของ amino acids จำนวน 300 ตัว เรียกว่า Rel homology domain (RHD) ซึ่งเป็นส่วนที่มีหน้าที่สำคัญในการเกิด DNA binding การเกิด dimers และการเกิดปฏิสัมพันธ์กับตัวยับยั้งที่เรียกว่า I κ B inhibitory protein ซึ่งในการกระตุ้นให้ NF- κ B โปรตีนทำงานนั้นขึ้นอยู่กับทำให้เกิด phosphorylation ของ I κ B inhibitory proteins (I κ B α และ p100) ผ่านทาง I κ B kinase (IKK) complex การกระตุ้นการทำงานของ NF- κ B สามารถเกิดขึ้นได้ 2 ทาง (รูปที่ 1.1) ทางแรกคือ classical หรือ canonical NF- κ B activation pathway ซึ่งเกี่ยวข้องกับ RelA-p50 dimers โดยในขณะที่ไม่มีการกระตุ้นนั้น จะถูกแยกอยู่ภายใน cytoplasm โดยทำปฏิสัมพันธ์กับตัวยับยั้ง I κ B protein เมื่อมีการกระตุ้นจากตัวกระตุ้นซึ่งมีอยู่หลายชนิดเช่น tumor necrosis factor α (TNF α), interleukin 1 (IL-1), ไวรัส, genotoxic agents หรือ การฉายรังสี I κ B จะเกิดการ phosphorylate ด้วย I κ B kinase (IKK) ส่งผลให้เกิดการ ubiquitylation และ degradation ผ่านทาง proteosome pathway ซึ่ง RelA-p50 จะถูกปลดปล่อยออกมา และเคลื่อนย้ายเข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์ และกระตุ้นให้เกิดการถอดรหัสของพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องต่าง ๆ โดยหน้าที่หลักของ canonical pathway เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของ innate immunity กระบวนการอักเสบ (inflammation) และการยับยั้งการเกิด apoptosis

NF- κ B สามารถถูกกระตุ้นได้อีกทางหนึ่งซึ่งเรียกว่า alternative หรือ non-canonical NF- κ B signaling pathway โดยตัวกระตุ้นที่เฉพาะกว่า pathway แรก โดยตัวกระตุ้นของ non-canonical pathway นี้คือ TNF superfamily, lymphotoxin β และ CD40 ligand การกระตุ้น pathway นี้เกี่ยวข้องกับ NF- κ B -inducing kinase (NIK) ซึ่งจะไปทำให้ IKK α ทำงาน และเกิดการ phosphorylation ของ p100 ซึ่งเป็นตัวยับยั้งของ RelB ส่งผลให้เกิดการสร้าง p52-RelB

dimer ซึ่งจะเคลื่อนย้ายเข้าสู่นิวเคลียส และกระตุ้นให้เกิดการถอดรหัสพันธุกรรมที่จำเป็นต่อ adaptive immunity และการพัฒนาของ secondary lymphoid organ ต่าง ๆ



รูปที่ 1.1 NF-κB signaling pathway (ดัดแปลงจาก (3))

1.2 NF- κ B in cancers

NF- κ B มีผลต่อคุณสมบัติที่สำคัญของเซลล์มะเร็งผ่านการกระตุ้นให้เกิดการถอดรหัสพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับ ความสามารถในการเพิ่มจำนวน (proliferation) การเปลี่ยนแปลงกลไก apoptosis การรุกรานเข้าไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียง และการแพร่กระจายของเซลล์ไปยังบริเวณอื่น และการสร้างเส้นเลือดใหม่บริเวณที่เกิดโรค (angiogenesis) (1) จากการศึกษาในมะเร็งหลายชนิดทั้งแบบ solid tumours และ haematological malignancies ดังแสดงในตารางที่ 1.1 พบว่า NF- κ B มีระดับการทำงานอย่างผิดปกติ

ตารางที่ 1.1 โรคมะเร็งที่เกี่ยวข้องกับ NF- κ B signaling pathway (3)

Haematological malignancies	Solid tumours	
- Multiple myeloma	-Breast cancer	-Ovarian cancer
- Mantle cell lymphoma	- Cervical cancer	- Melanoma
- Hodgkin's lymphoma	- Prostrate cancer	- Cylindroma
- MALT lymphoma	- Renal cancer	- Squamous cell carcinoma
- Diffuse large B-cell lymphoma	- Lung cancer	- Oral carcinoma
- myeodysplastic syndrome	- Colon cancer	- Endometrial carcinoma
- Adult T-cell leukemia (HTLV-1)	- Liver cancer	- Retinoblastoma
- Acute lymphocytic leukemia	- Pancreatic cancer	-Astrocytoma/Glioblastoma
- Chronic lymphocytic leukemia	- Oesophageal cancer	
- Chronic myeloid leukemia	- Gastric cancer	

ตัวอย่างเช่น Familial cylindromatosis ซึ่งเป็นมะเร็งชนิดเนื้องอกที่ไม่ร้ายแรงพบว่าเกิดขึ้นจากการหยุดการทำงานของ *CYLD* gene ซึ่งเป็นตัวควบคุมการทำงานของ NF- κ B ทำให้ระดับการทำงานของ NF- κ B เพิ่มขึ้น (4) ใน Diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) ซึ่งเป็นมะเร็งชนิด non-Hodgkin's lymphoma พบว่าเมื่อมีการทำงานที่ผิดปกติของ *CARD11* gene ซึ่งจำเป็นสำหรับการทำงานของ B-cell เมื่อถูกกระตุ้นด้วย antigen จะทำให้ระดับการทำงานของ NF- κ B เพิ่มขึ้นส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกลไกการอยู่รอดของ B-cell ทำให้เกิดการพัฒนามาเป็น B-cell ที่ผิดปกติ (5) ในการศึกษาในหนูทดลองพบว่าการเชื่อมโยงระหว่างการทำงานของ NF- κ B และการเกิดและการพัฒนาของเซลล์มะเร็ง จากการทดลองใน *Mdr2*-knockout mice ซึ่งเป็นโมเดลหนูทดลองที่สามารถเกิดการพัฒนาภาวะการอักเสบที่เรียกว่า cholestatic hepatitis ซึ่งต่อมาสามารถพัฒนาเป็น hepatocellular carcinoma ได้ พบว่าการพัฒนาเป็นเซลล์มะเร็งนี้เกี่ยวข้องกับ NF- κ B (6) นอกจากนี้ในโมเดลหนูทดลองที่เกิด colitis-associated colon cancer นั้นเมื่อทำการหยุดการทำงานของ *IKK α* พบว่าสามารถลดการเกิดการพัฒนาของเซลล์มะเร็งได้ (7)

1.3 NF- κ B and cancer therapies

การเปลี่ยนแปลงกลไก apoptosis ในเซลล์มะเร็งมีความเชื่อมโยงกับการทำงานของ antiapoptosis factors เช่น Bcl-2 หรือ Bcl-xL หรือการหยุดการทำงานของ proapoptosis factors เช่น Foxo3a หรือ p53 ซึ่งการทำงานของ NF- κ B พบว่าเกี่ยวข้องโดยตรงกับกลไกเหล่านี้ ตัวอย่างเช่น Bcl-2 และ Bcl-xL สามารถถูกกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกโดย NF- κ B ในมะเร็งหลายชนิด (8-10) นอกจากนี้ในการทดลองในเซลล์มะเร็งเต้านมพบว่าการเพิ่มการทำงานของ IKK α สามารถลดการเกิด apoptosis ได้โดยการเกิดกลไก phosphorylation และการเสื่อมสลายของ Foxo3a (11) จากรายงานการวิจัยพบประเด็นที่น่าสนใจว่าการรักษาด้วยวิธีทางเคมี และฉายรังสี ซึ่งอาศัยกลไกหลักในการชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิด apoptosis นั้นกระตุ้นให้ NF- κ B ทำงานมากขึ้น ซึ่งเมื่อรวมกับระดับทำงานของ NF- κ B ในเซลล์มะเร็งที่ผิดปกติอยู่แล้ว ส่งผลให้เกิดการยับยั้งกลไก apoptosis และทำให้เซลล์มะเร็งดื้อต่อยาที่ใช้รักษา เมื่อทำการศึกษาโดยยับยั้งการทำงานของ NF- κ B ในเซลล์มะเร็งพบว่าสามารถทำให้เซลล์มะเร็งตอบสนองต่อการรักษาได้ดีขึ้น (3, 12)

ปัจจุบันได้มีการพัฒนายาต้านมะเร็งที่มีประสิทธิภาพในการรักษา แต่พบว่ายาต้านมะเร็งหลายชนิด มีผลในการกระตุ้นการทำงานของ NF- κ B ด้วยกลไกต่าง ๆ กัน โดยเฉพาะยาในกลุ่ม vinca alkaloids และ topoisomerase inhibitors เช่น vincristin vinblastin SN38 และ Doxorubicin เป็นต้น ตัวอย่างเช่น Doxorubicin ซึ่งเป็นยาต้านมะเร็งในกลุ่ม topoisomerase II inhibitor ที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย และถูกพัฒนาให้อยู่ในระบบนำส่งยา liposome เพื่อลดความเป็นพิษลงนั้น จากผลการทดลองในเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น human lung adenocarcinoma, HeLa cells และ multiple myeloma cells พบว่า Doxorubicin มีส่วนส่งเสริมให้เกิด proliferation และเพิ่มอัตราการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งผ่านทางกระตุ้นให้ NF- κ B pathway ทำงาน (13-15) นอกจากนี้จากรายงานในผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมพบว่าผู้ป่วยที่มีระดับการทำงานของ NF- κ B ที่สูง จะดื้อต่อการรักษาด้วย Doxorubicin มากกว่าผู้ป่วยที่มีระดับการทำงานของ NF- κ B ปกติ (16) จากการศึกษาวิจัยพบว่า doxorubicin ที่ออกฤทธิ์โดยทำให้ DNA ของเซลล์เป้าหมายเสียหาย จะกระตุ้นให้ NF- κ B ทำงานโดยผ่านทาง IKK complex ทำให้เกิด phosphorylation และ degradation ของ IKK α (14, 17-19) ยาต้านมะเร็งในกลุ่ม microtubule-disrupting agents เช่น paclitaxel ก็มีผลในการกระตุ้นการทำงานของ NF- κ B เช่นกัน ซึ่งในการทดลองใน solid tumours พบว่ายาจะทำให้เกิดการ down-regulate ของ IKK α ส่งผลให้เพิ่มการทำงานของ NF- κ B (20) และจากการทดลองใน MIA-PaCa-2 human pancreatic cancer cell line พบว่า paclitaxel กระตุ้นให้มีการแสดงออกของ antiapoptosis factors, Bcl-2 ซึ่งถูกควบคุมโดย NF- κ B (21) cisplatin ซึ่งเป็นยาต้านมะเร็งในกลุ่ม platinum compounds เป็นยาอีกชนิดหนึ่งที่พบว่ากระตุ้นการทำงานของ NF- κ B ส่งผลให้เซลล์มะเร็งดื้อต่อการรักษา (22, 23) ซึ่งยาต้านมะเร็งที่มีผลในการกระตุ้นการทำงานของ NF- κ B โดยกลไกต่าง ๆ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.2 ยาต้านมะเร็งที่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการทำงานของ NF- κ B (24)

Anticancer drugs	Possible mechanism	Shown in
Irinotecan and SN38	Mobilization and stimulation of the IKK complex, which does not require synthesis of a protein intermediate	HeLa cells, colon cancer cells*, MCF-7 breast cancer cells, HT1080 human fibrosarcoma cells
Daunorubicin, doxorubicin, vinblastine, vincristine	The phosphorylation and degradation of I κ B, through the increased activity of protein kinase C	A549 human lung adenocarcinoma cells
Irinotecan, SN38, daunorubicin, etoposide, actinomycin D	DNA double-strand breaks are necessary for increased NF- κ B activation and this is independent of protein synthesis	ACH-2 cells and CEM T leukaemia cell lines
Daunorubicin	NF- κ B activation was demonstrated but the mechanism was not described.	HT1080 human fibrosarcoma cells
Doxorubicin	Mobilization and stimulation of the IKK complex, which does not require synthesis of a protein intermediate	HeLa cells
Doxorubicin	IKK independent I κ B α degradation that requires the proteasome; phosphorylation of serine 32 and serine 36 is not essential for doxorubicin-induced I κ B α degradation	<i>Ikk1/Ikk2</i> ^{-/-} mouse embryonic fibroblasts
Etoposide	Increase in the DNA-binding activity of NF- κ B	BxPC-3, PT45-P1, Capan-1 and A818-4 human pancreatic cancer cells [†]
Cisplatin	MEKK1-mediated JUN activation leading to NF- κ B activation	293T human embryonic kidney fibroblast cells
Vinblastine	Increases the degradation of I κ B α	HBL100 normal human epithelial mammary cells, HeLa S3 cells
Vinblastine, vincristine	The phosphorylation and degradation of I κ B through the increased activity of protein kinase C	A549 human lung adenocarcinoma cells
Paclitaxel, gemcitabine	Stimulated the activation of NF- κ B and increased its activation of the <i>BCL2</i> promoter; this response was blocked by inhibition of the AKT signalling pathway	MIA-PaCa-2 human pancreatic cancer cells
Gemcitabine	Inducing p65 nuclear translocation and enhancing the DNA binding of NF- κ B	A549 and H157 non-small-cell lung cancer cells
Suberoylanilide hydroxamic acid	Inducing p65 nuclear translocation and enhancing the transactivation potential of p65	A549, H157, H358, H460, H1299 non-small-cell lung cancer cells
Sodium butyrate and trichostatin A	Not through mechanisms involving I κ B α degradation, RELA nuclear translocation, or DNA binding; through mechanisms involving AKT-dependent phosphorylation of p300, recruitment of p300 to chromatin, and modulation of the transactivation potential of p300 co-activator complex	H157, H358 and A549 human non-small-cell lung cancer cells
Sodium butyrate and trichostatin A	Prolongation of TNF-induced IKK complex activity	HeLa cells
Sodium butyrate and suberoylanilide hydroxamic acid	The delayed reappearance of cytoplasmic I κ B α ; increased DNA-binding activity of NF- κ B	U937 human leukaemia cells

1.4 NF- κ B inhibitor in cancer therapies

จากหลักฐานงานวิจัยมากมายที่แสดงให้เห็นถึงบทบาทที่สำคัญของ NF- κ B pathway ที่เกี่ยวเนื่องกับเซลล์มะเร็งในการพัฒนา และอยู่รอด รวมถึงกลไกที่ทำให้เซลล์มะเร็งต่อต้านการรักษา การพัฒนาสาร NF- κ B inhibitor จึงเป็นเป้าหมายใหม่ที่น่าสนใจในการพัฒนาเพื่อเป็นแนวทางในการรักษาโรคมะเร็งให้เกิดประสิทธิผล อย่างไรก็ตามการยับยั้งการทำงานของ NF- κ B อย่างเดียวไม่เพียงพอที่จะให้ผลการรักษาที่มีประสิทธิภาพ ดังนั้นการศึกษาที่ผ่านมาจำนวนมากจึงมุ่งให้ความสำคัญในการใช้ NF- κ B inhibitor ร่วมกับการรักษาด้วยการใช้ยาต้านมะเร็ง ซึ่งมีเหตุผลอยู่บนพื้นฐานที่ว่า ในเซลล์มะเร็งมักมีการระดับการทำงานของ NF- κ B ผิดปกติ อีกทั้งยาต้านมะเร็งหลายชนิดกระตุ้นให้เกิดการทำงานของ NF- κ B เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เซลล์มะเร็งสามารถอยู่รอด และต่อต้านการรักษาด้วยยาต้านมะเร็ง ดังนั้นการให้ NF- κ B inhibitor จึงส่งผลดีที่ทำให้เซลล์มะเร็งตอบสนองต่อยาต้านมะเร็งได้ดีขึ้น ทำให้สามารถลดขนาดของยาต้านมะเร็ง และลดผลข้างเคียงจากการใช้ยาได้ (24)

จนถึงปัจจุบันได้มีการค้นพบสารต่าง ๆ มากถึง 700 ชนิด (25) ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง NF- κ B สารที่ออกฤทธิ์นี้มีทั้งสารธรรมชาติ เช่น curcumin, caffeic acid phenethyl ester (CAPE), resveratrol, genistein สารสังเคราะห์ เช่น Bay 11-7082, Bay 11-7085, PS-341 (Bortezomib) สารจำพวก cell permeable peptide เช่น SN-50 สารที่เป็น gene therapy เช่น I κ B α -suppressor repressor และ NF- κ B decoy oligodeoxynucleotide (ODN) (24, 26, 27) โดย NF- κ B inhibitors เหล่านี้มีกลไกการออกฤทธิ์ที่ขั้นตอนต่าง ๆ กันของ NF- κ B pathway เช่น I κ B phosphorylation inhibitors (Bay 11-7082, Bay 11-7085), proteasome inhibitors (PS-341), nuclear translocation inhibitors (SN-50) และ DNA binding inhibitors (ODN) โดยสารที่มีฤทธิ์อาจออกฤทธิ์ยับยั้งที่ขั้นตอนใดของ NF- κ B pathway มากกว่าหนึ่งขั้นตอน (24, 27)

NF- κ B inhibitors ที่ถูกค้นพบเหล่านี้ได้รับความสนใจ และถูกทดลองในการใช้เป็นยาต้านมะเร็ง และใช้ร่วมกับยาต้านมะเร็งหลายชนิด ซึ่ง NF- κ B inhibitors ที่ออกฤทธิ์โดยการยับยั้ง IKK/I κ B phosphorylation เป็นสารออกฤทธิ์ในกลุ่มที่ได้รับความสนใจมากที่สุด เนื่องจาก IKK/I κ B phosphorylation เป็นกลไกหลักที่สำคัญ และมีความจำเพาะต่อ NF- κ B signaling pathways มากกว่ายาในกลุ่ม proteasome inhibitors ซึ่งอาจออกฤทธิ์รบกวนต่อการสร้าง และสลายของโปรตีนที่สำคัญในร่างกาย (28, 29) Bay 11-7082 และ Bay 11-7085 เป็นตัวอย่าง NF- κ B inhibitors ที่มีผลยับยั้งต่อ IKK/I κ B phosphorylation ที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก จากรายงานการวิจัยพบว่า Bay 11-7082 และ Bay 11-7085 สามารถชักนำให้เกิดการ apoptosis ขึ้นได้ในเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น colon cancer cells (30), T-cell leukemia (31, 32), human B-lymphoma (33) เป็นต้น นอกจากนี้การใช้ Bay 11-7082 และ Bay 11-7085 ร่วมกับยาต้านมะเร็งชนิดอื่น เช่น cisplatin (34), paclitaxel (35, 36), doxorubicin (37) สามารถเพิ่มการตอบสนองของเซลล์มะเร็งต่อยาต้านมะเร็งได้เป็นอย่างดี

ถึงแม้ว่าจากการวิจัยจำนวนมากที่รายงานถึงผล และประโยชน์ของ NF- κ B inhibitor ที่สามารถกระตุ้นการตอบสนองต่อการรักษาเมื่อให้ร่วมกับยาต้านมะเร็งหลายชนิดต่อเซลล์มะเร็งต่าง ๆ อย่างไรก็ตามการนำ NF- κ B inhibitor มาใช้ร่วมกับยาต้านมะเร็งเพื่อเพิ่มการตอบสนองต่อการรักษานั้น อาจจำเป็นต้องพิจารณาถึงความเป็นพิษ และผลต่อเซลล์ปกติอื่นซึ่งอาศัยการทำงานของ NF- κ B signaling pathway ในกลไกการทำงานต่าง ๆ เช่นกัน ซึ่งในการให้ยาต้านมะเร็งร่วมกับ NF- κ B inhibitors เข้าสู่ระบบร่างกายนั้น สารแต่ละชนิดจะมีการกระจายตัวภายในร่างกายแตกต่างกัน ขึ้นกับคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของสารนั้น ๆ ดังนั้น NF- κ B inhibitors ที่ให้เข้าสู่ร่างกายอาจไม่สามารถไปสู่เป้าหมายที่เกิดโรคพร้อมกับยาต้านมะเร็งได้ รวมถึงปริมาณของสารที่ออกฤทธิ์ ณ บริเวณที่เกิดโรคก็ไม่สามารถควบคุมได้ ซึ่งในการแก้ปัญหาดังกล่าวจำเป็นต้องออกแบบระบบนำส่งยาที่สามารถนำส่งตัวยาทั้งสองร่วมกันเพื่อให้ไปสู่เป้าหมายที่กำหนด โดยสามารถควบคุมได้ทั้งความจำเพาะต่อเป้าหมาย และปริมาณของสารที่ส่งร่วมกันได้

Objective

1. เพื่อศึกษาพัฒนากระบวนการเก็บกักสาร Doxorubicin และ NF-kB inhibitor ร่วมกันในไลโปโซม รวมถึงคุณสมบัติทางกายภาพของไลโปโซมที่เตรียมได้
2. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการฆ่าเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ในหลอดทดลองของไลโปโซมที่เก็บกักยา Doxorubicin และ NF-kB inhibitor เปรียบเทียบกับยารูปแบบเดี่ยว

Materials and Methods

3.1 สารเคมี

- 3.1.1 Acetonitrile, HPLC grade (RCI Labscan, Thailand)
- 3.1.2 Ammonia 25% (Sigma-Aldrich[®], USA)
- 3.1.3 Chloroform (RCI Labscan, Thailand)
- 3.1.4 Dichloromethane (DCM) (RCI Labscan, Thailand)
- 3.1.5 Formic acid (Sigma-Aldrich[®], USA)
- 3.1.6 Methanol, HPLC grade (RCI Labscan, Thailand)
- 3.1.7 Citric acid (Ajax[®] Finechem, New Zealand)
- 3.1.8 Sodium citrate (Ajax[®] Finechem, New Zealand)
- 3.1.9 Sodium hydroxide (Ajax[®] Finechem, New Zealand)
- 3.1.10 *N*-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfonate (HEPES) (Sigma-Aldrich[®], USA)
- 3.1.11 Cholesterol (CHOL) (Sigma-Aldrich[®], USA)
- 3.1.12 Hydrogenated Phosphatidylcholine (HPC) (Phospholipon[®] 90H, Phospholipids GmbH, Germany, Germany)
- 3.1.13 Soybean Phosphatidylcholine (SPC) (Phospholipon[®] 90G, Phospholipids GmbH, Germany, Germany)
- 3.1.14 BAY11-7085 (BAY) (Enzo Life Science, USA)
- 3.1.15 Doxorubicin HCl (DOX) (Masu, Korea)
- 3.1.16 RPMI 1640 media (Gibco[™], USA)
- 3.1.17 Fetal bovine serum (FBS) (Gibco[™], USA)
- 3.1.18 Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7.4 (10x) (Gibco[™], USA)
- 3.1.19 Trypsin EDTA 10x (Sigma-Aldrich[®], USA)
- 3.1.20 Trypan Blue (Sigma-Aldrich[®], USA)
- 3.1.21 Penicillin-streptomycin (Gibco[™], USA)
- 3.1.22 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich[®], USA)
- 3.1.23 Dimethyl sulfoxide (DMSO) cell culture grade (Sigma-Aldrich[®], USA)
- 3.1.24 Dimethyl sulfoxide (DMSO) AR grade (RCI Labscan, Thailand)
- 3.1.25 Sterile water for irrigation (SWI) (Thai Otsuka Co. Ltd., Thailand)

- 3.1.26 Sephadex G-25 medium (GE Healthcare Bio-Science, Sweden)
- 3.1.27 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate (Dil dye) (InvitrogenTM, USA)

3.2 เครื่องมือ และอุปกรณ์

- 3.2.1 Rotary Evaporator (Eyela[®] N-1000 series Model A3S, Japan)
- 3.2.2 Lipid Extruder (LIPEX[®] extruder, Northern Lipid, Canada)
- 3.2.3 Polycarbonate membrane (Cyclopore[®] Whatman Track Etched Membrane 25 mm with pore size of 0.2 μ m, USA)
- 3.2.4 Ultracentrifuge (Beckman, Optimax XP, USA)
- 3.2.5 Zetasizer (Malvern[®] instrument Nano ZS series, UK)
- 3.2.6 HPLC (Agilent Technologies 1200 Series, USA)
- 3.2.7 HPLC C₁₈ reversed column (Advanced Chromatography Technology ACE 5 μ m C18-AR 250 mm x 4.6 mm, Scotland)
- 3.2.8 UV/VIS spectrophotometer (Perkin ElmerTM Lambda 35, USA)
- 3.2.9 CO₂ Incubator (Heraeus[®] BB15, Germany)
- 3.2.10 Multi well-plate reader (FLUOstar[®] OPTIMA, USA)
- 3.2.11 Transmission Electron Microscope (TEM) (FEI[®] TECNAI T20 G², Netherland)
- 3.2.12 Ultrasonic bath (Branson[®] Model B-12 Branson Cleaning Equipment, USA)
- 3.2.13 Microplate shaker (FINEPCR[®] Model Mx2, Korea)
- 3.2.14 pH meter (Mettler Toledo5 Easy, USA)
- 3.2.15 Incubator (Mettmert Beschikung/Loading-Modell 100-800, Germany)
- 3.2.16 Centrifuge universal 30 RF (Hettich, Germany)
- 3.2.17 IX81 motorized inverted microscope (Olympus, USA)

3.3 เซลล์มะเร็ง

เซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการทดลองได้รับความอนุเคราะห์จาก Laboratory of Biochemistry, Chulabhorn Research Institute ได้แก่

- 3.3.1 SK-Hep- 1 (Hepatocellular carcinoma)
- 3.3.2 HepG2 (Hepatocellular carcinoma)
- 3.3.3 A549 (Lung cancer)

3.4 วิธีทดลอง

3.4.1 การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์เชิงปริมาณของ Doxorubicin และ BAY 11-7085

วิธีการวิเคราะห์เชิงปริมาณของ Doxorubicin (DOX) และ BAY 11-7085 (BAY) สามารถทำการวิเคราะห์ร่วมกันได้โดยใช้เทคนิค HPLC (Agilent 1200 series, Agilent Technologies, USA) ที่ประกอบด้วย Photo diode array detector และ reversed phase C18 HPLC column (250 x 4.6 mm id., 5 μ m, ACE[®] HPLC, UK) และใช้ mobile phase ประกอบด้วย methanol 60% v/v และน้ำ 40% v/v ที่มีส่วนผสมของ formic acid 0.1% v/v และ ammonia 0.1% v/v โดยใช้ flow rate ที่ 1 mL/min อุณหภูมิ 35 °C โดยตรวจวัดปริมาณ BAY 11-7085 และ Doxorubicin ที่ความยาวคลื่น 254 nm และ 480 nm ตามลำดับ และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ในหัวข้อ linearity, specificity, precision และ accuracy

3.4.3 การเตรียมไลโปโซมเพื่อกัก Doxorubicin และ BAY11-7085 ร่วมกัน

การทดลองนี้มุ่งเน้นเพื่อศึกษาการกัก DOX และ BAY ในไลโปโซมทั้งแบบร่วมกัน และแบบยาเดี่ยว เนื่องจากคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของตัวยา BAY ถูกกักเข้าสู่ไลโปโซมก่อนด้วยวิธี Thin film หรือ reverse phase evaporation (REV) ต่อจากนั้น DOX จะถูกกักเข้าสู่ไลโปโซมด้วยวิธี pH gradient ต่อไป

3.4.3.1 การเตรียมไลโปโซมที่กัก BAY ในรูปแบบเดี่ยว

ปัจจัยซึ่งส่งผลต่อการกัก BAY ในไลโปโซมได้แก่ วิธีการเตรียม ชนิดไขมัน อัตราส่วนยาต่อไขมัน และ คอเลสเตอรอล (Cholesterol, CHOL) ถูกทำการศึกษาในเบื้องต้น ซึ่งในการทดลองนี้ได้ใช้วิธีการกัก 2 วิธีได้แก่ thin film method (TF) และ reverse phase evaporation (REV) โดยสูตรตำรับที่ใช้เพื่อเตรียมไลโปโซมในการกัก BAY แสดงไว้ในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สูตรตำรับที่ใช้เพื่อเตรียมไลโปโซมในการเก็บกัก BAY

Sample Type	Method	Drug : Lipid Mole ratio (mM)	PC : CHOL Mole ratio
SPC	Thin film	1:10	10 : 0
		1:20	10 : 0
		1:20	7 : 3
	REV	1:10	10 : 0
		1:20	10 : 0
		1:20	7 : 3
HPC	Thin film	1:20	10 : 0
	REV	1:20	10 : 0

1) Thin film method (TF)

การเตรียมไลโปโซมที่เก็บกัก BAY ด้วยวิธี conventional thin film method มีขั้นตอนดังนี้ เริ่มต้นโดยละลายส่วนประกอบไขมันที่ประกอบด้วย phospholipids (Phospholipon 90G หรือ 90H, Phospholipids GmbH, Germany) และ CHOL (Sigma-Aldrich, USA) ที่มีปริมาณรวม 20 mmol ร่วมกับ BAY ในตัวทำละลายอินทรีย์ chloroform : methanol (อัตราส่วน 2:1 v/v) บรรจุใน round bottom flask ขนาด 250 mL แล้วนำมาระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกโดยใช้ rotary evaporator เพื่อให้เกิดเป็นฟิล์มบางภายใน round bottom flask จากนั้นเติม citrate buffer 300 mM pH 4.0 ปริมาตร 2mL เขย่าจนเกิดเป็นอนุภาคไลโปโซม โดยควบคุมอุณหภูมิให้อยู่สูงกว่า phase transition temperature ของ phospholipids ที่ใช้ (Phospholipon 90G, SPC เตรียมที่อุณหภูมิห้อง ส่วน Phospholipon 90H, HPC เตรียมที่อุณหภูมิ 60 °C) ต่อมานำไลโปโซมที่เตรียมได้มาลดขนาดอนุภาคลงโดยการ extrude ผ่าน polycarbonate membrane รูเปิดขนาด 200 nm (Cyclopore®, Whatman, UK) โดยใช้เครื่อง lipid extruder (Northern Lipid, Canada) ดังแสดงในรูปที่ 3.1

2) Reverse-phase evaporation method (REV)

ละลาย Phospholipids และ cholesterol ในปริมาณ 20 mmol พร้อมกับ BAY ในตัวทำละลายอินทรีย์ dichloromethane 6 mL และ methanol 0.5 mL ในขวดกั่นกลมขนาด 100 mL จากนั้นเติม citrate buffer 300 mM pH 4.0 ปริมาตร 2 mL ซึ่งทำให้ได้อัตราส่วนระหว่าง

วัตถุดิบทำละลายอินทรีย์ต่อน้ำที่ 3:1 และทำการ sonicate ที่อุณหภูมิ ต่ำกว่า 10 °C เป็นเวลา 10 นาที นำ emulsion ที่เตรียมได้ไประเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกโดยใช้ rotary evaporator โดยตั้งค่าอุณหภูมิที่ 39 °C และความดัน 0.07 MPa จนกระทั่งเกิดการกลับ phase เป็นอนุภาคไลโปโซม ทำการบ่มที่อุณหภูมิสูงกว่า phase transition temperature ของไขมันที่ใช้เตรียม 10 °C ต่อไปเป็นเวลา 30 นาที ต่อมานำไลโปโซมที่เตรียมได้มาลดขนาดอนุภาคลง โดยการ extrude ผ่าน polycarbonate membrane รูเปิดขนาด 200 nm (Cyclopore®, Whatman, UK) โดยใช้เครื่อง lipid extruder (Northern Lipid, Canada)

A)



B)



รูปที่ 3.1 ลักษณะและส่วนประกอบของเครื่อง Lipex extruder

3.4.3.2 การเตรียมไลโปโซมที่เก็บกัก Doxorubicin ในรูปแบบเดี่ยว

การเก็บกัก DOX ในไลโปโซมทำได้โดยวิธี pH gradient เริ่มจากการเตรียมไลโปโซมเปล่า โดยทำการละลาย phospholipids ปริมาณ 20 mmol ในตัวทำละลายอินทรีย์ chloroform : methanol (อัตราส่วน 2:1 v/v) บรรจุใน round bottom flask ขนาด 250 mL แล้วนำมาระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกโดยใช้ rotary evaporator (Eyela, Japan) เพื่อให้เกิดเป็นฟิล์มบางภายใน round bottom flask จากนั้นเติม citrate buffer 300 mM pH 4.0 ปริมาตร 2 mL เขย่าจนเกิดเป็นอนุภาคไลโปโซม โดยควบคุมอุณหภูมิให้อยู่สูงกว่า phase transition temperature ของ phospholipids ที่ใช้ ต่อมานำไลโปโซมที่เตรียมได้มาลดขนาดอนุภาคลงโดยการ extrude ผ่าน polycarbonate membrane รูเปิดขนาด 200 nm (Cyclopore®, Whatman, UK) โดยใช้เครื่อง lipid extruder (Northern Lipid, Canada) นำไลโปโซมที่เตรียมได้ไปทำการเปลี่ยน buffer ภายนอก โดยทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง ultracentrifugation (Optima MAX-XP, Beckman Coulter, Germany) ที่ 50,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที กระจายตัวกลับ pellet ที่ได้ใน HEPES saline buffer solution pH 7.4 ซึ่งมีตัวยา doxorubicin ละลายอยู่ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL บ่มเพาะไลโปโซมที่แขวนตะกอนอยู่ในสารละลายที่อุณหภูมิ 39 °C และ 65 °C สำหรับไลโปโซมที่เตรียมจาก SPC และ HPC ตามลำดับ ทุกระยะเวลาที่กำหนด สุ่มไลโปโซม และนำไปแยก DOX อีสระออกโดยวิธี minicolumn centrifugation

3.4.4 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของอนุภาคไลโปโซม

3.4.4.1 Entrapment efficiency

แยกสารอีสระออกจากไลโปโซมด้วยวิธี minicolumn centrifugation ซึ่งเตรียมจาก Sephadex G-25 ที่ถูกบรรจุลงในหลอดฉีดยาขนาด 3 mL จากนั้นนำสารแขวนตะกอนไลโปโซม 0.5 mL ใส่ลงใน column และทำการปั่นเหวี่ยงที่ 2000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ที่ 25 °C แรงปั่นเหวี่ยงจะทำให้อนุภาคไลโปโซมแยกออกจาก column ในขณะที่สารอีสระถูกเก็บกักอยู่ภายใน column ต่อจากนั้นละลายไลโปโซมที่แยกได้ในสารละลาย methanol และทำการตรวจหาปริมาณยาด้วยวิธี HPLC ต่อไป โดยประสิทธิภาพในการเก็บกัก (EE, entrapment efficiency) สามารถหาได้จากสมการต่อไปนี้

$$\%Entrapment = \left[\frac{\text{Amount of drug in sample}}{\text{Total amount of drugs initially added}} \right] \times 100$$

3.4.4.2 ขนาดและการกระจายขนาดอนุภาค

วัดขนาดและการกระจายของขนาดอนุภาคไลโปโซมที่เตรียมได้ โดยเทคนิค dynamic light scattering ที่มุม 173° ด้วยเครื่อง Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) ที่อุณหภูมิ 25°C โดยทำการวัด 3 ครั้ง

3.4.4.3 Zeta-potential

วัดค่า zeta potential ด้วยวิธีการเคลื่อนที่ของอนุภาคภายใต้สนามไฟฟ้า โดยเครื่อง Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., UK) ที่อุณหภูมิ $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$

3.4.4.4 Transmission electron microscopy (TEM)

ลักษณะของไลโปโซมด้าน lamellarity สามารถตรวจได้ด้วยเทคนิค negative staining transmission electron microscopy ซึ่งสารที่ใช้ย้อมไลโปโซมคือสารละลาย 0.5% (w/v) ของ uranyl acetate (UA)

3.4.5 ความคงสภาพของไลโปโซมซึ่งเก็บกัก BAY และ DOX ร่วมกัน

ความคงสภาพทางเคมีกายภาพของไลโปโซมซึ่งเก็บกัก DOX ร่วมกับ BAY ถูกติดตามระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 30°C เป็นเวลา 3 เดือน โดยความคงตัวทางเคมีของ doxorubin และ BAY 11-7085 ถูกตรวจสอบด้วยวิธี HPLC ตามระยะเวลาที่กำหนด โดยร้อยละปริมาณที่เหลืออยู่ของสารทั้งสอง (%remaining) สามารถคำนวณได้ดังสมการ

3.4.5.1 ความคงสภาพทางกายภาพ

ความคงสภาพทางกายภาพในด้านขนาดและการกระจายขนาดอนุภาค และ zeta-potential ของไลโปโซมถูกตรวจสอบตามระยะเวลาที่กำหนด

3.4.5.2 ความคงสภาพทางเคมี

ความคงตัวทางเคมีของ DOX และ BAY ถูกตรวจสอบด้วยวิธี HPLC ตามระยะเวลาที่กำหนด โดยร้อยละปริมาณที่เหลืออยู่ของสารทั้งสอง (%remaining) สามารถคำนวณได้ดังสมการ

$$\begin{aligned} \%Remaining\ of\ drug \\ = \left[\frac{Amount\ of\ drug\ remaining}{Amount\ of\ drug\ initially\ entrapped} \right] \times 100 \end{aligned}$$

3.4.6 การประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพในหลอดทดลอง

3.4.6.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

เซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงถูกเลี้ยงในขวดชนิด T25 ที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้บรรยากาศที่ประกอบด้วย 5% CO₂ โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงคือ RPMI1640 สำหรับเซลล์ SK-Hep-1 และ A549 หรือ DMEM สำหรับเซลล์ HepG2 ซึ่งเติม antibiotic-antimycotic 1% และ fetal bovine serum 10% โดยหลังการเพาะเลี้ยง 3 วัน ทำการล้างชั้นเซลล์ด้วย phosphate buffered saline (PBS) เมื่อทำการเติม trypsin-EDTA เป็นเวลา 2 min ที่ 37°C เซลล์จะถูกแยกออกจากขวดเพาะเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ตามจำนวนเซลล์ที่กำหนด

3.4.6.2 MTT assay

ฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งของ DOX และ BAY ที่เก็บกักในไลโปโซม สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธี MTT หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งจำนวน 10⁴ cells/well ใน 96-well plates เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์จะถูกทำการบ่มเพาะกับตำรับยาที่กำหนดเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ประเมินจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตหลังจากเติมสาร MTT เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบค่า OD ที่ 550 nm กับเซลล์ที่ไม่ได้รับยา

3.4.7 สถิติ

ผลการทดลองแสดงในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ความแตกต่างทางสถิติของข้อมูลถูกตรวจสอบด้วยวิธี One-way ANOVA with Tukey test's multiple comparisons ค่า p-value น้อยกว่า 0.05 ($p < 0.05$) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

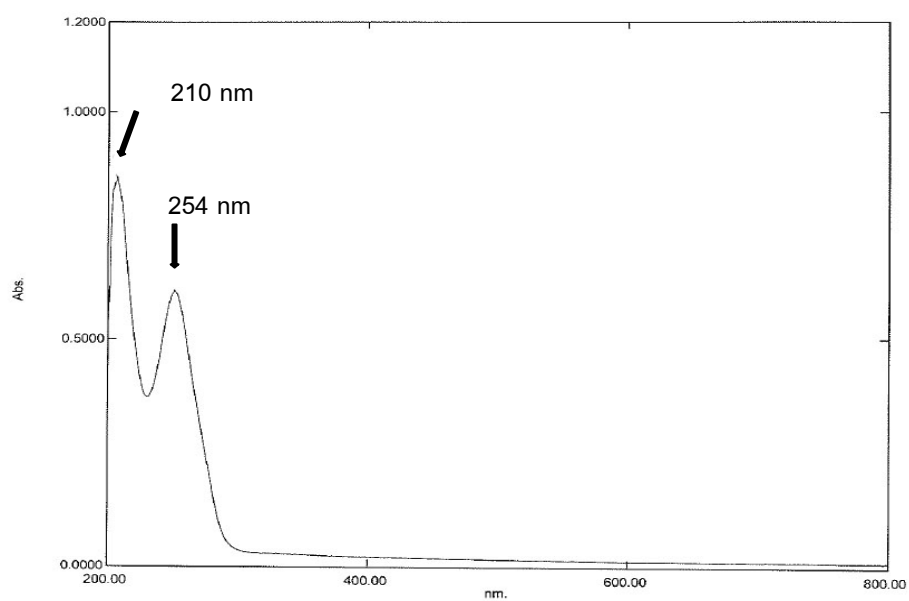
Results and Discussion

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณของ DOX และ BAY

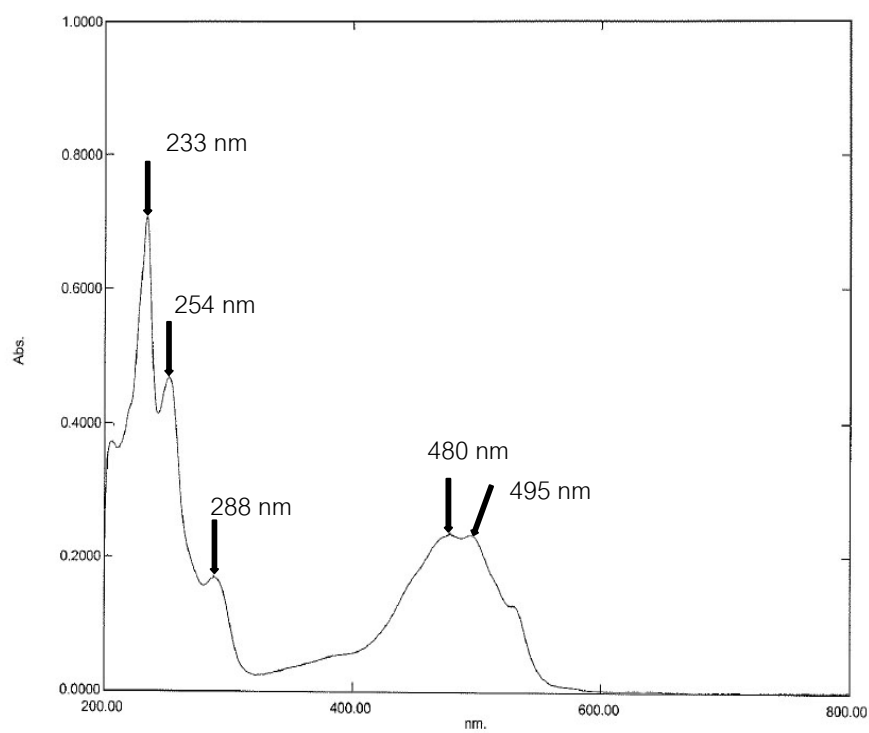
ก่อนการพัฒนาตำรับจำเป็นต้องพัฒนาวิธีการวิเคราะห์เชิงปริมาณของยา เพื่อเป็นประโยชน์ต่อไปในการควบคุมคุณภาพของตำรับที่ได้ทั้งด้าน ปริมาณ ความคงตัว การปลดปล่อยยา เป็นต้น ในการศึกษานี้ได้ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณของ DOX ซึ่งเป็นตัวยาสำคัญในการต้านมะเร็ง และ BAY ซึ่งเป็นสารยับยั้ง NF-kB ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งร่วม การคัดเลือก BAY มาทำการศึกษา เนื่องจากผลการทดลองก่อนเบื้องต้นที่แสดงให้เห็นว่าการให้ยา DOX ร่วมกับ BAY มีแนวโน้มเสริมฤทธิ์ในการต้านมะเร็งได้เป็นอย่างดี ในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง

รูปที่ 4.1 และ 4.2 แสดง UV-VIS absorption profiles ของ BAY and DOX ซึ่ง BAY มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 210 และ 254 nm ส่วน DOX ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 254 และ 480 ซึ่งถึงแม้ว่าสารทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติการดูดกลืนแสงได้ดี แต่การวิเคราะห์ด้วยวิธี UV-VIS spectrophotometry อาจไม่สามารถทำการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารทั้งสองชนิดได้พร้อมกันในกรณีที่ถูกเก็บกับรวมในไลโปโซม เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงนั้นทับซ้อนกัน ดังนั้นวิธี HPLC ซึ่งเป็นวิธีการวิเคราะห์ที่สามารถแยกสารที่มีคุณสมบัติแตกต่างกันได้จากลักษณะทางเคมีกายภาพ จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมกว่าในการพัฒนาเป็นวิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณ โดยจากการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ด้วย HPLC สามารถสรุปสถานะที่ใช้ในการวิเคราะห์ได้ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในรูปที่ 4.3 ซึ่งแสดงลักษณะ chromatogram ของ DOX และ BAY พบว่า DOX ที่สามารถแตกตัวได้ในที่ pH ต่ำนั้น ถูกขับออกจาก HPLC column ก่อน BAY ซึ่งมีความเป็น hydrophobic สูงกว่า ซึ่งจากค่าการดูดกลืนแสงนั้นสามารถระบุสารได้โดยพบว่า DOX ซึ่งมีการดูดกลืนแสงที่ 254 และ 480 nm มีค่า retention time ที่ 11.42 นาที ส่วน BAY ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 254 nm มีค่า retention time ที่ 21.99 นาที ซึ่งลักษณะ chromatogram ของสารทั้งสองชนิดมีลักษณะที่แคบ สมมาตร และแยกกันอย่างชัดเจน ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยวิธี HPLC นี้จึงเหมาะสมในการวิเคราะห์สารผสมทั้งสองชนิดในเวลาพร้อมกันได้ ซึ่งวิธีการวิเคราะห์นี้จะถูกตรวจสอบความถูกต้องต่อไปตาม ICH guideline ในหัวข้อ specificity, linearity, precision และ accuracy ต่อไป (38)



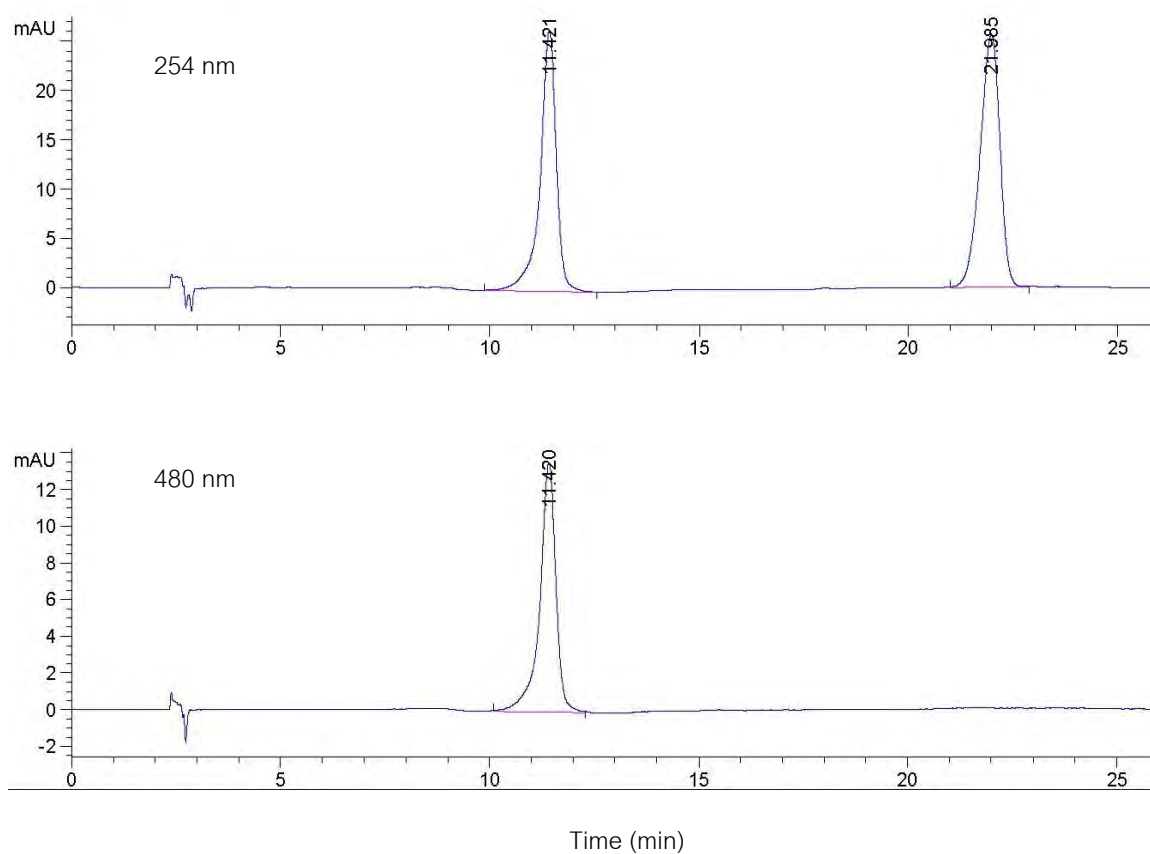
รูปที่ 4.1 UV-VIS Spectrum of BAY



รูปที่ 4.2 UV-VIS Spectrum of doxorubicin

ตารางที่ 4.1 HPLC system สำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณของ DOX และ BAY

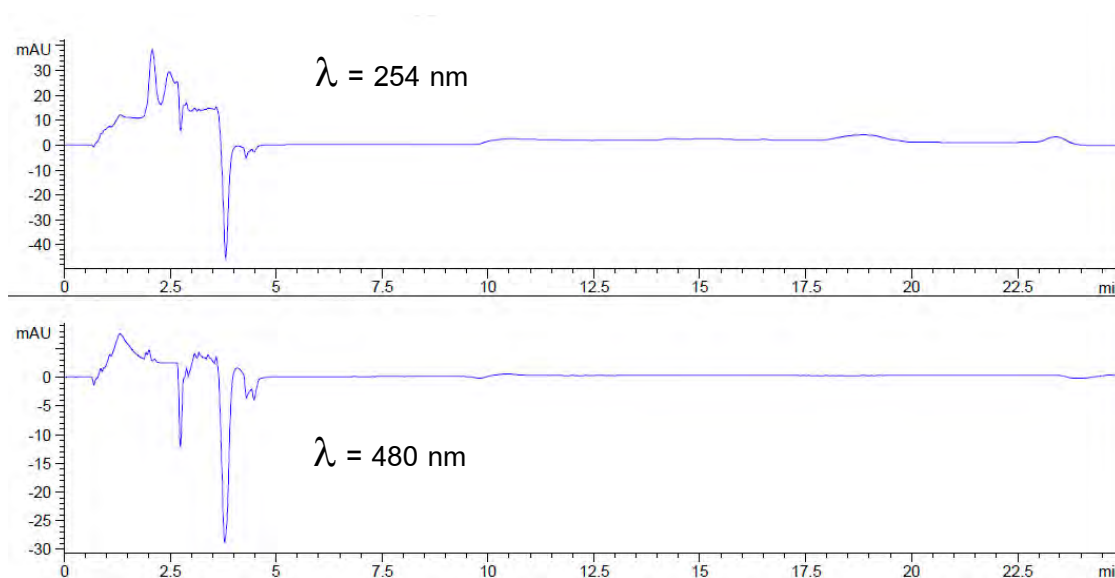
Stationary phase	C18 reverse phase HPLC column (250 x 4.6 mm id., 5 μ m, ACE®)
Mobile phase	0.1% formic acid+0.1% ammonia and methanol in a ratio of 4:6
Flow rate	1 mL/min
Temperature	35 °C
Detector	Diode array at wavelength of 254 and 480 nm



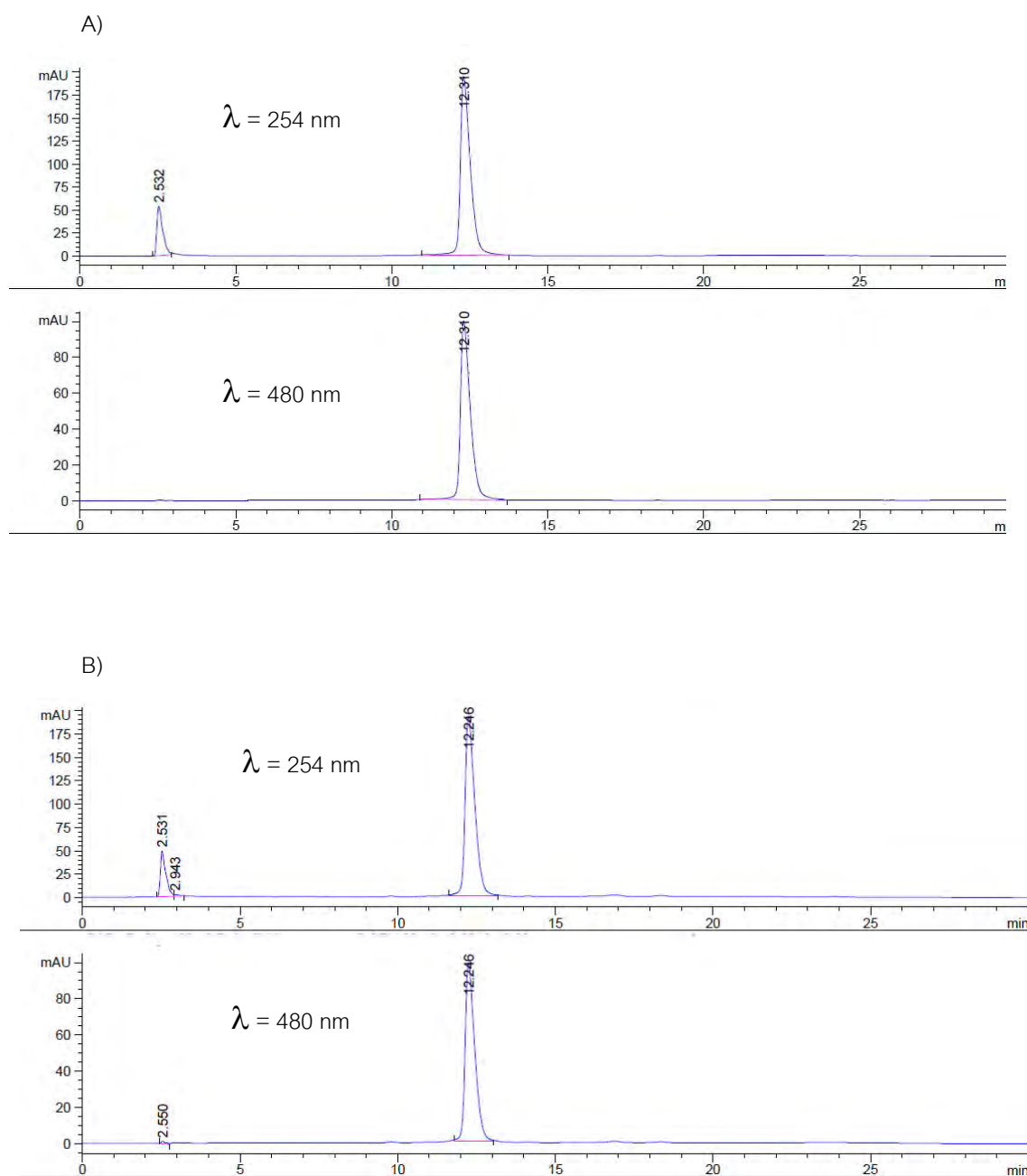
รูปที่ 4.3 HPLC Chromatogram ของ DOX และ BAY

4.1 Specificity

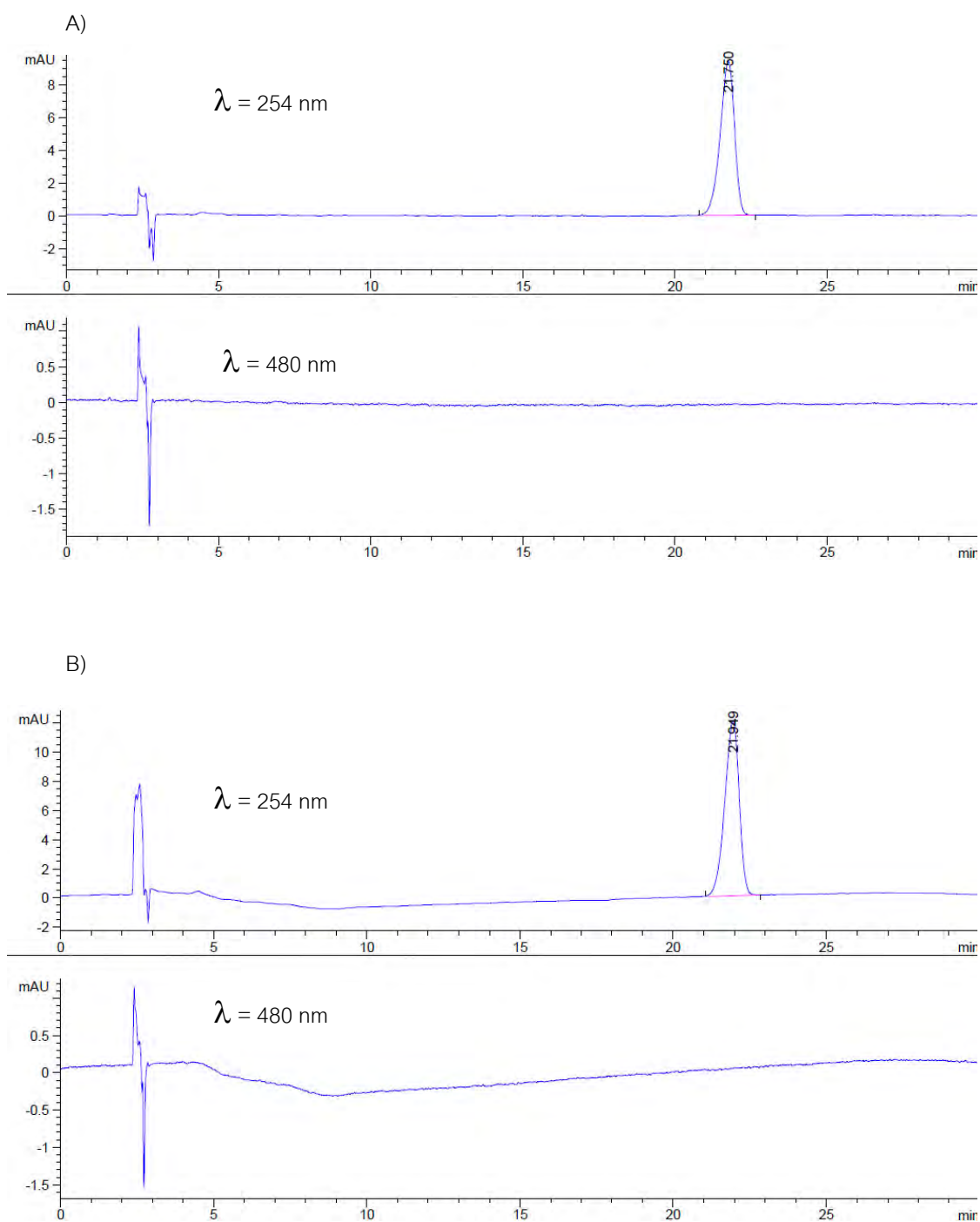
Specificity ของวิธีการวิเคราะห์นั้นแสดงถึงความสามารถในการวิเคราะห์สารที่ต้องการได้อย่างเจาะจง เมื่อมีการผสมกับสารอื่นๆ ในตำรับทั้งส่วนประกอบของตำรับ สารที่เกิดจากการเสียดสีทางเคมี เป็นต้น (38) ในการทดลองนี้ specificity ของวิธีการวิเคราะห์ถูกตรวจสอบโดยการเปรียบเทียบ chromatograms ส่วนผสมไขมันที่ใช้ในตำรับไลโปโซมซึ่งได้แก่ phospholipid และ cholesterol DOX BAY และยาที่ถูกผสมร่วมกับไขมันในตำรับ (รูปที่ 4.4-4.6) จากผลการทดลองพบว่า chromatogram ของสารแต่ละชนิดไม่ได้แสดงถึง peak ที่ซ้อนทับกันกับสารชนิดอื่น นอกจากนี้การแยกวิเคราะห์ด้วยยา DOX และ BAY โดยทำการฉีดตัวอย่างที่มีความเข้มข้นที่ 5 ug/mL เปรียบเทียบกับการฉีดตัวอย่างผสมที่มีความเข้มข้นเท่ากัน และทำการวิเคราะห์หาพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จาก chromatogram (รูปที่ 4.7 และ 4.8) ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังนั้นจากการทดลองจึงชี้ให้เห็นว่าวิธีการวิเคราะห์นี้มีความจำเพาะเจาะจงตามมาตรฐานที่กำหนด



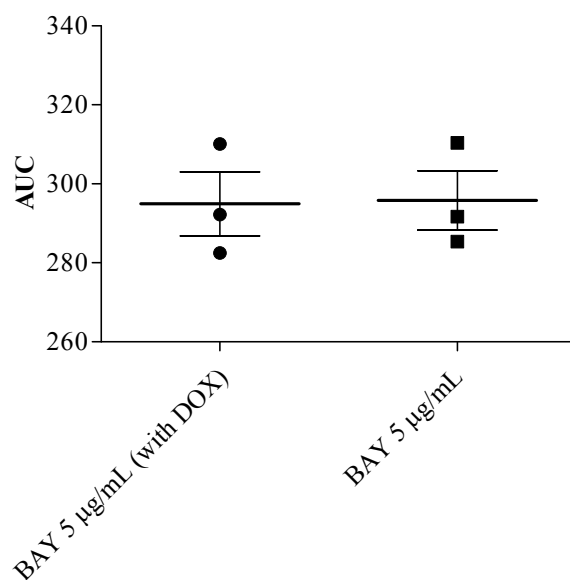
รูปที่ 4.4 HPLC chromatogram ของส่วนผสมไขมันที่ใช้เตรียมไลโปโซม



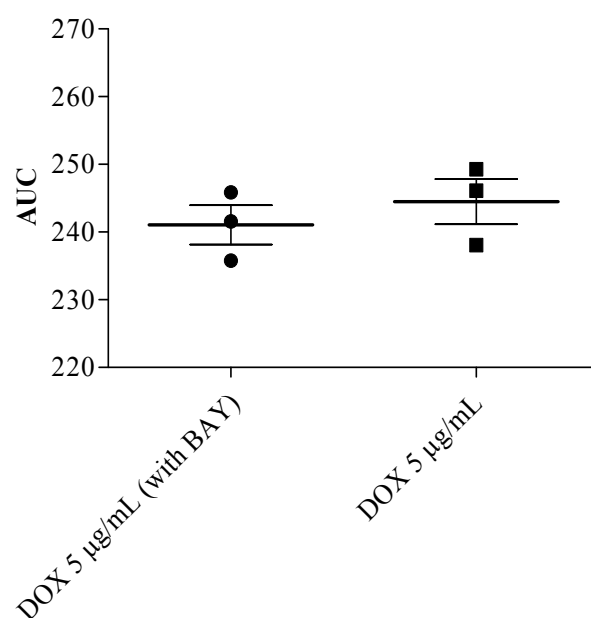
รูปที่ 4.5 HPLC chromatogram ของ DOX (A) และ DOX ผสมกับไซมัน (B)



รูปที่ 4.6 HPLC chromatogram ของ BAY (A) และ BAY ผสมร่วมกับไทม์น (B)



รูปที่ 4.7 การเปรียบเทียบค่า AUC ของ BAY และ BAY ที่ผสมร่วมกับ DOX ที่ความเข้มข้น 5 µg/mL (n=3).



รูปที่ 4.8 การเปรียบเทียบค่า AUC ของ DOX และ DOX ผสมร่วมกับ BAY ที่ความเข้มข้น 5 µg/mL (n=3).

4.2 Linearity

ความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ที่ความยาวคลื่น 254 nm ของ DOX และ BAY ถูกตรวจสอบในช่วงความเข้มข้นสารที่ 1-30 µg/mL ซึ่งกราฟมาตรฐานของยาแต่ละชนิดนั้นสร้างขึ้นได้จากค่าพื้นที่ใต้กราฟ (y) และความเข้มข้นของสาร (x) โดยใช้ regression analysis ได้ค่าสมการเชิงเส้นตรง ซึ่งการประเมิน linearity ของการวิเคราะห์นี้จะถูกทำซ้ำ 3 ครั้งในเวลาที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 4.2 แสดง regression line parameters of BAY ซึ่งวิเคราะห์ด้วย HPLC ที่ 254 nm ซึ่งในช่วงความเข้มข้นสารที่ 1-30 µg/mL พบว่าได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r^2) ที่ 0.9991 ซึ่งสูงกว่ามาตรฐานที่ 0.99 แสดงให้เห็นว่าถึงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ ซึ่งรูปที่ 4.9 แสดงกราฟมาตรฐานเฉลี่ยซึ่งสร้างขึ้นจากการทดลองอิสระ 3 ครั้ง โดยสมการเชิงเส้นตรงของการวิเคราะห์ BAY ด้วยวิธี HPLC คือ

$$y = 63.234x + 16.300$$

โดยที่ x และ y คือความเข้มข้น (µg/mL) และ AUC ของ BAY ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ที่ 254 nm ตามลำดับ

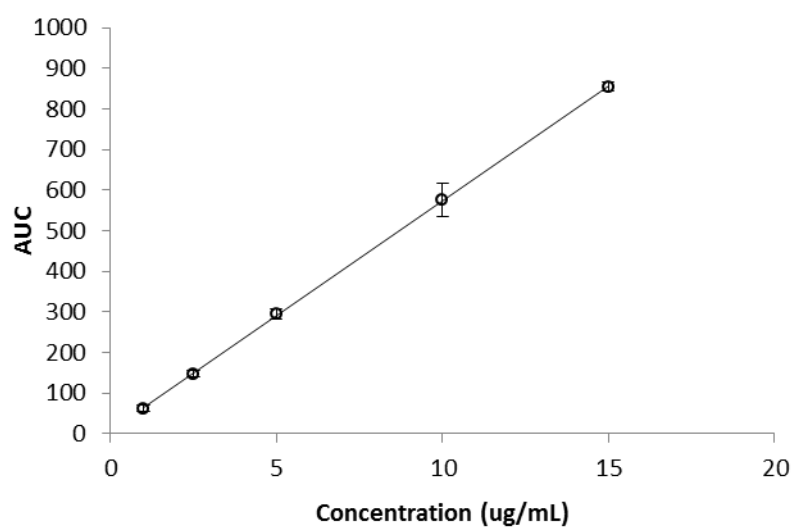
ตารางที่ 4.3 แสดง regression line parameters of DOX ซึ่งวิเคราะห์ด้วย HPLC ที่ 254 nm ซึ่งในช่วงความเข้มข้นสารที่ 1-30 µg/mL พบว่าได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r^2) ที่ 0.9997 ซึ่งสูงกว่ามาตรฐานที่ 0.99 แสดงให้เห็นว่าถึงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ ซึ่งรูปที่ 4.10 แสดงกราฟมาตรฐานเฉลี่ยซึ่งสร้างขึ้นจากการทดลองอิสระ 3 ครั้ง โดยสมการเชิงเส้นตรงของการวิเคราะห์ DOX ด้วยวิธี HPLC คือ

$$y = 52.053x - 1.2670$$

โดยที่ x และ y คือความเข้มข้น (µg/mL) และ AUC ของ DOX ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ที่ 254 nm ตามลำดับ

ตารางที่ 4.2 Regression line parameters ของ BAY วิเคราะห์โดยวิธี HPLC ตรวจวัดที่ 254 nm

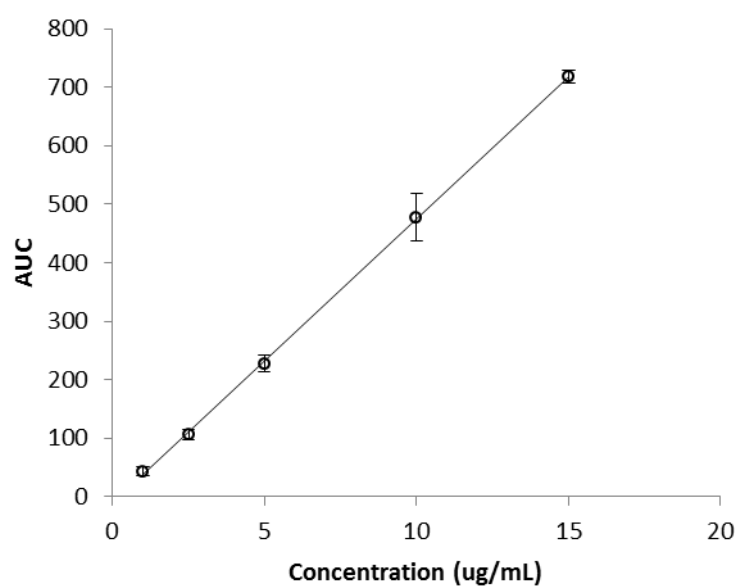
Linearity parameters	1 st run	2 nd run	3 rd run	Average	SD
Correlation coefficient, r^2	0.9991	0.9988	0.9993	0.9991	0.0003
Slope of regression line	63.434	63.585	62.684	63.234	0.483
Y-intercept	14.470	14.723	19.708	16.300	2.954



รูปที่ 4.9 Linearity curve ของ BAY ตรวจวัดที่ 254 nm

ตารางที่ 4.3 Regression line parameters ของ DOX วิเคราะห์โดยวิธี HPLC ตรวจวัดที่ 254 nm

Linearity parameters	1 st run	2 nd run	3 rd run	Average	SD
Correlation coefficient, r^2	0.9998	0.9996	0.9998	0.9997	0.0001
Slope of regression line	52.053	52.300	51.805	52.053	0.248
Y-intercept	-0.8282	-2.9642	-0.0087	-1.2670	1.5258



รูปที่ 4.10 Linearity curve ของ DOX ตรวจวัดที่ 254 nm

4.3 Precision

Precision ของการวิเคราะห์ถูกประเมินทั้งแบบภายในวัน และระหว่างวันที่วิเคราะห์ (intra-day and inter-day) (38) ซึ่งค่า intra- and inter-assay precisions ถูกแสดงอยู่ในรูปแบบของค่า relative standard deviation (RSD, %) โดยความเข้มข้น 3 ค่าของ BAY และ DOX ถูกวิเคราะห์ซ้ำทั้งสิ้น 6 ครั้งภายในวันเดียวกัน (intra-day precision) และ ภายใน 3 วันติดต่อกัน (inter-day precision) ตารางที่ 4.4 และ 4.5 แสดงให้เห็นค่า %RSD ซึ่งต่ำกว่า 1.5% ซึ่งอยู่ในช่วงมาตรฐานที่กำหนด (<11.0%) ซึ่งให้เห็นว่าวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมี Precision ที่ดี

4.4 Accuracy

Accuracy ของวิธีวิเคราะห์แสดงให้เห็นถึงความใกล้เคียงกันของปริมาณยาที่มีอยู่จริงในสารทดสอบต่อค่าที่สามารถตรวจสอบพบ ซึ่ง Accuracy สามารถประเมินได้จากการคำนวณปริมาณที่ตรวจพบจริงของสารตัวอย่างเปรียบเทียบกับปริมาณของสารตัวอย่างที่ใส่จริง และคำนวณออกมาในรูปแบบค่า percent recovery (%) (38) ซึ่งในการทดลองนี้ได้ทดสอบโดยใช้ความเข้มข้นของ BAY และ DOX 3 ระดับเพื่อตรวจสอบ accuracy ของวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น จากตารางที่ 4.6 และ 4.7 พบว่าค่าเฉลี่ย %recovery ของทั้ง BAY และ DOX ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC นั้นอยู่ในช่วง 100.11-105.53% ซึ่งเป็นค่าที่อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (80-110%) แสดงให้เห็นว่าวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมี accuracy ที่เป็นไปตามมาตรฐาน

ตารางที่ 4.4 Intraday (n=6) and interday (n=18) precisions ของ BAY ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

Concentration (µg/mL)	Intraday Precision (% RSD)	Interday Precision (% RSD)
1	1.50	1.11
10	0.34	0.34
30	0.23	0.43

ตารางที่ 4.5 Intraday (n=6) and interday (n=18) precisions ของ DOX ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

Concentration (µg/mL)	Intraday Precision (% RSD)	Interday Precision (% RSD)
1	0.97	1.75
10	0.31	0.25
30	0.45	0.52

ตารางที่ 4.6 ค่า %Recovery ของ BAY วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

Added concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Measured concentration ($\mu\text{g/mL}$)	% Recovery	Mean $\pm$ SD
6.250	6.480	106.37	105.53 $\pm$ 0.74
	6.560	104.96	
	6.578	105.24	
12.500	12.690	101.52	101.52 $\pm$ 0.04
	12.685	101.48	
	12.695	102.56	
25.000	25.020	100.08	100.11 $\pm$ 0.04
	25.021	100.08	
	25.039	100.16	

ตารางที่ 4.7 ค่า %Recovery ของ DOX วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

Added concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Measured concentration ($\mu\text{g/mL}$)	% Recovery	Mean $\pm$ SD
6.250	6.444	103.11	102.71 $\pm$ 0.68
	6.370	101.92	
	6.443	103.10	
12.500	12.758	102.06	102.19 $\pm$ 0.34
	12.741	101.93	
	12.821	102.57	
25.000	25.634	102.54	102.80 $\pm$ 0.23
	25.739	102.96	
	25.728	102.91	

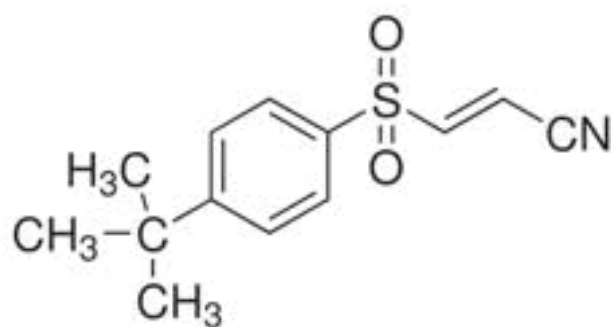
การเตรียมไลโปโซมเพื่อเก็บกับ BAY และ DOX

ไลโปโซมเป็นอนุภาคที่มีลักษณะทรงกลม ประกอบขึ้นจากผนังกัน (membrane) เก็บกักส่วนที่เป็นวัฏภาคน้ำไว้อยู่บริเวณช่องว่างระหว่างผนังกันของไลโปโซม ซึ่งผนังกันนี้เกิดจากการเรียงตัวซ้อนกันสองชั้น (bilayer) ของไขมัน (lipids) ที่มีคุณสมบัติที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) อยู่ในโมเลกุลเดียวกัน โดยส่วนที่ไม่ชอบน้ำของโมเลกุลไขมันหันเข้าหากันเกิดเป็นส่วนภายในของผนังกัน และส่วนที่ชอบน้ำจะหันออกสัมผัสกับวัฏภาคน้ำ ซึ่งการที่ส่วนภายในของผนังกันของไลโปโซมมีสภาพที่ไม่ชอบน้ำทำให้สามารถใช้เก็บกักโมเลกุลของสารที่ไม่ชอบน้ำได้ ในขณะที่โมเลกุลของสารที่ชอบน้ำสามารถถูกเก็บกักไว้ในวัฏภาคน้ำระหว่างชั้นของผนังกันในอนุภาคไลโปโซม ด้วยเหตุนี้การเก็บสารใดในไลโปโซมก็ตามจะขึ้นกับคุณสมบัติทางเคมีกายของสารนั้น นอกจากนี้ประสิทธิภาพในการเก็บกักของทั้งสารที่ชอบและไม่ชอบน้ำยังขึ้นอยู่กับไขมันที่เป็นส่วนประกอบของไลโปโซม และวิธีการเตรียมอีกด้วย ดังนั้นงานวิจัยในส่วนนี้จึงมุ่งเน้นในการศึกษาความเป็นไปได้ในการเก็บกัก BAY และ DOX ซึ่งมีคุณสมบัติทางเคมีกายภาพที่แตกต่างกัน ร่วมกันอยู่ในอนุภาคไลโปโซมเดียวกัน ซึ่งอนุภาคไลโปโซมที่ได้ถูกตรวจสอบทั้งด้านประสิทธิภาพการเก็บกัก ขนาด การกระจายขนาด zeta potential และความคงสภาพของอนุภาค

4.5 การเตรียมไลโปโซมเพื่อเก็บกัก BAY

รูปที่ 4.11 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ BAY ซึ่งลักษณะทางเคมีกายภาพด้านน้ำหนักโมเลกุล octanol-water $\log P$ และขีดการละลายในน้ำรายงานอยู่ในตารางที่ 4.8 โดยทั่วไปแล้วในด้านของเทคโนโลยีในการเก็บกักสารในไลโปโซมค่า $\log P$ เป็นค่าหนึ่งซึ่งอาจสะท้อนให้เห็นถึงอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลของสารและผนังกันไลโปโซมได้อย่างคร่าวๆ ว่าสารชนิดนั้นๆ จะสามารถเก็บกักอยู่ในชั้นไขมันหรือส่วนน้ำในไลโปโซม นอกจากนี้ค่านี้ยังแสดงให้เห็นถึงความไม่ชอบน้ำ รวมถึงขีดการละลายของสารนั้น ๆ ด้วย ซึ่งค่า $\log P$ สูงแสดงถึงความไม่ชอบน้ำที่เพิ่มมากขึ้นของโมเลกุลของสาร จากข้อมูลเบื้องต้นจึงเห็นได้ว่า BAY นั้นเป็นสารที่มีความไม่ชอบน้ำ และมีขีดการละลายที่ต่ำ ตามค่า $\log P$ ที่ปรากฏ

จนถึงปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาการเก็บกัก BAY ไลโปโซม ซึ่งในงานวิจัยนี้ไลโปโซมที่จะใช้เก็บกัก BAY ถูกเตรียมโดยเทคนิค 2 ชนิด ได้แก่ TF และ REV ซึ่งเทคนิคแต่ละชนิดจะส่งผลต่อคุณสมบัติของอนุภาคเช่น ขนาด และการกระจายขนาดอนุภาค ดังนั้นไลโปโซมที่เตรียมได้ในการทดลองถูกควบคุมขนาดและการกระจายขนาดอนุภาค รวมถึงจำนวนชั้นของผนังกันโดยการอัดผ่านแผ่นกรอง polycarbonate ที่มีรูเปิดขนาดที่กำหนดไว้ที่ 200 nm เพื่อให้ได้ไลโปโซมที่มีขนาดเล็ก และการกระจายขนาดในช่วงแคบ ซึ่งขนาดที่กำหนดดังกล่าวเป็นขนาดอนุภาคที่ถูกรายงานว่ามีความเหมาะสมในการรักษามะเร็งเมื่อให้ยาเข้าสู่ร่างกาย (39) โดยปัจจัยด้านส่วนประกอบไขมัน อัตราส่วนยาต่อไขมัน วิธีการเตรียม ต่อคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของไลโปโซมถูกทำการศึกษาในการทดลองนี้



รูปที่ 4.11 โครงสร้างเคมีของ BAY

ตารางที่ 4.8 คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของ BAY

Molecular weight	249
Solubility ($\mu\text{g/mL}$)	1.62 ± 0.49
<i>Log P</i>	3.09 ± 0.05

4.5.1 Entrapment efficiency

ประสิทธิภาพการเก็บกัก BAY ในไลโปโซมที่เตรียมจากส่วนผสมไขมัน อัตราส่วนไขมันต่อยา และวิธีเตรียมต่างๆแสดงไว้ในตารางที่ 4.9 จากการทดลองพบว่า ประสิทธิภาพการเก็บกักต่ำสุดที่ได้คือ 24.60% จากไลโปโซมที่เตรียมจาก HPC ด้วยวิธี TF ในขณะที่ประสิทธิภาพการเก็บกักสูงสุดที่ 60.47% พบในไลโปโซมที่เตรียมจาก SPC ด้วยวิธี เดียวกัน ซึ่งโดยปกติประสิทธิภาพการเก็บกักสารที่มีคุณสมบัติชอบน้ำในไลโปโซมที่เตรียมด้วย วิธี TF นั้นมักมีค่าที่ต่ำประมาณ 5-15% (40-42) ดังนั้นประสิทธิภาพการเก็บกัก BAY ที่สูงกว่า 60% นั้นแสดงให้เห็นถึงกลไกการเก็บกัก BAY ในไลโปโซมว่าเกิดจากคุณสมบัติที่ไม่ชอบน้ำ ของ BAY มีอันตรกิริยาแบบ hydrophobic interaction กับผนังกันที่เป็นส่วนไขมันของไลโปโซม

ตารางที่ 4.9 ประสิทธิภาพการเก็บกักของ BAY ในไลโปโซมที่เตรียมจากไขมัน อัตราส่วน ไขมันต่อยา และวิธีต่างๆ

Lipid composition (Mole ratio)	Lipid : Drug (Mole ratio)	Entrapment efficiency (%)*	
		TF	REV
SPC : CHOL (10:0)	1:10	35.75 ± 4.06	35.85 ± 6.69
	1:20	60.47 ± 7.05	48.37 ± 1.51
SPC : CHOL (7:3)	1:20	32.43 ± 5.82	26.23 ± 2.08
HPC : CHOL (10:0)	1:20	24.60 ± 7.61	-

* Values represent the mean ± SD, n=3

4.5.1.1 ผลของอัตราส่วนไขมันต่อยา

โดยทั่วไปการเก็บกักสารที่ไม่ชอบน้ำในผนังกันของไลโปโซมนั้น มีความสัมพันธ์กับค่า partition coefficient และขีดการละลายของตัวยานั้นในผนังกันส่วนไขมัน ของไลโปโซม หากตัวยานั้นถูกบรรจุลงไปในผนังกันของไลโปโซมไม่ถึงจุดอิ่มตัว ประสิทธิภาพ การเก็บกักมักจะขึ้นอยู่กับค่า partition coefficient โดยปริมาณยาที่เติมเข้าไปในตำรับจะไม่ส่งผล ต่อประสิทธิภาพการเก็บกัก อย่างไรก็ตามจากการศึกษาพบว่า ประสิทธิภาพการเก็บกัก BAY ในไลโปโซมเพิ่มขึ้นเกือบ 2 เท่าเมื่ออัตราส่วนโมลของยาต่อไขมันเพิ่มจาก 1:10 เป็น 1:20 ซึ่ง เมื่อปรับอัตราส่วนเป็น 1:5 นั้นพบว่าฟิล์มบางที่เกิดจากส่วนผสมของไขมันและ BAY นั้นไม่ สามารถเกิดเป็นไลโปโซมได้เมื่อทำให้เปียก ซึ่งปรากฏการณ์นี้เกิดขึ้นจากการอิ่มตัวของ BAY ในผนังกันส่วนไขมัน ดังนั้นอัตราส่วนโมลยาต่อไขมันที่เลือกใช้ในการศึกษาต่อไปคือ 1:20

4.5.1.2 ผลของส่วนประกอบไขมัน

ในการทดลองนี้ได้ศึกษาผลของ gel-to-liquid crystalline phase transition temperature ของไขมัน รวมถึงการเติม cholesterol ในตำรับต่อประสิทธิภาพการเก็บกัก BAY ในไลโปโซม

ผลของ gel-to-liquid crystalline phase transition temperature ของไขมันที่ใช้เตรียมไลโปโซมเพื่อเก็บกัก BAY ถูกศึกษาโดยใช้ไขมันสองชนิดได้แก่ SPC และ HPC ซึ่งไลโปโซมถูกเตรียมโดยวิธี TF ที่อัตราส่วนโมลยาต่อไขมันที่ 1:20 จากการศึกษพบว่าประสิทธิภาพการเก็บกัก BAY นั้นลดลงอย่างมากจาก 60% เป็น 25% เมื่อเปลี่ยนไขมันจาก SPC ซึ่งมี phase transition temperature $< 0^{\circ}\text{C}$ เป็น HPC ซึ่งมี phase transition temperature ประมาณ 55°C โดยทั่วไป SPC เป็น phospholipids แบบผสมจาก phosphatidylcholines ที่ไม่อิ่มตัวชนิด C16 และ C18 ในขณะที่ HPC เป็นไขมันที่มีส่วนผสมแบบเดียวกันแต่ถูกทำให้อิ่มตัวแล้ว ซึ่งความไม่อิ่มตัวในสายโซ่คาร์บอนในหางของไขมันจะทำให้เกิดความไม่เป็นระเบียบ และเกิดระยะห่างของโมเลกุลระหว่าง phospholipid (43) ส่งผลให้ hydrophobic interaction ระหว่างสายโซ่คาร์บอนลดลง และไขมันนั้นมี phase transition temperature ที่ต่ำหรืออาจกล่าวได้ว่ามี fluidity ที่สูงขึ้นเมื่อเกิดเป็นผนังกันไลโปโซม จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ศึกษาถึงประสิทธิภาพการเก็บกักสารที่ไม่ชอบน้ำหลายชนิดในไลโปโซมพบว่าประสิทธิภาพการเก็บกักมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความยาวของสายโซ่คาร์บอน หรือเพิ่มความอิ่มตัวของไขมัน (44-47) เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของพื้นที่ที่เป็น hydrophobic ผนังกันส่วนไขมัน เป็นที่น่าสังเกตที่ขัดแย้งกับการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าประสิทธิภาพการเก็บกัก BAY นั้นลดลงเมื่อใช้ไขมันชนิด HPC ที่มีความอิ่มตัว ซึ่งอาจอธิบายได้ว่าผลของ fluidity ของผนังกันของไลโปโซมนั้นมีความสำคัญมากกว่าพื้นที่ที่เป็น hydrophobic ต่อประสิทธิภาพการเก็บกักของ BAY ในไลโปโซม เนื่องจากลักษณะโครงสร้างทางเคมีของ BAY ที่มีหมู่ sulfonyl และ cyanide ซึ่งมีคุณสมบัติที่มีขั้วสูง อารบการสอดแทรกของโมเลกุลของ BAY เข้าสู่ชั้นไขมันในผนังกันไลโปโซมโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อบริเวณที่เป็น hydrophobic นั้นมีความเป็นระเบียบมาก

ผลของการเติม CHOL ลงในตำรับต่อการเก็บกัก BAY ในไลโปโซมที่เตรียมจาก SPC โดยใช้อัตราส่วนโมลยาต่อไขมันที่ 1:20 ก็พบว่าประสิทธิภาพการเก็บกักลดลงถึง 50% เมื่อเติม CHOL ลงในสูตรตำรับที่อัตราส่วนโดยโมลของ phospholipid:CHOL ที่ 7:3 ซึ่งอาจสามารถอธิบายได้จาก 2 สาเหตุคือ CHOL ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำเช่นกันแย่งที่ภายในผนังกันส่วนไขมันของไลโปโซม เนื่องจากโครงสร้างที่เป็นแผ่นราบของ CHOL นั้นมีความเหมาะสมต่อการแทรกเข้าไปในผนังกันไลโปโซมมากกว่า BAY ซึ่งมีหมู่ที่มีขั้วสูง (43) ซึ่งตรงกับผลการวิจัยก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นว่าการเติม CHOL ลงในสูตรตำรับนั้นสามารถลดประสิทธิภาพการเก็บกักสารที่ไม่ชอบน้ำเช่น carotenoid และ ibuprofen ในไลโปโซมได้ (47,

48) อีกสาเหตุหนึ่งอาจเกิดจากการที่ CHOL เป็นสารที่เมื่อเติมเข้าสู่ไลโปโซมแล้วทำให้ ผนังกันของไลโปโซมมี Rigidity ที่เพิ่มขึ้นหรืออาจกล่าวได้ว่าลด fluidity ลงที่อุณหภูมิสูงกว่า phase transition temperature (43) ดังนั้นจากที่อธิบายมาการลด fluidity ผนังกันลงจะส่งผลต่อการขอลดประสิทธิภาพการเก็บกักของ BAY

4.5.1.3 ผลของวิธีการเตรียม

ผลของวิธีการเตรียมต่อประสิทธิภาพการเก็บกัก BAY ถูกศึกษาโดยการเตรียมไลโปโซมด้วยเทคนิคที่แตกต่างกัน 2 วิธีได้แก่ TF และ REV ไลโปโซมถูกเตรียมขึ้นจาก SPC เป็นส่วนประกอบหลัก จากการศึกษาพบว่าประสิทธิภาพการเก็บกัก BAY ในไลโปโซมที่เตรียมจากวิธี TF นั้นมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าวิธี REV ($p < 0.05$) ยกเว้นในกรณีของไลโปโซมที่เตรียมจากอัตราส่วนยาต่อไขมันโดยโมลที่ 1:10 เมื่อพิจารณาผลประสิทธิภาพการเก็บกักของไลโปโซมที่เตรียมจากอัตราส่วนยาต่อไขมันโดยโมลที่ 1:20 นั้นพบว่าไลโปโซมที่เตรียมด้วยวิธี TF ประสิทธิภาพการเก็บกักสูงสุดที่ 60% ในขณะที่ไลโปโซมที่เตรียมด้วยวิธี REV นั้นมีประสิทธิภาพการเก็บกักสูงสุดที่ 48% เหตุที่เทคนิค TF นั้นให้ประสิทธิภาพการเก็บกักที่สูงกว่าอาจเกิดจากการ Partition ของโมเลกุลยาระหว่างการเตรียม เนื่องจากโดยปกติแล้วการเตรียมอนุภาคไลโปโซมด้วยวิธี REV นั้นมักให้อนุภาคไลโปโซมชนิด large unilamellar vesicles ในขณะที่วิธี TF นั้นให้อนุภาคชนิด multilamellar vesicles (49) ซึ่งการลดลงของจำนวนชั้นผนังกันทำให้เกิดการสัมผัสกันระหว่างวฏภาคน้ำและผนังกันมากยิ่งขึ้น ส่งผลให้เกิดการ partition ของโมเลกุลยาออกจากผนังกันในระหว่างการเตรียมมากขึ้นและลดประสิทธิภาพการกักเก็บลงได้ อย่างไรก็ตามในกรณีของไลโปโซมที่เตรียมจากอัตราส่วนยาต่อไขมันโดยโมลที่ 1:10 นั้นมีประสิทธิภาพการเก็บกักระหว่างสองวิธีใกล้เคียงกัน ($p > 0.05$) อาจเนื่องมาจากปริมาณยาในตำรับที่มากไปทำให้เกิดการอึดตัวของตัวยาในผนังกัน ส่งผลให้ BAY ไม่สามารถเก็บกักเข้าสู่ผนังกันได้อย่างสมบูรณ์ดังที่ได้อธิบายก่อนหน้านี้

4.5.2 ขนาด และการกระจายขนาดอนุภาค

ขนาดและการกระจายขนาดอนุภาคของไลโปโซมที่เก็บกัก BAY แสดงไว้ในตารางที่ 4.10 และ 4.11 ผลการทดลองพบว่าอนุภาคไลโปโซมที่เก็บกัก BAY มีขนาดเฉลี่ยอยู่ในช่วง 133.8-228.9 nm ความแตกต่างของขนาดอนุภาคนั้นขึ้นกับชนิดของไขมันที่ใช้เตรียมและวิธีการที่เตรียมไลโปโซม ส่วนการกระจายขนาดอนุภาคนั้นพบว่าค่า PDI นั้นประมาณ 0.1 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการกระจายขนาดอนุภาคที่แคบ ยกเว้นไลโปโซมที่เตรียมจาก HPC โดยในรูปที่ 4.12-4.18 นั้นได้แสดงรูป histograms ของอนุภาคไลโปโซมตำรับต่างๆ ซึ่งพบว่ามีลักษณะการกระจายขนาดแบบ unimodal สอดคล้องกับค่า PDI การที่ไลโปโซมที่เตรียมนั้นมีขนาดต่ำกว่า 200 nm และมีการกระจายขนาดที่แคบนั้นเนื่องมาจากการควบคุมและลดขนาดโดยการกดผ่านเมมเบรนที่มีรูเปิดกำหนดที่ 200 nm

ตารางที่ 4.10 ขนาดอนุภาคของไลโปโซมที่เก็บกัก BAY

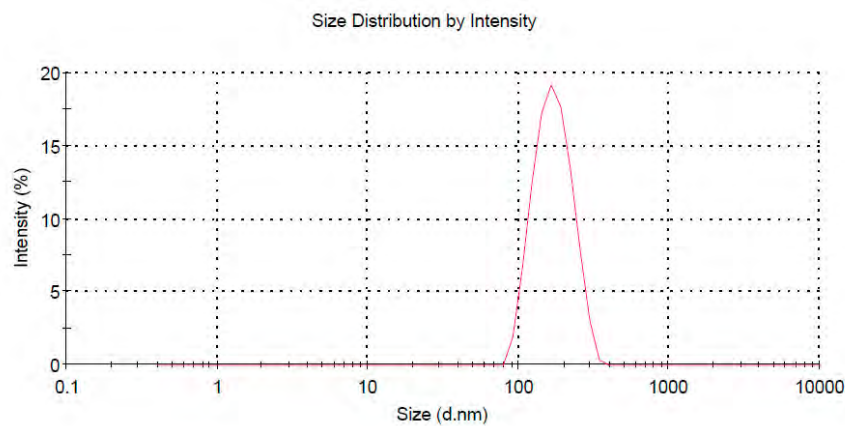
Lipid composition (Mole ratio)	Lipid : Drug (Mole ratio)	Particle size (nm)*	
		TF	REV
SPC : CHOL (10:0)	1:10	156.4 ± 5.7	141.9 ± 8.5
	1:20	170.3 ± 5.1	133.8 ± 11.6
SPC : CHOL (7:3)	1:20	164.1 ± 5.2	146.7 ± 1.4
HPC : CHOL (10:0)	1:20	228.9 ± 13.0	-

* Values represent the mean ± SD, n=3

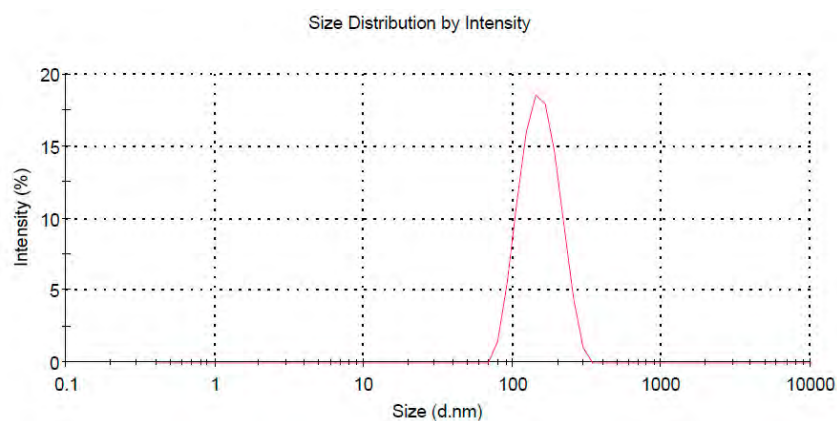
ตารางที่ 4.11 Polydispersity index ของไลโปโซมที่เก็บกัก BAY

Lipid composition (Mole ratio)	Lipid : Drug (Mole ratio)	PDI*	
		TF	REV
SPC : CHOL (10:0)	1:10	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.01
	1:20	0.11 ± 0.01	0.08 ± 0.01
SPC : CHOL (7:3)	1:20	0.06 ± 0.03	0.08 ± 0.03
HPC : CHOL (10:0)	1:20	0.37 ± 0.02	-

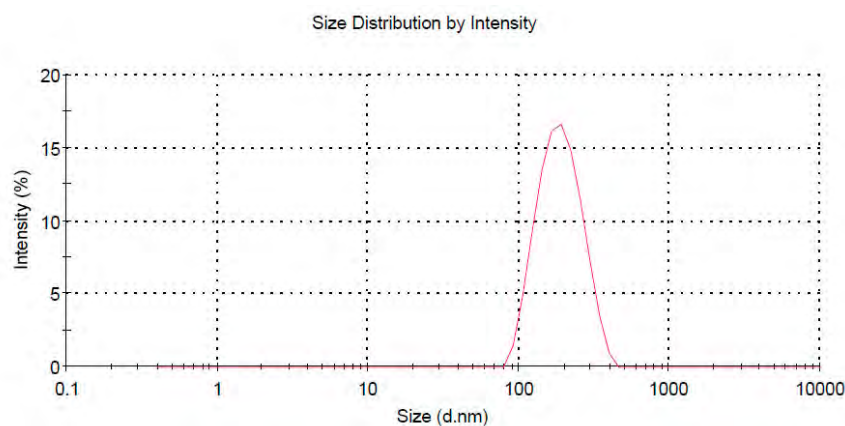
* Values represent the mean ± SD, n=3



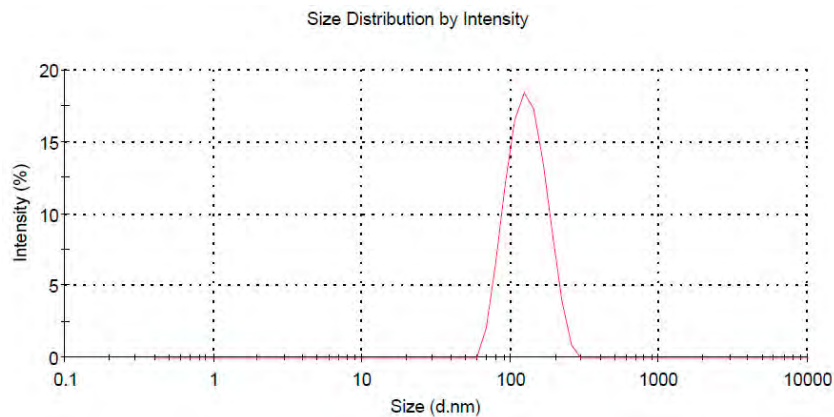
รูปที่ 4.12 การกระจายขนาดอนุภาคของไลโปโซมที่เก็บกัก BAY ซึ่งเตรียมจาก SPC ที่อัตราส่วนโดยโมลของยาต่อไขมันที่ 1:10 โดยวิธี TF



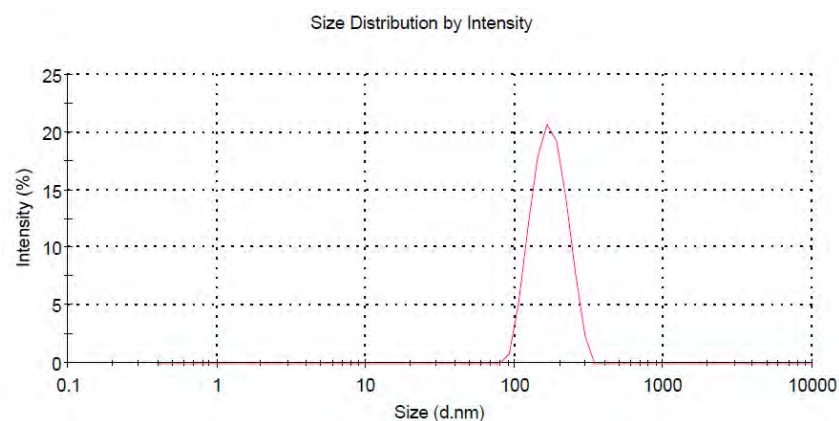
รูปที่ 4.13 การกระจายขนาดอนุภาคของไลโปโซมที่เก็บกัก BAY ซึ่งเตรียมจาก SPC ที่อัตราส่วนโดยโมลของยาต่อไขมันที่ 1:10 โดยวิธี REV



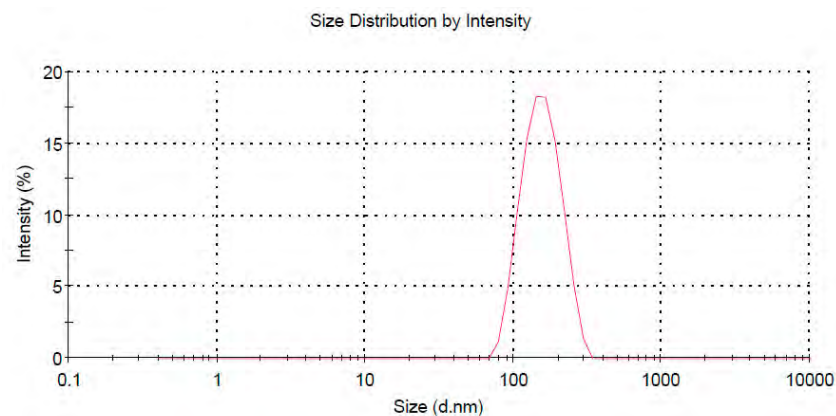
รูปที่ 4.14 การกระจายขนาดอนุภาคของไลโปโซมที่เก็บกัก BAY ซึ่งเตรียมจาก SPC ที่อัตราส่วนโดยโมลของยาต่อไขมันที่ 1:20 โดยวิธี TF



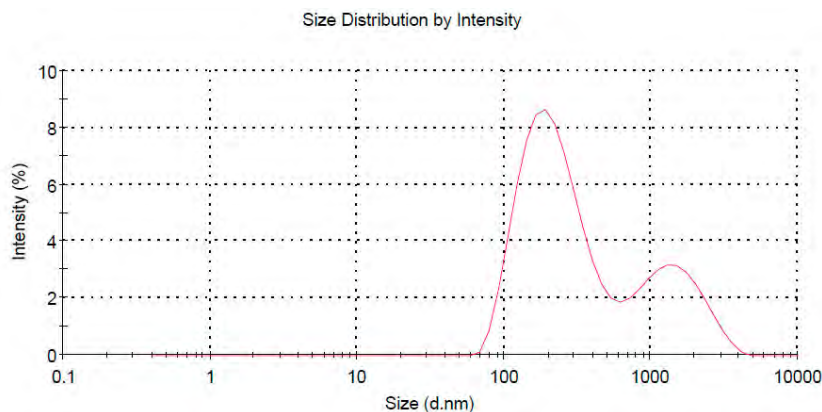
รูปที่ 4.15 การกระจายขนาดอนุภาคของไลโปโซมที่เก็บกัก BAY ซึ่งเตรียมจาก SPC ที่อัตราส่วนโดยโมลของยาต่อไขมันที่ 1:20 โดยวิธี REV



รูปที่ 4.16 การกระจายขนาดอนุภาคของไลโปโซมที่เก็บกัก BAY ซึ่งเตรียมจาก SPC และ CHOL (7:3) ที่อัตราส่วนโดยโมลของยาต่อไขมันที่ 1:20 โดยวิธี TF



รูปที่ 4.17 การกระจายขนาดอนุภาคของไลโปโซมที่เก็บกัก BAY ซึ่งเตรียมจาก SPC และ CHOL (7:3) ที่อัตราส่วนโดยโมลของยาต่อไขมันที่ 1:20 โดยวิธี REV



รูปที่ 4.18 การกระจายขนาดอนุภาคของไลโปโซมที่เก็บกัก BAY ซึ่งเตรียมจาก HPC ที่อัตราส่วนโดยโมลของยาต่อไขมันที่ 1:20 โดยวิธี TF

4.5.2.1 ผลของส่วนประกอบไขมัน

อนุภาคไลโปโซมที่เตรียมจาก phospholipids อย่างเดียวโดยมีอัตราส่วนโดยโมลของยาต่อไขมันที่ 1:20 ด้วยวิธี TF นั้นพบว่าชนิดของไขมันที่ใช้เตรียมมีผลต่อขนาดอนุภาค โดยอนุภาคไลโปโซมที่เตรียมจาก SPC มีขนาดเล็กกว่า HPC ($p < 0.05$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความอึดตัวของไขมันนั้นส่งผลต่อขนาดของอนุภาค เนื่องจากการใช้ไขมันที่มีความอึดตัว (HPC) เมื่อนำมาเตรียมเป็นไลโปโซมนั้นมีความ rigidity ที่สูง ซึ่งเป็นผลมาจาก phase transition temperature ที่สูง ทำให้ความขาดความยืดหยุ่นในการโค้งตัวสร้างเป็นอนุภาคไลโปโซม ดังนั้นจึงพบว่าไขมันที่ไม่อึดตัวเช่น SPC นั้นมักให้ไลโปโซมที่มีขนาดเล็กกว่าไขมันอึดตัว เช่น HPC (50)

4.5.2.2 ผลของวิธีเตรียม

จากที่อภิปรายก่อนหน้านี้ ไลโปโซมที่เตรียมจากวิธี TF มักจะเป็นชนิด multilamellar vesicles ในขณะที่วิธี REV มักให้ไลโปโซมชนิด oligolamellar vesicles ซึ่งโดยทั่วไปแล้วไลโปโซมชนิด multilamellar vesicles จะมีขนาดใหญ่กว่าชนิด oligolamellar vesicles (43, 49) ถึงแม้ไลโปโซมที่เตรียมทั้งสองวิธีจะถูกลดขนาดโดยการกดย่านเมมเบรนรูเปิด 200 nm ขนาดไลโปโซมที่เตรียมได้ก่อนการลดขนาดจึงอาจส่งผลต่อขนาดไลโปโซมภายหลังการลดขนาดได้ เนื่องจากขนาดไลโปโซมที่เล็กและมีผนังกันที่น้อยกว่าในกรณีของ REV นั้นจะสามารถแตกออกได้ง่ายกว่าเมื่อทำการกดย่าน membrane ส่งผลให้ได้ไลโปโซมที่มีขนาดเล็กกว่าที่เตรียมด้วยวิธี TF ได้

4.5.3 Zeta potential

Zeta potential ของไลโปโซมที่เก็บกัก BAY แสดงไว้ในตารางที่ 4.12 พบว่ามีค่าในช่วง -1.72 ถึง -3.16 mV ซึ่งอยู่ในช่วงเป็นกลาง เนื่องจากไขมันที่ใช้ในการเตรียมเป็นไขมันที่ไม่แตกประจุ

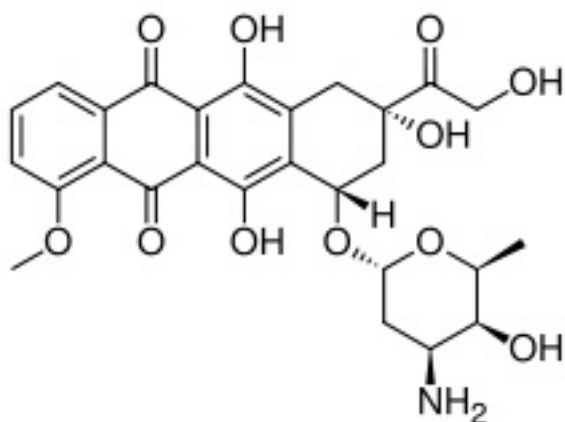
ตารางที่ 4.12 Zeta potential ของไลโปโซมที่เก็บกัก BAY

Lipid composition (Mole ratio)	Lipid : Drug (Mole ratio)	Zeta potential (mV)*	
		TF	REV
SPC : CHOL (10:0)	1:10	-3.16 $\pm$ 0.31	-1.99 $\pm$ 0.33
	1:20	-2.50 $\pm$ 0.54	-1.81 $\pm$ 0.62
SPC : CHOL (7:3)	1:20	-3.03 $\pm$ 0.78	-2.04 $\pm$ 0.41
HPC : CHOL (10:0)	1:20	-1.72 $\pm$ 0.64	-

* Values represent the mean $\pm$ SD, n=3

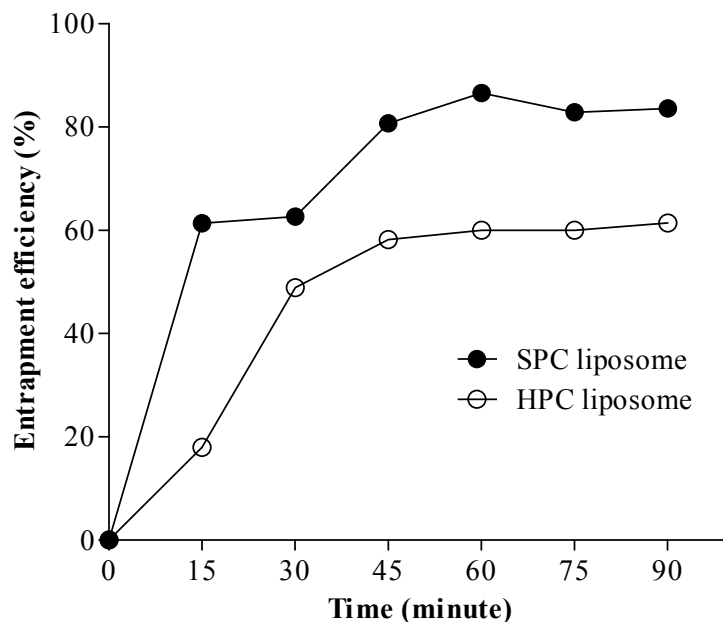
4.6 Liposomes entrapping doxorubicin

DOX เป็นสารที่มีคุณสมบัติที่เป็นเบสอ่อนมีค่า pKa ที่ 8.6 (51) ซึ่งจากโครงสร้างทางเคมีในรูปที่ 4.19 DOX เป็นสารที่มีคุณสมบัติ amphiphilic โดยประกอบด้วยส่วนที่ไม่ชอบน้ำได้แก่ส่วน planar anthraquinone และส่วนที่ชอบน้ำคือ amino sugar ซึ่งอยู่ในรูปที่แตกตัวได้ ดังนั้น DOX สามารถถูกเก็บกักในไลโปโซมได้ทั้งในผนังกันหรือในส่วนน้ำตรงแกนกลางขึ้นอยู่กับสถานะของทางเคมีกายภาพของ DOX อย่างไรก็ตามรายงานการวิจัยการเก็บกัก DOX ด้วยวิธีดั้งเดิมเช่น TF หรือ REV นั้นพบว่าประสิทธิภาพต่ำเนื่องจากการรั่วของ DOX ออกจากอนุภาคไลโปโซม ที่เกิดขึ้นจากคุณสมบัติที่เป็น amphiphilic ของมันเอง (52) ดังนั้นจึงมีการพัฒนาการเก็บกัก DOX โดยวิธี pH gradient ซึ่งจะเก็บกัก DOX ในรูปที่แตกตัวไว้ภายในไลโปโซม (53-57) ซึ่งวิธีการนี้เริ่มจากการเตรียมไลโปโซมในบัฟเฟอร์ที่มีสภาพเป็นกรดและทำการเปลี่ยนสภาพภายนอกไลโปโซมสู่สภาวะที่เป็นกลาง ซึ่งเมื่อเติม DOX เข้าสู่สารละลายภายนอกไลโปโซม DOX จะอยู่ในรูปไม่แตกตัวซึ่งจะแพร่เข้าสู่ภายในไลโปโซมซึ่งมีสภาพเป็นกรด และแตกตัวเพื่อให้อยู่ในสภาวะที่มีความเสถียรมากกว่า ซึ่งวิธีการนี้ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการเก็บกัก อีกทั้งลดการรั่วของ DOX ออกจากไลโปโซมได้ ดังนั้นวิธี pH gradient จึงถูกเลือกมาใช้ในการเก็บกัก DOX ในโครงการวิจัยนี้ เนื่องจากประสิทธิภาพการเก็บกัก BAY ในไลโปโซมที่ลดลงเมื่อมีการเติม CHOL ดังนั้นตำรับไลโปโซมจึงประกอบขึ้นจาก phospholipids ได้แก่ SPC และ HPC เพียงอย่างเดียว



รูปที่ 4.19 โครงสร้างเคมีของ DOX

รูปที่ 4.20 แสดงผลของส่วนประกอบไขมันต่อการเก็บกัก DOX ซึ่งไลโปโซมถูกเตรียมด้วยวิธี TF โดยใช้ SPC หรือ HPC เป็นส่วนประกอบ และถูกลดขนาดด้วยการกรองผ่านเมมเบรนที่ 200 nm ซึ่งภายหลังการเติม DOX เข้าสู่สารละลายภายนอกไลโปโซมเป็นเวลา 60 นาทีพบว่า ไลโปโซมที่เตรียมจาก SPC สามารถเก็บกัก DOX ได้ประมาณ 85% ซึ่งมากกว่าไลโปโซมที่เตรียมจาก HPC ซึ่งสามารถเก็บกัก DOX ได้ประมาณ 60% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพการเก็บกัก DOX เข้าสู่ไลโปโซมนั้นขึ้นกับ phase transition temperature ของไขมันที่ใช้ จากรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าการเก็บกัก DOX เข้าสู่ไลโปโซมนั้นขึ้นอยู่กับเวลา อุณหภูมิ และ ชนิดของไขมันที่เตรียมไลโปโซม (58) โดยการเก็บ DOX เข้าสู่ไลโปโซมที่เตรียมจาก egg phosphatidylcholine ซึ่งมี phase transition temperature ต่ำ 0 °C สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเก็บกักได้โดยเพิ่มอุณหภูมิของสภาวะจาก 21 เป็น 60 °C (58) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บกัก DOX เข้าสู่ไลโปโซมนั้นต้องสูงกว่า phase transition temperature ของไขมันที่ใช้เตรียมเป็นอย่างมาก ซึ่งในการวิจัยนี้ใช้อุณหภูมิ 65 °C สำหรับการเก็บกัก DOX เข้าสู่ไลโปโซมที่เตรียมจาก HPC ซึ่งมี phase transition temperature ที่ 55 °C ดังนั้นส่งผลให้ไลโปโซมที่มีเตรียมจาก SPC ซึ่งมี phase transition temperature ต่ำ 0 °C และใช้สภาวะในการเก็บกักที่ 39 °C นั้นให้ประสิทธิภาพการเก็บกักที่สูงกว่าไลโปโซมที่เตรียมจาก HPC ซึ่งในการทดลองต่อไปนั้นทางผู้วิจัยจึงเลือก SPC เป็นองค์ประกอบหลักในการเตรียมไลโปโซมเนื่องจากสามารถเก็บกัก BAY ได้ดี และใช้อุณหภูมิที่เก็บกัก DOX ไม่สูงมากนักซึ่งจะช่วยป้องกันการเสื่อมสลายของ BAY ได้



รูปที่ 4.20 ผลของส่วนประกอบไขมันในการเก็บกัก DOX เข้าสู่ไลโปโซม

4.7 การเตรียมไลโปโซมเพื่อเก็บกัก BAY และ DOX ร่วมกัน

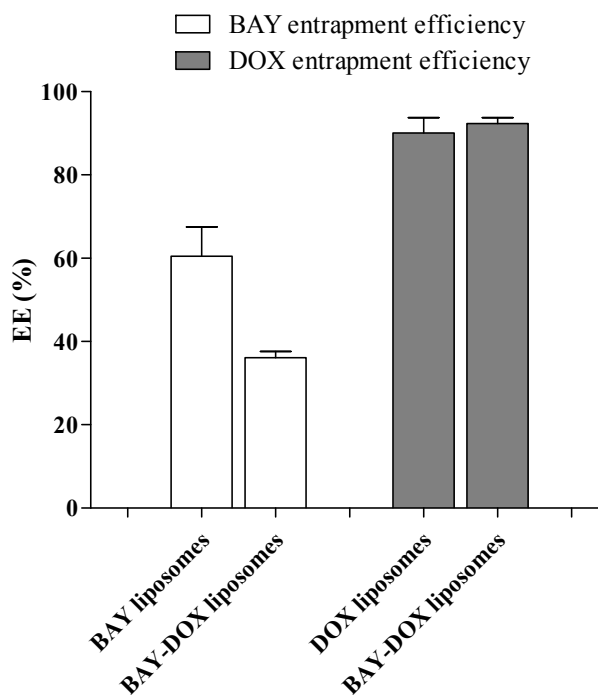
รายงานการวิจัยหลายชิ้นได้แสดงให้เห็นว่าการยับยั้ง NF-KB pathway โดยการให้สารยับยั้ง NF-KB สามารถเพิ่มความไวต่อการตอบสนองต่อยาต้านมะเร็งได้ ดังนั้นการให้ตัวยับยั้ง NF-KB ร่วมกับยาต้านมะเร็งจึงเป็นแนวทางการรักษาแบบใหม่ที่น่าสนใจ อย่างไรก็ตามการให้ยาแยกกันระหว่างยาต้านมะเร็ง และตัวยับยั้ง NF-KB นั้นอาจไม่สามารถที่จะควบคุมการกระจายของยาในร่างกาย และความจำเพาะต่อเป้าหมายได้ เนื่องจากความแตกต่างกันทางคุณสมบัติเคมีกายภาพของตัวยา ดังนั้นการขนส่งยาร่วมกันโดยตัวพาที่มีลักษณะเป็นอนุภาคจึงอาจเป็นวิธีที่สามารถนำมาแก้ปัญหานี้ได้ (39, 59-61) ซึ่งทำได้โดยการเก็บกักยาทั้งสองชนิดไว้ในอนุภาคเดียวกัน หรืออาจนำส่งยาแยกกันในอนุภาคที่มีคุณสมบัติที่เหมือนกันได้ (62) ในการทดลองนี้จึงมุ่งเน้นเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการเก็บกัก BAY และ DOX ร่วมกันในอนุภาคไลโปโซมซึ่งสามารถนำส่งยาไปสู่เป้าหมายที่ต้องการได้

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้เฉพาะ SPC เป็นองค์ประกอบไขมันชนิดเดียวในการเตรียมไลโปโซม โดยไลโปโซมที่เก็บกัก BAY ชนิด Multilamellar ถูกเตรียมขึ้นก่อนด้วยวิธี TF และลดขนาดโดยการกดผ่านเมมเบรนรูเปิดขนาด 200 nm ต่อจากนั้นจึงบรรจุ DOX เข้าสู่ไลโปโซมด้วยวิธี pH gradient ซึ่งไลโปโซมที่เก็บกัก BAY และ DOX ร่วมกัน จะถูกตรวจสอบในด้าน

ประสิทธิภาพการเก็บกัก ขนาดอนุภาค การกระจายขนาดอนุภาค zeta potential และลักษณะโครงสร้างของอนุภาค

4.7.1 ประสิทธิภาพการเก็บกัก

ประสิทธิภาพการเก็บกัก BAY และ DOX ในไลโปโซมแสดงไว้ในรูปที่ 4.21 โดยพบว่าประสิทธิภาพการเก็บกัก DOX และ BAY อยู่ที่ประมาณ 90% และ 40% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับไลโปโซมที่เก็บกักเฉพาะ DOX พบว่าประสิทธิภาพการเก็บกัก DOX ทั้งรูปแบบเดี่ยว และเก็บกักร่วมกับ BAY นั้นไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการเก็บกัก BAY นั้นไม่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพ และกลไกการเก็บกัก DOX เข้าสู่ไลโปโซม อย่างไรก็ตามพบว่าประสิทธิภาพการเก็บกัก BAY นั้นลดลงจาก 60% เป็น 40% เมื่อมีการเก็บกักร่วมกับ DOX ($p < 0.05$) อาจเนื่องมาจากสาเหตุของกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาวะภายนอกของไลโปโซมจากการดัดไปเป็นกลางด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงนั้น ต้องผ่านกระบวนการที่ทำการกระจายตัว และเจือจางไลโปโซมใหม่ ซึ่งทำให้เกิดการสูญเสีย BAY จากการ partition ระหว่างตัวทำละลายแขวนตะกอน และไลโปโซมได้ จากงานวิจัยหลายชิ้นได้มีข้อเสนอแนะว่าการเก็บกักยาในไลโปโซมให้มีประสิทธิภาพนั้นต้องการคุณสมบัติยาที่มีค่า log P ที่ต่ำหรือสูงมาก ถ้ายามีค่า log P ปานกลางคืออยู่ในช่วง 1.7-4.0 ไลโปโซมอาจไม่สามารถเก็บกักตัวยาดได้อย่างมีประสิทธิภาพนักเนื่องจากการ partition ที่เกิดขึ้นระหว่างตัวทำละลายและไลโปโซม ส่งผลให้ยานั้นปลดปล่อยออกสู่ภายนอกได้อย่างรวดเร็วเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อม (42)



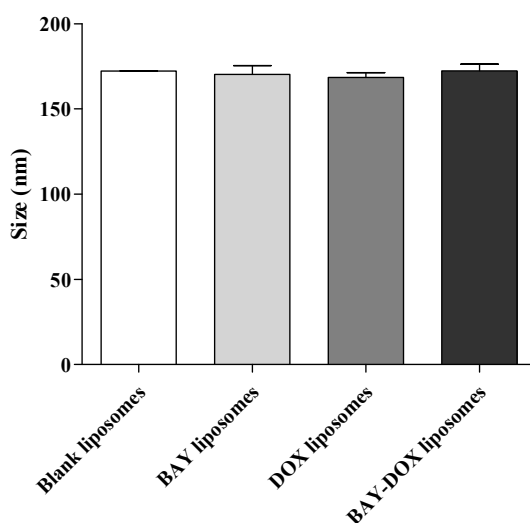
รูปที่ 4.21 ประสิทธิภาพการเก็บกัก BAY และ DOX ในไลโปโซม (Data represent mean and SD as error bar of three experiments.)

4.7.2 ขนาดอนุภาค

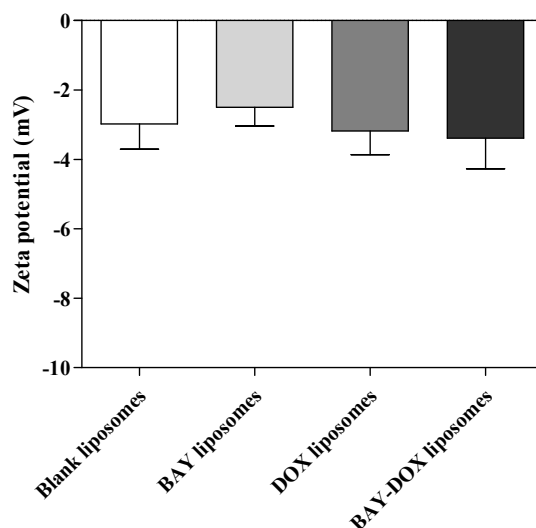
ขนาดอนุภาคโดยเฉลี่ยของไลโปโซมที่ตรวจสอบโดยวิธี dynamic light scattering แสดงไว้ในรูปที่ 4.22 ซึ่งมีขนาดประมาณ 170 nm เนื่องจากการกีดผ่านเมมเบรนขนาด 200 nm ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันในทุกตำรับ ($p > 0.05$) นอกจากนี้ค่า PDI ที่ประมาณ 0.1 ซึ่งให้เห็นว่ามีการกระจายขนาดอนุภาคที่แคบ (data not shown)

4.7.3 Zeta potential

ค่า zeta potential ของไลโปโซมแสดงไว้ในรูปที่ 4.23 โดยมีค่าระหว่าง -2.50 to -3.39 mV ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันในทุกตำรับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$).



รูปที่ 4.22 ขนาดอนุภาคไลโปโซมที่เก็บกัก BAY และ DOX (Data represent mean and SD as error bar of three experiments.)



รูปที่ 4.23 Zeta potential ของอนุภาคไลโปโซมที่เก็บกัก BAY และ DOX (Data represent mean and SD as error bar of three experiments.)

4.7.4 ลักษณะโครงสร้าง

รูปที่ 4.24 แสดงภาพถ่าย transmission electron photomicrograph (TEM) ของไลโปโซมเปล่า และไลโปโซมที่เก็บกัก BAY และ DOX ที่เตรียมจาก SPC ซึ่งพบว่าในทุกตำรับไลโปโซมมีลักษณะโครงสร้างแบบ oligolamellar vesicles

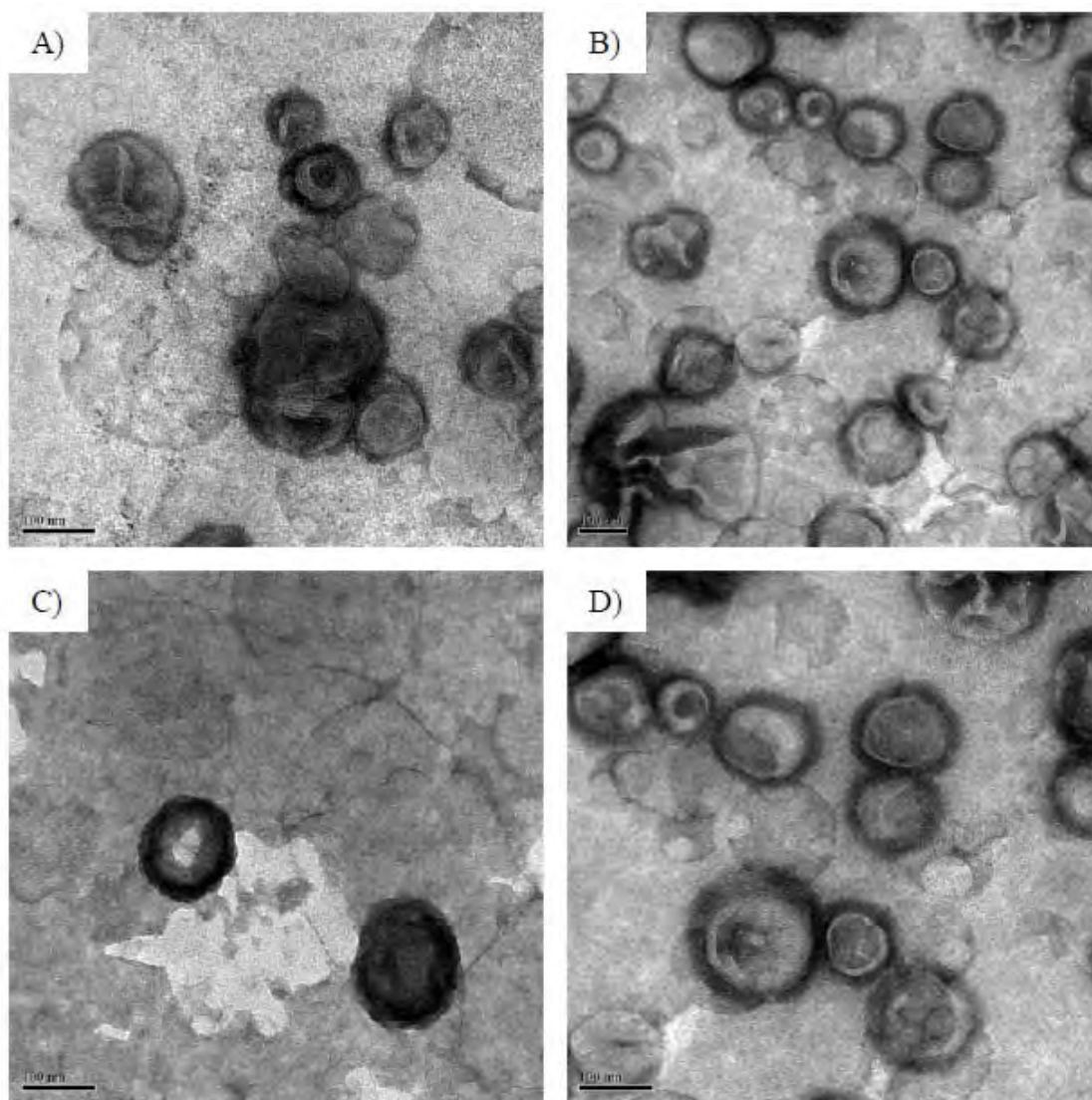


Figure 4.24 ภาพ TEM แบบ negative staining ของไลโปโซมที่เตรียมจาก SPC

- (A) Empty liposomes
- (B) BAY liposomes
- (C) DOX liposomes
- (D) BAY-DOX liposomes

4.8 การประเมินความคงสภาพของไลโปโซมที่เก็บกัก BAY และ DOX ร่วมกัน

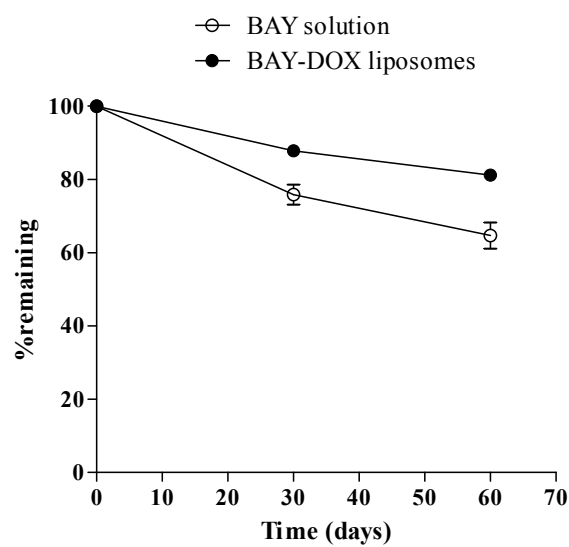
ความคงสภาพทางเคมี และทางกายภาพเป็นปัจจัยที่สำคัญสำหรับประเมินระยะเวลาในการเก็บรักษาของไลโปโซม ในการทดลองนี้ไลโปโซมขนาด 200 ที่เตรียมจาก SPC ด้วยวิธี TF ซึ่งเก็บกัก BAY และ DOX ร่วมกัน ถูกประเมินความคงสภาพทั้งทางเคมี และกายภาพที่อุณหภูมิที่กำหนด

4.8.1 ความคงสภาพทางเคมี

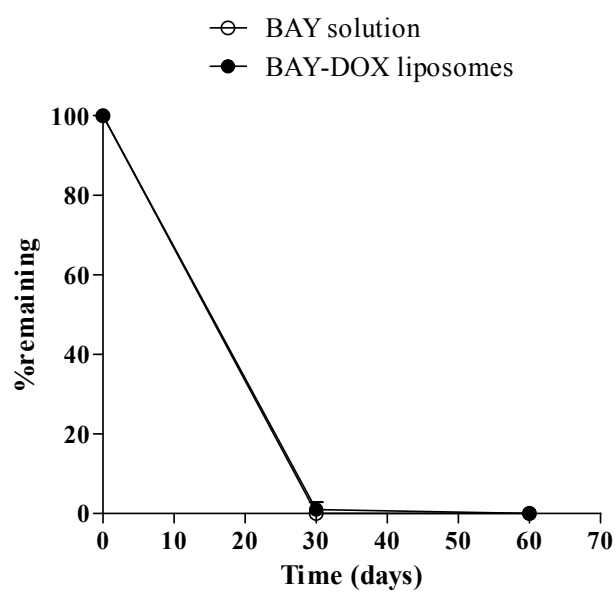
ความคงสภาพทางเคมีของ BAY และ DOX ที่เก็บกักไว้ในไลโปโซม ถูกประเมินเป็นช่วงระยะเวลา 2 เดือนที่อุณหภูมิ 4 และ 30 °C ด้วยวิธี HPLC ซึ่งผลการทดลองได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.25-4.28

ในกรณีของ BAY ที่ศึกษาความคงสภาพที่ 4 °C พบว่าอัตราการเสื่อมสลายมีแนวโน้มลดลงเมื่อถูกเก็บกักในไลโปโซม โดยที่ระยะเวลา 2 เดือนนั้น BAY ที่ถูกเก็บกักในไลโปโซม เสื่อมสลายไปประมาณ 20 % เมื่อเปรียบเทียบกับ BAY ในรูปสารละลายซึ่งพบว่ามีอัตราการเสื่อมสลายไปประมาณ 40 % ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการเก็บกักสารไว้ในไลโปโซมนั้นสามารถช่วยเพิ่มความคงสภาพของ BAY ได้ ถึงแม้ว่าในการศึกษานี้ไม่ได้ทำการระบุกลไกเกี่ยวกับการเสื่อมสลายของ BAY แต่จากการพิจารณาโครงสร้างคาดว่า การเสื่อมสลายของ BAY นั้นน่าจะเกิดจากปฏิกิริยา hydrolysis ดังนั้นความคงสภาพที่เพิ่มขึ้นของ BAY ที่ถูกเก็บกักไว้ในไลโปโซมนั้นอาจเป็นเพราะโมเลกุลของ BAY ที่สอดแทรกเข้าสู่ผนังกันไลโปโซมซึ่งเป็นส่วนไขมันที่มีความไม่ชอบน้ำสูง จึงปกป้อง BAY จากการเสื่อมสลายด้วยปฏิกิริยา hydrolysis ได้ อย่างไรก็ตามพบว่าเมื่อศึกษาความคงสภาพที่ 30 °C นั้น ทั้ง BAY ที่เก็บกักในไลโปโซม หรือ BAY ในรูปสารละลายนั้นเสื่อมสลายหมดสิ้นภายในเวลา 1 เดือน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเสถียรภาพของ BAY นั้นเป็นกลไกที่ขึ้นกับอุณหภูมิ และการเก็บกัก BAY ในไลโปโซมไม่สามารถที่จะป้องกันการเสื่อมสลายได้อย่างสมบูรณ์

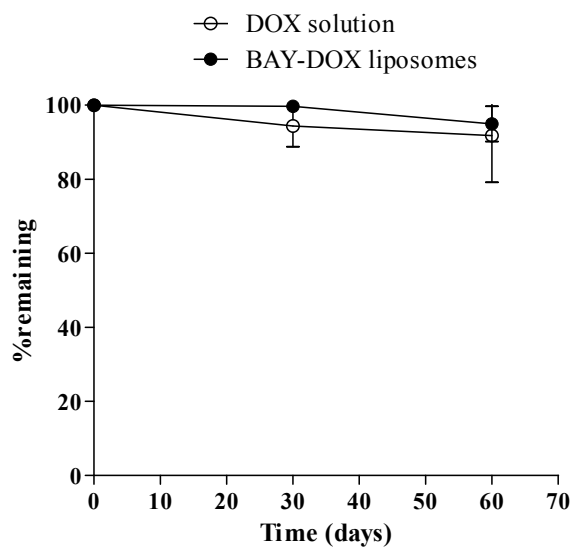
ในกรณีของ DOX ทั้งที่อยู่ในรูปสารละลาย และเก็บกักในไลโปโซมพบว่ามีความคงสภาพตลอดช่วงระยะเวลา 2 เดือน ที่ 4 °C จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าความคงสภาพของ DOX ในรูปสารละลายนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายด้าน เช่น อุณหภูมิ แสง pH (63, 64) ดังนั้นการเพิ่มอุณหภูมิจึงอาจเร่งปฏิกิริยาการเสื่อมสลายได้ ซึ่งที่ 30 °C พบว่า DOX เสื่อมสลายไปประมาณ 20% โดยไม่พบความแตกต่างระหว่าง DOX ในรูปสารละลายหรือที่เก็บกักในไลโปโซม ซึ่งกลไกการเสื่อมสลายของ DOX นั้นเป็นปฏิกิริยาแบบ hydrolysis (63, 64) ดังนั้นผลการทดลองที่การเสื่อมสลายของ DOX ทั้งแบบสารละลายและเก็บกักในไลโปโซมไม่แตกต่างกันนั้น อาจเนื่องมาจาก DOX ถูกเก็บกักอยู่ภายในแกนน้ำของไลโปโซม



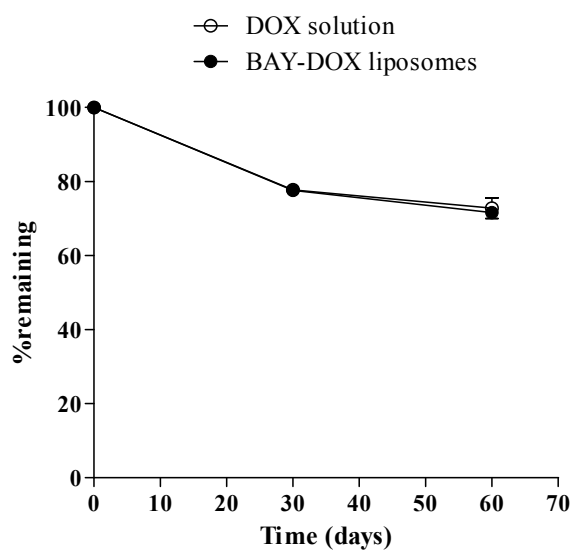
รูปที่ 4.25 ความคงสภาพทางเคมีของ BAY ที่ 4 °C ระยะเวลา 2 เดือน (Data represent mean and SD as error bar of three experiments.)



รูปที่ 4.26 ความคงสภาพทางเคมีของ BAY ที่ 30 °C ระยะเวลา 2 เดือน (Data represent mean and SD as error bar of three experiments.)



รูปที่ 4.27 ความคงสภาพทางเคมีของ DOX ที่ 4 °C ระยะเวลา 2 เดือน (Data represent mean and SD as error bar of three experiments.)



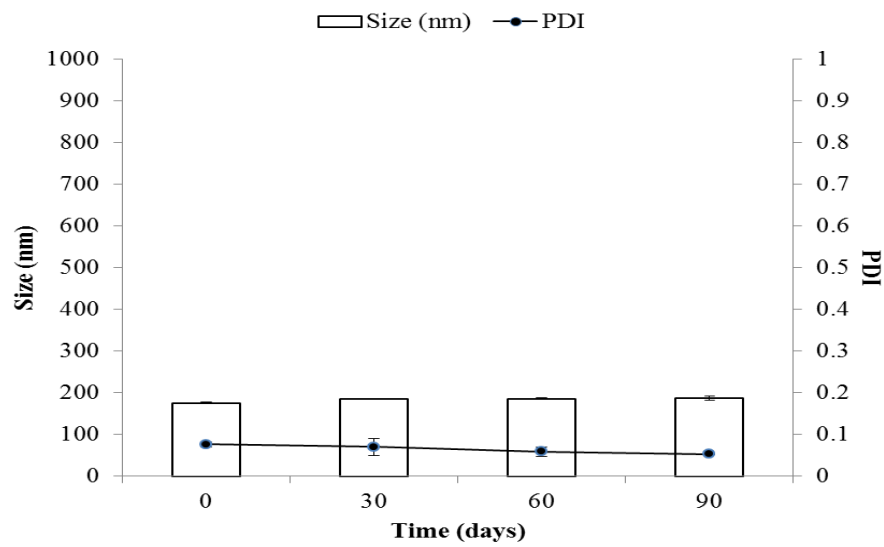
รูปที่ 4.28 ความคงสภาพทางเคมีของ DOX ที่ 30 °C ระยะเวลา 2 เดือน (Data represent mean and SD as error bar of three experiments.)

4.8.2 ความคงสภาพทางกายภาพ

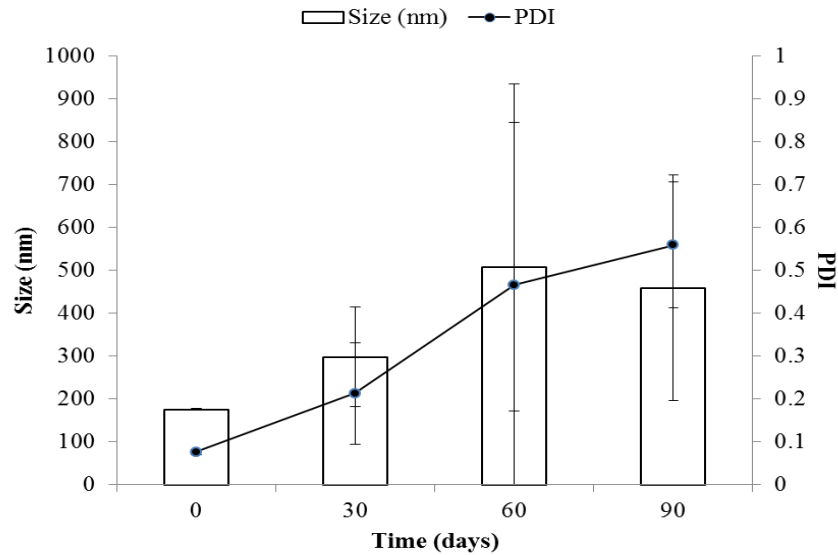
ความคงสภาพทางกายภาพของไลโปโซมที่เก็บกัก BAY และ DOX ร่วมกันถูกประเมินที่ 4 °C และ 30 °C เป็นระยะเวลา 3 เดือน ในด้านขนาดอนุภาค และ zeta potential

ผลการทดลองที่ 4 °C ระยะเวลา 3 เดือนพบว่าขนาดและการกระจายขนาดอนุภาคของไลโปโซมไม่มีการเปลี่ยนแปลง (รูปที่ 4.29) อย่างไรก็ตามเมื่อเก็บที่สภาวะ 30 °C พบว่าทั้งขนาดและการกระจายขนาดอนุภาคของไลโปโซมเพิ่มขึ้นอย่างมากภายในระยะเวลา 1 เดือน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความไม่คงสภาพด้านกายภาพที่อุณหภูมินี้ (รูปที่ 4.30) ซึ่งอาจเนื่องมาจากการเกาะกลุ่ม หรือหลอมรวมของอนุภาคไลโปโซม ส่วนในด้าน zeta potential ของไลโปโซมพบว่า มีแนวโน้มในทิศทางเดียวกับขนาดอนุภาค (รูปที่ 4.31 และ 4.32) โดยค่า zeta potential ของไลโปโซมที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในระยะเวลา 3 เดือน แต่เมื่ออุณหภูมิในการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นเป็น 30 °C นั้นพบว่าค่า zeta potential มีแนวโน้มลดลง อาจเนื่องมาจากการเสื่อมสลายแบบ hydrolysis ของ phospholipids ซึ่งเป็นส่วนประกอบของไลโปโซมซึ่งจะให้ lysophospholipid และ free fatty acid (65, 66)

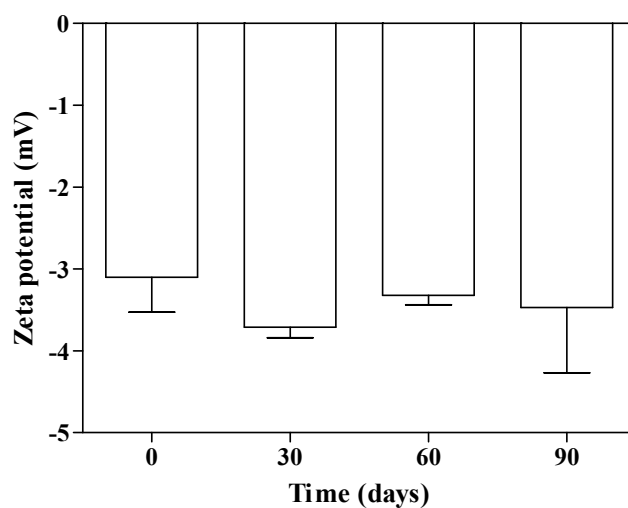
จากผลการทดลองในด้านความคงสภาพทางเคมี และกายภาพของตำรับไลโปโซมที่พัฒนาขึ้นนั้นยังจำกัดอยู่ในระยะเวลา 2-3 เดือน ดังนั้นการทดสอบฤทธิ์ของตำรับไลโปโซมนั้นจะใช้ตำรับไลโปโซมที่เตรียมขึ้นใหม่ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลาไม่เกิน 7 วัน



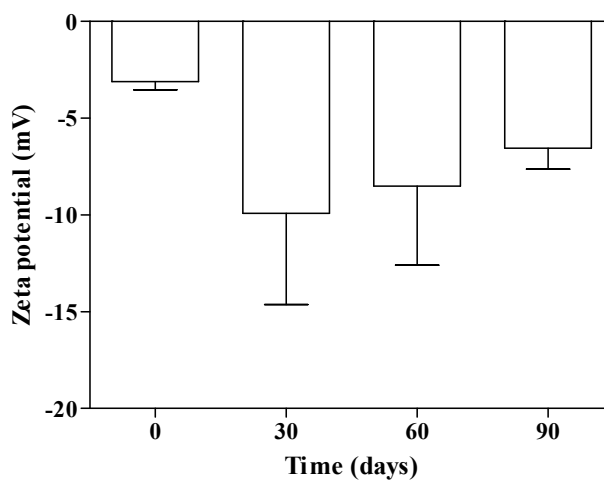
รูปที่ 4.29 ขนาดและการกระจายขนาดอนุภาคไลโปโซมที่กักเก็บ BAY และ DOX ที่ 4 °C ระยะเวลา 3 เดือน (Data represent mean and SD as error bar of three experiments.)



รูปที่ 4.30 ขนาดและการกระจายขนาดอนุภาคไลโปโซมที่กักเก็บ BAY และ DOX ที่ 30 °C ระยะเวลา 3 เดือน (Data represent mean and SD as error bar of three experiments.)



รูปที่ 4.31 zeta potential ของอนุภาคไลโปโซมที่กักเก็บ BAY และ DOX ที่ 4 °C
ระยะเวลา 3 เดือน (Data represent mean and SD as error bar of three
experiments.)



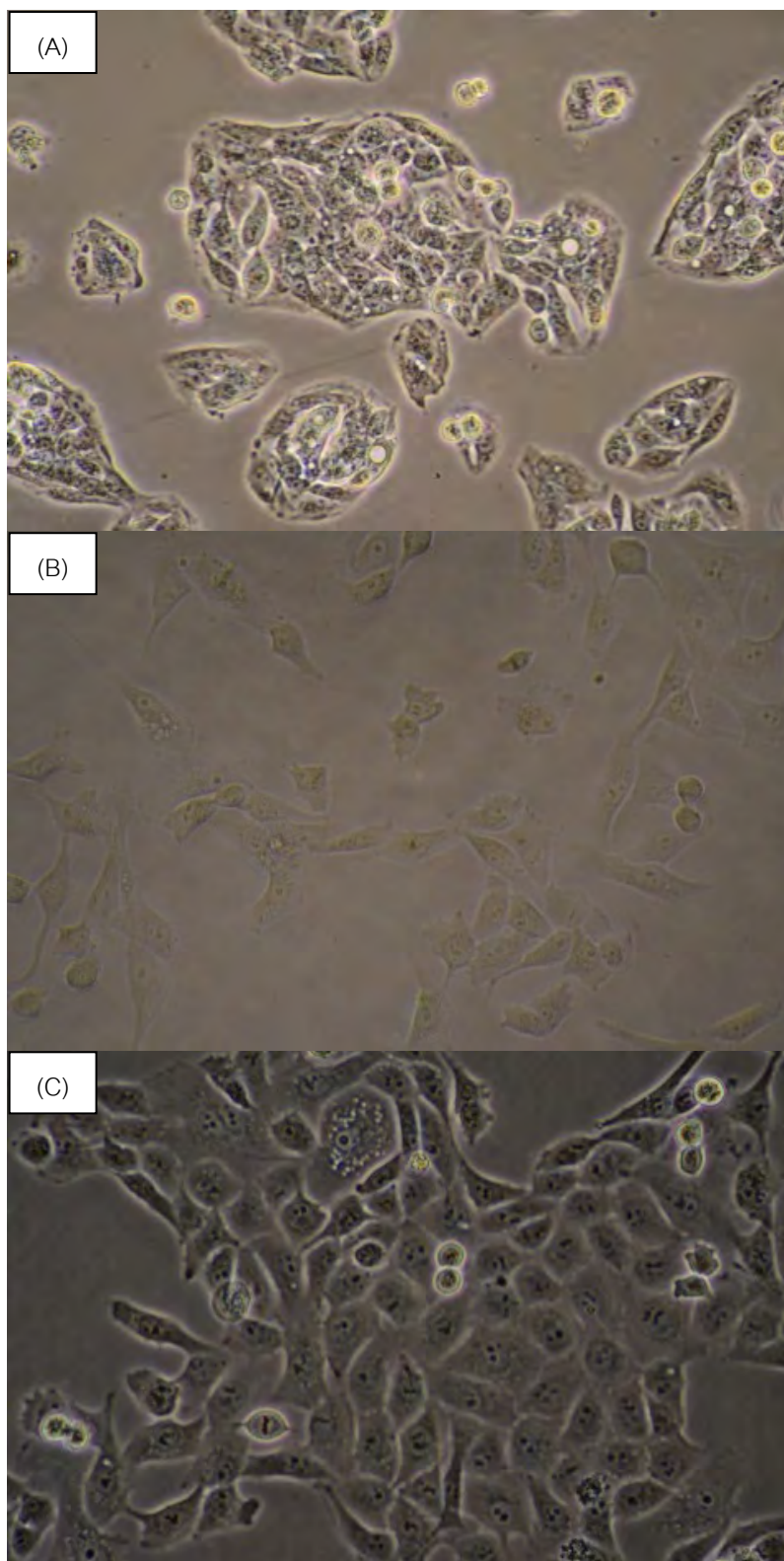
รูปที่ 4.32 zeta potential ของอนุภาคไลโปโซมที่กักเก็บ BAY และ DOX ที่ 30 °C
ระยะเวลา 3 เดือน (Data represent mean and SD as error bar of three
experiments.)

การประเมินฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง

NF-KB เป็นกลุ่มโปรตีนที่ควบคุมการแสดงออกของพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนต่างๆ ที่สำคัญในกระบวนการรอดชีวิตของเซลล์ (27, 67) ดังนั้นการรักษามะเร็งด้วยการให้ยาที่ยับยั้ง NF-KB ร่วมกับยาต้านมะเร็งจึงอาจเป็นหนทางหนึ่งที่จะเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาโรคมะเร็งได้ ซึ่งการควบคุมให้ยาทั้งสองชนิดสามารถออกฤทธิ์ ณ บริเวณที่กำหนดเพื่อให้ผลการตอบสนองของยาเป็นไปตามต้องการจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญยิ่ง การเก็บกักยาสองชนิดเพื่อนำส่งไปพร้อมกันในอนุภาคจึงเป็นแนวทางที่เหมาะสมในการพัฒนา (62) ซึ่งจากผลการศึกษาที่ได้แสดงให้เห็นแล้วว่า DOX และ BAY สามารถถูกเก็บกักร่วมกันได้โดยในอนุภาคไลโปโซมที่เตรียมจาก SPC อย่างไรก็ตามการควบคุมให้ขนาดยาที่อยู่ภายในอนุภาคเดียวกันให้มีปริมาณตามที่กำหนดเป็นเรื่องที่ทำได้ยาก ดังนั้นการเก็บกักยาแต่ละชนิดในอนุภาคที่ต่างกันแต่มีองค์ประกอบเหมือนกันนั้นจึงอาจเป็นแนวทางที่น่ามีความเป็นไปได้ในการนำมาใช้มากกว่าเนื่องจากโดยพื้นฐานการนำส่งยาแล้วอนุภาคที่มีส่วนประกอบที่เหมือนกันนั้น สามารถที่จะนำส่งเข้าสู่เป้าหมายได้พร้อมกัน ดังนั้นในการวิจัยในครั้งนี้ จึงเลือกประเมินฤทธิ์การต้านมะเร็งของตำรับไลโปโซมที่เก็บกัก DOX และ BAY แยกกัน แต่มีองค์ประกอบของอนุภาคเหมือนกัน เซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงสามชนิดได้แก่ A549, HepG2 และ SK-Hep-1 ถูกนำมาใช้เป็นต้นแบบในการศึกษา (รูปที่ 4.33) โดย A549 เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปอด ส่วน HepG2 และ SK-Hep-1 เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งตับ

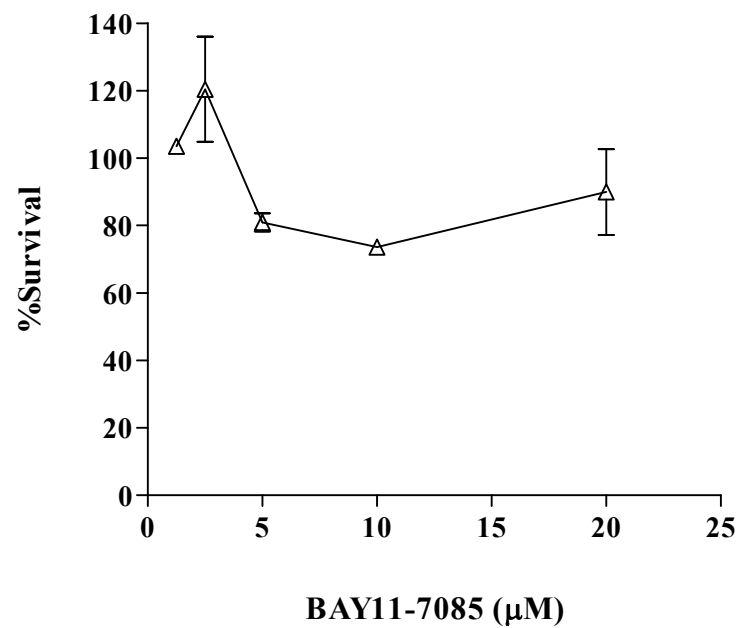
4.9 ความในการตอบสนองของเซลล์เพาะเลี้ยงต่อ BAY

ในการทดลองนี้ BAY ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (1.25, 2.5, 5, 10 and 20 μ M) ถูกทดสอบในเซลล์มะเร็งสามชนิดได้แก่ A549, HepG2 SK-Hep-1 เพื่อประเมินความไวในการตอบสนองของเซลล์ต่อ BAY ซึ่งเซลล์ทั้งสามชนิดนี้มีระดับ basal NF-KB activity ต่างกัน จากรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าเซลล์ SK-Hep-1 นั้นมีระดับ basal NF-KB activity ที่สูงกว่าเซลล์ HepG2 (68) แต่ไม่พบรายงานของเซลล์ A549 อย่างไรก็ตามจากการอ้างอิงผลการทดลองในห้องปฏิบัติการชีวเคมี ของสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์นั้นได้แสดงให้เห็นว่าเซลล์ชนิดนี้ก็มีระดับ basal NF-KB activity ที่ต่ำเช่นกัน เซลล์เหล่านี้จะถูกบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้บรรยากาศที่มี CO₂ ปริมาณ 5% (v/v) และความชื้นสัมพัทธ์ที่ 80% หลังจากเติมสารทดสอบเป็นเวลา 72 ชม. การรอดชีวิตของเซลล์ถูกประเมินด้วยวิธี MTT assay

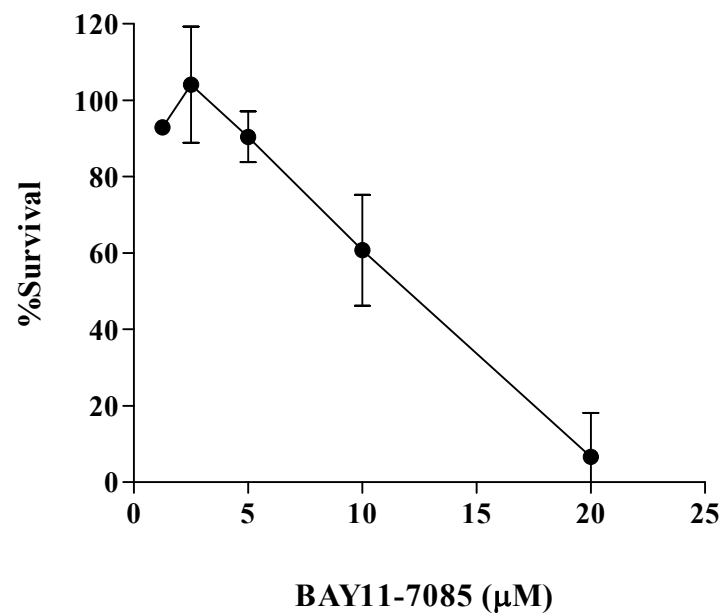


รูปที่ 4.33 รูปร่างลักษณะของเซลล์ (A) HepG2, (B) SK-Hep-1 and (C) A549

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของ BAY ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในเซลล์สามชนิด แสดงไว้ในรูปที่ Figure 4.34-4.36 ซึ่งเซลล์แต่ละชนิดนั้นให้ผลการตอบสนองที่แตกต่างกันต่อ BAY ซึ่งเป็นตัวยับยั้ง NF- κ B แบบยับยั้ง I κ B phosphorylation (69, 70) โดยพบว่าร้อยละ การรอดชีวิตของเซลล์ SK-Hep-1 และ A549 มีแนวโน้มลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BAY ในขณะที่ HepG2 นั้นแทบไม่มีการตอบสนองต่อ BAY เลย เช่นที่ BAY ความเข้มข้น 20 μ M ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ A549 อยู่ที่ประมาณ 40% ส่วนของ SK-Hep-1 อยู่ที่ประมาณ 10% ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเซลล์ SK-Hep1 มีการตอบสนองต่อ BAY ได้ดี ความแตกต่างในการตอบสนองต่อ BAY นั้นอาจเนื่องมาจากระดับ basal NF- κ B activity ที่ต่างกัน NF- κ B นั้นเป็น กลุ่มโปรตีนที่มีความสำคัญต่อเซลล์ (71) โดยระดับ basal NF- κ B activity มีผลต่อ transcriptional activity (68) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่กลไกการทำงานของ NF- κ B ขึ้นกับ ชนิดของเซลล์มะเร็งด้วย ถึงแม้ว่าทั้งเซลล์ SK-Hep-1 และ HepG2 เป็นเซลล์มะเร็งตับ เหมือนกัน แต่ระดับ basal NF- κ B activity ของ SK-Hep-1 นั้นมีระดับที่สูงกว่า ซึ่งทำให้การ ดำรงชีวิตของเซลล์ SK-Hep-1 นั้นขึ้นอยู่กับการทำงานของ NF- κ B มากกว่า ส่งผลให้เซลล์ SK-Hep-1 ตอบสนองต่อ BAY ดีกว่าเซลล์ HepG2 การทดลองนี้จึงชี้ให้เห็นว่า BAY นั้นมี ผลตอบสนองที่จำเพาะกับเซลล์ที่มีระดับ basal level of NF- κ B ที่สูง (69, 70) แนวโน้มการ ตอบสนองต่อเซลล์ A549 ก็เป็นเช่น HepG2 โดย A549 ซึ่งมีระดับ basal NF- κ B ที่ต่ำมีผลการ ตอบสนองต่อ BAY ที่ด้อยกว่าเซลล์ SK-Hep-1 การวิจัยนี้จึงให้แสดงให้เห็นว่าการนำ BAY มา ใช้เพื่อการต้านมะเร็งนั้นควรมุ่งไปยังมะเร็งชนิดที่มีระดับ basal NF- κ B สูง ซึ่งในการทดลอง ต่อไปทางผู้วิจัยจึงเลือกใช้ SK-Hep-1 เป็นต้นแบบในการศึกษาต่อไปเพื่อทดสอบฤทธิ์ของ ตำรับไลโปโซมที่พัฒนาขึ้น



รูปที่ 4.34ฤทธิ์ต้านมะเร็งของ BAY ต่อเซลล์ HepG2. (Data are expressed as mean $\pm$ SD from three independent experiments)



รูปที่ 4.35ฤทธิ์ต้านมะเร็งของ BAY ต่อเซลล์ SK-Hep-1 (Data are expressed as mean $\pm$ SD from three independent experiments)

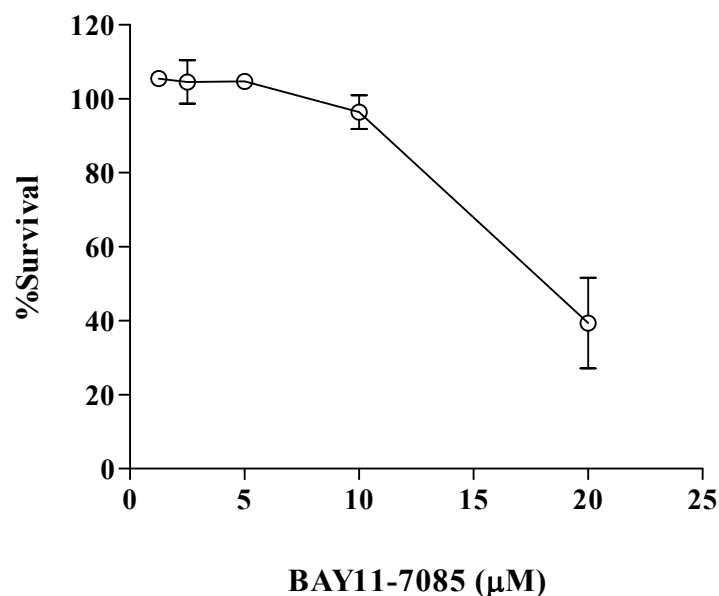
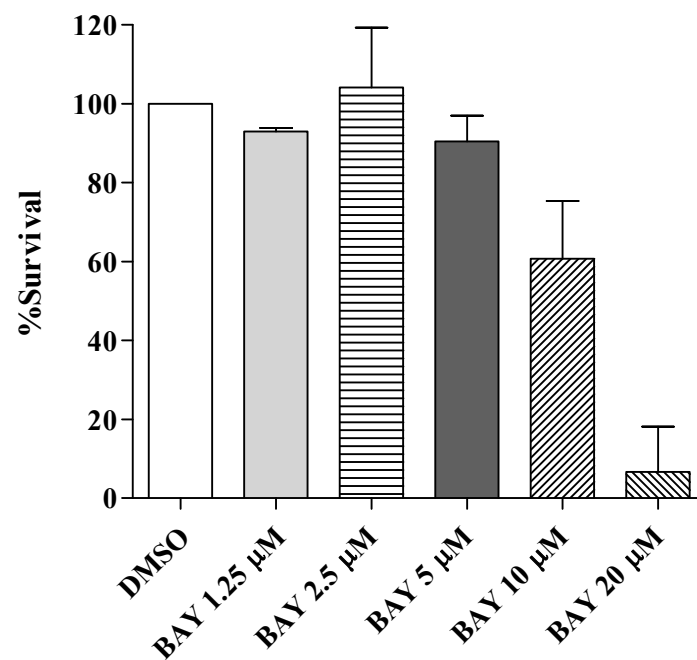


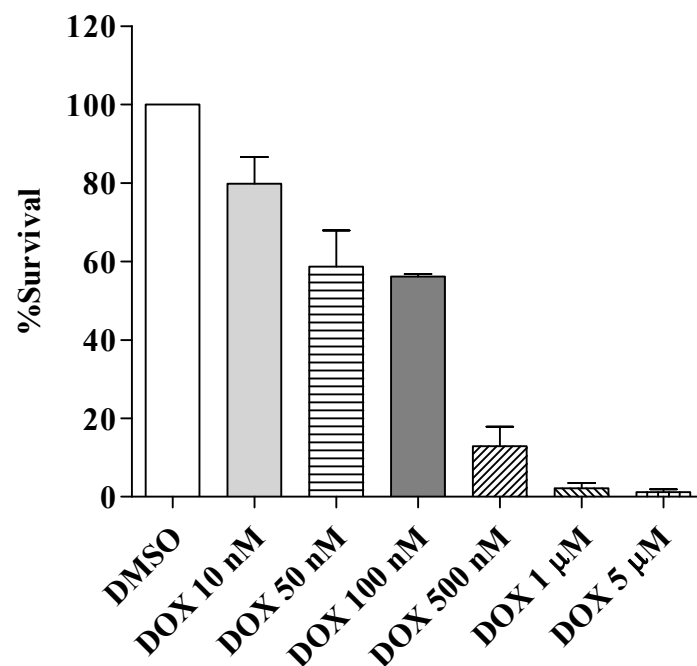
Figure 4.36ฤทธิ์ต้านมะเร็งของ BAY ต่อเซลล์ A549 (Data are expressed as mean $\pm$ SD from three independent experiments)

4.10 ฤทธิ์ต้านมะเร็งของ BAY และ DOX ต่อ SK Hep1

ในการทดลองนี้ฤทธิ์ต้านมะเร็งของตัวยาเดี่ยวถูกประเมินเพื่อหาขนาดยาที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาต่อไป โดย SK-Hep1 ถูกทดสอบกับ BAY ที่ความเข้มข้น 1.25, 2.5, 5, 10 และ 20 μ M ส่วน DOX ถูกทดสอบที่ความเข้มข้น 10, 50, 100, 500 nM, 1 และ 5 μ M โดยประเมินการรอดชีวิตของเซลล์หลังจากเติมสารทดสอบ 72 ชม. โดยวิธี MTT รูปที่ 4.37 และ 4.38 แสดงร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์หลังทดสอบกับ BAY และ DOX ตามลำดับ ซึ่งพบว่าการรอดชีวิตของเซลล์ลดลงตามขนาดยาที่เพิ่มขึ้นของสารทั้งสองชนิด โดย BAY ที่ 5 และ 10 μ M (อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ ~90% และ ~60% ตามลำดับ) และ DOX ที่ 10 และ 100 nM (อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ 80% และ ~60% ตามลำดับ) ถูกเลือกใช้ในการศึกษาต่อไป เนื่องจากที่ความเข้มข้นนี้เซลล์ยังมีอัตราการรอดชีวิตที่สามารถนำมาศึกษาถึงการเสริมฤทธิ์ของสารทั้งสองชนิดได้อยู่



รูปที่ 4.37 ผลการตอบสนองของเซลล์ SK-Hep1 ต่อ BAY ที่ความเข้มข้นต่างๆ (Data are presented as mean $\pm$ SD from three independent experiments)



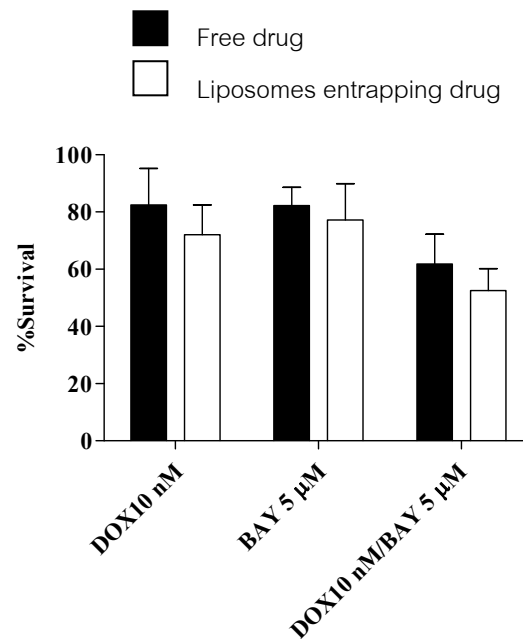
รูปที่ 4.38 ผลการตอบสนองของเซลล์ SK-Hep1 ต่อ DOX ที่ความเข้มข้นต่างๆ (Data are presented as mean $\pm$ SD from three independent experiments)

4.11ฤทธิ์ต้านมะเร็งของไลโปโซมที่เก็บกัก BAY และ DOX ต่อ SK-Hep1

BAY และ DOX ในรูปแบบยาเดี่ยว หรือผสมถูกศึกษาฤทธิ์ต่อเซลล์ SK-Hep1 เพื่อประเมินว่าการให้ยาร่วมกันสามารถเสริมฤทธิ์ทางการรักษาได้หรือไม่ โดยเซลล์ SK-Hep1 ถูกทดสอบกับไลโปโซมที่เก็บกัก BAY และ DOX ซึ่งบริหารยาร่วมกัน เปรียบเทียบกับยาในรูปแบบสารละลาย DMSO หรือไลโปโซมที่เก็บกักยาชนิดเดียว โดยใช้ความเข้มข้นสองระดับของ BAY (5 และ 10 μ M) และ DOX (10 และ 100 nM) ทดสอบกับเซลล์ เมื่อครบ 72 ชม. เซลล์ถูกประเมินการรอดชีวิตด้วย MTT assay ต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 4.39-4.42

เมื่อให้ BAY และ DOX รูปแบบสารละลายที่ความเข้มข้น 5 μ M และ 10 nM ตามลำดับในรูปแบบเดี่ยวต่อเซลล์ SK-Hep1 พบว่าเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตที่ประมาณ 80% (รูปที่ 4.39) หลังจากบริหารยาร่วมกันพบว่าประสิทธิภาพในการฆ่าเซลล์เพิ่มขึ้นเป็นประมาณ 60% ส่วนการให้ยาในรูปแบบไลโปโซมทั้งรูปแบบยาเดี่ยว หรือนำส่งยาร่วมกันนั้นพบว่าให้ผลการตอบสนองไปในทิศทางเดียวกับการทดสอบด้วยสารละลายของตัวยา โดยมีฤทธิ์ที่เทียบเคียงหรือเพิ่มขึ้น โดยพบว่าการให้ยาในรูปแบบไลโปโซมที่นำส่งร่วมกันระหว่าง BAY และ DOX สามารถเพิ่มฤทธิ์ขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับการให้ยาเดี่ยวในรูปแบบสารละลาย ดังนั้นฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งสูงสุดที่พบเมื่อใช้ความเข้มข้นของ BAY 5 μ M และ DOX 10 nM นั้นพบในการใช้ไลโปโซมนำส่ง BAY และ DOX ร่วมกัน โดยมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่ประมาณ 50% ซึ่งผลการทดลองเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BAY และ DOX เป็น 10 μ M และ 100 nM ตามลำดับนั้นพบว่าไม่มีแนวโน้มไปในทางเดียวกัน (รูปที่ 4.40-4.42)

โดยสรุปแล้วผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการบริหารยาร่วมกันระหว่าง BAY ซึ่งเป็นสารยับยั้ง NF-KB และ DOX ซึ่งเป็นสารต้านมะเร็งนั้นสามารถเพิ่มฤทธิ์ในการต้านมะเร็งในเซลล์ SK-Hep1 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งตับที่มีระดับ basal NF-KB ที่สูงได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นเพียงแนวโน้มการเสริมฤทธิ์เท่านั้น แต่ยังไม่อาจแสดงถึงความแตกต่างได้อย่างเด่นชัดได้ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุมาจากความเป็นไปได้ 3 กรณีคือ 1) ความไวต่อการตอบสนองของเซลล์มะเร็งที่อาจแตกต่างกันไปต่อสารออกฤทธิ์เนื่องจากกลไกการทำงานระดับเซลล์ที่ต่างกัน 2) การเสริมฤทธิ์ของสารสองชนิดอาจไม่ได้ขึ้นอยู่กับรูปแบบ และกลไกการต้านเซลล์มะเร็งของสารนั้น (72) 3) การบริหารยาร่วมกันโดยอัตราส่วนระหว่างยาทั้งสองชนิดและความเข้มข้นอาจไม่เหมาะสม (73-75) ในส่วนของไลโปโซมนั้น ถึงแม้ว่าการเก็บกักยาในไลโปโซมอาจไม่ส่งผลอย่างเด่นชัดในการเพิ่มฤทธิ์ของสารที่ถูกเก็บกัก แต่มีประโยชน์ในด้านการเพิ่มความคงตัวของสารที่ถูกเก็บกัก อีกทั้งยังสามารถควบคุมการกระจายของยา และเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยาที่นำส่งร่วมกันซึ่งมีคุณสมบัติทางเคมีกายภาพที่แตกต่างกันได้ในร่างกาย



รูปที่ 4.39ฤทธิ์ต้านมะเร็งของไลโปโซมที่นำส่ง BAY 5 μM และ DOX 10 nM ร่วมกันต่อเซลล์ SK-Hep-1 เปรียบเทียบกับยาในรูปแบบสารละลาย (Data are presented as mean ± SD from three independent experiments)

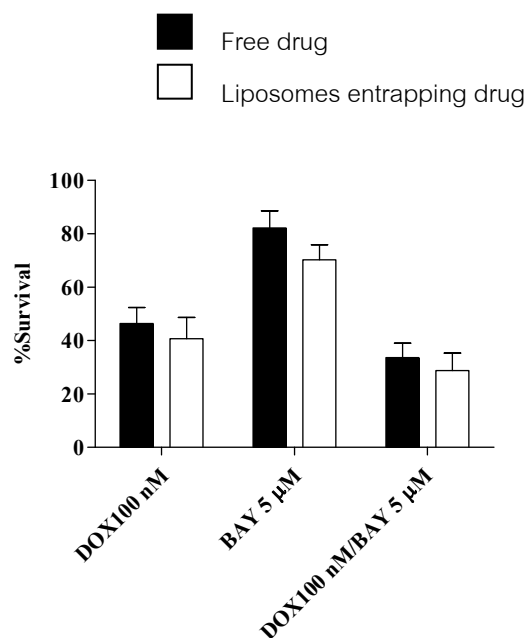
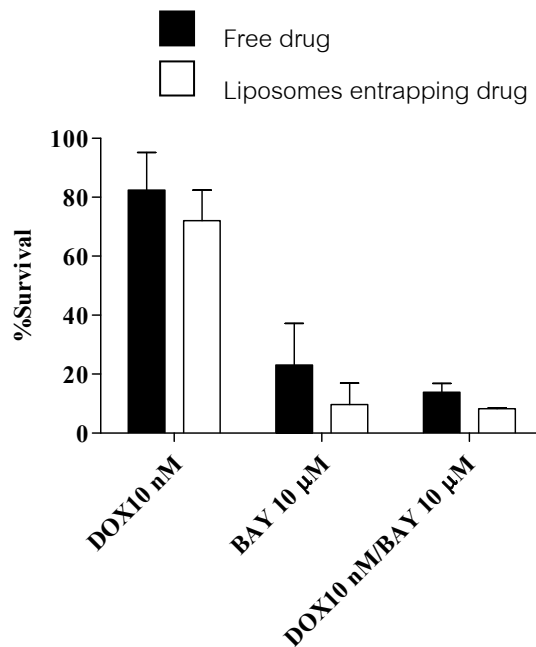
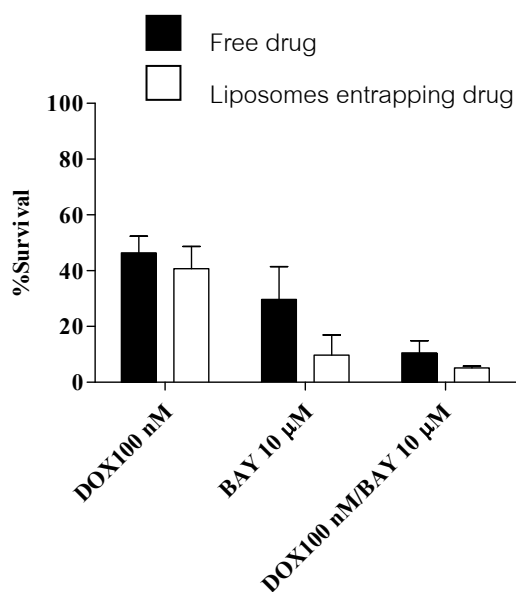


Figure 4.40 ฤทธิ์ต้านมะเร็งของไลโปโซมที่นำส่ง BAY 5 μM และ DOX 100 nM ร่วมกันต่อเซลล์ SK-Hep-1 เปรียบเทียบกับยาในรูปแบบสารละลาย (Data are presented as mean ± SD from three independent experiments)



รูปที่ 4.41ฤทธิ์ต้านมะเร็งของไลโปโซมที่นำส่ง BAY 10 μM และ DOX 10 nM ร่วมกันต่อเซลล์ SK-Hep-1 เปรียบเทียบกับยาในรูปแบบสารละลาย (Data are presented as mean ± SD from three independent experiments)



รูปที่ 4.42ฤทธิ์ต้านมะเร็งของไลโปโซมที่นำส่ง BAY 10 μM และ DOX 100 nM ร่วมกันต่อเซลล์ SK-Hep-1 เปรียบเทียบกับยาในรูปแบบสารละลาย (Data are presented as mean ± SD from three independent experiments)

Conclusion

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาระบบที่สามารถนำส่งยาต้านมะเร็งร่วมกับสารยับยั้ง NF-KB โดยใช้ตัวพาอนุภาคไลโปโซม DOX และ BAY ซึ่งเป็นสารต้านมะเร็ง และสารยับยั้ง NF-KB ตามลำดับ ได้ถูกเลือกใช้เป็นต้นแบบในงานวิจัยชิ้นนี้ จากผลการทดลองโดยสรุปพบว่า DOX และ BAY สามารถถูกเก็บกักร่วมกันได้ใอนุภาคไลโปโซมเดียวกัน แต่จากข้อจำกัดในการควบคุมขนาดยาแต่ละชนิดในอนุภาค การแยกเก็บกักรวมทั้งสองคนละอนุภาคที่สร้างขึ้นจากส่วนประกอบที่เหมือนกันอาจเป็นแนวทางที่เหมาะสมในการนำไปใช้ และการผลิตมากกว่า ซึ่งการเก็บกักรวมในไลโปโซม สามารถเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของสารนั้น และเมื่ออนุภาคไลโปโซมสร้างขึ้นจากส่วนประกอบที่เหมือนกัน การกระจายตัวและการนำส่งยาเข้าสู่เป้าหมายจะสามารถควบคุมได้ในลักษณะเดียวกัน จากการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งต่อเซลล์พบว่า การให้ยาร่วมกันสามารถเสริมประสิทธิภาพความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด SK-Hep-1 ได้ โดยไลโปโซมเก็บกัก BAY และ DOX ทั้งในรูปแบบเดี่ยว และแบบบริหารยาร่วมกันทั้งสองชนิด ให้ผลการยับยั้งเซลล์มะเร็งที่มีแนวโน้มเหมือนกับการบริหารยาที่ไม่ได้ถูกเก็บกักในไลโปโซม ด้วยประสิทธิภาพที่เท่าเทียมหรือมากกว่า แต่การบริหารยาเมื่อเก็บกักในไลโปโซมนั้น โดยทั่วไปแล้วมีข้อดีเหนือกว่าการให้ยาอิสระในทั้งด้านความสามารถในการควบคุมการกระจายตัว และควบคุมเป้าหมายในการนำส่งเมื่อเข้าสู่ร่างกายได้

จากผลการทดลองโดยรวมแล้ว งานวิจัยชิ้นนี้ชี้ให้เห็นว่าการพัฒนาการนำส่งร่วมกันของยาต้านมะเร็ง และสารยับยั้ง NF-KB ด้วยไลโปโซม โดยใช้สาร DOX และ BAY เป็นต้นแบบสามารถเตรียมขึ้นได้ และมีความเป็นไปได้ที่จะใช้เป็นแนวทางใหม่ในการเพิ่มประสิทธิภาพให้แก่การรักษาด้วยเคมีบำบัด อย่างไรก็ตามการพัฒนาเพื่อให้กลยุทธ์นี้สามารถใช้ในเชิงคลินิกได้ อาจจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องของอัตราส่วนของยาที่ใช้ในการบริหารร่วมกัน รวมถึงขนาดยาที่มีความเหมาะสมเพื่อให้เกิดประสิทธิผลในการรักษาสูงสุด นอกจากนี้การศึกษากการปลดปล่อยของยาที่เก็บกักจากไลโปโซม ณ เป้าหมายของโรคก็เป็นสิ่งที่มีความสำคัญที่ต้องมีการศึกษาต่อไป

References

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
2. Shen HM, Tergaonkar V. NF kappa B signaling in carcinogenesis and as a potential molecular target for cancer therapy. *Apoptosis*. 2009;14(4):348-63.
3. Baud V, Karin M. Is NF-kB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(1):33-40.
4. Saggat S, Chernoff KA, Lodha S, Horev L, Kohl S, Honjo RS, et al. CYLD mutations in familial skin appendage tumours. *J Med Genet*. 2008;45(5):298-302.
5. Lenz G, Davis RE, Ngo VN, Lam L, George TC, Wright GW, et al. Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science*. 2008;319(5870):1676-9.
6. Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, et al. NF-kappa B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*. 2004;431(7007):461-6.
7. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, et al. IKK beta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*. 2004;118(3):285-96.
8. Burstein E, Duckett CS. Dying for NF-kappa B? Control of cell death by transcriptional regulation of the apoptotic machinery. *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15(6):732-7.
9. Kucharczak J, Simmons MJ, Fan YJ, Gelinas C. To be, or not to be: NF-kappa B is the answer - role of Rel/NF-kappa B in the regulation of apoptosis. *Oncogene*. 2003;22(56):8961-82.
10. Dutta J, Fan Y, Gupta N, Fan G, Gelinas C. Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappa B. *Oncogene*. 2006;25(51):6800-16.
11. Hu MCT, Lee DF, Xia WY, Golfman LS, Fu OY, Yang JY, et al. I kappa B kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell*. 2004;117(2):225-37.
12. Ahmed KM, Li JJ. ATM-NF-kappa B connection as a target for tumor radiosensitization. *Curr Cancer Drug Targets*. 2007;7(4):335-42.
13. Das KC, White CW. Activation of NF-kB by antineoplastic agents. Role of protein kinase C. *J Biol Chem*. 1997;272(23):14914-20.

14. Bottero V, Busuttill V, Loubat A, Magne N, Fischel JL, Milano G, et al. Activation of nuclear factor kappa B through the IKK complex by the topoisomerase poisons SN38 and doxorubicin: A brake to apoptosis in HeLa human carcinoma cells. *Cancer Res.* 2001;61(21):7785-91.
15. Baumann P, Mandl-Weber S, Oduncu F, Schmidmaier R. Alkylating agents induce activation of NF kappa B in multiple myeloma cells. *Leuk Res.* 2008;32(7):1144-7.
16. Montagut C, Tusquets I, Ferrer B, Corominas JM, Bellosillo B, Campas C, et al. Activation of nuclear factor-kappa B is linked to resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Endocr-Relat Cancer.* 2006;13(2):607-16.
17. Tapia MA, González-Navarrete I, Dalmases A, Bosch M, Rodriguez-Fanjul V, Rolfe M, et al. Inhibition of the canonical IKK/NFkB pathway sensitizes human cancer cells to doxorubicin. *Cell Cycle.* 2007;6(18):2284-92.
18. Andriollo M, Favier A, Guiraud P. Adriamycin activates NF-kappa B in human lung carcinoma cells by I kappa B alpha degradation. *Arch Biochem Biophys.* 2003;413(1):75-82.
19. Bednarski BK, Ding XY, Coombe K, Baldwin AS, Kim HJ. Active roles for inhibitory kappa B kinases alpha and beta in nuclear factor-kappa B-mediated chemoresistance to doxorubicin. *Mol Cancer Ther.* 2008;7(7):1827-35.
20. Huang Y, Johnson KR, Norris JS, Fan WM. Nuclear Factor-kappa B/I kappa B signaling pathway may contribute to the mediation of paclitaxel-induced apoptosis in solid tumor cells. *Cancer Res.* 2000;60(16):4426-32.
21. Fahy BN, Schlieman MG, Virudachalam S, Bold RJ. Inhibition of AKT abrogates chemotherapy-induced NF-kappa B survival mechanisms: Implications for therapy in pancreatic cancer. *J Am Coll Surg.* 2004;198(4):591-9.
22. Yeh PY, Chuang SE, Yeh KH, Song YC, Ea CK, Cheng AL. Increase of the resistance of human cervical carcinoma cells to cisplatin by inhibition of the MEK to ERK signaling pathway partly via enhancement of anticancer drug-induced NF kappa B activation. *Biochem Pharmacol.* 2002;63(8):1423-30.
23. Sanchez-Perez I, Benitah SA, Martinez-Gomariz M, Lacal JC, Perona R. Cell stress and MEKK1-mediated c-Jun activation modulate NF kappa B activity and cell viability. *Mol Biol Cell.* 2002;13(8):2933-45.
24. Nakanishi C, Toi M. Nuclear factor-KB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(4):297-309.
25. Gilmore TD, Herscovitch M. Inhibitors of NF-kB signaling: 785 and counting. *Oncogene.* 2006;25(51):6887-99.

26. Aggarwal BB, Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol.* 2006;71(10):1397-421.
27. Lin Y, Bai L, Chen WJ, Xu SL. The NF-kappa B activation pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy. *Expert Opin Ther Targets.* 2010;14(1):45-55.
28. Drexler HCA. Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(3):855-60.
29. Schwartz AL, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases. *Annu Rev Med.* 1999;50:57-74.
30. Scaife CL, Kuang J, Wills JC, Trowbridge DB, Gray P, Manning BM, et al. Nuclear factor kB inhibitors induce adhesion-dependent colon cancer apoptosis: Implications for metastasis. *Cancer Res.* 2002;62(23):6870-8.
31. Mori N, Yamada Y, Ikeda S, Yamasaki Y, Tsukasaki K, Tanaka Y, et al. Bay 11-7082 inhibits transcription factor NF-kB and induces apoptosis of HTLV-I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. *Blood.* 2002;100(5):1828-34.
32. Mori N, Fujii M, Ikeda S, Yamada Y, Tomonaga M, Ballard DW, et al. Constitutive activation of NF-kB in primary adult T-cell leukemia cells. *Blood.* 1999;93(7):2360-8.
33. Berger N, Ben Bassat H, Klein BY, Laskov R. Cytotoxicity of NF-kB inhibitors Bay 11-7085 and caffeic acid phenethyl ester to Ramos and other human B-lymphoma cell lines. *Exp Hematol.* 2007;35(10):1495-509.
34. Mabuchi S, Ohmichi M, Nishio Y, Hayasaka T, Kimura A, Ohta T, et al. Inhibition of NFkB increases the efficacy of cisplatin in *in vitro* and *in vivo* ovarian cancer models. *J Biol Chem.* 2004;279(22):23477-85.
35. Nguyen DM, Chen GA, Reddy R, Tsai W, Schrump WD, Cole Jr. G, et al. Potentiation of paclitaxel cytotoxicity in lung and esophageal cancer cells by pharmacologic inhibition of the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (Akt)-mediated signaling pathway. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004;127(2):365-75.
36. Mabuchi S, Ohmichi M, Nishio Y, Hayasaka T, Kimura A, Ohta T, et al. Inhibition of inhibitor of nuclear factor-kB phosphorylation increases the efficacy of paclitaxel in *in vitro* and *in vivo* ovarian cancer models. *Clin Cancer Res.* 2004;10(22):7645-54.
37. Garcia MG, Alaniz L, Lopes EC, Blanco G, Hajos SE, Alvarez E. Inhibition of NF-kB activity by BAY 11-7082 increases apoptosis in multidrug resistant leukemic T-cell lines. *Leuk Res.* 2005;29(12):1425-34.

38. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, ICH harmonised tripartite guideline, "Validation of analytical procedures": text and methodology Q2(R1). 2005
39. Allen TM, Cullis PR. Drug delivery systems: Entering the mainstream. *Science*. 2004;303(5665):1818-22.
40. Sharma A, Sharma US. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *Int J Pharm*. 1997;154(2):123-40.
41. Szoka F, Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse phase evaporation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978;75(9):4194-8.
42. Gulati M, Grover M, Singh S, Singh M. Lipophilic drug derivatives in liposomes. *Int J Pharm*. 1998;165(2):129-68.
43. New R. Liposomes; a practical approach. New York: Oxford University Press; 1990.
44. Gregoriadis G. Drug entrapment in liposomes. *FEBS Lett*. 1973;36(3):292-6.
45. Ma L, Ramachandran C, Weiner ND. Partitioning of an homologous series of alkyl para-aminobenzoates into multilamellar liposomes - Effect of liposome composition. *Int J Pharm*. 1991;70(3):209-18.
46. Betageri GV, Parsons DL. Drug encapsulation and release from multilamellar and unilamellar liposomes. *Int J Pharm*. 1992;81(2-3):235-41.
47. Mohammed AR, Weston N, Coombes AGA, Fitzgerald M, Perrie Y. Liposome formulation of poorly water soluble drugs: optimisation of drug loading and ESEM analysis of stability. *Int J Pharm*. 2004;285(1-2):23-34.
48. Socaciu C, Jessel R, Diehl HA. Competitive carotenoid and cholesterol incorporation into liposomes: Effects on membrane phase transition, fluidity, polarity and anisotropy. *Chem Phys Lipids*. 2000;106(1):79-88.
49. Walde P, Ichikawa S. Enzymes inside lipid vesicles: Preparation, reactivity and applications. *Biomol Eng*. 2001;18(4):143-77.
50. Nii T, Ishii F. Dialkylphosphatidylcholine and egg yolk lecithin for emulsification of various triglycerides. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2005;41(4):305-11.
51. Fenske DB, Cullis PR. Encapsulation of drugs within liposomes by pH-gradient techniques. In: Gregoriadis G, editor. *Liposome Technology*. 3 ed. New York: Informa Healthcare; 2007.
52. Barenholz Y. Doxil[®] - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *J Controlled Release*. 2012;160(2):117-34.

53. Harrigan PR, Wong KF, Redelmeier TE, Wheeler JJ, Cullis PR. Accumulation of doxorubicin and other lipophilic amines into large unilamellar vesicles in response to transmembrane pH gradients. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1149(2):329-38.
54. Haran G, Cohen R, Bar LK, Barenholz Y. Transmembrane ammonium-sulfate gradients in liposomes produce efficient and stable entrapment of amphipathic weak bases. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1151(2):201-15.
55. Mayer LD, Tai LCL, Bally MB, Mitlenes GN, Ginsberg RS, Cullis PR. Characterization of liposomal systems containing doxorubicin entrapped in response to pH gradients. *BBA-Biomembranes*. 1990;1025(2):143-51.
56. Bolotin EM, Cohen R, Bar LK, Emanuel N, Ninio S, Lasic DD, et al. Ammonium sulfate gradients for efficient and stable remote loading of amphipathic weak bases into liposomes and ligandoliposomes. *J Liposome Res*. 1994;4(1):455-79.
57. Fritze A, Hens F, Kimpfler A, Schubert R, Peschka-Süss R. Remote loading of doxorubicin into liposomes driven by a transmembrane phosphate gradient. *BBA-Biomembranes*. 2006;1758(10):1633-40.
58. Mayer LD, Bally MB, Cullis PR. Uptake of adriamycin into large unilamellar vesicles in response to a pH gradient. *BBA - Biomembranes*. 1986;857(1):123-6.
59. Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC. Nanoparticles in medicine: Therapeutic applications and developments. *Clin Pharmacol Ther*. 2008;83(5):761-9.
60. Kim BYS, Rutka JT, Chan WCW. Current concepts: Nanomedicine. *N Engl J Med*. 2010;363(25):2434-43.
61. Couvreur P, Vauthier C. Nanotechnology: Intelligent design to treat complex disease. *Pharm Res*. 2006;23(7):1417-50.
62. Dicko A, Mayer LD, Tardi PG. Use of nanoscale delivery systems to maintain synergistic drug ratios in vivo. *Expert Opin Drug Del*. 2010;7(12):1329-41.
63. Janssen MJH, Crommelin DJA, Storm G, Hulshoff A. Doxorubicin decomposition on storage. Effect of pH, type of buffer and liposome encapsulation. *Int J Pharm*. 1985;23(1):1-11.
64. Beijnen JH, Van der Houwen OAGJ, Underberg WJM. Aspects of the degradation kinetics of doxorubicin in aqueous solution. *Int J Pharm*. 1986;32(2-3):123-31.
65. Grit M, Crommelin DJA. Chemical stability of liposomes: Implications for their physical stability. *Chem Phys Lipids*. 1993;64(1-3):3-18.

66. Zuidam NJ, Gouw HKME, Barenholz Y, Crommelin DJA. Physical (in) stability of liposomes upon chemical hydrolysis: The role of lysophospholipids and fatty acids. *BBA-Biomembranes*. 1995;1240(1):101-10.
67. Bharti AC, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappa B and cancer: Its role in prevention and therapy. *Biochem Pharmacol*. 2002;64(5-6):883-8.
68. Liu TZ, Andrew Hu CC, Chen YH, Stern A, Cheng JT. Differentiation status modulates transcription factor NF-kB activity in unstimulated human hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Lett*. 2000;151(1):49-56.
69. Pierce JW, Schoenleber R, Jesmok G, Best J, Moore SA, Collins T, et al. Novel inhibitors of cytokine-induced IKB α phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects *in vivo*. *J Biol Chem*. 1997;272(34):21096-103.
70. Nasu K, Nishida M, Ueda T, Yuge A, Takai N, Narahara H. Application of the nuclear factor-kB inhibitor BAY 11-7085 for the treatment of endometriosis: An *in vitro* study. *Am J Physiol-Endo M*. 2007;293(1):E16-E23.
71. He HN, Wang X, Zheng XL, Sun H, Shi XW, Zhong YJ, et al. Concurrent blockade of the NF-KB and Akt pathways potently sensitizes cancer cells to chemotherapeutic-induced cytotoxicity. *Cancer Lett*. 2010;295(1):38-43.
72. Abraham SA, McKenzie C, Masin D, Ng R, Harasym TO, Mayer LD, et al. *In vitro* and *in vivo* characterization of doxorubicin and vincristine coencapsulated within liposomes through use of transition metal ion complexation and pH gradient loading. *Clin Cancer Res*. 2004;10(2):728-38.
73. Harasym TO, Tardi PG, Johnstone SA. Fixed drug ratio liposome formulations of combination cancer therapeutics In: Gregoriadis G, editor. *Liposome technology volume III*. 3rd ed. New York: Informa Healthcare, Inc.; 2007. p. 25-48.
74. Mayer LD, Harasym TO, Tardi PG, Harasym NL, Shew CR, Johnstone SA, et al. Ratiometric dosing of anticancer drug combinations: Controlling drug ratios after systemic administration regulates therapeutic activity in tumor-bearing mice. *Mol Cancer Ther*. 2006;5(7):1854-63.
75. Mayer LD, Janoff AS. Optimizing combination chemotherapy by controlling drug ratios. *Molecular Interventions*. 2007;7(4):216-23.

Output of Research

ผลงานอื่นๆ เช่น การไปเสนอผลงาน การได้รับเชิญไปเป็นวิทยากร

- Poster presentation เรื่อง “Liposomes co-entrapping doxorubicin and NF-kB inhibitor for cancer treatment: physicochemical characterization” ในงานประชุม The 7th Princess Chulabhorn International Science Congress: "Cancer: From Basic Research to Cure", Nov 29 – Dec 3, 2012. เมื่อวันที่ 29 พฤศจิกายน – 3 ธันวาคม 2555

- Poster presentation เรื่อง “Co-delivery of doxorubicin and bay 11-7085 by using liposomes for cancer treatment” การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 13 วันที่ 16 – 18 ตุลาคม 2556 ณ โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี



The 7th Princess Chulabhorn International Science Congress

CANCER: FROM BASIC RESEARCH TO CURE

PROGRAM AND ABSTRACTS

November 29 - December 3, 2012

Shangri-La Hotel, Bangkok, Thailand

Organized by

Chulabhorn Research Institute

PF-04**LIPOSOMES CO-ENTRAPPING DOXORUBICIN AND NF-KB INHIBITOR FOR CANCER TREATMENT : PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION**

Saraphon Summart¹, Kriengsak Lirdprapamongkol², Satit Puttipipatkachorn¹, Montree Jaturanpinyo¹.

¹*Department of Manufacturing Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok, Thailand.* ²*Chulabhorn Cancer Centre, Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Thailand*

NF-KB is a key signaling pathway in controlling the initiation and progression of human cancer. Several studies have demonstrated that inhibition of this pathway can enhance the effectiveness of anticancer drugs. Therefore, combination of NF-KB inhibitor and anticancer drug is an attractive approach for cancer treatment. In this study, liposomes co-entrapping doxorubicin (DOX) and BAY11-7085 (BAY), a NF-KB inhibitor, were developed and their characteristics were investigated in terms of entrapment efficiency, size and zeta potential. Liposomes entrapping BAY were prepared with various lipid compositions and drug-to-lipid ratio by using thin film (TF) or reverse phase evaporation (REV) method, and subsequently reduced in size by extrusion through 200 nm membrane. The results demonstrated that the entrapment efficiency of BAY in liposomes prepared by TF was higher than those prepared by REV. Inclusion of cholesterol, reduction of drug-to-lipid ratio and saturation of lipid chain were found to decrease drug entrapment. The highest entrapment at 60% was achieved in liposomes prepared by TF and constructed with Phospholipon-90G at drug-to-lipid ratio of 1:20. The obtained liposomes were neutral with diameter of 170 nm. This formulation was further loaded with DOX by pH gradient technique, yielding an ultimate co-entrapment efficiency of DOX and BAY at 87% and 43%, respectively. In conclusion, these results clearly indicate that liposome for co-delivery of DOX and BAY can be successfully prepared. Further evaluation in cancer cells of developed formulation will be carried out to ensure the combination of their therapeutic effect. As the outcomes of this strategy, it would become a promising and potential cancer treatment.

LIPOSOMES CO-ENTRAPPING DOXORUBICIN AND NF- κ B INHIBITOR FOR CANCER TREATMENT : PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION

Saraphon Summart¹, Kriengsak Lirdprapamongko², Satit Puttipatkhachorn¹, Montree Jaturanpinyo^{1*}

¹Department of Manufacturing Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok, Thailand.

²Chulabhorn Cancer Centre, Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Thailand.

*Corresponding Author E-Mail Address: montree.jat@mahidol.ac.th



SUMMARY

Keyword: Doxorubicin, NF- κ B INHIBITOR, BAY11-7085, Cancer, Liposome

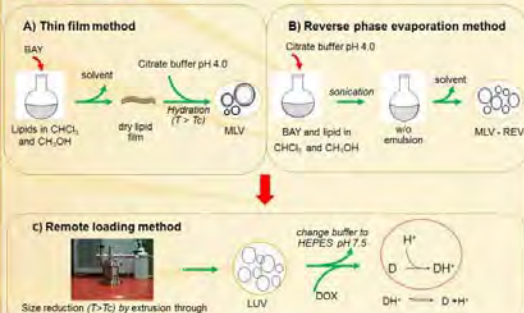
Liposomes co-entrapping doxorubicin (DOX) and BAY11-7085 (BAY), a NF- κ B inhibitor, were developed. Their characteristics were investigated in terms of entrapment efficiency, size and zeta potential. Liposomes entrapping BAY were prepared with various lipid compositions and drug-to-lipid ratio by using thin film (TF) or reverse phase evaporation (REV) method, and subsequently reduced in size by extrusion. The highest entrapment at 60% was achieved in liposomes prepared by TF and constructed with Phospholipon-90G at drug-to-lipid mole ratio of 1:20. The obtained liposomes were neutral with diameter of 170 nm. This formulation was further loaded with DOX by pH gradient technique, yielding an ultimate co-entrapment efficiency of DOX and BAY at 93% and 36%, respectively.

INTRODUCTION

NF- κ B is a key signaling pathway controlling the initiation and progression of human cancer [1]. Constitutive NF- κ B expression may predict the metastatic potential of tumors, indicating early use of adjuvant therapy and suggesting NF- κ B inhibitor as a novel treatment [2]. Several studies have demonstrated that inhibition of this pathway may enhance the effectiveness of anticancer drugs [3]. Therefore, combination of NF- κ B inhibitor and anticancer drug is an attractive approach for cancer treatment.

METHODS

Liposome Preparation



Liposome Characterizations



Table 1 HPLC system for quantitative analysis of DOX and BAY

Stationary phase	C18 reverse phase HPLC column (250 × 4.6 mm i.d., 5 μ m, ADE-6)
Mobile phase	0.1% formic acid+0.1% ammonia and methanol in a ratio of 4:6
Flow rate	1 mL/min
Temperature	35 °C
Detector	Diode array at wavelength of 254 and 480 nm

Figure 1 HPLC Chromatogram of DOX and BAY

RESULTS AND DISCUSSION

Table 2 shows the effect of preparation methods and lipid compositions on EE of BAY in liposomes. It was found that inclusion of cholesterol, rigidity of lipids and increment of drug-to-lipid ratio reduced the EE. Moreover, TF liposomes had higher EE than REV liposomes. The optimal EE at 60% was thus achieved in liposomes prepared by TF and constructed with 90G at drug-to-lipid mole ratio of 1:20. All liposomes were neutral, and exhibited the particle size less than 200 nm due to the extrusion (Table 3). Investigation of DOX entrapment revealed that the accumulation of DOX into liposomes reached a plateau within 60 min. The EE of DOX in 90G liposomes (~80%) was greater than 90H liposomes (~60%) (Fig 2). Consequently, liposomes composed of only 90G was selected to further formulate liposomes co-entrapping DOX and BAY. Table 4 indicates that DOX and BAY were successfully co-encapsulated in liposomes. However, the EE of BAY was decreased upon co-entrapping with DOX.

Table 2 Entrapment efficiency of BAY in liposomes.

Lipid composition	Drug : lipid (mole ratio)	Entrapment efficiency (%)	
		Thin film	REV
90G : Chol (10:0)	1:10	35.75 ± 4.06	35.85 ± 6.69
	1:20	60.47 ± 7.05	48.37 ± 1.51
90G : Chol (7:3)	1:20	32.43 ± 5.82	26.23 ± 2.08
90H : Chol (10:0)	1:20	24.60 ± 7.61	-

Values represent the mean ± SD, n=3

Table 3 Particle size and zeta potential of BAY liposomes.

Lipid composition	Drug : lipid (mole ratio)	Size (nm) and Zeta potential (mV)			
		Thin film		REV	
		Size (nm)	Zeta (mV)	Size (nm)	Zeta (mV)
90G : Chol (10:0)	1:10	156.1 ± 4.7	-2.95 ± 0.26	142.5 ± 7.0	-1.97 ± 0.27
	1:20	170.0 ± 4.2	-2.69 ± 0.58	133.8 ± 11.6	-1.96 ± 0.58
90G : Chol (7:3)	1:20	166.6 ± 6.6	-3.38 ± 0.94	151.2 ± 5.2	-2.33 ± 0.47

Values represent the mean ± SD, n=3

Table 4 Characteristics of 90G liposomes co-entrapping BAY and DOX

Entrapment efficiency (%)		SIZE (nm)	ZETA POTENTIAL (mV)
BAY11-7085	Doxorubicin		
36.11 ± 1.51	93.08 ± 0.92	153.0 ± 2.7	-3.52 ± 0.35

Values represent the mean ± SD, n=3

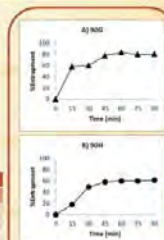


Figure 2 EE of DOX in liposomes prepared with: A) Phospholipon 90G B) Phospholipon 90H

CONCLUSION

In conclusion, these results demonstrated that liposomes for co-delivery of DOX and BAY can be successfully prepared. Further evaluation in cancer cells of developed formulation will be carried out to ensure the combination of their therapeutic effect. As the outcomes of this strategy, it would become a promising and potential approach for cancer treatment.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work is financially supported by The Thailand Research Fund (TRF) (MRG5480077).

REFERENCES

- Bharti AC, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochem Pharmacol*. 2002; 64(5-6): 883-8.
- James T, Wu JGK. The NF- κ B Signaling System: A Molecular Target in Breast Cancer Therapy. *J Surg Res*. 2005; 123: 158-69.
- Lin Y, Bai L, Chen W, Xu S. The NF- κ B activation pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy. *Expert Opin Ther Tar*. 2010; 14(1): 45-55.