

ผลของอนุพันธ์ NAMDA ต่อความเป็นพิษของเซลล์และการเกิดอะพอพोทอสิส
ของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa)

Effect of NAMDA derivatives on cytotoxicity and apoptosis in HeLa cells

ภัทรศิริ บุญคิม

PATTHARASIRI BOONKIM

โครงการนวัตกรรมบัณฑิต
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

หัวข้อโครงการวิจัย	ผลของอนุพันธ์ NAMDA ต่อความเป็นพิษของเซลล์และการเกิดอะพอฟโทสิสของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa)
ชื่อนิสิต	นางสาวกัทรศิริ บุญคิม
รหัสนิสิต	47035579
หลักสูตร	วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีวเคมี)
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.กล่าววชัย ศรีสุข
ปีการศึกษา	2550

คณะกรรมการการสอนได้พิจารณาโครงการวิจัยฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปรัญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

.....ประธานกรรมการ และอาจารย์ที่ปรึกษา

(ผศ.ดร.กล่าววชัย ศรีสุข)

.....กรรมการ

(อ.ดร.จิตติมา เจริญพานิช)

.....กรรมการ

(อ.ดร.เอกสารัฐ ศรีสุข)

ภาควิชาชีวเคมีอนุนัติให้รับโครงการวิจัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปรัญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

.....ผู้รักษาการแทนหัวหน้าภาควิชาชีวเคมี

(อ.ดร.จิตติมา เจริญพานิช)

วันที่...../...../.....

หัวข้อ โครงการวิจัย	ผลของอนุพันธ์ NAMDA ต่อความเป็นพิษของเซลล์และการเกิดออกซิฟิลส์
	ของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa)
ชื่อนิสิต	นางสาวกัทรศรี บุญคิม
รหัสนิสิต	47035579
หลักสูตร	วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีวเคมี)
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข
ปีการศึกษา	2550

บทคัดย่อ

สาร IMC 21 และสาร IMC 26 เป็นอนุพันธ์ของ *N-acetyl-O-methyldopamine* (NAMDA) ซึ่งสังเคราะห์ได้จาก vanillin และมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกสายพันธุ์ HeLa สาร IMC 21 และ IMC 26 ขับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ HeLa ในลักษณะที่ขึ้นกับปริมาณและเวลาโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 27.11 และ $10.80 \mu M$ ตามลำดับ ที่เวลา 72 ชั่วโมงโดยวิธี MTT ผลการวิเคราะห์การแตกหักของดีเอ็นเอ โดยเทคนิค agarose gel electrophoresis แสดงให้เห็นว่าสาร IMC 21 เหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายแบบออกซิฟิลส์

PROJECT TITLE Effect of NAMDA derivatives on cytotoxicity and apoptosis
 in HeLa cells

NAME Miss Pattharasiri Boonkim

STUDENT ID. 47035579

PROGRAM Bachelor of Science (Biochemistry)

ADVISOR Assist.Prof.Klaokwan Srisook , Ph.D.

ACADEMIC YEAR 2007

ABSTRACT

IMC 21 and IMC 26, *N*-acetyl-*O*-methyldopamine (NAMDA) derivatives synthesized from vanillin, showed cytotoxic effect in human cervix epithelioid carcinoma (HeLa). The cytotoxic effects of IMC 21 and IMC 26 showed dose and time-dependent inhibition of HeLa cell proliferation by MTT assay with IC₅₀ 27.11 and 10.80 μ M , respectively at 72 h. Furthermore, IMC 21-treated HeLa cells exhibited DNA fragmentation in agarose gel electrophoresis implying apoptosis in HeLa cells.

ประกาศคุณปการ

โครงการวิจัยทางชีวเคมีฉบับนี้ สำเร็จลงด้วยความช่วยเหลือจาก พศ.ดร.กัล่าววัญ ศรีสุข อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ให้คำปรึกษาและชี้แนะแนวทางในการศึกษาค้นคว้าให้ความช่วยเหลือแก่ไขจุดบกพร่องในการเขียน โครงการวิจัยทางชีวเคมีฉบับนี้ ขอขอบคุณ อาจารย์ ดร.จิตติมา เจริญพานิชและ ดร.อกรัฐ ศรีสุข ที่กรุณาเป็นกรรมการในการนำเสนอโครงการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณ ดร. วัลยา อุทัยสาง ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทร์ ประسانมิตรที่ให้เซลล์มะเร็ง HeLa มาศึกษา และทำโครงการวิจัยและขอบคุณ พี่สุพัตรา การกล้า ที่สังเคราะห์สาร IMC 21 และ IMC 26 ให้เพื่อศึกษา

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ให้ตลอดระยะเวลาในการศึกษา ขอบคุณพ่อ คุณแม่ ญาติ พี่ๆ เพื่อนๆ และทุกๆ คนที่เคยเป็นกำลังใจ อยช่วยเหลือและค่อยให้คำแนะนำตลอดมา

ภัทรศรี นุญคิม

22 กุมภาพันธ์ 2551

สารบัญ

	หน้า ก
ปกใน	ก
หน้าอนุมติ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ก
ประกาศคุณปการ	ก
สารบัญ	ก
สารบัญตาราง	ก
สารบัญรูป	ก

บทที่

1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัจุหา	1
1.2 วัสดุประสงค์ของการทดลอง	2
1.3 สมมติฐานของการทดลอง	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการทดลอง	2
1.5 ขอบเขตของการทดลอง	2
2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ทฤษฎี	3
2.1.1 มะเร็ง	3
2.1.2 เคมีบำบัด	5
2.1.3 อะพอโพธิส	6
2.1.4 เนื้蔻โรคติส	9
2.1.5 เทคนิค agarose gel electrophoresis	10
2.1.6 N-acetyl-O-methyldopamine	11
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	13
3 วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง	

บทที่

หน้า

3.1 วัสดุ อุปกรณ์	15
3.2 สารเคมี	15
3.3 วิธีการทดลอง	16
4 ผลการทดลอง	
4.1 การทดสอบความเป็นพิษของสาร IMC 21 และ IMC 26 ต่อเซลล์มะเร็ง HeLa	19
4.2 การทดสอบผลของสาร IMC 21 และ IMC 26 ต่อการแตกหักของดีเอ็นเอโดยวิธี DNA fragmentation assay	23
5 อภิปราย สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	
5.1 อภิปรายผลการทดลอง	23
5.2 สรุปผลการทดลอง	25
5.3 ข้อเสนอแนะ	25
เอกสารอ้างอิง	27
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี	29
ภาคผนวก ข แบบแพนของ Lamda DNA Hind III Digest Marker	31
ภาคผนวก ค การคำนวณค่า IC ₅₀	32
ประวัติย่อของนิสิต	37

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4-1 เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ HeLa ของสาร IMC 21 และ IMC 26 ในลักษณะที่เข้มกับปริมาณและเวลา.....	18
4-2 เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ HeLa ของสาร IMC 21 และ IMC 26 ในลักษณะที่เข้มกับปริมาณและเวลา.....	20

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1-1 โครงสร้างอนุพันธ์ NAMDA (IMC 21) และ (IMC 26)	1
2-1 ขั้นตอนการเกิดมะเร็งแบบ Multistep process	4
2-2 วิธีการกลืนกินโดยเซลล์แม่โคโรฟاج	7
2-3 แผนภาพแสดงกลไกการเกิดมะพอฟโทสิสของเซลล์โดยปัจจัยภายใน	8
2-4 ลักษณะเซลล์ที่กำลังเกิดมะพอฟโทสิส	9
2-5 โครงสร้างของ agarobiose	10
2-6 โครงสร้างของ <i>N</i> -acetyl- <i>O</i> -methyldopamine	11
2-7 แผนภาพแสดงโครงสร้างที่ทำการคัดแปลง	12
3-1 การเกิดตะกอน MTT formazan	16
4-1 กราฟแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ HeLa ของสาร IMC 21 เมื่อทดสอบโดยวิธี MTT	19
4-2 กราฟแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ HeLa ของสาร IMC 26 เมื่อทดสอบโดยวิธี MTT	19
4-3 กราฟแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ HeLa ที่สัมผัสกับสาร IMC 21 เมื่อทดสอบด้วยวิธี crystal violet	21
4-4 กราฟแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ HeLa ที่สัมผัสกับสาร IMC 26 เมื่อทดสอบด้วยวิธี crystal violet	21
4-5 ผลวิเคราะห์การแตกหักของดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis ของเซลล์ HeLa เมื่อเซลล์สัมผัสกับสาร IMC 21 และ IMC 26 ที่ความเข้มข้น 50 μ M ที่เวลา 24 และ 72 ชั่วโมง	22

บทที่ 1

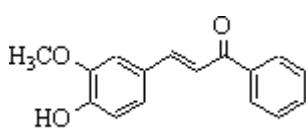
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

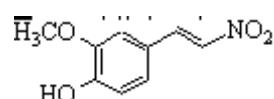
มะเร็ง (cancer) คือโรคที่เกิดจากความไม่สมดุลของการบูรณาการเจริญเติบโตและการบูรณาการตามของเซลล์ซึ่งผลลัพธ์ให้มีการเกิดและการเติบโตมากกว่าการตาย การที่มะเร็งมีกระบวนการเจริญเติบโตสูงกว่ากระบวนการตายนั้น ส่งผลให้เกิดความผิดปกติขึ้นทั้งภายในอกและภายในเซลล์ ลักษณะที่สำคัญที่สุดของมะเร็งที่สังเกตได้จากภายนอกคือ การมีรูปร่างและคุณสมบัติที่เปลี่ยนแปลงไปร่วมกับการแบ่งตัวอย่างไม่สื้นสุด ในปัจจุบันจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งได้เพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งสาเหตุสำคัญที่ทำให้มีผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งมากขึ้นนั้นเกิดจากการเพิ่มของประชากรโลก โดยเฉพาะสารก่อมะเร็งจาก การพัฒนาอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการบริโภค รวมทั้งขาดความรู้ในการป้องกันโรคและการดูแลสุขภาพตนเอง (วสันต์ ลินะสมิตและคณะ, 2542)

เคมีบำบัดเป็นการรักษามะเร็งวิธีหนึ่ง เป็นการรักษาด้วยยาเพื่อควบคุมหรือทำลายเซลล์มะเร็ง โดยการออกฤทธิ์ขึ้นยังการเจริญเติบโตและแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งและทำลายเซลล์มะเร็งโดยตรง โดยอาจจะรักษาด้วยการใช้สารเคมีบำบัดอย่างเดียว หรืออาจจะใช้รวมกับวิธีอื่นๆ เช่นการผ่าตัดหรือการฉายแสง อย่างไรก็ตามการให้เคมีบำบัดนั้นอาจมีผลข้างเคียง เช่น คลื่นไส้ อาเจียน ปากอักเสบ ผดร่วง เป็นต้น ซึ่งอาการเหล่านี้จะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของยา severity ความแข็งแรงของร่างกาย ความพร้อมทางด้านจิตใจของผู้ป่วย ดังนั้นการศึกษาด้านคัวพัฒนาやりักษณะมะเร็งตัวใหม่ ที่มีผลข้างเคียงต่ำและมีประสิทธิภาพในการรักษาจึงมีความจำเป็น

ในระหว่างที่มีการศึกษาอนุพันธ์ของ N-acetyl-O-methyldopamine (NAMDA) ซึ่งสังเคราะห์ได้จาก vanillin เพื่อค้นหาสารที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ พบร่วมกับ NAMDA 2 ชนิด คือ IMC 21 และ IMC 26 โดยสร้างแสดงในรูป 1-1 สามารถขึ้นยังการเจริญเติบโตของเซลล์แม่แครอฟ่าได้ในระดับที่ค่อนข้างสูง จึงทำให้ผู้วิจัยต้องการศึกษาผลของอนุพันธ์ IMC 21 และ IMC 26 ต่อความเป็นพิษของเซลล์ ไอล์น์สายพันธ์ HeLa ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งปากคลุกของมนุษย์รวมทั้งกลไกการทำงานของเซลล์มะเร็งชนิดนี้



IMC 21



IMC 26

รูปที่ 1-1 โครงสร้างอนุพันธ์ NAMDA (IMC 21 และ IMC 26)

1.2 วัตถุประสงค์ของการทดลอง

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของอนุพันธ์ NAMDA (IMC 21 และ IMC 26) ต่อความเป็นพิษของเซลล์มะเร็ง HeLa โดยวิธี MTT และ crystal violet
2. เพื่อศึกษากลไกการตายของเซลล์ HeLa โดยสารประกอบ IMC 21 และ IMC 26

1.3 สมมติฐานของการทดลอง

มีรายงานแสดงถึงฤทธิ์ของอนุพันธ์ NAMDA ที่ขับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เม็ดโครงฟางสายพันธ์ RAW 246.7 ได้ซึ่งอาจมีผลขับยั้งการเจริญเซลล์มะเร็ง HeLa ได้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการทดลอง

ข้อมูลการออกฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกและกลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นซึ่งอาจนำไปสู่การเป็นยาต้านมะเร็งชนิดใหม่

1.5 ขอบเขตของการทดลอง

ทดสอบความเป็นพิษของสาร IMC 21 และ IMC 26 ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) โดยวิธี MTT และวิธี crystal violet และทดสอบการเหนี่ยวแน่นการเกิดการตายแบบพอดพอกสีสีโดยการแตกหักของดีเอ็นเอ

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎี

2.1.1 มะเร็ง

คือ เซลล์ที่เปลี่ยนสภาพไปเป็นเนื้อร้ายและขยายตัวในหลอดเลือดและน้ำเหลืองกระจากไปปั้ง อวัยวะอื่นๆ ในร่างกาย ซึ่งหากเป็นส่วนที่สำคัญ เช่น ปอด ตับ สมอง ก็จะทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตในเวลา อันรวดเร็ว โดยมีสารเคมีที่เรียกว่า สารเคมีซิโนเจน (carcinogen) เป็นตัวแบ่งสำคัญ ที่ทำให้ยืนหรือ โครโนไซม์ในนิวเคลียสของเซลล์ผิดปกติ จนกลายเป็นมะเร็งที่มีการแบ่งตัวขยายออกไปเรื่อยๆ (ธิติชัย ลาภจรัสสุริยา, 2548) สาเหตุที่ทำให้ยืนของเซลล์ผิดปกติในนิวเคลียสเป็นมะเร็งได้นั้น ส่วนใหญ่นั้นมาจาก การรบกวนจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ซึ่งได้แก่

สารเคมี ส่วนใหญ่มา กับอาหารและยาหรืออนุหรือที่เราบริโภคประจำวัน สารเคมีเหล่านี้อาจอยู่ใน สภาพที่ทำให้เกิดมะเร็ง ได้เองหรือต้องถูกเปลี่ยนแปลงในร่างกายเป็น electrophile ก่อนที่จะสามารถทำ ปฏิกิริยากับ nucleophile ในโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิกจึงทำให้เกิดมะเร็งที่ได้

สารรังสี รังสีนี้จะปะปนอยู่กับแสงแดด เช่น รังสีอัลตราไวโอเลตชนิดบีหรือได้รับจากการแพทย์ หรือการอุตสาหกรรม เช่น รังสีเอกซ์ รังสีแกรมมา เป็นต้น

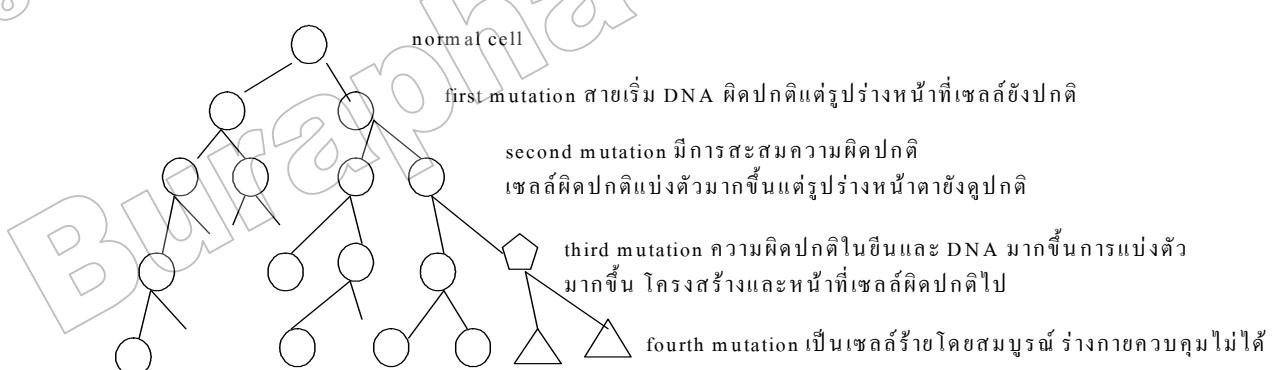
เชื้อโรค ที่ปะปนอยู่ในอาหารและน้ำหรือในผู้ป่วย เช่น แบคทีเรียชนิด *Helicobacter pylori* ปรสิตชนิด *Opisthorchis* หรือไวรัสซึ่งแบ่งได้เป็น DNA tumor virus และ RNA tumor virus (วัฒน์ ลี นะสมิตและคณะ, 2542)

เซลล์ร่างกายมีนุյย์ สร้างใหม่และตายลงเป็นวงจรอย่างสมดุล มีระบบหรือโปรแกรมและ เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุม เพื่อให้เกิดความสมดุลตามธรรมชาติ เช่น growth factor , apoptosis program , receptor ต่างๆ DNA และ โปรตีน อีกหลายชนิด มีระบบตรวจสอบความผิดปกติของ DNA และของเซลล์อีกหลายชนิด เพื่อทำการซ่อมแซมและหยุดวัฏจักรการสร้างเซลล์ (cell cycle) หากเกิด ความผิดปกติขึ้น หรือกระทั้งทำลายเซลล์ที่ผิดปกตินั้น ทั้งนี้ก่อนที่ความผิดพลาดในระดับ DNA จะถูก ถ่ายทอดต่อไปยังเซลล์ลูก (daughter cell)

ดังนั้น ร่างกายจะอยู่ในสมดุลของการสร้างเซลล์ (cell proliferation) และการทำลายเซลล์ (apoptosis) เกือบทตลอดเวลาอันยาวนานของชีวิต แต่ทว่า หากมีเซลล์ใดเซลล์หนึ่งที่ผิดปกติ แล้วหลุดรอด ไปจากการทำลายของระบบ ได้ ความสมดุล ณ ตำแหน่งของอวัยวะนั้นจะเสียไป เซลล์ที่ผิดปกตินั้นจะเริ่ม เปลี่ยนแปลงให้ผิดปกติมากขึ้น ในเซลล์รุ่นลูกๆ จนกระทั่งเป็นเซลล์มะเร็งหรือเนื้อร้าย เซลล์มะเร็งมี คุณสมบัติที่เรียกว่า autonomy คือ สามารถแบ่งตัวเติบโตได้ โดยไม่ต้องพึ่ง growth factor จาก ภายนอกเซลล์ ความสามารถดังกล่าวอาจจะเกิดได้จาก

1. เซลล์มีะเร็งสร้าง growth factor ได้ด้วยต้นเอง
2. ผิวเซลล์มีะเร็งสร้าง receptor ที่พิเศษ สามารถรู้กระบวนการตุ้นให้สร้างเซลล์ลูกได้ แม้ไม่ต้องมี growth factor
3. ระบบ intracellular signal transduction สามารถส่งสัญญาณได้เอง โดยไม่ต้องรับสัญญาณการกระตุ้นจาก growth factor ภายนอกเลย
4. เซลล์มีะเร็งมีระบบควบคุมพิเศษต่อวงจรการสร้างเซลล์ ทำให้เซลล์มีะเร็งมีอัตราการตายแบบ DNA สูงมาก ผลจากการนี้ จะทำให้ความผิดพลาดมากขึ้นเป็น replication error จนเกิดการสะสมความผิดปกติต่อไปในรุ่นลูกหลานเรียกว่า genomic instability
5. เมื่อเกิดร่วมกับระบบการตรวจสอบ DNA (DNA repair system) มีความผิดปกติไปด้วย เซลล์จะไม่หยุดซ่อมแซมต้นเอง ไม่เข้าสู่โปรแกรมการทำลายต้นเอง (apoptosis หรือ program cell death)

สภาพเซลล์ผิดปกติ ดังกล่าวข้างต้นจะดำเนินไปในระดับจีโนไทป์ จนกระทั่งเข้าสู่สภาวะที่กล้ายเป็นเซลล์ร้าย (malignant phenotype) โดยสมบูรณ์ ซึ่งจะมีคุณสมบัติคือ มีการรุกรานเนื้อเยื่อปกติ ที่อยู่ข้างเคียง (invasion) การแพร่กระจาย (metastasis) และการสร้างหลอดเลือดใหม่ๆ มาเลี้ยงต้นเอง (angiogenesis) มะเร็งก้อนใหญ่ๆ ที่ปรากฏให้เห็นในคลินิก มีจุดเริ่มต้นที่เซลล์เซลล์เดียว เป็นเซลล์ที่ผิดปกติเพียงเซลล์เดียว แต่หลังรอดจากการควบคุมที่มีอยู่หลายฯ ระบบด้วยกัน หรือระบบควบคุมหล่ายระบบเหล่านั้น เกิดความผิดพลาดควบกพร่องไป ทำให้เซลล์ที่ผิดปกติเติบโตพัฒนาสะสมความผิดพลาดมาหลายรุ่น จนกล้ายเป็นเซลล์มีะเร็งที่สมบูรณ์ในที่สุด ความผิดปกติทั้งของเซลล์ และของระบบควบคุม สะสมต่อเนื่องมาเป็นเวลานาน เป็นขั้นตอนที่ซับซ้อนหล่ายขั้นตอน จึงอาจกล่าวได้ว่า การเกิดมะเร็ง มีขั้นตอนแบบ Multistep process ดังแสดงในรูปที่ 2-1



รูปที่ 2-1 ขั้นตอนการเกิดมะเร็งแบบ Multistep process

ปัจจัยที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์มีปัจจัยภายนอก เช่น รังสี สารเคมี ความร้อน เชื้อโรค ฯลฯ และ/หรือมีความบกพร่องทางพันธุกรรม หลายประการที่ทำให้เกิดการทำลายแต่ยังไม่ทำให้เซลล์ลูกทำลายไปด้วย (nonlethal genetic damage) ภาวะของ nonlethal genetic damage เป็นสาเหตุสำคัญของการพัฒนา

เซลล์ไปเป็นเซลล์เนื้อร้าย โดยยืนที่เกิดการกลายพันธุ์ แล้วเป็นสาเหตุสำคัญของเซลล์ร้าย ประกอบด้วยยืนนี้ 4 กลุ่มคือ

1. proto-oncogenes ในสายพันธุกรรม มียืนปกติที่เรียกว่า oncogene หรือ proto-oncogene ยืนนี้จะทำการ encode protein ที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ปกติทั่วไป โปรตีนที่ได้มาจากการทำหน้าที่ของ oncogene เช่น growth factor เป็นโปรตีนที่กำหนดการทำงานของยืนนี้และเมื่อ oncogene ผิดปกติไป ก็จะกำหนดการสร้างโปรตีนที่ผิดปกติไปด้วย เช่น โปรตีนเกิดภาวะทำงานมากเกิน (uncontrolled overexpression) และมีบทบาทกระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัวคือเป็น growth promoting gene

2 suppressor genes หรือ antioncogene ยืนชนิดนี้จะทำหน้าที่ encode โปรตีนที่ทำหน้าที่หยุดยั้ง การเติบโตของเซลล์ เพื่อทำให้การสร้างและการตายของเซลล์อยู่ในภาวะสมดุล หากเกิดการผ่าเหลาของยืน suppressor gene ส่งผลให้มีการสร้างโปรตีนผิดปกติ ทำให้ การขับย้งการเติบโตของเซลล์ผิดไป (functional inactivation)

3. ยืนที่ควบคุมโปรแกรมอะพอฟไทสิส

4. ยืนที่ซ้อมแซม DNA

2.1.2 เคมีบำบัด (<http://www.zyworld.com/NAKARIN/earthwatch15.htm>)

เคมีบำบัด คือ การรักษาโรคด้วยยา เคมีบำบัดในการรักษาโรคระยะเรื้องคือ การใช้ยาเพื่อ ทำลายเซลล์มะเร็งในร่างกาย อีกความหมายหนึ่งของยาเคมีบำบัดคือ เป็นสารเคมีที่ใช้ในการขับย้ง การเจริญเติบโต การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยัง อวัยวะอื่นๆ ในร่างกาย การรักษาโรคระยะเรื้อง อาจใช้วิธีเดียวหรือหลายวิธีรวมกัน ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เคมีบำบัดมักใช่วิธีร่วมกับการผ่าตัด โดยการใช้ยาต้านมะเร็งเพื่อทำลายหรือควบคุมเซลล์มะเร็งไม่ให้ลุกลามไปยังอวัยวะอื่นๆ อย่างไรก็ตาม การรักษาโรคระยะเรื้องด้วยเคมีบำบัดจะมีผลต่อเซลล์ปกติ คือ เซลล์ถูกทำลายไปบ้างซึ่ง ส่งผลให้ผู้ป่วยมีอาการไม่สบายตามมา

ยาเคมีบำบัด คือ ยาหรือสารเคมีที่มีฤทธิ์ในการทำลาย หรือ ฆ่าเซลล์มะเร็ง โดยทั่วไป มี การแบ่งกลุ่มยาเคมีบำบัดเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

1 Cell cycle specific drug ยากลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการทำลายเซลล์มะเร็งเฉพาะใน บางระยะของการแบ่งเซลล์ ในวัฏจักรการแบ่งเซลล์

2 Cell cycle nonspecific drug ยากลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการทำลายเซลล์มะเร็งในทุก ระยะ ของการแบ่งเซลล์ ในวัฏจักรการแบ่งเซลล์

ความเป็นพิษ (toxicity) ของยาเคมีบำบัด ยาเคมีบำบัดนอกจากจะมีผลฆ่าเซลล์มะเร็งแล้ว ยัง ฆ่าหรือทำร้ายเซลล์ปกติของร่างกายด้วย ขึ้นอยู่กับอัตราการแบ่งตัว (proliferating rate) ของเซลล์มะเร็ง แต่ละชนิด เซลล์ปกติของร่างกายแบ่งได้เป็น

1. เซลล์ที่ไม่แบ่งตัว เป็นกลุ่มเซลล์ที่พัฒนามาเต็มที่แล้วหลังการแบ่งตัว เมื่อยังเป็นตัวอ่อน เซลล์เหล่านี้จะไม่มีการแบ่งตัวอีกหลังจากนั้น เซลล์ในกลุ่มนี้ได้แก่ เซลล์ถาวรเนื้อตาย และ เซลล์ประสาท

2. เซลล์ที่แบ่งตัวช้า เป็นกลุ่มเซลล์ที่พัฒนาแล้ว เช่น กัน ในภาวะปกติจะไม่แบ่งตัวแต่ในภาวะที่บ้าดเจ็บจะมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วได้ ตัวอย่างของเซลล์กลุ่มนี้ได้แก่ เซลล์ตับ

3. เซลล์ที่แบ่งตัวเร็ว เป็นกลุ่มเซลล์ที่มีการแบ่งตัว และ การตายของเซลล์เกิดหมุนเวียนกัน ไปเป็นปกติ เซลล์ในกลุ่มนี้ได้แก่ ผิวหนัง และ ทางเดินอาหาร เซลล์ที่แบ่งตัวเร็วจะถูกทำลายจากยาเคมีบำบัด ได้มากที่สุด ดังนั้นการให้ยาเคมีบำบัดจะต้องคำนึงถึงประโยชน์ที่ได้รับในการฆ่าเซลล์มะเร็งว่าจะต้องมากกว่าการทำลายเซลล์ของ เนื้อเยื่อปกติเสมอ

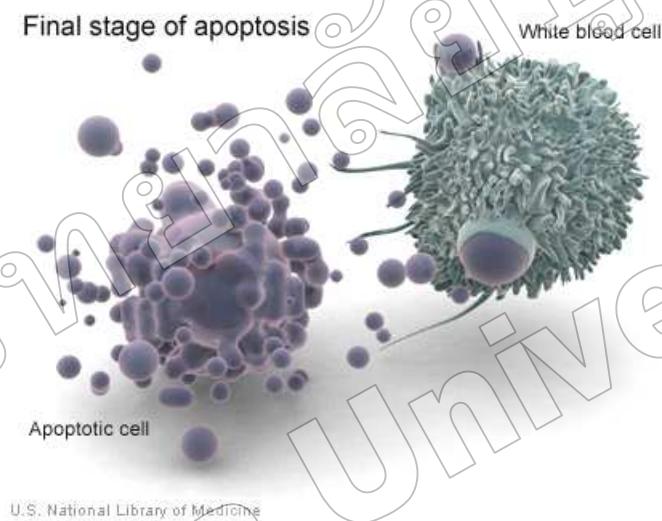
ความเป็นพิษต่อไบกระดูก (bone marrow toxicity) ความเป็นพิษที่พบบ่อยที่สุดของยาเคมีบำบัดคือ การกดไบกระดูก เม็ดเลือดขาวจะต่ำลงในช่วง 7 - 10 วัน หลังจากได้รับยาเคมีบำบัด และต่ออายุนาน 3 - 10 วัน ในช่วงนี้ผู้ป่วยจะมีอัตราเสี่ยงต่อการติดเชื้อต่างๆ เพิ่มขึ้น ส่วนภาวะเกล็ดเลือดต่ำจะทำให้ผู้ป่วยมีเลือดออกตามที่ต่างๆ ในบางครั้งเลือดออกมากจนเป็นอันตรายแก่ชีวิต เนื่องจากการกดไบกระดูกพบได้บ่อยในผู้ได้รับยาเคมีบำบัด จึงใช้ความรุนแรงของการกดไบกระดูกเป็นเกณฑ์เพื่อเลื่อนการให้ยา หรือปรับขนาดของยา การจัดลำดับความรุนแรงของการกดไบกระดูก จัดตามเกณฑ์ขององค์กรอนามัยโลก ผู้ป่วยที่มีการกดไบกระดูกเกรด 1 - 2 ไม่ต้องเลื่อนหรือลดขนาดของยาแต่อย่างใด ในขณะที่เกรด 3 - 4 ต้องเลื่อนหรือลดขนาดยา

ความเป็นพิษต่อระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal toxicity) ยาเคมีบำบัดส่วนใหญ่จะทำให้ผู้ป่วยมีอาการคลื่นไส้อเจียน การให้ยาจะรับอาการคลื่นไส้อเจียนที่เหมาะสม จะทำให้ผู้ป่วยยอมรับยาเคมีบำบัด ได้ดียิ่งขึ้น ยาเคมีบำบัดที่ก่อให้เกิดอาการคลื่นไส้อเจียนน้อย ได้แก่ bleomycin , vinca alkaloids , 5 - FU , methotrexate หรือ mitomicin C ยาเก็คลื่นไส้อเจียนที่ได้ผลคือ compazine , dexamethasone , thiethylperazine (Torecan) หรือ haloperidol (hadol) สำหรับยาเคมีบำบัดที่ก่อให้เกิดอาการคลื่นไส้อเจียนมาก ได้แก่ metoclopramide ซึ่ง metoclopramide ทำให่ง่วง ห้องเดิน และ ในบางครั้งมีอาการทางระบบประสาทได้

2.1.3 อะพอฟโทสิส (apoptosis) (สิทธิศักดิ์ ปุยอ้อก , 2548)

อะพอฟโทสิสเป็นคำนามมีต้นกำเนิดมาจากภาษากรีกที่หมายถึงลักษณะของสิ่งที่หมดอายุเข่นใบไม้ที่แก่แล้วหลุดร่วงลงดิน (apo = from และ ptosis = falling) แต่ในทางชีววิทยาอะพอฟโทสิสได้ถูกใช้เพื่ออธิบายถึงการตายของเซลล์ที่ถูกกำหนดไว้อย่างเป็นแบบแผน (programmed cell death) และเกิดขึ้นเป็นลำดับขั้นตอนที่แน่นอน หรืออีกนัยหนึ่งก็คือการฆ่าตัวตาย (suicide) ของเซลล์เมื่อพบว่าเซลล์นั้นไม่เป็นที่ต้องการอีกด้อไป เช่น เมื่อถูกพบว่าเซลล์มีการติดเชื้อโรค หรือเมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วผิดปกติซึ่งอาจก่อให้เกิดมะเร็งในที่สุด แต่การตายในลักษณะเช่นนี้จะไม่

ก่อให้เกิดผลข้างเคียงเนื่องมาจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น เกิดอาการอักเสบ เพราะเซลล์ที่ไม่ต้องการ จะถูกกำจัดไปด้วยวิธีการกลืนกิน (phagocytosis) โดยเซลล์แมกโทรฟاج (รูปที่ 2-2) ขณะที่เราเจริญเติบโตอยู่ในครรภ์ เนื้อเยื่อส่วนที่อยู่ระหว่างนิวจะถูกส่งให้ตายตามแบบของอะพอฟโทสิติกที่จะไม่ส่งผลกระทบต่อเซลล์ข้างเคียง ในอีกนัยหนึ่งคือ เมื่อเซลล์ถูกจู่โจมด้วยเชื้อโรค จะเซลล์นั้นอ่อนแอดง จำเป็นอย่างยิ่งที่เซลล์นั้นๆ จะต้องถูกกำจัดเพื่อปกติกัน การแพรเซื้อ อะพอฟโทสิต จะเข้ามามีบทบาททันที ดังนั้นเพื่อเป็นการรักษาสมดุลของจำนวนเซลล์ไว้อะพอฟโทสิตึงต้องเข้ามามีบทบาทในการรักษาสมดุลนี้ อย่างไรก็ตามในบางครั้ง อะพอฟโทสิตเกิดขึ้นได้อย่างเกินขีดจำกัด ส่งผลให้เกิดการสูญเสียไปของเซลล์อย่างผิดปกติ



รูปที่ 2-2 วิธีการกลืนกินโดยเซลล์แมกโทรฟاج

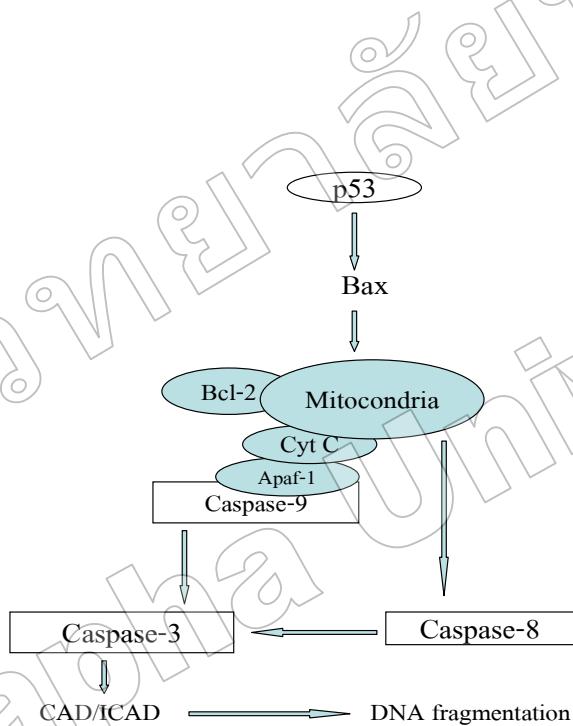
(ที่มา : ghr.nlm.nih.gov/.../apoptosismacrophage)

วันที่สืบค้น : 12 มกราคม 2551

กลไกการเกิดอะพอฟโทสิตของสัตว์เลี้ยงถูกด้วยนิมเกิดได้สองทางหลัก คือ

1. ปัจจัยภายใน (intrinsic) หรือวิถีทางผ่าน ไม โตกอนเดรีย (mitochondrial pathway) โดยเริ่มจากการที่เซลล์อยู่ในสภาพขาดอาหารหรือ ดีเอ็นเอได้รับความเสียหาย (DNA damage) อันเนื่องมาจากเซลล์ถูกนิริรังสี (ionizing radiation) ยังผลให้เกิดการแตกแยกของดีเอ็นเอ (double-strand DNA break) หรือการเข้าทำปฏิกิริยาชีวเคมีของอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species) กับดีเอ็นเอ ผลพวงของความเสียหายที่เกิดขึ้นกับดีเอ็นเอจะทำให้ปริมาณยีน p53 (ยีนที่ควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ และเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า tumor suppressor gene) เพิ่มมากขึ้นซึ่งจะไปกระตุ้นให้เกิดการทำงานของ Bax (โน阴谋กุลที่ล่อลงลอยอยู่ในของเหลวภายในเซลล์) ขณะเดียวกันยีนไซม์ caspase-8 ซึ่งอยู่ในสภาพที่ออกฤทธิ์ได้จะไปกระตุ้น Bid ด้วยการเปลี่ยนรูปให้เป็น t-Bid (truncated Bid) และย้ายเข้าไปอยู่ในช่องว่าง

ภายในเยื่อหุ้มไมโนโทคอนเดรีย (intermembrane space) พร้อมทั้งไปกระตุ้นการทำงานของ Bax ยังผลให้มีการปลดปล่อยโมเลกุลของ AIF (apoptosis-inducing factor) และ cytochrome C ออกสู่ช่องเหลวภายในเซลล์ ณ จุดนี้โปรตีน cytochrome C , procaspase-9 และ Apaf-1 (ได้จากการแยกตัวระหว่าง Bcl-2 และ Apaf-1 ทันทีที่ไมโนโทคอนเดรียเกิดความเสียหายและปล่อย Bcl-2 ออกสู่ช่องเหลวภายในเซลล์) ทั้งสามจะรวมตัวกันเป็นโปรตีนไมโนเลกุลเชิงซ้อนที่เรียกว่า อะพอฟโตโซม (apoptosome) ซึ่ง caspase-9 จะไปกระตุ้นการเปลี่ยนรูปของ procaspase-3 ให้อยู่ในรูปที่ออกฤทธิ์ได้ (caspase-3) ในลำดับต่อมา caspase-3 ก็จะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ Caspase-Activated Deoxyribonuclease (CAD) เอนไซม์ตัวนี้จะก่อให้เกิดการตัดสายของดีเอ็นเอ (double-strand DNA break) บริเวณ linker DNA ที่อยู่ระหว่างนิวคลีโอโซม ซึ่งจะนำไปสู่การตายของเซลล์ในที่สุด (รูปที่ 2-3)



รูปที่ 2-3 แผนภาพแสดงกลไกการเกิดอะพอฟโตโซของเซลล์โดยปัจจัยภายนอก

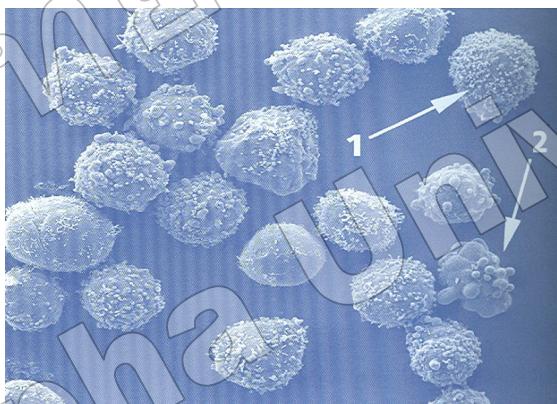
2. ปัจจัยภายนอก(extrinsic) หรือวิถีทางตัวรับความตาย (death receptor pathway) นั้นจะใช้หลักการของการจับตัวกันระหว่างลิแกนด์ (ligand, CD95L) ซึ่งอยู่ภายนอกเซลล์และรีเซปเตอร์ (receptor) ซึ่งอยู่บนผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ receptor นี้เรียกว่า CD95 หรือ Fas โดยส่วนที่อยู่ภายนอกเซลล์จะรวมตัวกับ FADD (fas-associated death domain) และ procaspase-8 เกิดเป็นโครงสร้างเชิงซ้อนที่เรียกว่า DISC (death-inducing signaling complex) หลังจากที่มีการจับตัวของ CD95L กับ CD95 และ procaspase-8 จะเปลี่ยนรูปไปเป็น caspase-8 และพร้อมที่จะไปกระตุ้นการทำงานของ Bid

การเกิดอะพอฟทอสิส จะมีการเปลี่ยนแปลงของสีองค์ประกอบหลัก คือ

1. การเปลี่ยนแปลงบริเวณผิวของเยื่อหุ้มเซลล์
2. การเปลี่ยนแปลงบริเวณผิวของเยื่อหุ้มในโตกอนเดรีย
3. การเปลี่ยนแปลงสถานะภาพของเอนไซม์ caspase หรือ โนมาเลกุลอื่นที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอะพอฟทอสิส
4. การเปลี่ยนแปลงสภาพของดีเอ็นเอ

ลักษณะเฉพาะของการเกิด อะพอฟทอสิสมีอยู่ 3 ประการ สำคัญคือ

1. เชลล์หดตัว (cell shrinkage) โดยสภาพปกติเชลล์จะมีลักษณะเต่ง
2. เกิดการอัดแน่นของโกรมาติน (chromatin condensation) ภายในนิวเคลียส ระหว่างพบลักษณะของโกรมาตินที่อัดตัวกันแน่นและ DNA กึ่งพร้อมที่จะแตกหักออกเป็นชิ้นส่วนย่อย (DNA fragmentation)
3. เยื่อหุ้มเซลล์แสดงลักษณะเป็นถุงพอง (membrane blebbing) ดังแสดงในรูป 2-4



รูปที่ 2-4 ลักษณะเชลล์ที่กำลังเกิดอะพอฟทอสิส (ลูกศรชี้หมายเลข 2) เปรียบเทียบกับเชลล์ปกติ (ลูกศรชี้หมายเลข 1) (ที่มา : สิทธิศักดิ์ บุญอ้อก , 2548)

2.1.4 เน็คโครสิส (necrosis) (ทวีพร สิทธิราช และ สมศักดิ์ พันธุ์วัฒนา , 2543)

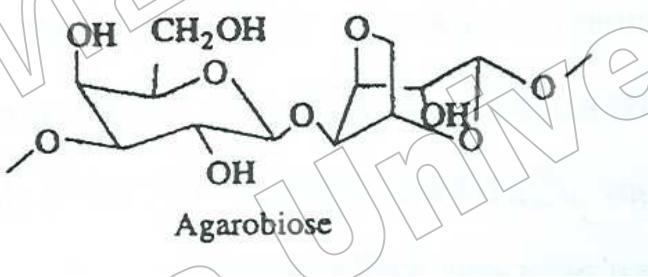
การตายแบบเน็คโครสิสเป็นการตายที่เกิดขึ้นอย่างผิดธรรมชาติ เกิดขึ้นเนื่องจากมีพยาธิสภาพ มีลักษณะเฉพาะตัวคือเป็นการตายแบบคาดเดาไม่ได้และแก่หรือความคุณไม่ได้เช่นกัน เรียกว่า เป็นการตายที่ไม่มีแบบแผนตายตัวและเกิดขึ้นอย่างไม่เหมาะสม

การตายแบบเน็คโครสิสส่งผลให้เกิดการอักเสบไปยังเชลล์หรือเนื้อเยื่อข้างเคียง เรียกว่า cascade of effects ซึ่งส่งผลให้คุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับการผ่านเข้าออกของสารภายในเชลล์ไปทำให้มีการร้าวไหลของเอนไซม์ที่จำเพาะที่ถูกเก็บโดยไอลโซไซม์ซึ่งอาจไปถลایหรือทำลายองค์ประกอบของ

เซลล์หรืออาจทำลายเซลล์ทั้งหมดได้ และอาจมีการปลดปล่อยสารเคมีที่สามารถทำลายเซลล์ข้างเคียงได้อีกด้วย (<http://en.wikipedia.org/wiki/Necrosis>)

2.1.5 เทคนิค Agarose gel electrophoresis (กล่าววัณ ศรีสุข, 2549)

เป็นเทคนิคที่นิยมใช้แยกกรดนิวคลีอิกและมักทำในแนวราบ (horizontal gel electrophoresis) หรือ submarine gel electrophoresis โดยโครงสร้างของ agarose gel เกิดจากโพลีเมอร์ของ agarobiose (ประกอบด้วย galactose และ 3,6-anhydrogalactose) ซึ่งสกัดได้จากสาหร่ายทะเล ตั้งรูปที่ 2-5 การฟอร์ม agarose gel เกิดจากการให้ความร้อนแก่ suspension ของ agarose หากันป้องอยให้เย็นตัวลง และจะเกิดการฟอร์ม gel การให้ความร้อนจะทำให้พันธะไฮโดรเจนในโมเลกุล (intramolecular hydrogen bond) ของ agarose ถูกทำลาย เมื่อยังตัวลงจะเกิดการสร้างพันธะขึ้นมาใหม่และมีบางส่วนเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุล (intramolecular hydrogen bond) ของ agarose ทำให้เกิดโครงสร้างที่เป็นรูปรุนไมค์สมบัติเป็นตะแกรงร้อน โมเลกุล agarose gel ไม่มีประจุและเลือยต่อกรดนิวคลีอิกหรือโปรตีน ขนาดของรูปรุนมีขนาดใหญ่กว่ารูปรุนของ polyacrylamide gel



รูปที่ 2-5 โครงสร้างของ agarobiose

(ที่มา: กล่าววัณ ศรีสุข, 2549)

การแยกกรดนิวคลีอิกโดย electrophoresis มีหลักการคือ ที่ pH เป็นกลาง กรดนิวคลีอิกจะมีประจุเป็นลบจากกลุ่มฟอสฟे�ต จำนวนประจุลบขึ้นอยู่กับจำนวนหน่วยนิวคลีโอไฮด์ที่เป็นองค์ประกอบ เมื่อยังในส่วนไฟฟ้าจึงเคลื่อนที่จากขั้วนไปทางขั้วน และการเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางที่มีรูปรุนมีผลทำให้เกิดตะแกรงร้อน โมเลกุล สามารถแยกกรดนิวคลีอิกออกจากกัน ได้ตามขนาดและรูปร่าง ขั้ตราเร็วของ การเคลื่อนที่ของกรดนิวคลีอิกขึ้นอยู่กับ

- ขนาดของกรดนิวคลีอิก กรดนิวคลีอิกที่มีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ผ่าน gel ได้ช้ากว่าขนาดเล็ก โดยระบบทางที่กรดนิวคลีอิกเคลื่อนที่จะแบร์เพนกับ \log_{10} ของมวลโมเลกุลของกรดนิวคลีอิก
- รูปร่างของกรดนิวคลีอิก แม้จะมีมวลโมเลกุลเท่ากันแต่ DNA ที่มีรูปร่างต่างกันจะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วต่างกัน ดังนี้ DNA วงกลมขาดเป็นเกลียว (superhelical circular DNA) เคลื่อนที่ได้เร็วกว่า DNA ที่เป็นเส้น (linear DNA) ส่วน DNA วงกลมที่คลายเกลียว (open circular หรือ nick circular DNA) จะเคลื่อนที่ช้าที่สุด

3. ความเข้มข้นและขนาดครูพรุนของ gel เมื่อมีความเข้มข้นของ gel ที่สูงทำให้เกิดครูพรุนขนาดเล็กกว่าที่มีความเข้มข้นต่ำๆ ทำให้กรดนิวคลีอิกที่มีขนาดใหญ่หรือมีโครงสร้างซับซ้อนเคลื่อนที่ผ่านได้ช้ากว่า กรดนิวคลีอิกที่มีขนาดเล็กและเป็นเส้นตรง ดังนั้นควรเลือกใช้ความเข้มข้นของ agarose gel ให้เหมาะสมกับขนาดของกรดนิวคลีอิก

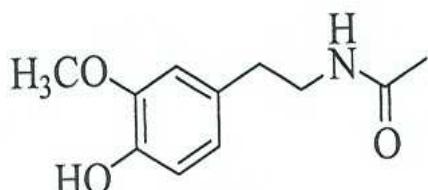
4. กระแทไฟฟ้าโดยทั่วไป กระทำภายในเดือนที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่คงที่ เมื่อใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าสูง กรดนิวคลีอิกจะเคลื่อนที่เร็วขึ้น แต่ถ้าใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าสูงเกินไป ทำให้เกิดความร้อนทำให้การเคลื่อนที่ของกรดนิวคลีอิกไม่স্মাเسمอและ gel อาจละลายได้

5. สารละลายที่ใช้เป็นตัวนำไฟฟ้าหรือบัฟเฟอร์ (buffer) สารละลายที่ใช้เป็นตัวนำไฟฟ้ามีผลต่อการเคลื่อนที่ของกรดนิวคลีอิก เพราะใช้เป็นตัวนำไฟฟ้าในส่วนนำไฟฟ้า ความเข้มข้นของสารละลายนามาร์นาไฟฟ้าจะเกิดขึ้นมากจนอาจทำลายกรดนิวคลีอิกและ gel บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้มีสองชนิดคือ TBE buffer (Tris-borate และ EDTA) เป็นบัฟเฟอร์ที่มี buffering capacity สูงจึงเป็นที่นิยมใช้ แต่ไม่เหมาะสมกับงานที่ต้องแยก DNA จาก gel ไปใช้และ TAE buffer (Tris-acetate และ EDTA) เป็นบัฟเฟอร์ที่มี buffering capacity ต่ำ นิยมใช้ในกรณีที่ต้องการแยกชิ้น DNA จาก gel เนื่องจากจะได้ DNA ที่ค่อนข้างบริสุทธิ์

กรดนิวคลีอิกที่แยกได้จะปรากฏเป็นแคน ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ด้วยการใช้สารที่มีคุณสมบัติเรืองแสง (fluorescent dye) ภายใต้แสง UV เช่น ethidium bromide, acridine หรือ quinacrine สารที่นิยมใช้คือ ethidium bromide แต่มีข้อเสียคือเป็นสารก่อภัยพันธุ์ (mutagen)

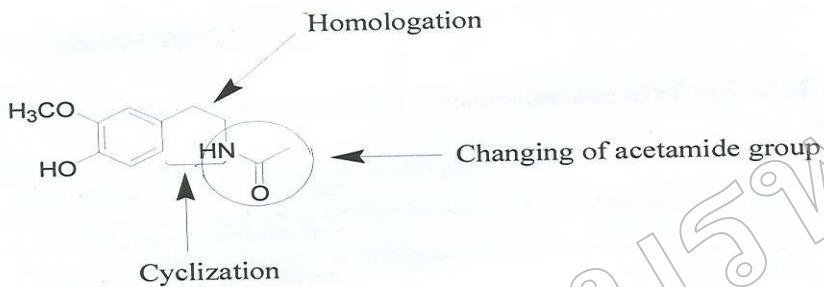
2.1.6 *N*-acetyl-*O*-methyldopamine (NAMDA) (Karnkla , 2008)

N-acetyl-*O*-methyldopamine (NAMDA) เป็นสารเมtabolite ของ dopamine ที่อยู่ในระบบประสาทส่วนกลาง (CNS) และเคยมีรายงานที่แสดงให้เห็นว่า NAMDA สามารถยับยั้งผลิตภัณฑ์ของไนตริกออกไซด์ได้โดย NAMDA จะไปทำให้แยกทิวต์ของผลิตภัณฑ์ในไนตริกออกไซด์ลดลง



รูปที่ 2-6 โครงสร้างของ *N*-acetyl-*O*-methyldopamine
(ที่มา : Karnkla , 2008)

ดังนั้นเพื่อให้ NAMDA มีประสิทธิภาพมากขึ้น จึงทำการสังเคราะห์สาร NAMDA และอนุพันธ์โดยทำการดัดแปลงโครงสร้าง คือ เปลี่ยนหมู่ acetyl ไปเป็นหมู่ functional อื่นๆ เช่น cyanide, amine, carboxyl ester, hydroxyl และหมู่ keto , cyclization to by cyclic ring, homologation



รูปที่ 2-7 แผนภาพแสดงโครงสร้างที่ทำการดัดแปลง
(ที่มา : Karnkla , 2008)

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของอนุพันธ์ NAMDA ในเซลล์ไอล์บีโนลด์ใน癌 พบว่าสาร IMC 21 และ IMC 26 ที่ความเข้มข้น $100 \mu\text{M}$ แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับสูง ทำให้เซลล์ตายถึง 95.6 และ 87.3 % ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง (Mongkol และคณะ, 2008)

ในปัจจุบันที่การค้นคว้าศึกษาพัฒนาหายาต้านมะเร็งชนิดใหม่ โดยที่ยาต้านมะเร็งเหล่านี้อาจมาจากการสกัดจากธรรมชาติหรือสารสังเคราะห์ที่เป็นอนุพันธ์ของสารจากธรรมชาติ ดังรายงานต่อไปนี้

Jantovà และคณะ (2003) ทำการศึกษาฤทธิ์ของสาร berberine ในกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งปากมดลูกสายพันธุ์ HeLa และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวสายพันธุ์ L1210 พบร่วมกับสาร berberine มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด แต่เซลล์ L1210 มีความไวต่อสารมากกว่าเซลล์ HeLa โดยค่า IC_{100} ของเซลล์ HeLa ต่ำกว่า $100 \mu\text{g/ml}$ ในขณะที่ค่า IC_{100} ของเซลล์ L1210 มีค่าประมาณ $10 \mu\text{g/ml}$ และเมื่อเซลล์ L1210 สัมผัสกับสาร berberine ที่ความเข้มข้น $10-50 \mu\text{g/ml}$ พบร่วมกับมีการชะงักนของวัฏจักรเซลล์ที่ระยะ G0/G1 และ berberine ที่ความเข้มข้น $25-100 \mu\text{g/ml}$ ทำให้เกิดการตายแบบพอดพอดโดยพบร่วมกับการแตกหักของดีเอ็นเอเมื่อทดสอบโดยเทคนิค agarose gel electrophoresis

Zhang และคณะ (2005) ทำการศึกษาลึกลับฤทธิ์และกลไกในการฆ่าเซลล์มะเร็งของมนุษย์ คือ เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) เซลล์มะเร็งปอด (A2) และเซลล์มะเร็ง neuroblastoma (SH-SY5Y) ของสาร 4-demethyl-picropodophyllotoxin 7-O- β -D-glucopyranoside (4DPG) ซึ่งเป็น podophyllotoxin glucoside ตัวใหม่ที่แยกได้มาจากเหง้าของต้น *Sinopodophyllum emodi* (Wall) Ying พบร่วมกับ 4DPG แสดงความเป็นพิษในลักษณะที่ขึ้นอยู่กับปริมาณและเวลา โดยเซลล์ HeLa มีความไวต่อสาร 4DPG มากกว่าเซลล์ไอล์บีโนลด์อื่นๆ การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Flow cytometry แสดงให้เห็นว่าสารทำให้เกิดการตายแบบพอดพอดของเซลล์ที่ระยะ G1 ลดลง และมีจำนวนประชากรของเซลล์ที่ระยะ G2/M เพิ่มขึ้น สาร 4DPG ยังส่งผลให้เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอในเซลล์ HeLa นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ HeLa และ A2 ที่สัมผัสสาร 4DPG ที่ความเข้มข้น $0.1 \mu\text{M}$ มีการทดสอบออกของโปรตีน p53 เพิ่มขึ้นและมีอัตราส่วนของโปรตีน Bax ต่อ BCl-2 สูงขึ้น จากผลการศึกษาครั้นนี้แสดงให้เห็นว่าสาร 4DPG เหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายแบบพอดพอดโดยอาจผ่านวิธีโปรตีน

p53

Sun และคณะ (2005) ทำการทดสอบสารต้านมะเร็ง 3β -Hydroxy-12-oleanen-27-oic acid (ATA) ซึ่งสกัดได้มาจากเหง้าของ *Astilbe chinensis* สาร ATA มีโครงสร้างคล้ายกับกรดโอลีโนลิก (oleanolic acid) สาร ATA มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง HeLa มากกว่ากรดโอลีโนลิก สาร ATA ยังมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง HeLa ในลักษณะที่ขึ้นอยู่กับปริมาณและเวลา และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบพอดพอดโดยพบร่วมกับสาร ATA เหนี่ยวนำให้เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอและมีการชะงักนของวัฏจักรเซลล์ที่

ระยะ G0/G1 เมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค Flow cytometry นอกจากนี้สาร ATA ยังเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน Bax และลดการแสดงออกของโปรตีน BCL-2 รวมทั้งลด mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$)

Chou และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาสาร osthol ที่สกัดได้จาก *Cnidium monnieri* (L.) Cusson ซึ่งเป็นยาสมุนไพรจีน ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านมะเร็งของ osthol ในเซลล์เพาะเลี้ยงและในสิ่งมีชีวิต ซึ่งผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสาร osthol สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์ HeLa โดยขึ้นกับปริมาณและเวลา ค่า IC₅₀ มีค่าประมาณ 77.96 และ 64.94 µg/ml เมื่อเซลล์สัมผัสกับสาร osthol เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ สาร osthol มีความเป็นพิษต่ำในเซลล์ปัจมูกูมิ cervical fibroblast และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอฟโทสิสในเซลล์ HeLa โดยเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอและกระดุnn poly ADP ribose polymerase (PARP) นอกจากนี้สาร osthol ยังทำให้หนูที่ได้รับเซลล์มะเร็ง P-388D1 มีอายุขัยที่ยาวนานมากกว่าหนูที่ไม่ได้รับสาร osthol จากผลการศึกษาเบื้องต้นนี้เป็นข้อพิสูจน์ให้เห็นว่าสาร osthol สามารถยับยั้งเซลล์ P-388 D1 ในสัตว์ทดลองและเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอฟโทสิสในเซลล์ HeLa ที่ทำในห้องปฏิบัติการ และสาร osthol เป็นสารที่สามารถนำไปสู่การพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งที่ดีได้

Yang และคณะ (2007) ทำการศึกษาผลของสารสังเคราะห์ 1,7-dimethyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (DMC) ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) และเซลล์มะเร็งปอด (A549) พบร่วมกับสาร DMC สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิด แต่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอฟโทสิสได้ในเซลล์ HeLa เท่านั้น เมื่อทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค Flow cytometry และทำการยืนยันผลโดยดูถูกยณาสัณฐานทางวิทยาของเซลล์รวมทั้งการเกิดการแตกหักของดีเอ็นเอ

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

1. ตู้ปลอดเชื้อ (Vertical laminar flow class II)
2. ตู้บ่มเซลล์แบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 incubator)
3. กล้องจุลทรรศน์แบบหักกลับ (Inverted Microscope)
4. เครื่องปั่นหัวใจ (Centrifuge)
5. เครื่องวัดการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท (Microplate reader)
6. หม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ (Autoclave)
7. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
8. กล่องดิจิตอลยึดห้องพานาโซนิค รุ่น ลูมิก

3.2 สารเคมี

1. Chloroform/Isoamyl alcohol (24:1) (amresco , ประเทศไทย)
2. Dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich , ประเทศไทย)
3. Dullbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ที่เติม phenol red (Gibco-invitrogen , ประเทศไทย)
4. Fetal bovin serum (FBS) (Gibco-invitrogen , ประเทศไทย)
5. MTT [3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma Chemical , ประเทศไทย)
6. penicillin/streptomycin (Gibco-invitrogen , ประเทศไทย)
7. Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25:24:1) (Pierce , ประเทศไทย)
8. Proteinase K (US Biological , ประเทศไทย)
9. RNase A (amresco , ประเทศไทย)
10. Sterile water for injection (A.N.B.Laboratory , ประเทศไทย)
11. 0.4% Trypan blue stain (Gibco-invitrogen , ประเทศไทย)

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

เพาะเลี้ยงเซลล์ไนน์ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ (HeLa) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 10% FBS-DMEM และนำไปบ่มที่ 37°C ในตู้บ่มเซลล์แบบใช้การบอนไดออกไซด์ ที่มีการบอนไดออกไซด์ในอากาศ 5% เมื่อเซลล์เจริญเติบโตเต็มพื้นผิวของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ทำการเก็บเซลล์ออกจากภาชนะโดยใช้ 0.025% Trypsin/EDTA

3.3.2 การ subculture โดยใช้ 0.025% Trypsin /EDTA

ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เติม PBS ที่ปราศจากแคลเซียมและแมกนีเซียมลงในจานเพาะเลี้ยงเพื่อล้างเซลล์จากนั้นเติมสารละลายน้ำ 0.025% trypsin/EDTA 1 ml เขย่าเบาๆและนำไปบ่มที่ตู้บ่มเซลล์ที่ 37°C นาน 2 นาที จากนั้นเติม 10% FBS-DMEM 10 ml ดูดสารละลายน้ำออกจากตู้บ่มเซลล์ใส่ในหลอดพลาสติกแบบฝาเกลียวแล้วนำไปปั่นตกร่องที่ 1300 rpm นาน 10 นาที ก่อนเติม 10% FBS-DMEM เพื่อละลายตกร่องเซลล์ จากนั้นทำการแบ่งเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงอันใหม่ในอัตราส่วนที่ต้องการทำ การนับเซลล์ที่มีชีวิต โดยการข้อมสี trypan blue นับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยเครื่อง hemocytometer

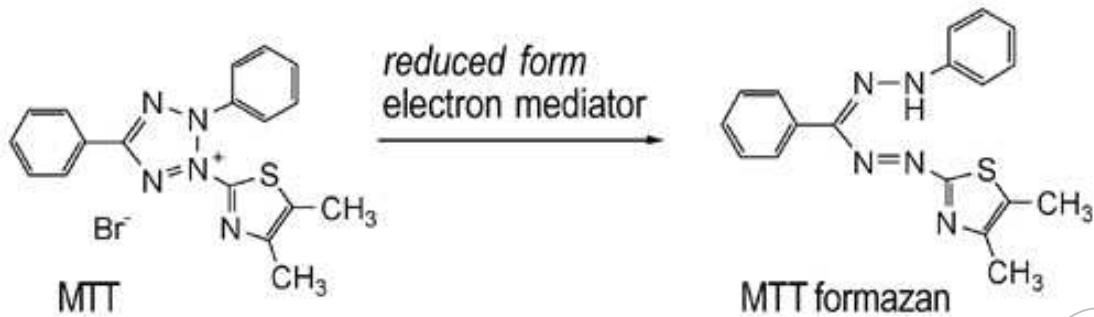
3.3.3 การวัดค่าการอยู่รอดของเซลล์ โดยวิธี MTT (กล่าวข้างต้น ครวีสุข, 2550)

ทำการทดลองโดยใช้วิธี MTT ซึ่งวัดการเปลี่ยนแปลงกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ โดยเกลือ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) เป็นสารสีเหลืองละลายน้ำได้ MTT จะถูกคริโควิชโดยการทำงานของเอนไซม์ดีไซโตรีโนสในไมโครคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตได้เป็นผลึก formazan มีสีม่วงน้ำเงินไม่ละลายน้ำ ดังแสดงปฏิกิริยาในรูปที่ 3-1 ปริมาณสารละลายน้ำ MTT-formazan จะแปรผันตรงกับปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิต วิธีการทดลองโดยย่อ มีดังนี้ ทำการแบ่งเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงแบบ 24 หลุม (1.0×10^5 เซลล์/หลุม) และบ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ในตู้บ่มเซลล์แบบใช้การบอนไดออกไซด์นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน นำเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 หรือ 72 ชั่วโมง ก่อนครบเวลา 4 ชั่วโมง เติมสารละลายน้ำ MTT (5 mg/ml) หลุมละ 10 μl และบ่มต่อจนครบเวลา จึงดูอาหารเลี้ยงเซลล์ทึ้งเติม DMSO หลุมละ 500 μl เพื่อละลายตกร่อง formazan ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 nm และแสดงผลเป็นร้อยละของการอยู่รอดของเซลล์ซึ่งคำนวณได้ดังนี้

$$\text{ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์} = (\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่สารทดสอบ}/\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ไม่ใส่สารทดสอบ}) \times 100$$

จากนั้นนำมาหารือยละเอียดความเป็นพิษต่อเซลล์ซึ่งคำนวณได้ดังนี้

$$\text{ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์} = 100 - \text{ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์}$$



รูปที่ 3-1 การเกิดตัวของ MTT formazan

(ที่มา : www.answers.com/topic/mtt-assay)

3.3.4 การวัดค่าการเพิ่มจำนวนเซลล์ โดยวิธี crystal violet (Oh และคณะ, 2006)

เป็นการวัดการเพิ่มจำนวนเซลล์ โดยการทดลองทำการแบ่งเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงแบบ 24 หลุม (1.0×10^5 เซลล์/หลุม) และบ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ในตู้บ่มเซลล์แบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน บ่มเซลล์ต่อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 หรือ 72 ชั่วโมง จากนั้นทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย PBS หลุมละ 1 ml ก่อนเติมสารละลาย crystal violet (0.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) crystal violet ใน 30% methanol และ 3% formaldehyde) หลุมละ 200 μl บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที ถึง งานเพาะเลี้ยงด้วยน้ำสะอาดจากจำนวน 2 ครั้งจากนั้นเติม 1% SDS หลุมละ 1 ml และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 nm แสดงผลเป็นร้อยละของการอยู่รอดของเซลล์ซึ่งคำนวณได้ดังนี้

ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ = $(\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่สารทดสอบ}/\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ไม่ใส่สารทดสอบ}) \times 100$

จากนั้นนำมาหารือถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ซึ่งคำนวณได้ดังนี้

ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ = $100 - \text{ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์}$

3.3.5 การทดสอบการแตกหักของดีเอ็นเอ (Zhang และคณะ, 2005)

เป็นการตรวจสอบการตายแบบอะพอฟโทสิสโดยดูแตกหักของดีเอ็นเอโดยการทดลองทำการแบ่งเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงขนาด 60 มิลลิเมตร (5×10^5 เซลล์) และบ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ในตู้บ่มเซลล์แบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารทดสอบที่ความเข้มข้น $50\mu\text{M}$ บ่มเซลล์ต่อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 หรือ 72 ชั่วโมง เซลล์ HeLa (5×10^5 เซลล์) สัมผัสถกับสาร IMC 21 และ IMC 26 เป็นเวลา 24 หรือ 72 ชั่วโมง จึงเก็บเซลล์ออกจากภาชนะโดยใช้ 0.025% Trypsin /EDTA และล้างเซลล์ด้วย PBS จากนั้นดูดสารละลายเซลล์ทึบหมดใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml ปั่นตกรตะกอนเซลล์ที่ 1300 rpm นาน 10 นาที ดูด PBS ทิ้ง เติม lysis buffer

(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, pH 8.0, 0.2 M NaCl, 200 µg/ml proteinase K and 1% SDS) ปริมาตร 500 µl นำไปปั่นที่ 50°C นาน 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติม phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 500 µl ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ 12000 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 20 นาที ดูดส่วนไขค้านบนใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml เติม chloroform/isoamyl alcohol (24:1) หนึ่งเท่าปริมาตร ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นที่ 12000 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 20 นาที จากนั้นดูดส่วนไขค้านบน ไปตกตะกอนดีอี็น เอค้ายการเติม isopropyl alcohol หนึ่งเท่าปริมาตรและปั่นตกตะกอนที่ 12000 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที ทำให้ตะกอนดีอี็นເອແห้ง โดยใช้เครื่องระเหยแบบหมุน (speed vacuum rotary) จากนั้นล้างตะกอนดีอี็นเอค้าย TE บัฟเฟอร์ 100 µl และ RNase A (10 µg/ml) 1 µl ก่อนนำไปปั่นที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปวิเคราะห์ผลด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ในบัฟเฟอร์ 1× TBE ด้วยความต่างศักย์ 50 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง 30 นาที โดยใช้ Lamda DNA Hind III Digest เป็น marker เมื่อครบเวลาข้อมแพ่นเจลด้วย ethidium bromide (10 µg/ml) นาน 10 นาที และถ่ายแพ่นเจล ด้วยน้ำสะอาด 2 ครั้งๆละ 5 นาที นำมาส่องดูภายใต้แสง UV และบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิตอล (Panasonic, Lumic)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

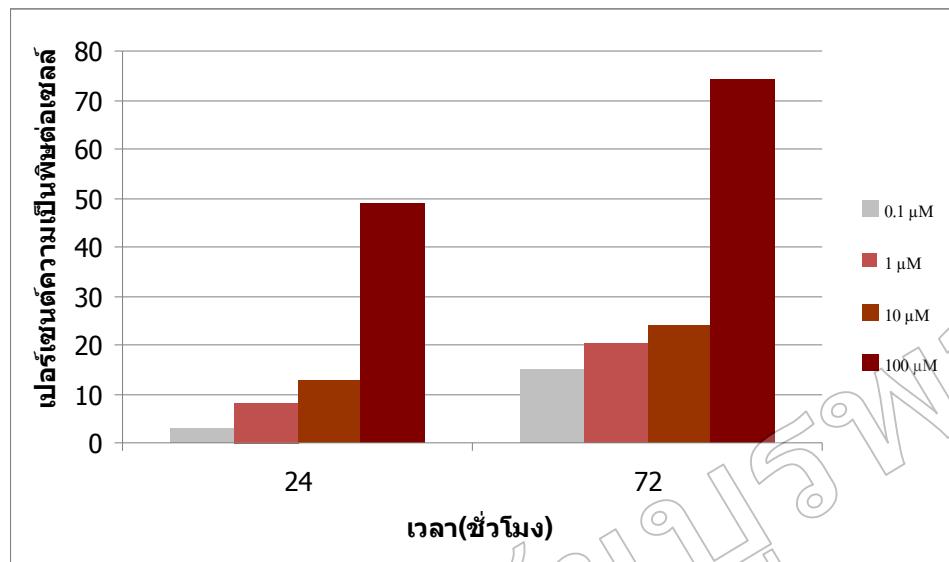
4.1 ความเป็นพิษของสาร IMC 21 และ IMC 26 ต่อเซลล์มะเร็ง HeLa

เมื่อทดสอบความเป็นพิษโดยวิธี MTT พบว่าสาร IMC 21 และ IMC 26 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง HeLa ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นและเวลา ดังตารางที่ 4-1 และ รูปที่ 4-1 และ 4-2 โดยพบว่าความสามารถในการทำลายเซลล์มะเร็ง HeLa ของสาร IMC 26 สูงกว่าสาร IMC 21 ทุกความเข้มข้น โดยมีค่า IC₅₀ ของสาร IMC 21 และ IMC 26 เท่ากับ 10.80 และ 27.11 μM ตามลำดับ ที่เวลา 72 ชั่วโมง ในขณะที่ความเข้มข้น 100 μM พบว่าสาร IMC 26 มีค่าปรอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ HeLa เท่ากับ 60.52 และ 70.68 μM ที่เวลา 24 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ ในขณะที่ค่าปรอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ HeLa ของสาร IMC 21 เท่ากับ 49.14 และ 74.15 μM ที่เวลา 24 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ

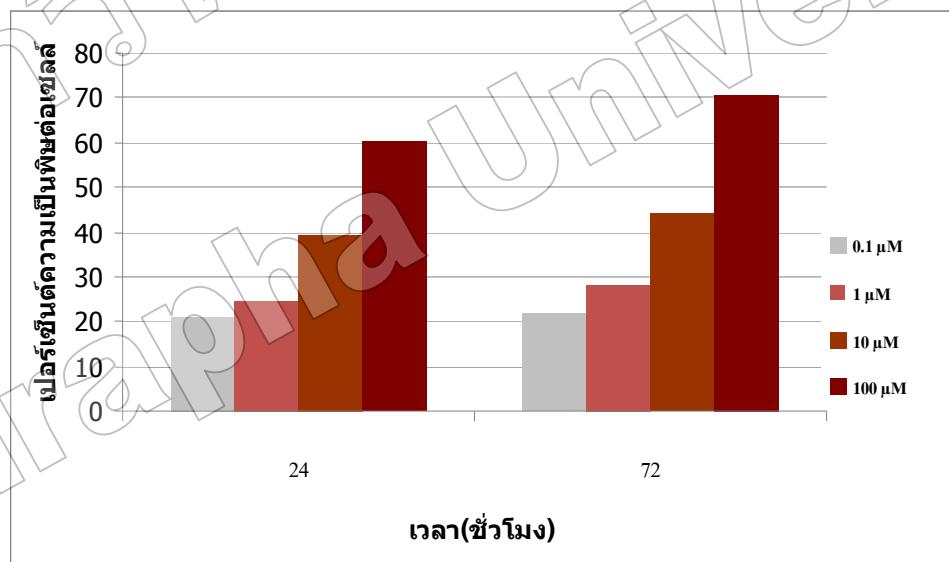
ตารางที่ 4-1 เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ HeLa ของสาร IMC 21 และ IMC 26 โดยวิธี MTT

ความเข้มข้น	IMC 21		IMC 26	
	24 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
0.1 μM	2.90 \pm 2.65 N=4	15.01 \pm 3.10 N=4	20.90 \pm 4.96 N=3	21.68 \pm 4.36 N=3
1 μM	8.19 \pm 2.37 N=4	20.57 \pm 3.31 N=4	24.66 \pm 4.72 N=3	28.37 \pm 7.12 N=3
10 μM	12.76 \pm 1.98 N=4	23.88 \pm 9.76 N=4	39.27 \pm 7.33 N=3	44.37 \pm 6.89 N=3
100 μM	49.14 \pm 6.15 N=4	74.15 \pm 9.80 N=4	60.52 \pm 4.96 N=7	70.68 \pm 11.69 N=7

หมายเหตุ : ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองแต่ละครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน N คือ จำนวนครั้งที่ทำการทดลอง แต่ละครั้งการทดลองทำการทดสอบ 3 ช้ำ



รูปที่ 4-1 กราฟแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ HeLa ของสาร IMC 21 เมื่อทดสอบโดยวิธี MTT



รูปที่ 4-2 กราฟแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ HeLa ของสาร IMC 26 เมื่อทดสอบโดยวิธี MTT

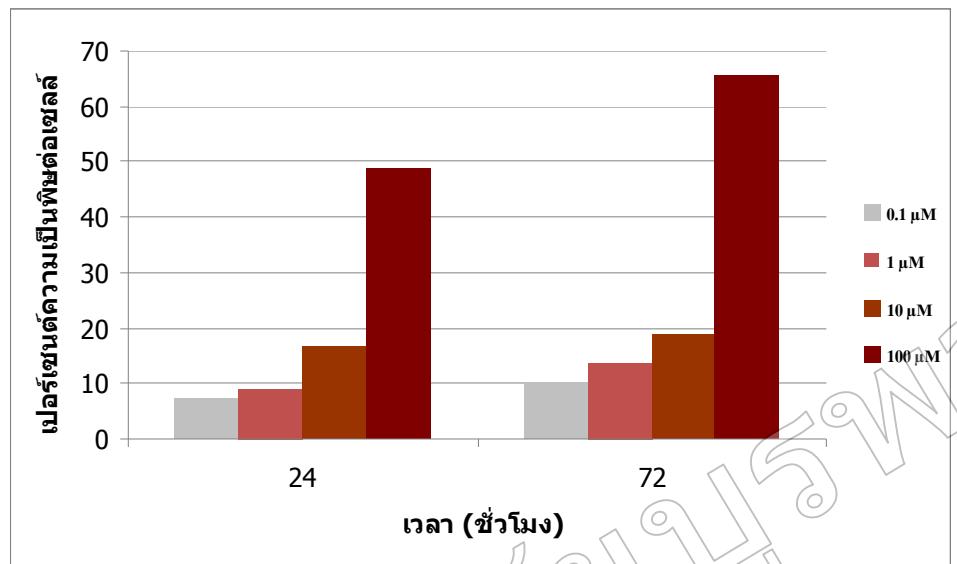
จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี crystal violet พบร้าสาร IMC 21 และ IMC 26 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง HeLa ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นและเวลา ดังตารางที่ 4-2 และ รูปที่ 4-3

และ 4-4 โดยพบว่าความสามารถในการทำลายเซลล์มะเร็ง HeLa ของสาร IMC 26 สูงกว่าสาร IMC 21 ทุกความเข้มข้น โดยมีค่า IC₅₀ ของสาร IMC 21 และ IMC 26 เท่ากับ 31.19 และ 68.03 μM ตามลำดับ ที่เวลา 72 ชั่วโมง ในขณะที่ความเข้มข้น 100 μM พบว่า สาร IMC 26 มีค่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ HeLa เท่ากับ 58.38 และ 74.61 μM ที่เวลา 24 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ ในขณะที่ค่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ HeLa ของสาร IMC 21 เท่ากับ 48.71 และ 65.84 μM ที่เวลา 24 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ

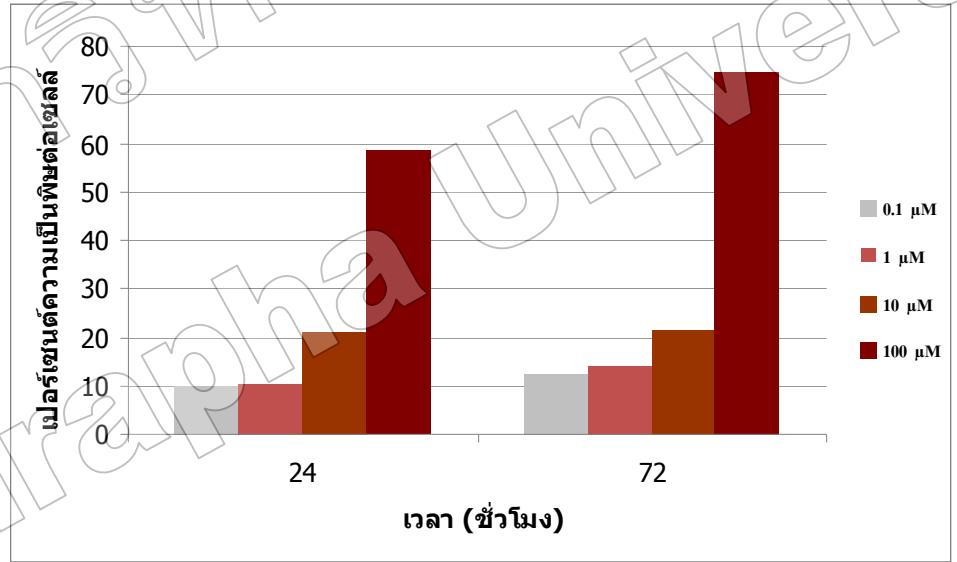
ตาราง ที่ 4-2 เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ HeLa เมื่อสัมผัสกับสาร IMC 21 และ IMC 26 โดยวิธี crystal violet

ความเข้มข้น	IMC 21		IMC 26	
	24 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
0.1 μM	7.10 ± 1.08 N=3	10.10 ± 3.21 N=3	9.89 ± 8.85 N=3	12.28 ± 8.87 N=3
1 μM	8.85 ± 1.44 N=3	13.67 ± 2.15 N=3	10.27 ± 9.51 N=3	14.06 ± 8.54 N=3
10 μM	16.62 ± 4.65 N=3	18.65 ± 3.77 N=3	20.89 ± 9.16 N=3	21.60 ± 10.32 N=3
100 μM	48.71 ± 13.41 N=3	65.84 ± 9.43 N=3	58.38 ± 11.62 N=3	74.61 ± 5.67 N=3

หมายเหตุ : ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองแต่ละครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน N คือ จำนวนครั้งที่ทำการทดลอง แต่ละครั้งการทดลองทำการทดสอบ 3 ช้ำ



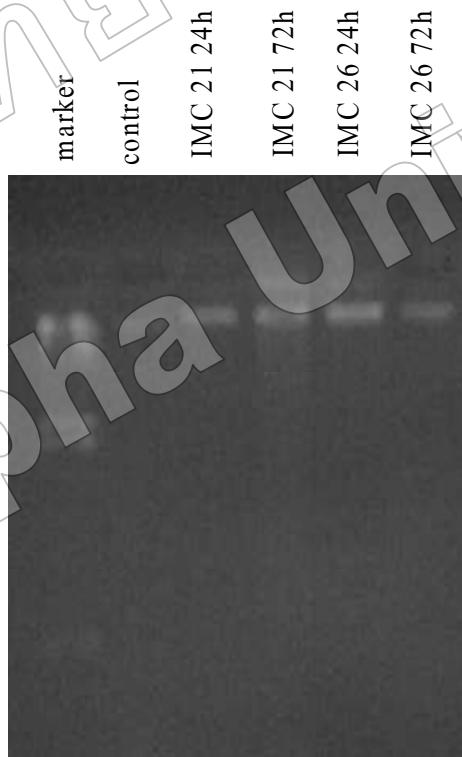
รูปที่ 4-3 กราฟแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ HeLa ที่สัมผัสกับสาร IMC 21 เมื่อทดสอบด้วยวิธี crystal violet



รูปที่ 4-4 กราฟแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ HeLa ที่สัมผัสกับสาร IMC 26 เมื่อทดสอบด้วยวิธี crystal violet

4.2 ผลของสาร IMC 21 และ IMC 26 ต่อการแตกหักของดีเอ็นเอ

การแตกหักของดีเอ็นเอเป็นลักษณะอย่างหนึ่งของการเกิดการตายแบบอะพอฟโทสิส ในระหว่างที่ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสาร IMC 21 และ IMC 26 โดยวิธี MTT และวิธี crystal violet นั้นในขั้นตอนของการ treat สารทดสอบทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆแล้วนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 หรือ 72 ชั่วโมง ก่อนที่จะทำการทดลองขั้นต่อไปได้นำเซลล์มาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าลักษณะสัณฐานทางวิทยาของเซลล์เปลี่ยนแปลงไป คือ ที่เยื่อเซลล์มีปูนปมเกิดขึ้นมองเห็นได้ชัดเจนที่ความเข้มข้นสูงสุดและที่เวลา 72 ชั่วโมงซึ่งลักษณะการเกิดปูนปมของเยื่อเซลล์นั้นเป็นลักษณะอย่างหนึ่งของการเกิดอะพอฟโทสิสของเซลล์ ซึ่งในการทดลองเมื่อเซลล์ถูกสกัดสาร IMC 21 และ IMC 26 ที่ความเข้มข้น 50 μM เป็นเวลา 24 และ 72 ชั่วโมงทำการสกัดดีเอ็นเอแล้วนำมาวิเคราะห์ผลด้วย agarose gel electrophoresis พบร่วงเซลล์ HeLa ที่สัมผัสกับสาร IMC 21 พบรการแตกหักของดีเอ็นเอที่เวลา 72 ชั่วโมง รูปที่ 4-5 ในขณะที่สาร IMC 26 ไม่พบรการแตกหักของดีเอ็นเอเมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง



รูปที่ 4-5 ผลวิเคราะห์การแตกหักของดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis ของเซลล์ HeLa เมื่อเซลล์สัมผัสกับสาร IMC 21 และ IMC 26 ที่ความเข้มข้น 50 μM ที่เวลา 24 และ 72 ชั่วโมง

บทที่ 5

อภิปราย สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการทดลอง

สาร IMC 21 และสาร IMC 26 เป็นอนุพันธ์ของ N-acetyl-O-methyldopamine (NAMDA) ซึ่งสังเคราะห์ได้จาก vanillin มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของเซลล์แมมโคร์ฟางของหนูสายพันธุ์ RAW 246.7 ได้ค่อนข้างสูง และในการศึกษาครั้งนี้เป็นการทดสอบฤทธิ์ของสารทั้งสองชนิดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง HeLa ซึ่งการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเป็นแนวทางหนึ่งในการรักษามะเร็ง วิธีการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ประกอบด้วย การลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งและการเหนี่ยวแน่น้ำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง (Hyun และคณะ , 2003) จากการทดลองพบว่า IMC 21 และ IMC 26 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง HeLa ในลักษณะที่แปรผันกับความเข้มข้นและเวลาโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 27.11 และ $10.80 \mu M$ ตามลำดับ ที่เวลา 72 ชั่วโมงเมื่อทดสอบโดยวิธี MTT และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 68.03 และ $31.19 \mu M$ ตามลำดับ ที่เวลา 72 ชั่วโมงเมื่อทดสอบโดยวิธี crystal violet แสดงให้เห็นว่าสาร IMC 26 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง HeLa มากกว่า IMC 21 จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างของสาร IMC 21 และ IMC 26 ดังแสดงในรูปที่ 1-1 นั้นแตกต่างกัน จึงส่งผลให้มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งแตกต่างกัน

อะพอพโทอสิส หรือที่เรียกว่าโปรแกรมการตายของเซลล์ เป็นลักษณะการตายแบบหนึ่งของเซลล์ที่สังเกตได้จากลักษณะสัณฐานทางวิทยาของเซลล์ภายในตัวกล้องจุลทรรศน์ หากเซลล์มีการเหนี่ยวแน่น้ำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทอสิส ลักษณะสัณฐานทางวิทยาของเซลล์จะเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัดเจน เช่น เซลล์มีความกลม เซลล์หดตัวเล็กลง และผนังเซลล์เกิดปูมปม เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี เช่น เกิดการแตกหักของดีอีนเอและในที่สุดเซลล์จะแตกออกเป็น apoptotic bodies (Earnshaw , 1995) เป็นต้น จากการทดลองเมื่อเซลล์ HeLa สัมผัสกับสาร IMC 21 และสาร IMC 26 ที่ความเข้มข้น $50 \mu M$ เป็นเวลา 24 หรือ 72 ชั่วโมง นำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าลักษณะสัณฐานทางวิทยาของเซลล์เปลี่ยนแปลงไปในลักษณะของการเกิดอะพอพโทอสิส กล่าวคือ ที่เวลา 72 ชั่วโมง เซลล์มีความกลมมากขึ้น เซลล์หดตัวเล็กลงและลักษณะที่เห็นได้ชัดเจนคือ เยื่อหุ้มเซลล์เกิดปูมปม ดังนั้นจึงทดสอบลักษณะการเกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทอสิสโดยดูการแตกหักของดีอีนเอซึ่งวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบว่าเซลล์ HeLa ที่สัมผัสกับสาร IMC 21 เป็นเวลา 72 ชั่วโมงนั้นเกิดการแตกหักของดีอีนเอได้ ดังรูปที่ 4-9 แสดงให้เห็นว่าสาร IMC 21 สามารถเหนี่ยวแน่น้ำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทอสิสได้ ในขณะที่เซลล์ที่สัมผัสกับสาร IMC 26 ไม่พบการแตกหักของดีอีนเอ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการสร้างของสาร IMC 26 นั้นแตกต่างจากโครงสร้างของสาร IMC 21 ซึ่งสามารถเหนี่ยวแน่น้ำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทอสิสได้ ในขณะที่สาร IMC 26

อาจเห็นได้ว่าน้ำให้เซลล์เกิดการตายแบบอื่น ดังนั้นอาจทำการศึกษาต่อไปว่าสาร IMC 26 มีความเป็นพิษต่อเซลล์โดยเห็นได้ว่าน้ำให้เซลล์เกิดการตายในลักษณะใด

5.2 สรุปผลการทดลอง

1. สาร IMC 26 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง HeLa มากกว่าสาร IMC 21 ในลักษณะที่บันทึกกับปริมาณและเวลาโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 27.11 และ $10.80 \mu\text{M}$ ตามลำดับ ที่เวลา 72 ชั่วโมง เมื่อทดสอบโดยวิธี MTT
2. สาร IMC 26 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง HeLa มากกว่าสาร IMC 21 ในลักษณะที่บันทึกกับปริมาณและเวลาโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 68.03 และ $31.19 \mu\text{M}$ ตามลำดับ ที่เวลา 72 ชั่วโมง เมื่อทดสอบโดยวิธี crystal violet
3. พบรการแตกหักของดีเอ็นเอเมื่อเซลล์มะเร็ง HeLa สัมผัสถูกสาร IMC 21 ที่ความเข้มข้น $50 \mu\text{M}$ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อทดสอบโดยเทคนิค agarose gel electrophoresis

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการทดสอบยืนยันผลการตายแบบอะพอโพตอสิสโดยวิธีอื่นร่วมด้วย
2. ควรมีการศึกษาต่อว่าสาร IMC 21 และสาร IMC 26 มีผลต่อเซลล์ปกติหรือไม่



เอกสารอ้างอิง

- กล่าวขวัญ ศรีสุข . 2549 . เอกสารประกอบการสอนรายวิชา 316222 เทคนิคทางชีวเคมี 1 ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- กล่าวขวัญ ศรีสุข . 2550 .เอกสารประกอบการสอนรายวิชา 316332 Techniques in cell and tissue culture. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- จิตชัย ลาภจารัสสุริยา . 2548 . รู้จักโรคมะเร็ง. กรุงเทพฯ : บริษัท สำนักพิมพ์บ้านหนังสือ 19 จำกัด.
- ทีวีพร สิทธิราชและสมศักดิ์ พันธุ์วัฒนา . 2543 . สารศิริราชเรื่อง การตายของเซลล์ประสาทตามแบบเนคโกรสิสและอะพอพโทสิส , 5 : 312-326.
- วสันต์ ลินะสมิตและสมเกียรติ ศรีสุพรรณดิฐ . 2542 . ตำรามะเร็งนรีเวชวิทยา . เรียนเรียงใหม่ครั้งที่ 2 . กรุงเทพฯ : บริษัท ไฮลิสติก พับลิชชิ่ง จำกัด.
- สิทธิศักดิ์ ปุยอ้อก . 2548 . apoptosis ตายเพื่ออยู่. วารสาร LAB. today. 4 : 45-49
- Chou , S-Y. , Hsu, C-S., Wang, K-T., Wang, M-C. and Wang, C. 2006 . Camelliin B induced apoptosis in HeLa cell line. Phytotherapy Research, 21 : 226-230.
- Earnshaw, W.C. 1995 . Nuclear changes in apoptosis. Current Opinion in Cell Biology. 7: 337-343
- Hyun, P-W., Hee, C-Y., Won, J-C., Oh, P-J., Kim, K., Hyuck, I-Y., Lee, MH., Ki, K-W. and Park, K. 2003 . 3 β -Hydroxyolean-12-en-27-oic acid: A cytotoxic, apoptosis-inducing natural drug against COLO-205 cancer cells. Biochemistry Biophysical Research Communication, 300 : 230-241.
- Jantová S. Cipák L. Černáková M. Koštállová D. 2003 . Effect of berberine on proliferation, cell cycle and apoptosis in HeLa and L1210 cells . Journal of Pharmacy and Pharmacology, 55 : 1143-1149
- Karnkla , S. 2008 . The synthesis of series of NAMDA derivatives and their biological activities. Master's thesis. Department of Chemistry, Graduate School, Burapha University
- Mongkol , N., Srisook , K., Srisook , E., Karnkla , S. 2008 . Suppression effect of nitric oxide (NO) production and inducible nitric oxide Synthase by NAMDA derivertives in LPS-stimulated macophages . Proceeding of the 9th National Symposium of Graduate Research , Chonburi , Thailand .
- Oh, H-Y., Namkoong , S., Lee , S-J., Por , E., Kim, C-K., Billiar, TR., Han, J-A., Ha, K-S., Chung, H-T., Kwon, Y-G., Lee, H and Kim, Y-M. 2006 . Dexamethasone protects primary cultured

- hepatocytes from death receptor- mediated apoptosis by upregulation of cFLIP. *Cell Death and Differentiation*, 13 : 512-523.
- Sun , H-X. , Zheng , Q-F., Tu , J. 2005 . Induction of apoptosis in HeLa cells by 3b-hydroxy-12-oleanen-27-oic acid from the rhizomes of *Astilbe chinensis* . *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14 : 1189–1198.
- Yang , L., Liang, F., Liu, M., Zheng, C., Wan, S., Xiong, X., Zhang, X., Shen, C. and Zhou, X. 2006 . HeLa cells apoptosis induced by 1,7-dimethyl-1,4,7,10-Tetraazacyclododecane. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17 : 1818–1822.
- Zhang , Q., Jiang, M., Zhao, C-Q., Yu, Miao., Zhang, Hui., Ding, Y-D., Zhai, Y-G. 2005 . Apoptosis induced by one new podophyllotoxin glucoside in human carcinoma cells. *Toxicology*, 212 : 46–53.
- [online].แหล่งเข้าถึง : www.answers.com/topic/mtt-assay [9 มกราคม 2551]
- [online].แหล่งเข้าถึง : <http://en.wikipedia.org/wiki/Necrosis> [5 มีนาคม 2551]
- [online].แหล่งเข้าถึง : ghr.nlm.nih.gov/.../apoptismacrophage [12 มกราคม 2551]
- [online].แหล่งเข้าถึง : <http://www.zyworld.com/NAKARIN/earthwatch15.htm> [10 มกราคม 2551]

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

สารเคมีสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ไอล์

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ที่มี phenol red
เทลง DMEM 1 ถุง ใส่ขวดแก้วแบบฝาเกลี่ยวน้ำด 1000 ml ละลายตัวยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 900 NaHCO₃ 3.7 g ผสมให้เข้ากันดี จากนั้นปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 7.1-7.2 ด้วย HCl หรือ NaOH ทำการเติม Penicillin/Streptomycin (10,000 U/ml Penicillin : 10,000 µg/ml) 10 ml นำมากรองผ่านเมมเบรน (0.22 µm) แบบสูญญากาศ จากนั้นเติม Fetal Bovine Serum (FBS) ที่ heat-inactivated และจำนวน 100 ml ผสมให้เข้ากันดีและเก็บที่ 4°C
2. 1x Phosphate-Buffered Saline (PBS), pH 7.4
ซึ่ง KCl 0.2 g , KH₂PO₄ 0.24 g , NaCl 8.0 g และ Na₂HPO₄ 1.44 g เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 900 ml ผสมให้เข้ากันดีด้วย stirrer ปรับ pH ให้ได้ 7.4 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาตร 1000 ml นำมากรองผ่านเมมเบรน (0.22 µm) แบบสูญญากาศ และเก็บที่ 4°C
3. สารละลายน 0.025% trypsin/EDTA (T/E)
ซึ่ง NaCl 4.0 g , KCl 0.2 g , NaHCO₃ 0.17 g , EDTA.2Na 0.1 g , HEPES 0.6 g และ Glucose 0.5 g เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 450 ml ปรับ pH ให้อยู่ประมาณ 7.2 จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 500 ml เติม trypsin 0.125 g ผสมให้เข้ากันดีด้วย stirrer นำไปกรองผ่านเมมเบรน (0.22 µm) แบบสูญญากาศ แบ่งใส่หลอดพลาสติกแบบฝาเกลี่ยวน้ำด 15 ml ที่ปราศจากเชื้อปิดฝาให้แน่นและเก็บที่ -20°C
4. การทำ heat-inactivation ของซีรัม
นำขวดซีรัมออกจากตู้ -20°C มาไว้ในตู้ 4°C นาน 1 คืน เพื่อให้ละลายนเป็นของเหลวจนหมดทั้งขวดจากนั้นนำขวดซีรัมไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 56°C นาน 30 นาที เบี่ยงขวดทุกๆ 10 นาที เพื่อให้ซีรัมถูกความร้อนทั่วทั้งขวด เมื่อครบเวลานำไปวางที่อุณหภูมิห้อง แบ่งซีรัมใส่หลอดพลาสติกแบบเกลี่ยวน้ำด 50 ml ที่ปิดด้วยและเก็บที่ -20°C

สารเคมีสำหรับทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

1. การเตรียมสารละลายน MTT (5 mg/ml)
ซึ่งสาร MTT จำนวน 125 mg ละลายด้วย 1x PBS 25 ml ผสมให้เข้ากันดีนำมากรองผ่านเมมเบรน (0.22 µm) แบบสูญญากาศใส่ในหลอด microtube ขนาด 1.5 ml หุ้มหลอดด้วย foil และเก็บที่ 4°C
2. การเตรียมสารละลายน 0.5% crystal violet
ซึ่ง crystal violet 0.5 g นำมาละลายด้วย 1X PBS : formaldehyde : methanol (67:3:30) ผสม

ให้เข้ากันดีจากนั้นนำมารองด้วยกระดาษ Whatman เปอร์ 1 ใส่ในภาชนะเก็บให้พื้นแสงที่อุณหภูมิห้อง

3. การเตรียม 1% SDS

ซึ่ง SDS มา 1g นำมาละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml

สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์การแตกหักของดีเอ็นเอโดยเทคนิค agarose gel electrophoresis

1. Lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, pH 8.0, 0.2 M NaCl, 200 μ g/ml proteinase K และ 1% SDS) 100 ml

- 1 M Tris-HCl, pH 8.0	5 ml
- 4 M NaCl	5 ml
- 0.5 M EDTA	2 ml
- SDS	1 g
- น้ำกลั่น	88 ml

นำไปนึ่งผ่าเชือด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำและเติม proteinase K 20 μ g/ml

2. TE buffer , pH 8.0 (10 mM Tris-HCl , pH 8.0 , 1 mM EDTA , pH 8.0)

- 1M Tris-Cl , pH 8.0	1.0 ml
- 0.5 M EDTA , pH 8.0	0.2 ml
- น้ำกลั่น	98.8 ml

นำไปนึ่งผ่าเชือด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ

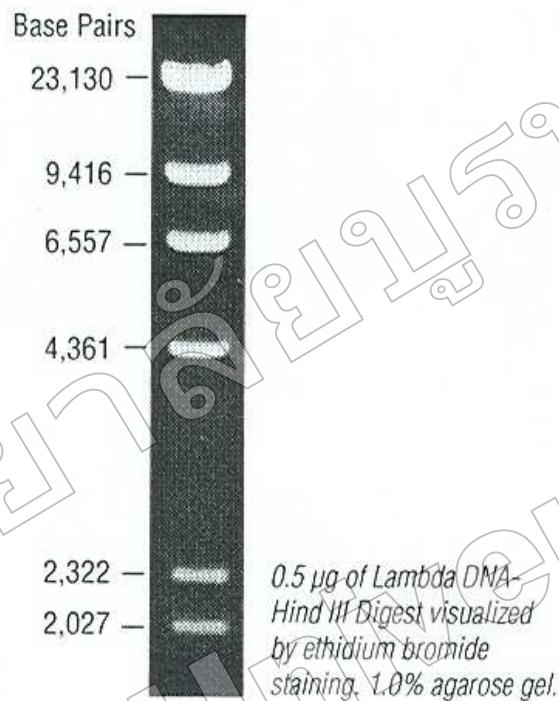
3. 10× TBE buffer (1 M Tris , 0.83 M Borric acid , 10mM EDTA)

- Tris-base	121.10 g
- Borric acid	51.32 g
- EDTA	3.72 g

ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรจากนั้นนำไปนึ่งผ่าเชือด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ

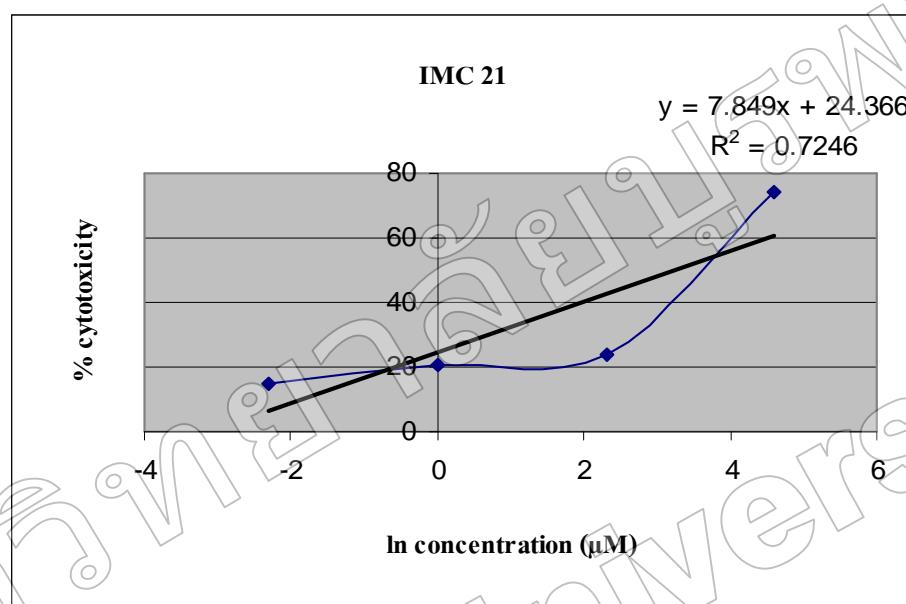
ภาคผนวก ๑

แบบแผนของ Lamda DNA Hind III Digest Marker



รูปที่ ๘-๑ แบบแผนของ Lamda DNA Hind III Digest Marker

ภาคผนวก ค
การคำนวณค่า IC_{50}



1. การคำนวณค่า IC_{50} ของสาร IMC 21 ที่เวลา 72 ชั่วโมงเมื่อทดสอบโดยวิธี MTT

$$\text{จากสมการ } y = 7.849x + 24.366$$

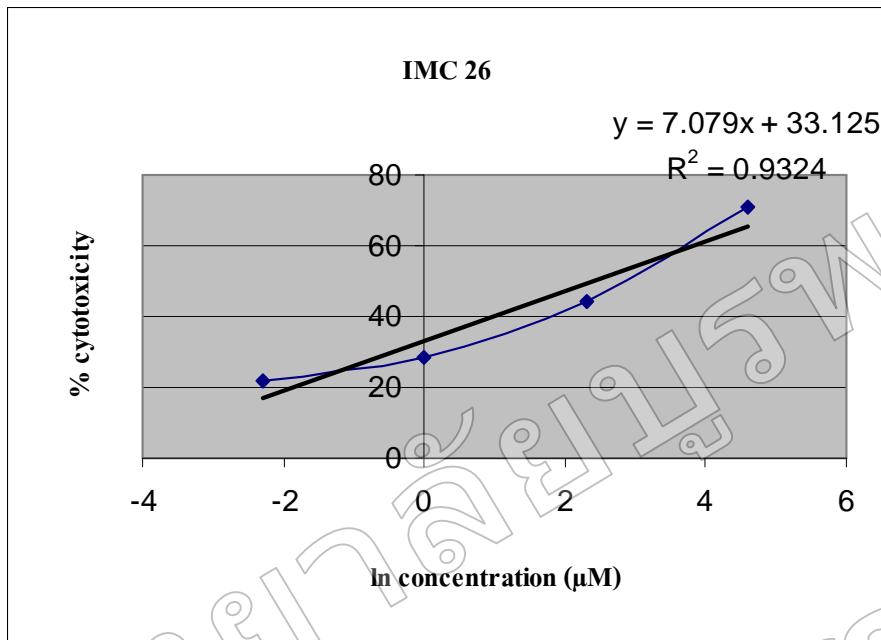
$$\text{ให้ } y \text{ เท่ากับ } 50 ; \quad 50 = 7.849x + 24.366$$

$$7.849x = 25.634$$

$$X = 3.265$$

แปลรูปเป็นตัวเลขที่ $50\% = 7.849x + 24.366$

ดังนั้นแปลรูปเป็นตัวเลขที่ $50\% = 3.265$

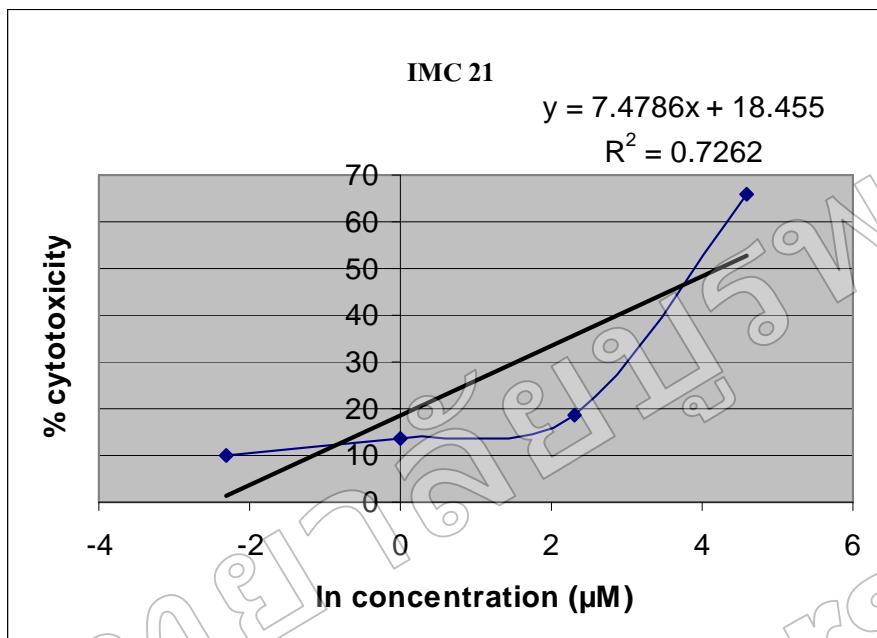


2. การคำนวณค่า IC_{50} ของสาร IMC 26 ที่เวลา 72 ชั่วโมงเมื่อทดสอบโดยวิธี MTT

$$\begin{aligned}
 &\text{จากสมการ} \quad y = 7.079x + 33.125 \\
 &\text{ให้ } y \text{ เท่ากับ } 50; \quad 50 = 7.079x + 33.125 \\
 &\quad 7.079x = 16.875 \\
 &\quad X = 2.38
 \end{aligned}$$

แปลงเป็นตัว变量 x ที่ $50\% = 7.079x + 33.125$

ดังนั้นแปลงเป็นตัว变量 x ที่ $50\% = 7.079x + 33.125$ เท่ากับ $10.80 \mu\text{M}$



3. การคำนวณค่า IC_{50} ของสาร IMC 21 ที่เวลา 72 ชั่วโมงเมื่อทดสอบโดยวิธี crystal violet

จากสมการ $y = 7.4786x + 18.455$

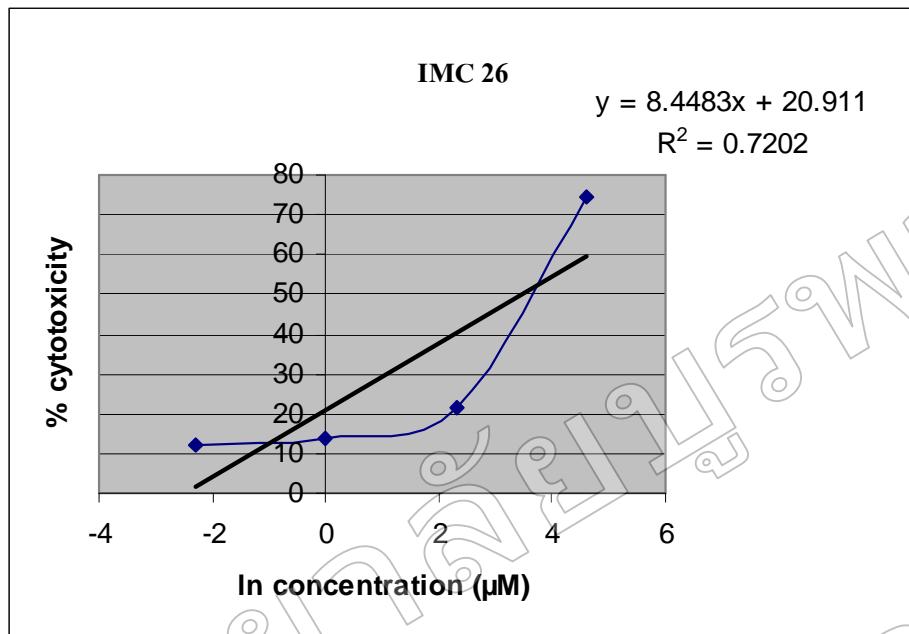
ให้ y เท่ากับ 50 ; $50 = 7.4786x + 18.455$

$$7.4786x = 31.545$$

$$x = 4.218$$

เมrorเรชันต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ 50% เท่ากับ $\ln 4.22$

ดังนั้นเมrorเรชันต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่สัมผัสกับสาร IMC 21 ที่ 50% เท่ากับ $68.03 \mu\text{M}$



4. การคำนวณค่า IC_{50} ของสาร IMC 26 ที่เวลา 72 ชั่วโมงเมื่อทดสอบโดยวิธี crystal violet

จากสมการ $y = 8.4483x + 20.911$

ให้ y เท่ากับ 50 ; $50 = 8.4483x + 20.911$

$$8.4483x = 29.089$$

$$X = 3.44$$

แปลร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ 50% เท่ากับ $\ln 3.44$

ดังนั้นแปลร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ 50% เท่ากับ $31.19 \mu\text{M}$

ประวัติย่อของนิสิต

ชื่อ-นามสกุล นางสาวภัทรศิริ บุญคิม
 วัน/เดือน/ปี เกิด วันเสาร์ที่ 6 เมษายน พ.ศ. 2528
 ที่อยู่ปัจจุบัน 9/22 หมู่ 11 ช. วัดทุ่งลานนา ถ.สุขุมวิท 103 แขวงคลองไม้ เขตประเวศ
 กรุงเทพฯ 10250

ประวัติการศึกษา

ระดับประถมศึกษา โรงเรียนคลองปักหลัก

ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนราชดำเนิน

ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนราชดำเนิน

เบอร์โทรศัพท์ 0837592921

E-mail address ryoma_06@hotmail.com

กิจกรรมระหว่างการศึกษา 海棠花