

## ระบบนำส่งยาเฉพาะที่สู่กระดูก: การควบคู่กับจี•แอล•เอ-3

ธีระศักดิ์ ดำรงรุ่งเรือง

ภาควิชาวินิจฉัยโรคช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

### Selective Drug Delivery System to Bone: 3GLA-conjugation

Teerasak Damrongrungruang

Department of Oral Diagnosis Faculty of Dentistry, Khon Kaen University

**หลักการและเหตุผล:** แนวคิดของระบบนำส่งยาแบบที่นำยาตรงไปยังอวัยวะที่เจาะจงโดยปราศจากผลข้างเคียงนั้นเป็นเรื่องที่จำเป็นในการรักษาโรคต่างๆ ผู้วิจัยได้พัฒนายาโดยนำตัวยาเริ่มต้นคือเอสตราไดโอดไปทำปฏิกิริยาแบบผูกติดกัน (conjugation) กับกรดแกมมาคาร์บอกซีกลูตามิก (จี•แอล•เอ) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนเฉพาะที่เป็นองค์ประกอบหลักของออสทีโอแคลซิน (osteocalcin) เพื่อให้เป็นระบบส่งยาไปยังกระดูก

**วัตถุประสงค์:** เพื่อศึกษาว่าโมเลกุลจี•แอล•เอทำปฏิกิริยาผูกติดกับเอสตราไดโอด สามารถใช้เป็นพาหนะนำยาไปยังเป้าหมายที่จำเพาะได้หรือไม่

**รูปแบบ:** เป็นการศึกษาเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการ (experimental study)

**สถานที่ทำการศึกษา:** มหาวิทยาลัยแพทย์และทันตแพทย์โตเกียว ประเทศญี่ปุ่น

**ผลการศึกษา:** การทดสอบการจับกับไฮดรอกซีอะพาไทต์แสดงให้เห็นว่า โมเลกุลนี้สามารถจับกับไฮดรอกซีอะพาไทต์ได้ และเมื่อนำจี•แอล•เอมาทำปฏิกิริยากับดานซิลคลอไรด์ซึ่งเป็นสารเรืองแสงที่สามารถติดตามกรดอะมิโน พบว่าโมเลกุลนี้กระจายไปยังกระดูกอย่างจำเพาะเจาะจงการศึกษาในสัตว์ทดลอง พบว่า เมื่อฉีดจี•แอล•เอ-3-เอสตราไดโอดเข้าใต้ผิวหนัง ของหนูที่ถูกตัดรังไข่ จะสังเกตการป้องกันการสูญเสีย กระดูก โดยไม่มีผลข้างเคียงที่เหมือนกับผลจากเอสโตรเจน เมื่อทดสอบการจับกับตัวรับเอสโตรเจนชนิดอัลฟา โมเลกุลจี•แอล•เอ-3เอง ไม่สามารถจับกับตัวรับเอสโตรเจนชนิดอัลฟาได้ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงความไม่ชอบน้ำของโมเลกุล แต่มันสามารถปล่อยให้เอสตราไดโอดเข้าไปในเซลล์

**Background:** The concept of drug delivery system is to deliver drug directly to certain organ without distributing to other tissues causing adverse effect. Based on this system, we developed a novel osteotropic prodrug of estradiol (E2) conjugated with gamma-caboxyglutamic acid (Gla), the main specific amino acid in osteocalcin for using as drug delivery system.

**Objectives:** To determine whether Gla-estradiol conjugation can serve as target-specific drug carrier.

**Study design:** Experimental study

**Setting:** Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

**Results:** Hydroxyapatite binding assay showed this molecule could bind to hydroxyapatite. After being conjugated with dansyl chloride, fluorescent for labeling amino acid, this molecule specifically distributed to bone. In vivo study, ovariectomized mice injected subcutaneously with Gla3-estradiol revealed that this compound could prevent bone loss without estrogen-like adverse effect. According to estrogen receptor  $\alpha$  binding assay, this molecule itself could not bind to estrogen receptor, resulting from changing its hydrophobicity but it could release and permit estradiol to enter the cell.

**Conclusion:** These findings indicate that Gla3-estradiol can be used as an osteotropic drug delivery agent. Its metabolism, however, is still to be thoroughly investigated. Thus, after optimal modification, we may use this molecule for efficient and effective treatment of bone disease in clinical situation in the near future.

**สรุป:** การค้นพบนี้บ่งชี้ว่า จี•แอล•เอ-3-เอสตราไดโอดอลสามารถใช้เป็นสารนำส่งยาสู่กระดูกได้ อย่างไรก็ตาม ยังคงต้องมีการศึกษาเมแทบอลิซึมของสารชนิดนี้ และเมื่อทำการดัดแปลงที่เหมาะสมเราอาจจะใช้โมเลกุลนี้เพื่อการรักษาโรคกระดูกที่มีประสิทธิผลและประสิทธิภาพในทางคลินิกได้ในอนาคตอันใกล้

**Keywords:** 17 $\alpha$ -estradiol, gamma-carboxyglutamic acid, MCF-7 cell, Osteotropic drug delivery system, ovariectomized mice

ศรีนครินทร์เวชสาร 2549; 21(3): 207-19 • Srinagarind Med J 2006; 21(3): 207-19

## บทนำ

เป็นที่ทราบกันดีว่าไม่ว่าจะเป็นในสภาวะปกติหรือพยาธิสภาพกระดูกสามารถปรับรูปแบบ (remodeling) ได้ ชีววิทยาของกระดูกเกี่ยวข้องกับการสลายกระดูกโดยเซลล์สลายกระดูก (osteoclast) และการสร้างกระดูกโดยเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast)<sup>1,2</sup> ความบกพร่องไม่ว่าจะเป็นจากกลไกการสร้างและ/หรือการทำลายกระดูกนำไปสู่การสูญเสียมวลกระดูกเช่นภาวะกระดูกพรุน (osteoporosis)<sup>1,3</sup> วิธีหนึ่งที่ยอมรับใช้กันมานานเพื่อย้อนกระบวนการของโรคให้กลับสู่สภาวะปกติ ได้แก่ การใช้มาตรการทางยา (pharmacological means) ชนิดของยาที่ใช้รักษาภาวะกระดูกพรุนมีหลายชนิด ยาตัวใหม่ๆ ได้ผลิตขึ้นมาเพื่อเพิ่มฤทธิ์ในการรักษาให้ดีขึ้นให้เหนือกว่ายาที่มีอยู่พร้อมๆ กับลดความเสี่ยง ได้แก่ ยาเอสโตรเจน<sup>4,5</sup> ยาออกฤทธิ์ต่อตัวรับเอสโตรเจนชนิดเจาะจง (selective estrogen-receptor modulators, SERM)<sup>6,7</sup> แคลซิโทนิน (calcitonin)<sup>8,9</sup> โซเดียมฟลูออไรด์ (sodium fluoride)<sup>10,11</sup> และบิสฟอสฟอเนต (bisphosphonate)<sup>12,13</sup> แม้จะมีหลายรายงานบรรยายถึงผลการเสริมสร้าง (anabolic effects)<sup>6-13</sup> ของยาแต่ละกลุ่ม แต่เอสโตรเจนยังเป็นโมเลกุลที่มีบทบาทสำคัญในการคงสภาวะการเสริมสร้างกระดูก และการบำบัดด้วยเอสโตรเจนยังเป็นวิธีที่มีผลในการลดกระดูกพรุนได้เป็นอย่างดี

อย่างไรก็ตาม ผลข้างเคียงต่อระบบต่างๆ ของร่างกายของยาทำให้ผู้ป่วยปฏิเสธการรักษาด้วยเอสโตรเจน<sup>14</sup> ดังนั้นการใช้ระบบนำส่งยา (drug delivery system, DDS) นำยาไปยังเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่จำเพาะมาใช้จึงมีประโยชน์ ทั้งในแง่ความสามารถในการทำให้ยาคงอยู่ในที่ที่ต้องการได้ในจำนวนมาก และการลดผลข้างเคียง<sup>15</sup> ระบบนำส่งยาสู่กระดูก (osteotropic drug delivery system, ODDS)<sup>16-18</sup> เป็นระบบนำส่งยาชนิดหนึ่งที่มีมุ่งนำยาไปรักษาถึงบริเวณกระดูกที่เป็นโรคอย่างจำเพาะ ที่ผ่านมามีการนำยาบิสฟอสฟอเนตซึ่งเป็นยาจับที่กระดูกได้ดีมาจับกับ 17บีตาเอสตราไดโอดอลเพื่อพัฒนาเป็นระบบนำส่งยาสู่กระดูก<sup>16-18</sup> มีรายงานในปีพ.ศ. 2538 โดย

Fujisaki และคณะ<sup>16</sup> เป็นกลุ่มแรกที่นำยาบิสฟอสฟอเนตซึ่งเป็นยาที่มีฤทธิ์ลดการทำลายกระดูกมารวมกับยาเอสตราไดโอดอล (estradiol) ซึ่งเป็นตัวยาที่มีฤทธิ์ของเอสโตรเจน เพื่อใช้เป็นยาในระบบนำส่งยาสู่กระดูก แม้ว่าสารประกอบดังกล่าวจะกระจายไปที่กระดูกอย่างค่อนข้างจำเพาะ<sup>16</sup> แต่ก็ยังมีผลข้างเคียงต่อร่างกายที่เกิดจากตัวยาบิสฟอสฟอเนตเอง ผลข้างเคียงที่สำคัญ ได้แก่ การระคายเคืองทางเดินอาหารส่วนต้น (upper gastrointestinal irritation)<sup>20</sup> การใช้สารโมเลกุลเล็กๆ เช่น เพปไทด์ที่มีอยู่ในกระดูก เช่น กรดแอสพาติกซึ่งเป็นองค์ประกอบที่พบได้บ่อยในโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนในกระดูกที่ชื่อว่า ออสทีโอพอนทินเพื่อเป็นตัวนำยาหรือใช้กรดแกมมาคาร์บอกซีกลูตามิกซึ่งเป็นองค์ประกอบของออสทีโอแคลซิน<sup>21-22</sup> น่าจะช่วยลดผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นได้ ทั้งออสทีโอพอนทินและออสทีโอแคลซินเป็นไกลโคโปรตีนที่พบมากอยู่ในกระดูกจึงไม่น่าจะก่อให้เกิดผลข้างเคียงแต่อย่างใด ในปีพ.ศ. 2543 Kasugai และคณะ<sup>19</sup> ได้พัฒนาระบบนำส่งยาสู่กระดูกตัวใหม่ โดยนำเพปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนแอสพาติก 6 โมเลกุลมาควบคู่กับ 17บีตาเอสตราไดโอดอลในรูปแบบเอ•เอส•ที-6-เอสตราไดโอดอล (Asp6-estradiol) แล้วฉีดเข้าไปในร่างกายสัตว์ทดลอง พบว่า มีฤทธิ์ในการต้านภาวะกระดูกพรุนโดยไม่พบผลข้างเคียงแต่อย่างใด ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยสันนิษฐานว่า กรดแกมมาคาร์บอกซีกลูตามิก หรือ จี•แอล•เอ3 โมเลกุลที่เรียงกันเป็นเพปไทด์ที่พบได้ในออสทีโอแคลซินซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนอีกตัวหนึ่งของกระดูกก็น่าจะสามารถนำ 17บีตาเอสตราไดโอดอลไปออกฤทธิ์เฉพาะที่กระดูกได้เช่นเดียวกันกับเอ•เอส•ที-6-เอสตราไดโอดอล

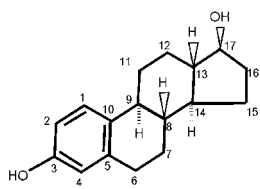
กรดแกมมาคาร์บอกซีกลูตามิก (รูปที่ 1) เป็นกรดอะมิโนที่มีบทบาทอยู่ในโปรตีนที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด ได้แก่ โพรทรอมบิน (prothrombin) แฟคเตอร์เจ็ดเก้าและสิบ (factor VII, IX and X) พลาสมาโปรตีน ได้แก่ โปรตีนซี เอสและแซท (protein C, S and Z) และออสทีโอแคลซิน

หรือที่เรียกว่า โบน จี•แอล•เอโปรตีน (bone Gla protein) จี•แอล•เอ โปรตีนเป็นองค์ประกอบสำคัญของโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนในแมทริกซ์ (noncollagenous matrix protein) ของกระดูกของสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง<sup>21-23</sup> โมเลกุลเหล่านี้ถูกสังเคราะห์ในไมโครโซมของตับ (hepatic microsomes) ด้วยกระบวนการเติมกลุ่มคาร์บอนไดออกไซด์ (carboxylation) ในสภาวะอาศัยวิตามินเค (vitamin K dependent)<sup>21</sup> โมเลกุลของจี•แอล•เอจับกับแคลเซียมไอออนและไฮดรอกซีอะพาไทต์ได้ด้วยพันธะที่แข็งแรง จนมีการกล่าวว่าเป็นโครงสร้างที่เสาะหากระดูก (bone-seeking structure)<sup>22</sup> ผู้วิจัยจึงสันนิษฐานว่า โมเลกุลจี•แอล•เอน่าจะสามารถนำยาเอสตราไดออลไปออกฤทธิ์เฉพาะที่กระดูกได้

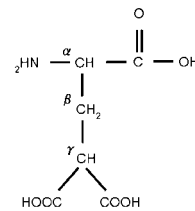
การศึกษานี้มีจุดมุ่งหมายที่จะพัฒนาระบบนำส่งยาสู่กระดูกโดยใช้กรดแกมมาคาร์บอกซีกลูตามิกเป็นตัวนำยาเอสตราไดออลซึ่งเป็นยาหลัก เพื่อหวังผลในการรักษาโรคกระดูกพรุนที่เฉพาะเจาะจงกับกระดูก โดยไม่มีผลข้างเคียงต่ออวัยวะอื่นๆ ในสัตว์ทดลอง

## วิธีดำเนินงานวิจัย

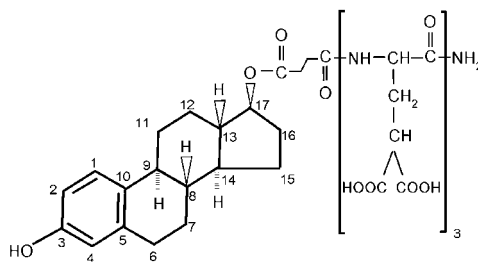
งานวิจัยนี้ศึกษาว่า จี•แอล•เอจะสามารถจับกับไฮดรอกซีอะพาไทต์ซึ่งเป็นสารอนินทรีย์หลักในกระดูกได้หรือไม่ โดยทำการทดลองในหลอดทดลอง หลังจากนั้นจึงนำสารนี้หนึ่งสองและสามโมเลกุลไปจับกับสารเรืองแสงแล้วฉีดเข้าไปในหนูทดลอง เพื่อทดสอบว่า จี•แอล•เอสามารถกระจายตัวไปยังอวัยวะใดบ้าง เมื่อทราบว่า เฉพาะจี•แอล•เอสามโมเลกุลสามารถกระจายไปสู่กระดูกได้ดีจึงทำการนำสารนี้สามโมเลกุลไปจับกับยาเอสตราไดออลซึ่งเป็นตัวยาหลักที่จะไปออกฤทธิ์ด้านการทำลายกระดูก โดยสังเคราะห์ตัวยาในรูปแบบจี•แอล•เอ-3-เอสตราไดออล (รูปที่ 1) หลังจากนั้น เพื่อที่จะทดสอบว่า ยาที่สังเคราะห์ใหม่จะออกฤทธิ์โดยผ่านตัวรับเอสโตรเจนชนิดอัลฟาซึ่งเป็นตัวรับที่สำคัญของเซลล์สร้างกระดูกได้หรือไม่ จึงทดสอบโดยใช้ชุดตรวจกรองตัวรับเอสโตรเจนแบบแย่งจับ (estrogen receptor  $\alpha$ -competitor screening) ในส่วนสุดท้ายทำการทดสอบผลของจี•แอล•เอ-3-เอสตราไดออลกับเซลล์ที่มีตัวรับเอสโตรเจนอัลฟาเพื่อยืนยันผล แล้วจึงนำสารดังกล่าวไปทดลองในหนูทดลองที่ถูกทำให้เกิดภาวะโรคกระดูกพรุนจำลอง เพื่อทดสอบว่า จี•แอล•เอ-3-เอสตราไดออลสามารถรักษาภาวะกระดูกพรุนโดยไม่มีผลข้างเคียงได้จริงหรือไม่



17  $\beta$  -estradiol



Gamma-carboxyglutamic acid (Gla)



(Gla)<sub>3</sub>-estradiol

รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ 17บีตาเอสตราไดออล กรดแกมมาคาร์บอกซีกลูตามิก หรือจี•แอล•เอ และจี•แอล•เอ-3-เอสตราไดออล

### การทดสอบความสามารถในการจับระหว่างจี•แอล•เอ โมเลกุลกับไฮดรอกซีอะพาไทต์

การทดสอบอิงขั้นตอนตามวิธีของ Kasugai และคณะ<sup>19</sup> พ.ศ.2543 โดยนำไฮดรอกซีอะพาไทต์ชนิดเม็ด (hydroxyapatite bead, Bio-Gel, Nippon Bio-Rad Laboratories, Yokohama, Japan) มาละลายในสารละลายที่ประกอบด้วย tris 50 มิลลิโมลาร์ ผสมกับโซเดียมคลอไรด์ 150 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 ให้ได้ความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารประกอบระหว่างจี•แอล•เอหนึ่งโมเลกุล สองและสาม โมเลกุลที่จับกับสารเรืองแสงดานซิล (Gla1-dansyl, Gla2-dansyl and Gla3-dansyl, Peptide Institute Inc, Osaka, Japan) มาละลายในสารละลาย Tris/NaCl ให้ได้ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรและแคลเซอินไดโซเดียม (calcein disodium, Fluka, Bucks, Switzerland) ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมให้ได้ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรเช่นกัน หลังจากนั้นเขย่าสารผสมทั้งหมดเบาๆ แล้วนำไปอบ (incubate) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในเครื่องอบที่สามารถปั่นด้วยความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 30 นาที แล้วนำสารละลายทั้งหมดมาปั่นเพื่อกำจัดไฮดรอกซีอะพาไทต์ ที่ไม่ได้จับกับสารใดๆ ออก และนำสารละลายส่วนที่ได้ (supernatant) ไปส่องตรวจให้ทั่ว (scan) ตรวจวัดไฮดรอกซีอะพาไทต์อิสระที่เหลืออยู่โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดของสารละลายแต่ละตัวด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) เนื่องจากมีเพียงจี•แอล•เอ 3 โมเลกุลเท่านั้น ที่สามารถจับกับไฮดรอกซีอะพาไทต์ได้เป็นอย่างดี ผู้วิจัยจึงติดต่อบริษัทเพปไทด์อินสทิทิวท์ จำกัด (Peptide Institutes Inc., Osaka, Japan) ให้รับผิดชอบการสังเคราะห์ รวมไปถึงการทดสอบ ความบริสุทธิ์จี•แอล•เอ-3-เอสตราไดออล (ข้อมูลไม่ได้แสดง)

### การทดสอบความสามารถในการจับกับตัวรับเอสโตรเจนชนิดอัลฟา

ชุดตรวจกรองตัวรับเอสโตรเจนอัลฟาแบบแย่งจับ (estrogen-R ( $\alpha$ ) competitor screening kit, Wako, Osaka, Japan) ถูกนำมาใช้เพื่อทดสอบความสามารถในการจับของสารจี•แอล•เอ-3-เอสตราไดออลกับตัวรับเอสโตรเจนชนิดอัลฟา (estrogen receptor  $\alpha$ ) โดยเปรียบเทียบระหว่างสารตัวอย่างสองชนิด ได้แก่ 17บีตาเอสตราไดออล (17  $\beta$ -estradiol) ความเข้มข้น 1600, 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78 และ 0.39 นาโนโมลาร์ และสารจี•แอล•เอ-3-เอสตราไดออล ความเข้มข้น 10000, 2000, 400, 80 และ 16 นาโนโมลาร์ เมื่อเตรียมสารทั้งหมดแล้วจึงนำสารแต่ละชนิดใส่ลงในภาชนะหลอดขนาด 96 หลุม ตามวิธีและปริมาณที่บริษัท

แนะนำสุดท้ายนำสารที่ได้ไปวัดความเข้มข้นของสารเรืองแสง (fluorescence intensity) ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลต (microplate reader, Spectrafluor, Tecan, Austria) ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (excitation wavelength) และความยาวคลื่นปลดปล่อย (emission wavelength) 485 นาโนเมตร และ 535 นาโนเมตร ตามลำดับ

### การทดสอบฤทธิ์เพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์เอ็มซีเอฟ-7

เพื่อทดสอบปฏิกิริยาระหว่างจี•แอล•เอ-3-เอสตราไดออลว่า สามารถออกฤทธิ์กับเซลล์ที่มีตัวรับเอสโตรเจนชนิดอัลฟาได้หรือไม่ ผู้วิจัยจึงใช้เซลล์เอ็มซีเอฟ-7 (MCF-7) ซึ่งเป็นเซลล์ที่พัฒนาจากมะเร็งเต้านมที่มีเฉพาะตัวรับเอสโตรเจนชนิดอัลฟา อยู่ในนิวเคลียส (JCRB cell bank, Japan) ในช่วงแรกเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 ถูกเลี้ยงในฟลasksเลี้ยงเซลล์ (cell culture flask) ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดเอ็มอีเอ็ม ( $\alpha$  MEM, minimum essential medium alpha, Invitrogen Corp., California, USA) เสริมด้วยซีรัมจากลูกวัว (FBS, fetal bovine serum) ร้อยละ 10 โดยปริมาตร เป็นเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำเซลล์ไปเลี้ยงในภาชนะขนาด 96 หลุมด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์เอ็มอีเอ็มที่ไม่มีฟีนอลเรด (pheno-red free) แต่เติมซีรัมจากลูกวัวชนิดพิเศษที่ผ่านการยับยั้งเอนไซม์ในซีรัมด้วยชาร์โคล-เดกแทรน (charcoal dextran treated FBS) ร้อยละ 10 โดยปริมาตร รายละเอียดตามวิธีการทำของ Darbre และคณะ<sup>24</sup> หลังจากเลี้ยงเซลล์ 24 ชั่วโมง เซลล์ถูกแบ่งเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 2 กลุ่มย่อยที่เหมือนกัน ได้แก่ กลุ่มควบคุม (เติมเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์) กลุ่มเอสตราไดออล (เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมกับ 17บีตาเอสตราไดออล) และกลุ่มจี•แอล•เอ-3 (เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมกับจี•แอล•เอ-3-เอสตราไดออล) ความเข้มข้นของสารในกลุ่มทดลองทั้งสามกลุ่มอยู่ในระหว่าง  $10^6$  ถึง  $10^{11}$  โมลาร์ หลังจากเลี้ยงเซลล์จนครบ 10 วัน จึงวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ที่มีด้วยการวัดสีวิธีเอ็มทีที (MTT colorimetric assay) การทดลองถูกทำซ้ำสามครั้ง

### การทดสอบในสัตว์ทดลอง

เพื่อที่ทดสอบว่า จี•แอล•เอ-3-เอสตราไดออลสามารถยับยั้งภาวะกระดูกพรุนโดยไม่มีผลข้างเคียงต่ออวัยวะอื่นๆ หนูเพศเมียพันธุ์ไอซีอาร์ (ICR mice, Sankyo Labo., Tokyo, Japan) อายุ 8 สัปดาห์ น้ำหนักเฉลี่ย  $27.39 \pm 0.87$  กรัม จำนวน 24 ตัวนำมาใช้ในการทดลองเพื่อหาว่า จี•แอล•เอ สามารถกระจายไปยังอวัยวะใดได้บ้างและมีการสังเกตพฤติกรรมของหนูเพื่อประเมินว่าหนูมีอาการแทรกซ้อนจากการใช้สารต่างๆ หรือไม่โดยใช้สารจี•แอล•เอ-1-ดานซิล, จี•แอล•เอ-2-ดานซิล

และจี•แอล•เอ-3-ดานซิล และหนูอายุ 12 สัปดาห์ น้ำหนักเฉลี่ย  $31.49 \pm 2.42$  กรัม จำนวน 48 ตัวถูกใช้ในการทดลองเพื่อหาว่า จี•แอล•เอ-3-เอสตราไดออลสามารถยับยั้งภาวะกระดูกพรุน โดยไม่มีผลข้างเคียงในอวัยวะอื่นๆ การทดลองในสัตว์ทดลองทั้งหมดได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมในสัตว์ทดลองมหาวิทยาลัย Tokyo Medical and Dental University การทดลองแบ่งตามชนิดของสารเป็นสองส่วนคือ

#### การทดสอบความจำเพาะเจาะจงต่อกระดูกของ จี•แอล•เอ โดยใช้สารจี•แอล•เอ-1, 2 และ 3 โมเลกุลที่จับกับดานซิล

สารต่างๆ ได้แก่ จี•แอล•เอ-1-ดานซิล, จี•แอล•เอ-2-ดานซิล และจี•แอล•เอ-3-ดานซิล สารทั้งสามถูกฉีดเข้าไปในหนูด้วยวิธีฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous administration) และการป้อน (oral administration) โดยใช้หนู 12 ตัวในแต่ละวิธี และสารแต่ละชนิดใช้หนู 4 ตัว หลังจากฉีดสาร 1, 4, 24 และ 72 ชั่วโมง เก็บเลือด, ปัสสาวะและอุจจาระของหนูมาเป็นตัวอย่างในการตรวจหาสารต่างๆ หลังจาก 72 ชั่วโมง ทำให้หนูเสียชีวิตด้วยการใช้คอลลีโอฟอร์มร่วมกับการบิดคอ (cervical dislocation) และนำชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างจากอวัยวะต่างๆ ได้แก่ กระโหลก กระดูกขากรรไกร กระดูกต้นขา (femoral bone) ตับ ไต กล้ามเนื้อหัวใจ สมอง ลำไส้ ผิวหนัง ม้าม ตับอ่อน และอวัยวะเพศของหนูแต่ละตัวมาส่องกราด (scan) ด้วยเครื่องส่องรังสียูวี (electronic UV transluminator)

#### การทดสอบความสามารถจี•แอล•เอ-3-เอสตราไดออล ในการต้านภาวะกระดูกพรุนในหนูที่ถูกทำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนในห้องทดลอง

ก่อนฉีดยา หนู 36 ตัวจาก 48 ตัวซึ่งเป็นหนูกลุ่มทดลองจะถูกตัดรังไข่ออก (ovariectomy) ส่วนหนูกลุ่มควบคุมถูกทำให้เสียชีวิตในวันที่ตัดรังไข่ออก เพื่อวัดพารามิเตอร์พื้นฐานต่างๆ ในกระดูก (baseline bone parameters) หนู 6 ตัวในแต่ละกลุ่มจะถูกฉีดสารใดสารหนึ่งต่อไปนี้ ยาหลอก (placebo, ซึ่งก็คือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (phosphate buffer saline)) 17บีตาเอสตราไดออลความเข้มข้น 0.28, 0.55 และ 1.1 ไมโครโมลต่อกิโลกรัมของน้ำหนักหนู (75, 150 และ 300 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ตามลำดับ หรือ จี•แอล•เอ-3-เอสตราไดออลความเข้มข้น 0.28, 0.55 และ 1.1 ไมโครโมลต่อกิโลกรัมของน้ำหนักหนูเช่นกัน (225, 450 และ 900 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) สารต่างๆ ถูกฉีดสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ยกเว้น 17บีตาเอสตราไดออลฉีด 2 ครั้งต่อสัปดาห์ หลังจาก 4 สัปดาห์ มดลูกและกระดูกต้นขาของหนูแต่ละตัวจะถูกแยกออกมาเพื่อตรวจด้วยภาพรังสีเอกซ์โดยใช้เครื่องซอฟเท็กซ์ (Softex, Sofron SPO-M50) แล้วนำไปวัดค่าความหนาแน่นของแร่ธาตุในกระดูก

(bone mineral density or BMD measurement) โดยใช้วิธีการดูดกลืนรังสีเอกซ์พลังงานคู่ (dual energy x-ray absorptiometry, DEXA)

#### การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ค่าความแตกต่างทางสถิติถูกวิเคราะห์ด้วย unpaired t test ยกเว้นการทดสอบกับเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 ใช้การวิเคราะห์ ANOVA โดยใช้โปรแกรมสแตตวิว (Statview 4.5) สำหรับวินโดวส์ โดยจะยอมรับว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อค่า p ที่ได้มีค่าน้อยกว่า 0.05

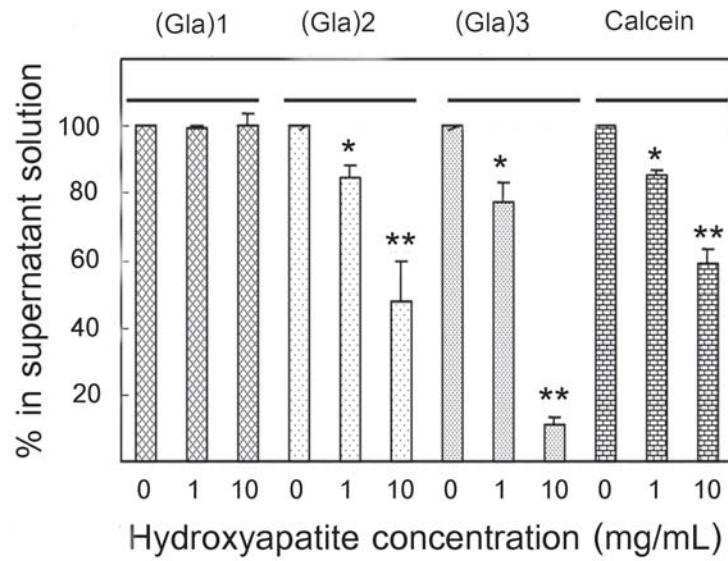
### ผลการวิจัย

#### การจับระหว่างจี•แอล•เอกับไฮดรอกซีอะพาไทต์

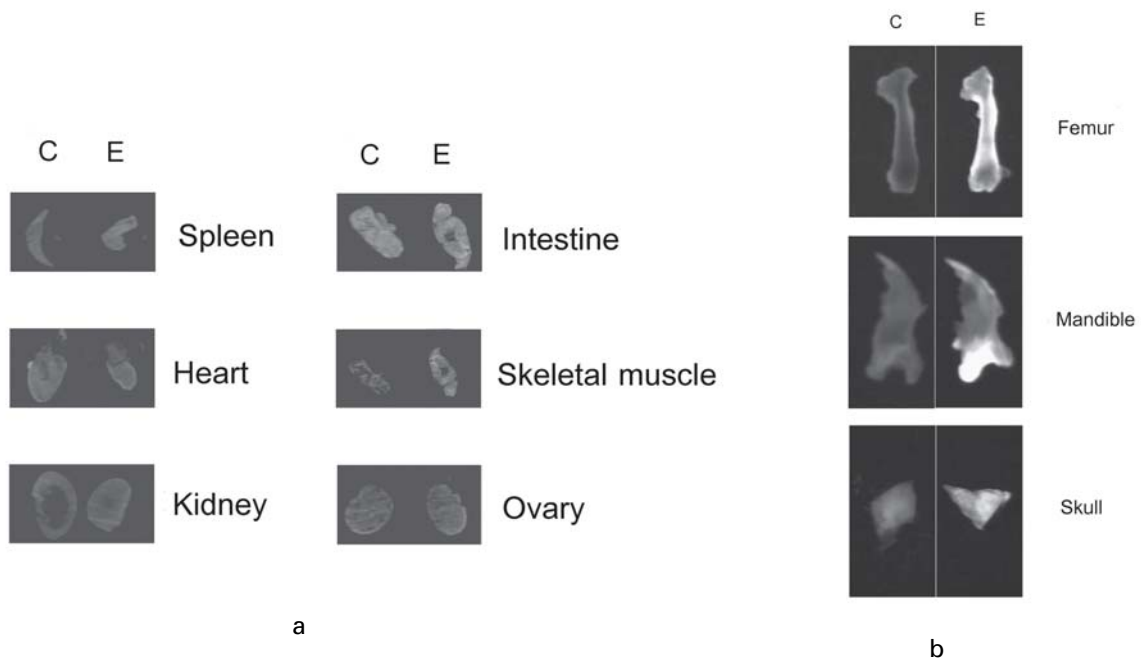
จากการทดสอบความสามารถของจี•แอล•เอในการจับกับไฮดรอกซีอะพาไทต์ตามวิธีของ Kasugai และคณะ<sup>19</sup> โดยใช้สารดานซิลคลอไรด์ซึ่งเป็นสารเรืองแสงที่ใช้ติดฉลากกรดอะมิโนและโปรตีนในการติดฉลากโมเลกุลจี•แอล•เอ แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลาย พบว่า จี•แอล•เอ-1-ดานซิลไม่สามารถจับกับไฮดรอกซีอะพาไทต์ได้เลย ตรงกันข้ามกับจี•แอล•เอ-2-ดานซิล และจี•แอล•เอ-3-ดานซิลสามารถจับกับไฮดรอกซีอะพาไทต์ได้โดยการจับขึ้นอยู่กับปริมาณของสาร ยิ่งสารมีความเข้มข้นสูงเท่าใดก็ยังสามารถจับกับไฮดรอกซีอะพาไทต์ได้ดียิ่งขึ้นเท่านั้น (รูปที่ 2) อย่างไรก็ตามจี•แอล•เอ-3-ดานซิลเป็นโมเลกุลที่จับการไฮดรอกซีอะพาไทต์เทียบเท่าหรือดีกว่าแคลเซอินซึ่งเป็นสารควบคุมบวก (positive control) เพราะเป็นที่ทราบกันดีว่าแคลเซอินเป็นสารเรืองแสงที่สามารถจับกับแคลเซียมในสารต่างๆ รวมทั้งไฮดรอกซีอะพาไทต์ได้ดี

#### ผลของจี•แอล•เอ-3-ดานซิลต่อกระดูก

แม้ว่าจี•แอล•เอ-2 จะสามารถจับกับไฮดรอกซีอะพาไทต์ได้แต่ไม่ดีเท่ากับจี•แอล•เอ-3 ผู้วิจัยจึงเลือกจี•แอล•เอ-3 เพื่อทำการทดสอบต่อ เพื่อประเมินว่า จี•แอล•เอ 3 โมเลกุลมีเป้าหมายไปยังกระดูกหรือไม่ ผู้วิจัยใช้จี•แอล•เอ-3-ดานซิลเป็นตัวบ่งชี้โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังของหนู หลังจากนั้น 72 ชั่วโมง นำอวัยวะต่างๆ มาตรวจสอบ หลังฉีดไม่พบว่า หนูมีอาการแทรกซ้อนจากการฉีดยาแต่อย่างใด เนื่องจากหนูทุกตัวมีพฤติกรรมต่างๆ เช่น การเดิน วิ่งหรือการขยับปลายปกติ หลัง 1, 4, 24 และ 72 ชั่วโมง เลือด ปัสสาวะและอุจจาระของหนูทุกตัว ถูกนำมาตรวจสอบ พบว่า มีสารเรืองแสงในปริมาณค่อนข้างสูงในปัสสาวะและอุจจาระของตัวอย่างที่เก็บ ณ เวลา 24 และ 72 ชั่วโมง (ข้อมูลไม่ได้แสดง) หลัง 72 ชั่วโมง อวัยวะต่างๆ ถูกนำมาตรวจสอบปริมาณสารเรืองแสงด้วยเครื่องตรวจสารเรืองแสง ตรวจไม่พบสารเรืองแสงในอวัยวะต่างๆ (รูปที่ 3a) ยกเว้นใน



**รูปที่ 2** การทดสอบการจับการไฮดรอกซีอะพาไทต์ของจีแอลเอ-3 จีแอลเอ-1-คานซิล ไม่สามารถจับกับไฮดรอกซีอะพาไทต์ ในขณะที่ จีแอลเอ-2 และ จีแอลเอ-3-คานซิลสามารถจับกับไฮดรอกซีอะพาไทต์ แคลเซอินใช้เป็นตัวควบคุมบวก ค่าที่แสดงคือ ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลองสามครั้ง \* ,  $p < .01$ . \*\* ,  $p < .001$  จากการทดสอบ unpaired t-test



**รูปที่ 3** การกระจายของจีแอลเอ-คานซิลในอวัยวะต่างๆ หลังจากฉีดสารเรืองแสงที่จับกับจีแอลเอทั้งสามชนิด 72 ชั่วโมง อวัยวะต่างๆ ถูกนำมาตรวจสอบภายใต้แสงยูวี a, ตัวอย่างจากส่วนที่ไม่ใช่เนื้อเยื่อโครงร่าง b, ตัวอย่างจากกระดูกต้นขา (C = กลุ่มควบคุม E = กลุ่มทดลอง)

กระดูกซึ่งสามารถพบสารเรืองแสงได้ในปริมาณสูง (รูปที่ 3b) ผลจากการทดลองสรุปได้ว่า จี•แอล•เอ 3 โมเลกุลสามารถนำสารไปสู่กระดูกโดยมีความจำเพาะสูง ในขณะที่จี•แอล•เอ-2 หรือ 1 โมเลกุลแทบจะไม่พบการเรืองแสงแต่อย่างใด (ข้อมูลไม่ได้แสดง) อย่างไรก็ตาม ในกรณีให้ยาทางปากแก่หนูไม่สามารถพบการเรืองแสงในอวัยวะใดๆ รวมทั้งกระดูก (ข้อมูลไม่ได้แสดง)

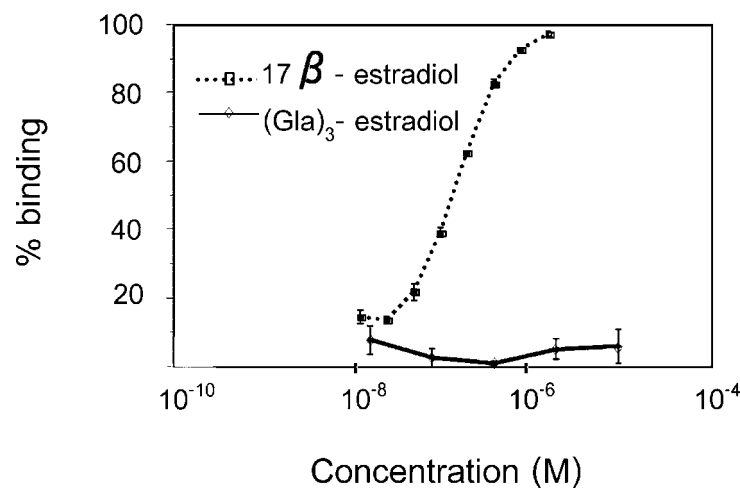
#### การสังเคราะห์สารจี•แอล•เอ-3-เอสทราไดออล

ผู้วิจัยสันนิษฐานว่า การสังเคราะห์จี•แอล•เอ-3-เอสทราไดออล น่าจะเป็นทางนำยาเอสทราไดออลไปออกฤทธิ์อย่างจำเพาะต่อกระดูก จึงสังเคราะห์จี•แอล•เอ-3-เอสทราไดออลขึ้น สูตรโครงสร้างทางเคมีของจี•แอล•เอ-3-เอสทราไดออล

แสดงไว้ในรูปที่ 1 สารที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 845 ดาลตัน ลักษณะทางกายภาพเป็นผงมีสีขาว คล้ายฟองน้ำ ละลายน้ำได้ดี

#### การทดสอบการจับการตัวรับเอสโตรเจนชนิดอัลฟา

ผู้วิจัยใช้ชุดตรวจกรองตัวรับเอสโตรเจนอัลฟาแบบแย่งจับเป็นเครื่องมือในการตรวจสอบความสามารถของจี•แอล•เอ-3-เอสทราไดออล ในการจับกับตัวรับเอสโตรเจนชนิดอัลฟา รูปที่ 4 เป็นการเปรียบเทียบความสามารถในการจับกับตัวรับเอสโตรเจนชนิดอัลฟา ระหว่างสาร จี•แอล•เอ-3-เอสทราไดออลกับ 17บีตาเอสทราไดออล (ตัวควบคุมบวก) พบว่าจี•แอล•เอ-3-เอสทราไดออล ไม่สามารถจับกับตัวรับเอสโตรเจนในหลอดทดลองได้ แม้จะภาวะที่มีความเข้มข้นสูงก็ตาม



**รูปที่ 4** การทดสอบการจับกับตัวรับเอสโตรเจนชนิดอัลฟา จากการใช้ชุดตรวจกรองเอสโตรเจนอัลฟาแบบแย่งจับ โดยใช้เอสโตรเจนความเข้มข้นตั้งแต่ 0.39-1600 นาโนโมลาร์และจี•แอล•เอ-3-เอสทราไดออลความเข้มข้นตั้งแต่ 16-10000 นาโนโมลาร์ พบว่าจี•แอล•เอ-3-เอสทราไดออลไม่สามารถจับกับตัวรับเอสโตรเจนชนิดอัลฟาได้เลย

#### ผลของจี•แอล•เอ-3-เอสทราไดออลต่อเซลล์เอ็มซีเอฟ-7

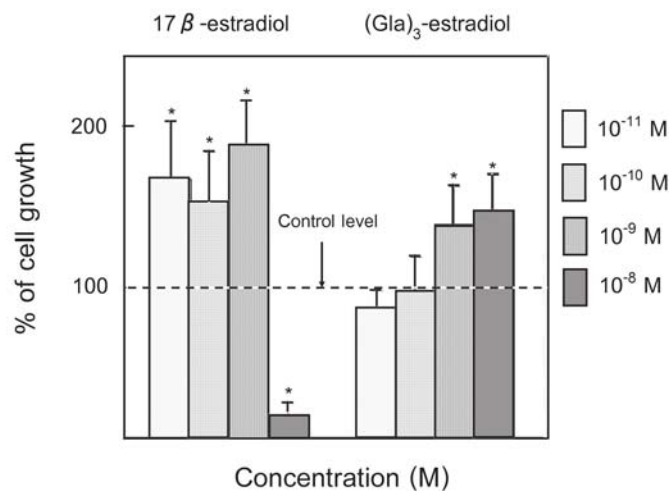
ผลจากการทดลองในรูปที่ 4 ทำให้ผู้วิจัยพยายามค้นหากลไกในการออกฤทธิ์ของสารจี•แอล•เอ-3-เอสทราไดออลในระดับเซลล์ เอ็มซีเอฟ-7 เป็นเซลล์ที่มีตัวรับเอสโตรเจนชนิดอัลฟาอยู่ในนิวเคลียส เซลล์ชนิดนี้พัฒนามาจากมะเร็งเต้านมมนุษย์ และเป็นต้นแบบในการศึกษาความไวของฮอร์โมนที่

เพราะนอกจากจะมีตัวรับเอสโตรเจนแล้วยังตอบสนองต่อเอสโตรเจนด้วยการเปลี่ยนแปลงทั้งการเพิ่มจำนวนและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์<sup>25-27</sup> หลังจากเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่ไม่มีเอสโตรเจนระยะหนึ่งแล้วจึงแบ่งเซลล์ออกเป็น 3 กลุ่มเพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์ในสามภาวะคือ ภาวะที่ไม่มีเอสโตรเจน ภาวะที่มี 17บีตาเอสทราไดออล 10<sup>-8</sup>-10<sup>-11</sup> โมลาร์ และภาวะที่มีจี•แอล•เอ-3-เอสทราไดออล 10<sup>-8</sup>-10<sup>-11</sup> โมลาร์ การวัดสีด้วยวิธีเอ็มทีทีซึ่งเป็นการวัดปริมาณเซลล์ที่มี

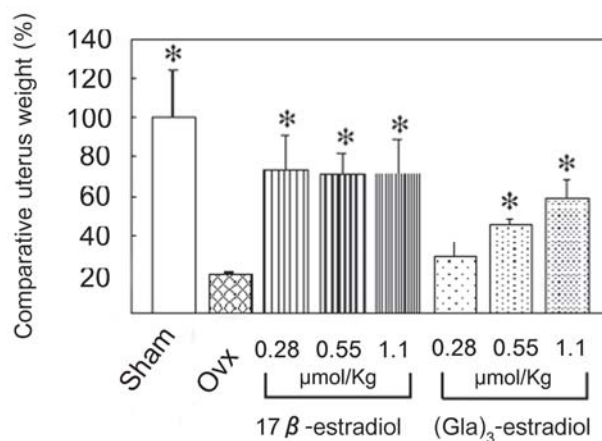
ชีวิต<sup>28</sup> ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า 17บีตาเอสตราไดโอดอลช่วยกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ชนิดนี้โดยเฉพาะในความเข้มข้นระหว่าง 10-9-10-11 โมลาร์ (รูปที่ 5) (p < .01) ซึ่งผลนี้สอดคล้องกับการรายงานโดย Soto และคณะ<sup>29</sup> และ Darbre และคณะ<sup>24</sup> อย่างไรก็ตามในกรณีของจี•แอล•เอ-3-เอสโตรเจนจะสามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 ในความเข้มข้นสูงๆ เช่น 10<sup>-8</sup>-10<sup>-9</sup> โมลาร์เท่านั้น (รูปที่ 5)

**ผลของจี•แอล•เอ-3-เอสโตรเจนในสัตว์ทดลอง**

เพื่อที่จะศึกษาผลของจี•แอล•เอ-3-เอสตราไดโอดอลในสิ่งมีชีวิต ผู้วิจัยจำลองภาวะกระดูกพรุนโดยการตัดรังไข่ออกแล้วจึงฉีดจี•แอล•เอ-3-เอสตราไดโอดอลเข้าไปในหนูทดลอง ซึ่งการทดลองไม่มีหนูตัวใดที่เกิดอาการข้างเคียงจากฤทธิ์ของยาที่ให้ น้ำหนักของหนูมีการเปลี่ยนแปลงบ้าง แต่เป็นความ



**รูปที่ 5** การทดสอบความเป็นพิษในเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 หลังจากเลี้ยงเซลล์ด้วยสารหนึ่งในสองชนิดคือ 17บีตาเอสตราไดโอดอลหรือจี•แอล•เอ-3-เอสตราไดโอดอลความเข้มข้น 10-11-10-8 โมลาร์เป็นเวลา 10 วันจึงนำเซลล์มาทดสอบด้วยวิธีเอ็มทีทีเพื่อคำนวณหาจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้น \* , p < .01 โดยใช้การวิเคราะห์ one way ANOVA



**รูปที่ 6** การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักมดลูกหลังจากได้รับสารต่างๆ หลังจาก 4 สัปดาห์ของการฉีดสารแต่ละชนิดมดลูกของสัตว์แต่ละตัวถูกนำมาชั่งน้ำหนัก (sham = สัตว์ที่ได้รับการผ่าตัดดลอก ovx = สัตว์ที่ได้รับการผ่าตัดเอามดลูกออก) ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน \* , p < .01 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับการผ่าตัดเอามดลูกออกโดยการทดสอบแบบ unpaired t-test



แตกต่างที่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ข้อมูลไม่ได้แสดง) หลังฉีดยา สีสึปดาห์ มดลูกและกระดูกต้นขาทั้งสองข้างถูกนำออกมา เพื่อตรวจสอบ น้ำหนักของมดลูกจากสัตว์ทดลองที่ได้รับ จี•แอล•เอ-3-เอสตราไดออล ในปริมาณ 0.55 และ 1.1 ไมโครโมลต่อกิโลกรัม (450 และ 900 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) แต่ไม่ใช่ขนาด 0.28 ไมโครโมลต่อกิโลกรัม (225 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ของน้ำหนักตัวของสัตว์ทดลอง มีน้ำหนักของมดลูกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ค่าเฉลี่ย (mean ± SD) เท่ากับ 0.115 ± 0.007 และ 0.147 ± 0.02 กรัมตามลำดับ (p < .01) (รูปที่ 6)

ในส่วนของการตรวจ ผู้วิจัยถ่ายภาพรังสีเพื่อศึกษารูปร่างของกระดูกโดยใช้รังสีเอกซ์ชนิดอ่อน (soft x-ray) ดังแสดงในรูปที่ 7a แล้วจึงทำการวัดค่าความหนาแน่นของแร่ธาตุโดยรวมในกระดูกต้นขา (total femoral BMD) ดังแสดงในรูปที่ 7b ด้วยวิธีการดูคลื่นรังสีเอกซ์พลังงานคู่ จากภาพรังสี พบว่า ความหนาแน่นของแร่ธาตุในกระดูกโดยรวมค่อยๆ เพิ่มขึ้น เมื่อปริมาณ จี•แอล•เอ-3-เอสตราไดออลมีค่ามากขึ้น โดยหนูที่ได้รับจี•แอล•เอ-3-เอสตราไดออลปริมาณ 0.28, 0.55 และ 1.1 ไมโครโมลต่อกิโลกรัม มีค่าความหนาแน่นของแร่ธาตุในกระดูก โดยรวมเพิ่มขึ้นร้อยละ 6.5, 6.3 และ 10.5 ตามลำดับ

## วิจารณ์

แนวคิดการใช้ระบบนำส่งยาไปสู่อวัยวะเป้าหมายที่จำเพาะ เป็นยุทธวิธีที่สามารถลดผลข้างเคียงที่อาจจะเกิดขึ้นในอวัยวะสำคัญอื่นๆ สำหรับกระดูกนั้น เป็นที่ทราบกันดีว่าภาวะกระดูกพรุนเป็นภาวะที่พบได้ในผู้ป่วยสูงอายุ โดยเฉพาะผู้ป่วยหญิงวัยหมดประจำเดือน แม้จะมีการพัฒนายาต่างๆ เพื่อบำบัดโรคกระดูกพรุน<sup>6-13</sup> แต่เอสโตรเจนโดยเฉพาะ 17บีตาเอสตราไดออล เป็นยาที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นหนึ่งในตัวยาที่มีประสิทธิภาพในการต้านภาวะกระดูกพรุน อย่างไรก็ตาม การปรากฏผลข้างเคียงที่พบได้ในอวัยวะอื่นๆ โดยเฉพาะ ผังชั้นในของมดลูกอักเสบ (endometritis) และมะเร็งเต้านม (breast cancer)<sup>30,31</sup> ทำให้ผู้ป่วยไม่ยอมรับการรักษาด้วยเอสโตรเจน

ผลจากการทดสอบความสามารถในการจับระหว่างไฮดรอกซีเอสตราไดออลกับโมเลกุลจี•แอล•เอ สอดคล้องกับผลของ Price และคณะ<sup>23</sup> และ Hauschka และคณะ<sup>32</sup> ซึ่งรายงานว่ามีโมเลกุลจี•แอล•เอสามารถจับกับแคลเซียมในไฮดรอกซีเอสตราไดออลได้อย่างแน่นอน การจับกับไฮดรอกซีเอสตราไดออลยับยั้งไม่ให้บรูไซต์ (brushite) ซึ่งเป็นผลึกแคลเซียมฟอสเฟตรูปหนึ่งเปลี่ยนแปลงมาเป็นไฮดรอกซีเอสตราไดออล ทำให้จี•แอล•เอเป็นโมเลกุลที่มีบทบาทในการควบคุมการสะสมของแร่ธาตุ<sup>33</sup> และกระบวนการปรับรูปแบบของกระดูก<sup>34</sup> ในการทดลองนี้ใช้ดานซิลซึ่งเป็นสารเรืองแสงที่ไม่สามารถทำปฏิกิริยาจับกับไฮดรอกซีเอสตราไดออลได้ เป็นตัวบ่งชี้ว่า จี•แอล•เอกระจายไปอยู่ในอวัยวะ

โตบ้าง พบว่า จี•แอล•เอนำดานซิลไปเฉพาะที่กระดูกเท่านั้น โดยไม่กระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ เลย การใช้ไฮดรอกซีเอสตราไดออลเป็นเป้าหมายของยารักษาโรคกระดูกเป็นแนวคิดที่เหมาะสม เนื่องจากไฮดรอกซีเอสตราไดออลเป็นองค์ประกอบสำคัญในเนื้อเยื่อแข็งในร่างกายโดยเฉพาะกระดูก อย่างไรก็ตาม แม้ว่า ฟันจะมีไฮดรอกซีเอสตราไดออลเป็นองค์ประกอบแต่ก็น้อยกว่าในกระดูกมาก รวมทั้งเส้นเลือดที่เลี้ยงฟันมีน้อยกว่าเส้นเลือดที่เลี้ยงกระดูก การฉีดยาจี•แอล•เอ-3-เอสตราไดออลน่าจะทำให้ยาเอสตราไดออลไปที่ฟันได้น้อย ดังนั้นโอกาสที่โมเลกุลจี•แอล•เอ-3-เอสตราไดออลจะเหนี่ยวนำให้เกิดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์จึงมีน้อย

ในการทดลองนี้ การให้ยาทางปากไม่ทำให้เกิดผลใดๆ เลย (ข้อมูลไม่ได้แสดง) ตรงข้ามกับการฉีดยาทางใต้ผิวหนัง ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า จี•แอล•เอ-3 เป็นโมเลกุลที่ไม่สามารถจะดูดซึมในทางเดินอาหารได้ เพราะพบจี•แอล•เอ เป็นจำนวนมากในอุจจาระเมื่อให้ยาทางปากแก่สัตว์ทดลอง นอกจากนั้น ทฤษฎีที่อธิบายปรากฏการณ์นี้ได้อีกทฤษฎีหนึ่งก็คือจี•แอล•เอ เป็นโมเลกุลที่ค่อนข้างเสถียรในภาวะปกติหรือภาวะที่มีปฏิกิริยาการสลายตัวในสภาพที่โปรตีนเป็นเบส (alkaline protein hydrolysis) แต่จี•แอล•เอสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นกรดกลูตามิกได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอนุมูลอิสระและมีความเป็นกรดจากกรดไฮโดรคลอริกสูงๆ เป็นระยะเวลาสั้นๆ นอกจากนั้นดังรูปที่ 1 จี•แอล•เอจับกับเอสโตรเจนด้วยพันธะโคเวเลนต์ซึ่งเป็นพันธะที่แข็งแรง จึงทำให้จี•แอล•เอ-3-เอสตราไดออล ถูกขับถ่ายออกมาโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปในอุจจาระ ในทางตรงกันข้าม การที่เอสตราไดออลสามารถเข้าเซลล์ไปทำให้เกิดผลต่างๆ ได้แสดงว่า สภาวะนอกเซลล์ต้องมีเอนไซม์เฉพาะที่สามารถทำลายพันธะระหว่างจี•แอล•เอและเอสตราไดออลได้ เช่น เอนไซม์จากชีรุม เป็นต้น ในการทดลองที่ใช้ 17บีตาเอสตราไดออลและจี•แอล•เอ-3-เอสตราไดออลความเข้มข้นที่เท่ากันแต่ 17บีตาเอสตราไดออลสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 ได้ดีกว่านั้นก็น่าจะมาจากสาเหตุเดียวกันคือ การที่เอสตราไดออลจับกับจี•แอล•เอโมเลกุล ทำให้เอสตราไดออลไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาในเซลล์ได้ เอสตราไดออลที่ถูกแยกพันธะออกจากโมเลกุลจี•แอล•เอเท่านั้นที่จะไปออกฤทธิ์ในเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 ได้ แต่สำหรับ 17บีตาเอสตราไดออลซึ่งเป็นเอสโตรเจนอิสระ จึงพร้อมเข้าไปในเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 เพื่อออกฤทธิ์ได้

กลไกการออกฤทธิ์ของจี•แอล•เอ-3-เอสตราไดออลยังคงเป็นประเด็นที่ไม่สามารถอธิบายได้ ในการทดลองนี้ พบว่า จี•แอล•เอ-3-เอสตราไดออลไม่สามารถจะจับกับตัวรับเอสโตรเจนชนิดอัลฟา อาจเป็นเพราะการจัดเรียงตัวของโมเลกุลไม่เอื้อให้เอสตราไดออลเข้าไปจับกับตัวรับ ตัวรับเอสโตรเจน

ชนิดอัลฟาเป็นตัวรับชนิดแรกที่ถูกค้นพบและพบตัวรับชนิดนี้ได้ในกระดูกโดยอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) และเซลล์สร้างกระดูกอ่อน (chondrocyte) แต่ไม่พบตัวรับชนิดนี้ในเซลล์สลายกระดูก (osteoclast)<sup>35</sup> อย่างไรก็ตาม ยังเป็นที่ถกเถียงกัน เนื่องจาก Huang และคณะ<sup>36</sup> ได้รายงาน ว่าพบเมเซนเจอร์อาร์เอ็นเอของตัวรับชนิดนี้ในเซลล์ต้นตอของเซลล์สลายกระดูก Peach และคณะ<sup>37</sup> ได้รายงาน ว่า 17 ปีต่อมา เอสทราไดโอดกระตุ้นการทรานสคริปของตัวรับเอสโตรเจนชนิดอัลฟา ในขณะที่ยับยั้งการทรานสคริปของตัวรับเอสโตรเจนชนิดบีตา เป็นที่น่าสังเกตว่า เมื่อให้จี•แอล•เอ-3-เอสทราไดโอดแก่เซลล์เอ็มซีเอฟ-7 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีตัวรับเอสโตรเจนชนิดอัลฟา จี•แอล•เอ-3-เอสทราไดโอดสามารถทำให้เซลล์ชนิดนี้เกิดการเพิ่มจำนวน แสดงว่าเอสทราไดโอดสามารถเข้าไปในเซลล์ได้ เพราะเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 เป็นเซลล์ที่เจริญเติบโตโดยอาศัยเอสโตรเจน (estrogen-dependent)<sup>29</sup> ซึ่งเข้าไปจับกับตัวรับเอสโตรเจนในนิวเคลียส โมเลกุลจี•แอล•เอเอง ไม่สามารถจับกับตัวรับเอสโตรเจน (ดังรูปที่ 4) ดังนั้นเฉพาะโมเลกุลจี•แอล•เอ จึงน่าจะไม่สามารถทำให้เซลล์ชนิดนี้เพิ่มจำนวนได้ อย่างไรก็ดี มีรายงานว่า ออกสทิโอแคลซินซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีจี•แอล•เอ 3 โมเลกุล มีฤทธิ์ช่วยในการยึด (adhesion) การเคลื่อนที่ (migration) การดึงดูดด้วยสารเคมี (chemotaxis) และการหลั่งสารที่เกี่ยวข้องกับการละลายกระดูกของเซลล์สลายกระดูก<sup>38</sup> ดังนั้น จี•แอล•เอ-3 น่าจะมีผลในทางด้านการละลายของกระดูกไม่ใช่การเพิ่มจำนวนเซลล์เอ็มซีเอฟ แต่อย่างไรก็ตาม มีผู้วิจัยสันนิษฐานว่า ความแตกต่างของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่าง 17 ปีต่อมาเอสทราไดโอดกับเซลล์เปรียบเทียบกับจี•แอล•เอ-3-เอสทราไดโอดกับเซลล์ที่เกิดขึ้นอาจเกี่ยวข้องกับความต่างศักย์ไฟฟ้าเคมี (electrochemical potential) เนื่องจากจี•แอล•เอ-3-เอสทราไดโอดเป็นโมเลกุลที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และจี•แอล•เอเองมีประจุเป็นลบ ในขณะที่เดียวกัน เยื่อหุ้มเซลล์ก็มีประจุเป็นลบด้วย ดังนั้น จี•แอล•เอและโมเลกุลที่จับกับจี•แอล•เอจึงน่าจะไม่สามารถเข้าเซลล์ได้ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Shah และคณะ<sup>39</sup> ที่กล่าวว่า จี•แอล•เอ ในรูปอิสระและจี•แอล•เอที่จับกับโมเลกุลอื่นๆ จะถูกขับออกจากร่างกายโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบ นอกจากนี้ จี•แอล•เอยังสามารถจับกับไฮดรอกซีอะพาไทต์ได้ดี ถ้าไม่มีเอนไซม์มาย่อยพันธะระหว่างจี•แอล•เอกับเอสทราไดโอด เอสทราไดโอด ก็ไม่สามารถจะเข้าเซลล์ไปออกฤทธิ์ได้ ถึงแม้ กระนั้น เหตุใดจี•แอล•เอ-3-เอสทราไดโอดความเข้มข้นสูงๆ จึงทำให้เซลล์เอ็มซีเอฟ-7 เพิ่มจำนวนเซลล์ได้ สามารถอธิบายได้ดังนี้ กรณีมีจี•แอล•เอ-3-เอสทราไดโอด จำนวนน้อยๆ โอกาสที่เอนไซม์ต่างๆ จะมาทำลายพันธะ เพื่อปล่อยให้เอสทราไดโอด อิสระเข้าไปในเซลล์มีโอกาสน้อย แต่กรณีมีความ

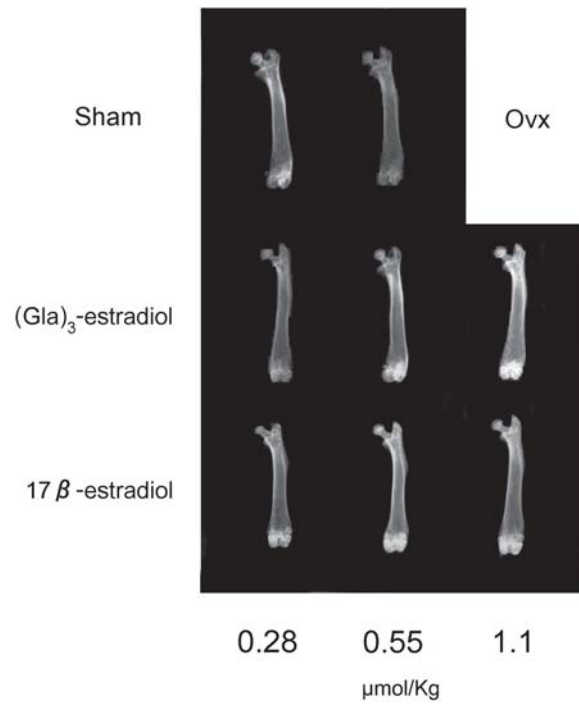
เข้มข้นของจี•แอล•เอ-3-เอสทราไดโอดสูง มีโอกาสที่เอนไซม์ จากซีรั่มที่ใส่เข้าไปพร้อมอาหารเลี้ยงเซลล์จะสามารถเข้าไปทำลายพันธะ ทำให้เกิดเอสทราไดโอดอิสระเข้าเซลล์ไปจับกับตัวรับเอสโตรเจนในเซลล์ ส่งผลช่วยเพิ่มจำนวนเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 ได้นั่นเอง ในการทดลองนี้ไม่ได้มีกลุ่มที่มีเฉพาะจี•แอล•เอ-3 เนื่องจากเซลล์เอ็มซีเอฟ-7 เป็นเซลล์ที่เจริญเติบโตโดยอาศัยเอสโตรเจน<sup>29</sup> ดังนั้นในการเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้ในภาวะที่ไม่มีเอสโตรเจนอาจทำให้เซลล์ไม่เจริญเติบโตได้ ยิ่งไปกว่านั้น มีรายงานโดย Shah และคณะ<sup>39</sup> ว่า จี•แอล•เอ โมเลกุลทั้งในรูปอิสระและในรูปที่จับกับเพปไทด์ที่ให้เข้าไปในระบบสิ่งมีชีวิตจะถูกขับถ่ายออกทางไตโดยไม่เปลี่ยนแปลงรูป และไม่มีการสะสมของโมเลกุลนี้ที่ตับหรือสมองแต่อย่างใด ดังนั้น จึงดูเหมือนว่าโมเลกุลจี•แอล•เอเอง ไม่น่าจะมีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์เอ็มซีเอฟ-7

เมื่อเปรียบเทียบผลต่างๆ ระหว่างจี•แอล•เอ-3-เอสทราไดโอดกับ (เอ•เอส•พี)6-เอสทราไดโอด ข้อมูลจากการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับผลของ6-เอสทราไดโอดซึ่งรายงานโดย Kasugai และคณะ<sup>19</sup> ในปี พ.ศ. 2543 และ Yokogawa และคณะ<sup>40</sup> ในปี พ.ศ. 2544 โดยทั้งสองสามารถลดความหนาแน่นของแร่ธาตุในกระดูกหลังจากสัตว์ทดลองถูกตัดรังไข่ได้ ในขณะที่ไม่มีผลข้างเคียงในอวัยวะอื่นๆ เช่น การขยายตัวของมดลูก

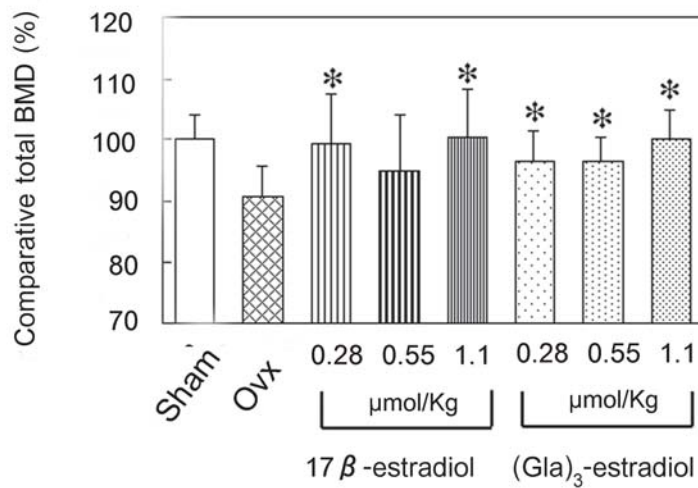
จากรูปที่ 7a พบว่า จี•แอล•เอ-3-เอสทราไดโอดในปริมาณสูงๆ (900 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวสัตว์ทดลอง) ทำให้เกิดความหนาแน่นของกระดูกมากเกินปกติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงถึงความไม่เหมาะสมเพื่อนำสารนี้ในปริมาณสูงไปใช้ในการรักษา กลไกในระดับอณูชีววิทยาของการออกฤทธิ์ของจี•แอล•เอ-3-เอสทราไดโอด ยังต้องมีการศึกษาค้นคว้ากันต่อไป โดยเฉพาะในแง่ของปริมาณสารที่พอเหมาะที่สามารถยับยั้งการละลายตัวของกระดูกในผู้ป่วยภาวะกระดูกพรุน ซึ่งเกิดจากการขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน รวมไปถึงเภสัชจลนศาสตร์ของสารนี้ นอกจากนั้น การพัฒนายาในรูปที่ให้ทางปากได้ จะทำให้ผู้ป่วยยอมรับการรักษาได้มากกว่าการฉีดยา

## สรุป

จากการศึกษานี้ชี้ให้เห็นความเป็นไปได้ที่จะนำเพปไทด์ที่ประกอบไปด้วย จี•แอล•เอ 3 โมเลกุลมาเป็นตัวพาในระบบส่งยาสู่กระดูก เนื่องจากจี•แอล•เอ-3 สามารถจับกับไฮดรอกซีอะพาไทต์และสามารถปลดปล่อยให้เฉพาะเอสทราไดโอดเข้าไปในเซลล์ที่มีตัวรับเอสโตรเจนชนิดอัลฟา รวมถึงสามารถต้านภาวะกระดูกพรุนในสัตว์ทดลองโดยไม่ผลข้างเคียงต่ออวัยวะอื่นๆ ในอนาคตอันใกล้ หลังจากการปรับจนได้รูปแบบ



รูปที่ 7a ภาพรังสีชนิดอ่อนของกระดูกต้นขาเปรียบเทียบระหว่างสารแต่ละชนิดหลังสัตว์ได้รับสารแต่ละชนิดเป็นเวลา 4 สัปดาห์



รูปที่ 7b ค่าความหนาแน่นของแร่ธาตุโดยรวมของกระดูกต้นขาของสัตว์ในแต่ละกลุ่มตามรูปที่ 7b \*,  $p < .05$  โดยการทดสอบแบบ unpaired t-test

ที่เหมาะสมเราน่าจะสามารถนำระบบนี้มาใช้ในการรักษาโรคกระดูกและฟันในทางคลินิกโดยปราศจากผลข้างเคียงทางระบบที่ไม่ต้องการ

### กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ Professor Shohei Kasugai, Assistant professor Kazuhiro Aoki และ Yoshihiro Waki ที่กรุณาให้คำแนะนำเกี่ยวกับเทคนิค วิธีการทดลอง และ รศ. ทพญ. ดร. สุวิมล ทวีชัยศุภพงษ์ ภาควิชาวิวินิจฉัยโรคช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่กรุณาให้คำปรึกษาถึงแนวคิดต่างๆ ที่มีประโยชน์ในงานวิจัยในครั้งนี้

### เอกสารอ้างอิง

- Rodan GA. Introduction to Bone Biology. Bone 1992;13:S3-6.
- Meghji S. Bone Remodeling. Br Dent J 1992;172:235-42.
- Mundy GR. Pathogenesis of Osteoporosis and challenges for drug delivery. Adv Drug Deliv Rev 2000;42:165-73.
- Anonymous. Effects of hormone therapy on bone mineral density: results from the postmenopausal estrogen/progestin interventions (PEPI) trial. The writing group for the PEPI. JAMA 1996;276:1389-96.
- Lindsay R, Tohme JF. Estrogen treatment of patients with established postmenopausal osteoporosis. Obstet Gynecol 1990;76:290-5.
- Anonymous. Raloxifene for postmenopausal osteoporosis. Med Lett Drugs Ther 1998;40:29-30.
- Delmas PD, Bjarnason NH, Mitlak BH, Ravoux AC, Shah AS, Huster WJ, et al. Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. New Eng J Med 1997;337:1641-7.
- Overgaard K, Riis BJ, Christiansen C, Podenphant J, Johansen JS. Nasal calcitonin for treatment of established osteoporosis. Clin Endocrinol 1989;30: 435-42.
- Overgaard K, Riis BJ, Christiansen C, Hansen MA. Effect of salcatonin given intranasally on early postmenopausal bone loss. BMJ 1989;299:477-79.
- Pak CY, Sakhae K, Adams-Huet B, Pizlak V, Peterson RD, Poindexter JR. Treatment of postmenopausal osteoporosis with a slow-release sodium fluoride. Final report of a randomized controlled trial. Ann Intern Med 1995;123:401-8.
- Farrerons J, Serna RDL, Guanabens N, Armadans L, Lopez-Navidad A, Yoldi B, et al. Sodium fluoride treatment is a major protector against vertebral and nonvertebral fractures when compared with other common treatments of osteoporosis: a longitudinal, observational study. Calcif Tissue Int 1997;60:250-4.
- Storm T, Steiniche T, Thamsborg G, Melsen F. Changes in bone histomorphometry after long-term treatment with intermittent, cyclic etidronate for postmenopausal osteoporosis. J Bone Miner Res 1993;8:199-208.
- O'uchi N, Nishikawa H, Motoie H, Shikama H. Morphometric evidence that YM 175, a bisphosphonate, reduces trabecular bone resorption in ovariectomized dogs with dietary calcium restriction. Jpn J Pharmacol 1999;79:397-400.
- Pinkerton JV, Santen R. Alternatives to the use of estrogen in postmenopausal women. Endocr Rev 1999;20:308-20.
- Eccleston DS, Horrigan MC, Ellis SG. Rationale for local drug delivery. Semin Interv Cardiol 1996;1:8-16.
- Fujisaki J, Tokunaga Y, Takahashi T, Hirose T, Shimojo F, Kagayama A, et al. Osteotropic drug delivery system (ODDS) based on bisphosphonic prodrug. I: synthesis and in vivo characterization of osteotropic carboxyfluorescein. J Drug Target 1995;3:273-82.
- Fujisaki J, Tokunaga Y, Takahashi T, Shimojo F, Kimura S, Hata T. Osteotropic drug delivery system (ODDS) based on bisphosphonic prodrug. IV: effects of osteotropic estradiol on bone mineral density and uterine weight in ovariectomized rats. J Drug Target 1998;5:129-38.
- Bauss F, Esswein A, Reiff K, Sponer G, Müller-Beckmann B. Effect of 17  $\beta$ -estradiol-bisphosphonate conjugates, potential bone-seeking estrogen pro-drugs, on 17  $\beta$ -estradiol serum kinetics and bone mass in rats. Calcif Tissue Int 1996; 59: 168-73.
- Kasugai S, Fujisawa R, Waki Y, Miyamoto K, Ohya K. Selective drug delivery system to bone: small peptide (Asp)<sub>6</sub> conjugation. J Bone Miner Res 2000;15:936-43.
- Wallace JL, Dickey M, McKnight W, Bastaki S, Blank MA. N-bisphosphonates causes gastric epithelial injury independent of effects on the microcirculation. Aliment Pharmacol Ther 1999;13:1675-82.
- Burnier JP, Borowski M, Furie BC, Furie B. Gamma-carboxy glutamic acid. Mol Cell Biochem 1981;39:191-207.
- Hauschka PV, Lian JB, Gallop PM. Direct identification of the calcium-binding amino acid,  $\gamma$ -carboxyglutamate, in mineralized tissue. Proc Nat Acad Sci U S A 1975;72: 3925-29.

23. Price PA, Otsuka AS, Poser JW, Kristaponis J, Raman N. Characterization of a  $\alpha$ -carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976;73: 1447-51.
24. Darbre P, Yates J, Curtis S, King RJB. Effect of estradiol on human breast cancer cells in culture. *Cancer Res* 1983;43: 349-54.
25. Lippman ME, Bolan G. Oestrogen-responsive human breast cancer in long term tissue culture. *Nature* 1975;256:592-3.
26. Sirbasku DA. Estrogen induction of growth factors specific for hormone-responsive mammary, pituitary, and kidney tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978;75: 3786-90.
27. Butler WB, Berlinski PJ, Hillman RM, Kelsey WH, Toenniges MM. Relation of in vitro properties to tumorigenicity for a series of sublines of the human breast cancer cell line MCF-7. *Cancer Res* 1986;46:6339-48.
28. Kasugai S, Hasegawa N, Ogura H. A simple in vitro cytotoxic test using the MTT (3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) colorimetric assay: analysis of eugenol toxicity on dental pulp cells (RPC-C2A). *Jpn J Pharmacol* 1990;52:95-100.
29. Soto AM, Sonnenschein C. The role of estrogens on the proliferation of human breast tumor cells (MCF-7). *J Steroid Biochem* 1985;23:87-94.
30. Bergvist L, Adami H-O, Persson I, Hoover R, Schairer C. The risk of breast cancer after estrogen and estrogen-progestin replacement. *N Engl J Med* 1989;321:293-7.
31. Colditz GA, Hankinson SE, Hunter DJ, Willet WC, Manson JE, Stampfer MJ, et al. The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1995;332:1589-93.
32. Hauschka PV, Carr SA. Calcium-dependent  $\alpha$ -helical structure in osteocalcin. *Biochemistry* 1982;21:2538-47.
33. Poser JW, Price PA. A method for decarboxylation of  $\gamma$ -carboxyglutamic acid in proteins. *J Biol Chem* 1979;254: 431-6.
34. Hauschka PV, Gallop PM. Calcium-binding proteins and calcium function. Amsterdam: Elsevier, North-Holland biomedical press 1977.
35. Kusec V, Virdi AS, Prince R, Triffitt JT. Localization of estrogen receptor- $\alpha$  in human and rabbit skeletal tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2421-8.
36. Huang WH, Lau AT, Daniel LL, Fujii H, Seydel U, Wood DJ, et al. Detection of estrogen receptor alpha, carbonic anhydrase II and tartrate-resistant acid phosphatase mRNAs in putative mononuclear osteoclast precursor cells of neonatal rats by fluorescence *in situ* hybridization. *J Mol Endocrinol* 1998;20:211-9.
37. Paech K, Webb P, Kuiper GGJM, Nilsson S, Gustafsson JA, Kushner PJ, et al. Differential ligand activation of estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$  at AP1 sites. *Science* 1997;277: 1508-10.
38. Chenu C, Colucci S, Grano M, Zigrino P, Barattolo R, Zamboni G, et al. Osteocalcin induces chemotaxis, secretion of matrix proteins, and calcium-mediated intracellular signaling in human osteoclast-like cells. *J Cell Biol* 1994;127:1149-58.
39. Shah DV, Tews JK, Harper AE, Suttie JW. Metabolism and transport of gamma-carboxyglutamic acid. *Biochim Biophys Acta* 1978;539:209-17.
40. Yokogawa K, Miya K, Sekido T, Higashi Y, Nomura M, Fujisawa R, et al. Selective delivery of estradiol to bone by aspartic acid oligopeptide and its effects on ovariectomized mice. *Endocrinology* 2001;142:1228-33.

