615.323117
ป533ร

รายงานการวิจัย

เรื่อง ฤทธิ์ของสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างในการทำให้เกิดการตายของเซลล์เม็ดเลือดขาว ที่ได้จากผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก

(Apoptosis Activity of *Stephania venosa* Extract on Lymphocytes from Patients with Cervical Cancer)

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปัทมา ลิ้วนิช

15 ส.ค. 2547

กันยายน 2545

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดิน

ปี 2544

h237800

บทคัดย่อ

บอระเพ็ดพุงช้าง (*Stephania venosa*) เป็นสมุนไพรไทยที่มีการนำหัวมาใช้รักษาโรคต่างๆ รวมทั้งมะเร็งโดยที่ยังไม่มีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ยืนยัน และการตายของเซลล์อะพอพโตสิส (apoptosis) เป็นเป้าหมายใหม่ในการรักษามะเร็งในปัจจุบัน ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดน้ำจากหัวบอระเพ็ดพุงช้างต่อความเป็นพิษและการตายของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้จากคนปกติและผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก

ทำการแยกและเพาะเลี้ยงเม็ดเลือดขาวที่ได้จากคนปกติและผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกในสารเพาะเลี้ยง RPMI ที่มีสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างความเข้มข้น 0, 10, 30, 100, 300 และ 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หลังจาก 48 ชั่วโมงทำการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic) ของสารสกัดด้วยวิธี trypan blue dye exclusion ศึกษาผลต่อการตายของเซลล์ด้วยวิธี terminal deoxynucleotidyl transferase assay โดยใช้การฉายรังสีที่ระดับ 0.5 Gy เป็นตัวควบคุม

ผลการศึกษาเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนปกติพบว่าสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างมีความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยค่าเท่ากับ IC_{50} 340 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรทำให้มีการตายของเซลล์เกิดขึ้นคล้ายกับการฉายรังสี เมื่อใช้สารสกัดร่วมกับการฉายรังสีพบว่าเซลล์มีการตายมากกว่าการใช้สารสกัดหรือการฉายรังสีเพียงอย่างเดียว สารสกัดและการฉายรังสีมีผลต่อการตายของเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกในทำนองเดียวกัน

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้บ่งชี้ว่าสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างมีฤทธิ์ cytotoxic และ apoptotic ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว ซึ่งจะต้องทำการศึกษาต่อไปถึงฤทธิ์ในการต้านมะเร็งของสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างนี้

Abstract

Stephania venosa (*S. venosa*) is a Thai folk medicine. Its rhizome has been used for treatment of various disease including cancer. It is widely accepted that apoptosis is a new therapeutic target of cancer research. This study aims to investigate the effect of the water extract from *S. venosa* rhizome on cytotoxic and apoptotic activities in both normal human lymphocytes and lymphocytes from patients with cervical cancer.

Lymphocytes were collected and separated from peripheral blood of either healthy donors or patients with cervical cancer. The lymphocytes were cultured in RPMI medium and treated with *S. venosa* extract at the concentration of 0, 10, 30, 100, 300 and 1000 μg/ml. After 48 hour incubation, the cytotoxic effect of the extract was determined by trypan blue dye exclusion method. Apoptotic activity of the extract was studied using in situ terminal deoxynucleotidyl transferase assay. The 0.5 Gys. ^{60}Co gamma ray exposure was uses as the positive control groups.

In normal lymphocytes, the results revealed that the *S. venosa* extract possessed cytotoxic effect with the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) at 340 μg/ml. At 300 μg/ml, the extract had apoptotic activity on cultured lymphocytes similar to radiation. The results also showed that the extract and radiation had an additive effect. Likely, the extract, at the concentration of 300 μg/ml, had apoptotic activity on lymphocytes from patients with cervical cancer similar to the radiation.

These data suggest that the water extract of *S. venosa* exhibited cytotoxic and apoptotic activity on lymphocytes. These results may encourage for future investigations on the effects of *S. venosa* as an anticancer agent.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2544

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิงธาดา สืบหลินวงศ์ ภาควิชาชีวเคมี และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัชรี ลิมปนสิทธิกุล ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำปรึกษาและให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ในการดำเนินงานวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณนางสาวทิพย์สุดา ปลื้มใจ นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในการช่วยทำงานวิจัย

ขอขอบคุณคณาจารย์ ภาควิชาเภสัชวิทยา และ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้การสนับสนุน กำลังใจ และอำนวยความสะดวกในการทำวิจัย ทำให้ผู้วิจัยสามารถดำเนินงานวิจัยตามแผนงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปัทมา ลิ้วนิช
หัวหน้าโครงการวิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	i
Abstract	ii
ประกาศคุณูปการ	iii
บัญชีตาราง	v
บัญชีภาพ	vi
บทที่	
1 บทนำ	1
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
3 วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า	9
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	
4.1 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity)	12
4.2 การศึกษาความคงตัวของสารสกัด (Stability)	12
4.3 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อการเกิด apoptosis	14
5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	17
บรรณานุกรม	18
อภิธานศัพท์	20
ประวัติย่อผู้วิจัย	21

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	ความคงตัวของความเป็นกรด-ด่างของสารละลายบอระเพ็ดพุงช้าง	13

บัญชีภาพ

รูป		หน้า
1	หัวบอระเพ็ดพุงช้าง	4
2	การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เมื่อดีเอนเอเสียหาย	6
3	ความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้าง	12
4	ความคงตัวด้านกายภาพของสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้าง	13
5	ผลของสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างต่อการเกิด apoptosis ของเซลล์เม็ดเลือดขาวจากคนปกติ	14
6	ผลของสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างที่ให้ร่วมกับการฉายรังสีต่อการเกิด apoptosis ของเซลล์ เม็ดเลือดขาวจากคนปกติ	15
7	ผลของสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างต่อการเกิด apoptosis ของเซลล์เม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก	16

บทที่ 1
บทนำ

ความมุ่งหมายของการวิจัย

เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากหัวของบอระเพ็ดพุงช้างต่อกระบวนการเกิด apoptosis ในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก

ความสำคัญของการวิจัย

โรคมะเร็งยังเป็นปัญหาที่สำคัญในวงการแพทย์ทั่วโลกเพราะยังไม่มีวิธีการหรือยาใดสามารถใช้รักษาโรคมะเร็งให้หายได้ ยิ่งกว่านั้นมีผู้ป่วยมะเร็งเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในแต่ละปี (1) การฉายรังสีและ/หรือการใช้ยาที่ปฏิบัติกันอยู่ในปัจจุบันมักจะมีอาการข้างเคียงที่ทำให้เกิดปัญหาแก่ผู้ป่วยและการรักษาล้มเหลวอยู่เสมอ นักวิทยาศาสตร์จึงได้พยายามศึกษาค้นคว้าหาวิธีการรักษาหรือยาใหม่ ๆ โดยมีเป้าหมายว่าจะได้สิ่งที่ดีกว่าเดิม การนำสมุนไพรมาใช้เป็นยารักษามะเร็งก็เป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งที่เป็นไปได้ ข้อดีของยาสมุนไพรคือเป็นสิ่งที่ได้จากธรรมชาติ มีสารต่าง ๆ เป็นองค์ประกอบอยู่หลายชนิด จึงเชื่อว่าการออกฤทธิ์ของสารต่าง ๆ เหล่านี้จะทำให้เกิดการส่งเสริมและการหักล้างฤทธิ์กัน ทำให้การเกิดอาการข้างเคียงไม่รุนแรงเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ยาที่ได้จากการสังเคราะห์ซึ่งจัดเป็นสารเคมีชนิดเดี่ยว การออกฤทธิ์และอาการข้างเคียงจึงรุนแรงกว่า การนำสมุนไพรมาใช้เป็นยารักษาโรคเป็นที่นิยมกันมากขึ้นเรื่อย ๆ ทั้งประเทศในแถบเอเชีย อเมริกาและยุโรป (2) โดยเฉพาะประเทศไทยซึ่งเป็นแหล่งที่มีสมุนไพรหลายหลากชนิด คนไทยรู้จักการใช้สมุนไพรในการรักษาโรคต่างๆมาเป็นระยะเวลาประมาณพันปีมาแล้ว แต่การใช้สมุนไพรในประเทศไทยยังมีปัญหาอยู่มากเพราะมักมีการกล่าวอ้างสรรพคุณของสมุนไพรในการรักษาโรคต่าง ๆ โดยที่ยังไม่ได้รับการพิสูจน์กันอย่างจริงจัง นอกจากนี้การเรียกชื่อโรคในตำรายาไทยบางครั้งก็ไม่สามารถสื่อถึงโรคที่เป็นอยู่ในปัจจุบันได้ จึงอาจทำให้มีการนำไปใช้ไม่ตรงกับโรค ทำให้การรักษาไม่ได้ผล และอาจเกิดอันตรายแก่ผู้ใช้ได้ ซึ่งจะก่อให้เกิดภาพพจน์ในทางที่ไม่ดีต่อสมุนไพรไทย *Stephania venosa* เป็นหนึ่งในสมุนไพรที่มีการนำมาใช้ในสรรพคุณว่าช่วยบรรเทาหรือยับยั้งการดำเนินโรคของมะเร็งได้ โดยยังไม่มีการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ที่แน่นอน ดังนั้น การศึกษาถึงฤทธิ์ของสารสารสกัดจาก *Stephania venosa* ต่อกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งอย่างถูกต้องตามระเบียบวิธีทดลองทางวิทยาศาสตร์จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการศึกษาถึงความเป็นไปได้เบื้องต้นในการนำมาใช้รักษามะเร็งของสมุนไพรชนิดนี้

ขอบเขตของการวิจัย

1. การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาโดยใช้หลอดทดลองเป็นแบบจำลอง (*in vitro*) เพราะสามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ที่อาจจะมีผลกระทบต่อการแปรผลได้ง่าย

2. ตัวอย่างสมุนไพรเป็นสมุนไพรที่ขึ้นเองตามธรรมชาติ ได้จากเกษตรกรที่เก็บมาขาย โดยเก็บมาจากป่า อำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรีเพียงแห่งเดียว ใช้เฉพาะส่วนที่เป็นหัวในการศึกษาวิจัย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Stephania venosa

Stephania venosa SPRENG. เป็นพืชในวงศ์ MENISPERMACEAE มีชื่อที่นิยมใช้เรียกกัน และใช้เป็นชื่อทางราชการว่า กลิ้งกลางดง นอกจากนี้ยังมีชื่ออื่นและชื่อพื้นเมืองที่ใช้เรียกแตกต่างกันไปตามท้องที่ ได้แก่ โกฐหัวบก บัวบก สมู่เลือด (ภาคกลาง) บอระเพ็ดพุงช้าง (ราชบุรี) กระท่อมเลือด (ตะวันออกเฉียงเหนือ) และ บอระเพ็ดยางแดง (ใต้) เป็นต้น *Stephania venosa* มีลักษณะเป็นไม้เลื้อย กิ่งก้านมีน้ำยางสีแดง ลำต้นบนดินมีอายุปีเดียว งอกมาจากหัวบนดินขนาดใหญ่ (รูปที่ 1) ใบเดี่ยวรูปไข่ เรียงสลับกัน ผลสดรูปไข่กลับ เมื่อสุกจะเป็นสีแดง ในตำรายาไทยใช้ต้น กระจายลมที่แน่นในอก, ใบ บำรุงธาตุไฟ ใส่บาดแผลสดและเรื้อรัง, ดอก ฆ่าเชื้อโรคเรื้อน ทำให้อุจจาระละเอียด, เถา ขับโลหิตระดู ขับพยาธิในลำไส้ , หัว ก้าน แก้เสมหะเบื้องบน ทำให้เกิดกำลัง แก้ปวดเมื่อย, ราก บำรุงเส้นประสาท รักษาอาการหอบหืด (3,4) ในประเทศญี่ปุ่นมีการใช้ ใบ รักษาอาการเจ็บหน้าอก อาหารไม่ย่อย ปวดศีรษะและทาแผล, ต้น รักษาอาการหอบหืด และโรคพยาธิ (5) ประเทศเนปาลมีการใช้ หัว รักษาวัณโรค โรคลำไส้ มีไข้ อาการไม่สบายในท้อง และอาการหอบหืด (5)

รูปที่ 1. หัวบอระเพ็ดพุงช้าง

นอกจากรายงานที่ปรากฏอยู่ในตำรายาไทยแล้ว ในปัจจุบันได้มีการใช้ *Stephania venosa* กับโรคชนิดอื่นอีก เช่น ใช้หัวของ *Stephania venosa* มาทำเป็นยาเม็ดลูกกลอนรับประทาน หรือชงกับน้ำร้อนดื่ม เพื่อลดระดับไขมันในเลือด ใช้รักษาผู้ป่วยโรคเบาหวาน โรคหอบหืด โรคอัมพาตที่มีอาการชา และ โรคมะเร็งหลายชนิด มีรายงานอย่างไม่เป็นทางการว่าผู้ป่วยที่ได้รับ *Stephania venosa* เหล่านี้มีอาการดีขึ้น ร่างกายแข็งแรงและบางรายหายจากโรค การศึกษาสารที่เป็นองค์ประกอบในส่วนต่าง ๆ ของ *Stephania venosa* พบว่าหัวของ *Stephania venosa* มีสารพวก isoquinoline alkaloids อยู่ไม่น้อยกว่า 30 ชนิด (6,7) และมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ของสารบางตัวเหล่านี้ว่ามีฤทธิ์แตกต่างกัน เช่น aromoline มีฤทธิ์ antiplasmodial, antiamoebic และ cytotoxic activities; berbamine และ tetradrine มีฤทธิ์ยับยั้งการผลิต interleukin-1 และ tumor necrosis factor และ cytotoxic activity; berbamunine และ cepharanthine มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและต่อภูมิคุ้มกัน; dicentrine มีฤทธิ์ลดความดันโลหิต; palmatine มีฤทธิ์ทำให้สงบ; และ sinoacutine มีฤทธิ์ immunosuppressive เป็นต้น สำหรับการออกฤทธิ์ของสารประกอบชนิดอื่นยังไม่มีรายงาน จะเห็นว่าข้อมูลการออกฤทธิ์ของสารประกอบเหล่านี้สอดคล้องกับการนำมาใช้รักษาโรค ดังนั้น การที่ *Stephania venosa* มีผลต่อโรคต่าง ๆ หลายชนิดดังที่ได้กล่าวมาแล้วนั้น อาจเกิดจากฤทธิ์ที่หลากหลายของสารต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในหัว *Stephania venosa* ฤทธิ์ที่เป็น cytotoxic และการออกฤทธิ์ต่อภูมิคุ้มกันทำให้สามารถตั้งข้อสมมุติฐานได้ว่าหัว *Stephania venosa* มีฤทธิ์ในการรักษามะเร็งได้จริง เพื่อพิสูจน์ข้อสมมุติฐานนี้ คณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษาการออกฤทธิ์ของหัว *Stephania venosa* ต่อกระบวนการ apoptosis และระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ซึ่งมีหลักฐานบ่งชี้ว่ามีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง

ความสัมพันธ์ระหว่างมะเร็ง และ apoptosis

ปัจจุบันโรคมะเร็งถูกจัดเป็นโรคพันธุกรรมที่ไม่ใช่โรคกรรมพันธุ์เนื่องจากพบความผิดปกติของสารพันธุกรรมหรือดีเอนเอ (8) แต่ไม่ถ่ายทอดจากพ่อแม่มาสู่ลูก ดังเช่นโรคกรรมพันธุ์อย่างโรคเลือดธาลัสซีเมีย มีการค้นพบยีนจำนวนมากที่มีบทบาทในการก่อมะเร็งซึ่งเรียกรวมว่า proto-oncogene และยีนอีกกลุ่มซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งการเกิดมะเร็งที่เรียกว่า tumor suppressor gene เซลล์ที่มีความบกพร่องเกิดขึ้นกับ tumor suppressor gene หรือ proto-oncogene เนื่องจากได้รับรังสี สารเคมี ฯลฯ และเปลี่ยนเป็น oncogene จะเป็นจุดเริ่มต้นของการก่อมะเร็ง กระบวนการก่อมะเร็งเป็นกระบวนการที่ซับซ้อนและมากขั้นตอน (multistep) (9,10)

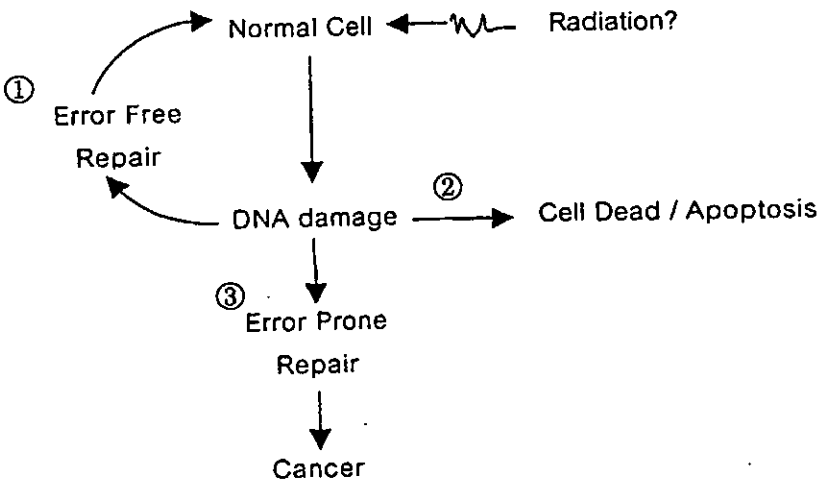
กลไกต้านมะเร็งอีกอย่างหนึ่งได้แก่ apoptosis หรือ programmed cell death ซึ่งเป็นปรากฏการณ์การตายของเซลล์ที่เกิดขึ้นในธรรมชาติในขณะที่ร่างกายของสิ่งมีชีวิตมีพัฒนาการจากตัวอ่อนเป็นตัวเต็มวัย ตัวอย่างเช่นการพัฒนของลูกอ๊อดไปเป็นกบ จะเกิดกระบวนการ apoptosis ขึ้นกับพังพืดระหว่างนิ้ว เป็นต้น ปรากฏการณ์ apoptosis จะเกิดขึ้นเมื่อยีนกลุ่มที่ควบคุมโปรแกรมการตายถูก

กระตุ้นให้ทำงาน สิ่งกระตุ้นอาจจะเป็นสารเคมีกลุ่ม carcinogen, รังสี ความร้อน ฯลฯ สิ่งเหล่านี้จะนำไปสู่การแตกหัก หรือเกิดความเสียหายต่อ ดีเอนเอ (DNA damage) ซึ่งเมื่อเกิดความเสียหายต่อดีเอนเอ เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นได้ 3 ทาง

1. ถ้าดีเอนเอเสียหายไม่มากนัก กลไกการซ่อมแซมดีเอนเอ (DNA repair mechanism) จะทำการซ่อมแซมได้จนกลับสู่สภาพปกติ ดังนั้นเซลล์กลับเป็นเซลล์ปกติได้

2. ดีเอนเอเสียหายและมีการกระตุ้นให้ยีนกลุ่มควบคุมโปรแกรมการตายทำงาน ซึ่งส่งผลให้เกิดการตายแบบ apoptosis อันเป็นการกำจัดเซลล์ผิดปกติหรือเซลล์ที่ไม่สมบูรณ์ให้หมดไป กลไกนี้ถูกมองว่าเป็นกลไกกำจัดเซลล์ที่ผิดปกติซึ่งเป็นการต้านมะเร็งวิธีหนึ่ง ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ที่ตายแล้วย่อมไม่สามารถเปลี่ยนเป็นเซลล์มะเร็ง

3. ถ้าดีเอนเอที่เสียหาย ได้รับการซ่อมแซมผิด ๆ ถูก ๆ จะเป็นเหตุให้เกิดความผิดปกติ ซึ่งเป็นจุดตั้งต้นนำไปสู่การเปลี่ยนเป็นเซลล์มะเร็งได้ทั้ง 3 กลไก สรุปได้ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2. การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เมื่อดีเอนเอเสียหาย

ลำดับการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในปรากฏการณ์ apoptosis (11)

1) chromatin condensation หรือ นิวเคลียสบางส่วนหลุดไปเป็น micronuclei
2) DNA fragmentation ดีเอนเอแตกหักเป็นท่อน ๆ ขนาด 180 - 200 bp
3) ขนาดของเซลล์หดเล็กลง
4) เยื่อหุ้มเซลล์ผิดปกติ และปริแตก เป็นชิ้น ๆ เกิด apoptotic bodies
5) apoptotic bodies ถูกจับกินโดย macrophage

การตายของเซลล์โดยกระบวนการ apoptosis จะไม่เกิดการอักเสบ (inflammation) และต่างจากการตายแบบ necrosis ทั้งด้านการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างรูปร่างและด้านชีวเคมี ดังตารางการเปรียบเทียบต่อไปนี้

Morphological criteria

Apoptosis	Necrosis
• Deletion of single cell	• Death of cell groups
• Membrane blebbing, but no loss of integrity	• Loss of membrane integrity
• Cell shrink, ultimately forming apoptotic bodies	• Cell swell and lyse
• No inflammatory response	• Significant inflammatory response
• Phagocytosis by adjacent normal cells, and some macrophages	• Phagocytosis by macrophages
• Lysosomes intact	• Lysosomal leakage
• Compaction of chromatin into uniformy dense masses	• Clumpy. ill-defined aggregation of chromatin

Biochemical Criteria

Apoptosis	Necrosis
• Induced by physiological stimuli	• Evoked by nonphysiological disturbances
• Tightly regulated process with synthetic and homeostasis activation steps	• Loss of regulation of ion
• Requires energy	• No requirement by energy
• Requires macromolecular synthesis	• No requirement for protein or nucleic acid synthesis
• De novo gene transcription	• No new gene transcription
• Non random oligonucleosomal length fragmentation of DNA	• Random digestion of DNA

โดยที่กระบวนการ apoptosis เริ่มต้นขึ้นจากการเกิดความเสียหายของดีเอนเอ และตามด้วยการเปลี่ยนแปลงในส่วนดีเอนเอของนิวเคลียส และเกิดพยาธิสภาพอื่น ๆ ดังกล่าวแล้วข้างต้น มีวิธีตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันว่าเซลล์มีความผิดปกติของดีเอนเอและเข้าสู่กระบวนการ apoptosis ได้ 3 วิธี

1. Strand Break Assay ใช้ตรวจด้วยวิธี Comet Assay (12), FADU (13)
2. Cytogenetic ตรวจดู chromosome aberrations โดย FISH หรือตรวจ Micronucleus formation (14)
3. Enzymatic Assay ได้แก่ TdT (Tunnel) (15-18)

การชักนำให้เซลล์ปกติเช่น เซลล์เม็ดเลือดขาวเข้าสู่กระบวนการ apoptosis ได้ถูกศึกษากันมาก Boreham และคณะ (16) ชักนำเม็ดเลือดขาวให้เกิด apoptosis โดยใช้การฉายรังสี และกระตุ้นด้วยความร้อน พบว่า % apoptosis ของเม็ดเลือดขาวแปรตามขนาดของรังสี และระดับของรังสีที่ 0.5Gy สามารถชักนำเซลล์เม็ดเลือดขาวให้เกิด apoptosis ได้ การศึกษา apoptosis ในเซลล์เม็ดเลือดขาวอาจช่วยบ่งชี้ความไวต่อรังสีของแต่ละบุคคลและใช้เป็นข้อมูลในการกำหนดปริมาณรังสีที่ใช้ในการรักษามะเร็ง นอกจากนี้ยังอาจช่วยบอกถึงความสามารถในการเกิด apoptosis ของเนื้อเยื่ออื่นในร่างกายต่อการต้านมะเร็งของบุคคลนั้น (19) โดยการเจาะเลือดนำเม็ดเลือดขาวมาวัดขนาดรังสีที่ชักนำให้เกิด apoptosis แล้วนำขนาดไปคำนวณปริมาณรังสีที่จะฉายต่อเนื้อมะเร็ง นอกจากประโยชน์ของการใช้ % apoptosis ของเม็ดเลือดขาวเป็นมาตรวัดชีวภาพ (biologic dosimeter) แล้ว การศึกษาความสามารถในการชักนำให้เกิด apoptosis ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก ซึ่งเป็นมะเร็งที่มีอุบัติการณ์สูงในคนไทย พบว่าร้อยละของเซลล์ที่เกิด apoptosis ในคนปกติที่เป็นกลุ่มควบคุมมีค่าสูงกว่าผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก และ ร้อยละของเซลล์ที่เกิด apoptosis ในผู้ป่วยจะลดลงเมื่อระยะของโรครุนแรงขึ้น (20) เมื่อมองในแง่มุมว่า apoptosis น่าจะเป็นกลไกการต้านการเกิดมะเร็งกลไกหนึ่ง ผู้วิจัยจึงตั้งสมมุติฐานว่า ยาหรือสมุนไพรที่สามารถกระตุ้นกระบวนการเกิด apoptosis ให้ออกฤทธิ์เต็มที่ ยาหรือสมุนไพรนั้นจะใช้รักษาโรคมะเร็งได้และยาหรือสมุนไพรนั้นน่าจะมีผลข้างเคียงที่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติน้อยกว่ายาหรือสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ทำลายเนื้อเยื่อมะเร็งโดยตรง ดังนั้นจึงสามารถใช้การทดสอบ apoptosis เป็นรูปแบบ (model) สำหรับตรวจคัดกรองสมุนไพร และยาต่าง ๆ ที่คาดว่าจะมีผลในการรักษาโรคมะเร็ง

วิธีการตรวจหา % Apoptosis บางวิธีแม้จะมีความไวสูง เช่น Comet Assay แต่วิธีการยุ่งยาก Boreham และคณะ (13) พบว่าการหา % Apoptosis โดยวิธี FADU (Fluorescence Analysis of DNA Unwinding) แม้จะไวกว่าวิธี TdT (Tunnel) เล็กน้อย แต่ยุ่งยากกว่า TdT assay ซึ่งเป็นการติดฉลากส่วนปลายด้าน 3'-OH ของท่อนดีเอนเอที่แตกหักด้วย digoxigenin-dUTP โดยการทำงานของเอนไซม์ TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase) และย้อมด้วย Antibody Fluorescein conjugate ซึ่งเมื่อกระตุ้นด้วย UV 494 nm จะเรืองแสงที่ 523 nm และสามารถแยกเซลล์ที่เกิด apoptosis ออกมาจากเซลล์ปกติ คำนวณหา % apoptosis ได้เมื่อย้อมเซลล์ด้วย Hoechst 33342 ซึ่งจะเห็นเซลล์ทั้งหมดเป็นสีฟ้าต่อเมื่อใส่ blue filter ตัดแสงสีฟ้าออกจะนับเซลล์ติดสีเหลืองที่เกิด apoptosis ได้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า

3.1 การเตรียมสารสกัดจากหัว *Stephania venosa*

1) นำหัว *Stephania venosa* มาล้างและหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ บาง ๆ แล้วนำไปตากให้แห้ง
2) นำ *Stephania venosa* ที่ตากแห้งแล้วไปต้มกับน้ำในหม้อต้มจนเดือด ประมาณ 3 ชั่วโมง
3) แยกส่วนที่เป็นน้ำออกมา แล้วนำไปทำให้แห้ง โดยใช้เครื่อง Freeze-Dryer
4) นำผงแห้งที่ได้ใส่ขวดฝาปิดสนิท แล้วเก็บไว้ในตู้ดูดความชื้น พร้อมที่จะนำไปใช้
5) เมื่อจะใช้ เตรียมเป็น stock solution โดยใช้น้ำกลั่น 2 ครั้งและทำให้ปลอดเชื้อโดย กรองผ่าน membrane ขนาด 0.22 μm เก็บ stock solutionในตู้เย็นที่ – 20 ° C

3.2. การเตรียมตัวอย่างเลือด

<u>การเก็บตัวอย่างเลือด</u>

1) จากอาสาสมัครผู้ที่มาบริจาคโลหิต ที่ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย เพศหญิง อายุ 20-60 ปี
2) ผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกระยะ II-III ที่มีอายุใกล้เคียงกัน ไม่มีโรคประจำตัว ไม่เคยรักษาด้วยการฉายรังสีมาก่อน และไม่ได้อยู่ในระหว่างการใช้ยาใด ๆ

กลุ่มตัวอย่างทั้งสองกลุ่มจะได้รับการชี้แจงเกี่ยวกับขั้นตอนในการศึกษาและตอบรับยินยอมเข้าร่วมโครงการ

<u>การแยกเม็ดเลือดขาว</u>

- นำเลือดมาปั่นแยกเอาเฉพาะ lymphocyte โดยใช้ Histopaque 1077/HBSS (Hank Buffered Salt Solution)/ % FBS (Fetal Bovine Serum)
- เลี้ยงปรับสภาพเม็ดเลือดขาวที่แยกได้ในขวดเพาะเลี้ยง (T-flask) ที่มี RPMI-1640, 20% FBS, L-glutamine 10 u/ml, Penicillin, Streptomycin เป็นอาหารเลี้ยง บ่มในตู้ CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C, ความชื้น 97 %, ปริมาณ CO_2 0.3 % นานอย่างน้อย 30 นาที

3.3 สารเคมีและอุปกรณ์

Absolute ethanol (Merk, Germany), Fetal bovine serum, Hank Buffered Salt Solution (HBSS) Powder, L-Glutamine, RPMI 1640 (Gibco BRL,Germany), Formaldehyde, Gentamycin (GOH) , Histopaque®-1077, Hoeschts 33258 Dye, Paraformaldehyde powder, (Sigma,USA), Heparin (LEO), Sodium hydroxide, di- Sodium hydrogen phosphate monobasic, Sodium bicarbonate, Potassium chloride, Potassium hydrogen phosphate, ApopTag® Fluorescein kits

(Intergen), Heparinized Vacationer 10 (Vacationer®, USA), Reagent bottles:250, 1,000 ml (Duran®,Germany), Slide film (Eritchrome 400, Kodak), Sterile polypropylenes centrifuge tube:15, 50 ml, T25 Tissue culture flasks, 96- well plates (NuncTM, USA), Slide (Super frost, Germany), Sterile membrane Filters (Whatman®, Japan), CO_2- Incubator (REVCO ULTIMA), Co-60 Teletherapy machines (Eldorado-78, Canada), Radiotherapy Unit, Department of Radiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Fluorescence microscope (Olympus), Andrology Unit, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Biohazard Lamina-Flow hood (Gelman Science), Light microscope (Olypus, Japan), Low Speed centrifuge (Beckman)

3.4. วิธีดำเนินการวิจัย

3.4.1 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity)

- ใส่เม็ดเลือดขาว $4x10^5$ cells/ml 190 µl/หลุม ใน 96- well plate เติมสารละลายของสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้าง 10 µl ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 µg/ml (เตรียมใหม่ทุกครั้ง) ใช้ actinomycin D เป็น positive control
- ทำการเพาะเลี้ยงที่ 0.35 % CO_2, 37 °C, 97% humidity เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วตรวจวัดความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี trypan blue dye exclusion method ด้วย 0.4 % trypan blue
- คำนวณหาเปอร์เซ็นต์เซลล์ตายเทียบกับจำนวนเซลล์ทั้งหมด และหาค่า IC_{50}

3.4.2 การศึกษาความคงตัวของสารสกัด (Stability)

- เตรียมสารละลายของสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างที่ความเข้มข้น 20 mg/ml เป็น stock solution แบ่งใส่หลอดทดลอง 12 หลอด เก็บไว้ที่ –20° C
- ในแต่ละสัปดาห์จะนำ stock solution ที่เตรียมไว้นี้ มาทำการวัด pH และศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic activity) ด้วยวิธี Trypan blue dye exclusion method เช่นเดียวกับข้างต้น ทำการทดลองนาน 12 สัปดาห์

3.4.3 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อการเกิด apoptosis

- ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนปกติหรือของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก จำนวน $4x10^5$ cells/ml ปริมาณ 10 ml ใน T25 Tissue culture flask ที่ 0.35% CO_2, 37OC ,97% humidity และแบ่งเป็นกลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ฉายรังสี (0.5 Gy Cobalt 60 gamma ray) และกลุ่มที่ได้รับสารละลายของสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างที่ขนาดประมาณ IC_{50}

- ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วตรวจวัดการเกิด apoptosis โดยวิธี TdT assay (Apoptag Kit)
- นับจำนวนเซลล์ และหา % Apoptosis
- ศึกษาการเกิด apoptosis จากการใช้สารสกัดร่วมกับการฉายรังสี ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้างต้น โดยให้สารสกัดความเข้มข้นสุดท้าย 300 μg/ml ร่วมกับการฉายรังสีโคบอลต์ 60 ขนาด 0.5Gys

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

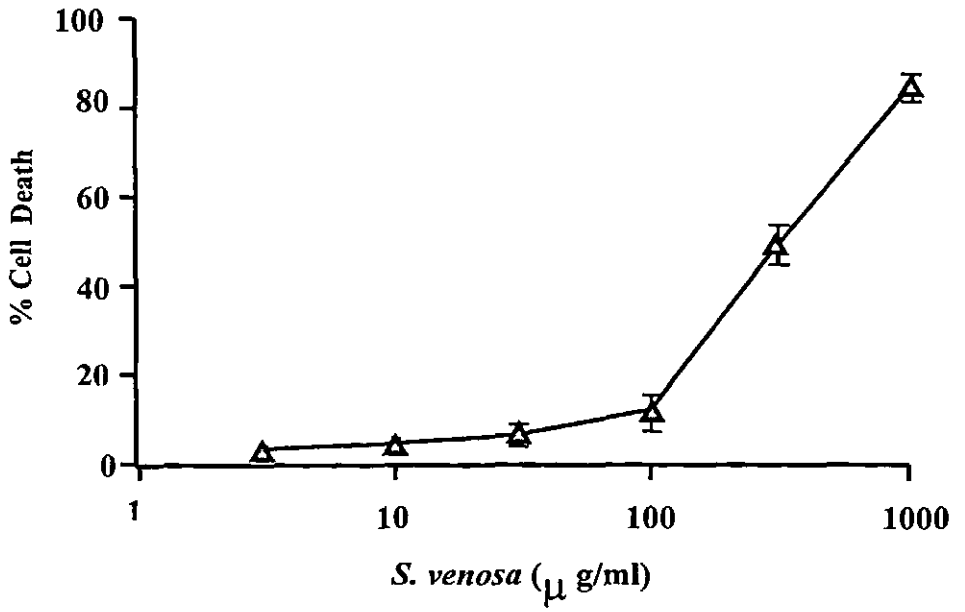
แสดงผลการทดลองต่างๆ ด้วย Mean ± S.D. และทดสอบความแตกต่างด้วยสถิติ repeated measurement ใน SPSS program

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity)

จากการทดสอบสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยใช้ Trypan blue dye exclusion method พบว่าสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างมีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยทำให้เซลล์ตายร้อยละ 3.2 $\pm$ 0.92, 4.6 $\pm$ 1.14, 6.6 $\pm$ 1.54, 12.4 $\pm$ 3.26, 48.2 $\pm$ 5.52 และ 84.4 $\pm$ 3.40 เมื่อให้สารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างความเข้มข้น 3, 10, 30, 100, 300 และ 1,000 μg/ml ตามลำดับ (รูปที่ 3) ค่า IC_{50} เท่ากับ 340 μg/ml



รูปที่ 3. ความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้าง : ใช้สารสกัด Stock solution ที่เก็บที่ –20°C ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทุกสัปดาห์นาน 12 สัปดาห์ (n =12)

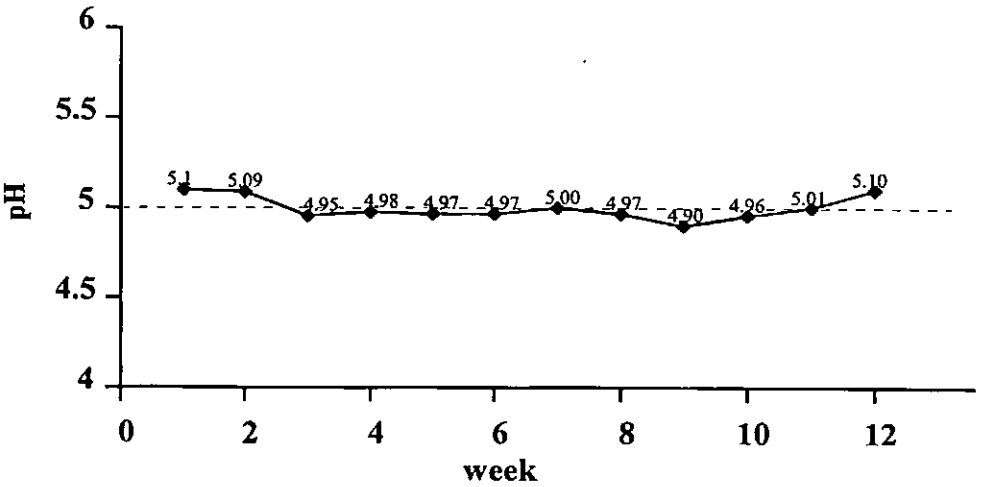
4.2 การศึกษาความคงตัวของสารสกัด (Stability)

วัดค่า pH ของสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างที่เตรียมเป็น stock solution ทุกๆ สัปดาห์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า pH มีค่าประมาณ 5.0 $\pm$ 1 ตามตารางที่ 1 และ รูปที่ 4

ตารางที่1. ความคงตัวของความเป็นกรด-ด่างของสารละลายบอระเพ็ดพุงช้าง

สัปดาห์ที่ no.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	5.096	5.115	5.039	5.035	5.05	5.081	5.061	5.091	5.073	5.085	5.081	5.074
2		5.092	5.092	5.095	5.100	5.110	5.109	5.097	5.070	5.082	5.079	5.071
3			4.950	4.965	4.988	4.974	4.970	4.951	4.946	4.945	4.938	4.926
4				4.975	4.967	4.972	4.961	4.971	4.952	4.922	4.946	4.933
5					4.966	4.972	4.957	4.947	4.968	4.921	4.943	4.935
6						4.972	4.939	4.969	4.988	4.959	4.954	4.935
7							5.003	4.979	5.041	4.951	4.956	4.945
8								4.967	4.951	4.961	4.930	4.934
9									4.900	4.947	4.942	4.924
10										4.960	4.958	4.959
11											5.005	4.954
12												5.096

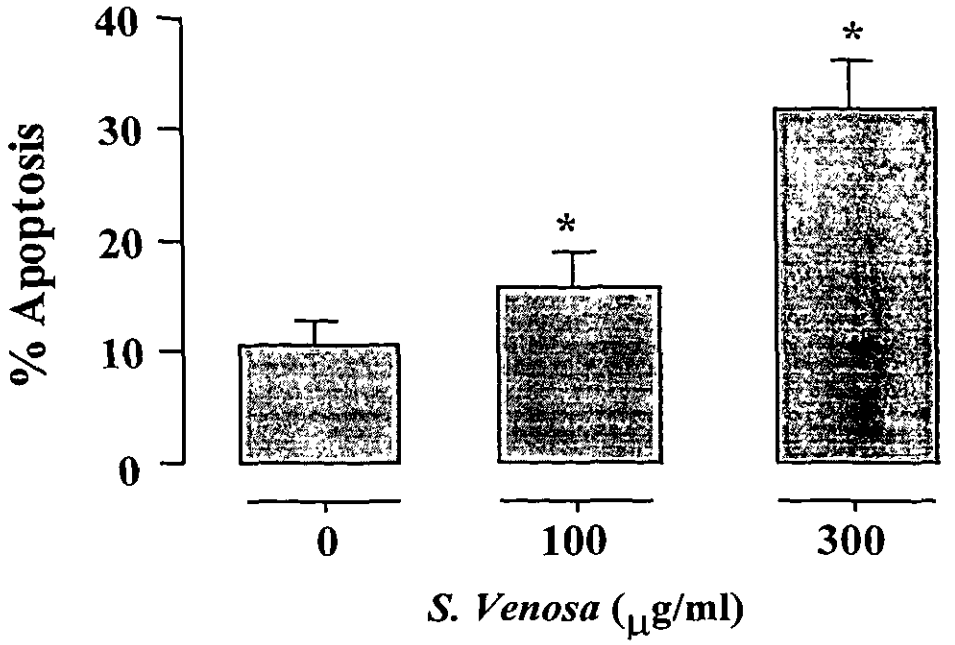
เป็นข้อมูลที่ได้จากการวัดแต่ละสัปดาห์ โดยนำหลอดเดิมของสัปดาห์ที่ผ่านมา มาทำให้ละลายโดยการตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการวัดซ้ำทุกสัปดาห์ ค่าสุดท้ายของแต่ละสัปดาห์เป็นค่าที่ได้จากการวัดครั้งแรกของสัปดาห์นั้น



รูปที่ 4. ความคงตัวด้านกายภาพของสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้าง : ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ของสารสกัด Stock solution ที่เก็บไว้ที่ –20°C เป็นเวลานาน 12 สัปดาห์ ตัวเลขแสดงค่าของ pH ในแต่ละสัปดาห์

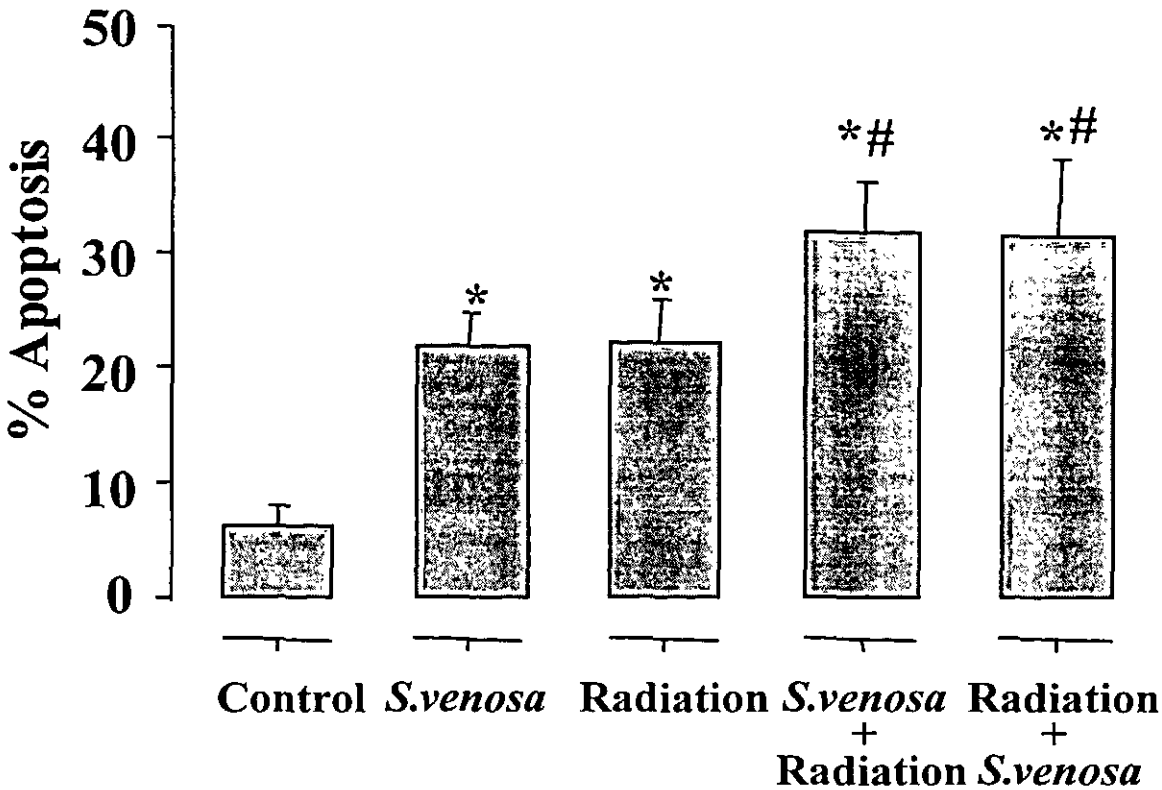
4.3. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อการเกิด apoptosis

สารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวจากคนปกติเกิด apoptosis ได้เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และมีการเกิด apoptosis เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นโดยร้อยละของการเกิด apoptosis เท่ากับ 10.7 $\pm$ 2.26, 15.8 $\pm$ 3.15 และ31.6 $\pm$ 4.64 ในกลุ่มควบคุม (control), ได้รับสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้าง (*S.venosa*) ขนาด 100 และ 300 μg/ml ตามลำดับ (รูปที่ 5) และเมื่อให้สารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างร่วมกับการฉายรังสี พบว่าการเกิด apoptosis สูงขึ้นจากการให้สารสกัดหรือการฉายรังสีเพียงอย่างเดียว โดยร้อยละการเกิด apoptosis เท่ากับ 6.3 $\pm$ 1.51, 21.8 $\pm$ 2.89, 22.3 $\pm$ 3.60, 31.9 $\pm$ 4.61 และ 31.6 $\pm$ 6.72 ในกลุ่ม ควบคุม, กลุ่มที่ให้สารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างขนาด 300 μg/ml, กลุ่มฉายรังสี, กลุ่มที่ให้สารสกัดก่อนการฉายรังสี และกลุ่มที่ให้สารสกัดหลังการฉายรังสี ตามลำดับ (รูปที่ 6) เมื่อนำเซลล์เม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก มาศึกษาการเกิด apoptosis พบว่าสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis เพิ่มขึ้น โดยร้อยละการเกิด apoptosis เท่ากับ 7.3 $\pm$ 3.64, 21.5 $\pm$ 9.11, 24.5 $\pm$ 5.78 และ 30.4 $\pm$ 10.15 ในกลุ่ม ควบคุม, กลุ่มที่ให้สารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างขนาด 300 μg/ml, กลุ่มฉายรังสี และกลุ่มที่ให้สารสกัดร่วมกับการฉายรังสี ตามลำดับ (รูปที่ 7)



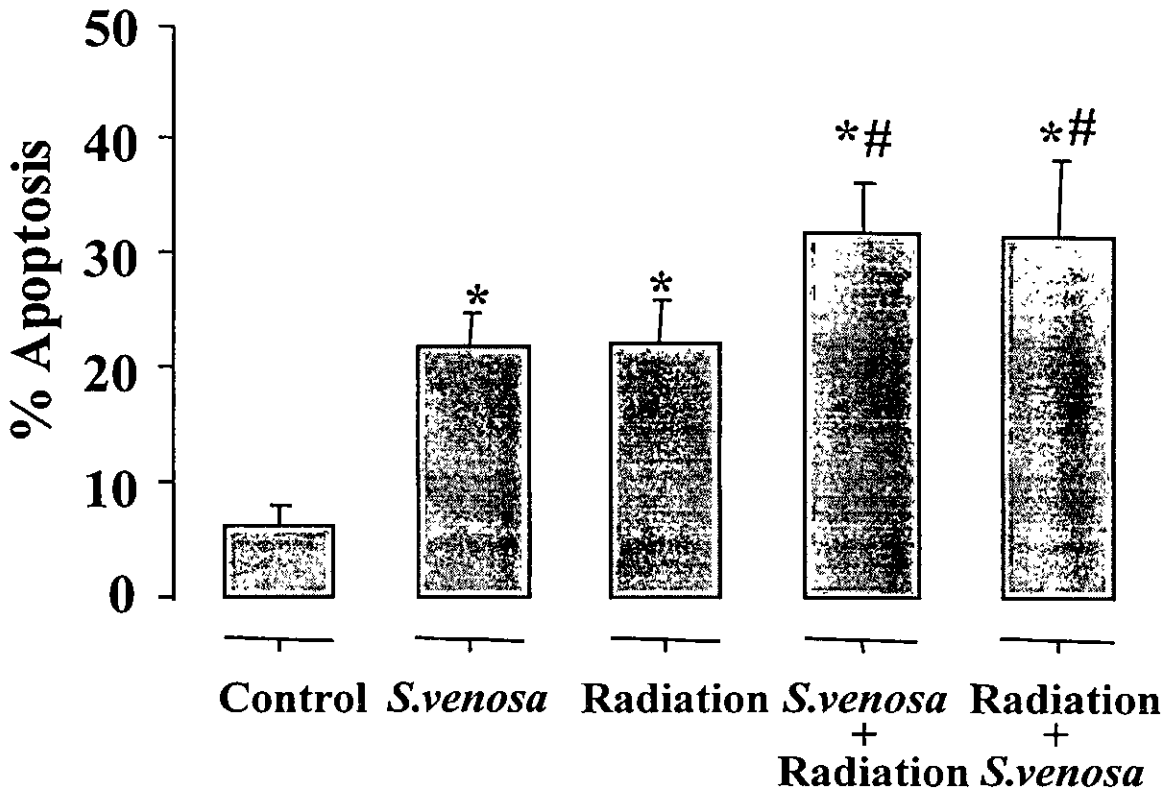
รูปที่ 5. ผลของสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างต่อการเกิด apoptosis ของเซลล์เม็ดเลือดขาวจากคนปกติ

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $P< 0.05$ เทียบกับกลุ่มควบคุม (control), (n = 10)



รูปที่ 6. ผลของสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างที่ให้ร่วมกับการฉายรังสีต่อการเกิด apoptosis ของเซลล์เม็ดเลือดขาวจากคนปกติ

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $P< 0.05$ เทียบกับกลุ่มควบคุม (control), # แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $P< 0.05$ เทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้าง (*S. venosa*) หรือ การฉายรังสี (radiation) เพียงเดียว, ($n = 5$)



รูปที่ 6. ผลของสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างที่ให้ร่วมกับการฉายรังสีต่อการเกิด apoptosis ของเซลล์เม็ดเลือดขาวจากคนปกติ

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ P< 0.05 เทียบกับกลุ่มควบคุม (control), # แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ P< 0.05 เทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้าง (*S. venosa*) หรือ การฉายรังสี (radiation) เพียงเดียว, (n = 5)

บทที่ 5
สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการทดลองศึกษาความคงตัวของสารสกัดน้ำของบอระเพ็ดพุงช้างโดยดูความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว และวัดการเปลี่ยนแปลงของค่า pH พบว่าสารสกัดน้ำของบอระเพ็ดพุงช้างมีความคงตัวต่อการเก็บที่อุณหภูมิ –20°C ในรูปของสารละลายที่ความเข้มข้น 20 mg/ml เป็นเวลา 12 สัปดาห์ และให้ผลเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวแบบแปรผันตามความเข้มข้นโดยแสดงค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเซลล์ตายได้ ร้อยละ50 ที่ความเข้มข้น 340 μg/ml (รูปที่ 3) และค่า pH คงตัวที่ประมาณ 5 (รูปที่ 4)

การศึกษาผลของสารสกัดน้ำบอระเพ็ดพุงช้างต่อการเกิด apoptosis ในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้จากอาสาสมัครคนปกติ พบว่าสารสกัดน้ำบอระเพ็ดพุงช้างที่ความเข้มข้น 300 μg/ml ให้ผลการเกิด apoptosis ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 % เมื่อเทียบกับการฉายรังสีโคบอลต์ 60 ขนาด 0.5 Gys โดยแสดงค่าร้อยละที่เกิด apoptosis เท่ากับ 31.6±4.64 และ 29.3±3.61 ตามลำดับ (รูปที่ 5) และจากการใช้สารสกัดน้ำบอระเพ็ดพุงช้างร่วมกับการฉายรังสีโคบอลต์ 60โดยการให้สารสกัดที่ความเข้มข้น 300 μg/ml และรังสีขนาด 0.5 Gys พบว่าให้ผลการเกิด apoptosis เพิ่มขึ้นแตกต่างจากการใช้สารสกัดหรือการฉายรังสีเพียงอย่างเดียวอย่างนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยการให้สารสกัดก่อนหรือหลังการฉายรังสี พบว่าให้ผลการเกิด apoptosis ไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 6) เมื่อนำเม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกมาทดสอบ พบว่าสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิด apoptosis เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และเมื่อให้สารสกัดร่วมกับการฉายรังสีพบว่าการเกิด apoptosis สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$ (รูปที่ 7)

จากการศึกษานี้ สามารถใช้เป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ในการพิสูจน์และยืนยันผลการใช้บอระเพ็ดพุงช้างในรูปแบบยาลูกกลอนและยาต้มของชาวบ้านว่าสารสกัดน้ำจากหัวบอระเพ็ดพุงช้างมีฤทธิ์ต้านมะเร็งได้โดยมีความเป็นพิษต่อเซลล์และสามารถก่อให้เกิดการตายแบบ apoptosis ในเซลล์เม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก ถ้ามีการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างเพิ่มเติมในเซลล์มะเร็งชนิดอื่น ๆ ก็จะสามารถช่วยยืนยันผลในการต้านมะเร็งของสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างได้ นอกจากนั้นควรมีการศึกษาถึงกลไกที่แท้จริงของสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างในการเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis เพื่อเป็นข้อมูลในการพัฒนายาต้านมะเร็งต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม

1. Mukhtar, H. and Ahmad, N., (1999). Cancer chemoprevention: future holds in multiple agents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **158**, 207-210.
2. ดร. ภญ. กฤษณา ไกรสินธุ์, (2542). สมุนไพรใน Expo 1999. R & D Newsletter. ปีที่ 6 ฉบับที่ 2, หน้า 1-6.
3. สุนทรี สังหบุตรา, (2540). สรรพคุณสมุนไพร 200 ชนิด. โรงพิมพ์ดอกเบี้ย : กรุงเทพฯ. หน้า 167.
4. วงศ์สถิตย์ ฉั่วกุล, (2538). สยามไภษัชยพฤกษ์: ภูมิปัญญาของชาติ. บริษัท อมรินทร์พริ้นติ้ง แอนด์ พับลิชชิ่ง จำกัด : กรุงเทพฯ. หน้า 212.
5. Kozuka, M., Miyaji, K., Sawada, T., and Tomita, M. (1985). A major alkaloid of the leaves and stems of Stephania rotunda. *J. Nat. Prod.* **48**, 341-342.
6. Likhitwitayawuid, K., Angerhofer, C.K., Chai, H., Pezzuto, J.M., Cordell, G.A., and Ruangrungsi, N. (1993). Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the tubers of Stephania pierrei. *J. Nat. Prod.* **56**, 1468-1478.
7. Tantisewie, B., Amurrio, S., Guinaudeau, H., and Shamma, M. (1989). New bisbenzylisoquinolines from Stephania pierri. *J. Nat. Prod.* **52**, 846-851.
8. Varmus, H.E., (1984). The molecular genetics of cellular oncogenes. *Annu Rev Genet.* **18**, 553-612.
9. Fearon, E.R., Vogelstein, B., (1990). A genetic model for colorectal Tumourignesis. *Cell* **61**, 759-67.
10. นวพรรณ จารุรักษ์, (2544). *วัฏจักรของเซลล์และอณูชีววิทยาของการเกิดมะเร็ง*. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: กรุงเทพฯ.
11. Steller, H., (1995). Mechanisms and Genes of Cellular Suicide. *Sci.* **267**, 1445-9.
12. Carson D.A., Ribeiro J.M. (1993). Apoptosis and disease. *Lancet* 341, 1251-4
13. Boreham, D.R., (1999). Radiation Biology Course Section #2 and Section #3", February 8-12, Bangkok, Thailand.
14. Vral, A., Thierens, H., de Ridder, L. (1995). The micronucleus centromere assay to asses low doses of irradiation. Warzberg Germany : Tenth International Congress of Radiation Research, 26-8.

15. Birnboim, H.C. and Jevack, J.J. (1981). Fluorometric Method for Rapid Detection of DNA Strand breaks in Human White Blood Cells Produced by low Dose of Radiation. *Cancer Res* **41**, 1889-92.

16. Boreham, D.R., Gale, K.L., Maves, S.R., Walker, J.A. and Harrison, D.P. (1996). Radiation-Induced Apoptosis in Human Lumphocytes : Potential as a biological dosimeter. *Health Phys.* **71**, 685-91.

17. Siles E, Villalobos M, Lones L, Guewero R, Eady JJ, Valenzuela MT, et al. (1998). Apoptosis after gamma irradiation. Is it an important cell death modality? *Br J Cancer* 78, 1594-9918.

18. Gorczyca, W., Bigman, K., Mittleman, A., Ahmed, T., Gong, J., Melamed, M.R., Darzynkiewicz, Z. (1993a). Induction of DNA strand breaks associated with apoptosis during treatment of leukemias. *Leukemia* 7, 659-70.

19. Boreham DR, Gale Kl, Maves SR, Walker JA, Morison DP. (1996). Radiation- induced apoptosis in human lymphocytes: potential as a biological dosimeter. *Health Physics* 71, 685-99

20. พิสุทธ์ ปามุทา, (2543). ศึกษาอะพอพโตสิสในเซลล์เม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกที่ได้รับรังสีรักษา. คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย : กรุงเทพฯ.

อภิธานศัพท์

IC_{50}	medium (50 %) inhibitory concentration
DNA	deoxyribonucleic acid
Bp	base pair
FADU	fluorescence analysis of DNA unwinding
TdT	terminal deoxynucleotidyl transferase
UV	ultraviolet
nm	nanomole
%	percentage
$^{\circ}C$	degree celsius
μm	micrometre
CO_2	carbondioxide
ml	millilitre
μl	microlitre
μg/ml	microgram per millilitre
mg/ml	milligram per millilitre
S.D.	standard deviation

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อผู้วิจัย	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปัทมา ลิ้วนิช Associate Professor Dr. Pathama Leewanich
ตำแหน่งและสถานที่ทำงานปัจจุบัน	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2525	ปริญญาตรี สาขาพยาบาล มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
พ.ศ. 2531	ปริญญาโท สาขาเภสัชวิทยา มหาวิทยาลัยมหิดล
พ.ศ. 2541	ปริญญาเอก สาขา Pharmacology, Toyama Medical and Pharmaceutical University

ประสบการณ์ในการวิจัย

1. Pharmacological studies on Thai medicinal plants
2. Studies on mechanism of drug action using receptor expressing model in frog oocytes

ผลงานวิจัย

1. Leewanich, P., Tohda, M., Matsumoto, K., Subhadhirasakul, S., Takayama, H., Aimi, N. and Watanabe, H. (1996) Behavioral studies on alkaloids extracted from the leaves of *Hunteria zeylanica*. Biol Pharm Bull 19:394-399.
2. Leewanich, P., Tohda, M., Matsumoto, K., Subhadhirasakul, S., Takayama, H., Aimi, N. and Watanabe, H. (1997) Inhibitory effects of corymine, an alkaloidal component from the leaves of *Hunteria zeylanica*, on glycine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. Eur J Pharmacol 332:321-326.
3. Leewanich, P., Tohda, M., Matsumoto, K., Subhadhirasakul, S., Takayama, H., Aimi, N. and Watanabe, H. (1998) A possible mechanism underlying corymine inhibition of glycine-induced chloride current in *Xenopus* oocytes. Eur J Pharmacol 348:271-277.
4. Leewanich, P., Tohda, M., Matsumoto, K., Subhadhirasakul, S., Takayama, H., Aimi, N. and Watanabe, H. (1998) Inhibitory effects of corymine-related compounds, indole alkaloids, on glycine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. Jpn J Pharmacol 77:169-172.
5. Luankosolchai R, Phivthong-ngam L, Leevanich P, Hnuklab S, Nontakanun S. The study of effects of Royal Jelly on the platelets function of coronary heart disease patients in vitro. *Srinakharinwirot R&D J* 1995; 9: 26-38.

ประวัติการรับทุน

พ.ศ. 2528- 2529 Fellowship for Graduate Students, Mahidol University

พ.ศ. 2530 The King Prajadhipok and Queen Rambrai Barni Memorial Foundation

พ.ศ. 2538- 2541 Monbusho's Scholarship

พ.ศ. 2543 ทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ มหาวิทยาลัยศรี-นครินทรวิโรฒ

พ.ศ. 2544 ทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยศรี-นครินทรวิโรฒ