เคอร์คูมินอยด์แอนาลอกเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิส ในเซลล์มะเร็งกลัยโอบลาสโทมาเพาะเลี้ยง

ศศิธร วรรณอุดม

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชากายวิภาคศาสตร์
พฤษภาคม 2559
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง “เคอร์คูมินอยด์แอนาลอกเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งกลัยโอบลาสโทมาเพาะเลี้ยง”

ของ นางสาวศศิธร วรรณอุดม

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชากายวิภาคศาสตร์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(รองศาสตราจารย์ ดร. พรพรหม ย่อยสูงเนิน)

.....ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ดร. วัชรี เที่ยงอยู่)

.....กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ดร. ดามรัศมน สุรางกูร)

.....กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก / ภายใน
(ดร. อิทธิพล พวงเพชร)

อนุมัติ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศักดิ์ชัย วิทยาอารีย์กุล)
รองคณบดีฝ่ายวิจัยและวิเทศสัมพันธ์ ปฏิบัติราชการแทน
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

13 พ.ค. 2559

ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในความกรุณาของ ดร.วัชรี เที่ยงอยู่ ซึ่งเป็นประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้อนุเคราะห์สละเวลาอันมีค่ามาเป็นที่ปรึกษา พร้อมทั้งคอยให้การสนับสนุนและคำแนะนำด้วยความเอาใจใส่มาโดยตลอดระยะเวลาการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และทั้งนี้ขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการวิทยานิพนธ์อันประกอบไปด้วย รองศาสตราจารย์ ดร.พรพรหม ย่อยสูงเนิน ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ดร.ดามรัศมน สุรางกูร กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร.อิทธิพล พวงเพชร กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์และทรงคุณค่า

กราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.อภิชาต สุขสำราญ และคณะ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์สารเคอร์คูมินอยด์แอนาลอก ที่ใช้ในการศึกษาตลอดโครงการวิจัย

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ได้สนับสนุนเงินทุนวิจัยให้กับโครงการวิจัยนี้ดำเนินงานจนสำเร็จลุล่วง

เหนือสิ่งอื่นใดขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวของผู้วิจัยที่เป็นแรงบันดาลใจที่ดียิ่ง และให้การสนับสนุนในทุก ๆ ด้านอย่างดีที่สุดเสมอมา

คุณค่า และคุณประโยชน์อันพึงจะมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบ และอุทิศแด่ครอบครัว มหาวิทยาลัยนเรศวร คณาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกๆ ท่าน

ศศิธร วรรณอุดม

Hoechst 33342 พบว่า Cur15 ส่งผลต่อเซลล์ในลักษณะการตายแบบ apoptosis และทำให้เซลล์สูญเสีย mitochondrial membrane potential (MMP) จากการย้อมด้วย JC-1 ส่วนในการศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบ apoptosis ด้วยเทคนิค western blot พบว่ากลุ่ม Cur15 ร่วมกับ TMZ มีผลลดการแสดงออกของ anti-apoptotic protein Bcl-2 และเพิ่มการแสดงออกของ pro-apoptotic protein Bax อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากผลดังกล่าวจึงสรุปได้ว่า curcuminoid analog มีผลชักนำการตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงได้ดี โดยเฉพาะเมื่อให้ร่วมกับ temozolomide ดังนั้นจึงน่าจะได้มีการนำ curcuminoid analog ไปพัฒนาเป็นยาเคมีบำบัดเพื่อรักษามะเร็งสมองชนิดกลัยโอบลาสโทมาในมนุษย์ต่อไป

Title	CURCUMINOID ANALOG INDUCED APOPTOSIS IN HUMAN GLIOBLASTOMA CELL LINE (T98G)
Author	Sasithorn Wanna-udom
Advisor	Watcharee Tiangyou, Ph.D.
Co - Advisor	Damratsamon Surangkul, Ph.D.
Academic Paper	Thesis M.S. in Anatomy, Naresuan University, 2015
Keywords	Glioblastoma, Curcuminoid analog, Temozolomide, Anticancer, Apoptosis

ABSTRACT

Glioblastoma (GBM) is the most common of malignant brain tumor. Temozolomide is commonly used as chemotherapy for GBM after surgery but it usually cause many side effects and drug resistance in a long period. Curcuminoid analogs (Cur) are the synthetic derivative of curcuminoids (turmeric extract from *Curcuma longa* L.) which have been shown anticancer property greater than parent compounds. Therefore, this study aimed to examine the anticancer effect of Cur on human glioblastoma cell line (T98G cells) and to compare with its parent compound. The cell viability was assessed by MTT assay, among the studies of 20 curcuminoid analogs, Cur15 exhibited the most anticancer activity which decreased cell viability in a concentration-dependent manner with the IC_{50} values of 31.28 µM. Interestingly, co-treatment of Cur15 (20 µM) and TMZ (200 µM) significantly increased anticancer property ($p < 0.05$) by reducing 12% and 52% of cell viability in comparison with Cur15 or TMZ treatment alone, respectively. While co-incubation of Cur1 (40 µM) and TMZ (200 µM) resulted in decreasing 12% and 28% of cell viability when compared with Cur1 or TMZ treatment alone, respectively. Thus, this study indicated that Cur15 and TMZ co-treatment significantly increased anticancer effect better than Cur15 or TMZ treatment alone and its parent compound (Cur1). The morphological changes of cell death were shown apoptotic characteristics when detected by the Hoechst 33342 staining.

Apoptosis was associated with a dissipation of mitochondrial membrane potential determined by using JC-1 dye. Proteins involved with apoptosis were measured by western blotting. Cur and TMZ co-treatment group significantly repressed the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 ($p < 0.05$) and induced the expression of pro-apoptotic protein Bax ($p < 0.05$) when compared with Cur or TMZ treatment alone. In conclusion, curcuminoid analog (Cur15) induced apoptosis in T98G cells especially when applied with temozolomide. Therefore, the curcuminoid analog might be developed as an effective chemotherapeutic drug for the treatment of glioblastoma.

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**	1
	ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
	จุดมุ่งหมายของการศึกษา	4
	ขอบเขตของงานวิจัย	4
	สมมติฐานของการวิจัย	4
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
	Glioblastoma multiforme	6
	อะพอพโทซิส (Apoptosis)	12
	Temozolomide (TMZ)	18
	ขมิ้นชัน (Turmeric, *Curcuma longa* Linn.)	24
3	วิธีดำเนินการวิจัย	37
	รูปแบบการวิจัย	37
	เซลล์เพาะเลี้ยง (Cell culture)	37
	เทคนิคการศึกษาวิจัย	38
	ศึกษาการมีชีวิตรอดของเซลล์ (cell viability) ด้วยวิธี MTT assay	38
	ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis ด้วยการย้อม Hoechst 33342 staining	39
	ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ Mitochondrial membrane potential (MMP) ด้วย JC-1 assay	40
	ศึกษาหาปริมาณโปรตีนด้วย Bradford protein assay	41
	ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน ด้วยวิธี Western Blot Technique	42

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	วิธีศึกษาการวิจัย.....	42
	การศึกษาความเป็นพิษของ DMSO ต่อ T98G cells โดยเทคนิค MTT assay.....	42
	การศึกษาผลของ curcuminoid analogs ต่อการตายของ T98G cells โดยวิธี MTT assay.....	43
	การศึกษาผลของ curcuminoid analog และสารต้นแบบ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการตายของ T98G cells โดยเทคนิค MTT assay..	43
	การศึกษาผลของ temozolomide (TMZ) ต่อ T98G cells โดยเทคนิค MTT assay.....	44
	การศึกษาผลการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งระหว่าง TMZ ร่วมกับ Cur1 และ TMZ ร่วมกับ Cur15 ต่อ T98G cells โดยเทคนิค MTT assay.....	44
	การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis ด้วยวิธี Hoechst 33342 staining.....	44
	การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ mitochondrial membrane potential (MMP) ด้วย JC-1 assay.....	45
	การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบ apoptosis.....	45
	การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (Statistical analysis).....	47
4	ผลการวิจัย.....	48
	ความเป็นพิษของตัวทำละลาย DMSO ต่อ T98G cells.....	48
	ผลของ curcuminoid analogs ต่อการตายของ T98G cells.....	50
	ผลของ curcuminoid analog และสารต้นแบบ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการตายของ T98G cells.....	53
	ผลของ temozolomide ต่อการตายของ T98G cells.....	56

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	ผลการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งร่วมกันระหว่าง curcuminoid analog และ temozolomide ต่อ T98G cells.....	58
	ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ของ T98G cells.....	61
	ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ mitochondrial membrane potential (MMP) ใน T98G cells.....	65
	ผลของ curcuminoid analog ร่วมกับ temozolomide ต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบ apoptosis ใน T98G cells.....	67
5	บทสรุป.....	72
	สรุปผลการวิจัย.....	72
	อภิปรายผลการวิจัย.....	73
บรรณานุกรม.....		78
ภาคผนวก.....		97
ประวัติผู้วิจัย.....		100

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

1 แสดงผลของ curcuminoid analogs 1-10 ต่อการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง T98G cells 51

2 แสดงผลของ curcuminoid analogs 11-20 ต่อการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง T98G cells 52

สารบัญภาพ

ตาราง		หน้า
1	แสดงภาพถ่าย MRI ในผู้ป่วยเพศชายอายุ 28 ปี ด้วย low-grade astrocytoma..	7
2	แสดงภาพถ่าย MRI ในผู้ป่วย high-grade astrocytoma.....	7
3	แสดงการกลายพันธุ์ของยีนใน primary และ secondary glioblastoma.....	10
4	แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ apoptosis.....	13
5	แสดงโครงสร้างของกลุ่มโปรตีน Bcl-2 Family.....	14
6	แสดงวิถีการเกิด apoptosis ผ่าน intrinsic และ extrinsic pathway.....	17
7	แสดงโครงสร้างของ temozolomide.....	18
8	แสดงโครงสร้างจากวิถี metabolism ของ temozolomide.....	20
9	แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของ temozolomide ต่อเซลล์มะเร็ง.....	23
10	แสดงลักษณะเหง้าและผงของขมิ้นชัน.....	25
11	แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารหลักที่พบใน curcuminiods.....	26
12	แสดงโครงสร้างทางเคมีของ curcumin ที่เป็นรูปแบบ diketone และ keto-enol..	27
13	แสดงการดูดซึมของ curcumin หลังได้รับโดยการกิน.....	29
14	แสดงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของ curcumin โดยกระบวนการทางชีวภาพ.....	30
15	แสดงคุณสมบัติของ curcumin ยับยั้งกระบวนการต่าง ๆ ของการเกิดมะเร็ง.....	34
16	แสดงคุณสมบัติการต้านมะเร็งของ curcumin โดยผ่านหลายกลไก.....	35
17	แสดงโครงสร้างของสารที่เป็นอนุพันธ์ของ curcumin.....	36
18	แสดงการเปลี่ยนโครงสร้างของสาร MTT เป็น formazan โดยเอนไซม์ mitochondrial reductase.....	38
19	แสดงสีของ formazan crystal หลังถูกละลายด้วย DMSO.....	39
20	แสดงการติดสีเรืองแสงใน nucleus ของเซลล์จากการย้อมด้วย Hoechst 33342	40
21	แสดงหลักการและการติดสีย้อมของ JC-1 dye.....	41
22	แสดงหลักการของ western blot analysis.....	42

สารบัญภาพ (ต่อ)

ตาราง		หน้า
23	แสดงผลความเป็นพิษของ DMSO ต่อ T98G cells.....	49
24	แสดงผลของ Cur1 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการตายของ T98G cells.....	54
25	แสดงผลของ Cur15 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการตายของ T98G cells.....	55
26	แสดงผลของ TMZ ต่อการตายของ T98G cells.....	57
27	แสดงผลการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งร่วมกันระหว่าง Cur1 และ TMZ ต่อ T98G cells.....	59
28	แสดงผลการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งร่วมกันระหว่าง Cur15 และ TMZ ต่อ T98G cells.....	60
29	แสดงผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางด้าน morphology ของ T98G cells ภายใต้กล้อง phase-contrast microscope.....	62
30	การศึกษาการตายแบบ apoptosis ใน T98G cells จากการย้อมด้วย Hoechst 33342 ศึกษาภายใต้กล้อง fluorescent microscope.....	63
31	แสดงผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ mitochondrial membrane potential ของ T98G cells.....	66
32	แสดงผลของ Cur1 ร่วมกับ TMZ ต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบ apoptosis ใน T98G cells.....	68
33	แสดงผลของ Cur15 ร่วมกับ TMZ ต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบ apoptosis ใน T98G cells.....	70
34	แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Cur1 และ Cur15.....	77
35	แสดงผลการเหนี่ยวนำการเกิด apoptosis ซึ่งมีวิถีผ่าน mitochondria เป็นศูนย์กลาง (intrinsic pathway) ของ curcuminoid analog ร่วมกับ TMZ ต่อเซลล์มะเร็งกลัยโอบลาสโทมาเพาะเลี้ยง (T98G).....	77

อักษรย่อ

AD	=	Alzheimer's disease
AGT	=	O^6-alkylguanine DNA alkyltransferase
AIC	=	4-amino-5-imidazole-carboxamide
Apaf-1	=	Apoptotic protease activating factor 1
ATCC	=	American Type Culture Collection
Bad	=	Bcl-2-associated death promoter
Bax	=	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	=	B-cell/lymphoma 2
BBB	=	Blood-brain barrier
BER	=	Base excision repair
CCCP	=	Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone
CT	=	Computed Tomography scan
Cur	=	Curcuminoid analog
DISC	=	Dead-inducing signaling complex
DMSO	=	Dimethyl sulfoxide
DSB	=	double-strand breaks
ECL	=	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	=	Ethylenediaminetetra acetic acid
EGFR	=	Epidermal growth factor receptor
FADD	=	Fas-associated dead domain
FasL	=	Fas ligand
GBM	=	Glioblastoma
IC_{50}	=	Inhibitory Concentration 50%
iNOS	=	Inducible nitric oxide synthase
JC-1	=	(5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolylcarbo-cyanine iodide)
mg	=	Milligram

อักษรย่อ (ต่อ)

MGMT	=	Methylguanine-DNA-methyltransferase
MMP	=	Mitochondrial membrane potential
MMR	=	Mismatch repair
MPT	=	Mitochondrial permeability transition
MRI	=	Magnetic Resonance Imaging
MTIC	=	Monomethyl 5-triazinoimidazole carboxamide
MTT	=	(3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium
NF-κB	=	Nuclear factor κB
nm	=	Nanometer
O_2-	=	Superoxide anion
OOP	=	Outer mitochondrial membrane
PBS	=	Phosphate buffer saline
PVDF	=	Polyvinylidene fluoride
ROS	=	Reactive oxygen species
SPSS	=	Statistical Package for the Social Sciences
SSE	=	Single-strand breaks
THC	=	Tetrahydrocurcumin
TMA	=	Temozolomide acid
TMZ	=	Temozolomide
TNF-α	=	Tumor necrosis factor
TNFR	=	Tumor necrosis factor receptor
TRAIL	=	TNF-related apoptosis inducing ligand
µl	=	Microliter
µM	=	Micromolar
WHO	=	World Health Organization

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา

Glioblastoma หรือ Glioblastoma multiforme (GBM) เป็นมะเร็งสมองชนิดร้ายแรงและพบมากที่สุดในมะเร็งสมองประเภท primary brain tumors ของมนุษย์ (Bleeker, et al., 2012; Ostrom, et al., 2014) โดย GBM จัดเป็นมะเร็งสมองระยะที่ 4 ซึ่งพัฒนาเปลี่ยนแปลงมาจากเซลล์ค้ำจุน astrocytes (grade IV astrocytoma) อุบัติการณ์ของการเกิด GBM คิดเป็น 45.6% ของ primary malignant brain tumors (Ostrom, et al., 2014) สามารถเกิดขึ้นได้กับทุกเพศทุกวัย การเกิดโรคในเพศชายจะสูงกว่าในเพศหญิงด้วยอัตราส่วน 3:2 และประมาณ 60% ของผู้ป่วยทั้งหมดอยู่ในช่วงอายุ 55-74 ปี (Brandes, et al., 2008) และอุบัติการณ์การเกิด GBM มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี (Lönn, et al., 2004) เนื่องจาก GBM เป็นมะเร็งชนิด malignant glioma ที่มีขอบเขตไม่ชัดเจน และเซลล์มีการเจริญอย่างรวดเร็ว หากผู้ป่วยไม่ได้รับการรักษามักจะเสียชีวิตในเวลาอันรวดเร็ว จากการสำรวจในชาวยุโรปและอเมริกันพบว่า ผู้ป่วยจะมีระยะเวลาการมีชีวิตรอดที่ 1, 3 และ 5 ปี อยู่ที่อัตราส่วน 30%, 5% และ 3% ตามลำดับ (Stewart, 2002) ถึงแม้ว่า GBM จะเป็นมะเร็งสมองชนิดร้ายแรงที่ไม่พบการแพร่กระจายไปยังนอกสมอง แต่มีความรุนแรงถึงชีวิตได้ เนื่องจากก้อนเนื้องอกทำลาย กดเบียดเนื้อสมอง ส่งผลต่อการทำงานที่ผิดปกติทางระบบประสาท ได้แก่ อาการชัก การประมวลผลทางระบบประสาท และระบบสั่งการการเคลื่อนไหวช้าลง หรืออาจสูญเสียหน้าที่ไป สูญเสียความทรงจำ เกิดความบกพร่องทางสติปัญญา การใช้ชีวิตประจำวันตามปกติก็มีโอกาสได้รับปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิด GBM ซึ่งในบางครั้งอาจไม่สามารถหลีกเลี่ยงได้ เช่น การติดเชื้อไวรัส HHV-6 และ cytomegalovirus (Chi, et al., 2012) การดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ (Baglietto, et al., 2011) การได้รับควันบุหรี่ การได้รับสารโพลีไวนิลคลอไรด์ที่นิยมใช้ในการก่อสร้าง และการติดเชื้อมาลาเรีย หรือมีพาหะนำโรค ซึ่งสามารถนำเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุการเกิด GBM ได้ (Wrensch, et al., 2002) เป็นต้น

วิธีการรักษา glioblastoma ทำได้โดยการผ่าตัดเพื่อนำเอาก้อนเนื้อออกให้ได้มากที่สุด แต่ก็ยังคงมีส่วนของเซลล์มะเร็งหลงเหลือ หรืออาจแพร่กระจายไปยังบริเวณอื่นของสมอง ดังนั้นในการรักษาจึงจำเป็นต้องใช้รังสีรักษาร่วม (radiation) หรือมีการใช้ยาเคมีบำบัดเสริม (chemotherapy) หรือรังสีเคมีบำบัด (radiochemotherapy) เพื่อไปกำจัดเซลล์มะเร็งที่ยัง

หลงเหลืออยู่ แม้ว่าจะมีความก้าวหน้าในการศัลยกรรมประสาท แต่การมีชีวิตรอดของผู้ป่วยหลังจากได้รับการรักษาโดยเฉลี่ยยังคงน้อยกว่า 1 ปี (Johnson and O'Neill, 2012) อีกทั้งการเลือกใช้เคมีบำบัดยังมีข้อจำกัด กล่าวคือ ยาเคมีบำบัดส่วนใหญ่ไม่สามารถผ่าน blood brain barrier (BBB) และยาบางชนิดมีกระบวนการ metabolism ผ่านตับ ทำให้ประสิทธิภาพของยาลดลง นอกจากนี้ หากมีการใช้ยาไปเป็นระยะเวลานานจะเกิดภาวะดื้อยาขึ้น ขณะเดียวกัน การใช้รังสีรักษาก็มีอันตรายต่อเนื้อสมองปกติข้างเคียงและเป็นเหตุให้เกิดมะเร็งขึ้นได้ใหม่ (Wrensch, et al., 2002)

Temozolomide (TMZ) เป็นยาเคมีบำบัดสำหรับการรักษาโรคมะเร็งได้หลายชนิด และได้รับความสนใจมากที่สุด เนื่องจากเป็นยากินและมีผลข้างเคียงต่ำกว่ายาเคมีบำบัดชนิดอื่น TMZ มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic nature เมื่อรับเข้าสู่ร่างกายโดยการกิน ไม่จำเป็นต้องผ่านกระบวนการ metabolism ภายในตับ สามารถซึมผ่านเนื้อเยื่อได้ดี และสามารถผ่าน BBB ได้ ดังนั้น จึงเป็นเหตุที่ทำให้ TMZ เป็นที่นิยมนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการรักษาโรคมะเร็งสมอง GBM (Denny, et al., 1994) แต่เมื่อใช้ TMZ ในการรักษาไปเป็นระยะเวลายาวนาน โดยธรรมชาติของมะเร็งจะมีกลไกที่ดื้อต่อยา จำเป็นต้องมีการเพิ่มขนาดมากขึ้น เพื่อให้ตอบสนองต่อการรักษา เป็นผลให้เกิดผลข้างเคียงที่รุนแรงเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน (Vecht, et al, 2003) ดังนั้นจึงมีนักวิจัยสนใจศึกษาหาสารอื่นมาออกฤทธิ์ร่วมกับ TMZ เพื่อลดปริมาณของการใช้ยา ลดผลข้างเคียงจากยาและช่วยเสริมฤทธิ์ในการต้านมะเร็งอย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น จากงานวิจัยล่าสุด พบว่าการใช้ curcumin ร่วมกับ TMZ ส่งผลต่อ DNA-damage ใน C6, U251MG และ U87MG cell lines ได้ดีกว่าการใช้ curcumin หรือ TMZ อย่างเดียว (Zanotto-Filho, et al., 2015)

Curcuminoids เป็นสารสกัดที่พบในขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn. หรือ Turmeric) ประกอบด้วยสารสำคัญ 3 ชนิด ได้แก่ curcumin 76.0%, demethoxycurcumin 20.2% และ bisdemethoxycurcumin 3.8% (Changtam, et al., 2010) ซึ่ง curcumin เป็นองค์ประกอบหลักที่มีมากที่สุด จากการศึกษาในหลอดทดลอง พบว่า curcumin มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย เช่น ในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) ต้านมะเร็ง (anticancer) ต้านการติดเชื้อ และภาวะ oxidative stress (Jaisin, et al., 2011; Park et al., 2008) เป็นต้น และยังมีรายงานทั้งในหนู และมนุษย์พบว่า การดูดซึมของ curcumin จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อรับพร้อมกับสาร piperine ซึ่งเป็นสารองค์ประกอบที่พบในพริกไทย (Shoba, et al., 1998) และยังมีการศึกษาวิจัยพบว่า curcumin ยังมีคุณสมบัติช่วยเสริมฤทธิ์เพิ่มประสิทธิภาพการต้านมะเร็งร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิดต่าง ๆ เช่น ใช้ร่วมกับ 5-fluorouracil (5-FU) ในการต้านมะเร็งลำไส้

ใหญ่ (Shakibaei, et al., 2013) และเสริมฤทธิ์ร่วมกับ TMZ ในการเพิ่มการตายของเซลล์มะเร็ง GBM (Dilnawaz and Sahoo, 2013) ยังมีการศึกษาวิจัยมากมายในเซลล์มะเร็ง พบว่า curcumin สามารถเหนี่ยวนำเซลล์มะเร็งให้เกิดการตายแบบ apoptosis ซึ่งถือได้ว่าเป็นกลไกที่สำคัญของคุณสมบัติการต้านมะเร็ง เช่น curcumin สามารถกระตุ้นการตายแบบ apoptosis โดยผ่าน intrinsic pathway ในมะเร็งต่อมลูกหมาก (Shankar and Srivastava, 2007) มะเร็งปากมดลูก (Singh and Singh, 2009) กระตุ้นผ่าน extrinsic pathway ในมะเร็งกระดูกอ่อน (Lee, et al., 2012) และกระตุ้นผ่านทั้ง 2 วิถีของ apoptosis ในมะเร็ง GBM (Karmakar, et al., 2006)

อย่างไรก็ตาม curcumin เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ ไม่เสถียร และมีความไวต่อแสง จึงได้มีการสังเคราะห์เป็นสารอนุพันธ์ (curcuminoid analogs) ขึ้นมากมาย ถูกนำไปใช้ในการทดลองต่าง ๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของผลการวิจัย โดยมีผลการทดสอบพบว่า curcuminoid analogs มีความเสถียรกว่าและมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งได้ดีกว่าสารต้นแบบ (curcuminoid compounds) (Tamvakopoulos, et al., 2007) ในขณะเดียวกัน กลุ่มวิจัยของศาสตราจารย์ ดร.อภิชาต สุขสำราญ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหงได้สังเคราะห์อนุพันธ์มากมายหลายโครงสร้างที่เป็น metabolites ของ curcuminoid compounds จากการนำสารต้นแบบมาปรับแต่งโครงสร้าง เพื่อให้มีความเสถียร คงทนและเพิ่มประสิทธิภาพของผลการศึกษาได้มากยิ่งขึ้น จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจอย่างยิ่งที่จะนำ analogs เหล่านี้มาใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

งานวิจัยนี้มีความสนใจศึกษาบทบาทของ curcuminoid analogs ต่อการตายของ human glioblastoma (T98G) cells เมื่อเทียบกับสารต้นแบบ รวมทั้งศึกษาผลการออกฤทธิ์ร่วมกับยาเคมีบำบัด หากได้ผลการยับยั้งมะเร็งที่ดี สามารถนำไปพัฒนาต่อไป และประยุกต์ใช้ในการรักษาได้จริง จะช่วยทำให้ลดปริมาณของการใช้ยาเคมีบำบัดลง ซึ่งสามารถลดผลข้างเคียงจากยาต่อผู้ป่วย และช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายในการรักษาได้อีกมาก อีกทั้งยังเป็นการช่วยให้ผู้มีรายได้น้อย หรือฐานะยากจนสามารถเข้าถึงการรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นด้วย

จุดมุ่งหมายของการศึกษา

1. เพื่อทดสอบหาสารเคอร์คูมินอยด์แอนาลอกที่สามารถต้านเซลล์มะเร็งสมองเพาะเลี้ยง human glioblastoma (T98G) ได้ดี

2. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารเคอร์คูมินอยด์แอนาลอกกับสารต้นแบบและการนำมาใช้ร่วมกันกับยาเคมีบำบัดทีโมโซโลไมด์ในการต้านเซลล์มะเร็งสมองเพาะเลี้ยง human glioblastoma (T98G)

3. เพื่อทดสอบสมมติฐานกลไกในการต้านเซลล์มะเร็งสมองเพาะเลี้ยง human glioblastoma (T98G) ของเคอร์คูมินอยด์แอนาลอก

ขอบเขตของงานวิจัย

ในการศึกษาวิจัยนี้เป็น *in vitro* study ที่ทำการศึกษาผลของเคอร์คูมินอยด์และเคอร์คูมินอยด์แอนาลอกจำนวน 20 สาร ต่อการตายของเซลล์มะเร็งสมองชนิดกลัยโอบลาสโทมาเพาะเลี้ยง (Human glioblastoma cell line; T98G) เพื่อหาสารที่มีคุณสมบัติที่ดีที่สุดในการต้านมะเร็ง โดยศึกษาการตายของเซลล์ผ่านกระบวนการ apoptosis และยังศึกษาผลการต้านมะเร็งเมื่อให้ร่วมกับยาเคมีบำบัด temozolomide ในการวิจัยได้ตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางรูปลักษณ์สัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้อง phase-contrast microscope รวมทั้งศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ nucleus ด้วยการย้อม Hoechst 33342 ทดสอบ mitochondrial membrane potential โดยวิธีการย้อมด้วย JC-1 dye และศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องในกลไกการตายแบบ apoptosis ด้วยเทคนิค western blot analysis

สมมติฐานของการวิจัย

curcuminoid analogs ซึ่งเป็น metabolites ของ curcumin จึงมีความเสถียรกว่า และมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง (anticancer) ได้ดีกว่า curcumin จะสามารถช่วยเสริมฤทธิ์กับยาเคมีบำบัด temozolomide ในการเพิ่มประสิทธิภาพการต้านมะเร็งในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง human glioblastoma (T98G cells) โดยเหนี่ยวนำให้เซลล์มีลักษณะการตายแบบ apoptosis

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. การสร้างองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับฤทธิ์การต้านมะเร็ง human glioblastoma ของสาร curcuminoid analogs

2. การสร้างองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับผลการออกฤทธิ์ร่วมกันของ curcuminoid analog กับ temozolomide ในการเพิ่มการตายของ human glioblastoma (T98G cells)

3. นำผลการศึกษาไปพัฒนาองค์ความรู้ทางวิทยาศาสตร์ให้สมบูรณ์ เพื่อใช้คุณประโยชน์จากสมุนไพรตามธรรมชาติในการรักษามะเร็ง glioblastoma โดยใช้ทดแทน หรือใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัด temozolomide ได้จริง ทั้งนี้จะสามารถช่วยให้ลดขนาดยา ผลข้างเคียงจากยาเคมีบำบัดและค่าใช้จ่ายในการรักษาได้

บทที่ 2

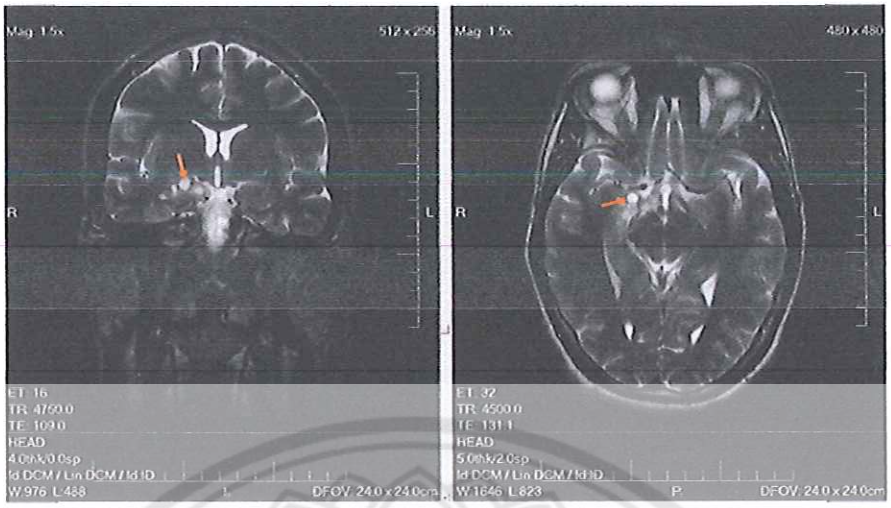
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Glioblastoma multiforme

Glioblastoma multiforme (GBM; malignant glioma) เรียกชื่อตามองค์การอนามัยโลกว่า glioblastoma เป็นมะเร็งสมองชนิดร้ายแรงสุดที่เกิดขึ้นบ่อย และพบมากที่สุดในบรรดา primary brain tumors ในมนุษย์ (Ostrom, et al., 2014) เป็นลักษณะ highest-grade form จากการเปลี่ยนแปลงของ astrocytes หรือ glial precursor คิดเป็น 52% ของ functional tissue brain tumor cases ทั้งหมด และคิดเป็น 20-25% ของ malignant nervous system tumours (Bleeker, et al., 2012)

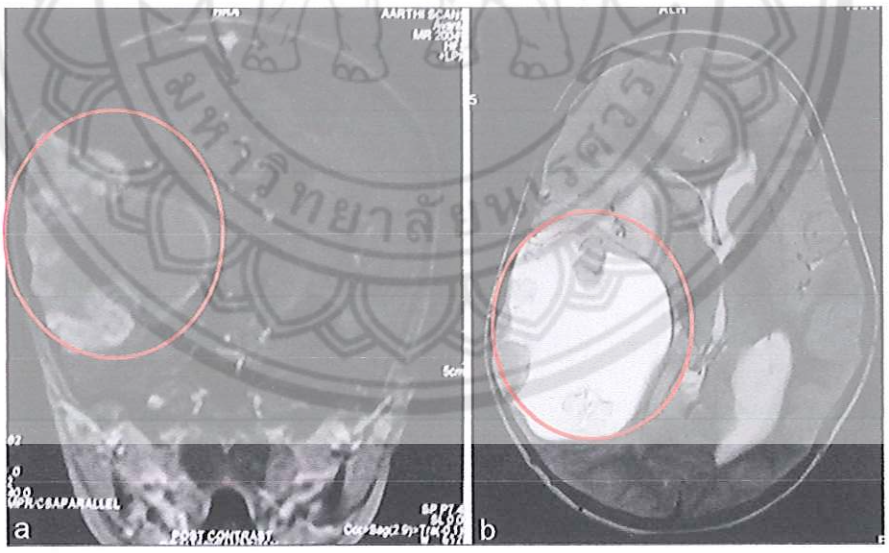
Astrocytes

Astrocytes หรือ astroglia เป็นเซลล์ค้ำจุนชนิดที่มีมากสุดในระบบประสาทส่วนกลาง โดยมีรูปลักษณะ star-shaped ตัวเซลล์จะยื่น processes ไปสัมผัสกับเซลล์ประสาท (neurons) และหลอดเลือดที่มาเลี้ยงสมอง ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งใน blood brain barrier ดังนั้น จึงมีบทบาทหน้าที่ เช่น ควบคุมการส่งสัญญาณไฟฟ้าภายในสมอง คอยคัดกรองสารอาหารและออกซิเจนให้กับเซลล์ประสาท เป็นต้น (Bélanger, et al., 2011) การเปลี่ยนแปลงไปของเซลล์ astrocytes สามารถกลายเป็นมะเร็ง astrocytoma ซึ่งแบ่งตามความรุนแรงได้เป็น 4 ระยะ (grade) ด้วยกัน (Buckner, et al., 2007) ได้แก่ ระยะที่ 1 (grade I) และ ระยะที่ 2 (grade II) จัดอยู่ในระดับ low-grade astrocytoma ลักษณะรอยโรคมีขนาดเล็ก ขอบเขตชัดเจน ไม่มีการกระจายตัวของเซลล์ สามารถทำการผ่าตัดออกมาได้หมด ดังแสดงในภาพ 1 ขณะที่ ระยะที่ 3 (grade III) และ ระยะที่ 4 (grade IV) จัดอยู่ในระดับ high-grade astrocytoma มีลักษณะรอยโรคขนาดกว้าง ไม่มีขอบเขตที่ชัดเจน การแพร่กระจายตัวเป็นไปอย่างรวดเร็ว ไม่สามารถผ่าตัดเนื้อร้ายออกได้หมด ในการรักษาจึงให้รังสี และยาเคมีบำบัดร่วมหลังการผ่าตัด ดังแสดงในภาพ 2 ซึ่ง GBM จัดอยู่ในระยะที่ 4 ของ astrocytoma หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า grade IV astrocytoma (Bleeker, et al., 2012)



ภาพ 1 แสดงภาพถ่าย MRI ในผู้ป่วยเพศชายอายุ 28 ปี ด้วย low-grade astrocytoma ลูกศรชี้แสดงลักษณะรอยโรค

ที่มา: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:MRI_glioma_28_yr_old_male.JPG



ภาพ 2 แสดงภาพถ่าย MRI ในผู้ป่วย high-grade astrocytoma และวงกลมแสดงลักษณะรอยโรค

ที่มา: ดัดแปลงจาก Cugati, et al., 2012

อุบัติการณ์ของ Glioblastomas (GBM)

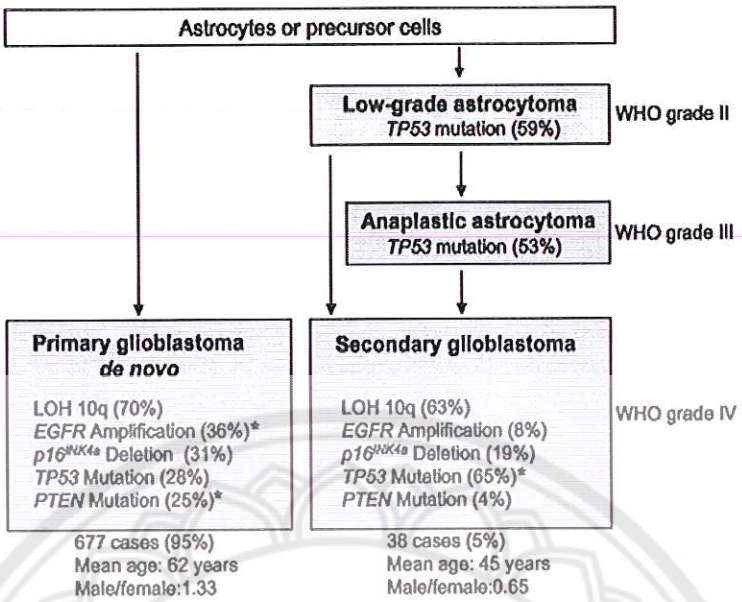
อุบัติการณ์การเกิด GBM ในชาวยุโรปและอเมริกาเหนือพบว่ามีประมาณ 2-3 คน ในประชากร 100,000 คน (Bleeker, et al., 2012) GBM สามารถเกิดขึ้นได้กับทุกเพศทุกวัยและการเกิดโรคในเพศชายสูงกว่าในเพศหญิงด้วยอัตราส่วน 3:2 จากกรณีศึกษาผู้ป่วย astrocytic หรือ oligodendroglial tumor ทั้งหมด 987 cases ในรัฐซูริกประเทศสวิสเซอร์แลนด์ ช่วงปี ค.ศ. 1980 ถึง 1994 ตรวจพบผู้ป่วยมะเร็งประเภท GBM มากที่สุดถึง 680 cases คิดเป็น 69.0% ของทั้งหมด โดยแบ่งตามช่วงอายุออกเป็นอายุน้อยกว่า 39 ปี 6.9% ช่วง 40-49 ปี 12.5%, 50-59 ปี 21.1%, 60-69 ปี 29.9%, 70-79 ปี 22.1% และมากกว่า 80 ปี 7.6% ซึ่งมีอายุโดยเฉลี่ยที่ 62.2 ± 613.4 ปี (Ohgaki and Kleihues, 2005) และจากข้อมูลทางสถิติตั้งแต่ปี 2007-2011 ใน Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States (CBTRUS) รายงานว่า มีอัตราเฉลี่ยของผู้ป่วย GBM อยู่ที่ 3.19 ในประชากร 100,000 คน และคิดเป็นร้อยละ 45.6 ของ primary malignant brain tumors อีกทั้งยังพบ glioma malignant เกิดขึ้นกับเด็กช่วงอายุ 0-19 ปี สูงถึง 11.7% (Ostrom, et al., 2014) จากการศึกษาเกี่ยวกับแนวโน้มอุบัติการณ์ของ primary intracerebral tumors ในเดนมาร์ก ฟินแลนด์นอร์เวย์ และสวีเดน พบว่าในช่วงปี 1969-1998 อัตราการเกิดโรคของผู้ป่วยมีแนวโน้นเพิ่มขึ้น (Lönn, et al., 2004) และยังมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในอนาคต นอกจากนี้ ได้มีการศึกษาวินิจฉัยและจัดจำแนกประเภทของมะเร็งสมองในระบบประสาทส่วนกลางของผู้ป่วยในโรงพยาบาลพยาธิวิทยาประเทศสิงคโปร์ ช่วงปี 1994-1998 พบประเภทผู้ป่วย GBM มี 9.3% ของผู้ป่วยทั้งหมด (Das, et al., 2000) สำหรับในประเทศไทยมีการรายงานอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งสมองที่ค่อนข้างน้อย โดยมีรายงานครั้งแรกตั้งแต่ปี 1974 และต่อมาในปี 2003 ได้มีการรายงานจากกรณีศึกษาระหว่างปี 1993-2002 ของวัยเด็กที่เป็นมะเร็งสมองจากโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ พบว่า เป็นผู้ป่วย primary brain tumor มี 185 คน ซึ่งเสียชีวิต 16 คน เหลืออีก 169 คน และมีอายุเฉลี่ยที่ 7 ปี โดยเป็นผู้ป่วย malignant astrocytoma ถึง 14 คน (Likasitwattanakul, et al., 2011)

พยาธิสรีรวิทยา

Glioblastoma สามารถแบ่งออกเป็น primary glioblastoma multiforme หรือ primary GBM และ secondary glioblastoma multiforme หรือ secondary GBM (Brandes, et al., 2008) primary GBM หรือ เรียกว่า *de novo* เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงโดยตรงของ astrocytes หรือ glial precursor cells ในลักษณะ single-step malignant transformation คิดเป็น 95% ของ

ผู้ป่วย ส่วนใหญ่เกิดขึ้นกับผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่า 50 ปี การพัฒนากลายเป็น primary GBM ใช้เวลาไม่เกิน 3 เดือนหลังจากแสดงอาการทางคลินิกเกิดขึ้น ส่วน secondary GBM คิดเป็น 5% ของผู้ป่วย (Ohgaki, et al., 2004) ส่วนใหญ่เกิดขึ้นกับผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า 45 ปี หรือเรียกว่าเป็น progressive glioblastoma โดยผ่านกระบวนการ progression จาก low-grade (WHO grade II) หรือ anaplastic astrocytomas (WHO grade III) (Kleihues and Ohgaki, 1999; Kleihues, et al., 2002) ระยะเวลาที่ใช้ในการ progression ของ secondary GBM ค่อนข้างยาวนาน ตั้งแต่น้อยกว่า 1 ปีถึงมากกว่า 10 ปี โดยมีช่วงเวลาเฉลี่ย 4-5 ปี

GBM ทั้ง 2 subtypes นี้ มีการเจริญผ่าน genetic pathways ที่ต่างกัน โดย Brandes, et al. ได้รวบรวมสรุปไว้ดังในภาพ 3 เช่น การเกิด loss of heterozygosity (LOH) ทำให้สูญเสียหน้าที่การทำงานของยีนต้านมะเร็ง การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมชนิดนี้พบได้บ่อยที่สุดใน GBM ประมาณ 60-90% ซึ่งพบใน primary GBM 70% และ secondary GBM 63% (Brandes, et al., 2008) การเกิด *Epidermal growth factor receptor* (*EGFR*) amplification ในมะเร็งชนิดต่าง ๆ จะส่งผลให้ receptor ทำงานโดยการเติมหมู่ฟอสเฟตตลอดเวลา โดยไม่จำเป็นต้องมี epidermal growth factor มาจับที่ receptor จะทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วผิดปกติไป ซึ่งส่งผลให้เซลล์นั้นกลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด (Bhargava, et al., 2005) การแสดงออกของการกลายพันธุ์ในยีนนี้จะพบมากใน primary GBM (36%) นอกจากนี้ ยังพบการกลายพันธุ์ใน tumor suppressor gene ต่าง ๆ ที่ทำหน้าที่เป็นยีนต้านมะเร็ง เช่น $p16^{INK4a}$ deletion พบใน primary GBM 31% และ พบใน secondary GBM 19% (Brandes, et al., 2008) *Phosphatase and tensin homolog* (*PTEN*) mutations ส่วนใหญ่พบใน primary GBM ถึง 32% และพบ 4% ใน secondary GBM (Tohma, et al., 1998) *p53* mutation ซึ่งพบใน secondary GBM (65%) มากกว่า ใน primary GBM (28%) (Ohgaki, et al., 2004) เป็นต้น ความหลากหลายของการกลายพันธุ์ในยีนต่าง ๆ ใน primary GBM และ secondary GBM ได้ส่งผลกระทบต่อผู้ป่วยในทุกเพศ ทุกวัย และแนวโน้มของการพยากรณ์โรคที่ยากขึ้น รวมทั้งการตอบสนองต่อการบำบัดรักษาที่ต่างกันออกไป



ภาพ 3 แสดงการกลายพันธุ์ของยีนใน primary และ secondary glioblastoma

ที่มา: Brandes, et al., 2008

ปัจจัยเสี่ยง

ปัจจัยเสี่ยงสำหรับ primary brain tumors ได้แก่ การสัมผัสกับรังสีรักษา ได้รับสาร vinyl chloride ยาฆ่าแมลง การทำงานในโรงงานผลิตยางสังเคราะห์ โรงงานกลั่นน้ำมันปิโตเลียม เป็นต้น การที่เคยได้รับรังสีบำบัดสำหรับรักษาโรคมะเร็งถือได้ว่าเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งสมองที่ชัดเจน แน่นอน และพบบ่อยที่สุด (Wrensch, et al., 2002) จากการศึกษาหนึ่งแสดงให้เห็นว่า มีความชุกสูงถึง 17% ในผู้ป่วย GBM เคยได้รับการรักษาด้วยการฉายรังสีมาก่อน และยังมีอีกหลายการศึกษาได้รายงานว่า ความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งสมองเพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยที่เคยได้รับการฉายรังสีรักษาโรค leukemia ตั้งแต่สมัยวัยเด็ก (Brandes, et al., 2008) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยเสี่ยงจากการได้รับสารในบุหรี่ การสัมผัสกับสนามแม่เหล็กไฟฟ้า สารฟอร์มาลดีไฮด์ (formaldehyde) (Wrensch, et al., 2002) รวมทั้งการใช้โทรศัพท์เคลื่อนที่ตั้งแต่ 10 ปีขึ้นไป สอดคล้องกับการเกิดความเสี่ยงที่เพิ่มมากขึ้นใน glioma และ neuroma (Hardell, et al., 2007) จากกรณีศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับการเกิด central nervous system cancers ในผู้ป่วย 154 ราย จาก 72 ครอบครัว แสดงให้เห็นว่า ในครอบครัวที่เป็น primary brain tumors โดยไม่จำเป็นต้องเป็นโรคที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม

การวินิจฉัย และวิธีการรักษา

ผู้ป่วยมะเร็งสมองส่วนใหญ่จะพบแพทย์ด้วยลักษณะอาการเบื้องต้น คือ ปวดศีรษะ คลื่นไส้อาเจียน อ่อนเพลีย อาการชัก หรืออาการที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของสมองในรูปแบบต่าง ๆ แต่ในส่วนมาก ผู้ป่วยที่มาพบแพทย์ ก็ต่อเมื่อมีอาการทรุดลงอย่างรวดเร็ว และมีความรุนแรงทางอาการเพิ่มมากขึ้น เมื่อถึงเวลานั้น รอยโรคได้กำเริบ เกิดการลุกลาม จนเข้าสู่ระยะที่ 4 ของการเกิด GBM อีกทั้งยังไม่มีวิธีป้องกัน หรือขั้นตอนเบื้องต้นที่เป็นไปได้สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งสมอง (Brandes, et al., 2008) เนื่องจาก GBM เป็นมะเร็งชนิด malignant glioma ที่มีขอบเขตไม่ชัดเจน และเซลล์มีการเจริญอย่างรวดเร็ว ดังนั้น วิธีที่นิยมใช้ในการวินิจฉัยโรคคือ ภาพเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ (Computed Tomography scan; CT) เป็นการตรวจหาความผิดปกติโดยฉายลำแสงเอกซ์ และให้คอมพิวเตอร์สร้างภาพขึ้นมา สำหรับอีกวิธีหนึ่งคือ ภาพถ่ายคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (Magnetic Resonance Imaging; MRI) โดยอาศัยหลักการของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าในการสร้างภาพ กำหนดขอบเขตของรอยโรค ซึ่งสามารถให้รายละเอียดภาพที่คมชัดกว่า CT scan

อุบัติการณ์ของ high-grade glioma พบได้ร้อยละ 75 ของ glioma ทั้งหมด และหากผู้ป่วยไม่ได้รับการรักษามักจะเสียชีวิตในเวลาอันรวดเร็ว การผ่าตัดเป็นการรักษาหลักมีวัตถุประสงค์เพื่อยืนยันผลทางพยาธิวิทยา และตัดก้อนมะเร็งออกให้ได้มากที่สุด โดยให้มีผลข้างเคียงต่อการทำงานของระบบประสาทให้น้อยที่สุด ลักษณะวิธีของการผ่าตัดก้อนเนื้อยังมีผลต่อระยะเวลาการรอดชีวิตของผู้ป่วยได้อีกด้วย ซึ่งระยะเวลาโดยเฉลี่ยของการมีชีวิตรอดของผู้ป่วยที่ทำการผ่าตัดด้วยลักษณะ total resection, partial resection และ biopsy อยู่ที่ 11.3, 10.4 และ 6.6 เดือน ตามลำดับ ภายหลังจากได้รับการผ่าตัด มักใช้ยาเคมีบำบัดเป็นการรักษาเสริม (adjuvant treatment) โดยยาเคมีบำบัดจะไปกำจัดเซลล์มะเร็งที่หลงเหลืออยู่ เพื่อป้องกันการกำเริบเฉพาะที่ และป้องกันการแพร่กระจายของโรค ยาเคมีบำบัดนั้น ๆ ควรมีประสิทธิภาพ กล่าวคือ มีการตอบสนองของก้อนมะเร็งต่อยาเคมีบำบัดพอสมควร แต่น่าเสียดายที่การใช้ยาเคมีบำบัดในการรักษา malignant glioblastoma มักมีประสิทธิภาพไม่ดีนัก เนื่องจากยาเคมีบำบัดส่วนใหญ่ไม่สามารถผ่าน blood brain barrier (BBB) ได้ และยาบางชนิดมี metabolism ผ่าน enzyme P450 ในตับ ผู้ป่วยมะเร็งสมองจะมีอาการชัก จึงอาจได้รับยากันชักร่วมด้วย เช่น phenytoin ซึ่งยาได้ทำปฏิกิริยากับยาเคมีบำบัด ทำให้ระดับยาเคมีบำบัดในร่างกายไม่สูงพอที่จะทำลายเซลล์มะเร็งได้ และเมื่อรักษาด้วยยาเคมีบำบัดไปเป็นเวลานานจนทำให้เซลล์มะเร็งดื้อยา ไม่ตอบสนองต่อการรักษา จึงต้องมีการเพิ่มขนาดยามากขึ้น เป็นผลให้เกิดผลข้างเคียงที่รุนแรงขึ้นเช่นกัน (Gilbert, et al., 2003; Vecht, et al., 2003) นอกจากนี้ ยังมีการฉายรังสีร่วมหลังการผ่าตัด

หรือร่วมกับยาเคมีบำบัด รังสีรักษามีบทบาทสำคัญในการเพิ่มอัตราการควบคุมโรคเฉพาะที่ และเพิ่มระยะเวลาการรอดชีวิตจาก 4-5 เดือน ในรายที่ ได้รับการผ่าตัดอย่างเดียว เป็น 9-12 เดือน ในรายที่ได้รับรังสีรักษาหลังผ่าตัด เพิ่มขึ้นจาก 12.1 เดือน ในรายที่ได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด temozolomide หลังผ่าตัด เป็น 14.6 เดือน ในรายที่ ได้รับรังสีเคมีบำบัด และอัตราการรอดชีวิตที่ 2 ปี เพิ่มขึ้นจาก 10.4% เป็น 26.5% (Stupp, et al., 2005) แต่อย่างไรก็ตาม การให้รังสีรักษาในปริมาณที่ไม่เหมาะสม หรือใช้รักษาเป็นเวลานาน จะส่งผลกระทบต่อเนื้อเยื่อปกติที่อยู่บริเวณข้างเคียงกับเซลล์มะเร็งที่ถูกฉายรังสี จึงเป็นเหตุทำให้การเกิดมะเร็งซ้ำขึ้นได้ในอนาคต

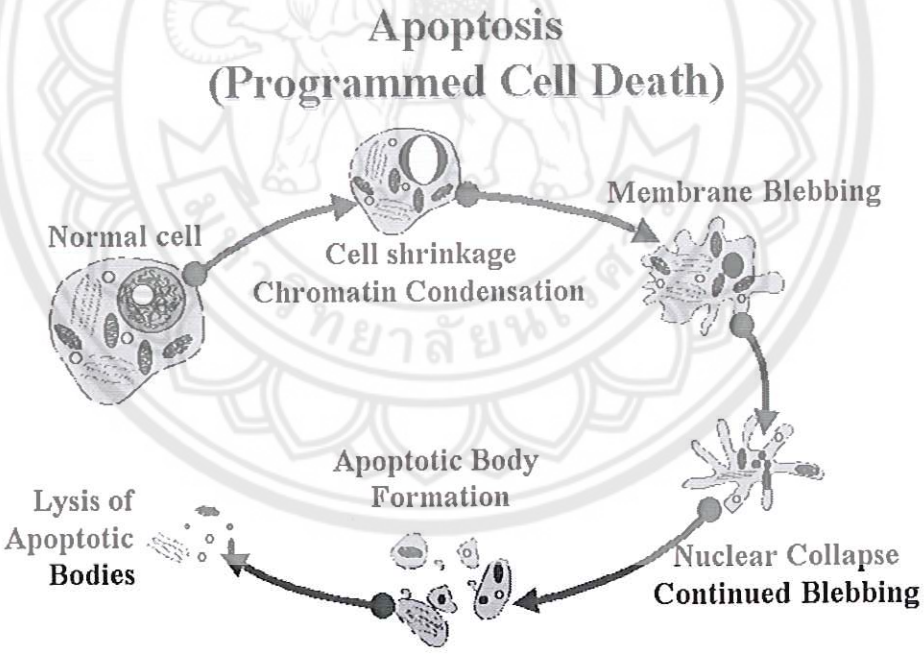
Glioblastoma (GBM) เป็นมะเร็งชนิดร้ายแรงที่สุดในบรรดามะเร็งสมอง ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ แม้ว่าจะมีความก้าวหน้าในการศัลยกรรมประสาทจากการผ่าตัด (surgery) หรือการฉายรังสี (radiation) หรือการใช้เคมีบำบัด (chemotherapy) หรือรังสีเคมีบำบัด (radiochemotherapy) แต่การมีชีวิตรอดของผู้ป่วยหลังจากได้รับการรักษาโดยเฉลี่ยยังคงน้อยกว่า 1 ปี (Avgeropoulos and Batchelor, 1999)

อะพอพโทซิส (Apoptosis)

อะพอพโทซิส (apoptosis) เป็นรูปแบบการตายหนึ่งของเซลล์ที่ เกิดขึ้นได้ในสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ และเป็นการตายที่เกิดขึ้นได้ตามปกติในการบวนการพัฒนาการเจริญเติบโตของของสิ่งมีชีวิต และเพื่อรักษาความสมดุล (homeostasis) ของประชากรเซลล์ในเนื้อเยื่อ หากมีการทำงานของระบบ apoptosis ที่ไม่เหมาะสม จะนำไปสู่การเกิดพยาธิสภาพของโรคชนิดต่างๆ เช่น ในกรณีที่มีการกระตุ้น apoptosis มากเกินไป ทำให้เกิดโรคภูมิคุ้มกันทำลายตนเอง (autoimmune disease) โรคความเสื่อมทางระบบประสาท (neurodegenerative disease) และถ้าหากเกิดความบกพร่องของ apoptosis จนสูญเสียการทำหน้าที่ไป ซึ่งนำไปสู่การเกิดโรคมะเร็ง (cancer) (Elmore, 2007; Thompson, 1995) นอกจากนี้ apoptosis ยังเป็นกลไกของการป้องกันกำจัดเซลล์ที่มีคุณสมบัติไม่เหมาะสมที่จะอยู่ต่อไปได้ด้วย เช่น ในปฏิกิริยาภูมิคุ้มกัน หรือป้องกันเมื่อเซลล์ได้รับความเสียหายจากโรค หรือสารเคมี (Norbury and Hickson, 2001) เซลล์ที่มีการกลายพันธุ์ (mutation) ซึ่ง apoptosis จะป้องกันไม่ให้เซลล์ที่ผิดปกติเจริญไปเป็นเซลล์มะเร็ง ในภาวะปกติของแต่ละวัน คนเราจะมีจำนวนเซลล์ประมาณ 10 พันล้านเซลล์ที่ตายไปด้วยกระบวนการ apoptosis และสามารถเพิ่มปริมาณการตายขึ้นได้ในระหว่างที่ร่างกายมีการเจริญพัฒนาการ หรือเกิดการเสื่อมชราภาพ หรือการเกิดโรค (Elmore, 2007)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์อะพอพโทซิส (Morphology of apoptosis)

การตายของเซลล์แบบ apoptosis ถูกตั้งชื่อขึ้นมาครั้งแรกในปี ค. ศ. 1972 โดย Kerr, Wyllie and Currie เพื่อใช้ในการอธิบายถึงลักษณะการตายของเซลล์ที่มีรูปลักษณ์สัณฐานที่เปลี่ยนแปลงไปในหลายรูปแบบ (Kerr, et al., 1972) สามารถศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง หรือกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Hacker, 2000) โดยขั้นตอนเบื้องต้นของการเกิดกระบวนการ apoptosis แสดงดังภาพ 4 ได้แก่ เซลล์มีการอัดแน่น และหดเล็กลง (cell shrinkage) กลุ่มของ chromatins หดสั้นอัดแน่นติดอยู่กับผนังของนิวเคลียส (pyknosis) เป็นลักษณะเด่นที่สุดของ apoptosis เกิดการแตกตัวออกของเยื่อหุ้มนิวเคลียส (karyorrhexis) เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการโป่งพองเป็นกระเปาะ (blebbing หรือ budding) สุดท้ายเซลล์จะแตกออกชิ้นเล็ก ๆ ซึ่งมีเยื่อหุ้มเซลล์มาห่อหุ้ม (apoptotic bodies) และถูกกำจัดด้วยกระบวนการ phagocytosis โดย phagocytic cells (Elmore, 2007) ซึ่งจะไม่เกิดปฏิกิริยาการอักเสบ หรือเป็นอันตรายต่อเซลล์ และเนื้อเยื่อข้างเคียง (Majno and Joris, 1995)

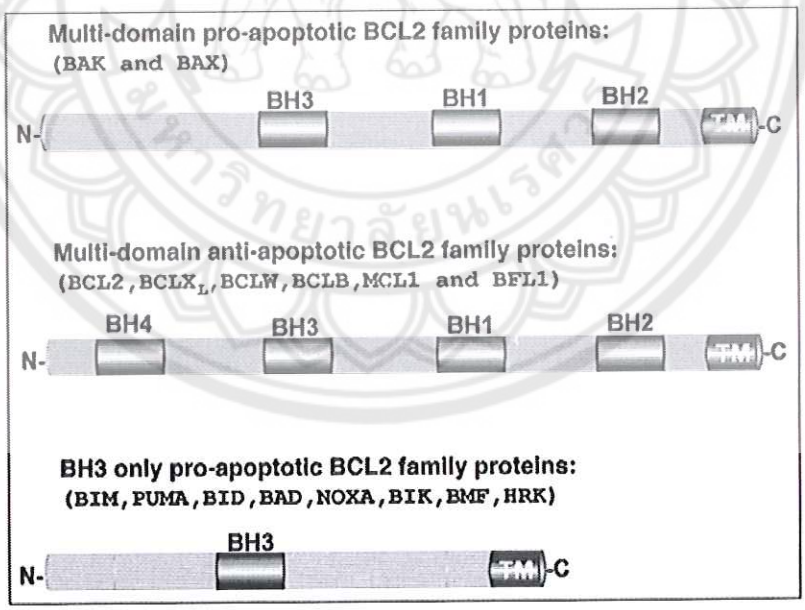


ภาพ 4 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ apoptosis

ที่มา: https://www.quora.com/What-role-does-apoptosis-play-in-metamorphosis

กลุ่มโปรตีน Bcl-2 (Bcl-2 Family)

B-cell lymphoma protein 2 (Bcl-2) เป็นกลุ่มโปรตีนที่มีบทบาทควบคุมกระบวนการ apoptosis โดยผ่าน mitochondria เป็นศูนย์กลาง (Gross, 2001) โดย Bcl-2 family จะควบคุมการซึมผ่านของ apoptogenic factors (cytochome *c*, AIF, Smac/Diablo, pro-caspase) จาก mitochondria สู่ cytoplasm (Green, 2000; Martinou and Green, 2001; Tsujimoto and Shimizu, 2000; Zamzami and Kroemer, 2001) กลุ่มโปรตีนใน Bcl-2 family มีลักษณะโครงสร้างเป็น Bcl-2 homology (BH) domains (BH1, BH2, BH3 และ BH4) (Adams and Cory, 2001) อีกทั้งยังมีส่วนของ *C*-terminal hydrophobic domain ทำให้เพิ่มคุณสมบัติการยึดเกาะที่เยื่อหุ้มชั้นนอกของ mitochondria (Gross, 2001) Bcl-2 family ประกอบด้วยกลุ่มโปรตีนย่อยอีก 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มโปรตีนต้านการเกิด apoptosis (anti-apoptotic proteins) เช่น Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1 (Bfl-1) และ Boo เป็นต้น กลุ่มโปรตีนเหนี่ยวนำการเกิด apoptosis (Pro-apoptotic proteins) เช่น Bax, Bak, Bad, Mtd (Bok) และ Diva เป็นต้น และกลุ่ม pro-apoptotic BH3 domain-only proteins เช่น Bid, Bad, Bim เป็นต้น (Schmitz, et al., 2000; Tsujimoto and Shimizu, 2000) แสดงดังภาพ 5



ภาพ 5 แสดงโครงสร้างของกลุ่มโปรตีน Bcl-2 Family ที่ประกอบด้วย Bcl-2 homology (BH) domains และ *C*-terminal hydrophobic domain (TM)

ที่มา: Dai, et al., 2016

วิถีการเกิด Apoptosis

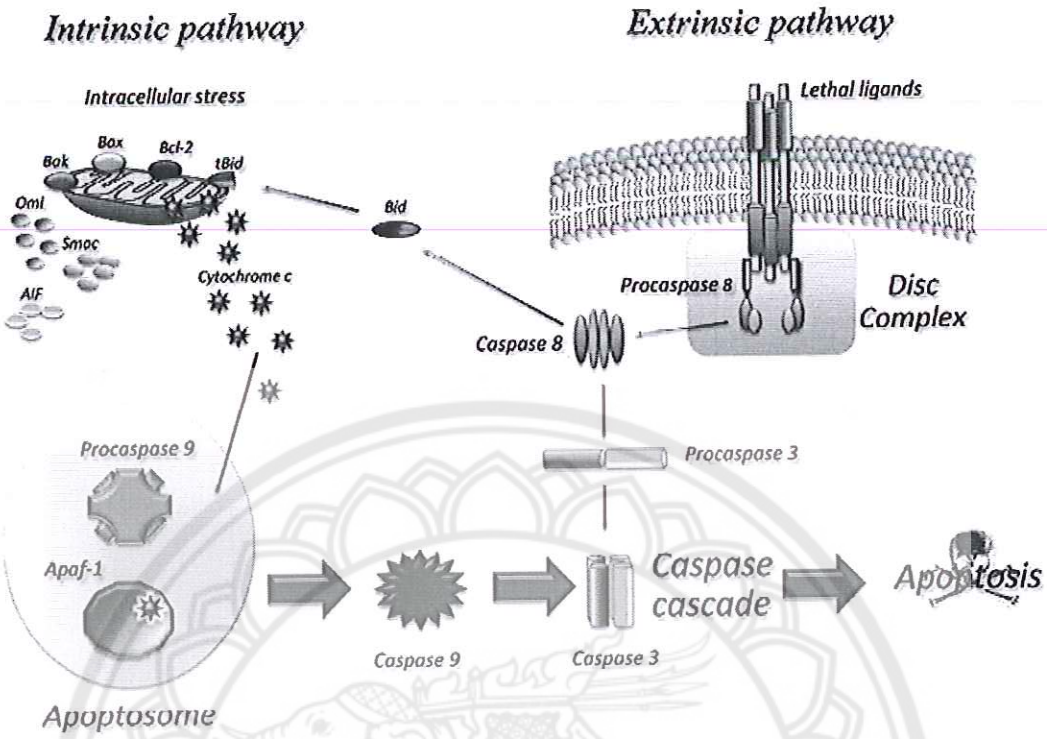
Apoptosis เป็นกลไกการตายของเซลล์ที่มีความซับซ้อนสูง ขึ้นอยู่กับการใช้พลังงานในระดับโมเลกุล (Elmore, 2007) ถูกควบคุมโดยยีนหลายตัว และเกิดขึ้นเมื่อมีสัญญาณเชื่อมโยงภายในเซลล์ (cascade of cell signaling) ซึ่งอาศัยเอนไซม์ caspase เป็นตัวกลาง (caspase-mediated events) ทำหน้าหลักเกี่ยวข้องในกระบวนการ apoptosis โดยมี pro-apoptotic protein เป็นโปรตีนชักนำการตาย และ anti-apoptotic proteins เป็นโปรตีนทำหน้าที่ยับยั้งการตาย วิถีการเหนี่ยวนำ apoptosis เกิดขึ้นได้ 2 วิถีหลัก ได้แก่ วิถีภายนอก (Extrinsic pathway) และวิถีภายใน (Intrinsic pathway) (Indran, 2011)

1. Death receptor pathway (Extrinsic pathway)

Extrinsic pathway หรือ extrinsic receptor mediated death pathway เป็นวิถีภายนอกที่ได้รับการกระตุ้นจากการจับของ ligands ที่จำเพาะต่อ death receptors (DRs) บนพื้นผิวของผนังเซลล์ (Scaffidi, et al., 1998) เช่น tumor necrosis factor receptor (TNFR), TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) receptors (TRAILR1 หรือ DR4 และ TRAILR2 หรือ DR5) และ Fas receptor (FasR) เป็นต้น ตัวรับเหล่านี้จะจับกับ ligands อย่างจำเพาะด้วยส่วนของ extracellular domain และส่วนของ intracellular domain ที่อยู่ภายในเซลล์จะทำหน้าที่เป็น death domain ซึ่งเป็นส่วนที่ตอบสนอง และส่งสัญญาณการตายจากผิวเซลล์เข้าไปยังในเซลล์ (Ashkenazi and Dixit, 1998) เกิดการกระตุ้นรวมกลุ่มกันของ adaptor protein และ initiator caspase (procaspase-8) กลายเป็นโครงสร้าง death-inducing signaling complex (DISC) (Kischkel, et al., 1995) จากนั้นกระตุ้น procaspase-8 กลายเป็น caspase-8 ไปกระตุ้น caspase-3 ซึ่งเป็น effector caspases ตัวสุดท้ายในการส่งสัญญาณเริ่มขบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis ต่อไป (Clarke, et al., 2004; Hengartner, 2000) แสดงดังภาพ 8 นอกจากนี้ กระบวนการกระตุ้นเอนไซม์ caspases ยังส่งผลต่อความเสียหายของ mitochondria ได้ด้วย เกิดการรั่วออกของกลุ่ม death amplifying proteins ซึ่งมีผลทำให้เกิด death signal ขึ้นภายในเซลล์ (Fesus, et al., 1991; Schultz and Harrington, 2003)

2. Mitochondrial-mediated pathway (Intrinsic pathway)

Intrinsic pathway เป็นวิถีภายในที่มีการกระตุ้นผ่าน mitochondria เป็นศูนย์กลาง กระบวนการนี้เกิดขึ้นเมื่อเซลล์ได้ความเสียหายจากสิ่งเร้าต่าง ๆ เช่น รังสี สารอนุมูลอิสระ สารพิษ การติดเชื้อไวรัส ภาวะเลือดขาดออกซิเจน (Elmore, 2007; Indran, et al., 2011) เป็นต้น สิ่งกระตุ้นเหล่านี้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเยื่อหุ้มของ mitochondria เนื่องจากหลังการกระตุ้น เกิดการเคลื่อนย้ายของโปรตีน Bax ซึ่งเป็นกลุ่ม pro-apoptotic proteins จาก cytoplasm มาสู่เยื่อหุ้มชั้นนอกของ mitochondria (Wolter, et al., 1997) ทำให้สูญเสีย mitochondrial transmembrane potential และ mitochondrial permeability transition (MPT) pore เปิดออก เกิดการรั่วไหลของ cytochrome c ออกมาจาก mitochondria ไปยัง cytoplasm แล้วจับกับ apoptotic protease activating factor (Apaf-1) และ procaspase-9 อยู่ในโครงสร้างที่เรียกว่า apoptosome (Chinnaiyan, 1999; Hill, et al., 2004; Ortiz, 2012) ทำให้ procaspase-9 ถูกกระตุ้นกลายเป็น caspase-9 ซึ่งทำหน้าที่ กระตุ้น caspase-3 ต่อไป และหลังการกระตุ้นการทำงานของ caspase-3 จะนำไปสู่ chromatin condensation, DNA fragmentation ซึ่งเป็นสัญญาณเริ่มต้นของการเกิด apoptosis ในขณะเดียวกัน หลังจากที่เซลล์ได้รับการกระตุ้น ยังมีกลุ่มโปรตีน anti-apoptotic proteins เช่น Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL เป็นต้น ได้เคลื่อนที่มาสู่ mitochondria ทำหน้าที่ป้องกันการเกิด apoptosis ซึ่งตรงข้ามกับกลุ่ม pro-apoptotic proteins เพิ่มสร้างความสมดุลของการควบคุมการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยผ่าน mitochondria เป็นศูนย์กลาง (Tsujimoto, 2003) แสดงดังภาพ 6



ภาพ 6 แสดงวิถีการเกิด apoptosis ผ่าน intrinsic และ extrinsic pathway

ที่มา: Favaloro, et al., 2012

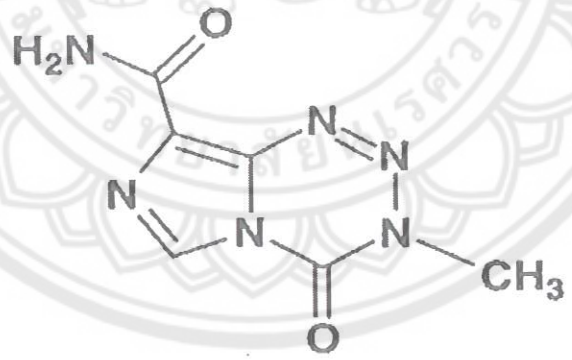
Apoptosis กับการเกิดมะเร็ง

การบกพร่องของกระบวนการ apoptosis สามารถนำไปสู่การเกิดมะเร็ง (Elmore, 2007; Thompson, 1995; Lowe and Lin, 2000) ในมะเร็งมีความทนทานต่อ apoptosis เนื่องจากมีการแสดงออกของโปรตีน anti-apoptotic proteins เช่น Bcl-2 ที่เพิ่มขึ้น (Elmore, 2007) และลดการแสดงออก หรือเกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ของโปรตีน pro-apoptotic proteins เช่น Bax จากการศึกษาใน human B cell lymphoma พบว่าเกิด overexpression ของ Bcl-2 ซึ่งเป็นหลักฐานสำคัญที่สุดของการบ่งชี้ถึงการตายของเซลล์ที่บกพร่องไป ส่งผลให้เกิดมะเร็งใน human B cell lymphoma (Vaux, et al., 1988) ในทางตรงกันข้าม พบการเกิด mutation และสูญเสียการทำงานของ Bax ใน colon cancer และ hematopoietic malignancies (Meijerink, et al., 1998; Rampino, et al., 1997) การแสดงออกของโปรตีนทั้ง Bcl-2 และ Bax ได้ถูกควบคุมโดยยีน *p53* (tumor suppressor gene) (Miyashita, et al., 1994) ซึ่งเป็น transcription factor ที่มีบทบาทสำคัญในวัฏจักรของเซลล์ และสั่งการให้เกิด apoptosis (Hainaut, 1995) จากการศึกษาความ

บกพร่องของ apoptosis ในมะเร็งนานาชนิด พบว่ามักเกิดจาก mutation ในยีน *p53* และ mutation ในยีนนี้พบมากที่สุดของการเกิดมะเร็งในมนุษย์ (Wang and Harris, 1997) ในผู้ป่วย GBM เกิดการ mutation ของ *p53* ยีน ประมาณ 25-40% และพบใน secondary GBM (65%) มากกว่า ใน primary GBM (28%) (Ohgaki, et al., 2004)

Temozolomide (TMZ)

Temozolomide (TMZ; 3,4-dihydro-3methyl-4-oxoimidazo[5,1-d]-as-tetrazine-8-carboxamide) มีชื่อทางการค้าว่า Temodar หรือ Temodal หรือ Temcad เป็นสารที่มีลักษณะเป็นผงสีขาว สีน้ำตาลอ่อน หรือสีชมพูอ่อนที่มีสูตรโมเลกุล $C_6H_6N_6O_2$ แสดงดังภาพ 7 น้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 194.151 g/mol มีจุดเดือดอยู่ที่ 212 °C (414 °F) โมเลกุลจะเสถียรในสภาวะเป็นกรด pH น้อยกว่า 5 และไม่คงที่ในสภาวะ pH มากกว่า 7 ด้วยเหตุนี้ TMZ จึงสามารถให้ได้โดยการกิน และฉีดเข้าเส้นเลือดดำ เป็นยาเคมีบำบัดตัวแรกที่ได้รับการอนุมัติให้ใช้สำหรับการรักษามะเร็งชนิด high-grade malignant gliomas มาเป็นระยะเวลามากกว่า 20 ปี (Agarwala and Kirkwood, 2000)



ภาพ 7 แสดงโครงสร้างของ temozolomide

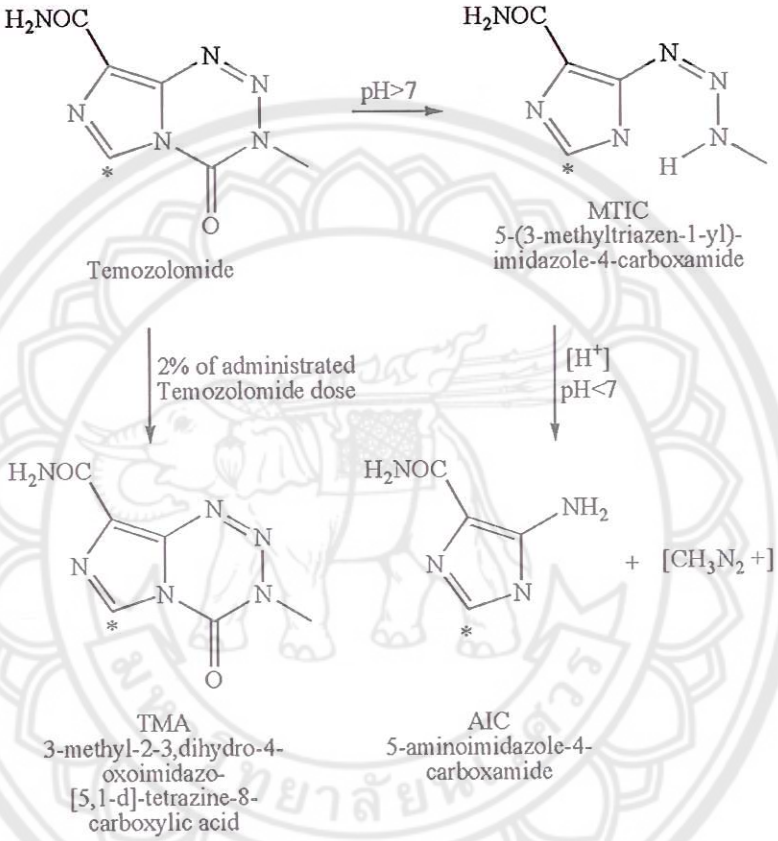
ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Agarwala and Kirkwood, 2000

เมตาบอลิซึมของ temozolomide

Temozolomide (TMZ) ได้รับการพัฒนาสร้างขึ้นในช่วงปี ค. ศ. 1980 โดย Malcolm Stevens, et al. ในมหาวิทยาลัย Aston ใน Birmingham ประเทศอังกฤษ TMZ เป็นยาเคมีบำบัดในกลุ่ม alkylating agent อนุพันธ์ของ imidazotetrazine และเป็น prodrug ที่ถูก metabolized ไปเป็น monomethyl 5-triazinoimidazole carboxamide (MTIC) ซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์ (active form) (Stevens and Newlands, 1993) ตารางการให้ยา TMZ ในการรักษาทางคลินิกโดยทั่วไปจะให้วันละครั้ง ติดต่อกัน 5 วัน ในทุก 4 สัปดาห์ (Dhodapkar, et al., 1997) เมื่อ TMZ เข้าสู่ร่างกายโดยการกิน จะถูกดูดซึม และขับออกอย่างรวดเร็ว ซึ่งไม่จำเป็นต้องผ่านกระบวนการ metabolism จากเอนไซม์ cytochrome P450 ภายในตับ (Tsang, et al., 1991) เนื่องจาก TMZ สามารถถูก hydrolyzed โดยธรรมชาติในสภาวะ pH ปกติของร่างกาย (Stupp, et al., 2001) กระบวนการสลาย TMZ ไปเป็น MTIC และสลาย MTIC ไปเป็น 4-amino-5-imidazole-carboxamide (AIC) กับสารที่เป็น methyl-diazonium cation นั้น ขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงของสภาวะความเป็นกรด-เบส (pH-dependent) และอยู่ในลักษณะปฏิกิริยาที่ไม่สามารถผันกลับได้ (irreversible) (Baker, et al., 1999) โดย TMZ มีความเสถียรใน aqueous buffers ที่ pH < 5 แต่จะสลายตัวไปอย่างรวดเร็วเป็น MTIC ที่ pH > 7 ในทางตรงกันข้าม MTIC จะเสถียรใน alkaline pH และสลายเป็น AIC อย่างรวดเร็วที่ pH < 7 นอกจากนี้ยังมีปริมาณของ TMZ เพียง 2% ที่ถูก metabolized ไปเป็น temozolomide acid (TMA) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ในรูป carboxylic acid ของ TMZ (Tsang, et al., 1990) กระบวนการเมตาบอลิซึมของ TMZ ไปเป็น products ตัวอื่น ดังแสดงในภาพ 8 สุดท้าย TMZ จะถูกขับออกในน้ำปัสสาวะ อยู่ในรูปของ TMZ ที่ไม่เปลี่ยนรูป 5.5%, AIC 11.9%, TMA 2.3% และสารประกอบมีขั้วที่ไม่ปรากฏชื่อ 17% (Baker, et al., 1999)

จากการศึกษาการกระจายตัวในพลาสมา (plasma) และถูกขับออกทางน้ำปัสสาวะ (urine) ของ TMZ และ products ตัวอื่น ๆ ในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งชนิด solid malignancies ที่ให้การรักษาด้วย TMZ ช่วงปริมาณ 50-250 มิลลิกรัมต่อพื้นที่ร่างกายต่อวัน ($mg/m^2/day$) ติดต่อกัน 5 วัน พบว่า TMZ มีการดูดซึม และถูกขับออกอย่างรวดเร็ว ตรวจพบได้ทั้งความเข้มข้นของ TMZ, MTIC, AIC, และ TMA ในพลาสมา โดยพบปริมาณ TMZ ในพลาสมาสูงสุดในช่วงเวลาเฉลี่ยที่ 1.2 ชั่วโมงหลังทานเข้าไป และมีครึ่งชีวิตของสารอยู่ที่ 1.8 ชั่วโมง (Dhodapkar, et al., 1997; Kim, et al., 1997; Reid, et al., 1997) พบ MTIC ความเข้มข้นสูงสุดในพลาสมาอยู่ที่ช่วงเวลาเฉลี่ย 1.5 ชั่วโมง มีค่าครึ่งชีวิตของสารโดยเฉลี่ยเพียง 2.5 นาที และช่วงเวลาที่ตรวจพบปริมาณสูงสุดของ AIC อยู่ที่ 2.5 ชั่วโมง (Baker, et al., 1999) อีกทั้งยังตรวจพบความเข้มข้นของ TMZ และ TMA ที่ถูกขับออกทางน้ำปัสสาวะ คิดเป็น 5.6% และ 0.8% ตามลำดับ (Dhodapkar, et al., 1997;

Kim, et al., 1997; Reid, et al., 1997) สำหรับการทดลองใน *in vitro* พบว่า ครึ่งชีวิตของ TMZ เท่ากับ 1.9 ชั่วโมง ใน phosphate buffer ที่ 37°C และ pH 7.4 ในขณะที่ MTIC มีครึ่งชีวิตเท่ากับ 2 นาที ใน phosphate buffer (Denny, et al., 1994)



ภาพ 8 แสดงโครงสร้างจากวิถี metabolism ของ temozolomide

ที่มา: Baker, et al., 1999

TMZ เป็นยาเคมีบำบัดสำหรับการรักษาโรคมะเร็งได้หลายชนิด และได้รับความสนใจมากที่สุด เนื่องจากเป็นยากิน และมีผลข้างเคียงต่ำ ถูกนำมาใช้ประโยชน์เป็นครั้งแรกในประเทศอังกฤษ และต่อมาในปี ค. ศ. 2000 ได้เริ่มนำไปใช้ในประเทศอื่น ๆ โรคมะเร็งที่รักษาโดย TMZ นั้น ได้แก่ astrocytoma, glioblastoma, melanoma (มะเร็งผิวหนัง) และใช้รักษา oligodendroglioma เฉพาะในบางประเทศเท่านั้น (Friedman et al., 1995; Sanson, et al., 2004; Stevens, et al.,

1987) เนื่องจากว่า TMZ มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic nature ที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดเล็กจึงสามารถซึมผ่านเนื้อเยื่อ และผ่าน blood-brain barrier (BBB) ได้เป็นอย่างดี ดังนั้น เป็นเหตุที่ทำให้ TMZ เป็นที่นิยมนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการรักษาโรคมะเร็งสมอง (Denny, et al., 1994)

กลไกการออกฤทธิ์ของ temozolomide

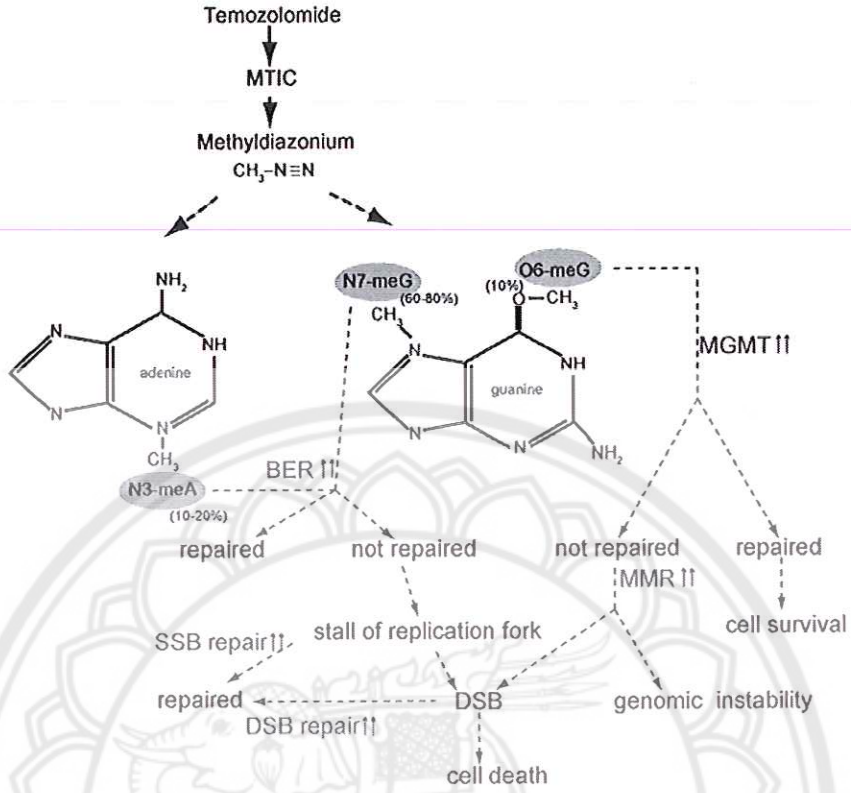
มีการศึกษาคุณสมบัติการต้านมะเร็ง (anticancer) ของ TMZ โดยศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในกระบวนการ DNA replication ซึ่งถือเป็นกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง (Friedman, et al., 2000) TMZ จะถูก hydrolyzed โดยน้ำที่ carbon ตำแหน่งที่ 4 ทำให้วงแหวนของ TMZ เปิดออกได้เป็นโครงสร้างของ MTIC ซึ่งเป็น reactive methylating agent จากนั้น MTIC จะเปลี่ยนเป็น methyldiazonium ซึ่งเป็นโครงสร้างที่สามารถถ่ายโอน methyl group ให้กับ DNA และจะสลายให้ product สุดท้ายเป็น AIC ซึ่งสามารถถูกขับออกผ่านทางไต (Denny, et al., 1994) ตำแหน่งที่ TMZ สามารถเกิด methylation บน DNA ได้แก่ nitrogen atom ตำแหน่งที่ 7 ของ guanine (N^7-methylguanine; 60–80%) nitrogen atom ตำแหน่งที่ 3 ของ adenine (N^3-methyladenine; 10–20%) และ oxygen atom ตำแหน่งที่ 6 ของ guanine (O^6-methylguanine; 5–10%) (Denny, et al., 1994; Friedman, et al., 2000; Fu, et al, 2012) (ภาพ 11)

แม้ว่า TMZ จะเกิด methylation ตรงตำแหน่ง O^6-methylguanine เพียงร้อยละ 5–10% แต่ก็มีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งในการเป็น cytotoxic action drug ต่อเซลล์มะเร็ง เนื่องจากว่า oxygen ตำแหน่งที่ 6 ของ guanine บน DNA เป็นบริเวณเริ่มต้นเข้ามาจับของ active agents against malignant gliomas (Stupp, et al., 2001) เมื่อเกิด O^6-methylguanine เป็นเหตุให้เกิดการเข้าคู่ของ thymine กับ methylguanine แทนที่ cytosine จึงทำให้เกิด mismatch ขึ้นใน daughter strand DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ โดยปกติจะมีเอนไซม์ O-6-DNA-methytransferase (MGMT) ที่ทำหน้าที่ในการซ่อมแซมความผิดปกติดังกล่าว แต่เมื่อ MGMT ถูก inactivated จึงไม่สามารถทำหน้าที่ได้ เป็นเหตุทำให้เกิด O^6-methylguanine ดำเนินต่อเนื่องไปเรื่อย ๆ โดยขาดวงจรของ mismatch repair (MMR) และนำไปสู่ double-strand breaks (DSB) (Yoshimoto, et al., 2012) การถูก inactivated ของ MGMT มีความเชื่อมโยงสอดคล้องกับความไวในการรักษาของ TMZ (Hegi, et al., 2005; Stupp, et al., 2009) โดยผู้ป่วยที่มีการแสดงออกที่ลดลงของยีน *MGMT* แสดงถึงมีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยเคมีบำบัดได้ผลดี ดังนั้น การแสดงออกของยีน *MGMT* จึงเป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพ (biomarker) ที่มีความสำคัญสำหรับพยากรณ์การตอบสนองต่อการรักษาผู้ป่วยมะเร็งสมองชนิด gliomas (Belanich, et al., 1996) จากผลการศึกษาในผู้ป่วย gliomas ที่ได้รับการรักษาด้วยเคมีบำบัด temozolamide พบว่า ผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของยีน *MGMT* ใน

ระดับต่ำ จะมีระยะเวลาของการรอดชีวิตโดยรวมที่นานขึ้น (Chinot, et al., 2007) ซึ่งการแสดงออกของยีน *MGMT* ที่ลดน้อยลง เกิดจาก epigenetic silencing โดยมีปฏิกิริยา methylation บริเวณควบคุมการแสดงออกของยีน *MGMT* (promoter methylation) ดังนั้น การตรวจพบ MGMT promoter methylation จึงเป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพของมะเร็ง (cancer biomarker) ที่บ่งบอกทั้งการรอดชีวิตโดยรวมของผู้ป่วยและการตอบสนองที่ดีต่อเคมีบำบัดสูตรที่มี alkylating agents (Stupp et al., 2009)

ในทำนองเดียวกัน จากการเหนี่ยวนำของ TMZ ทำให้เกิด N^7-methylguanine และ N^3-methyladenine ซึ่งจะถูกซ่อมแซมโดยการตัดออกของเบส base excision repair (BER) (Fu, et al., 2012) แต่ถ้าไม่ได้รับการซ่อมแซมก่อนกระบวนการ replication ก็จะก่อให้เกิด single-strand breaks (SSB) และนำไปสู่การเกิด DSB ในที่สุด (Yoshimoto, et al., 2012) แสดงดังภาพ 9

การเกิด N^7-methylguanine, N^3-methyladenine และ O^6-methylguanine จากอิทธิพลของ TMZ นี้มีบทบาทสำคัญส่งผลให้เกิด chronic strand breaks ซึ่งเป็นการทำให้เกิด DNA damage จากนั่นจะส่งสัญญาณเริ่มต้นของการเกิดกระบวนการ apoptosis ต่อไป (Roos and Kaina, 2013) แสดงดังภาพ 11



ภาพ 9 แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของ temozolomide ต่อเซลล์มะเร็ง

ที่มา: Yoshimoto, et al., 2012

การดื้อต่อยา temozolomide (TMZ)

ในสภาวะการดื้อยาเคมีบำบัดของมะเร็งส่วนใหญ่มักเกี่ยวข้องในกระบวนการซ่อมแซมความเสียหายบนสาย DNA จากการถูกทำลายโดยยาเคมีบำบัด (Stupp, et al., 2001) เอนไซม์ O^6-alkylguanine DNA alkyltransferase (AGT หรือ MGMT) เป็นโปรตีนที่ถูกถอดรหัสจากยีน *O^6-methylguanine DNA methyltransferase* (*MGMT*) (Tano, et al., 1990) มีบทบาททำหน้าที่ mismatch repair ตรงบริเวณ O^6-methylguanine (Yoshimoto, et al., 2012) จากการศึกษาใน *in vitro* พบว่าความเข้มข้นของ ATG ในระดับเซลล์ เป็นปัจจัยสำคัญของการตอบสนองต่อ cytotoxicity ของ TMZ (Wedge, et al., 1996) และในสภาวะของการทนทานต่อ TMZ หรือ MTIC จะพบว่าเอนไซม์ ATG ทำหน้าที่ซ่อมแซม DNA เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (Hayward and Parsons, 1984) ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์นี้ จะเพิ่มมากขึ้นใน central nervous system tumors ที่ดื้อต่อยาเคมีบำบัด และมีปริมาณน้อยในมะเร็งที่ไวต่อการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด ในการศึกษาผู้ป่วยทั้งหมด 167 คน พบว่าผู้ป่วย glioblastomas และ anaplastic astrocytomas ที่มีระดับของ AGT

ต่ำ มีอัตราการมีชีวิตรอดสูงกว่ากลุ่มที่มีเอนไซม์นี้ในระดับที่สูงอย่างมีนัยสำคัญ (Belanich, et al., 1996) และในผู้ป่วย 38 คนที่เพิ่งถูกวินิจฉัยเป็น glioblastoma และ anaplastic astrocytoma ซึ่งให้การรักษาด้วย TMZ หลังการผ่าตัด และให้ก่อนใช้รังสีรักษา พบว่า 70% ของผู้ป่วยมีระดับการแสดงออกของ AGT ต่ำกว่า 20% ซึ่งตอบสนองต่อการรักษาด้วย TMZ ถึง 60% มีเพียง 10% เท่านั้น ที่ตอบสนองต่อยา TMZ ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ AGT มากกว่า 20% ความสัมพันธ์ระหว่างการทำหน้าที่ของ AGT การตอบสนองต่อยา และการมีชีวิตรอด เกี่ยวข้องกับการเติมหมู่เมทิล (methylation) ที่ตำแหน่ง promoter ของยีน *AGT* (AGT-gene promoter) โดยในผู้ป่วย glioma ที่มีการแสดงออกของ methylated promoter ทำให้ AGT ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ ดังนั้น ผู้ป่วยจึงตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดได้ดี และการมีชีวิตรอดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (36 เดือน) เมื่อเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มี methylated AGT promoter (22 เดือน) (Esteller, et al., 2000)

ขมิ้นชัน (Turmeric, *Curcuma longa* Linn.)

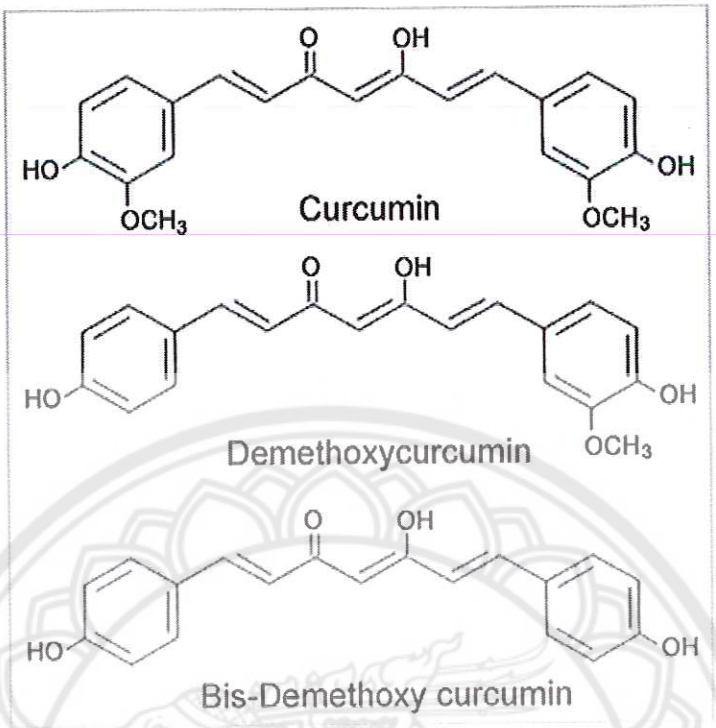
ขมิ้นชันมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Curcuma longa* Linn. อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae มีชื่อภาษาอังกฤษว่า turmeric เป็นไม้ล้มลุกอายุหลายปี ถูกจำแนกอยู่ในพืชตระกูลขิง มีเหง้าอยู่ใต้ดิน เนื้อในเหง้ามีลักษณะเป็นสีเหลืองส้ม แสดงดังภาพ 10 มีการปลูกอย่างกว้างขวางทั่วเอเชียเขตร้อนทางเขตตอนใต้ และตะวันออกเฉียงใต้ ในอินเดียขมิ้นชันถูกจัดเป็นพืชสมุนไพร และนำมาใช้ในการประกอบอาหาร (Kottke, 1998; Shishodia, et al., 2007) มีกลิ่นเฉพาะตัว และมีความหลากหลากของการใช้งาน สามารถนำไปตากแห้ง และบดใช้เป็นเครื่องเทศ แต่งกลิ่น รส และสีในอาหาร เป็นหนึ่งในส่วนผสมของผงกะหรี่ และในอินเดียนิยมใช้เป็นยาพื้นบ้านสำหรับการรักษาโรคต่าง ๆ เช่น ความผิดปกติทางเดินน้ำดี อาการไอ เบื่ออาหาร แผลจากเบาหวาน โรคไขข้อ โรคตับ และไซนัสอักเสบเป็นต้น ในประเทศสหรัฐอเมริกา ขมิ้นชันจะถูกใช้ทำเป็นสีในชีส เครื่องเทศ มัสตาร์ด ธัญพืช ผักดอง ซุป ไอศกรีม และโยเกิร์ต (Shishodia, et al., 2007) นอกจากนี้ ยังถูกนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ และยา อีกทั้งในพิธีกรรมทางศาสนาฮินดู (Srimal and Dhawan, 1973) ตำราเก่าแก่ของฮินดูยังอธิบายอีกว่า ขมิ้นชันเป็นสารกระตุ้นที่มีกลิ่นหอม สามารถนำมาใช้ขับลม เช่นเดียวกับในตำรายาไทยสามารถใช้เป็นยารักษาโรคประจำบ้านกันอย่างแพร่หลายมาเป็นระยะเวลายาวนาน เช่น ใช้เหง้าสดฝนกับน้ำทารักษาโรคผิวหนังผื่นคัน หรือกินรักษาอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ ช่วยลดกรด ขับลม เป็นต้น ตามตำราโบราณว่าด้วยอายุรเวท (Ayurveda) และแพทย์แผนจีนได้อธิบายถึงการใช้ขมิ้นชันในการป้องกัน และรักษาปัญหาทางสุขภาพต่าง ๆ เพื่อสร้างและยกระดับชีวิตความเป็นอยู่ที่ดีขึ้น (Shishodia, et al., 2007) สำหรับความปลอดภัย

ทางเภสัชวิทยาของขมิ้นชันเป็นที่พิจารณายอมรับว่าจะได้รับการบริโภคเป็นอาหารในปริมาณถึง 100 มิลลิกรัมต่อวัน และเป็นเช่นนี้มานานหลายทศวรรษ (Ammon and Wahl, 1991)

ภาพ 10 แสดงลักษณะเหง้าและผงของขมิ้นชัน

ที่มา: http://cell-nutrition.net/wp/curcuminoids-absorption

องค์ประกอบที่พบในขมิ้นชัน ซึ่งประกอบไปด้วยคาร์โบไฮเดรต (69.4%) โปรตีน (6.3%) ไขมัน (5.1%) แร่ธาตุ (3.5%) ความชื้น (13.1%) และน้ำมันหอมระเหย (5.8%) องค์ประกอบอื่นที่เหลือเป็นสารเม็ดสีที่ให้สีเหลือง คิดเป็น 3%-4% ของน้ำหนักแห้ง (Ruby, et al., 1995) สารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามี 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เป็นสารให้สี เรียกว่า curcuminoids ซึ่งเป็นสารผสมที่ประกอบด้วย curcumin (76.0%), demethoxycurcumin (20.2%) และ bisdemethoxycurcumin (3.8%) (Changtam, et al., 2010) โดยแสดงภาพโครงสร้างทางเคมีใน ภาพ 11 สารสำคัญอีกกลุ่ม คือ น้ำมันหอมระเหยที่ประกอบด้วยสารประกอบ monoterpenoids และ sesquiterpenoids เช่น turmerone ตามข้อกำหนดของตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยกำหนดให้วัตถุดิบขมิ้นชันสำหรับผลิตยาต้องมีปริมาณ curcuminoids ไม่ต่ำกว่า 5% และน้ำมันหอมระเหยไม่ต่ำกว่า 6%



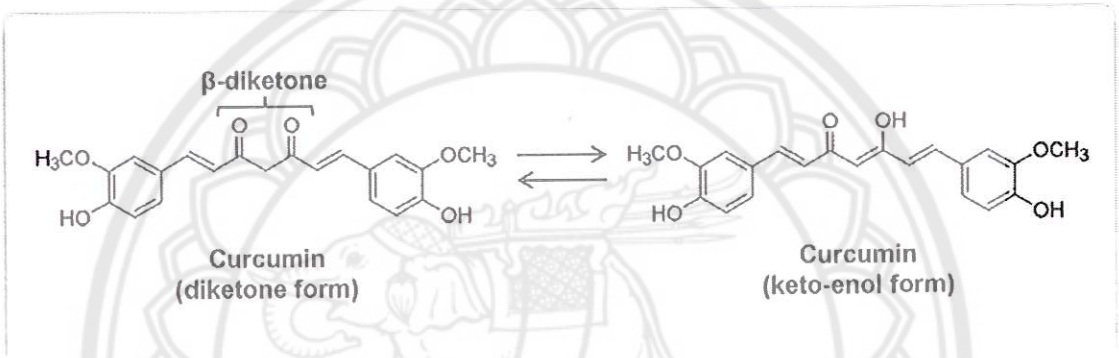
ภาพ 11 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารหลักที่พบใน curcuminiods

ที่มา: Wilken, et al., 2011

Curcumin

Curcumin เป็นองค์ประกอบที่ออกฤทธิ์ที่มีมากที่สุดในขมิ้นชัน สกัดได้มาจากส่วนที่เป็นเหง้าแห้ง มีลักษณะเป็นผงผลึกสีส้มเหลือง เป็นสาร lipophilic polyphenol ที่ไม่สามารถละลายได้ในน้ำ แต่ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น dimethylsulfoxide, acetone และ ethanol เป็นต้น (Aggarwal, et al., 2007) curcumin ถูกแยกได้เป็นครั้งแรกในปี 1815 โดย Vogel (Vogel and Pelletier, 1815) ต่อมาในปี 1870 ถูกแยกออกในรูปแบบผลึก (crystalline form) และถูกจัดจำแนกเป็น 1, 6-heptadiene-3, 5-dione-1, 7-bis (4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-(1E, 6E) หรือ diferuloylmethane (Daube, 1870) โดยโครงสร้างของ curcumin ที่เป็นแบบ diferuloylmethane ได้รับการยืนยันในปี 1910 จากการริเริ่มสังเคราะห์ขึ้นโดย Lampe, et al. (Lampe, et al., 1910; Lampe and Milobedzka, 1913) curcumin มีการเชื่อมต่อของโครงสร้างที่เป็นเอกลักษณ์ประกอบด้วย methylated phenols 2 หมู่ เชื่อมต่อกันด้วย 2 รูปแบบที่เป็นทอโทเมอร์ (tautomeric forms) เกิดจากการเคลื่อนที่ย้ายการเกาะของอะตอมไฮโดรเจน ได้แก่ diketone และ keto-enol form แสดงดังภาพ 12 ทำให้สารมีลักษณะสีเหลืองสดใส (Mimeault and Batra, 2011)

curcumin มีสูตรทางเคมี $C_{21}H_{20}O_6$ จุดหลอมเหลวอยู่ที่ 183^{0}C มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 368.37 g/mol และมีความไวต่อ oxygen ใน aqueous solution มีผลเมื่อสัมผัสกับ UV ภายใต้แสงอาทิตย์ เมื่อนำ curcumin ไป incubated ใน 0.1 M phosphate buffer และ serum-free medium ที่ pH 7.2 ในอุณหภูมิ 37^{0}C พบว่ามากกว่า 90% ของส่วนประกอบสลายไปภายใน 30 นาที แต่ curcumin จะคงตัวใน cell culture medium ที่มี 10% fetal calf serum และในเลือดซึ่งพบว่ามีส่วนประกอบน้อยกว่า 20% ที่สลายไปภายใน 1 ชั่วโมง และหลังจากที่ผ่านการ incubate เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จะยังคงเหลือ curcumin อยู่ประมาณ 50% (Wang, et al., 1997)



ภาพ 12 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ curcumin ที่เป็นรูปแบบ diketone และ keto-enol

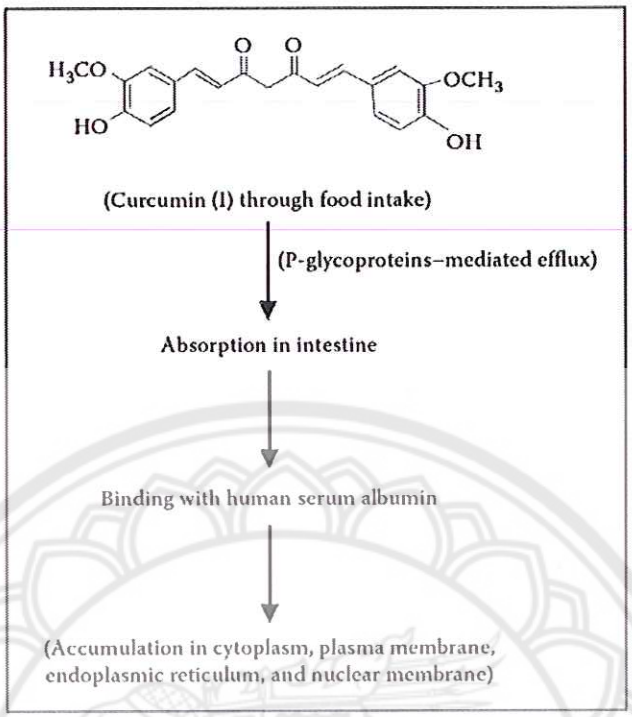
ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Mimeault and Batra, 2011

เมตาบอลิซึมของ curcumin

จากการทดสอบความปลอดภัยทางเภสัชวิทยาพบว่าขมิ้นชันเป็นผลิตภัณฑ์พืชสมุนไพรที่ไม่เป็นพิษทางคลินิกหลังจากการได้รับในปริมาณสูงถึง 100 mg ต่อวันในร่างกายมนุษย์ และ 5 g ต่อวันในหนู (Commandeur and Vermeulen, 1996) นอกจากนี้ ยังมีการบริโภคขมิ้นชันในทั่วทุกมุมโลก โดยเฉลี่ยประมาณ 1-2 mg ต่อวันต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ซึ่งไม่พบการรายงานถึงผลของความเป็นพิษต่อร่างกาย (Surh, 2009) การดูดซึมของขมิ้นชันจากการทดลองใน *in vivo* พบว่าอยู่ในระดับที่ต่ำหลังจากรับเข้าไปโดยทางปาก (Ammon, Martin, 1991) และยังมีรายงานทั้งในหนูและมนุษย์พบว่า การดูดซึมจะเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อรับเข้าไปพร้อมกับสารเพอรีน (piperine) ซึ่งเป็นสารแอลคาลอยด์ (alkaloid) ที่เป็นองค์ประกอบที่พบในพริกไทย (pepper) ส่วนที่ให้ความเผ็ดร้อน (Shoba, et al., 1998) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่าง curcumin กับสารประกอบในอาหารอื่นอีก (Groten, et al., 2000) ดังนั้น จากความเป็นไปได้ของ

การเกิดผลเสริมฤทธิ์ร่วมกันระหว่าง curcumin กับสารอาหารชนิดอื่น จึงเป็นเหตุของการนำ curcumin ทดสอบการออกฤทธิ์ร่วมกับสาร หรือยาชนิดอื่น ๆ ต่อไป เช่น curcumin ช่วยเสริมฤทธิ์เพิ่มประสิทธิภาพการต้านมะเร็งร่วมกับยาเคมีบำบัด 5-fluorouracil (5-FU) ต้านมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Shakibaei, et al., 2013) และเพิ่มประสิทธิภาพการต้านมะเร็ง GBM เมื่อให้ร่วมกับ TMZ (Dilnawaz and Sahoo, 2013; Zanotto-Filho, et al., 2015)

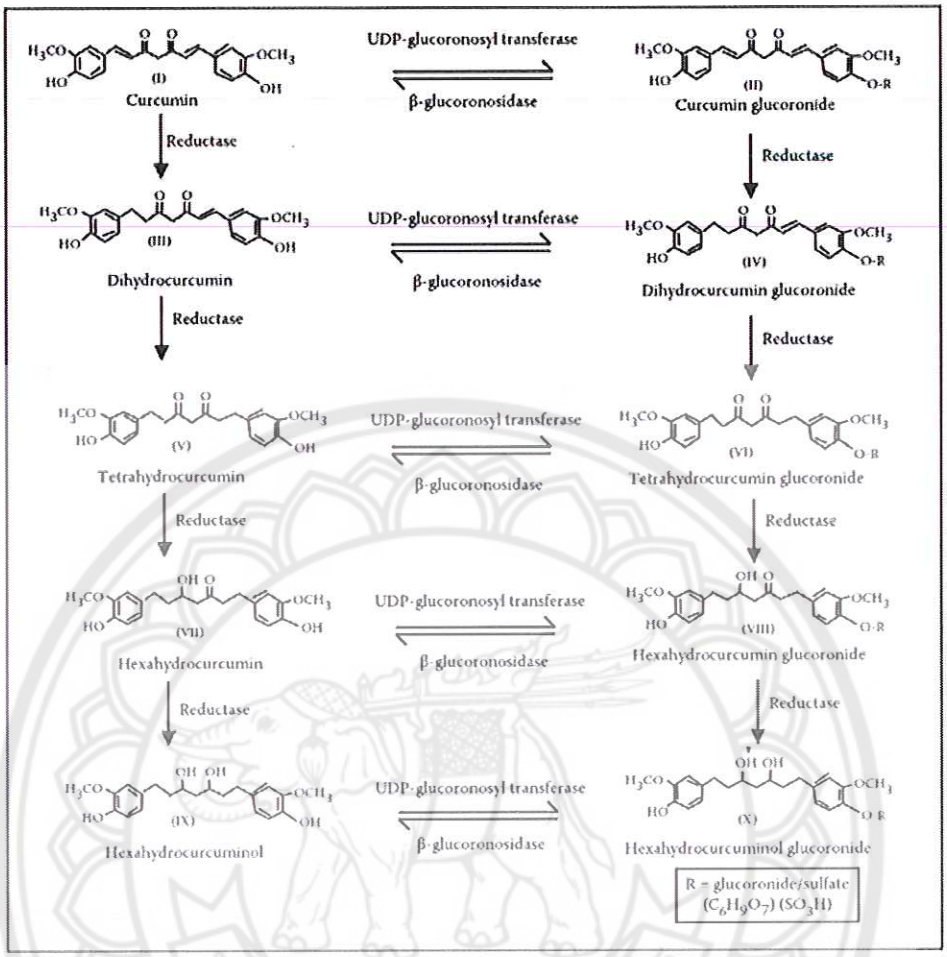
ภายหลังจากร่างกายได้รับ curcumin จากการรับประทานขมิ้นชันเข้าไป curcumin จะถูกดูดซึมที่ลำไส้เล็ก จากนั้น curcumin สามารถเชื่อมจับกับโปรตีนในน้ำเลือด (serum albumin) โดยมีน้ำเป็นตัวกลางในการทำปฏิกิริยา (Pulla, et al., 1999) โครงสร้างของ curcumin ที่มีการผันสลับระหว่างพันธะคู่กับพันธะเดี่ยวในบางตำแหน่งจนกลายเป็นอนุพันธ์ตัวใหม่ขึ้นนั้นมีความสามารถจับกับ serum albumin ได้ดีกว่า curcumin ดังนั้น จึงเป็นการบ่งชี้ให้เห็นว่า ทั้ง curcumin และอนุพันธ์ของ curcumin สามารถขนส่งไปยังเซลล์เป้าหมายโดยจับกับ serum albumin แล้วแทรกซึมเข้าไปใน cytoplasm และอาจจะสะสมบนเยื่อหุ้มต่าง ๆ ของเซลล์ (cellular membrane) เช่น plasma membrane, endoplasmic reticulum และ nuclear membrane (Jaruga, et al., 1998) แสดงดังแผนภาพ 13



ภาพ 13 แสดงการดูดซึมของ curcumin หลังได้รับโดยการกิน

ที่มา: Surh, et al., 2009

จากการทดสอบคุณสมบัติของ curcumin ทาง pharmacokinetics ในหนู โดยฉีด curcumin ปริมาณ 0.1 g/kg น้ำหนักตัวเข้าที่ช่องท้อง หลังจากผ่านไป 15 นาที ตรวจพบ curcumin ในพลาสมา (plasma) ปริมาณ 2.25 µg/ml และเมื่อผ่านไป 1 ชั่วโมง มีระดับของ curcumin พบในลำไส้เล็ก ม้าม ตับ และไต อยู่ที่ 177.04, 26.06, 26.90 และ 7.51 µg/g ตามลำดับ อีกทั้งยังตรวจพบในปริมาณ 0.41 µg/g (Pan, et al., 1999) เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงโดยกระบวนการทางชีวภาพ (biotransformation) ในโครงสร้างทางเคมีของ curcumin หลังถูก metabolite พบว่า curcumin ได้เปลี่ยนไปเป็นโครงสร้าง dihydrocurcumin (III) และ tetrahydrocurcumin (V) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่จะมีการปรับเปลี่ยนเป็น monoglucuronide conjugates ต่อไป ดังนั้น curcumin-glucuronoside (II), dihydrocurcumin-glucuronoside (IV), tetrahydrocurcumin-glucuronoside (VI) และ tetrahydrocurcumin (V) เป็นสารโครงสร้างหลักที่เกิดจากการเผาผลาญของ curcumin (Lin, et al., 2000; Pan, et al., 1999) แสดงดังในภาพ 14



ภาพ 14 แสดงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของ curcumin โดยกระบวนการทางชีวภาพ

ที่มา: Surh, et al., 2009

คุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของ curcumin

ในช่วง 5 ทศวรรษที่ผ่านมา ได้มีผลงานการตีพิมพ์เกี่ยวกับ curcumin มากกว่าหนึ่งพันเรื่อง โดยระบุว่า curcumin เป็นส่วนประกอบที่สำคัญที่สุดที่ทำให้ขมิ้นชันมีฤทธิ์หลากหลายทางเภสัชวิทยา เช่น ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด (Hussain and Chandrasekhara, 1992) ยับยั้งการรวมตัวของเกล็ดเลือด (Srivastava, et al., 1995) ยับยั้งการเกิดลิ่มเลือด (Srivastava, et al., 1985) ป้องกันกล้ามเนื้อหัวใจตาย (Dikshit, et al., 1995) ยับยั้งอาการที่เกี่ยวข้องกับโรคเบาหวานชนิดที่สอง (Srinivasan, 1972) ป้องกันโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease)

(Lim, et al., 2001) ในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านมะเร็ง ต้านการติดเชื้อ และต้านความเครียดจากภาวะออกซิเดชัน (Jaisin, et al., 2011; Park et al., 2008) เป็นต้น คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของ curcumin นั้น ขึ้นอยู่กับลักษณะทางโครงสร้างเคมี ซึ่งประกอบด้วย methoxylated phenols 2 หมู่และถูกเชื่อมต่อกันด้วยหมู่คาร์บอนิล (carbonyl groups) ที่อยู่ในรูปแบบ diketone และ keto-enol form (Mimeault and Batra, 2011) จากการศึกษาของ Masuda, et al. พบว่า curcumin ได้แสดงถึงฤทธิ์การต้าน oxidation ของไขมัน lipid peroxidation โดยใช้ linoleate ซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง ที่สามารถถูกออกซิไดซ์และกลายเป็นอนุมูลของกรดไขมัน (Masuda, et al., 2001) นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* พบว่า curcumin ยังสามารถยับยั้งกิจกรรมของสารอนุมูลอิสระต่าง ๆ (reactive oxygen species; ROS) เช่น curcumin ลดการแสดงออกของ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ซึ่งเป็นเอนไซม์เกิดจากการกระตุ้นเมื่อมีการอักเสบเกิดขึ้น ทำให้เกิดไนตริกออกไซด์ (NO) เป็นจำนวนมาก และ NO จะทำปฏิกิริยากับ superoxide radical (O^{-2}) ต่อไป (Joe, et al., 2004) จากการศึกษาเพิ่มเติมใน microglial cells แสดงให้เห็นถึง curcumin สามารถป้องกันการเกิด neuroinflammation โดยลดการสร้าง NO จาก microglial cells (Jung, et al., 2006) และยังป้องกันเซลล์สมองจากภาวะเครียดออกซิเดชั่น (oxidative stress) ใน neuroblastoma cells ของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย hydrogen peroxide (Zhao, et al., 2011) ความสามารถในการยังยั้ง neuroinflammation และ oxidative stress ในสมอง ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ถึงความสามารถของ curcumin ในการป้องกันปัจจัยเสี่ยงสำคัญของการนำไปสู่โรคความเสื่อมทางระบบประสาท (neurodegenerative diseases) ได้ เช่น Alzheimer's disease; AD (Ray and Lahiri, 2009) เป็นต้น นอกจากนี้ จากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่า ทั้ง curcumin และสารโครงสร้างที่เป็น metabolites ของ curcumin ได้แก่ tetryhydrocurcumin, hexahydrocurcumin และ octahydrocurcumin สามารถต้านการอักเสบ โดยยับยั้งการแสดงออกของ nuclear factor kappa B (NF-κB) ใน macrophages (Pan, et al., 2000) เนื่องจาก NF-κB เป็น transcription factor ควบคุมการแสดงออกของยีน และสาร interleukins ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ ยีนที่ถูกควบคุมโดย NF-κB เช่น *cyclooxygenase-2 (COX- 2)* , *TNF-α*, *iNOS* เป็นต้น และสาร interleukins เช่น IL-6 และ IL-8 (Singh and Aggarwal, 1995; Jobin, et al., 1999) การแสดงออกของ NF-κB เกิดจากการตอบสนองของเซลล์ต่อการกระตุ้น เช่น การกระตุ้นจาก cytokines แสงยูวี อนุมูลอิสระ ภาวะเซลล์ขาดออกซิเจน และการติดเชื้อ เป็นต้น (Gilmore, 2006) อีกทั้งการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นของ NF-κB ยังมีความเกี่ยวข้องในกระบวนต่างๆ ของการพัฒนา

ไปเป็นมะเร็งระยะร้ายแรงได้อีกด้วย (Aggarwal, et al., 2004) ดังนั้น จากผลการยับยั้งของ curcumin บน NF-κB pathway ถือได้ว่าเป็นคุณสมบัติของฤทธิ์ต้านการอักเสบที่สำคัญอย่างมาก นอกจากจะส่งผลต่อ NF-κB pathway แล้ว ยังมีการศึกษาพบว่า curcumin สามารถยับยั้งกระบวนการอักเสบโดยผ่าน pathway อื่นได้อีก เช่น ยับยั้งการสร้าง prostaglandin E2 (Koeberle, et al., 2009) คุณสมบัติต้านการอักเสบของ curcumin ได้รับการตรวจสอบในโรคชนิดต่าง ๆ เช่น โรคเบาหวาน (diabetes) ตับอ่อนอักเสบ (pancreatitis) โรคไต (renal disease) โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) และโรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular disease) โรคลำไส้อักเสบ (inflammatory bowel disease) (Babu and Srinivasan, 1995; Gukovsky, et al., 2003; Jones and Shoskes, 2000; Lim, et al., 2001; Yadav, et al., 2009; Yeh, et al., 2005)

ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Anticancer)

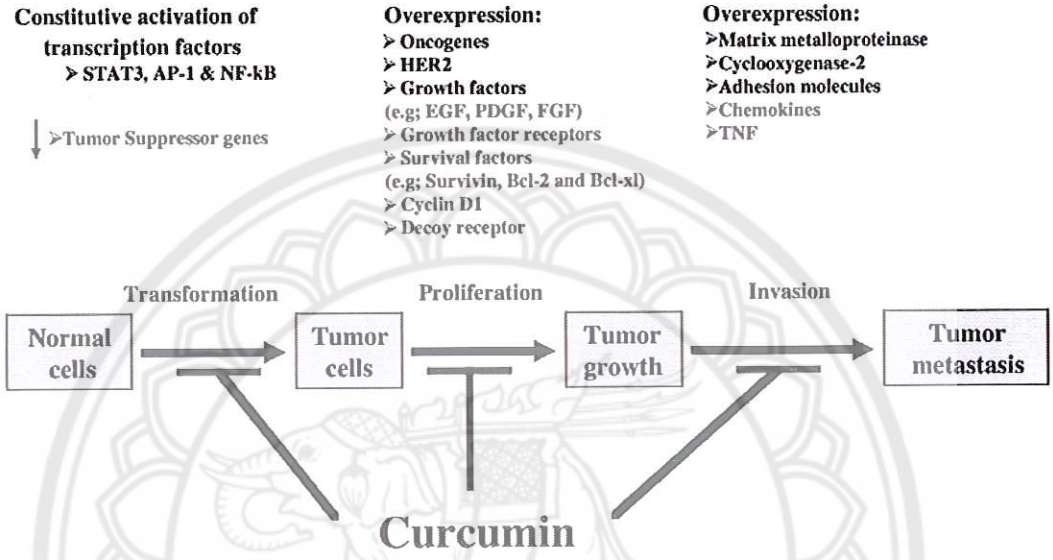
โรคมะเร็งเป็นปัญหาสาธารณสุขรุนแรงระดับโลก ตั้งแต่อดีตจนปัจจุบันได้มีนักวิจัยมากมายพยายามศึกษาหาสารจากธรรมชาติเพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง เนื่องจากสารในธรรมชาติมีความปลอดภัยกว่าและผลข้างเคียงน้อยกว่าสารเคมีสังเคราะห์ เช่นเดียวกันกับในผลงานวิจัยมากมายที่สนใจศึกษาคุณสมบัติในการต้านมะเร็งของ curcumin โดยมีการศึกษาทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* พบว่า curcumin มีเป้าหมายในหลายกลไกที่ครอบคลุมเกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโต และการตายของเซลล์มะเร็ง โดยมีผลกระทบโดยตรงต่อ transcription factor, oncogene และ signaling protein หลายชนิด ที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการขั้นตอนต่าง ๆ ของการเกิดมะเร็ง (carcinogenesis) ซึ่งมีกระบวนการเริ่มต้นตั้งแต่การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรม (DNA mutation) ในเซลล์ปกติ และผ่านกระบวนการต่าง ๆ จนนำไปสู่การเกิดเนื้องอก (tumorigenesis) การเจริญเติบโต (growth) และการแพร่กระจาย (metastasis) ในที่สุด (Wilken, et al., 2011) ดังแสดงในภาพ 15 โดย curcumin มีฤทธิ์ไปยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของ NF-κB ผ่านการยับยั้ง IκKB activity ที่เป็นปัจจัยกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cellular proliferation) (Plummer, et al., 1999) ยับยั้งการสร้างหลอดเลือด (angiogenesis) และการแพร่กระจายของมะเร็ง (metastasis) ผ่านการควบคุมปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์ (growth factors) หลายชนิด (Gururaj, et al., 2002) curcumin ยังมีบทบาทควบคุมในวงจรการแบ่งตัวของเซลล์ (cell cycle) โดย curcumin กระตุ้นการแสดงออกของกลุ่มยีนที่ส่งผลยับยั้งการดำเนินของ cell cycle คือ Cip/Kip family ($p21^{Cip1/Waf1}$ และ $p27^{Kip1}$) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งที่เกี่ยวของกับการควบคุมการทำงานของ cyclin-cdk เนื่องจากกลุ่ม Cip/Kip family จะไปจับทั้ง CDKs

และ cyclins เพื่อป้องกันการรวมตัวของ cyclin/CDK complexes ที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการดำเนินเข้าสู่ระยะต่าง ๆ ของเซลล์ (Park, et al., 2002) นอกจากนี้ curcumin ยังเพิ่มการแสดงออกของยีน *p53* ซึ่งเป็น tumor suppressor gene ที่มีบทบาทหน้าที่สำคัญในการตรวจสอบความผิดปกติในกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์ และกระตุ้นให้เซลล์เข้าสู่กระบวนการตายแบบ apoptosis (Choudhuri, et al., 2005) ดังแสดงในภาพ 16

Apoptosis เป็นรูปแบบการตายหนึ่งของเซลล์ ซึ่งดำเนินไปอย่างปกติใน normal cells เพื่อสร้างความสมดุลระหว่างการมีชีวิตรอด และการตายของเซลล์ แต่ในเซลล์มะเร็งเกิดการกลายพันธุ์ และระบบ apoptosis มีความบกพร่องเกิดขึ้น จึงมีแต่การเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งโดยปราศจากการตาย (Shishodia, et al., 2007) มีการศึกษาวิจัยมากมายในเซลล์พบว่า curcumin สามารถเหนี่ยวนำเซลล์มะเร็งให้เกิดการตายแบบ apoptosis ซึ่งถือได้ว่าเป็นกลไกที่สำคัญของคุณสมบัติการต้านมะเร็ง จากการศึกษาของ Rashmi, et al. รายงานว่า curcumin สามารถกระตุ้นการตายแบบ apoptosis ใน colon cancer cells โดยยับยั้งการแสดงออกของ Bcl-XL ซึ่งเป็น anti-apoptotic proteins ใน Bcl-2 family และในทางตรงกันข้าม ไปกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน Bax ที่เป็น pro-apoptotic proteins (Rashmi, et al., 2005) curcumin กระตุ้น apoptosis โดยเพิ่มการกลั่ง cytochrome *c* เพิ่มการแสดงออกของ Bax, Bid และ caspase-3 ใน human leukemia cells (Pan, et al., 2001) ยับยั้งการแสดงออกของ Bcl-2 และ Bcl-XL กระตุ้นการแสดงออกของ caspase-7 และ caspase-9 ใน multiple myeloma mantle และ mantle cell lymphoma (Bharti, et al., 2003; Shishodia, et al., 2005) เช่นเดียวกับรายงานการศึกษาใน human glioblastoma cells พบว่า curcumin ส่งผลให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis ผ่านทั้ง extrinsic และ intrinsic pathway โดยมีผลลดการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 เพิ่มการหลั่ง cytochrome *c* กระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน Bax, tBid และกลุ่มเอนไซม์ caspase-8, caspases-3 และ caspases-9 (Karmakar, et al., 2006) ซึ่งเป็น enzyme ที่ถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออก เมื่อภายในเซลล์มีกระบวนการชักนำให้เกิดกระบวนการ apoptosis (Kuida, 2000) นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาถึงคุณสมบัติความเป็น anti-angiogenesis ใน glioblastoma xenografts พบว่า curcumin สามารถยับยั้งการแสดงออกของ pro-angiogenic genes และ signaling molecules ซึ่งมีบทบาทหน้าที่กระตุ้นการสร้างขึ้นใหม่ของหลอดเลือด อันเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของมะเร็ง (Perry, et al., 2010)

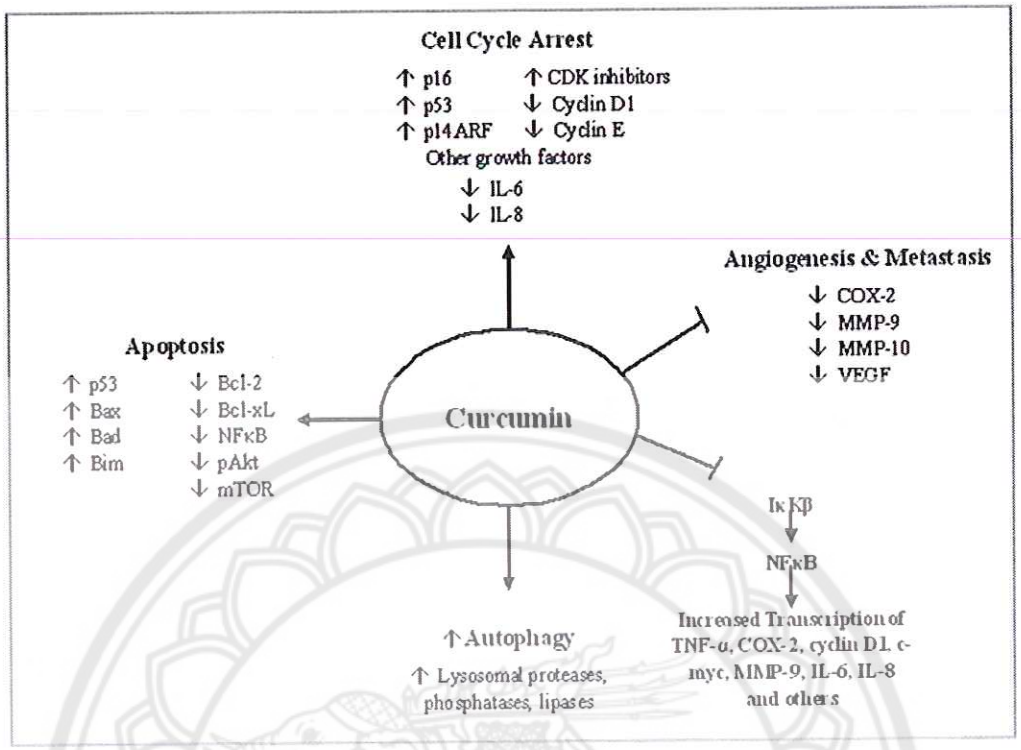
Curcumin ยังได้รับการนำไปศึกษากับมะเร็งในมนุษย์อื่น ๆ อีก และพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งได้นานาชนิด เช่น มะเร็งศีรษะและคอ (Aggarwal, et al., 2004) มะเร็งลำไส้ใหญ่

(Hanif, et al., 1997) มะเร็งรังไข่ (Lin, et al., 2007) มะเร็งตับอ่อน (Mach, et al., 2009) มะเร็งเต้านม (Mehta, et al., 1997) มะเร็งต่อมลูกหมาก (Mukhopadhyay, et al., 2001) และมะเร็งผิวหนัง (Siwak, et al., 2005) เป็นต้น



ภาพ 15 แสดงคุณสมบัติของ curcumin ยับยั้งกระบวนการต่าง ๆ ของการเกิดมะเร็ง

ที่มา: Aggarwal, et al., 2007



ภาพ 16 แสดงคุณสมบัติการต้านมะเร็งของ curcumin โดยผ่านหลายกลไก

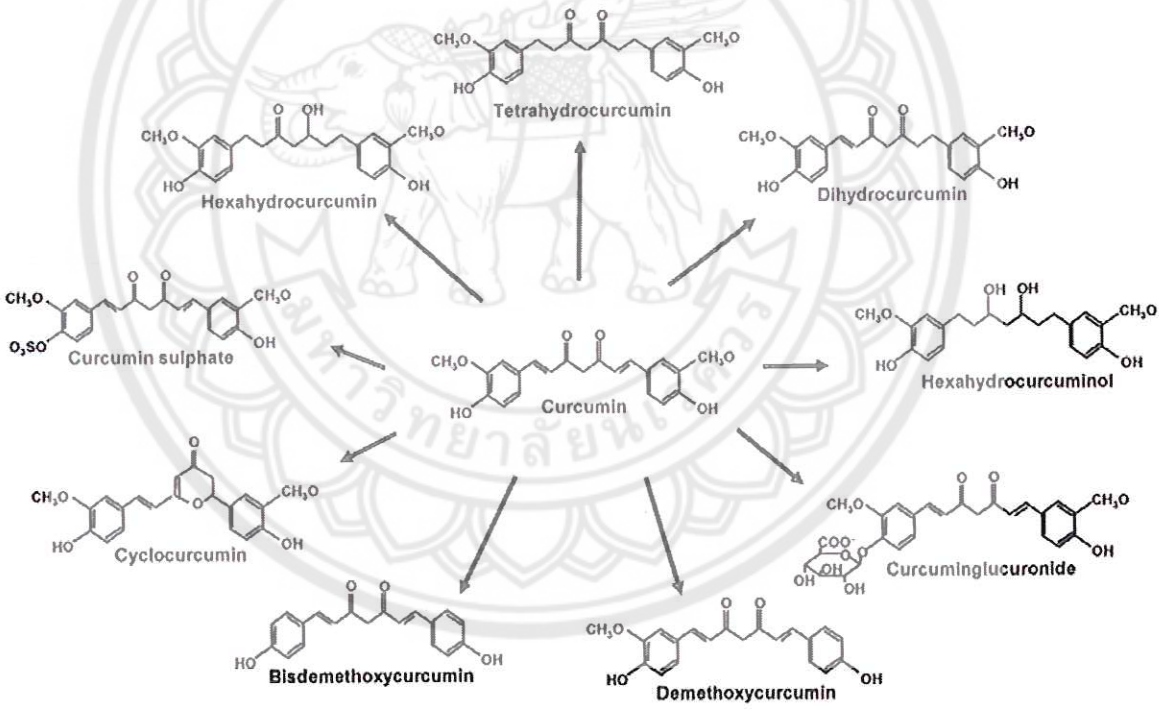
ที่มา: Wilken, et al., 2011

อนุพันธ์ของสารสกัดขมิ้นชัน (Curcuminoid analogs)

สารองค์ประกอบหลักที่สกัดได้จากขมิ้นชัน เรียกว่า curcuminoids ซึ่งประกอบไปด้วย curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin โดยมีการศึกษาพบว่า สารบริสุทธิ์ของ curcuminoids แต่ละชนิดนั้น มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งผิวหนังของหนู ขณะที่ bisdemethoxycurcumin แสดงการออกฤทธิ์ค่อนข้างน้อย (Huang, et al.,1997) นอกจากนี้ ยังได้มีการสังเคราะห์เป็นสารอนุพันธ์ขึ้นมาใหม่เป็นจำนวนมาก และนำมาใช้ในการทดลองต่างๆ (Dinkova and Talalay, 1999) ดังแสดงในภาพ 17 tetrahydrocurcumin เป็นโครงสร้างสารที่เกิดจากปฏิกิริยาการเติมไฮโดรเจน (hydrogenation) ของ curcumin หลังจากที่ถูก metabolized มีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาที่คล้ายกับสารต้นแบบ ในการวิจัยของ Naito, et al. พบว่า มีผลป้องกัน oxidative stress ในกระต่ายที่มีภาวะคอเลสเตอรอลสูง (Naito, et al., 2004) ยิ่งไปกว่านั้น tetrahydrocurcumin ยังมีความคงตัวอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ (pH 7.2) ใน plasma และที่สภาวะอุณหภูมิ 37°C ได้ดีกว่า curcumin ซึ่งชี้ให้เห็นว่า การศึกษาใน *in vivo* สารอนุพันธ์ของ

curcumin ที่เกิดจาก biotransformation จะออกฤทธิ์อยู่ในรูปของ available forms (Pan, et al., 1999) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอื่นอีกมากมายที่สนับสนุนว่า curcuminoid analogs มีความเสถียรกว่า และออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาได้ดีกว่าสารต้นแบบ (curcuminoid compounds) เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Venkatesan, et al., 2003) ต้านมะเร็ง (Kumar, et al., 2003; Tamvakopoulos, et al., 2007) ต้านการอักเสบ (Du, et al., 2013) เป็นต้น

ในประเทศไทยได้มีกลุ่มวิจัยของศาสตราจารย์ ดร.อภิชาต สุขสำราญ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหงได้สังเคราะห์ อนุพันธ์มากมายหลายโครงสร้างที่เป็น metabolites ของ curcuminoid compounds จากการนำสารต้นแบบมาปรับแต่งโครงสร้าง เพื่อให้มีความเสถียร คงทน และเพิ่มประสิทธิภาพของผลการศึกษาได้มากยิ่งขึ้น จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจอย่างยิ่งที่จะนำ analogs เหล่านี้มาใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้



ภาพ 17 แสดงโครงสร้างของสารที่เป็นอนุพันธ์ของ curcumin

ที่มา: Anand, et al., 2008

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

รูปแบบการวิจัย

การศึกษาคุณสมบัติการต้านมะเร็ง (anticancer) ของ curcuminoid analogs ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง human glioblastoma (T98G) และความสามารถในการช่วยเสริมฤทธิ์ให้กับ Temozolomide ซึ่งใช้เป็นยาเคมีบำบัดในการรักษาผู้ป่วย glioblastoma โดยมีรูปแบบการวิจัยเป็นการวิจัยเชิงทดลอง (experiment study design)

สารสกัด curcuminoids และ curcuminoid analogs เป็นสารสังเคราะห์ที่ได้รับมาจากกลุ่มนักวิจัยของศาสตราจารย์ ดร.อภิชาต สุขสำราญ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง นำมาละลายด้วยตัวทำละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO; AMRESCO®, USA) ทำการเจือจางความเข้มข้นด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ Minimum Essential Medium (MEM; GIBCO™, USA) ที่ไม่มีส่วนผสมของ serum และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C (SANYO, Japan)

Temozolomide (Sigma-Aldrich, USA) ลักษณะเป็นผง ขนาด 25 mg ถูกละลายด้วย DMSO แบ่งใส่ microcentrifuge tube สีชา ปิดด้วยแผ่น paraffin (PARAFILM®, USA) และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C และเจือจางความเข้มข้นด้วย MEM ก่อนนำไปใช้

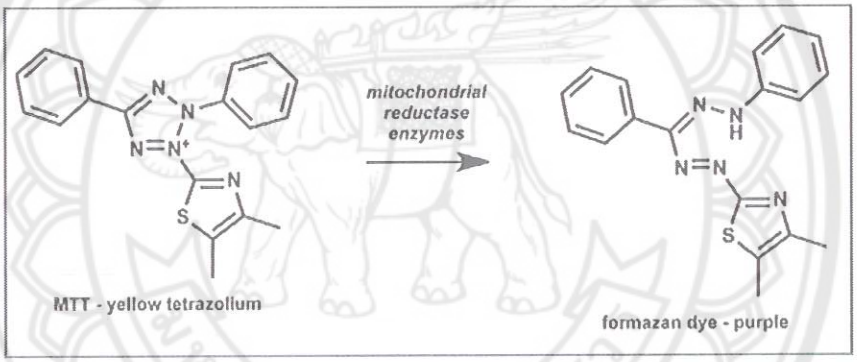
เซลล์เพาะเลี้ยง (Cell culture)

เซลล์เพาะเลี้ยง human glioblastoma (T98G; CRL-1690™) ได้รับมาจาก American Type Culture Collection (ATCC®; VA, USA) นำมาเพาะเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร Minimum Essential Medium (MEM; GIBCO™, USA) ผสมด้วย 10% bovine serum (BS; GIBCO™, USA) และ 1% penicillin/streptomycin (Capricorn Scientific, Germany) ใน cell culture incubator (Panasonic, Japan) โดยให้อยู่ในสภาวะควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C ในบรรยากาศที่มี 5% CO_2

เทคนิคการศึกษาวิจัย

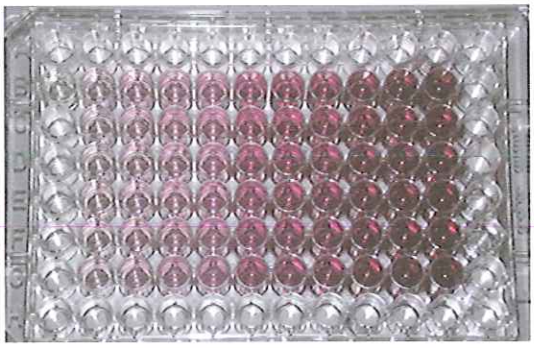
ศึกษาการมีชีวิตรอดของเซลล์ (cell viability) ด้วยวิธี MTT assay

การศึกษาการมีชีวิตรอดของเซลล์เป็นการวัด % cell viability ของเซลล์ที่มีชีวิตด้วยสารทดสอบ MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (AMRESCO®, USA) โดยศึกษาจากผลการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่พบใน mitochondria (mitochondrial reductase) ของเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งสาร MTT เป็นสีย้อมที่มีสีเหลือง ละลายน้ำได้ และจะถูกเปลี่ยนเป็นตะกอนสีม่วง (formazan crystal) โดยเอนไซม์ (mitochondrial reductase) ดังแสดงในภาพ 18 จากนั้น formazan crystal จะถูกทำละลายโดย DMSO (Bio Basic Canada Inc., Canada) เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 570 nm ด้วย microplate reader (BioTek®, USA) ระดับความเข้มของสารละลายสีม่วงบ่งชี้ถึงระดับการมีชีวิตรอดของเซลล์ ดังแสดงในภาพ 19



ภาพ 18 แสดงการเปลี่ยนโครงสร้างของสาร MTT เป็น formazan โดยเอนไซม์ mitochondrial reductase

ที่มา: http://modernsteroid.blogspot.com/2012_03_01_archive.html

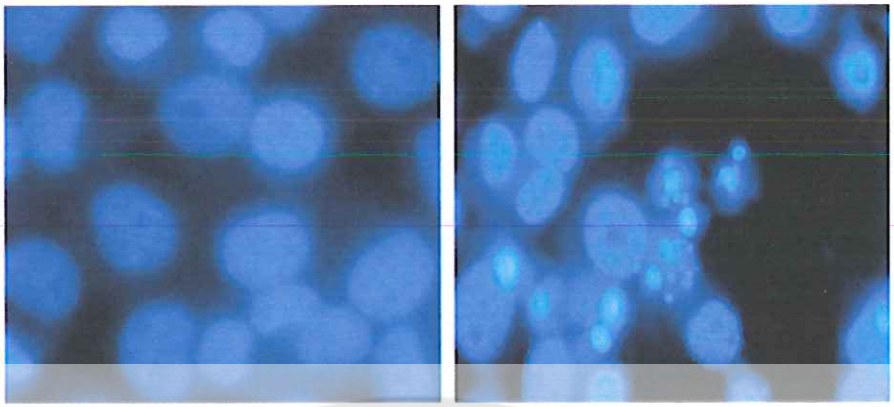


ภาพ 19 แสดงสีของ formazan crystal หลังถูกละลายด้วย DMSO พบว่า การมี**ชีวิตของ**เซลล์จากมากไปน้อย ได้แสดงที่ระดับความเข้มของสีม่วงมากไปยังสี**ม่วงจาง**ตามลำดับ

ที่มา: https://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis **ด้วยการย้อม** Hoechst 33342 staining

ในกระบวนการตายแบบ apoptosis เซลล์จะมีสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลง**ไปหลาย**รูป**แบบ** คือเกิดการอัดแน่น หดตัวสั้นลงของ chromatin เซลล์มีลักษณะเป็นถุง (blebbing) **เกิด**การแตกหักของ DNA และเซลล์แตกออกเป็นเศษซากเซลล์ โดยมี cell membrane ห่อหุ้ม **เรียกว่า** apoptotic bodies ดังนั้น สีย้อม Hoechst 33342 (bisBenzimide H 33342 trihydrochloride; Sigma-Aldrich, USA) เป็นการใช้ย้อมศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของ nucleus ซึ่งเป็น**ตัวบ่งชี้**รูป**แบบ**การตายแบบ apoptosis โดยสีของ Hoechst จะเข้าไปย้อมติดใน double-stranded DNA **ตรง**ตำแหน่งระหว่างคู่เบส adenine (A) กับ thymine (T) เกิดการเรืองแสงสีฟ้าน้ำเงิน**จากการ**วิเคราะห์ผลภายใต้กล้อง fluorescent microscope (Nikon, Japan) ดังแสดงในภาพ 20

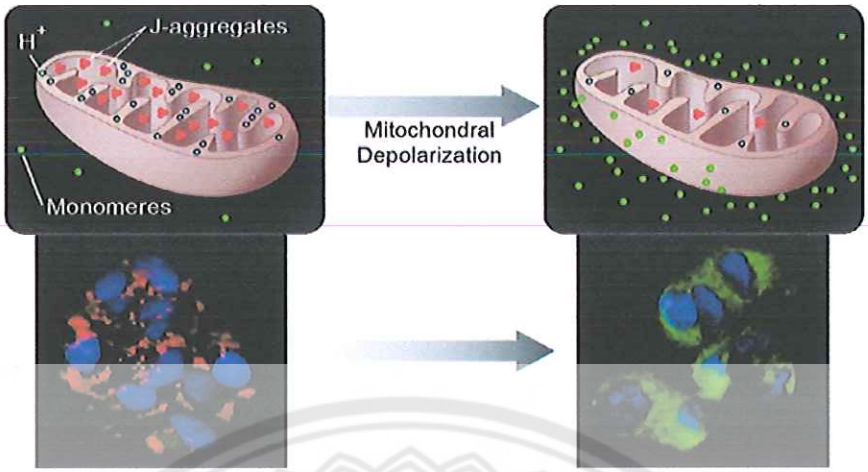


ภาพ 20 แสดงการติดสีเรืองแสงใน nucleus ของเซลล์ปกติ (ภาพซ้าย) และเซลล์**ที่เกิด**การตายแบบ apoptosis (ภาพขวา) จากการย้อมด้วย Hoechst 33342

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Pataer, et al., 2006

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ Mitochondrial membrane potential (MMP) **ด้วย JC-1 assay**

สีย้อม JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolylcarbo-cyanine iodide; MitoProbe™, USA) ใช้เป็นตัวบ่งบอกถึงสุขภาพของเซลล์ โดยการต**รวจสอบ** mitochondrial potential บนผนังของ mitochondria ในวิถีการเกิดกระบวนการ**ตาย**แบบ apoptosis โดยผ่าน intrinsic pathway นั้น มี mitochondria เป็นจุดศูนย์กลางที่สำคัญ **บนชั้นเยื่อหุ้มของ** mitochondria มีศักดิ์ไฟฟ้าที่เรียกว่า mitochondrial membrane potential (MMP) **ซึ่งเกิดจาก**การทำงานเคลื่อนที่แลกเปลี่ยนอิเล็กตรอน (e^-) ภายในชั้นเยื่อหุ้มของ mitochondria **ดังนั้นในส**ภาวะเซลล์ปกติจะมีระดับ MMP ที่สูง ทำให้สีย้อม JC-1 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น lipophilic cationic dye สามารถแทรกซึมเข้าสู่ mitochondria เกิดการเกาะกลุ่ม (aggregates) **สะสมใน** mitochondrial matrix **และจะพบการแสดงเป็นสีส้มแดง แต่ถ้าหากเกิดการสูญเสีย** MMP จากการทำงานของ mitochondria **ที่ผิดปกติไป ส่งผลทำให้สี** JC-1 ไม่สามารถผ่านเข้าสู่ mitochondria ได้ **จึงแสดงเป็นสีเขียวของ** JC-1 dye **อยู่ใน** cytoplasm **ของเซลล์ สามารถนำไปวิเคราะห์ผลภายใต้**กล้อง fluorescent microscope (Nikon, Japan) ดังแสดงในภาพ 21

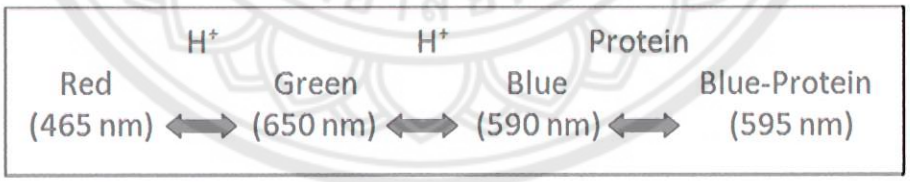


ภาพ 21 แสดงหลักการ และการติดสีย้อมของ JC-1 dye ในเซลล์ที่ปกติ (ภาพซ้าย) และในเซลล์สูญเสีย mitochondrial membrane potential (MMP) (ภาพขวา)

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Sakamuru, et al., 2011

ศึกษาหาปริมาณโปรตีนด้วย Bradford protein assay

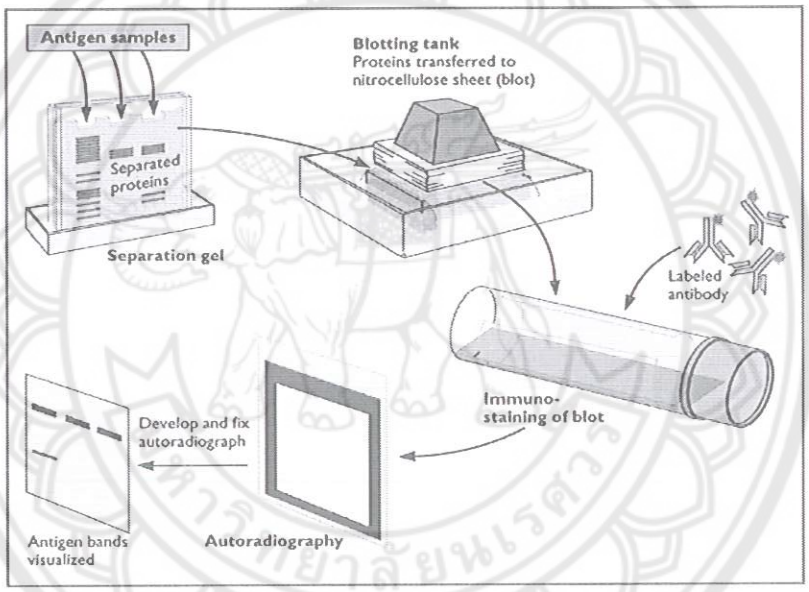
Bradford protein assay เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถใช้หาปริมาณโปรตีน โดยอาศัยหลักความสมดุลระหว่าง Coomassie Brillant Blue G-250 และการรวมตัวกันกับโปรตีนแบบเฉพาะเจาะจง ดังสมการ



Coomassie Brillant Blue G-250 หรือที่เรียกกันว่า Bradford's reagent ภายใต้สภาวะกรดเข้มข้น จะให้สีแดงออกน้ำตาล เมื่อมีการทำปฏิกิริยากับโปรตีน จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน ถ้าหากมีปริมาณกรดอะมิโนมาก สีที่เปลี่ยนจะยิ่งเข้ม ซึ่งสามารถวัดการดูดกลืนแสงของสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 595 nm

ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน ด้วยวิธี Western Blot Technique

Western blotting เป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษาการแสดงออกในระดับโปรตีน โดยใช้หลักการของ gel electrophoresis ในการแยกได้ทั้ง native protein และ denatured protein ต่อมาโปรตีนจะถูก transfer ไปยังแผ่น membrane แล้วตรวจสอบโปรตีนที่ต้องการโดยใช้ primary และ secondary antibody ซึ่ง primary antibody เป็น antibody ที่ specific ต่อโปรตีนที่ต้องการ และ secondary antibody เป็น antibody ที่ specific ต่อ primary antibody ซึ่ง secondary antibody นั้น จะติดด้วยเอนไซม์ หรือสารเรืองแสงอื่น และเมื่อทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นจะทำให้มีสีเกิดขึ้น และขั้นตอนสุดท้ายจะนำไปทำการวิเคราะห์ผล ดังแสดงในภาพ 22



ภาพ 22 แสดงหลักการของ western blot analysis

ที่มา: http://www.virology.ws/2010/07/07/virology-toolbox-the-western-blot/

วิธีศึกษาการวิจัย

1. **การศึกษาความเป็นพิษของ DMSO ต่อ T98G cells โดยเทคนิค MTT assay**

เนื่องจากว่าในงานวิจัยต้องใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายสารที่สนใจศึกษา ดังนั้น จึงจำเป็นต้องศึกษาหาความเป็นพิษของ DMSO ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่งแสดงอยู่ในผลของ vehicle control โดยจะคัดเลือกทดลองในระดับความเข้มข้นที่ปลอดภัยต่อเซลล์เพาะเลี้ยง เพื่อตัดปัจจัยการตายของเซลล์ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ลงใน 96 well-plate (Nunc™, USA) ในปริมาณ

$1X10^4$ cells/well บ่มในตู้ incubator (Panasonic, Japan) ที่อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายอาหารออกทิ้ง เติมอาหารใหม่กลับเข้าไป เติมสาร DMSO (AMRESCO®, USA) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 0.039% ถึง 5% ในปริมาณ 5 µl ในจำนวน 3 ซ้ำ บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทำ MTT assay โดยถ่ายสารออกทิ้งให้หมด ใส่สารละลาย 0.1% MTT (AMRESCO®, USA) จำนวน 100 µl นำไปบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมงครึ่ง ดูดสารละลาย MTT ออกทิ้งให้หมด ทำการละลาย formazan crystal ด้วยสารละลาย DMSO (Bio Basic Canada Inc., Canada) 100 µl เขย่าด้วยเครื่อง plate shaker เป็นเวลา 5 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ด้วยเครื่อง microplate reader (BioTek®, USA) แล้วนำมาคำนวณหาค่า % cell viability เทียบกับกลุ่ม control ความเข้มข้นของ DMSO ที่ถือว่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์ จะต้องไม่ทำให้ % cell viability ต่ำกว่า 95%

2. การศึกษาผลของ curcuminoid analogs ต่อการตายของ T98G cells โดยวิธี MTT assay

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ลงใน 96 well-plate (Nunc™, USA) ปริมาณ $1X10^4$ cells/well บ่มในตู้ incubator (Panasonic, Japan) ที่อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายอาหารออกทิ้ง แล้วเติมอาหารใหม่กลับเข้าไป พร้อมทั้งเติมสาร curcuminoid analogs (Prof. Dr. Apichart Suksamran) แต่ละชนิดที่ต้องการทดสอบ จำนวน 20 analogs ที่ระดับความเข้มข้น 20 µM และ 40 µM ในปริมาณ 5 µl ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ สำหรับที่เป็นกลุ่ม control เติมเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปทำ MTT assay และคำนวณหาค่า % cell viability เทียบกับกลุ่ม control ดังเช่นในการทดลองที่ 1

3. การศึกษาผลของ curcuminoid analog และสารต้นแบบ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการตายของ T98G cells โดยเทคนิค MTT assay

ในการศึกษานี้ ได้คัดเลือก curcuminoid analog ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเซลล์มะเร็งและที่เป็นสารต้นแบบจากการทดลองที่ 2 นั่นคือสารโครงสร้างที่ 15 (Cur15) และสารโครงสร้างที่ 1 (Cur1) ตามลำดับ นำมาศึกษาผลการยับยั้งเซลล์มะเร็งที่เป็นลักษณะ dose-dependent โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ลงใน 96 well-plate (Nunc™, USA) ในปริมาณ $1X10^4$ cells/well บ่มในตู้ incubator (Panasonic, Japan) ที่อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในการศึกษาผลของ Cur1 ต่อเซลล์ ให้เซลล์ได้รับที่ระดับความเข้มข้น 10 µM ถึง 120 µM และสำหรับการศึกษาผลของ Cur15 ต่อเซลล์ ให้เซลล์ได้รับที่ระดับความเข้มข้น 2.5 µM ถึง

60 μM จำนวนอย่างละ 3 ซ้ำ บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปทำ MTT assay และคำนวณหาค่า % cell viability เทียบกับกลุ่ม control ดังเช่นในการทดลองที่ 1

4. การศึกษาผลของ temozolomide (TMZ) ต่อ T98G cells โดยเทคนิค MTT assay

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ลงใน 96 well-plate (Nunc™, USA) ในปริมาณ $1X10^4$ cells/well บ่มในตู้ incubator (Panasonic, Japan) ที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบด้วย TMZ (Sigma-Aldrich, USA) ที่ระดับความเข้มข้น 100 μM ถึง 1,600 μM จำนวน 3 ซ้ำ บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำ MTT assay และคำนวณหาค่า % cell viability เทียบกับกลุ่ม control ดังเช่นในการทดลองที่ 1

5. การศึกษาผลการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งระหว่าง TMZ ร่วมกับ Cur1 และ TMZ ร่วมกับ Cur15 ต่อ T98G cells โดยเทคนิค MTT assay

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ลงใน 96 well-plate (Nunc™, USA) ในปริมาณ $1X10^4$ cells/well บ่มในตู้ incubator (Panasonic, Japan) ที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบด้วย temozolomide ในระดับความเข้มข้น 100 μM และ 200 μM ที่คัดเลือกจากการทดลองที่ 4 ร่วมกับ Cur1 ในระดับความเข้มข้น 10 μM ถึง 40 μM และร่วมกับ Cur15 ที่ระดับความเข้มข้น 5 μM ถึง 20 μM ซึ่งได้คัดเลือกจากการทดลองที่ 3 ทำการทดสอบในจำนวนอย่างละ 3 ซ้ำ บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำ MTT assay ดังเช่นในการทดลองที่ 1 แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ 570nm ได้มาคำนวณหาค่า % cell viability เทียบกับกลุ่ม control และกลุ่มที่ได้รับ temozolomide หรือ curcuminoid analog เพียงอย่างเดียว

6. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis ด้วยวิธี Hoechst 33342 staining

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ลงใน 8 well chamber slide (SPL Life Sciences Co., Ltd., Korea) ในปริมาณ $2X10^4$ cells/well บ่มในตู้ incubator (Panasonic, Japan) ที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายอาหารออกทิ้ง เติมอาหารใหม่กลับเข้าไป ทดสอบด้วย temozolomide และ curcuminoid analog ในระดับความเข้มข้นที่คัดเลือกจากการทดลองที่ 5 ปริมาณ 10 μl บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์ด้วย 1XPBS ให้สะอาด แล้วเติมสาร Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, USA) ในความเข้มข้น 0.1mg/ml บ่มที่อุณหภูมิห้อง ไว้ในที่มืดเป็นระยะเวลา 15 นาที ล้างสีย้อมส่วนเกินออกด้วย 1XPBS แล้วนำไปวิเคราะห์ผลภายใต้กล้อง fluorescent microscope (Nikon, Japan)

7. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ mitochondrial membrane potential (MMP) ด้วย JC-1 assay

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 8 well chamber slide (SPL Life Sciences Co., Ltd., Korea) ในปริมาณ $2X10^4$ cells/well บ่มในตู้ incubator (Panasonic, Japan) ที่อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายอาหารออกทิ้ง ทดสอบด้วย temozolomide และ curcuminoid analog ในระดับความเข้มข้นที่คัดเลือกจากการทดลองที่ 5 บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์ด้วย PBS เติมสาร JC-1 ในความเข้มข้น 2 µM ลงในแต่ละ well บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 15 นาที โดยป้องกันจากแสง สำหรับกลุ่ม positive control จะเติมด้วยสาร Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) ในปริมาณความเข้มข้น 50 µM บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงเติมด้วยสาร JC-1 บ่มต่อเป็นเป็นเวลา15 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วย PBS (37 °C) สุดท้ายนำไปวิเคราะห์ผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (Nikon, Japan)

8. การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบ apoptosis

ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบ apoptosis ใน human glioblastoma cells (T98G) ได้แก่ การแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ซึ่งเป็น anti-apoptotic protein และ โปรตีน Bax ซึ่งเป็น apoptotic protein เทียบกับ housekeeping protein คือ โปรตีน β-actin ด้วยเทคนิค western blot analysis โดยมีลำดับขั้นตอน ดังนี้

8.1 การสกัดโปรตีน

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ปริมาณ $3X10^5$ cells ลงใน 60 X 15mm dish (Falcon®, USA) บ่มในตู้ incubator (Panasonic, Japan) ที่อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหาร และแบ่ง dish ออกเป็น 4 กลุ่ม (1) control group (2) ทดสอบด้วย TMZ 100 µM (3) ทดสอบด้วย Cur1 ที่ความเข้มข้น 20 µM และ 30 µM หรือ Cur15 ที่ความเข้มข้น 10 µM และ 20 µM (4) ทดสอบด้วย TMZ + Cur1 หรือ TMZ + Cur15 บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเทอาหารออกทิ้งให้หมด ล้างด้วย PBS แช่เย็นแล้วขูดเซลล์ให้หลุดออกจาก dish ใส่ microcentrifuge tube เก็บให้อยู่ในความเย็นตลอดเวลา นำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 3 นาทีที่ 4 °C ดูด PBS ทิ้ง ชะล้างเซลล์ และ centrifuge ทำซ้ำอีก 1 รอบดูด PBS ทิ้งให้หมด เติม 500 µl RIPA buffer นำไป vortex เป็นเวลา 30 นาที โดยสลับ microcentrifuge tube เพื่อคงความเย็นให้กับแต่ละ microcentrifuge tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที ดูด

supernatant ใส่ microcentrifuge tube หลอดใหม่ที่แช่เย็นไว้แล้วเก็บไว้ที่ -80 °C (SANYO, Japan) หากยังไม่ได้นำไปใช้ทันที

8.2 การคำนวณหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford protein assay

เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานจากโปรตีน Bovine Serum Albumin (BSA) เจือจางโปรตีนตัวอย่างที่สกัดลง 40X ด้วยน้ำกลั่นนำโปรตีนมาตรฐาน และโปรตีนตัวอย่าง หยอดลง 96 well-plate (Nunc™, USA) หลุมละ 20 µl จำนวน 3 ซ้ำเติม 1X Bradford solution (Bio-Rad Laboratories, Inc., Canada) 200 µl/well ห่อด้วยกระดาษฟอยล์นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm นำค่าที่ได้ไปพล็อตกราฟทำเป็น standard curve และใช้สมการเชิงเส้นในการคำนวณหาปริมาณโปรตีนตัวอย่าง

8.3 การแยก protein ด้วยเทคนิค SDS-PAGE electrophoresis

เตรียมชุดอุปกรณ์การ run gel ตรวจสอบการรั่วซึมของกระจกด้วยน้ำกลั่นถ่ายน้ำกลั่นทิ้ง และซับด้วยกระดาษกรองเติม 12% separating gel ลงไป ¾ ของกระจก แล้วค่อยๆ เติมน้ำกลั่นให้เต็มเพื่อไล่อากาศออกให้หมด ทิ้งไว้ประมาณ 45 นาที จนเจลแข็งตัว ถ่ายน้ำกลั่นทิ้งและซับด้วยกระดาษกรอง แล้วเติม 4% stacking gel ให้เต็ม เสียบด้วย 10-well combs ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที จนเจลแข็งตัวนำไปใส่ใน buffer chamber เติม 1X running buffer ลงด้านข้างของ chamber จนท่วมแผ่นโลหะ และเติมลงตรงกลางระหว่างแผ่นกระจกเจล จนท่วมพอดี คำนวณปริมาณโปรตีนตัวอย่าง นำมาผสมกับ loading-dye ในปริมาณ 1:4 ของโปรตีน heat ด้วยความร้อน 100°C เป็นเวลา 5 นาที หยอดโปรตีนตัวอย่าง และ maker ลงใน well จากนั้นทำการแยกขนาดโปรตีนโดยใช้กำลังกระแสไฟฟ้า 100 Volts, 60 mA เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

8.4 การย้ายโปรตีนลงสู่แผ่น membrane polyvinylidene fluoride (PVDF)

นำอุปกรณ์ที่ใช้ (gel holder cassettes, foam pads, กระดาษกรอง) ทำให้เปียกโดยแช่ใน transfer buffer ส่วน membrane polyvinylidene fluoride (PVDF) ขนาดรูพรุน 0.45 µm (Millipore™, Germany) แช่ใน methanol เป็นเวลา 5 นาที วางกระดาษกรอง 3 แผ่นลงบน foam pad ด้านหนึ่งของ cassettes ตามด้วย membrane แผ่นเจลโปรตีน กระดาษกรอง 3 แผ่น foam pad และปิด cassettes ตามลำดับ นำไปใส่ใน buffer tank เติม transfer buffer ให้ท่วม cassettes ต่อขั้วไฟฟ้าให้ขั้วลบอยู่ด้านแผ่นเจล ส่วนขั้วบวกอยู่ด้าน membrane ใช้กระแสไฟฟ้า 80 Volts, 200 mA เป็นเวลา 30 นาทีทำการ block แผ่น membrane ด้วย 5 % skimmed milk ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

8.5 การตรวจหาโปรตีนที่ต้องการด้วย antibody

สำหรับโปรตีน Bcl-2 และโปรตีน Bax ใช้ mouse anti-Bcl-2 (MILLIPORE, USA) และ mouse anti-Bax (MILLIPORE, USA) ตามลำดับ เป็น primary antibody ที่ความเข้มข้น 1:500 ใน 1X TBST (0.1% tween-20) และสำหรับโปรตีน β-actin ใช้ mouse anti-actin (MILLIPORE, USA) เป็น loading control ความเข้มข้น 1:80,000 ใน 1X TBST (0.1% tween-20) ทั้งหมดปิดด้วยแผ่น paraffin (PARAFILM®, USA) บ่มไว้ที่สภาวะอุณหภูมิ 4^0C ข้ามคืน จากนั้นล้าง primary antibody ด้วย TBST 10 นาที เป็นจำนวน 5 ครั้ง แล้วจึงเติม secondary antibody ที่ติดฉลากด้วย horseradish peroxidase anti-mouse IgG (Invitrogen™, CA, USA) ความเข้มข้น 1:40,000 สำหรับโปรตีน Bcl-2 และ Bax ใช้ความเข้มข้น 1:80,000 สำหรับโปรตีน β-actin บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมงครึ่ง จากนั้นล้าง secondary antibody ด้วย TBST นาน 15 นาที จำนวน 3 ครั้งและทำการตรวจจับโปรตีนด้วย HRP Chemiluminescent Substrate Reagent Kit (Immobilon™, USA) โดยผสมสารละลาย A และ B ในอัตรา 1:1 แล้ว pipette ลงบนแต่ละ membrane ปิดด้วยแผ่น paraffin และป้องกันแสงโดยครอบด้วยกล่องโฟม ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปบันทึกสัญญาณบนแผ่นฟิลม์ X-ray แล้วจึงวิเคราะห์ปริมาณผลของโปรตีนแต่ละกลุ่มโดยการเปรียบเทียบปริมาณด้วย Java-based image processing program; ImageJ (NIH, USA)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (Statistical analysis)

ผลการทดลองเชิงปริมาณที่ได้จากการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง และนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติโดย *t*-test และ one-way ANOVA ด้วยโปรแกรม Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 17.0 (SPSS Inc. USA) และ Graph Prism Software, version 5 ข้อมูลที่ถูกวิเคราะห์ได้แสดงออกมาเป็นค่าเฉลี่ย (mean) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation; SD) ที่ค่า p value น้อยกว่า 0.05 ($p < 0.05$) ถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

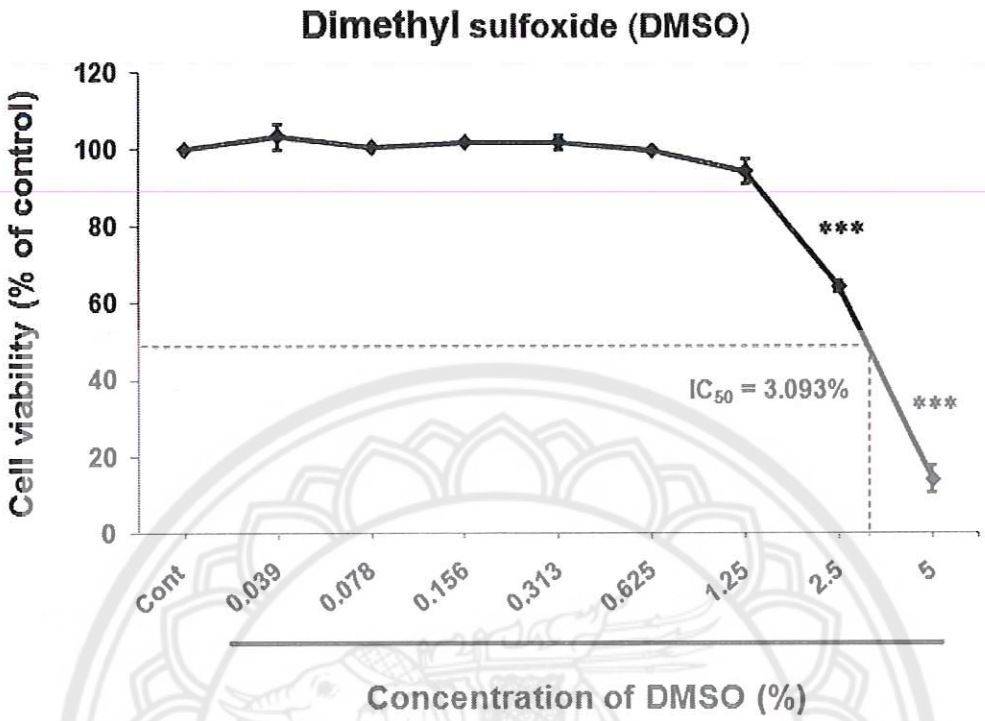
บทที่ 4

ผลการวิจัย

ความเป็นพิษของตัวทำละลาย DMSO ต่อ T98G cells

ในงานวิจัยนี้มีการใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายสารที่สนใจศึกษา ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์หากให้ในปริมาณที่สูง ดังนั้น จึงจำเป็นต้องศึกษาหาความเป็นพิษของ DMSO ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง คัดเลือกในระดับความเข้มข้นที่ปลอดภัย เพื่อตัดปัจจัยการตายของเซลล์ โดยในการทดลองให้เซลล์ได้รับที่ระดับเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ DMSO ตั้งแต่ 0.039% ถึง 5% จากผลการทดสอบพบว่า ช่วงความเข้มข้น 0.039% ถึง 1.25% ของ DMSO มีค่าใกล้เคียงและไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ treat ด้วย DMSO การมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงเหลือ 64.437 ± 1.54% และ 14.094 ± 3.41% ที่ระดับความเข้มข้น 2.5% และ 5% ตามลำดับ ซึ่งมีความต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในภาพ 23 โดยความสามารถในการยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์ลง 50% (half maximal inhibitory concentration; IC_{50}) ของ DMSO อยู่ที่ 3.09%

เนื่องจากในงานวิจัยได้มีการใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายสารที่สนใจศึกษา ดังนั้นจึงได้ทำ vehicle control เปรียบเทียบควบคู่ไปด้วยในแต่ละการทดลอง



ภาพ 23 แสดงผลความเป็นพิษของ DMSO ต่อ T98G cells โดยการทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay จากการที่เซลล์ได้รับสาร DMSO ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD จากการทดสอบ 3 ซ้ำ
***$p < 0.001$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Cont) ที่ไม่ได้รับ DMSO

ผลของ curcuminoid analogs ต่อการตายของ T98G cells

ในการศึกษานี้ เป็นการทดลองเบื้องต้นที่จะคัดเลือกโครงสร้างสารของ curcuminoid analogs ที่ออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง T98G ได้ดีที่สุดจากทั้งหมด 20 อนุพันธ์ โดยศึกษาด้วยวิธีการ MTT assay ซึ่งสารที่ดีที่สุดจะทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) ลดลงมากที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยที่ใช้ความเข้มข้นหรือมีค่า IC_{50} น้อยที่สุด

ในการทดลองให้ T98G cells ได้รับ curcuminoid analogs (Cur) สารที่ 1-10 และ 11-20 ที่ความเข้มข้น 20 µM และ 40 µM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วย MTT assay ผลการทดลองพบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 20 µM ของ Cur 1-10 และที่ 40 µM ของ Cur 2-10 ส่งผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์มีค่าใกล้เคียงและไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ให้เฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว แต่ Cur1 ที่ความเข้มข้น 40 µM มีผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์เหลือ 85.15 ± 4.55% ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) ดังแสดงในตาราง 1

ส่วนผลของ Cur 11-20 พบว่า Cur15 ที่ความเข้มข้น 20 µM และ 40 µM มีผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยค่า % cell viability อยู่ที่ 62.02 ± 4.47% และ 37.14 ± 2.39% ตามลำดับ ในขณะเดียวกัน ที่ความเข้มข้น 40 µM ยังพบว่า Cur13, 18 และ 19 มีผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่า % cell viability ลดลงอยู่ที่ 85.70 ± 3.26%, 85.38 ± 6.43% และ 86.38 ± 5.40% ตามลำดับ อีกทั้งใน Cur20 ที่ 40 µM ส่งผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงไปที่ 83.22 ± 1.58% ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในตาราง 2

สำหรับ vehicle control ที่ถูก treat ด้วย DMSO ในระดับความเข้มข้น 0.376% ซึ่งเท่ากับปริมาณความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการเตรียมสารของชุดการทดลองนี้ พบว่า ไม่ส่งผลต่อการตายของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

จากผลการศึกษานี้ ได้คัดเลือกสาร Cur15 และ Cur1 ที่เป็นสารต้นแบบ สำหรับในการศึกษาถัดไป

ตาราง 1 ผลของ curcuminoid analogs 1-10 ต่อการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง T98G จากการที่เซลล์ได้รับ curcuminoids analogs 1-10 ที่ระดับความเข้มข้น 20 µM และ 40 µM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยการศึกษาการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

Curcuminoid analogs	เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability)	
	20 µM	40 µM
1	94.39 ± 1.67	85.15 ± 4.55 *
2	101.60 ± 3.05	91.67 ± 2.03
3	103.27 ± 2.30	92.16 ± 1.10
4	100.46 ± 4.31	87.65 ± 1.41
5	98.60 ± 2.01	88.01 ± 2.63
6	102.89 ± 1.88	93.15 ± 7.70
7	102.15 ± 2.61	92.45 ± 1.72
8	102.33 ± 1.23	92.29 ± 3.59
9	103.93 ± 10.49	96.36 ± 3.13
10	103.78 ± 3.82	91.50 ± 3.68

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD จากจำนวนการทดลอง 3 ซ้ำ

*p < 0.05 แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ให้เฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว

ตาราง 2 ผลของ curcuminoid analogs 11-20 ต่อการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง T98G จากการที่เซลล์ได้รับ curcuminoids analogs 11-20 ที่ระดับความเข้มข้น 20 μM และ 40 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยการศึกษาการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

Curcuminoid analogs	เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability)	
	20 μM	40 μM
11	105.29 ± 2.79	103.10 ± 5.51
12	104.08 ± 2.55	99.23 ± 8.84
13	104.53 ± 4.59	85.70 ± 3.26 *
14	105.52 ± 4.10	92.75 ± 3.13
15	62.02 ± 4.47 ***	37.14 ± 2.39 ***
16	105.24 ± 2.43	96.86 ± 2.62
17	101.46 ± 5.18	88.27 ± 4.40
18	102.40 ± 4.38	85.38 ± 6.43 *
19	102.91 ± 5.87	86.38 ± 5.40 *
20	101.41 ± 3.79	83.22 ± 1.58 **

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD จากจำนวนการทดลอง 3 ซ้ำ

*p < 0.05, **p < 0.01 และ ***p < 0.001 แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ให้เฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว

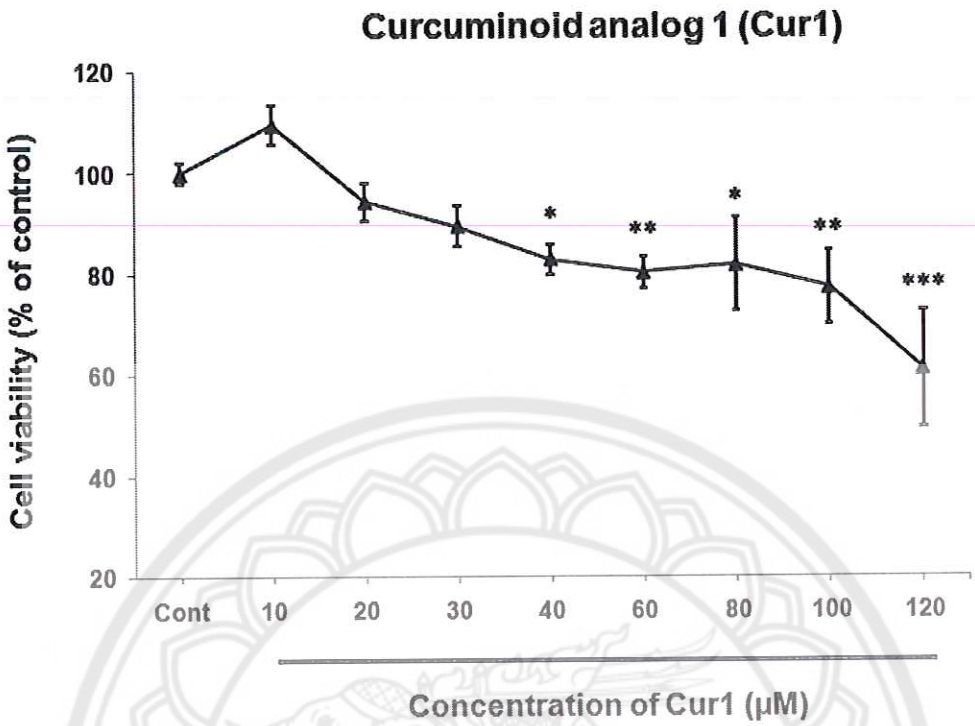
ผลของ curcuminoid analog และสารต้นแบบ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการตายของ T98G cells

ในการทดลองนี้ต้องการศึกษาถึงความเข้มข้นที่เป็นพิษของ curcuminoid analog ที่ได้คัดเลือกจากการทดลองก่อนหน้านี้ ที่มีฤทธิ์ต่อการตายของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง T98G ได้มากที่สุด นั่นคือ curcuminoid analog ที่ 15 (Cur15) รวมทั้ง curcuminoid ที่เป็นสารต้นแบบ คือ สารโครงสร้างที่ 1 (Cur1) ในการทดสอบให้เซลล์ได้รับ Cur1 ที่ระดับความเข้มข้น 10-120 μM และ Cur15 ในความเข้มข้น 2.5-60 μM เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วย MTT assay และคำนวณหา % cell viability เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเพียงอาหารเลี้ยงเซลล์

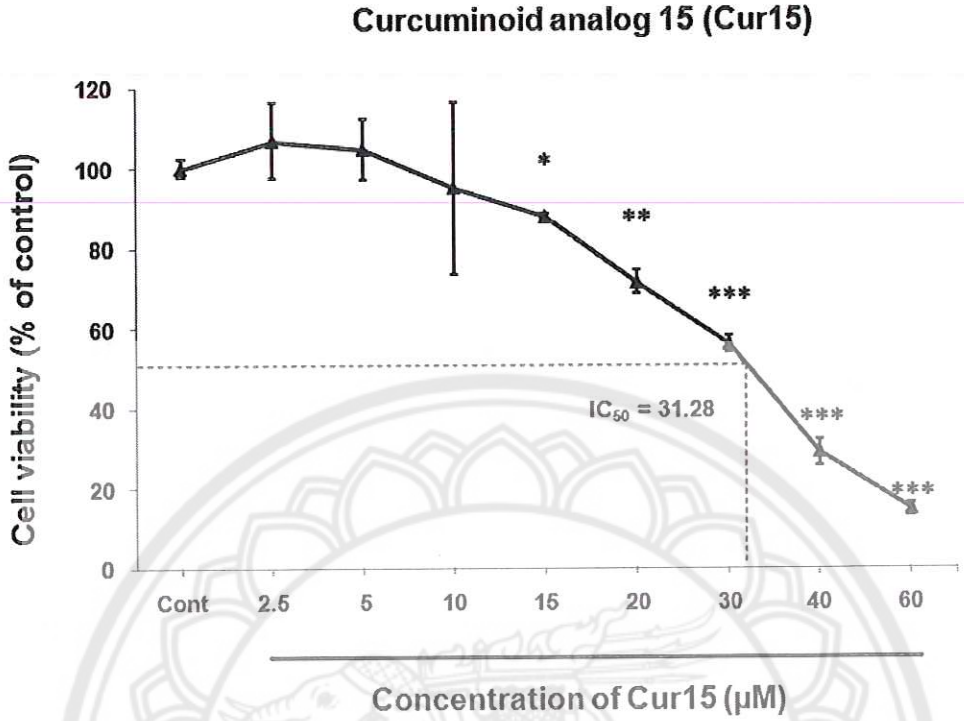
จากผลการศึกษาพบว่า ทั้ง Cur1 และ Cur15 มีผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์เป็นไปในลักษณะ dose-dependent โดยในสาร Cur1 มีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ลดลงประมาณ 20% ที่ความเข้มข้น 40 μM และเหลือ % cell viability ประมาณ 60% ที่ความเข้มข้น 120 μM ดังแสดงในภาพ 24 โดยมีค่า IC_{50} อยู่ที่ 170 μM โดยประมาณ

ส่วนผลของสาร Cur15 ที่ระดับความเข้มข้น 15 μM เริ่มส่งผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และที่ความเข้มข้น 60 μM มีผลลด % cell viability เหลือเพียง 14% เท่านั้น โดยมีค่า IC_{50} อยู่ที่ 31.28 μM ดังแสดงในภาพ 25

สำหรับ vehicle control ที่ถูก treat ด้วย DMSO ในระดับความเข้มข้น 0.276% เท่ากับปริมาณความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการเตรียมสาร curcuminoid analog พบว่า ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



ภาพ 24 แสดงผลของ Cur1 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการตายของ T98G cells ทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay จากการที่เซลล์ได้รับสาร Cur1 ในระดับความเข้มข้น 10-120 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD จากการทดสอบ 3 ซ้ำ
$^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$ และ $^{***}p < 0.001$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Cont) ที่ไม่ได้รับการ treat สาร



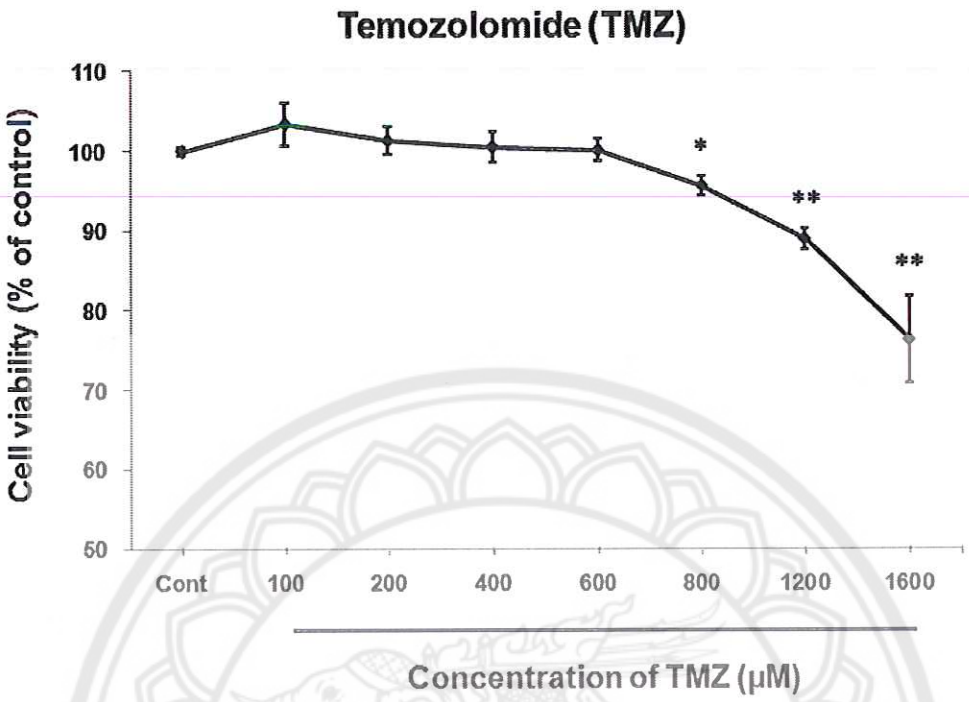
ภาพ 25 แสดงผลของ Cur15 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการตายของ T98G cells ทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay จากการที่เซลล์ได้รับสาร Cur15 ในระดับความเข้มข้น 2.5 μM ถึง 60 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD จากการทดสอบ 3 ซ้ำ
*$p < 0.05$, **$p < 0.01$ และ ***$p < 0.001$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Cont) ที่ไม่ได้รับการ treat

ผลของ temozolomide ต่อการตายของ T98G cells

การทดสอบผลของ temozolomide (TMZ) ซึ่งเป็นยาเคมีบำบัด ต่อการตายของ T98G cells มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ TMZ ในการนำไปใช้ทดสอบต่อการเหนี่ยวนำการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยทำการทดสอบให้เซลล์เพาะเลี้ยงได้รับ TMZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 100-1,600 μM เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วย MTT assay จากนั้นคำนวณหา % cell viability เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เซลล์ไม่ได้รับ TMZ

จากผลการศึกษาพบว่า TMZ มีผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์เป็นไปในลักษณะ dose-dependent โดยที่ระดับความเข้มข้น 800 μM เริ่มมีผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ TMZ และ % cell viability ลดลงเหลือ 76.31% ที่ความเข้มข้น 1,600 μM ($p < 0.01$) ดังแสดงในภาพ 26 สำหรับที่ระดับความเข้มข้นของ vehicle control เท่ากับปริมาณความเข้มข้นที่ใช้ในการเตรียมสาร TMZ พบว่า ไม่ส่งผลต่อการตายของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

จากผลการศึกษาจะสังเกตได้ว่า ถ้าต้องการให้การมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงที่ 24 ชั่วโมง จะต้องใช้ความเข้มข้นของ TMZ ถึง 800 μM ซึ่งถือได้ว่าเป็นระดับปริมาณที่สูง เนื่องด้วยวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ต้องการศึกษาการเสริมฤทธิ์ต้านมะเร็งของ TMZ ร่วมกับสารอื่นที่มีในธรรมชาติ เพื่อลดปริมาณการใช้ dose ของ TMZ ลง ดังนั้น จึงทำการคัดเลือกความเข้มข้นของ TMZ ที่ระดับต่ำ คือ 100 μM และ 200 μM สำหรับในการศึกษาถัดไป



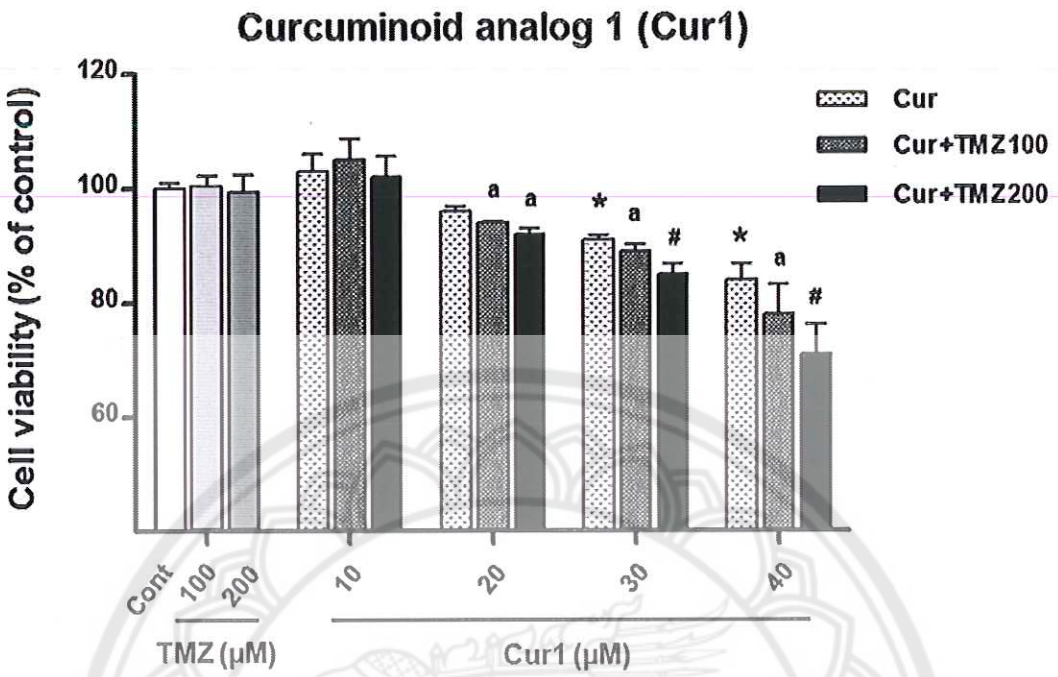
ภาพ 26 แสดงผลของ TMZ ต่อการตายของ T98G cells โดยการตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay จากการที่เซลล์ได้รับสาร TMZ ในระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD จากการทดสอบ 3 ซ้ำ
*$p < 0.05$ และ **$p < 0.01$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Cont) ที่ไม่ได้รับการ treat ด้วยสาร TMZ

ผลการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งร่วมกันระหว่าง curcuminoid analog และ temozolomide ต่อ T98G cells

วัตถุประสงค์ในการศึกษาผลการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งร่วมกันของ curcuminoid analog กับ temozolomide (TMZ) นั้นก็เพื่อนำผลการเสริมฤทธิ์ต้านมะเร็งร่วมกันของสารสกัดจากธรรมชาติกับยาเคมีบำบัดต่อเซลล์ glioblastoma เพาะเลี้ยงไปศึกษาพัฒนาต่อยอด ซึ่งอาจจะช่วยลดขนาดยา ลดผลข้างเคียงจากยาและเสริมประสิทธิภาพการรักษาให้ดียิ่งขึ้น รวมทั้งน่าจะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการรักษาลงได้ โดยในการศึกษานี้ได้คัดเลือก curcuminoid โครงสร้างสารที่ 1 (Cur1) ที่เป็นสารต้นแบบ ในระดับความเข้มข้น 10-40 μM และ curcuminoid analog โครงสร้างสารที่ 15 (Cur15) ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ ที่ความเข้มข้น 2.5-20 μM ร่วมกับ TMZ ในความเข้มข้น 100 μM หรือ 200 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทดสอบเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วย MTT assay

ผลการศึกษาพบว่า สาร Cur1 ที่ความเข้มข้น 20-40 μM ร่วมกับ TMZ 100 μM สามารถลดการมีชีวิตรอดของเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ treat ด้วย TMZ 100 μM เพียงอย่างเดียว เมื่อความเข้มข้นของ Cur1 เพิ่มขึ้นที่ 30 μM และ 40 μM ร่วมกับ TMZ 200 μM พบว่ายิ่งส่งผลลดการมีชีวิตรอดของเซลล์ลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ treat ด้วย TMZ หรือ Cur1 เพียงอย่างเดียว ซึ่งผลการลดการมีชีวิตรอดของเซลล์เป็นไปในลักษณะ dose-dependent ดังแสดงในภาพ 27

ส่วนผลของสาร Cur15 พบว่า ที่ความเข้มข้น 10-20 μM ร่วมกับ TMZ 100 μM ลดการมีชีวิตรอดของเซลล์แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ treat ด้วย TMZ 100 μM เพียงอย่างเดียว และการมีชีวิตรอดของเซลล์ยิ่งลดน้อยลงที่ความเข้มข้น 15 μM และ 20 μM ของ Cur15 ร่วมกับ TMZ 200 μM โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ treat ด้วย TMZ หรือ Cur15 เพียงอย่างเดียว ซึ่งผลการลดการมีชีวิตรอดของเซลล์เป็นไปแบบ dose-dependent เช่นเดียวกัน ดังแสดงในภาพ 28



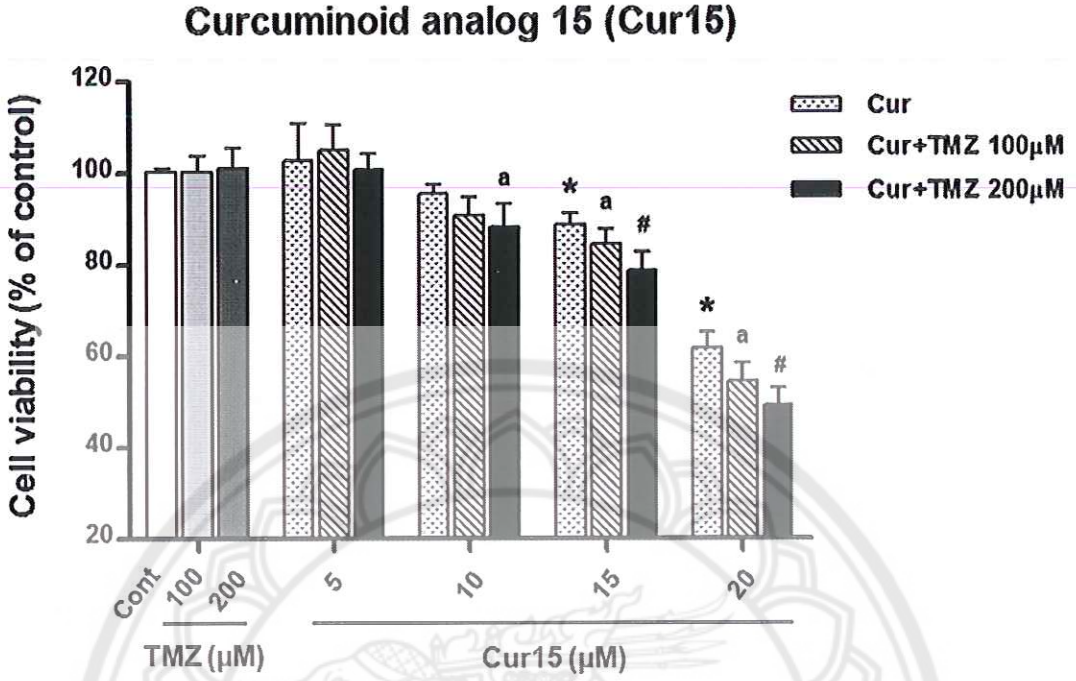
ภาพ 27 แสดงผลการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งร่วมกันระหว่าง Cur1 และ TMZ ต่อ T98G cells โดยการตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay จากการที่เซลล์ได้รับสาร Cur1 ในระดับความเข้มข้น 10-40 μM ร่วมกับ TMZ 100 μM หรือ 200 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD จากการทดสอบ 3 ซ้ำ

*$p < 0.05$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Cont) ที่ไม่ได้รับการ treat ทั้ง Cur1 และ TMZ

[a]$p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับการ treat ด้วย TMZ 100 μM

[#]$p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับการ treat ด้วย Cur1 หรือ TMZ เพียงอย่างเดียว



ภาพ 28 แสดงผลการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งร่วมกันระหว่าง Cur15 และ TMZ ต่อ T98G cells โดยการตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay จากการที่เซลล์ได้รับสาร Cur15 ในระดับความเข้มข้น 5-20 μM ร่วมกับ TMZ 100 μM หรือ 200 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD จากการทดสอบ 3 ซ้ำ

*$p < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Cont) ที่ไม่ได้รับการ treat ทั้ง Cur15 และ TMZ

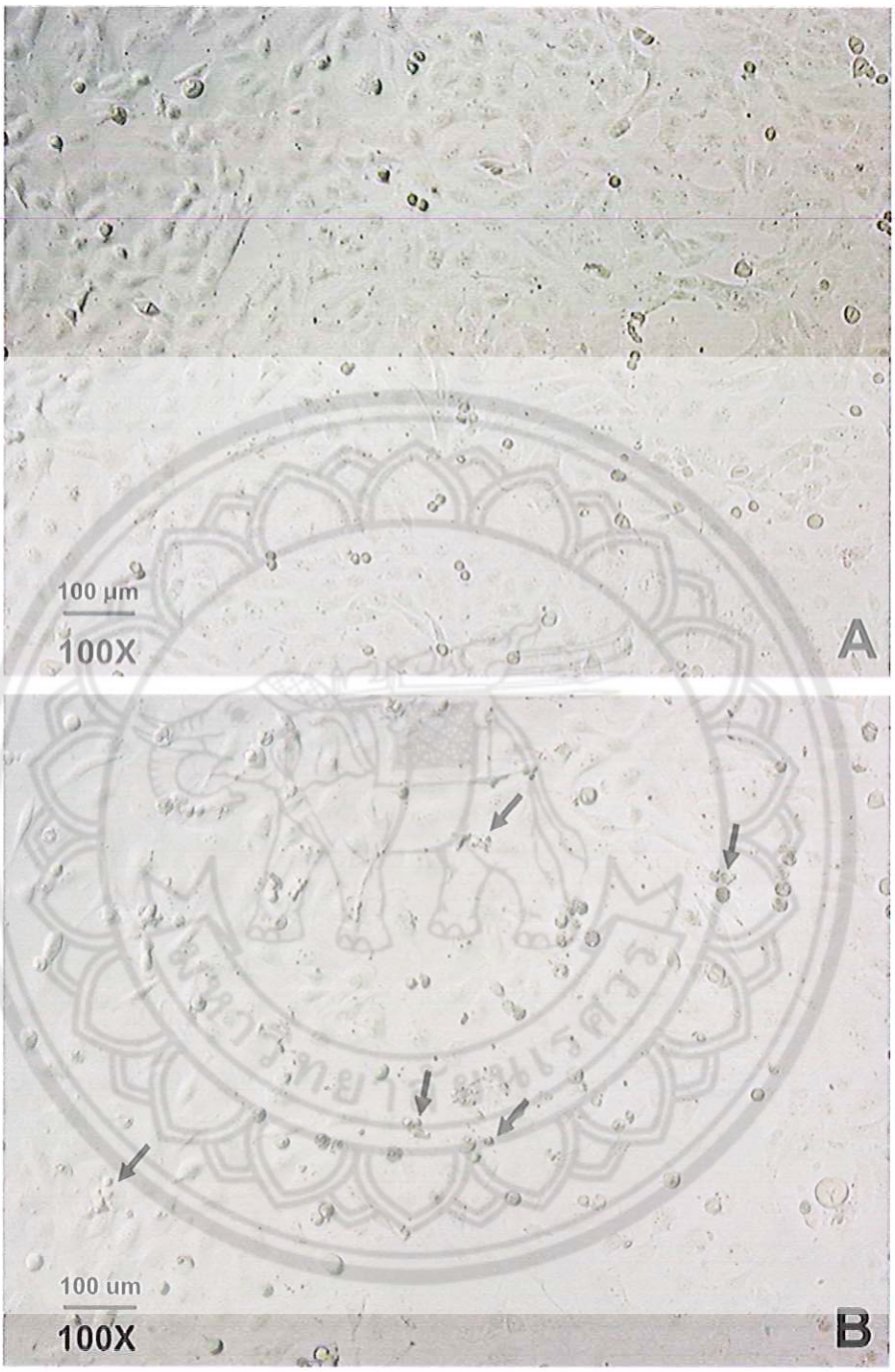
[a]$p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับการ treat ด้วย TMZ 100 μM

[#]$p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับการ treat ด้วย Cur15 หรือ TMZ เพียงอย่างเดียว

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ของ T98G cells

ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางด้าน morphology ของเซลล์ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะการตายของเซลล์ในรูปแบบ apoptosis จากการทดลอง ได้แบ่งกลุ่มเซลล์เพาะเลี้ยงออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมที่ให้เพียงอาหารเลี้ยงเซลล์ กลุ่มที่ treat ด้วย TMZ 100 μM กลุ่มที่ treat ด้วย Cur15 15 μM และกลุ่มที่ให้ TMZ ร่วมกับ Cur15 ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเซลล์ภายใต้กล้อง phase-contrast microscope พบว่าเซลล์ในกลุ่มที่ได้รับสาร นอกจากจะมีจำนวนที่ลดน้อยลง เซลล์ยังมีลักษณะหดเล็กลง และยังพบชิ้นส่วนเซลล์ที่แตกออก เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร ดังแสดงในภาพ 29

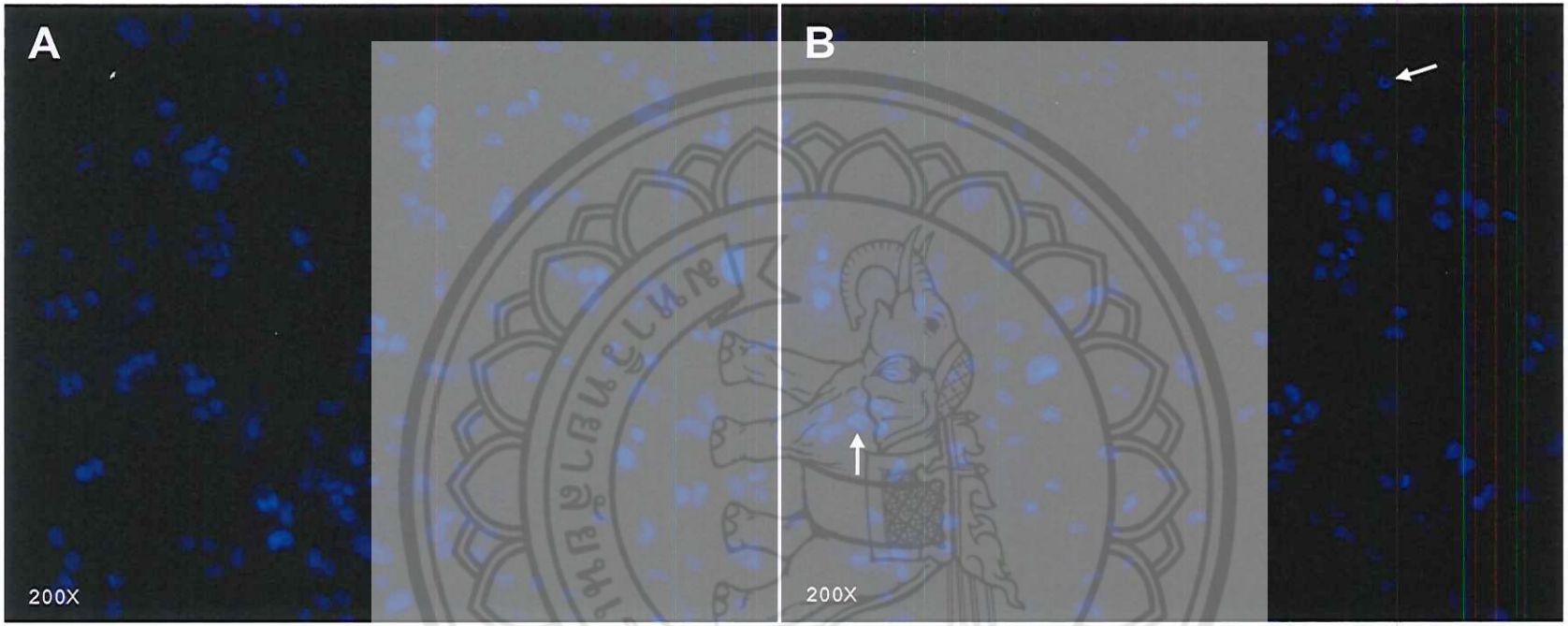
ในอีกทางหนึ่ง ได้ศึกษาการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยการย้อมด้วย Hoechst 33342 ศึกษาภายใต้กล้อง fluorescent microscope ส่วนของ nucleus ของเซลล์จะติดสีน้ำเงินเรืองแสง จากผลการศึกษา พบว่า เซลล์ในกลุ่มที่ treat ด้วย TMZ 100 μM กับกลุ่มที่ treat ด้วย Cur15 15 μM เกิดลักษณะ nuclear condensation และพบ apoptotic bodies ซึ่งพบลักษณะนี้เพิ่มมากขึ้นในกลุ่มที่ให้ TMZ ร่วมกับ Cur15 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีลักษณะ nucleus ขนาดใหญ่ และ เป็นทรงกลม ดังแสดงในภาพ 30



ภาพ 29 แสดงผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางด้าน morphology ของ T98G cells ภายใต้กล้อง phase-contrast microscope

(A) แสดงลักษณะเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร

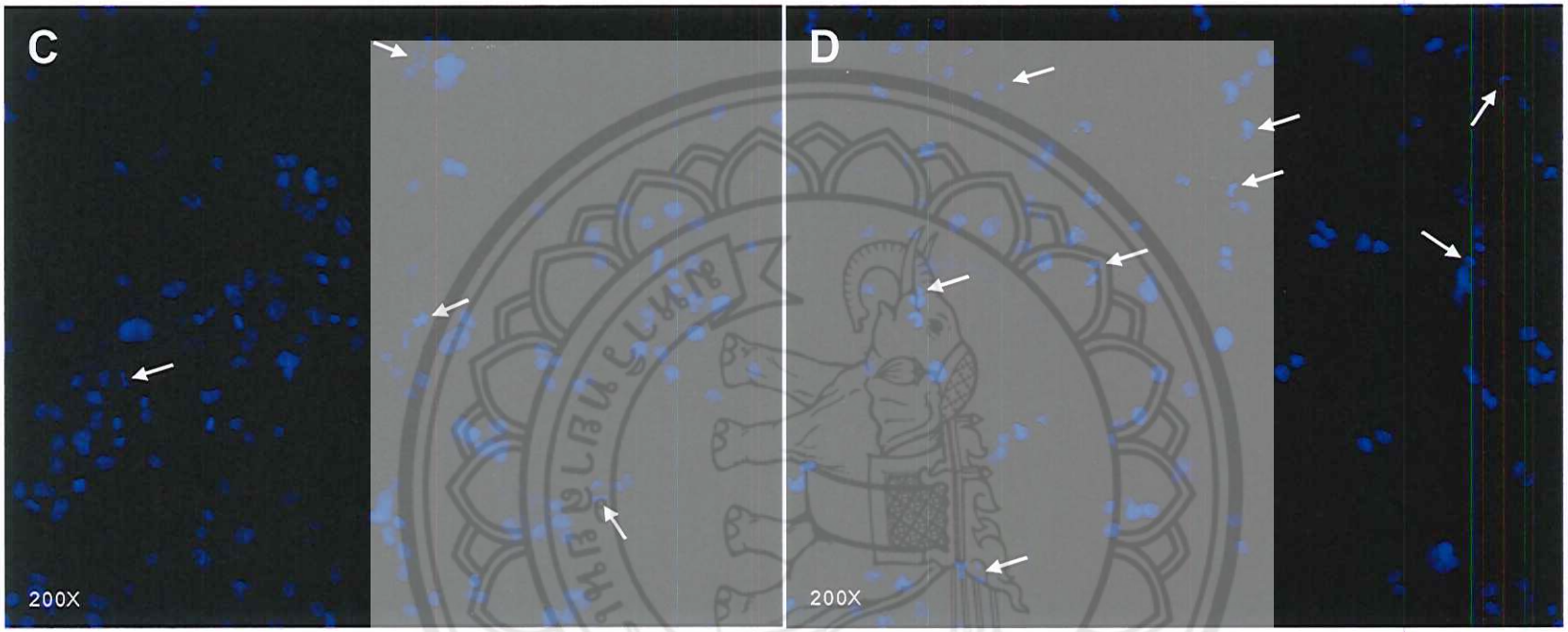
(B) แสดงลักษณะเซลล์ในกลุ่มที่ได้รับสาร Cur15 ที่ความเข้มข้น 15 µM ร่วมกับ TMZ 100 µM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งพบชิ้นส่วนเซลล์ที่แตกออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ (ลูกศรชี้)



ภาพ 30 แสดงผลการศึกษาการตายแบบ apoptosis ใน T98G cells จากการย้อมด้วย Hoechst 33342 ศึกษาภายใต้กล้อง fluorescent microscope ที่กำลังขยาย 200X โดยสีน้ำเงินแสดงการติดสีที่ตำแหน่ง nucleus ของเซลล์ ส่วนลักษณะการตายของเซลล์แบบ apoptosis แสดงให้เห็นลักษณะการเกิด apoptotic bodies (ลูกศรชี้)

(A) แสดงลักษณะเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร

(B) แสดงลักษณะเซลล์ในกลุ่มที่ treat ด้วย TMZ 100 μM



(C) **แสดงลักษณะเซลล์**ในกลุ่มที่ treat ด้วย Cur15 15 μM

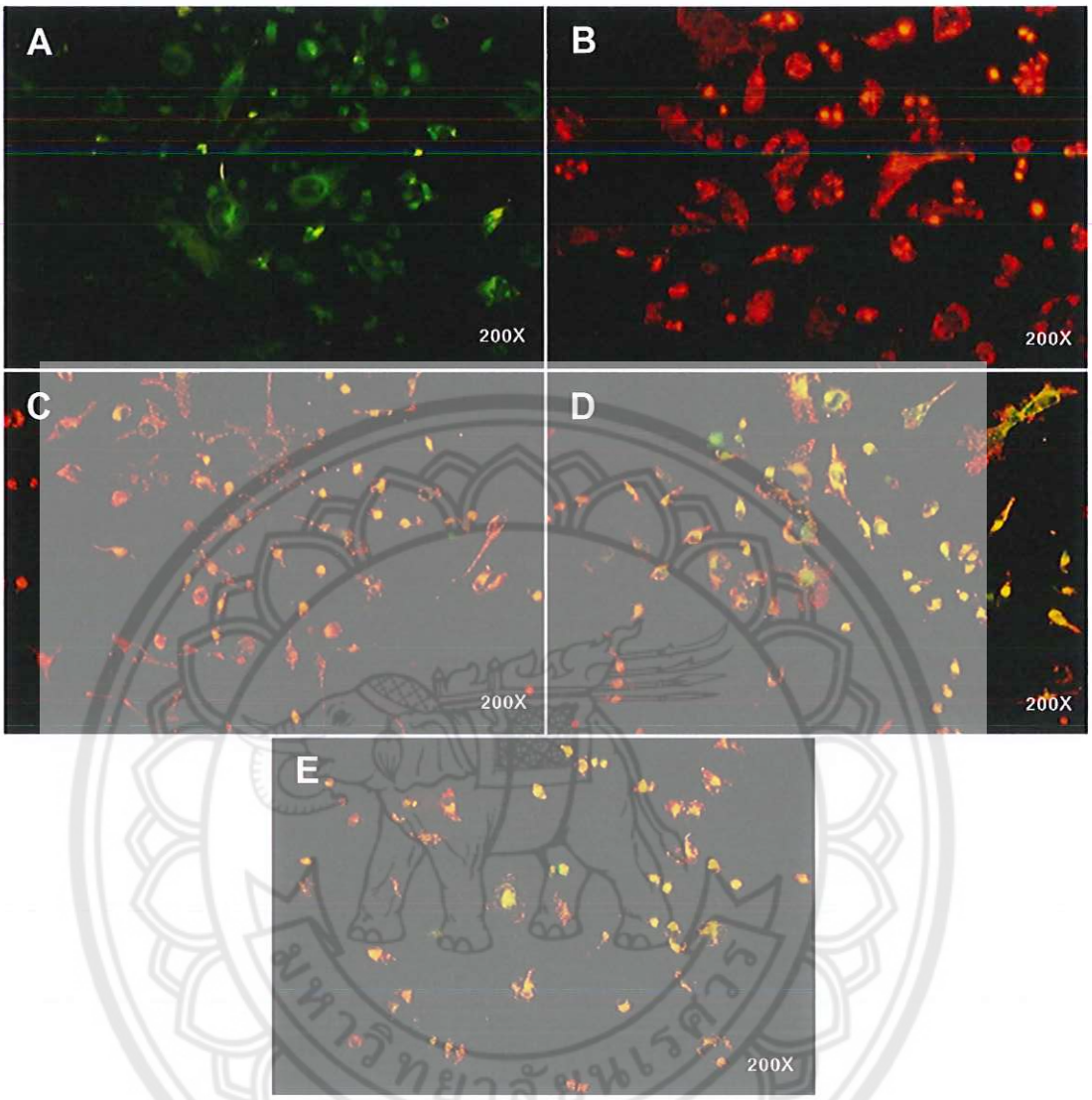
(D) **แสดงลักษณะเซลล์**ในกลุ่มที่ให้ TMZ ร่วมกับ Cur15

ภาพ 30 (ต่อ)

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ mitochondrial membrane potential (MMP) ใน T98G cells

การศึกษาผลการเปลี่ยนแปลง mitochondrial membrane potential (MMP) มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยผ่าน mitochondria เป็นศูนย์กลาง (intrinsic pathway) โดยใช้วิธีการย้อมสีด้วย JC-1 assay Kit ซึ่งคุณสมบัติของสี JC-1 สามารถเข้าไปใน mitochondria และเกิดการเกาะกลุ่มกันใน mitochondrial matrix ของเซลล์ที่มีค่า MMP สูง ทำให้สี JC-1 เปลี่ยนสีเป็นสีแดงส้ม แต่เมื่อบนผนังของ mitochondria ศูนย์เสีย MMP ไป ส่งผลทำให้สี JC-1 ไม่สามารถผ่านเข้าสู่ mitochondria ได้ จึงแสดงเป็นสีเขียวเรืองแสงของ JC-1 dye อยู่ใน cytoplasm ของเซลล์ภายใต้กล้อง fluorescent microscope

ในการทดลองให้เซลล์เพาะเลี้ยง T98G ได้รับการทดสอบด้วย TMZ ที่ความเข้มข้น 100 µM, Cur15 15 µM และ treat TMZ ร่วมกับ Cur15 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นย้อมด้วย JC-1 assay โดยเซลล์ในกลุ่ม positive control จะได้รับสาร CCCP (carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone) ซึ่งเป็นสารที่ไปรบกวน MMP โดยตรง จากผลการศึกษาพบว่า กลุ่มที่ treat ด้วย Cur15 หรือ TMZ เพียงอย่างเดียว หรือ Cur15 ร่วมกับ TMZ ส่งผลให้ปริมาณของการติดสีเขียวเพิ่มมากขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการ treat สาร ซึ่งแสดงการติดสีเป็นสีแดง แสดงดังในภาพ 31



ภาพ 31 แสดงผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ mitochondrial membrane potential ของ T98G cells ด้วยเทคนิค JC-1 assay ภายใต้กล้อง fluorescent microscope ที่กำลังขยาย 200X

(A) แสดงลักษณะเซลล์ในกลุ่ม positive control

(B) แสดงลักษณะเซลล์ในกลุ่มที่ไม่ได้รับสาร

(C) แสดงลักษณะเซลล์ในกลุ่มที่ treat ด้วย TMZ 100 µM

(D) แสดงลักษณะเซลล์ในกลุ่มที่ treat ด้วย Cur15 15 µM

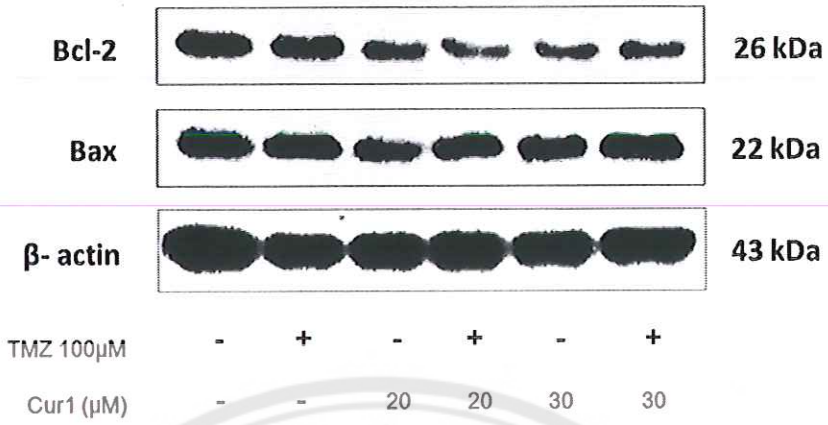
(E) แสดงลักษณะเซลล์ในกลุ่มที่ให้ TMZ ร่วมกับ Cur15

ผลของ curcuminoid analog ร่วมกับ temozolomide ต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบ apoptosis ใน T98G cells

การศึกษานี้ได้ตรวจสอบผลของ curcuminoid analog ร่วมกับ TMZ ต่อระดับการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis ได้แก่ Bcl-2 และ Bax ด้วยวิธี western blot analysis โดยแสดงผลในรูปของ relative protein expression เทียบกับโปรตีนควบคุม β-actin ในการทดลองให้เซลล์ได้รับ Cur1 (20 μM และ 30 μM) ร่วมกับ TMZ 100μM และ Cur15 (10 μM และ 20 μM) ร่วมกับ TMZ 100 μM แสดงผลดังภาพ 32 และ 33 ตามลำดับ

จากผลการทดลองพบว่า Cur1 ที่ความเข้มข้น 20 μM หรือ 30 μM หรือ ร่วมกับ TMZ ส่งผลต่อการแสดงออกของ Bcl-2 มีแนวโน้มลดลง ดังแสดงในภาพ 32(A) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร แต่ในกลุ่มที่ treat ด้วย Cur1 ที่ความเข้มข้น 30 μM หรือ ร่วมกับ TMZ มีผลต่อการแสดงออกของ Bax เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ และ $p < 0.01$ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม 32(B)

ส่วนผลของสาร Cur15 ที่ความเข้มข้น 20μM ร่วมกับ TMZ ส่งผลต่อการแสดงออกของ Bcl-2 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม หรือกลุ่มที่ treat ด้วย TMZ เพียงอย่างเดียว ($p < 0.01$) ดังแสดงในภาพ 33(A) ยิ่งไปกว่านั้น สาร Cur15 มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน Bax ที่เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้เด่นชัด โดยในกลุ่ม Cur15 อย่างเดียวที่ความเข้มข้นทั้ง 10 μM และ 20 μM มีผลต่อการแสดงออกของ Bax เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$ และ $p < 0.01$ ตามลำดับ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยในกลุ่มที่ให้ Cur15 ในความเข้มข้น 10 μM ร่วมกับ TMZ มีผลต่อ Bax เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อให้ Cur15 ที่ความเข้มข้นมากขึ้นเป็น 20 μM ร่วมกับ TMZ ยิ่งส่งผลต่อการแสดงออกของ Bax เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.001$) หรือกลุ่มที่ treat ด้วย TMZ ($p < 0.001$) หรือ Cur15 ($p < 0.01$) เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในภาพ 35(B)



ภาพ 32 แสดงผลของ Cur1 ร่วมกับ TMZ ต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบ apoptosis ใน T98G cells ตรวจสอบด้วยเทคนิค western blot analysis และกราฟแสดง relative protein expression

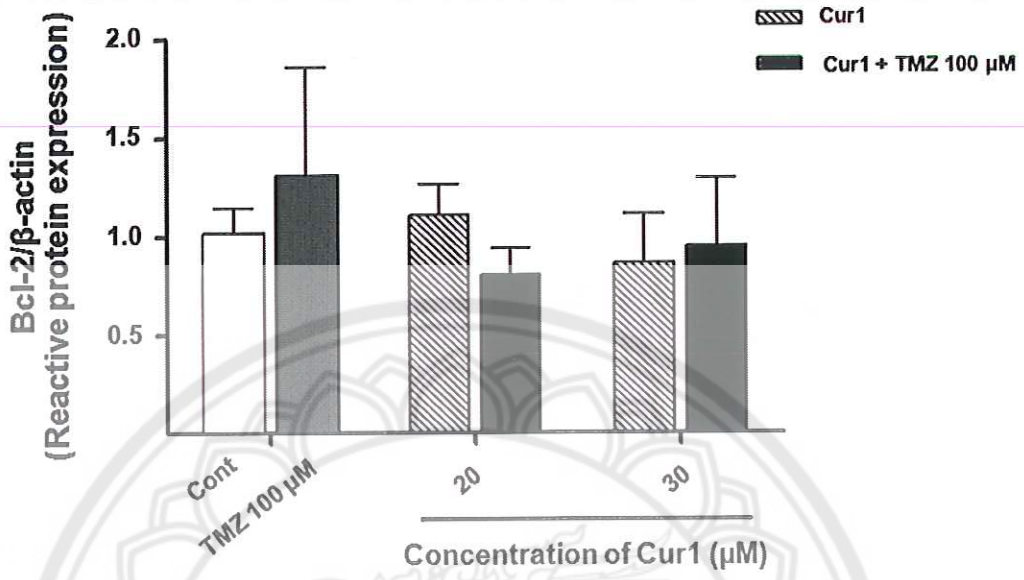
(A) กราฟแสดง relative protein expression ระหว่างโปรตีน Bcl-2 กับ β-actin

(B) กราฟแสดง relative protein expression ระหว่างโปรตีน Bax-2 กับ β-actin

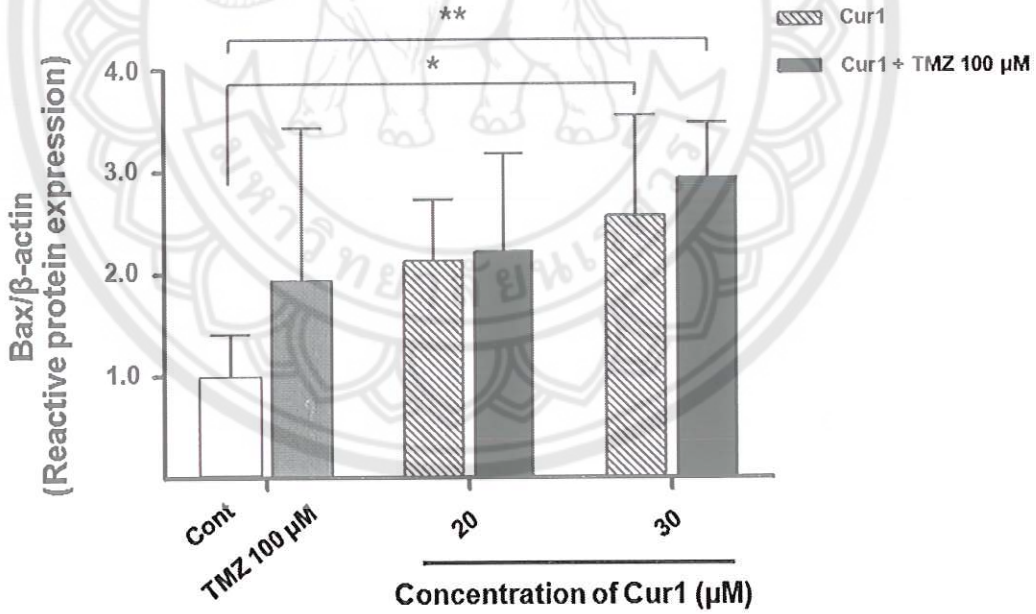
แสดงผลเป็นค่า mean ± SD จากการทดสอบ 3 ซ้ำ

$^{*}p < 0.05$ และ $^{**}p < 0.01$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Cont) ที่ไม่ได้รับสาร

32(A)



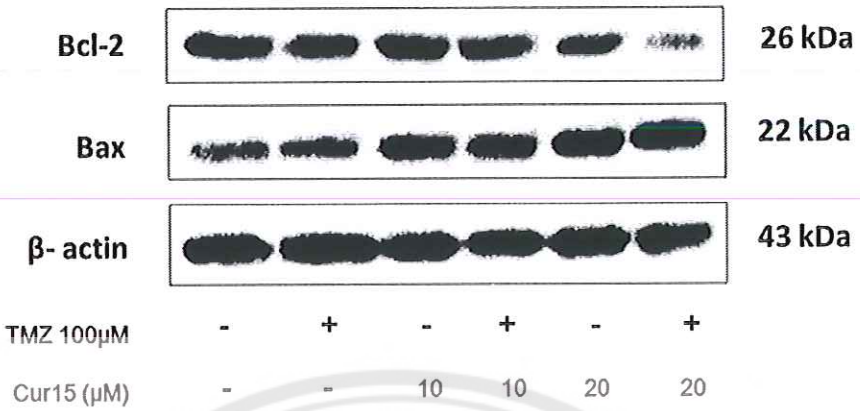
32(B)



(A) กราฟแสดง relative protein expression ระหว่างโปรตีน Bcl-2 กับ β-actin

(B) กราฟแสดง relative protein expression ระหว่างโปรตีน Bax กับ β-actin

ภาพ 32 (ต่อ)



ภาพ 33 แสดงผลของ Cur15 ร่วมกับ TMZ ต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบ apoptosis ใน T98G cells ตรวจสอบด้วยเทคนิค western blot analysis และกราฟแสดง relative protein expression

(A) กราฟแสดง relative protein expression ระหว่างโปรตีน Bcl-2 กับ β-actin

(B) กราฟแสดง relative protein expression ระหว่างโปรตีน Bax กับ β-actin

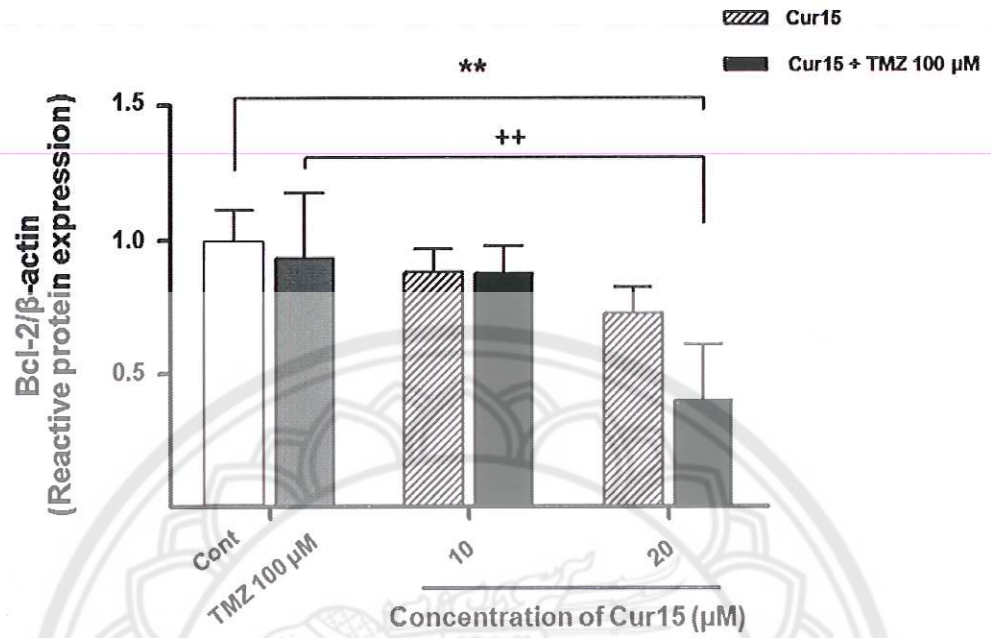
แสดงผลเป็นค่า mean ± SD จากการทดสอบ 3 ซ้ำ

$^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$ และ $^{***}p < 0.001$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Cont) ที่ไม่ได้รับสาร

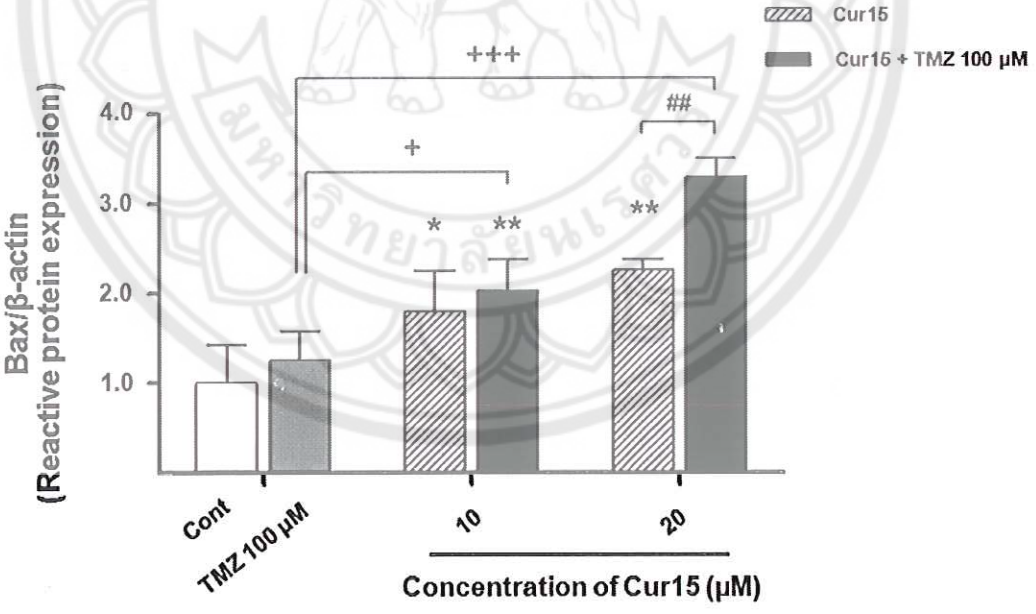
$^{+}p < 0.05$, $^{++}p < 0.01$ และ $^{+++}p < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ TMZ

$^{\#\#}p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ Cur15 (20 μM)

33(A)



33(B)



(A) กราฟแสดง relative protein expression ระหว่างโปรตีน Bcl-2 กับ β-actin

(B) กราฟแสดง relative protein expression ระหว่างโปรตีน Bax กับ β-actin

ภาพ 33 (ต่อ)

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

ในการวิจัยนี้ต้องการศึกษาผลการต้านมะเร็งของสาร curcuminoid analog ต่อมะเร็งสมองชนิดกลัยโอบลาสโทมา (glioblastoma; GBM) โดยการออกฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) อีกทั้งยังศึกษาผลการออกฤทธิ์ร่วมกับยาเคมีบำบัด temozolomide (TMZ) จากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า curcuminoid analog ที่ออกฤทธิ์มากที่สุดต่อเซลล์เพาะเลี้ยง T98G ซึ่งได้คัดเลือกจากทั้งหมด 20 สาร คือสารโครงสร้างที่ 15 (Cur15) มีผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์เป็นไปในลักษณะ dose-dependent กล่าวคือ การตายของเซลล์จะเพิ่มขึ้นตามปริมาณความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ เมื่อให้ curcuminoid analog ร่วมกับ TMZ จะส่งผลต่อการตายของเซลล์ในลักษณะ dose-dependent เช่นกัน อีกทั้งยังเสริมฤทธิ์ร่วมกันส่งผลต่อการตายของเซลล์เพิ่มมากขึ้น เมื่อเทียบกับเซลล์ในกลุ่มที่ได้รับ curcuminoid analog หรือ TMZ เพียงอย่างเดียว จากผลการย้อมศึกษาส่วนของ nucleus และศึกษาศักดิ์กายภาพบนผนังของ mitochondria (mitochondrial membrane potential) ชี้ให้เห็นว่า curcuminoid analog มีผลต่อลักษณะการตายของเซลล์เป็นไปในแบบ apoptosis เนื่องจาก มีการเปลี่ยนแปลงรูปลักษณ์สัณฐาน nucleus ของเซลล์สอดคล้องกับลักษณะการเกิด apoptotic cells และยังส่งผลรบกวนต่อ mitochondrial membrane potential สามารถบ่งชี้ได้ว่า curcuminoid analog สามารถเหนี่ยวนำการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยกระตุ้นผ่าน mitochondria เป็นศูนย์กลาง ซึ่งเป็นวิถีการตายโดยผ่าน intrinsic pathway นอกจากนี้ ยังยืนยันผลจากการศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องในกลไกการเกิด apoptosis โดย curcuminoid analog มีผลยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ที่เป็นโปรตีนต้านการเกิด apoptosis และกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน Bax ที่เป็นโปรตีนเหนี่ยวนำการเกิด apoptosis โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อให้ร่วมกับ TMZ ในการศึกษาครั้งนี้ยังได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการต้านมะเร็งระหว่าง curcuminoid analog กับสารต้นแบบ และจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า curcuminoid analog ที่เป็นสารอนุพันธ์มีฤทธิ์ต้านมะเร็งเพาะเลี้ยง GBM ได้ดีกว่าสารต้นแบบ

ผลการวิจัยที่ได้ในครั้งนี้ สามารถใช้เป็นองค์ความรู้สำคัญในการนำ curcuminoid analog ไปศึกษาต่อในระดับ *in vivo* และทางคลินิกตามลำดับ เพื่อที่ในอนาคตจะสามารถนำไปพัฒนาเป็นยาเคมีบำบัดทางเลือกซึ่งได้จากสารสกัดสมุนไพรตามธรรมชาติในการรักษาผู้ป่วย

มะเร็ง glioblastoma หรืออาจจะนำไปใช้รักษาร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิดอื่น ในมะเร็งชนิดอื่น ๆ จะช่วยทำให้ลดขนาดของการใช้ยาลง เป็นการลดปริมาณของผลข้างเคียงจากยาต่อผู้ป่วย และช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายในการรักษาได้อีกมาก อีกทั้งยังเป็นการช่วยให้ผู้มีรายได้น้อย หรือฐานะยากจนสามารถเข้าถึงการรักษาโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีชีวิตยืนยาวขึ้นอีกด้วย

อภิปรายผลการวิจัย

Glioblastoma (GBM) เป็นมะเร็งสมองชนิดจัดอยู่ในระยะที่ 4 ซึ่งมีความร้ายแรงที่สุดและพบมากที่สุดในมะเร็งประเภท primary brain tumor (Ostrom, 2014) มากกว่า 70% ของผู้ป่วยจะเสียชีวิตภายใน 2 ปีหลังถูกวินิจฉัย (Furnari, et al., 2007) ในช่วงปี 1969-1998 อัตราการเกิดโรคของผู้ป่วยมีแนวโน้นเพิ่มขึ้น (Lönn, et al., 2004) และยังมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในอนาคต สำหรับวิธีการรักษาทำได้โดยการผ่าตัดร่วมกับฉายรังสี และยาเคมีบำบัดเสริม แต่วิธีเหล่านี้เป็นเพียงการยืดระยะเวลาอยู่รอดของผู้ป่วยเท่านั้น เนื่องจากการมีชีวิตรอดของผู้ป่วยหลังจากได้รับการรักษาโดยเฉลี่ยยังคงน้อยกว่า 1 ปี (Johnson and O'Neill, 2012) ส่วนยา temozolomide (TMZ) เป็นยาเคมีบำบัดที่นิยมใช้ในการรักษา GBM ไม่จำเป็นต้องผ่านกระบวนการ metabolism ภายในตับ สามารถซึมผ่านเนื้อเยื่อได้ดี และสามารถผ่าน blood brain barrier (BBB) ได้ (Denny, et al., 1994) แต่อย่างไรก็ตาม TMZ เป็นยานำเข้า จึงมีราคาที่สูง และเมื่อใช้เป็นระยะเวลานานในผู้ป่วย GBM จะเกิดภาวะดื้อยา จึงจำเป็นต้องเพิ่มขนาดของยาเพื่อเกิดการตอบสนองต่อการรักษา ซึ่งส่งผลให้เกิดผลข้างเคียงที่เพิ่มมากขึ้นเช่นกัน (Gilbert, et al., 2003) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาหาสารสกัดจากพืชสมุนไพรธรรมชาติที่สามารถต้านมะเร็ง GBM ในการศึกษา *in vitro* ร่วมกับ TMZ เพื่อช่วยเสริมฤทธิ์ในการต้านมะเร็งอย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น จากการวิจัยมากมายที่ผ่านมา พบว่า curcumin ที่เป็นองค์ประกอบหลักมากสุดใน curcuminoid compounds ซึ่งเป็นสารสกัดสำคัญที่พบในขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn. หรือ Turmeric) มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย รวมทั้งฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง อีกทั้งยังมีคุณสมบัติช่วยเสริมฤทธิ์เพิ่มประสิทธิภาพการต้านมะเร็งร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิดต่าง ๆ (Shakibaei, et al., 2013) curcumin ยังสามารถเสริมฤทธิ์ร่วมกับ TMZ ในการเพิ่มการตายของมะเร็ง GBM (Dilnawaz and Sahoo, 2013) และที่สำคัญสามารถเหนี่ยวนำเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ให้เกิดการตายแบบ apoptosis (Karmakar, et al., 2006; Shankar and Srivastava, 2007; Singh and Singh, 2009; Lee, et al., 2012) ซึ่งถือได้ว่าเป็นกลไกที่สำคัญของคุณสมบัติการต้านมะเร็ง แต่อย่างไรก็ตาม curcumin ก็มีคุณสมบัติเฉพาะตัว ไม่ละลายน้ำ มีข้อจำกัดในด้านการคงตัว และไวต่อแสง จึงได้มีการปรับโครงสร้างของสาร curcuminoids ให้มีคุณสมบัติเป็นสาร metabolite สังเคราะห์เป็นสาร

อนุพันธ์ (curcuminoid analogs) มากมายขึ้น ใช้ในการทดลองต่างๆ เพื่อลดข้อจำกัด และเพิ่มประสิทธิภาพของผลการวิจัย มีการทดสอบพบว่า curcuminoid analogs มีความเสถียรกว่า และมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งได้ดีกว่าสารต้นแบบ (Tamvakopoulos, et al., 2007; Yoysungnoen, et al., 2008) ด้วยเหตุนี้จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจอย่างยิ่งที่จะนำ analogs เหล่านี้มาศึกษาฤทธิ์การต้านมะเร็งในเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง GBM อีกทั้งยังศึกษาผลการออกฤทธิ์เมื่อใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัด TMZ

จากผลการวิเคราะห์โครงสร้างทางโมเลกุลของสาร curcuminoid compounds พบว่าประกอบด้วยส่วนสำคัญสามส่วนด้วยกัน จึงทำให้มีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาที่แตกต่างกันไป คือ hydroxyl group มีคุณสมบัติเป็น antioxidant ส่วน ketone group และส่วน double bond ซึ่งทั้งในส่วนของ ketone และ double bond นี้มีคุณสมบัติเกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ต้านการอักเสบ ต้านสารก่อการกลายพันธุ์ และต้านมะเร็ง มีการศึกษา พบว่า การมี ketone group ในโครงสร้างของ 6-Gingerol ในพืชตระกูลขิง ซึ่งมีโครงสร้างพื้นฐานเหมือนกับโครงสร้างของ curcuminoids มีส่วนสำคัญในการเหนี่ยวนำเกิดการตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Lee and Surh, 1998) นอกจากนี้ จากการศึกษาของ Simon และคณะ พบว่าหมู่ diketone ที่พบในโครงสร้างของ curcuminoids มีความสำคัญในการยับยั้งกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเต้านม (Simon, et al., 1998) นอกจาก curcuminoids จะมีคุณสมบัติต้านวงจรการแบ่งเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งโดยตรงแล้ว การมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และต้านการอักเสบยังเป็นปัจจัยสำคัญยับยั้งการเกิดมะเร็งอีกด้วย (Wilken, et al., 2011) เนื่องจากอนุมูลอิสระเป็นตัวการสำคัญในการทำให้เกิดมะเร็ง และทำให้เซลล์มะเร็งเจริญเติบโตมากขึ้น โดยทำให้เกิดการแตกของ chromosome และทำลาย DNA นอกจากนั้นโรคที่มีการอักเสบเรื้อรังจากอนุมูลอิสระจะสามารถทำให้เกิดมะเร็งตามมาได้

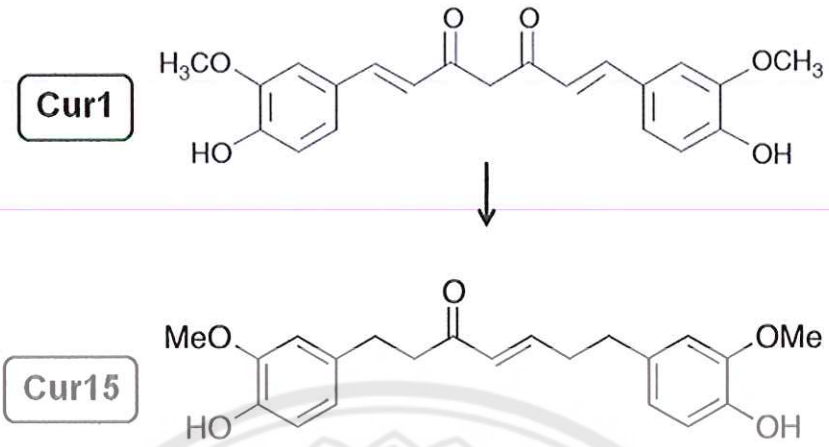
งานวิจัยนี้ ศึกษาผลการต้านมะเร็งของ curcuminoid analogs ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง T98G โดยการตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) ด้วยเทคนิค MTT assay พบว่า curcuminoid analog ที่ 15 (Cur15) มีฤทธิ์ต้านมะเร็งได้ดีที่สุดจากทั้งหมด 20 analogs โดย Cur15 ที่ 20 µM และ 40 µM มีผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่ง % cell viability ลดลงไปอยู่ที่ 62.02 ± 4.47% และ 37.14 ± 2.39% ตามลำดับ โดยแสดงผลการลดการมีชีวิตรอดของเซลล์เป็นไปในรูปแบบ dose-dependent ซึ่งคล้ายคลึงกับในงานวิจัยของ Changtam และคณะ พบว่า Cur15 มีฤทธิ์สูงสุดในการต่อต้านเชื้อโปรโตซัวได้มากกว่า analogs ตัวอื่น ๆ รวมทั้งออกฤทธิ์ได้ดีกว่าที่เป็นสารต้นแบบ (Changtam, et al., 2010) นอกจากนี้ จากผลการทดลองในกลุ่มที่ให้เซลล์ได้รับ Cur15 ร่วมกับ TMZ ได้ส่งผลเพิ่มประสิทธิภาพต่อการต้านมะเร็งมากยิ่งขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ให้ Cur15

หรือ TMZ เพียงอย่างเดียว เนื่องจาก Cur15 ซึ่งเป็นอนุพันธ์ที่ได้จากการปรับแต่งโครงสร้างมาจากสารต้นแบบใน curcumonoid compounds ให้เสถียร โดยยังคงสภาพโครงสร้างทางโมเลกุลที่มีคุณสมบัติในการต้านมะเร็ง อีกทั้งใน TMZ เป็นยาเคมีบำบัดที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ DNA ส่งผลให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Friedman, et al., 2000) จึงเป็นปัจจัยเสริมให้เพิ่มประสิทธิภาพการต้านมะเร็งร่วมกันของ Cur15 และ TMZ ซึ่งคล้ายกับในหลายผลงานวิจัยเกี่ยวกับการเกิดผลเสริมฤทธิ์ร่วมกันระหว่าง curcumin กับสาร หรือยาชนิดอื่น ๆ เช่น curcumin ช่วยเสริมฤทธิ์เพิ่มประสิทธิภาพการต้านมะเร็งของยาเคมีบำบัด cisplatin ในมะเร็งเนื้อเยื่อชนิดลุกลาม fibrosarcoma (Norris, et al., 1999) ร่วมกับยาเคมีบำบัด 5-fluorouracil (5-FU) ต้านมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Shakibaei, et al., 2013) และเพิ่มประสิทธิภาพการต้านมะเร็ง GBM เมื่อให้ร่วมกับ TMZ (Zanotto-Filho, et al., 2015) ยิ่งไปกว่านั้น จากผลการวิจัยยังชี้ให้เห็นว่า Cur15 ที่เป็นอนุพันธ์ของ Cur1 แต่กลับแสดงผลการต้านมะเร็งได้ดีกว่าสารต้นแบบ อาจเป็นเพราะว่า จากการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ Cur1 กลายเป็น Cur15 ดังแสดงในภาพ 34 ทำให้สารมีความเสถียร คงทน และเพิ่มประสิทธิภาพของผลการศึกษายิ่งขึ้น ยังมีการศึกษาอื่นอีกที่สนับสนุนว่า curcuminoid analogs มีความเสถียรกว่า และออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาได้ดีกว่าสารต้นแบบ เช่น enone 40 ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ของ curcumin มีฤทธิ์ในการต้านโปรโตซัวได้ดีกว่าสารต้นแบบ (Changtam, et al., 2010) curcumin analogue A_2 มีคุณสมบัติต้านการอักเสบ และต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า curcumin ทั้งการศึกษาใน *in vitro* และ *in vivo* (Du, et al., 2013) และ curcumin analog สามารถต้านการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ในหนูได้ดีกว่าสารต้นแบบ curcumin (Youssef, et al., 2015) เป็นต้น

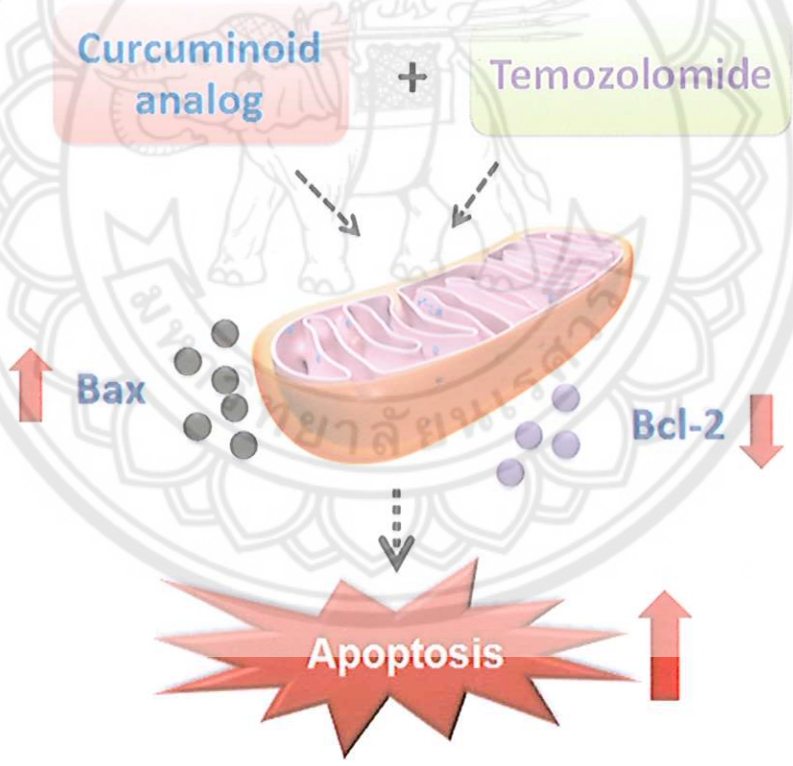
จากความสามารถของ Cur15 ที่ต้านมะเร็งได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับ curcuminoid analogs ตัวอื่น จึงได้นำ Cur15 ร่วมกับ TMZ ไปศึกษาต่อ อีกทั้งยังนำ Cur1 ซึ่งเป็นสารต้นแบบมาศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการต้านมะเร็งด้วย โดยศึกษาผลต่อการตายของเซลล์แบบ apoptosis จากการย้อมด้วย Hoechst 33342 เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ของ apoptotic cells และย้อม JC-1 dye เพื่อศึกษา mitochondrial membrane potential (MMP) รวมทั้งศึกษากลไกที่เกี่ยวข้อง ด้วยเทคนิค western blot โดยศึกษาผลต่อการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 (anti-apoptotic protein) และ Bax (pro-apoptotic protein) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในวิถี apoptosis โดยผ่าน mitochondria เป็นศูนย์กลาง (intrinsic pathway) (Tsujimoto, 2003) พบว่า Cur15 มีผลทำให้เซลล์เกิดการอัดแน่นของโครมาติน (chromatin condensation) และเซลล์แตกออกเป็น apoptotic bodies ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะที่บ่งชี้ถึงการตายของเซลล์แบบ apoptosis (Elmore, 2007) นอกจากนี้ ยังพบว่า Cur15 มีผลรบกวนทำให้

mitochondria สูญเสีย MMP และเป็นปัจจัยสำคัญที่บ่งบอกว่าเกิดการกระตุ้น apoptosis โดยผ่าน mitochondria เป็นศูนย์กลาง ในผลการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 และ Bax พบว่า Cur1 ที่ความเข้มข้น 20 µM และ 30 µM ร่วมกับ TMZ ส่งผลต่อแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 มีแนวโน้มลดลง แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ความเข้มข้น 30 µM ของ Cur1 ร่วมกับ TMZ มีผลต่อแสดงออกของโปรตีน Bax เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม สำหรับใน Cur15 ที่ความเข้มข้น 20 µM ร่วมกับ TMZ มีผลต่อแสดงออกของ Bcl-2 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่กลับเสริมฤทธิ์เพิ่มการแสดงออกของ Bax อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม หรือ กลุ่ม TMZ หรือ กลุ่ม Cur15 เพียงอย่างเดียว

จากผลการศึกษานี้ แสดงให้เห็นว่า Cur15 ร่วมกับ TMZ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพเหนี่ยวนำการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยผ่านวิถีทาง intrinsic pathway ซึ่งมี mitochondria เป็นศูนย์กลาง ดังแสดงในภาพ 35 เนื่องจากการเพิ่มปริมาณของ Bax จะเคลื่อนตัวสู่ผนัง mitochondria ทำให้เซลล์สูญเสีย MMP เกิดการรั่วไหลของ cytochrome *c* ออกมายัง cytoplasm เป็นปัจจัยส่งสัญญาณกระตุ้นการเกิด apoptosis ต่อไป ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยในหลอดทดลองก่อนหน้านี้ พบว่า curcumin ที่เป็นสารต้นแบบของ Cur15 สามารถเหนี่ยวนำการตายแบบ apoptosis ผ่าน intrinsic pathway ในมะเร็งต่อมลูกหมาก (Shankar and Srivastava, 2007) และมะเร็งปากมดลูก (Singh and Singh, 2009) อีกทั้งยังผ่าน extrinsic pathway ในมะเร็งกระดูกอ่อน (Lee, et al., 2012) นอกจากนี้ยังสามารถกระตุ้นผ่านทั้ง 2 pathway ในเซลล์มะเร็ง GBM (Karmakar, et al., 2006) ดังนั้น Cur15 ที่เป็นสารอนุพันธ์ จึงได้มีคุณสมบัติดังกล่าวที่คล้ายคลึงกับสารต้นแบบ และเนื่องจากความเสถียรคงทนกว่าของสาร จึงเป็นไปได้ว่าสามารถออกฤทธิ์ได้ดีกว่าสารต้นแบบ



ภาพ 34 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Cur1 และ Cur15



ภาพ 35 แสดงผลการเหนี่ยวนำการเกิด apoptosis ซึ่งมีวิถีผ่าน mitochondria เป็นศูนย์กลาง (intrinsic pathway) ของ curcuminoid analog ร่วมกับ TMZ ต่อเซลล์มะเร็งกลัยโอบลาสโทมาเพาะเลี้ยง (T98G) โดยกระตุ้นการแสดงออกของ pro-apoptotic protein Bax ให้เพิ่มขึ้น และลดการแสดงออกของ anti-apoptotic protein Bcl-2 ให้ลดลง

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

Adams, J. M. and Cory, S. (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. **Trends in Biochemical Sciences,** 26(1), 61-66.

Agarwala, S. S., and Kirkwood, J. M. (2000). Temozolomide, a novel alkylating agent with activity in the central nervous system, may improve the treatment of advanced metastatic melanoma. **The Oncologist,** 5(2), 144-151.

Aggarwal, B., Bhatt, I., Ichikawa, H., Ahn, K., Sethi, G., Sandur, S., et al. (2007). Curcumin-biological and medicinal properties. **Turmeric: the genus Curcuma,** 45, 297-368.

Aggarwal, B. B., Sundaram, C., Malani, N. and Ichikawa, H. (2007). Curcumin: The Indian solid gold. **Advances in Experimental Medicine and Biology,** 595, 1-75.

Aggarwal, S., Takada, Y., Singh, S., Myers, J. N., and Aggarwal, B. B. (2004). Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin via modulation of nuclear factor-κB signaling. **International journal of cancer,** 111(5), 679-692.

Ammon, H. P. T. and Wahi, M. A. (1991). Pharmacology of Curcuma longa. **Planta Medica,** 57(1), 1-7.

Anand, P., Thomas, S. G., Kunnumakkara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Sung, B., et al. (2008). Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. **Biochemical Pharmacology,** 76(11), 1590-1611.

Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. **Science,** 281(5381), 1305.

Avgeropoulos, N. G., and Batchelor, T. T. (1999). New treatment strategies for malignant gliomas. **The Oncologist,** 4(3), 209-224.

Babu, P. S. and Srinivasan, K. (1995). Influence of dietary curcumin and cholesterol on the progression of experimentally induced diabetes in an albino rat. **Molecular and Cellular Biochemistry,** 152, 13-21.

Baglietto, L., Giles, G. G., English, D. R., Karahalios, A., Hopper, J. L., and Severi, G. (2011). Alcohol consumption and risk of glioblastoma; evidence from the Melbourne Collaborative Cohort Study. **International journal of cancer**, 128(8), 1929-1934.

Baker, S. D., Wirth, M., Statkevich, P., Reidenberg, P., Alton, K., Sartorius, S. E., et al. (1999). Absorption, metabolism, and excretion of ^{14}C-temozolomide following oral administration to patients with advanced cancer. **Clinical Cancer Research**, 5(2), 309-317.

Bélanger, M., Allaman, I., and Magistretti, Pierre J. (2011). Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation. **Cell Metabolism**, 14(6), 724-738.

Belanich, M., Pastor, M., Randall, T., Guerra, D., Kibitel, J., Alas, L., et al. (1996). Retrospective study of the correlation between the DNA repair protein alkyltransferase and survival of brain tumor patients treated with carmustine. **Cancer Research**, 56, 783–788.

Bhargava, R., Gerald, W. L., Li, A. R., Pan, Q., Lal, P., Ladanyi, M., et al. (2005). *EGFR* gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. **Modern pathology**, 18(8), 1027-1033.

Bharti, A. C., Donato, N., Singh, S. and Aggarwal, B. B. (2003). Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor-kappa B and IkappaBalpha kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. **Blood**, 101(3), 1053-1062.

Bleeker, F. E., Molenaar, R. J., and Leenstra, S. (2012). Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. **Journal of neuro-oncology**, 108(1), 11-27.

Brandes, A. A., Tosoni, A., Franceschi, E., Reni, M., Gatta, G., and Vecht, C. (2008). Glioblastoma in adults. **Critical reviews in oncology/hematology**, 67(2), 139-152.

Buckner, J. C., Brown, P. D., O'Neill, B. P., Meyer, F. B., Wetmore, C. J., and Uhm, J. H. (2007). **Central nervous system tumors,** 82(10), 1271-1286.

Changtam, C., Koning, H. P. de., Ibrahim, H., Sajid, M. S., Gould, M. K. and Suksamrarn, A. (2010). Curcuminoid analogs with potent activity againstTrypanosoma and Leishmaniaspecies. **European Journal of Medicinal Chemistry,** 45, 941–956.

Chi, J., Gu, B., Zhang, C., Peng, G., Zhou, F., Chen, Y., et al. (2012). Human herpesvirus 6 latent infection in patients with glioma. **Journal of Infectious Diseases,** 206(9), 1394-1398.

Chinnaiyan, A. M. (1999). The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. **Neoplasia,** 1, 5-15.

Chinot, O. L., Barrié, M., Fuentes, S., Eudes, N., Lancelot, S., Metellus, P., et al. (2007). Correlation between O^6-methylguanineDNA methyltransferase and survival in inoperable newly diagnosed glioblastoma patients treated with neoadjuvanttemozolomide. **Journal of Clinical Oncology,** 25, 1470–1475.

Choudhuri, T., Pal, S., Das, T. and Sa, G. (2005). Curcumin selectively induces apoptosis in deregulated cyclin D1-expressed cells at G2 phase of cell cycle in a p53-dependant manner. **The Journal of Biological Chemistry,** 280(20), 20059-20068.

Clarke, N., Germain, P., Altucci, L. and Gronemeyer, H. (2004). Retinoids: potential in cancer prevention and therapy. **Expert Reviews in Molecular Medicine,** 6(25), 1-23.

Commandeur, J. N., and Vermeulen, N. P. (1996). Cytotoxicity and cytoprotective activities of natural compounds. the case of curcumin. **Xenobiotica,** 26(7), 667-80.

Cugati, G., Jain, P. K., Pande, A., Symss, N. P., Chakravarthy, V., and Ramamurthi, R. (2012). Pediatric multifocal glioblastoma multiforme with fulminant course. **Journal of Neurosciences in Rural Practice,** 3(2), 174.

Dai, H., Meng, X. W., and Kaufmann, S. H. (2016). BCL2 Family, Mitochondrial Apoptosis, and Beyond. **Cancer Translational Medicine,** 2(1), 7.

Das, A., Chapman, C., and Yap, W. (2000). Histological subtypes of symptomatic central nervous system tumours in Singapore. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry,** 68(3), 372-374.

Daube, F. V. (1870). Uber curcumin, den farbstoff der Curcumawurzel. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, 3, 609-13.

Denny, B. J., Wheelhouse, R. T., Stevens, M. F., Tsang, L. L., and Slack, J. A. (1994). NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. **Biochemistry,** 33(31), 9045-9051.

Dhodapkar, M., Rubin, J., Reid, J. M., Burch, P. A., Pitot, H. C., Buckner, J. C., et al. (1997). Phase I trial of temozolomide (NSC 362856) in patients with advanced cancer. **Clinical Cancer Research**, 3, 1093–1100.

Dikshit, M., Rastogi, L., Shukla, R. and Srimal, R. C. (1995). Prevention of ischaemia-induced biochemical changes by curcumin and quinidine in the cat heart. **Indian Journal of Medical Research**, 101, 31-35.

Dilnawaz, F., and Sahoo, S. K. (2013). Enhanced accumulation of curcumin and temozolomide loaded magnetic nanoparticles executes profound cytotoxic effect in glioblastoma spheroid model. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 85(3), 452-462.

Dinkova, K. A. T. and Talalay, P. (1999) Relation of structure of curcumin analogs to their potencies as inducers of Phase 2 detoxification enzymes. **Carcinogenesis,** 20(5), 911-914.

Du, Z. Y., Wei, X., Huang, M. T., Zheng, X., Liu, Y., Conney, A. H., et al. (2013). Anti-proliferative, anti-inflammatory and antioxidant effects of curcumin analogue A2. Archives of **pharmacal research**, 36(10), 1204-1210.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology,** 35(4), 495-516.

Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Andion, E., Goodman, S. N., Hidalgo, O. F., Vanaclocha, V., et al. (2000). Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. **The New England Journal of Medicine**, 343, 1350–1354.

Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., and De Laurenzi, V. (2012). Role of apoptosis in disease. **Aging (Albany NY)**, 4(5), 330-349.

Fesus, L., Davies, P. J. and Piacentini, M. (1991). Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death. **European Journal of Cell Biology**, 56(2), 170-177.

Zanotto-Filho, A., Braganhol, E., Klafke, K., Figueiró, F., Terra, S. R., Paludo, F. J., et al. (2015). Autophagy inhibition improves the efficacy of curcumin/temozolomide combination therapy in glioblastomas. **Cancer Letters**, 358(2), 220-231.

Friedman, H. S., Kerby, T., and Calvert, H. (2000). Temozolomide and treatment of malignant glioma. **Clinical Cancer Research**, 6(7), 2585-2597.

Fu, D., Calvo, J. A., and Samson, L. D. (2012). Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. **Nature Reviews Cancer**, 12(2), 104-120.

Gilbert, M. R., Supko, J. G., Batchelor, T., Lesser, G., Fisher, J. D., Piantadosi, S., and Grossman, S. (2003). Phase I clinical and pharmacokinetic study of irinotecan in adults with recurrent malignant glioma. **Clinical Cancer Research**, 9(8), 2940-2949.

Gilmore, T. D. (2006). Introduction to NF-κB: players, pathways, perspectives. **Oncogene**, 25, 6680-6684.

Green, D. R. (2000). Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. **Cell**, 102(1), 1-4.

Gross, A. (2001). BCL-2 protein: regulators of the mitochondrial apoptotic proteins. **Life**, 52, 231-236.

Groten, J. P., Butler, W., Feron, V. J., Kozianowski, G., Renwick, A. G., and Walker, R. (2000). An Analysis of the Possibility for Health Implications of Joint Actions and Interactions between Food Additives. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 31(1), 77-91.

Gukovsky, I., Reyes, C. N., Vaquero, E. C., Gukovskaya, A. S. and Pandol, S. J. (2003). Curcumin ameliorates ethanol and nonethanol experimental pancreatitis. **American journal of physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology,** 284, G85-G95.

Gururaj, A. E., Belakavadi, M., Venkatesh, D. A., Marme, D. and Salimath, B. P. (2002). Molecular mechanisms of anti-angiogenic effect of curcumin. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** 297, 934-942.

Hacker, G. (2000). The morphology of apoptosis. **Cell and Tissue Research,** 301, 5–17.

Hainaut, P. (1995). The tumor suppressor protein p53: A receptor to genotoxic stress that controls cell growth and survival. **Current opinion in oncology,** 7, 76–82.

Hanif, R., Qiao, L., Schiff, S. J. and Rigas, B. (1997). Curcumin, a natural plant phenolic food additive, inhibits cell proliferation and induces cell cycle changes in colon adenocarcinoma cell lines by a prostaglandin-independent pathway. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine,** 130, 576-584.

Hardell, L., Carlberg, M., Söderqvist, F., Mild, K. H., and Morgan, L. L. (2007). Long-term use of cellular phones and brain tumours: increased risk associated with use for ≥ 10 years. **Occupational and Environmental Medicine,** 64(9), 626-632.

Hayward, I. P., and Parsons, P. G. (1984). Comparison of virus reactivation, DNA base damage, and cell cycle effects in autologous human melanoma cells resistant to methylating agents. **Cancer Research,** 44. 55- 58.

Hegi, M. E., Diserens, A., Gorlia, T., Hamou, M., De Tribolet, N., Weller, M., et al. (2005). *MGMT* gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. **The New England Journal of Medicine,** 352, 997–1003.

Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. **Nature,** 407(6805), 770-776.

Hill, M. M., Adrain, C., Duriez, P. J., Creagh, E. M. and Martin, S. J. (2004). Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. **The EMBO Journal,** 23, 2134–2145.

Huang, M. T., Newmark, H. L. and Frenkel, K. (1997). Inhibitory effects of curcumin on tumorigenesis in mice. **Journal of cellular biochemistry. Supplement,** 27, 26-34.

Hussain, M. S. and Chandrasekhara, N. (1992). Effect on curcumin on cholesterol gall-stone induction in mice. **Indian Journal of Medical Research**, 96, 288-291.

Indran, I. R. Tufo, G., Pervaiz, S. and Brenner, C. (2011). Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1807, 735–745.

Jaisin, Y., Thampithak, A., Meesarapee, B., Ratanachamnong, P., Suksamrarn, A., Phivthong-ngam, L., et al. (2011). Curcumin I protects the dopaminergic cell line SH-SY5Y from 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity through attenuation of p53-mediated apoptosis. **Neuroscience Letters**, 489(3), 192-196.

Jaruga, E., Salvioli, S., Dobrucki, J., Chrul, S., Bandorowicz-Pikula, J., Sikora, E., et al. (1998). Apoptosis-like, reversible changes in plasma membrane asymmetry and permeability, and transient modifications in mitochondrial membrane potential induced by curcumin in rat thymocytes. **FEBS Letters**, 433(3), 287-293.

Jobin, C., Bradham, C. A., Russo, M. P., Juma, B., Narula, A. S., Brenner, D. A., et al. (1999). Curcumin blocks cytokine-mediated NF-kappa B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-kappa B kinase activity. **Journal of Immunology**, 163, 3474-3483.

Joe, B., Vijaykumar, M. and Lokesh, B. R. (2004). Biological properties of curcumin–cellular and molecular mechanisms of action. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 44, 97-111.

Jones, E. A. and Shoskes, D. A. (2000). The effect of mycophenolate mofetil and polyphenolic bioflavinoids on renal ischemia reperfusion injury and repair. **Journal of Urology**, 163, 999-1004.

Jung, K. K., Lee, H. S., Cho, J. Y., Shin, W. C., Rhee, M. H., Kim, T. G., et al. (2006). Inhibitory effect of curcumin on nitric oxide production from lipopolysaccharide-activated primary microglia. **Life Sciences**, 79, 2022-2031.

Karmakar, S., Banik, N. L., Patel, S. J., and Ray, S. K. (2006). Curcumin activated both receptor-mediated and mitochondria-mediated proteolytic pathways for apoptosis in human glioblastoma T98G cells. **Neuroscience Letters**, 407(1), 53-58.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, 26, 239–257.

Kim, H. K., Lin, C. C., Parker, D., Veals, J., Lim, J., Likhari, P., et al. (1997). High-performance liquid chromatographic determination and stability of 5-(3-methyltriazen-1-yl)-imidazo-4-carboximide, the biologically active product of the antitumor agent temozolomide, in human plasma. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**,703(1), 225-233.

Kischkel, F. C, Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., et al. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. **The EMBO Journal**, 14, 5579–5588.

Kleihues, P., Louis, D. N., Scheithauer, B. W., Rorke, L. B., Reifenberger, G., Burger, P. C., et al. (2002). The WHO classification of tumors of the nervous system. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, 61(3), 215-225.

Kleihues, P., and Ohgaki, H. (1999). Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. **Neuro-oncology**, 1(1), 44-51.

Koeberle, A., Northoff, H. and Werz, O. (2009). Curcumin blocks prostaglandin E2 biosynthesis through direct inhibition of the microsomal prostaglandin E2 synthase-1. **Molecular Cancer Therapeutics**, 8, 2348-2355.

Kottke, M. K. (1998). Scientific and regulatory aspects of nutraceutical products in the United Stateds. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 24(12), 1177-1195.

Kuida, K. (2000). Caspase-9. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, 32, 121-124.

Kumar, A .P., Garcia, G. E., Ghosh, R., Rajnarayanan, R. V., Alworth, W. L. and Slaga, T. J. (2003). 4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid methyl ester: a curcumin derivative targets Akt/NF kappa B cell survival signaling pathway: potential for prostate cancer management. **Neoplasia**, 5(3), 255-266.

Lampe, V., Milobedzka, J. and Kostaneski, V. (1910). Zur Kenntnis des Curcumins. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, 43, 2163-2170.

Lampe, V. and Milobedzka, J. (1913). Studien uber Curcumin. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, 46, 2235-2240.

Lee, E., and Surh, Y. J. (1998). Induction of apoptosis in HL-60 cells by pungent vanilloids, [6]-gingerol and [6]-paradol. **Cancer Letters**, 134(2), 163-168.

Lee, H. P., Li, T. M., Tsao, J. Y., Fong, Y. C., and Tang, C. H. (2012). Curcumin induces cell apoptosis in human chondrosarcoma through extrinsic death receptor pathway. **International Immunopharmacology**, 13(2), 163-169.

Likasitwattanakul, S., Katanyuwong, K., and Poneprasert, B. (2011). Brain tumors in children at Maharaj Nakorn Chiang Mai hospital. **Chiang Mai Medical Journal**, 42(4), 139-147.

Lim, G. P., Chu, T., Yang, F., Beech, W., Frautschy, S. A. and Cole, G. M. (2001). The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. **The Journal of Neuroscience**, 21(21), 8370-8377.

Lin, J. K., Pan, M. H. and Lin-Shiau, S. Y. (2000). Recent studies on the biofunctions and biotransformations of curcumin. **Biofactors**, 13(1-4), 153-158.

Lin, Y. G., Kunnumakkara, A. B., Nair, A., Merritt, W. M., Han, L. Y., Armaiz-Pena, G. N., et al. (2007). Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in ovarian carcinoma by targeting the nuclear factor-kappaB pathway. **Clinical Cancer Research**, 13, 3423-3430.

Lönn, S., Klaeboe, L., Hall, P., Mathiesen, T., Auvinen, A., Christensen, H. C., et al. (2004). Incidence trends of adult primary intracerebral tumors in four Nordic countries. **International journal of cancer**, 108(3), 450-455.

Lowe, S. W. and Lin, A. W. (2000). Apopsis in cancer. **Carcinogenesis**, 21(3), 485-495.

Mach, C. M., Mathew, L., Mosley, S. A., Kurzrock, R., and Smith, J. A. (2009). Determination of minimum effective dose and optimal dosing schedule for liposomal curcumin in a xenograft human pancreatic cancer model. **Anticancer research**, 29(6), 1895-1899.

Majno, G. and Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **American Journal of Pathology**, 146(1), 3–15.

Martinou, J. C. and Green, D. R. (2001). Breaking the mitochondrial barrier. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2(1), 63-67.

Masuda, T., Maekawa, T., Hidaka, K., Bando, H., Takeda, Y. and Yamaguchi, H. (2001). Chemical Studies on Antioxidant Mechanism of Curcumin: Analysis of Oxidative Coupling Products from Curcumin and Linoleate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49 (5), 2539–2547.

Mehta, K., Pantazis, P., McQueen, T. and Aggarwal, B. B. (1997). Antiproliferative effect of curcumin (diferuloylmethane) against human breast tumor cell lines. **Anticancer Drugs**, 8, 470-481.

Meijerink, J. P., Mensink, E. J., Wang, K., Sedlak,T. W., Sloetjes, A. W., de Witte, T., et al. (1998). Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. **Blood**, 91, 2991–2997.

Mimeault, M. and Batra, S. K. (2011). Potential applications of curcumin and its novel synthetic analogs and nanotechnology-based formulations in cancer prevention and therapy. **Chinese Medical**, 6, 31.

Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., et al. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of *bcl-2* and *bax* gene expression *in vitro* and *in vivo*. **Oncogene**, 9, 1799–1805.

Mukhopadhyay, A., Bueso-Ramos, C., Chatterjee, D., Pantazis, P. and Aggarwal, B, B. (2001). Curcumindownregulates cell survival mechanisms in human prostate cancer cell lines. **Oncogene**, 20, 7597-7609.

Naito, M., Wu, X., Nomura, H., Kodama, M., Kato, Y. and Osawa, T. (2002). The protective effects of tetrahydrocurcumin on oxidative stress in cholesterol-fed rabbits. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, 9(5), 243-250.

Norbury, C. J., and Hickson, I. D. (2001). Cellular responses to DNA damage. **Annual review of pharmacology and toxicology**, 41(1), 367-401.

Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T., Di Patre, P.-L., et al. (2004). Genetic Pathways to Glioblastoma A Population-Based Study. **Cancer research**, 64(19), 6892-6899.

Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2005). Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, 64(6), 479-489.

Ortiz, L. M. G. (2012). Chronicles of a silent death: Apoptosis. **Research in Cell Biology**, 1, 1-7.

Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Liao, P., Rouse, C., Chen, Y. W., Dowling, J., et al. (2014). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2007-2011. **Neuro-Oncology**, 16, 1-63.

Pan, M. H., Chang, W. L., Lin-Shiau, S. Y., Ho, C. T. and Lin, J. K. (2001). Induction of apoptosis by garcinol and curcumin through cytochrome c release and activation of caspases in human leukemia HL-60 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49(3), 1464-1474.

Pan, M. H., Huang, T. M. and Lin, J. K. (1999). Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. **Drug Metabolism and Disposition**, 27(4), 486-494.

Pan, M. H., Lin-Shiau, S. Y., and Lin, J. K. (2000). Comparative studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and its hydrogenated metabolites through down-regulation of IκB kinase and NFκB activation in macrophages. **Biochemical Pharmacology,** 60(11), 1665-1676.

Park, M. J, Kim, E. H., Park, I. C., Lee, H. C., Woo, S. H., Lee, J. Y., et al. (2002). Curcumin inhibits cell cycle progression of immortalized human umbilical vein endothelial (ECV304) cells by up-regulating cyclin-dependent kinase inhibitor, p21WAF1/CIP1, p27KIP1 and p53. **International Journal of Oncology,** 21, 379-383.

Park, S. Y., Kim, H. S., Cho, E. K., Kwon, B. Y., Phark, S., Hwang, K. W., et al. (2008). Curcumin protected PC12 cells against beta-amyloid-induced toxicity through the inhibition of oxidative damage and tau hyperphosphorylation. **Food and Chemical Toxicology,** 46, 2881–2887.

Perry, M. C., Demeule, M., Regina, A., Moumdjian, R. and Beliveau, R. (2010). Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in glioblastoma xenografts. **Molecular Nutrition and Food research,** 54, 1192–1201.

Plummer, S. M., Holloway, K. A., Manson, M. M., Munks, R. J., Kaptein, A., Farrow, S. and Howells, L. (1999). Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF-kappaB activation via the NIK/IKK signalling complex. **Oncogene,** 18(44), 6013-6020.

Pulla, R. A. C., Sudharshan, E., Appu, R. A. G. and Lokesh. B. R. (1999). Interaction of curcumin with human serum albumin-A spectroscopic study. **Lipids,** 34(10), 1025-1029.

Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y., Li, Y., Sawai, H., Reed, J. C., et al. (1997). Somatic frameshift mutations in the *BAX* gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. **Science,** 275, 967–969.

Rashmi, R., Kumar, S. and Karunagaran, D. (2005). Human colon cancer cells lacking Bax resist curcumin-induced apoptosis and Bax requirement is dispensable with ectopic expression of Smac or downregulation of Bcl-XL. **Carcinogenesis,** 26(4), 713-723.

Ray, B. and Lahiri, D. K. (2009). Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: different molecular targets and potential therapeutic agents including curcumin. **Current Opinion in Pharmacology,** 4, 434-444.

Reid, J. M., Stevens, D. C., Rubin, J., and Ames, M. M. (1997). Pharmacokinetics of 3-Methyl-(triazen-1-yl)imidazole-4-carboximide following administration of temozolomide to patients with advanced cancer. **Clinical Cancer Research,** 3, 2393–2398.

Roos, W. P., and Kaina, B. (2013). DNA damage-induced cell death: From specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. **Cancer Letters,** 332(2), 237-248.

Ruby, A. J., Kuttan, G., Dinesh Babu, K., Rajasekharan, K. N., and Kuttan, R. (1995). Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids. **Cancer Letters,** 94(1), 79-83.

Sanson, M., Cartalat, C. S., Taillibert, S., Napolitano, M., Djafari, L., Cougnard, J., et al. (2004). Initial chemotherapy in gliomatosiscerebri. **Neurology,** 63(2), 270-275.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J. and Debatin, K. M. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. The EMBO Journal, 17(6), 1675-1687.

Schmitz, I., Kirchhoff, S. and Krammer, P. H. (2000). Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. **Journal of Biochemistry and Cell Biology,** 32, 1123–1136.

Schultz, D. R. and Harrington, W. J., Jr. (2003). Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. **Seminars in Arthritis and Rheumatism,** 32(6), 345-369.

Shakibaei, M., Mobasheri, A., Lueders, C., Busch, F., Shayan, P. and Goel, A. (2013). Curcumin enhances the effect of chemotherapy against colorectal cancer cells by inhibition of NF-□B and Src protein kinase signaling pathways. **Public Library of Science**, 8(2), 1-13.

Shishodia, S., Amin, H. M., Lai, R. and Aggarwal, B. B. (2005). Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF-kappaB activation, induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma. **Biochem Pharmacol**, 70(5), 700-713.

Shishodia, S., Chaturvedi, M. M. and Aggarwal, B. B. (2007). Role of Curcumin in Cancer Therapy. **Current Problems in Cancer**, 31(4), 243-305.

Shoba, G., Joy, D., Joseph, T., Majeed, M., Rajendran, R. and Srinivas, P. S. (1998). Influence of Piperine on the Pharmacokinetics of Curcumin in Animals and Human Volunteers. **Planta Medica**, 64(4), 353-356.

Simon, A., Allais, D. P., Duroux, J. L., Basly, J. P., Durand-Fontanier, S., and Delage, C. (1998). Inhibitory effect of curcuminoids on MCF-7 cell proliferation and structure–activity relationships. **Cancer Letters**, 129(1), 111-116.

Singh, M., and Singh, N. (2009). Molecular mechanism of curcumin induced cytotoxicity in human cervical carcinoma cells. **Molecular and cellular biochemistry**, 325(1-2), 107-119.

Singh, S., and Aggarwal, B. B. (1995). Activation of transcription factor NF-κB is suppressed by curcumin (diferuloylmethane). **Biological Chemistry**, 270, 24995-25000.

Siwak, D. R., Shishodia, S., Aggarwal, B. B. and Kuzrock, R. (2005). Curcumin-induced antiproliferative and proapoptotic effects in melanoma cells are associated with suppression of IkappaB kinase and nuclear factor kappaB activity and are independent of the B-Raf/mitogen-activated/ extracellular signal-regulated protein kinase pathway and the Akt pathway. **Cancer**, 104, 879-890.

Srimal, R. C. and Dhawan, B. N. (1973). Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non-steroidal anti-inflammatory agent. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 25(6), 447-452.

Srinivasan, M. (1972). Effect of curcumin on blood sugar as seen in a diabetic subject. **Indian Journal of Medical Sciences,** 26(4), 269-70.

Srivastava, K. C., Bordia, A. and Verma, S. K. (1995). Curcumin, a major component of food spice turmeric (Curcuma longa) inhibits aggregation and alters eicosanoid metabolism in human blood platelets. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids,** 52(4), 223-227.

Srivastava, R., Dikshit, M., Srimal, R. C. and Dhawan, B. N. (1985). Anti-thrombotic effect of curcumin. **Thrombosis Research,** 40(3), 413-417.

Stevens, M. F. G., Hickman, J. A., Langdon, S. P., Chubb, D., Vickers, L., Stone, R., et al. (1987). Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of 8-carbamoyl-3-methylimidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one (CCRG 81045: M & B39831), a novel drug with potential as an alternative to dacarbazine. **Cancer Research,** 47, 5846 –5852.

Stevens, M. F. G. and Newlands, E. S. (1993). From Triazines and Triazenes to Temozolomide. **European Journal of Cancer,** 29(7), 1045-1047.

Stewart, L. A. (2002). Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. **Lancet,** 359(9311), 1011-1018.

Stupp, R., Gander, M., Leyvraz, S., and Newlands, E. (2001). Current and future developments in the use of temozolomide for the treatment of brain tumours. **The lancet oncology,** 2(9), 552-560.

Stupp, R., Mason, W. P., Van Den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., et al. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **New England Journal of Medicine,** 352(10), 987-996.

Stupp, R., Hegi, M. E., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Taphoorn, M. J., Janzer, R. C., et al. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. **The lancet oncology,** 10(5), 459-466.

Surh, Y. J., Dong, Z., Cadenas, E. and Packer, L. (2009). **Dietary modulation of cell signaling pathway.** U.K.: CPR press.

Tamvakopoulos, C., Dimas, K., Sofianos, Z. D., Hatziantoniou, S., Han, Z., Liu, Z.-L., et al. (2007). Metabolism and anticancer activity of the curcumin analogue, dimethoxycurcumin. **Clinical Cancer Research,** 13(4), 1269-1277.

Tano, K., Shiota, S., Collier, J., Foote, R. S., and Mitra, S. (1990). Isolation and structural characterization of a cDNA clone encoding the human DNA repair protein for O6-alkylguanine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 87(2), 686–690.

Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science,** 267, 1456–1462.

Tohma, Y., Gratas, C., Biernat, W., Peraud, A., Fukuda, M., Yonekawa, Y., et al. (1998). PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology,** 57(7), 684-689.

Tsang, L. L. H., Quarterman, C. P., Gescher, A., and Slack, J. A. (1991). Comparison of the cytotoxicityin vitro of temozolomide and dacarbazine, prodrugs of 3-methyl-(triazen-1-yl)imidazole-4-carboxamide. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology,** 27, 342–346.

Tsang, L. L. H., Farmer, P. B., Gescher, A. and Slack, J. A. (1990). Characterization of urinary metabolites of temozolomide in humans and mice and evaluation of their cytotoxicity. **Cancer Journal of Chemotherapy and Pharmacology,** 26, 429-436.

Tsujimoto, Y. (2003). Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. **Journal of cellular physiology,** 195(2), 158-167.

Tsujimoto, Y. and Shimizu, S. (2000). Bcl-2 family: life-or-death switch. **FEBS Letters,** 466(1), 6-10.

Vaux, D. L., Cory, S. and Adams, J. M. (1988). *Bcl-2* gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with cmyc to immortalize pre-B cells. **Nature,** 335, 440–442.

Vecht, C. J., Wagner, G. L., and Wilms, E. B. (2003). Interactions between antiepileptic and chemotherapeutic drugs. **The Lancet Neurology,** 2(7), 404-409.

Venkatesan, P., Unnikrishnan, M. K., Kumar, S. M. and Rao, M. N. A. (2003). Effect of curcumin analogues on oxidation of haemoglobin and lysis of erythrocytes. **Current Science,** 84(1), 74-78.

Vogel, A. and Pelletier, J. (1815). Examen chimique de la racine de curcuma. **Journal de Pharmacie,** 1, 289-300.

Wang, X. W. and Harris, C. C. (1997). *p53* tumor-suppressor gene: clues to molecular carcinogenesis. **Journal of Cellular Physiology,** 173, 247–255.

Wang, Y. L., Pan, M. H., Cheng, A. L., Lin, L. I., Ho, Y. Z., Hsieh, C. Y. and Lin, J. K. (1997). Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** 15, 1867-1876.

Wedge, S. R., Porteous, J. K., May, B. L. and Newlands, E. S. (1996). Potentiation of temozolomide and BCNU cytotoxicity by O(6)-benzylguanine: a comparative study *in vitro*. **British Journal of Cancer,** 73, 482–490.

Wilken, R., Veena, M. S., Wang, M. B., an Srivatsan, E. S. (2011). Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. **Molecular cancer,** 10(1), 1.

Wolter, K. G., Hsu, Y. T., Smith, C. L., Nechushtan, A., Xi, X. G. and Youle, R. J. (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. **The Journal of Cell Biology,** 139, 1281–1292.

Wrensch, M., Minn, Y., Chew, T., Bondy, M. and Berger, M. S. (2002). Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. **Neuro-oncology,** 4, 278–299.

Yadav, V. R., Suresh, S., Devi, K. and Yadav, S. (2009). Novel formulation of solid lipid microparticles of curcumin for anti-angiogenic and anti-inflammatory activity for optimization of therapy of inflammatory bowel disease. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 3, 311-321.

Yeh, C. H., Chen, T. P., Wu, Y. C., Lin, Y. M. and Jing, L. P. (2005). Inhibition of NFkappaB activation with curcumin attenuates plasma inflammatory cytokines surge and cardiomyocytic apoptosis following cardiac ischemia/ reperfusion. **Journal of Surgical Research**, 125, 109-116.

Yoshimoto, K., Mizoguchi, M., Hata, N., Murata, H., Hatae, R., Amano, T., et al. (2012). Complex DNA repair pathways as possible therapeutic targets to overcome temozolomide resistance in glioblastoma. **Frontiers in Oncology**, 2(186), 1-8.

Youssef, K. M., Ezzo, A. M., El-Sayed, M. I., Hazzaa, A. A., El-Medany, A. H., and Arafa, M. (2015). Chemopreventive effects of curcumin analogs in DMH-Induced colon cancer in albino rats model. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, 1(2), 57-72.

Yoysungnoen, P., Wirachwong, P., Changtam, C., Suksamrarn, A., and Patumraj, S. (2008). Anti-cancer and anti-angiogenic effects of curcumin and tetrahydrocurcumin on implanted hepatocellular carcinoma in nude mice. **World Journal of Gastroenterology**, 14(13), 2003-2009.

Zamzami, N. and Kroemer, G. (2001). The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2(1), 67-71.

Zhao, X. C., Zhang, L., Yu, H. X., Sun, Z., Lin, X. F., Tan, C., et al. (2011). Curcumin protects mouse neuroblastoma Neuro-2A cells against hydrogen-peroxide-induced oxidative stress. **Food Chemistry**, 129, 387–394.

ภาคผนวก

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์

การนำเซลล์ออกจากการแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196°C มาเพาะเลี้ยง (Thaw cell)

เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ใส่ cell culture flask ขนาด 25 cm^3 บ่มไว้ในตู้เพาะเซลล์ประมาณ 15 นาที จากนั้น นำเซลล์ออกมาจากไนโตรเจนเหลว ละลายใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C แล้วนำไปใส่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมไว้ข้างต้น ทำให้เซลล์กระจายตัว และนำเข้าตู้เพาะเลี้ยง incubator ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 °C, 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การถ่ายเลี้ยงเซลล์ (subculture) โดยการใช้เอนไซม์ trypsin

อุ่นอาหารเลี้ยงเซลล์ สารละลาย PBS และ 0.1% trypsin ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกทิ้งให้หมด ล้างผิวเซลล์ด้วยสารละลาย PBS ใส่ trypsin ลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ กลิ้ง trypsin คลุมทั่วผิวเซลล์ ดูด trypsin ออกทิ้ง นำไปบ่ม ประมาณ 3 นาทีเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ ทำการดูดพ่นให้เซลล์หลุดออก และเป็นการกระจายตัวของเซลล์ ให้เป็นเซลล์เดี่ยว นำเข้าตู้ incubator ทำการเพาะเลี้ยงต่อไป

การนับจำนวนเซลล์ด้วยเครื่อง hematocytometer โดยวิธี trypan blue exclusion assay

หลังจากการทำ trypsinize ได้เซลล์ suspension ทำการแบ่งเซลล์ใส่ tube ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ดูดสาร supernatant ออกให้หมดเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ ทำการดูดขึ้นลง เพื่อให้เซลล์ที่ตกตะกอนอยู่ก้นหลอดกระจายตัวเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ในอาหาร ใช้ auto-pipette ดูดเซลล์มา 20 µl ผสมกับ trypan blue 20 µl และนำไปทำการนับจำนวนเซลล์โดยใช้เครื่อง hematocytometer ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การคำนวณเซลล์ที่ต้องการในความเข้มข้น 1 x 10^4 cell/100ul ลงใน 96 well-plate

ความเข้มข้นของเซลล์ที่ต้องการ 1 x 10^4 cells/100ul = 1 x 10^5 cells/1 ml

ต้องการใช้เซลล์ลง 96 wells จะได้เซลล์ที่ต้องการใช้ 9600 µl เตรียมประมาณ 12 ml

ฉะนั้น เซลล์ที่ต้องใช้ลงใน 96 wells = 1 x 10^5 cell x 12 ml

= 3.6 x 10^6 cells

เซลล์ที่นับได้ X cells

ดังนั้น จะต้องใช้เซลล์ $\frac{3.6 \times 10^6}{X \text{ cells}}$ cells

= **จำนวนเซลล์ที่ใช้ + อาหารเลี้ยงเซลล์ (ปริมาตรทั้งหมด 12 ml)**

จากนั้นถ่ายเซลล์ลงใน 96 well-plate โดยใช้ mutichannel pipette จะได้เซลล์ 3×10^4 cells / well

แสดงวิธีการเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

หลอดที่	BSA (µl)	น้ำกลั่น (µl)	ปริมาณ BSA (µg/20 µl)
1	0	200	0
2	12.5	187.5	0.25
3	25	175	0.5
4	37.5	162.5	0.75
5	50	150	1.0
6	75	125	1.5
7	100	100	2.0
8	125	75	2.5

แสดงสูตรการเตรียม polyacrylamide gel

	12% separating gel	4% stacking gel
1. Distilled water	4.02 ml	3 ml
2. Gel buffer pH 8.8 (Tris-HCL 1.5 M)	3 ml	-
3. Gel buffer pH 6.8 (Tris-HCL 0.5 M)	-	1.26 ml
4. 30% acrylamide: Bis	4.8 ml	0.56 ml
5. 10% SDS	120 µl	50 µl
6. 10% APS (ammonium persulfate)	60 µl	25 µl
7. TEMED	6 µl	5 µl
Total volume	12 ml	5 ml