

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

มะเร็งเป็นสาเหตุการตายที่สำคัญในประชากรทั่วโลก จากประมาณการใน พ.ศ. 2537 พบว่า มีจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งมากกว่า 18 ล้านคน และมีผู้ป่วยใหม่ประมาณ 9 ล้านคนในทุก ๆ ปี องค์การอนามัยโลกได้คาดการณ์ไว้ว่าในปี 2563 ทั่วโลกจะมีคนตายด้วยโรคมะเร็งมากกว่า 11 ล้านคน และเกิดขึ้นในประเทศที่กำลังพัฒนามากกว่า 7 ล้านคนเนื่องจากมีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็ง สาเหตุการเกิดมะเร็งพบว่ามีปัจจัยร่วมที่หลากหลายและประกอบด้วยหลายขั้นตอน ได้แก่ initiation, promotion และ progression จากกลไกการเกิดมะเร็งที่เป็น multifactorial และ multistep processes ทำให้การรักษาไม่ได้หลายวิธีตั้งแต่การป้องกันการเกิดมะเร็งไปจนถึงการรักษา ประกอบกับการตรวจพบมะเร็งมักจะเป็นระยะหลัง ๆ ประมาณการว่าร้อยละ 70 ของผู้ป่วยมะเร็งที่ได้รับการวินิจฉัยจะมีการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งแล้ว ซึ่งการรักษาแบบ local treatment (เช่น การผ่าตัด หรือรังสีรักษา) มักไม่ได้ผล การรักษาในระยะนี้จึงต้องใช้ยาต้านมะเร็งหรือยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์จึงมักมีผลต่อเซลล์ปกติที่กำลังแบ่งตัวด้วย นอกจากนี้เซลล์มะเร็งบางชนิดจะมีปัญหาการดื้อยา แม้จะให้การรักษาแบบ combination therapy ก็จะทำให้ผลไม่ดีขึ้น

ในประเทศไทย มะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งตับที่มีอุบัติการณ์สูงมาก โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมะเร็งดังกล่าวมีอุบัติการณ์ในชายมากกว่าหญิง (1) โดยทั่วไปมะเร็งท่อน้ำดีในระยะเริ่มแรกมักไม่แสดงอาการ ประกอบกับในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการที่ใช้ในการวินิจฉัยในระยะเริ่มแรก ผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่เข้ารับการรักษามักมีการดำเนินโรคอยู่ในระยะสุดท้าย ซึ่งมะเร็งได้ลุกลามเกินกว่าจะทำการรักษาได้ทำให้มะเร็งชนิดนี้มีการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี และมีอัตราการตายสูง ปัจจุบันยังไม่มีการรักษามะเร็งชนิดนี้อย่างมีประสิทธิภาพ (2) การรักษาส่วนใหญ่จึงเป็นลักษณะบรรเทา (palliative treatment) หรือหากรักษาโดยการผ่าตัดก็มักพบการกลับเป็นซ้ำในอัตราสูง

ปัจจุบันยาที่ใช้ในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็งเป็นยาแผนปัจจุบัน ยาส่วนใหญ่ได้มาจากการนำเข้าจากต่างประเทศ การผลิตยาแผนปัจจุบันในประเทศเองก็มักใช้วัตถุดิบจากต่างประเทศซึ่งมีราคาแพงทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ การรักษาโรคมะเร็งโดยการให้ยารักษามะเร็งในปัจจุบัน ยังคงมีข้อจำกัด เช่น ปัญหาการดื้อยา (drug resistance) ผลข้างเคียงของยาที่เกิดขึ้นกับผู้ป่วย (side effect) เป็นต้น ดังนั้นการพยายามนำเอาสมุนไพรซึ่งเป็นทรัพยากรหรือวัตถุดิบที่มีราคาไม่สูงมากนักและมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี มาศึกษาฤทธิ์ร่วมกับยาเคมีบำบัดและศึกษาฤทธิ์การยับยั้งมะเร็งท่อน้ำดีในสัตว์ทดลองจึงมีความจำเป็น เพื่อนำไปสู่การผลิตเป็นยารักษาโรคแผนปัจจุบัน และนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับยารักษาโรคแผนปัจจุบัน จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยให้ผู้ป่วยมีชีวิตที่ยืนยาว และมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น โดยการรักษาด้วยยาที่มีค่าใช้จ่ายไม่สูงเกินไป มีผลข้างเคียงต่ำ และช่วยทำให้การนำสมุนไพรมาประยุกต์ใช้ในการป้องกันรักษาโรคมะเร็งตามแนวทางการรักษาแผนปัจจุบันแพร่หลายมากยิ่งขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1 เพื่อศึกษาถึงฤทธิ์ cytotoxicity ของยาเคมีบำบัด (5-FU, Gemcitabine, Cisplatin, Doxorubicin และ Paclitaxel) ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี โดยวิธี SRB assay

2 เพื่อศึกษาผลการใช้ร่วมกันของสารบริสุทธิ์จาก *Garcinia hanburyi* 4 ชนิด (isomorellin, isomorellinol, forbesione และ gambogic acid) กับยาเคมีบำบัดทั้ง 5 ชนิดในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีและเซลล์ปกติ

3 เพื่อศึกษากลไกเบื้องต้นในการยับยั้งเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีของสารบริสุทธิ์จากสมุนไพร ร่วมกับยาเคมีบำบัดที่ให้ผลเสริมฤทธิ์กันต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีที่ถูกชักนำให้เกิดกระบวนการ apoptosis โดยวิธี EB/AO staining

4 เพื่อศึกษากลไกในระดับโมเลกุลของการเกิดกระบวนการ apoptosis ของเซลล์มะเร็งโดยตรวจดูการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2, Bax, survivin, activated caspase-3 และ activated caspase-9 โดยวิธี western blot

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาผลการใช้ร่วมกันของสารบริสุทธิ์จาก *Garcinia hanburyi* 4 ชนิด (isomorellin, isomorellinol, forbesione และ gambogic acid) กับยาเคมีบำบัด 5 ชนิด (5-FU, Gemcitabine, Cisplatin, Doxorubicin และ Paclitaxel) ต่อ เซลล์ 3 ชนิด ได้แก่ KKU-100, KKU-M156 และ Chang liver cell โดยวิธี SRB assay รวมทั้งศึกษากลไกเบื้องต้นในการชักนำให้เกิดกระบวนการ apoptosis ด้วยวิธี EB/AO staining และกลไกในระดับโมเลกุลโดยศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2, Bax, survivin, activated caspase-3 และ activated caspase-9 ด้วยวิธี western blot analysis

1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

เนื่องจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีส่วนใหญ่มาพบแพทย์เมื่อมะเร็งได้พัฒนาสู่ระยะสุดท้าย หรือระยะแพร่กระจายซึ่งทำให้การบำบัดรักษาโดยการผ่าตัดให้พยากรณ์โรคที่ไม่ดี อัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยหลังผ่าตัดที่มีชีวิตถึง 5 ปีต่ำมาก การใช้ยาต้านมะเร็งก็ให้ผลในการรักษาดำเนินการเนื่องจากการดื้อต่อยาและเกิดอาการพิษของยาร่วมด้วย ดังนั้น การนำสารสกัดจากธรรมชาติที่ได้ทำการศึกษาแล้วพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีโดยไปชักนำให้เกิด cell cycle arrest และ การตายแบบ apoptosis และมีความเป็นพิษต่ำ มาศึกษาฤทธิ์ร่วมกับยาเคมีบำบัดในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีจึงมีความจำเป็น ดังนั้น การเลือกใช้สมุนไพรจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ปัจจุบันมีการศึกษาเพิ่มขึ้น

รงทอง เป็นพืชในวงศ์ Guttiferae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Garcinia hanburyi* Hook. f. ได้มีการนำมาใช้เป็นยาถ่าย ยารักษาแผลติดยาเสพติด รักษาโรคผิวหนังอักเสบเรื้อรัง ริดสีดวงทวาร และแผลกดทับ (9) จาก

การศึกษาสารเคมีพบว่า ยาง ผล และลำต้น มีสาร caged xanthones หลายชนิด ได้แก่ desoxymorellin, isomorellin, isomorellinol, morellic acid, gambogic acid, desoxygambogenin, hanburin, forbesione และ dihydroisomorellin (10, 11, 12, 13) มีรายงานการทดลองพบว่าสารสกัดจากเหงือกมีฤทธิ์ต้านอักเสบ ฤทธิ์ลดไข้ และฤทธิ์แก้ปวด (14) และยังพบว่าสาร caged xanthones หลายชนิดมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิด รวมทั้งฤทธิ์ anti-tumor (10, 11, 12, 15, 16) จากการศึกษาโดยจริยา หาญจนวนวงศ์และคณะ พบว่าสาร caged xanthone 4 ชนิด ได้แก่ isomorellin, isomorellinol, gambogic acid และ forbesione ที่แยกได้จากเหงือกสามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKKU-100 และ KKKU-M156 เกิด apoptosis โดยกลไกการเกิด apoptosis เกิดผ่านทาง mitochondrial pathway ทั้งแบบ caspase-dependent และ caspase-independent pathway (ทุนวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่นปี 2549-2550) และยังพบว่า isomorellin, isomorellinol, gambogic acid และ forbesione ชักนำให้เกิด G0/G1 arrest ใน KKKU-100 และ KKKU-M156 (ทุนวิจัย PERCH-CIC ปี 2550-2552) ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความประสงค์ที่จะศึกษาผลการใช้ร่วมกันของ isomorellin, isomorellinol, gambogic acid และ forbesione กับยาเคมีบำบัดในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี โดยจะทำการตรวจสอบฤทธิ์ cytotoxicity ของยาเคมีบำบัด (5-FU, Gemcitabine, Cisplatin, Doxorubicin และ Paclitaxel) ต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยวิธี SRB assay แล้วทำการศึกษาผลการใช้ร่วมกันของ caged xanthone 4 ชนิดกับยาเคมีบำบัดทั้ง 5 ชนิดในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี จากนั้นทำการศึกษากลไกเบื้องต้นในการยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยทำ apoptosis assay ด้วยวิธี EB/AO staining และกลไกในระดับโมเลกุลโดยศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2, Bax, survivin, activated caspase-3 และ activated caspase-9 ด้วยวิธี western blot analysis

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

- 1 ทราบถึงฤทธิ์ของยาเคมีบำบัด (5-FU, Cisplatin, Gemcitabine, Doxorubicin and Paclitaxel) ต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี
- 2 ทราบถึงผลการใช้ร่วมกันของ caged xanthone 4 ชนิดกับยาเคมีบำบัดทั้ง 5 ชนิดในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี
- 3 ทราบถึงกลไกเบื้องต้นของผลการใช้ร่วมกันของ caged xanthone 4 ชนิดกับยาเคมีบำบัดทั้ง 5 ชนิดในการยับยั้งเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี
- 4 ทราบถึงกลไกในระดับโมเลกุลของผลการใช้ร่วมกันของ caged xanthone 4 ชนิดกับยาเคมีบำบัดทั้ง 5 ชนิดต่อการแสดงออกของโปรตีนที่ควบคุมกระบวนการ apoptosis
- 5 จากข้อมูลที่ได้สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในศึกษาในสัตว์ทดลอง เพื่อการพัฒนาเป็นยาด้านมะเร็ง หรือใช้ร่วมกับยาด้านมะเร็ง ต่อไป
- 6 เผยแพร่ในวารสารระดับชาติ
- 7 นักศึกษาจบปริญญาโท 1 คน

8. หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

- สถาบันการแพทย์แผนไทย กระทรวงสาธารณสุข
- โรงพยาบาลชุมชน กระทรวงสาธารณสุข
- คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

1.6 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

สร้างกลุ่มวิจัยสมุนไพรที่มีศักยภาพในการศึกษาหายา/สารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง และผลงานที่ได้จัดทำจะนำเสนอในการประชุมวิชาการที่เกี่ยวข้อง เช่น การประชุมวิชาการของแพทย์แผนไทย กระทรวงสาธารณสุข การประชุมประจำปีของสมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย การประชุมประจำปีของคณะแพทยศาสตร์ ม.ขอนแก่น และสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย และตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารต่าง ๆ เช่น วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น เป็นต้น

1.7 สถานที่ทำการทดลอง และ/หรือ เก็บข้อมูล

ภาควิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ในประเทศไทย มะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งตับที่มีอุบัติการณ์สูงมาก โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมะเร็งดังกล่าวมีอุบัติการณ์ในชายมากกว่าหญิง (1) โดยทั่วไปมะเร็งท่อน้ำดีในระยะเริ่มแรกมักไม่แสดงอาการ ประกอบกับในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการที่ใช้ในการวินิจฉัยในระยะเริ่มแรก ผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่เข้ารับการรักษามักมีการดำเนินโรคอยู่ในระยะสุดท้าย ซึ่งมะเร็งได้ลุกลามเกินกว่าจะทำการรักษาได้ทำให้มะเร็งชนิดนี้มีการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี และมีอัตราการตายสูง ปัจจุบันยังไม่มีการรักษามะเร็งชนิดนี้อย่างมีประสิทธิภาพ (2) การรักษาส่วนใหญ่จึงเป็นลักษณะบรรเทา (palliative treatment) หรือหากรักษาโดยการผ่าตัดก็มักพบการกลับเป็นซ้ำในอัตราสูง

ปัจจุบันยาที่ใช้ในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็งเป็นยาแผนปัจจุบัน ยาส่วนใหญ่ได้มาจากการนำเข้าจากต่างประเทศ การผลิตยาแผนปัจจุบันในประเทศเองก็มักใช้วัตถุดิบจากต่างประเทศซึ่งมีราคาแพงทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ การรักษาโรคมะเร็งโดยการให้ยารักษามะเร็งในปัจจุบัน ยังคงมีข้อจำกัด เช่น ปัญหาการดื้อยา (drug resistance) ผลข้างเคียงของยาที่เกิดขึ้นกับผู้ป่วย (side effect) เป็นต้น ดังนั้นการพยายามนำเอาสารสกัดจากธรรมชาติที่ได้ทำการศึกษาแล้วพบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยไปชักนำให้เกิด cell cycle arrest และ การตายแบบ apoptosis และมีความเป็นพิษต่ำ นำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับยารักษาโรคแผนปัจจุบัน จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยทำให้การนำสารสกัดจากธรรมชาติมาประยุกต์ใช้ในการป้องกันรักษาโรคมะเร็งตามแนวทางการรักษาแผนปัจจุบันแพร่หลายมากยิ่งขึ้น

พืชเป็นแหล่งของยารักษาโรคที่สำคัญของมนุษย์มาเป็นเวลายาวนาน องค์การอนามัยโลก (World Health Organization) ประเมินการว่าประมาณร้อยละ 80 ของประชากรโลกใช้สมุนไพรพื้นบ้านโดยเฉพาะสารสกัดจากพืชในการรักษาการเจ็บป่วยเบื้องต้น ยิ่งไปกว่านั้นยาแผนปัจจุบันของประเทศตะวันตกหลายชนิดรวมทั้งยารักษามะเร็ง ก็มีแหล่งกำเนิดมาจากสารสกัดจากพืช (3) ปัจจุบันนี้พืชสมุนไพรกำลังได้รับความสนใจในการนำมาศึกษาวิจัยเพื่อทำเป็นยารักษาโรคต่างๆ รวมทั้งโรคมะเร็ง เนื่องจากในพืชสมุนไพรมีสารสำคัญในการออกฤทธิ์หลายชนิด บางชนิดสามารถออกฤทธิ์ได้กว้าง และมีรายงานว่า มีศักยภาพป้องกันหรือรักษาโรคมะเร็ง เช่น phenolic compounds, alkaloids, flavonoids, terpenoids, carotenoids, curcumin เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการรายงานข้อมูลยืนยันถึงความพยายามที่จะค้นหาสารหรือยาจากพืช เพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง โดยพบว่าสารหลายตัวอยู่ในระหว่างการศึกษาระดับคลินิก และหลายตัวถูกผลิตเป็นยาแผนปัจจุบันและใช้เป็นยารักษามะเร็งอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เช่น vinblastin, vincristine, podophyllotoxin, camptothecin, และ paclitaxel เป็นต้น (4)

รงทอง เป็นพืชในวงศ์ Guttiferae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Garcinia hanburyi* Hook. f. ได้มีการนำมาใช้เป็นยาถ่าย ยารักษาแผลติดเชื้อ รักษาโรคผิวหนังอักเสบเรื้อรัง ริดสีดวงทวาร และแผลกดทับ (5) จากการศึกษาสารเคมีพบว่า ยาง ผล และลำต้น มีสาร caged xanthones หลายชนิด ได้แก่ desoxymorellin, isomorellin, isomorellinol, morellic acid, gambogic acid, desoxygambogenin, hanburin,

forbesione และ dihydroisomorellin (6, 7, 8, 9) มีรายงานการทดลองพบว่าสารสกัดจากรงทองมีฤทธิ์ต้านอักเสบ ฤทธิ์ลดไข้ และฤทธิ์แก้ปวด (10) และยังพบว่าสาร caged xanthones หลายชนิดมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิด รวมทั้งฤทธิ์ anti-tumor (6, 7, 8, 11, 12) จากการศึกษาโดยจริยา หาญวงวงศ์ และคณะ พบว่าสาร caged xanthone 4 ชนิด ได้แก่ isomorellin, isomorellinol, gambogic acid และ forbesione ที่แยกได้จากรงทองสามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-100 และ KKU-M156 เกิด apoptosis โดยกลไกการเกิด apoptosis เกิดผ่านทาง mitochondrial pathway ทั้งแบบ caspase-dependent และ caspase-independent pathway (13)(ทุนวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่นปี 2549-2550) และยังพบว่า isomorellin, isomorellinol, gambogic acid และ forbesione ชักนำให้เกิด G0/G1 arrest ใน KKU-100 และ KKU-M156 (ทุนวิจัย PERCH-CIC ปี 2550-2552)

ยาเคมีบำบัดที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้เลือกจากยาที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี และมีกลไกในการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน

ยา 5-FU ใช้เป็นยามาตรฐานในการรักษาในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ (14) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในมะเร็งของระบบทางเดินหายใจ (15) กลไกในการออกฤทธิ์ของ 5-FU คือ สามารถไปยับยั้งเอนไซม์ thymidylate synthase (TS) ซึ่งเป็นผลให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์ DNA และเป็นสาเหตุให้เซลล์ตายโดยการเกิด apoptosis (16) นอกจากนี้ 5-FU ยังชักนำให้เซลล์เกิด apoptosis โดยผ่านทางการยับยั้ง NF-kappaB และเพิ่ม caspase activity เซลล์มะเร็งที่เกิด mutation ขึ้นที่ p53 พบว่าจะไม่ค่อยตอบสนองต่อการรักษาด้วย 5-FU (17) และมีรายงานพบว่าการรักษาด้วย 5-FU ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดียังให้ผลการรักษาที่ไม่ได้ผล (18, 19)

Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum [III]) เป็นสารประกอบอนินทรีย์ซึ่งมีรายงานแรกพบว่า cisplatin สามารถไปยับยั้งการแบ่งเซลล์และชักนำให้มีการเจริญแบบ filamentous *E. coli* กลไกการออกฤทธิ์ของ cisplatin ยังคงต้องมีการศึกษาต่อไป โดย cisplatin มีกลไกการทำงานเหมือนกับ alkylating agent cisplatin สามารถเข้าเซลล์ได้ในทุกระยะของวัฏจักรเซลล์, ยับยั้งการสังเคราะห์ DNA และยังสามารถไปจับกับ DNA และเกิดการ cross-link กันในระหว่างสาย cisplatin มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งมะเร็งในระบบสืบพันธุ์และทางเดินปัสสาวะ โดยเฉพาะในมะเร็งต่อมลูกหมาก, มะเร็งรังไข่ และมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

Gemcitabine (dFdC) เป็น pyrimidine antimetabolite โดยให้ผลดีต่อการรักษาในมะเร็งตับอ่อน, มะเร็งเต้านม, มะเร็งรังไข่, มะเร็งปอด และมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ gemcitabine ต้องเกิดการ phosphorylation ภายในเซลล์เพื่อให้อยู่ในรูป active gemcitabine-nucleotide ทั้ง gemcitabine diphosphate (dFdCDP) และ gemcitabine triphosphate (dFdCTP) มีส่วนในการยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาผลของ gemcitabine ในการยับยั้งมะเร็ง gemcitabine diphosphate มีคุณสมบัติในการยับยั้ง ribonucleotide reductase ซึ่งเป็นผลให้จำนวนของ deoxynucleotides (dNTP) ในเซลล์ลดจำนวนลง และมีผลทำให้มีสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ DNA ไม่เพียงพอ ทำให้สามารถไปยับยั้งการสร้าง DNA ได้ นอกจากนี้ การลดจำนวนลงของ dCTP เป็นผลให้ไปกระตุ้นการเกิด phosphorylation ของ gemcitabine และยิ่งช่วยส่งเสริมให้ gemcitabine nucleotide แทรกเข้าไปในสาย DNA นอกจากนี้การ

ยับยั้งของ dCMP deaminase โดย dFdCTP ทำให้ active dFdCTP มี half-life ในเซลล์นานขึ้นส่งผลให้ gemcitabine มีประสิทธิภาพในการรักษา solid tumors ได้ดีขึ้น gemcitabine ยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเกิด DNA repair เนื่องจาก radiation หรือ alkylating agent โดย gemcitabine มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการซ่อมแซม DNA รวมทั้งมีความเป็นพิษต่ำ ทำให้ gemcitabine เป็นความหวังสำหรับการรักษาแบบ combination (20)

Paclitaxel เป็นยาเคมีบำบัดในกลุ่ม mitotic inhibitor โดยมีกลไกการออกฤทธิ์คือช่วย stabilize microtubule

บทที่ 3

การดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1 เซลล์มะเร็ง

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี 2 ชนิด ได้แก่ KKU-100 (poorly-differentiated adenocarcinoma), KKU-M156 (moderately-differentiated adenocarcinoma), เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีทั้ง 2 ชนิด เป็นเซลล์ที่ establish ขึ้นที่หน่วยปฏิบัติการวิจัยพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด เพาะเลี้ยงใน Dulbecco's minimum essential medium/F-12 (Ham) ใส่ 10 % heat-inactivated fetal bovine serum, 2mM-glutamine, 100 IU Penicillin, 100 μ g streptomycin เซลล์ทุกชนิดเลี้ยงในตู้บัพที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้บรรยากาศ 5 % CO₂ ทำการเปลี่ยน media สัปดาห์ละ 2 ครั้ง

2 ยาเคมีบำบัด

ยา 5-FU , Cisplatin และ Paclitaxel ซื้อจากบริษัท Boryung Pharmaceutic Co. LTD (Korea) ยา Gemcitabine และ Doxorubicin ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท Dabur Pharma Limited, New Delhi, India.

3 การเตรียมสารละลาย isomorellin, isomorellinol, gambogic acid และ forbesione และยาเคมีบำบัด

ละลายสารด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม จากนั้นนำมาทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่าน millipore filter membrane ขนาด 0.45 μ m นำสารละลายที่ได้มาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นในขนาดต่าง ๆ กัน เพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ เทียบกับ vehicle และสารมาตรฐานต่อไป

4 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษของยาเคมีบำบัด

ทำการทดสอบโดยตรวจหาปริมาณของ cellular protein ด้วยวิธี sulforhodamine B (SRB) assay ตามวิธีของ Skehan และคณะ (1990) (21) ในการทดสอบนำเซลล์ที่มีปริมาณ 0.5 ถึง 1 x 10⁵ เซลล์ต่อมล. ใส่ลงใน 96-well microtiter plate เติมสารละลายยา ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันใช้ ellipticine เป็น positive control ใช้ DMSO เป็น solvent control จากนั้นนำไปบ่มที่ 37°C ใน CO₂ incubator นาน 72 ชั่วโมง ทำการย้อมด้วย SRB แล้วจึงทำการละลายสีด้วย Tris buffer เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวัด OD ที่ 510 nm จากค่า OD ที่ได้นำมาคำนวณหา % viability และค่า IC₅₀

5 การทดสอบฤทธิ์การใช้ร่วมกันของ caged xanthone 4 ชนิดกับยาเคมีบำบัดทั้ง 5 ชนิดในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

ทำการทดสอบโดยตรวจหาปริมาณของ cellular protein ด้วยวิธี sulforhodamine B (SRB) assay ตามวิธีของ Skehan และคณะ (1990) (25) ในการทดสอบนำเซลล์ที่มีปริมาณ 0.5 ถึง 1×10^5 เซลล์ต่อมล. ใส่ลงใน 96-well microtiter plate เติมน้ำสารละลายยาและสารละลาย caged xanthone ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมลงในเซลล์ ในการทดลองต้องมีเซลล์ที่ใส่สารละลายยาหรือสารละลาย caged xanthone ที่มีความเข้มข้นที่พอเหมาะเพียงอย่างเดียวทำควบคู่ไปด้วย แล้วทำ SRB assay ดังรายละเอียดในข้อ 13.4 จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลโดยใช้วิธีของ Chou and Talalay

6 การทดสอบกลไกเบื้องต้นของการใช้ร่วมกันของ caged xanthone 4 ชนิดกับยาเคมีบำบัดทั้ง 5 ชนิดที่ส่งผลเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีโดยวิธี EB/AO staining

เลือก caged xanthone และยาเคมีบำบัดที่ให้ผลเสริมฤทธิ์กันมาทำการทดสอบกลไกการตายของเซลล์ว่าเกิดจากกระบวนการ apoptosis หรือไม่ด้วยวิธี EB/AO staining โดยการย้อมสีติดเซลล์และนิวเคลียสของเซลล์ตามวิธีของ Park และคณะ ตรวจสอบ nuclear morphology และการติดสี ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนส์

7 การตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีนที่ควบคุมการเกิด apoptosis

นำเซลล์ที่ผ่านการ treat ด้วย caged xanthone และยาเคมีบำบัดที่ให้ผลเสริมฤทธิ์กันมาทำการสกัดโปรตีน จากนั้นตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีน Bax, Bcl2, survivin, activated caspase-3 และ activated caspase-9 โดยการทำ Western blot analysis

8 Statistical analysis

ทำการทดสอบความแตกต่างทางสถิติด้วย Student *t* test ของค่า mean $\pm$ SE ของการทดลองที่ทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง

ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการ

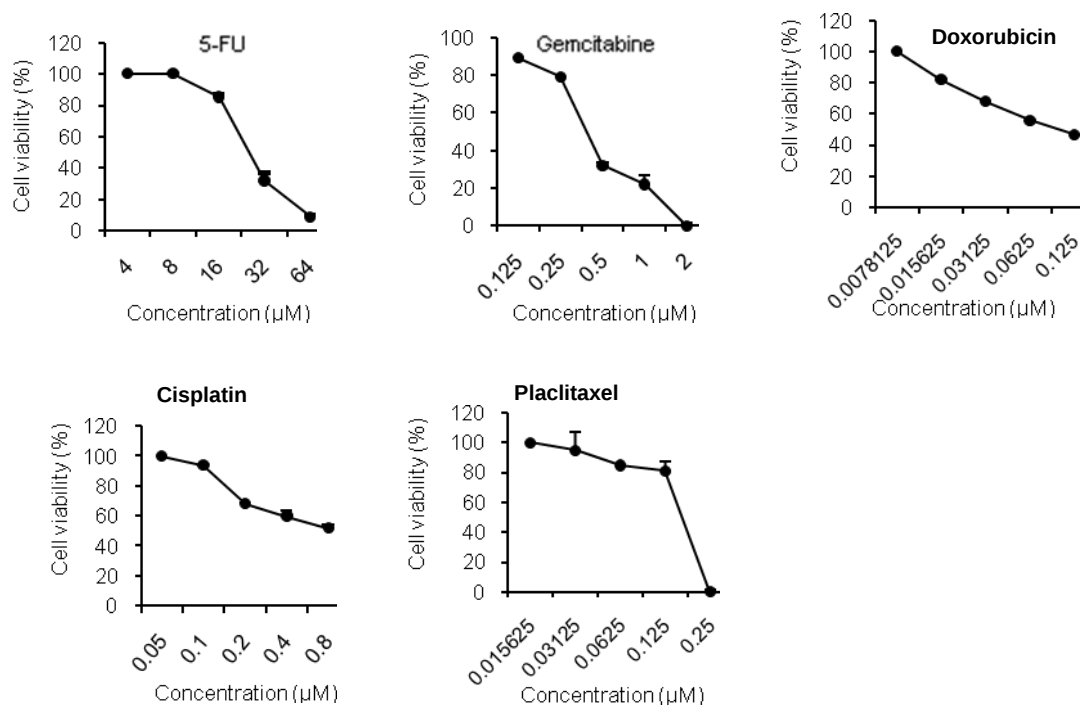
ระยะเวลาทำการวิจัย ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี

ตั้งแต่ ตุลาคม 2554– กันยายน 2555

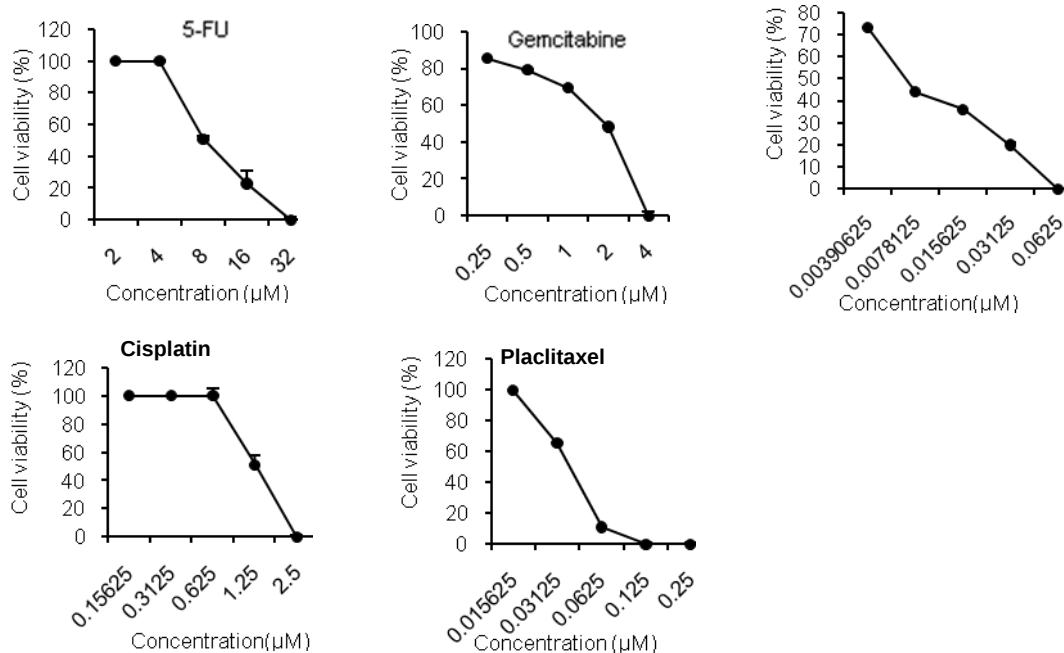
บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 ศึกษาฤทธิ์ cytotoxicity ของยาเคมีบำบัด 5 ชนิด ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

จากผลการทดสอบพบว่ายาเคมีบำบัด 5 ชนิด (5-FU, gemcitabine, doxorubicin, cisplatin และ paclitaxel) สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีทั้ง 2 ชนิด (KKU-100 และ KKU-M156) แบบ dose-dependent manner (รูปที่ 1 และ 2) และได้แสดงค่า IC_{50} ดังตารางที่ 1



รูปที่ 1 แสดงผลของยาเคมีบำบัดต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-100 เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีจะถูก treat ด้วยยาเคมีบำบัดที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เซลล์ที่รอดชีวิต (Cell viability) จะถูกตรวจวัดโดยใช้ SRB assay ค่าแต่ละค่าแสดงถึงค่า mean±SE ของการทดลองซ้ำสามครั้ง



รูปที่ 2 แสดงผลของยาเคมีบำบัดต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-M156 เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีจะถูก treat ด้วยยาเคมีบำบัดที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เซลล์ที่รอดชีวิต (Cell viability) จะถูกตรวจวัดโดยใช้ SRB assay ค่าแต่ละค่าแสดงถึงค่า mean±SE ของการทดลองซ้ำสามครั้ง

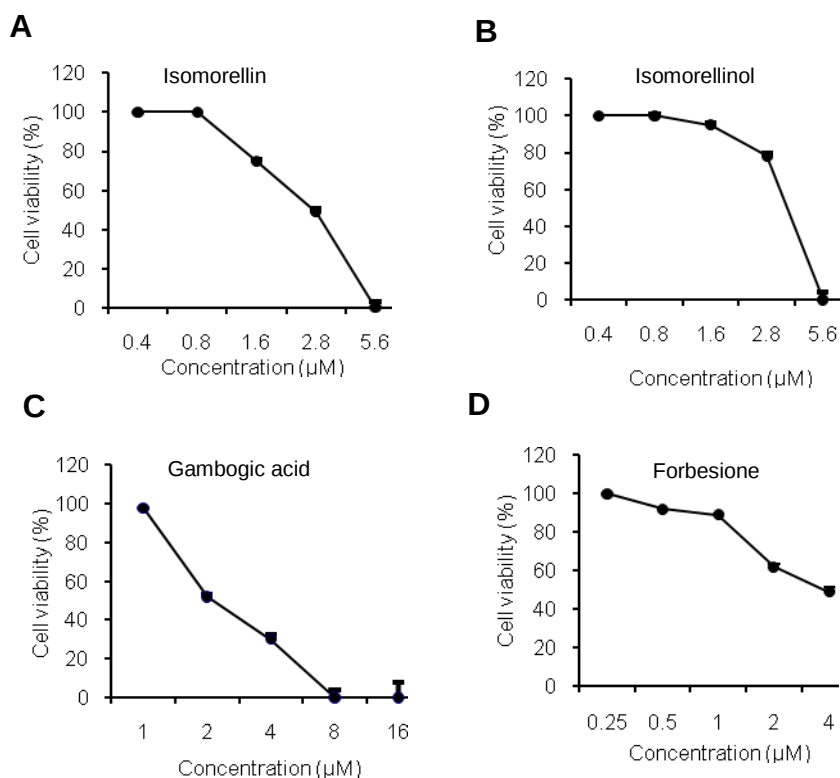
ตารางที่ 1 แสดงค่า IC_{50} ของยาเคมีบำบัดต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

Drugs	IC ₅₀ value (μM)	
	KKU-100	KKU-M156
5-FU	32.79±4.73	10.13±2.73
Gemcitabine	0.33±0.09	0.72±0.06
Cisplatin	0.49±0.14	0.27±0.08
Doxorubicin	0.66±0.07	0.01±0.007
Paclitaxel	0.078±0.003	0.036±0.012

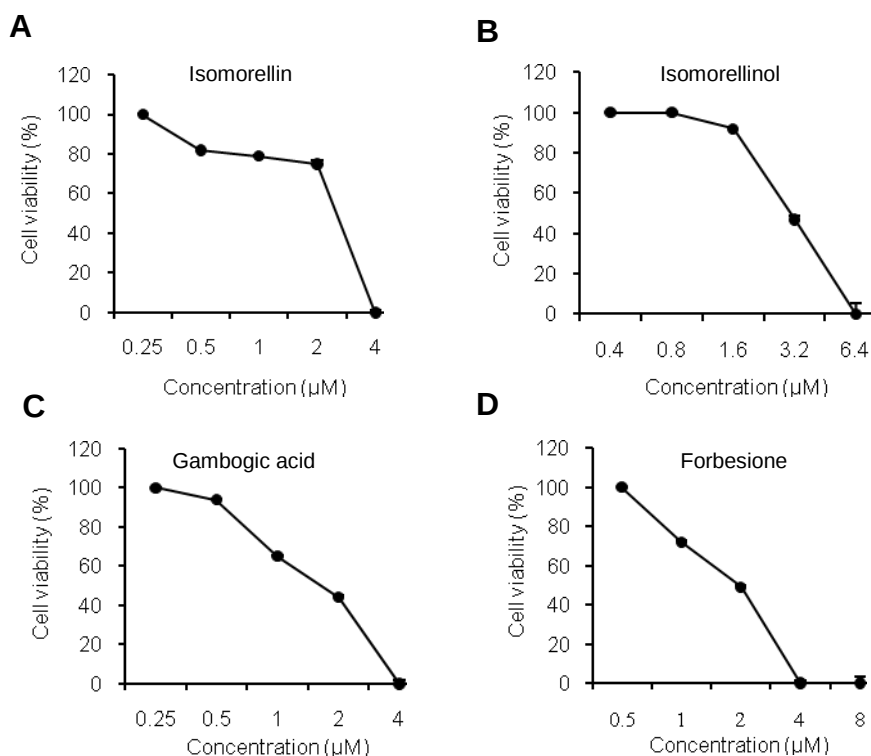
Data are mean ± SE of three independent experiments.

4.2 ศึกษาฤทธิ์ cytotoxicity ของ caged xanthone 4 ชนิด ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

จากผลการทดสอบพบว่า caged xanthone 4 ชนิด (isomorellin, isomorellinol, gambogic acid และ forbesione) สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีทั้ง 2 ชนิด (KKU-100 และ KKU-M156) แบบ dose-dependent manner (รูปที่ 3 และ 4) และได้แสดงค่า IC_{50} ดังตารางที่ 2



รูปที่ 3 แสดงผลของ caged xanthone 4 ชนิด (isomorellin, isomorellinol, gambogic acid และ forbesione) ต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKKU-100 เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีจะถูก treat ด้วย caged xanthone 4 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เซลล์ที่รอดชีวิต (Cell viability) จะถูกตรวจวัดโดยใช้ SRB assay ค่าแต่ละค่าแสดงถึงค่า mean±SE ของการทดลองซ้ำสามครั้ง



รูปที่ 4 แสดงผลของ caged xanthone 4 ชนิด (isomorellin, isomorellinol, gambogic acid และ forbesione) ต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-M156 เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีจะถูก treat ด้วย caged xanthone 4 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เซลล์ที่รอดชีวิต (Cell viability) จะถูกตรวจวัดโดยใช้ SRB assay ค่าแต่ละค่าแสดงถึงค่า mean±SE ของการทดลองซ้ำสามครั้ง

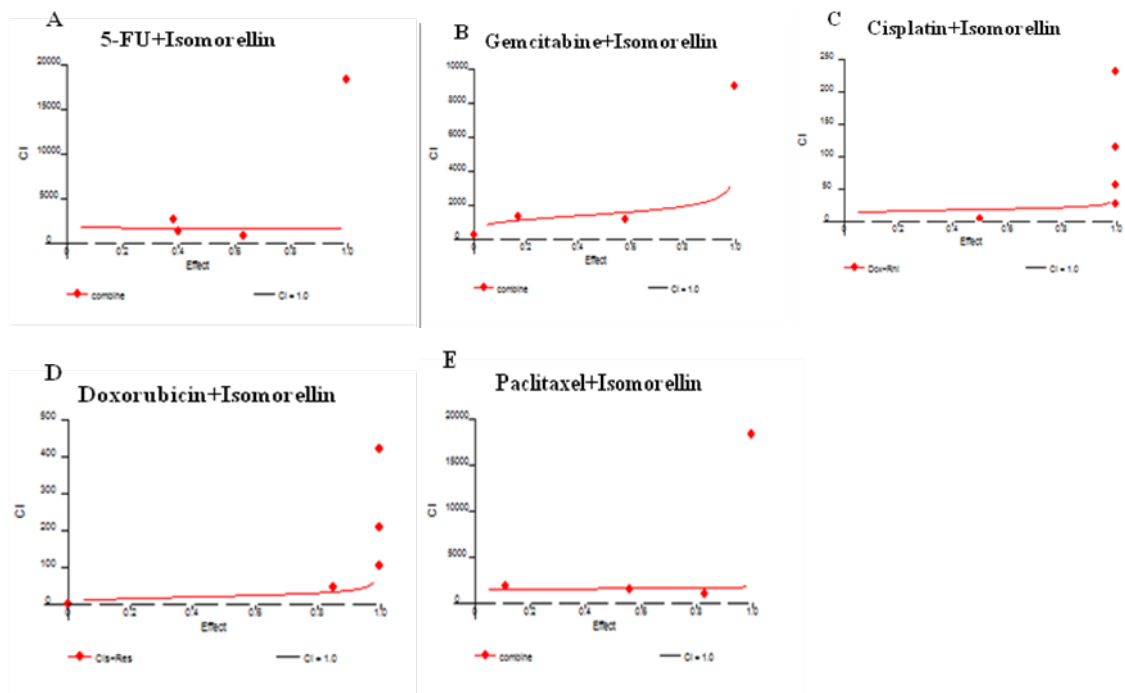
ตารางที่ 1 แสดงค่า IC₅₀ ของ caged xanthone 4 ชนิด ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

Compounds	IC ₅₀ value (μM)		
	KKU-100	KKU-M156	Chang
Isomorellin	2.03 ± 0.92	1.16 ± 0.80	46 ± 4.31
Isomorellinol	2.24 ± 0.22	2.10 ± 0.01	52 ± 8.90
Gambogic acid	2.20 ± 1.89	1.12 ± 0.07	23 ± 2.11
Forbesione	2.60 ± 0.06	1.57 ± 0.47	12 ± 1.54

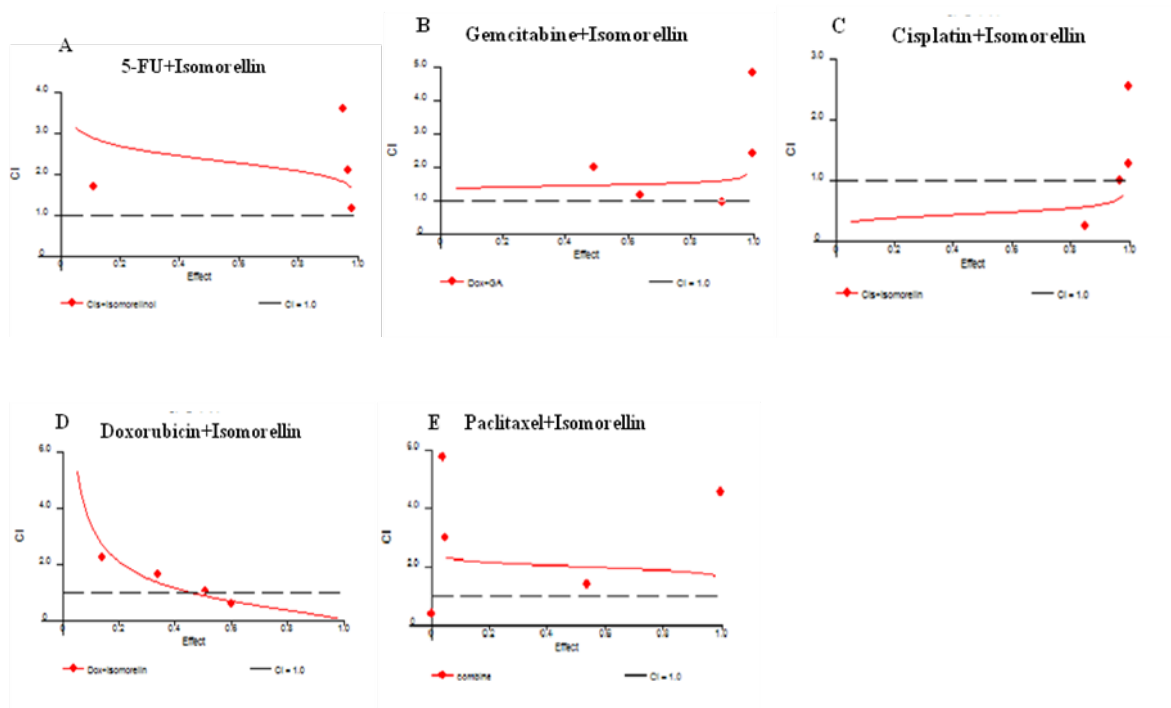
Data are mean ± SE of three independent experiments.

4.3 ศึกษาผลการใช้ร่วมกันระหว่าง caged xanthenes 4 ชนิด กับ chemotherapeutic drugs ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์

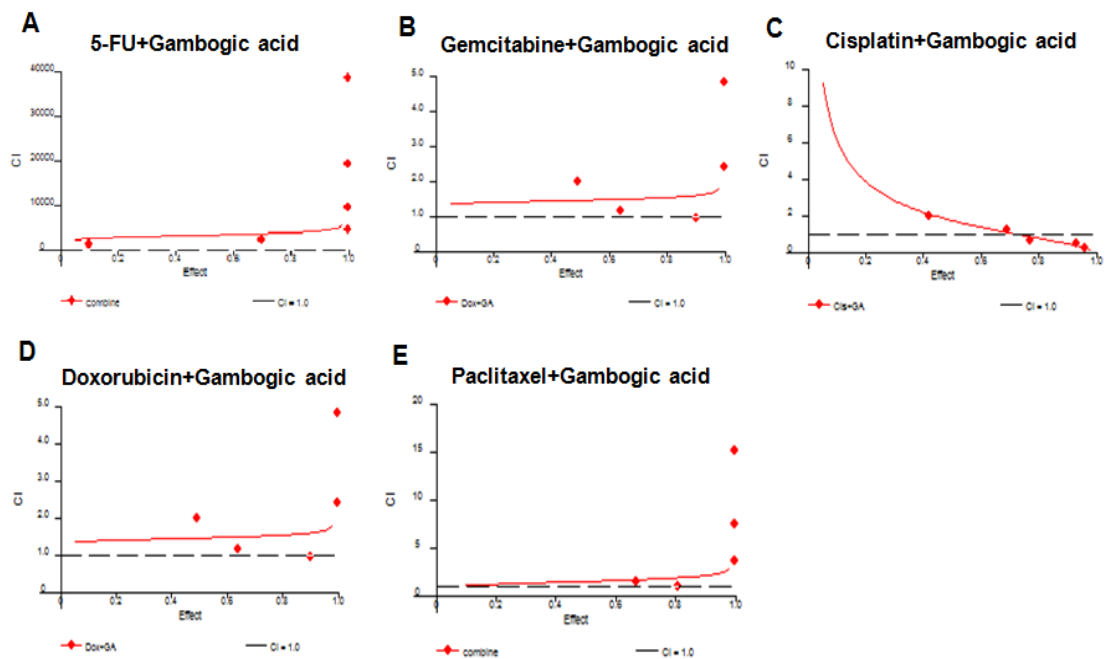
จากผลการศึกษาการใช้ร่วมกันของสารบริสุทธิ์จาก *Garcinia hanburyi* (isomorellin, isomorellinol, forbesione และ gambogic acid) กับยาเคมีบำบัดทั้ง 5 ชนิดในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีพบว่า ในเซลล์ K KU-100 ให้ผลเสริมฤทธิ์กันในการที่ treat ด้วย cisplatin+gambogic acid (รูปที่ 7C) และ doxorubicin+forbesione (รูปที่ 9D) ในขณะที่ ในเซลล์ K KU-M156 ให้ผลเสริมฤทธิ์กันสำหรับเซลล์ที่ treat ด้วย cisplatin + isomorellin (รูปที่ 6C) และ doxorubicin+isomorellin (รูปที่ 6D) ในขณะที่ ผลการศึกษาการใช้ร่วมกันของสารบริสุทธิ์จาก *Garcinia hanburyi* (isomorellin, isomorellinol, forbesione และ gambogic acid) กับยาเคมีบำบัดทั้ง 5 ชนิด combinations อื่นๆ ให้ผลเป็น antagonistic effect (รูปที่ 5-10) โดยที่ค่า combination index (CI) = 1 ถือเป็น additive, CI > 1 ถือเป็น antagonistic effect, CI < 1 ถือเป็น synergistic effect



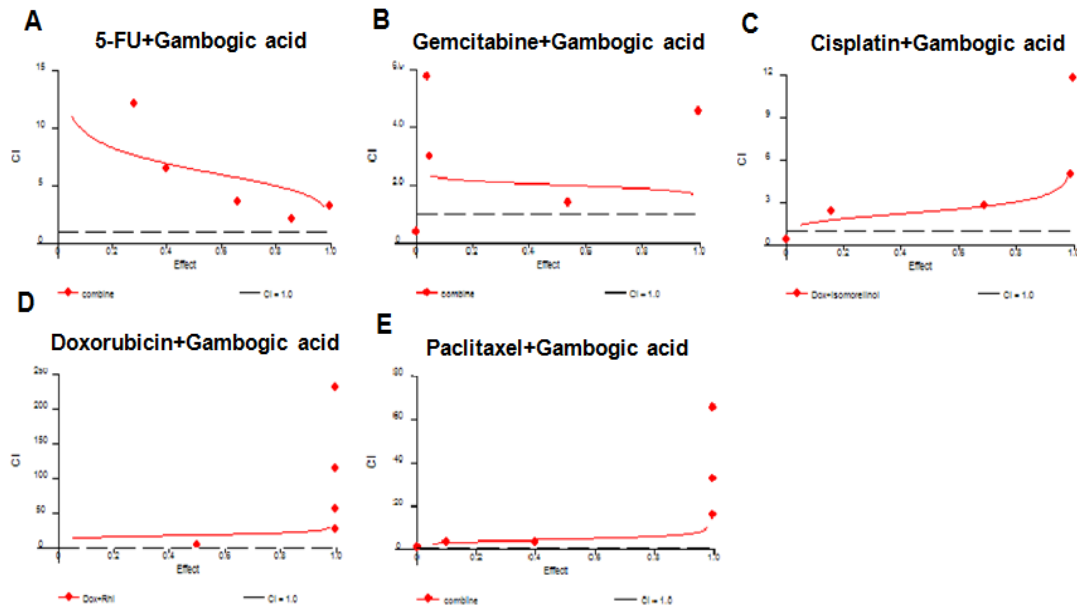
รูปที่ 5 แสดงผลการใช้ร่วมกันระหว่าง isomorellin กับ chemotherapeutic drugs 5 ชนิด ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี K KU-100 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เซลล์ที่รอดชีวิต (Cell viability) จะถูกตรวจวัดโดยใช้ SRB assay กราฟที่ได้เป็นค่า combination index (CI) การคำนวณดังแสดงในวิธีการทดลอง ค่าแต่ละค่าแสดงถึงค่า mean ของการทดลองซ้ำสามครั้ง --- = CI = 1.0



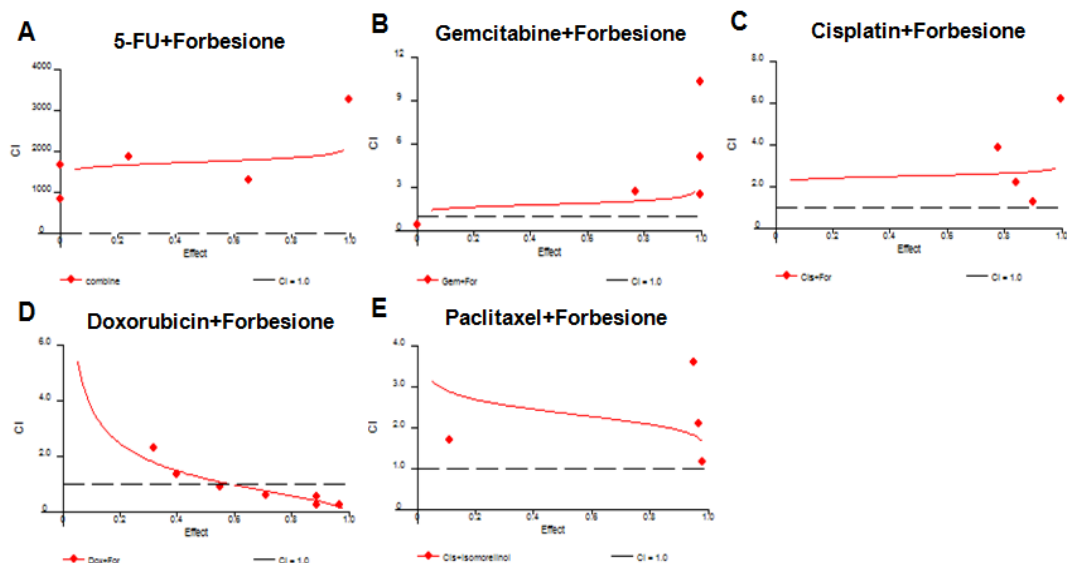
รูปที่ 6 แสดงผลการใช้ร่วมกันระหว่าง isomorellin กับ chemotherapeutic drugs 5 ชนิด ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-M156 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เซลล์ที่รอดชีวิต (Cell viability) จะถูกตรวจวัดโดยใช้ SRB assay กราฟที่ได้เป็นค่า combination index การคำนวณดังแสดงใน วิธีการทดลอง ค่าแต่ละค่าแสดงถึงค่า mean ของการทดลองซ้ำสามครั้ง --- = CI = 1.0



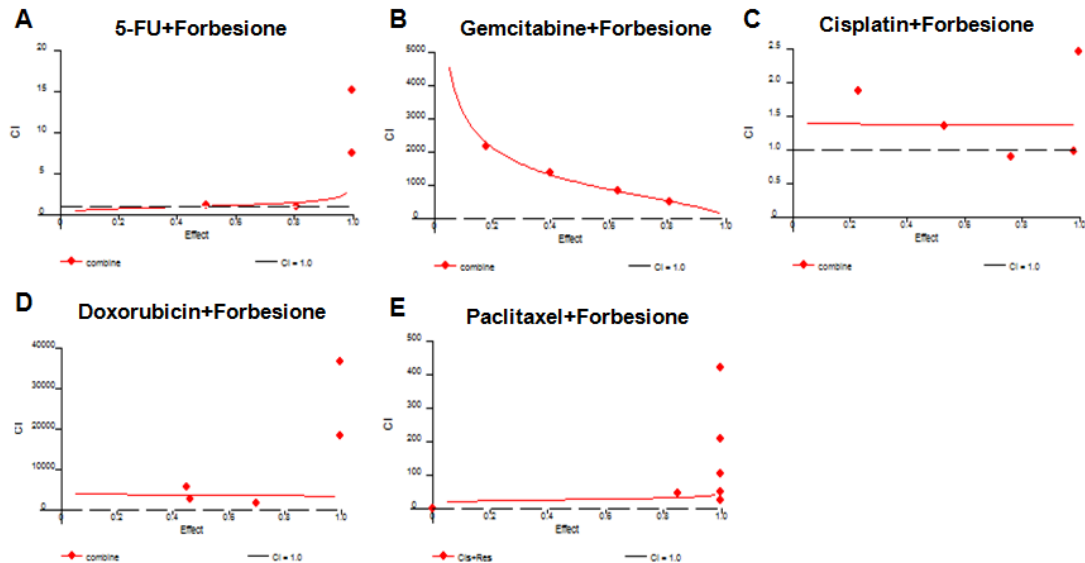
รูปที่ 7 แสดงผลการใช้ร่วมกันระหว่าง gambogic acid กับ chemotherapeutic drugs 5 ชนิด ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-100 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เซลล์ที่รอดชีวิต (Cell viability) จะถูกตรวจวัดโดยใช้ SRB assay กราฟที่ได้เป็นค่า combination index (CI) การคำนวณดังแสดงใน วิธีการทดลอง ค่าแต่ละค่าแสดงถึงค่า mean ของการทดลองซ้ำสามครั้ง --- = CI = 1



รูปที่ 8 แสดงผลการใช้ร่วมกันระหว่าง gambogic acid กับ chemotherapeutic drugs 5 ชนิด ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-M156 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เซลล์ที่รอดชีวิต (Cell viability) จะถูกตรวจวัดโดยใช้ SRB assay กราฟที่ได้เป็นค่า combination index การคำนวณดังแสดงใน วิธีการทดลอง ค่าแต่ละค่าแสดงถึงค่า mean ของการทดลองซ้ำสามครั้ง --- = CI = 1.0



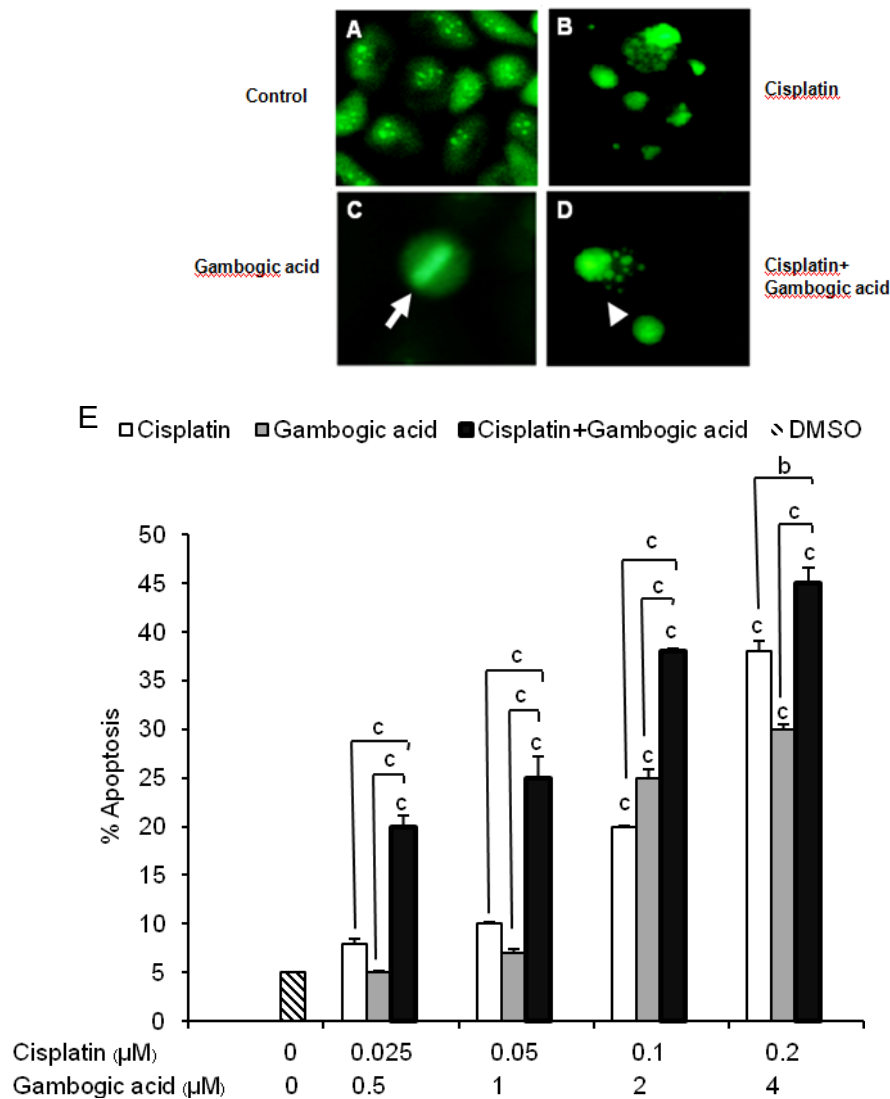
รูปที่ 9 แสดงผลการใช้ร่วมกันระหว่าง forbesione กับ chemotherapeutic drugs 5 ชนิด ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-100 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เซลล์ที่รอดชีวิต (Cell viability) จะถูกตรวจวัดโดยใช้ SRB assay กราฟที่ได้เป็นค่า combination index (CI) การคำนวณดังแสดงในวิธีการทดลอง ค่าแต่ละค่าแสดงถึงค่า mean ของการทดลองซ้ำสามครั้ง --- = CI = 1



รูปที่ 10 แสดงผลการใช้ร่วมกันระหว่าง forbesione กับ chemotherapeutic drugs 5 ชนิด ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-M156 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เซลล์ที่รอดชีวิต (Cell viability) จะถูกตรวจวัดโดยใช้ SRB assay กราฟที่ได้เป็นค่า combination index การคำนวณดังแสดงใน วิธีการทดลอง ค่าแต่ละค่าแสดงถึงค่า mean ของการทดลองซ้ำสามครั้ง --- = CI = 1.0

4.4 การทดสอบกลไกเบื้องต้น ในการยับยั้งเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี ของสารบริสุทธิ์จาก *Garcinia hanburyi* ร่วมกับยาเคมีบำบัดที่ให้ผลเสริมฤทธิ์กันโดยวิธี EB/AO staining

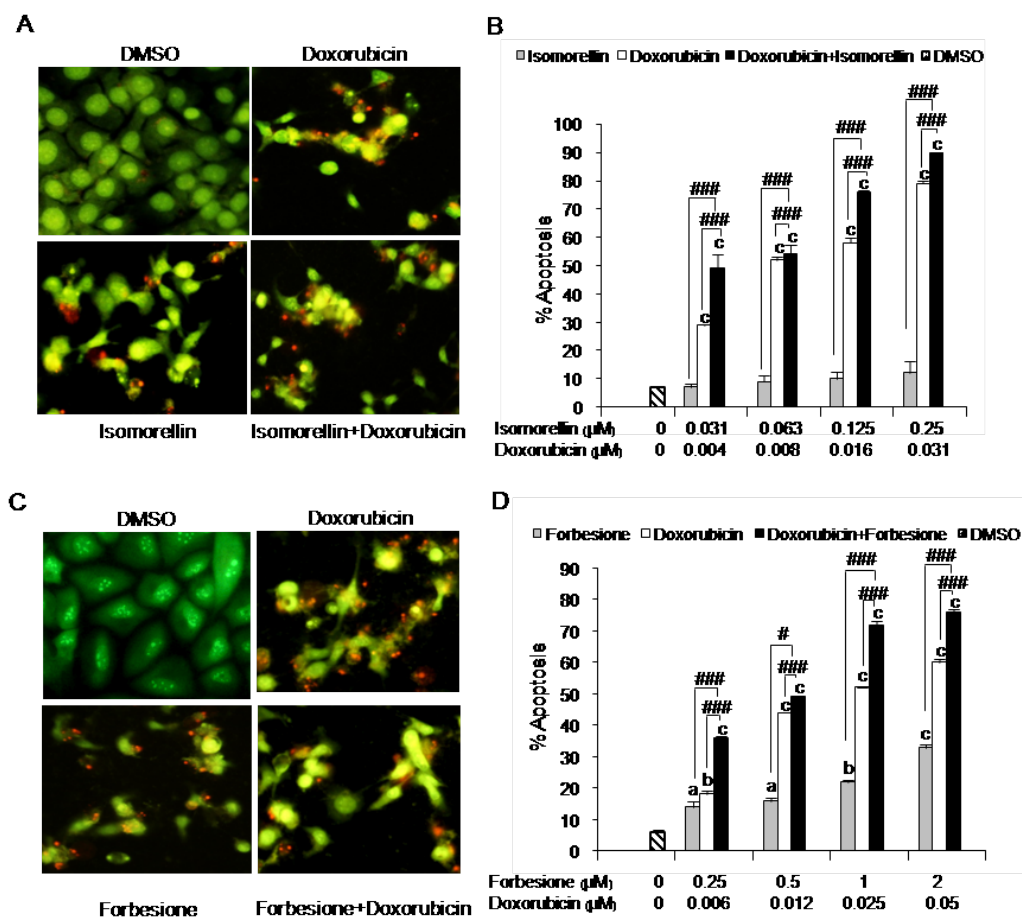
ผลการศึกษาพบว่าในเซลล์ KKU-100 ที่ treat ด้วย cisplatin หรือ gambogic acid หรือ cisplatin+gambogic acid จะมีเปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosis เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม control และยังพบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosis ในเซลล์ที่ treat ด้วย cisplatin+gambogic acid จะสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ treat ด้วย cisplatin หรือ gambogic acid เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในรูปที่ 11



รูปที่ 11 แสดงการเกิด apoptosis ใน เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-100 หลังจาก treat ด้วย cisplatin, gambogic acid อย่างเดียวหรือที่ใช้ร่วมกัน รูป A แสดงเซลล์ที่ treat ด้วย DMSO รูป B แสดงเซลล์ที่ treat ด้วย cisplatin รูป C แสดงเซลล์ที่ treat ด้วย gambogic acid และรูป D แสดงเซลล์ที่ treat ด้วย cisplatin+gambogic acid เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นย้อมด้วยสี fluorescence EO/AO ลูกศรแสดงลักษณะของนิวเคลียสที่เกิดการ condensation และหัวลูกศรแสดงลักษณะของนิวเคลียสที่เกิดการ fragmentation ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของ apoptotic cell จากนั้นทำการนับจำนวน apoptotic cell ทั้งหมด 500 เซลล์ แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ ค่าที่แสดงเป็นค่า mean $\pm$ SE จากการทดลอง 3 ครั้ง $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$, $^cP < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับ DMSO-treated cells และเปรียบเทียบระหว่างการ treat ด้วยยาหรือสารอย่างเดียวกับการ treat ด้วยยาร่วมกับสาร

ผลการศึกษพบว่าในเซลล์ K KU-M156 ที่ treat ด้วย isomorellin หรือ doxorubicin หรือ isomorellin + doxorubicin จะมีเปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosis เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม control และยังพบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosis ในเซลล์ที่ treat ด้วย isomorellin + doxorubicin จะสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ treat ด้วย isomorellin หรือ doxorubicin เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในรูปที่ 12A และ 12B

ผลการศึกษพบว่าในเซลล์ K KU-100 ที่ treat ด้วย forbesione หรือ doxorubicin หรือ forbesione + doxorubicin จะมีเปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosis เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม control และยังพบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosis ในเซลล์ที่ treat ด้วย forbesione + doxorubicin จะสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ treat ด้วย forbesione หรือ doxorubicin เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในรูปที่ 12C และ 12D



รูปที่ 12 แสดงการเกิด apoptosis ใน เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี K KU-M156 หลังจาก treat ด้วย DMSO, isomorellin, doxorubicin หรือ isomorellin + doxorubicin (รูป A) นับจำนวนเซลล์ที่เกิด apoptosis แล้วนำมา plot กราฟ (รูป B) แสดงการเกิด apoptosis ใน เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี K KU-100 หลังจาก treat ด้วย DMSO, forbesione, doxorubicin หรือ forbesione + doxorubicin (รูป C) นับจำนวนเซลล์ที่เกิด

apoptosis แล้วนำมา plot กราฟ (รูป D) โดยทำการ treat เซลล์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นย้อมด้วยสี fluorescence EO/AO เซลล์ที่เกิด apoptosis มีลักษณะของนิวเคลียสเกิดการ condensation และ fragmentation จากนั้นทำการนับจำนวน apoptotic cell ทั้งหมด 500 เซลล์ แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ ค่าที่แสดงเป็นค่า mean $\pm$ SE จากการทดลอง 3 ครั้ง ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.001$ vs DMSO-treated cells การเปรียบเทียบระหว่างการ treat ด้วยยาหรือสารอย่างเดียวกันกับการ treat ด้วยยาพร้อมกับสารจะแสดง โดย [#] $P < 0.05$, ^{###} $P < 0.001$.

บทที่ 5

อภิปรายผล/วิจารณ์ผล/สรุปผล

เนื่องจากการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ด้วยวิธีการผ่าตัด การใช้เคมีบำบัด หรือรังสีรักษามักไม่ได้ผล การรักษาโรคมะเร็งโดยการให้ยาเคมีบำบัดรักษามะเร็งในปัจจุบัน ยังคงมีข้อจำกัด เช่น ปัญหาการดื้อยา (drug resistance) ผลข้างเคียงของยาที่เกิดขึ้นกับผู้ป่วย (side effect) เป็นต้น ดังนั้นการพยายามนำเอาสารสกัดจากธรรมชาติที่ได้ทำการศึกษาแล้วพบว่ามียุทธียับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยไปชักนำให้เกิด cell cycle arrest และ การตายแบบ apoptosis และมีความเป็นพิษต่ำ นำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัดที่ใช้รักษาโรคมะเร็งในปัจจุบันเพื่อลดผลข้างเคียงของยาเคมีบำบัด จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยทำให้การนำสารสกัดจากธรรมชาติมาประยุกต์ใช้ในการป้องกันรักษาโรคมะเร็งตามแนวทางการรักษาแผนปัจจุบันแพร่หลายมากยิ่งขึ้น ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาค้นคว้าหาสารที่มีผลเสริมฤทธิ์ยาเคมีบำบัดในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี รวมถึงกลไกเบื้องต้นในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

คณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี K KU-100 และ K KU-M156 โดยใช้ สาร caged xanthon es 4 ชนิด, 5-FU, gemcitabine, cisplatin, doxorubicin และ placlitaxel พบว่า caged xanthon es 4 ชนิด และยาเคมีบำบัดทั้ง 5 ชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีในระดับที่ดีมาก

จากนั้นจึงทำการศึกษาผลการใช้ร่วมกันของ caged xanthon es 4 ชนิด กับยาเคมีบำบัดทั้ง 5 ชนิดในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีและ Chang cell พบว่า ในเซลล์ K KU-100 ให้ผลเสริมฤทธิ์กันกับเซลล์ที่ treat ด้วย cisplatin+gambogic acid (รูปที่ 7C) และ doxorubicin+forbesone (รูปที่ 9D) ในขณะที่ ในเซลล์ K KU-M156 ให้ผลเสริมฤทธิ์กันสำหรับเซลล์ที่ treat ด้วย cisplatin + isomorellin (รูปที่ 6C) และ doxorubicin+isomorellin (รูปที่ 6D) โดยให้ค่า combination index (CI) น้อยกว่า 1 ในขณะที่ เมื่อทำการทดสอบโดยใช้ความเข้มข้นของ caged xanthon es ร่วมกับยาเคมีบำบัดที่ให้ผลเสริมฤทธิ์กันมาทดสอบใน Chang cell พบว่าให้ผลต้านฤทธิ์กัน (antagonism) ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ โดยให้ค่า combination index (CI) มากกว่า 1 จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการใช้ cisplatin+gambogic acid, doxorubicin+forbesone, cisplatin+isomorellin และ doxorubicin+isomorellin จะมีความจำเพาะในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยไม่มีผลกับเซลล์ตับปกติ (Chang cell)

ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษากลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้น พบว่า เมื่อทำการทดสอบโดยใช้ combinations ที่ให้ผลเสริมฤทธิ์กัน มา treat เซลล์ K KU-100 และเซลล์ K KU-M156 พบว่า สามารถชักนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งแบบ apoptosis โดยเมื่อทำ EB/AO staining พบว่าเซลล์มะเร็งที่ถูก treat ด้วยสารจะเกิด chromatin condensation และ nuclear fragmentation ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ

apoptotic cell และยังพบว่าปริมาณของ apoptotic cell ในเซลล์ที่ treat ด้วย caged xanthones ร่วมกับยาเคมีบำบัดจะสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมและเซลล์ที่ treat ด้วย caged xanthones หรือ ยาเคมีบำบัดเพียงอย่างเดียว จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า caged xanthones มีผลไปเสริมฤทธิ์ยาเคมีบำบัดในการชักนำให้เกิด apoptosis ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

เนื่องจาก จากผลการศึกษาของคณะผู้วิจัยพบว่า caged xanthones ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว สามารถชักนำให้เกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (KKU-100 และ KKU-M156) (ทุนวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปี 2549-2550) และชักนำให้เกิด G0/G1 arrest ใน KKU-100 และ KKU-M156 (ทุนวิจัย PERCH-CIC ปี 2550-2552) ดังนั้น ผลจากการศึกษาค้นคว้าพบว่า caged xanthones มีฤทธิ์ในการเสริมฤทธิ์ยาเคมีบำบัดในการฆ่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี **ผลที่ได้จะสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษากลไกในระดับโมเลกุลของการทำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis (ซึ่งอยู่ในระหว่างดำเนินการศึกษาทุนอุดหนุนทั่วไปมหาวิทยาลัยขอนแก่น ปีงบประมาณ 2556)** ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาในสัตว์ทดลอง และในการพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็ง หรือใช้ร่วมกับยาต้านมะเร็งเพื่อลดความเป็นพิษของยาต้านมะเร็งต่อเซลล์ปกติ ต่อไปในอนาคต

สรุปผลการวิจัย

จากผลการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า isomorellin, gambogic acid และ forbesione มีผลไปเสริมฤทธิ์ยาเคมีบำบัดในการชักนำให้เกิด apoptosis ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี และเนื่องจาก isomorellin, gambogic acid และ forbesione มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่กว้างขวาง จึงน่าสนใจที่จะนำมาศึกษาฤทธิ์ในสัตว์ทดลอง และในการพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งต่อไปในอนาคต

บทที่ 6. บรรณานุกรม

1. Vatanasapt V, Martin N, Sriplung H, Chindavijak K, Sriamporn H, Parkin DM, Ferlay J. Cancer incidence in Thailand, 1988-1991. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; 4 : 475-83.
2. Watanapa P. Cholangiocarcinoma in patients with opisthorchiasis. *Br J Surg* 1996; 83 :1062-64.
3. Kaamesaki S : *Cancer Res* 1993 ; 53 : 4251.
4. Cordell GA, Beecher CWW, and Pezzuto, JM. Can ethnopharmacology contribute to development of new anticancer drugs. *J Ethnopharmacol* 1991; 32: 117-133.
5. Saralamp P, Chuakul W, Temsiririkkul R, Clayton T. *Medicinal plants in Thailand Volume 1*, Bangkok: Amarin Printing and publishing. 1996:p.97.
6. Asano J, Chiba K, Tada M, Yoshii T. Cytotoxic xanthones from *Garcinia hanburyi*. *Phytochemistry*. 1996;41:815-20.
7. Han QB, Wang YL, Yang L, *et al*. Cytotoxic polyprenylated xanthones from the resin of *Garcinia hanburyi*. *Chem Pharm Bull* 2006;54:265-7.
8. Lin LJ, Lin LZ, Pezzuto JM, Cordell GA. Isogambogic acid and isomorellinol from *Garcinia hanburyi*. *Mag Reson Chem* 1993;31:340-7.
9. Sukpondma Y, Rukachaisirikul V, Phongpaichit S. Antibacterial caged-tetraprenylated xanthones from the fruits of *Garcinia hanburyi*. *Chem Pharm Bull* 2005;53(7):850-2.
10. Panthong A, Norkaew P, Kanjanapothi D, Taesotikul T, Anantachoke N, Reutrakul V. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the extract of gamboge from *Garcinia hanburyi* Hook f. *J Ethnopharmacol* 2007;111:335-40.
11. Reutrakul V, Santisuk T, Noessner G, Schmidt J, Nickel B, Klenner T, Hose S. Novel Xanthone compounds, their preparation and use medicament. *Eup Pat Appl* 2004;20:312-7.
12. Reutrakul V, Anantachoke N, Pohmakotr M, Jaipetch T, Sophasan S, Yoosook Ch, Kasisit J, Napaswat Ch, Santisuk T, Tuchinda P. Cytotoxic and anti HIV-1 caged xanthones from the resin and fruits of *Garcinia hanburyi*. *Planta Med* 2007;73:33-40.
13. Hahnvajjanawong C, Boonyanugomol W, Nasomyon T, Loilome W, Namwat N, Anantachoke N, Tassaneeyakul W, Sripa B, Namwat W, Reutrakul V. Apoptotic activity of

- caged xanthenes from *Garcinia hanburyi* in cholangiocarcinoma cell lines. World J Gastroenterol. 2010 May 14; 16(18) 2235-2243..
14. Longley D, Harkin D and Johnston P. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. Nat Rev Cancer 2003; 3: 330-338.
 15. Araki Y, Isomoto H and Shirouzu K. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and thymidylate synthase level are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal cancer. Kurume Med J 2001; 48: 93-98.
 16. Aota K AM, Yamashita T, Tamatani T, Motegi K, Ishimaru N, Hayashi Y and Sata M. 5-Fluorouracil induces apoptosis through the suppression of NF-kappaB activity in human salivary gland cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 2000; 273: 1168-1174.
 17. Yukimoto K, Nakata B, Muguruma K, Yashiro M, Ohira M, Ishikawa T, Hino M and Hirakawa K. Apoptosis and thymidylate synthase inductions by 5-fluorouracil in gastric cancer cells with or without p53 mutation. Int J Oncol 2001; 19: 373-378.
 18. Gil-Benso R, Martinez-Lorente A, Pellin-Perez A, Narvarro-Fos S, Gregori-Romero MA, Carda C, Callaghan R, Peydro-Olaya A and Llombart-Bosch A. Characterization of a new rat cell line established from 2'AAF-induced combined hepatocellular cholangiocellular carcinoma. In Vitro Cell Dev Biol Anim 2001; 37: 17-25.
 19. Hasuike Y, Motoori M, Hattori T, Fujita J, Mishima H, Sawamura T, Nishishou I, Kikkawa N, Sai H, Hosoki T and Mitomo M. [A case report: successful resection of advanced intrahepatic cholangiocarcinoma responding to preoperative hepatic artery infusion of 5-FU]. Gan To Kagaku Ryoho 1999; 26: 1909-1912.
 20. Heinemann V. Gemcitabine: mechanism of action and clinical activity. Cancer detection and prevention 1996; 20(5).
 21. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. J Natl Cancer Inst 1990; 82 : 1107-1112.

แผนการดำเนินงานตลอดโครงการ

กิจกรรม	ระยะเวลา (เดือน)											
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
1. ทดสอบฤทธิ์ของยาต่อเซลล์มะเร็ง (SRB assay)	←→	←→										
2. การทดสอบฤทธิ์การใช้ร่วมกันของ caged xanthone 4 ชนิดกับยาเคมีบำบัดทั้ง 5 ชนิดในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี			←→	←→	←→	←→						
3. การทดสอบกลไกเบื้องต้นของการใช้ร่วมกันของ caged xanthone 4 ชนิดกับยาเคมีบำบัดทั้ง 5 ชนิดที่ให้ผลเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี โดยวิธี EB/AO staining					←→	←→	←→					
4. ศึกษากลไกในระดับโมเลกุลของการเกิดกระบวนการ apoptosis ของเซลล์มะเร็งโดยตรวจดูการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2, Bax, survivin, activated caspase-3 และ activated caspase-9 โดยวิธี western blot							←→	←→	←→	←→	←→	←→
6. รวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล					←→	←→					←→	←→
7. สรุปผลและจัดทำรายงานการวิจัย						←→	←→					←→

←→ แผนงานในโครงการวิจัย

←→ งานที่ได้ดำเนินการแล้วภายใน 1 ปี

7. ผลงานที่ได้จากโครงการวิจัย

1. Poster presentation and proceeding publication
 - 1.1 Wareeporn. Wattanawongdon, **Chariya. Hahnvajanawong**, Wongwarut, Boonyanukomol. Supaluk. Ketnimit, Watcharin. Loilome, Nissana. Namwat, Vichai. Reutrakul, Natthinee. Anantachoke, Kovit. Pattanapanyasat, Wises. Namwat, Banchob. Sripa. (2008, May 3-6). Induction of G0/G1 phase arrest and apoptosis and synergistic effect with chemotherapeutic drugs of isomorellin in human cholangiocarcinoma KKU-M156 cells. *The International Congress for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC Congress VI)* . Jomtien Palm Beach Hotel, Pattaya. Thailand (Poster presentation).
 - 1.2. Wareeporn. Wattanawongdon, **Chariya. Hahnvajanawong**, Natthinee. Anantachoke, Thidarut. Bunmars, Wichittra. Tassaneeyakul, Banchob. Sripa, Vichai. Reutrakul. (2010, October 12-15). Antagonistic growth inhibitory effect of isomorellinol with chemotherapeutic agents against human cholangiocarcinoma KKU-M156 cell line . *Srinagarind Medical Journal 2010*; Accepted in 12 October 2010. (Poster presentation, proceeding publication).
2. ขณะนี้อยู่ในระหว่างการเขียน manuscript เพื่อตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ (เสร็จแล้ว 80%)

ค. ส่วนประกอบตอนท้าย

1. ภาคผนวก (Appendix)

Poster presentation และ Proceeding presentation

2. ประวัติและผลงานวิจัยที่สำคัญของนักวิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาวจริยา ชมวารินทร์
(ภาษาอังกฤษ) MISS CHARIYA CHOMVARIN
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3-4099-01155-97-6
3. ตำแหน่ง รองศาสตราจารย์ ระดับ 9
4. สถานที่ทำงาน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
โทรศัพท์: (043) 245990, 348385 โทรสาร: (043) 243064
E-mail: chariya@kku.ac.th
5. ประวัติการศึกษา วท.บ. (ชีววิทยา),
วท.ม. (จุลชีววิทยา),
PhD. (Medical Microbiology, Monash University, Australia)
6. สาขาที่ชำนาญ Medical microbiology
Bacterial diarrhea (Vibrio, Salmonella, Shigella, Pathogenic *E. coli*, *Staphylococcus aureus*,
Helicobacter pylori infection
Molecular epidemiology in bacterial infection
7. ประสบการณ์และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
 1. Chomvarin C, Phusri K, Sawadpanich K, Mairiang P, Namwat W, Wongkham C, Hahnvajanawong C. Prevalence of *cagA* EPIYA motifs in *Helicobacter pylori* among dyspeptic patient in northeast Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2012, 43: 105 – 115.
 2. Boonyanugomol W, Chomvarin C, Sripa B, Bhudhisawasdi V, Khuntikeo N, Hahnvajanawong C, Chamsuwan A. *Helicobacter pylori* in Thai patients with cholangiocarcinoma and its association with biliary inflammation and proliferation. *HPB (Oxford)*. 2012 Mar;14(3):177-84 (IF = 1.285)
 3. Boonyanugomol W, Chomvarin C, Song JY, Kim KM, Kim JM, Cho MJ, Lee WK, Kang HL, Rhee KH, Sripa B, Hahnvajanawong C, Baik SC. Effects of *Helicobacter pylori* γ -glutamyltranspeptidase on apoptosis and inflammation in human biliary cells. *Dig Dis Sci*. 2012 Oct;57(10):2615-24. (IF = 2.117)
 4. Boonyanugomol W, Chomvarin C*, Baik SC, Song JY, Hahnvajanawong C, Kim KM, Cho MJ, Lee WK, Kang HL, Rhee KH, Sripa B. Role of *cagA*-positive *Helicobacter pylori* on cell proliferation, apoptosis, and inflammation in biliary cells. *Dig Dis Sci*. 2011 Jun; 56(6):1682-92. (IF= 2.06)

1. ชื่อ-นามสกุล นางจริยา หาญจนวงศ์
Mrs. Chariya Hahnvajanawong
2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 3-8199-00166-60-1
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 8 ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
4. หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002
โทรศัพท์ 0-4334-8385 โทรสาร 0-4334-8385

e-mail hchari@kku.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับการศึกษา	ปริญญา	สาขาวิชา	สถาบัน	ประเทศ
2523	ตรี	วท.บ.	ชีววิทยา	มหาวิทยาลัยศิลปากร	ไทย
2526	โท	วท.ม.	จุลชีววิทยา	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย
2533	เอก	Ph.D.	Microbiology	National University of Ireland, Cork	Ireland

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

- Tumor Immunology
- Anticancer activity of medicinal plants
- Molecular biology
- Virology

7. ประสบการณ์และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

5. **Hahnvajjanawong C**, Chaigagool J, Seubwai W, Bhudhisawasdi V, Namwat N, Khuntikeo N, Sripa B, Pugkhem A, Tassaneeyakul W. Orotate phosphoribosyl transferase mRNA expression and the response of cholangiocarcinoma to 5-fluorouracil. *World J Gastroenterol* 2012 August; 18(30): 3955-61 (Impact factor 2.47)
6. **Hahnvajjanawong C***, Ketnimit S, Pattanapanyasat K, Anantachoke N, Sripa B, Pinmai K, Seubwai W, Reutrakul V. Involvement of p53 and nuclear factor-kappaB signaling pathway for the induction of G1-phase cell cycle arrest of cholangiocarcinoma cell lines by isomorellin. *Biol Pharm Bull.* 2012 August;35(11):1914-25. (IF= 1.657)
7. Kanokmedhakul S, Lekphrom R, Kanokmedhakul K, **Hahnvajjanawong C**, Bua-art S, Saksirirat W, Prabpai S, Kongsaree P. Cytotoxic sesquiterpenes from luminescent mushroom *Neonothopanus nimbi*. *Tetrahedron* 2012 Sep; 68: 8261-66 (Impact factor 3.025)
8. Chomvarin C, Phusri K, Sawadpanich K, Mairiang P, Namwat W, Wongkham C, **Hahnvajjanawong C**. Prevalence of cagA EPIYA motifs in *Helicobacter pylori* among dyspeptic patient in northeast Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2012, 43: 105 – 115.
9. Boonyanugomol W, Chomvarin C, Sripa B, Bhudhisawasdi V, Khuntikeo N, **Hahnvajjanawong C**, Chamsuwan A. *Helicobacter pylori* in Thai patients with cholangiocarcinoma and its association with biliary inflammation and proliferation. *HPB (Oxford)*. 2012 Mar;14(3):177-84 (IF = 1.285)
10. Boonyanugomol W, Chomvarin C, Song JY, Kim KM, Kim JM,, Cho MJ, Lee WK, Kang HL, Rhee KH, Sripa B, **Hahnvajjanawong C**, Baik SC. Effects of *Helicobacter pylori* γ -glutamyltranspeptidase on apoptosis and inflammation in human biliary cells. *Dig Dis Sci.* 2012 Oct;57(10):2615-24. (IF = 2.117)
11. **Hahnvajjanawong C**, Seubwai W, Boonmars T, Vaeteewoottacharn K. Natural products for prevention and treatment of cholangiocarcinoma. *Srinagarind Med J* 2012 Dec; 27 suppl (cholangiocarcinoma): 371-380.
12. **Hahnvajjanawong C***, Ketnimit S, Boonyanugomol W, Pattanapanyasat K, Chamgramol Y, Sripa B, Namwat N, Pinmai K, Tassaneeyakul W, Reutrakul V . Inhibition of cell cycle progression and apoptotic

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาววีพร วัฒนวงศ์ดอน
(ภาษาอังกฤษ) Miss Wareeporn Wattanawongdon

4. **หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก**
ภาควิชาวิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002
โทรศัพท์ 0-4334-8385 โทรสาร 0-4334-8385
E-mail kikanooky@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต(เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยขอนแก่น
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

1. **Wareeporn. Wattanawongdon,** Chariya. Hahnvajana Wong, Wongwarut, Boonyanukomol. Supaluk. Ketnimit, Watcharin. Loilome, Nissana. Namwat, Vichai. Reutrakul, Natthinee. Anantachoke, Kovit. Pattanapanyasat, Wises. Namwat, Banchob. Sripa. (2008, May 3-6). Induction of G0/G1 phase arrest and apoptosis and synergistic effect with chemotherapeutic drugs of isomorellin in human cholangiocarcinoma KKU-M156 cells. *The International Congress for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC Congress VI)* . Jomtien Palm Beach Hotel, Pattaya. Thailand (Poster presentation).
2. **Wareeporn. Wattanawongdon,** Chariya. Hahnvajana Wong, Natthinee. Anantachoke, Thidarut. Bunmars, Wichitra. Tassaneeyakul, Banchob. Sripa, Vichai. Reutrakul. (2010, October 12-15). Antagonistic growth inhibitory effect of isomorellinol with chemotherapeutic agents against human cholangiocarcinoma KKU-M156 cell line . *Srinagarind Medical Journal 2010*; Accepted in 12 October 2010. (Poster presentation, proceeding publication).

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นายวิชัย รั้วตระกูล
(ภาษาอังกฤษ) Mr.Vichai Reutrakul
2. หมายเลขบัตรประชาชน: 3-8199-00166-60-1
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ศาสตราจารย์
4. หน่วยงาน/ที่อยู่ติดต่อได้
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400
E-mail: scvrt@mahidol.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับการศึกษา	ปริญญา	สาขาวิชา	สถาบัน	ประเทศ
2509	ตรี	B.Sc. 1 st Class Honours	Chemistry	University of Sydney	Australia
2514	เอก	Ph.D.	Organic Chemistry	University of Wisconsin, Madison	U.S.A.

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

- Natural Products Chemistry
- Synthetic Organic Chemistry
- Bioactive Natural Products
- Drug Discovery

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัย ในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

Director, The Center of Excellence for Innovation in Chemistry: The Postgraduate Education and Research Program in Chemistry, Ministry of University Affairs, 2000-Present
งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

7.1 ผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสารวิจัยระดับนานาชาติจำนวน 131 เรื่อง (ฐานข้อมูล Scopus วันที่ 17 ตุลาคม พ.ศ.2554)

7.2 ผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสารวิจัยระดับนานาชาติย้อนหลัง 5 ปี (2007-2011) จำนวน 37 เรื่อง (ฐานข้อมูล Scopus วันที่ 17 ตุลาคม พ.ศ.2554)

- [1] Boonkitpattarakul K, Soorukram D, Tuchinda P, Reutrakul V, Pohmakotr M. α,α -Difluoro- α -phenylsulfanyl- α -trimethylsilylmethane as a difluoromethyl building block: A general strategy to α,α -difluoromethyl aryl ketones. Journal of Fluorine Chemistry. 2011;132(11):987-90.

- [2] Chanakul W, Tuchinda P, Anantachoke N, Pohmakotr M, Piyachaturawat P, Jariyawat S, et al. Cytotoxic alkaloids from stems, leaves and twigs of *Dasymaschalon blumei*. *Fitoterapia*. 2011;82(7):964-8.
- [3] Chareonkla A, Pohmakotr M, Reutrakul V, Yoosook C, Kasisit J, Napaswad C, et al. A new diarylheptanoid from the rhizomes of *Zingiber mekongense*. *Fitoterapia*. 2011;82(4):534-8.
- [4] Montreekachon P, Chotjumlong P, Bolscher JGM, Nazmi K, Reutrakul V, Krisanaprakornkit S. Involvement of P2X7 purinergic receptor and MEK1/2 in interleukin-8 up-regulation by LL-37 in human gingival fibroblasts. *Journal of Periodontal Research*. 2011;46(3):327-37.
- [5] Kunanusorn P, Panthong A, Pittayanurak P, Wanauppathamkul S, Nathasaen N, Reutrakul V. Acute and subchronic oral toxicity studies of *Nelumbo nucifera* stamens extract in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011;134(3):789-95.
- [6] Chooprayoon S, Kuhakarn C, Tuchinda P, Reutrakul V, Pohmakotr M. Asymmetric total synthesis of (+)-swainsonine. *Organic and Biomolecular Chemistry*. 2011;9(2):531-7.

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นายบรรจบ ศรีภา
(ภาษาอังกฤษ) Mr. Banchob Sripa
2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 3-1002-00173-50-6
3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ ระดับ 9 ภาควิชาพยาธิวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก
ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
อ.เมือง จ. ขอนแก่น 40002
โทรศัพท์ 043-348338
E-mail : banchob@kku.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับการศึกษา	ปริญญา	สาขาวิชา	สถาบัน	ประเทศ
2524	ตรี	วท.บ.	ชีววิทยา	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ไทย
2527	โท	วท.ม.	พยาธิชีววิทยา	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย
2538	เอก	Ph.D.	Tropical Health	University of Queensland	ออสเตรเลีย

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

- Immunohistochemistry
- Oncology (Tumor marker & Tumor biology)
- Molecular Pathology
- Cell culture

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (2008, peer-reviewed only)

1. Namwat, N.; Amimanan, P.; Loilome, W.; Jearanaikoon, P.; **Sripa, B.**; Bhudhisawasdi, V.; Tassaneeyakul, W. Characterization of 5-Fluorouracil-Resistant Cholangiocarcinoma Cell Lines. *Chemotherapy*, 2008. **54**(5): p. 343-351.
2. Laha, T.; Sripa, J.; **Sripa, B.**; Pearson, M.; Tribiolet, L.; Kaewkes, S.; Sithithaworn, P.; Brindley, P. J.; Loukas, A. Asparaginyl endopeptidase from the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*, and its potential for serodiagnosis. *Int J Infect Dis*, 2008.
3. Suttiprapa, S.; Loukas, A.; Laha, T.; Wongkham, S.; Kaewkes, S.; Gaze, S.; Brindley, P. J.; **Sripa, B.** Characterization of the antioxidant enzyme, thioredoxin peroxidase, from the carcinogenic human liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. *Mol Biochem Parasitol*, 2008. **160**(2): p. 116-22.
4. **Sripa, B.**, Concerted action is needed to tackle liver fluke infections in Asia. *PLoS Negl Trop Dis*, 2008. **2**(5): p. e232.
5. Tangkawattana, S.; Kaewkes, S.; Pairojkul, C.; Tangkawattana, P.; **Sripa, B.** Mutations of KRAS and TP53 in a Minor Proportion of *Opisthorchis Viverrini*-Associated Cholangiocarcinomas in a Hamster Model. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2008. **9**(1): p. 101-6.
6. Thuwajit, P.; Chawengrattanachot, W.; Thuwajit, C.; **Sripa, B.**; Paupairoj, A.; Chau-In, S. Enhanced expression of mucin 6 glycoprotein in cholangiocarcinoma tissue from patients in Thailand as a prognostic marker for survival. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008. **23**(5): p. 771-8.
7. **Sripa, B.** and C. Pairojkul, Cholangiocarcinoma: lessons from Thailand. *Curr Opin Gastroenterol*, 2008. **24**(3): p. 349-56.
8. Saelee, P.; Wongkham, S.; Bhudhisawasdi, V.; **Sripa, B.**; Chariyalertsak, S.; Petmitr, S. Allelic loss on chromosome 5q34 is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2008. **134**(10): p. 1135-41.
9. Junking, M.; Wongkham, C.; **Sripa, B.**; Sawanyawisuth, K.; Araki, N.; Wongkham, S. Decreased expression of galectin-3 is associated with metastatic potential of liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Eur J Cancer*, 2008. **44**(4): p. 619-26.
10. Kaewpitoon, N.; Kaewpitoon, S. J.; Pengsaa, P.; **Sripa, B.** *Opisthorchis viverrini*: the carcinogenic human liver fluke. *World J Gastroenterol*, 2008. **14**(5): p. 666-74.
11. Kaewpitoon, N.; Laha, T.; Kaewkes, S.; Yongvanit, P.; Brindley, P. J.; Loukas, A.; **Sripa, B.** Characterization of cysteine proteases from the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. *Parasitol Res*, 2008. **102**(4): p. 757-64.
12. Chomvarin, C.; Namwat, W.; Chaicumpar, K.; Mairiang, P.; Sangchan, A.; **Sripa, B.**; Tor-Udom, S.; Vilaichone, R. K. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, cagE, iceA and babA2 genotypes in Thai dyspeptic patients. *Int J Infect Dis*, 2008. **12**(1): p. 30-6.