



**ใบรับรองวิทยานิพนธ์**  
**บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์**

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (รังสีประยุกต์และไอโซโทป)

**ปริญญา**

รังสีประยุกต์และไอโซโทป

รังสีประยุกต์และไอโซโทป

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ผลของสารประกอบฟลาโวนอยด์บางชนิดต่อความอยู่รอดและความไวต่อรังสี  
ของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์แบบเซลล์เล็ก

Effect of Some Flavonoids on Cell Viability and Radiosensitivity of  
Human Small-Cell Lung Cancer Cell Lines

นามผู้วิจัย นางสาวณัชชา จันทาพูน

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

( อาจารย์สมจิตต์ ปาละกาศ, Ph.D. )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

( อาจารย์กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์, Ph.D. )

หัวหน้าภาควิชา

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์วันวิสา สุกประเสริฐ, Ph.D. )

**บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว**

( รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr. )

**คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย**

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. ....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลของสารประกอบฟลาโวนอยด์บางชนิดต่อความอยู่รอดและความไวต่อรังสีของ  
เซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์แบบเซลล์เล็ก

Effect of Some Flavonoids on Cell Viability and Radiosensitivity of Human  
Small-Cell Lung Cancer Cell Lines

โดย

นางสาวศุภนิชชา จันทาพูน

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (รังสีประยุกต์และไอโซโทป)

พ.ศ. 2556

ญาณิชชา จันทาพูน 2556: ผลของสารประกอบฟลาโวนอยด์บางชนิดต่อความอยู่รอดและความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์แบบเซลล์เล็ก ปริญญาวิทยาสตรมหาบัณฑิต (รังสีประยุกต์และไอโซโทป) สาขารังสีประยุกต์และไอโซโทป ภาควิหารังสีประยุกต์และไอโซโทป อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์สมจิตต์ ปาละกาศ, Ph.D. 87 หน้า

การศึกษาผลของสารประกอบฟลาโวนอยด์บางชนิดต่อความอยู่รอดและความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์แบบเซลล์เล็ก 2 ชนิด คือ GLC<sub>4</sub> และ GLC<sub>4</sub>/Adr โดยอาศัยการประเมินความอยู่รอดด้วยวิธี resazurin assay พบว่า สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์ประกอบด้วย ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น เท่ากับ 2,000 และ 5,000 เซลล์ต่อมิลลิตร ตามลำดับ โดยใช้ระยะเวลาในการบ่มเซลล์ร่วมกับ resazurin เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อทดสอบความเป็นพิษของยาต้านมะเร็ง doxorubicin พบว่า ค่าความเข้มข้นของยาที่ลดการเจริญของเซลล์ GLC<sub>4</sub> และ GLC<sub>4</sub>/adr ได้ร้อยละ 50 คือ  $0.012 \pm 0.001 \mu\text{M}$  และ  $3.751 \pm 0.889 \mu\text{M}$  ตามลำดับ คิดเป็นค่า resistant factor ได้เท่ากับ 320

การศึกษาความอยู่รอดของเซลล์ภายหลังการได้รับสัมผัสรังสีแกมมาและสารประกอบฟลาโวนอยด์ 4 ชนิด คือ อพิจีนิน จินิสติน นาริงจินิกิน เคอร์เซทิน พบว่า ปริมาณรังสีที่ลดการเจริญของเซลล์ GLC<sub>4</sub> และ GLC<sub>4</sub>/adr ได้ร้อยละ 50 มีค่าเท่ากับ  $2.332 \pm 0.359$  เกรย์ และ  $3.185 \pm 0.856$  เกรย์ ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่าความเข้มข้นของสารประกอบฟลาโวนอยด์ข้างต้นที่สามารถลดการเจริญของเซลล์ GLC<sub>4</sub> ได้ร้อยละ 50 มีค่าเท่ากับ  $12.865 \pm 1.477 \mu\text{M}$   $38.1011 \pm 4.4239 \mu\text{M}$   $90.0046 \pm 5.9171 \mu\text{M}$  และ  $20.7960 \pm 5.6365 \mu\text{M}$  ตามลำดับ และมีค่าเท่ากับ  $31.6394 \pm 9.6094 \mu\text{M}$   $37.3603 \pm 6.8091 \mu\text{M}$   $76.1026 \pm 3.9933 \mu\text{M}$  และ  $22.8324 \pm 3.578 \mu\text{M}$  สำหรับเซลล์ GLC<sub>4</sub>/adr ตามลำดับ

นอกจากนี้ การศึกษาผลของอพิจีนินในระดับที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ร่วมกับการได้รับรังสีประกอบด้วย กลุ่มควบคุมที่ฉายรังสีเพียงอย่างเดียว กลุ่มที่ได้รับสัมผัสอพิจีนินก่อนการฉายรังสี 24 และ 72 ชั่วโมง และกลุ่มที่ได้รับสัมผัสอพิจีนินหลังการฉายรังสี 24 ชั่วโมง พบว่า การได้รับสัมผัสอพิจีนินทั้งก่อนและหลังได้รับรังสี ไม่ทำให้เซลล์ GLC<sub>4</sub> มีความไวต่อรังสีต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ต่างจากกรณีของเซลล์ GLC<sub>4</sub>/Adr ที่พบว่า การได้รับอพิจีนินก่อนการฉายรังสีเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้ความไวต่อรังสีของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

Yanitsa Chantapoon 2013: Effect of Some Flavonoids on Cell Viability and Radiosensitivity of Human Small-Cell Lung Cancer Cell Lines. Master of Science (Applied Radiation and Isotopes), Major Field: Applied Radiation and Isotopes, Department of Applied Radiation and Isotopes. Thesis Advisor: Mr.Somchit Palakas, Ph.D. 87 pages.

In this study, effect of some flavonoids on cell viability and radiosensitivity of lung cancer cell lines comprising of GLC<sub>4</sub> and GLC<sub>4</sub>/adr using simplified resazurin assay was investigated. Regarding optimization of resazurin assay, the respective initial cell density of each cell line was 2,000 and 5,000 cells/ml. The optimum incubation time in the presence of resazurin was 4 hours. The obtained condition was applied for cytotoxic test after exposure to doxorubicin. The 50% inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) of doxorubicin for GLC<sub>4</sub> and GLC<sub>4</sub>/adr cells were 0.012 ± 0.001 μM and 3.751 ± 0.889 μM, respectively and leading to the resistant factor of 320.

Afterwards, the effects of gamma radiation and some flavonoids comprising of apigenin, genistein, naringenin and quercetin were investigated. The radiation dose that inhibited 50% of cell proliferation (LD<sub>50</sub>) for GLC<sub>4</sub> and GLC<sub>4</sub>/adr cells were different with non statistical significance (2.332 ± 0.359 Gy and 3.185 ± 0.856 Gy, respectively). The IC<sub>50s</sub> of flavonoids mentioned previously were 12.865 ± 1.477 μM, 38.1011 ± 4.4239 μM, 90.0046 ± 5.9171 μM and 20.7960 ± 5.6365 μM, respectively. The respective IC<sub>50s</sub> of 31.6394 ± 9.6094 μM, 37.3603 ± 6.8091 μM, 76.1026 ± 3.9933 μM and 22.8324 ± 3.578 μM were found for GLC<sub>4</sub>/adr cells.

Furthermore, the effect of non toxic concentration of apigenin incorporated with gamma radiation was investigated. The experiments were divided into 4 conditions comprising of exposure to radiation alone, 24 and 72 hrs pre-exposure with apigenin before exposure to radiation and 24 hrs post treatment after exposure to radiation. Pre-treatment and post treatment of GLC<sub>4</sub> cells with apigenin did not modulate significantly radiosensitivity of cells. Meanwhile, pre-treated of GLC<sub>4</sub>/adr cells with apigenin for 24 hrs could increase the radiosensitivity with highly statistical significance.

---

Student's signature

Thesis Advisor's signature

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ดร.สมจิตต์ ปาละภาส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ ดร.กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้คำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ กราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก และ รองศาสตราจารย์ ดร.พีรณัฐ จอมพุก ประธานการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย ที่ได้ให้ความกรุณาในการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ชูศักดิ์ จอมพุก ที่ได้ให้คำแนะนำในการนำเอา ความรู้ทางสถิติมาใช้ในการวิเคราะห์ผลการทดลอง ขอขอบคุณศูนย์วิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ทำการทดลอง ตลอดจนเครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้ในการ ทดลอง ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ให้ทุนวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา เพื่อ การตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

ขอขอบคุณ คุณปกรณ์ ตั้งปอง คุณชาลินี ตั้งสมบัติวิจิตร คุณชนิตา ถิ่นนอก คุณณัฐนิชภู สุกีน คุณทิมมพร กรรเจียง คุณมยุรี ลิมติยะโยธิน และคุณเพชรลดา โรจนบัณฑิต ที่ได้ช่วยเหลือและแนะนำผู้วิจัยในการทำวิทยานิพนธ์เรื่องนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบคุณ เพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป สำหรับกำลังใจและความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และทุกคนในครอบครัว ที่คอยให้กำลังใจและ ให้การสนับสนุนทางด้านการศึกษาดำเนินการด้วยดีตลอดมา ความดีหรือประโยชน์อันใดที่เกิดจาก วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบคุณความดีนั้นแด่ บิดา มารดา สมาชิกทุกคนในครอบครัว รวมทั้ง ณาจารย์ทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้จนถึงปัจจุบัน

ญาณิษา จันทาพูน

เมษายน 2556

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	40
อุปกรณ์	40
วิธีการ	41
ผลและวิจารณ์	47
สรุปและข้อเสนอแนะ	70
สรุป	70
ข้อเสนอแนะ	72
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	73
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	87

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การนำวิธีการ flow cytometer ไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่าง ๆ	21
2	คุณสมบัติของสารคัดแปรผลของรังสีในอุดมคติ	29
3	ตัวอย่างชนิดและแหล่งของสารประกอบฟลาโวนอยด์บางชนิด	32
4	ค่า $IC_{50}$ และ Resistant Factor ของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์แบบเซลล์เดี่ยวชนิด $GLC_4$ และ $GLC_4/Adr$ ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี resazurin assay และ MTT assay	54
5	ค่าความเข้มข้นสูงสุดของสารประกอบฟลาโวนอยด์ชนิดต่าง ๆ ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์แบบเซลล์เดี่ยวชนิด $GLC_4$ และ $GLC_4/Adr$	62
6	ค่าความเข้มข้นของสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้ง 4 ชนิดที่สามารถลดการเจริญของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์แบบเซลล์เดี่ยวชนิด $GLC_4$ และ $GLC_4/Adr$ ได้ร้อยละ 50 ( $IC_{50}$ )	62
7	ค่าปริมาณรังสีที่ทำให้ลดการเจริญของเซลล์ได้ร้อยละ 50 ( $LD_{50}$ ) ของเซลล์ $GLC_4$ และ $GLC_4/Adr$ เมื่อได้รับสารอพิเจินิน ความเข้มข้น 1 $\mu M$	67

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	รูปแบบการก่อความเสียหายต่อ DNA โดยรังสี	4
2	การแตกตัวของน้ำโดยรังสี	7
3	วัฏจักรของเซลล์	9
4	การเกิด active complex ระหว่างโปรตีนในกลุ่ม cyclin-dependent kinases (CDKs) กับโปรตีนกลุ่ม cyclin ในวัฏจักรของเซลล์	10
5	แผนผังแสดงการตอบสนองของเซลล์ต่อความเสียหายที่เกิดกับ DNA	11
6	การรวมตัวของสารกลูตาไธโอน (glutathione) กับสารแปลกปลอม (xenobiotics) ที่มีเอนไซม์กลูตาไธโอนเอส-ทรานสเฟอเรส เป็นตัวกระตุ้น แล้วได้ผลผลิตเป็น glutathione-S-conjugate	13
7	การตรวจสอบการรอดชีวิต/การตายของเซลล์ด้วยการย้อมสี trypan blue เซลล์ที่รอดชีวิตจะไม่ติดสี ส่วนเซลล์ที่ตายจะติดสีน้ำเงิน (กำลังขยาย 400x)	14
8	การตรวจสอบความอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี clonogenic assay	15
9	การรีดิวซ์ MTT (Tetrazole) ให้เป็น Formazan ภายในเซลล์ที่มีชีวิต	16
10	การรีดิวซ์ resazurin ที่มีสีน้ำเงิน ให้เป็นสีม่วงของสาร resorufin ภายในเซลล์ที่มีชีวิต	18
11	ความสัมพันธ์ระหว่างระยะต่าง ๆ ในวัฏจักรของเซลล์กับปริมาณ DNA	20
12	แสดง glutathione oxidation pathway โดยเอนไซม์ glutathione reductase และเอนไซม์ glutathione peroxidase	24
13	โครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟลาโวนอยด์	32
14	โครงสร้างทางเคมีของสารอพิจีนิน	34
15	โครงสร้างทางเคมีของสารจินีสติน	37
16	โครงสร้างทางเคมีของสารนาริงจีนิน	37
17	โครงสร้างทางเคมีของเคอร์เซทิน	38
18	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์แบบเซลล์เดี่ยวชนิด GLC <sub>4</sub> (A) และ GLC <sub>4</sub> /Adr (B) (กำลังขยาย 400X)	47

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
19	ค่าการรีดิวซ์สาร resazurin ของเซลล์ GLC <sub>4</sub> (A) และเซลล์ GLC <sub>4</sub> /Adr (B) ที่มีความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น ในช่วง 0 - 50,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันอย่างน้อย 6 การทดลอง แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ	49
20	ความหนาแน่นของเซลล์ GLC <sub>4</sub> (A) และ GLC <sub>4</sub> /Adr (B) ในช่วงที่การรีดิวซ์สาร resazurin เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันอย่างน้อย 6 การทดลอง แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ	50
21	ค่าการรีดิวซ์สาร resazurin ของเซลล์ GLC <sub>4</sub> (A) และเซลล์ GLC <sub>4</sub> /Adr (B) ตามระยะเวลาของการบ่มเซลล์กับในสภาพที่มี resazurin ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันอย่างน้อย 6 การทดลอง แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ	1
22	ความอยู่รอดของเซลล์ GLC <sub>4</sub> (○) และ GLC <sub>4</sub> /Adr (●) ภายหลังจากได้รับสัมผัสยาต้านมะเร็ง Doxorubicin ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันอย่างน้อย 3 การทดลอง แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ	53
23	ความอยู่รอดของเซลล์ GLC <sub>4</sub> (A) และเซลล์ GLC <sub>4</sub> /Adr (B) เมื่อได้รับรังสี ค่าที่แสดงเป็นค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันอย่างน้อย 16 การทดลอง แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ	56
24	ความอยู่รอดของเซลล์ GLC <sub>4</sub> (A) และ GLC <sub>4</sub> /Adr (B) ภายหลังจากได้รับสัมผัสสารอพิจีนินความเข้มข้น 0 – 100 μM ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันอย่างน้อย 6 การทดลอง แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ	58
25	ความอยู่รอดของเซลล์ GLC <sub>4</sub> (A) และ GLC <sub>4</sub> /Adr (B) ภายหลังจากได้รับสัมผัสสารจินีสตินความเข้มข้น 0 – 100 μM ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันอย่างน้อย 3 การทดลอง แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ	59

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	เนื้อหา	หน้า
26	ความอยู่รอดของเซลล์ GLC <sub>4</sub> (A) และ GLC <sub>4</sub> /Adr (B) ภายหลังจากได้รับสัมผัสสารนาริงจีนิน ความเข้มข้น 0 – 100 $\mu$ M ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันอย่างน้อย 3 การทดลอง แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ	60
27	ความอยู่รอดของเซลล์ GLC <sub>4</sub> (A) และ GLC <sub>4</sub> /Adr (B) ภายหลังจากได้รับสัมผัสสารเคอร์เซทิน ความเข้มข้น 0 – 100 $\mu$ M ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันอย่างน้อย 3 การทดลอง แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ	61
28	ความอยู่รอดของเซลล์ GLC <sub>4</sub> หลังการฉายรังสี (○) และได้รับสัมผัสสารอพิจีนิน ความเข้มข้น 1 $\mu$ M ก่อนการฉายรังสีเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (□) 72 ชั่วโมง (◇) และ ภายหลังจากการฉายรังสีเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (△) ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันอย่างน้อย 3 การทดลอง แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ	64
29	ความอยู่รอดของเซลล์ GLC <sub>4</sub> /Adr หลังการฉายรังสี (●) และได้รับสัมผัสสารอพิจีนินความเข้มข้น 1 $\mu$ M ก่อนการฉายรังสีเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (■) 72 ชั่วโมง (◆) และภายหลังจากการฉายรังสีเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (▲) ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันอย่างน้อย 3 การทดลอง แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ	65
30	ความอยู่รอดของเซลล์ GLC <sub>4</sub> (○) และ GLC <sub>4</sub> /Adr (●) ภายหลังจากการฉายรังสี (A) ได้รับสัมผัสสารอพิจีนินก่อนการฉายรังสีเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (B) และ 72 ชั่วโมง (C) และได้รับสัมผัสสารอพิจีนินหลังการฉายรังสีเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (D) ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันอย่างน้อย 3 การทดลอง แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ	66

ผลของสารประกอบฟลาโวนอยด์บางชนิดต่อความอยู่รอดและความไวต่อรังสีของ  
เซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์แบบเซลล์เล็ก

**Effect of Some Flavonoids on Cell Viability and Radiosensitivity of Human  
Small-Cell Lung Cancer Cell Lines**

คำนำ

การศึกษาผลของรังสีต่อเซลล์สามารถทำได้หลากหลายวิธี ทั้งการศึกษาผลของรังสีต่อความไวต่อรังสี ผลของรังสีต่อความเสียหายของดีเอ็นเอ ผลของรังสีต่อกิจกรรมต่าง ๆ ภายในเซลล์ เช่น ระดับเอนไซม์ต่าง ๆ ระดับการแสดงออกของโปรตีนหรือยีนภายในเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปจากการได้รับรังสี

ในการรักษาโรคมะเร็งปอดนั้น มักจะใช้รังสีรักษา (radiotherapy)ควบคู่กับการรักษาด้วยเคมีบำบัด (chemotherapy) ซึ่งเซลล์มะเร็งปอดจะแบ่งได้ 2 ชนิดคือ small-cell lung cancer และ non-small-cell lung cancer โดยเซลล์ชนิด small-cell lung cancer จะมีความไวต่อรังสีมากกว่า non-small-cell lung cancer (Carmichael *et al.*, 1989) แต่อย่างไรก็ตามเซลล์ทั้ง 2 ชนิด สามารถพัฒนาความทนทานต่อการรักษาด้วยรังสีและเคมีบำบัดได้ ดังนั้นการศึกษาคัดแปรผลของรังสีจึงได้รับความสนใจ เนื่องจากรังสีสามารถทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (free radical) ซึ่งสามารถก่อความเสียหายให้กับส่วน ดีเอ็นเอ โปรตีน membrane lipids และส่วนประกอบต่าง ๆ ที่อยู่ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตได้ ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับสารคัดแปรผลของรังสีนั้นจึงมุ่งเน้นไปยังสารที่มีคุณสมบัติเป็น antioxidant ที่พบในธรรมชาติ ซึ่งมีศักยภาพในการเป็น radioprotector เนื่องจากความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระหรือยับยั้งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากการได้รับรังสี (Londe *et al.*, 2009) รวมไปถึงศักยภาพในการเป็น radiosensitizer ด้วยที่จะทำงานตรงข้ามกับ radioprotector ที่ไปเพิ่มผลที่เกิดขึ้นจากรังสี ซึ่งสาร antioxidant กลุ่มหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจในการศึกษาความเกี่ยวข้องเชื่อมโยงกับสุขภาพของมนุษย์อยู่ในปัจจุบัน คือ สารในกลุ่มของ flavonoids

Flavonoids เป็นสารที่ได้รับความสนใจในการศึกษาศักยภาพในการคัดแปรผลของรังสีในเซลล์มะเร็ง โดย flavonoids เป็นสารในกลุ่มของ phenolic compound พบได้ทั่วไปในพืช เช่น ผักและผลไม้ (Holden *et al.*, 2005) มีการศึกษาที่ยืนยันถึงประสิทธิภาพของสาร flavonoids ในการต้านการเกิดปฏิกิริยา oxidation (antioxidant activity) (Susanti *et al.*, 2007) รวมไปถึงความสามารถในการเป็น

antimicrobial (Kosalec *et al.* 2005; Pepeljnjak *et al.*, 2005; Mbaveng *et al.*, 2008; Özçelik *et al.*, 2008) antiviral (Choi *et al.*, 2009) antitumor (Cárdenas *et al.*, 2006; Zeng *et al.*, 2009) anticancer (Li *et al.*, 2007) และ anti-inflammatory (Clavin *et al.* 2007; Jin *et al.*, 2010)

โครงการวิทยานิพนธ์นี้จึงมุ่งเน้นที่จะพัฒนาวิธีการในการตรวจสอบผลของรังสีต่อความอยู่รอดเซลล์ และนำไปใช้ทดสอบความเป็นพิษของยาต้านมะเร็ง Doxorubicin และสารประกอบฟลาโวนอยด์ 4 ชนิดคือ อพิจินิน (apigenin) จินิสติน (genistein) นาริงจินิน (naringenin) และเคอร์เซทิน (quercetin) จากนั้นทำการคัดเลือกสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่จะใช้ในการศึกษาผลของสารประกอบฟลาโวนอยด์ต่อความไวต่อรังสีของเซลล์ต่อไป โดยจะใช้เซลล์มะเร็งปอด ชนิด GLC<sub>4</sub> และ GLC<sub>4</sub>/Adr ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ และการตรวจสอบความอยู่รอดของเซลล์จะใช้วิธี resazurin assay ผลการศึกษาดังกล่าวสามารถนำไปใช้ประยุกต์ใช้ประโยชน์ในการทดสอบสารพิษเบื้องต้น (screening test for toxic substance) งานด้านการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารต่างๆ (cytotoxicity assay) นอกจากนี้ผลการศึกษายังสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาด้านการคัดแปรผลของรังสีต่อไป

## วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลของสารประกอบฟลาโวนอยด์ต่อความอยู่รอดและความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์แบบเซลล์เล็ก โดยประเมินความอยู่รอดของเซลล์ทางอ้อมด้วยวิธี resazurin assay

### ขอบเขตการศึกษา

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์ ด้วยวิธี resazurin assay อาศัยการวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยให้ความสำคัญกับการประเมินความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้น และระยะเวลาในการบ่มเซลล์กับสี resazurin
2. การประเมินศักยภาพของการใช้วิธี resazurin assay ในการศึกษาความอยู่รอดของเซลล์ ภายหลังจากได้รับสิ่งก่อพิษต่อเซลล์
3. การศึกษาความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์แบบเซลล์เล็กชนิด GLC<sub>4</sub> และ GLC<sub>4</sub>/Adr
4. การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารประกอบฟลาโวนอยด์ 4 ชนิดคือ อพิจินิน จินิสติน นาริงจีนิน และ เคอร์เซทิน
5. การศึกษาผลของสารอพิจินินต่อการตัดแปรความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์แบบเซลล์เล็ก โดยแบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง ประกอบด้วย กลุ่มควบคุมที่ฉายรังสีแกมมาเพียงอย่างเดียว กลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารอพิจินินก่อนการฉายรังสีแกมมาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารอพิจินินก่อนการฉายรังสีแกมมาเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และ กลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารอพิจินินหลังการฉายรังสีแกมมาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

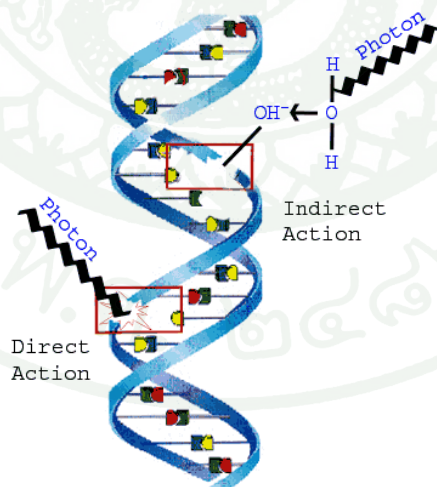
## การตรวจเอกสาร

### ผลของรังสีต่อเซลล์

#### 1. ความเสียหายที่เกิดจากการได้รับรังสีของเซลล์

##### 1.1 กลไกที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์

กระบวนการหลักที่เกิดขึ้นภายหลังการได้รับรังสีของเซลล์ คือ การแตกตัวเป็นไอออน (ionization) และกระบวนการกระตุ้น (excitation) ซึ่งเกิดจากการถ่ายเทพลังงานของรังสีให้กับโมเลกุลต่าง ๆ ที่อยู่ภายในเซลล์ เช่น DNA RNA โปรตีน และเอนไซม์ โดย DNA ถือเป็นเป้าหมายสำคัญของการทำลายโดยรังสี ผลทางชีวภาพที่เกิดขึ้นมาจากการที่ DNA ถูกทำลายแล้วไม่สามารถซ่อมแซมตัวเอง หรือซ่อมแซมไม่สมบูรณ์ หรือซ่อมแซมไม่ถูกต้อง ทั้งนี้ วอลวี (2547) ได้อธิบายถึงการกระทำของรังสีกับเป้าหมายว่ามี 2 แบบ (ภาพที่ 1) คือ การกระทำโดยตรง (direct action) และ การกระทำโดยอ้อม (indirect action) ซึ่งอธิบายโดยสรุปดังนี้



ภาพที่ 1 รูปแบบการก่อความเสียหายต่อ DNA โดยรังสี

ที่มา: Moeller (n.d.)

### 1.1.1 การกระทำโดยตรง (direct action)

เกิดจากการที่รังสีเข้าชนเป้าหมายแล้วถ่ายเทพลังงานให้กับอะตอมหรือโมเลกุลของเป้าหมายโดยตรง และผลของการแตกตัวเป็นไอออนหรือกระบวนการกระตุ้นทำให้โครงสร้างของโมเลกุลเหล่านั้นถูกทำลาย โดยเป้าหมายสำคัญของเซลล์คือ DNA การกระทำโดยตรงมักเกิดจากรังสีที่มีค่าถ่ายโอนพลังงานเชิงเส้น (linear energy transfer) สูง เช่น อนุภาคแอลฟา

### 1.1.2 การกระทำโดยอ้อม (indirect action)

เกิดจากการที่รังสีถ่ายเทพลังงานให้กับตัวกลางอื่น ๆ ในเซลล์ เช่น น้ำ เป็นผลให้เกิดอนุมูลอิสระ (free radical) ที่ไวต่อปฏิกิริยาทางเคมี แล้วอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะไปทำปฏิกิริยากับอะตอมหรือโมเลกุลของเซลล์ที่เป็นเป้าหมายสำคัญต่อไป การกระทำโดยอ้อมมักเกิดจากรังสีที่มีค่า LET ต่ำ เช่น รังสีแกมมา

เนื่องจากเซลล์มีน้ำเป็นองค์ประกอบมากกว่าร้อยละ 80 ดังนั้นการกระทำโดยอ้อมจึงมีโอกาที่จะเกิดขึ้นได้มากกว่าการกระทำโดยตรง รังสีสามารถทำให้เกิดการแตกตัวของน้ำ (radiolysis of water) ที่อยู่ในเซลล์ได้ดังภาพที่ 2 เมื่อน้ำดูดกลืนพลังงานจากรังสีจะเกิดกระบวนการกระตุ้น (excitations) และกระบวนการแตกตัวเป็นไอออน (ionizations) และนำไปสู่การเกิดอนุมูลอิสระ เช่น  $e_{aq}^-$ ,  $H^\bullet$ ,  $OH^\bullet$ ,  $H_2$ ,  $H_2O_2$ ,  $H^+$ ,  $OH^-$ ,  $O_2^{\bullet-}$  (หรือ  $HO_2^\bullet$ ) เป็นต้น ที่สามารถทำลายโมเลกุลที่เป็นเป้าหมายสำคัญต่อไป (Azzam *et al.*, 2012)

## 1.2 ผลของรังสีต่อเซลล์และประเภทของความเสียหายจากรังสี

รูปแบบพื้นฐานของความเสียหายต่อเซลล์ที่เกิดจากการได้รับรังสี เริ่มจากการที่รังสีเข้าชนกับเซลล์ทำให้เกิดการแตกตัวของอะตอมหรือโมเลกุลต่าง ๆ ที่อยู่ในเซลล์ ทำให้โครงสร้างของโมเลกุลที่อยู่ในเซลล์นั้นเปลี่ยนแปลงไป และส่งผลต่อการทำงานของเซลล์นั้น ๆ โดยผลที่สามารถเกิดขึ้นกับเซลล์ภายหลังจากได้รับรังสีมี 4 อย่าง (Gallagher, n.d.) ได้แก่

- 1) เซลล์ไม่ได้รับความเสียหายจากรังสี

2) เซลล์ได้รับความเสียหายและสามารถซ่อมแซมให้เป็นปกติได้

3) เซลล์ได้รับความเสียหายแต่ไม่สามารถซ่อมแซมให้เป็นปกติได้ รังสีทำให้ระบบการซ่อมแซมตัวเองของเซลล์ล้มเหลวและทำให้เซลล์ไม่สามารถแบ่งตัวได้อีกต่อไปหรืออาจจะแบ่งตัวในอัตราที่ไม่สามารถควบคุมได้

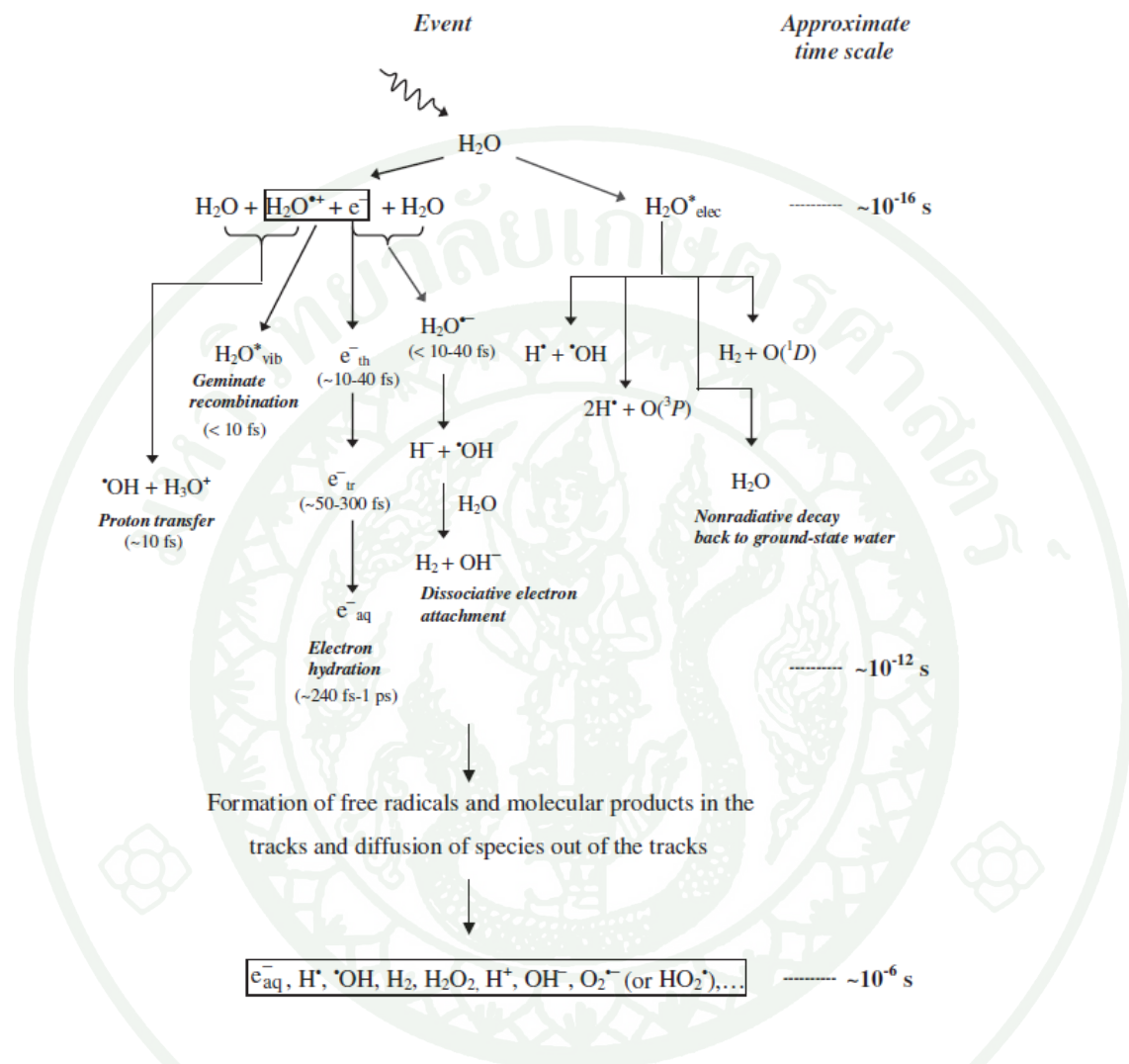
4) ความเสียหายที่เกิดขึ้นเป็นผลให้เซลล์ตาย เนื่องจากรังสีทำให้เซลล์ได้รับความเสียหายอย่างมากจนไม่สามารถซ่อมแซมได้ หรือความเสียหายที่เกิดขึ้นมีผลกับการแบ่งเซลล์ อาจจะนำมาสู่การตายของเซลล์ ความเสียหายของเซลล์ที่เกิดจากรังสีขึ้นกับความไวต่อรังสีของเซลล์ชนิดนั้น ๆ ด้วย

นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกความเสียหายที่เกิดจากรังสีได้ออกเป็น 3 ประเภท ตามการตอบสนองของเซลล์คือ (Kolbe, 2011)

1) Lethal damage ความเสียหายที่เกิดขึ้นกับเซลล์ ซึ่งไม่สามารถซ่อมแซมได้ นำไปสู่การตายของเซลล์

2) Sublethal damage ความเสียหายที่เกิดขึ้นสามารถซ่อมแซมได้ ยกเว้นจะได้รับความเสียหายเพิ่มในระหว่างการซ่อมแซมซึ่งจะเป็นผลให้เกิด lethal damage

3) Potentially lethal damage เซลล์สามารถซ่อมแซมความเสียหายที่เกิดขึ้นได้ เมื่ออยู่ในระยะพัก หรือระยะ  $G_0$



ภาพที่ 2 การแตกตัวของน้ำโดยรังสี

ที่มา: Azzam *et al.* (2012)

## 2. ดัชนีและการเปลี่ยนแปลงในระดับเซลล์

### 2.1 วัฏจักรของเซลล์

วัฏจักรของเซลล์แบ่งออกได้ 4 ขั้นตอน (ภาพที่ 3) ประกอบด้วย

2.1.1 ระยะเวลา mitosis (M) เป็นระยะที่เซลล์แบ่งตัวจาก 1 เซลล์ได้ 2 เซลล์ลูก

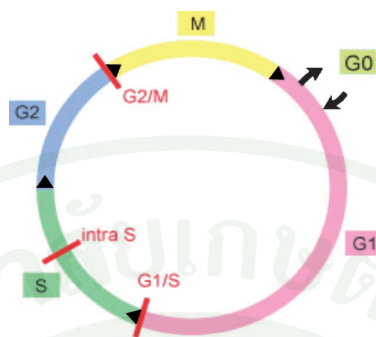
2.1.2 ระยะเวลา  $G_1$  เซลล์จะมีขนาดใหญ่ขึ้น และเริ่มการสังเคราะห์ RNA และโปรตีน

2.1.3 ระยะเวลา S เซลล์จะเริ่มสังเคราะห์ DNA

2.1.4 ระยะเวลา  $G_2$  เซลล์จะสร้างโปรตีนที่ใช้ในการแบ่งเซลล์ ในระยะนี้ โครโมโซมจะมีการจัดเรียงตัวเพื่อเตรียมที่จะแบ่งเซลล์ได้เซลล์ลูก 2 เซลล์ จากนั้นจะเข้าสู่ระยะ mitosis และจะเป็นอย่างนี้ต่อไปเรื่อย ๆ

นอกจากนี้ในเซลล์บางชนิดอาจออกไปอยู่นอกวัฏจักรของเซลล์โดยเซลล์จะหยุดการแบ่งเซลล์แล้วเข้าสู่ระยะ  $G_0$  โดยเซลล์จะอยู่ในระยะนี้สามารถกลับเข้าสู่วัฏจักรของเซลล์ได้อีกครั้งหรือจะอยู่ในระยะนี้ไปจนกว่าสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ จะตาย (Houtgraaf *et al.*, 2006)

วัฏจักรของเซลล์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ซึ่งความแตกต่างนี้มักเป็นผลมาจากระยะเวลาที่เซลล์อยู่ในระยะ  $G_1$  และเมื่อพิจารณาความไวต่อรังสีพบว่า ระยะต่าง ๆ ในวัฏจักรของเซลล์จะมีความไวต่อรังสีแตกต่างกัน โดยระยะ M และ  $G_2$  จะเป็นระยะที่มีความไวต่อรังสีมากที่สุด ส่วนระยะที่มีความไวต่อรังสีน้อยที่สุด คือ ระยะ late S นอกจากนี้ยังพบว่าในเซลล์ที่วัฏจักรของเซลล์แต่ละรอบใช้เวลานาน และมีเซลล์มีระยะ  $G_1$  นานจะมีความไวต่อรังสีในช่วง early  $G_1$  ด้วย (Hall, 1994)



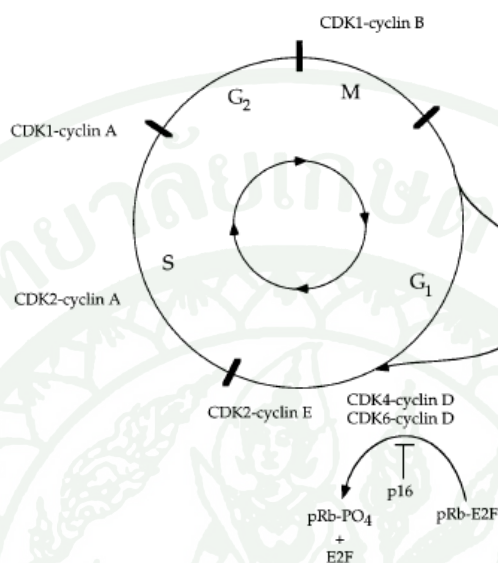
ภาพที่ 3 วัฏจักรของเซลล์

ที่มา: Houtgraaf *et al.* (2006)

## 2.2 การควบคุมวัฏจักรของเซลล์

แต่ละระยะของวัฏจักรของเซลล์เป็นกระบวนการที่ต้องอาศัยความต่อเนื่องและความถูกต้องของระยะก่อนหน้า เซลล์จึงมีกระบวนการควบคุมวัฏจักรของเซลล์ 2 กระบวนการ โดยกระบวนการแรกจะอาศัยการควบคุมผ่านโปรตีนในกลุ่ม kinases ที่ชื่อว่า cyclin-dependent kinases (CDKs) ซึ่งจะทำงานร่วมกับโปรตีนในกลุ่ม cyclin ที่จะแสดงออกในระยะต่าง ๆ กันในวัฏจักรของเซลล์ โดยโปรตีนสองกลุ่มนี้จับกันเกิดเป็น active complex ที่มีความจำเพาะกับระยะต่าง ๆ ในวัฏจักรของเซลล์ (Collins *et al.*, 1997) ดังภาพที่ 4 ที่แสดงให้เห็นถึง active complex ที่เกิดขึ้นในแต่ละระยะในวัฏจักรของเซลล์

กระบวนการที่สอง ที่เซลล์ใช้ควบคุมวัฏจักรของเซลล์ คือ cell cycle checkpoints ซึ่งเป็นกระบวนการที่ใช้ตรวจสอบความถูกต้องของการเพิ่มจำนวนของจีโนมเพื่อที่จะส่งต่อไปยังเซลล์ลูกใน eukaryotic cells จะมีการตอบสนองต่อความเสียหายหรือความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับ DNA ได้หลายแบบ โดยกระบวนการที่เกิดขึ้นจะเกี่ยวกับวัฏจักรของเซลล์กับการซ่อมแซมความเสียหายของ DNA (DNA repair), chromatin remodeling, transcriptional programs การปรับกระบวนการ metabolic ภายในเซลล์ รวมไปถึงการตายของเซลล์ (Lukas *et al.*, 2004) เซลล์จะมี checkpoints อยู่ 3 ตำแหน่งในวัฏจักรของเซลล์ ดังแสดงในภาพที่ 3 ได้แก่ G<sub>1</sub>/S, intra-S และ G<sub>2</sub>/M ทั้งสามตำแหน่งจะมีการตอบสนองต่อความเสียหายที่เกิดขึ้นกับ DNA เหมือนกัน โดย G<sub>1</sub>/S และ G<sub>2</sub>/M checkpoint จะเป็นการยับยั้งการผ่านเข้าสู่ระยะถัดไป ถ้า DNA ยังไม่ได้จำลองตัวเอง (unreplicated DNA) ส่วน intra-S checkpoint จะเป็นการตรวจสอบความถูกต้องของการสังเคราะห์สาย DNA ภายในระยะ S (Houtgraaf *et al.*, 2006)



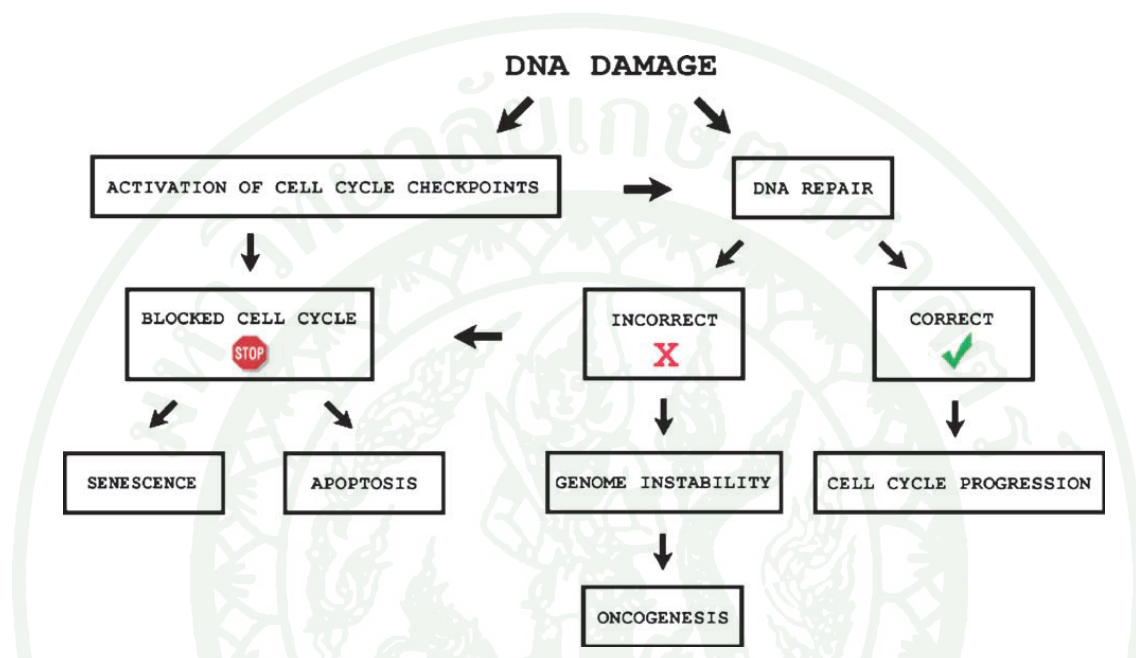
ภาพที่ 4 การเกิด active complex ระหว่างโปรตีนในกลุ่ม cyclin-dependent kinases (CDKs) กับโปรตีนกลุ่ม cyclin ในวัฏจักรของเซลล์

ที่มา: Colins *et al.* (1997)

### 2.3 การตอบสนองต่อความเสียหายของ DNA

เซลล์มีการตอบสนองต่อความเสียหายของ DNA เริ่มจากเซลล์จะใช้ sensor proteins, signal transducer ที่สามารถแปลงเป็น effector protein ในการตรวจจับความเสียหายที่เกิดขึ้นกับ DNA โดย effector proteins เหล่านี้ จะเป็นตัวเริ่มกระบวนการที่เซลล์ตอบสนองต่อความเสียหายของ DNA เมื่อ DNA ได้รับความเสียหายไม่ว่าในระยะใดก็ตามในวัฏจักรของเซลล์ เซลล์จะมีการตอบสนองต่อความเสียหายนั้นในรูปแบบเดียวกัน ตามภาพที่ 5 เมื่อ DNA ได้รับความเสียหาย กระบวนการ cell cycle checkpoints จะถูกกระตุ้นให้ทำงาน นำไปสู่การยับยั้งวัฏจักรของเซลล์ หรือเป็นการหยุดวัฏจักรของเซลล์ไว้เพื่อให้กระบวนการซ่อมแซม DNA ซ่อมแซมความเสียหาย เมื่อซ่อมแซมเสร็จแล้วเซลล์ก็จะดำเนินต่อไปในวัฏจักรของเซลล์ ถ้าเซลล์ไม่สามารถซ่อมแซมความเสียหายที่เกิดกับ DNA หรือเกิดความเสียหายมากจนไม่สามารถซ่อมแซมได้ เซลล์จะถูกบล็อกไว้และจะเกิดการเสื่อมสภาพ (senescence) หรือเกิดการตายแบบ apoptosis และในกรณีที่มีความผิดปกติของการซ่อมแซมความเสียหายของ DNA จะ

นำไปสู่การกลายพันธุ์ และความไม่เสถียรของจีโนม ซึ่งอาจนำไปสู่การเกิดเนื้องอก (oncogenesis) ในที่สุด



ภาพที่ 5 แผนผังแสดงการตอบสนองของเซลล์ต่อความเสียหายที่เกิดกับ DNA

ที่มา: Houtgraaf *et al.* (2006)

### 2.3 ผลของรังสีต่อระบบเอนไซม์กำจัดพิษในเซลล์

รังสีจัดเป็นสิ่งก่อพิษทางกายภาพอย่างหนึ่ง เนื่องจากสามารถเหนี่ยวนำให้สารที่อยู่ภายในเซลล์แตกตัวเป็นอนุมูลอิสระที่สามารถทำลายโครงสร้างต่าง ๆ ภายในเซลล์ได้ ระบบเอนไซม์กำจัดพิษจึงมีบทบาทในการลดความเสียหายที่เกิดขึ้นเนื่องจากรังสี

ระบบเอนไซม์กำจัดพิษประกอบด้วย 2 ระยะ ได้แก่ ระยะที่ 1 (phase 1) เป็นระยะที่สารจะเกิด biotransformation โดยเอนไซม์ cytochrome P450 (CypP450) ซึ่งจะเติมออกซิเจนและโคแฟกเตอร์ (NADH) ให้กับโมเลกุลที่เป็นพิษ เช่น hydroxyl radical ทำให้โมเลกุลใหม่ที่เกิดขึ้นมีพิษมากกว่าเดิม และมีโครงสร้างเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม และระยะที่ 2 (phase 2) เป็นการเร่ง

ปฏิกิริยา conjugation ที่เกิดต่อเนื่องจากระยะที่ 1 ได้เป็นโมเลกุลที่สามารถละลายน้ำได้และรอการขับออกจากร่างกายต่อไป ปฏิกิริยา conjugation ที่เกิดขึ้นมีหลายปฏิกิริยา ได้แก่ glucuronidation, sulfation และการเชื่อมต่อกันของ glutathione และ amino acid (Liska, 1998) ตัวอย่างเอนไซม์ทำลายพิษที่สำคัญ ได้แก่ เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส (carboxylesterase) และเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส (glutathione S-transferase)

### 2.3.1 เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรส (carboxylesterase)

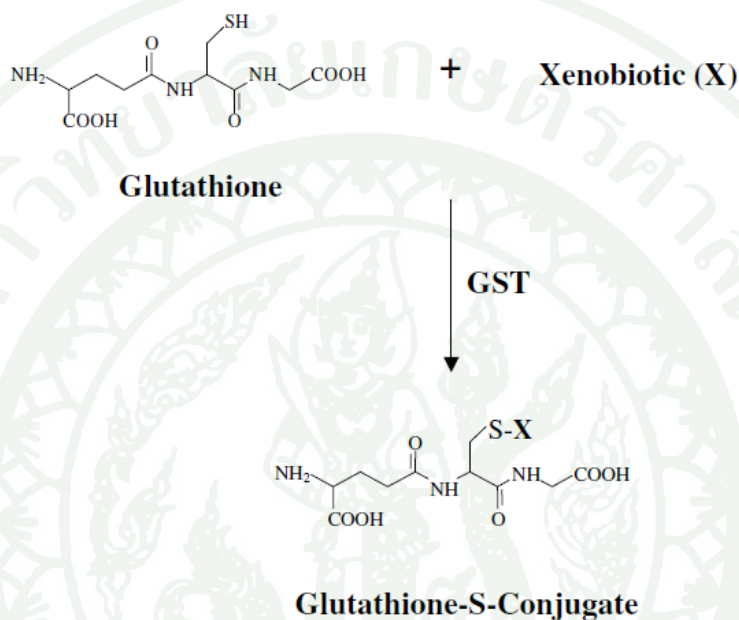
เอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรสพบในระยะที่ 1 ในระบบเอนไซม์กำจัดพิษที่มีความเกี่ยวข้องกับที่เกิด biotransformation โดยเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรสเกิดไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ได้เป็นเอนไซม์ไฮโดรเลส (hydrolyse) ซึ่งสามารถแยกกลุ่มของเอสเทอร์ (ester) ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยานี้ อาจจะมีพิษมากกว่าหรือน้อยกว่าสารตั้งต้น โดยทั่วไปเอนไซม์นี้จะควบคุมปริมาณสารที่ผลิตขึ้นในร่างกาย (endogenous substrate) ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม และมีหน้าที่สำคัญในการทำลายพิษของสารแปลกปลอม (xenobiotics) ที่เป็นสารเอสเทอร์หรือยึดกันด้วยพันธะ anhydride bond (นิสากร, 2553)

### 2.3.2 เอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส (glutathione S-transferase)

เอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส เป็นเอนไซม์ที่พบระยะที่ 2 ของระบบเอนไซม์กำจัดพิษที่สามารถปกป้อง macromolecule ที่อยู่ในเซลล์จากการโจมตีของ reactive electrophile ที่หมายรวมถึง reactive oxygen species ที่เกิดจากการแตกตัวของน้ำที่อยู่ในเซลล์ โดยเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส จะเป็นตัวกระตุ้นให้สารกลูตาไธโอน (glutathione) ภายในเซลล์รวมตัวกับสารแปลกปลอม (xenobiotics) แล้วกลายเป็น glutathione-S-Conjugate ดังภาพที่ 6 เอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส จะมีความจำเพาะกับหมู่ฟังก์ชันของสารแปลกปลอมมากกว่าชนิดของสาร (Townsend and Tew, 2003)

กลูตาไธโอนประกอบด้วยพันธะเปปไทด์ของกรดอะมิโน 3 ตัว ได้แก่ ซีสเตอีน (cysteine) กลูตามัต (glutamate) และไกลซีน (glycine) ถูกสังเคราะห์โดย glutathione synthase โดยการใส่กรดอะมิโน 3 ชนิด : L-cysteine, L-glutamate และ glycine กลูตาไธโอนเป็นสารที่มีส่วนร่วมในกระบวนการทางชีวภาพมากมายและพบกระจายอยู่ในเซลล์ โดยกลูตาไธโอนที่พบในเซลล์มีทั้งใน

รูปแบบรีดิวซ์ (GSH) และในรูปออกซิไดซ์ (GSSG) โดย GSSG สามารถถูก reduced ด้วย glutathione reductase ได้เป็น GSH ได้ (ฉัตรชัย, ม.ป.ป.; Tietze, 1969)



ภาพที่ 6 การรวมตัวของสารกลูตาไธโอน (glutathione) กับสารแปลกปลอม (xenobiotics) ที่มีเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส เป็นตัวกระตุ้น แล้วได้ผลผลิตเป็น glutathione-S-conjugate

ที่มา: Townsend and Tew (2003)

## 2.4 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในระดับเซลล์ภายหลังการได้รับรังสี

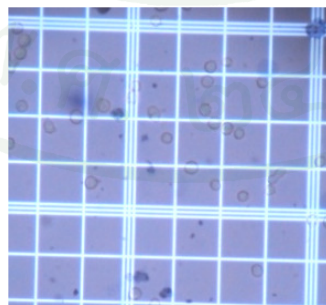
### 2.4.1 การตรวจสอบการรอดชีวิตหรือการตายของเซลล์

ก. Typan blue dye exclusion เป็นวิธีวัดการติดสีและไม่ติดสีของเซลล์ อาศัยสมบัติการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ยังมีชีวิตที่สามารถป้องกันการแพร่ของสีผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ จึงมีเฉพาะเซลล์ที่ตายเท่านั้นที่ติดสียอม ซึ่งสามารถทำได้ง่าย ราคาไม่แพง แต่มีข้อเสียคือ ถ้าหากมีจำนวนของตัวอย่างมากจะเสียเวลามากในการตรวจสอบการรอดชีวิตด้วยวิธีนี้

นอกจากนี้เทคนิคการวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์ด้วยการย้อมสี trypan blue สามารถนำไปใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพิษของสารต่าง ๆ ต่อเซลล์ได้ เช่น ในการศึกษาของ Okuno *et al* (2006) ได้ทำการศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y ภายหลังจากได้รับ acrylamide โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหาร DMEM/F12 ใน flask 25 ตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นนำไปบ่มเลี้ยงต่อในอาหารที่ไม่มี serum ที่เติม acrylamide จากนั้นจะทำการเก็บเซลล์มาวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์ แต่เนื่องจากเซลล์ SH-SY5Y เป็นเซลล์ที่มีการเจริญแบบ monolayer จึงต้องทำการย่อยเซลล์ด้วย เอนไซม์ทริปซิน (0.25% trypsin/1 mM EDTA) เมื่อเซลล์หลุดออกจากพื้น flask แล้วจะทำการเติม PBS จากนั้น จะนำเซลล์ที่ได้ไปย้อมสี trypan blue (เตรียมโดยการละลาย 0.3% trypan blue ใน Hanks' balanced salt solutions) ให้มี final concentration ของ trypan blue เท่ากับ 0.15% และจะนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตโดยใช้ haemocytometer โดยคำนวณร้อยละของเซลล์ที่รอดชีวิตจากสมการ

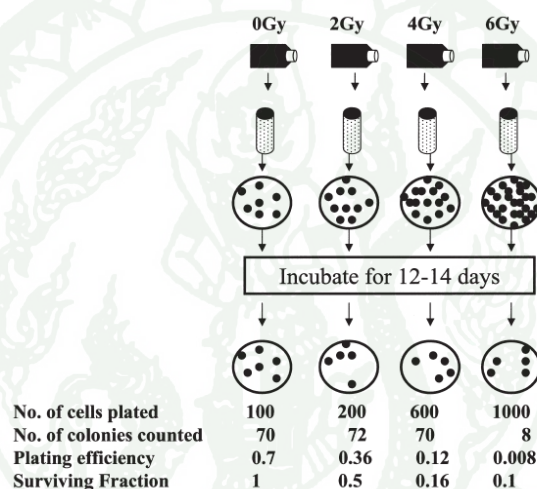
$$\text{cell viability} = \frac{\text{unstained cells}}{(\text{stained cells} + \text{unstained cells})} \times 100 \quad (1)$$

เทคนิคการวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์ด้วยการย้อมสี trypan blue เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์ที่สามารถทำได้ง่าย และราคาถูก สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ทั้งการศึกษาความอยู่รอดของเซลล์ภายหลังจากได้รับรังสี หรือสิ่งก่อพิษกับเซลล์ได้ เนื่องจากวิธีนี้เป็น การตรวจสอบความอยู่รอดของเซลล์ทางตรงที่ต้องตรวจสอบเซลล์ที่รอดชีวิต หรือเซลล์ที่ตาย ผ่านกล้องจุลทรรศน์ (ภาพที่ 7) ทำให้มีข้อเสีย คือ ต้องใช้เวลาและแรงงานเป็นอย่างมากในการนับจำนวนเซลล์ในแต่ละการทดลองให้ได้ผลการทดลองที่เป็นที่น่าเชื่อถือ



ภาพที่ 7 การตรวจสอบการรอดชีวิต/การตายของเซลล์ด้วยการย้อมสี trypan blue เซลล์ที่รอดชีวิตจะไม่ติดสี ส่วนเซลล์ที่ตายจะติดสีน้ำเงิน (กำลังขยาย 400x)

ข. Clonogenic assay หรือ colony forming assay เป็นการตรวจสอบความสามารถในการแบ่งตัวของเซลล์หรือความสามารถในการสร้างโคโลนีของเซลล์ที่รอดชีวิต ภายหลังจากฉายรังสี ดังตัวอย่างการศึกษาความไวต่อรังสีของเซลล์ดังกล่าวที่ 8 โดยมีวิธีการคือ เตรียมเซลล์แขวนลอยที่มีความหนาแน่นที่ต้องการนำมาฉายรังสีหรือบ่มกับสารเคมีที่ต้องการทดสอบ ทำการเจือจางเซลล์แขวนลอยในอัตราส่วนต่าง ๆ นำลงเลี้ยงบนอาหารแข็งแล้วนำไปบ่มเป็นเวลา 12 หรือ 14 วัน จึงนำมาตรวจผลด้วยการนับจำนวนโคโลนีของเซลล์



ภาพที่ 8 การตรวจสอบความอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี clonogenic assay

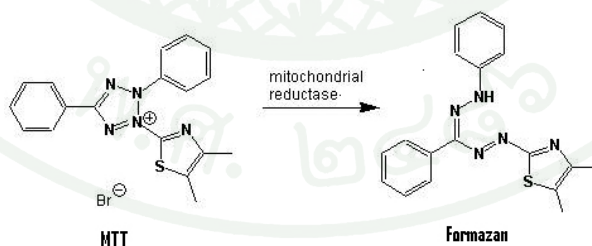
ที่มา: Munshi *et al.* (2005)

Clonogenic assay สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาการตัดแปรผลของรังสีด้วยการใช้สารเคมีหรือสารสังเคราะห์ต่าง ๆ ร่วมกับการฉายรังสีในเซลล์ชนิดต่าง ๆ โดย Hasan *et al.* (2010) ได้ศึกษาการตัดแปรผลของรังสีของสาร Provelx, Prostate Rx และ Trinovin ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด DU 145, PC-3 และเซลล์ปกติชนิด RWPE-1 และ PWR-1E ซึ่งทำโดยเลี้ยงเซลล์จำนวน  $2 \times 10^5$  เซลล์ ลงใน T25 culture flasks ที่มีอาหาร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ทำการฉายรังสีที่ปริมาณรังสี 0.5-4 เกรย์ จากนั้นเตรียมเซลล์ให้เป็นสารแขวนลอยเซลล์ นับเซลล์ แล้วนำลงเลี้ยงใน T25 culture flasks อีกครั้ง โดยแต่ละ flask จะมีเซลล์ประมาณ 200-250 เซลล์ นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-21 วัน (ขึ้นกับชนิดของเซลล์) แล้วทำการนับจำนวนโคโลนีที่

เกิดขึ้น โดยในแต่ละจานเพาะเชื้อที่นับจะต้องมีจำนวนโคโลนีมากกว่า 50 โคโลนีขึ้นไป โดยอัตราส่วนการรอดชีวิตจะทำการปรับค่าด้วย plating efficiency ของชุดการทดลองที่ไม่ได้รับการฉายรังสี

วิธี clonogenic assay นอกจากจะใช้วิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์ภายหลังการได้รับรังสีแล้วยังสามารถใช้ในการศึกษาการตัดแปรผลของรังสีด้วยสารเคมีต่าง ๆ อีกด้วย ซึ่งสามารถสรุปเป็นขั้นตอนง่าย ๆ คือ ทำการเลี้ยงเซลล์ นำไปฉายรังสีหรือเติมสารที่ต้องการศึกษา จากนั้นนำลงเลี้ยงในจานเพาะเชื้อ หรือใน culture flask จากนั้นนำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยระยะเวลาการบ่มเลี้ยงในขั้นตอนนี้จะขึ้นกับชนิดของเซลล์ที่ใช้ในการศึกษา จากนั้นจึงทำการนับโคโลนีที่เกิดขึ้น โดยในแต่ละจานเพาะเชื้อที่นับจะต้องมีจำนวนโคโลนีมากกว่า 50 โคโลนีขึ้นไป การคำนวณ survival fraction อาจจะทำการปรับค่าจาก plating efficiency ก่อน หรือทำการคำนวณเป็นร้อยละของชุดควบคุม

ก. MTT assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์ทางอ้อมที่อาศัยความสามารถในการทำงานของเอนไซม์จากไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่รอดชีวิตในการรีดักชันสาร 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide หรือ MTT ดังภาพที่ 9 ในกรณีของเซลล์ที่มีชีวิต เอนไซม์ dehydrogenase และ cofactor ในไมโทคอนเดรียจะรีดิวซ์สาร MTT ที่มีสีเหลืองให้กลายเป็น formazan ที่มีสีม่วง โดยวิธีการนี้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะไม่ละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ ดังนั้นจึงมีการเติมตัวทำละลายเพื่อละลายผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง



ภาพที่ 9 การรีดิวซ์ MTT (Tetrazole) ให้เป็น Formazan ภายในเซลล์ที่มีชีวิต

ที่มา: Brescia and Banks (2009)

การศึกษาของ Yuan *et al.* (2010) เกี่ยวกับการตอบสนองต่อเภสัชภัณฑ์รังสี  $\text{Na}^{131}\text{I}$  ในเซลล์ human non-small cell lung cancer ชนิด A549 ซึ่งทำโดยนำเซลล์ลงเลี้ยงใน 96-well plate หลุมละ  $1 \times 10^4$  เซลล์ นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอน ไดออกไซด์ ร้อยละ 5 เป็นเวลา 16 - 18 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์อยู่ในระยะการเจริญแบบก้าวหน้า เมื่อครบกำหนดเวลาจะทำการเปลี่ยนอาหารแล้วเติมสารละลายของ  $\text{Na}^{131}\text{I}$  ที่มีค่ากัมมันตภาพ เท่ากับ 9.25, 18.5 และ 37 MBq ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มเลี้ยงในสภาวะเดิมอีก 24 ชั่วโมง จากนั้นจะเติมสารละลาย MTT (ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/ลิตร) บ่มเลี้ยงต่ออีก 4 ชั่วโมง ดูดของเหลวในแต่ละหลุมออก แล้วเติม DMSO ปริมาตร 150 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 nm แล้วนำไปคำนวณความไวต่อรังสี (radiosensitivity) จากสมการ

$$\text{Radiosensitivity} = \frac{(1 - \text{OD}_{490}(\text{experiment group}))}{\text{OD}_{490}(\text{control group})} \times 100 \quad (2)$$

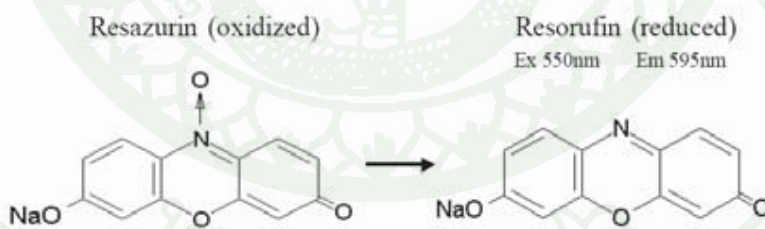
นอกจากนี้เทคนิคการ MTT assay ยังสามารถนำไปใช้ในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารต่าง ๆ ทั้งที่เป็นสารสังเคราะห์หรือสารสกัดได้ เช่น การศึกษาของ Zhou *et al.* (2007) ที่ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากต้น *Coriulus versicolor* (Yunzhi) ในเซลล์มะเร็งตับและมะเร็งเต้านม ซึ่งจะวิเคราะห์ความเป็นพิษของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ซึ่งดำเนินการโดยนำเซลล์มาลงเลี้ยงใน 96-well plate หลุมละ  $1 \times 10^4$  เซลล์ โดยในแต่ละหลุมจะมีอาหาร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นร้อยละ 95 คาร์บอน ไดออกไซด์ ร้อยละ 5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นจะเติมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (เจือจางโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์) หลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มเลี้ยงที่สภาวะเดิมอีก 72 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย MTT 5 กรัม/ลิตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม บ่มเลี้ยงที่สภาวะเดิมอีก 4 ชั่วโมง จากนั้นดูดของเหลวในแต่ละหลุมทิ้ง เติม  $\text{Me}_2\text{SO}$  ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุม นำไปเขย่าเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ด้วยเครื่อง Multiskan Spectrum Microplate Spectrophotometer (Thermo Labsystem) แล้วนำค่าที่ได้ไปคิดเป็นร้อยละของการรอดชีวิต (% cell viability) จากสมการ

$$\% \text{ Cell viability} = \frac{\text{Absorbance of treated cell}}{\text{Absorbance of control cell}} \times 100 \quad (3)$$

การวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี MTT assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์ที่รวดเร็ว สามารถทำได้ครั้งละหลาย ๆ ตัวอย่าง ทำให้ประหยัดเวลาใน

การทดสอบความเป็นพิษของสารก่อพิษต่อเซลล์ หรือแม้กระทั่งการศึกษาความอยู่รอดของเซลล์ภายหลังการได้รับรังสี ซึ่งสามารถสรุปเป็นขั้นตอนดังนี้ คือ ทำการเลี้ยงเซลล์ให้อยู่ในระยการเจริญแบบก้ำวหน้า จากนั้นนำไปทดสอบกับสาร และ/หรือ รังสี แล้วบ่มเลี้ยงอีกครั้งตามเวลาที่กำหนดในแต่ละการทดลอง เมื่อครบกำหนดเวลาจะเติมสารละลาย MTT แล้วนำไปบ่มเลี้ยงอีกครั้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อให้สารละลาย MTT ที่เติมเข้าไปนั้นเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์ในเซลล์ที่มีชีวิตอย่างสมบูรณ์ แล้วจึงจะดูของเหลวออก แล้วเติมตัวทำละลายเพื่อละลายผลิตภัณฑ์ formazan ที่เป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยานี้ จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งความเข้มของสัญญาณที่ได้เป็นสัดส่วนกับเซลล์ที่รอดชีวิต

ง. Resazurin assay หรือ AlamarBlue assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์ทางอ้อมที่อาศัยความสามารถในการทำงานของเซลล์ที่ยังรอดชีวิตภายหลังการได้รับรังสีหรือสิ่งก่อพิษต่าง ๆ โดยเซลล์ที่รอดชีวิตจะมีการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ซึ่งสามารถตรวจสอบได้จากการวัดการเปลี่ยนแปลงสีของ resazurin หรือ AlamarBlue ที่มีสีน้ำเงินเป็นสีม่วงของสาร resorufin (ภาพที่ 10) โดยเอนไซม์จากไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิต เช่น flavin mononucleotide dehydrogenase, flavin adenine dinucleotide dehydrogenase, nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase, nicotinamide adenine phosphate dehydrogenase และ cytochromes



ภาพที่ 10 การรีดิวซ์ resazurin ที่มีสีน้ำเงินให้เป็นสีม่วงของสาร resorufin ภายในเซลล์ที่มีชีวิต

ที่มา : Buranrat (2008)

การศึกษาของ Buranrat *et al.* (2008) ในเรื่องการปรับปรุงวิธีการวิเคราะห์การตายด้วยวิธี resazurin assay ในการวิเคราะห์การตายในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100 ภายหลังการได้รับยาต้านมะเร็ง Gemcitabine โดยมีวิธีการคือ นำเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-100 มาลงเลี้ยงใน 96-well plate หลุมละ  $5.0 \times 10^3$  เซลล์ จากนั้นเติมยา Gemcitabine ที่ทำการเจือจางไว้แล้วลงไป โดยจะมี final

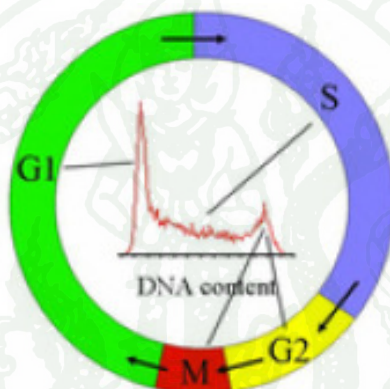
concentration เท่ากับ 1, 10 และ 100 nM นำไปบ่มเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นร้อยละ 95 คาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจะดูดเอาของเหลวในแต่ ละหลุมออก ล้างด้วย phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) เติมอาหารที่ผสมสี resazurin ลงในอาหาร เลี้ยงเซลล์โดยให้ความเข้มข้นของ resazurin เท่ากับ 0.001% ต่ออาหาร 200 ไมโครลิตร แล้วเติมลงไป หลุมละ 200 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มเลี้ยงที่สภาวะเดิม แล้วจะนำไปวิเคราะห์ fluorescence intensity ด้วย microplate spectrofluorometer (Gemini XPS, Molecular Devices, CA, USA) โดยจะทำการวัด fluorescence intensity 2 ความยาวคลื่น คือ excitation wavelength เท่ากับ 530 nm และ emission wavelength เท่ากับ 590 nm และนำค่าที่ได้มาใช้ในการคำนวณความอยู่รอดของเซลล์จากสมการ (Hara *et al.*, 2005)

$$\text{Survival fraction} = \frac{(\text{total No. of cells after treatment} \times \text{fluorescent intensity treated cells})}{(\text{total No. of control cells} \times \text{fluorescent intensity control cells})} \quad (4)$$

วิธีการวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี resazurin assay มีข้อดี คือ เนื่องจากสาร resorufin ที่เป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาระหว่างสาร resazurin กับเอนไซม์ในเซลล์ที่มีชีวิต เป็นสารที่สามารถละลายได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ จึงไม่มีการเติมตัวทำละลายในเทคนิคการวิเคราะห์ความ อยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธีนี้ ซึ่งสามารถสรุปขั้นตอนได้ดังนี้ คือ เลี้ยงเซลล์ให้อยู่ในระยะเจริญแบบก้ำวหน้า หรือในระยะที่ต้องการศึกษา จากนั้นนำไปทดสอบกับสาร และ/หรือ รังสี แล้วทำการเลี้ยงต่ออีกครั้งตาม ระยะเวลาที่กำหนดในแต่ละการทดลอง เมื่อครบกำหนดแล้วจึงเติมสารละลาย resazurin นำไปบ่มเลี้ยงอีก ครั้ง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ แล้วจึงนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงหรือ fluorescence intensity

#### 2.4.2 การตรวจสอบวัฏจักรของเซลล์ด้วยวิธี flow cytometry

flow cytometry เป็นวิธีการที่สามารถวิเคราะห์วัฏจักรของเซลล์ โดยอาศัยความแตกต่างของปริมาณ DNA (DNA content) ที่แตกต่างกันในแต่ละระยะของเซลล์ ยกเว้นระยะ  $G_2$  และ M ที่ไม่สามารถจำแนกได้ เนื่องจากทั้งสองระยะนี้มีปริมาณ DNA ในเซลล์เท่ากัน ดังภาพที่ 11 (Nunez, 2001) และสามารถตรวจวัดได้ด้วยการใช้สีย้อมเรืองแสง (fluorescent dye) ที่เหมาะสม ร่วมกับการใช้เครื่องมือที่เหมาะสมในการตรวจสอบวัฏจักรของเซลล์แต่ละชนิดหรือแต่ละระยะของเซลล์



ภาพที่ 11: ความสัมพันธ์ระหว่างระยะต่าง ๆ ในวัฏจักรของเซลล์กับปริมาณ DNA

ที่มา: Ormerod (2008)

วิธีการ flow cytometry มีความรวดเร็วกว่าการ side-based microspectrophotometry ประมาณ 4 ถึง 5 เท่า และยังสามารถตรวจสอบตัวอย่างได้ครั้งละมาก ๆ ในคราวเดียว ซึ่งแตกต่างจากวิธี side-based microspectrophotometry ที่จะทำได้คราวละน้อย ๆ (Darzynkiewicz *et al.*, 2004) สีย้อมเรืองแสงที่ใช้ในวิธี flow cytometry มีหลายอย่าง เช่น acriflavine-feulgen, ethidium bromide และ propidium iodide เป็นต้น (Fried *et al.*, 1976) นอกจากนี้วิธีการ flow cytometry ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยด้านต่าง ๆ ได้มากมายดังแสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การนำวิธีการ flow cytometry ไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่าง ๆ

Cell attribute (s) analyzed	Cell cycle compartments/ Events identified	Fluorochrome (s) used
<b>Univariate analysis of cellular DNA content</b>	G0/1 vs S vs G2/M	Feulgen-Auroamine O, acriflavine EB PI Mithramycin, EB _ mithramycin Chromomycin A3 DAPI Hoechst 33342 (supravital) DHAQ5
<b>Bivariate analysis of DNA and RNA content</b>	G0 vs. G1A vs. G1B vs. S vs. G2/M	Acridine orange Hoechst 33342, pyronin Y
<b>Bivariate analysis of ds and ss DNA after partial DNA denaturation (degree of chromatin condensation)</b>	G0 vs G1 vs S vs G2 vs M	Acridine orange
<b>Multivariate analysis of DNA, RNA and protein content</b>	G0 vs G1A vs G1B vs S vs G2/M	Hoechst 33342, pyronin Y, FITC
<b>BrdU incorporation</b>	S; DNA replication; cell cycle kinetics	Hoechst 33358 quenching AO quenching BrdU immunofluorescence DNA photolysis (SBIP)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Cell attribute(s) analyzed	Cell cycle compartments /Events identified	Fluorochrome (s) used
<b>“Proliferation-associated” proteins</b>	G0 vs cycling cells G0, S G0, M	Ki-67 Ab PCNA Ab Heterochromatin, p105 Ab
<b>Cyclins</b>	Up to seven “subcompartments” of the cell cycle	Cyclin B1 Ab Cyclin A Ab Cyclin E Ab Cyclins D1, D2, D3 Abs
<b>pRB phosphorylation</b>	Early postmitotic and G0	Hypophosphorylated pRB Ab
<b>Histone H3 phosphorylation</b>	G2 vs M	Histone H3 phosphorylated Ab
<b>DNA damage</b>	ds DNA breaks vs cell cycle phase	Histone H2AX phosphorylated Ab

ที่มา: ดัดแปลงจาก Darzynkiewicz *et al.* (2004)

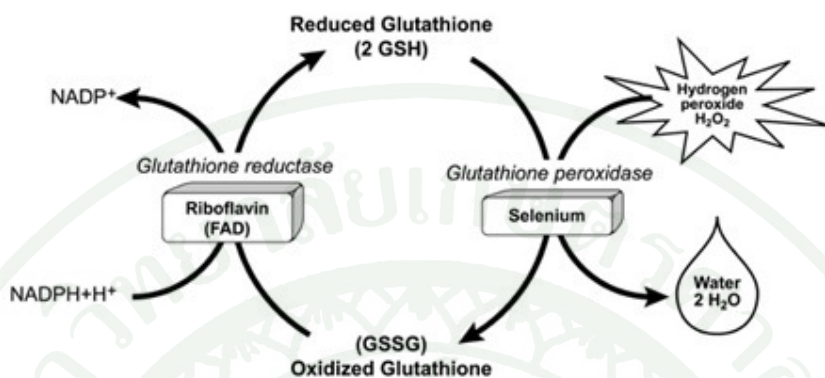
Yamamori *et al.* (2012) ได้ทำการประยุกต์วิธี flow cytometry เพื่อวิเคราะห์วัฏจักรของเซลล์พร้อมกับ mitochondrial content และวัฏจักรของเซลล์พร้อมกับ cellular oxidative stress levels ภายหลังการได้รับรังสีของเซลล์ human lung carcinoma A549 โดยการย้อมด้วยสีเรืองแสง 2 สี โดยถ้าต้องการวิเคราะห์วัฏจักรของเซลล์พร้อมกับ mitochondrial content จะใช้สีเรืองแสงเป็น Nuclear-ID red ร่วมกับ MitoTracker green ส่วนการวิเคราะห์วัฏจักรของเซลล์พร้อมกับ cellular oxidative stress levels จะใช้สีเรืองแสงเป็น Nuclear-ID red ร่วมกับ DCFDA โดยมีวิธีการคือ ภายหลังการฉายรังสี แล้วนำเซลล์มาล้างด้วย phosphate buffer saline จากนั้นนำมาบ่มกับสีเรืองแสงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดจะนำไปวิเคราะห์ด้วย Epics XL flow cytometer

Núñez *et al.* (2013) ได้ใช้วิธี flow cytometry ในการตรวจสอบวัฏจักรของเซลล์ MBA-MB-231 (ได้จาก human breast carcinoma ที่ไม่มีการแสดงออกของ ERO) เมื่อได้รับสารทดสอบ โดยเริ่มจากการเลี้ยงเซลล์ 24 ชั่วโมงในอาหารที่ไม่มี fetal bovine serum แล้วเติมสารทดสอบบ่มเลี้ยงต่อไปอีก 72 ชั่วโมง เก็บเซลล์มาตรึงด้วย methanol เย็น นำไปเหวี่ยง แล้วทำการย้อมสีด้วย propidium iodide ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจะนำไปตรวจวัดด้วยวิธี flow cytometry ผลที่ได้จะนำไปวิเคราะห์ด้วย Cylchred 1.0.2 software

จากงานวิจัยข้างต้นอาจจะสรุปขั้นตอนในการใช้วิธี flow cytometry ในการวิเคราะห์วัฏจักรของเซลล์ได้ว่าเริ่มจากการเตรียมเซลล์ที่ต้องการทดสอบแล้วนำมาบ่มกับสีย้อมเรืองแสงที่เหมาะสม จากนั้นจึงนำไปตรวจวัดด้วยเครื่อง flow cytometer

#### 2.4.3 การวิเคราะห์ระดับของกลูตาไธโอนในเซลล์

กลูตาไธโอน (glutathione; GSH) พบในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จัดเป็นสารอนุมูลอิสระที่มีบทบาทในกระบวนการทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดอะมิโนบางชนิดที่เป็นส่วนประกอบของโคเอนไซม์ (coenzyme) ของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ และป้องกัน oxygen radicals และสารพิษต่าง ๆ (Anderson, 1996) นอกจากนี้กลูตาไธโอนยังมีบทบาทที่สำคัญเกี่ยวกับกลไกที่ทำให้เซลล์มีความทนทานต่อรังสี (radioreistance) (Husbeck *et al.*, 2004; Hanot *et al.*, 2012) กลูตาไธโอนประกอบด้วยพันธะเปปไทด์ของกรดอะมิโน 3 ตัว ได้แก่ ซีสเทอีน (cysteine) กลูตามेट (glutamate) และไกลซีน (glycine) โดยกลูตาไธโอนที่พบในเซลล์มีทั้งในรูปแบบรีดิวซ์ (GSH) และในรูปออกซิไดซ์ (GSSG) โดย GSSG สามารถถูก reduced ด้วย glutathione reductase ได้เป็น GSH ดังภาพที่ 12 ที่แสดง glutathione oxidation pathway (ฉัตรชัย, ม.ป.ป.; Tietze, 1969) การทดสอบระดับกลูตาไธโอนภายในเซลล์สามารถทำได้ทั้งที่เป็นกลูตาไธโอนทั้งหมด (total glutathione) ในเซลล์ที่จะวัดทั้งกลูตาไธโอนในรูปแบบรีดิวซ์ (GSH) และในรูปออกซิไดซ์ (GSSG) และสามารถแยกวัดเฉพาะรูปแบบรีดิวซ์ (GSH) หรือรูปออกซิไดซ์ (GSSG) ซึ่งแต่ละวิธีการจะมีรายละเอียดแตกต่างกันออกไป (Anderson, 1996)



ภาพที่ 12 แสดง glutathione oxidation pathway โดยเอนไซม์ glutathione reductase และเอนไซม์ glutathione peroxidase

ที่มา: Lubner (2010)

หลักการวิเคราะห์ระดับกลูตาไธโอนในเซลล์ คือจะอาศัยการวิเคราะห์จาก GSH ที่มีอยู่ในเซลล์ที่สามารถรีดิวซ์ 5-5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) ให้เป็นสาร 2-nitro-5-thiobenzoic acid ที่มีสี สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm โดยสามารถทำการวัดเฉพาะ GSH หรือจะวัดทั้ง GSH และ GSSG โดยการรีดิวซ์ GSSG ให้เป็น GSH ด้วยเอนไซม์ glutathione reductase ก่อนจึงทำการวัด GSH (ภาพที่ 12) แต่ถ้าหากต้องการวัดเฉพาะ GSSG ก็จะบ่มกับ 1-methyl-4-vinyl-pyridinium ก่อนที่จะทำการวัด GSH เพื่อป้องกันการวัด GSH ที่มีอยู่แล้วในเซลล์ (Stern *et al.*, 2010)

Kinnaert *et al.* (2004) ได้ทำการวิเคราะห์ระดับกลูตาไธโอนในเซลล์ ในการทดสอบบทบาทของเม็ดสีในกลไกการป้องกันอันตรายจากรังสี (radioprotection) โดยจะนำสารสกัดที่ได้จากเซลล์มากำจัดโปรตีน (deproteinized) ด้วยการเติม trichloroacetic acid หลักการวิเคราะห์นั้นจะอาศัยหลักการการลดลงของ DTNB ที่จะถูกรีดิวซ์เป็น thio-nitrobenzoic acid (TNB) โดย GSH แต่เนื่องจากเซลล์มีกลูตาไธโอนทั้งที่อยู่ในรูปของ GSH และ GSSG จึงทำการรีดิวซ์ GSSG ให้กลับไปเป็น GSH โดยเอนไซม์ glutathione reductase ร่วมกับการให้ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) แล้วทำการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 nm แล้วนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบหา total GSH

content จาก standard curve ที่เตรียมจากสถานะเดียวกัน ผลการทดลองพบว่า ระดับของกลูตาไธโอนในเซลล์ลดลงแต่ไม่มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับเม็ดสี แต่การลดลงของกลูตาไธโอนมีผลทำให้เซลล์มีความไวต่อรังสีของเซลล์เพิ่มขึ้นมากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Pujari *et al.* (2009) ทำการศึกษาบทบาทของ GSH ในการเป็น radiosensitivity หรือ radioprotection ใน peripheral blood lymphocytes โดยจะให้ GSH กับ peripheral blood lymphocytes และศึกษาศักยภาพในการปกป้องหรือลดความเสียหายที่เกิดขึ้นกับโครโมโซมหรือการซ่อมแซมความเสียหายที่เกิดขึ้นภายหลังจากได้รับรังสี จะทำการทดลองวัดระดับของกลูตาไธโอน ทั้งหมดภายใน peripheral blood lymphocytes จะเตรียมตัวอย่างโดยหลังจากการบ่มกับกลูตาไธโอน และนำไปฉายรังสีด้วย peripheral blood lymphocytes ด้วย 0.1M phosphate-buffered saline solution (PBS) ที่เย็น จากนั้นเตรียมเซลล์ให้มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลังจากการกำจัดโปรตีนที่ไม่ต้องการออกไป (deproteinization) ด้วย 10% ice-cold 5-sulfosalicylic acid จากนั้นจะนำตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาผสมกับ buffer (0.1MEDTA phosphate buffer, pH 7.0) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร NADPH ปริมาตร 50 ไมโครลิตร DTNB (ความเข้มข้น 1.5mg/ml) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ GSH reductase (ความเข้มข้น 6 units/ml) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นจะนำไปวิเคราะห์การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 nm โดยใช้ UV-vis spectrophotometer (Beckman model DU-640) และสร้าง standard curve โดยการใช้กลูตาไธโอน ความเข้มข้น 100-1,000 นาโนโมล ที่เตรียมจาก stock solution ของกลูตาไธโอน ที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ แล้วทำการเจือจางด้วย 5% 5-sulfosalicylic acid ผลการทดลองพบว่า เมื่อให้รังสีเอกซ์ปริมาณสูง กลูตาไธโอนจะมีบทบาทในการตัดแปรผลของกระบวนการซ่อมแซม DNA ภายหลังจากได้รับรังสีมากกว่าที่จะแสดงบทบาทในการเป็น radioprotector โดยตรง

### การดัดแปรผลของรังสี

รังสีเป็นพลังงานรูปหนึ่งที่มีทั้งคุณประโยชน์หลายประการ ในปัจจุบันมีการนำรังสีมาใช้ประโยชน์ด้านต่าง ๆ มากมาย อย่างไรก็ตาม การใช้ประโยชน์โดยขาดความระมัดระวังก็อาจก่อความเสียหายต่อเซลล์ อวัยวะ หรือร่างกายของสิ่งมีชีวิตได้เช่นกัน รูปแบบสำคัญของการใช้ประโยชน์จากรังสีที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพร่างกายของมนุษย์โดยตรง คือ การนำรังสีมาใช้ประโยชน์ในการบำบัดรักษามะเร็งที่มีเป้าหมายเพื่อทำลายเซลล์มะเร็ง แต่ในความเป็นจริงแล้วนอกจากเซลล์มะเร็งจะถูกทำลาย เซลล์ปกติก็ยังได้รับความเสียหายจากการได้รับรังสีเช่นเดียวกัน ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับการดัดแปรผลของรังสี (radiation modification) จึงเป็นเรื่องสำคัญที่มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย ทั้งนี้การดัดแปรผลของรังสีนั้นสามารถจำแนกได้เป็น 3 รูปแบบ กล่าวคือ รูปแบบแรก คือ การดัดแปรความไวต่อรังสีด้วยสารเคมี หรือ chemical modification of radiosensitivity คือ การใช้สารที่มีคุณสมบัติในการดัดแปรผลของรังสีสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ การใช้สารเพิ่มการตอบสนองหรือเพิ่มโอกาสในการสร้างความเสียหายทางชีววิทยาจากรังสี (radiation sensitizer หรือ radiosensitizer) และ การใช้สารลดความเสียหายหรือป้องกันอันตรายจากรังสี (radiation protector หรือ radioprotector) รูปแบบที่สอง คือ การดัดแปรผลของรังสีด้วยวิธีการทางชีววิทยา (biological modification of radiosensitivity) สามารถทำได้โดยอาศัยพื้นฐานของการตอบสนองต่อรังสีของเซลล์ที่แตกต่างกันเมื่อเซลล์อยู่ในระยะต่าง ๆ ของวัฏจักรของเซลล์ สำหรับรูปแบบที่สาม คือ การดัดแปรผลของรังสีด้วยกระบวนการทางกายภาพ (physical modification of radiosensitivity) อาทิ การเปลี่ยนแปลงอัตรารังสี (dose rate effects) การอาศัยสมบัติทางกายภาพของรังสี คือ ค่าการถ่ายโอนพลังงานเชิงเส้น (linear energy transfer, LET) เป็นต้น (Held, n.d.)

ในการศึกษารังสีนี้ได้ให้ความสำคัญกับการดัดแปรผลของรังสีด้วยสารเคมีที่ประกอบด้วย สารที่มีสมบัติป้องกันความเสียหายที่เกิดขึ้นกับเซลล์และสารที่มีสมบัติในการเพิ่มความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็ง (radiation sensitizer, radiosensitizer) ซึ่งในปัจจุบันมีนักวิจัยที่ให้ความสนใจในการศึกษาการดัดแปรผลของรังสีมากมาย ซึ่งการศึกษาเหล่านี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการบำบัดรักษาโรคมะเร็งได้ การศึกษาการดัดแปรผลของยาต้านมะเร็งนั้น มีจุดประสงค์ก็เพื่อจะศึกษาสารเคมีทั้งที่เป็นสารสังเคราะห์หรือสารสกัดจากธรรมชาติที่สามารถเพิ่มความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็ง และลดผลข้างเคียงที่จะเกิดกับเซลล์ปกติ นอกจากนี้การศึกษาก็เกี่ยวกับสารที่มีคุณสมบัติในการป้องกันหรือลดความเสียหายของเซลล์จากรังสี (radioprotector) นั้น ยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ เมื่อเกิดอุบัติเหตุทางรังสีที่มีเหตุการณ์ที่ทำให้ประชาชน หรือผู้ที่ปฏิบัติงานเกี่ยวข้องกับรังสีได้รับรังสีเกินค่ามาตรฐานในการป้องกันอันตรายจากรังสีได้

สารที่ใช้ในการตัดแปรผลของรังสี (radiation modifiers) มีความแตกต่างจากสารที่เป็น anticancer เนื่องจากสารที่เป็น anticancer นั้นจะมุ่งเน้นไปที่ความเป็นพิษของสารที่เกิดกับเซลล์ แต่สารที่ใช้ในการตัดแปรผลของรังสีนั้นจะมีความสามารถในการเลือกกลไกของการออกฤทธิ์ กล่าวคือ สามารถเพิ่มความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็ง (radiation sensitizer, radiosensitizer) ในขณะที่จะแสดงคุณสมบัติเป็นสารที่ป้องกันเซลล์จากความเสียหายจากรังสีได้ หรือมีจุดมุ่งหมายที่จะลดความไวต่อรังสีของเซลล์ปกติ (radiation protector, radioprotector) ซึ่งคุณสมบัติของสารตัดแปรผลของรังสีในอุดมคติ ได้สรุปไว้ในตารางที่ 2 (Hall, 1978; Poggi *et al.*, 2001; Wardman, 2007)

Radiosensitizer คือ สารเคมีที่มีคุณสมบัติเพิ่มผลของรังสีก่อไอออนที่ทำให้เกิดการตาย หรือเพิ่มโอกาสในการสร้างความเสียหายให้กับเซลล์เมื่อได้รับรังสี โดยปกติแล้วสารดังกล่าวจะไม่เป็นพิษ ซึ่งในช่วงแรกของการศึกษาเกี่ยวกับ chemical radiosensitizer นั้น Wardman (2007) ได้แบ่งกลไกของการออกฤทธิ์ของสารในกลุ่มนี้ออกเป็น 5 ชนิด ได้แก่

1. ยับยั้งสารในกลุ่ม thiols ซึ่งถือว่าเป็นสารที่ป้องกันหรือลดความเสียหายที่เกิดจากรังสีที่อยู่ในภายในเซลล์ (endogenous radioprotective substances)
2. เหนี่ยวนาให้เกิดสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ขึ้นจากกระบวนการแตกตัวของน้ำโดยรังสี
3. ยับยั้งกระบวนการซ่อมแซมความเสียหายภายหลังจากรังสี
4. ทำให้เกิดการรวมตัวกันของ thymine analogues ของ DNA ภายในเซลล์
5. การเลียนแบบผลของออกซิเจนในการเพิ่มความไวต่อรังสี (oxygen-mimetic sensitizers)

เมื่อให้ความสำคัญกับความแตกต่างของผลที่เกิดขึ้นระหว่างเซลล์ปกติกับเซลล์มะเร็งจะแบ่งออกได้ 2 ประเภท คือ halogenated pyrimidines ซึ่งจะมีผลไปเปลี่ยนแปลงวัฏจักรของเซลล์มะเร็งให้เร็วกว่าเซลล์ปกติ และ hypoxic cell sensitizers ซึ่งจะเพิ่มความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็งที่ขาดแคลนโมเลกุลของออกซิเจนและจะไม่มีผลกับเซลล์ปกติ

Radioprotectors เป็นสารที่มีผลในการลดความเสียหายที่เกิดขึ้นกับเซลล์ปกติเมื่อได้รับรังสี ในปัจจุบันมีสารที่มีคุณสมบัติเป็น radioprotector มากมาย ยกตัวอย่างเช่น สารในกลุ่ม thiol ซึ่งมีความสามารถในการกำจัด free radicals และปรับกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอ ซึ่งจะมีผลทำให้การตอบสนองต่อรังสีนั้นเปลี่ยนแปลงไป (Thotala *et al.*, 2009)

Thotala *et al.* (2009) ทำการศึกษาสาร pyridoxamine (PM) ในการป้องกันการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ rat small intestine epithelium ชนิด IEC-6 โดยจะเติมสาร pyridoxamine 1 mM เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนการฉายรังสี พบว่าการเติมสาร pyridoxamine ก่อนการฉายรังสีสามารถเพิ่มความอยู่รอดของเซลล์ rat small intestine epithelium ได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่ได้เติมสาร pyridoxamine ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสาร pyridoxamine มีคุณสมบัติในการเป็น radioprotector

Liao *et al.* (2010) ศึกษาคุณสมบัติของสาร propranolol ในการเพิ่มความไวต่อรังสีในเซลล์ human gastric adenocarcinoma ชนิด BGC-823 และ SGC-7901 โดยจะให้เซลล์ได้รับสาร propranolol ก่อนการฉายรังสีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า propranolol สามารถลดความอยู่รอดของเซลล์ human gastric adenocarcinoma ทั้งสองชนิดได้ และเพิ่มความไวต่อรังสีของเซลล์ทั้งสองชนิด นอกจากนี้ยังพบว่าสาร propranolol สามารถเพิ่มการตายของเซลล์ human gastric adenocarcinoma โดยการเพิ่มการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการให้สาร propranolol สามารถเปลี่ยนแปลงผลทางชีววิทยาของรังสีได้

Chu *et al.* (2011) ได้ทำการทดลองเพิ่มความไวต่อรังสีของเซลล์ human glioblastoma ชนิด U87MG, U251MG และ GBM-3 โดยใช้สาร BO-1051 (1-{4-[Bis (2-chloroethyl) amino] phenyl}-3-[2-methyl-5-(4-methylacridin-9-ylamino) phenyl]urea) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม N-mustard DNA alkylating ทำการทดลองโดยให้เซลล์ได้รับสาร BO-1051 ก่อนการฉายรังสีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสาร BO-1051 สามารถเพิ่มความไวต่อรังสีของเซลล์ human glioblastoma ทั้งสามชนิดได้

ตารางที่ 2 คุณสมบัติของสารคัดแปรผลของรังสีในอูคมคติ

<b>Radiation protector</b>	<b>Radiation sensitizer</b>
- Acts selectively in normal tissue compared with tumor	- Acts selectively in tumor compared with normal tissues
- Reaches normal tissue in adequate concentration	- Reaches tumor in adequate concentration
- Excluded from tumor	- Predictable pharmacokinetics for timing with radiation therapy
- Predictable pharmacokinetics for timing with radiation therapy	- Able to be administered with every radiation treatment in a standard regimen
- Able to be administered with every radiation treatment	- Minimal toxicity of the drug itself
- Minimal toxicity of the drug itself	- Minimal or manageable enhancement of radiation toxicity
- Result may be decreased acute or late effect	- Range of potential mechanism of action including: Directly enhances DNA damage
- Range of potential mechanism of action including: Prevent DNA damage	- Alters cell biochemical/molecular response to radiation
- Alters cellular biochemical response to radiation	- Decreases repair of radiation damage
- Enhances repair of radiation damage	- Causes cell death by novel mechanism, eg, apoptosis
- Enhances repopulation of normal tissue	
- Alters late effect	

ที่มา: Poggi *et al.* (2001)

## สารประกอบฟลาโวนอยด์และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ปัจจุบันสารในกลุ่มของ flavonoids ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่ามีคุณสมบัติในการเป็น antioxidant และได้รับความสนใจในการศึกษาความเกี่ยวข้องเชื่อมโยงกับสุขภาพของมนุษย์ จากการศึกษาของ Susanti *et al.* (2007) เกี่ยวกับความสามารถในการต้านการเกิดปฏิกิริยา oxidation (antioxidant activity) ของสารประกอบ flavonoid ที่สกัดได้จากดอกของต้น *Melastoma malabathricum* L. พบว่า สารประกอบ flavonoid ที่สกัดได้นั้น สามารถต้านการเกิดปฏิกิริยาการ oxidation ได้ในการทดสอบด้วยวิธี DPPH assay นอกจากนี้ flavonoid จะเป็นสาร antioxidant แล้ว ยังมีคุณสมบัติในการเป็น antimicrobial ใน *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC 12204, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231 (Kosalec *et al.*, 2005), *Staphylococcus aureus*, *Proteus rettgeri*, *Candida tropicalis* and *Microsporum gypseum*, *Candida lusitanae* และ *Fusarium graminearum* (Pepeljnjak *et al.*, 2005), แบคทีเรียในสกุล *Candida* แบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ (Kuetz *et al.*, 2007), *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogens*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus* และ *Candida albicans* (Mbaveng *et al.*, 2008) และ *Klebsiella pneumonia* (Özçelik *et al.*, 2008)

จากการศึกษาของ Sarkar and Li (2006) เกี่ยวกับผลของ chemopreventive agents ที่มีต่อการตัดแปรผลของยาต้านมะเร็งพบว่า การให้สาร chemopreventive agents สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการลดการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ ยกตัวอย่างเช่น สารจินีสติน สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ได้ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งเต้านม มะเร็งตับ และมะเร็งปอดเมื่อให้ร่วมกับยา isplatin, docetaxel, doxorubicin และ gemcitabine นอกจากนี้ สารจินีสตินสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งลำไส้ ชนิด chemoresistant HT-29 เกิดการตายแบบ apoptosis ได้ และการให้สารจินีสตินที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ นั้น นอกจากจะยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ ยังไม่เป็นพิษกับเซลล์ปกติด้วย

จากการศึกษาของ Hermann *et al.* (2008) เกี่ยวกับการตัดแปรผลของรังสีของสารจินีสติน และ estradiol ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด LNCaP (androgen-sensitive) และ PC-3 (androgen-independent) โดยทำการบ่มเซลล์ร่วมกับสารจินีสติน และ estradiol ก่อนการฉายรังสีพบว่า การบ่มเซลล์ร่วมกับสารจินีสตินนั้น สามารถลดการรอดชีวิตของเซลล์ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี clonogenic assay ได้อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนการบ่มกับสาร estradiol ในเซลล์ทั้งสองชนิดพบว่า ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ (0.01  $\mu$ M) จะมี

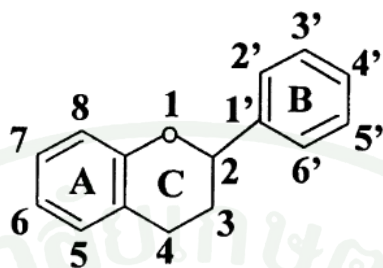
การกระตุ้นการเจริญของเซลล์มากกว่าที่จะลดการเจริญของเซลล์ และเมื่อบ่มเซลล์ LNCaP กับสาร จินิสติน และ estradiol ที่ความเข้มข้น 10  $\mu\text{M}$  แล้วทำการฉายรังสีที่ปริมาณรังสี 0-4 เกรย์ พบว่าการให้ สารทั้งสองชนิดนี้ร่วมกับการฉายรังสีที่ปริมาณรังสีต่ำ ๆ สามารถลดสัดส่วนการรอดชีวิตของเซลล์ได้ ส่วนการบ่มเซลล์ PC-3 ร่วมกับสารจินิสติน และ estradiol ที่ความเข้มข้น 10  $\mu\text{M}$  ก่อนการฉายรังสีที่ ปริมาณรังสี 0-4 เกรย์ พบว่าสารทั้งสองชนิดนี้ร่วมกับการฉายรังสี จะสามารถเพิ่มสัดส่วนการรอดชีวิต ของเซลล์ PC-3 ซึ่งการให้สารทั้งสองชนิดในเซลล์ PC-3 นั้นให้ผลที่แตกต่างจากการให้สารทั้งสองชนิดนี้ ในเซลล์ LNCaP

Choi *et al.* (2009) ศึกษาความสามารถในการเป็น antiviral ของสารประกอบของ เคอร์เซทิน โดยทดลองในเชื้อไวรัสชนิด Porcine epidemic diarrhea virus พบว่าสามารถยับยั้งการ replication ของ Porcine epidemic diarrhea virus นอกจากนี้ได้มีงานของ Chiang *et al.* (2003) ที่พบว่า สาร เคอร์เซทิน สามารถต้านการเจริญของเชื้อไวรัส herpesviruses (HSV-1, HSV-2) และ adenoviruses (ADV-3, ADV-8, ADV-11) ได้

จากการศึกษาของ Cárdenas *et al.* (2006) Li *et al.* (2007) และ Zeng *et al.* (2009) พบว่าสาร flavonoid มีการออกฤทธิ์ต้านมะเร็ง นอกจากนี้ยังพบว่าสาร flavonoid มีคุณสมบัติในการเป็น anti-inflammatory (Clavin *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2010) ได้อีกด้วย

### แหล่งของสารประกอบฟลาโวนอยด์และการจำแนกประเภท

สารประกอบฟลาโวนอยด์ เป็นสารที่พบได้ทั่วไปในผักและผลไม้ (Singh *et al.*, 2004) ปัจจุบัน สามารถระบุสารประกอบฟลาโวนอยด์ได้มากกว่า 5,000 ชนิด โดยส่วนใหญ่ในธรรมชาติจะอยู่ในรูปของ สารประกอบของ glycosides (Holden *et al.*, 2005) สารประกอบฟลาโวนอยด์เป็นอนุพันธ์ของ benzo- $\gamma$ -pyrone ที่ประกอบด้วย phenolic และ pyrane rings ดังภาพที่ 13 ชนิดของสารประกอบฟลาโวนอยด์ สามารถแบ่งตามตำแหน่งที่อะตอมหรือ โมเลกุลเข้ามาแทนที่ในโครงสร้างทั่วไปของสารประกอบฟลาโวนอยด์ (basic structure) ได้เป็น 6 ชนิด คือ flavanol, flavones, flavonol, flavanone, isoflavone และ anthocyanidin ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3 (Heim *et al.*, 2002)



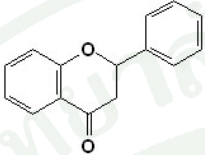
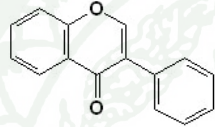
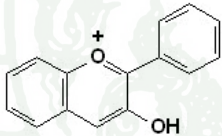
ภาพที่ 13 โครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟลาโวนอยด์

ที่มา: Heim *et al.* (2002)

ตารางที่ 3 ตัวอย่างชนิดและแหล่งของสารประกอบฟลาโวนอยด์บางชนิด

Class	General structure	Flavonoid	Dietary Sources
Flavanol		(+) catechin	Tea ( <i>Camellia sinensis</i> )
		-(-)epicatechin	Tea
		Epigallocatechin gallate	
Flavone		Chrysin	Fruit skins
		Apigenin	Parsley, celery
		Rutin	Red wine, buckwheat, Citrus, tomato skin
		Luteolin	Red pepper
		Luteolin glucosides	
Flavonol		Keampferol	Leek, broccoli, endives, grapefruit, black tea
		Quercetin	Onion, lettuce, broccoli, tomato, tea, red wine, berries, olive oil, apple skin
		Myricetin	

ตารางที่ 3 (ต่อ)

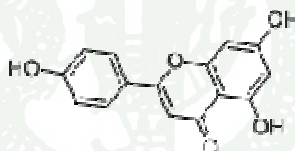
Class	General structure	Flavonoid	Dietary Sources
Flavanone (dihydroflavon)		Naringin	Citrus, grapefruit
		Naringenin	Citrus fruits
		Taxifolin	Citrus fruits
		Eriodictyol	Lemons
		Hesperidin	Oranges
Isoflavone		Genistin	Soybean
		Genistein	Soybean
		Daidzin	Soybean
		Daidzein	Soybean
Anthocyanidin		Apigenidin	Colored fruits
		Cyaniding	Cherry, rusberry, strawberry

ที่มา: ดัดแปลงจาก Heim *et al.* (2002)

## ศักยภาพของสารประกอบฟลาโวนอยด์ในการดัดแปรผลของรังสี

### 1. อพิจินิน (apigenin)

อพิจินิน (4', 5, 7-trihydroxyflavone) มีโครงสร้างทางเคมี ดังภาพที่ 14 เป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ในกลุ่มของ flavones ที่พบมากในผัก ผลไม้ และเครื่องดื่มที่ทำมาจากผลไม้ จากการศึกษาของ Birt *et al.* (1986, 1997) และ Fucks and Milbradt (1989) พบว่า อพิจินินมีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาการอักเสบและกระบวนการเกิดมะเร็งภายหลังการได้รับสารก่อมะเร็งหรือรังสี UV นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโต และยับยั้งวัฏจักรของเซลล์ รวมถึงสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ apoptosis ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งเต้านม และมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Yin *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000; Gupta *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังพบว่า สารอพิจินินสามารถป้องกันความเสียหายที่เกิดขึ้นกับสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอของ human lymphocyte ที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) (Siddique and Afzal, 2009)



ภาพที่ 14 โครงสร้างทางเคมีของสารอพิจินิน

ที่มา: Chemical Book (2008)

ในปี ค.ศ. 2001 Gupta *et al.* ค้นพบว่าสารอพิจินิน มีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ได้ในมะเร็งต่อมลูกหมากแต่จะไม่มีผลกับเซลล์ปกติ โดยนักวิจัยได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของสารอพิจินินต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด CA-HPV-10 และเซลล์ปกติชนิด PZ-HPV-7 ซึ่งพบว่า สารอพิจินินสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ CA-HPV-10 มากกว่าเซลล์ PZ-HPV-7 นอกจากนี้ยังทำการตรวจสอบการเกิด apoptosis ของเซลล์ด้วยวิธี DNA fragmentation assay โดยในระหว่างกระบวนการ apoptosis จะมีการสร้างเอนไซม์ endonucleases ขึ้นภายในเซลล์ ทำให้เกิดการแตกตัวของ genomic DNA ที่อยู่ใน nucleosomes ทำให้เกิดขึ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่าง ๆ กัน และเมื่อนำมาวิเคราะห์ผลด้วยการใช้ agarose gel electrophoresis จะปรากฏแถบของชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่าง ๆ

กัน โดยผลการทดลองพบว่า เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด CA-HPV-10 เมื่อได้รับสารอพิจีนินที่ความเข้มข้น 5, 10, 20  $\mu\text{M}$  จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารอพิจีนินนั้นสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ชนิด CA-HPV-10 เกิดการตายแบบ apoptosis ได้ ในขณะที่เซลล์ปกติชนิด PZ-HPV-7 เมื่อได้รับสารอพิจีนินที่ความเข้มข้นเดียวกับเซลล์ชนิด CA-HPV-10 จะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แม้ว่าจะได้รับสารอพิจีนินที่ความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$  ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดก็ตาม แสดงให้เห็นว่าสารอพิจีนินไม่เหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ชนิด PZ-HPV-7 ที่เป็นเซลล์ปกติ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสารอพิจีนินในการคัดเลือกการออกฤทธิ์ด้านการเจริญหรือเหนี่ยวนำให้เกิดการตายได้เฉพาะในเซลล์มะเร็ง ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญที่ต้องการในการคัดแปรผลของรังสีต่อเซลล์

Rithidech *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของสารอพิจีนินในการป้องกันการเกิดความเสี่ยงภัยกับโครโมโซมภายหลังการได้รับรังสีในเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างการให้สารอพิจีนินเพียงอย่างเดียวกับการให้สารอพิจีนินร่วมกับการฉายรังสีแกมมา จาก  $^{137}\text{Cs}$  ปริมาณรังสี 2 เกรย์ พบว่าการให้สารอพิจีนินเพียงอย่างเดียวนั้นไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในการเกิดไมโครนิวเคลียส แต่เมื่อให้สารอพิจีนินร่วมกับการฉายรังสี พบว่าเมื่อความเข้มข้นของอพิจีนินเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดไมโครนิวเคลียสลดลง ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาผลของสารอพิจีนินในการลดการเกิดไมโครนิวเคลียสจากการเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ในเซลล์เม็ดเลือดขาว ซึ่งพบว่าจำนวนไมโครนิวเคลียสของเซลล์ที่ได้รับสารอพิจีนินกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารอพิจีนินแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (Siddique and Afzal, 2009)

นอกจากนี้เมื่อทำการศึกษาบทบาทของสารอพิจีนินในการป้องกันความเสี่ยงของดีเอ็นเอจากรังสี โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ฉายรังสีเพียงอย่างเดียว เซลล์ที่ได้รับสารอพิจีนินในระหว่างการฉายรังสี และเซลล์ที่ให้สารอพิจีนินก่อนการฉายรังสีเป็นเวลา 30 นาทีแล้วเอาสารอพิจีนินออกก่อนการฉายรังสี พบว่าจำนวนไมโครนิวเคลียสที่เกิดในเซลล์ที่ฉายรังสีเพียงอย่างเดียวมีค่าใกล้เคียงกับเซลล์ที่ได้รับสารอพิจีนินก่อนการฉายรังสี ซึ่งเซลล์ทั้งสองกลุ่มนี้มีจำนวนไมโครนิวเคลียสมากกว่าในเซลล์ที่ได้รับสารอพิจีนินระหว่างการฉายรังสี ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าสารอพิจีนิน มีบทบาทในการป้องกันความเสี่ยงที่เกิดกับโครโมโซมในระหว่างการฉายรังสี (Rithidech *et al.*, 2005)

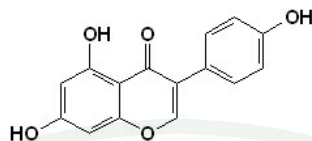
จากการศึกษาคุณสมบัติของสารอพิจีนินในการเป็นสารเพิ่มความไวต่อรังสี (radiosensitizer) ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด SQ-5 ของ Watanabe *et al.* (2007) ซึ่งทำการศึกษาโดยเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มเซลล์กับสารอพิจีนินที่ความเข้มข้น 40  $\mu\text{M}$  เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

จากนั้นจึงทำการฉายรังสีเอกซ์ แล้วนำไปบ่มเลี้ยงต่ออีก 8 ชั่วโมง จึงนำมาวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์ ด้วยวิธี clonogenic cell survival assay พบว่าในเซลล์ที่ได้รับสารอพิจีนินจะมีความไวต่อรังสีเพิ่มมากขึ้น หรือมีความอยู่รอดลดลงเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่เติมสารอพิจีนิน และจากการวิเคราะห์การตายแบบ apoptosis และ necrosis ของเซลล์ SQ-5 ที่ได้รับการฉายรังสีปริมาณ 6 เกรย์ พบว่า ในเซลล์ที่ได้รับสารอพิจีนินจะมีการตายแบบ apoptosis และ necrosis มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ให้สารอพิจีนินเพียงอย่างเดียวหรือฉายรังสีเอกซ์เพียงอย่างเดียว

## 2. จินิสติน (genistein)

จินิสติน (4', 5, 7-Trihydroxyisoflavone) มีโครงสร้างทางเคมี ดังภาพที่ 15 เป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ในกลุ่ม isoflavone พบมากในถั่วและผลิตภัณฑ์จากถั่ว สารจินิสติน สามารถยับยั้งการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ tumor cell ได้ นอกจากนี้ยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ได้ในเซลล์บางชนิด (Wu and Chan, 2007)

จากการศึกษาของ Hillman *et al.* (2001) เกี่ยวกับความสามารถของสารจินิสตินในการเพิ่มความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 เมื่อได้รับรังสี photon หรือ neutron โดยทำการบ่มสารจินิสตินกับเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการฉายรังสี photon หรือ neutron ที่ปริมาณรังสีต่าง ๆ แล้วนำมาวิเคราะห์ความอยู่รอดด้วยวิธี colony assay พบว่าสารจินิสตินสามารถลดการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด PC-3 ได้ โดยเมื่อความเข้มข้นของสารเพิ่มขึ้น การรอดชีวิตหรือจำนวนโคโลนีของเซลล์ลดลงแสดงให้เห็นว่าการให้สารจินิสตินร่วมกับการฉายรังสี photon นั้น สามารถลดจำนวนโคโลนีได้มากที่สุด โดยมีจำนวนโคโลนีเพียงร้อยละ 26 และการให้สารจินิสตินร่วมกับการให้รังสี neutron นั้นสามารถลดจำนวนโคโลนีได้มากที่สุดเช่นกัน แสดงให้เห็นว่า การให้สารจินิสตินร่วมกับการฉายรังสี photon หรือ neutron นั้นสามารถลดการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด PC-3 ได้



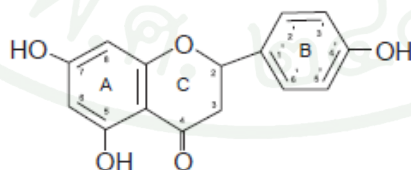
ภาพที่ 15 โครงสร้างทางเคมีของสารจินีสติน

ที่มา: Supplementscience (2012)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Shin *et al.* (2008) เกี่ยวกับความสามารถของสารจินีสตินในการเพิ่มความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki โดยพิจารณาจากการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็งภายหลังการได้รับรังสีแกมมาปริมาณรังสี 10 เกรย์ ซึ่งพบว่าสารจินีสตินนั้นสามารถเพิ่มการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ได้

### 3. นาริงจีนิน (naringenin)

นาริงจีนิน (4', 5, 7-trihydroxyflavanone) มีโครงสร้างทางเคมี ดังภาพที่ 16 เป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ในกลุ่ม flavanone พบมากในผลของต้นไม้ในตระกูล citrus และมะเขือเทศ มีคุณสมบัติในการป้องกันความเสียหายที่เกิดขึ้นกับเซลล์เนื่องมาจาก reactive oxygen species เช่น superoxide anion radicals, hydroxyl radicals และ peroxy radicals (Nagy *et al.*, 2008)



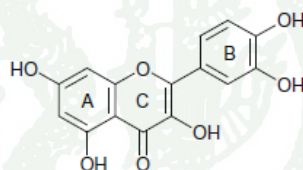
ภาพที่ 16 โครงสร้างทางเคมีของสารนาริงจีนิน

ที่มา: Nagy *et al.* (2008)

จากการศึกษาของ El-Mahdy *et al.* (2007) ถึงความสามารถในการป้องกันการตายของเซลล์ HaCaT เมื่อได้รับรังสี UVB โดยบ่มเซลล์กับสารนาริงจินิกินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำไปฉายรังสี UVB 15 mJ cm<sup>-2</sup> หรือ 30 mJ cm<sup>-2</sup> แล้วนำไปวิเคราะห์ความอยู่รอดด้วยวิธี colony formation assay ซึ่งพบว่าสารนาริงจินิกินที่ความเข้มข้น 5 และ 10 μM สามารถเพิ่มจำนวนโคโลนีที่รอดชีวิตได้ร้อยละ 53 และ 68 ตามลำดับ ในชุดที่ให้รังสี UVB 30 mJ cm<sup>-2</sup>

#### 4. เคอร์เซทิน (quercetin)

เคอร์เซทิน (3, 3', 4', 5, 7-pentahydroxyflavone) มีโครงสร้างทางเคมี ดังภาพที่ 17 เป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ในกลุ่มของ flavonol พบมากในหัวหอม แอปเปิ้ล บร็อคโคลี่ ไวน์ และชา (Williamson *et al.*, 1996) มีคุณสมบัติในการเป็นสารกำจัด superoxide radical และ hydroxyl radical ลด lipid peroxy radical และสามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation (Ishida *et al.*, 2005)



ภาพที่ 17 โครงสร้างทางเคมีของเคอร์เซทิน

ที่มา: Fahlman and Krol (2009)

Devipriya *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษาศักยภาพของสารเคอร์เซทินในการป้องกันความเสียหายที่เกิดขึ้นกับดีเอ็นเอใน plasmid DNA และ human peripheral blood lymphocytes เมื่อได้รับรังสีแกมมาจากต้นกำเนิดรังสี Co-60 เมื่อทำการศึกษาผลของสารเคอร์เซทินในการป้องกันความเสียหายของ plasmid DNA โดยบ่ม plasmid DNA pBR322 กับสารละลายสารเคอร์เซทินที่ความเข้มข้น 3-48 μM เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำการฉายรังสีแกมมาจาก Co-60 ปริมาณรังสี 6 เกรย์ จากนั้นจะนำมาทำ gel electrophoresis เพื่อวิเคราะห์การแตกหักที่เกิดขึ้นกับ plasmid DNA pBR322 แล้วนำมาคำนวณเป็นร้อยละของการป้องกันความเสียหาย ซึ่งได้ผลคือเมื่อความเข้มข้นของสารเคอร์เซทินมากขึ้น ร้อยละของการป้องกันความเสียหายก็จะเพิ่มขึ้นตามไปด้วย และมีค่ามากที่สุดที่ 24 μM และเมื่อทำการศึกษาผลของสารเคอร์เซทิน (ความเข้มข้น 24 μM) ต่อการเกิดไมโครนิวเคลียสในเซลล์ human peripheral blood

lymphocytes เมื่อได้รับรังสีแกมมาจาก Co-60 ที่ปริมาณรังสีต่าง ๆ โดยบ่มสารละลายสารเคอร์เซทินที่ความเข้มข้น 24  $\mu\text{M}$  กับ human peripheral blood lymphocytes ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปฉายรังสีที่ปริมาณรังสี 1, 2, 3 และ 4 เกรย์ ตามลำดับ และนำไปบ่มต่ออีก 1 ชั่วโมง จึงนำไปวิเคราะห์การเกิดไมโครนิวเคลียสด้วยวิธี cytokinesis-blocked micronucleus (CBMN) พบว่าสารเคอร์เซทินสามารถช่วยลดการเกิดไมโครนิวเคลียสได้ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ได้รับการฉายรังสีเพียงอย่างเดียว โดยจำนวนไมโครนิวเคลียสที่เกิดขึ้นในชุดการทดลองที่ให้สารเคอร์เซทิน ร่วมกับการฉายรังสีที่ปริมาณรังสี 1, 2, 3 และ 4 เกรย์ นั้นมีความแตกต่างจากชุดควบคุมที่ได้รับสารเคอร์เซทินเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญ

Olson *et.al.* (2008) ทำการศึกษาความสามารถของสารเคอร์เซทินในการเพิ่มการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ human keratinocyte ชนิด HaCaT เมื่อได้รับรังสี UVB พบว่าสารเคอร์เซทิน สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการให้สารเคอร์เซทินหรือการฉายรังสีเพียงอย่างเดียว

การศึกษาของ Pastore *et al.* (2009) เกี่ยวกับสารเคอร์เซทินในการป้องกันการตายแบบ necrosis ในเซลล์ human keratinocyte ชนิด HaCaT เมื่อได้รับรังสี UVC โดยพบว่าสารเคอร์เซทิน ความเข้มข้น 25  $\mu\text{M}$  สามารถป้องกันการตายแบบ necrosis ในเซลล์ HaCaT เมื่อได้รับรังสี UVC ได้ ร้อยละ  $26 \pm 8$  เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ฉายรังสี

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

1. เซลล์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ คือเซลล์มะเร็งรังไข่ของมนุษย์แบบเซลล์เล็ก (human small-cell lung cancer cell) ที่ประกอบด้วยเซลล์ GLC<sub>4</sub> ที่เป็นเซลล์ต้นแบบ และเซลล์ GLC<sub>4</sub>/Adr เป็นเซลล์ที่แยกได้จากการคัดเลือกโดยการเลี้ยงในอาหารที่มียาต้านมะเร็ง Doxorubicin (adriamycin) ซึ่งจะเพิ่มความเข้มข้นของยา Doxorubicin ไปจนถึง 1.2  $\mu$ M เซลล์ทั้งสองชนิดนี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. M. GARRIGOS (Laboratoire des protéine membranaires, iBiTecS, SB<sup>2</sup>SM, CEA Saclay, France)

### 2. อุปกรณ์

- 2.1 Microplate Reader บริษัท Biochrome Ltd. รุ่น Expert Plus Microplate Reader
- 2.2 96 well culture cluster บริษัท Corning Incorporated
- 2.3 เครื่องปั่นตกตะกอน บริษัท Hettich รุ่น zentrifugen D-78523
- 2.4 ตู้ปลอดเชื้อ (Biohazard) บริษัท Holten Lamin Air รุ่น HVR 2448
- 2.5 ตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ CO<sub>2</sub> incubator บริษัท Heal Force รุ่น HF 151 UV
- 2.6 กล้องจุลทรรศน์ชนิด Invert microscope บริษัท Nikon JAPAN รุ่น DIAPHOT
- 2.7 กล้องจุลทรรศน์ชนิด Light microscope บริษัท Olympus รุ่น CH30RF200
- 2.8 แผ่นสไลด์ heamacytometer บริษัท Neubauer
- 2.9 เครื่องชั่งความละเอียด 0.1 มิลลิกรัม
- 2.10 Micropipette ขนาด 20, 100, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
- 2.11 Microtube 1.5 มิลลิลิตร
- 2.12 Pipette ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร
- 2.13 Syringe filter ขนาด 0.20 ไมครอน
- 2.14 Syringe ขนาด 3 มิลลิลิตร
- 2.15 Centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร

### 3. สารเคมี

- 3.1 อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI + GlutaMAX™-1 (Gibco)
- 3.2 Heat inactivated fetal bovine serum (Gibco)
- 3.3 ยาปฏิชีวนะผสมของ streptomycin และ penicillin G (Gibco)
- 3.4 สารละลายบัฟเฟอร์ของเกลือฟอสเฟต (PBS) (Gibco)
- 3.5 Resazurin Sodium Salt ( $C_{12}H_6NNaO_4$ , F.W. 251.18 g/mol) (SIGMA)
- 3.6 Doxorubicin hydrochloride ( $C_{27}H_{29}NO_{11} \cdot HCl$ , M.W. 580 g/mol, pure = 98%) (SIGMA-ALDRICH)
- 3.7 อพิจีนิน (M.W. 270.2 g/mol, pure = 99.0%) (CALBIOCHEM)
- 3.8 จินิสติน (M.W. 270.2 g/mol, pure = 99.4%) (CALBIOCHEM)
- 3.9 เคอร์เซทิน hydrate ( $C_{15}H_{10}O_7 \cdot xH_2O$ , M.W. 302.24) (SIGMA-ALDRICH)
- 3.10 นาริงจีนิน ( $C_{15}H_{12}O_5$ , M.W. 272.26 g/mol) (SIGMA-ALDRICH)
- 3.11 Dimethyl sulfoxide ( $C_2H_6OS$ , M.W. = 78.13 g/mol) (Riedel-deHaën®)

4. เครื่องฉายรังสีแกมมา Mark I (MARK I Irradiator) ณ ศูนย์วิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ใช้ธาตุซีเซียม-137 ( $Cs-137$ ) เป็นต้นกำเนิดรังสีแกมมา

### วิธีการ

#### 1. การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์แบบเซลล์เล็ก (Human small cell lung cancer cell lines) ในห้องปฏิบัติการ

เซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์แบบเซลล์เล็กที่ใช้ในการศึกษานี้มี 2 ชนิด คือ  $GLC_4$  และ  $GLC_4/Adr$  โดยชนิดแรกเป็นเซลล์ต้นแบบ ส่วนเซลล์ชนิดที่สองได้จากการคัดเลือกโดยเลี้ยงในอาหารที่เติมยาต้านมะเร็ง Doxorubicin ซึ่งจะเพิ่มความเข้มข้นของยาต้านมะเร็งไปจนถึง  $1.2 \mu M$  ตามลำดับ โดยทั้งสองชนิดจะเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการในตู้  $CO_2$  incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95 ความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5

ในการศึกษาได้นำเซลล์ทั้งสองชนิดมาเลี้ยงให้อยู่ในระยการเจริญแบบก้ำวหน้า โดยเลี้ยงในอาหาร RPMI + GlutaMAX™ ที่มีการเติม heat inactivation bovine serum (ร้อยละ 10) sodium pyruvate (100 หน่วยต่อมิลลิลิตร) ยาปฏิชีวนะผสมของ penicillin G (100 หน่วยต่อมิลลิลิตร) และ streptomycin (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แล้วนำไปเลี้ยงในตู้ CO<sub>2</sub> incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95 ความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 ทั้งนี้สำหรับการเลี้ยงเซลล์ GLC<sub>4</sub>/Adr ได้เลี้ยงในอาหารที่มีการเติมยาต้านมะเร็ง Doxorubicin ความเข้มข้น 1.2 μM และก่อนจะนำมาทำการทดลองได้งดให้ยาต้านมะเร็ง Doxorubicin เป็นเวลา 11 วัน

## 2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี resazurin assay

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี resazurin assay ได้ให้ความสำคัญกับความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมที่จะใช้ในการวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์ภายหลังจากเซลล์ได้รับ/สัมผัสสิ่งก่อพิษ และระยะเวลาการบ่มเซลล์ภายหลังการเติมสี resazurin ที่เป็น indicator เพื่อให้ได้สัญญาณการวัดที่เหมาะสม

ในการประเมินความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสม ได้เลี้ยงเซลล์แต่ละชนิดให้อยู่ในช่วงการเจริญแบบก้ำวหน้าก่อนจะเตรียมเซลล์ให้มีความหนาแน่นในช่วง 0 ถึง 10,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ก่อนจะเติมลงในถาดเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุมแล้ว นำไปเลี้ยงในตู้ CO<sub>2</sub> incubator เป็นเวลา 96 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบความอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี resazurin assay (McBride *et al.*, 2005) โดยเติมสี resazurin แล้วนำไปบ่มเลี้ยงในสภาวะเดิมก่อนจะนำออกมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 และ 600 nm ทุก ๆ 1 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง Microplate Reader (Expert Plus Microplate Reader, Biochrome Ltd) และใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ และสี resazurin เป็น negative control แล้วนำไปคำนวณเป็น percent of resazurin reduction โดยใช้สมการ

$$\% \text{ resazurin reduction} = \frac{[(\text{ox}\lambda_2)(A\lambda_2)] - [(\text{ox}\lambda_1)(A\lambda_2)]}{[(\text{red}\lambda_1)(A\lambda_1)] - [(\text{red}\lambda_2)(A\lambda_1)]} \times 100 \quad (5)$$

$E_{\text{red}} \lambda_1$  คือ molar extinction coefficient ของ reduced resazurin ที่ความยาวคลื่น 570 nm มีค่าเท่ากับ 155,677

$E_{red} \lambda_2$  คือ molar extinction coefficient ของ reduced resazurin ที่ความยาวคลื่น 600 nm มีค่าเท่ากับ 14,652

$E_{ox} \lambda_1$  คือ molar extinction coefficient ของ oxidized resazurin ที่ความยาวคลื่น 570 nm มีค่าเท่ากับ 80,586

$E_{ox} \lambda_2$  คือ molar extinction coefficient ของ oxidized resazurin ที่ความยาวคลื่น 600 nm มีค่าเท่ากับ 117,216

$A\lambda_1$  คือ ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 570 nm

$A\lambda_2$  คือ ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 600 nm

$A'\lambda_1$  คือ ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของ negative control ที่ความยาวคลื่น 570 nm

$A'\lambda_2$  คือ ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของ negative control ที่ความยาวคลื่น 600 nm

เมื่อคำนวณ percent reduction of resazurin แล้วนำมาคำนวณสัดส่วนของเซลล์ที่รอดชีวิต (Survival Fraction) จากสมการ

$$\text{Survival Fraction} = \frac{\% \text{resazurin reduction}_{\text{test}}}{\% \text{resazurin reduction}_{\text{control}}} \times 100 \quad (6)$$

### 3. การทดสอบความเป็นพิษของยาต้านมะเร็ง Doxorubicin ด้วยวิธี resazurin assay

เลี้ยงเซลล์ GLC<sub>4</sub> และ GLC<sub>4</sub>/Adr ในห้อยู่ในระหว่างการเจริญแบบก้ำวหน้า จากนั้นเตรียมเซลล์ให้มีความหนาแน่น 2,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ 5,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำลงเลี้ยงในถาดเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้ CO<sub>2</sub> incubator ที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95 ความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาเติมยาต้านมะเร็ง Doxorubicin ที่มีความเข้มข้นในช่วง 0 – 10 ไมโครโมลาร์ จากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้ CO<sub>2</sub> incubator ที่สภาวะเดิม เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี resazurin assay แล้วนำมา

ประเมินค่า  $IC_{50}$  (50% inhibition concentration, ความเข้มข้นของยาต้านมะเร็ง Doxorubicin ที่สามารถลดการเจริญของเซลล์ได้ร้อยละ 50) จากกราฟความสัมพันธ์ของความอยู่รอดของเซลล์กับความเข้มข้นของยาต้านมะเร็ง Doxorubicin และ resistant factor (RF) จากสมการ (Reungpattanaphong *et al.*, 2003; Choiprasert *et al.*, 2010) เพื่อประเมินประสิทธิภาพของวิธี resazurin assay ในการวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์ โดยเปรียบเทียบกับวิธี MTT assay ของ Palakas *et al.* (2009) และ Mavel *et al.* (2006)

$$\text{Resistant Factor (RF)} = \frac{IC_{50} \text{ of resistant cells (GLC}_4\text{/Adr)}}{IC_{50} \text{ of sensitive cells (GLC}_4\text{)}} \quad (7)$$

#### 4. การศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์แบบเซลล์เล็ก

เลี้ยงเซลล์ GLC<sub>4</sub> และ GLC<sub>4</sub>/Adr ให้อยู่ในระหว่างการเจริญแบบก้ำวหน้า จากนั้นเตรียมเซลล์ ให้มีความหนาแน่น 2,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ 5,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วนำไปฉายรังสีที่อุณหภูมิห้องโดยใช้ปริมาณรังสี 0 - 4 เกรย์ (อัตรารังสี 4.33 เกรย์ต่อนาที) ทั้งนี้อัตราและปริมาณรังสีที่ใช้ได้จากการวัดปริมาณรังสีด้วยวิธี Fricke dosimetry (de Austerlitz *et al.*, 2006) จากนั้นนำกลับมาเลี้ยงในตู้ CO<sub>2</sub> incubator ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นร้อยละ 95 ความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตโดยวิธี resazurin assay โดยใช้ชุดการทดลองที่ไม่ผ่านการฉายรังสีเป็นชุดควบคุม

#### 5. การศึกษาความเป็นพิษของสารประกอบฟลาโวนอยด์ในเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์แบบเซลล์เล็ก

เลี้ยงเซลล์ GLC<sub>4</sub> และ GLC<sub>4</sub>/Adr ให้อยู่ในระหว่างการเจริญแบบก้ำวหน้า จากนั้นเตรียมเซลล์ ให้มีความหนาแน่น 2,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ 5,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำลงเลี้ยงในถาดเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้ CO<sub>2</sub> incubator ที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95 ความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาเติมสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่ต้องการทดสอบซึ่งประกอบด้วย สารอพิจินิน จินิสติน นาริงจินิน และเคอร์เซทิน ที่มีความเข้มข้นในช่วง 0 - 100  $\mu\text{M}$  จากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้ CO<sub>2</sub> incubator ที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95 ความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อีกเป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำมาวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี resazurin assay โดยใช้ชุดการทดลองที่ไม่เติมสารประกอบฟลาโวนอยด์เป็นชุดควบคุม ทำการศึกษาอย่างเป็นอิสระต่อกัน 3 ชุดการทดลอง แต่ละชุด

การทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ และทำการคัดเลือกสารประกอบฟลาโวนอยด์เพื่อที่จะใช้ในการศึกษาผลของสารประกอบฟลาโวนอยด์ต่อความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์แบบเซลล์เล็ก

## 6. การศึกษาผลของสารอพิจีนินต่อความไวต่อรังสีในเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์แบบเซลล์เล็ก

การศึกษาผลของสารอพิจีนินต่อความไวรังสีของเซลล์ จะแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มการทดลอง ประกอบด้วย กลุ่มควบคุม (ฉายรังสีเพียงอย่างเดียว) กลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารอพิจีนินก่อนการฉายรังสีเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง กลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารอพิจีนินก่อนการฉายรังสีเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง และกลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารอพิจีนินหลังจากการฉายรังสีเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยกลุ่มที่ให้สารอพิจีนินก่อนการฉายรังสี 24 และ 72 จะทำการเลี้ยงเซลล์ให้อยู่ในระยะเวลาการเจริญแบบก้าวหน้าในสภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95 ความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 แล้วเติมสารอพิจีนินในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 24 และ 72 ชั่วโมง ก่อนนำมาฉายรังสี ปริมาณรังสี 0 – 4 เกรย์ จากนั้นนำมาเลี้ยงในถาดเลี้ยงเซลล์ นำไปเลี้ยงในตู้ CO<sub>2</sub> incubator ที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95 ความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 อีกเป็นเวลา 96 ชั่วโมง จึงนำมาวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี resazurin assay

ในกลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารอพิจีนินหลังการฉายรังสี 24 ชั่วโมง หลังจากนำเซลล์ที่อยู่ในระยะเวลาการเจริญแบบก้าวหน้ามาฉายรังสีปริมาณรังสี 0 – 4 เกรย์ แล้วได้นำมาเลี้ยงในถาดเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในตู้ CO<sub>2</sub> incubator จากนั้นจึงเติมสารอพิจีนิน แล้วนำมาเลี้ยงต่อในตู้ CO<sub>2</sub> incubator อีกเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จึงนำมาวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี resazurin assay

## 7. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์ภายหลังการได้รับสัมผัสสิ่งก่อพิษต่อเซลล์ รวมทั้งการประมาณค่าความเข้มข้นของสารประกอบฟลาโวนอยด์และปริมาณรังสีที่ลดความอยู่รอดของเซลล์ลงร้อยละ 50 (IC<sub>50</sub> และ LD<sub>50</sub>) อธิบายค่าโดยใช้สถิติพรรณนา เช่น ค่าร้อยละ ค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน สำหรับการวิเคราะห์ความแตกต่างผลของสารอพิจีนินต่อความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์แบบเซลล์เล็ก โดยใช้วิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (completely randomized design: CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลองโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range test ด้วย R program (ชูศักดิ์, 2552)

## สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

### 1. สถานที่ทำการวิจัย

ศูนย์วิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

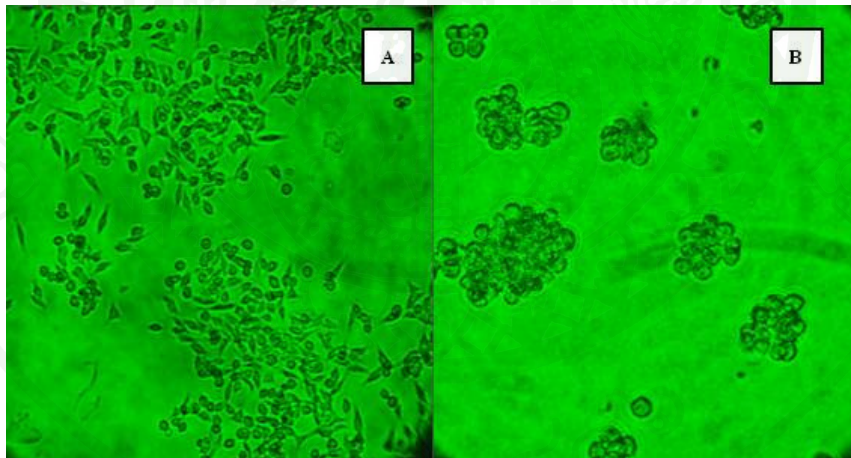
### 2. ระยะเวลาทำการวิจัย

เริ่มตั้งแต่ เดือน มิถุนายน 2552 ถึง เดือน กุมภาพันธ์ 2556

## ผลและวิจารณ์

### 1. สภาพที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี resazurin assay โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

เซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์แบบเซลล์เดี่ยวที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีลักษณะพื้นฐานดังภาพที่ 18 โดยเซลล์ GLC<sub>4</sub> มีลักษณะเป็นรูปกระสวย เกาะอยู่ติดพื้นผิวของภาชนะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ เมื่อแบ่งตัวจะขยายไปทางด้านข้างตามแนวราบ ส่วน GLC<sub>4</sub>/Adr มีลักษณะเป็นทรงกลมลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ และเมื่อแบ่งตัวไปเรื่อย ๆ จะมีลักษณะเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่นลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ จากการที่เซลล์ทั้งสองชนิดมีลักษณะพื้นฐานวิทยาที่แตกต่างกันการประเมินความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นจึงเป็นสิ่งจำเป็นในการนำวิธีการวิเคราะห์นี้ไปใช้

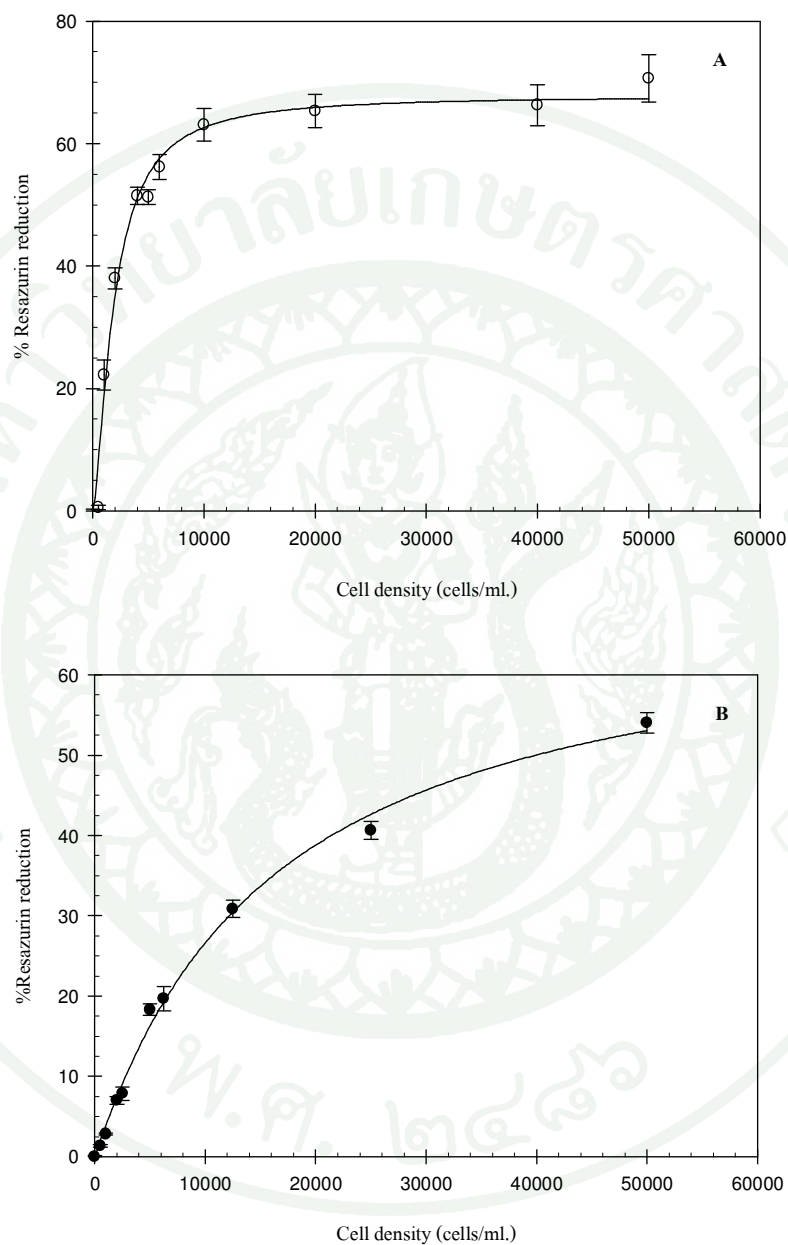


ภาพที่ 18 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์แบบเซลล์เดี่ยวชนิด GLC<sub>4</sub> (A) และ GLC<sub>4</sub>/Adr (B) (กำลังขยาย 400X)

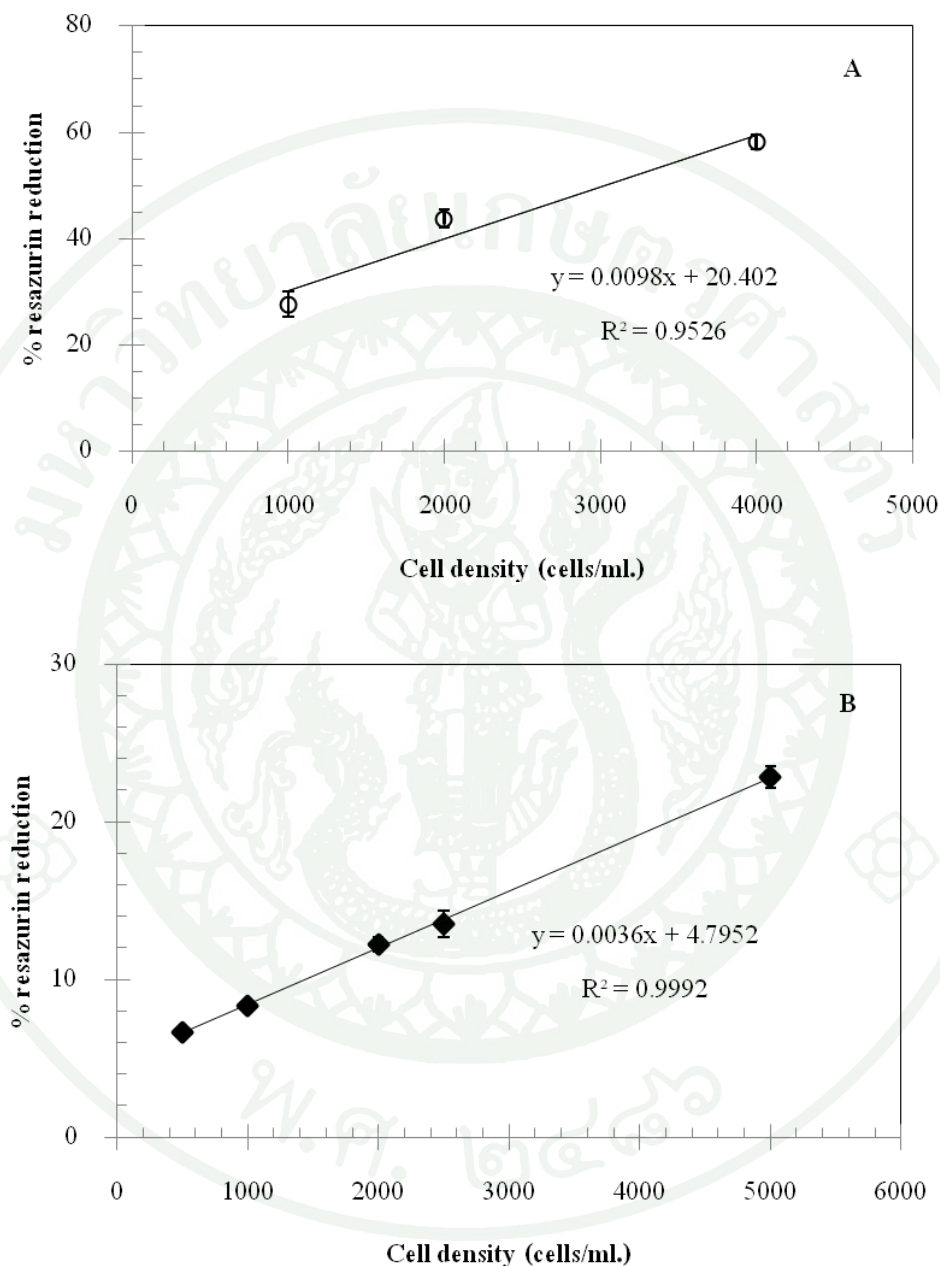
ผลการศึกษาความหนาแน่นของเซลล์มะเร็งเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาความอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี resazurin assay ที่ระยะเวลาการเลี้ยงเซลล์ 96 ชั่วโมง ของเซลล์ GLC<sub>4</sub> และ GLC<sub>4</sub>/Adr ได้แสดงในภาพที่ 19 (A-B) พบว่า สัดส่วนการรีดิวซ์ resazurin เพิ่มขึ้น เมื่อเวลาในการบ่มเซลล์กับ resazurin เพิ่มขึ้น โดยความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมจะพิจารณาจากช่วงที่การรีดิวซ์ของสาร resazurin

เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น ซึ่งเมื่อพิจารณาจากภาพที่ 19 แล้วพบว่าช่วงที่เซลล์มีการรีดิวซ์สาร resazurin เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นนั้นดังแสดงในภาพที่ 20 (A-B) มีค่าอยู่ในช่วง 1,000-4,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ 500-5,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สำหรับเซลล์ GLC<sub>4</sub> และ GLC<sub>4</sub>/Adr ตามลำดับ สำหรับผลการศึกษาระยะเวลาในการบ่มเซลล์ในสภาพที่มีสาร resazurin ที่ระยะเวลาในการบ่ม 0-8 ชั่วโมง (ภาพที่ 21) พบว่า ค่าการรีดิวซ์สาร resazurin มีค่าเพิ่มขึ้นโดยเป็นสัดส่วนโดยตรงกับระยะเวลาในการบ่ม ซึ่งอธิบายได้ว่าเมื่อเวลาการบ่มเซลล์กับสาร resazurin เพิ่มขึ้น ค่าการรีดิวซ์สาร resazurin มีค่าเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการตรวจวัดสัญญาณของสาร resazurin ที่เกิดขึ้นได้เพิ่มตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น จึงได้เลือกระยะเวลาที่ใช้บ่มเซลล์กับ resazurin เท่ากับ 4 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามสาร resazurin ที่ใช้เป็น indicator นั้น จะถูกรีดิวซ์เป็นสาร resorufin จะให้สัญญาณเป็น fluorescence แต่ในการศึกษาสถานะที่เหมาะสมครั้งนี้จะทำการวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer จึงได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของวิธี resazurin assay ในการวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์ด้วยการนำไปศึกษาความเป็นพิษของยาต้านมะเร็ง Doxorubicin ต่อไป

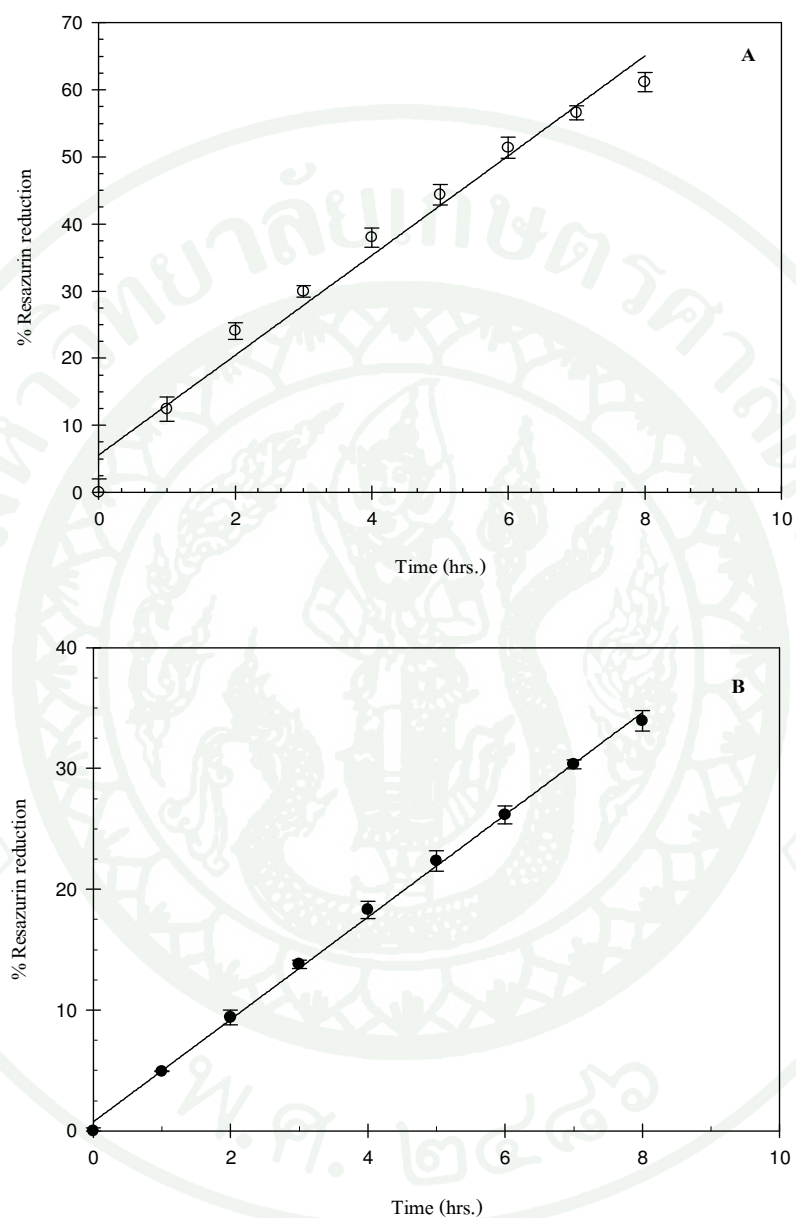
ในการนำผลการศึกษาความหนาแน่นของเซลล์มะเร็งเริ่มต้นที่เหมาะสมมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาขั้นต่อไป จะเลือกใช้ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นที่อยู่ในช่วงที่เซลล์มีการรีดิวซ์สาร resazurin เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น โดยจะเตรียมเซลล์ GLC<sub>4</sub> และ GLC<sub>4</sub>/Adr ให้มีความหนาแน่นเท่ากับ 2,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ 5,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับในการศึกษาต่อไป ซึ่งการวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์วิธีนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานได้หลากหลาย อาทิเช่น mitochondrial function, quantity/proliferation ของเซลล์ที่มีชีวิต และการทดสอบความเป็นพิษของสารต่าง ๆ ในเซลล์ เป็นต้น (Rolón *et al.*, 2006)



**ภาพที่ 19** ค่าการรีดิวซ์สาร resazurin ของเซลล์ GLC<sub>4</sub> (A) และเซลล์ GLC<sub>4</sub>/Adr (B) ที่มีความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นในช่วง 0 - 50,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันอย่างน้อย 6 การทดลอง แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ



ภาพที่ 20 ความหนาแน่นของเซลล์ GLC<sub>4</sub> (A) และ GLC<sub>4</sub>/Adr (B) ในช่วงที่การรีดิวซ์สาร resazurin เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันอย่างน้อย 6 การทดลอง แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ

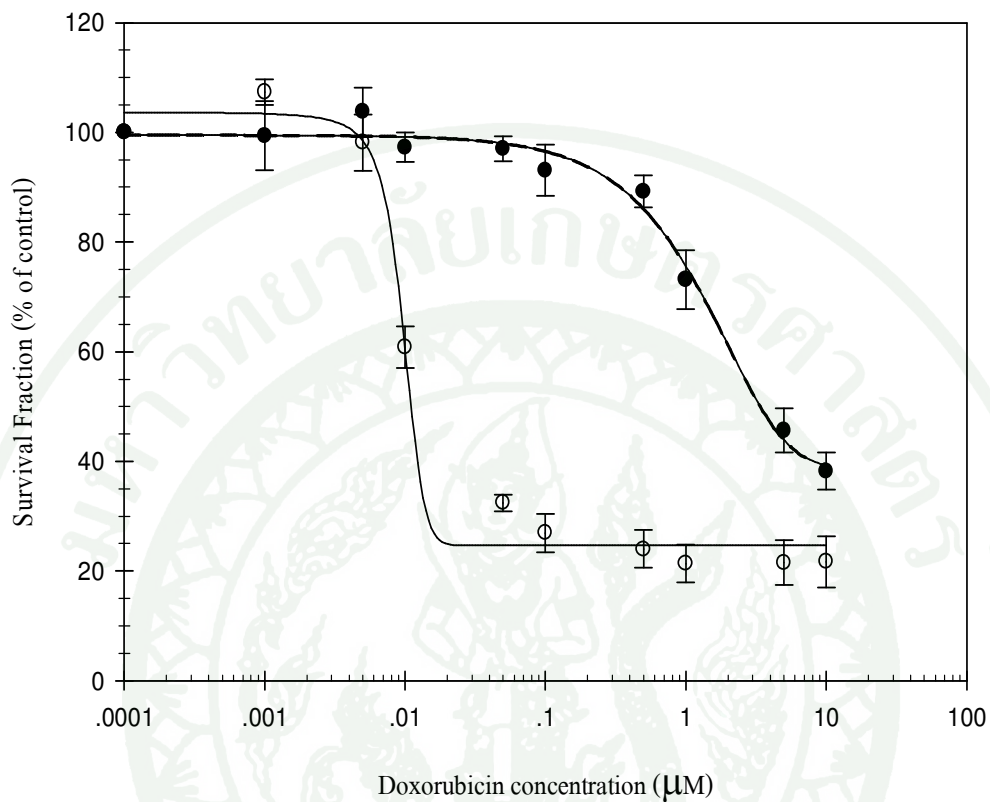


ภาพที่ 21 ค่าการรีดิวซ์สาร resazurin ของเซลล์ GLC<sub>4</sub> (A) และเซลล์ GLC<sub>4</sub>/Adr (B) ตามระยะเวลาของการบ่มเซลล์กับในสภาพที่มี resazurin ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันอย่างน้อย 6 การทดลอง แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ

## 2. ความเป็นพิษของยาต้านมะเร็ง Doxorubicin

เนื่องจากสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการรีดิวซ์ คือ resazurin และ resorufin เป็นสารที่มีสมบัติการวาวแสงหรือให้สัญญาณเป็นแบบ fluorescence แต่ในการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีการวัดสัญญาณโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันว่าวิธี resazurin assay สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์ภายหลังการได้รับสัมผัสสิ่งก่อพิษได้ จึงนำวิธีการวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์นี้ไปทำการทดสอบความเป็นพิษของยาต้านมะเร็ง Doxorubicin

ความอยู่รอดของเซลล์ GLC<sub>4</sub> และ GLC<sub>4</sub>/Adr ภายหลังการได้รับยาต้านมะเร็ง Doxorubicin ได้แสดงไว้ในภาพที่ 22 พบว่า เซลล์ทั้งสองชนิดมีการตอบสนองต่อยาต้านมะเร็ง โดยมีแนวโน้มการรอดชีวิตลดลงตามความเข้มข้นของยาที่เพิ่มขึ้น โดยเซลล์ GLC<sub>4</sub> มีความไวต่อยา Doxorubicin มากกว่า เซลล์ GLC<sub>4</sub>/Adr เมื่อวิเคราะห์ค่า IC<sub>50</sub> (ค่าความเข้มข้นของยาต้านมะเร็ง Doxorubicin ที่สามารถลดการเจริญของเซลล์ได้ร้อยละ 50) ดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่า เซลล์ชนิด GLC<sub>4</sub> และ GLC<sub>4</sub>/Adr มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ  $0.012 \pm 0.001 \mu\text{M}$  และ  $3.751 \pm 0.889 \mu\text{M}$  ตามลำดับ และมีค่า resistant factor เท่ากับ 320 ซึ่งค่า IC<sub>50</sub> และค่า Resistance Factor ของเซลล์ทั้งสองชนิดมีค่าใกล้เคียงกับในงานวิจัยของ Mavel *et al.* (2006) และ Palakas *et al.* (2009) แสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดชนิด GLC<sub>4</sub> และ GLC<sub>4</sub>/Adr ด้วยวิธี resazurin assay โดยใช้ spectrophotometer สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์เมื่อได้รับสัมผัสสิ่งก่อพิษได้



ภาพที่ 22 ความอยู่รอดของเซลล์ GLC<sub>4</sub> (O) และ GLC<sub>4</sub>/Adr (●) ภายหลังจากได้รับสัมผัสยาต้านมะเร็ง Doxorubicin ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันอย่างน้อย 3 การทดลอง แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ

ตารางที่ 4 ค่า  $IC_{50}$  และ Resistance Factor ของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์แบบเซลล์เดี่ยวชนิด  $GLC_4$  และ  $GLC_4/Adr$  ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี resazurin assay และ MTT assay

วิธีการทดสอบ	$IC_{50}$ <sup>1/</sup>		Resistance Factor
	$GLC_4$	$GLC_4/Adr$	
Resazurin assay	$0.012 \pm 0.001 \mu M$	$3.751 \pm 0.889 \mu M$	$320^{2/}$
MTT assay <sup>3/</sup>	$0.012 \pm 0.002 \mu M$	$3.553 \pm 0.247 \mu M$	310
MTT assay <sup>4/</sup>	$0.009 \pm 0.003 \mu M$	$3.1 \pm 0.3 \mu M$	340

หมายเหตุ <sup>1/</sup>  $IC_{50}$  ของยาต้านมะเร็ง Doxorubicin ที่ใช้วิธีการวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์ที่ต่างกัน ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันอย่างน้อย 3 การทดลอง แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ

<sup>2/</sup> Resistance Factor ของเซลล์  $GLC_4/Adr$  ที่ได้รับยาต้านมะเร็ง Doxorubicin คำนวณจากค่า  $IC_{50}$  ของเซลล์  $GLC_4/Adr$  หารด้วยค่า  $IC_{50}$  ของเซลล์  $GLC_4$

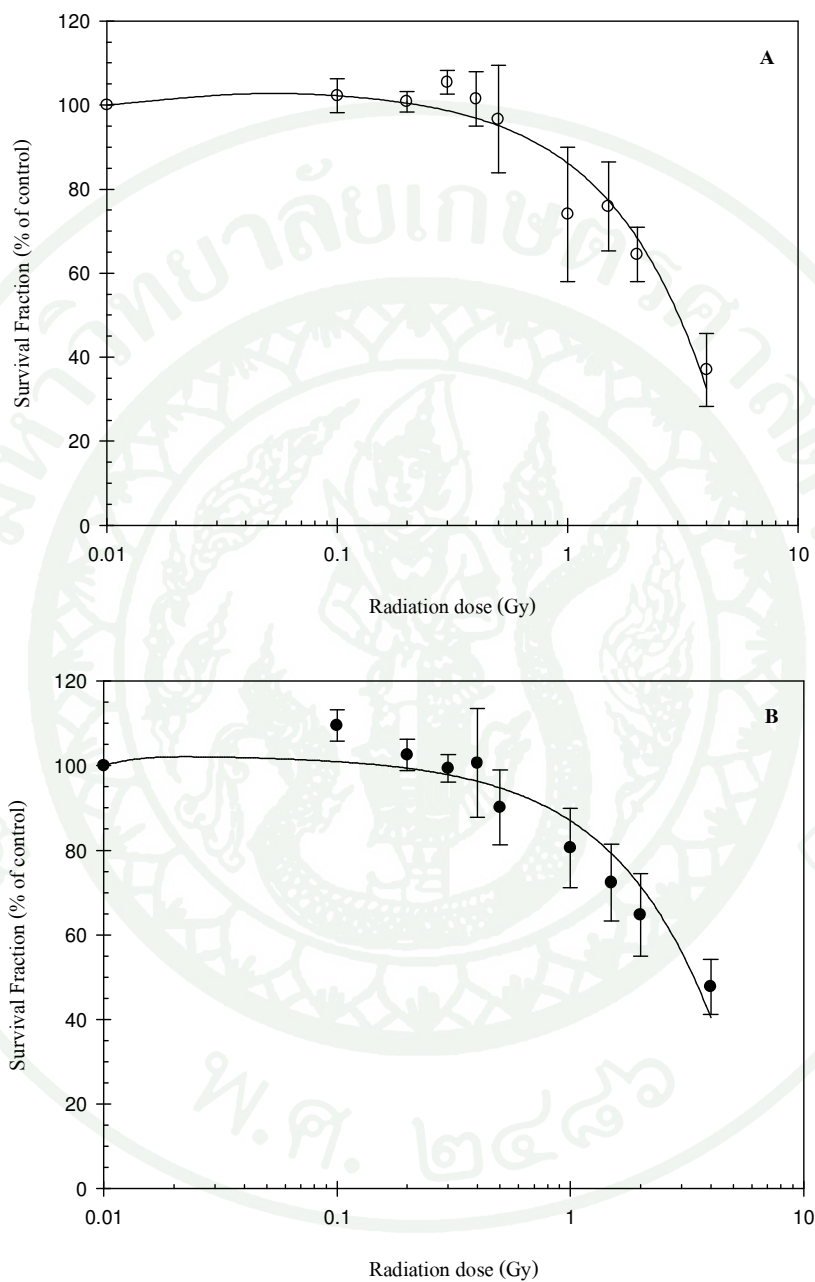
<sup>3/</sup> Palakas *et al.* (2009)

<sup>4/</sup> Mavel *et al.* (2006)

### 3. ผลของรังสีแกมมาต่อความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอด

ความอยู่รอดของเซลล์  $GLC_4$  และ  $GLC_4/Adr$  ภายหลังจากได้รับสัมผัสรังสีแกมมา เปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่ฉายรังสี ได้แสดงไว้ในภาพที่ 23 พบว่า เซลล์มีแนวโน้มการรอดชีวิตลดลงตามปริมาณรังสีที่เพิ่มขึ้น โดยมีการตอบสนองต่อรังสีแบบ dose-dependent manner เช่นเดียวกับรายงานการศึกษาเกี่ยวกับเซลล์มะเร็งชนิดอื่น เช่น เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa (Zhang *et al.*, 2006) เซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ชนิด SQ-5 (Watanabe *et al.*, 2007) squamous cell carcinoma cell ชนิด SKX และ เซลล์ human hypopharyngeal SCC ชนิด FaDu (Ulla *et al.*, 2009) และเซลล์ human glioblastoma ชนิด U87MG, U251MG และ GBM-3 (Chu *et al.*, 2011)

อย่างไรก็ตาม หากพิจารณาในรายละเอียดจะพบลักษณะของการกระตุ้นการเจริญ เนื่องจากการได้รับรังสีปริมาณต่ำหรือที่เรียกว่า hormesis (Mattson, 2008) โดยการที่เซลล์  $GLC_4$  ได้รับรังสีในปริมาณต่ำกว่า 0.4 เกรย์ ทำให้มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยก่อนจะมีการรอดชีวิตลดลงเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น ส่วนการได้รับรังสีของเซลล์  $GLC_4/Adr$  พบว่า ที่ปริมาณรังสี 0.1 – 0.2 เกรย์ เซลล์จะมีการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเช่นเดียวกัน จากนั้นการตอบสนองต่อรังสีของเซลล์  $GLC_4/Adr$  จะมีการรอดชีวิตลดลงตามปริมาณรังสีที่เพิ่มขึ้น เมื่อนำมาคำนวณค่า  $LD_{50}$  พบว่า  $LD_{50}$  ของเซลล์  $GLC_4$  มีค่าเท่ากับ  $2.332 \pm 0.359$  เกรย์ ส่วนเซลล์  $GLC_4/Adr$  มีค่าเท่ากับ  $3.185 \pm 0.856$  เกรย์ โดยเซลล์  $GLC_4$  มีความไวต่อรังสีมากกว่าเซลล์  $GLC_4/Adr$  ประมาณ 1.36 เท่า ทั้งนี้เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย พบว่าค่า  $LD_{50}$  ของเซลล์ทั้งสองชนิดมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

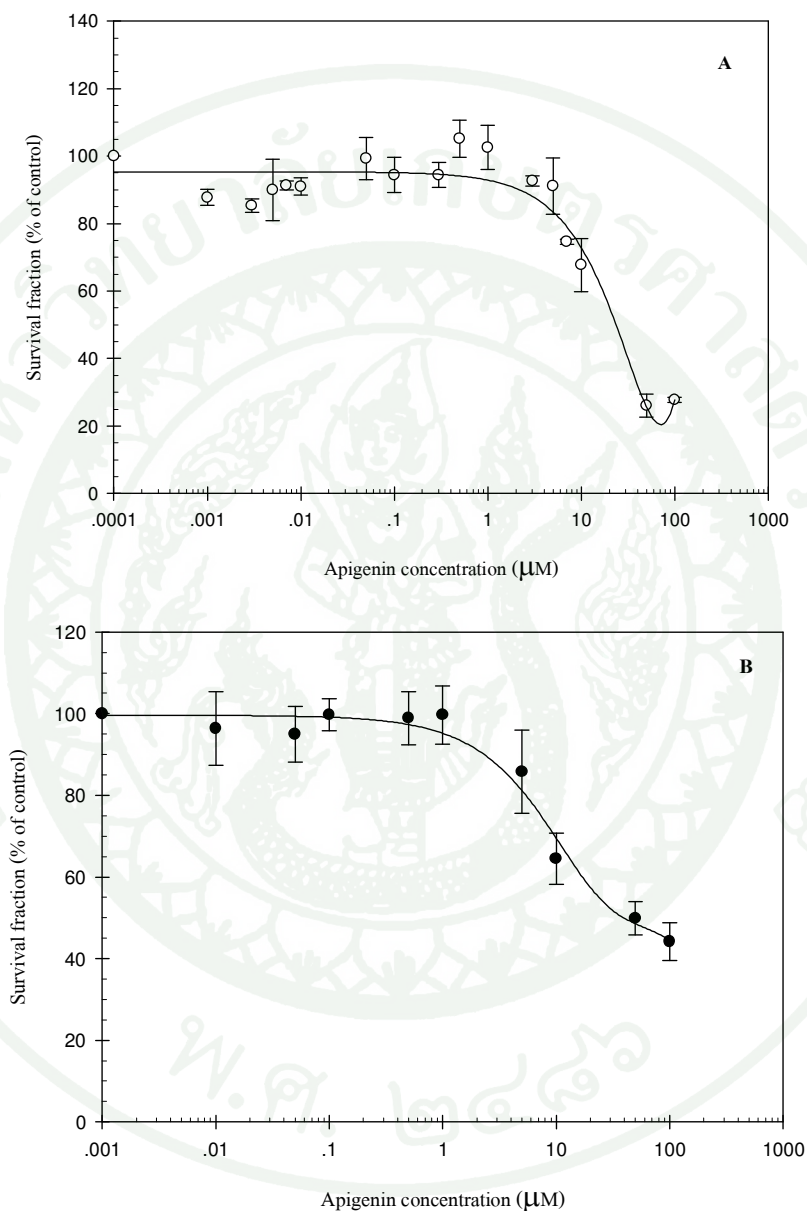


ภาพที่ 23 ความอยู่รอดของเซลล์ GLC<sub>4</sub> (A) และเซลล์ GLC<sub>4</sub>/Adr (B) เมื่อได้รับรังสี ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันอย่างน้อย 16 การทดลอง แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ

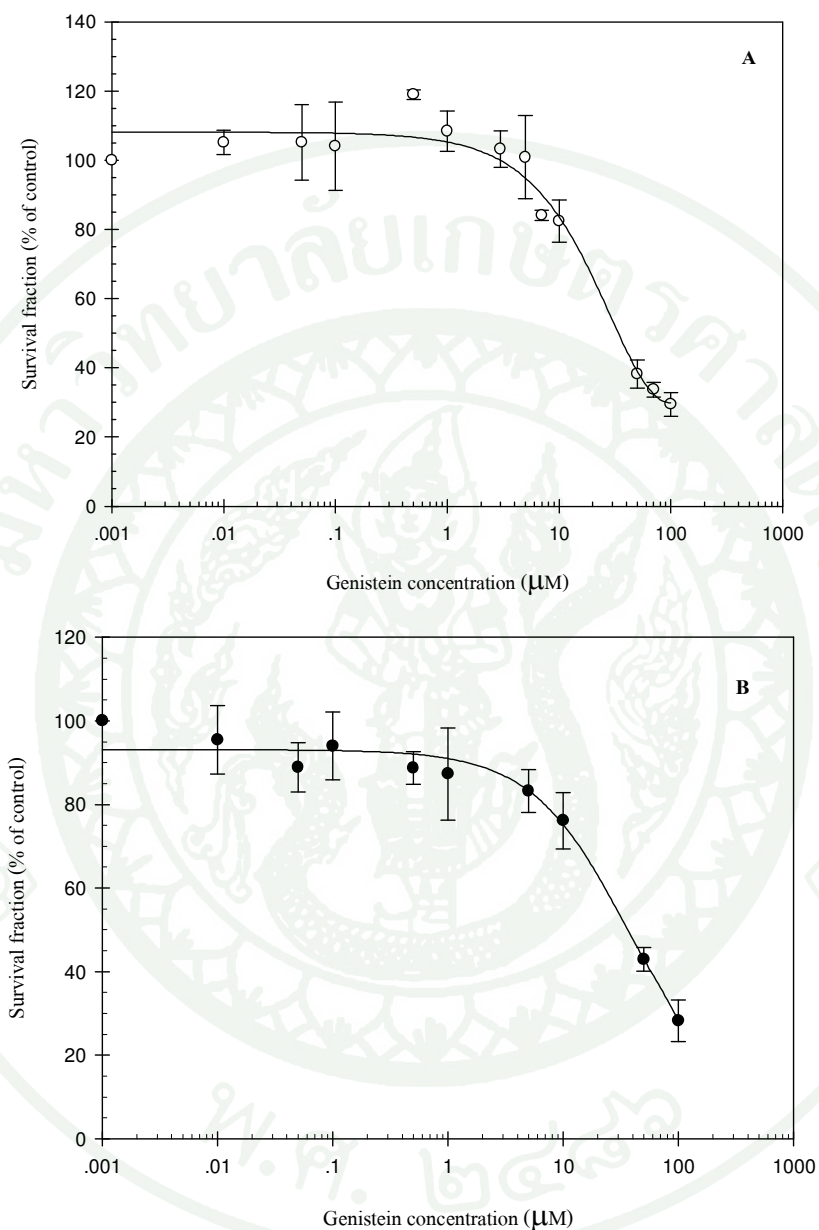
#### 4. ผลของสารประกอบฟลาโวนอยด์ต่อความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์แบบเซลล์เล็ก

ภายหลังการได้รับสัมผัสสารประกอบฟลาโวนอยด์คือ อพิจินิน จินิสติน นาริงจินิน และเคอร์เซทิน เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ความอยู่รอดของเซลล์ GLC<sub>4</sub> และ GLC<sub>4</sub>/Adr มีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารอพิจินิน จินิสติน นาริงจินิน และเคอร์เซทิน เพิ่มมากขึ้น ดังภาพที่ 24-27 อย่างไรก็ตามการได้รับสัมผัสสารประกอบฟลาโวนอยด์ความเข้มข้นปริมาณต่ำ ๆ มีผลให้เซลล์เจริญได้ดีกว่าชุดควบคุม หรือที่เรียกว่า hormesis (Mattson, 2008) โดยค่าความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ของสารประกอบฟลาโวนอยด์ชนิดต่าง ๆ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 5 พบว่า สารอพิจินินและเคอร์เซทินมีค่าความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ GLC<sub>4</sub> และ GLC<sub>4</sub>/Adr เท่ากันคือ 1  $\mu$ M สารจินิสตินเซลล์ GLC<sub>4</sub> เท่ากับ 5  $\mu$ M และ GLC<sub>4</sub>/Adr เท่ากับ 1  $\mu$ M ส่วนสารนาริงจินินเซลล์ GLC<sub>4</sub> เท่ากับ 10  $\mu$ M และ GLC<sub>4</sub>/Adr เท่ากับ 5  $\mu$ M และค่า IC<sub>50</sub> ของสารประกอบฟลาโวนอยด์ชนิดต่าง ๆ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 6

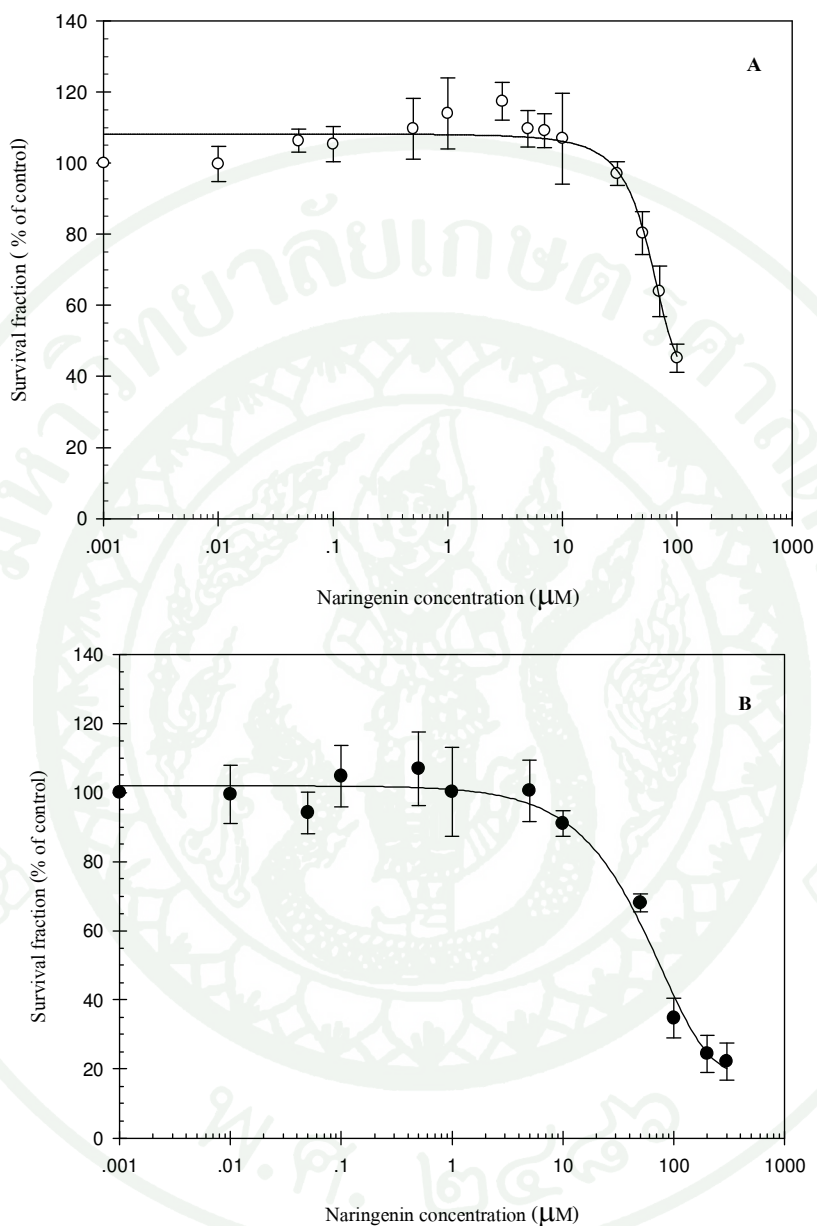
จากการศึกษาของ Gupta *et al.* (2001) แสดงให้เห็นว่าสารอพิจินินมีสมบัติเป็น radiosensitizer ในเซลล์มะเร็งและมีสมบัติเป็น radioprotector ในเซลล์ปกติ โดยสารอพิจินินมีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ได้ในมะเร็งต่อมลูกหมาก แต่จะไม่มีผลกับเซลล์ปกติ หรืออาจกล่าวได้ว่าสารอพิจินินมีคุณสมบัติของสารดัดแปรผลของรังสีในอุดมคติจึงได้เลือกสารอพิจินินไปใช้ในการศึกษาผลของสารอพิจินินต่อความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ที่เป็นเซลล์ต้นแบบ คือ GLC<sub>4</sub> และเซลล์ที่คัดเลือกจากการเลี้ยงในอาหารที่มียาต้านมะเร็ง Doxorubicin คือ GLC<sub>4</sub>/Adr และจะเลือกความเข้มข้นของสารอพิจินินที่เท่ากับ 1  $\mu$ M ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษกับเซลล์



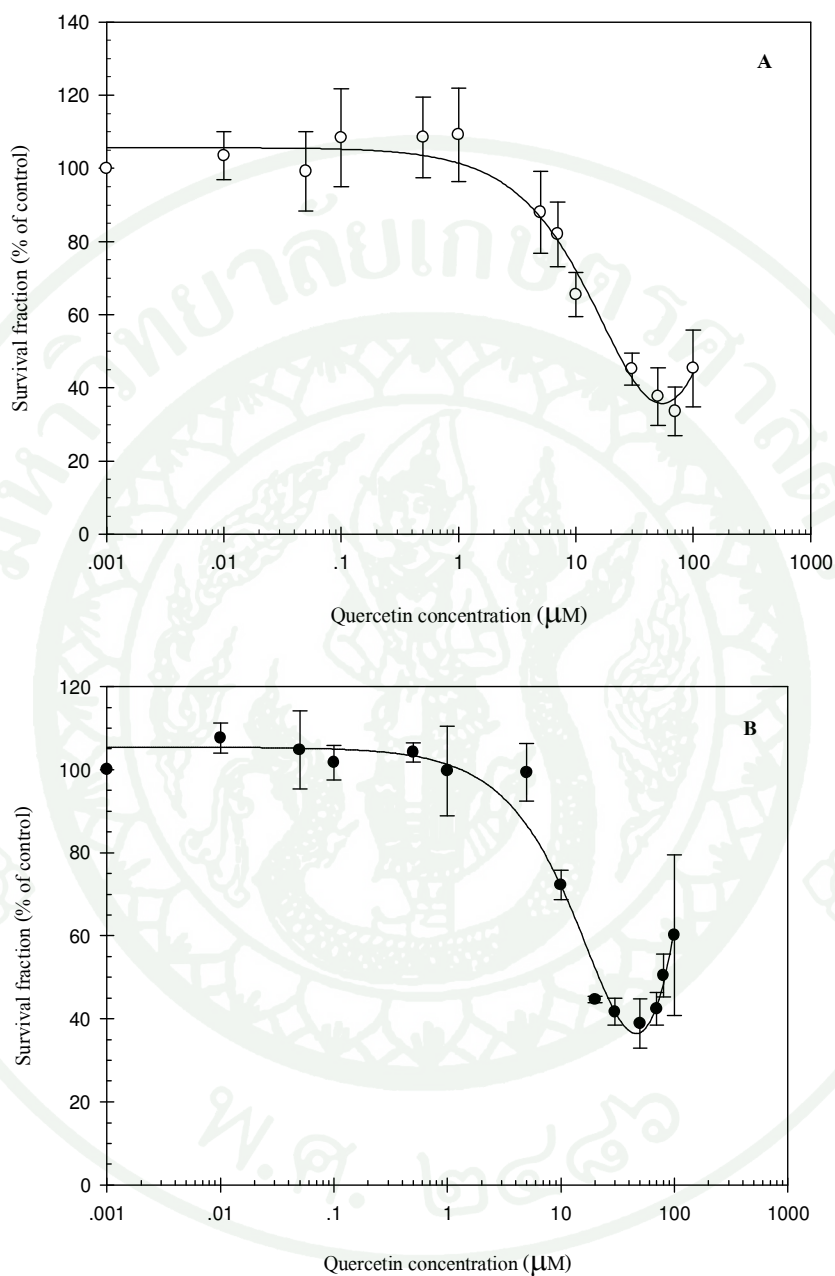
ภาพที่ 24 ความอยู่รอดของเซลล์ GLC<sub>4</sub> (A) และ GLC<sub>4</sub>/Adr (B) ภายหลังจากได้รับสัมผัสสารอพิจีนิน ความเข้มข้น 0 – 100 μM ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันอย่างน้อย 6 การทดลอง แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ



ภาพที่ 25 ความอยู่รอดของเซลล์  $\text{GLC}_4$  (A) และ  $\text{GLC}_4/\text{Adr}$  (B) ภายหลังจากได้รับสัมผัสสารจีนิสติน ความเข้มข้น 0 – 100  $\mu\text{M}$  ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันอย่างน้อย 3 การทดลอง แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ



**ภาพที่ 26** ความอยู่รอดของเซลล์ GLC<sub>4</sub> (A) และ GLC<sub>4</sub>/Adr (B) ภายหลังจากได้รับสัมผัสสารนาริงจีนิน ความเข้มข้น 0 – 100 µM ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันอย่างน้อย 3 การทดลอง แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ



ภาพที่ 27 ความอยู่รอดของเซลล์ GLC<sub>4</sub> (A) และ GLC<sub>4</sub>/Adr (B) ภายหลังจากได้รับสัมผัสสารเคอร์เซทิน ความเข้มข้น 0 – 100 µM ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันอย่างน้อย 3 การทดลอง แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ

ตารางที่ 5 ค่าความเข้มข้นสูงสุดของสารประกอบฟลาโวนอยด์ชนิดต่าง ๆ ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ปอดของมนุษย์แบบเซลล์เล็กชนิด GLC<sub>4</sub> และ GLC<sub>4</sub>/Adr

เซลล์	ค่าความเข้มข้นสูงสุดของสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (μM)			
	อพิจีนิน	จินีสติน	นาริงจีนิน	เคอร์เซทิน
GLC <sub>4</sub>	1	5	10	1
GLC <sub>4</sub> /Adr	1	1	5	1

ตารางที่ 6 ค่าความเข้มข้นของสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้ง 4 ชนิดที่สามารถลดการเจริญของเซลล์มะเร็ง ปอดของมนุษย์แบบเซลล์เล็กชนิด GLC<sub>4</sub> และ GLC<sub>4</sub>/Adr ได้ร้อยละ 50 (IC<sub>50</sub>)

เซลล์	IC <sub>50</sub> (μM)			
	อพิจีนิน	จินีสติน	นาริงจีนิน	เคอร์เซทิน
GLC <sub>4</sub>	12.865 ± 1.477	38.1011 ± 4.424	90.0046 ± 5.917	20.7960 ± 5.636
GLC <sub>4</sub> /Adr	31.6394 ± 9.609	37.3603 ± 6.809	76.1026 ± 3.993	22.8324 ± 3.578

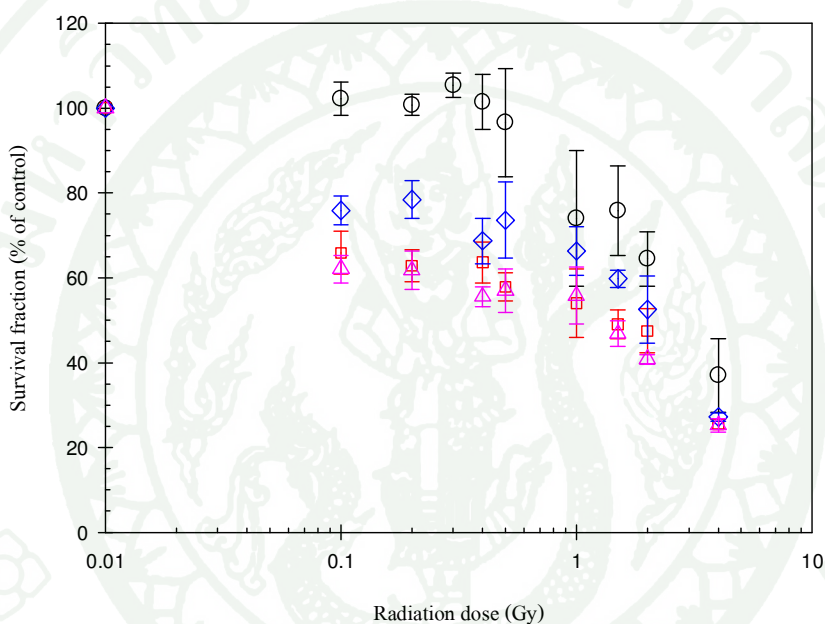
## 5. ผลของสารอพิจีนินต่อความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์แบบเซลล์เล็ก

ผลของสารอพิจีนินต่อความไวต่อรังสีของเซลล์  $GLC_4$  ได้แสดงไว้ในภาพที่ 28 พบว่าเมื่อเซลล์ได้รับรังสีในปริมาณรังสีต่ำ ๆ (0.1-0.5 เกรย์) ร่วมกับการได้รับสัมผัสสารอพิจีนินในทุกช่วงเวลาจะมีความอยู่รอดหรือการรอดชีวิตแตกต่างจากกลุ่มที่ผ่านการฉายรังสีอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการได้รับสัมผัสสารอพิจีนินทำให้ค่า  $LD_{50}$  เปลี่ยนแปลงไปจากกลุ่มที่ได้รับรังสีเพียงอย่างเดียว ดังตารางที่ 7 โดยกลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารอพิจีนินก่อนการฉายรังสีเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จะมีค่า  $LD_{50}$  ของเซลล์  $GLC_4$  ลดลงมากที่สุดคือ มีค่าเท่ากับ  $1.535 \pm 0.738$  เกรย์ รองลงมาคือ กลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารอพิจีนินก่อนการฉายรังสีเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งมีค่า  $LD_{50}$  เท่ากับ  $2.159 \pm 0.428$  เกรย์ ส่วนกลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารอพิจีนินหลังการฉายรังสี 24 ชั่วโมง มีค่า  $LD_{50}$  เท่ากับ  $2.660 \pm 0.280$  เกรย์ ซึ่งค่า  $LD_{50}$  ของทั้งสามกลุ่มนี้มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

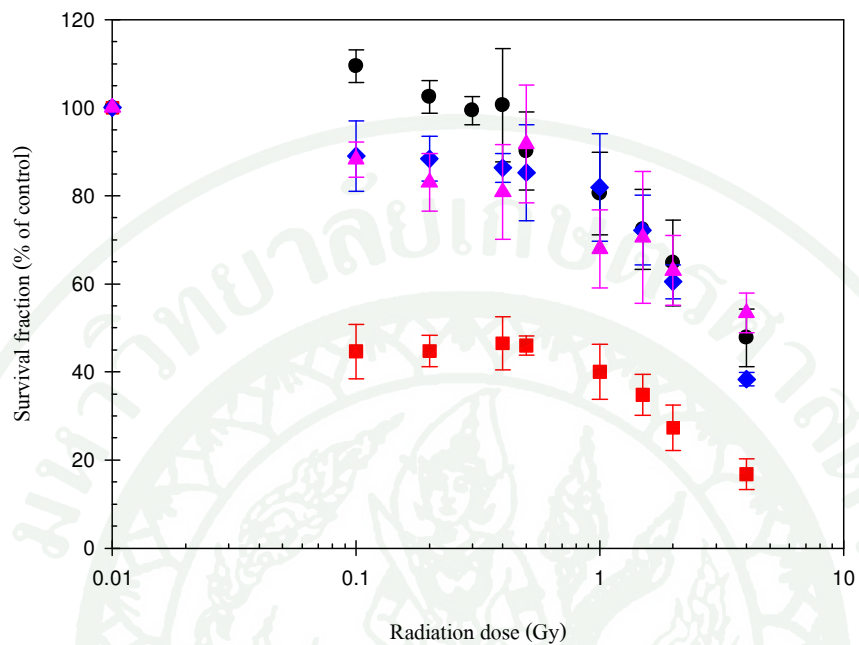
ส่วนในเซลล์  $GLC_4/Adr$  (ภาพที่ 29) พบว่า กลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารอพิจีนินก่อนฉายรังสีเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จะสามารถลดการเจริญของเซลล์  $GLC_4/Adr$  ได้มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ฉายรังสีอย่างเดียว และกลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารอพิจีนินก่อนฉายรังสีเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบค่า  $LD_{50}$  (ตารางที่ 3) พบว่า กลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารอพิจีนินก่อนการฉายรังสีเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีค่า  $LD_{50}$  ลดลงมากที่สุดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ฉายรังสีเพียงอย่างเดียวและกลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารอพิจีนิน ก่อนฉายรังสี 72 ชั่วโมง ส่วนกลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารอพิจีนินหลังการฉายรังสีเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงนั้น ไม่สามารถหาค่า  $LD_{50}$  เนื่องจากที่ปริมาณรังสี 4 เกรย์ ซึ่งเป็นปริมาณรังสีสูงสุดที่ใช้ในการทดลอง ค่าความอยู่รอดของเซลล์  $GLC_4/Adr$  ยังคงมากกว่าร้อยละ 50 แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาของการได้รับสารอพิจีนินมีผลต่อความไวต่อรังสีของเซลล์  $GLC_4/Adr$

เมื่อพิจารณาผลของการได้รับสัมผัสสารอพิจีนินต่อความไวต่อรังสีในเซลล์  $GLC_4$  และ  $GLC_4/Adr$  ที่ได้รับสัมผัสสารอพิจีนินก่อนการฉายรังสีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ได้รับสัมผัสรังสี พบว่า สารอพิจีนินสามารถทำให้เซลล์  $GLC_4/Adr$  ซึ่งมีการแสดงออกของโปรตีนคือยาแบบหลายขนานชนิด MRP1 หรือ multidrug resistance associated protein 1 (MRP1/ABCC1) มีความไวต่อรังสีมากกว่าเซลล์  $GLC_4$  ที่เป็นเซลล์ต้นแบบได้อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ แม้ว่าการตอบสนองต่อรังสีของเซลล์มะเร็งปอดทั้งสองชนิดจะมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ (ภาพที่ 30 A-B) แต่เมื่อพิจารณาจากกลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารอพิจีนินก่อนการฉายรังสีเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า เซลล์  $GLC_4$  มี

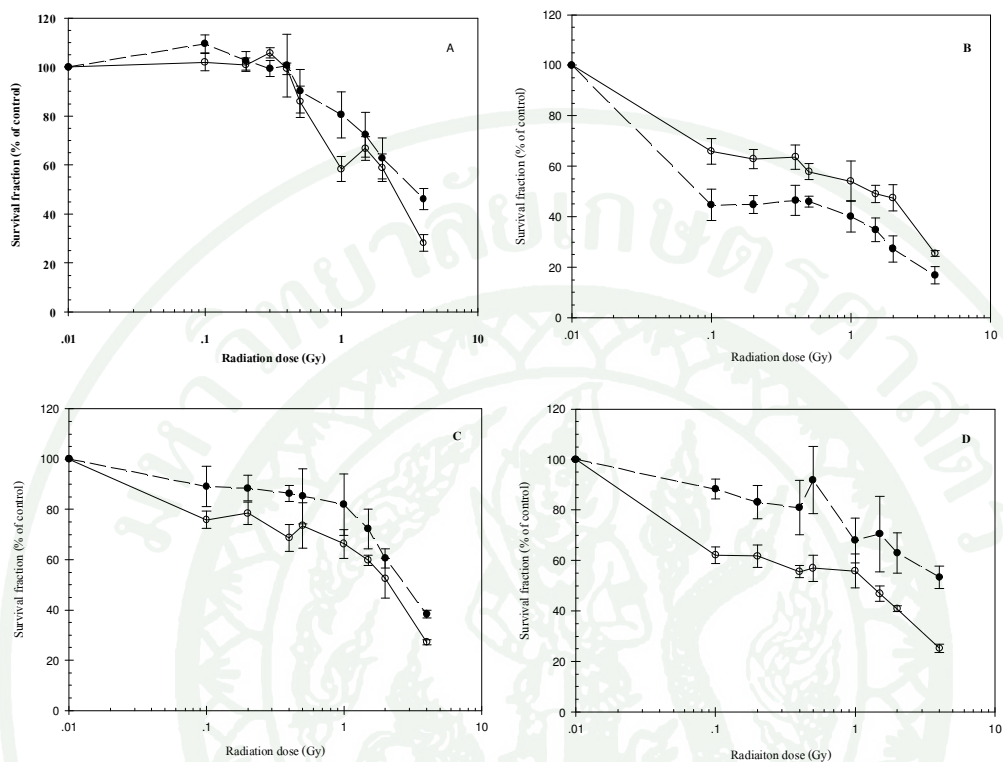
ความไวต่อรังสีมากกว่าเซลล์ GLC<sub>4</sub>/Adr (ภาพที่ 30C) ส่วนในกรณีของกลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารอพิจีนิน หลังการฉายรังสีเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 30D) พบว่า สารอพิจีนินสามารถลดความไวต่อรังสีใน เซลล์ GLC<sub>4</sub>/Adr ได้หรือกล่าวได้ว่าให้เซลล์ GLC<sub>4</sub>/Adr ทนต่อรังสีมากขึ้นตรงข้ามกับในเซลล์ GLC<sub>4</sub> ที่ สารอพิจีนินจะช่วยเพิ่มความไวต่อรังสี



**ภาพที่ 28** ความอยู่รอดของเซลล์ GLC<sub>4</sub> หลังการฉายรังสี (○) และได้รับสัมผัสสารอพิจีนินความเข้มข้น 1 μM ก่อนการฉายรังสีเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (□) 72 ชั่วโมง (◇) และภายหลังการฉายรังสี เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (△) ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการ ทดลองที่เป็นอิสระต่อกันอย่างน้อย 3 การทดลอง แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ



ภาพที่ 29 ความอยู่รอดของเซลล์ GLC<sub>4</sub>/Adr หลังการฉายรังสี (●) และได้รับสัมผัสสารอพิทีนิน ความเข้มข้น 1 μM ก่อนการฉายรังสีเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (■) 72 ชั่วโมง (◆) และภายหลังการฉายรังสีเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (▲) ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันอย่างน้อย 3 การทดลอง แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ



ภาพที่ 30 ความอยู่รอดของเซลล์ GLC<sub>4</sub> (O) และ GLC<sub>4</sub>/Adr (●) ภายหลังจากฉายรังสี (A) ได้รับสัมผัสสารอพิจีนินก่อนการฉายรังสีเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (B) และ 72 ชั่วโมง (C) และได้รับสัมผัสสารอพิจีนินหลังการฉายรังสีเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (D) ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันอย่างน้อย 3 การทดลอง แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ

ตารางที่ 7 ค่าปริมาณรังสีที่ทำให้ลดการเจริญของเซลล์ได้ร้อยละ 50 (LD<sub>50</sub>) ของเซลล์ GLC<sub>4</sub> และ GLC<sub>4</sub>/Adr เมื่อได้รับสารอพิจีนิน ความเข้มข้น 1  $\mu$ M

เซลล์ที่ใช้	กลุ่มการทดลอง	LD <sub>50</sub> (Gy)
GLC <sub>4</sub>	ฉายรังสีอย่างเดียว	2.332 $\pm$ 0.359 <sup>bcd</sup>
	ได้รับสารอพิจีนินก่อนฉายรังสี 24 ชม.	1.535 $\pm$ 0.738 <sup>d</sup>
	ได้รับสารอพิจีนินก่อนฉายรังสี 72 ชม.	2.159 $\pm$ 0.428 <sup>cd</sup>
	ได้รับสารอพิจีนินหลังฉายรังสี 24 ชม.	2.660 $\pm$ 0.280 <sup>d</sup>
GLC <sub>4</sub> /Adr	ฉายรังสีอย่างเดียว	3.432 $\pm$ 0.746 <sup>ab</sup>
	ได้รับสารอพิจีนิน ก่อนฉายรังสี 24 ชม.	0.111 $\pm$ 0.041 <sup>c</sup>
	ได้รับสารอพิจีนิน ก่อนฉายรังสี 72 ชม.	2.928 $\pm$ 0.238 <sup>abc</sup>
	ได้รับสารอพิจีนิน หลังฉายรังสี 24 ชม.	-
	F-test	**
	C.V =	20.98%

หมายเหตุ <sup>(1)</sup> ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตามด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % โดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range test ด้วย R program  
 - ค่าความอยู่รอดจากผลการทดลองมากกว่าร้อยละ 50  
 \*\* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 99 %

การที่สารอพิจีนินสามารถเพิ่มความไวต่อรังสีได้ อาจจะเป็นผลมาจากสารอพิจีนินสามารถยับยั้ง vascular endothelial growth factor (VEGF) transcriptional activation ของเซลล์มะเร็งปอด (A549 lung cancer cell) โดยสารอพิจีนินจะไปยับยั้ง VEGF transcriptional ผ่านทาง hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) binding site (Liu *et al.*, 2005) นอกจากนี้สารอพิจีนินยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ apoptosis ใน human hepatoma cells ผ่านทาง p53-dependent pathway (Chiang *et al.*, 2006) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Watanabe *et al.* (2007) ที่พบว่าทำให้สารอพิจีนินนั้นสามารถเพิ่มการแสดงออกของ WAF/p21 และลดการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ที่มีความเกี่ยวข้องกับการป้องกันการตายแบบ apoptosis ของเซลล์

ในกรณีของ GLC<sub>4</sub>/Adr ที่เป็น adriamycin-selective cell line ซึ่งมีการแสดงออกของ multidrug resistance protein 1 (Wong *et al.*, 2009) การที่สารอพิจีนินสามารถเพิ่มความไวต่อรังสีในการได้รับสัมผัสสารอพิจีนินก่อนการฉายรังสีได้อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ อาจจะเป็นผลมาจากสารอพิจีนินมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับของกลูตาไธโอนในเซลล์ซึ่งเป็น substrate ของ MRP1 (Laberge *et al.*, 2007) ในการนำส่งยาต้านมะเร็ง (anticancer drug) หรือ organic anions ออกนอกเซลล์ (Rothnie *et al.*, 2008) และกลูตาไธโอนมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแปลง (modifying the response) การตอบสนองของสิ่งมีชีวิตเมื่อได้รับรังสีได้ (Quiniliant *et al.*, 1977) โดยมีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าระดับของกลูตาไธโอนในเซลล์มีผลกับการรอดชีวิตของเซลล์ภายหลังการได้รับยาหรือรังสี ในการศึกษาของ Thornalley (2002) พบว่ากลูตาไธโอนมีบทบาทสำคัญในการกำจัดโมเลกุลของ isothiocyanates โดยจะเข้าจับกับ isothiocyanates ได้เป็น GSH - conjugate แล้วจะถูกขับออกนอกเซลล์ด้วยโปรตีน MRP1 ซึ่งจะทำให้การส่งโมเลกุลของยาออกนอกเซลล์ ทำให้เซลล์มีการสะสมภายในเซลล์ลดลงทำให้เซลล์ทนทานต่อยามากขึ้น

การฉายรังสีให้กับเซลล์นั้นจะเกิด free radical โดยเฉพาะ reactive oxygen species (ROS) จากกระบวนการ water radiolysis ของน้ำที่อยู่ภายในเซลล์ จากรายงานของ Laberge *et al.* (2007) พบว่าสารอพิจีนินทำให้ระดับของกลูตาไธโอนในเซลล์ลดลง แล้วมีการเพิ่ม ROS ในเซลล์ ซึ่งนำไปสู่การตายแบบ apoptosis ในที่สุด นอกจากนี้ในรายงานของ Colliaux *et al.* (2011) พบว่ากลูตาไธโอนมีความสามารถในการช่วยลดความเสียหายที่เกิดจาก HO• จากกระบวนการ water radiolysis ซึ่งในทางตรงกันข้ามถ้าหากว่าสามารถลดปริมาณของกลูตาไธโอนในเซลล์ได้ก็จะเป็นการเพิ่มความเสียหายที่เกิดจาก HO• ได้หรืออีกนัยหนึ่งก็คือ สามารถเพิ่มความไวต่อรังสีของเซลล์ได้ ดังนั้นการได้รับสัมผัสสารอพิจีนินของเซลล์ GLC<sub>4</sub>/Adr ก่อนการฉายรังสีอาจจะทำให้ระดับของกลูตาไธโอนในเซลล์ลดลง เมื่อทำการฉายรังสีผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการ water radiolysis ที่เกิดขึ้นนี้จะไปทำลายโมเลกุลต่าง ๆ โดยเฉพาะดีเอ็นเอที่อยู่ภายในเซลล์ ทำให้เซลล์เกิดความเสียหายเป็นผลให้เซลล์ตายในที่สุด สำหรับการได้รับสัมผัสสารอพิจีนินหลังการฉายรังสีในเซลล์ GLC<sub>4</sub>/Adr นั้น สารอพิจีนินไม่สามารถเพิ่มความไวต่อรังสีได้ เมื่อเปรียบเทียบกับการได้รับสัมผัสสารอพิจีนินก่อนการฉายรังสี ซึ่งอาจจะเกิดจากกลูตาไธโอนที่มีอยู่ในเซลล์กำจัด ROS ที่เกิดจากกระบวนการ water radiolysis ไปแล้วก่อนการได้รับสารอพิจีนิน ดังนั้นการได้รับสัมผัสสารอพิจีนินหลังการฉายรังสี อาจไม่มีผลในการเพิ่มความไวต่อรังสี โดย ROS ที่เกิดขึ้นนั้นไม่สามารถสร้างความเสียหายให้กับเซลล์ได้มากพอที่จะทำให้เซลล์ตายได้

นอกจากนี้สารอพิจีนินสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ รวมไปถึงสามารถหยุดวัฏจักรของเซลล์ไว้ที่ระยะ G<sub>2</sub>/M ได้ ในเซลล์ human hepatoma cells (Chiang *et al.*, 2006) pancreatic cancer

(Ujiki *et al.*, 2006) และ Human Colon Carcinoma Cell (Wang *et al.*, 2000) โดยระยะ  $G_2$  และ M เป็นระยะที่เซลล์มีความไวต่อรังสีมากที่สุด (Hall, 1994) การที่สารอพิจีนินสามารถหยุดวัฏจักรของเซลล์ไว้ที่ระยะ  $G_2/M$  ได้นั้น อาจทำให้เซลล์ไวต่อรังสีมากขึ้น เมื่อให้สารอพิจีนินก่อนการฉายรังสี 24 ชั่วโมง ในกรณีของเซลล์  $GLC_4$  ซึ่งเป็นเซลล์ต้นแบบ และ  $GLC_4/Adr$  คัดเลือกจากการเลี้ยงในอาหารที่มียาต้านมะเร็ง Doxorubicin (adriamycin-selective cell line) ได้ นอกจากนี้ยังมีการค้นพบว่าสารอพิจีนิน สามารถป้องกันการเกิดความเสียหายกับโครโมโซมภายหลังการได้รับรังสีใน human lymphocytes โดยสารอพิจีนินมีบทบาทในการป้องกันความเสียหายที่เกิดกับโครโมโซมในระหว่างการฉายรังสี (Rithidech *et al.*, 2005)

## สรุปและข้อเสนอแนะ

### สรุป

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์แบบเซลล์เล็ก ชนิด GLC<sub>4</sub> และ GLC<sub>4</sub>/Adr ด้วยวิธี resazurin assay พบว่าความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมมีค่าเท่ากับ 2,000 และ 5,000 เซลล์ต่อมิลลิตร ตามลำดับ และระยะเวลาในการบ่มเซลล์กับ resazurin เท่ากับ 4 ชั่วโมง เนื่องจากสาร resorufin ที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการรีดิวซ์สาร resazurin ที่เป็น indicator จะให้สัญญาณเป็น fluorescence แต่ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้เครื่อง spectrophotometer เป็นเครื่องมือในการวัดสัญญาณ ดังนั้นเพื่อเป็นการทดสอบศักยภาพของวิธี resazurin assay ในการทดสอบสิ่งก่อพิษหรือทดสอบความอยู่รอดของเซลล์จึงได้นำมาทดสอบความเป็นพิษของยาต้านมะเร็ง Doxorubicin เปรียบเทียบกับรายงานก่อนหน้านี้ที่ได้วิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ซึ่งพบว่า ค่า IC<sub>50</sub> และค่า resistance factor ของเซลล์ GLC<sub>4</sub> และ GLC<sub>4</sub>/Adr มีค่าเท่ากับ  $0.012 \pm 0.001 \mu\text{M}$  และ  $3.751 \pm 0.889 \mu\text{M}$  ตามลำดับ และมีค่า Resistance Factor เท่ากับ 320 ซึ่งใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ผลการศึกษาสามารถยืนยันว่าวิธีการวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์วิธี resazurin assay สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์เมื่อได้รับสัมผัสสิ่งก่อพิษได้เป็นอย่างดี

การศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์แบบเซลล์เล็กทั้งสองชนิด และการศึกษาผลของสารประกอบฟลาโวนอยด์ 4 ชนิดคือ สารอพิจีนิน จินิสติน นาริงจีนิน และเคอร์เซทิน ต่อความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์แบบเซลล์เล็กชนิด GLC<sub>4</sub> และ GLC<sub>4</sub>/Adr พบว่า การตอบสนองของเซลล์ที่มีต่อรังสีและสารประกอบฟลาโวนอยด์จะเป็นแบบ dose-dependent manner กล่าวคือ เมื่อปริมาณรังสีหรือความเข้มข้นของสารประกอบฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้นเซลล์จะมีความอยู่รอดลดลง เมื่อคำนวณค่าปริมาณรังสีที่ลดการเจริญเซลล์ GLC<sub>4</sub> และ GLC<sub>4</sub>/Adr ได้ร้อยละ 50 (LD<sub>50</sub>) มีค่าเท่ากับ  $2.332 \pm 0.359$  เกรย์ และ  $3.185 \pm 0.856$  เกรย์ ตามลำดับ สำหรับค่าความเข้มข้นที่สามารถลดการเจริญของเซลล์ GLC<sub>4</sub> ได้ร้อยละ 50 ของสารอพิจีนินมีค่าเท่ากับ  $12.865 \pm 1.477 \mu\text{M}$  สารจินิสตินมีค่าเท่ากับ  $38.1011 \pm 4.4239 \mu\text{M}$  สารนาริงจีนินมีค่าเท่ากับ  $90.0046 \pm 5.9171 \mu\text{M}$  และสารเคอร์เซทินมีค่าเท่ากับ  $20.7960 \pm 5.6365 \mu\text{M}$

ส่วนในเซลล์  $GLC_4/Adr$  ค่าความเข้มข้นที่สามารถลดการเจริญของเซลล์  $GLC_4$  ได้ร้อยละ 50 ของสารอพิจีนินมีค่าเท่ากับ  $31.6394 \pm 9.6094 \mu M$  สารจินิสตินมีค่าเท่ากับ  $37.3603 \pm 6.8091 \mu M$  สารนาริงจินินมีค่าเท่ากับ  $76.1026 \pm 3.9933 \mu M$  และสารเคอร์เซทินมีค่าเท่ากับ  $22.8324 \pm 3.578 \mu M$  และได้เลือกสารอพิจีนิน ความเข้มข้นเท่ากับ  $1 \mu M$  มาใช้ในการศึกษาผลของสารอพิจีนินต่อความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์แบบเซลล์เล็ก

การศึกษาค่าความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์แบบเซลล์เล็กชนิด  $GLC_4$  และ  $GLC_4/Adr$  ซึ่งได้แบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุมที่ฉายรังสีเพียงอย่างเดียว กลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารอพิจีนินก่อนการฉายรังสี 24 และ 72 ชั่วโมง และกลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารอพิจีนินหลังการฉายรังสี 24 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาค่า  $LD_{50}$  ของกลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารอพิจีนิน พบว่า การได้รับสัมผัสสารอพิจีนินที่ระยะเวลาต่างกันไม่ทำให้การตอบสนองต่อรังสีในเซลล์  $GLC_4$  เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนในกรณีของ  $GLC_4/Adr$  นั้นระยะเวลาของการได้รับสัมผัสสารอพิจีนินมีผลต่อการตอบสนองต่อรังสีของเซลล์  $GLC_4/Adr$  โดยการได้รับสัมผัสสารอพิจีนินก่อนการฉายรังสีเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง สามารถเพิ่มความไวต่อรังสีใน  $GLC_4/Adr$  ได้อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ รองลงมาคือ กลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารอพิจีนินก่อนการฉายรังสีเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ส่วนกลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารอพิจีนินหลังการฉายรังสีเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงทำให้เซลล์  $GLC_4/Adr$  มีการตอบสนองต่อรังสีลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งแสดงให้เห็นถึงผลของสารอพิจีนินในการเพิ่มหรือลดการตอบสนองต่อรังสีหรือความไวต่อรังสีในเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของโปรตีนคือยาแบบหลายขนานชนิด MRP1

### ข้อเสนอแนะ

ผลการศึกษาผลของสารประกอบฟลาโวนอยด์โดยเฉพาะอพิจีนินต่อความอยู่รอดและความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์แบบเซลล์เดี่ยวได้แสดงถึงข้อมูลสำคัญต่างๆ หลายประการดังได้กล่าวแล้วข้างต้น อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้จะมีความสมบูรณ์และเป็นประโยชน์ทั้งทางวิชาการและการนำไปใช้ประโยชน์ ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในประเด็นสำคัญดังนี้

1. การศึกษาผลของการได้รับสัมผัสสารอพิจีนินต่อปริมาณกลูตาไธโอนภายในเซลล์และการกระจายในวัฏจักรของเซลล์
2. การศึกษาผลของตัวยับยั้งที่มีความจำเพาะกับโปรตีนคือยาแบบหลายขนานชนิด MRP1
3. การศึกษาบทบาทของสารประกอบฟลาโวนอยด์ชนิดอื่นต่อความไวต่อรังสีของเซลล์

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

นัตรชัย ศรีบัณฑิต. ม.ป.ป. **GLUTATHIONE**. แหล่งที่มา:

[http://www.thaicam.go.th/index.php?option=com\\_content&view=article&id=191:glutathione&catid=52:glutathione&Itemid=86](http://www.thaicam.go.th/index.php?option=com_content&view=article&id=191:glutathione&catid=52:glutathione&Itemid=86), 10 กุมภาพันธ์ 2556.

ชูศักดิ์ จอมพัก. 2552. สถิติ: การวางแผนการตลาดและการวิเคราะห์ข้อมูลในงานวิจัยด้านพืชด้วย R. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นวลวี รุ่งชนเกียรติ. 2547. พลังงานนิวเคลียร์เพื่อมนุษยชาติ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นิสากร สุขหิรัญ. 2553. ผลของสารสกัดจากเหง้าข่า (*Alpinia Golanga* (Linn.) Sw.) ต่อการตายและปฏิกิริยาเอนไซม์ทำลายพิษในแมลงวันผลไม้ (*Bactrocera Dorsalis* (Hendel)). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Anderson, M.E. 1996. Glutathione, p. 213. In N.A. PUNCHARD and F.J. KELLY, eds. **Free Radical A Practical Approach**. Oxford University Press Inc., New York.

Azzam, E.I., J.-P. Jay-Gerin and D. Pain. 2012. Ionizing Radiation-Induced Metabolic Oxidative Stress and Prolonged Cell Injury. **Cancer Letters** 327 (1–2): 48-60.

Birt, D.F., D.L. Mitchell, B. Gold, P.Pour and H.C. Pinch. 1997. Inhibition of UV light induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by apigenin, a plant flavonoid. **Anticancer Res.** 17:85-92.

Birt, B. Walker, M.G. Tibbels, and E. Bresnick. 1986. Antimutagenesis and anti-promotion by apigenin, robinetin, and indole 3 carbinol. **Carcinogenesis.** 7:959-963.

- Brescia, P. and P. Banks. 2009. **Quantifying Cytotoxicity of Thiostrepton on Mesothelioma Cells using MTT Assay and the Epoch™ Microplate Spectrophotometer.** Available Source: <http://www.biotek.com/resources/articles/quontification-cell-viability-epoch.html>, January 31, 2013.
- Buranrat, B., A. Prawan and V. Kukongviriyapan. 2008. Optimization of Resazurin-based Assay for Cytotoxicity Test in Cholangiocarcinoma Cells. **KKU Res J.** 8 (1): 73-80.
- Cárdenas, M., M. Marder, V.C. Blank and L.P. Roguin. 2006. Antitumor Activity of Some Natural Flavonoids and Synthetic Derivatives on Various Human and Murine Cancer Cell Lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 14 (9): 2966-2971.
- Carmichael, J., W.G. Degraff, J. Gamson, D. Russo, A.F. Gazdar, M.L. Levitt, J.D. Minna and J.B. Mitchell. 1989. Radiation sensitivity of human lung cancer cell lines. **Eur J Cancer Clin Oncol.** 25(3): 527-534.
- Chemical Book. 2008. **Apigenin.** Available Source: [http://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB1384541\\_EN.htm](http://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB1384541_EN.htm), February 14, 2013.
- Chiang, L.C., L.T. Ng, I.C. Lin, P.L. Kuo and C.C. Lin. 2006. Anti-proliferative effect of apigenin and its apoptotic induction in human Hep G2 cells. **Cancer Letters** 237: 207-214.
- Chiang, L.C., W. Chiang, M.C. Liu and C.C. Lin. 2003. *In vitro* antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 52: 194-198.
- Choi, H.-J., J.-H. Kim, C.-H. Lee, Y.-J. Ahn, J.-H. Song, S.-H. Baek and D.-H. Kwon. 2009. Antiviral Activity of Quercetin 7-Rhamnoside against Porcine Epidemic Diarrhea Virus. **Antiviral Research** 81 (1): 77-81.

Choiprasert, W., N. Dechsupa, S. Kothan, M. Garrigos and S. Mankhetkorn. 2010. Quercetin, Quercetrin Except Rutin Potentially Increased Pirarubicin Cytotoxicity by Non-Competitively Inhibiting the P-Glycoprotein-and MRP1 Function in Living K562/adr and GLC4/adr Cells. **American Journal of Pharmacology and Toxicology** 5(1): 24-33.

Chu, P.M., S.H. Chiou, T.L. Su, Y.J. Lee, L.H. Chen, Y.W. Chen, S.H. Yen, M.T. Chen, M.H. Chen, Y.H. Shih, P.H. Tu and H.I. Ma. 2011. Enhancement of radiosensitivity in human glioblastoma cells by the DNA N-mustard alkylating agent BO-1051 through augmented and sustained DNA damage response. **Radiation Oncology** 6:7.

Clavin, M., S. Gorzalczany, A. Macho, E. Muñoz, G. Ferraro, C. Acevedo and V. Martino. 2007. Anti-Inflammatory Activity of Flavonoids from Eupatorium Arnottianum. **Journal of Ethnopharmacology** 112 (3): 585-589.

Colliaux, A., B. Gervais, C. Rodriguez-Lafrasse and M. Beuve. 2011. O<sub>2</sub> and glutathione effects on water radiolysis: a simulation study. **Journal of Physics: Conference Series** 261: 012007.

Collins, K., T. Jacks, and N. P. Pavletich. 1997. The Cell Cycle and Cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 94 2776-2778.

Darzynkiewicz, Z., H. Crissman and J.W. Jacobberger. 2004. Cytometry of the Cell Cycle: Cycling Through History. **Cytometry Part A** 58A:21-32

de Austerlitz, C., V. Souza, H.P. Villar and A. Cordilha. 2006. The Use of Fricke Dosimetry for Low Energy X-Rays. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 49: 17-23.

El-Mahdy, M.A., Q. Zhu, Q.-E. Wang, G. Wani, S. Patnaik, Q. Zhao, E.-S. Arafa, B. Barakat, S. N. Mir and A.A. Wani. 2008. Naringenin Protects HaCaT Human Keratinocytes Against UVB-induced Apoptosis and Enhances the Removal of Cyclobutane Pyrimidine Dimers from the Genome. **Photochemistry and Photobiology** 84: 307-316.

- Fahlman, B.M. and E.S. Krol. 2009. UVA and UVB radiation-induced oxidation products of quercetin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B** 97: 123–131.
- Fried, J., A.G. Perez and B.D. Clarkson. 1976. Flow cytofluorometric analysis of cell cycle distributions using propidium iodide. **THE JOURNAL OF CELL BIOLOG** 71: 172-181.
- Fucks, J., and R. Milbradt. 1989. Skin anti-inflammatory activity of apigenin 7 glucoside in rat. **Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.** 64:69-78.
- Gallagher, A. n.d. **Biological Effects of Radiation**. Available Source:  
<http://www.diamond3.org/Dublin%202006/2%20DEXA%20QA%20Training%20for%20Physicists/3%20Biological%20Effects%20of%20Radiation.pdf>, December 26, 2012.
- Gupta, S., F. Afaq, and H. Mukhtar. 2001. Selective Growth-Inhibitory, Cell-Cycle Deregulatory and Apoptotic Response of Apigenin in Normal versus Human Prostate Carcinoma Cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** 287:914–920.
- Hall, E.J. 1978. **Radiobiology for the Radiologist**. 2<sup>nd</sup> ed. HAPPER & ROW, PUBLISHERS, Inc., Philadelphia.
- Hall, E.J. 1994. **Radiobiology for the Radiologist**. 4th. J. B. Lippincott Company., United States of America.
- Hara, T., M. Omura-minamisawa, C. Chao, Y. Nakagami, M. Ito and T. Inoue. 2005. BCL-2 INHIBITORS POTENTIATE THE CYTOTOXIC EFFECTS OF RADIATION IN BCL-2 OVEREXPRESSING RADIORESISTANT TUMOR CELLS. **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.** 61(2): 517–528.

- Harmon, A.W. and Y.M. Patel. 2004. Naringenin inhibits glucose uptake in MCF-7 breast cancer cells: a mechanism for impaired cellular proliferation. **Breast Cancer Research and Treatment** 85: 103–110.
- Hasan, Y., D. Schoenherr, A.A. Martinez, G.D. Wilson and B. Marples. 2010. PROSTATE-SPECIFIC NATURAL HEALTH PRODUCTS (DIETARY SUPPLEMENTS) RADIOSENSITIZE NORMAL PROSTATE CELLS. **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.** 76(3): 896-904.
- Heim, K.E., A.R. Tagliaferro and D.J. Bobilya. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry** 13: 572–584.
- Held, K.D. n.d. **Chemical, Biological and Physical Modification of Radiation Response.**  
AvailableSource:<http://proex.epm.br/eventos08/radio/aulas/CURSO%20RADIOBIOLOGIA%202008%20AULAS%20KATH%20AND%20BARRY/Microsoft%20PowerPoint%20-%204%20Modif%20of%20response%20Brazil%202008.pdf>, May 17, 2011.
- Hermann, R.M., H.A. Wolff, H. Jarry, P. Thelen, C. Gruendker, M. Rave-Fraenk, H. Schmidberger and H. Christiansen. 2008. *In vitro* studies on the modification of low-dose hyper-radiosensitivity in prostate cancer cells by incubation with genistein and estradiol. **Radiation Oncology** 3(19).
- Hillman, G.G., J.D. Forman, O. Kucuk, M. Yudelev, R.L. Maughan, J. Rubio, A. Layer, S. Tekyi-Mensah, J. Abrams and F.H. Sarkar. 2001. Genistein Potentiates the Radiation Effect on Prostate Carcinoma Cells. **Clinical Cancer Research** 7: 382-390.
- Holden, J.M., S.A. Bhagwat, D.B. Haytowitz, S.E. Gebhardt, J.T. Dwyer, J. Peterson, J.R. Beecher, A.L. Eldridge and D. Balentine. 2005. Development of a Database of Critically Evaluated Flavonoids Data: Application of Usda's Data Quality Evaluation System. **Journal of Food Composition and Analysis** 18 829-844.

- Houtgraaf, J.H., J. Versmissen and W.J. van der Giessen. 2006. A Concise Review of DNA Damage Checkpoints and Repair in Mammalian Cells. **Cardiovascular Revascularization Medicine** 7 (3): 165-172.
- Husbeck, B., D.M. Peehl and S.J. Knox. 2004. Redox modulation of human prostate carcinoma cells by selenite increases radiation-induced cell killing. **Free Radical Biology & Medicine** 38: 50–57.
- Ishida, T., E. Naito, J. Mutoh, S. Takeda, Y. Ishii and H. Yamada. 2005. The Plant Flavonoids, Quercetin, Reduces Some Forms of Dioxin Toxicity by Mechanism Distinct from Aryl Hydrocarbon Receptor Activation, Heat-Shock Protein Induction and Quenching Oxidative stress. **Journal of Health Sciences** 52(4): 410-417.
- Jin, J.H., J.S. Kim, S.S. Kang, K.H. Son, H.W. Chang and H.P. Kim. 2010. Anti-Inflammatory and Anti-Arthritic Activity of Total Flavonoids of the Roots of *Sophora flavescens*. **Journal of Ethnopharmacology** 127 (3): 589-595.
- Kinnaert, E., P. Duez, R. Morandini, J. Dubois, P.V. Houtte and G. GhANEM. 2004. Cysteine but not Glutathione Modulates the Radiosensitivity of Human Melanoma Cells by Affecting Both Survival and DNA Damage. **PIGMENT CELL RES** 17: 275–280.
- Kolbe, E. 2011. **Biological Effects of Radiation**. Available Source: [http://phys-merger.physik.unibas.ch/~kolbe/teach/ARS/ARS\\_FS11\\_Week4.pdf](http://phys-merger.physik.unibas.ch/~kolbe/teach/ARS/ARS_FS11_Week4.pdf), December 25, 2012.
- Kosalec, I., S. Pepeljnjak, M. Bakmaz and S. Vladimir-Knezevic. 2005. Flavonoid Analysis and Antimicrobial Activity of Commercially Available Propolis Products. **Acta Pharm** 55 (4): 423-430.

- Kuete, V., I.K. Simo, B. Ngameni, J.D. Bigoga, J. Watchueng, R.N. Kapguez, F. Etoa, B.N. Tchaleu and V.P. Beng. 2007. Antimicrobial activity of the methanolic extract, fractions and four flavonoids from the twigs of *Dorstenia angusticornis* Engl. (Moraceae). **Journal of Ethnopharmacology** 112: 271-277.
- Laberge, R.M., J. Karwatsky, M.C. Lincoln, M.L. Leimanis and E. Georges. 2007. Modulation of GSH levels in ABCC1 expressing tumor cells triggers apoptosis through oxidative stress. **biochemical pharmacology** 73: 1727-1737.
- Li, Y.-L., G.-P. Gan, H.-Z. Zhang, H.-Z. Wu, C.-L. Li, Y.-P. Huang, Y.-W. Liu and J.-W. Liu. 2007. A Flavonoid Glycoside Isolated from Smilax China L. Rhizome in Vitro Anticancer Effects on Human Cancer Cell Lines. **Journal of Ethnopharmacology** 113 (1): 115-124.
- Liao, X., X. Che, W. Zhao, D. Zhang, H. Long, P. Chaudhary and H. Li. 2010. Effects of propranolol in combination with radiation on apoptosis and survival of gastric cancer cells in vitro. **Radiation Oncology** 5: 98.
- Liska, D.J. 1998. The Detoxification Enzyme Systems. **The Detoxification Enzyme Systems** 3 (3): 187-198.
- Liu, L.Z., J. Fang, Q. Zhou, X. Hu, X. Shi and B.H. Jiang. 2005. Apigenin Inhibits Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in Human Lung Cancer Cells: Implication of Chemoprevention of Lung Cancer. **Mol Pharmacol** 68(3):635-643.
- Londhe, J.S., T.P. Devasagayam, L.Y. Foo and S.S. Ghaskadbi. 2009. Radioprotective Properties of Polyphenols from *Phyllanthusamarus* Linn. **J. Radiat. Res.** 50 (4): 303-309.
- Lubner, R. 2010. **The beginning of the end or only the end of the beginning?**. Available Source: <http://howardhughes.trinity.duke.edu/blogs/2010/07/17/the-beginning-of-the-end-or-only-the-end-of-the-beginning>, February 11, 2013.

- Lukas, J., C. Lukas and J. Bartek. 2004. Mammalian Cell Cycle Checkpoints: Signalling Pathways and Their Organization in Space and Time. **DNA Repair** 3 (8–9): 997-1007.
- Mattson, M.P. 2008. Hormesis Defines. **Ageing Res Rev.** 7(1): 1-7.
- Mavel, S., B. Dikic, S. Palakas, P. Emond, I. Greguric, A. Gomez de Gracia, F. Mattner, M. Garrigos, D. Guilloteau, and A. Katsifis. 2006. Synthesis and biological evaluation of a series of flavone derivatives as potential radioligands for imaging the multidrug resistance-associated protein 1 (ABCC1/MRP1). **Bioorg Med Chem.** 14(5): 1599-1607.
- Mbaveng, A.T., B. Ngameni, V. Kuete, I.K. Simo, P. Ambassa, R. Roy, M. Bezabih, F.-X. Etoa, B.T. Ngadjui, B.M. Abegaz, J.J.M. Meyer, N. Lall and V.P. Beng. 2008. Antimicrobial Activity of the Crude Extracts and Five Flavonoids from the Twigs of *Dorstenia Barteri* (Moraceae). **Journal of Ethnopharmacology** 116 (3): 483-489.
- McBride, J. Ingram, P.R., Henriquez, F.L. and Robert, C.W. 2005. Development of Colorimetric Microtiter Plate Assay for Assessment of Antimicrobials against *Acanthamoeba*. **Journal of Clinical Microbiology.** 43(2):629-634.
- Moeller, D.W. n.d. **Effect of Radiation on Cells.** Available Source:  
<http://www.radtrainonline.com/free/viewslide.asp?CourseID=91&ModuleID=351&SlideID=6251>, December 12, 2012.
- Munshi, A., M. Hobbs and R.E. Meyn. 2005. Clonogenic Cell Survival Assay. **Methods in Molecular Medicine** (110): 21-28. cited R. Blumenthal, eds. 2005. **Chemosensitivity.** Humana Press.
- Nagy, T.O., K. Ledolter and S. Solar. 2008. Oxidation of naringenin by gamma-radiation. **Radiation Physics and Chemistry** 77: 728-733.

- Núñez, M., V. Medina, G. Cricco, M. Croci, C. Cocca, E. Rivera, R. Bergoc and G. Martín. 2013. Glibenclamide inhibits cell growth by inducing G0/G1 arrest in the human breast cancer cell line MDA-MB-231. **BMC Pharmacology and Toxicology** 14:6.
- Nunez, R. 2001. DNA Measurement and Cell Cycle Analysis by Flow Cytometry. **Curr. Issues Mol. Biol.** 3(3): 67-70.
- Okuno, T., M. Matsuoka, T. Sumizawa and H. Igisu. 2006. Involvement of the extracellular signal-regulated protein kinase pathway in phosphorylation of p53 protein and exerting cytotoxicity in human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) exposed to acrylamide. **Arch Toxicol.** 80: 146–153.
- Olson, E.R., T. Melton, Z. Dong and G. T. Bowden. 2008. Stabilization of Quercetin Paradoxically Reduces Its Proapoptotic Effect on UVB-Irradiated Human Keratinocytes. **Cancer Prev Res** 1(5): 362-368.
- Ormerod, M.G. 2008. **Flow cytometry A basic introduction.** Available Source: [http://flowbook.denovosoftware.com/Flow\\_Book/Chapter\\_6%3a\\_DNA\\_Analysis](http://flowbook.denovosoftware.com/Flow_Book/Chapter_6%3a_DNA_Analysis), February 5, 2013.
- Özçelik, B., D. Deliorman Orhan, S. Özgen, F. Ergun. 2008. Antimicrobial Activity of Flavonoids against Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ES $\beta$ 1)-Producing *Klebsiella Pneumoniae*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research** 7 (4): 1151-1157.
- Palakas, S., P. Pakkong and K. Ratanaphadit. 2009. Chemioresistance of an Adriamycin-Selective Human Small-Cell Lung Carcinoma Cell Line. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 43(5): 165-171.
- Pastore, S., A. Potapovich, V. Kostyuk, V. Mariani, D. Lulli, C.D. Luca and L. Korkina. 2009. Plant Polyphenols Effectively Protect HaCaT Cells from Ultraviolet C–Triggered Necrosis and Suppress Inflammatory Chemokine Expression. **Annals of the New York Academy of Sciences** 1171: 305–313.

- Pepeljnjak, S., Z. Kalodera and M. Zovko. 2005. Antimicrobial Activity of Flavonoids from *Pelargonium Radula* (Cav.) L'herit. **Acta Pharm** 55 (4): 431-435.
- Poggi, M.M., C.N. Coleman and J.B. Mitchell. 2001. Sensitizers and Protectors of Radiation and Chemotherapy. **Curr Probl Cancer** 25(6): 334-412.
- Pujari, G., A. Berni, F. Palitti and A. Chatterjee. 2009. Influence of glutathione levels on radiation-induced chromosomal DNA damage and repair in human peripheral lymphocytes. **Mutation Research** 675: 23–28.
- Quintiliani, M., R. Badiello, M. Tamba, A. Esfandi and G. Gorin. 1977. Radiolysis of glutathione in oxygen-containing solutions of pH 7. **INT. J. RADIAT. BIOL.** 32(2): 195-202.
- Reungpattanaphong, P., S. Dechsupa, J. Meesungnoen, C. Loetchutinat and S. Mankhetkorn. 2003. Rhodamine B as a mitochondrial probe for measurement and monitoring of mitochondrial membrane potential in drug-sensitive and -resistant cells. **J. Biochem. Biophys. Methods** 57: 1–16
- Rithidech, K. N., M. Tungjai and E.B. Whorton. 2005. Protective effect of apigenin on radiation-induced chromosomal damage in human lymphocytes. **Mutation Research** 585:96-104.
- Rolón, M., C. Vega, J.A. Escario and A. Gómez-Barrio. 2006. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitol Res** 99:103-107.
- Rothnie, A., G. Conseil, A.Y.T. Lau, R.G. Deeley and S.P.C. Cole. 2008. Mechanistic Differences between GSH Transport by Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1/ABCC1) and GSH Modulation of MRP1-Mediated Transport. **Mol Pharmacol** 74: 1630–1640.

- Sarkar F.H. and Y. Li. 2006. Using Chemopreventive Agents to Enhance the Efficacy of Cancer Therapy. **Cancer Res** 66 (7): 3347-3350. Cited J.T. Hwang, J. Ha and O.J. Park. 2005. Combination of 5-fluorouracil and genistein induces apoptosis synergistically in chemo-resistant cancer cells through the modulation of AMPK and COX-2 signaling pathways. **Biochem Biophys Res Commun** 332: 433-440.
- Shin, J.-I., J.-H. Shim, K.-H. Kim, H.-S. Choi, J.W. Kim, H.G. Lee, B.-Y. Kim, S.N. Park, O.-J. Park and D.-Y. Yoon. 2008. Sensitization of the Apoptotic Effect of  $\gamma$ -Irradiation in Genistein-pretreated CaSki Cervical Cancer Cells. **J. Microbiol. Biotechnol.** 18(3): 523-531.
- Siddique, Y. H. and M. Afzal, 2009. Protective effect of apigenin against hydrogen peroxide induced genotoxic damage on cultured human peripheral blood lymphocytes. **J Appl Biomed.** 7:35-43.
- Singh, V.J., K. Selvendiran, S.M. Banu, R. Padmavahi and D. Sakthisekaran. 2004. Protective role of Apigenin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against hepatocarcinogenesis in Wistar albino rats. **Phytomedicine** 11: 309-314.
- Stern, S.T., T.M. Potter, B.W. Neun. 2010. **NCL Method GTA-3 Hep G2 Hepatocyte Glutathione Assay**. Available Source: [http://ncl.cancer.gov/NCL\\_Method\\_GTA-3.pdf](http://ncl.cancer.gov/NCL_Method_GTA-3.pdf), February 12, 2013.
- Supplementscience. 2012. **Antioxidant Supplements**. Available Source: <http://supplementscience.org/antioxidants.html#top>, February 14, 2013.
- Susanti, D., H.M. Sirat, F. Ahmad, R.M. Ali, N. Aimi and M. Kitajima. 2007. Antioxidant and Cytotoxic Flavonoids from the Flowers of *Melastoma Malabathricum* L. **Antioxidant and Cytotoxic Flavonoids from the Flowers of Melastoma Malabathricum L** 103 (3): 710-716.

- Tietze, F. 1969. Enzymic Method for Quatitative Determination of Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione: Applications to Mammalian Blood and Other Tissues. **Analytical Biochemistry** 27: 502-522.
- Thornalley, P.J. 2002. Isothiocyanates: mechanism of cancer chemopreventive action. **Anticancer drugs** 13, 331-338.
- Thotala, D., S. Chetyrkin, B. Hudson, D. Hallahan, P. Voziyan and E. Yazlovitskaya. 2009. Pyridoxamine protects intestinal epithelium from ionizing radiation-induced apoptosis. **Free Radic Biol Med.** 47(6): 779–785.
- Townsend, D.M. and K.D. Tew. 2003. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. **Oncogene** 22, 7369–7375.
- Ujiki, M.B., X.Z. Ding, M.R. Salabat, D.J. Bentrem, L. Golkar, B. Milam, M.S. Talamonti, R.H.B Jr, T. Iwamura and T.E. Adrian. 2006. Apigenin inhibits pancreatic cancer cell proliferation through G<sub>2</sub>/M cell cycle arrest. **Molecular Cancer** 5(76).
- Ulla, K.K., M. Apostolos, B. Ingo, B. Kerstin, Y.M. Wael, D. Sarah, K. Mechthild, S. Andreas, D.D. Jochen, P. Cordula, D. Ekkehard and B. Michael. 2009. The extreme radiosensitivity of the squamous cell carcinoma SKK is due to a defect in double-strand break repair. **Radiotherapy and Oncology** 90: 257-264.
- Wang, W., Heidelman, L., Chung, C. S., Pelling, C. S., Koehlere, K. J., and Brit, D. F. 2000. Cell cycle arrest at G<sub>2</sub>/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell line. **Mol. Carcinog.** 28:102-110.
- Wardman, P. 2007. Chemical Radiosensitizers for Use in Radiotherapy. **Clinical Oncology** 19: 397-417.

- Watanabe, N., R. Hirayama, and N. Kubota. 2007. The chemopreventive flavonoid apigenin confers radiosensitizing effect in human tumor cell grown as monolayers and spheroids. **J. Radiat. Res.** 48:45-50.
- Williamson, G., G.W. Plumb, Y. Uda, K.R. Price and M.J.C. Rhodes. 1996. Dietary quercetin glycosides: antioxidant activity and induction of the anticarcinogenic phase II marker enzyme quinone reductase in Hepalclc7 cells. **Carcinogenesis** 17: 2385-2387.
- Wong, I.L.K., K.F. Chan, K.H. Tsang, C.Y. Lam, Y. Zhao, T.H. Chan and L.M.C. Chow. 2009. Modulation of Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1/ABCC1)-Mediated Multidrug Resistance by Bivalent Apigenin Homodimers and Their Derivatives. **J. Med. Chem.** 52: 5311–5322.
- Wu, H.-J and W.-H. Chan. 2007. Genistein protects methylglyoxal-induced oxidative DNA damage and cell injury in human mononuclear cells. **Toxicology in Vitro** 21: 335-342.
- Yamamori, T., H. Yasui, M. Yamazumi, Y. Wada, Y. Nakamura, H. Nakamura and O. Inanami. 2012. Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. **Free Radical Biology and Medicine** 53: 260–270.
- Yin, F., A.E.Giuliano, A.J. Van Herle. 1999. Growth inhibitory effects of flavonoids in human thyroid cancer cell lines. **Thyroid.** 9:369-376.
- Yuan, M., J. Wang, J. Deng, Z. Wang, W. Yang, G. Li and B. Ren. 2010. Combination therapy in A549 cells. **Nuclear Medicine and Biology** 37: 317-326.

- Zeng, S., W. Liu, F.-f. Nie, Q. Zhao, J.-j. Rong, J. Wang, L. Tao, Q. Qi, N. Lu, Z.-y. Li and Q.-L. Guo. 2009. Lyg-202, a New Flavonoid with a Piperazine Substitution, Shows Antitumor Effects in Vivo and in Vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 385 (4): 551-556.
- Zhang, Bei, J.-Y. Liu, J.-S. Pan, S.-P. Han, X.-X. Yin, B. Wang and G. Hu. 2006. Combined Treatment of Ionizing Radiation With Genistein on Cervical Cancer HeLa Cells. **J Pharmacol Sci** 102: 129 – 135.
- Zhou, X., H. Jiang, J. Lin and K. Tang. 2007. Cytotoxic activities of *Coriolus versicolor* (Yunzhi) extracts on human liver cancer and breast cancer cell line. **African Journal of Biotechnology** 6 (15): 1740-1743.

## ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นางสาวณัชชา จันทาพูน
เกิดวันที่	วันที่ 7 พฤศจิกายน พ.ศ. 2529
สถานที่เกิด	อำเภอแม่สาย จังหวัดเชียงราย
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา เพื่อการตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์