



การศึกษาฤทธิ์ของการยับยั้งเซลล์มะเร็งเยื่อปอดมนุษย์ของรังสีก่อไอออน
ร่วมกับสารสกัดจากใบย่านาง

CYTOTOXIC EFFECTS OF IONIZING RADIATION COMBINED WITH
YANANG LEAVES EXTRACT ON HUMAN EPITHELIAL LUNG
CARCINOMA CELL LINE

ฐิติทิพย์ ทิพยมนตรี

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ

สำนักวิชาเวชศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2567

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

การศึกษาฤทธิ์ของการยับยั้งเซลล์มะเร็งเยื่อปอดมนุษย์ของรังสีก่อไอออน
ร่วมกับสารสกัดจากใบย่านาง
CYTOTOXIC EFFECTS OF IONIZING RADIATION COMBINED WITH
YANANG LEAVES EXTRACT ON HUMAN EPITHELIAL LUNG
CARCINOMA CELL LINE

ฐิติทิพย์ ทิพยมนตรี

การค้นคว้าอิสระนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ

สำนักวิชาเวชศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2567

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง



หน้าอนุมัติการค้นคว้าอิสระ

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ

การค้นคว้าอิสระเรื่อง การศึกษาฤทธิ์ของการยับยั้งเซลล์มะเร็งเยื่อหุ้มปอดมนุษย์ของรังสีก่อไอออน
ร่วมกับสารสกัดจากใบย่านาง

Cytotoxic Effects of Ionizing Radiation Combined with Yanang
Leaves Extract on Human Epithelial Lung Carcinoma Cell Line

ผู้ประพันธ์ จุติทิพย์ ทิพยมนตรี

คณะกรรมการสอบ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ คันชิง

อาจารย์ ดร.อาริญา สาริกะภูติ

รองศาสตราจารย์ ดร.วงเดือน ปันตี

ประธานกรรมการ

กรรมการ

กรรมการ

อาจารย์ที่ปรึกษา

Arinya

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(อาจารย์ ดร.อาริญา สาริกะภูติ)

คณบดี

Kant W.

.....
(อาจารย์ ดร.กานต์ วงศ์ศุภสวัสดิ์)

กิตติกรรมประกาศ

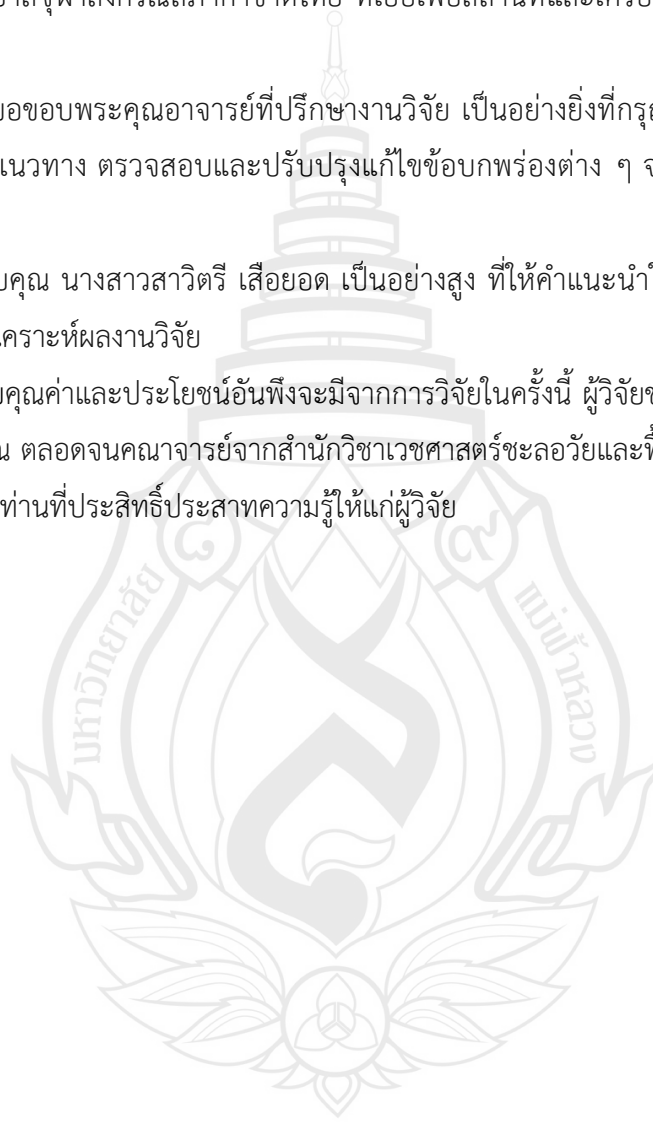
วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความอนุเคราะห์ทั้งด้านสถานที่ สารเคมี วัสดุ อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ จากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ขอขอบคุณ ภาควิชารังสีวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์สภากาชาดไทย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือต่าง ๆ ในการทำการทดลอง

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย เป็นอย่างยิ่งที่กรุณาสละเวลาให้คำแนะนำปรึกษา ชี้แนะแนวทาง ตรวจสอบและปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ งานวิจัยมีความถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ นางสาวสาวิตรี เสื่อยอด เป็นอย่างสูง ที่ให้คำแนะนำในการทำการทดลองและเทคนิคในการวิเคราะห์ผลงานวิจัย

สำหรับคุณค่าและประโยชน์อันพึงจะมีจากการวิจัยในครั้งนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณความดีทั้งหมดให้แก่ผู้มีพระคุณ ตลอดจนคณาจารย์จากสำนักวิชาเวชศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวงทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทความรู้ให้แก่ผู้วิจัย

ฐิติทิพย์ ทิพยมนตรี



ชื่อเรื่องการค้นคว้าอิสระ	การศึกษาฤทธิ์ของการยับยั้งเซลล์มะเร็งเยื่อบุผิวปอดมนุษย์ของรังสีก่อไอออนร่วมกับสารสกัดจากไບยานาง
ชื่อผู้ประพันธ์	ฐิติทิพย์ ทิพยมนตรี
หลักสูตร	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ)
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร.อาริญา สาริกะภูติ

บทคัดย่อ

สารสกัดจากสมุนไพรได้รับความนิยมอย่างมากในการพัฒนาเป็นสารเพิ่มประสิทธิภาพของรังสี เพื่อเพิ่มความไวของเซลล์มะเร็งต่อการรักษาด้วยรังสีให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น และมีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ปกติที่ต่ำ งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาการตอบสนองของเซลล์มะเร็งเยื่อบุผิวปอดมนุษย์ A549 เมื่อได้รับการรักษาด้วยรังสีร่วมกับสารสกัดจากไບยานาง โดยศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเยื่อบุผิวปอดมนุษย์ A549 ภายหลังจากได้รับการฉายรังสีร่วมกับสารสกัดจากไບยานาง และศึกษากลไกทางชีววิทยาที่ส่งผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเยื่อบุผิวปอดมนุษย์ A549 ภายหลังจากได้รับการฉายรังสีร่วมกับสารสกัดจากไບยานาง ดำเนินการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดไບยานางด้วยวิธี DPPH assay จากนั้นแบ่งตัวอย่างออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มที่ได้รับการฉายรังสีเพียงอย่างเดียว 2 Gy กลุ่มที่ 3 คือ กลุ่มที่ได้รับสารสกัดไບยานางเพียงอย่างเดียว ความเข้มข้น 0.05 mg% Flavonoids และกลุ่มที่ 4 คือ กลุ่มที่ได้รับสารสกัดไບยานางร่วมกับการฉายรังสี จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดไບยานางมีสารที่ออกฤทธิ์สำคัญได้แก่ Flavonoids ซึ่งมีฤทธิ์การแสดงออกในเซลล์ได้สองแบบ (dual action) คือ สามารถเป็นได้ทั้ง anti-oxidant และ pro-oxidant โดยที่มีฤทธิ์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดไບยานางที่เพิ่มขึ้น ค่าอัตราการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ A549 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญภายหลังจากการฉายรังสีร่วมกับสารสกัดไບยานาง โดยที่อัตราการอยู่รอดของเซลล์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละช่วงเวลาภายหลังจากการได้รับรังสีเมื่อใช้ร่วมกับสารสกัดไບยานาง นอกจากนี้ งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดไບยานางสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิต ROS ที่เพิ่มขึ้นในระบบได้ในระยะเวลาอันสั้นภายใน 24 ชั่วโมง และออกฤทธิ์ในการผลิต ROS ได้ต่อเนื่องไปจนถึงเวลาที่ 48 และ 72 ชั่วโมง มากไปกว่านั้น กลุ่มที่ได้รับสารสกัดไບยานางร่วมกับการฉายรังสี พบว่ามีระดับปริมาณ ROS ภายในเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับรังสี หรือ สารสกัดไບยานางเพียงอย่างเดียว ซึ่งแสดงถึงการเสริมฤทธิ์ของสาร

สกัดใบย่านางร่วมกับการฉายรังสี ดังนั้น จากผลการทดลองจากงานวิจัยนี้สามารถสนับสนุนการใช้สารสกัดใบย่านางร่วมกับการฉายรังสี ที่อาจจะใช้เป็นแนวทางที่มีประสิทธิภาพในการรักษามะเร็งปอดได้ต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: ย่านาง, รังสีก่อไอออน, เซลล์มะเร็งเยื่อหุ้มปอดมนุษย์, ฤทธิ์ของการยับยั้งเซลล์มะเร็ง



Independent Study Title Cytotoxic Effects of Ionizing Radiation Combined with Yanang Leaves Extract on Human Epithelial Lung Carcinoma Cell Line

Author Thititip Tippayamontri

Degree Master of Science (Anti-Aging and Regenerative Science)

Advisor Ariya Sarikaphuti, Ph. D.

ABSTRACT

Herbal extracts have garnered significant attention in the development of radiosensitizers, which enhance the effectiveness of radiation therapy by increasing the sensitivity of cancer cells while maintaining low toxicity to normal cells. This study investigates the response of human lung epithelial cancer cells (A549) treated with radiation in combination with Yanang leaf extract, focusing on cell survival and the biological mechanisms involved. The antioxidant activity of Yanang leaf extract was initially evaluated using the DPPH assay, and samples were then divided into four groups: control, radiation-only (2 Gy), Yanang leaf extract-only (0.05 mg% Flavonoids), and a combination of both treatments. Results showed that Flavonoids in Yanang leaf extract exhibited dual roles as both antioxidants and pro-oxidants, with antioxidant effects increasing at higher extract concentrations. When combined with radiation, flavonoids increased ROS levels in A549 cells, enhancing cancer cell sensitivity to radiation and leading to greater cell death. The combination treatment significantly reduced the survival rate of A549 cells, with no significant differences in survival across different time points post-radiation. Additionally, Yanang leaf extract induced ROS production within 24 hours, continuing to increase at 48 and 72 hours. The combination of Yanang leaf extract and radiation resulted in significantly higher intracellular ROS levels compared to all other groups, indicating a synergistic effect. These findings suggest that Yanang leaf extract may serve as an effective radiosensitizer, enhancing the efficacy of radiation therapy in lung cancer treatment.

Keywords: Yanang, Ionizing Radiation, Human Epithelial Lung Carcinoma Cell, Cytotoxic Effect

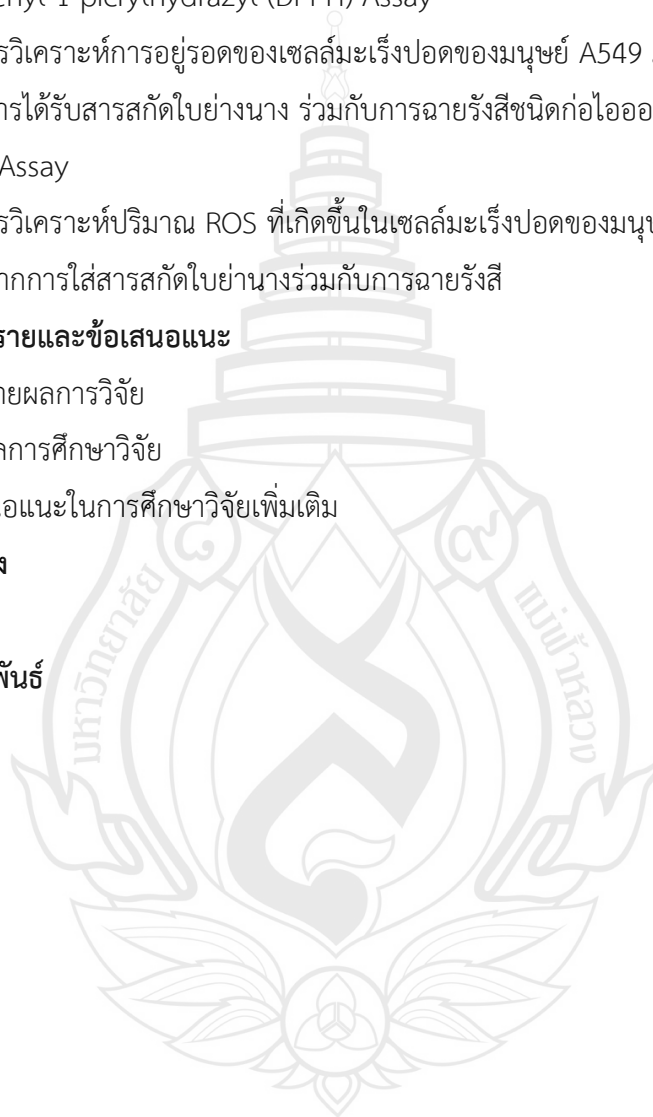


สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและความเป็นมาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 สมมติฐานของการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย	4
1.5 ขอบเขตของการวิจัย	4
1.6 นิยามศัพท์เฉพาะ	4
2 การทบทวนวรรณกรรม	10
2.1 โรคมะเร็งปอด อาการ สาเหตุ และอุบัติการณ์ของโรค	10
2.2 ฟิสิกส์รังสี (Radiation Physics)	11
2.3 รังสีชีววิทยา (Radiation Biology)	13
2.3 ช่วงระยะเวลาและผลกระทบที่เกิดขึ้นหลังจากการได้รับรังสีชนิดก่อไอออน	14
2.4 ยานาง	17
2.5 สารเพิ่มประสิทธิภาพของรังสี (Radiosensitizer)	22
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	24
3 วิธีดำเนินการวิจัย	27
3.1 รูปแบบการวิจัย	27
3.2 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ	27
3.3 สารเคมี	28
3.4 สถานที่ทำการทดลอง	28
3.5 วิธีการทดลอง	29
3.6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ	32
4 ผลการวิจัย	33
4.1 ผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการสารออกฤทธิ์ในสารสกัดใบย่านาง	33

สารบัญ

บทที่	หน้า
4.2 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบย่านางด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Assay	34
4.3 ผลการวิเคราะห์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ A549 ภายหลังจากการได้รับสารสกัดใบย่านาง ร่วมกับการฉายรังสีชนิดก่อไอออน ด้วยวิธี MTT Assay	36
4.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ ROS ที่เกิดขึ้นในเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ A549 หลังจากการใส่สารสกัดใบย่านางร่วมกับการฉายรังสี	40
5 สรุป อภิปรายและข้อเสนอแนะ	44
5.1 อภิปรายผลการวิจัย	44
5.2 สรุปผลการศึกษาวิจัย	48
5.3 ข้อเสนอแนะในการศึกษาวิจัยเพิ่มเติม	48
รายการอ้างอิง	50
ภาคผนวก	55
ประวัติผู้ประพันธ์	68



สารบัญตาราง

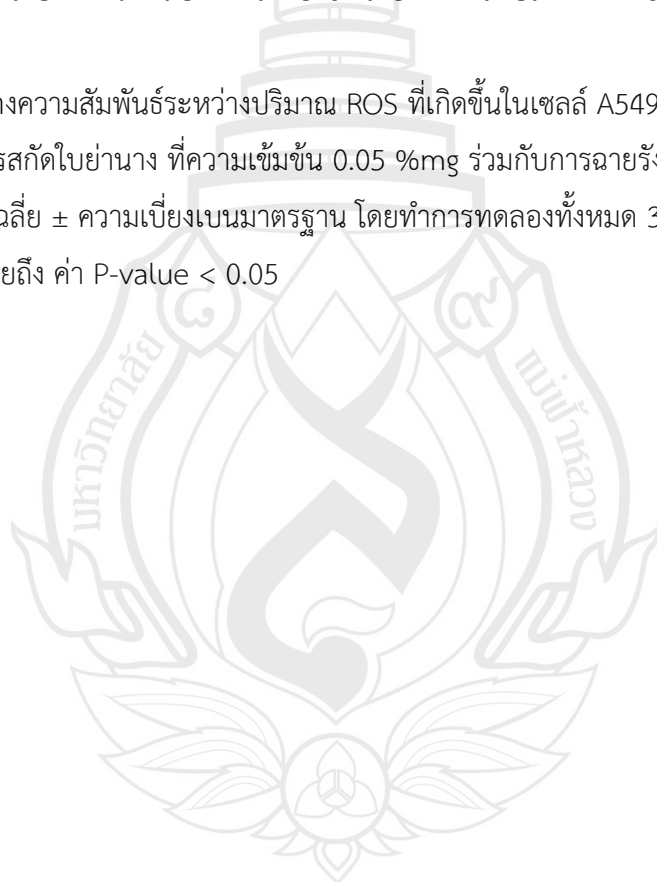
ตาราง	หน้า
4.1 ผลการตรวจประเมินคุณภาพและความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ของสารสกัด ใบย่านาง	33
4.2 ร้อยละของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบย่านางด้วยวิธี DDPH assay ที่ ความเข้มข้น 0, 0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 และ 10 mg% Flavonoids	35
4.3 ร้อยละของอัตราการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ A549 กับความ เข้มข้นของสารสกัดใบย่านางตั้งแต่ 0-100 mg% Flavonoids	36
4.4 อัตราการอยู่รอดของเซลล์ที่ระยะเวลา 24-72 h ภายหลังจากการได้รับปริมาณ รังสี 2 Gy เพียงอย่างเดียว	38
4.5 อัตราการอยู่รอดของเซลล์ที่ระยะเวลา 24-72 h ภายหลังจากการได้รับปริมาณ รังสี 2 Gy ร่วมกับสารสกัดใบย่านาง ความเข้มข้น 0.05 mg% Flavonoids	39
4.6 ปริมาณอนุมูลอิสระ (ROS) ที่เกิดขึ้นในเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ A549 หลังจากการใส่สารสกัดใบย่านางร่วมกับการฉายรังสี	40

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1.1 โครงสร้างของ DHE ethidium และแสดงปฏิกิริยาระหว่าง DHE และ ROS โดยมีผลิตภัณฑ์เป็น Ethidium	5
1.2 หลักการของวิธีวัดอัตราการอยู่รอดของเซลล์หลังจากการฉายรังสีแบบ Clonogenic assay	6
1.3 โครงสร้างทางเคมีของ MTT และ Formazan	7
1.4 หลักการของวิธีวัดอัตราการอยู่รอดของเซลล์หลังจากการฉายรังสีแบบ Trypan Blue Exclusion Assay	8
2.1 ประเภทของรังสีชนิดก่อไอออนและรังสีชนิดไม่ก่อไอออน	12
2.2 ความสามารถในการทะลุทะลวงของรังสีก่อไอออนแต่ละชนิด	13
2.3 ช่วงระยะเวลาและผลกระทบที่เกิดขึ้นหลังจากการได้รับรังสีชนิดก่อไอออน	14
2.4 การเข้าทำอันตรกิริยาของรังสีทางตรง (direct action) โดยรังสีเข้าทำลาย DNA โดยตรง และทางอ้อม (indirect action) รังสีทำให้เกิดการสร้าง ROS ซึ่ง ROS จะทำให้เกิดการทำลาย DNA	16
2.5 การเกิดรีดักชันของโมเลกุลออกซิเจนผ่าน four-and one-electron schemes	16
2.6 ความเสียหายของดีเอ็นเอประเภทต่าง ๆ อันเนื่องมาจากรังสีก่อไอออน	17
2.7 ไบยานาง	19
2.8 สรรพคุณทางเภสัชวิทยาของ Tiliacora triandra (Colebr.) Diels	20
2.9 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณรังสีที่ให้แก่เซลล์กับอัตราการอยู่รอดของเซลล์ของสารลดผลของรังสีและสารเพิ่มประสิทธิภาพของรังสี	24
3.1 การฉายรังสีแก่เซลล์แบบด้านบนล่าง ด้วยเครื่อง Linac Accelerators	30
3.2 แผนภาพแสดงส่วนประกอบของ Muse Oxidative Stress Working Solution	32
4.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดไบยานางกับร้อยละของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดไบยานาง	35
4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดไบยานาง 0-0.5 %mg กับร้อยละของอัตราการอยู่รอดของเซลล์	37

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ ROS ที่เกิดขึ้นในเซลล์ A549 หลังจากการฉายรังสี 2 Gy เพียงอย่างเดียว แสดงค่าเฉลี่ย \pm ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยที่ * หมายถึง ค่า P-value < 0.05	42
4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ ROS ที่เกิดขึ้นในเซลล์ A549 หลังจากการใส่สารสกัดใบย่านาง เพียงอย่างเดียว แสดงค่าเฉลี่ย \pm ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยที่ * หมายถึง ค่า P-value < 0.05	42
4.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ ROS ที่เกิดขึ้นในเซลล์ A549 หลังจากการใส่สารสกัดใบย่านาง ที่ความเข้มข้น 0.05 %mg ร่วมกับการฉายรังสี 2 Gy แสดงค่าเฉลี่ย \pm ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยที่ * หมายถึง ค่า P-value < 0.05	43



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและความเป็นมาของปัญหา

รายงานของ American Cancer Society ในปี พ.ศ. 2562 ระบุว่าอุบัติการณ์ของการเกิดโรคมะเร็งทั่วโลกมีผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่ประมาณ 19.3 ล้านคน และมีผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งประมาณ 10 ล้านคน [1] จากข้อมูลทางสถิติของ World Health Organization ปี พ.ศ. 2563 พบว่ามีผู้ป่วยโรคมะเร็งใหม่ 190,636 ราย โดยในจำนวนนี้มีผู้ป่วยโรคมะเร็งปอด 23,713 ราย คิดเป็น 12.4% ซึ่งเป็นอันดับ 2 ของโรคมะเร็งที่พบบ่อยที่สุด แบ่งเป็นเพศชาย 15,418 ราย และเพศหญิง 8,295 ราย นอกจากนี้ยังมีผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งปอด 20,395 ราย [2] สำหรับอุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งปอดในประเทศไทย พบได้บ่อยประมาณร้อยละ 14.1 ของโรคมะเร็งทุกชนิด และเป็นสาเหตุหลักอันดับ 2 ของการเสียชีวิตจากโรคมะเร็ง คิดเป็นร้อยละ 18.7 รองจากโรคมะเร็งตับ [3] สถาบันมะเร็งแห่งชาติรายงานไว้ว่า โรคมะเร็งปอดเป็นมะเร็งชนิดที่พบบ่อยเป็นอันดับ 2 ในประชากรเพศชาย และอันดับ 4 ในประชากรเพศหญิง [4]

โรคมะเร็งปอดแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ มะเร็งปอดปฐมภูมิ (Primary Lung Cancer) ซึ่งเกิดในปอด และมะเร็งปอดทุติยภูมิ (Secondary Lung Cancer) ซึ่งเกิดจากการแพร่กระจายของมะเร็งจากอวัยวะอื่นมายังปอด สำหรับมะเร็งปอดปฐมภูมิ สามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก (Small Cell Lung Cancer: SCLC) และมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก (Non-Small Cell Lung Cancer: NSCLC) ซึ่งชนิดที่พบบ่อยที่สุด คือ NSCLC [5] การรักษาโรคมะเร็งปอดในปัจจุบันมีหลายวิธี ขึ้นอยู่กับระยะของโรค เช่น การผ่าตัด การทำเคมีบำบัด และการฉายแสงหรือรังสีรักษา สำหรับผู้ป่วยมะเร็งปอดระยะที่ 1 และ 2 มักใช้การผ่าตัดเป็นวิธีหลัก ในขณะที่ผู้ป่วยมะเร็งปอดระยะที่ 3 และ 4 จะได้รับการรักษาด้วยการฉายรังสีร่วมกับเคมีบำบัด [6]

การรักษาโรคมะเร็งปอดด้วยรังสีรักษาคือการใช้รังสีชนิดที่ก่อไอออน (Ionizing radiation) เพื่อควบคุมหรือทำลายเซลล์มะเร็ง โดยมีวัตถุประสงค์หลักคือการรักษาให้หายขาด (Curative) หรือเพื่อประคับประคองและบรรเทาอาการเจ็บปวดของผู้ป่วย (Palliative) การรักษาด้วยรังสีแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ ประเภทที่ 1 การรักษาด้วยรังสีระยะใกล้ (Brachytherapy) ซึ่งแหล่งกำเนิดรังสีจะอยู่ใกล้ตัวผู้ป่วย และประเภทที่ 2 การรักษาด้วยรังสีระยะไกล (Teletherapy) โดยแหล่งกำเนิดรังสีจะอยู่ไกลจากตัวผู้ป่วย วัตถุประสงค์สำคัญคือเพื่อกำจัดเซลล์มะเร็งปอดให้ได้มาก

ที่สุดโดยไม่ก่อให้เกิดผลกระทบร้ายแรงต่อเซลล์ปกติที่อยู่ข้างเคียง สำหรับปริมาณรังสีที่ใช้ในการรักษาจะพิจารณาตามระยะของโรคมะเร็งปอด อย่างไรก็ตาม ผลข้างเคียงที่รุนแรงของรังสีต่อเซลล์ปกติทำให้ความสามารถในการใช้รังสีรักษาโรคมะเร็งปอดยังคงมีขีดจำกัด ด้วยเหตุนี้จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องเพิ่มพูนความรู้และความเข้าใจในกลไกทางชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับการใช้รังสีรักษาในการทำลายเซลล์มะเร็งปอด รวมทั้งค้นคว้าวิจัยใหม่ ๆ เพื่อพัฒนากระบวนการรักษาโรคมะเร็งด้วยรังสีรักษาให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ปัจจุบันได้มีการพัฒนาสารเพิ่มประสิทธิภาพของรังสีในการทำลายเซลล์มะเร็ง (Radiosensitizer หรือ Radiation Enhancer) ซึ่งสารดังกล่าวมีบทบาทในการเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาที่ทำให้สารพันธุกรรมและองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์มะเร็งได้รับความเสียหายมากขึ้น ส่งผลให้รังสีมีประสิทธิภาพมากขึ้นในการทำลายเซลล์มะเร็ง [7]

ทฤษฎีการทำลายเซลล์มะเร็งด้วยรังสีอธิบายถึงการใช้รังสีในการเข้าทำลายสารพันธุกรรม (DNA) ภายในเซลล์มะเร็ง เพื่อหยุดการเจริญเติบโตและนำไปสู่การตายของเซลล์มะเร็งในที่สุด การเกิดอันตรกิริยาของรังสีกับ DNA ของเซลล์มะเร็งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่

1. การทำอันตรกิริยาโดยตรง (Direct Action): รังสีจะเข้าทำลาย DNA ของเซลล์มะเร็งโดยตรง ส่งผลให้เซลล์มะเร็งไม่สามารถเจริญเติบโตหรือซ่อมแซมตนเองได้
2. การทำอันตรกิริยาโดยอ้อม (Indirect Action): รังสีจะถ่ายเทพลังงานให้กับตัวกลาง ซึ่งในเซลล์จะมีน้ำเป็นส่วนประกอบหลักถึง 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีการฉายรังสีให้กับเซลล์ รังสีจะถ่ายเทพลังงานให้กับน้ำ ทำให้เกิดการแตกตัวของน้ำ (Water Radiolysis) ซึ่งจะสร้างสารอนุมูลอิสระ (Free Radicals) จำนวนมาก โดย Reactive Oxygen Species (ROS) ที่เกิดขึ้น เช่น Hydroxyl Radical ($\cdot\text{OH}$) และ Superoxide Radical ($\text{O}_2\cdot^-$) เป็นโมเลกุลที่มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาสูง สามารถเข้าทำอันตรกิริยากับองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ เช่น DNA และไมโทคอนเดรีย ส่งผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์มะเร็ง จนอาจนำไปสู่การตายของเซลล์หากเซลล์นั้นไม่สามารถซ่อมแซมความเสียหายได้อย่างสมบูรณ์ [8]

ย่านาง (*Tiliacora triandra*) เป็นพืชสมุนไพรที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ทุกส่วน ไม่ว่าจะเป็นราก ใบ หรือเถา โดยเฉพาะรากของย่านางที่ประกอบด้วยสารอัลคาลอยด์ เช่น อัลคาลอยด์ บิสเบนซิลโซควิโนลีน ทิลิโครีนิน ทิลิอาโคริน และนอร์ทิลิอาโครินิน [9] ใบย่านางยังถูกระบุว่าเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติ ซึ่งประกอบไปด้วยเบต้าแคโรทีน แทนนินเข้มข้น ไตรเทอร์พีน ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน และแร่ธาตุ เช่น แคลเซียมและธาตุเหล็ก ที่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระและการก่อกลายพันธุ์ ซึ่งสามารถป้องกันมะเร็งได้ [10] ทั้งนี้ ใบและรากของย่านางมักถูกนำไปใช้ในการแพทย์พื้นบ้านในประเทศไทยและประเทศอื่น ๆ ในเอเชีย เพื่อรักษาโรคต่าง ๆ เช่น โรคมาลาเรีย โรคระบบทางเดินอาหาร โรคพิษสุราเรื้อรัง โรคผิวหนัง ความดันโลหิตสูง และไข้ นอกจากนี้ใบย่านางยังมีสารประกอบอัลคาลอยด์ เช่น บิสเบนซิลโซควิโนลีน ทิลิโครีนิน (Tiliacorinin) ทิลิอาโคริน

(Tiliacorinine) นอร์ทิลิอาโครีนีน (Nor-Tiliacorinine) N-oxide Tiliandrine Tetraandrine และ D-isochondendrine นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดไບ่ยานาง ซึ่งมีฤทธิ์เป็นพิษต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ฤทธิ์ต้านเชื้อมัคโคแบคทีเรียต่อเชื้อ Mycobacterium tuberculosis สายพันธุ์ MDR และฤทธิ์ต้านมาลาเรีย [11] รายงานเหล่านี้ชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของการใช้ยานางในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดร่วมกับการฉายรังสี เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาโรคมะเร็งปอดให้ดียิ่งขึ้น

งานวิจัยฉบับนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลกระทบทางรังสีชีววิทยาที่เกิดขึ้นจากการใช้สารสกัดไບ่ยานางร่วมกับการฉายรังสีต่อเซลล์มะเร็งปอดมนุษย์ชนิด A549 (adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells) ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งปอดชนิด non-small cell lung cancer (NSCLC) โดยมุ่งหวังที่จะยกระดับความรู้และความเข้าใจในการใช้รังสีร่วมกับสารสกัดสมุนไพรในการรักษาโรคมะเร็งปอด ทั้งนี้เพื่อนำไปสู่การพัฒนาแนวทางการรักษาโรคมะเร็งปอดที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น ส่งผลให้เกิดผลลัพธ์ทางการรักษาที่ดียิ่งขึ้นต่อผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 วัตถุประสงค์หลัก

เพื่อศึกษาการตอบสนองของเซลล์มะเร็งเยื่อบุผิวปอดมนุษย์ A549 เมื่อได้รับการรักษาด้วยรังสีร่วมกับสารสกัดจากไບ่ยานาง

1.2.2 วัตถุประสงค์รอง

1. เพื่อศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเยื่อบุผิวปอดมนุษย์ A549 ภายหลังจากได้รับการฉายรังสีร่วมกับสารสกัดจากไบ่ยานาง
2. เพื่อศึกษากลไกทางชีววิทยาที่ส่งผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเยื่อบุผิวปอดมนุษย์ A549 ภายหลังจากได้รับการฉายรังสีร่วมกับสารสกัดจากไบ่ยานาง

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

การใช้สารสกัดไบ่ยานางร่วมกับการฉายรังสี ทำให้เซลล์มะเร็งปอดมนุษย์ A549 เกิดอัตราการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งที่น้อยกว่าการรักษาด้วยการฉายรังสีเพียงอย่างเดียว

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1.4.1 สามารถทำความเข้าใจการตอบสนองและกลไกการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งปอดมนุษย์ที่เกิดจากการใช้สารสกัดใบย่านางร่วมกับการฉายรังสี

1.4.2 สามารถได้ข้อมูลพื้นฐานที่สามารถอ้างอิงได้เกี่ยวกับผลของการใช้สารสกัดใบย่านางร่วมกับการฉายรังสีในการเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาโรคมะเร็งปอด

1.4.3 ได้แนวทางในการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดด้วยการใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ร่วมกับการฉายรังสี

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเยื่อหุ้มปอดมนุษย์ A549 ภายหลังจากได้รับรังสีร่วมกับสารสกัดใบย่านาง รวมทั้งศึกษากลไกทางชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเยื่อหุ้มปอดมนุษย์ A549 ภายหลังจากได้รับรังสีร่วมกับสารสกัดใบย่านาง

1.6 นิยามศัพท์เฉพาะ

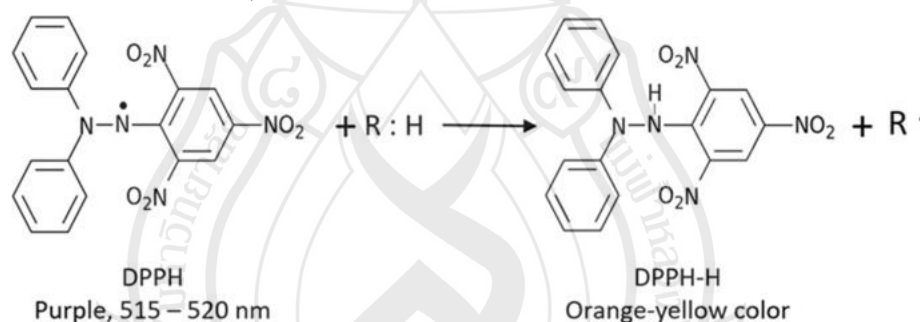
1.6.1 สารอนุมูลอิสระ (Free Radical)

สารอนุมูลอิสระ คือ โมเลกุลหรืออะตอมที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยว (unpaired electron) ซึ่งทำให้มันมีความไม่เสถียรและมีความต้องการในการรับหรือเสียอิเล็กตรอนเพื่อที่จะเสถียรตัวเอง ความไม่เสถียรนี้ทำให้สารอนุมูลอิสระมีปฏิกิริยาเคมีสูงและสามารถทำลายเซลล์ในร่างกายได้ สารอนุมูลอิสระสามารถเกิดขึ้นได้จากหลายแหล่ง เช่น การเผาผลาญในร่างกาย การสัมผัสกับรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV), คิวบุนหรือ, มลภาวะ และสารเคมีต่าง ๆ ซึ่งสารอนุมูลอิสระสามารถก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อในร่างกาย ก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ โรคเบาหวาน และกระบวนการแก่ชราของเซลล์ สำหรับกลไกการป้องกันอันตรายของร่างกายจากสารอนุมูลอิสระ คือ การสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) ซึ่งช่วยลดหรือยับยั้งการทำลายของสารอนุมูลอิสระ สำหรับสารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้ในอาหาร ผักผลไม้ และสมุนไพรต่าง ๆ [12-13]

การวัดปริมาณ Reactive oxygen species (ROS) ด้วยเทคนิค DPPH assay

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay เป็นการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน [14] โดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระ คือ อนุมูลอิสระ DPPH (DPPH[•], diphenyl-picrylhydrazyl radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัว (มีความเสถียร) และมีสีม่วง สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 515 - 520 นาโนเมตร (nm) เมื่ออนุมูลอิสระ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารสกัดจากสมุนไพรที่ละลายด้วยเมทานอลที่มีคุณสมบัติเป็น hydrogen donor อนุมูลอิสระ DPPH จะถูกรีดิวซ์และเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็น DPPH-H ซึ่งการลดลงของอนุมูลอิสระดังกล่าวจะสังเกตได้จากการจางลงของสีม่วงจนเป็นสีเหลือง สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 517 nm ได้โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) โดยใช้เป็นตัวชี้วัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารที่สนใจ

การวัดปริมาณ ROS สามารถทำได้โดยการใช้สาร dihydroethidium (DHE) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่สามารถผ่านเข้าไปภายในเซลล์ได้ DHE จะถูก ROS oxidize กลายเป็น Ethidium ซึ่งเป็นสารที่วาวแสง (excitation 480 nm, emission 580 nm) ดังแสดงในภาพที่ 1.1



ภาพที่ 1.1 โครงสร้างของ DHE ethidium และแสดงปฏิกิริยาระหว่าง DHE และ ROS โดยมีผลิตภัณฑ์เป็น Ethidium

ข้อดีของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีนี้ คือ ขั้นตอนและวิธีในการวิเคราะห์ไม่ซับซ้อน สะดวก และรวดเร็ว ใช้เพียงเครื่องมือวัดการดูดกลืนแสงเท่านั้น นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ เหมาะกับการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในสารสกัดผัก ผลไม้ และสมุนไพร [15]

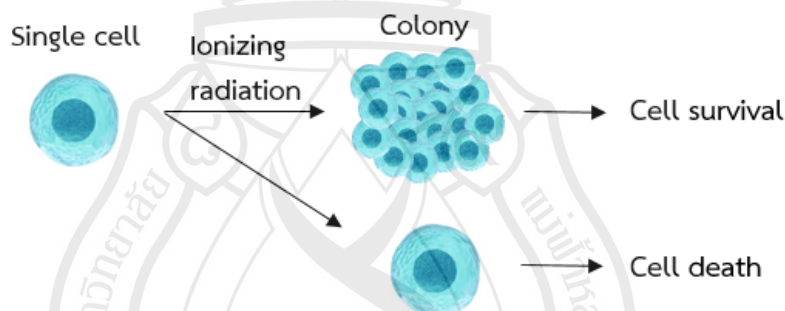
1.6.2 อัตราการอยู่รอดของเซลล์ (Cell Survival)

อัตราการอยู่รอดของเซลล์ (Cell survival rate) คือ การวัดเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่ยังคงมีชีวิตอยู่หลังจากที่ได้รับการรักษาหรือถูกสัมผัสกับสภาวะแวดล้อมที่สร้างความเสียหายให้แก่เซลล์ เช่น การสัมผัสกับรังสี หรือ การใช้สารเคมี ทั้งนี้ อัตราการอยู่รอดของเซลล์จะถูกวัดและคำนวณเพื่อ

ประเมินประสิทธิภาพของการรักษา การทดสอบความเป็นพิษของสารเคมีต่าง ๆ หรือความสามารถในการปรับตัวของเซลล์ต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ช่วยทำให้เราเข้าใจผลกระทบของการรักษาหรือสภาวะแวดล้อมของเซลล์ ช่วยพัฒนาให้มีประสิทธิภาพในการรักษาที่ดีและปลอดภัยมากยิ่งขึ้น โดยที่อัตราการอยู่รอดของเซลล์สามารถคำนวณได้โดยใช้วิธีการต่าง ๆ เช่น

1.6.2.1 การวัดอัตราการอยู่รอดของเซลล์ ด้วยวิธี Clonogenic assay

การวัดอัตราการอยู่รอดของเซลล์มีหลากหลายวิธี แต่วิธีที่นิยมวัดอัตราการอยู่รอดของเซลล์หลังจากการฉายรังสี คือ clonogenic assay ซึ่งเป็นการศึกษาความสามารถในการแบ่งเซลล์ โดยมีหลักการ คือ การ seed เซลล์จำนวนหนึ่งให้เป็นเซลล์เดี่ยว แล้วติดตามการอยู่รอดของเซลล์จากจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น ซึ่งการแบ่งตัวของเซลล์จากเซลล์เดี่ยวจนกลายเป็นโคโลนีที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่านั้นเป็นข้อสอบพิสูจน์ได้ถึงการอยู่รอดของเซลล์หลังจากการได้รับรังสี [16] ดังแสดงในภาพที่ 1.2 โดยหากเซลล์ที่สามารถแบ่งตัวจากเซลล์เดี่ยวจนกลายเป็นโคโลนีหมายถึงเซลล์ที่อยู่รอด และเซลล์ที่ไม่แบ่งตัวได้จนได้เป็นโคโลนีหมายถึงเซลล์ตาย (cell death)



ภาพที่ 1.2 หลักการของวิธีวัดอัตราการอยู่รอดของเซลล์หลังจากการฉายรังสีแบบ Clonogenic assay

1.6.2.2 การวัดอัตราการอยู่รอดของเซลล์ ด้วยวิธี MTT assay

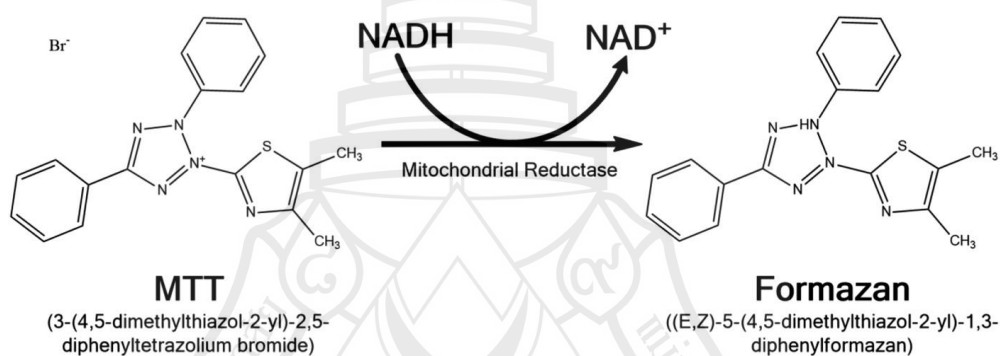
MTT assay เป็นวิธีการที่ใช้ในการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ซึ่งเป็นกระบวนการทดสอบเบื้องต้น (primary screening) ที่นิยมใช้ในการทดสอบทางชีววิทยาในงานด้านต่างๆ [17] โดยหลักการทำงานของ MTT assay คือ การใช้ความสามารถของ enzyme succinate dehydrogenase ที่พบอยู่ในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตในการรีดิวซ์ MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) ซึ่งเป็นสีสังเคราะห์ประเภท tetrazolium salt ที่มีสีเหลืองให้เปลี่ยนเป็น formazan ซึ่งมีลักษณะเป็นตะกอนสีม่วง ดังแสดงในภาพที่ 1.3 เมื่อนำมาละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น DMSO จะได้สารละลายสีม่วงน้ำเงินที่สามารถดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวช่วงคลื่นประมาณ 550-600 nm ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยค่าการดูดกลืนแสงจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสีม่วง

น้ำเงิน หรือปริมาณ formazan product ที่เกิดขึ้น อันแปรผันโดยตรงกับปริมาณของ succinate dehydrogenase enzyme ซึ่งขึ้นกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ดังนั้นจึงสามารถวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ โดยการวัดปริมาณ formazan product ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลง MTT ภายในเซลล์ได้ สามารถคำนวณอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ได้จากสมการจาก

$$\% \text{Cell viability} = \frac{\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{blank}}}{\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{blank}}} \times 100$$

โดย $\text{OD}_{\text{sample}}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ทดสอบ

$\text{OD}_{\text{control}}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ควบคุม



ที่มา [18]

ภาพที่ 1.3 โครงสร้างทางเคมีของ MTT และ Formazan

1.6.2.3 การวัดอัตราการอยู่รอดของเซลล์ ด้วยวิธี Trypan Blue Exclusion Assay

เซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถกีดขวางการซึมผ่านของสีย้อม Trypan Blue ในขณะที่เซลล์ที่ตายแล้วจะดูดซึมสีย้อมนี้ ทำให้สามารถนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและตายได้



ภาพที่ 1.4 หลักการของวิธีวัดอัตราการรอดของเซลล์หลังจากการฉายรังสี แบบ Trypan Blue Exclusion Assay

1.6.2.4 การวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค Flow Cytometry

Flow Cytometry คือเทคนิคทางชีววิทยาที่ใช้ในการวิเคราะห์ลักษณะของเซลล์หรืออนุภาคที่แขวนลอยในของเหลว โดยเซลล์ถูกนำผ่านลำแสงเลเซอร์ที่ละเซลล์เพื่อวัดคุณสมบัติต่าง ๆ เช่น ขนาด (forward scatter), ความซับซ้อนของโครงสร้างภายใน (side scatter), และการแสดงออกของโปรตีนจำเพาะ (ด้วยการติดฉลากฟลูออเรสเซนต์) เทคนิคนี้ได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุลขั้นสูง ยกตัวอย่างเช่น การวิจัยทางชีววิทยา เช่น ศึกษาชนิดและการทำงานของเซลล์ เช่น เซลล์ภูมิคุ้มกัน (T cells, B cells), การวิเคราะห์วัฏจักรเซลล์ (Cell Cycle Analysis) การวินิจฉัยทางการแพทย์ เช่น การตรวจหามะเร็งเม็ดเลือดขาว (Leukemia) และมะเร็งต่อมน้ำเหลือง (Lymphoma) การตรวจนับเซลล์ต้นกำเนิด (Stem Cell Enumeration) รวมถึงนำไปใช้อย่างแพร่หลายในกระบวนการพัฒนายา เช่น ศึกษาผลกระทบของยาในระดับเซลล์ คัดกรองสารเคมีหรือโมเลกุลที่มีศักยภาพเป็นยา

ข้อดีของ Flow Cytometry คือ

1. รวดเร็ว: สามารถวิเคราะห์เซลล์หลายพันถึงหลายล้านเซลล์ได้ในเวลาไม่กี่นาที
2. มีความแม่นยำสูง: แยกและวิเคราะห์เซลล์ตามคุณสมบัติหลากหลายพร้อมกัน
3. รองรับการวิเคราะห์หลายพารามิเตอร์ (Multiparameter Analysis)

ข้อจำกัด Flow Cytometry คือ

1. ราคาเครื่องมือและการดูแลรักษาสูง
2. ต้องมีผู้เชี่ยวชาญในการตั้งค่าการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล
3. การเตรียมตัวอย่างต้องระวังเพื่อป้องกันการสูญเสียเซลล์หรือสารฟลูออเรสเซนต์

หลักการทำงานเทคนิค Flow cytometry

1. การเตรียมตัวอย่าง
 - 1) เซลล์หรืออนุภาคที่ต้องการวิเคราะห์ถูกระงับในสารละลาย
 - 2) หากต้องการวิเคราะห์โปรตีนเฉพาะ จะใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสาร

ฟลูออเรสเซนต์ในการจับกับเป้าหมายบนหรือในเซลล์

2. การไหลของตัวอย่าง

ตัวอย่างถูกนำเข้าสู่เครื่องโดยผ่านระบบ *fluidics* ซึ่งจะจัดเรียงเซลล์ให้ไหลผ่าน

ลำแสงเลเซอร์ที่ละเซลล์

3. การตรวจจับแสง

เมื่อเซลล์ผ่านลำแสงเลเซอร์ จะเกิดการกระเจิงของแสง 2 รูปแบบ:

- 1) Forward Scatter (FSC): บอกข้อมูลเกี่ยวกับขนาดของเซลล์
- 2) Side Scatter (SSC): บอกข้อมูลเกี่ยวกับความซับซ้อนภายในเซลล์ เช่น

ออร์แกเนลล์ สารฟลูออเรสเซนต์ที่ติดฉลากกับเซลล์จะปล่อยแสงที่มีความยาวคลื่นเฉพาะ ซึ่งจะถูกระงับและวิเคราะห์

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

- 1) สัญญาณแสงที่ตรวจจับได้จะถูกแปลงเป็นข้อมูลดิจิทัลเพื่อวิเคราะห์

- 2) ใช้ *gating* เพื่อเลือกและจัดกลุ่มเซลล์ตามคุณสมบัติที่สนใจ เช่น ขนาด

ปริมาณโปรตีน หรือชนิดของเซลล์

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม

2.1 โรคมะเร็งปอด อาการ สาเหตุ และอุบัติการณ์ของโรค

โรคมะเร็งปอด เกิดจากการแบ่งเซลล์บริเวณเนื้อเยื่อปอดที่ไม่สามารถควบคุมได้ ซึ่งอาจแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่อบริเวณใกล้เคียงและส่วนต่าง ๆ ของร่างกายได้ อาการที่พบบ่อย ได้แก่ ไอเรื้อรัง บางครั้งอาจมีเสมหะปนเลือด เหนื่อยง่ายหรือแน่นหน้าอก อาจมีเสียงแหบเรื้อรัง เบื่ออาหาร น้ำหนักลดโดยไม่ทราบสาเหตุ สำหรับสาเหตุของโรคมะเร็งปอด ส่วนใหญ่มาจากการสูบบุหรี่ และการได้รับฝุ่นแร่บางชนิดเป็นระยะเวลาานาน เช่น จากการทำงานในเหมืองแร่ต่าง ๆ ตามรายงานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ โรคมะเร็งปอดเป็นชนิดของมะเร็งที่พบบมากที่สุดเป็นอันดับที่ 2 ในประชากรเพศชาย และเป็นอันดับที่ 4 ในประชากรเพศหญิง [4]

การรักษาโรคมะเร็งปอดขึ้นอยู่กับระยะของโรค เช่น การผ่าตัด การทำเคมีบำบัด และการฉายแสงหรือรังสีรักษา โดยปริมาณรังสีที่ใช้จะพิจารณาจากระยะของโรคมะเร็งปอดเป็นหลัก ผู้ป่วยมะเร็งปอดระยะที่ 1 และ 2 สามารถรักษาด้วยการผ่าตัดได้ ส่วนการรักษาด้วยการฉายรังสีจะใช้ปริมาณ 60-70 Gy โดยผู้ป่วยจะได้รับรังสีครั้งละ 2 Gy จำนวน 30-40 ครั้งตามอาการ สำหรับผู้ป่วยมะเร็งปอดระยะที่ 3 จะได้รับการรักษาด้วยการฉายรังสีปริมาณ 60-63 Gy ร่วมกับการทำเคมีบำบัด และในระยะที่ 4 จะใช้การฉายรังสีรักษาปริมาณ 30-50 Gy หรือรักษาร่วมระหว่างรังสีรักษาและเคมีบำบัด การฉายรังสีสามารถทำได้ทั้งแบบครั้งเดียว (single radiotherapy) หรือแบบแบ่งเป็นหลายครั้ง (fractionation radiotherapy) ซึ่งปริมาณรังสีที่ใช้สำหรับการฉายแบบแบ่งเป็นหลายครั้งจะอยู่ที่ประมาณครั้งละ 1.8-2 เกรย์ (Gy) [19] ซึ่งการฉายรังสีแบบหลายครั้งมีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์มะเร็งมากกว่าการฉายรังสีแบบครั้งเดียว เนื่องจากการฉายรังสีแบบหลายครั้งช่วยลดขนาดของก้อนมะเร็ง ส่งเสริมการนำส่งออกซิเจนจากเส้นเลือดเข้าสู่ก้อนมะเร็ง ทำให้รังสีทำลายเซลล์มะเร็งได้มากขึ้น อย่างไรก็ตาม การฉายรังสีไปยังบริเวณทรวงอกของผู้ป่วยมะเร็งปอดสามารถทำให้เกิดผลข้างเคียงที่รุนแรง เช่น เนื้อเยื่อปอดเสียหาย ปัญหาในระบบการหายใจ หรืออาจเหนียวน้ำให้เซลล์ปอดปกติกลายเป็นเซลล์มะเร็ง

รังสีที่ใช้ในการรักษามะเร็งคือรังสีแกมมา เช่น รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา และรังสีโปรตอน ซึ่งเป็นรังสีที่สามารถทำให้อิเล็กตรอนของอะตอมที่โดนรังสีหลุดออกจากวงโคจร กลายเป็นอิเล็กตรอนอิสระ รังสีชนิดนี้ถูกจัดว่าเป็นรังสีที่สามารถสร้างความเสียหายให้กับมนุษย์ได้ เนื่องจากมัน

สามารถทำให้อะตอมของตัวกลางที่รังสีผ่านเกิดการแตกตัวเป็นไอออน เช่น อะตอมภายในเซลล์หรือโมเลกุลของดีเอ็นเอภายในเซลล์ [20] เมื่อรังสีก่อไอออนผ่านเข้าสู่เซลล์มะเร็ง จะทำลายสารพันธุกรรมภายในเซลล์ ทำให้เซลล์มะเร็งเสียหายหรือตายไป ปัจจุบันเทคนิคการฉายรังสีได้รับการพัฒนาอย่างมาก ทำให้แพทย์รังสีรักษาสามารถกำหนดตำแหน่งของการฉายรังสีไปยังก้อนมะเร็งได้อย่างแม่นยำ ในขณะที่เนื้อเยื่อปกติโดยรอบได้รับปริมาณรังสีน้อยมาก อย่างไรก็ตาม ข้อดีของการใช้รังสีในการรักษา คือใช้เวลาไม่นานและไม่ทำให้เกิดความเจ็บปวด อย่างไรก็ตาม ยังมีข้อเสียคือ อาจทำให้เกิดการระคายเคืองผิวหนังบริเวณที่ฉายรังสี และทำให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อปกติที่อยู่ใกล้เคียงก้อนมะเร็งได้ [8]

2.2 ฟิสิกส์รังสี (Radiation Physics)

รังสี (radiation) คือ พลังงานที่แผ่มาจากแหล่งหนึ่งไปยังอีกแหล่งหนึ่งซึ่งอาจสามารถทะลุผ่านวัสดุชนิดต่างๆได้ โดยถูกถ่ายเทออกมาในรูปคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าหรืออนุภาคใด ๆ โดยชนิดของรังสี แบ่งได้เป็นสองประเภท ดังแสดงในภาพที่ 2.1 ดังนี้

2.2.1 รังสีไม่ก่อประจุ (Non-ionizing Radiation)

รังสีไม่ก่อประจุไม่สามารถทำให้เกิดการแตกตัวเป็นไอออนในอะตอมของตัวกลางที่รังสีผ่านได้ แต่จะถ่ายเทพลังงานของรังสีไปยังอิเล็กตรอนที่อยู่รอบ ๆ นิวเคลียสของอะตอมในตัวกลางนั้น ทำให้มันเลื่อนจากวงโคจรปกติขึ้นไปยังวงโคจรที่สูงขึ้น (excited state) และจากนั้นกลับไปยังวงโคจรเดิม โดยไม่มีการสูญเสียอิเล็กตรอน ทำให้อะตอมยังคงสภาพเสถียร

รังสีชนิดนี้มีพลังงานไม่สูงนักและอยู่ในช่วงต่ำของแถบคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า เช่น รังสีอินฟราเรด, คลื่นไมโครเวฟ, รังสีอัลตราไวโอเล็ต, และคลื่นวิทยุ โดยทั่วไปแล้ว รังสีไม่ก่อประจุไม่ทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิตมากนัก แต่การได้รับรังสีในปริมาณมากอาจก่อให้เกิดผลเสียต่อผิวหนัง เช่น ผื่นแดง มะเร็งผิวหนัง กระจกตาและเยื่อตาอักเสบ และอาจทำให้เกิดต่อกระจก [8]

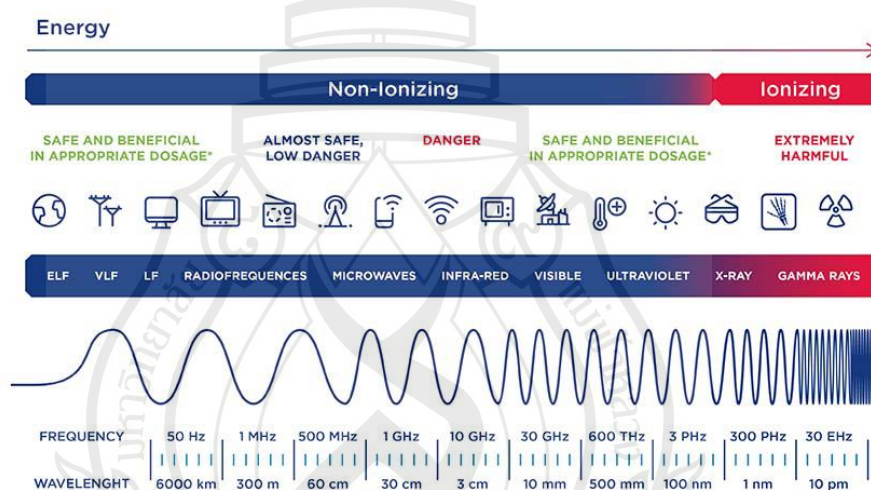
2.2.2 รังสีก่อประจุ (Ionizing Radiation)

รังสีชนิดนี้เกิดจากอะตอมหรือธาตุที่มีความไม่เสถียร และเป็นรังสีประเภทที่สามารถทำให้อิเล็กตรอนในวงโคจรของนิวเคลียสหลุดออกไปเป็นอิเล็กตรอนเสรีเมื่อกระทบกับวัตถุตัวกลาง อิเล็กตรอนที่หลุดออกจากวงโคจรจะเป็นไอออนลบ ขณะที่อะตอมเดิมที่มีจำนวนโปรตอนเท่ากับจำนวนอิเล็กตรอนจะกลายเป็นไอออนบวก รังสีประเภทนี้มีพลังงานสูงและสามารถทำให้เกิดการแตกตัวเป็นไอออนทั้งโดยทางตรงและทางอ้อม เช่น รังสีแอลฟา รังสีบีตา รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา และรังสี

นิวตรอน โดยแต่ละชนิดของรังสีจะมีความสามารถในการทะลุทะลวงที่แตกต่างกัน ตามที่แสดงในภาพที่ 2.2 สำหรับรังสีชนิดก่อประจุสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายประการ ทั้งในทางการแพทย์ ทางอุตสาหกรรม และงานวิจัย เช่น

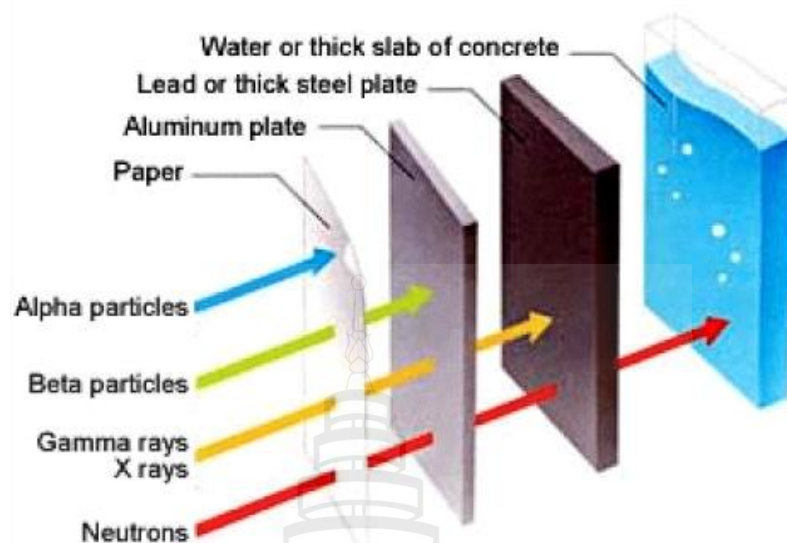
1. ทางการแพทย์: การใช้รังสีเอกซ์ในการถ่ายภาพเพื่อวินิจฉัยโรค หรือการใช้รังสีเพื่อการรักษามะเร็ง
2. ทางอุตสาหกรรม: การใช้รังสีในการตรวจสอบความแข็งแรงของวัสดุ หรือการตรวจสอบการเชื่อม
3. งานวิจัย: การใช้รังสีในการศึกษาโครงสร้างของวัสดุหรือเซลล์

อย่างไรก็ตาม รังสีชนิดก่อประจุเหล่านี้สามารถส่งผลกระทบต่อสุขภาพได้ หากไม่มีความเข้าใจเกี่ยวกับผลกระทบของรังสีต่อร่างกายและการป้องกันรังสีที่เหมาะสม



ที่มา [21]

ภาพที่ 2.1 ประเภทของรังสีชนิดก่อไอออนและรังสีชนิดไม่ก่อไอออน

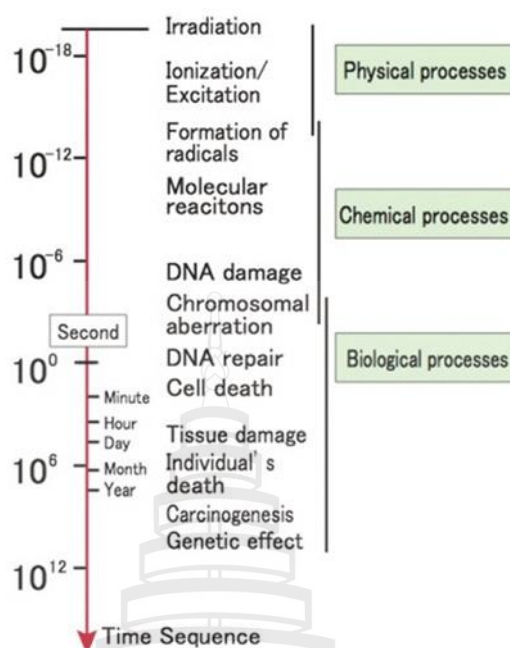


ที่มา [22]

ภาพที่ 2.2 ความสามารถในการทะลุทะลวงของรังสีก่อไอออนแต่ละชนิด

2.3 รังสีชีววิทยา (Radiation Biology)

เมื่อรังสีผ่านเข้าไปในร่างกายจะทำให้กระบวนการต่าง ๆ นำไปสู่การเกิดอันตรกิริยาเหนี่ยวนำให้ร่างกายเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ โดยสามารถแยกกระบวนการเหล่านี้ออกเป็น 3 แบบตามเวลา ดังแสดงตามภาพที่ 2.3 ดังนี้ ผลกระทบทางกายภาพ (Physical phase) ผลกระทบทางเคมี (Chemical phase) และผลกระทบทางชีวภาพ (Biological phase) โดยผลกระทบแต่ละประเภทจะเกิดในกระบวนการที่แตกต่างกันรวมไปถึงช่วงเวลาที่ทำให้เกิดกระทบด้วย



ที่มา [8]

ภาพที่ 2.3 ช่วงระยะเวลาและผลกระทบที่เกิดขึ้นภายหลังจากการได้รับรังสีชนิดก่อไอออน

2.3.1 ผลกระทบทางกายภาพหลังจากได้รับรังสี (Physical Phase)

ผลกระทบทางกายภาพเป็นผลกระทบที่เกิดขึ้นเร็วที่สุด จะเกิดขึ้นภายในไม่เกิน 10^{-15} วินาที (s) และเป็นระยะที่เริ่มตั้งแต่การเกิดอันตรกิริยาระหว่างอนุภาคและอะตอมของสารประกอบในเนื้อเยื่อ โดยเมื่อน้ำได้รับรังสีจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเริ่มต้น คือ น้ำจะเกิดการแตกตัวและเกิดการกระตุ้นภายในโมเลกุล ทำให้เกิด H_2O^+ , H_2O^* และอิเล็กตรอนอิสระ ซึ่งแต่ละปฏิกิริยาจะเกิดแบบอิสระและห่างกันไม่น้อยกว่า 0.1 ไมโครเมตร หลังจากเกิดผลกระทบทางกายภาพแล้วโมเลกุลของน้ำจะเคลื่อนที่ได้ประมาณ 1-2 อังสตรอม (Å) หรือประมาณขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโมเลกุลน้ำ ซึ่งมีขนาดประมาณ 2.9 Å และภายในเวลา 10^{-12} s จะเกิดผลกระทบทางเคมีเข้ามาแทนที่ แต่จะเป็นแค่เพียงช่วงแรกของผลกระทบทางเคมี ซึ่งจะเกิดการเปลี่ยนแปลง ดังนี้ H_2O^+ , H_2O^* และอิเล็กตรอนอิสระ ที่เกิดขึ้นในขั้นของผลกระทบทางกายภาพจะถูกแทนที่ด้วย H_3O^+ , $\cdot OH$, e^-_{aq} และ H_2 ซึ่งสามารถเขียนเป็นสมการทางเคมี ได้ดังนี้

1. $H_2O^+ + H_2O \rightarrow H_3O^+ + \cdot OH$
2. $H_2O^* \rightarrow H_2O^+ + e^-$
3. $e^- \rightarrow e^-_{aq}$

2.3.2 ผลกระทบทางเคมีภายหลังการได้รับรังสี (Chemical Phase)

ผลกระทบทางเคมีเป็นระยะที่อะตอมหรือโมเลกุลที่เสียหายเกิดอันตรกิริยาทางเคมีกับองค์ประกอบภายในเซลล์ โดยจะเกิดภายหลัง 10^{-12} s ซึ่งสารตั้งต้นจากช่วงแรกของผลกระทบทางเคมีมีดังนี้ H_3O^+ , $\cdot\text{OH}$, e^-_{aq} และ H_2 ซึ่งสารตั้งต้นเหล่านี้จะเป็นกลุ่มที่มีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่ ทำให้สารกลุ่มนี้สามารถเกิดการกระตุ้นและเกิดปฏิกิริยาได้ง่าย โดยสารตั้งต้นเหล่านี้จะเกิดการเคลื่อนที่แบบสุ่ม โดยอาศัยความร้อนเป็นตัวนำพาคล้ายกับการเคลื่อนที่ ที่กระจายตัวออกไปเรื่อย ๆ เมื่อสารตั้งต้นเคลื่อนที่เข้ามาใกล้กันมากจะสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาทางเคมีได้ ซึ่งสมการทางเคมีของผลกระทบทางเคมีภายหลังจากการได้รับรังสี สามารถเขียนได้ดังนี้

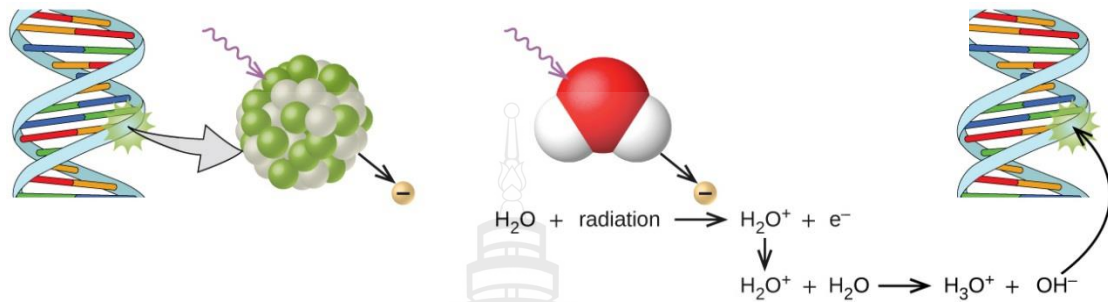
1. $\cdot\text{OH} + \cdot\text{OH} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$
2. $\cdot\text{OH} + \text{e}^-_{\text{aq}} \rightarrow \text{OH}^-$
3. $\cdot\text{OH} + \text{H}^{\cdot} \rightarrow \text{H}_2\text{O}$
4. $\text{H}_3\text{O}^+ + \text{e}^-_{\text{aq}} \rightarrow \text{H}^{\cdot} + \text{H}_2\text{O}$
5. $\text{e}^-_{\text{aq}} + \text{e}^-_{\text{aq}} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2 + 2\text{OH}^-$
6. $\text{e}^-_{\text{aq}} + \text{H}^{\cdot} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2 + \text{OH}^-$
7. $\text{H}^{\cdot} + \text{H}^{\cdot} \rightarrow \text{H}_2$

2.3.3 ผลกระทบทางชีวภาพภายหลังการได้รับรังสี (Biological Phase)

ผลกระทบทางชีวภาพเป็นขบวนการต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นภายหลังจากการเกิดความเสียหายของโมเลกุลสำคัญ หรือการเกิดการเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างและหน้าที่ของโมเลกุลนั้น หลังผ่าน 1 วินาทีไปแล้ว ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิต โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนของดีเอ็นเอภายในเซลล์ การเกิดมะเร็ง หรือการตายของเซลล์ได้ โดยผลกระทบทางชีวภาพภายหลังการได้รับรังสีจะขึ้นกับคุณภาพของรังสีและปริมาณรังสีที่ได้รับ [8]

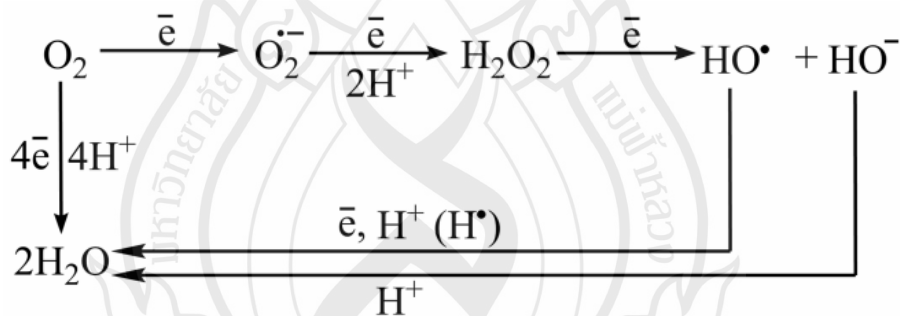
ผลกระทบที่เกิดขึ้นในร่างกายหลังจากการได้รับรังสีชนิดก่อไอออนเป็นผลมาจากการเกิดอันตรกิริยาได้ทั้งทางตรง (direct) และแบบทางอ้อม (indirect) ดังแสดงตามภาพที่ 2.4 โดยผลจากการเกิดอันตรกิริยาแบบทางตรงจะเกิดจากอันตรกิริยาโดยตรงระหว่างรังสีและโมเลกุลของร่างกาย ซึ่งเป็นการที่รังสีเข้าไปทำลายดีเอ็นเอโดยตรง ทำให้โครงสร้างต่าง ๆ เกิดความเสียหายนำไปสู่การตายของเซลล์ ส่วนผลจากอันตรกิริยาแบบทางอ้อมจะมีการทำอันตรกิริยากับตัวกลางหรือน้ำในร่างกายก่อน ทำให้น้ำเกิดการแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระ (Reactive Oxygen Species, ROS) ดังแสดงตามภาพที่ 2.5 ซึ่งตัวอนุมูลอิสระนี้จะเข้าไปทำอันตรกิริยากับดีเอ็นเอ โปรตีน ไขมัน RNA ก่อให้เกิดความเสียหายต่อระบบต่าง ๆ ภายในร่างกาย เช่น ระบบภูมิคุ้มกัน ระบบไหลเวียนเลือด การเกิดกระบวนการลิวติเนชันออกซิเดชัน ทำให้เนื้อเยื่อถูกทำลาย การเพิ่มขึ้นของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการ

อักเสบ ทำให้เกิดการอักเสบที่รุนแรง ความเสียหายทั้งหมดนี้ หากไม่สามารถซ่อมแซมได้สมบูรณ์ จะส่งผลทำให้เกิดการตายของเซลล์ได้



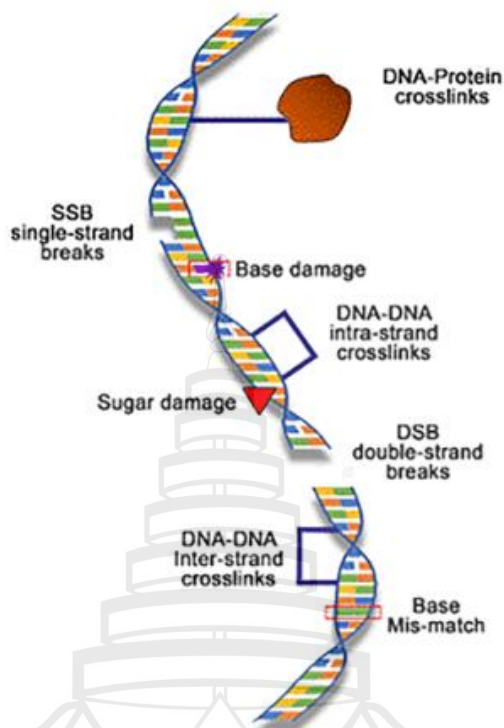
ที่มา [23]

ภาพที่ 2.4 การเข้าทำอันตรกิริยาของรังสีทางตรง (direct action) โดยรังสีเข้าทำลาย DNA โดยตรง และทางอ้อม (indirect action) รังสีทำให้เกิดการสร้าง ROS ซึ่ง ROS จะทำให้เกิดการทำลาย DNA



ภาพที่ 2.5 การเกิดรีดักชันของโมเลกุลออกซิเจนผ่าน four-and one-electron schemes

DNA จัดว่าเป็นเป้าหมายสำคัญในการเข้าทำลายของรังสี โดยรังสีสามารถทำให้เกิดความเสียหายของ DNA ได้หลายรูปแบบ เช่น (i) intra strand crosslink เมื่อเบสที่อยู่ภายในสายของ DNA สายเดียวกันมาเชื่อมพันธะกันเอง (ii) interstrand crosslink เมื่อเบสที่อยู่ภายในสายของ DNA สายคู่มาเชื่อมพันธะกัน (iii) DNA single strand break (SSB) คือ เมื่อสายดีเอ็นเอที่เป็นสายคู่ขาดไปหนึ่งเส้น และ (iv) DNA double strand break (DSB) คือ การที่สายดีเอ็นเอสายคู่แตกออกทั้งสองเส้น ดังแสดงในภาพที่ 2.6 ซึ่งความเสียหายแบบ DSB จัดว่าเป็นความเสียหายที่เซลล์สามารถทำการซ่อมแซมได้ยากที่สุด ชักนำไปสู่การตายของเซลล์ได้มากที่สุด [24]



ที่มา [25]

ภาพที่ 2.6 ความเสียหายของดีเอ็นเอประเภทต่าง ๆ อันเนื่องมาจากรังสีก่อไอออน

2.4 ย่านาง

ย่านาง เป็นผักพื้นบ้านและพืชสมุนไพร ชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels. จัดอยู่ในวงศ์ Menispermaceae มีถิ่นกำเนิดในตอนกลางของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบขึ้นตามป่าผลัดใบ ป่าดงดิบ และป่าโปร่งในทุกภาคของประเทศไทย โดยมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ คือ เป็นไม้เถาเลื้อย เถากลมขนาดเล็ก มีเนื้อไม้ เลื้อยพันตามต้นไม้หรือกิ่งไม้ เถาอ่อนมีสีเขียวและขนอ่อนปกคลุม เมื่อเถาแก่จะมีสีเข้มผิวเรียบแตกเป็นแนวถี่ รากมีขนาดใหญ่ มีเหง้าใต้ดิน ใบเป็นใบเดี่ยวติดกับลำต้นแบบสลับ มีสีเขียวเข้ม ลักษณะใบคล้ายรูปไข่ หรือรูปไข่ขอบขนาน ปลายใบเรียว ฐานใบมน ขอบใบเรียบ ผิวใบเป็นคลื่นเล็กน้อย ผิวใบด้านบนและหลังใบเรียบมัน ไม่มีหูใบ ออกดอกสีเหลือง มีขนาดเล็ก เป็นช่อสั้น ๆ แบบแยกแขนงตามข้อและซอกใบ แยกเป็นช่อดอกเพศผู้ และช่อดอกเพศเมีย ผลกลมรูปไข่กลับ ผิวเกลี้ยง มีเมล็ดแข็ง ผลสีเขียว ฉ่ำน้ำ ออกเป็นพวงตามข้อและซอกใบ เมื่อสุกจะเปลี่ยนเป็นสีส้มและแดงสด เมล็ดรูปเกือบกลม ย่านางเป็นพืชที่ขึ้นในดินทุกชนิด

และปลูกได้ทุกฤดู ขยายพันธุ์โดยการใช้หัวใต้ดิน เหงาแก่ที่ติดหัว ปักชำยอด หรือการเพาะเมล็ด เป็นไม้ที่ปลูกง่ายโดยสามารถปลูกเป็นหลุมหรือยกร่องได้ [9]

2.4.1 สารประกอบและสรรพคุณทางยาที่พบในย่านาง

ย่านางเป็นพืชสมุนไพรที่ใช้ประโยชน์ได้ทุกส่วนไม่ว่าจะเป็น ราก เหงา ใบ โดยส่วนที่ใช้ประโยชน์มากที่สุด คือ ส่วนใบ ใบย่านางมีสารเบต้าแคโรทีน วิตามินเอ วิตามินซี แชนโทฟิลล์ แทนนิน สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณสูง ได้แก่ มิเนโคไซด์ (Minecoside), กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก (p-hydroxy benzoic acid) และสารในกลุ่มฟลาโวนโกลโคไซด์ ได้แก่ สารโมโนอีพอกซีบีตาแคโรทีน (*monoepoxy-beta-carotene*) และอนุพันธ์ของกรดซินนามิก (flavones glycoside cinnamic acid derivative) ส่วนสารอัลคาลอยด์ (alkaloid) ได้แก่ ทีเรียโคริน (tiliacorine), ทีเรียโคลินิน (Tiliacorinine), นอร์ทีเรียโครินิน (nor-tiliacorinine), tiliacorinin 2, -N-oxide Tiliandrine, Tetraandrine และ D-isochondendrine พบได้ทั้งในราก และใบย่านาง และยังมีสารอาหารที่สำคัญ เช่น โพรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน ไฟเบอร์ แคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก โพแทสเซียม ไบโอฟลาวิน ไนอะซิน วิตามินบีหนึ่ง และ วิตามินบีสอง เป็นต้น [10] นอกจากนี้มีรายงานว่า ใบย่านาง เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ โดยมีเบต้าแคโรทีน แทนนินเข้มข้น ไตรเทอร์พีน ฟลาโวนอยด์ และซาโปนินในระดับสูง ตลอดจนแร่ธาตุ เช่น แคลเซียมและธาตุเหล็กฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการก่อกลายพันธุ์จากสารประกอบเหล่านี้ยังชี้ให้เห็นถึงศักยภาพในการป้องกันมะเร็งอีกด้วย สำหรับรากและใบของพืชชนิดนี้ประกอบด้วยสารประกอบอัลคาลอยด์ โดยเฉพาะอัลคาลอยด์บิสเบนซิลโซควิโนลีน ทิลิโครินิน ทิลิอาโคริน และนอร์ทิลิอาโครินิน และมีรายงานฤทธิ์เป็นพืชต่อเซลล์ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคที่เรียกว่าเชื้อ Mycobacterium tuberculosis สายพันธุ์ MDR และฤทธิ์ต้านมาลาเรีย [11]

2.4.2 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งด้วยสารสกัดใบย่านาง

จากการศึกษาฤทธิ์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยน้ำ เมทานอล เอทิลอะซิเตท และเฮกเซนของสมุนไพรไทย จำนวน 5 ชนิด คือ อัญชัน ย่านาง บัวบก หม่อน และกาวเครือขาว ด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay พบว่า สารสกัดด้วยเมทานอล และน้ำของย่านางมีฤทธิ์ออกซิเดชันดีที่สุด โดยมีค่า EC₅₀, VEAC, TEAC และ FRAP value เท่ากับ 61.8 µg/ml, 2.00 mM, 0.77 mM และ 546.9 mM ตามลำดับ ในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดใบย่านางที่สกัดด้วยน้ำด้วยวิธี MTT assay พบว่าสารสกัดใบย่านางจัดอยู่ในประเภทของสารที่มีความเป็นพิษต่ำ และไม่มีฤทธิ์เป็นสารกลายพันธุ์ [26] และการศึกษาพิษเฉียบพลันของสารสกัดด้วยน้ำจาก

ทุกส่วนของย่านาง พบว่าสารสกัดย่านางด้วยน้ำไม่ก่อให้เกิดพิษเฉียบพลัน และพิษกึ่งเรื้อรังในหนูทดลอง [27] แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ของย่านางยังมีไม่มากนัก ส่วนใหญ่เป็นการทดลองในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง ยังไม่พบรายงานการศึกษาทางคลินิก รวมทั้งข้อมูลด้านความเป็นพิษในมนุษย์

Tiliacora triandra เป็นหนึ่งในพืชที่ถูกใช้บ่อย ๆ ในการรักษาโดยหมอชาวบ้านในการผลิตสารต้านมะเร็ง และป้องกันโรคมะเร็ง ตัวอย่างรายงานถึงฤทธิ์ต้านมะเร็ง ดังแสดงในภาพที่ 2.8 ได้แก่ สารสกัดจากราก ที่แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดหลายชนิด รวมถึง KB, Hep2, A549, COR L23 และ NCI H226 โดยมีค่า IC_{50} ระหว่าง 19.5 ถึง 45.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร [28] สารสกัดจากลำต้น แสดงฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 81.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร [29] สารสกัดจากใบ แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้มนุษย์ (HT 29) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 203.52 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร [30] ในการศึกษาอื่น ๆ สารสกัดใบย่านางด้วยเอทิลแอลกอฮอล์, เมทานอล และน้ำ แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) และมะเร็งปอด (NCI H187) โดยมีค่า IC_{50} ระหว่าง 11.93 ถึง 32.15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และออกซอนาโลบิน, สารสกัดใบย่านางด้วยเมทานอล, แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ NCI H187 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 27.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ สารสกัดใบย่านางได้ถูกนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด A549 ชนิด sensitive และเซลล์มะเร็งปอด A549RT-eto ชนิด multidrug-resistance พบว่า สารสกัดดิลโคโรมินีน แสดงผลที่ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ ทั้งเซลล์ชนิดที่ sensitive และชนิดที่ multidrug-resistance โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 22.0 และ 48.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับ ทีเลียโคโรนิน (Tiliacoronine), สารอัลคาลอยด์ที่แยกได้จากราก และลำต้น แสดงฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้ถึงสี่ชนิด โดยมีค่า IC_{50} ระหว่าง 4.5 ถึง 7.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยจะไปกระตุ้นกระบวนการตายแบบ apoptosis ผ่านทางกระบวนการ caspase-activation [31]



ที่มา [32]

ภาพที่ 2.7 ใบย่านาง

Plant parts and extracts	DPPH assay (IC ₅₀)	ABTS assay (IC ₅₀)	FRAP assay Fe(II) equivalent	Other assays	References
Roots extracts					
Ethanol	83.64 µg/ml				Singharachai <i>et al.</i> (2011b)
Ethanol	15.38±0.25 µg/ml				Juckmeta <i>et al.</i> (2012)
Aerial extracts					
n-hexane fraction of twigs	2,436.83±22.49 µg/ml	190.04±8.59 µg/ml	402.21±13.62 µM/mg	Nitric Oxide assay (IC ₅₀) 30.50±0.47 µg/ml	Makinde <i>et al.</i> (2019)
Ethyl acetate fraction of twigs	424.16±2.69 µg/ml	21.62±0.03 µg/ml	1,116.54±3.9 µM/mg	87.51±8.72 µg/ml	
Ethyl acetate fraction of leaves	2,412.83±34.39 µg/ml	18.70 ± 3.68 µg/ml	276.59 ± 11.22 µM/mg	1,760.09±11.81 µg/ml	
Leaves extracts					
Ethanol	14.51±0.67 µg/ml				Phadungkit <i>et al.</i> (2012)
Methanol	8.4 mg/ml				Chaveerach <i>et al.</i> (2016)
Petroleum ether	113.81±0.85 ppm		0.49±0.00 mmol/mg	Total Flavonoid Content 7.22±0.08 mmolQE/mg	Rattana <i>et al.</i> (2010)
Dichloromethane	75.57±1.68 ppm		0.37±0.00 mmol/mg	17.04±0.06 mmolQE/mg	
Ethyl acetate	15.02±0.47 ppm		0.58±0.00 mmol/mg	14.71±0.08 mmolQE/mg	
Methanol	9.63±0.53 ppm		0.734±0.13 mmol/mg	18.68±0.28 mmolQE/mg	
Water	16.19±0.45 ppm		0.151±0.00 mmol/mg	2.01±0.07 mmolQE/mg	
80%Ethanol	6,346.05±1.17 µg extract/mg DPPH		0.27±0.02 mmol/g	22.63±1.53 mgCE/g	Nanasombat <i>et al.</i> (2019)
				Total Phenolic Content 101.25±1.81 mgGAE/g	
Water	0.197±0.018 mg/g	0.077±0.011 mg/g	0.054±0.002 mmol/g	97.899±1.735 mgGAE/g	Singthong <i>et al.</i> (2014)
Ethanol	0.333±0.024 mg/g	0.191±0.059 mg/g	0.034±0.001 mmol/g	26.703±1.642 mgGAE/g	
Acetone	0.419±0.091 mg/g	0.312±0.056 mg/g	0.014±0.001 mmol/g	16.456±2.968 mgGAE/g	
Ethanol (maceration)	0.1007±0.01 mg/ml			50.15±3.82 mgGAE/g	Soradech <i>et al.</i> (2018)
Ethanol (batch stirring at 30°C)	0.0968±0.01 mg/ml			58.02±4.11 mgGAE/g	
Ethanol (batch stirring at 40°C)	0.1131±0.01 mg/ml			59.13±4.81 mgGAE/g	
freeze-dried leaves juice	0.29±0.02 mgTE/g		0.34±0.03 mgGAE/g	0.94±0.04 mgGAE/g	Chuacharoen (2020)

IC₅₀=50% inhibitory concentration; DPPH=1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl; ABTS=2,2-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt; FRAP= Ferric Reducing Antioxidant Power; QE=Quercetin equivalent; CE=Catechin equivalent; GAE=Gallic acid equivalent; TE= Trolox equivalent

ภาพที่ 2.8 สรรพคุณทางเภสัชวิทยาของ *Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels

Activity	Model used	Plant part	Extracts / compounds	Major findings	References
Neuroprotective	<i>In vitro</i> . AChE inhibition assay	Root	MeOH extract	42.29% inhibition at 0.1 mg/ml.	Ingkaninan <i>et al.</i> (2003)
		Leaf	80%EtOH extract	2.18% inhibition at 0.1 mg/ml.	Nanasombat <i>et al.</i> (2019)
	<i>In vivo</i> . Alcoholic rat	Aerial part	Water extract (100, 200, and 400 mg/kg, p.o.)	↑ memory deficit, ↓ AChE activity, ↑ neuron density, ↓ MDA level, and ↑ SOD, CAT, and GSH-Px activities.	Phunchago <i>et al.</i> (2015)
	<i>In vivo</i> . Cerebral ischemia/reperfusion mice	Leaf	EtOH extract (300 and 600 mg/kg, p.o.)	↑ spatial learning, ↑ spatial memory, ↑ learning flexibility and prevent hippocampal cell death. Pretreatment: ↓ calcium level and ↓ MDA level, ↑ GSH, SOD and CAT activities, attenuate brain infarction, and ↓ dead cells in the cerebral cortex and hippocampus.	Thong-asa <i>et al.</i> (2017) Thong-asa and Bullangpoti (2020)
<i>In vivo</i> . Male mice	Leaf	EtOH extract (300 and 600 mg/kg, p.o.)	↑ spatial learning, ↑ spatial memory, ↑ learning flexibility, ↑ choline acetyltransferase activity and ↑ hippocampal cell density.	Thong-asa and Laisangnungam (2018)	
Antidiabetic	<i>In vitro</i> . α-amylase and α-glucosidase inhibition assays	Leaf	80%EtOH extract	78.28% α-amylase inhibition and 10.30% α-glucosidase inhibition at 1 mg/ml.	Nanasombat <i>et al.</i> (2019)
		Twig	n-hexane fraction	IC ₅₀ α-amylase=93.74 μg/ml. IC ₅₀ α-glucosidase=3.40 μg/ml.	Makinde <i>et al.</i> (2019)
		Aerial part	5,7-dihydroxy-6-oxoheptadecanoic acid	IC ₅₀ α-amylase=26.27 μM. IC ₅₀ α-glucosidase=11.58 μM.	Makinde, Ovatlamporn <i>et al.</i> (2020)
	<i>In vivo</i> . STZ-induced diabetic rats	Leaf	EtOH extract (300 mg/kg, p.o. for 8 weeks)	↓ blood glucose level, ↑ serum insulin level, and activated the regeneration of pancreatic Islets of Langerhans.	Katisart and Rattana (2017)
	<i>In vivo</i> . Mice with high sugar intake	Leaf	EtOH extract (300 and 600 mg/kg, p.o.)	↓ blood glucose, ↓ serum insulin, and ↑ liver and muscle glycogen contents.	Thong-asa <i>et al.</i> (2019)
	<i>In vivo</i> . High-fat diet/ STZ induced diabetic rats	Aerial part	EtOH extract (100 and 400 mg/kg, p.o. for 30 days)	↓ blood glucose level, ↓ lipid profiles, and ↑ liver and kidney functions.	Makinde, Radenahmad, <i>et al.</i> (2020)
Antiplasmodial	<i>In vitro</i> . Clinical isolate <i>Plasmodium falciparum</i>	Root	MeOH extract and isolated compounds	MeOH extract: IC ₅₀ =17 μg/ml, Tiliacorinine: IC ₅₀ =3533±281 ng/ml, Tiliacorinine: IC ₅₀ =675±96 ng/ml, Nor-tiliacorinine A: IC ₅₀ =558±41 ng/ml, alkaloid G: IC ₅₀ =344±44 ng/ml, alkaloid H: IC ₅₀ =916±122 ng/ml.	Pavanand <i>et al.</i> (1989)
	<i>In vitro</i> . <i>P. falciparum</i> CQ sensitive (3D7) and resistance (W2) strains	Stem, root	Different extracts and isolated compounds	The CH ₂ Cl ₂ and MeOH extracts of the stem and root: IC ₅₀ =1.22 to 5.73 μg/ml against both strains of parasites. Tiliacorinine: IC ₅₀ W2=2.14 μg/ml. Yanangcorinine: IC ₅₀ W2=1.55 μg/ml. Tiliacorinine and Yanangcorinine showed parasitocidal effect and potentiated the efficacy of CQ against CQ-resistant strain.	Nutmakul <i>et al.</i> (2016) Nutmakul <i>et al.</i> (2020)
Antipyretic	<i>In vivo</i> . Yeast-induced fever rats	Root	Powder (40 mg/kg, p.o.)	Significantly reduced rectal temperature from the first hour after yeast injection.	Konsue <i>et al.</i> (2008)
Anti-inflammatory	<i>In vitro</i> . LPS induced NO production in RAW264.7	Root	EtOH extract	NO inhibitory activity: IC ₅₀ =54.65±5.34 μg/ml.	Juckmeta and Itharat (2012)
	<i>In vivo</i> . Writhing test in mice	Leaf	Lyophilized leaves juice	56% nitrite production inhibition at 500 μg/ml.	Weerawatanakorn <i>et al.</i> (2018)
Anticancer	<i>In vitro</i> . Various lung cancer cell lines	Leaf	Water extract (1 g/kg, p.o.)	55.7% inhibition of writhing reflex.	Tangsucharit <i>et al.</i> (2006)
		Root	EtOH extract	IC ₅₀ KB=42.1±4.5 μg/ml, IC ₅₀ Hep2= 45.2±7.1 μg/ml, IC ₅₀ A549=33.6±0.6 μg/ml, IC ₅₀ COR-L23=25.7±7.9 μg/ml, IC ₅₀ NCI-H226=19.5±1.4 μg/ml.	Juckmeta <i>et al.</i> (2019)

ภาพที่ 2.8 (ต่อ)

Activity	Model used	Plant part	Extracts / compounds	Major findings	References
Anticancer	<i>In vitro</i> . Hepatoma cell line	Stem	EtOH extract	IC ₅₀ HepG2=81.06 µg/ml.	Lumlerdikij <i>et al.</i> (2020)
	<i>In vitro</i> . Colon cancer cell line	Leaf	MeOH extract	IC ₅₀ HT-29=203.52 µg/ml.	Manosroi <i>et al.</i> (2015)
	<i>In vitro</i> . Oral cavity cancer (KB) and lung cancer (NCI-H187) cell lines	Leaf	Different extracts	EtOAc extract: IC ₅₀ KB=15.81 µg/ml, IC ₅₀ NCI-H187=33.38 µg/ml. MeOH extract: IC ₅₀ KB=32.15 µg/ml, IC ₅₀ NCI-H187=11.93 µg/ml. Water extract: IC ₅₀ KB=12.06 µg/ml, IC ₅₀ NCI-H187=12.27 µg/ml. Oxonanolobine (isolated from MeOH extract): IC ₅₀ NCI-H187=27.6 µg/ml.	Surapong <i>et al.</i> (2016)
		<i>In vitro</i> . Sensitive (A549) and multidrug resistant (A549RT-eto) lung cancer cells	Leaf	Different extracts	CH ₂ Cl ₂ extract: IC ₅₀ A549=22.0 µg/ml, IC ₅₀ A549RT-eto=48.5 µg/ml EtOH extract: IC ₅₀ A549=67.3 µg/ml, IC ₅₀ A549RT-eto=73.0 µg/ml.
Human CCA <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	Stem, root	Tiliacorinine	IC ₅₀ KKU-M055=4.5 µM, IC ₅₀ KKU-M213=5.7 µM, IC ₅₀ KKU-M214=6.1 µM, IC ₅₀ KKU-100=7.0 µM. Tiliacorinine rapidly reduced tumor growth in CCA xenografted mice.	Janeklang <i>et al.</i> (2014)	
Antimicrobial	<i>In vitro</i> . Disc diffusion	Root	EtOH extract	The extract exhibited antibacterial and antifungal activities with the inhibition zone 6.8 to 16.3 mm.	Nuaeissara <i>et al.</i> (2011)
	<i>In vitro</i> . Broth microdilution	Aerial part	n-hexane and EtOAc fractions	The extracts exhibited antibacterial activity with MIC=0.39 to 6.25 mg/ml and MBC=1.5 to 12 mg/ml.	Makinde <i>et al.</i> (2019)
	<i>In vitro</i> . Disc diffusion and broth microdilution	Leaf	Essential oil	The essential oil exhibited antibacterial activity with the inhibition zone 10 to 16 mm, and MIC=6.25 µl/ml.	Naibaho <i>et al.</i> (2012)
	<i>In vitro</i> . Antimycobacterial activity	Root	Tiliacorine, Tiliacorinine, and 2'-nortiliacorinine	MIC=0.7 to 6.2 µg/ml against clinical isolates of multidrug-resistant <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	Sureram <i>et al.</i> (2012)

↑=increase; ↓=decrease; AChE=Acetylcholinesterase; MDA=malondialdehyde; SOD= Superoxide dismutase; CAT= Catalase; GSH-Px=Glutathione Peroxidase; STZ=Streptozotocin; CQ=chloroquine; LPS=lipopolysaccharide; NO=nitric oxide; CCA=Cholangiocarcinoma

ที่มา [11]

ภาพที่ 2.8 (ต่อ)

2.5 สารเพิ่มประสิทธิภาพของรังสี (Radiosensitizer)

สารเพิ่มประสิทธิภาพของรังสี หรือที่เรียกว่า Radiosensitizer คือ สารเคมีหรือยาที่ใช้ในการรักษามะเร็งที่มีบทบาทในการเพิ่มความไวของเซลล์มะเร็งต่อรังสีในการรักษาด้วยรังสี ซึ่งทำให้การรักษาด้วยรังสีมีประสิทธิภาพมากขึ้นในการทำลายเซลล์มะเร็ง โดยจะแตกต่างกับ สารลดผลของรังสี หรือ Radioprotector ดังแสดงในภาพที่ 2.9 ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณรังสีที่ให้แก่เซลล์กับอัตราการอยู่รอดของเซลล์ของสารลดผลของรังสีและสารเพิ่มประสิทธิภาพของรังสี โดยแกน x แสดงถึง ปริมาณรังสีที่ให้กับเซลล์ และแกน y แสดงถึง อัตราการอยู่รอดของเซลล์ จะเห็นได้ว่า สารเพิ่มประสิทธิภาพของรังสี จะก่อให้เกิดความเสียหายมากขึ้นและการอยู่รอดของเซลล์ลดลง ในทางกลับกัน สารลดผลของรังสี จะก่อให้เกิดความเสียหายแก่เซลล์น้อยลง มีการอยู่รอดของเซลล์มากขึ้น

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของสารสกัดจากธรรมชาติในการเป็นสารเพิ่มประสิทธิภาพของรังสี เนื่องจากเป็นสารสกัดจากธรรมชาติ ทำให้มีความเป็นพิษต่ำ และผลข้างเคียงน้อย โดยที่สารสกัดจากธรรมชาติเหล่านี้ประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของเคมีบำบัดและการฉายรังสีโดยทำให้เซลล์มะเร็งไวต่อรังสี เพิ่มผลความเป็นพิษต่อเซลล์ สำหรับกลไกของ Radiosensitizers หรือสารเพิ่มประสิทธิภาพของรังสี ในการทำให้เซลล์มะเร็งไวต่อรังสีมากขึ้น ดังนี้

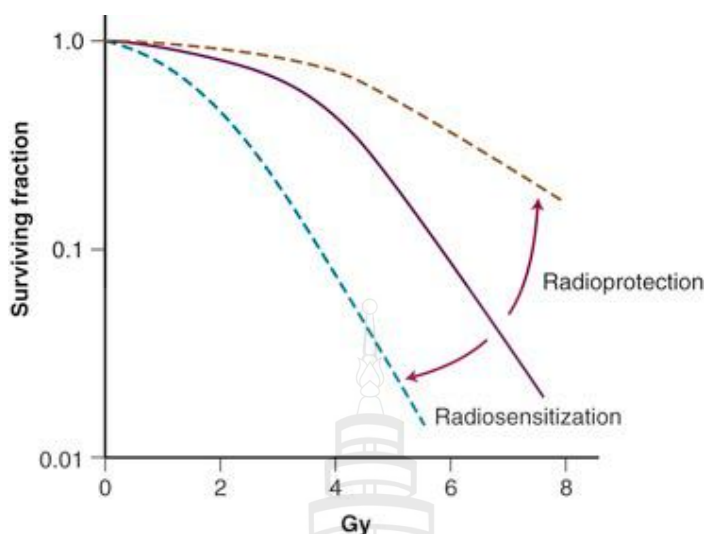
1. การทำให้ DNA เสียหายมากขึ้น: Radiosensitizers สามารถเพิ่มความเสียหายต่อ DNA ของเซลล์มะเร็ง ทำให้เซลล์ไม่สามารถซ่อมแซมตัวเองได้และนำไปสู่การตายของเซลล์ เช่น 5-Fluorouracil (5-FU) เป็นยาที่รบกวนการสังเคราะห์ DNA และ RNA ซึ่งเพิ่มความไวของเซลล์มะเร็งต่อรังสี

2. การยับยั้งการซ่อมแซม DNA: รังสีทำให้เกิดความเสียหายต่อ DNA ของเซลล์มะเร็ง โดยปกติแล้ว เซลล์จะมีการซ่อมแซม DNA ที่เสียหาย แต่ radiosensitizers สามารถยับยั้งกระบวนการนี้ ทำให้เซลล์ไม่สามารถซ่อมแซม DNA ได้ เช่น Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors สามารถยับยั้งการซ่อมแซม DNA ที่เสียหาย ทำให้เซลล์มะเร็งไวต่อรังสีมากขึ้น

3. การเพิ่มความไวต่อการเกิด oxidative stress: Radiosensitizers สามารถเพิ่มการผลิต reactive oxygen species (ROS) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อ DNA โปรตีน และลิพิดในเซลล์มะเร็ง เช่น Cisplatin สามารถเพิ่มการผลิต ROS ในเซลล์มะเร็ง ทำให้เซลล์มะเร็งไวต่อรังสีมากขึ้น

4. การยับยั้งการส่งสัญญาณการอยู่รอดของเซลล์: Radiosensitizers สามารถยับยั้งสัญญาณที่ทำให้เซลล์มะเร็งอยู่รอดและเติบโต ทำให้เซลล์มะเร็งไวต่อรังสีมากขึ้น เช่น Cetuximab เป็นตัวอย่างของสารที่ยับยั้งการทำงานของโปรตีน EGFR ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง

5. การทำให้เกิดการหยุดชะงักของวงจรเซลล์: Radiosensitizers สามารถหยุดวงจรเซลล์มะเร็งในระยะที่ไวต่อรังสี ทำให้เซลล์มะเร็งถูกทำลายได้ง่ายขึ้น เช่น Paclitaxel เป็นยาที่ทำให้เซลล์หยุดอยู่ในระยะ M (mitosis) ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์ไวต่อรังสีมากที่สุด



ภาพที่ 2.9 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณรังสีที่ให้แก่เซลล์กับอัตราการอยู่รอดของเซลล์ของสารลดผลของรังสีและสารเพิ่มประสิทธิภาพของรังสี

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยของ Surapong และคณะ [33] รายงานว่า *Tiliacora triandra* (*F. Menispermaceae*) สามารถรับประทานได้และยังเป็นที่รู้จักในด้านคุณค่าทางยา ใบเป็นพืชที่ได้รับความนิยมในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือเพื่อระบุองค์ประกอบหลักของใบย่านางและประเมินฤทธิ์ต้านมะเร็งต่อเซลล์มะเร็งในมนุษย์ วิธีการทดลองโดยการสกัดใบด้วยเครื่อง Soxhlet โดยใช้ปิโตรเลียมอีเธอร์ ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และน้ำ จากนั้นจึงทำการแยกองค์ประกอบหลักและใช้ขั้นตอนโครมาโทกราฟีและเทคนิคสเปกโทรสโกปี สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลองของสารสกัดจากใบย่านาง ดำเนินการโดยการทดสอบไมโครเพลตเรซาซูริน (REMA) และทดสอบกับเซลล์ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ เซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) เซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) จากงานวิจัยได้ผลการศึกษา ดังนี้ สารประกอบหลักของใบย่านาง คือ oxoanolobine สารสกัดเมทานอลมีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) สูงสุด ในขณะที่สารสกัดน้ำมีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) สูงสุด ค่า IC₅₀ ของ oxoanolobine เทียบกับเซลล์ NCI-H187 เท่ากับ 27.60 ± 4.30 $\mu\text{g/mL}$ จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า ใบย่านางมี oxoanolobine เป็นองค์ประกอบหลักและมีศักยภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง และยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในระดับเซลล์ต่อไป

งานวิจัยของ Samankul และคณะ [34] มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนายาทางเลือกเพื่อลดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์จากเคมีบำบัดในผู้ป่วยมะเร็งรังท่อน้ำดี ได้มีการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดใบย่านางด้วยเอธานอล (TLPE) ต่อเซลล์มะเร็งรังท่อน้ำดี งานวิจัยได้ทำการศึกษาระบบยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์โดยใช้การทดสอบ MTT ในขณะที่วิเคราะห์การเหนี่ยวนำ apoptosis และ cell-cycle arrest ด้วย flow cytometry ระดับของโปรตีนสำคัญและปริมาณกรดฟีนอลิกวิเคราะห์ด้วย western blot and reverse HPLC ตามลำดับ ผลการทดลองจากงานวิจัยนี้ พบว่า สารสกัด TLPE ยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งรังท่อน้ำดีในลักษณะที่ขึ้นกับขนาดยาและเวลา โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $7.86 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$ สำหรับเซลล์ KKU-M213B และ $8.59 \pm 0.36 \mu\text{g/ml}$ สำหรับเซลล์ KKU-100 ที่ระยะเวลาการบ่ม 72 ชั่วโมง สารสกัด TLPE ยับยั้งการเติบโตของเซลล์ CCA โดยกระตุ้นให้เซลล์ทั้งสองสายเกิด apoptosis และทำให้จำนวนเซลล์ KKU-100 เพิ่มขึ้นในระยะ G0/G1 สารสกัด TLPE เพิ่มการแสดงออกของ Ac-H3 แต่ลดการแสดงออกของ p-ERK, p53, Bax, CDK4 และ Bcl2 ในเซลล์ KKU-M213B สารสกัด TLPE เพิ่มการแสดงออกของ Ac-H3, p21 และ Bax แต่ลดการแสดงออกของ p-ERK, p53, CDK4 และ Bcl2 ในเซลล์ KKU-100 นอกจากนี้ ยังพบกรดฟีนอลิก ได้แก่ กรด p-hydroxybenzoic, กรด vanillic, กรด syringic, กรด p-coumaric, กรด ferulic และ กรด sinapinic โดยสรุปจากผลลัพธ์ของงานวิจัยนี้ ชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนาสารสกัดเอธานอลจากผงใบย่านางเป็นสารเคมีบำบัดหรือสารเคมีป้องกันมะเร็งรังท่อน้ำดี

งานวิจัยของ Juckmeta และคณะ [28] กล่าวถึงยาแผนไทยที่เรียกว่า เบญจโลกวิเชียร (BLW) ประกอบด้วยพืช 5 ชนิด ได้แก่ *Ficus racemosa*, *Capparis micracantha*, *Clerodendrum petasites*, *Harrisonia perforata* และ *Tiliacora triandra* ยาแผนไทยถูกนำมาใช้ในการแพทย์แผนไทยมาช้านานเพื่อลดไข้จากการติดเชื้อทางเดินหายใจ แต่ยังไม่มียารายงานเกี่ยวกับความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในระบบทางเดินหายใจหรือฤทธิ์ด้านการอักเสบ ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้คือเพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสารสกัดเอธานอลและน้ำของ BLW ส่วนประกอบจากพืชชนิดเดียวและสารประกอบแยกจากกันต่อเซลล์มะเร็ง 5 สายพันธุ์ของระบบทางเดินหายใจโดยใช้วิธี SRB นอกจากนี้ ยังทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดและสารประกอบทั้งหมดโดยใช้ไนตริกออกไซด์ (NO) ที่เหนี่ยวนำโดยไลโปโพลีแซ็กคาไรด์ในเซลล์ RAW 264.7 สารประกอบหลักถูกแยกด้วยโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และเปรียบเทียบกับ BLW และส่วนประกอบจากพืช สารประกอบหลักของสารสกัดเอธานอล BLW และ *H. perforata* คือ กรดเพอร์ฟอราติก ซึ่งยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งปอด 2 สายพันธุ์ คือ A549 และ H226 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.7 และ 13.2 $\mu\text{g/ml}$ สารสกัดเอธานอลของ BLW และ ย่านาง แสดงฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งทุกสายพันธุ์ โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 10.1 ถึง 45.2 $\mu\text{g/ml}$ ในทางตรงกันข้าม สารสกัดเอธานอลทั้งหมดแสดงฤทธิ์ด้านการอักเสบในระดับปานกลาง แต่สารสกัดน้ำไม่มีผลยับยั้งฤทธิ์ทั้งสองอย่าง เพกโตลินาริเจนินและโอเมทิลลาโลป

ตาเอรอกซีริน ซึ่งเป็นสารประกอบรอง 2 ชนิด แสดงผลยับยั้ง NO โดยมีค่า IC50 เท่ากับ 7.1 และ 7.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ตามลำดับ ในขณะที่กรดเพอร์ฟอราติกไม่มีผล ($>50 \mu\text{g}/\text{mL}$) นอกจากนี้ เพกโตลินารีเจนินยังแสดงกิจกรรมที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทุกสายพันธุ์ของระบบทางเดินหายใจ โดยมีค่า IC50 อยู่ในช่วง 1.9 ถึง 9.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ดังนั้น สารประกอบรองทั้ง 2 ชนิดนี้จึงสามารถใช้เป็นเครื่องหมายสำหรับการควบคุมคุณภาพของ BLW เพื่อฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ กรดเพอร์ฟอราติกและเพกโตลินารีเจนินเป็นที่สนใจในการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกการเป็นพิษต่อเซลล์ของกรดทั้งสองชนิดนี้ ที่น่าสนใจคือ ยานางซึ่งเป็นส่วนประกอบของพืชชนิดหนึ่งใน BLW อาจเป็นแหล่งที่มาของสารประกอบที่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ออกฤทธิ์



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย

การทดลองแบบ quantitative analysis, *in vitro* study

3.1.1 ประชากร

1. ประชากร เซลล์มะเร็งเยื่อหุ้มปอดมนุษย์ A549
2. ประชากรเป้าหมาย เซลล์มะเร็งเยื่อหุ้มปอดมนุษย์ A549
3. ประชากรกลุ่มควบคุม เซลล์มะเร็งเยื่อหุ้มปอดมนุษย์ A549 ที่ไม่ได้รับสารสกัด

ไบยานางและการฉายรังสี

3.1.2 กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มควบคุม (control)

กลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มที่ได้รับการฉายรังสีเพียงอย่างเดียว

กลุ่มที่ 3 คือ กลุ่มที่ได้รับสารสกัดไบยานางเพียงอย่างเดียว

กลุ่มที่ 4 คือ กลุ่มที่ได้รับสารสกัดไบยานางร่วมกับการฉายรังสี

3.2 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

1. กล้องจุลทรรศน์
2. Cell counting chamber (marine field รุ่น superior)
3. ไมโครปิเปตขนาด 1000 ไมโครลิตร
4. ไมโครปิเปตขนาด 200 ไมโครลิตร
5. ไมโครปิเปตที่ปขนาด 1000 ไมโครลิตร
6. ไมโครปิเปตที่ปขนาด 200 ไมโครลิตร
7. ปิเปตต์ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร
8. หลอดทดลองชนิด conical ขนาด 15 มิลลิลิตร
9. หลอดไมโครทิวป์ (Microtube)

10. 6-well plate
11. T75 Flask
12. อลูมิเนียมฟอยล์
13. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Thermo SCIENTIFIC รุ่น MEGAFUGE 8R)
14. ตู้บ่มเพาะเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (incubator)
15. Spectrophotometer (สเปกโตรโฟโตมิเตอร์) หรือ Microplate reader
16. Orbital shaker
17. เครื่องนับจำนวน
18. Phantom สำหรับการฉายรังสี
19. Linac Accelerators ยี่ห้อ Varian รุ่น Rapid arc

3.3 สารเคมี

1. MTT Reagent (บริษัท Abcam)
2. MTT Solvent (บริษัท Abcam)
3. Roswell Park Memorial Institute (RPMI)
4. Phosphate Buffer Saline (PBS)
5. Antibiotic/antimycotic solution
6. Fetal Bovine Serum (FBS)
7. Trypsin-EDTA
8. สารสกัดใบย่านาง

3.4 สถานที่ทำการทดลอง

ภาควิชารังสีเทคนิคและฟิสิกส์ทางการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ฝ่ายรังสีวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell Culture)

เซลล์มะเร็งเยื่อบุผิวปอดมนุษย์ A549 จาก American Type Culture Collection ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Roswell Park Memorial Institute (RPMI) ที่เสริมด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ Fetal Bovine Serum (FBS) และ 1% antibiotic ในตู้บ่มความชื้น (humidified incubator) ควบคุมระดับอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศภายในเครื่องที่ 5 เปอร์เซ็นต์

3.5.2 การฉายรังสี (Cell Irradiation)

การฉายรังสีจากภายนอก (External irradiation) เป็นการฉายรังสีแบบภายนอกร่าง (ex vivo) โดยยึดตามวิธีการจากงานวิจัยก่อนหน้าของ Radon และคณะ [35] โดยมีการปรับเปลี่ยนให้เหมาะสมตามรายละเอียดดังนี้ จะทำการแบ่งตัวอย่าง 3 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกจะเป็นกลุ่มควบคุม เป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับรังสี กลุ่มที่สอง จะเป็นกลุ่มที่ถูกฉายรังสีเพียงอย่างเดียว และกลุ่มที่สาม จะเป็นกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบย่านางร่วมกับการฉายรังสี ปริมาณ 2.0 Gy โดยจะใช้ตัวอย่างจำนวน 3 ตัวอย่างต่อหนึ่งครั้งของการฉายรังสี

ทำการฉายรังสีเอกซ์แก่เซลล์ตัวอย่าง ด้วยเครื่อง Linac Accelerators ยี่ห้อ Varian รุ่น Clinac IX ที่มีระดับอัตราปริมาณรังสี 400 monitor unit/minute ที่แผนกรังสีวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย โดยนำเซลล์วางไปที่บริเวณตรงกลาง phantom และทำการฉายรังสีที่ด้านบน (anteroposterior) และด้านล่าง (posteroanterior) ดังแสดงในภาพที่ 3.1 ภายหลังจากการฉายรังสีเอ็กซ์เซลล์มะเร็งเยื่อบุผิวปอดมนุษย์ A549 จะถูกนำมาเลี้ยงไว้ในตู้บ่มความชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศภายในเครื่องที่ 5 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 3.1 การฉายรังสีแก่เซลล์แบบด้านบนล่าง ด้วยเครื่อง Linac Accelerators

3.5.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบย่านางด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1 Picrylhydrazyl (DPPH) Assay

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ซึ่งดัดแปลงจากงานวิจัยก่อนหน้าของ Chaveerach และคณะ [36] โดยนำสารสกัดใบย่านางละลายเจือจางในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ 0-10 mg/% Flavonoid และนำสารสกัดใบย่านางแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 10 μ L ผสมกับ DPPH ในเมทานอลความเข้มข้น 2 mM ปริมาตร 90 ไมโครลิตร ใน 96-well plate แล้วบ่มในที่มืด อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 min จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาร้อยละของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สร้างกราฟระหว่างค่าร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดใบย่านางเพื่อคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดใบย่านางที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (ค่า IC_{50})

3.5.4 ประเมินระดับการเกิดสารอนุมูลอิสระ ด้วยเทคนิค Flow Cytometry

เซลล์มะเร็งปอดมนุษย์จะถูกนำไปทำการวัดปริมาณ ROS ที่เกิดขึ้น ด้วยชุดการทดสอบ Muse Oxidative Stress Kit ดังแสดงในภาพที่ 3.2 ดังนี้

3.5.4.1 ขั้นตอนการเตรียมสารละลาย Muse Oxidative Stress working solution

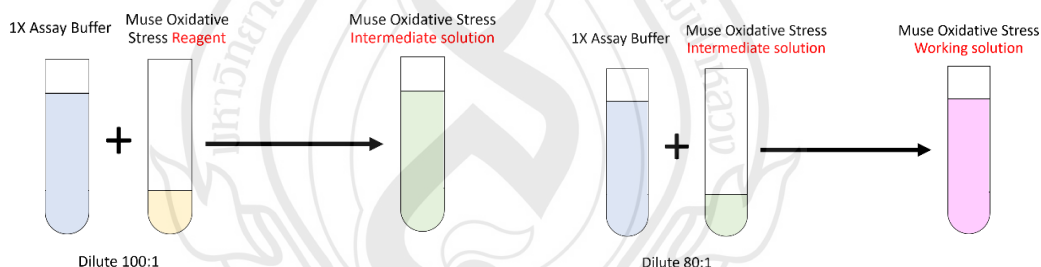
สำหรับ Muse Oxidative Stress Kit ประกอบด้วยสารละลาย Muse Oxidative Stress Reagent กับ 1X Assay Buffer มาให้ในชุดการทดสอบ โดยจะต้องทำการเจือจาง Muse Oxidative Stress Reagent ให้เป็น Working solution เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในเซลล์โดย Muse Oxidative Stress working solution สามารถเตรียมได้จากการเจือจาง Muse Oxidative Stress Reagent กับ 1X Assay Buffer ในอัตราส่วน 1:100 จะได้ Muse Oxidative Stress Intermediate solution จากนั้นทำการเจือจางอีกครั้งโดยการเจือจาง Muse Oxidative Stress Intermediate solution กับ 1X Assay Buffer ในอัตราส่วน 1:80 จะได้เป็น Muse Oxidative Stress working solution

3.5.4.2 ขั้นตอนการทดสอบหาปริมาณ Reactive Oxygen Species, ROS

1. ทำการล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ในเซลล์มะเร็งปอดมนุษย์ออกให้หมด แล้วเติม 1X Assay Buffer ให้ได้สารละลายที่มีเซลล์ 1×10^6 ถึง 1×10^7 cells/mL ใส่ลงในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml

2. ทำการดูดสารละลายเซลล์ใส่ microcentrifuge tube 10 μ l หลังจากนั้นจึงเติม working solution 190 μ l แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในตู้อบ

3. หลังจากครบเวลาปั่นทำการวัดปริมาณ ROS ด้วยเครื่อง Muse Cell Analyzer



ภาพที่ 3.2 แผนภาพแสดงส่วนประกอบของ Muse Oxidative Stress Working Solution

3.5.5 การวัดอัตราการอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT Assay

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดปกติมนุษย์ด้วยวิธี MTT assay จะทำการแบ่งตัวอย่าง 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่หนึ่ง เป็นกลุ่มควบคุม โดยที่ไม่ได้รับการฉายรังสี หรือได้รับการบ่มด้วยสารสกัดไย่อย่าง กลุ่มที่สอง คือ กลุ่มที่ได้รับการฉายรังสีเพียงอย่างเดียวที่ปริมาณรังสี 2.0 Gy (LD₅₀) กลุ่มที่สาม คือ กลุ่มที่ได้รับการสกัดไย่อย่างเพียงอย่างเดียวที่ความเข้มข้น 0.05 mg% Flavonoids (IC₂₅) และกลุ่มที่สี่ คือ กลุ่มที่ได้รับการสกัดไย่อย่างร่วมกับการฉายรังสี

1. กลุ่มควบคุม (control)

กลุ่มที่ไม่ได้รับทั้งการฉายรังสี และไม่ได้รับการบ่มด้วยสารสกัดไย่อย่าง

2. กลุ่มที่ได้รับการฉายรังสีเพียงอย่างเดียว

เลี้ยงเซลล์ 300 เซลล์ ใน 6-well plate ไปฉายรังสีที่ปริมาณรังสี 2.0 Gy

3. กลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบย่านางเพียงอย่างเดียว

ทำการเติมสารสกัดใบย่านางที่ความเข้มข้น 0.05 mg% Flavonoids จากนั้นนำไปบ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4. กลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบย่านางร่วมกับการฉายรังสี

ทำการเติมสารสกัดใบย่านางที่ความเข้มข้น 0.05 mg% Flavonoids และนำไปบ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ไปฉายรังสีที่ปริมาณรังสี 2.0 เกรย์

หลังจากนั้นทำการวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยนำเซลล์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในแต่ละหลุมของ 96-well plate จากนั้นเติม MTT reagent ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ลงใน 96-well plate แล้วนำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วเติม MTT solvent ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม ลงใน 96-well plate และท้อ 96-well plate ด้วยกระดาษฟอยล์ แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง orbital shaker เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader และคำนวณร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์

$$\% \text{Cell viability} = \frac{\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{blank}}}{\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{blank}}} \times 100$$

โดย $\text{OD}_{\text{sample}}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ทดสอบ

$\text{OD}_{\text{control}}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ควบคุม

3.6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ใช้โปรแกรม Excel แสดงผลเป็น ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation: SD) คำนวณค่าทางสถิติโดยใช้ Student T-test และ ANOVA ซึ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และ $p \leq 0.05$ ให้ถือว่ามีความสำคัญทางสถิติ

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการสารออกฤทธิ์ในสารสกัดใบย่านาง

จากตารางที่ 4.1 แสดงใบรับรองการตรวจประเมินคุณภาพของสารสกัดใบย่านาง จากการสกัดแบบ water-based extraction พบว่า ส่วนประกอบสำคัญที่ออกฤทธิ์ในสารสกัดใบย่านางตั้งต้น(stock solution) คือ ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) และมีค่าความเข้มข้นอยู่ที่ประมาณ 99.8 mg%

ตารางที่ 4.1 ผลการตรวจประเมินคุณภาพและความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ของสารสกัดใบย่านาง

Analysis	Specification	Unit	Result
Appearance	Brownish green to brown liquid	-	Brownish green liquid
Heavy Metal	Not more than 20	ppm	<20
Arsenic	Not more than 2	ppm	<2
Lead	Not more than 1	ppm	<1
pH Direct	4.00-7.00	-	5.66
Specific gravity	1.10-1.30	-	1.18
Total aerobic count	Not more than 1,000	cfu/g	<10
Yeast & Mold count	Not more than 100	cfu/g	<10
Enterobacteria count	Not more than 100	cfu/g	<10
<i>S.aureus</i>	Absent	in 1 g	Absent
<i>P.aeruginosa</i>	Absent	in 1 g	Absent
<i>E.coli</i>	Absent	in 1 g	Absent
<i>Salmonella spp.</i>	Absent	in 1 g	Absent
Content of active ingredients	Not less than 30.0 mg% Flavonoids	mg%	99.8

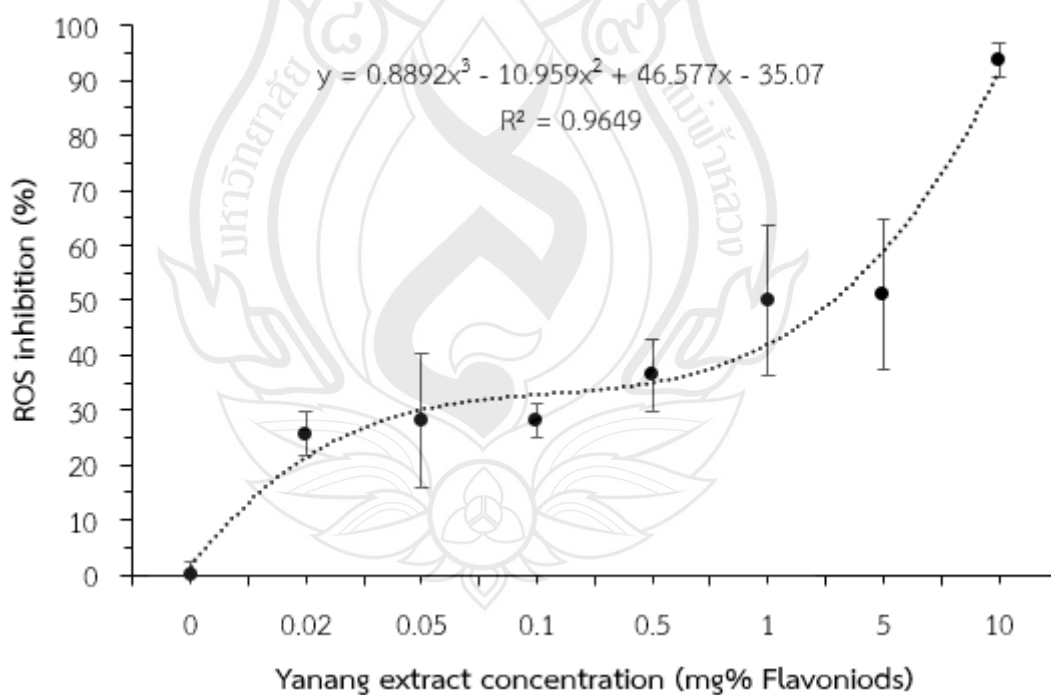
4.2 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบย่านางด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Assay

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบย่านาง (*Tiliacora triandra*) ที่ความเข้มข้นต่างกัน โดยใช้วิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบทางธรรมชาติ โดยใช้ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบแบ่งเป็นระดับต่าง ๆ ได้แก่ 0, 0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 และ 10 mg% Flavonoids จากผลการทดลองพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดใบย่านางสูงขึ้น ทำให้การดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 517 nm มีค่าลดลงตามลำดับ รวมถึง สีของสารละลายจะมีความเข้มจางลงตามความเข้มข้นของสารสกัดใบย่านางที่เพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการลดลงของอนุมูลอิสระ DPPH ที่เกิดขึ้นในสารละลาย

ค่า Inhibitory Concentration (IC) ที่ IC₂₅, IC₅₀ และ IC₇₅ หมายถึง ความเข้มข้นของสารละลายที่สามารถยับยั้งการทำงานของเซลล์หรือสารชีวภาพได้ 25%, 50% และ 74% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับการควบคุมที่ไม่ได้รับสารนั้น ค่า IC มักถูกใช้ในการศึกษาทางเภสัชวิทยาและชีวเคมี เพื่อวัดประสิทธิภาพของสารที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ รวมถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหรือต้านมะเร็ง สำหรับผลการศึกษาในงานวิจัยนี้ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และภาพที่ 4.1 ที่แสดงถึงร้อยละของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบย่านางที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่าค่าความเข้มข้นของสกัดใบย่านางที่สามารถยับยั้งอนุมูล DPPH ที่ระดับ IC₂₅ มีค่าเท่ากับ 0.05 mg% Flavonoids ที่ระดับ IC₅₀ มีค่าเท่ากับ 1 mg% Flavonoids และที่ระดับ IC₇₅ มีค่าเท่ากับ 7.5 mg% Flavonoids โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดใบย่านางสูงขึ้นที่ประมาณ 10 mg% Flavonoids จะทำให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระเข้าใกล้ร้อยละ 100 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดใบย่านางเพิ่มขึ้น ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระจะเพิ่มขึ้นทำให้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงขึ้น

ตารางที่ 4.2 ร้อยละของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบย่านางด้วยวิธี DPPH assay ที่ความเข้มข้น 0, 0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 และ 10 mg% Flavonoids

Yanang extract concentration (mg% Flavonoids)	DPPH radical scavenging activity (%)			Mean	S.D.
	1	2	3		
0	-2.183	-0.294	2.477	0.000	2.344
0.02	21.411	26.700	28.967	25.693	3.878
0.05	14.568	38.371	31.444	28.128	12.243
0.1	24.685	30.101	29.849	28.212	3.057
0.5	33.501	31.612	43.829	36.314	6.576
1	44.416	40.134	65.575	50.042	13.621
5	41.058	45.340	66.499	50.966	13.621
10	91.436	92.695	97.103	93.745	2.976



ภาพที่ 4.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดใบย่านางกับร้อยละของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบย่านาง

4.3 ผลการวิเคราะห์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ A549 ภายหลังจากการได้รับสารสกัดใบย่านาง ร่วมกับการฉายรังสีชนิดก่อไอออน ด้วยวิธี MTT Assay

งานวิจัยนี้ใช้เทคนิค MTT assay ซึ่งเป็นวิธีการวัดการมีชีวิตและการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยใช้สารเคมีที่สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นสีเมื่อเซลล์ที่มีชีวิตทำปฏิกิริยากับสารดังกล่าว ทำให้สามารถวัดความหนาแน่นของเซลล์มีชีวิตได้ เพื่อใช้ประเมินอัตราการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ A549 ภายหลังจากการได้รับการฉายรังสีร่วมกับการใช้สารสกัดใบย่านาง

4.3.1 การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ A549 ภายหลังจากการได้รับสารสกัดใบย่านางเพียงอย่างเดียว

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดใบย่านางต่อเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ A549 โดยทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ได้รับ ความเข้มข้นของสารสกัดใบย่านางที่แตกต่างกัน จากผลการทดลองในตารางที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่า อัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ A549 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญภายหลังจากการได้รับสารสกัดใบย่านางที่ระดับความเข้มข้น 10 mg% Flavonoids ซึ่งบ่งชี้ว่าสารสกัดใบย่านางมีฤทธิ์ต้านมะเร็งอย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นสำหรับการศึกษาผลความเป็นพิษต่อเซลล์ที่มีการรักษาร่วมกับการฉายรังสี ได้ดำเนินการประเมินผลของความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้นที่ 0-0.5 mg% Flavonoids เพื่อจะสามารถประเมินหาค่า IC50 ที่เหมาะสมต่อการรักษาร่วมกับรังสีต่อไปได้ดีที่สุด

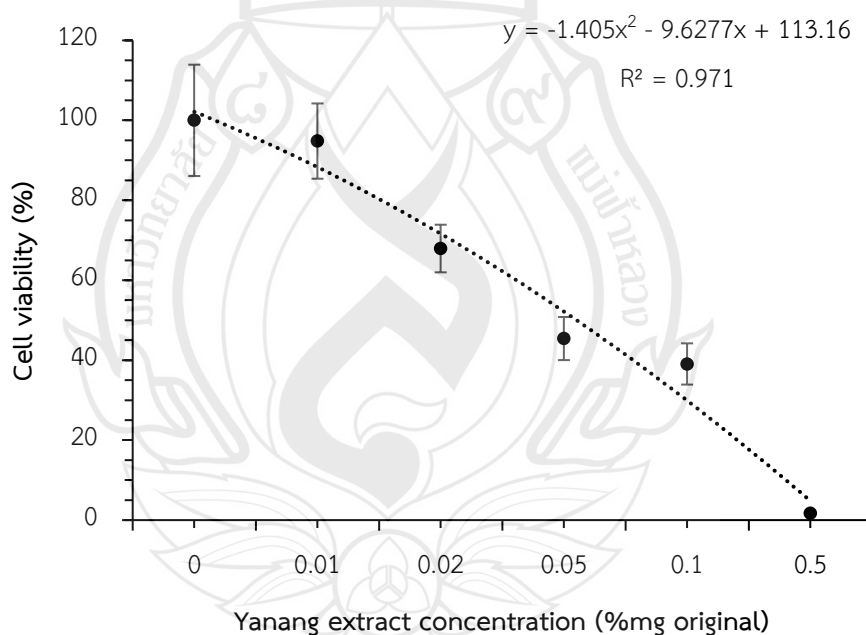
ตารางที่ 4.3 ร้อยละของอัตราการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ A549 กับความเข้มข้นของสารสกัดใบย่านางตั้งแต่ 0-100 mg% Flavonoids

Yanang extract concentration (mg% Flavonoids)	Cell viability (%)					Mean	S.D.
	1	2	3	4	5		
0	101.896	108.548	105.022	102.694	117.062	107.044	6.167
10	3.248	3.049	3.049	2.916	3.049	3.062	0.119
20	3.980	4.446	3.780	3.914	5.111	4.246	0.544
30	3.581	4.446	4.246	3.980	3.581	3.967	0.389
40	3.714	3.049	3.980	3.914	3.514	3.634	0.375
50	3.847	4.113	3.914	3.980	3.780	3.927	0.128
60	4.778	4.579	4.579	4.712	5.576	4.845	0.418
70	4.579	4.579	5.177	5.377	4.911	4.925	0.356

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

Yanang extract concentration (mg% Flavonoids)	Cell viability (%)					Mean	S.D.
	1	2	3	4	5		
80	4.712	5.310	5.111	5.976	5.510	5.324	0.469
90	5.111	5.710	6.508	5.909	5.776	5.803	0.499
100	5.111	5.710	6.508	5.909	5.776	5.803	0.499

จากภาพที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบย่านางที่ความเข้มข้น 0.02, 0.05, 0.1, และ 0.5 mg% Flavonoids แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอด A549 อย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ A549 ลดลงตามปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดใบย่านางที่ได้รับสูงขึ้น โดยที่ความเข้มข้นของสารสกัดใบย่านางที่ทำให้เซลล์ตาย 50% (IC50) อยู่ที่ประมาณ 0.05 mg% Flavonoids



ภาพที่ 4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดใบย่านาง 0-0.5 %mg กับ ร้อยละของอัตราการอยู่รอดของเซลล์

4.3.2 การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ A549 ที่ระยะเวลา 24-72 h ภายหลังจากการได้รับปริมาณรังสี 2 Gy เพียงอย่างเดียว

จากตารางที่ 4.4 แสดงอัตราการอยู่รอดของเซลล์ที่ระยะเวลา 24-72 h ภายหลังจากการได้รับปริมาณรังสี 2 Gy เพียงอย่างเดียว พบว่า ช่วงเวลาที่ 24 ชั่วโมงภายหลังจากการฉายรังสี มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์อยู่ที่ร้อยละ 93.83 ± 6.66 สำหรับช่วงเวลาที่ 48 และ 72 ชั่วโมงภายหลังจากการฉายรังสี มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์อยู่ที่ร้อยละ 89.38 ± 3.27 และ 75.26 ± 2.99 ตามลำดับ ตารางที่ 4.4 อัตราการอยู่รอดของเซลล์ที่ระยะเวลา 24-72 h ภายหลังจากการได้รับปริมาณรังสี 2 Gy เพียงอย่างเดียว

24 h after IR								
Dose of IR (Gy)	Cell viability (%)						Mean	S.D.
	1	2	3	4	5	6		
0	91.853	102.738	98.798	105.810	100.200	100.601	100.000	5.221
2	83.371	94.257	100.801	98.063	95.659	90.851	93.834	6.664

48 h after IR								
Dose of IR (Gy)	Cell viability (%)						Mean	S.D.
	1	2	3	4	5	6		
0	95.270	102.357	101.850	107.655	107.250	85.619	100.000	8.358
2	86.834	89.635	86.867	90.276	95.338	87.306	89.376	3.270

72 h after IR								
Dose of IR (Gy)	Cell viability (%)						Mean	S.D.
	1	2	3	4	5	6		
0	107.264	96.375	94.475	102.197	100.025	99.663	100.000	4.503
2	75.292	79.062	77.343	76.348	71.310	72.215	75.262	2.995

4.3.3 การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ A549 ที่ระยะเวลา 24-72 h ภายหลังจากได้รับปริมาณรังสี 2 Gy ร่วมกับสารสกัดใบย่านาง ความเข้มข้น 0.05 mg% Flavonoids

จากตารางที่ 4.5 แสดงอัตราการอยู่รอดของเซลล์ที่ระยะเวลา 24-72 h ภายหลังจากการได้รับปริมาณรังสี 2 Gy ร่วมกับสารสกัดใบย่านาง ความเข้มข้น 0.05 mg% Flavonoids ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50% โดยที่ ช่วงระยะเวลาที่ 24 ชั่วโมงหลังการฉายรังสีร่วมกับสารสกัดใบย่านาง มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์อยู่ที่ร้อยละ 1.42 ± 0.26 สำหรับช่วงเวลาที่ 48 และ 72 ชั่วโมงหลังการฉายรังสี มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์อยู่ที่ร้อยละ 1.47 ± 2.36 และ 1.38 ± 2.22 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.5 อัตราการอยู่รอดของเซลล์ที่ระยะเวลา 24-72 h ภายหลังจากการได้รับปริมาณรังสี 2 Gy ร่วมกับสารสกัดใบย่านาง ความเข้มข้น 0.05 mg% Flavonoids

24 h after IR								
Dose of IR (Gy)	Cell viability (%)						Mean	S.D.
	1	2	3	4	5	6		
0	84.336	99.466	98.042	113.884	115.486	88.786	100.000	12.815
2	1.388	1.032	1.388	1.566	1.744	1.388	1.418	0.264
48 h after IR								
Dose of IR (Gy)	Cell viability (%)						Mean	S.D.
	1	2	3	4	5	6		
0	103.313	102.007	94.027	92.649	118.982	89.022	100.000	10.499
2	3.279	-2.670	2.336	1.828	2.481	1.610	1.477	2.361
72 h after IR								
Dose of IR (Gy)	Cell viability (%)						Mean	S.D.
	1	2	3	4	5	6		
0	87.808	111.647	105.040	103.610	109.331	82.564	100.000	9.341
2	3.079	-2.506	2.193	1.716	2.329	1.512	1.387	2.217

4.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ ROS ที่เกิดขึ้นในเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ A549 หลังจากการใส่สารสกัดใบย่านางร่วมกับการฉายรังสี

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ Reactive Oxygen Species (ROS) ที่เกิดขึ้นในเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ A549 หลังจากได้รับสารสกัดใบย่านางร่วมกับการฉายรังสี เพื่อประเมินผลการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดใบย่านางในการเพิ่มความเสียหายต่อเซลล์มะเร็งผ่านการเพิ่มระดับ ROS งานวิจัยนี้ได้ผลการวิเคราะห์ปริมาณ ROS ในเซลล์มะเร็งปอด A549 หลังจากการใส่สารสกัดใบย่านางร่วมกับการฉายรังสี ดังแสดงในตารางที่ 4.6 และภาพที่ 4.3-4.5 สำหรับตัวอย่างกลุ่มควบคุม มีค่าปริมาณ ROS ต่ำสุด อยู่ที่ประมาณ 8.66 ± 3.811 ซึ่งจะถูกใช้เป็นฐานในการเปรียบเทียบกับกลุ่มการทดลองอื่น ๆ สำหรับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบย่านางที่ความเข้มข้น 0.05 mg% Flavonoids เพียงอย่างเดียว มีระดับปริมาณ ROS ภายในเซลล์อยู่ที่ประมาณ 54.68 ± 10.39 ซึ่งเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม สำหรับกลุ่มที่ได้รับการฉายรังสี 2 Gy เพียงอย่างเดียว ซึ่งมีค่าปริมาณ ROS ภายในเซลล์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย อยู่ที่ประมาณ 16.22 ± 0.82 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และสำหรับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบย่านางร่วมกับการฉายรังสี พบว่ามีระดับปริมาณ ROS ภายในเซลล์

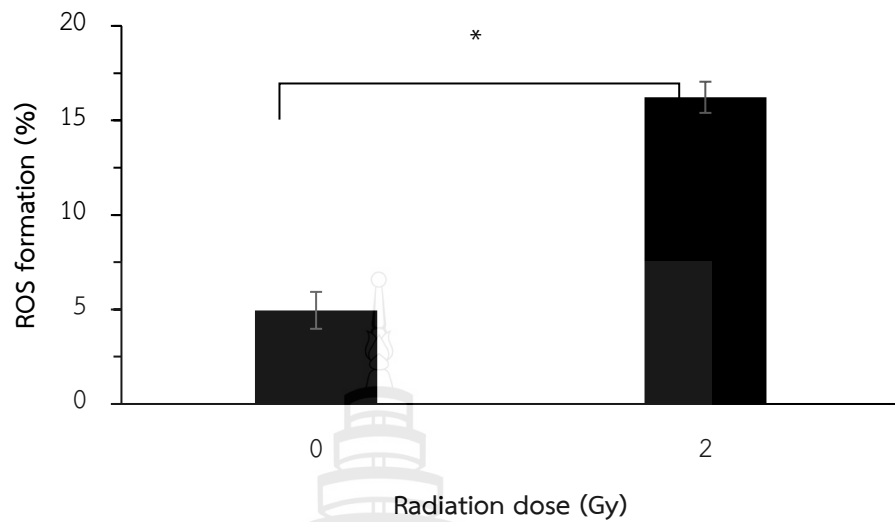
เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ อยู่ที่ประมาณ 64.22 ± 3.17 เมื่อเทียบกับทุกกลุ่ม ซึ่งแสดงถึงการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดไບ่ยานางร่วมกับการฉายรังสี

ตารางที่ 4.6 ปริมาณอนุมูลอิสระ (ROS) ที่เกิดขึ้นในเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ A549 หลังจากการใส่สารสกัดไບ่ยานางร่วมกับการฉายรังสี

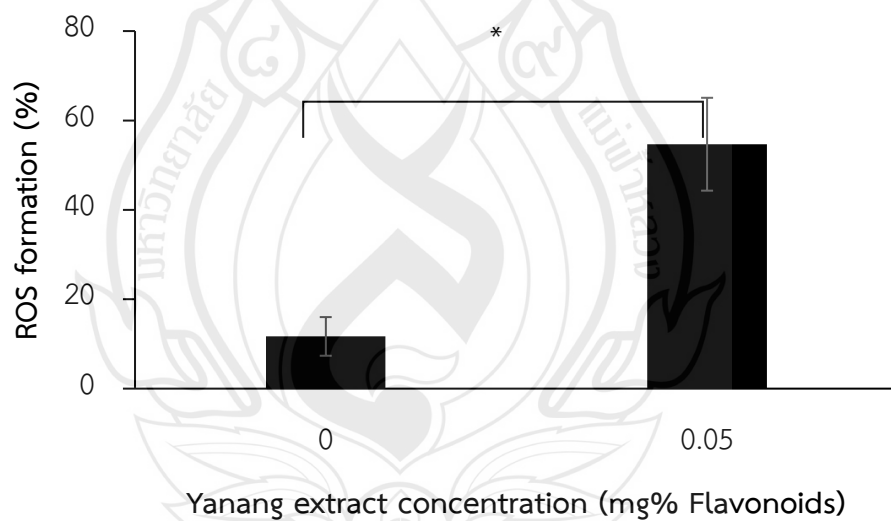
สารสกัดไບ่ยานางอย่างเดียว						
Treatment	ROS (%)			Mean	SD	
	1	2	3			
Control	16.41	10.69	7.94	11.68	4.32	
Flavonoids 0.05%	42.91	58.58	62.56	54.68	10.39	
การฉายรังสีอย่างเดียว						
Treatment	ROS (%)			Mean	SD	
	1	2	3			
Control	5.13	5.83	3.9	4.953333	0.98	
2 Gy	17.17	15.67	15.83	16.22	0.82	
สารสกัดไບ่ยานางร่วมกับการฉายรังสี						
Treatment	ROS (%)			Mean	SD	
	1	2	3			
Flavonoids 0.05%	8.33	11.5	8.2	9.343333	1.87	
Flavonoids 0.05% plus 2 Gy IR	61.07	64.19	67.41	64.22	3.17	
ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Rows	6378.685	3	2126.228	53.17965	0.000103	4.757063
Columns	34.74245	2	17.37122	0.434476	0.666472	5.143253
Error	239.892	6	39.98199			
Total	6653.32	11				

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

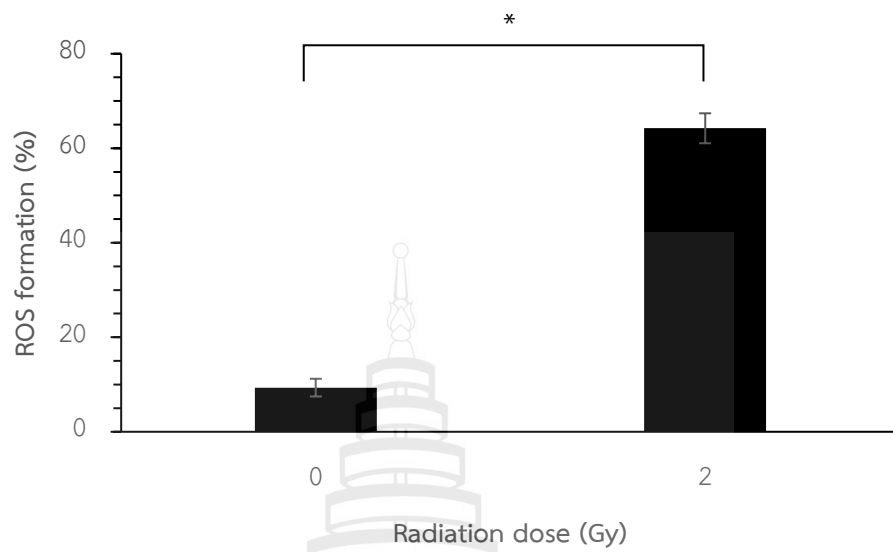
F-Test Two-Sample for Variances		
Control-Yanang alone	Variable 1	Variable 2
Mean	11.68	54.68333
Variance	18.6703	107.9186
Observations	3	3
df	2	2
F	0.173003	
P(F<=f) one-tail	0.147488	
F Critical one-tail	0.052632	
Control-IR alone	Variable 1	Variable 2
Mean	11.68	16.22333
Variance	18.6703	0.678533
Observations	3	3
df	2	2
F	27.51567	
P(F<=f) one-tail	0.035068	
F Critical one-tail	19	
Control-Yanang + IR	Variable 1	Variable 2
Mean	11.68	64.22333
Variance	18.6703	10.04973
Observations	3	3
df	2	2
F	1.857791	
P(F<=f) one-tail	0.349921	
F Critical one-tail	19	



ภาพที่ 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ ROS ที่เกิดขึ้นในเซลล์ A549 หลังจากการฉายรังสี 2 Gy เพียงอย่างเดียว แสดงค่าเฉลี่ย \pm ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยที่ * หมายถึง ค่า P-value < 0.05



ภาพที่ 4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ ROS ที่เกิดขึ้นในเซลล์ A549 หลังจากการใส่สารสกัดไฝ่ยานาง เพียงอย่างเดียว แสดงค่าเฉลี่ย \pm ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยที่ * หมายถึง ค่า P-value < 0.05



ภาพที่ 4.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ ROS ที่เกิดขึ้นในเซลล์ A549 หลังจากการใส่สารสกัดใบย่านาง ที่ความเข้มข้น 0.05 %mg ร่วมกับการฉายรังสี 2 Gy แสดงค่าเฉลี่ย \pm ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยที่ * หมายถึง ค่า P-value < 0.05

บทที่ 5

สรุป อภิปรายและข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการวิจัย

จากผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการสารออกฤทธิ์ในสารสกัดใบย่านาง สำหรับสารประกอบ Flavonoids และ สารประกอบ phenolic ชนิดอื่น ๆ เป็นที่รู้จักกันดีในรูปสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิของพืช (plant secondary metabolites) เป็นโครงสร้างแบบวงแหวนอะโรมาติกที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่ มีการรายงานก่อนหน้านี้ว่าพบสารประกอบฟีนอลิกในพืชที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติมากกว่า 8,000 ชนิด ซึ่งสามารถพบได้ในอาหารและยาสมุนไพร โดยส่วนใหญ่พบอยู่ในเซลล์หรือพื้นผิวของเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของพืช สารประกอบฟีนอลิกเหล่านี้ คือสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่ปรากฏในรูปแบบของ aglycone, glycoside และ methylated derivatives โดยมีการรายงานว่าทั้งฟลาโวนอยด์และสารประกอบฟีนอลิกอื่น ๆ มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพต้านมะเร็ง ต้านเชื้อแบคทีเรีย ป้องกันหัวใจ ต้านการอักเสบ เสริมระบบภูมิคุ้มกัน ปกป้องผิวจากรังสียูวี [37-38] ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาภาพรวมการออกฤทธิ์ของฟลาโวนอยด์ที่ได้จากสารสกัดใบย่านางจาก เพื่อเป็นอีกตัวเลือกหนึ่งที่น่าสนใจสำหรับการประยุกต์ใช้ในทางเภสัชกรรมและการแพทย์ต่อไป

สำหรับผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบย่านางด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay จากผลการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Pavanand และคณะ [39] ที่ได้ระบุว่า สารสกัดใบย่านางมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดสารอนุมูลอิสระได้ดีอย่างมีประสิทธิภาพ งานวิจัยของ ของ Surapong และคณะ พบว่า ใบย่านางมีสารประกอบประเภทฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และแทนนิน (tannins) ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสูง [33] Sanseera D. และคณะ [40] รายงานผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) ของสารสกัดใบย่านางด้วยตัวทำละลายเฮกเซนและเมทานอล พบว่าแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า IC50 เท่ากับ 4.41 และ 0.39 mg/mL ตามลำดับ สารสกัดใบย่านางด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์มแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า IC50 เท่ากับ 3.87 mg/mL ผลการวิจัยของภดุงกิจ และคณะ [41] รายงานว่าสารสกัดใบย่านางด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงด้วยค่า IC50 ที่ความเข้มข้น $12.69 \pm 1.02 \mu\text{g/mL}$ จากผลการทดลองข้างต้น สามารถสรุปได้ว่าการที่ค่า IC50 ของสารสกัดใบย่านางลดลงตามความเข้มข้นของสารสกัดใบย่านางที่เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นถึง

ความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดใบย่านางและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งตรงกับการวิจัย ของ Phadungkit และคณะ [41] ที่กล่าวว่าสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้จากพืชผักแสดงฤทธิ์ที่แรงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดนั้นที่เพิ่มขึ้น

เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ A549 ภายหลังจากการได้รับสารสกัดใบย่านาง ร่วมกับการฉายรังสีชนิดก่อก่อไอออน ด้วยวิธี MTT assay ผลการทดลองจากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบย่านางมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ A549 ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะเมื่อใช้สารสกัดใบย่านางที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น [34, 42] อย่างไรก็ตาม แม้ว่าในการแพทย์แผนไทยจะมีการกล่าวถึงคุณสมบัติต้านมะเร็งของสารสกัดใบย่านาง แต่จำนวนการศึกษาทางเคมีที่เกี่ยวข้องกับสารประกอบและฤทธิ์ต้านมะเร็งในสารสกัดใบย่านาง ยังคงน้อยมากในปัจจุบัน งานวิจัยของภคungskิจ และคณะ [41] รายงานว่า สารสกัดใบย่านางมีสารออกฤทธิ์สำคัญ คือ Oxonanolobine ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) และเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) อย่างไรก็ตาม สำหรับฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดนั้น มีความเฉพาะเจาะจงกับเซลล์ที่มีต้นกำเนิดจากมะเร็ง และโดยส่วนใหญ่ไม่ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรเหล่านั้น [43] Sanseera D. และคณะ [40] รายงานฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดใบย่านาง ซึ่งทำการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดจากพืชดำเนินการโดยใช้วิธี resazurin microplate assay พบว่า สารสกัดใบย่านางมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งช่องปากสายพันธุ์ KB และมะเร็งเต้านมสายพันธุ์ MCF7 โดยมีค่า IC50 เท่ากับ 41.14 และ 38.26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ตามลำดับ

จากผลการทดลองการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ A549 ที่ระยะเวลา 24-72 h ภายหลังจากการได้รับปริมาณรังสี 2 Gy เพียงอย่างเดียว แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า อัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ A549 ภายหลังจากการได้รับรังสีปริมาณ 2 Gy ขึ้นอยู่กับเวลา ภายหลังจากการได้รับรังสี ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าของ Wang และคณะ [44] โดยที่ช่วงระยะเวลา 24 ชั่วโมง รังสีจะสามารถส่งผลกระทบต่อความอยู่รอดของเซลล์ในระดับปานกลาง โดยการรอดชีวิตของเซลล์ลดลงประมาณ 20-40% ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณของรังสีที่เซลล์ได้รับ สำหรับการตอบสนองต่อความเสียหายของ DNA ในช่วงเวลานี้ เซลล์จะเปิดใช้งานกลไกการซ่อมแซม DNA เช่น non-homologous end joining (NHEJ) และ homologous recombination (HR) เพื่อพยายามซ่อมแซมความเสียหาย ซึ่งเมื่อเวลาผ่านไป สำหรับช่วงระยะเวลาที่ 48-72 ชั่วโมงภายหลังจากการฉายรังสี เซลล์ที่ไม่สามารถซ่อมแซมความเสียหายของ DNA ได้จะเริ่มเกิด apoptosis หรือการตายของเซลล์ในรูปแบบอื่น ๆ เช่น apoptosis, necrosis และ cell cycle arrest โดยเฉพาะในระยะ G_1 หรือ G_2/M ขณะที่พยายามซ่อมแซมความเสียหายที่เกิดจากรังสี เซลล์ที่ไม่สามารถซ่อมแซมได้สำเร็จจะตายหรือเข้าสู่ภาวะ senescence (การหยุดชะงักถาวร) ทำให้ผลกระทบของรังสีที่มีต่อ

เซลล์จะแสดงให้เห็นชัดเจนมากขึ้น โดยอัตราการอยู่รอดของเซลล์สามารถลดลงได้มากถึง 50-80% [44-45]

สำหรับการอยู่รอดเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ A549 ที่ระยะเวลา 24-72 h ภายหลังจากได้รับปริมาณรังสี 2 Gy ร่วมกับสารสกัดใบย่านาง ความเข้มข้น 0.05 mg% Flavonoids พบว่าอัตราการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ A549 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญภายหลังจากการฉายรังสีร่วมกับสารสกัดใบย่านาง สอดคล้องกับผลการรายงานก่อนหน้า โดยที่ Flavonoids มีบทบาทสองด้าน (Dual-action) เกี่ยวกับการรักษาสสมดุลของ ROS—ทำหน้าที่เป็น สารต้านอนุมูลอิสระ (Anti-oxidant) ในสภาวะปกติ แต่จะทำหน้าที่เป็น โปร-ออกซิแดนท์ (Pro-oxidant) ที่มีประสิทธิภาพในเซลล์มะเร็ง ซึ่งจะกระตุ้นกระบวนการเกิด apoptosis และยับยั้งการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของเซลล์ [46-47] งานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานอย่างต่อเนื่องว่า การรักษาเซลล์มะเร็งด้วย Flavonoids สามารถกระตุ้นการสร้าง ROS ในเซลล์มะเร็งหลายชนิด การกระตุ้น ROS นี้มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มผลความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของ Flavonoids โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้ร่วมกับการรักษาอื่น ๆ เช่น การฉายรังสี เนื่องจาก ROS สามารถก่อให้เกิด oxidative stress และทำลายองค์ประกอบที่สำคัญของเซลล์ เช่น DNA, โปรตีน, และไขมัน มากไปกว่านั้น Flavonoids แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์การต้านมะเร็งหลากหลายประการ เช่น เกี่ยวข้องกับการปรับการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัด ROS, มีบทบาทในการหยุดยั้งวงจรเซลล์, กระตุ้นการเกิดการตายแบบ apoptosis และ autophagy, และยับยั้งการเพิ่มจำนวนและความสามารถในการรุกรานของเซลล์มะเร็ง งานวิจัยของ Li และคณะ แสดงให้เห็นว่า flavonoids เช่น kaempferol สามารถเพิ่มระดับ ROS ในเซลล์มะเร็งและทำให้เซลล์ตอบสนองต่อการรักษาด้วยรังสีและเคมีบำบัดได้ดีขึ้น [48] งานวิจัยของ Russo และคณะ รายงานผลของ flavonoids ในการทำหน้าที่เป็น radiosensitizer โดยมุ่งเน้นที่การเพิ่มการผลิต ROS และการทำลายโครงสร้างเซลล์มะเร็งหลังการฉายรังสีได้อย่างมีนัยสำคัญ [49] แม้ว่ามีหลักฐานที่รายงานเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ว่า Flavonoids หลายชนิดมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง อย่างไรก็ตาม กลไกในระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องต่อผลกระทบนี้ยังไม่ได้รับการอธิบายอย่างครบถ้วนสมบูรณ์

มากกว่านั้น อัตราการอยู่รอดของเซลล์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละช่วงเวลาภายหลังจากการได้รับรังสีเมื่อใช้ร่วมกันกับสารสกัดใบย่านาง จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดใบย่านางสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิต ROS ที่เพิ่มขึ้นในระบบได้ในระยะเวลาอันสั้นภายใน 24 ชั่วโมง และ ออกฤทธิ์ในการผลิต ROS ได้ต่อเนื่องไปจนถึงเวลาที่ 48 และ 72 ชั่วโมง สำหรับการผลิต ROS หลังจากการใช้ Flavonoids เป็น radiosensitizer จะเริ่มทันทีหลังจากการฉายรังสีและเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องได้ในหลายช่วงเวลา ตั้งแต่ทันทีภายหลังจากการฉายรังสี (0-30 นาที) ในระยะสั้นหลังจากการฉายรังสี (1-24 ชั่วโมง) และในระยะยาวหลังจากการฉายรังสี (หลังจาก

24 ชั่วโมงเป็นต้นไป) โดย Flavonoids จะเพิ่มระดับของ ROS ผ่านกลไกกระบวนการซ่อมแซมและกระตุ้นการสะสมของ ROS ในเซลล์มะเร็ง โดยที่ทันทีภายหลังจากการที่เซลล์ได้รับรังสีร่วมกันกับการใช้สารสกัดใบย่านาง จะส่งผลทำให้ ROS ที่เกิดขึ้นจากรังสีมีความเข้มข้นสูงขึ้นและคงอยู่นานขึ้น สำหรับ ROS ที่เกิดขึ้นทันทีภายหลังจากการฉายรังสีจะมีการผลิต ROS อย่างรวดเร็ว ซึ่งเป็นผลจากปฏิกิริยาไอออไนเซชันที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ Flavonoids ทำหน้าที่เสริมสร้างการผลิต ROS ในช่วงนี้ โดยการเพิ่มการตอบสนองของเซลล์ต่อรังสี ผ่านการกระตุ้นระบบสร้าง ROS ที่อยู่ในเซลล์ เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ (O_2^-) และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งทำให้เซลล์เกิดความเสียหายอย่างรวดเร็ว ภายหลังจากการฉายรังสีไปได้ประมาณ 1-6 ชั่วโมง จะเหนี่ยวนำความเสียหายเกิดกับไมโทคอนเดรีย ซึ่งเป็นแหล่งผลิตพลังงานหลักของเซลล์ และจะกระตุ้นให้มีการผลิต ROS เพิ่มขึ้นในช่วงเวลานี้ ซึ่ง Flavonoids สามารถเพิ่มระดับ ROS ผ่านการขัดขวางกระบวนการซ่อมแซมไมโทคอนเดรียและการปิดกั้นระบบป้องกันตนเองของเซลล์ ระหว่าง 6-24 ชั่วโมงหลังจากการฉายรังสี จะเกิดการสะสมของ ROS เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ภายในเซลล์ จากการที่ Flavonoids กระตุ้นการผลิต ROS ผ่านการเสื่อมสภาพของเซลล์และการยับยั้งกระบวนการซ่อมแซม DNA ของเซลล์มะเร็ง กระตุ้นกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis . สำหรับผลกระทบของ Flavonoids ระยะยาวภายหลังจากการได้รับรังสี 24 ชั่วโมง จะส่งผลทำให้มีการผลิต ROS ที่ยังคงเกิดขึ้นต่อเนื่องในเซลล์มะเร็งที่เหลือรอด โดย flavonoids จะช่วยในการปิดกั้นกลไกป้องกันตนเองของเซลล์ ทำให้ ROS ยังคงมีบทบาทสำคัญในการทำให้เซลล์ที่รอดชีวิตหลังจากการฉายรังสีเกิดการทำลายตัวเองอย่างต่อเนื่อง

เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์ปริมาณ ROS ที่เกิดขึ้นในเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ A549 หลังจากการใส่สารสกัดใบย่านางร่วมกับการฉายรังสี สำหรับเซลล์มะเร็งมักมีระดับ ROS สูงอยู่แล้วเนื่องจากอัตราการเผาผลาญที่สูงและการแบ่งตัวที่รวดเร็ว ดังนั้นเมื่อได้รับสารสกัดใบย่านางที่มีสารประกอบ Flavonoids อยู่ สามารถยับยั้งเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) และ glutathione peroxidase (GPx) เซลล์จึงไม่สามารถกำจัด ROS ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันทำให้ ROS สะสมมากขึ้น มากไปกว่านั้น Flavonoids สามารถกระตุ้น NADPH oxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการผลิต ROS ในเซลล์ โดยที่การกระตุ้นการทำงานของ NADPH oxidase โดยเฉพาะในเซลล์มะเร็ง ทำให้เกิดซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) เพิ่มขึ้น NADPH oxidase ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการถ่ายโอนอิเล็กตรอนจาก NADPH ไปยังออกซิเจน ทำให้เกิดซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนที่สามารถเปลี่ยนเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และ ROS อื่น ๆ ดังนั้น เมื่อระดับ ROS ภายในเซลล์ที่สูงมากขึ้นเกินกว่าที่เซลล์มะเร็งจะสามารถรับมือได้ ก่อให้เซลล์มะเร็งเกิด oxidative stress เกินขีดจำกัด มากไปกว่านั้น Flavonoids ทำหน้าที่เป็นโปร-ออกซิแดนซ์ในเซลล์มะเร็งอย่าง

เฉพาะเจาะจง ส่งเสริมการตายของเซลล์ผ่านกระบวนการ apoptosis หรือ necrosis โดยไม่กระทบต่อเซลล์ปกติที่อยู่ข้างเคียง นอกจากนี้ Flavonoids ยังสามารถกระตุ้นให้เกิด การเสื่อมของไมโทคอนเดรีย โดยไปรบกวนกระบวนการทำงานของ electron transportation chains (ETC) ในไมโทคอนเดรีย โดยเฉพาะที่ complex I และ III ทำให้ไอเล็กตรอนหลุดรั่วและเกิดการผลิตซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) เพิ่มขึ้น [50]

5.2 สรุปผลการศึกษาวิจัย

จากผลการทดลอง สามารถสรุปได้ว่า สารสกัดใบย่านางมีสารที่ออกฤทธิ์สำคัญได้แก่ Flavonoids ซึ่งมีฤทธิ์การแสดงออกในเซลล์ได้สองแบบ (dual action) คือ สามารถเป็นได้ทั้ง anti-oxidant และ pro-oxidant โดยที่ฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระของ Flavonoids จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดใบย่านางที่เพิ่มขึ้น การศึกษานี้พบว่า สาร Flavonoids ที่ได้จากสารสกัดใบย่านางมีผลในการเพิ่มปริมาณ ROS ในเซลล์มะเร็งปอดมนุษย์ A549 เมื่อใช้ร่วมกับการฉายรังสี ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดในการทำให้เซลล์มะเร็งไวต่อการถูกทำลายด้วยรังสีมากขึ้น ซึ่งการเพิ่มขึ้นของปริมาณ ROS นี้สามารถนำไปสู่การตายของเซลล์มะเร็งมากขึ้น ซึ่งอัตราการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ A549 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญภายหลังจากการฉายรังสีร่วมกับสารสกัดใบย่านาง โดยที่อัตราการอยู่รอดของเซลล์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละช่วงเวลาภายหลังจากการได้รับรังสีเมื่อใช้ร่วมกันกับสารสกัดใบย่านาง นอกจากนี้ งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดใบย่านางสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิต ROS ที่เพิ่มขึ้นในระบบได้ในระยะเวลาอันสั้นภายใน 24 ชั่วโมง และออกฤทธิ์ในการผลิต ROS ได้ต่อเนื่องไปจนถึงเวลาที่ 48 และ 72 ชั่วโมง มากไปกว่านั้น กลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบย่านางร่วมกับการฉายรังสี พบว่ามีระดับปริมาณ ROS ภายในเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ อยู่ เมื่อเทียบกับทุกกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับรังสี หรือ สารสกัดใบย่านางเพียงอย่างเดียว ซึ่งแสดงถึงการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดใบย่านางร่วมกับการฉายรังสี ดังนั้น จากผลการทดลองจากงานวิจัยนี้สามารถสนับสนุนการใช้สารสกัดใบย่านางร่วมกับการฉายรังสี ที่อาจจะใช้เป็นแนวทางที่มีประสิทธิภาพในการรักษามะเร็งปอดได้ต่อไปในอนาคต

5.3 ข้อเสนอแนะในการศึกษาวิจัยเพิ่มเติม

5.3.1 สามารถต่อยอดจากงานวิจัยนี้ โดยการศึกษากลไกทางชีววิทยาขั้นสูงที่เกี่ยวข้องภายหลังจากการใช้รังสีร่วมกับสารสกัดใบย่านาง โดยใช้เทคนิค Gamma H2AX assay หรือทดสอบการ

สร้างไมโครนิวเคลียส (micronucleus) เพื่อศึกษาและตรวจสอบความเสียหายของ DNA Double Strand Break (DSB) ที่เกิดขึ้นหลังจากการได้รับสารสกัดใบย่านางร่วมกับการฉายรังสี

5.3.2 การศึกษานี้ควรได้รับการขยายผลเพิ่มเติมในระดับการทดลองทางคลินิกเพื่อยืนยันผลที่ได้ และเพื่อประเมินความปลอดภัยและประสิทธิภาพของการใช้สารสกัดใบย่านางร่วมกับการฉายรังสีในการรักษาโรคมะเร็งปอดต่อไป



รายการอ้างอิง

- [1] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249.
- [2] International Agency for Research on Cancer. (2022). *Cancer Today*.
<https://gco.iarc.fr>.
- [3] Reungwetwattana, T., Oranratnachai, S., Puataweepong, P., Tangsujaritvijit, V., & Cherntanomwong, P. (2020). Lung cancer in Thailand. *Journal of Thoracic Oncology*, 15(11), 1714-1721.
- [4] สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. (ม.ป.ป.). *มะเร็งปอด*. สืบค้นเมื่อ 1 มีนาคม 2567 จาก <https://www.nci.go.th/th/Knowledge/downloads/0013.pdf>
- [5] Cancer Research UK. (n.d.). *Types of lung cancer*. Retrieved February 11, 2024, from <https://www.cancerresearchuk.org/types>
- [6] Nieder, C., Pawinski, A., & Andratschke, N. H. (2013). Combined radio-and chemotherapy for non-small cell lung cancer: Systematic review of landmark studies based on acquired citations. *Frontiers in Oncology*, 3, 176.
- [7] Penninckx, S., Heuskin, A. C., Michiels, C., & Lucas, S. (2020). Gold nanoparticles as a potent radiosensitizer: A transdisciplinary approach from physics to patient. *Cancers*, 12(8), 2021.
- [8] Bolus, N. E. (2001). Basic review of radiation biology and terminology. *Journal of Nuclear Medicine Technology*, 29(2), 67-73.
- [9] คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. (ม.ป.ป.). *ย่านาง*. สืบค้นเมื่อ 13 กุมภาพันธ์ 2567 จาก <http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=148>
- [10] นิตยา บุญทิม, พรรณเพ็ญ เครือไทย, ชินกฤต สุวรรณศิริ และถกลวรรณ ศิริสวัสดิ์. (2556). *รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ เรื่อง การเพิ่มศักยภาพและสรรพคุณของพืชผักสมุนไพรในตำรับยา*
ล้านนา: การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและปัจจัยภายนอกที่มีผลต่อการให้ผลผลิต. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

- [11] Nutmakul, T. (2021). Phytochemical and pharmacological activity of *Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, 43(5).
- [12] Chu, Y. F., Sun, J. I. E., Wu, X., & Liu, R. H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23), 6910-6916.
- [13] Howard, L. R., Clark, J. R., & Brownmiller, C. (2003). Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(12), 1238-1247.
- [14] Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- [15] ปรียนันท์ บัวสด. (2549). การตรวจสอบความสามารถในการเป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ของเครื่องดื่มชาโดยวิธีไซคลิกโวลแทมเมตรี (วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต). มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- [16] Franken, N. A., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & Van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, 1(5), 2315-2319.
- [17] Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48, 412-422.
- [18] Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., & Capanoglu, E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, 1(3), 332-349.
- [19] Kepka, L., & Socha, J. (2021). Dose and fractionation schedules in radiotherapy for non-small cell lung cancer. *Translational Lung Cancer Research*, 10(4), 1969.
- [20] Nias, A. H. W. (1998). *An introduction to radiobiology*. John Wiley & Sons Ltd.
- [21] NSW Government. (n.d.). Ionizing and non-ionizing radiation. Retrieved February 13, 2024, from <https://www.safework.nsw.gov.au/hazards-a-z/ionising-and-non-ionising-radiation>
- [22] Mirion Technologies. (n.d.). Types of ionizing radiation. Retrieved February 13, 2024, from <https://www.mirion.com/learning-center/radiation-safety-basics/types-of-ionizing-radiation>

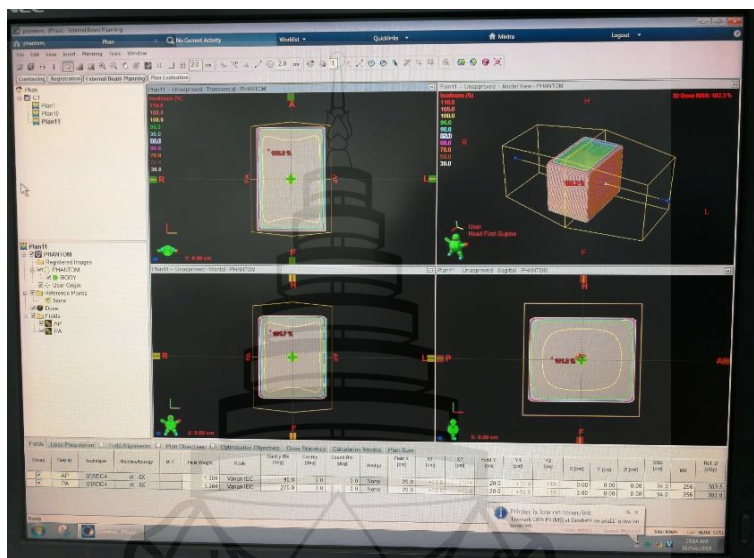
- [23] Mavragani, I. V., Nikitaki, Z., Kalospyros, S. A., & Georgakilas, A. G. (2019). Ionizing radiation and complex DNA damage: from prediction to detection challenges and biological significance. *Cancers*, *11*(11), 1789.
- [24] Frey, B., Borgmann, K., Jost, T., Greve, B., Oertel, M., Micke, O., . . . Eckert, F. (2023). DNA as the main target in radiotherapy—a historical overview from first isolation to anti-tumour immune response. *Strahlentherapie und Onkologie*, *199*(12), 1080-1090.
- [25] จิตรา สิงห์ทอง. (2557). *ฤทธิ์ทางชีวภาพและการผลิตไมโครแคปซูลของสารสกัดจากไผ่ย่านาง*. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.
- [26] Sireeratawong, S., Lertprasertsuke, N., Srisawat, U., Thuppia, A., Ngamjariyawat, A., Suwanlikhid, N., . . . Jaijoy, K. (2008). Acute and subchronic toxicity study of the water extract from *Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels in rats. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, *30*(5).
- [27] Juckmeta, T., Pipatrattanaseree, W., Jaidee, W., Dechayont, B., Chunthong-Orn, J., Andersen, R. J., . . . Itharat, A. (2019). Cytotoxicity to five cancer cell lines of the respiratory tract system and anti-inflammatory activity of Thai traditional remedy. *Natural Product Communications*, *14*(5), 1934578X19845815.
- [28] Lumlerdkij, N., Boonrak, R., Booranasubkajorn, S., Akarasereenont, P., & Heinrich, M. (2020). In vitro protective effects of plants frequently used traditionally in cancer prevention in Thai traditional medicine: An ethnopharmacological study. *Journal of Ethnopharmacology*, *250*, 112409.
- [29] Manosroi, A., Akazawa, H., Akihisa, T., Jantrawut, P., Kitdamrongtham, W., Manosroi, W., & Manosroi, J. (2015). In vitro anti-proliferative activity on colon cancer cell line (HT-29) of Thai medicinal plants selected from Thai/Lanna medicinal plant recipe database “MANOSROI III”. *Journal of Ethnopharmacology*, *161*, 11-17.
- [30] Janeklang, S., Nakaew, A., Vaeteewottacharn, K., Seubwai, W., Boonsiri, P., Kismali, G., . . . Wongkham, S. (2014). In vitro and in vivo antitumor activity of tiliacorinine in human cholangiocarcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *15*(17), 7473-7478.

- [31] นิตยา บุญทิม. (2563). *ใบย่านาง*. https://stri.cmu.ac.th/article_detail.php?id=34
- [32] Rattana, S., Cushnie, B., Taepongsorat, L., & Phadungkit, M. (2016). Chemical constituents and in vitro anticancer activity of *Tiliacora triandra* leaves. *Pharmacognosy Journal*, 8(1).
- [33] Samankul, A., Senawong, G., Utaiwat, S., Prompipak, J., Woranam, K., Phaosiri, C., . . . Senawong, T. (2023). *Tiliacora triandra* Leaf Powder Ethanolic Extract in Combination with Cisplatin or Gemcitabine Synergistically Inhibits the Growth of Cholangiocarcinoma Cells In Vitro and in Nude Mouse Xenograft Models. *Medicina*, 59(7), 1269.
- [34] Redon, C. E., Dickey, J. S., Bonner, W. M., & Sedelnikova, O. A. (2009). γ -H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin. *Advances in Space Research*, 43(8), 1171-1178.
- [35] Chaveerach, A., Lertsatitthanakorn, P., Tanee, T., Puangjit, N., Patarapadungkit, N., & Sudmoon, R. (2016). Chemical constituents, antioxidant property, cytotoxicity and genotoxicity of *Tiliacora triandra*. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8(5), 722-729.
- [36] Tungmunnithum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A., & Yangsabai, A. (2018). Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. *Medicines*, 5(3), 93.
- [37] Mutha, R. E., Tatiya, A. U., & Surana, S. J. (2021). Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: An overview. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7, 1-13.
- [38] Pavanand, K., Webster, H. K., Yongvanitchit, K., & Dechatiwongse, T. (1989). Antimalarial activity of *Tiliacora triandra* diels against *Plasmodium falciparum* in vitro. *Phytotherapy Research*, 3(5), 215-217.
- [39] Liawruangrath, B., & Liawruangrath, S. (2018). Antioxidant and anticancer activities of the extract from *tiliacora triandra* diels. in Nakhonsawan Province. *วารสารวิจัย มทร. กรุงเทพ*, 12(2), 73-78.

- [40] Phadungkit, M., Somdee, T., & Kangsadalampai, K. (2012). Phytochemical screening, antioxidant and antimutagenic activities of selected Thai edible plant extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(5), 662-666.
- [41] Kaewpiboon, C., Winayanuwattikun, P., Yongvanich, T., Phuwapraisirisan, P., & Assavalapsakul, W. (2014). Effect of three fatty acids from the leaf extract of *Tiliacora triandra* on P-glycoprotein function in multidrug-resistant A549RT-eto cell line. *Pharmacognosy Magazine*, 10(Suppl 3), S549.
- [42] Nanasombat, S., & Teckchuen, N. (2009). Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of Thai local vegetables. *J Med Plants Res*, 3(5), 443-449.
- [43] Wang, J. S., Wang, H. J., & Qian, H. L. (2018). Biological effects of radiation on cancer cells. *Military Medical Research*, 5, 1-10.
- [44] Jia, C., Wang, Q., Yao, X., & Yang, J. (2021). The role of DNA damage induced by low/high dose ionizing radiation in cell carcinogenesis. *Exploratory Research and Hypothesis in Medicine*, 6(4), 177-184.
- [45] Kopustinskiene, D. M., Jakstas, V., Savickas, A., & Bernatoniene, J. (2020). Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients*, 12(2), 457.
- [46] Pratheeshkumar, P., & Son, Y-O. (2014). Anticancer potential of flavonoids: Mechanisms of action and effects on cancer cell signaling pathways. *Cancer Letters*, 353(2), 195-203.
- [47] Li, X., Zhang, L., & Li, M. (2018). Kaempferol induces ROS and sensitizes breast cancer cells to cisplatin. *Oncotarget*, 9(5), 5072-5085.
- [48] Russo, M., Palumbo, R., & Tedesco, I. (2010). Flavonoids as radiosensitizing agents. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(5), 643-678.
- [49] Kicinska, A., & Jarmuszkiewicz, W. (2020). Flavonoids and mitochondria: activation of cytoprotective pathways?. *Molecules*, 25(13), 3060.

ภาคผนวก

1. วางแผนจำลองการฉายรังสีเซลล์มะเร็งเชิงปอดมนุษย์ เพื่อหาค่า MU สำหรับเครื่อง Linear accelerator



- ตั้งค่า dose rate เท่ากับ 400 MU/mins
- ตั้งค่า Field size เท่ากับ 20 X 20 cm², Right lateral, Left lateral

Dose (Gy)	MU (RL/LL)
0.5	26/26
1.0	51/51
2.0	102/102
3.0	154/154
5.0	256/256

2. สารสกัดใบย่านางด้วยวิธี water-based extraction



3. ใบรับรองการตรวจประเมินคุณภาพของสารสกัดใบย่านาง

SIPS
CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product Name: Tiliacora triandra Extract Liquid
Part used: Leaf
Botanical Name: *Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels
Product Code: HE-EL41-TIT
Lot No.: TS42TIT41A
Mfg Date: Feb 07, 2024

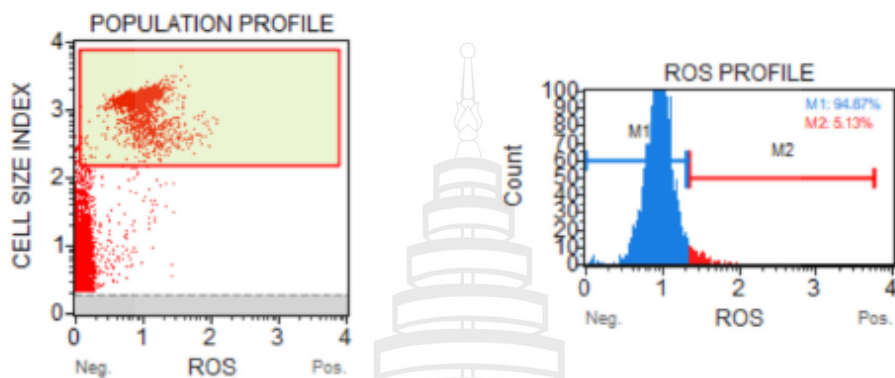
Analysis	Specification	Unit	Result
Appearance	Brownish green to brown liquid	-	Brownish green liquid
Heavy Metal	Not more than 20	ppm	< 20
Arsenic	Not more than 2	ppm	< 2
Lead	Not more than 1	ppm	< 1
pH Direct	4.00 - 7.00		5.66
Specific gravity (d ₂₀ ²⁰)	1.10 - 1.30	-	1.18
Total aerobic count	Not more than 1,000	cfu/g	< 10
Yeast & Mold count	Not more than 100	cfu/g	< 10
Enterobacteria count	Not more than 100	cfu/g	< 10
<i>S.aureus</i>	Absent	in 1 g	Absent
<i>P.aeruginosa</i>	Absent	in 1 g	Absent
<i>E. coli</i>	Absent	in 1 g	Absent
<i>Salmonella</i> spp.	Absent	in 25 g	Absent
Content of active ingredients	Not less than 30.0 mg % Flavonoids	mg%	99.8

Date of Analysis: Feb, 2024
Remark: STD 1
Shelf life: 24 months from manufacturing date

4. ผลการวิเคราะห์การเกิด ROS ในเซลล์ด้วยวิธี Flow cytometry ภายหลังจากการได้รับรังสีแกมมาอย่างเดียว สารสกัดใบย่านางอย่างเดียว หรือการฉายรังสีร่วมกับสารสกัดใบย่านาง

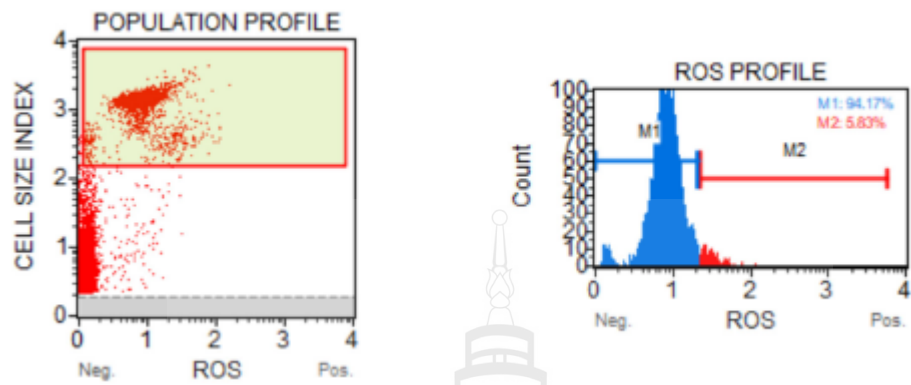
Ionizing radiation alone

0 Gy-1



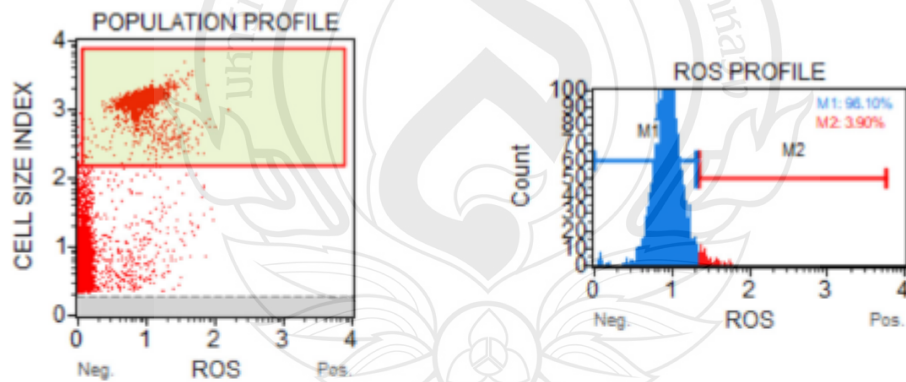
Oxidative Stress	% Gated	Cell Conc. (Cells/mL)
ROS(-) Cells (M1)	94.87	1.14E+05
ROS(+) Cells (M2)	5.13	6.18E+03
Total Cell Concentration	1.20E+05 Cells/mL	

0 Gy-2



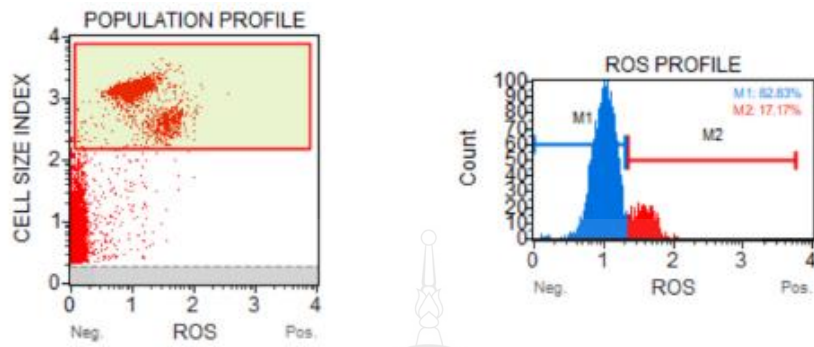
Oxidative Stress	% Gated	Cell Conc. (Cells/mL)
ROS(-) Cells (M1)	94.17	1.51E+05
ROS(+) Cells (M2)	5.83	9.36E+03
Total Cell Concentration	1.60E+05 Cells/mL	

0 Gy-3



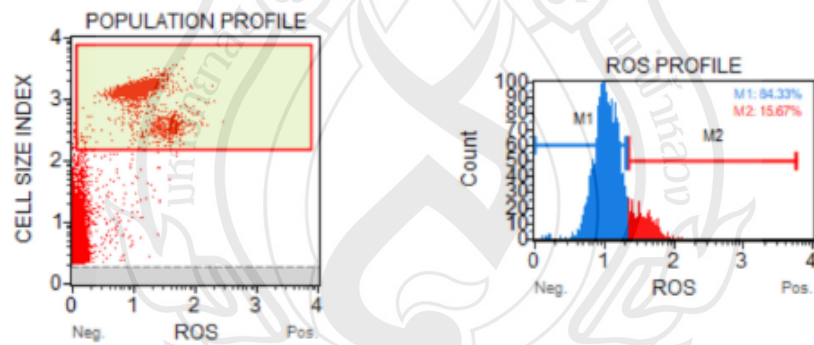
Oxidative Stress	% Gated	Cell Conc. (Cells/mL)
ROS(-) Cells (M1)	96.10	1.59E+05
ROS(+) Cells (M2)	3.90	6.44E+03
Total Cell Concentration	1.65E+05 Cells/mL	

2 Gy-1



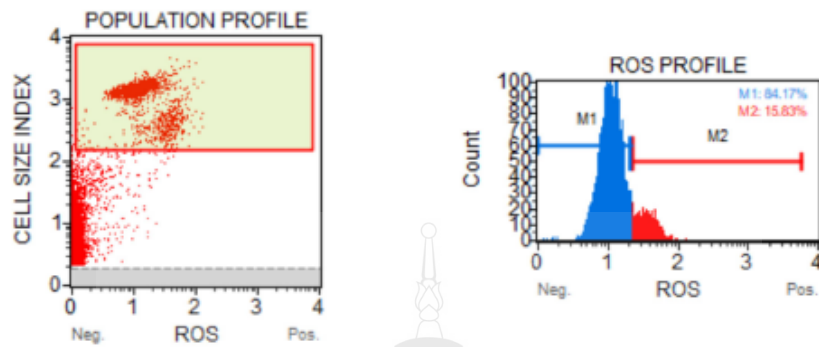
Oxidative Stress	% Gated	Cell Conc. (Cells/mL)
ROS(-) Cells (M1)	82.83	1.52E+05
ROS(+) Cells (M2)	17.17	3.16E+04
Total Cell Concentration	1.84E+05 Cells/mL	

2 Gy-2



Oxidative Stress	% Gated	Cell Conc. (Cells/mL)
ROS(-) Cells (M1)	84.33	1.31E+05
ROS(+) Cells (M2)	15.67	2.43E+04
Total Cell Concentration	1.55E+05 Cells/mL	

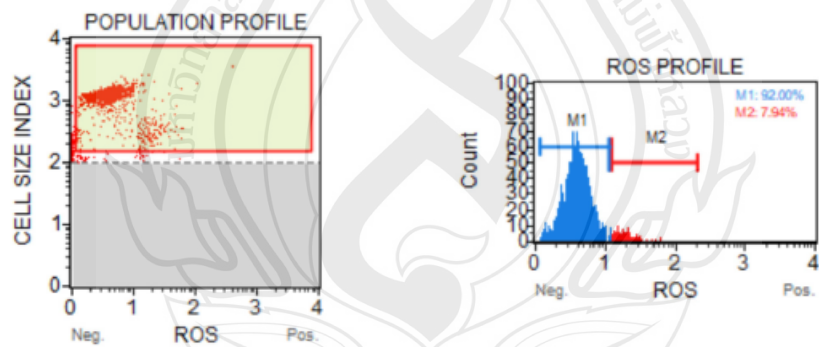
2 Gy-3



Oxidative Stress	% Gated	Cell Conc. (Cells/mL)
ROS(-) Cells (M1)	84.17	1.33E+05
ROS(+) Cells (M2)	15.83	2.50E+04
Total Cell Concentration	1.58E+05 Cells/mL	

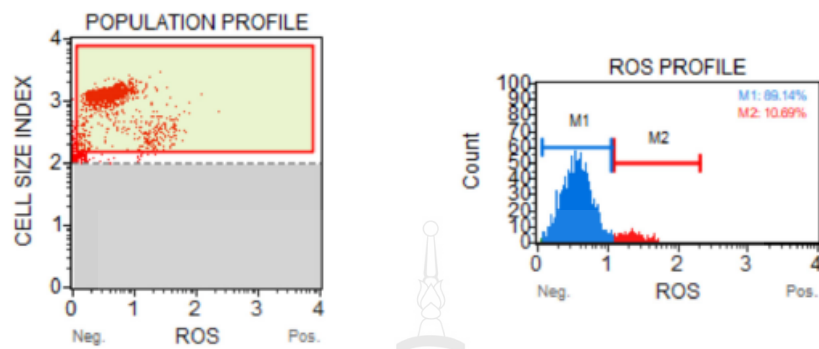
Yanang leaf extract alone

Control (1)



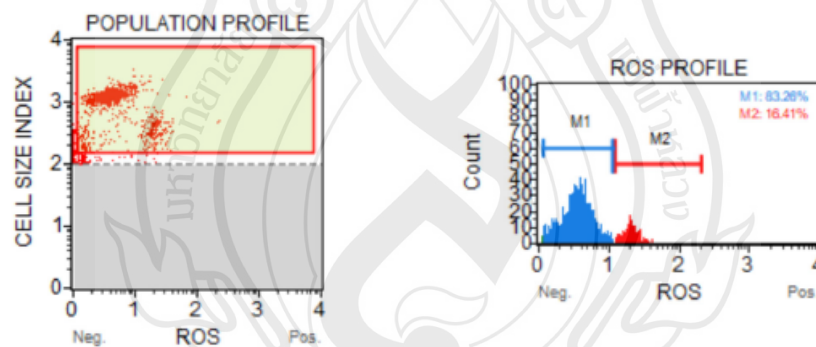
Oxidative Stress	% Gated	Cell Conc. (Cells/mL)
ROS(-) Cells (M1)	92.00	3.66E+04
ROS(+) Cells (M2)	7.94	3.15E+03
Total Cell Concentration	3.97E+04 Cells/mL	

Control (2)



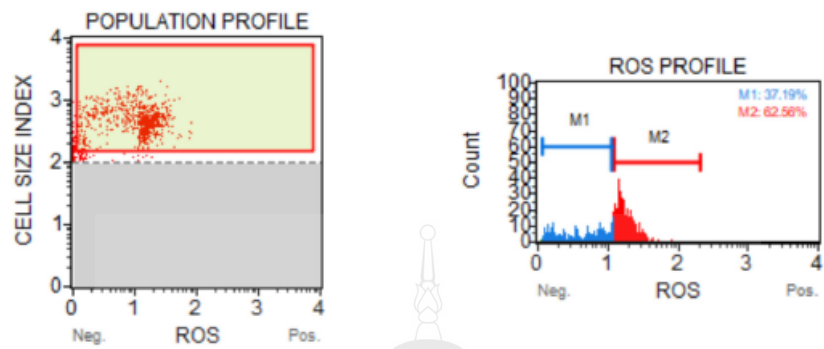
Oxidative Stress	% Gated	Cell Conc. (Cells/mL)
ROS(-) Cells (M1)	89.14	2.92E+04
ROS(+) Cells (M2)	10.69	3.50E+03
Total Cell Concentration	3.28E+04 Cells/mL	

Control (3)



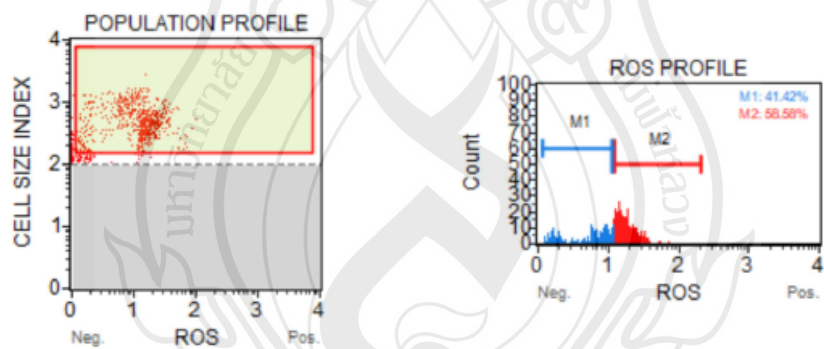
Oxidative Stress	% Gated	Cell Conc. (Cells/mL)
ROS(-) Cells (M1)	83.26	1.48E+04
ROS(+) Cells (M2)	16.41	2.91E+03
Total Cell Concentration	1.77E+04 Cells/mL	

Tilia concentration 0.05 % (1)



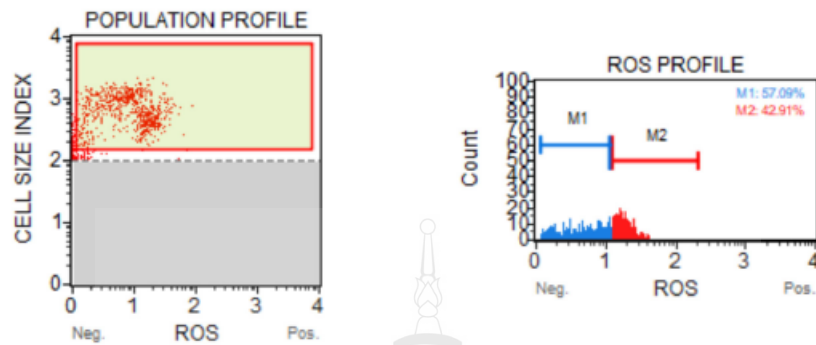
Oxidative Stress	% Gated	Cell Conc. (Cells/mL)
ROS(-) Cells (M1)	37.19	4.18E+03
ROS(+) Cells (M2)	62.56	7.04E+03
Total Cell Concentration	1.12E+04 Cells/mL	

Tilia concentration 0.05 % (2)



Oxidative Stress	% Gated	Cell Conc. (Cells/mL)
ROS(-) Cells (M1)	41.42	3.92E+03
ROS(+) Cells (M2)	58.58	5.54E+03
Total Cell Concentration	9.46E+03 Cells/mL	

Tilia concentration 0.05 % (3)

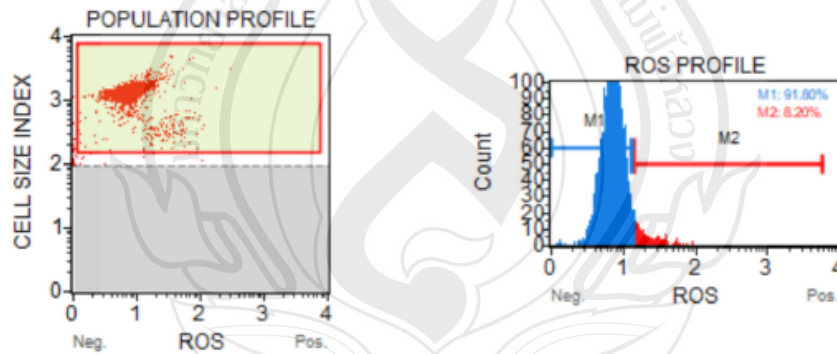


Oxidative Stress	% Gated	Cell Conc. (Cells/mL)
ROS(-) Cells (M1)	57.09	5.92E+03
ROS(+) Cells (M2)	42.91	4.45E+03

Total Cell Concentration 1.04E+04 Cells/mL

Ionizing radiation plus Yanang leaf extract

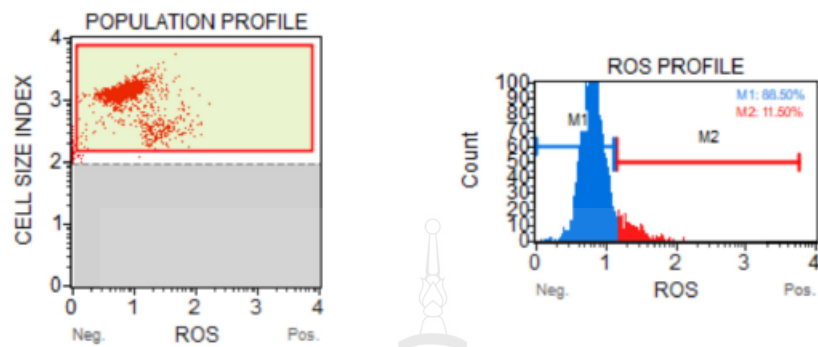
Control (1)



Oxidative Stress	% Gated	Cell Conc. (Cells/mL)
ROS(-) Cells (M1)	91.80	1.29E+05
ROS(+) Cells (M2)	8.20	1.15E+04

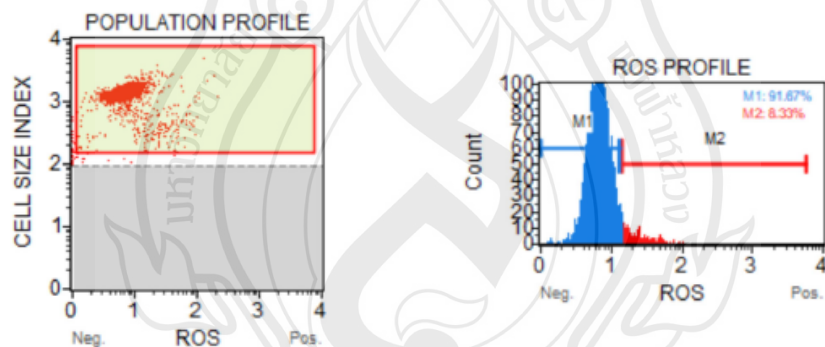
Total Cell Concentration 1.40E+05 Cells/mL

Control (2)



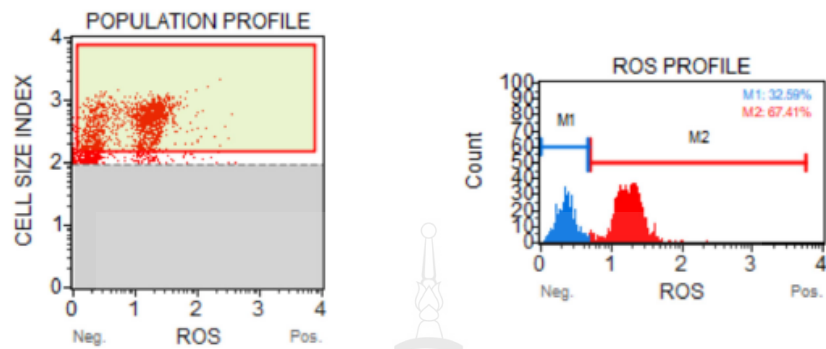
Oxidative Stress	% Gated	Cell Conc. (Cells/mL)
ROS(-) Cells (M1)	88.50	1.40E+05
ROS(+) Cells (M2)	11.50	1.82E+04
Total Cell Concentration	1.58E+05 Cells/mL	

Control (3)



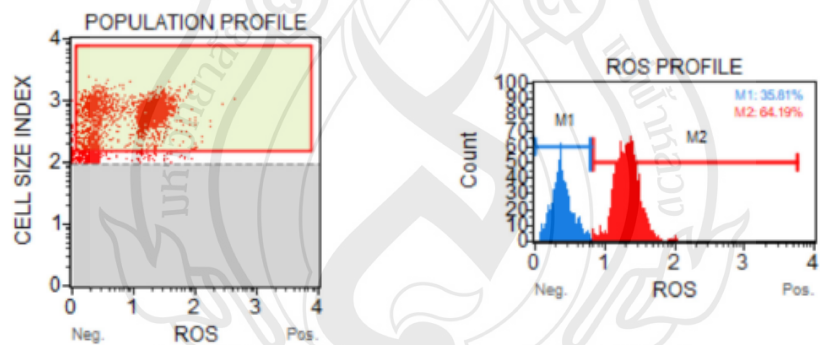
Oxidative Stress	% Gated	Cell Conc. (Cells/mL)
ROS(-) Cells (M1)	91.67	1.31E+05
ROS(+) Cells (M2)	8.33	1.19E+04
Total Cell Concentration	1.43E+05 Cells/mL	

2 Gy + Yanang (1)



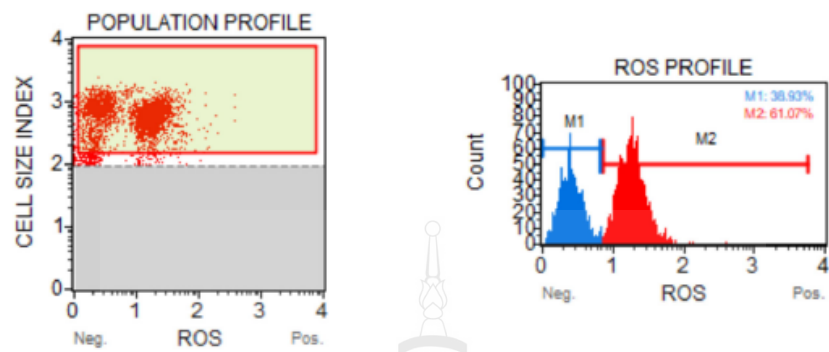
Oxidative Stress	% Gated	Cell Conc. (Cells/mL)
ROS(-) Cells (M1)	32.59	7.15E+03
ROS(+) Cells (M2)	67.41	1.48E+04
Total Cell Concentration	2.19E+04 Cells/mL	

2 Gy + Yanang (2)

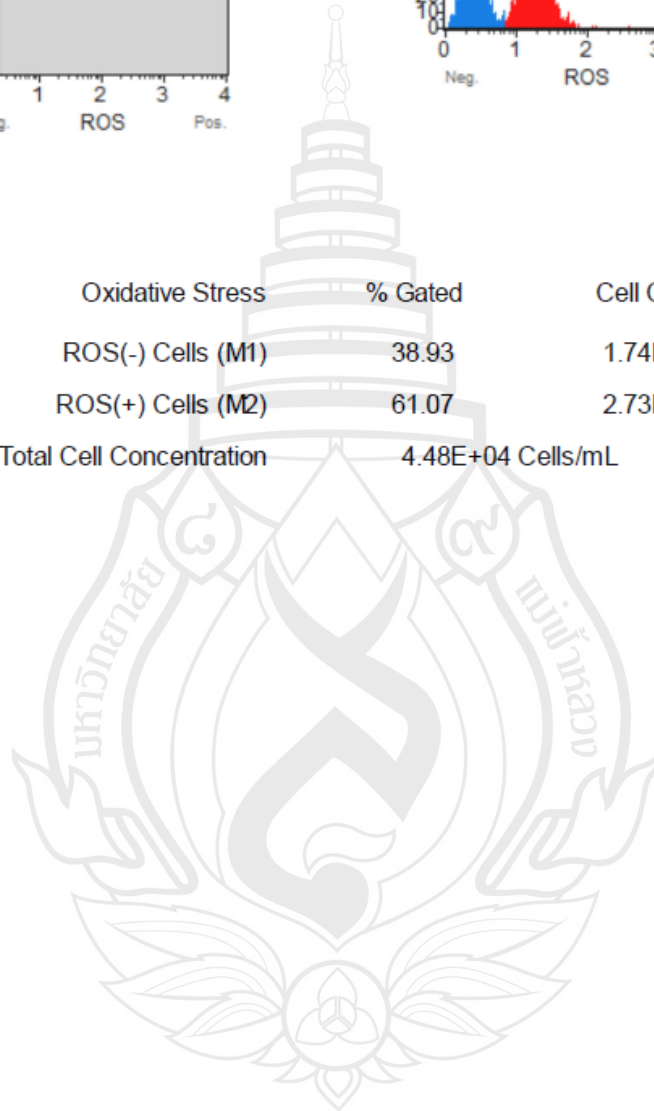


Oxidative Stress	% Gated	Cell Conc. (Cells/mL)
ROS(-) Cells (M1)	35.81	1.30E+04
ROS(+) Cells (M2)	64.19	2.33E+04
Total Cell Concentration	3.63E+04 Cells/mL	

2 Gy + Yanang (3)



Oxidative Stress	% Gated	Cell Conc. (Cells/mL)
ROS(-) Cells (M1)	38.93	1.74E+04
ROS(+) Cells (M2)	61.07	2.73E+04
Total Cell Concentration	4.48E+04 Cells/mL	



ประวัติผู้ประพันธ์

ชื่อ

ฐิติทิพย์ ทิพยมนตรี

ประวัติการศึกษา

2549

ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต

เกียรตินิยมอันดับ 2

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการทำงาน

2559-ปัจจุบัน

ภาควิหารังสีเทคนิคและฟิสิกส์ทางการแพทย์

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

