Thesis Title Anticancer and Multidrug Reversing Action of Qinghaosu Drugs: A Study of Its Impact on Mitochondrial and Cellular Energetic State of Drug–sensitive and Drug–resistant Cells.

Author Mr. Paiboon Reungpatthanaphong

Degree Doctor of Philosophy (Biomedical Sciences)

Thesis Advisory Committee Dr. Samlee Mankhetkorn Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Wongwiwat Tassaneeyakul Committee
Asst. Prof Dr. Wisatre Kongcharoensuntorn Committee

ABSTRACT

In this thesis, the new pharmacological targets to overcome cancers, particularly multidrug-resistance phenomenon were investigated including mitochondria and the difference in production of energy supplies. These biomarkers can be used to monitor the cellular response to cytotoxic drugs by using spectrofluorometric and ^{1}H-NMR spectroscopic methods. This is the first study to demonstrate that drug-sensitive cells (K562 and GLC4) dominantly produce energy supplies via oxidative metabolism, while an up-regulation of glycolysis seems to dominate in the drug-resistant (K562/*adr* and GLC4/*adr*) cells. The $|\Delta\Psi_m|$ values of the four cell lines are 160 ± 4 milivolts for K562 cell, 146 ± 6 milivolts for K562/*adr* cell, 161 ± 10 milivolts for GLC4 cell and 168 ± 2 milivolts for GLC4/*adr* cell, respectively. An increase or a decrease in the $|\Delta\Psi_m|$ was leading to an increase or a decrease in the cellular ATP contents. The cellular energy supplies was impaired by various stimulants, such as a decrease in glycolysis while an increase in oxidative metabolism was observed in MDR cells exposed to artemisinin, artesunate and dihydroartemisinin and a decrease in oxidative metabolism in their corresponding drug-sensitive cells. Artemisinin, artesunate and dihydroartemisinin efficiently decreased the mitochondrial membrane potential, leading to a decrease in intracellular ATP in all cell lines tested by 30% to 50% at 5 μM. Consequently, artemisinin and its derivatives have been found to inhibit the proliferation of cancer cells in the micromolar range. They poorly inhibited the function of P-glycoprotein and did not inhibit the function of MRP1-protein. The concentrations required to inhibit 50% the function of P-glycoprotein were 110 ± 5 μM. Artemisinin, artesunate and dihydroartemisinin increased cytotoxicity of pirarubicin and doxorubicin in P-glycoprotein-overexpressing K562/*adr* and in MRP1-overexpressing GLC4/*adr*, with the $\delta_{0.5}$ ranged from 200 to 860 nM, but not in their corresponding drug-sensitive cell lines. The drugs exhibited anticancer activities and reversed MDR phenomenon by impairing cellular metabolism, particularly the mitochondria was proposed as the potential intracellular targets. The results clearly show for the first time that artemisinin and its derivatives are very potent anticancer drugs and can be used in combination with anticancer drugs to overcome MDR phenomena.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ฤทธิ์ในการต้านมะเร็งและการยับยั้งการดื้อยาแบบไขว้ของยาคิงฮาวซู: การศึกษาผลกระทบต่อสถานะเชิงพลังงานของไมโตคอนเดรียและเซลล์ของเซลล์มะเร็งชนิดที่ไวและดื้อต่อยา
ผู้เขียน	นายไพบูลย์ เรืองพัฒนพงศ์
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	อ.ดร. สำรี มั่นเขตต์กรน์ อาจารย์ที่ปรึกษาและประธานกรรมการ รศ. ดร. วงศ์วิวัฒน์ ทัศนียกุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผศ. ดร. วิสาตรี คงเจริญสุนทร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ในวิทยานิพนธ์นี้ได้ทำการศึกษาเป้าหมายการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาคือไมโตคอนเดรียและความแตกต่างของกระบวนการสร้างพลังงานของเซลล์ระหว่างเซลล์ที่ไวต่อยาและดื้อต่อยาเพื่อการรักษามะเร็งโดยเฉพาะมะเร็งที่ดื้อต่อยาแบบหลายขนาน เป้าหมายทางเภสัชวิทยาทั้งสองนี้สามารถใช้ในการติดตามการตอบสนองของเซลล์ต่อยาซึ่งสามารถติดตามได้ด้วยการใช้ สเปกโตรฟลูออโรเมทรีและโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกรปี การศึกษานี้นับเป็นครั้งแรกที่ได้แสดงให้เห็นว่าพลังงานส่วนใหญ่ของเซลล์ที่ไวต่อยา (K562 และ GLC4) ถูกสร้างจากขบวนการเมตาบอลิซึมแบบที่ต้องใช้ออกซิเจนในขณะที่เซลล์ดื้อยามีการทำงานของขบวนการไกลโคไลซิสเพิ่มมากขึ้นและได้กลายเป็นแหล่งพลังงานหลักของเซลล์ดื้อยา (K562/*adr* และ GLC4*adr*) ค่าสัมบูรณ์ของความต่างศักย์เมมเบรนของไมโตคอนเดรียของเซลล์ K562 มีค่าเท่ากับ 160 $\pm$ 4 มิลลิโวลท์ เซลล์ K562/adr มีค่า เท่ากับ 146 $\pm$ 6 มิลลิโวลท์ เซลล์ GLC4 มีค่า เท่ากับ 161 $\pm$ 10 มิลลิโวลท์ และเซลล์ GLC4/*adr* มีค่าเท่ากับ 168 $\pm$ 2 มิลลิโวลท์ ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่าการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของความต่างศักย์เมมเบรนของไมโตคอนเดรียมีผลทำให้ปริมาณของเอทีพีภายในเซลล์มีค่าเพิ่มและลดลงตามไปด้วย การสร้างพลังงานของเซลล์สามารถเกิดผลกระทบได้จากปัจจัยหลายอย่างที่มากระตุ้น ตัวอย่างเช่น เกิดการลดลงของขบวนการไกลโคไลซิสและเกิดการเพิ่มขึ้นของขบวนการเมตาบอลิซึมแบบที่ต้องใช้ออกซิเจนในเซลล์ที่ดื้อยาแบบหลายขนาน และเกิดการลดลงของขบวนการเมตาบอลิซึมแบบที่ต้องใช้ออกซิเจนในเซลล์ที่ไวต่อยาเมื่อเซลล์ถูกบ่มร่วมกับยาอาร์ทีมิซินิน อาร์ทีซูเนทและไดไฮโดรอาร์ทีมิซินิน โมเลกุลมีประสิทธิภาพในการทำให้ความต่างศักย์ เมมเบรนของไมโตคอนเดรียลดลงซึ่งทำให้เอทีพีของเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิดมีปริมาณลดลง 30—50 เปอร์เซ็นต์เมื่อมีการบ่มร่วมกับยาที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ อาร์ทีมิซินินและอนุพันธ์ สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งในระดับไมโครโมลาร์และพบว่าโมเลกุลเหล่านี้ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของพี—ไกลโคโปรตีนได้น้อยมากและไม่ยับยั้งการทำงานของเอ็มอาร์พี—1โปรตีน โดยความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการทำงานของพี—ไกลโคโปรตีนได้ 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 110 $\pm$ 5 ไมโครโมลาร์ นอกจากนี้ยากลุ่มนี้ยังเสริมฤทธิ์การฆ่าเซลล์มะเร็งของยาพีรารูบีซินและด็อกโซรูบีซินทั้งในเซลล์มะเร็งที่ดื้อต่อยาแบบหลายขนานที่มีการแสดงออกของพี—ไกลโคโปรตีน (K562/*adr*) และในเซลล์ที่มีการแสดงออกของเอ็มอาร์พี—1โปรตีน (GLC4/adr) โดยมีค่า $\delta_{0.5}$ อยู่ในช่วง 200 ถึง 860 นาโนโมลาร์แต่ไม่พบผลนี้ในเซลล์ที่ไวต่อยา แสดงให้เห็นว่าอาร์ทีมิซินิน และอนุพันธ์มีประสิทธิภาพในการต้านมะเร็งและยับยั้งเซลล์ที่มีการดื้อยาแบบหลายขนานได้ โดยทำให้เกิดความไม่สมดุลของเมตาบอลิซึมในเซลล์ซึ่งมีเป้าหมายการออกฤทธิ์อยู่ที่ไมโตคอนเดรีย จากผลการทดลองแสดงให้เห็นได้อย่างชัดเจนว่าอาร์ทีมิซินินและอนุพันธ์มีคุณสมบัติเป็นยาต้านมะเร็งและสามารถนำไปใช้ร่วมกับยาต้านมะเร็งในการรักษามะเร็งที่มีปรากฏการณ์การดื้อยาแบบหลายขนานได้อย่างมีประสิทธิ ภาพ