

Thesis Title	A STUDY OF APOPTOSIS-INDUCING ACTION OF SIAMOIS RED WINE POLYPHENOLS IN BREAST CANCER MDA-MB-435 CELLS XENOGRAFTED IN ATHYMIC NUDE MICE: MOLECULAR IMAGING AND HISTOCHEMICAL EVIDENCE.		
Author	Mr. Samarn Dechsupa		
Degree	Doctor of Philosophy (Biomedical Science)		
Thesis Advisor Committee	Dr. Samlee	Mankhetkorn	Chairperson
	Assoc.Prof.Dr. Wichitra	Tassaneeyakul	Member
	Dr. Rachain	Kosanlavit	Member
	Asst.Prof.Dr. Wisatre	Kongcharoensuntorn	Member

ABSTRACT

Natural polyphenolic compounds was refocused and extended to use in cancer prevention and intervention purposes. Many of their biological activities, antioxidants, antiproliferations, inhibitors of the MDR transporters and modulators of the cellular energetic state have been documented.

In this study the polyphenol extracts derived from Siamois® red wine (SRPE), mamoa wood extracts (MPE) and the mixture 1:1 of SRPE and MPE (Siamois®) were studied on anticancer and apoptosis-inducing activities in both *in vitro* and *in vivo*. It is the first report that the polyphenols used in this study stimulated normal myocyte cell growth while doxorubicin was completely inhibited. Contrary to normal cells, the polyphenols inhibited cell growth against 5 cancer cell lines including MDA-MB-435, K562, K562/*adr*, GLC4 and GLC4/*adr* cells. The results also showed that polyphenols provided an induction of apoptosis of cancer cells indicating that their action on cancer cells can be described as “assisted suicide”. Quercetin, the most abundant molecule found in our polyphenol extracts were selected to study effects on mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) change as well as its ability to induce apoptosis against K562 and K562/*adr* cells. Quercetin induced an increase followed by a decrease in $|\Delta\Psi_m|$ value depending on its concentration.

The research on potential use of polyphenols for cancer treatment was extended from cells cultured to athymic nude mice xenografted with MDA-MB-435 cells. We used molecular imaging (^{99m}Tc -hynic-Annexin V) and histochemical technique for monitoring the cancer cell response to polyphenols. The double IC_{50} value of the polyphenol exhibited an induction of apoptosis only in tumor tissue. There was no normal tissue damage, particularly the liver. It is the first time that the antiproliferative and apoptosis-inducing effects of the polyphenols on MDA-MB-435 cell *in vitro* were effectively extrapolated to the *in vivo* situation.

The overall results of this demonstrated that the polyphenol extracts derived from Siamois® red wine (SRPE), mamoa wood extracts (MPE) and Siamois® could be considered as non-toxic compounds; as a matter of fact it looks as if these polyphenols have very few side effects given their availability as a nutrition-based intervention in cancer treatment.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การศึกษาการออกฤทธิ์ของสาร โพลีฟีนอลในไวน์แดงสยามมั่วส์ต่อการตายแบบอะพอพโตซิสของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-435 ที่ปลูกถ่ายในหนูเปลือยที่ตัดต่อมัทัส: ตรวจสอบผลโดยการสร้างภาพระดับเคมีและฮิสโตเคมี

ผู้เขียน

นายสมาน เชนสุภา

ปริญญา

วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตรชีวการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ดร. คำรียะ มั่นเขตต์กรณ์	ประธานกรรมการ
รศ. ดร. วิจิตรา ทศนียกุล	กรรมการ
ดร. ราเชนทร์ โกศลวิตร	กรรมการ
ผศ. ดร. วิสาดรี คงเจริญสุนทร	กรรมการ

บทคัดย่อ

สารประกอบโพลีฟีนอลจากธรรมชาติได้ถูกนำกลับมาพิจารณาเพื่อใช้ในการป้องกันและรักษามะเร็งอย่างกว้างขวางอีกครั้งหนึ่ง มีรายงานผลการศึกษานานมากแสดงถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบโพลีฟีนอล เช่น การออกฤทธิ์ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นสารต้านมะเร็ง เป็นตัวยับยั้งการทำงานของโปรตีนที่ทำหน้าที่ปั๊มยาในเซลล์มะเร็ง และออกฤทธิ์เป็นตัวปรับเปลี่ยนระดับพลังงานของเซลล์ เป็นต้น

วิทยานิพนธ์นี้ได้ศึกษาผลของสารประกอบโพลีฟีนอลที่สกัดจากไวน์แดงสยามมั่วส์ (SRPE) ไม้มะเฒ่า (MPE) และจากสารสกัดผสมสัดส่วน 1 ต่อ 1 ระหว่างไวน์แดงสยามมั่วส์และไม้มะเฒ่า (Siamois®) ต่อการออกฤทธิ์เป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง และฤทธิ์ในการกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเข้าสู่การตายแบบอะพอพโตซิสทั้งในระดับเซลล์และสัตว์ทดลอง โดยพบว่าสารโพลีฟีนอลที่ใช้ในการศึกษากระตุ้นการเจริญเติบโตในเซลล์โมไอโซที่ปกติของคนในขณะที่คอกโซรูบิซินออกฤทธิ์ยับยั้ง ทั้งนี้สารโพลีฟีนอลแสดงผลยับยั้งการเจริญเติบโตในเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-435 มะเร็งเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนชนิดที่ไว (K562) และคือต่อยา (K562/adr) มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็กที่ไว (GLC4) และคือต่อยา (GLC4/adr) นอกจากนี้สารโพลีฟีนอลยังออกฤทธิ์กระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเข้าสู่การตายแบบอะพอพโตซิส โดยสารโพลีฟีนอลนี้ทำหน้าที่เป็น “สื่อช่วยชักนำเซลล์เข้าสู่โปรแกรมการตาย” และเพื่อศึกษากลไกการการตายของเซลล์มะเร็ง เคอร์ซินเป็นสารที่อุดมในสารสกัดทั้งสามได้ถูกเลือกเป็นตัวแทน จากการวิจัยพบว่าเคอร์ซินกระตุ้นการตายแบบอะพอพโตซิสและทำให้ความต่างศักย์เมมเบรนไมโทคอนเดรียเพิ่มขึ้นและลดลงในเวลาต่อมาในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนทั้งสองชนิด โดยการเปลี่ยนแปลงนี้ขึ้นกับความเข้มข้น

การศึกษาการใช้โพลีฟีนอลในการฆ่าเซลล์มะเร็งได้ขยายความสำคัญจากระดับเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์สู่หนูเปลือยที่ปลูกมะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-435 โดยใช้เทคนิคโมเลกุลาร์อิมเมจจิง ได้แก่การติดตามด้วยสารเกดซ์ซิงตี^{99m}Tc-hynic-Annexin V ที่จำเพาะกับเซลล์ที่มีการตายแบบอะพอพโตซิส และยืนยันผลโดยการย้อมชิ้นเนื้อด้วยเทคนิคทางฮิสโตเคมี พบว่าสารโพลีฟีนอล (ความเข้มข้นที่ใช้เท่ากับ 2 เท่าของค่า IC₅₀) ทำให้เฉพาะก้อนมะเร็งเท่านั้นที่มีการตายแบบอะพอพโตซิส เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติและก้อนมะเร็งที่ไม่ได้รับสารโพลีฟีนอล และไม่พบว่าการตายของเนื้อเยื่อตับ รายงานการวิจัยนี้เป็นรายงานแรกที่มีมีการรายงานถึงผลของสารโพลีฟีนอลต่อการออกฤทธิ์ด้านการเจริญเติบโตและกระตุ้นการตายแบบอะพอพโตซิสในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-435 ที่สอดคล้องกันทั้งในระดับเซลล์และในระดับสัตว์ทดลอง

จากผลการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าสารประกอบโพลีฟีนอลที่สกัดจากไวน์แดงสยามมั่วส์ ไม้มะเฒ่า และจากสารสกัดผสมจากไวน์แดงสยามมั่วส์และไม้มะเฒ่าไม่จัดเป็นสารมีพิษ และมีผลเคียงข้างน้อยมาก ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้อย่างยิ่งที่จะพัฒนาสารโพลีฟีนอลดังกล่าวเป็นสารอาหารที่ใช้ในการป้องกันและรักษามะเร็งในระดับคลินิกต่อไป