

## การเตรียมสารสกัดจากเมล็ดมะปรางและประเมินฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวและมะเร็งปอดชนิดที่ไวและดื้อต่อยา

วิภพ สุตชนะ<sup>1</sup>, ณัฐปกรณ์ เดชสุภา<sup>2</sup>, สำริ มั่นเขตต์กรณ์<sup>2</sup>

<sup>1</sup>สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา

<sup>2</sup>ภาควิชารังสีเทคนิค คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

## Preparation of Maprang Seed Extracts and Evaluation of Their Anti-Proliferative Activity against Drug-Sensitive and Drug-Resistant Leukemic and Lung Cancer Cells

Wipob Suttana<sup>1\*</sup>, Nathupakorn Dechsupa<sup>2</sup>, Samlee Mankhetkorn<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Technology, School of Allied Health Sciences, University of Phayao, Phayao

<sup>2</sup>Department of Radiologic Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai

**หลักการและวัตถุประสงค์:** เมล็ดมะปรางเป็นสิ่งเหลือทิ้งจากการบริโภคผลไม้ในท้องถิ่น และเนื่องจากเมล็ดมะปรางมีสีม่วงจึงน่าจะมีองค์ประกอบของรงควัตถุกลุ่มโพลีฟีนอล การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางเคมี ฟิสิกส์เบื้องต้นและประเมินฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดมะปราง ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวและมะเร็งปอดที่ไวและดื้อต่อยา

**วิธีการศึกษา:** เตรียมสารสกัดเมล็ดมะปรางโดยการสกัดแบบเป็นลำดับด้วยคลอโรฟอร์ม, อะซิโตไนโตรล, เอทานอล และน้ำ ตามลำดับ และศึกษาคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์เบื้องต้น โดยการวิเคราะห์แถบการดูดกลืนแสง และประเมินฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดมะปรางในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวและมะเร็งปอดที่ไวและดื้อต่อยาต่อเซลล์โรบิซิน (K562, K562/adr, GLC4 และ GLC4/adr) รวมทั้งศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งที่ปมร่วมกับสารสกัดดังกล่าว

**ผลการศึกษา:** สารสกัดเมล็ดมะปรางที่สกัดด้วยอะซิโตไนโตรล, เอทานอล และน้ำ มีแถบการดูดกลืนแสงที่สอดคล้องกับสารกลุ่มโพลีฟีนอล และพบว่าสารสกัดเมล็ดมะปรางทั้ง 4 ส่วนสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง K562, K562/adr, GLC4 และ GLC4/adr ได้ โดยสารสกัดเมล็ดมะปรางที่สกัดด้วยเอทานอลออกฤทธิ์ดีที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่า

**Background and Objective:** Maprang or Marian plum (*Bouae burmanica*) seeds are the leftover from local fruit consumption. Since seeds have purple color, it may contain the pigments which are polyphenols. This study aimed to investigate basic physicochemical properties and evaluate anti-proliferative activity of Maprang seed extracts against drug-sensitive and resistant leukemic and lung cancer cells.

**Methods:** Maprang seeds were extracted in serial manner with chloroform, acetonitrile, ethanol and water, respectively. The absorption spectra were analyzed and anti-proliferative activities of the extracts were evaluated against doxorubicin-sensitive and -resistant leukemic and lung cancer cells (K562, K562/adr, GLC4 and GLC4/adr). Furthermore, the morphological changes of cancer cells treated with the extracts were investigated.

**Results:** The acetonitrile, ethanol and water extracts possessed absorption spectra corresponding to those of polyphenols. In addition, all extracts can inhibit cell growth in K562, K562/adr, GLC4 and GLC4/adr cells with similar potency. The most potent anti-proliferative activity was found in ethanol extract. Moreover, the morphological changes of the extract treated cells were consistent with those of the apoptotic cell death.

**Conclusions:** Maprang seed extracts might contain

การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์สอดคล้องกับการตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิส

**สรุป:** สารสกัดเมล็ดมะปรางน่าจะมีสารกลุ่มโพลีฟีนอลเป็นองค์ประกอบและมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวและมะเร็งปอดชนิดที่ไวและดื้อต่อยาซึ่งสามารถทำให้เอาชนะปัญหาการดื้อยาแบบหลายขนานได้ โดยฤทธิ์ดังกล่าวอาจเกี่ยวข้องกับการชักนำการตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิส ดังนั้นผลการศึกษานี้ น่าจะสามารถนำไปใช้ในการพัฒนายารักษาโรคมะเร็งจากสารสกัดเมล็ดมะปรางต่อไป

**คำสำคัญ:** เมล็ดมะปราง, โพลีฟีนอล, ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ, เซลล์มะเร็งดื้อยา, อะพอพโตซิส

polyphenols and exhibit anti-proliferative activity against drug-sensitive as well as -resistant leukemic and lung cancer cells. The effect might be associated with apoptotic induction. Therefore, this information could be useful for the development of anticancer drugs derived from Maprang seed extracts.

**Keywords:** Maprang seed, polyphenols, anti-proliferative activity, multidrug resistance, apoptosis

ศรีนครินทร์เวชสาร 2556; 28(1): 100-9 • Srinagarind Med J 2013; 28(1): 100-9

### บทนำ

โรคมะเร็งเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญซึ่งมีอุบัติการณ์การเสียชีวิตเป็นอันดับหนึ่งของประชากรในประเทศไทยและในอนาคตคาดว่าแนวโน้มของอัตราการตายจากโรคมะเร็งจะเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ<sup>1</sup> โดยการรักษาโรคมะเร็งยังไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร และผู้ป่วยมะเร็งจะได้รับความทุกข์ทรมานจากการบำบัดรักษา เช่น การผ่าตัด รังสีรักษา เคมีบำบัด เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการรักษาด้วยวิธีเคมีบำบัดซึ่งมีบทบาทสำคัญในการรักษามะเร็งหลายชนิด เนื่องจากการรักษามะเร็งด้วยวิธียาเคมีบำบัดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการรักษาโดยการผ่าตัดหรือฉายรังสี พบว่าผู้ป่วยจากการรักษาด้วยวิธีเคมีบำบัดจะสามารถกระจายไปทุกส่วนของร่างกายเพื่อกำจัดเซลล์มะเร็งที่แพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่น ๆ ในขณะที่การฉายรังสีหรือการผ่าตัดเป็นการรักษาเฉพาะส่วน แต่การรักษาด้วยยาเคมีบำบัดมีข้อเสียโดยทำให้เกิด ผลข้างเคียงคือ ยาเคมีบำบัดมีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งที่มีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว ซึ่งรวมถึงเซลล์ร่างกายปกติที่มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วด้วย เช่น กระดูก เซลล์เม็ดเลือดแดง ไขกระดูก เยื่อบุทางเดินอาหาร และอวัยวะสืบพันธุ์<sup>2</sup> รวมทั้งปัญหาการรักษาด้วยเคมีบำบัดไม่มีประสิทธิภาพตามต้องการ เนื่องจากเซลล์มะเร็งเกิดการดื้อยาหลังจากที่ได้รับยาต้านมะเร็งอย่างต่อเนื่อง ซึ่งการดื้อยาที่ใช้รักษาโรคมะเร็งที่สำคัญเกิดจากเซลล์มะเร็งมีการดื้อยาแบบหลายขนาน (multidrug resistance; MDR) พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนขนส่ง (transporter protein) กลุ่มเอมิตีอาร์ (MDR) ที่ผิวเซลล์มากกว่าปกติ เช่น P-glycoprotein (P-gp), multidrug resistance associated protein-1 (MRP-1) เป็นต้น ซึ่ง

ทำหน้าที่ในการลำเลียงยาหรือสารที่เป็นพิษออกนอกเซลล์ทำให้เซลล์มะเร็งไม่ตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด<sup>3</sup> ดังนั้นสารต้านมะเร็งจึงควรมีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของโปรตีนเอมิตีอาร์หรือมีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างจากยาเคมีบำบัดซึ่งทำให้เกิดการดื้อยาของเซลล์มะเร็ง รวมทั้งไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติในร่างกาย

จากรายงานการศึกษาพบว่า มีสารกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenols) เป็นสารเมตาบอไลต์ชั้นทุติยภูมิที่ประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติกและมีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่ไฮดรอกซิล และเป็นรงควัตถุที่พบมากในพืชผัก และผลไม้ ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพ ส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ด้านการแข็งตัวของเลือด ด้านการอักเสบ ด้านอนุมูลอิสระ และต้านมะเร็ง<sup>4, 5</sup> นอกจากนี้จากการศึกษาที่ผ่านมาของผู้วิจัยและคณะพบว่าสารในกลุ่มโพลีฟีนอลมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งผ่านการชักนำให้เซลล์มะเร็งให้เข้าสู่การตายแบบอะพอพโตซิส (apoptosis) โดยสามารถออกฤทธิ์ได้ดีทั้งในเซลล์มะเร็งที่ไวและดื้อต่อยาแบบหลายขนานแต่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ<sup>6, 7</sup> มะปรางชื่อวิทยาศาสตร์ *Bouae burmanica* Griff. วงศ์ Anacardiaceae เป็นผลไม้ที่พบมากในท้องถิ่นและจากการบริโภคผลไม้ดังกล่าวทำให้มีสิ่งเหลือทิ้งก็คือเมล็ดมะปราง ซึ่งน่าจะนำมาใช้ประโยชน์ และสามารถเพิ่มมูลค่าได้ โดยจากลักษณะของเมล็ดมะปรางที่มีสีม่วงนั้นน่าจะเกิดจากรงควัตถุที่เป็นสารกลุ่มโพลีฟีนอล และจากการวิเคราะห์องค์ประกอบด้านเคมีในเมล็ดของผลไม้บางชนิด เช่น องุ่น มะเเฒ่า มะขาม พบว่าประกอบด้วยสารกลุ่มโพลีฟีนอลซึ่งมีหลากหลายชนิดและมีปริมาณสูง รวมทั้งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ฤทธิ์ต้านมะเร็ง เป็นต้น<sup>8-10</sup> ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์เบื้องต้นโดยการวิเคราะห์แถบการดูดกลืนแสง และประเมินฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งด้วยสารสกัดเมล็ดมะปรางที่สกัดแบบเป็นลำดับ (serial extraction) ด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างกัน ได้แก่ สารสกัดเมล็ดมะปรางที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม อะซิโตไนโตรล เอทานอล และน้ำ รวมทั้งศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งที่ป่มร่วมกับสารสกัดดังกล่าวด้วย

## วิธีการศึกษา

### การเตรียมสารสกัดเมล็ดมะปราง

นำมะปรางมาแกะเมล็ดออกให้เหลือเฉพาะเมล็ดภายใน ซึ่งมีสีม่วงและนำไปผึ่งลมให้แห้ง จากนั้นนำมาบดให้ละเอียด แล้วชั่งผงเมล็ดมะปรางมา 200 กรัม นำมาสกัดแบบเป็นลำดับ (serial extraction) โดยใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างกัน เรียงลำดับจากตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยที่สุดไปยังขั้วมากที่สุด ได้แก่ คลอโรฟอร์ม (chloroform), อะซิโตไนโตรล (acetonitrile), เอทานอล (ethanol) และน้ำ ซึ่งใช้ตัวทำละลาย ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และสกัดในกรวยแยกโดยการเขย่าอย่างแรงและตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อให้เกิดตะกอนและนำส่วนใสไปกรองด้วยกระดาษกรอง จากนั้นนำน้ำกรองไประเหยแห้งโดยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุน (rotary evaporator) เมื่อได้ผงแห้งของสารสกัดก็นำมาเตรียมเป็นสารละลายโดยละลายในตัวทำละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

### การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์เบื้องต้น

เติมสารละลาย 0.1 M NaCl pH 7.4 ลงในคิวเวทควอทซ์ (Quartz cuvette) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และเติมสารละลายของสารสกัดเพื่อให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ จากนั้นนำไปวิเคราะห์แถบการดูดกลืนแสง (absorption spectra) โดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์อินแฟดเรดที่ตามองเห็นและอุลตราไวโอเลต (UV-VIS spectrophotometer)

### การประเมินความเป็นพิษระดับเซลล์

#### เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด erythromyelogenous ที่ไวและดื้อต่อยาดอกโซรูบิซิน (doxorubicin-sensitive and -resistant erythromyelogenous leukemic cells; K562, K562/adr) และเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็กที่ไวและดื้อต่อยาดอกโซรูบิซิน (doxorubicin-sensitive and -resistant small cell lung carcinoma cells; GLC4, GLC4/adr)

### การเพาะเลี้ยงและการเตรียมเซลล์

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10% fetal calf serum และ 1% penicilin/streptomycin นำไปบ่มภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มี 5% CO<sub>2</sub> และความชื้น 95% เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเตรียมเซลล์เพื่อการทดลองโดยใช้ความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 5x10<sup>5</sup> cells/ml แล้วนำไปบ่มในอาหารเลี้ยงเซลล์และสภาวะที่เหมาะสมเป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนนำมาทำการทดลอง

### การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและการศึกษาทางสัณฐานวิทยาของเซลล์

เติมสารที่ใช้ทดสอบลงไปในแต่ละหลุมของ 24 wells-plate ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 (ซึ่งมี 10% fetal calf serum และ 1% penicilin-streptomycin) และมีเซลล์มะเร็งอยู่ 5x10<sup>4</sup> cells/ml โดยให้ได้สารทดสอบที่มีความเข้มข้นตามต้องการ จากนั้นนำไปบ่มภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มี 5% CO<sub>2</sub> และความชื้น 95% เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และบันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (inverted microscope) เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ (cell morphology) เมื่อครบเวลาแล้วจึงนับจำนวนเซลล์ด้วยเครื่อง Coulter Epics MCL-XL<sup>®</sup> แล้วนำไปคำนวณหาค่า % growth inhibition จากสูตร % growth inhibition = (จำนวนเซลล์ในหลุมควบคุม - จำนวนเซลล์ในหลุมที่เติมสารทดสอบ) x 100 / (จำนวนเซลล์ในหลุมควบคุม - จำนวนเซลล์เริ่มต้น) แล้วนำไปสร้างกราฟระหว่างค่า % growth inhibition กับความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบเพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ 50% (IC<sub>50</sub>)

## ผลการศึกษา

### สารสกัดเมล็ดมะปราง

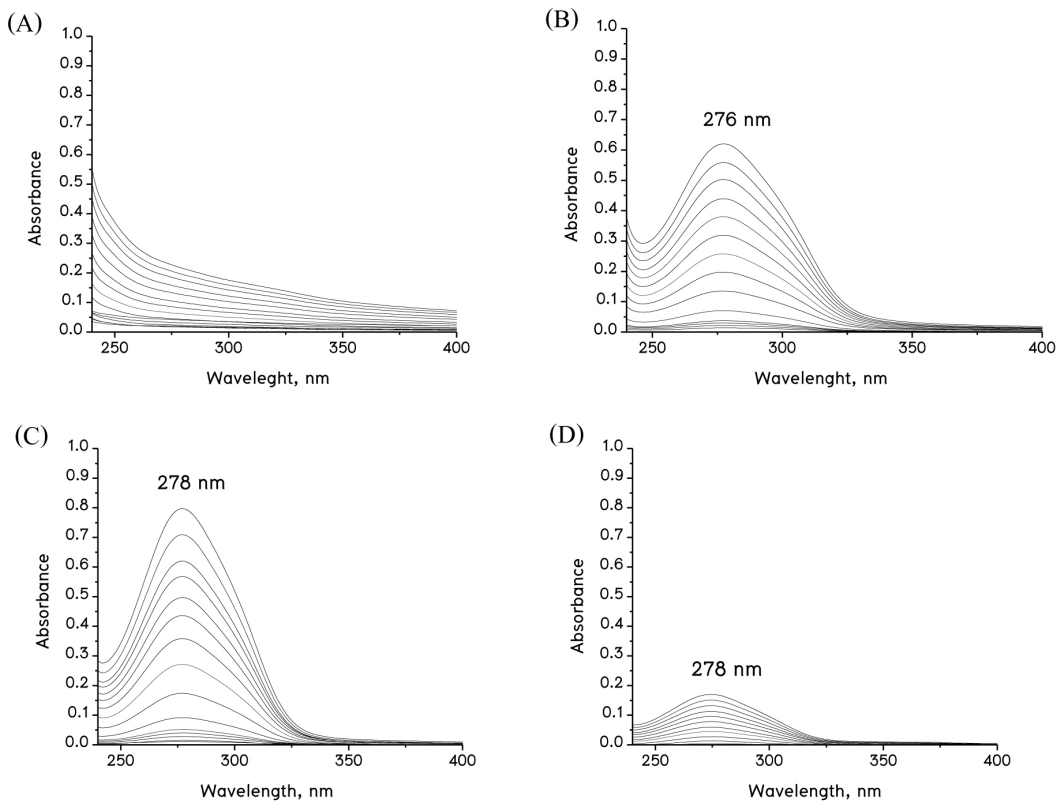
จากการเตรียมสารสกัดเมล็ดมะปรางโดยการสกัดแบบเป็นลำดับ (serial extraction) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วแตกต่างกัน ได้แก่ คลอโรฟอร์ม อะซิโตไนโตรล เอทานอล และน้ำ ตามลำดับ ทำให้แยกสารสกัดเมล็ดมะปรางได้ออกเป็น 4 กลุ่มตามความมีขั้วของตัวทำละลาย ได้แก่ สารสกัดเมล็ดมะปรางที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (chloroform extract) อะซิโตไนโตรล (acetonitrile extract) เอทานอล (ethanol extract) และน้ำ (water extract) โดยลักษณะของผงสารสกัดเมล็ดมะปรางที่สกัดด้วยอะซิโตไนโตรล เอทานอล และน้ำมีลักษณะเป็นผงสีม่วงและได้ผลผลิตร้อยละ (percent yield) เท่ากับ 35.6, 2.6 และ 2.0 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดเมล็ดมะปรางที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มมีลักษณะเหนียวคล้ายคาราเมลสีเหลืองและได้ผลผลิตร้อยละเท่ากับ 0.5

**คุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์เบื้องต้น**

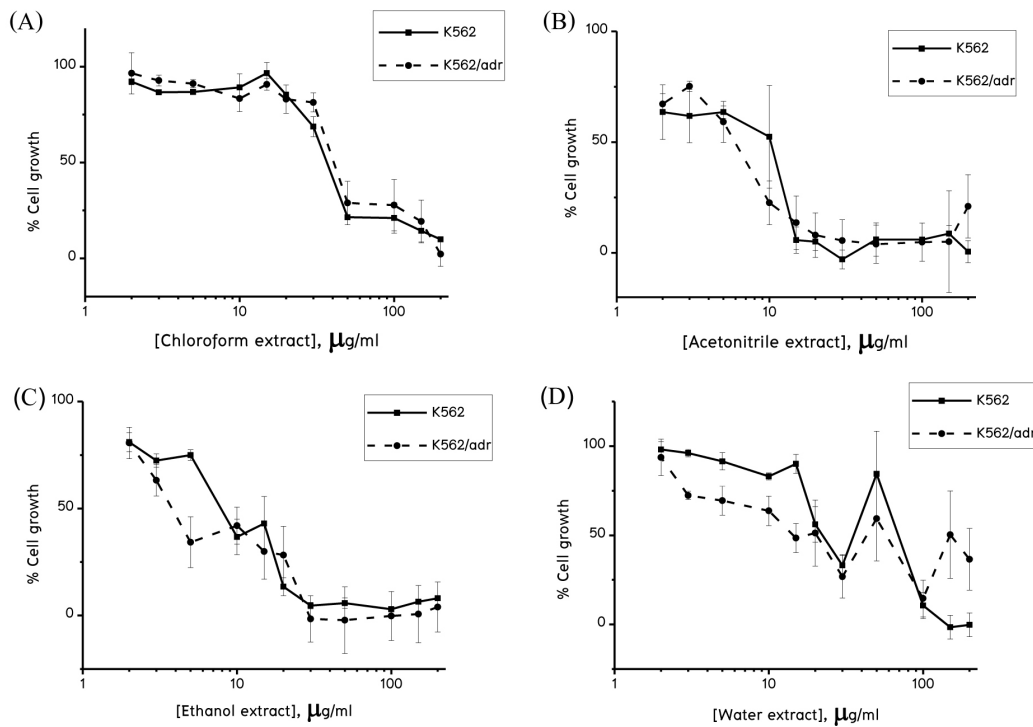
จากการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์เบื้องต้นของสารสกัดโดยการวิเคราะห์แถบการดูดกลืนแสงโดยวิธีสเปกโทรโฟโตเมตรี (spectrophotometry) พบว่าสารสกัดเมล็ดมะพร้าวที่สกัดด้วยอะซิโตน ไตรคลอโรเอทานอล และน้ำมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 276, 278 และ 278 นาโนเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 1A, C, D) ซึ่งเป็นช่วงความยาวคลื่นการดูดกลืนแสงของสารในกลุ่มโพลีฟีนอลซึ่งอยู่ที่ 260-280 นาโนเมตร<sup>11</sup> แสดงว่าสารสกัดเมล็ดมะพร้าวที่สกัดด้วยอะซิโตน ไตรคลอโรเอทานอล และน้ำน่าจะมีสารกลุ่มโพลีฟีนอลเป็นองค์ประกอบ ส่วนสารสกัดเมล็ดมะพร้าวที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มไม่พบการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 260-280 นาโนเมตร (รูปที่ 1A) แสดงว่าสารสกัดเมล็ดมะพร้าวที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มน่าจะไม่มีสารกลุ่มโพลีฟีนอลเป็นองค์ประกอบ

**ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง**

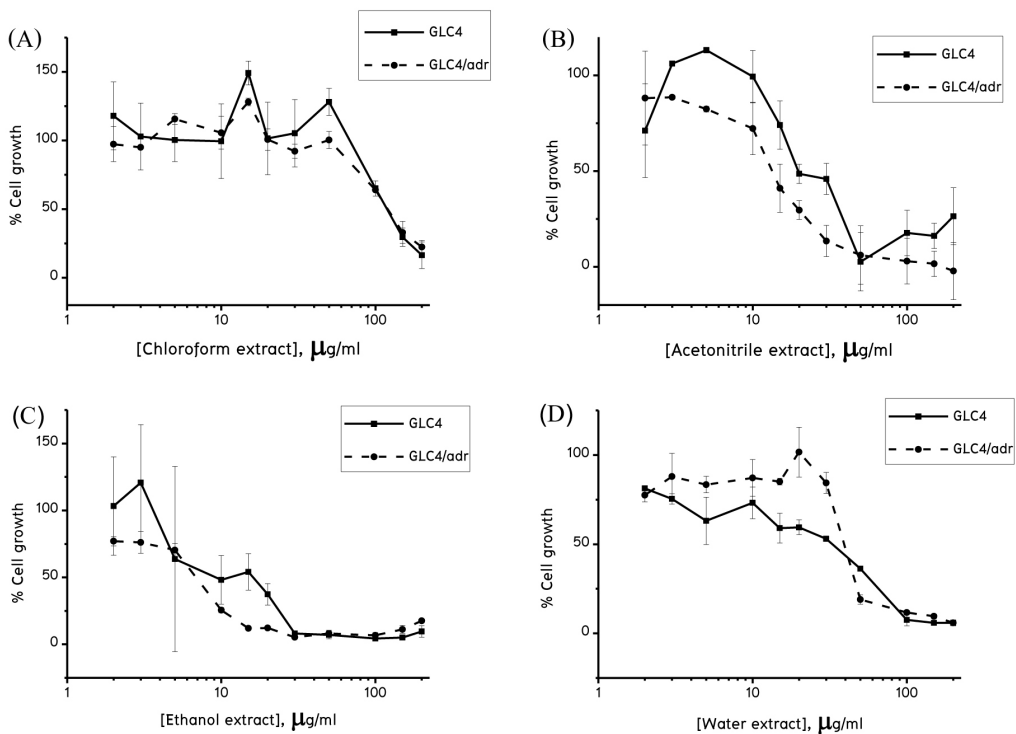
จากการประเมินความเป็นพิษระดับเซลล์ของสารสกัดจากเมล็ดมะพร้าวทั้ง 4 ส่วนต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด erythromyelogenous และเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็กที่ไวและดื้อต่อยาออกไซรูบิซิน (K562, K562/adr, GLC4, GLC4/adr) พบว่าสารสกัดจากเมล็ดมะพร้าวทั้ง 4 ส่วนสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง K562, K562/adr, GLC4 และ GLC4/adr ได้ โดยการเจริญของเซลล์มีแนวโน้มลดจำนวนลงเรื่อย ๆ เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารสกัดเมล็ดมะพร้าวทั้ง 4 ส่วน แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัด (dose dependent) และพบว่าที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ จะมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งมากขึ้น (รูปที่ 2) อาจเนื่องมาจากสารสกัดเมล็ดมะพร้าวที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ จะสามารถกระตุ้นเซลล์มะเร็งให้มีการตอบสนองและปรับตัวเพื่อความอยู่รอดเซลล์จึงเพิ่มจำนวนมากขึ้นกว่าปกติ<sup>12</sup>



**รูปที่ 1** แถบการดูดกลืนแสงของสารสกัดเมล็ดมะพร้าวที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (A) อะซิโตน ไตรคลอโรเอทานอล (C) และน้ำ (D)



รูปที่ 2 การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ไวและดื้อต่อยาดอกไซรูบิซิน (K562, K562/adr) โดยสารสกัดเมล็ดมะพร้าวที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (A) อะซิโตไนไตรล์ (B) เอทานอล (C) และน้ำ (D)



รูปที่ 3 การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอดที่ไวและดื้อต่อยาดอกไซรูบิซิน (GLC4, GLC4/adr) โดยสารสกัดเมล็ดมะพร้าวที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (A) อะซิโตไนไตรล์ (B) เอทานอล (C) และน้ำ (D)



จากการหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดเมล็ดมะพร้าว ที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม อะซิโตไนโตรล เอทานอล และน้ำในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ 50% (IC<sub>50</sub>) ต่อเซลล์มะเร็ง K562, K562/adr, GLC4 และ GLC4/adr แสดงดังตารางที่ 1 พบว่าสารสกัดเมล็ดมะพร้าวที่สกัดด้วยอะซิโตไนโตรลและเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง K562 และ K562/adr ดีที่สุด และสารสกัดเมล็ดมะพร้าวที่สกัดเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง GLC4 และ GLC4/adr ดีที่สุด ส่วนสารสกัดเมล็ดมะพร้าวที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิดน้อยที่สุด (ตารางที่ 1)

จากการหาค่าปัจจัยในการดื้อยา (resistance factor; RF) ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด erythromyelogenous และเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็กซึ่งเป็นอัตราส่วนของค่า IC<sub>50</sub> ของสารทดสอบในเซลล์มะเร็งชนิดที่ดื้อและไวต่อยา โดยถ้าค่า RF น้อยกว่า 1 แสดงว่าสารสกัดหรือสารทดสอบสามารถ

ยับยั้งการเจริญของเซลล์ที่ดื้อต่อยาได้ดีกว่าเซลล์ที่ไวต่อยา ถ้าค่า RF เท่ากับ 1 แสดงว่าสารสกัดหรือสารทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ที่ดื้อต่อยาได้เท่ากับเซลล์ที่ไวต่อยา และถ้าค่า RF มากกว่า 1 แสดงว่าสารสกัดหรือสารทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ที่ดื้อต่อยาได้น้อยกว่าเซลล์ที่ไวต่อยา ดังนั้นถ้าค่า RF น้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 แสดงว่าสารสกัดหรือสารทดสอบนั้นสามารถเอาชนะปัญหาการดื้อยาแบบหลายขนาน (multidrug resistance) ของเซลล์มะเร็งได้ และจากค่า RF พบว่าสารสกัดเมล็ดมะพร้าวที่สกัดด้วยเอทานอล และอะซิโตไนโตรลสามารถเอาชนะปัญหาการดื้อยาเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด erythromyelogenous และเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็กได้เนื่องจากมีค่า RF น้อยกว่า 1 เมื่อเทียบกับยาออกไซรูบิซินซึ่งเป็นยาที่ใช้ทางคลินิกในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งพบว่าค่า RF มากกว่า 1 และมากกว่าค่า RF ของสารสกัดดังกล่าวหลายเท่า (ตารางที่ 2)

**ตารางที่ 1** ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ 50% (IC<sub>50</sub>) ของสารสกัดจากเมล็ดมะพร้าวที่บ่มร่วมกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ไวและดื้อต่อยาออกไซรูบิซิน (K562, K562/adr) และเซลล์มะเร็งปอดที่ไวและดื้อต่อยาออกไซรูบิซิน (GLC4, GLC4/adr)

Compounds Cells	IC <sub>50</sub> (µg/ml)				
	Chloroform extract	Acetonitrile extract	Ethanol Extract	Water Extract	Doxorubicin
K562	38.3 ± 2.6	6.6 ± 1.6	8.9 ± 2.6	24.4 ± 4.2	0.01
K562/adr	50.2 ± 7.2	6.0 ± 1.7	5.8 ± 2.2	14.8 ± 3.6	0.72 ± 0.72
GLC4	97.9 ± 12.3	21.8 ± 3.5	10.9 ± 2.2	29.8 ± 5.4	0.02 ± 0.01
GLC4/adr	104.7 ± 8.3	14.8 ± 3.0	6.9 ± 1.0	45.4 ± 3.9	0.33 ± 0.21

**ตารางที่ 2** ค่าปัจจัยการดื้อยา (Resistance Factor; RF) ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวและเซลล์มะเร็งปอด

Compounds Cells	Resistance Factor (RF)				
	Chloroform extract	Acetonitrile extract	Ethanol Extract	Water extract	Doxorubicin
Erythromyelogenous leukemic cells	1.3	0.9	0.7	0.6	72.0
Small cell lung carcinoma cells	1.1	0.7	0.6	1.5	16.5

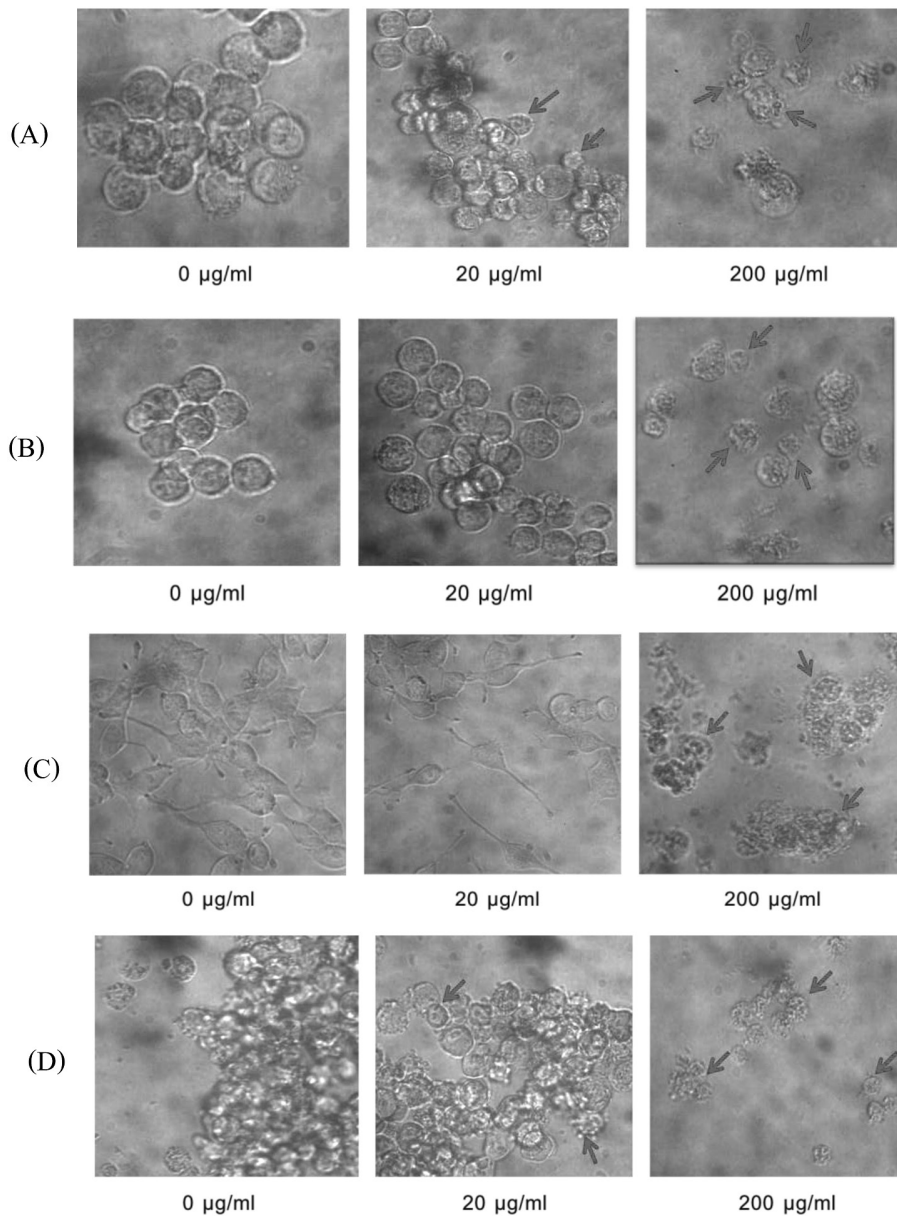
**การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็ง**

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็ง K562, K562/adr, GLC4 และ GLC4/adr ที่บ่มร่วมกับสารสกัดเมล็ดมะพร้าวเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มะเร็ง K562, K562/adr และ GLC4/adr ซึ่งตามปกติจะมีลักษณะเป็นทรงกลม มีการเกาะกลุ่มกัน และล่องลอยอยู่ใน

อาหารเลี้ยงเซลล์ ส่วนเซลล์มะเร็ง GLC4 ซึ่งตามปกติจะมีลักษณะเป็นรูปกระสวยและเกาะติดบนผิวภาชนะ แต่เมื่อมีการบ่มเซลล์ร่วมกับสารสกัดเมล็ดมะพร้าวที่ความเข้มข้น 20 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่าเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาไปจากเดิมเทียบกับเซลล์ในหลอดควบคุม (0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) คือ ถ้าเป็น

เซลล์มะเร็ง K562, K562/adr และ GLC4/adr เซลล์จะจับกันน้อยลง ส่วนถ้าเป็นเซลล์มะเร็ง GLC4 ไม่เกาะติดบนผิวภาชนะและล่องลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิดมีการหดแฟบของเซลล์ (cell shrinkage) และผิวเซลล์มีการโป่งพอง (membrane blebbing) มีการรวมตัวอัดแน่นของออร์แกเนลภายในเซลล์ (organelle

condensation) ซึ่งมองเห็นเป็นลักษณะเป็นจุดสีดำอยู่ภายในเซลล์ ขอบเขตของเซลล์ไม่ชัดเจน และมีลักษณะชิ้นส่วนของเซลล์ที่แยกจากกันเป็นเม็ดเล็ก ๆ กระจายอยู่ และพบว่าความรุนแรงของการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์แปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารสกัด (รูปที่ 4)



**รูปที่ 4** การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ไว (A) และดื้อ (B) ต่อยา ดอกโชรุมิซิน (K562, K562/adr) และเซลล์มะเร็งปอดที่ไว (C) และดื้อ (D) ต่อยาดอกโชรุมิซิน (GLC4, GLC4/adr) ที่ป่มร่วมกับสารสกัดเมล็ดมะปรางเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

## วิจารณ์

จากการสกัดสารจากเมล็ดมะพร้าวแบบเป็นลำดับ (serial extraction) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วแตกต่างกัน ได้แก่ คลอโรฟอร์ม อะซิโตน ไตรคล อีทานอล และน้ำ ตามลำดับ ทำให้แยกสารสกัดเมล็ดมะพร้าวได้ออกเป็น 4 กลุ่มตามขั้วของตัวทำละลายได้แก่ สารสกัดเมล็ดมะพร้าวที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม อะซิโตน ไตรคล อีทานอล และน้ำ จากการศึกษที่ผ่านมาพบว่าสารกลุ่มโพลีฟีนอลเป็นสารที่พบมากในพืชที่มีรงควัตถุสีม่วง (anthocyanin)<sup>4, 13</sup> เนื่องจากลักษณะสารสกัดเมล็ดมะพร้าวที่สกัดด้วย อะซิโตน ไตรคล อีทานอล และน้ำมีลักษณะเป็นผงสีม่วง ส่วนสารสกัดเมล็ดมะพร้าวที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มมีลักษณะหนืดคล้ายคาราเมลสีเหลือง ทั้งนี้ลักษณะสารสีม่วงที่พบอาจเกิดจากสารกลุ่มโพลีฟีนอล

จากการวิเคราะห์แถบการดูดกลืนแสงของสารสกัดเมล็ดมะพร้าวทั้ง 4 ส่วน โดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ในแถบคลื่นแสงที่ตามองเห็นและอุลตราไวโอเล็ตพบว่า สารสกัดเมล็ดมะพร้าวที่สกัดด้วยน้ำ สกัดด้วยเอทานอล และสกัดด้วยอะซิโตน ไตรคล มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วงความยาวคลื่นที่ 278, 278 และ 276 นาโนเมตร ตามลำดับ โดยการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารกลุ่มของโพลีฟีนอลมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วงความยาวคลื่น 260-280 นาโนเมตร<sup>11</sup> นอกจากสารกลุ่มโพลีฟีนอลอาจมีสารอื่นที่อยู่ ในสารสกัดที่สามารถดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วงความยาวคลื่น ดังกล่าวได้ เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิก แต่จากขั้นตอน การเตรียมสารสกัดจึงน่าจะมีโปรตีนและกรดนิวคลีอิกปนอยู่ น้อยมาก ซึ่งจะเห็นได้ว่าสารสกัดเมล็ดมะพร้าวที่สกัดด้วย อะซิโตน ไตรคล สกัดด้วยเอทานอล และสกัดด้วยน้ำมีค่า การดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วงดังกล่าว แสดงว่าสารสกัด เหล่านี้ อาจจะมีสารกลุ่มโพลีฟีนอลเป็นองค์ประกอบ ส่วนสาร สกัดเมล็ดมะพร้าวที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม ไม่พบการดูดกลืน แสงสูงสุดในช่วงดังกล่าว แสดงว่าสารสกัดนี้อาจจะไม่มีสาร กลุ่มโพลีฟีนอลเป็นองค์ประกอบ อย่างไรก็ตามผลจากการ วิเคราะห์แถบการดูดกลืนแสงเป็นข้อมูลเกี่ยวกับคุณสมบัติ ทางเคมีฟิสิกส์เบื้องต้นเท่านั้นซึ่งต้องมีการศึกษาคุณสมบัติ ทางเคมีฟิสิกส์ของสารในกลุ่มโพลีฟีนอลด้วยเทคนิคอื่นต่อไป

จากผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด erythromyelogenous และเซลล์ มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็กที่ไวและดื้อต่อยาออกไซรูบิซิน (K562, K562/adr, GLC4, GLC4/adr) พบว่าสารสกัดจาก เมล็ดมะพร้าวทั้ง 4 ส่วนสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ มะเร็ง K562, K562/adr, GLC4 และ GLC4/adr ได้ และ

มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งแตกต่าง กันในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวและเซลล์มะเร็งปอดทั้งชนิดที่ ดื้อและไวต่อยาออกไซรูบิซิน ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าการที่ สารสกัดเมล็ดมะพร้าวทั้ง 4 ส่วน ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์ มะเร็งได้แตกต่างกันเป็นเพราะว่าสารสกัดเมล็ดมะพร้าวทั้ง 4 ส่วน มีสารสำคัญในการออกฤทธิ์ (active compounds) ยับยั้ง การเจริญของเซลล์มะเร็งในปริมาณที่แตกต่างกัน ซึ่งพบว่า สารสกัดเมล็ดมะพร้าวที่สกัดด้วย เอทานอลยับยั้งเซลล์มะเร็ง ได้ดีที่สุดในเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิด ซึ่งน่าจะเกิดจากสารสกัด ดังกล่าวมี active compounds เป็นองค์ประกอบในปริมาณ ที่มากกว่าสารสกัดอื่น ๆ และเมื่อพิจารณาจากผลการวิเคราะห์ แถบการดูดกลืนแสงแล้วสามารถบอกได้ว่าสารที่ออกฤทธิ์ อาจจะเป็นสารกลุ่มโพลีฟีนอลซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูง ที่สุดในสารสกัดดังกล่าวเช่นกันเมื่อเทียบกับสารสกัดอื่น ๆ ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ส่วนสารสกัดเมล็ดมะพร้าวที่สกัดด้วย คลอโรฟอร์มมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิดได้น้อยที่สุด ก็น่าจะเกิดจากสารสกัดดังกล่าวมี active compounds เป็น องค์ประกอบน้อยกว่าสารสกัดอื่น ๆ โดยสามารถพิจารณา ได้จากการวิเคราะห์แถบการดูดกลืนแสงซึ่งพบว่าสารสกัด เมล็ดมะพร้าวที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มไม่มีแถบการดูดกลืน แสงในช่วงความยาวคลื่น 260-280 นาโนเมตร แสดงให้เห็นว่า สารสกัดดังกล่าวอาจจะมีสารกลุ่มโพลีฟีนอลซึ่งเป็น active compounds โดยที่ผ่านมาได้มีผู้สนใจทำการศึกษาวิจัย เกี่ยวกับ intracellular targets เพื่อหาสารหรือโมเลกุล ที่มีความจำเพาะในการยับยั้งหรือรบกวนการทำงานของ intracellular target ในเซลล์มะเร็งเพื่อใช้ในการยับยั้ง การเจริญของเซลล์มะเร็ง ซึ่งพบว่า intracellular targets ดังกล่าว ได้แก่ โมเลกุลส่งสัญญาณ (signaling molecules), ทรานสคริปชันแฟคเตอร์ (transcription factors) โปรตีนที่ ยับยั้งการตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิส (anti-apoptotic proteins) เป็นต้น<sup>7, 14, 15</sup>

นอกจากนี้ยังมีผู้ศึกษาความแตกต่างระหว่างเซลล์ มะเร็งที่ดื้อและไวต่อยาในเซลล์มะเร็งชนิดเดียวกัน พบว่า เซลล์มะเร็งที่ดื้อต่อยาจะมีการแสดงออกของโปรตีนขนส่ง (transporter proteins) ในปริมาณที่มากกว่าเซลล์มะเร็ง ที่ไวต่อยาเนื่องจากโปรตีนดังกล่าวมีหน้าที่ในการขนส่งยา หรือสารพิษออกจากเซลล์ โดยในเซลล์มะเร็ง K562/adr จะมีการแสดงออกของโปรตีนขนส่งคือ P-glycoprotein (P-gp) ที่สูงกว่าเซลล์มะเร็ง K562 และในเซลล์มะเร็ง GLC4/adr จะมีการแสดงออกของโปรตีนขนส่งคือ multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) ที่สูงกว่าเซลล์ มะเร็ง GLC4 การทำงานของ transporter protein เหล่านี้



จะต้องอาศัย ATP ภายในเซลล์ ซึ่งการสร้าง ATP ส่วนใหญ่จะอาศัยการทำงานของไมโทคอนเดรีย ดังนั้นการทำงานของ transporter ที่สูงขึ้นจำเป็นต้องใช้ ATP สูงเช่นกัน จึงทำให้ไมโทคอนเดรียของเซลล์มะเร็งที่ดื้อต่อยาทำงานหนักขึ้นเพื่อเร่งสร้าง ATP ซึ่งทำให้ไมโทคอนเดรียของเซลล์มะเร็งที่ดื้อต่อยามีความอ่อนแอกว่าเซลล์มะเร็งที่ไวต่อยา<sup>16, 17</sup> ดังนั้นการที่สารสกัดเมล็ดมะปรางที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ดื้อต่อยาได้ดีกว่าเซลล์มะเร็งที่ไวต่อยาอาจเกิดจาก active compounds ในสารสกัดดังกล่าวมีความจำเพาะต่อไมโทคอนเดรีย แต่อย่างไรก็ตามประเด็นนี้เป็นเพียงข้อสันนิษฐานเท่านั้น เนื่องจากยังไม่มีผลการทดลองที่ยืนยันและยังคงต้องทำการศึกษาต่อไป

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็ง K562, K562/adr, GLC4, GLC4/adr ที่ปน่วมร่วมกับสารสกัดเมล็ดมะปรางพบว่าเซลล์มีการโป่งพองของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane blebbing) การเหี่ยวของเซลล์ (cell shrinkage) การรวมตัวอัดแน่นของออร์แกเนลภายในเซลล์ (organelle condensation) และในระยะสุดท้ายเซลล์จะแยกออกจากกันเป็นส่วนเล็ก ๆ คล้ายกับ apoptotic bodies ซึ่งลักษณะดังกล่าวสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่ตายแบบอะพอพโตซิส (apoptosis)<sup>18, 19</sup> เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งที่ปน่วมกับยาดอกโทรูบิซินซึ่งจะมีการการตายของเซลล์ทั้งแบบอะพอพโตซิสและเนโครซิส (necrosis)<sup>20</sup> ดังนั้นสารสกัดจากเมล็ดมะปรางน่าจะสามารถชักนำการตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิส (apoptotic induction)

## สรุป

สารสกัดเมล็ดมะปรางน่าจะมีสารกลุ่มโพลีฟีนอลเป็นองค์ประกอบ และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวและมะเร็งปอดชนิดที่ไวและดื้อต่อยาซึ่งสามารถทำให้เอาชนะปัญหาการดื้อยาแบบหลายขนานได้ โดยสารสกัดเมล็ดมะปรางที่สกัดด้วยเอทานอลออกฤทธิ์ได้ดีที่สุดและฤทธิ์ดังกล่าวอาจเกี่ยวข้องกับการชักนำการตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิส ซึ่งสารสกัดดังกล่าวอาจถูกนำไปพัฒนาเป็นยารักษาโรคมะเร็งในอนาคต และศึกษานี้ยังเป็นการวางรากฐานในการค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากเมล็ดผลไม้ซึ่งจะเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับสิ่งเหลือทิ้งจากการบริโภคและแปรรูปผลไม้ในท้องถิ่นต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยพะเยา ประจำปีงบประมาณ 2555 (สัญญาเลขที่ 020055221024) และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการเคมีฟิสิกส์ชีววิทยาระดับเซลล์และโมเลกุล ภาควิชารังสีเทคนิค คณะเทคนิคการแพทย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ และอำนวยความสะดวกในการวิจัย

## เอกสารอ้างอิง

1. สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข กระทรวงสาธารณสุข. สถิติสาธารณสุขฉบับเต็ม ปีพ.ศ. 2553. ได้จาก: <http://bps.ops.moph.go.th/Healthinformation/statistic53/statistic53.html> [Cited October 21, 2012].
2. กลุ่มงานเคมีบำบัด สถาบันมะเร็งแห่งชาติ. ยาเคมีบำบัด. ได้จาก <http://www.nci.go.th/knowledge/chem.html> [Cited October 21, 2012].
3. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:48-58.
4. Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 2000; 55:481-504.
5. Wrolstad RE. The Possible Health Benefits of Anthocyanin Pigments and Polyphenolics. ได้จาก <http://web.ruammid.com/go.php?url=http://ipi.oregonstate.edu/ss01/anthocyanin.html> [Cited October 21, 2012].
6. Dechsupa S, Kothan S, Vergote J, Leger G, Martineau A, Berangeo S, et al. Quercetin, Siamois 1 and Siamois 2 induce apoptosis in human breast cancer MDA-mB-435 cells xenograft in vivo. *Cancer Biol Ther* 2007; 6:56-61.
7. Suttana W, Mankhetkorn S, Poompimon W, Palagani A, Zhokhov S, Gerlo S, et al. Differential chemosensitization of P-glycoprotein overexpressing K562/Adr cells by withaferin A and Siamois polyphenols. *Molecular cancer* 2010; 9:99.
8. Puangpronpitag D, Areejitranusorn P, Boonsiri P, Suttajit M, Yongvanit P. Antioxidant activities of polyphenolic compounds isolated from *Antidesma thwaitesianum* Mull. Arg. seeds and marcs. *Journal of food science* 2008; 73:C648-53.
9. Liang Z, Yang Y, Cheng L, Zhong GY. Characterization of Polyphenolic Metabolites in the Seeds of *Vitis germplasm*. *J Agric Food Chem* 2012; 60:1291-9.
10. Lamien-Meda A, Lamien CE, Compaore MM, Meda RN, Kiendrebeogo M, Zeba B, et al. Polyphenol content and antioxidant activity of fourteen wild edible fruits from Burkina Faso. *Molecules (Basel, Switzerland)* 2008; 13:581-94.

11. Arfan M, Khan R, Rybarczyk A, Amarowicz R. Antioxidant activity of mulberry fruit extracts. *Int J Mol Sci* 2012; 13:2472-80.
12. Jaganathan SK, Mandal M. Antiproliferative effects of honey and of its polyphenols: a review. *J Biomed Biotechnol.* 2009; 1-13.
13. Iris E. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology 2004; 24:851-74.
14. Wachtel M., Shafer B.W. Targets for cancer therapy in childhood sarcoma. *Cancer Treatment Reviews* 2010; 36:318-27.
15. Kurohane K, Tominaga A, Sata K, North JR, Namba Y, Oku N. Photodynamic therapy targeted to tumor-induced angiogenic vessels. *Cancer Letters* 2001; 167:49-56.
16. Solazzo M, Fantappie O, Lasagna N, Sassoli C, Nosi D, Mazzanti R. P-gp localization in mitochondria and its functional characterization in multiple drug-resistant cell lines. *Exp Cell Res* 2006; 312:4070-8.
17. Kothan S, Dechsupa S, Leger G, Moretti JL, Vergote J, Mankhetkorn S. Spontaneous mitochondrial membrane potential change during apoptotic induction by quercetin in K562 and K562/adr cells. *Can J Physiol Pharmacol* 2004; 82:1084-90.
18. ปกป้อง ประยงค์, นาถธิดา วีระปรียาภูร, สหพัฒน์ บรัดวีรัชย์. อะพอพอโทซิส: วิถีและการตรวจวัด. *J Health Res* 2007; 21:227-38.
19. Van Cruchten S, Van Den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 2002; 31:214-23.
20. Lopes MA, Meisel A, Dimagl U, Carvalho FD, Bastos Mde L. Doxorubicin induces biphasic neurotoxicity to rat cortical neurons. *Neurotoxicology* 2008; 29:286-93.

