

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และการต้านมะเร็งท่อน้ำดี

ของสารสกัดว่านคางคาวดำ

The study of antioxidant activity and anticancer in cholangiocarcinoma of

Tacca chantrieri André (TC) extract

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ดร.สุรรัตน์ ปัดไธสง

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะ สหเวชศาสตร์

เลขสัญญาทุน AHS๐๑/๒๕๖๖

ผู้ร่วมวิจัย

ดร.พุดธิดา คงธิติเลิศ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ ๒๕๖๖

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

สิงหาคม ๒๕๖๗

หัวข้อวิจัย การศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และการต้านมะเร็งท่อน้ำดีของสารสกัดว่านค้ำควาดำ

ชื่อผู้วิจัย ดร.สุรรัตน์ ปัดไธสง

หน่วยงาน สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะ สหเวชศาสตร์

ปีงบประมาณ 2566

บทคัดย่อ

โรคมะเร็งท่อน้ำดีคือโรคที่มีความท้าทายในการรักษาเนื่องจากข้อจำกัดทางการรักษาด้วยเคมีบำบัด ดังนั้นปัจจุบันผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติจึงได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางในการวิจัยเพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็งเนื่องจากมีผลข้างเคียงน้อยมาก ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดว่านค้ำควาดำในการต้านอนุมูลอิสระ และต้านมะเร็งในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213A และ KKU-213C โดยวิธี MTT assay และ flow cytometry และทำการวัดระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ ได้แก่ Bax และ Bcl-2 โดยวิธี western blot analysis นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพในการต้านมะเร็งของสารสกัดว่านค้ำควาดำร่วมกับยาเคมีบำบัด cisplatin ด้วย จากการศึกษาพบว่าสารสกัดว่านค้ำควาดำประกอบด้วยสารฟีนอลและฟลาโวนอยด์ซึ่งมีฤทธิ์ที่ดีในการต้านอนุมูลอิสระ และการใช้สารสกัดสามารถลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็ง โดยการยับยั้งการเจริญเติบโตและกระตุ้นการตายของเซลล์ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราส่วนระหว่าง Bax/Bcl-2 ยังเพิ่มขึ้นซึ่งถือเป็นการส่งเสริมการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ และที่สำคัญการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสารสกัดว่านค้ำควาดำไม่เพียงแต่ลดการมีชีวิตของเซลล์ แต่ยังเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งการมีชีวิตของยาเคมีบำบัด cisplatin อีกด้วย

จากผลการศึกษาเหล่านี้ชี้ให้เห็นถึงกลไกการรักษามะเร็งด้วยสารสกัดว่านค้ำควาดำ และแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการทำงานร่วมกันระหว่างสารสกัดและเคมีบำบัดแบบเดิม ซึ่งถือเป็นแนวโน้มที่ดีสำหรับการพัฒนาการรักษาแบบทางเลือกและการรักษาที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นสำหรับการรักษา CCA

หัวข้อวิจัย The study of antioxidant activity and anticancer in cholangiocarcinoma of *Tacca chantrieri* André (TC) extract

ชื่อผู้วิจัย Sureerat Padthaisong, Ph.D.

หน่วยงาน Department of Medical Sciences, Faculty of Allied Health Sciences

ปีงบประมาณ 2566

Abstract

Cholangiocarcinoma (CCA) poses a significant healthcare challenge due to the limited effects of chemotherapeutic drugs. Natural products have gained widespread attention in cancer research due to their promising anti-cancer effects with minimal adverse side effects. Ethanol extraction of TC was conducted, and antioxidant activities were assessed through various assays. The cytotoxic effects of TC extracts on CCA cell lines (KKU-213A and KKU-213C) were evaluated using MTT assays and flow cytometry. Protein levels of Bax and Bcl-2 were determined through western blot analysis. Additionally, the study investigated whether the combined impact of TC extract and cisplatin on CCA cells enhanced cisplatin's efficacy as an anti-cancer treatment. Results indicated that ethanolic extracts from TC contained phenolic and flavonoid compounds with robust antioxidant activity. TC treatments reduce CCA cell viability, inhibiting growth and inducing apoptosis in a dose-dependent manner. The Bax/Bcl-2 ratio increases, signifying a pro-apoptotic shift. Importantly, TC extract not only decreases cell viability but also augments the inhibitory effect of cisplatin in CCA cells. These results provide valuable insights into TC's therapeutic mechanisms and its potential to synergize with conventional chemotherapeutic agents, offering a promising avenue for the development of alternative and more effective strategies for CCA treatment.

คำนำ

ในปัจจุบันนี้ผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรกำลังได้รับความสนใจและถูกศึกษาเป็นอย่างมากเพื่อใช้ในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคต่างๆ เช่น โรคติดเชื้อ หรือโรคไม่ติดเชื้อ สำหรับในโรคมะเร็งนั้นพบว่ามีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรอย่างกว้างขวาง ทั้งฤทธิ์ในการต้านการรุกราน ด้านการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน หรือการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งเป็นต้น ซึ่งเป็นการศึกษาเพื่อพัฒนาแนวทางการรักษาใหม่ๆ และในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาสารสกัดสมุนไพรว่านค้ำควดดำเพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีซึ่งถือเป็นปัญหาสาธารณสุขของประเทศไทย พร้อมทั้งศึกษาฤทธิ์ในการป้องกันอนุมูลอิสระด้วย โดยคณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่างานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ และสามารถเป็นแนวทางเพื่อนำไปพัฒนาเป็นยารักษาโรคมะเร็งได้ต่อไป

คณะผู้วิจัย

๘ สิงหาคม ๒๕๖๗

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และการต้านมะเร็งท่อน้ำดีของสารสกัด ว่านค้ำควาดำนี้ สามารถสำเร็จลุล่วงได้เนื่องจากการได้รับความอนุเคราะห์จากทางคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาซึ่งให้ความกรุณาในการสนับสนุนทุนวิจัยตามเลขที่สัญญา AHS๐๑/๒๕๖๖ ตลอดจนให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือวิจัยและสถานที่ในการวิจัย นอกจากนี้การวิจัยในครั้งนี่ยังได้รับความอนุเคราะห์จากคณะแพทยศาสตร์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในการเอื้อเฟื้อเครื่องมือ และอุปกรณ์ในการดำเนินการวิจัยอีกด้วยด้วย

คณะผู้วิจัย

๘ สิงหาคม ๒๕๖๗

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
คำนำ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	ง
สารบัญ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
1.4 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	6
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี.....	6
3.2 ขั้นตอนการศึกษา.....	7
3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	9
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล.....	10
4.1 ผลการวิจัย.....	10
4.2 อภิปรายผล.....	15
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ.....	17
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	17
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	17
บรรณานุกรม.....	18
ภาคผนวก.....	23

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 4.1 : ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม สารประกอบฟลาโวนอยด์รวม.....	10
และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดว่านค้ำควาดำ.....	
ตารางที่ 4.2 : แสดงค่า inhibitory concentration (IC) IC50 ของสารสกัด.....	11
ในการทดสอบกับเซลล์ KKU-213A และ KKU-213C เมื่อทดสอบเป็นเวลา.....	
24, 48 และ 72 ชั่วโมง.....	
ตารางที่ 4.3 : แสดงค่า inhibitory concentration (IC) IC50 ของสารสกัดว่านค้ำควาดำ.....	14
ร่วมกับการให้ยา cisplatin ในการทดสอบกับเซลล์ KKU-213A และ KKU-213C...	

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1 : ว่านค้ำควาดำ (Tacca chantrieri André (TC)).....	5
ภาพที่ 4.1 :ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดว่านค้ำควาดำด้วยวิธี DPPH scavenging.....	10
ภาพที่ 4.2 : ผลของสารสกัดว่านค้ำควาดำต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี.....	12
ภาพที่ 4.3 : ผลของสารสกัดว่านค้ำควาดำต่อการตายแบบ apoptosis.....	13
โดยใช้ flow cytometry ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี.....	
ภาพที่ 4.4 : ผลของสารสกัดว่านค้ำควาดำต่อการตายแบบ apoptosis โดยใช้.....	13
western blot analysis ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี.....	
ภาพที่ 4.5 : ผลของสารสกัดว่านค้ำควาดำร่วมกับยาเคมีบำบัด cisplatin ต่อการมีชีวิต.....	14
ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี.....	

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคมะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma) คือโรคมะเร็งที่มีแหล่งกำเนิดจากจากเยื่อบุของท่อน้ำดีซึ่งพบว่ามีอุบัติการณ์สูงที่สุดในประเทศไทย ในปัจจุบันแนวทางการรักษามะเร็งท่อน้ำดีที่ให้ผลดีที่สุดคือการผ่าตัด นอกจากนี้ผู้ป่วยอาจได้รับยาเคมีบำบัดร่วมด้วย เช่น 5-ฟลูออโรยูราซิล (5-Fluorouracil) ซิสพลาติน (cisplatin) เจมซิตาบิน (gemcitabine) ซึ่งพบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาได้ อย่างไรก็ตามพบว่าในปัจจุบันมะเร็งมีแนวโน้มในการดื้อต่อยาเคมีบำบัด และนอกจากนี้ผู้ป่วยบางรายได้รับผลข้างเคียงจากการใช้ยาเคมีบำบัด ดังนั้นปัจจุบันจึงได้มีการพยายามในการพัฒนาแนวทางการรักษาอื่นๆ เช่น การพัฒนายาชนิดใหม่ๆ หรือรูปแบบการรักษาแบบใหม่ เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาโรค และเพิ่มคุณภาพชีวิตให้กับผู้ป่วย จากการศึกษาที่ผ่านมาซึ่งทำการศึกษาความไวต่อยาเคมีบำบัดชนิดซิสพลาตินและเจมซิตาบินต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี พบว่ามะเร็งท่อน้ำดีมีแนวโน้มดื้อต่อยาเคมีบำบัดชนิดเจมซิตาบินแม้ใช้ในความเข้มข้นสูง ขณะที่มีการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดชนิดซิสพลาติน ดังนั้นการใช้ยาเคมีบำบัดชนิดซิสพลาตินจึงมีแนวโน้มที่จะใช้ในการรักษาโรคมะเร็งได้ดี

ปัจจุบันได้มีการศึกษาเกี่ยวกับสารพฤกษเคมีหรือไฟโตนิวเทรียนท์ (Phytochemicals or Phytonutrients) เพิ่มขึ้น โดยสารสกัดที่ได้จากพืชเหล่านี้เป็นสารเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยสารเหล่านี้อาจเป็นสารที่ทำให้พืชมีกลิ่น สี หรือรสชาติที่ลักษณะเฉพาะตัว นอกจากนี้สารพฤกษเคมีหลายชนิดยังมีคุณสมบัติการต่อต้านอนุมูลอิสระ ส่งเสริมภูมิคุ้มกัน ต่อต้านการอักเสบ ตลอดจนสามารถต่อต้านมะเร็งได้ นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่สารพฤกษเคมียังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของยาเคมีบำบัด และลดผลข้างเคียงจากการใช้ยาเคมีบำบัดได้อีกด้วย ว่านค้ำควาดำ (*Tacca chantrieri* André) เป็นพืชอีกหนึ่งชนิดที่พบว่ามีมีการนำมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งหลาย เช่น โรคทางกระเพาะอาหาร อาหารเป็นพิษ แก้วปวด ลดไข้ ต้านการอักเสบ นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่สารพฤกษเคมีที่เป็นองค์ประกอบในว่านค้ำควาดำยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ อย่างไรก็ตามยังไม่พบการศึกษาฤทธิ์ของสารพฤกษเคมีที่ได้จากว่านค้ำควาดำในมะเร็งท่อน้ำดี

เพื่อให้ได้ข้อมูลเชิงลึกเกี่ยวกับศักยภาพของสารสกัดว่านค้ำควาดำ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการต้านสารอนุมูลอิสระ รวมไปถึงศึกษาประสิทธิภาพในการต้านมะเร็งของสารสกัดว่านค้ำควาดำเพียงอย่างเดียว หรือร่วมกับยาเคมีบำบัด cisplatin ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (total phenolic compound) และสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (total flavonoid compound) จากสารสกัดว่านค้ำค้ำ
- 2) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดว่านค้ำค้ำ
- 3) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการต้านมะเร็งของสารสกัดว่านค้ำค้ำเพียงอย่างเดียว หรือร่วมกับยาเคมีบำบัด cisplatin ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) กลไกในการใช้ผลงานวิจัย (delivery system)

มีการตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ เพื่อเป็นการกระตุ้นให้มีการศึกษาเกี่ยวกับว่านค้ำค้ำให้หลากหลายขึ้น และเพื่อให้เกิดการพัฒนาในเชิงพาณิชย์ต่อไป

2) ผลประโยชน์ที่ได้รับจากโครงการวิจัย

1. ค้นพบองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และต้านมะเร็งของสารสกัดว่านค้ำค้ำ
2. ได้เผยแพร่องค์ความรู้ให้กับผู้ที่สนใจเพื่อนำไปศึกษาต่อยอด โดยการตีพิมพ์บทความวิจัยในวารสารนานาชาติ
3. เป็นการกระตุ้นให้เกิดการปลูกและใช้สมุนไพรไทยเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะเป็นการช่วยให้เพิ่มมูลค่าให้กับสมุนไพรไทย

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

- 1) ทำการสกัดว่านค้ำค้ำด้วย 95% เอทานอล และหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (total phenolic compound) และสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (total flavonoid compound)
- 2) ศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดว่านค้ำค้ำโดยวิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) และ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity
- 3) ศึกษาประสิทธิภาพในการต้านมะเร็งของสารสกัดว่านค้ำค้ำเพียงอย่างเดียว ในมะเร็งชนิด KLU-213A และ KLU-213C และวัดการมีชีวิตของเซลล์โดยวิธี 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) วัดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสโดยใช้หลักการ flow cytometry และศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบอะพอพโทซิสโดยวิธี western blotting
- 4) ศึกษาประสิทธิภาพในการต้านมะเร็งของสารสกัดว่านค้ำค้ำร่วมกับยาเคมีบำบัด cisplatin โดยวัดการมีชีวิตของเซลล์โดยวิธี MTT

บทที่ 2

วรรณกรรมและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคมะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma; CCA) เป็นโรคมะเร็งที่มีต้นกำเนิดจากเยื่อของทางเดินท่อน้ำดี สำหรับสาเหตุของการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีนั้นพบว่ามีปัจจัยเสี่ยงหลายปัจจัย แต่จากการศึกษาที่ผ่านมาทำให้ทราบว่า การติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับชนิด *Opisthorchis viverrini* (*O. viverrini*) คือสาเหตุที่สำคัญที่นำไปสู่การเป็นโรคมะเร็งท่อน้ำดีในประเทศไทย เนื่องจากผู้ป่วยโรคมะเร็งท่อน้ำดีมักจะไม่แสดงอาการเมื่อระยะแรกเริ่ม ดังนั้นผู้ป่วยส่วนใหญ่จึงถูกวินิจฉัยเมื่อโรคมะเร็งลุกลามแล้ว ดังนั้นการรักษาจึงมักไม่ได้ผลนักและทำให้ผู้ป่วยมีการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีหลังจากการรักษา (Banales et al., 2016) ปัจจุบันการวินิจฉัยโรคมะเร็งท่อน้ำดีสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การตรวจสอบด้วยรังสีเพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของท่อน้ำดี เช่น อัลตราซาวด์ (ultrasound) ซีทีสแกน (computerized tomography scan) และการตรวจเอกซเรย์คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (magnetic resonance imaging) หรือการใช้ตัวบ่งชี้มะเร็ง (tumor markers) เช่น CA19-9 และ CEA แต่อย่างไรก็ตามพบว่าปัจจุบันยังไม่มีวิธีการที่จำเพาะในการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งท่อน้ำดีในระยะแรกเริ่ม (Takakura et al., 2013) ในปัจจุบันแนวทางการรักษามะเร็งท่อน้ำดีที่ให้ผลดีที่สุดคือการผ่าตัด (Macias, 2014) นอกจากนี้ผู้ป่วยอาจมีการได้รับยาเคมีบำบัดร่วมด้วยเช่น การได้รับ 5-ฟลูออโรยูราซิล (5-Fluorouracil) ซิสพลาติน (cisplatin) เจมซิตาบิน (gemcitabine) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาผู้ป่วย อย่างไรก็ตามยังพบว่ายาเคมีบำบัดอาจมีผลข้างเคียงในผู้ป่วยบางรายและมะเร็งยังมีแนวโน้มในการดื้อต่อยาเคมีบำบัด ซึ่งเป็นผลให้ผู้ป่วยมีการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี (Sun et al., 2019; Wattanawongdon et al., 2015) ดังนั้นในปัจจุบันจึงได้มีการพยายามในการค้นหาวิธีการรักษาใหม่ๆ โดยเฉพาะการใช้พืชสมุนไพรเนื่องจากพบว่าสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่ได้จากสารสกัดพืชสมุนไพรสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการรักษามะเร็ง โดยการเพิ่มฤทธิ์ของยาเคมีบำบัดได้ (Huq et al., 2014; Kim et al., 2014) นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าสารสกัดเหล่านี้มักมีคุณสมบัติเป็นสาร anti-oxidant ซึ่งสามารถช่วยลดผลข้างเคียงจากการใช้ยาเคมีบำบัดได้ (Rizeq et al., 2020)

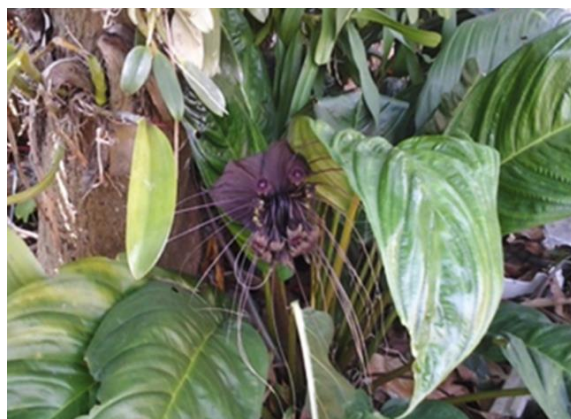
ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับสารพฤกษเคมี (Phytochemicals) ที่ถูกค้นพบมากกว่า 10,000 ชนิด และจัดเป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของพืช และป้องกันเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในพืช (Ecological functions) (Zhang et al., 2015) ส่วนในมนุษย์สารดังกล่าวเป็นสารที่ไม่ได้ให้พลังงาน แต่สามารถป้องกันและรักษาโรคบางชนิด เช่น ยับยั้งเชื้อก่อโรค ชะลอวัย ป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด และออกฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Li et al. 2015) เช่น paclitaxel ที่ค้นพบ

จากต้น pacific yew (*Taxus Brevifolia*) ถูกนำมาใช้ยารักษาโรคมะเร็งเต้านม และมะเร็งปอด (Crown et al., 2004)

Cisplatin เป็นยาเคมีบำบัดที่ใช้ในการรักษามะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (bladder cancer) มะเร็งของศีรษะและลำคอ (head and neck) มะเร็งปอด (lung cancer) มะเร็งรังไข่ (ovarian cancer) มะเร็งอัณฑะ (testicular cancers) รวมไปถึงมะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma) สำหรับการยับยั้งมะเร็งนั้น cisplatin ออกฤทธิ์โดยการจับกับเบสพิวรีนบนสายดีเอ็นเอ โดยการจับกันนี้เป็นผลให้เกิดการยับยั้งการซ่อมแซมดีเอ็นเอ ทำให้ดีเอ็นเอเกิดความเสียหาย ซึ่งกระบวนการเหล่านี้ทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง (Dasari and Tchounwou, 2014) นอกจากนี้ยังพบว่ายาเคมีบำบัด cisplatin เมื่อมีการให้ร่วมกับสารสกัดจากพืช สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาโรคมะเร็งได้ ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การให้ยา cisplatin ร่วมกับสารสกัดจากใบของ *Sasa quelpaertensis* Nakai สามารถช่วยลดคุณสมบัติการเป็นสเต็มเซลล์ และกระบวนการรุกรานของเซลล์มะเร็งปอดได้ (Kim et al., 2014) นอกจากนี้พบว่า curcumin ที่ได้จากการสกัดเหง้าขมิ้นชันสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาด้วย cisplatin โดยเกี่ยวข้องกับกระบวนการยับยั้งการรุกรานของมะเร็ง (Bose et al., 2015; Wang et al., 2019)

สำหรับมะเร็งท่อน้ำดีนั้นพบว่ามีสารสกัดจากพืชเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งเดียวกัน ในปี 2018 Thongchot และคณะได้พบว่า dihydroartemisinin และ resveratrol ซึ่งเป็นสารเมแทบอลิต์จากพืช สามารถลดขนาดก้อนเนื้องอกในหนูที่ปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้ (Thongchot et al., 2018) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่พบว่า xanthohumol ซึ่งเป็นสารเมแทบอลิต์จากต้นฮอปส์ (Thongchot et al., 2020) สามารถขัดขวางกระบวนการก่อมะเร็งท่อน้ำดีในแฮมสเตอร์ที่เหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งได้ ซึ่งถือเป็นการศึกษาที่แสดงฤทธิ์ของสารพฤกษเคมีทั้งในระดับ *in vitro* และ *in vivo* นอกจากนี้ยังพบการรายงานผลของ cucurbitacin B ซึ่งเป็นสารที่พบได้ในพืชตระกูล cucurbitaceous สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยการยับยั้งวิถี FAK/PI3K/PDK1/AKT และ FAK/p53 (Klungsaeng et al., 2020) ซึ่งจากการศึกษาเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากพืชมีแนวโน้มที่จะสามารถพัฒนาเป็นยารักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีได้

ว่านค่างควดามีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Tacca chantrieri* André (TC) อยู่ในสกุล *Tacca* จัดอยู่ในวงศ์ *Dioscoreaceae* ชื่อว่านค่างควด่าเกิดจากการที่ดอกของพืชชนิดนี้มีลักษณะคล้ายปีกค่างควด ดังนั้นจึงนิยมนำมาปลูกเป็นไม้ประดับ (Ajisyahputra et al., 2017) รูปที่ 2-1



รูปที่ 2.1 ว่านค้ำควาดำ (*Tacca chantrieri* André (TC))

ว่านค้ำควาดำเป็นไม้ยืนต้นพบได้ในแถบตอนใต้ของจีน เวียดนาม มาเลเซีย และไทย และถูกใช้อย่างแพร่หลายเพื่อเป็นสมุนไพรทางการแพทย์ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เพื่อบรรเทาอาการปวดเมื่อยตามร่างกาย โรคทางกระเพาะอาหาร และเป็นยาใช้รักษาอาการอาหารเป็นพิษ ยาแก้ปวด ยาลดไข้ ด้านการอักเสบ เป็นต้น (Jinhe et al., 2014; Kittipong et al., 2010) นอกจากนี้การศึกษาทางองค์ประกอบที่เป็นพฤษเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งได้จากการสกัดเหง้าของว่านค้ำควาดำพบว่ามีหลากหลายชนิด ได้แก่ diarylheptanoids, diarylheptanoid glucosides, spirostanol saponins และ withanolide glucosides (Yokosuka and Mimaki, 2007; Yokosuka et al., 2002a; Yokosuka et al., 2002b; Yokosuka et al., 2003) ซึ่งพฤษเคมีบางชนิดแสดงคุณสมบัติในการยับยั้งมะเร็ง เช่น spirostanol saponins, diarylheptanoid glucosides, taccalonolides และ withanolides (Ni et al., 2015; Yokosuka et al., 2002b; Yokosuka et al., 2003) อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสกัดจากว่านค้ำควาดำต่อมะเร็งท่อน้ำดี รวมไปถึงการให้รวมกันกับยาเคมีบำบัด cisplatin

ดังนั้นในการศึกษานี้ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการต้านสารอนุมูลอิสระ รวมไปถึงศึกษาประสิทธิภาพในการต้านมะเร็งของสารสกัดว่านค้ำควาดำเพียงอย่างเดียว หรือร่วมกับยาเคมีบำบัด cisplatin ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

1. ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
2. เครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator)
3. เครื่องชั่งไฟฟ้า
4. กรวยกรองบุชเนอร์ (Buchner funnel)
5. เครื่อง UV-Vis spectrophotometer
6. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง
7. กระดาษกรอง Whatman No.1
8. ชุดเครื่องแก้วพื้นฐาน เช่น บีกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ กระจกตวง เป็นต้น
9. ชุดพลาสติกเลี้ยงเซลล์ เช่น จานเลี้ยงเซลล์ จานหลุมพลาสติก 96 หลุม หลอดทดลอง
10. เอทานอล 95%
11. สารเคมีในการวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เช่น Folin-Ciocalteu, Na_2CO_3
12. สารเคมีในการวัดปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม เช่น AlCl_3 , $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$
13. สารเคมีในการวัดการต้านอนุมูลอิสระ เช่น DPPH, FRAP, potassium persulfate
14. สารมาตรฐาน เช่น gallic acid, quercetin, ascorbic acid
15. สารเคมีในการเลี้ยงเซลล์ เช่น Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin และ streptomycin
16. สารละลาย MTT
17. สารเคมีในการทำ western blotting
18. แอนติบอดี เช่น anti-Bax antibody, anti-Bcl-2 antibody, anti- β -actin antibody
19. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
20. ยาเคมีบำบัด cisplatin
21. สารละลาย Annexin V

3.2 ขั้นตอนการศึกษา

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์

การศึกษานี้ใช้เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี 2 ชนิด ที่มีคุณสมบัติที่ต่างกันทั้ง phenotypes และ genotypes เพื่อให้เห็นผลที่อาจมีความแตกต่างกันในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเซลล์ชนิด KKKU-213A (squamous cell carcinomas) เป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติ high proliferative และ metastasis ขณะที่ KKKU213C (adenosquamous carcinoma) เป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติ low proliferative และ metastasis เมื่อเทียบกับ KKKU-213A นอกจากนี้เซลล์ทั้งสองชนิดมีการแสดงออกของยีนที่ต่างกัน (Sripa et al., 2020)

เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีชนิดเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่ประกอบด้วย 10 % Fetal Bovine Serum (FBS), 100 U/ml Penicillin และ 100 g/ml Streptomycin ที่ 37 °C ภายใต้สภาวะ 5% CO₂

2. การสกัดว่านค้ำควด้า

ว่านค้ำควด้าถูกนำมาล้างทำความสะอาดและอบในตู้อบลมร้อนให้แห้ง จากนั้นว่านค้ำควด้าถูกบดเป็นผงให้ละเอียด สกัดผงว่านค้ำควด้าด้วย 95% ethanol จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง นำสารสกัดที่ได้ไปทำการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator เก็บผงสารสกัดให้แห้งที่ 2-4 °C สำหรับการศึกษาต่อไป ดัดแปลงจาก (Promraksa et al., 2019)

3. การวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (total phenolic compound)

ทำการวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu โดยผสมสารสกัดว่านค้ำควด้าความเข้มข้น 1 mg/mL กับสารละลาย Folin-Ciocalteu และบ่มในที่มืด จากนั้นเติม 7% Na₂CO₃ ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm โดยใช้ตัวหลอดที่ไม่มีสารสกัดเป็น blank และเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid (Aryal et al., 2019)

4. การวัดปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (total flavonoid compound)

ทำการวัดปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมด้วยวิธี aluminum chloride colorimetric โดยการผสมสารสกัดว่านค้ำควด้าความเข้มข้น 1 mg/mL กับ 10% AlCl₃ ผสมให้เข้ากันดี เติม 1 M CH₃CO₂K ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm และเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของ quercetin ดัดแปลงจาก (Aryal et al., 2019)

5. การทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

เตรียมสารละลาย 0.1 mM DPPH และผสมสารละลาย DPPH กับสารสกัดว่านค้ำควาดำที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm วัดประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเทียบกับ ascorbic acid รายงานผลเป็นร้อยละประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระพร้อมแสดงค่า EC50 (Zhao et al., 2018)

6. การทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP)

เตรียมสารละลาย FRAP โดยผสมสารละลายทั้ง 3 ชนิด ดังนี้ 0.25 M Acetate buffer pH 3.6 : 10 mM 2,4,6-Tripyridyltriazine (TPTZ) : 20 mM Ferric chloride ในอัตราส่วน 10:1:1 และผสมสารสกัดว่านค้ำควาดำความเข้มข้น 1 mg/mL กับสารละลาย FRAP ผสมให้สารละลายเข้ากันและบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm วัดประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเทียบกับ ascorbic acid

7. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดว่านค้ำควาดำต่อการตายของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี 2 ชนิด (KKU-213A และ KKU-213C) จะถูกนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ใน 96-well plate ทิ้งให้เซลล์เกาะกันหลุมเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ดูดอาหารเก่าทิ้งและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดว่านค้ำควาดำที่ละลายในน้ำปราศจากไอออน และเจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ นำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง วัดการตายของเซลล์โดยใช้วิธี 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay โดยทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง เติมสารละลาย MTT ลงในหลุมเลี้ยงเซลล์ จากนั้นบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมงในที่มืด เมื่อครบเวลาดูดสารละลาย MTT ทิ้ง และทำการเติมสาร DMSO ลงในหลุมเลี้ยงเซลล์เพื่อละลายผลึกของสี จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm คำนวณการมีชีวิตรอดของเซลล์เป็นร้อยละการมีชีวิตในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดและเปรียบเทียบความแตกต่างของแต่ละกลุ่ม

8. การวัดการตายของเซลล์แบบ apoptosis

เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี 2 ชนิด (KKU-213A และ KKU-213C) จะถูกนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 100 mm ทิ้งให้เซลล์เกาะจานเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ดูดอาหารเก่าทิ้งและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดว่านค้ำควาดำ และเจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ นำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์

ทำการวัดการตายของเซลล์โดยการผสมเซลล์ในสารละลาย Annexin V, FITC และวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง flow cytometer สำหรับการตรวจโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ จะทำการเก็บเซลล์เพื่อนำไปสกัดโปรตีนรวม นำโปรตีนที่ได้ไปทำ sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และ western blotting วิเคราะห์ระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis ได้แก่ Bax และ Bcl-2 โดยใช้ actin เป็นตัวควบคุม (internal control) และเทียบระดับโปรตีนดังกล่าวในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัด

9. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดว่านค้ำควาดำร่วมกับยาเคมีบำบัด Cisplatin ต่อการตายของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

เซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี 2 ชนิด (KKU-213A และ KKU-213C) จะถูกนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ใน 96-well plate ทิ้งให้เซลล์เกาะกันหลุมเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ดูดอาหารเก่าทิ้งและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดว่านค้ำควาดำที่ IC25 และ IC50 ที่ได้จากการทดสอบในข้อ 7.7 ร่วมกับ cisplatin ที่ความเข้มข้นต่างๆ และในหลุมควบคุมจะทำการเติมเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์หรือยา cisplatin นำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่ 37 °C ภายใต้สภาวะ 5% CO₂ จากนั้นตรวจวัดการตายของเซลล์โดยใช้วิธี 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay โดยทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง เติมสารละลาย MTT ลงในหลุมเลี้ยงเซลล์ จากนั้นบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมงในที่มืด เมื่อครบเวลาดูดสารละลาย MTT ทิ้ง และทำการเติมสาร DMSO ลงในหลุมเลี้ยงเซลล์เพื่อละลายผลึกของสี จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm คำนวณการมีชีวิตรอดของเซลล์เป็นร้อยละการมีชีวิตเทียบกับหลุมที่มีการเติมเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์หรือยาเคมีบำบัด cisplatin เพียงอย่างเดียว (กลุ่มควบคุม)

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมรายงานเป็นค่ามิลลิกรัมสมมูลของ gallic acid และ quercetin ตามลำดับ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ วิธี DPPH รายงานผลเป็นร้อยละประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระพร้อมแสดงค่า EC50 สำหรับวิธี FRAP รายงานเป็นค่ามิลลิกรัมสมมูลของ ascorbic acid การมีชีวิตของเซลล์รายงานเป็นค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน การตายของเซลล์โดยการวัดด้วย flow cytometry รายงานเป็นร้อยละการตายของเซลล์และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ระดับการแสดงออกของโปรตีนรายงานเป็นสัดส่วนของ Bax ต่อ Bcl-2 และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ความแตกต่างระหว่างกลุ่มวิเคราะห์ด้วย Analysis of variance (ANOVA) (GraphPad Prism) โดย p-value น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการวิจัย

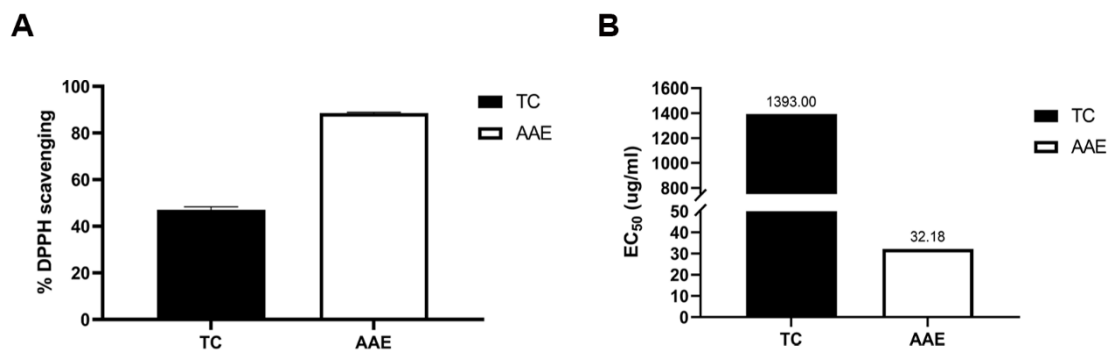
4.1.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม สารประกอบฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดว่านค้ำคาวดำ

จากการทดสอบการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม สารประกอบฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดว่านค้ำคาวดำพบว่า สารสกัดว่านค้ำคาวดำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเท่ากับ 84.243 ± 1.904 $\mu\text{g GAE/ mg dry wt}$ ขณะที่สารประกอบฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 10.738 ± 0.997 $\mu\text{g quercetin/ mg dry wt}$ และจากการหาค่าการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP พบว่า สารสกัดมีค่าการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 95.044 ± 3.769 $\mu\text{g AAE/ mg dry wt}$ (ตารางที่ 4.1) และวิธี DPPH scavenging พบว่าสารสกัดความเข้มข้น 1 mg/mL มีค่าการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 47.038 % และมีค่า EC₅₀ เท่ากับ 1393.00 $\mu\text{g/mL}$ (รูปที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม สารประกอบฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดว่านค้ำคาวดำ

Extract	Total phenolic content ($\mu\text{g GAE/mg dry wt.}$)	Total flavonoid content ($\mu\text{g quercetin/mg dry wt.}$)	FRAP assay ($\mu\text{g AAE/mg dry wt.}$)
TC	84.243 ± 1.904	10.738 ± 0.997	95.044 ± 3.769

TC: *Tacca chantrieri* André, GAE: gallic acid equivalent, AAE: ascorbic acid equivalent, mg dry wt: milligram dry weight.



รูปที่ 4.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดว่านค้ำคาวดำด้วยวิธี DPPH scavenging

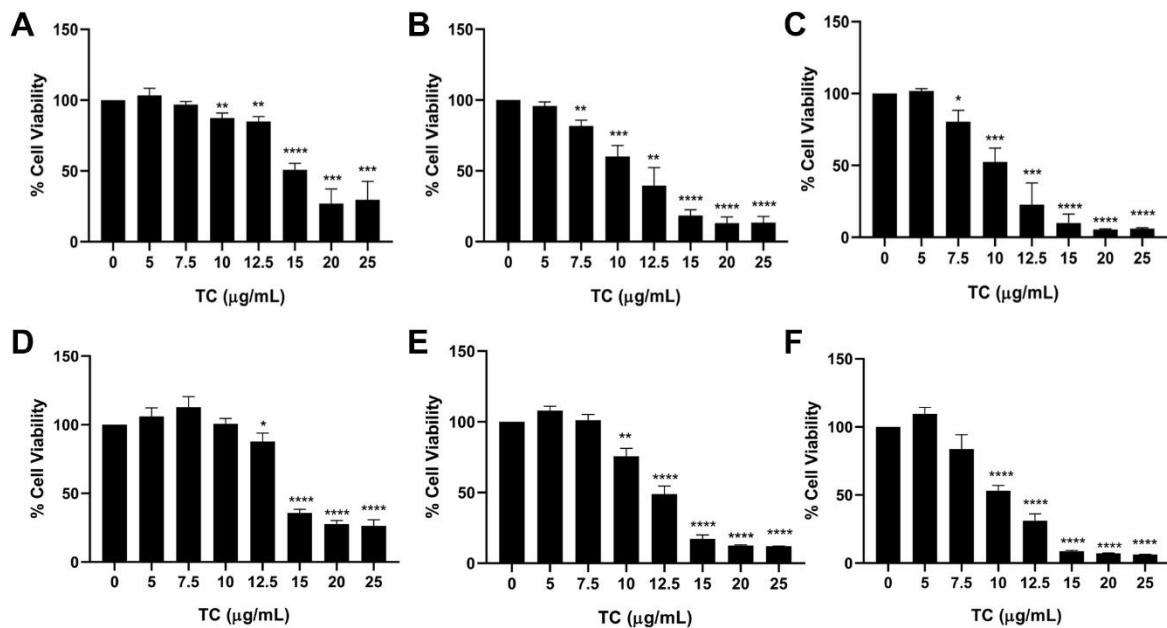
(A) แสดงค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (B) แสดงค่า EC₅₀

4.1.2 ผลของสารสกัดว่านค้ำควาดำต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดว่านค้ำควาดำต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี 2 ชนิด พบว่าในเซลล์ KKU-213A สารสกัดที่ความเข้มข้น 7.5, 10, 12.5, 15, 20 and 25 $\mu\text{g/mL}$ สามารถลดการมีชีวิตของเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทดสอบเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (รูปที่ 4.2A-4.2C) และใน KKU-213C พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 10, 12.5, 15, 20 and 25 $\mu\text{g/mL}$ สามารถลดการมีชีวิตของเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทดสอบเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (รูปที่ 4.2D-4.2F) นอกจากนี้ยังมีการคำนวณค่า IC_{25} และ IC_{50} ของสารสกัดในการทดสอบกับเซลล์ทั้ง 2 ชนิด ซึ่งให้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 4.2 แสดงค่า inhibitory concentration (IC) IC_{50} ของสารสกัดในการทดสอบกับเซลล์ KKU-213A และ KKU-213C เมื่อทดสอบเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

Cell lines	Times	TC ($\mu\text{g/mL}$) $\pm$ SD	
		IC_{25}	IC_{50}
KKU-213A	24h	13.2 ± 0.2	15.3 ± 0.4
	48h	8.5 ± 0.5	11.5 ± 1.2
	72h	8.1 ± 0.8	10.4 ± 0.9
KKU-213C	24h	13.2 ± 0.2	14.3 ± 0.2
	48h	10.1 ± 0.3	12.4 ± 0.3
	72h	7.9 ± 0.5	10.3 ± 0.1



รูปที่ 4.2 ผลของสารสกัดว่านค้ำควาดำต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

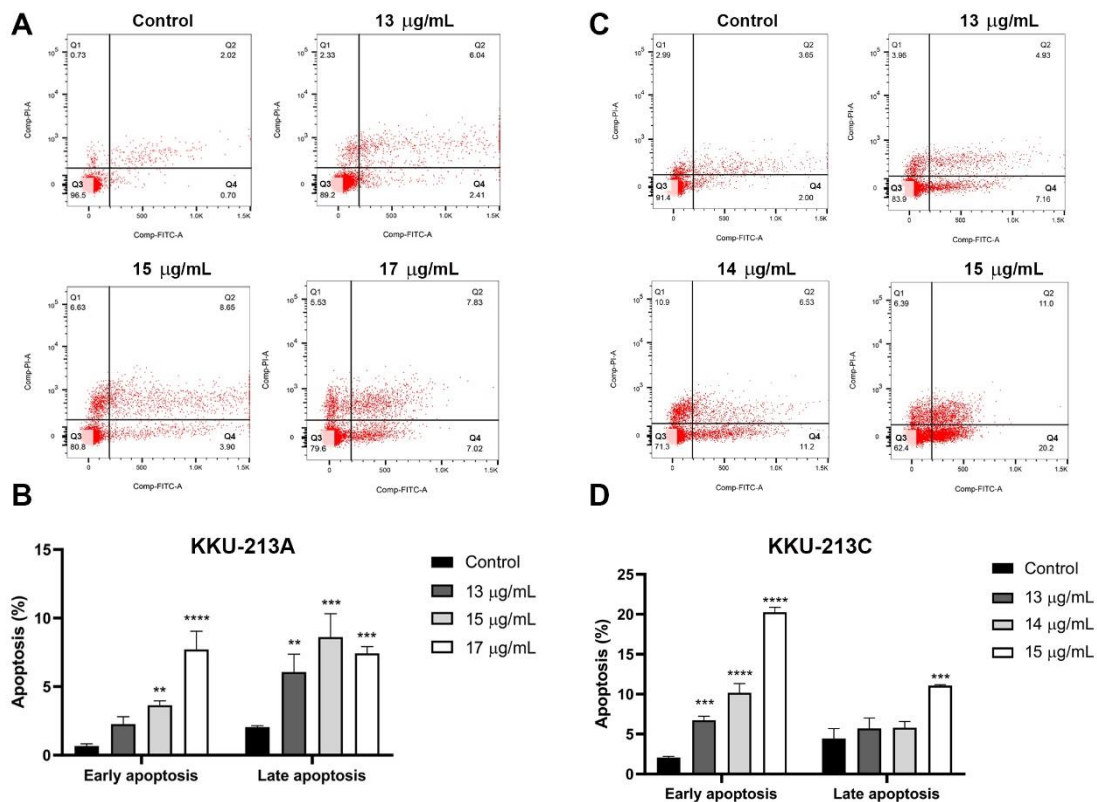
(A-C) แสดงผลของ KKU-213A ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ

(D-F) แสดงผลของ KKU-213C ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ

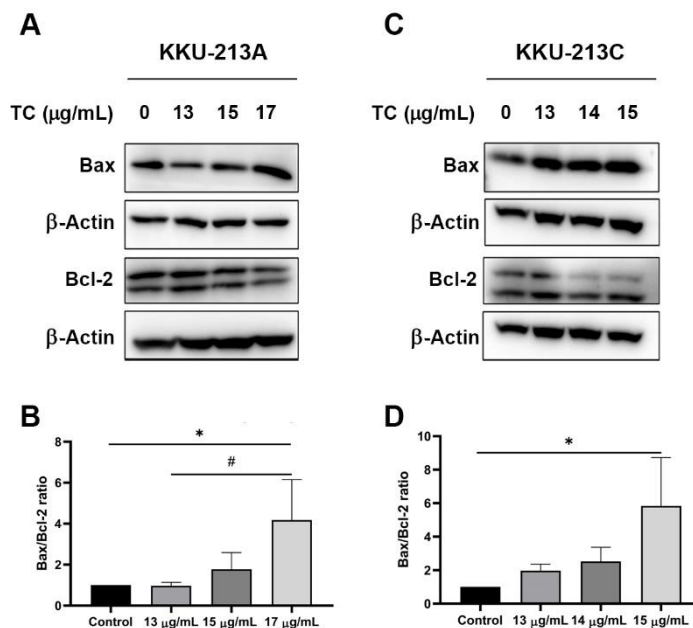
4.1.3 ผลของสารสกัดว่านค้ำควาดำต่อการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

ผลการทดสอบสารสกัดว่านค้ำควาดำต่อการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยใช้ flow cytometry พบว่าใน KKU-213A มีการตายแบบ apoptosis ทั้งในระยะ early และ late apoptosis ในกลุ่มที่มีการทดสอบด้วยสารสกัดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในความเข้มข้น 15 µg/mL และ 17 µg/mL (รูปที่ 4.3A-4.3B) และใน KKU-213C พบว่ามีการตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้นในระยะ early apoptosis ที่ความเข้มข้น 13, 14 และ 15 µg/mL ขณะที่ late apoptosis มีการเพิ่มขึ้นที่ความเข้มข้น 15 µg/mL (รูปที่ 4.3C-4.3D)

และจากการทำ western blot analysis เพื่อดูระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบ apoptosis พบว่า อัตราส่วนของ Bax/Bcl-2 มีการเพิ่มขึ้น และเพิ่มอย่างมีนัยสำคัญที่ 15 µg/mL และ 17 µg/mL (รูปที่ 4.4A-4.4D)



รูปที่ 4.3 ผลของสารสกัดว่านค้ำควาดำต่อการตายแบบ apoptosis โดยใช้ flow cytometry ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (A-B) แสดงผลของ KKKU-213A (C-D) แสดงผลของ KKKU-213C

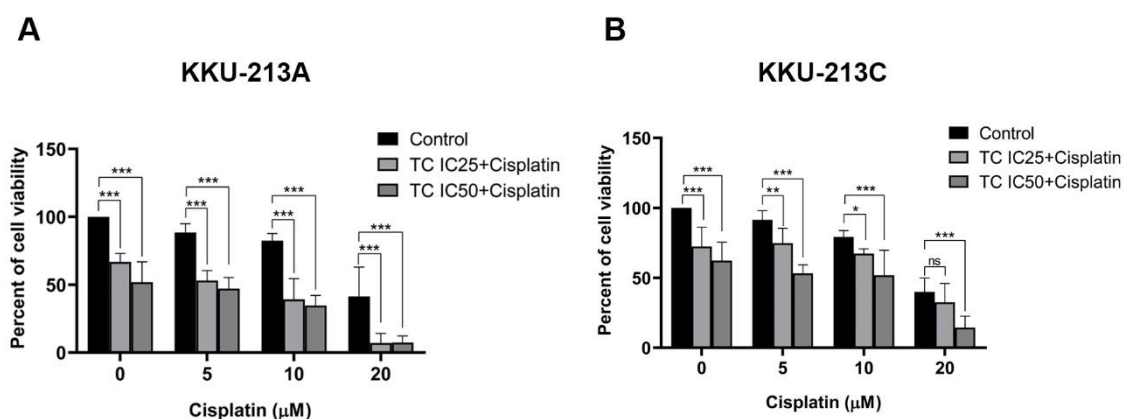


รูปที่ 4.4 ผลของสารสกัดว่านค้ำควาดำต่อการตายแบบ apoptosis โดยใช้ western blot analysis ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (A-B) แสดงผลของ KKKU-213A (C-D) แสดงผลของ KKKU-213C

4.1.4 ผลของสารสกัดว่านค้ำควาดำร่วมกับยาเคมีบำบัด cisplatin ต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

จากการทดสอบการให้ร่วมกันระหว่างสารสกัดว่านค้ำควาดำที่ความเข้มข้น IC25 และ IC50 กับยาเคมีบำบัด cisplatin ที่ความเข้มข้น 5, 10 and 20 μM พบว่าการใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่ IC25 และ IC50 สามารถลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งได้ดีเมื่อเทียบกับกับควบคุมซึ่งให้เฉพาะยาเคมีบำบัด โดยการให้ร่วมกันระหว่างสารสกัดว่านค้ำควาดำที่ความเข้มข้น IC25 และ IC50 กับยาเคมีบำบัด cisplatin ที่ความเข้มข้น 5, 10 and 20 μM สามารถลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งได้อย่างมีนัยสำคัญที่ 24 ชั่วโมง ทั้งในเซลล์ KKU-213A และ KKU-213C (รูปที่ 4.5A-4.5B)

และจากการหาค่า IC50 ของการให้ร่วมกันของสาร 2 ชนิด พบว่าการให้ร่วมกันระหว่างสารสกัดและยาเคมีบำบัดสามารถลดค่า IC50 ของยา cisplatin ได้เมื่อเทียบกับการให้เฉพาะยา cisplatin เพียงอย่างเดียว (ตารางที่ 4.3)



รูปที่ 4.5 ผลของสารสกัดว่านค้ำควาดำร่วมกับยาเคมีบำบัด cisplatin ต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (A) แสดงผลของ KKU-213A (B) แสดงผลของ KKU-213C

ตารางที่ 4.3 แสดงค่า inhibitory concentration (IC) IC50 ของสารสกัดว่านค้ำควาดำร่วมกับการให้ยา cisplatin ในการทดสอบกับเซลล์ KKU-213A และ KKU-213C

CCA cells	IC ₅₀ (μM) $\pm$ SD		
	Cisplatin	TC at IC ₂₅ +Cisplatin	TC at IC ₅₀ +Cisplatin
KKU-213A	24.0 $\pm$ 15.5	5.0 $\pm$ 1.8	4.2 $\pm$ 2.0
KKU-213C	23.0 $\pm$ 4.4	14.3 $\pm$ 4.7	6.6 $\pm$ 2.0

4.2 อภิปรายผล

สารสกัดจากธรรมชาติมีการถูกใช้เพื่อพัฒนาเป็นยารักษาโรคต่างๆ มาเป็นเวลานาน และยาหลายชนิดที่ใช้รักษาโรคมะเร็งก็มีการพัฒนามาจากสารสกัดพืช เช่น Paclitaxel (PTX) หรือ Vinblastine (VBS) โดยพบว่า PTX เป็นสารที่ได้จากเปลือกต้นสนแปซิฟิกและถูกนำมารักษาโรคมะเร็งหลายๆ ชนิด ได้แก่ มะเร็งรังไข่ มะเร็งหลอดอาหาร มะเร็งเต้านม มะเร็งปอด มะเร็งตับอ่อน เป็นต้น (Shaik et al., 2022) นอกจากนี้สารสกัดพืชหลายชนิดก็มีฤทธิ์ที่ส่งผลดีต่อสุขภาพเนื่องจากมีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย (Xing et al., 2022) ดังนั้นในการศึกษานี้ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดว่านค้ำควาดำในการต่อต้านอนุมูลอิสระ และต้านมะเร็งอีกด้วย

1) ฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระ

จากผลการศึกษาพบว่าสารสกัดว่านค้ำควาดำอุดมไปด้วยมีสารประกอบฟีนอลิก สารประกอบพลาโวนอยด์ อย่างไรก็ตามพบว่าระดับสารมีความแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้าซึ่งอาจเนื่องมาจากการใช้สารสกัดจากส่วนที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจส่งผลต่อระดับของสารประกอบเหล่านี้ได้ (Borchers and Pieler, 2010; Mohan and Kakkar, 2020) นอกจากนี้สารสกัดว่านค้ำควาดำยังมีประสิทธิภาพที่ดีในการต่อต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการมีสารประกอบที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น ซาโปนิน ซึ่งมีการศึกษาแล้วว่าสารนี้สามารถลดระดับไนตริกออกไซด์ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบได้ (Wang et al., 2016)

2) ฤทธิ์ในการต่อต้านมะเร็ง

การรักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีถือเป็นความท้าทายอย่างมากเนื่องจากผู้ป่วยส่วนใหญ่ถูกวินิจฉัยว่าเป็นโรคมะเร็งเมื่อเข้าสู่ระยะท้ายแล้ว และในปัจจุบันการผ่าตัดถือเป็นการรักษาเพียงวิธีเดียวที่รักษาให้โรคหายขาดได้ ในขณะที่การรักษาวิธีอื่น เช่น เคมีบำบัด การฉายรังสี ยังไม่มีประสิทธิภาพมากนักจึงส่งผลให้ผู้ป่วยยังมีอัตราการตาย รวมถึงการกลับมาเป็นซ้ำที่สูง (Banales et al., 2020; Li et al., 2022) ยิ่งไปกว่านั้นการรักษาด้วยวิธีดั้งเดิม เช่น เคมีบำบัดมักส่งผลข้างเคียงกับผู้ป่วย และเพื่อลดผลข้างเคียงดังกล่าว ปัจจุบันจึงมีการคิดค้นวิธีการรักษาโดยใช้สารอื่นๆ เพื่อที่จะลดผลกระทบดังกล่าว

ในการศึกษานี้ผู้วิจัยพบว่าสารสกัดว่านค้ำควาดำมีประสิทธิภาพที่ดีในการต่อต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งเป็นอาจเป็นผลมาจากการมีสารประกอบออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีผลยับยั้งมะเร็ง (He et al., 2021; Peng et al., 2010) การตายแบบ apoptosis สามารถถูกกระตุ้นได้ด้วยปัจจัยหลายอย่างรวมถึงยารักษาโรคมะเร็ง อย่างไรก็ตามเซลล์มะเร็งสามารถพัฒนาตัวเองเพื่อหลีกเลี่ยงกระบวนการตายนี้ได้ (Hanahan and Weinberg, 2011) โดยพบว่าการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ถือเป็นหนึ่งในกระบวนการนี้ และจากการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยพบว่าสารสกัดว่านค้ำควาดำสามารถกระตุ้นการตาย

แบบ apoptosis ได้โดยการเพิ่มสัดส่วนของโปรตีน Bax/Bcl-2 และยิ่งไปกว่านั้นการใช้สารสกัดว่าน
ค้ำควาดำร่วมกับยาเคมีบำบัด cisplatin สามารถกระตุ้นการตายของเซลล์ได้ดีกว่าการใช้สารสกัดหรือเคมี
บำบัดเพียงอย่างเดียว การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดนอกจากจะลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งแล้วยัง
สามารถกระตุ้นประสิทธิภาพของยา cisplatin ได้ด้วย ดังนั้นการใช้สารสกัดอาจจะช่วยแก้ปัญหาเกี่ยวกับการ
ดื้อยาเคมีบำบัดของเซลล์ได้ เนื่องจากมีส่วนประกอบหลายชนิดที่อาจมีเป้าหมายที่แตกต่างกันภายใน
เซลล์ (Solowey et al., 2014)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถสรุปได้ดังนี้

1. สารสกัดว่านค้ำควาดำอุดมไปด้วยสารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์ โดยมีปริมาณสารเท่ากับ $84.243 \pm 1.904 \mu\text{g GAE/ mg dry wt}$ และ $10.738 \pm 0.997 \mu\text{g quercetin/ mg dry wt}$ ตามลำดับ และจากการศึกษาการต้านอนุมูลอิสระพบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ที่ดีในการต่อต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่าการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ $95.044 \pm 3.769 \mu\text{g AAE/ mg dry wt}$ โดยวิธี FRAP และเท่ากับ 47.038% และมีค่า EC_{50} เท่ากับ $1393.00 \mu\text{g/mL}$ โดยวิธี DPPH scavenging ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL
2. สารสกัดว่านค้ำควาดำมีฤทธิ์ที่ดีในการต้านมะเร็งท่อน้ำดี โดยพบว่าสามารถลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งได้อย่างดีทั้ง KKU-213A และ KKU-213C แบบมีลักษณะขึ้นอยู่กับการเพิ่มปริมาณสารและเวลา (dose and time dependent manner) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดสามารถกระตุ้นการตายของเซลล์แบบ apoptosis ได้ โดยการเพิ่มอัตราส่วนของโปรตีน Bax/Bcl-2 ซึ่งมีผลทำให้มีการตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้น ยิ่งไปกว่านั้นสารสกัดว่านค้ำควาดำยังสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของยาเคมีบำบัด cisplatin ที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งได้อีกด้วย

5.2 ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากการศึกษานี้พบว่าสารสกัดว่านค้ำควาดำสามารถลดการมีชีวิตของเซลล์มะเร็ง และกระตุ้นการตายของเซลล์ได้ อย่างไรก็ตามเพื่อให้ได้ความรู้ครอบคลุมมากขึ้น ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับฤทธิ์ในการยับยั้งกระบวนการอื่นๆ ของเซลล์มะเร็ง เช่น การรุกราน การแพร่กระจาย เป็นต้น และเพื่อให้เข้าใจถึงกลไกเชิงลึกในการเพิ่มประสิทธิภาพของยา cisplatin จึงควรมีการศึกษาถึงกลไกเชิงโมเลกุลเพิ่มเติม

บรรณานุกรม

- Ajisyahputra, N., Palupi, E., Krisantini, K., Wiendi, N., Mulyono, J., 2017. Evaluation of Growth, Flowering and Seed Morphology of Batflower, *Tacca chantrieri* Andre. *Journal of Tropical Crop Science* 4, 64-69.
- Aryal, S., Baniya, M.K., Danekhu, K., Kunwar, P., Gurung, R., Koirala, N., 2019. Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Potential of Wild Vegetables from Western Nepal. *Plants (Basel)* 8.
- Banales, J.M., Cardinale, V., Carpino, G., Marzioni, M., Andersen, J.B., Invernizzi, P., Lind, G.E., Folseraas, T., Forbes, S.J., Fouassier, L., Geier, A., Calvisi, D.F., Mertens, J.C., Trauner, M., Benedetti, A., Maroni, L., Vaquero, J., Macias, R.I., Raggi, C., Perugorria, M.J., Gaudio, E., Boberg, K.M., Marin, J.J., Alvaro, D., 2016. Expert consensus document: Cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA). *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 13, 261-280.
- Banales, J.M., Marin, J.J.G., Lamarca, A., Rodrigues, P.M., Khan, S.A., Roberts, L.R., Cardinale, V., Carpino, G., Andersen, J.B., Braconi, C., Calvisi, D.F., Perugorria, M.J., Fabris, L., Boulter, L., Macias, R.I.R., Gaudio, E., Alvaro, D., Gradilone, S.A., Strazzabosco, M., Marzioni, M., Coulouarn, C., Fouassier, L., Raggi, C., Invernizzi, P., Mertens, J.C., Moncsek, A., Rizvi, S., Heimbach, J., Koerkamp, B.G., Bruix, J., Forner, A., Bridgewater, J., Valle, J.W., Gores, G.J., 2020. Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 17, 557-588.
- Borchers, A., Pieler, T., 2010. Programming pluripotent precursor cells derived from *Xenopus* embryos to generate specific tissues and organs. *Genes (Basel)* 1, 413-426.
- Bose, S., Panda, A.K., Mukherjee, S., Sa, G., 2015. Curcumin and tumor immune-editing: resurrecting the immune system. *Cell Div* 10, 6.
- Crown, J., O'Leary, M., Ooi, W.S., 2004. Docetaxel and paclitaxel in the treatment of breast cancer: a review of clinical experience. *Oncologist* 9 Suppl 2, 24-32.

Dasari, S., Tchounwou, P.B., 2014. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* 740, 364-378.

Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

He, J., Ma, R., Li, Z.H., Feng, T., Liu, J.K., 2021. Taccachatrone A-G, Highly Oxidized Steroids from the Rhizomes of *Tacca chantrieri* and Their Cytotoxicity Assessment. *J Nat Prod* 84, 2265-2271.

Huq, F., Yu, J.Q., Beale, P., Chan, C., Arzuman, L., Nessa, M.U., Mazumder, M.E., 2014. Combinations of platinum and selected phytochemicals as a means of overcoming resistance in ovarian cancer. *Anticancer Res* 34, 541-545.

Jinhe, J., Yang, H.-M., Wang, Y.-L., Chen, Y., 2014. Phytochemical and Pharmacological Studies of the Genus *Tacca* : A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 13, 635.

Kim, M., Kim, Y.S., Kim, K.M., Ko, H.C., Kim, S.J., Kim, J.H., Kim, Y., 2014. Combination of *Sasa quelpaertensis* Nakai leaf extract and cisplatin suppresses the cancer stemness and invasion of human lung cancer cells. *Integr Cancer Ther* 13, 529-540.

Kittipong, K., Chaiyong, R., Duangporn, A., 2010. Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects of *Tacca chantrieri* Andre. *Journal of Medicinal Plants Research* 4, 1991-1995.

Klungsaeng, S., Kukongviriyapan, V., Prawan, A., Kongpetch, S., Senggunprai, L., 2020. Targeted Modulation of FAK/PI3K/PDK1/AKT and FAK/p53 Pathways by Cucurbitacin B for the Antiproliferation Effect Against Human Cholangiocarcinoma Cells. *Am J Chin Med* 48, 1475-1489.

Li, Y., Song, Y., Liu, S., 2022. The new insight of treatment in Cholangiocarcinoma. *J Cancer* 13, 450-464.

Macias, R.I., 2014. Cholangiocarcinoma: Biology, Clinical Management, and Pharmacological Perspectives. *ISRN Hepatol* 2014, 828074.

Mohan, B., Kakkar, A., 2020. Evaluation of phenolic, flavonoid contents and antioxidant activity in leaves, stem and roots of *Solanum indicum* Linn. *Environment Conservation Journal* 21, 167-172.

Ni, G., Yang, H.Z., Fu, N.J., Zhang, L.L., Wang, M.C., Chen, J., Zhang, C.L., Li, Y., Chen, X.G., Chen, R.Y., Yu, D.Q., 2015. Cytotoxic taccalonolides and withanolides from *Tacca chantrieri*. *Planta Med* 81, 247-256.

Peng, J., Jackson, E.M., Babinski, D.J., Risinger, A.L., Helms, G., Frantz, D.E., Mooberry, S.L., 2010. Evelynin, a cytotoxic benzoquinone-type Retro-dihydrochalcone from *Tacca chantrieri*. *J Nat Prod* 73, 1590-1592.

Promraksa, B., Phetcharaburanin, J., Namwat, N., Techasen, A., Boonsiri, P., Loilome, W., 2019. Evaluation of anticancer potential of Thai medicinal herb extracts against cholangiocarcinoma cell lines. *PLoS One* 14, e0216721.

Rizeq, B., Gupta, I., Ilesanmi, J., AlSafran, M., Rahman, M.M., Ouhtit, A., 2020. The Power of Phytochemicals Combination in Cancer Chemoprevention. *J Cancer* 11, 4521-4533.

Shaik, B.B., Katari, N.K., Jonnalagadda, S.B., 2022. Role of Natural Products in Developing Novel Anticancer Agents: A Perspective. *Chem Biodivers* 19, e202200535.

Solowey, E., Lichtenstein, M., Sallon, S., Paavilainen, H., Solowey, E., Lorberboum-Galski, H., 2014. Evaluating medicinal plants for anticancer activity. *ScientificWorldJournal* 2014, 721402.

Sripa, B., Seubwai, W., Vaeteewoottacharn, K., Sawanyawisuth, K., Silsirivanit, A., Kaewkong, W., Muisuk, K., Dana, P., Phoomak, C., Lert-Itthiporn, W., Luvira, V., Pairojkul, C., Teh, B.T., Wongkham, S., Okada, S., Chamgramol, Y., 2020. Functional and genetic characterization of three cell lines derived from a single tumor of an *Opisthorchis viverrini*-associated cholangiocarcinoma patient. *Hum Cell* 33, 695-708.

Sun, C.Y., Zhang, Q.Y., Zheng, G.J., Feng, B., 2019. Phytochemicals: Current strategy to sensitize cancer cells to cisplatin. *Biomed Pharmacother* 110, 518-527.

Takakura, K., Kajihara, M., Iwasaki, T., Ide, D., Miyazaki, T., Arai, Y., Saruta, M., Arihiro, S., Matsuoka, M., Koido, S., Ito, R., Matsumoto, M., Gocho, T., Wakiyama, S., Yanaga, K., Tajiri, H., 2013. Unusual images of mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma. *Case Rep Gastroenterol* 7, 414-419.

Thongchot, S., Thanee, M., Loilome, W., Techasen, A., Boonmars, T., Sa-Ngiamwibool, P., Titapun, A., Yongvanit, P., Isidoro, C., Namwat, N., 2020. Curative effect of xanthohumol

supplementation during liver fluke-associated cholangiocarcinogenesis: Potential involvement of autophagy. *J Tradit Complement Med* 10, 230-235.

Thongchot, S., Vidoni, C., Ferraresi, A., Loilome, W., Yongvanit, P., Namwat, N., Isidoro, C., 2018. Dihydroartemisinin induces apoptosis and autophagy-dependent cell death in cholangiocarcinoma through a DAPK1-BECLIN1 pathway. *Mol Carcinog* 57, 1735-1750.

Wang, M., Jiang, S., Zhou, L., Yu, F., Ding, H., Li, P., Zhou, M., Wang, K., 2019. Potential Mechanisms of Action of Curcumin for Cancer Prevention: Focus on Cellular Signaling Pathways and miRNAs. *Int J Biol Sci* 15, 1200-1214.

Wang, Y., Li, C., Xiang, L., Huang, W., He, X., 2016. Spirostanol saponins from Chinese onion (*Allium chinense*) exert pronounced anti-inflammatory and anti-proliferative activities. *Journal of Functional Foods* 25, 208-219.

Wattanawongdon, W., Hahnvajanawong, C., Namwat, N., Kanchanawat, S., Boonmars, T., Jearanaikoon, P., Leelayuwat, C., Techasen, A., Seubwai, W., 2015. Establishment and characterization of gemcitabine-resistant human cholangiocarcinoma cell lines with multidrug resistance and enhanced invasiveness. *Int J Oncol* 47, 398-410.

Xing, F., Hu, Q., Qin, Y., Xu, J., Zhang, B., Yu, X., Wang, W., 2022. The Relationship of Redox With Hallmarks of Cancer: The Importance of Homeostasis and Context. *Front Oncol* 12, 862743.

Yokosuka, A., Mimaki, Y., 2007. New glycosides from the rhizomes of *Tacca chantrieri*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 55, 273-279.

Yokosuka, A., Mimaki, Y., Sakagami, H., Sashida, Y., 2002a. New diarylheptanoids and diarylheptanoid glucosides from the rhizomes of *Tacca chantrieri* and their cytotoxic activity. *Journal of natural products* 65, 283-289.

Yokosuka, A., Mimaki, Y., Sashida, Y., 2002b. Spirostanol saponins from the rhizomes of *Tacca chantrieri* and their cytotoxic activity. *Phytochemistry* 61, 73-78.

Yokosuka, A., Mimaki, Y., Sashida, Y., 2003. Chantriolides A and B, two new withanolide glucosides from the rhizomes of *Tacca chantrieri*. *Journal of natural products* 66, 876-878.

Zhang, Y.J., Gan, R.Y., Li, S., Zhou, Y., Li, A.N., Xu, D.P., Li, H.B., 2015. Antioxidant Phytochemicals for the Prevention and Treatment of Chronic Diseases. *Molecules* 20, 21138-21156.

Zhao, L.J., Liu, W., Xiong, S.H., Tang, J., Lou, Z.H., Xie, M.X., Xia, B.H., Lin, L.M., Liao, D.F., 2018. Determination of Total Flavonoids Contents and Antioxidant Activity of Ginkgo biloba Leaf by Near-Infrared Reflectance Method. *Int J Anal Chem* 2018, 8195784.

ภาคผนวก

รายงาน รายงานงบประมาณของโครงการ

การศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และการต้านมะเร็งท่อน้ำดี
ของสารสกัดว่านคางคาวดำ

The study of antioxidant activity and anticancer in cholangiocarcinoma of
Tacca chantrieri André (TC) extract

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ดร.สุรรัตน์ ปัดไธสง

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะ สหเวชศาสตร์

เลขสัญญาทุน AHS๐๑/๒๕๖๖

ผู้ร่วมวิจัย

1. ดร.พุทธิดา คงธิติเลิศ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ ๒๕๖๖

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

รายจ่ายงบประมาณของโครงการ

งบประมาณที่ได้รับสนับสนุน ทั้งสิ้น	150,000.00	บาท
งบประมาณที่ใช้จ่ายจริงทั้งสิ้น	150,348.97	บาท
งบประมาณคงเหลือ	0	บาท

รายการ		งบประมาณ (บาท)			หมายเหตุ
งบดำเนินการ		เงินที่ตั้งไว้	ค่าใช้จ่ายจริง	คงเหลือ	
	1. ค่าตอบแทน				ถ้าเฉลี่ยทุก รายการ
	2. หมวดค่าใช้สอย				
	2.1 ค่าจ้างเหมาเลี้ยงเซลล์	15,000.00	15,000.00	0.00	
	2.2 ค่าใช้จ่ายในการตรวจทาง ห้องปฏิบัติการ	5,000.00	2,250.00	2,750.00	
	3. หมวดค่าวัสดุ				
	3.1 ค่าสารเคมีและวัสดุอุปกรณ์ในการ สกัดตัวอย่าง และวัดฤทธิ์การต้าน อนุมูลอิสระ (Pipette tips, conical tube 15 ml, conical tube 50 ml, Folin-Ciocalteu's phenol reagent) เป็นต้น	20,000.00	22,052.70	-2,052.70	
	3.2 ค่าสารเคมีและค่าวัสดุอุปกรณ์ใน การเลี้ยงเซลล์ (100 mm culture dish, 96-well plate, cell culture media, serological pipettes) เป็น ต้น	60,000.00	61,354.62	-1,354.62	
	3.3 ค่าสารเคมีและค่าวัสดุอุปกรณ์ใน การตรวจการตายของเซลล์ (Annexin V staining kit, MTT reagent, dimethyl sulfoxide, antibody) เป็นต้น	50,000.00	49,691.65	308.35	
รวมทั้งสิ้น		150,000.00	150,348.97	-348.97	

เอกสารใบรับรองจริยธรรม



ที่ 40/2566

ใบรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการวิจัยด้านความปลอดภัยทางชีวภาพในงานวิจัย

คณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพในงานวิจัย มหาวิทยาลัยบูรพา ได้พิจารณาโครงการวิจัย

รหัสโครงการวิจัย IBC 021/2566

ชื่อข้อเสนอการวิจัย

ภาษาไทย การศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และการต้านมะเร็งท่อน้ำดีของสารสกัด
ว่านค้ำควดดำ

ภาษาอังกฤษ The study of antioxidant activity and anticancer in cholangiocarcinoma
of Tacca chantrieri Andre (TC) extract

หัวหน้าโครงการวิจัย ดร.สุวิรัตน์ ปัดไธสง
หน่วยงานที่สังกัด คณะสหเวชศาสตร์
มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา

ข้อเสนอการวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพในงานวิจัย
มหาวิทยาลัยบูรพา เป็นที่เรียบร้อยแล้ว เห็นว่ามีความสอดคล้องกับแนวทางปฏิบัติเพื่อความปลอดภัย
ทางชีวภาพสำหรับการดำเนินงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ จึงเห็นสมควรให้ดำเนินการวิจัย
ด้านความปลอดภัยทางชีวภาพในงานวิจัย ตามข้อเสนอการวิจัยนี้ได้ โดยจัดเป็นงานวิจัยประเภทที่ 2
(การวิจัยและทดลองที่มีความเสี่ยงหรืออันตรายปานกลางต่อผู้ปฏิบัติงาน ชุมชน และสิ่งแวดล้อม)

วันที่รับรอง : วันที่ 27 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2566

วันที่หมดอายุ : วันที่ 27 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2567

ลงนาม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิรมล ธรรมวิริยสดี)

ประธานคณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพในงานวิจัย
มหาวิทยาลัยบูรพา

เอกสารอนุมัติรายงานความก้าวหน้า



บันทึกข้อความ

ส่วนงาน คณะสหเวชศาสตร์ สำนักงานคณบดี มหาวิทยาลัยบูรพา โทร. ๒๖๑๔, ๓๑๖๘
ที่ อว ๘๑๒๐/กน ๒๓๓ /๒๕๖๖ วันที่ ๒๓ มิถุนายน พ.ศ. ๒๕๖๖
เรื่อง แจ้งผลการอนุมัติรายงานความก้าวหน้า ทูลอดหนุนการวิจัย งบประมาณเงินรายได้
คณะสหเวชศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๖ (ประเภททุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่)

เรียน คณบดีคณะสหเวชศาสตร์

สืบเนื่องจาก ดร.สุรวิทย์ บัดโง่ง หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และการต้านมะเร็งของสารสกัดจากข้าวคั่ว” ซึ่งได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณเงินรายได้ คณะสหเวชศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๖ (ประเภททุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่) ขอจัดส่งรายงานความก้าวหน้า และขออนุมัติเบิกจ่ายงบประมาณงวดที่ ๒ ตามความทราบแล้วนั้น

ทางฝ่ายวิจัยได้ดำเนินการให้คณะกรรมการพิจารณารายงานความก้าวหน้าเป็นที่เรียบร้อยแล้ว และฝ่ายวิจัยได้พิจารณาอนุมัติรายงานความก้าวหน้า และอนุมัติเบิกจ่ายเงินทุนวิจัยงวดที่ ๒

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ และพิจารณาลำดับต่อไป

(ดร.วารณรินทร์ ยิสารคุณ)
รองคณบดีฝ่ายวิชาการและวิจัย

ทราบ/อนุมัติ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ดร.มารุด ตั้งวัฒนาสุสิทธิ์)

คณบดีคณะสหเวชศาสตร์

เอกสารการอนุมัติขอขยายระยะเวลา ครั้งที่ 1



คณะสัตวแพทยศาสตร์ ม.ปทุมธานี

เลขที่รับ: 2151
วันที่: 10 พ.ย. 2566
เวลา: 14.00

คดีแพ่ง

วันที่: 31 พ.ค. 2567
เวลา: 14.49

1300

10

บันทึกข้อความ

ส่วนงาน คณะสัตวแพทยศาสตร์ สำนักงานคณบดี มหาวิทยาลัยปทุมธานี โทร. ๒๖๑๔.๓๑๖๘
ที่ อว ๔๑๒๐/ 9๓/๐๙ วันที่ ๓๐ ตุลาคม พ.ศ. ๒๕๖๖

เรื่อง ขอยกเวลาการส่งรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ทูลเกล้าทูลกระหม่อมถวาย งบประมาณเงินรายได้
คณะสัตวแพทยศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๖ (ประเภททุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่) ครั้งที่ ๑

เรียน รองอธิการบดีฝ่ายวิจัยและนวัตกรรม

ข้าพเจ้า ดร.สุวิรัตน์ ปัดไธสง ตำแหน่ง อาจารย์ ประจำคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยปทุมธานี หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง "การศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และการต้านมะเร็งของสารสกัดจากคางคกค้ำ" เป็นผู้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณเงินรายได้ คณะสัตวแพทยศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๖ (ประเภททุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่) เป็นจำนวนเงิน ๑๕๐,๐๐๐ บาท (หนึ่งแสนห้าหมื่นบาทถ้วน) ตามสัญญาเลขที่ AHS๐๙/๒๕๖๖ มีความประสงค์ขอยกเวลาส่งรายงานฉบับสมบูรณ์ ทั้งนี้เนื่องจากอยู่ระหว่างการสั่งซื้อสารเคมี ได้แก่ อาหารเลี้ยงเซลล์ และ fetal bovine serum ซึ่งต้องมีการนำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้นจึงต้องใช้ระยะเวลาในการรอคอยประมาณ ๒-๓ เดือนหลังจากสั่งซื้อ เป็นผลให้เกิดความล่าช้าในการทำการวิจัย และอยู่ระหว่างการขอรับการพิจารณาความปลอดภัยทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการ ดังนั้นจึงขอยกเวลาการส่งรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ออกไปอีก ๒ เดือน ระหว่างวันที่ ๒๑ พฤศจิกายน พ.ศ. ๒๕๖๖ จนถึงวันที่ ๒๐ พฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๖๗

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณา และดำเนินการต่อไป จักขอบพระคุณยิ่ง

สุวิรัตน์ ปัดไธสง
(ดร.สุวิรัตน์ ปัดไธสง)
หัวหน้าโครงการวิจัย

(ผู้รักษาสถาบันอาจารย์ ดร.ปทุมธานี) (ผู้รักษาสถาบัน)
คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์

เรียน รองอธิการบดีฝ่ายวิจัยและนวัตกรรม

ตามที่ ดร.สุวิรัตน์ ปัดไธสง สังกัดคณะสหเวชศาสตร์ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณเงินรายได้ส่วนงาน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๖ เรื่อง การศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และการต้านมะเร็งของน้ำคั้นของสารสกัดจากค่างคาวดำ งบประมาณ ๑๕๐,๐๐๐ บาท สัญญาเลขที่ AHS๐๑/๒๕๖๖ นั้น

บัดนี้ ดร.สุวิรัตน์ ปัดไธสง มีความประสงค์ขอขยายระยะเวลาการดำเนินงานวิจัยเรื่องดังกล่าว เป็นครั้งที่ ๑ ระยะเวลา ๖ เดือน ตั้งแต่วันที่ ๒๑ พฤศจิกายน พ.ศ. ๒๕๖๖ ถึงวันที่ ๒๐ พฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๖๗

จึงเรียนมา

๑. เพื่อโปรดทราบ
๒. เพื่ออนุมัติ การขอขยายระยะเวลาดำเนินการวิจัยครั้งที่ ๑
๓. เห็นควรแจ้งผู้ช่วยอธิการบดีฝ่ายบริหารการวิจัย เพื่อโปรดทราบ *ทบทวน ๒๕ พ.ย. ๖๖*
๔. เห็นควรมอบคุณพิมพ์ภัทรา คงเกษม ดำเนินการต่อไป

พิมพ์ภัทรา คงเกษม
(นางสาวพิมพ์ภัทรา คงเกษม)
นักวิชาการศึกษา

๒๕ พ.ย. ๖๖

ดร.สุวิรัตน์ ปัดไธสง
๒๕ พ.ย. ๖๖

อนุมัติขยายเวลาถึง

๒๐ พ.ค. ๖๗

ดำเนินการตามเสนอ

ดร.สุวิรัตน์ ปัดไธสง
๕ พ.ย. ๖๖

เรียน คณบดีคณะสหเวชศาสตร์

๑. เพื่อโปรดทราบ
๒. เห็นควรแจ้งรองอธิการบดี / ดร.สุวิรัตน์ ปัดไธสง
เพื่อพิจารณาต้นฉบับขอต่อให้
๓. เห็นควรแจ้ง คุณจุฬารัตน์ ทนท

จุฬารัตน์
๑๐ พ.ย. ๒๕๖๖

ทราบ/ดำเนินการ

ดร.สุวิรัตน์ ปัดไธสง
๑๐ พ.ย. ๖๖

เอกสารการอนุมัติขอขยายระยะเวลา ครั้งที่ 2



บันทึกข้อความ

ส่วนงาน คณะสหเวชศาสตร์ สำนักงานคณบดี มหาวิทยาลัยบูรพา โทร. ๒๖๓๔, ๓๑๖๘
ที่ อว ๘๑๒๐/๗๒๕ วันที่ ๒๑ พฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๖๗

เรื่อง ขอยกยเวลาการส่งรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณเงินรายได้
คณะสหเวชศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๖ (ประเภททุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่) ครั้งที่ ๒

เรียน รองอธิการบดีฝ่ายวิจัยและนวัตกรรม

ข้าพเจ้า ดร.สุรรัตน์ ปัดไธสง ตำแหน่ง อาจารย์ ประจำคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง "การศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และการต้านมะเร็งของน้ำดีของสารสกัดจาก
"คางคาวดำ" เป็นผู้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณเงินรายได้ คณะสหเวชศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ
พ.ศ. ๒๕๖๖ (ประเภททุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่) เป็นจำนวนเงิน ๑๕๐,๐๐๐ บาท (หนึ่งแสนห้าหมื่นบาทถ้วน)
ตามสัญญาเลขที่ AHS๐๑/๒๕๖๖ มีความประสงค์ขอยกยเวลาส่งรายงานฉบับสมบูรณ์ ครั้งที่ ๒ ทั้งนี้
เนื่องจากอยู่ระหว่างดำเนินการส่วนสุดท้ายของงานวิจัย เนื่องจากได้รับสารเคมีในการวิเคราะห์การตายของ
เซลล์ล่าช้า รวมถึงอยู่ระหว่างการวิเคราะห์ข้อมูล และจัดเตรียมต้นฉบับบทความวิจัยสำหรับเผยแพร่ในวารสาร
นานาชาติอีกด้วย ดังนั้นจึงขอยกยเวลาการส่งรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ออกไปอีก ๖ เดือน ระหว่างวันที่ ๒๑
พฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๖๗ จนถึงวันที่ ๒๐ พฤศจิกายน พ.ศ. ๒๕๖๗

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณา จักขอบพระคุณยิ่ง

สุรรัตน์ ปัดไธสง
(ดร.สุรรัตน์ ปัดไธสง)
หัวหน้าโครงการวิจัย


(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มารุต ตั้งวัฒนาคุณสิทธิ์)
คณบดีคณะสหเวชศาสตร์

เรียน รองอธิการบดีฝ่ายวิจัยและนวัตกรรม

ตามที่ ดร.สุรรัตน์ ปัดไธสง คณะสหเวชศาสตร์ ได้รับงบประมาณเงินรายได้ส่วนงาน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๖ โครงการเรื่อง การศึกษาพฤติกรรมการด้านอนุมูลอิสระและการต้านมะเร็งท่อน้ำดีของสารสกัดจากขมิ้นชัน งบประมาณ ๓๕๐,๐๐๐ บาท สัญญาเลขที่ AHS๐๑/๒๕๖๖

บัดนี้ ดร.สุรรัตน์ ปัดไธสง แจ้งว่าอยู่ระหว่างการดำเนินการส่วนสุดท้ายของงานวิจัย เนื่องจากได้รับสารเคมีในการวิเคราะห์การตายของเซลล์ลำไส้ จึงมีความประสงค์ขอขยายระยะเวลาดำเนินโครงการวิจัย ครั้งที่ ๒ ระยะเวลา ๒ เดือน ถึงวันที่ ๒๐ พฤศจิกายน พ.ศ. ๒๕๖๗ โดยมีรายละเอียดดังเอกสารแนบ

ทั้งนี้เป็นไปตาม ประกาศมหาวิทยาลัยบูรพาที่ ๐๕๕๗/๒๕๖๓ เรื่อง หลักเกณฑ์และแนวปฏิบัติในการบริหารจัดการงานวิจัยและนวัตกรรม พ.ศ. ๒๕๖๓ ข้อ ๓๓ (๔)

จึงเรียนมา

๑. เพื่อโปรดทราบ และพิจารณา
๒. เห็นควรแจ้งผู้ช่วยอธิการบดีฝ่ายบริหารการวิจัย เพื่อโปรดทราบ
๓. เห็นควรแจ้งผู้อำนวยการกองบริหารการวิจัยและนวัตกรรม เพื่อโปรดทราบ
๔. เห็นควรมอบคุณกฤษณา เกิดบุญส่ง เสนอเพื่อทราบในคณะกรรมการบริหารการวิจัยและนวัตกรรม ครั้งที่ ๖/๒๕๖๗ เดือน มิถุนายน ๒๕๖๗
๕. เห็นควรแจ้งคณบดีคณะสหเวชศาสตร์ เพื่อโปรดทราบ และแจ้ง ดร.สุรรัตน์ ปัดไธสง ทราบ และบันทึกการขยายเวลา ครั้งที่ ๒ ในระบบ e-research และดำเนินการในส่วนที่เกี่ยวข้องต่อไป



๑๓ พฤษภาคม ๒๕๖๗

๓๐.๐๐ น.

อนุมัติขยายเวลาถึง ๒๐ พ.ย. ๖๗

อนุมัติขยายเวลาถึง

ดำเนินการตามเสนอ



๓๐ พ.ค. ๖๗