

Thesis Title Development of Nano Delivery System for Anticancer Extract of *Cyrtosperma johnstonii* N.E.Br.

Author Miss Ruttiros Khonkarn

Degree Doctor of Philosophy (Pharmacy)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Siriporn Okonogi Advisor

Assoc. Prof. Dr. Samlee Mankhetkorn Co-advisor

Asst. Prof. Dr. Chadarat Ampasavate Co-advisor

Assoc. Prof. Dr. Wilart Poompimon Co-advisor

ABSTRACT

Singhamora (*Cyrtosperma johnstonii*) has long been used in the treatment of inflammation and several kinds of cancer by local Thai people. However, no scientific data has been reported to substantiate the respective biological activities. The aim of the present study was to evaluate antioxidant and anticancer activities of singhamora in comparison with high antioxidant Thai plant extracts, i.e. rambutan (*Nephelium lappaceum*), mangosteen (*Garcinia mangostana*) and coconut (*Cocos nucifera*) and to develop the drug delivery system in the form of polymeric micelles based interesting natural bioactive compounds for anticancer activity.

Interestingly, the acetone fraction of singhamora revealed the potent cytotoxicity against different cancer cells (human epidermal carcinoma of the mouth cells (KB), human erythromyelogenous leukemia cells (K562) and small lung

carcinoma cells (GLC4) as well as their corresponding resistant cells) with IC₅₀ values ranging from 5 - 65 µg/ml and the high antioxidant activity with TEAC and EC values of 19.2 mM/mg and 19.2 mM/mg, respectively. The results also indicated that up to the maximum of 100 µg/ml, all singhamora extracts showed no serious cytotoxicity to normal cells. Besides, the results of flow cytometry analysis with propidium iodide-stained cells presented that upon exposure to the acetone extracts, cell cycle arrest occurred at the G2/M phase and followed by apoptosis. The research found that the phenolic compounds play an important part in antioxidant and anticancer activities.

The HPLC assay showed that rutin presented as a main constituent in the acetone extract of singhamora. Structure identification revealed that rutin is a quercetin glycoside. Both rutin and quercetin (QCT) demonstrated high antioxidant and anticancer activities. Moreover, xanthone, a main constituent of mangosteen extract, is also remarkable bioactive compound because of its interesting activity on antioxidant and anticancer. However, these interesting bioactive compounds are low aqueous solubility which generally leads to a low bioavailability. Presently attractive block co-polymers for the formation of self-assembled drug delivery system which are mPEG750-*b*-OCL; poly(ethylene glycol)-*b*-oligo(ϵ -caprolactone) and mPEG-*b*-p(HPMAm-Lac₂); poly(ethylene glycol)-*b*-poly[*N*-(2-hydroxypropyl) methacrylamide-dilactate], were used to overcome the solubility issue of these compounds. The result showed that rutin and QCT were successful loaded into mPEG750-*b*-OCL micelles. The aqueous solubility of both rutin and QCT increased up to 1 mg/ml when loaded into mPEG750-*b*-OCL micelles. On the other hand, xanthone was achievable loaded into mPEG-*b*-p(HPMAm-Lac₂) micelles and the aqueous solubility of xanthone increased up to 2 mg/ml. *In vitro* cytotoxicity showed

that the studied bioactive compounds loaded in the polymeric micelles were effectively inhibited the growth of both sensitive and resistant human erythromyelogenous leukemia (K562) and small lung carcinoma (GLC4) cells. The mechanism of cancer cell growth inhibition by those bioactive compounds loaded in the polymeric micelles was mediated through arresting of cell cycle at G2/M phase or induction of apoptosis.

It could be concluded that the acetone extract of singhamora should be considered as potential pharmaceutical product for cancer therapy. Rutin is the main constituent of the singhamora acetone fraction. mPEG-*b*-OCL micelles hold good promise for formulation of rutin and quercetin whereas mPEG-*b*-p(HPMAm-Lac₂) micelles were suitable for xanthone.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การพัฒนาระบบนำส่งนาโนสำหรับสารสกัดต้านมะเร็งของสิงหโมรา	
ผู้เขียน	นางสาวรัตติรส คนการณ	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เภสัชศาสตร์)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์		
	รศ.ดร. ศิริพร โอโกโนกิ	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	รศ.ดร. สำรี มั่นเขตต์กรณ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ผศ.ดร. ชฎารัตน์ อัมพะเสวต	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	รศ.ดร. วิลาศ พุ่มพิมล	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

สิงหโมรา (*Cyrtosperma johnstonii*) เป็นพืชสมุนไพรไทยที่มีการใช้มาเป็นระยะเวลาช้านานในการรักษาโรคต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับอาการอักเสบ และใช้ในการรักษามะเร็งหลายชนิดแต่ยังขาดข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สนับสนุนการออกฤทธิ์ดังกล่าว การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านมะเร็งของสารสกัดสิงหโมราเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากพืชไทยที่มีรายงานว่ามียุทธศาสตร์สูงในการต้านอนุมูลอิสระได้แก่ สารสกัดจากเงาะ (*Nephelium lappaceum*) มังคุด (*Garcinia mangostana*) และมะพร้าว (*Cocos nucifera*) และพัฒนาระบบนำส่งยาในรูปแบบโพลีเมอร์ไมเซลล์สำหรับสารธรรมชาติที่น่าสนใจในการต้านมะเร็ง

ผลการศึกษานี้ที่น่าสนใจอย่างยิ่งเมื่อพบว่าสารสกัดแยกส่วนในชั้นอะซิโตนของสิงหโมรา มีประสิทธิภาพดีเยี่ยมในการยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิด ได้แก่ มะเร็งปาก มะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ดื้อยา และมะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็กที่ดื้อยา (ค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งเซลล์มะเร็งร้อยละ 50 อยู่ระหว่าง 5 - 65 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และการศึกษาโดยเทคนิคเอบีทีเอสและเอพอาร์เอพบว่าสารสกัดสิงหโมราในชั้นอะซิโตนมีประสิทธิภาพสูงในการต้านอนุมูลอิสระ โดยให้ค่าทีเอค = 19.2 มิลลิโมล/มิลลิกรัม และอีซี = 19.2 มิลลิโมล/มิลลิกรัมตามลำดับ และผลการศึกษายังพบว่าสารสกัดจากสิงหโมราในความเข้มข้นสูงสุด (100 ไมโครกรัม/

มิลลิลิตร) ไม่มีพิษร้ายแรงต่อเซลล์ปกติ ส่วนการศึกษากลไกการต้านเซลล์มะเร็งโดยใช้โฟลไซโตเมทรีและข้อมเซลล์ด้วยโพรพิเดียมไอโอไดด์ พบว่าสารสกัดสิงหโมราในชั้นอะซิโตนยับยั้งวัฏจักรของเซลล์ในระยะจี2/เอ็ม และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะปอโทซิส สารโพลีฟีนอลมีบทบาทสำคัญในการออกฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งและต้านอนุมูลอิสระดังกล่าว การศึกษาโดยระบบโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงพบว่ารูทินเป็นสารสำคัญในสารสกัดสิงหโมราชั้นอะซิโตนเมื่อวิเคราะห์ถึงโครงสร้างทางโมเลกุลของสารพบว่ารูทินคือสารเคอร์เซทินไกล์โคไซด์ ทั้งรูทินและเคอร์เซทินมีประสิทธิภาพสูงในการต้านอนุมูลอิสระและต้านมะเร็ง นอกจากนี้แซนโทนเป็นสารสำคัญจากสารสกัดมังคุดที่มีคุณสมบัติที่น่าสนใจในการต้านอนุมูลอิสระและต้านมะเร็ง อย่างไรก็ตามค่าการละลายน้ำของสารออกฤทธิ์ดังกล่าวนี้ต่ำจึงส่งผลให้มีชีวประสิทธิผลต่ำ ในการศึกษาต่อมาได้นำระบบการนำส่งยาที่น่าสนใจในปัจจุบันซึ่งได้แก่การสร้างไมเซลล์ของโพลีเมอร์ชนิดโพลีเอททิลีนไกล์คอลโอลิโกคาโพรแลคโตน และโพลีเอททิลีนไกล์คอลโพลีไฮดรอกซิลโพรพิลเมทาไครลาไมด์ไดเลคเทท มาใช้เพื่อแก้ปัญหาการละลายน้ำ ผลการศึกษาพบว่าสามารถกักเก็บรูทินและเคอร์เซทินในโพลีเอททิลีนไกล์คอลโอลิโกคาโพรแลคโตน ไมเซลล์ได้สำเร็จ ค่าการละลายน้ำของรูทินและเคอร์เซทินเมื่อนำมากักเก็บในโพลีเอททิลีนไกล์คอลโอลิโกคาโพรแลคโตน ไมเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่แซนโทนสามารถกักเก็บในไมเซลล์ของโพลีเอททิลีนไกล์คอลโพลีไฮดรอกซิลโพรพิลเมทาไครลาไมด์ไดเลคเทท ไมเซลล์ได้ถึง 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อทดสอบความสามารถในการต้านมะเร็งพบว่าสารออกฤทธิ์ต้านมะเร็งที่กักเก็บในไมเซลล์มีฤทธิ์ดีเยี่ยมในการต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาวและมะเร็งปอดทั้งชนิดปกติและชนิดที่ดื้อต่ออารักษามะเร็ง ส่วนการศึกษากลไกการต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง สารออกฤทธิ์ต้านมะเร็งที่กักเก็บในไมเซลล์สามารถเหนี่ยวนำให้ยับยั้งวัฏจักรของเซลล์ในระยะจี2/เอ็ม หรือเกิดการตายแบบอะปอโทซิส

โดยสรุปสิงหโมราในชั้นอะซิโตนมีความน่าสนใจในการนำไปใช้ในเภสัชตำรับเพื่อรักษามะเร็ง รูทินเป็นสารหลักในสารสกัดสิงหโมราชั้นอะซิโตน โพลีเอททิลีนไกล์คอลโอลิโกคาโพรแลคโตน ไมเซลล์เป็นตำรับที่น่าสนใจอย่างยิ่งในการนำส่งรูทินและเคอร์เซทิน ในขณะที่โพลีเอททิลีนไกล์คอลโพลีไฮดรอกซิลโพรพิลเมทาไครลาไมด์ไดเลคเทท ไมเซลล์ก็น่าสนใจสำหรับนำส่งแซนโทน