

Thesis Title Cytotoxic Effect of Hyperthermia on Carcinogenesis

Author Mr. Bundit Boonsintai

M.Sc. Biochemistry

Examining Committee :

Assoc. Prof. Dr. Maitree Suttajit.....Chairman

Dr. Porn-Ngarm Limtrakul.....Member

Assist. Prof. Dr. Umnat Mevatee.....Member

Dr. Anchalee Pongchaidecha.....Member

Assoc. Prof. Dr. Vicharn Lorvidhaya.....Member

ABSTRACT

Cytotoxic effects of hyperthermia on cancer cells in vitro and in vivo system, independently and in conjunction with other modalities have not been clearly defined. The main purpose of this research was to study the cytotoxic effects of hyperthermic condition and its modulation either in vitro or in vivo model. Qualitative and quantitative assessment of the cytotoxicity of hyperthermia plus or minus 5-fluorouracil (5-FU) against human carcinoma cell line (KB cells) in vitro were performed. The result revealed that the percentage of cell survival and cellular proliferation were declined gradually after hyperthermia treatment at various thermal doses (40°C to 45°C, 1 to 3 h) in comparison with normothermia controlled cells. However, the cell line could develop thermotolerance state at priming heat dose of 42°C, 1 h, maximally at 1 to 2 h and began to decline after that. The KB cells synthesized M_r 200,000 heat-shock protein

within 2 h after the 40°C, 1 h heat-shocked treatment. Biochemical analysis indicated that hyperthermia (40°C, 1 h), 5-FU (10.0 µg/ml), and hyperthermia plus 5-FU treatments could inhibit DNA and protein synthesis in KB cells. The percentage of inhibition of DNA synthesis by hyperthermia, 5-FU, and hyperthermia plus 5-FU were 81.2 ± 6.9 , 45.6 ± 7.5 , and 87.0 ± 2.6 respectively. The percentage of inhibition of protein synthesis by hyperthermia, 5-FU, and hyperthermia plus 5-FU were 72.2 ± 4.3 , 53.3 ± 7.3 , and 87.6 ± 7.7 respectively. The results showed that the combination of hyperthermia and 5-FU increased the inhibitory effect on protein synthesis ($p < 0.05$), but however, did not significantly change DNA synthesis. The potentiating effect of hyperthermia on cytotoxicity by 5-FU may be clinically applied to reduce the dose of 5-FU and its side effect. Furthermore, these studies suggest that human carcinoma cells may be extremely sensitive to the cytotoxic effect of heat.

The studies on cytotoxicity of hyperthermia were also performed in vivo system in order to know how hyperthermia affects a chemically-induced tumourigenesis and carcinogenesis. Based on tumour initiation and tumour promotion, the two-stage carcinogenesis experiment on mouse skin was therefore performed by a single application of 100 µg 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) and followed by twice weekly application of 2.5 µg of 12-O-tetra-decanoylphorbol-13-acetate (TPA) through the experiment. The experimental mice were divided into eight groups (N=10 per group): chemical control, temperature control, DMBA

and TPA treatment under room temperature, DMBA and TPA treatment under hyperthermic condition (whole-body hyperthermia at 40°C, 20 min/day, 3 days/week) at the initiation stage, treatment at the promotion stage, treatment at the both stages, DMBA and TPA treatment after 1 week hyperthermia treatment, and localized hyperthermia treatment (43°C, 1 h/day, 3 days/week) at week 30 of tumour promotion. Tumour development on mouse skin in each group was determined as the percentage of tumour-bearing, the average number of tumour per mouse, and the average volume of tumour per mouse. The results demonstrated strong inhibitory effects of hyperthermia either on the tumour initiation or tumour promotion, as well as on the both stages. Therefore, chemical carcinogenesis could be prevented by hyperthermia. The molecular explanation of anti-tumour activity of hyperthermia on mouse skin carcinogenesis could be related with host-defense mechanism(s), for example, immunologically increases endogenous anti-cancer activities, and heat-shocked proteins synthesis.

In conclusion, in vitro hyperthermia exerts cytotoxic effects on KB cells, significantly potentiates the cytotoxic effect of 5-FU by inhibiting protein synthesis and in vivo hyperthermic conditions shows significant preventive effects on both the initiation and the promotion in chemical carcinogenesis on mouse skin.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลกระทบที่เป็นพิษต่อเซลล์ของภาวะไฮเปอร์เซอร์เมียในการ
เกิดมะเร็ง

ชื่อผู้เขียน นายบัณฑิต บุญศิลป์ไทย

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาชีวเคมี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. โมศรี สุทธิจิตต์.....ประธานกรรมการ

อ. ดร. พรงาม ลีมิตรกุล.....กรรมการ

ผศ. ดร. อานาจ มีเวที.....กรรมการ

อ. ดร. อัญชลี พงษ์ชัยเดชา.....กรรมการ

รศ. นพ. วิชาญ หล่อวิทยา.....กรรมการ

บทคัดย่อ

ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดถึงผลกระทบที่เป็นพิษต่อเซลล์ ของภาวะไฮเปอร์เซอร์เมีย
ประการเดียวและเมื่อใช้ร่วมกับปัจจัยอื่นๆ ที่มีต่อเซลล์มะเร็ง ทั้งในหลอดทดลองและสัตว์
ทดลอง งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาถึงผลกระทบที่เป็นพิษต่อเซลล์ ของภาวะไฮเปอร์เซอร์เมีย
และการควบคุมผลกระทบนั้น ทั้งการศึกษาในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง จากการประเมิน
ความเป็นพิษต่อเซลล์ ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ ของภาวะไฮเปอร์เซอร์เมีย เมื่อมีหรือ
ไม่มี 5-fluorouracil (5-FU) ในการต่อต้านเซลล์มะเร็ง KB ในหลอดทดลอง พบว่า
ร้อยละของการรอดชีวิต และการเพิ่มจำนวนเซลล์จะลดลงตามลำดับ หลังจากเซลล์ได้รับความ
ความร้อนมากขึ้น (40°C ถึง 45°C) และเวลานานขึ้น (1 ถึง 3 ชั่วโมง) เปรียบเทียบ
กับเซลล์ที่ไม่ได้รับความร้อน อย่างไรก็ตามเซลล์ KB จะสามารถเกิดภาวะทนต่อความร้อน
ได้ เมื่อผ่านการได้รับความร้อนครั้งแรก (42°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง) มาแล้ว การทน
ต่อความร้อนจะสูงที่สุดที่เวลา 1 ถึง 2 ชั่วโมง และเริ่มลดลงหลังจากนั้น เซลล์ KB
สามารถสังเคราะห์โปรตีนที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 200,000 ภายในเวลา 2 ชั่วโมง
หลังจากได้รับความร้อนที่ 40°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์ทางชีวเคมี
พบว่าภาวะไฮเปอร์เซอร์เมีย (40°C เวลา 1 ชั่วโมง), 5-FU (10.0 ไมโครกรัม/

มิลลิเมตร) และภาวะไฮเปอร์เซอร์เมียร่วมกับ 5-FU จะสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอและโปรตีนของเซลล์ KB ได้ โดยมีร้อยละของการยับยั้ง การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เป็น 81.2 ± 6.9 , 45.6 ± 6.5 และ 87.0 ± 2.6 ตามลำดับ ร้อยละของการยับยั้ง การสังเคราะห์โปรตีนเป็น 72.2 ± 4.3 , 53.3 ± 7.3 และ 87.6 ± 7.7 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า เมื่อใช้ภาวะไฮเปอร์เซอร์เมียร่วมกับ 5-FU จะเพิ่มสมรรถภาพในการ ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) การเพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์ ของภาวะไฮเปอร์เซอร์เมียโดย 5-FU นี้ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ ในทางการแพทย์ เพื่อลดปริมาณ 5-FU และผลข้างเคียงของยาได้ นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าความร้อน อาจส่งผลกระทบต่อเซลล์มะเร็ง เนื้อเยื่ออวัยวะชนิดต่างๆ ของมนุษย์ได้เช่นกัน

ได้มีการศึกษา ถึงผลกระทบที่เป็นพิษต่อเซลล์ ของภาวะไฮเปอร์เซอร์เมียต่อการ เกิดมะเร็ง โดยสารเคมี แบบสองขั้นตอน ในสัตว์ทดลอง การเกิดมะเร็ง แบบสองขั้นตอน ประกอบด้วย ขั้นตอนเริ่มต้นและขั้นส่งเสริม ทำได้โดยทาผิวหนังของหนูทดลองด้วยสาร 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) จำนวน 100 ไมโครกรัม ตามด้วยสาร 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) จำนวน 2.5 ไมโครกรัม เช่นกัน ทุกสองครั้งต่อสัปดาห์จนสิ้นสุดการทดลอง ได้แบ่งหนูทดลองเป็น 8 กลุ่ม (กลุ่มละ 10 ตัว) คือกลุ่มทดลองปกติ (อะซีโตน), กลุ่มทดลองปกติ (ไฮเปอร์เซอร์เมีย), กลุ่มที่ได้รับ DMBA และ TPA, กลุ่มที่ได้รับ DMBA และ TPA พร้อมกับการเหนี่ยวนำให้เกิด ภาวะไฮเปอร์เซอร์เมียที่ขั้นเริ่มต้น โดยให้ความร้อนแบบทั้งตัว ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 20 นาทีต่อวัน 3 วันต่อสัปดาห์, กลุ่มที่ได้รับ DMBA และ TPA และภาวะไฮเปอร์เซอร์เมีย ที่ขั้นส่งเสริม, กลุ่มที่ได้รับ DMBA และ TPA และภาวะไฮเปอร์เซอร์เมียทั้งสอง ขั้นตอนของการเกิดมะเร็ง, กลุ่มที่ได้รับภาวะไฮเปอร์เซอร์เมียเป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนที่ จะได้รับ DMBA และ TPA และกลุ่มที่ได้รับภาวะไฮเปอร์เซอร์เมีย แบบเฉพาะที่ที่อุณหภูมิ 43°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงต่อวัน 3 วันต่อสัปดาห์ หลังจากได้รับการส่งเสริมให้เกิด มะเร็งมาเป็นเวลา 30 สัปดาห์ ตรวจสอบการเกิดก้อนเนื้องอก ในหนูแต่ละกลุ่มโดย ดูจำนวนหนูที่มีก้อนเนื้องอก, จำนวนก้อนเนื้องอกต่อหนู 1 ตัว และปริมาตรเฉลี่ย ของก้อน เนื้องอกต่อหนู 1 ตัว ผลการวิจัยพบว่า ความร้อนมีผลดีทั้งในด้านการป้องกันการเกิด

มะเร็งและรักษา โดยความร้อนสามารถยับยั้งการเกิดมะเร็งได้ทั้งชั้นเริ่มต้น ชั้นส่งเสริม และทั้งสองขั้นตอนของการเกิดมะเร็ง ความร้อนจึงสามารถป้องกัน การเกิดมะเร็งจาก สารเคมีได้ ความสามารถในการต่อต้านการเกิดมะเร็งบนผิวหนังของหนูทดลอง โดยภาวะ ไฮเปอร์เทอร์เมียนี้ อาจเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเอง ของหนูทดลอง เช่น การ สร้างภูมิคุ้มกันต่อต้านมะเร็งและ การสร้าง heat-shocked protein ฯลฯ

โดยสรุปแล้ว ภาวะไฮเปอร์เทอร์เมียจะส่งผลกระทบต่อเซลล์มะเร็ง KB และยังกระตุ้นความเป็นพิษให้มากขึ้น เมื่อใช้ร่วมกับ 5-FU โดยที่ จะไปยับยั้ง การสังเคราะห์โปรตีน จากการศึกษาในหนูทดลอง ภาวะไฮเปอร์เทอร์เมียสามารถป้องกัน การเกิดมะเร็งเนื่องจากสารเคมี ได้ทั้งชั้นเริ่มต้นและชั้นส่งเสริม