

การเปรียบเทียบฤทธิ์ด้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง
ของยาต้านมะเร็งชนิดคาร์โบพลาตินที่ใช้ในการรักษามะเร็งปากมดลูก
Comparison of the anti-proliferative effects of carboplatin anticancer
drugs used for cervical cancer treatment

คมศิลป์ พลแดง^{1*}, ธนเศรษฐ์ เสนาวงศ์²

Komsil Pholdaeng^{1*}, Thanaset Senawong²

¹ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด

²สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

¹Department of Science and Technology, Faculty of Liberal Arts and Science,
Roi Et Rajabhat University

²Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University

*Corresponding author: kpholdaeng@reru.ac.th

Received: February 23, 2025; Revised: March 16, 2025; Accepted: March 28, 2025

Abstract

Cancer is a genetic material abnormality and a major problem cause of death in many countries. Cervical cancer is the third most common in Thai women following breast and colorectal cancers, respectively. Human papilloma virus (HPV) infection is a major cause of cervical cancer, transmitted through sexual contact. Nowadays, HPV vaccines can effectively protect the viral epidemics, but many problems regarding the use and distribution still exist. Chemotherapy plays a major role in standard treatment to inhibit cancer cell growth. However, it has the disadvantages of inducing drug resistance and producing unwanted side effects in patients. The objective of this research was to evaluate the potential anticancer activity of carboplatin against human cervical cancer cells (HeLa cells). Antiproliferative activity of carboplatin was determined at exposure times of 24, 48 and 72 h using MTT assay. The results showed that carboplatin inhibited the growth of HeLa cells with half maximal inhibitory concentrations (IC₅₀ values) of more 400, 244.96 ± 3.33 and 97.60 ± 3.63 μM at 24, 48 and 72 h exposures, respectively. In conclusion, carboplatin exhibited antiproliferative activity against HeLa cells in a dose- and time-dependent manner. This study helps in the design of drug treatments or chemotherapy programs to control cervical cancer cells and reduce side effects in patients.

Keywords: Cervical cancer; Carboplatin; Chemotherapy; MTT assay

บทคัดย่อ

มะเร็งเป็นความผิดปกติของสารพันธุกรรม เป็นปัญหาการเสียชีวิตในหลายประเทศ ผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูกในผู้หญิงไทยจัดเป็นอันดับที่ 3 รองจากมะเร็งเต้านมและมะเร็งลำไส้ การติดเชื้อไวรัสฮิวแมนพาปิลโลมา (เอชพีวี) เป็นสาเหตุหลักของการก่อโรค แพร่ระบาดทางเพศสัมพันธ์ ปัจจุบันวัคซีนเอชพีวีมีประสิทธิภาพสูงในการป้องกัน แต่พบปัญหาในการนำไปใช้และการกระจาย การรักษาด้วยยาเคมีบำบัดเป็นวิธีมาตรฐานเพื่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ซึ่งมีข้อเสียในการเหนี่ยวนำการดื้อยาและส่งผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ต่อสุขภาพของผู้ป่วย วัตถุประสงค์การวิจัยเพื่อประเมินศักยภาพของยาคาร์โบพลาติน (Carboplatin) ในการต้านเซลล์มะเร็งปากมดลูก โดยทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 h ด้วยวิธีทดลอง MTT assay ผลการทดลองพบว่าคาร์โบพลาตินมีฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ร้อยละ 50 มีค่าความเข้มข้นของยาคาร์โบพลาติน มากกว่า $400, 244.96 \pm 3.33$ และ $97.60 \pm 3.63 \mu\text{M}$ เมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 h ตามลำดับ สรุปได้ว่าคาร์โบพลาตินมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกขึ้นกับความเข้มข้นของยาและระยะเวลาที่ใช้ทดสอบ การศึกษารังนี้ช่วยในการออกแบบการรักษาด้วยยาหรือโปรแกรมเคมีบำบัดเพื่อควบคุมเซลล์มะเร็งปากมดลูกและลดผลข้างเคียงในผู้ป่วย

คำสำคัญ: มะเร็งปากมดลูก; คาร์โบพลาติน; การรักษาด้วยยาเคมีบำบัด; วิธี MTT

บทนำ

โรคมะเร็งเป็นความผิดปกติของสารพันธุกรรม ปัจจุบันพบว่าเป็นสาเหตุการเสียชีวิตของประชากรในหลายประเทศ เป็นอันดับต้นๆ และมีแนวโน้มว่าจำนวนผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตจะเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ ในทุกปี โดยองค์การระหว่างประเทศเพื่อการวิจัยโรคมะเร็ง (International Agency for Research on Cancer; IARC) เปิดเผยรายงานประจำปี พ.ศ.2561 ชี้ว่ามีผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่เพิ่มขึ้นเป็น 18.1 ล้านคนทั่วโลก และมียอดผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งพุ่งสูงถึง 9.6 ล้านคน นอกจากนี้ยังมีการคาดการณ์ว่าประมาณปี 2040 จะมีผู้ป่วยโรคมะเร็งรายใหม่มากถึง 29.3 ล้านคน และอัตราการเสียชีวิตจะพุ่งสูงขึ้นเป็น 16.3 ล้านคน (Bray et al., 2018) ประเทศไทย ในปี 2563 มีรายงานการเสียชีวิตของคนไทยจากสาเหตุโรคมะเร็ง ใน 5 อันดับแรก ได้แก่ มะเร็งตับ 14.4% มะเร็งปอด 12.4% มะเร็งเต้านม 11.6% มะเร็งลำไส้ 11.1% และ มะเร็งปากมดลูก 4.8% (Sung et al., 2021) ดังนั้นจะเห็นว่ามะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งชนิดหนึ่งที่เป็นสาเหตุการเสียชีวิตของผู้หญิงไทยในลำดับต้น ๆ โดยพบว่า 99.7% ของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกมีสาเหตุหลักเกิดจากการติดเชื้อไวรัสชนิด Human papilloma virus (HPV) ที่แพร่ระบาดได้ผ่านทางเพศสัมพันธ์ (Okunade, 2020) แม้ว่าปัจจุบันจะมีวัคซีนต้านเชื้อไวรัสที่มีประสิทธิภาพ (Lei et al., 2020; Aggarwal et al., 2023) แต่ปัญหาการติดเชื้อไวรัส HPV และการก่อโรค ก็ยังคงสร้างปัญหาด้านสาธารณสุขในหลายประเทศ โดยเฉพาะกลุ่มประเทศกำลังพัฒนาและประเทศแถบแอฟริกา ทั้งนี้เพราะการใช้วัคซีนดังกล่าวเพื่อการป้องกันโรคและลดการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส HPV ในกลุ่มประเทศดังกล่าว ยังคงมีข้อจำกัด เนื่องจากพบปัญหา

และอุปสรรคหลายประการในการใช้วัคซีนและการกระจายวัคซีน เช่น วัคซีนมีราคาแพง ความยากลำบากของการขนส่งเพื่อการกระจายวัคซีนไปยังโรงพยาบาลหรือสถานบริการสุขภาพ เป็นต้น (Burmeister et al., 2022) ดังนั้นจึงทำให้ปัญหาโรคมะเร็งปากมดลูก ยังคงเป็นปัญหาด้านสาธารณสุขในหลายประเทศ ผู้ป่วยโรคมะเร็งส่วนใหญ่จะเสียชีวิตอย่างรวดเร็วหลังจากตรวจพบว่าเป็นมะเร็ง เนื่องจากวิถีตรรวินิจฉัยโรคในระยะเริ่มแรกของการเป็นโรคมะเร็งปากมดลูกยังไม่มีวิธีการที่แม่นยำในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูกด้วยวิธีการใช้ยาเคมีบำบัด (Chemotherapy) มักทำร่วมกับการผ่าตัดหรือการฉายรังสีเพื่อยืดอายุผู้ป่วย ปัจจุบันพบว่าการใช้ยาเคมีบำบัดเป็นวิธีการหลักในการรักษาโรคมะเร็งปากมดลูก ได้ก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยาของโรคมะเร็งและยายังส่งผลเสียต่อสุขภาพและอาการข้างเคียงกับผู้ป่วยที่ได้รับการรักษา (Akhlaghi et al., 2020) ดังนั้นการพัฒนาวิธีการรักษาใหม่ๆ รวมทั้งการค้นหาดัวยาใหม่ๆ จึงยังคงมีความจำเป็นสำหรับการรับมือและการแก้ปัญหาดังกล่าวข้างต้น

เนื่องจากการรักษาโรคมะเร็ง ยังคงใช้ยาเคมีบำบัดเป็นวิธีการหลัก ที่เป็นมาตรฐานสำหรับการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูก ปัจจุบันพบทั้งแบบใช้ยาเดี่ยว (Single drug treatment) หรือนำยาเดี่ยวจากหลายกลุ่มมาใช้ร่วมกัน (Combination drug treatment) ทั้งนี้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา ลดระดับความเป็นพิษของยาแต่ละชนิด ทำให้ผลการรักษาดีขึ้น และลดโอกาสการดื้อยาของโรคมะเร็งด้วย ตัวอย่างของยาที่นิยมใช้ในการรักษาโรคมะเร็งปากมดลูกในปัจจุบัน ได้แก่ 5-ฟลูออโรยูราซิล (5-Fluorouracil) ซิสพลาติน (Cisplatin) และ คาร์โบพลาติน (Carboplatin) เป็นต้น (Regalado Porras et al., 2018)

5-ฟลูออโรยูราซิล เป็นยาเคมีบำบัด ชนิด Antineoplastic antimetabolite ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นให้โครงสร้างทางเคมีคล้ายเบสไพริมิดีน (Pyrimidine analog) กลไกการออกฤทธิ์จะไปขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Thymidylate synthase ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน Deoxyuridine monophosphate (dUMP) ไปเป็น Deoxythymidine monophosphate (dTMP) โดยตัวยาคจะทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนชนิด Ternary complex ของการจับกันระหว่าง 1) 5-Fluorouracil 2) dUMP 3) Folate cofactor (5,10-methylenetetrahydrofolate) และ 4) Thymidylate synthase เป็นสาเหตุให้เอนไซม์ไม่สามารถทำการสังเคราะห์ Thymidylate จากเบสยูราซิล (Uracil) ส่งผลให้เกิดการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ DNA และ RNA และทำให้เซลล์ตายแบบ Apoptosis ในที่สุด นอกจากนี้ ตัวยายังสามารถแทรกเข้าไปในสาย RNA โดยแทนที่นิวคลีโอไทด์ (Nucleotide) ชนิด Uridine triphosphate (UTP) ส่งผลให้ได้สาย RNA ที่มีความผิดปกติ จึงมีผลให้ไปรบกวนกระบวนการ RNA processing และการสังเคราะห์โปรตีน ซึ่งนำไปสู่การตายของเซลล์ (Longley et al., 2003)

ซิสพลาติน เป็นยาเคมีบำบัด ชนิด Antineoplastic alkylating agent ภายในโครงสร้างประกอบด้วยธาตุแพลทินัม (Platinum, Pt) กลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์สารพันธุกรรมชนิดดีเอ็นเอ โดยตัวยาคจะเติมหมู่แอลคิล (Alkyl group) จากปฏิกิริยา Alkylation ลงบนสายนิวคลีโอไทด์ เกิดการสร้างพันธะชนิดโควาเลนต์ระหว่างธาตุแพลทินัมกับเบสกวีนิน (Guanine base) บนสายนิวคลีโอไทด์ เหนียวนาให้เกิดความผิดปกติภายในสายดีเอ็นเอ ชนิดโครงสร้างโมโนแอตตัก

(Monoadduct) ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดการแตกหักของโมเลกุลดีเอ็นเอ (DNA fragmentation) จากการทำงานของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ซ่อมแซมดีเอ็นเอ เพื่อป้องกันการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและการถอดรหัส RNA จากสาย DNA ที่มีโครงสร้างหรือลำดับเบสที่ผิดปกติหรือมีการเปลี่ยนแปลง ตัวยาายังทำลายดีเอ็นเอโดยทำให้เกิดการเชื่อมต่อนระหว่างอะตอมภายในสายดีเอ็นเอ (DNA crosslinking) ที่ผิดปกติ ทำให้ไม่เกิดการแยกคู่สายดีเอ็นเอออกจากกันในช่วงขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอหรือการถอดรหัสทางพันธุกรรม นอกจากนี้ยาชนิดนี้ยังเหนี่ยวนำให้เกิดการเข้าสู่สมของเบสนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ถูกต้อง ทำให้เกิดการผ่าเหล่า (Mutation) ซึ่งจะถูกกำจัดในลำดับต่อมา (Dasari & Bernard Tchounwou, 2014)

คาร์โบพลาติน เป็นยาเคมีบำบัด ชนิด Organoplatinum antineoplastic alkylating agent กลไกออกฤทธิ์ในการยับยั้งการสังเคราะห์สารพันธุกรรมทั้งชนิด DNA และ RNA ด้วยชนิดนี้ถูกพัฒนาและสังเคราะห์ขึ้นจากการดัดแปลงโครงสร้างให้เป็นสารอนาล็อก (Analog) คล้ายกับยาซิสพลาติน เพื่อช่วยลดอาการข้างเคียงด้านภาวะแทรกซ้อนทางไต (Nephrotoxicity) และ ลดอาการอาเจียน (Vomiting) กลไกการออกฤทธิ์ของตัวยาก่อเกิดจากการเติมหมู่แอลคิล (Alkyl group) จากปฏิกิริยา Alkylation ลงบนสายนิวคลีโอไทด์ เกิดการสร้างพันธะระหว่างธาตุแพลทินัมกับเบสกวานีนจำนวน 2 เบส บนสายนิวคลีโอไทด์ อาจเป็นการเชื่อมจับกันภายในสาย (Intrastrand crosslink) หรือระหว่างสาย (Interstrand crosslink) เหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติภายในสายดีเอ็นเอ ที่จะเป็สาเหตุทำให้เกิดการแตกหักของโมเลกุลดีเอ็นเอ จากการทำงานของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ซ่อมแซมดีเอ็นเอ นอกจากนี้ยาคาร์โบพลาตินยังทำให้เกิดการเชื่อมต่อนระหว่างสายดีเอ็นเอ (DNA crosslinking) ที่ผิดปกติ โดยจะเข้าจับกับเบสบนสายดีเอ็นเอของสายหนึ่งแล้วเชื่อมต่อกับเบสของดีเอ็นเออีกสาย เป็นการป้องกันไม่ให้เกิดการแยกคู่สายดีเอ็นเอออกจากกันในช่วงขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอหรือการถอดรหัสพันธุกรรม (Transcription) สุดท้ายเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งในลำดับต่อมา

เนื่องจากยาที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งปามดลูกมีหลากหลายชนิดและมีหลากหลายของกลไกในการออกฤทธิ์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาประสิทธิภาพของยาคาร์โบพลาตินเปรียบเทียบกับยาชนิดอื่น ซึ่งได้ศึกษามาก่อนหน้านี้ ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตหรือการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปามดลูกในระดับหลอดทดลอง (*in vitro* experiment) ซึ่งผลการวิจัยครั้งนี้คาดหวังว่าจะมีประโยชน์ต่อการนำข้อมูลที่ได้ ไปใช้เพื่อเลือกชนิดของยาที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้บำบัดรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งปามดลูกในระยะต่าง ๆ ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปามดลูก ชนิด HeLa cells

เซลล์มะเร็งปามดลูก (HeLa, ATCC, Manassas, VA, USA) ถูกเพาะเลี้ยงภายในภาชนะเพาะเลี้ยง (Tissue culture flask) ขนาดความจุ 25 cm³ ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI-1640 (Gibco-BRL, Switzerland) ที่มี 10% Fetal bovine serum (FBS) (Gibco-BRL, U.S.A.) และ 1% Antibiotic (100 µg/ml Penicillin, และ 100 µg/ml Streptomycin, Gibco-BRL, U.S.A.) ปริมาตร 3 ml โดยทำการกระจายเซลล์อย่างสม่ำเสมอภายในภาชนะเพาะเลี้ยง เซลล์มีความหนาแน่น (Confluency) ประมาณ 60% แล้วทำการบ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 °C และ ภายใต้สภาวะ

5% CO₂ ทั้งนี้เซลล์จะถูกนำมาขยายใหม่ (Subculture) ลงในภาชนะเพาะเลี้ยงใหม่ เมื่อเซลล์มีความหนาแน่น 80-90% ใช้เวลาประมาณ 24-72 h เซลล์จะถูกเพาะเลี้ยงเพื่อรอการนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป รูปร่างของเซลล์มะเร็งปากมดลูก ชนิด HeLa cells ดังแสดงใน Figure 1 (A)

การเตรียมยาที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ยาคาร์โบพลาติน (MW 371.25 g/mol, Sigma, U.S.A.) นำไปชั่งน้ำหนัก ด้วยเครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง ลงในหลอด Microtube ขนาด 1.5 ml จากนั้นละลายผงยาด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เก็บไว้เป็นสารละลายเข้มข้น (Stock solution) เพื่อใช้ในการเจือจาง (Dilution) ในลำดับต่อไป โดยจะเตรียมความเข้มข้นสุดท้าย เพื่อการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 และ 400 μ M ตามลำดับ และใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวควบคุม (Solvent control) โครงสร้างของยา Carboplatin ดังแสดงใน Figure 1 (B)

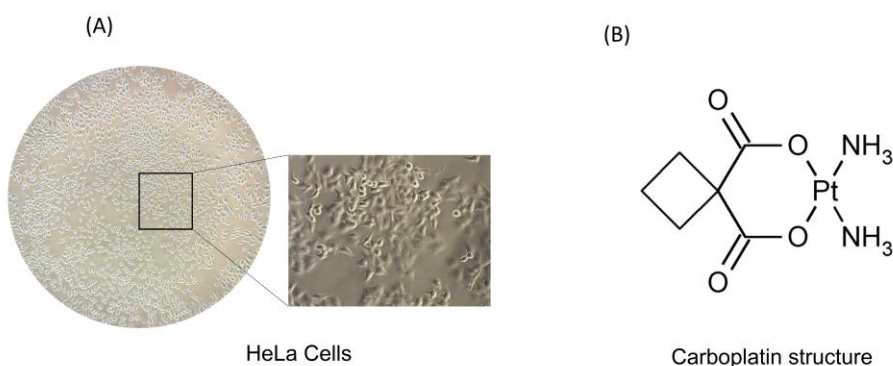


Figure 1 HeLa cells morphology (A) and Carboplatin structure (B)

การทดสอบฤทธิ์การเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกด้วยวิธี MTT assay

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของยา ภายหลังเติมยาคาร์โบพลาติน ที่ระดับต่าง ๆ ของความเข้มข้นสุดท้าย เป็นระยะเวลา 24 48 และ 72 h (Exposure time) จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิต (Viability cell, %) ด้วยวิธี MTT assay วิธีนี้อาศัยหลักการวัดค่าการดูดกลืนแสงของการเปลี่ยนสีของสารละลาย MTT (Invitrogen, USA) จากการทำงานของเอนไซม์ Mitochondrial reductase ที่อยู่ในเซลล์ที่มีชีวิต อาศัยปฏิกิริยารีดักชัน ในการรีดิวซ์สาร MTT ที่มีสีเหลือง ให้เปลี่ยนเป็นผลึก Formazan ในรูปสารออกซิไดซ์ ที่มีสีม่วง มีสมบัติละลายในตัวทำละลาย ชนิด Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, Inc., U.S.A.) เกิดเป็นสารละลายสีม่วง ความเข้มของสีม่วงที่เพิ่มขึ้นจะแปรผันตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต จากการเตรียมยาที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และระยะเวลาต่างๆ จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิต ผ่านการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายสีม่วง ที่ความยาวคลื่น 570 nm วิธีทำการทดลองเริ่มจากนำเซลล์ HeLa มาเพาะเลี้ยงใน 96-well plate มีความหนาแน่น 8,000 cells/well/100 μ l รวมทั้งหมด 3 ชุดการทดลอง นำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 h จากนั้นนำเซลล์มาทดสอบฤทธิ์ ความเป็นพิษต่อเซลล์ของ

ยาкарโบพลาคิน ที่ช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ได้แก่ 24, 48 และ 72 h ตามลำดับ โดยจะทดสอบที่ระดับความเข้มข้นสุดท้ายของยา เท่ากับ 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 และ 400 μM นำทั้ง 3 ชุดการทดลอง ไปบ่มเป็นช่วงระยะเวลา 24, 48 และ 72 h โดยมีตัวควบคุมเป็นน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เมื่อบ่มครบตามช่วงระยะเวลาที่กำหนด แต่ละชุดการทดลองจะนำออกมาเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นอาหารใหม่ที่มีการเติมสารละลาย 1.2 mM MTT ที่ละลายใน 1X PBS เติมปริมาตร 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 2 h 30 min จากนั้นดูดสารละลาย MTT ทิ้งไป แล้วเติมตัวทำละลาย DMSO ปริมาตร 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ เพื่อละลายผลึก Formazan ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 min ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 570 nm และ ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ 655 nm ด้วยเครื่องไมโครเพอร์ทีดเดอร์ (Microplate reader) แล้วคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิต (Cell viability, %) (Liu et al., 1999) จากสมการ

$$\text{Cell viability, \%} = \frac{(A570_{\text{sample}} - A655_{\text{sample}})}{(A570_{\text{solvent control}} - A655_{\text{solvent control}})} \times 100$$

A570 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm

A655 คือ ค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 655 nm

การวิเคราะห์ข้อมูล

ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (Statistical analysis) จะแสดงเป็นค่าเฉลี่ยบวกลบค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Mean $\pm$ S.E.M.) ซึ่งคำนวณมาจากค่าที่ได้จากผลการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ที่ทดสอบในแต่ละครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน (Independent experiments) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้ One-Way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มพรีตเมนต์ด้วยวิธี Duncan's test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 29.0 เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลอง แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าความเข้มข้นของยาที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ที่เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่รอดชีวิต เท่ากับ 50 หรือ ค่า IC_{50} จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิต (แกน Y) กับ ระดับความเข้มข้นของยา (แกน X) ทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบค่า IC_{50} กับยา 5-ฟลูออโรยูราซิลและซิสพลาติน ที่ผู้วิจัยได้ทดลองและได้รายงานเอาไว้ก่อนหน้านี้

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของยาкарโบพลาคิน ที่ระดับความเข้มข้น 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 และ 400 μM โดยให้กลุ่มควบคุมมีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิต เท่ากับ 100 พบว่า ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 h มีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตลดลงตามลำดับอย่างต่อเนื่อง เมื่อทดสอบเป็นระยะเวลานานขึ้น แสดงให้เห็นความสัมพันธ์แบบแปรผันโดยตรงกับเวลา ขณะเดียวกันในแต่ละระดับความเข้มข้นพบว่าเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตลดลงตามลำดับอย่างต่อเนื่อง เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของยาให้สูงขึ้น แสดงให้เห็นความสัมพันธ์แบบแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของยาที่ใช้ ดังแสดงใน Figure 2 ค่า IC_{50} ของความเข้มข้นของยาที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก

ชนิด HeLa cells ได้เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่รอดชีวิต เท่ากับ 50 มีค่าความเข้มข้นของยาकारิโบพลาตินมากกว่า 400, 244.96 ± 3.33 และ 97.60 ± 3.63 μM เมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 h ตามลำดับ

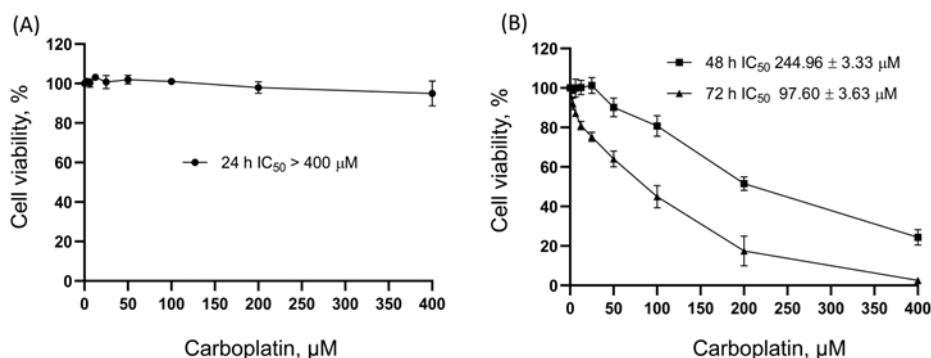


Figure 2 Antiproliferative effects of carboplatin against HeLa cells. HeLa cells were treated with various concentrations of carboplatin (0-400 μM) for 24 h (A), 48 and 72 h (B). The percentage of cell viability was calculated relative to the solvent control treatment. The data showed mean $\pm$ S.E.M. from two to three independent experiments.

การวิเคราะห์ค่า IC_{50} ของยาकारิโบพลาติน ที่ช่วงเวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับค่า IC_{50} ของยา 5-ฟลูออโรยูราซิล และซิสพลาติน ที่ทีมผู้วิจัยได้ทดลองและได้รายงานเอาไว้ก่อนหน้านี้ ดังรายละเอียดที่แสดงใน Table 1 จะพบว่า ที่เวลา 24 h ยาซิสพลาตินจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ผลดีกว่ายาकारิโบพลาตินและ 5-ฟลูออโรยูราซิล ขณะที่เวลา 48 และ 72 h ยาकारิโบพลาตินจะออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกดีกว่ายาซิสพลาตินและ 5-ฟลูออโรยูราซิล เนื่องจากกลไกการออกฤทธิ์ของยาทั้งสามชนิดนี้มีฤทธิ์ไปยับยั้งหรือขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์สารพันธุกรรมภายในเซลล์ ที่เกิดขึ้นในระยะ S phase ที่มีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจำนวนมากสำหรับใช้ในการแบ่งเซลล์ และเนื่องจากระยะ S phase อยู่ถัดจากระยะ G1 phase (ใช้เวลานาน ประมาณ 23-24 h) การทดลองจึงเห็นฤทธิ์ของยาทั้งสามชนิดนี้ ออกฤทธิ์การยับยั้งเซลล์เมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 48 และ 72 h ยาซิสพลาติน และ 5-ฟลูออโรยูราซิล มีประสิทธิภาพที่สูงกว่าและออกฤทธิ์ได้เร็วกว่ายาकारิโบพลาติน จากการศึกษและเปรียบเทียบค่า IC_{50} จะพบว่ายาकारิโบพลาตินมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกต่ำกว่ายาซิสพลาติน และ 5-ฟลูออโรยูราซิล ทั้ง 3 ระยะเวลา โดยมีค่า IC_{50} ของยาकारิโบพลาติน มากกว่า 400, 244.96 และ 97.60 μM เมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 h ตามลำดับ

Table 1 IC₅₀ values of carboplatin, Cisplatin and 5-Fluorouracil treatment against HeLa cells for 24, 48 and 72 h exposures. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M.

Exposure time (h)	IC ₅₀ , μ M		
	Carboplatin	Cisplatin (Ref.)	5-Fluorouracil (Ref.)
24	> 400 ^a	34.61 $\pm$ 0.86 ^c	> 200 ^b
48	244.96 $\pm$ 3.33 ^a	12.51 $\pm$ 1.16 ^b	16.49 $\pm$ 3.04 ^b
72	97.60 $\pm$ 3.63 ^a	8.27 $\pm$ 2.20 ^b	2.91 $\pm$ 0.12 ^b

Note: Comparison of means used a statistically significant difference ($p < 0.05$) by One-Way ANOVA and multiple comparison by Duncan's test. Different superscript letters indicate statistically significant differences between the treatments in horizontal values.

ค่า IC₅₀ ของยาคาร์โบพลาติน จากการศึกษาของ Zon et al. (2025) ได้ศึกษาฤทธิ์ของยาคาร์โบพลาตินต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก ได้ค่าความเข้มข้น มากกว่า 400, 226.51 $\pm$ 2.84 และ 76.06 $\pm$ 3.48 μ M เมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 h ตามลำดับ ซึ่งค่า IC₅₀ ที่หาได้ในครั้งนี้ใกล้เคียงกับการศึกษาโดย Zon และคณะ ซึ่งสอดคล้องกันว่า ที่ระยะเวลา 24 h ยาคาร์โบพลาตินไม่ส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก จากรายงานของ Adams & Meade (2020) พบฤทธิ์ของยาคาร์โบพลาตินต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก ได้ค่า IC₅₀ ระดับความเข้มข้น 71.2 $\pm$ 4.9 μ M ในช่วงระยะเวลา 72 h โดยค่าที่รายงานต่ำกว่าการศึกษาครั้งนี้ (97.60 $\pm$ 3.63 μ M) และ รายงานฤทธิ์ของยาซิสพลาติน ที่ค่า IC₅₀ ระดับความเข้มข้น 14.7 $\pm$ 1.2 μ M ในช่วงระยะเวลา 48 h ซึ่งค่าที่รายงานใกล้เคียงกับงานวิจัยในครั้งนี้ (12.51 $\pm$ 1.16 μ M) ซึ่งค่า IC₅₀ ในช่วงระยะเวลา 72 h ในครั้งนี้มีค่าสูงกว่า อาจเป็นผลเนื่องจากความแปรปรวนในการทดลอง เช่น จำนวนเซลล์ที่ใช้ทดสอบ การเตรียมช่วงของความเข้มข้นของยาเพื่อทดสอบที่ต่างกัน สภาวะสิ่งแวดล้อมของการทดสอบในหลอดทดลอง จำนวนเซลล์ที่ใช้ทดสอบ เป็นต้น ตัวแปรเหล่านี้ล้วนมีผลต่อการเปรียบเทียบค่า IC₅₀ ที่อาจจะส่งผลให้ได้ค่าที่แตกต่างกัน (Ghasemi et al., 2021) นอกจากนี้จากรายงานของ Adams และ Meade พบว่ายาคาร์โบพลาตินมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cells) น้อยกว่ายาซิสพลาติน (Adams & Meade, 2020) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในครั้งนี้

Zhong et al. (2013) ได้รายงานฤทธิ์ของยาคาร์โบพลาติน ในการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งปากมดลูก ชนิด SiHa และ CaSki Human cervical cancer cell lines พบว่ายาคาร์โบพลาตินไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Ribonucleotide reductase ที่เร่งปฏิกิริยารีดักชันในการเปลี่ยนไรโบนิวคลีโอไทด์ ไปเป็นดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ ซึ่งไรโบนิวคลีโอไทด์และดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ เป็นหน่วยโครงสร้างพื้นฐาน (Building block) สำหรับการสังเคราะห์ RNA และ DNA ตามลำดับและมีความสำคัญต่อกระบวนการซ่อมแซม DNA ในเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด (Zhong et al., 2013)

การศึกษาในมะเร็งรังไข่ (Ovarian cancer cell) ชนิด OVCAR-3 cells พบว่ายาคาร์โบพลาติน ที่ความเข้มข้น 20 และ 50 μM ภายในระยะเวลา 24 h จะไปยับยั้ง Cell cycle ที่ระยะ G0/G1 phase และเหนี่ยวนำทำให้เซลล์เกิดการตายแบบ Apoptosis (Zhou et al., 2018) ซึ่งระยะ G0 phase เป็นระยะที่เซลล์ออกจากวัฏจักรเซลล์เพื่อหยุดพัก (Quiescent cells) หรือเป็นเซลล์ชรา/เสื่อมสภาพ (Senescent cells) ทั้งนี้เซลล์ระยะพักอาจกลับเข้าสู่ระยะ G1 phase ได้ (ที่ระยะ G1 จะมีการสังเคราะห์โปรตีนและเอนไซม์สำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในระยะเวลา S phase และเตรียมความพร้อมสำหรับการแบ่งเซลล์) ระยะ G1 นี้เซลล์จะอยู่เป็นเวลานานที่สุด ประมาณ 23-24 h ดังนั้นผลการทดลองครั้งนี้จึงพบว่ายาคาร์โบพลาติน ซึ่งเป็นยาชนิด Organoplatinum antineoplastic alkylating agent ที่มีกลไกออกฤทธิ์ในการยับยั้งการสังเคราะห์สารพันธุกรรม ทั้งชนิด DNA และ RNA ของเซลล์ ไม่แสดงฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ระยะเวลา 24 h ดังแสดงค่า IC_{50} ที่มากกว่า 400 μM แต่จะพบฤทธิ์การยับยั้งที่ระยะเวลา 48 และ 72 h ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เซลล์เข้าสู่ระยะ S phase เป็นจำนวนมาก เพื่อเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์สารพันธุกรรม ดังนั้นจึงเห็นว่ายาคาร์โบพลาตินออกฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็ง ที่ระยะเวลา 48 และ 72 h แสดงค่า IC_{50} ที่สูง เท่ากับ 244.96 μM และ 97.60 μM ที่ระยะเวลา 48 และ 72 h ตามลำดับ จากการศึกษาฤทธิ์ของยาต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตหรือการฆ่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกในครั้งนี้จะพบว่า ยา 5-ฟลูออโรยูราซิล หรือ ยาซิสพลาตินมีฤทธิ์การยับยั้งสูงที่สุด ที่ระยะเวลา 48 และ 72 h ($p > 0.05$) ซึ่งนักวิจัยอาจจะพิจารณานำไปใช้สำหรับเป็น positive control เทียบกับตัวยานชนิดอื่นๆ ที่ต้องการศึกษาฤทธิ์การฆ่าเซลล์มะเร็ง

สรุปผลการวิจัย

ยาคาร์โบพลาตินมีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก ที่ระดับ IC_{50} ความเข้มข้น มากกว่า 400, 244.96 ± 3.33 และ 97.60 ± 3.63 μM เมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 h ตามลำดับ ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกของยาคาร์โบพลาตินมีลักษณะขึ้นกับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้เพื่อควบคุมการแพร่กระจายหรือกำจัดเซลล์มะเร็งปากมดลูก เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกกับยาซิสพลาติน และ 5-ฟลูออโรยูราซิล ทั้ง 3 ระยะเวลา พบว่ายาคาร์โบพลาตินมีฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งน้อยที่สุด การวิจัยครั้งนี้มีประโยชน์ต่อการนำข้อมูลระดับความเข้มข้นของยาคาร์โบพลาติน ซิสพลาติน และ 5-ฟลูออโรยูราซิล ไปใช้สำหรับการออกแบบโปรแกรมการรักษาหรือควบคุมเซลล์มะเร็งปากมดลูก เพื่อลดปัญหาการเกิดการดื้อยาของเซลล์มะเร็งและลดผลของอาการข้างเคียงในผู้ป่วยระหว่างการรักษา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนวิจัย National Science Research and Innovation Fund (Fundamental Fund-2567)

เอกสารอ้างอิง

- Adams, C. J., & Meade, T. J. (2020). Gd(III)–Pt(IV) theranostic contrast agents for tandem MR imaging and chemotherapy. *Chemical Science*, 11(9), 2524–2530.
<https://doi.org/10.1039/C9SC05937G>
- Aggarwal, S., Agarwal, P., & Singh, A. K. (2023). Human papilloma virus vaccines: A comprehensive narrative review. *Cancer Treatment and Research Communications*, 37, 100780. <https://doi.org/10.1016/j.ctarc.2023.100780>
- Akhlaghi, E., Lehto, R. H., Torabikhah, M., Sharif Nia, H., Taheri, A., Zaboli, E., & Yaghoobzadeh, A. (2020). Chemotherapy use and quality of life in cancer patients at the end of life: An integrative review. *Health and Quality of Life Outcomes*, 18(1), 332. <https://doi.org/10.1186/s12955-020-01580-0>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Burmeister, C. A., Khan, S. F., Schäfer, G., Mbatani, N., Adams, T., Moodley, J., & Prince, S. (2022). Cervical cancer therapies: Current challenges and future perspectives. *Tumour Virus Research*, 13, 200238. <https://doi.org/10.1016/j.tvr.2022.200238>
- Dasari, S., & Bernard Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, 364–378.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12827.
<https://doi.org/10.3390/ijms222312827>
- Lei, J., Ploner, A., Elfström, K. M., Wang, J., Roth, A., Fang, F., Sundström, K., Dillner, J., & Sparén, P. (2020). HPV Vaccination and the risk of invasive cervical cancer. *New England Journal of Medicine*, 383(14), 1340–1348.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1917338>
- Liu, Y., Tergaonkar, V., Krishna, S., & Androphy, E. J. (1999). Human papillomavirus type 16 E6-enhanced susceptibility of L929 cells to tumor necrosis factor alpha correlates with increased accumulation of reactive oxygen species. *The Journal of biological chemistry*, 274(35), 24819–24827.
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.35.24819>

- Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 330–338.
<https://doi.org/10.1038/nrc1074>
- Okunade, K. S. (2020). Human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 40(5), 602–608.
<https://doi.org/10.1080/01443615.2019.1634030>
- Regalado Porras, G. O., Chávez Noguera, J., & Poitevin Chacón, A. (2018). Chemotherapy and molecular therapy in cervical cancer. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy*, 23(6), 533–539.
<https://doi.org/10.1016/j.rpor.2018.09.002>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Zhong, H., Jin, G., Qi, H., Lou, M., Liu, X., Qu, Y., Zhao, L., Zhang, W., Shao, J., & Zhao, J. (2013). Gemcitabine and carboplatin demonstrate synergistic cytotoxicity in cervical cancer cells by inhibiting DNA synthesis and increasing cell apoptosis. *OncoTargets and Therapy*, 1707. <https://doi.org/10.2147/OTT.S54217>
- Zon, A. M., Namwan, N., Senawong, S., Nontakitticharoen, M. & Senawong, T. (2025). Antiproliferative activity of alizarin derivative against human cervical cancer cell line. *Proceedings of the 2025 International symposium for agricultural biomedical research network: The fusion of natural product chemistry and medical information engineering for advancement of medicine-2025. University Academic Service Center (UNISERV CMU), Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand* (pp. 105-111). <https://www.agribiomed2025.org/>