

บทนำ

การรักษามะเร็งด้วยรังสีเป็นหนึ่งในวิธีมาตรฐานในการรักษามะเร็ง โดยประสิทธิภาพของการรักษาขึ้นอยู่กับ การตอบสนองต่อรังสีของเซลล์มะเร็ง กล่าวคือมีประสิทธิภาพของการรักษาสูงในมะเร็งที่มีความไวต่อรังสีมาก แต่มีประสิทธิภาพของการรักษาดำเนินมะเร็งที่ดื้อต่อรังสี (Orth et al., 2014) การตอบสนองต่อรังสีนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัย หลายอย่าง ซึ่งประสิทธิภาพการทำงานของ cell cycle checkpoints เป็นหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อความไวต่อการ ตอบสนองต่อรังสีของเซลล์มะเร็ง (Pawlik, Keyomarsi, 2004; Hematulin et al., 2014) โดย DNA damage checkpoints ทำหน้าที่ยับยั้งวัฏจักรเซลล์เพื่อให้เซลล์มีเวลาในการซ่อมแซมความเสียหายที่เกิดขึ้นกับดีเอ็นเอ นอกจากนี้ DNA damage checkpoints ยังสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายเมื่อความเสียหายที่เกิดขึ้นกับดีเอ็นเอมีความรุนแรง จนไม่สามารถซ่อมแซมได้ (Barnum, O'Connell, 2014) โดยทั่วไปเซลล์มะเร็งมักมีความบกพร่องของ G₁ checkpoint ทำให้เซลล์สูญเสียกลไกในการยับยั้งวัฏจักรเซลล์และกลไกการตายของเซลล์ในระยะ G₁ ส่งผลให้เซลล์มะเร็งดื้อ ต่อรังสี (Kim et al., 2015) และหากเซลล์มะเร็งชนิดนั้นมีการทำงานของ G₂ checkpoint ที่ปกติ G₂ checkpoint ก็จะเป็น กลไกหลักในการยับยั้งการดำเนินไปของวัฏจักรเซลล์เมื่อเซลล์ได้รับรังสี แต่ถ้าหากเซลล์มะเร็งชนิดนั้นมีความบกพร่อง ของ G₂ checkpoint เซลล์ก็จะมีความไวต่อรังสีมากขึ้น เนื่องจากเซลล์ที่ดีเอ็นเอเกิดความเสียหายจากการได้รับรังสี จะทำการแบ่งตัวโดยที่ความเสียหายของดีเอ็นเอยังไม่มีการซ่อมแซม ส่งผลให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายในขณะที่กำลัง แบ่งตัวหรือตายหลังจากแบ่งตัวไปแล้ว (Vance et al., 2011; Bridges et al., 2016)

นอกจาก DNA damage checkpoints แล้ว เซลล์ในระยะไมโทซิสยังมี mitotic checkpoint ซึ่งทำหน้าที่ ในการป้องกันความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นในขณะที่เซลล์ทำการแบ่งตัว โดยทำหน้าที่ตรวจสอบความถูกต้องของ การยึดเชื่อมกันระหว่างเส้นใยสปินเดิลและไคนีโทคอร์ และตรวจสอบความสมดุลของแรงดึงในการแยกโครโมโซม ซึ่งหากตรวจพบความเสียหาย mitotic checkpoint จะยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์จนกว่าความเสียหายนั้นจะถูกซ่อมแซม ให้เป็นปกติหรือหากไม่สามารถทำการซ่อมแซมได้ mitotic checkpoint จะเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ (Burgess et al., 2014; Ferrari, Gentili, 2016) ความเกี่ยวข้องระหว่างประสิทธิภาพการทำงานของ DNA damage checkpoints ต่อความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็งนั้นมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง (Ahmed et al., 2015; Wang et al., 2015) แต่ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อนว่าการทำงานของ mitotic checkpoint มีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อรังสี ของเซลล์มะเร็งหรือไม่ งานวิจัยในครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาว่าประสิทธิภาพการทำงานของ mitotic checkpoint มีผลต่อ การตอบสนองต่อรังสีของเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A หรือไม่ โดยทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของการ ตอบสนองต่อรังสีเมื่อทำการยับยั้งการทำงานของ mitotic checkpoint ด้วยสาร NMS-P715 ในเซลล์ C-33A ที่มีการ ทำงานของ mitotic checkpoint ที่ปกติกับเซลล์ C-33A ที่ถูกยับยั้งการทำงานของ mitotic checkpoint ด้วยสาร NMS-P715 โดยผลที่ได้จากการทดลองจะเป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ที่สำคัญซึ่งอาจสามารถนำไปสู่การศึกษา ต่อยอดและการประยุกต์ใช้ในการรักษามะเร็งเพื่อเพิ่มการตอบสนองต่อการรักษาของผู้ป่วยมะเร็งในอนาคต

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของ mitotic checkpoint ต่อการตอบสนองต่อรังสีของเซลล์ไลน์มะเร็ง ปากมดลูก C-33A

วิธีการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์ที่ใช้ในศึกษานี้คือเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ C-33A โดยเป็นเซลล์ทางการค้าของบริษัท American Type Culture Collection (ATCC) ซึ่งไม่มีการติดเชื้อไวรัสเอชพีวี แต่มีความผิดปกติของขนาดโปรตีน retinoblastoma และมีการกลายพันธุ์ของยีน TP53 แบบ point mutation จากการเปลี่ยนแปลงลำดับของโปรตีนอาร์จินีนไปเป็นโปรตีนซิสทีน (McCormack et al., 2013) โดยเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มีการเติม sodium bicarbonate 0.25%, heat-inactivated FBS 10%, streptomycin 1% (100 µg/mL) และ penicillin 1% (100 U/mL) ในตู้เพาะเลี้ยง ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และความชื้นสัมพัทธ์ 95%

การให้สารแก่เซลล์เพาะเลี้ยง

การให้ยาแพคลิแทกเซล (Paclitaxel) เพื่อกระตุ้นการทำงานของ mitotic checkpoint แก่เซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A โดยละลายยาแพคลิแทกเซลในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ แก่เซลล์เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ก่อนนำเซลล์ไปใช้ในการทดลอง

การให้สาร NMS-P715 เพื่อยับยั้งการทำงานของ mitotic checkpoint แก่เซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A โดยละลายสาร NMS-P715 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้น 0.2 และ 1 ไมโครโมลาร์ แก่เซลล์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำเซลล์ไปฉายรังสีและใช้ในการทดลอง

การฉายรังสีแก่เซลล์เพาะเลี้ยง

ทำการฉายรังสีให้แก่เซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A ด้วยเครื่องเร่งอนุภาคแนวตรงยี่ห้อ Varian รุ่น Trilogy ณ แผนกรังสีรักษา โรงพยาบาลจุฬารัตน์ วิทยาลัยวิทยาศาสตร์การแพทย์เจ้าฟ้าจุฬาภรณ ราชวิทยาลัยจุฬารัตน์ กรุงเทพมหานคร ด้วยโฟตอนพลังงาน 6 เมกะโวลต์ อัตราการแผ่รังสี 600 MU/min พื้นที่ลำรังสี 25x25 ตารางเซนติเมตร ด้วยเทคนิค source to axis distance (SAD technique) ใช้ back scatter ขนาด 5 เซนติเมตร ด้วยเทคนิคการฉายรังสีแบบครั้งเดียว ปริมาณรังสี 2 เกรย์ (212 MU), 4 เกรย์ (424 MU), 6 เกรย์ (636 MU) และ 8 เกรย์ (848 MU) โดยการฉายรังสีให้แก่เซลล์ในการทดลองใช้ปริมาณรังสี 4 เกรย์

การวิเคราะห์การกระจายตัวของเซลล์ในแต่ละระยะของวัฏจักรเซลล์ด้วยเทคนิคโฟลไซโตเมทรี

หลังให้ยาแพคลิแทกเซลเพื่อกระตุ้นการทำงานของ mitotic checkpoint แก่เซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A จากนั้นทำการเก็บเซลล์ตามระยะเวลาต่าง ๆ เพื่อศึกษาการกระจายตัวของเซลล์ในแต่ละระยะของวัฏจักรเซลล์ด้วยเทคนิคโฟลไซโตเมทรี ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมงหลังการให้ยาแพคลิแทกเซล โดยทำการตรึงและทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพด้วยเอทานอลที่เย็นจัดความเข้มข้น 70% แล้วเก็บสารละลายที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อนำเซลล์ไปวิเคราะห์การกระจายตัวของเซลล์ ทำการล้างและปั่นเซลล์ด้วย PBS จากนั้นข้อมนิวเคลียสด้วยสารละลายโปรปริเดียมไอโอไดด์ (PI) ที่ประกอบด้วย PI, RNase A และ Na-citrate ปริมาตร 500 มิลลิลิตร บ่มสารละลายที่อุณหภูมิห้องและหลีกเลี่ยงจากแสงเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์

การศึกษาสัดส่วนการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยการทดสอบการสร้างโคโลนี

ให้สาร NMS-P715 ความเข้มข้น 0.2 และ 1 ไมโครโมลาร์ แก่เซลล์ก่อนการฉายรังสีเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์ไปฉายรังสีด้วยเทคนิคการฉายรังสีแบบครั้งเดียว ปริมาณรังสี 0, 2, 4, 6 และ 8 เกรย์ หลังการฉายรังสีทำการล้างสาร NMS-P715 ออกด้วย PBS จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 13 วัน จนกระทั่งสามารถมองเห็น โคโลนีของ

เซลล์ที่รอดชีวิตได้ด้วยตาเปล่า โดยใน 1 โคโลนีต้องมีจำนวนเซลล์ไม่น้อยกว่า 50 เซลล์ หลังการนับโคโลนีคำนวณหาประสิทธิภาพในการเลี้ยงเซลล์ และคำนวณหาสัดส่วนการรอดชีวิตของเซลล์ เพื่อนำไปใช้เปรียบเทียบการตอบสนองต่อรังสีของเซลล์โดยพิจารณาจากปริมาณรังสีที่ทำให้เซลล์เกิดการรอดชีวิตร้อยละ 37 (D_{37}) จากจำนวนตั้งต้น

การศึกษารูปแบบการตายของเซลล์หลังการได้รับรังสีจากลักษณะสัญญาณวิทยาของนิวเคลียส

ให้สาร NMS-P715 ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ แก่เซลล์ก่อนการฉายรังสีเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์ไปฉายรังสีปริมาณ 0 หรือ 4 เกรย์ หลังการฉายรังสีทำการล้างสาร NMS-P715 ออกด้วย PBS แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ จากนั้นทำการเก็บเซลล์ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมงหลังจากเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ จากนั้นทำการย้อมนิวเคลียสของเซลล์ โดยเริ่มจากการตรึงและทำให้เชื้อหุ้มเซลล์เสียสภาพด้วยเมทานอลที่เย็นจัดความเข้มข้น 90% เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างเมทานอลออกด้วย PBS แล้วย้อมนิวเคลียสด้วยสารเรืองแสง Hoechst 33342 บ่มที่อุณหภูมิห้องและหลีกเลี่ยงจากแสงเป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างออกด้วย PBS จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นประกบแผ่นกระจกเข้ากับแผ่นสไลด์ด้วย anti-faded solution แล้วประเมินลักษณะสัญญาณวิทยาของนิวเคลียสภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ที่กำลังขยาย 40X จากการถ่ายภาพแบบส้อมทั่วทั้งแผ่นสไลด์ การประเมินรูปแบบการตายของเซลล์หลังการได้รับรังสีจากลักษณะสัญญาณวิทยาของนิวเคลียสจากนิวเคลียสอย่างน้อย 500 เซลล์ในแต่ละกลุ่มการทดลอง โดยประเมินรูปแบบการตายของเซลล์หลังการได้รับรังสีตามวิธีการของ Amornwichee N (Amornwichee et al., 2014) โดยการตายแบบ apoptosis ลักษณะของนิวเคลียสติดสีเข้มและพบชิ้นส่วนของ apoptotic bodies การตายแบบ mitotic catastrophe ลักษณะของนิวเคลียสติดสีเป็นพูโดยมีจำนวนมากกว่า 2 พูขึ้นไป และการตายแบบ senescence ลักษณะของนิวเคลียสติดสีไม่สม่ำเสมอและพบการติดสีของขอบเซลล์จาง ๆ

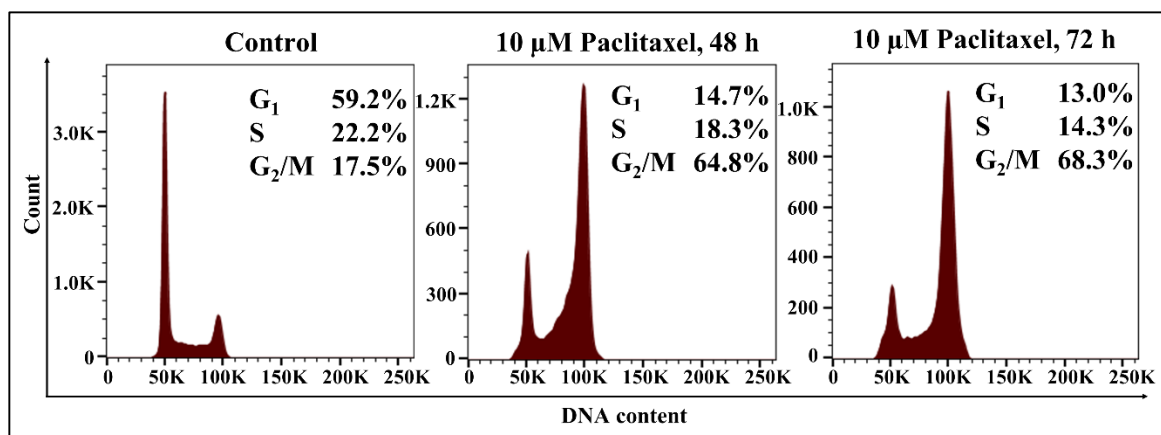
การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลการกระจายตัวของเซลล์ในแต่ละระยะของวัฏจักรเซลล์แสดงในรูปของร้อยละ ข้อมูลการตอบสนองต่อรังสีของเซลล์แสดงในรูปของค่าเฉลี่ย± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน สร้างกราฟสัดส่วนการรอดชีวิตของเซลล์ในรูปแบบเอกซ์โพเนนเชียล จากนั้นคำนวณหาปริมาณรังสีที่ทำให้เซลล์เกิดการรอดชีวิตร้อยละ 37 จากจำนวนตั้งต้น และหาความแตกต่างของสัดส่วนการรอดชีวิตของเซลล์ในแต่ละกลุ่มการทดลองด้วยสถิติ one-way ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 ($p < 0.05$) และข้อมูลรูปแบบการตายของเซลล์จากลักษณะสัญญาณวิทยาของนิวเคลียสแสดงในรูปของร้อยละจากค่าเฉลี่ย± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ผลการวิจัย

ประสิทธิภาพการทำงานของ mitotic checkpoint ของเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A ในการยับยั้งการดำเนินไปในวัฏจักรเซลล์หลังได้รับยาพาคลิแทกเซล

การกระจายตัวของเซลล์ในแต่ละระยะของวัฏจักรเซลล์ดังแสดงในรูปที่ 1 พบว่าเซลล์ที่ไม่ได้รับยาพาคลิแทกเซลมีการกระจายตัวของเซลล์ในระยะ G_1 , S และ G_2/M เท่ากับ 59.2%, 22.2% และ 17.5% ตามลำดับ เซลล์ที่ได้รับยาพาคลิแทกเซลเป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง มีการหยุดในระยะ G_2/M โดยมีสัดส่วนประชากรของเซลล์ในระยะ G_2/M เท่ากับ 64.8% และ 68.3% ตามลำดับ ซึ่งเป็นการเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับยาพาคลิแทกเซล ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า mitotic checkpoint ของเซลล์ C-33A มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการดำเนินไปในวัฏจักรเซลล์หลังได้รับยาพาคลิแทกเซล

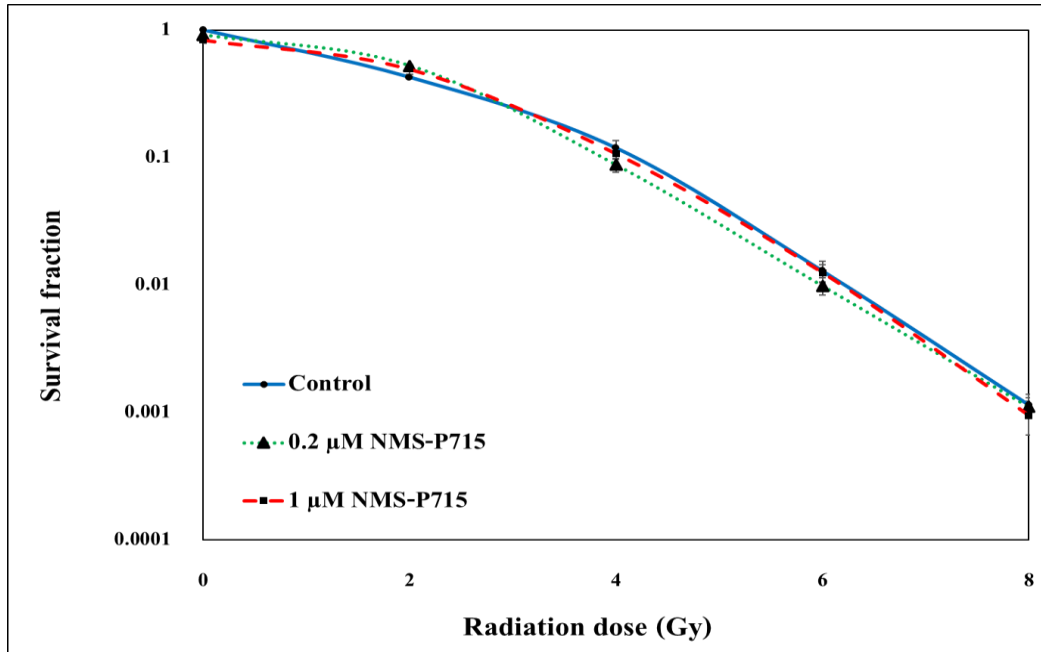


รูปที่ 1 การกระจายตัวของเซลล์ในแต่ละระยะของวัฏจักรเซลล์ของเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A หลังได้รับยาพาคลิแทกเซลเป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง เซลล์ที่ไม่ได้รับยาพาคลิแทกเซล (Control) และเซลล์ที่ได้รับยาพาคลิแทกเซล ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ (10 μM Paclitaxel)

ประสิทธิภาพการทำงานของ mitotic checkpoint ต่อการตอบสนองต่อรังสีของเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A

ในการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของ mitotic checkpoint ว่ามีผลต่อความไวต่อรังสีของเซลล์หรือไม่สามารถศึกษาโดยการเปรียบเทียบความไวต่อรังสีของเซลล์ระหว่างเซลล์ C-33A ที่มีการทำงานของ mitotic checkpoint ที่ปกติกับเซลล์ C-33A ที่ถูกยับยั้งการทำงานของ mitotic checkpoint ด้วยสาร NMS-P715 โดยประเมินจากความสามารถในการสร้างโคโลนีของเซลล์หลังได้รับรังสี

สัดส่วนการรอดชีวิตของเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A ดังแสดงในรูปที่ 2 พบว่าเซลล์ที่ได้รับรังสีเพียงอย่างเดียว และเซลล์ที่ได้รับสาร NMS-P715 ด้วยความเข้มข้น 0.2 และ 1 ไมโครโมลาร์ ก่อนการฉายรังสีเป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีค่าของปริมาณรังสีที่ทำให้เซลล์เกิดการรอดชีวิตร้อยละ 37 จากจำนวนตั้งต้น เท่ากับ 1.85 ± 0.07 , 1.78 ± 0.09 และ 1.80 ± 0.10 เกรย์ ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของสัดส่วนการรอดชีวิตของเซลล์ในแต่ละกลุ่มการทดลองด้วยสถิติ one-way ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 ($p \leq 0.05$) พบว่าสัดส่วนการรอดชีวิตของเซลล์ทั้งสามกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.583$) ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพการทำงานของ mitotic checkpoint ไม่มีผลต่อความไวต่อรังสีของเซลล์ C-33A

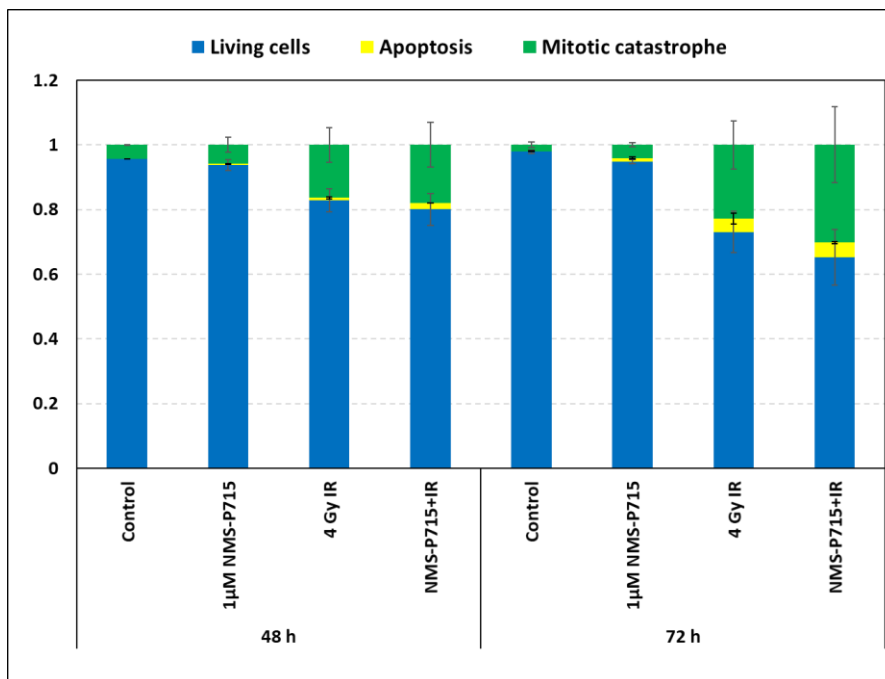


รูปที่ 2 สัดส่วนการรอดชีวิตของเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A ที่ได้รับรังสีเพียงอย่างเดียว (Control) เซลล์ที่ได้รับสาร NMS-P715 ความเข้มข้น 0.2 และ 1 ไมโครโมลาร์ ก่อนการได้รับรังสีเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (0.2 และ 1 μM NMS-P715 ตามลำดับ)

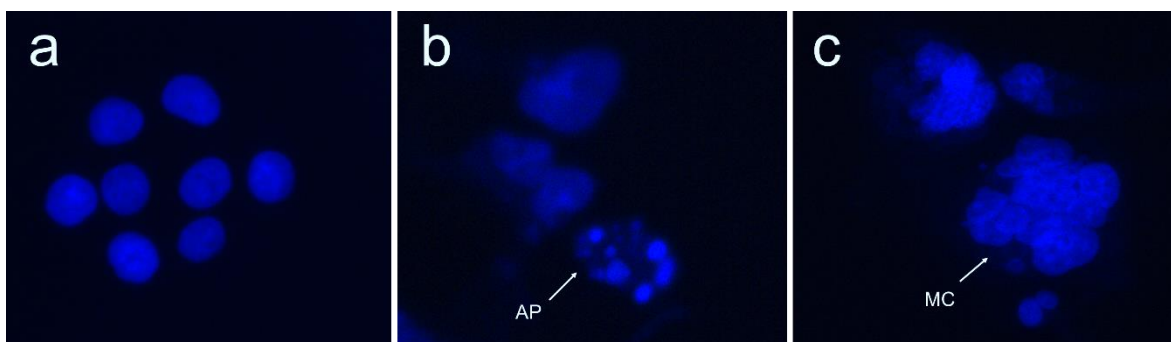
รูปแบบการตายของเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A หลังการได้รับรังสี

ลักษณะสัณฐานวิทยาของนิวเคลียสของเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A หลังการได้รับรังสีดังแสดงในรูปที่ 3 ลักษณะของนิวเคลียสของเซลล์ที่มีชีวิตดังแสดงในรูปที่ 3 (a) เซลล์ที่ตายแบบ apoptosis มีลักษณะของนิวเคลียสติดสีเข้มและพบชิ้นส่วนของ apoptotic bodies ดังแสดงในรูปที่ 3 (b) เซลล์ที่ตายแบบ mitotic catastrophe มีลักษณะของนิวเคลียสขนาดใหญ่ เกิดการติดสีเป็นพู่โดยมีการติดสีของนิวเคลียสมากกว่า 2 พู่ และพบลักษณะของนิวเคลียสขนาดเล็กดังแสดงในรูปที่ 3 (c) เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง เซลล์ที่ไม่ได้รับทั้งรังสีและสาร NMS-P715 พบลักษณะของนิวเคลียสของเซลล์ที่มีชีวิต และเซลล์ที่ตายแบบ mitotic catastrophe เท่ากับ 95.70 ± 0.04 และ 4.30 ± 0.06 ตามลำดับ เซลล์ที่ได้รับสาร NMS-P715 ด้วยความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบลักษณะของนิวเคลียสของเซลล์ที่มีชีวิต เซลล์ที่ตายแบบ apoptosis และเซลล์ที่ตายแบบ mitotic catastrophe เท่ากับ 93.77 ± 1.67 , 0.40 ± 0.09 , 5.83 ± 2.28 ตามลำดับ เซลล์ที่ได้รับการฉายรังสีปริมาณ 4 เกรย์ พบลักษณะของนิวเคลียสของเซลล์ที่มีชีวิต เซลล์ที่ตายแบบ apoptosis และเซลล์ที่ตายแบบ mitotic catastrophe เท่ากับ 82.92 ± 3.57 , 0.69 ± 0.31 , 16.39 ± 5.35 ตามลำดับ และเซลล์ที่ได้รับสาร NMS-P715 ด้วยความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนการฉายรังสี พบลักษณะของนิวเคลียสของเซลล์ที่มีชีวิต เซลล์ที่ตายแบบ apoptosis และเซลล์ที่ตายแบบ mitotic catastrophe เท่ากับ 80.03 ± 4.87 , 2.00 ± 0.02 , 17.96 ± 6.91 ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง เซลล์ที่ไม่ได้รับทั้งรังสีและสาร NMS-P715 พบลักษณะของนิวเคลียสของเซลล์ที่มีชีวิต เซลล์ที่ตายแบบ apoptosis และเซลล์ที่ตายแบบ mitotic catastrophe เท่ากับ 97.86 ± 0.51 , 0.16 ± 0.10 , 1.97 ± 0.82 ตามลำดับ เซลล์ที่ได้รับสาร NMS-P715 ด้วยความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบลักษณะของนิวเคลียสของเซลล์ที่มีชีวิต เซลล์ที่ตายแบบ apoptosis และเซลล์ที่ตายแบบ mitotic catastrophe เท่ากับ 94.80 ± 0.60 , 1.16 ± 0.26 , 4.04 ± 0.59 ตามลำดับ เซลล์ที่ได้รับการฉายรังสีปริมาณ 4 เกรย์ พบลักษณะของนิวเคลียสของเซลล์ที่มีชีวิต

เซลล์ที่ตายแบบ apoptosis และเซลล์ที่ตายแบบ mitotic catastrophe เท่ากับ 73.09 ± 6.47 , 4.18 ± 1.65 , 22.74 ± 7.50 ตามลำดับ และเซลล์ที่ได้รับสาร NMS-P715 ด้วยความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนการฉายรังสี พบลักษณะของนิวเคลียสของเซลล์ที่มีชีวิต เซลล์ที่ตายแบบ apoptosis และเซลล์ที่ตายแบบ mitotic catastrophe เท่ากับ 65.17 ± 8.58 , 4.65 ± 0.35 , 30.18 ± 11.78 ตามลำดับ โดยรูปแบบการตายหลักของเซลล์หลังการได้รับรังสีเป็นการตายแบบ apoptosis และ mitotic catastrophe



รูปที่ 3 ร้อยละของรูปแบบการตายของเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A หลังการได้รับรังสีเป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง เซลล์ที่ไม่ได้รับทั้งรังสีและสาร NMS-P715 (Control) เซลล์ที่ได้รับสาร NMS-P715 ด้วยความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (1 µM NMS-715) เซลล์ที่ได้รับการฉายรังสีปริมาณ 4 เกรย์ (4 Gy IR) และเซลล์ที่ได้รับสาร NMS-P715 ด้วยความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนการฉายรังสีปริมาณ 4 เกรย์ (NMS-715+IR)



รูปที่ 4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของนิวเคลียสของเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A หลังการได้รับรังสี โดย (a) คือลักษณะของนิวเคลียสของเซลล์ที่มีชีวิต (b) คือเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis (AP) และ (c) คือเซลล์ที่ตายแบบ mitotic catastrophe (MC)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

อภิปรายผลการวิจัย

ประสิทธิภาพของการฉายรังสีเพื่อรักษามะเร็งขึ้นอยู่กับ การตอบสนองต่อรังสีของเซลล์มะเร็ง โดยประสิทธิภาพการทำงานของ cell cycle checkpoints เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความไวต่อรังสีของเซลล์มะเร็ง (Pawlik, Keyomarsi, 2004; Hematulin et al., 2014) โดย DNA damage checkpoints ทำหน้าที่ตรวจสอบความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอของเซลล์ในระยะอินเตอร์เฟส (Shaltiel et al., 2015) แต่เมื่อเซลล์ผ่านจากระยะอินเตอร์เฟสไปยังระยะไมโทซิสแล้ว mitotic checkpoint จะทำหน้าที่ในการตรวจสอบความพร้อมของเซลล์ก่อนที่จะทำการแบ่งตัว (Liu, Zhang, 2016) มีรายงานว่าเซลล์ที่มีความเสียหายของดีเอ็นเอเมื่อผ่านเข้าสู่ระยะไมโทซิส เซลล์จะมีกลไกในการตรวจจับความผิดปกติและมีการส่งต่อสัญญาณภายในเซลล์เพื่อให้มีการซ่อมแซมดีเอ็นเอในระยะถัดไปหลังจากเซลล์ทำการแบ่งตัวไปแล้ว แต่ถ้าหากความเสียหายของดีเอ็นเอมีความรุนแรง เซลล์จะเกิดการตายขณะที่กำลังแบ่งตัว (Ferrari, Gentili, 2016) แต่ยังไม่มีการศึกษาที่ชัดเจนว่าการตรวจจับดีเอ็นเอที่มีความเสียหาย และกลไกการตายของเซลล์ในระยะไมโทซิสมีความเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการทำงานของ mitotic checkpoint หรือไม่

การศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของ mitotic checkpoint ของเซลล์ไลน์มะเร็งปากมดลูก C-33A สามารถทำได้โดยวิเคราะห์จากการกระจายตัวของเซลล์ในแต่ละระยะของวัฏจักรเซลล์ด้วยเทคนิคโฟลไซโตเมทรีหลังการกระตุ้นการทำงานของ mitotic checkpoint ด้วยยาพาคลิแทคเซลซึ่งเข้าจับกับ β -subunit ของทิวบูลินในไมโครทิวบูลอันเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เส้นใยสปินเดิล โดยยาพาคลิแทคเซลทำให้ทิวบูลินเกิดการงอรูปไม่สามารถเกิดการหดและคลายตัวได้ จึงส่งผลให้ไม่เกิดการยึดเชื่อมกันระหว่างเส้นใยสปินเดิลและไคนีโทคอร์ และไม่เกิดแรงดึงในการแยกโครมาทิด (Matson, Stukenberg, 2011) โดยเมื่อกระตุ้นการทำงานของ mitotic checkpoint ด้วยยาพาคลิแทคเซลพบว่าเซลล์ที่ได้รับยาพาคลิแทคเซลความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ มีสัดส่วนประชากรของเซลล์ในระยะ G₂/M เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับยาพาคลิแทคเซล ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์ C-33A มีการทำงานของ mitotic checkpoint ที่มีประสิทธิภาพ

เพื่อศึกษาว่าการทำงานของ mitotic checkpoint ส่งผลต่อความไวต่อรังสีของเซลล์หรือไม่ งานวิจัยนี้จึงทำการเปรียบเทียบความไวต่อรังสีของเซลล์ C-33A ที่ไม่มีการยับยั้งการทำงานของ mitotic checkpoint กับเซลล์ C-33A ที่ถูกยับยั้งการทำงานของ mitotic checkpoint ด้วยสาร NMS-P715 ซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งการทำงานของ MPS1 kinase อันเป็นโปรตีนที่สำคัญในการทำงานของ mitotic checkpoint (Musacchio, 2015) ผลการทดลองพบว่าหลังการได้รับรังสี เซลล์ C-33A ที่ไม่ได้รับสาร NMS-P715 และเซลล์ C-33A ที่ได้รับสาร NMS-P715 มีสัดส่วนการรอดชีวิตไม่แตกต่างกันซึ่งแสดงให้เห็นว่าการทำงานของ mitotic checkpoint ไม่มีผลต่อความไวต่อรังสีของเซลล์ C-33A

ข้อจำกัดของงานวิจัยในครั้งนี้คือความเป็นพิษของสาร NMS-P715 โดยการใช้สาร NMS-P715 ความเข้มข้น 0.2 และ 1 ไมโครโมลาร์ เป็นความเข้มข้นที่สูงกว่าค่า IC₅₀ ที่ 0.182 ไมโครโมลาร์ ทำให้หลังการฉายรังสีผู้วิจัยดั่งสาร NMS-P715 ออก (Caldarelli et al., 2011; Colombo et al., 2010; Maachani et al., 2015) ซึ่งการล้างสาร NMS-P715 ออกอาจส่งผลต่อการยับยั้งการทำงานของ mitotic checkpoint ดังนั้นหากต้องการหลีกเลี่ยงข้อจำกัดของสาร NMS-P715 ผู้วิจัยเสนอให้ทำการยับยั้งการทำงานของ mitotic checkpoint โดยใช้ small interfering RNA ที่จำเพาะกับ MPS1 kinase แทน นอกจากนั้นในงานวิจัยนี้ทำการประเมินรูปแบบการตายของเซลล์หลังการได้รับรังสีจากการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัญญาณวิทยาของนิวเคลียสเท่านั้น ซึ่งหากต้องการยืนยันกลไกการตายของเซลล์ที่จำเพาะมากขึ้นจะต้องทำการศึกษาโปรตีนอื่น ๆ ที่จำเพาะต่อกลไกการตายของเซลล์แต่ละชนิดร่วมด้วย เช่น คาสเปส หรือเบต้ากาแลคโตซิเดส เป็นต้น

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของ mitotic checkpoint ของเซลล์ไลน์มะเร็งเรื้อรังปากมดลูก C-33A หลังกระตุ้นการทำงานของ mitotic checkpoint ด้วยยาพาคลิแทกเซล โดยประเมินจากการกระจายตัวของเซลล์ในแต่ละระยะของวัฏจักรเซลล์ด้วยเทคนิคโพลไซโตเมทรี ทำให้ทราบว่าเซลล์ C-33A มีการทำงานของ mitotic checkpoint ที่ปกติเมื่อทำการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของ mitotic checkpoint ที่ส่งผลต่อการตอบสนองต่อรังสีของเซลล์ โดยการยับยั้งการทำงานของ mitotic checkpoint ด้วยสาร NMS-P715 พบว่าการทำงานของ mitotic checkpoint ไม่มีผลต่อความไวต่อรังสีของเซลล์ นอกจากนี้การยับยั้งการทำงานของ mitotic checkpoint ไม่เปลี่ยนแปลงรูปแบบการตายหลักของเซลล์หลังการได้รับรังสี ผลจากการศึกษาในครั้งนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางรังสีชีววิทยาที่อาจนำไปใช้ในการศึกษาเชิงลึกต่อไปได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยสำหรับนิสิตบัณฑิตศึกษา คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่สนับสนุนเงินทุนบางส่วนสำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้ ตลอดจนแผนกรังสีรักษา โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร แผนกรังสีรักษา โรงพยาบาลจุฬารัตน์ และหน่วยห้องปฏิบัติการวิจัยระดับโมเลกุลและจีโนม งานห้องปฏิบัติการกลางเพื่อการวิจัย ฝ่ายวิจัยนวัตกรรมและวิเทศสัมพันธ์ วิทยาลัยวิทยาศาสตร์การแพทย์เจ้าฟ้าจุฬารัตน์ ราชวิทยาลัยจุฬารัตน์ และสถาบันวิจัยจุฬารัตน์ ที่ให้ความร่วมมือและอำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยเป็นอย่างดีในการเข้าไปทำวิจัยและเก็บข้อมูล

เอกสารอ้างอิง

- Ahmed SU, Carruthers R, Gilmour L, Yildirim S, Watts C, Chalmers AJ. Selective Inhibition of Parallel DNA Damage Response Pathways Optimizes Radiosensitization of Glioblastoma Stem-like Cells. *Cancer Research* 2015; 75(20): 4416-4428.
- Amornwichee N, Oike T, Shibata A, Ogiwara H, Tsuchiya N, Yamauchi M, et al. Carbon-Ion Beam Irradiation Kills X-Ray-Resistant p53-Null Cancer Cells by Inducing Mitotic Catastrophe. *PLOS ONE* 2014; 9(12): e115121.
- Barnum KJ, O'Connell MJ. Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) 2014; 1170, 29-40.
- Bridges KA, Chen X, Liu H, Rock C, Buchholz TA, Shumway SD, et al. MK-8776, a novel chk1 kinase inhibitor, radiosensitizes p53-defective human tumor cells. *Oncotarget* 2016; 7(44): 71660-71672.
- Burgess A, Rasouli M, Rogers S. Stressing mitosis to death. *Frontiers in Oncology* 2014; 4: 140.
- Caldarelli M, Angiolini M, Disingrini T, Donati D, Guanci M, Nuvoloni S, et al. Synthesis and SAR of new pyrazolo[4,3-h]quinazoline-3-carboxamide derivatives as potent and selective MPS1 kinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2011; 21(15): 4507-4511.
- Colombo R, Caldarelli M, Mennecozi M, Giorgini ML, Sola F, Cappella P, et al. Targeting the mitotic checkpoint for cancer therapy with NMS-P715, an inhibitor of MPS1 kinase. *Cancer Research* 2010; 70(24): 10255-10264.
- Ferrari S, Gentili C. Maintaining Genome Stability in Defiance of Mitotic DNA Damage. *Frontiers in Genetics* 2016; 7: 128.

- Hematulin A, Sagan D, Sawanyawisuth K, Seubwai W, Wongkham S. Association between cellular radiosensitivity and G1/G2 checkpoint proficiencies in human cholangiocarcinoma cell lines. *International Journal of Oncology* 2014; 45(3): 1159-1166.
- Kim BM, Hong Y, Lee S, Liu P, Lim JH, Lee YH, et al. Therapeutic Implications for Overcoming Radiation Resistance in Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences* 2015; 16(11): 26880-26913.
- Liu ST, Zhang H. The mitotic checkpoint complex (MCC): looking back and forth after 15 years. *AIMS Molecular Science* 2016; 3(4): 597-634.
- Maachani UB, Kramp T, Hanson R, Zhao S, Celiku O, Shankavaram U, et al. Targeting MPS1 Enhances Radiosensitization of Human Glioblastoma by Modulating DNA Repair Proteins. *Molecular Cancer Research: MCR* 2015; 13(5): 852-862.
- Matson DR, Stukenberg PT. Spindle poisons and cell fate: a tale of two pathways. *Molecular Interventions* 2011; 11(2): 141-150.
- McCormack A, Fan JL, Duesberg M, Bloomfield M, Fiala C, Duesberg P. Individual karyotypes at the origins of cervical carcinomas. *Molecular Cytogenetics* 2013; 6(1): 44.
- Musacchio A. The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics. *Current Biology: CB* 2015; 25(20): R1002-1018.
- Orth M, Lauber K, Niyazi M, Friedl AA, Li M, Maihöfer C, et al. Current concepts in clinical radiation oncology. *Radiation and Environmental Biophysics* 2014; 53(1): 1-29.
- Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 2004; 59(4): 928-942.
- Shaltiel IA, Krenning L, Bruinsma W, Medema RH. The same, only different - DNA damage checkpoints and their reversal throughout the cell cycle. *Journal of Cell Science* 2015; 128(4): 607-620.
- Vance S, Liu E, Zhao L, Parsels JD, Parsels LA, Brown JL, et al. Selective radiosensitization of p53 mutant pancreatic cancer cells by combined inhibition of Chk1 and PARP1. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 2011; 10(24): 4321-4329.
- Wang Z, Lai ST, Ma NY, Deng Y, Liu Y, Wei DP, et al. Radiosensitization of metformin in pancreatic cancer cells via abrogating the G2 checkpoint and inhibiting DNA damage repair. *Cancer Letters* 2015; 369(1): 192-201.