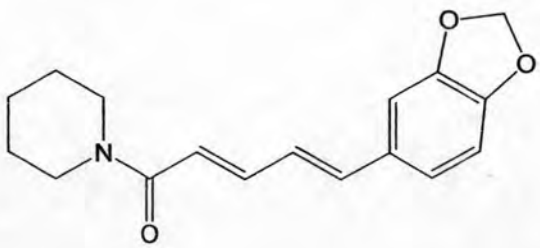
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พิเพอรีน

2.1.1 คุณสมบัติทั่วไปของพิเพอรีน

พิเพอรีน (1-[5-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-oxo-2,4-pentadienyl] piperidine) พบมากในพริกไทยดำ (*Piper nigrum* หรือ black pepper) และดีปลี (*Piper longum* หรือ long pepper) สารสกัดจากพริกไทยดำมีพิเพอรีนอยู่ถึงร้อยละ 98 พิเพอรีนเป็นสารประกอบประเภทอัลคาลอยด์ (alkaloid) ซึ่งเป็นสารประเภท Cyclic compound ที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ คุณสมบัติทั่วไปของอัลคาลอยด์ส่วนใหญ่คือ เป็นสารไม่มีสี มีลักษณะเป็นผลึก มีรสขม ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ในสารละลายอินทรีย์ (Organic Solvent) (24-26) พิเพอรีนมีสูตรโครงสร้างคือ $C_{17}H_{19}NO_3$ (ดังรูปที่ 2.1) น้ำหนักโมเลกุล 285.34 กรัม ความหนาแน่น 0.0861 จุดหลอมเหลว 130 องศาเซลเซียส มีฤทธิ์เป็นกลางเมื่อทดสอบกับกระดาษลิตมัส สามารถละลายได้ในเบนซีน (benzene) คลอโรฟอร์ม (chloroform) อีเทอร์ (ether) เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) แอลกอฮอล์ (alcohol) และกรดอะซิติก (acetic acid) แต่ไม่ละลายในน้ำ (water) และปิโตรเลียม อีเทอร์ (petroleum ether) มีฤทธิ์กระตุ้นให้ร่างกายสร้างความร้อนหรือ thermogenesis ซึ่งเป็นกระบวนการที่สร้างพลังงานให้กับเซลล์ (27-29)



รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างของ piperine

มีรายงานการศึกษาวิจัยเพื่อทดสอบการออกฤทธิ์ของพิเพอรีนในด้านต่างๆ มากมายโดยได้ทำการศึกษาทั้งในหลอดทดลอง ในสัตว์ทดลองและในมนุษย์ซึ่งสามารถจำแนกการออกฤทธิ์ของพิเพอรีนในด้านต่างๆ ได้ดังนี้

2.1.2 ฤทธิ์ต่อระบบย่อยอาหารและการดูดซึม

การศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าพิเพอรีนช่วยเพิ่มการผ่านเข้าออกของสาร (permeability) ในเซลล์ลำไส้เล็กของหนู ชักนำให้เกิดการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโครงร่างเซลล์ (cytoskeletal function) โดยพบว่ามีไรโบโซมอิสระ (free ribosome) และไรโบโซมที่เกาะอยู่กับเอนโดพลาสมิกเรกติกคิวลัม (endoplasmic reticulum) เพิ่มขึ้น ความยาวของไมโครวิลไล (microvilli) ที่เซลล์ลำไส้ (enterocyte) เพิ่มขึ้น พื้นที่ผิวในการดูดซึมจึงมากขึ้น (30, 31) นอกจากนี้พิเพอรีนยังมีบทบาทในการเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ (bioavailability) ของ Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของชาเขียว (green tea) โดยหนูที่ได้รับ EGCG ร่วมกับพิเพอรีน (70.2 μmol/kg) จะมีระดับของ EGCG ในเลือดสูงกว่าหนูที่ได้รับ EGCG เพียงอย่างเดียว พิเพอรีนที่ระดับความเข้มข้น 50–500 μmol/l จะยับยั้งการเกิด glucuronidation ที่ไมโครโซม (microsomes) ของลำไส้เล็ก (small intestine) (32) Ononiwu และคณะพบว่าพิเพอรีนยังมีผลต่อการหลั่งกรดในกระเพาะอาหารของหนู โดยขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของพิเพอรีน ทั้งนี้พิเพอรีนที่ระดับความเข้มข้น 20 mg/kg จะส่งผลให้การหลั่งกรดในกระเพาะอาหารของหนูเพิ่มขึ้นเพียง 22.2% ในขณะที่พิเพอรีนที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นถึง 142 mg/kg ส่งผลให้การหลั่งกรดในกระเพาะอาหารของหนูเพิ่มขึ้นถึง 3.346 เท่า อย่างไรก็ตามพิเพอรีนยังคงมีบทบาทในการกระตุ้นการหลั่งกรดในกระเพาะอาหารน้อยกว่าฮิสตามีน (histamine) ถึง 40 เท่า (33) นอกจากนี้พิเพอรีนยังมีบทบาทในการเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยอาหาร (digestive enzymes) เช่น ไลเปส (lipase) และอะไมเลส (amylase) ที่ตับอ่อนและลำไส้เล็กของหนู (34)

การศึกษาวิจัยในมนุษย์โดย Vladimir และคณะพบว่าคนที่กินเบต้าแคโรทีน (beta-carotene) 15 mg พร้อมกับพิเพอรีน 5 mg จะส่งผลให้ระดับของเบต้าแคโรทีนในซีรัมเพิ่มขึ้นถึง 60% เมื่อเทียบกับคนที่กินเบต้าแคโรทีนเพียงอย่างเดียว และคนที่กินโคเอนไซม์คิวเทน (Coenzyme Q10) 120 mg ร่วมกับ piperine 5 mg เป็นเวลา 21 วันต่อเนื่องกัน จะมีระดับความเข้มข้นของโคเอนไซม์คิวเทนในเลือดเพิ่มขึ้น 30% เมื่อเทียบกับคนที่กินโคเอนไซม์คิวเทนเพียงอย่างเดียว (35, 36) นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยพบว่าคนที่ได้รับยาโพรพราโนลอล (Propanolol) 40 mg หรือยาทีโอฟิลลีน (theophylline) 150 mg ร่วมกับพิเพอรีน 20 mg เป็นเวลา 7 วัน จะมีระดับความเข้มข้นของยาโพรพราโนลอลในเลือดเพิ่มขึ้นจาก 45 ng/ml เป็น 92 ng/ml และมีระดับความเข้มข้นของยาทีโอฟิลลีนในเลือดเพิ่มขึ้นจาก 4.55 μg/ml เป็น 7.36 μg/ml (37) อีกทั้งยังพบว่าพบว่าคนไข้โรคลมชักที่ได้รับยาฟีไนโตอิน (phenytoin) ร่วมกับพิเพอรีน 20 mg จะมีความเข้มข้นของยาฟีไนโตอินในเลือดสูงขึ้นเช่นเดียวกัน (38)

2.1.3 ฤทธิ์ต่อระบบประสาทและฮอร์โมน

จากการทดลองในหนูพบว่าพิเพอรีนมีคุณสมบัติในการคลายเครียด (anti-depressant) โดยทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส (monoamine oxidase inhibitor) หรือ MAO inhibitor ซึ่งจะยับยั้ง MAO ทั้งชนิด A และ B โดย MAO เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ catalyze สารสื่อประสาทในกลุ่มโมโนเอมีน (monoamine) เช่น ซีโรโทนิน (serotonin) โดปามีน (dopamine) และนอเอพิเนฟริน (norepinephrine) (39) นอกจากนี้พิเพอรีนยังมีคุณสมบัติในการควบคุมฮอร์โมนจากต่อมไทรอยด์ (thyroid hormone) และระดับกลูโคส (glucose) ในหนู หากหนูได้รับพิเพอรีนปริมาณ 2.5 mg/kg เป็นเวลา 15 วัน จะมีระดับของฮอร์โมนจากต่อมไทรอยด์ได้แก่ ไธรอกซิน (thyroxin หรือ T4) ไทรไอโอโดไธโรนิน (triiodothyronine หรือ T3) และมีระดับกลูโคสในซีรัมลดลง รวมไปถึงการทำงานของเอนไซม์ Hepatic 5'D และเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสฟาเตส (G-6-Phosphatase) ลดลงเช่นกัน (40)

2.1.3 ฤทธิ์ต่อระบบสืบพันธุ์

Malini และคณะได้ศึกษาระบบสืบพันธุ์ในหนูตัวผู้พบว่าเมื่อให้พิเพอรีนปริมาณ 5 mg/kg/day เป็นเวลา 30 วัน จะทำให้เกิดการเสื่อมของเซลล์สืบพันธุ์ (germ cell type) และเมื่อให้พิเพอรีนปริมาณ 10 mg/kg/day จะส่งผลให้เกิดการทำลายท่อเซมินิเฟอรัส (seminiferous tubules) และทำให้ฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนในอัณฑะ (intratesticular testosterone) ลดลง นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 2005 D'Cruz และคณะพบว่าพิเพอรีนมีผลทำให้การทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant enzymes) และระดับกรดเซียลิก (sialic acid) ใน epididymis ลดลง เป็นสาเหตุทำให้ระดับของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) เพิ่มขึ้น ซึ่งจะไปทำลายเซลล์และสารต่างๆ ที่อยู่ใน epididymis ทำให้อสุจิ (sperm) สูญเสียการทำงานไป นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำหนักของส่วน caput, corpus และ cauda regions ของ epididymis รวมถึงจำนวนและการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลงด้วย (41, 42)

2.1.4 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ

ปี ค.ศ. 2004 Vijayakumar และคณะพบว่าพิเพอรีนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยสามารถลดความเครียดทางออกซิเดทีฟ (oxidative stress) ในหนูที่ได้รับอาหารประเภทที่มีไขมันสูง (high-fat diet) ได้ โดยหนูจะมีระดับของ thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ซึ่งเป็นตัวชี้วัดการเกิด lipid peroxidation และความเครียดทางออกซิเดทีฟสูงขึ้น ต่อเมื่อหนูได้รับอาหารประเภทที่มีไขมันสูงร่วมกับพิเพอรีน จะส่งผลให้ระดับ TBARS ลดลง (43) ส่วนหนูที่ถูก

ชักนำให้เกิดการอักเสบโดยสาร Carrageenin ซึ่งจะมีอาการบวมและเกิดเป็นก้อนแกรนูโลมา (granuloma) นั้น เมื่อได้รับพิเพอรีนจะช่วยลดการอักเสบในช่วงเริ่มต้นของขบวนการอักเสบ และช่วงการเปลี่ยนแปลงของก้อนแกรนูโลมาได้ (44)

2.1.5 ความเป็นพิษ (toxicity) ของพิเพอรีน

จากการวิจัยในหนูเพื่อศึกษาความเป็นพิษของพิเพอรีนต่อระบบภูมิคุ้มกัน (immunotoxic effect) พบว่า พิเพอรีนที่ความเข้มข้น 1.12 mg/kg ไม่เป็นพิษต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันคือเป็น no observed adverse effect level (NOAEL) dose แต่พิเพอรีนที่ระดับความเข้มข้น 1.12 และ 2.25 mg/kg จะมีผลกดการตอบสนองต่อไมโตเจนของเม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์ (T-lymphocyte) และพิเพอรีนที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นคือ 2.25 และ 4.5 mg/kg จะมีผลกดการตอบสนองต่อไมโตเจนของเม็ดเลือดขาวชนิดบี-ลิมโฟไซต์ (B-lymphocyte) นอกจากนี้พิเพอรีนที่ 4.5 mg/kg ยังส่งผลให้ม้ามและต่อมไทมัสมีขนาดลดลง (45) จากงานวิจัยที่ศึกษาความเป็นพิษของพิเพอรีนต่อเซลล์ (cytotoxicity) โดยทดสอบในไรน้ำเค็ม (brine shrimp) นั้น พบว่าพิเพอรีนมีความเป็นพิษต่อไรน้ำเค็มสูง ความเข้มข้นของพิเพอรีนที่ทำให้สัตว์ทดลองตายเป็นจำนวน 50% ของจำนวนทั้งหมด (lethal dose$_{50}$) เท่ากับ 2.8 $\pm$0.3 µg/ml นอกจากนี้ยังพบว่าพิเพอรีนสามารถยับยั้งพัฒนาการของไข่เม่นทะเล (sea urchin egg) ได้ทุกระยะตั้งแต่ระยะ cleavage ไปจนถึง blastulae อีกทั้งยังพบว่าพิเพอรีนไม่ทำลายเม็ดเลือดแดงของหนู แสดงว่าความเป็นพิษต่อเซลล์ที่เกิดจากพิเพอรีนไม่เกี่ยวข้องกับการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (46)

2.2. ผลของพิเพอรีนต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ

2.2.1 การศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลอง

Pradeep และคณะพบว่าพิเพอรีนมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งผิวหนัง (melanoma cell) ชนิด B16F-10 ในหนูโดยมีกลไกในการยับยั้งทรานสคริปชันแฟคเตอร์ (transcription factor) และไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (proinflammatory cytokine) ส่งผลให้การเจริญของเซลล์มะเร็งลดลง (47) นอกจากนี้ในหนูที่ถูกชักนำให้เกิดมะเร็งปอด (lung cancer) โดยเบนโซไพรีน (benzo(a)pyrene หรือ BaP) ซึ่งเป็นสารประกอบโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโครคาร์บอน (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon หรือ PAHs) ซึ่งเกิดจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของสารอินทรีย์นั้น พบว่าหากหนูได้รับพิเพอรีนจะช่วยลดการเกิด DNA-protein cross links ใน BaP ลดการเกิด lipid peroxidation โปรตีนคาร์โบนิล (protein carbonyls) และกรด

นิวคลิอิก (nucleic acid) ส่งผลให้การแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งลดลงได้ (48) นอกจากนี้พิเพอรีน ยังช่วยเพิ่มระดับของเอนไซม์เอทีพีเอส (ATPase) ได้แก่ โซเดียม-โพแทสเซียมเอทีพีเอส (Na^+/K^+–ATPases) แมกนีเซียม-เอทีพีเอส (Mg^{2+}-ATPases) และ แคลเซียม-เอทีพีเอส (Ca^{2+}-ATPases) ที่บริเวณเนื้อเยื่อและที่เยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง (49, 50) นอกจากนี้ ในปี ค.ศ. 1999 Bezerra และคณะพบว่าเมื่อใช้พิเพอรีนร่วมกับ 5-fluorouracil (5-FU) จะเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในสัตว์ทดลองได้ (51)

2.2.2 การศึกษาวิจัยในมนุษย์

มีรายงานในผู้ป่วยโรคมะเร็งปอด พบว่าพิเพอรีนมีบทบาทในการเพิ่มระดับของเอนไซม์ที่กำจัดสารพิษ (detoxification enzymes) ต่างๆ เช่น กลูตาไทโอน ทรานสเฟอเรส (glutathione transferase หรือ GST) ควิโนน รีดักเทส (quinone reductase หรือ QR) และยูดีพี-กลูคิวโรโนซิล ทรานสเฟอเรส (UDP-glucuronosyl transferase หรือ UDP-GT) ทำให้ระดับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลดลง ส่งผลให้การทำลายสารพันธุกรรมลดลงตามไปด้วย (52)

2.3 มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Leukemia)

ต้นกำเนิดของเซลล์เม็ดเลือดในร่างกายมาจากไขกระดูก ในภาวะปกติเซลล์ต้นกำเนิดจะแบ่งตัว (proliferation) และพัฒนา (differentiation) ไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่างๆ โดยมีเซลล์ต้นกำเนิดคือ hematopoietic stem cell (HSC) ซึ่งสามารถพัฒนาไปเป็น lymphocytic series ที่ต่อมไทมัส (thymus) และต่อมน้ำเหลือง (lymph nodes) ซึ่งจะพัฒนาต่อไปอีกเป็น mature lymphocyte ได้แก่ T- และ B-lymphocytes และในไขกระดูก HSC ยังสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดแดง (erythroid series) เซลล์เม็ดเลือดขาว (myeloid series) และ เซลล์ที่สร้างเกล็ดเลือด (megakaryocytic series) อีกด้วย เมื่อเกิดความผิดปกติที่ทำให้เซลล์เม็ดเลือดมีอัตราการแบ่งตัวสูงขึ้น หรือไม่สามารถหยุดการแบ่งตัวได้ รวมทั้งพัฒนาการ (differentiation) หยุดลง จะเรียกว่าเป็นมะเร็งของเม็ดเลือดขาว (53)

2.3.1 สาเหตุของมะเร็งเม็ดเลือดขาว

สาเหตุของมะเร็งเม็ดเลือดขาวยังไม่ทราบแน่ชัด แต่ปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญได้แก่ การได้รับสารเคมีหรือรังสี การติดเชื้อไวรัส ความผิดปกติของโครโมโซม เป็นต้น

2.3.2 ชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว

หากแบ่งตามระยะเวลาของอาการและชนิดของเซลล์ จะได้เป็น 4 ชนิด ดังนี้

1. Acute lymphoblastic leukemia (ALL)
2. Acute myeloblastic leukemia (AML) หรือนิยมเรียกเป็น Acute non-lymphoblastic leukemia (ANLL)
3. Chronic lymphocytic leukemia (CLL)
4. Chronic myelocytic leukemia (CML)

French-American-British Coorporative group (FAB) แบ่ง acute leukemia ได้ดังนี้

1. Acute lymphoblastic สามารถแบ่งย่อยโดยยึดหลักลักษณะทาง cytology และ degree heterogeneity ของเซลล์ทั้งหมดที่พบได้เป็น 3 subtypes คือ L1, L2 และ L3
2. Acute undifferentiated leukemia
3. Acute myeloid leukemia สามารถแบ่งย่อยโดยดูจาก differentiation และ maturation ของเซลล์แบ่งได้เป็น
    - 3.1 Myeloblastic leukemia without cytologic maturation (M0)
    - 3.2 Myeloblastic leukemia with minimal maturation (M1)
    - 3.3 Myeloblastic leukemia with significant maturation (M2)
    - 3.4 Hypergranular promyelocytic leukemia (M3)
    - 3.5 Hypogranular promyelocytic leukemia (M3 variant)
    - 3.6 Myelomonocytic leukemia (M4)
    - 3.7 Myelomonocytic leukemia with eosinophilia (M4eo)
    - 3.8 Monocytic leukemia (M5) แบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ 2 กลุ่มคือ
        - 3.8.1 M5a Poorly differentiated (monoblastic)
        - 3.8.2 M5b Differentiated
    - 3.9 Erythroleukemia (M6)
    - 3.10 Megakaryocytic leukemia (M7)

2.3.3 **อุบัติการณ์และระบาดวิทยาของมะเร็งเม็ดเลือดขาว** (54)

ปัจจุบันคนไทยเสียชีวิตจากโรคมะเร็งเป็นอันดับ 1 และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดเวลา โดยในปี พ.ศ. 2545 อัตราการตายจากโรคมะเร็งสูงถึง 73.3 รายต่อประชากร 100,000 คน ซึ่งมะเร็งแต่ละชนิดที่พบมีความแตกต่างกันตามอายุและภูมิภาค จากการสำรวจพบว่ามะเร็งเม็ดเลือดขาวจัดเป็นมะเร็งที่พบบ่อยเป็นอันดับ 10 ทั้งในเพศชายและเพศหญิง โดยพบผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวเพศชาย 3.9 รายต่อประชากร 100,000 คน และเพศหญิง 3.5 รายต่อประชากร 100,000 คน องค์การอนามัยโลกมีแนวทางในการป้องกันควบคุมโรคมะเร็งไว้ 4 แนวทางด้วยกันคือ

2.3.3.1 การป้องกันไม่ให้เกิดโรคมะเร็ง (primary prevention)

2.3.3.2 การค้นหามะเร็งในระยะแรกเริ่ม (early detection)

2.3.3.3 การวินิจฉัยและรักษา (diagnosis and treatment หรือ tertiary prevention)

2.3.3.4 การรักษาแบบประคับประคอง

ทั้งนี้คณะผู้วิจัยได้มุ่งเน้นการศึกษาเพื่อหากลไกการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของพิเพอรีนเพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาต่อยอดเพื่อการนำไปใช้รักษา หรือป้องกันการลุกลามของมะเร็งเม็ดเลือดขาวต่อไป

2.3.4 **การรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาว** (53, 55)

ปัจจุบันโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวเป็นโรคมะเร็งที่มีโอกาสรักษาให้หายขาดได้ โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวต่างจากโรคมะเร็งอื่นๆ ตรงที่ไม่สามารถรักษาได้โดยการผ่าตัด แต่มีวิธีการรักษาโดยการทำลายเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวให้หมดไปจากร่างกาย วิธีการรักษามีหลายวิธีได้แก่

2.3.4.1 เคมีบำบัด (Chemotherapy)

คือยาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ขั้นตอนสำคัญของการแบ่งเซลล์คือการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ โดยการลอกแบบมาจากของเดิม ยาเคมีบำบัดเป็นยาที่สามารถทำลายเซลล์โดยการขัดขวางการแบ่งตัวของเซลล์ แบ่งเป็นกลุ่มต่างๆ ได้ดังนี้

- Alkylating agents การลอกแบบดีเอ็นเอเพื่อสร้างดีเอ็นเอเส้นใหม่นั้นต้องใช้เอนไซม์หลายชนิดร่วมกันทำงาน ยาบางชนิดจะเติม methyl group, ethyl group หรือ alkyl group บนสายดีเอ็นเอ ทำให้สายดีเอ็นเอผิดปกติ ส่งผลให้เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ลอกแบบพันธุกรรมไม่สามารถทำงานได้ เป็นการป้องกันการถอดรหัสของสายดีเอ็นเอที่ผิดปกตินั้น ยาบางชนิดทำให้เส้นดีเอ็นเอหลายเส้นติดกัน ไม่สามารถแยกมาสร้างเส้นใหม่

ได้ ดังนั้นการเพิ่มจำนวนจึงถูกขัดขวาง ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ เช่น busulfan, cisplatin, cyclophosphamide, dacarbazine, ifosfamide, mechlorethamine และ melphalan

- Nitrosoureas ออกฤทธิ์โดยไปยับยั้งเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับการซ่อมแซมดีเอ็นเอ ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ เช่น carmustine และ lomustine

- Antimetabolites ในการสร้างนิวคลิโอไทด์ (nucleotides) ต้องอาศัยโฟเลต (folate) ช่วยในการเร่งปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ยาเคมีบำบัดที่เป็น Antimetabolites นั้น บางตัวเป็นยาที่มีโมเลกุลคล้ายโฟเลต สามารถแย่งจับกับเอนไซม์ต่างๆ เช่น dihydrofolate reductase และ ribonucleotide reductase ได้ ทำให้การสร้างนิวคลิโอไทด์หยุดชะงักลง และสารบางตัวยังมีโมเลกุลใกล้เคียงกับ guanine มาก เมื่อเซลล์นำสารนั้นไปสร้างเป็นสายดีเอ็นเอแทน guanine จะส่งผลให้ดีเอ็นเอเส้นนั้นทำงานไม่ได้ ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ 5-fluorouracil, methotrexate, gemcitabine, cytarabine, mercaptopurine, thioguanine และ fludarabine

- Antibiotics ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ หรือสอดแทรกอยู่ระหว่างดีเอ็นเอสายเดี่ยวทั้งสองสาย (intercalation) ขัดขวางการถอดรหัสเป็นอาร์เอ็นเอ ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ เช่น bleomycin, actinomycin D, daunorubicin, doxorubicin และ idarubicin

- Mitotic inhibitors เป็นสารกลุ่มอัลคาลอยด์ สามารถยับยั้งการเกิดไมโตซิสโดยการไปจับกับโปรตีน tubulin ซึ่งเป็นส่วนประกอบของไมโครทิวบูลภายในเซลล์ ยับยั้งการดึงขดของโครโมโซมให้แยกออกไป 2 ข้างได้ การแบ่งตัวจึงไม่สำเร็จ ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ เช่น paclitaxel, docetaxel, etoposide, vinblastin, vincristine และ vinorelbine

- Topoisomerase inhibitors ปกติสายดีเอ็นเอนอกจากจะจับกันเป็น double helix แล้ว ยังมีการขมวดเป็นปมคล้ายสปริง (coiling และ supercoiling) ในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่จะต้องมีการคลายตัวของปมดีเอ็นเอก่อน โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Topoisomerase ดังนั้นยาที่เป็น Topoisomerase inhibitors จะสามารถขัดขวางการทำงานของ Topoisomerase ทำให้ไม่มีการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ได้ ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ เช่น Camptothecin

- ยาเคมีบำบัดกลุ่มอื่นๆ เช่น L-asparaginase, amsacrine และ tretinoin

2.3.4.2 Immunotherapy

โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวบางชนิดเช่น ALL จะมีจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ปกติลดลง ทำให้ภูมิต้านทานโรคลดลง ผู้ป่วยจึงมักเสียชีวิตจากการติดเชื้อ การรักษาโดยวิธี Immunotherapy จึงเป็นการกระตุ้นศักยภาพของเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการฆ่าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เช่น natural killer cell (NK cell) และกระตุ้นให้มีการเพิ่มจำนวนของลิมโฟไซต์ เพื่อลดโอกาสในการติดเชื้อ การรักษาดังกล่าวมีหลายวิธี เช่น การฉีดแอนติบอดีเข้าไปในตัวผู้ป่วย การกระตุ้น NK activity ในหลอดทดลองเพื่อเพิ่มศักยภาพของ NK cell แล้วฉีดกลับเข้าไปในตัวผู้ป่วย เป็นต้น

2.3.4.3 Interferon therapy

กระบวนการผลิตเซลล์เม็ดเลือดนั้นถูกควบคุมโดย growth factors ชนิดต่างๆ ปัจจุบัน มีการนำสารโปรตีนเหล่านี้มาใช้ในการรักษามะเร็ง โดยอินเตอร์เฟอรอนสามารถกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดตัวอ่อนเกิด differentiation ได้ นอกจากนี้ยังกระตุ้น B cells, T cells, NK cells และ macrophages รวมถึงมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (antiproliferative activity) ได้อีกด้วย

2.3.4.4 รังสีรักษา (Radiotherapy)

เนื่องจากมะเร็งเม็ดเลือดขาวจะมีมะเร็งแพร่กระจายทั่วไปในกระแสเลือด การใช้รังสีรักษาสำหรับมะเร็งเม็ดเลือดขาวจึงไม่เหมาะสมเพราะไม่สามารถฉายแสงทั่วร่างกายได้ ในปัจจุบันนั้นจึงมีเพียงการใช้รังสีรักษาสำหรับมะเร็งต่อมน้ำเหลือง (Lymphoma) และ solid tumor ชนิดต่างๆ

2.3.4.5 การปลูกถ่ายไขกระดูก (Bone marrow transplantation)

ในการให้ยาเคมีบำบัดจำนวนมาก จะทำลายเซลล์มะเร็งได้มากขึ้นแต่จะส่งผลให้เซลล์เม็ดเลือดปกติถูกทำลายไปด้วย จึงต้องมีการนำเซลล์เม็ดเลือดหรือ hematopoietic stem cell ปกติ มาปลูกถ่ายให้ผู้ป่วย ผู้ป่วยจึงมีโอกาสรอดชีวิตได้

2.3.4.6 ยีนบำบัด (Gene therapy)

มะเร็งเป็นโรคที่มีความผิดปกติทางพันธุกรรมร่วมด้วย ดังนั้นการศึกษาความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับเซลล์ในระดับโมเลกุล จะช่วยให้สามารถคิดค้นวิธีรักษาและแก้ไขความผิดปกตินั้นได้โดยตรง การค้นคว้าวิจัยที่สำคัญและศึกษากันอย่างกว้างขวางขณะนี้คือยีนบำบัดซึ่งเป็นการนำ genetic material ใส่เข้าไปในเซลล์ของผู้ป่วยเพื่อทำหน้าที่ทดแทนยีนที่ผิดปกติหรือยีนที่ขาดหายไป

2.3.5 Human leukemia cell lines

การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดสามารถทำการทดสอบได้ในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดที่สามารถเพาะเลี้ยงเพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการมีมากมายหลายชนิด สามารถแบ่งตามต้นกำเนิดของเซลล์ได้เป็น 2 กลุ่มคือ

1. Human myeloid leukemia cell lines ได้แก่ KG-1a, KG-1, HL-60, ML-1 and 3, U937, THP-1, K562, HEL, KU812, MEG-01 และ CM-SM เป็นต้น

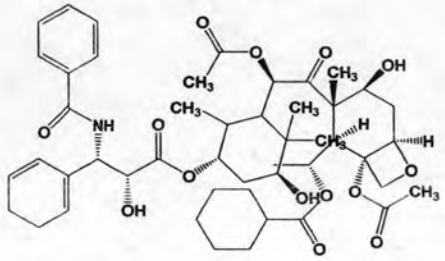
2. Human lymphoid leukemia cell lines ได้แก่ MOLT-4, Daudi, Ramos, H9 และ Jurkat เป็นต้น

เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ คือ Human T cell lines ได้แก่ H9 ซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากผู้ป่วย lymphoma และ Jurkat ซึ่งมีแหล่งกำเนิดมาจากผู้ป่วย acute lymphoblastic leukemia (ALL)

2.3.6 ยาต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ใช้ในการทดลอง

2.3.6.1 Paclitaxel

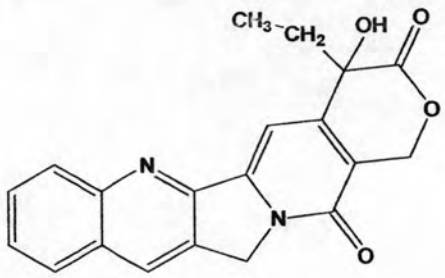
Paclitaxel เป็น alkaloid ที่สกัดได้จาก *Taxus brevifolia* หรือต้นยิว (yew) มีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.2 ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ นอกจากนี้ยังสามารถจับกับไมโครทิวบูล (microtubules) ส่งผลให้การเจริญของเซลล์หยุดชะงัก (arrest) ที่ระยะไมโตซิสของวัฏจักรเซลล์ ในปี ค.ศ. 2004 Wang และคณะพบว่า Paclitaxel ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว HL-60 ในหลอดทดลอง โดยทำให้การเจริญของเซลล์หยุดชะงักที่ระยะ G_2/M และชักนำให้เกิดการตายแบบ Apoptosis (56, 57)



รูปที่ 2.2 แสดงสูตรโครงสร้างของ Paclitaxel

2.3.6.2 Camptothecin

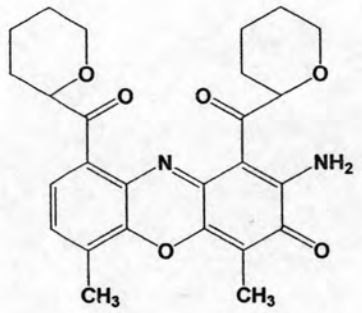
Camptothecin เป็น alkaloid ที่สกัดได้จากพืช *Camptotheca acuminate* (family Nyssaceae) มีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.3 ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้ง DNA topoisomerase I ทำให้การเจริญของเซลล์หยุดชะงักที่ระยะ S (58-60)



รูปที่ 2.3 แสดงสูตรโครงสร้างของ Camptothecin

2.3.6.3 Actinomycin D

Actinomycin D จัดเป็นยาปฏิชีวนะ (antibiotics) มีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.4 สามารถจับกับดีเอ็นเอได้ จึงขัดขวางขบวนการถอดรหัส (transcription) เป็น mRNA Bansal และคณะพบว่า Actinomycin D สามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือด CEM-C7 เกิดการตายแบบ Apoptosis (61-63) การวิจัยครั้งนี้มี Actinomycin D เป็น positive control สำหรับการตรวจสอบฤทธิ์ของพิเพอรีนในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ (PBMC)



รูปที่ 2.4 แสดงสูตรโครงสร้างของ Actinomycin D

2.4 **การเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์** (cytotoxicity)

ความเป็นพิษต่อเซลล์เกิดจากการที่เซลล์ตายโดยสารประกอบเคมี เช่น อาหาร ยา หรือ cytotoxic T cells โดยการทำลายเซลล์จะก่อให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ มีการผ่านเข้าออกของสารและน้ำภายในเซลล์ นำไปสู่การแตกสลายของเซลล์ในที่สุด การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ส่วนใหญ่จะอาศัยการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ในการยอมให้สารผ่านเข้าออก (permeability) ส่งผลให้เซลล์ปล่อยสารต่างๆ ออกมาภายนอก เช่น การปล่อยเอนไซม์แลคเตตดีไฮโดรจีเนส (Lactate Dehydrogenase, LDH) ซึ่งจะอยู่ในส่วน cytoplasm พบได้ในเซลล์ทุกชนิดและมีความเสถียร เซลล์จะปล่อย LDH ออกมาอย่างรวดเร็วเมื่อเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย (64) ดังนั้นปริมาณ LDH ที่ตรวจวัดได้จึงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับเซลล์ที่แตกสลาย ในปี ค.ศ. 1990 Racher และคณะพบว่าเมื่อเซลล์มะเร็งลูกผสมในหนู (C1E3 hybridoma cell) ถูกทำลาย จะปล่อย LDH ออกมามากขึ้น จำนวนเซลล์ที่ตายก็เพิ่มขึ้นเช่นกัน (65) นอกจากนี้ยังมีวิธีการอย่างง่ายที่ใช้ในการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ได้แก่คุณสมบัติในการยอมให้สารแพร่ผ่านเข้าไปในเซลล์ในสภาวะที่ผนังเซลล์ถูกทำลาย โดยใช้สีย้อมเป็นตัวตรวจวัด ได้แก่ Trypan blue, Eosine, Erythrosine, Methylene blue, Congo red และ Nigrosine เป็นต้น (66) ซึ่งจะย้อมติดเซลล์ที่เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย แต่ไม่สามารถย้อมติดเซลล์ที่มีชีวิตได้ ในงานวิจัยชิ้นนี้ได้ทำการตรวจวัดความเป็นพิษของสารต่อเซลล์อาศัยคุณสมบัติของสีย้อม Trypan blue ที่แพร่ผ่านเข้าไปในเซลล์และตรวจวัดระดับ LDH activity เปรียบเทียบกับสภาวะควบคุม

2.5 **วัฏจักรของเซลล์** (Cell cycle) (67)

วัฏจักรเซลล์เป็นขบวนการที่เกี่ยวเนื่องกับการเจริญของเซลล์ (growth) พัฒนาการของเซลล์ (differentiation) และการผลัดเปลี่ยนหมุนเวียน (turnover) ของเซลล์ โดยเซลล์ในระยะพักจะอยู่ในช่วง G_0 phase วัฏจักรของเซลล์จะเริ่มขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับสัญญาณที่ชักนำให้เกิดการแบ่งตัว สัญญาณดังกล่าว ได้แก่ growth factors, cytokines หรือ mitogens ซึ่งจะมีลักษณะการกระตุ้นเป็น signal transduction cascades ผ่านกลไกสำคัญ 3 ทาง คือ Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK), Protein Kinase C (PKC) และ Just Another Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription (JAK/STAT)

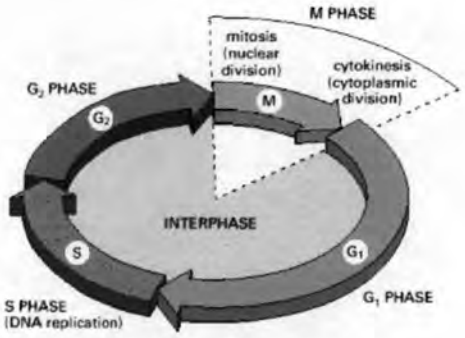
เมื่อเซลล์แบ่งตัว ก็จะเริ่มเข้าสู่ active phase ของวัฏจักรเซลล์ (ดังรูปที่ 2.5) ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 4 ระยะคือ

1. ระยะ G_1 phase (G หมายถึง GAP) เป็นช่วงที่เซลล์เตรียมความพร้อมสำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ในช่วงท้ายของระยะ G_1 เซลล์จะต้องผ่านจุดที่เรียกว่า restriction point (R) เพื่อเข้าสู่วัฏจักรต่อไป

2. ระยะ S phase เป็นช่วงที่เซลล์มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ และมีการจำลองสารพันธุกรรมในระยะนี้ โดยจะมีชุดดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า

3. ระยะ G_2 phase เป็นระยะที่เซลล์มีการเตรียมความพร้อมเพื่อแบ่งเซลล์และมีการตรวจการจำลองสารพันธุกรรมโดยเอนไซม์สำหรับซ่อมแซมดีเอ็นเอ

4. ระยะ M phase เป็นระยะที่เซลล์มีการแบ่งตัวโดยขบวนการไมโตซิส (mitosis) หรือไมโอซิส (meiosis) และจะกลับเข้าสู่ระยะ G_0 หรือ G_1 ต่อไป



รูปที่ 2.5 **วัฏจักรของเซลล์** (Alberts, 2002)

วัฏจักรของเซลล์ดำเนินไปด้วยกลไกการทำงานของโปรตีน Cyclins ร่วมกับเอนไซม์ Cyclin-dependent protein kinase (CDKs) เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะ G_1/S จะพบ Cyclin D และ Cyclin E สูงขึ้น เมื่อเริ่มระยะ S จะมีระดับของ Cyclin A เพิ่มขึ้น เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะ M การเกิดไมโตซิสจะถูกควบคุมโดย Cyclin B เมื่อถึงช่วง anaphase นั้น Cyclin B จะสลายไป ซึ่งการสลายของ Cyclin B จะเป็นการควบคุมให้เซลล์ออกจากระยะไมโตซิส และเข้าสู่ระยะ G_1

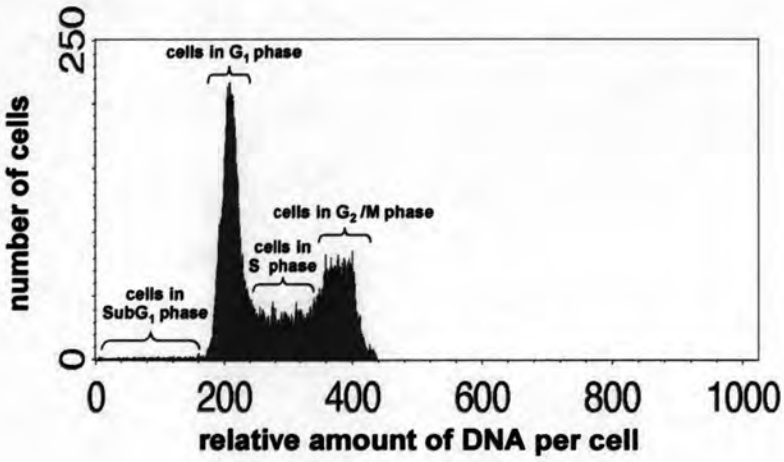
การวิเคราะห์เซลล์ในวัฏจักรเซลล์ทำได้โดยการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอ (DNA content) โดยใช้ DNA-binding fluorescent dye และตรวจสอบโดย flow cytometer ซึ่งปริมาณการเรืองแสง (mean fluorescent intensity) ที่ตรวจวัดได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอในแต่ละเซลล์ (ดังรูปที่ 2.6) โดยจะจำแนกเซลล์ออกได้เป็น 4 กลุ่มคือ

1. เซลล์ในระยะ $SubG_1$ คือเซลล์ที่จัดเป็น Apoptotic cells

2. เซลล์ในระยะ G_1 เป็นช่วงที่เซลล์ยังไม่มีการจำลองดีเอ็นเอเพิ่ม

3. เซลล์ในระยะ S เป็นช่วงที่มีปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น

4. เซลล์ในระยะ G_2/M เป็นช่วงที่มีการจำลองดีเอ็นเอแล้ว ทำให้มีปริมาณดีเอ็นเอเป็น 2 เท่าของระยะ G_1



รูปที่ 2.6 **ผลการวิเคราะห์** DNA content **โดยเครื่อง** flow cytometer

งานวิจัยชิ้นนี้ได้ทำการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอและจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะโดยการใช้สารเรืองแสง propidium iodide (PI) และตรวจวัดด้วย flow cytometer

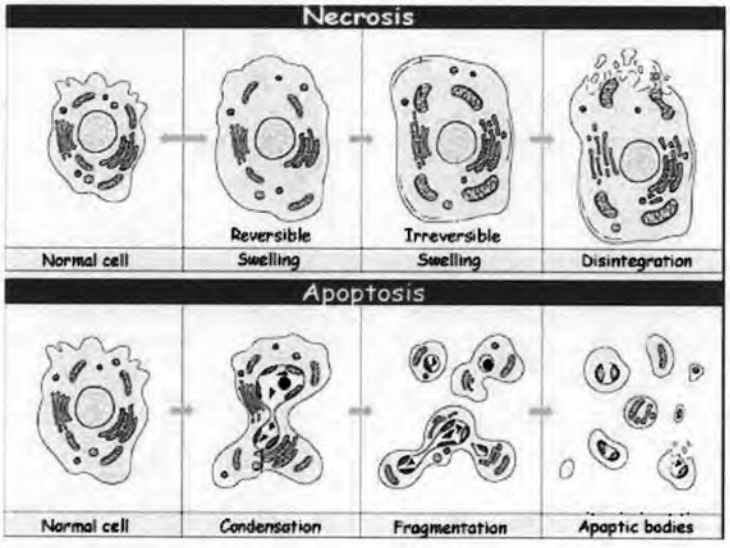
2.6. **การตายแบบอะพอพโทซิส (Apoptosis)** (64, 68)

การควบคุมสมดุลระหว่างการแบ่งตัวของเซลล์ และการตายของเซลล์เป็นขบวนการที่จำเป็นสำหรับพัฒนาการของสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ กระบวนการตายของเซลล์ (Programmed cell death) เกิดจากการควบคุมโดยหน่วยพันธุกรรม เหนี่ยวนำให้เกิดการตายที่เรียกว่า Apoptosis ซึ่งเกิดจากการกระตุ้นโดยปัจจัยภายนอกหลายสาเหตุ เช่น การผ่าเหล่าของยีน การติดเชื้อไวรัส โรคทางระบบภูมิคุ้มกัน และโรคทางระบบประสาท

2.6.1 **การตายของเซลล์**

ในปี ค.ศ. 1972 Kerr และคณะได้จำแนกชนิดการตายของเซลล์ไว้ 2 แบบ ได้แก่ การตายแบบ Necrosis และ Apoptosis (ดังรูปที่ 2.7) การตายแบบ Necrosis เป็นการตายที่รุนแรง ถูกกระตุ้นจากสิ่งกระตุ้นแวดล้อม (environmental stimuli) ส่งผลให้เกิดการทำลายสมดุลของเซลล์อย่างรวดเร็ว การเกิด Necrosis นั้น เซลล์จะบวมเนื่องจากสูญเสียการควบคุมการผ่านเข้าออก

ของสารที่เยื่อหุ้มเซลล์และเกิดการสลายของเซลล์ในที่สุด ส่วนการตายแบบ Apoptosis เป็นการตายที่มีรูปแบบเฉพาะและมีการควบคุม ดังนั้นการตายแบบ Apoptosis จึงมีบทบาทสำคัญในการควบคุมจำนวนเซลล์และมีความสำคัญต่อการควบคุมสมดุลของเนื้อเยื่อ (tissue homeostasis) ของสิ่งมีชีวิต เซลล์ที่เกิด Apoptosis จะมีการเปลี่ยนแปลงของ Plasma membrane โดย phosphotidylserine (PS) ซึ่งอยู่ด้านในของเยื่อหุ้มเซลล์จะเคลื่อนออกมายังด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ เซลล์จะมีการสูญเสียปริมาตรของเซลล์ (loss of cell volume) เยื่อหุ้มเซลล์หดแฟบ (plasma membrane blebbing) นิวเคลียสรวมตัวกันแน่น (nuclear condensation) มีการเกาะกลุ่มของโครมาติน (Chromatin aggregation) และดีเอ็นเอถูกย่อยเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ (nucleosomal fragments) ในที่สุด



รูปที่ 2.7 ลักษณะการตายแบบ Necrosis และ Apoptosis (Wyllie, 1999)

2.6.2 ตัวควบคุมการเกิด Apoptosis

การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เกิด Apoptosis อาศัยเอนไซม์คาสเปส (caspase) ควบคุมโดย proapoptotic proteins และ antiapoptotic proteins ยีนที่ควบคุม Apoptotic ได้แก่ Tumor suppressor gene เช่น p53, PTEN และ oncogenes เช่น AKT, bcl-2 การควบคุมอะพอพโทซิสในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเกี่ยวข้องกับกลุ่ม Anti-Apoptotic proteins เช่น Bcl-2, Bcl-X_L และกลุ่ม Pro-Apoptotic proteins เช่น Apaf-1, caspases นอกจากนี้ไมโตคอนเดรียยังเป็นออร์แกเนลล์ที่มีบทบาทสำคัญในขั้นตอน

เริ่มแรกของอะพอพโทซิส เพราะจะหลั่งสารที่เหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิส เช่น cytochrome C และ Apoptosis-inducing factor (AIF)

2.6.3 การตรวจสอบการตายแบบ Apoptosis

2.6.3.1 การประเมินรูปสัณฐานการตายของเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดาและฟลูออเรสเซนต์

2.6.3.2 การเปลี่ยนแปลง Plasma membrane

2.6.3.3 การวิเคราะห์รูปแบบการแตกหักของดีเอ็นเอ (DNA fragmentation)

2.6.3.4 การตรวจวัด caspases

2.6.3.5 การวิเคราะห์การทำงานของไมโตคอนเดรียระหว่างเกิด Apoptosis

งานวิจัยชิ้นนี้ได้ตรวจสอบฤทธิ์ของพิเพอรีนที่มีผลต่อการตายของเซลล์แบบ Apoptosis โดยอาศัยหลักการต่างๆ ดังนี้

1. ประเมินรูปสัณฐานของเซลล์โดยใช้กล้องฟลูออเรสเซนต์

Apoptosis ในระยะเริ่มต้นจะสามารถสังเกตได้จากลักษณะรูปร่างของเซลล์และนิวเคลียสที่เปลี่ยนแปลงไปโดยการย้อมเซลล์ด้วยสารเรืองแสง ซึ่งสีย้อมที่ใช้ในงานวิจัยชิ้นนี้คือ Acridine orange และ Ethidium bromide โดย Acridine orange จะจับกับดีเอ็นเอ ย้อมติดสีเขียว สามารถย้อมติดสีทั้งเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ไม่มีชีวิต ส่วน Ethidium bromide จะจับกับดีเอ็นเอ ย้อมติดสีส้ม แต่จะย้อมติดสีเฉพาะเซลล์ที่ไม่มีชีวิตเท่านั้น ดังนั้น Live cell หรือเซลล์ที่มีชีวิตจะย้อมติดสีเขียวและเห็นนิวเคลียสเป็นเนื้อเดียวกัน ส่วน Apoptotic cells จะย้อมติดสีเขียวหรือส้ม และมองเห็นนิวเคลียสหดเป็นก้อนหรือมีชิ้นส่วนของดีเอ็นเออยู่ภายใน ส่วน Necrotic cells จะย้อมติดสีส้มและมองเห็นนิวเคลียสติดสีเป็นเนื้อเดียวกันเหมือนเซลล์ที่มีชีวิต (69)

2. วิเคราะห์รูปแบบการแตกหักของดีเอ็นเอ (DNA fragmentation)

หากเซลล์เกิด Apoptosis โดยมีการแตกหักของดีเอ็นเอร่วมด้วย จะได้ผลลัพธ์ของดีเอ็นเอเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ มีลักษณะเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ ขนาดประมาณ 200 คู่เบส (70) สามารถตรวจสอบได้โดยวิธี gel electrophoresis วิธีนี้จัดเป็นการวิเคราะห์ทางคุณภาพ

3. การเปลี่ยนแปลงของ Plasma membrane

เซลล์ที่เกิด Apoptosis ในระยะเริ่มต้นจะมีการเปลี่ยนแปลงของ Plasma membrane โดย phosphatidylserine (PS) ซึ่งอยู่ด้านในของเยื่อหุ้มเซลล์จะเคลื่อนออกมายังด้านนอก ทำให้โปรตีน Annexin V ซึ่งจำเพาะกับ PS สามารถจับกับ PS ที่ผิวเซลล์ด้านนอกได้ ส่วน propidium iodide (PI) ซึ่งสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ที่เกิด apoptosis จึงสามารถย้อมติดสีส่วนดีเอ็นเอได้ ดังนั้นการย้อมเซลล์ด้วยสารเรืองแสง 2 ชนิด คือ Annexin V-FITC และ PI จึงสามารถใช้ในการตรวจสอบการตายแบบ Apoptosis โดยใช้เครื่อง flow cytometer ได้