บทที่ 1 บทนำ (Introduction)

ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

มะเร็งเป็นปัญหาทางสุขภาพเป็นอันดับต้นๆของประเทศไทยและทั่วโลก การรักษาโรคมะเร็ง อาจจะใช้วิธีผ่าตัดหรือฉายแสงรังสีเพื่อกำจัดเนื้อร้าย ถ้ามะเร็งนั้นเกิดเฉพาะที่ แต่กว่า 50% ของโรคมะเร็ง จำเป็นต้องรักษาโดยเคมีบำบัด เนื่องจากยารักษาโรคมะเร็งในปัจจุบัน เป็นสารที่ทำให้เกิดการเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxic agents) ซึ่งทำลายทั้งเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ จึงส่งผลให้มีผลข้างเคียงสูง และยังพบว่า ยาที่ใช้ยังอาจมีส่วนทำให้เกิดการกลับมาเป็นมะเร็งใหม่ ซึ่งไม่สามารถรักษาด้วยยาตัวเดิม นอกจากนั้น เซลล์มะเร็งยังมีการพัฒนาให้ต้านกับยามะเร็งหลายชนิด (Multi-drug resistance) ดังนั้น ยารักษาโรคมะเร็งรุ่นใหม่ จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อ เซลล์มะเร็งสูง และมีผลต่อเซลล์ปกติให้น้อยที่สุด

จากการศึกษากลไกในระดับโมเลกุลภายในเซลล์มะเร็ง รวมทั้งสาเหตุและปัจจัยของการเกิดและแพร่กระจาย (Metastasis) ของเซลล์มะเร็ง ทำให้เราพบเป้าหมายใหม่ๆในการฆ่าเซลล์มะเร็งอย่างจำเพาะเจาะจง ในบรรดาเป้าหมายใหม่เหล่านี้ ซึ่งได้แก่ การขัดขวางการสร้างเส้นเลือดใหม่ที่หล่อเลี้ยงเซลล์มะเร็ง (Angiogenesis) การขัดขวางโมเลกุลหรือเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวงจรชีวิตของเซลล์หรือการแบ่งตัวของเซลล์ (Cell cycle or cell proliferation) รวมทั้งการขัดขวางการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังส่วนอื่นๆของร่างกาย (Metastasis) ก็ยังมี เอนไซม์เทโลเมอเรส พบว่า เอนไซม์นี้มีความจำเป็นต่อการเป็นอมตะของเซลล์มะเร็ง โดยเซลล์มะเร็งกว่า 85% มีการแสดงออกของเอนไซม์นี้ ในขณะที่เซลล์ร่างกายส่วนใหญ่ ตรวจไม่พบการทำงานของเอนไซม์นี้เลย ดังนั้น ยาที่ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรส จะมีความจำเพาะเจาะจงสูง

เซลล์ร่างกายทั่วไปมีความสามารถในการแบ่งตัวอย่างจำกัด พบว่าความสามารถในการแบ่งตัว มีความสัมพันธ์โดยตรง กับความยาวของโครงสร้างดีเอ็นเอพิเศษ ที่อยู่ปลายสุดของโครโมโซม ที่เรียกว่าเทโลเมีย (Telomere) โดยพบว่า ในแต่ละรอบของการแบ่งตัว ส่วนเทโลเมียจะหดสั้นไปทีละน้อย จนเมื่อถึงความยาวหนึ่ง เซลล์จะไม่สามารถแบ่งตัวได้อีก และจะมีการเปลี่ยนแปลงของระบบภายในเซลล์ ที่เรียกว่าการแก่ (Senescence) แต่ถ้าหากยังมีการแบ่งตัวอีก เซลล์จะถูกกระตุ้นให้มีการตายแบบอะพอพโตซิส (Apoptosis) แต่ในเซลล์ต้นกำเนิด (Stem cells) เซลล์สืบพันธุ์ (Germ line cells) และเซลล์ที่มีการแบ่งตัวสูงบางชนิด เทโลเมียจะมีการคงความยาวได้โดยการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรส

เซลล์มะเร็งมากกว่า 85% ก็ใช้เอนไซม์นี้ ในการรักษาความยาวของเทโลเมีย ทำให้มันสามารถแบ่งตัวได้ไม่จำกัดและมีความเป็นอมตะ

ในการเสาะคัดเลือกหายาต้านมะเร็งโดยทั่วไป ซึ่งใช้วิธีศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (Cytotoxic tests) ภายในระยะเวลาอันสั้น จะไม่สามารถคัดกรองหายาที่เป็นสารที่ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรสได้ เนื่องจากสารเหล่านี้ โดยหลักการแล้วจะทำให้เซลล์มะเร็งตายต่อเมื่อเซลล์มะเร็งนั้น มีการแบ่งตัวจนกระทั่งเทโลเมียหดสั้นจนถึงจุดวิกฤต และมีการตายในที่สุด ซึ่งจำเป็นที่จะต้องให้เซลล์มะเร็งมีการแบ่งตัวหลายรอบ ดังนั้น จึงจำเป็นต้องจัดหาระบบที่คัดกรองหาสารเหล่านี้โดยเฉพาะ และเนื่องจากการที่เทโลเมอเรส เป็น Nucleoprotein ซึ่งประกอบไปด้วยส่วนอาร์เอ็นเอ และส่วนของโปรตีนที่เป็น Reverse transcriptase และในการทำงานของเอนไซม์นี้ ยังจำเป็นต้องมีโปรตีนอื่นในเซลล์ประกอบด้วย ดังนั้น จึงไม่สามารถแยกเอนไซม์เดี่ยวมาทำการทดสอบได้ ระบบในปัจจุบันเป็นการแยกเอาส่วนสารละลายในเซลล์มะเร็ง มาทดสอบการทำงานของเอนไซม์โดยวิธี TRAP (Telomerase Repeat Amplification Protocol) Assay ดังนั้น ระบบการคัดกรองหาสารยับยั้งการทำงานของเทโลเมอเรส จำเป็นต้องมีมาตรฐานที่ดี

ประเทศไทย เป็นหนึ่งในประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพ ดังนั้น จึงน่าจะมีการสำรวจและใช้ประโยชน์จากทรัพยากรอันมีค่านี้ในการเสาะหายาที่ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรส เนื่องจากยากลุ่มนี้ นอกจากจะใช้ในการรักษาโรคมะเร็งแล้ว ยังสามารถใช้ในการป้องกันการเกิดเป็นโรคใหม่ได้ เนื่องจากจะไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ แต่ทำให้เซลล์มะเร็ง มีช่วงอายุเซลล์ที่จำกัดเหมือนเซลล์ทั่วไป ดังนั้น ยากลุ่มนี้จะเป็นยาที่ใช้อย่างแพร่หลายในอนาคต

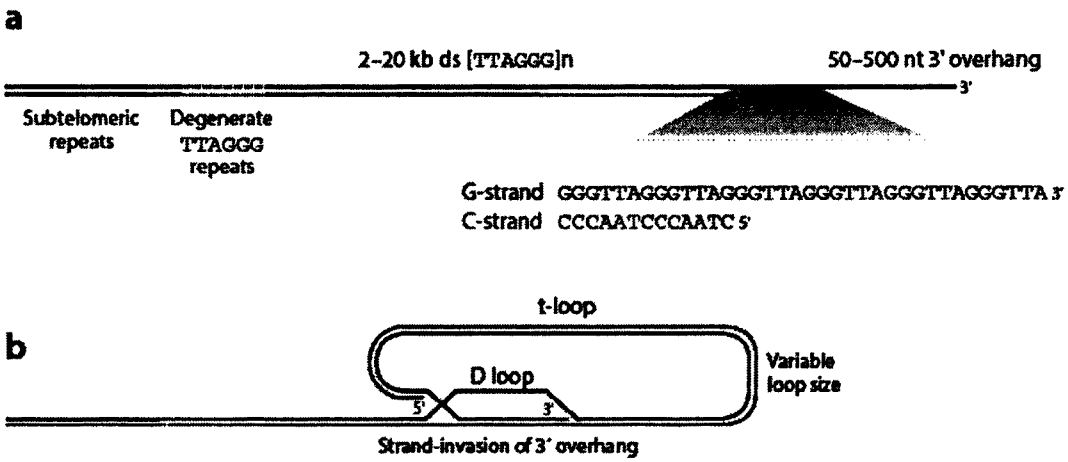
ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature Review)

ในการรักษาโรคมะเร็งให้มีผลข้างเคียงน้อยที่สุด จำเป็นที่จะต้องหาเป้าหมายที่มีเฉพาะในเซลล์มะเร็ง หรือมีความจำเป็นต่อการเกิด หรือการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ในส่วนต่อไปนี้ เป็นผลงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่า เทโลเมอเรสเป็นเป้าหมายเฉพาะ ที่จำเป็นต่อความเป็นอมตะของเซลล์มะเร็ง

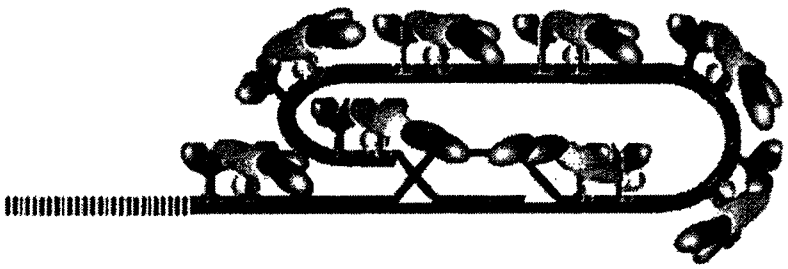
<u>โครงสร้างของเทโลเมีย</u> [1]

เทโลเมียเป็นโครงสร้างพิเศษ ที่อยู่บริเวณปลายสุดของโครโมโซม ของยูแคริโอท ประกอบไปด้วยโปรตีนหลากหลายชนิด รวมตัวอยู่กับดีเอ็นเอ ในมนุษย์ ส่วนของดีเอ็นเอประกอบไปด้วยดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็น TTAGGG ซ้ำๆกัน โดยมีความยาวระหว่าง 2-20 กิโลเบส ที่ส่วนปลายสุดของดีเอ็นเอ จะมีปลายทางด้าน 3' ที่ยาวยื่นออกมาประมาณ

50-500 เบส โดยส่วนที่ยื่นออกมานี้ จะแทรกเข้าไปบริเวณส่วนที่เป็นสายคู่ ทำให้เกิดเป็นบ่วงใหญ่ที่เรียกว่า "ทีลูป" (t-loop) และบ่วงเล็กที่เกิดจากการแทรกของปลาย 3' ที่เรียกว่า "ดีลูป" (D-loop) (รูปที่ 1) โครงสร้างดีเอ็นเอนี้ จะถูกจับด้วยโปรตีนหลากหลายชนิด แต่ที่สำคัญได้แก่ กลุ่มโปรตีนพิเศษที่เรียกว่า "เชลเตอริน" (Shelterin) ซึ่งประกอบไปด้วยโปรตีนหกชนิดที่พบเฉพาะที่เทโลเมีย โครงสร้างนี้จะทำให้ปลายเทโลเมียมีความเสถียรภาพ และมีความแตกต่างไปจากดีเอ็นเอที่แตกหัก ทำให้เซลล์ไม่ทำการซ่อมแซมปลายดีเอ็นเอที่เทโลเมีย



รูปที่ 1.1: ส่วนของดีเอ็นเอที่เทโลเมีย



รูปที่ 1.2: กลุ่มโปรตีนเชลเตอรินที่เทโลเมีย

<u>การหดสั้นของเทโลเมียและการแก่ของเซลล์</u>

ในกระบวนการเรพพลิเคชั่น เพื่อทำการคัดลอกดีเอ็นเออีกชุดหนึ่งก่อนการแบ่งเซลล์นั้น ส่วนปลายของดีเอ็นเอ (เทโลเมีย) ที่สร้างใหม่ จะถูกสร้างได้ไม่ครบสมบูรณ์ เนื่องจากส่วนที่เป็นไพรเมอร์ จะถูกกำจัดออก ทำให้ดีเอ็นเอสายใหม่ มีขนาดที่สั้นลง [2,3] นอกจากนั้นแล้ว เซลล์ยังอาจมีกระบวนการย่อยปลายเทโลเมีย ทำให้เกิดปลายทางด้าน 3'

ที่ยาวยื่นออกมา [4] ทั้งสองปัจจัยนี้ ทำให้ส่วนของเทโลเมีย มีการหดสั้นลงในทุกๆรอบของการแบ่งเซลล์ เมื่อปลายเทโลเมียปลายใดปลายหนึ่งภายในเซลล์ หดสั้นจนถึงจุดๆหนึ่ง เทโลเมียจะไม่สามารถคงโครงสร้างที่เหมาะสมได้ ทำให้ปลายเทโลเมีย มีสภาพคล้ายดีเอ็นเอที่แตกหัก ซึ่งจะส่งสัญญาณให้เซลล์ทำการซ่อมแซม ซึ่งจะทำให้มีการหยุดวงจรของเซลล์ และนำเซลล์เข้าสู่ภาวะแก่ หรือที่เรียกว่า "ซีเนสเซนส์" (Senescence) ซึ่งเป็นภาวะที่เซลล์ไม่สามารถแบ่งตัวได้ และมีการเปลี่ยนแปลงทั้งทางกายภาพและคุณภาพของเซลล์ [5] พบว่า เซลล์ร่างกายทั่วไปมีความสามารถในการแบ่งตัวอย่างจำกัด เช่น เซลล์ไฟโบรบลาสต์ เมื่อนำมาเลี้ยงในถาดเลี้ยงเซลล์ จะสามารถแบ่งตัวได้ประมาณ 50-70 รอบ ก่อนที่เซลล์จะเข้าสู่ภาวะซีเนสเซนส์ โดยที่เทโลเมียจะหดสั้นลงตามจำนวนรอบของการแบ่งตัวที่เพิ่มขึ้น นอกจากนั้นแล้ว ยังพบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่มาจากคนหลายๆคน จะมีปลายเทโลเมียที่มีความยาวแตกต่างกัน โดยความยาวของเทโลเมียมีความสัมพันธ์ผกผันกับอายุของคนๆนั้น และความยาวของเทโลเมีย มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความสามารถในการแบ่งตัวของเซลล์นั้นๆ ก่อนที่เซลล์จะเข้าสู่ภาวะซีเนสเซนส์ ดังนั้น จึงมีการเชื่อว่า ความยาวของเทโลเมีย สามารถใช้เป็นตัวกำหนดความสามารถในการแบ่งตัวของเซลล์หนึ่งๆ [6-8]

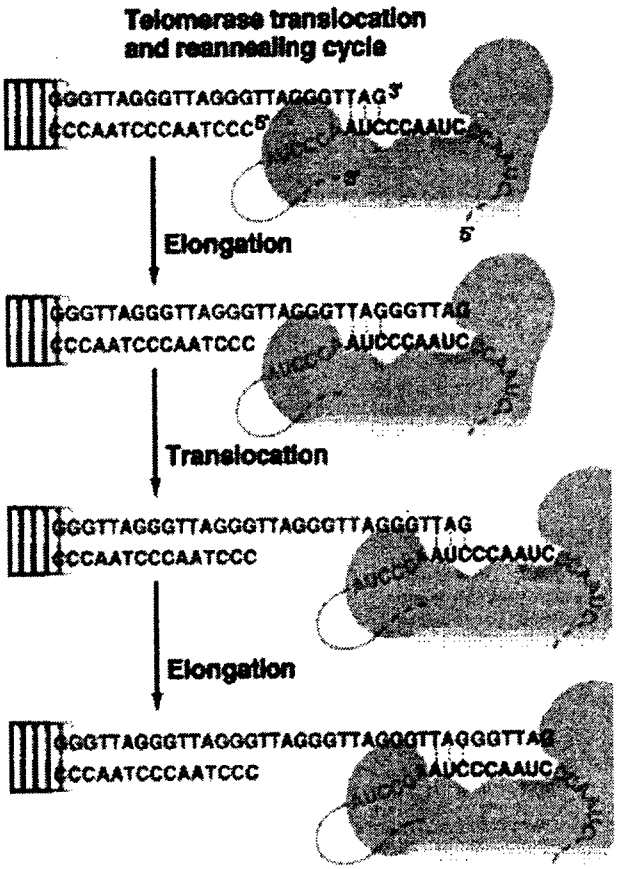
<u>บทบาทของเทโลเมอเรส</u>

ในเซลล์ต้นกำเนิด (Stem cells) เซลล์สืบพันธุ์ (Germ line cells) และเซลล์ที่มีการแบ่งตัวสูงบางชนิด จำเป็นที่จะต้องมีการคงความสามารถในการแบ่งตัวอย่างไม่จำกัดไว้ ได้มีการตรวจพบว่า เซลล์เหล่านี้ มีการรักษาความยาวของของเทโลเมียไว้ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรส เช่นเดียวกัน เซลล์มะเร็งมากกว่า 85% ก็ใช้เอนไซม์นี้ในการรักษาความยาวของเทโลเมีย ทำให้มันสามารถแบ่งตัวได้ไม่จำกัด [9]

ถึงแม้ว่าการแสดงออกของเทโลเมอเรส จะจำเป็นต่อการแบ่งตัวอย่างไม่จำกัดของเซลล์มะเร็ง แต่ก็ไม่ใช่สาเหตุที่ทำให้เกิดเซลล์มะเร็ง ได้มีการศึกษาโดยการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของเทโลเมอเรสในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเซลล์ผิวหนัง พบว่าเซลล์เหล่านั้นสามารถมีการแบ่งตัวอย่างไม่จำกัด มีสภาพการทำงานที่เป็นปกติ ถึงแม้ว่าจะผ่านการแบ่งตัวในจำนวนรอบที่ทำให้เซลล์ที่ไม่มีการเหนี่ยวนำเปลี่ยนเป็นเซลล์ที่แก่ แต่ไม่มีลักษณะอื่นๆของเซลล์มะเร็ง [10] ความสามารถในการป้องกันการแก่ของเซลล์นี้ ได้มีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านเชื่อว่า การกระตุ้นให้มีการแสดงออกของเทโลเมอเรส จะทำให้ร่างกายชะลอการแก่ไปได้ [8,11] จากรายงานผลการทดลองล่าสุด (2008) ในหนูที่ต้านมะเร็ง พบว่าการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกเทโลเมอเรส ทำให้หนูจำนวนหนึ่งมีการลดอาการแก่และมีอายุที่ยืนยาวขึ้น [12] แต่ความเชื่อนี้ ก็มีการถกเถียงกันอยู่ [13]

การทำงานของเทโลเมอเรส

เทโลเมอเรสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มรีเวิร์สทรานสคิปเตส (Reverse transcriptase) คือ เป็นดีเอ็นเอโพลีเมอเรสที่ใช้อาร์เอ็นเอเป็นแม่แบบ โดยเทโลเมอเรสมีความพิเศษตรงที่ มีส่วนอาร์เอ็นเอแม่แบบอยู่ร่วมกับส่วนของโปรตีนที่เป็นดีเอ็นเอโพลีเมอเรส จากรายงานโครงสร้างเทโลเมอเรสของมนุษย์ล่าสุดในปี 2007 พบว่า โมเลกุลของเทโลเมอเรสอยู่ในรูปที่เป็นคอมเพล็กซ์ใหญ่ ที่ประกอบไปด้วยสองชุดของโมเลกุลสามชนิด ได้แก่ โปรตีน hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase) ซึ่งทำหน้าที่เป็นดีเอ็นเอโพลีเมอเรส โมเลกุลชนิดที่สองคือ อาร์เอ็นเอ hTR (human Telomeric RNA) โดยมีอาร์เอ็นเอส่วนหนึ่งทำหน้าที่เป็นอาร์เอ็นเอแม่แบบสำหรับhTERT ในการต่อปลายเทโลเมีย โมเลกุลชนิดที่สาม คือ โปรตีน Dyskerin ซึ่งจะจับอยู่กับส่วนของ อาร์เอ็นเอ hTR ซึ่งคาดว่าจำเป็นต่อการรวมตัวของส่วนประกอบของเทโลเมอเรส [14,15]



รูปที่ 1.3: การต่อปลายเทโลเมียโดยเทโลเมอเรส

การทำงานของเทโลเมอเรส (รูปที่ 3) จำเป็นที่ปลายเทโลเมีย จะต้องมีการคลายตัวของปลายเดี่ยวด้าน 3' ออกจากโครงสร้าง t-loop เมื่อมีการคลายตัวแล้ว ปลายเดี่ยวด้าน 3' จะถูกจับโดยเทโลเมอเรส โดยเบสบางส่วนของลำดับเบส TTAGGG จะสามารถจับคู่กับ

ลำดับเบสบางส่วนของอาร์เอ็นเอแม่แบบ หลังจากนั้น ส่วนของโปรตีน TERT (Telomerase Reverse Transcriptase) จะทำการต่อปลายเดี่ยวด้าน 3' นี้ โดยใช้อาร์เอ็นเอแม่แบบบน hTR ซึ่งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จะเป็นการต่อลำดับเบส GGTTAG หลังจากนั้นจะมีการเคลื่อนที่ทำให้อาร์เอ็นเอแม่แบบกลับไปตำแหน่งเดิม แล้วกระบวนการต่อปลายเทโลเมียจะวนกลับเป็นวงจรต่อไป จนได้ความยาวของเทโลเมียที่เพียงพอ [16,17]

<u>การแสดงออกของยีน hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase)</u>

จากการทดลองให้มีการแสดงออกของยีน hTR และ hTERT ภายในหลอดทดลองทีมีสารภายในเซลล์ของเม็ดเลือดแดง พบว่า สามารถได้เทโลเมอเรสที่ทำงานได้ แสดงให้เห็นว่า การทำงานของเทโลเมอเรสในหลอดทดลอง จำเป็นต้องมีสองส่วนนี้เป็นอย่างน้อย [18] และจากการทดลองที่ใส่ยีน hTERT และทำให้มีการแสดงออกในเซลล์หลายชนิด ที่ไม่มีเทโลเมอเรส ก็พบว่า สามารถได้เทโลเมอเรสที่ทำงานได้ และเซลล์ดังกล่าวสามารถแบ่งตัวได้ไม่จำกัด แสดงให้เห็นว่า hTERT เป็นตัวกำหนดปริมาณของเทโลเมอเรสภายในเซลล์ [19-21] นอกจากนั้น ยังพบว่า ปริมาณของ hTERT mRNA มีความสัมพันธ์โดยตรงกับผลการทำงานของเทโลเมอเรส แสดงให้เห็นว่า การควบคุมการแสดงออกที่กระบวนการทรานสคริปชั่น เป็นขั้นตอนหลักในการควบคุมการแสดงออกของเทโลเมอเรส [20,21]

การศึกษาการควบคุมการแสดงออกที่กระบวนการทรานสคริปชั่น มักจะทำการศึกษาว่า มีตัวควบคุมใดบ้างที่จับกับโปรโมเตอร์ของยีน แล้วทำหน้าที่ช่วย หรือยับยั้งการแสดงออกของยีนนั้นๆ ได้มีผลการศึกษาการควบคุมการแสดงออกของยีน hTERT หลายฉบับ ดังที่รวบรวมและสรุปในเอกสารอ้างอิง [20,21] ซึ่งได้แสดงถึงตัวควบคุมที่ทำหน้าที่ช่วยและยับยั้ง ยกตัวอย่างเช่น c-Myc จะรวมตัวกับ Max แล้วไปจับที่ E-box บนโปรโมเตอร์ของ hTERT ทำให้มีการแสดงออกของยีน hTERT มากขึ้น ในขณะที่ การเพิ่มการแสดงออกของ Mad ซึ่งจะไปจับกับ Max แล้วไปจับที่ E-box เช่นกัน กลับทำให้มีการแสดงออกของยีน hTERT น้อยลง [22] นอกจากนี้แล้ว บนโปรโมเตอร์ของยีน hTERT ยังมีบริเวณที่เป็นที่จับของ Sp1 ถึงห้าตำแหน่ง พบว่า Sp1 ร่วมทำงานกับ c-Myc/Max ในการเพิ่มการแสดงออกของยีน hTERT [22] ในรายงานปี 2007 ยังพบว่าโปรตีน AP-2β เป็นโปรตีนเฉพาะที่พบในเซลล์มะเร็งปอด แต่ไม่พบในเซลล์ปกติ สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน hTERT ได้ [23] สำหรับตัวยับยั้งการแสดงออกของยีน hTERT อื่นๆ ได้แก่ P53 และ MZF-2 อย่างไรก็ตาม ยังไม่สามารถสรุปได้ว่า ตัวควบคุมตัวใดตัวหนึ่ง มีหน้าที่กระตุ้นให้เซลล์มะเร็งมีการแสดงออกของยีน hTERT [20,21,24]

การยับยั้งเทโลเมอเรสกับการรักษาโรคมะเร็ง

จากความสำคัญของเทโลเมอเรส ที่มีผลต่อการทำให้เซลล์มะเร็งมีความสามารถในการแบ่งตัวที่ไม่จำกัด และการที่ไม่พบการแสดงออกของเทโลเมอเรส ในเซลล์ร่างกายทั่วไป ทำให้เทโลเมอเรส เป็นเป้าหมายเฉพาะที่น่าสนใจยิ่งในการรักษาโรคมะเร็ง ยาต้านเทโลเมอเรส ตามหลักการแล้ว จะไม่เหมาะต่อการลดจำนวนเซลล์มะเร็งอย่างรวดเร็ว เนื่องจากการหดสั้นของเทโลเมีย จะค่อยเป็นค่อยไป เซลล์อาจต้องใช้เวลานานกว่าที่เทโลเมียจะหดสั้นจนถึงจุดวิกฤติ แต่ยาต้านเทโลเมอเรส จะเหมาะที่จะใช้ควบคู่ไปกับยาต้านมะเร็งอื่นๆ โดยหลังจากที่เซลล์มะเร็งหดหายไปหมดแล้ว ให้ใช้ยาต้านเทโลเมอเรสต่อไปอีกระยะเวลาหนึ่ง ซึ่งจะทำให้ลดการกลับคืนมาของมะเร็ง รวมทั้งยังสามารถจัดการกับเซลล์ต้นกำเนิดของมะเร็ง (Cancer stem cells) และจากการเป็นเป้าหมายเฉพาะ ตามหลักการแล้ว การให้ยาต้านเทโลเมอเรสจึงสามารถให้ได้เป็นเวลานาน โดยคาดว่าจะมีผลข้างเคียงน้อย ต่างจากยาต้านมะเร็งอื่นๆที่ใช้ทั่วไปในขณะนี้ ซึ่งโดยมากจะทำการฆ่าเซลล์ที่มีการแบ่งตัวเร็วทั่วไป โดยไม่มีการแยกว่าเป็นเซลล์ที่ดี หรือ เซลล์มะเร็ง จนถึงขณะนี้ ได้มีสารที่ยับยั้งเทโลเมอเรสหลายชนิด ได้เข้าสู่การทดสอบทางคลินิกในมนุษย์แล้ว [25-27]

การยับยั้งเทโลเมอเรส อาจทำได้หลายวิธี เช่น การยับยั้งการทำงานที่ตัวเอนไซม์ (hTERT) [28-30] เอง หรือ การขัดขวางการทำงานของส่วนอาร์เอ็นเอต้นแบบ โดยการใช้แอนติเซนส์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ [31-32] หรือ การใช้ไรโบไซม์ในการย่อยส่วนอาร์เอ็นเอ [33-34] หรือการใช้แอนติบอดี้ต่อเทโลเมอเรส [35] หรือ การทำให้ปลายเทโลเมียอยู่ในรูป G-quadruplex ที่ไม่สามารถต่อปลายเทโลเมียโดยเทโลเมอเรสได้ [36-37] หรือการยับยั้งการรวมตัวของเทโลเมอเรสที่สมบูรณ์ [38]นอกจากการยับยั้งเทโลเมอเรส โดยวิธีเบื้องต้นแล้ว ยังมีการใช้โปรโมเตอร์ของเทโลเมอเรส มาต่อกับยีนที่สร้างโปรตีนที่ฆ่าเซลล์ เช่น TRAIL ทำให้สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งอย่างจำเพาะเจาะจง [39-41] รวมไปถึงการยับยั้งการแสดงออกของเทโลเมอเรส

การศึกษาหาสารต้านเทโลเมอเรสในพืช

ได้มีการศึกษาพบสารต้านเทโลเมอเรสในพืชหลายชนิด ซึ่งได้แก่ Apigenin ที่สกัดได้จากถั่วเหลือง [42] สารเมแทบอไลท์ของ Saponin ในโสมเกาหลี [43-44] สาร Methylenedioxy lignan ในหญ้าใต้ใบ (*Phyllanthus urinaria*) [45] สารจำพวก lectin จาก Korean Mistletoe [46-47] สาร Sulfoquinovosyl diacylglycerol จาก purple laver [48], สารสกัดจาก Plactycodon grandiflorum [49], สารสกัดจากกระเพรา (*Ocimum sanctum*) [50], สารสกัดจากผักบุ้งส้ม (*Fagopynum cymosum*) [51] นอกจากนั้น ยังพบสารอื่นๆที่ได้จาก

พืช เช่น Gambogic acid [52] Helenalin [53] สารจำพวก Catecholic flavanoids [54] และ Verbascoside [55] เนื่องจากประเทศไทย เป็นหนึ่งในประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพ ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ เราจึงได้ทำการสำรวจพืชหลากหลายชนิด เพื่อหาสารที่ยับยั้งเทโลเมอเรส หรือสารที่ยับยั้งการแสดงออกของเทโลเมอเรสในเซลล์มะเร็ง โดยมีรายละเอียดในส่วนต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. หาสารสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรส หรือยับยั้งการแสดงออกของเทโลเมอเรส เพื่อใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็ง
2. จัดตั้งระบบการคัดกรองหาสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรส ที่มีมาตรฐาน

ขอบเขตของโครงการวิจัย

<u>ปีที่ 1</u>

ทำการแยกสกัดสารสมุนไพรจำนวนไม่น้อยกว่า 10 ชนิด ออกเป็นส่วนต่างๆตามความสามารถในการละลายในสารละลายที่มีขั้วแตกต่างกันสี่ชนิด ได้แก่ Hexane, Ethyl acetate, Acetone, และ Methanol แล้วนำสารสกัดเหล่านี้ ไปตรวจหาฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรส หรือยับยั้งการแสดงออกของเทโลเมอเรส

ในการตรวจสอบหาสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรส เราจะทำการจัดตั้ง TRAP (Telomerase Repeat Amplification Protocol) Assay ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบหาสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรส โดยจะทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็ง เพื่อทำการสกัดเอาเอนไซม์เทโลเมอเรส แล้วทดสอบกับสาร 2 ชนิดที่ทราบว่ามีคุณสมบัติเป็น Telomerase inhibitors (PIPER และ $TmPyP_4$) เพื่อเป็นตัวทดสอบและควบคุมผล

ในการตรวจสอบหาสารยับยั้งการแสดงออกของเทโลเมอเรส เราจะทดสอบสารสกัดที่ได้ ว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน hTERT ในระดับ mRNA โดยวิธี RT-PCR และในระดับโปรตีน โดยวิธี Western blotting analysis

ปีที่ 2

ทำการทดสอบสารสกัดสมุนไพร ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรส โดย TRAP Assay และทำการพัฒนาการตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรสที่ง่าย และเร็วขึ้น เพื่อรองรับการตรวจสอบสารจำนวนมากในเวลาที่รวดเร็วและประหยัดค่าใช้จ่าย

หากตรวจพบว่าสารสกัดใด มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรส หรือยับยั้งการแสดงออกของเทโลเมอเรส เราจะทำการแยกสกัดสารสมุนไพร ให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น และนำไปทดสอบซ้ำ เพื่อที่จะนำไปสู่การได้เป็นสารเดี่ยวบริสุทธิ์ เพื่อทำการพิสูจน์หาโครงสร้างต่อไป

- หมายเหตุ โครงการนี้ เดิมได้เสนอเป็นโครงการต่อเนื่อง เป็นระยะเวลาสามปี แต่ได้รับอนุมัติในปี 2550 ให้เป็นโครงการวิจัยใหม่ที่มีระยะเวลาวิจัยสิ้นสุดในปีงบประมาณที่เสนอขอ คณะผู้วิจัยจึงได้ใช้เวลาประมาณ 20 เดือน หลังได้รับอนุมัติ ทำการวิจัยให้ได้มากที่สุด เท่าที่งบประมาณที่ให้มาจะพึงทำได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

จากที่กล่าวมาแล้วเบื้องต้น ยาต้านมะเร็งที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรส จะเป็นยาที่มีผลข้างเคียงน้อย และสามารถใช้ในการป้องกันการเกิดโรคมะเร็งซ้ำได้ ดังนั้น การมีระบบที่คัดกรองหาสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรสที่มีมาตรฐาน จะทำให้ประเทศไทยสามารถแข่งขันเพื่อหายาที่ออกฤทธิ์ที่เป้าหมายนี้ และเนื่องจากการมีความหลากหลายทางชีวภาพของประเทศไทย ทำให้เราได้เปรียบในค้นคว้าหายาต้านมะเร็งในกลุ่มนี้ ซึ่งถ้าค้นพบได้จริง หรือแม้แต่เพียงพบสารต้นแบบ (Lead compound) ก็จะมีคุณค่าทางการค้าอย่างมาก

หน่วยงานทางสาธารณสุข สามารถนำผลงานไปทำการศึกษาต่อยอด เช่น ทางด้านเภสัชเคมี อาจนำสารต้นแบบ (Lead compound) ไปศึกษาผลของโครงสร้างต่อการออกฤทธิ์ และทำการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ เพื่อหาสารที่นำไปใช้ในทางยาได้ดีที่สุด ทางด้านการรักษา อาจนำสารที่ได้ไปทดสอบผลในสัตว์ทดลอง และเมื่อประสบผลดี อาจนำไปสู่การทดลองในผู้ป่วย