

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การตายแบบอะพอพโทซิส

การตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) เป็นการตายชนิดหนึ่งที่เกิดขึ้นในเซลล์สิ่งมีชีวิตตั้งแต่ในสัตว์ชั้นต่ำ (หนอนพยาธิ) เช่น *Caenorhabditis elegans* ไปจนถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม การตายชนิดนี้สามารถพบในสภาวะปกติ (homeostasis) เช่น การพัฒนาของตัวอ่อน (development) การลอกตัวของเซลล์ผิวหนัง และในภาวะที่มีพยาธิสภาพ เช่น ในโรคมะเร็ง โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ โรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง (AIDS) ^[1, 2, 3]

ในเซลล์มะเร็งจะมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วมีเมแทบอลิซึมสูงกว่าเซลล์ปกติสามารถเจริญเติบโตและแบ่งตัวตลอดเวลา มีกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน ดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอในอัตราที่สูงกว่าเซลล์ปกติแต่ขาดกระบวนการตายของเซลล์ทั้งแบบอะพอพโทซิสและเนโครซิส ^[4]

การตายชนิดนี้มีลักษณะแตกต่างจากการตายแบบเนโครซิส (necrosis) กล่าวคือ การตายแบบอะพอพโทซิส เซลล์จะมีไซโทซอลขนาดเล็กลง (shrinkage) นิวเคลียสมีขนาดเล็กกว่าเดิมและมีความหนาแน่นเพิ่มขึ้น (condensation) ผิวเซลล์มีลักษณะเป็นถุงน้ำ (blebbing) และทั้งนิวเคลียสและไซโทซอลมีการแตกตัวออกเป็นชิ้นเล็กๆ เรียกว่า fragmented bodies หรือ apoptotic bodies การตายแบบอะพอพโทซิสไม่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดขบวนการอักเสบ (inflammation) ตรงกันข้าม เซลล์ที่ตายแบบเนโครซิสจะก่อให้เกิดขบวนการอักเสบ เซลล์จะสูญเสีย membrane integrity และยอมให้น้ำและสารต่างๆ เข้าสู่เซลล์ เซลล์บวม และแตกในที่สุด ทำให้สารต่างๆ ภายในเซลล์กระจายสู่ภายนอกเกิดการอักเสบขึ้น ^[5]

การตรวจสอบเซลล์ว่าเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส

การตรวจสอบเซลล์ว่าเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส สามารถทำได้โดยวิธีต่างๆ ยกตัวอย่าง เช่น

1. การตรวจสอบรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้อง phase contrast microscope หรือด้วยการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ แล้วดูรูปร่างด้วยกล้อง fluorescence microscope จะเห็นเซลล์มีลักษณะดังกล่าวข้างต้น ^[6]

2. การตรวจสอบลักษณะ DNA เนื่องจากเซลล์ที่ตายแบบอะพอพโทซิส DNA จะถูกตัดระหว่าง nucleosome ทำให้ได้ DNA ที่มีความยาวเป็นเท่าๆ ของ 180-200 bp สามารถตรวจสอบโดยวิธี agarose gel electrophoresis ^[7] หรือ 3' hydroxyterminal nucleotidyl transferase fluorescein labeled-dUTP and nick end labeling (TUNEL) ^[8]

3. การติดตามฟอสโฟลิปิดชนิดฟอสฟาติดีลซีรีน (phosphatidylserine; PS) ซึ่งปกติจะพบที่ inner leaflet ของ lipid bilayer แต่เมื่อเซลล์ตายโดยขบวนการอะพอพโทซิส จะมีการเคลื่อนที่ของ PS

จาก inner leaflet ไปสู่ outer leaflet ของ lipid bilayer ซึ่ง PS มีความจำเพาะในการจับกับ annexin-V ซึ่งเมื่อติดฉลาก annexin V ด้วย fluorescein isothiocyanate ซึ่งเรืองแสงสีเขียว สามารถติดตามโดยใช้เครื่องมือ flow cytometer^[9]

กลไกการตายแบบอะพอพโทซิส

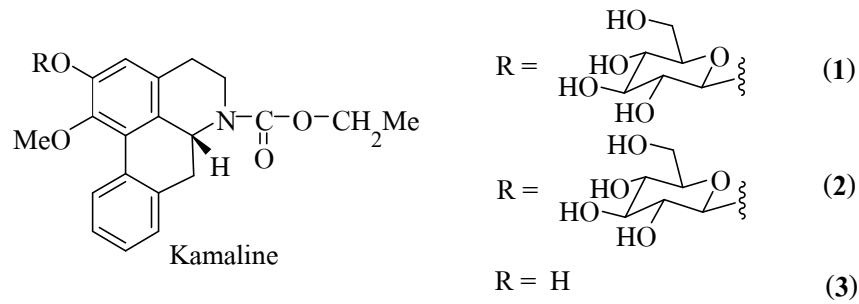
กลไกการตายแบบอะพอพโทซิสแบ่งออกได้เป็น 2 วิธีหลักคือ extrinsic pathway และ intrinsic pathway มีลักษณะดังต่อไปนี้^[10-17] คือ

1. extrinsic pathway มีลิแกนด์จากภายนอก อาจเป็น Fas ligand หรือ tumor necrosis factor หรือ TRAIL จับกับโปรตีนตัวรับหรือ receptor ได้แก่ Fas (Apo-1 หรือ CD95) และ tumor necrosis factor receptor (TNFR) ตามลำดับ แล้วเกิด oligomerization ของรีเซพเตอร์ ส่งสัญญาณเข้าไปยังส่วนของ death domain ภายในไซโตซอล และก่อให้เกิดปฏิสัมพันธ์กับส่วนของ FADD (Fas associated death domain) หรือ TRADD (TNF receptor associated death domain) ไปกระตุ้น caspase-8 ต่อไป ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการกระตุ้น caspase-3, -6, -7 ตามมา และไปตัดสับสเตรทที่เป็นโปรตีนโครงสร้างก่อให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสตามมา

2. intrinsic pathway ไม่ผ่านรีเซพเตอร์ แต่เมื่อเกิดภาวะได้รับรังสี หรือสารอนุมูลอิสระ หรือการนำเอา growth factor ออกไป (withdrawal) หรือภาวะที่ก่อให้เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอ เช่น ได้รับยาเคมีบำบัด จะไปกระตุ้นผ่านทางไมโทคอนเดรีย ซึ่งมีโปรตีนในตระกูล Bcl-2 อยู่ที่เมมเบรนของไมโทคอนเดรีย มีทั้งกลุ่มที่ต่อต้านการตายแบบอะพอพโทซิส (antiapoptotic proteins) เช่น Bcl-xL, Bcl-2, Mcl-1 และกลุ่มที่ทำให้เกิดการตายอะพอพโทซิส (proapoptotic proteins) ได้แก่ Bad, Bax, Bak, Bid, Bok/MTD ในภาวะสมดุลจะมีปริมาณของ anti-apoptotic proteins ที่จับอยู่กับ proapoptotic proteins หาก rheostat เปลี่ยนแปลง กล่าวคือมีปริมาณ proapoptotic proteins มากขึ้นและฟอร์มเป็นไดเมอร์และแซนเนลที่ไมโทคอนเดรียลเมมเบรน ทำให้ mitochondrial membrane potential ลดลงและจะก่อให้เกิดการรั่วของ cytochrome c จาก intermembranous space ไปยังไซโตซอล cytochrome c จะไปจับกับ Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) และ caspase-9 ฟอร์มเป็น apoptosome ซึ่งจะไปตัดและกระตุ้น caspase-3, -6, -7 เช่นเดียวกับ caspase-8

สารสนเทศ (information)/งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Banerji, J^[18] และคณะได้นำส่วนทั้งหมดของ *Stephania venosa* มาสกัดเย็นด้วย CHCl_3 -EtOH แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี จากนั้นแยกสารให้บริสุทธิ์ต่อไปด้วยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบางได้สารประกอบ kamaline แล้วนำมาทำเอซีทีเลชันได้สาร 1 2 และ 3

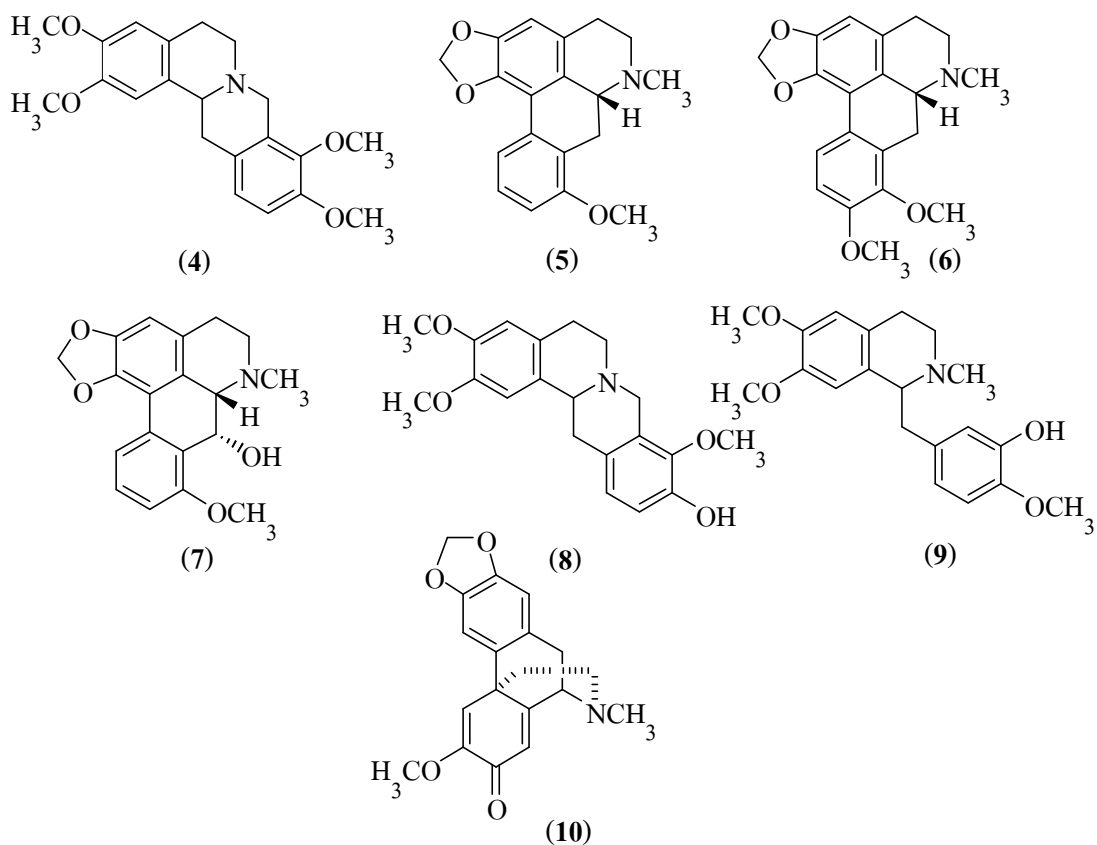


รูปที่ 3 แสดงสารประกอบ 1-3

สุนา จงสมบุญกุลศ ^[19] ได้นำกระท่อมเลือดมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล แอซีโตน อีเทอร์ ปีโตรเลียมอีเทอร์ เอทิลแอซีเตต และแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยนำสารสกัดและ ส่วนแยกของกระท่อมเลือดมาทดสอบฤทธิ์ด้านการเพิ่มจำนวน การทำให้เกิดอะพอโทซิส ผลกระทบ ต่อวงจรชีวิตของเซลล์มะเร็งและการต้านอนุมูลอิสระที่มีผลต่อเซลล์มะเร็งรังไข่ SKOV3 และเซลล์มะเร็ง เต้านม SKBR3 ผลการวิจัยพบว่า สบู่เลือด ED₅₀ ของสารสกัดเอทานอล แอซีโตน อีเทอร์ ปีโตรเลียม อีเทอร์ เอทิลแอซีเตต สารสกัดจากซิลิกาส่วนที่ 12-17, 18-19 และ 20-23 มีฤทธิ์ต่อ SKOV3 35.11, 3.91, 6.67, 7.03, 4.38, 3.01, 1.95 และ 3.13 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

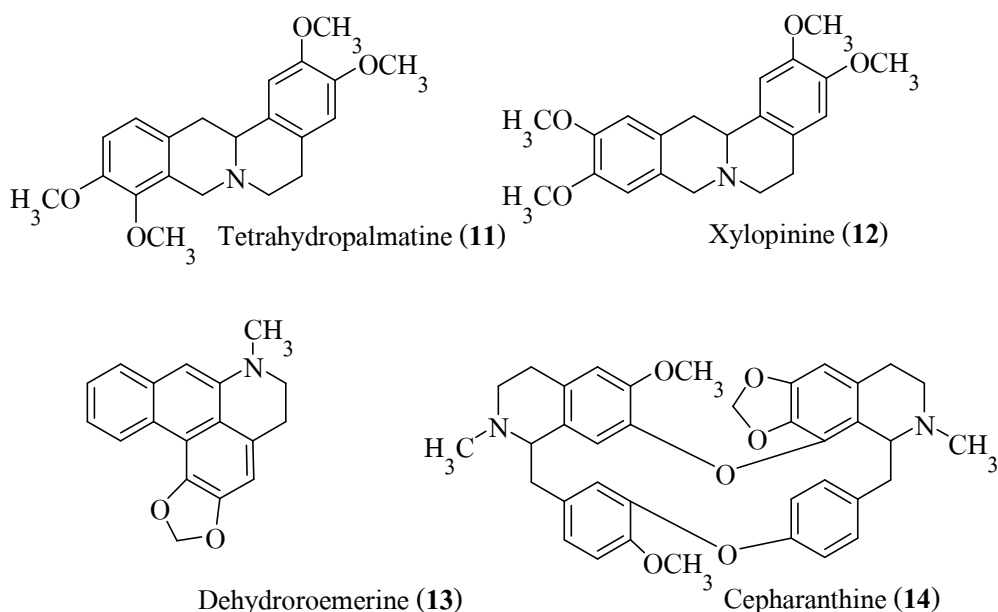
Ghosh, D. ^[20] และคณะได้ศึกษาขนาดของสารสกัดจากใบของ *Stephania hernandifolia* ต่อ การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในอวัยวะของหนูขาว ซึ่งก่อนหน้านี้ได้เคยศึกษาผลของสารสกัดดังกล่าวต่อดับและ ไตมาแล้ว ซึ่งการวิจัยครั้งนี้จะป้อนสารสกัดด้วยน้ำจากใบ 2 กรัมและ 4 กรัมต่อน้ำหนักตัวหนูทุกวันการ ทดลองนาน 28 วัน

Blanchfield, J.T. ^[21] และคณะได้นำส่วนหัวใต้ดินของ *Stephania bancroftii* มาบดแห้งแล้ว สกัดแบบต่อเนื่องด้วย Soxhlet apparatus โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำส่วนที่สกัด ได้มาเติมกรดไฮโดรคลอริก สกัดสารที่ได้ด้วยอีเทอร์แล้วกรองสารสีเหลือง ชื่อ Tetrahydropalmatine (4) ออกมาในขั้นต่อไปเมื่อสกัดด้วยโซเดียมคาร์บอเนตจะได้สาร Stephanine (5) Crebatine (6) Ayuthianine (7) และ Corydalmine (8) ในส่วนของการสกัดแยกส่วนรากของ *Stephania aculeate* เมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์สกัดแล้วทำให้แห้งก็ปรากฏเป็นของแข็งซึ่งเมื่อตกผลึกด้วยเมทานอล:ไดคลอโร มีเทน จะได้ของแข็งสีขาวของ Laudanidine (9) และ Amurine (10) ดังแสดง



รูปที่ 4 แสดงสารประกอบ 4-10

Chea, A ^[22] และคณะได้นำ *Stephania rotunda* จากเมืองเสียมเรียบ ประเทศกัมพูชา โดยใช้ ส่วนหัวใต้ดินบดแห้งมาต้มกับน้ำ จากนั้นกรองกากออกไปแล้วนำไปทำให้แห้งได้ผงสีน้ำตาลซึ่งมา สกัด แอลคาลอยด์ออกโดยใช้กรดไฮโดรคลอริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์ เมื่อเสร็จกระบวนการสกัดแล้วนำสาร ที่ได้ไปแยกแอลคาลอยด์ออกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้สารประกอบ 9 ชนิด สำหรับสาร 11-14 เป็นกลุ่มสารจำพวกแอลคาลอยด์ ดังแสดง



รูปที่ 5 แสดงสารประกอบ 11-14

นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* พบว่า Dehydroroemerine และ Cepharanthine มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้ดังกล่าวที่ IC_{50} 0.36 และ 0.61 ไมโครโมล สำหรับการทดสอบในหนูที่มีเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium berghei* สาร Cepharanthine สามารถลดอาการ parasitaemia ที่ความเข้มข้น 10 mg/kg ถึงร้อยละ 47

ในปี 2007 Sueblinvong, T^[23] และคณะได้นำส่วนหัวใต้ดิน (tuber) ของกระเทียมเลือด (*Stephania venosa*) ซึ่งเก็บจากจังหวัดราชบุรี มาตากแดดจนแห้ง จากนั้นนำไปบดเป็นผงละเอียด จำนวน 30 กรัมไปแช่น้ำปริมาตร 2 ลิตร ให้ความร้อนโดยการต้มประมาณ 5 ชั่วโมง นำมากรองด้วย กระดาษกรองแล้วทำให้แห้ง ด้วยโถทำแห้งอุณหภูมิต่ำ จากนั้นทำสารสกัดที่ได้มาทดสอบความเป็นพิษกับ เซลล์ Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) โดยวิธี blue dye exclusion method นอกจากนั้นยังทดสอบการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (apoptosis determination) แบบ TUNEL assay ผลการวิจัยพบว่าค่า IC_{50} ของสารสกัดที่ทำลายเซลล์ ณ ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรและกลไกการตายแบบอะพอพโทซิสมี antiproliferative activity with IC_{50} 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับสารเคมีองค์ประกอบที่พบเมื่อตรวจสอบด้วย แก๊สโครมาโทกราฟี (GC-MS) พบสาร ไฮโซควิโนลิน แอลคาลอยด์ เป็นส่วนใหญ่