บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การอักเสบ (inflammation) เป็นปฏิกิริยาอันซับซ้อนที่เนื้อเยื่อต่างๆ ตอบสนองต่อเชื้อจุลชีพ และสิ่งที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในร่างกาย ทำให้เกิดการหลั่งของสารสื่อกลางในการอักเสบ (inflammatory mediators) ชนิดต่างๆ เช่น ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) ออกจากเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์แมคโครฟาจ โดยไนตริกออกไซด์มีฤทธิ์ส่งเสริมการอักเสบ ไนตริกออกไซด์เป็นอนุมูลอิสระที่ถูกผลิตขึ้นจากการเปลี่ยน L-arginine ได้เป็น L-citrulline โดยเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS; EC 1.14.13.39) ในปัจจุบันพบว่า NOS มี 3 isoform ได้แก่ neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS) และinducible NOS (iNOS) โดยที่ nNOS และ eNOS เป็น constitutive form ในขณะที่ iNOS เป็น inducible form การเร่งปฏิกิริยาของ NOS ต้องการโคแฟคเตอร์ เช่น nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), flavin adenine dinucleotide (FAD), flavin mononucleotide (FMN), calmodulin (CaM), tetrahydrobiopterin (BH_4) และฮีม (Alderton, 2001) transcription factor ที่สำคัญและทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของ iNOS เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS ในเซลล์ คือ NF-KB ในสภาวะปกติที่เซลล์ไม่ถูกกระตุ้น NF-KB จะถูกจับโดย IKB และอยู่ในไซโตซอล เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นจะมีการส่งสัญญาณทางชีวภาพให้มีการสลาย IKB ส่งผลให้ NF-KB เกิด translocation เข้าสู่นิวเคลียสเพื่อกระตุ้นการแสดงออกของยีน iNOS

ไนตริกออกไซด์มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ในร่างกาย เช่น การสื่อสัญญาณประสาท (neurotransmission) ควบคุมความดันโลหิตโดยทำให้หลอดเลือดขยายตัว (vascular relaxation) ป้องกันการเกาะตัวของเกล็ดเลือด (platelet aggregation) และการจับของเม็ดเลือดขาว (leukocyte adhesion) รวมทั้งยังเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity ในการกำจัดจุลชีพที่บุกรุกโดยเซลล์แมคโครฟาจ (Coleman, 2001) ไนตริกออกไซด์ที่สร้างในเซลล์แมคโครฟาจนี้ ถูกผลิตโดยเอนไซม์ iNOS ซึ่งถูกกระตุ้นการแสดงออกของยีนเมื่อมีการสัมผัสกับ cytokine endotoxin หรือ lipopolysaccharide (LPS) จากแบคทีเรีย ถึงแม้ว่าไนตริกออกไซด์จะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดจุลชีพที่รุกรานร่างกายมนุษย์ แต่ไนตริกออกไซด์ที่ถูกผลิตขึ้นในปริมาณที่มากเกินไปจาก iNOS ถูกพบว่ามีส่วนร่วมในการเกิดการอักเสบและนำไปสู่อาการของโรคต่างๆ เช่น ภาวะช็อคจากการติดเชื้ออย่างรุนแรง (septic shock) การปฏิเสธของเนื้อเยื่อในการปลูกถ่ายอวัยวะ โรคสมองเสื่อม เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer disease) โรคพาร์กินสัน (Parkinson disease) โรคมะเร็ง โรคไขข้ออักเสบรูมาตอยด์ โรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว และ ischemia/reperfusion injury (Wright, 1992; Dorheim, 1994; Grisham, 1999; Coleman, 2001; Cross และ Wilson, 2003; Guzik, 2003; Latham, 2005) โดยไนตริกออกไซด์ทำหน้าที่เป็นสารสื่อกลางการอักเสบที่

สำคัญซึ่งถูกผลิตขึ้นโดยเซลล์แมคโครฝาจ การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่มากเกินไปนี้น่าจะช่วยรักษาโรคต่างๆนี้ได้ วิธีการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์มีหลายวิธี เช่น การใช้ตัวยับยั้งเอนไซม์ iNOS (iNOS inhibitor) การยับยั้งการแสดงออกของยีนสำหรับเอนไซม์ iNOS (iNOS regulator) หรือยีนสำหรับสร้างโคแฟคเตอร์ รวมทั้งการกระตุ้นเอนไซม์ anti-inflammatory เช่น heme oxygenase-1 (HO-1) ในปัจจุบันมีความพยายามในการค้นหาโมเลกุลสารจากธรรมชาติและจากการสังเคราะห์ที่สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ เพื่อนำไปสู่การผลิตยาต้านการอักเสบต่อไป

HO-1 (EC 1.14.99.3) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายกลุ่มฮีมได้ผลผลิตเป็นเหล็ก (Fe^{2+}) คาร์บอน มอนอกไซด์ (CO) และ biliverdin ซึ่งถูกเปลี่ยนต่อเป็น bilirubin โดยเอนไซม์ biliverdin reductase ทั้ง biliverdin และ bilirubin หน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย ส่วนคาร์บอนมอนอกไซด์ถูกรายงานว่าสามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ และลดการแสดงออกของยีน iNOS (Sarady-Andrews, 2005; Sawles, 2005; Srisook และคณะ, 2006) ดังนั้นการกระตุ้นเอนไซม์ HO-1 นอกจากที่จะลดการผลิตไนตริกออกไซด์แล้ว ยังสามารถลดปริมาณอนุมูลอิสระอื่นๆที่เกิดขึ้นในระหว่างการตอบสนองการอักเสบ (immune response) ได้อีกด้วย จึงทำให้การต้านการอักเสบมีประสิทธิภาพมากขึ้นและไม่ทำให้สมดุลของ oxidative stress เสียไป

N-acetyl-3-*O*-methyldopamine (NAMDA) เป็นสารเมทาบอไลต์ของ dopamine ที่อยู่ในระบบประสาทส่วนกลาง (CNS) สาร NAMDA แสดงการออกฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์ microglia ของหนู (BV-2) ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยผ่านการยับยั้งการผลิต BH_4 นอกจากนี้ NAMDA ยังมีผลในการปกป้องเซลล์สมองชนิด CA1 hippocampus จากการถูกทำลายด้วยไนตริกออกไซด์ที่มากเกินไป (Cho, 1999) ถึงแม้ว่า NAMDA ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่ระดับความเข้มข้นที่สามารถแสดงฤทธิ์การยับยั้งได้อยู่ที่ความเข้มข้นสูงประมาณ 1-3 mM นอกจากนี้ Seo และคณะ (2005, 2008) ได้ทำการดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีของ NAMDA และพบว่าอนุพันธ์ NAMDA ที่ออกฤทธิ์ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 100 μM สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์ BV-2 ลงประมาณ 60% นอกจากนี้กลุ่มวิจัยของเราได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ NAMDA ชนิดใหม่ จำนวน 43 สาร เมื่อศึกษาในเซลล์แมคโครฝาจสายพันธ์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ซึ่งเป็นการจำลองสภาวะการอักเสบในระดับ in vitro โดยพบว่าสารที่มีโครงสร้างคล้าย ferulic acid จำนวน 10 สารจากทั้งหมด 43 สาร ที่ความเข้มข้น 100 μM แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับต่ำ และสามารถลดปริมาณไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฝาจสายพันธ์ RAW 264.7 ได้มากกว่า 90% เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เพียงอย่างเดียว (Karnkla, 2008 และ Mongkol, 2008) จากผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่า อนุพันธ์ ferulic acid ที่มีโครงสร้างคล้าย ferulic acid ทั้ง 10 สารนี้ สามารถลดปริมาณโปรตีนของ iNOS โดยมีสารเหล่านี้นอกจากจะมีฤทธิ์ลดการผลิตไนตริกออกไซด์ได้มากแล้วยังสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของโปรตีนHO-1 ได้ จากผลการศึกษาเบื้องต้นนี้แสดงให้เห็นว่าอนุพันธ์ ferulic acid ชนิดใหม่เหล่านี้มีศักยภาพที่จะถูกพัฒนาไปเป็นยาต้านการอักเสบได้ เนื่องจากมีความสามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

โดยสาร BMC41 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ดีที่สุด แต่อย่างไรก็ตามกลไกในการลดการผลิตไนตริกออกไซด์ของสาร BMC41 นี้ยังไม่ได้ทำการศึกษา โดยกลไกหนึ่งที่อาจเป็นไปได้คือการลดการผลิตไนตริกออกไซด์โดยผ่านการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ HO-1 ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของสาร BMC41 ซึ่งเป็นอนุพันธ์ ferulic acid นี้ ในด้านความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์ iNOS กับ HO-1 และการส่งสัญญาณทางชีวภาพในวิถี NF-KB เพื่อให้ได้องค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในเซลล์ที่สัมผัสสาร BMC41 อันจะนำไปสู่แนวทางในการยับยั้งการอักเสบต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อตรวจสอบผลของสาร BMC41 ต่อการแสดงออกของยีน iNOS และ HO-1 ในระดับ mRNA และโปรตีนในเซลล์แมคโครฝาจ RAW 264.7ที่สัมผัสกับ LPS

2. เพื่อตรวจสอบผลของสาร BMC41 ต่อการกระตุ้น NF-KB และ iNOS promoter activity ของเซลล์แมคโครฝาจ RAW 264.7ที่สัมผัสกับ LPS

1.3 ทฤษฎี สมมติฐานหรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การอักเสบ เป็นปฏิกิริยาของร่างกาย ที่ทำการตอบโต้ ตอบสนอง หรือผ่อนคลายความรุนแรงของอันตราย ที่กำลังกระทำต่อร่างกาย การอักเสบ เป็นกระบวนการปกป้อง คุ้มครองตั้งแต่ระดับเซลล์ จนถึงชีวิตมนุษย์ การอักเสบมีสาเหตุจากการติดเชื้อ (infection) และสาเหตุที่ไม่ใช่การติดเชื้อ เช่น สารเคมี หรือปฏิกิริยาของภูมิคุ้มกันของร่างกาย เป็นต้น เมื่อมีอันตรายแบบใดๆ กระทำต่อร่างกาย ระบบภูมิคุ้มกันร่างกายที่ซับซ้อน จะทำการตอบสนองในขั้นแรก ด้วยระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง เพื่อควบคุม ลด จำกัดและทำลายสาเหตุก่อนการอักเสบในทันที รวมทั้งกำจัดเนื้อเยื่อที่เสียหาย หรือตายด้วย เรียกการตอบสนองเช่นนี้ว่า การอักเสบเฉียบพลัน (acute inflammation) ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญ คือ การขยายตัวของหลอดเลือด ทำให้เลือดมาเลี้ยงเพิ่มขึ้น มีการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดทำให้เซลล์เม็ดเลือดออกนอกหลอดเลือดได้ และเซลล์เม็ดเลือดขาวเคลื่อนเข้าสู่เนื้อเยื่อที่เกิดภยันตราย ความเสียหายหรือผลจากการอักเสบเช่นนี้ ร่างกายมักจะซ่อมแซมจนหายได้ดี แทบไม่พบความผิดปกติของอวัยวะหรือการทำงานของระบบบกพร่องรุนแรง แต่หากระบบภูมิคุ้มกัน ควบคุมสาเหตุก่อการอักเสบเฉียบพลันไม่ได้ดี ทำให้การทำลาย ลุกลาม รุกรานอย่างต่อเนื่องนานออกไปอีก ระบบภูมิคุ้มกันจะขยายผลการควบคุม เพิ่มประสิทธิภาพการทำลายสาเหตุก่อการอักเสบอีก เรียกภาวะเช่นนี้ว่า การอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation) สิ่งที่แตกต่างไปจากการอักเสบเฉียบพลันคือ เซลล์หรือเนื้อเยื่อถูกทำลายมากขึ้น และหากการควบคุมยังทำได้ไม่ดีจะทำให้เกิดความบกพร่องของระบบและเป็นสาเหตุของโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคไขข้อเสื่อม โรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์กินสัน โรคเบาหวาน โรค

กระเพาะและลำไส้อักเสบ

ในการอักเสบทั้งชนิดฉับพลันและเรื้อรัง จะมีการหลั่งสารสื่อกลางในการอักเสบหลายชนิด เช่น ไนตริกออกไซด์ และไซโตคายน์เป็นจำนวนมาก สารเหล่านี้จะเป็นเครื่องมือทำให้เกิดการตอบสนองและการอักเสบมากขึ้น (Van der Vilet, 2000) จากการศึกษาพบว่าเมื่อทำการยับยั้งการหลั่งสารเหล่านี้จะทำให้การอักเสบลดลง เป้าหมายของยาต้านการอักเสบจึงมุ่งยับยั้งหรือลดการหลั่งสารเหล่านี้ การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ ที่มากเกินไปนี้เป็นหนทางหนึ่งที่จะช่วยป้องกันและรักษาโรคต่างๆที่ไนตริกออกไซด์เข้าไปเกี่ยวข้อง วิธีการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ มีหลายวิธี เช่น การใช้ตัวยับยั้งแอคทิวิตีของเอนไซม์ การยับยั้งในระดับการสร้าง mRNA ของเอนไซม์หรือโคแฟคเตอร์ (cofactor) รวมทั้งการกระตุ้นเอนไซม์ anti-inflammatory เช่น Heme oxygenase-1 (HO-1) ในปัจจุบันมีความพยายามในการค้นหาโมเลกุลสารจากธรรมชาติและจากการสังเคราะห์ที่สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ เพื่อนำไปสู่การผลิตยาต้านการอักเสบ และประเทศไทยมีการนำเข้ายาจากต่างประเทศเป็นมูลค่าปีละหลายพันล้านบาท ดังนั้นเพื่อเป็นการพึ่งพาตนเองและลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศ การค้นคว้าหาสารที่จะนำมาเป็นยาต้านอักเสบจึงมีความจำเป็น นอกจากนี้การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลก็มีความสำคัญเพื่อความเข้าใจและยืนยันการออกฤทธิ์ของสารที่มีศักยภาพจะนำไปเป็นยาต้านการอักเสบ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้องค์ความรู้ใหม่ที่ได้จากการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของสาร BMC 41 จะสามารถนำไปเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สนับสนุนการใช้สาร BMC 41 เป็นสารต้านอักเสบซึ่งจะสามารถจดองค์ความรู้ที่ได้ในรูปสิทธิบัตรได้ ทำให้องค์ความรู้นี้เป็นของประเทศไทย และตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานทางวารสารวิชาการเป็นการสร้างชื่อเสียงให้แก่ประเทศไทย เป็นพื้นฐานและองค์ความรู้ที่สามารถนำไปต่อยอด โดยการศึกษาต่อในระดับคลินิก และองค์การเภสัชกรรม หรือบริษัทอุตสาหกรรมยา นำไปพัฒนาเป็นยาต้านอักเสบชนิดใหม่

1.5 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทำการวิเคราะห์ผลของอนุพันธ์ ferulic acid หรือ สาร BMC 41 ในเซลล์แมคโครฝาจสายพันธ์ RAW 264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS ซึ่งเป็นการจำลองการอักเสบในหลอดทดลอง โดยวิเคราะห์ปริมาณ mRNA และโปรตีนของเอนไซม์ iNOS และ HO-1 โดยเทคนิค RT-PCR และ western blotting ตามลำดับ และนำสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งดีที่สุดศึกษาการกระตุ้น NF-KB โดยเทคนิค western blotting ศึกษา iNOS promoter activity โดยเทคนิค transfection and luciferase assay และทำการยืนยันผลการลดปริมาณไนตริกออกไซด์และการแสดงออกของ iNOS โดยการเติมตัวยับยั้งแอกติวิตีของ

เอนไซม์ HO-1 และสารที่จับกับคาร์บอนมอนอกไซด์ซึ่งเชื่อว่าเป็นตัวการหนึ่งในการยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS