บทที่ 2
ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

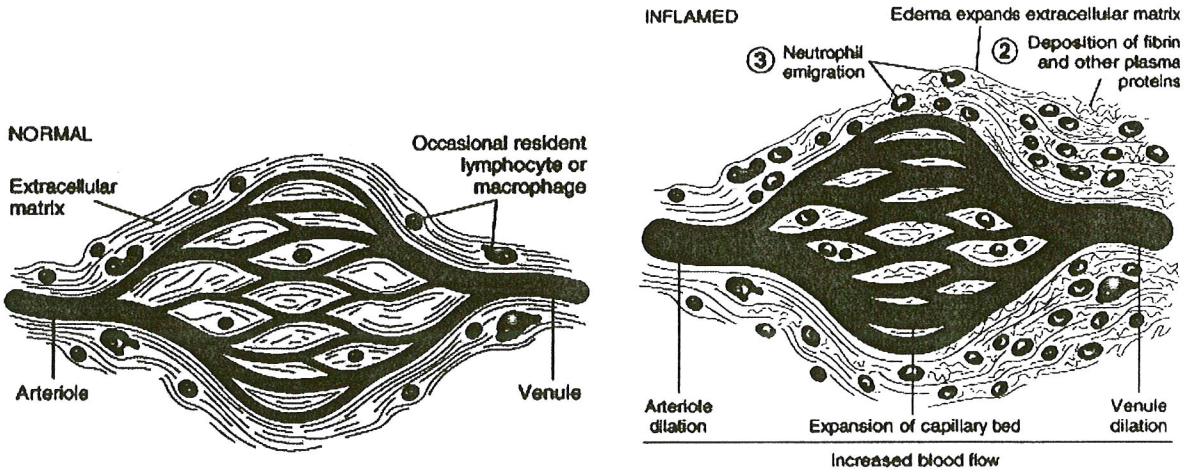
2.1 ทฤษฎี

2.1.1 การอักเสบ (พีรยุทธ สิทธิไชยากุล, 2551)

การอักเสบ (inflammatory) เป็นปฏิกิริยาที่ร่างกายตอบสนองต่อสิ่งที่ทำให้เนื้อเยื่อของร่างกายได้รับบาดเจ็บ เช่น เชื้อโรค การตายของเซลล์จากการขาดเลือดหรือขาดออกซิเจน กระบวนการอักเสบจัดเป็นกลไกสำคัญในการป้องกันสิ่งแปลกปลอม หรือสิ่งที่จะทำให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อของร่างกายได้รับบาดเจ็บ ผลของการอักเสบจะทำให้เกิดการกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคออกไปนอกจากนี้ยังกำจัดเซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บหรือตายจากการเข้ามาของสิ่งแปลกปลอมดังกล่าว กระบวนการอักเสบเป็นเหตุการณ์ที่เกิดเป็นลำดับขั้นของการตอบสนองแบบไม่จำเพาะ ซึ่งมีอาการบวมแดง อุณหภูมิสูงขึ้น และอาการเจ็บปวดบริเวณนั้น

กระบวนการอักเสบประกอบด้วย ขั้นตอนการทำงาน 3 ประการ คือ

1. การเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด โดยหลอดเลือดขยายตัว (vasodilation) ซึ่งการขยายตัวของหลอดเลือดนี้เป็นผลมาจากสารเคมีหลายชนิด เช่น histamine และ ไนตริกออกไซด์ เป็นต้น ทำให้เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบรอบหลอดเลือด (แสดงดังรูปที่ 2-1)



รูปที่ 2-1 การไหลเวียนของเลือดในเซลล์ปกติ (ภาพซ้ายมือ) ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดเมื่อเซลล์มีการอักเสบหลอดเลือดจะขยายออก ทำให้หลอดเลือดที่ก่อนหน้านี้ปิดชั่วคราวเปิดออก เพื่อรองรับปริมาณเลือดที่ไหลเข้ามา เป็นผลให้ของเหลวที่อยู่ภายในหลอดเลือดไหลผ่านผนังหลอดเลือดไปยังบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บ เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอม (ภาพขวามือ) (ที่มา: พีรยุทธ สิทธิไชยากุล, 2551)

2. การเข้ามาของเซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์เม็ดเลือดขาวรวมตัวกันที่ผนังหลอดเลือดในเนื้อเยื่อที่ได้รับบาดเจ็บ จะแทรกผ่านผนังหลอดเลือดเข้าไปในเนื้อเยื่อ เรียกกระบวนการดังกล่าวว่า extravasation และเกิด leukocyte activation เป็นกระบวนการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวให้สามารถทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาทำความบาดเจ็บแก่เนื้อเยื่อ เช่น การสร้างสารจากกรดอะราชิโดนิก

3. ผลกระทบที่เกิดกับร่างกายทั้งระบบ (systemic effect) systemic inflammatory response syndrome (SIRD) ซึ่งเป็นผลมาจาก cytokine และสารต่างๆ ที่มีการหลั่งในระหว่างที่มีการอักเสบเกิดขึ้น โดยเฉพาะโพรสตาแกลนดิน E_2 ซึ่งจะไปกระตุ้นต่อมไฮโปทาลามัส ให้ปรับอุณหภูมิของร่างกายให้สูงขึ้น

Phagocytosis เป็นกระบวนการเก็บกินและทำลายสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว แบ่งเป็นขั้นตอนย่อย 3 ขั้นตอน คือ

1. Recognition and attachment เป็นกระบวนการที่เซลล์เม็ดเลือดขาวเข้าจับกับเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม โดยอาศัย receptors ที่อยู่บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวจับกับสารซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์เชื้อโรค กระบวนการนี้อาศัย mannose receptors และ scavenger receptors นอกจากนี้สารจำพวก opsonin ยังมีส่วนร่วมให้เซลล์เม็ดเลือดขาวจับกับเชื้อโรคได้ง่ายขึ้น

2. Engulfment เป็นกระบวนการที่เซลล์จับเชื้อโรคให้เข้ามาภายในโดยการยื่นส่วนของ ไซโทพลาส-ซึม เรียกว่า pseudopods เข้าโอบล้อมเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม เกิดเป็น phagosome ให้เข้ามาในเซลล์ หลังจากนั้น phagosome จะรวมเข้ากับ lysosome เกิดเป็น phagolysosome สารจาก lysosome จึงเข้าทำลายเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมดังกล่าวภายใน phagolysosome กระบวนการนี้ส่วนใหญ่อาศัยการทำงานของ actin ดังนั้นจึงอาศัยสารเคมีและ receptors ที่คล้ายกับกระบวนการ chemotaxis

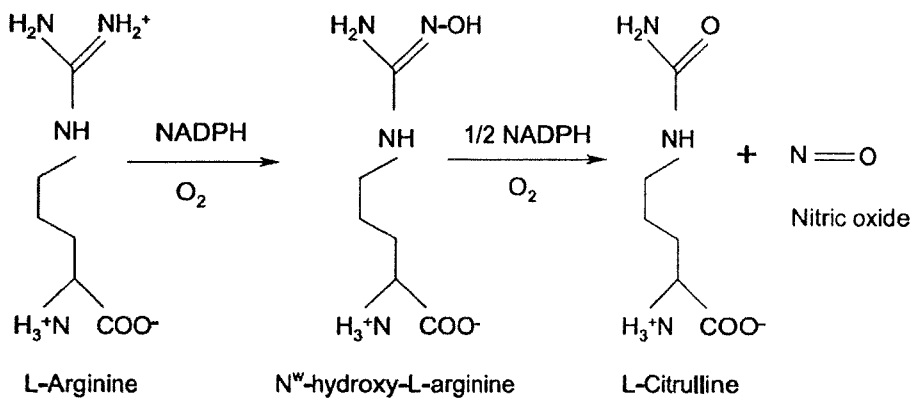
3. Killing and Degradation กระบวนการนี้อาศัยปฏิกิริยาทางเคมีซึ่งใช้ออกซิเจน (oxygen-dependent mechanism) ทำให้เกิดการสร้าง reactive oxygen species (ROS) รวมทั้ง reactive nitrogent species (RNS) เข้าทำลายเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมภายใน phagolysosome นอกจากนี้เซลล์เม็ดเลือดขาวอาจใช้ปฏิกิริยาซึ่งไม่ต้องอาศัยออกซิเจนก็ได้ (oxygen-independent mechanism) เช่น การใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ หรือ bactericidal permeability increasing protein (BPI) เป็นต้น รวมทั้งสารเคมีซึ่งทำหน้าที่เป็นสื่อ (chemical mediator) เช่น โพรสตาแกลนดิน และไนตริกออกไซด์

การตอบสนองต่อการอักเสบ เริ่มต้นจากปฏิกิริยาของสารเคมีตัวกลางต่างๆมากมาย ซึ่งปฏิกิริยาหลายประการยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ตัวกลางที่เริ่มต้นปฏิกิริยาอาจมาจากจุลินทรีย์ที่รุกรานบางชนิดเนื่องจากเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย บางชนิดเกิดจากระบบเอนไซม์ต่างๆในพลาสมา บางชนิดเป็นผลิตภัณฑ์เกิดมาจากเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548) เช่น เมื่อ แมคโครฟาจและนิวโทรฟิล ถูกกระตุ้น จะเปลี่ยนโมเลกุลของออกซิเจนไปเป็น reactive oxygen intermediates (ROIs) ซึ่งเป็นสารออกซิไดซ์ที่รุนแรงสามารถที่จะทำลายจุลชีพและเซลล์อื่นๆได้ ระบบที่ก่อให้เกิด primary free radical คือ ระบบ phagocyte oxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีหลายหน่วยย่อยรวมกันเอนไซม์ phagocyte

oxidase ซึ่งส่วนมากอยู่ใน phagolysosomal membrane ถูกเหนี่ยวนำและถูกกระตุ้นโดยสิ่งกระตุ้นต่างๆ รวมถึง IFN-γ การทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้จะรีดิวซ์โมเลกุลของออกซิเจนไปเป็น ROIs เช่น ซุปเปอร์ออกไซด์ แรดิคอล (super oxide radical) นอกจากนี้แมคโครฟาจยังสามารถผลิต reactive nitrogen intermediates โดยส่วนมากคือไนตริกออกไซด์ โดยการทำงานของเอนไซม์ iNOS ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในไซโตซอลโดยในสภาวะปกติจะไม่มีการแสดงออกแต่จะถูกเหนี่ยวนำจากการตอบสนองต่อ LPS และผลผลิตจากจุลชีพที่เข้ามาภายในเซลล์โดยเฉพาะมีการรวมกับ IFN-γ ภายใน phagolysosomal ไนตริกออกไซด์อาจรวมเข้ากับซุปเปอร์ออกไซด์เกิดเป็นเพอร์ออกซีไนไตรท์ (peroxynitrite) ที่มีฤทธิ์รุนแรงซึ่งสามารถฆ่าจุลชีพได้ เป็นต้น (Abbas and Lichtman, 2003) การตอบสนองต่อการอักเสบบริเวณเนื้อเยื่อถูกทำลาย เศษของเซลล์จะถูกกำจัดโดยกระบวนการฟาโกไซโทซิส (phacocytosis) มีการซ่อมแซมของเนื้อเยื่อและการงอกหรือการเจริญทดแทน (regeneration) ของเนื้อเยื่อใหม่ โดยจะมีการงอกของหลอดเลือดฝอยเข้าไปยังบริเวณที่เลือดแข็งตัว และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) เดินทางเข้ามาสะสมสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันก่อให้เกิดเป็นแผล เพื่อยับยั้งการรุกรานของสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย

2.1.2 ไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide, NO)

ไนตริกออกไซด์ สังเคราะห์ขึ้นจาก L-arginine และ โมเลกุลของออกซิเจน โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS; EC 1.14.13.39) โดยมีการรับอิเล็กตรอนจาก NADPH การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ NOS ต้องการโคแฟคเตอร์ ได้แก่ flavin adenine dinucleotide (FAD), flavin mononucleotide (FMN), heme, calmodulin (CaM) และ tetrahydrobiopterin (BH_4) (Alderton และคณะ, 2001) ดังแสดงในรูปที่ 2-2 ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ไนตริก ออกไซด์ทำหน้าที่เสมือนตัวขยายหลอดเลือด (vascular relaxing agent) สารสื่อประสาท และ ตัวยับยั้งการจับกลุ่มของเกล็ดเลือด นอกจากนี้ ไนตริกออกไซด์ยังเกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) และการตอบสนองต่อการอักเสบในการกำจัดจุลชีพ แต่ในขณะเดียวกันก็สามารถที่จะเหนี่ยวและควบคุมการตายของเซลล์ตนเองได้เช่นกัน ซึ่งเป็นการควบคุมแบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Coleman, 2001)



รูปที่ 2-2 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์โดยเอนไซม์ NOS

(ที่มา: Aktan, 2004)

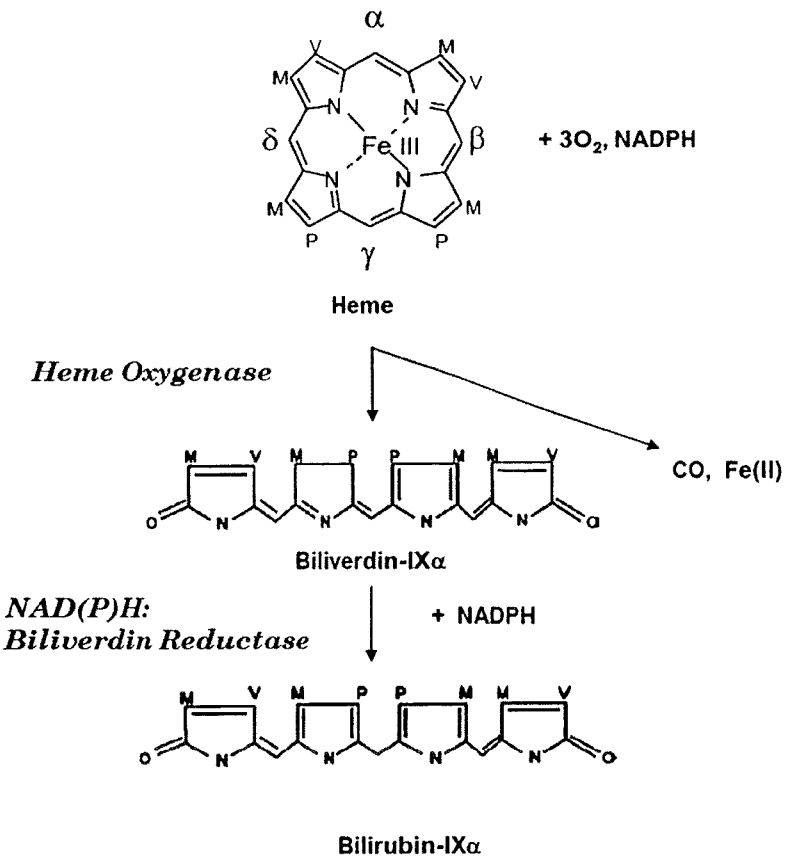
ปัจจุบันมีการค้นพบเอนไซม์ NOS จำนวน 3 ไอโซฟอร์ม ซึ่งจะมีลักษณะการทำงานที่แตกต่างกันในเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมแต่ละชนิด โดย 2 ไอโซฟอร์มแรก คือ neuronal NOS (nNOS) หรือ type-1 และไอโซฟอร์มที่สอง คือ endothelial NOS (eNOS) หรือ type-3 มีการแสดงออกตลอดเวลาโดยการกระตุ้นจากการเพิ่มขึ้นของ Ca^{2+} ในไซโทซอล ส่วนไอโซฟอร์มสุดท้ายไม่ถูกกระตุ้นด้วย Ca^{2+} ในไซโทซอลคือ inducible NOS (iNOS) หรือ type-2 จะมีการแสดงออกในเซลล์แมคโครฟาจ นิวโทรฟิล เซลล์ตับ และ เซลล์อื่นๆ (Alderton และคณะ, 2001) การเหนี่ยวนำให้ iNOS เกิดการแสดงออกเริ่มจาก inflammatory cytokines interferon-γ (IFN-γ), interleukin-1 (IL-1) หรือ tumor necrosis factor-α (TNF-α) รวมทั้ง lipopolysaccharide (LPS) (Geller และคณะ., 1993; Sunyer และคณะ, 1996; McMicking และคณะ, 1997; Alderton และคณะ, 2001) หน้าที่ของไนตริกออกไซด์เกี่ยวข้องกับกระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอม เช่น จุลชีพ แต่ถ้ามีการผลิตไนตริกออกไซด์ที่มากเกินพอเป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคได้หลายชนิด เช่น ภาวะช็อคจากการติดเชื้ออย่างรุนแรง โรคอัลไซเมอร์ ภาวะหลอดเลือดแข็งตัว โรคหืด และโรคไขข้อรูมาตอยด์ เป็นต้น (Wright และคณะ, 1992; Dorheim และคณะ, 1994; Guzik และคณะ, 2003; Latham และคณะ, 2005)

LPS สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ iNOS โดย LPS จะเข้าจับที่ LPS receptor และกระตุ้นการส่งสัญญาณเพื่อกระตุ้นการทำงานของ nuclear factor-kappa B (NF-KB) ซึ่งเป็น transcription factor ที่ก่อให้เกิดการการแสดงออกของ iNOS (Lowenstein และคณะ, 1993) NF-KB เป็น transcription factor ประกอบด้วยหน่วยย่อยต่างๆ ดังนี้ p50, p52, c-Rel, RelA (p65) และ RelB จำนวน 2 หน่วยในลักษณะเป็น homodimer หรือ heterodimer ในเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นพบว่า NF-KB จะอยู่ในไซโทซอล เนื่องจากถูกจับไว้ด้วยโปรตีน inhibitory protein of NF-KB (IKB) หลังจากที่เซลล์สัมผัสกับสิ่งกระตุ้น เช่น LPS จะทำให้ IKB ถูกฟอสโฟรีเลชั่น ส่งผลให้ IKB ถูกสลายโดย 26S proteasome ดังนั้น NF-KB จึงเป็นอิสระและสามารถเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสได้ เมื่อเข้าสู่นิวเคลียส NF-KB จะไปจับบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนสำหรับโปรตีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ รวมทั้ง iNOS และเกิดการแสดงออกของยีนเหล่านั้น (Baeuerle และ Baltimore, 1996; Nishikori, 2005).

2.1.3 เอนไซม์ Heme oxygenase-1

เอนไซม์ heme oxygenase (HO; EC 1.14.99.3) ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการสลายกลุ่มฮีมให้กลายเป็นบิลิเวอร์ดิน (biliverdin) คาร์บอนไดออกไซด์ (carbon monoxide, CO) และเหล็ก (ferrous iron) ดังแสดงในรูปที่ 2-3 (Ryter และChoi, 2009) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วนมากพบเอนไซม์ HO จำนวน 3 ไอโซฟอร์ม โดยที่ HO-2 และ HO-3 เป็นเอนไซม์ที่มีการแสดงออกตลอดเวลา (constitutively expressed form) ส่วนเอนไซม์ HO-1 เป็นโปรตีนที่เหนี่ยวนำ (inducible form) ให้มีการแสดงออกโดยความเครียดจากออกซิเดชัน กลุ่มฮีม ไนตริกออกไซด์ LPS ไซโตไคน์ ไอออนของโลหะหนัก และสิ่งเร้าต่างๆ (Terry และคณะ, 1998; Naughton และคณะ, 2002; Srisook และคณะ, 2004; Srisook และ Cha, 2005) ในเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบว่าบิริเวอร์ดินถูกเปลี่ยนเป็นบิลิรูบิน

(bilirubin) ซึ่งเป็นสารแอนติออกซิแดนท์ (antioxidant) ที่สามารถกำจัด reactive oxygen species (ROS) และ reactive nitrogen species (RNS) (Stocker และคณะ, 1987; Kaur และคณะ, 2003) นอกจากนี้ยังมีการพบว่าบิลิรูบินสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และการแสดงออกของ iNOS ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (Wang และคณะ, 2004; Lanone และคณะ, 2005) ส่วน CO ซึ่งเป็นผลผลิตอีกตัวหนึ่งของเอนไซม์ HO-1 ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ และลดการอักเสบได้ในสัตว์ทดลอง โดยที่ CO สามารถจับกับกลุ่มฮีมของเอนไซม์ NOS ทำให้ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน arginine เป็น citrulline และไนตริกออกไซด์ ดังนั้นการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกและมีแอกติวิตีของ HO-1 ทำให้เกิดการควบคุมแบบลบกับเอนไซม์ iNOS ส่งผลให้ปริมาณของอนุมูลอิสระลดน้อยลง (Srisook และคณะ, 2006; Lanone และคณะ, 2005; Ashino และคณะ, 2008) HO-1 จึงถูกจัดเป็นเอนไซม์ที่ช่วยต้านการออกซิเดชัน (antioxidant defence enzyme)



รูปที่ 2-3 การเร่งปฏิกิริยาของ heme oxygenase

(ที่มา : Ryter และChoi, 2009)

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปัจจุบันมีรายงานว่า *N*-acetyl-3-*O*-methyldopamine (NAMDA) เป็นเมทาบอไลต์ของ dopamine ในระบบประสาทส่วนกลาง (CNS) ซึ่งมีรายงานว่า สามารถลดการบาดเจ็บของเซลล์ประสาทโดยยับยั้งการสังเคราะห์ของ NOS cofactor , BH_4 ในเซลล์ microglial BV-2 ซึ่งถูกกระตุ้นด้วย LPS โดย NAMDA จะยับยั้งเอนไซม์ GTP cyclohydrolase I ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ควบคุมอัตราการเร่งปฏิกิริยาของการสังเคราะห์ BH_4 (Cho et al. , 1999) แม้ว่า NAMDA จะไม่มีพิษแต่สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ที่ความเข้มข้นสูง ต่อมา Seo และ คณะ (2005, 2008) ได้ทำการดัดแปลงโครงสร้างของอนุพันธ์ NAMDA และพบว่าอนุพันธ์บางชนิดมีความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ ต่อมา Karnkla (2008) ได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ NAMDA ชนิดใหม่ จำนวน 43 สาร และพบว่าอนุพันธ์ NAMDA มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH และมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Mongkol, 2008) โดยการศึกษาในเซลล์แมคโครฟาจสายพันธ์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ซึ่งเป็นการจำลองสภาวะการอักเสบในระดับ *in vitro* พบว่าอนุพันธ์ NAMDA บางชนิดสามารถลดปริมาณไนตริกออกไซด์ได้ โดยไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ และจากการศึกษาของ Karnkla (2008) พบว่าสาร BMC41 ซึ่งเป็นอนุพันธ์ NAMDA นอกจากสามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์แล้ว สารที่ความเข้มข้น 100 μM ยังสามารถเหนี่ยวนำปริมาณ mRNA ของ HO-1 ได้อีกด้วย

นอกจากนี้มีรายงานการสังเคราะห์สารต่างๆ ที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบโดยสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์โดยผ่านการยับยั้งการกระตุ้น NF-ΚB โดย LPS

Tsao และคณะ (2002) ทำการสังเคราะห์สาร LCY-2-CHO [9-(2-chlorobenzyl)-9H-caebazole-3-carbaldehyde] และพบว่า LCY-2-CHO สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น และยับยั้งการแสดงออกของ iNOS ที่ระดับ transcription โดยที่สารไม่ไปเร่งการสลายตัวของ mRNA ของ iNOS นอกจากนี้ สาร LCY-2-CHO สามารถการเหนี่ยวนำ iNOS promotor activity ในเซลล์แมคโครฝาจ RAW 264.7ที่สัมผัสกับ LPS แต่ไม่มีผลต่อการสลายตัวของ IKBα หรือ IKBβ และแอกติวิตีของ NF-ΚB ในการจับกับดีเอ็น ต่อมาภายหลังสาร LCY-2-CHO ได้ถูกรายงานว่าสามารถยับยั้งการกระตุ้น p38 MAPK ซึ่งเป็นโปรตีนในขบวนการส่งสัญญาณชีวภาพของเซลล์แมคโครฝาจ RAW 264.7ที่สัมผัสกับ LPS แต่ไม่ผลต่อการกระตุ้น ERK และ JNK ของ MAPKs (Ho และคณะ, 2004)

สาร chroman KL-1156 หรือ 6-Hydroxy-7-methoxychroman-2-carboxylic acid phenylamide สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฝาจ RAW 264.7ที่สัมผัสกับ LPS และยังลดปริมาณ mRNA และโปรตีนของ iNOS กลไกในการออกฤทธิ์ต้านอักเสบของ chroman KL-1156 คือการยับยั้งการ translocation ของ NF-ΚB เข้าสู่นิวเคลียส และลดแอกติวิตีของ NF-ΚB ในการจับกับดีเอ็นเอ ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น ในขณะที่สาร chroman KL-1156 ไม่มีผลต่อการสลายตัวของ IKBα (Kim และคณะ, 2004).

ในปี 2005, Shin และคณะได้รายงานฤทธิ์ต้านอักเสบโดยสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของ N^1-benzyl-4-methylbenzene-1,2-diamine (BMD)ในเซลล์แมคโครฝาจ RAW 264.7ที่สัมผัสกับ LPS ยับยั้งการแสดงออกของ iNOS ที่ระดับ transcription และลด iNOS promotor activity นอกจากนี้ยังลดการ translocation ของ NF-KB เข้าสู่นิวเคลียส และลดแอกติวิตีของ NF-KB ในการจับกับดีเอ็นเอ แต่สาร BMD ไม่สามารถยับยั้งการกระตุ้น p38, ERK-1/2 หรือ JNK ของ MAPKsได้

อนุพันธ์ของ chalcone ทั้งหมด 41 ชนิด ถูกสังเคราะห์และทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฝาจ RAW 264.7 ที่ถูกสัมผัสกับ LPS พบว่า อนุพันธ์ของ chalcone สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ โดยมีค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 7.1 ถึง 23.1 μM โดยที่อนุพันธ์บางตัวสามารถลดการกระตุ้น NF-KB และลดปริมาณ mRNA กับโปรตีนของ iNOS ในขณะที่อนุพันธ์บางตัวไม่สามารถลดปริมาณ mRNA กับโปรตีนของ iNOS รวมทั้งไม่สามารถลดการกระตุ้น NF-KB (Kim และคณะ, 2007)

นอกจากกลไกการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์โดยผ่านการยับยั้งการกระตุ้น NF-KB แล้วยังมีรายงานที่แสดงถึงกลไกอีกทางหนึ่งคือ การยับยั้งเกิดโดยผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์ HO-1 โดยผ่านการกระตุ้นการแสดงออกของ HO-1

Kwak และคณะ (2005) รายงานผลการศึกษากลไกการยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS และปริมาณไนตริกออกไซด์รวมทั้ง TNF-α โดย roflumilast เป็นตัวยับยั้งของ phosphodiesterase 4 (PDE4) ซึ่งใช้เป็นยาในการรักษาผู้ป่วยโรคหืด พบว่า roflumilast นี้กระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน HO-1 ซึ่งผลของการกระตุ้นนี้ทำให้ลดการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฝาจ RAW 264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS เนื่องจากผลิตภัณฑ์ของการกระตุ้นเอนไซม์ HO-1 เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นตัวที่เกี่ยวข้องกับการลดไนตริกออกไซด์

การศึกษาของ Lee และคณะ (2006) พบว่า 2',4',6' tris (methoxymethoxy) chalcone (TMMC)สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฝาจ RAW 264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS นอกจากนี้ยังลดการแสดงออกของยีน iNOS โดยลดปริมาณ mRNA และโปรตีนของ iNOS และลดการสลายตัวของ IKB สาร TMMC สารถกระตุ้นการแสดงออกของ HO-1 ทั้งในระดับmRNA และโปรตีน ฤทธิ์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ลดลงเมื่อให้เซลล์สัมผัสกับ zinc protoporphyrin ซึ่งเป็นตัวยับยั้งของ HO-1 หรือสัมผัสกับฮีโมโกลบินซึ่งเป็นสารที่กำจัดคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าสาร TMMC กระตุ้นการแสดงออกของ HO-1 โดยการกระตุ้น p42/44 MAPK