

บทที่ 2

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แคดเมียม

ข้อมูลทั่วไป

แคดเมียมเป็นธาตุโลหะที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ โดยพบแคดเมียมอยู่ในรูปของสารประกอบ เช่น แคดเมียมคลอไรด์ (Cadmium chloride: $CdCl_2$) แคดเมียมออกไซด์ (Cadmium oxide: CdO) แคดเมียมซัลเฟต (Cadmium sulfate: $CdSO_4$) และแคดเมียมซัลไฟด์ (Cadmium sulfides: CdS) (ATSDR, 1999) ในทางเคมีแคดเมียมจะอยู่ในรูปที่เป็นประจุบวก 2 จัดเป็นธาตุเคมีที่มีเลขอะตอม 48 สัญลักษณ์ของแคดเมียมคือ Cd ซึ่งแคดเมียมนั้นเป็นธาตุโลหะทรานซิชันสีขาว มีลักษณะมันและเงา มีน้ำหนักอะตอมเท่ากับ 112.41 มีความถ่วงจำเพาะ (specific gravity) 8.65 จุดหลอมเหลวอยู่ที่ 321.07 องศาเซลเซียส จุดเดือด 767 องศาเซลเซียส (ATSDR, 1999) ส่วนใหญ่พบแคดเมียมในธรรมชาติเพียงปริมาณเล็กน้อย เนื่องจากเป็นธาตุที่พบปนร่วมกับสังกะสี (Zn) ตะกั่ว (Pb) และทองแดง (Cu) (ATSDR, 1999)

คุณสมบัติของแคดเมียมที่เบา อ่อนดัดโค้งง่าย และทนต่อการกัดกร่อน ทำให้แคดเมียมถูกนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น ผลิตท่อพีวีซี เม็ดสีทาบ้าน รวมทั้งการผลิตปุ๋ยฟอสเฟตเพื่อนำไปใช้ปลูก พืช ผัก ผลไม้ ซึ่งเป็นแหล่งอาหารทั้งมนุษย์ และสัตว์ โดยเฉพาะแคดเมียมถูกนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมแบตเตอรี่เป็นหลัก (Dorris, et al., 2002) จากการนำแคดเมียมมาใช้ในประโยชน์อุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย ย่อมส่งผลทำให้เกิดการแพร่กระจายและการปนเปื้อนของแคดเมียมลงสู่สิ่งแวดล้อม ทั้งใน ดิน น้ำ และอากาศ รวมทั้ง พืช ผัก ผลไม้ที่เป็นแหล่งอาหารของคน และสัตว์ ซึ่งในทั่วโลกจากการสำรวจพบว่า มีการปล่อยแคดเมียมออกสู่สิ่งแวดล้อมประมาณปีละ 7,000 ตัน (Stoepler, 1991) นอกจากนี้ในโรงงานอุตสาหกรรมพบว่าผลิตภัณฑ์ของแคดเมียมโดยส่วนใหญ่ไม่สามารถกลับมารีไซเคิล (recycle) จึงก่อให้เกิดกลายเป็นขยะ และทำให้ต้องกำจัดขยะด้วยวิธีเผา หรือ ฝังกลบลงในดิน ซึ่งผลกระทบที่ได้รับตามมาคือ เกิดการปนเปื้อนของแคดเมียมลงสู่สิ่งแวดล้อม ส่งผลนำไปสู่การแพร่กระจายการปนเปื้อน และเกิดการสะสมพิษของแคดเมียม เข้าสู่พืชผล สัตว์ และมนุษย์ตามมา

แคดเมียม จัดเป็นโลหะหนักที่มีความเป็นพิษสูง ซึ่งเป็นอันตรายต่อ สัตว์ และมนุษย์ โดยการสำรวจประชากรมนุษย์ทั่วโลกที่อยู่ในพื้นที่เสี่ยงที่ได้รับพิษจากแคดเมียมพบว่า มีปัจจัยเสี่ยงที่ได้รับพิษของแคดเมียมเข้าสู่ร่างกาย และจากการสำรวจสุขภาพของประชากรพบว่า มีปัญหา

สุขภาพที่เกี่ยวกับไต และกระดูกเป็นส่วนใหญ่ (Satarung and Moore, 2004) ภาวะที่ได้รับพิษจากแคดเมียมที่เป็นรู้จักกันดีคือ โรคอิไต-อิไต (Itai-Itai disease) ในประเทศญี่ปุ่น ซึ่งมีสาเหตุจากโรงงานถลุงแร่สังกะสี และโรงงานผลิตแร่ทองแดง ตะกั่ว โดยเกิดการจากทั้งกากแร่ที่มีแคดเมียมและสารโลหะอื่นๆ ปนมากับน้ำเสียในโรงงาน ทำให้เกิดการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม และเกิดการสะสมในข้าว และอาหารอื่นๆ ที่ประชากรนำมาบริโภค ประชากรที่ใช้น้ำจากแม่น้ำ หรือ สาเหตุในการได้รับแคดเมียมทางอ้อมพบว่า ประชากรมีอาการป่วยเป็นโรคไต กระดูกผุ เจ็บปวดบริเวณหลัง และเอวอย่างรุนแรงมาก และยังพบว่า อัตราการเกิดเด็กพิการสูงผิดปกติ ดังนั้นหากเมื่อได้รับปริมาณแคดเมียมสะสมเข้าไปในร่างกายมากๆ จึงก่อให้เกิดอันตรายร้ายแรงต่อสุขภาพได้

ความเป็นพิษของแคดเมียม แบ่งออกเป็น 2 ลักษณะดังนี้ การได้รับแคดเมียมในปริมาณมากอาจทำให้เกิดพิษแบบเฉียบพลันได้ โดยการเกิดพิษแบบเฉียบพลันส่วนใหญ่เกิดจากการหายใจเอาฝุ่น หรือ ไอระเหยที่มีการปนเปื้อนของแคดเมียม ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อแคดเมียมถูกความร้อน โดยทั่วไปอาการเริ่มแรกหลังจากสัมผัสสารที่มีการปนเปื้อนของแคดเมียม จะแสดงอาการหลังจากเวลาผ่านไป 2-3 ชั่วโมง อาการเริ่มแรกนั้น จะมีการระคายเคืองเล็กน้อยของทางเดินหายใจส่วนต้น อีก 2-3 ชั่วโมงต่อมาจะมีอาการไอ เจ็บปวดในทรวงอก เหนื่อยออก และหนาวสั่น ซึ่งเป็นอาการที่คล้ายกับการติดเชื้อทั่วไปของทางเดินหายใจส่วนต้น ต่อมา 8-24 ชั่วโมง หลังจากสัมผัสสารอย่างฉับพลันอาจเห็นอาการระคายเคืองอย่างแรงที่ปอด เจ็บปวดในทรวงอก หายใจลำบาก ไอ และอ่อนเพลีย อาการหายใจลำบากจะรุนแรงขึ้นเมื่อเกิดน้ำท่วมปอดตามมา อันตรายจากกรณีเช่นนี้มีถึง 15% ซึ่งผู้ป่วยที่รอดชีวิต อาจมีฟองอากาศในเนื้อเยื่อ และเนื้อปอดปูดพองออกมา (Nordberg, 2004) แต่ในส่วนใหญ่จะพบความเป็นพิษของแคดเมียมที่เกิดขึ้นเป็นแบบชนิดเรื้อรัง โดยเกิดจากที่ร่างกายได้รับปริมาณของแคดเมียมเพียงเล็กน้อยเป็นเวลานานติดต่อกัน ซึ่งมีผลต่อการสะสมของแคดเมียมภายในร่างกายตามมา โดยโรคที่เกิดจากการได้รับแคดเมียมสะสมในร่างกายเป็นเวลานาน ได้แก่ โรคไตเสื่อมสภาพ โรคกระดูกพรุน โรคความดันโลหิตสูง และมีความเสี่ยงในการเป็นมะเร็ง (Jarup, et al., 1998)

การดูดซึมแคดเมียมเข้าสู่ร่างกาย

โดยทั่วไป แคดเมียมสามารถเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ได้ 2 ทางใหญ่ๆ คือ

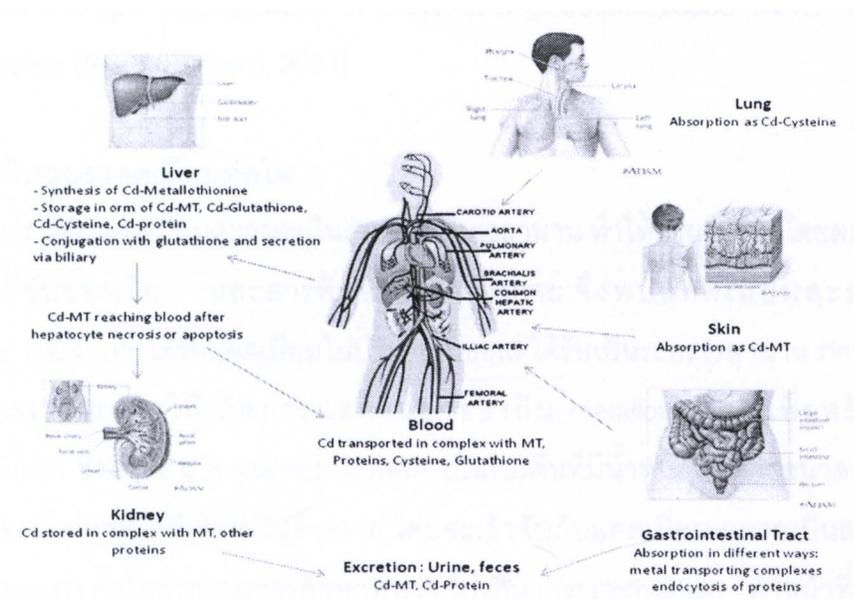
1. การสูดดมไอระเหยของแคดเมียม หรือสารประกอบของแคดเมียมเข้าไป ร่างกายจะดูดซึมแคดเมียมประมาณร้อยละ 10-30 ซึ่งมักพบในกลุ่มคนทำงานที่สัมผัสกับแคดเมียมโดยตรง (Friberg, et al., 1986) แคดเมียมที่ปนเปื้อนในอากาศจะอยู่ในรูปแคดเมียมออกไซด์ (CdO) โดยส่วนใหญ่จะได้อาจจากการสูบบุหรี่ ซึ่งในบุหรี่จะพบแคดเมียมในปริมาณ 0.5-1 ไมโครกรัมต่อบุหรี่ 1 มวน (ATSDR, 1999)

2. การรับประทานอาหาร หรือ น้ำดื่มที่มีการปนเปื้อนของแคดเมียมเจือปนอยู่ (Meranger, et al., 1979) แคดเมียมจะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายประมาณร้อยละ 5-8 และยังคงพบปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมในทางเดินอาหาร เช่น ระบบในร่างกายจะเกิดการดูดซึมเพิ่มขึ้นต่อเมื่อร่างกายได้รับสารอาหารประเภทแคลเซียม เหล็ก และโปรตีน ในปริมาณที่ต่ำ โดยถ้าหากร่างกายมีแคลเซียมในปริมาณที่ต่ำ จะมีปัจจัยเสี่ยงในการที่จะได้รับแคดเมียมเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากเกิดการกระตุ้นการสร้างโปรตีน metallothionein ซึ่งเป็นโปรตีนที่สามารถจับกับโลหะหนักได้ ทำให้เกิดการจับแคดเมียมกับโปรตีน (Godt, et al., 2006) ส่งผลให้ร่างกายดูดซึมแคดเมียม และเกิดการสะสมของแคดเมียมมากขึ้น จากการศึกษาในหนูที่อยู่ในสภาวะร่างกายขาดธาตุเหล็ก (iron-deficiency) พบว่า การขาดธาตุเหล็กมีปัจจัยต่อการเพิ่มขึ้นของการสะสมแคดเมียมในร่างกาย ในขณะที่ร่างกายมีธาตุเหล็กในปริมาณเพียงพอพบว่า การสะสมของแคดเมียมลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Gunshin, et al., 1997)

การวัดหาระดับแคดเมียมในร่างกาย เป็นการหาปริมาณสารอันตราย (internal dose of hazard) ภายในร่างกาย เพื่อประเมินความเสี่ยง (risk assessment) ในการเกิดอันตรายทางสุขภาพจากพิษของแคดเมียม โดยอาศัยความรู้พื้นฐานทางพิษจลนศาสตร์ (toxicokinetics) ได้ว่า เมื่อแคดเมียมเข้าสู่ร่างกายจะถูกเก็บไว้ที่ตับ และส่วนหนึ่งจะจับกับโปรตีน metallothionein และอยู่ในเม็ดเลือดแดง แล้วถูกส่งไปที่ไต (Nordberg, 2004; Suwazono, et al., 2009) ซึ่งแคดเมียมส่วนหนึ่งจะสะสมอยู่ที่ไต และอีกส่วนหนึ่งจะถูกกำจัดออกจากร่างกายทางไต โดยส่วนใหญ่จะพบแคดเมียมอยู่ในรูปแคดเมียมจับกับโปรตีน metallothionein ซึ่งจะถูกระดมอยู่ที่ตับ และไต (Godt, et al., 2006)

การกระจายและการสะสมของแคดเมียมในร่างกาย

ภายหลังจากร่างกายดูดซึมแคดเมียมเข้าสู่ร่างกาย แคดเมียมจะถูกลำเลียงไปในกระแสเลือดพร้อมกับเม็ดเลือดแดง และ Albumin เข้าสู่ตับ โดยที่ตับจะมีการเหนียวทำให้เกิดการสร้างโปรตีน metallothionine (MT) และเกิดการจับแคดเมียมในตับ ให้อยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนเป็น Cd-Metallothionine (Cd-MT), Cd-Glutathione, Cd-Cystgenine และ Cd-protein เพื่อป้องกันการเกิดพิษของแคดเมียมในตับ ส่งผลทำให้เซลล์ตับ (hepatocytes) ถูกทำลายจากพิษของแคดเมียม และทำให้เซลล์เกิดการตายในรูปแบบทั้งเนโครซิส และอะพอพโทซิสตามมา ในส่วนของสารประกอบเชิงซ้อน (Cd-MT) จะถูกลำเลียงเข้าสู่กระแสเลือดส่งผ่านไปไต เพื่อให้ไตขับแคดเมียมออกจากร่างกาย (Godt, et al., 2006) ดังแสดงในภาพ 2 โดยปกติแคดเมียมจะถูกขับออกจากร่างกายอย่างช้าๆ ผ่านทางอุจจาระ แต่ในกรณีที่ร่างกายได้รับแคดเมียมในปริมาณที่มาก จะพบการขับออกของแคดเมียมผ่านทางปัสสาวะมากขึ้น โดยอัตราการสะสมของแคดเมียมในไตจะเกิดขึ้นได้รวดเร็วกว่าในตับ เนื่องจากไตมีอัตราการขับออก (rate of elimination) ของแคดเมียม (Cd-MT) ต่ำกว่าตับ ส่งผลให้ไตเป็นอวัยวะแรกที่มีพบการสะสมของแคดเมียมในปริมาณที่สูง (Nordberg, 2004) นอกจากนี้ยังอาจพบการสะสมใน placenta อีกด้วย



ภาพ 2 แสดง Metabolism, Storage และ Excretion ของแคดเมียมในร่างกาย

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Godt, et al., 2006

การขับแคดเมียมออกจากร่างกาย

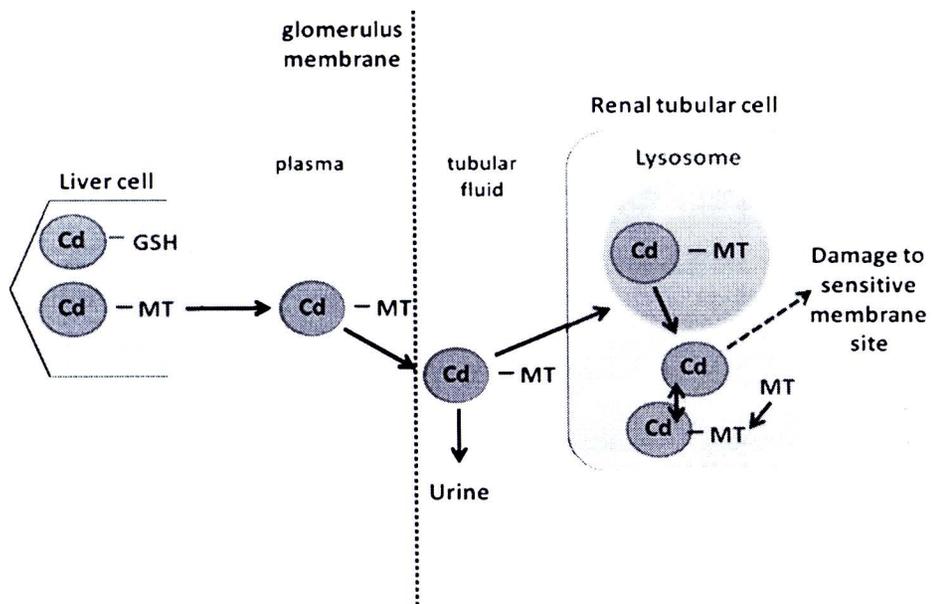
การกำจัดแคดเมียมในร่างกาย ส่วนใหญ่จะกำจัดออกทางอุจจาระ และปัสสาวะ โดยไต จะทำหน้าที่ขับแคดเมียมออกจากร่างกายประมาณร้อยละ 10 เท่านั้น ซึ่งอัตราการขับออกจะน้อยกว่าการดูดซึม เนื่องจากแคดเมียมมีค่าครึ่งชีวิต (Half-life) ในมนุษย์ประมาณ 20-30 ปี (Jarup, et al., 1998) การสะสมแคดเมียมภายในร่างกายก็จะเพิ่มมากขึ้นตามอายุ โดยที่แคดเมียมในปริมาณครึ่งหนึ่งจะถูกสะสมอยู่ที่ตับ และไต (Nordberg, 2004; Suwazono, et al., 2009) ซึ่งแต่ละวัน แคดเมียมจะถูกขับออกทางปัสสาวะในปริมาณ 2-3 ไมโครกรัมต่อวัน (ATSDR, 1989) และนอกจากนี้แคดเมียมยังถูกขับออกทางนม ผิวน้ำ ในปริมาณที่น้อยมาก โดยการขับออกของแคดเมียมยังขึ้นอยู่กับระยะเวลาของการได้รับแคดเมียม เข้าสู่ร่างกาย และ Total body burden ของแต่ละคน

การสะสมของแคดเมียมในร่างกายเป็นเวลานาน ส่งผลให้ไตไม่สามารถทำหน้าที่ดูดกลับ โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low molecular weight protein) ทำให้สามารถตรวจพบโปรตีนที่มี น้ำหนักโมเลกุลต่ำในปัสสาวะ ดังนั้นปริมาณแคดเมียมที่ตรวจพบในปัสสาวะ จึงมีความสัมพันธ์ ต่อการเสื่อมสภาพหน้าที่ของไต (Jarup, et al., 1998) โดยตัวชี้วัดการเสื่อมสภาพของไตใน ภาวะเริ่มต้น ได้แก่ β 2-microglobulin, N-acetyl- α -D-glucosaminidase (NAG) และ retinol-binding-protein (RBP) (Bernard, 2004)

ความเป็นพิษของแคดเมียมต่อไต

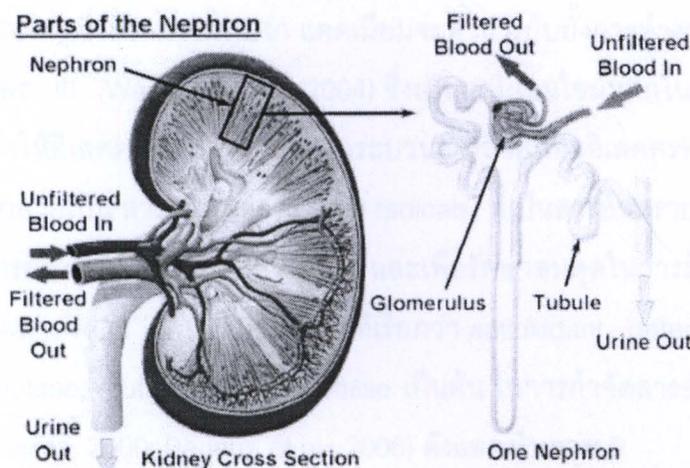
การได้รับแคดเมียมสะสมอยู่ในร่างกายเป็นเวลานาน ทำให้ส่งผลต่อไตโดยตรง เนื่องจาก ไตทำหน้าที่ขับของเสีย และสารพิษออกจากร่างกาย จึงพบแคดเมียมสะสมอยู่ที่ไต (Nordberg, 2004) การได้รับแคดเมียมในปริมาณน้อยแต่ได้รับเป็นระยะเวลานาน ภายในร่างกาย จะเกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน metallothionein เพื่อสร้างโปรตีน metallothionein ซึ่งโปรตีน metallothionein เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดเล็กสามารถ เข้าจับกับสารโลหะหนักที่เข้าไปในร่างกาย โดยจะเข้าจับกับแคดเมียม กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (Cd-MT) ซึ่งในรายงานการศึกษาพบว่า โปรตีน metallothionein ทำหน้าที่ลดอันตราย จากพิษของแคดเมียมในร่างกายได้ (Kagi and Schaffer, 1988) เมื่อแคดเมียม (Cd-MT) ถูก ลำเลียงส่งผ่านมายังที่ไตเพื่อกรองของเสียออกจากร่างกาย แคดเมียมจะผ่านในส่วน ของ glomerulus ซึ่งเป็นส่วนที่ทำหน้าที่กรองของเสีย แคดเมียม (Cd-MT) จะแทรกซึมเข้าไปในเยื่อบุ เซลล์ของท่อไต (renal tubular cell) ซึ่งเมื่อสารประกอบเชิงซ้อน (Cd-MT) ถูก metabolized จะ เกิดการปลดปล่อยแคดเมียมให้เป็นอะตอมอิสระ ส่งผลทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ หรือ ในอีก

ทางหนึ่งจะเกิดการกระตุ้นให้เกิดการสะสมของ (Cd-MT) ในเซลล์เยื่อบุของท่อไต โดยเซลล์จะเกิดการสร้างโปรตีน metallothionein ขึ้นอีกเพื่อป้องกันการเกิดพิษต่อเซลล์ และนำไปสู่การสะสมของแคดเมียมภายในเซลล์เยื่อบุของท่อไตตามมา (Nordberg, 1992) ดังแสดงในภาพ 3 ซึ่งตามส่วนต่างๆ ของท่อไต พบว่าเซลล์เยื่อบุของท่อไตถูกทำลายโดยตรงจากการเกิดภาวะ oxidative stress (Cuttle, et al., 2001; Gobe and Johnson, 2007) ซึ่งเป็นผลจากการสะสมของแคดเมียมในเซลล์ไต ก่อให้เกิดเป็น chronic kidney disease ตามมาได้ (Thijssen, et al., 2007)



ภาพ 3 แสดงการสะสมของแคดเมียม และการเกิดพิษต่อเซลล์เยื่อบุของท่อไต

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Nordberg, 2009



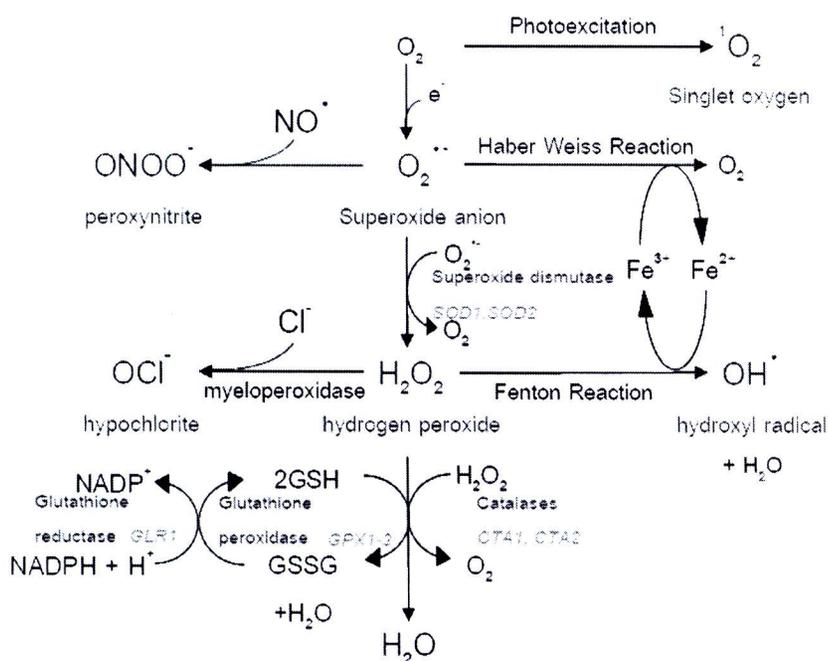
ภาพ 4 แสดงโครงสร้างของท่อไต (nephron)

ที่มา : <http://www.unckidneycenter.org/kidneyhealthlibrary/glomerulardisease.html>

ความเป็นพิษของแคดเมียมในไต อันเกิดจาก ภาวะ oxidative stress

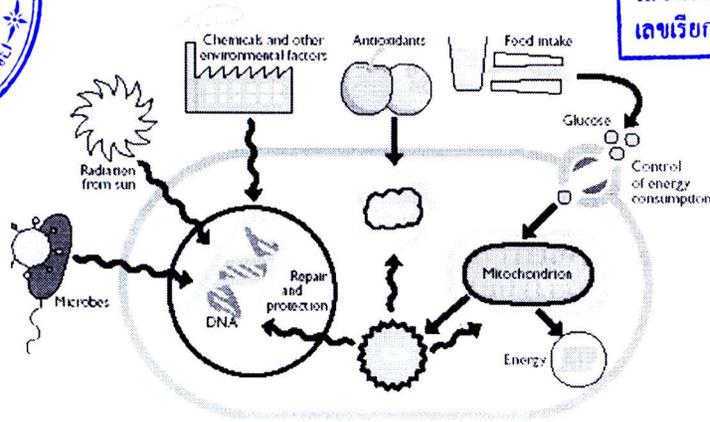
เมื่อร่างกายดูดซึมแคดเมียมเข้าไป เกิดการกระจายของแคดเมียมเข้าสู่อวัยวะต่างๆ ภายในร่างกาย โดยที่แคดเมียมสามารถเข้าสู่เซลล์ได้จากการทำงานร่วมกันกับโปรตีน metallothionein (Cd-MT) ในรายงานการศึกษาพบว่า (Cd-MT) สามารถเข้าสู่เซลล์ได้จากระบวนการ endocytosis บริเวณ brush-border ในท่อไตส่วนต้น (renal proximal tubules) ของหนู (Sabolic, et al., 2002) มีผลทำให้เกิดการทำลายของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) เกิดการ reabsorption และ secretion ที่ผิดปกติส่งผลให้เกิด nephrotoxicity ตามมา และยังพบ (Cd-MT) ในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ของเยื่อบุเซลล์ท่อไตส่วนต้น (renal proximal tubular epithelial cells) ส่งผลให้เกิดการทำลายออร์แกเนลล์ที่สำคัญของเซลล์ คือ mitochondria (Tang and Shaikh, 2001) เนื่องจากแคดเมียมสามารถแทรกซึมเข้าสู่ mitochondria ได้ (Lee, et al., 2005) ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานของ mitochondria ทำให้การทำงานของ mitochondria ผิดปกติไป (mitochondrial dysfunction) โดยจากรายงานการศึกษาพบว่า แคดเมียมกระตุ้นให้เซลล์เกิดการสังเคราะห์ ROS ส่งผลให้เซลล์เกิดภาวะที่เรียกว่า oxidative stress ดังแสดงในภาพ 6 ซึ่งเป็นสาเหตุนำไปสู่การตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสตามมา (Cannino, et al., 2009) โดยอาจเป็นไปได้ว่า แคดเมียมส่งผลกระทบต่อกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน (electron transport chain) หรือ กระบวนการหายใจของเซลล์ โดยผ่านการทำงานของ mitochondria (Nigam, et al., 1999; Tang and Shaikh, 2001; Dorta, et al., 2003;

Takaki, et al., 2004) ซึ่งมีรายงานพบว่า แคดเมียมจะทำการยับยั้งการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ complexes I และ III (Wang, et al., 2004) ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์หลักในขบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน โดยทำให้อิเล็กตรอนหลุดออกจากกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน จับกับออกซิเจน (O_2) ภายในเซลล์กลายเป็น สารอนุมูลอิสระ (free radicals) ที่เป็นสารอันตรายต่อเซลล์ โดยภาวะปกติ เซลล์จะมีการสร้างสาร ROS ภายในเซลล์ และเพื่อรักษาสมดุลในการมีชีวิตนั้น เซลล์จะมีขบวนการในกำจัดสาร ROS โดยจะมีกลุ่มสารที่เรียกว่า antioxidant defenses เช่น เอนไซม์ superoxide dismutase, glutathione และ catalase เป็นต้น ในการกำจัดสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น (Cadenas and Davies, 2000; Benard, et al., 2006) ดังแสดงในภาพ 5



ภาพ 5 แสดงการเกิด และการป้องกันการเกิดของกลุ่มสาร ROS (Reactive Oxygen Speices) ภายในบริเวณเยื่อหุ้มของ mitochondria ในภาวะเซลล์ปกติ

ที่มา : ดัดแปลงมาจากของ Lan W, 2006



ภาพ 6 แสดงปัจจัยที่ส่งผลให้เซลล์เกิดภาวะ Oxidative Stress

ที่มา : <http://www.heattreat.ca/aging.php>

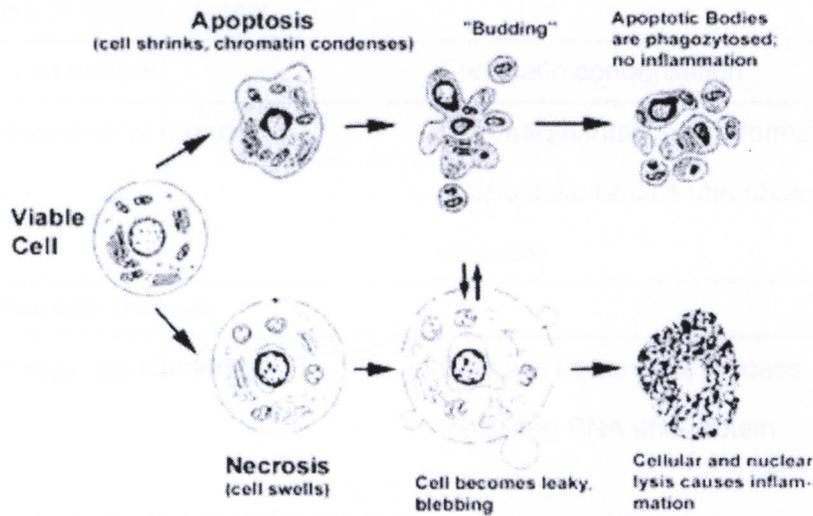
อะพอพโทซิส

โดยทั่วไปการตายของเซลล์แบ่งออกเป็น 2 รูปแบบ คือ เนโครซิส (necrosis) และอะพอพโทซิส (apoptosis) ดังแสดงในภาพ 7 ซึ่งการตายแบบอะพอพโทซิสเป็นรูปแบบหนึ่งของการตายของเซลล์ที่มีการตั้งโปรแกรมไว้ (Programmed cell death) (Gewies, 2003) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการพัฒนาการเจริญเติบโต (Development) และรักษาสสมดุล (Homeostasis) ของสิ่งมีชีวิต (Steller, 1995) หากเมื่อการควบคุมการเกิดอะพอพโทซิสไม่เหมาะสมอาจนำไปสู่การก่อโรคต่างๆ ได้ เช่น โรคมะเร็ง (Cancer) โรคออโตอิมมูน (Autoimmune) และโรคการเสื่อมของระบบประสาท (Neurodegenerative disease) (Munoz and Feldman, 2000)

ลักษณะการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส

ลักษณะการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส จะมีลักษณะรูปร่างที่จำเพาะ ซึ่งสามารถมองเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ดังนี้ เซลล์จะเกิดการหดตัว ไซโตพลาสซึมมีลักษณะหนาแน่น และออร์แกเนลภายในจะรวมตัวหนาแน่นขึ้น รวมทั้งโครมาติน และนิวเคลียสหดตัวแน่นขึ้น ซึ่งเป็นลักษณะที่สำคัญในการบ่งบอกการเกิดอะพอพโทซิสภายในเซลล์ (Susin, et al., 2000; Kihlmark, et al., 2001) บริเวณเยื่อหุ้มของนิวเคลียส และเยื่อหุ้มเซลล์เกิดลักษณะเป็นถุง เรียกว่า blebbing หรือ budding สุดท้ายเซลล์จะแตก และถูกหุ้มด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ซึ่งเรียกโครงสร้างเฉพาะนี้ว่า apoptotic bodies โดยภายในจะประกอบไปด้วยโครมาตินที่อัดกันแน่น และออร์แกเนลต่างๆ จากนั้นก็จะถูกเก็บกินจากการทำงานของ macrophage

ภายในร่างกาย (Gewies, 2003) ดังแสดงในภาพ 7 ในการตายแบบอะพอพอโทซิสจะไม่ส่งผลกระทบต่อกระบวนการเกิด inflammatory (Majno and Joris, 1995) ซึ่งต่างจากการตายแบบเนโครซิส ซึ่งลักษณะการตายคือ เยื่อหุ้มเซลล์จะเสียหาย เซลล์เกิดบวม และเซลล์จะแตกในที่สุด ดังนั้นองค์ประกอบภายในเซลล์จะถูกปล่อยออกมาสู่เซลล์ข้างเคียง ทำให้เซลล์อื่นๆ ได้รับความเสียหายไปด้วย และทำให้เกิดการตอบสนองของ inflammatory response อย่างรุนแรง (Leist and Jaattela, 2001) ดังแสดงในตาราง 1



ภาพ 7 แสดงลักษณะการตายของเซลล์แบบเนโครซิส และ อะพอพอโทซิส

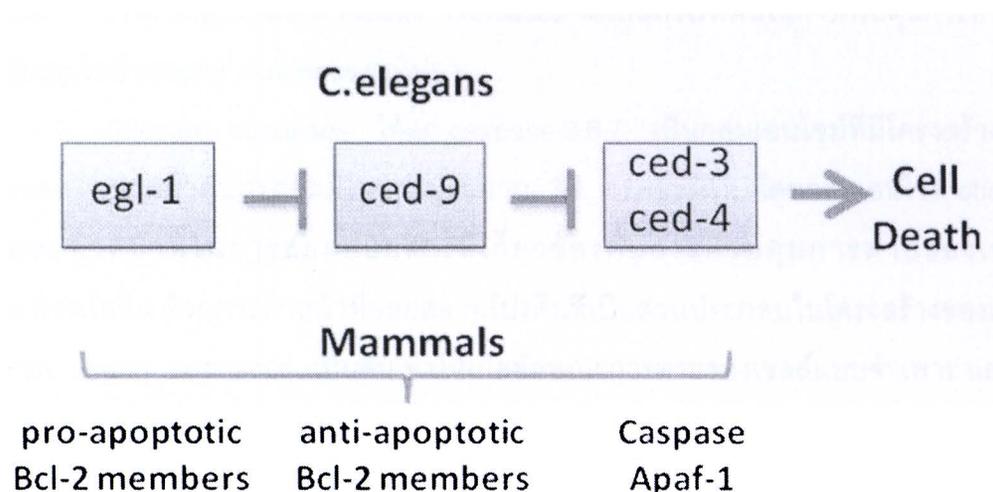
ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Gewies, 2003

ตาราง 1 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะการตายของเซลล์แบบเนโครซิส
และอะพอพโทซิส

Necrosis	Apoptosis
Morphological changes	
Cell swelling	Cell shrinkage
Loss of cell membrane integrity with release of cellular content	Cell membrane blebbing
Total cell rupture	Chromatin condensation
Disintegration of organelles	DNA fragmentation and formation of apoptotic bodies (membrane vesicles)
Biochemical changes	
No energy requirement	Energy – dependent process (requiring RNA and protein synthesis)
Random digestion of DNA	Non random DNA fragmentation
	Activation of caspase cascade
Physiological changes	
Affect groups of cells	Affects individual cells
Induced by major pathological acute injury i.e. hypoxia	Induced by physiological stimuli i.e. withdraw of growth factors
Phagocytosis by circulating engulfing immune cell	Phagocytosis by neighboring engulfing cell
Significant inflammatory response	No inflammatory response

ยีนควบคุมการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (Apoptotic gene)

ในการศึกษาทางพันธุศาสตร์ของหนอนตัวกลม *Caenorhabditis elegans* พบว่ายีนที่สำคัญในการควบคุมการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส คือ *ced-3*, *ced-4* ซึ่งเป็นกลุ่มยีนที่กระตุ้นให้เกิดการเหนี่ยวนำการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส และ *ced-9* ซึ่งเป็นกลุ่มยีนที่ยับยั้งไม่ให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส ในสภาวะปกติ ยีน *ced-9* จะทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของยีน *ced-3* และ *ced-4* เพื่อควบคุมไม่ให้เกิดการเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิส แต่ถ้าหากเซลล์ได้รับการกระตุ้นให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส ยีน *ced-9* จะทำงานแยกตัวออกมา (Horvitz, 1999) ดังแสดงในภาพ 8



ภาพ 8 แสดงการเปรียบเทียบของ Apoptotic genes ของ *c.elegans* และ mammals

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Horvitz, 1999

เอนไซม์ Caspases

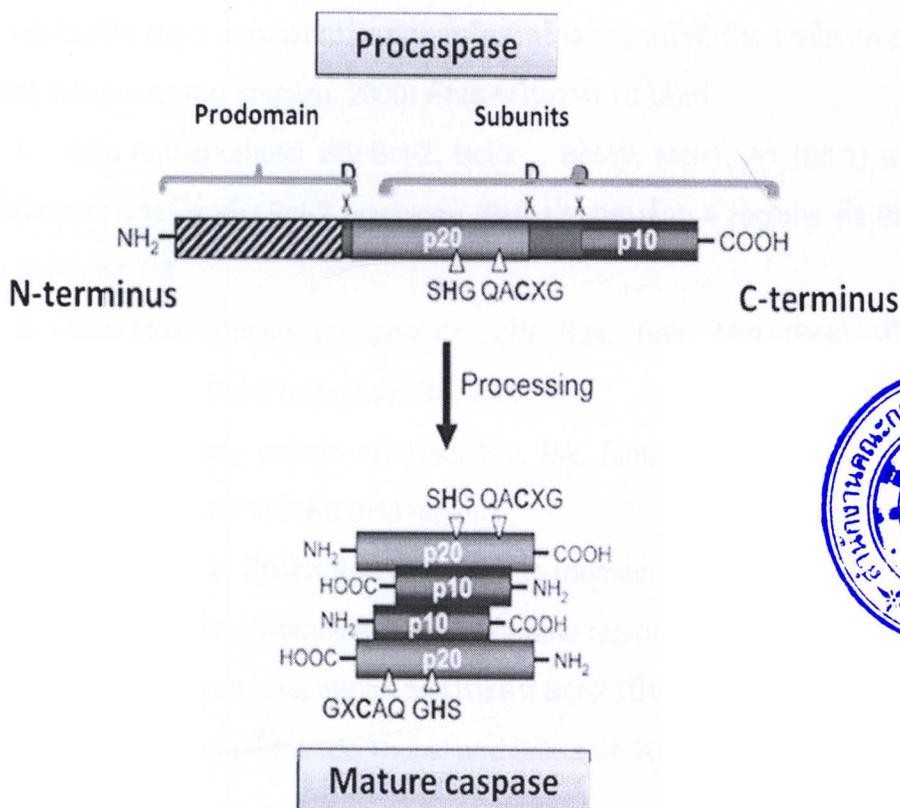
Caspases หรือ cysteine aspartyl specific proteases เป็นกลุ่มเอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเกิดอะพอพโทซิส (Bratton, 2000) ที่พบจากการศึกษาทางพันธุศาสตร์ในหนอนตัวกลม *Caenorhabditis elegans* (Horvitz, 1999) ในสภาวะเซลล์ปกติ caspase จะถูกสร้างอยู่ในสภาพที่ไม่ทำงาน (inactive) เรียกกลุ่มนี้ว่า procaspase (proenzyme) ซึ่งมีโครงสร้างหลักประกอบไปด้วย prodomain และ subunit แต่หากเกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิส กลุ่มเอนไซม์ procaspase จะมีการตัดเอาส่วน prodomain ออก กลายเป็น caspase (active) ใน

สภาพพร้อมที่จะทำงาน โดยการกระตุ้นเอนไซม์ caspase จะถูกกระตุ้นอย่างเป็นลำดับ (Adrain, et al., 2002) ดังแสดงในภาพ 9

ในปัจจุบัน มีรายงานพบว่ามีเอนไซม์ caspase ประมาณ 14 ชนิด ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มตามหน้าที่การทำงาน (Gupta, S., 2003) ได้แก่

1. Initiator caspases ได้แก่ caspase-2,8,9,10 เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีโครงสร้างของ prodomain ขนาดลำดับกรดอะมิโนยาวประมาณ 100 กรดอะมิโน ซึ่งในส่วนโครงสร้าง prodomain จะมีโครงสร้างเฉพาะ (structure motifs) เช่น DED (Death effector domain) ของเอนไซม์ caspase-8 และ caspase-10 เพื่อจำเป็นในการจับกับ adaptor molecule เช่น FADD หรือ Apaf-1 สำหรับกลุ่มเอนไซม์ initiator caspases จะเป็นตัวเริ่มต้นในการกระตุ้นการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ effector caspases ต่อไป

2. Effector caspases ได้แก่ caspase-3,6,7 เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีโครงสร้างของ prodomain ขนาดลำดับกรดอะมิโนยาวประมาณ 30 กรดอะมิโน โดยกลุ่มเอนไซม์ effector caspases ทำหน้าที่ในการแยกย่อยสารที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส ด้วยการทำหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบในโครงสร้างของเซลล์ เช่น actin, fodrin และ lamin เป็นต้น ทำให้เกิดลักษณะการตายของเซลล์แบบจำเพาะ และทำหน้าที่ในการกระตุ้นให้เซลล์เกิดการแตกหักของเซลล์ การหดตัวของนิวเคลียส และเกิดการแตกหักของ DNA ตามมา โดยพบว่ากลุ่มเอนไซม์ effector caspases ส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ caspase-activated DNase และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ poly-ADP-ribose polymerase ทำให้เกิดการแตกหักของ DNA ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส



ภาพ 9 แสดงโครงสร้างเอนไซม์ caspases ประกอบด้วย prodomain และ subunits

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Chowdhury, et al., 2008

กลุ่มโปรตีน Bcl-2

B-cell lymphoma protein 2 (Bcl-2) เป็นกลุ่มโปรตีนที่มีบทบาทเกี่ยวข้องในกระบวนการตายของเซลล์ (Tsujiimoto, et al., 1985; Tsujiimoto and Croce, 1986) ในรายงานการศึกษาพบว่า โปรตีน Bcl-2 ป้องกันการตายของเซลล์ lymphoid cell line จากการยับยั้ง IL-3 (interlukin-3) (Vaux, et al., 1998) ซึ่งภายหลังได้มีรายงานพบว่าโปรตีน Bcl-2 สามารถยับยั้งการตายของเซลล์จากสิ่งกระตุ้น เช่น chemotherapy agent, ethanol และภาวะ heat shock (Tsujiimoto, 1989) ซึ่งแสดงว่าโปรตีน Bcl-2 อาจเป็นตัว negative regulator ต่อกระบวนการตายของเซลล์ นอกจากนี้ได้มีรายงานการศึกษาใน *in vivo* ในหนู (mice) ที่ทำการทดลองให้ไม่มีการแสดงออกของยีน Bcl-2 (lacking the *bcl-2* gene) พบว่า หนูมีการเจริญเติบโตที่ผิดปกติไป และตายในที่สุด (Veis, et al., 1993; Nakayama, et al., 1994; Kamada, et al., 1995)

กลุ่มโปรตีน Bcl-2 สามารถแบ่งแยกตามโครงสร้าง และหน้าที่เป็น 3 ชนิด (Adams and Cory, 1998; Tsujimoto and Shimizu, 2000) ดังแสดงในภาพ 10 ได้แก่

1. กลุ่ม Anti-apoptotic เช่น Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-W, Mcl-1, A1 (Bfl-1) และ Bcl-B เป็นต้น ซึ่งโครงสร้างจะมีลำดับ Bcl-2 homology (BH) ประกอบด้วย 4 regions คือ BH1, BH2, BH3 and BH4 และ TM

2. กลุ่ม Multi-domain proapoptotic เช่น Bax, Bak, Mtd (Bok) เป็นต้น โดยโครงสร้างจะมีหลายลำดับ Bcl-2 homology (BH) และ TM

3. กลุ่ม BH3-only protein เช่น Bad, Bid, Bik, Bim, Noxa, Puma, Bmf และ Hrk เป็นต้น โดยโครงสร้างจะมีเฉพาะลำดับ BH3 region

กลุ่มโปรตีน Bcl-2 มีหน่วยย่อยของโครงสร้าง (domain regions) ร่วมกันในส่วน BH (Bcl-2 homology) และมีส่วน N-terminal transmembrane region ของ Bcl-2 protein ซึ่งในส่วนที่เป็น N-terminal transmembrane region ของโปรตีน Bcl-2 เป็นตำแหน่งในการเคลื่อนย้ายไปยังเยื่อหุ้มชั้นนอกของ mitochondria (de Thonel and Eriksson, 2005)

Anti-apoptotic BCL-2 proteins



Pro-apoptotic BCL-2 proteins

Effectors



BH3-only proteins



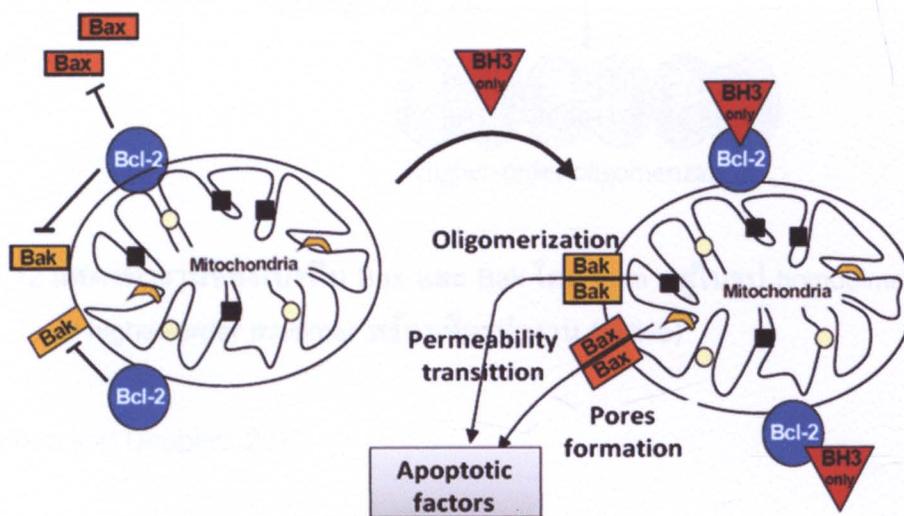
ภาพ 10 แสดงโครงสร้างของโปรตีนกลุ่ม Bcl-2 ซึ่งประกอบไปด้วย Bcl-2 homology (BH) regions และมีส่วน N-terminal transmembrane region (TM)

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Stephen and Douglas, 2010

การทำงานของโปรตีน Bcl-2 ต่อ mitochondria

โดยในการควบคุมกระบวนการเกิดอะพอพโทซิส จะถูกควบคุมโดยโปรตีนทั้งหมด 3 กลุ่ม คือ กลุ่มโปรตีน pro-apoptotic, กลุ่มโปรตีน pro-apoptotic (BH-3 only) เช่น BH3 ซึ่งมีบทบาทในการสนับสนุนกระตุ้นการทำงานของกลุ่มโปรตีน pro-apoptotic เช่น Bax, Bak และอีกหนึ่งกลุ่มคือ กลุ่มโปรตีน anti-apoptotic เช่น Bcl-2 มีบทบาทยับยั้งการปล่อยของ apoptogenic factors (de Thonel and Eriksson, 2005) หรือ มีบทบาทในการควบคุมการทำงานของ mitochondrial membrane potential (MMP) ซึ่งจะคอยควบคุมการปล่อย apoptogenic factors ที่อยู่ภายในชั้น intermembrane space ของ mitochondria ออกมาสู่ cytosol (Tsujiimoto and Shimizu, 2000 a,b; Green, 2000; Martinou and Green, 2001; Zamzami and Kromer, 2001)

คุณลักษณะเฉพาะของโปรตีนกลุ่ม anti-apoptotic และ pro-apoptotic มีบทบาทในการคอยควบคุมการทำงานซึ่งกันและกัน (Huang, et al., 1998; Shimizu, et al., 2000) เพื่อรักษาสสมดุลของเซลล์ ในภาวะที่เซลล์ปกติ แต่หากเมื่อเซลล์ได้รับสัญญาณเหนี่ยวนำการตาย โปรตีนกลุ่ม pro-apoptotic จะเข้ามามีบทบาทในการทำงานต่อกระบวนการตาย ซึ่งจะมีโปรตีนกลุ่ม anti-apoptotic ควบคุมการทำงานของโปรตีนกลุ่ม pro-apoptotic เพื่อป้องกันการตาย ดังแสดงใน ภาพ 11

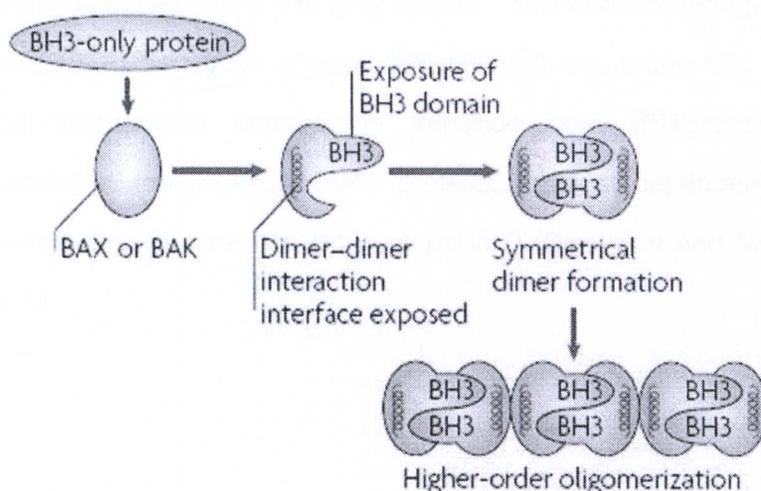


ภาพ 11 แสดงบทบาทการทำงานของกลุ่มโปรตีน Bcl-2 ต่อ mitochondria

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Gewies, 2003

Pro-apoptotic proteins

ในกลุ่มโปรตีน pro-apoptotic เช่น Bax (Bcl-2-associated X protein), Bak (Bcl-2 antagonist or Killer) ในภาวะเซลล์ปกติโปรตีน Bax และ Bak จะอยู่ในรูป monomeric (inactive) พบอยู่ใน cytosol หรือ cytoskeleton (Hsu, et al., 1997; Puthalakath, et al., 1999) แต่หากเมื่อเซลล์ได้รับสัญญาณให้เกิดการเหนี่ยวนำการตาย (apoptotic stimulation) โปรตีน Bax และ Bak จะเปลี่ยนแปลงรูปแบบ (conformation) ให้อยู่ในรูป homodimer/higher-order multimer พร้อมทั้งจะทำงาน (active) และจะเคลื่อนที่มายังเยื่อหุ้มชั้นนอกของ mitochondria (outer mitochondrial membrane) ดังแสดงในภาพ 12 ซึ่งในรายงานการศึกษา mitochondria ของยีสต์ (yeast cells) พบว่า โปรตีน Bax และ Bak เหนี่ยวนำให้เกิดการปล่อย cytochrome C และทำให้เกิดการสูญเสีย mitochondrial membrane potential (MMP) (Shimizu, et al., 2000; Priault, et al., 1999)



ภาพ 12 แสดงทำงานของโปรตีน Bax และ Bak โดย form อยู่ในรูป homodimer or higher-order multimer พร้อมทั้งจะทำงาน (active)

ที่มา : Stephen and Douglas, 2010

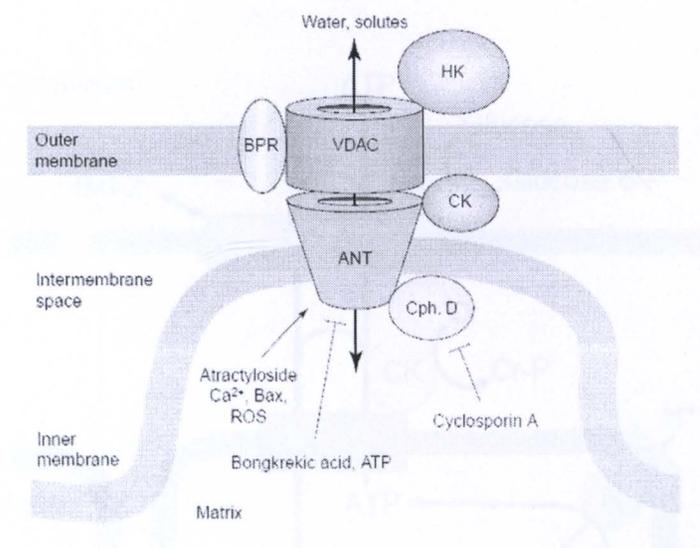
Anti-apoptotic proteins

ในกลุ่มโปรตีน anti-apoptotic เช่น โปรตีน Bcl-2, Bcl-x_L มีบทบาทในการควบคุมการทำงานของ mitochondrial membrane potential (MMP) ใน mitochondria ในภาวะเซลล์ปกติจะพบโปรตีน Bcl-2, Bcl-x_L อยู่ที่ mitochondria, endoplasmic reticulum (ER) หรือ เยื่อหุ้ม

นิวเคลียส ซึ่งในรายงานการศึกษา mitochondria ของยีสต์ (yeast cells) พบว่า โปรตีน Bcl-2, Bcl-x_L มีบทบาทในการช่วยป้องกันไม่ให้เกิดการปล่อย cytochrome c และป้องกันการสูญเสีย mitochondrial membrane potential (MMP) (Shimizu, et al., 2000)

ความสำคัญของ mitochondria ต่อการตายแบบอะพอพโทซิส

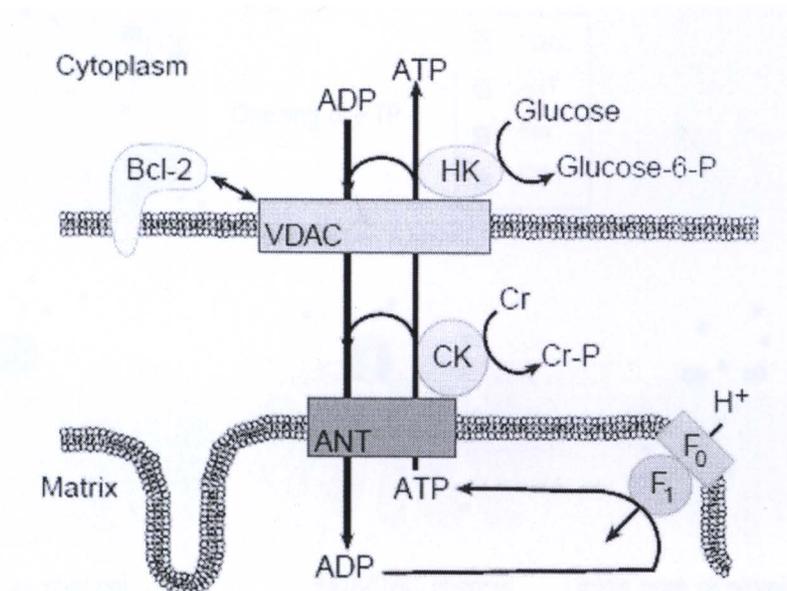
Mitochondria เป็นออร์แกเนลล์ที่สำคัญต่อการสร้างพลังงานให้แก่เซลล์ โดยขบวนการที่เรียกว่า Oxidative phosphorylation ซึ่งมีความสำคัญต่อกระบวนการอะพอพโทซิส (Desagher and Martinou, 2000) ภายในชั้น inter membrane space ของ mitochondria ซึ่งเป็นช่องว่างอยู่ระหว่างเยื่อหุ้มชั้นนอก และเยื่อหุ้มชั้นในของ mitochondria จะพบว่ามีกลุ่มโปรตีน apoptogenic factors เช่น cytochrome c, apoptosis-inducing factor (AIF) เป็นต้น ซึ่งเป็นตัวเหนี่ยวนำในการกระตุ้นการเกิดอะพอพโทซิส (Bras, et al., 2005) โดยสารเหล่านี้จะผ่านออกจากเยื่อหุ้มชั้นนอกของ mitochondria ออกมาสู่ cytosol ทางช่อง mitochondrial permeability transition pore (PTP) ซึ่งเป็น ion channel ที่พบอยู่บนผิว membrane ของ mitochondria โดยโครงสร้างของ mitochondrial permeability transition pore (PTP) ประกอบไปด้วยโปรตีน adenine nucleotide translocation (ANT protein), voltage dependent anion channel (VDAC), benzodiazepine receptor และ cyclophilin D (Desagher and Martinou, 2000) ดังแสดงในภาพ 13



ภาพ 13 แสดงโครงสร้าง mitochondrial permeability transition pore บนเยื่อหุ้มของชั้นนอกและชั้นในของ mitochondria (outer and inner mitochondrial membrane)

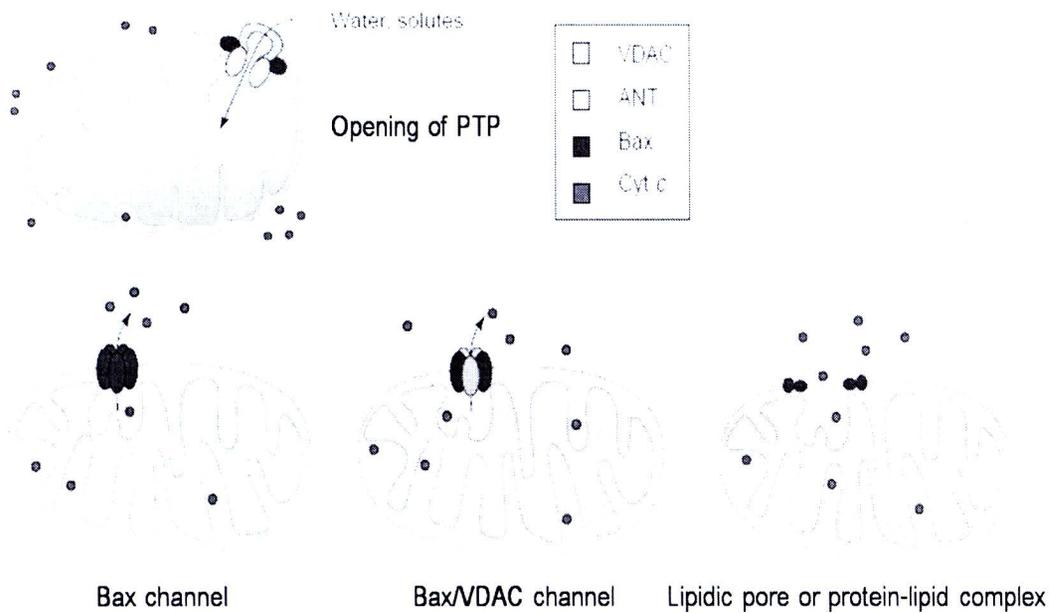
ที่มา : Desagher and Martinou, 2000

ในภาวะที่เซลล์ปกติ mitochondrial membrane potential (MMP) อยู่ภายใต้การควบคุมของกลุ่มโปรตีน Bcl-2 family (Bras, et al., 2005; Regula, et al., 2003) โดยกลุ่มโปรตีน anti-apoptotic เช่น โปรตีน Bcl-2 จะทำหน้าที่ควบคุมการแลกเปลี่ยนระหว่าง ADP/ATP ใน mitochondria และ cytosol (Vander Heiden and Thompson, 1999) ซึ่งจะคอยควบคุมไม่ให้เกิดการปล่อยกลุ่มสาร apoptogenic factors จากชั้น mitochondria ออกมาสู่ cytosol โดยเป็นการควบคุมการเกิดอะพอพโทซิสทางอ้อม ดังแสดงในภาพ 14 แต่หากเมื่อเซลล์ได้รับสิ่งกระตุ้นในสภาวะต่างๆ เช่น การเกิดสารอนุมูลอิสระ (free radicals) หรือ ภาวะ oxidative stress กลุ่มโปรตีน pro-apoptotic เช่น Bax จะทำหน้าที่กระตุ้นให้เกิดการเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิส โดยจะไปรบกวนการควบคุมของ electron chemical gradient ระหว่าง mitochondria และ cytosol ทำให้เกิดการสูญเสีย MMP ส่งผลให้ permeability transition pore (PT pore) เสียการควบคุม เกิดการรั่วของสารจาก cytosol ไหลเข้าสู่ mitochondria ทำให้ mitochondria บวม (swelling) จนเกิดรอยร้าวบนผิว membrane ของ mitochondria นำไปสู่การปล่อยสาร apoptotic factors ออกสู่ cytosol และทำให้เกิดการเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิสตามมา (Desagher and Martinou, 2000) ดังแสดงในภาพ 15



ภาพ 14 แสดงบทบาทของโปรตีน Bcl-2 ที่ทำหน้าที่รักษาสมดุลของ mitochondria โดยทำงานควบคุมการผ่านเข้าออกของ electron chemical gradient ระหว่าง cytosol และ mitochondria

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Vander Heiden and Thompson, 1999

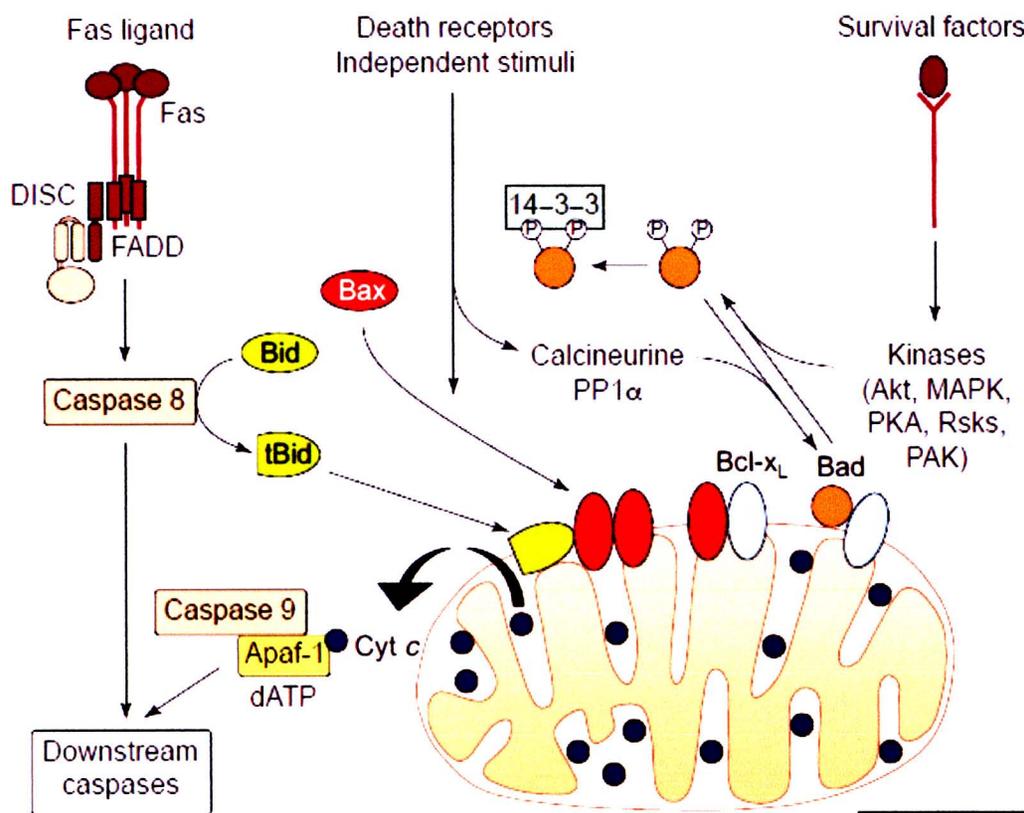


ภาพ 15 แสดงบทบาทของโปรตีน Bax ต่อ mitochondrial permeability transition pore (PTP)

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Desagher and Martinou, 2000

วิถีอะพอพโทซิส

วิถีการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ เป็นวิถีการตายที่จะเกิดขึ้นได้ ต้องอาศัยคำสั่ง หรือ สัญญาณการเหนี่ยวนำให้เกิดการตาย อาจจะเป็นคำสั่ง หรือ สัญญาณที่มาจากภายนอกเซลล์ (extrinsic pathway) หรือ ภายในเซลล์ (intrinsic pathway) โดยจะมีกลไกการทำงานสัมพันธ์กันหลาย pathway เป็น network ดังแสดงในภาพ 16



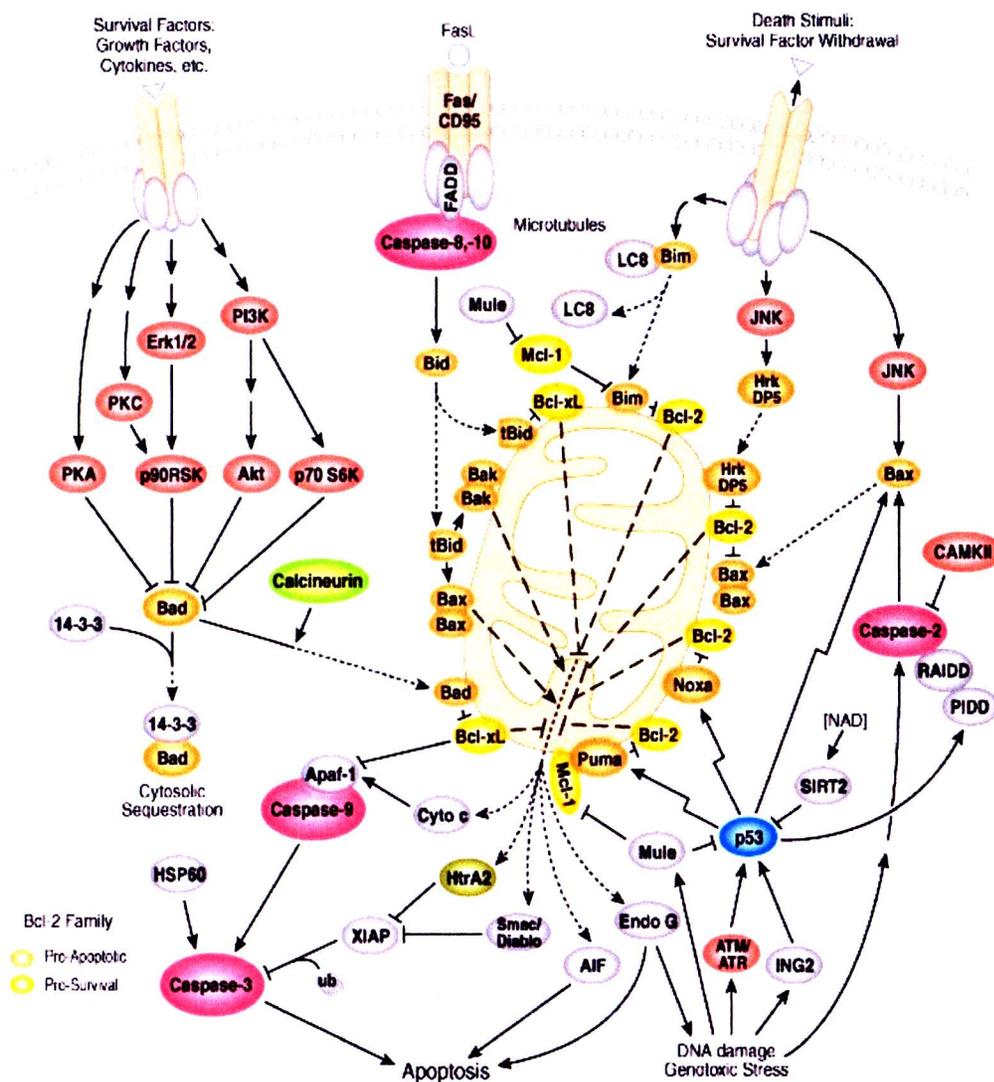
ภาพ 16 แสดงวิถีการเกิดอะพอพโทซิส โดยผ่านการเหนี่ยวนำของ Death receptor pathway และ Mitochondria pathway

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Desagher and Martinou, 2000



กลไกการเกิดอะพอพโทซิสโดยทำงานผ่านทาง mitochondria pathway

วิถีจากภายในที่มี mitochondria เป็นศูนย์กลาง โดยจะมีกลุ่มโปรตีน Bcl-2 family ที่คอยควบคุมในการปล่อยสาร apoptogenic factors ที่อยู่ภายใน mitochondria matrix ในการทำงานของกลุ่มโปรตีน pro-apoptotic เช่น Bax สภาวะเซลล์ปกติ โปรตีน Bax จะอยู่ในสภาพที่ยังไม่พร้อมทำงาน (inactive) และอยู่ภายใน cytosol (Hsu, et al., 1997) แต่หากเมื่อเซลล์ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิส โปรตีน Bax จะเปลี่ยนให้อยู่ในสภาพพร้อมที่จะทำงาน (active) และจะเคลื่อนไปจับที่เยื่อหุ้มชั้นนอกของ mitochondria การทำงานของโปรตีน Bax ที่อยู่บนเยื่อหุ้มชั้นนอกของ mitochondria (Gross, et al., 1999) ทำให้เกิดรอยร้าวบนผิวของ mitochondria และในขณะเดียวกัน กลุ่มโปรตีน anti-apoptotic เช่น Bcl-2 ที่ทำหน้าที่คอยควบคุม mitochondrial membrane potential (MMP) (Vander Heiden and Thompson, 1999) โดยจะยับยั้งการทำงานของกลุ่มโปรตีน pro-apoptotic ซึ่งเป็นการปกป้อง mitochondria แต่หากเมื่อการทำงานของกลุ่มโปรตีน pro-apoptotic มีมากกว่า ส่งผลให้เกิด permeability transition pore (PT pore) เสียการควบคุม ทำให้กลุ่มสาร apoptogenic factors เช่น cytochrome C ถูกปล่อยออกมาสู่ cytosol เกิดการรวมตัว apoptosis-protease-activating factor-1 (Apaf-1) กลายเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า apoptosome โดยโครงสร้าง apoptosome จะไปกระตุ้น procaspase-9 (inactive) ให้เป็น caspase-9 (active) ซึ่งจะไปกระตุ้น caspase-3 ซึ่งเป็น caspase ตัวสุดท้ายในการเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ (Sudhir , 2001) ดังแสดงในภาพ 17

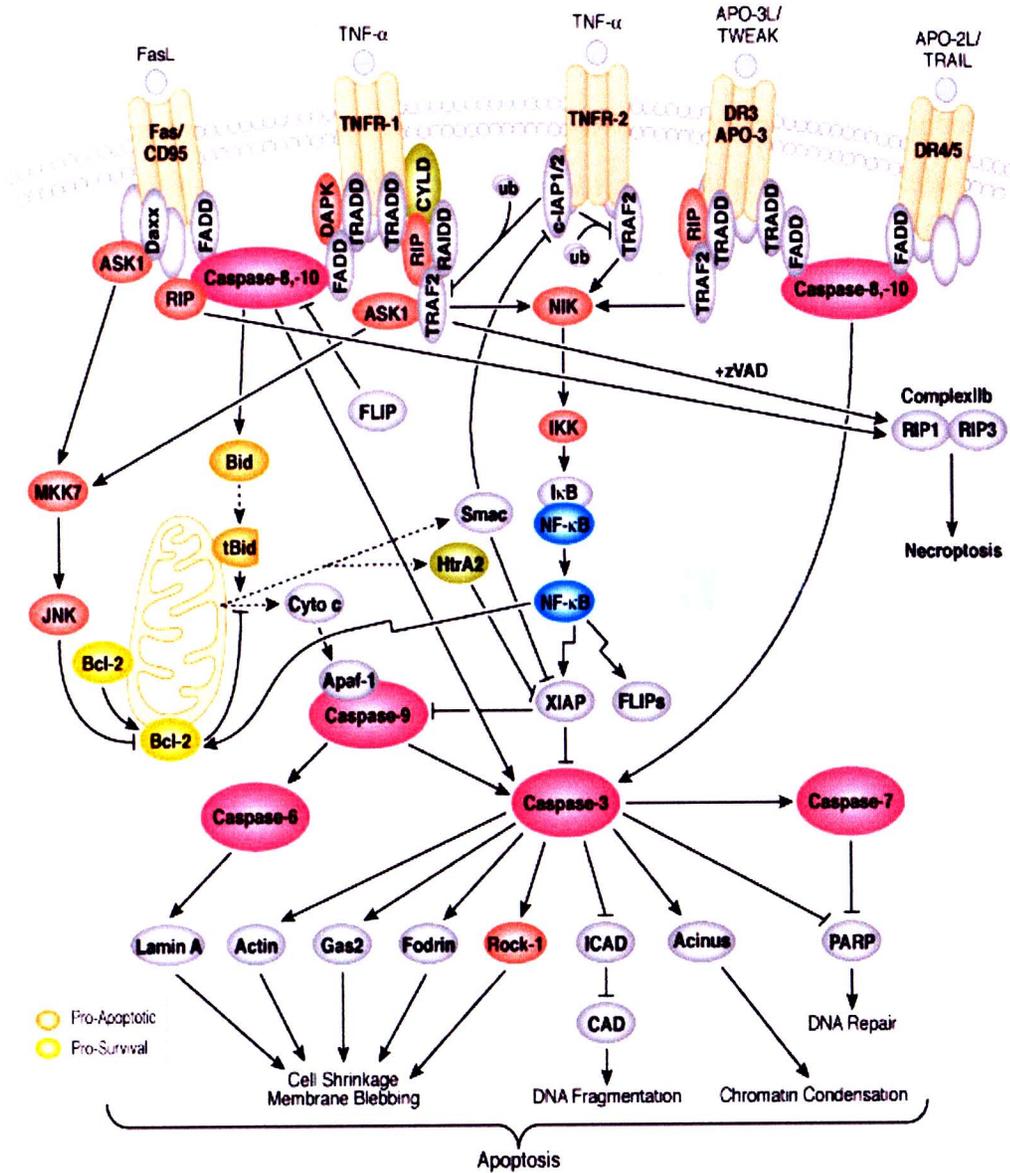


ภาพ 17 แสดงวิถีการเกิดอะพอพโทซิสโดยทำงานผ่านทาง mitochondria ซึ่งมีกลุ่มโปรตีน Bcl-2 คอยควบคุม

ที่มา : http://www.cellsignal.com/reference/pathway/apoptosis_Mitochondrial.html

กลไกการเกิดอะพอพโทซิสโดยทำงานผ่านทาง Death receptor pathway

วิถีจากการทำงานของตัวรับสัญญาณที่เรียกว่า Death receptors ซึ่งเป็นโปรตีนที่ฝังหรืออยู่บนผนังเซลล์ เช่น Fas receptor (Fas R, Fas/CD95), Tumor necrosis factor receptor (TNFR) และ DR5 เป็นต้น โดยจะมีตัวสัญญาณที่เหนี่ยวนำให้เกิดการตาย เรียกว่า Ligand เช่น Fas ligand (FasL), Tumor necrosis factor- α (TNF- α) และ TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) เป็นต้น ทำให้เกิดการจับกันของตัว Death receptor และ ligand เกิดลักษณะการเชื่อมต่อของ Death domain (DD) และ Death effector domain (DED) กลายเป็นกลุ่มโปรตีนที่เรียกว่า Death inducing signaling complexes (DISC) ซึ่งกลุ่มโปรตีน DISC จะไปกระตุ้น procaspase-8 (inactive) ให้เป็น caspase-8 (active) ทำหน้าที่ไปกระตุ้นเอนไซม์ caspase ตัวอื่นต่อไป และนอกจากนี้ caspase-8 ไปกระตุ้นโปรตีน BH3-interacting domain death agonist (Bid) ให้ตัดเอาส่วน prodomain ออก กลายเป็น tBid โดยจะไปกระตุ้นโปรตีน Bax ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีน Bcl-2 ที่เป็น proapoptotic ทำให้เกิดกระตุ้นการตายผ่าน mitochondria pathway ต่อไป (Rao, et al., 2001) ดังแสดงในภาพ 18



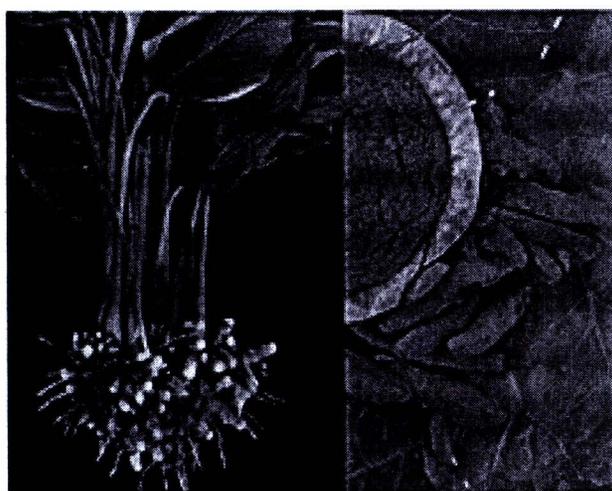
ภาพ 18 แสดงวิถีการเกิดอะพอพโทซิสโดยทำงานผ่านทาง death receptor ที่อยู่บนเยื่อหุ้มของเซลล์

ที่มา : http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Death_Receptor.html

Curcuma longa Linn. (ขมิ้นชัน)

ข้อมูลทั่วไป

Curcuma longa Linn. หรือ Turmeric เป็นพืชที่จัดอยู่ในตระกูลขิง (Zingiberaceae) มีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีเหง้าอยู่ใต้ดิน เนื้อในของเหง้าเป็นสีเหลืองเข้ม ดังแสดงในภาพ 18 เหง้าของขมิ้น มีรสฝาด กลิ่นหอม ส่วนใหญ่ ขมิ้นชัน เป็นพืช ผัก สวนครัวที่รู้จักกันมานาน ถูกนำมาใช้เป็นเครื่องเทศ เครื่องแต่งกลิ่น รส และสี ในอาหาร นอกจากนี้ยังใช้เป็นยารักษาโรคประจำบ้าน มาเป็นระยะเวลายาวนานแล้ว เช่น ช่วยลดกรด ขับลม แก้ปวดท้อง ซึ่งในปัจจุบันได้นำสรรพคุณของขมิ้นชัน นำมาทำเป็นยาในการรักษาโรคต่างได้ เช่น biliary disorder, anorexia, cough, hepatic disorder (Kozuki, et al., 2001)



Turmeric Plant and Rhizome

ภาพ 19 แสดงลักษณะเหง้าของขมิ้นชัน

ที่มา : <http://www.curcuminoids.com/>

สารสกัดที่ได้จากขมิ้นชัน (Curcuminoids)

เคอร์คิวมินอยด์ (Curcuminoids) เป็นสารสกัดที่ได้จากผงของเหง้าขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) เป็นสารจำพวก diferuloylmethane ซึ่งมีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองเข้มสะสม อยู่ในเซลล์ของเหง้าขมิ้นชัน เป็นสารที่มีกลิ่น และคุณสมบัติเฉพาะตัว ไม่ละลายน้ำ (insoluble water)

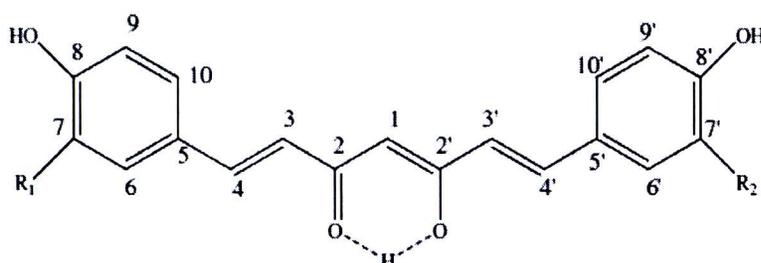
แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายบางตัว เช่น ethanol, alkalis, ketone, acetic acid, chloroform และ dimethylsulfoxide (DMSO) เป็นต้น

เคอร์คิวมินอยด์ (Curcuminoids) ประกอบด้วย สารหลัก 3 ตัว (Jayaprakasha, et al., 2002) ดังแสดงในภาพ 20 และ 21 ดังนี้

1. Curcumin มีชื่อเรียกทางโครงสร้างเคมีว่า 1, 6-Heptadiene-3,5-dione,1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{21}H_{20}O_6$ มีน้ำหนักโมเลกุล 368.39 เป็นผลึกขนาดเล็กสีส้มปนน้ำตาล มีจุดหลอมเหลวประมาณ 183 องศาเซลเซียส

2. Demethoxycurcumin มีชื่อเรียกทางโครงสร้างเคมีว่า 1,6-Heptadiene-3,5-dione,1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-(4-hydroxyphenyl) มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{20}H_{18}O_5$ เป็นผลึกสีเหลือง มีจุดหลอมเหลวประมาณ 168 องศาเซลเซียส

3. Bisdemethoxycurcumin มีชื่อเรียกทางโครงสร้างเคมีว่า 1,6-Heptadiene-3,5-dione,1,7-bis(4-hydroxyphenyl) มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{19}H_{16}O_4$ เป็นผลึกสีเหลืองเข้ม มีจุดหลอมเหลวประมาณ 224 องศาเซลเซียส



Compound	R ₁	R ₂
Curcumin	OMe	OMe
Demethoxycurcumin	H	OMe
Bisdemethoxycurcumin	H	H

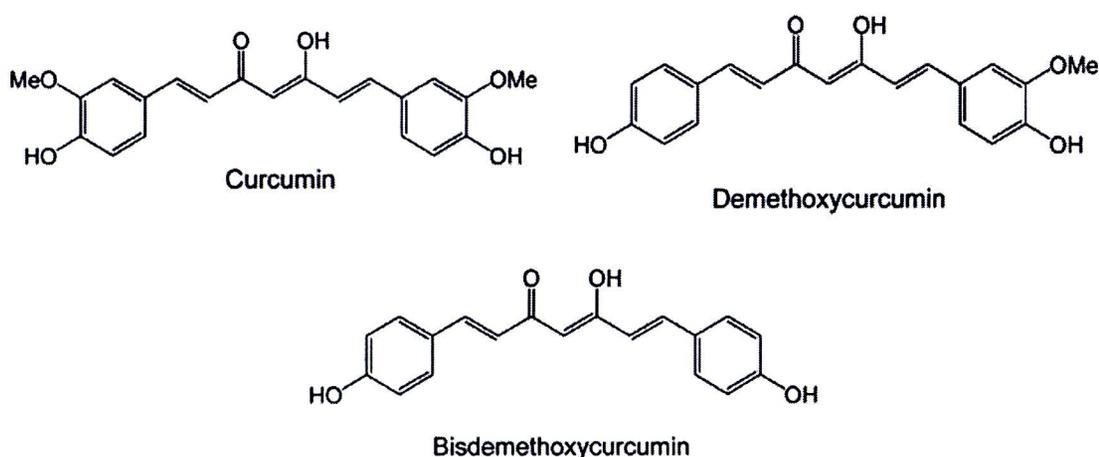
ภาพ 20 แสดงโครงสร้างทางเคมีของเคอร์คิวมินอยด์ (Curcuminoids)

ที่มา : Simay Cikrikci, 2008

curcumin เป็นสารประกอบหลักที่พบอยู่ในขมิ้นชันประมาณ 77% และอีก 18% เป็น Demethoxycurcumin และ 5% เป็น Bisdemethoxycurcumin (Chainani-Wu, 2003) มีรายงาน

การศึกษาทางเภสัชวิทยาทั้งในประเทศไทย และต่างประเทศ เช่นฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) (Simal and Dhawan, 1973; Ammon, et al., 1992) ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (anti-bacterial) (Mahady, et al., 2006) ฤทธิ์ต้านเชื้อรา (anti-fungi) (Srinivasan, et al., 2001; Roth, et al., 1998) ฤทธิ์ต้านการเกิดเนื้องอก และฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ (anti-tumor and antioxidant activity) (Soudamini, et al., 1989) ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง (anti-cancer) (Chen, et al., 2003)

สำหรับการทดสอบความเป็นพิษ (toxicity) ของ curcumin พบว่า ผงขมิ้นชันในขนาด 2.5 และ 5.0 กรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ทำให้การเจริญเติบโต และการกินอาหารของหนูเพศผู้ลดลงเล็กน้อย แต่ไม่มีผลต่อหนูเพศเมีย รวมทั้งไม่พบความผิดปกติของค่าทางโลหิตวิทยา หรือ ชีวเคมี และไม่ทำให้เกิดพยาธิสภาพต่ออวัยวะภายในของหนูทั้งเพศผู้ และเพศเมีย (Sittisomwong, et al., 1990) และในทางเภสัชวิทยามีการศึกษาถึงปริมาณของ curcumin 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ไม่มีผลแสดงความเป็นพิษต่อร่างกายมนุษย์ (Commandeur and Vermeulen, 1996)



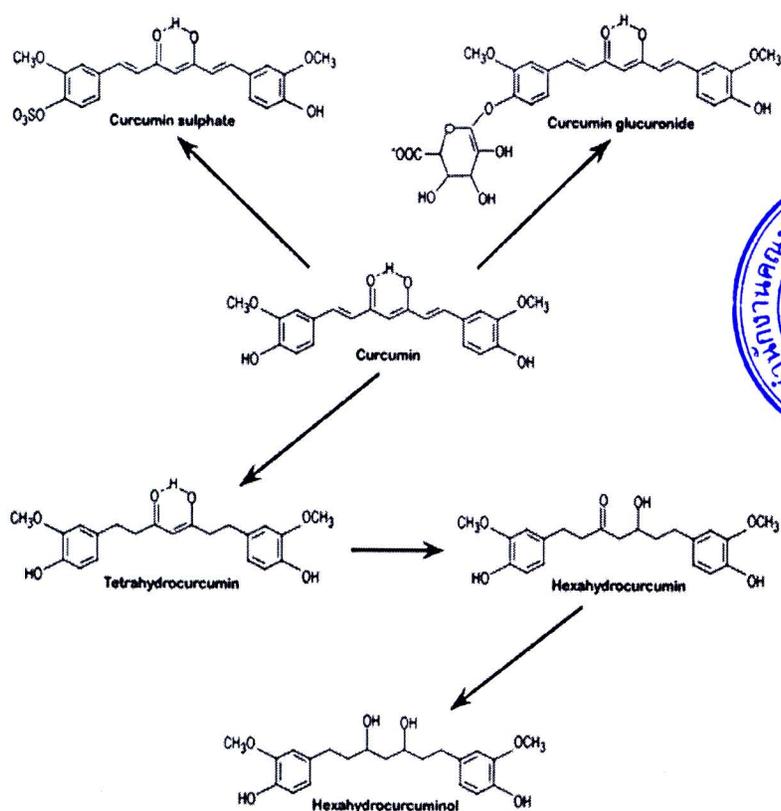
ภาพ 21 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของเคอร์คิวมินอยด์ (Curcuminoids)

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Cashman, et al., 2008

เมตาบอลิซึมของขมิ้นชัน

ในการทดสอบของหนูหลังจากให้กิน curcumin ที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน พบปริมาณ curcumin ถูกขับออกจากร่างกายทางอุจจาระปริมาณร้อยละ 75 (Wahlstrom and Blennow, 1978) สำหรับการทดสอบคุณสมบัติของ curcumin ทาง pharmacokinetics ของหนู

พบว่าหลังจากฉีด curcumin ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อกิโลกรัม เป็นเวลา 15 นาที พบปริมาณไขมันชั้น 2.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมในพลาสมา (plasma) และหลังจากฉีด curcumin เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบ curcumin ในลำไส้ ม้าม ตับ และไต ในปริมาณ 177.04, 26.06, 26.90 และ 7.51 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ และพบไขมันชั้นในสมอง ปริมาณ 0.41 ไมโครกรัมต่อกรัม (Pan, et al., 1999) จากการสำรวจประชากรในประเทศฝรั่งเศสพบว่า แต่ละวันประชากรมนุษย์สามารถรับปริมาณ curcumin ได้ประมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน และสามารถรับปริมาณ curcumin ได้มากที่สุดถึง 4.51 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ตาม body weight (Vanger, et al., 1998)



ภาพ 22 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ curcumin หลังถูก metabolited ภายในร่างกายมนุษย์

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Hossain, et al., 2012

ในการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ curcumin หลังถูก metabolited พบว่า หลังจากฉีด curcumin ให้หนู curcumin เกิดการเปลี่ยนแปลงโดยกระบวนการทางชีวภาพ (biotransformed)

ไปเป็นโครงสร้าง dihydrocurcumin และ tetrahydrocurcumin (THC) และหลังจากนั้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็น monoglucuronide conjugates โดยพบโครงสร้างทางเคมีของ tetrahydrocurcumin (THC) ที่ถูก metabolited เป็นหลัก ซึ่ง tetrahydrocurcumin (THC) มีความคงตัว (stability) ต่อค่า pH ที่ต่างกัน และ ยังพบว่าสามารถคงตัวในสารละลาย phosphate ที่ความเข้มข้น 0.1 M ใน pH ที่ต่างกันด้วย นอกจากนี้ยังพบว่า tetrahydrocurcumin (THC) มีความคงตัว (stability) ในสารละลาย phosphate ที่ความเข้มข้น 0.1 M ในค่า pH 7.2 และ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มากกว่า curcumin หลังจาก curcumin ถูก metabolited จะพบโครงสร้างทางเคมี curcumin-glucuronoside, dihydrocurcumin-glucuronoside, tetrahydrocurcumin-glucuronoside และ tetrahydrocurcumin ดังแสดงในภาพ 22 (Pan et al., 1999; Hossain, et al., 2012)

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของขมิ้นชัน

ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory)

Curcumin สามารถลดปริมาณของ histamine ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดอาการภูมิแพ้ และยังช่วยเพิ่มฮอร์โมน cortisone ในต่อมหมวกไต (adrenal glands) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องในการรักษาโรคข้ออักเสบ และ อาการภูมิแพ้ curcumin สามารถยับยั้งการทำงานของ TNF (tumor necrosis factor) ซึ่ง TNF กระตุ้นการแสดงออกของยีน NF-KB และยังพบว่า curcumin เองก็ยังสามารถยับยั้งการทำงานของ NF-KB (Aggarwal, et al., 2005) curcumin สามารถหยุดการสร้าง prostaglandins โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 (Ammon, et al., 1993) ซึ่ง COX-2 และ nitric oxide synthase (iNOS) เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการอักเสบ เมื่อเกิดการ up-regulation ของเอนไซม์ทั้ง 2 ตัวนี้ส่งผลให้เกิด pathophysiology ใน human cancer หรือ inflammatory disorder

Curcumin สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ HT-29 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ โดยพบว่า curcumin ยับยั้งการทำงานของ mRNA และการแสดงออกของโปรตีน COX-2 (Goel, et al., 2001) curcumin สามารถลดการสร้าง pro-inflammatory leukotriene โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ lipoyxygenase (LOX) (Wallace, 2002) และสามารถหยุดการทำงานของ cytokinemediated NF-KB และการแสดงออกของยีน pro-inflammatory โดยการยับยั้ง inhibitory factor I-KB kinase (Nanji, et al., 2003; Surh, et al., 2001) Kumar P และคณะ (2007) พบว่า curcumin สามารถป้องกันระบบประสาทจากการกระตุ้นของ 3-Nitropropionic (3-NP) และ การเกิดภาวะ oxidative stress ในหนู และ curcumin มีผลต่อการ

แสดงออกของ WT1 mRNA และ WT1 protein (Anuchapreedee, et al., 2008) ซึ่ง WT1 (Wilms, tumor1) เป็นยีนที่พบใน leukemic blast cells และยังพบว่า curcumin สามารถลดการเกิด lipid peroxides และการเกิด lipofuscin ในสมองส่วน medulla, cerebellum, cerebral cortex และ hippocampus (Bala et al., 2006)

ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Anti-cancer)

ในการศึกษาคุณสมบัติของ curcumin ต่อต้านการเกิดมะเร็ง โดยแสดงผลใน *in vitro* และ *in vivo* พบว่า curcumin สามารถกระตุ้นการเกิดอะพอพโทซิส ในเซลล์ HT-29 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งในลำไส้ใหญ่ โดยพบการ up-regulating ของ serine phosphorylation ใน p53 tumor suppressor และโปรตีน Bax ซึ่งเป็นโปรตีนกลุ่ม pro-apoptotic ในขณะที่พบการเกิด down-regulating ของโปรตีน Bcl-2 ซึ่งเป็นกลุ่ม anti-apoptotic โดยโปรตีนทั้ง 2 กลุ่มนี้เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเกิดอะพอพโทซิส (Chen, et al., 1999) จากงานวิจัยของ Goel และคณะ (2001) พบว่า curcumin ที่ความเข้มข้น 75 μM มีผลในการยับยั้งการแสดงออกของ COX-2 mRNA แต่ไม่มีผลต่อ COX-1 ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ นอกจากนี้ยังพบว่าที่ความเข้มข้น 10-20 μM ผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของ COX-2 ในเซลล์มะเร็งบริเวณกระเพาะอาหารและลำไส้ หลังจากได้รับการกระตุ้นจาก chenodeoxycholate และ phorbo ester (Zhang, et al., 1999)

Curcumin สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในลำไส้ใหญ่ (HT-29 cells) ในระยะ S, G2/M ซึ่งเป็นขั้นตอนการเริ่มต้นของขบวนการเกิดมะเร็ง (Hanif, et al., 1997) นอกจากนี้ยังพบว่า curcumin มีผลต่อการเพิ่มของสาร glutathione-S-transferase ซึ่งเป็นเอนไซม์ phase II ในการ detoxify ของการเกิดมะเร็งในเซลล์ตับ (hepatic) (Sharma, et al., 2001) และในเซลล์มะเร็งเต้านมอีกด้วย (human breast cancer) (Syng-ai, et al., 2004)

ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ (Anti-Oxidant)

Curcumin สามารถคงตัวอยู่ใน lysosomal membrane และจะถูกปล่อยออกมา เมื่อเกิดขบวนการ oxidative phosphorylation และยังพบว่า curcumin มีความสามารถในการเป็น oxygen radical scavenging activity ซึ่งในหมู่ hydroxyl ของโครงสร้าง curcumin มีการทำงานเป็น anti-oxidative และ anti-allergic ซึ่งปริมาณของ curcumin 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีผลลดการเกิดภาวะ oxidative และ allergic ได้ถึงร้อยละ 50 เทียบกับการให้ ibuprofen (ยาลดการอักเสบ) ปริมาณ 20 mg/kg ลดได้ร้อยละ 61 (Suzuki, et al., 2005) ในการศึกษาทาง *in vitro* พบว่า curcumin สามารถคงตัวอยู่ใน lysosomal membrane ได้ดีกว่า ibuprofen และพบว่า

curcumin มีหน้าที่เป็น superoxide scavenger ด้วยเหตุนี้จึงพบว่า curcumin มีความสัมพันธ์ต่อการทำงานเป็น anti-inflammatory (Kunchandy and Rao, 1990) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่า curcumin และ dimethoxycurcumin มีผลในการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ได้ถึงร้อยละ 82 และ 24 ตามลำดับในหนูที่ได้รับรังสี (Priyadarsini, et al., 2003) ซึ่งพบว่าในกลุ่มโครงสร้างของ curcumin และ dimethoxycurcumin ที่มี phenolic (OH) มีคุณสมบัติในการทำงานเป็น anti-oxidant และ free radical kinetics curcumin ยังสามารถช่วยป้องกันการเกิด vascular dementia ได้ด้วย โดยทำงานเป็น anti-oxidant (Thiyagarajan and Shamar, 2004; Vajragupta, et al., 2003) ซึ่งพบว่าที่ความเข้มข้น 2.4-9.6 $\mu\text{mol/L}$ สามารถยับยั้งการเกิด oxidation ของ Low-density lipoprotein (LDL) (Quiles, et al., 1998)

Chan และคณะ (2003) พบว่า curcumin สามารถช่วยลดการเกิดกลุ่มสาร reactive oxygen species (ROS) จากแสง ultraviolet ใน *in vitro* ซึ่งแสง ultraviolet นี้จะไปกระตุ้นการทำงานของโปรตีน c-Jun N-terminal kinase (JNK) และเกิดการเปลี่ยนแปลงของ mitochondrial membrane potential (MMP) ทำให้เกิดการหลั่ง cytochrome C ออกมา ซึ่งเป็น apoptogenic factor นำไปสู่การเกิดอะพอพโทซิสตามมา และยังพบว่า curcumin สามารถป้องกันการตายของ PC12 cells จากการกระตุ้นของ MPP^+ (1-methyl-4-phenylpyridinium) โดยพบว่า curcumin มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 เพิ่มมากขึ้น ซึ่งเป็นกลุ่ม anti-apoptotic ทำให้ลดการสูญเสีย mitochondrial membrane potential (MMP) จึงมีความเป็นไปได้ว่า กลไกการปกป้องเซลล์จาก ROS และ iNOS ของ curcumin นั้นดำเนินการผ่านการทำงานของโปรตีน Bcl-2 และ mitochondria เป็นสำคัญ (Chen, et al., 2006) นอกจากนี้ยังพบว่า curcumin มีผลกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ glutathione S-transferase P1 (GSTP1) ใน HepG2 cells ซึ่ง glutathione นี้เป็น detoxifying enzyme ที่สำคัญ (Nishinaka, et al., 2007) และยังมีการศึกษาพบว่า curcumin มีผลในการกระตุ้นการทำงาน Nrf2/antioxidant response element (ARE) signaling pathway โดย curcumin นั้นมี protein kinase C เป็นตัวควบคุมร่วมด้วย (Rushworth, et al., 2006)

Curcuminoid analogs

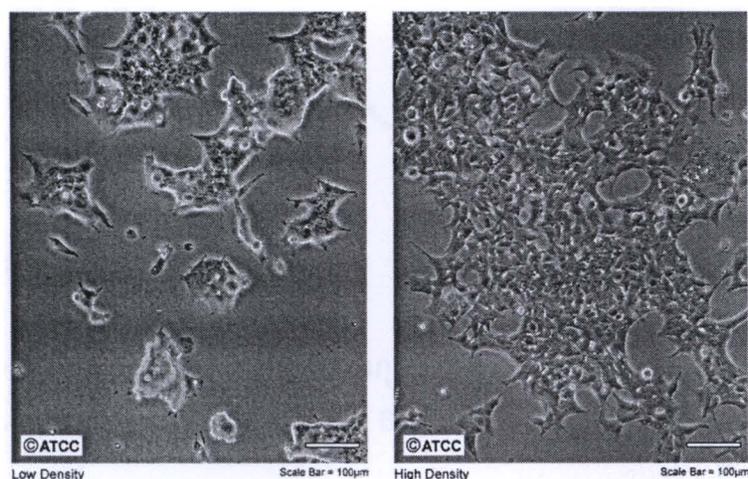
ในรายงานการศึกษาถึงคุณสมบัติของ curcuminoid analogs ได้รายงานพบว่า มีคุณสมบัติเหมือนสารต้นแบบ (curcuminoid compounds) ที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ต้านการเกิดมะเร็ง และต้านการเกิดสารอนุมูลอิสระ จากรายงานของ Anto และคณะ (1996) พบว่าโครงสร้างของ analog ที่มี ortho hydroxyl group มีประสิทธิภาพเป็น anti-oxidant ในการทดสอบ

ต่อเซลล์มะเร็งบนผิวหนัง เมื่อเทียบกับ curcuminoid กลุ่มอื่นๆ และในโครงสร้าง analogs ที่มี hydroxyl group ในตำแหน่ง 'O' และ 'P' พบว่ามีความสามารถช่วยเพิ่มการทำงานเป็น antioxidant ต่อกระบวนการเกิด lipid peroxidation และในตำแหน่ง 'O' ที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยว พบว่าสามารถเพิ่มความคงตัว (stability) ของ aryroxly radicals และมีผลทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานเป็น antioxidant (Rukkumani, et al., 2004; Sreeejayan and Rao, 1997)

Curcuminoid analog (bis-1,7-(2-hydroxyphenyl)-hepta-1,6-diene-3,5-dione) ที่ความเข้มข้น 6.91 μM พบว่า สามารถป้องกันการสูญเสียเอนไซม์ glutathinone จากการกระตุ้นด้วยรังสีแกมมา (γ -irradiation) ในเซลล์ตับ (Srinivasan, et al., 2008) ในรายงานของ Rukkamani และคณะ (2004) พบว่า curcuminoid analog สามารถลดการเกิดภาวะ oxidative stress ได้ ซึ่งมีประสิทธิภาพมากกว่า curcumin (Babu and Rajasekharan, 1994)

HEK-293 (Human embryonic kidney cells)

Human Embryonic Kidney หรือ HEK-293 เป็น cell line ที่ได้มาจากเซลล์ไตในตัวอ่อนของมนุษย์ เซลล์ HEK-293 เป็นเซลล์ที่เหมาะสมในการนำมาเพาะเลี้ยง เนื่องจากมีการเจริญเติบโตที่ดี และสามารถนำไป transfection ได้ง่าย โดยเป็นที่ยอมรับในงานวิจัยทางชีววิทยาของเซลล์ และได้ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ ในกระบวนการรักษาโรคต่างๆ



ภาพ 23 แสดงลักษณะทาง morphological ของ HEK-293 (Human embryonic kidney cells)

ที่มา : <http://www.atcc.org/Attachments/1820.jpg>