สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

บทที่ 5

บทสรุป

อภิปรายผลการวิจัย

เคอร์คิวมินอยด์ (Curcuminoids) เป็นสารสกัดที่ได้จากผงของเหง้าขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ซึ่งมีสารประกอบ curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin จากรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาพบว่า สารประกอบ curcumin มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) (Srimal, et al., 1973; Ammon, et al., 1992) ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง (anti-cancer) (Chen, et al., 1999) และฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) (Soudamini, et al., 1989) โดยในทางการแพทย์ได้มีการนำสารสกัด curcumin มาใช้ประโยชน์ในกระบวนการรักษาโรคต่างๆ มากมาย แต่อย่างไรก็ตาม curcumin ก็มีคุณสมบัติเฉพาะตัว ไม่ละลายน้ำ (insoluble water) แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายบางตัว มีข้อจำกัดในด้านการคงตัว (unstable) และไวต่อแสง ดังนั้นจึงได้มีการปรับโครงสร้างของสาร curcuminoids ขึ้นมาใช้เรียกว่า curcuminoid analogs โดยนักวิจัยกลุ่มของศาสตราจารย์ ดร. อภิชาต สุขสำราญ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ได้ปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสาร curcuminoid ไปเป็น สารสังเคราะห์ (analogs) ที่มีคุณสมบัติเป็น metabolite ของ curcuminoids ที่มีความคงตัวที่ดีกว่า ซึ่งในงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้มีการได้ทำการทดสอบคุณสมบัติของ curcuminoid analogs ต่อการต้านการเกิดมะเร็งต่อเซลล์มะเร็งในตับของหนู พบว่า curcuminoid analog สารโครงสร้างที่ 7 (tetrahydrocurcumin) สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งในตับของหนูได้ (Yoysungnoen, et al., 2008) ด้วยเหตุนี้จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งที่จะนำ analogs เหล่านี้มาทำการศึกษา ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาคุณสมบัติของสาร curcuminoids และ analogs ต่อการต้านการตายของเซลล์ไตเพาะเลี้ยงจากการเหนี่ยวนำการตายด้วยแคดเมียม โดยศึกษาผลของสาร curcuminoids ที่เป็น mixture (analogs 1+2+3) และสาร curcuminoids แต่ละสารเดี่ยวๆ ได้แก่ สารโครงสร้างที่ 1, 2 และ 3 ที่เป็นสารต้นแบบ รวมทั้งสารโครงสร้างที่ 4, 5 และ 6 ที่เป็น analogs

ผลของ curcuminoids และ analogs ต่อเซลล์ไตเพาะเลี้ยง

ในการศึกษาความเป็นพิษ (toxicity) ของ curcumin พบว่า การให้ผงขมิ้นชันในขนาด 2.5 และ 5.0 กรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน มีผลต่อการเจริญเติบโต และการกินอาหารของหนูเพศผู้เพียงเล็กน้อย แต่ไม่มีผลต่อหนูเพศเมีย รวมทั้งไม่พบความผิดปกติของค่าทางโลหิตวิทยา หรือ

ชีวเคมี และไม่ทำให้เกิดพยาธิสภาพภายในอวัยวะของหนูทั้งเพศผู้ และเพศเมีย (Sittisomwong, et al., 1990)

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษ (toxicity) ของสาร curcuminoids (สารโครงสร้างที่ 1, 2, 3) และ analogs (สารโครงสร้างที่ 4, 5, 6) ต่อการมีชีวิตของเซลล์ไตเพาะเลี้ยง พบว่า สารแต่ละสารของ curcuminoids และ analogs ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน มีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์แตกต่างกันออกไป จากผลการทดลองพบว่า กลุ่มเซลล์ไตเพาะเลี้ยงที่ได้รับในความเข้มข้น 5 μM ไม่มีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ แต่เมื่อเซลล์ในความเข้มข้นสูงขึ้น (30-40 μM) มีผลทำให้การมีชีวิตของเซลล์ลดลง ดังนั้นจากผลการทดลองทำให้เห็นช่วงความปลอดภัยของสาร curcuminoids และ analogs ต่อเซลล์ไตเพาะเลี้ยงในแต่ละสาร และแต่ละความเข้มข้น ซึ่งเกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกสารที่จะนำไปศึกษาจะต้องเลือก สาร และความเข้มข้นที่ไม่ทำให้การมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) ลดลงต่ำกว่า 95% (สารที่นำมาใช้ไม่ควรมีผลทำให้การมีชีวิตของเซลล์ลดลงเกิน 5 % เมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ควบคุม)

ผลของ curcuminoids และ analogs ต่อเซลล์ไตเพาะเลี้ยงที่ได้รับการเหนี่ยวนำการตายด้วยแคดเมียม ($CdCl_2$)

สำหรับการศึกษาผลของ curcuminoids และ analogs ต่อการต้านการตายของเซลล์ไตเพาะเลี้ยงจากการเหนี่ยวนำการตายด้วยแคดเมียม จากผลการทดลองพบว่าสาร curcuminoids ได้แก่ สารโครงสร้างที่ 1, 2 และ 3 ที่เป็นสารต้นแบบ และสารโครงสร้างที่ 4 ที่เป็น analog มีผลทำให้การมีชีวิตของเซลล์ไตเพาะเลี้ยงเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ไตเพาะเลี้ยงที่ได้รับแคดเมียม ซึ่งในกลุ่มเซลล์ไตเพาะเลี้ยงที่ได้รับสาร curcuminoid ที่เป็น mixture (analogs 1+2+3) พบว่ามีผลทำให้การมีชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้นแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) จากการวิเคราะห์โครงสร้างของสาร curcuminoids สารแต่ละสารมีคุณสมบัติแตกต่างกันไปตามโครงสร้าง ซึ่งโครงสร้างของสาร curcuminoids (สารที่ 1, 2, 3) และ analogs (สารที่ 4) เป็นโครงสร้างที่มี parahydroxyl group เป็นส่วนประกอบ ทำให้สารมีคุณสมบัติเป็น anti-oxidant โดยมีรายงานการศึกษาโครงสร้างของ curcumin และ demethoxycurcumin ที่มี phenolic (OH) มีคุณสมบัติในการทำงานเป็น anti-oxidant และ free radical kinetics (Thiyagarajan and Shamar, 2004; Vajragupta, et al., 2003) ผลจากการทดลองอาจเป็นไปได้ว่าคุณสมบัติของสาร curcuminoids (สารโครงสร้างที่ 1, 2, 3) และ analogs (สารโครงสร้างที่ 4) ที่เป็น anti-oxidant อาจมีผลต่อการลด หรือ ต้านการเกิดสารอนุมูลอิสระ (free radicals) (Chan, et al., 2003) ที่ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress จากการกระตุ้นด้วยแคดเมียม ซึ่งสารเหล่านี้อาจมีประสิทธิภาพดีกว่าสาร curcuminoid ที่เป็น mixture เนื่องจากอาจเป็นไปได้ว่าสาร

curcuminoid ที่เป็น mixture (analogs 1+2+3) เป็นสารที่มีโครงสร้างแต่ละสารต่างกันมารวมตัวกัน อาจจะทำให้เกิดความไม่สมดุล และไม่ส่งเสริมกัน ทำให้คุณสมบัติที่เป็น anti-oxidant เปลี่ยนแปลงไป

ผลของแคดเมียมต่อเซลล์ไตเพาะเลี้ยง

แคดเมียมจัดเป็นโลหะหนักที่มีความเป็นพิษรุนแรงต่อสิ่งแวดล้อม การได้รับแคดเมียมสะสมอยู่ในร่างกายเป็นเวลานาน ทำให้ส่งผลต่ออวัยวะภายในร่างกายโดยตรง โดยเฉพาะไต (Kidney) (Nordberg, 2004) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบความเป็นพิษของแคดเมียม ($CdCl_2$) ต่อเซลล์ไตเพาะเลี้ยง (HEK-293) จากผลการวิเคราะห์การมีชีวิตของเซลล์ (% Cell viability) ด้วยเทคนิค MTT พบว่า ในระดับความเข้มข้นของแคดเมียม 1-10 ppm ที่ต่างกัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีผลทำให้การมีชีวิตของเซลล์ไตเพาะเลี้ยงลดลง โดยที่ระดับความเข้มข้นของแคดเมียม 7 ppm ทำให้การมีชีวิตของเซลล์ลดลงถึง 50% (IC_{50} = inhibitory concentration of 50% growth) ซึ่งได้มีรายงานการศึกษาผลของแคดเมียม ($CdCl_2$) ที่ความเข้มข้น 10 และ 20 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง (PC12 และ SH-SY5Y cells) พบว่า แคดเมียมมีผลทำให้เซลล์สร้างสาร reactive oxygen species (ROS) ซึ่งส่งผลให้เซลล์เกิดภาวะ oxidative stress ตามมา (Chen, et al., 2008) ในรายงานการศึกษาของ Mao และคณะ 2006 พบว่าแคดเมียม ($CdCl_2$) ที่ความเข้มข้น 30 μM เป็นเวลา 8 ชั่วโมง มีผลทำให้เซลล์ไตเพาะเลี้ยง (HEK-293) เกิดลักษณะการตายแบบอะพอพโทซิส จากการศึกษาลักษณะการตายทางด้าน morphology ภายใต้กล้อง transmission electron microscopy โดยในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาลักษณะการตายของเซลล์ (morphology) จากการวิเคราะห์ด้วยการย้อม Propidium iodide และ Acridine orange ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ พบว่า แคดเมียม ($CdCl_2$) ที่ความเข้มข้น 1-3 ppm (10-30 μM) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีผลทำให้เซลล์ไตเพาะเลี้ยง (HEK-293) เกิดลักษณะ nuclear condensation ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของการตายแบบอะพอพโทซิส นอกจากนี้ในรายงานการศึกษาของ Seon-Hee และคณะ (2004) พบว่า แคดเมียมมีผลทำให้เซลล์สร้างสาร reactive oxygen species (ROS) ส่งผลทำให้เกิดการสูญเสียของระดับ mitochondria membrane potential (MMP) ใน mitochondria ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบในครั้งนี้จากการวิเคราะห์ด้วยการย้อมสี JC-1 assay Kit พบว่า แคดเมียมมีผลต่อการเปลี่ยนแปลง mitochondria membrane potential (MMP) ในเซลล์ไตเพาะเลี้ยงลดลง ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดการปล่อย apoptotic factors ออกมาสู่ cytosol ส่งผลให้เกิดการเหนี่ยวกระบวนการอะพอพโทซิสตามมา (Desagher and Martinou, 2000) ดังนั้นอาจสรุปได้ว่า แคดเมียม ($CdCl_2$) มีผลทำให้เซลล์ไตเพาะเลี้ยง (HEK-293) เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสโดยมีกลไกการทำงานผ่าน mitochondria เป็นสำคัญ

ผลของแคดเมียมต่อการทำงานของโปรตีน Bax และ Bcl-2

ในกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิสที่ดำเนินผ่านทาง mitochondria จะมีการทำงานของกลุ่มโปรตีน Bcl-2 family ที่คอยควบคุมในการปล่อยสาร apoptogenic factors ที่อยู่ภายในชั้น inner membranous space ซึ่งการทำงานของโปรตีนกลุ่ม pro-apoptotic เช่น Bax, Bak ในสภาวะเซลล์ปกติ โปรตีน Bax จะอยู่ในสภาพที่ยังไม่พร้อมทำงาน (inactive) และอยู่ภายใน cytosol (Hsu, et al., 1997) แต่หากเมื่อเซลล์ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิส โปรตีน Bax จะเปลี่ยนให้อยู่ในสภาพพร้อมที่จะทำงาน (active) และจะเคลื่อนไปจับที่เยื่อหุ้มชั้นนอกของ mitochondria จากการทำงานของโปรตีน Bax ที่อยู่บนเยื่อหุ้มชั้นนอกของ mitochondria (Gross, et al., 1999) ทำให้เกิดรอยรั่วบนเยื่อหุ้มของ mitochondria และในขณะเดียวกัน โปรตีนกลุ่ม anti-apoptotic เช่น Bcl-2 มีบทบาทในการควบคุมระดับ mitochondrial membrane potential (MMP) (Vander Heiden, 1999) โดยจะยับยั้งการทำงานของโปรตีนกลุ่ม pro-apoptotic ซึ่งเป็นการปกป้อง mitochondria และป้องกันการตายของเซลล์ แต่หากเมื่อโปรตีนกลุ่ม pro-apoptotic มีการทำงานที่มากกว่า ส่งผลให้เกิด permeability transition pore (PT pore) บนเยื่อหุ้มของ mitochondria เกิดการสูญเสียการควบคุมการผ่านเข้า-ออกของสารระหว่าง cytosol และ mitochondria ทำให้กลุ่มสาร apoptogenic factors เช่น cytochrome C ถูกปล่อยออกมาสู่ cytosol เกิดการรวมตัวกับ apoptosis-protease-activating factor-1 (Apaf-1) กลายเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า apoptosome โดยโครงสร้าง apoptosome จะไปกระตุ้น procaspase-9 (inactive) ให้เป็น caspase-9 (active) แล้วจึงไปกระตุ้น caspase-3 ซึ่งเป็น caspase ตัวสุดท้ายในการเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ (Sudhir , 2001)

ผลการทดลองการเหนี่ยวนำการตายด้วยแคดเมียม ($CdCl_2$) ต่อค่าเฉลี่ยการแสดงออกของโปรตีน Bax และ Bcl-2 พบว่า แคดเมียมมีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน Bax, Bcl-2 ทั้งใน cytosol และ mitochondria ให้เพิ่มมากขึ้น จากการวิเคราะห์ผลอาจกล่าวได้ว่า ความเป็นพิษของแคดเมียม ($CdCl_2$) มีผลต่อการทำงานของโปรตีน Bax ทั้งใน cytosol และ mitochondria เพื่อกระตุ้นให้เกิดการเหนี่ยวการตายของเซลล์ไตเพาะเลี้ยงให้เกิดกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิส เนื่องจากโปรตีน Bax เป็นโปรตีนกลุ่ม pro-apoptotic ที่มีบทบาทในการเหนี่ยวนำการตายในกระบวนการเกิดอะพอพโทซิส และในทางเดียวกันแคดเมียม ($CdCl_2$) มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ทั้งใน cytosol และ mitochondria เนื่องจากโปรตีน Bcl-2 เป็นโปรตีนกลุ่ม anti-apoptotic มีบทบาทในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน Bax เพื่อป้องกันการตายของเซลล์จากการเหนี่ยวนำการตายด้วยแคดเมียม โดยโปรตีนทั้ง 2 กลุ่มนี้จะมีการทำงานเป็น antagonist ซึ่งกันและกัน ซึ่งในรายงานการศึกษา Seon-Hee และคณะ (2004) จากการกระตุ้นของแคดเมียม 40 μM

ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง (WI 38 cells) เป็นเวลา 24 และ 36 ชั่วโมง พบว่า แคดเมียมมีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน Bax เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า แคดเมียมมีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 เพิ่มขึ้นหลังได้รับแคดเมียม 40 μM เป็นเวลา 36 ชั่วโมงด้วย

ผลของ curcuminoids และ analogs ต่อการทำงานของโปรตีน Bax และ Bcl-2

สำหรับการวิเคราะห์ผลของ curcuminoids และ analogs ต่อค่าเฉลี่ยการแสดงออกของโปรตีน Bax และ Bcl-2 ซึ่งในการทดสอบจะมีกลุ่มเซลล์ไตเพาะเลี้ยงที่ได้รับสารที่ 1 (curcumin) สารที่เป็น mixture (analogs 1+2+3) และสารที่ 4 mono-*O*-demethylcurcumin อภิปรายผลได้ดังนี้

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน Bax ใน cytosol และ mitochondria พบว่า

สารที่ 1 (curcumin) มีผลกระตุ้นให้เซลล์ไตเพาะเลี้ยงเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีน Bax ใน cytosol เพิ่มขึ้น เนื่องจากเซลล์ได้รับสารแปลกปลอมเข้าไปทำให้เซลล์ได้รับการเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีน Bax แต่การทำงานของโปรตีน Bax ในบทบาทการเหนี่ยวนำการตายไม่มีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ เมื่อพิจารณาจากการแสดงออกของโปรตีน Bax ใน mitochondria เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งพบว่าปริมาณการแสดงออกไม่แตกต่างกัน จากผลการวิเคราะห์สรุปได้ว่าโปรตีน Bax เพิ่มขึ้นจากผลการทดลองของสารที่ 1 (curcumin) ซึ่งไม่มีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ไตเพาะเลี้ยง

สารที่เป็น mixture (analogs 1+2+3) และ สารที่ 4 (mono-*O*-demethylcurcumin) มีผลกระตุ้นให้เซลล์ไตเพาะเลี้ยงเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีน Bax ใน cytosol และ mitochondria เพิ่มขึ้น เนื่องจากเซลล์อาจได้รับสารแปลกปลอม ทำให้เซลล์ได้รับการเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีน Bax โดยมีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ไตเพาะเลี้ยง เนื่องจากพิจารณาการแสดงออกของโปรตีน Bax ใน mitochondria เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งพบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน Bax เพิ่มขึ้น โดยบทบาทการทำงานของโปรตีน Bax ในการเหนี่ยวนำการตายจะเข้ามามีบทบาทการทำงานต่อ mitochondria เป็นสำคัญ (Gross, et al., 1999) จากผลการวิเคราะห์สรุปได้ว่า สารที่เป็น mixture (analogs 1+2+3) และสารที่ 4 (mono-*O*-demethylcurcumin) อาจมีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ไตเพาะเลี้ยง

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ใน cytosol และ mitochondria พบว่า

สารที่ 1 (curcumin) สารที่เป็น mixture (analogs 1+2+3) และสารที่ 4 (mono-*O*-demethylcurcumin) มีผลกระตุ้นให้เซลล์ไตเพาะเลี้ยงเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีน Bcl-2 เพิ่มขึ้นทั้งใน cytosol และ mitochondria โดยบทบาทการทำงานของโปรตีน Bcl-2 จะทำหน้าที่คอยควบคุมสมดุลของ mitochondria หรือ ทำหน้าที่คอยยับยั้งการทำงานของกลุ่มโปรตีน Bax เพื่อป้องกันการตายของเซลล์ (Vander Heiden, 1999) จากผลการวิเคราะห์อาจสมมติฐานได้ว่า สารที่ 1

(curcumin) สารที่เป็น mixture (analogs 1+2+3) และ สารที่ 4 (mono-*O*-demethylcurcumin) มีความสามารถในการเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีน Bcl-2 ให้เพิ่มขึ้น ซึ่งเหมือนเป็นการเพิ่มกลไกการป้องกันตัวเองของเซลล์จากการเหนี่ยวนำการตาย นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีน Bax ได้อีกด้วย

ผลของ curcuminoids และ curcuminoid analogs ต่อกลไกการทำงานของโปรตีน Bax และ Bcl-2 จากการกระตุ้นของแคดเมียม

สำหรับการวิเคราะห์ผลของ curcuminoids และ analogs ต่อค่าเฉลี่ยการแสดงออกของโปรตีน Bax และ Bcl-2 ซึ่งการทดสอบจะมีกลุ่มเซลล์ไตเพาะเลี้ยงที่ได้รับสารที่ 1 (curcumin) สารที่เป็น mixture (analogs 1+2+3) และสารที่ 4 (mono-*O*-demethylcurcumin) ร่วมกับแคดเมียม อภิปรายผลได้ดังนี้

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน Bax ใน cytosol และ mitochondria พบว่า

สารที่ 1 (curcumin) และสารที่เป็น mixture (analogs 1+2+3) มีผลให้เซลล์ไตเพาะเลี้ยงมีการแสดงออกของโปรตีน Bax ใน mitochondria ลดลงอย่างชัดเจน จะเห็นได้ว่าจากการวิเคราะห์สารที่ 1 (curcumin) มีผลทำให้การแสดงออกของโปรตีน Bax ใน mitochondria ลดลง และเมื่อได้รับการเหนี่ยวนำการตายด้วยแคดเมียม สารที่ 1 (curcumin) มีผลทำให้การแสดงออกของโปรตีน Bax ใน mitochondria ลดลงเช่นเดียวกัน และเมื่อเปรียบเทียบกับผลของสารที่เป็น mixture (analogs 1+2+3) ซึ่งในส่วนผสมพบว่ามีสารที่ 1 (curcumin) เป็นส่วนประกอบถึง 75% โดยมีผลทำให้การแสดงออกของโปรตีน Bax ใน mitochondria ลดลงเช่นเดียวกัน ซึ่งจากการวิเคราะห์อาจสรุปได้ว่า สารที่ 1 (curcumin) มีความสามารถช่วยต้านการตายของเซลล์ไตเพาะเลี้ยง โดยมีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน Bax จากการกระตุ้นของแคดเมียม

สารที่ 4 (mono-*O*-demethylcurcumin) มีผลกระตุ้นให้เซลล์ไตเพาะเลี้ยงเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีน Bcl-2 ใน mitochondria เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน จะเห็นได้ว่าจากการวิเคราะห์สารที่ 4 (mono-*O*-demethylcurcumin) มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 เพิ่มขึ้นใน cytosol และ mitochondria และเมื่อได้รับการเหนี่ยวนำการตายด้วยแคดเมียม สารที่ 4 (mono-*O*-demethylcurcumin) มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ใน mitochondria เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ซึ่งบทบาทการทำงานของโปรตีน Bcl-2 ในการป้องกันการตายของเซลล์จะมีบทบาทต่อ mitochondria เป็นสำคัญ โดยจะทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของโปรตีน Bax จากการวิเคราะห์อาจสรุปได้ว่า สารที่ 4 (mono-*O*-demethylcurcumin) มีคุณสมบัติช่วยต้านการตายจากการเหนี่ยวนำด้วยแคดเมียม โดยการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน Bcl-2 เพิ่มมากขึ้น ซึ่งในงานวิจัยของ Chen

และคณะ (2006) พบว่าสาร curcumin สามารถป้องกันการตายของเซลล์ได้ โดยทำให้เกิดการ overexpression ของโปรตีน Bcl-2 ซึ่งช่วยลดการสูญเสียของ mitochondrial membrane potential (MMP) จากภาวะ oxidative stress ซึ่งเป็นภาวะที่มีกลุ่มสาร ROS เพิ่มมากขึ้นหลังจากได้รับการเหนี่ยวนำจากสารพิษ โดยกลไกการป้องกันสาร ROS ของสาร curcumin พบว่าดำเนินการผ่านทางโปรตีน Bcl-2 และ mitochondria ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ที่พบการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ใน mitochondria เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน

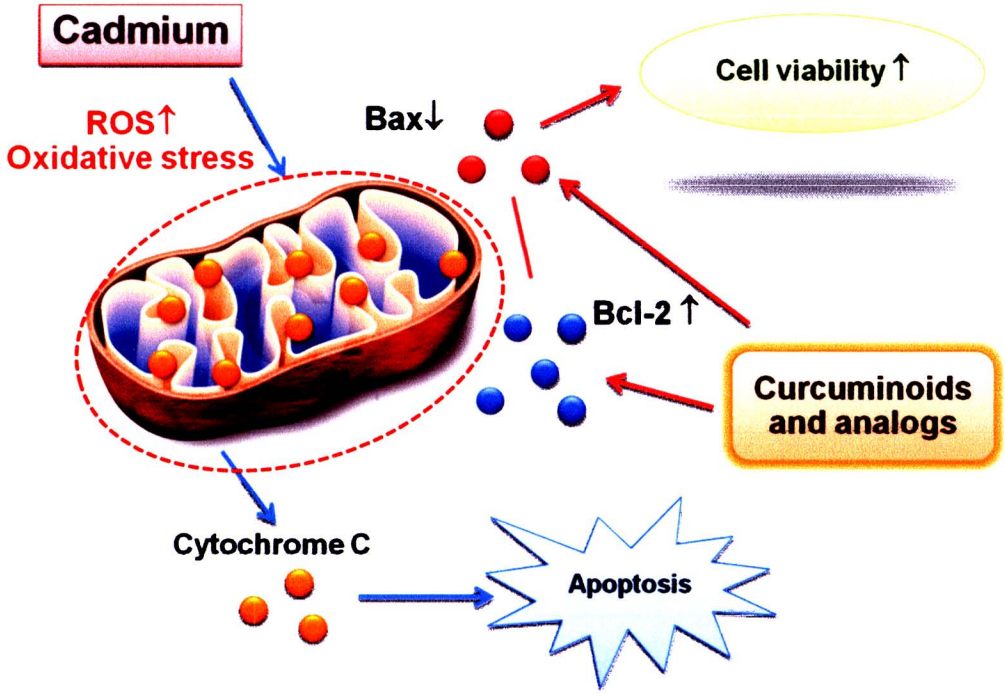
ดังนั้นจากการวิเคราะห์ผลการทดลองของสาร curcuminoids และ analogs ต่อการแสดงออกของโปรตีน Bax และ Bcl-2 จากการเหนี่ยวนำการตายด้วยแคดเมียม พบว่าสารที่ 1 (curcumin) และสารที่เป็น mixture (analogs 1+2+3) มีความสามารถช่วยต้านการตายของเซลล์ไตเพาะเลี้ยง โดยมีผลต่อการยับยั้งการทำงานของโปรตีน Bax ซึ่งเป็นโปรตีนกลุ่ม pro-apoptotic และสารที่ 4 (mono-*O*-demethylcurcumin) มีความสามารถช่วยต้านการตายของเซลล์ไตเพาะเลี้ยง โดยมีผลในการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน Bcl-2 เพิ่มมากขึ้น เพื่อทำหน้าที่ในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน Bax ซึ่งจากการวิเคราะห์อาจบอกได้ว่าผลของสาร curcuminoids และ analogs มีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ไตเพาะเลี้ยงจากการกระตุ้นของแคดเมียม โดยทำงานผ่านโปรตีน Bax และ Bcl-2 ซึ่งมี mitochondria เป็นศูนย์กลาง ดังนั้นจึงสมมติฐานได้ว่า ถ้าหากนำสารบริสุทธิ์แต่ละสารที่มีโครงสร้างที่มีคุณสมบัติช่วยต้านการตายที่โดดเด่น และมีลักษณะการทำงานที่ส่งเสริมกันมารวมกัน ก็อาจทำให้ได้สารที่ช่วยยับยั้งการตายของแคดเมียมที่มีประสิทธิภาพที่ดีมากยิ่งขึ้นได้หรือไม่ จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการศึกษาครั้งต่อไป ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้จึงสรุปได้ว่าสาร curcuminoids และ analogs สามารถช่วยลด หรือ ป้องกันการตายของเซลล์ไตเพาะเลี้ยงจากการเหนี่ยวนำด้วยแคดเมียม โดยมีการทำงานผ่านบทบาทของโปรตีน Bax และ Bcl-2 ซึ่งมี mitochondria เป็นศูนย์กลาง ดังแสดงในภาพ 49

สรุปผลการวิจัย

แคดเมียมจัดเป็นมลพิษที่มีความเป็นพิษรุนแรงโดยพิษสะสมจะส่งผลกระทบต่อการสูญเสียหน้าที่ของไตทำให้เกิดภาวะไตวาย จากการประเมินความเป็นพิษของแคดเมียมด้วยวิธี MTT assay และการศึกษา morphological change ในเซลล์ไตเพาะเลี้ยง (human embryonic kidney cells: HEK-293) พบว่า เซลล์ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสได้ด้วย แคดเมียม ($CdCl_2$) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยพบว่าค่า IC_{50} อยู่ที่ 7 ppm นอกจากนี้พิษของแคดเมียมยังมีผลต่อเซลล์ไตเพาะเลี้ยงทั้งในรูปแบบ dose และ time dependent จากการศึกษาผลของสาร curcuminoids (สารโครงสร้างที่ 1, 2 และ 3) สาร curcuminoid analogs (สาร

โครงสร้างที่ 4) และสาร curcuminoids ที่เป็น mixture (analogs 1+2+3) พบว่า ช่วยยับยั้งการตายของเซลล์ได้ดี โดยเฉพาะในลักษณะการเหนี่ยวนำการตายแบบ time dependent โดยให้แคดเมียมในปริมาณที่ต่ำกว่าค่า IC_{50} เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะของฤทธิ์สะสมของแคดเมียมในการทำให้เกิดพยาธิสภาพไตวายในคน โดยสาร curcuminoids ที่แยกแต่ละโครงสร้าง รวมทั้งสาร curcuminoid analog (สารโครงสร้างที่ 4) ที่ความเข้มข้น 2.5-5 μM ช่วยยับยั้งการตายของเซลล์ได้ถึง 20-35% โดยถึงแม้ว่าการตายแบบอะพอพโทซิส จะมีได้หลายวิถีและหลายปัจจัย แต่จากการศึกษาลักษณะคุณสมบัติของโครงสร้างของสาร curcuminoids และ analogs ที่มี parahydroxy group เป็นส่วนประกอบอยู่นั้นทำให้อาจสมมติฐานได้ว่าสาร curcuminoids และ analogs จะช่วยลดภาวะการเกิด oxidative stress และมีกลไกที่ผ่านทาง mitochondria หรือ intrinsic pathway นั่นเอง

นอกจากนี้การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีการเกิดอะพอพโทซิสทั้งใน cytosol และ mitochondria ได้แก่ Bax และ Bcl-2 ก็มีการเปลี่ยนแปลงที่สอดคล้องกับการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ และสมมติฐานการตายของเซลล์ที่มี mitochondria เป็นศูนย์กลางสำคัญ ดังนั้นจึงสามารถช่วยอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ของสาร curcuminoids และ analogs ได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น ซึ่งสารเหล่านี้มีคุณสมบัติที่ดี และอาจมีผลในการป้องกัน บรรเทาชะลอการตายของเซลล์ อันมีสาเหตุมาจากการสะสมสารพิษจากธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม และอาจเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะนำไปช่วยเหลือ ฟื้นฟู ป้องกันบรรเทาการตายของเซลล์ในผู้ที่มีความเสี่ยงในการได้รับสารปนเปื้อนแคดเมียมต่อไปได้



ภาพ 49 แสดงกลไกการต้านการตายของ curcuminoids และ analogs ต่อเซลล์ไตเพาะเลี้ยงจากการเหนี่ยวนำด้วยแคดเมียม โดยมีการทำงานผ่านบทบาทของโปรตีน Bax และ Bcl-2 ซึ่งมี mitochondria เป็นศูนย์กลาง