บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาที่ดำเนินการวิจัย

จากการศึกษาผลของ glutamic acid (GLU) ที่มีต่อระบบประสาท ในปี ค.ศ. 1957 Lucus และ Newhouse (Lucus and Newhouse, 1957) ได้รายงานว่า GLU สามารถทำลายเซลล์ประสาทได้ ทั้งในส่วนของสมองและจอประสาทตา (retina) ทำให้ GLU ถูกจัดเป็นสารพิษต่อระบบประสาท (neurotoxin) นอกจากนี้จากการศึกษาต่อมาพบว่า GLU และ aspartic acid (ASP) สามารถกระตุ้นเซลล์ประสาทได้ (Curtis and Watkin, 1960, 1965; Coyle *et al.*, 1981) ทำให้มีการจัดกรดอะมิโนเหล่านี้เป็นกรดอะมิโนชนิดกระตุ้น (excitatory amino acids, EAAs)

ในปี ค.ศ. 1982 Olney (Olney, 1982) เสนอแนะสมมุติฐานเกี่ยวกับการที่ EAAs สามารถทำลายเซลล์ประสาทได้ โดยเรียกว่า "Excitotoxic Hypothesis" สมมุติฐานนี้กล่าวว่า EAAs อาจจะทำให้เซลล์ประสาทเกิดการตาย เนื่องจากมีการกระตุ้นที่มากกว่าปกติและมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ประสาท จากการศึกษาโดยใช้จอประสาทตา พบว่า GLU สามารถชักนำให้มีการทำลายจอประสาทตา ทั้งในหนู (Lucus and Newhouse, 1957; Cohen, 1967; Olney, 1969; Hansson, 1970; Karlsen and Fonnum, 1976) และในไก่ (Reif-Lehrer *et al.*, 1975; Blank *et al.*, 1981; Casper *et al.*, 1982) โดยทำให้มีการเสื่อมสภาพของจอประสาทตาชั้นในอย่างมาก

การที่ EAAs เป็น neurotoxin และพบได้ทั้งจากสิ่งแวดล้อมและภายในร่างกาย ทำให้เป็นที่เชื่อกันว่า EAAs อาจเป็นสาเหตุสำคัญอย่างหนึ่งของการเสื่อมสภาพและการตายของเซลล์ประสาทที่พบได้จากกระบวนการเปลี่ยนแปลงที่เกิดตามวัย (aging), ภาวะขาดเลือด (ischemic insults), ภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ (hypoglycemic condition) รวมทั้งการตายของเซลล์ประสาทที่พบใน neurodegenerative disorders

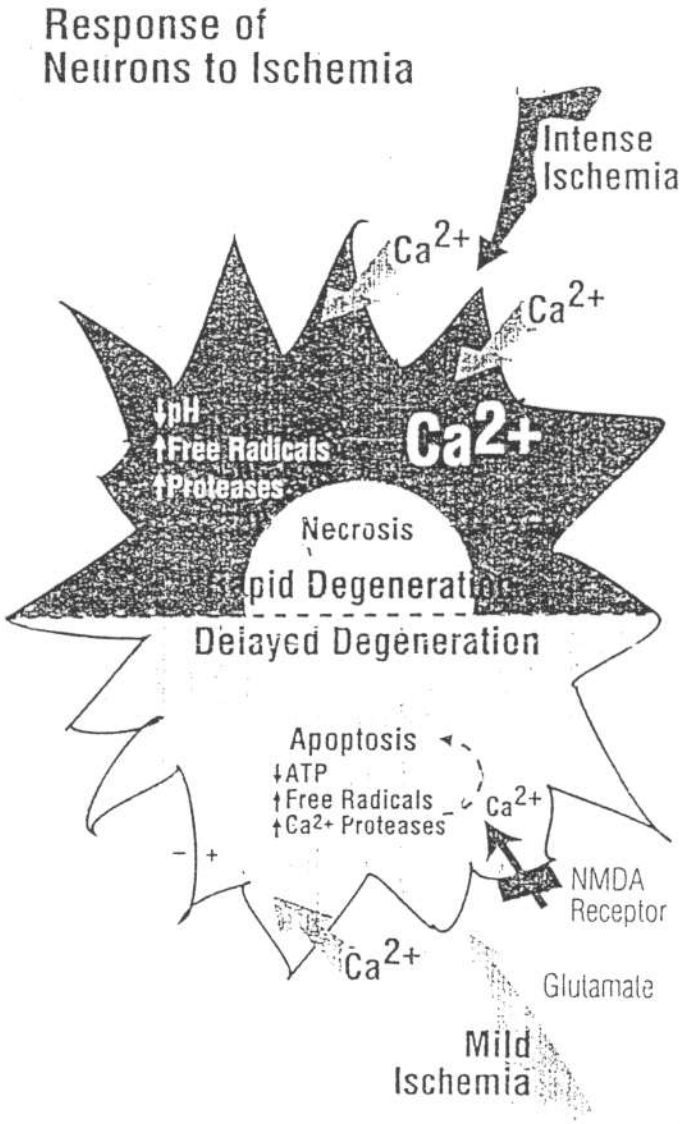
หลายชนิดเช่น Alzheimer's disease, Huntington's disease, Parkinson's disease, epilepsy และ amyotrophic lateral sclerosis เป็นต้น

จากการศึกษารูปแบบของการตายของเซลล์ประสาท ในการทดลองต่างๆ พบว่า อาจแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด ที่สำคัญได้แก่ apoptosis และ necrosis ทั้งนี้การตายแบบ apoptosis หรือ programmed cell death นับว่าเป็นการตายของเซลล์ประสาทที่อาจเป็นสาเหตุสำคัญของภาวะ aging และ chronic neurodegenerative disorders ต่าง ๆ ในขณะของเซลล์ประสาทในรูปแบบ necrosis น่าจะมีความสำคัญในกรณีของการตอบสนองแบบเฉียบพลันต่อภาวะอันตรายต่างๆ (Wyllie, Kerr, and Currie, 1980; Ellis, Yuan, and Horvitz, 1991; Arend and Wyllie, 1991)

ในปี ค.ศ. 1995 Lipton และ Kalil (Lipton and Kalil, 1995) ได้เสนอแนะว่าการเกิด apoptosis หรือ necrosis อาจขึ้นกับความรุนแรงของตัวกระทำที่ก่อให้เกิดการตอบสนองแตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 1.1 อย่างไรก็ตามได้มีผู้รายงานถึงการทดลองในเซลล์ประสาทโดยระบุว่า มีสารหลายชนิดที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ในลักษณะ apoptosis ได้ เช่น dimethylsulfate (DMS) ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง Hela cells (Bertazzoni and Scovassi, 1992) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงของสมองหนูส่วนคอร์ติคัล (cortical neurons cell culture) (Whitlemore, Loo, and Cotman, 1994) ทั้งนี้โดยอาศัยลักษณะ DNA ladder บน agarose gel ซึ่งบ่งบอกถึงการสลายของ DNA อย่างจำเพาะเจาะจง ซึ่งเป็นตัวชี้วัดแบบหนึ่งในการเกิด apoptosis

การศึกษาเกี่ยวกับ EAAs จำนวนมากพบว่าการที่ EAAs กระตุ้นที่ EAAs receptor น่าจะมีส่วนสำคัญในการทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาท ทั้งนี้ชนิดของ receptor ที่เกี่ยวข้องอาจเป็นได้ทั้ง N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) type และ non-NMDA type อย่างไรก็ตามนักวิทยาศาสตร์ส่วนมากได้ให้ความสนใจเกี่ยวกับกลไกที่ผ่านทาง NMDA receptor ที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ประสาท รวมทั้งการพยายามหา NMDA antagonist เพื่อนำมาใช้ในการป้องกันการทำลายของเซลล์ที่เกิดขึ้นในกรณีต่างๆ ส่วนการกระตุ้นผ่านทาง non-NMDA receptor นั้นเพิ่งเริ่มมีผู้สนใจถึงบทบาทเกี่ยวกับการตายของเซลล์ประสาทมาเมื่อไม่นานนี้

รูปที่ 1.1 แสดงการตอบสนองของเซลล์ประสาทต่อภาวะขาดเลือด (ischemia) ที่อาจเป็นสาเหตุการตายของเซลล์ประสาทในรูปแบบ apotosis หรือ necrosis ซึ่งขึ้นอยู่กับระดับความรุนแรงของอันตรายที่ได้รับ โดยที่ภาวะขาดเลือดที่ไม่รุนแรง (mild ischemia) มีผลให้เกิด apoptosis ในขณะที่ภาวะขาดเลือดที่รุนแรง (intense ischemia) มีผลให้เกิด necrosis (Liton and Kalil, 1995)


Response of
Neurons to Ischemia
Intense
Ischemia
Ca2+
Ca2+
↓pH
↑Free Radicals
↑Proteases
Ca2+
Necrosis
Rapid Degeneration
Delayed Degeneration
Apoptosis
↓ATP
↑Free Radicals
↑Ca2+ Proteases
Ca2+
NMDA
Receptor
Ca2+
Glutamate
Mild
Ischemia

ในปี ค.ศ. 1996 Simonion และคณะ (Simonion *et al.*, 1996) ได้ศึกษาถึงผลของการกระตุ้นผ่าน non-NMDA receptor ในเซลล์เพาะเลี้ยงของสมองหนูส่วนซีรีบัลลัม (cerebellar granule cell culture) โดยใช้ kainic acid (KA) ความเข้มข้น 100 μM สัมผัสกับเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นตรวจสอบลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ประสาทดังกล่าว พบว่า การสัมผัสต่อ KA ทำให้จำนวนเซลล์ที่ตายเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่าเกิด DNA ladder ซึ่งเป็นการเสนอแนะว่า เกิดการตายของเซลล์ประสาทในรูปแบบ apoptosis

จากการที่มีผู้ศึกษาค้นคว้ากันอย่างกว้างขวางเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง EAAs และการตายของเซลล์ประสาทนั้น กระบวนการสำคัญหรือกลไกที่แท้จริงในการตายของเซลล์ประสาทยังไม่ทราบแน่ชัด งานวิจัยครั้งนี้จึงสนใจศึกษาผลของ EAAs ได้แก่ GLU ซึ่งเป็น excitatory neurotransmitter ที่สำคัญในระบบประสาท ตลอดจน KA และ NMDA ซึ่งเป็น agonists ที่ออกฤทธิ์ผ่านทาง non-NMDA receptor และ NMDA receptor โดยนำจอประสาทตาของไก่มาใช้เป็นแบบจำลอง (model) ในการศึกษาและตรวจสอบผลที่มีต่อ DNA pattern โดยอาศัย agarose gel electrophoresis และศึกษาเปรียบเทียบกับผลของ H_2O_2 การทดลองกระทำทั้ง *in vitro* และ *in vivo* นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาผลของโซเดียมอิออน (Na^+), folic acid และ zinc sulfate ($ZnSO_4$) ที่อาจมีผลต่อฤทธิ์ของ EAAs และ H_2O_2 ในการก่อให้เกิดการสลายของ DNA ทั้งนี้เนื่องจาก Na^+ เป็นอิออนที่น่าจะมีความสำคัญในการก่อให้เกิดการบวมของเซลล์และการตายแบบ necrosis ส่วน folic acid นั้นมีผู้รายงานว่า สามารถต้านฤทธิ์การทำลายจอประสาทตาไก่จาก KA และ NMDA ได้ (Sattayasai *et al.*, 1986) ในขณะที่ $ZnSO_4$ สามารถป้องกันการเกิด DNA ladder จาก DMS ได้ (Bertazzoni and Scovassi, 1992)

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาผลของ EAAs ได้แก่ GLU, KA และ NMDA ที่มีต่อ DNA ของจอประสาทตาไก่ ทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* เปรียบเทียบกับผลที่เกิดจาก H_2O_2

1.2.2 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของ Na^+ กับ EAAs ในการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ DNA ของจอประสาทตาไก่ใน *in vitro*

1.2.3 เพื่อศึกษาผลของ folic acid และ $ZnSO_4$ ในการต้านฤทธิ์ของ EAAs และ H_2O_2 ที่มีต่อ DNA ของจอประสาทตาไก่

1.2.4 เพื่อปรับปรุงและหาวิธีการที่เหมาะสมในการแยกสกัด DNA และศึกษาการเปลี่ยนแปลง DNA ของจอประสาทตาไก่ และความเป็นไปได้ในการนำจอประสาทตาไก่มาใช้เป็น model ในการศึกษากระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ประสาท

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ทำให้ทราบผลของ EAAs และ H_2O_2 ที่มีต่อ DNA ของจอประสาทตาไก่ทั้ง ใน *in vitro* และ *in vivo*

1.3.2 การศึกษาครั้งนี้อาจนำไปสู่การค้นคว้าวิจัยที่เกี่ยวข้องกับกลไกการตายของเซลล์ประสาทอย่างแท้จริงต่อไปในอนาคต

1.3.3 ผลที่ได้จะเป็นแนวทางนำไปสู่การป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทที่พบในกรณีต่างๆ

1.3.4 พัฒนางานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษากลไกการตายของเซลล์ประสาทโดยใช้เทคนิคทางชีวเคมี เช่น การสกัด DNA การศึกษา DNA pattern โดยวิธี gel electrophoresis

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการทดลองในห้องปฏิบัติการโดยใช้จอประสาทตาของไก่เป็น model โดยทำทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* ทั้งนี้เพราะ *in vitro* มีข้อจำกัดเกี่ยวกับระยะเวลาที่ทำการทดลอง ส่วนการศึกษาใน *in vivo* มีข้อจำกัดเกี่ยวกับการศึกษาถึงผลของ Na^+ รวมทั้งอาจเกิดปัญหาเกี่ยวกับการกระจายของสารภายในลูกตาไก่