

บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 จอประสาทตา (retina)

จอประสาทตานับว่าเป็นส่วนที่มีความสำคัญต่อการมองเห็น กล่าวคือ ทำหน้าที่ในการรับภาพและแสง ทั้งนี้กระบวนการรับรู้ภาพจะเกิดขึ้นเมื่อแสงจากภาพผ่านกระจกตา (cornea) เข้าสู่รูม่านตา (pupil) โดยเลนส์ (lens) ทำหน้าที่รวมแสง ให้ไปตกที่บริเวณจอประสาทตา (retina) จากนั้นจึงเกิดกระบวนการถ่ายทอดกระแสประสาทไปสู่สมองทางประสาทตา (optic nerve) โดยสมองจะทำหน้าที่แปลความหมายให้เกิดกระบวนการรับรู้ของภาพขึ้น

จอประสาทตา (รูปที่ 2.1) ประกอบด้วยเซลล์ประสาทจำนวนมากมาย และมี การจัดเรียงกันเป็นชั้นๆ ซึ่งแบ่งออกเป็น 10 ชั้น (Borwein, 1981) ได้แก่

1. Pigment epithelium (PE) ประกอบด้วยเซลล์ pigment epithelium ซึ่งอยู่ด้านนอกสุด
2. Bacillary layer (BL) ประกอบด้วยส่วน outer และ inner segments ของเซลล์ photoreceptor
3. Outer limiting membrane (OLM) เป็นรอยต่อระหว่างเซลล์ glia และเซลล์ photoreceptor
4. Outer nuclear layer (ONL) เป็นบริเวณที่มีนิวเคลียสของเซลล์ photoreceptor ปรากฏอยู่
5. Outer plexiform layer (OPL) เป็นบริเวณที่อยู่ของ photoreceptor terminal ซึ่งเชื่อมโยง หรือติดต่อสื่อสารกับเซลล์ bipolar และ เซลล์ horizontal
6. Inner nuclear layer (INL) เป็นบริเวณที่ประกอบด้วย cell bodies ของเซลล์ horizontal, bipolar, amacrine และ interplexiform

7. Inner plexiform layer (IPL) เป็นบริเวณที่เซลล์ bipolar และ amacrine ทำการเชื่อมโยง หรือติดต่อสื่อสารกับเซลล์ ganglion

8. Ganglion cell layer (GCL) ประกอบด้วยเซลล์ ganglion เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังอาจพบเซลล์บางชนิด ซึ่งเรียกว่าเซลล์ displaced amacrine

9. Optic fibre layer (OFL) ประกอบด้วย axon ของเซลล์ ganglion ซึ่งจะรวมกันเป็นประสาทตา (optic nerve)

10. Inner limiting membrane เป็นบริเวณที่แบ่งเขตระหว่าง vitreous surface และจอประสาทตา

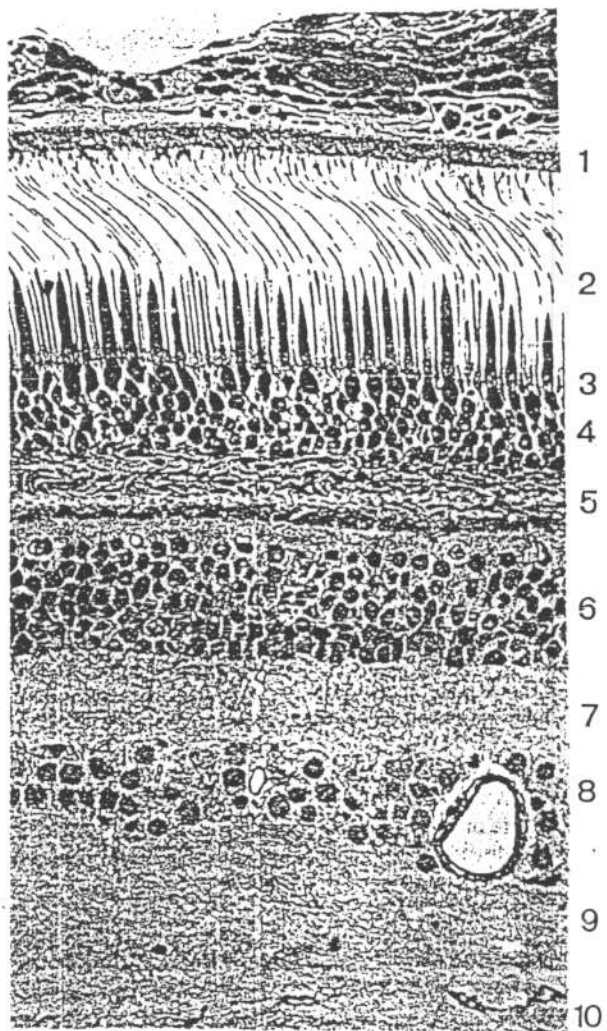
จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นว่าจอประสาทตาประกอบด้วยเซลล์ประสาทที่สำคัญ 6 ชนิดคือ photoreceptor, horizontal, bipolar, amacrine, interplexiform และ ganglion cell โดยมีเซลล์ photoreceptor หน้าที่รับพลังงานแสงเปลี่ยนให้เป็นตัวกระตุ้นทางไฟฟ้า และอาศัยสารสื่อประสาทช่วยในการติดต่อเซลล์ประสาทชนิดอื่นต่อไป สำหรับในสัตว์มีกระดูกสันหลังพบว่า GLU เป็นสารสื่อประสาทที่สำคัญชนิดหนึ่งในจอประสาทตา โดยเชื่อว่า เซลล์ประสาทที่ใช้ GLU เป็นสารสื่อประสาทมีหลายชนิด เช่น photoreceptor, bipolar cell เป็นต้น

2.2 กรดอะมิโนที่มีฤทธิ์กระตุ้น (excitatory amino acids, EAAs)

กรดอะมิโนหลายชนิดเป็นสารสื่อประสาทที่สำคัญ โดยที่บางชนิดอาจมีฤทธิ์กระตุ้น ในขณะที่บางชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเซลล์ประสาท GLU เป็นสารสื่อประสาทกรดอะมิโนชนิดกระตุ้นที่มีความสำคัญมาก เนื่องจากสามารถกระตุ้นเซลล์ประสาทได้ทั่วไป นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า GLU เป็นสารพิษต่อเซลล์ประสาท ทั้งต่อจอประสาทตา (Lucas and Newhouse, 1957) และ hypothalamus (Lowe, 1970; Olney, 1971)

ในปี ค.ศ. 1982 Olney (Olney, 1982) เสนอแนะสมมุติฐานเกี่ยวกับการที่ EAAs สามารถทำลายเซลล์ประสาทได้ โดยเรียกว่า “Excitotoxic Hypothesis” สมมุติฐานนี้กล่าวว่า EAAs อาจจะทำให้เซลล์ประสาทเกิดการตายเนื่องจาก มีการ

รูปที่ 2.1 แสดงจอประสาทตา ซึ่งแบ่งออกเป็น 10 ชั้น ได้แก่ 1) Pigment epithelium (PE), 2) Bacillary layer (BL), 3) Outer limiting membrane (OLM), 4) Outer nuclear layer (ONL), 5) Outer plexiform layer (OPL), 6) Inner nuclear layer (INL), 7) Inner plexiform layer (IPL), 8) Ganglion cell layer (GCL), 9) Optic fiber layer (OFL), 10) Inner limiting membrane (ILM) (Borwein, 1981)



กระตุ้นที่มากกว่าปกติ และมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ประสาท จากการ ศึกษาโดยใช้จอประสาทตาพบว่า GLU สามารถชักนำให้มีการทำลายจอประสาทตา ทั้ง ในหนู (Lucus and Newhouse, 1957; Cohen, 1967; Hansson, 1970; Karlsen and Fonnum, 1976) และในไก่ (Reif-Lehrer *et al.*, 1975; Blank *et al.*, 1981; Casper *et al.*, 1982)

ในปี ค.ศ. 1989 สัตยาชัย และคณะ (Satayasai *et al.*, 1989) ได้ทำการศึกษา ผลของอนุพันธ์ของ GLU ได้แก่ KA, quisqualic acid (QUIS) และ NMDA พบว่า มีผล ต่อการเจริญเติบโตของลูกตา และมีผลทำลายเซลล์ประสาทในจอประสาทตาอย่างมาก โดยที่ KA มีผลทำลายเซลล์ bipolar, amacrine, horizontal, displaced amacrine และ บางส่วนของเซลล์ ganglion จากการตรวจดู photoreceptor terminal พบว่า ถูกทำลาย อย่างรุนแรงเช่นเดียวกับ photoreceptor outer segment ส่วนผลของ QUIS พบว่า มีการ ทำลายเซลล์ amacrine, bipolar, horizontal และยังพบการเปลี่ยนแปลงของ photoreceptor synaptic ribbons เช่นกัน ส่วน NMDA จะทำลายเซลล์ amacrine และบางส่วนของเซลล์ ganglion โดยไม่มีผลต่อ photoreceptor terminal และ outer segment

นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่า การกระตุ้นโดย GLU และ/หรืออนุพันธ์ของ GLU อาจเกี่ยวข้องกับการทำลายของเซลล์ประสาท ภายหลังจากเกิดภาวะ ischemia, hypoglycemia, hypoxia หรือ anoxia (Weiss *et al.*, 1987; Goldberg *et al.*, 1987, 1988; Gail *et al.*, 1988; Park *et al.*, 1988, Yoon and Marmor, 1989; Mosinger *et al.*, 1991)

ในปัจจุบันเชื่อว่า GLU เป็นสารสื่อประสาทที่มีความสำคัญในสมองของสัตว์ เลี้ยงลูกด้วยนม จากการศึกษาที่ผ่านมา (Nakanishi, 1992; Pin and Duvoisin, 1995) ได้ แบ่ง receptor ของ GLU ออกเป็น 2 ชนิด โดยอาศัยคุณสมบัติเกี่ยวกับ signal transduction ดังนี้คือ

- 1) Ionotropic glutamate receptor (iGLU) เป็น receptor ชนิด ion-gated receptor

2) Metabotropic glutamate receptor (mGLU) เป็น receptor ที่เกี่ยวข้องกับ metabolism โดยผ่านทาง secondary messenger หลายชนิด เช่น DAG, PKC, IP₃ เป็นต้น

นอกจากนี้ ionotropic glutamate receptor ยังแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ NMDA receptor โดยมี NMDA เป็น agonist. และ non-NMDA receptor โดยมี KA, QUIS, AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate) เป็น agonist ส่วน metabotropic glutamate receptor แบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ group I mGLU, group II mGLU และ group III mGLU เป็นต้น

การกระตุ้นที่ ionotropic และ/หรือ metabotropic glutamate receptor อาจเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาท (รูปที่ 2.2) ซึ่งเกี่ยวข้องกับโรคทางระบบประสาทหลายชนิด เช่น Alzheimer's disease, Huntington's disease, Parkinson's disease, epilepsy เป็นต้น (Choi, 1988; Coyle and Puttfarcken, 1993; Wrathall *et al.*, 1994)

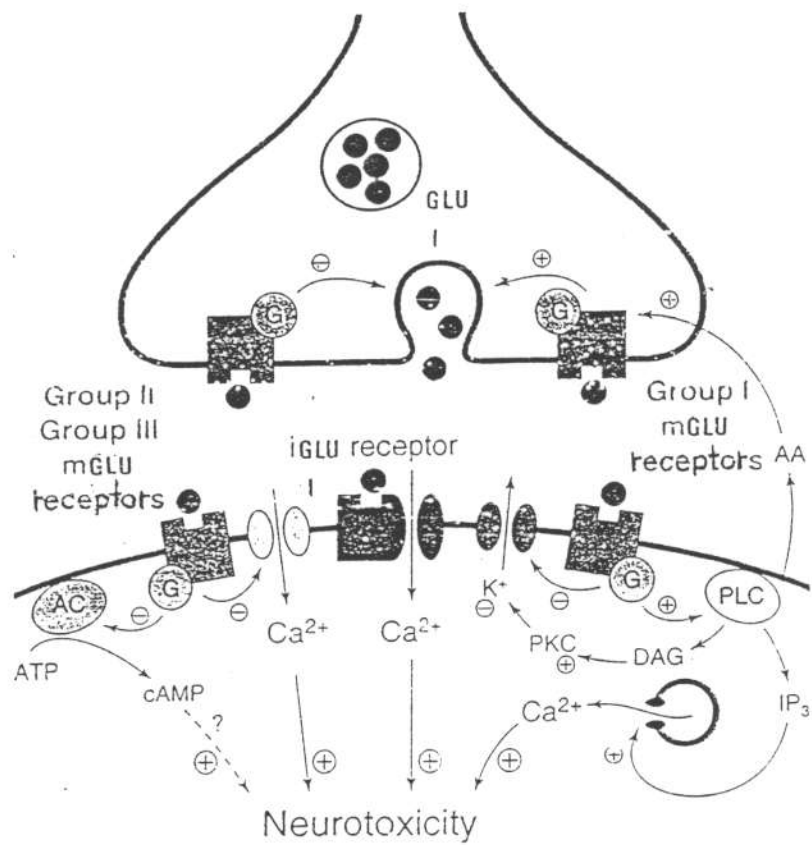
2.3 การตายของเซลล์ประสาท (neuronal cell death)

เซลล์ปกติอยู่ในภาวะ homeostasis คือ มีภาวะสมดุลระหว่างการทำงานของเซลล์กับสภาวะแวดล้อม เมื่อมีสิ่งที่มีอันตรายต่อเซลล์ หรือสิ่งแวดล้อมเปลี่ยนแปลงจะเกิดภาวะ stress ต่อเซลล์ ทำให้เกิดผลกับเซลล์ได้หลายแบบดังนี้

1. เกิดอันตรายต่อเซลล์อย่างเฉียบพลัน (acute cell injury) ผลจะเสียหายต่อเซลล์มากหรือน้อย ขึ้นอยู่กับความรุนแรงและระยะเวลาที่เซลล์ได้รับสิ่งที่ทำอันตรายนั้น กล่าวคือ ถ้าเป็นอันตรายที่ไม่รุนแรงนัก เมื่อกำจัดสาเหตุออกไป เซลล์จะสามารถคืนสู่สภาพปกติได้ อันตรายชนิดนี้เรียกว่า reversible cell injury แต่ถ้าเป็นอันตรายที่รุนแรง เซลล์ไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพปกติได้ และก่อให้เกิดการตาย ของเซลล์ (cell death) เรียกอันตรายชนิดนี้ว่า irreversible cell injury

2. เกิดอันตรายต่อเซลล์อย่างเรื้อรัง (chronic cell injury) เซลล์จะเกิดการปรับตัว (adaptation) ซึ่งอาจเป็นการปรับตัวโดยกระบวนการทางชีวเคมีภายใน เซลล์ทำให้มี

รูปที่ 2.2 แสดงกลไกของ GLU ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการทำลายเซลล์ประสาท ซึ่งเกี่ยวข้องกับ receptor ทั้งชนิด iGLU และ mGLU receptor โดยเกี่ยวข้องกับสารหลายชนิด เช่น arachidonic acid (AA), adenylate cyclase (AC), diacyl glycerol (DAG), inositol triphosphate (IP₃), phospholipase C (PLC) และ protein kinase C (PCK) เป็นต้น (Nicoletti *et al.*, 1996)



metabolism ผิดไปจากเดิม หรือมีการปรับตัวในด้านโครงสร้างของเซลล์

สาเหตุที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ ไม่ว่าจะเกิดจากภาวะ hypoxia, anoxia, physical agents, chemical agents, immunologic reactions หรือ genetic dearrangement สาเหตุเหล่านี้ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเซลล์ได้หลายแบบ ได้แก่

1. การเปลี่ยนแปลง permeability และ เอนไซม์ของ cell membrane
2. การเปลี่ยนแปลงของ oxidative respiration ใน mitochondria ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ pH และมีปริมาณ ATP ลดลง

3. การเปลี่ยนแปลงในการสังเคราะห์โปรตีน จะพบการเปลี่ยนแปลงที่ endoplasmic reticulum, ribosome และ messenger RNA

4. การเปลี่ยนแปลงใน genetic apparatus ของเซลล์

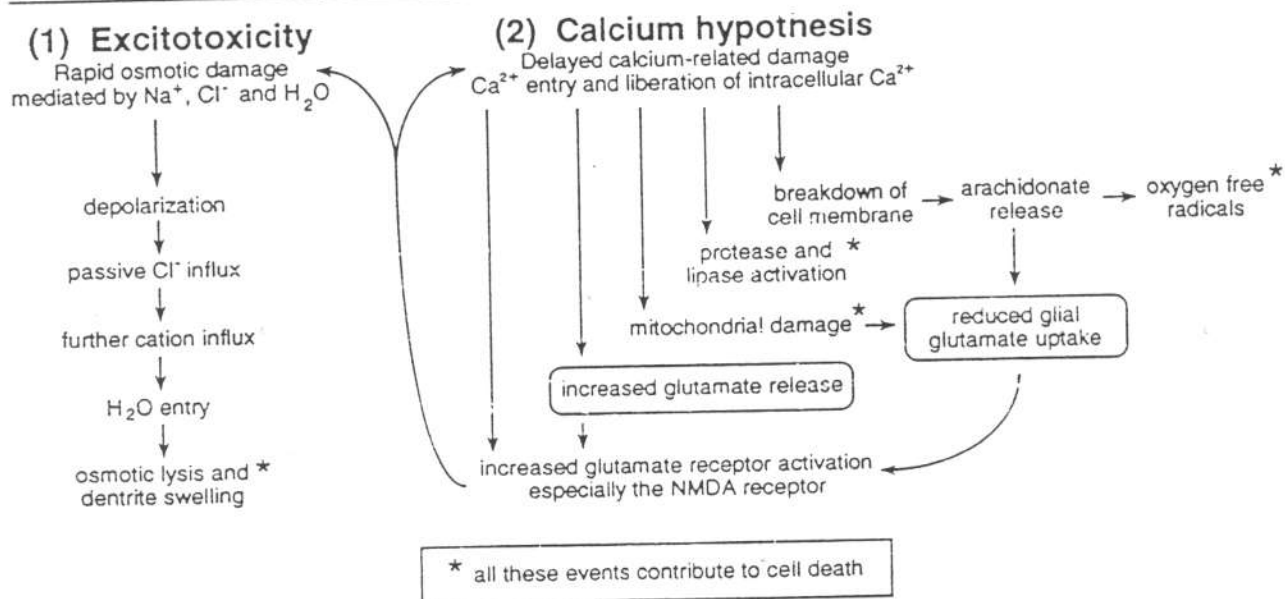
การเปลี่ยนแปลงทั้งหลายนี้ จะเกิดขึ้นเกี่ยวโยงซึ่งกันและกัน เริ่มต้นด้วยการเปลี่ยนแปลงทางโมเลกุลชีวภาพ (biomolecule) และทางชีวเคมี (biochemical) จนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในหน้าที่การทำงานของเซลล์ในที่สุด (Scarpelli, 1985; Cotran, 1989)

จากการศึกษาที่ผ่านมากลไกการตายของเซลล์ประสาทยังไม่ทราบแน่ชัด แต่เชื่อว่าอาจจะเกี่ยวข้องกับหลายปัจจัยที่มากระตุ้นการทำลายเซลล์ประสาท และทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทตามมา การตายของเซลล์โดยทั่วไปพบว่ามีลักษณะของการเปลี่ยนแปลงแบ่งได้เป็น 2 แบบ ได้แก่ necrosis และ apoptosis ทั้งนี้จะพบว่า เซลล์ที่เกิด necrosis จะมีการบวม (swollen) ของ cytoplasm และ organelles ต่างๆ ภายในเซลล์ มีการขาดพลังงาน (depletion of energy) และการเสื่อมสลายของผนังเซลล์ สำหรับการตายของเซลล์แบบ apoptosis นั้น จะพบลักษณะหดตัว (shrinkage) ของ cytoplasm ร่วมกับการเกิด internucleosomal fragmentation ของ DNA โดย endonuclease ทำให้ DNA ถูกย่อยให้ได้ขนาดน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ซึ่งจะเป็นลักษณะแบบขั้นบันได (DNA ladder) เมื่อตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis ซึ่งการตายของเซลล์แบบ apoptosis นี้ มักพบในการตายของเซลล์ที่เรียกว่า programmed cell death ซึ่งเป็นการตายของเซลล์ที่พบได้ในช่วง embryos, metamorphosis และ aging (Schwartzman and John, 1990)

จากการศึกษาที่ผ่านมาเชื่อว่า กลไกการตายของเซลล์ประสาทอาจจะเกี่ยวข้องกับปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อเซลล์ประสาท แล้วเห็ยวนำให้เกิดการตายขึ้น ในปี ค.ศ. 1995 Lipton และ Kalil (Lipton and Kalil, 1995) ได้เสนอแนะว่า ปัจจัยที่มีผลก่อให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทแบบ necrosis หรือการตายแบบ rapid degeneration มีดังนี้คือ เกิดการรบกวนการทำงานของ survival protein ซึ่งได้แก่ glutathione reductase, superoxide dismutase, protease inhibitor ทำให้มีการเพิ่มของ proteases มากขึ้นภายในเซลล์ประสาท ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทตามมา ส่วนปัจจัยที่มีผลทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทแบบ apoptosis หรือการตายแบบ delayed degeneration มีดังนี้คือ การลดลงของ ATP, การเพิ่มขึ้นของ proteases ภายในเซลล์ประสาท รวมถึงการเพิ่มขึ้นของ Ca^{2+} ซึ่งเห็ยวนำให้มีการเพิ่มของ free radical และส่งผลให้เกิดการตายในรูปแบบของ apoptosis ตามมา และมีการศึกษาที่เสนอแนะเกี่ยวกับกลไกการตายของเซลล์ประสาท เชื่อว่าเกิดจากการที่มีโซเดียม (Na^+) และแคลเซียม (Ca^{2+}) เข้ามาเกี่ยวข้อง โดยที่การกระตุ้นเซลล์มากเกินไป (over stimulation) จาก EAAs ทำให้ Na^+ และน้ำเข้าสู่เซลล์มากจนเกิดการบวมของเซลล์ประสาท มีผลทำให้หน้าที่การทำงานของ mitochondria สูญเสียหน้าที่ไป นอกจากนี้ยังเกิดการกระตุ้นเอนไซม์ protease และเอนไซม์ lipase มีผลให้เกิดการย่อยสลายโปรตีน และไขมัน ซึ่งทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Rothman and Olney, 1987) ดังแสดงในรูปที่ 2.3 ต่อมาปี ค.ศ. 1995 Ankarcrona และคณะ (Ankarcrona *et al.*, 1995) เสนอแนะว่า กลไกการตายของเซลล์ประสาทเกิดจาก Ca^{2+} overload และกระตุ้นที่ GLU receptor มากเกินไป ส่งผลให้เกิดการสูญเสียหน้าที่ของ mitochondria และเกิดการตายของเซลล์ประสาทในรูปแบบทั้ง necrosis และ apoptosis นอกจากนั้นมีการเสนอแนะถึงกลไกการตายของเซลล์ประสาท เชื่อว่าเกิดจากภาวะ oxidative stress ซึ่งก่อให้เกิด free radical ที่เป็นพิษต่อเซลล์ประสาท และกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทตามมาในรูปแบบการตายของ apoptosis (Halliwell and Gutteridge, 1984; Orrenius *et al.*, 1993)

จากการนำเอาอนุพันธ์ของ GLU มาศึกษาพบว่า อนุพันธ์หลายๆ ตัวมีความแรงในการกระตุ้นมากกว่า GLU โดยออกฤทธิ์ที่ receptor subtype ของ GLU แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น KA ซึ่งแยกได้จาก seaweed *Diginea Simplex* (Shinozaki and Konishi,

รูปที่ 2.3 แสดงการเสนอแนะกลไกการตายของเซลล์ประสาทจากการกระตุ้นของ
EAAs (Rothman and Olney, 1987)



1970) จับกับ KA-preferring receptor subtype, QUIS ซึ่งแยกได้จาก *Quisqualis nut* (Shinosaki and Shibuya, 1974) จับกับ QUIS-preferring receptor subtype และ NMDA ซึ่งเป็นสารประกอบที่สังเคราะห์ขึ้น (Curtis and Watkins, 1960, 1963) จับกับ NMDA-preferring receptor subtype นอกจากนี้ยังรายงานว่ GLU เป็น endogenous ligand ของ KA-preferring receptor subtype และ QUIS-preferring receptor subtype ในขณะที่ ASP เป็น endogenous ligand ของ NMDA-preferring receptor subtype

จากการศึกษาที่ผ่านมาเชื่อว่าการกระตุ้นที่ GLU receptor น่าจะมีส่วนสำคัญในการทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาท โดยที่มี receptor subtype ที่เกี่ยวข้อง ซึ่งอาจเป็น NMDA receptor หรือ non-NMDA receptor มีการศึกษาพบว่า NMDA receptor อาจจะเกี่ยวข้องกับการทำลายของสมอง ซึ่งทำให้เกิดโรคทางระบบประสาท เช่น stroke, epilepsy, neurodegenerative disorder ต่างๆ (Simon *et al.*, 1990) และมีการศึกษาที่เชื่อว่า การกระตุ้นที่ NMDA receptor เกี่ยวข้องกับการนำเข้าของ Ca^{2+} เข้าสู่เซลล์ประสาทมากขึ้น โดยการกระตุ้นผ่าน voltage-gated Ca^{2+} channel ทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทตามมา (MacDermott and Dale, 1987; Limbrick *et al.*, 1995) มีการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (hippocampal neurons cultures) โดยให้สัมผัสต่อ GLU 500 mM เป็นเวลา 10 นาที พบว่าทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทเกิดขึ้น ร่วมกับการกระตุ้นที่ NMDA receptor subtype (Chum *et al.*, 1995) นอกจากนี้มีการศึกษาที่เชื่อว่า non-competitive antagonist ของ NMDA receptor สามารถป้องกันการเกิดการตายของเซลล์ประสาทได้ (Rothman and Olney, 1987) ส่วน non-NMDA receptor ซึ่งได้แก่ KA receptor นั้น มีการศึกษาว่า KA สามารถกระตุ้นต่อเซลล์ประสาทได้โดยตรง และนอกจากนี้ยังสามารถไปกระตุ้นการหลั่งของสาร neurotoxin ตัวอื่นๆ เช่น GLU และ ASP ส่งผลทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทตามมา มีการตั้งสมมุติฐาน (Coyle's hypothesis) ที่ว่า การกระตุ้น KA receptor อาจเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของระดับ Ca^{2+} ภายในเซลล์ประสาท ซึ่งเป็นผลให้เกิดการตายของเซลล์ประสาท (Coyle, 1983, 1987) นอกจากนี้ยังมีสมมุติฐาน (McGeer's hypothesis) ที่เชื่อว่าการตายของเซลล์ประสาท อาจจะมีการยับยั้งการ uptake ของ GLU กลับเข้าไปใน synaptic vesicle ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ GLU อย่างมากมาย ซึ่ง

เป็นสาเหตุให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทในเวลาต่อมา (McGeer *et al.*, 1978) ดังแสดงในรูปที่ 2.4

ในปี ค.ศ. 1996 Simonian และคณะ (Simonian *et al.*, 1996) ได้ศึกษาการตายของเซลล์ประสาทของเซลล์เพาะเลี้ยงของสมองหนูส่วนซีรีเบลลัม (cerebellar granule cell culture) เช่นเดียวกัน พบว่า การสัมผัสต่อ KA ความเข้มข้น 100 μ M เป็นเวลานาน 30 นาที ทำให้เกิดการตายในรูปแบบของ apoptosis โดยใช้ DNA ladder เป็นตัวชี้วัดในการทดลองครั้งนี้ เช่นเดียวกับการศึกษาในปี ค.ศ. 1994 Whitemore และคณะ (Whitemore *et al.*, 1994) ซึ่งได้ศึกษาการตายของเซลล์เพาะเลี้ยงของสมองหนูส่วนคอร์เท็กซ์ (cortical cell culture) พบว่าการสัมผัสต่อ H_2O_2 ในขนาดต่างๆ ทำให้เกิดการตายในรูปแบบของ apoptosis โดยใช้ DNA ladder เป็นตัวชี้วัดในการตายรูปแบบดังกล่าวเช่นเดียวกัน

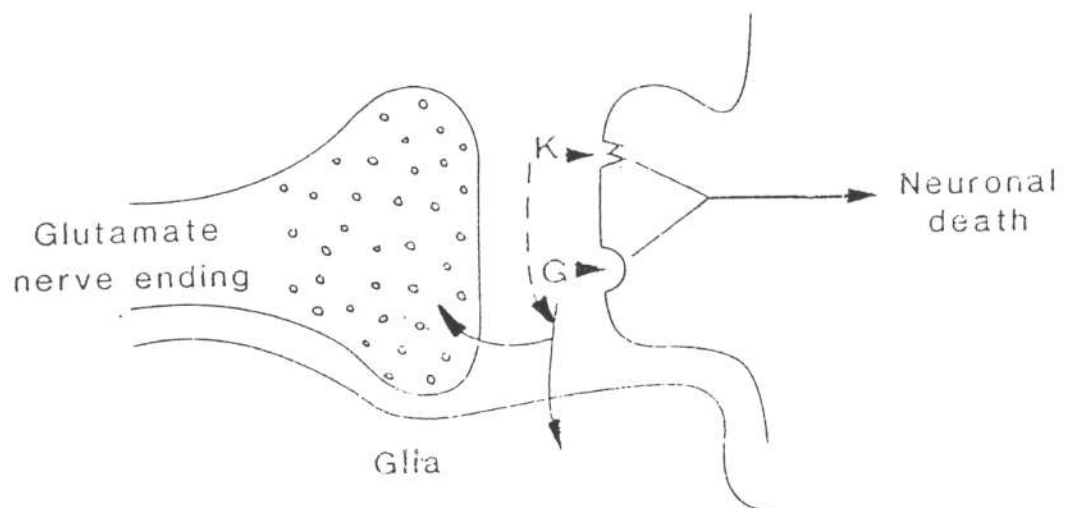
นอกจากนี้ยังมีรายงานการป้องกันการเกิด DNA ladder ได้ จากการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง (HeLa cells) ที่ถูกกระตุ้นด้วย DMS ความเข้มข้น 1 mM ทำให้เกิดการตายในรูปแบบ apoptosis และสามารถป้องกันการตายของเซลล์ดังกล่าวด้วย $ZnSO_4$ ความเข้มข้น 100 μ M ได้ (Bertazzoni and Scovassi, 1992) และมีการศึกษาการป้องกันการทำลายของเซลล์ประสาท โดยใช้ folic acid ความเข้มข้น 10 mM พบว่า สามารถป้องกันการทำลายเซลล์จอประสาทตาของไก่จากการกระตุ้นด้วย KA และ NMDA ได้ (Sattayasai *et al.*, 1986)

2.4 Agarose gel electrophoresis

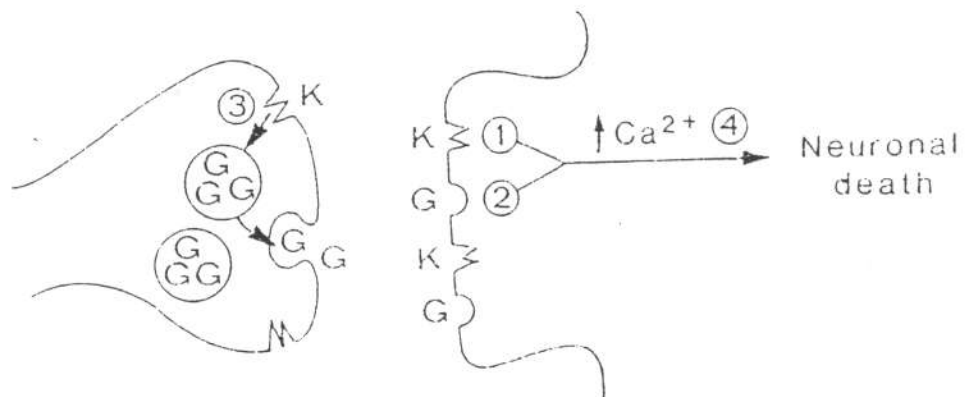
Agarose gel electrophoresis เป็นเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาวิเคราะห์แยกสารพันธุกรรม (DNA, RNA) โดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่ของ DNA หรือ RNA ภายใต้สนามไฟฟ้า (electrophoresis) โดยผ่านตัวกลาง คือ agarose gel ซึ่งสามารถแยก DNA ที่มีขนาด ตั้งแต่ 500 base pairs (bp) ขึ้นไปได้ จากที่ DNA มีโครงสร้างที่ประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟต (PO_4^{2-}) ทำให้ DNA มีประจุโดยรวมเป็นลบ เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจะเคลื่อนที่คอยล์ (supercoil form) จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า DNA แบบปลายเปิด (linear form) และ

รูปที่ 2.4 แสดงสมมุติฐานที่เกี่ยวข้องกับกลไกการตายในเซลล์ประสาท ของ McGeer's hypothesis (A) และ Coyle's hypothesis (B) โดยที่ McGeer's hypothesis เชื่อว่า เกิดการกระตุ้นของ GLU (G) ผ่านทาง GLU หรือ KA (K) receptor ส่วน Coyle's hypothesis เชื่อว่า GLU จะออกฤทธิ์ที่ postsynaptic GLU receptor (2) ในขณะที่ KA ออกฤทธิ์ได้ทั้ง postsynaptic (1) และ presynaptic receptor (3) (McGeer, 1978; Coyle, 1983, 1987)

A. McGeer's Hypothesis



B. Coyle's Hypothesis

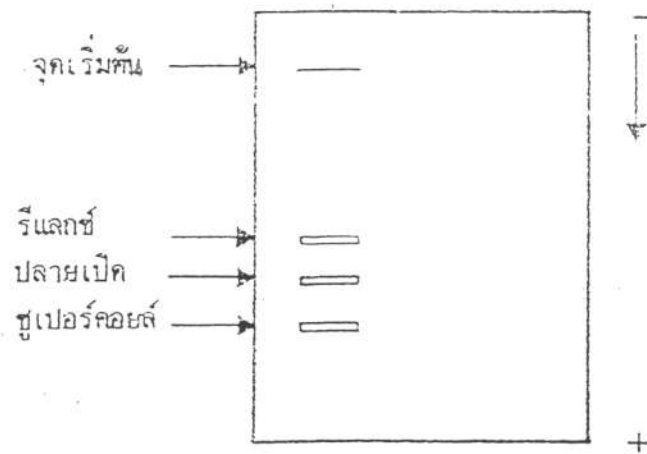
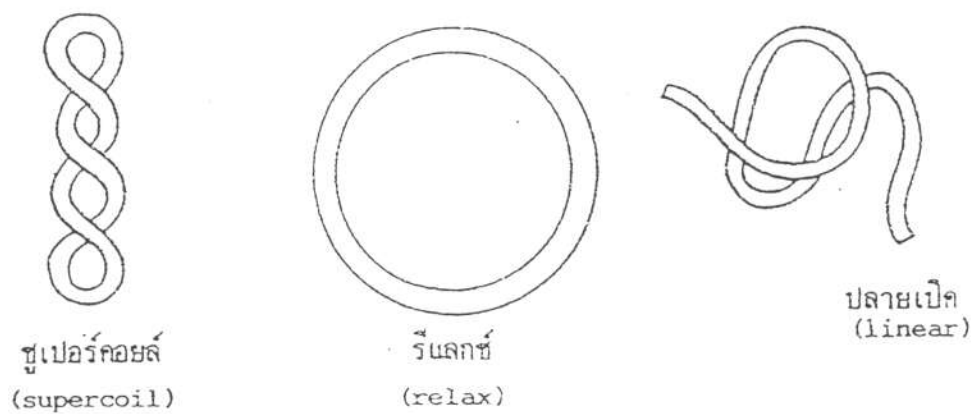


จากข้อสรุปไปสู่ข้อสรุปว่า DNA ขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าขนาดเล็ก ทำให้สามารถแยก DNA ขนาดต่างๆ ออกจากกันได้ ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ผ่าน agarose gel ของ DNA มีหลายประการได้แก่ ขนาดโมเลกุลของ DNA, รูปร่างของ DNA, ความเข้มข้นของ gel, ส่วนประกอบของ electrophoresis buffer และ กระแสไฟฟ้า ซึ่งสามารถอธิบายได้ดังนี้ ขนาดโมเลกุลของ DNA มีผลต่อการเคลื่อนที่ของ DNA คือ DNA ขนาดใหญ่จะผ่าน gel ได้ช้ากว่า และเคลื่อนที่ได้ระยะทางสั้นกว่า DNA ขนาดเล็ก เพราะการแยกขนาดของ DNA เป็นผลมาจากขนาดช่องว่างที่เกิดจากการซ้อนทับของเส้น agarose ในขณะที่รูปร่างของ DNA มีผลต่อการเคลื่อนที่ของ DNA คือ DNA แบบซูเปอร์คอยล์ (supercoil form) จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า DNA แบบปลายเปิด (linear form) และ DNA แบบปลายเปิด จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า DNA แบบรีแลกซ์ (relaxed form) ดังแสดงในรูปที่ 2.5 ส่วนความเข้มข้นของ gel มีผลต่อการเคลื่อนที่ของ DNA คือ agarose gel ที่มีความเข้มข้นสูงจะทำให้เกิดการสานของเส้น agarose ได้มากกว่า จึงมีช่องว่างของ gel น้อย ทำให้ DNA เคลื่อนที่ผ่านได้ช้ากว่า agarose gel ที่มีความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นการแยก DNA ขนาดต่างๆ ต้องเลือกความเข้มข้นของ gel ให้เหมาะสม ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ความเข้มข้นของ agarose gel กับขนาดของ DNA ปลายเปิด

ความเข้มข้นของ agarose gel (%)	ขนาดของ DNA (kb)
0.3	5 - 60
0.5	1 - 30
0.7	0.8 - 12
1.0	0.5 - 10
1.2	0.4 - 7
1.5	0.2 - 3
2.0	0.1 - 2

รูปที่ 2.5 แสดงโครงรูปของ DNA ในลักษณะ supercoil, relax และ linear เมื่อเคลื่อนที่ใน gel electrophoresis เดียวกันจะเคลื่อนที่ได้เร็วต่างกัน (Sambrook *et al.*, 1989)



สำหรับส่วนประกอบของ electrophoresis buffer มีผลต่อการเคลื่อนที่ของ DNA คือ ในบัฟเฟอร์มีส่วนประกอบของประจุหรือไอออน และ ionic strength ที่แตกต่างกัน ถ้าใช้บัฟเฟอร์ที่มี ionic strength สูง การนำไฟฟ้าเกิดขึ้นอย่างมาก ทำให้เกิดความร้อนเพิ่มมากขึ้นอาจทำให้ gel ละลาย และอาจทำลาย DNA ได้ ขณะที่บัฟเฟอร์ที่มี ionic strength ต่ำๆ จะทำให้การนำไฟฟ้าเกิดขึ้นน้อย ทำให้ DNA เคลื่อนที่ช้ามากหรือไม่เคลื่อนที่เลย ดังนั้นการเลือกใช้บัฟเฟอร์ให้เหมาะสมจึงมีความสำคัญต่อการแยก DNA บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในกระบวนการ electrophoresis มีหลายชนิด เช่น Tris-acetate (TAE) หรือ Tris-borate (TBE) ที่ pH ประมาณ 7.5-8.0 โดยที่ TAE-buffer นิยมใช้กันมากในงานวิจัยทั่วไป แต่บัฟเฟอร์ชนิดนี้มีความจุ (buffering capacity) ค่อนข้างต่ำ ในกรณีที่ต้องทำ electrophoresis เป็นเวลานานๆ เช่น ค้างคืน จะทำให้สารละลายด้านขั้วลบเป็นด่างและสารละลายด้านขั้วบวกเป็นกรด ซึ่งสูญเสียความเป็นบัฟเฟอร์ไป ดังนั้นระหว่างการทำ electrophoresis ต้องคอยผสมบัฟเฟอร์ระหว่างขั้วทั้งสองให้เข้ากัน บัฟเฟอร์ชนิดนี้จะเก็บได้นาน ถ้านำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) และเก็บใน 4 องศาเซลเซียส เนื่องจากสามารถรักษาสภาพความเป็นบัฟเฟอร์และป้องกันการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ส่วน TBE นิยมใช้กันมากเช่นกัน จากการที่บัฟเฟอร์ชนิดนี้มีความจุสูง แลบ DNA ที่แยกได้จะคมชัดและเล็ก เมื่อเตรียมที่ความเข้มข้น 10 เท่า สามารถเก็บบัฟเฟอร์ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน เพราะ boric acid ในบัฟเฟอร์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ สำหรับกระแสไฟฟ้ามีผลต่อการเคลื่อนที่ของ DNA คือ ความเร็วในการเคลื่อนที่ของ DNA แบบปลายเปิด จะแปรโดยตรงกับปริมาณ voltage เนื่องจากค่าของ voltage มีผลต่อการเคลื่อนที่ของ DNA โดยมีค่าความต้านทานของตัวกลาง ซึ่งได้แก่ gel และ บัฟเฟอร์มาเกี่ยวข้องด้วย ดังสมการ Ohm's Law, $V = IR$ เมื่อค่า V คือ ค่าแรงดันไฟฟ้า หรือ voltage (volts), I คือ ค่ากระแสไฟฟ้าหรือ current (milliamps) และ R คือ ค่าความต้านทานหรือ resistance (Ohms) ของตัวกลางในสนามไฟฟ้า ดังนั้นจากสมการ เมื่อผ่านแรงดันไฟฟ้า (voltage) จำนวนหนึ่งเข้าไปในวงจร จะส่งผลให้กระแสไฟฟ้าเข้าไปในตัวกลาง แรงดันไฟฟ้าเมื่อผ่านตัวกลาง จะมีค่าเปลี่ยนแปลงขึ้นอยู่กับความต้านทานของตัวกลางนั้น ทำให้เกิด voltage gradient ซึ่งผลักดันให้ DNA เกิดการเคลื่อนที่ขึ้น แต่หากใช้ voltage สูงมากเกินไป DNA ที่มีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ไม่สมำ

เสมอ ทำให้ความสามารถในการแยก DNA ลดลง ดังนั้นเพื่อให้การแยก DNA ที่มีขนาดใหญ่มากกว่า 2 kb ได้ผลดี ควรใช้ voltage ไม่เกิน 5 volts/cm.

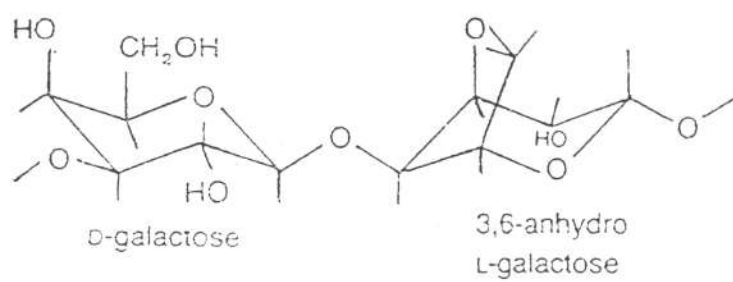
Agarose gel electrophoresis เป็นวิธีมาตรฐานในการแยกวิเคราะห์ DNA และ RNA เนื่องจากโครงสร้างโมเลกุลของ agarose ประกอบด้วยสารที่แยกได้จากผนังเซลล์สาหร่ายทะเล โดยเป็นสาร polysaccharide ซึ่งมี galactose และอนุพันธ์ เป็นส่วนประกอบ สาย agarose จะพันไขว้กัน (crosslinked) ดังแสดงในรูปที่ 2.6 ทำให้ gel มีลักษณะเป็นรูพรุน และสามารถแยก DNA หรือ RNA ออกได้ตามขนาด เมื่อ run gel ในบัฟเฟอร์ที่มีกระแสไฟฟ้า การแยก DNA โดย agarose gel electrophoresis ส่วนใหญ่ทำในลักษณะแนวนอน (horizontal submarine gel) ซึ่งอุปกรณ์ที่ใช้ทำ gel electrophoresis แบบนี้ประกอบด้วย ที่วาง gel (gel plate). แผ่นสำหรับทำ ช่อง gel (well) สำหรับหยอด DNA ตัวอย่างลงไป และส่วนสำหรับวางแผ่น gel อยู่ตรงกลาง (gel chamber) ดังแสดงในรูปที่ 2.7 สำหรับการเตรียมแผ่น gel โดยทั่วไปมักใช้แผ่น gel ที่มีความหนา 3- 5 mm. เพราะถ้าใช้แผ่น gel ที่หนาเกินไป จะทำให้ผลการแยก DNA fragment ไม่ดีเท่าที่ควร และถ้าใช้แผ่น gel ที่บางกว่า 3 mm. แผ่น gel จะเปราะบาง แตกหักง่ายเกินไป

สำหรับการเตรียม DNA ตัวอย่าง ก่อนทำ gel electrophoresis นั้น ต้องผสม DNA ตัวอย่างกับสารที่มีความหนาแน่น (density) มากกว่า electrophoresis buffer เสียก่อน สารนั้นเรียกว่า loading dye หรือ loading buffer โดยสารนี้ประกอบไปด้วยสีและสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ซึ่งจะช่วยให้สารละลาย DNA ตัวอย่างไม่ฟุ้งกระจายขณะหยอดลงในช่อง gel (well) ที่มีบัฟเฟอร์อยู่ และยังช่วยให้ทราบถึงระยะทางที่ DNA เคลื่อนที่ไป ซึ่งมองเห็นด้วยตาเปล่า เนื่องจากสี bromophenol blue ที่ผสมอยู่ใน loading dye

2.5 การตรวจสอบและการถ่ายภาพ DNA pattern

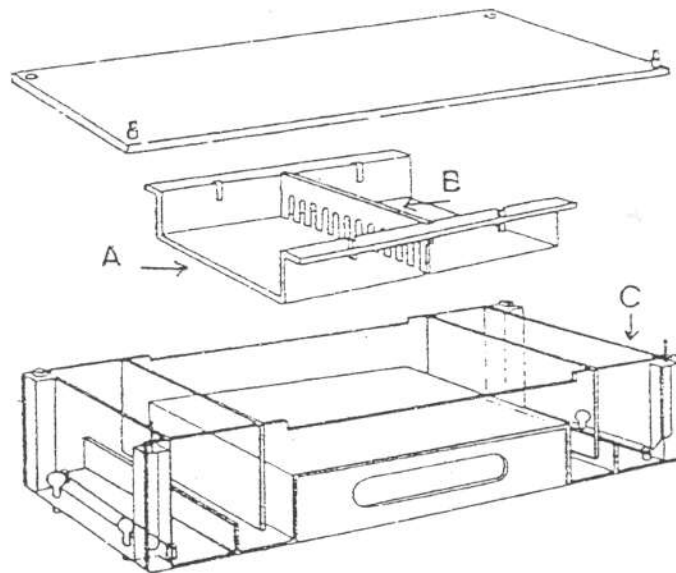
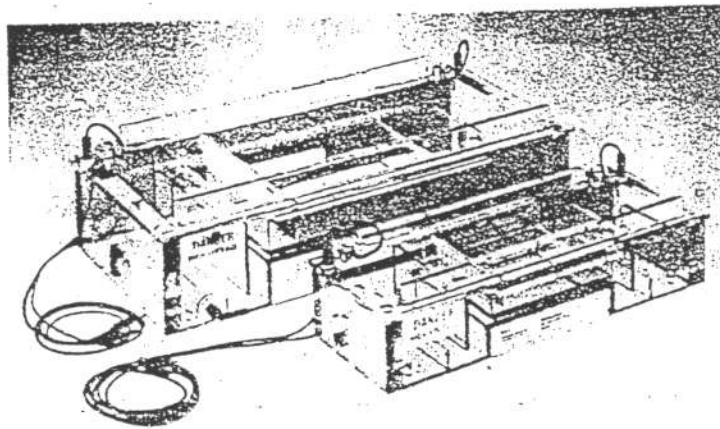
การศึกษา DNA pattern ทำโดยการย้อมสี DNA ในแผ่น gel (DNA-staining) ด้วย ethidium bromide สารนี้มีโครงสร้างแบน (planar) สามารถแทรก (intercalate) เข้า

รูปที่ 2.6 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของ agarose (Sambrook *et al.*, 1989)



รูปที่ 2.7 แสดงเครื่องมือ run agarose gel electrophoresis ที่ผลิตขึ้น ซึ่งส่วนใหญ่
เป็นลักษณะ horizontal submarine gel (Sambrook *et al.*, 1989)

- A) gel plate
- B) comb
- C) gel chamber



ไประหว่าง base ของ DNA เมื่อนำแผ่น gel ไปส่องผ่านแสง ultraviolet (UV) ทำให้เกิดการเรืองแสงสีแดง (fluorescent radiation) เนื่องจาก ethidium bromide เมื่อถูกกระตุ้นด้วย UV light ที่ความยาวคลื่น (wave length) ประมาณ 300 nm. จะปล่อยแสง fluorescent ออกมาให้มองเห็นได้ แต่ ethidium bromide เป็น mutagen และ carcinogen จึงต้องระวังในการใช้ ควรสวมถุงมือและทำลายฤทธิ์ก่อนทิ้งลงในท่อน้ำทิ้งทุกครั้ง สำหรับวิธีการทำ DNA staining ทำได้ 2 วิธีคือ วิธีแรกเติม ethidium bromide ลงไปใน gel ขณะที่ยังเหลวอยู่ โดยให้ความเข้มข้น 0.5 $\mu\text{g/ml}$ วิธีนี้จะสะดวกในการติดตามผลการทำ electrophoresis ถึงแม้ ethidium bromide อาจทำให้ DNA เคลื่อนช้าลงประมาณ 10-15% อีกวิธีหนึ่งคือ การย้อมแผ่น gel โดยแช่แผ่น gel ในสารละลาย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5-1.0 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 10-30 นาที จากนั้นนำแผ่น gel แช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 30 นาที จึงนำแผ่น gel ไปตรวจสอบดู DNA pattern ต่อไป การตรวจสอบดู DNA pattern จะต้องทำในห้องมืด หรือใช้อุปกรณ์ที่กันไม่ให้แสงสว่าง หรือแสงแดด ไปบดบังแสง fluorescent จากแถบ DNA และการถ่ายภาพของ DNA pattern สามารถทำได้หลายลักษณะดังนี้คือ

1. ใช้กล้อง polaroid MPA ที่มี red filter สำหรับกรองแสงสีแดงที่เกิดจาก UV lamp ติดอยู่ ซึ่งปัจจุบันได้มีการผลิตกล้อง polaroid ชนิดที่ทำงานเพื่อถ่ายภาพ DNA pattern จากเครื่อง UV transilluminator โดยตรง ฟิล์มที่ใช้ได้ดีคือชนิด 667 หรือชนิด 57 (3,000 ASA) ซึ่งใช้ exposure time เพียง 2-3 วินาทีที่ $f 4.5$
2. ใช้ระบบ thermal printer ในการถ่ายภาพ โดยเครื่องมือชนิดนี้เป็นเครื่องมือสำเร็จรูปที่ประกอบด้วยเครื่อง UV transilluminator และกล้องถ่ายรูประบบ thermal printer ภาพถ่ายของ DNA pattern จะถูกพิมพ์ออกบนกระดาษ หลังจากกดปุ่มถ่ายภาพอัตโนมัติแล้ว
3. ใช้กล้องถ่ายภาพมาตรฐาน วิธีนี้เป็นวิธีที่ให้ภาพคมชัด และสามารถเก็บไว้ได้นาน โดยที่ภาพไม่เลือนหรือจางไป ฟิล์มที่ใช้เป็นฟิล์มขาว-ดำ และใช้กล้องถ่ายรูปขนาดเลนส์ 35 mm. ความไวแสง ISO 100-200 เปิดหน้ากล้องที่ $f 5.6$ ใช้ red filter สำหรับกรองแสง และใช้เวลาถ่ายภาพประมาณ 45-100 วินาที/ภาพ หลังการถ่ายภาพแล้ว ต้องนำฟิล์มไปทำการล้างและอัดภาพเก็บไว้ (Sambrook *et al.*, 1989)