

บทที่ 5

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า EAAs มีผลต่อ DNA ในจอประสาทตาไก่ โดยก่อให้เกิดการสลายของ DNA ในลักษณะ smear band โดยที่การสลายของ DNA ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและชนิดของ EAAs จากการทดลองพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ GLU (0.1, 1, 10 mM) จะทำให้เกิดการสลาย DNA มากขึ้น แสดงให้เห็นว่า GLU ออกฤทธิ์ในรูปแบบ dose-dependent response ในทำนองเดียวกันมีผู้รายงานว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณ GLU ในเซลล์เพาะเลี้ยงของสมองของหนูส่วนคอร์เท็กซ์มีผลทำให้เกิดการเสื่อมสลายและการตายของเซลล์ประสาทเพิ่มมากขึ้น (Hartley *et al.*, 1996) และจากการทดลองครั้งนี้พบว่า ที่ความเข้มข้นที่เท่ากันคือ 0.1 mM ของ EAAs (GLU, KA, NMDA) จะพบการสลาย DNA ของจอประสาทตาไก่ชัดเจนจาก GLU และ KA ส่วน NMDA ไม่พบการสลายของ DNA อาจเป็นไปได้ว่าการสลายของ DNA ในจอประสาทตาไก่ผ่านทาง EAAs receptor ชนิด KA receptor เช่นเดียวกับการศึกษาของ Simonian และคณะ (Simonian *et al.*, 1996) เชื่อว่าการเสื่อมสลายและการตายของเซลล์ประสาทน่าจะกระตุ้นผ่านทาง non-NMDA receptor อย่างไรก็ตามการตอบสนองของเซลล์ประสาทแต่ละชนิดอาจผ่านทาง receptor ที่แตกต่างกัน (Limbrick *et al.*, 1995 Said *et al.*, 1996)

สัตยาชัยและคณะ (Sattayasai *et al.*, 1989) ศึกษาผลของ EAAs ต่อจอประสาทตาไก่และเสนอแนะว่า ในจอประสาทตาไก่มี GLU receptor หลายชนิดทั้ง NMDA, KA และ QUIS เป็นต้น จากการศึกษาครั้งนี้ ผลของ GLU ที่มีต่อ DNA มีความแรงใกล้เคียงกับ KA แต่การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า KA มีคุณสมบัติในการเป็น EAA แรงกว่า GLU ประมาณ 100-1,000 เท่า (Olney, 1982) เป็นไปได้ว่า GLU ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทในจอประสาทตา อาจกระตุ้นผ่านทาง receptor อื่นนอกเหนือจาก KA receptor เช่น QUIS receptor รวมทั้ง metabotropic glutamate receptor (Nakanishi, 1992; Pin and Duvoisinin, 1995) ซึ่งส่งผลให้การทำลาย DNA มีความรุนแรงขึ้น

นอกจากนี้จากการศึกษาพบว่า การสลายของ DNA ในจอประสาทตาไก่ที่ถูกกระตุ้นด้วย 1mM GLU ไม่ขึ้นอยู่กับภาวะที่มี Na^+ หรือไม่มี Na^+ จากการศึกษาที่ผ่านมาเชื่อว่า Na^+ เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสลายและการตายของเซลล์ประสาทในรูปแบบ necrosis โดย Na^+ จะดึงน้ำเข้าภายในเซลล์ประสาท จนเกิดการบวมของเซลล์ และเกิดการสูญเสียหน้าที่ของ mitochondria ทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทในที่สุด (Rothman and Olney, 1987) การศึกษาของ Simonian และคณะพบว่า การตายของเซลล์ประสาทในเซลล์เพาะเลี้ยงสมองหนูส่วนซีรีบัลลัม เกิดในภาวะที่ไม่มี Na^+ ในรูปแบบ DNA ladder (Simonian *et al.*, 1996) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า การเสื่อมสลายของ DNA ในจอประสาทตาไก่ที่เกิดในลักษณะ smear band ทั้งในภาวะที่มี Na^+ หรือไม่มี Na^+ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า การตายของเซลล์ประสาทตาไก่เป็นอีกรูปแบบหนึ่งซึ่งไม่ใช่ลักษณะการตายแบบ apoptosis หรือ necrosis ก็เป็นไปได้ จากการศึกษาถึงการตายของเซลล์ประสาทที่พบใน neurodegenerative disorders ในระบบประสาทพบว่า ยังมีการตายในรูปแบบที่ยังไม่สามารถอธิบายได้ (unknown type) ร่วมด้วยเช่นกัน (Rubin, 1997)

ในการศึกษาถึง recovery ของ DNA ที่ถูกทำลายโดย GLU พบว่า ที่เวลา 60 นาทีหลังเปลี่ยน medium การสลายของ DNA ในจอประสาทตาไก่เพิ่มมากขึ้นกว่าเวลา 0 และ 30 นาทีหลังเปลี่ยน medium และยังคงเกิดการสลาย DNA ไปจนถึงเวลา 120 นาทีหลังเปลี่ยน medium ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ไม่พบแนวโน้มที่ DNA จะกลับคืนสู่สภาพปกติ ถึงแม้ว่าจะทำการเปลี่ยน medium เอา GLU ที่เป็นสาเหตุของการสลาย DNA ออกไปแล้วก็ตาม อาจเป็นไปได้ว่า กระบวนการที่ก่อให้เกิดการทำลายของ DNA อันเกิดจากการกระตุ้นด้วย GLU มีส่วนเกี่ยวข้องกับ intracellular processes หลายขั้นตอน ซึ่งเมื่อเริ่มถูกกระตุ้นแล้วอาจกลับคืนสู่สภาพปกติได้ยาก จากการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงสมองหนูส่วนซีรีบัลลัม (Simonian *et al.*, 1996) พบการทำลาย DNA ที่ยังคงดำเนินต่อหลังจากกำจัด KA ออกไปแล้วเช่นกัน

จากการศึกษาในเซลล์ประสาทหลายๆ ชนิดมีรายงานว่า H_2O_2 เป็นสารที่สามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์ได้ทั้งในรูปแบบของ apoptosis และ necrosis โดยขึ้นกับปริมาณและระยะเวลาที่ได้รับ (Halliwell and Gutteridge, 1984; Orrenius *et al.*, 1993) เมื่อตรวจสอบผลของ H_2O_2 ที่มีต่อ DNA ของจอประสาทตาพบว่า H_2O_2 ก่อให้

เกิด smear band ของ DNA ทั้งการทดลอง *in vitro* และ *in vivo* อย่างไรก็ตามพบว่า 1 ใน 4 eye cups ที่ incubate ใน medium ที่ไม่มี Na^+ ของ 3 mM H_2O_2 แสดงลักษณะของ DNA เป็นแบบ DNA ladder ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า จากกลไกที่ H_2O_2 ก่อให้เกิดการตายของเซลล์โดยทำให้เกิดภาวะ oxidative stress จาก free radical ที่เกิดขึ้นภาวะการณ์ต่างๆ ในการทดลองอาจทำให้มีความแตกต่างกันใน free radical ที่เกิดขึ้นจึงก่อให้เกิดความแตกต่างของผลที่มีต่อ DNA ได้

นอกจากนี้จากการศึกษาของสัตยาชัยและคณะ (Sattayasai *et al.*, 1988) ยังพบว่า folic acid สามารถป้องกันการทำลายจอประสาทตาของไก่ จากการกระตุ้นด้วย KA และ NMDA ได้ อย่างไรก็ตามจากการ incubate 10 mM folic acid ร่วมกับ 1 mM GLU ไม่พบว่า folic acid จะมีผลต้านฤทธิ์ของ GLU ในการทำลาย DNA แต่จากการที่ folic acid สามารถต้านฤทธิ์ของ KA ได้ (Sattayasai *et al.*, 1988) อาจเป็นข้อมูลเสริมว่าการออกฤทธิ์ของ GLU ในจอประสาทตามีส่วนผ่านทาง receptor ชนิดอื่นนอกเหนือจาก KA receptor และ/หรือความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ อาจยังไม่เหมาะสมในการต้านฤทธิ์กัน

เป็นที่น่าสนใจว่า folic acid สามารถยับยั้งผลของ H_2O_2 ที่มีต่อ DNA ได้ เมื่อทำการทดลองใน *in vitro* อาจเนื่องมาจาก folic acid เป็นส่วนประกอบที่สำคัญในการสังเคราะห์ DNA และป้องกันการทำลาย DNA (Jennings, 1995) และอาจเป็นไปได้ว่า folic acid ในความเข้มข้น 10 mM สามารถป้องกันการทำลาย DNA จาก oxidative stress ที่เกิดจาก 3 mM H_2O_2 ได้ อย่างไรก็ตามผลจากการทดลอง *in vivo* กลับไม่พบการต้านฤทธิ์ของ H_2O_2 จาก folic acid ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า การกระจายตัวของ folic acid ในวันตาเกิดได้ยาก ทำให้ความเข้มข้นของ folic acid ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถกระจายไปถึงจอประสาทตา จึงไม่สามารถป้องกันการทำลาย DNA ได้ ซึ่งปัญหาการกระจายตัวของสารในวันตานับว่าเป็นข้อจำกัดอย่างหนึ่งของการทดลอง *in vivo*

ผลของ ZnSO_4 ในการป้องกันการทำลาย DNA จาก GLU และ H_2O_2 นับว่าเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่ง ทั้งนี้เพราะ ZnSO_4 สามารถยับยั้งผลของทั้ง GLU และ H_2O_2 ที่มีต่อ DNA ได้ทั้งในการทดลอง *in vitro* และ *in vivo* จากการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยง

Hela cells (Bertazzoni and Scovassi, 1992) พบว่า ZnSO_4 สามารถป้องกันการทำลาย DNA จากฤทธิ์ของ DMS ได้ซึ่งผู้ศึกษาเสนอแนะว่า Zn^{2+} อาจมีผลต่อ $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -dependent endonuclease เป็นการป้องกันการเกิดการทำลายของ DNA และยังอาจมีส่วนป้องกันผลของ DMS ที่ยับยั้งเอนไซม์ซึ่งทำหน้าที่ซ่อมแซม DNA ด้วย เช่น พวก polymerase เป็นต้น

จากการที่ ZnSO_4 สามารถต้านฤทธิ์ของทั้ง GLU และ H_2O_2 ได้ อาจเป็นไปได้ว่า ฤทธิ์ในการทำลาย DNA ของ GLU และ H_2O_2 ต้องผ่านกระบวนการที่มี common pathway ซึ่งสามารถต้านหรือยับยั้งได้ด้วย ZnSO_4 อย่างไรก็ตามกระบวนการที่เกิดขึ้นจากสารทั้งสองชนิดก็น่าจะเป็นกระบวนการเดียวกัน เนื่องจากมีความแตกต่างกันในการตอบสนองต่อ folic acid

การศึกษาถึงชนิดหรือรูปแบบของการตายของเซลล์ประสาทโดยการตรวจสอบลักษณะของ DNA pattern อาจจะเป็นวิธีการที่ต้องอาศัยความละเอียดรอบคอบและมีโอกาสที่จะเกิดปัญหาขึ้นได้เช่น ขั้นตอนการเตรียม eye cup preparations จะต้องทำอย่างรวดเร็ว เพื่อป้องกันการสลายตัวของ DNA ที่อาจเกิดจากขบวนการ autolysis หลังจาก cell death ขั้นตอนการสกัด DNA สารละลายและอุปกรณ์ที่ใช้ต้องมีความสะอาดเพียงพอ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อรา รวมทั้ง DNase ที่เป็นสาเหตุของการสลาย DNA ดังนั้นจึงจำเป็นต้องนำสารละลายและอุปกรณ์ที่ใช้มา autoclave ก่อนทำการสกัด DNA ขั้นตอนในการตรวจสอบ DNA โดยวิธี agarose gel electrophoresis จะต้องมีความแม่นยำในการใส่ตัวอย่าง DNA ลงใน well ของ agarose gel เพื่อป้องกันการผิดพลาดจากปริมาณ DNA ที่มากหรือน้อยเกินกว่าปริมาณที่ต้องการ และขั้นตอนสุดท้ายในการถ่ายภาพ DNA pattern เพื่อเก็บไว้เป็นหลักฐานในการศึกษา จะต้องถ่ายภาพ DNA pattern ทันทีหลังจากการตรวจสอบ DNA pattern เสร็จ เพื่อป้องกันการ diffuse ของแถบ DNA อันอาจเป็นสาเหตุให้การตรวจสอบ DNA pattern ผิดพลาดได้ อย่างไรก็ตามจากผลของการศึกษาครั้งนี้อาจเสนอแนะได้ว่า GLU ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทที่สำคัญตัวหนึ่ง ในจอประสาทตามีผลกระทบทำให้เกิดการทำลายของ DNA ได้ในลักษณะที่ไม่จำเพาะเจาะจง โดยไม่ใช่ในรูปแบบ apoptosis หรือ necrosis รวมทั้งยังเป็นรูปแบบที่แตกต่างจากผลของ H_2O_2 อีกด้วย การศึกษาในรายละเอียดเพิ่ม

เดิมจะนำมาซึ่งการเข้าใจถึงบทบาทของ GLU ในการก่อให้เกิดทำลายของเซลล์ประสาท รวมทั้งแนวทางการป้องกันและรักษา neurodegenerative disorders บางอย่าง ทั้งนี้จอประสาทตาไถ่ฉบับได้ว่าเป็น model ที่สามารถนำมาใช้ในการศึกษาได้ดีอีก model หนึ่งในการศึกษาการตายของเซลล์ประสาท