

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคมะเร็งจัดเป็นโรคที่มีความร้ายแรงที่สามารถเกิดขึ้นได้กับคนทุกคน ไม่ว่าจะเป็นเพศชายหรือเพศหญิง ผู้ใหญ่หรือเด็ก คนรวยหรือคนยากจน ความอันตรายของโรคมะเร็งนั้นสามารถพิจารณาได้จากในส่วนของประเทศไทยเอง เนื่องจากโรคมะเร็งถือเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุขของประเทศปัญหาหนึ่ง เพราะในแต่ละปีจะมีประชากรไทยเสียชีวิตเนื่องจากโรคร้ายนี้มากเป็นอันดับที่ 2 (Thai Junior Encyclopedia Project by Royal Command of H.M. the King Network, 2006) รองจากการเสียชีวิตด้วยอุบัติเหตุ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากลักษณะความเป็นอยู่และการใช้ชีวิตที่เปลี่ยนแปลงไป สังคมเมืองเริ่มแผ่ขยายตัว ชีวิตของผู้คนทุกวันนี้นับวันยิ่งสัมผัสอยู่ท่ามกลางสิ่งแวดล้อมที่เป็นพิษมากขึ้น ซึ่งสิ่งเหล่านี้เองที่อาจเป็นตัวการเหนี่ยวนำทำให้เกิดโรคมะเร็งได้

ความน่ากลัวของโรคมะเร็งอยู่ที่ความไม่มีระเบียบแบบแผน สามารถรุกรานเซลล์ข้างเคียง (Invasion) หรือแพร่กระจายจากจุดตั้งต้นของโรคไปยังอวัยวะต่างๆทั่วร่างกายที่อยู่ไกลออกไป (Metastasis) โดยเซลล์มะเร็งจะแทรกผ่านเข้าไปในกระแสเลือด กระแสน้ำเหลือง หรือตามพื้นผิวของช่องว่างภายในร่างกาย และไปเจริญเติบโตขึ้นที่อวัยวะต่างๆ ต่อจากนั้นเซลล์มะเร็งจะทำให้เนื้อเยื่อของอวัยวะนั้นเสียไป ถ้าเป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่สำคัญของร่างกาย เช่น ปอด ตับหรือสมองจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตลงในเวลาอันรวดเร็ว (Thailand medical Clinic Online, 2006) ส่วนสาเหตุของการเกิดเซลล์มะเร็งนั้น เกิดจากการที่เซลล์ปกติของร่างกายเกิดการพิการหรือเกิดความผิดปกติของยีนภายในโครโมโซมขึ้น โดยโครโมโซมนั้นถือเป็นรหัสพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่คอยควบคุมลักษณะหน้าที่การทำงานของเซลล์ต่างๆภายในร่างกายให้เป็นไปอย่างสมดุล ซึ่งจากการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการเกิดการรุกรานและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งพบว่า RAGE หรือ Receptor of Advanced Glycation Endproducts ที่มีการศึกษากันมากในเรื่องของความสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพแทรกซ้อนในผู้ป่วยโรคเบาหวานนั้น ได้กลายเป็นปัจจัยหนึ่งที่ควบคุมการรุกรานและการเกิดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งอีกทางด้วยเช่นกัน (Bhawal et al., 2005)

จากงานวิจัยในอดีตที่ผ่านมาจะเห็นได้ว่า การศึกษาส่วนใหญ่ได้ให้ความสำคัญในเรื่องของการเกิดการรุกรานของเซลล์มะเร็งต่อเซลล์ข้างเคียง และการเกิดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังอวัยวะต่างๆ แต่ในด้านของการพัฒนาตัวยาหรือวิธีการรักษาที่สามารถยับยั้งการรุกรานและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งนั้น ยังไม่สมบูรณ์ทั้งในด้านของประสิทธิภาพผลข้างเคียง และความปลอดภัยของผู้รับการรักษา จากการศึกษาที่ผ่านมา เป็นที่น่าสนใจว่าได้มีการรายงานถึงความสามารถของสาร Catechin ตัวหนึ่งในกลุ่มของสารโพลีฟีนอล ที่มีชื่อว่า Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) ที่ช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งตับ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต และการรุกรานของเซลล์มะเร็งอันเนื่องมาจาก RAGE ได้ (Takada et al., 2000) โดยในการวิจัยส่วนใหญ่มักจะศึกษาในเรื่องผลของ EGCG ที่พบได้แต่เพียงในชาเขียว แต่ในอีกแง่หนึ่งของชาเขียวที่ผู้คนมักมองข้ามไปนั้นคือ นอกจากในชาเขียวจะมีสารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายแล้วยังมีสารบางชนิดอันได้แก่ Caffeine ซึ่งอาจทำให้เกิดโทษต่อร่างกายโดยเฉพาะเด็กในกรณีของการบริโภคที่มากเกินไป นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าชาเขียวอาจทำให้เกิดการใช้เวลานานกว่าปกติ (prolong) เมื่อเกิดการเลือดออกได้เช่นเดียวกัน (Supplementwatch, 2006) ซึ่งในปัจจุบันนี้เป็นที่ทราบกันดีว่าสารเคมีบางอย่างในผลไม้บางชนิดมีคุณสมบัติในการช่วยต้านมะเร็ง ประกอบกับผลไม้มีราคาที่ถูกมากเมื่อทำการเปรียบเทียบกับยาที่ใช้รักษาโรคมะเร็งที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้น และยังมีผลข้างเคียงต่อผู้ใช้อีกด้วย นอกจากนี้สารเคมีที่ได้จากผลไม้ นั้น เป็นสารที่ได้จากธรรมชาติและไม่ก่อให้เกิดโทษแก่ผู้บริโภคแต่อย่างใด ดังนั้นผลไม้จึงถือเป็นทางเลือกที่ดีอีกทางหนึ่งในการรักษาโรคมะเร็ง โดยสารที่ผู้คนให้ความสนใจมากในเรื่องของความสามารถในการต้านมะเร็งคือ สารในกลุ่มของโพลีฟีนอล ซึ่งเป็นสารที่พบได้ทั่วไปในผลไม้มันนั่นเอง

โพลีฟีนอลจัดเป็นสารในกลุ่มของ Micronutrient ที่มีการรายงานกันอย่างกว้างขวางว่าสามารถป้องกันการเกิดโรคในกลุ่มของ Degenerative Disease อันได้แก่ โรคหลอดเลือดหัวใจและโรคมะเร็งได้ ซึ่งสารโพลีฟีนอลแต่ละตัวจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันออกไป (Manach et al., 2004) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารโพลีฟีนอล โดยเฉพาะในกลุ่มของ Flavonoids ต่างก็มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโต การรุกราน และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้ (Huang et al., 1999; Menon et al., 1995; Benelli et al., 2002) โพลีฟีนอลจึงเป็นที่สนใจในหลายๆการทดลองในเรื่องของการยับยั้งการเจริญเติบโตและการเกิดการรุกรานของเซลล์มะเร็ง

เนื่องด้วยเหตุผลตามที่ได้กล่าวมาข้างต้นทั้งหมด ผู้ทำการวิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาในเรื่องของแหล่งโพลีฟีนอลที่สามารถหาได้ทั่วไป รับประทานได้ง่าย และไม่ก่อให้เกิดผลอันไม่พึงประสงค์แก่ตัวของผู้บริโภค เพื่อนำมาใช้ในการยับยั้งการเกิดการรุกรานของเซลล์มะเร็งอันเนื่องมาจาก RAGE ประกอบกับได้มีการรายงานว่ แอปเปิ้ลเป็นหนึ่งในผลไม้ที่มีระดับของโพลีฟีนอล ในปริมาณที่สูงมากเมื่อทำการเปรียบเทียบกันในกลุ่มของผลไม้ด้วยกันเอง ดังนั้นแอปเปิ้ลจึงเป็นผลไม้ที่ถูกเลือกนำมาใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ทั้งนี้ได้เคยมีผู้รายงานถึงความสามารถของแอปเปิ้ลที่มีผลต้านมะเร็ง ไม่ว่าจะเป็นในเรื่องของการยับยั้งการเจริญเติบโตหรือการรุกรานของเซลล์มะเร็ง แต่ยังไม่มีการรายงานถึงผลของสารสกัดจากแอปเปิ้ลที่มีต่อการแสดงออกของ RAGE ทั้งที่ RAGE ก็ถือเป็นปัจจัยหนึ่งในการเกิดการรุกรานของเซลล์มะเร็งด้วยเช่นกัน ดังนั้นผู้ทำการวิจัยจึงมีความสนใจทำการศึกษาผลของสารสกัดจากแอปเปิ้ลในเรื่องของการยับยั้งการรุกรานของเซลล์มะเร็งอันเนื่องมาจาก RAGE แม้กลไกในการยับยั้งจะยังไม่เป็นที่แน่ชัดนัก

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาถึงความสามารถของสารสกัดจากแอปเปิ้ลในการยับยั้งการรุกรานของเซลล์มะเร็งที่เกี่ยวข้องกับ RAGE

ขอบเขตของการวิจัย

การสกัดสารจากแอปเปิ้ลนั้นจะอยู่ในรูปของสารสกัดอย่างหยาบ (crude extract) ซึ่งเป็นการสกัดที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ และใช้เมธานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัด โดยจะนำมาทดสอบกับเซลล์มะเร็งที่ผ่านการคัดเลือกว่ามีการแสดงออกของยีน RAGE ด้วยวิธี Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ทั้ง 2 ชนิด อันได้แก่ SW480 และ HeLa หลังจากนั้นเซลล์มะเร็งที่ผ่านการบ่มกับสารสกัดแอปเปิ้ลเหล่านี้ จะถูกนำไปวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งด้วยวิธี Proliferation assay, วัดความสามารถในการรุกรานของเซลล์มะเร็งโดยใช้หลักการของ Matrigel Invasion assay และวัดการแสดงออกของยีน RAGE บนเซลล์มะเร็งด้วยวิธี RT-PCR ณ ความเข้มข้นที่ต่างกัน เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาแปลผลและทำการเปรียบเทียบกับตัวควบคุม

ข้อตกลงเบื้องต้น

1. เนื่องจากผู้ทำการวิจัยไม่สามารถทำการหาเซลล์มะเร็งที่เคยมีการรายงานว่ามีการแสดงออกของยีน RAGE บนผิวเซลล์ได้ ดังนั้นผู้ทำการวิจัยจึงทำการแก้ไขปัญหาโดยการนำเซลล์มะเร็งที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการอยู่แล้ว มาทำการทดสอบด้วยวิธี RT-PCR และทำการคัดเลือกเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของ RAGE มากที่สุด เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยนี้ ซึ่งจากการคัดเลือกด้วยวิธี RT-PCR นั้น ได้เซลล์มะเร็งทั้งหมด 4 ชนิดที่มีการแสดงออกของเซลล์มะเร็งโดยเรียงลำดับจากเซลล์ที่มีการแสดงออกของยีน RAGE มากที่สุดไปหาเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของยีน RAGE น้อยที่สุดได้ ดังต่อไปนี้ SW480, HeLa, HT-29, HepG2, HEP-2 และ HaCaT
2. สารโพลีฟีนอลที่สกัดได้จากแอปเปิ้ลนั้น ถือเป็นสารสกัดให้อยู่ในรูปของการสกัดแบบอย่างหยาบเพียงเท่านั้น

ข้อจำกัดของการวิจัย

การสกัดสารโพลีฟีนอลจากแอปเปิ้ลนั้นเป็นเพียงการสกัดให้อยู่ในรูปของสารอย่างหยาบ (Crude extraction) ซึ่งเป็นสารสกัดที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการแยกสารโพลีฟีนอลออกเป็นชนิดต่างๆ ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย (Manach et al., 2004)

สารโพลีฟีนอลเป็นกลุ่มของสารที่ผู้คนมักให้ความสนใจในเรื่องของการเป็นสาร antioxidant และบทบาทในการป้องกันในหลายๆโรคที่มีความเกี่ยวข้องกับ oxidative stress เช่น โรคมะเร็ง, โรคหลอดเลือดหัวใจ และโรคที่มีการทำลายของระบบประสาท เป็นต้น โดยแหล่งที่สำคัญของสาร polyphenol จะพบเป็นส่วนใหญ่ในผักและผลไม้ โดยสามารถแบ่ง polyphenol ออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ อันได้แก่ phenolic acids, flavonoids, stilbenes และ lignans ซึ่งในการวิจัยนี้สารโพลีฟีนอลจะหมายถึงความถึงสารโพลีฟีนอลโดยรวม (Total Polyphenol) โดยสารโพลีฟีนอลที่พบมากในแอปเปิ้ลจะอยู่ในกลุ่มของ phenolic acids และ flavonoids เป็นส่วนใหญ่

1. Phenolic acids : แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ
 - 1.1. Hydroxybenzoic acid : ได้แก่ gallic acid นอกจากนี้ hydroxybenzoic acid ยังเป็นส่วนประกอบของสารที่มีโครงสร้างซับซ้อนขึ้นไปอีกเช่น hydrolyzable tannin
 - 1.2. Hydroxycinnamic acid : สามารถแบ่งออกเป็น free form (เช่น p-coumaric, caffeic, ferulic และ sinapic acid) กับ bound form (เช่น quinic acid, shikimic acid และ tartaric acid) โดยเมื่อ caffeic เกิดการรวมกันกับ quinic acid จะเกิดเป็น chlorogenic acid ซึ่งเป็นสารที่พบมากในผลไม้ โดย hydroxycinnamic acid จะเป็นสารในกลุ่มของ phenolic acid ที่พบมากในแอปเปิ้ล

2. Flavonoid : สามารถแบ่งออกได้เป็น 6 subclasses ด้วยกันคือ
 - 2.1 Flavonols : ได้แก่ quercetin และ kaempferol เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังมี myricetin อยู่ในกลุ่มของ flavonols ด้วย
 - 2.2 Flavones : ได้แก่ apigenin และ luteolin
 - 2.3 Isoflavones : ได้แก่ daidzein , genistein และ glycitein
 - 2.4 Flavanones : ได้แก่ hesperetin, naringenin และ eriodictyol
 - 2.5 Anthocyanins : ได้แก่ cyanidin, pelargonidin, peonidin, delphinidin และ malvidin
 - 2.6 Flavanols : สามารถแบ่งออกเป็น monomer form (เช่น catechin และ epicatechin) กับ polymer form (เช่น proanthocyanidin)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงผลของสารสกัดจากแอปเปิ้ลที่มีต่อการรุกรานของเซลล์มะเร็ง
2. แอปเปิ้ลเป็นผลไม้ที่สามารถหาได้ทั่วไปตามท้องตลาด และสามารถรับประทานได้ง่าย ดังนั้นถ้าสารสกัดจากแอปเปิ้ลมีความสามารถในการยับยั้งได้จริง จะสามารถนำไปใช้ใน

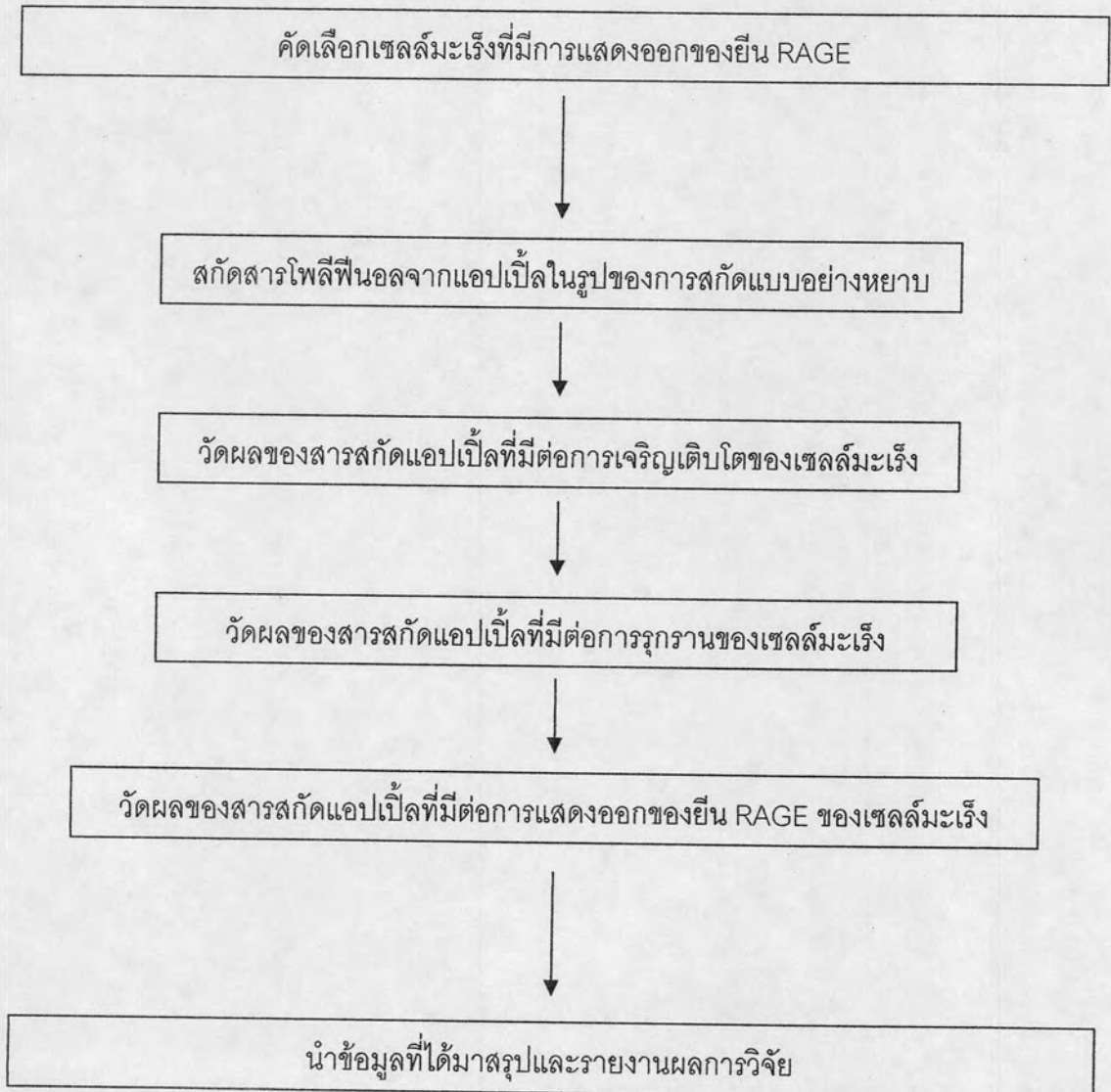
การป้องกันการรุกรานของเซลล์มะเร็งอันเนื่องมาจาก RAGE ได้ ทั้งนี้สารสกัดจากผลไม้ เป็นสารที่มาจากธรรมชาติ จึงไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภคเมื่อเทียบกับยารักษา โรคมะเร็งที่สังเคราะห์ขึ้น

3. เป็นที่ทราบกันว่า RAGE นั้นมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดการรุกรานของเซลล์มะเร็ง จากที่ ผ่านมายังไม่มีการศึกษาใดที่แสดงถึงผลของสารสกัดแอปเปิ้ล ที่มีต่อการรุกรานของ เซลล์มะเร็งอันเนื่องมาจาก RAGE ดังนั้นถ้าพบว่าสารสกัดจากแอปเปิ้ลมีความสามารถ ในการลดการรุกรานของเซลล์มะเร็งจริง จะสามารถนำมาใช้เป็นหนึ่งในแนวทางการ รักษาการรุกราน และนำข้อมูลที่ได้ไปพัฒนาให้เกิดประโยชน์แก่ทั้งทางด้านสาธารณสุข และทางด้านเศรษฐกิจของประเทศต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

ในขั้นแรกของการทดลอง จะเป็นขั้นตอนในเรื่องของการคัดเลือกเซลล์มะเร็งเพื่อหา เซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของยีน RAGE ด้วยเทคนิค RT-PCR จากนั้นทำการสกัดแอปเปิ้ลด้วย 100% เมธานอล นำสารสกัดอย่างหยาบที่ได้ไปทำการวัดเพื่อหาค่าโพลีฟีนอลโดยรวม ตาม หลักการของ Folin-Ciocalteu เมื่อได้สารสกัดจากแอปเปิ้ลตามที่ต้องการแล้ว นำสารสกัดที่ได้ไป บ่มกับเซลล์มะเร็งที่ได้รับการคัดเลือกว่ามีการแสดงออกของยีน RAGE เพื่อวัดการเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็งด้วยน้ำยา MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)- 2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt) จากบริษัท Promega เพื่อหาค่า IC_{50} (Inhibitory Concentration at 50%) จากนั้นนำค่า IC_{50} ที่ได้มาเป็นแนวทางในการทดลองผลของสารสกัดจาก แอปเปิ้ลที่มีต่อการรุกรานของเซลล์มะเร็ง ซึ่งในการทดลองนี้จะใช้หลักการของ Matrigel invasion assay ด้วยชุดทดสอบจากบริษัท Beckton-Dickinson เมื่อได้ค่าความเข้มข้นของสารสกัดจาก แอปเปิ้ลที่สามารถยับยั้งการรุกรานของเซลล์มะเร็งได้ครั้งหนึ่งแล้วให้นำค่าความเข้มข้นนั้นมาบ่ม กับเซลล์มะเร็งเพื่อวัดการแสดงออกของยีน RAGE บนเซลล์มะเร็งด้วยวิธี RT-PCR ซึ่งทุกการ ทดลองจะต้องทำควบคู่ไปกับกลุ่มควบคุมด้วย

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย



ภาพที่ 1 : แผนผังลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย