บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยระบบยีสต์นี้ เป็นระบบคัดกรองเชิงบวก กล่าวคือ ลักษณะของผลบวกจะมีการเจริญของเซลล์บ่งชี้ได้ ซึ่งต่างจากหลักการทั่วไปๆที่ใช้หลักการยับยั้งการเจริญของเซลล์บ่งชี้ ดังนั้นระบบคัดกรองเชิงบวกนี้จะเป็นการเพิ่มโอกาสที่จะพบสารใหม่ๆ หรือทราบฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ของสารที่เคยมีการค้นพบมาแล้ว และเนื่องจากระบบยีสต์นี้เป็นระบบคัดกรองเชิงบวกทำให้สารที่คัดกรองออกมาสามารถที่จะแยกฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic effect) ออกจากฤทธิ์ทางชีวภาพได้ รวมทั้งสารที่ได้นี้จะมีความจำเพาะต่อโมเลกุลเป้าหมายสูง เนื่องจากสามารถยับยั้งโมเลกุลเป้าหมายใดเป้าหมายหนึ่งในวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียม

การคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดอย่างหยาบของพืชทั้งหมด 141 ตัวอย่างโดยระบบคัดกรองยีสต์ พบสารสกัดอย่างหยาบที่ให้ผลบวก 2 ตัวอย่าง คือสารสกัดอย่างหยาบจากกระชายเหลือง *Boesenbergia pandurata* และฟ้าทลายโจร *Andrographis paniculata* และพบว่าลักษณะของผลบวกของสารสกัดอย่างหยาบจากกระชายเหลือง ทำให้เซลล์บ่งชี้ คือ ยีสต์สายพันธุ์กลาย *Δzds1* มีการเจริญเป็นลักษณะวงแหวน แสดงให้เห็นว่าในส่วนสกัดอย่างหยาบของกระชายเหลือง อาจจะประกอบไปด้วยสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ยีสต์โดยตรง และสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่ให้ผลการทดสอบบวก หรืออาจเป็นสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่เป็นพิษต่อเซลล์เมื่อใช้ในปริมาณสูง ซึ่งจะสามารถยืนยันเหตุผลดังกล่าวจากสารออกฤทธิ์บริสุทธิ์ที่แยกได้ต่อไป

เนื่องจากข้อมูลทางเคมีพบว่ากระชายเหลืองสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ง่ายกว่าและเก็บรวบรวมวัตถุดิบได้ง่ายกว่า ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้ได้เลือกทำการศึกษาสารสกัดจากกระชายเหลืองในการศึกษาขั้นตอนต่อไป สารสกัดอย่างหยาบจากกระชายเหลืองถูกนำมาทำการแยกให้เป็นส่วนย่อยและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีและการตกผลึก ทำการติดตามการออกฤทธิ์ของสารที่แยกได้จากแต่ละส่วนย่อยโดยใช้ระบบยีสต์ พบสารบริสุทธิ์ 3 ชนิดที่ให้ผลบวกในระบบยีสต์ คือ pinostrobin, alpinetin และ pinocembrin chalcone (รูปที่ 4.2) (นางสาวสายพิน บุญเกิด ยังไม่ได้ตีพิมพ์) pinostrobin มีระดับของแอกติวิตีมากที่สุดในระบบยีสต์(ตารางที่ 4.2) สารบริสุทธิ์ทั้ง 3 ชนิดนี้ทำให้เซลล์บ่งชี้ *Δzds1* มีลักษณะการเจริญแบบวงแหวน (รูปที่ 4.3) สามารถอธิบายลักษณะการเจริญแบบวงแหวนจากผลของสารบริสุทธิ์ได้ว่าสารออกฤทธิ์ชีวภาพมีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้นสูงทำให้เซลล์ตาย แต่ที่ความเข้มข้นต่ำลงมาเซลล์สามารถเจริญได้(ตาราง 4.2) ได้มีงานวิจัยที่ศึกษาถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ทั้ง 3 ชนิดดังนี้

Li และ Du (2004) พบว่า alpinetin มีฤทธิ์ป้องกัน (protective effect) vascular smooth muscle cells (VSMC) จาก H_2O_2 โดยการลดการรั่วของ lactate dehydrogenase ซึ่งเกิดจากการกระตุ้นของ H_2O_2 ได้อย่างมีนัยสำคัญ และ alpinetin ที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์สามารถยับยั้งการเกิด migration ของ VSMC รวมทั้งยับยั้งการสร้าง Nitric oxide ที่เกิดจากการกระตุ้นของ TNF∝ ได้

Jantan และคณะ (2004) รายงานว่า alpinetin ที่แยกได้จากกระชายเหลืองมีฤทธิ์ต่อต้านการทำงานของ platelet-activating factor (PAF) ซึ่งควบคุมการทำงานของกระบวนการอักเสบภูมิแพ้ และเกล็ดเลือดผ่านเม็ดเลือดขาว leucocyte โดยมีค่า IC_{50} คือ 41.6 ไมโครโมลาร์

Lo´pez และคณะ (2002) รายงานว่า pinocembrin chalcone ที่แยกได้จาก *Piper lanceaefolium* มีฤทธิ์ต่อต้านการเจริญของ *Candida albicans* ที่ความเข้มข้นน้อยที่สุดคือ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Wu และคณะ (2001) รายงานว่า pinostrobin สามารถยับยั้งเอนไซม์ Cyclooxygenase (COX) I และ COX II ในหลอดทดลองได้โดยเอนไซม์ COX I/II เป็นเอนไซม์ที่เป็นส่วนหนึ่งของวิถีการสร้าง prostaglandin ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการเกิดกระบวนการอักเสบ

Bharmapravati และคณะ (2003) รายงานว่า pinostrobin มีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* ซึ่งปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่าเป็นสาเหตุของโรคกระเพาะอาหาร

Trakoontivakorn และคณะ (2001) รายงานว่า pinostrobin มีฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ (antimutagenic) จากสาร 3-amino-1-methyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-2) and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) โดยมีค่า IC_{50} คือ 5.3±1.0 ไมโครโมลาร์

Fahey และคณะ (2002) ศึกษาความสามารถของสารสกัดจากพืชในการเหนี่ยวนำเอนไซม์ที่ใช้กำจัดสารพิษ (phase 2 detoxification enzyme) ในมะเร็งตับของหนู พบว่า pinostrobin สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ quinone reductase ที่ใช้กำจัดสารพิษในตับได้

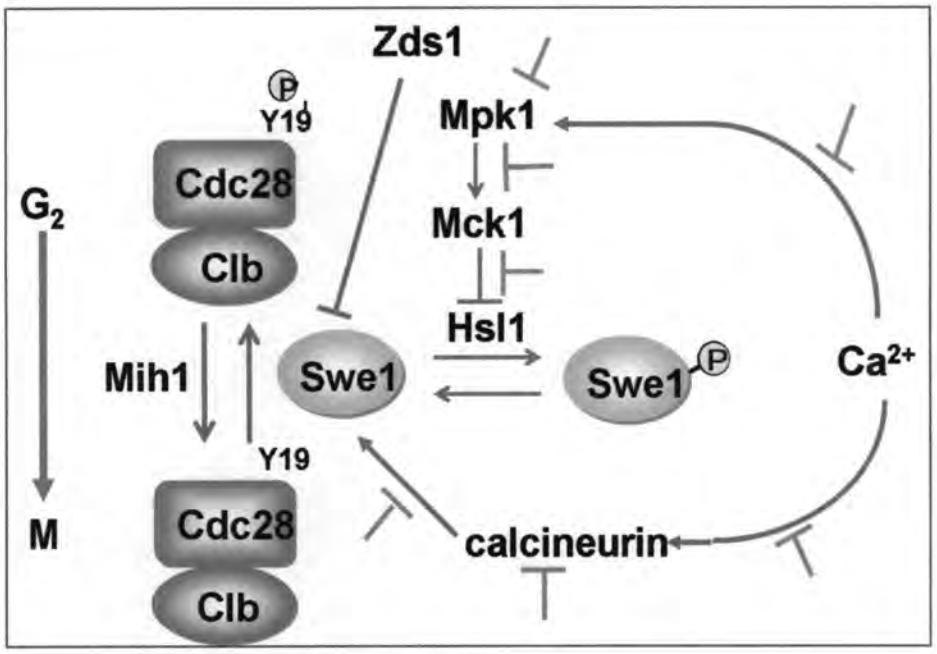
Smolarz และคณะ (2006) คัดกรองหาสารสกัดจากพืชที่มีฤทธิ์ต่อต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาวในมนุษย์ พบว่า pinostrobin มีฤทธิ์ทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Jurkat และ HL-60) มีการตายแบบอะพอพโทสิส (apoptosis) โดยมีการตายเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของ pinostrobin โดยพบว่าที่ 10 นาโนโมลาร์ ทำให้เซลล์ตาย 25-60% ที่ 100 นาโนโมลาร์ทำให้เซลล์ตาย 45-76% และที่ 1 ไมโครโมลาร์ทำให้เซลล์ตาย 70-88% ตามลำดับ

Ashidi และคณะ (2007) ทดสอบฤทธิ์pinostrobinในมะเร็งเม็ดเลือดขาวในมนุษย์ (CCRF-CEM) พบว่าสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของมะเร็งเม็ดเลือดขาว และยังทำให้เกิด reactive

oxygen species (ROS) ที่ไปทำลายเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียที่มีบทบาทสำคัญในการตายแบบอะพอพโทสิส

เนื่องจาก alpinetin และ pinocembrin chalcone มีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงเมื่ออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (ข้อมูลไม่ได้แสดง) ทำให้เป็นอุปสรรคในการศึกษาถึงลักษณะสมบัติเบื้องต้นเมื่อต้องศึกษาฤทธิ์ของสารในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ดังนั้นจึงเลือก pinostrobin ที่มีระดับความแรงของแอคติวิตีมากที่สุดและมีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยเมื่ออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว อีกทั้งในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ยังได้ % yield (นางสาวสายพิณ บุญเกิด ยังไม่ได้ตีพิมพ์) มากกว่าอีก 2 ชนิด ดังนั้นจึงเลือกเฉพาะ pinostrobin มาศึกษาถึงลักษณะสมบัติเบื้องต้นในการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในการศึกษาขั้นต่อไป

จากผลการทดลองข้อ 4.3 พบว่าฤทธิ์การยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมของ pinostrobin ที่แยกได้จากระบบยีสต์ข้างต้นถูกยืนยันด้วยการศึกษาระยะการแบ่งเซลล์โดย Flow cytometry และการย้อมสีดีเอ็นเอในนิวเคลียสด้วยสี Hoechst 33342 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานของการแตกหน่อของยีสต์ Δ*zds1* พบว่า pinostrobin ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ สามารถป้องกันการเกิดการชะลอระยะการแบ่งเซลล์อยู่ที่ระยะ G2 ได้และการแตกหน่อที่ผิดปกติอันมีสาเหตุมาจากวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์สายพันธุ์กลายΔ*zds1*ได้ ดังรูปที่ 4.8 - 4.10 เมื่อยืนยันผลแล้วว่า pinostrobin สามารถยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมได้ แต่ยังไม่ทราบว่า pinostrobin ออกฤทธิ์ยับยั้งที่ตำแหน่งใดของวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียม การทราบว่า pinostrobin สามารถยับยั้งที่ช่วงหรือโมเลกุลเป้าหมายใดของวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมจะช่วยให้สามารถทราบหรือคาดเดาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารได้ อย่างเช่น การออกฤทธิ์ต้านอักเสบ ต้านมะเร็ง เป็นต้น(ตารางที่ 2.2) ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงได้ทำการศึกษาหาเป้าหมายของการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมโดย pinostrobin ว่าอยู่ที่ช่วงหรือโมเลกุลเป้าหมายใดในวิถีดังรูป 5.1



รูปที่ 5.1 วิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมโดย ⊢ แทนเป้าหมายของการยับยั้งวิถีของ pinostrobin ที่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้

ผลจากการทดลองในข้อ 4.4.1 พบว่า pinostrobin ไม่สามารถลดแอคติวิตีของเอนไซม์ ß-Galactosidase ที่ถูกกระตุ้นโดยระดับของแคลเซียมอิสระได้ (ตารางที่ 4.3) แสดงว่า pinostrobin ออกฤทธิ์ยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในช่วงหรือโมเลกุลเป้าหมายอื่นที่ไม่ใช่ในขั้นของการควบคุมระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์

จากนั้นจึงมาทำการศึกษาถึงผลของ pinostrobin ในการยับยั้งการทำงานของโมเลกุลเป้าหมาย Calcineurin หรือ Mpk1 โดยใช้ยีสต์สายพันธุ์กลาย Δ*cnb1*หรือ Δ*mpk1* จากผลการทดลองพบว่า pinostrobin ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของทั้งสองสายพันธุ์ได้ (รูปที่ 4.12) แสดงว่า pinostrobin ไม่ได้มีเป้าหมายอยู่ที่การยับยั้งโมเลกุลของ Calcineurin หรือ Mpk1

ต่อมาจึงทำการศึกษาถึงการออกฤทธิ์ของ pinostrobin ในช่วง downstream จาก Calcineurin, Mpk1 หรือ Mck1 และโดยการทำให้มีการแสดงออกมากเกินของทั้งสามยีนในยีสต์สายพันธุ์กลาย Δ*zds1* พบว่า pinostrobin สามารถป้องกันการเกิดการแตกหน่อที่ผิดปกติและการเกิดการชะลอระยะการแบ่งเซลล์อยู่ที่ระยะ G2 (รูปที่ 4.13 และรูปที่ 4.14) ได้แสดงว่า pinostrobin สามารถยับยั้งการส่งสัญญาณจากทั้ง Calcineurin, Mpk1 และ Mck1 โดยจะไปยับยั้งที่เป้าหมายที่ถูกกระตุ้นจากโปรตีนทั้งสามร่วมกัน ดังนั้นเป้าหมายของ pinostrobin ควรจะเป็นเป้าหมายที่นอกเหนือจาก downstream จากแต่ละโปรตีนดังกล่าวข้างต้น ดังนั้นโปรตีนเป้าหมายของ pinostrobin อาจอยู่ที่โปรตีน Hsl1 หรือ Mih1 หรือการยับยั้งการทำงานของโปรตีน Swe1 ซึ่งจะสามารถป้องกันการเกิดการแตกหน่อที่ผิดปกติและการเกิดการชะลอระยะการแบ่ง

เซลล์อยู่ที่ระยะ G2 ซึ่งเป็นผลมาจากการทำให้มีการแสดงออกมากเกินของ Calcineurin, Mpk1 หรือ Mck1 ได้ ในการศึกษาต่อไปน่าจะได้ศึกษาถึงบทบาทของ pinostrobin ต่อโปรตีนเป้าหมาย Hsl1 Mih1 หรือ Swe1 ต่อไปในอนาคต

จากรายงานที่ผ่านมาพบว่า pinostrobin มีการค้นพบฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เช่น ฤทธิ์ต้านอักเสบ (Wu และคณะ, 2001) ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Bharmapravati และคณะ, 2003) หรือฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Ashidi และคณะ, 2007, Smolarz และคณะ, 2006) การทราบถึงโมเลกุลเป้าหมายเบื้องต้นของ pinostrobin ในวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมจะช่วยให้สามารถคาดคะเนหรือเป็นพื้นฐานในการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ของ pinostrobin ที่ละเอียดยิ่งขึ้นได้ต่อไป อย่างเช่น โปรตีนเป้าหมายอื่นๆที่เป็นไปได้ คือ เป้าหมายของ pinostrobin นั้นอาจจะเป็น Mih1 ซึ่งเป็นโปรตีนฟอสฟาเทส (phosphatase) ส่วน Hsl1 และ Swe1 เป็นโปรตีนไคเนสตามลำดับ และได้มีรายงานว่าการเกิดความผิดปกติของโปรตีนไคเนสหลายๆชนิดมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดมะเร็ง (Hughes, 2002) ซึ่งผลจากรายงายนี้สอดคล้องกับรายงานดังที่กล่าวไว้ข้างต้นที่พบว่า pinostrobin มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งหลายชนิด ดังนั้นเมื่อทราบว่าเป้าหมายของ pinostrobin คือโปรตีนตัวใดจะสามารถเป็นพื้นฐานในการหากลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งต้านเซลล์มะเร็งซึ่งอาจจะนำไปสู่การพัฒนาเป็นยารักษาโรคมะเร็งบางชนิดได้ต่อไป เป้าหมายของpinostrobin ในวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมคือการควบคุมการทำงานของโปรตีนฟอสฟาเทสหรือไคเนสดังกล่าวนั้นอาจจะไม่สอดคล้องหรือสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอักเสบ เนื่องจาก pinostrobin ไม่ได้ควบคุมการทำงานของโปรตีนฟอสฟาเทสหรือไคเนสนั้นโดยตรง แต่ควบคุมทางอ้อมผ่านทางโปตีนเป้าหมายตัวอื่นๆซึ่งอาจจะเกี่ยวของกับกระบวนการอักเสบในมนุษย์ อีกความเป็นไปได้หนึ่งก็คือ pinostrobin มีโปรตีนเป้าหมายมากกว่า 1 ชนิด ดังนั้นการหาโปรตีนเป้าหมายโดยตรงของ pinostrobin จึงเป็นงานที่น่าจะมีการศึกษาต่อไป หากทราบถึงโปรตีนเป้าหมายโดยตรงแล้ว นอกจากข้อมูลดังกล่าวจะทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอักเสบและฤทธิ์ต้านมะเร็งแล้วจะยังเป็นการเพิ่มองค์ความรู้เกี่ยวกับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมอีกในยีสต์ด้วย การหาโมเลกุลเป้าหมายของ pinostrobin สามารถทำได้โดย วิธีการทางชีวเคมี เช่น photo-crosslinking และRadiolabeled ligand binding และ Affinity chromatography (Backer และคณะ, 2004) หรือวิธีที่ใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมโคลนนิ่ง cDNA library เช่นวิธี yeast three-hybrid (Backer และคณะ, 2004) วิธี Phase display(Tanaka และคณะ, 1999) วิธี Drug western (Licitrac และคณะ, 1996) และ การแสดงออก cDNA library เพื่อหาโคลนที่กดลักษณะการดื้อต่อยาของยีสต์ที่เกิดการกลายพันธุ์เป็นสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา (Kobayashi และคณะ, 2006) เป็นต้น

งานวิจัยครั้งนี้ใช้ระบบคัดกรองที่เป็นยีสต์สายพันธุ์กลายทำหน้าที่เป็นเซลล์บ่งชี้เพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมจากพืช ซึ่งเป็นวิธีการคัดกรองวิธีใหม่ซึ่งใช้หลักการแตกต่างออกไปจากเดิม แม้ว่าพืชหรือสารบริสุทธิ์ที่คัดกรองมาได้ เช่น pinostrobin นั้นจะมีการค้นพบและรายงานถึงฤทธิ์ทางชีวภาพบ้างแล้ว แต่ยังไม่มีงานวิจัยใดที่ศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ที่แน่ชัดของสารเหล่านั้น ฉะนั้นการศึกษาหาโมเลกุลเป้าหมายเบื้องต้นในยีสต์ในงานวิจัยนี้จะเป็นองค์ความรู้พื้นฐานที่จะนำไปสู่การเข้าใจถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารดังกล่าวได้ต่อไป