

กลไกการออกฤทธิ์ของสารประกอบคูมารินจากสองฟ้าแดง *Clausena harmandiana* (Pierre)
ในการยับยั้งวิถีการสังเคราะห์ของแคลเซียมในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

นางสาวปิติปริญา เสืออ่วม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

ACTIVITY MECHANISM OF A COUMARIN COMPOUND FROM *Clausena harmandiana*
(Pierre) ON INHIBITION OF CALCIUM SIGNALING PATHWAY
IN *Saccharomyces cerevisiae*

Miss Pitipreya Suauam

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	กลไกการออกฤทธิ์ของสารประกอบคูมารินจากส่งฟ้า ดง <i>Clausena harmandiana</i> (Pierre) ในการยับยั้งวิถี การสังเคราะห์ของแคลเซียมในยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
โดย	นางสาวปิติปริญา เสืออ่วม
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุติ ยมภักดี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธีนิยวัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุติ ยมภักดี)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญเอก ยิ่งยงณรงค์กุล)

ปิติปริญา เลือ่อ่วม : กลไกการออกฤทธิ์ของสารประกอบคูมารินจากสองฟ้าดง
Clausena harmandiana (Pierre) ในการยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียม
 ในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*. (ACTIVITY MECHANISM OF A COUMARIN
 COMPOUND FROM *Clausena harmandiana* (Pierre) ON INHIBITION OF
 CALCIUM SIGNALING PATHWAY IN *Saccharomyces cerevisiae*) อ.ที่ปรึกษา
 วิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร.ชูลี ยมภักดี, 106 หน้า.

วิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงควบคุมกระบวนการทางชีวภาพที่สำคัญ
 หลากหลายกระบวนการ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมได้ อาจนำไปพัฒนา
 เป็นยารักษาโรคต่างๆ ได้ อาทิ ยากดภูมิคุ้มกันและยาต้านมะเร็ง ในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*
 สายพันธุ์กลายที่ขาดยีน *ZDS1* ($\Delta zds1$) พบว่าการกระตุ้นสัญญาณของแคลเซียมที่มากเกินไปก่อให้เกิดความ
 ผิดปกติอย่างรุนแรงในการเจริญของเซลล์ ซึ่งเป็นผลมาจากการยับยั้งกระบวนการแบ่งเซลล์ที่ระยะ G2
 การค้นพบดังกล่าวได้ถูกนำไปใช้ประยุกต์สำหรับการคัดกรองที่มีผลสัมฤทธิ์สูง เพื่อหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งวิธีการ
 ส่งสัญญาณของแคลเซียมที่มีต่อการควบคุมการแบ่งเซลล์ยีสต์ งานวิจัยก่อนหน้าได้ใช้ระบบคัดกรองดังกล่าว
 เพื่อคัดกรองหาสารออกฤทธิ์จากสารสกัดสมุนไพรไทย และพบว่าส่วนสกัดหยาดจากสองฟ้าดงสามารถยับยั้ง
 วิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ ได้ สำหรับงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหา
 โมเลกุลเป้าหมายของการออกฤทธิ์ของสารประกอบคูมารินที่สกัดได้จากส่วนสกัดหยาดของสองฟ้าดงในวิธีการ
 ส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์ จากการทดลองโดยใช้วิธีทางพันธุศาสตร์ของยีสต์พบว่าโมเลกุลเป้าหมายของ
 สารประกอบคูมารินในยีสต์คือ calcineurin โดยพบว่าสามารถช่วยฟื้นความบกพร่องในการเจริญของเซลล์ยีสต์
 อันเนื่องมาจากสัญญาณกระตุ้น calcineurin ที่มากเกินไป calcineurin เป็นโมเลกุลที่มีการอนุรักษ์จากยีสต์
 สู่มนุษย์ ซึ่งเป็นเอนไซม์ฟอสฟาเฟสที่มีบทบาทสำคัญหนึ่งในกระบวนการกระตุ้นการแบ่งเซลล์และการหลั่ง
 ไซโตไคน์ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T-lymphocyte เมื่อศึกษาผลของสารประกอบคูมารินดังกล่าวในเซลล์ไลน์
 มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Jurkat พบว่าสารประกอบคูมารินไม่มีความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน เมื่อศึกษาผลของ
 สารประกอบคูมารินต่อโมเลกุลเป้าหมาย NFAT ซึ่งเป็นโมเลกุลปลายทางที่ต่อจาก calcineurin โดยวิธี
 เวสเทิร์นบลอตพบว่าสารประกอบคูมารินมีผลยับยั้งการเกิด NFAT dephosphorylation โดยส่งผลให้เกิดการ
 ยับยั้งการผลิต IL-2 ได้ตั้งแต่ระดับการถอดรหัสของยีน ดังนั้นสารประกอบคูมารินที่ได้จึงมีศักยภาพนำไปพัฒนา
 เป็นยากดภูมิคุ้มกันได้ต่อไป

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....
 สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ปีการศึกษา 2554.....

5272421023 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS : YEAST / Ca^{2+} -SIGNALING / COUMARIN COMPOUND / *Clausena harmandiana* (Pierre) / IMMUNOSUPPRESSANT

PITIPREYA SUAUAM : ACTIVITY MECHANISM OF A COUMARIN COMPOUND FROM *Clausena harmandiana* (Pierre) ON INHIBITION OF CALCIUM SIGNALING PATHWAY IN *Saccharomyces cerevisiae*. ADVISOR : ASST. PROF. CHULEE YOMPAKDEE, Ph.D., 106 pp.

In higher eukaryotes, calcium (Ca^{2+}) signaling pathway plays the important roles in diverse biological processes. The inhibitors of Ca^{2+} -signals lead to various drugs development such as immunosuppressive drugs and anti-cancer drugs. Hyperactivation of Ca^{2+} -signals in a *zds1*-null *Saccharomyces cerevisiae* strain causes a severe growth defect through the inhibition of the cell-cycle engine in G2 phase. According to such findings, a novel high throughput drug screening system to search for small-molecule inhibitors of the Ca^{2+} -dependent cell-cycle regulation was developed. Upon screening of Thai medicinal plant extracts, the crude extract from *Clausena harmandiana* (Pierre) showed Ca^{2+} -signals inhibition in the $\Delta zds1$ yeast strain. The aim of this study was to determine the molecule target affected by the coumarin compound from this plant extract as an inhibitor of Ca^{2+} -signals in yeast. Yeast genetics studies showed that calcineurin is the molecular target of the coumarin compound. It was found that the coumarin compound could suppress the growth defect caused by genetic hyperactivation of calcineurin. Calcineurin is conserved from yeast to human, a phosphatase play an important role in T-lymphocyte activation and cytokine secretion. In T-lymphocyte activation, calcineurin is important in regulation of NFAT dephosphorylation and Interleukin-2 (IL-2) production in human. The effect of the coumarin compound on proliferation of Jurkat cell line was evaluated and no acute toxicity of the coumarin compound was observed. Western blot analysis indicated that the inhibitory effect of the coumarin compound resulted from NFAT dephosphorylation, which led to suppression of IL-2 gene transcription and as a result, inhibition of IL-2 production. The results obtained from this study emphasize the potential development of the coumarin compound as immunosuppressant.

Department :Microbiology.....Student's Signature.....

Field of Study :Industrial Microbiology.....Advisor's Signature.....

Academic Year :2011.....

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการทำวิจัยจากทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุน
รัชดาภิเษกสมโภช รุ่นที่ 16 ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทูลี ยมภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่
กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ในทุกขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนตรวจ
แก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ ที่กรุณาให้
ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็น รวมทั้งให้ใช้วัสดุอุปกรณ์ สายพันธุ์เซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์
และรับเป็นกรรมการภายในในการสอบวิทยานิพนธ์ และกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์
ดร.บุญเอก ยิ่งยงณรงค์กุลที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็น รวมทั้งช่วยสกัดสารบริสุทธิ์
ด้วยวิธีการทางเคมี รวมทั้งกรุณารับเป็นกรรมการจากภายนอกในการสอบวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการ
สอบวิทยานิพนธ์ กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่กรุณารับเป็น
กรรมการภายในในการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย ตลอดจนช่วย
ตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น และกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชา
จุลชีววิทยาที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

กราบขอบพระคุณ Prof. Tokichi Miyakawa Department of Molecular Biotchnology,
Graduate School for Advanced Science and Matter, Hiroshima University Japan ที่กรุณา
ให้สายพันธุ์ยีสต์ต่างๆ ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ รวมทั้งให้ความรู้ และคำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย

ทั้งนี้ขอขอบคุณสมาชิกทุกคนในห้องปฏิบัติการห้อง 452 และ 403 ตลอดจนเจ้าหน้าที่ใน
ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน สำหรับทุกความห่วงใยและความช่วยเหลือที่มีให้ตลอดมา

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวของผู้วิจัยเป็นอย่างมาก
ที่มีความห่วงใยและให้การสนับสนุนช่วยเหลือ รวมทั้งเป็นกำลังใจให้ผู้วิจัยตลอดมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.3 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
1.5 วิธีดำเนินการวิจัย.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 อุตสาหกรรมยาและสมุนไพรในประเทศไทย.....	6
2.2 ฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรไทย.....	8
2.3 การคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	11
2.4 การทดสอบที่ใช่ยีสต์เพื่อค้นหาสายชนิดใหม่ๆ.....	12
2.5 วิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียม.....	14
2.6 ยากดภูมิคุ้มกัน.....	17
2.7 สมุนไพรสองฟ้าแดง.....	21
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	24
3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	24
3.2 เคมีภัณฑ์.....	26
3.3 ยีสต์.....	29
3.4 เซลล์ไล่นมะเร็งของมนุษย์.....	29
3.5 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรมเมอร์.....	30

	หน้า
3.6 แอนติบอดีที่ใช้ในการทำเวสเทิร์นบลอต.....	30
3.7 การเก็บตัวอย่างส่องฟ้าแดง.....	31
3.8 การแยกเป็นส่วนย่อยและทำให้บริสุทธิ์ของสารสกัดหยาบส่องฟ้าแดง.....	31
3.9 การทำละลายสารประกอบคูมาริน.....	32
3.10 การศึกษาผลของสารประกอบคูมารินในการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียม ในยีสต์.....	32
3.11 การศึกษาหาโมเลกุลเป้าหมายของสารประกอบคูมารินในวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์.....	33
3.12 การศึกษาผลของสารประกอบคูมารินต่อโมเลกุลเป้าหมายในยีสต์ โดยวิธีทางพันธุศาสตร์ของยีสต์.....	36
3.13 การศึกษาผลของสารประกอบคูมารินต่อการทำงานของ calcineurin แบบ <i>in vitro</i>	38
3.14 การศึกษาผลของสารประกอบคูมารินต่อโมเลกุลเป้าหมายในเซลล์มนุษย์... 38	38
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	47
4.1 ผลการแยกเป็นส่วนย่อยและทำให้บริสุทธิ์ของสารสกัดหยาบส่องฟ้าแดง.....	47
4.2 ผลของสารประกอบคูมารินต่อวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์.....	48
4.3 ผลของสารประกอบคูมารินต่อระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ยีสต์.....	49
4.4 ผลของสารประกอบคูมารินต่อโปรตีน Mpk1 และ calcineurin ในเซลล์ยีสต์..	51
4.5 ผลของสารประกอบคูมารินต่อโมเลกุลเป้าหมาย calcineurin ในเซลล์ยีสต์...	54
4.6 ผลของสารประกอบคูมารินต่อการทำงานของ calcineurin แบบ <i>in vitro</i>	58
4.7 ผลของสารประกอบคูมารินต่อโมเลกุลเป้าหมายในเซลล์มนุษย์.....	59
บทที่ 5 อภิปรายผล ข้อเสนอแนะ และสรุปผลการวิจัย.....	69
รายการอ้างอิง.....	78
ภาคผนวก.....	87
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	106

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	รายการสมุนไพรรักษาและฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	10
2.2	ความสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลเป้าหมายกับฤทธิ์ทางชีวภาพในระบบคัดกรองที่ใช้ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ เป็นเซลล์บ่งชี้.....	17
2.3	กลไกการทำงานของยากดภูมิคุ้มกัน.....	19
3.1	สายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้.....	29
3.2	โพลิโนวคลีโอไทด์ไพรมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้.....	30
3.3	แอนติบอดีที่ใช้ในการทำเวสเทิร์นบลอตที่ใช้ในงานวิจัยนี้.....	30
3.4	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (RT-PCR).....	42

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1	14
2.2	20
2.3	23
2.4	23
3.1	34
4.1	47
4.2	48
4.3	50
4.4	52
4.5	53
4.6	55
4.7	57
4.8	59
4.9	60
4.10	61
4.11	63
4.12	65
4.13	67
5.1	72
5.2	74

ภาพที่		หน้า
ค1	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฟอสเฟตและค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 620 นาโนเมตร.....	102
ค2	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนและค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 540 นาโนเมตร.....	103
ค3	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ IL-2 และค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 450 นาโนเมตร.....	104

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์และนักวิจัยจากนานาประเทศต่างเริ่มหันมาศึกษาวิจัยเกี่ยวกับชนิดและสรรพคุณของพืชสมุนไพรในการบรรเทาและรักษาอาการเจ็บป่วยกันมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากยาที่ใช้รักษาโรคกันอยู่ในปัจจุบันยังพบปัญหาหลายประการ เช่น ปัญหาการเกิดผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์ การดื้อต่อยาของเชื้อโรค และการเกิดโรคภัยชนิดใหม่ๆ ที่ไม่ปรากฏในอดีต นอกจากนี้ยังขาดแบบที่นำเข้ามาจากต่างประเทศส่วนใหญ่มักมีราคาแพง เป็นผลให้เกิดการขาดดุลทางด้านการค้าของอุตสาหกรรมยาในประเทศ ดังนั้นการค้นหายาออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่จากสมุนไพรเพื่อนำมาพัฒนาเป็นยาชนิดใหม่นั้น จึงเป็นงานวิจัยที่อยู่ในความสนใจกันทั่วโลก ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าในอนาคตยาแผนโบราณและสมุนไพรจะมีมูลค่าการบริโภคในระดับตลาดโลกสูงมากขึ้น

ในประเทศไทยมีแนวโน้มของผู้ป่วยด้วยโรคที่มีความผิดปกติเกี่ยวกับกลไกของระบบภูมิคุ้มกันเพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะโรคแพ้ภูมิตนเอง หรือ โรคอโต้อิมมูน (Autoimmune Diseases) โดยจากการรายงานข้อมูลตามบัญชีจำแนกโรคระหว่างประเทศ พ.ศ.2548-2552 พบว่าโรคเลือดและความผิดปกติเกี่ยวกับกลไกของระบบภูมิคุ้มกัน เป็นสาเหตุให้มีจำนวนและอัตราการตายของประชากรสูงติด 10 อันดับแรกเมื่อเปรียบเทียบกับสาเหตุการตายอื่นๆ โดยโรคอโต้อิมมูนเป็นโรคที่มีสาเหตุเนื่องมาจากภูมิต้านทานของตนเองที่ผิดปกติ ทำให้มีปฏิกิริยาต่อต้านเนื้อเยื่อของร่างกายตนเอง จนก่อให้เกิดพยาธิสภาพที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย ทั้งจากการทำลายเนื้อเยื่อโดยตรงจากปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันที่ผิดปกติ หรือจากการที่ระบบภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยไปกระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานบางอย่างภายในร่างกายส่งผลให้เกิดความผิดปกติขึ้น โรคอโต้อิมมูนที่พบได้บ่อยก็คือ โรคเอสแอลอี (Systemic lupus erythematosus: SLE) ซึ่งมักเกิดกับหลายๆ อวัยวะ เช่น ผิวหนัง ไต สมอ หัวใจ และปอด เป็นต้น (Vyse และ Todd, 1996) นอกจากนี้ยังมีโรครูมาตอยด์ (Rheumatoid arthritis) ที่เกิดขึ้นได้หลายอวัยวะ เช่น ข้อเล็กๆ ของมือและเท้า (Firestein, 2003) และโรคสะเก็ดเงิน (Psoriasis) ซึ่งมีอาการผิวหนังอักเสบ และอาจมีอาการผิดปกติที่เล็บและข้อต่างๆ ร่วมด้วย (Barker, 1998) เป็นต้น

ยากดภูมิคุ้มกัน เป็นยาที่ถูกนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคอโตอิมมูน และยังถูกนำมาใช้ป้องกันการปฏิเสธอวัยวะในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะจากผู้อื่น ซึ่งผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มนี้จำเป็นต้องได้รับการรักษาโดยการให้ยากดภูมิคุ้มกันอย่างต่อเนื่อง หรืออาจตลอดชีวิต

ปัจจุบันพบข้อจำกัดของยากดภูมิคุ้มกันที่ใช้รักษาผู้ป่วยในปัจจุบันมากมาย ทั้งนี้เนื่องจากการให้ยากดภูมิคุ้มกันรักษาอย่างต่อเนื่อง มักก่อให้เกิดผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์กับผู้ป่วย ได้แก่ อาการพิษต่อระบบประสาท และมีความเป็นพิษต่อไต อีกทั้งยากดภูมิคุ้มกันที่ใช้อยู่ส่วนใหญ่ล้วนเป็นยานำเข้าจากต่างประเทศ จึงมีราคาแพง ทำให้ผู้ป่วยต้องเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะเมื่อต้องใช้ติดต่อกันในระยะยาวด้วย ดังนั้นยากดภูมิคุ้มกันชนิดใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถใช้ได้สะดวก ราคาถูก และที่สำคัญคือไม่มีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย จึงยังคงเป็นที่ต้องการในวงการแพทย์เป็นอย่างมาก ปัจจุบันจึงมีการคิดค้นพัฒนาผลิตภัณฑ์ใหม่ๆ ออกมามากมายอย่างต่อเนื่อง แต่โอกาสในการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ ที่มีกลไกการออกฤทธิ์ที่ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจง หรือมีประสิทธิภาพสูงนั้นหาได้ยาก ทำให้ยาส่วนใหญ่ที่ใช้รักษาในปัจจุบันมักมีราคาแพงมาก

ดังนั้นยากดภูมิคุ้มกันชนิดใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพสูงในการกดภูมิคุ้มกันได้ดี สามารถใช้ได้สะดวก ราคาถูก และที่สำคัญคือไม่มีผลข้างเคียง หรือมีผลข้างเคียงต่ำกว่ายาที่มีใช้อยู่ในปัจจุบัน จึงยังคงเป็นที่ต้องการในวงการการแพทย์ในปัจจุบันเป็นอย่างมาก

ปัจจุบันจึงมีการคิดค้นพัฒนาผลิตภัณฑ์ใหม่ๆ ออกมามากมายอย่างต่อเนื่อง แต่โอกาสในการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ ที่มีกลไกการออกฤทธิ์ที่ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจง หรือมีประสิทธิภาพสูงนั้นหาได้ยาก จึงจำเป็นต้องอาศัยวิธีคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีหลักการแตกต่างไปจากวิธีการทั่วไป ซึ่งระบบการคัดกรองหาสารออกฤทธิ์โดยใช้ยีสต์สายพันธุ์กลายที่ไม่มียีน *ZDS1* ($\Delta zds1$) เป็นเซลล์บ่งชี้ (indicator cell) นับว่าเป็นระบบการคัดกรองที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อเพิ่มโอกาสในการค้นพบสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่และมีความจำเพาะเจาะจงสูง โดยมีหลักการคือ เมื่อเซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลายดังกล่าวถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมสูง ซึ่งเป็นสภาวะที่วิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมถูกกระตุ้น เซลล์จะไม่สามารถเจริญได้ แต่หากมีสารโมเลกุลขนาดเล็กไปยับยั้งที่ส่วนใดส่วนหนึ่งของวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมจะทำให้ยีสต์สายพันธุ์กลายดังกล่าวสามารถเจริญในภาวะที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมสูงได้ตามปกติ โดยวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียม (Ca^{2+} signaling pathway) นับเป็นวิถีการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่สำคัญ และยังมีบทบาทต่อการควบคุม

กระบวนการทางชีวภาพหลากหลายกระบวนการ รวมไปถึงการกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิด T-cell (T-cell activation) ด้วย (Clapham, 1995) ดังนั้น สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียม จึงน่าจะมีฤทธิ์กดภูมิคุ้มกันได้เช่นกัน

จากการคัดกรองโดยการใช้อยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ ดังกล่าวพบว่าส่วนสกัดหยาบของใบส่องฟ้าดงมีสารออกฤทธิ์ที่สามารถยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์ได้ (ณัฐพงศ์ ภักดีใหม่, 2551) โดยสมุนไพรส่องฟ้าดงมีชื่อพื้นเมืองแตกต่างกันไปตามแต่ละท้องถิ่น เช่น ส่องฟ้า เหม็น และสมุยหอ และมีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Clausena harmandiana* (Pierre) พบได้ตามภาคตะวันออก ภาคใต้ และ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ในทางภูมิปัญญาไทย ส่องฟ้าดงมีสรรพคุณใช้เป็นยาสมุนไพรแก้ไข้ ปวดศีรษะ แก้ผดผื่นคัน แก้หูดดอม อักเสบ รวมไปถึงแก้จุกเสียดได้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบคูมารินที่มีอยู่ในส่วนใบของต้นส่องฟ้าดงซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์ โดยการค้นหาโมเลกุลเป้าหมายของสารออกฤทธิ์ดังกล่าวในยีสต์ เนื่องจากความสัมพันธ์ระหว่างยาและโมเลกุลเป้าหมาย (drug target) ทั้งของในยีสต์และในมนุษย์มีความใกล้เคียงกันมาก ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้นอกจากได้องค์ความรู้เกี่ยวกับสรรพคุณทางยาชนิดใหม่ๆ ของสมุนไพรไทยหายากด้วยการยืนยันรับรองประสิทธิภาพด้วยขั้นตอนทางวิทยาศาสตร์ ทั้งนี้จะช่วยให้ยารักษาโรคหรือผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ที่จะพัฒนาขึ้นเป็นที่ยอมรับในระดับสากล อีกทั้งแพทย์และผู้ป่วยมีความมั่นใจในการนำไปใช้ ทั้งนี้จะเป็นการช่วยลดการนำเข้ายาราคาแพงจากต่างประเทศ ทำให้ผู้ป่วยสามารถใช้ยาที่มีราคาถูกลง ทั้งยังเป็นการอนุรักษ์สมุนไพรส่องฟ้าดงที่ใกล้สูญพันธุ์อีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1) ศึกษาลักษณะสมบัติการออกฤทธิ์ของสารประกอบคูมารินจากสารสกัดหยาบของใบส่องฟ้าดงในวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์
- 2) ตรวจสอบโมเลกุลเป้าหมายของสารประกอบคูมารินในวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์ โดยวิธีการทางพันธุศาสตร์ของยีสต์
- 3) ศึกษาลักษณะสมบัติทางชีวเคมีของสารประกอบคูมารินที่มีผลต่อโมเลกุลเป้าหมายในมนุษย์ โดยวิธีการทางชีววิทยาโมเลกุล

1.3 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

วิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียม ด้วยยับยั้ง *Saccharomyces cerevisiae* สองฟ้าดง สารกตุมิคุ้มกัน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลของงานวิจัยนี้จะเป็นทั้งการสร้างองค์ความรู้ใหม่ เกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพในเชิงลึกของสารประกอบคูมารินที่พบในใบสองฟ้าดง นอกจากนี้จะเป็นการอนุรักษ์สมุนไพรหายากแล้ว ยังจะเป็นแนวทางในการพัฒนาสมุนไพรไทยเป็นยาแผนปัจจุบันต่อไป ทั้งนี้เพื่อเป็นการทดแทนอัตรากรนำเข้ายาจากต่างประเทศที่มีราคาแพง

1.5 วิธีดำเนินการวิจัย

- 1) ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์ของสารประกอบคูมาริน
- 2) ทดสอบฤทธิ์ของสารประกอบคูมารินที่มีผลต่อระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ยีสต์
- 3) ทดสอบฤทธิ์ของสารประกอบคูมารินที่มีผลต่อโปรตีน Mpk1 และ calcineurin ในเซลล์ยีสต์
- 4) ศึกษาผลของสารประกอบคูมารินต่อโมเลกุลเป้าหมาย calcineurin ในยีสต์
- 5) ศึกษาผลของสารประกอบคูมารินที่มีต่อโมเลกุลเป้าหมายแบบ *in vitro*
- 6) ศึกษาผลของสารประกอบคูมารินที่มีต่อโมเลกุลเป้าหมายในเซลล์มนุษย์

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี

ปัจจุบันงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนา วิธีการคัดกรองสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (Natural product) เช่นสมุนไพร กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากการใช้ยารักษาโรคในวงการแพทย์เริ่มพบปัญหาสำคัญหลายประการ อาทิ ผลข้างเคียง อันไม่พึงประสงค์ต่อร่างกายผู้ป่วย การดื้อต่อยาของเชื้อก่อโรค ยาในปัจจุบันมีประสิทธิภาพไม่เพียงพอ และการเกิดโรคใหม่ที่ไม่เคยพบในอดีต เป็นต้น เป็นผลทำให้งานวิจัยที่พัฒนาขึ้นมาเพื่อหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่เพื่อพัฒนาเป็นยา ยังคงมีอย่างแพร่หลายและต่อเนื่อง

วิธีการคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยทั่วไป ใช้หลักการที่สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์บ่งชี้ (indicator cell) เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ หรือปรสิตก่อโรคต่างๆ หรือระบบการคัดกรองหาสารออกฤทธิ์อื่นๆ ที่มีการใช้ทั่วไป เนื่องจากวิธีดังกล่าวนี้เป็นที่นิยมใช้กันทั่วไปทำให้มีความเป็นไปได้สูงที่จะพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดเดิมที่ได้มีการค้นพบก่อนหน้านี้แล้ว ดังนั้นการพัฒนาวิธีการคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีหลักการใหม่จะช่วยเพิ่มโอกาสในการพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่ยังอาจไม่ถูกค้นพบโดยวิธีการคัดกรองที่มีอยู่เดิมหรืออาจค้นพบฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่จากสารออกฤทธิ์ที่มีการค้นพบแล้วได้ โดยเฉพาะการใช้ยีสต์เป็นเซลล์บ่งชี้ได้เริ่มมีการวิจัยอย่างหลากหลาย เนื่องจาก *S. cerevisiae* เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวที่ถูกจัดเป็นยูแคริโอตชั้นพื้นฐาน ซึ่งได้ถูกใช้เป็นสิ่งมีชีวิตต้นแบบ (model organism) ในการศึกษากระบวนการทางชีวภาพต่างๆ (biological processes) ในระดับโมเลกุลและระดับเซลล์ เช่น การศึกษากระบวนการควบคุมการแบ่งเซลล์ (regulation of cell cycle) ของยูแคริโอต และของเซลล์มะเร็ง (Botstein และคณะ, 1997; Hartwell, 2002) จึงนับได้ว่าเป็นวิธีการคัดกรองที่มีความจำเพาะต่อโมเลกุลเป้าหมายสูง ทั้งนี้ยังเป็นการเพิ่มโอกาสในการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ ที่ได้จากสมุนไพรเพื่อนำมาพัฒนาเป็นยารักษาโรคต่อไป

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อุตสาหกรรมยาและสมุนไพรในประเทศไทย

ข้อมูลจากรายงานสรุปภาวะเศรษฐกิจอุตสาหกรรมปีพ.ศ. 2553 และแนวโน้มปีพ.ศ. 2554 โดยกระทรวงอุตสาหกรรม พบว่าในปีพ.ศ. 2553 อุตสาหกรรมยาในประเทศไทยมีปริมาณการผลิตยาและผลิตภัณฑ์เภสัชกรรมขยายตัวเพิ่มขึ้นตามยอดคำสั่งซื้อทั้งภายในและต่างประเทศ โดยมีปริมาณ 30,683.8 ตัน ซึ่งเพิ่มขึ้นจากปีก่อนหน้าร้อยละ 9.4 แต่อย่างไรก็ตามในส่วนของมูลค่าการนำเข้ายาจากต่างประเทศนั้นยังคงมีการขยายตัวอย่างต่อเนื่องทั้งยาต้นแบบและยาสามัญ ซึ่งมีมูลค่าถึง 37,911 ล้านบาท โดยเพิ่มขึ้นจากปีก่อนร้อยละ 2.4 ตลาดนำเข้าที่สำคัญ ได้แก่ ประเทศสหรัฐอเมริกา สวิตเซอร์แลนด์ ฝรั่งเศส เยอรมนี และสหราชอาณาจักร แต่เมื่อเปรียบเทียบกับในอดีตพบว่าการนำเข้ายาในปีพ.ศ. 2553 มีอัตราการขยายตัวที่ไม่สูงมากนัก ทั้งนี้เนื่องมาจากทางภาครัฐได้มีการควบคุมการเบิกจ่ายยาและเวชภัณฑ์ ทำให้สถานพยาบาลภาครัฐมีแนวโน้มที่จะใช้ยาสามัญที่ผลิตภายในประเทศมากขึ้น เพื่อลดค่าใช้จ่ายที่ฟุ่มเฟือยลง นอกจากนี้ยังมีการเน้นการส่งออกยาที่ผลิตขึ้นภายในประเทศออกจำหน่ายไปยังประเทศต่างๆ โดยตลาดส่งออกที่สำคัญ ได้แก่ เวียดนาม พม่า กัมพูชา มาเลเซีย และฮ่องกง ซึ่งเป็นผลทำให้มูลค่าการส่งออกยาของประเทศไทยมีการขยายตัวขึ้นเช่นกัน ทั้งนี้มีมูลค่า 6,342.1 ล้านบาท เพิ่มขึ้นจากปีก่อนร้อยละ 13.0

เห็นได้ชัดว่าแนวโน้มของอุตสาหกรรมยาภายในประเทศโดยรวมนั้น ปริมาณการผลิตรวมไปถึงการส่งออกยาและผลิตภัณฑ์เภสัชกรรมมีอัตราการขยายตัวเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ สำหรับด้านการนำเข้ายานั้นมีแนวโน้มการขยายตัวเพิ่มขึ้นในอัตราที่ไม่สูงมาก แต่อย่างไรก็ตามก็ยังทำให้ประเทศไทยยังคงประสบกับปัญหาขาดดุลทางการค้าในด้านการนำเข้ายาต้นแบบจากต่างประเทศ ทำให้ต้องสูญเสียรายจ่ายจำนวนมากให้กับประเทศผู้ผลิตยาต้นแบบ ดังนั้นเพื่อการลดปัญหาการขาดดุลทางการค้าในอุตสาหกรรมยาในปัจจุบัน ทางภาครัฐจึงได้มีนโยบายในการลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศที่มีราคาแพง และที่สำคัญได้มีการส่งเสริมและพัฒนากาใช้สมุนไพรไทยควบคู่ไปกับการรักษาด้วยยาแผนปัจจุบัน จนถึงขั้นการใช้ทดแทนในอนาคต ส่งผลให้อุตสาหกรรมยาแผนโบราณและสมุนไพรเวชภัณฑ์ของประเทศไทยเริ่มมีอัตราการขยายตัวเพิ่มขึ้น โดยการเร่งผลักดันให้เกิดการใช้ยาสมุนไพรภายในประเทศจากทางภาครัฐตามที่ปรากฏในแผนการสนับสนุนการใช้ยาสมุนไพรระดับชาติ เช่น แผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 1 (2504-2509), นโยบายแห่งชาติด้านยา พ.ศ. 2536 และพระราชบัญญัติคุ้มครองและส่งเสริม

ภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย พ.ศ. 2542 เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีประกาศจากกระทรวงสาธารณสุข เรื่องการควบคุมการผลิตยาแผนปัจจุบันตามกฎหมายว่าด้วยยา พ.ศ. 2554 ให้สถานที่ผลิตยาแผนปัจจุบันทุกแห่งปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ GMP (Good Manufacturing Practice) หรือข้อกำหนดขั้นพื้นฐานในการผลิต ควบคุมให้ยามีคุณภาพและได้มาตรฐาน ซึ่งการสนับสนุนด้านการใช้ยาแผนโบราณและสมุนไพรเวชภัณฑ์ โดยนโยบายจากภาครัฐดังกล่าวนี้ นับเป็นแรงกระตุ้นต่อแผนการสนับสนุนการใช้ยาสมุนไพรระดับชาติ ในการเพิ่มการเข้าถึงยาสมุนไพรและสร้างมาตรฐานการผลิตยาที่มีคุณภาพเป็นที่ยอมรับในระดับสากล

การใช้ยาสมุนไพรเป็นการแพทย์ทางเลือก รวมไปถึงการใช้สมุนไพรเพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตยา หรือเป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิตสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ยานั้นกำลังได้รับความสนใจและมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นในหลากหลายประเทศทั่วโลก ทั้งนี้ทางองค์การอนามัยโลก (WHO) ได้กำหนดแผนยุทธศาสตร์เกี่ยวกับศาสตร์การแพทย์ดั้งเดิม ปีพ.ศ. 2545 - 2548 เพื่อใช้เป็นกรอบแนวคิดการวางบทบาทและการส่งเสริมให้บูรณาการการแพทย์ดั้งเดิมไว้ในนโยบายสุขภาพระดับชาติ เน้นคุณภาพ ประสิทธิภาพและความปลอดภัยในการใช้ รวมทั้งการเข้าถึงยาสมุนไพรของผู้รับบริการ โดยเฉพาะในประเทศที่กำลังพัฒนาและด้อยพัฒนา

ทั้งนี้การส่งเสริมการใช้ยาสมุนไพรไทยในประเทศจากการสนับสนุนของทางภาครัฐในปัจจุบันเริ่มมีให้เห็นเป็นรูปธรรมมากขึ้น เช่นการสนับสนุนให้มีการใช้ยาสมุนไพรในโรงพยาบาลอภัยภูเบศร จังหวัดปราจีนบุรี ซึ่งถือเป็นโรงพยาบาลต้นแบบในการใช้สมุนไพรและยาแผนโบราณที่มีประสิทธิภาพ โดยทางโรงพยาบาลมีการใช้สมุนไพรอยู่ 2 รูปแบบ คือ

1. ใช้ยาสมุนไพรทดแทนยาแผนปัจจุบันแบบ 100% ได้แก่ ผลิตภัณฑ์จากพญาขอ (ครีมพญาขอ, กลีเซอรินพญาขอ และเจลพญาขอ) ใช้ทดแทนยา Acyclovir cream ในการรักษาเริม งูสวัด อีสุกอีใส นอกจากนี้ยังมีการใช้สมุนไพรเพชรสังฆาตแคปซูล ซึ่งใช้ทดแทนยา Daflon เพื่อรักษาริดสีดวงทวาร
2. ใช้ยาสมุนไพรร่วมกับยาแผนปัจจุบัน เช่น ยาน้ำแก้ไอมะขามป้อมช่วยบรรเทาอาการไอ ระคายคอ, แคปซูลขมิ้นชันช่วยบรรเทาอาการจุกแน่น, แคปซูลฟ้าทะลายโจรในการรักษาอาการเจ็บคอ เป็นหวัดน้ำมูกไหล และครีมโพลีใช้บรรเทาอาการปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ เป็นต้น

แต่อย่างไรก็ตามปัญหาด้านความเชื่อมั่นเกี่ยวกับยาสมุนไพรและมาตรฐานคุณภาพของยาสมุนไพร ก็นับเป็นปัญหาสำคัญในการส่งเสริมให้แพทย์หันมาเลือกใช้ยาสมุนไพร รักษาผู้ป่วย เนื่องจากแพทย์ส่วนใหญ่ยังคงคุ้นเคยกับการรักษาอาการเจ็บป่วยด้วยยาสังเคราะห์ หรือยาที่นำเข้ามาจากต่างประเทศมากกว่าการใช้ยาสมุนไพรที่ผลิตขึ้นเองภายในประเทศ โดยมีสาเหตุมาจากการขาดความเชื่อมั่นในประสิทธิภาพและความปลอดภัยของยาจากสมุนไพร เนื่องจากยาสมุนไพรส่วนใหญ่ยังคงขาดแคลนข้อมูลทางวิชาการและงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ที่มีความน่าเชื่อถือสนับสนุน ซึ่งเกิดจากการที่งานวิจัยทางด้านสมุนไพรในประเทศมีน้อย มีรูปแบบการวิจัยเป็นแบบกระจัดกระจายและขาดทิศทาง รวมทั้งไม่เน้นการประยุกต์ใช้และส่งเสริมอุตสาหกรรมยาแผนโบราณของประเทศ

2.2 ฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรไทย

เนื่องจากยาที่ใช้รักษาโรคในปัจจุบันกว่าร้อยละ 25 ได้ถูกค้นพบและได้รับการพัฒนามาจากสารสกัดที่ได้จากพืช (Hamburger และ Hostettmann, 1991) นักวิทยาศาสตร์และนักวิจัยจากนานาประเทศจึงต่างเริ่มหันมาศึกษาวิจัยเกี่ยวกับชนิดและสรรพคุณของสมุนไพรในการบรรเทาและรักษาอาการเจ็บป่วยกันมากขึ้น ทั้งนี้เพื่อเป็นการเพิ่มโอกาสในการค้นพบยาชนิดใหม่ๆ เพื่อเป็นการเพิ่มทางเลือกใหม่ในการรักษาโรคในปัจจุบัน

ข้อมูลจากองค์การอนามัยโลก ปี 2003 ระบุว่าประเทศจีนได้เริ่มใช้สมุนไพรเป็นแนวทางหลักในการรักษาโรคทางเดินหายใจรุนแรงแบบเฉียบพลัน (SARS) นอกจากนี้ในประเทศสหรัฐอเมริกาได้เริ่มมีแนวทางการรักษาโรคตับอักเสบเรื้อรังโดยใช้การแพทย์ทางเลือกใหม่หลายแนวทาง และการรักษาโดยใช้สมุนไพรก็เป็นหนึ่งในแนวทางการรักษาโรคดังกล่าวด้วยเช่นกัน (Seeff และคณะ, 2001)

สำหรับผลงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับสมุนไพรนั้นเริ่มมีแพร่หลายมากขึ้น ยกตัวอย่างเช่น ผลงานวิจัยโดย Global Neuroscience Initiative Foundation ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าการใช้สมุนไพรที่สกัดจากพืชไม้ดอก อาทิ ดิ้นมังกร ดอกเสาวรส (Passion flower) สามารถบรรเทาอาการวิตกกังวลและคลายความเครียดได้ (Lakhan และ Vieira, 2010) งานวิจัยเกี่ยวกับการใช้สมุนไพรจากพืชประเภทใบโหระพา (*Tanacetum vulgare*) ซึ่งเชื่อว่ามี

คุณสมบัติต้านไวรัสที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อที่ผิวหนัง ได้แก่ เริม และปากนกกระจอก (Alvarez และคณะ, 2011)

นอกจากนี้ยังมีพืชสมุนไพรไทยอีกหลายชนิดที่มีสรรพคุณหรือมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ คือฤทธิ์ต้านมะเร็งหรือฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาเป็นยารักษาโรคมะเร็งได้ เช่น หญ้าปากกิ้ง หรือ *Murdannia loriformis* (Intiyot และคณะ, 2002), ตะไคร้ หรือ *Cymbopogon citratus* (Vinitketkumnuen และคณะ, 1994) และมะระ หรือ *Mormodica charantia* (Vinitketkumnuen และคณะ, 1996) และยังมีพืชสมุนไพรอีกหลายชนิดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ที่สำคัญ ดังนี้

บัวบก มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Centella asiatica* (Linn.) Urban อยู่ในวงศ์ Umbelliferae เป็นพืชที่พบได้ทั่วไปในแถบเขตร้อน เช่น ประเทศไทย โดยบัวบกมีประสิทธิภาพในการใช้สมานแผลและสามารถนำไปทำยาเพื่อใช้รักษาโรคผิวหนังได้ โดยมีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญประกอบไปด้วยอนุพันธ์ของ triterpene เช่น asiatic acid, asiaticoside, madecassic acid และ madecassoside. (Farnsworth และ Bunyapraphats, 1992)

หญ้าปากกิ้ง มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *M. loriformis* (Hassk.) Rolla Rao et Kammathy อยู่ในวงศ์ Commelinaceae หญ้าปากกิ้งถูกนำมาใช้ในการรักษาอาการปวดจากโรคหลอดเลือดอักเสบและโรคมะเร็งต่างๆ นอกจากนี้สารสกัดจากหญ้าปากกิ้งยังสามารถลดระดับของสาร aflatoxin-albumin ที่ฉีดเข้าไปในหนูได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสาร aflatoxin ดังกล่าวนับเป็นสารก่อมะเร็งที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคมะเร็งตับได้ (Vinitketkumnuen และคณะ, 1999)

ตะไคร้ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *C. citratus* (DC.) Stapf อยู่ในวงศ์ Gramineae ตะไคร้สามารถนำมาใช้รักษาโรคมะเร็งได้ เนื่องจากมีรายงานค้นพบว่า มีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ใน *Salmonella typhimurium* ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสารเคมี (Vinitketkumnuen และคณะ, 1994)

กระเทียม มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Allium sativum* Linn. กระเทียมสามารถลดปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจได้ โดยพบว่ากระเทียมมีสรรพคุณช่วยลดระดับ cholesterol และ triglyceride ในซีรัม และยังสามารถลดการเกิดลิ้มเลือดได้ (Reuter, 1995) นอกจากนี้ยังมีอีกหลายงานวิจัยทั้งในรูปแบบ *in vitro* และ *in vivo* ที่พบว่ากระเทียมสามารถป้องกันการเกิดโรคมะเร็งได้อีกด้วย (Yang และคณะ, 1994)

มะระ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *M. charantia* Linn. นอกจากมะระจะเป็นที่นิยมสำหรับการบริโภคแล้ว ยังมีสรรพคุณทางยาหลายอย่าง เช่นมีฤทธิ์ในการต้านเบาหวาน, ต้านมะเร็ง และกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันได้ (Cunnick และคณะ, 1990)

นอกจากนี้ยังมีสมุนไพรไทยอีกหลายชนิดที่มีงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ยืนยันฤทธิ์ทางชีวภาพแล้ว (ตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 รายการสมุนไพรไทยและฤทธิ์ทางชีวภาพ

ชื่อวิทยาศาสตร์ (ชื่อวงศ์)	ชื่อท้องถิ่น	ส่วนที่ใช้	โรคที่ใช้รักษา
<i>Dioscorea birmanica</i> Prain & Burkill (Dioscoreaceae)	มันนก, หัวข้าวเย็น	เหง้า	มะเร็ง
<i>Dioscorea membranacea</i> Pierre ex Prain & Burkill (Dioscoreaceae)	มันหมู, หัวข้าวเย็น	เหง้า	มะเร็ง
<i>Hydnophytum formicarum</i> Jack. (Rubiaceae)	หัวร้อยรู	เหง้า	การอักเสบ, มะเร็ง และฝี
<i>Micromelum minutum</i> Wight & Arn. (Rutaceae)	หัสคุณ, หมุยช้าง	ราก	เนื้องอก
<i>Premna herbacea</i> Roxb. (Verbenaceae)	ข้าวเย็น	เหง้า	มะเร็ง
<i>Salacia chinensis</i> L. (Celastraceae)	ว่านกำแพงเจ็ดชั้น	ลำต้น	การอักเสบ, อาการ ปวด และมะเร็ง
<i>Siphonodon celastrineus</i> Griff. (Celastraceae)	มะดุก, ยายปลวก	ลำต้น, ใบ	โรคกระดูก, การ อักเสบ, ฝี และ มะเร็ง
<i>Smilax corbularia</i> Kunth (Smilacaceae)	ข้าวเย็นเหนือ	เหง้า	มะเร็ง
<i>Smilax glabra</i> Roxb. (Smilacaceae)	ข้าวเย็นใต้	เหง้า	มะเร็ง

ตารางที่ 2.1 รายการสมุนไพรไทยและฤทธิ์ทางชีวภาพ (ต่อ)

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อท้องถิ่น	ส่วนที่ใช้	โรคที่ใช้รักษา
<i>Suregada multiflora</i> Baill. (Euphorbiaceae)	ชันทองพยับบาท	ลำต้น	การอักเสบ, มะเร็ง, โรคผิวหนัง และกามโรค
<i>Willughbeia cochinchinensis</i> Pierre ex Pitard (Apocynaceae)	คุย	ลำต้น	การอักเสบ

ที่มา : Itharat และคณะ, 2004

2.3 การคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

เนื่องจากยาที่ใช้ในการรักษาโรคส่วนใหญ่มักถูกค้นพบหรือได้รับการพัฒนามาจากผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ (natural products) ยกตัวอย่างเช่นยา elliptinium, galantamine และ huperzine ได้มาจากพืช ส่วนยา daptomycin ได้มาจากจุลินทรีย์ และยังมียา exenatide และ ziconotide ซึ่งได้มาจากสัตว์ (Harvey, 2008) นอกจากนี้ยาที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งและฤทธิ์ต้านการติดเชื้อที่มีการใช้รักษาโรค รวมไปถึงยาที่กำลังอยู่ในขั้นตอนทดลองใช้อยู่กว่าร้อยละ 60 ได้ถูกค้นพบมาจากผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติด้วยเช่นกัน (Eldridge และคณะ, 2002) พืชนับได้ว่าเป็นแหล่งผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติแหล่งใหญ่ มีพืชหรือสมุนไพรหลากหลายชนิดที่สามารถนำมาใช้รักษาโรคหรือมีสรรพคุณบรรเทาอาการต่างๆ ได้ การใช้สมุนไพรในการรักษาโรคนั้นได้มีการใช้กันมานานตั้งแต่อดีตตามภูมิปัญญาท้องถิ่น และเริ่มได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน ดังนั้นการค้นหารายสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เพื่อนำมาพัฒนาเป็นยาชนิดใหม่ๆ นั้นยังคงเป็นงานวิจัยที่อยู่ในความสนใจกันทั่วโลก

การค้นหารายสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีอยู่ในพืชสมุนไพร เพื่อนำมาพัฒนาเป็นยารักษาโรคได้นั้น จำเป็นต้องอาศัยวิธีการคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีหลักการใหม่ๆ ที่แตกต่างไปจากหลักการเดิมๆ ที่ใช้กันอยู่ซึ่งมักเป็นวิธีการคัดกรองแบบเชิงลบที่อาศัยหลักการการยับยั้งการเจริญของเซลล์บ่งชี้ชนิดต่างๆ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา หรือปรสิตก่อโรค เป็นต้น โดยการคัดกรองแบบนี้มักพบปัญหาหลายอย่าง เช่น ไม่สามารถแยกได้ชัดเจนว่าสารออกฤทธิ์มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์บ่งชี้โดยตรงหรือมีความเป็นพิษต่อเซลล์บ่งชี้ อีกทั้งยังมีโอกาสในการค้นพบสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่หรือฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ๆ ได้น้อย ดังนั้นเพื่อเป็นการเพิ่มโอกาสในการค้นพบสารชนิดใหม่ๆ

หรืออาจค้นพบฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ของสารที่เคยมีการรายงานฤทธิ์มาก่อนแล้ว จึงต้องมีการใช้วิธีคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีหลักการแตกต่างจากวิธีการทั่วไป

ปัจจุบันแนวโน้มในการค้นพบยาชนิดใหม่ๆ จากการคัดกรองโดยอาศัยหลักการยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณต่างๆ ภายในเซลล์มีเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะมีข้อดีคือ สามารถลดผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์ต่อร่างกายผู้ป่วย เนื่องจากยาที่ได้จะมีความจำเพาะเจาะจงต่อโปรตีนเป้าหมาย ยกตัวอย่างเช่น สาร Tyrphostins ถูกค้นพบว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้ง Protein tyrosine kinase ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่ทำหน้าที่ควบคุมการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ นำไปสู่การพัฒนาเป็นยารักษาโรคมะเร็ง (Levitzki และ Mishani, 2006) สาร Sulfasalazine ถูกค้นพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NF-kappaB ซึ่งเป็น transcription factor ที่สำคัญในการส่งสัญญาณในระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งหากมีการทำงานที่ผิดปกติ จะเหนี่ยวนำให้เกิดโรคทางระบบภูมิคุ้มกัน เช่น โรคลำไส้อักเสบ (inflammatory bowel disease) และโรครูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) ดังนั้นสาร Sulfasalazine จึงสามารถนำมาพัฒนาเป็นยารักษาโรคดังกล่าวได้ (Wahl และคณะ, 1998)

2.4 การทดสอบที่ใช้ยีสต์เพื่อค้นหาชนิดใหม่ๆ

การคัดกรองที่ใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นเซลล์บ่งชี้ (Yeast-based assay) นับเป็นการทดสอบหนึ่งที่มีความน่าสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวที่ถูกจัดเป็นยูแคริโอตชั้นพื้นฐาน ซึ่งได้ถูกใช้เป็นสิ่งมีชีวิตต้นแบบ (model organism) ในการศึกษากระบวนการทางชีวภาพต่างๆ มากมายทั้งในระดับโมเลกุลและระดับเซลล์ เช่น การศึกษากระบวนการควบคุมการแบ่งเซลล์ (regulation of cell cycle) ของยูแคริโอตและของเซลล์มะเร็ง (Botstein และคณะ, 1997; Hartwell, 2002) กระบวนการทางชีวภาพในยีสต์หลากหลายกระบวนการมีความคล้ายคลึงกับเซลล์สิ่งมีชีวิตชั้นสูง (Mager และ Winderickx, 2005) และพบว่าประมาณร้อยละ 2 ของโปรตีนของยีสต์สามารถใช้เป็นเป้าหมายของยารักษาโรคได้ (Drews, 1996) และเมื่อเปรียบเทียบจีโนมของมนุษย์และยีสต์ พบว่าประมาณร้อยละ 50 ของยีนที่ทราบแล้วว่าเกี่ยวข้องกับการก่อโรคในมนุษย์นั้นคล้ายกันกับในยีสต์ (Hartwell, 2004) อีกทั้งความสัมพันธ์ระหว่างยาและโมเลกุลเป้าหมายของยา (drug target) ทั้งของในยีสต์และในมนุษย์มีความใกล้เคียงกันมาก ดังเช่น โมเลกุลเป้าหมายของสารกดภูมิคุ้มกัน Rapamycin ถูกค้นพบในยีสต์ก่อนและถูกยืนยันผลในมนุษย์ในเวลาต่อมา (Heitman และคณะ, 1991) จากเหตุผลดังกล่าว

จึงทำให้ยีสต์มีความเหมาะสมที่จะถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการค้นหาและศึกษาสมบัติของยาชนิดใหม่ๆ เป็นอย่างมาก

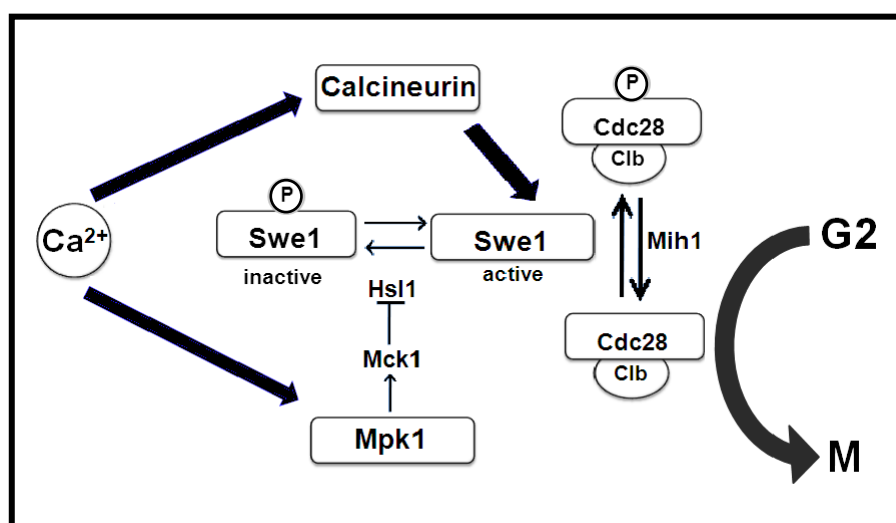
วิธีการคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยนำยีสต์มาประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาวิธีการคัดกรองให้มีลักษณะจำเพาะมากขึ้น ยกตัวอย่างเช่น การคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ยับยั้ง human poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) โดยใช้ระบบยีสต์และพบสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ PARP1 ซึ่งเป็นเอนไซม์จะถูกกระตุ้นเมื่อเกิดการทำลายดีเอ็นเอสายคู่ และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ทำให้สามารถใช้ประโยชน์เป็นยาควบคุมการตอบสนองต่อการเกิดการทำลายดีเอ็นเอที่ใช้เป็นยาต้านมะเร็งได้ โดยเมื่อนำ PARP1 ไปแสดงออกในยีสต์เป็นผลทำให้ยีสต์ไม่สามารถเจริญได้ ถ้ามีสารไปยับยั้งการทำงานของ PARP1 ได้จะทำให้ยีสต์สามารถกลับมาเจริญได้ตามปกติ (Perkins และคณะ, 2001)

การคัดกรองโดยใช้ระบบยีสต์หายาด้าน prion ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคคว่ำบ้า ซึ่งทำการค้นหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งโปรตีนของยีสต์ที่มีลักษณะคล้ายกับ prion ของมนุษย์และพบว่าสารออกฤทธิ์ที่ได้จากระบบคัดกรองนี้ สามารถยับยั้ง prion ของมนุษย์ได้เนื่องจากมีการอนุรักษ์ทางพันธุกรรมจากยีสต์สู่มนุษย์สูง (Bach และคณะ, 2003)

นอกจากนี้ยีสต์ยังถูกดัดแปลงทางพันธุกรรมได้ง่ายและรวดเร็ว จึงได้มีวิธีการคัดกรองหาสารออกฤทธิ์โดยการทำลายยีนในยีสต์สำหรับใช้เป็นเซลล์บ่งชี้ โดยมีการศึกษายีสต์สายพันธุ์กลายที่ไม่มียีน *ZDS1* ($\Delta zds1$) ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์ พบว่าเมื่อเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์กลายดังกล่าวในภาวะที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมสูง เซลล์จะไม่สามารถเจริญได้ แต่ถ้ามีสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กไปยับยั้งที่ส่วนใดส่วนหนึ่งของวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมจะทำให้ยีสต์สายพันธุ์กลายสามารถเจริญในภาวะที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมสูงได้ (Shitamukai และคณะ, 2000) ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากระบบการคัดกรองนี้จะมีลักษณะจำเพาะสูง เนื่องจากวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์มีความสัมพันธ์อย่างมากกับกระบวนการทางชีวภาพที่สำคัญในมนุษย์ เนื่องมาจากการอนุรักษ์ทางพันธุกรรมจากยีสต์สู่มนุษย์

2.5 วิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียม

การอาศัยหลักการพื้นฐานของการควบคุมการเจริญของเซลล์ยีสต์ด้วยวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียม (Calcium signal transduction pathway) นับเป็นอีกหลักการหนึ่งที่มีความน่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง โดยวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมนี้เป็นวิธีการส่งสัญญาณหนึ่งที่มีบทบาทต่อการควบคุมการแบ่งเซลล์ในยีสต์ *S. cerevisiae* จากระยะ G2 สู่วัฏจักร M (ดังภาพที่ 2.1) โดยการควบคุมการทำงานของโปรตีน Swe1 ซึ่งเป็นโปรตีนไคเนส (protein kinase) ในสถานะที่มีแคลเซียมสูง โปรตีน Swe1 จะเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylate) ให้โปรตีน Cdc28 ซึ่งเป็น cyclin-dependent protein kinase เป็นผลทำให้โปรตีนเชิงซ้อน cyclin-Cdc28 ไม่สามารถทำงานได้ เซลล์จึงหยุดหรือชะลอการแบ่งเซลล์อยู่ที่ระยะ G2 จึงกล่าวได้ว่าในสถานะที่มีแคลเซียมสูง จะเกิดการกระตุ้นวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียม เป็นผลให้เซลล์ยีสต์หยุดหรือชะลอการเจริญ (Means, 1994) โดยวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมนี้เกิดขึ้นโดย 2 วิธีคู่ขนาน ได้แก่ วิธีที่ส่งสัญญาณของแคลเซียมผ่าน calcineurin และวิธีที่ส่งสัญญาณของแคลเซียมผ่าน Mpk1 โดยทั้งสองวิธีนี้ทำงานร่วมกันในการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน Swe1 (Mizunuma และคณะ, 1998) และเพื่อให้เกิดความสมดุลระหว่างสัญญาณการกระตุ้นและยับยั้งการทำงาน ในเซลล์ปกติจึงมีโปรตีน Zds1 ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของโปรตีน Swe1 (negative regulator) (Bi และ Pringle, 1996)



ภาพที่ 2.1 แบบจำลองวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์ *S. cerevisiae*
ที่มา : Mizunuma และคณะ, 1998

Shitamukai และคณะ (2000) จึงได้เสนอระบบคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียม โดยใช้ยีสต์สายพันธุ์กลายที่ไม่มียีน *ZDS1* ($\Delta zds1$) เป็นเซลล์บ่งชี้ โดยมีหลักการคือ เมื่อเซลล์ยีสต์ดังกล่าวถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมสูง ซึ่งเป็นสภาวะที่วิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมถูกกระตุ้น เซลล์ดังกล่าวจะไม่สามารถเจริญได้ เนื่องจากในยีสต์สายพันธุ์นี้ไม่มีตัวยับยั้งการทำงานของโปรตีน Swe1 เป็นผลให้โปรตีน Swe1 อยู่ในสภาพที่ทำงานได้ จะทำการเติมหมู่ฟอสเฟตบน Cdc28 ทำให้โปรตีนเชิงซ้อน Clb-Cdc28 ไม่อยู่ในสภาวะที่ทำงานได้ เซลล์จึงหยุดอยู่ในระยะ G2 ของวัฏจักรการแบ่งเซลล์ ดังนั้นยีสต์ดังกล่าวจะไม่สามารถเจริญในสภาวะที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมสูง อย่างไรก็ตามหากมีสารโมเลกุลขนาดเล็กที่สามารถยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมได้ จะทำให้ยีสต์กลายพันธุ์ $\Delta zds1$ สามารถเจริญได้ตามปกติ แม้จะอยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมสูงก็ตาม ซึ่งวิธีการคัดกรองด้วยหลักการนี้ จะเป็นการเพิ่มโอกาสที่จะพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่และสารออกฤทธิ์ที่ได้จะมีความจำเพาะกับโมเลกุลเป้าหมายสูง

ถ้าสารออกฤทธิ์ไปยับยั้งโปรตีน Mpk1 ซึ่งเป็นโปรตีน MAP kinase ชนิดหนึ่ง สารออกฤทธิ์นี้น่าจะเป็นสารออกฤทธิ์ต้านมะเร็งหรือสารต้านการอักเสบ เนื่องจากโปรตีน Mpk นี้มีความคล้ายคลึงกับ Erk1/Erk2 ในมนุษย์ (Sugiura และคณะ, 2002) ในเซลล์มะเร็งบางชนิดนั้น Erk1/Erk2 จะถูกกระตุ้นตลอดโดยโปรตีนไคเนส Ras เป็นผลให้เกิดการส่งเสริมการแบ่งเซลล์ในเซลล์มะเร็ง และ Erk1/Erk2 มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ โดยที่เมื่อ Erk1/Erk2 ถูกกระตุ้นนั้นจะไปควบคุมการทำงานของ transcription factor ในกลุ่ม AP-1 โดย AP-1 transcription factor ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างไซโตไคน์ IL-2 ที่มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการแบ่งตัวของ T-cell ตัวอย่างรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารยับยั้งวิถี Erk1/Erk2 มีดังนี้

งานวิจัยเกี่ยวกับสาร U0126 ซึ่งสามารถยับยั้งวิถี Erk1/Erk2 ได้ พบว่าสารนี้สามารถยับยั้งแอนติเจนต้นแบบ Ovalbumin (OVA) ในการกระตุ้นเม็ดเลือดขาวชนิดอีโอซิโนฟิลในกระแสเลือด และการเกิดเมือกที่ทางเดินหายใจ รวมทั้งการแสดงออกของ VCAM-1 ในเนื้อเยื่อปอดของหนูได้ และจากผลของการศึกษาปอดหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย OVA พบว่า U0126 สามารถป้องกันการกระตุ้นวิถี Erk1/Erk2 อันเนื่องมาจาก OVA ได้ แสดงว่าการยับยั้งวิถี Erk1/Erk2 สามารถที่จะใช้เป็นแนวทางการรักษาโรคมะเร็งในระบบทางเดินหายใจได้ (Duan และคณะ, 2004)

งานวิจัยเกี่ยวกับสาร PD184352 (CL-1040) ซึ่งเป็นสารยับยั้งวิถี Erk1/Erk2 พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของมะเร็งได้ จากการให้สารดังกล่าวโดยวิธีกิน พบว่าสามารถป้องกันการเจริญของมะเร็งลำไส้ในสัตว์ทดลองได้ ซึ่งจากการตรวจสอบพบว่าเกี่ยวข้องกับกลไกการกระตุ้นวิถี Erk1/Erk2 ซึ่งแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารที่ให้ (Sebolt-Leopold และคณะ, 1999)

ถ้าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีโมเลกุลเป้าหมายเป็น calcineurin สารออกฤทธิ์ที่จะได้นำจะเป็นสารออกฤทธิ์ด้านการอักเสบหรือสารกดภูมิคุ้มกัน เป็นต้น เนื่องจาก calcineurin ในยีสต์ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งในวิถีการส่งสัญญาณแคลเซียมมีความคล้ายคลึงกับ calcineurin ในมนุษย์ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อแคลเซียม มีโมเลกุลเป้าหมายที่สำคัญอย่างหนึ่งได้แก่ transcription factor ในกลุ่ม Nuclear factor of activated T cells (NFAT) ซึ่งปกติอยู่ในไซโทพลาซึม แต่ถ้า calcineurin ถูกกระตุ้น จะทำหน้าที่ตัดหมู่ฟอสเฟตของ NFAT ส่งผลให้ NFAT เข้าไปยังนิวเคลียสเพื่อไปกระตุ้นยีนประมวลรหัสไซโตไคน์ได้แก่ IL-2 ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้น T-lymphocyte (Sugiura และคณะ, 2002) ตัวอย่างยาที่ยับยั้ง calcineurin ได้แก่ FK506 และ cyclosporin A ซึ่งเป็นยากดภูมิคุ้มกันที่มีการใช้กันอยู่ทั่วไป

ถ้าสารออกฤทธิ์ไปยับยั้งที่โปรตีนไคเนส Mck1 สารออกฤทธิ์ที่ได้นำจะเป็นสารออกฤทธิ์ต้านโรคเบาหวานประเภทที่ 2 (Diabetes type 2) และหรืออาจเป็นสารต้านโรค Alzheimer เนื่องจากโปรตีน Mck1 ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งในวิถีส่งสัญญาณแคลเซียมนี้มีความคล้ายคลึงกับ GSK-3 β ในมนุษย์ (Kassir และคณะ, 2006) GSK-3 β มีกลไกการทำงานตรงกันข้ามกับกระบวนการสร้างไกลโคเจน (Nikoulina และคณะ, 2000) ในผู้ป่วยโรคเบาหวานพบว่ามียกระดับของ GSK-3 β ผิดปกติ ดังนั้นการยับยั้ง GSK-3 β อาจจะสามารถนำไปรักษาโรคเบาหวานได้ นอกจากนี้ในระบบประสาทส่วนกลางของผู้ป่วยโรค Alzheimer ได้ถูกพบการเกิดการตกตะกอนของโปรตีน Tau สาเหตุเนื่องมาจากระดับของ GSK-3 β ที่ผิดปกติ โดยมีการเติมหมู่ฟอสเฟตให้โปรตีน Tau มากจนเป็นผลให้โปรตีนสูญเสียโครงสร้างและจับตัวตกตะกอนเกิดเป็นแอมิลอยด์ในระบบประสาทส่วนกลาง ส่งผลให้เซลล์สมองหรือระบบประสาทส่วนกลางเสียหาย (Bhat และคณะ, 2004)

ดังนั้นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าจะได้จากวิธีการคัดกรองในระบบยีสต์นี้ ได้แก่ สารต้านการอักเสบ สารกดภูมิคุ้มกัน และสารต้านมะเร็ง เป็นต้น (ตารางที่ 2.2)

ตารางที่ 2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลเป้าหมายกับฤทธิ์ทางชีวภาพในระบบคัดกรองที่ใช้ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ เป็นเซลล์บ่งชี้

โมเลกุลเป้าหมาย	ฤทธิ์ทางชีวภาพ
Calcineurin	Immunosuppressants (Sugiura และคณะ, 2002) Allergy remedy (Kawai และคณะ, 2007)
MPK1 (ERK1, ERK2)	Anticancer agent (Sebolt-Leopold และคณะ, 1999)
MCK1 (GSK-3)	Alzheimer disease (Bhat และคณะ, 2004) Type II diabetes (Nikoulina และคณะ, 2000)

ที่มา : วชิรศักดิ์ วังกังวาน, 2550

2.6 ยากดภูมิคุ้มกัน

ข้อมูลตามบัญชีจำแนกโรคระหว่างประเทศฉบับแก้ไขครั้งที่ 10 พ.ศ. 2548-2552 พบว่าโรคเลือดและความผิดปกติเกี่ยวกับกลไกของระบบภูมิคุ้มกัน เป็นสาเหตุให้มีจำนวนและอัตราการตายของประชากรสูงติด 10 อันดับแรกในประเทศไทย เมื่อเปรียบเทียบกับสาเหตุการตายอื่นๆ

โรคออโต้ภูมิคุ้มกัน หรือโรคแพ้ภูมิตนเอง หรือโรคภูมิคุ้มกันทำลายเนื้อเยื่อของตนเอง (Autoimmune Diseases) เป็นโรคที่มีสาเหตุเนื่องมาจากมีภูมิคุ้มกันที่ผิดปกติต่อแอนติเจนของเนื้อเยื่อร่างกายตนเอง และก่อให้เกิดพยาธิสภาพที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย ทั้งจากการทำลายเนื้อเยื่อโดยตรงจากปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันที่ผิดปกติ หรือจากการที่ไปกระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานของบางอย่างภายในร่างกายส่งผลให้เกิดความผิดปกติขึ้น โดยโรคออโต้ภูมิคุ้มกันนี้ ประกอบไปด้วยโรคต่างๆ จำนวนมาก โดยอาจแบ่งได้เป็นสองกลุ่มใหญ่ๆ คือ Organ-Specific Autoimmune Diseases คือเป็นโรคที่เกิดขึ้นกับอวัยวะใดอวัยวะหนึ่งเท่านั้น ก่อให้เกิดอาการได้ระบบเดียวหรืออวัยวะเดียว เช่น โรคเบาหวานชนิดที่ 1 และ Grave's disease ซึ่งมีการทำงานของต่อมไทรอยด์มากกว่าปกติ เป็นต้น (Lesage และ Goodnow, 2001) และอีกกลุ่มหนึ่งคือ Systemic Autoimmune Diseases คือโรคที่ไม่เกิดขึ้นเพียงอวัยวะใดอวัยวะหนึ่ง แต่มีพยาธิสภาพเกิดขึ้นกับ

เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะหลายอย่างในร่างกาย จึงก่อให้เกิดอาการได้หลายระบบ โรคในกลุ่มนี้ที่พบได้บ่อยคือ Systemic lupus erythematosus (SLE) ซึ่งมักเกิดกับหลายๆ อวัยวะเช่น ผิวหนัง ไต สมอง หัวใจ และปอด เป็นต้น (Vyse และ Todd, 1996), โรค Rheumatoid arthritis ที่เกิดขึ้นได้หลายอวัยวะ เช่น ข้อเล็กๆ ของมือและเท้า เป็นต้น (Firestein, 2003) และโรคสะเก็ดเงิน (Psoriasis) ซึ่งมีอาการผิวหนังอักเสบเป็นปื้นแดง ลอกเป็นขุยและมีอาการผิดปกติที่เล็บและข้อต่างๆ ร่วมด้วย (Barker, 1998)

การรักษาโรคออโตอิมมูน ยังไม่มีวิธีการรักษาให้หายขาด ปัจจุบันเป้าหมายการรักษาคือต้องควบคุมอาการของโรคไม่ให้กำเริบหรือมีอาการทรุดหนักขึ้น ทำให้ผู้ป่วยต้องได้รับยากดภูมิคุ้มกันในการรักษาอย่างต่อเนื่อง รวมไปถึงผู้ป่วยที่ได้รับการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะก็จำเป็นต้องได้รับยากดภูมิคุ้มกันด้วย เนื่องจากในปัจจุบันนี้มีอัตราการเจ็บป่วยของผู้สูงอายุ ส่วนใหญ่ด้วยโรคเรื้อรังต่างๆ มากขึ้นเรื่อยๆ เช่น โรคหัวใจ โรคมะเร็งที่อวัยวะต่างๆ เช่น ตับ ปอด เป็นต้น ผู้ป่วยจำนวนไม่น้อยจำเป็นต้องได้รับการรักษาโรคดังกล่าวด้วยการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ เนื่องจากอวัยวะนั้นๆ ถูกใช้งานจนเสื่อมประสิทธิภาพ ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติแล้ว แพทย์จะนำอวัยวะภายในมาผ่าตัดเปลี่ยนให้กับผู้ป่วยที่จำเป็นต้องได้รับการรักษาเพื่อให้มีชีวิตรอดต่อไป ทำให้การรักษาโดยการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะสามารถช่วยชีวิตผู้ป่วยได้เป็นอย่างมาก แต่ทั้งนี้ผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนอวัยวะต้องได้รับยากดภูมิคุ้มกันเพื่อลดและป้องกันไม่ให้ระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายทำร้ายและปฏิเสธอวัยวะใหม่ ทั้งนี้ทำให้ทั้งผู้ป่วยโรคออโตอิมมูนและผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะต้องเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาเป็นจำนวนมากเนื่องจากต้องใช้อยากดภูมิคุ้มกันในการรักษาอย่างต่อเนื่อง และอีกปัญหาสำคัญที่ตามมาจากการรักษาดังกล่าวก็คือผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์ต่อร่างกายผู้ป่วยนั่นเอง

ยากดภูมิคุ้มกันที่ใช้รักษาผู้ป่วยในปัจจุบันนั้นมีกลไกการออกฤทธิ์ที่โมเลกุลเป้าหมายแตกต่างกันไป ซึ่งสามารถแบ่งประเภทตามกลไกการทำงานได้เป็น 5 กลุ่ม (ตารางที่ 2.3)

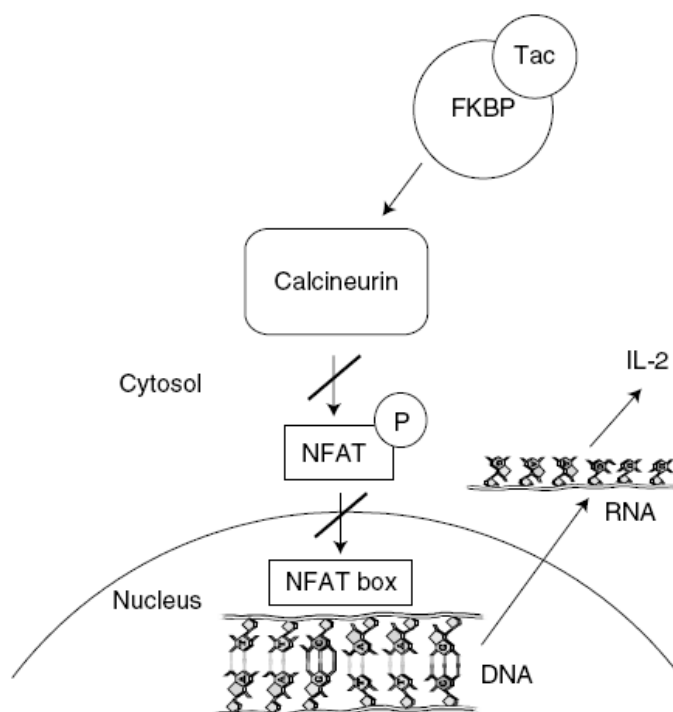
ตารางที่ 2.3 กลไกการทำงานของยากดภูมิคุ้มกัน

กลไกการทำงาน	ยากดภูมิคุ้มกัน	โมเลกุลเป้าหมาย
1. ควบคุมการแสดงออกของยีน	Glucocorticoids	Glucocorticoid receptors
2. เกิดปฏิกิริยาการแทนที่ด้วยหมู่ Alkyl (Alkylation)	Cyclophosphamide	DNA
3. ยับยั้งการทำงานของ Kinase และ Phosphatase	Cyclosporin A Tacrolimus Rapamycin	Calcineurin Calcineurin Cyclin kinase cascade
4. ยับยั้งการสังเคราะห์ Purine	Azathioprine Mycophenolate Mofetil	Several enzymes IMPDH
5. ยับยั้งการสังเคราะห์ Pyrimidine	Leflunomide Methotrexate	DHOD Thymidylate synthase

ที่มา : Allison, 2000

ยากดภูมิคุ้มกัน Tacrolimus (FK506) จัดเป็นยากดภูมิคุ้มกันในกลุ่ม calcineurin inhibitor เป็นที่นิยมใช้เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูง มักใช้รักษาผู้ป่วยที่ได้รับการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ เช่น ตับและไต รวมไปถึงผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องเพื่อป้องกันปฏิกิริยาปฏิเสธอวัยวะในผู้ป่วย Tacrolimus เป็นยากดภูมิคุ้มกันเดียวกับยา Cyclosporin-A ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง calcineurin โดยการออกฤทธิ์ของยา Tacrolimus เริ่มจากการที่ยาจับกับโมเลกุลเป้าหมายภายในเซลล์คือ FK506-binding protein-12 (FKBP-12) จากนั้น Tacrolimus-FKBP-12 complex จะไปจับกับ calcineurin (calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase) ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของ calcineurin

การทำงานของ calcineurin ใน T-lymphocyte นั้น calcineurin จะถูกกระตุ้นโดยออคัยแคลเซียมและ calmodulin ร่วมกัน ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ตัดหมู่ฟอสเฟต (dephosphorylation) ออกจาก Nuclear-factor activated T-cell (NFAT) ส่งผลให้ NFAT มีการเคลื่อนที่จากไซโตพลาสซึมเข้าสู่นิวเคลียส และไปทำการกระตุ้นกระบวนการถอดรหัสยีนของ lymphokines เช่น เกิดการผลิต interleukin-2 (IL-2) และกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ T-lymphocyte ตามลำดับ สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของยากดภูมิคุ้มกัน Tacrolimus นั้น ยาจะจับกับโปรตีนเป้าหมาย FKBP ก่อน จากนั้นโปรตีนเชิงซ้อน Tacrolimus-FKBP จะมาจับและออกฤทธิ์ยับยั้ง calcineurin ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการผลิต IL-2 ทำให้ปริมาณ IL-2 ลดลงและการเพิ่มจำนวนของ T-lymphocyte จึงลดลงด้วยตามลำดับ (ดังภาพที่ 2.2) ยาจึงสามารถกดภูมิคุ้มกันได้ (Suthanthiran และ Strom, 1997)



ภาพที่ 2.2 แบบจำลองกลไกการออกฤทธิ์ของยา Tacrolimus

ที่มา : Westhoff และ van der Giet, 2007

แต่อย่างไรก็ตามแมวยา Tacrolimus จะมีประสิทธิภาพดีในการกดภูมิคุ้มกัน แต่การใช้อย่างมีข้อจำกัดเนื่องจากมักเกิดผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์กับผู้ป่วย ได้แก่ อาการพิษต่อระบบประสาท มีความเป็นพิษต่อไต และก่อให้เกิดโรคเบาหวาน (Pirsch และคณะ, 1997) นอกจากนี้การให้ยาในกลุ่มของสเตียรอยด์ มักพบผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์อย่างรุนแรงต่อผู้ป่วยมากมายหลายประการ เช่น การติดเชื้อ กัดการทำงานของระบบที่ควบคุมการหลั่งฮอร์โมน และผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง (Xie และคณะ, 1992) แพทย์จึงหันมานิยมให้ยาในกลุ่มที่ไม่ใช่สเตียรอยด์กันอย่างกว้างขวาง แต่อย่างไรก็ตามการใช้ยากลับที่ไม่ใช่สเตียรอยด์นี้ ก็ยังพบผลข้างเคียงที่เกิดกับกระเพาะอาหารและลำไส้ เช่น ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน แสบท้อง และอาหารไม่ย่อย เป็นต้น (Fries และคณะ, 1991) ดังนั้นยากดภูมิคุ้มกันชนิดใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพสูงในการลดการอักเสบได้ดี สามารถใช้ได้สะดวก ราคาถูก และที่สำคัญคือไม่มีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย จึงยังคงเป็นที่ต้องการในวงการแพทย์เป็นอย่างมาก ปัจจุบันจึงมีการคิดค้นพัฒนาผลิตรักษาใหม่ๆ ออกมามากมายอย่างต่อเนื่อง แต่โอกาสในการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ ที่มีกลไกการออกฤทธิ์กดระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจง หรือมีประสิทธิผลสูงนั้นหาได้ยาก ทำให้ยาส่วนใหญ่ที่ใช้รักษาในปัจจุบันมักมีราคาแพงมาก

2.7 สมุนไพรสองฟ้าแดง

สองฟ้าแดง เป็นพืชสมุนไพรไทยหายากชนิดหนึ่ง มีชื่อพื้นเมืองซึ่งเรียกแตกต่างกันไปตามแต่ละท้องถิ่นคือ โปรงฟ้า (ภาคกลาง), ล่องฟ้า (อุดรธานี), สองฟ้าแดง (เลย), เหม็น (จันทบุรี) และสมุยหอม (นครศรีธรรมราช) และมีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Clausena harmandiana* (Pierre) ซึ่งอยู่ในวงศ์ Rutaceae พบได้ตามภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคใต้ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยพืชในสกุล *Clausena* หลายชนิดได้ถูกค้นพบและมีการนำมาใช้เป็นสมุนไพรรักษาโรคมากมายในประเทศอินเดีย เช่น ใช้รักษาอาการท้องเสีย อาการโรคบิดในไต อาการปวดที่เกิดจากโรคตับและม้าม เป็นต้น (Chopra และคณะ, 1956) และยังมีรายงานก่อนหน้านี้ที่พบว่า *C. anisata*, *C. heptaphylla*, *C. indica*, *C. wampi* และ *C. pentaphylla* มีฤทธิ์ลดการบีบตัวของกล้ามเนื้อเรียบได้ (spasmolytic activity) (Patnaik และ Dhawan, 1982) แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสองฟ้าแดง หรือ *Clausena harmandiana* (Pierre) ได้มีการรายงานพบแต่เพียงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ *Escherichia coli* TISTR 780, *Salmonella typhimurium* TISTR 292, *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 และ methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) SK1 ของสารในกลุ่ม carbazole

alkaloids ที่แยกได้จากกิ่งของสองฟ้าแดง (Maneerat และคณะ, 2012) จึงมีความน่าสนใจเป็นอย่างยิ่งสำหรับการศึกษาค้นหาหาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ จากสองฟ้าแดง

ตามภูมิปัญญาไทย สองฟ้าแดงมีสรรพคุณใช้เป็นยาสมุนไพร โดยนำรากต้มน้ำดื่ม แก้ไข้ ปวดศีรษะ แก้ผดผื่นคัน ผสมกับรากหนามजूชั่งและเหง้าว่านน้ำปริมาณเท่ากัน ต้มน้ำดื่ม แก้หลอดลมอักเสบ หรือผสมกับรากพังคิ ต้มน้ำดื่ม แก้จุกเสียด หรือผสมกับรากน้ำนมราชสีห์ รากทับทิมและเตื่อยไก่ป่า ผสมกับน้ำกินและทาตัวแก้ไข้ทำมะลา(อาการไข้หมดสติและตายโดยไม่ทราบสาเหตุ) นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งอาหารธรรมชาติสำหรับทะเล่มีส่วนยอดและใบของโค กระบือ และสัตว์ป่า เป็นต้น ส่วนใบอ่อนเป็นอาหารผักเพื่อบริโภคสำหรับคนได้ (วงศ์สถิตย์ ฉั่วกุล และคณะ, 2543)

สำหรับลักษณะทั่วไปของสองฟ้าแดง เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก ทรงต้นตั้งสูง ลำต้นมีสีเขียวอมน้ำตาลเข้ม ใบประกอบเรียงสลับมีลักษณะเป็นแบบขนนกปลายคี่ (odd-pinnately) ซึ่งมีใบย่อยประมาณ 3-7 ใบ ลักษณะของใบมีรูปร่างแบบขอบขนานแกมรูปไข่ (ovate-oblong) ปลายใบแหลม (acute) ขอบใบมีรอยหยักแบบฟันเลื่อยห่าง (serrate) ขอบใบด้านล่างโค้งเบี้ยวเล็กน้อย ใบมีสีเขียวเข้ม ผิวใบมัน (lustrous) มีจุดน้ำมันโปร่งแสง (punctate) กระจายทั่วไป เมื่อส่องดูจะเห็นทะลุไปอีกด้านได้ หากส่องดูจุดน้ำมันบนใบกับท้องฟ้า จะเห็นลักษณะจุดคล้ายดาว จึงเป็นที่มาของชื่อสองฟ้าแดงหรือโปร่งฟ้า สำหรับเส้นใบเรียงตัวแบบร่างแห (ภาพที่ 2.3) สองฟ้าแดงจะออกดอกในช่วงระหว่างเดือนมีนาคมถึงพฤศจิกายน ช่อดอกเป็นแบบแยกแขนง (panicle) ดอกมีขนาดเล็ก สีเหลืองอมเขียวอ่อน มีเกสรสีเหลือง มักติดผลในช่วงเดือนเมษายน โดยมีผลเป็นรูปกลมรี ผิวออกขรุขระ ผลอ่อนมีสีเขียว ผลแก่มีสีชมพูอมขาวและมีลักษณะค่อนข้างฉ่ำน้ำ (ภาพที่ 2.4) (วงศ์สถิตย์ ฉั่วกุล และคณะ, 2543)

จากรายงานก่อนหน้าี้มีการศึกษาวิจัยใช้ยีสต์เป็นระบบคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ต้านวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมจากพืชสมุนไพรและพืชหายากจากสวนป่าสมุนไพร ศูนย์ศึกษาการพัฒนาเขาหินซ้อน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดฉะเชิงเทรา และพบว่าส่วนสกัดอย่างหยาบของใบสองฟ้าแดง ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียม เมื่อทำการคัดกรองด้วยระบบยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ (ณัฐพงศ์ ภัคดี ใหม่, 2551)



ภาพที่ 2.3 ลักษณะของต้นและใบส่องฟ้าแดง



ภาพที่ 2.4 ลักษณะของช่อดอกและผลส่องฟ้าแดง

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany
2. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น BE 600 ของบริษัท Memmert, Germany
3. ตู้เขย่าเชื้อ รุ่น Clean model. V4 ของบริษัท LAB Service, Thailand
4. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น S-20K ของบริษัท Mettler-Toledo, Switzerland
5. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (thermo-block) รุ่น MylabTH Thermo-Block SLTDB-120 ของบริษัท SeouLin Bioscience, Korea
6. เครื่องชั่ง รุ่น AG285 PG2002-S และ PB3002 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
7. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น Geniell G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA
8. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น MLS 3020 ของบริษัท SANYO, Japan
9. เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น 2600 ของบริษัท Denville, Germany
10. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า (waterbath shaker) รุ่น NST 2000 ของบริษัท EYELA, Japan
11. เครื่องโซนิเคเตอร์ (Sonicator) รุ่น RK100 ของบริษัท BANDELIN, Germany
12. เครื่องนับจำนวนเม็ดเลือด (Haemocytometer) ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
13. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) รุ่น P10 P20 P100 P200 P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France
14. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ
 - Gel Documentation และโปรแกรม Quantity One เวอร์ชัน 4.4.1 ของบริษัท Bio-Rad, USA
15. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) Mini gel electrophoresis system ของบริษัท Mupid-ex, Japan
16. เครื่องไมโครเวฟ (microwave oven) รุ่น MW-2020 ของบริษัท Turbera, Singapore
17. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (microplate reader) รุ่น Elx 800 ของบริษัท Bio-tek instrument, USA

18. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter) รุ่น S20-K ของบริษัท Mettler-Toldo, Switzerland
19. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส รุ่น ULT 1786 ของบริษัท FORMA Scientific, USA
20. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น MDF-U332 ของบริษัท SANYO Electric, Japan
21. ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส รุ่น Tiara ของบริษัท Mitsubishi electric, Japan
22. ชุดเครื่องมือทำ SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (Protein III System) ของบริษัท Biorad, USA
23. ชุดเครื่องมือทำ semi-dry electrophoretic transfer cell รุ่น Trans-Blot® SD ของบริษัท Bio-Rad, USA
24. ภาชนะกบฟิล์ม ของบริษัท OKAMOTO, Japan
25. ฟิล์มเอกซเรย์ ของบริษัท Kodak, USA
26. กระดาษกรอง (filter paper) ของบริษัท Whatman, USA
27. แผ่นกระจกสไลด์ ของบริษัท Nissho Nipro, Japan
28. กระจกปิดสไลด์ ของบริษัท Nissho Nipro, Japan
29. กล้อง inverted microscope ของบริษัท Olympus, Japan
30. ปิเปตต์แก้ว (seropipette) 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร ของบริษัท Corning Incorporation, USA
31. ภาชนะเลี้ยงเซลล์ (Tissue culture Flask ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร) ของบริษัท Corning Incorporation, USA
32. ภาชนะเลี้ยงเซลล์ 12 หลุม (tissue culture plate 12 well) ของบริษัท NUNC™, Denmark
33. ภาชนะเลี้ยงเซลล์ 24 หลุม (tissue culture plate 12 well) ของบริษัท NUNC™, Denmark
34. ภาชนะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (tissue culture plate 12 well) ของบริษัท NUNC™, Denmark
35. ภาชนะเลี้ยงเซลล์ 384 หลุม (tissue culture plate 96 well) ของบริษัท NUNC™, Denmark
36. ปีกเกอร์ ของบริษัท Corning Incorporation, USA
37. ขวดรูปชมพู่ขนาด 125, 250 และ 500 มิลลิลิตร ของบริษัท Corning Incorporation, USA
38. ขวดใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ขนาด 100 มิลลิลิตร ของบริษัท Corning Incorporation, USA
39. หลอดเก็บเซลล์แช่แข็ง (cryotube) ของบริษัท Corning Incorporation, USA
40. ทิปปลอดอาร์เอ็นเอส (RNase-free tip) ปริมาตร 2, 10, 100 และ 1,000 ไมโครลิตร ของบริษัท Corning Incorporation, USA

41. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA
42. Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane ของบริษัท Amersham Biosciences, UK
43. กระบอกตวง (cylinder) ของบริษัท Corning Incorporation, USA
44. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร ของบริษัท Corning Incorporation, USA
45. หลอดพีซีอาร์ (PCR tube) ขนาด 200 ไมโครลิตร ของบริษัท Corning Incorporation, USA
46. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (micro centrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บริษัท Axygen Scientific, USA

3.2 เคมีภัณฑ์

1. Yeast extract ของบริษัท Difco Laboratories, USA
2. Glucose ของบริษัท Difco Laboratories, USA
3. Agarose gel ของบริษัท Prondisa, Spain
4. Sodium hydroxide (NaOH) ของบริษัท E Merck, Germany
5. Hydrochloric acid (HCl) ของบริษัท LAB-SCAN, Ireland
6. Galactose ของบริษัท Difco Laboratories, USA
7. Yeast Nitrogen Base without Amino Acids ของบริษัท Difco Laboratories, USA
8. กรดอะมิโนทุกชนิด ของบริษัท Sigma, USA
9. Glycerol ของบริษัท Carlo ERBA, France
10. MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ของบริษัท Bio Basic inc, Canada
11. DEPC (diethylpyrocarbonate) ของบริษัท Sigma, USA
12. Random hexamer ของบริษัท Fermentus, Canada
13. Ribonuclease inhibitor ของบริษัท Fermentus, Canada
14. EGTA (Ethylene-bis (oxyethylenitrilo) tetraacetic acid tetrasodium) ($C_{14}H_{20}N_2O_{10}Na_4$) ของบริษัท Sigma, USA
15. Hydrochloric acid (HCl) ของบริษัท Merck, Germany
16. Potassium chloride (KCl) ของบริษัท Merck, Germany
17. Potassium di-hydrogen phosphate (KH_2PO_4) ของบริษัท Merck, Germany

18. Sodium di-hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) ของบริษัท Merck, Germany
19. Sodium phosphate (NaH_2PO_4) ของบริษัท Merck, Germany
20. Sodium carbonate (Na_2CO_3) ของบริษัท Merck, Germany
21. Magnesium chloride (MgCl_2) ของบริษัท Merck, Germany
22. Magnesium sulfate (MgSO_4) ของบริษัท Merck, Germany
23. HPLC water ของบริษัท Merck, Germany
24. Tag polymerase ของบริษัท Fermentus, Canada
25. M-MuLV reverse transcriptase ของบริษัท Fermentus, Canada
26. dNTP mix ของบริษัท Fermentus, Canada
27. SDS (sodium dodecyl sulfate), ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{OSO}_3$) ของบริษัท Sigma, USA
28. Tween20 ของบริษัท Sigma, USA
29. Ribonuclease A (RNase A) ของบริษัท Sigma, USA
30. Proteinase K ของบริษัท Sigma, USA Absolute alcohol ของบริษัท Merck, Germany
31. 100 bp และ 1 kb DNA ladder ของบริษัท Fermentas, USA
32. Isopropanol ของบริษัท Merck, Germany
33. Chloroform ของบริษัท Lab-scan, Thailand
34. β -mercapto-ethanol ของบริษัท Sigma, USA
35. Protease inhibitor ของบริษัท Sigma, USA
36. Buffer A สำหรับสกัดโปรตีน (วิธีเตรียมคุณภาพคนวก ข)
37. Buffer B สำหรับสกัดโปรตีน (วิธีเตรียมคุณภาพคนวก ข)
38. Chloroform ของบริษัท Lab-scan, Thailand
39. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) ของบริษัท Sigma, USA
40. Ionomycin ของบริษัท Sigma, USA
41. Acrylamide/Bisacrylamide 40% solution ของบริษัท Sigma, USA
42. TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethylenediamide) ของบริษัท Bio Basic inc, Canada
43. Amonium persulfate ของบริษัท Bio Basic inc, Canada
44. Dithiothreitol (DTT) ของบริษัท USB corporation, USA
45. ECL western blotting ของบริษัท Amersham biosciences, UK
46. Absolute methanol ของบริษัท Merck, Germany

47. Tris buffer pH 8.8 (วิธีเตรียมในภาคผนวก ข)
48. Tris buffer pH 6.8 (วิธีเตรียมในภาคผนวก ข)
49. Prestain molecular weight marker ของบริษัท Fermentus, Canada
50. Bromphenol blue ของบริษัท Sigma, USA
51. น้ำยาล้างฟิล์ม ของบริษัทเจเนเซน
52. BCATM protein assay ของบริษัท PIERCE Absolute methanol ของบริษัท Merck, Germany
53. NFAT Tag Antibody ของบริษัท Cell Signaling Technology Inc, USA
54. Anti-Actin, clone C4 ของบริษัท Cell Signaling Technology Inc, USA
55. Donkey anti-rabbit IgG-HRP ของบริษัท Amersham biosciences, UK
56. Sheep anti-Mouse Ig, (H+L) HRP conjugate ของบริษัท Cell Signaling Technology Inc, USA
57. Fetal Bovine Serum (FBS) ของบริษัท Hyclone
58. อาหารเลี้ยงเซลล์ (RPMI 1640) ของบริษัท Hyclone
59. Dimethylsulfoxide (DMSO) ของบริษัท Sigma, USA
60. Trypan blue 0.5%w/v ของบริษัท Biochrom AG, Germany
61. Hydrochloric acid (HCl) ของบริษัท Merck, Germany
62. Trizol reagent ของบริษัท Invitrogen, CA
63. Phosphatase inhibitor ของบริษัท Sigma, USA
64. Ortho-nitrophenyl-b-D-GALactopyranoside (ONPG) ของบริษัท Merck, Germany
65. Hoechst 33342 ของบริษัท Sigma, USA
66. FK506 ของบริษัท Sigma, USA
67. Skim milk ของบริษัท Difco Laboratories, USA

หมายเหตุ สารเคมีที่ใช้ในการทดลองทุกชนิดเป็นเกรดเพื่อการวิเคราะห์ (analytical grade)

3.3 ยีสต์

รายละเอียดของยีสต์ที่ใช้ในการทดลองได้แสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

สายพันธุ์ยีสต์	จีโนมไทป์	แหล่งที่มา
W303	<i>trp1-1 leu2-3 ade2-1 ura3-1</i> <i>112 his3-11 can1-100</i>	R. Rothstein
YNS17, $\Delta zds1$	เหมือนกับ W303 ยกเว้น <i>zds1::TRP1</i> <i>syr1::HIS3 pdr1::hisG-URA3-</i> <i>hisG pdr3::hisG-URA3-hisG</i>	ได้รับมาจาก Professor Tokichi Miyakawa, Hiroshima University;
$\Delta mpk1$	เหมือนกับ W303 ยกเว้น <i>TRP1</i> <i>mpk1::HIS3 syr1::HIS3</i> <i>pdr1::hisG-URA3-hisG</i> <i>pdr3::hisG-URA3-hisG</i>	ได้รับมาจาก Professor Tokichi Miyakawa, Hiroshima university
$\Delta cnb1$	เหมือนกับ W303 ยกเว้น <i>TRP1</i> <i>cnb1::HIS3 syr1::HIS3</i> <i>pdr1::hisG-URA3-hisG</i> <i>pdr3::hisG-URA3-hisG</i>	ได้รับมาจาก Professor Tokichi Miyakawa, Hiroshima university
YRC1, $\Delta zds1$ [<i>GAL1p-CMPΔ2C</i>]	เหมือนกับ W303 ยกเว้น <i>GAL-</i> <i>CMP2ΔC::URA3 zds1::TRP1</i> <i>erg3::HIS3 pdr1::higG</i> <i>pdr3::hisG</i>	ได้รับมาจาก Professor Tokichi Miyakawa, Hiroshima university

3.4 เซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์

Jurkat (Human acute T cell leukemia) รหัส (ATCC number) CRL-2063

3.5 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์	T _m (°C)	หมายเหตุ
Interleukin-2	ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ 5'-ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTT-3' รีเวิร์ดไพรเมอร์ 5'-GTTAGTGTTGAGATGATGCTTTGAC-3'	55	ออกแบบในงานวิจัยนี้
Beta-actin	ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ 5'-ACCAACTGGGACGACATGGAGAA-3' รีเวิร์ดไพรเมอร์ 5'-GTGGTGGTGAAGCTGTAGCC-3'	55	ออกแบบในงานวิจัยนี้

3.6 แอนติบอดีที่ใช้ในการทำเวสเทิร์นบลอต

แอนติบอดีที่ใช้ในการทำเวสเทิร์นบลอต ดังแสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 แอนติบอดีที่ใช้ในการทำเวสเทิร์นบลอตที่ใช้ในงานวิจัยนี้

แอนติเจน	อัตราส่วนแอนติบอดีปฐภูมิ ต่อ Blocking solution	อัตราส่วนแอนติบอดีทุติยภูมิ ต่อ Blocking solution
NFAT1	Rabbit anti-NFAT1 1:1,000	Donkey anti-rabbit IgG-HRP 1:4,000
Actin	Mouse anti-Actin 1:10,000	Sheep anti-Mouse Ig-HRP 1:4,000

3.7 การเก็บตัวอย่างใบสองฟ้าดง

ใบสองฟ้าดง ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์ศึกษาการพัฒนาเขาหินซ้อน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดฉะเชิงเทรา นำกิ่งสองฟ้าดงที่มีใบที่สมบูรณ์ ดอก และ/หรือ ผล นำมาอัดให้แห้ง นำตัวอย่างแห้งไปตรวจสอบชนิดและเทียบเคียงกับตัวอย่างพรรณไม้ที่หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช (Forest Herbarium-BKF) โดยได้รับหมายเลขทะเบียนตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงงานวิจัย (voucher specimen) คือ BKF 171577

3.8 การแยกเป็นส่วนย่อยและทำให้บริสุทธิ์ของสารสกัดหยาบสองฟ้าดง

ในขั้นตอนการแยกเป็นส่วนย่อยและทำให้บริสุทธิ์ของส่วนสกัดหยาบจากสองฟ้าดง ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการทางเคมีของผศ.ดร.บุญเอก ยิ่งยงณรงค์กุล ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ซึ่งทำการแยกเป็นส่วนย่อยด้วยเทคนิคทาง Column Chromatography จนได้เป็นสารประกอบส่วนย่อย จากนั้นนำส่วนย่อยต่างๆ ที่ได้รับมาทำการทดสอบติดตามฤทธิ์ยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์จนได้สารบริสุทธิ์ โดยวิธีการทดสอบฤทธิ์บนอาหารแข็งได้ดำเนินการตาม (Wangkwan และคณะ, 2009) โดยใช้ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ (*MATa trp1-1 leu2-3 ade2-1 ura3-1 112 his3-11 can1-100 zds1::TRP1 syr1::HIS3 pdr1::hisG-URA3-hisG pdr3::hisG-URA3-hisG*) (Chanklan และคณะ, 2008) โดยมีวิธีการทดสอบดังนี้ เตรียมอาหารกึ่งแข็ง YPAUD (ภาคผนวก ก) ปริมาณ 8 มิลลิลิตร/หลอด ที่ทำการหลอมจนเป็นเนื้อเดียวกัน และเก็บไว้ที่ 55 องศาเซลเซียสในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ จากนั้นทำการผสมอาหารเลี้ยงเชื้อ, เซลล์บ่งชี้ $\Delta zds1$ (6×10^5 เซลล์ต่อ มิลลิลิตร) และ CaCl_2 ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 150 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ เทอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวในจานเพาะเชื้อ รอให้อาหารแข็งและหยดส่วนสกัดที่ได้ (ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร โดยใช้สาร FK506 ความเข้มข้น 500 นาโนโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตรและ DMSO ปริมาตร 5 ไมโครลิตรเป็นชุดควบคุมผลบวกและผลลบตามลำดับ เมื่อสารซึมลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน แล้วจึงอ่านผลการทดลองโดยสังเกตการเจริญของยีสต์บนจานเพาะเชื้อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลบวกและผลลบ

3.9 การทำละลายสารประกอบคูมาริน

ทำละลายสารประกอบคูมารินด้วยตัวทำละลาย DMSO โดยทำการซั่งสารประกอบคูมารินน้ำหนัก 3.98 มิลลิกรัม เติมตัวทำละลาย DMSO ลงไปเล็กน้อยแล้วนำไปปั่นผสมด้วยเครื่องปั่นผสมสารจนสารละลายเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นจึงค่อยๆ เติมตัวทำละลาย DMSO ลงไปและทำการปั่นผสม จนครบปริมาตร 100 ไมโครลิตร ได้สารประกอบคูมารินความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (น้ำหนักโมเลกุลของสารประกอบคูมารินคือ 398 กรัมต่อโมล)

การนำสารประกอบคูมารินไปใช้ในการทดลองต่อไป ต้องทำการผสมสารประกอบคูมารินกับอาหารเลี้ยงเชื้อหรืออาหารเลี้ยงเซลล์ โดยมีขั้นตอนดังนี้ เติมสารประกอบคูมารินที่ละลายในตัวทำละลาย DMSO ลงในหลอดทดลองใหม่ จากนั้นค่อยๆ เติมอาหารเลี้ยงเชื้อหรืออาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำไปปั่นผสมด้วยเครื่องปั่นผสมสารจนสารละลายเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นจึงเติมอาหารเลี้ยงเชื้อหรืออาหารเลี้ยงเซลล์ ลงไปในปริมาตรที่เพิ่มขึ้นแบบเท่าตัว และนำไปปั่นผสมด้วยเครื่องปั่นผสมสารจนสารละลายเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน ค่อยๆ เติมจนได้ครบปริมาตรที่ต้องการ การละลายด้วยวิธีดังกล่าวจะทำให้สารประกอบคูมารินไม่ตกผลึกและจับตัวเป็นก้อน

3.10 การศึกษาผลของสารประกอบคูมารินในการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์

ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์ของสารประกอบคูมาริน โดยการติดตามผลการเจริญของยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ ในอาหารเหลวที่มีสารประกอบคูมาริน โดยนำยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ เลี้ยงในอาหารเหลว Yeast Peptone Adenine Uracil Dextrose (YPAUD) จนกระทั่งมีความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยอยู่ในช่วง early log phase ($0.5-1 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) แล้วปั่นแยกตะกอนเซลล์และละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเหลว YPAUD ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโทมิเตอร์ แล้วปรับความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์แขวนลอยให้เป็น 5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบกับสารประกอบคูมารินที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยแปรผันความเข้มข้นของสาร (ไมโครโมลาร์) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ FK506 ความเข้มข้น 250 นาโนโมลาร์ และ DMSO ร้อยละ 0.5 เป็นชุดควบคุมผลบวกและชุดควบคุมผลลบตามลำดับ จากนั้นจึงเติม CaCl_2 ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการนับจำนวนเซลล์ยีสต์ทุกๆ 2

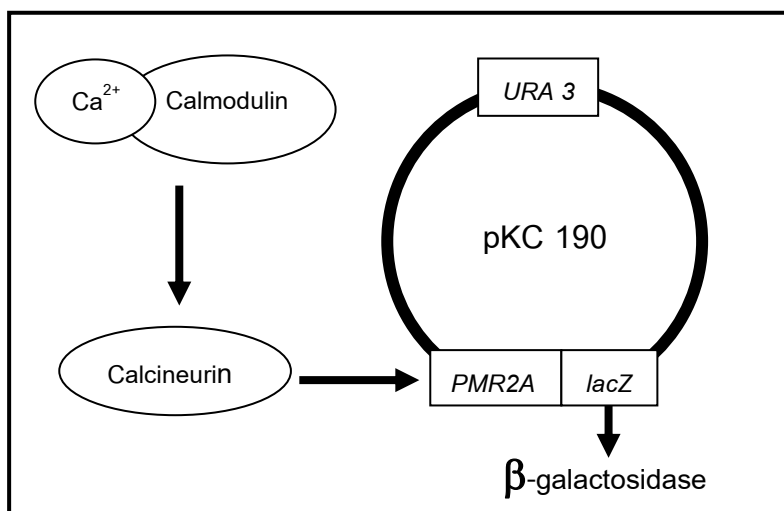
ชั่วโมงเป็นเวลานาน 14 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์เพื่อติดตามการเจริญของเซลล์ด้วยฮีมาไซโทมิเตอร์

3.11 การศึกษาหาโมเลกุลเป้าหมายของสารประกอบคูมารินในวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์

สารประกอบคูมารินสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณแคลเซียมได้ แต่ไม่ทราบว่ายับยั้งที่ตำแหน่งหรือช่วงใดของวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียม ดังนั้นการทดลองดังต่อไปนี้ จะทำการศึกษาหาโมเลกุลเป้าหมายเบื้องต้นของสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งการส่งสัญญาณของแคลเซียมในเซลล์ยีสต์

3.11.1 การศึกษาผลของสารประกอบคูมารินต่อระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ยีสต์

เนื่องจากสารออกฤทธิ์อาจออกฤทธิ์ยับยั้งแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ได้ จึงต้องมีการตรวจสอบระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ ซึ่งมีวิธีการดังนี้ นำยีสต์สายพันธุ์ W303 (*trp1-1 leu2-3 ade2-1 ura3-1 112 his3-11 can1-100*, จาก SGD's culture collection) ที่มีพลาสมิด pKC190 (Matheos และคณะ, 1997) อยู่ภายในเซลล์ โดยพลาสมิด pKC190 ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ของยีน *PMR2A* ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตอบสนองต่อระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ ซึ่งต่อกับยีนแสดงผล *lacZ* ซึ่งประมวลรหัสเอนไซม์ β -galactosidase (ภาพที่ 3.1) (Cunningham และ Fink, 1996) เมื่อมีระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์เพิ่มขึ้น แคลเซียมอิสระจะจับกับ calmodulin และจะไปกระตุ้นการทำงานของ calcineurin ซึ่งจะส่งผลให้มีการกระตุ้น promoter และมีการแสดงออกของยีนประมวลรหัสดังกล่าว จึงเป็นผลให้เกิดการสร้างเอนไซม์ β -galactosidase ขึ้น



ภาพที่ 3.1 แบบจำลองส่วนประกอบภายในพลาสมิด pKC190 และการตอบสนองต่อระดับแคลเซียมอิสระในเซลล์

ที่มา : วชิรศักดิ์ วังกังวาน, 2550

โดยการทดลองมีรายละเอียดดังนี้ นำยีสต์สายพันธุ์ดังกล่าวเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPAUD จนกระทั่งมีความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยอยู่ในช่วง exponential phase ($2 - 5 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ปั่นแยกตะกอนเซลล์และละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPAUD จากนั้นนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโทมิเตอร์ แล้วปรับความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์แขวนลอยให้เป็น 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเติมสารประกอบคูมารินให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายตามต้องการ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที โดยใช้สาร FK506 ความเข้มข้น 500 นาโนโมลาร์, $MgCl_2$ และ DMSO ร้อยละ 0.5 เป็นชุดควบคุมผลการทดลอง จากนั้นเติม $CaCl_2$ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 มิลลิโมลาร์ และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยที่ได้มาวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ β -galactosidase (β -galactosidase activity) ด้วยวิธี β -galactosidase liquid assay for yeast (Joseph และ Russell, 2001)

การสกัดเซลล์ยีสต์เพื่อตรวจหาระดับของเอนไซม์ β -galactosidase มีรายละเอียดดังนี้ ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยใช้ blank เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPAUD บันทึกค่าที่ได้ และนำ 1 มิลลิลิตรของเซลล์แขวนลอยมาปั่นแยกเซลล์ จากนั้นนำสารละลายเซลล์ยีสต์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที แล้วเทส่วนน้ำใสออก ละลายตะกอนเซลล์ด้วย Z-buffer (ภาคผนวก ข) 150 ไมโครลิตร จากนั้นเติมคลอโรฟอร์ม 50 ไมโครลิตรและ 0.1% SDS 20 ไมโครลิตร นำไป

ปั่นผสมด้วยเครื่องปั่นผสมสารที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 15 นาที เติม Ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) (1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่มีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันพร้อมกับจับเวลาเริ่มต้นปฏิกิริยา บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส จนกว่าสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน จดบันทึกเวลาที่ใช้ (หน่วยวินาที) จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม Na_2CO_3 1 โมลาร์ 500 ไมโครลิตร และนำไปปั่นผสมสารให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที โดยเก็บส่วนใสใส้หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ เพื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร โดยใช้ blank เป็น ONPG 700 ไมโครลิตรผสมกับ Na_2CO_3 1 โมลาร์ 500 ไมโครลิตร คำนวณหาแอกติวิตีของเอนไซม์ β -galactosidase โดยใช้สมการต่อไปนี้

$$\beta\text{-galactosidase activity (miller unit)} = \frac{A_{420} \times 1,000}{A_{600} \times T \times V}$$

OD_{420} = ค่าการดูดกลืนแสงของส่วนใสที่ 420 นาโนเมตร

OD_{600} = ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPAUD ที่ 600 นาโนเมตร

T = เวลาที่ทำให้สารละลายเปลี่ยนสีจากสีขาวเป็นสีเหลืองอ่อน ในหน่วยวินาที

V = ปริมาตรของเซลล์แขวนลอยที่ใช้

3.11.2 การศึกษาผลของสารประกอบคูมารินต่อโปรตีน Mpk1 และ calcineurin ในเซลล์ยีสต์

เมื่อแคลเซียมอิสระเข้าสู่ภายในเซลล์ยีสต์แล้ว วิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียม นั้นเกิดขึ้นได้โดยการส่งสัญญาณผ่าน 2 วิธีคู่ขนานได้แก่ วิธีที่ส่งสัญญาณของแคลเซียมผ่าน Mpk1 และวิธีที่ส่งสัญญาณของแคลเซียมผ่าน calcineurin (ดังรูปที่ 1) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงต้องศึกษาว่าโมเลกุลเป้าหมายของสารประกอบคูมารินคือ โปรตีน Mpk1 หรือ calcineurin โดยอาศัยวิธีทางพันธุศาสตร์ของยีสต์ที่เรียกว่า Synthetic lethality analysis ซึ่งมีหลักการดังนี้ ยีสต์ที่มีการทำลายทั้งยีน *MPK1* และยีน *CNB1* ($\Delta\text{mpk1}\Delta\text{cnb1}$) ไม่สามารถเจริญได้ (lethal phenotype) แต่ยีสต์สายพันธุ์ที่มีการทำลายยีน *MPK1* (Δmpk1) หรือมีการทำลายยีน *CNB1*

($\Delta cnb1$) ยังสามารถเจริญได้ ดังนั้นหากสารออกฤทธิ์ที่ได้ไปยับยั้ง ที่โมเลกุลเป้าหมายที่โปรตีน Mpk1 หรือ calcineurin จะทำให้ยีสต์สายพันธุ์กลาย ($\Delta cnb1$) หรือ ($\Delta mpk1$) ไม่สามารถเจริญได้ ตามลำดับ (Nakamura และคณะ , 1996) โดยการดูลักษณะการเจริญของสายพันธุ์กลายต่างๆเมื่อเติมสารออกฤทธิ์จะทำให้ทราบได้ว่า สารที่ได้ออกฤทธิ์ที่โมเลกุลเป้าหมายคือ Mpk1 หรือ calcineurin หรือไม่ โดยมีวิธีการดังนี้

ทำการทดสอบโดยใช้ยีสต์สายพันธุ์กลาย ($\Delta cnb1$ จีโนไทป์เหมือนกับ W303 ยกเว้น *TRP1 cnb1::HIS3 syr1::HIS3 pdr1::hisG-URA3-hisG pdr3::hisG-URA3-hisG*) หรือ ($\Delta mpk1$ จีโนไทป์เหมือนกับ W303 ยกเว้น *TRP1 mpk1::HIS3 syr1::HIS3 pdr1::hisG-URA3-hisG pdr3::hisG-URA3-hisG*) (วชิรศักดิ์ วังกังวาน, 2550) วิธีการวัดการเจริญในอาหารเหลว (ดัดแปลงจากวิธีการที่ระบุใน สิรินพร สุขสวัสดิ์อำนาจ, 2552) มีรายละเอียดดังนี้ นำยีสต์สายพันธุ์กลายเลี้ยงในอาหารเหลว YPAUD จนกระทั่งมีความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยอยู่ในช่วง early log phase ($0.5-1 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ปั่นแยกเซลล์และละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเหลว YPAUD จากนั้นนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโทมิเตอร์ แล้วปรับความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์แขวนลอยให้เป็น 5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดทดลองที่เติมสารประกอบคูมาริน ใช้สาร FK506 ความเข้มข้น 250 นาโนโมลาร์และ DMSO ร้อยละ 0.5 เป็นชุดควบคุมผลบวกและชุดควบคุมผลลบตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นวัดการเจริญของยีสต์โดยทำการนับจำนวนเซลล์ทุกๆ 2 ชั่วโมงเป็นเวลานาน 14 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์เพื่อหาความหนาแน่นของเซลล์โดยการนับได้กล้องด้วยฮีมาไซโทมิเตอร์

3.12 การศึกษาผลของสารประกอบคูมารินต่อโมเลกุลเป้าหมายในยีสต์ โดยวิธีทางพันธุศาสตร์ของยีสต์

3.12.1 การศึกษาผลของสารประกอบคูมารินต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์กลาย

$\Delta zds1$ [GAL1p-CMP $\Delta 2C$]

ทดสอบโดยใช้ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ overexpressed calcineurin [GAL1p-CMP $\Delta 2C$] การวัดการเจริญในอาหารเหลวมีรายละเอียดดังนี้ นำยีสต์สายพันธุ์กลายเลี้ยงในอาหารเหลว YPAUD จนกระทั่งมีความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยอยู่ในช่วง early log phase ($0.5-1 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ปั่นแยกเซลล์ ละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเหลว 2%

galactose 1% raffinose SC medium จากนั้นนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโทมิเตอร์ แล้วปรับความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์แขวนลอยให้เป็น 5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดทดลองที่เติมสารประกอบคูมารินความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์และ FK506 ความเข้มข้น 250 นาโนโมลาร์และ DMSO ร้อยละ 0.5 เป็นชุดควบคุมผลบวกและชุดควบคุมผลลบตามลำดับ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส วัดการเจริญของยีสต์โดยทำการนับจำนวนเซลล์เพื่อหาความหนาแน่นของเซลล์โดยการนับได้กล้องด้วยฮีมาไซโทมิเตอร์

3.12.2 การศึกษาผลของสารประกอบคูมารินต่อรูปร่างของเซลล์และการแบ่งนิวเคลียสของยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ [GAL1p-CMP Δ 2C]

เซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ เมื่อถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมสูง เซลล์จะหยุดการเจริญอยู่ที่ระยะ G2 นอกจากนี้แล้ววิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมยังมีผลทำให้รูปร่างของเซลล์ผิดปกติด้วย กล่าวคือ เซลล์ลูกที่แตกหน่อออกมาจะยืดยาวออก (elongated bud) และเมื่อย้อมดูนิวเคลียสพบว่า นิวเคลียสจะไม่ถูกแบ่งไปสู่เซลล์ลูกที่ยืดยาว (unequal nuclear division) (Bi และ Pringle, 1996) ในการทดลองนี้จึงมุ่งหมายที่จะศึกษาผลของสารประกอบคูมารินที่มีต่อรูปร่างของเซลล์และการแบ่งนิวเคลียสของยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ [GAL1p-CMP Δ 2C]

ทดสอบโดยใช้ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ overexpressed calcineurin [GAL1p-CMP Δ 2C] เลี้ยงในอาหารเหลว YPAUD จนกระทั่งมีความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยอยู่ในช่วง early log phase ($0.5-1 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ปั่นแยกเซลล์ ละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเหลว 2% galactose 1% raffinose SC medium จากนั้นนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโทมิเตอร์ แล้วปรับความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์แขวนลอยให้เป็น 5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดทดลองที่เติมสารประกอบคูมารินความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์และ DMSO ร้อยละ 0.5 เป็นชุดควบคุมผลลบ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เก็บเซลล์ในช่วงเวลาดังกล่าวมาดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และย้อมนิวเคลียสของเซลล์ด้วยสี Hoechst 33342 และดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์

3.13 การศึกษาผลของสารประกอบคูมารินต่อการทำงานของ calcineurin แบบ *in vitro*

ทดสอบผลของสารประกอบคูมารินที่มีต่อแอกติวิตีของ calcineurin ในหลอดทดลอง (*in vitro* assay) โดยใช้ชุด calcineurin Assay kit (Calbiochem, Germany) เพื่อวัดการทำงานของ calcineurin โดยอาศัยหลักการการเปลี่ยนแปลงสีของสารตั้งต้น โดย calcineurin จะทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ phosphatase ตัดหมู่ฟอสเฟตออกจากสารตั้งต้น RII phosphopeptide ทำให้เกิดการปลดปล่อยหมู่ฟอสเฟตอิสระขึ้น จากนั้นสามารถวัดการทำงานของ calcineurin ได้จากการวัดปริมาณฟอสเฟตอิสระ ซึ่งจะเปลี่ยนสี Malachite green จากสีเหลืองเป็นสีเขียว ขั้นตอนการทดลองมีรายละเอียดดังนี้ ทำการทดลองในภาชนะเลี้ยงเซลล์แบบ 384 หลุม โดยใส่ calmodulin ที่ละลายด้วย assay buffer 6.25 ไมโครลิตร, calcineurin 5 ไมโครลิตรและสารประกอบคูมารินในความเข้มข้น 62.5, 125, 250 และ 500 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร (กำหนดให้ชุดควบคุมผลบวกคือ FK506 ความเข้มข้น 150 นาโนโมลาร์ และชุดควบคุมผลลบคือ DMSO ร้อยละ 0.5 และน้ำกลั่น) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม RII phosphopeptide 2.5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เติม Malachite green 25 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 20 – 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่น 620 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader และคำนวณปริมาณฟอสเฟตอิสระของแต่ละชุดทดสอบจากกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฟอสเฟตอิสระและค่าการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่น 620 นาโนเมตร (ภาคผนวก ค)

3.14 การศึกษาผลของสารประกอบคูมารินต่อโมเลกุลเป้าหมายในเซลล์มนุษย์

3.14.1 การศึกษาผลของสารประกอบคูมารินต่อการอยู่รอดของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ Jurkat โดยวิธี MTT proliferation assay

เนื่องจาก calcineurin มีบทบาทในกระบวนการกระตุ้นการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T-lymphocyte ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายมนุษย์ การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบคูมารินในเซลล์มนุษย์ จึงต้องทดลองโดยใช้เซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ชนิด Jurkat ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด T-lymphocyte ซึ่งต้องมีการทดลองหาช่วงค่าความเข้มข้นของสารที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยใช้วิธี MTT proliferation assay (Mosmann, 1983) เพื่อศึกษาผลของสารประกอบคูมารินต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ Jurkat โดยมีวิธีการทดลองดังนี้ เตรียมเซลล์ความเข้มข้น 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หยอดลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุมปริมาตร 50

ไมโครลิตร เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารประกอบคูมารินที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งละลายใน DMSO ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงไป นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บรรยากาศ CO₂ 5% นาน 24 ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นเติม MTT ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งละลายใน Phosphate Buffered Saline (PBS) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ต่อหลุม บ่มไว้ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสบรรยากาศ CO₂ 5% นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นเติม HCl ความเข้มข้น 0.04 นอร์มัลไนไฮโซโพรพานอล ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุมโดยใช้ปิเปตต์ หลายช่อง (multi channel pipette) ดูดขึ้นลงให้ตะกอนสีม่วงละลายจนหมด จากนั้นนำไปวัดค่า การดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ (%viability) โดยใช้สมการต่อไปนี้

$$\%Viability = \frac{(OD_{\text{test average}} - OD_{\text{blank average}}) \times 100}{OD_{\text{control cell average}} - OD_{\text{blank average}}}$$

OD_{test average} = ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่เติมสารประกอบคูมารินหรือ DMSO

OD_{control cell average} = ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของเซลล์

OD_{blank average} = ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม

3.14.2 การศึกษาผลของสารประกอบคูมารินต่อระดับของ IL-2 โดยวิธี ELISA

เตรียมเซลล์ความเข้มข้น 0.5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หยอดลงในถาดเลี้ยงเซลล์ แบบ 12 หลุมปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารประกอบคูมารินที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งละลายใน DMSO ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงไป บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บรรยากาศ CO₂ 5% นาน 30 นาที จากนั้นกระตุ้นด้วย Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ Ionomycin (Io) 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในตู้ บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสบรรยากาศ CO₂ 5% นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นย้ายเซลล์ในแต่ละ หลุมใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ หลอดละ 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 rpm นาน 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส วิธีการทำ ELISA ตาม รายละเอียดดังนี้ ใส่ capture antibody (anti-human IL-2) ที่ละลายใน coating buffer 100

ไมโครลิตร ในแต่ละหลุมของภาดเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม นำไปป่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ค้างคืน นำมาล้างด้วย PBST จำนวน 5 ครั้ง และใส่ assay diluents 200 ไมโครลิตร ป่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBST จำนวน 5 ครั้ง ใส่ตัวอย่างที่เตรียมไว้ หรือสารมาตรฐาน (Recombinant human IL-2) ลงไป 100 ไมโครลิตร ป่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน นำมาล้างด้วย PBST จำนวน 5 ครั้ง ใส่ detection antibody (Biotin-conjugated anti-human IL-2) 100 ไมโครลิตร ป่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST จำนวน 5 ครั้ง จากนั้นใส่ Avidin-HRP 100 ไมโครลิตร ป่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที และล้างด้วย PBST จำนวน 7 ครั้ง เติม substrate (TMB solution) 100 ไมโครลิตร ป่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที และใส่ stop solution (2N H₂SO₄) 50 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาคำนวณกับกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ IL-2 และค่าการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่น 450 นาโนเมตร

3.14.3 การศึกษาผลของสารประกอบมารินต่อการแสดงออกที่ยีนเป้าหมายในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ ด้วยวิธี RT-PCR

ศึกษาผลต่อการแสดงออกของยีนเป้าหมายในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ในเชิงกึ่งปริมาณด้วยวิธี RT-PCR (Udvardi และคณะ, 2008) โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.14.3.1 การสกัดอาร์เอ็นเอ

เตรียมเซลล์ความเข้มข้น 0.5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หยอดลงในภาดเลี้ยงเซลล์แบบ 12 หลุม ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารประกอบมารินที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งละลายใน DMSO ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงไป ป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสบรรยากาศ CO₂ 5% นาน 30 นาที จากนั้นกระตุ้นด้วย Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรและ Ionomycin (Io) 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในตู้ป่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บรรยากาศ CO₂ 5% นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นย้ายเซลล์ในแต่ละหลุมใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ หลอดละ 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้งจะได้ตะกอนเซลล์ จากนั้นนำตะกอนเซลล์ดังกล่าวมาสกัดอาร์เอ็นเอ โดยการใช้ TRIZOL reagent (Invitrogen, CA) โดยมีวิธีการดังนี้ ใส่ TRIZOL reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ตะกอนเซลล์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5

นาที่ จากนั้นใส่ chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าหลอดแรงๆ ประมาณ 15 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-3 นาที เพื่อให้สารเกิดการแยกชั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 12000 g เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นค่อยๆ ดูดส่วนใสด้านบน ประมาณ 400 ไมโครลิตร ย้ายใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ เติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทำการผสมกันเบาๆ แบบกลับไปมา (invert) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 12000 g เป็นเวลา 10 นาที จะได้ตะกอนอาร์เอ็นเอ ทำการเทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยร้อยละ 75 เอทานอลในน้ำปลอดประจุปลอด RNase (DEPC water) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 7500 g เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วทำให้ตะกอนอาร์เอ็นเอแห้ง จากนั้นละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย DEPC water 25 – 40 ไมโครลิตร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดของตะกอน นำไปปั่นที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำไปหาค่าความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ตามลำดับ โดยใช้ DEPC water เป็นตัวเปรียบเทียบ (blank) คำนวณหาค่าความเข้มข้นของ RNA จากสมการดังนี้

$$\text{ปริมาณ RNA (ไมโครกรัมต่อลิตร)} = A_{260} \times 40 \times \text{dilution factor}$$

$$A_{260} = \text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร}$$

RNA 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0 (Ausubel และคณะ, 1999) ความบริสุทธิ์ของ RNA คำนวณได้จากอัตราส่วนระหว่าง A_{260}/A_{280} ค่าที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 1.8 - 2.0 ถ้าค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อนสูง ถ้าค่ามากกว่า 2.0 แสดงว่ามี DNA ปนเปื้อนสูง

3.14.3.2 การสังเคราะห์คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ (cDNA) โดยรีเวอร์สทรานสคริปเทส

ใช้อาร์เอ็นเอที่เตรียมได้ตามข้อ 3.5.2.1 จำนวน 100 นาโนกรัม - 1 ไมโครกรัมต่อปฏิกิริยา เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอโดยใส่ในหลอดพีซีอาร์ จากนั้นเติม random hexamer ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เติม DEPC water จนปริมาตรครบ 12.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมสารและปั่นเหวี่ยงให้สารละลายตกที่ก้นหลอดพีซีอาร์ประมาณ 2-3 วินาที นำไปใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermal Cycler, USA) โดยตั้งอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และ

4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำมาเติม 5X Reverse Transcriptase buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร dNTP mix ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร Ribonuclease inhibitor ความเข้มข้น 40 ยูนิต/ไมโครลิตร ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมสารและปั่นเหวี่ยงให้สารละลายตกลงที่ก้นหลอดพีซีอาร์ประมาณ 2-3 วินาที ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที เติม Reverse Transcriptase ความเข้มข้น 200 ยูนิต/ไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที จากนั้นดำเนินปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เก็บรักษาคอมพลีเมนต์ที่เย็นได้ที่เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส หรือนำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อไป

3.14.3.3 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ดำเนินปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้คอมพลีเมนต์ที่เย็นเอจากข้อ 3.5.2.2 เป็นต้นแบบ ดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermal Cycler, USA) ตามส่วนผสมและสภาวะการทำปฏิกิริยาที่กำหนดไว้ ดังตารางที่ 3.4 โดยใช้ไพรเมอร์ Interleukin-2 (IL-2) และ β -Actin และตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5-10 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วย Gel Documentation โปรแกรม Quantity One version 4.4.1 (Bio-Rad, USA)

ตารางที่ 3.4 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (RT-PCR)

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตร	ความเข้มข้นสุดท้าย
Reaction buffer	10 เท่า	2.5 ไมโครลิตร	1 เท่า
ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์	25 มิลลิโมลาร์	1.25 ไมโครลิตร	0.5 ไมโครโมลาร์
รีเวิร์สไพรเมอร์	10 ไมโครโมลาร์	1.25 ไมโครลิตร	0.5 ไมโครโมลาร์
dNTP mix	10 ไมโครโมลาร์	0.5 ไมโครลิตร	200 ไมโครโมลาร์
Taq DNA polymerase	5 ยูนิต/ไมโครลิตร	0.2 ไมโครลิตร	1 ยูนิต
Nuclease-free water		17.3 ไมโครลิตร	
cDNA	1 ไมโครกรัม/ ไมโครลิตร	2 ไมโครลิตร	
ปริมาตรสุทธิ		25 ไมโครลิตร	

ดำเนินสภาวะการทำปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

Denaturation	1 รอบ
Amplification	30 รอบ
Extension	1 รอบ
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที
Amplification	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที
	ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 1 นาที
	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที
Cooling	ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

3.14.4 การศึกษาผลของสารประกอบคูมารินต่อการแสดงออกของโปรตีนเป้าหมาย NFAT โดยวิธีเวสเทิร์นบลอต

ในกระบวนการกระตุ้นการทำงานของ T-lymphocyte โดยผ่านการกระตุ้นของ calcineurin จะเกิดขึ้นโดยการตัดหมู่ฟอสเฟตออกจาก NFAT ส่งผลให้มีการเคลื่อนที่ของ NFAT เข้าสู่นิวเคลียส และกระตุ้นการผลิตไซโตไคน์เช่น Interleukin-2 ตามลำดับ ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาผลของสารประกอบคูมารินต่อโปรตีนเป้าหมาย NFAT ด้วย โดยวิธีเวสเทิร์นบลอต

3.14.4.1 การสกัดโปรตีนสำหรับวิเคราะห์โดยวิธีเวสเทิร์นบลอต

เตรียมเซลล์ความเข้มข้น 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารประกอบคูมารินที่ความเข้มข้นต่างๆ (12.5, 25, 50, 75 และ 100 μM ตามลำดับ) ในถาดเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ปริมาตรหลุมละ 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บรรยากาศ CO_2 5% นาน 30 นาที โดยมีชุดควบคุมผลบวกเป็น FK506 ความเข้มข้น 100 นาโนโมลาร์ จากนั้นเติมสาร Ionomycin (Io) 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสบรรยากาศ CO_2 5% นาน 24 ชั่วโมง มีชุดควบคุมผลลบเป็นเซลล์ที่ไม่ได้เติมสาร Ionomycin

สกัดโปรตีนโดยนำเซลล์ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนน้ำใสออก จากนั้นล้างตะกอนเซลล์ด้วย PBS (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 7,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนน้ำใสออก เติม Buffer A (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำไปปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 7,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนน้ำใสออก จากนั้นเติม Buffer B (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) ที่ผสม Phosphatase inhibitor (อัตราส่วน 1 ไมโครลิตร/ Buffer B 100 ไมโครลิตร) ปริมาณ 25-30 ไมโครลิตร นำไปปั่นผสมด้วยเครื่องผสมสาร (vortex) ที่ความเร็วสูงสุด นาน 1 นาที (ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) และปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 7,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนน้ำใสใส่หลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ เก็บที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส

3.14.4.2 การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bicinchoninic Acid Assay (BCA assay)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA assay โดยใช้ชุดทดสอบ BCATM protein assay kit ของบริษัท PIERCE ตามคำแนะนำของผู้ผลิต ดังนี้ เตรียม working reagent ด้วยการผสมรีเอเจนต์ A กับ รีเอเจนต์ B ในอัตราส่วน A:B เป็น 50:1 จากนั้นเตรียมสารมาตรฐาน BSA และสารตัวอย่าง โดยทำการเจือจางสารมาตรฐาน BSA 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิตรด้วยน้ำปลอดประจุในภาตเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม ซึ่งจะเจือจางลง 2 เท่าด้วยน้ำปลอดประจุทำให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 และ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรตามลำดับ และสารตัวอย่างเจือจางที่ความเข้มข้น 1:10 จำนวน 10 ไมโครลิตรด้วยน้ำปลอดประจุ (ทำสองหลุมต่อหนึ่งตัวอย่าง) เติม working reagent ลงไปในหลุมที่มีสารมาตรฐานและสารตัวอย่างหลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าภาตเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุมเบาๆประมาณ 30 วินาที ก่อนนำไปเข้าตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำภาตเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุมออกมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2-3 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรโดยใช้เครื่อง microplate reader คำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนและค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 540 นาโนเมตร (ภาคผนวก ค)

3.14.4.3 การแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

เตรียมเจล SDS-polyacrylamide gel ขนาด 8.3x8.3 เซนติเมตร หน้า 1.5 มิลลิเมตร โดย separating gel และ stacking gel ใช้ acrylamide ความเข้มข้น 10% และ 5% ตามลำดับ (ภาคผนวก ข) เตรียมตัวอย่างทดสอบปริมาณ 20 ไมโครกรัม เติม staining buffer ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาทีเพื่อทำลายโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน หยดสารละลายโปรตีนแต่ละตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลลงในช่อง SDS-polyacrylamide gel ทำการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 50 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง ใน Western blot running buffer (ภาคผนวก ข) โดยใช้ชุดเครื่องมือ Protein III System ของบริษัท Bio-Rad, USA

3.14.4.4 การถ่ายโอนโปรตีนจากเจลไปยัง polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane

หลังจากแยกโปรตีนด้วยวิธีข้างต้นแล้ว ตัดบริเวณ stacking gel ที่ วัดขนาดของเจล นำเจลไปแช่ใน transfer buffer (ภาคผนวก ข) วางบนเครื่องเขย่าประมาณ 5 นาที ตัดกระดาษกรองและ PVDF membrane ให้มีขนาดเท่ากับเจลจำนวน 6 แผ่น และ 1 แผ่น ตามลำดับ นำแผ่น PVDF membrane แช่ในเมทานอลสัมบูรณ์ (absolute methanol) ให้ชุ่มทั่วทั้งแผ่น ล้างด้วยน้ำปลอดประจุ 2 ครั้ง แล้วนำมาแช่ใน transfer buffer จากนั้นนำกระดาษกรองที่แช่ใน transfer buffer จำนวน 3 แผ่น PVDF membrane เจลและกระดาษกรองที่แช่ใน transfer buffer จำนวน 3 แผ่น วางบนเครื่อง Semi-dry transfer apparatus ตามลำดับ ทำการไล่ฟองอากาศโดยกลิ้งหลอดแก้วบนกระดาษกรองและ PVDF membrane เบาๆ 3 ครั้งไปในทิศทางเดียวกัน หยด transfer buffer ปริมาตรเพียงเล็กน้อย ปิดฝาเครื่อง semi-dry Western blot ทำการส่งถ่ายโปรตีนจากเจลไปยัง PVDF membrane โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 80 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 90 นาที ต่อเจลหนึ่งแผ่น

3.14.4.5 การวิเคราะห์การแสดงผลโดยวิธีเวสเทิร์นบลอตโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะ

นำ PVDF membrane ที่ได้มาแช่ใน blocking solution (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง นำมาแช่ในแอนติบอดีปฐมภูมิ (primary antibody) ที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ต้องการตรวจสอบซึ่งเจือจางใน blocking solution (ภาคผนวก ข) ตามตารางที่ 3.4 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียสทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำมาวางบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 60 นาที เทแอนติบอดีปฐมภูมิใส่ในหลอดทดลองล้าง PVDF membrane ด้วย PBST เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง 15 นาที 2 ครั้ง เท PBST ทิ้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิ (secondary antibody) ที่มี Horse-radish peroxidase ติดฉลากอยู่ ซึ่งเจือจางใน blocking solution ตามตารางที่ 3.4 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร วางบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 60 นาที ล้าง PVDF membrane ด้วย PBST เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง 15 นาที 3 ครั้ง

3.14.4.6 การตรวจสัญญาณด้วยวิธี chemiluminescence และการทำให้เกิดสัญญาณบนแผ่นฟิล์ม X-ray

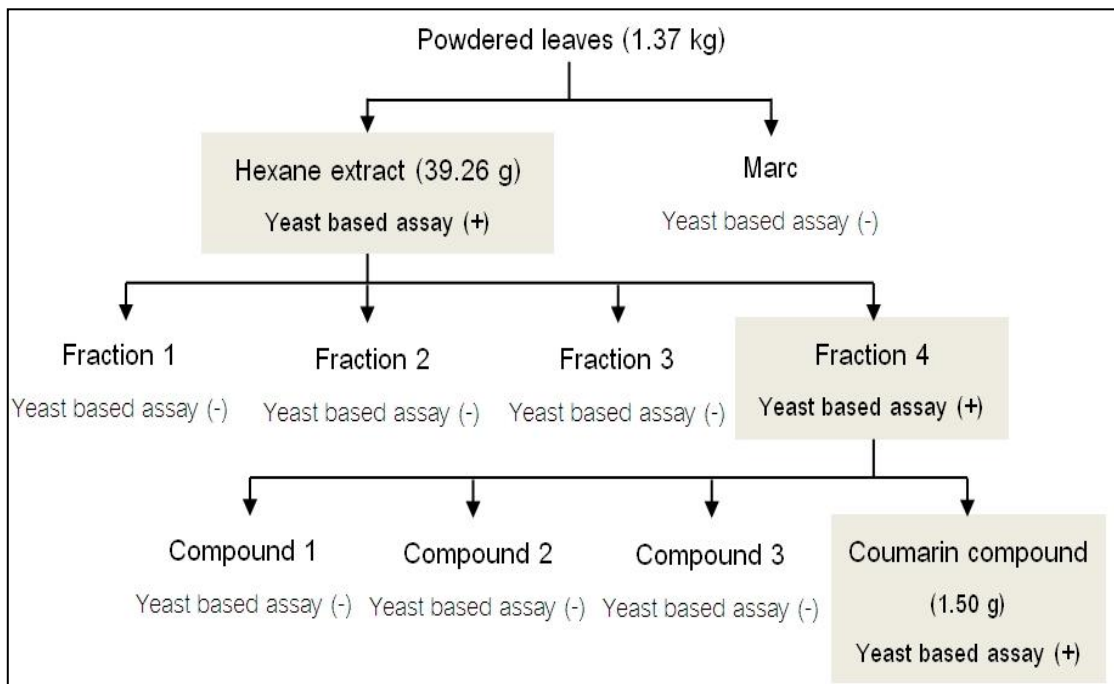
เตรียมชั้นสเตรตของ Horse-radish peroxidase โดยใช้ ECL Western Blot Reagent โดยผสมรีเอเจนต์ 1 กับรีเอเจนต์ 2 ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) นำ PVDF membrane แच्छ่งไปในชั้นสเตรต นาน 1 นาที ใช้ปากคีบคีบเมมเบรนวางลงบนพลาสติกใส (wrap membrane) และปิดทับเมมเบรน ใช้กรรไกรตัดพลาสติกใสให้ห่างจากเมมเบรนเล็กน้อย นำไปวางบนถาดประกบฟิล์ม ใช้เทปกาวติดทั้งสี่มุม ปิดฝาถาด นำไปประกบฟิล์ม X-ray และล้างฟิล์ม X-ray ในห้องมืด

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการแยกเป็นส่วนย่อยและทำให้บริสุทธิ์ของสารสกัดหยาบสองฟ้าดง

ในขั้นตอนการแยกเป็นส่วนย่อยและทำให้บริสุทธิ์ของส่วนสกัดหยาบจากสองฟ้าดง ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการทางเคมีของผศ.ดร.บุญเอก ยิ่งยงณรงค์กุล ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ซึ่งทำการแยกเป็นส่วนย่อยด้วยเทคนิคทาง Column Chromatography จนได้เป็นสารประกอบส่วนย่อย จากนั้นนำส่วนย่อยต่างๆ ที่ได้รับมาทำการทดสอบติดตามฤทธิ์ยับยั้งวิธีการสังเคราะห์ของแคลเซียมในยีสต์จนได้สารบริสุทธิ์ โดยวิธีการทดสอบฤทธิ์บนอาหารแข็งได้ดำเนินการตาม (Wangkangwan และคณะ, 2009) โดยใช้ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ อ่านผลการทดลองโดยสังเกตการเจริญของยีสต์บนจานเพาะเชื้อเปรียบเทียบกับชุดทดสอบกับชุดควบคุมผลบวกและผลลบ หากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสามารถยับยั้งวิธีการสังเคราะห์ของแคลเซียมได้จะทำให้ยีสต์สายพันธุ์กลายกลับมาเจริญได้ตามปกติ อ่านผลเป็น positive และหากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพไม่สามารถยับยั้งวิธีการสังเคราะห์ของแคลเซียมได้ อ่านผลเป็น negative ดังภาพที่ 4.1

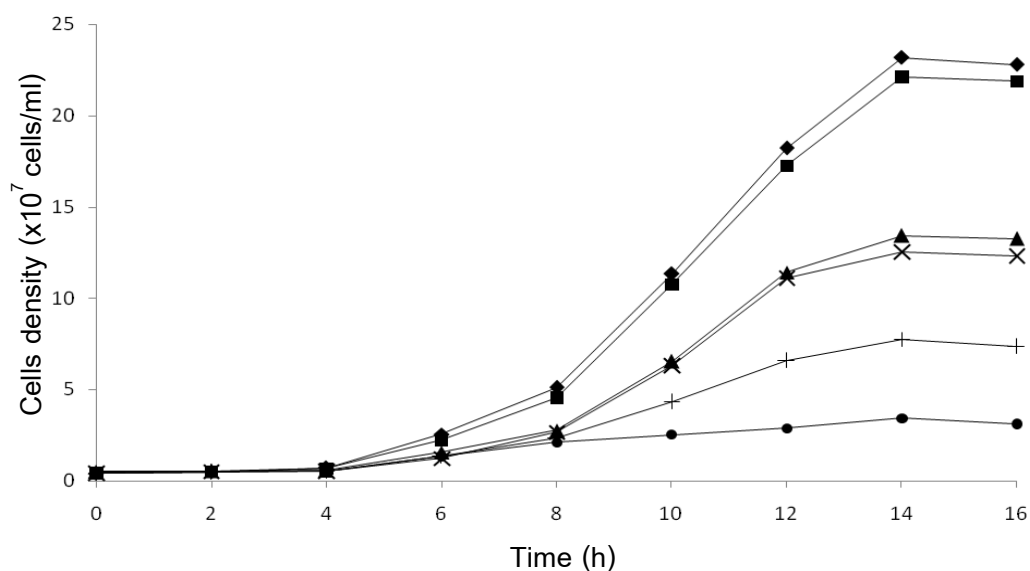


ภาพที่ 4.1 ผลการแยกเป็นส่วนย่อยและทำให้บริสุทธิ์ของใบสองฟ้าดง

จากภาพที่ 4.1 เมื่อติดตามฤทธิ์ทางชีวภาพในส่วนย่อยต่างๆ ที่แยกได้จากใบสองฟ้าแดง พบว่าสารประกอบคูมารินเป็นสารบริสุทธิ์ที่ให้ผลยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์ เนื่องจากสามารถทำให้ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ กลับมาเจริญได้ตามปกติแม้จะถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีแคลเซียมสูงก็ตาม

4.2 ผลของสารประกอบคูมารินต่อวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์

ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์ของสารประกอบคูมารินความเข้มข้นต่างๆ โดยติดตามผลการเจริญของยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ ในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมสูง โดยทำการนับจำนวนเซลล์ยีสต์ทุกๆ 2 ชั่วโมงเป็นเวลานาน 14 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.2



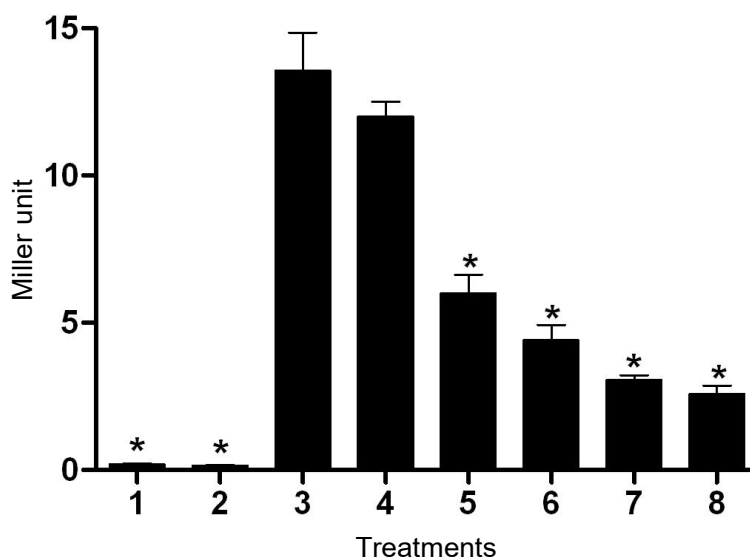
ภาพที่ 4.2 ฤทธิ์ยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ ของสารประกอบคูมาริน

ในภาพแสดงการเจริญของยีสต์ $\Delta zds1$ ที่ถูกเลี้ยงใน YPAUD medium ที่ผสมสารทดสอบต่างๆ ซึ่งกำหนดสัญลักษณ์ดังนี้ ◆ = 0.5% DMSO, ■ = สารประกอบคูมาริน 250 μM , ▲ = 250 nM FK506 + 100 mM CaCl₂, ✕ = สารประกอบคูมาริน 250 μM + 100 mM CaCl₂, + = สารประกอบคูมาริน 125 μM + 100 mM CaCl₂ และ ● = 0.5% DMSO + 100 mM CaCl₂ (ภาพที่แสดงนี้เป็นตัวแทนจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

จากผลการทดลองภาพที่ 4.2 เมื่อติดตามผลการเจริญของยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ พบว่าเซลล์ยีสต์ดังกล่าวเมื่อถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมสูง จะไม่สามารถเจริญได้ เมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีแคลเซียม ซึ่งพบการเจริญของยีสต์ตามปกติ ทั้งนี้เมื่อใส่ยา FK506 (calcineurin inhibitor) ซึ่งเป็นชุดควบคุมผลบวก จะเห็นได้ว่าแม้ยีสต์สายพันธุ์กลายจะถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมสูง แต่ก็ยังสามารถกลับมาเจริญได้ ผลการทดลองเป็นไปในทำนองเดียวกันกับในกรณีของสารประกอบคูมาริน 250 μM ซึ่งสามารถทำให้ยีสต์สายพันธุ์กลายกลับมาเจริญได้เช่นกัน และมีฤทธิ์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสาร (dose-dependent manner) อีกทั้งยังไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลายที่ความเข้มข้นดังกล่าวอีกด้วย บ่งชี้ได้ว่าสารประกอบคูมารินมีฤทธิ์ยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์ได้

4.3 ผลของสารประกอบคูมารินต่อระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ยีสต์

เนื่องจากสารประกอบคูมารินมีฤทธิ์ยับยั้งการส่งสัญญาณของแคลเซียม อาจเกิดจากการยับยั้งที่แคลเซียมอิสระภายในเซลล์ได้ จึงต้องมีการตรวจสอบระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ เพื่อศึกษาว่าสารประกอบคูมารินสามารถลดระดับหรือขัดขวางการทำงานของแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ในสภาวะที่มีแคลเซียมสูงหรือไม่ ยีน *PMR2A* ประมวลรหัส ion transporter มีความสำคัญต่อกระบวนการรักษาสสมดุลย์ของไอออน (ion haemostasis) ถูกควบคุมระดับการแสดงออกโดยระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ผ่านทาง calcineurin (Cunningham และ Fink, 1996) ในการทดลองนี้ได้ใช้ยีสต์สายพันธุ์ W303 ที่มีพลาสมิด pKC190 พลาสมิดดังกล่าวประกอบด้วย promotor ของยีน *PMR2A* เชื่อมกับยีนรายงานผล lacZ ที่ประมวลรหัสเอนไซม์ β -galactosidase โดยที่ถ้ายีสต์ดังกล่าวอยู่ในสภาวะที่มีแคลเซียมสูง จะมีการแสดงออกของยีนรายงานผลมากกว่าปกติ ถ้าสารออกฤทธิ์ที่ได้มีผลต่อระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์จะทำให้การกระตุ้นการแสดงออกของยีนรายงานผลอยู่ในระดับต่ำกว่าชุดที่ไม่มีการเติมสาร ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.3 ผลของสารประกอบคูมารินต่อระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ยีสต์

ในภาพแสดงระดับของแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ โดยเลี้ยงเซลล์ยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPAUD ซึ่งผสมสารทดสอบต่างๆ ในแต่ละชุดทดสอบ ดังนี้ 1 = ไม่ใส่แคลเซียม, 2 = 500 nM FK506 + 100 mM CaCl₂, 3 = 100 mM CaCl₂, 4 = 0.5% DMSO + 100 mM CaCl₂, 5 = สารประกอบคูมาริน 0.5 mM + 100 mM CaCl₂, 6 = สารประกอบคูมาริน 1 mM + 100 mM CaCl₂, 7 = สารประกอบคูมาริน 2 mM + 100 mM CaCl₂ และ 8 = 1 mM MgCl₂ + 100 mM CaCl₂ (ภาพที่แสดงนี้เป็นตัวแทนจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

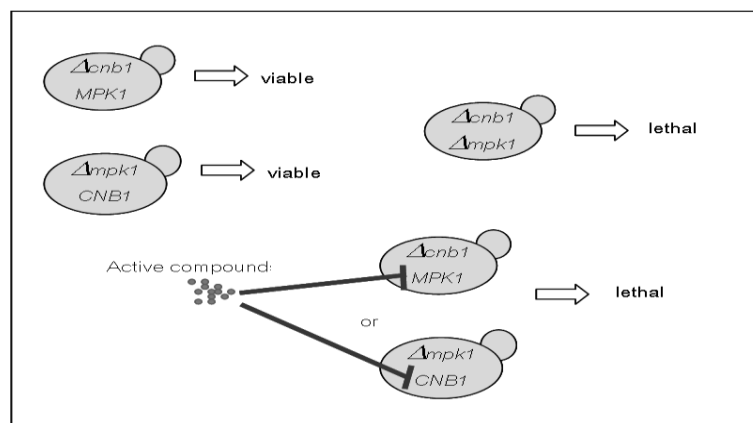
ผลการทดลองภาพที่ 4.3 จากการตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์ β -galactosidase เพื่อตรวจสอบระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ยีสต์ พบว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์ยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมแคลเซียม (ชุดทดสอบ 3) มีผลทำให้ระดับของเอนไซม์ β -galactosidase เพิ่มขึ้น แต่สำหรับชุดทดสอบที่ไม่ใส่แคลเซียมและชุดควบคุมผลบวก FK506 (ชุดทดสอบ 1 และ 2 ตามลำดับ) จะพบระดับเอนไซม์ β -galactosidase ต่ำมาก และในชุดทดสอบ 8 ที่เติม MgCl₂ พบว่าสามารถลดระดับเอนไซม์ β -galactosidase ลงได้ เนื่องจากแมกนีเซียมนั้นสามารถลดระดับของแคลเซียมอิสระภายในเซลล์โดยการแย่งจับกับ ion channels ทำให้แคลเซียมไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ ก่อให้เกิดผลบวกปลอม (false positive) สำหรับในชุดทดสอบที่ใส่สารประกอบคูมาริน (ชุดทดสอบ 5 - 7) พบว่าสามารถลดระดับเอนไซม์ β -galactosidase ได้บางส่วนโดยระดับเอนไซม์จะลดลงตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น จากการทดลองนี้ยังไม่สามารถระบุได้ชัดเจนว่าโมเลกุลเป้าหมายของสารคือแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ หรือ calcineurin เนื่องจากทั้งสอง

โมเลกุลดังกล่าวมีการทำงานร่วมกันในการส่งสัญญาณของแคลเซียม ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันโมเลกุลเป้าหมายจึงต้องมีการศึกษาผลของสารที่มีต่อโปรตีน calcineurin ในการทดลองต่อไปควบคู่ด้วย

4.4 ผลของสารประกอบคูมารินต่อโปรตีน Mpk1 และ calcineurin ในเซลล์ยีสต์

จากการตรวจสอบพบว่าสารประกอบคูมารินอาจมีผลต่อระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ยีสต์ หรือ calcineurin ดังนั้นในการทดลองนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาว่าสารประกอบคูมารินมีผลยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในเซลล์ยีสต์ โดยไปยับยั้งการทำงานของโปรตีน Mpk1 หรือ calcineurin หรือไม่ โดยอาศัยหลักการดังนี้ เซลล์ยีสต์ที่มีโปรตีน Mpk1 หรือ Calcineurin สูญเสียความสามารถในการทำหน้าที่ เซลล์จะยังสามารถอยู่รอดได้ในสภาวะปกติ แต่การสูญเสียความสามารถในการทำหน้าที่ทั้งสองวิธีจะทำให้เซลล์ไม่สามารถอยู่รอดได้ (lethal phenotype) สาเหตุหลักเกิดจากการบกพร่องของ cell wall integrity (Nakamura และคณะ, 1996)

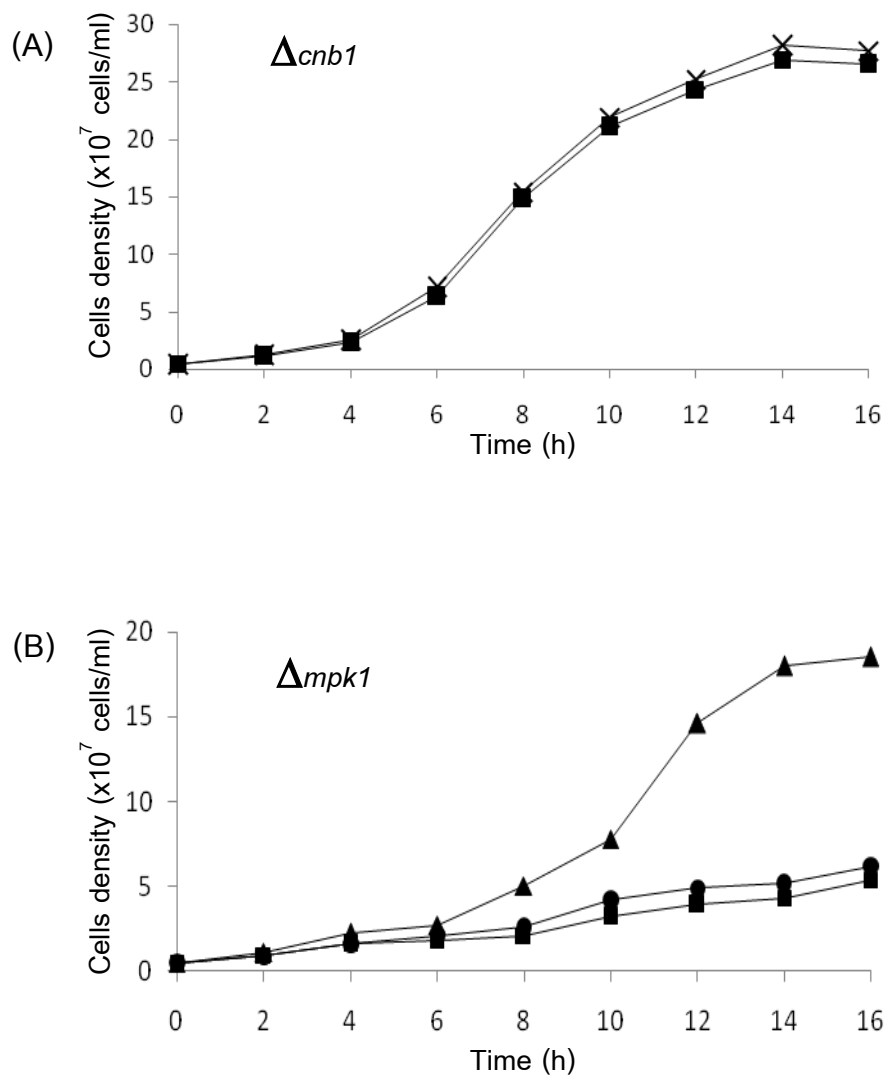
เมื่อแคลเซียมอิสระเข้าสู่ภายในเซลล์ยีสต์แล้ว วิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมนี้เกิดขึ้นได้โดยการส่งสัญญาณผ่าน 2 วิธีคู่ขนานได้แก่ วิธีที่ส่งสัญญาณของแคลเซียมผ่าน Mpk1 และวิธีที่ส่งสัญญาณของแคลเซียมผ่าน calcineurin (ดังภาพที่ 2.1) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงต้องศึกษาว่าโมเลกุลเป้าหมายของสารประกอบคูมารินคือ โปรตีน Mpk1 หรือ calcineurin โดยอาศัยวิธีทางพันธุศาสตร์ของยีสต์ที่เรียกว่า Synthetic lethality analysis ซึ่งมีหลักการดังนี้ หากยีสต์มีความบกพร่องที่โปรตีน Mpk1 หรือ calcineurin แค่เพียงโปรตีนใดโปรตีนหนึ่ง เซลล์จะสามารถเจริญได้ตามปกติ แต่ไม่สามารถเจริญได้หากมีความบกพร่องของทั้ง Mpk1 และ calcineurin พร้อมกัน (Nakamura และคณะ, 1996) (ดังภาพที่ 4.4)



ภาพที่ 4.4 หลักการของการทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งโปรตีน Mpk1 และ calcineurin โดยใช้หลักการเกิด synthetic lethality

ที่มา : วชิรศักดิ์ วังกังวาน, 2550

เมื่อทำการทดสอบโดยใช้ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta cnb1$ และ $\Delta mpk1$ เลี้ยงในอาหารเหลว YPAUD ที่เติมสารประกอบคูมารินความเข้มข้น 250 μM โดยใช้ 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุมผลลบ และใช้ FK506 ความเข้มข้น 250 nM เป็นชุดควบคุมผลบวก (สำหรับเซลล์ยีสต์ $\Delta mpk1$) จากนั้นวัดการเจริญของยีสต์โดยทำการนับจำนวนเซลล์ทุกๆ 2 ชั่วโมงเป็นเวลานาน 14 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.5



ภาพที่ 4.5 ผลของสารประกอบคูมารินต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์กลาย

$\Delta cnb1$ และ $\Delta mpk1$

ในภาพแสดงผลการเจริญของเซลล์ยีสต์ $\Delta cnb1$ (A) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPAUD โดยกำหนดสัญลักษณ์ดังนี้ \times = ไม่ใส่สารประกอบคูมาริน และ \blacksquare = สารประกอบคูมาริน 250 μ M และการเจริญของเซลล์ยีสต์ $\Delta mpk1$ (B) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPAUD โดยกำหนดสัญลักษณ์ดังนี้ \blacktriangle = ไม่ใส่สารประกอบคูมาริน, \bullet = 250 nM FK506 และ \blacksquare = สารประกอบคูมาริน 250 μ M (ภาพที่แสดงนี้เป็นตัวแทนจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

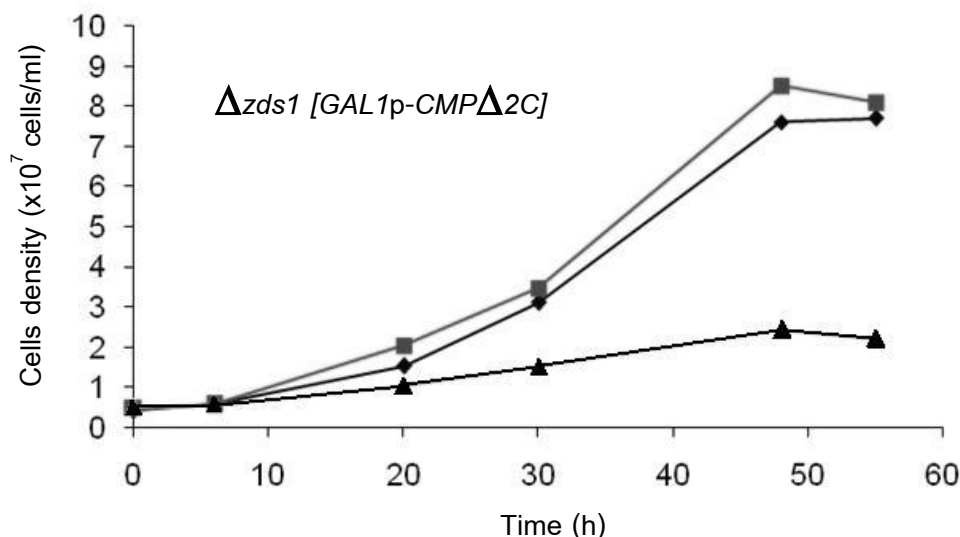
หากยีสต์มีความบกพร่องที่โปรตีน Mpk1 หรือ calcineurin แค่เพียงโปรตีนใดโปรตีนหนึ่ง เซลล์จะสามารถเจริญได้ตามปกติ แต่จะไม่สามารถเจริญได้ หากมีความบกพร่องของทั้ง Mpk1 และ calcineurin พร้อมกัน ดังนั้นหากมีสารใดๆ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งโมเลกุลเป้าหมาย Mpk1 หรือ calcineurin จะมีผลทำให้ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta cnb1$ หรือ $\Delta mpk1$ ตามลำดับ ไม่สามารถเจริญได้ เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ของสารประกอบคูมารินต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta cnb1$ พบว่ายีสต์สายพันธุ์กลายนั้นสามารถเจริญได้ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลการทดลองที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อปกติ จึงสามารถบอกได้ว่าสารประกอบคูมารินไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ Mpk1 สำหรับการทดลองเมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารประกอบคูมารินต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta mpk1$ พบว่ายีสต์สายพันธุ์กลายไม่สามารถเจริญได้ตามปกติ เป็นไปในทำนองเดียวกันกับชุดควบคุมผลบวก FK506 (calcineurin inhibitor) ดังนั้นจากผลการทดลองภาพที่ 4.5 สามารถกล่าวได้ว่า calcineurin อาจเป็นโมเลกุลเป้าหมายของสารประกอบคูมารินในวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์

4.5 ผลของสารประกอบคูมารินต่อโมเลกุลเป้าหมาย calcineurin ในเซลล์ยีสต์

เพื่อยืนยันถึงผลของสารประกอบคูมารินที่มีต่อ calcineurin ในเซลล์ยีสต์ การทดลองต่อไปจึงต้องมีการศึกษาถึงผลของสารประกอบคูมารินที่มีต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ [$GAL1p-CMP\Delta 2C$] ที่ขาดยีน $ZDS1$ และมีการแสดงออกเกินของ calcineurin

4.5.1 ผลของสารต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์กลาย $GAL1p-CMP\Delta 2C$

ทดสอบโดยวัดการเจริญของยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ overexpressed calcineurin [$GAL1p-CMP\Delta 2C$] ที่เลี้ยงในอาหารเหลว 2% galactose 1% raffinose SC medium ที่เติมสารประกอบคูมาริน และใช้ 250 nM FK506 และ 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุมผลบวกและชุดควบคุมผลลบตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.6



ภาพที่ 4.6 ผลของสารประกอบคูมารินต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1 [GAL1p-CMP\Delta 2C]$

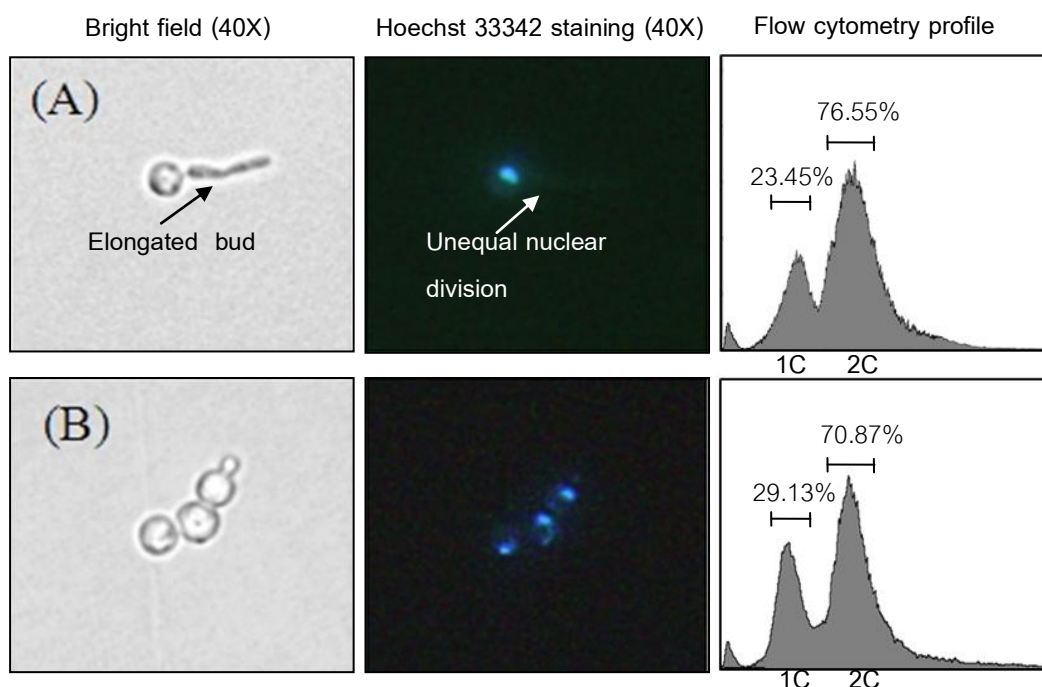
ในภาพแสดงผลการเจริญของเซลล์ยีสต์ $\Delta zds1 [GAL1p-CMP\Delta 2C]$ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2% galactose 1% raffinose SC medium ที่ผสมสารทดสอบต่างๆ โดยกำหนดสัญลักษณ์ดังนี้ ◆ = สารประกอบคูมาริน 250 μ M, ■ = 250 nM FK506 และ ▲ = 0.5% DMSO (ภาพที่แสดงนี้เป็นตัวแทนจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

จากผลการทดลองดังภาพที่ 4.6 เห็นได้ว่า ภายใต้การควบคุมของ GAL promoter ที่ถูกกระตุ้นด้วย galactose ยีสต์สายพันธุ์กลายจะมีการแสดงออกเกินของ calcineurin (ชุดทดสอบ ▲) เป็นผลให้ Swe1 kinase ถูกกระตุ้น เกิดการหยุดชะลอการแบ่งเซลล์ที่ระยะ G2 ทำให้เซลล์ไม่สามารถเจริญได้ แต่หากมีสารใดๆ มายับยั้งการทำงานของ calcineurin จะทำให้ยีสต์ดังกล่าวสามารถกลับมาเจริญได้ตามปกติ (ชุดทดสอบ ◆ และ ■) จากกราฟแสดงให้เห็นว่าสารประกอบคูมาริน และ FK506 สามารถยับยั้งการทำงานของ calcineurin ได้ ทำให้ยีสต์สายพันธุ์กลายสามารถเจริญได้ตามปกติ

4.5.2 ผลของสารที่มีต่อรูปร่างของเซลล์และการแบ่งนิวเคลียสของยีสต์สายพันธุ์ กลาย $\Delta zds1$ [*GAL1p-CMP Δ 2C*]

เซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ เมื่อถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มข้นของ แคลเซียมสูง เซลล์จะหยุดการเจริญอยู่ที่ระยะ G2 นอกจากนี้แล้ววิถีการส่งสัญญาณของ แคลเซียมยังมีผลทำให้รูปร่างของเซลล์ผิดปกติด้วย กล่าวคือ เซลล์ลูกที่เกิดจากการแตกหน่อจะ ยืดยาวออก (elongated bud) และเมื่อย้อมคูนิวเคลียสของเซลล์พบว่า นิวเคลียสจะไม่ถูกแบ่ง ไปสู่เซลล์ลูกที่ยืดยาว (unequal nuclear division) (Bi และ Pringle, 1996) ในการทดลองนี้จึงมุ่ง หมายที่จะศึกษาผลของสารประกอบคูมารินที่มีต่อรูปร่างของเซลล์และการแบ่งนิวเคลียสของยีสต์ สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ [*GAL1p-CMP Δ 2C*]

ทดสอบโดยใช้ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ overexpressed calcineurin [*GAL1p-CMP Δ 2C*] เลี้ยงในอาหารเหลว 2% galactose 1% raffinose SC medium ที่เติม สารประกอบคูมาริน 250 μ M และ 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุมผลลบ แล้วบ่มเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ย้อมนิวเคลียสด้วยสี Hoechst 33342 และดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ ผลการ ทดลองแสดงดังภาพที่ 4.7



ภาพที่ 4.7 ผลของสารประกอบคูมารินต่อรูปร่างของเซลล์และการแบ่งนิวเคลียสของยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ [$GAL1p-CMP\Delta 2C$]

ในภาพแสดงรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่า (ภาพซ้าย), การแบ่งนิวเคลียสภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ กำลังขยาย 40 เท่า (ภาพกลาง) และปริมาณดีเอ็นเอภายในเซลล์ (ภาพขวา) ของยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ [$GAL1p-CMP\Delta 2C$] ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2% galactose 1% raffinose SC medium ที่ผสม 0.5% DMSO (A) และสารประกอบคูมาริน 250 μ M (B) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

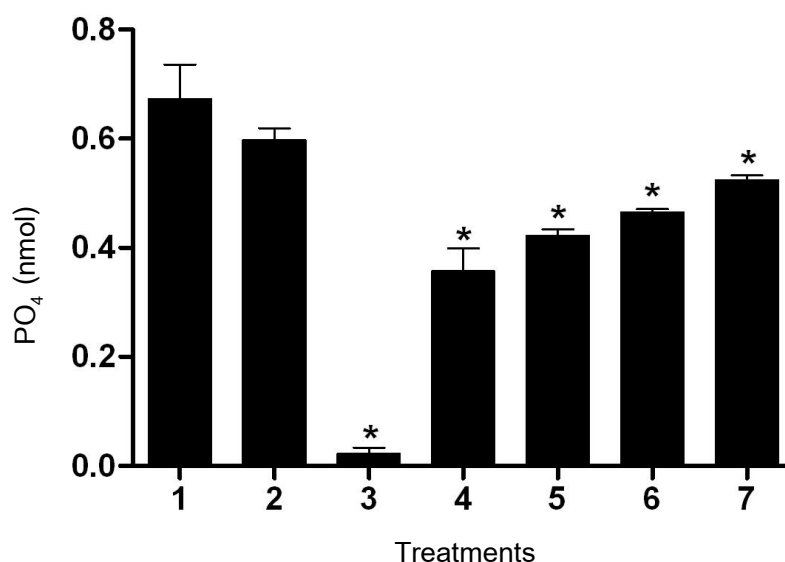
จากผลการทดลองภาพที่ 4.7 เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะเห็นได้ว่าสารประกอบคูมารินมีฤทธิ์ในการยับยั้ง calcineurin ได้ โดยสามารถทำให้รูปร่างของยีสต์สายพันธุ์กลายกลับมามีรูปร่างปกติได้เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลลบซึ่งยีสต์สายพันธุ์กลายจะเกิดความผิดปกติมีการยืดยาวเวลาแบ่งเซลล์ และเมื่อดูการแบ่งนิวเคลียสหลังจากย้อมด้วยสีย้อมนิวเคลียส Hoechst 33342 แล้วส่องกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ เห็นได้ว่าสารประกอบคูมารินทำให้ยีสต์สายพันธุ์กลายมีการแบ่งนิวเคลียสแบบเท่ากันเมื่อมีการแบ่งเซลล์ตามปกติ แต่ในชุดควบคุมผลลบเห็นได้ว่าการแบ่งนิวเคลียสแบบผิดปกติ กล่าวคือ ไม่พบนิวเคลียสในเซลล์ลูกที่มีรูปร่างยืดยาวผิดปกติ สำหรับการตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอภายในเซลล์ โดยแกน x แสดงปริมาณ

ดีเอ็นเอ 1C คือปริมาณดีเอ็นเอหนึ่งเท่า และ 2C คือปริมาณดีเอ็นเอสองเท่า และแกน y แสดงปริมาณเซลล์ พบว่าเมื่อยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ [$GAL1p-CMP\Delta 2C$] ถูกกระตุ้นด้วย galactose จะทำให้จำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีปริมาณดีเอ็นเอเป็น 2 เท่า (2C) เพิ่มขึ้น (76.55%) ในขณะที่จำนวนเซลล์ที่มีปริมาณดีเอ็นเอ 1 เท่า (1C) ลดลง (23.45%) เมื่อเทียบกับสภาวะที่เต็มสารประกอบคูมารินที่มีค่าดังกล่าว เป็น 70.87% และ 29.13% ตามลำดับ

4.6 ผลของสารประกอบคูมารินต่อการทำงานของ calcineurin แบบ *in vitro*

จากการทดลองที่ผ่านมา เป็นการพบฤทธิ์ของสารประกอบคูมารินที่มีต่อ calcineurin ในเซลล์ยีสต์ เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลอง จึงต้องมีการทดสอบผลของสารประกอบคูมารินที่มีต่อแอกติวิตีของ calcineurin ในหลอดทดลอง (*in vitro* assay)

ทำการทดลองโดยใช้ชุด calcineurin Assay kit (Calbiochem, Germany) เพื่อวัดการทำงานของ calcineurin โดยอาศัยหลักการการเปลี่ยนแปลงสีของสารตั้งต้น โดย calcineurin จะทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ phosphatase ตัดหมู่ฟอสเฟตออกจากสารตั้งต้น RII phosphopeptide ทำให้เกิดการปลดปล่อยหมู่ฟอสเฟตอิสระขึ้น จากนั้นสามารถวัดการทำงานของ calcineurin ได้จากการวัดปริมาณฟอสเฟตอิสระ ซึ่งจะเปลี่ยนสี Malachite green ให้เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีเขียว จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 620 นาโนเมตร ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.8



ภาพที่ 4.8 ผลของสารประกอบคูมารินต่อแอกติวิตีของ calcineurin แบบ *in vitro*

ในภาพแสดงผลของสารทดสอบต่างๆ ที่มีต่อแอกติวิตีของ calcineurin โดยกำหนดชุดทดสอบดังนี้ 1 = น้ำกลั่น, 2 = 0.5% DMSO, 3 = 150 nM FK506, 4 = สารประกอบคูมาริน 500 μM , 5 = สารประกอบคูมาริน 250 μM , 6 = สารประกอบคูมาริน 125 μM และ 7 = สารประกอบคูมาริน 62.5 μM (* คือ $P \leq 0.001$ และภาพที่แสดงนี้เป็นตัวแทนจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

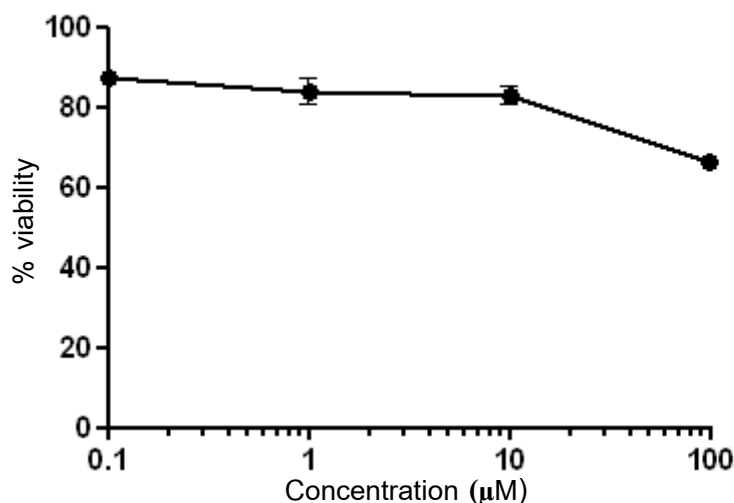
จากผลการทดลองภาพที่ 4.8 กราฟที่ได้แสดงให้เห็นว่าสารประกอบคูมารินสามารถยับยั้งการทำงานของ calcineurin ได้บางส่วน โดยพบการลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดสอบที่ 1 ที่ระดับนัยสำคัญ $P \leq 0.001$ ของชุดทดสอบที่ 3, 4, 5, 6 และ 7 โดยจะมีฤทธิ์เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นสาร (dose-dependent manner) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมผลบวก FK506 สามารถยับยั้งการทำงานของ calcineurin ได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นสารประกอบคูมารินจึงน่าจะมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ calcineurin โดยทางอ้อม

4.7 ผลของสารประกอบคูมารินต่อโมเลกุลเป้าหมายในเซลล์มนุษย์

เนื่องจากการศึกษาในยีสต์พบว่าสารประกอบคูมารินมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ calcineurin ซึ่ง calcineurin เป็นโปรตีนที่มีการอนุรักษ์จากยีสต์สู่มนุษย์ การทดลองต่อไปจึงต้องการศึกษาผลของสารประกอบคูมารินที่มีต่อเซลล์ไลน์ของมนุษย์

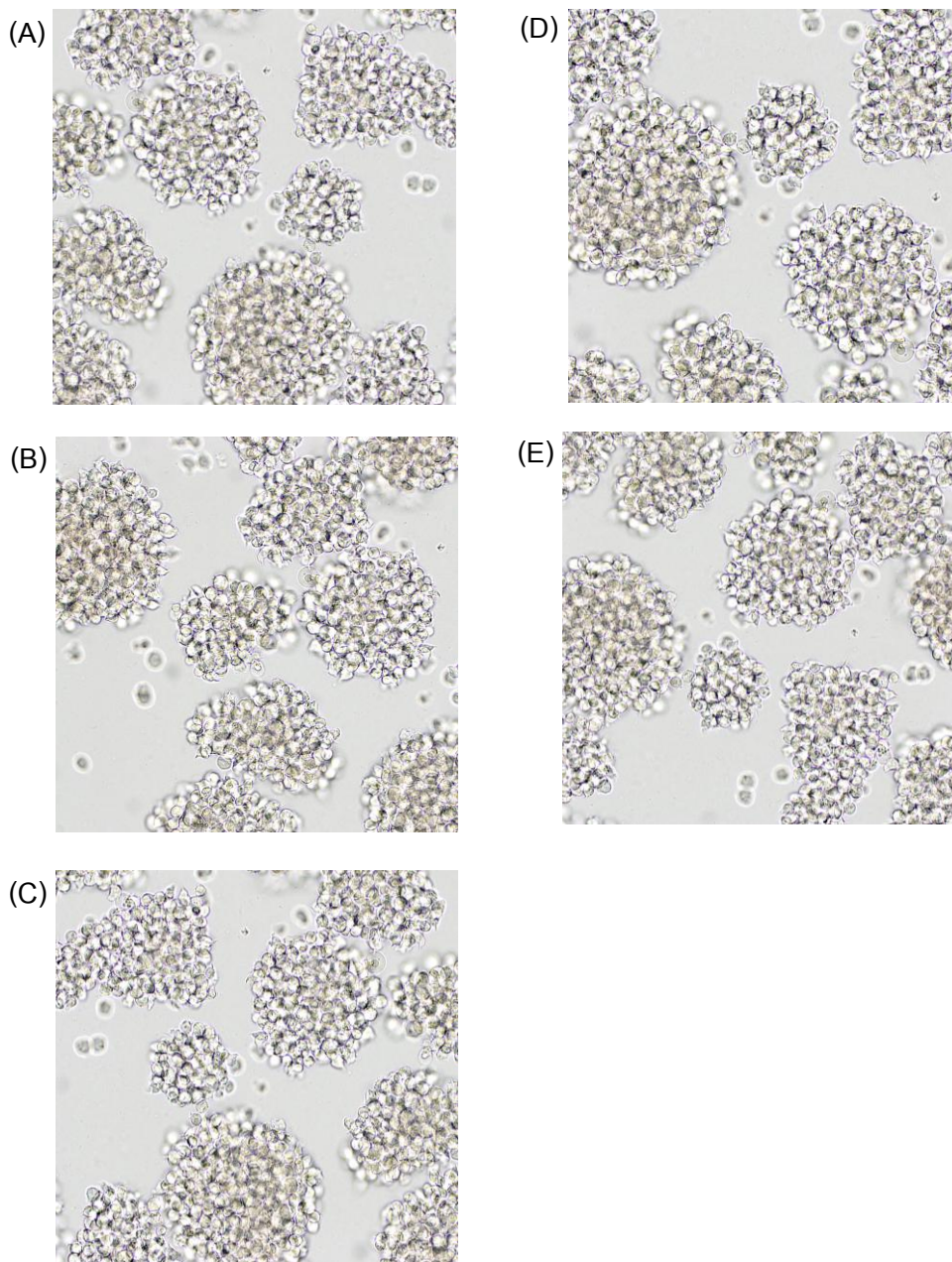
4.7.1 ทดสอบความเป็นพิษของสารประกอบคูมารินต่อเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ ด้วยวิธี MTT proliferation assay

เนื่องจาก calcineurin กระตุ้นการแบ่งเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T-lymphocyte ดังนั้นในการทดลองต่อไป จะได้ทำการศึกษาในเซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด T-lymphocyte (Jurkat) โดยการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบคูมารินในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ ต้องมีการทดลองหาช่วงค่าความเข้มข้นของสารที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยใช้วิธี MTT proliferation assay (Mosmann, 1983) เพื่อศึกษาผลของสารประกอบคูมารินต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ (%viability) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.9



ภาพที่ 4.9 ศึกษาความเป็นพิษของสารประกอบคูมารินต่อเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์

จากผลการทดลองภาพที่ 4.9 ผลของสารประกอบคูมารินที่มีต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ชนิด Jurkat ในเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าช่วงค่าความเข้มข้นของสารตั้งแต่ 1-100 µM มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์สูง (ร้อยละ 70 - 90) แสดงว่าช่วงค่าความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีความเป็นพิษแบบเฉียบพลันต่อเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ และสารประกอบคูมารินมีค่า IC_{50} มากกว่า 100 µM



ภาพที่ 4.10 ลักษณะของ Jurkat cells ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า

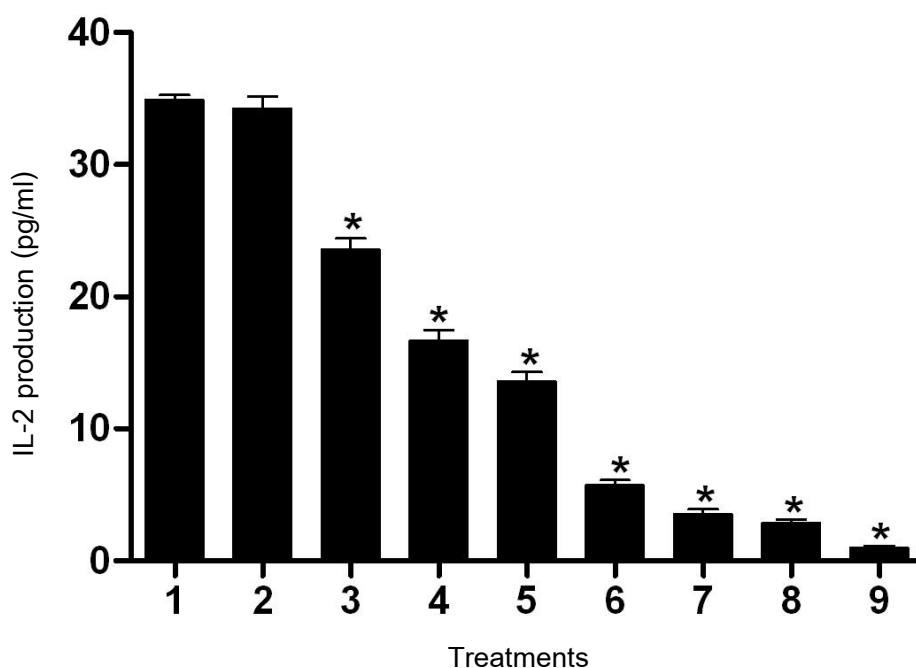
ในภาพแสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast กำลังขยาย 40 เท่าของ Jurkat cells ที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารประกอบคูมารินความเข้มข้นต่างๆ คือ ไม่ใส่สารประกอบคูมาริน (A), สารประกอบคูมาริน 0.1 μM (B), สารประกอบคูมาริน 1 μM (C), สารประกอบคูมาริน 10 μM (D) และสารประกอบคูมาริน 100 μM (E) โดยทำการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากภาพที่ 4.10 ผลของสารประกอบคูมารินที่มีเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ในเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าช่วงค่าความเข้มข้นของสารตั้งแต่ 1-100 μM เซลล์มีลักษณะรูปร่างปกติ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดสอบที่ไม่ใส่สารประกอบคูมาริน กล่าวคือรูปร่างของเซลล์มีลักษณะกลมฉาบ และมีการเจริญแบบเกาะกลุ่มกัน

4.7.2 ผลของสารประกอบคูมารินต่อระดับของ IL-2 โดยวิธี ELISA

ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เมื่อ T-lymphocyte ถูกกระตุ้นให้มีการหลั่งไซโตไคน์ต่างๆ นั้น calcineurin ก็เป็นโปรตีนสำคัญโปรตีนหนึ่งที่ทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการหลั่งไซโตไคน์ใน T-lymphocyte กล่าวคือ การทำงานของ calcineurin ใน T-lymphocyte นั้น calcineurin จะถูกกระตุ้นโดยอาศัยแคลเซียมและ calmodulin ร่วมกัน ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ตัดหมู่ฟอสเฟต (dephosphorylation) ออกจาก Nuclear-factor activated T-cell (NFAT) ส่งผลให้ NFAT มีการเคลื่อนที่จากไซโตพลาสซึมเข้าสู่นิวเคลียส และไปทำการกระตุ้นกระบวนการถอดรหัสยีนของ lymphokines เช่น เกิดการผลิต interleukin-2 (IL-2) และกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ T-lymphocyte ตามลำดับ

เนื่องจากผลการทดลองของการศึกษาผลของสารประกอบคูมารินที่มีต่อแอกติวิตีของ calcineurin พบว่าสารประกอบคูมารินสามารถยับยั้งการทำงานของ calcineurin ได้บางส่วน ทั้งนี้เพื่อเป็นการศึกษาต่อไปในระดับโมเลกุลเป้าหมายปลายน้ำของ calcineurin จึงมีการวิเคราะห์หาระดับของ IL-2 เมื่อเลี้ยงเซลล์ Jurkat ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารประกอบคูมารินในสภาวะที่ถูกกระตุ้นให้มีการผลิต IL-2 โดยสาร PMA และ Ionomycin จากนั้นปั่นแยกตะกอนเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเซลล์และนำส่วนใสมาวิเคราะห์หาระดับ IL-2 ด้วย ELISA Ready-SET-Go! kit (eBioscience, CA) ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.11



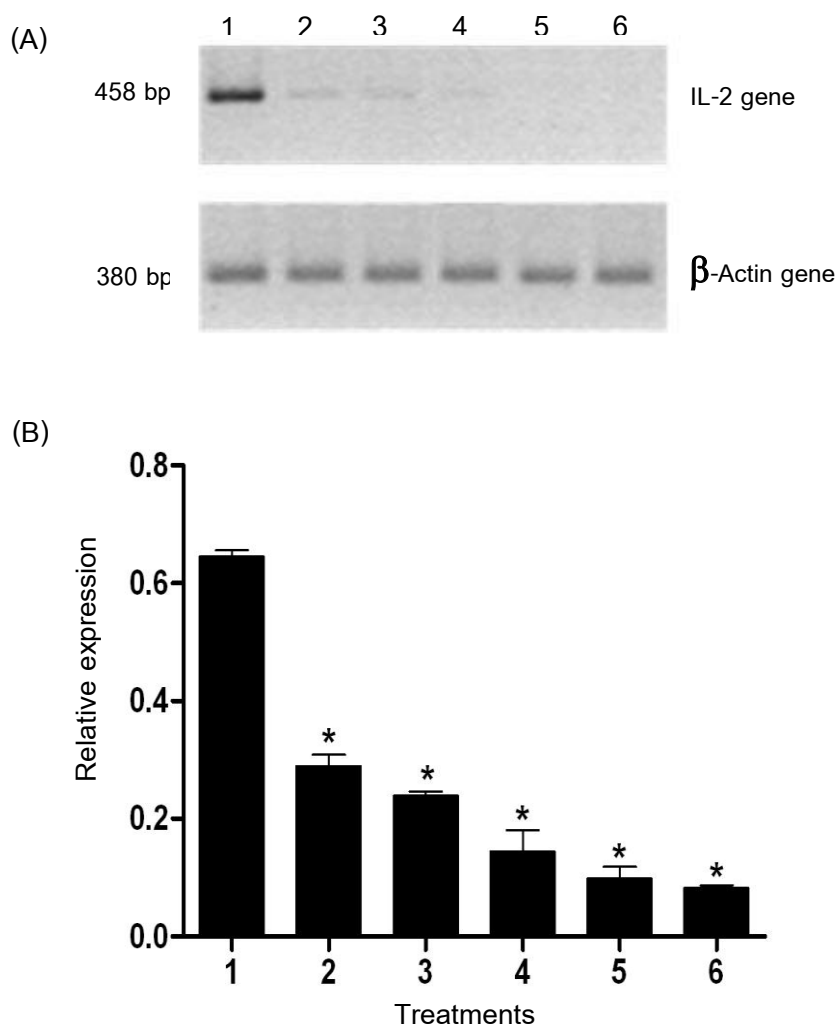
ภาพที่ 4.11 ผลของสารประกอบคูมารินต่อระดับของ IL-2

ในภาพแสดงระดับของ IL-2 ที่วัดได้ จากการเลี้ยง Jurkat cells ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารทดสอบต่างๆ โดยกำหนดชุดทดสอบดังนี้ 1 = PMA/Io, 2 = PMA/Io + 0.5% DMSO, 3 = PMA/Io + สารประกอบคูมาริน 0.25 μ M, 4 = PMA/Io + สารประกอบคูมาริน 1 μ M, 5 = PMA/Io + สารประกอบคูมาริน 2.5 μ M, 6 = PMA/Io + สารประกอบคูมาริน 5 μ M, 7 = PMA/Io + สารประกอบคูมาริน 50 μ M, 8 = PMA/Io + 100 nM FK506 และ 9 = ไม่ใส่ PMA/Io

จากผลการทดลองภาพที่ 4.11 แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการกระตุ้น Jurkat cells ด้วย PMA/Io (ชุดทดสอบที่ 1) จะเกิดการผลิต IL-2 ขึ้น และพบการลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดสอบที่ 1 ที่ระดับนัยสำคัญ $P \leq 0.001$ ของชุดทดสอบที่ 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 คือเมื่อไม่มีการกระตุ้นด้วย PMA/Io (ชุดทดสอบ 9) ก็จะไม่มีการผลิต IL-2 เช่นกัน เมื่อทำการเลี้ยง Jurkat cells ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมสารประกอบคูมารินที่ความเข้มข้นต่างๆ และทำการกระตุ้นด้วย PMA/Io เห็นได้ว่าสารประกอบคูมารินสามารถยับยั้งการผลิต IL-2 ได้อย่างชัดเจน โดยจะมีฤทธิ์เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นสาร (dose-dependent manner) เป็นไปในทำนองเดียวกันกับชุดควบคุมผลบวก FK506 (ชุดทดสอบ 8) ที่สามารถยับยั้งการผลิต IL-2 gene ได้เช่นกัน จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารประกอบคูมารินสามารถยับยั้งการผลิต IL-2 ในมนุษย์ได้

4.7.3 ผลของสารประกอบคูมารินต่อการแสดงออกที่ยีนเป้าหมายในเซลล์ไลน์ มะเร็งของมนุษย์ชนิด Jurkat ด้วยวิธี RT-PCR

การทดลองต่อไปจึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาผลของสารประกอบคูมารินที่มีผลต่อ IL-2 ที่ระดับการถอดรหัสของยีน IL-2 แบบเชิงกึ่งปริมาณ (semi-quantitative analysis) เนื่องจากผลการทดลองก่อนหน้านี้พบว่าสารประกอบคูมารินสามารถยับยั้งการผลิตไซโตไคน์ IL-2 ได้ โดยพบระดับของ IL-2 ที่ถูกหลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ลดลงเมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ Jurkat ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารประกอบคูมาริน เพื่อเป็นการศึกษาถึงผลการยับยั้งในขั้นตอนการสังเคราะห์ mRNA ของยีน IL-2 จึงทำการทดลองโดยเลี้ยง Jurkat cells ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารประกอบคูมารินที่ความเข้มข้นต่างๆ และใช้ 100 nM FK506 เป็นชุดควบคุมผลบวก จากนั้นทำการกระตุ้นให้เซลล์มีการผลิต IL-2 โดยการเติมสาร Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 25 ng/ml และ Ionomycin (Io) 1 µg/ml โดย PMA จะทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้น Protein kinase C (PKC) และเกิดการกระตุ้นการผลิต IL-2 ตามลำดับ สำหรับ Ionomycin เป็นสาร Ionophore ซึ่งมีผลทำให้ระดับแคลเซียมภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น และเกิดการกระตุ้นการทำงานของ calcineurin ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.12



ภาพที่ 4.12 ผลของสารประกอบคูมารินต่อระดับ mRNA ของ IL-2 gene ใน Jurkat cells

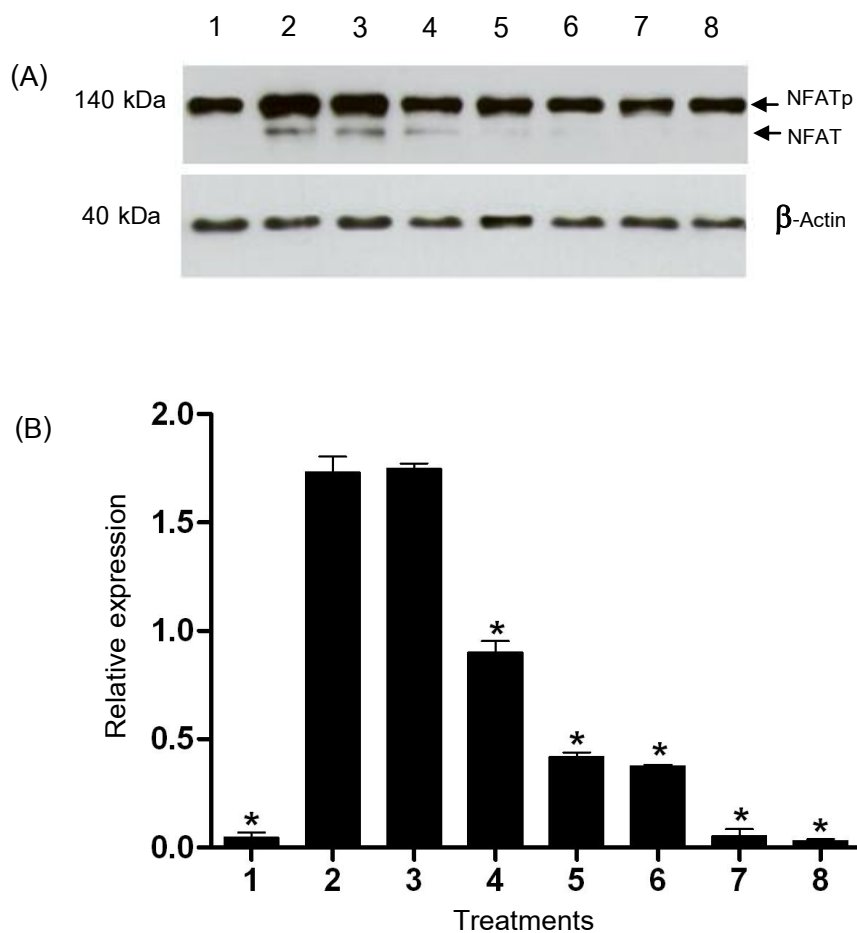
ในภาพ A แสดงระดับ mRNA ของ IL-2 gene (ภาพบน) และยืนยันควบคุมผลการทดลองที่มีการแสดงออกอย่างต่อเนือง β -Actin gene (ภาพล่าง) ใน Jurkat cells ที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมสารทดสอบต่างๆ โดยกำหนดชุดทดสอบดังนี้ 1 = PMA/Io, 2 = PMA/Io + สารประกอบคูมาริน 5 μ M, 3 = PMA/Io + สารประกอบคูมาริน 25 μ M, 4 = PMA/Io + สารประกอบคูมาริน 50 μ M, 5 = PMA/Io + 100 nM FK506 และ 6 = ไม่เติม PMA/Io

ในภาพ B แสดงความเข้มของ mRNA ของ IL-2 gene ถูกปรับให้มีการแสดงออกของ mRNA ของ β -Actin gene สม่่าเสมอกันด้วยโปรแกรม Quantity One (ภาคผนวก ค) (* คือ $P \leq 0.001$ และภาพที่แสดงนี้เป็นตัวแทนจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

จากผลการทดลองที่ 4.12 เมื่อเปรียบเทียบการสังเคราะห์ mRNA ของ β -Actin gene ในทุกชุดทดสอบพบว่ามีการแสดงออกที่ใกล้เคียงกัน สำหรับการสังเคราะห์ mRNA ของ IL-2 gene แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการกระตุ้น Jurkat cells ด้วย PMA/Io (ชุดทดสอบที่ 1) จะเกิดการผลิต IL-2 ขึ้น และพบการลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดสอบที่ 1 ที่ระดับนัยสำคัญ $P \leq 0.001$ ของชุดทดสอบที่ 2, 3, 4, 5 และ 6 คือเมื่อไม่มีการกระตุ้นด้วย PMA/Io (ชุดทดสอบ 6) ก็จะไม่มีการผลิต IL-2 เช่นกัน เมื่อทำการเลี้ยง Jurkat cells ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมสารประกอบคูมารินและทำการกระตุ้นด้วย PMA/Io เห็นได้ว่าสารประกอบคูมารินสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ mRNA ของ IL-2 gene ได้อย่างชัดเจน โดยจะมีฤทธิ์เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นสาร (dose-dependent manner) เป็นไปในทำนองเดียวกันกับชุดควบคุมผลบวก FK506 (ชุดทดสอบ 5) ที่สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ mRNA ของ IL-2 gene ได้อย่างสมบูรณ์ จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารประกอบคูมารินที่ระดับความเข้มข้น 50 μ M สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ mRNA ของ IL-2 gene ได้อย่างสมบูรณ์

4.7.4 ผลของสารประกอบคูมารินต่อ NFAT โดยวิธี Western blot analysis

เนื่องจากในการกระตุ้นให้มีการผลิต IL-2 ใน T-lymphocyte นั้น calcineurin จะทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ตัดหมู่ฟอสเฟต (dephosphorylation) ออกจาก Nuclear-factor activated T-cell (NFAT) ส่งผลให้ NFAT มีการเคลื่อนที่จากไซโตพลาสซึมเข้าสู่นิวเคลียส โดยจะไปจับที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน IL-2 เป็นผลทำให้เกิดการกระตุ้นกระบวนการถอดรหัสยีนของ IL-2 มีการสร้าง mRNA และแปลรหัสเป็นไซโตไคน์ IL-2 ออกมาตามลำดับ จากผลการทดลองที่ผ่านมา เห็นได้ชัดว่าสารประกอบคูมารินสามารถยับยั้งการผลิต IL-2 ได้ตั้งแต่ระดับการถอดรหัสของยีน ดังนั้นการทดลองต่อไป ได้ทำการศึกษาถึงผลของสารประกอบคูมารินที่มีต่อ NFAT โดยวิธี Western blot analysis ซึ่งทำการวิเคราะห์โปรตีน NFAT ที่สกัดได้จาก Jurkat cells ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมสาร Ionomycin เพื่อเป็นการกระตุ้นให้ระดับของแคลเซียมภายในเซลล์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ calcineurin ไปตัดหมู่ฟอสเฟตออกจาก NFATp เกิดเป็น NFAT โดยผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.13



ภาพที่ 4.13 ผลของสารประกอบคูมารินต่อ NFAT dephosphorylation

ในภาพ A แสดงผลการแยกขนาดของโปรตีน NFAT (ภาพบน) และยืนยันควบคุมผลการทดลองที่มีการแสดงออกอย่างต่อเนือง β -Actin gene (ภาพล่าง) โดยวิธี Western blot analysis เลี้ยง Jurkat cells ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารทดสอบต่างๆ โดยกำหนดชุดทดสอบดังนี้ 1 = ไม่ใส่ Ionomycin (Io), 2 = Io, 3 = Io + สารประกอบคูมาริน 12.5 μ M, 4 = Io + สารประกอบคูมาริน 25 μ M, 5 = Io + สารประกอบคูมาริน 50 μ M, 6 = Io + สารประกอบคูมาริน 75 μ M, 7 = Io + สารประกอบคูมาริน 100 μ M และ 8 = Io + 100 nM FK506

ในภาพ B แสดงความเข้มของโปรตีน NFAT ถูกปรับให้มีการแสดงออกของโปรตีน β -Actin สม่่าเสมอกันด้วยโปรแกรม Quantity One (ภาคผนวก ค) (* คือ $P \leq 0.001$ และภาพที่แสดงนี้เป็นตัวแทนจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

จากผลการทดลองภาพที่ 4.13 เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีน β -Actin ในทุกชุดทดสอบพบว่ามีการแสดงออกที่ใกล้เคียงกัน สำหรับการแสดงออกของโปรตีน NFAT พบว่าเมื่อไม่มีการกระตุ้นด้วย Ionomycin (ชุดทดสอบ 1) ทำให้ calcineurin ไม่ทำงาน จึงพบ NFAT-P เนื่องจากไม่เกิดการ dephosphorylation ซึ่งแตกต่างกับชุดทดสอบที่ใส่ Io (ชุดทดสอบ 2) จะเกิดการตัดหมู่ฟอสเฟตออกจาก NFAT-P เกิดเป็น NFAT ขึ้น ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลที่น้อยลง จึงเห็นเป็นแถบของโปรตีนที่เคลื่อนที่เร็วกว่าแยกลงมา ซึ่งพบการลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดสอบที่ 2 ที่ระดับนัยสำคัญ $P \leq 0.001$ ของชุดทดสอบที่ 4, 5, 6, 7 และ 8 เมื่อทำการเลี้ยง Jurkat cells ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมสารประกอบคูมารินและทำการกระตุ้นด้วย Ionomycin เห็นได้ว่าสารประกอบคูมารินสามารถยับยั้งการ dephosphorylation ของ NFAT ได้ โดยจะมีฤทธิ์เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นสาร (dose-dependent manner) เป็นไปในทำนองเดียวกันกับชุดควบคุมผลบวก FK506 (ชุดทดสอบ 8) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารประกอบคูมารินมีผลยับยั้งการ dephosphorylation ของ NFAT ได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 50 μ M

บทที่ 5

อภิปรายผล ข้อเสนอแนะ และสรุปผลการวิจัย

5.1 อภิปรายผลการวิจัย

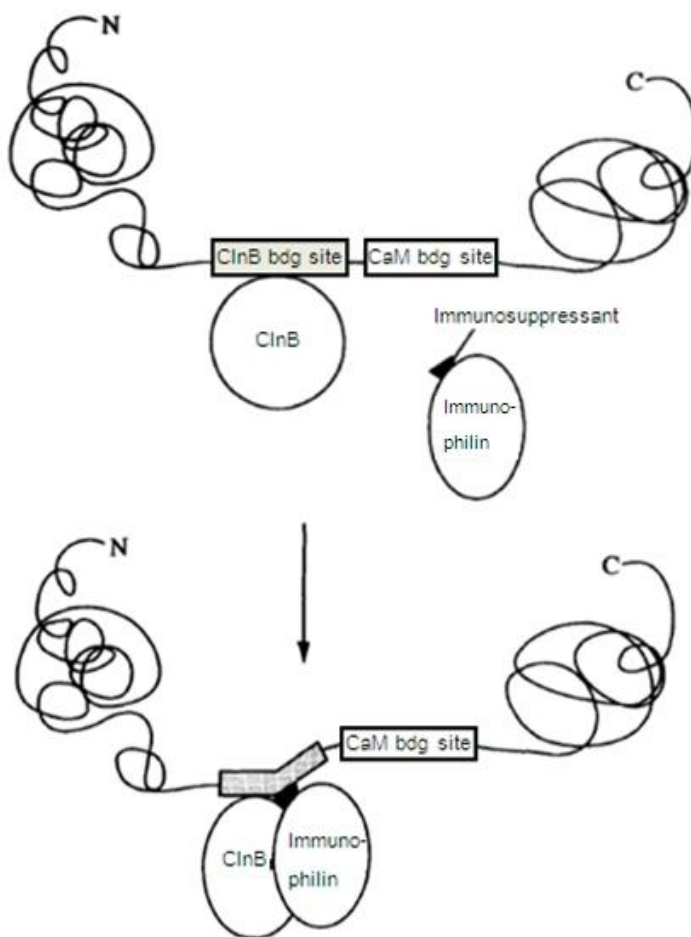
การคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ เป็นวิธีการคัดกรองที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง ทั้งยังเป็นระบบการคัดกรองเชิงบวกที่สามารถตรวจหาโมเลกุลเป้าหมายของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมได้ ซึ่งจากการคัดกรองด้วยระบบยีสต์ดังกล่าว พบว่าสารประกอบคูมารินสามารถยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมได้ โดยมีฤทธิ์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสาร และเมื่อตรวจสอบโมเลกุลเป้าหมายของสารประกอบคูมารินในวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์แล้ว พบว่าสารประกอบคูมารินมีโมเลกุลเป้าหมายเป็น calcineurin เนื่องจากสามารถทำให้ยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta mpk1$ ซึ่งถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารประกอบคูมารินไม่สามารถเจริญได้ (ภาพที่ 4.5) และสามารถทำให้ยีสต์สายพันธุ์กลายที่มีการแสดงออกเกินของ calcineurin สามารถเจริญได้และมีรูปร่างปกติที่ความเข้มข้นของสาร 250 μM (ภาพที่ 4.6 และ 4.7)

calcineurin เป็นโปรตีนที่มีการอนุรักษ์สูงจากยีสต์สู่สิ่งมีชีวิตชั้นสูง โดยในมนุษย์สามารถพบ calcineurin ได้ในเนื้อเยื่อทั่วไป เช่น สมอง, หัวใจ, กระดูก, เม็ดเลือด, ตับ และไต เป็นต้น (Rusnak และ Mertz, 2000) โดยมีบทบาทในการควบคุมกระบวนการทางชีวภาพที่สำคัญมากมาย อาทิ การควบคุมการหลั่งของฮอร์โมนในสมอง (Cohen, 1982), ควบคุมกระบวนการสลายกระดูกของเซลล์ osteoclast (Sun และคณะ, 2007), กระตุ้นการทำงานของ $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase ในเซลล์ตับ (Bertorello และ Katz, 1993) และที่สำคัญ calcineurin มีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกันในมนุษย์ โดยควบคุมกระบวนการหลังไซโตไคน์ใน T-lymphocyte (Gardner, 1989) สำหรับการทำงานของ calcineurin ใน T-lymphocyte นั้น calcineurin จะถูกกระตุ้นโดยอาศัยแคลเซียมและ calmodulin ร่วมกัน ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ตัดหมู่ฟอสเฟต (dephosphorylation) ออกจาก Nuclear-factor activated T-cell (NFAT) ส่งผลให้ NFAT มีการเคลื่อนที่จากไซโตพลาสซึมเข้าสู่นิวเคลียส และไปทำการกระตุ้นกระบวนการถอดรหัสยีนของ lymphokines เช่น เกิดการผลิตไซโตไคน์ interleukin-2 (IL-2) และกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ T-lymphocyte ตามลำดับ ดังนั้นสารประกอบคูมารินซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้ง calcineurin ได้นั้น จึง

น่าจะมีศักยภาพในการนำมาพัฒนาเป็นยากดภูมิคุ้มกันได้ เนื่องจากผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันผิดปกติ จะพบการหลังไซโตไคน์มากผิดปกติส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกันถูกระงับมากเกินไป เช่นในผู้ป่วยโรคข้ออักเสบเรื้อรัง เป็นต้น และเพื่อเป็นการยืนยันและค้นหาฤทธิ์กดภูมิคุ้มกันของสารประกอบคูมารินในเซลล์มนุษย์ จึงใช้เซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ชนิด Jurkat ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด T-lymphocyte ซึ่งในช่วงค่าความเข้มข้นของสารประกอบคูมารินตั้งแต่ 1-100 μM ไม่พบความเป็นพิษแบบเฉียบพลันต่อเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ชนิด Jurkat และพบว่าสารประกอบคูมารินสามารถยับยั้งการทำงานของ calcineurin ได้ โดยสามารถลดการแสดงออกของยีน IL-2 ได้ โดยมีผลตั้งแต่กระบวนการถอดรหัสของยีน และสามารถยับยั้งกระบวนการตัดหมู่ฟอสเฟตออกจาก NFAT-P ได้อย่างชัดเจนที่ค่าความเข้มข้นของสาร 50 μM จึงเป็นการยืนยันถึงฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ calcineurin ในมนุษย์ได้

เมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพของสารประกอบคูมารินในเซลล์ยีสต์กับเซลล์มนุษย์นั้น พบว่าสารประกอบคูมารินสามารถออกฤทธิ์ยับยั้ง calcineurin ในเซลล์ยีสต์ได้ที่ความเข้มข้น 250 μM ในขณะที่สามารถออกฤทธิ์ต่อโมเลกุลเป้าหมาย IL-2 และ NFAT ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ชนิด Jurkat ได้ที่ความเข้มข้นเพียงแค่ 50 μM ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ต่ำกว่าในเซลล์ยีสต์ถึง 5 เท่า ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากความสามารถของสารในการผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ยีสต์ทำได้ยาก เนื่องจากเซลล์ยีสต์จะมีผนังเซลล์ห่อหุ้มอยู่ภายนอก ซึ่งแตกต่างกับเซลล์ของมนุษย์ที่ไม่มีผนังเซลล์ ทำให้สารภายนอกเซลล์สามารถผ่านเข้าไปภายในเซลล์มนุษย์ได้ง่ายกว่าในเซลล์ยีสต์ ซึ่งสารประกอบคูมารินอาจสามารถผ่านเข้าไปออกฤทธิ์ที่โมเลกุลเป้าหมายภายในเซลล์ยีสต์ได้เพียงบางส่วน จึงต้องเพิ่มความเข้มข้นของสารเป็น 250 μM เพื่อให้สารออกฤทธิ์ยับยั้งโมเลกุลเป้าหมายได้อย่างชัดเจน โดยเห็นได้ว่าสารประกอบคูมารินจะมีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ดีขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสาร (dose-dependent manner) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของยา FK506 กับสารประกอบคูมารินในการยับยั้งการทำงานของ calcineurin พบว่ายา FK506 สามารถยับยั้ง calcineurin ได้อย่างสมบูรณ์ที่ค่าความเข้มข้นของยาในหน่วยนาโนโมลาร์ ในขณะที่ค่าความเข้มข้นของสารประกอบคูมารินอยู่ในหน่วยไมโครโมลาร์ เนื่องจากยา FK506 มีความสามารถทางการต้านละลายน้ำสูงกว่าสารประกอบคูมาริน ทำให้ยา FK506 เข้าสู่ภายในเซลล์ได้ง่ายกว่าสารประกอบคูมารินซึ่งมีความสามารถทางการต้านละลายน้ำต่ำ

calcineurin เป็นเอนไซม์ฟอสฟาเทสที่จำเป็นต้องอาศัยวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมเพื่อกระตุ้นให้สามารถทำงานได้ (active form) โดยประกอบด้วย 2 subunits คือ catalytic subunit (A) และ regulatory subunit (B) สำหรับในส่วนของ catalytic subunit (A) ประกอบด้วยส่วนย่อยต่างๆ คือ catalytic domain, B subunit-binding domain, calmodulin-binding domain และ autoinhibitory domain ในสถานะที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมสูง แคลเซียมจะจับกับ calmodulin ก่อนจากนั้นจะมาจับที่ calcineurin บริเวณ calmodulin-binding domain ของ catalytic subunit (A) เป็นผลให้ autoinhibitory domain หลุดออก ทำให้ calcineurin สามารถทำงานได้ แต่ในสถานะที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมต่ำ autoinhibitory domain จะยังคงจับอยู่ที่บริเวณ catalytic domain ทำให้ calcineurin ไม่สามารถทำงานได้ (inactive form) (Rusnak และ Mertz, 2000) การทำงานของยากดภูมิคุ้มกัน FK506 และยา Cyclosporin A ในการยับยั้ง calcineurin จำเป็นต้องอาศัย binding protein ที่จำเพาะเจาะจง คือ FKBP12 และ Cyclophilin A ตามลำดับ โดยยาจะต้องจับกับ binding protein บริเวณที่จำเพาะเจาะจง เกิดเป็นโมเลกุลเชิงซ้อนของ FK506-FKBP12 และ Cyclosporin A-Cyclophilin ตามลำดับ ซึ่งไปจับกับ calcineurin ที่บริเวณระหว่าง catalytic subunit (A) และ regulatory subunit (B) ดังแสดงในภาพที่ 5.1 (Husi และคณะ, 1994) มีผลทำให้ calcineurin ไม่สามารถทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ฟอสฟาเทสได้ จึงไม่เกิดการตัดหมู่ฟอสเฟตออกจาก NFAT-P ดังนั้น NFAT จึงไม่เคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสไปกระตุ้นยีนประมวลรหัส IL-2 ส่งผลให้ไม่เกิดการผลิต IL-2 ขึ้น



ภาพที่ 5.1 แบบจำลองกลไกการจับ calcineurin ของยากดภูมิคุ้มกัน

ที่มา : Husi และคณะ, 1994

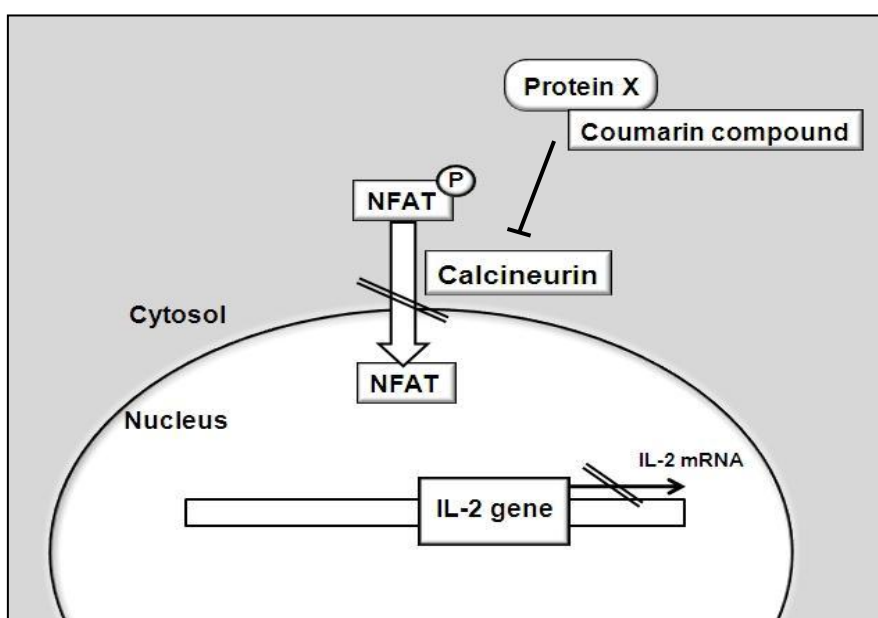
เห็นได้ว่ายากดภูมิคุ้มกันส่วนใหญ่ มักต้องอาศัย binding protein ในการทำงาน ออกฤทธิ์กดภูมิคุ้มกัน ซึ่งประสิทธิภาพของการทำงานนั้นจะขึ้นอยู่กับความจำเพาะเจาะจงระหว่าง ชนิดของ binding protein กับ drug ligand กล่าวคือยาแต่ละชนิดจะมีประสิทธิภาพในการกดภูมิคุ้มกันได้ก็ต่อเมื่อมี binding protein ที่จำเพาะเจาะจงกับยาชนิดดังกล่าวเท่านั้น จากรายงานก่อนหน้านี้ได้พบว่า binding protein (immunophilin) นั้นมีอยู่มากมาย เช่น FKBP12.6, FKBP13, FKBP25, FKBP52 และ FKBP54 เป็นต้น ซึ่งเป็นชนิดที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ FKBP12 แต่มีความแตกต่างกันที่น้ำหนักโมเลกุล (Lam และคณะ, 1995) โดยพบว่ายา FK506 จะสามารถยับยั้งการทำงานของ calcineurin ได้ ก็ต่อเมื่อจับกับ binding protein ชนิด FKBP12 และ FKBP12.6 เท่านั้น (Sewell และคณะ, 1994) แต่สำหรับ binding protein ชนิด FKBP13 และ FKBP25 พบว่าไม่มีความจำเพาะจงกับยา FK506 แต่อย่างไรก็ตามและไม่ทำให้ยับยั้งการทำงาน

ของ calcineurin ได้ เป็นไปในทำนองเดียวกันกับ binding protein ซึ่งอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ Cyclophilin A พบว่ามีหลายชนิดเช่นกัน เช่น Cyclophilin B และ Cyclophilin C แต่พบว่ายา Cyclosporin A นั้นสามารถยับยั้งการทำงานของ calcineurin ได้ ก็ต่อเมื่อจับกับ Cyclophilin A และ Cyclophilin B ในทางตรงกันข้ามยาจะไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง calcineurin หากจับกับ Cyclophilin C (Bram และคณะ, 1993) เห็นได้ชัดเลยว่ายาแต่ละชนิดนั้นจะมีประสิทธิภาพในการก่อกำเนิดได้ต้องอาศัยการจับกับ binding protein ที่จำเพาะเจาะจงกับยาชนิดนั้น หาก binding protein ดังกล่าวไม่มีความจำเพาะเจาะจงกับยาแล้ว จะทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้

สารประกอบคูมารินสามารถยับยั้งการทำงานของ calcineurin ในเซลล์ (*in vivo*) ได้อย่างสมบูรณ์ทั้งในเซลล์สัตว์และในเซลล์ไลม์มะเร็งของมนุษย์ชนิด Jurkat แต่สำหรับในหลอดทดลอง (*in vitro*) พบว่าสารประกอบคูมารินสามารถยับยั้งแอกติวิตีของ calcineurin ได้ไม่สมบูรณ์หรืออาจเป็นไปในทางอ้อม ทั้งนี้แตกต่างจากยา FK506 ซึ่งสามารถยับยั้งแอกติวิตีของ calcineurin ได้อย่างสมบูรณ์ทั้งใน *in vivo* และ *in vitro* มีความเป็นไปได้ว่าสารประกอบคูมารินมีกลไกการก่อกำเนิดที่แตกต่างกับยา FK506 เนื่องจากการทดลองในหลอดทดลอง (*in vitro*) นั้นทดลองโดยใช้ชุดทดสอบแอกติวิตีของ calcineurin ซึ่งมีการเติมโปรตีนต่างๆ จาก bovine brain เพื่อช่วยให้ calcineurin อยู่ในสภาพถูกกระตุ้นและสามารถทำงานได้ในหลอดทดลอง โดย immunophilin ที่จำเพาะเจาะจงกับยา FK506 คือ FKBP12 นั้นมีรายงานว่าถูกพบในสมองได้มากกว่าบริเวณเนื้อเยื่ออื่นๆ (Steiner และคณะ, 1992) ดังนั้นจึงทำให้ยา FK506 สามารถยับยั้งแอกติวิตีของ calcineurin ได้อย่างสมบูรณ์ แตกต่างกับสารประกอบคูมารินที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้แบบไม่สมบูรณ์ จึงมีความเป็นไปได้ว่าสารประกอบคูมารินอาจจำเป็นต้องอาศัย binding protein ที่จำเพาะเจาะจงชนิดอื่นที่แตกต่างกับยา FK506 ในการยับยั้ง calcineurin ซึ่ง binding protein ที่จำเพาะเจาะจงกับสารประกอบคูมารินนั้นอาจพบได้น้อยในสมอง โดย binding protein และมีความเป็นไปได้ว่าอาจพบได้มากเฉพาะใน T-lymphocyte เท่านั้น เนื่องจากผลการทดลองที่ศึกษาในเซลล์ไลม์มะเร็งของมนุษย์ชนิด Jurkat พบว่าสารประกอบคูมารินสามารถออกฤทธิ์ยับยั้ง calcineurin ได้อย่างชัดเจน

ในกลไกการยับยั้งการทำงานของ calcineurin ของสารประกอบคูมารินนั้น binding protein ที่จำเพาะเจาะจงกับสารประกอบคูมารินนั้นนอกจากจะเป็น immunophilin แล้ว ยังมีความเป็นไปได้ว่าอาจจะเป็น endogenous calcineurin inhibitors เช่นโปรตีน AKAP79, Cabin1, Calcipressin, DSCR1 และ Carabin เป็นต้น โดย endogenous calcineurin inhibitors

ดังกล่าวนี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม negative regulator ของ calcineurin กล่าวคือเมื่อได้รับการกระตุ้นให้ มีการทำงานจะส่งผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานของ calcineurin ได้ (Savignac และคณะ, 2007) จึงมีความเป็นไปได้ว่ากลไกการยับยั้งการทำงานของ calcineurin อาจเกิดจากการที่ สารประกอบคูมารินจับกับ endogenous calcineurin inhibitors ชนิดใดชนิดหนึ่ง และมีผลทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ endogenous calcineurin inhibitors และส่งผลทำให้ calcineurin ถูกยับยั้งได้



ภาพที่ 5.2 แผนผังจำลองกระบวนการยับยั้ง calcineurin ของสารประกอบคูมาริน

กลไกการทำงานของสารประกอบคูมาริน โดยจะจับกับ binding protein (Protein X) ซึ่งอาจจะเป็น immunophilin หรือ endogenous calcineurin inhibitors แล้วจึงมาจับที่ calcineurin ส่งผลยับยั้งการทำงานของ calcineurin จึงไม่สามารถทำงานเป็นเอนไซม์ฟอสฟาเทสได้ ดังนั้น NFAT-P จึงไม่ถูกตัดหมู่ฟอสเฟตออก ส่งผลให้ไม่สามารถเคลื่อนที่เข้ามาภายในนิวเคลียสได้และไม่เกิดการถอดรหัสของยีน IL-2 และผลิตไซโตไคน์ IL-2 ออกมา ดังนั้น สารประกอบคูมารินจึงสามารถกดภูมิคุ้มกันได้

สารประกอบคูมารินอาจมีศักยภาพในการนำไปพัฒนาและประยุกต์ใช้สำหรับรักษาผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันผิดปกติหรือโรคออโตอิมมูนได้ เช่น โรค Systemic lupus erythematosus (SLE), โรค Rheumatoid arthritis และโรคสะเก็ดเงิน (Psoriasis) เป็นต้น รวมไปถึงผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะด้วย ซึ่งผู้ป่วยเหล่านี้ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาเป็นจำนวนมากเนื่องจากต้องใช้ยากดภูมิคุ้มกันในการรักษาอย่างต่อเนื่อง และยากดภูมิคุ้มกันที่ใช้มักเป็นยา นำเข้าจากต่างประเทศที่มีราคาแพง นอกจากนี้ปัญหาของยากดภูมิคุ้มกันที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน เช่นยา FK506 และ Cyclosporin A จะพบผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์ต่อร่างกายผู้ป่วย ได้แก่ อาการพิษต่อระบบประสาท มีความเป็นพิษต่อไต และก่อให้เกิดโรคเบาหวาน (Pirsch และคณะ, 1997) แต่สำหรับสารประกอบคูมารินซึ่งในอดีตเป็นอาหารผักเพื่อบริโภคสำหรับคน และยังเป็นแหล่งอาหารธรรมชาติสำหรับแพะเล็มสวนยอดและใบของโค กระบือ และสัตว์ป่าได้ จึงเป็นสารที่มีความน่าสนใจเป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาเป็นยากดภูมิคุ้มกันที่อาจลดการเกิดผลข้างเคียงต่อร่างกายผู้ป่วยได้ ซึ่งจากการศึกษานี้ยังเป็นการค้นพบฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่จากสมุนไพรไทย ส่องฟ้าแดงที่ได้จากการคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ ซึ่งนับว่าเป็นวิธีการคัดกรองที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง ทั้งยังเป็นระบบการคัดกรองเชิงบวกที่สามารถตรวจหาโมเลกุลเป้าหมายของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมได้อย่างแม่นยำ

5.2 สรุปผลการวิจัย

1. สารประกอบคูมารินถูกแยกได้จากส่วนสกัดหยาบของใบส่องฟ้าแดง มีผลยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์ โดยมีฤทธิ์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสาร (dose-dependent manner) อีกทั้งไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ยีสต์ที่ความเข้มข้น 250 μM
2. สารประกอบคูมารินอาจมีผลยับยั้งระดับแคลเซียมอิสระภายในเซลล์ยีสต์ได้บางส่วน ซึ่งเกิดจากฤทธิ์ยับยั้ง calcineurin ที่น่าจะเป็นไปในทางอ้อม อาจเป็นเพราะต้องอาศัย binding protein ที่จำเพาะเจาะจง จึงจะสามารถยับยั้งแอกติวิตีของ calcineurin ได้อย่างสมบูรณ์

3. ในวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์ สารประกอบคูมารินไม่ได้มีโมเลกุลเป้าหมายเป็นโปรตีน Mpk1 แต่มีโมเลกุลเป้าหมายคือ calcineurin และมีผลทำให้ยีสต์สายพันธุ์กลายที่มีการแสดงออกเกินของ calcineurin สามารถเจริญได้ตามปกติ และมีการแบ่งนิวเคลียสแบบปกติ แสดงให้เห็นว่าสารประกอบคูมารินมีฤทธิ์ตัดสัญญาณการกระตุ้นวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมที่ calcineurin โดยมีผลการยับยั้ง calcineurin ในเซลล์ยีสต์ที่ชัดเจนและสมบูรณ์กว่าการยับยั้ง calcineurin ในหลอดทดลอง ทั้งนี้อาจเนื่องจากสารประกอบคูมารินจำเป็นต้องอาศัย binding protein ที่จำเพาะเจาะจงภายในเซลล์ เพื่อยับยั้ง calcineurin

4. เนื่องจากการอนุรักษ์ทางพันธุกรรมของ calcineurin จากยีสต์สู่มนุษย์สูง สารประกอบคูมารินจึงน่าจะมีฤทธิ์ยับยั้ง calcineurin ในมนุษย์ได้เช่นกัน ซึ่งในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ชนิด Jurkat สารประกอบคูมารินไม่มีความเป็นพิษแบบเฉียบพลันในช่วงค่าความเข้มข้นของสารตั้งแต่ 1-100 μM ซึ่งค่าสูงสุดนี้อยู่ในช่วงที่สารประกอบคูมารินมีฤทธิ์กดภูมิคุ้มกันในเซลล์มนุษย์ได้อย่างสมบูรณ์

5. สารประกอบคูมารินมีผลยับยั้งการแสดงออกของยีน Interleukin-2 (IL-2) ได้ในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ชนิด Jurkat ตั้งแต่ระดับการถอดรหัสของยีน และมีผลยับยั้งการตัดหมู่ฟอสเฟตออกจากโปรตีน NFAT ซึ่งที่ค่าความเข้มข้นของสาร 50 μM ของสารประกอบคูมารินสามารถยับยั้งแอกติวิตีของ calcineurin ในเซลล์มนุษย์ได้อย่างชัดเจน

6. ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบคูมารินคือฤทธิ์กดภูมิคุ้มกันในเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์ชนิด Jurkat ซึ่งช่วงความเข้มข้นที่สารออกฤทธิ์นั้น เป็นความเข้มข้นที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ทำให้มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาและประยุกต์ใช้สำหรับการรักษาผู้ป่วยโรคออโตอิมมูนได้ เช่น โรค Systemic lupus erythematosus (SLE), โรค Rheumatoid arthritis และโรค สะเก็ดเงิน (Psoriasis) เป็นต้น รวมไปถึงผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะด้วย

7. สารประกอบคูมารินน่าจะเป็นสารกดภูมิคุ้มกันชนิดใหม่ (Novel immunosuppressant) ที่ถูกค้นพบฤทธิ์ชีวภาพจากการศึกษานี้ เนื่องจากสารประกอบคูมารินมีโครงสร้างโมเลกุลที่แตกต่างจากสารกดภูมิคุ้มกันที่มีการใช้อยู่ในปัจจุบันและมีกลไกยับยั้ง calcineurin โดยอาศัย immunophilin ต่างชนิดกับยา FK506 โดยยา FK506 ต้องอาศัย immunophilin ชนิด FKBP12 และนอกจากนี้สารประกอบคูมารินสามารถยับยั้ง calcineurin ในมนุษย์ได้ดีกว่าในเซลล์ยีสต์ เนื่องจากสารสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์มนุษย์ได้ง่ายกว่าในเซลล์ยีสต์ซึ่งมีผนังเซลล์ห่อหุ้มอยู่

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. ทำการเพิ่มประสิทธิภาพของสารประกอบคูมารินโดยใช้นาโนเทคโนโลยี เช่น การห่อหุ้มสารด้วยไลโปโซม (Liposome) เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการนำสารเข้าสู่ภายในเซลล์ ทั้งนี้เนื่องจากสารประกอบคูมารินเป็นสารที่ได้จากผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติที่มีข้อจำกัดในด้านความสามารถทางการละลายน้ำ สารจึงเข้าสู่เซลล์ได้ยาก

2. ทำการศึกษาผลสารประกอบคูมารินที่มีต่ออัตราการรอดชีวิตในเซลล์ไลน์ มะเร็งของมนุษย์ชนิดอื่นๆ เช่น KATOIII, BT474, MDA MB 231, HL-60 และ THP-1 โดยทำการศึกษาทดสอบความเป็นพิษทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง ด้วยวิธี MTT proliferation assay เพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพความเป็นพิษของสารที่มีต่อเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ

3. ศึกษาหา binding protein ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับสารประกอบคูมารินในเซลล์ โดยเฉพาะในมนุษย์ เพื่อให้ทราบถึงความจำเพาะของฤทธิ์ทางชีวภาพและผลข้างเคียงของสารประกอบ คูมาริน โดยทำการศึกษาโดยใช้วิธี Affinity column chromatography นำสารประกอบคูมารินตรึงกับคอลัมน์ จากนั้นนำส่วนผสมของเซลล์ผ่านคอลัมน์ ซึ่งจะช่วยให้โปรตีนใดๆ ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับสารประกอบคูมารินจะถูกจับกับสารประกอบคูมารินที่ตรึงไว้ในคอลัมน์ จากนั้นจะได้โปรตีนดังกล่าวออกมาศึกษาลักษณะสมบัติจนพบว่า เป็นโปรตีนชนิดใด

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ณัฐพงษ์ รักดีใหม่. 2552. การใช้ยีสต์เป็นระบบคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ต้านวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมจากพืชสมุนไพรและพืชหายากจากสวนป่าสมุนไพร เขาหินซ้อน จ.ฉะเชิงเทรา. วิทยานิพนธ์ปริญญาบัณฑิต, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วงศ์สถิต ฉั่วกุล, พร้อมจิต ศรีลัมพ์ และสมภพ ประธานธรรักษ์. 2543. สารานุกรมสมุนไพร เล่ม 2. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์สยามไภษัชยพิภพ.

วชิรศักดิ์ วังกังวาน. 2550. การคัดกรองเชิงบวกและศึกษาสมบัติเบื้องต้นของสารสกัดจากพืชที่ออกฤทธิ์ยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมโดยใช้ยีสต์สายพันธุ์กลาย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบัณฑิต, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สิรินพร สุขสวัสดิ์อำนาจ. 2552. ฤทธิ์ทางชีวภาพของฟิโนสโทรบินจากกระชายเหลือง *Boesenbergia pandurata* ซึ่งเป็นสารยับยั้งวิธีสัญญาณของแคลเซียมใน *Saccharomyces cerevisiae* และฤทธิ์ด้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์มะเร็งของมนุษย์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบัณฑิต, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Allison, A.C. 2000. Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. Immunopharmacology 47: 63-83.

Alvarez, A.L., Habtemariam, S., Juan-Badaturuge, M., Jackson, C., and Parra, F. 2011. In vitro anti HSV-1 and HSV-2 activity of *Tanacetum vulgare* extracts and isolated compounds. Phytotherapy research 25: 296-301.

- Ausubel, F.A., et al. 1999. Current protocols in molecular biology. New York: John Willey & Sons.
- Bach, S., et al. 2003. Isolation of drugs active against mammalian prions using a yeast-based screening assay. Nature biotechnology 21: 1075-1081.
- Barker, J. 1998. Psoriasis as a T cell-mediated autoimmune disease. Hospital medicine london England 59: 530-533.
- Bertorello, A.M.,and Katz, A.I. 1993. Short-term regulation of renal Na-K-ATPase activity: physiological relevance and cellular mechanisms. American journal of physiology-renal physiology 265: 743-755.
- Bhat, R.V., Budd Haeberlein, S.L.,and Avila, J. 2004. Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. Journal of neurochemistry 89: 1313-1317.
- Bi, E.,and Pringle, J. 1996. ZDS1 and ZDS2, genes whose products may regulate Cdc42p in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and cellular biology 16: 5264-5275.
- Botstein, D., Chervitz, S.A.,and Cherry, J.M. 1997. Yeast as a model organism. Science 277: 1259-1260.
- Bram, R.J., Hung, D., Martin, P., Schreiber, S.,and Crabtree, G. 1993. Identification of the immunophilins capable of mediating inhibition of signal transduction by cyclosporin A and FK506: roles of calcineurin binding and cellular location. Molecular and cellular biology 13: 4760-4769.
- Chanklan, R., Aihara, E., Koga, S., Takahashi, H., Mizunuma, M.,and Miyakawa, T. 2008. Inhibition of Ca²⁺-signal-dependent growth regulation by radicicol in budding yeast. Bioscience, biotechnology, and biochemistry 72: 132-138.

- Chopra, R.N., Nayar, S.L., and Chopra, I.C. 1956. Glossary of Indian medicinal plants. New Delhi: CSIR.
- Clapham, D.E. 1995. Calcium signaling. Cell 80: 259-268.
- Cohen, P. 1982. The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity. Nature 296: 613-620.
- Cunnick, J.E., Sakamoto, K., Chapes, S.K., Fortner, W., and Takemoto, D.J. 1990. Induction of tumor cytotoxic immune cells using a protein from the bitter melon (*Momordica charantia*). Cellular immunology 126: 278-289.
- Cunningham, K., and Fink, G. 1996. Calcineurin inhibits VCX1-dependent H⁺/Ca²⁺ exchange and induces Ca²⁺ ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and cellular biology 16: 2226-2237.
- Drews, J. 1996. Genomic sciences and the medicine of tomorrow. Natural biotechnology 14: 1516-1518.
- Duan, W., Chan, J.H., Wong, C.H., Leung, B.P., and Wong, W.S. 2004. Anti-inflammatory effects of mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor U0126 in an asthma mouse model. Journal of immunology 172: 7053-7059.
- Eldridge, G.R., et al. 2002. High-throughput method for the production and analysis of large natural product libraries for drug discovery. Analytical chemistry 74: 3963-3971.
- Farnsworth, N.R., and Bunyapraphatsn, N. 1992. Thai medicinal plants recommended for primary health care system. Bangkok: Mahidol University.
- Firestein, G.S. 2003. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. Nature 423: 356-361.

- Fries, J.F., Williams, C.A., Bloch, D.A., and Michel, B.A. 1991. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-associated gastropathy: Incidence and risk factor models. The American journal of medicine 91: 213-222.
- Gardner, P. 1989. Calcium and T lymphocyte activation. Cell 59: 15-20.
- Hamburger, M., and Hostettmann, K. 1991. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. Phytochemistry 30: 3864-3874.
- Hartwell, L.H. 2002. Nobel lecture: yeast and cancer. Bioscience reports 22: 373-394.
- Hartwell, L.H. 2004. Yeast and cancer. Bioscience reports 24: 523-544.
- Harvey, A.L. 2008. Natural products in drug discovery. Drug discovery today 13: 894-901.
- Heitman, J., Mowva, N.R., and Hall, M.N. 1991. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. Science 253: 905-909.
- Husi, H., Luyten, M. A., and Zurini, M. 1994. Mapping of the immunophilin-immunosuppressant site of interaction on calcineurin. Journal of biological chemistry 269: 14199-14204.
- Intiyot, Y., et al. 2002. Antimutagenicity of *Murdannia loriformis* in the Salmonella mutation assay and its inhibitory effects on azoxymethane-induced DNA methylation and aberrant crypt focus formation in male F344 rats. Journal of medical investigation 49: 25-34.
- Itharat, A., Houghton, P.J., Eno-Amooquaye, E., Burke, P., Sampson, J. H., and Raman, A. 2004. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. Journal of ethnopharmacology 90: 33-38.

- Joseph, S., and Russell, W. 2001. Molecular cloning, A laboratory manual third edition. New York: Cold spring harbor laboratory press.
- Kassir, Y., Rubin-Bejerano, I., and Mandel-Gutfreund, Y. 2006. The *Saccharomyces cerevisiae* GSK-3 beta homologs. Current drug targets 7: 1455-1465.
- Lakhan, S.E., and Vieira, K.F. Nutritional and herbal supplements for anxiety and anxiety-related disorders: systematic review. Nutrition journal 9: 42-50.
- Lam, E., Martin, M., and Wiederrecht, G. 1995. Isolation of a cDNA encoding a novel human FK506-binding protein homolog containing leucine zipper and tetratricopeptide repeat motifs. Gene 160: 297-302.
- Lesage, S., and Goodnow, C.C. 2001. Organ-specific autoimmune disease. The journal of experimental medicine 194: 31-36.
- Levitzi, A., and Mishani, E. 2006. Tyrophostins and other tyrosine kinase inhibitors. Annual review of biochemistry 75: 93-109.
- Mager, W.H., and Winderickx, J. 2005. Yeast as a model for medical and medicinal research. Trends in Pharmacological Sciences 26: 265-273.
- Maneerat, W., et al. 2012. Antibacterial carbazole alkaloids from *Clausena harmandiana* twigs. Fitoterapia 24: 444-452.
- Matheos, D.P., Kingsbury, T.J., Ahsan, U.S., and Cunninghaml, K.W. 1997. Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Genes & development 11: 3445-3458.
- Means, A.R. 1994. Calcium, calmodulin and cell cycle regulation. FEBS Letters 347: 1-4.

- Mizunuma, M., Hirata, D., Miyahara, K., Tsuchiya, E., and Miyakawa, T. 1998. Role of calcineurin and Mpk1 in regulating the onset of mitosis in budding yeast. Nature 392: 303-306.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunological methods 65: 55-63.
- Nakamura, T., Ohmoto, T., Hirata, D., Tsuchiya, E., and Miyakawa, T. 1996. Genetic evidence for the functional redundancy of the calcineurin and Mpk1-mediated pathways in the regulation of cellular events important for growth in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and general genetics 251: 211-219.
- Nikoulina, S.E., Ciaraldi, T.P., Mudaliar, S., Mohideen, P., Carter, L., and Henry, R.R. 2000. Potential role of glycogen synthase kinase-3 in skeletal muscle insulin resistance of type 2 diabetes. Diabetes 49: 263-271.
- Patnaik, G., and Dhawan, B. 1982. Evaluation of spasmolytic activity of clausmarin-A. A novel coumarin from *Clausena pentaphylla* (Roxb.) DC. Journal of ethnopharmacology 6: 127-137.
- Perkins, E., et al. 2001. Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase/PARP1 and PARP2 identified using a cell-based screen in yeast. Cancer research 61: 4175-4183.
- Pirsch, J.D., Miller, J., Deierhoi, M.H., Vincenti, F., and Filo, R.S. 1997. A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation 1. Transplantation 63: 977-983.
- Reuter, H. 1995. *Allium sativum* and *Allium ursinum*: Part 2 pharmacology and medicinal application. Phytomedicine 2: 73-91.

- Rusnak, F.,and Mertz, P. 2000. Calcineurin: form and function. Physiological reviews 80: 1483-1521.
- Savignac, M., Mellstrom, B.,and Naranjo, J.R. 2007. Calcium-dependent transcription of cytokine genes in T lymphocytes. European journal of physiology 454: 523-533.
- Sebolt-Leopold, J.S., et al. 1999. Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. Nature medicine 5: 810-816.
- Seeff, L.B., Lindsay, K.L., Bacon, B.R., Kresina, T.F.,and Hoofnagle, J.H. 2001. Complementary and alternative medicine in chronic liver disease. Hepatology 34: 595-603.
- Sewell, T.J., et al. 1994. Inhibition of calcineurin by a novel FK-506-binding protein. Journal of biological chemistry 269: 21094-21102.
- Shitamukai, A., Mizunuma, M., Hirata, D., Takahashi, H.,and Miyakawa, T. 2000. A positive screening for drugs that specifically inhibit the Ca²⁺-signaling activity on the basis of the growth promoting effect on a yeast mutant with a peculiar phenotype. Bioscience, biotechnology and biochemistry 64: 1942-1946.
- Steiner, J.P., et al. 1992. High brain densities of the immunophilin FKBP colocalized with calcineurin. Nature 358: 584-587.
- Sugiura, R., Sio, S.O., Shuntoh, H.,and Kuno, T. 2002. Calcineurin phosphatase in signal transduction: lessons from fission yeast. Genes cells 7: 619-627.
- Sun, L., et al. 2007. Evidence that calcineurin is required for the genesis of bone-resorbing osteoclasts. American journal of physiology-renal physiology 292: 285-291.
- Suthanthiran, M.,and Strom, T.B. 1997. Immunoregulatory drugs: mechanistic basis for use in organ transplantation. Pediatric nephrology 11: 651-657.

- Udvardi, M.K., Czechowski, T.,and Scheible, W.R. 2008. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. The plant cell online 20: 1736-1737.
- Vinitketkumnuen, U., Charoenkunathum, W., Kongtawelert, P., Lertprasertsuke, N., Picha, P.,and Matsushima, T. 1996. Antimutagenicity and DT-diaphorase inducer activity of the Thai medicinal plant, *Murdannia loriformis*. Journal of herbs, spices & medicinal plants 4: 45-52.
- Vinitketkumnuen, U., Chewonarin, T., Dhumtanom, P., Lertprasertsuk, N.,and Wild, C.P. 1999. Aflatoxin-albumin adduct formation after single and multiple doses of aflatoxin B1 in rats treated with Thai medicinal plants. Molecular mechanisms of mutagenesis 428: 345-351.
- Vinitketkumnuen, U., Puatanachokchai, R., Kongtawelert, P., Lertprasertsuke, N.,and Matsushima, T. 1994. Antimutagenicity of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) to various known mutagens in salmonella mutation assay. Mutation research/genetic toxicology 341: 71-75.
- Vyse, T.J.,and Todd, J.A. 1996. Genetic analysis of autoimmune disease. Cell 85: 311-318.
- Wahl, C., Liptay, S., Adler, G.,and Schmid, R.M. 1998. Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. Journal of Clinical Investigation 101: 1163-1174.
- Wangkangwan, W., et al. 2009. Pinostrobin from *Boesenbergia pandurata* is an inhibitor of Ca²⁺-signal-mediated cell-cycle regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry 73: 1679-1682.
- Westhoff, T.H.,and Giet, M.V. 2007. Tacrolimus in the treatment of idiopathic nephrotic syndrome. Nephrology 16: 1099-1110.

- Xie, W., Robertson, D.L.,and Simmons, D.L. 1992. Mitogen-inducible prostaglandin G/H synthase: A new target for nonsteroidal antiinflammatory drugs. Drug development research 25: 249-265.
- Yang, C.S., Wang, Z.Y.,and Hong, J.Y. 1994. Inhibition of tumorigenesis by chemicals from garlic and tea. Advances in experimental medicine and biology 354: 113-122.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast peptone dextrose (YPD)

Yeast extract	10 กรัม
Peptone	20 กรัม
Glucose	20 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 4.5 และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast peptone adenine uracil dextrose (YPAUD)

Yeast extract	10 กรัม
Peptone	20 กรัม
Glucose	20 กรัม
Adenine	400 มิลลิกรัม
Uracil	200 มิลลิกรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Yeast peptone adenine uracil dextrose (YPAUD agar)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPAUD ละลายอะการ์ 20 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Yeast peptone adenine uracil dextrose soft agar (YPAUD soft agar)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ละลายอะการ์ 7 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว synthetic complete medium (SC medium)

Yeast nitrogen base without amino acid	6.7 กรัม
Glucose	20 กรัม
10 x amino acid without uracil	100 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 4.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Synthetic complete medium (SC medium agar)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SC medium ละลายอะการ์ 20 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast peptone galactose (YPGal)

Yeast extract	10 กรัม
Peptone	20 กรัม
Galactose	20 กรัม
Raffinose	10 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 4.5 และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast peptone (YP)

Yeast extract	10 กรัม
Peptone	20 กรัม
Raffinose	10 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

20% galactose

Galactose	20 กรัม
H ₂ O	100 มิลลิลิตร

10 x amino acid without uracil

Adenine sulfate	200 มิลลิกรัม
L-Tryptophan	200 มิลลิกรัม
L-Histidine HCl	200 มิลลิกรัม
L-Argine HCl	200 มิลลิกรัม
L-Methionine	200 มิลลิกรัม
L-Tyrosine	300 มิลลิกรัม
L-Leucine	1000 มิลลิกรัม
L-Isoleucine	300 มิลลิกรัม
L-Lysine HCl	300 มิลลิกรัม
L-Phenylalanine	500 มิลลิกรัม
L-Glutamic acid	1000 มิลลิกรัม
L-Aspartic acid	1000 มิลลิกรัม
L-Valine	1500 มิลลิกรัม
L-Threonine	2000 มิลลิกรัม
L-Serine	4000 มิลลิกรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 (stock reagent)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ผงสำเร็จรูป	10.4 กรัม
โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต	2 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร กวนให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ให้มีค่าประมาณ 6.9-7.4 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1N ปรับให้ได้ ปริมาตร 1 ลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่านหัวกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ปลอดเชื้อขนาด 0.22 ไมครอนเมตร ลงในขวดใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ปลอดเชื้อขนาด 90 มิลลิลิตร ปิดฝาและพัน พาราฟิล์ม เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี Fetal bovine serum ความเข้มข้น 10% (working reagent) สำหรับเลี้ยงเซลล์ไคนะเร็งชนิด Jurkat

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 (stock reagent)	90 มิลลิลิตร
ซีรัม (inactivated fetal bovine serum)	10 มิลลิลิตร
penicillin G (10^6 U/ml)	10 ไมโครลิตร
streptomycin (500 mg/ml)	50 ไมโครลิตร
β -mercaptoethanol	91 ไมโครลิตร
L-Glutamine (200 mM)	1 มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับเก็บเซลล์แช่แข็ง

อาหารเลี้ยงเซลล์ (working reagent)	9 มิลลิลิตร
DMSO	1 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

กลีเซอรอล

นำกลีเซอรอลมานึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำอีก 2 รอบ

สารละลาย Tris-HCl 1 M ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0

Trisma base	121.1 กรัม
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น	42 มิลลิลิตร

ละลาย Trisbase ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-เบสด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย EDTA 0.5 M ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0

EDTA	186.1 กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	20 กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-เบสด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อ ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

บัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0

Tris-HCl	10 มิลลิโมลาร์
EDTA	1 มิลลิโมลาร์

ผสมสารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เข้ากับสารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบสเป็น 8.0 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

High extraction buffer

Tris-HCl, pH 8.0	250 มิลลิโมลาร์
สารละลาย EDTA, pH 8.0	50 มิลลิโมลาร์
สารละลายโซเดียมคลอไรด์	125 มิลลิโมลาร์
น้ำปลอดประจุ	

Loading dye

Bromphenolblue	0.025%
ซูโครส	40%

ละลายส่วนผสมในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารละลายโปรตีนเนสเค (proteinase K) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผงโปรตีนเนสเคน้ำหนัก 20 มิลลิกรัม ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลาย RNase A 10 mg/ml

ละลายผง RNase A น้ำหนัก 10 มิลลิกรัม ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

70% เอทานอล

99% เอทานอล	700 มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดประจุ	300 มิลลิลิตร

บัฟเฟอร์ Phosphate buffer saline (PBS, Ca²⁺, Mg²⁺ Free) ความเป็นกรด-เบส 7.4

NaCl	8.0 กรัม
KCl	0.2 กรัม
NaHPO ₄	1.44 กรัม
KH ₂ PO ₄	0.24 กรัม

นำแต่ละส่วนค่อยๆ ละลายในน้ำปลอดประจุ 800 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 7.4 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1 N หรือ NaOH ความเข้มข้น 1 N ปรับปริมาตรด้วยกระบอกตวงจนครบ 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย MTT 5 mg/ml ใน PBS

MTT 50 มิลลิกรัม

PBS (สำหรับทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เท่านั้น) 10 มิลลิลิตร

ละลาย MTT ใน PBS ใส่ในหลอดฝาเกลียวขนาด 15 มิลลิลิตร ที่ปลอดเชื้อผสมให้เข้ากัน กรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปปลอดเชื้อขนาด 0.22 ไมโครเมตร (ทำในตู้ปลอดเชื้อ) แบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่ปลอดเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร หุ้มด้วยแผ่นฟอยด์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ MTT เป็นสารก่อมะเร็ง ต้องสวมถุงมือก่อนชั่งหรือเตรียมสารทุกครั้ง

สารละลาย 0.04 N HCl ใน isopropanol

นำ volume metric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมไอโซโพรพานอล จำนวน 80 มิลลิลิตร เติม HCl 0.331 มิลลิลิตร ปริมาตรให้ครบ 100 ml ด้วยไอโซโพรพานอล เก็บที่อุณหภูมิห้อง

สารละลาย 0.5 M EGTA

ละลาย EGTA จำนวน 9.52 กรัม ในน้ำปลอดประจุ 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

สารละลาย 5 M NaCl

ละลาย NaCl จำนวน 14.625 กรัม ในน้ำปลอดประจุ 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

สารละลาย 1 M Dithiothreitol (DTT)

ละลาย DTT จำนวน 3.09 กรัม ใน Sodium acetate ความเข้มข้น 0.01 M pH 5.2 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร กรองผ่านหัวกรอง (filter disc) ขนาด 0.22 ไมโครเมตรแบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลาย 1 M Tris-HCl (ค่าความเป็นกรด-เบส 7.2)

ละลาย Tris-HCl จำนวน 15.76 กรัม ในน้ำปลอดประจุ 80 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบส เป็น 7.2 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1 N หรือ NaOH ความเข้มข้น 1 N ปรับปริมาตรด้วยกระบอกตวงจนครบ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย Buffer A สำหรับสกัดโปรตีน

500mM Tris-HCl (pH 7.2)	1 มิลลิลิตร
10 mM EGTA	1 มิลลิลิตร
10 mM DTT	1 มิลลิลิตร
1.4 M KCl	1 มิลลิลิตร
25 mM MgCl ₂	1 มิลลิลิตร
ddH ₂ O	5 มิลลิลิตร

สารละลาย Buffer B สำหรับสกัดโปรตีน

Buffer A	990 ไมโครลิตร
Nonidet p-40	10 ไมโครลิตร
Phosphatase inhibitor	10 ไมโครลิตร

สารละลาย BCATM protein assay

สารละลาย A	50 ส่วน
สารละลาย B	1 ส่วน

สารละลาย 1.5 M Tris ความเป็นกรด-เบส 8.8

ละลาย trisma base จำนวน 90.855 กรัม ในน้ำปลอดประจุ 400 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบส เป็น 8.8 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1 N หรือ NaOH ความเข้มข้น 1 N ปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็น เวลา 15 นาที

สารละลาย 1 M Tris ความเป็นกรด-เบส 6.8

ละลาย trisma base จำนวน 12.114 กรัม ในน้ำปลอดประจุ 80 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบส เป็น 6.8 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1 N หรือ NaOH ความเข้มข้น 1 N ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย 10% SDS

ละลาย SDS (Sodium dodecyl sulfate) จำนวน 5 กรัม ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 40 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 7.2 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1 N หรือ NaOH ความเข้มข้น 1 N ปรับปริมาตรด้วยกระบอกตวงจนครบ 50 มิลลิลิตร

สารละลาย 10% Ammonium persulfate (APS)

ละลาย Ammonium persulfate จำนวน 0.5 กรัม ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ 5 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10% Separating gel

ddH ₂ O	3.836 มิลลิลิตร
40% Acrylamide	2.0 มิลลิลิตร
1.5 M Tris pH 8.8	2.0 มิลลิลิตร
10% SDS	0.08 มิลลิลิตร
10% APS	0.08 มิลลิลิตร
TEMED	0.004 มิลลิลิตร

5% stacking gel

ddH ₂ O	1.204 มิลลิลิตร
40% Acrylamide	0.25 มิลลิลิตร
1 M Tris pH 6.8	0.504 มิลลิลิตร
10% SDS	0.02 มิลลิลิตร
10% APS	0.02 มิลลิลิตร
TEMED	0.002 มิลลิลิตร

สารละลาย 5x Running buffer

trisma base	15.1 กรัม
glycine	94 กรัม
SDS	5 กรัม

นำแต่ละส่วนค่อยๆ ละลายในน้ำปลอดประจุ 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยกระบอกตวงจนครบ 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย 2x loading buffer

10% SDS	4 มิลลิลิตร
Glycerol 87%	2.29 มิลลิลิตร
1.0 M Tris pH 6.8	1 มิลลิลิตร

ddH ₂ O	2.71 มิลลิลิตร
Bromphenol blue	0.001 กรัม

สารละลาย Staining buffer

β -mercapto ethanol	100 ไมโครลิตร
2x loading buffer	900 ไมโครลิตร

สารละลาย Transfer buffer

Glycine	2.9 กรัม
Trisma base	15.1 กรัม
SDS	0.37 กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำปลอดประจุ 700 มิลลิลิตร เติมเมทานอลสัมบูรณ์จำนวน 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปลอดประจุ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย 10x Phosphate buffer saline (PBS)

NaCl	80.0 กรัม
KCl	2.0 กรัม
NaHPO ₄	14.4 กรัม
KH ₂ PO ₄	2.4 กรัม

นำแต่ละส่วนค่อยๆละลายในน้ำปลอดประจุ 800 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 7.4 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1 N หรือ NaOH ความเข้มข้น 1 N ปรับปริมาตรด้วยกระบอกตวงจนครบ 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย Phosphate buffer saline tween20 (PBST)

1x Phosphate buffer	1 ลิตร
Tween 20	0.5 มิลลิลิตร

สารละลาย Blocking solution (PBST in 3% non-fat dry milk)

PBST	200 มิลลิลิตร
skim milk	6 กรัม

ECL Western blot reagent

สารละลาย 1	2 มิลลิลิตร
สารละลาย 2	2 มิลลิลิตร

น้ำยาล้างฟิล์ม

Developer	1 ส่วน : น้ำ 4 ส่วน
Fixer	1 ส่วน : น้ำ 4 ส่วน

น้ำปลอด RNAase (DEPC water)

เติมสารละลาย Diethylpyrocarbonate (DEPC) 10 ไมโครลิตรลงในน้ำ HPLC ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย 70% Ethanol in DEPC water

Absolute Ethanol	70 มิลลิลิตร
DEPC water	30 มิลลิลิตร

สารละลาย 50x TAE buffer

Tris base acetate	48.4 กรัม
Garcial acetic acid	11.42 มิลลิลิตร
0.5 M EDTA pH 8.0	20 มิลลิลิตร

นำแต่ละส่วนค่อยๆ ละลายในน้ำปลอดประจุ 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปลอดประจุ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1% Agarose gel

สารละลาย 1x TAE buffer	20 มิลลิลิตร
Agarose gel	0.2 กรัม

2% Agarose gel

สารละลาย 1x TAE buffer	20 มิลลิลิตร
Agarose gel	0.4 กรัม

สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE

ละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่ปิดสนิทในที่มืด

Z-buffer

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	16.1 กรัม
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5.5 กรัม
KCl	0.75 กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.246 กรัม
β -mercapto-ethanol	2.7 มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 7 ด้วย HCl ความเข้มข้น 1 N

ONPG (1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

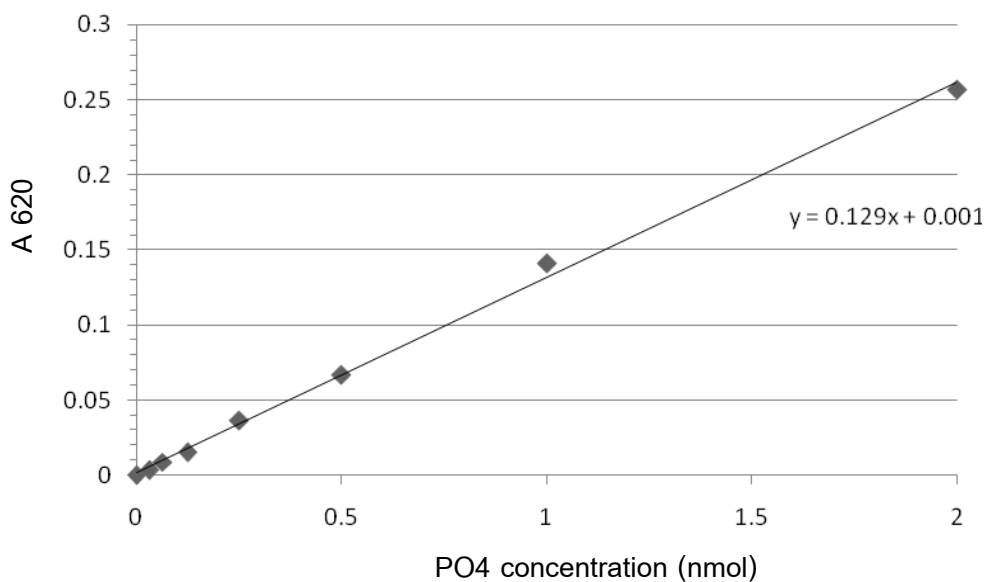
ชั่ง ONPG 1.5 มิลลิกรัม ละลายใน Z-buffer 1,000 มิลลิลิตร (เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนทดลอง)

1M Na₂CO₃

ชั่ง Na₂CO₃ 105.99 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ค
การวิเคราะห์ผล

1. กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฟอสเฟตและค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 620 นาโนเมตร



ภาพที่ ค1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฟอสเฟตและค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 620 นาโนเมตร

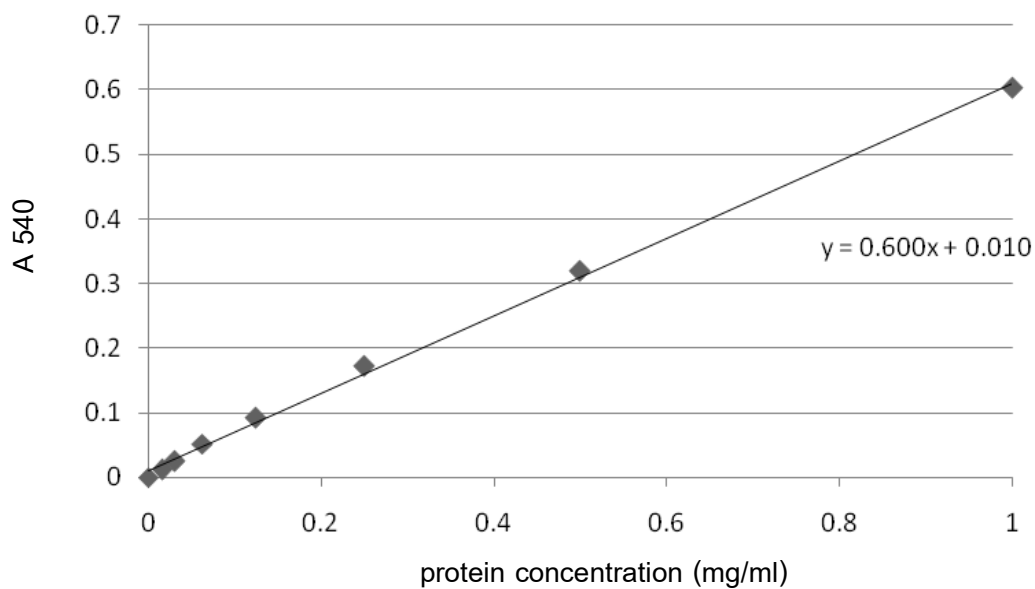
คำนวณการหาค่าความเข้มข้นของฟอสเฟตจากสมการ ดังต่อไปนี้

$$Y = 0.129X + 0.001$$

กำหนดให้ Y = ค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 620 นาโนเมตร

X = ความเข้มข้นของฟอสเฟต (นาโนโมล)

2. กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนและค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 540 นาโนเมตร



ภาพที่ ค2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนและค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 540 นาโนเมตร

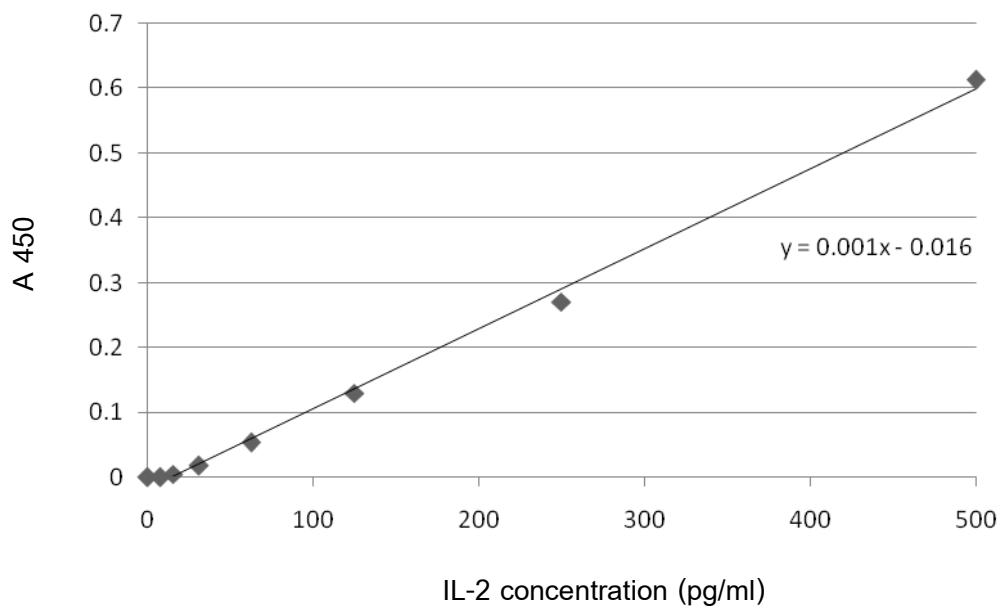
คำนวณการหาค่าความเข้มข้นของฟอสเฟตจากสมการ ดังต่อไปนี้

$$Y = 0.6X + 0.01$$

กำหนดให้ Y = ค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 540 นาโนเมตร

X = ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

3. กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนและค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 540 นาโนเมตร



ภาพที่ ค3 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ IL-2 และค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 450 นาโนเมตร

คำนวณการหาค่าความเข้มข้นของฟอสเฟตจากสมการ ดังต่อไปนี้

$$Y = 0.001X - 0.016$$

กำหนดให้ Y = ค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 450 นาโนเมตร

X = ความเข้มข้นของ IL-2 (พิโคกรัมต่อมิลลิตร)

4. การวิเคราะห์การแสดงออกของ mRNA หรือ โปรตีน

การคำนวณ

1. นำไฟล์ภาพหรือนำฟิล์ม X-ray ที่ต้องการวิเคราะห์ผลมาสแกนรูปโดยเซฟในรูปแบบ TIF ไฟล์
2. นำรูปที่ได้มาคำนวณหาความเข้มแบนโปรตีน ด้วยโปรแกรม Quantity One เวอร์ชัน 4.4.1 ของบริษัท Bio-Rad, USA จะได้ค่า Adjust Volume ($\text{INT} \cdot \text{mm}^2$)
3. ทำการปรับค่าความเข้มแถบให้มีการแสดงออกของ reference gene เท่าๆกัน เพื่อสามารถเปรียบเทียบค่าความเข้มได้ ดังสมการ

$$\text{Intensity} = \text{Adjust Volume target} / \text{Adjust Volume reference}$$

4. เปรียบเทียบค่าการแสดงออกของโปรตีน target ระหว่างชุดควบคุม และชุดทดลอง ดังสมการ

$$\text{Fold induction} = \text{Intensity sample} / \text{Intensity control}$$

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวปิติปรีญา เสืออ่วม เกิดเมื่อวันที่ 21 กรกฎาคม พ.ศ. 2530 สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ในปีการศึกษา 2551 และเข้ารับการศึกษต่อในระดับปริญญาโทวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2552

ผลงานทางวิชาการ

Suauam, P., Yompakdee, C. and Paechamud, T. Screening of calcium signaling pathway inhibitor in yeast *Saccharomyces cerevisiae* from Thai plants. Silpakorn University Research Fair 4; 2011 January 19-21, Silpakorn University (Sanam Chandra Palace Campus), Nakhonpatom, Thailand.

Suauam, P., Yingyongnarongkul, B., Miyakawa, T. and Yompakdee, C. A coumarin compound from *Clausena harmandiana* (Pierre) posseses a calcium signal inhibiting activity in a mutant *Saccharomyces cerevisiae*. The 23rd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology on "Systems Biotechnology: Quality and Success"; 2012 February 1-2, Imperial queen park Hotel, Bangkok, Thailand.