



บทบาทของเปปไทด์ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบที่เกิดจากโมโนไซต์เดี่ยวมยูเรต



สุพัตรา เจริญวุฒิกุล

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

บทบาทของเปปไทด์ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบที่เกิดจากโมโนไซต์เดี่ยวมยูเรต



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "บทบาทของเปปไทด์ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบที่เกิดจากโมโนไซเตียม
ยูเรต "

ของ สุภัตรา เจริญวุฒิกุล

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยิ่งมณี ตระกูลพั้ว)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงกมล ชันฉเลิศ)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชลฤดี สงวนเสริมศรี)

อนุมัติ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.กรองกาญจน์ ชูทิพย์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	บทบาทของเปปไทด์ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบที่เกิดจากโมโนโซเดียมยูเรต
ผู้วิจัย	สุพัตรา เจริญวุฒิกุล
สถานที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงกมล ชันธเลิศ
กรรมการที่ปรึกษา	ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2565
คำสำคัญ	โรคเกาต์, โมโนโซเดียมยูเรต, เปปไทด์, อินเตอร์ลิวคิน-1 เบตา

บทคัดย่อ

โรคเกาต์ (gout) เป็นโรคข้ออักเสบที่พบได้บ่อย โดยเป็นผลมาจากร่างกายมีภาวะระดับกรดยูริกสูงในเลือด (hyperuricemia) เป็นเวลานาน ทำให้เกิดการตกตะกอนเป็นผลึกโมโนโซเดียมยูเรต (monosodium urate crystals; MSU) สะสมตามบริเวณข้อและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ทั่วร่างกาย ส่งผลให้มีอาการปวด บวม แดง และอาการอักเสบบริเวณข้ออย่างเฉียบพลัน และส่งผลกระทบต่อการใช้ชีวิตประจำวันของผู้ป่วยเป็นอย่างมาก สาเหตุหลักของการอักเสบเกิดจากการตอบสนองต่อ MSU ก่อให้เกิดการหลั่ง pro-inflammatory cytokine ชนิด interleukin-1 β (IL-1 β) ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการอักเสบและการเกิดพยาธิสภาพของโรคเกาต์ การรักษาโรคเกาต์ในปัจจุบันจะใช้ยาต้านอักเสบ เช่น ยาในกลุ่ม nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), glucocorticoids และ colchicine อย่างไรก็ตามการใช้ยาในกลุ่มนี้มีผลข้างเคียงอย่างมากมาตั้งแต่การหาสารใหม่ที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและมีความปลอดภัยยังคงมีความจำเป็น ในปัจจุบันเปปไทด์ออกฤทธิ์ได้รับความสนใจมาก เนื่องจากมีความหลากหลายของฤทธิ์ทางชีวภาพ แต่รายงานที่ระบุถึงฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบที่เกิดจาก MSU ยังมีไม่มากนัก การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของเปปไทด์ R14 ต่อการยับยั้งการอักเสบ ตลอดจนศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยโมโนโซเดียมยูเรต ดำเนินการโดยทดสอบการยับยั้งการอักเสบต่อการสร้าง IL-1 β ของเปปไทด์ R14 ตั้งแต่ความเข้มข้น 5-100 μ M ในเซลล์แมคโครฟาจ THP-1 ที่กระตุ้นด้วย MSU (100 μ g/ml) ผลการวิจัยพบว่า เปปไทด์ R14 สามารถยับยั้งการสร้าง IL-1 β ตามความเข้มข้นของเปปไทด์ที่ได้รับได้เป็นอย่างดี โดยมีค่า IC₅₀ มีค่าเท่ากับ 53.29 \pm 5.39% และเมื่อทดสอบความเป็นพิษ พบว่าเปปไทด์ R14 ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ใช้ทดสอบ ประกอบกับไม่ส่งผลทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก

แต่อย่างไรก็ตาม แสดงให้เห็นถึงความไม่เป็นพิษของเปปไทด์ R14 และเมื่อนำมาศึกษากลไกการออกฤทธิ์พบว่า เปปไทด์ R14 สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน nuclear factor kappa B (NF- κ B) p65 ในนิวเคลียส ในวิถี NF- κ B signaling pathway อีกทั้งยังสามารถลดการแสดงออกของ NLRP3 และ caspase-1 ได้ ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในประกอบตัวขึ้นของ Inflammasome นอกจากนี้ยังลดระดับการแสดงออกของโปรตีน IL-1 β ได้เป็นอย่างดี ผลของการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ R14 สามารถยับยั้งการสร้าง IL-1 β ในเซลล์แมคโครฟาจที่กระตุ้นด้วย MSU โดยมีกลไกผ่านวิถี NF- κ B signaling pathway (NF- κ B p65) และ NLRP3 inflammasome ผลการศึกษานี้ได้รับจึงชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของเปปไทด์ R14 ในการนำไปพัฒนาเพื่อใช้เป็นทางเลือกในการยับยั้งการอักเสบที่เกิดจากโมโนโซเดียมยูเรตได้ในอนาคต

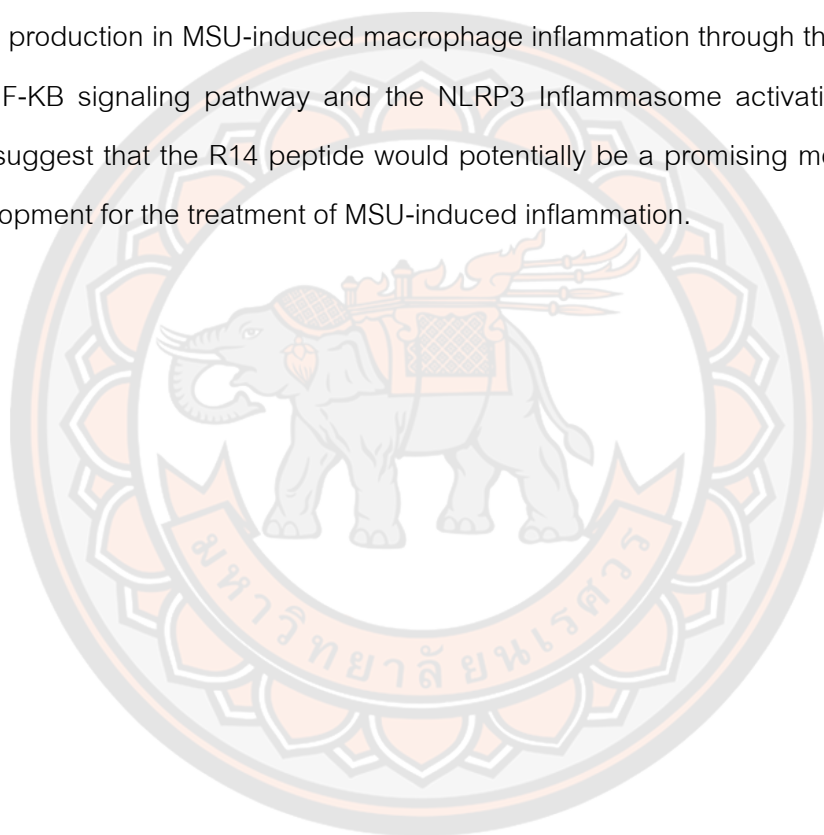


Title	ROLES OF THE BIOACTIVE PEPTIDES IN INHIBITION OF MONOSODIUM URATE-INDUCED INFLAMMATION
Author	Supattra Charoenwutthikun
Advisor	Associate Professor Duangkamol Kunthalert, Ph.D.
Co-Advisor	Sittiruk Roytrakul, Ph.D.
Academic Paper	M.Sc. Thesis in Microbiology, Naresuan University, 2022
Keywords	Gout Monosodium urate Peptide Interleukin-1 beta

ABSTRACT

Gout is currently the most common form of inflammatory arthritis caused by hyperuricemia leading to the deposition of monosodium urate (MSU) crystals in the joints and surrounding tissues. The disease is typically characterized by attacks of severe pain, swelling, and stiffness of one or more distal peripheral joints, which can have a substantial impact on the patient's health-related quality of life. The inflammatory cytokine interleukin-1 β (IL-1 β) plays a key role in response to MSU which contributes significantly to the pathophysiology of inflammation in gout. Nowadays, nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), glucocorticoids, and colchicine are used in gout treatment, however these drugs produce many serious side effects. As a consequence, developing novel anti-inflammatory agents that really are safe for gout patients continues a priority. Bioactive peptides have received increasing attention because of their broad biological activities. Nevertheless, studies on bioactive peptides that effectively suppress MSU-induced inflammation in gout is still lacking. The aim of this study was to investigate the anti-inflammatory activity as well as the mechanism of action of the R14 peptide in the MSU-induced macrophage model, with particular emphasized on the IL-1 β production. Differentiated THP-1 macrophage cells were treated with MSU (100 μ g/ml) in the presence or absence of R14 peptide at the concentrations ranging from 5-100 μ M and the levels of IL-1 β measured. The results herein showed that the R14 peptide was capable of inhibiting IL-1 β production in MSU-

induced macrophages in a dose dependent manner, with IC_{50} value of $53.29 \pm 5.39\%$. The R14 peptide exhibited low cytotoxic effect on THP-1 macrophages. Furthermore, the R14 peptide also showed no hemolytic activity. For the mechanisms of action, our results showed that the R14 peptide suppressed the nuclear factor kappa B (NF-KB) p65. This peptide also decreased NLRP3 expression and the cleavage of caspase-1, both of which are essential components in the Inflammasome activation involved in the maturation of the IL-1 β . All of our results therefore indicated the R14 peptide inhibited IL-1 β production in MSU-induced macrophage inflammation through the suppression of the NF-KB signaling pathway and the NLRP3 Inflammasome activation. Our findings thus suggest that the R14 peptide would potentially be a promising molecule for future development for the treatment of MSU-induced inflammation.



ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงที่งานวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างยิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร. ดวงกมล ชันฉลิต ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณามาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาพร้อมทั้งให้คำปรึกษา ตลอดจนชี้แนะแนวทางในการแก้ไขอุปสรรคหรือข้อบกพร่องต่าง ๆ ตั้งแต่เริ่มต้นการดำเนินการวิจัย จนกระทั่งทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์บรรลุตามวัตถุประสงค์ได้เป็นอย่างดี และขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการวิทยานิพนธ์อันประกอบไปด้วย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ยิ่งมณี ตระกูลพั้ว ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ดร. สิทธิรักษ์ รอยตระกูล กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. ดลฤดี สงวนเสริมศรี กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ด้วยความเอาใจใส่ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวรทุกท่านที่กรุณาประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ คำปรึกษา และประสบการณ์ที่มีคุณค่ายิ่งเสมอมา รวมถึงเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ และเจ้าหน้าที่ห้องสำนักงาน คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่คอยประสานงานและดำเนินการเรื่องเอกสารต่าง ๆ ในระหว่างดำเนินงานวิจัย นอกจากนี้ขอกราบขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ ที่คอยอำนวยความสะดวก และสละเวลามาให้คำแนะนำในการใช้งานเครื่องถ่ายภาพ CCD ImageQuant LAS 4000 Biomolecular Imager

ขอขอบคุณสมาชิกในห้องปฏิบัติการ MD 307 ทุกคน ที่เป็นผู้มอบความเป็นมิตร ให้กำลังใจ ให้คำปรึกษา และให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้านแก่ข้าพเจ้าที่ติดลวดมา ตลอดจนเพื่อนนิสิตปริญญาโททุกคนที่คอยเป็นกำลังใจในการดำเนินงานวิจัยและทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอมอบเป็นกตัญญูแก่เวทีแต่ บิดา มารดา ครู อาจารย์ ของผู้วิจัยที่ได้สั่งสอนอบรม และให้ความกรุณาช่วยเหลือแก่ข้าพเจ้าตลอดมา และคุณประโยชน์อันพึงได้จากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบและอุทิศแด่มหาวิทยาลัยนเรศวร คณาจารย์ และผู้มีพระคุณทุก ๆ ท่าน ซึ่งผู้วิจัยจะนำความรู้และความสามารถไปพัฒนาต่อยอด และเป็นประโยชน์สำหรับผู้เกี่ยวข้องต่อไป

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
ประกาศคุณูปการ.....	ช
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฅ
บทที่ 1.....	13
บทนำ.....	13
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	13
บทที่ 2.....	19
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	19
การอักเสบ (inflammation).....	19
กระบวนการอักเสบ (inflammation process).....	20
กลุ่มโรค autoinflammatory diseases.....	25
โรคเกาต์ (gout).....	26
อินเฟลมมาโซมและการกระตุ้นอินเฟลมมาโซม (inflammasome and inflammasome activation).....	28
ความสัมพันธ์ระหว่าง NLRP3 inflammasome และ gout.....	37
ยาต้านการอักเสบ (anti-inflammatory drugs).....	39

เปปไทด์ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive peptide).....	41
บทที่ 3.....	44
วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	44
เซลล์เพาะเลี้ยงและสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง.....	44
เปปไทด์ออกฤทธิ์.....	44
การศึกษาผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง (hemolytic activity).....	45
การศึกษาผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการมีชีวิตรอด (cell viability) ในเซลล์ differentiated THP-1.....	45
การศึกษาผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการสร้าง IL-1 β ในเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU.....	46
การศึกษาผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการแสดงออกของโปรตีน NF- κ B p65 ใน เซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU.....	47
การศึกษาผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการแสดงออกของโปรตีน IL-1 β , NLRP3, caspase-1 และ β -actin ในเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU.....	50
การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical Analysis).....	52
บทที่ 4.....	53
ผลการทดลอง.....	53
ผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง.....	53
ผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการมีชีวิตรอด (cell viability) ของเซลล์ differentiated THP-1.....	54

ผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการสร้าง IL-1 β ในเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU	56
ผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการแสดงออกของโปรตีนใน NF- κ B signaling pathway ในเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU.....	58
ผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการแสดงออกของโปรตีน caspase-1 และ IL-1 β ในเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU	61
ผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการแสดงออกของโปรตีน NLRP3 inflammasome ในเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU	67
บทที่ 5.....	70
บทสรุป	70
สรุปผลการทดลอง.....	70
อภิปรายผล	71
บรรณานุกรม.....	80
ประวัติผู้วิจัย.....	104

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการแตกของเม็ดเลือดแดง	53
--	----



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 การส่งสัญญาณของ TLR4.....	24
ภาพที่ 2 แผนผังแสดงองค์ประกอบของโครงสร้าง inflammasome.....	31
ภาพที่ 3 การกระตุ้นการทำงานของ NLRP3 inflammasome.....	34
ภาพที่ 4 ฤทธิ์ทางชีวภาพของ IL-1 β	36
ภาพที่ 5 กลไกการตอบสนองต่อโมโนไซเตียมยูเรต และการสร้าง IL-1 β	38
ภาพที่ 6 ผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ differentiated THP-1	55
ภาพที่ 7 ผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการสร้าง IL-1 β ในเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU	57
ภาพที่ 8 ผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการแสดงออกของโปรตีนใน NF- κ B signaling pathway ในเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU	59
ภาพที่ 9 ผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการแสดงออกระดับโปรตีน caspase-1 และ IL-1 β ในเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU.....	63
ภาพที่ 10 ผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการแสดงออกระดับโปรตีน NLRP3 ในเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU.....	68

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การอักเสบ (inflammation) เป็นกระบวนการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immunity) เมื่อร่างกายได้รับสิ่งกระตุ้นที่เป็นอันตราย (harmful stimuli) ต่อเนื้อเยื่อของร่างกาย เช่น จุลชีพ สารพิษ รังสี รวมถึงเซลล์ที่ถูกทำลาย ทำให้เกิดการหลั่งสารสื่อการอักเสบ (pro-inflammatory mediator) จากเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ ให้หมดไปและเริ่มกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย (Meizlish et al., 2021) ดังนั้นการอักเสบจึงเป็นกลไกที่สำคัญของระบบภูมิคุ้มกันในการป้องกัน กำจัด และทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย (Ratan et al., 2022) อีกทั้งเป็นการรักษาภาวะสมดุล (homeostasis) ของร่างกาย อย่างไรก็ตามหากร่างกายมีการอักเสบมากเกินไป หรือไม่สามารถควบคุมได้ การอักเสบแบบเฉียบพลัน (acute inflammation) สามารถพัฒนาเป็นการอักเสบแบบเรื้อรัง (chronic inflammation) (Zhou et al., 2016) ซึ่งการอักเสบแบบเรื้อรังเป็นการอักเสบที่เกิดขึ้นเป็นเวลานาน และเกิดขึ้นอย่างซ้ำ ๆ ทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อ ส่งผลให้เนื้อเยื่อเสียหายอย่างรุนแรง ยิ่งไปกว่านั้นหากมีการหลั่งสารสื่อการอักเสบที่มากเกินไป จะเป็นปัจจัยเสี่ยงที่ก่อให้เกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammatory diseases) และกลุ่มของโรค autoinflammatory diseases (Ciccarelli et al., 2014; Ham & Moon, 2013; Kaur et al., 2013; Lontchi-Yimagou et al., 2013; Park & Igarashi, 2013) ถึงแม้ว่าโรคอักเสบเรื้อรัง จัดอยู่ในกลุ่มของโรคไม่ติดต่อ (non-communicable diseases) แต่จากข้อมูลขององค์การอนามัยโลกได้รายงานอุบัติการณ์เกิดโรคไม่ติดต้อมีสถิติที่เพิ่มสูงขึ้นทุก ๆ ปี โดยแต่ละปีมีประชากรทั่วโลกเสียชีวิตมากถึง 41 ล้านคน คิดเป็นร้อยละ 71 และอยู่ในช่วงอายุระหว่าง 30-69 ปี คิดเป็นร้อยละ 85 จากผู้ป่วยทั้งหมด (World Health Organization, 2020) โดยโรคที่พบได้บ่อย ได้แก่ โรคหลอดลมอักเสบเรื้อรัง (chronic bronchitis), โรคหอบหืด (asthma), โรคมะเร็ง (cancer), โรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular diseases, CVD), โรคอัลไซเมอร์ (alzheimer's disease), โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis), โรคหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis), และโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (diabetes type II) (Ferguson, 2010; Maruotti, et al., 2007; Prasad, Sung & Aggarwal,

2012) เป็นต้น และกลุ่มโรค autoinflammatory diseases มีลักษณะทางคลินิกคล้ายกับ autoimmune diseases (Doria et al., 2012; Kastner et al., 2010) ซึ่งสาเหตุของการเกิดโรค autoinflammatory diseases มาจากปัจจัยทางพันธุกรรม (Stehlik & Reed, 2004) หรือความผิดปกติของระบบเมแทบอลิซึม (Martinon et al., 2006) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า autoinflammatory diseases มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มสูงขึ้นของปริมาณสารสื่อการอักเสบในกลุ่ม interleukin- (IL)-1 family โดยเฉพาะอย่างยิ่ง interleukin-1 β (IL-1 β) นับว่ามีบทบาทสำคัญในการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบและอาการปวด (Hausmann, 2019)

โรคเกาต์จัดเป็นหนึ่งในโรค autoinflammatory diseases และเป็นสาเหตุที่พบเป็นอันดับแรกของโรคข้ออักเสบ (inflammatory arthritis diseases) โดยมีลักษณะอาการที่เด่นชัด คือ เกิดภาวะข้อต่อกระดูกอักเสบ (arthritis) และเกิดอาการ ปวด บวม อย่างรุนแรง และแดง บริเวณข้อ อย่างเฉียบพลันซึ่งส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย โดยทั่วโลกมีความชุกของผู้ป่วยโรคเกาต์ อยู่ระหว่างร้อยละ 1 ถึง 6.8% (Dehlin et al., 2020) และผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นชายวัยกลางคน และกลุ่มผู้สูงอายุจะมีแนวโน้มของโรคเกาต์เพิ่มสูงขึ้น (Wallace et al., 2004) สำหรับในประเทศไทยมีการสำรวจ พบความชุกของโรคเกาต์อยู่ประมาณร้อยละ 0.16% และคาดว่าจะมีแนวโน้มที่เพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ (Kuo et al., 2015) สาเหตุหลักของการเกิดโรคเกาต์เกิดจากความผิดปกติของเมแทบอลิซึมในร่างกาย ทำให้เกิดภาวะกรดยูริกในกระแสเลือดสูง (hyperuricemia) เป็นระยะเวลานาน เป็นสาเหตุทำให้เกิดการตกตะกอนของกรดยูริกเป็นผลึกของโมโนโซเดียมยูเรต (monosodium urate crystals; MSU) ซึ่งปัจจัยสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคเกาต์มาจากการสะสมผลึกของโมโนโซเดียมยูเรตภายในข้อต่อ หรือเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบริเวณข้อต่อ (Dalbeth et al., 2016) โดย MSU จัดเป็นหนึ่งในตัวกระตุ้นชนิด danger-associated molecular patterns (DAMPs) ที่สามารถกระตุ้นให้เซลล์แมคโครฟาจหลั่ง pro-inflammatory cytokine ชนิดที่สำคัญคือ IL-1 β สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะอักเสบในผู้ป่วยโรคเกาต์ และเป็นปัจจัยที่ทำให้ระดับความรุนแรงและการเกิดความเจ็บปวดของผู้ป่วยที่เพิ่มมากขึ้น (Reber et al., 2014; Rock et al., 2013) นอกจากนี้มีการรายงานที่ IL-1 β มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคเกาต์ทำให้เกิดอาการไข้และความเจ็บปวด จากการส่งเสริมให้ neutrophil เคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณข้อต่อ และน้ำไขข้อ ยังก่อให้เกิดการอักเสบเฉียบพลันซึ่งเป็นจุดเด่นของการเกิดพยาธิสภาพของโรคเกาต์ ทำให้การ

อักเสบจากระยะเฉียบพลัน (acute gout) พัฒนาไปสู่ระยะเรื้อรังของโรคเกาต์ (chronic gout) ได้ (Schlesinger & Lipsky, 2018)

ดังที่กล่าวข้างต้นจะเห็นได้ว่า IL-1 β เป็น cytokine ที่มีความสำคัญต่อการเกิดการอักเสบของโรคเกาต์ ซึ่ง IL-1 β ถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์ macrophage และจำเป็นต้องอาศัย 2 signal โดย signal ที่ 1 (priming step) เป็นสัญญาณที่กระตุ้นตัวรับสัญญาณ TLR ถ่ายทอดสัญญาณไปกระตุ้น transcription factor ชนิด NF- κ B ทำให้สร้าง pro-IL-1 β และ signal ที่ 2 อาศัยตัวรับสัญญาณภายในเซลล์ตรวจจับสัญญาณ ทำให้เกิดการประกอบขึ้นของกลุ่มโปรตีนเชิงซ้อนที่เรียกว่า inflammasome โดย inflammasome เป็นกลุ่มโปรตีนขนาดใหญ่ภายในไซโตพลาสซึม (cytosolic multiprotein complex) สามารถถูกกระตุ้นโดยโมเลกุลของสิ่งแปลกปลอม ที่เรียกว่า pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) และโมเลกุลที่เป็นสัญญาณเกี่ยวข้องกับภาวะเครียด (stress) หรือเกิดความเสียหายต่อเซลล์ เรียกว่า danger-associated molecular patterns (DAMPs) (Lamkanfi & Dixit, 2014; Sutterwala et al., 2014) การทำงานของ inflammasomes ทำให้เกิดการหลั่ง IL-1 β โดยผ่านการกระตุ้น caspase-1 ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ cysteine-dependent protease โดย caspase-1 ทำหน้าที่ย่อย precursor cytokines คือ pro-IL-1 β และ pro-IL-18 นำไปสู่การสร้าง mature IL-1 β และ IL-18 จากนั้นเกิดการหลั่งของ pro-inflammatory cytokine IL-1 β และ IL-18 ออกสู่ภายนอกเซลล์ (Gu et al., 1997; Howard et al., 1991) และเหนี่ยวนำให้เซลล์ที่อักเสบเกิด pyroptosis ซึ่งเป็นรูปแบบของการตายของเซลล์ที่อักเสบ (programmed inflammatory cell death) (Vanaja et al., 2015; Wen et al., 2013) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการสร้าง IL-1 β จำเป็นต้องอาศัยการทำงานของ inflammasome ยิ่งไปกว่านั้นจากการศึกษาของ Martinon และคณะ ปี 2006 ได้รายงานว่าการ NLRP3 inflammasome เป็นองค์ประกอบที่สำคัญต่อกลไกการย่อย pro-IL-1 β และเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง pro-inflammatory cytokine ชนิด IL-1 β (Martinon et al., 2006) นอกจากนี้การศึกษานี้ในปัจจุบันยังมีการรายงานมากมายที่แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของ inflammasome ซึ่งนอกจากจะเป็นปัจจัยที่ส่งเสริมความรุนแรงของการอักเสบให้เพิ่มมากขึ้นแล้ว ยังสามารถควบคุมการสร้าง IL-1 β และ IL-18 ได้อีกด้วย (Lamkanfi & Dixit, 2014; Man et al., 2017)

การรักษาทางคลินิกของโรคเกาต์จะใช้ยาต้านการอักเสบ (anti-inflammatory drug) ได้แก่ ยาต้านอักเสบชนิดไม่ใช้กลุ่มสเตียรอยด์ (non-steroidal anti-inflammatory drugs,

NSAIDs), ยาในกลุ่มคอร์ติโคสเตียรอยด์ (corticosteroids) และโคลชิซีน (colchicine) ซึ่งยาทั้ง 3 กลุ่มมีผลช่วยบรรเทาอาการอักเสบ แต่มีเป้าหมายในการรักษาที่ไม่จำเพาะต่อการอักเสบที่เกิดจากโรคเกาต์ (Khanna et al., 2014) การใช้ยาในกลุ่ม corticosteroids และกลุ่ม NSAIDs เป็นระยะเวลานานจะทำให้มีผลข้างเคียงต่ออวัยวะต่าง ๆ ในร่างกาย (Brasil-Oliveira et al., 2020; Vostinaru, 2017) เกิดภาวะแทรกซ้อน โดยเฉพาะระบบประสาทส่วนกลาง และระบบทางเดินอาหาร อาจทำให้เกิดเลือดออกภายในทางเดินอาหาร (Brasil-Oliveira et al., 2020; Vostinaru, 2017; Wolfe et al., 1999) ในขณะที่ยา colchicine มีการแนะนำให้ใช้สำหรับรักษาโรคเกาต์ในระยะข้ออักเสบกำเริบอย่างเฉียบพลัน (Hui et al., 2017) อย่างไรก็ตามการใช้ยา colchicine มีผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์ในระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal) ที่เกิดขึ้นได้บ่อย ได้แก่ ท้องเสีย, คลื่นไส้ และอาเจียน (Slobodnick et al., 2018) ในปัจจุบันได้มีการพัฒนายาต้านการอักเสบโดยมีเป้าหมายเพื่อยับยั้ง IL-1 (IL-1 inhibitor) ทั้งสิ้น 4 ชนิด ได้แก่ anakinra, rilonacept, canakinumab และ gevokizumab (Ozaki et al., 2015; So, 2018) อย่างไรก็ตามการใช้ยาในกลุ่มนี้ยังส่งผลข้างเคียงที่รุนแรงมากต่อผู้ป่วยเมื่อได้รับการรักษา เช่น anakinra มีอายุการใช้งานสั้นเพียง 4 – 6 ชั่วโมง ทำให้ผู้ป่วยต้องได้รับการรักษาด้วยการฉีดยาทุกวัน โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่เป็นโรคเกาต์แบบเฉียบพลันมีความจำเป็นต้องใช้ยาปริมาณสูงมากถึง 100 มก./วัน ซึ่งเป็นปริมาณที่มีผลต่อระบบการเผาผลาญของร่างกาย (Schlesinger, 2014; So, 2018) นอกจากนี้การใช้ canakinumab ในการรักษาจะทำให้เกิดผลข้างเคียงที่เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคเยื่อจมูกและลำคออักเสบเฉียบพลัน (nasopharyngitis) มากถึงร้อยละ 34 จากผู้ป่วยที่มีผลข้างเคียง (Galea et al., 2011) และในขณะนี้ยังไม่มีผลการวิจัยทางคลินิกระยะที่ 3 (clinical trials phase 3) ของการรักษาด้วยยา gevokizumab (Terry, 2017) จากปัญหาผลข้างเคียงของการรักษาการอักเสบด้วยยาต้านการอักเสบ อีกทั้งค่าใช้จ่ายในการรักษาที่สูง (So, 2018) ดังนั้นงานวิจัยเพื่อค้นหาตัวใหม่หรือสารประกอบอื่น ๆ ที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและมีความปลอดภัยยังคงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งในปัจจุบันได้มีความสนใจนำเปปไทด์ มาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ (Hu et al., 2014; Hwang et al., 2012; Jantaruk et al., 2017; Vernaza et al., 2012) เนื่องจากจากคุณสมบัติของเปปไทด์เป็นโมเลกุลขนาดเล็ก ไม่สะสมในอวัยวะหรือเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของร่างกาย และมีความจำเพาะต่อเป้าหมายจึงทำให้ออกฤทธิ์ได้ตรงเป้าหมาย (high selectivity) รวมถึงยังลดโอกาสการเกิดผลข้างเคียงต่ออวัยวะต่าง ๆ และเปปไทด์มีความเป็นพิษต่ำ (Chakrabarti et

al., 2014) ถึงแม้ว่าเปปไทด์จะมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ มากมาย (Lorenzo et al., 2018) อย่างไรก็ตาม การศึกษาบทบาทของเปปไทด์ออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการอักเสบที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยโมโนไซเตียมยูเรต ยังมีการศึกษาที่น้อยมาก งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาบทบาทของเปปไทด์ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบที่เกิดจากโมโนไซเตียมยูเรต และศึกษากลไกที่เปปไทด์ออกฤทธิ์ใช้ในการยับยั้งการอักเสบที่เกิดจากโมโนไซเตียมยูเรต เพื่อพัฒนาวิธีการรักษาโรคใหม่ที่ใช้ในการรักษาโรคเกาต์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาการอักเสบที่เกิดจากโรคเกาต์

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ต่อการยับยั้งการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยโมโนไซเตียมยูเรต
2. เพื่อศึกษากลไกของเปปไทด์ออกฤทธิ์ต่อการยับยั้งการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยโมโนไซเตียมยูเรต

ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการอักเสบที่เกี่ยวข้องกับอินฟลามมาไซมของเปปไทด์ออกฤทธิ์ในเซลล์แมคโครฟาจ THP-1 (monocyte/macrophage) ที่ถูกกระตุ้นด้วยโมโนไซเตียมยูเรต โดยศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง pro-inflammatory cytokine ที่สำคัญ คือ IL-1 β และศึกษากลไกระดับเซลล์ที่เปปไทด์ออกฤทธิ์ใช้ในการยับยั้งการอักเสบที่เกี่ยวข้องกับอินฟลามมาไซม โดยศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการสร้าง IL-1 β ประกอบด้วย inflammasome pathway และ NF- κ B pathway ซึ่งมีบทบาทในการสำคัญในการควบคุมกระบวนการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วยโมโนไซเตียมยูเรต

สมมุติฐานของการวิจัย

เปปไทด์ออกฤทธิ์สามารถยับยั้งการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วยโมโนไซเตียมยูเรต

ประโยชน์ที่จะคาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ต่อการยับยั้งการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยโมโนไซเดียมยูเรต
2. ทราบกลไกของเปปไทด์ออกฤทธิ์ต่อการยับยั้งการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยโมโนไซเดียมยูเรต
3. สามารถนำผลของการวิจัยที่ได้ไปตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการต่างประเทศ
4. ผลงานวิจัยที่ได้สามารถเป็นข้อมูลและแนวทางในการพัฒนายาต้านการอักเสบเพื่อใช้ในการรักษาโรคเกาต์ได้ในอนาคต



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การอักเสบ (inflammation)

การอักเสบ (inflammation) เป็นกระบวนการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เมื่อได้รับสิ่งกระตุ้นที่เป็นอันตราย (harmful stimuli) ต่อเนื้อเยื่อของร่างกาย เช่น จุลชีพ (แบคทีเรีย, เชื้อรา, ไวรัส, และโปรโตซัว) (Meizlish et al., 2021) สารพิษ รังสี รวมถึงเซลล์ที่ถูกทำลาย (Medzhitov, 2010) ทำให้เกิดการอักเสบและการหลั่งสารสื่อการอักเสบ (pro-inflammatory mediator) จากเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์แมคโครฟาจ (macrophage) (Gordon & Martinez-Pomares, 2017) ผลของการอักเสบทำให้เกิดการกำจัดสิ่งแปลกปลอมต่างๆ ให้หมดไป และเริ่มกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย (Ferrero-Miliani et al., 2007) การอักเสบได้รับการยอมรับว่าเป็นกลไกที่สำคัญของระบบภูมิคุ้มกันในการป้องกัน กำจัด และทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย (Nathan & Ding, 2010) อีกทั้งยังเป็นการรักษาสภาวะสมดุล (homeostasis) ของร่างกาย (Kotas & Medzhitov, 2015) ซึ่งกระบวนการอักเสบจัดว่าเป็นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) โดยลักษณะทางคลินิกของการอักเสบประกอบด้วยอาการ บวม (swelling) แดง (redness) อาการร้อนภายในเนื้อเยื่อ (heat) อาการเจ็บปวด (pain) และสูญเสียการทำงานของเนื้อเยื่อบริเวณที่อักเสบ (loss of function) (Kayama et al., 2013; Yi, 2016) ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดและการตอบสนองของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ เช่น neutrophil, lymphocyte, monocyte, dendritic cell และ mast cell มายังบริเวณที่ติดเชื้อหรือได้รับบาดเจ็บ (Meizlish et al., 2021; Takeuchi & Akira, 2010) มีขั้นตอนโดยสรุปดังนี้ เริ่มจากการเปลี่ยนแปลงการไหลเวียนเลือดภายในหลอดเลือด จากการขยายตัวของหลอดเลือด (vasodilation) ทำให้เลือดไหลเวียนมายังบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บมากขึ้น ขณะเดียวกันหลอดเลือดเกิดการหดตัวบริเวณที่นำเลือดออก ส่งผลให้เลือดคั่งทำให้เกิดอาการแดง และเกิดอาการร้อน จากนั้นเกิดการเพิ่มการไหลของหลอดเลือดนอกหลอดเลือด (vascular permeability) จึงก่อให้เกิดอาการบวม (edema) นำไปสู่การเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวออกจากผนังหลอดเลือด (extravasation) เนื่องจากการตอบสนองต่อการกระตุ้นจากสารเคมีที่ดึงดูด (chemotaxis) ต่าง ๆ และขั้นตอนสุดท้ายเกิด

การเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวเข้าไปสู่บริเวณที่อักเสบ และทำให้ร่างกายสามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ ได้ (Henson et al., 1984; Takeuchi & Akira, 2010)

การอักเสบสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ การอักเสบแบบเฉียบพลัน (acute inflammation) และ การอักเสบแบบเรื้อรัง (chronic inflammation) โดยการอักเสบแบบเฉียบพลันเป็นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ภายในระยะเวลาสั้น ๆ เป็นวินาทีหรือนาที หลังจากที่ได้รับสิ่งกระตุ้นที่เป็นอันตราย และสามารถคงอยู่ได้ประมาณ 2 ถึง 3 วัน แต่มีอาการไม่เกิน 1 สัปดาห์ ลักษณะสำคัญของการอักเสบแบบเฉียบพลัน ได้แก่ การบวมของเนื้อเยื่อ (edema) และเกิดการหลั่งสารน้ำและโปรตีนในพลาสมาภายในเนื้อเยื่อที่ได้รับบาดเจ็บ ส่วนการอักเสบแบบเรื้อรังเป็นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นในระยะเวลายาวนานกว่า อาจเป็นสัปดาห์หรือเป็นเดือน และไม่ได้ถูกกำจัดออกไปให้หมด อาจเกิดขึ้นตามหลังจากการอักเสบแบบเฉียบพลัน ลักษณะที่เด่นของการเกิดการอักเสบแบบเรื้อรัง ได้แก่ การสร้างเนื้อเยื่อที่เป็นพังพืดขึ้น (fibrosis) (Ross, 2017) โดยปกติแล้วหากร่างกายเกิดการอักเสบอย่างเหมาะสมและสามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ ออกไปได้หมด ร่างกายจะมีการยับยั้งการอักเสบเพื่อให้ร่างกายเข้าสู่สภาวะปกติ ในทางตรงกันข้าม หากเกิดการอักเสบที่มากเกินไปจนไม่สามารถควบคุมให้อยู่ในสภาวะสมดุลได้ อาจก่อให้เกิดการอักเสบอย่างรุนแรงและเรื้อรัง ทำให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นได้รับความเสียหายและเกิดพยาธิสภาพ นำไปสู่การพัฒนากการอักเสบเรื้อรังให้กลายเป็นโรคในที่สุด (Pahwa et al., 2021)

กระบวนการอักเสบ (inflammation process)

การอักเสบเป็นปฏิกิริยาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) การอักเสบนอกจากจะเป็นการตอบสนองต่อการติดเชื้อ (infectious factors) แล้วยังสามารถตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นที่ไม่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ (non-infectious factors) เช่น ปัจจัยทางกายภาพ (บาดแผลจากไฟไหม้, รังสี), ปัจจัยทางเคมี (กลูโคส, กรดไขมัน, แอลกอฮอล์, สารพิษหรือสารระคายเคืองทางเคมี) ปัจจัยทางชีวภาพ (เซลล์เสื่อมสภาพ) (Jabbour et al., 2009) เป็นต้น ในระหว่างที่เกิดกระบวนการอักเสบจะมีเซลล์ภูมิคุ้มกันหลายชนิดเข้ามาเกี่ยวข้อง เนื่องจากมีการหลั่ง chemokine และ growth factor จากเนื้อเยื่อที่ได้รับบาดเจ็บเพื่อดึงดูด (attract) เซลล์ภูมิคุ้มกัน โดยเซลล์ชนิดแรกที่เคลื่อนย้ายไปยังบริเวณที่เนื้อเยื่อได้รับบาดเจ็บ คือ neutrophil ตามด้วย monocyte, lymphocyte และ mast cell (Stramer et al., 2007; Van

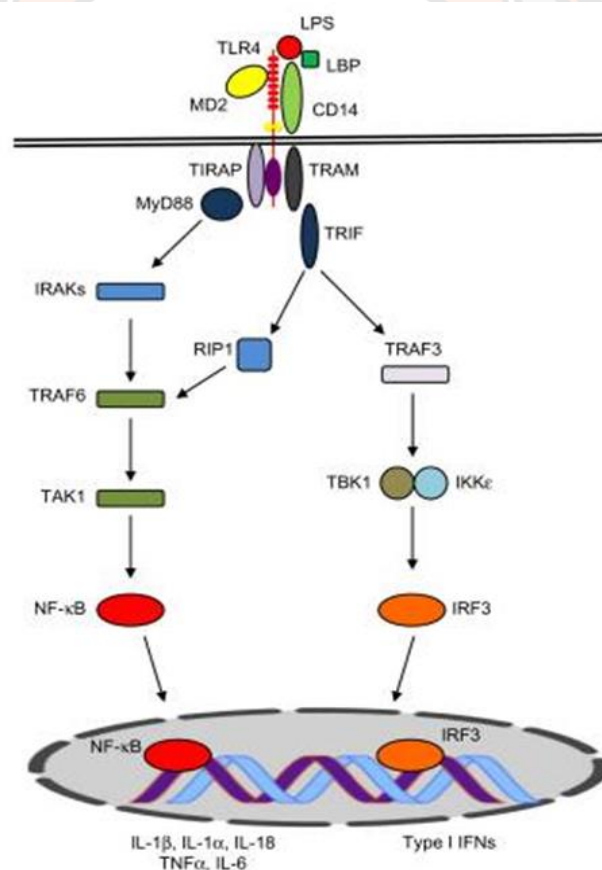
Linthout et al., 2014) โดย macrophage เป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบ ทำหน้าที่จับกินและทำลายสิ่งแปลกปลอมด้วยวิธี phagocytosis จากนั้นปล่อยสิ่งแปลกปลอมที่ถูกย่อยทำลายเสร็จสิ้นออกสู่ภายนอกเซลล์ (elimination) (Kourtzelis et al., 2020) นอกจากนี้ยังส่งผลให้เกิดการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบ (inflammatory mediator) (Yu et al., 2012) เช่น chemokine, cytokine, histamine, nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂) และ leukotriene ออกมา สารสื่อกลางการอักเสบเหล่านี้ทำหน้าที่ดึงดูดเซลล์เม็ดเลือดขาว (chemoattractant) นำไปสู่การเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวออกจากผนังหลอดเลือดไปยังบริเวณที่มีการติดเชื้อหรือได้รับบาดเจ็บ จากนั้นเซลล์เม็ดเลือดขาวจะหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบ (inflammatory mediators) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม pro-inflammatory cytokines เช่น interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1β), tumor necrosis factor- alpha (TNF-α), colony stimulating factors (CSFs) และ Interferon (IFN) และ chemokine เช่น interleukin-8 (IL-8), macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1α), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) และสารอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species, ROS) (Abdulkhaleq et al., 2018) สาร inflammatory mediator เหล่านี้จะกระตุ้นผ่านกลไกการทำงานภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาของการอักเสบ คือ mitogen-activated protein kinase (MAPK), nuclear factor kappa-B (NF-κB) และ Janus kinase (JAK) signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway (Hendrayani et al., 2016; Henríquez-Olguín et al., 2015; Kyriakis & Avruch, 2001) ทั้ง 3 กลไกที่กล่าวมานี้มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันและกระบวนการอักเสบ และในทางตรงกันข้ามหากร่างกายเกิดความผิดปกติของการทำงานที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาของการอักเสบ อาจนำไปสู่โรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบได้ (inflammation-associated disease) (Chen et al., 2018) อาทิเช่น cardiovascular diseases, cancer, atherosclerosis, rheumatoid arthritis และ type 2 diabetes (Sugimoto et al., 2016)

ระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดมีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม และเกิด recognition ระหว่างเชื้อจุลชีพและเซลล์ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกัน เริ่มการตอบสนองของภูมิคุ้มกันโดยการตรวจจับสัญญาณอันตรายผ่านโมเลกุลตัวรับที่เรียกว่า pattern-recognition receptors (PRRs) (Sadik et al., 2015) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ใช้จับโมเลกุลของจุลชีพที่เรียกว่า pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) อาทิเช่น สารพันธุกรรมของไวรัส,

ส่วนประกอบในผนังเซลล์เชื้อรา (mannan, β -glucan และ chitin) และองค์ประกอบผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เป็นต้น (Mogensen, 2009; Pradhan et al., 2019) ขณะเดียวกันสามารถตรวจจับโมเลกุลที่บ่งชี้ถึงอันตรายและภาวะเครียด (stress) ของร่างกาย ที่เรียกว่า danger-associated molecular patterns (DAMPs) อีกทั้งในปัจจุบันสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีการแสดงออกของ PRRs ถึง 5 ชนิด คือ Toll-like receptors (TLRs), RIG-like helicases (RLHs), NOD-like receptors (NLRs), C-type lectin-like receptors และ cytosolic DNA sensors (Kumar et al., 2011; Newton & Dixit, 2012) โดย TLRs มีทั้งหมด 9 รูปแบบ (TLR 1-9) ได้แก่ TLR 1, 2, 5, 6 และ 10 เป็นตัวรับแสดงออกที่ผิวเซลล์ (extracellular membranes) และขณะที่ TLRs 3, 7, 8 และ 9 เป็นตัวรับตรวจจับสัญญาณภายในเซลล์ (intracellular membranes) (Moser & Leo, 2010) TLRs แสดงออกใน innate immune cells เซลล์ภูมิคุ้มกันหลายชนิด อีกทั้งยังทำหน้าที่ตรวจจับโมเลกุล PAMPs (Zhang & Liang, 2016) และ DAMPs (Yu & Feng, 2018) อาทิเช่น double-stranded (ds) DNA และ RNA ของไวรัส (Häcker et al., 2000), lipopolysaccharide (LPS) (Zhang et al., 1999), flagellin (Moors et al., 2001), peptidoglycan, teichoic acids (Schwandner et al., 1999), pilin (Hedlund et al., 2001), dsRNA ของไวรัส (Moors et al., 2001) และ fungal zymosan (Lin et al., 2000) เป็นต้น หนึ่งในสมาชิกของ PRR ที่ได้รับการศึกษาอย่างละเอียด คือ TLR4 เป็น receptor ที่มีบทบาทหลักในการใช้จับ LPS ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญภายในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ (Song & Lee, 2012) โครงสร้างของ TLR4 ประกอบด้วย extracellular leucine-rich repeat (LRR) domain, transmembrane domain และ intracellular Toll/interleukin (IL)-1 receptor (TIR) domain (Rock et al., 1998) ซึ่งขั้นตอนการรับรู้ LPS ที่นำไปสู่การกระตุ้นผ่าน TLR4 receptor โดย LPS ถูกตรวจจับด้วย LPS-binding protein (LBP) เกิดเป็น LPS-LBP complex จากนั้นจับกับ CD14 ซึ่งทำหน้าที่เป็น co-receptor ส่งเสริมให้ Myeloid differentiation factor 2 (MD2) จับกับ LPS โดยผ่าน TLR4-MD2 complexes (ภาพที่ 1) ส่งผลให้เกิดการรับรู้ LPS และเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการขนส่งเข้าสู่ภายในเซลล์ (endocytosis) (Diamond et al., 2015; Zanoni et al., 2011) อีกทั้งเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย LPS ผ่านทาง TLR4 จะเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบซึ่งจะเป็นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน โดยเกิดการกระตุ้นการถ่ายทอดสัญญาณภายในเซลล์ (signaling pathways) ระหว่าง Toll-Interleukin receptor (TIR) domain กับ adaptor protein ต่าง ๆ เช่น Myeloid differentiation primary

response 88 (MyD88), TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β (TRIF), TRIF-related adaptor molecule (TRAM) หรือ TIR domain-containing adaptor protein (TIRAP) ซึ่งโมเลกุล TLRs ส่วนใหญ่สามารถถ่ายทอดสัญญาณเข้าไปภายในเซลล์ผ่าน adaptor protein ชนิด MyD88 ได้ (ยกเว้น TLR3) (Bryant et al., 2015) รวมถึง receptor IL-1 family ที่สามารถถ่ายทอดสัญญาณไปให้ Transcription factor ได้แก่ nuclear factor kappa B (NF- κ B) และ activator protein-1 (AP-1) ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง pro-inflammatory cytokines ต่าง ๆ โดยการส่งสัญญาณเข้าไปภายในเซลล์แตกต่างกันได้ 2 รูปแบบ (ภาพที่ 1) ได้แก่ การถ่ายทอดสัญญาณผ่าน MyD88-dependent pathway เป็นรูปแบบที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ pro-inflammatory cytokine อาทิเช่น TNF- α , IL-6, IL-1 β และ IL-18 และการถ่ายทอดสัญญาณรูปแบบ MyD88-independent pathway เป็นรูปแบบที่อาศัยตัวกลางในการเหนี่ยวนำให้เกิด interferon Type I และขึ้นที่กระตุ้นด้วย interferon โดยการส่งสัญญาณของรูปแบบ MyD88-dependent pathway จะเกิดปฏิริยากันระหว่าง TIR domain-containing adaptor protein (TIRAP) และ MyD88 จากนั้น MyD88 จะสรรหาและกระตุ้น IL-1 receptor-associated kinase (IRAKs) ที่มีทั้ง death domain และ kinase domain (Kumar et al., 2011) ทำหน้าที่ในการถ่ายทอดสัญญาณและการสลายตัวของ IRAK-1 (Lye et al., 2004) นอกจากนี้ adaptor protein อื่นที่มีความสำคัญสำหรับการส่งสัญญาณที่ขึ้นอยู่กับ MyD88 อย่าง tumor necrosis factor (TNF)-receptor associated factor 6 (TRAF6) สามารถกระตุ้น TAK1 (transform-factor- β -activated kinase 1) ส่งผลให้เกิดการถ่ายทอดสัญญาณไปยังโปรตีน IKKs (Inhibitory kappaB kinase) และ MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Sato et al., 2005) (ภาพที่ 1) โดย IKK α , IKK β และ IKK γ เป็นองค์ประกอบเชิงซ้อน เมื่อได้รับสัญญาณจาก MyD88 จะไปเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ให้กับโปรตีน I κ B (inhibitor of kappa B) ทำให้โปรตีน I κ B ที่จับอยู่กับ transcription factor ชนิด NF- κ B หลุดและแยกตัว (degradation) ออกจากโปรตีน NF- κ B จากนั้นโปรตีน NF- κ B จะเคลื่อนที่จากไซโตพลาสซึมเข้าสู่ภายในนิวเคลียส (nuclear translocation) (Oeckinghaus et al., 2011) จับกับดีเอ็นเอเป้าหมายและถอดรหัสยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบออกมา รวมถึง MAPK signaling pathway จะส่งสัญญาณผ่าน Transcription factor ชนิด activator protein-1 (AP-1) ทำให้เคลื่อนที่เข้าสู่ภายในนิวเคลียส และถอดรหัสยีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการอักเสบเช่นเดียวกัน (Adib-Conquy & Cavillon, 2007;

Rubartelli & Lotze, 2007) ในขณะที่รูปแบบของ MyD88-independent pathway เป็นรูปแบบที่ไม่ขึ้นกับ MyD88 จะเกิดปฏิกริยากันระหว่าง TRIF-related adaptor molecule (TRAM) และ TIR domain-containing adapter-inducing interferon- β (TRIF) จากนั้นเกิดการถ่ายทอดสัญญาณได้ 2 สัญญาณ โดยไปกระตุ้น TRAF6 ทำให้เกิดการกระตุ้นโปรตีน NF- κ B และ MAPK ในขณะที่ TRIF-TRAM signaling เกิดการถ่ายทอดสัญญาณไปกระตุ้นโปรตีน interferon regulatory factor 3 (IRF3) จะเคลื่อนที่จากไซโตพลาสซึมเข้าสู่ภายในนิวเคลียส จากนั้นจะกระตุ้นการถอดรหัสยีนเกี่ยวข้องกับการอักเสบ IFN-inducible genes ส่งผลให้เกิดการเหนี่ยวนำการสร้าง type-I interferon (IFN) (Kawai & Akira, 2004; Vallabhapurapu & Karin, 2009)



ภาพที่ 1 การส่งสัญญาณของ TLR4 (TLR4 signaling pathway)

ที่มา: Diamond et al., 2015

กลุ่มโรค autoinflammatory diseases

กลุ่มโรค autoinflammatory diseases (AID) เป็นกลุ่มโรคที่ได้รับการจัดตั้งขึ้นและปรากฏครั้งแรกในวารสาร Cell ในปี ค.ศ 1999 อธิบายลักษณะทางคลินิกว่าเป็นกลุ่มอาการของโรคที่มีไข้เป็นระยะ (McDermott et al., 1999) เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (Oliviero et al., 2020) โดยมีอาการแตกต่างจากกลุ่มอาการแพ้ภูมิตัวเอง (autoimmune syndromes) โรคกลุ่มนี้มีลักษณะสำคัญคือ มีการอักเสบในระบบต่าง ๆ ของร่างกาย เนื่องจากการอักเสบนั้นเกิดจากการทำงานที่ผิดปกติของเซลล์ภูมิคุ้มกัน และการหลั่งสารสื่อการอักเสบที่มากจนเกินไป จากเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) โดยไม่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive immunity) (Manthiram et al., 2017) จึงกล่าวได้ว่าโรคกลุ่มนี้ไม่มีความเกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์ autoreactive T cells และ autoantibody (Goldbach-Mansky et al., 2006; Harapas et al., 2018; Kambe et al., 2010) อดีตกลุ่มโรค autoinflammatory diseases เป็นกลุ่มโรคที่มีอาการไข้ขึ้นเป็นครั้งคราว (recurrent fever) โดยที่ไม่มีการติดเชื้อจุลชีพ (without microbial infection) หรือภาวะแพ้ภูมิตัวเอง (autoimmunity) (Stehlik & Reed, 2004) โดยมีอาการไข้เกิดร่วมกับอาการผื่นคันบริเวณผิวหนัง เยื่อช่องปอด และเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ มีอาการต่อมน้ำเหลืองโต ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อจนถึงกล้ามเนื้ออักเสบ และมีอาการข้ออักเสบได้ นอกจากนี้สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ (mutations) ของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด และสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ (Kahan et al., 2006; Steen & Medsger Jr, 2000) ในปัจจุบันมีงานวิจัยที่ศึกษากลไกการเกิดโรคในกลุ่มนี้มากขึ้น และเริ่มมีกล่าวถึงโรคและภาวะอื่น ๆ เพิ่มเติม โดยพบว่าโรค autoinflammatory diseases เกิดขึ้นได้จากปัจจัยหลายประการ (multifactorial diseases) และมีลักษณะทางคลินิกคล้ายกับ autoimmune diseases (AI) ได้แก่ การอักเสบที่เกิดจากเนื้อเยื่อตนเอง (self-tissue directed inflammation) (Doria et al., 2012) ซึ่งสาเหตุของ autoinflammatory diseases มาจากปัจจัยทางพันธุกรรม หรือความผิดปกติของระบบเมแทบอลิซึม (Touitou & Aksentjevich, 2019) อีกทั้งกลไกการเกิดโรคยังเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดเป็นหลัก ส่งผลให้เกิดการอักเสบตามมา ตัวอย่างเช่น familial Mediterranean fever (FWF) (Alghamdi, 2017), Pyrin-associated autoinflammation with neutrophilic dermatosis (PAAND) (Moghaddas et al., 2017), cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS), mevalonate kinase deficiency

(MKD), tumor necrosis factor (TNF)-receptor-associated periodic syndrome (TRAPS) (Harapas et al., 2018), โรคเกาต์ (gout) และโรคเกาต์เทียม (pseudogout) (Oliviero et al., 2020) เป็นต้น จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า autoinflammatory diseases มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มสูงขึ้นของปริมาณสารสื่อการอักเสบในกลุ่ม interleukin- (IL)-1 family โดยเฉพาะอย่างยิ่ง IL-1 β นับว่ามีบทบาทที่สำคัญในการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบและอาการปวด (Hausmann, 2019) ยิ่งไปกว่านั้นการศึกษาในปัจจุบันยังมีการรายงานมากมายที่แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของ inflammasome นอกจากจะควบคุมการสร้าง IL-1 β และ IL-18 แล้ว (Lamkanfi & Dixit, 2014; Man et al., 2017) และยังเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของการอักเสบที่เพิ่มขึ้นอีกด้วย (Harapas et al., 2018)

โรคเกาต์ (gout)

โรคเกาต์จัดเป็นหนึ่งในโรคอักเสบเรื้อรัง เป็นโรคที่มีอาการอักเสบบริเวณข้อต่อต่าง ๆ เกิดภาวะข้อต่อกระดูกอักเสบ (arthritis) และมีอาการแดง บวมปวด ปวดอย่างรุนแรง ที่บริเวณข้อต่อต่าง ๆ ทำให้ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย โดยส่วนใหญ่มักเกิดขึ้นกับชายวัยกลางคน และผู้สูงอายุมีอุบัติการณ์เกิดโรคเกาต์เพิ่มขึ้น (Dehlin et al., 2020) โรคเกาต์มีความสัมพันธ์กับความผิดปกติของเมแทบอลิซึมในร่างกาย ทำให้เกิดภาวะกรดยูริกในกระแสเลือดสูง (hyperuricemia) และปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการอักเสบของเกาต์เป็นผลมาจาก การสะสมผลึกโมโนโซเดียมยูเรต (monosodium urate crystals; MSU) ภายในข้อต่อ หรือเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบริเวณข้อต่อ เช่น กระดูกอ่อน หรือ เนื้อเยื่อไต ทำให้เกิดอาการทางคลินิกของโรคเกาต์ (Bitik & Öztürk, 2014; Shi et al., 2010) ซึ่งผลึกโมโนโซเดียมยูเรต (MSU) เกิดจากร่างกายมีความเข้มข้นของกรดยูริกในกระแสเลือดสูงกว่าเกณฑ์ค่าขีดจำกัดของความสามารถในการละลายของกรดยูริก (saturation point of MSU) คือที่ระดับ urate > 6.8 mg / dL (Burns & Wortmann, 2012) และยังเป็นผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายของกระบวนการการสลายเบสพิวรีน (purine nucleotides) (Cleophas et al., 2017) โดยพยาธิสภาพของโรคเกาต์ที่เกิดจากการตอบสนองต่อผลึกโมโนโซเดียมยูเรต ผู้ป่วยมักมีอาการอักเสบของเยื่อหุ้มข้อต่อเพียงข้อเดียว (monoarthritis) ที่เกิดขึ้นอย่างเฉียบพลัน จึงทำให้ผู้ป่วยได้รับความเจ็บปวดอย่างมาก โดยอาการเหล่านี้สามารถหายได้เองภายในไม่กี่วัน หรือในระยะเวลา 1-2 สัปดาห์ แต่อย่างไรก็ตามผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการรักษา หรือในกรณีที่มีการสะสมของผลึกโมโนโซเดียมยูเรต ในบริเวณข้อเป็นระยะเวลายาวนาน ทำให้ข้อต่อเสียหาย

(joint damage) หรือพัฒนาจนเกิดเป็นโรคเกาต์ในระยะเรื้อรัง ที่มีก้อนโทฟัสในชั้นใต้ผิวหนัง (subcutaneous tophus) ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้ผู้ป่วยโรคเกาต์มีข้อต่อที่ผิดปกติ หรืออาจทำลายกระดูกข้อต่อจนเกิดความพิการได้ จึงเป็นปัญหาที่สำคัญที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ และคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยที่แย่ลง (Dalbeth et al., 2016; Puig & Martinez, 2008) ยิ่งไปกว่านั้น MSU จัดเป็นหนึ่งในตัวกระตุ้นชนิด DAMP ดังนั้นการสะสม MSU สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองของการอักเสบที่มีความสัมพันธ์กับการหลั่ง pro-inflammatory cytokine ชนิด IL-1 β ซึ่งมีบทบาทสำคัญอย่างมากต่อการตอบสนองการอักเสบ และทำให้เกิดความเจ็บปวดที่รุนแรงเพิ่มมากขึ้นในผู้ป่วยโรคเกาต์ (Busso & So, 2012; Martinon et al., 2006; Shi et al., 2010) ถึงแม้ว่าโรคเกาต์จัดอยู่ในกลุ่มของโรคไม่ติดต่อ (non-communicable diseases) แต่จากข้อมูลขององค์การอนามัยโลกได้รายงานอุบัติการณ์เกิดโรคไม่ติดต้อมีสถิติที่เพิ่มสูงขึ้นทุก ๆ ปี โดยแต่ละปีมีประชากรทั่วโลกเสียชีวิตมากถึง 41 ล้านคน คิดเป็นร้อยละ 71 และอยู่ในช่วงอายุระหว่าง 30-69 ปี คิดเป็นร้อยละ 85 จากผู้ป่วยทั้งหมด (World Health Organization, 2020) จากการรายงานที่ผ่านมาโรคเกาต์ เป็นปัญหาสำคัญในประเทศต่าง ๆ โดยทั่วโลกมีช่วงความชุกของโรคที่เพิ่มขึ้นจาก 0.1% ถึงประมาณ 10% (Kuo et al., 2015) โดยเฉพาะประชากรชายวัยกลางคน และกลุ่มผู้สูงอายุมีความชุกและอุบัติการณ์ของโรคเกาต์มีแนวโน้มที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Kuo et al., 2015; Wallace et al., 2004; Zhu et al., 2011) ยกตัวอย่างเช่น ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี ค.ศ. 2007 ถึง 2008 พบความชุกของโรคเกาต์อยู่ประมาณ 3 ถึง 4% (Zhu et al., 2011) ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลจาก National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) ในปี ค.ศ. 2015 และ 2016 ความชุกของโรคเกาต์ประมาณร้อยละ 3.9 (Chen-Xu et al., 2019) จากข้อมูลในทวีปยุโรป ในปี ค.ศ. 2003 จนถึง 2014 ในประเทศเยอรมัน, ฝรั่งเศส, อิตาลี, เนเธอร์แลนด์ และอังกฤษ พบว่ามีอุบัติการณ์ของโรคเกาต์เพิ่มขึ้นเฉลี่ยจาก 1% เป็น 4% (Kuo et al., 2015) ในขณะที่ข้อมูลอุบัติการณ์โรคเกาต์ในทวีปเอเชียยังคงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น จากการศึกษาประชากรของประเทศจีน พบว่า 30 ปีที่ผ่านมาในหลายเมืองของประเทศจีน มีความชุกของโรคเกาต์ที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในเมืองปักกิ่ง (Beijing), เซี่ยงไฮ้ (Shanghai) และ ซิงเตา (Qingdao) เป็นต้น (Dai et al., 2003; Li et al., 2012; Liu et al., 2015) และในปี ค.ศ. 2017 พบว่าความชุกของโรคเกาต์สูงถึงร้อยละ 1.1 คิดจากประชากรทั้งหมด โดยส่วนใหญ่มักเป็นกลุ่มผู้สูงอายุ (Chen et al., 2017) ในประเทศเกาหลีใต้ ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2007 จนถึง ปี 2015 พบว่าความชุกของโรคเกาต์เพิ่มขึ้นจาก 0.37% เป็น 0.75% ยิ่งไปกว่านั้นยังมีการคาดการณ์ว่าจะเพิ่มขึ้นไปถึงร้อยละ 1.66 ภายในปี 2025 (Kim et al., 2017) สำหรับการศึกษากาการระบาดของโรคเกาต์ในประเทศไทย ได้มีการสำรวจพบความชุก

ของโรคอยู่ประมาณร้อยละ 0.16 และคาดการณ์ว่าจะมีแนวโน้มที่เพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ (Kuo et al., 2015)

อินเฟลมมาโซมและการกระตุ้นอินเฟลมมาโซม (inflammasome and inflammasome activation)

ระบบภูมิคุ้มกันที่มีแต่กำเนิดเป็นกลไกการต่อต้านสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายแบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific) และสามารถตอบสนองอย่างรวดเร็ว (rapid response) ในช่วงเริ่มต้นของการติดเชื้อ (infection) หรือการบาดเจ็บ (injury) ของร่างกาย (Medzhitov, 2008) ซึ่งการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดสามารถตรวจจับโมเลกุลของจุลชีพ หรือ pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) ในขณะเดียวกันก็สามารถตรวจจับโมเลกุลที่บ่งชี้ถึงเป็นอันตรายต่อเซลล์ หรือ danger-associated molecular patterns (DAMPs) โดยอาศัยโมเลกุลโปรตีนตัวรับที่เรียกว่า pattern-recognition receptors (PRRs) ที่แสดงออกโดยเซลล์ภูมิคุ้มกัน (Kawai & Akira, 2010) ในการรับรู้โมเลกุลของ PAMPs และ DAMPs โดย PRRs นั้นขึ้นอยู่กับลักษณะของเซลล์ที่ตอบสนองและจุลชีพที่บุกรุกที่ทำให้เกิดการผลิต pro-inflammatory cytokine/chemokine ซึ่งนอกเหนือจาก TLRs จะเห็นได้ว่า intracellular PRRs ที่มีบทบาทสำคัญเช่นเดียวกับ TLRs คือ nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs) โดย NLRs เป็น cytosolic receptor และกลุ่มโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็น tripartite domain structure ประกอบด้วยโครงสร้างของ nucleotide-binding oligomerization domain (NACHT) ซึ่งอยู่ตรงกลางที่ขนาบข้างด้วย C-terminal leucine-rich repeats (LRRs) และ N-terminal caspase recruitment (CARD) หรือ pyrin (PYD) domain (Grebe et al., 2018; Schroder et al., 2010)

inflammasome ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Martinon และ Coworkers ในปี ค.ศ 2002 (Martinon et al., 2002) เป็นกลุ่มโปรตีนขนาดใหญ่ภายในไซโตพลาสซึม (cytosolic multiprotein complex) ของ monocyte, neutrophil, dendritic cell, lymphocyte, epithelial cell และ osteoblast (Kummer et al., 2007) การประกอบขึ้นของ inflammasome สามารถจำแนกชนิดตามลักษณะโครงสร้างของ NLRs แบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ NLRP1/NALP1 (leucine-rich repeat และ pyrin domain-containing protein 1) inflammasome, NLRP3/NALP (leucine-rich repeat and pyrin domain-containing protein 3) inflammasome, IPAF/NLRC4 (NLR

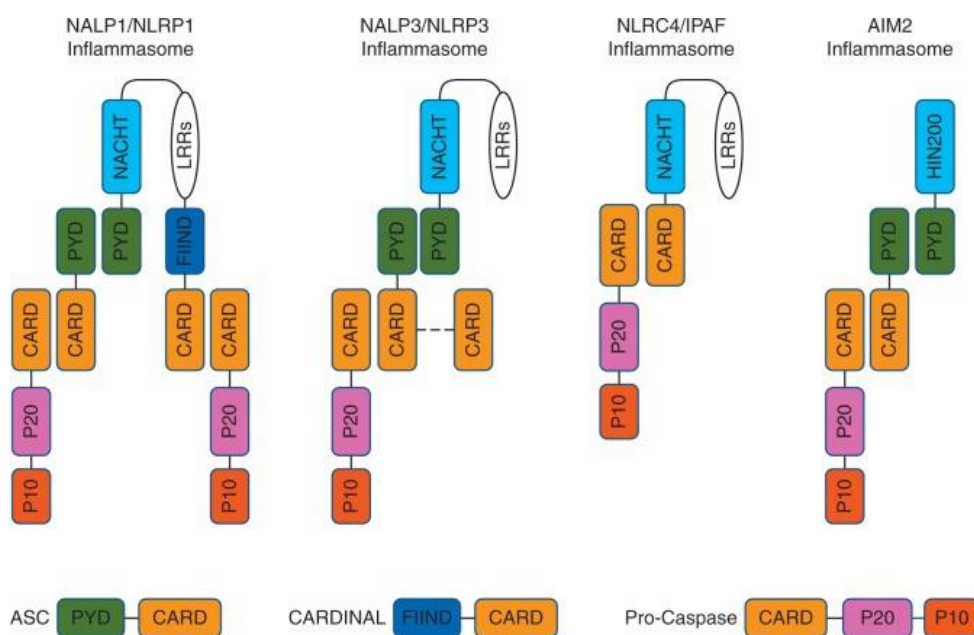
family CARD domain-containing protein 4) inflammasome ที่กล่าวมาทั้ง 3 ชนิดเป็นกลุ่มโปรตีนในโมเลกุลตัวรับ NLRs family ประกอบด้วยโครงสร้างคล้ายคลึงกันซึ่งทั้งหมดนี้จะมี PYD domain, NACHT และ LRR (Ye et al., 2008) นอกจากนี้การศึกษาที่ผ่านมาทำให้สามารถจำแนกชนิดของ inflammasome ได้เพิ่มเติม ได้แก่ absent in melanoma 2 (AIM2) inflammasomes ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม non-NLR เนื่องจากไม่มีองค์ประกอบของ LRR ซึ่งตัวรับเหล่านี้ถูกกระตุ้นโดยตัวกระตุ้นที่แตกต่างกันไป (Franchi et al., 2012; Lamkanfi & Dixit, 2014) แสดงดังภาพที่ 2

NLRP1/NALP1 (leucine-rich repeat และ pyrin domain-containing protein 1) inflammasome เป็น inflammasome ชนิดแรกที่ค้นพบ และเป็นโปรตีนเชิงซ้อนแสดงออกอย่างกว้างขวางภายในเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน และ non-haematopoietic tissues ซึ่งประกอบขึ้นด้วย NLRP1 ที่เชื่อมกันกับ ASC ผ่านทาง PYD domain และ ASC เชื่อมกับ caspase-1/caspase-5 ผ่านทาง CARD domain การกระตุ้นการทำงานของ NLRP1 inflammasome ต้องอาศัย 2 signal โดย signal ที่ 1 เป็นการจับกันระหว่าง microbial ligands กับ bacterial toxins และ signal ที่ 2 ต้องอาศัย NLRP1 ตรวจจับสัญญาณของ ribonucleoside triphosphate (rNTP) (Faustin et al., 2007; Franchi et al., 2009; Yu & Finlay, 2008)

IPAF/NLRC4 (NLR family CARD domain-containing protein 4) inflammasome เป็นสมาชิกเพียงหนึ่งเดียวใน NLRC family แสดงออกภายในไซโตพลาสซึมของ haematopoietic tissues โดย NLRC4 ประกอบด้วยโครงสร้างของ NBD domain อยู่ตรงกลางที่ขนาบข้างด้วย N-terminal caspase recruitment (CARD) และ C-terminal leucine-rich repeats (LRRs) (Mariathasan et al., 2006; Pétrilli et al., 2007) โดย NLRC4 สามารถเชื่อมกันกับ pro-caspase-1 ผ่านทาง CARD domain โดยไม่ต้องใช้ adaptor protein แต่อย่างไรก็ตามการประกอบขึ้นของ NLRC4 inflammasome สำหรับใช้สร้าง pro-inflammatory cytokine ชนิด IL-1 β จำเป็นต้องการ ASC เป็นตัวเชื่อมระหว่างโปรตีน และ NLRC4 inflammasome แสดงออกภายในไซโตพลาสซึมของ haematopoietic tissues และสามารถตรวจจับโมเลกุลของจุลชีพ ได้แก่ flagellin ของแบคทีเรียหลากหลายชนิด (Miao et al., 2006; Zhao et al., 2011)

Absent in melanoma 2 (AIM2) inflammasomes เป็น inflammasome ที่จัดอยู่ในกลุ่ม non-NLR โดยไม่มีองค์ประกอบของ LLRs แต่สามารถประกอบตัวขึ้นเป็น inflammasome ได้ (Broderick et al., 2015; Fernandes-Alnemri et al., 2009) เป็นโปรตีนเชิงซ้อนที่แสดงออกในไซโตพลาสซึมของผิวหนัง และ เนื้อเยื่อของระบบประสาท (Denes et al., 2015) อย่างไรก็ตาม AIM2 inflammasomes ยังมีความแตกต่างจากกลุ่ม NLRs คือ มีโครงสร้างของ carboxy-terminal hematopoietic IFN-inducible nuclear protein (HIN) domain หรือ HIN domain เชื่อมกับ amino-terminal PYD domain เรียกว่า (PYHIN)-family protein ทำหน้าที่เป็น ligand ตรวจจับโมเลกุลของจุลชีพ ได้แก่ double-stranded DNA (dsDNA) ทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงาน AIM2 inflammasomes ทำให้เกิดการประกอบตัวขึ้นโดยผ่าน PYD domain ของ (PYHIN)-family protein เชื่อมต่อกับ ASC ทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ caspase-1 ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการหลั่ง IL-1 β (Fernandes-Alnemri et al., 2009; Hornung et al., 2008)





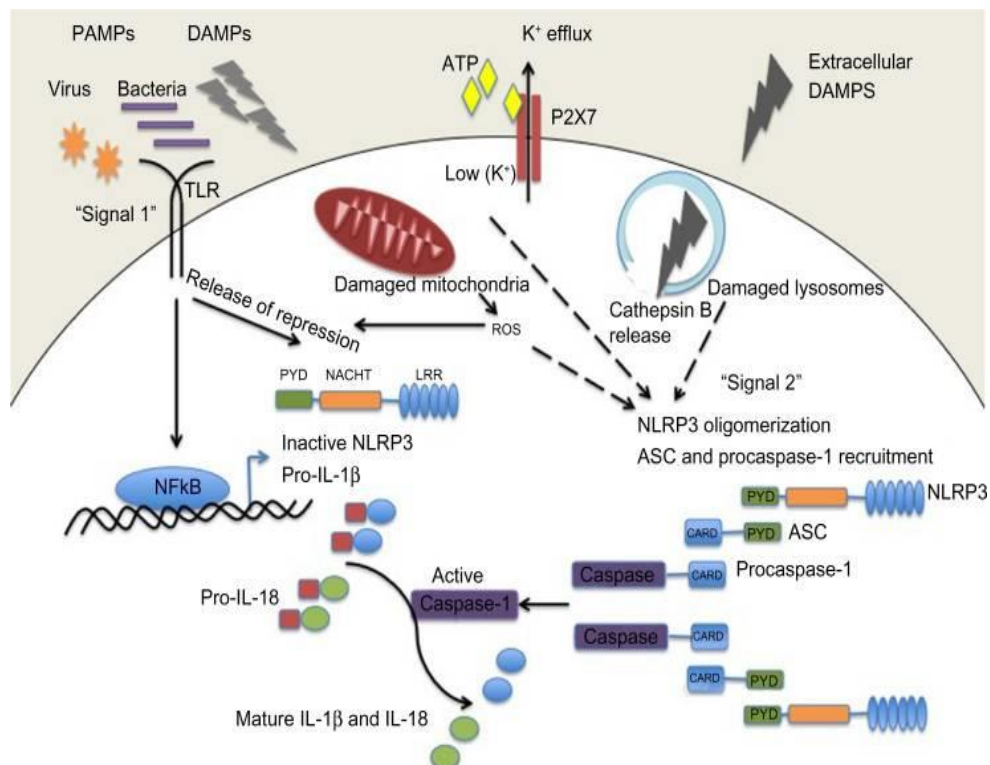
ภาพที่ 2 แผนผังแสดงองค์ประกอบของโครงสร้าง inflammasome และการปฏิสัมพันธ์ของกลุ่มโปรตีน multiprotein complex ของ NLRP3 Inflammasome

ที่มา: Zhang et al., 2016

inflammasome ชนิด NLR family, pyrin domain-containing 3 (NLRP3) inflammasome (หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า cryopyrin และ NALP3) แสดงออกใน myeloid lineage cells (O'Connor et al., 2003) เป็นชนิดที่ได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวาง เนื่องจากมีความเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรคที่เกิดจากการอักเสบ (inflammatory diseases) โดย NLRP3 inflammasome มีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของ proteolytic enzyme caspase-1 ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการสร้าง pro-inflammatory cytokines เช่น IL-1 β และ IL-18 ในขณะที่การประกอบขึ้นของ NLRP3 inflammasome จะเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิด pyroptosis ซึ่งเป็นรูปแบบการตายของเซลล์ที่อักเสบชนิดหนึ่ง (programmed inflammatory cell death) (Liu & Cao, 2016) ที่มีกลไกแตกต่างจากการตายของเซลล์แบบ apoptosis และ necrosis โดยจะเกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ส่งผลให้ออกซิเจนไหลออกภายนอก ผลที่ตามมาเกิดการแตก

สลายของเซลล์อักเสบ และหลั่ง pro-inflammatory cytokines (Bergsbaken et al., 2009) NLRP3 inflammasome ประกอบขึ้นด้วยโปรตีนหลัก 3 ชนิด ได้แก่ 1) โปรตีน NLRP3 ทำหน้าที่เป็น sensor 2) apoptosis-associated speck-like protein (ASC) ทำหน้าที่เป็น adaptor protein และ 3) pro-caspase-1 มีคุณสมบัติเป็น effector ซึ่งมี CARD domain สำหรับคุณสมบัติ ASC เป็น bipartite complex (ประกอบด้วย PYD และ CARD domain) ทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมระหว่างโปรตีน NLRP3 และ pro-caspase-1 (Martinon et al., 2002) โดย NLRP3 inflammasome สามารถตอบสนองต่อสัญญาณอันตราย (danger signal) ได้หลากหลาย นอกจากตอบสนองต่อ PAMPs อีกทั้งยังตอบสนองต่อ DAMPs เช่น monosodium urate (MSU) crystals (Martinon et al., 2006) extracellular adenosine triphosphate (ATP) (Mariathasan et al., 2006), pore-forming toxin (Muñoz-Planillo et al., 2013), (β -amyloid) (Halle et al., 2008), การสะสม amyloid polypeptide (Masters et al., 2010), cholesterol (Miao et al., 2006), ความเข้มข้นของ K^+ ภายในเซลล์ต่ำ (Pétrilli et al., 2007), ความเข้มข้นของกลูโคสสูง (Zhou et al., 2010), aluminum hydroxide (alum) (Li et al., 2008) และซิลิกา เป็นต้น ซึ่งการตรวจจับสัญญาณอันตรายเหล่านี้จะผ่าน LRR domain เกิดกระตุ้นส่งผลให้เกิดการเชื่อมกัน (oligomerization) ระหว่าง NLRP3 monomer ซึ่งการเกิด oligomerization ของ NLRP3 monomer เป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนที่มี domain เหมือนกันมาเชื่อมกัน (protein-protein homotypic) โดย pyrin domain (PYD) domain ของ NLRP3 เกิดปฏิสัมพันธ์กับ PYR domain ของ ASC (PYD-PYD interactions) (Cai et al., 2014; Lu et al., 2014) จากนั้น ASC ทำการคัดเลือก cysteine protease pro-caspase-1 โดยผ่านการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่าง caspase recruitment domain (CARD) ของ ASC และ CARD domain ของ pro-caspase-1 (CARD-CARD interactions) (Lu et al., 2014) เมื่อโปรตีนแต่ละกลุ่มเชื่อมกันอย่างสมบูรณ์จะเหนี่ยวนำให้เกิดการย่อยตัวเอง (autoproteolytic) ของ pro-caspase-1 ทำให้กลายเป็น caspase-1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่พร้อมทำงาน โดย caspase-1 ทำหน้าที่ย่อย precursor cytokines คือ pro-IL-1 β และ pro-IL-18 นำไปสู่การสร้าง mature IL-1 β และ IL-18 จากนั้นเกิดการหลั่งของ pro-inflammatory cytokine IL-1 β และ IL-18 ออกสู่ภายนอกเซลล์ (Gu et al., 1997; Howard et al., 1991) และเกิดการเหนี่ยวนำการตายของเซลล์แบบ pyroptosis (Vanaja et al., 2015)

การกระตุ้นการทำงานของ NLRP3 inflammasome ที่สามารถเป็นได้ทั้ง PAMP หรือ DAMP ซึ่งตัวกระตุ้นเหล่านี้จะมีผลต่อเซลล์ ทำให้เซลล์เกิดสภาวะเครียด (stress) ในรูปแบบต่างๆ อาทิเช่น กระบวนการ endocytosis ทำให้เกิดความไม่มีเสถียรภาพของเยื่อหุ้ม lysosome และการแตกของ lysosome มีผลให้ปลดปล่อย cathepsin B ออกสู่ไซโตพลาสซึม (Homung et al., 2008), การสร้าง reactive oxygen species (ROS) (Zhou et al., 2010), การไหลออกของโพแทสเซียมไอออน (K^+ efflux) (Pétrilli et al., 2007), การเคลื่อนที่ของ NLRP3 เข้าสู่ mitochondria, การปลดปล่อย mitochondrial DNA หรือ cardiolipin (Vanaja et al., 2015) เป็นต้น ภาวะดังกล่าวทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ NLRP3 inflammasome ที่สำคัญอย่างยิ่ง การกระตุ้น NLRP3 inflammasome จำเป็นต้องผ่าน 2 signal (ภาพที่ 3) signal ที่ 1 (priming step) เป็นสัญญาณที่กระตุ้นตัวรับสัญญาณ TLR ถ่ายทอดสัญญาณไปกระตุ้น Transcription factor ชนิด NF- κ B เพื่อควบคุมการสร้าง IL-1 β (pro-IL-1 β) signal ที่ 2 เป็นการกระตุ้นที่เกิดจาก DAMPs ที่ทำให้เกิดการเชื่อมกันของโปรตีน (oligomerization) และการประกอบขึ้นของ inflammasome ส่งผลให้เกิดการทำงานของ caspase-1 (Ozaki et al., 2015) จากการศึกษที่ผ่านมาพบว่าสัญญาณที่มีบทบาทในการกระตุ้นการทำงานของ NLRP3 inflammasome และทำให้เกิดการตอบสนองของการอักเสบ ยกตัวอย่างเช่น LPS เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ชั้นนอกในแบคทีเรียแกรมลบจัดเป็นสัญญาณ PAMPs ชนิดหนึ่ง (Hsu & Wen, 2002) โดยกระตุ้นผ่านทาง CD14/TLR4 (Fan & Cook, 2004; Nagaoka et al., 2001; Triantafilou & Triantafilou, 2002) ของเซลล์ macrophage ซึ่งเป็นสัญญาณที่ 1 หลังจากนั้นถูกเหนี่ยวนำด้วยอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (adenosine triphosphate; ATP) ซึ่งจะถูกปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ที่ตายแล้ว โดย ATP จัดเป็นสัญญาณ DAMPs ชนิดหนึ่งที่กระตุ้นเซลล์ macrophage ผ่านทาง purinergic nucleotide receptor (P2X7) นำไปสู่การกระตุ้นการทำงานของ NLRP3 inflammasome (Mariathasan et al., 2006; Moore & MacKenzie, 2009) ซึ่งตัวกระตุ้นในปัจจุบันที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา NLRP3 inflammasome formation ได้แก่ extracellular ATP, pore-forming toxin, crystalline substances, nucleic acids, hyaluronan รวมถึงส่วนที่องค์ประกอบต่างๆ ของเชื้อก่อโรค (Lamkanfi & Dixit, 2014; Vanaja et al., 2015) ตัวกระตุ้นเหล่านี้พบได้ในระหว่างการติดเชื้อทั้งที่ปล่อยออกมาจากเชื้อก่อโรคหรือเซลล์ตนเองที่ได้รับความเสียหาย



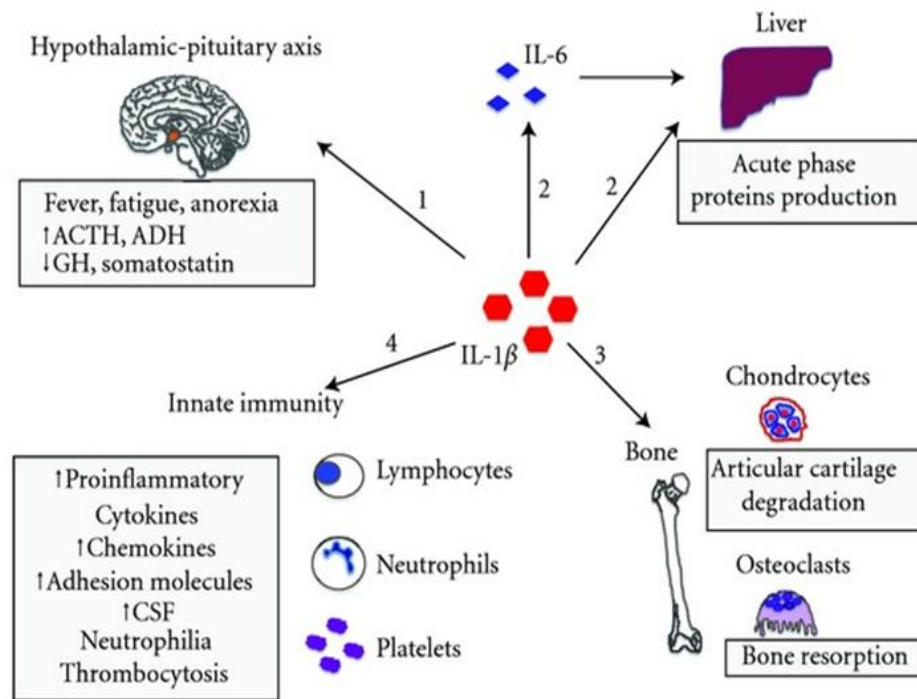
ภาพที่ 3 การกระตุ้นการทำงานของ NLRP3 inflammasome (NLRP3 inflammasome activation)

ที่มา: Ozaki et al., 2015

จากที่กล่าวมาข้างต้น inflammasomes เป็นกลุ่ม multiprotein complex ที่กระตุ้นการทำงานของ proteolytic enzyme caspase-1 เป็นสัญญาณที่สำคัญในการควบคุมการหลั่งของ pro-inflammatory cytokines ชนิด IL-1 family ออกมา โดย IL-1 สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบเฉียบพลันและเรื้อรัง (Bergsbaken et al., 2009; Ozaki et al., 2015; Ren & Torres, 2009) มีบทบาทในการป้องกันเซลล์จากการติดเชื้อ (von Moltke et al., 2013) ยิ่งไปกว่านั้น ปริมาณ IL-1 ที่เพิ่มสูงขึ้นมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (inflammatory disease) (Diamond et al., 2015) โดย IL-1 family ประกอบด้วยสมาชิกทั้งสิ้น 11 ชนิด สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มตามขนาดและความยาวของ precursor protein ซึ่งกลุ่ม IL-1 subfamily จะ

ประกอบด้วย 3 ligands คือ IL-1 α , IL-1 β และ IL-1Ra (Dinarello et al., 2012) โดย IL-1 α ถูกสังเคราะห์ได้จากเซลล์ ได้แก่ keratinocytes, epithelial cells และที่บริเวณเนื้อเยื่อทั่วร่างกายในมนุษย์ เป็นต้น (Berda-Haddad et al., 2011) ในขณะที่ IL-1 β ถูกสังเคราะห์ได้จากเซลล์ ได้แก่ monocyte, macrophage และ dendritic cell เป็นต้น (Agostini et al., 2004; Martinon et al., 2009) ซึ่ง IL-1 α จะมีฤทธิ์ทางชีวภาพตั้งแต่เป็น Pro-IL-1 α (Berda-Haddad et al., 2011) ในขณะที่ cytokine ตัวอื่น ๆ เช่น IL-1 β และ IL-18 ยังไม่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (inactive) จำเป็นต้องมีการตัดส่วนของปลาย amino-terminal (N-terminal) ให้อยู่ในรูปที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (active) โดย IL-1 β จะเป็น cytokine ที่มีฤทธิ์เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบอย่างชัดเจน ถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในไซโทพลาซึม มีขนาดโมเลกุล 31 kDa การตัดส่วน amino-terminal ของ Pro-IL-1 β (inactive) ให้ได้ IL-1 β (active) เป็นขั้นตอนที่สำคัญอย่างยิ่ง เกี่ยวข้องกับการทำงานของ inflammasome ทำให้เกิดการ ทำงานของ cysteine protease caspase-1 ทำหน้าที่ควบคุมการสร้าง IL-1 β (Agostini et al., 2004; Martinon et al., 2009) NLRP3 inflammasome เป็นกลไกที่การตอบสนองอย่างเฉียบพลัน โดยผ่านการกระตุ้นการทำงานของ caspase-1 ซึ่งทำหน้าที่เป็นเอ็นไซม์ cysteine-dependent protease ควบคุมการหลั่ง cytokine โดยเฉพาะกลุ่ม IL-1 family (ชนิดที่สำคัญคือ IL-1 β และ IL-18) ที่ได้รับการยอมรับว่ามีบทบาทสำคัญในการอักเสบที่มีคุณสมบัติเป็น pro-inflammatory cytokine ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเฉียบพลันและเรื้อรัง (De Nardo & Latz, 2011; Martinon et al., 2002) โดย IL-1 β เป็น cytokine ที่โดดเด่นที่สุดต่อการตอบสนองของการอักเสบในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immune system) (Kastner et al., 2010) ซึ่งฤทธิ์ทางชีวภาพของ IL-1 β สามารถกระตุ้นให้เกิดการอักเสบภายในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ร่วมกับมีอาการอักเสบทาง systemic อื่น ๆ (systemic autoinflammatory diseases) เช่น มีไข้ อ่อนเพลีย และมีลักษณะเฉพาะที่มีอาการปวดข้อ ปวดกล้ามเนื้อและอ่อนเพลียเมื่อย่ำ เป็นต้น อีกทั้งการเพิ่มขึ้นของปริมาณ cytokine ดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการทำงานของ NLRP3 inflammasome (ภาพที่ 4) ยิ่งไปกว่านั้นจากการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าปริมาณของ IL-1 β มีความสัมพันธ์กับโรค autoinflammatory diseases พบว่า ในเลือดของผู้ป่วยโรค autoinflammatory diseases มีปริมาณ IL-1 β ที่มากกว่าคนสุขภาพดี (Colina et al., 2010; Gattorno et al., 2007; Goldbach-Mansky et al., 2006) ดังนั้นการขัดขวางกระบวนการสร้าง

IL-1 β (IL-1 β signaling pathway) ถือว่าส่งผลให้ช่วยลดการอักเสบได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Binshtok et al., 2008; Ren & Torres, 2009)



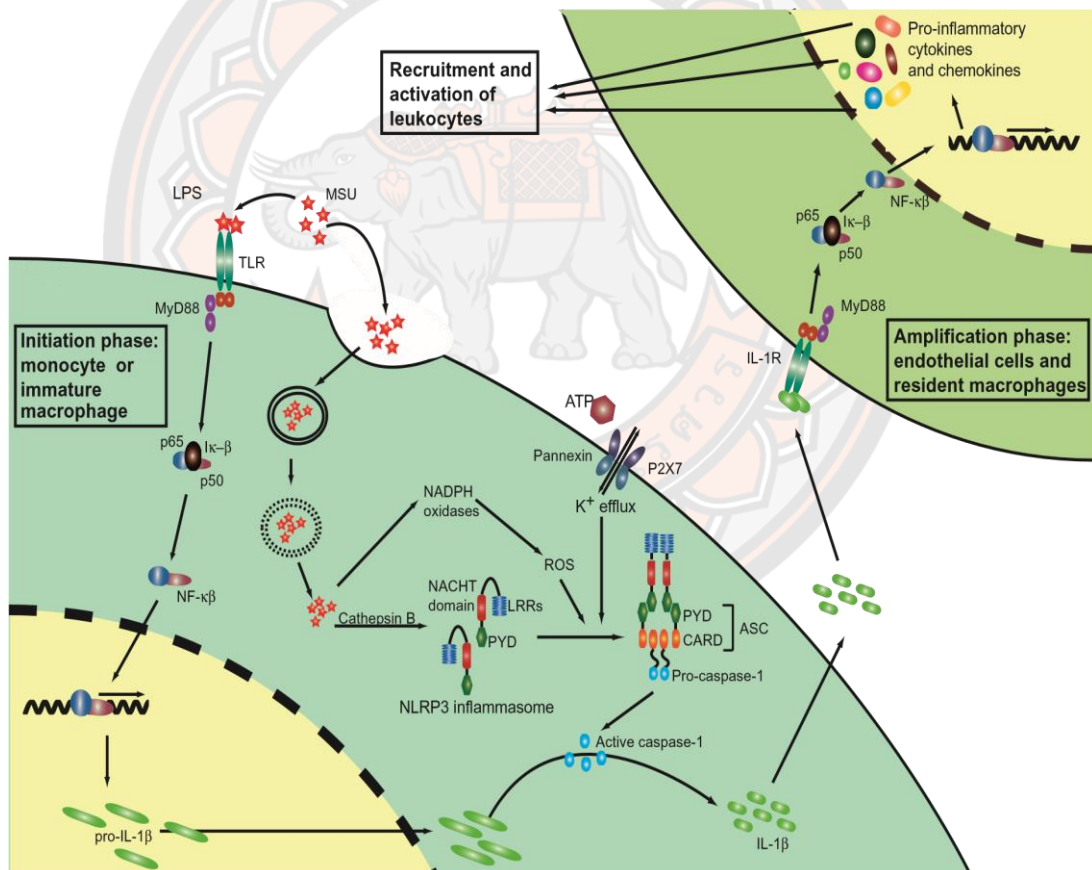
ภาพที่ 4 ฤทธิ์ทางชีวภาพของ IL-1 β

ที่มา: Rossi-Semerano & Koné-Paut, 2012

ความสัมพันธ์ระหว่าง NLRP3 inflammasome และ gout

โรคเกาต์เป็นโรคข้ออักเสบ ที่มีความสัมพันธ์กับความผิดปกติของเมแทบอลิซึมในร่างกาย ทำให้ร่างกายเกิดภาวะกรดยูริกสูง (hyperuricemia) ในกระแสเลือด และปัจจัยสำคัญที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบของโรคเกาต์เป็นผลมาจากการสะสมผลึกโมโนโซเดียมยูเรต (MSU) ภายในข้อต่อต่าง ๆ (Dalbeth et al., 2016) ซึ่งกรดยูริก (Uric acid) สามารถปล่อยออกมาจาก dying cells หรือเซลล์ที่ถูกกระตุ้นจาก danger signal (Vénéreau et al., 2015) ลักษณะสำคัญของพยาธิสภาพของโรคเกาต์ คือ มี neutrophil เคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณข้อต่อ และน้ำไขข้อ (synovial fluid) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาที่ผ่านมา การเกิดพยาธิสภาพโรคเกาต์มีความเกี่ยวข้องกับการรับรู้ของ mononuclear phagocytes ทำให้เริ่มต้นการตอบสนองต่อ MSU เมื่อเซลล์ macrophage ตรวจจับถึงสัญญาณของ MSU จึงเกิดกระบวนการ endocytosis นำ MSU เข้าสู่เซลล์ และเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง proinflammatory cytokine โดยเฉพาะ IL-1 β (Yang et al., 2020) เป็นชนิดที่มีความสำคัญเนื่องจากส่งเสริมการอักเสบในข้อต่อให้มีความรุนแรงเพิ่มขึ้น (Brydges et al., 2009; Hoffman & Firestein, 2006) ยิ่งไปกว่านั้นจากการศึกษาของ Martinon และคณะ ในปี 2006 รายงานว่า NLRP3 inflammasome มีบทบาทสำคัญต่อการตอบสนองต่อ MSU และมีความเกี่ยวข้องกับการสร้าง IL-1 β โดยคณะผู้วิจัยทำการศึกษาเซลล์ macrophage ของหนูทดลองที่มีความบกพร่องขององค์ประกอบต่าง ๆ ของ NLRP3 inflammasome ได้แก่ caspase-1, ASC และ NLRP3 พบว่า เซลล์ macrophage ของหนูทดลองที่ถูกกระตุ้นจาก MSU ไม่สามารถสร้าง IL-1 β นอกจากนี้ยังพบว่า neutrophil เคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณข้อต่อ หลังจากหนูทดลองได้รับการฉีด MSU เข้าบริเวณข้อต่อ (Martinon et al., 2006) ซึ่งกลไกที่ MSU ทำให้เกิดการอักเสบ มีขั้นตอนดังนี้ เริ่มจากการสะสม MSU ภายในข้อต่อ ทำให้เซลล์ macrophage ตรวจจับโมเลกุลของ MSU ได้โดยผ่านตัวรับ PRRs ชนิด TLR (2 หรือ 4) ที่แสดงออกบนผิวเซลล์ ทำให้ถ่ายทอดสัญญาณไปกระตุ้น transcription factor ชนิด NF- κ B เพื่อสร้าง pro-IL-1 β ซึ่งเป็นรูปแบบที่ไม่สามารถทำงานได้ (He et al., 2019) จากนั้นเกิดกระบวนการ phagocytosis นำพา MSU เข้าสู่เซลล์ทำให้ตัวรับสัญญาณภายในเซลล์รับรู้ต่อ MSU ผ่านการทำงานของ NLRP3 inflammasome เกิดกระบวนการ oligomerization ของ NLRP3 ทำให้ pro-caspase-1 ย่อยตัวเองเป็น caspase-1 ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการสร้าง IL-1 β โดยการย่อย Pro-IL-1 β (inactive) ให้ได้ IL-1 β (active) จากนั้นจะปล่อยออกนอกเซลล์ (Yang et al., 2020) IL-1 β สามารถไปจับกับ IL-1 receptors บน endothelial cell

และ macrophage cell ที่อยู่บริเวณภายในข้อต่อ เกิดการถ่ายทอดสัญญาณภายในเซลล์ (signal transduction) และการกระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ทำให้เกิดการหลั่งของ proinflammatory cytokine และ chemokine ซึ่งสามารถดึงดูดให้ leukocyte เคลื่อนตัวเข้าสู่บริเวณข้อต่อ ดังนั้นทำให้เกิดการอักเสบที่รุนแรงมากขึ้น นอกจากนี้ cathepsin B, ROS และ K^+ efflux สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ oligomerization ของ NLRP3 ได้เช่นกัน (Liu et al., 2018) ดังภาพที่ 5 ดังนั้นจากที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของการทำงานของ NLRP3 inflammasome และการสร้าง IL-1 β สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบในบริเวณข้อต่อของผู้ป่วยเกาต์



ภาพที่ 5 กลไกการตอบสนองต่อโมโนไซเตียมยูเรต และการสร้าง IL-1 β

ที่มา: Kingsbury et al., 2011

ยาต้านการอักเสบ (anti-inflammatory drugs)

ยาต้านการอักเสบ เป็นกลุ่มยาที่มีฤทธิ์บรรเทาอาการอักเสบ สามารถออกฤทธิ์ได้ทั้งลดไข้ และอาการปวด ในปัจจุบันยาต้านการอักเสบที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ ยากลุ่มสเตียรอยด์ (steroids), กลุ่มยาต้านการอักเสบกลุ่มที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (non-steroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs)

ในช่วง 50 ปีที่ผ่านมาการรักษาทางคลินิกของโรคเกาต์ จะใช้ยาต้านการอักเสบ (anti-inflammatory drugs) เพื่อบรรเทาอาการปวด และลดการอักเสบของข้อ โดยในระยะแรกที่มีอาการเฉียบพลันของโรคเกาต์แนะนำให้ใช้ยากลุ่มแรก (first drug) คือ ยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (nonsteroidal anti-inflammatories ; NSAIDs) แต่เมื่อรักษาด้วยยากลุ่มแรกไม่ได้ผล แพทย์จะแนะนำให้ใช้ยากลุ่มที่ 2 เป็นการฉีดยา glucocorticosteroids เข้าบริเวณข้อต่อที่มีภาวะข้ออักเสบเฉียบพลันในโรคเกาต์ (Jordan et al., 2007) และยากลุ่มที่ 3 (third drug) เป็นการรับประทานยา colchicine ซึ่งเป็นยาที่บรรเทาอาการอักเสบเฉียบพลันของโรคเกาต์ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง (Martinon et al., 2006) แต่อย่างไรก็ตามยาทั้ง 3 กลุ่มมีผลช่วยบรรเทาอาการอักเสบ แต่มีเป้าหมายในการรักษาที่ไม่จำเพาะต่อการอักเสบที่เกิดจากโรคเกาต์ การใช้ยาในกลุ่ม corticosteroids และกลุ่ม NSAIDs เป็นระยะเวลานาน จะทำให้มีผลข้างเคียงต่ออวัยวะต่าง ๆ ในร่างกาย (Vostinaru, 2017; Yasir et al., 2020) เกิดภาวะแทรกซ้อน โดยเฉพาะระบบประสาทส่วนกลาง และระบบทางเดินอาหาร ซึ่งอาจเกิดเลือดออกภายในทางเดินอาหารได้ (Brasil-Oliveira et al., 2020; Vostinaru, 2017; Wolfe et al., 1999) โดยเฉพาะในปัจจุบัน ยา colchicine เป็นยาที่นิยมใช้รักษาโรคเกาต์ และเป็นยาที่มีการแนะนำให้ใช้สำหรับรักษาภาวะข้ออักเสบกำเริบอย่างเฉียบพลันในโรคเกาต์ ตามแนวเวชปฏิบัติที่ได้รับการยอมรับอย่างแพร่หลาย ได้แก่ แนวเวชปฏิบัติการดูแลรักษาโรคเกาต์โดยสมาคมโรคข้อแห่งประเทศไทย (British Society for Rheumatology; BSR) ปี พ.ศ. 2560 (Hui et al., 2017), แนวเวชปฏิบัติการดูแลรักษาโรคเกาต์โดยวิทยาลัยแพทย์โรคข้ออเมริกา (American College of Rheumatology; ACR) ปี พ.ศ. 2555 (Khanna et al., 2012), แนวเวชปฏิบัติการดูแลรักษาโรคเกาต์โดยสมาคมความร่วมมือโรคข้อแห่งยุโรป (European League Against Rheumatism; EULAR) ปี พ.ศ. 2559 (Richette et al., 2017) และแนวเวชปฏิบัติสมาคมรูมาติสซั่มแห่งประเทศไทย ปี พ.ศ. 2555 (สมาคมรูมาติสซั่มแห่งประเทศไทย, 2555) แนะนำให้ใช้ยา colchicine ในขนาด 0.5 - 0.6

มิลลิกรัม วันละ 2 – 4 ครั้ง ไม่แนะนำให้รับประทานยาในขนาดสูงหรือต่อเนื่องกันทุก ๆ 2 ชั่วโมง เนื่องจากทำให้เกิดอาการท้องเสียร่วมด้วย โดยออกฤทธิ์บรรเทาอาการอักเสบ บวม และลดการก่อตัวของผลึกกรดยูริก และยับยั้งการทำลายข้อกระดูกจากการทำงานของเม็ดเลือดขาว อย่างไรก็ตามมีรายงานผลข้างเคียงที่สำคัญในผู้ป่วยที่ได้รับยา colchicine ทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ หรืออาเจียน และถ่ายอุจจาระเหลวหรืออุจจาระร่วง เป็นต้น (Slobodnick et al., 2018) นอกจากนี้ยังมีรายงานอาการข้างเคียงที่รุนแรงได้ ได้แก่ ภาวะกดไขกระดูก, ภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (myopathy) และ เกิดภาวะผิดปกติของเส้นประสาท (neuropathy) เป็นต้น จากการรักษาโรคเกาต์ด้วยการใช้ยาต้านการอักเสบที่ใช้ในการทางคลินิกส่งผลข้างเคียงที่อันตรายต่อร่างกาย และค่าใช้จ่ายด้านการดูแลสุขภาพที่เพิ่มมากขึ้น ทำให้ในปัจจุบันได้มีการพัฒนายาต้านการอักเสบทางการค้าโดยมีเป้าหมายเพื่อยับยั้ง IL-1 (IL-1 inhibitors) ทั้งสิ้น 4 ชนิด ได้แก่ anakinra, rilonacept, canakinumab และ gevokizumab (Ozaki et al., 2015; So et al., 2018)

anakinra เป็นยาต้านการอักเสบชนิดแรก ที่มีเป้าหมายจำเพาะต่อ IL-1 โดยออกฤทธิ์เป็น interleukin-1 receptor antagonist สามารถยับยั้งการจับกันระหว่าง IL-1 receptor (L-1R) กับ IL-1 ได้ทั้งชนิด IL-1 α และ IL-1 β (Frendeus et al., 2001) จากการศึกษาทางคลินิกแสดงให้เห็นว่า anakinra สามารถลดการอักเสบในผู้ป่วยโรคเกาต์ได้ อาทิเช่น การรายงานของ So และคณะ ปี 2007 ได้ศึกษาประสิทธิภาพของ anakinra โดยฉีดยาเข้าใต้ผิวหนังเป็นเวลา 3 วัน ในผู้ป่วยโรคข้ออักเสบเกาต์เฉียบพลัน (acute gouty arthritis) 10 ราย พบว่า มีประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยโรคข้ออักเสบเกาต์เฉียบพลัน (So et al., 2007) แต่อย่างไรก็ตาม anakinra มีอายุการใช้งานสั้นเพียง 4 – 6 ชั่วโมง ทำให้ผู้ป่วยต้องได้รับการรักษาด้วยการฉีดยาทุกวัน โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่เป็นโรคเกาต์แบบเฉียบพลันมีความจำเป็นต้องใช้ยาปริมาณสูงมาก ถึง 100 มก./วัน ซึ่งเป็นปริมาณที่มีผลต่อระบบการเผาผลาญของร่างกาย (Schlesinger, 2014; So et al., 2010) rilonacept เป็น fusion protein ที่ออกฤทธิ์เป็น interleukin-1 receptor antagonist โดยทำหน้าที่เป็น soluble decoy receptor เพื่อยับยั้งไม่ให้ IL-1 α และ IL-1 β จับกับ IL-1 receptor (L-1R) (Terkeltaub et al., 2009) canakinumab เป็น human monoclonal antibody (mAb) ที่มีเป้าหมายเจาะจงต่อ L-1 β และมีอายุการใช้งานยาวนาน (So et al., 2010) แต่ในทางตรงกลับกันในการรักษาด้วย canakinumab จะทำให้เกิดผลข้างเคียงที่เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคเยื่อจมูกและลำคออักเสบเฉียบพลัน (nasopharyngitis) มากถึงร้อยละ 34 จากผู้ป่วยที่มีผลข้างเคียง

(Galea et al., 2011) แต่ในขณะนี้ยังไม่มีผลการวิจัยทางคลินิกระยะที่ 3 (clinical trials phase 3) ของการรักษาด้วยยา gevokizumab

จากปัญหาในการรักษาด้วยยาต้านการอักเสบที่ใช้ในทางคลินิกเหล่านี้มีผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายต่อร่างกายและค่าใช้จ่ายในการรักษาที่ค่อนข้างสูง (So, 2018) ถึงแม้ว่าในปัจจุบันจะมีการคิดค้นยาชนิดใหม่ ๆ ออกมาเป็นจำนวนมาก แต่อย่างไรก็ตามการพัฒนาชนิดใหม่ หรือ ค้นหาสารต่าง ๆ ที่มีประสิทธิภาพในการลดการอักเสบ มีความปลอดภัยสูง และลดค่าใช้จ่ายในการรักษาให้น้อยลง ยังคงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง สำหรับใช้รักษาโรคอักเสบเรื้อรังและโรคเกาต์

เปปไทด์ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive peptide)

เปปไทด์ เป็นสายของโมเลกุลกรดอะมิโนเชื่อมต่อกัน ด้วยพันธะเปปไทด์ (peptide bond) หรือพันธะเอไมด์ (amide bond) โดยสายที่มีกรดอะมิโนยาวประมาณ 3-20 โมเลกุล เรียกว่า oligopeptide หรือ peptide จากการศึกษที่ผ่านมาเปปไทด์สายสั้น ๆ หลากหลายชนิดมีบทบาทสำคัญในสิ่งมีชีวิต ในปัจจุบันจึงมีความสนใจในการนำเปปไทด์ มาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งด้านการแพทย์ เนื่องจากคุณสมบัติของเปปไทด์เป็นโมเลกุลขนาดเล็ก ไม่สะสมในอวัยวะหรือเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของร่างกาย นอกจากสามารถดูดซึมได้ง่าย และถูกนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างรวดเร็วแล้ว ยังมีความจำเพาะต่อเป้าหมายจึงทำให้ออกฤทธิ์ได้ตรงเป้าหมาย (high selectivity) รวมถึงยังลดโอกาสการเกิดผลข้างเคียงต่ออวัยวะต่าง ๆ ในขณะเดียวกัน โมเลกุลของเปปไทด์มีขนาดเล็กจึงมีโอกาสเป็นแอนติเจนที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันที่น้อยกว่าสารโมเลกุลขนาดใหญ่ แสดงให้เห็นว่าเปปไทด์มีความเป็นพิษต่ำ (Chakrabarti et al., 2014) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำเปปไทด์มาใช้เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้

จากการศึกษาที่ผ่านมา มีงานวิจัยมากมายที่นำเปปไทด์มาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านการอักเสบ อาทิเช่น การศึกษาของ Vernaza et al. (2012) ได้นำเปปไทด์ที่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสจากถั่วเหลืองสายพันธุ์บราซิล BRS มาศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS พบว่า เปปไทด์ที่ได้ถั่วเหลืองสายพันธุ์บราซิล BRS สามารถยับยั้งการอักเสบได้ โดยการยับยั้งการสร้าง NO, TNF- α , iNOS, COX-2 และ PGE₂ จากการศึกษาของ Jantaruk et al. (2017) ได้นำเปปไทด์ออกฤทธิ์ KLK ที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้น

ใหม่ จาก core peptide α -helix motif ของโปรตีน sapecin B มาศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ผลการทดลองพบว่าเปปไทด์ KLK มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการอักเสบได้ ด้วยการยับยั้งการสร้างสื่อกลางอักเสบที่สำคัญ ได้แก่ NO, IL-1 β และ TNF- α ขณะเดียวกันเปปไทด์ KLK ยังสามารถยับยั้งการสร้าง PGE₂ ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้เปปไทด์ KLK ยังสามารถยับยั้งการแสดงออกในระดับ mRNA ของ iNOS, COX-2, IL-1 β และ TNF- α และยับยั้งการแสดงออกในระดับโปรตีนของ iNOS และ COX-2 โดยไปยับยั้ง NF- κ B pathway การศึกษาใน *ex vivo* เช่น การศึกษาของ Hwang et al. (2012) นำเปปไทด์ที่ได้จากกระบวนการไฮโดรไลซิสจากหอยนางรมแปซิฟิก *Crassostrea gigas* มีคุณสมบัติด้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity) ในเซลล์ macrophage ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในหลอดทดลอง (*in vitro*) มาศึกษาฤทธิ์การต้านการอักเสบในหนู BALB/c ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบที่ลำไส้ใหญ่ ด้วย dextran sulfate sodium จากการทดลองพบว่าเปปไทด์จากหอยนางรมแปซิฟิก สามารถยับยั้งการอักเสบที่ลำไส้ใหญ่ของหนู BALB/c ได้ด้วยการยับยั้งการสร้าง NO นอกจากนี้ยังลดปริมาณการหลั่ง IgG ในเซรัมของหนู เป็นต้น

ในปัจจุบันได้เริ่มมีการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของเปปไทด์ ที่มุ่งเน้นไปที่ inflammasome โดยยับยั้งการทำงานของ inflammasome ผ่านกลไกที่สำคัญในลักษณะที่แตกต่างกันไป ซึ่งจะนำไปสู่การยับยั้งการทำงานของ caspase-1 ที่ทำให้เกิดการสร้างและการหลั่งของ pro-inflammatory cytokine โดยงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาฤทธิ์ของเปปไทด์ในการต้านการอักเสบจาก inflammasome อาทิเช่น การศึกษาของ Li et al. (2017) ได้นำเปปไทด์ GW-A2 ที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้นใหม่จากโปรตีน pleurocidin ของปลา winter flounder และโปรตีน magainin 2a ของกบ มาศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบในเซลล์ macrophage ผลการทดลองพบว่า เปปไทด์ GW-A2 สามารถยับยั้งการสร้าง NO, iNOS, COX-2, TNF- α และ interleukin-6 (IL-6) ในเซลล์ macrophage ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ ATP และยับยั้งการอักเสบได้ด้วยการยับยั้งการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ของเอนไซม์ mitogen-activated protein kinase และยับยั้ง NF- κ B pathway ในขณะเดียวกันเปปไทด์ GW-A2 สามารถยับยั้งการทำงานของ NLRP3 inflammasome โดยลดการแสดงออกของ caspase-1 และลดการสร้าง IL-1 β ในเซลล์ macrophage (J774A.1 macrophage) ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ ATP การศึกษา

ของ Hu et al. (2014) ได้นำเปปไทด์ LL-37 ที่แยกได้จาก cationic antimicrobial polypeptide ขนาด 18 kDa ซึ่งเป็นโปรตีน cathelicidin ของมนุษย์ นำมาศึกษากลไกในการต้านการอักเสบใน สภาวะที่เกิด Sepsis ในเซลล์ macrophage (J774A.1 macrophage) และ THP-1 (human monocytic cell line) ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ ATP การทดลองพบว่า เปปไทด์ LL-37 ยับยั้ง การสร้าง IL-1 β โดยยับยั้งการแสดงออกของ IL-1 β , caspase-1 ขณะเดียวกัน เปปไทด์ LL-37 ยังสามารถทำลายความเป็นพิษของ LPS (neutralizing) โดยยับยั้งการจับกันระหว่าง LPS กับ TLR4 และยับยั้ง P2X7 ไม่ให้ตอบสนองต่อ ATP ส่งผลให้ยับยั้งการทำงานของ inflammasome ในเซลล์ macrophage ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ ATP การศึกษาใน *ex vivo* อาทิเช่น การศึกษาของ Zhou et al. (2020) นำเปปไทด์ Vasoactive intestinal peptide (VIP) เป็น neuropeptide ที่พบได้ทั่วไปในสมองและระบบทางเดินอาหาร มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ มาศึกษา การยับยั้งการอักเสบที่เกี่ยวข้องกับ NLRP3 inflammasome ในหนูทดลอง C57BL/6 ที่ถูก เหนี่ยวนำไปเกิดการอักเสบเฉียบพลันของถุงลมปอด (acute lung injury) ด้วย LPS และ primary peritoneal macrophages ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในหลอดทดลอง (*In vitro*) ผลการทดลองพบว่า เปปไทด์ VIP ยับยั้งการอักเสบเฉียบพลันของถุงลมปอดที่ถูกเหนี่ยวนำไปด้วย LPS ได้ โดยยับยั้งการ แสดงออกของ NLRP3, pro-caspase-1, pro-IL- β และ pro-IL-18 ในปอดของหนูทดลองที่ถูก กระตุ้นด้วย LPS นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้ง caspase-1 (p10) และส่งผลให้เกิดยับยั้งการสร้าง IL- β และ IL-18 ในขณะที่การศึกษาใน primary peritoneal macrophages ยังพบว่าเปปไทด์ VIP สามารถลดการแสดงออกของ caspase-1, IL- β และ IL-18 โดยยับยั้งผ่าน NF- κ B และ NLRP3 inflammasome จากการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า เปปไทด์ออกฤทธิ์ทางชีวภาพมี ประสิทธิภาพในการต้านการอักเสบ แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันการศึกษากฤทธิ์ของเปปไทด์ในการ ต้านการอักเสบที่ถูกเหนี่ยวนำไปด้วยโมโนโซเดียมยูเรต ยังคงมีการศึกษาจำนวนน้อยมาก ดังนั้น งานวิจัยเพื่อค้นหาตัวใหม่หรือสารประกอบอื่น ๆ ที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ถูกเหนี่ยวนำไปด้วยโม โนโซเดียมยูเรต และมีความปลอดภัยยังคงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

เซลล์เพาะเลี้ยงและสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

เซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ THP-1 cell line (TIB-202™) ซึ่งเป็นเซลล์ monocyte ของมนุษย์ที่ได้รับมาจาก American Type Culture Collection (ATCC®, USA) เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium ที่มี ส่วนประกอบของ 10% (v/v) fetal bovine serum (Gibco, South America), 2 mM L-glutamine (Gibco), 10 mM HEPES (HyClone), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Gibco) และ 0.05 mM 2-Mercaptoethanol (Bio-Rad, China) เลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C ในบรรยากาศที่มี 5% CO₂ ก่อนการทดสอบจะทำการ differentiated THP-1 ให้เป็น macrophage โดยกระตุ้นเซลล์ด้วย 50 ng/ml Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; Sigma, St. Louis, MO, USA) และบ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C ในบรรยากาศที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารออกและล้างเซลล์ด้วย 1X phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 จำนวน 2 ครั้ง และเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 medium ที่ไม่มีส่วนประกอบของ 10% (v/v) fetal bovine serum (Gibco, South America) และ 0.05 mM 2-mercaptoethanol (Bio-Rad, China) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนทำการศึกษาต่อไป

เปปไทด์ออกฤทธิ์

เปปไทด์ออกฤทธิ์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเปปไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ ได้แก่ เปปไทด์ R14 สังเคราะห์โดยบริษัท GenScript (Piscataway, USA) ที่มีความบริสุทธิ์มากกว่าเท่ากับ 95% ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จาก ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ โดยเปปไทด์ R14 ประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 7 AA คือ ILIILDD เตรียมเปปไทด์ R14 โดยละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, USA) ให้ได้ความเข้มข้น 40 mM และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C เมื่อต้องการทำการทดสอบจึงนำเปปไทด์มาละลายที่ อุณหภูมิห้อง และเตรียมเปปไทด์ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 medium ที่ไม่มีส่วนประกอบของ 10% (v/v) fetal bovine serum (Gibco, South America) และ 0.05 mM 2-mercaptoethanol (Bio-Rad, China)

การศึกษาผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง (hemolytic activity)

การศึกษาผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยวิธีทดสอบนี้ดัดแปลงจาก Lee et al. (2004) ทำการทดสอบโดยเตรียม 2% เซลล์เม็ดเลือดแดงแกะในสารละลาย 1X PBS pH 7.4 ปริมาตร 100 μ l มาบ่มร่วมกับเปปไทด์ R14 ที่ความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 μ M (final concentration) ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในบรรยากาศที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยในการศึกษาครั้งนี้มี 1X PBS pH 7.4, 1% Triton X-100 และ DMSO (Sigma) ที่บ่มร่วมกับ 2% เซลล์เม็ดเลือดแดงแกะ เป็น untreated control, positive control และ vehicle control ตามลำดับ เมื่อทำการบ่มเวลาจึงปั่นตกตะกอนเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 1,000 \times g ที่ เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาจึงดูด supernatant ปริมาตร 100 μ l ลงใน 96 well-microtiter plate (Nunc™, Roskilde, Denmark) จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 ด้วยเครื่อง microplate reader (Molecular Devices, USA) นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง (% hemolysis) โดยเปรียบเทียบระหว่างเซลล์เม็ดเลือดแดงที่บ่มร่วมกับเปปไทด์ และเซลล์เม็ดเลือดแดงที่บ่มร่วมกับ 1% Triton X-100 ตามสมการดังนี้

$$\% \text{ hemolysis} = (\text{OD}_{405 \text{ nm peptide}} - \text{OD}_{405 \text{ nm PBS pH7.4}}) / (\text{OD}_{405 \text{ nm 1\% Triton X-100}} - \text{OD}_{405 \text{ nm PBS pH 7.4}}) \times 100.$$

การศึกษาผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการมีชีวิตรอด (cell viability) ในเซลล์ differentiated THP-1

ศึกษาผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ โดยนำเซลล์ differentiated THP-1 จำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อหลุม ที่เลี้ยงใน 96-well microtiter plate (Nunc™) ที่อุณหภูมิ 37 °C ในบรรยากาศที่มี 5% CO₂ มาบ่มร่วมกับเปปไทด์ R14 ที่ความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 μ M บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในบรรยากาศที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีหลุมที่มีเฉพาะเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์แต่ไม่ได้บ่มร่วมกับเปปไทด์ และเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี DMSO (Sigma) เป็น untreated control และ vehicle control ตามลำดับ เมื่อครบเวลาทำการตรวจสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์ ด้วยวิธี 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay ซึ่งวิธีทดสอบนี้ดัดแปลงจาก Denizot and Lang (1986) โดยเติม MTT solution (5 mg/ml; Sigma, USA) ปริมาตร 20 μ L ลงในทุกหลุม จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในบรรยากาศที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงดูด

supernatant ออกให้หมด และเติม DMSO ปริมาตร 100 μL ลงในทุกหลุม เพื่อละลายผลึก formazan ให้อยู่ในรูปสารละลาย แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (Rayto RT-2100C, China) นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) โดยเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่บ่มร่วมกับเปปไทด์ และ untreated control ตามสมการดังนี้

$$\% \text{ cell viability} = (\text{OD}_{540} \text{ of treated well} / \text{OD}_{540} \text{ of untreated well}) \times 100$$

การศึกษาผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการสร้าง IL-1 β ในเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU

ศึกษาผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการสร้าง IL-1 β ในเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU โดยนำเซลล์ differentiated THP-1 จำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อหลุม ที่ถูกกระตุ้นด้วย 100 $\mu\text{g/ml}$ monosodium urate (MSU; InvivoGen, USA) มาบ่มร่วมกับเปปไทด์ R14 ที่ความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 μM ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$ ในบรรยากาศที่มี 5% CO_2 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยหลุมที่มีเฉพาะเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์, หลุมที่มีเซลล์บ่มร่วมกับ MSU แต่ไม่เติมเปปไทด์ และหลุมที่เติม DMSO (Sigma) เป็น negative control, positive control และ vehicle control ตามลำดับ เมื่อครบเวลาจึงเก็บ supernatant เพื่อนำไปตรวจวัดปริมาณ IL-1 β ต่อไป

ตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ IL-1 β ใน cell culture supernatant โดยวิธี quantitative sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป (Human IL-1 β ELISA MAX Deluxe Set) และทดสอบตามขั้นตอนที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต ซึ่งการตรวจวัดปริมาณ IL-1 β มีขั้นตอนโดยสรุป ดังนี้ เริ่มจากเคลือบ 96-well ELISA plate (Nunc Maxisorp™) ด้วย capture antibody ที่มีความจำเพาะต่อ IL-1 β (anti-IL-1 β) ปริมาตร 100 μl บ่มเพลทที่อุณหภูมิระหว่าง 2 - 8 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงล้างเพลทด้วย wash buffer (0.05% Tween 20 ใน 1X PBS pH 7.4) จำนวน 4 ครั้ง เพื่อล้าง capture antibody ที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก จากนั้นเติม 1X assay diluent A ปริมาตร 200 μl ลงในทุกหลุม บ่มเพลทที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงล้างเพลทด้วย wash buffer จำนวน 4 ครั้ง แล้วเติม assay buffer D ปริมาตร 50 μl ลงในทุกหลุม จากนั้นเติม cell culture supernatant และ standard IL-1 β dilutions ปริมาตร 50 μl ลงในหลุมทดสอบ และหลุม standard ตามลำดับ สำหรับ Blank ใช้เป็น 1X assay diluent A นำเพลทบ่มที่อุณหภูมิห้องพร้อมทั้งเขย่า เป็นเวลา 2

ชั่วโมง ล้างเพลทด้วย wash buffer จำนวน 4 ครั้ง จากนั้นเติม detection antibody ที่มีความจำเพาะต่อ IL-1 β ปริมาตร 100 μ l ทุกหลุม แล้วบ่มเพลทที่อุณหภูมิห้องพร้อมทั้งเขย่า เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย wash buffer จำนวน 4 ครั้ง เพื่อล้าง detection antibody ที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกจากเพลท จากนั้นเติม Avidin-HRP (avidin ที่ติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ horseradish peroxidase) ปริมาตร 100 μ l ทุกหลุม บ่มเพลทในที่มืดที่อุณหภูมิห้องพร้อมทั้งเขย่า เป็นเวลา 30 นาที เมื่อบ่มครบเวลาล้างเพลทด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง และเติม substrate solution F ปริมาตรหลุมละ 100 μ l บ่มเพลทในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที และเติม stop solution (1M H₂SO₄) ปริมาตร 100 μ l เพื่อหยุดปฏิกิริยาเป็นขั้นตอนสุดท้าย จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง unique multi-detection microplate reader (BioTek Synergy HT, USA) และคำนวณหาปริมาณ IL-1 β ใน cell culture supernatant โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้จาก standard IL-1 β

การศึกษาผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการแสดงออกของโปรตีน NF- κ B p65 ในเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU

1. การเตรียมเซลล์

โดยนำเซลล์ differentiated THP-1 จำนวน 2×10^6 เซลล์ต่อหลุม ที่เลี้ยงใน 6-well plate (Nunc™) ในสภาวะที่ได้รับการกระตุ้นด้วย 100 μ g/ml MSU (InvivoGen, USA) มาบ่มร่วมกับเปปไทด์ R14 ที่ความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 μ M ที่อุณหภูมิ 37 °C ในบรรยากาศที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 30 นาที โดยหลุมที่มีเฉพาะเซลล์ differentiated THP-1 ในอาหารเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว, หลุมที่มีเซลล์ differentiated THP-1 บ่มร่วมกับ MSU แต่ไม่เติมเปปไทด์ และหลุมที่เติม DMSO (Sigma-Aldrich, USA) เป็น negative control, positive control และ vehicle control ตามลำดับ

2. การสกัดนิวเคลียร์โปรตีน (nuclear protein extraction)

หลังจากบ่มครบเวลาจึงทำการล้างเซลล์ด้วย cold 1X PBS pH 7.2 จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นจึงเก็บเซลล์โดยใช้ cell scraper แล้วเก็บเซลล์ลงใน cold-steriled 1.5 ml microcentrifuge tube และนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Allegra™ X-22 R Benchtop Centrifuge; Beckman Coulter, Germany) ที่ความเร็วรอบ 500 \times g ที่

อุณหภูมิ 4 °C นาน 5 นาที หลังจากดูดส่วนด้านบนที่เป็น culture supernatant ที่ทิ้ง จึงละลายตะกอนเซลล์ด้วย 1X PBS pH 7.2 และย้ายตะกอนเซลล์ทั้งหมดลงในหลอดใหม่ จากนั้นปั่นตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Allegra™ X-22R Benchtop Centrifuge; Beckman Coulter, Germany) ที่ความเร็วรอบ 500 ×g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 3 นาที แล้วทำการดูด supernatant ที่ทิ้งให้หมด และจึงจะทำการสกัดโปรตีนจากนิวเคลียสของเซลล์ ด้วยชุดสกัดโปรตีนสำเร็จรูป NE-PER® nuclear and cytosolic extraction reagents kit (Thermo-Fisher Scientific, Rockford, USA) ที่มีการเติม protease and phosphatase inhibitor cocktail (Thermo-Fisher Scientific Rockford, USA) และทำตามขั้นตอนที่ระบุไว้โดยบริษัทผู้ผลิต ซึ่งการสกัดโปรตีนมีขั้นตอนดังนี้ หลังจากเติม cytoplasmic extraction reagent I (CER I) ลงในหลอดเซลล์ที่เตรียมไว้ จึง vortex ที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 15 วินาที และวางหลอดเซลล์ไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม cytoplasmic extraction reagent II (CER II) แล้ว vortex ที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 5 วินาที และวางหลอดเซลล์ไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 1 นาที หลังจากปั่นตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 16,000 ×g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที จึงเก็บส่วนใสด้านบน (เป็นส่วนที่มี cytoplasmic protein อยู่) ลงใน cold-steriled 1.5 ml microcentrifuge tube หลอดใหม่ และเก็บโปรตีนไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C สำหรับตะกอนเซลล์ที่เหลืออยู่จะทำการสกัดโปรตีนในนิวเคลียสต่อไป โดยเติม nuclear extraction reagent (NER) แล้ว vortex ที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 15 วินาที และวางไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ทำการ vortex และวางไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ตามเดิมโดยทำซ้ำเป็นจำนวน 4 ครั้ง เมื่อทำครบเวลาจึงปั่นตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 16,000 ×g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที จึงเก็บส่วนใสด้านบน (เป็นส่วนที่มี Nuclear protein อยู่) ใส่ใน cold-steriled 1.5 ml microcentrifuge tube หลอดใหม่ จากนั้นวัดความเข้มข้นโปรตีนทั้งหมดด้วย Bradford protein assay kit (Bio-Rad, USA) สำหรับโปรตีนที่สกัดได้ของแต่ละตัวอย่าง เตรียมความเข้มข้นโปรตีนตัวอย่างละ 25 µg และนำไปตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีน NF-κB p65 ในนิวเคลียส ด้วยวิธี Western blot

3. การวัดการแสดงออกของโปรตีน NF-κB p65 ด้วยวิธี Western blot

การตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีน NF-κB p65 ในนิวเคลียส เทียบกับ β-actin ในเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU ด้วยวิธี Western blot เริ่มจากแยกขนาดโมเลกุลของโปรตีนด้วย sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-

PAGE) โดยใช้ 10% TGX™FastCast™Acrylamide gel (Bio-Rad, USA) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 200 โวลต์ เป็นเวลา 35 นาที และย้ายโปรตีนที่แยกตามขนาดโมเลกุลจากแผ่นเจลสู่แผ่น nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Germany) ด้วยเครื่อง semi-dry transfer system (Bio-Rad, USA) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 15 โวลต์ เป็นเวลา 15 นาที ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย 1X TBS buffer pH 7.6 นาน 20 นาทีแล้วทำการ block non-specific binding ด้วย 5% skim milk ใน 1X TBS buffer pH 7.6 ที่มี 0.1% Tween 20 บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง เพื่อเป็นการป้องกันการเกิด non-specific ของโปรตีนอื่น ๆ ไม่ให้เข้ามาจับกับแผ่นเมมเบรน เมื่อครบเวลาล้างเมมเบรนด้วย 1X TBS buffer pH 7.6 ที่มี 0.1% Tween 20 เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นติดตามโปรตีนที่ต้องการศึกษาด้วยการบ่มร่วมกับแอนติบอดีที่จำเพาะ (specific primary antibody) ต่ อ NF- κ B p65 (sc-8008; Santa Cruz Biotechnology, USA) และ β -actin (ab170325; Abcam, USA) ที่อุณหภูมิห้องในที่มีดเป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากล้างเมมเบรนด้วย 1X TBS buffer pH 7.6 ที่มี 0.1% Tween 20 เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง และ 1X TBS buffer pH 7.6 เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 ครั้ง จึงบ่มแผ่นเมมเบรนร่วมกับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ peroxidase-conjugated AffiniPure goat anti-mouse IgG (secondary antibody) สำหรับแอนติบอดีต่อโปรตีน NF- κ B p65 และ β -actin แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงล้าง secondary antibody ที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกด้วย 1X TBS buffer pH 7.6 ที่มี 0.1% Tween 20 เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง จึงล้างด้วย 1X TBS buffer pH 7.6 เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติม ECL Substrate solution (Bio-Rad, USA) เพื่อตรวจวัดการแสดงผลของโปรตีน รวมถึงถ่ายภาพและบันทึกภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพ ImageQuant LAS 4000 Biomolecular Imager (GE Healthcare Life Sciences, UK) และวัดความเข้มของแถบโปรตีนด้วยโปรแกรม ImageJ จึงวิเคราะห์ผลโดยเปรียบเทียบเซลล์ differentiated THP-1 ในสภาวะที่ถูกกระตุ้น และไม่ถูกกระตุ้นด้วย MSU รวมถึงในสภาวะที่บ่มร่วมกับเปปไทด์ R14 โดยนำค่าความเข้มของโปรตีนที่วัดได้มาคำนวณค่าอัตราส่วนระหว่างการแสดงผลของโปรตีน NF- κ B p65 ในนิวเคลียสต่อโปรตีน β -actin (Housekeeping protein)

การศึกษาผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการแสดงออกของโปรตีน IL-1 β , NLRP3, caspase-1 และ β -actin ในเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU

1. การเตรียมเซลล์

เลี้ยงเซลล์ differentiated THP-1 จำนวน 2×10^6 เซลล์ต่อหลุม ใน 6-well plate (Nunc™) ที่ถูกกระตุ้นด้วย 100 μ g/ml MSU (InvivoGen, USA) มาบ่มร่วมกับเปปไทด์ R14 ที่ความเข้มข้น 5, 25, 50 และ 100 μ M ที่อุณหภูมิ 37 °C ในบรรยากาศที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยหลุมที่มีเฉพาะเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์, หลุมที่มีเซลล์บ่มร่วมกับ MSU แต่ไม่เติมเปปไทด์ และหลุมที่เติม DMSO (Sigma) เป็น negative control, positive control และ vehicle control ตามลำดับ หลังจากบ่มครบเวลาจึงทำการเก็บ culture supernatant เพื่อนำไปตกตะกอนโปรตีนโดยใช้วิธี methanol-chloroform precipitation protein (Wessel & Flugge, 1984) และเก็บเซลล์ไปสกัด total protein ด้วย RIPA lysis buffer (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)

2. การสกัดโปรตีน (Total protein extraction) และการตกตะกอนโปรตีนด้วยวิธี methanol-chloroform precipitation protein

สำหรับ culture supernatant นำไปตกตะกอนโปรตีนโดยใช้วิธี methanol-chloroform precipitation protein โดยเริ่มจากนำแต่ละตัวอย่างมาเติม methanol และ chloroform ในอัตราส่วน supernatant ต่อ methanol ต่อ chloroform เท่ากับ 4:4:1 ตามลำดับ โดยผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (LaboGene™ ScanSpeed 2236R; LaboGene ApS, Lyngø, Denmark) ที่ความเร็ว 20,000 \times g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงดูดส่วน liquid phase ด้านบนทิ้ง และเติม methanol ปริมาตรเป็น 2 เท่าของปริมาตรสารละลายที่เหลืออยู่ ละลายตะกอนโปรตีน นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (LaboGene™ ScanSpeed 2236R) ที่ความเร็ว 20,000 \times g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วน supernatant ทิ้งให้หมด และละลายตะกอนโปรตีนด้วย methanol ปริมาตร 1 ml ย้ายสารละลายโปรตีนลงใน cold-steriled 1.5 ml microcentrifuge tube นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Allegra™ X-22R Benchtop Centrifuge) ที่ความเร็ว 20,000 \times g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากดูดส่วน supernatant ทิ้ง ทำการระเหย methanol ออกจากตะกอนโปรตีนให้หมดด้วย heat box ที่อุณหภูมิ 50-55 °C เป็นเวลาประมาณ

3-5 นาที จากนั้นละลายตะกอนโปรตีนด้วย sterilized distilled water ปริมาตร 30 μ l และนำไปตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี Western blot ต่อไป

หลังจากเก็บ culture supernatant ทำการล้างเซลล์ด้วย cold 1X PBS (pH 7.4) จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นสกัดโปรตีนทั้งหมดจากเซลล์ (Total protein extraction) ด้วย RIPA lysis buffer (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) ที่มีส่วนผสมของ protease และ phosphatase inhibitor เพื่อป้องกันการทำลายโปรตีนที่สกัดได้จากเอ็นไซม์ย่อยโปรตีน และบ่มพร้อมเขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 20 นาที แล้วเก็บเซลล์ลงใน cold-steriled 1.5 ml microcentrifuge tube และทำให้เซลล์แตกโดยนำไป sonicate ด้วยเครื่อง Sonicator (Sonics & Materials Vibra-Cells™, San Diego, CA, USA) ที่ 40 แอมพลิจูด เป็นเวลา 10 วินาที จำนวน 3 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Allegra™ X-22R Benchtop Centrifuge; Beckman Coulter, Germany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 \times g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วน supernatant ลงใน cold-sterile 1.5 ml microcentrifuge tube จากนั้นวัดความเข้มข้นโปรตีนทั้งหมดด้วย Bradford protein assay kit (Bio-Rad, USA) สำหรับโปรตีนที่สกัดได้ของแต่ละตัวอย่าง เตรียมความเข้มข้นโปรตีนตัวอย่างละ 25 μ g และนำไปตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี Western blot

3. การวัดการแสดงออกของโปรตีน IL-1 β , caspase-1, NLRP3 และ β -actin ด้วยวิธี Western blot

การตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี Western blot เริ่มจากการนำแต่ละตัวอย่างที่ผ่านการละลายตะกอนโปรตีน และจากการที่สกัดโปรตีนได้ (25 μ g) มาแยกขนาดโมเลกุลของโปรตีนด้วย sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยใช้ 10% TGX™FastCast™Acrylamide gel (Bio-Rad, USA) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 200 โวลต์ เป็นเวลา 35 นาที และย้ายโปรตีนที่แยกตามขนาดโมเลกุลจากแผ่นเจลสู่ nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Germany) ด้วยเครื่อง semi-dry transfer system (Bio-Rad, USA) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 15 โวลต์ เป็นเวลา 15 นาที ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย 1X TBS buffer pH 7.6 เป็นเวลา 20 นาที แล้วทำการ block non-specific binding ด้วย 5% skim milk ใน 1X TBS buffer pH 7.6 ที่มี 0.1% Tween 20 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อป้องกันการเกิด

non-specific ของโปรตีนอื่น ๆ ไม่ให้เข้ามาจับกับแผ่นเมมเบรน เมื่อครบเวลาด้างเมมเบรนด้วย 1X TBS buffer pH 7.6 ที่มี 0.1% Tween 20 เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นติดตามโปรตีนที่ต้องการศึกษาด้วยการบ่มร่วมกับแอนติบอดีที่จำเพาะ (specific primary antibody) ต่อ NLRP3 (#7074; Cell Signaling Technology) หรือ caspase-1 (sc-56036; Santa Cruz Biotechnology, USA) หรือ IL-1 β (#12242; Cell Signaling Technology) และ β -actin (ab170325; Abcam, USA) ที่อุณหภูมิห้องในที่มีดเป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากล้างแผ่นเมมเบรนด้วย 1X TBST เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง และ 1X TBS buffer pH 7.6 เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 ครั้ง บ่มแผ่นเมมเบรนร่วมกับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ peroxidase-conjugated AffiniPure goat anti-mouse IgG สำหรับแอนติบอดีต่อโปรตีน IL-1 β , caspase-1 และ β -actin หรือ Anti-rabbit IgG HPR-linked Antibody สำหรับแอนติบอดีต่อโปรตีน NLRP3 แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงล้าง secondary antibody ที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกด้วย 1X TBS buffer (pH 7.6) ที่มี 0.1% Tween 20 เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง และล้างด้วย 1X TBS buffer pH 7.6 เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติม ECL Substrate solution (Bio-Rad, USA) เพื่อตรวจวัดการแสดงผลของโปรตีน รวมถึงถ่ายภาพและบันทึกภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพ ImageQuant LAS 4000 Biomolecular Imager (GE Healthcare Life Sciences, UK) และวัดความเข้มของแถบโปรตีนด้วยโปรแกรม ImageJ นำค่าความเข้มของโปรตีนที่วัดได้ มาคำนวณค่าอัตราส่วนระหว่างการแสดงผลของโปรตีน NLRP3 หรือ IL-1 β หรือ caspase-1 ต่อโปรตีน β -actin วิเคราะห์ผลโดยเปรียบเทียบเซลล์ differentiated THP-1 ในสถานะที่ถูกกระตุ้นและไม่ถูกกระตุ้นด้วย MSU

การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical Analysis)

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean) \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD) และวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป IBM SPSS (Statistical Package for the Social Science for Windows) Version 26.0 software (Armonk, NY, USA) โดยใช้ค่าเฉลี่ยทดสอบเปรียบเทียบทางสถิติแบบ Independent samples *t*-test ที่ค่า *p*-Value น้อยกว่า 0.05 ($p < 0.05$) จะถือว่าข้อมูลมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง

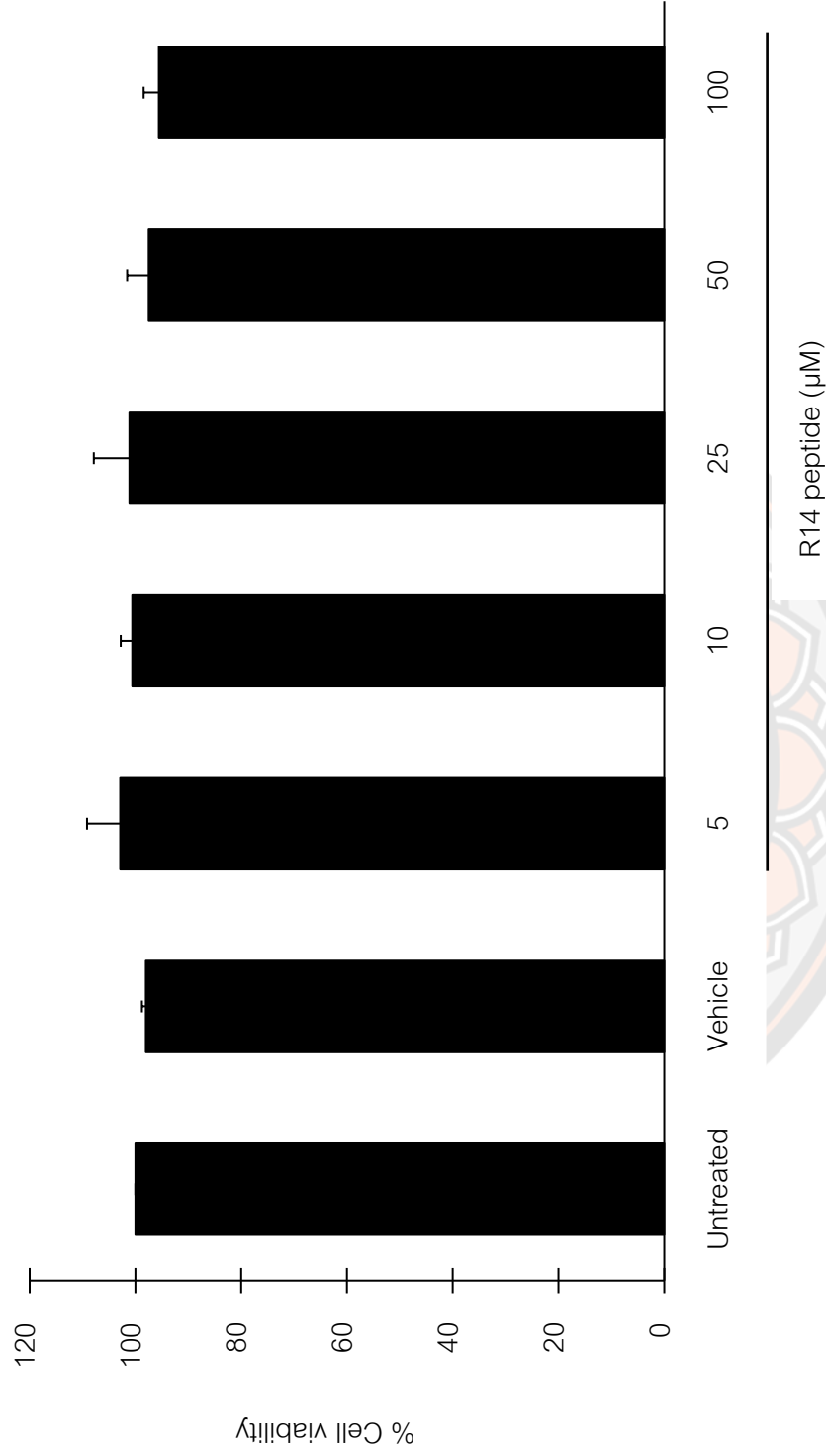
เพื่อศึกษาผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์เปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยศึกษาจากความสามารถในการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง ในการทดสอบนี้จึงได้นำเปปไทด์ R14 มาบ่มร่วมกับ 2% เม็ดเลือดแดงแกะ ผลแสดงดังตารางที่ 1 พบว่าเปปไทด์ R14 ที่ความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 μM มีค่า % Hemolysis ที่ใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ untreated control ที่มีเฉพาะเม็ดเลือดแดงที่บ่มร่วมกับ 1XPBS pH 7.4 นอกจากนี้ยังพบว่า % Hemolysis ของ vehicle control (DMSO) มีค่าใกล้เคียงและไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากศึกษาความสามารถในการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง แสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ R14 และ vehicle control ไม่มีฤทธิ์ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก ดังนั้นเปปไทด์ R14 จึงถูกคัดเลือกไปใช้ในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจต่อไป

ตารางที่ 1 ผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการแตกของเม็ดเลือดแดงโดยค่าที่แสดงเป็นค่า mean \pm SD จากการทดสอบ 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน

R14 peptide concentration (μM)	% Hemolysis
5	0
10	0.095 \pm 0.165
25	0.067 \pm 0.115
50	0.029 \pm 0.049
100	0.057 \pm 0.099
Vehicle control	0.019 \pm 0.033

ผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการมีชีวิตรอด (cell viability) ของเซลล์ differentiated THP-1

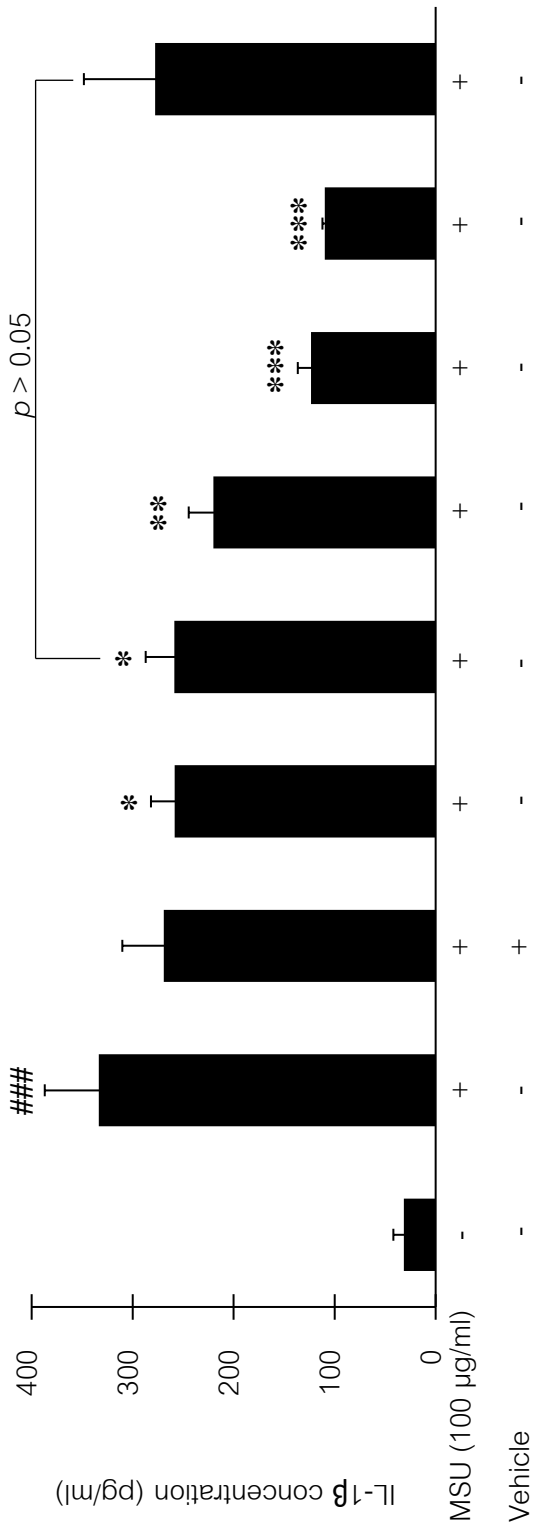
ผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ ได้แก่ เปปไทด์ R14 ต่อการมีชีวิตรอด (cell viability) ของเซลล์ differentiated THP-1 และศึกษาด้วยวิธี MTT assay แสดงดังภาพ 6 เมื่อบ่มเซลล์ differentiated THP-1 ร่วมกับเปปไทด์ R14 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่า % viability ของเซลล์ differentiated THP-1 ที่เลี้ยงร่วมกับเปปไทด์ R14 ที่ความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 μM มีค่าใกล้เคียงและไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ untreated control ที่มีเฉพาะเซลล์ differentiated THP-1 และไม่ได้เติมเปปไทด์ทดสอบ นอกจากนี้ยังพบว่า % viability ของ vehicle control ซึ่งเป็นเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกบ่มร่วมกับ DMSO มีค่าที่ใกล้เคียงและไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) จากผลการศึกษาที่ได้แสดงให้เห็นว่า เปปไทด์ R14 ที่ความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบทั้งหมด (5-100 μM) ให้ผลในทิศทางเดียวกันและไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ differentiated THP-1 ดังนั้นความเข้มข้นของเปปไทด์ R14 ที่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบจึงถูกคัดเลือกมาใช้ในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง IL-1 β ต่อไป



ภาพที่ 6 ผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ differentiated THP-1 ที่ความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 μM และทดสอบด้วยวิธี MTT assay, ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD จากการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน

ผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการสร้าง IL-1 β ในเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU

ผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ต่อการสร้างไซโตไคน์ชนิด IL-1 β ในเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU ศึกษาได้โดยนำเซลล์ differentiated THP-1 มาเลี้ยงร่วมกับ 100 $\mu\text{g/ml}$ MSU และเปปไทด์ R14 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ (5, 10, 25, 50 และ 100 μM) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นเก็บ supernatant และตรวจวัดปริมาณการสร้างไซโตไคน์ชนิด IL-1 β ด้วยวิธี sandwich ELISA ผลแสดงดังภาพ 7 ในภาพแสดงปริมาณการสร้าง IL-1 β เทียบกับเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU แต่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับสารทดสอบ ผลการทดลองพบว่า เซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU สามารถเหนี่ยวนำการสร้าง IL-1 β เพิ่มสูงขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะควบคุมที่มีเซลล์ differentiated THP-1 ไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วย MSU และเมื่อบ่มร่วมกับเปปไทด์ R14 พบว่า ทุกความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบสามารถยับยั้งการสร้าง IL-1 β ได้ในเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU ซึ่งปริมาณ IL-1 β ลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU แต่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับเปปไทด์ R14 ซึ่งมีผลการยับยั้งในลักษณะที่ตามความเข้มข้นของเปปไทด์ (dose-dependent manner) โดยมีค่า %inhibition อยู่ในช่วง 22 ถึง 67% (ภาพ 8) และเมื่อพิจารณาความสามารถในการยับยั้งการสร้าง IL-1 β ที่ 50% (half-maximal inhibitory concentration; IC₅₀) ของเปปไทด์ R14 พบว่า IC₅₀ มีค่าเท่ากับ 53.29 \pm 5.39% อย่างไรก็ตามเมื่อทำการศึกษาเช่นเดียวกัน โดยบ่มร่วมกับยา colchicine (ซึ่งเป็นยาต้านการอักเสบที่ใช้รักษาผู้ป่วยโรคเกาต์ในปัจจุบัน) พบว่ายา colchicine สามารถยับยั้งการสร้าง IL-1 β ได้ค่าใกล้เคียงและไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ differentiated THP-1 ที่กระตุ้นด้วย MSU และบ่มร่วมกับเปปไทด์ R14 ที่ความเข้มข้นเดียวกัน (10 μM) และเป็นที่น่าสังเกตว่าเปปไทด์ R14 สามารถยับยั้งการสร้าง IL-1 β ด้วย % inhibition ที่ใกล้เคียงกันกับยา colchicine อีกด้วย โดยมีค่าเท่ากับ 22.44% และ 16.70% ตามลำดับ จากผลข้างต้นแสดงให้เห็นว่า เปปไทด์ R14 มีความสามารถในการลดการสร้าง IL-1 β ในเซลล์แมคโคฟาจได้ทุก ๆ ความเข้มข้นที่ใช้ในการศึกษานี้ ดังนั้นเปปไทด์ R14 มีศักยภาพจึงนำไปศึกษาถึงกลไกเชิงลึกในการสร้าง IL-1 β ต่อไป

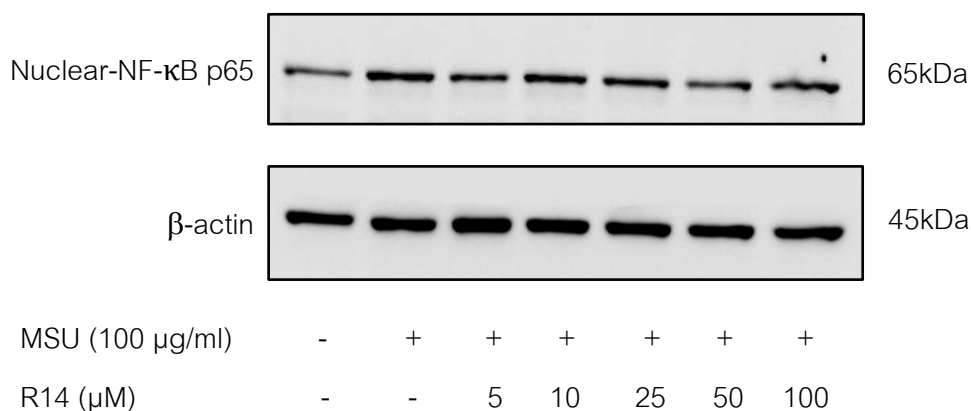


ภาพที่ 7 ผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการสร้าง IL-1β ในเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU โดยนำเซลล์ differentiated THP-1 บ่มร่วมกับ 100 µg/ml MSU และเปปไทด์ R14 หรือยา colchicine เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จึงเก็บ supernatant และวัดปริมาณ การสร้าง IL-1β ด้วยวิธี sandwich ELISA โดยค่าที่แสดงในภาพเป็นค่า mean ± SD จากการทดสอบอย่างน้อย 4 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน, ### $p < 0.001$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุมที่มีเฉพาะเซลล์ differentiated THP-1, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ และ *** $p < 0.001$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ เซลล์ differentiated THP-1 ที่ ถูก กระตุ้น ด้วย MSU อย่าง เดียว

ผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการแสดงออกของโปรตีนใน NF- κ B signaling pathway ในเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU

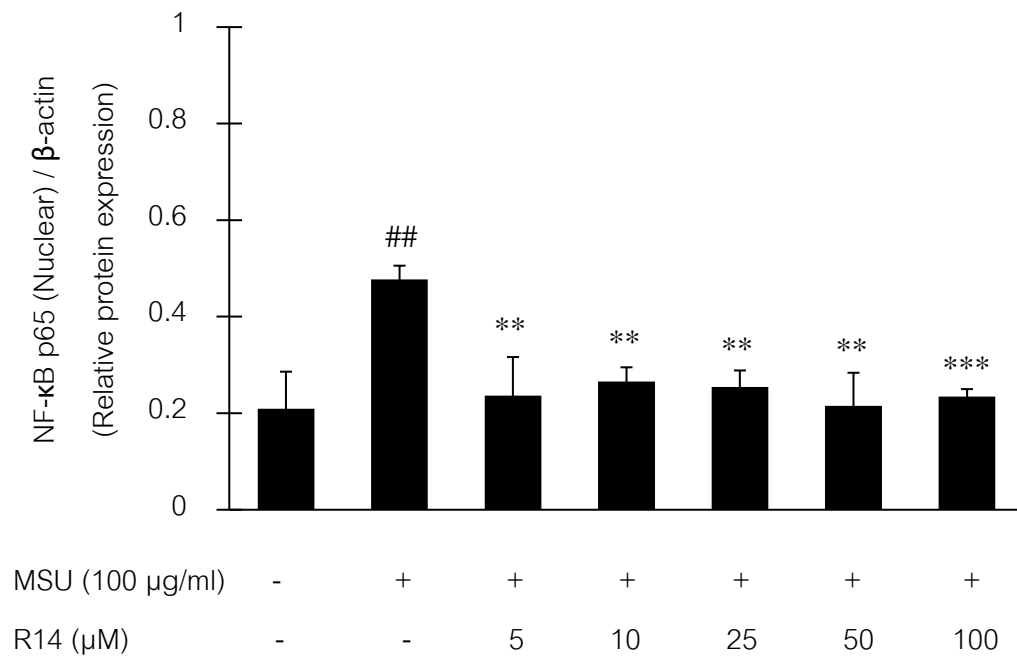
ผลของเปปไทด์ R14 ต่อการแสดงออกของโปรตีนใน NF- κ B signaling pathway คือ NF- κ B p65 ภายในนิวเคลียสของเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU โดยสกัดโปรตีนภายในนิวเคลียส และนำมาทดสอบด้วยวิธี Western Blot และผลของการแสดงออกโปรตีน NF- κ B p65 จะแสดงในรูปของ relative protein expression เปรียบเทียบกับโปรตีนควบคุม β -actin แสดงดังภาพที่ 8 ผลการทดลองพบว่า หลังจากที่เซลล์ differentiated THP-1 ถูกกระตุ้นด้วย MSU จะทำให้มีการแสดงออกของโปรตีน NF- κ B p65 ในนิวเคลียสเพิ่มขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีเฉพาะเซลล์ differentiated THP-1 เพียงอย่างเดียว และเมื่อเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU บ่มร่วมกับเปปไทด์ R14 พบว่า ทุกความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ (5 - 100 μ M) มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน NF- κ B p65 ในนิวเคลียสที่ลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ differentiated THP-1 ถูกกระตุ้นด้วย MSU เพียงอย่างเดียว ซึ่งมีผลการยับยั้งในลักษณะที่ตามความเข้มข้นของเปปไทด์

A)



ภาพที่ 8 ผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการแสดงออกของโปรตีนใน NF-κB signaling pathway ในเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU โดยเลี้ยงเซลล์ differentiated THP-1 บ่มร่วมกับ 100 μg/ml MSU และเปปไทด์ R14 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และทดสอบด้วยวิธี Western Blot assay (A) และกราฟของ relative protein expression ระหว่างโปรตีน NF-κB p65 ในนิวเคลียสเปรียบเทียบกับโปรตีน β-actin (B) ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD จากการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน, ## $p < 0.01$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุมที่มีเฉพาะเซลล์ differentiated THP-1 เพียงอย่างเดียว, ** $p < 0.01$ และ *** $p < 0.001$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU เพียงอย่างเดียว

B)



ภาพ 8 (ต่อ)



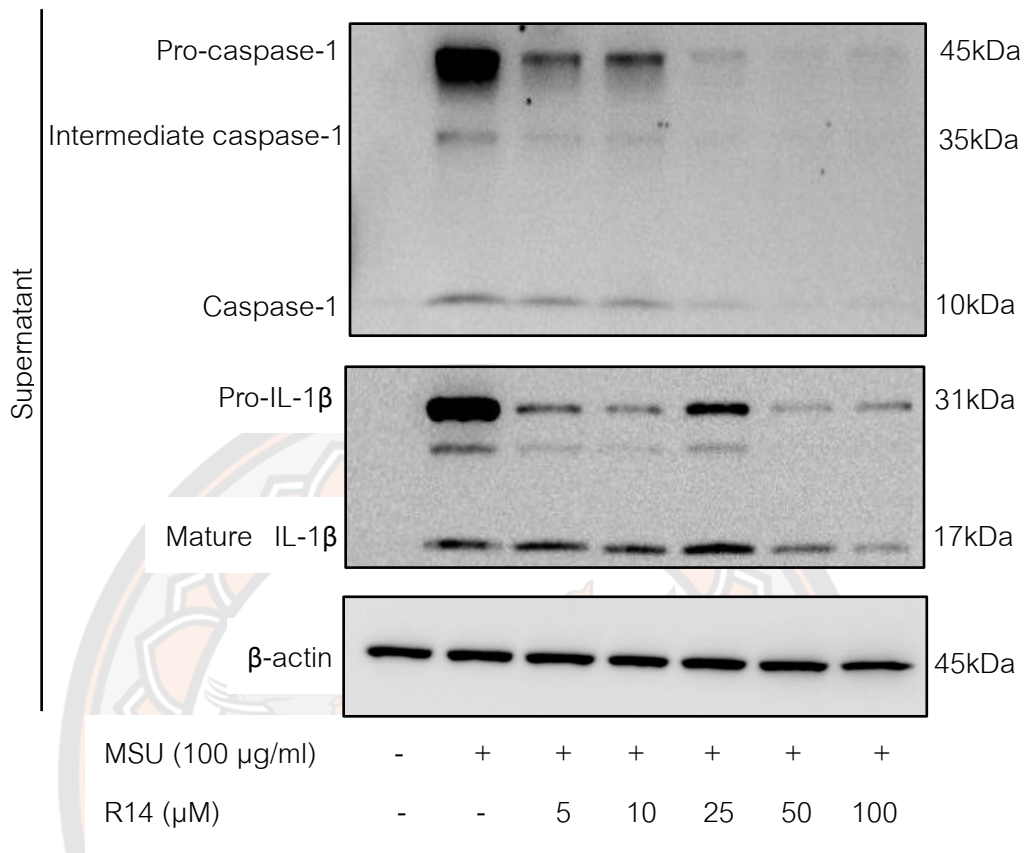
ผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการแสดงออกของโปรตีน caspase-1 และ IL-1 β ในเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU

ผลของเปปไทด์ R14 ต่อการแสดงออกของโปรตีน caspase-1 และ IL-1 β ในเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU โดยตัวอย่างโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนจาก supernatant นำมาตรวจวัดระดับการแสดงออกของโปรตีน caspase-1 และ IL-1 β และในรูปแบบที่โปรตีนทั้งสองยังไม่ถูกย่อย ได้แก่ pro-caspase-1 และ pro-IL-1 β ด้วยวิธี Western Blot และการแสดงออกโปรตีนดังกล่าวจะแสดงในรูปของ relative protein expression เปรียบเทียบกับโปรตีนควบคุม β -actin แสดงดังภาพที่ 9 ผลการทดลองพบว่า เซลล์ differentiated THP-1 ในสภาวะปกติที่ไม่ได้รับการกระตุ้นจาก MSU จะตรวจพบการแสดงออกของโปรตีนทั้งในรูปของ pro-caspase-1 (p45), intermediated caspase-1 (p35) และ caspase-1 (p10) ในระดับที่ต่ำ และเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย MSU ให้อยู่ในสภาวะอักเสบ สามารถเหนี่ยวนำให้ระดับการแสดงออกของโปรตีนได้ทั้ง 3 form เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) อย่างไรก็ตามในสภาวะเซลล์ที่บ่มร่วมกับเปปไทด์ R14 ที่ความเข้มข้นระหว่าง 5 ถึง 100 μ M พบว่า ทุกความเข้มข้นของเปปไทด์ R14 มีความสามารถในการลดระดับการแสดงออกของโปรตีนได้ทั้ง pro-caspase-1, intermediated caspase-1 และ caspase-1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของเปปไทด์ (dose-dependent manner) จากการกระตุ้นด้วย MSU (ภาพ 9B, 9C และ 9D) โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 100 μ M พบว่าเปปไทด์ R14 มีผลทำให้การแสดงออกของโปรตีน caspase-1 (p10) ลดลงได้ใกล้เคียงกับกลุ่มเซลล์ differentiated THP-1 ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วย MSU (ภาพ 9D) ในทำนองเดียวกันทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน pro-IL-1 β และ IL-1 β พบว่าในสภาวะปกติที่เซลล์ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย MSU จะมีการแสดงออกของโปรตีนทั้งในรูปของ pro-IL-1 β (p31) และ IL-1 β (p17) ในระดับที่ต่ำเช่นเดียวกัน และหลังจากเซลล์ differentiated THP-1 ถูกกระตุ้นด้วย MSU ส่งผลให้เซลล์เกิดการแสดงออกของโปรตีนทั้งในรูป pro-IL-1 β และ IL-1 β มีระดับที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีเฉพาะเซลล์ differentiated THP-1 เพียงอย่างเดียว แต่ในสภาวะที่มีเปปไทด์ R14 ที่ความเข้มข้นระหว่าง 5 ถึง 100 μ M พบว่า ระดับการแสดงออกของโปรตีน pro-IL-1 β และ IL-1 β จะลดลงตามความเข้มข้นของเปปไทด์ R14 ที่เพิ่มมากขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของเปปไทด์ (dose-dependent manner) (ภาพ 9E และ 9F) เช่นเดียวกับโปรตีน caspase-1 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เซลล์บ่มร่วมกับ

MSU โดยเฉพาะเปปไทด์ R14 ที่ความเข้มข้น 100 μ M สามารถลดระดับการแสดงออกของ IL-1 β (p17) ได้ใกล้เคียงกับกลุ่มที่มีเฉพาะเซลล์ differentiated THP-1 (ภาพ 9F) จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ R14 มีความสามารถในการลดการทำงานของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ inflammasome ได้

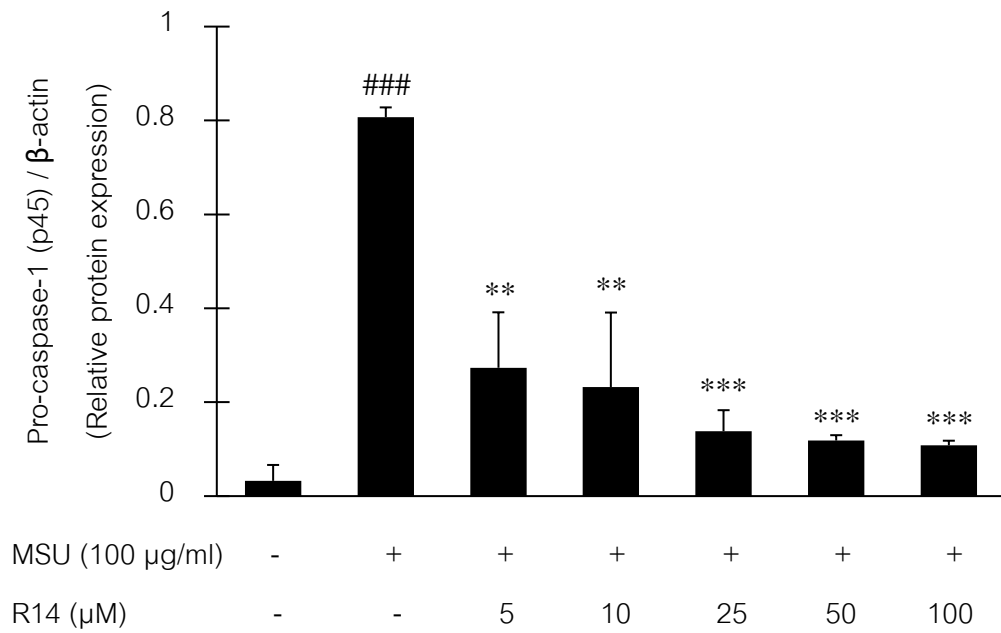


A)

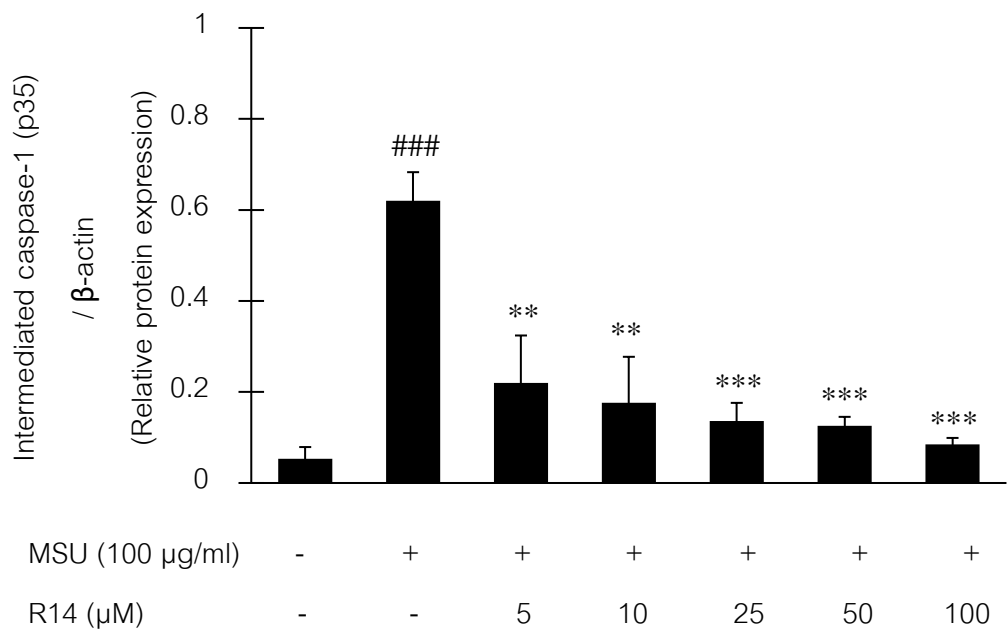


ภาพที่ 9 ผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการแสดงออกระดับโปรตีน caspase-1 และ IL-1 β ในเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU โดยเลี้ยงเซลล์ differentiated THP-1 ร่วมกับ 100 μ g/ml MSU และเปปไทด์ R14 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนใน supernatant นำมาทดสอบด้วยวิธี Western Blot assay (A) และกราฟของ relative protein expression ระหว่างโปรตีน pro-caspase-1, caspase-1, pro-IL-1 β และ IL-1 β เปรียบเทียบกับโปรตีน β -actin (B) ข้อมูลที่แสดงเป็นค่า mean \pm SD จากการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน, ### $p < 0.001$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุมที่มีเฉพาะเซลล์ differentiated THP-1 เพียงอย่างเดียว, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ และ *** $p < 0.001$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU เพียงอย่างเดียว

B)

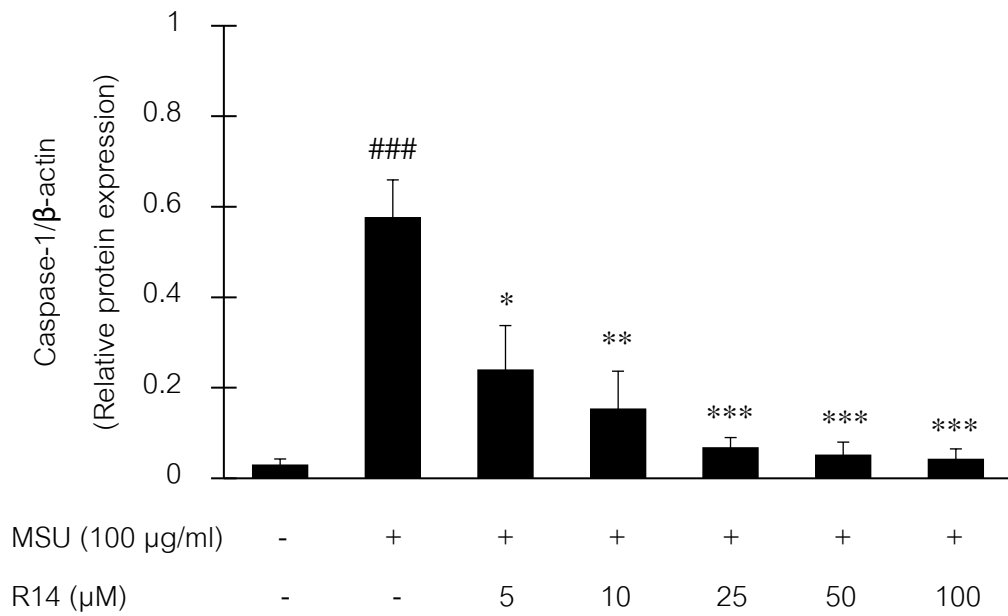


C)

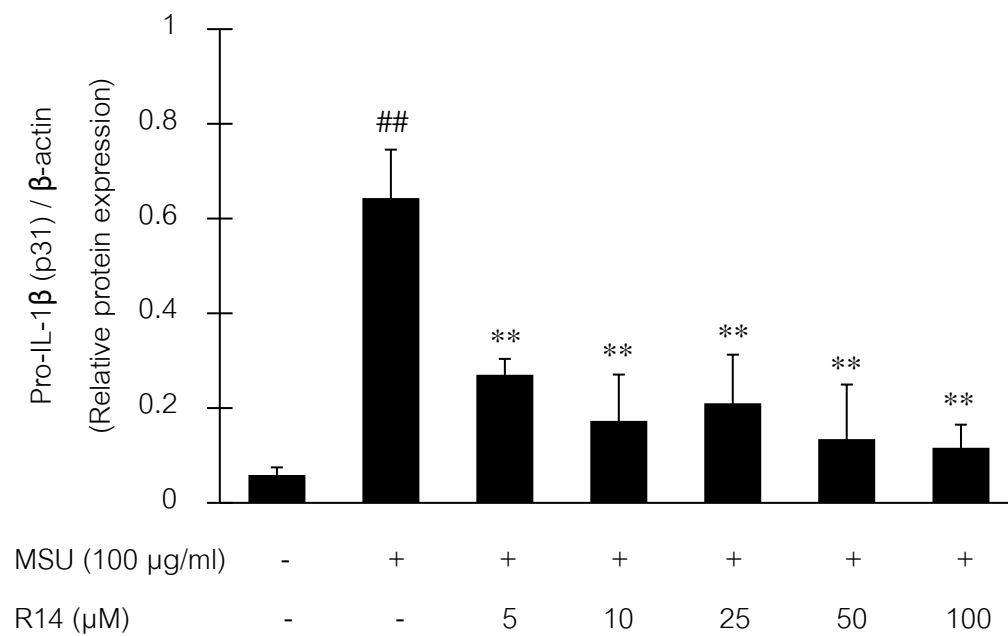


ภาพ 9 (ต่อ)

D)

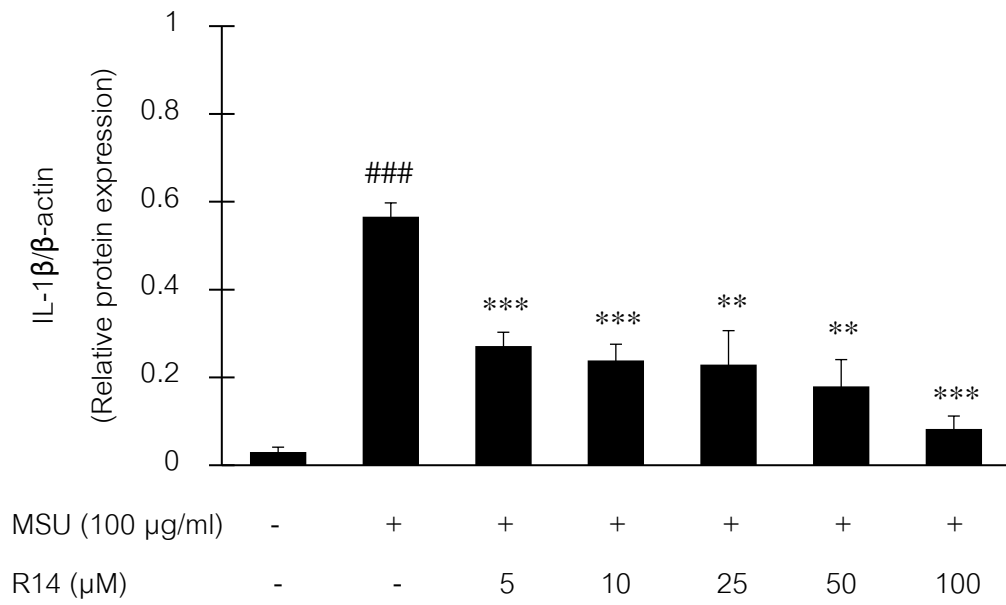


E)



ภาพ 9 (ต่อ)

F)



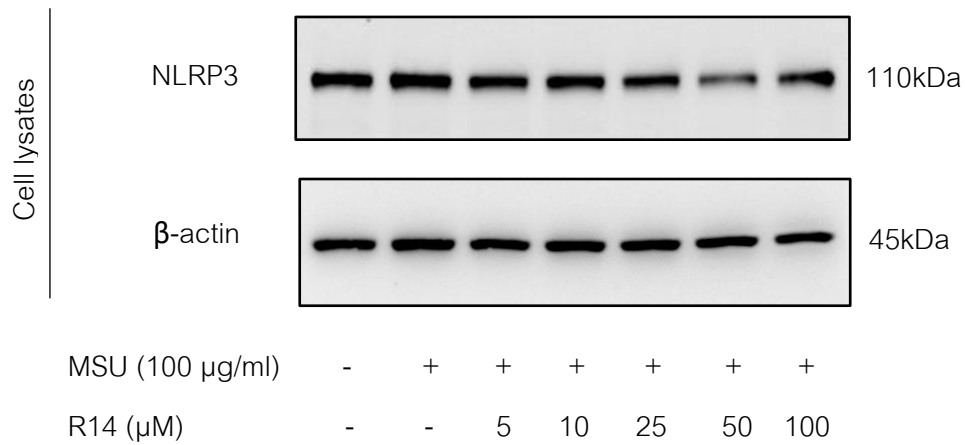
ภาพ 9 (ต่อ)



ผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการแสดงออกของโปรตีน NLRP3 inflammasome ในเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU

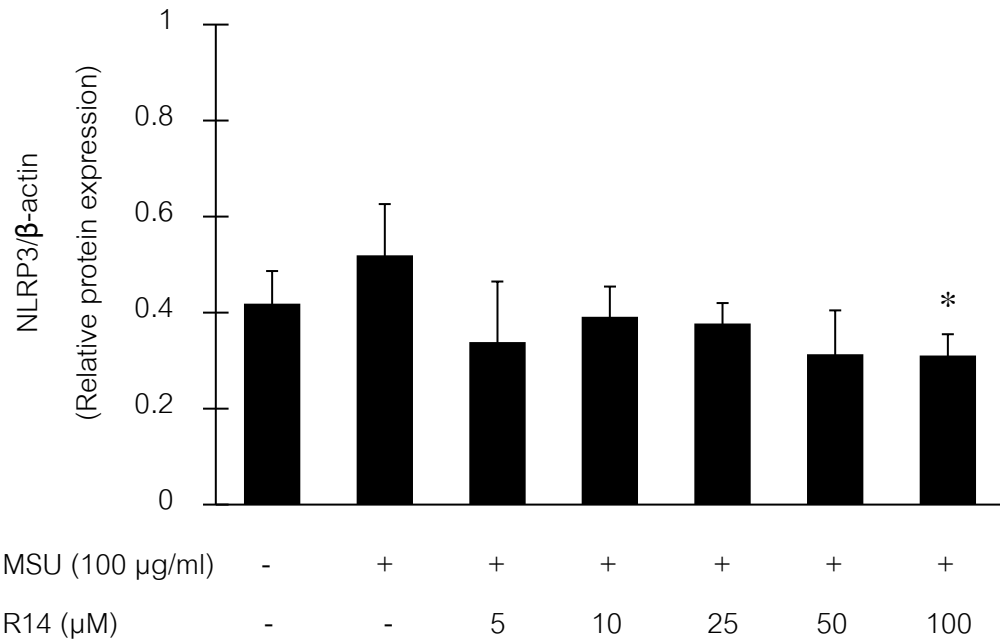
ผลของเปปไทด์ R14 ต่อการแสดงออกของโปรตีน NLRP3 inflammasome ในเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU โดยนำโปรตีนที่ได้จากเซลล์มาวิเคราะห์ด้วยวิธี Western Blot และข้อมูลแสดงในรูปของ relative protein expression ระหว่างโปรตีน NLRP3 เปรียบเทียบกับโปรตีนควบคุม β -actin ดังแสดงในภาพ 11 จากผลการทดลองพบว่า ในกลุ่มการทดลองที่มีเฉพาะเซลล์ differentiated THP-1 มีการแสดงออกของโปรตีน NLRP3 อยู่ในระดับที่สูงอยู่แล้วในสภาวะปกติที่ไม่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดภาวะอักเสบ และเมื่อเซลล์ differentiated THP-1 ได้รับการกระตุ้นด้วย MSU การแสดงออกของโปรตีนดังกล่าว จะเห็นได้ว่า MSU ไม่ส่งผลให้การแสดงออกของโปรตีน NLRP3 นั้นแตกต่างจากกลุ่มที่มีเฉพาะเซลล์ differentiated THP-1 ใดๆ ก็ตามเมื่อเซลล์ differentiated THP-1 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย MSU และบ่มร่วมกับเปปไทด์ R14 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จะพบว่าผลของเปปไทด์ R14 ที่ความเข้มข้น 100 μ M สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน NLRP3 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เซลล์ดังกล่าวบ่มร่วมกับ MSU เพียงอย่างเดียว

A)



ภาพที่ 10 ผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการแสดงออกระดับโปรตีน NLRP3 ในเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU โดยเลี้ยงเซลล์ differentiated THP-1 ร่วมกับ 100 μg/ml MSU และเปปไทด์ R14 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นำโปรตีนที่สกัดได้จากเซลล์ มาวิเคราะห์ด้วยวิธี Western Blot assay (A) และกราฟของ relative protein expression ระหว่างโปรตีน NLRP3 เปรียบเทียบกับโปรตีน β-actin (B) ข้อมูลที่แสดงเป็นค่า mean ± SD จากการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน, * $p < 0.05$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ differentiated THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU เพียงอย่างเดียว

B)



บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 ต่อการยับยั้งการอักเสบที่เกิดจากโมโนไซเตียมยูเรต ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า เปปไทด์ R14 ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนทั้งหมด 7 ตัว คือ ILIILDD ในทุกความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ (5-100 μM) ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเม็ดเลือดแดง นอกจากนี้เปปไทด์ R14 ยังไม่แสดงความเป็นพิษใด ๆ ต่อเซลล์แมคโครฟาจ เมื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ พบว่า เปปไทด์ R14 มีความสามารถในการยับยั้งการสังเคราะห์สื่อกลางการอักเสบที่สำคัญอย่าง IL-1 β ในเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับกระตุ้นด้วยโมโนไซเตียมยูเรต ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในลักษณะที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเปปไทด์ และเมื่อนำมาศึกษากลไกการออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้อง พบว่าการยับยั้งการหลั่ง IL-1 β ในเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับกระตุ้นด้วยโมโนไซเตียมยูเรต โดยเปปไทด์ R14 เป็นผลมาจากการยับยั้งในกระบวนการ NF- κ B signaling pathway โดยผ่านการลดการแสดงออกของโปรตีน NF- κ B p65 ภายในนิวเคลียส รวมทั้งยังเป็นผลมาจากการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ NLRP3 inflammasome pathway ได้แก่ ลดการแสดงออกของโปรตีน pro-caspase-1, caspase-1, pro-IL-1 β และ IL-1 β ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งการทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์จะเป็นข้อมูลสำคัญที่ยืนยันถึงฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบของเปปไทด์ R14 จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ประสิทธิภาพของเปปไทด์ R14 ในการยับยั้งการอักเสบที่เกิดจากโมโนไซเตียมยูเรต เป็นเปปไทด์ที่มีแนวโน้มที่ดีที่จะนำมาใช้เป็นทางเลือกในการลดการอักเสบที่อักเสบที่เกิดจากโมโนไซเตียมยูเรต อีกทั้งงานวิจัยนี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่อาจนำความรู้ต่อยอด เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นยาที่ใช้รักษาโรคเกาต์ต่อไป

อภิปรายผล

โรคเกาต์ เป็นโรคที่พบเป็นอันดับหนึ่งในกลุ่มโรคข้ออักเสบ (inflammatory arthritis diseases) โดยมีสาเหตุมาจากการสะสมของผลึกโมโนโซเดียมยูเรต (MSU) ภายในข้อต่อ และเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของร่างกาย ทำให้เกิดการอักเสบอย่างรุนแรงส่งผลให้ผู้ป่วยโรคเกาต์มีอาการ บวม ผื่นแดง และทำให้มีความเจ็บปวดแบบรุนแรงที่ข้อต่อ (Hainer et al., 2014; Towiwat et al., 2019) ถึงแม้ว่าโรคเกาต์จะเป็นโรคที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายรุนแรงถึงแก่ชีวิต แต่พยาธิสภาพของโรคส่งผลกระทบต่อการใช้ชีวิตประจำวันของผู้ป่วยทำให้ต้องทนทุกข์ทรมานกับอาการเจ็บปวดที่เกิดขึ้น นอกจากนี้ในผู้ป่วยในรายเรื้อรังหรือไม่ได้รับการรักษาในระยะนานจะทำให้เกิดข้อต่อผิดรูปหรือถูกทำลายจนเกิดความพิการและใช้งานไม่ได้ โรคเกาต์จึงเป็นปัญหาสำคัญที่สร้างผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตที่ดีของผู้ป่วยและครอบครัว (Dalbeth et al., 2016; Dehlin et al., 2020) การรักษาทางคลินิกของโรคเกาต์ใช้ยา corticosteroids, กลุ่มยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDs) และยา colchicine เพื่อบรรเทาอาการปวดและอักเสบของข้อ อย่างไรก็ตามควรใช้รักษาในระยะที่สั้น และจำเป็นต้องได้รับคำแนะนำจากแพทย์ เนื่องจากมีการรายงานของผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยาเหล่านี้มีผลข้างเคียงที่รุนแรงหลายประการ ตัวอย่างเช่น ผู้ป่วยที่ได้รับยากลุ่ม NSAIDs มีผลข้างเคียง ได้แก่ มีเลือดออกในกระเพาะอาหาร (gastric bleeding) และไตได้รับความเสียหาย เป็นต้น และ colchicine ซึ่งเป็นยาสำคัญตัวหนึ่งในการรักษาโรคเกาต์ในปัจจุบัน มีรายงานพบว่าผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยา colchicine มากกว่าร้อยละ 80 มีอาการข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์เกิดขึ้น ได้แก่ มีอาการคลื่นไส้ และอาเจียน และยังมีภาวะท้องเสียร่วมด้วย จึงต้องใช้ยาภายใต้คำแนะนำของแพทย์เท่านั้น อีกทั้งมีราคาค่อนข้างสูง และไม่มีฤทธิ์ระงับอาการปวด และมีประสิทธิภาพน้อยในการใช้รักษาโรคเกาต์ระยะเฉียบพลัน (acute gout flares) เมื่อให้ยาเกิน 72 ถึง 96 ชั่วโมง หลังจากเริ่มมีอาการของโรค (Khanna et al., 2012; Zhang et al., 2006) ดังนั้นจึงยังมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการค้นคว้าวิจัยหายา หรือสารต่าง ๆ มีความปลอดภัยสูง และมีประสิทธิภาพที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นทางเลือกสำหรับใช้รักษาโรคเกาต์ได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

ในงานวิจัยครั้งนี้ ได้นำเปปไทด์ออกฤทธิ์ที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ คือ เปปไทด์ R14 มาศึกษาถึงผลที่มีต่อการยับยั้งการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นจาก MSU รวมถึงศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของเปปไทด์ R14 ที่ยับยั้งการอักเสบ โดยเปปไทด์ออกฤทธิ์ R14 เป็นเปปไทด์

ที่สังเคราะห์ได้จากใบของข้าวป่าสายพันธุ์ *Oryza minuta* และเบื้องต้นได้รับการทดสอบว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพ (Moung-ngam et al., 2020) ยกเว้นการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นจาก MSU จากการศึกษาที่ผ่านมาชี้ให้เห็นว่า MSU เป็นสาเหตุสำคัญของการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะอักเสบในโรคเกาต์ โดยการตอบสนองต่อ MSU นำไปสู่การเจริญเต็มที่ (maturation) และการปลดปล่อย cytokine หลายชนิด ได้แก่ interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6) และ Tumor Necrosis Factor- α (TNF) เป็นต้น (Martinon et al., 2006; Strowig et al., 2012) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง cytokine ชนิด IL-1 β เป็นสารสื่อกลางการอักเสบที่สำคัญชนิดหนึ่งที่มีบทบาทในการกระตุ้นทำให้เกิดการอักเสบในเนื้อเยื่อต่าง ๆ และก่อให้เกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อบริเวณข้อต่อที่อักเสบ (Schlesinger & Thiele, 2010) จากงานวิจัยหลายฉบับได้พิสูจน์ว่า IL-1 β มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดพยาธิสภาพในโรคเกาต์ และทำให้การดำเนินการของโรคเพิ่มมากขึ้น (Joosten et al., 2010; Liu-Bryan, 2010; Martinon et al., 2006; Rock et al., 2013) จากการศึกษาของ Reber et al. (2014) ทำการศึกษา murine gout model โดยให้หนูทดลองเกิดสภาวะอักเสบโดยการฉีดผลึกของ MSU เข้าสู่ข้อเข่า พบว่าผลึก MSU เหนี่ยวนำให้สร้าง IL-1 β ที่เพิ่มมากขึ้น และระดับ IL-1 β ยังมีความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพของโรค และสอดคล้องกับความรุนแรงของอาการบวมของเนื้อเยื่อ (tissue swelling) ข้อเข่าของหนู นอกจากนี้ยังได้รายงานการพบระดับ IL-1 β ในน้ำไขข้อ (synovial fluids) ของผู้ป่วยโรคเกาต์ สูงกว่าผู้ป่วยโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) และจากการรายงานที่ผ่านมาของ Crişan et al. (2016) ได้ทำการศึกษา peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคเกาต์และผู้ป่วยที่มีสุขภาพดี โดยนำเซลล์กระตุ้นด้วย uric acid ที่ความเข้มข้นสูง พบว่า เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย uric acid ทำให้ PBMC ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคเกาต์สร้างระดับของ IL-1 β สูงขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่มีสุขภาพดี นอกจากนี้ยังพบว่า uric acid สามารถเหนี่ยวนำให้ PBMC ที่ได้จากผู้ป่วยที่มีสุขภาพดีสร้าง IL-1 β ได้เช่นเดียวกัน จากความสัมพันธ์ดังกล่าว การยับยั้ง IL-1 β จึงเป็นเป้าหมายสำคัญในการรักษาการอักเสบ โดยเฉพาะที่เกิดจากผลึก MSU และลดการเกิดพยาธิสภาพของโรคเกาต์ได้ผลดียิ่งขึ้น ในงานวิจัยนี้เป็นการรายงานครั้งแรกถึงประสิทธิภาพของเปปไทด์ R14 ต่อการยับยั้งการอักเสบที่จำเพาะต่อสารสื่อกลางการอักเสบที่สำคัญอย่าง IL-1 β ในเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นจาก MSU โดยใช้เปปไทด์ R14 มาทดสอบพร้อมกับเซลล์ที่มีการอักเสบ (co-treatment) แล้วจึงวัดระดับ IL-1 β ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ ด้วยเทคนิค ELISA จากผล

การศึกษาพบว่า เปปไทด์ R14 มีฤทธิ์ลดการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบ IL-1 β ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU ให้อยู่ในสภาวะอักเสบได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีผลยับยั้งเป็นไปตามความเข้มข้นของเปปไทด์ (dose-dependent manner) เมื่อเทียบกับเซลล์แมคโครฟาจ THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU เพียงอย่างเดียว (ภาพ 8) โดยการทดสอบครั้งนี้ฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบของเปปไทด์ดังกล่าวเป็นผลมาจากเปปไทด์โดยตรง เนื่องจากเปปไทด์ R14 ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ THP-1 (ภาพ 6) แม้ว่าจะทดสอบกับเปปไทด์ที่ความเข้มข้น 100 μ M และ vehicle control (DMSO) ในปริมาณที่ใช้ละลายเปปไทด์ R14 ก็ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ THP-1 เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่าเปปไทด์ R14 สามารถลดการสร้าง IL-1 β ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU เมื่อทำให้อยู่ในสภาวะอักเสบด้วย % inhibition ที่ใกล้เคียงกันกับยา colchicine (10 μ M) ในขณะที่ใช้ความเข้มข้นของเปปไทด์เท่ากับยา colchicine ซึ่งเป็นยาที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคเกาต์ จากความสามารถในการยับยั้งการสร้าง IL-1 β แสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ R14 ให้ประสิทธิภาพที่ใกล้เคียงกันกับยา colchicine ถึงแม้ว่ายา colchicine เป็นยาสำคัญตัวหนึ่งในการรักษาโรคเกาต์อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เพื่อให้บรรเทาอาการปวดและอักเสบของข้อ อย่างไรก็ตามมีการรายงานผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นกับผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยา colchicine โดยอาการข้างเคียงที่สำคัญและพบได้บ่อยจากการใช้ยา คือ อาการท้องร่วง (diarrhea), อาการที่ไม่พึงประสงค์ต่อระบบทางเดินอาหาร (คลื่นไส้ หรือ อาเจียน), มีผลต่อไต และตับ เป็นต้น (Leung et al., 2015) จากการศึกษาของ Terkeltaub et al. (2010) ที่ได้ศึกษาผู้ป่วยโรคเกาต์ทั้งหมด 184 ราย โดยสุ่มให้ยา colchicine ในขนาดสูงและขนาดต่ำ โดยผู้ป่วยที่ได้รับยา colchicine ในปริมาณ 1.8 มิลลิกรัม (low-dose) ภายในระยะเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าผู้ป่วยมีอาการไม่พึงประสงค์ ร้อยละ 23% เกิดอาการท้องร่วง และ 3% เกิดอาการปวดคอหอย (pharyngolaryngeal pain) นอกจากนี้ในผู้ป่วยที่ได้รับยาในปริมาณที่สูงถึง 4.8 มิลลิกรัม (high-dose) ภายในระยะเวลา 6 ชั่วโมง (high-dose) พบว่ามีการเพิ่มสูงขึ้นของอาการข้างเคียงที่เกี่ยวข้องต่อระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal side effects) โดยร้อยละ 76.9% เกิดอาการท้องร่วง, ร้อยละ 19.2% เกิดการอาเจียน และร้อยละ 17.3% เกิดอาการท้องร่วงอย่างรุนแรง การรักษาโรคเกาต์เฉียบพลันโดยทั่วไปจึงแนะนำให้ใช้ยา colchicine ในขนาดต่ำ โดยเริ่มรักษาไม่เกิน 1.8 มิลลิกรัมต่อวัน ครั้งละ 0.6 มิลลิกรัม 1 ถึง 2 ครั้งต่อวันจนอาการข้ออักเสบหายสนิท หรือ 0.5 มิลลิกรัม 3 ครั้งต่อวัน หรือสูงสุด 2.0 มิลลิกรัมต่อวันจนอาการข้ออักเสบหายสนิท) (Sivera et al.,

2014) เนื่องจากความเป็นพิษจากระดับของยา colchicine ที่สูงขึ้นส่งผลให้เกิดผลข้างเคียงที่เพิ่มมากขึ้น จึงเป็นข้อจำกัดของการใช้ยา colchicine ในการใช้รักษาทางคลินิก (Dvorak et al., 2007; Khanna et al., 2014) รวมทั้งยังมีการรายงานภาวะแทรกซ้อนจากการใช้ยา colchicine ในปริมาณที่ใช้รักษาปกติ (therapeutic doses of colchicine) ได้แก่ ภาวะโลหิตจาง (blood dyscrasias), กดการทำงานของไขกระดูก (myelosuppression), ภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (leukopenia), ภาวะเกล็ดเลือดต่ำ (thrombocytopenia), และภาวะไขกระดูกฝ่อ (aplastic anemia) เป็นต้น (Leung et al., 2015) นอกจากนี้ยังมีรายงานในผู้ป่วยที่รักษาด้วยยา colchicine เป็นระยะเวลายาวนานหรือการใช้ยาในขนาดที่สูงกว่าขนาดของยาที่ใช้ในการรักษาปกติ อาจเป็นพิษต่อระบบต่าง ๆ ของร่างกาย และทำให้เกิดผลข้างเคียงที่รุนแรงได้ โดยมิผลต่อการทำงานของระบบไตบกพร่อง (renal impairment), ภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (myopathy), และภาวะกล้ามเนื้อลายสลาย (rhabdomyolysis) ซึ่งการเกิดภาวะผิดปกติเหล่านี้เพิ่มโอกาสให้เกิดอันตรายแก่ชีวิตของผู้ป่วยได้ (Morris et al., 2003; Richette et al., 2014) แสดงให้เห็นว่าการรักษาด้วยยา colchicine ต้องใช้ยาภายใต้คำแนะนำของแพทย์ และพิจารณาให้ในขนาดที่เหมาะสมในผู้ป่วยแต่ละราย และใช้ยาระยะเวลาตามที่แพทย์แนะนำเท่านั้น ผลที่ได้รับจากการศึกษาครั้งนี้จึงแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของเปปไทด์ R14 ต่อการยับยั้งการสร้าง IL-1 β ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU ได้เป็นอย่างดี อีกทั้งงานวิจัยนี้ได้ศึกษาแน่ชัดว่าฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบของเปปไทด์ R14 ไม่ได้เป็นผลมาจากการตายของเซลล์ทดสอบ และเมื่อคำนึงถึงคุณสมบัติในการนำสารใด ๆ ไปพัฒนาต่อเป็นยาที่ใช้สำหรับรักษาโรคต่าง ๆ นั้น โดยปัจจัยที่เป็นอุปสรรคต่อการพัฒนายาคือ ความเป็นพิษของสาร เพื่อให้มั่นใจถึงความปลอดภัยในการนำเปปไทด์ไปใช้จึงเป็นเรื่องที่จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาความเป็นพิษของเปปไทด์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาถึงความเป็นพิษของเปปไทด์ R14 ต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง ผลการทดลองพบว่าทุกความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบของเปปไทด์ R14 ไม่ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก แสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ R14 มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงในระดับที่ต่ำมาก จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำเปปไทด์ R14 ไปพัฒนาเป็นยาใช้สำหรับรักษาการอักเสบที่เกิดจาก MSU และนำไปพัฒนาเป็นยาทางเลือกหนึ่งสำหรับใช้รักษาโรคเกาต์ได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

จากความสามารถของเปปไทด์ R14 ในการยับยั้งการสร้าง IL-1 β จึงได้มีการศึกษาต่อถึงกลไกที่ใช้ในการยับยั้งการสร้าง IL-1 β โดยได้ทำการศึกษาผลของเปปไทด์ R14 ต่อการแสดงออก

ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ NF- κ B signaling pathway และ NLRP3 inflammasome pathway ในเซลล์แมคโครฟาจ THP-1 ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย MSU เนื่องจากกลไกที่ใช้ในการสร้าง IL-1 β มีความแตกต่างจากการสร้าง cytokine ชนิดอื่น ๆ และมีการควบคุมอย่างเข้มงวด จำเป็นต้องอยู่ภายใต้การควบคุมผ่าน 2 signal (two-step process) (So et al., 2018) โดย signal ที่ 1 เป็นการส่งสัญญาณผ่าน NF- κ B signaling pathway เป็นการควบคุมในระดับการถอดรหัสของยีน เพื่อแปลรหัสเป็นโปรตีนในรูป pro-IL-1 β (31-kDa) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ยังไม่สามารถกระตุ้นการอักเสบได้ ในขณะที่เดียวกันยังควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ NLRP3 inflammasome ได้แก่ NLRP3, ASC, และ pro-caspase-1 (Guo et al., 2015; Mariotte et al., 2020) และ signal ที่ 2 เป็นการควบคุมการหลั่ง IL-1 β (17-kDa) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ caspase-1 ย่อยโปรตีน pro-IL-1 β ให้อยู่ในรูป active IL-1 β เป็นรูปแบบพร้อมที่จะหลั่งออกภายนอกเซลล์ และทำหน้าที่กระตุ้นการอักเสบได้ โดย NF- κ B เป็น transcription factors ที่มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองของเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันและการอักเสบ รวมถึงเกี่ยวข้องกับกลไกควบคุมการแสดงออกของยีนจำนวนมากที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ และควบคุมการสังเคราะห์ proinflammatory mediators ต่าง ๆ ในการอักเสบ (Taniguchi & Karin, 2018) ในโรคเกาต์การสังเคราะห์ IL-1 β เกิดขึ้นเมื่อเซลล์แมคโครฟาจได้รับการกระตุ้นด้วย MSU โดยมีรายงานว่า MSU จะเข้าจับกับ TLR2/4 receptor (Crişan et al., 2016) และ CD14 จะส่งสัญญาณเข้าไปภายในเซลล์ต่อเนื่องผ่านการกระตุ้นการทำงานของ adaptor protein MyD88 และส่งสัญญาณกระตุ้นผ่านกระบวนการ NF- κ B signaling pathway โดยจะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ I κ B kinase (IKK) ซึ่งทำหน้าที่เติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ให้กับโปรตีน inhibitors of NF- κ B (I κ B) ที่จับอยู่กับ NF- κ B transcription factor (NF- κ B : I κ B complex) อยู่ในไซโตพลาสซึม และเมื่อโปรตีน I κ B ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตจะส่งผลให้ถูกย่อยสลาย (ubiquitination) และแยกตัว (degradation) ออกจาก NF- κ B ทำให้ NF- κ B อยู่ในรูปของโปรตีน dimers ที่ประกอบไปด้วยโปรตีน p65 และ p50 subunits (Oeckinghaus & Ghosh, 2009) เมื่อ NF- κ B เป็นอิสระทำให้ NF- κ B จะเคลื่อนที่จากไซโตพลาสซึมเข้าสู่ภายในนิวเคลียส (nuclear translocation) (Korwek et al., 2016; Van Essen et al., 2009) จึงไปจับกับตำแหน่งของดีเอ็นเอเป้าหมาย (NF- κ B binding site) ที่บริเวณ promotor (Liang et al., 2013) ทำให้เกิดกระบวนการ transcription และ translation ของยีน และการสังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ จากนั้นเซลล์แมคโครฟาจ

จะหลัง pro-inflammatory cytokine ส่งออกสู่นอกเซลล์ และก่อให้เกิดการอักเสบต่อไป (Ben-Neriah & Karin, 2011; Cheon et al., 2009) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง NF- κ B p65 ถือว่าเป็นโมเลกุลเป้าหมายหนึ่งที่สำคัญในการยับยั้งการอักเสบ (Giridharan & Srinivasan, 2018) และการกระตุ้นผ่าน NF- κ B signaling pathway เป็นวิธีหลักในการตอบสนองต่อการกระตุ้นจาก MSU รวมทั้งยังมีความสัมพันธ์ต่อกระบวนการอักเสบในโรคเกาต์ (Wu et al., 2020) จึงเป็นเหตุผลที่งานวิจัยนี้จะศึกษาการแสดงของโปรตีน NF- κ B p65 ใน signal 1 โดยงานวิจัยนี้จากการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนโดยเทคนิค western blot พบว่า MSU สามารถกระตุ้นการอักเสบผ่าน NF- κ B pathway ได้ มีผลกระตุ้นการแสดงออกของ NF- κ B p65 ภายในนิวเคลียสของเซลล์แมคโครฟาจ THP-1 เมื่อเทียบกับเซลล์ดังกล่าวที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย MSU และเมื่อทำการ treatment เซลล์แมคโครฟาจ THP-1 ด้วยเปปไทด์ R14 พบว่าเปปไทด์ R14 สามารถลดระดับการแสดงออกของโปรตีน NF- κ B p65 ในนิวเคลียสในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการแสดงออกของโปรตีนลดลงไปตามความเข้มข้นของเปปไทด์ที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 9) โดยเฉพาะเปปไทด์ที่ความเข้มข้น 100 μ M มีผลลดการแสดงออกของโปรตีน NF- κ B p65 ที่ใกล้เคียงกับเซลล์แมคโครฟาจที่ไม่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดสภาวะอักเสบอีกด้วย ซึ่ง NF- κ B มีหน้าที่ในการควบคุมการตอบสนองต่อการอักเสบ โดยการลดการทำงานของ transcription factor NF- κ B pathway นี้จะทำให้ลดการแสดงออกของโปรตีน NF- κ B subunit ส่งผลให้มีการสร้าง cytokine ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบลดลงด้วย (Chen, 2019; Wang et al., 2021) นอกจากนี้มีรายงานวิจัยที่พบว่า เมื่อยับยั้งการทำงานของ NF- κ B ด้วย Bay11-7082 (specific inhibitor of NF- κ B) นอกจากสามารถลดการแสดงออกของ pro-IL-1 β ยังสามารถลดการแสดงออกของ NLRP3 inflammasome ได้ (Bauernfeind et al., 2009) ซึ่ง NF- κ B เป็นองค์ประกอบที่สำคัญต่อการกระตุ้นการแสดงออกของ NLRP3, ASC และ pro-caspase-1 (Guo et al., 2015; Mariotte et al., 2020) การศึกษาในปี 2019 พบว่าการแสดงออกของ RelA (p65) ซึ่งเป็น subunit ของ transcription factor NF- κ B มีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของ NIMA-related kinase 7 (NEK7) ซึ่ง NEK7 เป็น regulatory protein ที่มีความเกี่ยวข้องการส่งเสริมให้เกิดการ assembly ของ NLRP3 inflammasome (Chen et al., 2019) นอกจากนี้ NF- κ B ยังควบคุมการแสดงออกของ gasdermin-D (GSDMD) ที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบ pyroptosis (Liu et al., 2017) ซึ่งเป็นรูปแบบการตายของ pro-inflammatory cell death (Aglietti et al., 2016) ดังนั้นจากผล

การศึกษากลไกใน signal 1 เป็นไปได้ว่า การที่เปปไทด์ R14 ลดการแสดงออกของโปรตีน NF- κ B p65 ในครั้งนี้อาจเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของ NLRP3 inflammasome รวมทั้งการควบคุมการแสดงออกของโปรตีน pro-IL-1 β อีกด้วย และทำการศึกษาลดการแสดงออกของโปรตีน NLRP3, caspase-1 และ IL-1 β ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ในส่วนของ signal 2 โดยผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่า เปปไทด์ R14 ทำให้การแสดงออกของโปรตีน caspase-1 ลดลงได้ทั้งรูปแบบที่โปรตีนยังไม่ถูกย่อย (pro-caspase-1) และถูกย่อย (caspase-1) ตลอดจนสามารถลดระดับการแสดงออกของโปรตีน pro-IL-1 β และ IL-1 β ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการแสดงออกของโปรตีนลดลงตามความเข้มข้นของเปปไทด์ที่เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะเปปไทด์ที่ความเข้มข้น 100 μ M มีผลลดการแสดงออกของโปรตีนทั้ง 4 ได้ใกล้เคียงกับเซลล์แมคโครฟาจที่ไม่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดสภาวะอักเสบด้วย ซึ่งการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-1 นี้เกิดขึ้นผ่านการประกอบตัวขึ้น (assembly) ของ inflammasome complex ส่งผลไปสู่การย่อยตนเอง (autocatalytic) ของ pro-caspase-1 เป็น caspase-1 โดยการทำงานของเอนไซม์ caspase-1 นี้มีความสำคัญในการเป็นสื่อกลางที่ทำให้เกิดการอักเสบโดยควบคุมการสร้าง mature IL-1 β จากการย่อย pro-IL-1 β ที่มาจาก signal 1 (Molla et al., 2020) และนอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับวิถีการตายแบบ pyroptosis โดยเอนไซม์ caspase-1 ย่อย gasdermin-D และกระตุ้นการทำงานของ N-terminal domain ของ gasdermin-D ไปจับกับ plasma membrane ของเซลล์ส่งผลให้เกิดรู ทำให้ IL-1 β ปลั่งออกสู่นอกเซลล์ได้ (Keller et al., 2008) จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การที่เปปไทด์ R14 สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ IL-1 β และลดการแสดงออกของโปรตีน IL-1 β ซึ่งผลส่วนหนึ่งอาจมีผลจากการยับยั้งการแสดงออกของ caspase-1 ด้วย และนอกจากนี้เปปไทด์ R14 ยังสามารถลดการแสดงออกของโปรตีน NLRP3 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU ถึงแม้ว่าการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ NLRP3 ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU เมื่อเทียบกับเซลล์แมคโครฟาจในสภาวะปกติ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการที่เซลล์แมคโครฟาจ THP-1 ที่นำมาใช้ศึกษานี้มีการแสดงออกของโปรตีน NLRP3 ในระดับหนึ่งอยู่แล้ว แม้จะไม่ได้กระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นใด ๆ ก็ตาม (Gregersen et al., 2017; Marchetti et al., 2018) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานี้มีการแสดงออกของโปรตีน caspase-1 และ IL-1 β ที่เพิ่มขึ้น ในเซลล์แมคโครฟาจถูกกระตุ้นด้วย MSU

เมื่อเทียบกับเซลล์ในสภาวะปกติ จึงแสดงให้เห็นว่า model ในการศึกษานี้สามารถใช้เพื่อตอบ
วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ต่อไปได้

ที่ผ่านมาการรายงานเกี่ยวกับเปปไทด์ออกฤทธิ์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบที่เกิดจาก
MSU มีเพียงไม่กี่ฉบับ เช่น การรายงานในปี 2009 ของ Capsoni et al. ได้ศึกษาเปปไทด์
melanocortin peptides ได้แก่ Alpha-melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) และเปป
ไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ CKPV₂ ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบอันเกิดจากการกระตุ้นด้วย MSU
ได้ในเซลล์ monocytes จากมนุษย์ ที่จำเพาะต่อ IL-1 β , IL-8, TNF- α และ caspase-1 (Capsoni
et al., 2009) นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของ neutrophil มาถึงบริเวณที่มีการอักเสบ
นอกจากนี้มีการรายงานในปี 2020 ได้ทำการศึกษา rice-derived-peptide-3 (RDP3) ที่
สังเคราะห์ได้จากเปลือกของข้าวสายพันธุ์ *O. sativa* เป็นเปปไทด์สายสั้นที่มีความเป็นพิษกับ
เซลล์ในระดับต่ำ และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย MSU ได้ใน
สัตว์ทดลอง โดยลดระดับกรดไขมันในเลือด และยังสามารถยับยั้งการสร้าง IL-1 β ได้ด้วย (Liu et
al., 2020) สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้ที่สนใจศึกษาเปปไทด์ R14 (ILILDD) ที่สังเคราะห์ได้จากใบ
ข้าวป่าสายพันธุ์ *O. minuta* นั้นในปัจจุบันมีเพียงรายงานฉบับเดียวที่ระบุถึงฤทธิ์ทางชีวภาพใน
การยับยั้งมะเร็งได้ (Moung-ngam et al., 2020) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานถึงฤทธิ์ในการ
ยับยั้งการอักเสบแต่อย่างใด ดังนั้นเปปไทด์ R14 ในงานวิจัยนี้เป็นสารตัวใหม่ที่ยังไม่มีการรายงาน
มาก่อนถึงฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบที่เกิดจาก MSU ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า การที่เปป
ไทด์ R14 สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ IL-1 β ได้นั้นเกี่ยวข้องกับ signal ที่ 1 โดยสามารถไปลด
การแสดงออกของโปรตีน NF- κ B p65 ในนิวเคลียส ในวิถี NF- κ B signaling pathway ซึ่ง
เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ pro-IL-1 β และเปปไทด์ R14 ยังมีผลต่อ signal ที่ 2 โดยลดการ
แสดงออกของ caspase-1 และ NLRP3 ที่มีความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ mature IL-1 β ผล
จากการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของเปปไทด์ R14 ในการลดการอักเสบในเซลล์
แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย MSU โดยเปปไทด์ R14 สามารถยับยั้งการส่งสัญญาณผ่าน NF- κ B
signaling pathway ผ่านการลดการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ NF- κ B p65 รวมทั้งยังสามารถ
ลดการทำงานของโปรตีน caspase-1 ทำให้การแสดงออกของ IL-1 β ลดลง ซึ่งเป็นผลมาจากการ
ยับยั้งการ formation ของ NLRP3 inflammasome ผลการศึกษานี้จึงเป็นองค์ความรู้ใหม่ และเป็น

ข้อมูลสำคัญเบื้องต้น เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นยาที่ใช้รักษาโรคเกาต์ และใช้เป็น
ทางเลือกในการรักษาโรคเกาต์ต่อไป



บรรณานุกรม

- สมาคมรูมาติสซั่มแห่งประเทศไทย. (2555). แนวทางเวชปฏิบัติการดูแลรักษาโรคเกาต์. กรุงเทพฯ.
- Abdulkhaleq, L., Assi, M., Abdullah, R., Zamri-Saad, M., Taufiq-Yap, Y., & Hezmee, M. (2018). The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Veterinary World*, 11(5), 627.
- Adib-Conquy, M., & Cavaillon, J.-M. (2007). Stress molecules in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *FEBS Letters*, 581(19), 3723-3733.
- Aglietti, R. A., Estevez, A., Gupta, A., Ramirez, M. G., Liu, P. S., Kayagaki, N., Ciferri, C., Dixit, V. M., & Dueber, E. C. (2016). GsdmD p30 elicited by caspase-11 during pyroptosis forms pores in membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(28), 7858-7863.
- Agostini, L., Martinon, F., Burns, K., McDermott, M. F., Hawkins, P. N., & Tschopp, J. (2004). NALP3 forms an IL-1 β -processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity*, 20(3), 319-325.
- Alghamdi, M. (2017). Familial Mediterranean fever, review of the literature. *Clinical Rheumatology*, 36(8), 1707-1713.
- Bauernfeind, F. G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E. S., MacDonald, K., Speert, D., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Monks, B. G., & Fitzgerald, K. A. (2009). Cutting edge: NF- κ B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *The Journal of Immunology*, 183(2), 787-791.
- Ben-Neriah, Y., & Karin, M. (2011). Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. *Nature Immunology*, 12(8), 715-723.
- Berda-Haddad, Y., Robert, S., Salers, P., Zekraoui, L., Farnarier, C., Dinarello, C. A., Dignat-George, F., & Kaplanski, G. (2011). Sterile inflammation of endothelial cell-derived apoptotic bodies is mediated by interleukin-1 α . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(51), 20684-20689.
- Bergsbaken, T., Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2009). Pyroptosis: host cell death and

- inflammation. *Nature Reviews Microbiology*, 7(2), 99-109.
- Binshtok, A. M., Wang, H., Zimmermann, K., Amaya, F., Vardeh, D., Shi, L., Brenner, G. J., Ji, R.-R., Bean, B. P., & Woolf, C. J. (2008). Nociceptors are interleukin-1 β sensors. *Journal of Neuroscience*, 28(52), 14062-14073.
- Bitik, B., & Öztürk, M. A. (2014). An old disease with new insights: Update on diagnosis and treatment of gout. *European Journal of Rheumatology*, 1(2), 72-77.
- Brasil-Oliveira, R., Cruz, Á. A., Sarmiento, V. A., Souza-Machado, A., & Lins-Kusterer, L. (2020). Corticosteroid use and periodontal disease: A systematic review. *European Journal of Dentistry*, 14(03), 496-501.
- Broderick, L., De Nardo, D., Franklin, B. S., Hoffman, H. M., & Latz, E. (2015). The inflammasomes and autoinflammatory syndromes. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 10, 395-424.
- Bryant, C. E., Symmons, M., & Gay, N. J. (2015). Toll-like receptor signalling through macromolecular protein complexes. *Molecular Immunology*, 63(2), 162-165.
- Brydges, S. D., Mueller, J. L., McGeough, M. D., Pena, C. A., Misaghi, A., Gandhi, C., Putnam, C. D., Boyle, D. L., Firestein, G. S., & Horner, A. A. (2009). Inflammasome-mediated disease animal models reveal roles for innate but not adaptive immunity. *Immunity*, 30(6), 875-887.
- Burns, C., & Wortmann, R. (2012). Disorders of purine and pyrimidine metabolism. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 18th eds. New York: McGraw Hill, 3181-3187.
- Busso, N., & So, A. (2012). Microcrystals as DAMPs and their role in joint inflammation. *Rheumatology*, 51(7), 1154-1160.
- Cai, X., Chen, J., Xu, H., Liu, S., Jiang, Q.-X., Halfmann, R., & Chen, Z. J. (2014). Prion-like polymerization underlies signal transduction in antiviral immune defense and inflammasome activation. *Cell*, 156(6), 1207-1222.
- Capsoni, F., Ongari, A. M., Reali, E., & Catania, A. (2009). Melanocortin peptides inhibit urate crystal-induced activation of phagocytic cells. *Arthritis Research & Therapy*, 11(5), R151.

- Chakrabarti, S., Jahandideh, F., & Wu, J. (2014). Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress. *BioMed Research International*, 2014.
- Chen-Xu, M., Yokose, C., Rai, S. K., Pillinger, M. H., & Choi, H. K. (2019). Contemporary prevalence of gout and hyperuricemia in the United States and decadal trends: the National Health and Nutrition Examination Survey, 2007–2016. *Arthritis & Rheumatology*, 71(6), 991-999.
- Chen, B., Hongmei Li, Guochun Ou, Long Ren, Xiaohong Yang, Mei Zeng. (2019). Curcumin attenuates MSU crystal-induced inflammation by inhibiting the degradation of IKK α and blocking mitochondrial damage. *Arthritis Research & Therapy*, 21(1), 1-15.
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. (2018). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9(6), 7204–7218.
- Chen, X., Liu, G., Yuan, Y., Wu, G., Wang, S., & Yuan, L. (2019). NEK7 interacts with NLRP3 to modulate the pyroptosis in inflammatory bowel disease via NF- κ B signaling. *Cell Death & Disease*, 10(12), 1-12.
- Chen, Y., Tang, Z., Huang, Z., Zhou, W., Li, Z., Li, X., & Sun, F. (2017). The prevalence of gout in mainland China from 2000 to 2016: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Public Health*, 25(5), 521-529.
- Cheon, M. S., Yoon, T., Choi, G., Moon, B. C., Lee, A.-Y., Choo, B. K., & Kim, H. K. (2009). Chrysanthemum indicum Linné extract inhibits the inflammatory response by suppressing NF- κ B and MAPKs activation in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 122(3), 473-477.
- Ciccarelli, F., De Martinis, M., & Ginaldi, L. (2014). An update on autoinflammatory diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 21(3), 261-269.
- Cleophas, M. C., Crişan, T. O., & Joosten, L. A. (2017). Factors modulating the inflammatory response in acute gouty arthritis. *Current Opinion in Rheumatology*, 29(2), 163-170.
- Colina, M., Pizzirani, C., Khodeir, M., Falzoni, S., Bruschi, M., Trotta, F., & Di Virgilio, F.

- (2010). Dysregulation of P2X7 receptor-inflammasome axis in SAPHO syndrome: successful treatment with anakinra. *Rheumatology*, 49(7), 1416-1418.
- Crişan, T. O., Cleophas, M. C., Oosting, M., Lemmers, H., Toenhake-Dijkstra, H., Netea, M. G., Jansen, T. L., & Joosten, L. A. (2016). Soluble uric acid primes TLR-induced proinflammatory cytokine production by human primary cells via inhibition of IL-1Ra. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 75(4), 755-762.
- Dai, S.-M., Han, X.-H., Zhao, D.-B., Shi, Y.-Q., Liu, Y., & Meng, J.-M. (2003). Prevalence of rheumatic symptoms, rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, and gout in Shanghai, China: a COPCORD study. *The Journal of Rheumatology*, 30(10), 2245-2251.
- Dalbeth, N., Stamp, L., & Merriman, T. (2016). Gout. *Lancet (London, England)*, 388(10055), 2039–2052.
- De Nardo, D., & Latz, E. (2011). NLRP3 inflammasomes link inflammation and metabolic disease. *Trends in Immunology*, 32(8), 373-379.
- Dehlin, M., Jacobsson, L., & Roddy, E. (2020). Global epidemiology of gout: prevalence, incidence, treatment patterns and risk factors. *Nature Reviews Rheumatology*, 16(7), 380-390.
- Denes, A., Coutts, G., Lénárt, N., Cruickshank, S. M., Pelegrin, P., Skinner, J., Rothwell, N., Allan, S. M., & Brough, D. (2015). AIM2 and NLRC4 inflammasomes contribute with ASC to acute brain injury independently of NLRP3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(13), 4050-4055.
- Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, 89(2), 271-277.
- Diamond, C. E., Khameneh, H. J., Brough, D., & Mortellaro, A. (2015). Novel perspectives on non-canonical inflammasome activation. *ImmunoTargets and Therapy*, 4, 131–141.
- Dinarello, C. A., Simon, A., & Van Der Meer, J. W. (2012). Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nature Reviews Drug*

Discovery 11(8), 633-652.

- Doria, A., Zen, M., Bettio, S., Gatto, M., Bassi, N., Nalotto, L., Ghirardello, A., Iaccarino, L., & Punzi, L. (2012). Autoinflammation and autoimmunity: bridging the divide. *Autoimmunity Reviews*, 12(1), 22-30.
- Dvorak, Z., Ulrichova, J., Weyhenmeyer, R., & Simanek, V. (2007). Cytotoxicity of colchicine derivatives in primary cultures of human hepatocytes. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky*, 151(1), 47–52.
- Fan, H., & Cook, J. A. (2004). Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *Journal of Endotoxin Research*, 10(2), 71-84.
- Faustin, B., Lartigue, L., Bruey, J.-M., Luciano, F., Sergienko, E., Bailly-Maitre, B., Volkmann, N., Hanein, D., Rouiller, I., & Reed, J. C. (2007). Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Molecular Cell*, 25(5), 713-724.
- Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.-W., Datta, P., Wu, J., & Alnemri, E. S. (2009). AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature*, 458(7237), 509-513.
- Ferrero-Miliani, L., Nielsen, O., Andersen, P., & Girardin, S. (2007). Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. *Clinical & Experimental Immunology*, 147(2), 227-235.
- Franchi, L., Eigenbrod, T., Muñoz-Planillo, R., & Núñez, G. (2009). The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nature Immunology*, 10(3), 241-247.
- Franchi, L., Muñoz-Planillo, R., & Núñez, G. (2012). Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nature Immunology*, 13(4), 325-332.
- Frendéus, B., Wachtler, C., Hedlund, M., Fischer, H., Samuelsson, P., Svensson, M., & Svanborg, C. (2001). Escherichia coli P fimbriae utilize the Toll-like receptor 4 pathway for cell activation. *Molecular Microbiology*, 40(1), 37-51.
- Galea, J., Ogungbenro, K., Hulme, S., Greenhalgh, A., Aarons, L., Scarth, S., Hutchinson, P., Grainger, S., King, A., & Hopkins, S. J. (2011). Intravenous anakinra can

- achieve experimentally effective concentrations in the central nervous system within a therapeutic time window: results of a dose-ranging study. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 31(2), 439-447.
- Gattorno, M., Tassi, S., Carta, S., Delfino, L., Ferlito, F., Pelagatti, M. A., D'Ostualdo, A., Buoncompagni, A., Alpigiani, M. G., & Alessio, M. (2007). Pattern of interleukin-1 β secretion in response to lipopolysaccharide and ATP before and after interleukin-1 blockade in patients with CIAS1 mutations. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 56(9), 3138-3148.
- Giridharan, S., & Srinivasan, M. (2018). Mechanisms of NF-kappaB p65 and strategies for therapeutic manipulation. *Journal of Inflammation Research*, 11, 407-419.
- Goldbach-Mansky, R., Dailey, N. J., Canna, S. W., Gelabert, A., Jones, J., Rubin, B. I., Kim, H. J., Brewer, C., Zalewski, C., & Wiggs, E. (2006). Neonatal-onset multisystem inflammatory disease responsive to interleukin-1 β inhibition. *New England Journal of Medicine*, 355(6), 581-592.
- Gordon, S., & Martinez-Pomares, L. (2017). Physiological roles of macrophages. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 469(3), 365-374.
- Grebe, A., Hoss, F., & Latz, E. (2018). NLRP3 inflammasome and the IL-1 pathway in atherosclerosis. *Circulation Research*, 122(12), 1722-1740.
- Gregersen, I., Sandanger, O., Askevold, E. T., Sagen, E. L., Yang, K., Holm, S., Pedersen, T. M., Skjelland, M., Krohg-Sorensen, K., Hansen, T. V., Dahl, T. B., Otterdal, K., Espevik, T., Aukrust, P., Yndestad, A., & Halvorsen, B. (2017). Interleukin 27 is increased in carotid atherosclerosis and promotes NLRP3 inflammasome activation. *PLoS One*, 12(11), e0188387.
- Gu, Y., Kuida, K., Tsutsui, H., Ku, G., Hsiao, K., Fleming, M. A., Hayashi, N., Higashino, K., Okamura, H., & Nakanishi, K. (1997). Activation of interferon- γ inducing factor mediated by interleukin-1 β converting enzyme. *Science*, 275(5297), 206-209.
- Guo, H., Callaway, J. B., & Ting, J. P. (2015). Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nature Medicine*, 21(7), 677-687.
- Häcker, H., Vabulas, R. M., Takeuchi, O., Hoshino, K., Akira, S., & Wagner, H. (2000).

- Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(4), 595-600.
- Hainer, B. L., Matheson, E. M., & Wilkes, R. T. (2014). Diagnosis, treatment, and prevention of gout. *American Family Physician*, 90(12), 831-836.
- Halle, A., Hornung, V., Petzold, G. C., Stewart, C. R., Monks, B. G., Reinheckel, T., Fitzgerald, K. A., Latz, E., Moore, K. J., & Golenbock, D. T. (2008). The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β . *Nature Immunology*, 9(8), 857-865.
- Ham, M., & Moon, A. (2013). Inflammatory and microenvironmental factors involved in breast cancer progression. *Archives of Pharmacal Research*, 36(12), 1419-1431.
- Harapas, C. R., Steiner, A., Davidson, S., & Masters, S. L. (2018). An update on autoinflammatory diseases: inflammasomopathies. *Current Rheumatology Reports*, 20(7), 1-7.
- Hausmann, J. S. (2019). Targeting cytokines to treat autoinflammatory diseases. *Clinical Immunology*, 206, 23-32.
- He, Y., Yang, Q., Wang, X., Jia, A., Xie, W., & Zhou, J. (2019). Inhibition of triggering receptor expressed on myeloid cell-1 alleviates acute gouty inflammation. *Mediators of Inflammation*, 2019.
- Hedlund, M., Freund us, B., Wachtler, C., Hang, L., Fischer, H., & Svanborg, C. (2001). Type 1 fimbriae deliver an LPS-and TLR4-dependent activation signal to CD14-negative cells. *Molecular Microbiology*, 39(3), 542-552.
- Hendrayani, S.-F., Al-Harbi, B., Al-Ansari, M. M., Silva, G., & Aboussekhra, A. (2016). The inflammatory/cancer-related IL-6/STAT3/NF- κ B positive feedback loop includes AUF1 and maintains the active state of breast myofibroblasts. *Oncotarget*, 7(27), 41974-41985.
- Henríquez-Olgu n, C., Altamirano, F., Valladares, D., López, J. R., Allen, P. D., & Jaimovich, E. (2015). Altered ROS production, NF- κ B activation and interleukin-6 gene expression induced by electrical stimulation in dystrophic mdx skeletal

- muscle cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1852(7), 1410-1419.
- Henson, P., Larsen, G., Henson, J., Newman, S., Musson, R., & Leslie, C. (1984). Resolution of pulmonary inflammation. Federation proceedings,
- Hoffman, H. M., & Firestein, G. S. (2006). Anakinra for the treatment of neonatal-onset multisystem inflammatory disease. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, 2(12), 646-647.
- Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E. O., Kono, H., Rock, K. L., Fitzgerald, K. A., & Latz, E. (2008). Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature Immunology*, 9(8), 847-856.
- Howard, A. D., Kostura, M. J., Thornberry, N., Ding, G., Limjuco, G., Weidner, J., Salley, J. P., Hogquist, K. A., Chaplin, D. D., & Mumford, R. A. (1991). IL-1-converting enzyme requires aspartic acid residues for processing of the IL-1 beta precursor at two distinct sites and does not cleave 31-kDa IL-1 alpha. *The Journal of Immunology*, 147(9), 2964-2969.
- Hsu, H.-Y., & Wen, M.-H. (2002). Lipopolysaccharide-mediated reactive oxygen species and signal transduction in the regulation of interleukin-1 gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 277(25), 22131-22139.
- Hu, Z., Murakami, T., Suzuki, K., Tamura, H., Kuwahara-Arai, K., Iba, T., & Nagaoka, I. (2014). Antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 inhibits the LPS/ATP-induced pyroptosis of macrophages by dual mechanism. *PLoS One*, 9(1), e85765.
- Hui, M., Carr, A., Cameron, S., Davenport, G., Doherty, M., Forrester, H., Jenkins, W., Jordan, K. M., Mallen, C. D., & McDonald, T. M. (2017). The British Society for Rheumatology guideline for the management of gout. *Rheumatology*, 56(7), e1-e20.
- Hwang, J.-W., Lee, S.-J., Kim, Y.-S., Kim, E.-K., Ahn, C.-B., Jeon, Y.-J., Moon, S.-H., Jeon, B.-T., & Park, P.-J. (2012). Purification and characterization of a novel peptide with inhibitory effects on colitis induced mice by dextran sulfate sodium from enzymatic

- hydrolysates of *Crassostrea gigas*. *Fish & Shellfish Immunology*, 33(4), 993-999.
- Jabbour, H. N., Sales, K. J., Catalano, R. D., & Norman, J. E. (2009). Inflammatory pathways in female reproductive health and disease. *Reproduction*, 138(6), 903-919.
- Jantaruk, P., Roytrakul, S., Sitthisak, S., & Kunthalert, D. (2017). Potential role of an antimicrobial peptide, KLK in inhibiting lipopolysaccharide-induced macrophage inflammation. *PLoS One*, 12(8), e0183852.
- Joosten, L. A., Netea, M. G., Mylona, E., Koenders, M. I., Malireddi, R. K., Oosting, M., Stienstra, R., van de Veerdonk, F. L., Stalenhoef, A. F., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Kanneganti, T. D., & van der Meer, J. W. (2010). Engagement of fatty acids with Toll-like receptor 2 drives interleukin-1beta production via the ASC/caspase 1 pathway in monosodium urate monohydrate crystal-induced gouty arthritis. *Arthritis & Rheumatology*, 62(11), 3237-3248.
- Jordan, K. M., Cameron, J. S., Snaith, M., Zhang, W., Doherty, M., Seckl, J., Hingorani, A., Jaques, R., & Nuki, G. (2007). British Society for Rheumatology and British Health Professionals in Rheumatology guideline for the management of gout. *Rheumatology*, 46(8), 1372-1374.
- Kahan, A., Coghlan, G., & McLaughlin, V. (2006). Cardiac complications of systemic sclerosis. *Rheumatology*, 48(Suppl 3), iii45-iii48.
- Kambe, N., Nakamura, Y., Saito, M., & Nishikomori, R. (2010). The inflammasome, an innate immunity guardian, participates in skin urticarial reactions and contact hypersensitivity. *Allergology International*, 59(2), 105-113.
- Kastner, D. L., Aksentijevich, I., & Goldbach-Mansky, R. (2010). Autoinflammatory disease reloaded: a clinical perspective. *Cell*, 140(6), 784-790.
- Kaur, M., Singh, M., & Silakari, O. (2013). Inhibitors of switch kinase 'spleen tyrosine kinase' in inflammation and immune-mediated disorders: a review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 67, 434-446.
- Kawai, T., & Akira, S. (2004). Toll-like receptor downstream signaling. *Arthritis Research & Therapy*, 7(1), 1-8.

- Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, *11*(5), 373-384.
- Kayama, H., Nishimura, J., & Takeda, K. (2013). Regulation of intestinal homeostasis by innate immune cells. *Immune Network*, *13*(6), 227-234.
- Keller, M., Rüegg, A., Werner, S., & Beer, H.-D. (2008). Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell*, *132*(5), 818-831.
- Khanna, D., Fitzgerald, J. D., Khanna, P. P., Bae, S., Singh, M. K., Neogi, T., Pillinger, M. H., Merill, J., Lee, S., & Prakash, S. (2012). 2012 American College of Rheumatology guidelines for management of gout. Part 1: systematic nonpharmacologic and pharmacologic therapeutic approaches to hyperuricemia. *Arthritis Care & Research*, *64*(10), 1431-1446.
- Khanna, P. P., Gladue, H. S., Singh, M. K., FitzGerald, J. D., Bae, S., Prakash, S., Kaldas, M., Gogia, M., Berrocal, V., & Townsend, W. (2014). Treatment of acute gout: a systematic review. *Seminars in arthritis and rheumatism*, *44*(1), 31-38.
- Kim, J.-W., Kwak, S. G., Lee, H., Kim, S.-K., Choe, J.-Y., & Park, S.-H. (2017). Prevalence and incidence of gout in Korea: data from the national health claims database 2007–2015. *Rheumatology International*, *37*(9), 1499-1506.
- Kingsbury, S. R., Conaghan, P. G., & McDermott, M. F. (2011). The role of the NLRP3 inflammasome in gout. *Journal of Inflammation Research*, *4*, 39-49.
- Korwek, Z., Tudelska, K., Natęcz-Jawecki, P., Czerkies, M., Prus, W., Markiewicz, J., Kochańczyk, M., & Lipniacki, T. (2016). Importins promote high-frequency NF- κ B oscillations increasing information channel capacity. *Biology Direct*, *11*(1), 1-21.
- Kotas, M. E., & Medzhitov, R. (2015). Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. *Cell*, *160*(5), 816-827.
- Kourtzelis, I., Hajishengallis, G., & Chavakis, T. (2020). Phagocytosis of apoptotic cells in resolution of inflammation. *Frontiers in Immunology*, *11*, 553.
- Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology*, *30*(1), 16-34.
- Kummer, J. A., Broekhuizen, R., Everett, H., Agostini, L., Kuijk, L., Martinon, F., Bruggen, R.

- v., & Tschopp, J. (2007). Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 55(5), 443-452.
- Kuo, C.-F., Grainge, M. J., Zhang, W., & Doherty, M. (2015). Global epidemiology of gout: prevalence, incidence and risk factors. *Nature Reviews Rheumatology*, 11(11), 649-662.
- Kyriakis, J. M., & Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological Reviews*, 81(2), 807-869.
- Lamkanfi, M., & Dixit, V. M. (2014). Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*, 157(5), 1013-1022.
- Lee, K., Shin, S. Y., Kim, K., Lim, S. S., Hahm, K.-S., & Kim, Y. (2004). Antibiotic activity and structural analysis of the scorpion-derived antimicrobial peptide IsCT and its analogs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 323(2), 712-719.
- Leung, Y. Y., Hui, L. L. Y., & Kraus, V. B. (2015). Colchicine—update on mechanisms of action and therapeutic uses. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 45(3), 341-350.
- Li, H., Willingham, S. B., Ting, J. P.-Y., & Re, F. (2008). Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *The Journal of Immunology*, 181(1), 17-21.
- Li, L.-H., Ju, T.-C., Hsieh, C.-Y., Dong, W.-C., Chen, W.-T., Hua, K.-F., & Chen, W.-J. (2017). A synthetic cationic antimicrobial peptide inhibits inflammatory response and the NLRP3 inflammasome by neutralizing LPS and ATP. *PLoS One*, 12(7), e0182057.
- Li, R., Sun, J., Ren, L.-M., Wang, H.-Y., Liu, W.-H., Zhang, X.-W., Chen, S., Mu, R., He, J., & Zhao, Y. (2012). Epidemiology of eight common rheumatic diseases in China: a large-scale cross-sectional survey in Beijing. *Rheumatology*, 51(4), 721-729.

- Liang, P., Zhang, H., Wang, G., Li, S., Cong, S., Luo, Y., & Zhang, B. (2013). KPNB1, XPO7 and IPO8 Mediate the Translocation of NF- κ B/p65 into the Nucleus. *Traffic*, 14(11), 1132-1143.
- Lin, Y., Lee, H., Berg, A. H., Lisanti, M. P., Shapiro, L., & Scherer, P. E. (2000). The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 275(32), 24255-24263.
- Liu-Bryan, R. (2010). Intracellular innate immunity in gouty arthritis: role of NALP3 inflammasome. *Immunology and Cell Biology*, 88(1), 20-23.
- Liu, J., & Cao, X. (2016). Cellular and molecular regulation of innate inflammatory responses. *Cellular & Molecular Immunology*, 13(6), 711-721.
- Liu, N., Wang, Y., Zeng, L., Yin, S., Hu, Y., Li, S., Fu, Y., Zhang, X., Xie, C., Shu, L., Li, Y., Sun, H., Yang, M., Sun, J., & Yang, X. (2020). RDP3, A Novel Antigout Peptide Derived from Water Extract of Rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(27), 7143-7151.
- Liu, Q., Zhang, D., Hu, D., Zhou, X., & Zhou, Y. (2018). The role of mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Molecular Immunology*, 103, 115-124.
- Liu, R., Han, C., Wu, D., Xia, X., Gu, J., Guan, H., Shan, Z., & Teng, W. (2015). Prevalence of hyperuricemia and gout in mainland China from 2000 to 2014: a systematic review and meta-analysis. *BioMed Research International*, 2015.
- Liu, Z., Gan, L., Xu, Y., Luo, D., Ren, Q., Wu, S., & Sun, C. (2017). Melatonin alleviates inflammasome-induced pyroptosis through inhibiting NF- κ B/GSDMD signal in mice adipose tissue. *Journal of Pineal Research*, 63(1), e12414.
- Lontchi-Yimagou, E., Sobngwi, E., Matsha, T. E., & Kengne, A. P. (2013). Diabetes mellitus and inflammation. *Current Diabetes Reports*, 13(3), 435-444.
- Lorenzo, J. M., Munekata, P. E., Gomez, B., Barba, F. J., Mora, L., Perez-Santaescolastica, C., & Toldra, F. (2018). Bioactive peptides as natural antioxidants in food products—A review. *Trends in Food Science & Technology*, 79, 136-147.
- Lu, A., Magupalli, V. G., Ruan, J., Yin, Q., Atianand, M. K., Vos, M. R., Schröder, G. F.,

- Fitzgerald, K. A., Wu, H., & Egelman, E. H. (2014). Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. *Cell*, *156*(6), 1193-1206.
- Lye, E., Mirtsos, C., Suzuki, N., Suzuki, S., & Yeh, W.-C. (2004). The role of interleukin 1 receptor-associated kinase-4 (IRAK-4) kinase activity in IRAK-4-mediated signaling. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(39), 40653-40658.
- Man, S. M., Karki, R., & Kanneganti, T. D. (2017). Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. *Immunological Reviews*, *277*(1), 61-75.
- Manthiram, K., Zhou, Q., Aksentijevich, I., & Kastner, D. L. (2017). The monogenic autoinflammatory diseases define new pathways in human innate immunity and inflammation. *Nature Immunology*, *18*(8), 832-842.
- Marchetti, C., Swartzwelter, B., Gamboni, F., Neff, C. P., Richter, K., Azam, T., Carta, S., Tengesdal, I., Nemkov, T., D'Alessandro, A., Henry, C., Jones, G. S., Goodrich, S. A., St Laurent, J. P., Jones, T. M., Scribner, C. L., Barrow, R. B., Altman, R. D., Skouras, D. B., . . . Dinarello, C. A. (2018). OLT1177, a beta-sulfonyl nitrile compound, safe in humans, inhibits the NLRP3 inflammasome and reverses the metabolic cost of inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(7), E1530-E1539.
- Mariathasan, S., Weiss, D. S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W. P., Weinrauch, Y., Monack, D. M., & Dixit, V. M. (2006). Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*, *440*(7081), 228-232.
- Mariotte, A., De Cauwer, A., Po, C., Abou-Faycal, C., Pichot, A., Paul, N., Aouadi, I., Carapito, R., Frisch, B., Macquin, C., Chatelus, E., Sibilia, J., Armspach, J. P., Bahram, S., & Georgel, P. (2020). A mouse model of MSU-induced acute inflammation *in vivo* suggests imiquimod-dependent targeting of IL-1 β as relevant therapy for gout patients. *Theranostics*, *10*(5), 2158-2171.
- Martinon, F., Burns, K., & Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of pro-IL- β .

Molecular Cell, 10(2), 417-426.

- Martinon, F., Mayor, A., & Tschopp, J. (2009). The inflammasomes: guardians of the body. *Annual Review of Immunology*, 27, 229-265.
- Martinon, F., Petrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A., & Tschopp, J. (2006). Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*, 440(7081), 237-241.
- Masters, S. L., Dunne, A., Subramanian, S. L., Hull, R. L., Tannahill, G. M., Sharp, F. A., Becker, C., Franchi, L., Yoshihara, E., & Chen, Z. (2010). Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 β in type 2 diabetes. *Nature Immunology*, 11(10), 897-904.
- McDermott, M. F., Aksentijevich, I., Galon, J., McDermott, E. M., Ogunkolade, B. W., Centola, M., Mansfield, E., Gadina, M., Karenko, L., & Pettersson, T. (1999). Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. *Cell*, 97(1), 133-144.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428-435.
- Medzhitov, R. (2010). Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*, 140(6), 771-776.
- Meizlish, M. L., Franklin, R. A., Zhou, X., & Medzhitov, R. (2021). Tissue homeostasis and inflammation. *Annual Review of Immunology*, 39, 557-581.
- Miao, E. A., Alpuche-Aranda, C. M., Dors, M., Clark, A. E., Bader, M. W., Miller, S. I., & Aderem, A. (2006). Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin-1 β via Ipaf. *Nature Immunology*, 7(6), 569-575.
- Mogensen, T. H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(2), 240-273.
- Moghaddas, F., Llamas, R., De Nardo, D., Martinez-Banaclocha, H., Martinez-Garcia, J. J., Mesa-del-Castillo, P., Baker, P. J., Gargallo, V., Mensa-Vilaro, A., & Canna, S. (2017). A novel Pyrin-Associated Autoinflammation with Neutrophilic Dermatitis mutation further defines 14-3-3 binding of pyrin and distinction to Familial

- Mediterranean Fever. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 76(12), 2085-2094.
- Molla, M. D., Akalu, Y., Geto, Z., Dagneu, B., Ayelign, B., & Shibabaw, T. (2020). Role of Caspase-1 in the Pathogenesis of Inflammatory-Associated Chronic Noncommunicable Diseases. *Journal of Inflammation Research*, 13, 749–764.
- Moore, S. F., & MacKenzie, A. B. (2009). NADPH oxidase NOX2 mediates rapid cellular oxidation following ATP stimulation of endotoxin-primed macrophages. *The Journal of Immunology*, 183(5), 3302-3308.
- Moors, M. A., Li, L., & Mizel, S. B. (2001). Activation of interleukin-1 receptor-associated kinase by gram-negative flagellin. *Infection and Immunity*, 69(7), 4424-4429.
- Morris, I., Varughese, G., & Mattingly, P. (2003). Colchicine in acute gout. *BMJ*, 327(7426), 1275-1276.
- Moser, M., & Leo, O. (2010). Key concepts in immunology. *Vaccine*, 28, C2-C13.
- Moung-ngam, P., Chotechuen, S., Roytrakul, S., Suwan, J., Narawatthana, S., Soontrajarn, K., Ratchawat, C., Jaresitthikunchai, J., Phaonakrop, N., Kittisenachai, S., & Yingchutrakul, Y. (2020). *In Vitro* Study on Potential Effect of Peptide from Wild Rice for Anticancer Agent. *Thai Rice Research Journal*, 11(2), 84-93.
- Muñoz-Planillo, R., Kuffa, P., Martínez-Colón, G., Smith, B. L., Rajendiran, T. M., & Núñez, G. (2013). K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity*, 38(6), 1142-1153.
- Nagaoka, I., Hirota, S., Niyonsaba, F., Hirata, M., Adachi, Y., Tamura, H., & Heumann, D. (2001). Cathelicidin family of antibacterial peptides CAP18 and CAP11 inhibit the expression of TNF- α by blocking the binding of LPS to CD14⁺ cells. *The Journal of Immunology*, 167(6), 3329-3338.
- Nathan, C., & Ding, A. (2010). Nonresolving inflammation. *Cell*, 140(6), 871-882.
- Newton, K., & Dixit, V. M. (2012). Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(3), a006049.
- O'Connor, W., Harton, J. A., Zhu, X., Linhoff, M. W., & Ting, J. P.-Y. (2003). Cutting edge: CIAS1/cryopyrin/PYPAF1/NALP3/CATERPILLER 1.1 is an inducible inflammatory mediator with NF- κ B suppressive properties. *The Journal of Immunology*, 171(12),

6329-6333.

- Oeckinghaus, A., & Ghosh, S. (2009). The NF- κ B family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(4), a000034.
- Oeckinghaus, A., Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2011). Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nature Immunology*, 12(8), 695-708.
- Oliviero, F., Bindoli, S., Scanu, A., Feist, E., Doria, A., Galozzi, P., & Sfriso, P. (2020). Autoinflammatory mechanisms in crystal-induced arthritis. *Frontiers in Medicine*, 7, 166.
- Ozaki, E., Campbell, M., & Doyle, S. L. (2015). Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: current perspectives. *Journal of Inflammation Research*, 8, 15-27.
- Pahwa, R., Goyal, A., & Jialal, I. (2021). Chronic inflammation. *StatPearls [Internet]*.
- Park, M. H., & Igarashi, K. (2013). Polyamines and their metabolites as diagnostic markers of human diseases. *Biomolecules & Therapeutics*, 21(1), 1-9.
- Pétrilli, V., Dostert, C., Muruve, D. A., & Tschopp, J. (2007). The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 19(6), 615-622.
- Pradhan, A., Avelar, G. M., Bain, J. M., Childers, D., Pelletier, C., Larcombe, D. E., Shekhova, E., Netea, M. G., Brown, G. D., & Erwig, L. (2019). Non-canonical signalling mediates changes in fungal cell wall PAMPs that drive immune evasion. *Nature Communications*, 10(1), 1-14.
- Puig, J. G., & Martinez, M. A. (2008). Hyperuricemia, gout and the metabolic syndrome. *Current Opinion in Immunology*, 20(2), 187-191.
- Ratan, Z. A., Haidere, M. F., Costa, J. J., Runa, N. J., Hosseinzadeh, H., & Cho, J. Y. (2022). Overview of inflammation. In *Recent Advancements in Microbial Diversity* (pp. 29-51). Elsevier.
- Reber, L. L., Marichal, T., Sokolove, J., Starkl, P., Gaudenzio, N., Iwakura, Y., Karasuyama, H., Schwartz, L. B., Robinson, W. H., & Tsai, M. (2014). Contribution of Mast Cell-Derived Interleukin-1 β to Uric Acid Crystal-Induced Acute Arthritis in Mice.

Arthritis & Rheumatology, 66(10), 2881-2891.

- Ren, K., & Torres, R. (2009). Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. *Brain Research Reviews*, 60(1), 57-64.
- Richette, P., Doherty, M., Pascual, E., Barskova, V., Becce, F., Castañeda-Sanabria, J., Coyfish, M., Guillo, S., Jansen, T., & Janssens, H. (2017). 2016 updated EULAR evidence-based recommendations for the management of gout. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 76(1), 29-42.
- Richette, P., Frazier, A., & Bardin, T. (2014). Pharmacokinetics considerations for gout treatments. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 10(7), 949-957.
- Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A., & Bazan, J. F. (1998). A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(2), 588-593.
- Rock, K. L., Kataoka, H., & Lai, J.-J. (2013). Uric acid as a danger signal in gout and its comorbidities. *Nature Reviews Rheumatology*, 9(1), 13-23.
- Ross, A. C. (2017). Impact of chronic and acute inflammation on extra-and intracellular iron homeostasis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 106(suppl 6), 1581S-1587S.
- Rossi-Semerano, L., & Koné-Paut, I. (2012). Is Still's disease an autoinflammatory syndrome? *International Journal of Inflammation*, 2012, 480373.
- Rubartelli, A., & Lotze, M. T. (2007). Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends in Immunology*, 28(10), 429-436.
- Sadik, N. A. H., Shaker, O. G., Ghanem, H. Z., Hassan, H. A., & Abdel-Hamid, A.-H. Z. (2015). Single-nucleotide polymorphism of Toll-like receptor 4 and interleukin-10 in response to interferon-based therapy in Egyptian chronic hepatitis C patients. *Archives of Virology*, 160(9), 2181-2195.
- Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Matsumoto, K., Takeuchi, O., & Akira, S. (2005). Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nature Immunology*, 6(11), 1087-1095.

- Schlesinger, N. (2014). Anti-interleukin-1 therapy in the management of gout. *Current Rheumatology Reports*, 16(2), 1-6.
- Schlesinger, N., & Lipsky, P. E. (2018). *Gout* (1st ed.). Elsevier Health Sciences.
- Schlesinger, N., & Thiele, R. G. (2010). The pathogenesis of bone erosions in gouty arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 69(11), 1907-1912.
- Schroder, K., Zhou, R., & Tschopp, J. (2010). The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? *Science*, 327(5963), 296-300.
- Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M., & Kirschning, C. J. (1999). Peptidoglycan-and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *Journal of Biological Chemistry*, 274(25), 17406-17409.
- Shi, Y., Mucsi, A. D., & Ng, G. (2010). Monosodium urate crystals in inflammation and immunity. *Immunological Reviews*, 233(1), 203-217.
- Sivera, F., Andrés, M., Carmona, L., Kydd, A. S., Moi, J., Seth, R., Sriranganathan, M., Van Durme, C., Van Echteld, I., & Vinik, O. (2014). Multinational evidence-based recommendations for the diagnosis and management of gout: integrating systematic literature review and expert opinion of a broad panel of rheumatologists in the 3e initiative. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 73(2), 328-335.
- Slobodnick, A., Shah, B., Krasnokutsky, S., & Pillinger, M. H. (2018). Update on colchicine, 2017. *Rheumatology*, 57(suppl 1), i4-i11.
- So, A., De Meulemeester, M., Pikhlak, A., Yücel, A. E., Richard, D., Murphy, V., Arulmani, U., Sallstig, P., & Schlesinger, N. (2010). Canakinumab for the treatment of acute flares in difficult-to-treat gouty arthritis: results of a multicenter, phase II, dose-ranging study. *Arthritis & Rheumatism*, 62(10), 3064-3076.
- So, A., De Smedt, T., Revaz, S., & Tschopp, J. (2007). A pilot study of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout. *Arthritis Research & Therapy*, 9(2), 1-6.
- So, A., Dumusc, A., & Nasi, S. (2018). The role of IL-1 in gout: from bench to bedside. *Rheumatology (Oxford)*, 57(suppl 1), i12-i19.
- Song, D. H., & Lee, J. O. (2012). Sensing of microbial molecular patterns by Toll-like receptors. *Immunological Reviews*, 250(1), 216-229.

- Steen, V. D., & Medsger Jr, T. A. (2000). Severe organ involvement in systemic sclerosis with diffuse scleroderma. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 43(11), 2437-2444.
- Stehlik, C., & Reed, J. C. (2004). The PYRIN connection: novel players in innate immunity and inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*, 200(5), 551-558.
- Stramer, B. M., Mori, R., & Martin, P. (2007). The inflammation–fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(5), 1009-1017.
- Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E., & Flavell, R. (2012). Inflammasomes in health and disease. *Nature*, 481(7381), 278-286.
- Sugimoto, M. A., Sousa, L. P., Pinho, V., Perretti, M., & Teixeira, M. M. (2016). Resolution of inflammation: what controls its onset? *Frontiers in Immunology*, 160.
- Sutterwala, F. S., Haasken, S., & Cassel, S. L. (2014). Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1319(1), 82-95.
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6), 805-820.
- Taniguchi, K., & Karin, M. (2018). NF-kappaB, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nature Reviews Immunology*, 18(5), 309-324.
- Terkeltaub, R., Sundry, J., Schumacher, H., Murphy, F., Bookbinder, S., Biedermann, S., Wu, R., Mellis, S., & Radin, A. (2009). The interleukin 1 inhibitor rilonacept in treatment of chronic gouty arthritis: results of a placebo-controlled, monosequence crossover, non-randomised, single-blind pilot study. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 68(10), 1613-1617.
- Terkeltaub, R. A., Furst, D. E., Bennett, K., Kook, K. A., Crockett, R., & Davis, M. W. (2010). High versus low dosing of oral colchicine for early acute gout flare: twenty-four-hour outcome of the first multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, dose-comparison colchicine study. *Arthritis & Rheumatism*, 62(4), 1060-1068.
- Touitou, I., & Aksentijevich, I. (2019). Genetic approach to the diagnosis of

- autoinflammatory diseases. In *Textbook of Autoinflammation* (pp. 225-237). Springer.
- Towiwat, P., Chhana, A., & Dalbeth, N. (2019). The anatomical pathology of gout: a systematic literature review. *BMC Musculoskeletal Disorders*, *20*(1), 1-14.
- Triantafilou, M., & Triantafilou, K. (2002). Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends in Immunology*, *23*(6), 301-304.
- Vallabhapurapu, S., & Karin, M. (2009). Regulation and function of NF- κ B transcription factors in the immune system. *Annual Review of Immunology*, *27*, 693-733.
- Van Essen, D., Engist, B., Natoli, G., & Sacconi, S. (2009). Two modes of transcriptional activation at native promoters by NF- κ B p65. *PLoS Biology*, *7*(3), e1000073.
- Van Linthout, S., Miteva, K., & Tschöpe, C. (2014). Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells. *Cardiovascular Research*, *102*(2), 258-269.
- Vanaja, S. K., Rathinam, V. A., & Fitzgerald, K. A. (2015). Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. *Trends in Cell Biology*, *25*(5), 308-315.
- Vénéreau, E., Ceriotti, C., & Bianchi, M. E. (2015). DAMPs from cell death to new life. *Frontiers in Immunology*, *6*, 422.
- Vernaza, M. G., Dia, V. P., De Mejia, E. G., & Chang, Y. K. (2012). Antioxidant and antiinflammatory properties of germinated and hydrolysed Brazilian soybean flours. *Food Chemistry*, *134*(4), 2217-2225.
- von Moltke, J., Ayres, J. S., Kofoed, E. M., Chavarría-Smith, J., & Vance, R. E. (2013). Recognition of bacteria by inflammasomes. *Annual Review of Immunology*, *31*, 73-106.
- Vostinaru, O. (2017). Adverse effects and drug interactions of the non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs*, *17*, 31.
- Wallace, K. L., Riedel, A. A., Joseph-Ridge, N., & Wortmann, R. (2004). Increasing prevalence of gout and hyperuricemia over 10 years among older adults in a managed care population. *The Journal of Rheumatology*, *31*(8), 1582-1587.
- Wang, Q., Lin, B., Li, Z., Su, J., & Feng, Y. (2021). Cichoric acid ameliorates monosodium

- urate-induced inflammatory response by reducing NLRP3 inflammasome activation via inhibition of NF- κ B signaling pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021.
- Wen, H., Miao, E. A., & Ting, J. P.-Y. (2013). Mechanisms of NOD-like receptor-associated inflammasome activation. *Immunity*, 39(3), 432-441.
- Wolfe, M. M., Lichtenstein, D. R., & Singh, G. (1999). Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *New England Journal of Medicine*, 340(24), 1888-1899.
- World Health Organization. (2020). *Non-communicable diseases*. Retrieved 7 September from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>
- Wu, M., Tian, Y., Wang, Q., & Guo, C. (2020). Gout: a disease involved with complicated immunoinflammatory responses: a narrative review. *Clinical Rheumatology*, 39(10), 2849-2859.
- Yang, G., Lee, H. E., Moon, S. J., Ko, K. M., Koh, J. H., Seok, J. K., Min, J. K., Heo, T. H., Kang, H. C., & Cho, Y. Y. (2020). Direct Binding to NLRP3 Pyrin Domain as a Novel Strategy to Prevent NLRP3-Driven Inflammation and Gouty Arthritis. *Arthritis & Rheumatology*, 72(7), 1192-1202.
- Yasir, M., Goyal, A., Bansal, P., & Sonthalia, S. (2020). Corticosteroid adverse effects [Internet]. Treasure Island, FL. In: StatPearls Publishing [updated 2020 Jul 4.
- Ye, Z., Lich, J. D., Moore, C. B., Duncan, J. A., Williams, K. L., & Ting, J. P.-Y. (2008). ATP binding by monarch-1/NLRP12 is critical for its inhibitory function. *Molecular and Cellular Biology*, 28(5), 1841-1850.
- Yi, Y.-S. (2016). Folate receptor-targeted diagnostics and therapeutics for inflammatory diseases. *Immune Network*, 16(6), 337-343.
- Yu, H. B., & Finlay, B. B. (2008). The caspase-1 inflammasome: a pilot of innate immune responses. *Cell Host & Microbe*, 4(3), 198-208.
- Yu, L., & Feng, Z. (2018). The role of toll-like receptor signaling in the progression of heart failure. *Mediators of Inflammation*, 2018.
- Yu, T., Yi, Y.-S., Yang, Y., Oh, J., Jeong, D., & Cho, J. Y. (2012). The pivotal role of TBK1 in

- inflammatory responses mediated by macrophages. *Mediators of Inflammation*, 2012.
- Zanoni, I., Ostuni, R., Marek, L. R., Barresi, S., Barbalat, R., Barton, G. M., Granucci, F., & Kagan, J. C. (2011). CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell*, 147(4), 868-880.
- Zhang, F. X., Kirschning, C. J., Mancinelli, R., Xu, X.-P., Jin, Y., Faure, E., Mantovani, A., Rothe, M., Muzio, M., & Ardit, M. (1999). Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor- κ B through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 274(12), 7611-7614.
- Zhang, H., Li, F., Li, W.-W., Stary, C., Clark, J., Xu, S., & Xiong, X. (2016). The inflammasome as a target for pain therapy. *BJA: British Journal of Anaesthesia*, 117(6), 693-707.
- Zhang, W., Doherty, M., Bardin, T., Pascual, E., Barskova, V., Conaghan, P., Gerster, J., Jacobs, J., Leeb, B., & Lioté, F. (2006). EULAR evidence based recommendations for gout. Part II: Management. Report of a task force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT). *Annals of the Rheumatic Diseases*, 65(10), 1312-1324.
- Zhang, Y., & Liang, C. (2016). Innate recognition of microbial-derived signals in immunity and inflammation. *Science China Life Sciences*, 59(12), 1210-1217.
- Zhao, Y., Yang, J., Shi, J., Gong, Y.-N., Lu, Q., Xu, H., Liu, L., & Shao, F. (2011). The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature*, 477(7366), 596-600.
- Zhou, R., Tardivel, A., Thorens, B., Choi, I., & Tschopp, J. (2010). Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nature Immunology*, 11(2), 136-140.
- Zhou, Y., Hong, Y., & Huang, H. (2016). Triptolide attenuates inflammatory response in membranous glomerulo-nephritis rat via downregulation of NF- κ B signaling pathway. *Kidney and Blood Pressure Research*, 41(6), 901-910.

- Zhou, Y., Zhang, C.-Y., Duan, J.-X., Li, Q., Yang, H.-H., Sun, C.-C., Zhang, J., Luo, X.-Q., & Liu, S.-K. (2020). Vasoactive intestinal peptide suppresses the NLRP3 inflammasome activation in lipopolysaccharide-induced acute lung injury mice and macrophages. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 121, 109596.
- Zhu, Y., Pandya, B. J., & Choi, H. K. (2011). Prevalence of gout and hyperuricemia in the US general population: the National Health and Nutrition Examination Survey 2007–2008. *Arthritis & Rheumatism*, 63(10), 3136-3141.

