I4784674

สำนักหอสมุด
สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ

คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยนเรศวร

ผลของ Cytokines ต่อการสร้าง Nitric oxide ในกระบวนการอักเสบ และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง

โดย
นายนริศ ชัยยูรวัฒน์
นางสาวพิไลวรรณ สุวรรณชื่น

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 26 ก.ค. 2548
เลขทะเบียน 417012 4
เลขเรียกหนังสือ W4
ว251พ
2548

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต
มหาวิทยาลัยนเรศวร
กุมภาพันธ์ 2548

ชื่อเรื่อง	ผลของ Cytokines ต่อการสร้าง Nitric oxide ในกระบวนการอักเสบและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง
คณะผู้ดำเนินการวิจัย	นายนริศ ชัยยูรวัฒน์
	นางสาวพิไลวรรณ สุวรรณชื่น
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. สกลวรรณ แสงศรี
ภาควิชา	เภสัชกรรมปฏิบัติ
ปีการศึกษา	2547

บทคัดย่อ

กาซอนุมูลอิสระ Nitric oxide (NO) ถูกสร้างจากเซลล์ภายในร่างกาย พบว่ามีบทบาทสำคัญในการควบคุมกระบวนการต่างๆ ในร่างกายทั้งภาวะปกติและเมื่อเกิดพยาธิสภาพ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเมื่อร่างกายเกิดพยาธิสภาพ เช่น การติดเชื้อ หรือภาวะอักเสบ เซลล์หลายชนิดในร่างกายจะสร้าง NO ในปริมาณสูงมาก (ในความเข้มข้นระดับไมโครโมล) โดยเฉพาะเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน NO จะทำหน้าที่ขจัดเชื้อโรค และมีผลต่อกระบวนการอักเสบ อาทิ ผนังหลอดเลือดคลายตัวและรั่วมากขึ้น ความดันโลหิตลดต่ำ การสร้าง NO ปริมาณสูงมากเกิดจากเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นก่อการอักเสบ (inflammatory mediators) รวมทั้ง cytokines ที่ถูกหลั่งออกมาในกระบวนการภูมิคุ้มกัน ในปัจจุบันมะเร็งเป็นโรคที่เป็นสาเหตุสำคัญอันดับต้นต่อการเสียชีวิต ในการพัฒนาของโรคมะเร็งพบว่า NO อาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง การเข้าใจและอธิบายกระบวนการที่เกี่ยวข้องในระดับเซลล์อาจนำไปสู่แนวทางการรักษามะเร็งที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัยสำหรับผู้ป่วย ในการศึกษานี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของ cytokines ในที่นี้เลือกศึกษา interleukin 1 และ interleukin 18 ต่อการสร้าง NO ในเซลล์มะเร็ง จากรก (MCF-7 cell lines) วิธีการวัดปริมาณ NO โดยใช้สารละลายกรีสส์ (Griess reagent) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับอนุพันธ์ nitrite ของ NO ในสารละลายที่มีสี และตรวจวัดความเข้มของสีด้วยเครื่องสเปคโตรมิเตอร์ ณ ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ความเข้มข้นของ NO ได้จากการคำนวณเปรียบเทียบกับ standard curve ของ sodium nitrite ในน้ำ สารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ (PBS) และสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำ standard curve พบว่าค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้สารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์มีค่าสูงกว่า เซลล์มะเร็งจากรกถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมด้วยซีรั่มร้อยละ 10 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีกาซคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศร้อยละ 5 ปรากฏว่าเซลล์เจริญเติบโตดี แต่ถูกปนเปื้อนด้วยเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราตามลำดับ สาเหตุของการปนเปื้อนด้วยเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่เกิดจากการขาดทักษะด้านเทคนิคปราศจากเชื้อ การปนเปื้อนด้วยเชื้อราอาจมีสาเหตุจากการรักษาความสะอาดและการควบคุมความชื้นภายในห้องเลี้ยงเชื้อ การแก้ปัญหาที่เซลล์เกิดการปนเปื้อนโดยการเติมยาฆ่าเชื้อแบคทีเรีย streptomycin และ penicillin และยาฆ่าเชื้อรา amphotericin B ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่มียาฆ่าจุลินทรีย์ไม่พบการปนเปื้อนอีก แต่เซลล์มีลักษณะเติบโตช้ากว่าปกติ จึงยังไม่พร้อมที่จะนำมาทดสอบ ในการศึกษานี้ยังต้องมีการค้นหาสภาวะของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมและทดสอบผลของ cytokines ต่อการสร้าง NO ในเซลล์มะเร็งจากรกต่อไป

Title	Effect of cytokines on nitric oxide production in inflammatory and metastasis processes of carcinoma cell lines
By:	Narit Chaiyurawat
	Pilaiwan Suwanachuen
Advisor:	Dr. Sakonwun Sangsree
Department:	Pharmacy Practice
Academic Year:	2004

Abstract

Nitric oxide (NO), a free radical gas synthesized endogenously in a body cell is found to play many important roles in physiological and pathological processes. Previous studies demonstrated that in pathological conditions such as bacterial infection or inflammation, a variety types of cells in the body, especially immunological cells, produce a large amount of NO (in a range of micromolar). Roles of NO are to eradicate pathogens and also involve in inflammation, For example, they increase vasodilation and vascular permeability, causing hypotension. The large amount of NO production from the cells is stimulated by inflammatory mediators as well as cytokines released from immune responses. Presently, cancer is one of major cause of death. It has been showed that in the disease progression, NO related to inflammatory and metastasis processes of cancer cells. To gain knowledge of understanding of these mechanisms will lead to an effective and safe therapy for cancer. An objective of our study is to study effects of cytokines in different types and concentrations, on NO production of carcinoma cell lines, an epithelial cells from placenta (MCF-7). NO is measured by using Griess reagent NO as a derivative nitrite in aqueous interacts with the reagent, resulting in color solution. The absorbance of the samples is read by a spectrometer at wavelength 540 nanometers. NO concentration is calculated from a sodium nitrite standard curve at various concentrations. We made standard curves in water, a phosphate saline buffer (PBS) and a DMEM medium. The absorbances reading in the medium were similar as in water, however in PBS was slightly higher. MCF-7 cells were grown in the DMEM media with 10% serum fetal bovine, at 37 ° C and 5% carbon dioxide. The cells were grown appropriately. However, we found bacterial and fungal contaminations respectively. The causes of bacterial and fungal contaminations mostly are from poor aseptic techniques and improper hygiene and humid conditions. We tried to solve these problems by adding the medium with antibacterial agents, streptomycin and penicillin and antifungal agent, amphotericin B. The cells were grown without contamination under antimicrobial agent mixed medium but we noticed a vary slow growing rate, resulting in inappropriate cell for testing. This study still needs further to find a good condition for growing cells and test cytokine effect on NO production.

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ผลของ Cytokines ต่อการสร้าง Nitric oxide ในกระบวนการอักเสบและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ได้รับความกรุณาจาก

อ. ดร. สกลวรรณ แสงศรี ที่กรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาและให้คำแนะนำในด้านต่างๆ รวมทั้งการแก้ไขข้อบกพร่องในการจัดทำรายงานปริญญานิพนธ์

ในการจัดทำปริญญานิพนธ์ครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ซึ่งอนุญาตให้ใช้อุปกรณ์และห้องปฏิบัติการ ภ.4306 ในการทำปฏิบัติการ ทั้งในเวลาราชการและนอกเวลาราชการ

ขอขอบคุณคณาจารย์และเพื่อนๆ นิสิตคณะเภสัชศาสตร์ รุ่นที่ 8 มหาวิทยาลัยนเรศวร ทุกท่านที่ให้คำแนะนำและเป็นกำลังใจเสมอมา

สุดท้ายนี้ คุณค่าและประโยชน์อันเกิดจากการศึกษานี้ ขอมอบให้เป็นแนวทางการศึกษาเพื่อการพัฒนาแนวทางการรักษาโรคมะเร็งในอนาคต

นริศ ชัยยูรวัฒน์
พิไลวรรณ สุวรรณชื่น

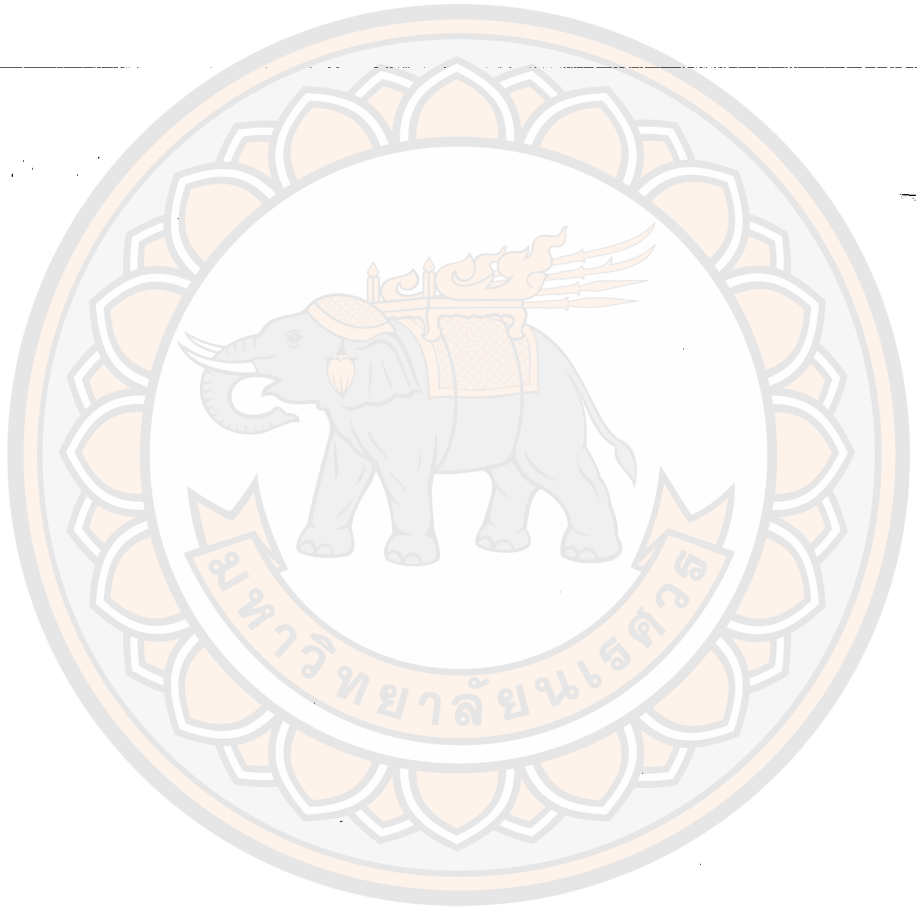
สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		II
กิตติกรรมประกาศ		III
สารบัญ		IV
สารบัญตาราง		V
สารบัญรูปภาพ		VI
บทที่ 1	บทนำ	
	ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
	วัตถุประสงค์	2
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2	ปริทัศน์วรรณกรรม	
	อนุมูลอิสระ	3
	บทบาทของ Nitric Oxide ทางสรีรวิทยาและพยาธิวิทยา	4
	กระบวนการสังเคราะห์ Nitric Oxide ในร่างกาย	5
	ผลของ Nitric Oxide ในการยับยั้งและการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง	8
บทที่ 3	วิธีการที่ใช้ในการศึกษา	
	วิธีการเพาะเลี้ยง cell lines	10
	การทำ standard curve	12
	ผลการทำ standard curve	14
บทที่ 4	สรุปและอภิปรายผลการศึกษา	17
	บรรณานุกรม	18

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 : ชนิดและความแตกต่างของ NOS ที่ใช้ในการสังเคราะห์ NO 7



สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 : กระบวนการสังเคราะห์ NO ในร่างกาย	6
รูปที่ 2 : ปฏิกิริยาของ NO กับอนุมูลอิสระอื่นๆ	6
รูปที่ 3: ลักษณะของ MCF-7 cell lines ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง	10
รูปที่ 4: ลักษณะของ MCF-7 cell lines ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง เมื่อมองจากภายใต้แสง fluorescence	11
รูปที่ 5: ลักษณะของ MCF-7 cell lines ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง เมื่อมองจากภายใต้แสง ไฟ (light)	11
รูปที่ 6: ผลการทำ standard curve ของ $NaNO_3$ ในน้ำ	14
รูปที่ 7: ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานการทำ standard curve ของ $NaNO_3$ ในน้ำ ($P \leq 0.05$)	14
รูปที่ 8: ผลการทำ standard curve ของ $NaNO_3$ ใน DMEM	15
รูปที่9: ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานการทำ standard curve ของ $NaNO_3$ ใน DMEM ($P \leq 0.05$)	15
รูปที่ 10: ผลการทำ standard curve ของ $NaNO_3$ ใน PBS	16
รูปที่11: ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานการทำ standard curve ของ $NaNO_3$ ใน PBS ($P \leq 0.05$)	16

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มา

ปัจจุบันนี้โรคไม่ติดต่อเป็นปัญหาด้านสุขภาพของประชากรโลก ได้มีการคาดการณ์ไว้ว่าในปี พ.ศ. 2558 โรคไม่ติดต่อจะเป็นสาเหตุการตายของประชากรโลกมากกว่าร้อยละ 50 โรคมะเร็ง จัดเป็น 1 ใน 10 ของสาเหตุการตายดังกล่าว และผู้ป่วยโรคมะเร็งมากกว่าร้อยละ 50 เป็นผู้ป่วยที่อาศัยอยู่ในประเทศที่กำลังพัฒนา นอกจากนี้องค์การอนามัยโลกได้ประมาณการณ์ไว้ว่าในปี 2563 จะมีประชากรโลกตายด้วยโรคมะเร็งมากกว่า 11,000,000 คน อยู่ในประเทศกำลังพัฒนามากกว่า 7,000,000 คน ดังนั้นโรคมะเร็งจึงจัดเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของโลก (1)

สำหรับประเทศไทยจากรายงานการประชุมวิชาการเรื่องโรคไม่ติดต่อและการบาดเจ็บระดับชาติ ซึ่งผลการรายงานข้อมูลจากสถิติสาธารณสุขในปี 2545 พบว่าสาเหตุการเสียชีวิตทั้งหมดโรคที่เป็นต้นเหตุของการเสียชีวิตสูงเป็นอันดับ 1 ได้แก่โรคมะเร็ง ซึ่งมีจำนวนผู้เสียชีวิตทั้งหมด 45,834ราย โดยคิดเป็น 73.3 ต่อประชากรไทย 100,000 คน (2) เพิ่มขึ้นจากสถิติสาธารณสุขในปี 2535 ซึ่งพบว่าโรคมะเร็งเป็นสาเหตุการตายอันดับที่ 3 ของประชากรไทยโดยคิดเป็น 43.5 ต่อประชากรไทย 100,000 คน ซึ่งแสดงว่าในปัจจุบันโรคมะเร็งเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประชากรไทย (3)

มะเร็งปากมดลูกเป็นโรคมะเร็งที่พบมากในประชากรไทย จากสถิติสาธารณสุขในปี 2545 พบว่าเป็นอันดับที่ 4 ของสาเหตุการตายของโรคที่เกิดจากมะเร็งในประชากรไทย คิดเป็น 4.0 ต่อประชากรไทย 100,000 คน (3) และพบว่ามะเร็งปากมดลูกเป็นโรคมะเร็งที่พบมากที่สุดในเพศหญิง จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า nitric oxide (NO) เป็นกาซที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระ มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ นอกจากนี้ยังพบว่ามีความสำคัญต่อการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง โดยมีตัวอย่างงานวิจัยที่มีการศึกษาผลของ NO ต่อกระบวนการอักเสบและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ดังนี้

ในปี 1987 Hibbs และคณะ เป็นกลุ่มวิจัยแรกที่อธิบายผลของการสร้าง NO ใน macrophage โดยพบว่าเป็น cytotoxicity ต่อเซลล์มะเร็ง (4)

ในปี 1991 Radomski และคณะเป็นกลุ่มวิจัยแรกที่พบว่ามีการพบ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จะผลิต NO ได้ในปริมาณที่สูง ใน tumor cell line จากเซลล์มนุษย์ โดยทดลองใน cell line จากมะเร็งลำไส้ใหญ่และ cell line ของมะเร็งที่มีการแพร่กระจายไปตามท่อน้ำเหลือง (5)

ผลของ NO ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งพบว่ามีผลเป็น cytotoxicity ต่อเซลล์ เนื่องจากมีผลทำลาย DNA ของเซลล์มะเร็งโดยยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ทำให้เกิดปฏิกิริยา reduction ของกาซออกซิเจนในกระบวนการ electron transport ของ mitochondria และกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเกิดกระบวนการ apoptosis เร็วขึ้น มีผลช่วยลดอายุและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (6-8)

ในปี 1995 Xie และคณะพบว่า NO มีผลกระตุ้นกระบวนการ apoptosis, ยับยั้งการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง โดยพบกระบวนการขยายหลอดเลือด, ยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเกร็ดเลือด และยับยั้งกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (9)

ในปี 1995 Jenkins และคณะ ศึกษาผลของ NO ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งโดยพบว่า NO มีผลกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง มีผลกระตุ้นให้เกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่มาหล่อเลี้ยงเซลล์มะเร็ง (10)

นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์มะเร็งมีความสัมพันธ์กับระยะของโรคมะเร็งในมนุษย์ เช่น มะเร็งที่เต้านม, รังไข่, ปากมดลูก, กระเพาะอาหาร, ศีรษะและคอ (11) และ NO ยังมีผลช่วยเพิ่มการดำเนินโรคของมะเร็ง โดยมีผลทำลาย DNA ของเซลล์ปกติในช่วงระยะแรกของการสร้างเซลล์มะเร็ง, เพิ่มการการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งโดยกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่มาหล่อเลี้ยงเซลล์มะเร็ง, กดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (12) และทำให้เกิดกระบวนการกลายพันธุ์ (mutation) ของ p53 เพื่อไม่ให้เกิดกระบวนการ apoptosis ของเซลล์มะเร็ง (13) vascular endothelial growth factor (VEGF) หรือ NO และ bradykinin มีผลเพิ่มความสามารถในการเลือกผ่าน (permeability) ของหลอดเลือดที่เลี้ยงเซลล์มะเร็ง ทำให้เกิดการกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่มาหล่อเลี้ยงเซลล์มะเร็ง (14)

ในปี 1997 Chinje และคณะใน พบว่า NO ในปริมาณที่ต่ำ จะมีความสัมพันธ์กับการสร้างหลอดเลือดใหม่และการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง แต่ NO ในปริมาณที่สูงจะให้ผลตรงข้ามกัน (15)

ในปี 1999 Murta และคณะพบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทั้งผลกระตุ้นและผลยับยั้งขึ้นอยู่กับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (16)

จากตัวอย่างผลการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการกระตุ้นการสร้าง NO มีความเกี่ยวข้องกับขบวนการอักเสบ การเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ทั้งในด้านบวกและลบ ทั้งมีผลยับยั้งและเสริม ต่อขบวนการแพร่กระจายเซลล์มะเร็ง ซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณของ NO ที่ถูกสร้างขึ้นมาและสิ่งแวดล้อม (16)

จากการศึกษาด้านการอักเสบ พบว่า cytokine เป็นสารสำคัญที่มีผลต่อการสร้าง NO จากเซลล์ โดยงานวิจัยส่วนใหญ่จะใช้ cell lines ในการศึกษาเป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากมีข้อดีที่แตกต่างจาก primary cells ซึ่งเป็นเซลล์ที่พบในร่างกาย คือ สามารถเจริญเติบโตได้อย่างต่อเนื่องไม่มีที่สิ้นสุด ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะที่พบในเซลล์มะเร็งเช่นกัน (17) นอกจากนี้พบว่าบาง cell lines สามารถสังเคราะห์ NO ได้คล้ายคลึงกับเซลล์มะเร็งที่พบในร่างกาย (18) ในการศึกษานี้ใช้ MCF-7 (cell line จากรก) ในกระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อใช้ในงานวิจัย

วัตถุประสงค์ของโครงงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง cell lines จากรก เพื่อใช้เป็นแบบ (model) ที่เหมาะสมในการศึกษากระบวนการอักเสบและการแพร่กระจายเซลล์มะเร็ง
2. เพื่อศึกษาผลของสารก่อภาวะอักเสบ (cytokines) ต่อการสร้าง nitric oxide ใน cell lines (ในที่นี้ใช้ Interleukin 1 และ Interleukin 18)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ

ประโยชน์ต่องานวิจัย:

1. ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง cell lines จากรก (MCF-7 cell lines)
2. อธิบายผลของ cytokines ต่อการสร้าง nitric oxide จากเซลล์มะเร็ง

ประโยชน์ต่อผู้วิจัย:

1. ได้รับความรู้และประสบการณ์ที่ถูกต้องเกี่ยวกับวิธีการเพาะเลี้ยง cell lines
2. นำความรู้ที่ได้รับไปใช้เป็นพื้นฐานในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเซลล์มะเร็งต่อไปในอนาคต

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรม

1. อนุมูลอิสระ (Free radical) (19)

อนุมูลอิสระเป็นอะตอม, โมเลกุลหรือสารประกอบซึ่งมีอิเล็กตรอนอิสระ (unpaired electron) อย่างน้อยหนึ่งตัวขึ้นไป มีคุณสมบัติชอบอิเล็กตรอน และจะดึงอิเล็กตรอนจากสารอื่นบริเวณที่มีอิเล็กตรอนหนาแน่น เช่น จากอะตอมของไนโตรเจนใน DNA, RNA และโปรตีน หรือจากพันธะคู่ระหว่างคาร์บอนใน unsaturated fatty acid และ Phospholipids เป็นต้น

การเกิดอนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้จากการที่อะตอมหรือโมเลกุลดูดกลืนพลังงานเข้าไปปริมาณเพียงพอที่ทำให้เกิดการแตกออกของพันธะโควาเลนท์ ดังสมการ

$R{:}H \longrightarrow R^{\bullet} + H^{\bullet}$

ซึ่งอนุมูลอิสระจะไม่มีความเสถียรและมีความโน้มเอียงสูงในการที่จะไปดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นเพื่อมาเข้าคู่กับ unpaired electron ของตนเอง ดังสมการ

$R^{\bullet} + H\text{-}X \longrightarrow R\text{-}H + X^{\bullet}$

อนุมูลอิสระที่สำคัญในร่างกาย

1. **ออกซิเจนและอนุพันธ์** (Oxygen and its derivertives)

ออกซิเจนโมเลกุลในธรรมชาติ มี 2 unpaired electrons ทำให้มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระ นอกจากนี้อนุพันธ์ของออกซิเจนส่วนใหญ่จะมีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยากับสารอื่นได้สูง ประกอบด้วย

1.1 Hydroxyl radical ($^{\bullet}OH$)

1.2 Superoxide anion ($O_2^{\bullet}$)

1.3 Hydrogen peroxide (H_2O_2)

2. **โอโซนและออกไซด์ของไนโตรเจน** (Ozone and oxide of nitrogen) ประกอบด้วย

2.1 Ozone (O_3)

2.2 The oxide of nitrogen) ประกอบด้วย

- nitric oxide (NO)
- nitrogen dioxide (NO_2)
- peroxynitrite ($ONOO^-$)

3. **โลหะทรานสิชัน** (Transition metals)

โลหะทรานสิชันที่แสดงคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระที่พบได้บ่อยในร่างกาย เช่น Fe^{2+}, Fe^{3+}, Cu^{2+}, Cu^{3+}, Mn^{2+} โดยอาจอยู่ในรูป metal containing protein, อยู่ในรูปอิสระหรืออยู่ในรูป complex metal

4. **อนุมูลอิสระอื่น ๆ**: ประกอบด้วย

4.1 Sulfur-centered radical เช่น Thiyl radical ($RS^{\bullet}$)

4.2 Carbon-centered radical เช่น Trichloromethyl radical ($^{\bullet}CCl_3$)

NO เป็นโมเลกุลที่ไม่มีประจุ ประกอบด้วยอิเล็กตรอน 5 ตัวจากไนโตรเจน และอิเล็กตรอน 6 ตัวจากออกซิเจน ซึ่งถือว่าเป็นอนุมูลอิสระและเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดเล็กที่สุดที่ได้จากเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากมายหลายประการ

ตั้งแต่ปี 1916 Mitchell เป็นคนแรกที่เสนอว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมสามารถสร้างออกไซด์ของกาซไนโตรเจน ในปี 1980 Furchott และ Zawadzki ได้ค้นพบ NO โดยบังเอิญจากการสังเกตการขยายตัวของหลอดเลือดแดงเออร์ตา (aorta) ของกระต่ายพบว่าเซลล์ endothelium สามารถสร้างสารที่ทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือดได้ จึงตั้งชื่อว่า endothelium-derived relaxation factor (EDRF)จากการศึกษาพบว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมสามารถสร้าง nitrate (NO_3^-) ได้ โดยพบว่า NO_3^- สร้างขึ้นมาจากเซลล์แมคโครฟาจ (macrophages) ของสัตว์ฟันแทะ เมื่อเซลล์สัมผัสกับสาร lipoplysaccharide (LPS) และ interferon-γ (IFN-γ) ในปี 1986 Furchott และ Zawadzki ก็เสนอว่า EDRF นี้ก็คือ อนุมูลอิสระ NO ซึ่งต่อมาได้มีการค้นพบว่า L-arginine เป็นสารตั้งต้นในการผลิต NO ในเซลล์ endothelium นอกจากนี้ยังมีการรวบรวมหลักฐานที่ค้นพบ สามารถสรุปได้ว่า NO เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเซลล์ macrophage ที่ถูกกระตุ้นแล้ว และได้มีการค้นพบ pathway การสร้าง NO ในเนื้อเยื่อสมอง และมีการค้นคว้าอีกมากมายเกี่ยวกับความสำคัญในการผลิต NO ในระบบสรีรวิทยาและพยาธิสรีรวิทยาในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ตั้งแต่การควบคุมความดัน ระบบการสื่อสารทางระบบประสาท ระบบภูมิคุ้มกัน ไปจนถึงการแข็งตัวขององคชาติ (20)

บทบาททางสรีรวิทยาของ NO ในภาวะปกติ (21)

1. ผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง: พบว่ามีบทบาทหน้าที่เป็นตัวช่วยในกระบวนการสร้างหน่วยความจำของเซลล์ประสาท (neuromediation)
2. ผลต่อระบบประสาทส่วนปลาย: พบว่าทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท เช่น การเกิดกระบวนการแข็งตัวขององคชาติ (penile erection), กระบวนการเคลื่อนไหวของกระเพาะอาหาร (gastric motility)
3. ผลต่อระบบทางเดินหายใจ: พบว่าออกฤทธิ์ทำให้เกิดการคลายตัวของหลอดลม (bronchodilator)
4. ผลต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด: พบว่าทำให้เกิดการคลายตัวของหลอดเลือดทำให้ความดันโลหิตลดลง และมีผลยับยั้งกระบวนการแข็งตัวของเกร็ดเลือด
5. ผลต่อระบบทางเดินอาหาร: พบว่ามีผลป้องกันการถูกทำลายของเยื่อบุเซลล์ของระบบทางเดินอาหาร
6. ผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน: พบว่า NO มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ (antimicrobial agent)

บทบาททางพยาธิวิทยาของ NO ในภาวะที่เกี่ยวข้องกับ Inflammatory Diseases (21)

1. <u>ภาวะติดเชื้อและภาวะช็อกเนื่องจากการติดเชื้อ</u>: พบว่ามีความสัมพันธ์กับความผิดปกติของ iNOS ที่เพิ่มขึ้น ทำให้ความสามารถในการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบที่หลอดเลือดเพิ่มขึ้น ทำให้ร่างกายมีความดันโลหิตลดลง
2. <u>ภาวะความดันโลหิตสูงและอาการแทรกซ้อนจากโรคเบาหวาน</u>: พบว่ามีความสัมพันธ์กับความผิดปกติของ eNOS ที่ลดลง ทำให้ความสามารถในการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบที่หลอดเลือดลดลง ทำให้ร่างกายมีความดันโลหิตเพิ่มขึ้น และเลือดไม่สามารถไหลเวียนไปเลี้ยงอวัยวะส่วนปลายซึ่งอาจก่อให้เกิดปัญหาเนื้อตายในผู้ป่วยเบาหวานได้

3. <u>ภาวะเนื่องจากการเสื่อมของเซลล์ประสาท:</u> พบว่ามีความสัมพันธ์กับความผิดปกติของ nNOS ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการสร้างหน่วยความจำในเซลล์ประสาท ถ้ามีปริมาณมากเกินไปก็จะสามารถสร้าง NO ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระทำให้เกิดกระบวนการ apoptosis ในเซลล์ประสาทได้ แต่ถ้ามีน้อยเกินไปก็จะทำให้ขาด NO ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการสร้างหน่วยความจำในเซลล์ประสาทได้ เช่น โรค Alzheimer

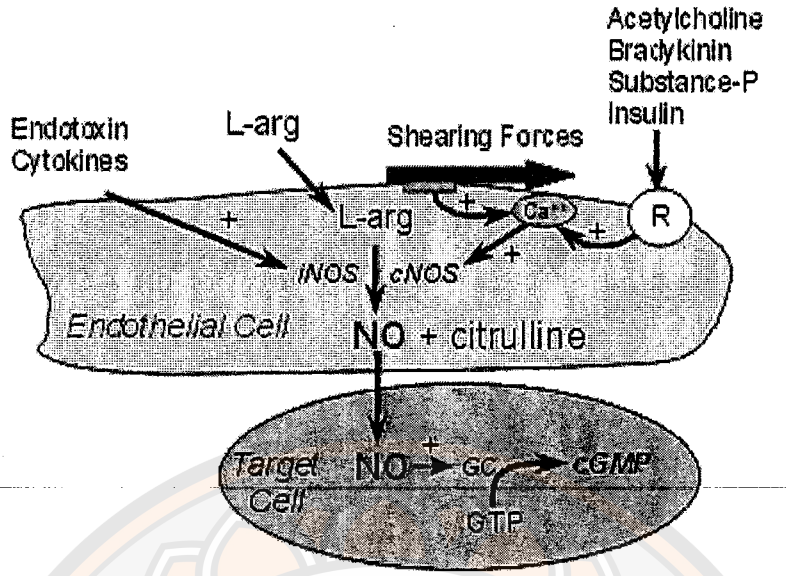
กระบวนการสังเคราะห์ Nitric oxide ในร่างกาย (22-24)

กระบวนการสังเคราะห์ NO มีปัจจัยที่สำคัญ คือ

- กรดอะมิโน L-Arginine
- nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form : NADPH)
- กาซออกซิเจน (O_2)
- nitric oxide synthase (NOS)
- cofactor คือ flavin adenine dinucleotide (FAD), flavin mononucleotide (FMN), heme และ tetrahydrobioptein (BH4)

จากสารตั้งต้นกรดอะมิโน L- Arginine ร่วมกับกาซออกซิเจน เกิดผลิตภัณฑ์ คือ กรดอะมิโน L-Citrulline และ NO ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่สามารถจับกับอนุมูลอิสระอื่นๆ, กาซออกซิเจน และโลหะหนักได้ดี สารเมตาบอไลท์ (metabolites) ที่เกิดขึ้น คือ nitrite, nitrate ซึ่งสามารถละลายน้ำได้ และ peroxynitrite ($OONO^-$) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เกิดจาก NO กับเปอร์ออกไซด์ที่สามารถทำลาย DNA ได้โดยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน

นอกจากนี้ยังพบว่าอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นยังสามารถเข้าจับกับอิออนของเหล็ก (Fe^{2+}) ในร่างกายได้ดี โดยเฉพาะกับอิออนของเหล็กใน soluble guanylate cyclase (sGC) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยน GTP เป็น cGMP ทำให้ cGMP ซึ่งเป็นสารสื่อ (secondary messenger) เพิ่มขึ้น มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ phosphodiesterase ทำให้ระดับของแคลเซียมอิออนภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น จึงเกิดกระบวนการขยายหลอดเลือด (vasodilation), ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือด (platelet aggregation), เป็นสารสื่อประสาท (neurotransmission) และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (macrophage-mediated immunity)



รูปที่ 1 : กระบวนการสังเคราะห์ NO ในร่างกาย

$$NO^{\cdot} + O_2^{\cdot} \longrightarrow ONOO^{-}$$
$$NO^{\cdot} + OH^{\cdot} \longrightarrow HNO_2$$
$$NO^{\cdot} + HbO_2 \longrightarrow MetHb + O_2$$

รูปที่ 2 : ปฏิกิริยาของ NO กับอนุมูลอิสระอื่นๆ

กระบวนการสังเคราะห์ NO: ในร่างกายพบว่าขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ NOS ซึ่งแบ่งเป็น 3 ชนิด คือ (20)

1. neuronal NOS (nNOS หรือ NOS I) พบในเซลล์ประสาท (neuron) มีหน้าที่สร้าง NO ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท
2. inducible NOS (iNOS หรือ NOS II) เป็นชนิดของ NOS ที่พบน้อยมากในภาวะปกติของเซลล์ทั่วไป แต่จะถูกกระตุ้นให้สร้างเมื่อร่างกายหรือเซลล์อยู่ในภาวะอักเสบเท่านั้น ซึ่งพบว่า iNOS ถูกสร้างมากในเซลล์ไฟโบรบลาส (fibroblast) และเซลล์แมคโครฟาจ (macrophages) เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารก่อภาวะอักเสบ (cytokines) เช่น interferon-γ (IFN-γ), interleukin-1β (IL-1β), tumor necrosis factor-α (TFN-α) และ lipopolysaccharide (LPS เป็น bacterial endotoxin ที่มีผลกระตุ้นให้ร่างกายเกิดภาวะอักเสบ)
3. endothelial NOS (eNOS หรือ NOS III) พบในเซลล์ endothelial มีหน้าที่สร้าง NO ซึ่งทำหน้าที่เป็น endothelial-derived relaxing factor (EDRF) มีผลทำให้กล้ามเนื้อเรียบคลายตัวป้องกันไม่ให้เกร็ดเลือดหรือเซลล์เม็ดเลือดขาวมาเกาะที่ผนังเยื่อบุด้านในของเซลล์ endothelial

ตารางที่ 1 : ชนิดและความแตกต่างของ NOS ที่ใช้ในการสังเคราะห์ NO

Isoform	nNOS	iNOS	eNOS
Class	Constitutive	Inducible	Constitutive
Source	Neurone	Macrophage Neutrophil Hepatocyte	Endothelial Epithelial
First cloned	Rat Cerebellum	Murine Macrophage	BAEC
Ca2+ Regulated	Dependent	Independent	Dependent
NO Production	Picomole	Nanomole-Micromole	Picomole

การแสดงออกของยีนและแหล่งที่พบ Nitric oxide synthase (NOS) (23-26)

เอนไซม์ NOS ทั้งสามชนิดนี้ประกอบด้วย BH_4 และ heme group ซึ่งสามารถเกาะเชื่อมกับ calmodulin (CaM), FAD, FMN และ NADPH ได้ แต่เอนไซม์ NOS แต่ละชนิดเป็นผลผลิตของยีนที่แตกต่างกันและอยู่กันคนละโครโมโซม ทำให้ NOS แต่ละชนิดมีความจำเพาะในการออกฤทธิ์, แหล่งเซลล์ที่พบและความแตกต่างในการควบคุมการสร้าง NO ซึ่งพบว่า nNOS และ eNOS สามารถสร้าง NO ขึ้นได้เองในภาวะปกติ และจะออกฤทธิ์ทำงานได้ก็ต่อเมื่อมีการจับกับ CaM โดยอาศัยผลของแคลเซียมอิออนภายในเซลล์ ฉะนั้น nNOS และ eNOS จึงถูกควบคุมการสร้าง NO จากผลของระดับแคลเซียมอิออนภายในเซลล์ร่วมกับปริมาณของ CaM แต่ iNOS จะถูกสร้างขึ้นเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย cytokines และสามารถจับกับ CaM โดยไม่จำเป็นต้องอาศัยผลของระดับแคลเซียมอิออนภายในเซลล์ ฉะนั้น iNOS จึงถูกควบคุมการสร้าง NO จากผลของ substrates และ cofactor ที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ NO

เอนไซม์ eNOS มักบริเวณผนังเยื่อหุ้มเซลล์ โดยพบได้ในภาวะปกติของเซลล์เยื่อบุ endothelium ทั่วไป ซึ่งต่อมามีการศึกษาพบว่าพบ NOS ในเซลล์ประสาท จึงเรียกชื่อใหม่เป็น neuronal NOS (nNOS) ซึ่งพบได้ในส่วนของไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ของเซลล์ประสาทของระบบประสาทส่วนปลายและระบบประสาทอัตโนมัติ ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท

เอนไซม์ iNOS เป็นเอนไซม์ที่สร้าง NO โดยไม่ต้องอาศัยการควบคุมจากระดับแคลเซียมอิออนภายในเซลล์ ทำให้เซลล์สามารถสร้าง NO ตลอดเวลา เซลล์ในร่างกายจะพบ iNOS เพิ่มมากขึ้น เมื่อร่างกายหรือเซลล์อยู่ในภาวะอักเสบ โดยพบว่าหลังจากจากที่เซลล์ได้รับการกระตุ้นด้วย cytokines และ LPS แล้ว ต้องใช้เวลาหลายชั่วโมงจึงจะสังเคราะห์เอนไซม์ iNOS ได้ และจะสร้างอยู่ได้นานหลายชั่วโมงเช่นกัน ซึ่งพบว่าชนิดและปริมาณของ cytokines เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการตอบสนองต่อสังเคราะห์เอนไซม์ iNOS นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์แต่ละชนิดก็มีการตอบสนองต่อ cytokines แตกต่างกัน

กลไกการกระตุ้นของ cytokines ให้มีการแสดงออกของยีน iNOS (20)

cytokines แต่ละชนิดจะมีผลในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนบน iNOS ที่ขั้นตอนแตกต่างกัน เช่น

a. ผลต่อขั้นตอนการสร้าง mRNA (Transcriptional mechanism)
b. ผลต่อขั้นตอนหลังการสร้าง mRNA (Post-transcriptional mechanism)
c. ผลต่อขั้นตอนการสร้างสายโปรตีน (Translational mechanism)

นอกจากนี้ยังพบว่าสิ่งมีชีวิตต่างเผ่าพันธุ์ (species) จะมีการแสดงออกของยีน iNOS แตกต่างกัน

จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า NO มีทั้งผลยับยั้งและผลกระตุ้นการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง โดยขึ้นอยู่กับปริมาณของ NO ที่สร้างขึ้น

ผลของ NO ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง:

พบว่ามีผลเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ต่อเซลล์ เนื่องจากมีผลทำลาย DNA ของเซลล์มะเร็งโดยกระบวนการ ดังนี้

1. ยับยั้งการสังเคราะห์ DNA (6)
2. ทำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันกับกาซออกซิเจนในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport) ในเซลล์ไมโตรคอนเดรีย (mitochondria) (6)
3. กระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเกิดกระบวนการตายของเซลล์ (apoptosis) เร็วขึ้น มีผลช่วยลดอายุและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (7)
4. ยับยั้งการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง โดยมีผลต่อกระบวนการขยายหลอดเลือด, ยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเกร็ดเลือด และยับยั้งกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (8)

ผลของ NO ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง:

NO มีผลกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง เนื่องกระตุ้นให้มีการสร้างหลอดเลือดใหม่มาหล่อเลี้ยงเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์มะเร็งมีความสัมพันธ์กับระยะของโรคมะเร็งในมนุษย์ เช่น มะเร็งที่เต้านม, รังไข่, ปากมดลูก, กระเพาะอาหาร, ศีรษะและคอ และ NO ยังมีผลช่วยเพิ่มการดำเนินโรคของมะเร็ง โดยมีผลทำลาย DNA ของเซลล์ปกติในช่วงระยะแรกของการสร้างเซลล์มะเร็ง โดยพบว่า NO มีผลกระกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งด้วยกระบวนการดังนี้

1. กดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (12)
2. ทำให้เกิดกระบวนการกลายพันธุ์ (mutation) ของ p53 เพื่อไม่ให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์ ของเซลล์มะเร็ง (13)
3. เพิ่มการการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งโดยกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่มาหล่อเลี้ยงเซลล์มะเร็ง โดยพบว่า vascular endothelial growth factor (VEGF) และ สารแบรดดิไคนิน (bradykinin) มีผลเพิ่มความสามารถในการเลือกผ่าน (permeability) ของหลอดเลือดที่เลี้ยงเซลล์มะเร็ง (14)

จากการศึกษาของ Chinje และคณะในปี 1997 พบว่า NO ในปริมาณที่ต่ำ จะมีความสัมพันธ์กับการสร้างหลอดเลือดใหม่และการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (15) แต่ NO ในปริมาณที่สูงจะให้ผลตรงข้ามกัน ซึ่งการศึกษาของ Murtaและคณะ ในปี1999 พบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทั้งผลกระตุ้นและผลยับยั้งขึ้นอยู่กับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (16)

จากผลการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการกระตุ้นการสร้าง NO มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ การเจริญเติบโต และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งทั้งในด้านบวกและลบ ทั้งมีผลยับยั้งและเสริมต่อขบวนการแพร่กระจายเซลล์มะเร็ง ซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณของ NO ที่ถูกสร้างขึ้นมาและสิ่งแวดล้อม (16)

จากการศึกษาด้านการอักเสบ พบว่า cytokine เป็นสารสำคัญที่มีผลต่อการสร้าง NO จากเซลล์ โดยงานวิจัยส่วนใหญ่จะใช้ cell lines ในการศึกษาเป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากมีข้อดีที่แตกต่างจาก primary cells ซึ่งเป็นเซลล์ที่พบในร่างกาย คือ สามารถเจริญเติบโตได้อย่างต่อเนื่องไม่มีที่สิ้นสุด ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะที่พบในเซลล์มะเร็งเช่นกัน (17) นอกจากนี้พบว่าบาง cell lines สามารถสังเคราะห์ NO ได้เหมือนกับเซลล์มะเร็งที่พบในร่างกาย (18) ในการศึกษานี้ใช้ MCF-7 (cell lines จากกรก) ในกระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อใช้ในงานวิจัย

ซึ่งผลของ NO ต่อการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ตามที่กล่าวมาข้างต้น อาจใช้เป็นเหตุผลร่วมในการอธิบายการเกิดกระบวนการอักเสบและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้ เนื่องจากในเซลล์มะเร็งจะพบว่ามีภาวะอักเสบของเซลล์ร่วมด้วยเสมอ ในการศึกษาผลของ cytokines (ในที่นี้ใช้ IL-1 และ IL-18) ต่อการสร้าง NO จาก MCF-7 cell lines อาจเป็นส่วนหนึ่งที่สามารถช่วยในการอธิบายกระบวนการระดับเซลล์ ต่อการเกิดกระบวนการอักเสบและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง และใช้เป็นส่วนหนึ่งของการพัฒนาแนวทางการรักษาโรคมะเร็งในอนาคต

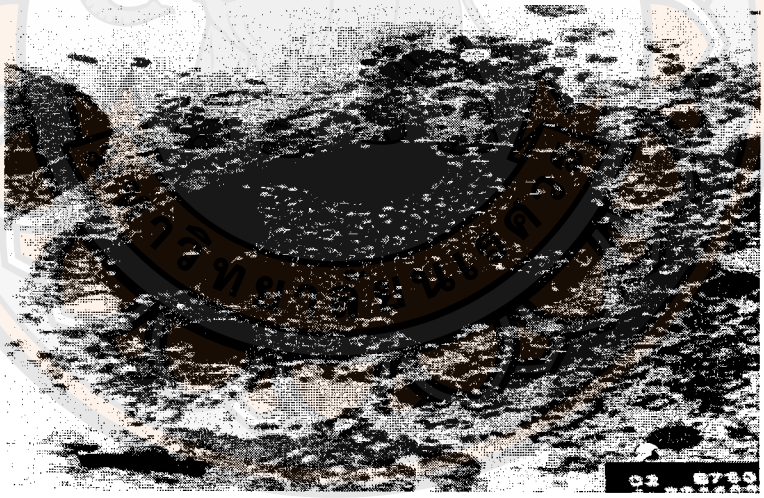
วิธีการที่ใช้ในการศึกษา

โครงงานวิจัยนี้ใช้รูปแบบการวิจัยเชิงทดลอง ซึ่งมีขั้นตอนการปฏิบัติที่สำคัญ 3 ขั้นตอนคือ

1. การศึกษาหาปัจจัยในการเพาะเลี้ยง cell lines (MCF-7) ซึ่งเป็นเซลล์ที่ได้จากกรก ที่เหมาะสม
2. การทดสอบผลของ cytokines ต่อการสร้าง NO ของ cell line จากกรกโดยการเปลี่ยนแปลงชนิดและความเข้มข้นของ cytokines ที่สนใจ (IL-1 และ IL-18)
3. การหาปริมาณของ NO ที่เกิดขึ้น โดยวัดจากความเข้มข้นของ nitrite ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเทียบกับ standard curve ของ sodium nitrite การหาปริมาณ NO โดยใช้ Griess reagent

วิธีการเพาะเลี้ยง cell lines:

1. ทำการเพาะเลี้ยง MCF-7 cell lines โดยใช้ เซลล์ที่แช่แข็ง (freeze cell) ที่อุณหภูมิ -80 องศา โดยนำมาอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาทันทีหลังจากนำออกจากตู้เย็น จากนั้นทำการเทเซลล์ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์
2. ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อวันเว้นวัน



รูปที่ 3: ลักษณะของ MCF-7 cell lines ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

(ที่มา: www.amaxa.com/products/cancer_research/commonly_used_cell_lines/mcf7/)

รูปที่ 4: ลักษณะของ MCF-7 cell lines ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง
เมื่อมองจากภายใต้แสง *fluorescence*

(ที่มา: www.amaxa.com/products/cancer_research/commonly_used_cell_lines/mcf7/)

รูปที่ 5: ลักษณะของ MCF-7 cell lines ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง
เมื่อมองจากภายใต้แสง ไฟ (light)

(ที่มา: www.amaxa.com/products/cancer_research/commonly_used_cell_lines/mcf7/)

สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์:

1. ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM media)
   10% fetal bovine serum (FBS)
2. เลี้ยงเซลล์ในตู้อบเลี้ยงเชื้อที่ควบคุมสภาวะดังต่อไปนี้
   - อุณหภูมิ 37° C
   - 5% carbon dioxide
3. ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อวันเว้นวัน

การเตรียม DMEM media + 10% FBS:

1. ละลาย DMEM ในน้ำกลั่น 900 ml
2. ผสม 3.7 g/l sodium bicarbonate + 1mM sodium pyruvate
3. ปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในช่วง7.2-7.3 โดยใช้ 1 N hydrocholic acid (HCl) และ 1 N sodium hydroxide (NaOH)
4. กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 micron แล้วเติม FBS อัตราส่วน 1 : 10

หลักการทำ Standard curve:

1. นำสารละลาย sodium nitrite ($NaNO_3$) ที่จะใช้ทำ standard curve มาผสมกับ greiss reagent ในอัตราส่วน 1:1 ของทุก ความเข้มข้น
2. นำไปวัดค่าดูดซับ(absorbance)ด้วยเครื่องสเปคโตรมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 540 nm
3. ทำการทดลอง 3 ครั้ง แล้วนำค่าเฉลี่ยไปเขียนเป็นกราฟ

การเตรียม Na nitrite:

นำ $NaNO_3$ ละลายน้ำ, DMEM และ Phosphate buffer saline (PBS) โดยเตรียม9 ความเข้มข้น ได้แก่ 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 10, 20 µM

การเตรียม griess reagent:

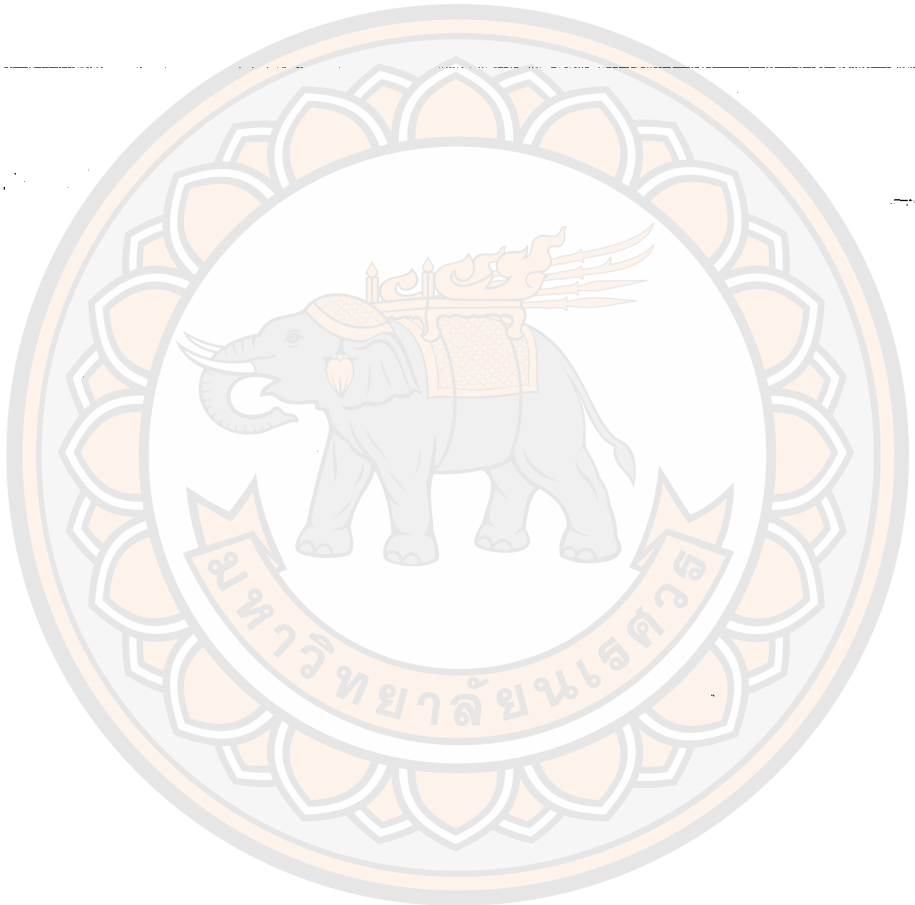
สารที่ใช้ประกอบด้วย

- 1% Sulfanilamide(w/v)
- 0.1% Napthalinediamine(w/v)
- 2% Phosphoric acid(v/v)

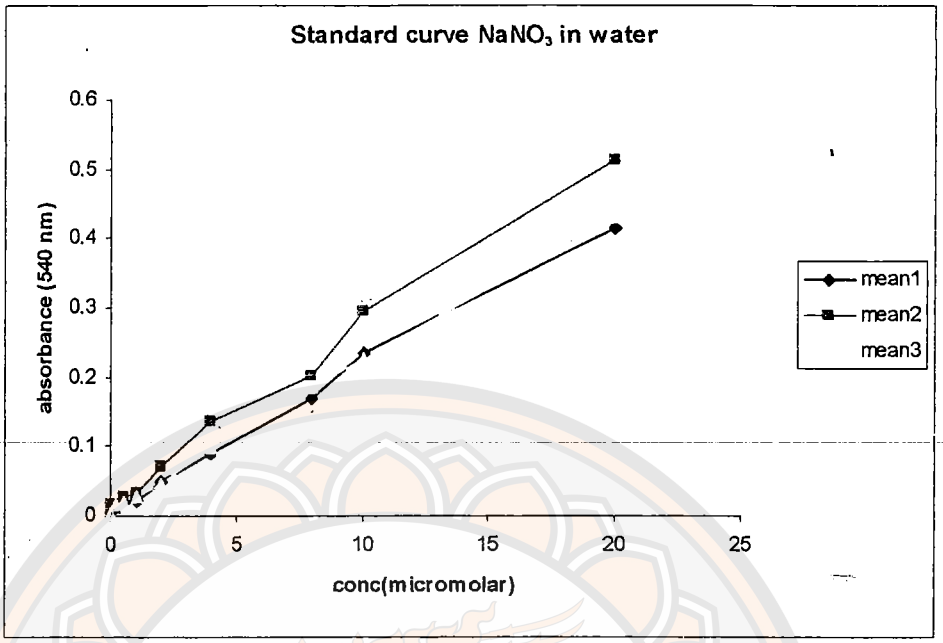
เตรียม 25 ml โดยผสม sulfanilamide 0.25 g ใน napthalinediamine 0.025 g และหยดด้วย phospholic acid (85%) 0.588 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ

ผลการทำ Standard curve

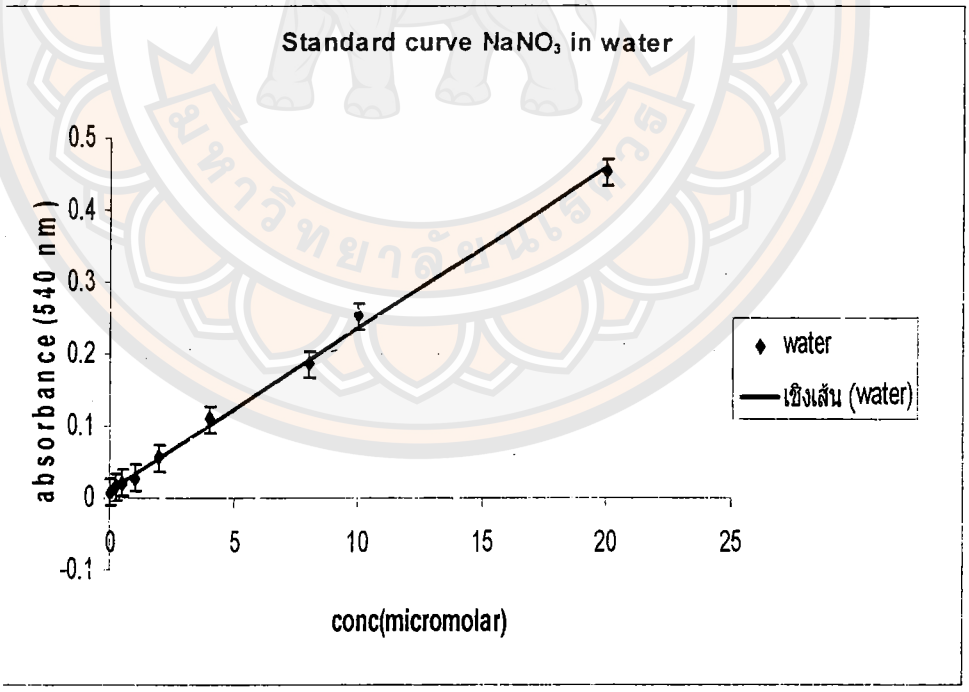
จากค่าดูดซับที่วัดได้นั้นเมื่อนำสารทั้งสามชนิดคือ $NaNO_3$ในน้ำ, ในDMEM และ ในPhosphate buffer saline (PBS) ไปเขียนกราฟพบว่าค่าดูดซับที่ได้จาก PBS นั้นมีค่าสูงกว่าค่าดูดซับจาก DMEM และน้ำ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกัน ซึ่งอาจแสดงให้เห็นว่าในภาวะปกตินั้น PBS เป็นสารที่มีค่าดูดซับในตัวอยู่แล้ว



ผลการทดลอง

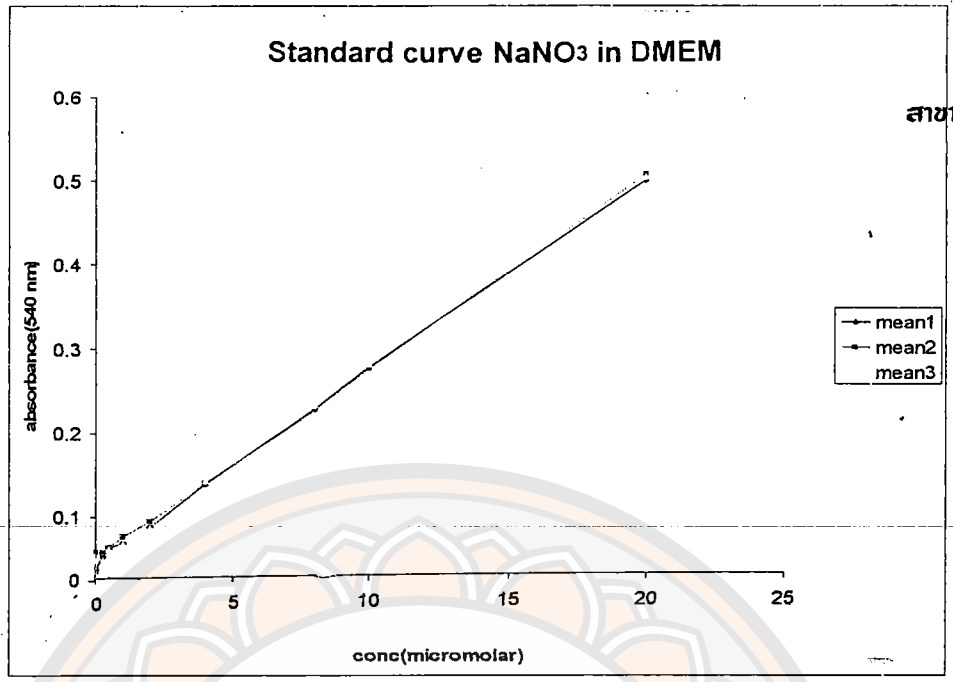


รูปที่ 6: ผลการทำ standard curve ของ $NaNO_3$ ในน้ำ

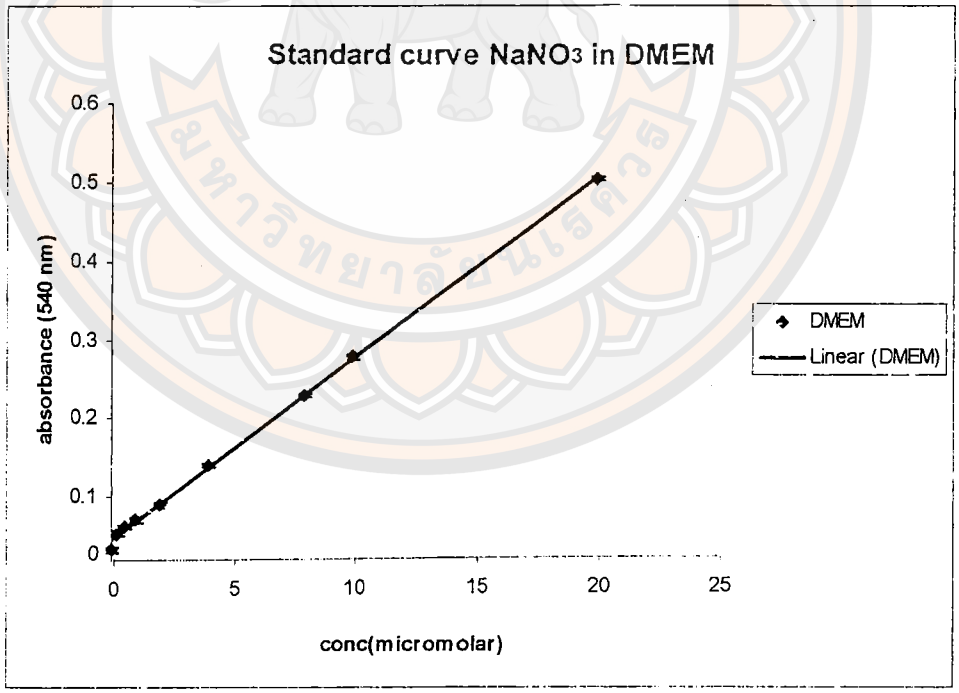


รูปที่ 7: ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานการทำ standard curve ของ $NaNO_3$ ในน้ำ ($P \leq 0.05$)

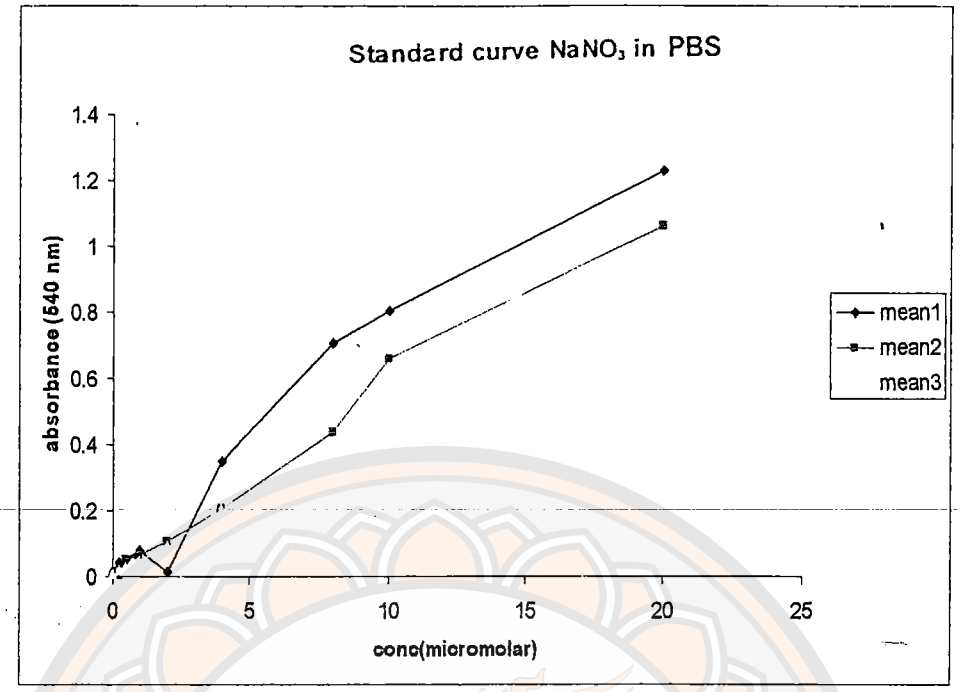
T
W4
96251พ
2548
3478674
15
26 ก.ค. 2548
482017ค
สำนักหอสมุด
สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ



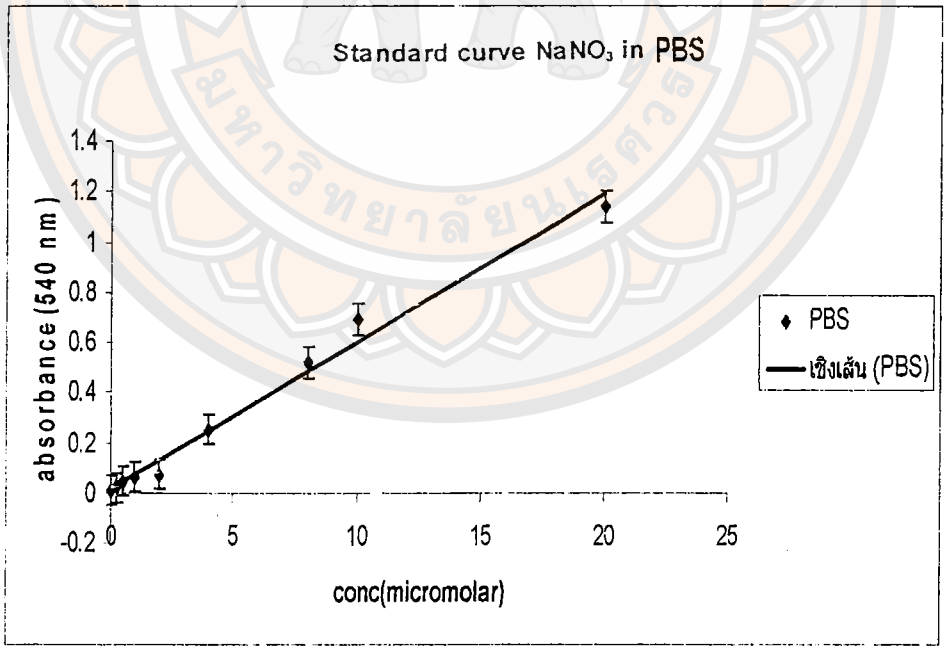
รูปที่ 8: ผลการทำ standard curve ของ $NaNO_3$ ใน DMEM



รูปที่9: ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานการทำ standard curve ของ $NaNO_3$ ใน DMEM ($P \leq 0.05$)



รูปที่ 10: ผลการทำ standard curve ของ $NaNO_3$ ใน PBS



รูปที่11: ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานการทำ standard curve ของ $NaNO_3$ ใน PBS ($P \leq 0.05$)

สรุปและอภิปรายผลการศึกษา

เซลล์มะเร็งจากรกที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมด้วยซีรั่มร้อยละ 10 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และกาซคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศร้อยละ 5 ปรากฏว่าเซลล์เจริญเติบโตได้ดีแต่เกิดอุปสรรคในการเพาะเลี้ยงคือ เซลล์มะเร็งถูกปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียและเชื้อราตามลำดับ โดยที่สาเหตุของการปนเปื้อนน่าจะเกิดมาจาก การขาดทักษะทางด้านเทคนิคปราศจากเชื้อ การรักษาความสะอาดและการควบคุมสภาวะในห้องเลี้ยงเชื้อ ทางคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการแก้ไขปัญหาที่คาดว่าน่าจะเป็นสาเหตุของการปนเปื้อน โดยทำความสะอาดอุปกรณ์ทุกชนิดด้วยเทคนิคปราศเชื้อ เติม streptomycin + penicillin ความเข้มข้น 100 µg/ml ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรีย และเติม amphoteracin B ความเข้มข้น 25 µg/ml ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับป้องกันการติดเชื้อรา เมื่อทำการแก้ไขปัญหาแล้วจึงทำการเลี้ยงเซลล์ต่อไป เซลล์ที่เลี้ยงได้นั้นมีลักษณะการเติบโตที่แตกต่างจากตอนแรก โดยมีการเจริญเติบโตของเซลล์ช้ากว่าปกติ การกระจายตัวของกลุ่มเซลล์ไม่สม่ำเสมอ และลักษณะออแกเนลล์ของเซลล์ผิดปกติ ทางคณะผู้วิจัยคาดว่าการเติมยาฆ่าเชื้อนั้นลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นอาจทำให้สภาวะในการเลี้ยงเชื้อไม่เหมาะสม เนื่องด้วยเวลาในการดำเนินงานที่มีอยู่จำกัด เซลล์ที่ได้จึงไม่พร้อมที่จะมีการทำทดสอบในขั้นต่อไปตามที่ได้วางแผนไว้

ขั้นตอนการทดลองที่คณะผู้วิจัยได้ทำในขณะทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งจากรกคือการทำ standard curve โดยใช้สาร 3 ชนิดคือ $NaNO_3$ในน้ำ, ในDMEM และ ในPhosphate buffer saline (PBS) ซึ่งผลที่ได้นั้นค่าดูดซับจาก PBS มีค่าเฉลี่ยสูงกว่า น้ำและ DMEM ซึ่งมีค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกัน อาจแสดงให้เห็นว่าในภาวะปกตินั้น PBS เป็นสารที่มีค่าดูดซับในตัวอยู่แล้ว

การทดสอบในขั้นต่อไปซึ่งคณะผู้วิจัยได้วางแผนไว้นั้นเป็นการทดสอบโดยใช้ cytokines 2 ชนิดคือ IL-1, IL-18 แบ่งเป็น 2 ส่วนคือ

1. Dose dependent
2. Time dependent

Dose dependent คือ เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้าง NO โดยกำหนดระยะเวลาสมมติไว้โดยมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มข้นของ cytokines ในแต่ละความเข้มข้นแล้วดูว่าที่ความเข้มข้นไหนมีการกระตุ้นการสร้าง NO ในเซลล์มะเร็งได้มากที่สุด ส่วน Time dependent เป็นการนำค่าความเข้มข้นที่ได้จากการทดสอบ dose dependent มาทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้าง NO

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยชิ้นนี้ คือ ควรมีการฝึก aseptic technique ของผู้ทำการวิจัยให้ชำนาญก่อนเริ่มการทำวิจัย รวมถึงควรมีการค้นหาสภาวะของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมให้ได้ก่อน เพื่อป้องกันปัญหาเนื่องจากความจำกัดของระยะเวลาทำการวิจัยจะในการเพาะเลี้ยงเซลล์ สุดท้ายนี้การทดสอบผลของ cytokines ต่อการสร้าง NO ในเซลล์มะเร็งจากรก ควรมีการดำเนินการต่อไป เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการพัฒนาแนวทางในการรักษาโรคมะเร็งในอนาคต

บรรณานุกรม

1. ระบาดวิทยาของโรคมะเร็งในประเทศไทย [homepage on internet]. Karol Sikora.Developing a global strategy for cancer; date unknown [revised 8 สิงหาคม 2547; cited 8 กันยายน 2547]. หนังสือประกอบการประชุมแผนการป้องกันและควบคุมโรคมะเร็งแห่งชาติวันที่ 20 เมษายน 2541 กระทรวงสาธารณสุข. Available from: http://www.geocities.com/suchartw/epidermiology.html.
2. หัวใจ มะเร็ง อุบัติเหตุ ความดัน ดับชีวิตคนไทย ชม.ละ 13 คน [homepage on internet]. ผู้จัดการออนไลน์; date unknown [revised 16 มิถุนายน 2547; cited 8 กันยายน 2547]. Available from: http://www.manager.co.th/QOL/ViewNews.
3. อัตราตาย 5 อันดับแรกปี 2535 และ ปี 2545 แบ่งตามกลุ่มโรคสำคัญ 10 กลุ่มโรคสำคัญ [homepage on internet]. สถิติสาธารณสุข; date unknown [revised 2545; cited 8 กันยายน 2547]. สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข. Available from: http://203.157.19.191/index%20stat%2045.html.
4. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deaminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. Science 1987; 235:473-6.
5. Radomski MW, Palmer PMJ, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway, present in human platelets aggregation. Proc Natl Acad Sci Usa 1990; 87:5193-7.
6. Garban HJ, Bonavida B. Nitric oxide sensitizes ovarian tumor cells to Fas- induced apoptosis. Gynecol Oncol 1999; 73:257-64.
7. Juang SH, Xie K, Xu L. suppression of tumorigenicity and metastasis of human ranal carcinoma cells by infection with retroviral vectors harboring the murine inducible nitric oxide synthase gene. Hum Gene Ther 1998; 9:845-85.
8. Cui S, Reichner JS, Mateo RB, Albina JE. Activated murine macrophage induced apoptosis in tumor cells through nitric oxide-dependent or-independent mechanisms. Cancer Res 1994; 54:2462-7.
9. Xie K, Huang S, Dong Z. Transfection with the inducible nitric oxide synthase gene suppresses tumorigenicity and abrogates metastasis by K-1735 murine melanoma cells. J Exp Med 1995; 181:1333-43.
10. Jenkins DC, Charles IG, Thomsen LL. Roles of nitric oxide in tumor growth. Proc Natl Ac Acad Sci USA 1995; 92:4392-6.
11. Thomsen LL, Miles D. Role of nitric oxide in human progression: lesson from human tumors. Cancer Met Rev 1998; 17:107-18.
12. Lala PK, Orucevic A. Role of nitric oxide in tumor progression: lessons from experimental tumors. Cancer Metastasis Rev 1998; 17:91-106.

13. Ambs S, Hussain SP, Harris CC. Interactive effects of nitric oxide and the p53 tumor suppressor gene in carcinogenesis and tumor progression. FASEB J 1997; 11:443-8.

14. Maeda H, Akaide T. Nitric oxide and oxygen radical infection, inflammation and cancer. Biochemistry 1998; 7:1007-19.

15. Chinje EC, Stratford IJ. Role of nitric oxide in growth solid tumor: a balancing act. Essays Biochem 1997; 32: 61-72.

16. Murta BMT, Machado JS, Zaparoli M, Lala VC, Murta EF. The relationship of host immune cells. Cytokines and nitric oxide production to tumor cells in ovarian carcinoma. Sao Paulo Med J 1999; 2:87-92.

17. Cancer Cell Line Profiling Array [homepage on internet]. BD Biosciences; date unknown [revise 2003 Jan; cited 2004 Sep 8]. Available from: http://www.bdbiosciences.com/clontech/archive/JAN03UPD/pdf/Cancer_ Cell.pdf.

18. Clinical Science (2004) Immediate Publication[homepage on internet]. Magarett AMN, Nelson DMM, Oleg E, Peter JG. Tumour cell growth in culture. Tumour cell growth in culture; date unknown [revise 2004 May 25; cited 2004 Sep 8]. Available from: http://www.clinsci.org/cs/imps/refer.html.

19. Koppenol WH, What is in a name? Rule for radical. Free Radic Biol. Med 1990; 9:225-7.

20. สมเกียรติ วัฒนศิริชัยกุล, ดวงฤดี วัฒนศิริชัยกุล. ไนตริกออกไซด์กับภาวะช็อก ใน: สมเกียรติ วัฒนศิริชัยกุล, บรรณาธิการ, ภาวะช็อก (Moleculllar / cellular and clinical basis). กรุงเทพ: เม็ดทรายพริ้นติ้ง; 2545: 154-75.

21. Kai Z. Role of Nitric Oxide during Inflammation. Nature 1987; 327:1-5.

22. Xu W, Liu L, Loizidou M, Ahmed M, Charles LG. The role of nitric oxide in cancer. Cell research 2002;12:311-20.

23. Palmer PMJ, Rees DS, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature 1988; 333:664-6.

24. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide in mammals. Biochem J 1994; 298:249-58

25. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byms RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from the artory and vein is nitric oxide. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84:9265-9.

26. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev 1991; 43:109-42.