

ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระและยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งของ
ไฮโดรไลเซทจากสาหร่ายพวงองุ่น

FREE RADICAL SCAVENGING AND CANCER ANTI-PROLIFERATIVE
ACTIVITIES OF HYDROLYSATE FROM SEA GRAPES

รชานนท์ มั่นกิจ
RACHANON MANKIT

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2562

KMITL-2019-SC-M-020-062

ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระและยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งของ
ไฮโดรไลเซทจากสาหร่ายพวงองุ่น

FREE RADICAL SCAVENGING AND CANCER ANTI-PROLIFERATIVE
ACTIVITIES OF HYDROLYSATE FROM SEA GRAPES

รชานนท์ มั่นกิจ
RACHANON MANKIT

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2562

KMITL-2019-SC-M-020-062

FREE RADICAL SCAVENGING AND CANCER ANTI-PROLIFERATIVE
ACTIVITIES OF HYDROLYSATE FROM SEA GRAPES

RACHANON MANKIT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2019

KMITL-2019-SC-M-020-062

COPYRIGHT 2019

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระและยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งของไฮโดรไลเซทจากสาหร่ายพวงองุ่น
ชื่อนักศึกษา	นายรชานนท์ มั่นกิจ
รหัสประจำตัว	59605055
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2562
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พุกษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รศ.ดร.อภิชาติ กาญจนทัต

บทคัดย่อ

อนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลที่ว่องไวในการทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของสารชนิดต่างๆ ภายในร่างกายของมนุษย์ ส่งผลให้อนุมูลอิสระสร้างความเสียหายให้กับเซลล์ของสิ่งมีชีวิตได้ สาหร่ายบางชนิดสามารถผลิตเพปไทด์ขนาดเล็กที่มีความสามารถขจัดอนุมูลอิสระและยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากสาหร่ายพวงองุ่น จากผลการศึกษาพบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยโปรตีนในสาหร่ายพวงองุ่นด้วยเอนไซม์เพปซิน-แพนกรีเอติน ที่ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS สูงที่สุด จากนั้น โปรตีนไฮโดรไลเซทนี้จะถูกแยกออกเป็น 5 ส่วนที่มีขนาดต่างกันตามน้ำหนักโมเลกุล ส่วนของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 0.65 กิโลดาลตัน (UF-5) แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ UF-5 สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 เซลล์มะเร็งตับชนิด Hep-G2 และ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.77, 0.71 และ 0.76 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้น เซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 ที่ได้รับ UF-5 มีระดับการแสดงออกของยีน CTSS เพิ่มขึ้น และมีระดับการแสดงออกของยีน BCL2 ลดลง ซึ่งให้เห็นว่า เซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 ที่ได้รับ UF-5 เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส จากการวิเคราะห์การจัดเรียงลำดับกรดอะมิโนของเพปไทด์จากสาหร่ายพวงองุ่น พบว่าเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะประกอบด้วย ฮีสทีดีน กรดแอสปาร์ติก และ ไลซีน

Thesis Title	Free radical scavenging and cancer anti-proliferative activities of hydrolysate from Sea grapes
Student Name	Mr. Rachanon Mankit
Student ID	59605055
Degree	Master of Science in Biotechnology
Department	Biology
Year	2019
Thesis Advisor	Asst. Prof. Saranya Phunpruch, Dr.rer.nat.
Thesis Co-advisor	Assoc. Prof. Aphichart Karnchanatat, Ph.D.

Abstract

Free radicals are molecules that can react easily with many substances in the human body and thus cause damage to the cells. Some kinds of algae can produce a great variety of small peptides which show high free radical scavenging and cancer anti-proliferative activities. The aim of the present study was to evaluate such activities of protein hydrolysate extracted from Sea grapes. The result revealed that protein hydrolysate of Sea grapes obtained from enzymatic hydrolysis with 5% (w/v) pepsin-pancreatin showed the highest antioxidant activity against ABTS. This protein hydrolysate was separated into 5 fractions based on their molecular weight (MW). The protein hydrolysate fraction with MW less than 0.65 kDa (UF-5) exhibited high level of free radical scavenging activity on ABTS radical with IC_{50} values of 3.35 $\mu\text{g/ml}$. It had also the highest anti-proliferative activity on human lung cancer cells (CHAGO-K1), human liver cancer cells (Hep-G2) and human colon cancer cells (SW620) with IC_{50} values of 0.77, 0.71 and 0.76 $\mu\text{g/ml}$, respectively. In addition, upregulation of CTSS gene and downregulation of BCL2 gene were found in CHAGO-K1 cells treated with UF-5, indicating that cells underwent the process of apoptosis after treatment with UF-5. By *de novo* peptide sequencing analysis, peptides exhibiting antioxidant activity from Sea grapes contained histidine, aspartic acid and lysine.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีโดยได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สร้อยญา พันธุ์ฤกษ์ และ อาจารย์ที่ปรึกษา ร่วม รศ.ดร.อภิชาติ กาญจนทัต ที่คอยให้ความรู้ คำแนะนำ และความช่วยเหลือต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ตลอดมา ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอขอบพระคุณท่านอาจารย์ไว้ ณ ที่นี้

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.เสาวรัตน์ จันทะโร ประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รศ.ดวงใจ โอชัยกุล กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.สร้อยญา พันธุ์ฤกษ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ รศ.ดร.อภิชาติ กาญจนทัต กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาสละเวลาตรวจสอบให้คำแนะนำ ตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้ให้มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ดร.ธนาธร สายสวย นักวิจัยหลังปริญญาเอก สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ และวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ดร.พิรุฬห์พร ศรีมงคล นักวิจัยหลังปริญญาเอก สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ คุณปภััสสรา แสงธนู นักวิจัยผู้ช่วย สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่คอยช่วยเหลือให้การทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ บุคลากรเจ้าหน้าที่สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวกในการจัดหาอุปกรณ์ สารเคมี และคำแนะนำต่างๆ ในการใช้อุปกรณ์ระหว่างการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ คุณสุนทร บารมี คุณดุขฎิ มั่นกิจ และคุณเอื้อใจ วงศ์สิน รวมทั้งครอบครัวบารมีทุกท่านของข้าพเจ้า ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ความรัก ความเข้าใจ และสนับสนุนส่งเสริมด้านการศึกษาให้แก่ข้าพเจ้าโดยตลอดมา

รชานนท์ มั่นกิจ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	4
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
2.1 อนุมูลอิสระ	6
2.1.1 อนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจน	7
2.1.1.1 อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์	8
2.1.1.2 อนุมูลอิสระไฮดรอกซิล	8
2.1.1.3 ไฮโดรเจนเพอรอกไซด์	9
2.1.1.4 อนุมูลอิสระเพอรอกซิล	10
2.1.1.5 ซิงเกิลทออกซิเจน	10
2.1.1.6 อนุมูลอิสระไฮโปคลอไรต์	10
2.1.2 อนุมูลอิสระกลุ่มไนโตรเจน	11
2.1.2.1 ไนตริกออกไซด์	11
2.1.2.2 เพอรอกซิลไนไตรต์	12
2.2 ภาวะเครียดออกซิเดชัน	13

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.7.2 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบอะพอโทซิส	43
2.8 สาหรัยพวงงุ่น	45
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	47
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	51
3.1 สาหรัยที่ใช้ในการทดลอง	51
3.2 อุปกรณ์	51
3.3 เซลล์และอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์	53
3.4 สารเคมี	54
3.5 วิธีการทดลอง	56
3.5.1 การเตรียมเพปไทด์หรือโปรตีนไฮโดรไลเซท	56
3.5.2 การวัดปริมาณโปรตีน	57
3.5.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	57
3.5.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง	58
3.5.5 การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบอะพอโทซิส	60
3.5.6 การทำโปรตีนไฮโดรไลเซทให้บริสุทธิ์	66
3.5.7 การศึกษาลำดับกรดอะมิโนของเพปไทด์	67
3.5.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ	68
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	69
4.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทและอัลตราฟิลเทรต	
จากสาหรัยพวงงุ่น	69
4.1.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากสาหรัยพวงงุ่น	69
4.1.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของอัลตราฟิลเทรต	74
4.2 ฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งของอัลตราฟิลเทรต-5	76
4.3 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบอะพอโทซิส	84
4.3.1 ผลการสกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1	84
4.3.2 ผลการแสดงออกของยีนในวิถีการตายของเซลล์แบบอะพอโทซิส	88

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.4 ผลการศึกษาการทำ UF-5 ให้บริสุทธิ์และการระบุชนิดของเพปไทด์	92
4.4.1 ผลการทำ UF-5 ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค RP-HPLC	92
4.4.2 การระบุชนิดของเพปไทด์	94
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	97
5.1 สรุปผลการวิจัย	97
5.2 ข้อเสนอแนะ	98
เอกสารอ้างอิง	100
ภาคผนวก	108

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 บทบาทของไนตริกออกไซด์ต่ออวัยวะในร่างกายของมนุษย์	12
2.2 เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากสิ่งมีชีวิตบางชนิด	23
2.3 การทำงานของเอนไซม์ แหล่งที่มา และสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของ เอนไซม์โปรตีเอส	31
3.1 สภาวะที่ใช้ในการย่อยโปรตีนในสาหร่ายพวงองุ่นด้วยเอนไซม์โปรตีเอส	56
3.2 องค์ประกอบของสารที่ใช้ในขั้นตอน Annealing step ใน 1 ปฏิกริยา	63
3.3 องค์ประกอบของสารที่ใช้ในขั้นตอน Extension step ใน 1 ปฏิกริยา	64
3.4 ไพโรมเมอร์สำหรับใช้ทำปฏิกริยาพีซีอาร์แบบเรียลไทม์	65
3.5 สภาวะต่างๆ ที่ใช้ในปฏิกริยาพีซีอาร์แบบเรียลไทม์	65
4.1 ค่า IC ₅₀ ของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยโปรตีนของสาหร่ายพวงองุ่นด้วย เอนไซม์ชนิดต่างๆ ต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS	70
4.2 ค่า IC ₅₀ ของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยโปรตีนของสาหร่ายพวงองุ่นด้วย เอนไซม์ชนิดต่างๆ ต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH	72
4.3 ค่า IC ₅₀ ของอัลตราฟิลเทรตต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH	75
4.4 ค่า IC ₅₀ ของ UF-5 ต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์	78
4.5 ลักษณะของเซลล์ในสภาวะปกติและเซลล์ที่ได้รับ UF-5 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ใช้แสงแบบอินเวิร์ท (Invert microscope) กำลังขยายภาพ 400 เท่า	80
4.6 ความเข้มข้นและคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่ได้จากเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 ในสภาวะต่างๆ	85
4.7 ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของ Chromatographic fraction	93
4.8 ลำดับกรดอะมิโนของเพปไทด์จากการทำ <i>De novo</i> peptide sequencing เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนในสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในฐานข้อมูล NCBI	95

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ปฏิกริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ	7
2.2 การทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ	18
2.3 โครงสร้างของกรดแอสคอร์บิกหรือวิตามินซี	20
2.4 โครงสร้างของสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์บางชนิด	21
2.5 โครงสร้างของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์บางชนิด	22
2.6 โครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์บางชนิด	24
2.7 โครงสร้างของเพปไทด์	25
2.8 ตัวอย่างฤทธิ์ทางชีวภาพของเพปไทด์	26
2.9 ลักษณะการเร่งปฏิกิริยาสลายพันธะเพปไทด์ของเอนโดเพพทีเดสและเอ็กโซเพพทีเดส	28
2.10 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของอนุมูลอิสระ DPPH· เมื่อเกิดปฏิกิริยารีดักชันกับ สารต้านอนุมูลอิสระ (AH)	34
2.11 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของอนุมูลอิสระ ABTS· เมื่อเกิดปฏิกิริยารีดักชันกับ สารต้านอนุมูลอิสระ	35
2.12 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ MTT ไปเป็นผลึกของฟอร์มazan โดยเอนไซม์ ไมโทคอนเดรียลรีดักเตส	37
2.13 ลักษณะของเซลล์ที่เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสและเนโครซิส	39
2.14 วิธีการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส	42
2.15 ลักษณะทั่วไปของสาหร่ายพวงองุ่น	45
4.1 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง 5 ชนิดและเซลล์ปกติของไฟโบรบลาสต์ ที่เนื้อเยื่อปอดชนิด Wi-38 ของ UF-5 ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนในอัลตราฟิลเตรต เท่ากับ 1.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	77
4.2 แถบของอาร์เอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	87
4.3 ระดับการแสดงออกของยีนสัมพันธ์ (Relative gene expression) ของยีนที่เกี่ยวข้อง กับการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1	89
4.4 อัลตราไวโอเลตโครมาโทแกรม (Ultraviolet chromatogram) จากเทคนิค RP-HPLC บนคอลัมน์แบบรีเวิร์สเฟส C ₁₈	93

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ในปัจจุบัน มนุษย์มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคภัยไข้เจ็บต่างๆ มากขึ้น เนื่องจากการดำรงชีวิตของมนุษย์ต้องเผชิญกับปัญหาและมลภาวะต่างๆ ในชีวิตประจำวัน เช่น มลพิษทางอากาศ ความกดดันหรือความเครียดจากการทำงาน การสูบบุหรี่ การได้รับสารพิษจากเชื้อจุลินทรีย์ สารเคมีทางการเกษตร สารกำจัดวัชพืช ยาฆ่าแมลง รวมถึงสารปรุงแต่งในผลิตภัณฑ์อาหาร เป็นต้น ปัญหาต่างๆ เหล่านี้ทำให้มนุษย์มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคได้หลายชนิด เช่น โรคมะเร็ง โรคอัลไซเมอร์ และโรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว ฯลฯ สาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ เหล่านี้ ส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากอนุมูลอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยาทางชีวเคมีภายในร่างกาย และการได้รับอนุมูลอิสระจากสิ่งแวดล้อมภายนอก

อนุมูลอิสระ (Free radical) คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่ (Unpaired electron) อะตอมหรือโมเลกุลของอนุมูลอิสระมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีกับโมเลกุลข้างเคียงอื่นๆ ได้ง่าย โดยมีความสามารถในการแย่งชิงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลข้างเคียงอื่นๆ ทำให้โมเลกุลข้างเคียงเกิดเป็นโมเลกุลที่ไม่มีความเสถียรและทำให้เกิดความเสียหายที่เป็นอันตรายต่อเซลล์โดยทั่วไป อนุมูลอิสระสามารถเกิดขึ้นเป็นปกติจากปฏิกิริยาต่างๆ ภายในร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งอนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจน (Reactive oxygen species, ROS) ได้แก่ อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ (Superoxide radical, O_2^-) ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide, H_2O_2) และอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (Hydroxyl radical, $HO\cdot$) ร่างกายของสิ่งมีชีวิตจะมีกลไกในการกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยาเคมีต่างๆ ภายในร่างกาย โดยการสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น เอนไซม์คะตะเลส (Catalase) เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase, SOD) เอนไซม์กลูตาไทโอนรีดักเทส (Glutathione reductase) ฯลฯ แต่ทว่าอนุมูลอิสระยังสามารถเกิดขึ้นจากการดำรงชีวิตของมนุษย์หรือการรับมลพิษจากสภาวะแวดล้อมภายนอก เช่น อาหาร แสงแดดหรือรังสีอัลตราไวโอเลต ความเครียด การสูบบุหรี่ และการเผชิญกับมลพิษต่างๆ ในชีวิตประจำวัน เป็นต้น การดำรงชีวิตและกิจกรรมต่างๆ ที่เกิดขึ้นในชีวิตประจำวันเหล่านี้ทำให้ร่างกายของมนุษย์มีการสะสมอนุมูลอิสระในร่างกายมากขึ้น ส่งผลให้อนุมูลอิสระกลายเป็นสารพิษที่มีอันตรายต่อร่างกาย และเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคภัยหลายชนิด ดังนั้น ระบบหรือกลไกการต้านอนุมูลอิสระจากร่างกายเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอต่อการกำจัดอนุมูลอิสระให้อยู่ในระดับที่ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย ทำให้

ร่างกายมีความจำเป็นต้องพึ่งพาสารต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งภายนอกอื่นๆ เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกาย ทำให้ร่างกายมีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระได้ดียิ่งขึ้น

แหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอกสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มหลักๆ คือ สารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติ และสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ได้แก่ วิตามินเอ วิตามินซี วิตามินอี เบต้า-แคโรทีน รวมถึงสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) และ สารประกอบพอลิฟีนอลิก (Polyphenolic compound) ที่พบได้มากในพืชผักและผลไม้หลากหลายชนิด ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ เช่น บิวทิลไฮดรอกซีโทลูอีน (Butylated hydroxytoluene, BHT) บิวทิลไฮดรอกซีแอนนิโซล (Butylated hydroxyanisole, BHA) และ เทอเทียรี-บิวทิลไฮโดรควิโนน (Tertiary-butylhydroquinone, TBHQ) (Cai et al. 2015) อย่างไรก็ตาม สารต้านอนุมูลอิสระที่ได้มาจากธรรมชาติ เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี เนื่องจากในปัจจุบันผู้บริโภคส่วนใหญ่หันมาใส่ใจสุขภาพมากขึ้น ทำให้ผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติรวมถึงอาหารเสริมเพื่อสุขภาพที่ปราศจากสารเคมีเป็นทางเลือกที่ดีและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

เมื่อไม่นานมานี้ มีรายงานพบว่า เพปไทด์ (Peptide) ที่ได้จากย่อยสลายโปรตีนในอาหารบางชนิด เช่น ถั่วเหลือง และ หางนม ฯลฯ มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยพบว่าเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโนในกลุ่มอะโรมาติก (Aromatic amino acid) ได้แก่ ฟีนิลอะลานีน ไทโรซีน และ ทริปโทเฟน และเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโนซิสเทอีน และ ฮีสทีดีน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพ (Dávalos et al. 2004) นอกจากนี้ เพปไทด์ที่มีกรดอะมิโนกลุ่มไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic amino acid) เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ โพรลีน ลิวซีน อะลานีน ทริปโทเฟน และ ฟีนิลอะลานีน จะมีกิจกรรมต่อต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพเช่นเดียวกัน (Mendis et al. 2005) ดังนั้น องค์ประกอบของกรดอะมิโนที่พบภายในเพปไทด์ ชนิดของแหล่งโปรตีน และชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ย่อยโปรตีนเป็นปัจจัยสำคัญที่ควบคุมการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเพปไทด์ นอกจากนี้ จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมายังพบว่า เพปไทด์บางชนิดมีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ที่น่าสนใจ เช่น เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง และ เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ เป็นต้น (Qian et al. 2008) ชนิดของแหล่งโปรตีนเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางชีวภาพของเพปไทด์ ทำให้ในปัจจุบันศูนย์วิจัยและองค์กรทางด้านวิทยาศาสตร์มีการศึกษาค้นคว้าหาชนิดของแหล่งโปรตีนใหม่ๆ เพื่อเป็นทางเลือกให้กับผู้บริโภคมกยิ่งขึ้น มีรายงานพบว่า เพปไทด์ที่ได้จากการย่อยโปรตีนในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น เพปไทด์จากปลาหมึกยักษ์ (Mendis et al. 2005) เพปไทด์จากปลิงทะเล (Zhou et al. 2012) เพปไทด์จากปลาหูฉลาม (Ranathunga et al. 2006) และเพปไทด์จากสาหร่าย

Chlorella vulgaris (Sheih et al. 2009) มีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ พบว่าเพปไทด์จากสาหร่ายเกลียวทอง *Arthrospira platensis* (Wang and Zhang 2016) และเพปไทด์จากสาหร่ายสีแดง *Pyropia haitanensis* (Mao et al. 2016) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งบางชนิด สาหร่ายเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความน่าสนใจในการนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดต่างๆ เนื่องจากสาหร่ายหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สาหร่ายทะเลจัดเป็นสาหร่ายที่มีคุณค่าทางโภชนาการและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคอย่างกว้างขวาง

สาหร่ายทะเล (Marine algae) เป็นสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในกลุ่มยูคาริโอต จัดเป็นพืชชั้นต่ำ ไม่มีส่วนที่เป็นราก ลำต้น และใบที่แท้จริง สาหร่ายทะเลไม่มีระบบท่อลำเลียงอาหารจากรากสู่ลำต้น เหมือนกับพืชชั้นสูง แต่ใช้วิธีดูดซับแร่ธาตุจากน้ำทะเลเข้าสู่เซลล์โดยตรง และสามารถสร้างอาหารด้วยกระบวนการสังเคราะห์แสง สาหร่ายทะเลเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความน่าสนใจในการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดต่างๆ เนื่องจากสาหร่ายทะเลมีคุณค่าทางโภชนาการ อุดมไปด้วยวิตามิน แร่ธาตุ โยอาหาร โปรตีน และ พอลิแซคคาไรด์ (MacArtain et al. 2007) มีรายงานว่าสาหร่ายทะเลบางชนิด เช่น *Enteromorpha prolifera*, *Grateloupia filicina*, *Porphyra tenera*, *Costaria costata* และ *Ulva rigida* สามารถผลิตสารเคมีที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Lee et al. 2005) สารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากสาหร่ายทะเลมีหลายชนิด เช่น กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) แคโรทีนอยด์ (Carotenoid) โบรโมฟินอล (Bromophenol) และ คาเทชิน (Catechin) เป็นต้น (Matsukawa et al. 1997) นอกจากนี้ เพปไทด์ที่ได้จากสาหร่ายบางชนิด ได้แก่ *Ulva rigida*, *Enteromorpha clathrata*, *Jania adherens* และ *Corallina elongate* มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง โดยพบว่าเพปไทด์ที่ได้จากสาหร่ายเหล่านี้มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับในหนู (Salem and Atef 2011)

สาหร่ายพวงองุ่น (Sea grapes) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Caulerpa lentillifera* จัดเป็นสาหร่ายทะเลที่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค เนื่องจากมีรสชาติดี มีคุณค่าทางโภชนาการ อุดมไปด้วยสารอาหาร แร่ธาตุ และวิตามินหลายชนิด เช่น กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หลายตำแหน่ง (Polyunsaturated fatty acid, PUFA) วิตามินบี 2 วิตามินอี โปรตีน และ คาร์โบไฮเดรต เป็นต้น จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสาหร่ายพวงองุ่นพบว่า สาหร่ายพวงองุ่นมีคาร์โบไฮเดรต 64 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณโปรตีน 9.26 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณลิพิด 1.57 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณโยอาหาร 2.97 เปอร์เซ็นต์ และ ปริมาณเถ้า 22.20 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้ง (Nguyen et al. 2011) ทำให้สาหร่ายพวงองุ่นจัดเป็นอาหารที่มีแคลอรีต่ำ โซเดียมต่ำ มีโยอาหารสูง ช่วยกระตุ้นระบบขับถ่ายได้ดี และใช้เป็นอาหารสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน โรคหัวใจ และ โรคความดันโลหิตสูง อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบัน

การศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากสาหร่ายพวงองุ่น ส่วนใหญ่มุ่งเน้นไปที่การศึกษาสารกลุ่มฟีนอลิกและพอลิแซคคาไรด์ แต่การศึกษาฤทธิ์ของโปรตีนหรือเพปไทด์ รวมถึงสารประเภทอื่นๆ จากสาหร่ายชนิดนี้ยังมีรายงานน้อยมาก

งานวิจัยนี้สนใจศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากสาหร่ายพวงองุ่น โดยการนำตัวอย่างโปรตีนจากสาหร่ายพวงองุ่นมาย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอสชนิดต่างๆ และนำตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ หลังจากนั้น นำโปรตีนไฮโดรไลเซทไปผ่านกระบวนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ และนำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่บริสุทธิ์ และนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง และนำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่บริสุทธิ์จากสาหร่ายพวงองุ่นไประบุชนิดของเพปไทด์ โดยทำการศึกษาลำดับของกรดอะมิโนภายในโมเลกุลของเพปไทด์

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนของสาหร่ายพวงองุ่นด้วยเอนไซม์โปรตีเอส

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. เตรียมตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซท โดยนำตัวอย่างโปรตีนจากสาหร่ายพวงองุ่นมาย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอสชนิดต่างๆ ได้แก่ เอนไซม์ปาเปน เอนไซม์โปรตีเอส จี6 เอนไซม์โปรตีเอส จีเอ็น และเอนไซม์เพปซิน-แพนกรีเอทิน โดยใช้ความเข้มข้นของสุดท้ายเอนไซม์เท่ากับ 0, 1, 2.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร)

2. ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ โดยทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับสาร 2,2-ไดฟีนิล-1-ไพคริลไฮดราซิล (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH) และ 2,2'-อะซิโนบิส (3-เอทิลเบนโซไทอะโซลีน)-6-ซัลโฟนิคแอซิด (2,2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid, ABTS)

3. ทำโปรตีนไฮโดรไลเซทให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคอัลตราฟิลเตรชัน (Ultrafiltration) โดยการใช้เมมเบรนที่สามารถคัดแยกสารตามขนาดโมเลกุล (Molecular weight cut off membrane, MWCO) ขนาด 10, 5, 3 และ 0.65 กิโลดาลตัน และเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบรีเวิร์สเฟส (Reverse phase-high performance liquid chromatography, RP-HPLC) โดยใช้คอลัมน์ Luna C₁₈ (กว้าง 4.6 มิลลิเมตร x ยาว 250 มิลลิเมตร)

4. ศึกษาผลของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่บริสุทธิ์ต่อการยับยั้งการเจริญเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ดังนี้ เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด BT474 เซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 เซลล์มะเร็งตับชนิด Hep-G2 เซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด SW620 และ เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารชนิด KATO-III โดยใช้วิธีการวัดกิจกรรมของเซลล์กับสาร 3-(4,5-ไดเมทิล-2-ไทอะโซลิล)-2,5-ไดฟีนิลเตตระโซเลียมโบรไมด์ (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)

5. ทำการศึกษาฤทธิ์ของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่บริสุทธิ์จากสาหร่ายพวงองุ่นต่อการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอพโทซิส (Apoptosis) โดยศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส ได้แก่ ยีน BCL2 (B-cell lymphoma 2 apoptotic regulator) ยีน MADD (MAP kinase activating death domain) และ ยีน CTSS (Cathepsin S)

6. ทำการศึกษาหาลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่บริสุทธิ์ที่ได้จากสาหร่ายพวงองุ่นด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลว/แมสสเปกโตรเมตรี (Liquid chromatography/Mass spectrometry, LC/MS) และนำข้อมูล Mass spectra ที่ได้มาทำการจัดเรียงลำดับกรดอะมิโน (*De novo sequencing*)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

พบเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหรือมีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพ

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

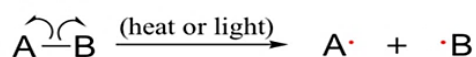
2.1 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (Free radical) คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่ ทำให้อนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลที่ไม่มีความเสถียร และมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับอะตอมหรือโมเลกุลข้างเคียงอื่นๆ ได้ง่าย โดยทั่วไป อนุมูลอิสระสามารถเกิดขึ้นได้จากกระบวนการหายใจใช้ออกซิเจนของสิ่งมีชีวิต ปฏิกิริยาชีวเคมีภายในเซลล์ รวมถึงกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนภายในเซลล์ นอกจากนี้ อนุมูลอิสระยังสามารถเกิดได้จากการกระตุ้นจากสภาวะแวดล้อมภายนอกอื่นๆ เช่น แสงแดดหรือรังสีอัลตราไวโอเล็ต ความเครียด การสูบบุหรี่ มลพิษทางอากาศ การได้รับสารพิษจากอุตสาหกรรม สารกำจัดวัชพืช ยาฆ่าแมลง และสารเติมแต่งในอาหาร เป็นต้น

โดยทั่วไป ทุกอะตอมหรือโมเลกุลของสารจะมีอนุภาคของอิเล็กตรอนที่อยู่ภายในเซลล์ (Shell) หรือออร์บิต (Orbit) รอบๆ นิวเคลียส ในแต่ละออร์บิตจะมีสับออร์บิต (Sub-orbit) ที่เรียกว่าออร์บิทัล (Orbital) โดยในแต่ละออร์บิทัลจะเป็นที่อยู่ของอิเล็กตรอน 2 ตัว อนุมูลอิสระจะเกิดขึ้นได้เมื่อมีการสลายพันธะเคมีระหว่างอะตอมหรือโมเลกุล ส่งผลให้อะตอมหรือโมเลกุลของสารเหลืออิเล็กตรอนอยู่ในออร์บิทัลเพียงแค่ 1 ตัว ทำให้อะตอมหรือโมเลกุลที่ขาดอิเล็กตรอนนี้เกิดสภาวะเครียดและต้องการอิเล็กตรอนอีก 1 ตัว ด้วยเหตุนี้ อนุมูลอิสระจึงเป็นโมเลกุลที่ไม่มีความเสถียร มีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยาทางเคมีกับอะตอมหรือโมเลกุลข้างเคียง โดยแย่งชิงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่น เพื่อให้ตัวอนุมูลอิสระมีความเสถียรมากขึ้น

เมื่อมีอะตอมหรือโมเลกุลอนุมูลอิสระเกิดขึ้นอย่างน้อย 1 โมเลกุล จะนำไปสู่การเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ (Free radical chain reaction) ส่งผลให้อนุมูลอิสระมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น ปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ ขั้นที่ 1 ขั้นเริ่มต้น เป็นขั้นตอนเริ่มต้นของการเกิดอนุมูลอิสระที่เกิดจากการสลายพันธะเคมีของโมเลกุลแบบเสมอภาค ที่ใช้ความร้อนหรือแสงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา อะตอมของแต่ละตัวจะนำอิเล็กตรอนเดี่ยวไปด้วย 1 ตัว ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขั้น 2 อะตอม ขั้นที่ 2 ขั้นแพร่กระจาย อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากขั้นเริ่มต้นจะเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ โดยแย่งชิงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลข้างเคียงเพื่อให้ตนเองมีความเสถียร ทำให้มีอนุมูลอิสระตัวใหม่เกิดขึ้น และขั้นที่ 3 ขั้นสิ้นสุดปฏิกิริยา เป็นขั้นตอนที่อนุมูลอิสระ 2 อะตอมทำปฏิกิริยาต่อกัน เกิดเป็นโมเลกุลที่เป็นกลาง และมีความเสถียร (รูปที่ 2.1)

ขั้นที่ 1 ขั้นเริ่มต้น



ขั้นที่ 2 ขั้นแพร่กระจาย



ขั้นที่ 3 ขั้นสิ้นสุดปฏิกิริยา



รูปที่ 2.1 ปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ

ดัดแปลงจาก: Dunn 1995

โดยทั่วไป สิ่งมีชีวิตทุกชนิดมีกระบวนการในการรักษาสมดุลระหว่างการสร้างและการทำลายอนุมูลอิสระที่ร่างกายสร้างขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม ร่างกายของสิ่งมีชีวิตมักจะได้รับอนุมูลอิสระจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ทำให้ร่างกายของสิ่งมีชีวิตมีการสะสมอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เกิดความไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระและกลไกการต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกาย ภาวะที่ร่างกายของสิ่งมีชีวิตมีการสะสมอนุมูลอิสระที่มากเกินไปกว่าที่ร่างกายจะกำจัดเองได้หมดนี้ เรียกว่า ภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) (Birben et al. 2012) ภาวะเครียดออกซิเดชันเป็นผลกระทบที่ไม่พึงประสงค์ของความไม่สมดุลทางชีวเคมีภายในร่างกาย เมื่อร่างกายเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน จะทำให้สารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ ในร่างกายได้รับความเสียหาย ทำให้ไม่สามารถคงรูปร่างหรือทำหน้าที่ได้ตามปกติ

อนุมูลอิสระที่มีบทบาทในสิ่งมีชีวิตสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทหลักๆ ดังนี้ (Ames et al. 1993)

2.1.1 อนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจน

อนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจน (Reactive oxygen species, ROS) เป็นอนุมูลอิสระที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ อนุมูลอิสระในกลุ่มนี้เป็นอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นเป็นปกติภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีพ เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากเมแทบอลิซึมของเซลล์ในภาวะปกติ และเป็นอนุมูลอิสระที่มีทั้งประโยชน์และโทษต่อสิ่งมีชีวิต (Birben et al. 2012) ตัวอย่างของอนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจนที่มีบทบาทในสิ่งมีชีวิตมีหลายชนิด ดังนี้

2.1.1.1 อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์

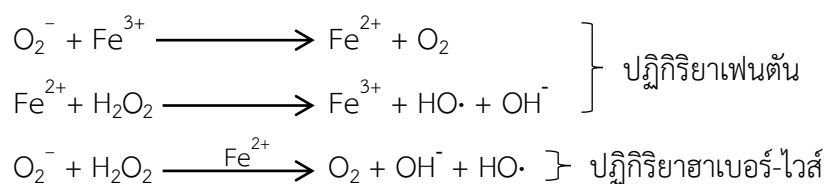
อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ (Superoxide radical, O_2^-) เป็นอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นเมื่อโมเลกุลของออกซิเจน (O_2) รับอิเล็กตรอนเพิ่มมาหนึ่งตัว เป็นอนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจนชนิดแรกที่เกิดขึ้นมาจากกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนภายในเซลล์ ซูเปอร์ออกไซด์จัดเป็นอนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจนปฐมภูมิ (Primary ROS) เป็นอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์ทำลายชีวโมเลกุลของเซลล์ได้ และสามารถสลายตัวกลายเป็นอนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจนทุติยภูมิ (Secondary ROS) ได้แก่ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide, H_2O_2) และเมื่อซูเปอร์ออกไซด์ทำปฏิกิริยากับ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ จะได้เป็นอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (Hydroxyl radical, $HO\cdot$)

แหล่งกำเนิดของซูเปอร์ออกไซด์ในสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ได้มาจากกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนภายในไมโทคอนเดรีย คลอโรพลาสต์ และเอ็นโดพลาสมิกเรติคูลัม นอกจากนี้ ยังได้มาจากกระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาวในระบบภูมิคุ้มกัน โดยเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในเม็ดเลือดขาวจะถูกทำลายด้วยซูเปอร์ออกไซด์ที่สร้างมาจากการทำงานของ เอนไซม์นิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสฟอออกซิเดส (NADPH oxidase) ที่อยู่บนเยื่อชั้นนอกของเซลล์เม็ดเลือดขาว นอกจากนี้ อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์สามารถเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (Xanthine oxidase, XO) ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสลายเบสพิวรีน โดยการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไฮโปแซนทีน (Hypoxanthine) ไปเป็นแซนทีน (Xanthine) และแซนทีนไปเป็นกรดยูริก พร้อมกับการขนส่งอิเล็กตรอนให้กับออกซิเจน เกิดเป็นอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์

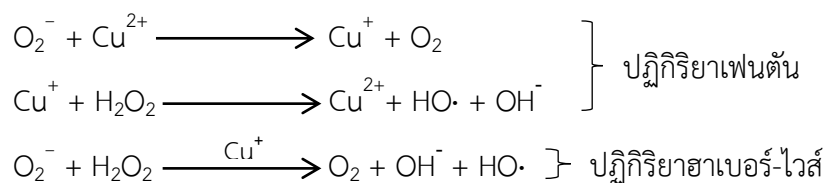
2.1.1.2 อนุมูลอิสระไฮดรอกซิล

อนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (Hydroxyl radical, $HO\cdot$) เป็นอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์รุนแรงที่สุด มีความสามารถในการออกซิไดซ์ที่รุนแรง และมีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ ที่อยู่รอบข้างได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้น อนุมูลอิสระไฮดรอกซิลจัดเป็นอนุมูลอิสระที่มีความอันตรายต่อสารชีวโมเลกุลของเซลล์สิ่งมีชีวิตมากกว่าอนุมูลอิสระชนิดอื่นๆ (Siti et al. 2015) อนุมูลอิสระไฮดรอกซิลสามารถทำลายคุณสมบัติและหน้าที่ของลิพิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ เอนไซม์ รวมถึง ดีเอ็นเอ โดยอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลจะทำให้โครงสร้างของสารเปลี่ยนแปลงไป สารอินทรีย์ดังกล่าวจึงไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ ในสิ่งมีชีวิตหลายๆ ชนิด อนุมูลอิสระไฮดรอกซิลอาจได้มาจากการแตกตัวของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เมื่อได้รับความร้อนหรือรังสี นอกจากนี้ อนุมูลอิสระไฮดรอกซิลยังถูกสร้างขึ้นจากปฏิกิริยาของฮาเบอร์-ไวส์ (Haber-Weiss reaction) และปฏิกิริยาของเพนตัน

(Fenton reaction) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase, SOD) ที่มีเหล็กหรือทองแดงเป็นโคแฟกเตอร์ (Noori et al. 2012) ดังนี้

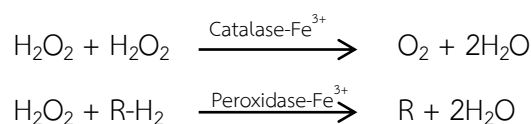


ปฏิกิริยาของฮาเบอร์-ไวส์และปฏิกิริยาของเฟนตันเป็นหัวข้อที่มีการกล่าวถึงมากในวิถีชีวเคมีของอนุมูลอิสระ ซึ่งความรู้ที่ได้ส่วนใหญ่ได้มาจากปฏิกิริยาในหลอดทดลอง (*In vitro*) ภายใต้สภาวะเลียนแบบสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้ ยังพบว่า ปฏิกิริยาของฮาเบอร์-ไวส์และปฏิกิริยาเฟนตันสามารถใช้ทองแดงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแทนที่เหล็กได้ ดังนี้



2.1.1.3 ไฮโดรเจนเพอรอกไซด์

ไฮโดรเจนเพอรอกไซด์ (Hydrogen peroxide, H_2O_2) จัดเป็นสารประกอบเพอรอกไซด์ที่ประกอบด้วยออกซิเจนและไฮโดรเจนอย่างละ 2 อะตอม โดยทั่วไป H_2O_2 ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตเป็นสารที่มีความคงตัวมาก และมีความสามารถในการผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของสิ่งมีชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ ไฮโดรเจนเพอรอกไซด์จัดเป็นอนุมูลอิสระที่สร้างความเสียหายต่อชีวโมเลกุลของเซลล์ในระดับที่ไม่เป็นอันตรายมากนัก แต่ไฮโดรเจนเพอรอกไซด์เป็นสารตั้งต้นที่สำคัญที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลที่มีฤทธิ์รุนแรงที่สุดได้ แหล่งที่มาที่สำคัญของไฮโดรเจนเพอรอกไซด์คือกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนภายในไมโทคอนเดรีย นอกจากนี้ ไฮโดรเจนเพอรอกไซด์ยังได้มาจากปฏิกิริยาชีวเคมีภายในเซลล์บางชนิด เช่น ปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่มีไรโบเฟลวิน (Riboflavin) เป็นโคเอนไซม์ ปฏิกิริยาออกซิเดชันของควิโนน (Quinone) ปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบที่มีหมู่ซัลไฟไฮดริล (Sulfhydryl group) และปฏิกิริยาของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส เป็นต้น (Siti et al. 2015) ในสิ่งมีชีวิตที่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีพส่วนใหญ่จะมีกลไกในการทำลายไฮโดรเจนเพอรอกไซด์มากกว่า 1 ระบบ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์คะตะเลส (Catalase) และเอนไซม์เพอรอกซิเดส (Peroxidase) ดังนี้



2.1.1.4 อนุมูลอิสระเพอรอกซิล

อนุมูลอิสระเพอรอกซิล (Peroxyl radical, ROO·) เป็นอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในกระบวนการลิพิดเพอรอกซิเดชัน (lipid peroxidation) ของกรดไขมันที่มีพันธะคู่หลายตำแหน่ง (Polyunsaturated fatty acid, PUFA) โดยทั่วไป เมื่อมีอนุมูลอิสระเพอรอกซิลเกิดขึ้น อนุมูลอิสระชนิดนี้จะแย่งชิงไฮโดรเจนจากอะตอมหรือโมเลกุลของสารที่อยู่ข้างเคียง เพื่อให้ตนเองมีความเสถียร เกิดเป็นสารอินทรีย์ออร์แกนิกเพอรอกไซด์ (Organic peroxide, ROOH) ออร์แกนิกเพอรอกไซด์เป็นโมเลกุลที่มีความคงตัวในร่างกายหรือเซลล์ของสิ่งมีชีวิต อย่างไรก็ตาม ถ้าภายในเซลล์มีไอออนของโลหะ ได้แก่ เฟอร์รัสไอออน (Ferrous ion, Fe^{2+}) ไอออนของโลหะจะไปออกซิไดซ์โมเลกุลของออร์แกนิกเพอรอกไซด์ เกิดเป็นอนุมูลอิสระอัลคอกซิล (Alkoxyl radical, RO·) และทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิดอีกครั้ง อนุมูลอิสระเพอรอกซิลเป็นอนุมูลอิสระที่มีส่วนร่วมทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิด ที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (Birben et al. 2012)

2.1.1.5 ซิงเกิลทออกซิเจน

ซิงเกิลทออกซิเจน (Singlet oxygen, $^1O_2^*$) เป็นสารที่มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาแต่ไม่จัดเป็นอนุมูลอิสระ เนื่องจากออร์บิทัลชั้นนอกสุดประกอบด้วย 2 ออร์บิทัล ออร์บิทัลหนึ่งมีอนุภาคของอิเล็กตรอน 2 ตัวที่มีการเคลื่อนที่ในทิศทางตรงกันข้าม ในขณะที่อีกหนึ่งออร์บิทัลว่าง หรือไม่มีอิเล็กตรอนในออร์บิทัล ซิงเกิลทออกซิเจนเป็นโมเลกุลที่มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลข้างเคียง สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารอินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น กรดไขมันไม่อิ่มตัว สารประกอบอะโรมาติก และกรดอะมิโนโดยเฉพาะกรดอะมิโนทรีโตนิน เป็นต้น

2.1.1.6 อนุมูลอิสระไฮโปคลอรัส

อนุมูลอิสระไฮโปคลอรัส (Hypochlorous radical, HOCl·) หรืออาจจะเรียกว่ากรดไฮโปคลอรัส เป็นอนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจนที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบ อนุมูลอิสระชนิดนี้เกิดจากการรวมกันของไฮโดรเจนเพอรอกไซด์และคลอไรด์ไอออน กรดไฮโปคลอรัสมีฤทธิ์สร้างความเสียหายต่อชีวโมเลกุลของเซลล์ ได้แก่ โปรตีน กรดอะมิโน และดีเอ็นเอ ฯลฯ อนุมูลอิสระไฮโปคลอรัสผลิตได้จากเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (Neutrophil) ในระบบภูมิคุ้มกันเพื่อทำลายเชื้อจุลินทรีย์หรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย (Elochukwu et al. 2015)

2.1.2 อนุมูลอิสระกลุ่มไนโตรเจน

อนุมูลอิสระกลุ่มไนโตรเจน (Reactive nitrogen species, RNS) เป็นอนุมูลอิสระที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ พบได้ทั่วไปในบรรยากาศและร่างกายของสิ่งมีชีวิต อนุมูลอิสระกลุ่มไนโตรเจนที่พบในร่างกายของสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท สารขยายหลอดเลือด สารป้องกันการเชื่อมติดกันระหว่างเซลล์ สารกำจัดสิ่งแปลกปลอมในระบบภูมิคุ้มกัน สารป้องกันร่างกายจากพยาธิ และ สารที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็ง เป็นต้น (Siti et al. 2015) ตัวอย่างของอนุมูลอิสระกลุ่มไนโตรเจนที่มีความสำคัญในสิ่งมีชีวิต มี 2 ชนิด ดังนี้

2.1.2.1 ไนตริกออกไซด์

ไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide, NO) เป็นอนุมูลอิสระที่มีสถานะเป็นก๊าซที่ไม่มีสี และสามารถเคลื่อนที่ได้ดีภายในเซลล์ อนุมูลอิสระชนิดนี้สามารถพบได้ทั่วไปในบรรยากาศ เป็นผลผลิตจากการเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิลของเครื่องยนต์ หรือโรงงานอุตสาหกรรมที่มีการใช้เชื้อเพลิงฟอสซิล นอกจากนี้ ไนตริกออกไซด์สามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติระหว่างการเกิดฟ้าผ่า ในร่างกายของมนุษย์ การสร้างไนตริกออกไซด์จะเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทส (Nitric oxide synthase) ไนตริกออกไซด์มีบทบาทต่อการทำงานของเซลล์ที่สำคัญหลายชนิด เช่น ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจ มีการสร้างไนตริกออกไซด์เพื่อทำหน้าที่ทำลายเซลล์แบคทีเรีย ไวรัสหรือเซลล์มะเร็ง ในเซลล์ประสาท ไนตริกออกไซด์ส่วนใหญ่จะถูกใช้เป็นสารสื่อประสาทเพื่อควบคุมการไหลเวียนของเลือดในสมอง และ ในเซลล์เยื่อบุอดหรือผนังหลอดเลือด ไนตริกออกไซด์จะถูกใช้ในกระบวนการหายใจและการสูบฉีดเลือด เป็นต้น ไนตริกออกไซด์จัดเป็นอนุมูลอิสระที่มีประโยชน์ต่อร่างกายของมนุษย์ แต่อย่างไรก็ตาม ไนตริกออกไซด์ยังมีโทษหรือผลเสียต่อร่างกายของมนุษย์ เช่น การทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน การทำลายระบบสารต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกาย เป็นต้น บทบาทของไนตริกออกไซด์ต่ออวัยวะบางชนิดในร่างกายของมนุษย์ แสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 บทบาทของไนตริกออกไซด์ต่ออวัยวะในร่างกายของมนุษย์ (Noori et al. 2012)

อวัยวะ	บทบาทเชิงบวก	บทบาทเชิงลบ
เส้นเลือด	ต้านทานการเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว	ทำให้เกิดการอักเสบ ภาวะติดเชื้ในกระแสเลือด
ปอด	ช่วยให้เกิดการหลั่งของเยื่อเมือก	ทำให้เกิดการอักเสบของถุงลม เนื่องจากอิมมูโนคอมเพล็กซ์
ไต	ช่วยในการหลั่งเอนไซม์เรนิน	กรวยไตอักเสบ ไตวายเฉียบพลัน
ระบบประสาทส่วนกลาง	ช่วยการไหลเวียนของเลือดในสมอง ความจำ การทำงานของระบบประสาทและต่อมไร้ท่อ การได้ยิน การสื่อสารระหว่างเซลล์สมอง ความทรงจำ การเรียนรู้ใหม่ๆ	ทำให้เกิดอาการชัก เป็นพิษต่อระบบประสาท ปวดหัว การเกิดภาวะอัมพฤกษ์ อัมพาต การเกิดภาวะชราภาพของสมอง
ตับอ่อน	การหลั่งฮอร์โมนและเอนไซม์ช่วยย่อย	การทำลายเซลล์
ลำไส้	การไหลเวียนของเลือด การบีบตัวของลำไส้ การหลั่งเอนไซม์ ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์	การกลายพันธุ์ การทำลายเยื่อบุลำไส้ การอักเสบของเยื่อบุลำไส้ มะเร็งลำไส้

2.1.2.2 เพอรอกซิลไนไตรท์

เพอรอกซิลไนไตรท์ (Peroxyl nitrite, ONOO⁻) เป็นอนุมูลอิสระที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิตอย่างมาก และมีความว่องไวสูงในการทำปฏิกิริยากับสารโมเลกุลข้างเคียง เพอรอกซิลไนไตรท์สามารถสร้างขึ้นจากเซลล์แมคโครฟาจ เป็นสารที่มีความเป็นพิษสูง มีฤทธิ์ทำลายดีเอ็นเอ โปรตีน และลิพิดที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ เพอรอกซิลไนไตรท์มีความจำเพาะเจาะจงในการการเกิดปฏิกิริยากับชีวโมเลกุลของเซลล์บางชนิดเท่านั้น ยกตัวอย่างเช่น เพอรอกซิลไนไตรท์สามารถทำปฏิกิริยากับกลูตาไทโอนและกรดอะมิโนซิสเทอีน ทำให้เกิดอนุมูลอิสระไทล (Thiyl radical, RS[•]) เพอรอกซิลไนไตรท์จะทำปฏิกิริยาการเติมหมูไนเตรต (Nitration) ให้กับกรดอะมิโนไทโรซีน ทำให้โปรตีนเสียสภาพ และสามารถทำให้เกิดการยับยั้งปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชัน (Phosphorylation) เป็นต้น นอกจากนี้ เพอรอกซิลไนไตรท์สามารถเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลที่เป็นอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์รุนแรงที่สุดได้ด้วย

2.2 ภาวะเครียดออกซิเดชัน

ภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) หมายถึง สภาวะที่ร่างกายมีการสะสมอนุมูลอิสระมากเกินไปที่ร่างกายจะสามารถกำจัดได้หมด อนุมูลอิสระที่มากเกินไปเหล่านี้จะทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและสร้างความเสียหายต่อสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ ดังนี้

2.2.1 การเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันกับโมเลกุลของลิพิด

ความเสียหายของลิพิดที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ที่เกิดจากภาวะเครียดออกซิเดชันมาจากการเกิดปฏิกิริยาลิพิดเพอรอกซิเดชัน (Lipid peroxidation) การเกิดลิพิดเพอรอกซิเดชันสามารถเกิดขึ้นได้กับหลายส่วนของเซลล์ บริเวณแรกที่มีลิพิดเพอรอกซิเดชัน คือ เยื่อหุ้มเซลล์ โดยมีผลทำให้โมเลกุลของลิพิดและคลอเรสเตอรอลที่เยื่อหุ้มเซลล์เกิดความเสียหาย เยื่อหุ้มเซลล์จะสูญเสียคุณสมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่าน นอกจากนี้ เอนไซม์ทรานส์เมมเบรนซึ่งเป็นตัวขนส่ง ตัวรับ และโปรตีนอื่นๆ ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ จะเกิดการเสียสภาพธรรมชาติไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียความสามารถในการรักษาภาวะสมดุลของปริมาตรภายในเซลล์ และทำให้เกิดความผิดปกติของเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ (Birben et al. 2012)

เยื่อหุ้มเซลล์มีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบจำนวนมาก กรดไขมันไม่อิ่มตัวเหล่านี้มีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาลิพิดเพอรอกซิเดชัน นำไปสู่การเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน อนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดใน การเข้าทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับกรดไขมันคือ อนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ($\text{OH}\cdot$) โดยทั่วไป การเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันของลิพิดแบ่งออกเป็น 3 ระยะ ดังนี้

2.2.1.1 ระยะเริ่มต้น

ระยะเริ่มต้น (Initiation stage) เป็นระยะที่อนุมูลอิสระเข้าทำปฏิกิริยากับกรดไขมันไม่อิ่มตัว โดยอนุมูลอิสระจะดึงเอาไฮโดรเจนอะตอมออกจากหมู่เมทิลีน (Methylene group) ในกรดไขมัน การมีพันธะคู่ที่ติดอยู่กับหมู่เมทิลีนทำให้เกิดพันธะที่ไม่แข็งแรงระหว่างไฮโดรเจนและคาร์บอนอะตอม ดังนั้น ไฮโดรเจนอะตอมที่อยู่กับหมู่เมทิลีนสามารถถูกดึงออกจากโมเลกุลของกรดไขมันได้ง่าย หลังจากไฮโดรเจนอะตอมถูกดึงออกไป จะทำให้เกิดกรดไขมันที่เป็นอนุมูลอิสระ (Fatty acid radical) ที่เหลืออิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ 1 ตัว กรดไขมันที่เป็นอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเกิดเป็นอนุมูลอิสระเพอรอกซิล ($\text{ROO}\cdot$)

2.2.1.2 ระยะเพิ่มจำนวน

ระยะเพิ่มจำนวน (Propagation stage) เป็นระยะที่กรดไขมันที่เป็นอนุมูลอิสระสามารถดึงไฮโดรเจนอะตอมออกจากโมเลกุลของกรดไขมันที่อยู่ข้างเคียงได้ นำไปสู่การสร้าง

อนุมูลอิสระตัวใหม่ที่เกิดจากปฏิกิริยาเดียวกัน จะเห็นได้ว่าการเริ่มต้นของปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียวสามารถนำไปสู่การเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ออกซิเดชันของลิพิดที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ และเกิดการสร้างลิพิดไฮโดรเพอรอกไซด์ (Lipid hydroperoxide) และอัลดีไฮด์ (Aldehyde) ดังนั้นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเพียงครั้งเดียวสามารถมีผลต่อเนื่องไปยังลิพิดโมเลกุลอื่นๆ อีกหลายโมเลกุล

2.2.1.3 ระยะสิ้นสุดการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่

ระยะสิ้นสุดปฏิกิริยาลูกโซ่ (Chain termination stage) เป็นระยะสิ้นสุดการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ออกซิเดชันของลิพิด ระยะนี้จะเกิดขึ้นเมื่อมีการทำปฏิกิริยาเคมีกันระหว่างอนุมูลอิสระเพอรอกซิล 1 โมเลกุล กับอนุมูลอิสระตัวอื่นหรือสารต้านอนุมูลอิสระ

2.2.2 การเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันกับโมเลกุลของโปรตีน

โปรตีนเป็นสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และยังเป็นเป้าหมายที่สำคัญของการจับของอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง อนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจน การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของโปรตีนเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมทางชีววิทยาของเซลล์ โดยพบว่าอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลเป็นอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำให้เกิดความเสียหายต่อโปรตีน (Birben et al. 2012) โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ที่มีความเสี่ยงต่อการถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระคือ โปรตีนที่มีกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้ อนุมูลอิสระสามารถสร้างความเสียหายต่อโปรตีนหรือเอนไซม์บางชนิด เช่น แอลฟา-1 แอนตีโปรตีเอส (Alpha-1 antiprotease) คาลโมดูลิน (Calmodulin) แคลเซียมเอทีพีเอส (Calcium ATPase) กลูโคส-6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (Glucose-6-phosphate dehydrogenase) กลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) และโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งไอออนบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นต้น ผลของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีนทำให้โครงสร้างทางเคมีของโปรตีนเกิดการแตกหักไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ ความเสียหายของโปรตีนที่เกิดจากภาวะเครียดออกซิเดชันมีผลต่อเซลล์หลายประการ ได้แก่ ทำให้เกิดปฏิกิริยาเพอรอกซิเดชันของกรดอะมิโน เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในโครงสร้างของโปรตีน เกิดการเสียสภาพธรรมชาติหรือการแตกหักของโปรตีน และเกิดการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์

2.2.3 การเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันกับโมเลกุลของดีเอ็นเอ

อนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจนสามารถสร้างความเสียหายต่อโมเลกุลของดีเอ็นเอได้โดยตรง โดยทำให้เกิดความเสียหายต่อน้ำตาลดีออกซีไรโบส หมู่ฟอสเฟต และไนโตรจีนัสเบส ดีเอ็นเอเป็นสารชีวโมเลกุลที่มีความคงตัวสูงและมีระบบป้องกันตนเองที่ดี แต่อย่างไรก็ตาม อนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจนสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอและก่อให้เกิดความเสียหายได้หลายรูปแบบ เช่น การปรับเปลี่ยนเบสในดีเอ็นเอ การแตกหักของสายดีเอ็นเอ การสูญเสียเบสพิวรีน และสร้างความเสียหายต่อน้ำตาลดีออกซีไรโบส เป็นต้น นอกจากนี้ อนุมูลอิสระสามารถทำให้ดีเอ็นเอสูญเสียระบบการซ่อมแซมดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีน ซึ่งนำไปสู่การเกิดโรคมะเร็งหรือการตายของเซลล์ (Birben et al. 2012) โดยทั่วไป อนุมูลอิสระไฮดรอกซิลเป็นอนุมูลอิสระที่มีความสามารถในการสร้างความเสียหายต่อดีเอ็นเออย่างมาก เมื่อดีเอ็นเอสัมผัสกับอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลจะมีผลทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และเกิดผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น 8-ไฮดรอกซีดีออกซีควาโนซีน (8-Hydroxydeoxyguanosine) 8 (หรือ 4-,5-)ไฮดรอกซีอะดีนีน (8 (or 4-,5)-Hydroxyadenine) เป็นต้น นอกจากนี้ อนุมูลอิสระไฮดรอกซิลยังสามารถทำปฏิกิริยากับเบสในกลุ่มไพริมิดีน ทำให้เกิดการสังเคราะห์ไทมีนเพอรอกไซด์ (Thymine peroxide) ไทมีนไกลคอล (Thymine glycol) และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลยูราซิล (5-Hydroxymethyluracil) (Birben et al. 2012)

2.3 สารต้านอนุมูลอิสระ

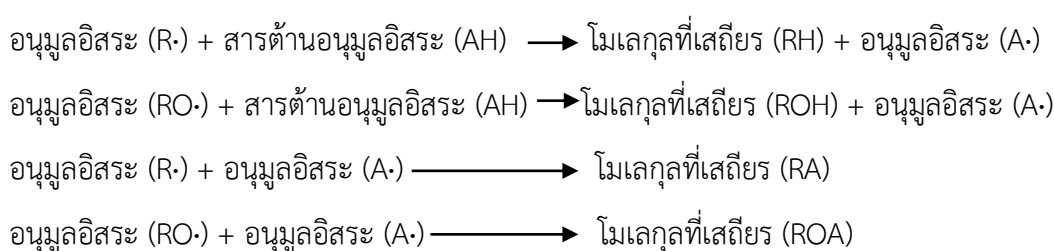
สารต้านอนุมูลอิสระหรือสารกำจัดอนุมูลอิสระ (Antioxidant compound) เป็นสารที่สามารถยับยั้งหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระต่อสารโมเลกุลอื่นๆ ทำให้อนุมูลอิสระไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาถูกโซ่ออกซิเดชันและสร้างความเสียหายต่อเซลล์ได้ โดยทั่วไป กลไกการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายมีเพียงพอต่อการกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาชีวเคมีภายในร่างกาย แต่ทว่า ร่างกายมักจะได้รับอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ทำให้ร่างกายของมนุษย์มีการสะสมอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น นำไปสู่สภาวะเครียดออกซิเดชัน ดังนั้น กลไกการกำจัดอนุมูลอิสระจากร่างกายเพียงพออาจไม่เพียงพอ จำเป็นต้องพึ่งพาสารต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งภายนอกด้วย

โดยทั่วไป สารต้านอนุมูลอิสระที่สังเคราะห์ภายในร่างกายและสารต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งภายนอกจะมีกลไกออกฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันตามชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระ

2.3.1 กลไกการออกฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ

2.3.1.1 การดักจับอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระที่มีกลไกการออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้ เช่น บิวทิลไฮดรอกซีโทลูอีน (Butylated hydroxytoluene, BHT) และวิตามินอี เป็นต้น ในกลไกนี้ สารต้านอนุมูลอิสระจะเป็นตัวให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระโดยตรง และเมื่อสารต้านอนุมูลอิสระได้ให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระไปแล้ว จะทำให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่มีความรุนแรงน้อยกว่าอนุมูลอิสระตัวเดิม หรือไปรวมตัวกับอนุมูลอิสระอีกโมเลกุลหนึ่งเกิดผลิตภัณฑ์ที่เสถียร ดังสมการ



2.3.1.2 กลไбыับยั้งการทำงานของซิงเกิลออกซิเจน

สารต้านอนุมูลอิสระที่มีกลไกต้านอนุมูลอิสระแบบนี้จะออกฤทธิ์โดยยับยั้งการทำงานของซิงเกิลออกซิเจน โดยการเปลี่ยนซิงเกิลออกซิเจน ($^1\text{O}_2^*$) ให้ไปอยู่ในรูปทริปเพิลออกซิเจน ($^3\text{O}_2$) และปลดปล่อยพลังงานที่ได้รับออกไปในรูปความร้อน สารที่ออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้ เช่น สารในกลุ่มแคโรทีนอยด์

2.3.1.3 การจับกับไอออนของโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน

ไอออนของโลหะ เช่น เฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+}) เพอริกไอออน (Fe^{3+}) และคอปเปอร์ไอออน (Cu^{2+}) ช่วยเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย ซึ่งไอออนของโลหะดังกล่าวจะไปเร่งการเกิดอนุมูลอิสระหลายชนิด เช่น อนุมูลอิสระเพอรอกซิล อนุมูลอิสระไฮดรอกซิล และซิงเกิลออกซิเจน เป็นต้น ดังนั้น การที่มีสารต้านอนุมูลอิสระไปจับกับไอออนของโลหะเหล่านี้จะช่วยชะลอการเกิดอนุมูลอิสระภายในร่างกายได้ สารต้านอนุมูลอิสระที่ออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้ ได้แก่ สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ กรดฟอสฟอริก กรดซิตริก และ วิตามินซี เป็นต้น

2.3.1.4 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ

สารประกอบฟีนอลิกบางชนิด เช่น ฟลาโวนอยด์ และ แกลเลท (Gallate) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลพอกซีจีเนส (Lipoxygenase) โดยการเข้าจับกับไอออนของเหล็กซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ ส่งผลให้เอนไซม์ดังกล่าวไม่สามารถทำงานได้

2.3.2 ชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระ

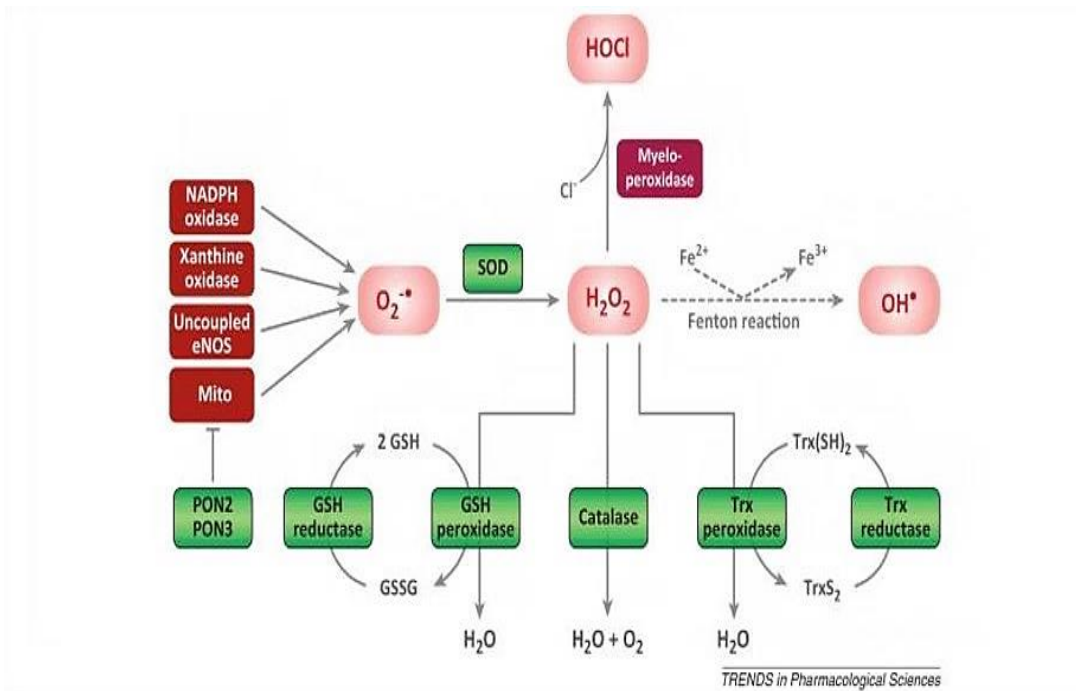
สารต้านอนุมูลอิสระจัดเป็นสารที่มีประโยชน์ในการกำจัดอนุมูลอิสระเพื่อป้องกันความเสียหายขององค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้ สารต้านอนุมูลอิสระมักจะมีประโยชน์กับระบบต่างๆ ภายในร่างกาย เช่น ระบบหัวใจและหลอดเลือด ช่วยในการมองเห็น เสริมสุขภาพความงามของผิวพรรณและเส้นผม ป้องกันโรคมะเร็งและโรคจากการเสื่อมของระบบต่างๆ เป็นต้น โดยทั่วไป สารต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทหลัก ดังนี้

2.3.2.1 สารต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกาย

สารต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกาย (Endogenous antioxidant) คือ สารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายสามารถสังเคราะห์ขึ้นมาเองได้ สารต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกายสามารถพบได้ทั่วไปในเนื้อเยื่อหรือเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดและสามารถนำไปใช้สำหรับปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสารต่างๆ เพื่อให้ได้สารที่ร่างกายต้องการ (Bouayed and Torsten 2010) สารต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกายสามารถจัดจำแนกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

2.3.2.1.1 เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ

เอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Enzymatic antioxidant) คือ เอนไซม์ที่มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง อนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจนเป็นที่ทราบกันดีว่า อนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจนที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาต่างๆ ภายในเซลล์ จะถูกควบคุมให้อยู่ในระดับที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยกลไกการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหลายๆ ชนิด ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีโมเลกุลของอนุมูลอิสระเป้าหมายที่แตกต่างกัน (รูปที่ 2.2)



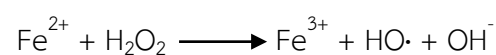
รูปที่ 2.2 การทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ

ที่มา: Li et al. 2013

ตัวอย่างของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่

2.3.2.1.1.1 เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส

เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase, SOD) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของซูเปอร์ออกไซด์ให้เปลี่ยนเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เอนไซม์ SOD สามารถพบได้ในเซลล์ทุกชนิดและมีโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ ได้แก่ ทองแดง สังกะสี และแมงกานีส ฯลฯ ในร่างกายของมนุษย์ เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสที่ขึ้นกับทองแดงหรือสังกะสีจะพบอยู่ในไซโทซอล (Cytosol) ในขณะที่เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสที่ขึ้นกับแมงกานีสจะพบได้ในไมโทคอนเดรีย อย่างไรก็ตาม ผลลัพธ์ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ SOD ยังคงเป็นสารที่มีอันตรายต่อเซลล์ คือ H_2O_2 ซึ่งในสภาวะปกติจะมีเอนไซม์คะตะเลส และกลูตาไรโอนเพอรอกซิเดส เข้ามาเปลี่ยนโมเลกุลของ H_2O_2 ให้กลายเป็นน้ำและออกซิเจนต่อไป ดังนั้น หากร่างกายขาดเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์ SOD และ คะตะเลส จะทำให้ร่างกายเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันและเสี่ยงต่อการเกิดปฏิกิริยาของเฟนต์ัน (Fenton reaction) ซึ่งจะเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้กลายเป็นอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลที่มีความอันตรายต่อเซลล์ ดังสมการ



2.3.2.1.1.2 เอนไซม์คะตะเลส

เอนไซม์คะตะเลส (Catalase, CAT) เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในกระบวนการกำจัดอนุมูลอิสระภายในร่างกาย โดยทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของไฮโดรเจนเพอรอกไซด์ให้ได้เป็นน้ำและออกซิเจน ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เอนไซม์คะตะเลสพบมากในเพอรอกซิโซม (Peroxisome) และมีประสิทธิภาพในการกำจัดไฮโดรเจนเพอรอกไซด์ในภาวะเฉียบพลันหรือภาวะที่มีการเกิดความเครียดออกซิเดชันภายในเซลล์

2.3.2.1.1.3 เอนไซม์กลูตาไทโอนเพอรอกซิเดส

เอนไซม์กลูตาไทโอนเพอรอกซิเดส (Glutathione peroxidase) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยารีดักชันของไฮโดรเจนเพอรอกไซด์เปลี่ยนเป็นน้ำ เอนไซม์ชนิดนี้ 25 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์พบในไมโทคอนเดรีย และ 60 ถึง 70 เปอร์เซ็นต์พบในไซโทพลาซึม

2.3.2.1.2 สารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์

สารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์ คือ สารต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่นๆ ที่ไม่ใช่เอนไซม์ที่ได้มาจากสังเคราะห์ภายในเซลล์ เช่น กลูตาไทโอน (Glutathione, GSH) กรดไลโปอิก (Lipoic acid) นิโคตินามายด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) โคเอนไซม์ คิว (Coenzyme Q) อัลบูมิน (Albumin) บิลิรูบิน (Bilirubin) เฟอริทิน (Ferritin) เมทัลโลไทโอนิน (Metallothionine) เมลาโทนิน (Melatonin) และ แอล-คาร์นิทีน (L-carnithine) เป็นต้น (Bouayed and Torsten 2010) โดยส่วนใหญ่ สารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์จะมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจนและอนุมูลอิสระกลุ่มไนโตรเจน โดยใช้กลไกการดักจับอนุมูลอิสระ (Free radical scavenging) โดยสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์เหล่านี้จะเป็นสารที่มีความสามารถในการให้อิเล็กตรอน (Reducing agent) แก่อนุมูลอิสระ ทำให้อนุมูลอิสระกลายเป็นโมเลกุลที่มีความเสถียร (Noori, 2012)

2.3.2.2 สารต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งภายนอก

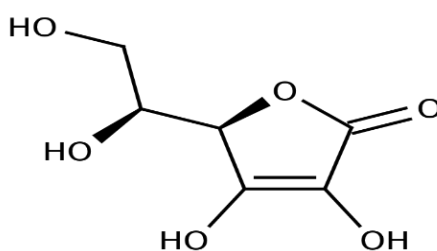
สารต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งภายนอก (Exogenous antioxidant) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้มาจากการรับประทานหรือผลิตภัณฑ์อาหารเสริม เช่น ผัก ผลไม้ ธัญพืช พืชสมุนไพร และ วิตามินชนิดต่างๆ เป็นต้น โดยทั่วไป สารต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งภายนอกแบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ ดังนี้

2.3.2.2.1 สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ

สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Natural antioxidant) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พบได้ทั่วไปในพืช ผักและผลไม้ ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติมีดังนี้

2.3.2.2.1.1 กรดแอสคอร์บิกหรือวิตามินซี

กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) หรือวิตามินซีเป็นสารประกอบแลคโตนที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ภายในโครงสร้างมีหมู่ไฮดรอกซิล 4 หมู่ (รูปที่ 2.3) ทำให้กรดแอสคอร์บิกมีความสามารถในการละลายน้ำได้ดี วิตามินซีหรือกรดแอสคอร์บิกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในส่วนที่เป็นของเหลวภายในเซลล์ และในไซโทซอล (Cytosol) การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกรดแอสคอร์บิกจะใช้กลไกการดักจับอนุมูลอิสระ โดยการให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระ นอกจากนี้ วิตามินซียังมีคุณสมบัติทางชีวภาพด้านอื่นๆ เช่น ช่วยในการสังเคราะห์คอลลาเจน ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ของเอนไซม์มอนออกซิจีเนสที่ขึ้นกับทองแดง (Cu^+ -dependent monooxygenase) และเอนไซม์ไดออกซิจีเนสที่ขึ้นกับเฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+} -dependent dioxygenase) เป็นต้น กรดแอสคอร์บิกหรือวิตามินซีพบได้ทั่วไปในผักและผลไม้หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กะหล่ำปลี พริกหยวกแดง ผักเคล ฝรั่ง ส้ม สตรอเบอร์รี่ องุ่น สับปะรด ลิ้นจี่ เป็นต้น

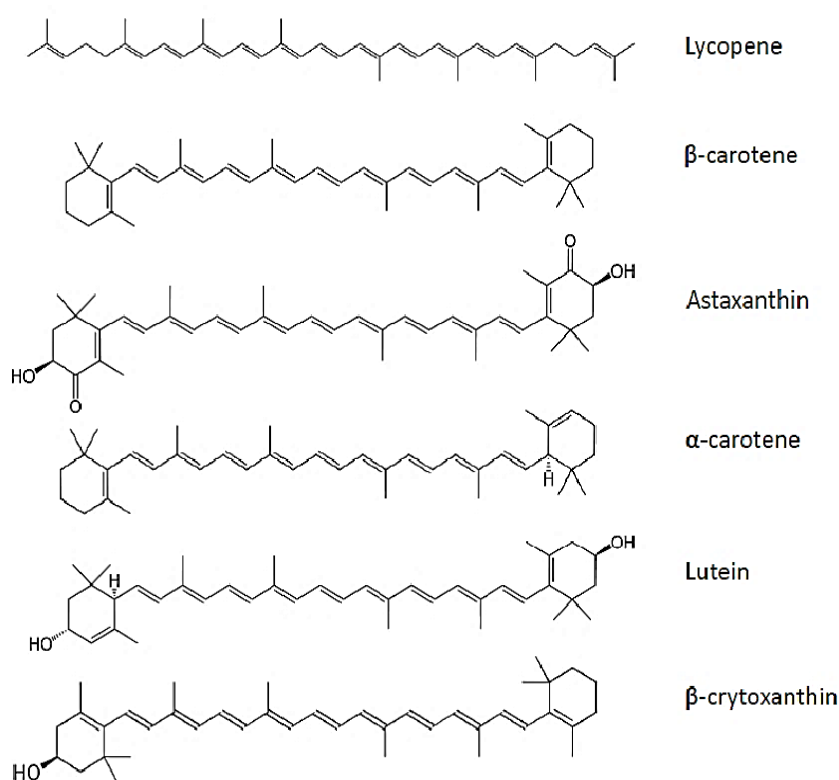


รูปที่ 2.3 โครงสร้างของกรดแอสคอร์บิกหรือวิตามินซี

ที่มา: Michels and Frei 2012

2.3.2.2.1.2 แคโรทีนอยด์

แคโรทีนอยด์ (Carotenoid) เป็นกลุ่มสารที่มีโครงสร้างแบบพอลิไอโซพรีนอยด์ (Polyisoprenoid) ที่ประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นสายยาว มีการเรียงตัวสลับกันระหว่างพันธะคู่และพันธะเดี่ยว และมีสมมาตรของโมเลกุลที่ปลายทั้งสองข้างของโมเลกุล (รูปที่ 2.4) โครงสร้างในลักษณะนี้ทำให้อิเล็กตรอนเคลื่อนที่ได้ง่าย ทำให้แคโรทีนอยด์มีความสามารถในการดูดกลืนแสงในช่วงการมองเห็น (Visible light) และทำให้เห็นเป็นสีส้มแดง แคโรทีนอยด์เป็นสารที่มีโครงสร้างที่มีขนาดใหญ่ โครงสร้างแกนหลักประกอบไปด้วยธาตุคาร์บอน 40 อะตอม ทำให้แคโรทีนอยด์มีคุณสมบัติที่เป็นไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic) คือละลายน้ำได้น้อยมาก แต่ละลายได้ดีในไขมัน แคโรทีนอยด์สามารถพบได้มากในผักผลไม้ และสาหร่ายบางชนิด แคโรทีนอยด์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีความสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้โดยตรง โดยผ่านกลไกที่เป็นไปได้ทั้งสิ้น 3 รูปแบบคือ การเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรง การให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ และการให้โปรตอนหรืออะตอมของไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ

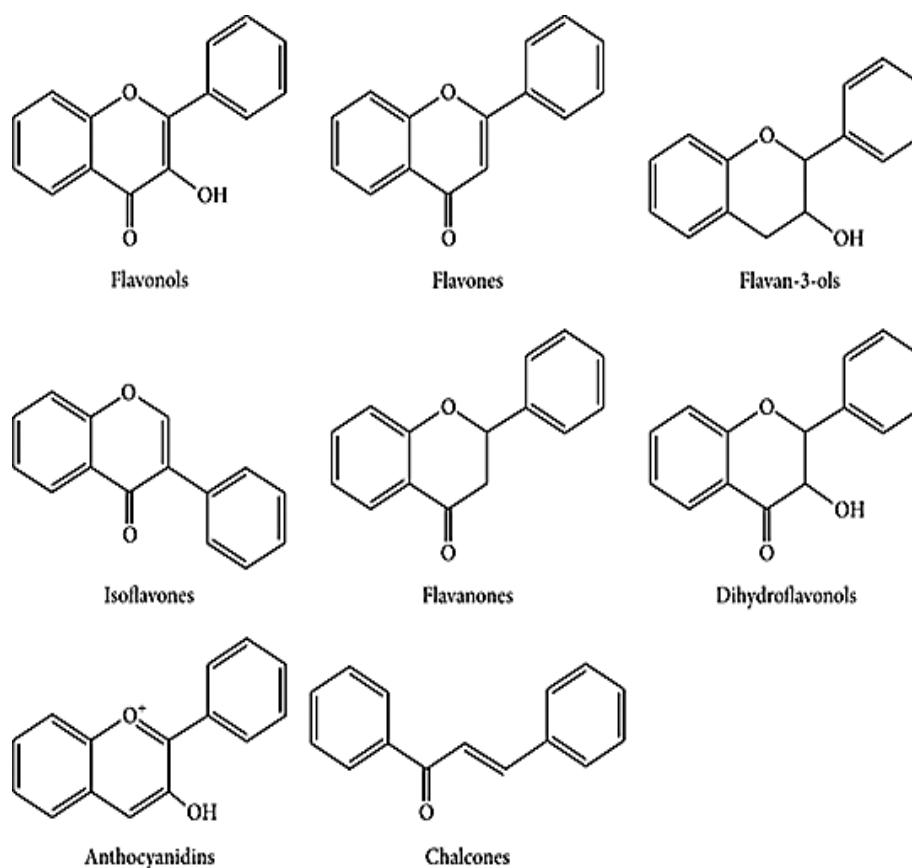


รูปที่ 2.4 โครงสร้างของสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์

ที่มา: Landrier et al. 2012

2.3.2.2.1.3 ฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) เป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบพอลิฟีนอลิก (Polyphenolic compound) ที่พบได้ทั่วไปในพืชหลายชนิด สารในกลุ่มนี้สร้างขึ้นจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของพืช ในรูปสารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิ (Secondary metabolite) ฟลาโวนอยด์เป็นสารที่มีการรายงานถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจำนวนมาก โดยเฉพาะการเป็นตัวดักจับอนุมูลอิสระ และความสามารถในการปกป้องดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล นอกจากนี้ สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ยังมีกลไกที่สำคัญอีกอย่างหนึ่ง คือ การดักจับกับไอออนของโลหะ โดยเฉพาะ ไอออนของเหล็กและไอออนของคอปเปอร์ ซึ่งช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาเฟนตันที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ตัวอย่างของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์แสดงในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์

ที่มา: Lotito and Frei 2006

2.3.2.2.1.4 เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

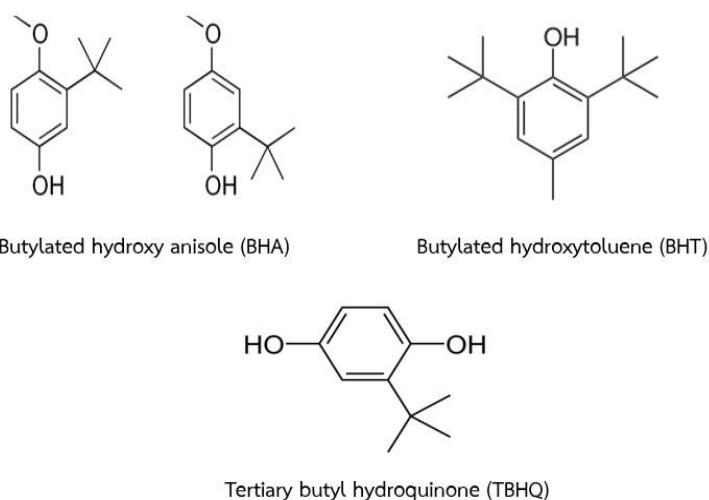
เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ ชิ้นส่วนของโปรตีนขนาดต่างๆ ที่ได้มาจากการย่อยสลายโปรตีน โดยชิ้นส่วนของโปรตีนเหล่านี้เป็นชิ้นส่วนที่มีฤทธิ์จับอนุมูลอิสระหรือต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ มีรายงานว่า เพปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนในกลุ่มอะโรมาติก ได้แก่ ฟีนอลอะลานีน ไทโรซีน และ ทริปโทเฟน และเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโนซิสเทอีน และฮิสทีดีนมีกิจกรรมต่อต้านอนุมูลอิสระอย่างมีประสิทธิภาพ (Dávalos et al. 2004) นอกจากนี้ เพปไทด์ที่มีกรดอะมิโนในกลุ่มไฮโดรโฟบิกเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ โพรลีน ลิวซีน อะลานีน ทริปโทเฟน และฟีนอลอะลานีน มีกิจกรรมการต่อต้านอนุมูลอิสระสูงเช่นเดียวกัน (Mendis et al. 2005) ดังนั้น องค์ประกอบของกรดอะมิโนที่พบภายในโมเลกุลของเพปไทด์ ชนิดของแหล่งโปรตีน และชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลาย เป็นปัจจัยสำคัญที่ควบคุมการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเพปไทด์ (ตารางที่ 2.2) นอกจากนี้ น้ำหนักโมเลกุลของเพปไทด์ยังเป็นปัจจัยสำคัญที่ควบคุมคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของเพปไทด์ โดยพบว่า เพปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำหรือเพปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก จะมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพมากกว่าเพปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงหรือขนาดโมเลกุลใหญ่ (Ranathunga et al. 2006)

ตารางที่ 2.2 เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากสิ่งมีชีวิตบางชนิด

แหล่งโปรตีน	เอนไซม์	ลำดับกรดอะมิโนของเพปไทด์	อ้างอิง
กิ้ง (<i>Penaeus japonicas</i>)	Pepsin	Ile-Lys-Lys, Phe-Lys-Lys และ Phe-Ile-Lys-Lys	Suetsuna, 2000
ปลาหมึกยักษ์ (<i>Dosidicus gigas</i>)	Trypsin	Phe-Asp-Ser-Gly-Pro-Ala- Gly-Val-Leu	Mendis et al. 2005
ปลาทูน่า (<i>Conger myriaster</i>)	Trypsin	Leu-Gly-Leu-Asn-Gly-Asp- Asp-Val-Asn	Ranathunga et al. 2006
สาหร่ายสีเขียว (<i>Chlorella vulgaris</i>)	Pepsin	Val-Glu-Cys-Tyr-Gly-Pro- Asn-Arg-Pro-Glu-Phe	Sheih et al. 2009
ปลิงทะเล (<i>Stichopus japonicas</i>)	Trypsin	Gly-Pro-Glu-Pro-Thr-Gly- Pro-Thr-Gly-Ala-Pro-Gln- Trp-Leu-Arg	Zhou et al. 2012

2.3.2.2.2 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthetic antioxidant) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี โดยนิยมใช้สารสังเคราะห์เหล่านี้เติมลงไปในการอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในอาหาร เช่น การเติมสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ลงในอาหารประเภทไขมันและน้ำมัน เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและน้ำมัน ในปัจจุบัน สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ที่ได้รับการอนุญาตให้ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น บิวทิลเฮกซะไฮดรอกซีโทลูอีน (Butylated hydroxytoluene, BHT) บิวทิลเฮกซะไฮดรอกซีแอนนิโซล (Butylated hydroxyanisole, BHA) และ เทอร์เทียรีบิวทิลไฮโดรควิโนน (Tertiary-butylhydroquinone, TBHQ) เป็นต้น (Cai et al. 2015) อย่างไรก็ตาม การใช้สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ มีข้อจำกัดในผลิตภัณฑ์อาหาร สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์อาจก่อให้เกิดความผิดปกติที่ไม่พึงประสงค์ต่อผู้บริโภค เช่น การสะสมของสารเคมีภายในร่างกายส่งผลต่อการทำงานของตับหรือไต สารที่สังเคราะห์ทางเคมีอาจก่อให้เกิดอาการแพ้ต่อผู้บริโภค เป็นต้น โครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์แสดงในรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 โครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์บางชนิด

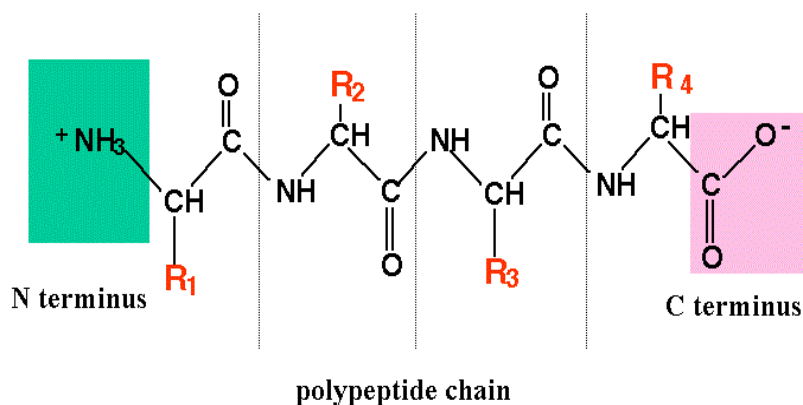
ที่มา: Iverson 1995

2.4 เพปไทด์และโปรตีนไฮโดรไลเซท

2.4.1 ลักษณะของเพปไทด์และโปรตีนไฮโดรไลเซท

เพปไทด์ (Peptide) หรือโปรตีนไฮโดรไลเซท (Protein hydrolysate) คือ ผลิตภัณฑ์ของโปรตีนที่ได้มาจากการบวนการย่อยสลายพันธะเพปไทด์ภายในโมเลกุลของโปรตีน โดยทั่วไปอาจเรียกกระบวนการย่อยสลายนี้อีกว่า ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) เมื่อโมเลกุลของโปรตีนเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดอะมิโนอิสระหรือเพปไทด์ที่มีสายสั้นลง โครงสร้างของเพปไทด์จะประกอบไปด้วยกรดอะมิโนต่อกันตั้งแต่ 2 ถึง 30 ตัวด้วยพันธะเพปไทด์ ที่ปลายสายข้างหนึ่งจะมีหมู่เอมิโน (Amino group, R-NH₂) เรียกปลายด้านนั้นว่า ปลายเอ็น (N-terminus) ในขณะที่ปลายสายอีกด้านหนึ่งมีหมู่คาร์บอกซิล (Carboxyl group, R-COOH) เรียกปลายด้านนั้นว่า ปลายซี (C-terminus) (รูปที่ 2.7)

Peptide = chain of amino acids

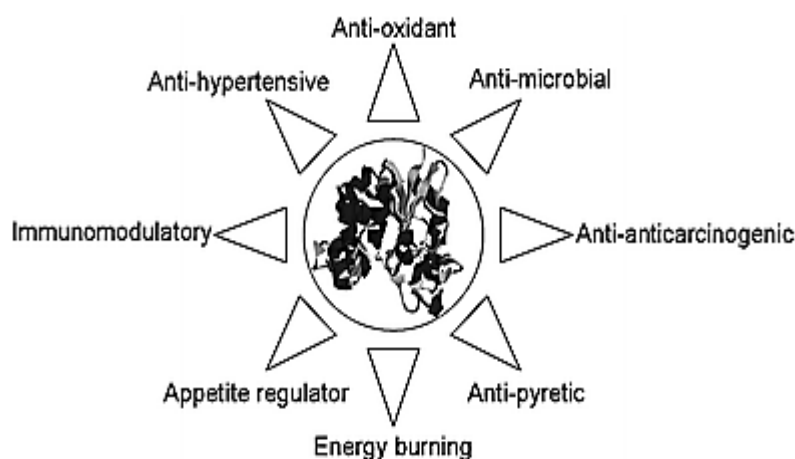


รูปที่ 2.7 โครงสร้างของเพปไทด์

ที่มา: Daintith 2000

เพปไทด์เป็นสารชีวโมเลกุลที่มีบทบาทหลายต่อสิ่งมีชีวิตหลากหลายประการ เช่น ทำหน้าที่เป็นฮอร์โมน ได้แก่ อินซูลิน และ กลูคากอน แอสปาร์แตมที่ใช้เป็นสารให้ความหวานแทนน้ำตาลเป็นสารที่ได้จากเพปไทด์ที่มีแอสพาราจिनและฟีนิลอะลานีนเป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้ยังพบว่า เพปไทด์บางชนิดสามารถแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่มีผลต่อระบบต่างๆ ภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิต นอกเหนือจากการแสดงคุณสมบัติของโปรตีนในเชิงหน้าที่และการเป็นสารอาหารที่จำเป็นตามปกติ มักเรียกเพปไทด์เหล่านี้ว่า เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive peptide)

เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive peptide) คือ เปปไทด์ที่มีผลต่อระบบหรือกลไกต่างๆ ภายในร่างกาย ที่นอกเหนือจากการแสดงคุณสมบัติของโปรตีนในเชิงหน้าที่และการเป็นสารอาหารที่จำเป็นตามปกติของโปรตีน เช่น มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง มีฤทธิ์ลดความดันโลหิต มีฤทธิ์เร่งการเผาผลาญพลังงาน และมีฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น (รูปที่ 2.8) เปปไทด์เหล่านี้สามารถพบได้ทั่วไปในอาหารที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลายชนิด เช่น นม ไข่ เนื้อ ปลา และโปรตีนจากพืช เป็นต้น อย่างไรก็ตาม เปปไทด์เหล่านี้จะไม่แสดงกิจกรรมทางชีวภาพเมื่ออยู่ในโมเลกุลของโปรตีนที่พบตามธรรมชาติ จนกระทั่งโปรตีนถูกย่อยโดยเอนไซม์ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหาร ได้เป็นกรดอะมิโนและเปปไทด์สายสั้นๆ เปปไทด์เหล่านี้จะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายทางลำไส้เล็ก และเข้าสู่กระแสเลือด ก่อนจะแสดงกิจกรรมทางชีวภาพต่อระบบของร่างกายระบบใดระบบหนึ่งอย่างจำเพาะ โดยทั่วไป เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจะประกอบด้วยกรดอะมิโน 2 ถึง 20 ตัว และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์จะขึ้นอยู่กับลำดับกรดอะมิโนที่อยู่ภายในสายของเปปไทด์



รูปที่ 2.8 ตัวอย่างฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์

ที่มา: Nagpal et al. 2011

โดยทั่วไป เพปไทด์หรือโปรตีนไฮโดรไลเซทจะสามารถผลิตได้จาก 3 กระบวนการ คือ การย่อยสลายโปรตีนด้วยสารเคมี (Chemical hydrolysis) การย่อยสลายโปรตีนโดยอาศัยกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ (Microbial fermentation) และการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์กลุ่มโปรตีเอส (Enzymatic hydrolysis) อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบัน หน่วยงานและองค์กรต่างๆ ในอุตสาหกรรมอาหารนิยมผลิตเพปไทด์โดยใช้วิธีการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรตีเอส เนื่องจาก การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็นปฏิกิริยาที่ไม่รุนแรง สามารถดำเนินการได้ในสถานะที่มีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 6 ถึง 8 อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาจะอยู่ระหว่าง 40 ถึง 60 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ การเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์และซับสเตรทจะเกิดขึ้นอย่างจำเพาะเจาะจง มีโอกาสเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงอื่นๆ ได้น้อย ข้อดีเหล่านี้ทำให้เพปไทด์ที่ผลิตจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตีเอสง่ายต่อการเก็บเกี่ยว และเพปไทด์หรือโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้มีความบริสุทธิ์เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตเพปไทด์ด้วยวิธีการอื่นๆ (Clemente 2000)

2.4.2 เอนไซม์โปรตีเอส

เอนไซม์โปรตีเอส (Protease) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเพปไทด์ของโปรตีนให้ได้เป็นโอลิโกเพปไทด์ (Oligopeptide) และกรดอะมิโนอิสระ เอนไซม์โปรตีเอสผลิตได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ในระยะแรกๆ การผลิตเอนไซม์ชนิดนี้จะผลิตจากพืชและสัตว์เป็นส่วนใหญ่ เอนไซม์โปรตีเอสที่ผลิตได้จากพืช เช่น โบรมีเลนจากสับปะรด และ ปาเปนจากยางของมะละกอ เป็นต้น ส่วนเอนไซม์โปรตีเอสที่ผลิตจากสัตว์ เช่น เรนินจากกระเพาะลูกวัว เป็นต้น แต่ในปัจจุบัน การผลิตเอนไซม์โปรตีเอสนิยมผลิตจากจุลินทรีย์มากกว่า เนื่องจากเอนไซม์โปรตีเอสที่ได้จากพืชและสัตว์มีปริมาณการผลิตในแต่ละฤดูกาลที่แตกต่างกัน ปริมาณของเอนไซม์ที่สกัดได้นั้นน้อย เอนไซม์ที่ได้จากพืชจะเสียต้นทุนในการดำเนินการเพาะปลูกในราคาสูง ถ้าเป็นโปรตีเอสจากสัตว์จะขึ้นอยู่กับปริมาณเนื้อสัตว์ที่ผลิตได้ ในขณะที่การผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์สามารถผลิตได้ในอัตราที่สม่ำเสมอ ใช้เวลาและพื้นที่น้อยกว่า

2.4.2.1 ชนิดของเอนไซม์โปรตีเอส

ปัจจุบัน ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์โปรตีเอสอย่างแพร่หลาย ทำให้แบ่งชนิดของเอนไซม์โปรตีเอสได้หลากหลายวิธี ดังนี้

2.4.2.1.1 แหล่งกำเนิด

หากแบ่งชนิดของโปรตีเอสตามแหล่งกำเนิดจะมีทั้งหมด 3 ชนิด คือ โปรตีเอสจากพืช โปรตีเอสจากสัตว์ และโปรตีเอสจากจุลินทรีย์

2.4.2.1.2 ลักษณะการตัดบนสายพอลิเพปไทด์

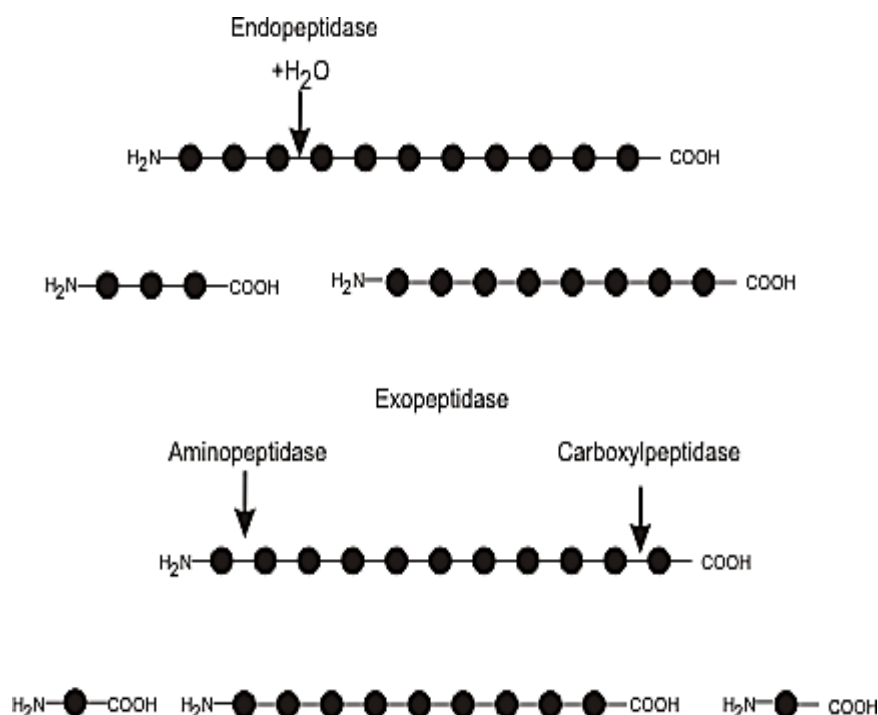
หากแบ่งโปรตีนตามลักษณะการเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายพันธะเพปไทด์ แบ่งได้เป็น 2 ชนิด ดังนี้

2.4.2.1.2.1 เอนโดเพปติเดส

เอนโดเพปติเดส (Endopeptidase) เป็นโปรตีนที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเพปไทด์อย่างสุ่มภายในสายของโปรตีน

2.4.2.1.2.2 เอ็กโซเพปติเดส

เอ็กโซเพปติเดส (Exopeptidase) เป็นเอนไซม์โปรตีนที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเพปไทด์ที่ปลายสายของโปรตีน โดยขึ้นอยู่กับความจำเพาะของเอนไซม์ต่อปลายด้าน N-terminus หรือ C-terminus ด้านใดด้านหนึ่ง ทำให้สามารถแบ่งเอนไซม์กลุ่มเอ็กโซเพปติเดสได้อีกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ คาร์บอกซีเพปติเดส (Carboxypeptidase) ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเพปไทด์ทางด้านปลายซี และ อะมิโนเพปติเดส (Aminopeptidase) ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเพปไทด์ทางด้านปลายเอ็น (รูปที่ 2.9)



รูปที่ 2.9 ลักษณะการเร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเพปไทด์ของเอนโดเพปติเดสและเอ็กโซเพปติเดส
ที่มา: Samanthi 2017

2.4.2.1.3 ลักษณะของบริเวณเร่งหรือกลไกการทำงาน

หากแบ่งโปรตีเอสตามลักษณะของโปรตีเอสหรือกลไกการทำงานของเอนไซม์ แบ่งได้เป็น 4 ชนิดดังนี้

2.4.2.1.3.1 เซอรีนโปรตีเอส

เซอรีนโปรตีเอส (Serine protease) เป็นเอนไซม์ที่มีกรดอะมิโนเซอรีน ฮีสทีดีน และ กรดแอสปาร์ติก อยู่ที่บริเวณเร่ง (Active site) ของเอนไซม์ เป็นเอนไซม์ที่ชอบความเป็นด่าง (Alkaline protease) มีช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ระหว่าง 7 ถึง 11 และเป็นเอนไซม์ที่มีลักษณะการเร่งปฏิกิริยาสลายพันธะสายเพปไทด์แบบเอนโดเพปติเดส ตัวอย่างของเซอรีนโปรตีเอส เช่น ไคโมทริปซิน (Chymotrypsin) ทริปซิน (Trypsin) อีลาสเทส (Elastase) ทรอมบิน (Thrombin) และ ซับทิลิซิน (Subtilisin) เป็นต้น

2.4.2.1.3.2 ซีสเทอีนโปรตีเอส

ซีสเทอีนโปรตีเอส (Cysteine protease) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่าซัลไฟไฮดริลโปรตีเอส (Sulphydryl protease) เอนไซม์กลุ่มนี้มีกรดอะมิโนซีสเทอีน ฮีสทีดีน และ กรดแอสปาร์ติกหรือแอสปาร์ราจีน อยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ เป็นโปรตีเอสที่ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกลางคือพีเอชระหว่าง 6 ถึง 7.5 และเป็นเอนไซม์ที่มีลักษณะการเร่งปฏิกิริยาสลายพันธะสายเพปไทด์แบบเอนโดเพปติเดส ตัวอย่างของซีสเทอีนโปรตีเอส เช่น เอนไซม์ปาเปน โบรมิเลน และ ฟิซิน เป็นต้น

2.4.2.1.3.3 แอซิดโปรตีเอส

แอซิดโปรตีเอส (Acid protease) เป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ระหว่าง 2 ถึง 4 เอนไซม์กลุ่มนี้มีกรดอะมิโนแอสปาร์ติก และ ไทโรซีน อยู่ที่บริเวณเร่ง สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดีกับกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวน ตัวอย่างของโปรตีเอสในกลุ่มนี้ เช่น เพปซิน และ เรนิน เป็นต้น

2.4.2.1.3.4 เมทัลโลโปรตีเอส

เมทัลโลโปรตีเอส (Metalloprotease) เป็นเอนไซม์ที่มีไอออนของโลหะรวมอยู่ในโมเลกุลของเอนไซม์ หรือต้องการไอออนของโลหะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ (เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์) เมทัลโลโปรตีเอสมีลักษณะการเร่งปฏิกิริยาสลายพันธะเพปไทด์แบบเอ็กโซเพปติเดสเกือบทั้งหมด และทำงานได้ดีที่พีเอชเป็นกลางหรือต่างขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ ตัวอย่างของโปรตีเอสกลุ่มนี้ เช่น คาร์บอกซิเพปติเดส เอ คาร์บอกซิเพปติเดส บี และ โพรลิเดส เป็นต้น

2.4.2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรตีเอส

ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรตีเอสขึ้นอยู่กับ 3 ปัจจัยหลัก ดังนี้

2.4.2.2.1 ชนิดของแหล่งโปรตีนที่ใช้ในการย่อยสลาย

แหล่งโปรตีนประกอบด้วยโปรตีนชนิดที่มีความยืดหยุ่นสูงจะย่อยสลายได้ง่าย ในขณะที่ถ้ามีโปรตีนที่มีรูปร่างกลมจะทำให้เอนไซม์โปรตีเอสจะเข้าทำปฏิกิริยาได้ยาก อย่างไรก็ตาม หากมีการปรับสภาพของแหล่งโปรตีนด้วยความร้อนก่อนนำมาย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตีเอสจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีนได้ดียิ่งขึ้น ผลลัพธ์ที่ได้มาจากการย่อยสลายแหล่งโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรตีเอส จะได้เปปไทด์หลายเส้นที่มีขนาดและลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน ทำให้เปปไทด์ที่ได้มีการแสดงคุณสมบัติและฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันด้วย

2.4.2.2.2 ชนิดของเอนไซม์โปรตีเอส

โดยทั่วไป การทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ เอนโดเปปติเดส (Endopeptidase) และ เอ็กโซเปปติเดส (Exopeptidase) เอนไซม์ที่มีกิจกรรมการทำงานแบบเอนโดเปปติเดสสามารถย่อยสลายพันธะเปปไทด์ภายในโมเลกุลของโปรตีนแบบสุ่ม ทำให้เกิดขึ้นส่วนของโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีขนาดต่างๆ หลายชนิด ในขณะที่เอนไซม์ที่มีกิจกรรมการทำงานแบบเอ็กโซเปปติเดสจะสามารถย่อยสลายกรดอะมิโนออกจากโมเลกุลของโปรตีนได้ที่ละหนึ่งโมเลกุลที่บริเวณปลายเอ็น (N-terminus) หรือ บริเวณปลายซี (C-terminus) ของโปรตีน (Clemente, 2000)

2.4.2.2.3 สภาวะที่ใช้ในการย่อยสลายแหล่งโปรตีน

การใช้เอนไซม์โปรตีเอสในการย่อยสลายโปรตีนจำเป็นต้องมีการควบคุมสภาวะต่างๆ เช่น พีเอช อุณหภูมิ และระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา เพื่อเป็นการส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ให้สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ เอนไซม์โปรตีเอสต่างชนิดกันจะมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 2.3)

ตารางที่ 2.3 การทำงานของเอนไซม์ แหล่งที่มา และสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ โปรตีเอส (Adler 1986; Jung et al. 2006)

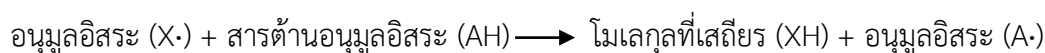
เอนไซม์	การทำงานของเอนไซม์	แหล่งที่มา	สภาวะที่ใช้	
			พีเอช	อุณหภูมิ (°C)
Pepsin	Endopeptidase	เมือกในกระเพาะอาหาร	2	37
Trypsin	Endopeptidase	วุ้น สุก และตับอ่อนของมนุษย์	5	37
Alcalase	Endopeptidase	<i>Bacillus licheniformis</i>	7	50
Papain	Endopeptidase	ยางมะละกอ	6	37
Flavourzyme	Endo-exo-peptidase	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	7	50
Neutrase	Endopeptidase	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	8	50

2.5 ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระ

ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระหรือฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Free radicals scavenging activity) คือความสามารถของสารใดๆ ต่อการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดจากอนุมูลอิสระ หรือความสามารถของสารใดๆ ที่ทำให้อนุมูลอิสระมีความเข้มข้นลดลง โดยทั่วไป หลักการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ ดังนี้

2.5.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยอาศัยหลักการถ่ายเทไฮโดรเจนอะตอม

การวิเคราะห์กิจกรรมต่อต้านอนุมูลอิสระโดยอาศัยหลักการถ่ายเทไฮโดรเจนอะตอม (Hydrogen atom transfer) เป็นการวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระต่อการกำจัดอนุมูลอิสระโดยการให้ไฮโดรเจนอะตอม ดังสมการ



วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่อาศัยหลักการนี้ มี 3 วิธี ดังนี้

2.5.1.1 Oxygen radical absorbance capacity

Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) เป็นวิธีการวัดกิจกรรมต่อต้านอนุมูลอิสระที่อาศัยหลักการถ่ายเทไฮโดรเจนอะตอมให้กับอนุมูลอิสระ วิธีการนี้อาศัยการสร้างอนุมูลอิสระเพอรอกซิล (ROO \cdot) เมื่ออนุมูลอิสระเพอรอกซิลทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับตัวติดตาม

หรือโพรบเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescent probe) จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีคุณสมบัติการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ ดังสมการ



เมื่ออยู่ในสถานะที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระจะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระเพอรอกซิล ทำให้โพรบเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์มีความคงตัว และสามารถตรวจสอบโดยการติดตามการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ได้ การเรืองแสงของโพรบจะอยู่ได้นานเมื่อเทียบกับสถานะที่ไม่มีสารต้านอนุมูลอิสระในปฏิกิริยา ตัวอย่างโพรบเรืองแสงที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ORAC เช่น บี-ไฟโคอีรีทริน (B-phycoerythrin, B-PE) แต่โพรบชนิดนี้มีข้อจำกัดคือ มีความแปรปรวนสูงและอาจเกิดปฏิกิริยากับแสงได้ นอกจากนี้ บี-ไฟโคอีรีทรินสามารถจับกับสารในกลุ่มพอลิฟีนอล ทำให้เกิดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ต่ำกว่าปกติ โพรบชนิดอื่นๆ ที่นิยมใช้ ได้แก่ ฟลูออเรสซิน (Fluorescein) และไดคลอโรฟลูออเรสซิน (Dichlorofluorescein) ซึ่งเป็นโพรบเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่มีความคงตัวมากกว่า

การรายงานความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากวิธีการ ORAC ทำได้โดยใช้วิธีคำนวณความแตกต่างของพื้นที่ใต้กราฟของความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการเกิดปฏิกิริยากับระดับความเข้มของฟลูออเรสเซนต์สัมพัทธ์ (Relative fluorescent intensity) ในสถานะที่มีเปรียบเทียบกับไม่มีสารต้านอนุมูลอิสระ หรืออาจรายงานในรูปของโทรลอกซ์อิควิวาเลนต์ (Trolox equivalent, TE) ที่ได้จากการคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานโทรลอกซ์ (Trolox) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 6.25 ถึง 50 ไมโครโมลาร์ และแสดงค่าในรูปของไมโครโมลโทรลอกซ์อิควิวาเลนต์ต่อลิตร ($\mu\text{mol TE/l}$) หรือ ไมโครโมลโทรลอกซ์อิควิวาเลนต์ต่อน้ำหนักของตัวอย่าง ($\mu\text{mol TE/g sample}$) (Alam et al. 2013)

2.5.1.2 Total radical trapping antioxidant parameter

Total radical trapping antioxidant parameter (TRAP) เป็นวิธีการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยอาศัยการตรวจวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระต่อการรบกวนการทำปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระเพอรอกซิลที่สร้างจาก 2,2'-อะโซบิส (2-อะมิดีโนโพรเพน) ไตไฮโดรคลอไรด์ (2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride, AAPH) กับโพรบเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ ด้วยหลักการที่คล้ายกับวิธี ORAC วิธีนี้เป็นการวัดการเรืองแสงของอาร์-ไฟโคอีรีทริน (R-phycoerythrin) หรือการวัดการดูดกลืนแสงของ 2,2'-อะซิโนบิส (3-เอทิลเบนโซไทอะโซลีน)-6-ซัลโฟนิคแอซิด (2,2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic

acid, ABTS) (Alam et al. 2013) สำหรับวิธีการ TRAP โพรบที่เลือกใช้ต้องสามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระเพอรอกซิลและแสดงความแตกต่างทั้งในรูปการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์หรือการดูดกลืนแสงได้ระหว่างโพรบในสภาวะปกติกับโพรบที่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน

การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากวิธี TRAP นิยมแสดงในรูปของ Lag time หรือเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบเปรียบเทียบกับเวลาในการทำปฏิกิริยาของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานโทรลอคซ์ (Alam et al. 2013) หรือรายงานในรูปของไมโครโมลอนุมูลอิสระเพอรอกซิลที่ถูกกำจัดต่อปริมาตร ข้อควรระวังสำหรับวิธีการของ TRAP คือ ปฏิกิริยานี้ต้องมีออกซิเจนมากพอ เนื่องจากภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ อนุมูลอิสระของคาร์บอนที่เกิดจาก AAPH จะเข้าทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระแทนที่จะเป็นตัวสร้างอนุมูลอิสระเพอรอกซิลทำให้เกิดการความคลาดเคลื่อนของผลการทดลองได้

2.5.1.3 β -carotene bleaching

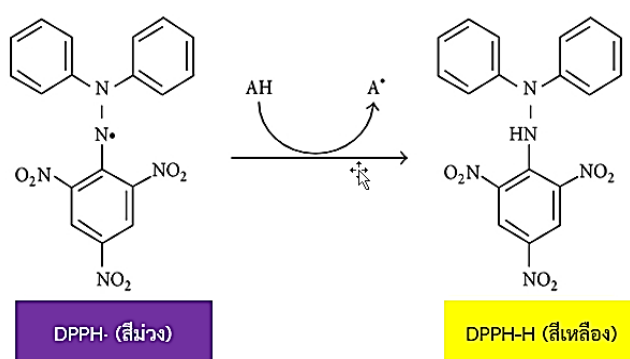
β -carotene bleaching เป็นวิธีการตรวจสอบกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ โดยอาศัยคุณสมบัติของสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ เมื่อสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่มาจาก การเหนี่ยวนำโดยแสง ความร้อน หรืออนุมูลอิสระเพอรอกซิล แคโรทีนอยด์จะมีสีจางลง แล้วทำการวัดการเปลี่ยนแปลงสีของแคโรทีนอยด์ที่จางลงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร เพื่อเป็นตัวบ่งชี้ว่าสารที่ต้องการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถเกิดปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระได้โดยมีการถ่ายเทไฮโดรเจนอะตอมให้กับอนุมูลอิสระเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระก่อนที่อนุมูลอิสระจะเข้าทำปฏิกิริยากับแคโรทีนอยด์

2.5.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยอาศัยหลักการถ่ายเทอิเล็กตรอน

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยอาศัยหลักการถ่ายเทอิเล็กตรอน (Electron transfer) เป็นการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ และนำไปสู่การเปลี่ยนสี ในปัจจุบัน การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยอาศัยหลักการถ่ายเทอิเล็กตรอนเป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมมากที่สุด เนื่องจาก วิธีการที่อาศัยหลักการนี้มีขั้นตอนในการเตรียมสารเคมี การทำปฏิกิริยา และการตรวจติดตามผลที่ไม่ยุ่งยาก และซับซ้อนเมื่อเทียบกับการวิเคราะห์ที่ใช้หลักการแบบอื่น วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่อาศัยหลักการนี้ มีดังนี้

2.5.2.1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ 2,2-ไดฟีนิล-1-ไพคริลไฮดราซิล

อนุมูลอิสระ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) เป็นอนุมูลอิสระที่มีความโดดเด่น คือ เป็นอนุมูลอิสระชนิดที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ มีความคงตัวสูงและสามารถดูดกลืนแสงในช่วงของแสงที่ตามองเห็น (Visible light) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เมื่อ DPPH เกิดปฏิกิริยารีดักชันหรือได้รับอิเล็กตรอนจะเปลี่ยนสีจากสีม่วงเข้มกลายเป็นสีเหลือง (รูปที่ 2.10) การเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้นสามารถตรวจติดตามด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์



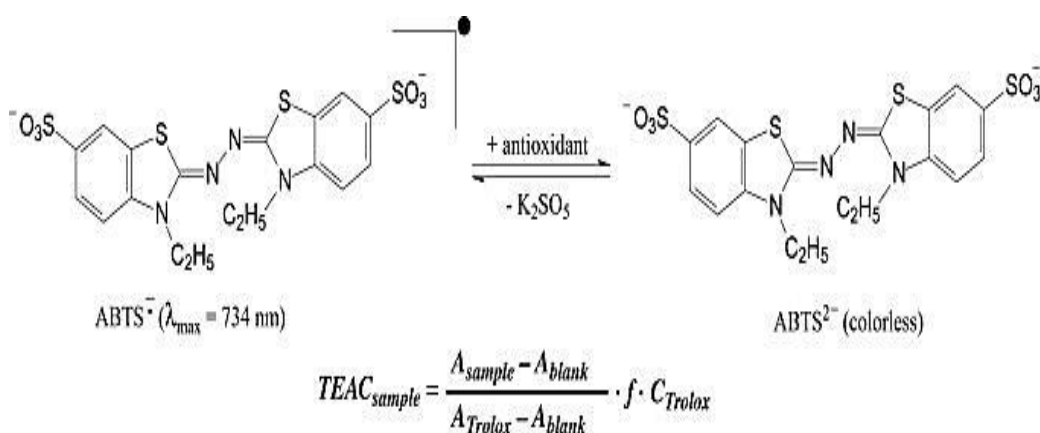
รูปที่ 2.10 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของอนุมูลอิสระ DPPH เมื่อเกิดปฏิกิริยารีดักชันกับสารต้านอนุมูลอิสระ (AH)

ดัดแปลงจาก: Kaur and Geetha 2006

วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH· ทำได้โดยการเตรียมสารละลาย DPPH ในเมทานอล จากนั้น นำสารละลายอนุมูลอิสระ DPPH· มาผสมกับสารที่ต้องการทดสอบ และวัดการเปลี่ยนแปลงสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรูปของร้อยละความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH· โดยเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน เช่น กรดแอสคอร์บิก และ วิตามินอี เป็นต้น วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยสาร DPPH· เป็นวิธีการที่ง่ายและสะดวกในการติดตามผล อย่างไรก็ตาม อนุมูลอิสระ DPPH· เป็นอนุมูลอิสระที่มีความคงตัวสูง มีอายุค่อนข้างยาวเมื่อเทียบกับอนุมูลอิสระทั่วไป จึงพบว่าสารต้านอนุมูลอิสระบางชนิดเกิดปฏิกิริยาได้ช้ามากกับ DPPH· ในกรณีนี้จะทำให้การทดสอบกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH· ได้ค่าที่ต่ำกว่าความเป็นจริง

2.5.2.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ 2,2'-อะซิโนบิส (3-เอทิลเบนโซไทอะโซลีน)-6-ซัลโฟนิคแอซิด

2,2'-อะซิโนบิส (3-เอทิลเบนโซไทอะโซลีน)-6-ซัลโฟนิค แอซิด (2,2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid, ABTS) เป็นสารเคมีชนิดหนึ่งที่สามารถปลดปล่อยอนุมูลอิสระ ABTS[•] เมื่อเกิดปฏิกิริยาเพอซัลเฟตออกซิเดชันกับโพแทสเซียมเพอซัลเฟต วิธีการเตรียมอนุมูลอิสระ ABTS[•] ทำได้โดยละลายสาร ABTS ในน้ำและเติมโพแทสเซียมเพอซัลเฟตบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จนได้เป็นสารละลายสีน้ำเงินเข้ม จากนั้น เจือจางด้วยน้ำกลั่น จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เท่ากับ 0.7 ± 0.2 ทำการทดสอบโดยผสมสารที่เตรียมได้กับสารที่ต้องการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS[•] เมื่ออนุมูลอิสระ ABTS[•] เกิดปฏิกิริยารีดักชันกับสารต้านอนุมูลอิสระ สีของสารละลายจะจางลง โดยการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้นสามารถตรวจติดตามด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรูปร้อยละความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS[•] โดยเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน เช่น กรดแอสคอร์บิก และวิตามินอี เป็นต้น ปฏิกิริยารีดักชันของอนุมูลอิสระ ABTS[•] แสดงในรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของอนุมูลอิสระ ABTS[•] เมื่อเกิดปฏิกิริยารีดักชันกับสารต้านอนุมูลอิสระ

ที่มา: Huang et al. 2005

2.6 ฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง

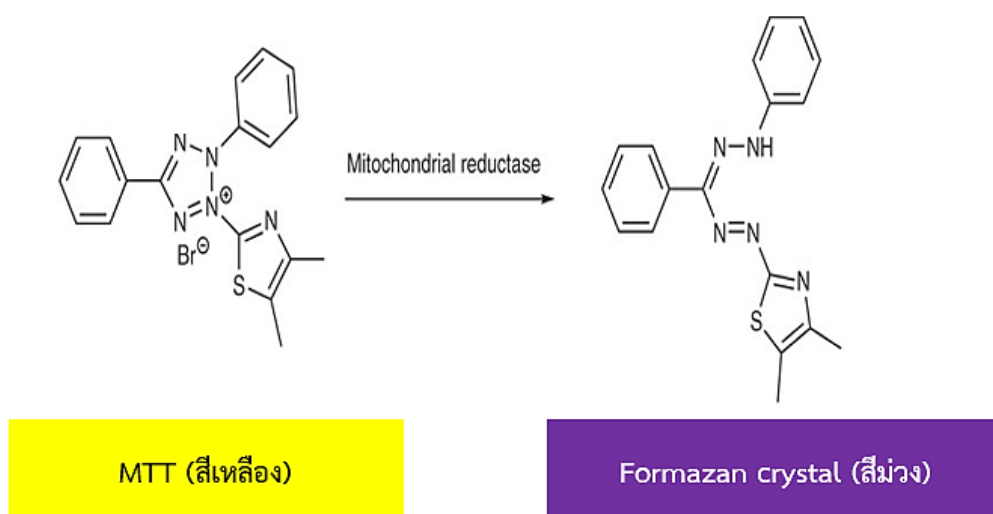
โรคมะเร็งเป็นโรคที่มีความรุนแรงและเป็นสาเหตุการเสียชีวิตของมนุษย์ที่สำคัญทั่วโลก ในอดีตที่ผ่านมา อัตราการเกิดโรคมะเร็งพบมากในวัยผู้สูงอายุ แต่ปัจจุบันพบว่า แนวโน้มอัตราการเกิดโรคมะเร็งชนิดต่างๆ เริ่มพบมากขึ้นในคนวัยทำงานหรือวัยรุ่น เนื่องจากการดำรงชีวิตของมนุษย์มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งมากขึ้น เช่น การสัมผัสสารก่อมะเร็ง และการบริโภคอาหารที่มีการปรับแต่งทางพันธุกรรมหรือผ่านกระบวนการต่างๆ มีรายงานเกี่ยวกับสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งว่าสามารถเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น การติดเชื้อไวรัสบางชนิด การได้รับรังสี การได้รับสารเคมีต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สารทอבקโค (Tobacco) ที่พบในบุหรี่ สารเคมีในอาหาร สารเคมีที่ใช้ชีวิตประจำวัน รวมถึงอนุมูลอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยาต่างๆ ภายในร่างกายและการรับอนุมูลอิสระจากสิ่งแวดล้อมภายนอก (Elochukwu 2015)

โรคมะเร็งเป็นโรคที่เกิดจากความเสียหายของดีเอ็นเอหรือสารพันธุกรรม ส่งผลให้เซลล์ปกติมีการเปลี่ยนแปลงกลายเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็นมะเร็ง คุณสมบัติทั่วไปของเซลล์มะเร็ง คือ เซลล์จะมีการเจริญและแบ่งตัวในระดับที่มากกว่าปกติ ทำให้เกิดกลุ่มก้อนของเซลล์ที่มีความผิดปกติ เกิดการเบียดเบียนเซลล์ข้างเคียง และสามารถแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ นอกจากนี้ เซลล์มะเร็งยังมีคุณลักษณะเด่นที่ทำให้ยากต่อการรักษา คือ เซลล์มะเร็งสามารถรักษาการเจริญเติบโตของเซลล์ไว้ได้ตลอด สามารถหลบเลี่ยงกระบวนการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ และสามารถต้านทานระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบัน มีวิธีการในการรักษาโรคมะเร็งมีหลายวิธี เช่น การผ่าตัด การให้ยาหรือเคมีบำบัด และการฉายแสง แต่ว่าการรักษาด้วยวิธีเหล่านี้ได้ผลไม่เท่าที่ควร ทำให้ผู้ป่วยเกิดภาวะแทรกซ้อนจากการรักษาและได้รับผลกระทบจากการรักษาทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง (Elochukwu 2015) นอกจากนี้ การออกฤทธิ์ของยารักษามะเร็งบางชนิดยังไม่มีเฉพาะต่อเซลล์มะเร็งที่เป็นเป้าหมายในการกำจัด แต่ยังมีผลในการทำลายเซลล์ปกติด้วย จากข้อมูลดังกล่าว ทำให้ในปัจจุบัน หน่วยงานทางการแพทย์และองค์กรต่างๆ ที่เกี่ยวข้องได้มีการศึกษาค้นคว้าเพื่อพัฒนาสารเคมีหรือผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเพิ่มมากขึ้น โดยมุ่งเน้นไปที่การศึกษาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติในระดับต่ำ

ฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งหรือฤทธิ์ต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง (Cancer anti-proliferative activity) คือ ความสามารถของสารใดๆ ที่มีผลต่อการยับยั้งหรือการลดการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งนิยมรายงานผลในรูปของร้อยละความสามารถ

ในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง (% Inhibition) หรือรายงานผลในรูปของความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งหรือลดจำนวนเซลล์มะเร็งลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (Half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) โดยเปรียบเทียบกับยาหรือสารเคมีมาตรฐานที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง เช่น 5-ฟลูออโรยูราซิล (5-Fluorouracil) และดอกโซรูบิซิน (Doxorubicin) เป็นต้น

วิธีการที่นิยมใช้ในการศึกษาความสามารถของสารใดๆ ต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง คือ การทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วย 3-(4,5-ไดเมทิล-2-ไทอะโซลิล)-2,5-ไดฟีนิลเตตราโซเลียมโบรไมด์ (3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay) (Wang and Zhang 2016) หลักการของ MTT assay คือ เซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถใช้เอนไซม์ไมโทคอนเดรียลดรีดักเตส (Mitochondrial reductase) รีดิวซ์สาร MTT ที่มีสีเหลืองให้เปลี่ยนเป็นผลึกของฟอร์มazan (Formazan crystal) ที่มีสีม่วง (รูปที่ 2.12) โดยสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นประมาณ 550-600 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของผลึกของฟอร์มazanที่มีสีม่วง



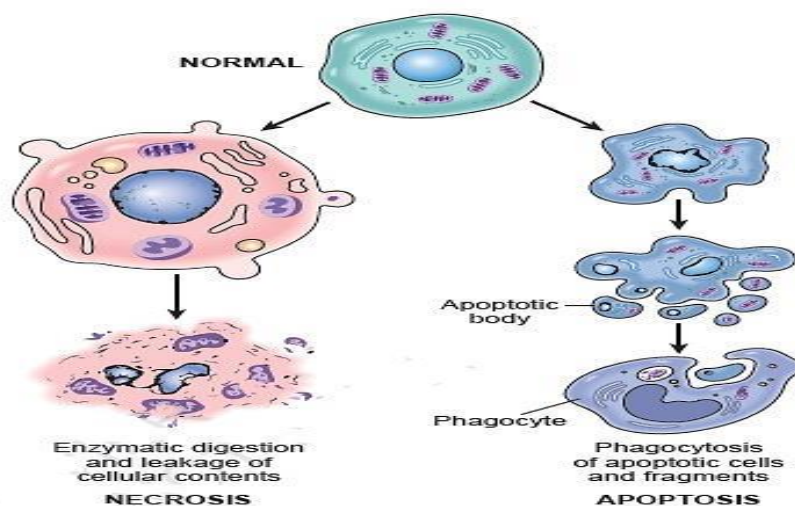
รูปที่ 2.12 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ MTT ไปเป็นผลึกของฟอร์มazanโดยเอนไซม์ไมโทคอนเดรียลดรีดักเตส

ดัดแปลงจาก: Stockert et al. 2012

2.7 การตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส

อะพอพโทซิส (Apoptosis) คือการตายของเซลล์ชนิดหนึ่งที่มีแบบแผน (Programmed cell death) และจัดเป็นรูปแบบการตายตามธรรมชาติของเซลล์ อะพอพโทซิสมีบทบาทสำคัญในการพัฒนาและรักษาสสมดุลของเซลล์ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง และเป็นกลไกในการกำจัดเซลล์ที่ติดเชื้อหรือเซลล์เป็นอันตรายต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิต ดังนั้น ถ้าการควบคุมการตายแบบอะพอพโทซิสมีความผิดปกติ จะทำให้เกิดโรคหรือพยาธิสภาพได้หลายรูปแบบ เช่น เมื่อมีการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ในระดับที่ต่ำเกินไป จะทำให้เกิดโรคมะเร็ง และโรคมุมักุมักันทำลายตนเอง เป็นต้น ในขณะที่ถ้ามีการชักนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสในระดับที่สูงเกินไป จะทำให้เกิดการเสื่อมของระบบประสาท และโรคสภาวะขาดเลือดเฉพาะที่ เป็นต้น (Elmore 2007)

การตายแบบอะพอพโทซิสเป็นรูปแบบการตายที่เกิดขึ้นได้เมื่อเซลล์มีความผิดปกติ หรือเกิดขึ้นในกลไกตามปกติเพื่อสร้างเซลล์ใหม่ทดแทนเซลล์ที่มีความเสียหาย ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญของเซลล์ที่จะเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส คือ มีไซโทพลาสซึมและออร์แกเนลล์ต่างๆ หนาแน่นขึ้น เซลล์เหี่ยว เยื่อหุ้มเซลล์หดตัว โครมาตินอัดกันอย่างหนาแน่น ดีเอ็นเอแตกเป็นท่อน นิวเคลียสแตกเป็นชิ้นส่วน หลังจากนั้น เซลล์จะแยกออกจากกันเป็นถุงเล็กๆ หลายๆ ถุง ที่เรียกว่า อะพอพโทติกบอดี (Apoptotic bodies) และสุดท้ายอะพอพโทติกบอดีเหล่านี้จะถูกทำลายโดยเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจในระบบภูมิคุ้มกัน โดยไม่มีการกระตุ้นกระบวนการอักเสบของเซลล์ ซึ่งมีความแตกต่างจากการตายของเซลล์แบบเนโครซิส (Necrosis) (รูปที่ 2.13) การเกิดเนื้อตายหรือการตายของเซลล์แบบเนโครซิสเกิดจากเซลล์ได้รับความเสียหายแบบเฉียบพลัน เนื่องจากเซลล์มีการตอบสนองต่อสภาวะเครียดอย่างรุนแรงหรือมีการสัมผัสกับสารพิษ โดยเซลล์ที่จะพัฒนาไปเป็นเนื้อตายจะมีปริมาตรเพิ่มขึ้นหรือเกิดการรั่วของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เซลล์บวม และเซลล์แตก การเกิดเนื้อตายส่วนใหญ่จะเกิดกับกลุ่มเซลล์หรือเนื้อเยื่อบริเวณใดบริเวณหนึ่งอย่างจำเพาะ และเมื่อเซลล์แตกจะปลดปล่อยสารหรือองค์ประกอบต่างๆ ออกมาสู่ภายนอกจะมีผลทำให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อที่อยู่ข้างเคียงได้รับความเสียหายและมีการอักเสบเกิดขึ้น (Gewies 2003)



รูปที่ 2.13 ลักษณะของเซลล์ที่เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสและเนโครซิส

ที่มา: Goland 2014

การเกิดการตายแบบอะพอพโทซิสมีเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการตาย คือ เอนไซม์แคสเพส (Caspase) เอนไซม์แคสเพสเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมวิถีของการเกิดอะพอพโทซิส โดยทั่วไป เอนไซม์แคสเพสที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบอะพอพโทซิสแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มหลัก คือ แคสเพสที่เป็นตัวเริ่มต้น (Initiator) ได้แก่ แคสเพส-8 และ แคสเพส-9 และแคสเพสที่เป็นตัวดำเนินการ (Executioner) ได้แก่ แคสเพส-3 แคสเพส-6 และ แคสเพส-7 ในสภาวะปกติของเซลล์แคสเพสชนิดต่างๆ จะอยู่ในรูปของเอนไซม์ที่ยังไม่สามารถทำงานได้ที่เรียกว่า โปรเอนไซม์หรือไซโมเจน (Pro-enzyme or zymogen) เมื่อเซลล์ได้รับอันตรายหรือความเสียหาย แคสเพสที่เป็นตัวเริ่มต้นจะถูกกระตุ้นให้สามารถทำงานได้อย่างอัตโนมัติ จากนั้น แคสเพสที่เป็นตัวเริ่มต้นจะไปกระตุ้นแคสเพสที่เป็นตัวดำเนินการ ทำให้แคสเพสที่เป็นตัวดำเนินการไปย่อยสลายชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเซลล์ และทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส เซลล์ที่เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี แล้วได้เป็นโมเลกุลของฟอสโฟลิพิดฟอสฟาติลเซอร์ิน (Phospholipid phosphatidylserine) ฟอสโฟลิพิดฟอสฟาติลเซอร์ินที่จัดเป็นโมเลกุลสัญญาณ (Signal molecule) ที่ส่งสัญญาณให้แมโครฟาจเข้ามากำจัดอะพอพโทติกบอดีที่เกิดขึ้น การตายแบบอะพอพโทซิสเป็นกลไกที่ค่อนข้างซับซ้อนมีเอนไซม์และโปรตีนที่เกี่ยวข้องหลายชนิด นอกจากนี้ สัญญาณที่เป็นตัวบ่งบอกว่าให้เซลล์มีการตายแบบอะพอพโทซิสมี 2 ชนิด คือ สัญญาณที่เริ่มต้นจากภายนอกเซลล์ (Extrinsic signal) และ สัญญาณที่เริ่มต้นจากภายในเซลล์ (Intrinsic signal)

2.7.1 วิธีการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส

การตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสถูกควบคุมโดยการส่งสัญญาณของเซลล์หลายชนิด ซึ่งอาจเกิดจากตัวชักนำภายนอกเซลล์ (Extrinsic inducer) เช่น สารพิษ ฮอโมน หรือ ไซโตไคน์ (Cytokine) นอกจากนี้ การตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสอาจถูกชักนำจากการตอบสนองต่อสถานะเครียดของเซลล์ เช่น การขาดสารอาหาร การติดเชื้อไวรัส และการได้รับรังสี ซึ่งเป็นการตอบสนองต่อความเครียดของเซลล์ที่เกิดขึ้นจากปัจจัยภายในเซลล์ ก่อนที่จะเกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส สัญญาณอะพอพโทซิสที่ได้รับจากภายในและภายนอกเซลล์จะเชื่อมต่อกับวิธีการตาย (Death pathway) กระบวนการเหล่านี้จะถูกควบคุมด้วยยีนและโปรตีนหลากหลายชนิด เพื่อที่จะนำสัญญาณอะพอพโทซิสเหล่านั้นเข้าสู่กระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส วิธีการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสมี 2 วิธีหลัก ดังนี้

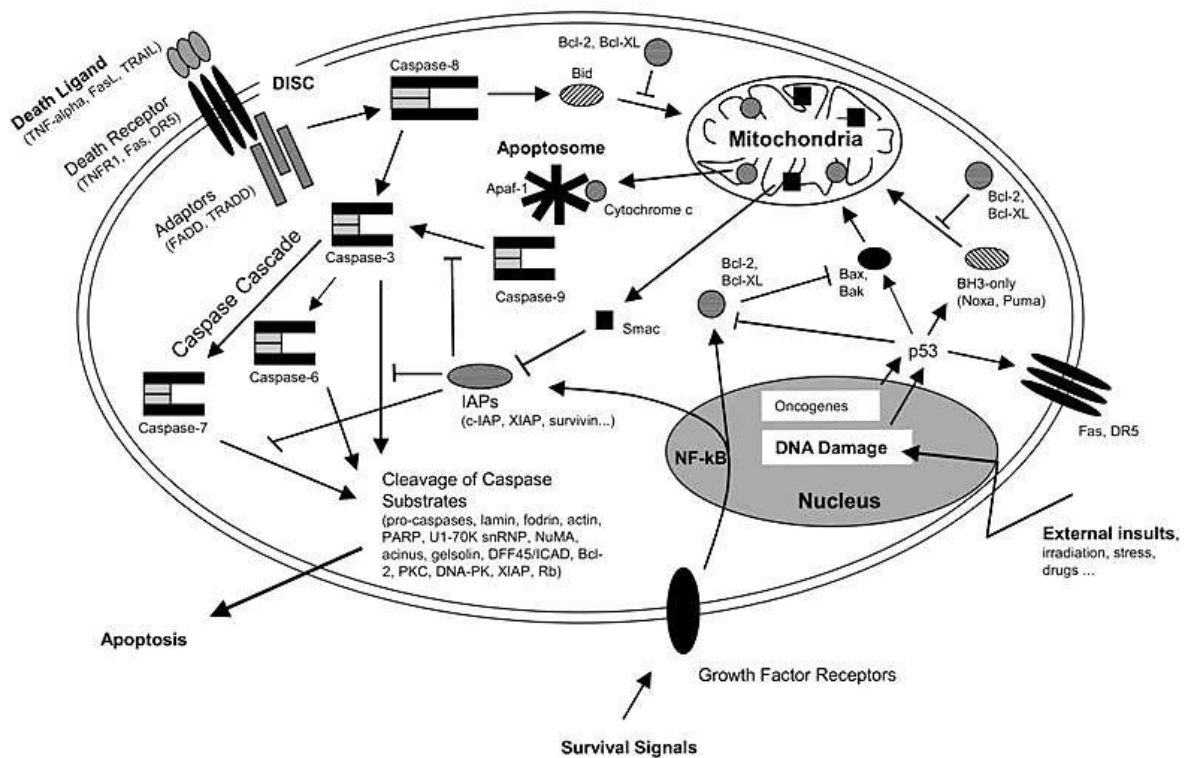
2.7.1.1 วิธีภายในหรือวิถีไมโทคอนเดรีย

ไมโทคอนเดรียเป็นออร์แกเนลล์ที่มีความสำคัญในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงที่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีพ ถ้าหากเซลล์ใดไม่มีไมโทคอนเดรีย หรือไมโทคอนเดรียได้รับความเสียหาย เซลล์นั้นจะเกิดตายอย่างรวดเร็ว และจากสาเหตุดังกล่าวทำให้การตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสสามารถเกิดขึ้นได้จากการควบคุมของไมโทคอนเดรีย โปรตีนในวิธีการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสจะเข้าไปสร้างความเสียหายหรือมีผลต่อไมโทคอนเดรียได้หลากหลายรูปแบบ เช่น ทำให้เยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรียรั่ว หรืออาจเพิ่มความสามารถในการซึมผ่าน (Permeability) ของสารต่างๆ ของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย เพื่อทำให้สารหรือองค์ประกอบภายในไมโทคอนเดรียบางชนิดรั่วไหลออกมาที่บริเวณไซโทซอล โดยทั่วไป ในเซลล์ปกติจะพบโปรตีนที่ชื่อว่า Bcl-2 เป็นโปรตีนที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย โปรตีน Bcl-2 เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส นอกจากนี้ ยังพบว่าโปรตีน Bcl-2 ยังพบได้ในเยื่อหุ้มของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม และ เยื่อหุ้มนิวเคลียส เซลล์ที่ได้รับความเสียหายจากภายในเซลล์จะส่งสัญญาณให้โปรตีน 4 ชนิด คือ Bcl-2 associated X protein (Bax), Bcl-2 antagonist of cell death (Bad), Bcl-2 antagonist killer (Bak) และ Bcl-2 interacting death domain (Bid) อยู่ในรูปที่ว่องไว โปรตีน Bax, Bad, Bak และ Bid จะเคลื่อนย้ายจากไซโทซอลไปยังบริเวณผิวของไมโทคอนเดรียเพื่อที่จะยับยั้งการทำงานของโปรตีน Bcl-2 โดยโปรตีน Bax, Bad, Bak และ Bid จะแทรกตัวเข้าไปในเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย ทำให้เยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรียเป็นรูและปลดปล่อยไซโทโครม ซี (Cytochrome c, Cyt c) ออกมายังไซโทซอล จากนั้น Cyt c จะไปรวมตัวกับโปรตีนที่มีชื่อว่า Apoptosis protease activating factor-1 (Apaf-1) แล้วเกิดเป็น

อะพอพโทโซม (Apoptosome) อะพอพโทโซมเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการทำงานของเอนไซม์แคสเพส-9 และเอนไซม์แคสเพส-9 จะเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์แคสเพส-3 เอนไซม์แคสเพส-6 และ เอนไซม์แคสเพส-7 ต่อไป เอนไซม์แคสเพสจะไปย่อยสลายโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ เช่น ลามิน (Lamin) ฟอทริน (Fodrin) แอคติน (Actin) ส่งผลไม่สามารถคงสภาพอยู่ได้ และเกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสในที่สุด นอกจากนี้ โปรตีนบางชนิดที่ถูกปล่อยออกมาจากไมโทคอนเดรีย เช่น โปรตีน Second mitochondria-derived activator of caspases (Smac) จะยับยั้งการทำงานของโปรตีนที่ต้านการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (Inhibitor of apoptosis proteins, IAPs) ทำให้ IAPs ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แคสเพสได้ ส่งผลให้เซลล์สามารถเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส ในทางตรงกันข้าม เมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้นด้วยสัญญาณการรอดชีวิตของเซลล์ (Survival signal) จะทำให้มีการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ IAPs โดยการกระตุ้นการทำงานของทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่มีชื่อว่า NFκB โปรตีนที่ทำหน้าที่ต้านการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (Anti-apoptotic protein) มีหลายชนิด เช่น โปรตีน Bcl-2 และ Bcl-xL โปรตีนเหล่านี้จะไปยับยั้งการทำงานของโปรตีนที่ส่งเสริมให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส เช่น โปรตีน Bid, Bax และ Bak ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสที่ถูกควบคุมโดยไมโทคอนเดรีย (รูปที่ 2.14)

2.7.1.2 วิธีภายนอกหรือวิถีตัวรับการตาย

วิถีภายนอกหรือวิถีตัวรับการตาย (Extrinsic pathway or death receptor pathway) เป็นวิถีการตายของเซลล์ที่เริ่มจากการจับกันระหว่างเดทลิแกนด (Death ligand) ได้แก่ Tumor necrosis factor (TNF), Fas ligand (Fas-L) และ TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) กับตัวรับสัญญาณการตาย (Death receptor) ได้แก่ Type 1 TNF-receptor, Fas (CD95/Apo-1) และ TRAIL receptor ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (รูปที่ 2.14) เมื่อมีการจับกันระหว่างเดทลิแกนดกับตัวรับสัญญาณการตายจะเกิดเป็น Death domain ที่เชื่อมอยู่กับอะแดปเตอร์โปรตีน (Adaptor protein) เช่น Fas-associated death domain (FADD) และ TNF receptor-associated death domain (TRADD) ทำให้เกิดเป็นสัญญาณเหนี่ยวนำการตาย (Death inducing signaling complex, DISC) (รูปที่ 2.14) สัญญาณเหนี่ยวนำการตายจะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการทำงานของเอนไซม์แคสเพส-8 และเอนไซม์แคสเพส-8 จะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการทำงานของเอนไซม์แคสเพส-3 แคสเพส-6 และแคสเพส-7 โดยเอนไซม์แคสเพสเหล่านี้จะไปย่อยยับสเตรทที่เป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์เช่นเดียวกันกับวิถีไมโทคอนเดรีย และส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสในที่สุด (รูปที่ 2.14)



รูปที่ 2.14 วิธีการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส

ที่มา: Gewies 2003

การตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสเป็นกลไกที่ค่อนข้างซับซ้อนและต้องใช้โปรตีนในการควบคุมวิธีการตายของเซลล์ชนิดนี้หลายตัวทำงานร่วมกันอย่างเป็นระบบ เพื่อป้องกันความผิดพลาดเนื่องจาก ถ้าหากการควบคุมการตายเซลล์แบบอะพอพโทซิสเกิดความผิดปกติจะนำไปสู่เหตุการณ์ที่เป็นอันตรายต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตได้ เช่น ถ้ามีการเกิดตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสที่สูงเกินไปจะทำให้เกิดการฝ่อของอวัยวะ เนื่องจากเกิดภาวะขาดเลือดเฉพาะที่ (Ischemic damage) ในขณะที่ถ้ามีการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสที่ไม่เพียงพอ ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วที่ไม่สามารถควบคุมได้จนเกิดเป็นเนื้องอก และอาจกลายเป็นมะเร็งได้ในที่สุด กลุ่มของโปรตีนที่ควบคุมการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสมีหลายชนิด มีทั้งกลุ่มที่เป็นตัวยับยั้งไม่ให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (Anti-apoptotic protein) เช่น Bcl-2 และ Bcl-xL และกลุ่มโปรตีนที่เป็นตัวส่งเสริมการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (Pro-apoptotic protein) เช่น Bid และ Bak เป็นต้น โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสเหล่านี้จะเกิดมาจากกระบวนการถอดรหัส (Transcription) และกระบวนการแปลรหัส (Translation) ของยีนในดีเอ็นเอ โดยการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสจะขึ้นอยู่กับสถานะของเซลล์ ถ้า

เซลล์อยู่ในสภาวะปกติจะมีการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีนยับยั้งไม่ให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสมากกว่ายีนที่สร้างโปรตีนตัวส่งเสริมให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส แต่หากเซลล์อยู่ในสภาวะเครียดหรือได้รับความเสียหายจะมีการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีนตัวส่งเสริมให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสมากกว่ายีนที่สร้างโปรตีนยับยั้งไม่ให้เกิดอะพอพโทซิส

2.7.2 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส

การตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส เป็นกระบวนการตายของเซลล์รูปแบบหนึ่งที่มีความซับซ้อนและถูกควบคุมด้วยโปรตีนหลายตัว ดังนั้น ยีนที่เกี่ยวข้องกับอะพอพโทซิสก็มีหลายชนิดเช่นเดียวกัน ตัวอย่างของยีนที่มีความสำคัญในการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส เช่น BCL2 apoptosis regulator (BCL2), Cathepsin S (CTSS) และ MAP kinase activating death domain (MADD) เป็นต้น

2.7.2.1 BCL2 apoptosis regulator (BCL2)

ในมนุษย์ ยีน BCL2 จะอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 18 เมื่อเกิดการแสดงของยีน (Gene expression) BCL2 จะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นโปรตีนที่แทรกอยู่เยื่อหุ้มเซลล์หรือออร์แกเนลล์บางชนิด (Integral membrane protein) ที่ชื่อว่า Bcl-2 โปรตีน Bcl-2 เป็นโปรตีนที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มของร่างแหเอนโดพลาซิม (Endoplasmic reticulum) เยื่อหุ้มนิวเคลียส (Nuclear membrane) และเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย (Outer mitochondrial membrane) มีรายงานว่าโปรตีน Bcl-2 จะทำหน้าที่ป้องกันเซลล์ของสิ่งมีชีวิตไม่ให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส โดยยับยั้งไม่ให้เกิดอะพอพโทโซมหรือป้องกันไม่ให้มีการรั่วไหลของไซโทโครม ซี และโปรตีน Smac จากไมโทคอนเดรีย นอกจากนี้ โปรตีน Bcl-2 ยังสามารถยับยั้งโปรตีนที่ส่งเสริมการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส เช่น โปรตีน Bid, Bak และ Bax โดยโปรตีน Bcl-2 จะกุดการทำงานของโปรตีนเหล่านี้ไว้ให้อยู่ในรูปที่ไม่สามารถทำงานได้ (Tsujimoto 1998) ยีน BCL2 จัดเป็นยีนที่เป็นตัวส่งเสริมให้เกิดมะเร็ง (Proto-oncogene) เนื่องจากเมื่อยีน BCL2 เกิดกลายพันธุ์และมีการแสดงออกที่มากกว่าปกติจะนำไปสู่การยับยั้งเซลล์ไม่ให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส ทำให้เซลล์นั้นเจริญและแบ่งตัวต่อไปเรื่อยๆ จนกลายเป็นเนื้องอก และเนื้องอกกลายเป็นมะเร็งในที่สุด

2.7.2.2 Cathepsin S (CTSS)

ในมนุษย์ ยีน CTSS จะอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 1 เมื่อเกิดการแสดงของยีนนี้ จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอนไซม์ซิสเทอีนโปรตีเอสในไลโซโซม (Lysosomal cysteine protease) ที่ชื่อว่า Cathepsin S Cathepsin S เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีนภายในเซลล์ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อไลโซโซมได้รับความเสียหายจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างเฉียบพลัน (Heat shock) หรือมีเอนไซม์แคสเพส-8 มาย่อยโปรตีนที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มของไลโซโซม ทำให้เยื่อหุ้มของไลโซโซมเกิดรูขึ้นและปลดปล่อยกลุ่มของเอนไซม์ซิสเทอีนโปรตีเอสออกมายังไซโทซอล ได้แก่ Cathepsin B, H, K, L และ S กลุ่มของเอนไซม์ซิสเทอีนโปรตีเอสเหล่านี้จะไปกระตุ้นโปรตีนที่เป็นตัวส่งให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส ได้แก่ โปรตีน Bid ทำให้โปรตีน Bid อยู่ในรูปที่ว่องไว เมื่อโปรตีน Bid อยู่ในรูปที่ว่องไวจะทำให้โปรตีนชนิดนี้ไปเกาะรูเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย ทำให้ไซโทโครม ซี ในไมโทคอนเดรียรั่วไหลออกมายังไซโทซอล ไซโทโครม ซี จะไปรวมตัวกับโปรตีน Apaf-1 เกิดเป็นอะพอพโทโซม อะพอพโทโซมจะไปกระตุ้นโปรแคสเพส-9 ให้อยู่ในรูปว่องไว และแคสเพส-9 จะไปกระตุ้น แคสเพส-3 แคสเพส-6 และ แคสเพส-7 ทำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสในที่สุด (Stoka et al. 2005)

2.7.2.3 MAP kinase activating death domain (MADD)

ในมนุษย์ ยีน MADD จะอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 11 เมื่อเกิดการแสดงของยีนนี้จะได้เป็นผลิตภัณฑ์เป็นโปรตีนตัวรับสัญญาณการตายที่ชื่อว่า Type 1 TNF-receptor (TNFR1) ที่รวมอยู่กับอะแดปเตอร์โปรตีน โดยเรียกกกลุ่มของโปรตีนนี้ว่า Death domain กลุ่มของโปรตีน Death domain จะเป็นตัวกระตุ้นเอนไซม์ Mitogen-activated protein kinase complex (MAPK) และนำไปสู่กระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส Mitogen-activated protein kinase complex (MAPK) เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับสารตั้งต้น โดยพบว่า MAPK จะเป็นตัวนำสัญญาณที่ได้รับจากเยื่อหุ้มเซลล์ไปสู่การตอบสนองของเซลล์ในรูปแบบต่างๆ เช่น การมีชีวิตของเซลล์ การแบ่งเซลล์ ปฏิกิริยาชีวเคมีภายในเซลล์ รวมถึงการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส MAPK จัดเป็นกลุ่มเอนไซม์ Serine/Threonine kinase ที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโมเลกุลของโปรตีนที่บริเวณกรดอะมิโนเซอรีน และทรีโอนีน จากนั้น โปรตีนที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตเหล่านั้นจะเป็นตัวกระตุ้นโปรตีนตัวอื่นๆ ต่อไปเพื่อให้เซลล์มีการตอบสนองในรูปแบบต่างๆ โดยการตอบสนองของเซลล์นั้นจะขึ้นอยู่กับสัญญาณที่ได้รับมาจากโปรตีนตัวรับสัญญาณที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ วิธีชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับ MAPK มีความซับซ้อนมาก แต่พบว่าเอนไซม์ในกลุ่มนี้ 3 ชนิดที่มีบทบาทในการควบคุมการตายของเซลล์แบบอะพอพโท-

ซิส ได้แก่ Extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK) และ p38-MAPK โดยพบว่า ERK มีบทบาทเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการสร้างโปรตีนที่เป็นตัวยับยั้งอะพอพโทซิส ในขณะที่ JNK และ p38-MAPK สามารถเป็นตัวกระตุ้นให้มีการสร้างทั้งโปรตีนที่เป็นตัวยับยั้งอะพอพโทซิส และโปรตีนที่เป็นตัวส่งเสริมอะพอพโทซิส โดยขึ้นอยู่กับสัญญาณที่ได้รับจากเยื่อหุ้มเซลล์ (Wada and Penninger 2004)

2.8 สาหร่ายพวงองุ่น

สาหร่ายพวงองุ่น (Sea grapes) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Caulerpa lentillifera* จัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในกลุ่มยูคาริโอต สาหร่ายพวงองุ่นเป็นสาหร่ายทะเลสีเขียวที่มีขนาดใหญ่ และมีลักษณะทั่วไปคือ มีลักษณะเป็นเม็ดทรงกลม มีสีเขียวที่มีความใส มีแขนงของลำต้นตั้งตรงลักษณะคล้ายกับพวงองุ่น (รูปที่ 2.15)



รูปที่ 2.15 ลักษณะทั่วไปของสาหร่ายพวงองุ่น

ที่มา: Belton et al. 2015

สาหร่ายพวงองุ่นสามารถจัดจำแนกได้ดังนี้ (Dawes 1998)

อาณาจักร (Kingdom): Plantae

ดิวิชัน (Division): Chlorophyta

คลาส (Class): Ulvophyceae

อันดับ (Order): Bryopsidales

วงศ์ (Family): Caulerpaceae

จีนัส (Genus): *Caulerpa*

สปีชีส์ (Species): *lentillifera*

สาหร่ายพวงองุ่นชอบเจริญอยู่บนโขดหิน ก้อนกรวด และพื้นทราย รวมถึงในเขตที่มีน้ำขึ้นน้ำลงไปจนถึงเขตน้ำล้นต่ำสุดบริเวณชายฝั่งที่มีคลื่นไม่รุนแรง อาจอยู่รวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนหรือปะปนอยู่กับสาหร่ายชนิดอื่นๆ ตามซอกหินหรือปะการัง ปัจจุบัน สามารถพบสาหร่ายพวงองุ่นได้ในธรรมชาติในเขตประเทศอินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ ไทย เวียดนาม และญี่ปุ่น นอกจากนี้ ยังพบสาหร่ายพวงองุ่นในประเทศเขตร้อน เช่น เคนยา มาดากัสการ์ โมซัมบิก แทนซาเนียและปาปัวนิวกินี เป็นต้น (Zemke and Ohno 1999)

สาหร่ายพวงองุ่นจัดเป็นสาหร่ายทะเลที่ได้รับความนิยมจากผู้บริโภค เนื่องจากเป็นสาหร่ายที่มีรสชาติดี มีคุณค่าทางโภชนาการ อุดมไปด้วยสารอาหารแร่ธาตุและวิตามินหลายชนิด เช่น กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หลายตำแหน่ง วิตามินบี 2 วิตามินอี โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต เป็นต้น จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสาหร่ายพวงองุ่น พบว่า สาหร่ายพวงองุ่นมีคาร์โบไฮเดรต 64 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณโปรตีน 9.26 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณลิวซีน 1.57 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณใยอาหาร 2.97 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณเถ้า 22.20 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้ง (Nguyen et al. 2011) ทำให้สาหร่ายพวงองุ่นจัดเป็นแหล่งอาหารที่มีแคลอรีต่ำ มีโซเดียมต่ำ มีใยอาหารสูง ช่วยกระตุ้นระบบขับถ่ายได้ดี และใช้เป็นอาหารสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน โรคหัวใจ และโรคความดันโลหิตสูง

การศึกษาด้านออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายพวงองุ่นส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษาสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต มีรายงานว่าซัลเฟตเทตไซโลกาแลกแทน (Sulfated xylogalactan) ที่ได้จากสาหร่ายพวงองุ่นมีฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยกระตุ้นการทำงานของเซลล์แมคโครฟาจ (Maeda et al. 2012) และเบต้า-1,3-ไซโลโอลิโกซัคคาไรด์ (β -1,3-xylooligosaccharide) ที่ได้จากสาหร่ายพวงองุ่นมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 โดยชักนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอพโทซิส (Maeda et al. 2012) นอกจากนี้ ยังพบว่าสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดที่ได้จากสาหร่ายพวงองุ่นมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ เช่น สารสกัดเอทานอลที่ได้จากสาหร่ายพวงองุ่นมีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อน (Sharma and Rhyu 2014) เป็นต้น

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Guo et al. (2009) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเพปไทด์ที่ได้จากนมผึ้ง โดยทำการศึกษาเพปไทด์ 12 สายที่มีกรดอะมิโน 2-4 ตัวภายในโมเลกุลของเพปไทด์ คือ Ala-Leu, Phe-Lys, Phe-Arg, Ile-Arg, Lys-Phe, Lys-Leu, Lys-Tyr, Arg-Tyr, Tyr-Asp, Tyr-Tyr, Leu-Asp-Arg และ Lys-Asn-Tyr-Pro จากผลการทดลองพบว่าเพปไทด์ทั้ง 12 เส้นมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลและไฮโดรเจนเพอรอกไซด์อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ทว่าเพปไทด์เหล่านี้มีความสามารถในการดักจับโลหะและมีความสามารถขจัดอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ได้ต่ำ

Sheih et al. (2009) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเพปไทด์ที่ได้จากสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* โดยนำโปรตีนที่สกัดจาก *C. vulgaris* มาย่อยสลายด้วยเอนไซม์เพปซิน และนำโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ผลการทดลองพบว่า เพปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโน VECYGNRPQF มีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ อนุมูลอิสระเพอรอกซิล อนุมูลอิสระ DPPH อนุมูลอิสระ ABTS และพบว่าเพปไทด์ชนิดนี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูงกว่า BHT และโทรลอคซ์ นอกจากนี้ เมื่อทำการทดสอบความพิษของเพปไทด์ต่อเซลล์ไฟโบบลาสต์ของปอด (Human diploid fibroblast cell) ชนิด Wi-38 พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับต่ำ แสดงให้เห็นว่าเพปไทด์ที่ได้จาก *C. vulgaris* เป็นเพปไทด์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดอนุมูลอิสระ และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติในระดับต่ำ

Alemán et al. (2011) ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเพปไทด์ที่ได้จากปลาหมึกยักษ์ โดยนำเจลาตินจากปลาหมึกยักษ์ (*Dosidicus gigas*) มาย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตีเอสจำนวน 7 ชนิด คือ โปรตามิกซ์ (Protamex) ทริปซิน นิวเทรส ซาวิเนส NS37005 แอสเพอเรส และอัลคาเลส จากผลการทดลองพบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยสลายด้วยอัลคาเลสมีฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นสารลดความดันโลหิต (Antihypertensive agent) ในขณะที่โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์แอสเพอเรสมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 โดยมีค่า IC_{50} 0.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเซลล์มะเร็งสมองชนิด U87 โดยมีค่า IC_{50} 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยทดสอบความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลเซตในการแย่งจับกับเฟอร์ริกไอออน พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์แอสเพอเรสและอัลคาเลสมีความสามารถในการแย่งจับกับไอออนของโลหะ (Metal chelating capacity) ที่สูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์

Zhao et al. (2011) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากเข่าอ่อนของกวางแดง *Cervus elaphus* โดยทำการย่อยโปรตีนในเข่าอ่อนของกวางแดงด้วยเอนไซม์ผสมของเพปซินและแพนครีเอติน และนำโปรตีนไฮโดรไลเซตดังกล่าวไปทดสอบกับอนุมูลอิสระ DPPH และอนุมูลอิสระ ABTS นอกจากนี้ ยังทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากเข่าอ่อนของกวางแดงด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) และ Fe^{2+} -chelating assays ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากเข่าอ่อนของกวางแดงพบว่าสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 41.7 ± 3.7 เปอร์เซ็นต์ และสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้สูงถึง 54.0 ± 1.6 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากเข่าอ่อนของกวางแดงมีกำลังในการรีดิวซ์เฟอริก (Ferric reducing power) 10.9 ± 0.2 เปอร์เซ็นต์ และมีความสามารถในการดักจับเฟอริกไอออนที่สูงถึง 85.8 ± 0.2 เปอร์เซ็นต์

Chen et al. (2012) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเปปไทด์จากไข่ขาวของเป็ด โดยทำการย่อยสลายโปรตีนจากไข่ขาวของเป็ดด้วยเอนไซม์โปรตีเอสจำนวน 5 ชนิด คือ ปาเปน ทริปซิน ไคโมทริปซิน อัลคาเลส และ ฟลาโวไซม์ จากการทดลองพบว่าเอนไซม์ปาเปนมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีนในไข่ขาวได้ดีที่สุด เมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเซตของไข่ขาวมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับสาร DPPH พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซตของไข่ขาวที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนไข่ขาวด้วยเอนไซม์ปาเปนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก (Linoleic acid) ได้สูงถึง 70 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้มาจากโปรตีนไข่ขาว ยังมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์และอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลได้ด้วย

Umayaparvathi et al. (2014) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งของเปปไทด์จากหอยนางรม โดยทำการย่อยสลายโปรตีนจากหอยนางรม (*Saccostrea cucullate*) และนำโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซตจากหอยนางรมมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สูงถึง 85.7 ± 0.37 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ พบว่า เปปไทด์จากหอยนางรมมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 โดยเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอโทซิส

Cai et al. (2015) ศึกษาฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระของเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยโปรตีนจากปลาฉลาม (*Ctenopharyngodon idella*) ด้วยเอนไซม์อัลคาเลส พบว่าได้เปปไทด์ 3 สาย คือ Pro-Try-Ser-Phe-Lys, Gly-Phe-Gly-Pro-Glu-Leu และ Val-Gly-Gly-Arg-Pro ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 640.74, 618.89 และ 484.56 ดาลตัน ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบกับอนุมูลอิสระ DPPH แล้ว

พบว่าเปปไทด์ทั้ง 3 สายนี้มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยมีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ที่ร้อยละ 50 เท่ากับ 2.459, 3.634 และ 6.063 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และเมื่อทำการทดสอบกับอนุมูลอิสระ ABTS แล้ว พบว่าเปปไทด์ทั้ง 3 สายนี้มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยมีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ที่ร้อยละ 50 เท่ากับ 0.281, 0.530 และ 0.960 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

Chi et al. (2015) ศึกษาฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งของเปปไทด์ 2 สาย ที่ได้จากโปรตีนไฮโดรไลเสตของหอยแครง (*Tegillarca granosa*) คือ Trp-Pro-Pro (BCP-A) และ Gln-Pro (BCP-B) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 398.44 และ 243.23 ดาลตัน ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบกับอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS แล้ว พบว่า Trp-Pro-Pro มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญ โดยมี IC_{50} เท่ากับ 1.388 และ 2.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ เมื่อทดสอบความเป็นพิษ (Cytotoxicity) กับเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-3 เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด DU-145 เซลล์มะเร็งปอดชนิด H-1299 และ เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa พบว่า Trp-Pro-Pro มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสัญญาณวิทยาของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC-3 อย่างมีนัยสำคัญ และทำให้เปอร์เซ็นต์การตายแบบอะพอโทซิสของเซลล์มะเร็งชนิดนี้สูงขึ้นจาก 11.22 เปอร์เซ็นต์ เป็น 22.78 เปอร์เซ็นต์

Mao et al. (2016) ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งของเปปไทด์จากสาหร่ายสีเขียว *Pyropia haitanensis* โดยทำการย่อยสลายโปรตีนในสาหร่ายสีเขียวด้วยเอนไซม์โปรตีเอส 2 ชนิด คือ เอนไซม์เพปซินและเอนไซม์ปาเปน จากนั้น นำโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคอัลตราฟิลเตรชัน (Ultrafiltration) และเจลฟิลเตรชันโครมาโทกราฟี นำเปปไทด์ที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 เซลล์มะเร็งตับชนิด Hep-G2 เซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารชนิด SGC-7901 และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 ผลการทดลองพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปาเปนมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม เซลล์มะเร็งตับ และเซลล์มะเร็งปอด โดยมีค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 50.09-272.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์โดยใช้เทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry แล้วนำลำดับกรดอะมิโนไปสังเคราะห์เปปไทด์ทางเคมี และนำมาทดสอบกับเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ อีกครั้ง พบว่า เปปไทด์สังเคราะห์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับได้สูงถึง 61.36 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เปปไทด์สังเคราะห์มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติเพียง 22.81 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Saisavoey et al. (2016) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการอักเสบของเซลล์ของเพปไทด์จากรำข้าว โดยทำการย่อยสลายโปรตีนจากรำข้าวที่ปราศจากไขมันโดยใช้เอนไซม์โปรตีเอสชนิดต่างๆ ดังนี้ เอนไซม์อัลคาเลส เอนไซม์ฟลาโวไซม์ เอนไซม์นิวเทรส เอนไซม์ปาเปน และเอนไซม์เพปซิน-แพนกรีเอติน จากนั้น นำโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระโดยใช้อนุมูลอิสระ 3 ชนิด คือ DPPH, ABTS และไนตริกออกไซด์ (NO) จากผลการทดลองพบว่าไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนด้วยเพปซิน-แพนกรีเอตินมีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดอนุมูลอิสระทั้ง 3 ชนิดได้ดี และเมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์เพปซิน-แพนกรีเอตินไปผ่านการทำให้บริสุทธิ์ นำโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระอีกครั้ง พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีขนาดโมเลกุลน้อยกว่า 3 กิโลดาลตัน มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH, ABTS และไนตริกออกไซด์ นอกจากนี้ ยังพบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซตที่บริสุทธิ์เหล่านี้มีฤทธิ์ต้านการอักเสบของเซลล์อีกด้วย

Wang and Zhang (2016) ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง โปรตีนไฮโดรไลเซตจากสาหร่ายเกลียวทอง (*Arthrospira platensis*) ด้วยทริปซิน อัลคาเลส และปาเปน จากนั้น นำโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG-2 เซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารชนิด SGC-7901 และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตเหล่านี้มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิด โดยมีค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 31.25 ถึง 336.57 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Tipsomut et al. (2018) ศึกษาฤทธิ์ของพอลิเพปไทด์ที่ชื่อว่า Melittin ที่แยกได้มาจากพิษของผึ้ง (*Apis mellifera* venom) ต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 พบว่า Melittin มีค่า IC_{50} ต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 เพียง 0.79 ± 0.02 ไมโครโมลาร์ นอกจากนี้ ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอพโทซิส ได้แก่ ยีน BCL2 และ ยีน MADD พบว่าเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 ที่ได้รับ Melittin จะทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส และทำให้เซลล์มะเร็งปอดชนิดนี้หยุดวัฏจักรของการแบ่งเซลล์ไว้ที่ระยะอินเตอร์เฟสในช่วง G_1 นอกจากนี้ ยังพบว่าเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 ที่ได้รับ Melittin จะมีการแสดงออกของยีน BCL2 ในระดับที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่การแสดงออกของยีน MADD มีแนวโน้มที่ลดลง เมื่อเทียบกับเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 ที่ไม่ได้รับ Melittin

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 สาหร่ายที่ใช้ในการทดลอง

สาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa lentilifera*) ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี ประเทศไทย

3.2 อุปกรณ์

- 3.2.1 กระบอกตวง (Cylinder) (Kartell, Italy)
- 3.2.2 กระดาษกรองเซลลูโลสอะซีเตท (Cellulose acetate filter paper) (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 3.2.3 กระดาษกรองพอลิเตตระฟลูออโรเอทิลีน (PTFE paper filter) (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.2.4 กระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 (Whatman no.1) (Whatman plc company, UK)
- 3.2.5 กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบหัวกลับ (Invert microscope) (MXD-400, Bwoptics, China)
- 3.2.6 เครื่องแก้วต่างๆ (Glasswares)
- 3.2.7 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) (Marshall scientific, Innova 4330, USA)
- 3.2.8 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแยกสารภายใต้ความดัน (High performance liquid chromatograph, HPLC) (Spectra System, Thermo Scientific, USA)
- 3.2.9 เครื่องชั่งสาร (Analytical balance) (Mettler Toledo, ME104TE/00, Switzerland)
- 3.2.10 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) (Hirayama, HVE-50, Japan)
- 3.2.11 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermocycler) (T100 Thermo cycler, BIO-RAD, USA)
- 3.2.12 เครื่องปฏิกิริยาพีซีอาร์แบบเรียลไทม์ (Real-time PCR Cycler) (MyGo Pro, IT-IS International Ltd, UK)
- 3.2.13 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) (Labnet, Spectrafuge 16M, USA)

- 3.2.14 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วรอบต่ำ (Spin down centrifuge) (Labnet, Spectrafuge 16M, USA)
- 3.2.15 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) (Kubota 3700, Japan)
- 3.2.16 เครื่องปั่นเอนกประสงค์ (Blender) (Phillips, Problend 6, The Netherlands)
- 3.2.17 เครื่องผสมสาร (Vortex) (Genie-2, Scientific Industries, USA)
- 3.2.18 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter) (Mettler Toledo, FP20-bio, Switzerland)
- 3.2.19 เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (Nanodrop ND-1000 spectrophotometer) (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 3.2.20 เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลต (Microplate reader) (Thermo Scientific, Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, USA)
- 3.2.21 เครื่องโฮโมจีไนเซอร์ (Homogenizer) (IKA, Turrax t25, Germany)
- 3.2.22 ชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป (RNA extraction kit) (PureLink™ RNA Mini kit Invitrogen, USA)
- 3.2.23 ชุดเปลี่ยนดีเอ็นเอคู่สมสำเร็จรูป (Reverse transcription kit, PrimerDesign, UK)
- 3.2.24 ชุดอุปกรณ์ถ่ายภาพอะกาโรสเจล (Gel documentation) (Syngene, MD1 1019, Japan)
- 3.2.25 ชุดอุปกรณ์แยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (Electrophoresis equipment) (Advance Mupid®-exu, Japan)
- 3.2.26 ตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide (CO₂) incubator) (Thermo Scientific, Forma Steri-Cult, USA)
- 3.2.27 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow cabinet) (ESCO, SCV4A1, Singapore)
- 3.2.28 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Delta Laboratory, 1375FX, Thailand)
- 3.2.29 ฟลาสก์เลี้ยงเซลล์ขนาด 25 มิลลิลิตร (Cell culture flask) (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 3.2.30 เมมเบรนคัดแยกสารตามขนาดโมเลกุล (Molecular weight cut off (MWCO) membrane) ขนาด 10, 5, 3 และ 0.65 กิโลดาลตัน (PALL, USA)

- 3.2.31 ไมโครไทเทอร์เพลท 96 หลุม (96-wells Microtiter plate) (ThermoFisher Scientific, Nunc Microwell F96, USA)
- 3.2.32 ไมโครปิเปต (Micropipette) (Transferpette® S pipettes, Sigma-Aldrich, USA)
- 3.2.33 หลอดพีซีอาร์ (PCR tube) (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 3.2.34 หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (Microcentrifuge tube) (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 3.2.35 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Waterbath) (Tokyo Rikakikai, EYELA bath SB-9, Japan)
- 3.2.36 ฮีโมไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer) (Boeco, Neubauer improved bright line, Germany)

3.3 เซลล์และอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์

3.3.1 เซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ

เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด BT474 (Human breast ductal carcinoma, ATCC no. HTB 20) เซลล์มะเร็งตับชนิด Hep-G2 (Human liver hepatoblastoma, ATCC no. HB8065) เซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO (Human undifferentiated lung carcinoma, ATCC no. HTB 168) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620 (Human colon adenocarcinoma, ATCC no. CCL227) เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารชนิด KATO-III (Human gastric carcinoma, ATCC no. HTB 103) และเซลล์ไฟโบรบลาสของเนื้อเยื่อปอดชนิด Wi-38 (Human diploid fibroblast cell, ATCC no. CCL75) ซึ่งมาจาก The American Type Culture Collection (ATCC) ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3.2 อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์

อาหารที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ คือ อาหารสูตร RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, USA) พีเอช 7.2 ที่ประกอบด้วย โซเดียมไบคาร์บอเนต (Sodium bicarbonate, NaHCO_3) 2 กรัมต่อลิตร โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, NaCl) 6 กรัมต่อลิตร และโซเดียมฟอสเฟตไดเบสิกแอนไฮดรัส (Sodium phosphate dibasic anhydrous, Na_2HPO_4) 0.8 กรัมต่อลิตร โดยมีการเติมซีรัมตัวอ่อนของลูกวัว (Fetal calf serum) 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)

3.4 สารเคมี

3.4.1 สารเคมีสำหรับการเตรียมเพปไทด์หรือโปรตีนไฮโดรไลเซต

- 3.4.1.1 โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, NaCl) (Ajax Finechem, New Zealand)
- 3.4.1.2 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Dipotassium hydrogen phosphate, K_2HPO_4) (Ajax Finechem, New Zealand)
- 3.4.1.3 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogen phosphate, KH_2PO_4) (Ajax Finechem, New Zealand)
- 3.4.1.4 เอนไซม์โปรตีเอส จี6 (Protease G6) (Brentag, Germany)
- 3.4.1.5 เอนไซม์โปรตีเอส จีเอ็น (Protease GN) (Brentag, Germany)
- 3.4.1.6 เอนไซม์ปาเปน (Papain) (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.4.1.7 เอนไซม์เพปซิน (Pepsin) (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.4.1.8 เอนไซม์แพนครีเอติน (Pancreatin) (Sigma-Aldrich, USA)

3.4.2 สารเคมีสำหรับการวัดปริมาณโปรตีน

- 3.4.2.1 กรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid, H_3PO_4) (Merck, Germany)
- 3.4.2.2 คูแมสซีบริเลียนบลู จี250 (Coomassie brilliant blue G250) (Affymetrix, USA)
- 3.4.2.3 โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin, BSA)
- 3.4.2.4 เอทานอล (Ethanol, C_2H_5OH) (Merck, Germany)

3.4.3 สารเคมีสำหรับวัดกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ

- 3.4.3.1 2,2-ไดฟีนิล-1-ไพคริลไฮดราซิล (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), $C_{18}H_{12}N_5O_6$) (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.4.3.2 โพแทสเซียมเพอร์ซัลเฟต (Potassium persulfate, $K_2S_2O_8$) (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.4.3.3 เมทานอล (Methanol, CH_3OH) (Merck, Germany)
- 3.4.3.4 กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid, $C_6H_8O_6$) (Sigma-Aldrich, USA)

- 3.4.3.5 2,2'-อะซิโน-บิส(3-เอทิลเบนโซไทอะโซลีน-6-ซัลโฟนิคแอซิด) (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS), $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$) (Sigma-Aldrich, USA)

3.4.4 สารเคมีสำหรับวัดกิจกรรมการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง

- 3.4.4.1 3-(4,5-ไดเมทิล-2-ไทอะโซลิล)-2,5-ไดฟีนิล-เตตระโซเลียมโบรไมด์ (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), $C_{18}H_{16}BrN_5S$) (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.4.4.2 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide (DMSO), C_2H_6OS) (Merck, Germany)
- 3.4.4.3 สารละลายทริปซิน-EDTA (Trypsin-EDTA) (Sigma-Aldrich, USA)

3.4.5 สารเคมีสำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนในวิธีการตายแบบอะพอโทซิส

- 3.4.5.1 โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, NaCl) (Ajax Finechem, New Zealand)
- 3.4.5.2 ไชกรีนมิกซ์ (2x qPCR BIO SyGreen Mix) (PCR Biosystem Ltd, UK)
- 3.4.5.3 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Dipotassium hydrogen phosphate, K_2HPO_4) (Ajax Finechem, New Zealand)
- 3.4.5.4 ด็อกโซรูบิซิน (Doxorubicin, $C_{27}H_{29}NO_{11}$) (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.4.5.5 2-เมอแคปโทเอทานอล (2-mercaptoethanol) (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.4.5.6 ไพร์เมอร์สำหรับปฏิกิริยาเรียลไทม์พีซีอาร์ (qPCR primer) (iScience Technology, Thailand)
- 3.4.5.7 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogen phosphate, KH_2PO_4) (Ajax Finechem, New Zealand)
- 3.4.5.8 เอทานอล (Ethanol) (Merck, Germany)
- 3.4.5.9 เอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide, $C_{21}H_{20}BrN_3$) (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.4.5.10 เอนไซม์ดีออกซีไรโบนิวคลีเอส 1 (Deoxyribonuclease I, DNase I) (Qiagen, Germany)

3.4.6 สารเคมีสำหรับการใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

- 3.4.6.1 กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (Trifluoroacetic acid (TFA), $C_2HF_3O_2$) (Merck, Germany)
- 3.4.6.2 เมทานอล (Methanol, CH_3OH) (Merck, Germany)
- 3.4.6.3 อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile, C_2H_3N) (Merck, Germany)

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การเตรียมเพปไทด์หรือโปรตีนไฮโดรไลเซท

นำตัวอย่างสาหร่ายพวงองุ่น 1.5 กิโลกรัมปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นอเนกประสงค์ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน (Phosphate buffer saline, PBS) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.2 (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 5 ลิตร ต่อมา นำสาหร่ายพวงองุ่นในบัฟเฟอร์มาทำการโฮโมจีไนซ์ด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างที่ผ่านการโฮโมจีไนซ์มาย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรตีเอสชนิดต่างๆ ได้แก่ เอนไซม์ปาเปน โปรตีเอส จี6 โปรตีเอส จีเอ็น และเอนไซม์เพปซิน-แพนครีเอตินในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์เท่ากับ 1, 2.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) โดยมีการควบคุมสภาวะต่างๆ ให้มีความเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด (ตารางที่ 3.1) เมื่อครบเวลาของปฏิกิริยาย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรตีเอส นำตัวอย่างไปหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใส (Supernatant) ที่มีเพปไทด์หรือโปรตีนไฮโดรไลเซทไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการย่อยโปรตีนในสาหร่ายพวงองุ่นด้วยเอนไซม์โปรตีเอส

สภาวะ	ชนิดของเอนไซม์โปรตีเอส			
	ปาเปน	โปรตีเอส จี6	โปรตีเอส จีเอ็น	เพปซิน-แพนครีเอติน
พีเอช	7.0	8.0	7.0	2.5-7.5
อุณหภูมิ (°C)	60	50	50	37
เวลา (ชั่วโมง)	6	4	4	6

3.5.2 การวัดปริมาณโปรตีน

การวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดในตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซทจะใช้วิธีการของ Bradford (Bradford 1976) โดยใช้ตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซทผสมกับสารละลายของ Bradford (ภาคผนวก ก) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 ปริมาตรสุทธิ 330 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 นาที จากนั้น นำตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผสมกับสารละลายของ Bradford ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Microplate reader spectrophotometer) โดยมีสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin, BSA) ความเข้มข้น 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

3.5.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.5.3.1 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

ตรวจสอบกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ 2,2-ไดฟีนิล-1-ไพคริลไฮดราซิล (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH) ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากสาหร่ายพวงองุ่น โดยดัดแปลงวิธีการของ Zhang et al. (2007) วิธีการคือผสมสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซทกับน้ำที่ระดับความเจือจางต่างๆ ได้แก่ 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0313, 0.0156 และ 0.0078 เท่าของความเข้มข้นของโปรตีนที่วัดได้กับสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ในเมทานอลความเข้มข้น 95.5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 4 ปริมาตรสุทธิ 350 ไมโครลิตร นำสารละลายผสมระหว่างโปรตีนไฮโดรไลเซทและ DPPH บ่มในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ คำนวณหาฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ (เปอร์เซ็นต์) และนำเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระไปคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนในไฮโดรไลเซทที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50 (Half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) โดยมีกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (Positive control) ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (เปอร์เซ็นต์) สามารถคำนวณได้ตามสูตร ดังนี้

$$\text{ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (เปอร์เซ็นต์)} = [1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

โดยที่ A sample เป็นค่าการดูดกลืนแสงของเพปไทด์ที่เติมสารละลาย DPPH

A blank เป็นค่าการดูดกลืนแสงของเพปไทด์ที่ไม่เติมสารละลาย DPPH

A control เป็นค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่ได้เติมเพปไทด์

3.5.3.2 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS

ตรวจสอบกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ 2,2'-อะซิโน-บิส (3-เอทิลเบนโซไทโอะซีน-6-ซัลโฟนิค-6-ซัลโฟนิคแอซิด (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid, ABTS) ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากสาหร่ายพวงองุ่น โดยดัดแปลงวิธีการของ Cai et al. (2004) โดยการเตรียมอนุมูลอิสระ ABTS จากสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ผสมกับโพแทสเซียมเพอร์ซัลเฟต (Potassium persulfate) ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ปริมาตรสุทธิ 50 มิลลิลิตร บ่มไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้น นำสารละลายอนุมูลอิสระ ABTS มาผสมกับโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ระดับความเจือจางต่างๆ ได้แก่ 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0313, 0.0156 และ 0.0078 เท่าของความเข้มข้นของโปรตีนที่วัดได้ โดยใช้สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซทปริมาตร 10 ไมโครลิตรผสมกับอนุมูลอิสระ ABTS ที่เตรียมได้ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำตัวอย่างเพปไทด์ที่ผสมกับอนุมูลอิสระ ABTS ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ หลังจากนั้น ทำการคำนวณหาฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ ABTS (เปอร์เซ็นต์) และนำเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระไปคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนในไฮโดรไลเซทที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีกรดแอสคอร์บิกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS (เปอร์เซ็นต์) สามารถคำนวณได้ตามสูตร ดังนี้

$$\text{ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS (เปอร์เซ็นต์)} = [1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

โดยที่ A sample เป็นค่าการดูดกลืนแสงของเพปไทด์ที่เติมสารละลาย ABTS

A blank เป็นค่าการดูดกลืนแสงของเพปไทด์ที่ไม่เติมสารละลาย ABTS

A control เป็นค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS ที่ไม่ได้เติมเพปไทด์

3.5.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง

3.5.4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

ศึกษาผลของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากสาหร่ายพวงองุ่นต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด BT474 เซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO เซลล์มะเร็งตับชนิด Hep-G2 เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620 และเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารชนิด KATO-III โดยทำการศึกษาด้วย MTT assay การทดลองเริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ และเซลล์ปกติไฟโบรบลาสต์ที่เนื้อเยื่อปอดชนิด Wi-38 ลงในพลาสติกเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 มิลลิลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่ผสมซีรัมตัวอ่อนของลูกวัว (Fetal calf serum) 5 เปอร์เซ็นต์

(ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตรสุทธิ 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จะได้เซลล์ประมาณ 2 ถึง 4 ล้านเซลล์ต่อขวด เซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง 72 ชั่วโมง จะถูกนำมาทำให้หลุดออกจากพลาสติกเลี้ยงเซลล์โดยการเติมเอนไซม์ทริปซินความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) ที่มี EDTA ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไป ในพลาสติกเลี้ยงเซลล์ บ่มไว้ในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้เซลล์หลุดตัว เมื่อครบ 2 นาที ทำการดูดเอนไซม์ทริปซินทิ้งแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปใหม่อีกครั้งปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วเคาะให้เซลล์หลุด จากนั้นทำการนับเซลล์ด้วยฮีโมไซโทมิเตอร์ (Hemocytometer) และเจือจางให้เซลล์มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 2.5×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เซลล์เริ่มต้นที่เตรียมไว้จะถูกนำไปใส่ในไมโครไทเทอร์เพลท 96 หลุม หลุมละ 200 ไมโครลิตร (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 5×10^3 เซลล์ต่อหลุม) และนำไปบ่มไว้ในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.5.4.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วย MTT assay

ทำการเตรียมตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซทจากสาหร่ายพวงองุ่นที่มีความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นในไฮโดรไลเซทเท่ากับ 19.72 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการเจือจางตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซทนี้แบบอนุกรม (Serial dilution) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ให้ได้ทั้งหมด 9 ระดับความเจือจาง ได้แก่ โปรตีนไฮโดรไลเซทจากสาหร่ายพวงองุ่นที่ถูกเจือจาง 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 และ 512 เท่า เตรียมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) (Normal saline) เมื่อเซลล์ในไมโครไทเทอร์เพลท 96 หลุม จากหัวข้อ 3.5.4.1 บ่มจนครบเวลาที่กำหนด ทำการเติมตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซทจากสาหร่ายพวงองุ่นที่เตรียมไว้ทั้งหมด 9 ระดับความเจือจาง ปริมาตร 2 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นนำไปบ่มไว้ในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบ 72 ชั่วโมงให้เติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยหลุมที่เป็นตัวควบคุมเชิงลบ (Negative control) ไม่ต้องเติมสารละลาย MTT แล้วนำเพลทไปบ่มต่อในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบ 4 ชั่วโมงทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วเติม DMSO ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม เติมไกลซีนที่มีความเข้มข้น 0.1

โมลาร์ พีเอช 10.4 ปริมาตร 25 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วนำไมโครไทเทอร์เพลท 96 หลุมนี้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการแบ่งของเซลล์มะเร็งสามารถคำนวณได้จากสมการ ดังนี้

$$\text{ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (เปอร์เซ็นต์)} = ((A \text{ control} - A \text{ sample}) / A \text{ control}) \times 100$$

โดยที่ A sample เป็นค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่สารทดสอบ

A control เป็นค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ไม่ได้ใส่สารทดสอบ

เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง ให้นำเปอร์เซ็นต์มาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของโปรตีนในไฮโดรไลเซทที่ระดับความเจือจางต่างๆ เพื่อนำไปหาความเข้มข้นของโปรตีนในไฮโดรไลเซทที่ทำให้เซลล์มะเร็งมีจำนวนลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ในครั้งนี้จะใช้โปรแกรมสำเร็จรูป GraphPad Prism Version 6.01 ในการคำนวณหาค่า IC_{50}

3.5.5 การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส

3.5.5.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์สำหรับการสกัดอาร์เอ็นเอ

การทดลองเริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งในพลาสติกเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 มิลลิลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่มีการผสมซีรัมตัวอ่อนของลูกวัว (Fetal calf serum) 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตรสุทธิ 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง 72 ชั่วโมง จะถูกนำมาทำให้หลุดออกจากพลาสติกเลี้ยงเซลล์โดยการเติมเอนไซม์ทริปซินความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) ที่มี EDTA ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในพลาสติกเลี้ยงเซลล์ บ่มไว้ในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้เซลล์หลุดตัว เมื่อครบ 2 นาที ทำการดูดเอนไซม์ทริปซินทิ้งแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปใหม่อีกครั้งปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วเคาะให้เซลล์หลุด จากนั้นทำการนับเซลล์ด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer) และเจือจางให้เซลล์มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สารละลายเซลล์ที่มีความเข้มข้นของเซลล์ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จะถูกนำไปใส่ในพลาสติกเลี้ยงเซลล์ขวดใหม่ ทั้งหมด 3 ขวด (แต่ละขวดมีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) สารละลายเซลล์ขวดที่ 1 เติมโปรตีนไฮโดรไลเซทจากสาหร่ายพวงองุ่น โดยให้มีความเข้มข้นของโปรตีนในไฮโดรไลเซทที่ระดับ IC_{50} ต่อเซลล์ชนิดนั้น สารละลายเซลล์ขวดที่ 2 เติมยามาตรฐานที่ใช้รักษาโรคมะเร็ง Doxorubicin โดยให้มีความเข้มข้นของยาที่ระดับ IC_{50} ต่อเซลล์ชนิด

นั้น และสารละลายเซลล์ขวดที่ 3 ไม่มีการเติมสารใดๆ (กลุ่มควบคุม) จากนั้นนำสารละลายเซลล์ทั้ง 3 ขวด ไปปั่นไว้ในตู้ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อปั่นจนครบเวลาทำการเก็บเกี่ยวเซลล์เพื่อนำใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอต่อไป

3.5.5.2 การสกัดอาร์เอ็นเอ

การสกัดอาร์เอ็นเอจะใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป PureLink™ RNA Mini kit (Invitrogen, USA) โดยในชุดสกัดอาร์เอ็นเอจะประกอบด้วยน้ำยา 4 ชนิด ได้แก่ Lysis buffer, Wash buffer I, Wash Buffer II และ RNase free water นอกจากนี้ ในชุดสกัดจะมีหลอดที่มีคอลัมน์สำหรับรองรับอาร์เอ็นเอในขั้นตอนการทำอาร์เอ็นเอให้บริสุทธิ์ Collection tube และหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เซลล์จะถูกเก็บอยู่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วเติมน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ RNase ลงไป 500 ไมโครลิตร เพื่อเป็นการล้างอาหารเก่าออกจากเซลล์ที่เก็บเกี่ยวมาได้ (ล้างเซลล์ 2 รอบ) เมื่อทำการล้างเซลล์ครบ 2 รอบแล้ว ให้ทิ้งส่วนใสให้เหลือแค่ตะกอนของเซลล์ไว้เท่านั้น จากนั้นทำการเติมสาร A ที่ประกอบด้วย 2-เมอแคปโทเอทานอล และ Lysis buffer ในอัตราส่วน 10 ต่อ 1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตรลงไปในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีตะกอนของเซลล์อยู่ ทำให้สาร A กับเซลล์ผสมกันด้วยเครื่องผสมสาร (Vortex mixer) เพื่อเป็นการเร่งให้เซลล์แตก แล้วนำหลอดหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ดังกล่าวไปปั่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (ทุกๆ 10 นาทีนำหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ออกมาเร่งการแตกเซลล์ด้วยเครื่องผสมสาร) เมื่อครบ 30 นาที นำหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที แล้วดูดส่วนใสปริมาตร 700 ไมโครลิตร ใสในหลอดใหม่ จากนั้นทำการเติมเอทานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงไปในหลอดดังกล่าว ทำให้มีสารละลายอาร์เอ็นเอปริมาตรสุทธิเป็น 1400 ไมโครลิตร ขั้นตอนต่อมาคือการทำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ให้บริสุทธิ์ โดยการดูดสารละลายอาร์เอ็นเอปริมาตร 700 ไมโครลิตรไปใสในหลอดที่มีคอลัมน์รองรับอาร์เอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 20 วินาที และทิ้งส่วนใส (ทำ 2 รอบเนื่องจากสารละลายอาร์เอ็นเอที่ได้มีปริมาตรสุทธิเป็น 1400 ไมโครลิตร) จากขั้นตอนต่างๆ ดังกล่าวจะทำให้อาร์เอ็นเอติดอยู่กับคอลัมน์เรียบร้อยแล้ว ขั้นตอนมาอาร์เอ็นเอที่ติดอยู่กับคอลัมน์จะถูกล้างด้วย Wash buffer I ปริมาตร 350 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 วินาที และนำส่วนใสทิ้งไป การกำจัดดีเอ็นเอปนเปื้อนใช้เอนไซม์ดีออกซีไรโบนิวคลี-

เอส I (DNase I) (Qiagen, Germany) โดยใช้ DNase I 10 ไมโครลิตร ผสมกับบัฟเฟอร์ 70 ไมโครลิตร ดังนั้น สารละลาย DNase I ปริมาตร 80 ไมโครลิตรจะถูกเติมลงไปหลอดที่มีคอลัมน์รองรับอาร์เอ็นเอที่มีอาร์เอ็นเอเกาะอยู่ แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำหลอดที่ตั้งกล่าวไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 วินาที และนำส่วนใสทิ้งไป จากนั้นเติม Wash buffer I ลงไปอีกครั้ง ปริมาตร 350 ไมโครลิตร และนำหลอดดังกล่าวไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 วินาที และทิ้งส่วนใส คอลัมน์ที่มีอาร์เอ็นเอจะถูกเปลี่ยนใสในหลอดใหม่ (Collection tube) จากนั้น ทำการเติม Wash buffer II ลงไป 500 ไมโครลิตร แล้วนำหลอดดังกล่าวไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 วินาที และทิ้งส่วนใส ทำการล้างคอลัมน์ด้วย Wash buffer II 2 รอบ เมื่อล้างคอลัมน์ด้วย Wash buffer II ครบสองรอบแล้ว ทำให้เมมเบรนในคอลัมน์แห้งด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นทำการย้ายคอลัมน์จากเดิมที่อยู่ใน Collection tube มายังหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมน้ำที่ปราศจาก RNase ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงไปตรงกลางคอลัมน์ และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อเป็นการชะอาร์เอ็นเอที่เกาะอยู่กับคอลัมน์ให้หลุดลงมายังหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (Nanodrop ND-1000 spectrophotometer) (Thermo Fisher Scientific, USA) โดยจะทำให้ทราบถึงความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอในหน่วยนาโนกรัมต่อไมโครลิตร ความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอจะดูจากค่าอัตราส่วน A_{260}/A_{230} และ ค่า A_{260}/A_{280} นอกจากนี้ คุณภาพของอาร์เอ็นเอจะถูกตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ตัวอย่างอาร์เอ็นเอ 3 ไมโครลิตรผสมกับสีย้อม 5X loading dye 0.8 ไมโครลิตร จากนั้นหยอดตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่ผสมกับสีย้อมลงในอะกาโรสเจล 1.2 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) ที่ละลายด้วยบัฟเฟอร์ Tris-acetate EDTA (TAE) โดยใช้ GeneRuler™ 1 kb plus DNA ladder เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน แล้วเปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้า ตั้งค่าแรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลา ทำการปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้า และนำแผ่นอะกาโรสเจลไปแช่ในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำแผ่นวิ่งไปวางบน UV Transilluminator ที่มีแผ่นพลาสติกใสรองรับ จะเห็นแถบของอาร์เอ็นเอเรืองแสง ทำการบันทึกภาพผลการทดลองที่ได้

3.5.5.3 การเปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้กลายเป็นดีเอ็นเอคู่สม

อาร์เอ็นเอที่ได้จากหัวข้อ 3.5.5.2 จะถูกนำไปเปลี่ยนเป็นดีเอ็นเอคู่สม (Complementary DNA, cDNA) ที่ใช้เอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) เป็นต้นแบบ ด้วยชุดเปลี่ยนสำเร็จรูป Reverse transcription kit (PrimerDesign, UK) ชุดสำเร็จรูปจะประกอบด้วยไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยารีเวิร์สทรานสคริปชัน (RT primer), น้ำที่ปราศจากเอนไซม์ DNase และ RNase (DNase/RNase free water), nanoScript2 4X Buffer, dNTP mix ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และ nanoScript2 reverse transcriptase การเปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็นดีเอ็นเอคู่สมมี 2 ขั้นตอนหลัก ดังนี้

3.5.5.3.1 Annealing step

ขั้นตอน Annealing step จะนำตัวอย่างอาร์เอ็นเอใส่ลงไปในหลอดพีซีอาร์ (PCR tube) ขนาด 0.2 มิลลิลิตร แล้วเติมสารต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 3.2 ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบของสารที่ใช้ในขั้นตอน Annealing step ใน 1 ปฏิกริยา

องค์ประกอบหรือสารที่ใช้	ปริมาตรสารที่ใช้ใน 1 ปฏิกริยา (ไมโครลิตร)
อาร์เอ็นเอแม่แบบ (1 ไมโครกรัม)	X_1
ไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยารีเวิร์สทรานสคริปชัน	1
น้ำที่ปราศจาก DNase และ RNase	X_2
ปริมาตรสุทธิ	10

ปริมาตรของ X_1 และ X_2 จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่วัดได้จากเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมในหัวข้อที่ 3.5.5.2

เมื่อทำการเติมสารทุกตัวลงในหลอดพีซีอาร์เรียบร้อยแล้ว นำหลอดพีซีอาร์ที่มีตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่รวมอยู่กับสารอื่นๆ ปริมาตรสุทธิ 10 ไมโครลิตร ไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermocycler) โดยใช้ฟังก์ชันการบ่ม (Incubation) เมื่อบ่มหลอดพีซีอาร์ที่ 65 องศาเซลเซียส ครบเวลา 5 นาทีให้นำหลอดพีซีอาร์มาแช่ในน้ำแข็ง 5 นาทีก่อนที่จะเข้าสู่ขั้นตอน Extension step ต่อไป

3.5.5.3.2 Extension step

หลอดพีซีอาร์ที่มีตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่รวมอยู่กับสารอื่นๆ ในตารางที่ 3.2 ปริมาตรสุทธิ 10 ไมโครลิตร จะถูกนำมาเติมสารชนิดต่างๆ เพิ่มเติมที่ได้แสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 องค์ประกอบของสารที่ใช้ในขั้นตอน Extension step ใน 1 ปฏิกริยา

องค์ประกอบหรือสารที่ใช้	ปริมาณสารที่ใช้ใน 1 ปฏิกริยา (ไมโครลิตร)
หลอดพีซีอาร์ที่มี RNA รวมกับสารในตารางที่ 3.2	10
บัฟเฟอร์ nanoScript2 4X	5
dNTP mix ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์	1
น้ำที่ปราศจาก DNase และ RNase	3
nanoScript2 reverse transcriptase	1
ปริมาตรสุทธิ	20

หลอดพีซีอาร์ที่เติมสารต่างๆ ตามตารางที่ 3.2 และ 3.3 จะมีปริมาตรสุทธิ 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำหลอดพีซีอาร์ดังกล่าวไปใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermocycler) โดยมีการกำหนดอุณหภูมิดังนี้ ช่วงแรกใช้อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ช่วงที่สองใช้อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำ cDNA ที่ได้จากปฏิกริยาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทำปฏิกริยาพีซีอาร์แบบเรียลไทม์ต่อไป

3.5.5.4 ไพรเมอร์และปฏิกริยาพีซีอาร์แบบเรียลไทม์

ยีนที่ใช้การศึกษาครั้งนี้มียีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสทั้งหมด 3 ยีน ได้แก่ BCL2 apoptosis regulator (BCL2) Cathepsin S (CTSS) และ MAP kinase activating death domain (MADD) โดยใช้ยีน β -actin (ACTB) เป็นยีนที่ถูกควบคุมให้มีการแสดงออกอย่างสม่ำเสมอในขณะที่เซลล์ยังมีชีวิตอยู่ (Housekeeping gene) ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่มีความเหมาะสมกับยีน BCL2, ACTB และ MADD ได้มาจากการศึกษาของ Buahorm et al. (2015) และลำดับเบสของไพรเมอร์ที่เหมาะสมกับยีน CTSS ได้มาจากการศึกษาของ Zhang et al. (2016) เพื่อใช้ในการทำปฏิกริยาพีซีอาร์แบบเรียลไทม์ ข้อมูลไพรเมอร์ของยีนทั้ง 4 ยีนแสดงในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 โพรเมอร์สำหรับใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แบบเรียลไทม์

ยีนเป้าหมาย	ลำดับเบสของโพรเมอร์ (5' → 3')	ความยาว (คู่เบส)	Tm (°C)	ขนาดผลิตภัณฑ์ (คู่เบส)
ACTB	CCGTTCCGAAAGTTGCCTTTT (FP)	21	61.2	170
	ATCATCCATGGTGAGCTGGC (RP)	20	59.5	
BCL2	GTGAACTGGGGGAGGATTGTG (FP)	21	60.2	194
	CAGCCCAGACTCACATCACCAA (RP)	22	62.0	
CTSS	CCTGGGAGACATGACCAGTGA (FP)	21	59.5	117
	GAATCAGGCAATATCCGATTAGGG (RP)	24	60.7	
MADD	TGCTGTGTGGCTTGGTTGGTTA (FP)	21	58.8	102
	GGGGAAGGCAGTTTGGTCTT (RP)	20	59.0	

FP คือ Forward primer และ RP คือ Reverse primer Tm หรือ Melting temperature หมายถึง อุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกออกจากกันกลายเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว 50 เปอร์เซ็นต์

ปฏิกิริยาพีซีอาร์แบบเรียลไทม์จะดำเนินการโดยใช้เครื่อง MyGo Pro Real-time PCR Cycler (IT-IS International Ltd, UK) โดยเริ่มต้นจากการเตรียมหลอดพีซีอาร์ที่ประกอบด้วย cDNA 1 ไมโครกรัม โพรเมอร์แต่ละตัว ความเข้มข้นสุดท้าย 400 นาโนโมลาร์ และ 2x qPCRBIO SyGreen Mix (PCR Biosystem Ltd, UK) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จะได้ปริมาตรสุทธิสุดท้ายในหลอดพีซีอาร์เป็น 20 ไมโครลิตร แล้วนำหลอดพีซีอาร์นี้ไปดำเนินการปฏิกิริยาพีซีอาร์แบบเรียลไทม์ในเครื่อง MyGo Pro Real-time PCR Cycler โดยควบคุมสภาวะต่างๆ ในการเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ตามที่แสดงในตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 สภาวะต่างๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์แบบเรียลไทม์

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	95	2 นาที	1
Denaturation	95	10 วินาที	40
Annealing	60	20 วินาที	40
Extension	72	30 วินาที	40

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาเครื่อง MyGo Pro Real-time PCR Cycler จะแปลผลออกมาในรูปแบบของค่า Cycle threshold (Ct) ของแต่ละยีน ค่า Ct ของยีนทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ BCL2, CTSS และ MADD จะถูกนำไปหักลบกับค่า Ct ของยีน ACTB จากนั้น นำค่า Ct ที่ได้ไปคำนวณหาระดับการแสดงออกของยีน (Relative gene expression) ดังสมการ

$$\text{ระดับการแสดงออกของยีน (Relative gene expression)} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

เมื่อ $\Delta\Delta Ct$ เป็นค่าที่สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของยีนเป้าหมายเมื่อเทียบกับยีนที่ถูกควบคุมให้มีการแสดงออกอย่างสม่ำเสมอในขณะที่เซลล์ยังมีชีวิตอยู่ (Housekeeping gene) ในที่นี้คือยีน ACTB โดยเมื่อระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายมีค่าเท่ากับ 1 หมายถึงไม่มีการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน ในขณะที่ถ้ามีระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายมีค่ามากกว่า 1 หมายความว่ายีนนั้นมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น (Up-regulation) และหากพบว่าระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายมีค่าน้อยกว่า 1 จะหมายความว่ายีนนั้นมีการแสดงออกลดลง (Down regulation)

3.5.6 การทำโปรตีนไฮโดรไลเซตให้บริสุทธิ์

3.5.6.1 เทคนิคอัลตราฟิลเตรชัน

นำโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนของสาหร่ายพวงองุ่นด้วย เอนไซม์โปรตีเอส มาทำให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นโดยใช้เทคนิคอัลตราฟิลเตรชัน โดยใช้เมมเบรนคัดแยกตามขนาดโมเลกุล (Molecular weight cut off (MWCO) membrane) ขนาดต่างๆ ได้แก่ เมมเบรนกรองคัดแยกสารที่มีขนาดมากกว่า 10 กิโลดาลตัน เมมเบรนคัดแยกสารที่มีขนาด 10 ถึง 5 กิโลดาลตัน เมมเบรนคัดแยกสารที่มีขนาด 5 ถึง 3 กิโลดาลตัน เมมเบรนคัดแยกสารที่มีขนาด 3 ถึง 0.65 กิโลดาลตัน และ เมมเบรนคัดแยกสารที่มีขนาดน้อยกว่า 0.65 กิโลดาลตัน ตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผ่านเทคนิคอัลตราฟิลเตรชัน เรียกว่า อัลตราฟิลเตรต (Ultrafiltrate) นำอัลตราฟิลเตรตไปใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง และการแสดงออกยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส

3.5.6.2 เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบรีเวิร์สเฟส

นำอัลตราฟิลเตรตจะทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบรีเวิร์สเฟส (Reverse phase High performance liquid chromatography, RP-HPLC) โดยใช้คอลัมน์ Luna C₁₈ (กว้าง 4.6 มิลลิเมตร x ยาว 250 มิลลิเมตร) อัลตราฟิลเตรตจะเข้าสู่คอลัมน์และถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยตัวทำละลาย A ที่ประกอบด้วยกรดไตรฟลูออ-

โรอะซีติก ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ตัวทำละลาย B ประกอบด้วยอะซีโตไนไตรล์ ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในกรตไทรฟลูออโรอะซีติกความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) โดยมีอัตราการไหลเป็น 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที นำของเหลวที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์มาตรวจสอบโปรตีนจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และแปลผลออกมาในรูปของอัลตราไวโอเลตโครมาโทแกรม (Ultraviolet chromatogram) อัลตราไวโอเลตโครมาโทแกรมสามารถดูได้จากระบบคอมพิวเตอร์จากโปรแกรม ChromQuest (Thermo Scientific, USA) ของเหลวที่รวบรวมได้จากขั้นตอน RP-HPLC นี้จะเรียกว่า Chromatographic fraction นำของเหลวนี้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และทำการระบุชนิดของเปปไทด์ด้วยการศึกษาลำดับกรดอะมิโนต่อไป

3.5.7 การศึกษาลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์

การศึกษาลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่ได้จากสาหร่ายพวงองุ่น จะใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลว-แมสสเปกโตรเมตรี (Liquid chromatography-Mass spectrometry, LC-MS) ประกอบด้วย Liquid chromatograph (Dionex Ultimate 3000, Thermo Scientific, USA) ที่รวมกับ Electrospray ionization (ESI)/quadrupole ion trap mass spectrometer (Model Amazon SL, Bruker, Germany) การแยกสารด้วยเทคนิค LC จะใช้คอลัมน์แบบรีเวิร์สเฟส Hypersil GOLD C₁₈ (ยาว 50 มิลลิเมตร x กว้าง 0.5 มิลลิเมตร) การแยกสารจะใช้สภาวะกราเดียน (Gradient) ของระบบตัวทำละลาย (Solvent system) ที่ประกอบด้วย ตัวทำละลาย A ที่ประกอบด้วยน้ำที่มีกรดฟอร์มิก 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) และตัวทำละลาย B ที่ประกอบด้วยอะซีโตไนไตรล์ 100 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) การดำเนินการเทคนิค LC-MS จะส่งไปดำเนินการที่ศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยมหิดล แล้วทำการวิเคราะห์แมสสเปกตรัม (Mass spectra) จากค่ามวลต่อประจุตั้งแต่ 300 ถึง 1500 m/z ด้วยฐานข้อมูล MASCOT เมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลจากฐานข้อมูล MASCOT เรียบร้อยแล้วให้นำข้อมูลดังกล่าวไปจัดเรียงลำดับของกรดอะมิโนต่อกันเป็นสายของเปปไทด์ (*De novo* peptide sequencing) จากนั้น ให้นำลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไปเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่อยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้ Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

3.5.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทได้ออกแบบเป็นการทดลองที่มีแผนแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design, RCBD) ในขณะที่การทดลองอื่นๆ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของอัลตราฟิลเทรตและ Chromatographic fraction และฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งของอัลตราฟิลเทรต ได้ออกแบบการทดลองเป็นแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design, CRD) การทดลองทุกชุดการทดลองจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ ผลการทดลองจะแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย (Mean) \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Standard error) การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยจะใช้วิธีการของ Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยใช้โปรแกรมทางสถิติสำเร็จรูป SPSS Statistics version 16.0 สำหรับ Windows (IBM, USA) และและการคำนวณค่า IC_{50} จะใช้โปรแกรม GraphPad Prism Version 6.01 สำหรับ Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, USA)

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตและอัลตราฟิลเทรตจากสาหร่าย พวงองุ่น

4.1.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากสาหร่ายพวงองุ่น

จากการนำสาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa lentilifera*) มาย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอสชนิดต่างๆ ได้แก่ เอนไซม์ปาเปน โปรตีเอส จี6 โปรตีเอส จีเอ็น และ เอนไซม์เพปซิน-แพนครีเอตินในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์เท่ากับ 0, 1, 2.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) จะได้โปรตีนไฮโดรไลเซตทั้งหมด 16 ตัวอย่าง คือ ปาเปนไฮโดรไลเซต 4 ตัวอย่าง โปรตีเอส จี6 ไฮโดรไลเซต 4 ตัวอย่าง โปรตีเอส จีเอ็น ไฮโดรไลเซต 4 ตัวอย่าง และ เพปซิน-แพนครีเอตินไฮโดรไลเซต 4 ตัวอย่าง โดยแต่ละตัวอย่างมาจากการใช้เอนไซม์แต่ละความเข้มข้น ตัวอย่างที่ได้ทั้งหมดจะถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH โดยแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตในรูปของความเข้มข้นของโปรตีนในไฮโดรไลเซตที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) จากการนำโปรตีนไฮโดรไลเซตทั้ง 16 ตัวอย่างมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับอนุมูลอิสระ ABTS พบว่าตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 1, 2.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ตารางที่ 4.1) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้มาจากการย่อยด้วยเอนไซม์เพปซินกับแพนครีเอติน ที่ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ 1, 2.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) มีค่าความเข้มข้นของโปรตีนในไฮโดรไลเซตที่สามารถยับยั้ง ABTS ให้ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) เป็น 9.36 ± 0.20 , 5.53 ± 0.18 และ 3.61 ± 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 ค่า IC_{50} ของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยโปรตีนของสาหร่ายพวงองุ่นด้วย เอนไซม์โปรตีเอสชนิดต่างๆ ต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS

ชนิดและความเข้มข้น ของเอนไซม์	ความเข้มข้นของโปรตีนในไฮโดรไลเซตที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ให้ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)			
	0 เปอร์เซ็นต์	1 เปอร์เซ็นต์	2.5 เปอร์เซ็นต์	5 เปอร์เซ็นต์
โปรตีเอส จี6	มากกว่า 200	44.43±0.36 ^h	25.88±0.05 ^f	20.65±0.10 ^e
โปรตีเอส จีเอ็น	มากกว่า 200	55.91±2.73 ^k	46.90±0.48 ⁱ	49.34±0.95 ^j
ปาเปน	มากกว่า 200	16.43±0.30 ^d	26.63±0.64 ^f	32.03±0.77 ^s
เพปซิน-แพนครีเอติน	มากกว่า 200	9.36±0.20 ^c	5.53±0.18 ^b	3.61±0.05 ^a

ข้อมูลในตารางที่ 4.1 แสดงอยู่ในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของการวัด (Standard error) ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) ของค่าเฉลี่ย IC_{50}

กรดแอสคอร์บิกหรือวิตามินซีเป็นตัวควบคุมเชิงบวก (Positive control) โดยมีค่า IC_{50} ของวิตามินซีต่ออนุมูลอิสระ ABTS เท่ากับ 138 ± 0.35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.1 พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยด้วย เอนไซม์ผสมระหว่างเพปซินกับแพนครีเอตินที่ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ 1, 2.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) มีค่าความเข้มข้นของโปรตีนในไฮโดรไลเซตที่สามารถยับยั้ง ABTS ให้ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) เป็น 9.36 ± 0.20 , 5.53 ± 0.18 และ 3.61 ± 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อนำค่า IC_{50} ของโปรตีนในไฮโดรไลเซตดังกล่าวไปเปรียบเทียบกับค่า IC_{50} ของวิตามินซีต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ซึ่งมีค่าเท่ากับ 138 ± 0.35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตจากสาหร่ายพวงองุ่นที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์เพปซิน-แพนครีเอติน มีประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS สูงกว่าวิตามินซี โดยมีค่าเฉลี่ย IC_{50} ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เพปซินกับแพนครีเอตินในการย่อยโปรตีนในสาหร่ายพวงองุ่น จะทำให้ได้โปรตีนไฮโดรไลเซตที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

จากรายงานของ Sheih et al. (2009) ที่ได้ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากสาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* ที่ได้มาจากการย่อยโปรตีนในสาหร่ายด้วยเอนไซม์เพปซินความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากสาหร่ายสีเขียว *C. vulgaris* มีค่าความเข้มข้นของโปรตีนในไฮโดรไลเซทที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ให้ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) เท่ากับ 93.4 ± 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองในครั้งนี้พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซทจากสาหร่ายพวงองุ่นที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์ปาเปน โปรตีเอส จี6 โปรตีเอส จีเอ็น และเอนไซม์ผสมระหว่างเพปซินกับเอนไซม์แพนครีเอติน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ที่ดีกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทจากสาหร่าย *C. vulgaris*

จากการทดลองของ Cian et al. (2012) ที่ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากสาหร่ายสีแดง *Porphyra columbina* ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินกับอัลคาเลสความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) ต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทจากสาหร่ายสีแดง *P. columbina* มีค่าความเข้มข้นของโปรตีนในไฮโดรไลเซทที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ให้ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) เท่ากับ 2.1×10^3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับค่า IC_{50} ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากสาหร่ายพวงองุ่นกับโปรตีนไฮโดรไลเซทจากสาหร่ายสีแดง *P. columbina* ต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทจากสาหร่ายพวงองุ่นมีประสิทธิภาพสูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทจากสาหร่ายสีแดง *P. columbina*

นอกจากนี้ Saisavoey et al. (2016) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากรำข้าวที่ไร้ไขมัน *Oryza sativa* โดยทำการย่อยโปรตีนในรำข้าวชนิดนี้ด้วยเอนไซม์เพปซินกับแพนครีเอตินโดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการศึกษาพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากรำข้าวมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS โดยมีค่าความเข้มข้นของโปรตีนในไฮโดรไลเซทที่ทำให้อนุมูลอิสระ ABTS มีปริมาณลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) เป็น 0.17 ± 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำผลการทดลองที่ได้ในครั้งนี้เทียบกับค่า IC_{50} ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากสาหร่ายพวงองุ่นต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซทจากรำข้าวที่ไร้ไขมันมีประสิทธิภาพที่สูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทจากสาหร่ายพวงองุ่นในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS เนื่องมาจากการใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่สูงกว่า พบว่าการใช้เอนไซม์เพปซินร่วมกับแพนครีเอตินสามารถย่อยโปรตีนให้ได้โปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้อย่างมีประสิทธิภาพซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของงานวิจัยในครั้งนี้

เมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอสชนิดต่างๆ ทั้งหมด 16 ตัวอย่างมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับอนุมูลอิสระ DPPH พบว่า มีเพียงปาเปนไฮโดรไลเซตที่สามารถคำนวณหาค่าความเข้มข้นของโปรตีนในไฮโดรไลเซตที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ให้ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ได้ โดยปาเปนไฮโดรไลเซตที่ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ 1, 2.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) มีค่าความเข้มข้นของโปรตีนที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ให้ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์เป็น 71.84 ± 4.60 , 89.37 ± 3.47 และ 74.16 ± 2.42 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) ในขณะที่โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอสชนิดอื่นๆ สามารถตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จึงทำให้ไม่สามารถนำเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ดังกล่าวมาคำนวณเป็นค่าความเข้มข้นของโปรตีนที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ให้ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ได้

ตารางที่ 4.2 ค่า IC_{50} ของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยโปรตีนของสาหร่ายพวงอุ้งด้วยเอนไซม์โปรตีเอสชนิดต่างๆ ต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH

ชนิดของเอนไซม์	ความเข้มข้นของโปรตีนในไฮโดรไลเซตที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ให้ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)			
	0 เปอร์เซ็นต์	1 เปอร์เซ็นต์	2.5 เปอร์เซ็นต์	5 เปอร์เซ็นต์
โปรตีเอส จี6	มากกว่า 200	มากกว่า 200	มากกว่า 200	มากกว่า 200
โปรตีเอส จีเอ็น	มากกว่า 200	มากกว่า 150	มากกว่า 200	มากกว่า 350
ปาเปน	มากกว่า 200	71.84 ± 4.60^b	89.37 ± 3.47^c	74.16 ± 2.42^b
เพปซิน-แพนครีเอติน	มากกว่า 200	มากกว่า 200	มากกว่า 150	มากกว่า 200

ข้อมูลในตารางที่ 4.2 แสดงอยู่ในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของการวัด (Standard error) ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) ของค่าเฉลี่ย IC_{50}

กรดแอสคอร์บิกหรือวิตามินซีเป็นตัวควบคุมเชิงบวก (Positive control) โดยมีค่า IC_{50} ของวิตามินซีต่ออนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 20.50 ± 0.10^a ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากตารางที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่าปาเปนไฮโดรไลเซทสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย IC_{50} ของปาเปนไฮโดรไลเซทต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH กับกรดแอสคอร์บิกที่ใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก พบว่า ปาเปนไฮโดรไลเซทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ที่ต่ำกว่าวิตามินซี โดยมีค่าเฉลี่ย IC_{50} แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ยังพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอสชนิดอื่นๆ ไม่สามารถคำนวณหาค่า IC_{50} ต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ที่แน่ชัดได้ เนื่องจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH มีค่าไม่ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ การที่ไม่สามารถวัดเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์นั้น อาจเป็นเพราะในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ต้องนำโปรตีนไฮโดรไลเซทมาทำปฏิกิริยากับ DPPH ที่ละลายอยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ เมทานอล อาจส่งผลต่อโครงสร้างของโปรตีนหรือสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในไฮโดรไลเซท ทำให้สารต่างๆ เหล่านั้นมีโครงสร้างที่ไม่เหมาะสมกับการทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ส่งผลให้ฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH มีค่าลดลงจนไม่สามารถนำไปคำนวณค่า IC_{50} ได้

จากผลการทดลองที่ได้ในตารางที่ 4.2 พบว่าปาเปนไฮโดรไลเซทสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อนำปาเปนไฮโดรไลเซทเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH กับวิตามินซีที่ใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวกพบว่า ปาเปนไฮโดรไลเซทมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง DPPH ต่ำกว่าวิตามินซี ในทางตรงกันข้าม เพปซิน-แพนครีเอตินไฮโดรไลเซทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ที่ดีกว่าวิตามินซีที่ใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (ตารางที่ 4.1) ดังนั้น การทำโปรตีนไฮโดรไลเซทให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคอัลตราฟิลเตรชัน (Ultrafiltration) จะเลือกจากผลของโปรตีนไฮโดรไลเซทต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS โดยโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์เพปซินกับเอนไซม์แพนครีเอติน ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) จะถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคอัลตราฟิลเตรชัน โดยใช้เมมเบรนคัดแยกตามน้ำหนักโมเลกุลขนาดต่างๆ ได้แก่ เมมเบรนคัดแยกสารที่มีขนาดมากกว่า 10 กิโลดาลตัน เมมเบรนคัดแยกสารที่มีขนาด 10 ถึง 5 กิโลดาลตัน เมมเบรนคัดแยกสารที่มีขนาด 5 ถึง 3 กิโลดาลตัน เมมเบรนคัดแยกสารที่มีขนาด 3 ถึง 0.65 กิโลดาลตัน และ เมมเบรนคัดแยกสารที่มีขนาดน้อยกว่า 0.65 กิโลดาลตัน จากนั้น นำส่วนของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผ่านเมมเบรนคัดแยกสารตามขนาดต่างๆ ที่เรียกว่า อัลตราฟิลเตรต (Ultrafiltrate) ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS และอนุมูลอิสระ DPPH ต่อไป

4.1.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของอัลตราฟิลาเทรต

เมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเซตจากสาหร่ายพวงองุ่นที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์เพปซินกับแพนกรีเอตินที่ใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ 5 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) ไปผ่านเทคนิคการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์อัลตราฟิลาเทรชัน ด้วยการกรองผ่านเมมเบรนคัดแยกสารตามขนาดโมเลกุลต่างๆ จะได้ออกมาเป็นอัลตราฟิลาเทรต (Ultrafiltrate) ทั้งหมด 5 ตัวอย่างที่แบ่งตามน้ำหนักโมเลกุล คือ อัลตราฟิลาเทรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10 กิโลดาลตัน (UF-1) อัลตราฟิลาเทรตที่มีน้ำหนักโมเลกุล 10 ถึง 5 กิโลดาลตัน (UF-2) อัลตราฟิลาเทรตที่มีน้ำหนักโมเลกุล 5 ถึง 3 กิโลดาลตัน (UF-3) อัลตราฟิลาเทรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 3 ถึง 0.65 กิโลดาลตัน (UF-4) และอัลตราฟิลาเทรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 0.65 กิโลดาลตัน (UF-5) จากนั้น นำอัลตราฟิลาเทรตทั้ง 5 ตัวอย่างไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับ DPPH พบว่าไม่สามารถหาค่า IC_{50} ของอัลตราฟิลาเทรตทั้ง 5 ตัวอย่างต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ เนื่องจากการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH มีค่าไม่ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.3) เมื่อนำอัลตราฟิลาเทรตทั้ง 5 ตัวอย่างไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS พบว่าอัลตราฟิลาเทรตทั้ง 5 ตัวอย่างมีความสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ตารางที่ 4.3) โดยพบว่าเมื่อโมเลกุลของสารที่อยู่ในอัลตราฟิลาเทรตมีขนาดเล็กลงจะทำให้ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS มีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น จากตารางที่ 4.3 จะเห็นได้ว่า อัลตราฟิลาเทรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 0.65 กิโลดาลตันมีค่า IC_{50} ต่ำสุดโดยมีค่า IC_{50} ของการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS เท่ากับ 3.35 ± 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการเปรียบเทียบค่า IC_{50} ต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของ UF-5 เทียบกับ UF-1 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม แม้ว่า UF-5 มีค่า IC_{50} ต่ำสุดในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS แต่พบว่าเมื่อนำค่าเฉลี่ย IC_{50} ของ UF-5 เปรียบเทียบกับ UF-2, UF-3 และ UF-4 ต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า ขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของสารที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในอัลตราฟิลาเทรต มีผลต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS

ตารางที่ 4.3 ค่า IC₅₀ ของอัลตราฟิลเทรตต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH

ตัวอย่าง	ขนาดของสาร (กิโลดัลตัน)	ความเข้มข้นของโปรตีนในอัลตราฟิลเทรตที่สามารถยับยั้ง อนุมูลอิสระให้ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC ₅₀) (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
		ABTS	DPPH
		UF-1	> 10
UF-2	10 ถึง 5	3.52±0.03 ^a	มากกว่า 150
UF-3	5 ถึง 3	3.43±0.06 ^a	มากกว่า 150
UF-4	3 ถึง 0.65	3.39±0.06 ^a	มากกว่า 150
UF-5	< 0.65	3.35±0.05 ^a	มากกว่า 150
กรดแอสคอร์บิก		138±0.35 ^c	20.50±0.10

ข้อมูลในตารางที่ 4.3 แสดงอยู่ในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของการวัด (Standard error) ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) ของค่าเฉลี่ย IC₅₀

กรดแอสคอร์บิกหรือวิตามินซีเป็นตัวควบคุมเชิงบวก (Positive control)

จากรายงานของ Cai et al. (2015) ที่ศึกษาฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระของเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยโปรตีนจากปลาฉา (*Ctenopharyngodon idella*) ด้วยเอนไซม์อัลคาเลส ซึ่งได้เปปไทด์ 3 สาย คือ Pro-Trp-Ser-Phe-Lys, Gly-Phe-Gly-Pro-Glu-Leu และ Val-Gly-Gly-Arg-Pro ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 0.64, 0.62 และ 0.48 กิโลดัลตัน ตามลำดับ เมื่อนำมาทดสอบกับอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าเปปไทด์ทั้ง 3 สายนี้มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยมีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 1.57×10^9 , 2.25×10^9 และ 2.91×10^9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และยังสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS โดยมีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS 50 เปอร์เซ็นต์ เป็น 1.80×10^8 , 3.28×10^8 และ 4.60×10^8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของเปปไทด์ที่ได้จากปลาฉาและอัลตราฟิลเทรตจากสาหร่ายพวงองุ่น พบว่าอัลตราฟิลเทรตที่ได้จากสาหร่ายพวงองุ่นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS สูงกว่าเปปไทด์จากปลาฉา ในขณะที่เปปไทด์จากปลาฉาสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ทั้ง 2 ชนิด คือ อนุมูลอิสระ ABTS และ อนุมูลอิสระ DPPH

ในทำนองเดียวกัน Chi et al. (2015) ได้ศึกษาฤทธิ์ของเพปไทด์ 2 สายที่ได้จากโปรตีนไฮโดรไลเซทจากหอยแครง คือ Trp-Pro-Pro (BCP-A) และ Gln-Pro (BCP-B) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 0.40 และ 0.24 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS จากผลการทดลองพบว่า BCP-A สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีค่า IC_{50} ของ BCP-A ต่อ ABTS เพียง 2.75×10^3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ ยังพบว่า BCP-A สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH อนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ซูเปอร์ออกไซด์ และการเกิดลิพิดเพอรอกซิเดชันได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของอัลตราฟิลเทรตจากสาหร่ายพวงองุ่นกับเพปไทด์จากหอยแครง พบว่า อัลตราฟิลเทรตจากสาหร่ายพวงองุ่นสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดีกว่าเพปไทด์จากหอยแครง

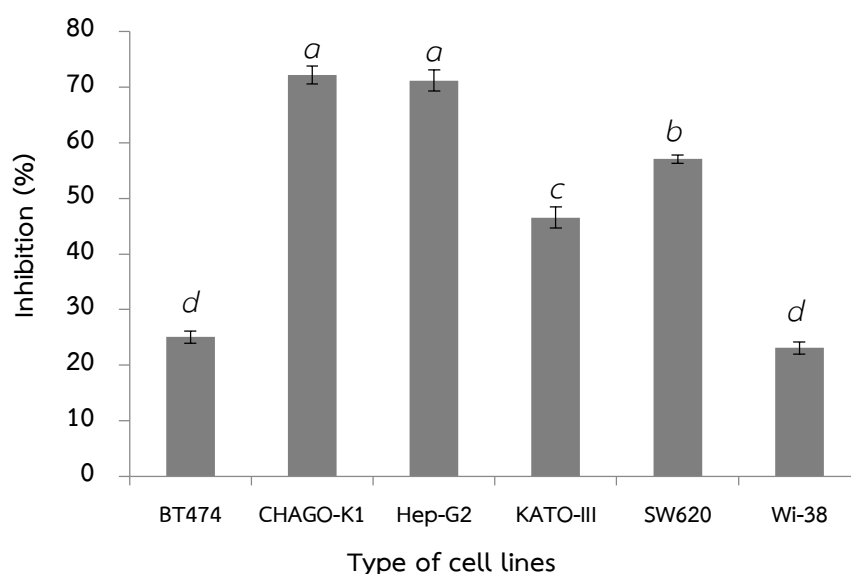
จากผลการทดลองในตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบกับการศึกษาที่ได้กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่า องค์ประกอบของกรดอะมิโนที่พบในโมเลกุลของเพปไทด์ ชนิดของแหล่งโปรตีน เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยโปรตีน เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เพปไทด์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ ยังพบว่า เพปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำมีแนวโน้มแสดงให้เห็นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพที่ดีกว่าเพปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า อัลตราฟิลเทรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 0.65 กิโลดาลตัน (UF-5) มีค่า IC_{50} ต่ำสุดในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS แสดงให้เห็นว่า UF-5 ซึ่งประกอบไปด้วยสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ มีความเหมาะสมในการนำไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพดังนั้น UF-5 จะถูกนำไปใช้ในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง และศึกษาการแสดงออกยีนในวิถีการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอโทซิส สุดท้ายนำ UF-5 ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค RP-HPLC และศึกษาลำดับกรดอะมิโนของเพปไทด์ต่อไป

4.2 ฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งของอัลตราฟิลเทรต-5

จากการนำอัลตราฟิลเทรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 0.65 กิโลดาลตัน (UF-5) ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนในอัลตราฟิลเทรตเท่ากับ 19.72 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity testing) ในเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด BT474 เซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 เซลล์มะเร็งตับชนิด Hep-G2 เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620 และ เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารชนิด KATO-III โดยใช้เซลล์ปกติของไฟโบรบลาสต์ที่เนื้อเยื่อปอดชนิด Wi-38 เป็นเซลล์ควบคุม พบว่า UF-5 สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดย UF-5 ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนในอัลตราฟิลเทรตเท่ากับ 9.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดที่มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์

โดยพบว่า UF-5 มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด BT474 เซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 เซลล์มะเร็งตับชนิด Hep-G2 เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620 และเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารชนิด KATO-III เท่ากับ 93, 92, 94, 95 และ 96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เมื่อทำการเจือจาง UF-5 ต่อไปจนเหลือความเข้มข้นของโปรตีนในอัลตราฟิลเตรตเท่ากับ 1.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร UF-5 ก็ยังสามารถแสดงฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 เซลล์มะเร็งตับชนิด Hep-G2 และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620 ถึง 72.22, 71.22 และ 57.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 4.1) นอกจากนี้ ยังพบว่า UF-5 ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนในอัลตราฟิลเตรตเป็น 1.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติไฟโบรบลาสต์ของเนื้อเยื่อปอดชนิด Wi-38 ในระดับต่ำ โดยพบว่า UF-5 มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ปกติชนิดนี้เพียง 23.10 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.1) จากผลการทดลองข้างต้นชี้ให้เห็นว่า UF-5 สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งบางชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติในระดับต่ำ



รูปที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง 5 ชนิดและเซลล์ปกติของไฟโบรบลาสต์ที่เนื้อเยื่อปอดชนิด Wi-38 ของ UF-5 ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนในอัลตราฟิลเตรตเท่ากับ 1.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) ของค่าเฉลี่ย IC_{50}

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งของ UF-5 ที่เจือจางทั้งหมด 9 ระดับ ความเจือจาง ได้แก่ 2 ,4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 และ 512 เท่า และนำเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งมาสร้างเป็นกราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของโปรตีนใน UF-5 เพื่อที่จะคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนในอัลตราฟิลเทรตที่สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งให้ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC₅₀) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป GraphPad Prism Version 6.01 พบว่า อัลตราฟิลเทรต UF-5 มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดอย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 เซลล์มะเร็งตับชนิด Hep-G2 และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620 ที่ใช้ความเข้มข้นของโปรตีนใน UF-5 ที่ทำให้เซลล์มะเร็งลดลง 50 เปอร์เซ็นต์เท่ากับ 0.77 ± 0.04 , 0.71 ± 0.04 และ 0.76 ± 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 ค่า IC₅₀ ของ UF-5 ต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์

ชนิดของเซลล์	IC ₅₀ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด BT474	1.94±0.03 ^c
เซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1	0.77±0.04 ^a
เซลล์มะเร็งตับชนิด Hep-G2	0.71±0.04 ^a
เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารชนิด KATO-III	1.31±0.08 ^b
เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620	0.76±0.02 ^a
เซลล์ควบคุมชนิด Wi-38	1.96±0.02 ^c

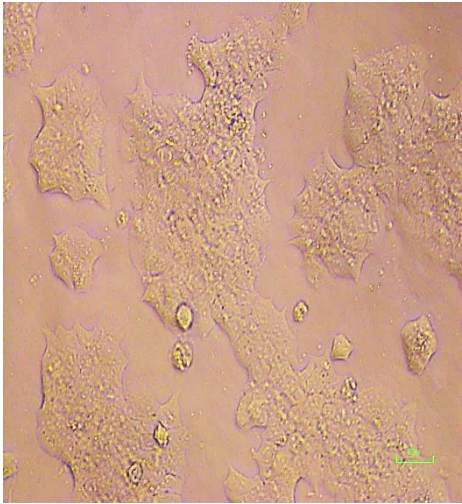
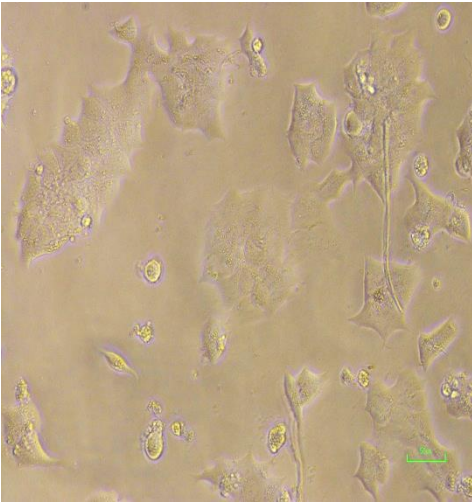
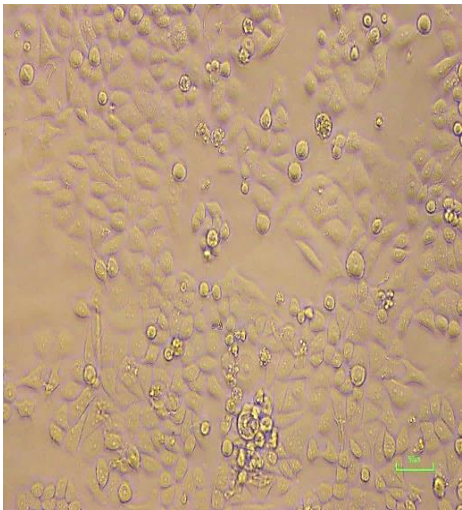
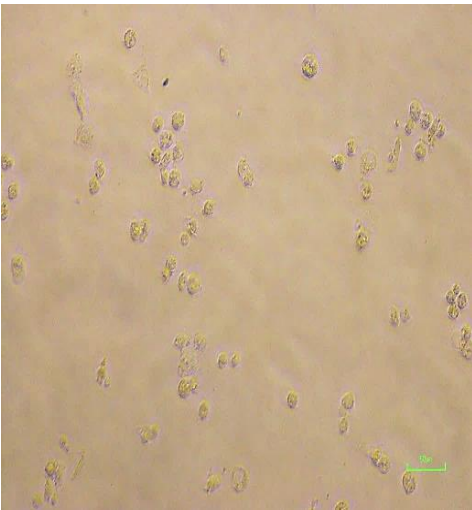
ข้อมูลในตารางที่ 4.4 แสดงอยู่ในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของการวัด (Standard error) ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) ของค่าเฉลี่ย IC₅₀

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.4 พบว่า UF-5 สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่อย่างไรก็ตาม UF-5 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของไฟโบรบลาสต์ที่เนื้อเยื่อปอดชนิด Wi-38 ด้วย โดยมีค่าความเข้มข้นของโปรตีนใน UF-5 ที่ทำให้เซลล์ชนิด Wi-38 มีจำนวนลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 1.96 ± 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้น การนำ UF-5 ไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งจะต้องคำนึงถึงความปลอดภัยในการใช้และต้องทำการทดสอบความเป็นพิษในคน (Pre-clinical phase) และการทดสอบทางคลินิก (Clinical trial) ก่อนการใช้จริง

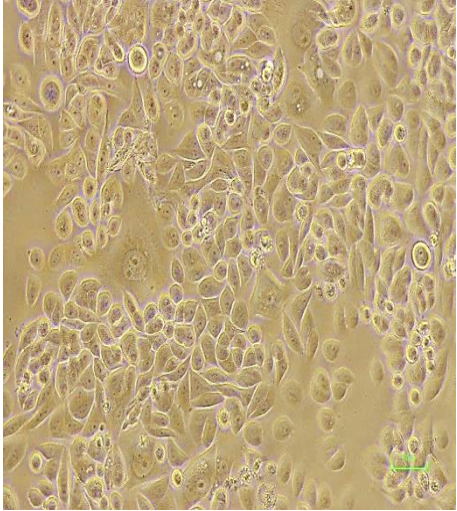
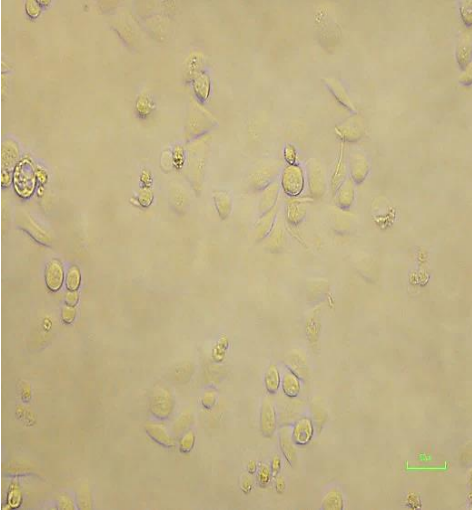
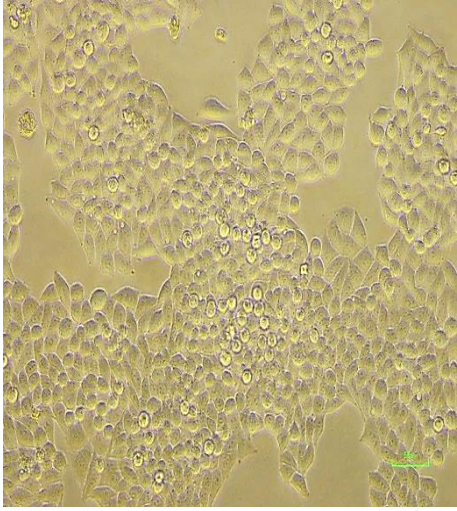
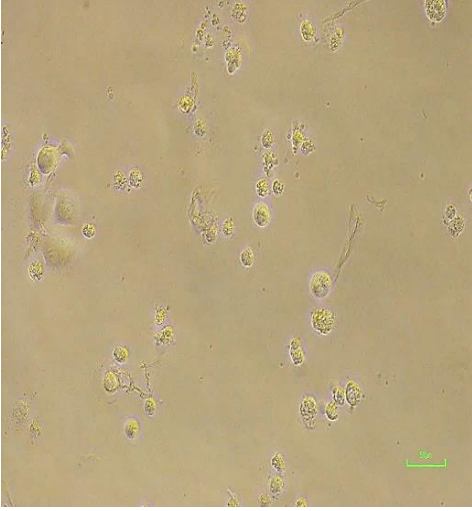
จากการนำเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดภายหลังจากการบ่มด้วย UF-5 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดในสภาวะที่ไม่ได้รับ UF-5 ภายใต้อุณหภูมิห้อง พบว่าเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดที่ได้รับ UF-5 มีจำนวนของเซลล์ลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับเซลล์มะเร็งในสภาวะปกติ (ตารางที่ 4.5) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าเพปไทด์มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งบางชนิด จากการศึกษาของ Sheih et al. (2010) พบว่าเพปไทด์ที่ได้จากสาหร่าย *C. vulgaris* ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น VECYGPNRPQF สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารชนิด AGS โดยมีค่าความเข้มข้นของโปรตีนที่สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งให้ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) เท่ากับ 70.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการศึกษาของ Wang and Zhang (2013) ได้ทำการแยกเอาเพปไทด์ CPAP จาก *C. pyrenoidosa* และนำเพปไทด์ที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งพบว่า เพปไทด์ CPAP สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งตับชนิด Hep-G2 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีค่าความเข้มข้นของโปรตีนที่สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งให้ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) เท่ากับ 426 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจากรายงานของ Mao et al. (2016) ที่ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งของเพปไทด์จากสาหร่ายสีแดง *Pyropia haitanensis* พบว่าเพปไทด์จากสาหร่ายสีแดง *P. haitanensis* มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งตับชนิด Hep-G2 เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 โดยมีค่าความเข้มข้นของโปรตีนที่สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งให้ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) อยู่ระหว่าง 59.09 ถึง 272.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ Wang and Zhang (2016) ได้ศึกษาฤทธิ์ของเพปไทด์ที่ได้จากสาหร่าย *Arthrospira platensis* พบว่าเพปไทด์ที่ได้จากสาหร่ายชนิดนี้มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 เซลล์มะเร็งตับชนิด Hep-G2 เซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารชนิด SGC-7901 และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 โดยมีค่าความเข้มข้นของโปรตีนที่สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งให้ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) เท่ากับ 31.25 ถึง 336.57 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งบางชนิดของ UF-5 กับเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งจากสาหร่ายชนิดต่างๆ ที่ได้กล่าวมาข้างต้น พบว่า UF-5 ที่ได้มาจากสาหร่ายพวงองุ่นมีประสิทธิภาพที่สูงกว่าในการยับยั้งเซลล์มะเร็งบางชนิด เช่น เซลล์มะเร็งตับ Hep-G2 โดยปริมาณโปรตีนใน UF-5 เพียง 0.71 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจะทำให้ Hep-G2 ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์

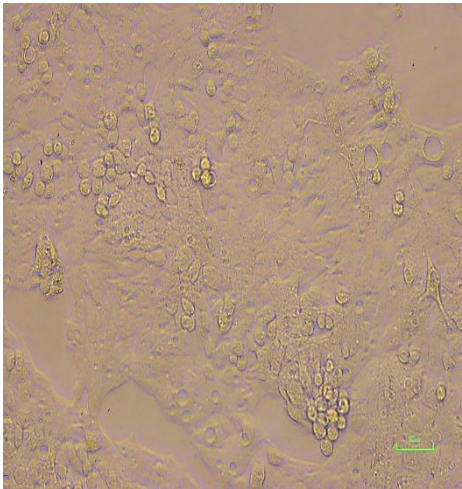
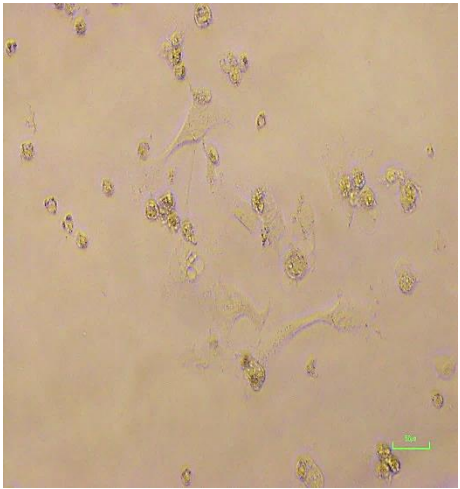
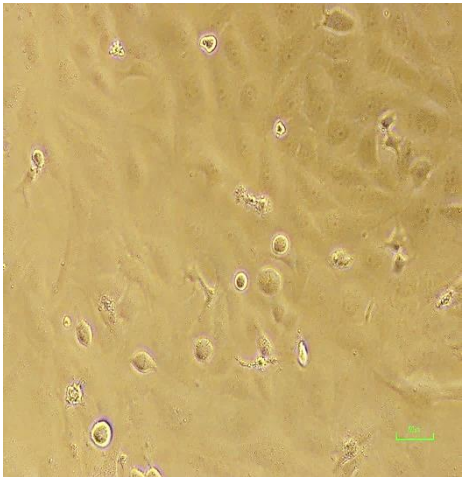
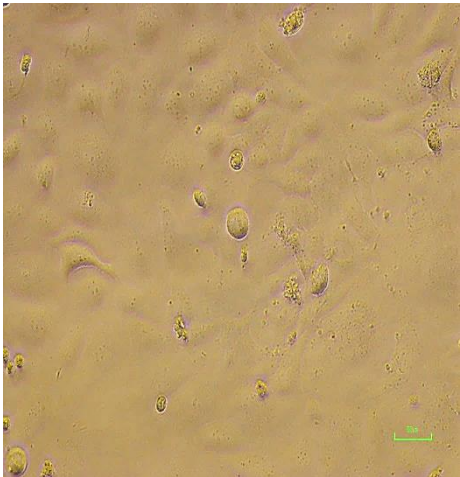
ตารางที่ 4.5 ลักษณะของเซลล์ในสภาวะปกติและเซลล์ที่ได้รับ UF-5 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบอินเวอร์ท (Invert microscope) กำลังขยายภาพ 400 เท่า

ชนิดของ เซลล์	ภาพแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์	
	เซลล์ในสภาวะปกติ	เซลล์ที่ได้รับ UF-5
เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด BT474		
เซลล์มะเร็งรังไข่ชนิด CHAGO-K1		

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) ลักษณะของเซลล์ในสภาวะปกติและเซลล์ที่ได้รับ UF-5 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
ใช้แสงแบบอินเวิร์ท (Invert microscope) กำลังขยายภาพ 400 เท่า

ชนิดของ เซลล์	ภาพแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์	
	เซลล์ในสภาวะปกติ	เซลล์ที่ได้รับ UF-5
เซลล์มะเร็งตับชนิด Hep-G2		
เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร KATO-III		

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) ลักษณะของเซลล์ในสภาวะปกติและเซลล์ที่ได้รับ UF-5 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
ใช้แสงแบบอินเวิร์ท (Invert microscope) กำลังขยายภาพ 400 เท่า

ชนิดของ เซลล์	ภาพแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์	
	เซลล์ในสภาวะปกติ	เซลล์ที่ได้รับ UF-5
เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620		
เซลล์ปกติของไฟโบรบลาสต์ที่เนื้อเยื่อปอด Wi-38		

จากข้อมูลในตารางที่ 4.4 แสดงให้เห็นว่า UF-5 สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 เซลล์มะเร็งตับชนิด Hep-G2 และ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดย UF-5 มีค่าเฉลี่ยของ IC_{50} ต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ แต่อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบัน พบว่าโรคมะเร็งที่พบได้ 5 อันดับแรกของโลก ได้แก่ โรคมะเร็งปอด โรคมะเร็งเต้านม โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ โรคมะเร็งกระเพาะอาหาร และ โรคมะเร็งต่อมลูกหมาก โดยพบว่าในบรรดาผู้ป่วยใหม่จำนวน 12.7 ล้านคน พบผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดสูงถึง 1.6 ล้านคน (สถาบันมะเร็งแห่งชาติ 2560) จากข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าประชากรมนุษย์มีความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งปอดเพิ่มมากขึ้น ดังนั้น ในการศึกษาการแสดงของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอพโทซิส จะเลือกใช้เซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 เพื่อใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษาการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอพโทซิสต่อไป

เมื่อพิจารณาค่า IC_{50} ของโปรตีนใน UF-5 ต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.77 ± 0.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร (ตารางที่ 4.4) ในทางปฏิบัติจริงการเตรียมความเข้มข้นของโปรตีนใน UF-5 ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.77 ± 0.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรนั้นทำได้ยากมากเนื่องจากเป็นระดับความเข้มข้นที่ค่อนข้างต่ำ ทำให้การทดลองนี้มีความจำเป็นต้องทดสอบความเป็นพิษของ UF-5 ต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 อีกครั้งหนึ่ง โดยเพิ่มความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์มะเร็งปอดชนิดนี้ในแต่ละหลุมของไมโครไทเทอร์เพลท 96 หลุม จากเดิมที่ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์ในแต่ละหลุมเท่ากับ 5×10^3 เซลล์ต่อหลุม จะเพิ่มเป็น 1×10^4 เซลล์ต่อหลุม ซึ่งจะทำให้ได้ค่า IC_{50} ของโปรตีนใน UF-5 ที่มีต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 มีค่าเพิ่มขึ้น จากการทดสอบความเป็นพิษของ UF-5 ต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 ครั้งนี้พบว่า UF-5 มีค่า IC_{50} ของโปรตีนใน UF-5 ที่ทำให้เซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 8.18 ± 0.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร และเมื่อเทียบกับยามาตรฐานที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง Doxorubicin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร พบว่ายานชนิดนี้ต้องใช้ความเข้มข้นสูงถึง 84.80 ± 4.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรในการทำให้เซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 มีจำนวนเซลล์ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่า UF-5 สามารถยับยั้งเซลล์ CHAGO-K1 ได้ดีกว่ายา Doxorubicin

4.3 การแสดงออกยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส

การทดลองในครั้งนี้ใช้เซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 เพื่อเป็นตัวอย่างในการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส การทดลองนี้จะใช้เซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 ที่ได้รับ UF-5 โดยใช้ความเข้มข้นของโปรตีนใน UF-5 ที่สามารถยับยั้งการแบ่งตัวเซลล์มะเร็งชนิดนี้ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) มาศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์มะเร็งที่ได้รับ UF-5 มาสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด (Total RNA) ด้วยชุดสกัด PureLink™ RNA Mini kit (Invitrogen, USA) จากนั้น นำ RNA ที่สกัดได้ไปเปลี่ยนเป็นคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอหรือดีเอ็นเอคู่สม (Complementary DNA, cDNA) ด้วยชุด Precision nanoScript2 Reverse Transcription Kit (PrimerDesign, UK) cDNA ที่ได้ออกมาจากกระบวนการดังกล่าวจะถูกนำไปศึกษาการแสดงออกยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส โดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในสภาพจริง (Quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR) การทดลองนี้ได้ทำการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสทั้งหมด 3 ยีน ได้แก่ BCL2 apoptosis regulator (BCL2), Cathepsin S (CTSS) และ MAP kinase activating death domain (MADD)

4.3.1 ผลการสกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1

จากการนำโปรตีนใน UF-5 ที่มีความเข้มข้น 8.18 ± 0.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 มีจำนวนลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) นี้ไปทดสอบกับเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 โดยให้เซลล์มะเร็งปอดชนิดนี้ได้รับ UF-5 ที่ค่า IC_{50} เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้น ทำการสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 ด้วยชุดสกัด PureLink™ RNA Mini kit อาร์เอ็นเอที่ได้จากเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 ในสถานะต่างๆ ได้แก่ อาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 ในสถานะปกติ (ควบคุม) เซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 ที่ได้รับยา Doxorubicin 84.80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ CHAGO-K1 ที่ได้รับ UF-5 ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 8.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะถูกนำไปวัดความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer และตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จากผลการทดลองพบว่า เซลล์ CHAGO-K1 ในสถานะปกติ เซลล์ CHAGO-K1 ที่ได้รับ Doxorubicin และ เซลล์ CHAGO-K1 ที่ได้รับ UF-5 มีความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอเท่ากับ 267.23 ± 0.32 , 228.86 ± 1.01 และ 233.87 ± 0.20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6)

ตารางที่ 4.6 ความเข้มข้นและคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่ได้จากเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 ในสภาวะต่างๆ

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นอาร์เอ็นเอ (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	A_{260}/A_{230}^*	A_{260}/A_{280}^{**}
CHAGO-K1 สภาวะปกติ	267.23±0.32	1.92±0.01	2.07±0.01
CHAGO-K1 ที่ได้รับ Doxorubicin	228.86±1.01	2.14±0.01	2.06±0.01
CHAGO-K1 ที่ได้รับ UF-5	233.87±0.20	1.82±0.01	2.08±0.01

ข้อมูลในตารางที่ 4.6 แสดงอยู่ในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของการวัด (Standard error)

*ค่า A_{260}/A_{230} เป็นค่าที่บ่งบอกถึงความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอ อาร์เอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์และเป็นที่ยอมรับให้ใช้ในการทดลองจะต้องมีค่าอัตราส่วน A_{260}/A_{230} ที่มากกว่า 1.7 ขึ้นไป

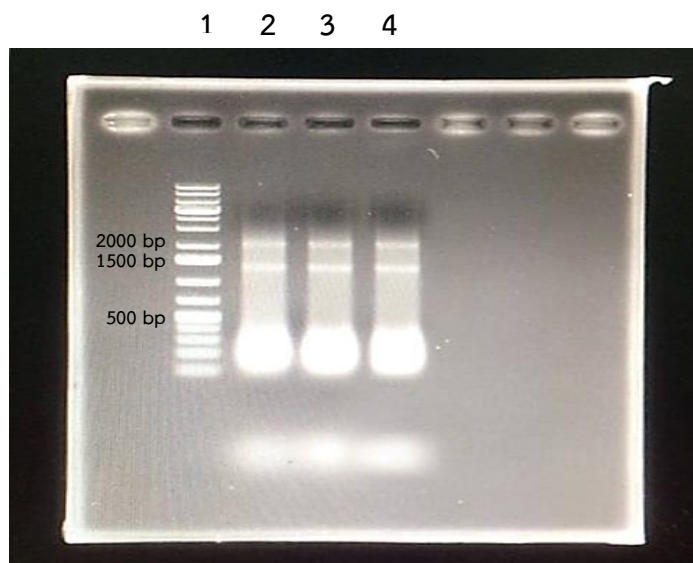
**ค่า A_{260}/A_{280} เป็นค่าที่บ่งบอกถึงความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอ อาร์เอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์และเป็นที่ยอมรับให้ใช้ในการทดลองจะต้องมีค่าอัตราส่วน A_{260}/A_{280} ไม่ต่ำกว่า 1.8 ถึง 2.2

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) เป็นค่าที่ใช้ตรวจวัดปริมาณของกรดนิวคลีอิกที่มีอยู่ในตัวอย่าง อาศัยหลักการที่ว่า โครงสร้างของกรดนิวคลีอิกจะมีไนโตรจีนัส-เบสเป็นองค์ประกอบ ไนโตรจีนัสเบสคือเบสที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบและมีโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติก โดยสามารถดูดกลืนแสงได้สูงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอจะใช้ค่า A_{260} ที่วัดได้ เทียบกับ Extinction coefficient ของอาร์เอ็นเอ โดยกำหนดให้เมื่อวัดค่า A_{260} ได้เท่ากับ 1 อาร์เอ็นเอจะมีความเข้มข้นเป็น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการทดลองนี้ ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอสามารถตรวจสอบได้ด้วยเครื่อง Nanodrop ND-1000 spectrophotometer

นอกจากนี้ ความบริสุทธิ์อาร์เอ็นเอต้องพิจารณาจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A_{280}) และ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร (A_{230}) ด้วย การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เป็นการตรวจสอบปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการที่ว่า กรดอะมิโนที่มีอยู่ในโปรตีนที่มีแขนข้างเป็นสารประกอบอะโรมาติก เช่น ทริปโตเฟน ฟีนอลอะลานีน และ ไทโรซีน สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรได้ดี นอกจากนี้ การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร สามารถตรวจสอบปริมาณสารประกอบอินทรีย์ที่มีฟีนอลเป็นองค์ประกอบบางชนิดได้ ดังนั้น อัตราส่วนของ A_{260}/A_{280} เป็นค่าที่บ่งชี้ว่ามี

โปรตีนหรือตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีฟีนอลเป็นองค์ประกอบปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างอาร์เอ็นเอหรือไม่ โดยทั่วไป ค่าอัตราส่วน A_{260}/A_{280} ที่ยอมรับให้ใช้ในการทดลองทางวิทยาศาสตร์จะต้องมีค่าไม่ต่ำกว่า 1.8 ถึง 2.2 การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร เป็นการตรวจสอบสารอินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่อาจพบได้ในตัวอย่าง เช่น ฟีนอล, TRIzol RNA Isolation Reagents และ Chaotropic salts นอกจากนี้ ยังพบว่าพันธะเพปไทด์ (Peptide bond) ที่อยู่ในโปรตีนสามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 200 ถึง 230 นาโนเมตรได้ ดังนั้นค่า A_{260}/A_{230} เป็นค่าที่บ่งชี้ว่ามีโปรตีนหรือตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างอาร์เอ็นเอหรือไม่ โดยทั่วไป ค่าอัตราส่วน A_{260}/A_{230} ที่ยอมรับให้ใช้ในการทดลองทางวิทยาศาสตร์จะต้องมีค่าไม่ต่ำกว่า 1.7 (Desjardins and Conklin 2010)

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.6 พบว่าอาร์เอ็นเอที่ได้จากเซลล์ CHAGO-K1 ในสภาวะปกติ เซลล์ CHAGO-K1 ที่ได้รับ Doxorubicin และ เซลล์ CHAGO-K1 ที่ได้รับ UF-5 มีค่า A_{260}/A_{230} เท่ากับ 1.92 ± 0.01 , 2.14 ± 0.01 และ 1.82 ± 0.01 ตามลำดับ และมีค่า A_{260}/A_{280} เท่ากับ 2.07 ± 0.01 , 2.06 ± 0.01 และ 2.08 ± 0.01 ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์ CHAGO-K1 ในสภาวะต่างๆ ว่าเป็นที่ยอมรับให้สามารถนำไปใช้ในการทดลองทางวิทยาศาสตร์ได้ แต่อย่างไรก็ตาม การพิจารณาความบริสุทธิ์หรือคุณภาพของอาร์เอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer เพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอ จำเป็นต้องตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่ได้จากเซลล์ CHAGO-K1 ในสภาวะต่างๆ ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าบนเจลแถวที่ 2, 3 และ 4 มีแถบของไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (rRNA) 2 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 1400 และ 2100 คู่เบส เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRulerTM 1 kb plus DNA ladder (รูปที่ 4.2)

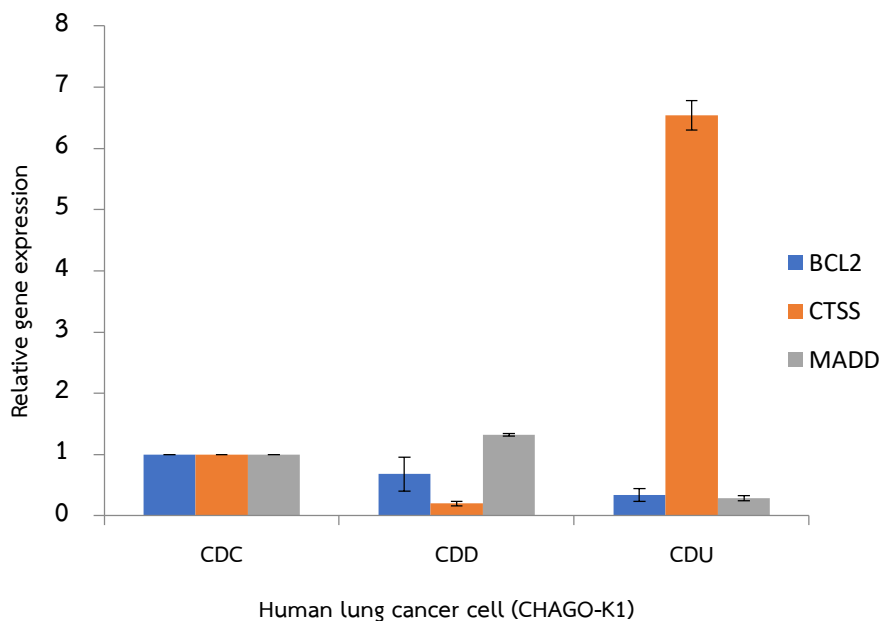


รูปที่ 4.2 แถบของอาร์เอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แถวที่ 1 คือ GeneRuler™ 1 kb plus DNA ladder แถวที่ 2 คือ RNA ที่สกัดจากเซลล์ในสภาวะปกติ แถวที่ 3 คือ RNA ที่สกัดจากเซลล์ CHAGO-K1 ที่ได้รับ Doxorubicin และ แถวที่ 4 คือ RNA ที่สกัดจากเซลล์ CHAGO-K1 ที่ได้รับ UF-5

จากรูปที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์ CHAGO-K1 ในสภาวะต่างๆ ว่าไม่มีการปนเปื้อนของจีโนมิกดีเอ็นเอ (Genomic DNA) ทำให้ตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่ได้จากเซลล์ CHAGO-K1 ในสภาวะต่างๆ มีความเหมาะสมในการนำไปเปลี่ยนเป็น cDNA ต่อไป เมื่อทำการเปลี่ยน RNA ที่ได้ไปเป็น cDNA จะใช้ cDNA ในการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอพโทซิส ดังนั้น จากการทดลองในหัวข้อนี้จะทำให้ได้ตัวอย่างของ cDNA ทั้งหมด 3 ตัวอย่าง ได้แก่ 1) cDNA ที่ได้มาจาก RNA ที่สกัดจากเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 ที่เลี้ยงในสภาวะปกติที่ไม่ได้รับ UF-5 หรือยา Doxorubicin (CDC) 2) cDNA ที่ได้มาจาก RNA ที่สกัดจากเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 ที่เลี้ยงในสภาวะที่มียา Doxorubicin ความเข้มข้น 84.80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (CDD) และ 3) cDNA ที่ได้มาจาก RNA ที่สกัดจากเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 ที่เลี้ยงในสภาวะที่มี UF-5 ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนใน UF-5 เท่ากับ 8.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (CDU) ตัวอย่าง CDC, CDD และ CDU จะถูกนำไปศึกษาการแสดงออกของยีนในวิถีการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอพโทซิสต่อไป

4.3.2 ผลการแสดงออกของยีนในวิถีการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส

ในงานวิจัยนี้ ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส ทั้งสิ้น 3 ยีน คือ BCL2 apoptosis regulator (BCL2), Cathepsin S (CTSS) และ MAP kinase activating death domain (MADD) โดยใช้ยีน Beta actin (ACTB) เป็นยีนควบคุม หรือ Housekeeping gene เมื่อนำตัวอย่าง cDNA ของเซลล์ CHAGO-K1 ที่ได้จากหัวข้อ 4.3.1 ไปเพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอของยีนต่างๆ ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสโดยใช้เครื่อง MyGo Pro Real-time PCR Cycler (IT-IS International Ltd, UK) และนำค่า Cycle threshold (Ct) ของยีนใน วิถีอะพอพโทซิสทั้ง 3 ยีน รวมถึงยีน Beta actin ที่ใช้เป็น Housekeeping gene ไปคำนวณระดับ การแสดงออกของยีน (Relative gene expression) ตามวิธีการของ Livak and Schmittgenm (2001) โดยกำหนดให้ยีนที่มีการแสดงออกของยีนเท่ากับ 1 หมายความว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลง ระดับการแสดงออกของยีน ยีนที่มีระดับการแสดงออกของยีนที่มีค่ามากกว่า 1 หมายความว่า มีการ แสดงออกของยีนเพิ่มมากขึ้น (Up-regulation) และ ยีนที่มีระดับการแสดงออกของยีนที่มีค่าน้อยกว่า 1 หมายความว่า มีการแสดงออกของยีนลดลง (Down-regulation) จากผลการทดลองพบว่า CDU มีระดับการแสดงออกของยีน Cathepsin S (CTSS) ในระดับที่สูงมาก โดยพบว่ามีการแสดงออกของยีนสัมพัทธ์ (Relative gene expression) สูงถึง 6.54 ± 0.24 (รูปที่ 4.3) ในขณะที่ ยีน BCL2 และ ยีน MADD ของตัวอย่าง CDU มีระดับการแสดงออกของยีนในระดับต่ำ โดยมีระดับ การแสดงออกของยีนเท่ากับ 0.34 ± 0.10 และ 0.29 ± 0.04 ตามลำดับ (รูปที่ 4.3)



รูปที่ 4.3 ระดับการแสดงออกของยีนสัมพันธ์ (Relative gene expression) ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 CDC คือ ตัวอย่าง cDNA ที่ได้มาจาก RNA ที่สกัดจากเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 ที่เลี้ยงในสภาวะปกติที่ไม่ได้รับ UF-5 หรือยา Doxorubicin CDD คือ ตัวอย่าง cDNA ที่ได้มาจาก RNA ที่สกัดจากเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 ที่เลี้ยงในสภาวะที่มียา Doxorubicin ความเข้มข้น 84.80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ CDU คือ ตัวอย่าง cDNA ที่ได้มาจาก RNA ที่สกัดจากเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 ที่เลี้ยงในสภาวะที่มี UF-5 ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนใน UF-5 เท่ากับ 8.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากผลการดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 เมื่อได้รับ UF-5 ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนใน UF-5 เท่ากับ 8.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์มะเร็งชนิดนี้ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้เกิดการแสดงออกของยีน CTSS เพิ่มขึ้น (CTSS up-regulation) มีรายงานว่าเมื่อเกิดกระบวนการแปลรหัสของยีน CTSS จะได้โปรตีนที่มีชื่อว่า Cathepsin S โดยโปรตีนชนิดนี้ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่อยู่ในไลโซโซมและจะถูกปล่อยออกมาจากไลโซโซมมายังไซโทซอลเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะเครียด หรือได้รับสัญญาณเหนี่ยวนำการตายเชิงซ้อน (Death inducing signaling complex, DISC) ส่งผลให้เยื่อหุ้มของไลโซโซมมีความสามารถในการซึมผ่าน (Lysosomal membrane permeabilization) ของสารภายในออกมายังไซโทซอลเพิ่มขึ้น Cathepsin S เป็นเอนไซม์โปรตีเอสจากไลโซโซมที่มีความสามารถไปตัดสายเพปไทด์บางส่วนของโปรตีนที่ชื่อว่า BCL-2 interacting death domain (Bid) ซึ่งโปรตีน

Bid เป็นโปรตีนที่ส่งเสริมให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส เมื่อโปรตีน Bid ถูกตัดเพปไทด์บางส่วนออกจากโมเลกุล จะได้เป็นโปรตีนที่มีสายสั้นลงเรียกว่า Truncated BCL-2 interacting death domain (tBid) ที่สามารถไปกระตุ้นการซึมผ่านของสารที่อยู่ภายในไมโทคอนเดรียผ่านเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial outer membrane permeabilization) ให้เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้มีการปลดปล่อยโปรตีน Cytochrome C ออกมาสู่บริเวณไซโทซอล จากนั้น Cytochrome C จะไปรวมตัวกับโปรตีนที่ชื่อว่า Apaf-1 (Apoptosis protease activating factor-1) เกิดเป็น Apoptosome ที่จะไปกระตุ้นให้โปรเอนไซม์แคสเพส-9 เปลี่ยนเป็นเอนไซม์แคสเพส-9 ที่พร้อมทำงาน และเอนไซม์แคสเพส-9 จะไปกระตุ้นโปรเอนไซม์แคสเพส-3 ให้เป็นแคสเพส-3 ที่พร้อมทำงานอีกทอดหนึ่ง จากนั้น เอนไซม์แคสเพส-3 ที่พร้อมทำงานจะไปย่อยสลายโปรตีนหรือองค์ประกอบที่สำคัญของเซลล์ต่อไป ส่งผลให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (Stoka et al. 2005) จากผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า UF-5 สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 มีการตายแบบอะพอพโทซิสโดยเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน CTSS เพิ่มขึ้น และไปกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสผ่านวิถีภายในหรือวิถีไมโทคอนเดรีย (Intrinsic or mitochondrial pathway)

นอกจากนี้ ยังพบว่า เซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 ที่เลี้ยงในสภาวะที่มี UF-5 ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนใน UF-5 เท่ากับ 8.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (CDU) มีระดับการแสดงออกของยีน BCL2 ในระดับต่ำ โดยมีระดับการแสดงออกของยีนชนิดนี้เพียง 0.34 ± 0.10 (BCL2 down-regulation) (รูปที่ 4.3) ยีน BCL2 เมื่อเกิดการแปลรหัสออกมาจะได้โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งไม่ให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส ได้แก่ โปรตีน Bcl-2 โดย Bcl-2 มีหน้าที่ยับยั้งการทำงานของโปรตีนที่ส่งเสริมให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส เช่น โปรตีน Bid โปรตีน BCL-2 associated X protein (Bax) และ โปรตีน BCL-2 antagonist killer (Bak) ให้อยู่ในรูปที่ไม่พร้อมทำงานอยู่ตลอดเวลา (Tsujiimoto 1998) จากการศึกษาี้แสดงให้เห็นว่า UF-5 สามารถยับยั้งการทำงานของยีน BCL2 ให้มีระดับของการแสดงออกยีนชนิดนี้ลดลง ส่งผลให้เซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 สามารถเกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสได้

เมื่อพิจารณาผลของ UF-5 ต่อการแสดงออกของยีน MADD ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 พบว่ามีระดับการแสดงออกของยีนเพียง 0.29 ± 0.04 (MADD down-regulation) (รูปที่ 4.3) จากผลการทดลองดังกล่าวอาจเกิดจากการที่ UF-5 ประกอบไปด้วยสารชนิดต่างๆ รวมถึงเพปไทด์ที่มีขนาดเล็กกว่า 0.65 กิโลดาลตัน ทำให้สารที่อยู่ใน UF-5 ซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ง่าย ดังนั้น เพปไทด์หรือสารชนิดอื่นๆ ที่มีฤทธิ์กระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์จะเป็นตัวกระตุ้นจาก

ภายในเซลล์เป็นหลัก ในขณะที่เมื่อ ยีน MADD เมื่อเกิดการแปลรหัสจะได้เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณการตาย (Death receptor) ได้แก่ Type 1 TNF-receptor (TNFR1) ที่รวมอยู่กับโปรตีนที่เป็นโมเลกุลดัดแปลง (Adaptor molecule) ที่เรียกว่า TNF receptor-associated death domain (TRADD) เกิดเป็นกลุ่มโปรตีนที่เรียกว่า Death domain ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ Death domain จะเกี่ยวข้องกับวิธีการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสโดยอาศัยสัญญาณการตายที่มาจากภายนอกเซลล์มาจับตัวรับการตาย ทำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส การตายในลักษณะนี้จัดเป็นวิธีการตายแบบภายนอกเซลล์หรือวิถีตัวรับการตาย (Extrinsic or death receptor pathway) จากผลการทดลองพบว่าเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 ที่ได้รับยา Doxorubicin ความเข้มข้น 84.80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพิ่มระดับการแสดงของยีน MADD ขึ้นเล็กน้อย (MADD up-regulation) โดยมีระดับการแสดงออกของยีนเท่ากับ 1.32 ± 0.02 ในขณะที่ ยีน BCL2 และ CTSS มีระดับการแสดงออกของยีนในระดับต่ำ โดยมีระดับการแสดงออกของยีนเท่ากับ 0.68 ± 0.28 และ 0.20 ± 0.04 ตามลำดับ (รูปที่ 4.3) อาจกล่าวได้ว่าเมื่อเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 ได้รับยา Doxorubicin ความเข้มข้น 84.80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสผ่านวิถีภายนอกหรือวิถีตัวรับการตาย

จากรายงานของ Tipgomut et al. (2018) ที่ศึกษาฤทธิ์ของพอลิเพปไทด์ที่ชื่อว่า Melittin ที่แยกมาจากพิษของผึ้ง (*Apis mellifera* venom) ต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 และศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอพโทซิส ได้แก่ ยีน BCL2 และ ยีน MADD พบว่าเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 ที่ได้รับ Melittin เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส และทำให้เซลล์มะเร็งปอดชนิดนี้หยุดวัฏจักรของการแบ่งเซลล์ไว้ที่ระยะอินเตอร์เฟสในช่วง G_1 นอกจากนี้ ยังพบว่าเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 ที่ได้รับ Melittin จะมีการแสดงออกของยีน BCL2 ในระดับที่เพิ่มขึ้น (BCL2 up-regulation) ในขณะที่ยีน MADD มีแนวโน้มของระดับการแสดงออกของยีนที่ลดลง เมื่อเทียบกับเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 ที่ไม่ได้รับ Melittin อย่างไรก็ตาม กลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 ที่เกิดจากพอลิเพปไทด์ Melittin ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

นอกจากนี้ Wang et al. (2019) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของเพปไทด์ไฟโบรอินของไหม (Silk fibroin peptide, SFP) ที่ได้จากรังไหม (Silkworm cocoons) ต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 และ เซลล์มะเร็งปอดชนิด H460 จากการศึกษาพบว่า SFP สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดทั้งสองชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดย SFP สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด

H460 โดยทำให้เซลล์มะเร็งปอดชนิด H460 หยุดชะงักอยู่ในระยะอินเตอร์เฟสในช่วงระยะ S ของวัฏจักรเซลล์ และเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส ยิ่งไปกว่านั้น SFP สามารถทำให้เซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 มีระดับการแสดงออกของ BCL2 ที่ลดลง และทำให้ยีนที่ทำหน้าสร้างโปรตีน Bak ในเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460 มีระดับการแสดงออกของยีนที่เพิ่มมากขึ้น จากการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า SFP มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดทั้ง 2 ชนิด โดยเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอพโทซิส

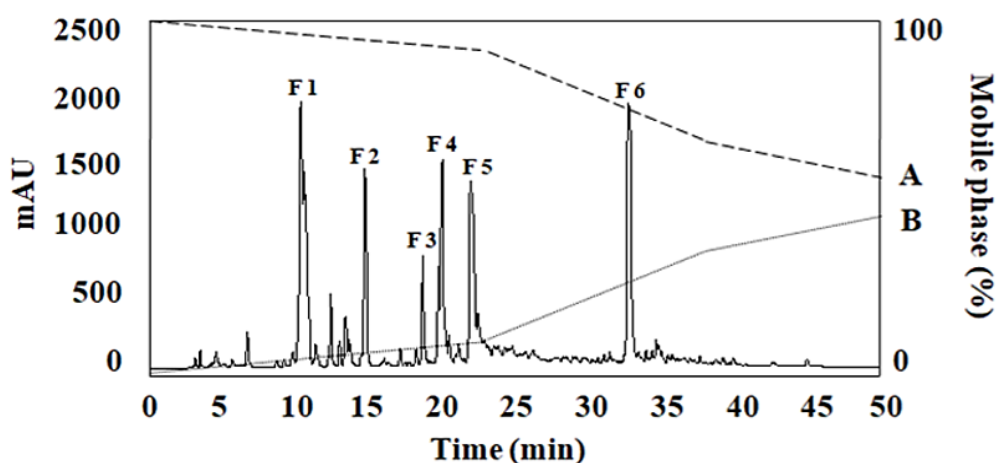
การตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสเป็นรูปแบบการตายของเซลล์ที่มีความซับซ้อนมาก การควบคุมการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสมีกลไกที่ควบคุมหลากหลายรูปแบบที่ทำงานร่วมกันอย่างเป็นระบบ ทำให้ต้องมียีนและโปรตีนหลายชนิดที่ควบคุมการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส เนื่องจากถ้าการควบคุมการตายของเซลล์ในลักษณะนี้เกิดความผิดปกติ อาจนำไปสู่เหตุการณ์ที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิตได้ เช่น การตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสมีน้อยเกินไปอาจส่งผลให้เซลล์เหล่านั้นพัฒนากลายเป็นเซลล์มะเร็ง ถ้าหากมีการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสที่มากเกินไปก็จะนำไปสู่การเสื่อมของระบบประสาท เป็นต้น

4.4 ผลการศึกษาการทำ UF-5 ให้บริสุทธิ์และการระบุชนิดของเพปไทด์

งานวิจัยนี้ได้นำ UF-5 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค RP-HPLC และตรวจสอบ UF-5 ที่แยกได้ด้วยอัลตราไวโอเล็ตโครมาโทแกรม (Ultraviolet chromatogram) ด้วยโปรแกรม ChromQuest (Thermo Scientific, USA) นำของเหลวที่รวบรวมได้จากขั้นตอนของ RP-HPLC ที่เรียกว่า Chromatographic fraction ไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและศึกษาลำดับของกรดอะมิโนต่อไป

4.4.1 ผลการทำ UF-5 ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค RP-HPLC

จากการนำ UF-5 ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค RP-HPLC จะได้ Chromatographic fraction ออกมาทั้งหมด 6 พีค (Peak) ได้แก่ F1, F2, F3, F4, F5 และ F6 (รูปที่ 4.4) จากนั้น นำ Chromatographic fraction เหล่านี้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS และอนุมูลอิสระ DPPH จากการทดลองพบว่า Chromatographic fraction ทั้ง 6 พีค สามารถตรวจหาฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้ แต่พบว่า Chromatographic fraction ทั้ง 6 ตัวอย่างนี้มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ไม่ถึง 3 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทดสอบกับอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าสามารถหาฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้เท่ากับ 18.22 ± 0.01 , 11.51 ± 0.68 , 13.92 ± 0.51 , 32.67 ± 0.75 , 18.03 ± 0.93 และ 19.77 ± 0.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7)



รูปที่ 4.4 อัลตราไวโอเล็ตโครมาโทแกรม (Ultraviolet chromatogram) ของ UF-5 จากเทคนิค RP-HPLC บนคอลัมน์แบบรีเวิร์สเฟส C_{18} โดยวัดจากการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย ตัวทำละลาย A คือ กรดไตรฟลูออโรอะซิติกที่มีความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) และ ตัวทำละลาย B คือ อะซิโตนไนไตรล์ที่มีความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในกรดไตรฟลูออโรอะซิติกความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)

ตารางที่ 4.7 ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH ของ Chromatographic fraction

ตัวอย่าง	ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ (เปอร์เซ็นต์)	
	ABTS	DPPH
F1	2.32±0.01 ^e	18.22±0.01 ^b
F2	2.25±0.12 ^e	11.51±0.68 ^d
F3	2.44±0.77 ^e	13.92±0.51 ^c
F4	2.35±0.61 ^e	32.67±0.75 ^a
F5	2.51±0.33 ^e	18.03±0.93 ^b
F6	2.42±0.46 ^e	19.77±0.51 ^b

ข้อมูลในตารางที่ 4.7 แสดงอยู่ในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของการวัด (Standard error) ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH

4.4.2 การระบุชนิดของเปปไทด์

จากข้อมูลในตารางที่ 4.7 ตัวอย่าง Chromatographic fraction 3 ตัวอย่าง ได้แก่ F1, F4 และ F6 เป็นตัวอย่างที่ประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ดังนั้น จึงนำ F1, F4 และ F6 ไปศึกษาลำดับของกรดอะมิโนด้วยเทคนิค LC-MS และนำข้อมูลในรูปของ Mass spectra ซึ่งมีค่าเป็นมวลต่อประจุ (m/z) ไปวิเคราะห์โดยใช้ฐานข้อมูล MASCOT จากนั้น นำข้อมูลที่วิเคราะห์ได้ ไปสร้างและจัดเรียงลำดับของกรดอะมิโนให้ต่อกันเป็นสายของเปปไทด์ (*De novo peptide sequencing*) และทำการเปรียบเทียบลำดับที่ได้กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่อยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) ในหัวข้อ Protein Blast (Blastp) พบว่าได้ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จาก Chromatographic fraction ชนิด F1 และ F6 จำนวนทั้งหมด 9 เส้น ซึ่งมีความใกล้เคียงกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่พบในสาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa lentilifera*) ที่เคยรายงานมาก่อน (ตารางที่ 4.8) ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์เส้นที่ 1 ถึง 4 มาจาก F1 และ เส้นที่ 5 ถึง 9 มาจาก F6 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับของกรดอะมิโนที่พบในโปรตีนในสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในฐานข้อมูล NCBI พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์เส้นที่ 1 มีความเหมือน (Identity) กับลำดับกรดอะมิโนในเปปไทด์หรือโปรตีนของ *Caulerpa cliftonii* 100 เปอร์เซ็นต์ และยังมีความเหมือนครอบคลุมทั้งสายของในเปปไทด์หรือโปรตีน (Query cover) ชนิดนี้ 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาความเหมือนและครอบคลุมทั้งสายของเปปไทด์เส้นอื่นๆ กับสิ่งมีชีวิตในฐานข้อมูล พบว่าเปปไทด์ที่ได้จาก F1 และ F6 มีความเหมือนหรือสอดคล้องกับโปรตีนที่อยู่ในสาหร่ายพวงองุ่นจีนัส *Caulerpa* sp.

ตารางที่ 4.8 ลำดับกรดอะมิโนของเพปไทด์จากการทำ *De novo* peptide sequencing เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนในสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในฐานข้อมูล NCBI

เส้นที่	ลำดับกรดอะมิโน	สิ่งมีชีวิตที่ใช้เปรียบเทียบ	ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่ เหมือนกับสิ่งมีชีวิตที่ใช้เทียบ	ความเหมือน (เปอร์เซ็นต์)	ครอบคลุมทั้งสาย (เปอร์เซ็นต์)	หมายเลขการเข้าถึง
1	LLGPLGLASHK	<i>Caulerpa cliftonii</i>	PLGLAS	100	100	YP009306420.1
2	SVPGATGMPGPPA	<i>Caulerpa lentilifera</i>	PGPP	100	30	YP009514448.1
3	GEPGTLGLPGPPA	<i>Caulerpa lentilifera</i>	GEPGT	100	76	YP009514447.1
4	DGLLGPLGVGHDK	<i>Caulerpa lentilifera</i>	LLNPLGV	86	53	YP009514388.1
5	GGDLAGANPL	<i>Caulerpa lentilifera</i>	GADPL	80	50	YP009514412.1
6	GLLGPLGLTGHGA	<i>Caulerpa racemosa</i>	LGLTGH	100	61	YP009326852.1
7	RKLGPLGMHHM	<i>Caulerpa manorensis</i>	RKLGELG	86	63	YP009472868.1
8	LLGPLGYGTGCCK	<i>Caulerpa lentilifera</i>	LATLGYGVG	67	69	YP009514407.1
9	GELGPAGLLCAPNSH	<i>Caulerpa lentilifera</i>	LLGAALLCA	78	66	YP009514408.1

เส้นที่ 1 ถึง 4 เป็นลำดับกรดอะมิโนที่ได้จาก Chromatographic fraction F1 เส้นที่ 5 ถึง 9 เป็นลำดับกรดอะมิโนที่ได้จาก Chromatographic fraction F6

จากข้อมูลในตารางที่ 4.8 พบว่าเพปไทด์เส้นที่ 1, 4, 7 และ 9 พบว่ามีกรดอะมิโน ฮีสทีดีน (Histidine, H) เป็นองค์ประกอบ มีรายงานว่าเพปไทด์ที่มีฮีสทีดีนเป็นองค์ประกอบสามารถแสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้เนื่องจากฮีสทีดีนมีแขนข้างเป็นลักษณะวงแหวนอิมิดาโซลที่สามารถเป็นตัวให้โปรตอนหรือไฮโดรเจนตอมแก่อนุมูลอิสระได้ (Hernández-Ledesma et al. 2005) เพปไทด์เส้นที่ 1, 4, 5 และ 8 พบกรดแอสปาทิก (Aspartic acid, D) และไลซีน (Lysine, K) มีรายงานว่า เพปไทด์ที่มีกรดแอสปาทิกและไลซีนเป็นองค์ประกอบจะสามารถดักจับไอออนของโลหะที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระได้ ได้แก่ ไอออนของเหล็ก และ ไอออนของทองแดง เป็นต้น (Saiga et al. 2003) นอกจากนี้ ยังพบว่ากรดอะมิโนอาร์จินีน (Arginine, R) ที่พบในเพปไทด์เส้นที่ 7 สามารถเป็นตัวดักจับไอออนของโลหะที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระได้เช่นกัน (Zhang et al. 2010) ลิวซีน (Leucine, L) เป็นกรดอะมิโนที่พบในเพปไทด์เกือบทุกเส้น (ตารางที่ 4.8) จากรายงานการศึกษาของ Mendis et al. (2005) พบว่าเพปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีสมบัติไฮโดรโฟบิก ได้แก่ กรดอะมิโนโพรลีน (Proline, P) ลิวซีน (Leucine, L) อะลานีน (Alanine, A) ทริปโทเฟน (Tryptophane, W) และ ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine, F) จะมีคุณสมบัติเป็นตัวยับยั้งอนุมูลอิสระได้ ดังนั้น องค์ประกอบของกรดอะมิโนภายในโมเลกุลของเพปไทด์เป็นปัจจัยที่สำคัญมากที่ทำให้เพปไทด์แสดงคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการนำสาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa lentilifera*) มาย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรตีเอสชนิดต่างๆ ได้แก่ โปรตีเอส จี6 โปรตีเอส จีเอ็น ปาเปน และ เอนไซม์เพปซินร่วมกับแพนครีเอติน และนำโปรตีนไฮโดรไลเซตจากสาหร่ายพวงองุ่นไปศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง สรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1. โปรตีนไฮโดรไลเซตของสาหร่ายพวงองุ่นที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์เพปซิน-แพนครีเอติน ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) จะได้เพปซิน-แพนครีเอตินไฮโดรไลเซตที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีค่าความเข้มข้นของโปรตีนในไฮโดรไลเซตที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) เท่ากับ 3.61 ± 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับค่า IC_{50} ต่อการยับยั้ง ABTS ของเพปซิน-แพนครีเอตินไฮโดรไลเซตกับวิตามินซี สรุปได้ว่า เพปซิน-แพนครีเอตินไฮโดรไลเซตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้สูงกว่าวิตามินซี

2. จากการนำเพปซิน-แพนครีเอตินไฮโดรไลเซตไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคอัลตราฟิลเตรชันด้วยเมมเบรนคัดแยกสารตามขนาดโมเลกุลขนาดต่างๆ สรุปได้ดังนี้ อัลตราฟิลเตรตทุกตัวอย่างสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง อัลตราฟิลเตรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 0.65 กิโลดาลตัน (UF-5) มีค่า IC_{50} ต่ออนุมูลอิสระ ABTS เท่ากับ 3.35 ± 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นถึงเพปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะแสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ที่สูงขึ้น

3. จากการศึกษากิจกรรมของ UF-5 ต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด BT474 เซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 เซลล์มะเร็งตับชนิด Hep-G2 เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด SW620 และเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารชนิด KATO-III สรุปว่า UF-5 สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่อย่างไรก็ตาม UF-5 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของไฟโบลาสต์ที่เนื้อเยื่อปอดชนิด Wi-38 ด้วยเช่นกัน

4. จากการศึกษากิจกรรมของ UF-5 ต่อการทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 โดยการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส

ทั้งหมด 3 ยีน ได้แก่ BCL2 apoptosis regulator (BCL2) Cathepsin S (CTSS) และ MAP kinase activating death domain (MADD) สรุปว่า UF-5 สามารถทำให้เซลล์มะเร็งชนิดนี้มีการแสดงออกของยีน CTSS สูงขึ้น แสดงให้เห็นว่า เซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 มีการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสที่เกิดจากวิถีภายในหรือวิถีไมโทคอนเดรีย นอกจากนี้ UF-5 ยังทำให้เซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 มีระดับการแสดงออกของยีน BCL2 ลดลง โดยยีน BCL2 เมื่อเกิดการแปลรหัสจะได้ออกมาเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ยับยั้งไม่ให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส

5. จากการทำ UF-5 ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค RP-HPLC และนำ Chromatographic fraction ที่ได้ไปศึกษาลำดับกรดอะมิโนด้วยเทคนิค LC-MS สรุปว่า ได้เปปไทด์ออกมาทั้งหมด 9 เส้นที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่อยู่ในสาหร่ายพวงองุ่น นอกจากนี้ ยังพบว่าองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่อยู่ในเปปไทด์จากสาหร่ายพวงองุ่นมีบางเส้นที่มีกรดอะมิโนฮีสทีดีน กรดแอสปาร์ติก ไลซีน อาร์จินีน โพรลีน ลิวซีน และ อะลานีน เป็นองค์ประกอบ มีผลต่อการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเปปไทด์

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากสาหร่ายพวงองุ่น โดยการนำโปรตีนไฮโดรไลเซทไปทดสอบกับอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH เป็นวิธีการที่สะดวก รวดเร็ว และได้ผลการทดลองที่น่าเชื่อถือ อย่างไรก็ตาม อนุมูลอิสระมีอีกมากมายหลายชนิด และมีกลไกในการทำให้เกิดความเสื่อมสภาพของเซลล์สิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกัน ดังนั้น จึงควรทำการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบอื่นๆ เช่น ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (Ferric reducing power) เนื่องจาก เฟอร์ริกไอออนเป็นไอออนของโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลได้ นอกจากนี้ การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในงานวิจัยครั้งนี้เป็นการทดสอบในหลอดทดลอง (*In vitro*) อาจทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากสาหร่ายพวงองุ่นต่อการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตหรือในสัตว์ทดลอง

2. การศึกษาฤทธิ์ของ UF-5 ต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด พบว่า UF-5 สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่อย่างไรก็ตาม UF-5 สามารถยับยั้งหรือมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของไฟโบรบลาสต์ที่เนื้อเยื่อปอดชนิด Wi-38 เช่นกัน ดังนั้น การนำ UF-5 ไปพัฒนาสำหรับใช้ปีนยารักษาผู้ป่วยมะเร็งจำเป็นต้องคำนึงถึงความปลอดภัยต่อผู้ป่วยด้วย โดยอาจทำการศึกษาฤทธิ์ของ UF-5 เพิ่มเติมในสัตว์ทดลอง (*In vivo*) รวมถึงศึกษาความเข้มข้นของโปรตีนใน UF-5 ที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดี และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติให้น้อยที่สุด

3. การศึกษาฤทธิ์ของ UF-5 ต่อการชักนำให้เกิดตายของเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 แบบอะพอพโทซิส อาจทำการศึกษายีนตัวอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องเพิ่มเติม และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสควบคู่กันไปด้วย เพื่อเป็นการยืนยันว่าการใช้ UF-5 สามารถชักนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งปอดชนิด CHAGO-K1 แบบอะพอพโทซิสได้

เอกสารอ้างอิง

- สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 2560. “ทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล พ.ศ. 2560”
- Adler, N.J. 1986 "Enzymatic hydrolysis of food proteins." London; *Elsevier Applied Science*.
- Alam, M. N., Bristi, N. J. and Rafiqzaman, M. 2013. “Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity.” *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143–152.
- Alemán, A., Pérez-Santín, E., Bordenave-Juchereau, S., Arnaudin, I., Gómez-Guillén, M. C. and Montero, P. 2011. “Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive anticancer and antioxidant activity.” *Food Research International*, 44(4), 1044–1051.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K. and Hagen, T. M. 1993. “Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(17), 7915–7922.
- Belton, G.S., Huisman, J.M. and Gurgel, C.F.D. 2015: "Caulerpaceae." In: *Algae of Australia: marine benthic algae of north-western Australia. 1. Green and brown algae*. (Huisman, J.M. Eds), pp 1: 75-102. Canberra & Melbourne: ABRS & CSIRO Publishing.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S. and Kalayci, O. 2012. “Oxidative Stress and Antioxidant Defense.” *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19.
- Bouayed, J. and Bohn, T. 2010. “Exogenous Antioxidants—Double-Edged Swords in Cellular Redox State: Health Beneficial Effects at Physiologic Doses versus Deleterious Effects at High Doses.” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(4), 228–237.
- Bradford, M. M. 1976. “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.” *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248–254.
- Buahorm, S., Puthong, S., Palaga, T., Lirdprapamongkol, K., Phuwapraisirisan, P., Svasti, J. and Chanchao, C. 2015. “Cardanol isolated from Thai *Apis mellifera* propolis induces cell cycle arrest and apoptosis of BT-474 breast cancer cells via p21 upregulation.” *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(1)

- Cai, L., Wu, X., Zhang, Y., Li, X., Ma, S. and Li, J. 2015. "Purification and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin." *Journal of Functional Foods*, 16, 234–242.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M. and Corke, H. 2004. "Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer." *Life Sciences*, 74(17), 2157–2184.
- Chen, C., Chi, Y.-J., Zhao, M.-Y. and Lv, L. 2011. "Purification and identification of antioxidant peptides from egg white protein hydrolysate." *Amino Acids*, 43(1), 457–466.
- Chi, C.-F., Hu, F.-Y., Wang, B., Li, T. and Ding, G.-F. 2015. "Antioxidant and anticancer peptides from the protein hydrolysate of blood clam (*Tegillarca granosa*) muscle." *Journal of Functional Foods*, 15, 301–313.
- Cian, R. E., Martínez-Augustin, O. and Drago, S. R. 2012. "Bioactive properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis from protein byproducts of *Porphyra columbina*." *Food Research International*, 49(1), 364–372.
- Clemente, A. 2000. "Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition." *Trends in Food Science & Technology*, 11(7), 254–262.
- Dávalos, A., M. Miguel, B. Bartolomé and R. López-Fandiño, R. 2004. "Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis." *Journal of Food Protection* 67(9), 1939-1944.
- Dawes, C. J. 1998. "Caulerpaceae." *Marine botany*. New York: John Wiley. ISBN 0-471-19208-2.
- Denault, J.-B. and Salvesen, G. S. 2002. "Caspases: Keys in the Ignition of Cell Death." *Chemical Reviews*, 102(12), 4489–4500.
- Desjardins, P. and Conklin, D. 2010. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Journal of Visualized Experiments*.
- Dunn, A. S., G. Moad and D. H. Solomon. 1995 "The chemistry of free radical polymerization" *Elsevier Science Polymer International*, 42(3), 346-346.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.
- Elochukwu, C. 2015. "Generation and reaction of free radicals in the human body: a major cause of aging and chronic degenerative diseases." *EC Nutrition* 1(3), 132-136.

- Gewies, A. 2003. "Introduction to apoptosis." *Aporeview* no. 1: 1-26.
- Goland, M. 2014. "Diferencias morfológicas entre necrosis y apoptosis." [Online]. Available : [https:// http://patologiabcom6.blogspot.com/2014/05/blog-post.html](https://http://patologiabcom6.blogspot.com/2014/05/blog-post.html)
- Guo, H., Kouzuma, Y. and Yonekura, M. 2009. "Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein." *Journal of Food Chemistry*, no. 113, 238-245.
- Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B. and Amigo, L. 2005. "Preparation of Antioxidant Enzymatic Hydrolysates from α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin. Identification of Active Peptides by HPLC-MS/MS." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (3), 588–593.
- Huang, D., Ou, B. and Prior, R.L. 2005 "Methods evaluation of antioxidant activity." *Journal Agricultural Food Chemistry*, 53 (1), 1841-1856.
- Iverson, F. 1995. "Phenolic antioxidants: Health protection branch studies on butylated hydroxyanisole." *Cancer Letters*, 93(1), 49–54.
- Jung, W.-K., Karawita, R., Heo, S.-J., Lee, B.-J., Kim, S.-K. and Jeon, Y.-J. 2006. "Recovery of a novel Ca-binding peptide from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) backbone by pepsinolytic hydrolysis." *Process Biochemistry*, 41(9), 2097–2100.
- Kaur, I. P. and Geetha, T. 2006. "Medicine chemistry: DPPH radical scavenging activity." 43 (6), 305-312.
- Kim, S.-K., Kim, Y.-T., Byun, H.-G., Nam, K.-S., Joo, D.-S. and Shahidi, F. 2001. "Isolation and Characterization of Antioxidative Peptides from Gelatin Hydrolysate of Alaska Pollack Skin." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 1984–1989.
- Kim, S.-Y., Je, J.-Y., & Kim, S.-K. 2007. "Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion." *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(1), 31–38.
- Landrier, J., Marcotorchino, J. and Tourniare, F. 2012. "Lipophilic micronutrients and adipose tissue biology." *Nutrients* 4 (11), 1622-1649.
- Lee, J.M., S.G. You and S.M. Kim. 2005. "Functional Activities of Low Molecular Weight Peptides Purified from Enzymatic Hydrolysates of Seaweeds." *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*." 34 (8), 1124-1129.

- Lee, S.-J., Kim, K. H., Kim, Y.-S., Kim, E.-K., Hwang, J.-W., Lim, B. O. and Park, P.-J. 2012. "Biological activity from the gelatin hydrolysates of duck skin by-products." *Process Biochemistry*, 47(7), 1150–1154.
- Li, H., Horke, S., & Förstermann, U. 2013. "Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention." *Trends in Pharmacological Sciences*, 34(6), 313–319.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method." *Methods*, 25(4), 402–408.
- Lotito, S., and Frei, B. 2006. "Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon?" *Free Radical Biology and Medicine*, 41(12), 1727–1746.
- MacArtain, P., Christopher I. R. G., Mariel B., Ross C. and Ian R. R. 2007. "Nutritional value of edible seaweeds." *Nutrition Reviews*, 65 (12), 535-543.
- Maeda, R., Ida, T., Ihara, H. and Sakamoto, T. (2012). "Immunostimulatory Activity of Polysaccharides Isolated from *Caulerpa lentillifera* on Macrophage Cells." *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 76 (3), 501–505.
- Maeda, R., Ida, T., Ihara, H. and Sakamoto, T. 2012. "Induction of apoptosis in MCF-7 cells by β -1,3-xylooligosaccharide prepared from *Caulerpa lentillifera*." *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 76 (5), 1032-1034.
- Mao, X., Bai, L., Fan, X. and Zhang, X. 2016. "Anti-proliferation peptides from protein hydrolysates of *Pyropia haitanensis*." *Journal of Applied Phycology*, 29(3), 1623–1633.
- Matsukawa, R., Z. Dubinsky, E. Kishimoto, K. Masaki, Y. Masuda, T. Takeuchi, M. Chihara, Y. Yamamoto, E. Niki and I. Karube. 1997. "A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds." *Journal of Applied Phycology*, 9 (1), 29-35.
- Mendis, E., Niranjana R., Hee G. B. and Se K. K. 2005. "Investigation of jumbo squid (*Dosidicus Gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects." *Life Sciences*, 77 (17), 2166-2178.
- Michels, A. and Frei, B. 2012. "Vitamin C". In Caudill MA, Rogers M. *Biochemical, Physiological, and Molecular Aspects of Human Nutrition* (3 ed.). Philadelphia: Saunders. pp. 627–654.

- Nagpal, R., Behare, P., Rana, R., Kumar, A., Kumar, M., Arora, S., Morotta, F., Jain, S. and Yadav, H. 2011. "Bioactive peptides derived from milk proteins and their health beneficial potentials: an update." *Food function*, 2 (1), 18-27.
- Nguyen, V. T., Ueng, J. P. and Tsai, G. J. (2011). "Proximate Composition, Total Phenolic Content, and Antioxidant Activity of Seagrape (*Caulerpa lentillifera*)." *Journal of Food Science*, 76(7), C950–C958.
- Noori, S. 2012 "An overview of oxidative stress and antioxidant defensive system." *Open Access Scientijfic Reports*, 1 (8), 1-9.
- Patterson, C. E. and Rhoades, R. A. (1988). Protective role of sulfhydryl reagents in oxidant lung injury. *Experimental Lung Research*, 14(1), 1005-1019.
- Pérez, J. M., Maldonado, M. E., Rojano, B. A., Alzate, F., Sáez, J. and Cardona, W. (2014). Comparative antioxidant, antiproliferative and apoptotic effects of *Ilex laurina* and *Ilex paraguariensis* on colon cancer cells. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(8), 1279-1286.
- Pham-Huy, L. A., He, H. and Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*, 4(2), 89-96.
- Pihlanto-Leppälä, A. (2000). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 11(9), 347-356.
- Pokora, M., Eckert, E., Zambrowicz, A., Bobak, Ł., Szottysik, M., Dabrowska, A., Chrzanowska, J., Polanowski, A. and Trziszka, T. (2013). Biological and functional properties of proteolytic enzyme-modified egg protein by-products. *Food Science and Nutrition*, 1(2), 184-195.
- Prohmhirangul, P. (2011). Evaluation of antioxidant activity in Thai herbal beverages and wines. *Maharat Nakhon Ratchasima Hospital Medical Bulletin*, 32(2), 101108.
- Qian, Z. J., Won K. J. and Se K. K. 2008. "Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *rana catesbeiana* shaw." *Bioresource Technology*, 99 (6), 1690-1698.
- Ranathunga, S., Niranjana R. and Se K. K. 2006. "Purification and characterization of antioxidative peptide derived from muscle of conger eel (*Conger Myriaster*)." *European Food Research and Technology*, 222 (3), 310-315.

- Rustad, T. 2003 "Utilisation of marine by-products." *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 2 (4), 458-463.
- Saiga, A., Tanabe, S. and Nishimura, T. (2003). Antioxidant Activity of Peptides Obtained from Porcine Myofibrillar Proteins by Protease Treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (12), 3661–3667.
- Saisavoey, T., Sangtanoo, P., Reamtong, O. and Karnchanatat, A. 2016. "Antioxidant and anti-inflammatory effects of defatted rice bran (*Oryza sativa* L.) protein hydrolysates on raw 264.7 macrophage cells." *Journal of Food Biochemistry*, 40, 731-740.
- Salem, T. A. and Atef M. I. 2011. "Anticancer activity of egyptian marine alga *Ulva Rigida*." *International Journal of Health Sciences*, 5 (2), 6-8.
- Samanthi. 2017. "Difference Between Protease and Peptidase." [Online]. Available : <https://www.differencebetween.com/difference-between-protease-and-vs-peptidase/>
- Samarakoon, K. and You J. J. 2012. "Bio-functionalities of proteins derived from marine algae — a review." *Food Research International*, 48 (2), 948-960.
- Saraste, A. 2000. "Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis." *Cardiovascular Research*, 45(3), 528–537.
- Shackelford, R. E., Kaufmann, W. K. and Paules, R. S. 1999. "Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress." *Environmental Health Perspectives*, 107 (1), 5-24.
- Sharma, B. R. and Rhyu, D. Y. 2014. "Anti-diabetic effects of *Caulerpa lentillifera*: stimulation of insulin secretion in pancreatic β -cells and enhancement of glucose uptake in adipocytes." *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(7), 575–580.
- Sheih, I. C., Tung-Kung Wu and Tony J. Fang. 2009. "Antioxidant Properties of a New Antioxidative Peptide from Algae Protein Waste Hydrolysate in Different Oxidation Systems." *Bioresource Technology*, 100 (13), 3419-3425.
- Sheih, I. C., Fang, T. J., Wu, T.-K. and Lin, P.-H. 2010. "Anticancer and Antioxidant Activities of the Peptide Fraction from Algae Protein Waste." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 1202–1207.

- Siti, Hawa N., Y. Kamisah and J. Kamsiah. 2015. "The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a Review)." *Vascular Pharmacology*, 71, 40-56.
- Stockert, JC., Blázquez-Castro A., Cañete M., Horobin RW., and Villanueva A. 2012. "MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets." *Acta Histochemica*, 114, 785-796
- Stoka, V., Turk, B. and Turk, V. 2005. "Lysosomal cysteine protease: Structural features and their role in apoptosis." *IUBMB Life*, 57, 347-353
- Suetsuna, Kunio. 2000. "Antioxidant peptides from the protease digest of prawn (*Penaeus japonicus*) muscle." *Marine Biotechnology*, 2 (1), 5-10.
- Suttana, W. 2013 "Anticancer of flavonoids: mechanism of actions." *Srinagarind Medical journal*, 28 (4), 567-582.
- Tipgomut, C., Wongprommoon, A., Takeo, E., Ittiudomrak, T., Puthong, S. and Chanchao, C. 2018. "Melittin Induced G1 Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Chago-K1 Human Bronchogenic Carcinoma Cells and Inhibited the Differentiation of THP-1 Cells into Tumour-Associated Macrophage." *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 19, 3427-3434
- Tsujimoto, Y. 1998 "Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis." *Gene to Cells*, 3, 697-707
- Umayaparvathi, S., Meenakshi, S., Vimalraj, V., Arumugam, M., Sivagami, G. and Balasubramanian, T. 2014. "Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostrea cucullata*)." *Biomedicine and Preventive Nutrition*, 4, 343-353.
- Wada, T. and Penninger, J. M. 2004. "Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation". *Oncogene*, 23, 2838-2849.
- Wang, M., Du, Y., Huang, H., Zhu, Z., Du, S., Chen, S. and Yan, Z. 2018. "Silk fibroin peptide suppresses proliferation and induces apoptosis and cell cycle arrest in human lung cancer cells". *Acta Pharmacologica Sinica*.
- Wang, Z. and Zhang, X. 2016. "Inhibitory effects of small molecular peptides from *Spirulina (Arthrospira) platensis* on cancer cell growth." *Journal of Food & function*, 7, 781-788.

- Wang, X. and Zhang, X. 2013. "Separation, antitumor activities, and encapsulation of polypeptide from *Chlorella pyrenoidosa*." *Biotechnology Progress*, 29(3) ,681–687.
- Yang, S., Q. Zhao, H. Xiang, M. Liu, Q. Zhang, W. Xue, B. Song and S. Yang. 2013 "Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of constituents from *Toona Sinensis* on human cancer cells." *Cancer Cell International*, 13 (1), 12.
- Zemke, W. and Ohno, M. 1999. "World seaweed utilisation: an end-of-century summary. " *Journal of Applied Phycology*, 11, 369-376.
- Zhang, Wei-Wei, Xiao-Juan Duan, Hai-Lan Huang, Yi Zhang and Bin-Gui Wang. 2007 "Evaluation of 28 marine algae from the Qingdao coast for antioxidative capacity and determination of antioxidant efficiency and total phenolic content of fractions and subfractions derived from *Symphyocladia Latiuscula* (Rhodomelaceae)." *Journal of Applied Phycology*, 19 (2), 97-108.
- Zhang, Z., Zhang, H. and Peng, T. 2016. "Melittin suppresses cathepsin S-induced invasion and angiogenesis via blocking of the VEGF-A/VEGFR-2/MEK1/ERK1/2 pathway in human hepatocellular carcinoma." *Oncology Letters*, 11, 610-618.
- Zhao, L., Luo, Y.-C., Wang, C.-T. and Ji, B.-P. 2011. "Antioxidant Activity of Protein Hydrolysates from Aqueous Extract of Velvet Antler (*Cervus elaphus*) as Influenced by Molecular Weight and Enzymes." *Natural Product Communications*, 6(11), 1683-1688.
- Zhou, X., Wang, C. and Jiang, A. 2011. "Antioxidant peptides isolated from sea cucumber *Stichopus Japonicus*." *European Food Research and Technology*, 234 (3), 441–447.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

บัฟเฟอร์และสารเคมี

1. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ พีเอช 7.2 (Phosphate buffer saline, PBS) (pH 7.2)

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2.721	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	3.483	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.766	กรัม
โซเดียมเอไซด์ (N_3Na)	0.065	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

เตรียม PBS โดยละลายสารทุกตัวในน้ำกลั่น ปรับพีเอชให้ได้ 7.2 ด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) และปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2. การเตรียมสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยาของ Bradford

2.1 Bradford stock solution ประกอบด้วย

เอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ (v/v)	100	มิลลิลิตร
กรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 88 เปอร์เซ็นต์ (v/v)	200	มิลลิลิตร
สี SERVA Blue G	350	กรัม

2.2 สารละลายสำหรับทำปฏิกิริยาของ Bradford ประกอบด้วย

น้ำกลั่น	85	มิลลิลิตร
เอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ (v/v)	3	มิลลิลิตร
กรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 88 เปอร์เซ็นต์ (v/v)	6	มิลลิลิตร
Bradford stock solution	6	มิลลิลิตร

3. สารละลาย 2,2-ไดฟีนิล-1-ไพคริลไฮดราซิล (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ประกอบด้วย

2,2-ไดฟีนิล-1-ไพคริลไฮดราซิล (DPPH)	0.004	กรัม
เมทานอล (CH_3OH)	100	มิลลิลิตร

4. การเตรียมสารละลายอนุโมลิสระของ 2,2'-อะซิโน-บิส(3-เอทิลเบนโซไทอะโซลีน-6-ซัลโฟนิคแอซิด (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid, ABTS)

4.1) เตรียมสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ (สารละลาย A) โดยละลาย ABTS 0.096 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร

4.2) เตรียมสารละลายโพแทสเซียมเพอซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) (สารละลาย B) โดยละลาย $K_2S_2O_8$ 0.016 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร

4.3) สารละลายอนุโมลิสระ ABTS เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ สารละลาย B บ่มในที่มืดเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนนำสารละลายอนุโมลิสระ ABTS ไปใช้ ต้องนำไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เท่ากับ 0.7 ± 0.02

5. การเตรียมสารละลายของเอนไซม์ทริปซินความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) ที่มี EDTA 0.02 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร)

5.1) เตรียมโดยการใช้ Trypsin-EDTA stock solution 10X (Sigma-Aldrich, USA) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ ปริมาตร 45 มิลลิลิตร

5.2) ปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 7.2-7.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ หรือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์

5.3) ปรับปริมาตรสุทธิให้ได้ 50 มิลลิลิตรด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์

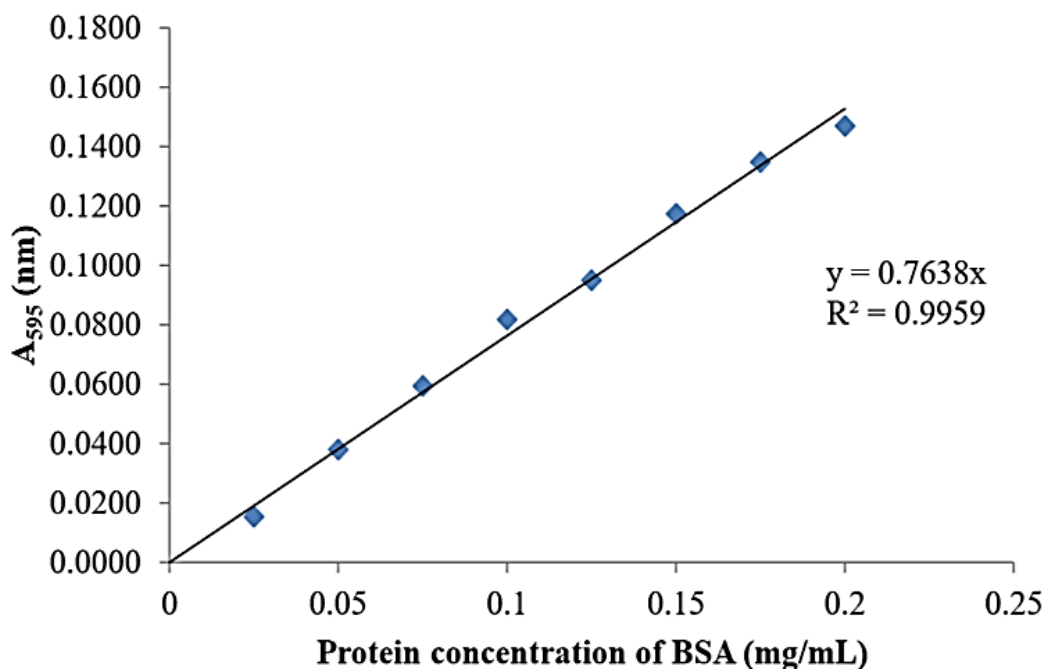
6. การเตรียมสารละลาย 3-(4,5-ไดเมทิล-2-ไทอะโซลิล)-2,5-ไดฟีนิล-เตตระโซเลียมโบรไมด์ (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

6.1) ชั่งสาร MTT (Sigma-Aldrich, USA) 50 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ละลายสาร MTT ให้หมด

6.2) ปรับปริมาตรสุทธิให้ได้ 10 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

การทำกราฟมาตรฐานของโบรินเซรัมอัลบูมินเพื่อใช้ในการคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนในไฮโดรไลเซตตามวิธีการของ Bradford 1976



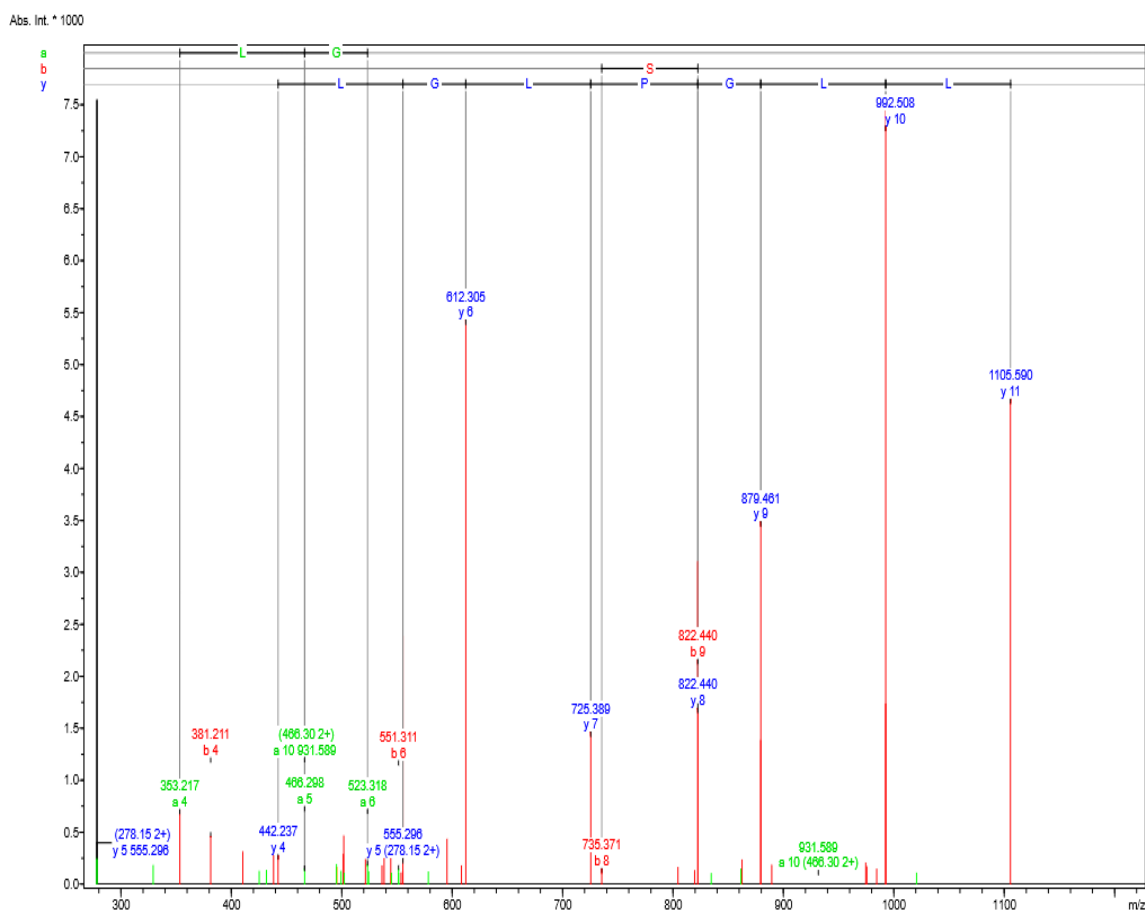
รูป ข 1 กราฟมาตรฐานของความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโบรินเซรัมอัลบูมินกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์แมสเปกตรัมและการจัดเรียงลำดับกรดอะมิโน

ลำดับกรดอะมิโนของ F1 เส้นที่ 1: LLGPLGLASHK

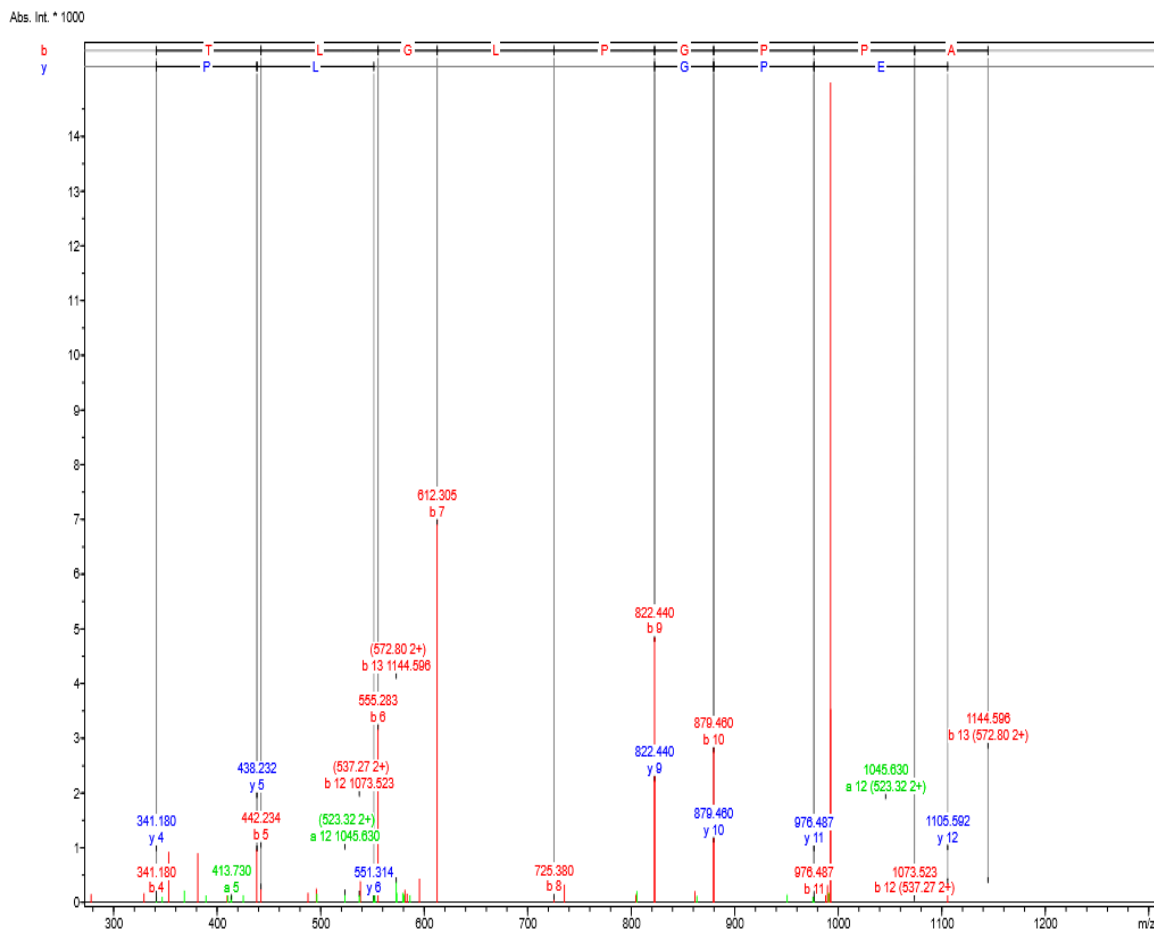
Parentmass:	1105.591	Mass Error:	-0.082
MH+ (mono):	1105.673	MH+ (avg):	1106.341
Threshold (a.i.):	0.000	Tolerance (Da):	0.500
Number of Peaks:	51	Above Threshold:	51
Assigned Peaks:	15	Not assigned Peaks:	36



รูป ค 1 แมสสเปกตรัมของ F1 chromatographic fraction เส้นที่ 1 ที่มีค่ามวลต่อประจุ (m/z) ตั้งแต่ 300 ถึง 1500 ที่นำไปเปรียบเทียบกับค่า m/z ที่มีในฐานข้อมูล MASCOT ได้เป็นลำดับกรดอะมิโน LLGPLGLASHK

ลำดับกรดอะมิโนของ F1 เส้นที่ 3: GEPGTLGLPGPPA

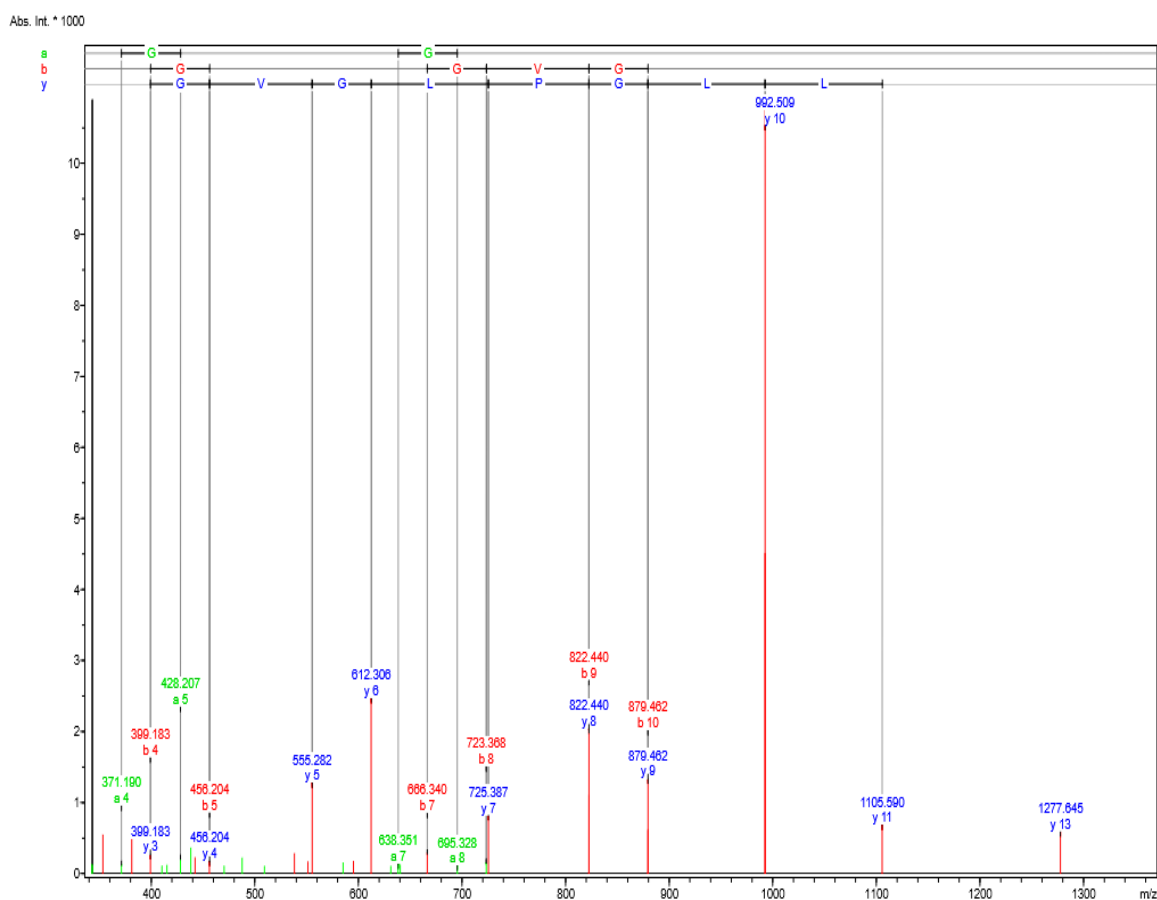
Parentmass:	1162.612	Mass Error:	0.001
MH+ (mono):	1162.611	MH+ (avg):	1163.303
Threshold (a.i.):	0.000	Tolerance (Da):	0.500
Number of Peaks:	58	Above Threshold:	58
Assigned Peaks:	17	Not assigned Peaks:	41



รูป ค 3 แมสสเปกตรัมของ F1 chromatographic fraction เส้นที่ 3 ที่มีค่ามวลต่อประจุ (m/z) ตั้งแต่ 300 ถึง 1500 ที่นำไปเปรียบเทียบกับค่า m/z ที่มีในฐานข้อมูล MASCOT ได้เป็นลำดับกรดอะมิโน GEPGTLGLPGPPA

ลำดับกรดอะมิโนของ F1 เส้นที่ 4: DGLLGPLGVGHDK

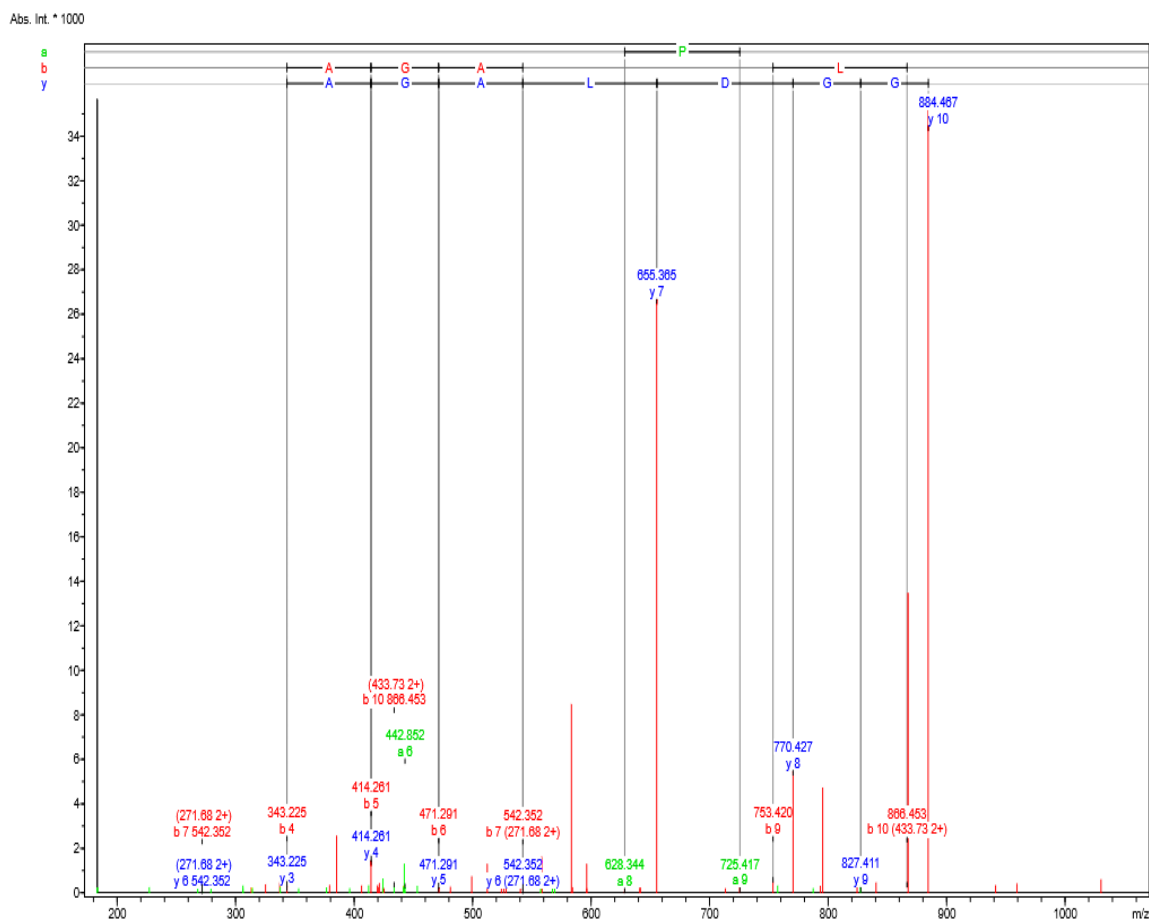
Parentmass:	1277.640	Mass Error:	-0.045
MH+ (mono):	1277.685	MH+ (avg):	1278.437
Threshold (a.i.):	0.000	Tolerance (Da):	0.500
Number of Peaks:	35	Above Threshold:	35
Assigned Peaks:	16	Not assigned Peaks:	19



รูป ค 4 แมสสเปกตรัมของ F1 chromatographic fraction เส้นที่ 4 ที่มีค่ามวลต่อประจุ (m/z) ตั้งแต่ 300 ถึง 1500 ที่นำไปเปรียบเทียบกับค่า m/z ที่มีในฐานข้อมูล MASCOT ได้เป็นลำดับกรดอะมิโน DGLLGPLGVGHDK

ลำดับกรดอะมิโนของ F6 เส้นที่ 5: GGDLAGANPL

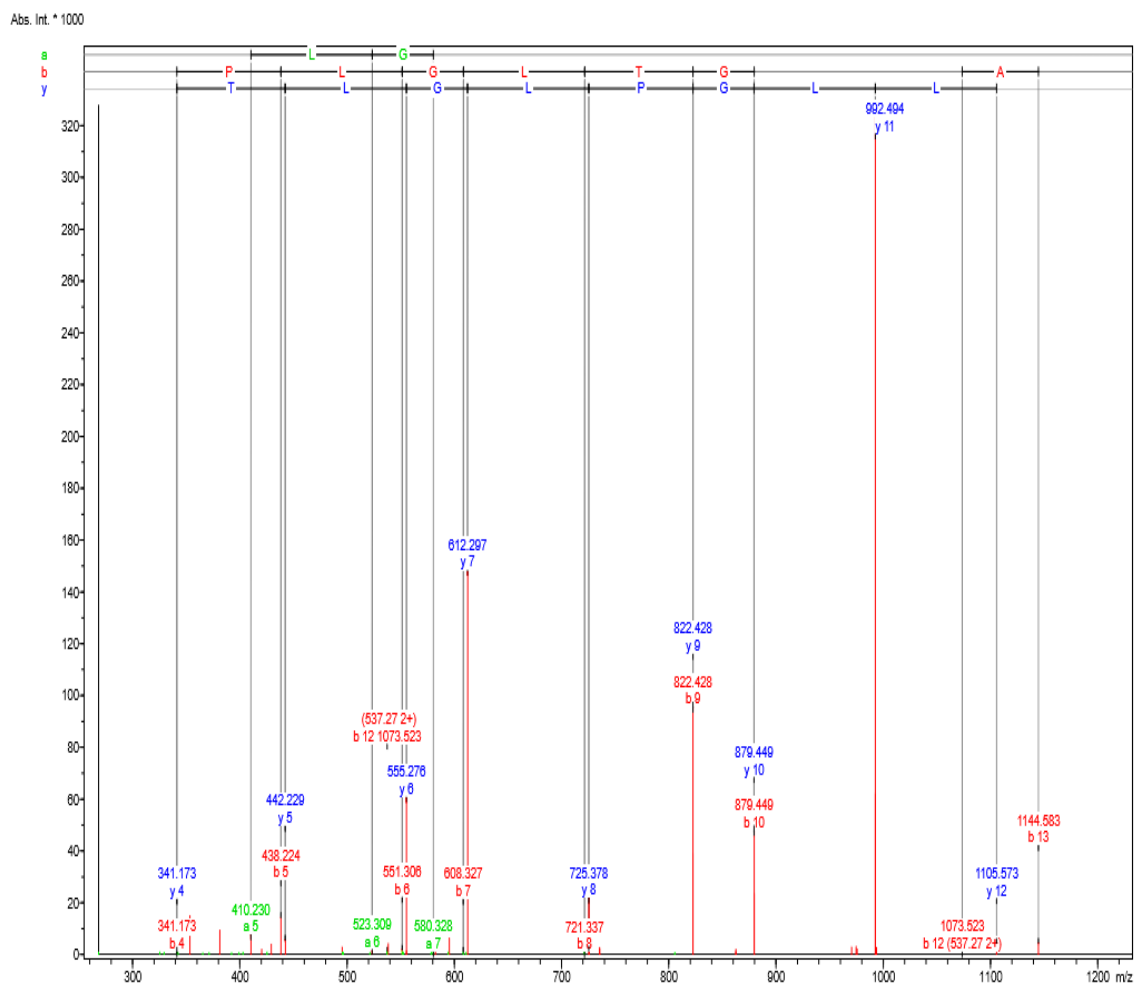
Parentmass:	884.469	Mass Error:	0.021
MH+ (mono):	884.448	MH+ (avg):	884.955
Threshold (a.i.):	0.000	Tolerance (Da):	0.500
Number of Peaks:	71	Above Threshold:	71
Assigned Peaks:	13	Not assigned Peaks:	58



รูป ค 5 แมสสเปกตรัมของ F6 chromatographic fraction เส้นที่ 5 ที่มีค่ามวลต่อประจุ (m/z) ตั้งแต่ 300 ถึง 1500 ที่นำไปเปรียบเทียบกับค่า m/z ที่มีในฐานข้อมูล MASCOT ได้เป็นลำดับกรดอะมิโน GGDLAGANPL

ลำดับกรดอะมิโนของ F6 เส้นที่ 6: GLLGPLGLTGHGA

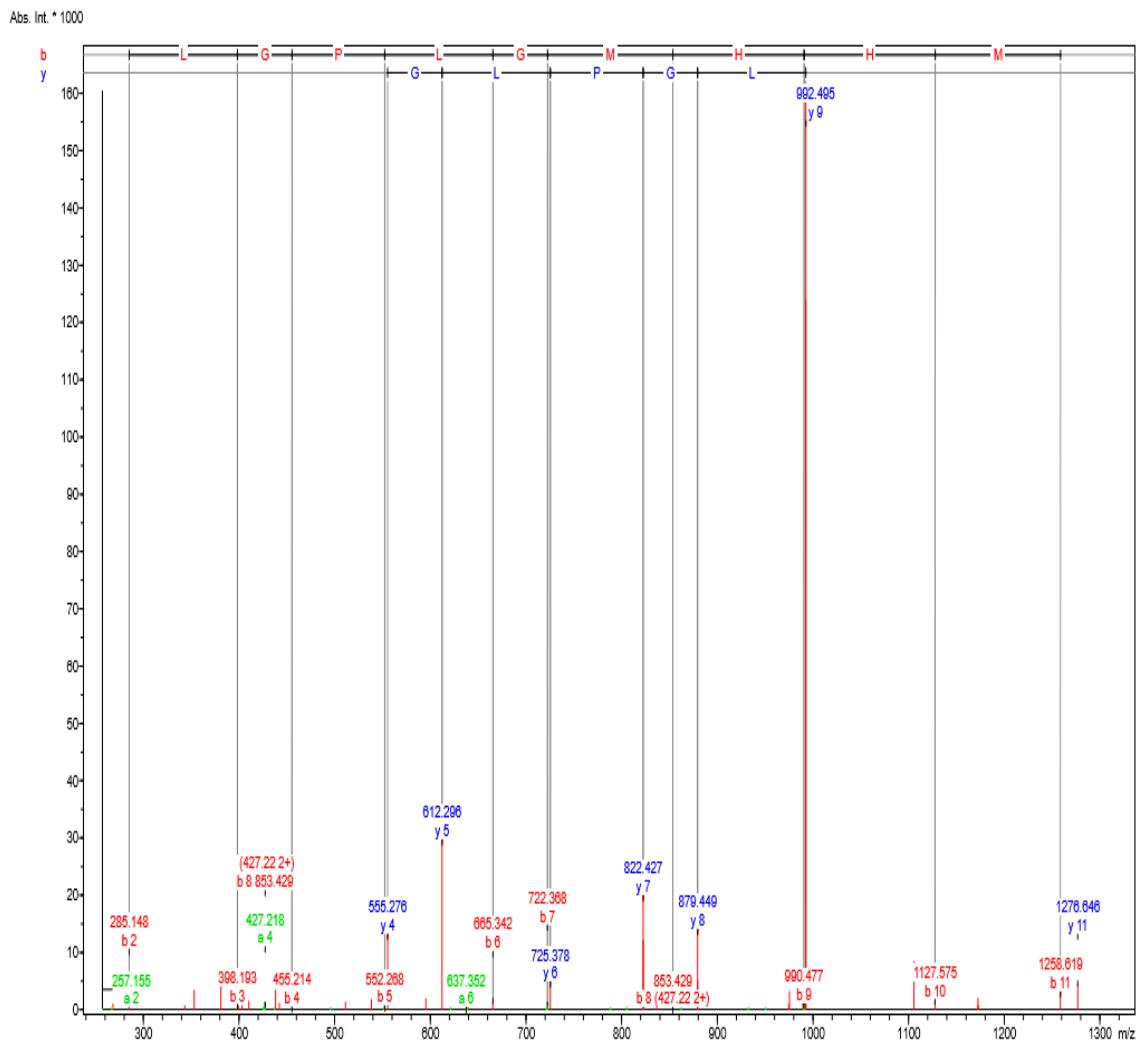
Parentmass:	1162.601	Mass Error:	-0.057
MH+ (mono):	1162.658	MH+ (avg):	1163.349
Threshold (a.i.):	0.000	Tolerance (Da):	0.500
Number of Peaks:	59	Above Threshold:	59
Assigned Peaks:	18	Not assigned Peaks:	41



รูป ค 6 แมสสเปกตรัมของ F6 chromatographic fraction เส้นที่ 6 ที่มีค่ามวลต่อประจุ (m/z) ตั้งแต่ 300 ถึง 1500 ที่นำไปเปรียบเทียบกับค่า m/z ที่มีในฐานข้อมูล MASCOT ได้เป็นลำดับกรดอะมิโน GLLGPLGLTGHGA

ลำดับกรดอะมิโนของ F6 เส้นที่ 7: RKLGPLGMHHM

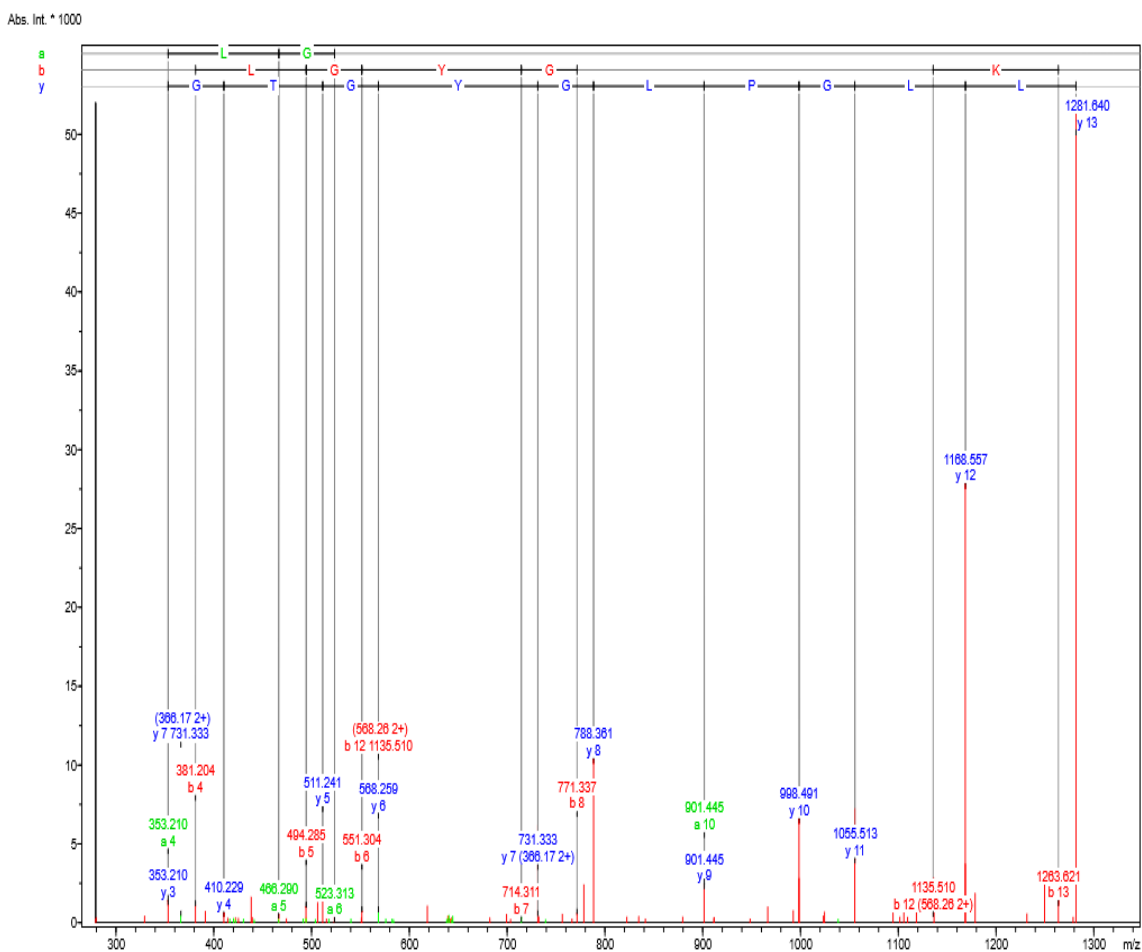
Parentmass:	1276.641	Mass Error:	-0.036
MH+ (mono):	1276.677	MH+ (avg):	1277.590
Threshold (a.i.):	0.000	Tolerance (Da):	0.500
Number of Peaks:	62	Above Threshold:	62
Assigned Peaks:	20	Not assigned Peaks:	42



รูป ค 7 แมสสเปกตรัมของ F6 chromatographic fraction เส้นที่ 7 ที่มีค่ามวลต่อประจุ (m/z) ตั้งแต่ 300 ถึง 1500 ที่นำไปเปรียบเทียบกับค่า m/z ที่มีในฐานข้อมูล MASCOT ได้เป็นลำดับกรดอะมิโน RKLGPLGMHHM

ลำดับกรดอะมิโนของ F6 เส้นที่ 8: LLGPLGYGTGCK

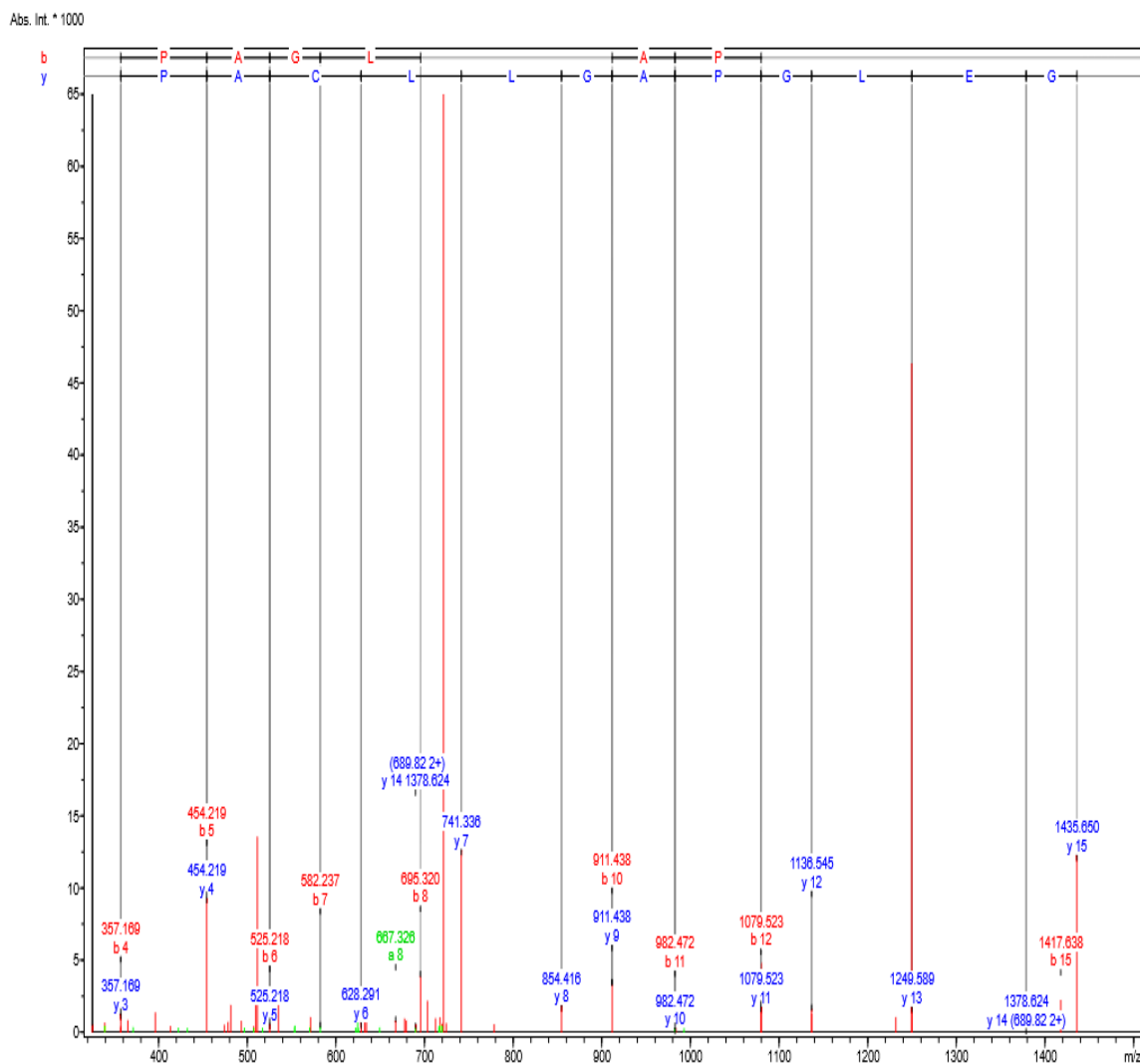
Parentmass:	1281.643	Mass Error:	0.009
MH+ (mono):	1281.634	MH+ (avg):	1282.557
Threshold (a.i.):	0.000	Tolerance (Da):	0.500
Number of Peaks:	90	Above Threshold:	90
Assigned Peaks:	20	Not assigned Peaks:	70



รูป ค 8 แมสสเปกตรัมของ F6 chromatographic fraction เส้นที่ 8 ที่มีค่ามวลต่อประจุ (m/z) ตั้งแต่ 300 ถึง 1500 ที่นำไปเปรียบเทียบกับค่า m/z ที่มีในฐานข้อมูล MASCOT ได้เป็นลำดับกรดอะมิโน LLGPLGYGTGCK

ลำดับกรดอะมิโนของ F6 เส้นที่ 9: GELGPAGLLCAPNSH

Parentmass:	1435.654	Mass Error:	-0.046
MH+ (mono):	1435.700	MH+ (avg):	1436.617
Threshold (a.i.):	0.000	Tolerance (Da):	0.500
Number of Peaks:	72	Above Threshold:	72
Assigned Peaks:	17	Not assigned Peaks:	55



รูป ค 9 แมสสเปกตรัมของ F6 chromatographic fraction เส้นที่ 8 ที่มีค่ามวลต่อประจุ (m/z) ตั้งแต่ 300 ถึง 1500 ที่นำไปเปรียบเทียบกับค่า m/z ที่มีในฐานข้อมูล MASCOT ได้เป็นลำดับกรดอะมิโน GELGPAGLLCAPNSH

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายรชานนท์ มั่นกิจ
วัน เดือน ปีเกิด	6 กุมภาพันธ์ 2537
ที่อยู่ปัจจุบัน	653/11 ซอยฉลองกรุง 1 ถนนฉลองกรุง ลาดกระบัง กทม. 10520
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม เกردเฉลี่ย 3.37 เกียรตินิยมอันดับ 2 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ เกรดเฉลี่ย 3.81
ชื่อสถานศึกษา	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนเครือเจริญโภคภัณฑ์ (CP) และ ทุนอุดหนุนการศึกษาคณะวิทยาศาสตร์
ผลงานทางวิชาการ	Mankit, R., Phunpruch, S., Saisavoey, T. and Kanchanatat, A. 2018. "Free radical scavenging and anti-proliferative activities of protein hydrolysate from sea grapes (<i>Caulerpa lentilifera</i>). In Proceeding of 20 TH Food Innovation Asia Conference 2018 (FIAC 2018). Bangkok: Bangkok International Trade & Exhibition Centre (Bitec Bangna). 14-16 June 2018. 122-129.