สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5
วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

เมแทบอไลต์ของ *Streptomyces* spp. 2 ไอโซเลต จากทั้งหมด 178 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดิน จากอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน (Punkum, 2007) พบว่ามีความสามารถในการต้านการอักเสบ แมโครฟาจ RAW 264.7 cell line โดยการวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ตามปฏิกิริยาของ Giress's เพื่อหาความสามารถในการต้านการอักเสบและทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay พบว่า *Streptomyces* sp. D230704 และ *Streptomyces* sp. O245704 สามารถกดการผลิตไนตริกออกไซด์และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และเนื่องจาก *Streptomyces* spp. 2 ไอโซเลตนี้ยังไม่ได้มีการพิสูจน์เอกลักษณ์ถึงสายพันธุ์ จึงทำการศึกษาถึงสายพันธุ์ของ *Streptomyces* spp. โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA จากข้อมูลดังกล่าวจึงสามารถจำแนกได้ว่า *Streptomyces* sp. D230704 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Streptomyces lanatus* ที่ความคล้ายคลึงกัน 99% และ *Streptomyces* sp. O245704 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Streptomyces yokosukanensis* ที่ความคล้ายคลึงกัน 100% นอกจากนี้ยังได้ทำการคัดแยกสารเมแทบอไลต์ของ *Streptomyces* spp. ทั้ง 2 ไอโซเลตนี้ โดยเพิ่มปริมาณการเลี้ยงเชื้อของ *Streptomyces* spp. เป็น 20 ลิตร เพื่อทำให้สารที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบและไม่เป็นพิษต่อเซลล์บริสุทธิ์ จากการคัดแยกสารพบว่าเมแทบอไลต์จาก *Streptomyces* sp. D230704 ส่วนใหญ่เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย ^{1}H NMR พบว่าจะเป็นสารกลุ่มสารที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมต่อกันเป็นสายยาว (long carbon chain) จึงคาดว่าจะเป็นสารในกลุ่มของน้ำมันหอมระเหย (essential oil) ซึ่งเป็นสารที่มีความเสถียรค่อนข้างต่ำพวกน้ำมันหอมระเหย มีรายงานว่าสารกลุ่มน้ำมันหอมระเหยที่คัดแยกได้จาก *Casearia sylvestris* มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ (Esteves et al., 2005) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงสารสกัดจากชา (tea tree oil) ที่ได้ปรับเปลี่ยนโครสร้างให้สามารถละลายน้ำได้ มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ (Hart et al., 2000) จะเห็นได้ว่าสารกลุ่มนี้ความเสถียรค่อนข้างต่ำ ละลายน้ำได้ไม่ดีจึงไม่น่าสนใจที่จะนำไปศึกษาต่อ และได้นำ *Streptomyces* sp. O245704 มาคัดแยกสาร โดยทำการเพิ่มปริมาณการผลิตเมแทบอไลต์เป็น 20 ลิตร เช่นกัน พบว่าสามารถแยกสารที่บริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการต้านการอักเสบและไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบ เพื่อเป็นบ่งชี้ชนิดและการวิเคราะห์โครงสร้างของสาร จึงนำสารไปวิเคราะห์ด้วยวิธี ^{1}H NMR และ MALDI-TOF mass spectrometry สามารถวิเคราะห์โครงสร้างของสารได้ว่าสารบริสุทธิ์ที่แยกได้คือ dihydroeponemycin มีลักษณะทั่วไปเป็นผงสีแดงเข้ม ละลายได้ดีในสารละลาย DMSO สูตรโครงสร้าง คือ $C_{20}H_{36}N_2O_6$ และมวลโมเลกุล 400.51 และมีการศึกษาว่าสาร dihydroeponemycin เป็นสารที่จัดเป็นพวก proteasome inhibitor ซึ่ง proteasome เป็นกลไก

สำคัญในการกำจัดโปรตีนที่ไม่ต้องการหรือโปรตีนที่เกิดการเสียหายภายในเซลล์ การทำงานของ proteasome inhibitor คือเมื่อมีโปรตีนที่จะถูกกำจัดทิ้ง จะมีการเติมติดฉลากเพื่อให้ proteasome รับรู้ เช่น Ubiquitin กับโปรตีนเหล่านั้น จากนั้น proteasome จะนำโปรตีนที่ถูกติดฉลากเข้าไปในโมเลกุลและย่อยสลายโปรตีนเหล่านั้นออกมา (Qureshi et al., 2005) มีรายงานถึงการทำงานของ proteasome inhibitor ที่มีผลเกี่ยวข้องกับการต้านการอักเสบ โดยศึกษา proteasome inhibitor ที่ชื่อว่า MLN519 พบว่า MLN519 มีผลต่อวิธีสัญญาณ NF-κB นอกจากนี้ยังมีผลทำให้การแสดงออกของไซโตไคน์ที่เกี่ยวกับการอักเสบ (IL-1β, IL-6 และ TNF-α) ลดลง (Williams et al., 2006) ก่อนหน้านี้มีการศึกษาถึงความสามารถของสาร dihydroeponemycin กับเซลล์มะเร็ง พบว่าสาร dihydroeponemycin ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาและส่งเสริมการเกิด apoptosis ของเซลล์ (Meng et al., 1999)

เพื่อเป็นการยืนยันความสามารถของสารในการต้านการอักเสบ จึงนำสาร dihydroeponemycin ไปทดสอบการต้านการอักเสบและความเป็นพิษต่อเซลล์ในเซลล์แมโครฟาจ RAW 264.7 พบว่าสาร dihydroeponemycin มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบโดยมีค่า IC50 ของเปอร์เซ็นต์ในการการยับยั้งการผลิตไนตรกออกไซด์ที่ความเข้มข้น 79.40±4.5 ไมโครโมลาร์ และมีค่า IC50 ของเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์ >100 ไมโครโมลาร์ เมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ก็พบว่าลักษณะทางสัญฐานวิทยาของเซลล์ทดสอบมีลักษณะปกติเช่นเดียวกับเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น จึงเป็นการยืนยันได้ว่าสารมีความเป็นพิษต่อเซลล์ค่อนข้างต่ำ แม้จะในการทดสอบที่ความเข้มข้นของสารสูงๆ

อย่างไรก็ตามงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ dihydroeponemycin ยังไม่มีการศึกษาถึงกลไกการทำงานในระดับโมเลกุล เพื่อเป็นการเข้าใจถึงกลไกการทำงานของ dihydroeponemycin จึงทำการศึกษาถึงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ ยีน *iNOS* ซึ่งเป็นยีนที่ถอดรหัสของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไนตริก ออกไซด์ ซึ่งเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบ (Nussler and Billiar, 1993) พบว่าสารสามารถกดการแสดงออกของ iNOS ในระดับยีนและในระดับโปรตีน และได้ทำการศึกษาถึงผลของสาร dihydroeponemycin ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ proinflammatory cytokine พบว่าสาร dihydroeponemycin สามารถกดการแสดงออกของยีน *IL-6* แต่ไม่มีฤทธิ์ต่อการแสดงออกของยีน *TNFα*

นอกจากนี้ยังศึกษาถึงกลไกของสาร dihydroeponemycin ต่อวิถีสัญญาณ NF-κB โดยพบว่าสาร dihydroeponemycin มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตของโปรตีน IκBα และ p65 ในแมโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ IFN-γ ศึกษาถึงกลไกของสาร dihydroeponemycin ต่อวิถีสัญญาณ MAPK โดยมีฤทธิ์กดการเติมหมู่ฟอสเฟตของโปรตีน SAPK/JNK และเหนี่ยวนำ

การเติมหมู่ฟอสเฟตของโปรตีน ERK1/2 ในแมโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ IFN-γ จากผลการทดลองจึงเป็นการยืนยันฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ เนื่องจากสาร dihydroeponemycin มีฤทธิ์ในการกดการเติมหมู่ฟอสเฟตของโปรตีน SAPK/JNK ในวิธีสัญญาณ MAPK ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น transcription factor ที่สำคัญของ promoter ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (Huang et al., 2010) จากผลการทดลองที่ได้คาดว่าจะมีประโยชน์ที่จะใช้เป็นข้อมูลเพื่อการศึกษาที่มีประโยชน์ในอนาคต