



## 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การอักเสบคือกลไกการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ในบริเวณที่เนื้อเยื่อหรืออวัยวะถูกสิ่งเร้าภายนอกเข้ามาทำให้เกิดอันตราย เช่น การติดเชื้อแบคทีเรีย ความระคายเคืองจากสารเคมี การได้รับสารก่อภูมิแพ้ การได้รับบาดเจ็บจากอุบัติเหตุ สัญญาณที่บ่งบอกถึงอาการของการอักเสบแบบเฉียบพลัน ได้แก่ อาการปวด บวม ร้อน แดง และการสูญเสียการทำงานของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่เกิดการอักเสบ อาการเหล่านี้เป็นการเปลี่ยนแปลงเนื่องมาจากการทำงานของหลอดเลือดบริเวณที่เกิดการอักเสบขยายตัวและมีการเพิ่มการซึมผ่านของสารน้ำที่ประกอบไปด้วยสารสื่อกลาง (chemical mediators) และเม็ดเลือดขาว ในบริเวณที่เกิดการอักเสบเพื่อทำหน้าที่กำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาทำลายและเป็นสาเหตุให้เกิดการอักเสบขึ้น นอกจากนี้สารและเม็ดเลือดต่างๆ เหล่านี้ยังไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ การแสดงออกของยีน inducible nitric oxide synthase (*iNOS*) ในแมโครฟาจ (macrophage) และ pro-inflammatory cytokine อย่างเช่น interleukin-1 (*IL-1*), interleukin-6 (*IL-6*) และ tumor necrosis factor alpha (*TNF- $\alpha$* ) (Feghali and Wright, 1997) ยีนเหล่านี้ถูกชักนำได้โดย pathogen associated molecular patterns (PAMP) เช่น lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ (Tobian et al., 2003) และ cytokine บางชนิด เช่น interferon gamma (*IFN- $\gamma$* ) โดยกระตุ้นผ่านทาง Toll like receptor 4 (TLR4) TLR4 ซึ่งเป็นตัวรับอยู่บนผิวเซลล์ของแมโครฟาจ ซึ่งจะรับรู้ส่วนประกอบของของแบคทีเรียได้ จากการที่มีการแสดงออกของยีน *iNOS* เป็นผลให้มีการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide; NO) ขึ้นจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) ไนตริกออกไซด์เป็นก๊าซที่สามารถละลายน้ำมีบทบาทในการเพิ่มการขยายตัวของหลอดเลือด การจับกันของเกล็ดเลือด มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ นอกจากนี้การผลิตไนตริกออกไซด์ในปริมาณสูงอาจนำไปสู่สภาวะของการอักเสบแบบเรื้อรังได้ และอาจส่งผลให้อาการติดเชื้อรุนแรงขึ้น การอักเสบแบบเรื้อรังเป็นสาเหตุหลักของการเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันต่างๆ อย่างเช่น โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) โรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว (atherosclerosis) และโรคมะเร็ง (cancer)

ในการรักษาอาการอักเสบ ปัจจุบันมักมีการใช้ยาในกลุ่ม non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) NSAIDs เป็นกลุ่มยาที่ออกฤทธิ์โดยตรงต่อเอนไซม์ cyclooxygenase (COX) COX ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีอยู่ 2 ไอโซฟอร์ม คือ COX-1 และ COX-2 ไอโซฟอร์ม COX-1 ทำหน้าที่ใน

ระบบทั่วไปของร่างกาย เช่น ควบคุมการสร้างเยื่อเมือกในกระเพาะอาหาร ควบคุมการไหลเวียนเลือดของไต และมีผลต่อการจับกันของเกล็ดเลือด สำหรับ COX-2 เป็นไอโซฟอร์มที่มีบทบาทสำคัญในการบวนการอักเสบ เนื่องจากเมื่อเกิดการอักเสบ pro-inflammatory cytokine จะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ COX-2 ที่มีหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงกรด arachidonic ให้เป็น prostaglandin ซึ่งจะเป็ตัวที่ส่งเสริมให้เกิดการอักเสบเพิ่มมากยิ่งขึ้น แต่เนื่องจากยา NSAIDs ออกฤทธิ์แบบไม่จำเพาะต่อเอนไซม์ COX (Nonselective COX inhibitor) ทำให้ส่งผลถึงการทำงานของเอนไซม์ COX-1 ซึ่งพบว่าผู้ป่วยที่ได้รับการรักษานี้มีผลข้างเคียงค่อนข้างรุนแรงต่อระบบทางเดินอาหาร จนอาจเกิดแผลในกระเพาะอาหาร (Laan et al., 2007) และมีผลต่อไตอาจทำให้เกิดภาวะไตวายได้ จึงมีการพัฒนาตัวยาให้เกิดผลอันไม่พึงประสงค์นี้ให้ลดลงเหลือน้อยที่สุดหรือไม่มีเลย อย่างไรก็ตามแม้จะมีการพัฒนายาให้ออกฤทธิ์แบบจำเพาะต่อไอโซฟอร์ม COX-2 เท่านั้น ก็ยังมีการตรวจพบว่ายายังมีผลกระทบต่อผู้ป่วยอยู่บ้าง จึงเป็นเหตุผลที่มีการพัฒนายาต้านการอักเสบกันอย่างต่อเนื่อง ร่วมกับการศึกษาตัวใหม่ที่ไม่มืผลข้างเคียงดังกล่าวนี้

*Streptomyces* เป็นสมาชิกหนึ่งในกลุ่ม Actinomycetes จัดอยู่ใน Order Actinobacteria ใน Class Actinobacteria *Streptomyces* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เจริญได้ในภาวะที่มีออกซิเจน เป็นแบคทีเรียที่มีการสร้างโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นสายใยและสปอร์คล้ายกับรา บางสายพันธุ์สายใยและสปอร์มีสารรงควัตถุที่ให้สีต่างๆ สามารถพบ *Streptomyces* มากจากตัวอย่างดิน โดยมีรายงานว่า Actinomycetes เป็นแบคทีเรียหลักที่ใช้ในการศึกษาถึงสารด้านการเจริญของแบคทีเรีย เนื่องจากสารด้านการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นสารสกัดที่ได้จากสารเมแทบอลิต์ของแบคทีเรียกลุ่มนี้ และ *Streptomyces* ก็เป็นตัวหลักที่มีการศึกษาและค้นพบสารที่มีประโยชน์ที่หลากหลายมากที่สุดทั้งทางการแพทย์ ทางอุตสาหกรรม รวมไปถึงทางการเกษตรกรรม เช่น ยาปฏิชีวนะ สารด้านการเจริญของรา สารด้านการเจริญของปรสิต และสารด้านการเจริญของแมลง

สำหรับการศึกษาถึงสารด้านการอักเสบนั้นพบว่าปี 2006 Pereira และคณะ ได้ศึกษาสารที่มีชื่อว่า tacrolimus ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะชนิดหนึ่งและเป็นสารที่สกัดได้จาก *Streptomyces tsukubaensis* โดยทำการศึกษาในหนูที่เหนียวนำไปเป็นโรคเชื้อหุ่มปอดอักเสบ ทำการรักษาด้วยสาร tacrolimus เปรียบเทียบกับยาต้านการอักเสบในกลุ่มสเตียรอยด์ dexamethasone พบว่าสาร tacrolimus สามารถลดการแสดงออกของ proinflammatory cytokine (Pereira et al., 2006) และในปี 2007 Taechowisan และคณะ ได้ทำการคัดแยก endophytic *Streptomyces* spp. จากจังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย พบว่า *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 สามารถผลิตสารใหม่ 4 ชนิด ได้แก่ lansai A-D โดยการทดสอบกับเซลล์ไลน์แมโครฟาจ RAW 264.7 (Taechowisan et al., 2007)

ในการศึกษาก่อนหน้านี้ Pankum ได้ทำการคัดกรอง *Streptomyces* spp. จากตัวอย่างดินจากอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน และทำการจัดกลุ่ม *Streptomyces* spp. 178 ไอโซเลตโดยอาศัยสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมี ร่วมกับการใช้เทคนิคลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP) ของบริเวณ 16S-ITS ด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดคือ *HaeIII* และ *BstUI* และนำมาหาความสัมพันธ์โดยการสร้าง phylogenetic tree สามารถแบ่งกลุ่ม *Streptomyces* spp. ได้ 14 กลุ่ม จากนั้นได้ทำการคัดกรองความสามารถในการต้านการอักเสบจากสารเมตาบอไลต์สกัดจาก *Streptomyces* spp. เหล่านั้น โดยทำการศึกษาในเซลล์ไลน์แมโครฟาจ RAW 264.7 พบว่ามีอยู่ 2 ไอโซเลตได้แก่ *Streptomyces* sp. D230704 และ *Streptomyces* sp. O245704 ที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบและมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ นอกจากนี้ *Streptomyces* spp. ทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ยังผลิตสารต้านการเจริญของยีสต์ *Candida albican* ด้วย (Pankum, 2007) ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาลักษณะสมบัติของสารบริสุทธิ์ที่สกัดจาก *Streptomyces* spp. ทั้ง 2 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการต้านการอักเสบ รวมไปถึงกลไกการทำงานของสารบริสุทธิ์ในระดับโมเลกุลต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ผลที่คาดว่าจะได้จากการศึกษานี้อาจนำไปสู่การค้นพบยาตัวใหม่หรือนำไปพัฒนายาที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อคัดกรองและทำให้สารออกฤทธิ์ชีวภาพจากเมแทบอไลต์ของ *Streptomyces* spp. สายพันธุ์ D230704 หรือ O245704 บริสุทธิ์และศึกษาฤทธิ์ในการต้านการอักเสบในระดับโมเลกุล

## 1.3 ขอบเขตและวิธีการดำเนินการวิจัย

1. พิสูจน์เอกลักษณ์ของ *Streptomyces* spp. ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA
2. ทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Streptomyces* spp. ที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ
3. ทำให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพบริสุทธิ์โดยวิธีทางเคมี
4. ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ที่คัดกรองได้โดยดูการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบชนิดใหม่หรือทราบถึงกลไกของสารที่คัดกรองได้ เพื่อนำไปพัฒนาเป็นยาต้านการอักเสบที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น