บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคความเสื่อมของระบบประสาท (Neurodegennerative disease) คือ โรคที่มีการทำลายเซลล์ประสาทในสมอง ทำให้สมองส่วนที่มีการตายของเซลล์ประสาทสูญเสียโครงสร้างและหน้าที่การทำงาน ปริมาณของสมองจะค่อยๆ ฝ่อเล็กลง โรคความเสื่อมของระบบประสาทกลุ่มที่รู้จักกันดีได้แก่ อัลไซเมอร์ และพาร์กินสันโดยที่โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease: AD) จะมีการทำลายของเซลล์ประสาทในส่วนที่ทำหน้าที่จดจำ การเรียนรู้ ทำให้มีภาวะสมองเสื่อมตามมาและส่งผลกระทบต่อกิจวัตรประจำวันของผู้ป่วย ส่วนโรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease: PD) จะมีการทำลายเซลล์ประสาทในบริเวณที่ควบคุมการเคลื่อนไหว ทำให้แสดงอาการสั่น ไม่สามารถควบคุมการทำงานของกล้ามเนื้อได้ ซึ่งเป็นโรคในกลุ่มที่รักษาไม่หายขาดแต่สามารถชะลออาการเอาไว้ได้ในปัจจุบันพบว่าประเทศไทยมีประชากรผู้สูงอายุร้อยละ 10 จากประชากรทั้งประเทศ 6 ล้านคน มีภาวะสมองเสื่อมจำนวน 6 แสนคน สาเหตุของโรคสมองเสื่อมมีได้หลายสาเหตุด้วยกัน และหนึ่งในสาเหตุที่สำคัญคือสารกำจัดศัตรูพืชและสารเคมีอื่นๆ เนื่องจากการได้รับสารเคมีเหล่านี้ก่อให้เกิดปัญหาสุขภาพ เช่น เกิดอาการแพ้ที่ผิวหนังทำให้เกิดผดผื่น อาการวิงเวียนและอาการเหล่านั้นไม่ได้แสดงให้เห็นทันที หากได้รับสารพิษสะสมเป็นเวลานานจะเป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดความผิดปกติทางสมอง โดยเฉพาะสาร paraquat ซึ่งใช้เป็นส่วนผสมของยากำจัดศัตรูพืชจัดเป็นสารเคมีที่อันตรายที่หลายๆ ประเทศห้ามผลิตเนื่องจากก่อให้เกิดอันตรายแก่ชีวิตและเป็นพิษสะสมเป็นอันตรายต่อระบบประสาทเป็นสาเหตุของโรคอัลไซเมอร์ และพาร์กินสันเพิ่มมากขึ้นในผู้สูงอายุ การเกิด amyloid plaques เป็นพยาธิสภาพสำคัญอย่างหนึ่งของโรคอัลไซเมอร์ การสะสมของ amyloid-beta (Aβ) เป็นองค์ประกอบหลักของ amyloid plaquesโดย amyloid plaques ที่เกิดขึ้นนั้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทโดยจะทำลายสมดุลไอออน (Pollard, et al., 1993) ทำให้เกิดการหลั่ง Reactive Oxygen Species (ROS) เกิด oxidative stress (Gabbita, et al., 1997) ทำลาย lipid และ protein โดยเฉพาะที่เยื่อหุ้มเซลล์และทำให้เกิดการกระตุ้นเซลล์ไมโครเกลีย เมื่อไมโครเกลียถูกกระตุ้นจะทำให้เกิดการหลั่งสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่เป็น neurotoxic compounds เช่น nitric oxide, excitotoxins หรือสารกลุ่ม pro-inflammatory cytokines เช่น interleukin-1α (IL-1α), interleukin-1β (IL-1β) และ interleukin-6 (IL-6) (Ariga, et al., 2001;

Kalaria, 1999; Klegeris and McGeer, 1997) ทำให้ไมโตคอนเดรียสูญเสียหน้าที่การทำงาน เหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis (Yu, et al., 2006) และทำให้เซลล์ประสาทตายในที่สุดส่วนพยาธิสภาพในสมองผู้ป่วยพาร์กินสันพบว่าสมองส่วน Substantia nigra ที่ปกติจะมีค่อนข้างดำจะจางลงไปและตรวจสอบทางจุลพยาธิภาพก็จะพบ Lewy body (alpha-synuclein) ซึ่งเป็นก้อนโปรตีน (Inclusions) ใน Cytoplasm จากการศึกษาปัจจัยทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับโรคพาร์กินสันพบว่ามียีนที่มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับโรคพาร์กินสัน คือ alpha-synuclein โดยมักจะพบสะสมเป็น Lewy body ใน Dopaminergic neuron และยังพบว่า alpha-synuclein เป็นองค์ประกอบหลักที่พบรองลงมาจาก Aβ ใน amyloid plaque จึงเป็นโปรตีนที่พบทั้งในผู้ป่วยอัลไซเมอร์และพาร์กินสัน ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์พยายามที่จะศึกษาและทำความเข้าใจเกี่ยวกับการเกิดโรครวมทั้งแนวทางการป้องกันและรักษาโรคความผิดปกติทางระบบประสาท โดยเฉพาะการคิดค้นวัคซีนซึ่งพบว่าสามารถลดพยาธิสภาพจาก Aβ ได้ อย่างไรก็ตามหลายรายงานพบว่าจะมีการอักเสบเกิดขึ้นหลังจากการให้วัคซีนเมื่อนำมาใช้กับมนุษย์ (Ghochikyan, et al., 2006; Mathews and Nixon, 2003) การใช้ Adjuvant ซึ่งเป็นสารประกอบหรือโมเลกุลที่ช่วยให้แอนติเจนในวัคซีนชนิดใดชนิดหนึ่งกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดีทำให้มีการสร้างภูมิคุ้มกันจำเพาะที่มากขึ้น ส่งเสริมการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้านเซลล์และอยู่ในร่างกายได้นานขึ้นช่วยลดปริมาณแอนติเจนที่ใช้และลดจำนวนครั้งที่ให้วัคซีนเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีนในกลุ่มคนที่มีระบบภูมิคุ้มกันไม่ปกติ ปัจจุบันมี cytokine มากมายที่สร้างขึ้นทำหน้าที่ประสานงานกระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานของเซลล์และกำหนดการตอบสนองของเซลล์ จากคุณสมบัติเหล่านี้ cytokine จึงถูกนำมาใช้ในการเสริมความสามารถของวัคซีนในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในฐานะเป็น adjuvant หรือควบคุมการตอบสนองต่อวัคซีนให้เป็นไปตามต้องการมีทั้งในรูปโปรตีนและยีน ซึ่งการใช้ในรูปของยีน (DNA vaccine) มีข้อดีคือต้นทุนต่ำและไม่ทำให้คุณสมบัติทางกายภาพด้านความคงทนและเก็บรักษาวัคซีนเปลี่ยนไป Interleukin-13 (IL-13) มีรายงานการวิจัยพบว่าเป็นไซโตไคน์ที่ช่วยลดการอักเสบซึ่งมีฤทธิ์ต่อ macrophages, B-cells และ Th2-cells โดยจะไปกระตุ้น B-cell ให้มีการเจริญเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะ (growth and differentiation) ยับยั้งการหลั่ง inflammatory cytokines (IL-1, IL-6) ในเซลล์ macrophages และสามารถใช้เป็น adjuvant ร่วมกับวัคซีนเพื่อลดการอักเสบที่จะเกิดขึ้นรวมทั้งเพิ่มประสิทธิภาพของวัคซีนด้วย นอกจากนี้จากการศึกษาในสัตว์ทดลอง (In-vivo studies) ก่อนหน้านี้ทำการฉีด IL-4 ร่วมกับ IL-13 เข้าไปใน APP23 mice ซึ่งเป็น transgenic mice ที่มีการแสดงของ amyloid precursor protein พบว่าสามารถกระตุ้นเซลล์ microglial ช่วยสลาย Aβ ทั้ง intra และ extraneuronal cells (Kawahara, et al., 2012) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจ

ในการผลิต IL-13 ในรูปของ Plasmid DNA และศึกษาการแสดงออกของ IL-13 รีคอมบิแนนท์โปรตีนในเซลล์ประสาท SK-N-SH โดยเซลล์นี้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาทางด้านความเป็นพิษต่อเซลล์โดยเฉพาะเซลล์ในระบบประสาทเนื่องจากมี neurochemical marker หลายชนิดรวมถึงศึกษาผลของ IL-13 รีคอมบิแนนท์โปรตีนต่อการป้องกันการตายของเซลล์ SK-N-SH ที่ได้รับพิษของ Paraquat รวมทั้งการแสดงออกของยีน Amyloid precursor protein (APP) และ alpha-synuclein (α-syn) เพื่อนำไปสู่การพัฒนาวิธีการรักษาโรคเกี่ยวกับระบบประสาทรวมทั้งได้ข้อมูลพื้นฐานในการสร้าง IL-13 ในรูปของ Plasmid DNA เพื่อใช้ในการพัฒนาเป็น adjuvant vaccine ต่อไป

จุดมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อโคลนยีน IL-13 ใน mammalian expression vector (pSELECT-blasti-mcs)
2. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนและโปรตีน IL-13 ในเซลล์ SK-N-SH ที่ถูก transfected ด้วย pSELECT-blasti-mcs-IL-13
3. เพื่อศึกษาผลของเซลล์ SK-N-SH ที่ถูก transfected ด้วย pSELECT-blasti-mcs-IL-13 เมื่อได้รับสาร paraquat ต่อการป้องกันการตายของเซลล์
4. เพื่อศึกษาผลของเซลล์ SK-N-SH ที่ถูก transfected ด้วย pSELECT-blasti-mcs-IL-13 เมื่อได้รับสาร paraquat ต่อการแสดงออกของยีน Amyloid precursor protein (APP) และ α-synuclein (α-syn)

ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาในเซลล์ SK-N-SH ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของเซลล์ประสาทถูก transfected ด้วย pSELECT-blasti-mcs-IL-13 ที่ได้จากการโคลนยีน IL-13 ใน mammalian expression vector (pSELECT-blasti-mcs) จากนั้นตรวจสอบการแสดงออกของ IL-13 ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน ทำการทดสอบเซลล์ SK-N-SH ที่ถูก transfected ด้วย pSELECT-blasti-mcs-IL-13 เมื่อได้รับสาร paraquat เพื่อตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์และการแสดงออกของยีน Amyloid precursor protein (APP) และα-synuclein (α-syn) จากการเหนี่ยวนำของสาร paraquat เทียบกับเซลล์ SK-N-SH ปกติ

นิยามศัพท์เฉพาะ

Recombinant หมายถึง การสร้างยีนหรือโปรตีนขึ้นมาใหม่โดยมีลำดับเบสและกรดอะมิโนเหมือนกับที่พบในธรรมชาติ

Clone หมายถึง เซลล์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกันทุกประการ เกิดจากการแบ่งเซลล์มาจากเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์เดียวกัน

สมมุติฐานของการวิจัย

สามารถโคลนยีน IL-13 ใน mammalian expression vector ได้และเมื่อนำไป transfected ใน SK-N-SH พบว่ามีการแสดงออกของ IL-13 ภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้นกว่าเซลล์ปกติ ส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตและลดการแสดงออกของยีน Amyloid precursor protein (APP) และ α-synuclein (α-syn) ของเซลล์ SK-N-SH ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร paraquat