

# บทที่ 1

## บทนำ

### ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรค retinitis pigmentosa (RP) เป็นโรคความเสื่อมของจอประสาทตา (retina) ที่พบได้ในประชากรทั่วโลกในอัตราเฉลี่ย 1:4000 ซึ่งตามมาด้วยการสูญเสียการมองเห็นอย่างถาวรเนื่องจากเกิดการสูญเสียของเซลล์รับแสงซึ่งไม่สามารถแบ่งตัวได้อีกในจอประสาทตาที่เจริญเต็มที่แล้ว (1) โดย RP เกิดจากความผิดปกติของยีนหลากหลายรูปแบบ (2-3) โดยยีนที่ผิดปกตินี้จะแสดงออกที่เซลล์รับแสงชนิดแท่ง (rod photoreceptor หรือ rod) ซึ่งอยู่ในจอประสาทตาทำให้เกิดความเสื่อมสภาพและการตายในที่สุดของเซลล์นี้และมีผลตามมาคือผู้ป่วยจะไม่สามารถมองเห็นในที่แสงสลัว (night vision) ในระยะแรก ซึ่งตามทฤษฎีแล้วการสูญเสียของ rods อย่างเดียวไม่น่าจะสร้างผลกระทบที่รุนแรงในเขตเมืองใหญ่ เพราะแม้ว่าในเวลากลางคืนก็ยังมีแสงเพียงพอที่จะกระตุ้นเซลล์รับภาพอีกชนิดหนึ่งในจอประสาทตาที่เรียกว่าเซลล์รับแสงชนิดกรวย (cone photoreceptor) หรือ cone ให้ทำงานแทนได้ อย่างไรก็ตามสิ่งเหล่านี้ไม่ได้เกิดอย่างที่คิดกับประชาชนนับล้านคนทั่วโลกที่กำลังป่วยเป็นโรคนี้นี้ เนื่องจากในท้ายที่สุดแล้ว cones ก็จะค่อยๆตายไปตามหลัง rods ถึงแม้ว่ายีนที่แสดงออกผิดปกติจะไม่ได้อยู่ที่ cones (4-8) ก็ตาม

ดังนั้นการศึกษาเพื่อหาหนทางในการรักษาหรือชะลอความเสื่อมสภาพของ cones ซึ่งมักตายตามหลัง rods ใน RP ก็น่าจะเป็นหนทางในการช่วยชะลอหรือป้องกันการสูญเสียการมองเห็นอย่างถาวรชนิด daylight vision ในผู้ป่วยที่มีภาวะ RP ได้ ซึ่งจะช่วยให้ผู้ป่วยสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ใกล้เคียงปกติมากที่สุด และลดงบประมาณของรัฐในการดูแลผู้ป่วยเหล่านี้

เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมาพบ rods เป็นผู้บริโภค oxygen รายใหญ่ของจอประสาทตา และการตายของ rods จำนวนมากใน RP จึงมีผลตามมาอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ในการทำให้เกิดการเพิ่มระดับของ oxygen ในจอประสาทตา (9-14) และมีผลกระทบตามมาด้วยการเกิด oxidative stress และการตายของ cones แบบ apoptosis (15-16) นอกจากนี้ยังมีหลักฐานที่แสดงให้เห็นว่า antioxidants ช่วยปกป้อง cones จากการทำลายโดย oxidative stress ได้ (16) ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาเหล่านี้ได้นำมาใช้อธิบายว่า ทำไม cones ยังมีชีวิตอยู่ได้เป็นเวลาอีกหลายปีหลังจากที่ rods หายไป หรือความแตกต่างอย่างมากมายของช่วงเวลาของการตายของ cones ซึ่งตามหลัง rods ของผู้ป่วยแต่ละคนซึ่งถึงแม้จะพบว่ามาจากความผิดปกติของยีนตัวเดียวกันที่แสดงออกใน rods ดังนั้นถึงแม้ว่าจะเป็นการยากในการรักษา rods ซึ่งมีการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติเอาไว้ แต่การปรับวิธีการดำเนินชีวิตและการบริโภคอาหารหรือยาที่มีสาร antioxidants อาจช่วยยับยั้งการตายของ cones และบรรเทาหรือชะลอการสูญเสียการมองเห็นในผู้ป่วย RP ได้

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า berberine ซึ่งเป็นสารสกัดที่พบได้ในสมุนไพรไทยหลายชนิด เช่น เห้ม (*Coscinium fenestratum*) บอระเพ็ด ( *Tinospora crispa Miers ex Hook.f. & Thoms*) และ พืชตระกูลขมิ้นเครือ เช่น *Arcangelisia flava* และ *Coscinium blumeum* (17-21) โดยมีคุณสมบัติทางการรักษาและใช้ในทางการแพทย์มานานแล้ว (22) โดยพบว่า berberine มีฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ประสาทจากการตายแบบ apoptosis และทำให้ระบบไหลเวียนเลือดในสมองดีขึ้น และยังช่วยป้องกัน Alzheimer's disease (23) นอกจากนี้ยังพบว่า berberine ยังมีคุณสมบัติทางการรักษาอื่นๆอีก เช่น สามารถลดระดับสารสื่อประสาทโดปามีน (dopamine) ในระบบประสาทส่วนกลาง (24) ด้านการติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัส ด้านอาการหัวใจเต้นไม่เป็นจังหวะ ลดไขมันในเลือด กำจัดเซลล์มะเร็ง (25-27) และลดระดับน้ำตาลในเลือด เป็นต้น (28-31) และที่น่าสนใจคือพบว่า berberine มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยพบว่า berberine สามารถลดการเพิ่มของ lipid peroxidation ในหนู ซึ่งชักนำไปให้เกิดมะเร็งด้วย azoxymethane โดยไปเพิ่ม activities ของ superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione (GSH) และ glutathione peroxidase (GPx) และเพิ่มความสามารถในการ ROS โดยช่วยป้องกันการลดระดับของ GSH (32) นอกจากนี้ยังพบว่า berberine สามารถยับยั้งผลของ tert-butylhydroperoxide ซึ่งชักนำไปให้เกิด oxidative damage ในตับหนูได้ โดยไปลดผลในการลดระดับของ GSH ของ tert-butylhydroperoxide ซึ่งจะไปเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและชักนำไปให้เกิดการซ่อมแซมของ DNA และลดการเกิด lipid peroxidation product ซึ่งได้แก่ malondialdehyde (MDA) (33)

เป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่ามีประชากรมากมายบนโลกนี้โดยเฉพาะประเทศที่กำลังพัฒนา ที่ไม่สามารถแบกรับภาระค่าใช้จ่ายจากยาสมัยใหม่ที่น่าเข้าจากต่างประเทศได้ ดังนั้นการนำพืชสมุนไพรพื้นบ้านมาใช้พัฒนาเป็นยาจึงน่าจะเป็นหนทางเลือกหนึ่งได้ อย่างไรก็ตามควรจะได้มีการศึกษาถึงสารประกอบที่ออกฤทธิ์ ความเป็นพิษและสรรพคุณที่แท้จริง รวมทั้งกลไกการออกฤทธิ์ของสมุนไพรนั้นๆ เพื่อจะได้ก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดและสามารถนำมาใช้ในการรักษาโรคได้จริงในอนาคตอันใกล้ ในการศึกษาครั้งนี้จะได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของ berberine ในการป้องกันการตายของ mouse cone photoreceptor-derived cells (661W) แบบ apoptosis จาก oxidative stress หลังจากได้รับ  $H_2O_2$  ซึ่งจะใช้เป็น *in vitro model* ในการศึกษา RP ซึ่งจะใช้ผลการศึกษาที่ได้ในเบื้องต้นไปใช้ต่อยอดในการศึกษาถึงกลไกต่างๆ ที่เกี่ยวข้องต่อไป โดย 661W cells ที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้มาจาก retina tumor ของหนู mouse ซึ่งมีคุณสมบัติและการแสดงออกของยีนที่พบได้เฉพาะใน cones เช่น blue และ green opsins, transducin และ x-arrestin (34-35) สิ่งที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือ 661W cells สามารถตอบสนองต่อแสงและ  $H_2O_2$  ได้เช่นเดียวกับ cones เซลล์ตามธรรมชาติ (36) ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า  $H_2O_2$  ซึ่งเป็นผลผลิตของ oxidative stress สามารถชักนำไปให้เกิดการตายของเซลล์หลายชนิดรวมทั้ง mouse cone photoreceptor-derived 661W cells (37)

การศึกษาใน *in vitro* พบว่า  $H_2O_2$  สามารถชักนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ใน 661W cells โดยมีการเพิ่มขึ้นของระดับ mRNA ของ apoptotic marker genes และให้ผลบวกต่อ TUNEL ซึ่งเป็น DNA-break staining ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเซลล์กำลังจะตายด้วย apoptosis (38) ซึ่งผลที่จะได้จากการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งเป็นความรู้ใหม่ที่ได้จะสามารถนำไปใช้ในการพัฒนาหาหนทางชะลอหรือยับยั้งการตายของ cones เซลล์ใน RP ต่อไป ทั้งนี้เพื่อรักษาความสามารถในการมองเห็นชนิด daylight vision ของผู้ป่วยไว้ให้ได้มากที่สุด ซึ่งองค์ความรู้ใหม่ที่ได้ยังสามารถนำไปสู่แนวทางในการศึกษาและรักษาโรค RP ด้วยสมุนไพรพื้นบ้านที่มีคุณสมบัติเป็น antioxidants ต่อไป และเป็นการกระตุ้นเตือนให้เห็นถึงคุณค่าของพืชสมุนไพรท้องถิ่นในการนำมาพัฒนาเป็นยาในการรักษาโรคต่างๆ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ทั้งต่อตัวผู้ป่วย เกษตรกรผู้ปลูกสมุนไพรเป็นรายได้ และภาครัฐในการประหยัดงบประมาณในการนำเข้ายาจากต่างประเทศและค่าใช้จ่ายในการดูแลผู้ป่วย

### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะศึกษาคุณสมบัติของ berberine ในการทำหน้าที่ป้องกันการตายของ mouse cone photoreceptor-derived 661W cells หลังได้รับ oxidative stress ซึ่งชักนำโดย  $H_2O_2$  โดยมีวัตถุประสงค์เฉพาะแยกเป็นข้อๆดังนี้

- 1) เพื่อศึกษาและทำการตรวจสอบหาขนาดของ berberine ที่จะเป็นพิษต่อ cone-derived 661W cells โดยใช้ trypan blue exclusion technique
- 2) เพื่อศึกษาและทำการตรวจสอบคุณสมบัติของ berberine ในการป้องกันการตายของ 661W cells ที่ได้รับ  $H_2O_2$  และหาขนาดที่เหมาะสมที่จะใช้ในการยับยั้งการตายของ cone-derived 661W cells โดยใช้ trypan blue exclusion technique
- 3) เพื่อตรวจสอบว่า berberine สามารถช่วยป้องกันการตายของเซลล์โดยไม่มีผลยับยั้งขั้นตอนการเกิดการตายแบบ apoptosis ใน mouse cone photoreceptor-derived 661W cells ซึ่งตามหลังการได้รับ  $H_2O_2$  ได้หรือไม่ โดยการเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis ซึ่งตามหลัง nuclear chromatin condensation โดยใช้การย้อมเซลล์ด้วย DNA specific dye, Hoechst 33342 (ซึ่งผลที่ได้จะสามารถนำไปต่อยอดในการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องโดยละเอียดต่อไป)

### ขอบเขตของโครงการวิจัย

เป็นการวิจัยในห้องปฏิบัติการ โดยทำการเพาะเลี้ยง mouse cone photoreceptor-derived cells (661W) โดยใช้ cell culture technique และมีการชักนำให้เกิด oxidative stress และการตายของเซลล์ด้วย hydrogen peroxide เพื่อใช้เป็น *in vitro* model ของ retinitis pigmentosa ในการศึกษาดู

ความสามารถของ berberine ซึ่งมี antioxidant property ในการปกป้องการตายของ 661W cells ซึ่งผลการศึกษาที่ได้จะสามารถนำไปใช้ต่อยอดในการทำการศึกษาดังกล่าวการออกฤทธิ์โดยละเอียดต่อไป และนำผลการทดลองที่ได้มาใช้ในการหาทางเลือกในการรักษาจำนวนของ cones เอาไว้ซึ่งมีแนวโน้มจะตายตามหลัง rods ด้วย oxidative stress ในโรค RP

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ สามารถนำผลการศึกษาที่ได้ไปใช้ต่อยอดในการศึกษาหากลไกการออกฤทธิ์โดยละเอียดต่อไปของ berberine และสารสกัดจากพืชสมุนไพรอื่นๆ ในการทำหน้าที่ป้องกันการตายของ cone photoreceptor cells หลังจากได้รับ oxidative stress ด้วย hydrogen peroxide ซึ่งเป็น model ที่ใช้ในการศึกษาหาหนทางในการรักษาโรค retinitis pigmentosa ในห้องปฏิบัติการ จะสามารถนำผลที่ได้ในอนาคตไปใช้ในการเผยแพร่ในวารสารวิชาการ และเป็นการกระตุ้นเตือนให้ภาครัฐและเอกชน รวมถึงตัวเกษตรกรมองหาแนวทางในการนำพืชสมุนไพรท้องถิ่นมาสกัดเป็นยาในการรักษาโรค retinitis pigmentosa และโรคอื่น ๆ ได้ต่อไปในอนาคต อีกทั้งประโยชน์เชิงพาณิชย์อาจตกแก่เกษตรกรผู้ปลูกสมุนไพรในอนาคต และการประหยัดงบประมาณของชาติในการนำเข้ายาและดูแลผู้ป่วยที่บกร่องทางการมองเห็นจากโรคนี้

#### 1. แก้ปัญหาในการดำเนินงานของหน่วยงานที่ทำการวิจัย

ทำให้เพิ่มศักยภาพในการผลิตผลงานวิจัยและพัฒนาศักยภาพของนักวิจัยที่มีอยู่ รวมทั้งพัฒนาศักยภาพในการผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ซึ่งรวมถึงมหาบัณฑิต และ ดุษฎีบัณฑิตทางด้านวิทยาศาสตร์ สุขภาพและชีวการแพทย์ในอนาคต

#### 2. เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป

ได้รับองค์ความรู้ใหม่ในการนำเอาสารสกัดจากธรรมชาติจากพืชและสมุนไพรพื้นบ้านที่มีสรรพคุณเป็น antioxidant มาใช้พัฒนาเป็นยารักษาความเสื่อมสภาพของ rod photoreceptors ในโรค retinitis pigmentosa เพื่อเป็นทางเลือกในอนาคตในการชะลอหรือหยุดยั้งการดำเนินโรคซึ่งนำไปสู่การสูญเสียการมองเห็น ทำให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น

นอกจากนี้ยังเป็นการกระตุ้นเตือนให้นักวิจัยได้เห็นถึงประโยชน์ของการศึกษาและทำวิจัยของสมุนไพรท้องถิ่น เพื่อนำมาพัฒนาเป็นยาในอนาคต ซึ่งจะช่วยลดภาระของรัฐบาลและประชาชนในการนำเข้ายาจากต่างประเทศ อีกทั้งการค้นพบยาใหม่ยังสามารถนำไปสู่การจดสิทธิบัตรและนำรายได้มาสู่ประเทศในอนาคต

### 3. บริการความรู้แก่ประชาชน

หากนำผลการวิจัยที่ได้ไปทำการต่อยอดจะทำให้สามารถตีพิมพ์ผลงานวิจัยที่ได้ในอนาคต เพื่อเป็นการกระตุ้นให้ประชาชนเห็นความสำคัญและประโยชน์ของการใช้พืชสมุนไพรท้องถิ่นมาใช้เป็นยา หรือการเห็นความสำคัญของการบริโภคอาหารที่นำไปสู่การมีสุขภาพดี

### 4. บริการความรู้แก่ภาคธุรกิจ

ผลงานวิจัยที่ได้จะช่วยกระตุ้นให้ภาคธุรกิจหันมาลงทุนในการผลิตยาที่มาจากสมุนไพรท้องถิ่น ซึ่งจะสามารถเพิ่มรายได้ให้กับประชากรในท้องถิ่นนั้นๆด้วย เพื่อการพึ่งพาตนเองแบบยั่งยืน

### 5. นำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์

ผลการทดลองที่ได้อาจมีส่วนช่วยผลักดันให้มีการนำสมุนไพรท้องถิ่นมาใช้ผลิตเป็นยามากขึ้น โดยผ่านการทดสอบและวิจัยที่มีคุณภาพ นอกจากนี้การพัฒนาพืชสมุนไพรท้องถิ่นมาเป็นยาจะช่วยให้รัฐประหยัดงบประมาณในการนำเข้ายาจากต่างประเทศ และการที่ประชาชนมีสุขภาพที่ดีจากนิสัยการบริโภคที่ดี จะช่วยให้ลดการเจ็บป่วยของประชาชนและประหยัดงบประมาณทางด้านสาธารณสุข

### 6. เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต

ทำให้เราสามารถพึ่งพาตนเองได้อย่างยั่งยืนและเพิ่มผลผลิตจากพืชสมุนไพรในการนำมาผลิตในรูปแบบเชิงพาณิชย์ต่อไป

### 7. เป็นประโยชน์ต่อประชากรกลุ่มเป้าหมาย

ทั้งนี้เพื่อความเป็นอยู่ที่ดีและสุขภาพที่ดีของประชาชนอย่างยั่งยืน การเผยแพร่ผลงานวิจัยที่ได้และให้ความรู้แก่ประชาชนจะทำให้ประชาชนตระหนักถึงการดูแลสุขภาพเพื่อเป็นการป้องกันจากการเจ็บป่วย ในผู้ป่วย RP เองก็จะมีทางเลือกในการชะลอหรือยับยั้งการสูญเสียการมองเห็นอย่างสมบูรณ์

### 8. การเผยแพร่ในวารสาร

ถึงแม้ว่าการศึกษารุ่นนี้อาจจะไม่สามารถตีพิมพ์ผลงานวิจัยออกไปได้ แต่สามารถนำผลงานวิจัยที่ได้ไปเสนอผลงานหรือนำไปต่อยอดในการศึกษาต่อเพื่อตีพิมพ์ผลงานในวารสารต่างประเทศเพื่อเผยแพร่ผลงานวิจัยได้ในอนาคต