



ฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนทินและแอสตาแซนทินลิโปโซมสกัดจาก
เปลือกกุ้งขาวในหนูเม้าส์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้อุ้งเท้าบวมด้วยคาร์ราจีแนน
**Anti-inflammatory effects of astaxanthin and astaxanthin-liposome from
white shrimp shell on carrageenan-induced paw edema
in mouse.**

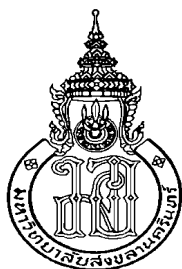
ซุกกีฟลี กือโด
Zulkiflee Kuedo

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาสรีรวิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Physiology
Prince of Songkla University**

2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



ฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินและแอสตาแซนธินลิโปโซมสกัดจาก
เปลือกกุ้งขาวในหนูเม้าส์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้อุ้งเท้าบวมด้วยคาร์ราจีแนน
**Anti-inflammatory effects of astaxanthin and astaxanthin-liposome from
white shrimp shell on carrageenan-induced paw edema
in mouse.**

ซุกกีฟลี กือโด

Zulkiflee Kuedo

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสรีรวิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Physiology
Prince of Songkla University**

2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินและแอสตาแซนธินลิโปโซมสกัด
 จากเปลือกกุ้งขาวในหนูเม้าส์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้อู้งเท้าบวมด้วยคาร์ราจีแนน
 ผู้เขียน นายชูเกียรติ กือโต
 สาขาวิชา สรีรวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เพ็ญภา ชลปฐมพิกุลเลิศ) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตติตา จิตติวัฒน์)

.....กรรมการ
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิจจา สว่างเจริญ)

.....กรรมการ
 (ดร.ไพไลวรรณวดี หุตะเมขลิน)

.....กรรมการ
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เพ็ญภา ชลปฐมพิกุลเลิศ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
 เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสรีรวิทยา

.....
 (รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณ
บุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เพ็ญนภา ชลปฐมพิกุลเลิศ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(นายชุกีพลี กือโต)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน
และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นายชุกีพลี กือโต)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	ฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินและแอสตาแซนธินลิโพโซมสกัดจากเปลือกกุ้งขาวในหนูเมาส์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้อุ้งเท้าบวมด้วยคาร์ราจีแนน
ผู้เขียน	นายชุกีพลี กือโต
สาขาวิชา	สรีรวิทยา
ปีการศึกษา	2558

บทคัดย่อ

แอสตาแซนธินเป็นสารสกัดจากธรรมชาติที่นิยมนำมารับประทานเป็นอาหารเสริมสุขภาพ ซึ่งการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาได้ค้นพบคุณประโยชน์ต่าง ๆ มากมายต่อร่างกาย เช่น มีประสิทธิภาพสูงในการต้านอนุมูลอิสระ มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและมะเร็ง เป็นต้น แหล่งทางธรรมชาติที่สำคัญของแอสตาแซนธินคือ ไรน้ำสายพันธุ์ *Haematococcus pluvialis* ซึ่งเพาะเลี้ยงยากในประเทศไทยและมีราคาแพง ในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งหาแอสตาแซนธินจากแหล่งอื่นในธรรมชาติ กุ้งขาวสายพันธุ์แวนนาไม่ใช่อีกแหล่งหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาสกัดสารแอสตาแซนธิน เนื่องจากในประเทศไทยมีการเลี้ยงกุ้งสายพันธุ์นี้กันอย่างแพร่หลายและในกระบวนการแปรรูปกุ้งของโรงงานอุตสาหกรรมพบว่า มีเศษเหลือทิ้งจากกุ้งเป็นปริมาณมาก ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินสกัดจากเปลือกกุ้งขาวและเปรียบเทียบประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของแอสตาแซนธินเปล่าและแอสตาแซนธินลิโพโซม หนูได้รับการป้อนสารตามกลุ่มทดลองเป็นระยะเวลา 21 วัน โดยมีกลุ่มที่ได้รับยาต้านการอักเสบมาตรฐานได้แก่ diclofenac 25 มก./กก. และ indomethacin 10 มก./กก. เป็นกลุ่มควบคุมบวก เมื่อครบกำหนดการป้อนสาร หนูทดลองจะได้รับการเหนี่ยวนำให้อุ้งเท้าบวมโดยการฉีดคาร์ราจีแนนเข้าที่ฝ่าเท้าหลังทั้งสองข้าง หลังการเหนี่ยวนำที่เวลา 2 และ 6 ชม. หนูทดลองจะได้รับการประเมินการบวมของเท้าและพฤติกรรมการสนองตอบต่อการอักเสบ จากนั้นทำการเก็บเนื้อเยื่อเท้าและพลาสมาเพื่อใช้ในการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของแอสตาแซนธิน

หนูกลุ่มที่ได้รับแอสตาแซนธินเปล่าขนาด 100 และ 150 มก./กก. มีผลลดการบวมของเท้าและบรรเทาพฤติกรรมไวต่อการสนองตอบต่อการอักเสบและลดระดับของสารบ่งชี้การอักเสบได้แก่ myeloperoxidase, nitric oxide และไซโตไคน์ (TNF- α และ IL-6) และพบว่าแอสตาแซนธินสกัดยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระผ่านการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation (MDA) และเพิ่มความสามารถในการยับยั้งการเกิด superoxide anion ส่วนการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบระหว่างแอสตาแซนธินเปล่าและแอสตาแซนธินลิโพโซมพบว่า แอสตาแซนธินขนาด 10 มก. ที่บรรจุในรูปแบบลิโพโซมมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับแอสตาแซนธินเปล่าขนาด 100 และ 150 มก./กก.

กล่าวโดยสรุปคือ แอสตาแซนธินสกัดจากเปลือกกุ้งขาวสามารถลดการบวมของเท้า บรรเทาพฤติกรรมไวต่อการสนองตอบต่อการอักเสบและสามารถลดระดับสารบ่งชี้การอักเสบและลดภาวะเครียดออกซิเดชันจากอนุมูลอิสระ และพบว่าแอสตาแซนธินในรูปแบบลิโพโซมมีผลเพิ่มประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ได้ดีกว่าแอสตาแซนธินเปล่า

Thesis Title	Anti-inflammatory effects of astaxanthin and astaxanthin-liposome from white shrimp shell on carrageenan-induced paw edema in mouse.
Author	Mr. Zulkiflee Kuedo
Major Program	Physiology
Academic	2015

ABSTRACT

Astaxanthin, a nutraceutical, has been reported to possess the potential preventive capacity associated with health benefits. Previous study reported that astaxanthin has strong anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-tumor effects. Common source of astaxanthin for human consumption is from *Haematococcus pluvialis* but it is not able to be cultivated in Thailand. In the present study attempt to find an alternative source of astaxanthin. White shrimp shell (*Litopenaeus Vannamei*) is one of an interesting source which large amount of shells are wastefully from marine industry. The objectives of this study was to investigate anti-inflammatory effect of astaxanthin-extracted from white shrimp shell and compare its anti-inflammatory efficacy between free astaxanthin and astaxanthin-liposome. Astaxanthin, positive control drugs (diclofenac and indomethacin), vitamin E were applied by oral gavage to mice for 21 days. After 1 h of administration, the animals were induced by injection of carrageenan into both hind paws. The experimental animals were then assessed paw thickness, thermal and mechanical pain threshold at 2 and 6 h after carrageenan induction. Hind paw tissues and plasma were also collected.

Animal that received 100 and 150 mg/kg of free astaxanthin exhibited anti-inflammatory effect by decreasing paw thickness and improving hypersensitivity to pain stimuli. Moreover, astaxanthin decreased myeloperoxidase, nitric oxide and cytokines (TNF- α and IL-6) levels. It also showed the anti-oxidative effect by inhibit lipid peroxidation (MDA) of cell membrane and increased %inhibition of superoxide anion level. Comparing anti-inflammatory efficacy of free astaxanthin and astaxanthin-liposome revealed that 10 mg of astaxanthin encapsulated in liposome showed similar effects with free astaxanthinat dose of 100 and 150 mg/kg.

In conclusion, astaxanthin extracted from white shrimp shell decreased hypersensitivity to pain stimulus, edema, free radical and inflammatory related markers suggesting its anti-inflammatory effect. Astaxanthin in liposome showed better efficacy in anti-inflammatory effect than free astaxanthin.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีด้วยความช่วยเหลือจากหลายฝ่าย ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เพ็ญนภา ชลปฐมพิกุลเลิศ อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์หลัก ที่คอยให้คำปรึกษาและชี้แนะแนวทางในการศึกษาวิจัย อีกทั้งยังช่วย แก้ปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงานตลอดมา ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตติตา จิตติวัฒน์ ดร.พีไลวรรณวดี หุตะเมขลินและผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิจจา สว่างเจริญ ที่กรุณาเสียสละเวลามาเป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และให้ข้อเสนอแนะ เพื่อนำไปใช้เป็นแนวทางในการเขียนวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาที่ปรึกษาที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ เจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ที่คอยอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ ธุรการที่ให้ความช่วยเหลือประสานงานที่ดีตลอดมาและขอบคุณเพื่อนนักศึกษาทุกท่านที่คอยให้ คำแนะนำและเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สถานเลี้ยงสัตว์ทดลองทุกท่านที่อนุเคราะห์สถานที่ การ จัดหาสัตว์ทดลองและอำนวยความสะดวกในการศึกษาทดลอง

ขอขอบคุณกองทุนวิจัยคณะวิทยาศาสตร์ที่มอบทุนอุดหนุนการศึกษาเป็นผู้ช่วย วิจัย ทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์และทุนอุดหนุนการ วิจัยจากเงินรายได้ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประเภททั่วไป (SCI 590365S-0)

และขอขอบพระคุณครอบครัวที่คอยสนับสนุน ชี้แนะสั่งสอนและเป็นกำลังใจ สำคัญที่คอยผลักดันจนประสบความสำเร็จในการศึกษาครั้งนี้ด้วยดี

ชูกีพลี กือโต

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	(5)
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	(7)
กิตติกรรมประกาศ	(9)
รายการตาราง	(11)
รายการรูป	(13)
คำย่อและสัญลักษณ์	(15)
บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	
การอักเสบ	2
ยาต้านการอักเสบ	22
แอสตาแซนธิน	26
ลิโพโซม	32
การเก็บกักสาร	34
วิตามินอีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	36
คาร์ราจีแนนและกลไกการออกฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ	36
วัตถุประสงค์การวิจัย	37
วิธีการวิจัย	
การสกัดแอสตาแซนธินจากเปลือกกุ้งขาวและแอสตาแซนธินลิโพโซม	38
สัตว์ทดลอง	38
ยาและสารเคมี	39
เครื่องมือและอุปกรณ์	39
วิธีดำเนินการวิจัย	
การแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง	39
การเหนี่ยวนำให้อุ้งเท้าบวมด้วยคาร์ราจีแนน	42
การประเมินการบวมของเท้าจากการอักเสบ	43
การประเมินพฤติกรรมกรรมการสนองต่อการอักเสบ	43
การทำให้สัตว์ทดลองสลบและการเก็บตัวอย่าง	45

การวิเคราะห์ผลทางชีวโมเลกุล	45
การวิเคราะห์ผลการทดลอง	47
ผลการทดลอง	48
วิจารณ์ผลการทดลอง	62
สรุปและข้อเสนอแนะ	69
บรรณานุกรม	71
ภาคผนวก	82
ประวัติผู้เขียน	92

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1-1	สารในกลุ่มของ ecosanoids และผลของสารในกระบวนการอักเสบ	13
1-2	อิทธิของสารสื่อกลางการอักเสบต่อการเปลี่ยนแปลงของร่างกาย	19
2-1	การแบ่งกลุ่มและการดำเนินการต่อสัตว์ทดลองเพื่อศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธิน	40
2-2	การแบ่งกลุ่มและการดำเนินการต่อสัตว์ทดลองเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินอิสระและแอสตาแซนธินในรูปแบบลิโปโซม	42
3-1	ฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินและแอสตาแซนธินลิโปโซมต่อค่าความหนาของเท้าของหนูเมาส์ที่ถูกเหนียวทำให้อ้วนเท้าบวมด้วยคาร์ราจีแนน	48
3-2	ฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินและแอสตาแซนธินลิโปโซมต่อพฤติกรรมการสนองตอบต่อการกระตุ้นด้วยความร้อน	50
3-3	ฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินและแอสตาแซนธินลิโปโซมต่อพฤติกรรมการสนองตอบต่อการกระตุ้นด้วยแรงกด	51
3-4	ฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินและแอสตาแซนธินลิโปโซมต่อการหลั่งเอนไซม์ MPO ในเนื้อเยื่อเท้า	52
3-5	ฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินและแอสตาแซนธินลิโปโซมต่อการหลั่งเอนไซม์ MPO ในพลาสมา	53
3-6	ฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินและแอสตาแซนธินลิโปโซมต่อระดับของ nitric oxide ในเนื้อเยื่อเท้า	55
3-7	ฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินและแอสตาแซนธินลิโปโซมต่อระดับของ nitric oxide ในพลาสมา	56
3-8	ฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินและแอสตาแซนธินลิโปโซมต่อการยับยั้งการเกิด superoxide anion ในเนื้อเยื่อเท้า	57
3-9	ฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินและแอสตาแซนธินลิโปโซมต่อการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation (MDA) ในเนื้อเยื่อเท้า	58

รายการตาราง (ต่อ)

3-10	ฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินและแอสตาแซนธินลิโปโซม ต่อระดับของ TNF- α ในเนื้อเยื่อเท้า	60
3-11	ฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินและแอสตาแซนธินลิโปโซม ต่อระดับของ IL-6 ในเนื้อเยื่อเท้า	61

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1-1	การเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดและเซลล์อักเสบในการอักเสบเฉียบพลัน	3
1-2	การเคลื่อนตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวจากหลอดเลือดเข้าสู่เนื้อเยื่อที่มีการอักเสบ	8
1-3	กลไกการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยผ่านตัวรับชนิดต่าง ๆ	10
1-4	กระบวนการเผาผลาญ arachidonic acid และหน้าที่ของสารที่ได้ในกระบวนการอักเสบ	13
1-5	ผลของ TNF และ IL-1 ต่อการเกิด acute phase reaction	15
1-6	กลไกต่าง ๆ ในการกระตุ้น complement protein	17
1-7	ความสัมพันธ์ของสารกลุ่ม complement, kinin, clotting และ fibrinolytic system ในกระบวนการอักเสบ	18
1-8	ผลที่เกิดขึ้นภายหลังการเกิดกระบวนการอักเสบเฉียบพลัน	21
1-9	โครงสร้างทางเคมีของแอสตาแซนธิน	28
1-10	โครงของเยื่อหุ้มเซลล์และการวางตัวของแอสตาแซนธิน	28
1-11	ลักษณะโครงสร้างของลิโปโซมที่มีผนังคู่ชั้นเดียวและลิโปโซมที่มีผนังคู่หลายชั้น	33
2-1	การฉีดคาร์ราจีแนนเข้าที่อุ้งเท้าและเท้าหนูที่มีการอักเสบ	43
2-2	เครื่องมือ vernier caliper ใช้วัดความหนาของเท้าและตำแหน่งที่ใช้วัดเท้าหนูที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ	43
2-3	การประเมินความไวในการสนองต่อความร้อน	44
2-4	การประเมินความไวในการสนองต่อแรงกด	45
3-1	กราฟแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินและแอสตาแซนธินในรูปลิโปโซมต่อการบวมของเท้า	49
3-2	กราฟแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินและแอสตาแซนธินในรูปลิโปโซมต่อพฤติกรรมการสนองต่อการกระตุ้นด้วยความร้อน	50
3-3	กราฟแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินและแอสตาแซนธินในรูปลิโปโซมต่อพฤติกรรมการสนองต่อ	51

รายการรูป (ต่อ)

	การกระตุ้นด้วยแรงกด	
3-4	กราฟแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินและแอสตาแซนธินในรูปแบบลิโปโซมต่อการหลั่งเอนไซม์ MPO ในเนื้อเยื่อเท้า	53
3-5	กราฟแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินและแอสตาแซนธินในรูปแบบลิโปโซมต่อการหลั่งเอนไซม์ MPO ในพลาสมา	54
3-6	กราฟแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินและแอสตาแซนธินในรูปแบบลิโปโซมต่อการยับยั้งการสร้าง nitric oxide ในเนื้อเยื่อเท้า	55
3-7	กราฟแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินและแอสตาแซนธินในรูปแบบลิโปโซมต่อการยับยั้งการสร้าง nitric oxide ในพลาสมา	56
3-8	กราฟแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินและแอสตาแซนธินในรูปแบบลิโปโซมต่อการยับยั้งการเกิด superoxide anion ในเนื้อเยื่อเท้า	58
3-9	กราฟแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินและแอสตาแซนธินในรูปแบบลิโปโซมต่อการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ในเนื้อเยื่อเท้า	59
3-10	กราฟแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินและแอสตาแซนธินในรูปแบบลิโปโซมต่อการยับยั้งหลั่ง TNF- α ในเนื้อเยื่อเท้า	60
3-11	กราฟแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินและแอสตาแซนธินในรูปแบบลิโปโซมต่อการยับยั้งหลั่ง IL-6 ในเนื้อเยื่อเท้า	61

คำย่อและสัญลักษณ์

ชม.	= ชั่วโมง
มก.	= มิลลิกรัม
กก.	= กิโลกรัม
มล.	= มิลลิลิตร
α	= alpha
β	= beta
δ	= delta
γ	= gamma
p	= p-value
AERD	= aspirin-exacerbated respiratory disease
3,6-AG	= 3,6-anhydro-galactose
AST	= aspartate amino transferase
ALT	= alanine amino transferase
BL	= blank-liposome
BSA	= bovine serum albumin
CCl_4	= carbon tetrachloride
CGD	= chronic granulomatous disease
cGMP	= cyclic guanosine monophosphate
Cl	= chloride
COX	= cyclooxygenase
CR1	= complement receptor type 1
CuSO_4	= copper (II) sulfate
DAG	= diacylglycerol
EDTA	= ethylenediaminetetraacetic acid
ELAM-1	= E-selectin

คำย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

eNOS	= endothelial NOS
FDP	= fibrin degradation products
h	= hour
HETE	= hydroxyeicosatetraenoic acid
HCl	= hydrochloric acid
HOCl	= hypochlorous acid
HOCl ⁻	= hydroxyl chloride
H ₂ O ₂	= hydrogen peroxide
ICAM-1	= intercellular adhesion molecule1
IFN	= interferon
IgG	= immunoglobulin G
IκB-α	= inhibitor of NF-κB-α
IL	= interleukin
iNOS	= inducible nitric oxide synthase
IP ₃	= inositol-1,4,5-triphosphate
KCl	= potassium chloride
KH ₂ PO ₄	= potassium dihydrogen phosphate
K ₂ HPO ₄	= dipotassium phosphate
LAM-1	= L-selectin
LFA-1	= lymphocyte function-associated antigen-1
LOO [·]	= lipid peroxy radicals
LPS	= lipopolysaccharide
LX	= lipoxin
MAC-1	= macrophage-1
MAC	= membrane attack complex
MCP-1	= monocyte chemoattractant protein
MDA	= malondialdehyde
MIP-1	= macrophage inflammatory protein-1
MPO	= myeloperoxidase
NaCl	= sodium chloride

คำย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

NADPH	= reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate
Na ₂ HPO ₄	= sodium hydrogen phosphate
NBT	= nitroblue tetrazolium
NK cell	= natural killer cell
nNOS	= neuronal NOS
NO	= nitric oxide
Nrf2	= nuclear factor E2 related factor 2
NSAIDs	= non-steroidal anti-inflammatory drugs
O ₂ ⁻	= superoxide anion
·OH	= hydroxyl radical
PAF	= platelet activating factor
PC	= phosphatidylcholine
PECAM-1	= platelet endothelial cell adhesion molecule
PG	= propylene glycol
PGI ₂	= prostacyclin
PIP ₂	= phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PUFAs	= polyunsaturated fatty acids
RANTES	= regulate and normal T cell expressed and secreted
SDS	= sodium dodecyl sulfate
SLE	= systemic lupus erythematosus
SR-BI	= scavenger receptor class B, type I
TBA	= thiobarbituric acid
TEMPOL	= 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl
LFA-1	= beta2/lymphocyte function-associated antigen-1
LPS	= lipopolysaccharide
LT	= leukotriene
RANTES	= regulate and normal T cell expressed and secreted
TLR	= Toll-like receptor
TMB	= tetramethylbenzidine
TNF	= tumor necrosis factors

คำย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

TxA ₂	= thromboxane
USFDA	= The United States Food and Drug Administration
VCAM-1	= vascular cell adhesion molecule1
VEGF	= vascular endothelial growth factor
VLA-4	= very late antigen-4
ZnSO ₄	= zinc sulfate

บทที่ 1

บทนำ

1. บทนำต้นเรื่อง

การอักเสบเป็นกระบวนการตอบสนองของร่างกายต่อสิ่งก่อภัยอันตรายที่เข้าสู่ร่างกายหรือเป็นการตอบสนองต่อการบาดเจ็บและ/หรือมีการตายของเนื้อเยื่อ สามารถแบ่งได้เป็น 2 รูปแบบ คือ การอักเสบเฉียบพลันและการอักเสบเรื้อรัง ซึ่งสิ่งกระตุ้นที่ก่อให้เกิดการอักเสบนั้นมีหลากหลาย สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ สาเหตุจากการติดเชื้อ (infection stimuli) เช่น เชื้อโรคหรือผลิตภัณฑ์ที่เชื้อโรคร่างขึ้น ถัดมาคือสาเหตุที่ไม่ใช่จากการติดเชื้อ (non-infection stimuli) เช่น การบาดเจ็บจากอุบัติเหตุหรือสารเคมี ปฏิกริยาต่อต้านของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เป็นต้น เมื่อร่างกายได้รับสิ่งกระตุ้นต่าง ๆ เหล่านี้ ร่างกายจะตอบสนองผ่านกระบวนการอักเสบ ซึ่งก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขนาดและโครงสร้างของหลอดเลือดขนาดเล็กจนเกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบต่าง ๆ เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด เกล็ดเลือด เป็นต้น ตลอดจนกระบวนการอักเสบที่ได้กล่าวมาข้างต้นนั้น จะมีการสร้างและหลั่งสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ภายในร่างกายทั้งในพลาสมาและจากเซลล์ที่เกิดการอักเสบ เช่น histamine, serotonin, interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factors (TNF), prostaglandins, leukotrienes, bradykinin, complement C3a และ C5a ซึ่งสารเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบ อีกทั้งเมื่อการอักเสบดำเนินมาเป็นช่วงระยะเวลาหนึ่ง สารชีวโมเลกุลต่าง ๆ เหล่านี้ยังส่งผลต่อกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ (Kumar *et al.*, 2010)

ปัจจุบันมีการศึกษาเพื่อพัฒนายาที่ใช้ในการรักษาหรือบรรเทาอาการที่เกิดจากการอักเสบอย่างต่อเนื่อง โดยมีเป้าหมายเพื่อพัฒนาประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของยาและลดอาการไม่พึงประสงค์จากยาให้น้อยที่สุด ซึ่งยาต้านการอักเสบที่ถูกนำมาใช้ในการรักษากันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ ยากลุ่มสเตียรอยด์และกลุ่มยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ มีรายงานผลข้างเคียงของยาเป็นจำนวนมากและยาบางตัวมีราคาแพง ดังนั้นบรรดานักวิจัยจึงเล็งเห็นความสำคัญในจุดนี้ จึงมีการคิดค้นและพัฒนายากลุ่มใหม่ ที่สามารถออกฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียงอื่น ๆ ต่อร่างกาย มีรายงานการค้นพบสารสกัดจากธรรมชาติหลายชนิดที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ เช่น carotenoids, alkaloids, flavonoids, terpenoids เป็นต้น (Yuan *et al.*, 2006) ซึ่งสารเหล่านี้มีราคาไม่แพงและยังไม่พบรายงานถึงอาการข้างเคียงหรืออาจมีผลข้างเคียงในระดับที่น้อยมาก

แอสตาแซนธินเป็นสารหนึ่งในกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoids) ธรรมชาติที่มีสีส้มหรือสีแดงที่พบได้ในสาหร่ายสีแดง (*Haematococcus pluvialis*) ยีสต์สีชมพู (*Phaffia*

rhodozyma) หรือจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเลอื่น ๆ เช่น ปลาแซลมอน กุ้ง เป็นต้น ซึ่งเป็นสารที่ได้รับการยอมรับจาก The United States Food and Drug Administration (USFDA) ของสหรัฐอเมริกาให้เป็นอาหารเสริมสุขภาพ (Ambati *et al.*, 2014) แอสตาแซนธินเป็นสารที่มีความปลอดภัยสูงสำหรับบริโภคและมีการบริโภคกันมาอย่างยาวนาน สารนี้มีโครงสร้างทางเคมีพิเศษกว่าสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์อื่น ๆ ประกอบด้วยส่วนปลายทั้งสองด้านที่มีคุณสมบัติมีขั้ว ด้วยคุณสมบัตินี้ทำให้สามารถแทรกตัวอยู่ในชั้นผนังเซลล์ได้ทั้งชั้นน้ำและชั้นไขมัน มีประสิทธิภาพสูงในการต้านอนุมูลอิสระและยังมีฤทธิ์อื่น ๆ อีก เช่น ด้านการอักเสบ ลดการติดต่ออินซูลินในโรคเบาหวานชนิดที่สอง เป็นต้น ถึงแม้ว่าแอสตาแซนธินจะมีคุณสมบัติในการต้านการอักเสบได้ แต่ส่วนใหญ่เป็นรายงานประสิทธิผลของแอสตาแซนธินที่สกัดได้จากสาหร่ายสีแดง (Ambati *et al.*, 2014) ซึ่งมีราคาแพงและไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในประเทศไทย นอกจากนี้พบว่า แอสตาแซนธินมีความเสถียรต่ำและถูกทำลายได้ง่ายจากสภาวะแวดล้อม ทำให้มีข้อจำกัดในการนำไปประยุกต์ใช้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการนำสารสกัดแอสตาแซนธิน จากเศษเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกุ้งร่วมกับการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเอนแคปซูลชัน (encapsulation) ในรูปแบบลิโปโซม ซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่มีศักยภาพสูงในการช่วยกักเก็บสารแอสตาแซนธินที่ผลิตได้ เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพจากสภาวะแวดล้อม อีกทั้งอาจเป็นการลดปริมาณการใช้สารได้อีกด้วย

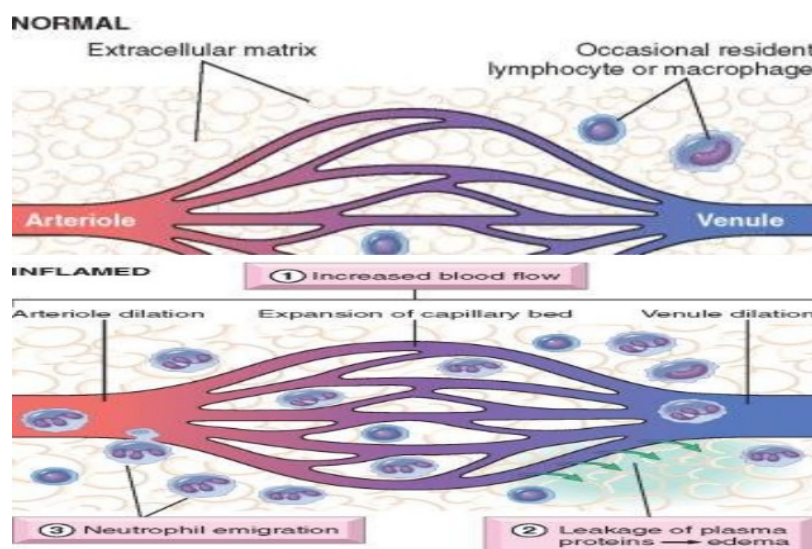
2. การตรวจสอบเอกสาร

2.1 การอักเสบ (inflammation)

การอักเสบเป็นกระบวนการตอบสนองของร่างกายในรูปแบบเฉพาะที่หรือทั้งระบบต่อสิ่งก่อภัยอันตราย (pathogen) ที่เข้าสู่ร่างกายหรือเกิดขึ้นภายในร่างกายเอง โดยเป็นการทำงานประสานกันของสารสื่อกลาง สารน้ำและเม็ดเลือดขาวซึ่งมีการเคลื่อนที่จากหลอดเลือดเข้าสู่เนื้อเยื่อที่มีการอักเสบ กระบวนการอักเสบเกิดขึ้นเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคนำไปสู่การฟื้นตัวและรักษาสมดุลในการทำงานของร่างกาย (Rubin และ Strayev, 2012) หากร่างกายปราศจากการตอบสนองโดยการอักเสบแล้ว ร่างกายจะไม่สามารถตรวจพบการรุกรานของเชื้อโรคที่เข้าสู่ร่างกาย ทำให้แผลหายช้าจนเกิดการบาดเจ็บของเนื้อเยื่ออย่างเรื้อรัง (Kumar *et al.*, 2010) ในช่วงแรกเริ่มของกระบวนการอักเสบนั้น เซลล์ที่มีการบาดเจ็บจะหลั่งสารบางอย่างเข้าสู่กระแสเลือดหรือสารนั้นอาจมาจากสิ่งแปลกปลอม เช่น เชื้อโรค ซึ่งสิ่งเหล่านี้สามารถตรวจพบได้อย่างรวดเร็วโดยเม็ดเลือดขาวและพลาสมาโปรตีนในระบบไหลเวียน เมื่อมีการตรวจพบความผิดปกติ เม็ดเลือดขาวจะหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบและพลาสมาโปรตีนจะถูกกระตุ้นให้ทำงานได้ สองอย่างนี้เป็นตัวการสำคัญที่จะกระตุ้นให้เกิดการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบอื่น ๆ อีกหลายชนิด พบว่า เชื้อโรค การตายของเซลล์แบบนีโครซิส (necrosis) และภาวะขาดออกซิเจน มีผลกระตุ้นการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบ ซึ่งมีหน้าที่ในการตอบสนองให้เกิดการอักเสบจนนำไปสู่กระบวนการต่อสู้หรือการกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรค การอักเสบ

สามารถเกิดขึ้นได้สองรูปแบบคือ การอักเสบเฉียบพลัน (acute inflammation) และการอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation) ขึ้นอยู่กับลักษณะการเกิดและสิ่งกระตุ้นการอักเสบ หากการอักเสบที่เกิดขึ้นในระยะแรกล้มเหลวในการกำจัดสิ่งก่อภยันตรายออกได้ จะส่งผลให้เกิดการอักเสบเรื้อรังได้ (Kumar *et al.*, 2010) ลักษณะอาการสำคัญของการอักเสบนั้น ได้แก่ แดง (redness) ร้อน (heat) บวม (swelling) ปวด (pain) และการสูญเสียหน้าที่ของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะ (loss of function) อาการเหล่านี้มีความเชื่อมโยงกับการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากการอักเสบ เช่น การขยายตัวของหลอดเลือดทำให้เกิดการบวมแดงบริเวณที่อักเสบ (Rubin และ Strayev, 2012)

2.1.1 การอักเสบเฉียบพลัน (acute inflammation) เป็นการตอบสนองที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเม็ดเลือดขาวและพลาสมาโปรตีนบริเวณที่มีการติดเชื้อและมีการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ องค์ประกอบหลักของการอักเสบเฉียบพลัน ได้แก่ เกิดการเปลี่ยนแปลงของขนาดและการไหลเวียนภายในหลอดเลือด มีการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของเส้นเลือดฝอย เอื้ออำนวยให้เกิดการรั่วไหลของพลาสมาโปรตีนและเม็ดเลือดขาวออกนอกหลอดเลือดและเกิดการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวไปรวมตัวบริเวณที่มีการบาดเจ็บเพื่อการกำจัดสิ่งแปลกปลอม (Kumar *et al.*, 2010) ดังรูปที่ 1-1



รูปที่ 1-1 การเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดและเซลล์อักเสบในการอักเสบเฉียบพลัน (Kumar *et al.*, 2010)

สิ่งกระตุ้นที่ก่อให้เกิดการอักเสบเฉียบพลัน (stimuli of acute inflammation)

สิ่งกระตุ้นที่ก่อให้เกิดการอักเสบเฉียบพลันมี 4 ประการ ประการแรกคือ การติดเชื้อ (แบคทีเรีย ไวรัส เชื้อรา ปรสิต) และสารพิษจากเชื้อโรค ซึ่งเป็นสาเหตุส่วนใหญ่และที่สำคัญของการอักเสบ ตัวรับ (receptor) ในร่างกายที่มีบทบาทสำคัญต่อสิ่งกระตุ้นที่เป็นผลิตภัณฑ์จากจุลชีพคือ Toll-like receptor (TLRs) และยังมีตัวรับอื่น ๆ ที่อยู่ในไซโทพลาสซึม ซึ่งตัวรับเหล่านี้เมื่อได้รับการกระตุ้นแล้ว จะก่อให้เกิดการผลิตสารสื่อกลางการอักเสบหลายชนิด ประการที่สอง การตายของเซลล์แบบนีโครซิสซึ่งเกิดได้จากหลายสาเหตุด้วยกันเช่น ภาวะขาดเลือด (ischemia) การบาดเจ็บ (trauma) จากอุบัติเหตุ การบาดเจ็บจากปัจจัยทางกายภาพ (physical injury) และสารเคมี (chemical injury) ประการที่สาม สิ่งแปลกปลอม (foreign bodies) เป็นสิ่งกระตุ้นที่ก่อให้เกิดการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อและนำเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกาย ประการสุดท้าย ปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน (immune reactions) หรือเป็นภาวะที่ระบบภูมิคุ้มกันร่างกายมีการทำลายตัวเอง (hypersensitivity reactions) ซึ่งบางครั้งเป็นความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกันเอง หรือที่เรียกว่า autoimmune disease หรืออาจเกิดจากการทำงานที่มากเกินไปในการทำลายสิ่งแปลกปลอม ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่พบบ่อยในโรคที่มีการอักเสบ การอักเสบที่เกิดจากระบบภูมิคุ้มกันเป็นสาเหตุที่ไม่สามารถกำจัดออกได้ จึงก่อให้เกิดการอักเสบเรื้อรังและมีความยากลำบากในการรักษาให้หายได้ (Kumar *et al.*, 2010)

การเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดในการอักเสบเฉียบพลัน (reactions of blood vessels in acute inflammation)

ในกระบวนการอักเสบนั้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด เพื่ออำนวยความสะดวกต่อการเคลื่อนที่ของพลาสมาโปรตีนและเซลล์เม็ดเลือดขาวออกสู่บริเวณที่ได้รับบาดเจ็บ การมีสารน้ำ โปรตีนและเซลล์เม็ดเลือดออกจากหลอดเลือดสู่ช่องว่างระหว่างเซลล์ (interstitial tissue) หรือช่องว่างของร่างกาย (body cavities) เรียกว่า exudation ซึ่งสารน้ำ exudates หรือเรียกว่า น้ำหนอง ประกอบไปด้วยส่วนประกอบของเซลล์และโปรตีนจำนวนมาก ส่วนสารน้ำที่มีลักษณะใส ประกอบด้วยโปรตีนจำนวนน้อย (ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนอัลบูมิน) ไม่มีส่วนประกอบของเซลล์รั่วออกมา เรียกว่า transudates ซึ่งเกิดจากความไม่สมดุลกันระหว่างแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) และแรงดันไฮโดรสแตติก (hydrostatic pressure) ต่อผนังหลอดเลือด ซึ่งไม่ได้มีสาเหตุจากการสูญเสียความสามารถในการซึมผ่านผนังหลอดเลือดเหมือนสารน้ำ exudates เมื่อเกิดการอักเสบเฉียบพลัน หลอดเลือดจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสองประการดังนี้ ประการแรกการเปลี่ยนแปลงการไหลเวียนและขนาดของหลอดเลือด (changes in vascular flow and caliber) ในระยะแรกของการอักเสบ เนื้อเยื่อบริเวณอักเสบจะตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงทันที โดยหลอดเลือดขนาดเล็ก (arterioles) หดตัวและตีบลงภายในระยะเวลาสั้น

ไม่กี่วินาที (transient vasoconstriction) หลังจากนั้นหลอดเลือดเหล่านี้จะขยายออก (vasodilatation) ปล่อยให้เลือดไหลเข้าสู่ร่างแหของหลอดเลือดฝอย ทำให้หลอดเลือดฝอยจำนวนหนึ่งที่ก่อนหน้านี้ปิดชั่วคราวเปิดออก เพื่อรองรับปริมาณเลือดที่ไหลเข้ามา การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้เป็นผลมาจากการหลั่งของสารเคมีภายในร่างกายหลายชนิดเมื่อเกิดการอักเสบ เช่น histamine, bradykinin, leukotriene, nitric oxide เป็นต้น ในขณะที่เดียวกันความดันเลือดในหลอดเลือดฝอยก็จะเพิ่มมากขึ้น เป็นผลให้ของเหลวในเส้นเลือดฝอยไหลผ่านผนังหลอดเลือดออกสู่ภายนอกไปยังช่องว่างระหว่างเซลล์เกิดการสะสมของของเหลวในเนื้อเยื่อบริเวณดังกล่าว นอกจากนี้ภายในหลอดเลือดที่สูญเสียของเหลวออกไปกลับมีความเข้มข้นของเลือดเพิ่มขึ้น เป็นผลให้ของเหลวในหลอดเลือดเพิ่มความหนืดมากขึ้น เลือดไหลช้าลงเรียกว่า stasis เมื่อมองดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในระยะนี้พบหลอดเลือดในเนื้อเยื่อบริเวณอักเสบขยายออกพร้อมกับมีเม็ดเลือดแดงบรรจุเต็มภายในหลอดเลือด เม็ดเลือดขาวโดยเฉพาะนิวโทรฟิล (neutrophils) ที่ไหลผ่านหลอดเลือดมีการเปลี่ยนแปลง โดยในภาวะปกติเม็ดเลือดขาวที่ไหลอยู่ในหลอดเลือดจะไหลอยู่กลางหลอดเลือด เมื่อเลือดเกิดความหนืดและไหลช้าลง เม็ดเลือดขาวเหล่านี้จะกระจายหนีห่างจากแกนกลางหลอดเลือดเข้าหาผนังและกลิ้งไปตามพื้นผิวผนังเส้นเลือดฝอยและหลอดเลือดดำขนาดเล็ก (venules) จนในที่สุดเกาะติดกับผนังหลอดเลือด เกิดการสะสมรวมกันที่ผนังหลอดเลือดและแทรกผ่านผนังหลอดเลือดออกสู่ช่องว่างระหว่างเซลล์และเนื้อเยื่อบริเวณข้างเคียง ประการที่สอง การเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของผนังหลอดเลือด (increase vascular permeability or vascular leakage) ของเหลวในหลอดเลือดบริเวณที่เกิดการอักเสบไหลผ่านผนังหลอดเลือดออกสู่ภายนอก ทำให้เกิดการสะสมของของเหลวในช่องว่างระหว่างเซลล์และเนื้อเยื่อบริเวณข้างเคียง ภาวะดังกล่าวอาจเกิดจากสาเหตุร่วมได้อีกหลายประการ การที่ของเหลวรั่วไหลหรือซึมผ่านผนังหลอดเลือดได้อย่างคล่องตัวมากขึ้นเรียกว่า การเพิ่มสภาวะการซึมผ่านผนังหลอดเลือด (vascular permeability) และของเหลวที่รั่วไหลออกมานี้มีปริมาณโปรตีนค่อนข้างสูงทำให้เกิดแรงดันคอลลอยด์ออสโมซิส (extravascular colloid osmotic pressure) นอกหลอดเลือดเพิ่มขึ้นในขณะที่เดียวกันทำให้แรงดันคอลลอยด์ออสโมซิสในหลอดเลือด (intravascular colloid osmotic pressure) ลดลง ในขณะที่ความดันเลือด (hydrostatic pressure) ในหลอดเลือดกลับเพิ่มขึ้น น้ำจึงไหลผ่านผนังหลอดเลือดออกสู่ภายนอกมากขึ้น เป็นผลทำให้เลือดเข้มข้นขึ้น ไหลช้าลงและเนื้อเยื่อข้างเคียงเกิดการบวม (Kumar *et al.*, 2010)

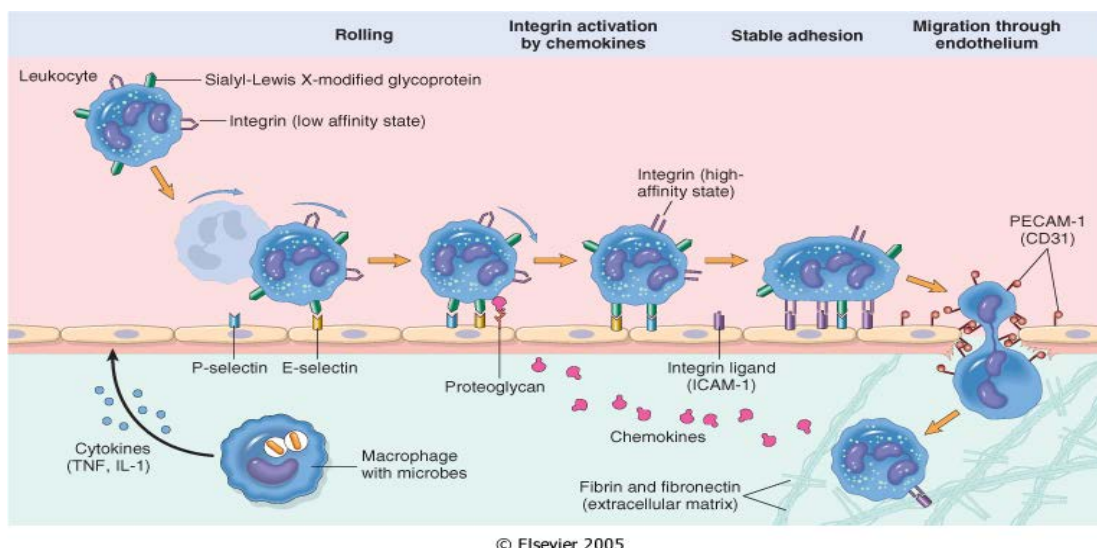
การรั่วไหลของสารน้ำในช่วงของการอักเสบเฉียบพลันเกิดจากหลายสาเหตุ สาเหตุแรกเป็นผลจากการกระตุ้นของสารชักนำการอักเสบ เช่น histamine, bradykinin, leukotriene, neuropeptide และ substance P ทำให้เกิดช่องว่างระหว่างเซลล์บุผนังหลอดเลือดดำขนาดเล็ก เนื่องจากพบตัวรับของสารเหล่านี้จำนวนมากบนผนังหลอดเลือดดำขนาดเล็ก เมื่อเกิดการจับกันก่อให้เกิดการหดตัวทันทีเป็นระยะเวลาสั้น ๆ ประมาณ 15 ถึง 30 นาที เรียก

ปรากฏการณ์นี้ว่า immediate transient response นอกจากนี้ยังมีการหดตัวของเซลล์บุผนังหลอดเลือดดำ (endothelial venule cell retraction) ที่เกิดจากการกระตุ้นของสารกลุ่มไซโตไคน์ (cytokines) เช่น IL-1, TNF และ interferon (IFN) เป็นต้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในโครงสร้างของเซลล์บุผนังหลอดเลือด โดยเฉพาะพวก cytoskeleton และ junctional complex เป็นผลให้เซลล์บุผนังหลอดเลือดดำมีขนาดเล็กลงทำให้เซลล์ห่างจากกัน เกิดช่องว่างระหว่างเซลล์มากขึ้น ทำให้ของเหลวไหลออกจากหลอดเลือดได้มากขึ้น แต่การย่นย่อขนาดของเซลล์จะใช้เวลานานกว่าวิธีแรก (endothelial cell contraction) ประมาณ 4 ถึง 6 ชม. นับจากตัวรับของเซลล์บุผนังหลอดเลือดดำเกาะจับกับสารเคมีดังกล่าวและเปิดช่องว่างระหว่างเซลล์บุผนังหลอดเลือดดำได้นานกว่า 24 ชม. หรือมากกว่าสาเหตุที่สอง เกิดการทำลายเซลล์บุผนังหลอดเลือดโดยตรง (direct endothelial injury) เซลล์บุผนังหลอดเลือดตายหรือหลุดร่อนจากผลการทำลายเยื่อบุผนังหลอดเลือดโดยตรง เช่น จากการถูกไฟไหม้หรือน้ำร้อนลวกอย่างรุนแรงหรือถูกทำลายจากสารพิษของจุลชีพต่าง ๆ เป็นต้น ทำให้ของเหลวไหลออกจากหลอดเลือดเข้าสู่บริเวณใกล้เคียงอย่างรวดเร็วและกินเวลานานหลายชั่วโมงหรือจนกว่าเส้นเลือดที่ถูกทำลายได้รับการซ่อมแซมหรือเกิดก้อนเลือดแข็งจับติดผนังหลอดเลือด (thrombosis) สาเหตุที่สาม การรั่วไหลเกิดขึ้นขณะที่เม็ดเลือดขาวเคลื่อนที่ผ่านผนังหลอดเลือด (leukocyte-dependent leakage หรือ leukocyte-mediated endothelial injury) ในระยะแรกของการเกิดอักเสบ ขณะเม็ดเลือดขาวไหลทะลุผ่านผนังหลอดเลือดอาจปล่อยสารพิษที่เกิดจากขบวนการสันดาปของออกซิเจน (toxic oxygen species) รวมถึงเอนไซม์ เช่น lysozyme ที่หลั่งออกมาทำลายเซลล์บุผนังหลอดเลือดดำทำให้ของเหลวไหลออกสู่ภายนอก สาเหตุที่สี่ การรั่วไหลของสารน้ำเกิดจากการเพิ่มกระบวนการไหลซึมผ่านช่องว่างในเซลล์บุผนังหลอดเลือดที่เรียกว่า increased transcytosis โดยอาศัยการเชื่อมต่อกันของถุงขนาดเล็กภายในเซลล์ (intracellular vesicles) ของเซลล์บุผนังหลอดเลือดกลายเป็นช่องว่าง (channels) ทำให้ของเหลวรั่วไหลออกจากผนังหลอดเลือดได้ เหตุการณ์นี้จะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์บุผนังหลอดเลือดดำได้รับการกระตุ้นจากสารชักนำบางชนิด เช่น vascular endothelial growth factor (VEGF) และสาเหตุที่ห้า ในขณะที่มีการสร้างเซลล์บุผนังหลอดเลือดใหม่ (regenerating endothelium) ในกระบวนการซ่อมแซมของร่างกายนั้น เส้นเลือดฝอยที่เพิ่งสร้างใหม่เจริญเติบโตและงอกยาวออกมา (angiogenesis) เซลล์บุผนังหลอดเลือดที่เกิดขึ้นใหม่ยังไม่แข็งแรงและเจริญเต็มที่ทำให้เกิดช่องว่างระหว่างเซลล์ได้ง่าย ของเหลวจึงไหลออกสู่ภายนอกหลอดเลือดได้ง่ายทำให้เกิดการบวม (Kumar *et al.*, 2010)

การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เม็ดเลือดขาว (cellular events)

เม็ดเลือดขาวหลุดออกจากผนังหลอดเลือด (leukocyte extravasation) เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นหลังจากการรวมตัวของเม็ดเลือดขาวที่ผนังหลอดเลือดโดยเม็ดเลือดขาวจะแทรกผ่านผนังหลอดเลือดไปยังบริเวณเนื้อเยื่อที่ได้รับบาดเจ็บ เพื่อเตรียมตัวทำลายสิ่ง

กระตุ้นการอักเสบและเก็บกินเซลล์ที่ตาย เริ่มจากเม็ดเลือดขาวเกาะติดผนังหลอดเลือดและเคลื่อนย้ายไปยังที่ที่มีการอักเสบ (adhesion and transmigration) ซึ่งเหตุการณ์นี้เกิดขึ้นเฉพาะที่ผนังหลอดเลือดดำขนาดเล็กเท่านั้นโดยอาศัยการเกาะจับของตัวรับที่เรียกว่า อนุภาคเกาะจับ (adhesion molecules) ซึ่งพบบนผนังเซลล์ของเม็ดเลือดขาวและเซลล์บุผนังหลอดเลือดเปรียบเสมือนการจับกันของลูกกุญแจกับแม่กุญแจหรือตัวต่อที่แนบกันสนิทโดยอาศัยสารเคมีบางชนิดเป็นตัวช่วยสร้างตัวรับเหล่านี้ เช่น สารเคมีชักนำ (chemoattractants) และไซโตไคน์บางชนิด เช่น IL-1 อนุภาคเกาะจับเหล่านี้สามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ สารในกลุ่มแรกคือ selectins เช่น E-selectin (ELAM-1) พบบนผิวเซลล์เยื่อบุด้านในผนังหลอดเลือด P-selectin พบบนเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดและเกล็ดเลือด L-selectin (LAM-1) พบบนพื้นผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว เป็นต้น สารในกลุ่มที่สองคือ immunoglobulins ที่สำคัญมีอยู่ 2 ชนิด คือ intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) และ vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) พบบนเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด ทำหน้าที่ยึดเกาะกับ integrin ซึ่งอยู่บนเซลล์เม็ดเลือดขาว สารในกลุ่มที่สามคือ integrin พบได้ในเซลล์หลายชนิด เช่น beta2/lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1), macrophage-1 (MAC-1) และ beta1/very late antigen-4 (VLA-4) สารกลุ่มสุดท้ายคือ สารกลุ่ม mucin-like glycoprotein เช่น heparan sulfate พบได้ทั้งในเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ (extracellular matrix) และบนผิวเซลล์หลายชนิด ทำหน้าที่จับกับ CD44 ซึ่งเป็นอนุภาคเกาะจับบนเซลล์เม็ดเลือดขาว กระบวนการที่เม็ดเลือดขาวเกาะติดผนังหลอดเลือดและเคลื่อนย้ายไปยังที่ที่มีการอักเสบเกิดขึ้นเป็นลำดับขั้นตอนต่าง ๆ ได้แก่ การเข้าหาผนังหลอดเลือด (margination) เมื่อการไหลเวียนเลือดช้าลง เซลล์เม็ดเลือดขาวกระจายเข้าหาผนังหลอดเลือดและรวมตัวสะสมที่ผนังหลอดเลือดด้านใน การกลิ้ง (rolling) เมื่อชนิดผนังหลอดเลือดแล้วจะกลิ้งไปตามผนังเป็นการหมุนไปบนผนังหลอดเลือด เพื่อให้ได้ตำแหน่งที่เหมาะสมในการยึดเกาะ การยึดเกาะ (adhesion) เป็นการยึดเกาะของเซลล์เม็ดเลือดขาวกับผนังหลอดเลือดการจัดเรียงตัวแบบชิดติดผนัง (pavementing) ในที่สุดเม็ดเลือดขาวเหล่านี้เบียดชิดกันเองและจัดเรียงอย่างเป็นระเบียบเกาะติดผนังหลอดเลือดเป็นแผ่นฉาบอีกชั้นหนึ่งการเคลื่อนที่ผ่านผนังหลอดเลือด (transmigration หรือ diapedesis) เม็ดเลือดขาวจะยื่นขาเทียม (pseudopod) ออกไปและแทรกตัวตามช่องว่างระหว่างเซลล์บุผนังหลอดเลือดเข้าไปอยู่ในช่องว่างระหว่างผนังหลอดเลือดด้านในกับ basement membrane จนในที่สุดแทรกทะลุออกสู่ภายนอกหลอดเลือดและเคลื่อนที่เข้าหาบริเวณเนื้อเยื่อที่เกิดอักเสบ โดยปกติช่องว่างระหว่างเซลล์ผนังหลอดเลือด (intercellular junction) จะปิดกลับสนิททันทีเมื่อไซโทพลาซึมโดยไมโททอซอแยก แต่บางครั้งอาจมีเม็ดเลือดแดงเล็ดลอดผ่านออกมาได้ กระบวนการสุดท้ายเกิดการเคลื่อนที่ (migration) ของเม็ดเลือดขาวสู่บริเวณเนื้อเยื่อที่ได้รับบาดเจ็บ (Kumar *et al.*, 2010) ดังรูปที่ 1-



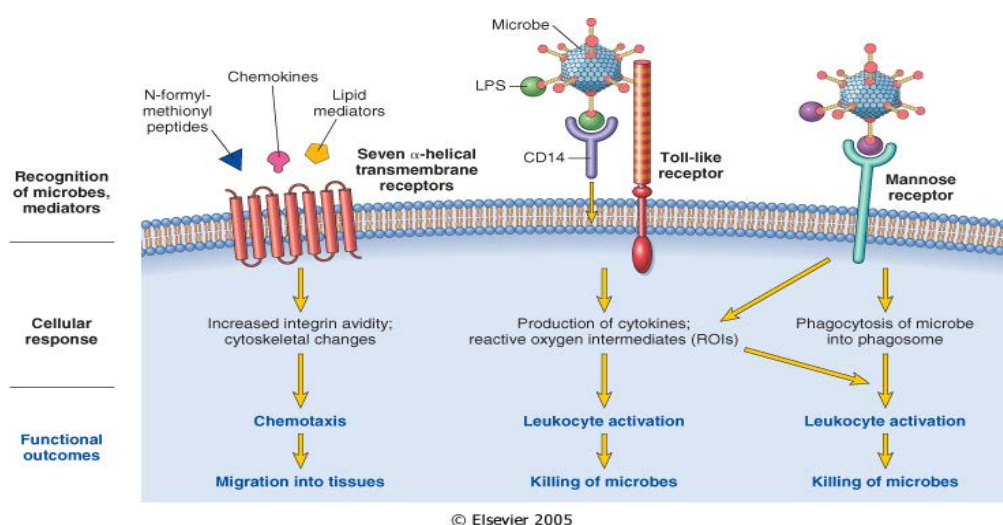
รูปที่ 1-2 การเคลื่อนตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวจากหลอดเลือดเข้าสู่เนื้อเยื่อที่มีการอักเสบ (Kumar *et al.*, 2010)

การชักนำเซลล์เม็ดเลือดขาวเข้าสู่บริเวณเนื้อเยื่อที่ได้รับบาดเจ็บต้องอาศัยการทำงานของอนุภาคเกาะจับซึ่งกระบวนการนี้เริ่มต้นในขณะที่ร่างกายหลัง histamine, thrombin และ platelet activating factor (PAF) จะกระตุ้นให้ Weibel-palade body ปล่อย P-selectin ซึ่งสะสมอยู่ภายในให้ออกมาปรากฏที่ผิวเซลล์ นอกจากนี้ แมโครฟาจ (macrophage), เซลล์แมสต์ (mast cell) และเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดในเนื้อเยื่อที่ได้รับบาดเจ็บจะหลั่งสาร TNF และ IL-1 ซึ่งสามารถกระตุ้นเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดที่อยู่ข้างเคียงสร้าง E-selectin ขึ้นบนผนังเซลล์ ส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวจะสร้าง selectin ligand ซึ่งจะจับกับ selectin ที่อยู่บนผิวเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวสามารถจับกับเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด นอกจากนี้ TNF และ IL-1 จะกระตุ้นให้เซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดสร้าง integrin ligand ได้แก่ VCAM-1 และ ICAM-1 ทำหน้าที่จับกับ integrin บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว รวมทั้งมีสารเคมีอีกหลายชนิดที่ส่งเสริมให้การจับกันของ integrin กับ VCAM-1 และ ICAM-1 แน่นหนามากขึ้น เมื่อมีการจับกันระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดจะเกิดกระบวนการแทรกผ่านของเซลล์เม็ดเลือดผ่านผนังหลอดเลือด ซึ่งในกระบวนการนี้อนุภาคเกาะจับที่มีบทบาทสำคัญคือ platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1 หรือ CD31) ในช่วงแรกของการบาดเจ็บ ประมาณ 6 ถึง 24 ชม. แรกจะพบนิวโทรฟิลแทรกเข้าสู่เนื้อเยื่อที่ได้รับบาดเจ็บ เนื่องจากนิวโทรฟิลมีจำนวนมากในกระแสเลือดแต่ด้วยมีอายุค่อนข้างสั้นและจะเกิด apoptosis ภายใน 24 ถึง 48 ชม. แต่จะมีโมโนไซต์ (monocytes) และแมโครฟาจแทรกมาแทนที่ อย่างไรก็ตามในการบาดเจ็บของเนื้อเยื่ออาจพบเซลล์อักเสบที่แตกต่างกัน เช่น ในการติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* อาจพบนิวโทรฟิลได้ถึง 4 วัน การติดเชื้อไวรัสอาจพบลิมโฟไซต์

(lymphocytes) เป็นเซลล์ชนิดแรกหรือในปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันบางชนิด (hypersensitivity reaction) เซลล์ที่มีบทบาทอาจเป็นอีโอซิโนฟิล (eosinophils) (Kumar *et al.*, 2010)

เม็ดเลือดขาวที่ออกสู่ภายนอกหลอดเลือดจะถูกชักนำด้วยสารเคมีเพื่อมุ่งเข้าหาบริเวณอักเสบเรียกขบวนการนี้ว่า chemotaxis สารเคมีชักนำ (chemotactic stimuli) จากภายนอก (exogenous stimuli) ที่พบบ่อยได้แก่ ผลผลิตจากเชื้อแบคทีเรียซึ่งเป็นสาร polypeptides หรือ สารจำพวกไขมัน (lipid substances) สารเคมีชักนำจากภายในร่างกาย (endogenous stimuli) เช่น สารที่เกิดจากระบบ complement โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประกอบเชิงซ้อนของ complement C5, C6 และ C7 รวมถึงผลผลิตที่เกิดจาก C3 และ C5 ได้แก่ C3a และ C5a นอกจากนี้ผลผลิตจากกรดไขมัน arachidonic acid จากโมเลกุลฟอสโฟลิพิด (phospholipids) ในเยื่อหุ้มเซลล์ผ่านกระบวนการ lipoxigenase pathway ได้แก่ leukotriene B₄ เป็นต้น อีกทั้งสารพวกไซโตไคน์เป็นสารเคมีชักนำจำพวกหนึ่ง สารเคมีชักนำเหล่านี้ทำหน้าที่จับกับตัวรับบนเซลล์เม็ดเลือดขาวกระตุ้นให้มีการสร้าง actin มากขึ้น เพื่อช่วยในการเคลื่อนที่สู่เนื้อเยื่อที่มีการบาดเจ็บ การที่เม็ดเลือดขาวเคลื่อนที่เข้าหาบริเวณอักเสบโดยอาศัยการชักนำของสารเคมีนั้น เริ่มจากอาศัยขบวนการปฏิกิริยาหลายขั้นตอนภายในเยื่อหุ้มเซลล์และไซโทพลาสซึม จนเกิดการสร้างสาร second messengers ภายในเซลล์ โดยเริ่มแรกเมื่อสารเคมีชักนำ (chemoattractants) จับกับตัวรับบนผนังเซลล์เม็ดเลือดขาว ก่อให้เกิดการกระตุ้นเอนไซม์ phospholipase C (โดยอาศัยสาร G-protein) เกิดปฏิกิริยา hydrolysis ต่อ phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) ไปเป็นสาร inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃) และ diacylglycerol (DAG) ร่วมกับการหลั่งแคลเซียมจากแหล่งสะสมภายในและภายนอกเซลล์ การเพิ่มปริมาณแคลเซียมในไซโทพลาสซึมทำให้เกิดขบวนการเหนี่ยวนำให้ contractile elements ได้แก่ actin และ myosin ทำงาน เกิดการเคลื่อนไหวของเซลล์โดยไซโทพลาสซึมถูกผลักดันไปข้างหน้า พร้อมกับดันเยื่อหุ้มเซลล์ออกไปด้วย เกิดเป็นขาเทียมยื่นออกไปและดึงเอาส่วนอื่น ๆ ที่เหลือของเซลล์ตามติดไปด้วย เซลล์จึงเกิดการเคลื่อนที่ไปด้านหน้าในกระบวนการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวให้สามารถทำงานได้นั้นจำเป็นต้องอาศัยสารต่าง ๆ มากกระตุ้นผ่านอนุภาคเกาะจับหรือตัวรับต่าง ๆ ของเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยสามารถแบ่งชนิดของอนุภาคเกาะจับบนผนังเซลล์เม็ดเลือดขาวได้หลายชนิด (ดังรูปที่ 3) ชนิดแรก TLRs เป็นตัวรับที่ทำหน้าที่จับกับสารที่พบในเชื้อแบคทีเรีย เช่น lipopolysaccharide (LPS) และ proteoglycans รวมทั้งเชื้อไวรัสบางชนิด การจับกันดังกล่าวมีผลกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวให้สร้างไซโตไคน์และสารชนิดต่าง ๆ เพื่อทำลายเชื้อโรค (microbicidal substance) ตัวรับชนิดที่สอง different seven-transmembrane G-protein-couple receptors สารที่จับกับตัวรับชนิดนี้คือ chemokine, complement C5a, PAF, prostaglandin E และ leukotriene B₄ การจับกับอนุภาคเกาะจับชนิดนี้ ทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวสร้างสารทำลายเชื้อโรคและยังส่งเสริมกระบวนการ migration ของเซลล์เม็ดเลือดขาวตัวรับชนิดที่สามคือ ตัวรับสำหรับไซโตไคน์ พบในเซลล์กลุ่มฟาโกไซต

(phagocytes) สารที่จับกับตัวรับนี้คือ ไซโตไคน์ ซึ่งตัวที่สำคัญและมีบทบาทชัดเจน คือ IFN- γ ซึ่งสร้างจากเซลล์ lymphocytes ชนิด NK cell และ T-lymphocytes ทำหน้าที่กระตุ้นแมโครฟาจ ตัวรับชนิดที่สี่คือ ตัวรับสำหรับออปโซนิน (opsonins) สารที่ทำหน้าที่เป็นออปโซนิน เช่น antibody, complement proteins และ lectin ซึ่งจะจับกับสิ่งแปลกปลอมทำให้เซลล์ phagocytes สามารถเก็บกินสิ่งแปลกปลอมนั้นได้ง่าย ตัวอย่างของตัวรับกลุ่มนี้ เช่น Fc receptor บนเซลล์ฟาโกไซโตสซึ่งจับกับ IgG antibody หรือ complement receptor type 1 (CR1) ซึ่งจับกับ complement protein C3 (Kumar *et al.*, 2010) ดังรูปที่ 1-3



รูปที่ 1-3 กลไกการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยผ่านตัวรับชนิดต่าง ๆ (Kumar *et al.*, 2010)

กระบวนการเก็บกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว (phagocytosis) มีลำดับเหตุการณ์การดังนี้ การรับรู้สิ่งแปลกปลอมและการเข้าประชิด (recognition and attachment) เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกายจะมีสาร opsonins เข้าจับ ซึ่ง opsonins จะทำหน้าที่เกาะจับกับตัวรับบนผนังเม็ดเลือดขาวอีกต่อหนึ่ง มิเช่นนั้นเม็ดเลือดขาวจะจับกินสิ่งแปลกปลอมไม่ได้ เนื่องจากพื้นผิวของทั้งสองมีประจุไฟฟ้าเหมือนกันจึงเกิดแรงผลักรันให้ออกห่างจากกัน สาร opsonins ที่สำคัญได้แก่ Fc fragment ของ immunoglobulin G (IgG) และ C3b (หรือเรียกว่า opsonin fragment ของ C3 ซึ่งสามารถถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นได้จาก immune complex (Ag-Ab complex) สารเคมีหรือผลิตภัณฑ์จากจุลชีพ แต่ในบางกรณีมีข้อยกเว้นไม่ต้องอาศัย opsonins แต่อาศัยการทำงานของเม็ดเลือดขาวในการตรวจจับสาร LPS บนผนังเซลล์จุลชีพเอง ขั้นตอนที่สองคือการเข้าเขมือบ (engulfment) ภายหลังจาก opsonins จับกับตัวรับบนผนังเซลล์เม็ดเลือดขาวแล้ว จะเกิดการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวผ่านทางตัวรับเหล่านี้ โดยอาศัยสารบางอย่างร่วมในการทำให้เกิดการกระตุ้นเม็ดเลือดขาว ได้แก่ สารที่ปกติพบในเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ เช่น fibronectin และ laminin นอกจากนี้ยังพบสารจำพวกไซโตไคน์บางชนิด จนในที่สุดเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ ขึ้นในเยื่อหุ้มเซลล์และมีการสร้างและหลั่งตัวสื่อสัญญาณตัวที่สอง (second

messengers) และการคั่งของแคลเซียมในเซลล์ กระบวนการนี้ทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวสามารถเคลื่อนที่ได้ โดยการยื่นขาเทียมออกไปล้อมรอบสิ่งแปลกปลอมและรวบรวมเข้ามาในไซโทพลาสซึมของเซลล์เกิดเป็นถุงน้ำหุ้มด้วยเยื่อบางของเยื่อหุ้มเซลล์ภายในบรรจุสิ่งแปลกปลอมที่กินเข้ามา เรียกถุงน้ำนี้ว่า phagosome ต่อจากนั้นไลโซโซมที่อยู่ในไซโทพลาสซึมจะเข้าไปประชิด phagosome ถุงน้ำทั้งสองจะสมานรวมกันเป็นถุงเดี่ยว เรียกว่า phagolysosome ทั้งนี้เม็ด granules ที่บรรจุอยู่ในไลโซโซมซึ่งมีเอนไซม์ย่อยสิ่งแปลกปลอมมีการแตกออกปล่อยสารเคมีช่วยย่อยเข้าสู่ phagolysosome จนสุดท้ายจะเข้าสู่ขั้นกระบวนการทำลายและย่อยสิ่งแปลกปลอม (killing and degradation) ภายหลังจาก phagocytosis สารเคมีในไลโซโซมจะทำการย่อยสิ่งแปลกปลอมใน phagolysosome การย่อยนี้เกิดการเผาผลาญโดยอาศัยออกซิเจนเกิดการสันดาปสารจำพวกแป้ง (glycogenolysis) ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันต่อสารพวกน้ำตาล โดยผ่านกระบวนการ hexose-monophosphate shunt และในที่สุดได้สารก่อปฏิกิริยาจากออกซิเจนหลายชนิด (reactive oxygen metabolites) กระบวนการดังกล่าวข้างต้น เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADPH) โดยอาศัยเอนไซม์ NADPH oxidase จนได้สารก่อปฏิกิริยา คือ อนุภาค superoxide anion (O_2^-) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ไม่เสถียร จะเกิดปฏิกิริยา dismutation ได้ hydrogen peroxide (H_2O_2) โดยจะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ myeloperoxidase (MPO) โดยอาศัยสาร halide เช่น อนุภาค chloride (Cl^-) ไปเป็นน้ำ (H_2O) และ hydroxyl chloride ($HOCl$) สารชนิดนี้มีคุณสมบัติในการฆ่าจุลชีพ (antimicrobial agent) ผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของยีนที่สร้างองค์ประกอบของ NADPH oxidase จะเกิดการติดเชื้อได้ง่าย เกิดโรค chronic granulomatous disease (CGD) เป็นต้น (Kumar *et al.*, 2010)

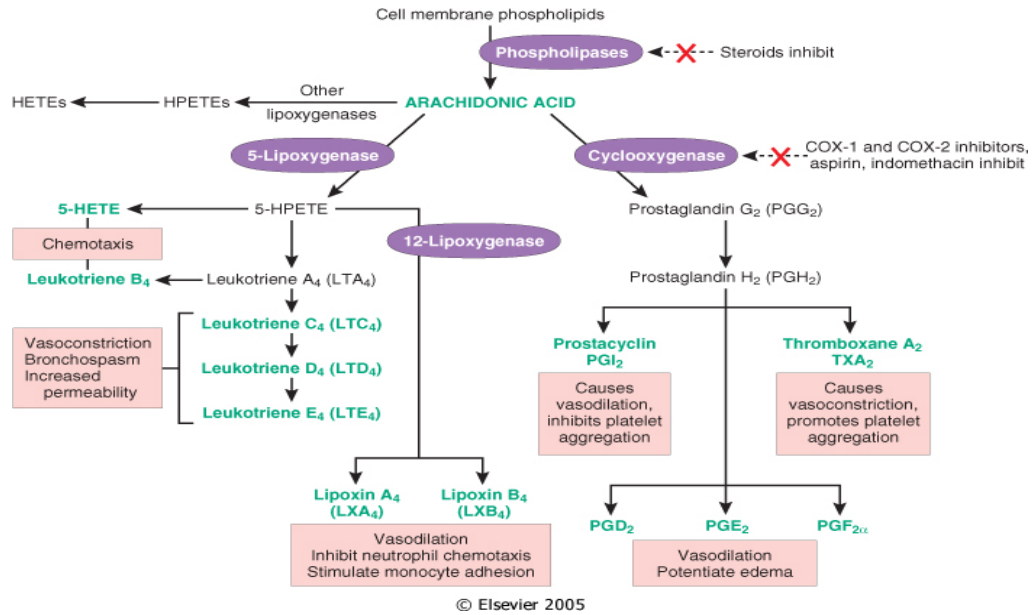
สารชักนำการอักเสบ (inflammatory chemical mediators)

ในกระบวนการอักเสบมีการผลิตและหลั่งสารสื่อกลางและสารชักนำการอักเสบมากมาย เพื่อให้การอักเสบสามารถดำเนินได้อย่างมีประสิทธิภาพ จนสามารถกำจัดสิ่งก่อภัยอันตรายและการฟื้นฟูความสมดุลของเนื้อเยื่อกลับมา สารชักนำการอักเสบสามารถแบ่งออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ ๆ กลุ่มแรกเป็นสารชักนำการอักเสบที่ได้มาจากเซลล์ ซึ่งมีทั้งกลุ่มสารที่มีอยู่ดั้งเดิมในเซลล์ (preformed) และกลุ่มสารที่มีการสร้างขึ้นใหม่ (newly synthesized) กลุ่มสารที่มีอยู่ดั้งเดิมในเซลล์ ได้แก่ สารกลุ่ม vasoactive amine สารในกลุ่มนี้ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบมีด้วยกัน 2 ชนิด คือ ฮีสตามีน (histamine) พบได้ทั่วไปในเนื้อเยื่อ พบมากในเซลล์แมสต์ซึ่งพบอยู่ตามเนื้อเยื่อรอบ ๆ หลอดเลือด นอกจากนี้สารฮีสตามีนยังพบในเบโซฟิล (basophils) และเกล็ดเลือด สารฮีสตามีนจะจับกับ H_1 receptor บนเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดทำให้เกิดการขยายหลอดเลือดแดงขนาดเล็ก และเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านผนังหลอดเลือดของหลอดเลือดดำขนาดเล็กโดยกระตุ้นให้เกิดการหดตัวของผนังหลอดเลือดดำและขยายช่องว่างระหว่างเซลล์บุผนังหลอดเลือด ภาวะที่สามารถกระตุ้นการหลั่งสารฮีสตามีนออก

จากเซลล์แมสต์ได้มีหลายกรณี เช่น การบาดเจ็บทางกายภาพ (physical injury) เช่น การได้รับอุบัติเหตุความร้อน หรือความเย็นปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน เช่น กรณีสโตรคหรือหัวใจล้มเหลว เซลล์แมสต์ การกระตุ้นโดยสารกลุ่ม anaphylatoxins เช่น complement C3a และ C5a และการกระตุ้นปฏิกิริยาโดยชีวโมเลกุลอื่น ๆ เช่น โปรตีนที่หลั่งจากเม็ดเลือดขาว ที่เรียกว่า histamine-releasing proteins, substance P และสารไซโตไคน์ เช่น IL-1 และ IL-8 สารในกลุ่ม vasoactive amine ตัวที่สองคือ ซีโรโทนิน (serotonin) ถูกสร้างจากเกล็ดเลือดและ enterochromaffin cells และจะถูกกระตุ้นให้มีการหลั่งโดย PAF นอกจากนี้ในกระบวนการ platelet aggregation ก็สามารถพบซีโรโทนินได้เช่นกัน โดยผลของการหลั่งจะเหมือนกับฮีสตามีน สารที่มีอยู่ดั้งเดิมอีกชนิดหนึ่งคือ lysosomal compounds เป็นสารชีวโมเลกุลที่พบในไลโซโซมของเม็ดเลือดขาวและโมโนไซต์ สารเหล่านี้เมื่อปล่อยออกมาจากเซลล์มีผลชักนำให้เกิดการอักเสบได้ สารเคมีในไลโซโซมเหล่านี้มีหลายชนิดที่สำคัญรวมเรียกว่า proteases (เช่น elastase, collagenase, proteinase เป็นต้น) สารต่าง ๆ เหล่านี้ทำลายเนื้อเยื่อในร่างกาย ในขณะที่ร่างกายมีการสร้างสารต่อต้านสารเคมีเหล่านี้เรียกว่า antiproteases สารเหล่านี้ที่สำคัญ ได้แก่ สาร alpha-1-antitrypsin ซึ่งปกติจะคอยต้านตัวทำลาย (proteases) ที่สำคัญคือ elastase (Kumar *et al.*, 2010)

สารชักนำการอักเสบที่มีการสร้างขึ้นใหม่มีหลายกลุ่มย่อยด้วยกันดังนี้ กลุ่มที่หนึ่งคือ prostaglandins และ leukotrienes สารทั้งสองชนิดนี้เรียกรวมว่า eicosanoids เป็นผลิตภัณฑ์ได้จาก arachidonic acid ซึ่งเป็นสารที่เปลี่ยนมาจากฟอสโฟลิพิด อันเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยอาศัยการทำงานของ phospholipase ซึ่ง arachidonic acid ถูกย่อยต่อไปด้วยเอนไซม์ต่างชนิดกัน ทำให้ได้สาร 2 กลุ่ม คือ ถ้าถูกย่อยด้วยเอนไซม์ cyclooxygenase (COX) ได้สารกลุ่ม prostaglandins และหากถูกย่อยด้วยเอนไซม์ lipoxygenase ได้สารกลุ่ม leukotrienes และ lipoxins ซึ่งสารในกลุ่ม prostaglandins จะถูกย่อยต่อไปจนได้สารต่าง ๆ ตามแต่ชนิดของเอนไซม์ที่เข้าทำปฏิกิริยา เช่น ถูกย่อยด้วยเอนไซม์บนเกล็ดเลือดได้ thromboxane เป็นสารช่วยให้เกล็ดเลือดจับติดกัน (platelet aggregation activator) และทำให้เส้นเลือดหดตัว ส่วนที่เซลล์บุผนังหลอดเลือด มีเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งเปลี่ยน prostaglandins เป็น prostacyclin ทำให้หลอดเลือดขยายตัวและห้ามการจับกันของเกล็ดเลือด (platelet aggregation inhibitor) นอกจากนี้มีสาร prostaglandins ชนิดอื่น ๆ อีก เช่น prostaglandin D₂, prostaglandin E₂ และ prostaglandin F₂ สารเหล่านี้มีส่วนช่วยในกระบวนการอักเสบ ส่วนหนึ่งทำให้หลอดเลือดขยายตัวเกิดการบวม ส่วนสาร leukotrienes มีหลายชนิด เช่น leukotriene A₄, leukotriene B₄ มีบทบาทเกี่ยวกับการเกาะติดของเม็ดเลือดขาว ส่วน leukotriene C₄, leukotriene D₄ และ leukotriene E₄ ทำให้หลอดเลือดหดตัวและเพิ่มการซึมผ่านผนังหลอดเลือด รวมทั้งทำให้หลอดลมหดเกร็ง (bronchospasm) ในทางตรงข้ามสารกลุ่ม lipoxins เช่น lipoxin

A₄ และ lipoxin B₄ มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งกระบวนการอักเสบ (Kumar *et al.*, 2010) ดังรูปที่ 1-4 และตารางที่ 1-1



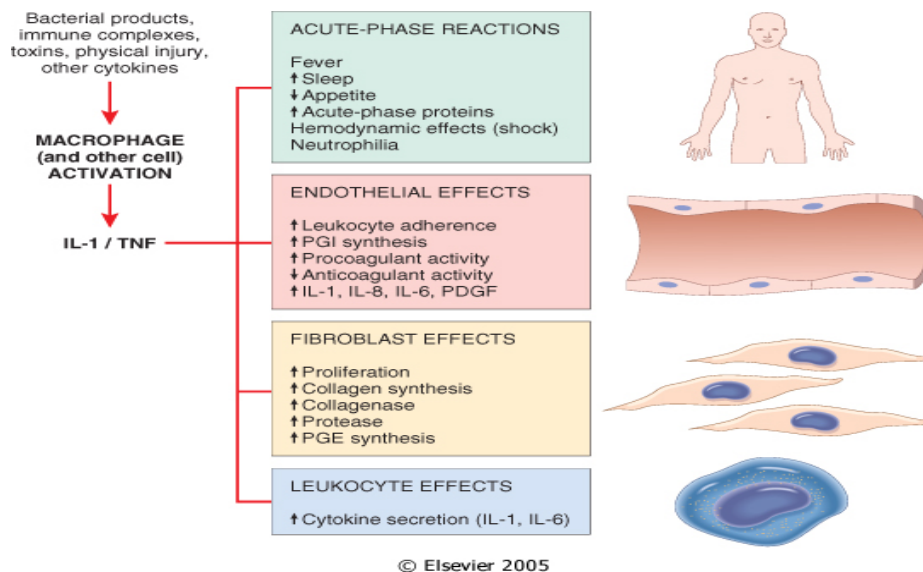
รูปที่ 1-4 การสร้างสารต่าง ๆ จาก arachidonic acid รวมทั้งหน้าที่ของสารเหล่านี้ในกระบวนการอักเสบ (Kumar *et al.*, 2010)

ตารางที่ 1-1 สารในกลุ่มของ eicosanoids และผลของสารในกระบวนการอักเสบ (Kumar *et al.*, 2010)

Actions	Eicosanoids
vasoconstriction	thromboxane, leukotriene C ₄ , -D ₄ , -E ₄
vasodilation	prostacyclin, prostaglandin E ₁ , -E ₂ , -D ₂
increased vascular permeability	leukotriene C ₄ , -D ₄ , -E ₄
chemotaxis and leukocyte adhesion	leukotriene B ₄ , HETE, lipoxins

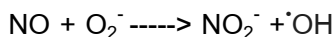
สารกลุ่มที่สอง PAF เป็นสารชักนำการอักเสบที่มีแหล่งกำเนิดมาจากโมเลกุลฟอสโฟลิพิดในเยื่อหุ้มเซลล์เช่นเดียวกับกลุ่ม arachidonic acid มีคุณสมบัติทำให้เกิดเลือดจับกันเป็นก้อน (aggregation) และเร่งการปลดปล่อยเกล็ดเลือดเข้าสู่กระแสเลือด นอกจากนี้ยังมีผลทำให้หลอดเลือดและหลอดลมหดตัว ในกรณีพบปริมาณเล็กน้อยในเลือดกลับช่วยให้หลอดเลือดขยายตัวและเพิ่มคุณสมบัติการซึมผ่านของผนังหลอดเลือดดำขนาดเล็ก (increased venular permeability) นอกจากนี้ PAF ยังช่วยในการเกาะติดผนังหลอดเลือดของเม็ดเลือดขาว (leukocyte adhesion) ส่งเสริมกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมและส่งเสริมให้เกิดการสร้าง chemical mediators ชนิดอื่น ๆ รวมทั้งช่วยเร่งการสร้างสาร eicosanoids ในเซลล์อีกด้วย สาร

PAF นอกจากสร้างมาจากฟอสโฟลิพิด ในเยื่อหุ้มเซลล์ยังถูกสร้างจากเซลล์อื่น ๆ อีกหลายชนิด เช่น เกล็ดเลือด เซลล์แมสต์ เม็ดเลือดขาวเบโซฟิล นิวโทรฟิลและแมโครฟาจและเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด สารกลุ่มที่สามคือ สารไซโตไคน์เป็นสารพวกโพลีเปปไทด์ (polypeptides) พบว่ามีการสร้างในเซลล์หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในลิมโฟไซตส์และแมโครฟาจ ไซโตไคน์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบเช่น IL-1, TNF และ IL-8 (ดังรูปที่ 1-5) โดยเฉพาะต่อเซลล์บุผนังหลอดเลือดในการช่วยสร้างอนุภาคเกาะจับเพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดขาวเกาะติดกับผนังหลอดเลือด ช่วยสร้างไซโตไคน์และ growth factors ตัวอื่น ๆ อีกทั้งยังช่วยการสร้างสาร eicosanoids และ nitric oxide ทำให้เกิดอาการทางคลินิกอื่น ๆ เมื่อมีการอักเสบ เช่น ไข้ สารชักนำในกลุ่มนี้บางชนิดมีบทบาทชักนำให้เซลล์มีการเคลื่อนที่เข้ามาในบริเวณที่มีการหลั่งสารมีอยู่ด้วยกัน 4 ชนิดคือ α -chemokines สารสำคัญในกลุ่มนี้ ได้แก่ IL-8 ซึ่งถูกหลั่งมาจากเซลล์แมโครฟาจ เซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดและสารที่กระตุ้นการหลั่ง IL-8 คือ TNF, IL-1 และสารพิษจากเชื้อโรค โดยการหลั่ง IL-8 มีผลทำให้เกิดกระบวนการกระตุ้นการทำงานและการเคลื่อนที่เข้าหาบริเวณที่มีการอักเสบของเซลล์นิวโทรฟิล ชนิดที่สอง β -chemokine ตัวอย่างสารสำคัญในกลุ่มนี้คือ monocyte chemoattractant protein (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1) และ regulate and normal T cell expressed and secreted (RANTES) ทำหน้าที่เป็น chemoattractant ต่อเซลล์โมโนไซตส์ อีโอซิโนฟิล เบโซฟิลและลิมโฟไซตส์ ชนิดถัดมา γ -chemokines เช่น lymphotaxin ทำหน้าที่ชักนำเซลล์ลิมโฟไซตส์ และชนิดสุดท้าย CX₃C chemokines ได้แก่ fractalkine ทำหน้าที่ชักนำเซลล์โมโนไซตส์และลิมโฟไซตส์ สาร nitric oxide เป็นสารที่มีการผลิตขึ้นใหม่ โดยอยู่ในรูปของก๊าซอนุภาคอิสระที่ละลายในน้ำ (soluble free radical gas) ปกติผลิตจากเซลล์บุผนังหลอดเลือด แมโครฟาจและเซลล์ประสาทในสมอง ทำให้เกิดการขยายหลอดเลือด เนื่องจากก๊าซ nitric oxide ไปเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณของ cyclic guanosine monophosphate (cGMP) ผลทำให้เซลล์กล้ามเนื้อในหลอดเลือดผ่อนคลายและเกิดการขยายหลอดเลือด



รูปที่ 1-5 ผลของ TNF และ IL-1 ต่อการเกิด acute phase reaction (Kumar *et al.*, 2010)

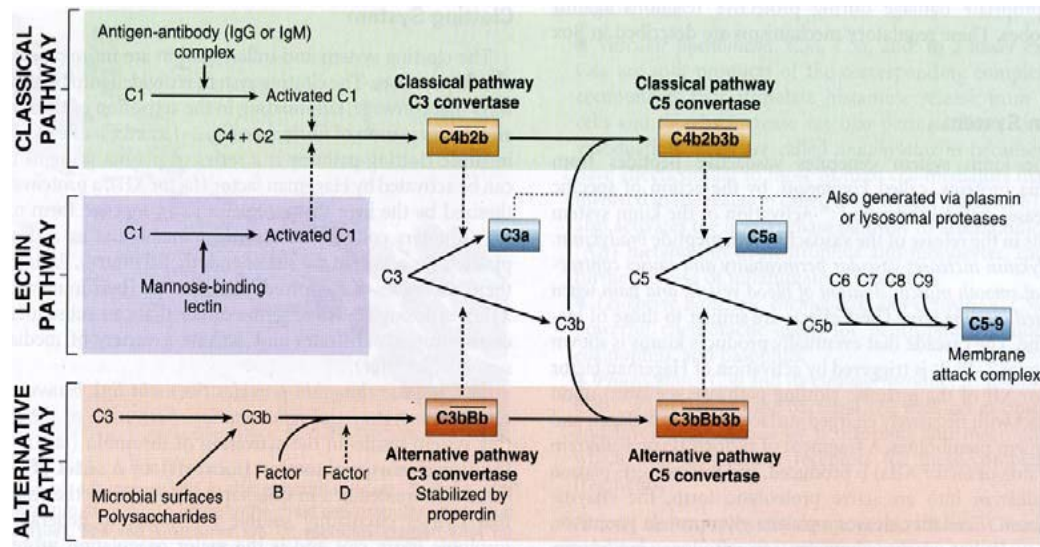
นอกจากนั้น nitric oxide ยังทำให้เกิดเลือดจับกันเป็นก้อนและติดแน่นกับผนังหลอดเลือดและยังทำปฏิกิริยากับ superoxide anion ได้สารอนุมูลอิสระที่สำคัญคือ nitrogen dioxide กับสาร hydroxyl radical ดังนี้



ในภาวะช็อค (shock) หลอดเลือดในร่างกายขยายตัวเนื่องจาก nitric oxide ที่ผลิตจากแมโครฟาจ อนุมูลอิสระจากออกซิเจน (oxygen-derived free radicals) กลุ่มอนุมูลอิสระเหล่านี้ถูกปลดปล่อยออกจากเซลล์เม็ดเลือดขาว สารเหล่านี้เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ NADPH ได้สาร superoxide ซึ่งจะทำปฏิกิริยาต่อไปเป็น H_2O_2 , hydroxyl radical ($^{\cdot}\text{OH}$) และสารพิษอื่น ๆ ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยากับ nitric oxide ในร่างกาย มีสารที่คอยทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้เรียกว่า antioxidant ซึ่งเป็นกลไกป้องกันร่างกายจากอันตรายที่เกิดจากอนุมูลอิสระอันตรายที่ได้รับมากน้อยขึ้นกับความสมดุลของสารทั้งสองจำพวกนี้ สารเหล่านี้หลังจากได้รับการกระตุ้นจากสารประกอบในเชื้อโรค คีโมไคน์ สารประกอบทางภูมิคุ้มกัน (immune complexes) และอนุมูลอิสระของออกซิเจนในปริมาณน้อยจะทำให้มีการสร้างคีโมไคน์ ไซโตไคน์ อนุมูลเกาะจับและสารชนิดอื่น ๆ ซึ่งส่งเสริมกระบวนการอักเสบ การหลั่งสารเหล่านี้ในปริมาณมากจะทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อของร่างกาย นอกจากนี้ยังมีผลยับยั้งการทำงานของ antiprotease ส่งเสริมให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อของร่างกายได้รุนแรงมากขึ้นนอกจากนี้ยังพบสารชักนำอื่น ๆ ที่มีบทบาทในกระบวนการอักเสบ ได้แก่ neuropeptides สารกลุ่มนี้มีกลไกการออกฤทธิ์คล้ายกับกลุ่ม vasoactive amines และ eicosanoids ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ เช่น neuropeptide, substance P และ neurokinin A เป็นต้น สารในกลุ่ม lysosomal ในนิวโทรฟิลและโมโนไซต์ จะพบ lysosomal granules ภายใน ซึ่งสามารถกระตุ้นกระบวนการอักเสบได้ใน

นิวโทรฟิล พบ granules ได้ 2 ชนิด คือ specific (secondary) granules ซึ่งมีเอนไซม์ที่บรรจุอยู่ภายใน เช่น lysozyme, collagenase, gelatinase, lactoferrin, plasminogen activator, histamine, alkaline phosphatase และ azurophil (primary) granules พบเอนไซม์หลายชนิด เช่น MPO, bactericidal factors (lysozyme, defensins), acid anhydase, neutral protease เป็นต้น การหลั่งเอนไซม์เหล่านี้อาจพบใน phagolysosome ดังที่ได้กล่าวไปแล้ว นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวสามารถหลั่งสารเหล่านี้สู่เมทริกซ์ภายนอกเซลล์และส่งผลกระทบต่อกระบวนการอักเสบได้ เช่น neutral protease สามารถกระตุ้น complement C3 และ C5 ในพลาสมา (Kumar *et al.*, 2010)

สารชักนำการอักเสบบางชนิดพบว่ามาจากพลาสมา สารเหล่านี้มีสองกลุ่ม ได้แก่ สารที่ได้จากปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันต้านทานในกระบวนการ complement activation ได้แก่ C3a, C5a และ C5b-9 ซึ่ง complement system ประกอบด้วย complement proteins ตั้งแต่ C1 ถึง C9 ซึ่งโดยปกติสารเหล่านี้อยู่ในสภาพที่ไม่สามารถทำงานได้ (inactive form) จะสามารถทำงานได้เมื่อถูกกระตุ้น สารสำคัญในกลุ่มนี้ คือ C3 ซึ่งสามารถถูกกระตุ้นได้ 3 วิธีด้วยกัน คือ classical pathway เกิดจากการจับกันของแอนติเจน แอนติบอดี และ C1 ทำให้เกิดปฏิกิริยาอีกหลายขั้นตอนตามมาโดยเอนไซม์ classical pathway C3 convertase จะกระตุ้น C3 ให้ทำงาน ถัดมาคือ alternative pathway สารในผนังเซลล์ของเชื้อโรค เช่น LPS จะกระตุ้น C3 โดยตรง ผ่านการทำงานของเอนไซม์ alternative pathway C3 convertase ขั้นตอนสุดท้ายคือ lectin pathway เกิดจาก lectin ซึ่งเป็นสารที่มีอยู่ในพลาสมาจับกับสารในผนังเซลล์ของเชื้อโรค กระตุ้น C1 ผ่านการทำงานของเอนไซม์ C3 convertase เช่นกัน เมื่อ C3 ถูกทำปฏิกิริยาโดย C3 convertase เกิดเป็น C3a และ C3b โดย C3b จะจับ complement proteins อื่น ๆ เกิดเป็น C5 มี C5 convertase ทำหน้าที่ย่อย C5 เกิดเป็น C5a และ C5b โดย C5b จะจับ complement proteins อื่น ๆ อีกเช่นกัน คือ C6 ถึง C9 เกิดเป็น membrane attack complex (MAC) ซึ่งสามารถทำหน้าที่ทำลายเชื้อโรคดังรูปที่ 1-6

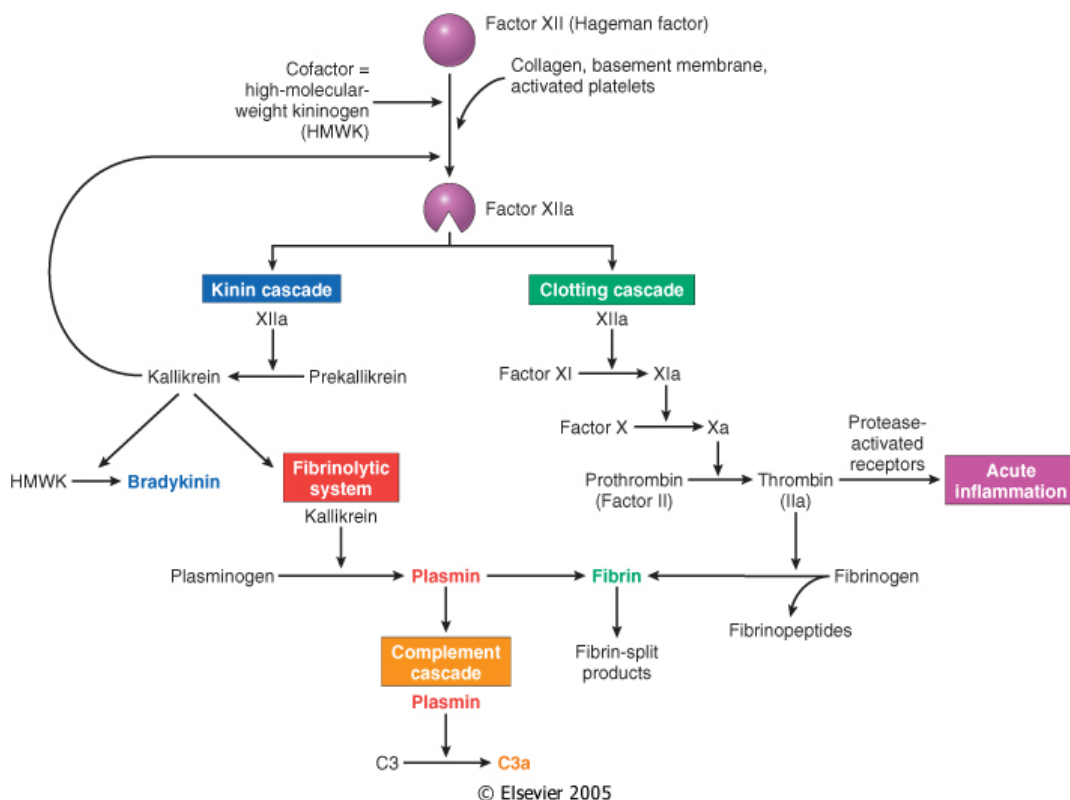


รูปที่ 1-6 กลไกต่าง ๆ ในการกระตุ้น complement protein (Kumar *et al.*, 2010)

C3a และ C5a สามารถกระตุ้นให้เซลล์แมสต์หลั่งสารฮีสตามีน นอกจากนี้ C5a ยังกระตุ้นนิวโทรฟิลและโมโนไซต์ให้สร้างสารต่าง ๆ จาก arachidonic acid โดยเอนไซม์ lipoxigenase ทำให้เกิดสารเคมีซึ่งเป็นสารสื่อกลางการอักเสบ อีกทั้ง C5a เป็น chemotactic stimuli ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว ดังนั้นจึงมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเกาะติดผนังหลอดเลือด การกระตุ้นการทำงานและการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาว มากไปกว่านั้น C3b สามารถทำหน้าที่เป็น opsonin จึงมีส่วนช่วยในกระบวนการทำลายสิ่งแปลกปลอมด้วย หากมองเฉพาะสารในกลุ่ม complement system จะพบว่า C3 และ C5 เป็นสารที่มีบทบาทมากที่สุดต่อกระบวนการอักเสบ นอกจากนี้จะถูกกระตุ้นโดยกลไกที่กล่าวมาแล้ว ยังสามารถถูกกระตุ้นได้โดยเอนไซม์ เช่น lysosomal enzyme และ plasmin ที่สร้างจากนิวโทรฟิล ดังนั้นจะเห็นได้ว่าทั้ง complement system และ นิวโทรฟิลต่างสามารถทำหน้าที่ส่งเสริมการทำงานซึ่งกันและกัน

สารชักนำการอักเสบบางชนิดได้มาจากกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับระบบการแข็งตัวของเลือด (Hageman factor activation system) เช่น kinin สารในกลุ่มนี้เปลี่ยนแปลงมาจากโปรตีนในกระแสเลือด คือ kininogen โดยอาศัยเอนไซม์ kallikreins การกระตุ้นสารในกลุ่มนี้ทำให้เกิดการหลั่ง bradykinin ซึ่งมีผลทำให้เกิดการขยายตัวและเพิ่มการซึมผ่านของผนังหลอดเลือด นอกจากนี้ยังมีผลทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อที่ผนังหลอดเลือดและเกิดความรู้สึกปวด (pain) สุดท้าย bradykinin จะถูกทำลายโดย kininase ถัดมาคือ coagulation (clotting) เป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด ได้แก่สาร thrombin ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนสาร fibrinogen ไปเป็น fibrin ทำให้ได้สาร fibrinopeptides หลายชนิดซึ่งมีคุณสมบัติเพิ่มการซึมผ่านผนังหลอดเลือดและชักนำเม็ดเลือดขาว นอกจากนี้ thrombin ยังมีคุณสมบัติกระตุ้นการสร้างอนุภาคเกาะจับและเร่งการสร้างเยื่อเกี่ยวพัน (fibroblast proliferation) ส่วน

กระบวนการ fibrinolysis เป็นกระบวนการที่มีบทบาททำลายการแข็งตัวของเลือดโดยละลายก้อน fibrin ที่เกิดจากระบบการแข็งตัวของเลือด ได้สารที่แตกกระจายออกมาหลายชนิดที่เรียกว่า fibrin degradation products (FDP) ซึ่งมีคุณสมบัติเพิ่มการซึมผ่านผนังหลอดเลือด สารสำคัญของระบบนี้ได้แก่ plasmin ซึ่งเป็นผลิตผลจาก plasminogen โดยอาศัยเอนไซม์ที่เรียกรวมว่า plasminogen activator พบได้ในผนังหลอดเลือด เม็ดเลือดขาวและเนื้อเยื่ออื่น ๆ สาร plasmin เป็นตัวการสำคัญที่ละลายก้อน fibrin เพื่อทำลายการแข็งตัวของเลือดดังรูปที่ 1-7



รูปที่ 1-7 ความสัมพันธ์ของสารกลุ่ม complement, kinin, clotting และ fibrinolytic system ในกระบวนการอักเสบ (Kumar *et al.*, 2010)

ความเกี่ยวเนื่องกันระหว่างการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อในกระบวนการอักเสบและสารสื่อกลางการอักเสบที่เกี่ยวข้อง สรุปได้ดังตารางที่ 1-2

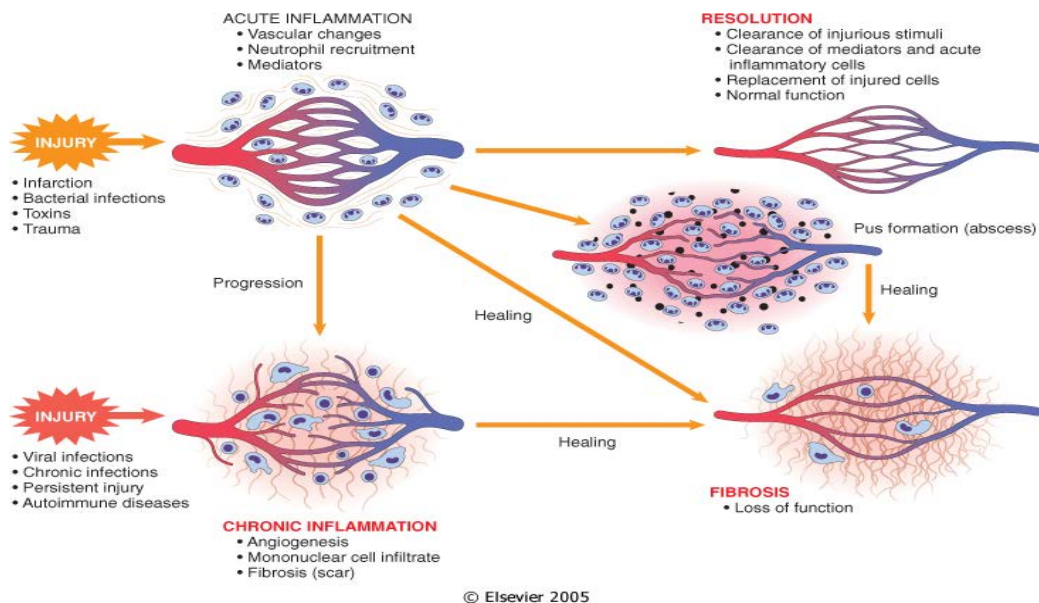
ตารางที่ 1-2 อิทธิพลของสารสื่อกลางการอักเสบต่อการเปลี่ยนแปลงของร่างกาย (Kumar *et al.*, 2010)

Effects	Mediators
vasodilatation	-prostaglandins -nitric oxide -histamine
increased vascular permeability	-vasoactive amines -complement C3a, C5a -bradykinin -leukotriene C ₄ , -C ₅ , -E ₄ -PAF -substance P
hemotaxis, leukocyte recruitment and activation	-complement C5a -leukotriene B ₄ -chemokine -TNF -IL-1
fever	-TNF -IL-1 -prostaglandins
pain	-prostaglandins -bradykinin
tissue damage	-neutrophil and macrophage lysosomal enzymes -oxygen metabolite -nitric oxide

ผลกระทบหลังเกิดการอักเสบเฉียบพลัน (sequelae of acute inflammation)

กลไกการอักเสบเป็นกระบวนการเกิดการอักเสบทั่ว ๆ ไป แต่ทั้งนี้ย่อมมีการข้ามขั้นตอนหรือเสริมแต่งตามแต่เหตุการณ์เป็นราย ๆ ไป ซึ่งขึ้นกับปัจจัยอื่น ๆ ได้แก่ คุณลักษณะและความรุนแรงของเหตุชักนำให้เกิดการอักเสบชนิดของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะ บริเวณที่เกิดการอักเสบและสภาพของผู้ป่วย ปัจจัยเหล่านี้ต้องนำมาพิจารณาประกอบในกลไกการอักเสบ อย่างไรก็ตามเมื่อเกิดการอักเสบเฉียบพลันแล้ว ผลที่เกิดขึ้นกับเนื้อเยื่อที่ได้รับบาดเจ็บนั้นสามารถแบ่งได้หลายแบบดังนี้ รูปแบบแรกคือ การกลับเข้าสู่สภาพเดิม (complete resolution) มักพบในกรณีที่ได้รับการบาดเจ็บเล็กน้อยหรือการบาดเจ็บในช่วงเวลาสั้น ๆ เมื่อ

การอักเสบสามารถกำจัดต้นเหตุและสารเคมีชักนำ หรือควบคุมสภาพการเปลี่ยนแปลงไม่ให้ เป็นมากขึ้น การบาดเจ็บนั้นจะกลับเข้าสู่ภาวะปกติอย่างเป็นขั้นตอน เช่น สภาพของหลอดเลือด เข้าสู่ภาวะปกติ สามารถเข้าควบคุมการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเมื่อเกิดการอักเสบ ของเหลวที่ เพิ่มขึ้นในบริเวณเนื้อเยื่อที่อักเสบรวมถึงเม็ดเลือดขาว สิ่งแปลกปลอมและเศษเนื้อตายถูกเก็บ กินและลำเลียงออกไปจากบริเวณอักเสบผ่านทางระบบท่อน้ำเหลือง เม็ดเลือดขาวกลับเข้าสู่ ภาวะปกติ ไม่ถูกกระตุ้นจากสารเคมีชักนำและมีจำนวนลดลงทำให้เนื้อเยื่อหรืออวัยวะนั้น ๆ เข้าสู่สภาพเดิมเหมือนก่อนการอักเสบ รวมถึงการกลับสู่หน้าที่ปกติของอวัยวะนั้น ๆ ไม่ทิ้งร่องรอย การอักเสบ เช่น ในผู้ป่วยปอดอักเสบ (pneumonia) ที่ไม่พบร่องรอยการอักเสบหลงเหลืออยู่ รูปแบบถัดมาคือ เกิดการซ่อมแซมส่วนสึกหรอโดยการแทนที่ด้วยเยื่อพังผืด (healing by connective tissue replacement) หรือที่เรียกว่า fibrosis พบในกรณีการบาดเจ็บรุนแรง มีการ ทำลายโครงสร้างพื้นฐานของเนื้อเยื่อ ทำให้เกิดหนองซึ่งประกอบด้วย fibrin จำนวนมาก ร่างกายจะสามารถกำจัดสารดังกล่าวออกไปได้ เนื้อเยื่อเกี่ยวพันจึงเข้าไปแทนที่และอาจเกิด หนองฝี (abscess formation) ในกรณีที่การอักเสบเฉียบพลัน เกิดในอวัยวะที่ทึบและมีการ ทำลายเนื้อเยื่อค่อนข้างสูงแต่อยู่ในวงจำกัด บริเวณนั้นจะพบเนื้อเยื่อที่ตายร่วมกับเซลล์อักเสบ เช่น เม็ดเลือดขาวชนิด polymorphonuclear cells ในปริมาณค่อนข้างสูงและผลิตผลที่เป็น ของเหลวจากการบวม เนื่องจากการอักเสบเฉียบพลันรวมเป็นหนองฝีในอวัยวะนั้น ๆ และยัง พบพยาธิสภาพของการซ่อมแซมที่บริเวณขอบของฝีหนองร่วมด้วย เช่น พบการสร้างเส้นเลือด ฝอยใหม่ (neovascularization) และเซลล์ไฟโบรบลาสต์โดยรอบ ๆ เส้นเลือดฝอยเหล่านี้พบเม็ด เลือดขาวชนิด polymorphonuclear cell เกาะติดอยู่ พร้อมกับเซลล์บุผนังหลอดเลือดที่กำลัง เจริญเติบโต เรียกรวมว่า granulation tissue และรูปแบบสุดท้ายคือ เกิดการอักเสบเรื้อรังกรณี ที่สาเหตุชักนำให้เกิดการอักเสบไม่ถูกกำจัดออกไปและยังคงอยู่เป็นเวลานาน พยาธิสภาพจะ เปลี่ยนจากการอักเสบเฉียบพลันเป็นการอักเสบเรื้อรัง โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด polymorphonuclear ซึ่งมีชีวิตสั้นและชนิด mononuclear ซึ่งมีชีวิตยาวนานกว่าเป็นเดือนหรือปี เข้ามาแทนที่ เช่น ลิมโฟไซต์และแมโครฟาจ ในขณะที่เดียวกันพยาธิสภาพการซ่อมแซมที่พบร่วม เช่น การเพิ่มจำนวนไฟโบรบลาสต์และหลอดเลือดที่สร้างขึ้นใหม่จะพบเห็นเด่นชัดขึ้น (Kumar *et al.*, 2010) ดังรูปที่ 1-8



รูปที่ 1-8 แสดงผลที่เกิดขึ้นภายหลังการเกิดกระบวนการอักเสบเฉียบพลัน (Kumar *et al.*, 2010)

2.1.2 การอักเสบชนิดเรื้อรัง เป็นการอักเสบที่เกิดขึ้นซ้ำและกินระยะเวลานาน ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของสาเหตุชักนำและระยะเวลาของการอักเสบ อาจพบพยาธิสภาพร่วมของการซ่อมแซมส่วนสึกหรอ เช่น เกิดการพอกของเยื่อพังผืดและสารหินปูน (calcification) หรือบางรายพบการสร้างเซลล์เนื้อเยื่อใหม่ขึ้นทดแทนที่ตายไปหรือเกิดจากการอักเสบชนิดเฉียบพลันและต่อมากลายเป็นชนิดเรื้อรัง ถ้าสาเหตุชักนำยังไม่ถูกกำจัดออกไป พยาธิสภาพประกอบด้วยเซลล์อักเสบเม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cells เช่น แมโครฟาจ เซลล์แมสต์ ฮีสติโอไซต์ หรือแมโครฟาจและพบพยาธิสภาพของการซ่อมแซมดังกล่าวข้างต้น

พยาธิกำเนิดและอาการสัมพันธ์ของการอักเสบเรื้อรัง (pathogenesis of chronic inflammation)

การอักเสบเรื้อรังเป็นปรากฏการณ์อย่างหนึ่งที่มีลักษณะเฉพาะ เช่น เกิด granulomatous inflammation หรืออาจเกิดลักษณะไม่เฉพาะ (non-specific) ทำให้ยากต่อการให้คำจำกัดความแต่อย่างไรก็ตามการอักเสบเรื้อรังกินเวลานาน ค่อยๆเกิดไม่รุนแรงและรวดเร็ว ซึ่งผิดกับการอักเสบเฉียบพลันที่ใช้เวลาเร็วกว่า รุนแรงกว่าแต่เกิดไม่นาน ตัวอย่างการอักเสบเรื้อรัง เช่น การติดเชื้อบางชนิดซึ่งเชื้อโรคสามารถคงอยู่ในร่างกายได้เป็นเวลานาน เช่น *Mycobacterium*, *Treponemapallidum* เชื้อไวรัส เชื้อราและเชื้อปรสิตบางชนิด เชื้อก่อโรคเหล่านี้มีความรุนแรงต่ำแต่ติดเชื้อนานและค่อยเป็นค่อยไป จนสร้างปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันชนิด delayed hypersensitivity ให้ลักษณะเฉพาะของพยาธิสภาพที่เรียกว่า granulomatous inflammation นอกจากนี้สารบางอย่างที่ดูไม่มีพิษและไม่ก่อโรค ในบางครั้งถ้ามีมากและอยู่

นาน เช่น ฝุ่นผงซิลิกา (silica) ทำให้เกิดการอักเสบเรื้อรังในปอดหรือปริมาณไขมันในเลือดสูง และเป็นอยู่นานจนในที่สุดมีผลต่อหลอดเลือดทำให้ผนังหลอดเลือดแข็งตัวเกิด atherosclerosis เป็นต้น การอักเสบบางชนิดเกิดจากความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกันที่มีการทำลายเนื้อเยื่อผิดปกติหรือเรียกว่าโรคภูมิคุ้มกันทำลายตัวเอง (autoimmune disease) โรคในกลุ่มนี้เช่น rheumatoid arthritis และ systemic lupus erythematosus (SLE) เป็นต้น ลักษณะการเปลี่ยนแปลงในเนื้อเยื่อจะพบเซลล์อักเสบหลาย ๆ ชนิด เซลล์ที่พบร่วมในการอักเสบเรื้อรัง ส่วนใหญ่เป็น mononuclear cell ได้แก่ แมโครฟาจ ลิมโฟไซต์ เซลล์แมสต์และพลาสมาเซลล์ มีการทำลายเนื้อเยื่อจากเซลล์อักเสบเหล่านี้และพบการพอกของเยื่อพังผืดเพื่อซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอที่เรียกว่า fibrosis ควบคู่ไปกับการอักเสบ นอกจากนี้พบเส้นเลือดที่เกิดใหม่ขนาดเล็กเป็นจำนวนมากในบริเวณที่อักเสบ (Kumar *et al.*, 2010)

2.2 ยาต้านการอักเสบ (anti-inflammatory drugs)

โดยทั่วไปเป้าหมายการออกแบบยาต้านการอักเสบมี 2 ประการ คือ ประการแรกเพื่อบรรเทาอาการและคงไว้ซึ่งหน้าที่การทำงานของเนื้อเยื่อ ประการถัดมาเพื่อชะลอหรือหยุดกระบวนการทำลายเนื้อเยื่อ (Clark *et al.*, 2012) ปัจจุบันมีการคิดค้นและพัฒนายาต้านการอักเสบมากมาย ยาต้านการอักเสบที่นิยมนำมาใช้ในการรักษาโรคเกี่ยวกับการอักเสบส่วนใหญ่ ได้แก่ ยาต้านการอักเสบกลุ่ม NSAIDs และยากลุ่มสเตียรอยด์

ยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (Non-steroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs)

NSAIDs เป็นกลุ่มยาต้านการอักเสบที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายเนื่องจากสามารถออกฤทธิ์ได้กว้างขวาง การใช้ในขนาดต่ำสามารถให้ผลลดไข้และบรรเทาอาการปวดทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง การใช้ในขนาดสูงสามารถออกฤทธิ์ลดการอักเสบได้ดี

กลไกการออกฤทธิ์ของยาโดยทั่วไป (mechanisms of action)

ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory effects) กลไกหลักในการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบของ NSAIDs โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX ในกระบวนการเปลี่ยนแปลงของสาร arachidonic acid ทำให้ลดการสร้างผลิตภัณฑ์ที่กระตุ้นการอักเสบ ได้แก่ สารในกลุ่ม prostaglandins และสารกลุ่ม leukotrienes โดยยา NSAIDs ในกลุ่ม non-specific COX inhibitors จะมีผลยับยั้งเอนไซม์ทั้งสอง isoform คือ COX-1 และ COX-2 มีผลทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ต่อระบบทางเดินอาหารสูง โดยเฉพาะยา aspirin และ indomethacin เป็นต้น ส่วนยาในกลุ่มของ COX-2 specific inhibitors มีการพัฒนาให้มีความเฉพาะเจาะจงต่อ COX-2 จึงลดการเกิดอาการข้างเคียงต่อระบบทางเดินอาหาร แต่พบว่าเพิ่มความเสี่ยงต่ออาการข้างเคียงต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด เช่น thrombosis และ myocardial infarction (Stovitz

และ Johnson, 2003) ฤทธิ์บรรเทาปวด (analgesic effects) จากการยับยั้งการสร้างสาร prostaglandins ทั้งที่ระบบประสาทส่วนกลางและส่วนปลาย ประสิทธิภาพการบรรเทาปวดอาจไม่เท่ากับยาในกลุ่ม opioids แต่ไม่ทำให้เกิดผลข้างเคียงทางสมอง เช่น กัดการหายใจ ภาวะติดยา ยาในกลุ่ม NSAIDs ยังมีการนำไปใช้บรรเทาอาการอักเสบจากข้อเข่าเสื่อม ปวดศีรษะไมเกรน ปวดฟัน ปวดท้องประจำเดือน ปวดจากนิ้วในข้อโต ปวดจากมะเร็งและการปวดจากแผล ซึ่งครอบคลุมแผลที่เกิดจากการทำหัตถการและการผ่าตัด โดยที่ในกรณีเกิดแผลเลือดออก (active bleeding) จะเลือกใช้ยาในกลุ่ม COX-2 specific inhibitors เพื่อหลีกเลี่ยงการขัดขวางการจับกลุ่มของเกล็ดเลือด ยาในกลุ่มนี้ยังมีฤทธิ์ในการลดไข้ (antipyretic effects) เชื่อว่ายาสามารถยับยั้งการสร้าง prostaglandin E₂ ซึ่งเป็นสารที่สามารถกระตุ้น thermoregulatory center บริเวณ anterior hypothalamus แล้วทำให้เกิดไข้ สำหรับอาการไข้ต่ำ ๆ ควรเลือกใช้ยาที่ออกฤทธิ์เร็วและหลีกเลี่ยงการใช้ยาในกลุ่ม salicylates ในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 12 ปี เพราะเสี่ยงต่อการเกิด Reye's syndrome นอกจากนี้ยายังมีฤทธิ์อื่น ๆ เช่น ฤทธิ์ต้านเกล็ดเลือด (anti-platelet effects) ยาในกลุ่ม traditional NSAIDs รวมถึงแอสไพริน ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ COX-1 ที่เกล็ดเลือดด้วย ทำให้การสร้าง thromboxane ลดลง ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด (platelet aggregation) โดยแอสไพรินมีคุณสมบัติที่แตกต่างจาก traditional NSAIDs อื่น ๆ คือ แอสไพรินยับยั้ง COX ที่เกล็ดเลือดอย่างถาวร (irreversible) ในขณะที่ traditional NSAIDs ยับยั้ง COX แบบชั่วคราวหรือเป็นปฏิกิริยาทวนกลับได้ (reversible reaction) ดังนั้นแอสไพรินจึงมีฤทธิ์โดดเด่นใน การต้านการแข็งตัวของเลือดและนิยมนำมาใช้ในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจหรือหลอดเลือดสมองตีบยาบางตัวในกลุ่มนี้มีการนำมาใช้ป้องกันการเกิดมะเร็ง โดยพบว่าในเนื้อเยื่อมะเร็งลำไส้ใหญ่มีการแสดงออกของเอนไซม์ COX-2 มากกว่าเนื้อเยื่อปกติประกอบกับการแสดงออกของเอนไซม์ COX-2 นั้นสัมพันธ์กับความสามารถในการกระจายตัวของเซลล์มะเร็งและอัตราการอยู่รอดของผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ จึงเชื่อว่า COX-2 น่าจะเป็นตัวกระตุ้นเซลล์มะเร็งให้เติบโตขึ้นและจากการศึกษาทางด้านระบาดวิทยาพบว่ายาต้านอักเสบชนิดไม่สเตียรอยด์ สามารถลดการเกิดมะเร็งบางชนิดได้โดยเฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็น familial adenomatous polyposis (FAP) ที่ได้รับยา celecoxib ขนาด 800 มิลลิกรัมต่อวันพบว่าสามารถลดอุบัติการณ์ของการเกิด rectal polyp ได้ ดังนั้นในปัจจุบันองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาจึงให้การรับรองการใช้ยา celecoxib เพื่อลดปริมาณของ polyp ในผู้ป่วย FAP (Clark *et al.*, 2012)

Diclofenac เป็นยาตัวหนึ่งในกลุ่ม traditional NSAIDs ที่มีฤทธิ์บรรเทาอาการปวด ต้านการอักเสบและลดไข้ มีฤทธิ์โดดเด่นในการบรรเทาอาการปวดและต้านการอักเสบทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง จากการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของยา diclofenac พบว่ากลไกหลักในการออกฤทธิ์โดยการยับยั้งเอนไซม์ COX แต่พบว่า มีผลยับยั้ง COX-2 มากกว่า COX-1 ทำให้รบกวนสมดุลการทำงานของ COX-1 น้อยกว่า นับว่าเป็นจุดเด่นของ diclofenac

จากยา NSAIDs อื่น ๆ รวมถึงยาในกลุ่ม COX-2 specific ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดอาการไม่พึงประสงค์ทางระบบหัวใจและหลอดเลือด (Wallace et al., 2000) ยา diclofenac มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ thromboxane prostanoid receptor ส่งผลรบกวนการหลั่งและกระบวนการเปลี่ยนแปลงของ arachidonic acid ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ lipoxigenase นอกจากนี้มีรายงานว่า diclofenac อาจมีผลยับยั้ง substance P และรบกวนกระบวนการสร้าง IL-6 อีกด้วย (Gan, 2010).

Indomethacin เป็นยาในกลุ่ม traditional NSAIDs เช่นกัน ยามีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX และมีรายงานว่า ยาอาจมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ phospholipase A และ C ยับยั้งกระบวนการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิลและลดการเพิ่มจำนวนของ T-cell และ B-cell ยาที่ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางกับคนไข้ที่มีอาการระดับกลางถึงรุนแรงในโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) โรคข้อสันหลังอักเสบยึดติด (ankylosing spondylitis) ข้ออักเสบ (osteoarthritis) และเกาต์ระยะเฉียบพลัน นอกจากนี้ indomethacin มีการใช้เพื่อเร่งการปิดของ patent ductus arteriosus อีกด้วย (Katzung et al., 2012)

อาการไม่พึงประสงค์ของยาในกลุ่ม NSAIDs

อาการไม่พึงประสงค์ของยากกลุ่ม NSAIDs เช่น เสี่ยงต่อการเกิดภาวะหายใจเร็ว (hyperventilation) โดยเฉพาะยาแอสไพรินในคนที่มีความผิดปกติเป็นโรคทางเดินหายใจเดิมมีโอกาสเกิดภาวะอาการกำเริบจากยาแอสไพริน (aspirin-exacerbated respiratory disease; AERD) ผลต่อระบบทางเดินอาหาร ทำให้เกิดอาการปวดท้อง อาหารไม่ย่อย คลื่นไส้อาเจียน เนื่องจากยาออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX อย่างไม่จำเพาะ (nonselective COX inhibitor) รบกวนการทำงานของ COX-1 โดยปกติทำหน้าที่ในกระบวนการสร้าง prostaglandin E₂ และ prostacyclin ควบคุมสมดุลของชั้น mucosa ทำให้เนื้อเยื่อทางเดินอาหารโดยเฉพาะกระเพาะถูกทำลายได้จากกรดเกิดแผลในทางเดินอาหาร ในกรณีที่รุนแรงอาจพบภาวะทะลุหรือพบการตีบแคบของกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กได้ (Fries, 1999; Yamada et al., 2012) ผลต่อระบบเลือด เนื่องจากยามีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-1 ด้วย ทำให้ไปยับยั้งการสังเคราะห์ thromboxane เพิ่มความเสี่ยงในการเกิดอาการเลือดออกง่าย โดยเฉพาะในคนที่ได้รับแอสไพริน ส่วนผลต่อดับ เนื่องจากกระบวนการเปลี่ยนแปลงยา (metabolite) เกิดขึ้นที่ตับ ในคนที่รับประทานยากกลุ่มนี้เป็นประจำหรือเป็นระยะเวลานาน มีความเสี่ยงต่อภาวะตับอักเสบ มีการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ที่อยู่ในตับ เช่น alanine amino transferase (ALT), aspartate amino transferase (AST) โดยเฉพาะยา diclofenac และ sulindac ผลต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด จากฤทธิ์ของยามีผลต่อหลอดเลือดที่หน่วยไต (nephron) ส่งผลให้เกิดการคั่งของเกลือและน้ำ ความดันเลือดสูงกว่าปกติ บวม เสี่ยงต่อภาวะหัวใจขาดเลือดและหัวใจล้มเหลว ผลต่อระบบ

ประสาท อาจพบอาการปวดศีรษะ หูอื้อและเวียนศีรษะ และผลต่อระบบผิวหนัง อาจมีผื่น (rashes) ขึ้นตามตัว (Katzung *et al.*, 2012)

ผลข้างเคียงที่แตกต่างกันระหว่างยา diclofenac และ indomethacin มีรายงานพบว่า diclofenac มีผลข้างเคียงต่อระบบประสาทส่วนกลางน้อยกว่า indomethacin ซึ่งอาการทางระบบประสาทส่วนกลางของยา indomethacin ที่พบบ่อยได้แก่ อาการปวดศีรษะ ซึ่งมีอุบัติการณ์การเกิดสูง นอกจากนี้พบอาการมีนงง เวียนศีรษะ สับสน ภาวะซึมเศร้า เป็นต้น (Hebel, 2003)

ยาด้านการอักเสบกลุ่มสเตียรอยด์ (Steroids; glucocorticoids or corticosteroids)

ยาในกลุ่มสเตียรอยด์ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการรักษาโรคทางภูมิคุ้มกันทำลายตัวเอง ใช้รักษาโรคเกาต์โดยใช้ยาในช่วงเวลาสั้น ๆ และยังถูกนำมาใช้ฉีดเข้าตำแหน่งที่ปวดในโรคข้อและเอ็นอักเสบ ยาสเตียรอยด์มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ phospholipase A₂ จึงมีผลไปยับยั้งการสังเคราะห์ arachidonic acid ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ COX-2 และยับยั้งการหลั่งสารจากเซลล์แมสต์ทำให้ลดระดับของฮีสตามีนในเลือดจึงมีผลลดการซึมผ่านผนังหลอดเลือด และด้วยคุณสมบัติของสเตียรอยด์ที่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้และมีบทบาทสำคัญภายในเซลล์โดยลดการแสดงออก (expression) ของ cytokine-induced genes โดยไปจับกับตัวรับภายในเซลล์ (cytoplasmic steroid receptor) เป็นสารประกอบเชิงซ้อน ผ่านเข้าสู่นิวเคลียสไปจับกับ transcription factor คือ NF- κ B และ AP-1 ยับยั้งการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ไซโตไคน์ต่าง ๆ ยาในกลุ่มสเตียรอยด์ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการถอดรหัสยีนที่กระตุ้นให้เกิดการทำงานของ T cell growth factors เช่น IL-2, IL-4, IL-15, IL-17 และ interferon- γ (IFN- γ) อีกทั้ง ยาสเตียรอยด์มีฤทธิ์ยับยั้งการถอดรหัสในกระบวนการสังเคราะห์ COX-2, inducible nitric oxide synthase (iNOS), ICAM-1 ซึ่งโดยปกติโปรตีนเหล่านี้ถูกกระตุ้นการสร้างโดย IL-1 β และ TNF- α ยากลุ่มสเตียรอยด์มีฤทธิ์กระตุ้นกระบวนการถอดรหัสของโมเลกุลด้านการอักเสบในร่างกายให้มากขึ้น เช่น IL-10 และ IL-1 type 2 decoy receptor (Katzung *et al.*, 2012) นอกจากนี้ ยากลุ่มสเตียรอยด์มีฤทธิ์กระตุ้นการกระจายตัวของเม็ดเลือดขาว ลดการเกาะตัวบริเวณที่เกิดการอักเสบ เพิ่มการคั่งของนิวโทรฟิลมากขึ้นและยังสามารถลดความหนาแน่นของลิมโฟไซต์ (T และ B cells) เบโซฟิล ฮีโอซิโนฟิลและโมโนไซต์ ลดความสามารถในการตอบสนองของลิวโคไซต์และแมโครฟาจต่อ mitogens และ antigens (Clark *et al.*, 2012)

อาการไม่พึงประสงค์จากยากลุ่มสเตียรอยด์

อาการไม่พึงประสงค์ของยาที่พบบ่อยคือ ภาวะกระดูกพรุนจากยาไปขัดขวางการดูดซึมแคลเซียมที่ลำไส้ ยับยั้งการสร้างกระดูกและการสังเคราะห์ฮอร์โมนเพศ และพบว่า

การทานยาแบบเว้นวันไม่สามารถหลีกเลี่ยงภาวะกระดูกพรุนจากยาได้ สำหรับการทานยาในระยะยาวมีผลทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ได้หลากหลาย เช่น ลดการเจริญเติบโตในเด็ก ดวงตาเกิดต้อหิน เกิดการสะสมของไขมันบริเวณแกนกลางของร่างกาย เพิ่มความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ ผอมร่วง หิวบ่อย อารมณ์เปลี่ยนแปลง หงุดหงิดง่าย แผลในทางเดินอาหาร ความดันเลือดสูง แขนขาบวมและภาวะโพแทสเซียมในเลือดสูง (Katzung *et al.*, 2012)

จากข้อมูลยาต้านการอักเสบ จะเห็นได้ว่า ยาต้านการอักเสบมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย แต่ยังคงพบว่ายาแต่ละตัวนั้นมีความเสี่ยงในการใช้กับคนไข้และมีอาการไม่พึงประสงค์ที่แตกต่างกัน การใช้สารสกัดทางธรรมชาตินั้นเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะยังคงประสิทธิภาพในการรักษาการอักเสบและสามารถลดความเสี่ยง ตลอดจนอาการไม่พึงประสงค์ที่อาจเกิดขึ้นระหว่างและหลังการรักษาได้

2.3 แอสตาแซนธิน (astaxanthin)

แอสตาแซนธินเป็นสารในกลุ่มแซนโทฟิลล์แคโรทีนอยด์ (xanthophyll carotenoid) มนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมไม่สามารถสังเคราะห์สารนี้ได้ (Jyonouchi *et al.*, 1995) แหล่งทางธรรมชาติของแอสตาแซนธิน ได้แก่ สิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก (microorganism) จำพวกยีสต์ แบคทีเรีย ราและไรน้ำหรือสาหร่ายสีแดง (Yuan *et al.*, 2011) โดยเฉพาะไรน้ำสายพันธุ์ *H. pluvialis* ซึ่งเชื่อว่าเป็นแหล่งทางธรรมชาติที่มีสารแอสตาแซนธินเข้มข้นที่สุด (Fassett *et al.*, 2011) ซึ่งอุดมไปด้วยสารแอสตาแซนธินสูงถึง 7% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ไรน้ำชนิดนี้สามารถใช้พลังงานจากแสงอาทิตย์ร่วมกับแหล่งสารอินทรีย์ทางธรรมชาติเพื่อผลิตสารอาหารในถุงไขมันของไรน้ำชนิดนี้จะมีการสะสมของสารแอสตาแซนธินปริมาณมาก ซึ่งสารจะมีบทบาทในการป้องกันนิวเคลียสของเซลล์จากรังสียูวีที่จะกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ซึ่งอาจทำให้เกิดการทำลายดีเอ็นเอของเซลล์ตัวมันเองได้ (Wang *et al.*, 2003) และยังคงพบว่าการสะสมของสารแอสตาแซนธินในสัตว์ทะเลหลายชนิด เช่น ปลาแซลมอน ปลาเทราท์ กุ้ง และกุ้งเครย์ฟิช เชื่อว่าเมื่อบริโภคสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กเหล่านี้จะเกิดการสะสมตามเนื้อ ผิวหนังและระบบโครงร่างภายนอก (exoskeleton) ทำให้เห็นลักษณะภายนอกของสัตว์เหล่านี้เป็นสีชมพูหรือสีแดง (Kidd, 2011) ปัจจุบันเป็นที่ทราบโดยทั่วไปว่า แอสตาแซนธินมีประสิทธิภาพสูงในปฏิกิริยาต้านอนุมูลอิสระและยังมีคุณสมบัติป้องกันการอักเสบ มะเร็ง แผลในทางเดินอาหาร เบาหวาน โรคทางระบบหัวใจและหลอดเลือดและมีฤทธิ์ป้องกันการทำลายของเนื้อเยื่อตับอีกด้วย (Yuan *et al.*, 2011) กุ้งเป็นอีกแหล่งหนึ่งของแคโรทีนอยด์ทางธรรมชาติ (Shahidi, 1998; Venugopal, 2008) ซึ่งสามารถหาได้ง่ายและมีราคาถูก แต่อุดมไปด้วยแคโรทีนอยด์ที่มีคุณภาพ (Sachindra *et al.*, 2005) ในอุตสาหกรรมอาหารทะเลมีการนำกุ้งมาแปรรูปมีรายงานว่าประมาณ 60% เป็นเศษเหลือทิ้งจากส่วนของหัวและเปลือกกุ้งและอีก 40% ถูกนำมาใช้ทำการแปรรูปต่อไป (Brarratt และ Montano, 1986) การกำจัดทิ้งเศษเหลือเหล่านี้บางที่อาจก่อมลพิษ

ทางสิ่งแวดล้อมและยังเป็นการสูญเสียสารต่าง ๆ ที่มีประโยชน์อีกด้วย (Giyose *et al.*, 2009) สำหรับประเทศที่มีการผลิตกุ้งเป็นจำนวนมากในแต่ละปี มีรายงานว่า โดยเฉลี่ยประเทศไทยผลิตกุ้งโดยเฉลี่ยประมาณ 2-3 แสนตัน/ปี (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2558) จากข้อมูลเหล่านี้การนำเศษเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเหล่านี้มาแปรรูปเป็นสารสกัดแล้วนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ไม่เพียงแต่เป็นการลดมลพิษที่อาจเกิดขึ้นเท่านั้นแต่ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่ผู้ประกอบการได้อีกด้วย

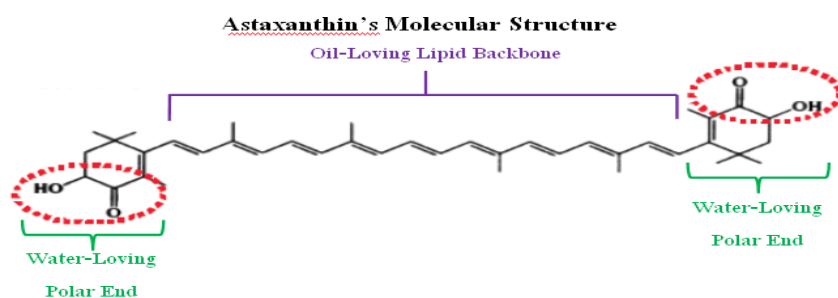
ถึงแม้ว่าปัจจุบันจะมีรายงานฤทธิ์ต่าง ๆ ของแอสตาแซนธินออกมาเยอะ แต่ส่วนใหญ่ล้วนมาจากสาหร่ายสีแดงชนิด *H. pluvialis* ซึ่งมีราคาแพงและเพาะเลี้ยงไม่ได้ในประเทศไทย ดังนั้นเศษเหลือทิ้งจากกุ้งเช่นเปลือกกุ้ง จึงเป็นแหล่งที่น่าสนใจ โดยมีรายงานพบว่ากุ้งแดงอาราเบียชนิด *Aristeus alcocki* มีสัดส่วนของแอสตาแซนธินไดเอสเทอร์ต่อกรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acids: PUFAs) มากกว่าสาหร่ายสีแดงชนิด *H. pluvialis* (Sindhu และ Sherief, 2011)

ปัจจุบันกุ้งขาวแวนนาไมเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของประเทศไทยที่มีการนำเข้ามาเลี้ยงทดแทนกุ้งกุลาดำ และเลี้ยงในพื้นที่บริเวณที่เคยเลี้ยงกุ้งกุลาดำมาก่อน โดยมีการเลี้ยงในเขตชายฝั่งทะเล และเขตน้กร่อยบริเวณปากแม่น้ำ (ชลอ และ พรเลิศ, 2547) กุ้งขาวแวนนาไม เป็นกุ้งที่มีสามารถเลี้ยงได้ง่าย โตเร็วและมีต้นทุนของการผลิตที่ต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาวแวนนาไมมีสีของลำตัวเป็นสีขาว กรีด้านบนมีลักษณะเป็นหยักและถี่ปลายกกรีตรง โดยมีปลายพังกกรีด้านล่าง 2 อัน และด้านบน 8 อัน ความยาวของกกรีจะยาวกว่าลูกตาไม่มาก และเห็นลำไส้ชัดเจนกว่ากุ้งขาวชนิดอื่น ๆ (ภิญโญ, 2545) อีกทั้งมีรายงานพบว่ากุ้งขาวแวนนาไมมีสัดส่วนแอสตาแซนธินไดเอสเทอร์ต่อกรดไขมันไม่อิ่มตัวมากกว่ากุ้งแดงอาราเบียชนิด *Aristeus alcocki* และสาหร่ายสีแดงชนิด *H. pluvialis* (Miao *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2015)

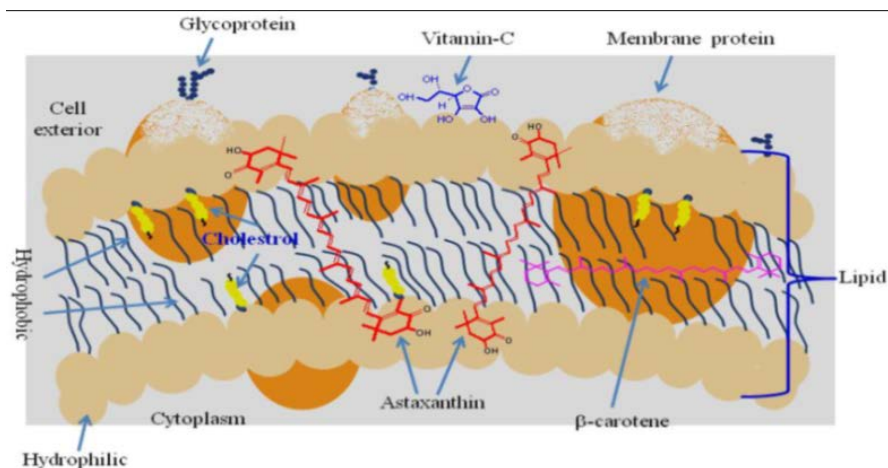
โครงสร้างและคุณสมบัติทางเคมี

แอสตาแซนธิน (3,3'-dihydroxy-beta, beta-carotene-4,4'-dione) ถูกจัดอยู่ในกลุ่มแคโรทีนอยด์เช่นเดียวกับเบต้าแคโรทีน (β -carotene) เนื่องจากสารทั้งสองมีโครงสร้างเป็นสายโพลีอินและมีวิถีในการสังเคราะห์ทางชีวภาพบางส่วนร่วมกันในการแบ่งแยกในกลุ่มย่อยนั้น แอสตาแซนธินถูกจัดอยู่ในกลุ่มแซนโทฟิลล์ เนื่องจากมีหมู่คีโตนและหมู่ไฮดรอกซีจับกับวงแหวนไอโซพรีน ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวทำให้สามารถปรับตัวอยู่ได้ทั้งในส่วนที่เป็นไฮโดรฟิลิก (ชั้นน้ำ) และส่วนที่เป็นไฮโดรโฟบิก (ชั้นไขมัน) ได้ และทำให้มีประสิทธิภาพในการป้องกันผนังเซลล์แบบ lipid bilayer จากปฏิกิริยาเพอรอกซิเดชันได้ดีกว่าสารเบต้าแคโรทีน ซึ่งสามารถอยู่ได้เฉพาะส่วนที่เป็นชั้นไขมัน (Ambati *et al.*, 2014) แอสตาแซนธินประกอบด้วยสาย

ไฮโดรคาร์บอน มีออกซิเจนอะตอมและวงแหวนที่ปลายโมเลกุลทั้งสองด้านติดกับสายโพลีเอิน (polyene chain) (Higuera-Ciapara *et al.*, 2006) ดังรูปที่ 1-9 และ 1-10



รูปที่ 1-9 โครงสร้างทางเคมีของแอสตาแซนธิน (Capelli และ Cysewski, 2007)



รูปที่ 1-10 โครงของเยื่อหุ้มเซลล์และการวางตัวของแอสตาแซนธิน (Superior position of astaxanthin in the cell membrane) (Ambati *et al.*, 2014)

การเปลี่ยนแปลงของแอสตาแซนธิน (metabolism of astaxanthin)

แอสตาแซนธินมีค่าความสามารถละลายได้ในสิ่งแวดล้อมที่เป็นน้ำต่ำ (low solubility) และจากการศึกษาพบว่าสารในกลุ่มแซนโทฟิลล์แคโรทีนอยด์ มีค่าชีวปริมาณการออกฤทธิ์ (bioavailability) ต่ำกว่าอาหารในกลุ่มไขมันชนิดอื่น เช่น ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) (Kotake-Nara *et al.*, 2011) แต่ด้วยโครงสร้างปลายด้านที่มีขั้วของแอสตาแซนธินอิสระนั้น ทำให้แอสตาแซนธินสามารถละลายได้ดีกว่าสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่ไม่มีขั้วอื่น ๆ เช่น lycopene, β-carotene เป็นต้น (Ranga *et al.*, 2010) โครงสร้างตามธรรมชาติส่วนใหญ่ของสารนี้เป็นกรดไขมันที่มีหมู่เอสเทอร์เชื่อมอยู่ในกระบวนการดูดซึมนั้นแอสตาแซนธินจะถูกย่อยจนได้แอสตาแซนธินอิสระด้วยปฏิกิริยาเติมน้ำ (hydrolysis) และจะถูกรวมเข้าในโครงสร้างที่เป็นไมเซลล์และ

ดูดซึมผ่านเซลล์ที่ลำไส้เล็ก (Breithaupt *et al.*, 2011; Nagao *et al.*, 2011) สารอาหารชนิดไขมันมีส่วนช่วยให้แอสตาแซนธินดูดซึมได้ดีขึ้นที่ลำไส้เล็ก (Okada *et al.*, 2009) การศึกษาในคนพบว่าทำให้แอสตาแซนธินเข้ารวมอยู่ในโครงสร้างไขมัน เช่น lipophilic glycerol monooleate, dioleate และ emulsifier polysorption มีผลเพิ่มความสามารถดูดซึมสารแอสตาแซนธิน (Mercke *et al.*, 2003) การดูดซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ลำไส้ในกระบวนการแรกเกิดขึ้นแบบการแพร่อย่างง่าย (simple diffusion) นอกจากนี้ยังมีตัวรับที่มีส่วนช่วยในการดูดซึมได้เร็วขึ้น คือ scavenger receptor class B, type I (SR-BI) ซึ่งเป็นตัวรับเดียวกับกับ β -carotene และสารแซนโทโรฟิลล์อื่น ๆ เช่น β -cryptoxanthin, lutein และ zeaxanthin แล้วนำเข้าสู่เซลล์ลำไส้ต่อไป การศึกษาในคนโดยการรับประทานแอสตาแซนธินในรูปอิสระ 100 มก. ค่าความเข้มข้นในเลือดของสารขึ้นสูงสุดที่ 1.3 ± 0.1 มก./ลิตร มีค่าครึ่งชีวิต 21 ± 11 ชม. (Osterlie *et al.*, 2000) ในขณะที่การรับประทานแอสตาแซนธินไดเอสเทอร์ (astaxanthin diesters) ค่าความเข้มข้นในพลาสมาอยู่ที่ 0.28 ± 0.12 มก./ลิตร ค่าครึ่งชีวิตของสารอยู่ที่ 52 ± 40 ชม. (Coral-Hinostroza *et al.*, 2004) ความเข้มข้นที่ต่ำลงนี้เชื่อว่ามีสาเหตุมาจากกระบวนการย่อยสลายจากปฏิกิริยาการเติมน้ำ ทำให้อัตราการดูดซึมสารช้าลง (Yang *et al.*, 2013) จากการศึกษาในหนูพบว่า ในกระบวนการแรกนั้นแอสตาแซนธินจะถูกย่อยเป็น 3-hydroxy-4-oxo- β -ionone และ 3-hydroxy-4-oxo-7,8-dihydro- β -ionone ในเซลล์ตับ (Wolz *et al.*, 1999) อย่างไรก็ตามยังไม่มีอธิบายถึงเอนไซม์ตัวใดที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการย่อยสลายของแอสตาแซนธิน

ความปลอดภัยของแอสตาแซนธิน

จากการศึกษาที่ผ่านมาทั้งการศึกษาในสัตว์ทดลองและในคน พบว่าแอสตาแซนธินมีความปลอดภัยในการนำมาใช้ (Fassett และ Coombes, 2011; Spiller และ Dewell, 2003) การศึกษาวิจัยแบบ double blind randomized control ในคนวัยผู้ใหญ่ที่มีสุขภาพดีโดยได้รับแอสตาแซนธินสกัดจาก *H. pluvialis* ที่ขนาด 6 มก. วันละครั้ง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าแอสตาแซนธินไม่มีผลต่อค่าความดันเลือด ความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด แต่มีผลเพิ่มระดับของแคลเซียม โปรตีนและเพิ่มจำนวนอีโอซิโนฟิลเพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยค่ายังคงอยู่ในเกณฑ์ปกติของคนทั่วไป (Spiller และ Dewell, 2003) นอกจากนี้มีการทดลองให้รับประทานแอสตาแซนธินในขนาด 40 มก. เป็นเวลา 4 สัปดาห์ในคนไข้ที่มีภาวะอาหารไม่ย่อย (dyspepsia) และให้ในขนาด 4 มก. วันละครั้ง ติดต่อกันนานหนึ่งในคนไข้ที่มีภาวะจอประสาทตาเสื่อม (macular degeneration) พบว่าการได้รับแอสตาแซนธิน ไม่มีผลทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์แต่อย่างใด (Kupcinskis *et al.*, 2008) และมีผลทำกระตุ้นการฟื้นตัวของจอประสาทตาเสื่อมและยังยับยั้งการเสื่อมของจอประสาทตาส่วนอื่นได้อีกด้วย (Parisi *et al.*, 2008)

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของแอสตาแซนธิน

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant effects)

ภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) เป็นภาวะที่มีอนุมูลอิสระมากเกินไป และเกิดความไม่สมดุลกับปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย ส่งผลให้เกิดการทำลายสารชีวโมเลกุลในร่างกายที่สำคัญ ได้แก่ ดีเอ็นเอ โปรตีน ไขมันและโมเลกุลอื่น ๆ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดความชราภาพและสาเหตุของการเกิดโรคหลายชนิด เช่น โรคทางระบบหัวใจและหลอดเลือด โรคไขมันพอกตับที่ไม่ใช่สาเหตุจากพิษของแอลกอฮอล์ (nonalcoholic fatty liver disease) (Wojcik *et al.*, 2010) จากการศึกษาที่ผ่านมา มีรายงานว่า แอสตาแซนธินมีความสำคัญในการป้องกันการเกิดโรคหลายชนิด (Kidd, 2011) เนื่องจากมีฤทธิ์ในการต้านปฏิกิริยาทางอนุมูลอิสระ (reactive radicals) และสารประกอบที่มีออกซิเจนในโมเลกุล (reactive oxygen species; ROS) มีการศึกษาวิจัยมากมายที่สามารถยืนยันถึงประสิทธิภาพของแอสตาแซนธินในการต้านอนุมูลอิสระ ดังนี้ แอสตาแซนธินมีประสิทธิภาพในการจับ superoxide anion และ hypochlorous acid (HOCl) ได้ดีกว่า α -tocopherol (vitamin E), lutein, lycopene และ β -carotene (Rodrigues *et al.*, 2012) การศึกษาแบบ *in vitro* membrane model พบว่าสารแอสตาแซนธินมีประสิทธิภาพในการรักษาความคงตัวของเยื่อเซลล์และป้องกันการก่อตัวของสาร lipid peroxide ในขณะที่ lutein และ β -carotene นั้นมีผลกระตุ้นให้เกิดการกระจายตัวของโครงสร้างชั้นไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์และเพิ่มระดับของ lipid peroxides (McNulty *et al.*, 2007) ด้วยข้อมูลดังกล่าวนี้ บ่งบอกว่าแอสตาแซนธินนั้นมีประสิทธิภาพเหนือกว่าสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ อีกทั้งยังมีรายงานว่า แอสตาแซนธินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าวิตามินอีและแคโรทีน (Kurashige *et al.*, 1990; Guerin *et al.*, 2003) นอกจากนี้แล้วยังมีการศึกษาเชิงเปรียบเทียบระหว่างสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่ไม่มีประจุ เช่น lycopene และ β -carotene กับแอสตาแซนธิน พบว่า สารแคโรทีนอยด์ที่ไม่มีประจุนั้นสามารถทำหน้าที่ได้เฉพาะส่วนชั้นไขมันเท่านั้น ในขณะที่แอสตาแซนธินนั้นประกอบไปด้วยโครงสร้างที่เป็นไขมันและมีส่วนปลายทั้งสองข้างที่มีคุณสมบัติมีขั้ว ทำให้สามารถทำปฏิกิริยาไม่เพียงแต่ชั้นไขมันแต่ยังครอบคลุมถึงส่วนหัวของโมเลกุลฟอสโฟลิพิด ทั้งสองฝั่งของเยื่อหุ้มเซลล์อีกด้วย (Valko *et al.*, 2007) ในส่วนของวิตามินซีนั้น มีบทบาททำงานร่วมกับแอสตาแซนธิน โดยที่วิตามินซีมีคุณสมบัติมีขั้วและอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เป็นน้ำได้ ซึ่งวิตามินซีมีบทบาทเหมือนอ่างรับอนุมูลอิสระต่าง ๆ และนำส่งให้กับแอสตาแซนธินเพื่อทำการกำจัดต่อไป (Yang *et al.*, 2013) สำหรับระบบต้านอนุมูลอิสระนั้น แอสตาแซนธินมีส่วนช่วยเสริมการทำงานโดยจะกระตุ้นการทำงานผ่าน nuclear factor E2 related factor 2 (Nrf2) มีผลกระตุ้นกระบวนการจับและกำจัดอนุมูลอิสระ (Yang *et al.*, 2011) มีรายงานว่า การกระตุ้นผ่าน Nrf2 ผลไปเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในการสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น glutathione peroxidase, glutathione S-transferase และ heme

oxygenase 1 (Itoh *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 2005) Nfr2 ยังมีผลเสริมประสิทธิภาพการทำงานของกลูตาไธโอน (glutathione) โดยการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่สร้างเอนไซม์ glutathione reductase ซึ่งเอนไซม์ตัวนี้มีหน้าที่กักเก็บความสามารถในการทำงานของกลูตาไธโอน (Harvey *et al.*, 2009) จากการศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลองพบว่า ความสามารถในการทำงานต้านอนุมูลอิสระของแอสตาแซนธินผ่านการกระตุ้น Nrf2 pathway (Yang *et al.*, 2013) มีการศึกษาในชายวัยผู้ใหญ่ที่มีสุขภาพดี โดยให้รับประทานแอสตาแซนธิน 4 มก. ต่อวัน เป็นเวลา 3 เดือน พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยลดปริมาณของ peroxidized lipids รวมถึงไปลดกรดไขมันอีกสองชนิด คือ 12- และ 15-hydroxy fatty acids บ่งชี้ว่าแอสตาแซนธินมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันได้ (Karppi *et al.*, 2007) และจากการศึกษาในคนที่มีประวัติสูบบุหรี่ที่ยังมีสุขภาพแข็งแรง โดยให้รับประทานแอสตาแซนธินในขนาดที่แตกต่างกัน คือ 5, 20 หรือ 40 มก. 1 ครั้ง/วันเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า สามารถลดระดับของ lipid peroxidation markers ได้คือ malondialdehyde (MDA) และ isoprostane เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่สูบบุหรี่ที่มีสุขภาพดีแต่ไม่ได้รับแอสตาแซนธิน (Kim *et al.*, 2011)

ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory effects)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแอสตาแซนธินมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยกลไกการทำงานบางส่วนเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการทำงานของโมเลกุล NF- κ B ซึ่งเป็น transcription factor โดยตรงที่คอยควบคุมการแสดงออกของยีนเกี่ยวกับการอักเสบ ในภาวะปกติ NF- κ B จะอยู่ในไซโทพลาสซึม โดยมี inhibitor of NF- κ B- α (I κ B- α) ติดอยู่กับ NF- κ B ซึ่งมีหน้าที่คอยยับยั้งการทำงานของ NF- κ B โดยป้องกันไม่ให้เคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียส เมื่อมีปัจจัยกระตุ้นที่ก่อให้เกิดการอักเสบ เช่น LPS จะเกิดกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตให้แก่ I κ B- α และหลุดออกจาก NF- κ B โมเลกุลของ NF- κ B จะเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสและจะกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่สร้างไซโตไคน์การอักเสบต่าง ๆ เช่น TNF- α , IL-6 และ IL-1 β (Baker *et al.*, 2011; Tornatore *et al.*, 2012) พบว่า แอสตาแซนธินมีฤทธิ์ลดการสร้างสาร nitric oxide, prostaglandin E₂ และ TNF- α และยังสามารถลดการทำงานของเอนไซม์ iNOS ที่ทำหน้าที่กระตุ้นการสร้าง nitric oxide การทดลองที่ใช้ LPS กระตุ้นเซลล์ RAW264.7 macrophages (Ohgami *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003) พบว่าการได้รับแอสตาแซนธินในหนูที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS มีผลลดระดับของ nitric oxide, TNF- α และ IL-1 β (Lee *et al.*, 2003) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของแอสตาแซนธินยังมีความเชื่อมโยงกับฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ โดยการยับยั้งการสะสมของ ROS ภายในเซลล์และการยับยั้งการทำงานของ NF- κ B ทั้งสองกลไกนี้มีผลไปลดการทำงานของ iNOS promoter การศึกษาในเซลล์ THP-1 human monocytic โดยอาศัยการเหนี่ยวนำผ่าน NF- κ B พบว่าแอสตาแซนธินสามารถลดการสร้างสื่อกลางการอักเสบ เช่น TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNOS และเอนไซม์ COX-2 (Kishimoto *et al.*, 2010) การศึกษาในหนูเมาส์สายพันธุ์

BALB/C โดยให้หนูได้รับแอสตาแซนธิน 40 มก./กก. 12 ชม. ก่อนได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบโดยการฉีด LPS เข้าทางช่องท้อง มีผลลดปริมาณของ nitric oxide, prostaglandin E₂, TNF- α และ IL-1 β ในซีรัม (Suzuki *et al.*, 2006) แสดงถึงฤทธิ์ของแอสตาแซนธินในการต้านการอักเสบ มีการศึกษาฤทธิ์ของแอสตาแซนธินในการรักษามะเร็ง โดยเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่และการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบของลำไส้ใหญ่ (colitis) โดยใช้ dextran sulfate sodium ในหนูเมาส์พบว่า แอสตาแซนธินสามารถยับยั้งการเกิดแผลในทางเดินอาหารได้ ยับยั้งเนื้องอกและกุดการแสดงออกของยีน NF- κ B, COX-2, TNF- α , IL-6 และ IL-1 β มากกว่านั้นยังมีฤทธิ์กระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งแบบ apoptosis (Yusui *et al.*, 2011) เนื่องจากแอสตาแซนธินมีความสามารถละลาย (solubility) ในสิ่งแวดล้อมที่เป็นน้ำได้ต่ำและยังมีค่าชีวปริมาณการออกฤทธิ์ที่ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับอาหารไขมันในกลุ่มอื่น เช่น ไตรกลีเซอไรด์ (Kotake-Nara และ Nagao, 2011) แอสตาแซนธินเป็นสารที่มีความเสถียรน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ตัวอื่น ๆ เนื่องจากมีความไวต่อแสง อุณหภูมิ กรด-ด่าง และปฏิกิริยาออกซิเดชัน ปัจจัยเหล่านี้ส่งเสริมให้เกิดปฏิกิริยาไอโซเมอไรเซชันของแอสตาแซนธิน ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจากเดิมที่อยู่ในรูปทรานส์ไปอยู่ในรูปซิส ลดชีวปริมาณการออกฤทธิ์ของแอสตาแซนธินลง (Sweeney และ Marsh, 1973; Urich, 1994) เป็นจุดด้อยและข้อจำกัดของแอสตาแซนธินในการนำมาใช้เพื่อสุขภาพและการรักษาโรค

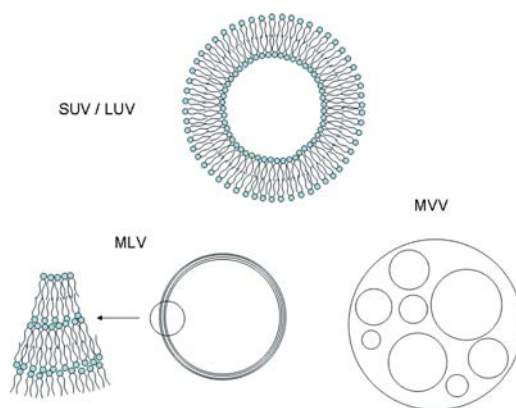
2.4 ลิโปโซม (liposome)

ส่วนหนึ่งของเทคโนโลยีการบรรจุแคปซูลขนาดเล็กนี้คือ การใช้ลิโปโซมซึ่งเป็นถุงที่ถูกสร้างขึ้นให้มีขนาดเล็ก มีรูปร่างทรงกลมและสามารถสร้างได้จากฟอสโฟลิพิดที่ไม่เป็นพิษร่วมกับคอเลสเตอรอล (วรารภรณ์, 2555) ลิโปโซมมีลักษณะเป็นถุงไขมันประเภทฟอสโฟลิพิดที่เรียงติดกันสองชั้น ข้างในบรรจุน้ำ คำว่า liposome รากศัพท์เดิมมาจากภาษากรีก คือ lipos แปลว่า ไขมัน และ soma แปลว่า ตัว (body) ลิโปโซมมีขนาดเล็กตั้งแต่ระดับนาโนเมตรถึงไมโครเมตร ส่วนใหญ่มีการแบ่งชนิดของลิโปโซมออกเป็นสองชนิด ได้แก่ unilamellar liposome เป็นลิโปโซมที่ประกอบขึ้นจากโครงสร้างผนังชั้นไขมันแค่ชั้นเดียว อีกชนิดหนึ่งคือ multi-lamellar liposome เป็นชนิดที่ประกอบขึ้นจากผนังชั้นไขมันตั้งแต่สองชั้นขึ้นไป (Mansoori *et al.*, 2012) ด้วยโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นถุงไขมันที่เก็บส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ไว้ด้านในผนัง ทำให้สามารถบรรจุสารที่มีขั้วไว้ด้านในได้ จึงมีการนำลิโปโซมมาใช้ตัวนำส่งยาต้านมะเร็งและโรคอื่น ๆ

ส่วนประกอบลิโปโซม

ส่วนประกอบสำคัญของลิโปโซมประกอบด้วยโมเลกุลฟอสโฟลิพิดและสารเติมจำเพาะ (specific additives) สารฟอสโฟลิพิดที่เป็นส่วนประกอบสำคัญทั้งในพืชและสัตว์มี

ด้วยกัน 2 ชนิด คือ ฟอสฟาติดีลโคลีน (phosphatidylcholine; PC) และฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidyl ethanolamine) สำหรับการเตรียมฟอสโฟลิพิดนั้น ส่วนใหญ่จะใช้ฟอสฟาติดีลโคลีน ฟอสโฟลิพิดชนิดนี้เป็นที่รู้จักในชื่อ เลซิธิน (lecithin) มีคุณสมบัติเป็นกลาง แต่ลิพโซมบางชนิดมีประจุซึ่งได้จากการเตรียมที่มีการเติมฟอสโฟลิพิดที่มีประจุ เช่น ฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) หรือฟอสฟาติดีลเซอรีน (phosphatidyl serine) การเกิดประจุของลิพโซมมีผลดีทำให้เกิดระยะห่างระหว่างชั้นมากขึ้น เพิ่มความสามารถในการกักเก็บสารและความคงตัวมากขึ้น (วรารภรณ์, 2555) สารเติมจำเพาะในลิพโซมมีด้วยกัน 2 ประเภทคือ สารเติมกลุ่มแรก สารกลุ่มสเตอรอล (sterol) สารที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ ไฟโตสเตอรอล (phytosterol) ไดไฮโดรคอเลสเตอรอล (dihydrocholesterol) และคอเลสเตอรอล (cholesterol) สารเติมเหล่านี้สามารถพบในผนังชั้นคู่ของโครงสร้างฟอสโฟลิพิด มีบทบาททำให้ลิพโซมมีคุณสมบัติเฉพาะทางเคมีและโครงสร้างที่มีความแข็งแรงมากขึ้น (Benita *et al.*, 2006) โดยทั่วไปมีการเติมคอเลสเตอรอลเข้ากับฟอสโฟลิพิดเป็นโครงสร้างผนังของลิพโซม ช่วยปรับปรุงคุณสมบัติการไหล (fluidity) ของผนัง ชั้นคู่ ทำให้ความสามารถเป็นเยื่อเลือกผ่านของสารละลายน้ำผ่านเมมเบรนได้ดีขึ้น ช่วยเพิ่มความคงตัวของผนังลิพโซม เมื่ออยู่ในเลือดหรือของเหลวในร่างกายด้วยการลดการจับกันระหว่างลิพโซมและโปรตีนในเลือด (Vemuri และ Rhodes, 1995) สารเติมกลุ่มที่สอง เป็นสารกลุ่มบัฟเฟอร์ อิเล็กโทรไลต์ สารปรับสภาพความเป็นกรดด่าง (pH) สารกันเสียและสารที่มีประจุ สารเติมเหล่านี้มีส่วนช่วยให้โครงสร้างของลิพโซมมีความเป็นประจุ เพิ่มความคงตัว ทำให้เพิ่มช่องว่างระหว่างผนังชั้นคู่ เพิ่มความสามารถในการกักเก็บสารได้มากขึ้น (Benita *et al.*, 2006) ดังรูปที่ 1-11



รูปที่ 1-11 ลักษณะโครงสร้างของลิพโซมที่มีผนังชั้นเดียว (unilamellar) และลิพโซมที่มีผนังคู่หลายชั้น (multilamellar) large and small unilamellar vesicles; SUV/LUV, multilamellar vesicles; MLV และ multivesicular vesicles; MVV (Taylor *et al.*, 2005)

การประยุกต์ใช้ลิโปโซมเป็นระบบนำส่งยา

การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ลิโปโซมสามารถใช้เป็นตัวนำส่งยาได้หลายชนิดและให้ผลการรักษาดีกว่าการให้ตัวยาคือเดี่ยว ๆ และยังสามารถลดอันตรายที่อาจเกิดจากอาการข้างเคียงของยาได้ โดยทั่วไปลิโปโซมสามารถนำส่งยาไปยังอวัยวะหรือเซลล์เป้าหมายได้ดี เช่น เซลล์เนื้องอก (tumor cells) บางส่วนของงานวิจัยมุ่งเน้นเพื่อให้ลิโปโซมสามารถนำส่งยาที่มีความเป็นพิษสูง เช่น ยาต้านมะเร็งและยาต้านเชื้อรา ตัวอย่างยาที่ประสบความสำเร็จที่ใช้ลิโปโซมในการนำส่งยา เช่น แอมโฟเทอริซิน บี (amphotericin B) นิสเตติน (nystatin) และดอกโซรูบิซิน (doxorubicin) เป็นต้น (วรารภรณ์, 2555) การศึกษาระบบการนำส่งยาด้วยลิโปโซมผ่านทางเดินอาหาร พบว่าด้วยสภาพทางสรีรวิทยาในทางเดินอาหารนั้นทำให้ความคงตัวของลิโปโซมต่ำลง มีการศึกษาการนำส่งสารแคลซิโทนิน (calcitonin) ผ่านทางเดินอาหาร โดยให้อยู่ในรูปแบบ chitosan-aprotinin coated liposomes พบว่าผลการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาสูงกว่าโมเลกุลเปปไทด์ในสารละลาย (Werle *et al.*, 2009) การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของ pectin-liposome และ pectin ในสารละลายในลำไส้เล็กของหนูแรท โดยติดสีฟลูออเรสเซนต์และติดตามความคงตัวของยาและประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของยาหลังจากให้ไป 6 ชม. พบว่า pectin-liposome สามารถออกฤทธิ์ได้ดีกว่าและช่วงเวลาในการออกฤทธิ์ยาวกว่า pectin ในสารละลาย (Thirawong *et al.*, 2008) มีรายงานการศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์ของสารในรูปแบบลิโปโซมสามารถเพิ่มค่าครึ่งชีวิตของสารได้ เช่น การศึกษาการให้ยา gentamicin อิสระและในรูปแบบลิโปโซม โดยทั้งสองรูปแบบมีขนาดยาที่เท่ากันคือ 20 มก./กก. ในหนูเม้าส์และหนูแรท พบว่า ยาในรูปแบบอิสระมีค่าครึ่งชีวิตในซีรัมเฉลี่ย 1.0 และ 0.6 ชม. ตามลำดับ ในขณะที่ยาในรูปแบบลิโปโซมมีค่าครึ่งชีวิตเฉลี่ยที่ 3.8 ชม. ในหนูเม้าส์และ 4.0 ชม. ในหนูแรท และพบว่า ยาในรูปแบบลิโปโซมมีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ที่สูงกว่าและยาวนานกว่าในอวัยวะที่อุดมไปด้วย reticuloendothelial cell โดยเฉพาะในม้ามและตับ (Swenson *et al.*, 1989) นอกจากนี้การศึกษาประสิทธิภาพการดูดซึมและการออกฤทธิ์ของขมิ้นชัน ทั้งสามรูปแบบคือ ขมิ้นชัน ยาน้ำขมิ้นชัน และขมิ้นชันในรูปแบบลิโปโซมโดยให้ได้รับทางปากในหนูขาวใหญ่ พบว่าขมิ้นชันในรูปแบบลิโปโซมมีการดูดซึมได้ดีและเร็วกว่า อีกทั้งมีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ได้ดีกว่าขมิ้นชันรูปแบบอื่น (Takahashi *et al.*, 2009)

2.5 การเก็บกักสาร (encapsulation)

การเก็บกักสารเป็นกระบวนการที่สารหรือส่วนผสมของสารถูกห่อหุ้มด้วยสารชนิดอื่นเพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของสารจากสิ่งแวดล้อมที่อาจทำลายความคงตัวของสารได้ เช่น ออกซิเจน ความร้อน แสง กรด ด่างหรือสภาวะที่ไม่เหมาะสมอื่น ชนิดของสารห่อหุ้มที่นิยมนำมาใช้ ได้แก่ สารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต เซลลูโลส กัม ลิพิด และโปรตีน (Desai และ Park, 2005) เทคนิคการเก็บกักสารมีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเป็นเวลานานกว่า 60 ปี ด้วยวัตถุประสงค์

ต่าง ๆ ดังนี้ ประการแรก เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารแกนกับสิ่งแวดล้อมประการที่สอง เพื่อลดอัตราการปลดปล่อยสารแกนออกสู่ภายนอก ประการที่สามเพื่อง่ายต่อการจัดการสารที่บรรจุอยู่ภายใน ประการที่สี่ เพื่อควบคุมการปลดปล่อยสารแกน ประการที่ห้าเพื่อבודบังรสชาติของสารแกนประการสุดท้ายเพื่อลดความเข้มข้นหรือปริมาณการใช้สารในกรณีที่ต้องใช้หรือมีสารแกนในปริมาณน้อย (Shahidi และ Han, 1993) มีการพัฒนารูปแบบการเก็บกักสารให้มีขนาดเล็กโดยเรียกการเก็บกักนี้ว่า microencapsulation โดยทั่วไปแล้ว ไมโครแคปซูลจะมีลักษณะเป็นทรงกลมขนาดเล็ก มีเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ขนาดนาโนเมตรถึงมิลลิเมตร ซึ่งสามารถแบ่งขนาดของไมโครแคปซูลตามเส้นผ่านศูนย์กลางออกเป็น 3 ระดับ คือ ระดับมาโคร (macro) มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 5,000 ไมโครเมตร ระดับไมโคร (micro) เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 ถึง 5,000 ไมโครเมตรและระดับนาโน (nano) มีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 1.0 ไมโครเมตร (Andres, 1977)

แอสตาแซนธินเป็นสารที่มีความเสถียรน้อยและสามารถเสื่อมสภาพได้ง่ายจากสภาพแวดล้อม เช่น แสง ความร้อนและออกซิเจน การศึกษาวิจัยที่ผ่านมาพยายามหาแนวทางในการป้องกันสารจากสภาพแวดล้อมเหล่านี้ เทคนิคหนึ่งที่มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลายคือการบรรจุสารในแคปซูลที่มีขนาดไมโครหรือนาโน จากการศึกษาของ Tachaprutinun และคณะ (2009) โดยศึกษาเปรียบเทียบระหว่างแอสตาแซนธินเปล่าและแอสตาแซนธินที่บรรจุในรูปแบบ polymeric nanospheres จากการถูกทำลายจากความร้อนพบว่า แอสตาแซนธินที่บรรจุในรูปแบบ polymeric nanospheres มีการเสื่อมสภาพเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับแอสตาแซนธินเปล่าซึ่งพบว่าเสื่อมสภาพเกือบทั้งหมด การศึกษาเปรียบเทียบการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของแอสตาแซนธินของ Lee และคณะ (2011) พบว่า การบรรจุแอสตาแซนธินใน calcium alginate gel สามารถป้องกันสารจากการเกิด lipid peroxidation ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับแอสตาแซนธินเปล่า การศึกษาของ Hama และคณะ (2012) โดยศึกษาประสิทธิภาพการป้องกันการเกิด hydroxyl radical ของแอสตาแซนธิน ในเซลล์ที่เหนี่ยวนำให้เกิด cytotoxicity พบว่า แอสตาแซนธินในรูปแบบลิโปโซมสามารถป้องกันการเกิด hydroxyl radical ได้ดีกว่าแอสตาแซนธินเปล่าและมีประสิทธิภาพสูงกว่าในการต้านอนุมูลอิสระ การศึกษาของ Matsushita และคณะ (2000) โดยประเมินประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีขั้วรวมถึงแอสตาแซนธินโดยนำไปบรรจุใน PC liposome พบว่า สามารถเพิ่มความคงตัวของสารจากการจับกันของโมเลกุลที่มีขั้วระหว่างสารแคโรทีนอยด์และ PC ทั้งสองชั้นและทำให้สารมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีขึ้น ดังนั้นการบรรจุแอสตาแซนธินในรูปแบบแคปซูลขนาดเล็กเป็นเทคนิคที่น่าสนใจในการเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์และป้องกันการสารจากการถูกทำลายจากสภาพแวดล้อม

2.6 วิตามินอี (vitamin E) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

เป็นวิตามินที่ละลายได้ในไขมัน พบวิตามินอีตามธรรมชาติธรรมชาติหลายชนิด มีการแบ่งกลุ่มเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ tocopherols และ tocotrienols (tocochromanols) แต่ละกลุ่มมีการแบ่งย่อยอีกเป็น 4 ชนิด ได้แก่ อัลฟา (α -) เบต้า (β -) แกมมา (γ -) และเดลต้า (δ -) (Jiang, 2014) แหล่งของวิตามินอีตามธรรมชาติได้แก่ ผักสีเขียวเข้ม น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันถั่วลิสง น้ำมันข้าวโพด น้ำมันดอกคำฝอย จมูกข้าวสาลี เมล็ดอัลมอนต์ เป็นต้น (Dreher, 2012; McLaughlin และ Weihrauch, 1979) วิตามินอีทุกชนิดมีประสิทธิภาพสูงในการต้านอนุมูลอิสระ มีบทบาทในการกำจัดอนุมูลอิสระจากไขมันคือ lipid peroxyl radicals (LOO^{\cdot}) โดยการเติมไฮโดรเจน (Jiang *et al.*, 2001) และพบว่า วิตามินอีมีการกระจายตัวอยู่ในชั้น lipid bilayer ของเยื่อหุ้มเซลล์คอยทำปฏิกิริยากับ LOO^{\cdot} เป็นการหยุดปฏิกิริยา lipid peroxidation (Packer *et al.*, 2001; Wong และ Radhakrishnan, 2012)

2.7 คาร์ราจีแนน (carrageenan)

คาร์ราจีแนนเป็นชื่อทั่วไปของสารในตระกูล gelforming และ viscosifying polysaccharides สกัดได้จากสาหร่ายสีแดง ตระกูล *Rhodophyceae* พบบริเวณมหาสมุทรแอตแลนติกแถบใกล้กับเกาะอังกฤษและอเมริกาเหนือคาร์ราจีแนนไม่มีคุณสมบัติทางโภชนาการ แต่มีการนำมาใช้ปรุงอาหารเพื่อให้มีลักษณะเป็นวุ้น (Van de Velde *et al.*, 2002) นอกจากนี้ในทางเภสัชวิทยาคาร์ราจีแนนถูกนำมาใช้ในการทดสอบยาต้านการอักเสบ (Zacharopoulos และ Phillips 1997)

คุณสมบัติทางเคมี

คาร์ราจีแนนเป็นสารประกอบ sulfated polygalactan อุดมไปด้วย ester-sulfate ปริมาณมากถึง 15-40% มีมวลโมเลกุล 100 kDa โครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยโครงสร้างที่ต่อกันของน้ำตาล D-galactose และ 3,6-anhydro-galactose (3,6-AG) เชื่อมต่อกันด้วย α -1,3 and β -1,4-glycosidic linkage

การเหนี่ยวนำให้เกิดการบวมที่เท้าด้วยคาร์ราจีแนน (carrageenan-induced paw edema)

การเหนี่ยวนำการอักเสบที่เท้าของสัตว์ทดลองโดยฉีดคาร์ราจีแนน เป็นโมเดลที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารและอาการปวดบริเวณที่มีการอักเสบโดยไม่ก่อให้เกิดการบาดเจ็บและการทำลายเนื้อเยื่อของสัตว์ทดลอง (Necas และ Bartosikova, 2013) เป็นการเหนี่ยวนำเฉพาะที่ซึ่งสามารถหลีกเลี่ยงการตอบสนองของระบบต่าง ๆ ในร่างกาย (systemic effects) และคาร์ราจีแนนมีประสิทธิภาพสูงในการเหนี่ยวนำให้มีการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบต่าง ๆ อีกด้วย (Willis, 1969) ในการเหนี่ยวนำการอักเสบที่เท้า

น้ำใช้คาร์ราจีแชนความเข้มข้น 1-3% ในสารละลาย saline ปริมาตร 50–150 ไมโครลิตร สามารถแบ่งอาการออกเป็น 2 ระยะ คือ ช่วงแรก (early phase) ประมาณ 1-2 ชม. มีการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบประเภท histamine, serotonin และ bradykinin เริ่มมีการหลั่งสาร prostaglandins (Boughton-smith *et al.*, 1993; Di Rosa *et al.*, 1971; Vinegar *et al.*, 1969; Vinegar *et al.*, 1987) ต่อมาในระยะหลังจากการเหนี่ยวนำ 3-6 ชม. มีการหลั่งสาร prostaglandins, leukotrienes จากแมโครฟาจและสารอื่น ๆ เช่น PAF, nitric oxide และเกิดการสร้าง ROS ขึ้น (Boughton-smith *et al.*, 1993; Busnardo *et al.*, 2010; Nathan, 1997; Salvemini *et al.*, 1996; Vinegar *et al.*, 1969; Vinegar *et al.*, 1987) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการอักเสบโดยมีผลเพิ่มความสามารถในการซึมของสารผ่านผนังหลอดเลือด นอกจากนี้ยังมีการหลั่งสารในกลุ่ม pro-inflammatory cytokines เช่น TNF- α , IL-1 และ IL-6 (Cuzzocrea *et al.*, 1999) ในกระบวนการตอบสนองต่อการอักเสบของเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลจะมีการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบต่าง ๆ รวมถึงอนุมูลอิสระจากออกซิเจนเช่น O_2^- และ $^{\bullet}OH$ (Posadas *et al.*, 2004; Salvemini *et al.*, 1996) สารสื่อกลางในกระบวนการอักเสบเฉียบพลันที่สำคัญอีกตัวหนึ่งคือ nitric oxide ผ่านการทำงานของเอนไซม์ NOS ซึ่งมี 3 ไอโซฟอร์มด้วยกัน คือ endothelial NOS (eNOS), neuronal NOS (nNOS) และ iNOS การเหนี่ยวนำการอักเสบด้วยคาร์ราจีแชนมีผลกระตุ้นการทำงานของ iNOS จึงมีผลเพิ่มการสังเคราะห์และการหลั่ง nitric oxide ทำให้เกิดอาการบวมและปวด (Handy และ Moore, 1998; Omote *et al.*, 2001)

3. วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบของแอสตาแซนธินสกัดจากเปลือกกุ้งขาวในหนูเม้าส์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้อุ้งเท้าบวมด้วยคาร์ราจีแชน
2. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพฤทธิ์ด้านการอักเสบของแอสตาแซนธินเปล่าและแอสตาแซนธินในรูปแบบลิโปโซมสกัดจากเปลือกกุ้งขาวในหนูเม้าส์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้อุ้งเท้าบวมด้วยคาร์ราจีแชน

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

1. สารสกัดแอสตาแซนธินจากเปลือกกุ้งขาว

1.1 การสกัดแอสตาแซนธินจากเปลือกกุ้งขาว

สารสกัดแอสตาแซนธินได้รับการอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.วรรณวิมล คล้ายประดิษฐ์ ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ เปลือกกุ้งขาวที่ซื้อจากรองงานอุตสาหกรรมอาหารทะเลในเขตจังหวัดสมุทรสาคร ทางผู้เตรียมได้ดัดแปลงกระบวนการสกัดจากรายงานการศึกษาของ Sachindra และคณะ (2005) ขั้นตอนการสกัดโดยนำเปลือกกุ้งผสมกับเอทานอลในสัดส่วน 1:2 (w/v) นำมาปั่นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง Waring laboratory blender (Waring Laboratory Science, Winsted, USA) จากนั้นนำมารองเอาเปลือกกุ้งออกด้วยเครื่องกรองระบบสุญญากาศ นำสารละลายที่กรองได้เข้าเครื่องระเหยสุญญากาศเพื่อทำการไอระเหยเอทานอลออก สารสกัดแอสตาแซนธินที่ได้จะทำการเก็บในภาชนะสีชา เติมแก๊สไนโตรเจนและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.2 การบรรจุแอสตาแซนธินลิโปโซม

แอสตาแซนธินลิโปโซมได้รับการอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.วรรณวิมล คล้ายประดิษฐ์ เช่นกัน เตรียมโดยใช้วิธี thin film hydration ขั้นตอนการเตรียมจะนำฟอสโฟลิพิดที่ประกอบด้วยฟอสฟาติดีลโคลีน 70% มาละลายใน 99% เอทานอลปริมาตร 100 มล. หลังจากนั้นเติมแอสตาแซนธินที่ได้จาก 1.1 ปริมาณ 2 กรัม ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปกำจัดเอทานอลออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศจนได้ฟิล์มบาง ๆ ของฟอสโฟลิพิด จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มล. ลงบนฟิล์มของฟอสโฟลิพิด และนำมาทำการ sonication ด้วยเครื่อง ultra sonicator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที สุดท้ายจะได้แอสตาแซนธินลิโปโซม และนำลิโปโซมที่ได้นี้มารองผ่านเยื่อแก้วด้วยเครื่อง extruder เพื่อให้ได้ขนาดของลิโปโซมประมาณ 200 นาโนเมตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสระหว่างที่รอนำไปใช้ในการทดลอง

2. สัตว์ทดลอง

หนูเมาส์เพศผู้สายพันธุ์ ICR น้ำหนัก 25-30 กรัม อายุ 2 เดือน จำนวน 90 ตัว จากสถานเลี้ยงสัตว์ทดลองภาคใต้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ นำมาเลี้ยงที่ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองของสถานเลี้ยงสัตว์ทดลอง โดยควบคุมสลับช่วงมืดและสว่างช่วงละ 12 ชม. ต่อวัน ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้อาหารและน้ำไม่จำกัดปริมาณ การศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ผ่านการพิจารณาจริยบรรณการใช้สัตว์ทดลองจาก

คณะกรรมการพิจารณาการใช้สัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (หมายเลข 0521.11/019)

3. ยาและสารเคมี

ยาเม็ด diclofenac sodium 50 มก. และ indomethacin 25 มก. ขององค์การเภสัชกรรม ชื้อจากร้านยาในอำเภอหาดใหญ่ จ.สงขลา และใช้จากขวดเดียวกันตลอดการทดลอง α -tocopherol จากบริษัท Sigma-ALDRICH Lot #MKBT5986V Germany นำมาเตรียมใน propylene glycol ตามความเข้มข้นที่ต้องการ

4. เครื่องมือและอุปกรณ์

- 4.1 automatic pipette ขนาด 10,100, 200, 1000 ไมโครลิตร
- 4.2 centrifuge
- 4.3 microplate reader UVM 340 biochrom
- 4.4 microtube ขนาด 1.5 มล.
- 4.5 vernier caliper
- 4.6 vortex mixer
- 4.7 กล้องถ่ายรูป
- 4.8 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- 4.9 ชุดเครื่องมือผ่าตัด
- 4.10 ชุดเครื่องทดสอบ paw withdrawal (hot plate)
- 4.11 ชุดทดสอบ Randall-Selitto test (ANALGESY-METER Cat No. 37215)

5. วิธีดำเนินการวิจัย

5.1 การแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง

5.1.1 เพื่อศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินสกัดจากเปลือกกุ้งขาวในหนูเม้าส์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้อุ้งเท้าบวมด้วยคาร์ราจีแนน ได้แบ่งหนูทดลองโดยการสุ่มทั้งหมด 7 กลุ่มคือ

กลุ่มที่ 1: กลุ่มควบคุม ได้รับการบ้วนสาร propylene glycol (PG) 0.5 มล. ซึ่งเป็นตัวทำละลายของแอสตาแซนธินและไม่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วยคาร์ราจีแนน

กลุ่มที่ 2: กลุ่มตัวทำละลาย ได้รับการบ้วนสาร PG (0.5 มล.) และได้รับการเหนี่ยวนำด้วยคาร์ราจีแนน

กลุ่มที่ 3: กลุ่มที่ได้รับสารแอสตาแซนธินสกัดขนาด 100 มก./กก. ของน้ำหนักตัวและได้รับการเหนี่ยวนำด้วยคาร์ราจีแนน

กลุ่มที่ 4: กลุ่มที่ได้รับสารแอสตาแซนธินสกัดขนาด 150 มก./กก. ของน้ำหนักตัวและได้รับการเหนียวหน้าด้วยคาร์ราจีแนน

กลุ่มที่ 5: กลุ่มควบคุมบวก ที่ได้รับยาต้านการอักเสบ indomethacin 5 มก./กก. ของน้ำหนักตัวและได้รับการเหนียวหน้าด้วยคาร์ราจีแนน

กลุ่มที่ 6: กลุ่มควบคุมบวก ที่ได้รับยาต้านการอักเสบ diclofenac 25 มก./กก. ของน้ำหนักตัวและได้รับการเหนียวหน้าด้วยคาร์ราจีแนน

กลุ่มที่ 7: กลุ่มที่ได้รับวิตามินอี (สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน) ขนาด 100 มก./กก. ของน้ำหนักตัวและได้รับการเหนียวหน้าด้วยคาร์ราจีแนน

สัตว์ทดลองทุกกลุ่มจะได้รับการป้อนสารทางปาก วันละ 1 ครั้ง เป็นระยะเวลา 21 วัน ซึ่งในวันที่ 21 ของการทดลอง 1 ชม. หลังจากได้รับการป้อนสารตามกลุ่มแล้ว สัตว์ทดลองจะถูกเหนียวหน้าให้อุ้งเท้าบวมโดยการฉีด 2.5% คาร์ราจีแนน ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ที่ฝ่าเท้าหลังทั้งสองข้าง หลังการเหนียวหน้าสัตว์ทดลองจะได้รับการประเมินความหนาของอุ้งเท้า (paw thickness) ความไวในการสนองตอบต่อการกระตุ้นด้วยอุณหภูมิ (thermal hyperalgesia) และการกระตุ้นด้วยแรงกด (mechanical hyperalgesia) ที่เวลา 2 และ 6 ชม. เมื่อเสร็จสิ้นการประเมินที่ 6 ชม. สัตว์ทดลองจะได้รับการฉีดยาสลบแล้วทำการเก็บเลือดจากหัวใจ (cardiac puncture) นำเลือดที่ได้ไปปั่นให้ตกตะกอนจนได้พลาสมา แล้วเก็บไว้ในตู้ -80 องศาเซลเซียส สุดท้ายสัตว์ทดลองจะได้รับการการุณยฆาตด้วยวิธี cervical dislocation และเก็บเนื้อเยื่ออุ้งเท้าทั้งสองข้างนำไปเก็บในตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ทางชีวโมเลกุล ดังตารางที่ 2-1 และแผนผังที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 การแบ่งกลุ่มและการดำเนินการต่อสัตว์ทดลองเพื่อศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินสกัดจากเปลือกกุ้งขาวในหนูเม้าส์ที่ถูกเหนียวหน้าให้อุ้งเท้าบวมด้วยคาร์ราจีแนน

กลุ่มสัตว์ทดลอง	ชนิดของสารที่ได้รับการป้อน (ระยะเวลา 21 วัน)	หัตถการ (ในวันที่ 21 ของการทดลอง)
1.control	propylene glycol	1 ชม. หลังจากสัตว์ทดลองได้รับการป้อนสารต่าง ๆ สัตว์ทดลองจะได้รับหัตถการตามลำดับดังนี้ 1. การเหนียวหน้าให้เกิดการอักเสบที่เท้าด้วยคาร์ราจีแนน ยกเว้น กลุ่มควบคุมจะไม่ถูกเหนียวหน้า 2. หลังการเหนียวหน้า ที่ 2 และ 6 ชม. ทำการตรวจวัดความหนาของเท้าและประเมินพฤติกรรมการสนองตอบต่อการอักเสบ 3. การเก็บตัวอย่างพลาสมาและเนื้อเยื่ออุ้งเท้า
2.PG (vehicle)	propylene glycol	
3. astaxanthin 100	astaxanthin 100 mg/kg BW	
4. astaxanthin 150	astaxanthin 150 mg/kg BW	
5. indomethacin	propylene glycol ระยะเวลา 14 วัน + indomethacin 5 mg/kg BW ระยะเวลา 7 วัน	
6. diclofenac	propylene glycol ระยะเวลา 18 วัน + diclofenac 25 mg/kg BW ระยะเวลา 3 วัน	
7. vitamin E	vitamin E 100 mg/kg BW	

5.1.2 เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพฤทธิ์ด้านการอักเสบของแอสตาแซนธิน เปล่าและแอสตาแซนธินลิโปโซมสกัดจากเปลือกกุ้งขาวในหนูเมาส์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้อุ้งเท้าบวม ด้วยคาร์ราจีแนน ทำการแบ่งหนูทดลองโดยการสุ่มทั้งหมด 6 กลุ่มคือ

กลุ่มที่ 1: กลุ่มควบคุม ได้รับการบ้วนสาร PG 0.5 มล. และไม่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วยคาร์ราจีแนน

กลุ่มที่ 2: กลุ่มตัวทำละลาย ได้รับการบ้วนสาร PG 0.5 มล. และได้รับการเหนี่ยวนำด้วยคาร์ราจีแนน

กลุ่มที่ 3: กลุ่มที่ได้รับสารแอสตาแซนธินสกัดขนาด 100 มก./กก. ของน้ำหนักตัวและได้รับการเหนี่ยวนำด้วยคาร์ราจีแนน

กลุ่มที่ 4: กลุ่มที่ได้รับสารแอสตาแซนธินสกัดขนาด 150 มก./กก. ของน้ำหนักตัวและได้รับการเหนี่ยวนำด้วยคาร์ราจีแนน

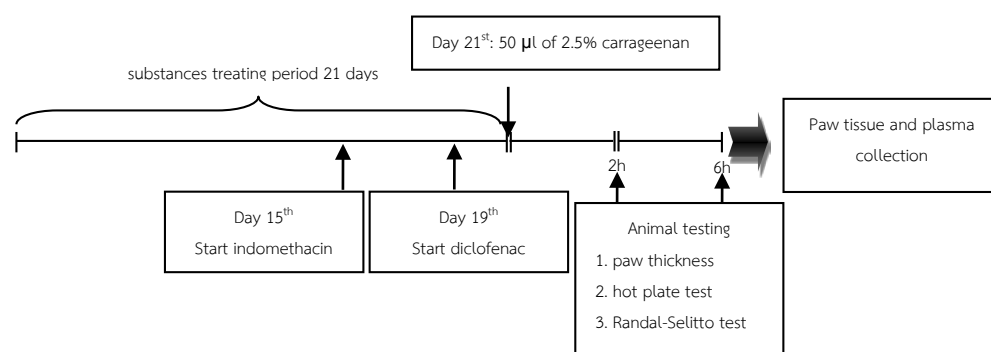
กลุ่มที่ 5: กลุ่มที่ได้รับสารแอสตาแซนธินสกัดในรูปแบบลิโปโซมขนาด 100 มก./กก. ของน้ำหนักตัว ที่มีแอสตาแซนธินภายใน 10 มก. และได้รับการเหนี่ยวนำด้วยคาร์ราจีแนน

กลุ่มที่ 6: กลุ่มที่ได้รับลิโปโซม (blank liposome; BL) เปล่าขนาด 100 มก./กก. ของน้ำหนักตัวและได้รับการเหนี่ยวนำด้วยคาร์ราจีแนน

สัตว์ทดลองจะได้รับการบ้วนสารทางปาก วันละ 1 ครั้ง เป็นระยะเวลา 21 วัน ซึ่งในวันที่ 21 ของการทดลอง 1 ชม.หลังจากได้รับการบ้วนสารตามกลุ่มแล้ว สัตว์ทดลองจะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วยการฉีด 2.5% คาร์ราจีแนนปริมาตร 50 ไมโครลิตร ที่ฝ่าเท้าหลังทั้งสองข้าง หลังการเหนี่ยวนำการอักเสบ สัตว์ทดลองจะได้รับการประเมินความหนาของอุ้งเท้า ความไวในการสนองตอบต่อการกระตุ้นด้วย อุณหภูมิและการกระตุ้นด้วยแรงกดที่ระยะเวลา 2 และ 6 ชม. เมื่อเสร็จสิ้นการประเมินที่ 6 ชม. สัตว์ทดลองจะได้รับการฉีดยาสลบแล้วทำการเก็บเลือดจากหัวใจ และจะได้รับการุณยฆาตด้วยวิธี cervical dislocation และเก็บเนื้อเยื่ออุ้งเท้าทั้งสองข้าง นำไปเก็บในตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ทางชีวโมเลกุล ดังตารางที่ 2-2 และแผนผังที่ 2-1

ตารางที่ 2-2 การแบ่งกลุ่มและการดำเนินการต่อสัตว์ทดลองเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินเปล่าและแอสตาแซนธินลิโปโซมในหนูเม้าส์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้อุ้งเท้าบวมด้วยคาร์ราจีแนน

กลุ่มสัตว์ทดลอง	ชนิดของสารที่ได้รับการป้อน (ระยะเวลา 21 วัน)	หัตถการ (ในวันที่ 21 ของการทดลอง)
1. control	propylene glycol	1 ชม.หลังจากสัตว์ทดลองได้รับการป้อนสารต่าง ๆ สัตว์ทดลองจะได้รับหัตถการตามลำดับดังนี้ 1. การเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบที่เท้าด้วยคาร์ราจีแนน ยกเว้น กลุ่มควบคุมจะไม่ถูกเหนี่ยวนำ 2. หลังการเหนี่ยวนำ ที่ 2 และ 6 ชม. ทำการตรวจวัดความหนาของเท้าและประเมินพฤติกรรมการสนองตอบต่อการอักเสบ 3. การเก็บตัวอย่างพลาสมาและเนื้อเยื่ออุ้งเท้า
2. PG (vehicle)	propylene glycol	
3. astaxanthin 100	astaxanthin 100 mg/kg BW	
4. astaxanthin 150	astaxanthin 150 mg/kg BW	
5. astaxanthin-liposome	astaxanthin-liposome	
6. liposome blank	liposome blank	



แผนผังที่ 2-1 สรุปการออกแบบการทดลอง

5.2 การเหนี่ยวนำให้เกิดการบวมของอุ้งเท้า

การเหนี่ยวนำให้เกิดการบวมของอุ้งเท้าใช้ 2.5% คาร์ราจีแนน ในน้ำเกลือ สัตว์ทดลองจะได้รับยาระงับความรู้สึกโดยการดมยา 2% isoflurane แล้วทำการฉีดคาร์ราจีแนน ปริมาตร 50 ไมโครลิตรเข้าชั้นผิวหนังที่บริเวณ subplantar ของอุ้งเท้าหลังทั้งสองข้าง ดังรูปที่



รูปที่ 2-1 แสดงการฉีดคาร์ราจีแนบบริเวณ subplantar ของอุ้งเท้าหนู (ซ้าย) และเท้าหนูที่มีการอักเสบ (ขวา)

5.3 การประเมินการบวมของเท้าจากการอักเสบ

ความหนาของเท้าหนูถูกนำมาใช้ในการประเมินอาการบวมจากการอักเสบ ตำแหน่ง dorsoventral thickness ของเท้าหนูทั้งสองข้างเป็นจุดอิงในการประเมิน โดยใช้ vernier caliper (รูปที่ 2-2) โดยพยายามควบคุมการวัดให้พอสัมผัสกับผิวเท้าหนูทั้งสองด้าน ไม่บีบกดเท้าเพราะจะทำให้ได้ค่าที่ไม่ถูกต้อง ค่าจากการวัดเอามาหาเฉลี่ยทั้งสองข้างของหนูแต่ละตัว (mean \pm S.E.M)



รูปที่ 2-2 เครื่องมือ vernier caliper ใช้วัดความหนาของเท้าและตำแหน่งที่ใช้วัดเท้าหนูที่ได้รับการเหนียวทำให้เกิดการอักเสบ

5.4 การประเมินพฤติกรรมตอบสนองต่อการอักเสบ (behavioral for inflammation assessments)

5.4.1 การประเมินความไวในการตอบสนองต่ออุณหภูมิ (thermal hyperalgesia determination)

ในการทดสอบทางพฤติกรรมสัตว์จะได้รับการฝึกให้มีความคุ้นเคยกับสิ่งแวดล้อมและเครื่องการวัด ตลอดจนการปรับระดับประคองระหว่างการวัด เพื่อให้สัตว์คุ้นเคยและไม่ตื่นตระหนกระหว่างการวัด ในส่วนของการทดสอบความไวต่ออุณหภูมิใช้เครื่องมือในการทดสอบคือ unilateral hot plate test เป็นวิธีการที่ใช้ในการศึกษาของ Menéndez และคณะ (2002) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Hargreaves และคณะ (1988) หลักการทดสอบโดยการใช้

hot plate ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 42-45 องศาเซลเซียสวางเท้าหนูที่ละข้างให้สัมผัสกับ hot plate จับเวลาการตอบสนองโดยการชักเท้าหนี (withdrawal latency) โดยกำหนดระยะเวลาสัมผัสไม่ให้เกิน 20 วินาที/ครั้ง เพื่อป้องกันมิให้เกิดการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อเท้าจากความร้อนของ hot plate ทำการวัดทั้งสองข้าง วัดซ้ำสองครั้ง ห่างกัน 5 นาที ค่าที่ได้จากการวัดทั้งสองข้างของหนูแต่ละตัวจะนำมาหาค่าเฉลี่ยและนำเสนอในรูปแบบ mean \pm S.E.M (รูปที่ 2-3)



รูปที่ 2-3 การประเมินความไวในการสนองต่อความร้อน (thermal hyperalgesia) โดยใช้ hot plate test

5.4.2 การประเมินความไวในการสนองต่อแรงกด (mechanical hyperalgesia determination)

การประเมินนี้อาศัยหลักการกระตุ้นด้วยแรงกดบนเท้าหนู เรียกรการทดสอบนี้ว่า Randall-Selitto test โดยใช้เครื่อง analgesy-meter หลักการประเมินโดยการวางเท้าหนูบนที่วางเท้าและเพิ่มน้ำหนักแรงกดของเครื่อง เมื่อหนูรับรู้ถึงแรงกดจะตอบสนองโดยการชักเท้าออก (รูปที่ 2-4) ค่าจากการทดสอบประเมินออกมาเป็นกรัมของน้ำหนักที่กด วัดทั้งสองข้างของเท้าหนูแต่ละตัว โดยวัดเพียงครั้งเดียวในแต่ละข้าง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย mean \pm S.E.M (Nogueira *et al.*, 2012)



รูปที่ 2-4 การประเมินความไวในการตอบสนองต่อแรงกดด้วยเครื่อง analgesy-meter

5.5 การทำให้สลบและการเก็บตัวอย่างจากสัตว์ทดลอง

เมื่อสัตว์ทดลองได้รับการประเมินความหนาของเท้าและการประเมินทางพฤติกรรมที่ 6 ชม. แล้ว ผู้ทดลองจะทำการฉีดยา sodium thiopental ขนาด 50 มก./กก. ของน้ำหนักตัวโดยฉีดผ่านทางผนังช่องท้อง (intraperitoneal injection) สังเกตและประเมินระดับการสลบจนสัตว์ทดลองสลบหนึ่ง จึงจะทำการผ่าตัดและเก็บตัวอย่างเลือดจากหัวใจ โดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มล. ที่หล่อด้วย heparin นำมาเก็บในหลอดทดลองขนาด 1.5 มล. เขย่าหลอดเบา ๆ และนำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 6000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนพลาสมาใส่หลอดทดลองอันใหม่ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นจะทำการการุณยฆาตด้วยวิธี cervical dislocation และเก็บเนื้อเยื่อตัวอย่างจากเท้าหลังทั้งสองข้าง เก็บตัวอย่างในตู้แช่ตัวอย่างทางห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

5.6 การวิเคราะห์ผลทางชีวโมเลกุล (molecular measurements)

5.6.1 การวิเคราะห์ระดับโปรตีนในตัวอย่าง

ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างเนื้อเยื่อเท้าและพลาสมาวิเคราะห์โดยใช้วิธีลอร์รี (Lowry assay) หลักการวิเคราะห์คือ ในสภาวะเป็นด่างคิวปริกไอออน (Cu^{2+}) จะถูกรีดิวซ์เป็นคิวปรัสไอออน (Cu^{1+}) เมื่อเติมสารละลาย bicinchoninic acid (BCA) หมู่ R ของส่วนที่เหลือของไทโรซีน ทริптоเฟนและซีสเทอีนในโปรตีนรวมถึงคิวปรัสไอออนจะเกิดปฏิกิริยากับสารในน้ำยา ซึ่งถูกรีดิวซ์เกิดเป็นสารประกอบสีน้ำเงิน ซึ่งระดับความเข้มของสีขึ้นอยู่กับปริมาณไทโรซีนและทริптоเฟนในตัวอย่าง ซึ่งนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนโดยเทียบกับ standard protein (Pierce BCA protein assay kit, Thermo Fisher Scientific Inc., USA.)

5.6.2 การวิเคราะห์ระดับของ myeloperoxidase

การประเมินการตอบสนองของ neutrophils ต่อการกระตุ้นการอักเสบด้วยคาร์ราจีแนน เนื้อเยื่อทำหุจะได้รับการปั่นละเอียด (homogenization) โดยนำมาใส่ร่วมกับสารละลายที่ผสมกันระหว่าง 50 มิลลิโมลาร์ phosphate buffer pH 6 กับ 0.5% hexadecyltrimethyl-ammonium bromide (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) หลังจากการปั่นละเอียดแล้ว จะใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifugation) ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที่เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส หลักการในการวิเคราะห์ระดับ MPO อาศัยหลักการทำให้ทำปฏิกิริยาใน 96 well plate สารที่เติมลงไปมีดังนี้ 50 มิลลิโมลาร์ phosphate buffer pH 6 จำนวน 190 ไมโครลิตร, 0.5% o-dianisidine hydrochloride 5 ไมโครลิตร, 20 มิลลิโมลาร์ H₂O₂ 5 ไมโครลิตรและ supernatant sample 10 ไมโครลิตร (Suzuki และคณะ, 1983)

5.6.3 การวิเคราะห์ระดับของ superoxide anion

การวิเคราะห์ระดับของ superoxide anion อาศัยหลักการ โดยปกติ superoxide dismutase จะสลาย superoxide anion เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H₂O₂) และออกซิเจน โดยใช้ระบบของ xanthine/xanthine oxidase (XO) system ซึ่ง xanthine oxidase จะกระตุ้นปฏิกิริยาการเปลี่ยน xanthine เป็น uric acid กับ H₂O₂ และยังเปลี่ยน nitroblue tetrazolium (NBT: สีชมพู) เป็น NBT-diformazan (สีน้ำเงิน) แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 460 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จะนำมาคำนวณเทียบกับกราฟ standard ของ superoxide anion คือ 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO) ข้อมูลจากการวิเคราะห์ดังกล่าวจะนำมาคำนวณเป็น %inhibition โดยใช้สมการดังนี้

$$\%inhibition\ of\ O_2^{\cdot -} = (A - B)/A \times 100$$

$$A = OD\ of\ reagent\ only; B = OD\ of\ sample$$

5.6.4 การวิเคราะห์การเกิด lipid peroxidation

การวิเคราะห์ระดับการเกิด lipid peroxidation ในการศึกษาครั้งนี้อาศัยการวัดระดับของ malondialdehyde (MDA) ตามการศึกษาของ Uchiyama และ Mihara (1978) ขั้นตอนการทดสอบโดยการหยอด supernatant sample ลงในขวดทดลองที่มีส่วนผสมของสารต่าง ๆ เตรียมไว้ดังนี้ 8% (w/v) sodium dodecyl sulfate, 20% (v/v) acetic acid, 0.8% (w/v) thiobarbituric acid และน้ำกลั่นหลังจากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชม. สารละลายในขวดทดลองจะเปลี่ยนสีเป็นสีแดงตามปริมาณของ MDA นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง microplate reader (ASYS UVM 340, Biochrom Ltd.) ที่ความยาว

คลื่น 532 นาโนเมตรค่าการดูดกลืนแสงดังกล่าวจะนำไปคำนวณเทียบค่ากับสมการของ standard สำหรับ MDA คือ 1,1,3,3-tetramethoxypropane

5.6.5 การวิเคราะห์ระดับของ nitric oxide

การวิเคราะห์ระดับของ nitric oxide อาศัยหลักการความไม่เสถียรของ nitric oxide ซึ่งสามารถถูกออกซิไดซ์ได้ง่ายเป็น nitrite (NO_2^-) และ nitrate (NO_3^-) อนุพันธ์ทั้งสองนี้สามารถใช้วัดปริมาณของ nitric oxide ที่ถูกสร้างขึ้น ซึ่งหลักการมีดังนี้ NO_3^- จะถูกเปลี่ยนเป็น NO_2^- โดย nitrate reductase อาศัยปฏิกิริยา diazotization คือ acidified NO_2^- สร้าง nitrosating agent ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ sulfanilic acid ได้ diazonium ion ซึ่งจะทำปฏิกิริยาต่อกับ N-(1-naphthyl) ethylenediamine ได้ chromophoric azo-derivative แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (Cortus และ Wakid, 1990; Sen และ Donaldson, 1978)

5.6.6 การวิเคราะห์ปริมาณของ TNF- α และ IL-6

การวิเคราะห์ปริมาณของ TNF- α และ IL-6 วัดโดยใช้หลักการ sandwich ELISAs (R&D systems, USA) เตรียม plate (96 well plate) โดยการบ่ม capture antibody ไว้ค้างคืน แล้วนำมาล้างและบล็อกด้วย reagent diluents นำ sample มาหยอดลง plate ที่เตรียมไว้บ่มนาน 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง ทำการล้าง plate ด้วย 1X washing buffer แล้วบ่มต่อด้วย detection antibody ของโปรตีนที่ต้องการศึกษา ล้าง plate แล้วหยอดสาร streptavidin ซึ่งต่ออยู่กับ horseradish peroxidase ตามด้วยบ่มและล้าง แล้วเติม substrate solutions ซึ่งประกอบด้วยสาร tetramethylbenzidine (TMB) และ H_2O_2 TMB จะถูก oxidize โดยเอนไซม์ horseradish peroxidase ที่ต่ออยู่กับ detection antibody ซึ่งมีโปรตีนเฉพาะที่ต้องการศึกษาซึ่งเกาะติดอีกทีหนึ่งกับ capture antibody ที่เคลือบ plate ไว้ในขั้นตอนแรก ได้ oxidized form ของ TMB ซึ่งมีสีนำมาอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร

6. การวิเคราะห์ผลการทดลอง

ข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean) \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (standard error of mean; S.E.M.) และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลองโดยใช้ one-way ANOVA post-hoc test (LSD) ซึ่งพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p < 0.05$)

บทที่ 3

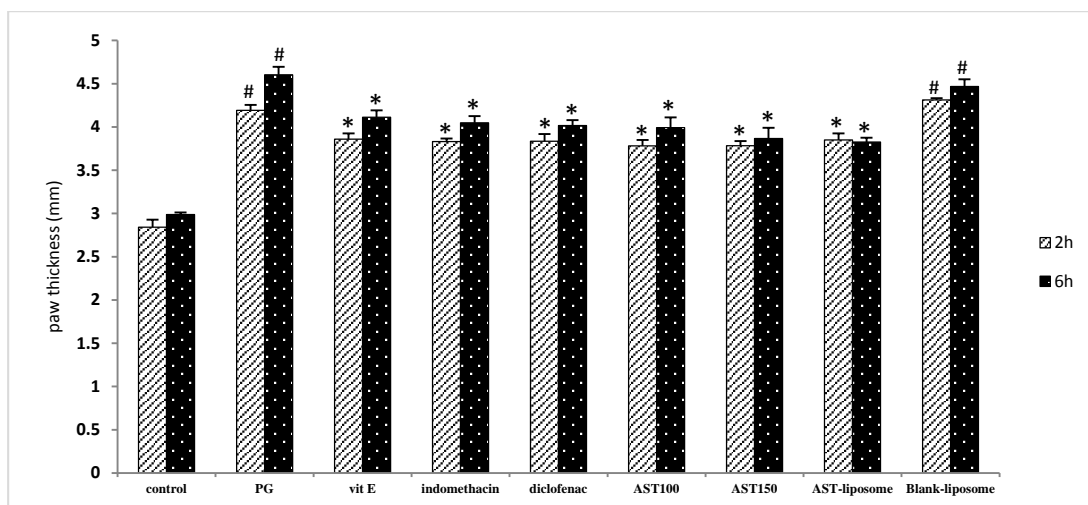
ผลการทดลอง

1. ผลของการเหนี่ยวนำให้เกิดการบวมที่เท้าด้วยคาร์ราจีแนน

การบวมเป็นลักษณะอาการสำคัญอย่างหนึ่งที่บ่งชี้ว่าเกิดการอักเสบ ในการศึกษาครั้งนี้ใช้คาร์ราจีแนนฉีดที่เท้าของหนูทดลองเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการบวม ผลการศึกษาพบว่า หลังการเหนี่ยวนำด้วยคาร์ราจีแนน หนูกลุ่มตัวทำละลาย PG และกลุ่ม blank liposome (BL) มีค่าความหนาของเท้าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ตามช่วงเวลาทำการประเมินที่ 2 และ 6 ชม. ส่วนหนูที่ได้รับแอสตาแซนธินเปล่าขนาด 100 และ 150 มก./กก. และแอสตาแซนธินลิโปโซมพบว่า ค่าความหนาของเท้ามีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG และ BL ทั้งที่ 2 และ 6 ชม. และค่าความหนาของเท้าของกลุ่มแอสตาแซนธินนั้นมีค่าที่ใกล้เคียงกันกับกลุ่มวิตามินอีและกลุ่มควบคุมบวกทั้งสองกลุ่ม (indomethacin 5 มก./กก. และ diclofenac 25 มก./กก.) การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ระหว่างแอสตาแซนธินเปล่าและแอสตาแซนธินลิโปโซมพบว่า กลุ่มแอสตาแซนธินเปล่า 100 และ 150 มก./กก. และแอสตาแซนธินลิโปโซมมีค่าความหนาของเท้า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางและรูปที่ 3-1)

ตารางที่ 3-1 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินเปล่าและแอสตาแซนธินลิโปโซมต่อค่าความหนาของเท้าในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้อุ้งเท้าบวมด้วยคาร์ราจีแนน

Treatments (n=7)	paw thickness (mm)	
	2 h	6 h
control	2.84 ± 0.09	2.98 ± 0.02
PG	4.19 ± 0.06 [#]	4.60 ± 0.09 [#]
vit E	3.86 ± 0.07*	4.11 ± 0.08*
indomethacin	3.83 ± 0.03*	4.05 ± 0.08*
diclofenac	3.83 ± 0.08*	4.02 ± 0.06*
AST100	3.78 ± 0.07*	3.99 ± 0.12*
AST150	3.78 ± 0.05*	3.86 ± 0.12*
AST-liposome	3.85 ± 0.07*	3.82 ± 0.05*
Blank liposome	4.31 ± 0.02 [#]	4.46 ± 0.08 [#]



รูปที่ 3-1 กราฟแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินเปล่าและแอสตาแซนธินลิโพโซมต่อการบวมของเท้า

$p < 0.05$ มีความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (control)

* $p < 0.05$ มีความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มตัวทำลาย PG และกลุ่ม Blank-liposome (BL)

2. ผลต่อพฤติกรรมการสนองต่อการอักเสบ

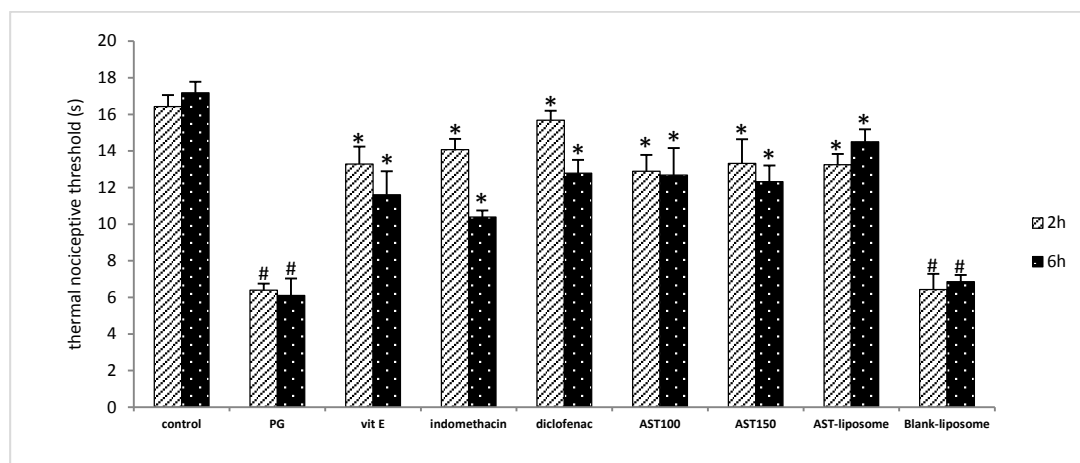
การเหนี่ยวนำด้วยคาร์ราจีแนนทำให้หนูทดลองมีความไวต่อการสนองต่อสิ่งกระตุ้น ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า การกระตุ้นด้วยความร้อน (hot plate test) การทดสอบนี้จะประเมินระยะเวลาที่หนูสามารถทนต่อความร้อนเมื่อนำเท้าหนูไปสัมผัสกับ hot plate (42-45 องศาเซลเซียส) และตอบสนองโดยการชักเท้าหนี ในหนูกลุ่มตัวทำลาย PG และกลุ่ม BL มีผลลดระยะเวลาที่หนูสามารถทนต่อการกระตุ้นด้วยความร้อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ทั้งสองระยะเวลาที่ทำการประเมินคือ ที่ 2 และ 6 ชม. ส่วนหนูกลุ่มวิตามินอี กลุ่ม indomethacin (5 มก./กก.) และ diclofenac (25 มก./กก.) และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแอสตาแซนธินเปล่าขนาด 100 150 มก./กก. และแอสตาแซนธินในรูปลิโพโซมพบว่า มีผลเพิ่มระยะเวลาของการสนองต่อการกระตุ้นด้วยความร้อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มตัวทำลาย PG และกลุ่ม BL และเมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างกลุ่มที่ได้รับแอสตาแซนธินเปล่าทั้งสองขนาดและแอสตาแซนธินลิโพโซมพบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางและรูปที่ 3-2)

การประเมินการอักเสบโดยการกระตุ้นด้วยแรงกด (Randall-Selitto test) บนเท้าหนูทดลองพบว่า มีผลในแนวเดียวกันกับการทดสอบโดยการกระตุ้นด้วยความร้อน กล่าวคือ หนูกลุ่มที่ได้รับแอสตาแซนธินเปล่าทั้งสองขนาดและแอสตาแซนธินลิโพโซม และกลุ่มควบคุม

บวกมีผลลดความไวของการสนองต่อการกระตุ้นด้วยแรงกด โดยน้ำหนักที่ใช้ในการกระตุ้น มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG และ BL ที่ 2 และ 6 ชม. (ตารางและรูปที่ 3-3)

ตารางที่ 3-2 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินเปล่าและแอสตาแซนธินในรูปลิโปโซมต่อพฤติกรรมการสนองต่อการกระตุ้นด้วยความร้อน

Treatments (n=7)	thermal nociceptive threshold (s)	
	2 h	6 h
control	16.43 ± 0.63	17.18 ± 0.60
PG	6.39 ± 0.36 [#]	6.11 ± 0.93 [#]
vit E	13.29 ± 0.96 [*]	11.61 ± 1.28 [*]
indomethacin	14.07 ± 0.59 [*]	10.39 ± 0.35 [*]
diclofenac	15.68 ± 0.52 [*]	12.79 ± 0.73 [*]
AST100	12.89 ± 0.89 [*]	12.68 ± 1.48 [*]
AST150	13.32 ± 1.32 [*]	12.32 ± 0.89 [*]
AST-liposome	13.25 ± 0.59 [*]	14.50 ± 0.69 [*]
Blank liposome	6.43 ± 0.86 [#]	6.86 ± 0.37 [#]



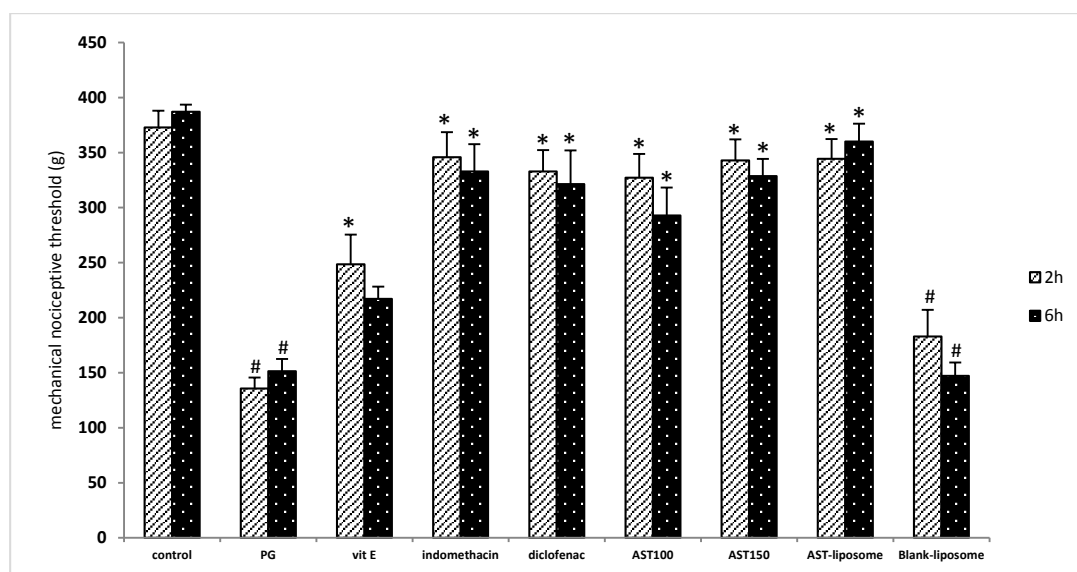
รูปที่ 3-2 กราฟแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินเปล่าและแอสตาแซนธินในรูปลิโปโซมต่อพฤติกรรมการสนองต่อการกระตุ้นด้วยความร้อน

[#] $p < 0.05$ มีความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม control

^{*} $p < 0.05$ มีความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม PG และ BL

ตารางที่ 3-3ฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินเปล่าและแอสตาแซนธินในรูปลิโปโซมต่อพฤติกรรมการสนองต่อการกระตุ้นด้วยแรงกด

Treatments (n=7)	mechanical nociceptive threshold (g)	
	2 h	6 h
control	372.86 ± 15.23	387.14 ± 6.44
PG	135.71 ± 9.96 [#]	151.43 ± 11.00 [#]
vit E	248.57 ± 26.94 [*]	217.14 ± 11.06
indomethacin	345.71 ± 22.87 [*]	332.86 ± 24.85 [*]
diclofenac	332.86 ± 19.36 [*]	321.43 ± 30.50 [*]
AST100	327.14 ± 21.57 [*]	292.86 ± 25.42 [*]
AST150	342.86 ± 19.11 [*]	328.57 ± 15.65 [*]
AST-liposome	344.29 ± 17.97 [*]	360.00 ± 16.18 [*]
Blank liposome	182.86 ± 24.27 [#]	147.14 ± 12.09 [#]



รูปที่ 3-3 กราฟแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินเปล่าและแอสตาแซนธินในรูปลิโปโซมต่อพฤติกรรมการสนองต่อการกระตุ้นด้วยแรงกด

#p < 0.05 มีความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม control

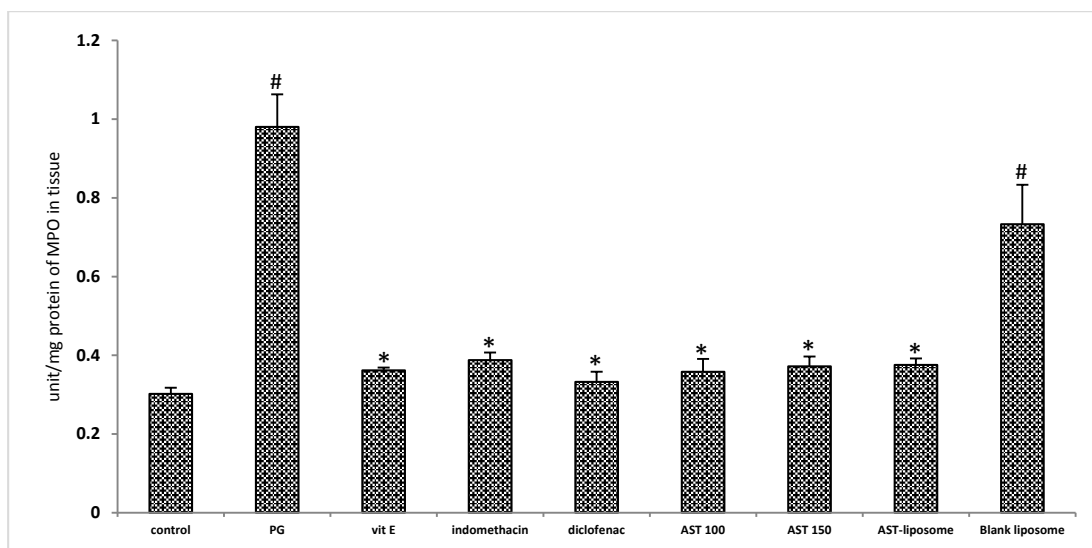
*p < 0.05 มีความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม PG และ BL

3. ผลต่อการหลัง MPO

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า การเหนี่ยวนำโดยการฉีดคาร์ราจีแคนที่เท้าหนูทดลองมีผลเพิ่มระดับ MPO ทั้งในเนื้อเยื่อเท้าและพลาสมา ระยะเวลาประมาณ 6 ชม. หลังจากหนูทดลองได้รับการเหนี่ยวนำด้วยคาร์ราจีแคนผลการวิเคราะห์ระดับของ MPO ในหนูกลุ่มตัวทำละลาย PG และกลุ่ม BL มีระดับที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สำหรับกลุ่มแอสตาแซนธินเปล่าขนาด 100, 150 มก./กก. และแอสตาแซนธินลิโปโซม กลุ่มวิตามินอีและกลุ่มที่ได้รับยาต้านการอักเสบทั้งสองกลุ่ม (indomethacin 5 มก./กก. และ diclofenac 25 มก./กก.) มีระดับของ MPO ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG และ BL และเมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างกลุ่มแอสตาแซนธินเปล่าและแอสตาแซนธินลิโปโซมพบว่า ระดับของ MPO มีค่าที่ใกล้เคียงกันและไม่มีความต่างทางสถิติ (ตารางและรูปที่ 3-4 และ 3-5)

ตารางที่ 3-4 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินเปล่าและแอสตาแซนธินในรูปลิโปโซมต่อการยับยั้งการปล่อยเอนไซม์ MPO ในเนื้อเยื่อเท้า

Treatments (n=7)	MPO in paw tissue (unit/mg protein)
control	0.302 ± 0.016
PG	0.980 ± 0.083 [#]
vit E	0.362 ± 0.007*
indomethacin	0.388 ± 0.019*
diclofenac	0.332 ± 0.026*
AST 100	0.358 ± 0.032*
AST 150	0.372 ± 0.025*
AST-liposome	0.375 ± 0.017*
Blank liposome	0.733 ± 0.100 [#]



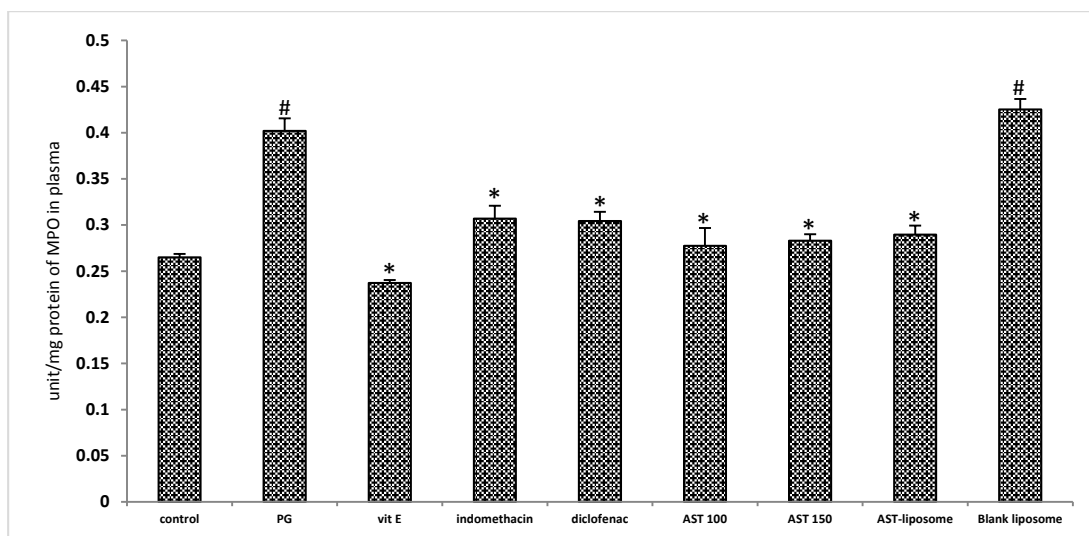
รูปที่ 3-4 กราฟแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินเปล่าและแอสตาแซนธินในรูปลิโปโซมต่อการยับยั้งการปล่อยเอนไซม์ MPO ในเนื้อเยื่อเท้า

[#] $p < 0.05$ มีความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม control

^{*} $p < 0.05$ มีความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม PG กับ BL

ตารางที่ 3-5 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินเปล่าและแอสตาแซนธินในรูปลิโปโซมต่อการยับยั้งการปล่อยเอนไซม์ MPO ในพลาสมา

Treatments (n=7)	MPO in plasma (unit/mg protein)
control	0.265 ± 0.004
PG	0.402 ± 0.014 [#]
vit E	0.237 ± 0.003 [*]
indomethacin	0.307 ± 0.014 [*]
diclofenac	0.304 ± 0.010 [*]
AST 100	0.278 ± 0.019 [*]
AST 150	0.283 ± 0.007 [*]
AST-liposome	0.290 ± 0.010 [*]
Blank liposome	0.425 ± 0.011 [#]



รูปที่ 3-5 กราฟแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินเปลาและแอสตาแซนธินในรูปลิโพโซมต่อการยับยั้งการปล่อยเอนไซม์ MPO ในพลาสมา

$p < 0.05$ มีความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม control

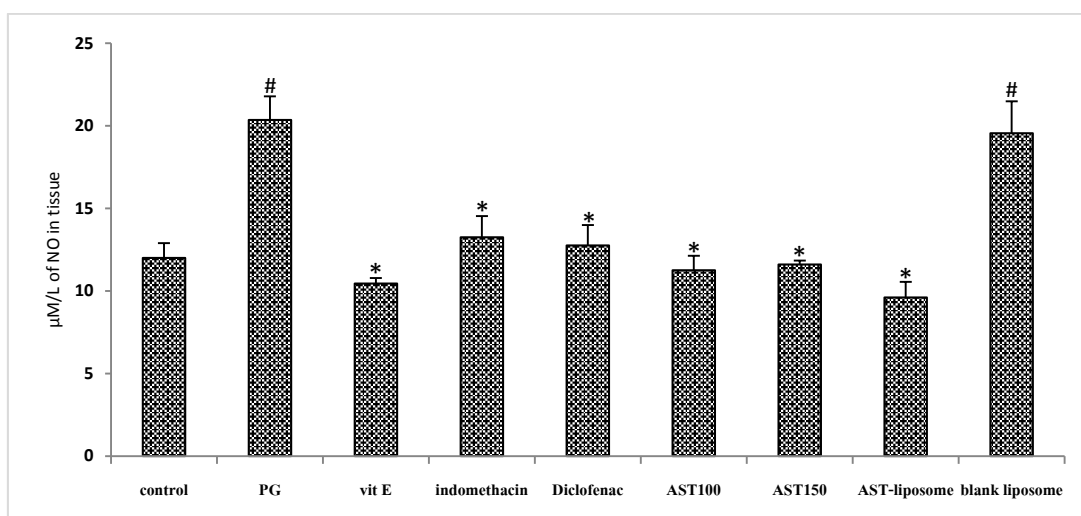
* $p < 0.05$ มีความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม PG และ BL

4. ผลต่อการระดับ nitric oxide

การเหนี่ยวนำการอักเสบด้วยคาร์ราจีแนนมีผลกระตุ้นการสร้างและหลั่ง nitric oxide ในปริมาณที่มากขึ้น จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ระดับของ nitric oxide ในกลุ่ม PG และ BL มีระดับที่เพิ่มขึ้นทั้งในเนื้อเยื่อเท้าและพลาสมาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม การได้รับการบ่อนสารต่าง ๆ ได้แก่ แอสตาแซนธิน ยาต้านการอักเสบมาตรฐานทั้งสองตัว (indomethacin 5 มก./กก. และ diclofenac 25 มก./กก.) และวิตามินอี มีผลลดระดับการสร้างและหลั่ง nitric oxide อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG และ BL แต่หากนำมาเทียบระหว่างกลุ่มแอสตาแซนธินเปลาและแอสตาแซนธินลิโพโซมพบว่า ระดับของ nitric oxide ไม่มีความต่างทางสถิติทั้งในเนื้อเยื่อและในพลาสมา (ตารางและรูปที่ 3-6 และ 3-7)

ตารางที่ 3-6 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินเปล่าและแอสตาแซนธินในรูปลิโปโซมต่อระดับของ nitric oxide ในเนื้อเยื่อเท้า

Treatments (n=7)	NO in paw tissue ($\mu\text{M/L}$)
control	12.00 \pm 0.89
PG	20.35 \pm 1.43 [#]
vit E	10.45 \pm 0.33 [*]
indomethacin	13.25 \pm 1.29 [*]
Diclofenac	12.75 \pm 1.24 [*]
AST100	11.25 \pm 0.88 [*]
AST150	11.60 \pm 0.24 [*]
AST-liposome	9.60 \pm 0.95 [*]
blank liposome	19.55 \pm 1.93 [#]



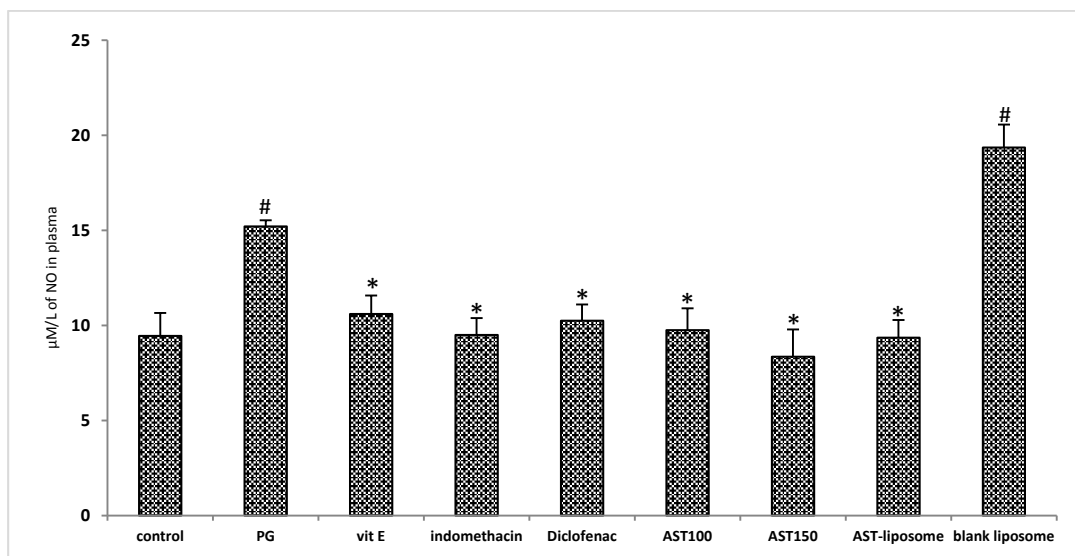
รูปที่ 3-6 กราฟแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินเปล่าและแอสตาแซนธินในรูปลิโปโซมต่อระดับของ nitric oxide ในเนื้อเยื่อเท้า

[#] $p < 0.05$ มีความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม control

^{*} $p < 0.05$ มีความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม PG และ BL

ตารางที่ 3-7 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินเปล่าและแอสตาแซนธินลิโพโซมต่อระดับของ nitric oxide ในพลาสมา

Treatments (n=7)	NO in plasma ($\mu\text{M/L}$)
control	9.45 ± 1.20
PG	$15.20 \pm 0.33^\#$
vit E	$10.60 \pm 0.97^*$
indomethacin	$9.50 \pm 0.89^*$
diclofenac	$10.25 \pm 0.85^*$
AST100	$9.75 \pm 1.14^*$
AST150	$8.35 \pm 1.43^*$
AST-liposome	$9.35 \pm 0.93^*$
blank liposome	$19.35 \pm 1.21^\#$



รูปที่ 3-7 กราฟแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินเปล่าและแอสตาแซนธินในรูปลิโพโซมต่อระดับของ nitric oxide ในพลาสมา

[#] $p < 0.05$ มีความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม control

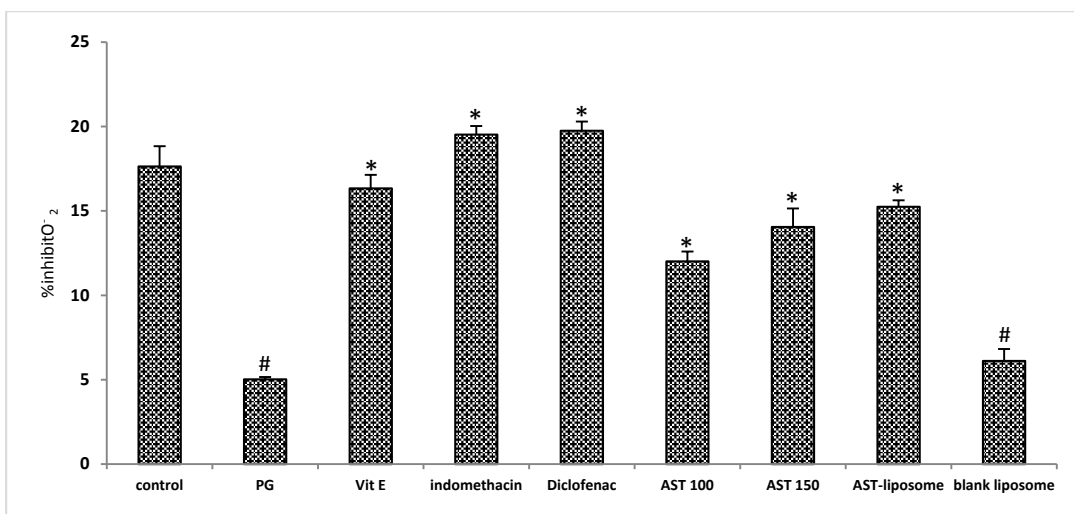
^{*} $p < 0.05$ มีความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม PG และ BL

5. ผลต่อการเกิดอนุมูลอิสระจากออกซิเจน (Reactive oxygen species: ROS)

การเหนี่ยวนำให้อุ้งเท้าบวมด้วยคาร์ราจีแนทก่อให้เกิดอนุมูลอิสระจากออกซิเจนและเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ดังผลการศึกษาในครั้งนี้ ประมาณ 6 ชม. หลังการเหนี่ยวนำด้วยคาร์ราจีแนท เมื่อนำเนื้อเยื่อเท้ามาวิเคราะห์ระดับของ superoxide anion และการเกิด lipid peroxidation (MDA) พบว่า หนูทดลองกลุ่มตัวทำละลาย PG และกลุ่ม BL มีระดับของ superoxide anion และ MDA ในระดับที่สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ระดับของ superoxide anion และ MDA ในหนูกลุ่มที่ได้รับวิตามินอี ยาต้านการอักเสบและแอสตาแซนธินพบว่า มีระดับที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PG และ BL โดยหนูกลุ่มแอสตาแซนธินเปล่าขนาด 100 และ 150 มก./กก. และกลุ่มแอสตาแซนธินลิโปโซมให้ผลที่ใกล้เคียงกันและไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางและรูปที่ 3-8 และ 3-9)

ตารางที่ 3-8 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินเปล่าและแอสตาแซนธินลิโปโซมต่อการยับยั้งการเกิด superoxide anion ในเนื้อเยื่อเท้า

Treatments (n=7)	% inhibition of O_2^-
control	17.64 ± 1.19
PG	5.03 ± 0.14 [#]
Vit E	16.34 ± 0.80 [*]
indomethacin	19.52 ± 0.50 [*]
Diclofenac	19.75 ± 0.55 [*]
AST 100	12.01 ± 0.59 [*]
AST 150	14.05 ± 1.10 [*]
AST-liposome	15.25 ± 0.38 [*]
blank liposome	6.11 ± 0.70 [#]



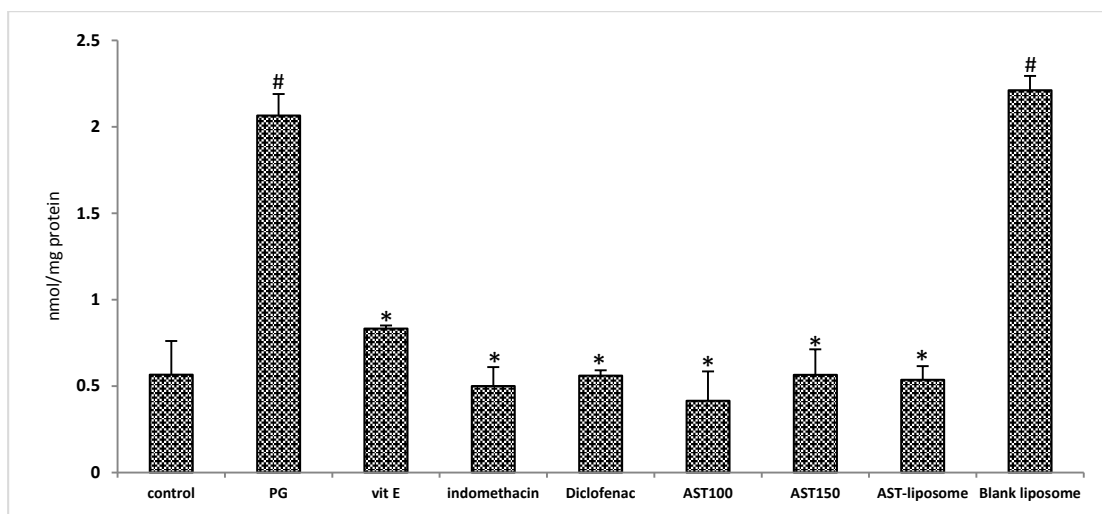
รูปที่ 3-8 กราฟแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินเปล่าและแอสตาแซนธินลิโพโซมต่อการยับยั้งการเกิด superoxide anion ในเนื้อเยื่อเท้า

$p < 0.05$ มีความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม control

* $p < 0.05$ มีความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม PG และ BL

ตารางที่ 3-9 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินเปล่าและแอสตาแซนธินในรูปลิโพโซมต่อการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation (MDA) ในเนื้อเยื่อเท้า

Treatments (n=7)	MDA level (nmol/mg protein)
control	0.566 ± 0.20
PG	2.066 ± 0.12 [#]
vit E	0.833 ± 0.02 [*]
indomethacin	0.500 ± 0.11 [*]
Diclofenac	0.561 ± 0.03 [*]
AST100	0.415 ± 0.17 [*]
AST150	0.565 ± 0.15 [*]
AST-liposome	0.537 ± 0.08 [*]
Blank liposome	2.212 ± 0.08 [#]



รูปที่ 3-9 กราฟแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินเปล่าและแอสตาแซนธินลิโพโซม ต่อการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation (MDA) ในเนื้อเยื่อเท้า

$p < 0.05$ มีความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม control

* $p < 0.05$ มีความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม PG และ BL

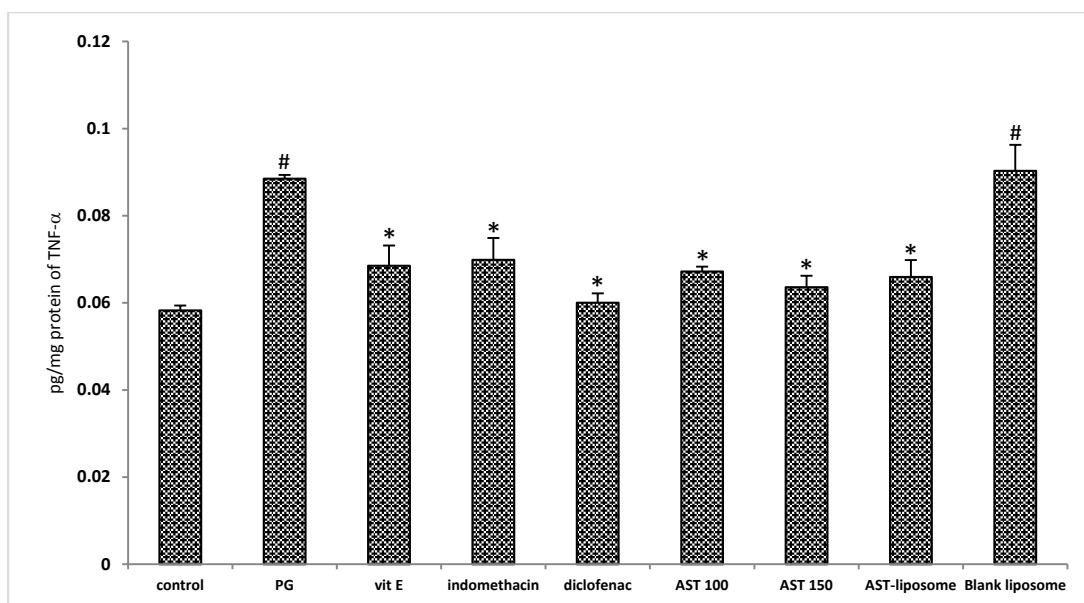
6. ผลต่อระดับของ TNF- α และ IL-6

ผลการวิเคราะห์ระดับไซโตไคน์พบว่า การเหนี่ยวนำด้วยคาร์ราจีแนนมีผลเพิ่มระดับของไซโตไคน์ TNF- α และ IL-6 หลังจากหนูทดลองได้รับการเหนี่ยวนำประมาณ 6 ชม. หนูกลุ่ม PG และ BL มีระดับของ TNF- α ที่สูงขึ้นในเนื้อเยื่ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนกลุ่มวิตามินอี indomethacin 5 มก./กก. diclofenac 25 มก./กก. กลุ่มแอสตาแซนธินเปล่าขนาด 100, 150 มก./กก. และแอสตาแซนธินลิโพโซมมีผลลดระดับ TNF- α อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มตัวทำละลาย PG และ BL การเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งการสร้าง TNF- α ระหว่างกลุ่มที่ได้รับแอสตาแซนธินเปล่าและแอสตาแซนธินลิโพโซมพบว่า มีผลยับยั้งที่ใกล้เคียงกันและไม่มีความต่างกันทางสถิติ (ตารางและรูปที่ 3-10)

ส่วนผลต่อการสร้าง IL-6 พบว่า ผลการทดลองได้ผลในลักษณะเดียวกันกับ TNF- α กล่าวคือ กลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วยคาร์ราจีแนนแต่ไม่ได้รับสารต้านการอักเสบใดๆ ได้แก่กลุ่มตัวทำละลาย PG และ BL มีระดับของ IL-6 ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และการได้รับแอสตาแซนธินมีผลลดระดับของ IL-6 ลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม PG และ BL (ตารางและรูปที่ 3-11)

ตารางที่ 3-10 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินเปล่าและแอสตาแซนธินลิโพโซมต่อระดับของ TNF- α ในเนื้อเยื่อเท้า

Treatments (n=7)	TNF- α level (pg/mg protein)
control	0.058 \pm 0.001
PG	0.088 \pm 0.001 [#]
vit E	0.069 \pm 0.005 [*]
indomethacin	0.070 \pm 0.005 [*]
diclofenac	0.060 \pm 0.002 [*]
AST 100	0.067 \pm 0.001 [*]
AST 150	0.064 \pm 0.003 [*]
AST-liposome	0.066 \pm 0.004 [*]
Blank liposome	0.090 \pm 0.006 [#]



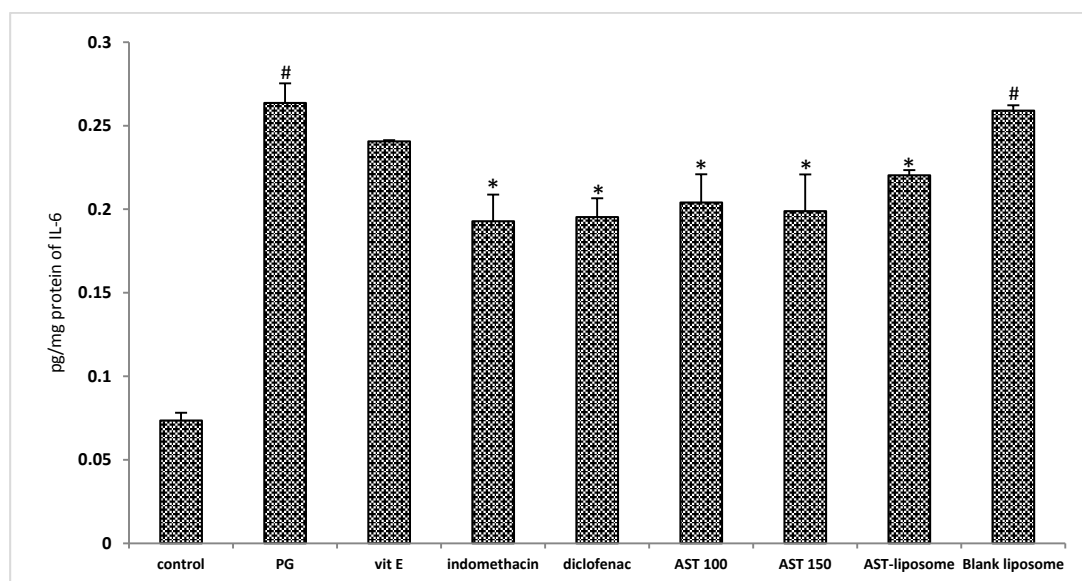
รูปที่ 3-10 กราฟแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินเปล่าและแอสตาแซนธินลิโพโซมต่อระดับของ TNF- α ในเนื้อเยื่อเท้า

$p < 0.05$ มีความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม control

* $p < 0.05$ มีความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม PG และ BL

ตารางที่ 3-11ฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินเปล่าและแอสตาแซนธินลิโพโซมต่อระดับของ IL-6 ในเนื้อเยื่อเท้า

Treatments (n=7)	IL-6 level (pg/mg protein)
control	0.074 ± 0.005
PG	0.264 ± 0.012 [#]
vit E	0.241 ± 0.001
indomethacin	0.193 ± 0.016 [*]
diclofenac	0.195 ± 0.011 [*]
AST 100	0.204 ± 0.017 [*]
AST 150	0.199 ± 0.022 [*]
AST-liposome	0.220 ± 0.003 [*]
Blank liposome	0.259 ± 0.003 [#]



รูปที่ 3-11 กราฟแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินและแอสตาแซนธินลิโพโซมต่อระดับของ IL-6 ในเนื้อเยื่อเท้า

[#]*p* < 0.05 มีความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม control

^{*}*p* < 0.05 มีความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม PG และ BL

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. แอสตาแซนทินเปล้าและแอสตาแซนทินลิพโซมสกัดจากเปลือกกุ้ง

ชาว

การศึกษาที่ผ่านมารายงานว่า แอสตาแซนทินมีโครงสร้างทางเคมีเป็นสายโพลีอิน มีวงแหวนไอโซพรีนที่ปลายด้านทั้งสองซึ่งมีหมู่คีโตนและหมู่ไฮดรอกซิลจับกับวงแหวน (Ambati *et al.*, 2014) มีโครงสร้างไอโซเมอร์เป็นแบบ trans- และ cis-astaxanthin แอสตาแซนทินตามธรรมชาติส่วนใหญ่มีโครงสร้างเป็นแบบ trans-astaxanthin ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความเสถียรกว่า (Britton, 1995) และโครงสร้าง trans มีชีวปริมาณการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่ดีกว่า cis-astaxanthin (Coral-Hinostroza *et al.*, 2004) ในธรรมชาติพบโครงสร้างของแอสตาแซนทินที่อยู่ในรูปแอสตาแซนทินอิสระ (free form astaxanthin) แต่พบในสัดส่วนที่น้อยและเป็นโครงสร้างที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ส่วนใหญ่จะมีโมเลกุลไขมันเกาะติดอยู่ด้วยซึ่งทำให้แอสตาแซนทินมีความเสถียรมากขึ้น และจะเรียกชื่อแอสตาแซนทินตามจำนวนหมู่เอสเทอร์ของกรดไขมันเช่น astaxanthin monoester หรือ diester (Hussein *et al.*, 2006) การศึกษาที่ผ่านมา มีการสกัดแอสตาแซนทินจากเปลือกกุ้งขาวแวนα และศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของแอสตาแซนทินพบว่า แอสตาแซนทินที่สกัดได้ส่วนใหญ่อยู่ในรูปที่มีโมเลกุลกรดไขมันไม่อิ่มตัวติดกับโครงสร้างของแอสตาแซนทินอยู่ และพบว่ามีสัดส่วนของแอสตาแซนทินไดเอสเทอร์ต่อกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มากกว่ากุ้งแดงอาราเบียและสาหร่ายสีแดง (Yang *et al.*, 2015; Miao *et al.*, 2006) สำหรับแอสตาแซนทินที่นำมาใช้ในการศึกษาค้นคว้านี้ ถึงแม้ว่ายังไม่พบผลวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีอย่างละเอียด แต่จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาของ Yang และคณะ ซึ่งใช้แอสตาแซนทินสกัดจากเปลือกกุ้งขาวแวนα มา ซึ่งเป็นกุ้งสายพันธุ์เดียวกันกับแอสตาแซนทินสกัดที่ได้จากการศึกษาค้นคว้านี้ จึงพอที่จะอนุมานได้ว่า แอสตาแซนทินที่ได้จากการสกัดจากเปลือกกุ้งขาวแวนα มาใช้ในการทดลองครั้งนี้ คาดว่ามีลักษณะโครงสร้างส่วนใหญ่เป็นแบบ trans-astaxanthin และคาดว่าเป็นแอสตาแซนทินที่มีกรดไขมันเกาะติดอยู่และมีสัดส่วนของแอสตาแซนทินไดเอสเทอร์ต่อกรดไขมันไม่อิ่มตัวในสัดส่วนที่สูงเช่นเดียวกับงานของ Yang และคณะ

2. ผลต่ออาการบวมจากการเหนียวทำให้เกิดการอักเสบด้วยคาร์ราจีแนน

การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนทินสกัดจากเปลือกกุ้งขาวในครั้งนี้ได้นำวิธีการเหนียวนำให้อุ้งเท้าบวมด้วยคาร์ราจีแนน ซึ่งเป็นวิธีการที่มีการนำมาใช้เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารต่าง ๆ อย่างแพร่หลาย (Paschapur *et al.*, 2009;

Petersson *et al.*, 2001; Sini *et al.*, 2010) การศึกษาที่ผ่านมารายงานว่า การเหนี่ยวนำให้อุ้งเท้าบวมด้วยคาร์ราจีแนสามารถกระตุ้นให้มีการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบได้ 2 ระยะที่แตกต่างกันคือ ระยะแรกหลังการเหนี่ยวนำ 1-2 ชม. บริเวณที่มีการอักเสบมีการหลั่งสาร histamine, serotonin, bradykinin และเริ่มมีการหลั่งสาร prostaglandins (Boughton-smith *et al.*, 1993; Di Rosa *et al.*, 1971; Vinegar *et al.*, 1969; Vinegar *et al.*, 1987) ต่อมาประมาณ 3-6 ชม. หลังการเหนี่ยวนำมีการหลั่งสาร prostaglandins, leukotrienes และสารก่อการอักเสบอื่น ๆ เช่น PAF, nitric oxide และเกิดการสร้าง ROS ขึ้น (Boughton-smith *et al.*, 1993; Busnardo *et al.*, 2010; Nathan, 1997; Salvemini *et al.*, 1996; Vinegar *et al.*, 1969; Vinegar *et al.*, 1987) อีกทั้งจากผลการศึกษาของกลุ่มผู้วิจัยก่อนหน้า ซึ่งได้ทำการทดลองในหนูที่ได้รับการบ้วนสาร PG หลังจากได้รับการบ้วนเป็นเวลา 21 วันแล้วนำมาเหนี่ยวนำให้เกิดการบวมที่เท้าด้วยคาร์ราจีแนพบว่า ค่าความหนาของเท้าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งได้รับการบ้วนสาร PG แต่ไม่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วยคาร์ราจีแน และเมื่อเปรียบเทียบความหนาของเท้าระหว่างกลุ่มที่ได้รับการบ้วน PG กับกลุ่มที่ไม่ได้รับการบ้วนสารใด ๆ ที่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วยคาร์ราจีแนพบว่า ค่าความหนาของเท้าที่เพิ่มขึ้นจากการอักเสบไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (Kuedo *et al.*, 2016) มากไปกว่านั้นผลการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Posadas และคณะ (2004) ซึ่งมีรายงานว่า การเหนี่ยวนำด้วยคาร์ราจีแนกระตุ้นให้มีการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบที่สำคัญได้แก่ prostaglandins และ nitric oxide ทำให้ตรวจพบอาการบวมในสัตว์ทดลอง และผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับการบ้วนสารแอสตาแซนธินสกัดจากเปลือกกุ้งขนาด 100 และ 150 มก./กก. มีผลยับยั้งอาการบวมได้ทั้งที่ 2 และ 6 ชม. เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) และหากนำมาเปรียบเทียบผลระหว่างกลุ่มแอสตาแซนธินและกลุ่มควบคุมบวกร (indomethacin 5 มก./กก. และ diclofenac 25 มก./กก.) และกลุ่มวิตามินอีพบว่า ค่าความหนาของเท้ามีค่าที่ใกล้เคียงกันและไม่มีความแตกต่างทางสถิติ พอที่จะกล่าวได้ว่าแอสตาแซนธินสกัดจากเปลือกกุ้งสามารถยับยั้งอาการบวมจากการอักเสบได้เทียบเท่ากับยาต้านอักเสบจากผลการทดลองนี้ทำให้ทราบว่า แอสตาแซนธินสกัดจากเปลือกกุ้งขนาด 100 มก./กก. คาดว่าเป็นขนาดต่ำสุดที่ให้ฤทธิ์ในการรักษา (therapeutic dose) เนื่องจากผลการศึกษาของกลุ่มผู้วิจัยที่ผ่านมาพบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับแอสตาแซนธินสกัดจากเปลือกกุ้งขนาด 50 มก./กก. ค่าความหนาของเท้าไม่มีความต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มตัวทำละลาย PG (Kuedo *et al.*, 2016) และแอสตาแซนธินขนาด 150 มก./กก. ให้ผลที่ใกล้เคียงกับขนาด 100 มก./กก. ส่วนแอสตาแซนธินรูปแบบลิโปโซมออกแบบเพื่อต้องการลดปริมาณการใช้แอสตาแซนธิน ซึ่งสามารถลดลงได้ถึงสิบเท่า (มีแอสตาแซนธิน 10 มก.ในความเข้มข้น 100 มก./กก. น้ำหนักตัว) จากผลการทดลองพบว่า เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับแอสตาแซนธินเปล่าและแอสตาแซนธินลิโปโซมพบว่า ประสิทธิภาพในการยับยั้งการบวมมีค่าที่ใกล้เคียงกันและไม่มีความ

ความต่างทางสถิติ แต่หากพิจารณาถึงปริมาณของแอสตาแซนธินที่ใช้ป้อนย่อมมีความแตกต่างกันคือ แอสตาแซนธินในรูปแบบลิโปโซมมีการลดปริมาณลงถึงสิบเท่า แต่ให้ผลในการยับยั้งการบวมใกล้เคียงกับกลุ่มที่ได้รับแอสตาแซนธินเปล่าขนาด 100 และ 150 มก./กก. คาดว่า การบรรจุแอสตาแซนธินในรูปแบบลิโปโซมสามารถป้องกันการเสื่อมสภาพและการถูกทำลายของสารจากสภาพแวดล้อมก่อนที่จะถูกดูดซึมได้และยังเป็นการประหยัดสารได้มากกว่าการให้ในรูปแบบแอสตาแซนธินเปล่าอีกด้วย

3. ผลต่อพฤติกรรมตอบสนองต่อการอักเสบ

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ การเหนี่ยวนำการอักเสบด้วยคาร์ราจีแนนมีผลเพิ่มความไวในการสนองตอบต่อสิ่งกระตุ้นความเจ็บปวดทั้งการกระตุ้นในรูปแบบความร้อน (thermal stimulus) และการกระตุ้นในรูปแบบแรงกด (mechanical stimulus) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม หนูกลุ่มที่ได้ยาต้านการอักเสบ indomethacin (5 มก./กก.) และ diclofenac (25 มก./กก.) กลุ่มที่ได้รับแอสตาแซนธินเปล่าทั้งสองขนาดและแอสตาแซนธินลิโปโซมมีผลลดความไวในการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นทั้งความร้อนและแรงกดได้ดีกว่ากลุ่ม PG และ BL อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากรายงานการศึกษาของ Hebel (2003) พบว่า indomethacin มีรายงานเกี่ยวกับการออกฤทธิ์ทางระบบประสาทมากกว่า NSAIDs ตัวอื่น จึงคาดว่าน่าจะให้ประสิทธิผลบรรเทาอาการปวดและลดความไวของการถูกกระตุ้นได้ดีกว่า แต่ผลการทดลองครั้งนี้พบว่าเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการลดความไวต่อการกระตุ้นระหว่างกลุ่ม indomethacin กับกลุ่ม diclofenac ให้ผลที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าแอสตาแซนธินสามารถลดความไวต่อสิ่งกระตุ้นได้ทั้งแรงกดและความร้อน คาดว่าแอสตาแซนธินอาจมีผลยับยั้งการทำงานของ NF- κ B ทั้งในระยะแรกและระยะที่สองของการเหนี่ยวนำด้วยคาร์ราจีแนน การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ระหว่างแอสตาแซนธินเปล่าและในรูปแบบลิโปโซมให้ผลในแนวเดียวกันกับการประเมินการบวมของเท้าและสามารถกล่าวได้ว่า การบรรจุแอสตาแซนธินในรูปแบบลิโปโซมสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของสารได้ดีและเป็นการลดปริมาณการใช้สารลงได้อีก

4. ผลต่อการหลั่ง MPO

เมื่อมีการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อสารสื่อกลางการอักเสบที่หลั่งเข้าสู่กระแสเลือดในช่วงแรกจะทำหน้าที่สื่อสารและกระตุ้นเม็ดเลือดขาวให้ทำงานโดยเม็ดเลือดขาวจะเคลื่อนที่เข้าไปใกล้ผนังหลอดเลือดและเกาะจับกับเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดโดยอาศัยอนุภาคเกาะจับ (adhesion molecules) ซึ่งพบทั้งบนผนังเซลล์เม็ดเลือดขาวเองและเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด adhesion molecules จะถูกสร้างมากขึ้นเมื่อมีการอักเสบโดยมีสารสื่อกลางต่าง ๆ ที่คอยกระตุ้น

การสร้าง เช่น chemotactants, cytokines เป็นต้น เม็ดเลือดขาวที่เกาะจับกับเยื่อผนังหลอดเลือดจะเคลื่อนที่ต่อไปออกนอกหลอดเลือดและเข้าหาสิ่งแปลกปลอมและเกิดการคั่งของเม็ดเลือดขาวบริเวณที่เกิดการอักเสบ MPO เป็นเอนไซม์ที่พบเป็นจำนวนมากในเม็ดเลือดขาวกลุ่ม polymorphonuclear leukocytes (PMNs) การตรวจพบระดับของเอนไซม์ที่สูงขึ้นเป็นตัวบ่งชี้ที่ดีในการบ่งบอกว่าบริเวณดังกล่าวเกิดการอักเสบ (Schierwagen *et al.*, 1990) การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์ระดับของ MPO ทั้งในเนื้อเยื่อเท้าและพลาสมาโดยเก็บตัวอย่างดังกล่าวหลังจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ 6 ชม. ผลการศึกษาพบว่า หนูกลุ่มตัวทำลาย PG และ BL มีระดับของ MPO ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ทั้งในเนื้อเยื่อเท้าและพลาสมา การได้รับสารแอสตาแซนธินเปล่าขนาด 100 และ 150 มก./กก. และแอสตาแซนธินในรูปแบบลิโพโซมมีผลลดระดับ MPO ทั้งในเนื้อเยื่อเท้าและพลาสมา และแอสตาแซนธินในรูปแบบลิโพโซมมีประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ดีกว่าแอสตาแซนธินเปล่า

5. ผลต่อการสร้าง nitric oxide

กระบวนการอักเสบถูกขับเคลื่อนโดยสารสื่อกลางการอักเสบหลายชนิดซึ่งมีบทบาทหน้าที่ที่แตกต่างกัน แต่ละชนิดอาจมีความเชื่อมโยงกัน การกระตุ้นของสารสื่อกลางหนึ่งก่อให้เกิดการสร้างและหลังสารสื่อกลางการอักเสบอื่น ๆ nitric oxide เป็นสารสื่อกลางที่สำคัญอีกตัวหนึ่งในกระบวนการอักเสบ ซึ่ง pro-inflammatory cytokines มีอิทธิพลต่อการสร้าง nitric oxide โดยไปกระตุ้น monocyte/macrophages, neutrophil granulocytes และเซลล์อื่น ๆ ให้มีการสร้าง inducible nitric oxide synthase (iNOS) ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสร้าง nitric oxide ให้มีปริมาณมากขึ้นเมื่อเกิดการอักเสบ บทบาทหน้าที่ของ nitric oxide ขึ้นกับปริมาณที่ถูกสร้างขึ้น ในปริมาณที่เหมาะสม nitric oxide ทำหน้าที่เป็นสารสื่อกลางการอักเสบที่กระตุ้นให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด มีส่วนช่วยในการฆ่าเชื้อโรคโดยการทำลายโมเลกุล DNA ของเชื้อโรค ทำหน้าที่เป็นคิโมโคئنช่วยในกระบวนการเคลื่อนที่เข้าหาสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว แต่ในปริมาณที่มากเกินไปจะกลายเป็นพิษต่อเซลล์ เช่น กระตุ้นให้เกิดภาวะภูมิคุ้มกันทำลายตัวเอง การเพิ่มขึ้นในปริมาณที่มากเกินไปของ iNOS มีผลยับยั้งการสร้างเซลล์ใหม่และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis การยับยั้งและควบคุมให้มีการสร้าง iNOS และ nitric oxide ในปริมาณที่เหมาะสมมีส่วนช่วยให้เกิดการอักเสบอย่างมีประสิทธิภาพและยับยั้งการถูกทำลายของเซลล์เดิมและที่สร้างขึ้นใหม่ (Sharma *et al.*, 2007) การวิเคราะห์ระดับของ nitric oxide ในหนูที่ได้รับการเหนี่ยวนำการอักเสบด้วยคาร์ราจีแนน โดยวิเคราะห์ที่ 6 ชม. หลังการเหนี่ยวนำซึ่งถือเป็น late phase ของการเหนี่ยวนำพบว่า การได้รับแอสตาแซนธินเปล่าและแอสตาแซนธินลิโพโซมลดระดับของ nitric oxide ในช่วงของการอักเสบเฉียบพลันได้ทั้งในเนื้อเยื่อบริเวณที่มีการอักเสบและในพลาสมา ผลการศึกษานี้มีความสอดคล้องการศึกษาที่ผ่านมา

ของ Lee และคณะ (2003) ซึ่งทำการศึกษาทั้งแบบ *in vitro* และ *in vivo* ได้รายงานว่าการได้รับ แอสตาแซนธินมีผลยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS, COX-2, TNF- α และ IL-1 β และมีผลยับยั้งการสร้าง nitric oxide และ prostaglandins ในโมเดลการเหนี่ยวนำเซลล์แมโครฟาจด้วย LPS และการเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื่อในกระแสน้ำเลือดด้วย LPS ในสัตว์ทดลอง

6. ผลต่อการเกิดอนุมูลอิสระจากออกซิเจน

สารสื่อกลางอีกชนิดหนึ่งที่เกิดขึ้นในกระบวนการอักเสบคือ อนุมูลอิสระ มีบทบาทหน้าที่ในการฆ่าเชื้อโรคและเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการสร้างสารสื่อกลางการอักเสบในกลุ่มไซโตไคน์และสารสื่อกลางกลุ่มอื่น ๆ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า อนุมูลอิสระของออกซิเจนยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมของเนื้อเยื่ออีกด้วยกระบวนการตอบสนองต่อการอักเสบจำเป็นต้องใช้ออกซิเจนปริมาณที่มากกว่าปกติเพื่อใช้ผลิต superoxide anion, hydroxyl anion (OH \cdot) และ H $_2$ O $_2$ ในทางกลับกันการเกิดขึ้นของอนุมูลอิสระที่มากเกินไปจะก่อให้เกิดผลเสียต่อร่างกายได้ การศึกษาที่ผ่านมารายงานว่า การเผาผลาญโดยการใช้ออกซิเจนของนิวโทรฟิลมีผลทำลายเนื้อเยื่อ เนื่องจากการสร้างที่มากเกินไปทำให้มีการสูญเสียสมดุลของระบบต้านอนุมูลอิสระของร่างกาย (Reuter *et al.*, 2010)

จากผลการทดลองพบว่า หนูกลุ่มแอสตาแซนธินมีการเพิ่มขึ้นของร้อยละในการยับยั้งการเกิด superoxide anion และสามารถลดระดับของ MDA จึงสามารถกล่าวได้ว่า แอสตาแซนธินสกัดจากเปลือกกุ้งขาวแวนนาไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยมียับยั้งการเกิด superoxide anion และสามารถป้องกันการเกิด lipid peroxidation ของเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ซึ่งเมื่อพิจารณาจากรายงานการศึกษาที่ผ่าน อนุมานได้ว่า ด้วยลักษณะโครงสร้างทางเคมีของแอสตาแซนธินที่มีหมู่ไฮดรอกซิลจับกับวงแหวนไอโซพรีนทั้งสองข้างของโครงสร้างทำให้ส่วนปลายทั้งสองของโครงสร้างมีคุณสมบัติมีขั้วและส่วนกลางของโครงสร้างมีคุณสมบัติเป็นกลาง ทำให้แอสตาแซนธินสามารถออกฤทธิ์ได้ทั้งในส่วน hydrophilic และ hydrophobic ของเยื่อหุ้มเซลล์ (Ambati *et al.*, 2014) เป็นผลให้การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระจากออกซิเจนได้ดีซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Kang และคณะ (2001) ซึ่งทำการศึกษาฤทธิ์ของแอสตาแซนธินในหนูแรทที่ได้การเหนี่ยวนำให้เกิดพิษต่อตับด้วย CCl $_4$ พบว่า แอสตาแซนธินมีส่วนช่วยในการป้องกันการถูกทำลายของเซลล์ตับโดยการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation และส่งเสริมการทำงานได้ดีขึ้นของระบบต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย

7. ผลต่อระดับของ TNF- α และ IL-6

TNF- α เป็นไซโตไคน์ที่สร้างขึ้นโดยแมโครฟาจ โมโนไซต์ เซลล์แมสต์, T cell และ NK cell บางชนิด ผลของ TNF- α ต่อร่างกายทำให้เกิดอาการไข้ ผ่านการกระตุ้นการสร้างสาร prostaglandin E $_2$ และยังมีผลทางอ้อมต่อการหลั่ง IL-1 อีกด้วย การหลั่งของ TNF- α และ

IL-1 มีผลต่อเนื่องในการกระตุ้นการสร้าง IL-6 ซึ่งไซโตไคน์ทั้งสามตัวนี้มีผลให้เกิดอาการไข้ในระหว่างการอักเสบเฉียบพลัน ส่วน IL-6 ถูกสร้างขึ้นโดย mononuclear phagocyte, T cells และ fibroblast นอกจากนี้ IL-6 มีบทบาทหน้าที่เป็น growth factor แก่ mature B cells กระตุ้นการทำงานและการเพิ่มจำนวนของ T cells และยังทำหน้าที่กระตุ้นการแสดงออกของยีน IL-2 และ IL-2 receptor ระดับของ IL-6 มีผลเป็น negative feedback ต่อการสร้าง TNF- α ในระยะของการอักเสบเฉียบพลัน (Hirano, 1992 และ tan *et al.*, 1990)

จากผลการทดลองหนูกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำการอักเสบด้วยคาร์ราจีแนนตรวจพบระดับของ TNF- α และ IL-6 สูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลการศึกษาที่สอดคล้องกับการรายงานของ Cuzzocrea และคณะ (1999) ว่า การเหนี่ยวนำการอักเสบด้วยคาร์ราจีแนนมีผลกระตุ้นการสร้างสารสื่อกลางการอักเสบในกลุ่มไซโตไคน์ เช่น TNF- α , IL-1 และ IL-6 ส่วนหนูกลุ่มที่ได้รับแอสตาแซนธินเปลาชขนาด 100 และ 150 มก./กก. และแอสตาแซนธินลิโพโซมมีผลยับยั้งการหลั่งของ TNF- α และ IL-6 สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Lee และคณะ (2003) ซึ่งศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนธินทั้งในแม่โครฟาจและสัตว์ทดลองที่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วย LPS พบว่า แอสตาแซนธินมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโมเลกุล NF- κ B จึงมีผลยับยั้งการสร้าง COX-2, TNF- α และ IL-1 และยังรายงานอีกว่า ด้วยคุณสมบัติของแอสตาแซนธินที่มีประสิทธิภาพสูงในการต้านอนุมูลอิสระทำให้แอสตาแซนธินสามารถลดการคั่งของ ROS และกีดกันการทำงานของ H₂O₂ ในกระบวนการกระตุ้นการทำงานของโมเลกุล NF- κ B

หนึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกให้ยาต้านการอักเสบ 2 ตัวด้วยกันคือ indomethacin 5 มก./กก. และ diclofenac 25 มก./กก. ยาทั้งสองเป็นยา NSAIDs ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มอนุพันธ์ของ acetic acid โดยมีกลไกการออกฤทธิ์หลักในการยับยั้งการทำงานของ COX-1 และ COX-2 เพิ่มการนำ arachidonic acid ไปเก็บในรูป triglyceride ทำให้มี arachidonic acid สำหรับเอนไซม์ COX และ lipoxygenase ลดลง (Brenner และ Stevens, 2006) บางการศึกษา รายงานว่า diclofenac ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ COX-2 มากกว่า COX-1 (Wallece *et al.*, 2000) ซึ่งนับว่าเป็นจุดเด่นของยาและสามารถลดโอกาสการเกิดผลข้างเคียงต่อระบบทางเดินอาหารได้ดีกว่า นอกจากนี้มีรายงานที่ diclofenac อาจมีผลลดการหลั่งของ IL-6 ได้อีกด้วย (Gan, 2010) การศึกษาเปรียบเทียบความรุนแรงของการต้านอักเสบ (anti-inflammatory potency) พบว่า diclofenac มีฤทธิ์ต้านการอักเสบมากกว่า aspirin ถึง 20 เท่า ส่วน indomethacin มีความแรงในการต้านการอักเสบมากกว่า aspirin ถึง 40 เท่า (Brenner และ Stevens, 2006) ความแตกต่างของยาต้านการอักเสบทั้งสองตัวนี้ในเรื่องของอาการไม่พึงประสงค์จากยาซึ่งมีรายงานที่ indomethacin มีอุบัติการณ์เกิดข้างเคียงทางระบบประสาทได้มากกว่า diclofenac อาการที่พบเช่น ปวดเวียนศีรษะ มึนงง สับสนและอาจพบภาวะซีมีเตร่า

(Hebel, 2003) ในการศึกษาครั้งได้กำหนดขนาดยา indomethacin 5 มก./กก. ของน้ำหนักตัว หนูทดลอง และใช้ระยะเวลาในการป้อน 7 วัน เนื่องจากยามีความแรงในการต้านอักเสบสูงและมี ผลรบกวน COX อย่างไม่เฉพาะเจาะจง การป้อนในขนาดน้อยเป็นเวลาหลายวันคาดว่า จะมี ส่วนช่วยในการลดโอกาสการเกิดผลข้างเคียงต่อหนูทดลองและรักษาระดับยาให้คงตัวก่อนที่จะ ทำการเหนี่ยวนำด้วยคาร์ราจีแนน อีกทั้งความเข้มข้นที่ใช้นี้ก็ได้อ้างอิงมาจากการศึกษา ก่อนหน้า (Prasad *et al.*, 2013; Vanderlinde *et al.*, 2009) ในส่วนของยาของยา diclofenac ทำการป้อนในขนาด 25 มก./กก. เนื่องจากความรุนแรงการต้านอักเสบน้อยกว่า indomethacin ถึง 20 เท่า ตลอดจนยามีความเฉพาะเจาะจงต่อ COX-2 มากกว่า การให้ในขนาดที่สูงกว่าแต่ลด จำนวนวันลงเป็น 3 วัน คาดว่า ยังคงสามารถรักษาระดับยาในพลาสมาให้อยู่ในช่วงที่ให้ผลต่อ การออกฤทธิ์ของยาได้ และผลการทดลองพบว่า การได้รับยาทั้งสองตัวมีผลยับยั้งการอักเสบ จากการเหนี่ยวนำด้วยคาร์ราจีแนนได้เทียบเท่ากัน โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

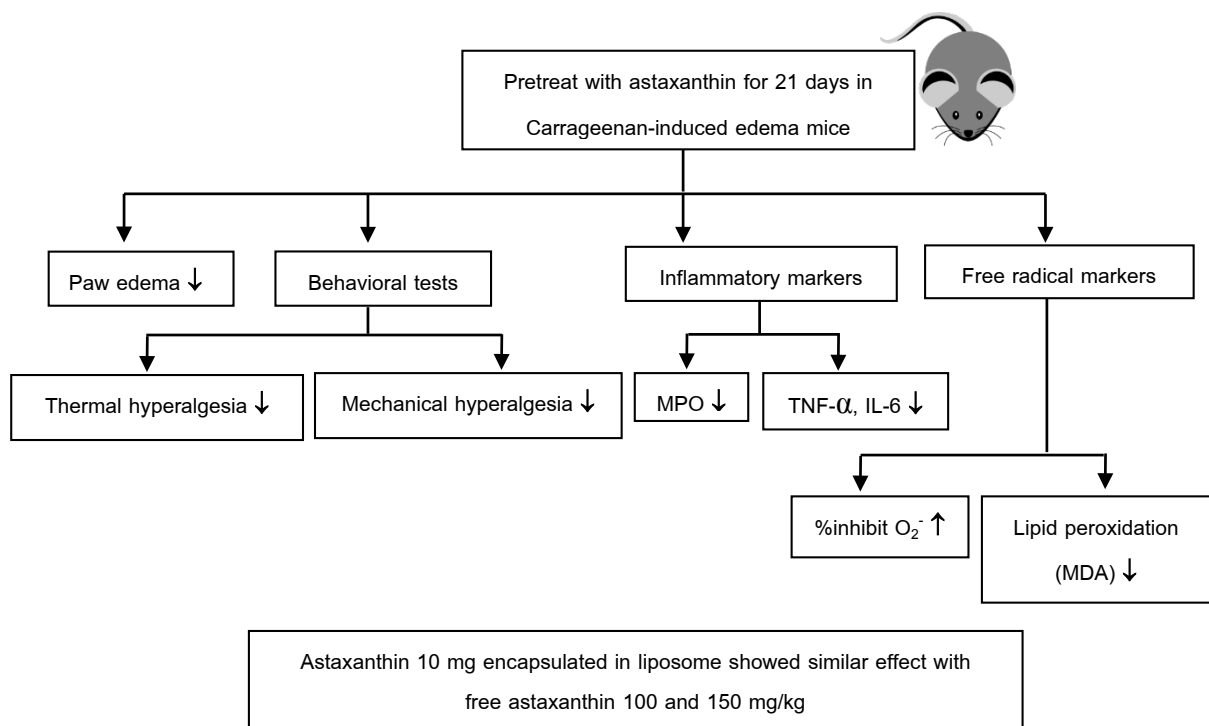
บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการการศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า แอสตาแซนธินสกัดจากเปลือกกุ้งขาวมีฤทธิ์ต้านการอักเสบในหนูเม้าส์ที่ถูกเหนี่ยวนำการอักเสบด้วยคาร์ราจีแนน โดยสามารถยับยั้งอาการบวมและลดความไวต่อการตอบสนองต่อการกระตุ้นความเจ็บปวดได้ แอสตาแซนธินสกัดมีฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านการยับยั้งการทำงานของนิวโทรฟิลโดยลดระดับของ MPO และมีผลยับยั้งการเกิด superoxide anion จากกระบวนการ NADPH oxidase และคาดว่าอาจมีผลยับยั้งการแสดงออกของ NF- κ B เป็นผลทำให้ยับยั้งการสร้างสาร prostaglandins, nitric oxide และลดระดับของ TNF- α และ IL-6 การศึกษาครั้งนี้ยังได้ทำการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของแอสตาแซนธินสกัดอีกด้วยซึ่งพบว่า สารสกัดมีฤทธิ์ต้านการเกิดอนุมูลอิสระจากออกซิเจนโดยยับยั้งการเกิด superoxide anion และมีส่วนช่วยป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์จากการถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระจากการอักเสบผ่านการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation (MDA)

การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบระหว่างแอสตาแซนธินเปล้าและแอสตาแซนธินลิโปโซมพบว่า แอสตาแซนธินปริมาณ 10 มก. ที่บรรจุในรูปแบบลิโปโซมให้ผลในการยับยั้งการอักเสบได้ใกล้เคียงกับการได้รับแอสตาแซนธินเปล้าขนาด 100 และ 150 มก./กก. นั้นแสดงว่า การบรรจุแอสตาแซนธินในรูปแบบลิโปโซมสามารถป้องกันสารจากการถูกทำลายจากสภาพแวดล้อม เพิ่มประสิทธิภาพการออกฤทธิ์และยังเป็นการลดปริมาณการใช้สารได้อีกด้วย (แผนผังที่ 5-1)

การศึกษาครั้งนี้ทำให้มีการค้นพบแหล่งทางธรรมชาติของแอสตาแซนธินอีกแหล่งหนึ่งคือ กุ้งขาวสายพันธุ์ *Litopenaeus vannamei* เป็นแหล่งที่หาได้ง่ายในประเทศไทย มีเศษเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกุ้งปริมาณมาก และราคาถูก การศึกษาฤทธิ์ของแอสตาแซนธินสกัดจากเปลือกกุ้งขาวในครั้งนี้สามารถอธิบายเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านการอักเสบและต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดนี้ได้เบื้องต้นและยังไม่ได้ลงลึกเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์เชิงลึก (pathway) ทางผู้วิจัยคาดหวังว่า ผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถเป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อใช้ประกอบในการศึกษาต่อในอนาคต



แผนผังที่ 5-1 ผลของการเหนี่ยวนำให้เกิดการบวมของอุ้งเท้าด้วยคาร์ราจีแนนและฤทธิ์ต้านการอักเสบของแอสตาแซนทินสกัดจากเปลือกกุ้งขาวแวนนาไม

บรรณานุกรม

- ชะลอ ลี้มสุวรรณและพรเลิศ จันทร์รัชชกุล. 2547. อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.
- ภิญโญ เกียรติภิญโญ. 2545. วิธีปฏิบัติสำหรับเลี้ยงกุ้งขาว แอล. แวนนาไม. กรุงเทพฯ. หน้า 120.
- วารสารณ์ จรรยาประเสริฐ. 2555. Nanotechnology in skin delivery: นาโนเทคโนโลยีในการนำส่งทางผิวหนัง. กรุงเทพฯ: ประชาชน จำกัด.
- สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2558. สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้ม ปี 2558. หน้า 187-198.
- Ambati, R. R., Phang, S. M. and Ravi, S. 2014. Astaxanthin: extraction, stability, biological activities and its commercial applications-a review. *Mar Drugs*. 12: 128-152.
- Andres, C. 1977. Encapsulation ingredients. *Food Proc*. 38: 44-56.
- Auclair, C., Voisin, E. 1985. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greewald, R.A (Ed.), CRC Handbook of. *Methods Oxygen Radical Res*. 123–132.
- Baker, R. G., Hayden, M. S. and Ghosh, S. 2011. NF- κ B, inflammation and metabolic disease. *Cell Metab*. 13: 11-22.
- Barratt, A. and Montano, R. 1986. Shrimp heads-a new source of protein. *Infofish Markg Dig*. 4(86): 21.
- Benita, S., Martini, M., Orecchioni, A. and Monique, S. 2006. Cosmetic applications of colloidal delivery systems. 2nd ed. Boca Raton.
- Boughton-Smith, N. K., Deakin, A. M., Follenfant, R. L., Whittle, B. J. and Garland, L. G. 1993. Role of oxygen radicals and arachidonic acid metabolites in the reverse passive Arthus reaction and carrageenin paw oedema in the rat. *Br J Pharm*. 110: 896-902.
- Breithaupt, D. E., Bamedi, A. and Wirt, U. 2002. Carotenol fatty acid esters: easy substrates for digestive enzymes? *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 132: 721-728.
- Brenner, G. M. and Stevens, C. 2006. Pharmacology. 4th ed. Philadelphia.
- Britton, G. 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J*. 9: 1551-1558.

- Busnardo, T. C., Padoani, C., Mora, T. C., Biavatti, M. W., Fröde, T. S., Bürger, C., Claudino, V. D., Dalmarco, E. M. and Souza, M. M. 2010. Anti-inflammatory evaluation of *Coronopus didymus* in the pleurisy and paw oedema models in mice. *J Ethnopharm.* 128: 519–525.
- Capilli, B. and Cysewski, G. R. 2007. The world's best kept health secret natural astaxanthin. 3rd ed. Hawaii.
- Clark, M. A., Finkel, R., Rey, J. A. and Whalen, K. 2012. Pharmacology. 5th ed. Philadelphia.
- Coral-Hinostroza, G. N., Ytrestøyl, T., Ruyter, B. and Bjerkeng, B. 2004. Plasma-appearance of unesterified astaxanthin geometrical E/Z and optical R/S isomers in men given single doses of a mixture of optical 3 and 3'R/S isomers of astaxanthin fatty acyl diesters. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharm.* 139: 99-110.
- Cortas, N. K., Wakid, N. W. 1990. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem.* 36: 1440-1443.
- Cuzzocrea, S., Sautebin, L., De Sarro, G., Costantino, G., Rombola, L., Mazzon, E., Lalenti, A., De Sarro, A., Ciliberto, G., Di Rosa, M., Caputi, A. P. and Thiemermann, C. H. 1999. Role of IL-6 in the pleurisy and lung injury caused by carrageenan. *J Immunology.* 163: 5094–5104.
- Desai, K. G. H. and Park, H. J. 2005. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technol.* 23: 1361–1394.
- Di Rosa, M., Giroud, J. P. and Willoughby, D. A. 1971. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J Pathol.* 104: 15–29.
- Dreher, M. L. 2012. Pistachio nuts: composition and potential health benefits. *Nutr Rev.* 70: 234–240.
- Fassett, R. G. and Coombes, J. S. 2011. Astaxanthin: a potential therapeutic agent in cardiovascular disease. *Mar Drugs.* 9: 447-465.
- Fries, J. F. 1999. Gastrointestinal toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *N Engl J Med.* 341: 1397-1399.
- Gan, T. J. 2010. Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. *C Med Res Opn.* 26: 1715-1731.

- Giyose, N. Y., Mazomba, N. T. and Mabinya, L. V. 2009. Evaluation of protease produced by *Erwinia chrysanthemi* for the deproteinization of crustacean waste in a chitin production process. *Afr J Biotechnol.* 9: 707-711.
- Guerin, M., Huntley, M. E. and Olaizola, M. 2003. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol.* 21: 210-216.
- Hama, S., Uenishi, S., Yamada, A., Ohgita, T., Tsuchiya, H., Yamashita, E. and Kogure, K. 2012. Scavenging of hydroxyl radicals in aqueous solution by astaxanthin encapsulated in liposomes. *Biol Pharm Bull.* 35(12): 2238–2242.
- Handy, R. L. C. and Moore, P. K. 1998. A comparison of the effects of L-NAME, 7-NI and L-NIL on carrageenan-induced hind paw oedema and NOS activity. *Brit J Pharm.* 123: 1119–1126.
- Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flures, C. and Joris, J. 1988. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain.* 32: 77-88.
- Harvey, C. J., Thimmulappa, R. K., Singh, A., Blake, D. J., Ling, G. and Wakabayashi, N. 2009. Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 46: 443-453.
- Hebel, S. K., Burnham, T. H. 2003. *Drug, Facts and Comparisons.* St. Louis.
- Schierwagen, C., Bylund-Fellenius, A. C. and Lundberg, C. 1990. Improved method for quantification of tissue PMN accumulation measured by myeloperoxidase activity. *J Pharm Meth.* 23: 179-186.
- Higuera-Ciapara, I., Felix-Valenzuela, L., Goycoolea, F. M. and Arguelles-Monal, W. 2004. Microencapsulation of astaxanthin in a chitosan matrix. *Carbohydrate Polymers.* 56: 41-45.
- Hirano, T. 1992. Interleukin-6 and its relation to inflammation and disease. *Clin Immunol Immunopathol.* 62: 60-65.
- Hochadel, M. A. 2014. *Mosby's drug reference for health professions.* 4th ed. Elsevier Mosby. Florida.
- Hussein, G., Sankawa, U., Goto, H., Matsumoto, K. and Watanabe, H. 2006. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *J Nat Prod.* 69: 443-449.

- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K. and Katoh, Y. 1997. An Nrf2/ small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun.* 236: 313-322.
- Jiang, Q., Christen, S., Shigenaga, M. K. and Ames, B. N. 2001. gamma-Tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention. *Am J Clin Nutr.* 74: 714–722.
- Jiang, Q. 2014. Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. *Free radical Biol Med.* 72: 76-90.
- Jyonouchi, H., Sun, S., Tomita, Y. and Gross, M. D. 1995. Astaxanthin, a carotenoid without vitamin A activity, augments antibody responses in cultures including T-helper cell clones and suboptimal doses of antigen. *J Nutr.* 125: 2483-2492.
- Kang, J. O., Kim, S. J. and Kim, H. 2001. Effect of astaxanthin on the hepatotoxicity, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in the liver of CCl₄-treated rats. *Methods Find Exp Clin Pharm.* 23(2): 79-84.
- Karppi, J., Rissanen, T. H., Nyssönen, K., Kaikkonen, J., Olsson, A. G. and Voutilainen, S. 2007. Effects of astaxanthin supplementation on lipid peroxidation. *Int J Vitam Nutr Res.* 77: 3-11.
- Katzung, B., Masters, S. and Trevor, A. 2012. Basic & Clinical Pharmacology. 12thed. USA.
- Kidd, P. 2011. Astaxanthin, cell membrane nutrient with diverse clinical benefits and anti-aging potential. *Altern Med Rev.* 16: 355-364.
- Kim, J. H., Chang, M. J., Choi, H. D., Youn, Y. K., Kim, J. T. and Oh, J. M. 2011. Protective effects of *Haematococcus* astaxanthin on oxidative stress in healthy smokers. *J Med Food.* 14: 1469-1475.
- Kishimoto, Y., Tani, M., Uto-Kondo, H., Iizuka, M., Saita, E. and Sone, H. 2010. Astaxanthin suppresses scavenger receptor expression and matrix metalloproteinase activity in macrophages. *Eur J Nutr.* 49: 119-126.
- Kotake-Nara, E. and Nagao A. 2011. Absorption and metabolism of xanthophylls. *Mar Drugs.* 9: 1024-1037.

- Kuedo, Z., Nuanplab, S. Klaypradit, W. and Chonpathomphullert, P. 2016. Effects of astaxanthin from *Lipopenaeus vannamei* on carrageenan-induced paw edema in mice. *The NATPRO* 6th. p 137.
- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N. and Aster, J. C. 2010. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 8th ed. Philadelphia.
- Kupcinskas, L., Lafolie, P., Lignell, A., Kiudelis, G., Jonaitis, L. and Adamonis, K. 2008. Efficacy of the natural antioxidant astaxanthin in the treatment of functional dyspepsia in patients with or without *Helicobacter pylori* infection: A prospective, randomized, double blind, and placebo-controlled study. *Phytomed.* 15: 391-399.
- Kurashige, M., Okimasu, E., Inoue, M., and Utsumi, K. 1990. Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. *Physiol Chem Phys Med.* 22: 27-38.
- Lee, J. S., Park, S.A., Chung, D. and Lee, H. G. 2011. Encapsulation of astaxanthin-rich *Xanthophyllomyces dendrorhous* for antioxidant delivery. *Int J Biol Macromole.* 49: 268-273.
- Lee, S., Bai, S., Lee, K., Namkoong, S. Na, H. and Ha, K. 2003. Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing I κ B kinase-dependent NF- κ B activation. *Mol Cells.* 16: 97-105.
- Mansoori, M., Agrawal, S., Jaward, S. and Khan, M. I. 2012. A review on liposome. *IJARPB.* 4: 453-464.
- Matsushita, Y., Suzuki, R., Nara, E., Yokoyama, A. and Miyashita, K. 2000. Antioxidant activity of polar carotenoids including astaxanthin- β -glucoside from marine bacterium on PC liposomes. *Fish Sci.* 66: 980-985.
- McLaughlin, P. J. and Weihrauch, J. L. 1979. Vitamin E content of foods. *J Am Diet Assoc.* 75: 647-665.
- McNulty, H. P., Byun, J., Lockwood, S. F., Jacob, R. F., Mason, R. P. 2007. Differential effects of carotenoids on lipid peroxidation due to membrane interactions: X-ray diffraction analysis. *Biochim Biophys Acta.* 1768: 167-174.
- Menendez, L., Lastra, A., Hidalgo, A. and Baamonde, A. 2002. Unilateral hot-plate test: a simple and sensitive method for detecting central and peripheral hyperalgesia in mice. *J Neurosci Methods.* 113: 91-97.

- Mercke, O. J., Lignell, A., Pettersson, A. and Höglund, P. 2003. Oral bioavailability of the antioxidant astaxanthin in humans is enhanced by incorporation of lipid based formulations. *Eur J Pharm Sci.* 19: 299-304.
- Miao, F., Lu, D., Li, Y. and Zeng, M. 2006. Characterization of astaxanthin esters in *Haematococcus pluvialis* by Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry. *Anal Bio-Chem.* 352: 176–181.
- Nagao, A. 2011. Absorption and metabolism of dietary carotenoids. *Biofactors.* 37: 83-87.
- Nathan, C. 1997. Perspective series: Nitric oxide and nitric oxide synthesis. *J Clin Investig.* 100: 2417-2423.
- Necas, J. and Bartosikova, L. 2013. Carrageenan: a review. *Veterinarni Med.* 58: 187–205.
- Nogueira, E. S., Castro, E. R., Mancuso, R. and Navarro, X. 2012 Randall-Selitto test: a new approach for the detection of neuropathic pain after spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 29: 898–904.
- Ohgami, K., Shiratori, K., Kotake, S., Nishida, T., Mizuki, N. and Yazawa, K. 2003. Effects of astaxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation *in vitro* and *in vivo*. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44: 2694-2701.
- Okada, Y., Ishikura, M. and Maoka, T. 2009. Bioavailability of astaxanthin in *Haematococcus algal* extract: the effects of timing of diet and smoking habits. *Biosci Biotechnol Biochem.* 73: 1928-1932.
- Omote, K., Hazama, K., Kawamata, T., Kawamata, M., Nakayaka, Y., Toriyabe, M. and Namiki, A. 2001. Peripheral nitric oxide in carrageenan-induced inflammation. *Brain Res.* 912: 171–175.
- Osterlie, M., Bjerkeng, B. and Liaaen, S. 2000. Plasma appearance and distribution of astaxanthin E/Z and R/S isomers in plasma lipoproteins of men after single dose administration of astaxanthin. *J Nutr Biochem.* 11: 482-490.
- Packer, L. Weber, S. U., Rimbach, G. 2001. Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signalling. *J Nutr.* 131: 369S–373S.
- Parisi, V., Tedeschi, M., Gallinaro, G., Varano, M., Saviano, S. and Piermarocchi, S. 2008. Carotenoids and antioxidants in age-related maculopathy italian study: multifocal electroretinogram modifications after 1 year. *Ophthalmology.* 115: 324-333.

- Paschapur, M. S., Patil, M. B., Kumar, R. and Patil, S. R. 2009. Evaluation of anti-inflammatory activity of ethanolic extract of *Borassus flabellifer* L. male flowers (inflorescences) in experimental animals. *J Med Plants Res.* 2: 49–54.
- Petersson, M., Wiberg, U., Lundeberg, T. and Uvnas-Moberg, K. 2001. Oxytocin decreases carrageenan induced inflammation in rats. *Peptides.* 22: 1479–1484.
- Posadas, I., Bucci, M., Roviezzo, F., Rossi, A., Parente, L., Sautebin, L., Cirino, G. 2004. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Brit J Pharm.* 142: 331–338.
- Prasad, CHLVK., Rao, K. R., Rao, M. P., Guddeti, V. and Praveen, T. K. 2013. Antioxidant and anti-inflammatory activity of ethyl acetate extract of the aerial parts of *Argimone Mexicana*. *IJPCBS.* 3(4): 1185-1190.
- Ranga, R. A., Raghunath, R. R., Baskaran, V., Sarada, R. and Ravishankar, G. A. 2010. Characterization of microalgal carotenoids by mass spectrometry and their bioavailability and antioxidant properties elucidated in rat model. *J Agric Food Chem.* 58: 8553-8559.
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M. and Aggarwal, B. B. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med.* 49(11): 1603–1616.
- Rubin, R. and Strayev D. S. 2012. RUBIN's pathology Clinicopathologic Foundations of Medicine. 6th ed. Philadelphia.
- Rodrigues, E., Mariutti, L. R. and Mercadante, A. Z. 2012. Scavenging capacity of marine carotenoids against reactive oxygen and nitrogen species in a membrane-mimicking system. *Mar Drugs.* 10: 1784-1798.
- Sachindra, N. M., Bhaskar, N., Mahendrakar, N. S. 2005. Carotenoids in different body components of Indian shrimps. *J Sci Food Agric.* 85: 167-172.
- Salvemini, D., Wang, S-Q., Wyatt, P. S., Bourdon, D. M., Marino, M. H., Manning, P. T. and Currie, M.G. 1996. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *Brit J Pharm.* 118: 829–838.
- Sen, N. P., Donaldson, B. 1978. Improved colorimetric method for determining nitrate and nitrite in foods. *J Assoc Off Anal Chem.* 61: 1389-1394.
- Shahidi, F. and Han, X-Q. 1993. Encapsulation of food ingredients. *Crit Rev Food Sci Human Nutr.* 33: 501–547.

- Shahidi, F., Metusalach and Brown, J. A. 1998. Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. *CRC Crit Rev Food Sci.* 38: 1-67.
- Sharma, J. N., Al-Omran, A., Parvathy, S. S. 2007. Review: Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology.* 15: 252–259.
- Sindhu, S. and Sherief, P. M. 2011. Extraction, characterization, antioxidant and anti-inflammatory properties of carotenoids from the shell waste of Arabian red shrimp *Aristeus alcocki*, Ramadan 19. *Open Conf Proc J.* 2: 95-103.
- Sini, J. M., Yaro, A. H., Ayanwuyi, L. O., Aiyelero, O. M., Mallum, S. M. and Gamaniel, K. S. 2010. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of the root bark of *Combretumsericeum* in rodents. *Afr J Biotechnol.* 9: 8872–8876.
- Spiller, G. A. and Dewell, A. 2003. Safety of an astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis* algal extract: a randomized. *clin trial J Med Food.* 6: 51-56.
- Stovitz, S. D. and Johnson, R. J. 2003. NSAIDs and musculoskeletal treatment: what is the clinical evidence? *Phys Sportsmed.* 31: 35-52.
- Suzuki, K., Ota, H., Sasagawa, S., Sakatani, T. and Fujikura, T. 1983. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem.* 132: 345–352.
- Suzuki, Y., Ohgami, K., Shiratori, K., Jin, X. H., Ilieva, I. and Koyama, Y. 2006. Suppressive effects of astaxanthin against rat endotoxin-induced uveitis by inhibiting the NF- κ B signaling pathway. *Exp Eye Res.* 82: 275-281.
- Sweeney, J. P. and Marsh, A. C. 1973. Liver storage of vitamin A in rats fed carotene stereoisomers. *J Nutr.* 103: 20-25.
- Swenson, C. E., Stewart, K. A., Hammett, J. L., Fitzsimmons, W. E. and Ginsberg, R. S. 1989. Pharmacokinetics and *in vivo* activity of liposome-encapsulated gentamicin. *Antimicrobial agent and chemotherapy.* 34: 235-240.
- Tachaprutinun, A., Udomsup, T., Luadthong, C., Wanichwecharungruang, S. 2009. Preventing the thermal degradation of astaxanthin through nanoencapsulation. *Int J Pharm.* 374: 119–124.
- Takahashi, M., Uechi, S., Takara, K., Asikin, Y. and Wada, K. E. 2009. Evaluation of an oral carrier system in rats: bioavailability and antioxidant properties of liposome-encapsulated Curcumin. *J Agric Food Chem.* 57: 9141-9146.

- Tan, P. L. J., Farmiloe, S., Yoeman, S., Watson, J. D. 1990. Expression of the interleukin 6 gene in rheumatoid synovial fibroblasts. *J Rheumatol.* 17: 1608-1612.
- Taylor, T. M., Davidson, P., Bruce, B. and Weiss, J. 2005. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. *Food Sci Nutr.* 45: 587-605.
- Thirawong, N., Thongborisute, J., Takeuchi, H. and Sriamornsak, P. 2008. Improved intestinal absorption of calcitonin by mucoadhesive delivery of novel pectin-liposome nanocomplexes. *J Contr.* 125: 236–245.
- Tornatore, L., Thotakura, A. K., Bennett, J., Moretti, M. and Franzoso, G. 2012. The nuclear factor kappa B signaling pathway: integrating metabolism with inflammation. *Trends. Cell Biol.* 22: 557-566.
- Uchiyama, M. and Mihara, M. 1978. Determination of malonaldehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem.* 86: 271–278.
- Urich, K. 1994. Comparative animal biochemistry. Germany.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. and Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem. Cell Biol.* 39: 44-84.
- Vanderlinde, F. A., Landim, H. F., Costa, E. A., Galdino, P. M., Maciel, M. A. M., Anjos, G. C., Malvar, D. C., Côrtes, W. S. and Rocha, F. F. 2009. Evaluation of the antinociceptive and anti-inflammatory effects of the acetone extract from *Anacardium occidentale L.* Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. *Braz J Pharm Sci.* 45: 437-442.
- Van de Velde, F., Lourenco, N. D., Pinheiro, H. M. and Bakkerd, M. 2002. Carrageenan: a food-grade and biocompatible support for immobilisation techniques. *Adv Synth Catal.* 344: 815–835.
- Venugopal, V. 2008. Marine Products for Healthcare: Functional and Bioactive Nutraceutical Compounds from the Ocean. New York.
- Vemuri, S. and Rhodes, C. T. 1995. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharm Acta Helvetiae.* 70: 95-11.
- Vinegar, R., Schreiber, W. and Hugo, R. 1969. Biphasic development of carrageenan edema in rats. *J Pharm Exp Ther.* 166: 96–103.

- Vinegar, R., Truax, J. F., Selph, J. L., Johnston, P. R., Venable, A. L., McKenzie, K. K. 1987. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. *Fed Proc.* 46: 118–126.
- Wallace, J. L., McKnight, W., Reuter, B. K., et al. 2000. NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. *Gastroenterology.* 119: 706-14.
- Wang, B., Trebst, A., Zarka, A. and Boussiba, S. 2003. Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) as an active photoprotective process under high irradiance. *J Phycol.* 39: 1116-1124.
- Werle, M. and Takeuchi, H. 2009. Chitosan-aprotinin coated liposomes for oral peptide delivery: development, characterisation and *in vivo* evaluation. *Int J Pharm.* 370: 26–32.
- Willis, A. L. 1969. Measurement of inflammatory mediators by cascade superfusion of inflammatory exudates. *J Pharm Pharmac.* 21: 126-128.
- Wolz, E., Liechti, H., Notter, B., Oesterhelt, G. and Kistler, A. 1999. Characterization of metabolites of astaxanthin in primary cultures of rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 27: 456-462.
- Wojcik, M., Burzynska-Pedziwiatr, I. and Wozniak, L. A. 2010. A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. *Curr Med Chem.* 17: 3262-3288.
- Wong, S. and Radhakrishnan, A. K. 2012. Tocotrienol research: past into present. *Nutr Rev.* 70: 483–490.
- Yamada, S., Naito, Y., Takagi, T. et al. 2012. Rebamipide ameliorates indomethacin-induced small intestinal injury in rats via the inhibition of matrix metalloproteinases activity. *J Gastroenterol Hepatol.* 27: 1816-1824.
- Yang, S., Zhou, Q., Yang, L., Xue, Y., Xu, J. and Xue, C. 2015. Effect of thermal processing on astaxanthin and astaxanthin esters in pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J Oleo Sci.* 64: 243–253.
- Yang, Y., Kim, B. and Lee, J. Y. 2013. Astaxanthin Structure, Metabolism and Health Benefits. *J Hum Nutr Food Sci.* 1: 1003: 1/11-11/11.
- Yang, Y., Seo, J. M., Nguyen, A., Pham, T. X., Park, H. J. and Park, Y. 2011. Astaxanthin-rich extract from the green alga *Haematococcus pluvialis* lowers

- plasma lipid concentrations and enhances antioxidant defense in apolipoprotein E knockout mice. *J Nutr.* 141: 1611-1617.
- Yasui, Y., Hosokawa, M., Mikami, N., Miyashita, K. and Tanaka, T. 2011. Dietary astaxanthin inhibits colitis and colitis-associated colon carcinogenesis in mice via modulation of the inflammatory cytokines. *Chem Biol Interact.* 193: 79-87.
- Yuan, G., Wahlquist, M. L., He, G., Yang, M. and Li, D. 2006. Natural products and anti-inflammatory activity. *Asia Pac J Clin Nutr.* 15: 143-152.
- Yuan, J. P., Peng, J., Yin, K. and Wang, J. H. 2011. Potential health-promoting effects of astaxanthin: a high-value carotenoid mostly from microalgae. *Mol Nutr Food Res.* 55: 150-165.
- Zacharopoulos, V. R., Phillips, D. M. 1997. Vaginal formulations of carrageenan protect mice from herpes simplex virus infection. *Clin diag lab immunol.* 4: 465–468.
- Zhu, H., Itoh, K., Yamamoto, M., Zweier, J. L. and Li, Y. 2005. Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury. *FEBS Lett.* 579: 3029-3036.

ภาคผนวก

สารละลายที่ใช้ในการทดลอง

1. การเตรียม 0.9% sodium chloride

สารที่ใช้

- | | |
|---------------------------|-----------|
| 1. Sodium chloride (NaCl) | 9 ก. |
| 2. Distilled water | 1,000 มล. |

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง NaCl จำนวน 9 ก.ใส่ในบีกเกอร์
2. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1,000มล.คนให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องพร้อมใช้

2. การเตรียม 0.1 โมลาร์ Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4

สารที่ใช้

- | | | |
|--|-------|-----|
| 1. Potassium chloride (KCl) | 0.8 | ก. |
| 2. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) | 0.8 | ก. |
| 3. NaCl | 32 | ก. |
| 4. Sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) | 4.6 | ก. |
| 5. Distilled water | 3,800 | มล. |

วิธีการเตรียม

1. ชั่งสารต่าง ๆ ตามน้ำหนักที่ได้กล่าวไว้ในบีกเกอร์
2. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 3,800มล.คนให้เข้ากันและปรับ pH ด้วย Sodium hydroxide (NaOH) ให้ได้ 7.4 โดยให้ปริมาตรสุดท้ายของสารละลายทั้งหมด 4,000 มล.

การวัดโปรตีนในเนื้อเยื่อและพลาสมา

สารที่ใช้

1. Bovine serum albumin (BSA) standards และตัวอย่างที่ต้องการตรวจ
2. BSA working reagent (WR) ส่วนผสมระหว่าง reagent A ต่อ reagent B ในอัตราส่วน 50:1

ขั้นตอนการวัด

1. ใช้ micropipette ดูด BSA standards หรือตัวอย่าง 25 ไมโครลิตรหยอดลง 96 well plate
2. ใส่ BSA WR 200 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ ประมาณ 30 วินาที
3. ปิดplate วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง (37 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที
4. นำไปอ่านค่าสีที่ได้ด้วยเครื่อง microplate reader ที่ค่าการดูดกลืนแสง 560 นาโนเมตร

อ้างอิง: คู่มือการวิเคราะห์โปรตีนของ Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific Inc. USA.

การวัดระดับของ Myeloperoxidase (MPO)

สารที่ใช้

1. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) 1.360 ก.
2. Dipotassium phosphate (K_2HPO_4) 0.43545 ก.
3. O-dianisidine Hydrochloride 50 มก.
4. 30% Hydrogen peroxide (H_2O_2)

วิธีการวัด

1. เตรียม 0.68% Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) ใน DW
2. เตรียม 0.87% Dipotassium phosphate (K_2HPO_4) ใน DW
3. นำ (1) และ (2) มาผสมกันและปรับ pH 6 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl)
4. นำสารละลาย (3) มาผสมกับ 0.05 ก. ของ Hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) สารละลายนี้ใช้ในการเจือจางตัวอย่าง
5. นำสารละลาย (3) มา 5 มล. และเติม 50 มก. O-dianisidine Hydrochloride
6. นำสารละลาย (3) 190 ไมโครลิตร, (5) 5 ไมโครลิตร, H_2O_2 5 ไมโครลิตร และตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร หยอดผสมกันลง 96 well plate บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่า OD ที่ 460 นาโนเมตร

อ้างอิง: Suzuki, K., Ota, H., Sasagawa, S., Sakatani, T. and Fujikura, T.

1983. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem.* 132: 345–352.

การวัดปริมาณการเกิดของ lipid peroxide (MDA)

สารที่ใช้

1. 8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS)
2. 20% acetic acid
3. 0.8% thiobarbituric acid (TBA)
4. 1,1,3,3-tetramethoxy propane (TMP) ใช้เป็น standard ของการสาร lipid peroxide

วิธีการวัด

1. เติมสารต่าง ๆ ลงขวดทดลองที่มีฝาปิดตามตารางดังนี้

	Blank (ml)	Standard (ml)	Unknown
Sample (1:50)	-	-	0.2
8.1% SDS	0.2	0.2	0.2
20% Acetic acid (pH 3.5)	1.5	1.5	1.5
0.8% TBAs	1.5	1.5	1.5
TMP stock standard	-	0.2	-
Distilled water	0.8	0.6	0.6

2. นำมาต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 95-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที
3. เมื่อสารเย็นลง ทำการเติมน้ำกลั่น 1 มล.ตามด้วยการเติมส่วนผสมระหว่าง n-butanol และ pyridine ในอัตราส่วน 15:1 แล้วผสมให้เข้ากันด้วย vortex
4. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดูส่วนใส (supernatant) มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร
5. เทียบหาปริมาณของ lipid peroxide ด้วยกราฟ standard ในหน่วย นาโนโมล/มก.

โปรตีน

อ้างอิง: Uchiyama, M. and Mihara, M. 1978. Determination of malonaldehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem.* 86: 271-278.

การวิเคราะห์ระดับของ superoxide anion

สารที่ใช้

1. 0.3 มิลลิโมลาร์ Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
2. 0.6 มิลลิโมลาร์ nitroblue tetrazolium (NBT)
3. 0.1 มิลลิโมลาร์ Xanthine
4. xanthine oxidase ใช้ในปริมาณ 0.02 ยูนิต/มล.
5. 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl (TEMPOL) เป็น standard ในการวัด

วิธีการวัด

1. เตรียม mix reagent โดยผสมสารละลาย EDTA, NBT และ Xanthine แล้วเติม xanthine oxidase 0.02 ยูนิต/มล.
2. ใส่ TEMPOL (STD) หรือตัวอย่างที่ต้องการวัดจำนวน 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ อุณหภูมิห้อง 10 นาที
3. นำไปวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร
4. นำค่า OD ไปคำนวณหาค่า %inhibition of O_2^- ตามสูตรดังนี้

$$\%inhibition = (A-B/A) \times 100$$

A: ค่า OD ของ reagent อย่างเดียว

B: ค่า OD ของ ตัวอย่าง/STD

อ้างอิง: Auclair, C., Voisin, E., 1985. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greewald, R.A (Ed.). *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Res.* 123–132.

การวิเคราะห์ระดับของ nitric oxide

สารที่ใช้

1. 1.2% Zinc sulfate($ZnSO_4$) ในน้ำ RO
2. 0.22% Sodium hydroxide (NaOH) ในน้ำ RO
3. 0.08% Copper(II) sulfate ($CuSO_4$) ในน้ำ RO
4. 51.9% Sulfanilic acid ใน HCl 3 โมลาร์
5. 0.02% N-naphthylethylenediamine ในน้ำ RO
6. 4.5% glycine buffer pH 9.7 ในน้ำ RO
7. Cadmium granules 2-2.5 กรัม

วิธีการวัด

ขั้นตอนการ deprotein ตัวอย่าง

1. ใช้ตัวอย่าง 300 ไมโครลิตร ผสมกับ $ZnSO_4$ 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 1 นาทีแล้วดูด supernatant ใส่ในหลอดใหม่
2. เติม NaOH 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 3 นาที
3. ดูด supernatant 750 ไมโครลิตร นำมาผสมกับ glycine buffer ในหลอดใหม่ เป็นตัวอย่างที่พร้อมใช้ในการวิเคราะห์

ขั้นตอนการวิเคราะห์

1. เตรียม activated cadmium granules โดยการนำมาแช่ใน $CuSO_4$ เป็นเวลา 5 นาที
2. นำ activated cadmium granules 2-2.5 ก. ใส่ลงในตัวอย่างที่เตรียมไว้แล้วหมวนแช่ เป็นเวลา 1 นาที แล้วบ่มไว้เป็นเวลา 10 นาที
3. เตรียม reagents หยอดลง 96 well plate ได้แก่ N-naphthylethylenediamine 75 ไมโครลิตร หยอดตามด้วย Sulfanilic acid 80 ไมโครลิตร
4. เมื่อบ่มครบ 10 นาทีในขั้นตอนที่ 2 ให้ดูดตัวอย่างมาหยอดลง 96 well plate และบ่มต่ออีก 10 นาที แล้วนำมาวิเคราะห์ค่า OD ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

อ้างอิง: Cortas, N. K., Wakid, N. W. 1990. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem.* 36: 1440-1443.

Sen, N. P. and Donaldson, B. 1978. Improved colorimetric method for determining nitrate and nitrate in foods. *J Assoc Off Anal Chem.* 61: 1389-1394.

การวัดวิเคราะห์ปริมาณของไซโตไคน์

สารที่ใช้

1. Reagent diluents (RD): 1% BSA ในสารละลาย PBS
2. 1X Wash buffer
3. Color reagent A และ B
4. Stop solution: 2N sulfuric acid
5. Antibody: capture และ detection antibodies
6. Streptavidin-Horseradish peroxidase

การวิเคราะห์

การเตรียม 96 well plate

1. เตรียม capture antibody แล้วนำมาหยอดลง 96 well plate ป่มไว้ข้ามคืน
2. กำจัด capture antibody ที่งั่งแล้วล้างด้วย wash buffer 3 ครั้ง
3. ทำการบล็อก plate โดยเติม RD 300 ไมโครลิตร ป่มไว้ 1 ชม.
4. กำจัด RD ที่งั่งและล้างด้วย wash buffer 3 ครั้ง plate พร้อมใช้วิเคราะห์

ขั้นตอนการวิเคราะห์

1. เจือจางตัวอย่างหรือ STD ใน RD แล้วนำมาหยอดลง plate 100 ไมโครลิตรป่มไว้ 2 ชม.
2. กำจัดสารใน plate ที่งั่งและล้างด้วย wash buffer 3 ครั้ง
3. เติม detection antibody 100 ไมโครลิตร ป่มไว้ 2 ชม.
4. กำจัดสารใน plate ที่งั่งและล้างด้วย wash buffer 3 ครั้ง
5. เติม Streptavidin-Horseradish peroxidase 100 ไมโครลิตรลง plate ป่มไว้ 20 นาที โดยป้องกัน plate ไม่ให้โดนแสง
6. กำจัดสารใน plate ที่งั่งและล้างด้วย wash buffer 3 ครั้ง
7. เติมส่วนผสมของ Color reagent A และ B ในอัตราส่วน 1:1 100 ไมโครลิตร ป่ม นาน 20 นาที
8. เติม stop solution 50 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ แล้วนำไปวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

อ้างอิง: Duoset ELISA development system, R&D Systems, USA.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นายชูกีพลี กือโต	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5710220036	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
พยาบาลศาสตรบัณฑิต (พยาบาลศาสตร์)	มหาวิทยาลัยราชภัฏวราชนครินทร์	2555

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการการศึกษา)

1. ทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2. ทุนอุดหนุนการศึกษา เป็นผู้ช่วยวิจัย (Research Assistant) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
3. ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
4. ทุนสนับสนุนไปเสนอผลงานวิชาการจากภาควิชาสรีรวิทยาและคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
5. ทุนสนับสนุนการเข้าร่วมประชุมฝึกอบรมระยะสั้นจาก IBRO school ที่ The Atta-ur-Rahman School of Applied Bioscience (ASAB), National University of Sciences and Technology (NUST), Islamabad, Pakistan.

การเผยแพร่ผลงาน

1. Kuedo, Z., Sangsuriyawong, A., Klaypradit, W., Tipmanee, V. and Chonpathompikunlert, P. 2016. Effects of astaxanthin from *Litopenaeus vannamei* on carrageenan-induced edema and pain behavior in mice. *Molecules*. 21(3): 382.
2. Kuedo, Z., Nuanplab, S., Klaypradit, W. and Chonpathompikunlert, P. Effects of astaxanthin from *Litopenaeus vannamei* on carrageenan-induced paw edema in mice. *The 6th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO6)*, Khon Kaen, Thailand, January 21st-23rd, 2016. Poster presentation.
3. Kuedo, Z., Sangsuriyawong, A., Klaypradit, W. and Chonpathompikunlert, P. Antinociceptive/anti-edema effects of liposomal astaxanthin during acute inflammation of the mice paw. *IBRO-APRC Associate School-Molecular Basis of Behavior conference*. The Atta-ur-Rahman School of Applied Biosciences (ASAB), National University of Sciences and Technology (NUST), Islamabad, Pakistan, March 14th-18th, 2016. Poster presentation.