

การวัดปริมาณคอลลาเจน ในเซลล์เพาะเลี้ยง

ปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องสำอาง อาหารเสริม หรือเครื่องดื่มของประเทศไทยมีการเติบโตอย่างต่อเนื่อง มีผู้ประกอบการหลายผลิตภัณฑ์ที่มีการผลิตเครื่องสำอาง อาหารเสริม หรือเครื่องดื่มที่มีคุณสมบัติ กระตุ้นหรือเสริมการสร้างคอลลาเจนในชั้นผิวหนัง เพื่อชะลอวัย เพื่อลดริ้วรอยบนผิวหนัง รวมไปถึงการเสริมสร้างกระดูกและข้อ เพื่อชะลอความเสื่อม ซึ่งในการผลิตเครื่องสำอาง อาหารเสริม หรือเครื่องดื่มเหล่านั้นมักจะมีการนำเสนอคุณสมบัติของสารสกัด ที่ได้จากสมุนไพรหรือจากสารทางชีวภาพ ล้วนมีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์กระตุ้นการสร้างคอลลาเจนทั้งสิ้น

คอลลาเจน (Collagen) คือ โปรตีนที่มนุษย์สามารถสร้างเองได้ตามธรรมชาติ สามารถพบได้ในกระดูก กระดูกอ่อน รวมไปถึงเนื้อเยื่อต่างๆ ในร่างกายสามารถพบได้ทั้งในสัตว์และมนุษย์ คอลลาเจนมีหลายชนิด ซึ่งที่ถูพบในร่างกายมากที่สุดคือ คอลลาเจนชนิดที่ 1 พบได้มากที่สุดถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ในร่างกาย อย่างไรก็ตามมีคอลลาเจนถึง 28 ชนิด ที่มีการแสดงคุณลักษณะของแต่ละชนิด ซึ่งมีการจัดหมวดหมู่ได้ทั้งหมด 5 ประเภท ดังนี้

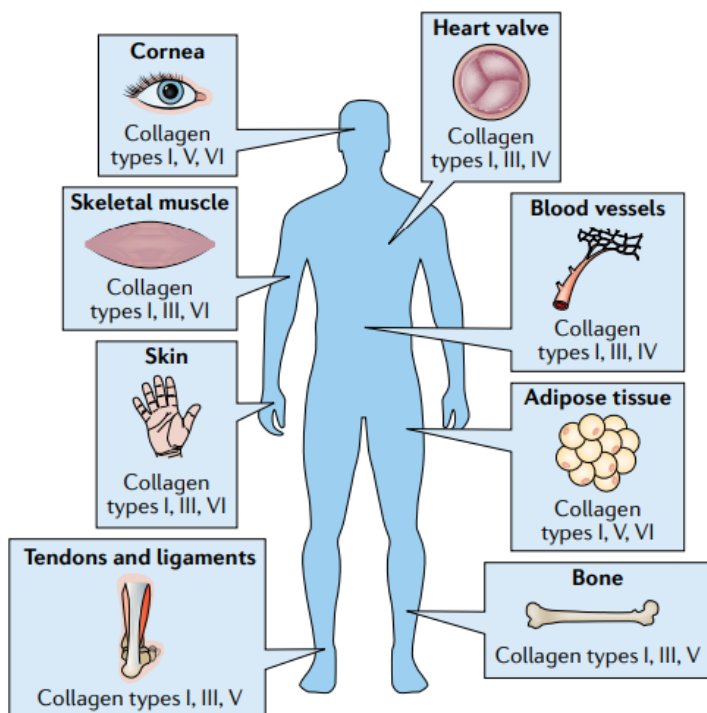
คอลลาเจนชนิดที่ 1 พบได้ใน ผิวหนัง เอ็น อวัยวะ และกระดูก (องค์ประกอบหลักสำคัญของกระดูก)

คอลลาเจนชนิดที่ 2 พบได้ในกระดูกอ่อน (องค์ประกอบหลักสำคัญของกระดูกอ่อน)

คอลลาเจนชนิดที่ 3 เป็นร่างแหปกคลุมร่างกาย (องค์ประกอบหลักสำคัญของเส้นใย)

คอลลาเจนชนิดที่ 4 เนื้อเยื่อประสาน

คอลลาเจนชนิดที่ 5 ผิวเซลล์ ผม และรก



ที่มา: Bielajew et al. (2020)

รูปที่ 1. อวัยวะต่างๆ ในร่างกายมนุษย์ที่มีการพบ ประเภทของคอลลาเจนประเภทต่างๆ

การวัดปริมาณคอลลาเจนในเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นการตรวจวัดปริมาณคอลลาเจนเบื้องต้น เพื่อเป็นข้อมูลทางเภสัชวิทยาในการประเมินคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนในเซลล์เพาะเลี้ยง เป็นการวัดจากอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการบ่มร่วมกับตัวอย่างทดสอบหรือสารทดสอบที่ต้องการทราบถึงคุณสมบัติดังกล่าว โดยเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการทดสอบคือ เซลล์สร้างเส้นใย

เซลล์สร้างเส้นใยมนุษย์ (human fibroblast) เป็นเซลล์ที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในการทดสอบการสร้างคอลลาเจนในเซลล์ สามารถแยกเซลล์ได้จากเนื้อเยื่อเพื่อให้ได้เซลล์ปฐมภูมิ (primary cell) และได้จากเซลล์ที่มีการเติบโตและเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่อง (cell line) ซึ่งได้ยกตัวอย่างเซลล์ที่ใช้ในการวัดปริมาณคอลลาเจน คือเซลล์สร้างเส้นใยจากผิวหนังมนุษย์ เป็น cell line ที่แยกได้จากตัวอ่อนอายุ 12 สัปดาห์ เป็นเซลล์ประเภทยึดเกาะกับภาชนะในการเพาะเลี้ยง (adherent) สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ วิธีการทดสอบเริ่มจากขยายเซลล์ให้มีปริมาณเพียงพอต่อการทดสอบกับตัวอย่างทดสอบ และทำการย่อยเซลล์ให้เป็นเซลล์เดี่ยวคำนวณปริมาณเซลล์ที่ใช้ในการทดสอบ โดยใช้ความเข้มข้น 100,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และนำเซลล์เพาะเลี้ยงหยดลงจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม โดยกลุ่มควบคุมบวกคือสารละลายวิตามินซี ซึ่งมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจน บ่มเซลล์ร่วมกับสารทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเมื่อครบกำหนดเวลาทดสอบ นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่บ่มเลี้ยงเซลล์วัดปริมาณคอลลาเจนชนิดที่ 1 ด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นขั้นตอนในการตรวจหาโปรตีนที่ต้องการทดสอบโดยการใช้แอนติเจนจับกับแอนติบอดีและมีการเปลี่ยนแปลงสีเกิดขึ้น วัดค่าปริมาณจากการตรวจวัดค่าดูดกลืนแสง และคำนวณหาปริมาณคอลลาเจนตามคำแนะนำของชุดการทดสอบ

ในการวัดปริมาณคอลลาเจนที่มีการทดสอบในปัจจุบันนี้เป็นการประเมินเพื่อให้ทราบถึงคุณสมบัติเบื้องต้นเพื่อเลือกตัวอย่างทดสอบที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม สามารถช่วยให้นักวิจัยหรือผู้ประกอบการสามารถนำข้อมูลดังกล่าวใช้ในการพัฒนางานวิจัย ที่ส่งเสริมให้มีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติในการสร้างคอลลาเจน

เอกสารอ้างอิง

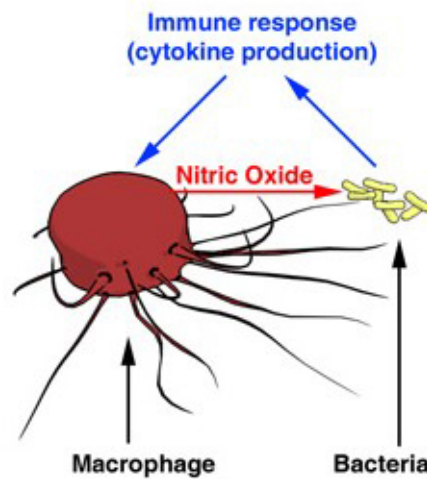
- Bielajew, B. J., Hu J. C. and Athanasiou, K. A., 2020. Collagen: quantification, biomechanics and role of minor subtypes in cartilage. *Nature Reviews Materials*.
- Biswas, C. and Dayer, J. M., 1979. Stimulate of collagenase production by collagen in mammalian cell culture. *Cell.*, **18**, pp. 1035-1041.

การวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ ในเซลล์เพาะเลี้ยง (RAW 264.7)

ปัจจุบันนี้มีงานวิจัยและพัฒนาวิธีการทดสอบในเซลล์เพื่อลดการใช้สัตว์ทดลอง ทั้งทางด้านพิษวิทยาและเภสัชวิทยาอย่างแพร่หลาย เพื่อเป็นการทดสอบประสิทธิภาพหรือการประเมินความปลอดภัยเบื้องต้น ในการยืนยันประสิทธิภาพของตัวอย่างทดสอบก่อนที่จะนำตัวอย่างเหล่านั้นออกสู่ท้องตลาด ตัวอย่างเช่น การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นการทดสอบด้านการประเมินความปลอดภัยในเซลล์เบื้องต้น และมีการทดสอบประสิทธิภาพอีกการทดสอบหนึ่ง ซึ่งเป็นการประเมินประสิทธิภาพของตัวอย่างทดสอบที่มีผลต่อกระบวนการอักเสบ ซึ่งคือ การวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ในเซลล์

ไนตริกออกไซด์มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน และเป็นโมเลกุลที่มีความสำคัญของระบบทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิต ระบบประสาท รวมถึงระบบการหมุนเวียนเลือด ตัวอย่างเช่น เมื่อร่างกายได้รับการรุกรานจากแบคทีเรีย ในร่างกายผลิตไซโตไคน์ (โปรตีน) ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ ดังรูปที่ 1 รวมถึงเรียกเซลล์แมคโครฟาจมายังบริเวณที่ได้รับการรุกรานจากจุลชีพนั้น ซึ่งแมคโครฟาจจะผลิตไนตริกออกไซด์เพื่อทำลายแบคทีเรียเหล่านั้น และในไวรัสและปรสิตที่มีการรุกรานเกิด

กระบวนการเช่นเดียวกัน ไนตริกออกไซด์คือ อนุภาคแก๊สอิสระที่สามารถละลายน้ำได้ สร้างจากเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทส (nitric oxide synthase; NOS) ที่จะหลั่งเมื่อมีการกระตุ้นจากสิ่งเร้าที่จะส่งผลให้หลอดเลือดขยายตัว ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ แต่อย่างไรก็ตามการผลิตไนตริกออกไซด์ในปริมาณที่มากจะส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงานมากเกินไป อาจก่อให้เกิดภาวะแพ้ภูมิตัวเอง (autoimmune diseases)



ที่มา: Dash (2020)

รูปที่ 1. การหลั่งไนตริกออกไซด์เมื่อได้รับการกระตุ้นจากแบคทีเรีย

การวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ที่หลั่งจากในเซลล์แมคโครฟาจของหนู (RAW 264.7) โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการ และเหนี่ยวนำเซลล์ให้เกิดการหลั่งไนตริกออกไซด์ด้วยสารไลโปโพลีแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide: LPS) ที่ได้จากแบคทีเรียแกรมลบ ทำการทดสอบโดยหาค่าเฉลี่ยของสาร LPS ร่วมกับตัวอย่างทดสอบที่เตรียมในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ทำการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บสารผสมของสาร LPS ร่วมกับสารตัวอย่างทดสอบนั้น ทำการวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ที่มีการหลั่งออกมา ด้วยชุดสารทดสอบ Griess reagent เปรียบเทียบกับสารละลาย

มาตรฐานของชุดสารทดสอบ จากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งปริมาณไนตริกออกไซด์ ซึ่งปริมาณไนตริกออกไซด์จะมีการหลั่งออกมาเล็กน้อยแปรผันตามการอักเสบ ซึ่งสารนี้จะหลั่งออกมาเมื่อมีกระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมของร่างกาย ดังนั้นการวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ในเซลล์ เป็นการประเมินประสิทธิภาพส่วนหนึ่งของกระบวนการอักเสบ เพื่อศึกษาถึงฤทธิ์ของตัวอย่างทดสอบ อย่างไรก็ตามการทดสอบนี้เป็นเพียงการทดสอบเบื้องต้น ซึ่งต้องมีการทดสอบในการวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ ซึ่งเป็นการทดสอบในระดับโปรตีน เพื่อยืนยันผลการทดสอบต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Dash, P., 2020. Role of Nitric Oxide in Biology. [online]. Available at: <https://www.reading.ac.uk/nitricoxide/intro/no/biol.html>, [accessed 19 April 2020].
- Liu, Z., Li, W., Wang, F., Sun, C., Wang, L., Wang, J., and Sun, F., 2012. Enhancement of lipopolysaccharide-induced nitric oxide and interleukin-6 production by PEGylated gold nanoparticles in RAW264.7 cells. *Nanoscale*, **4**(22), pp. 7135-7142.
- Patho, C., 2000. [online]. Available at: <http://cai.md.chula.ac.th/chulapatho/chulapatho/lecturenote/inflammation/mediator.html>, [accessed 19 April 2020].
- Zha, L., Mao, L., Lu, X., Deng, H., Ye, J., Chu, X., Sun, S. and Luo, H., 2011. Anti-inflammatory effect of soyasaponins through suppressing nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by attenuation of NF- κ B-mediated nitric oxide synthase expression. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **21**(8), pp. 2415-2418.