บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

4.1 อภิปรายผลการทดลอง

การศึกษานี้เป็นการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในหลอดทดลอง และทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide ของส่วนสกัดจากลำต้นใต้ดินของเร่วหอมและว่านสาวหลง สมุนไพรที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในภาคตะวันออกของไทย ในการศึกษาสกัดสารจากลำต้นใต้ดินของพืชโดยใช้เอทานอล และทำการสกัดแยกส่วนด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และน้ำ ผลการทดลองพบว่าส่วนสกัดย่อยน้ำของเร่วหอมและว่านสาวหลง มีร้อยละของน้ำหนักแห้งสูงที่สุด รองลงมาเป็นส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท และส่วนสกัดย่อยเฮกเซน (ตารางที่ 3-1) และได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในส่วนสกัดทั้งหมด เนื่องจากสารประกอบฟีนอลเป็นสารกลุ่มใหญ่ที่พบมากในพืช มีโครงสร้างหลักประกอบด้วยวงอะโรมาติก (Aromatic ring) แทนที่ด้วยหมู่ไฮดรอกซี โดยมากเป็นสารที่มีขั้ว ละลายในตัวทำละลายจำพวกแอลกอฮอล์ได้ดี ตัวอย่างของสารกลุ่มนี้ได้แก่ สารจำพวก ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) กลไกของสารประกอบฟีนอลที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ เมื่อมีอนุมูลอิสระมาดึงอิเล็กตรอนไป แต่โครงสร้างมีอิเล็กตรอนหนาแน่นจึงสามารถเกิดการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนไปทั่วโครงสร้าง (Delocalization) ทำให้โครงสร้างเสถียรไม่เกิดอนุมูลอิสระต่อไป (ระวิวรรณ แก้วอมตวงศ์ และทรงพร จึงมั่นคง, 2549) การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในส่วนสกัดย่อยต่างๆ จากลำต้นใต้ดินของเร่วหอมและว่านสาวหลง โดยการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมนั้นจะคำนวณได้จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานกรดแกลลิค จากการทดลอง พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดย่อยของพืชทั้งสองชนิด เป็นดังนี้ ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท > ส่วนสกัดย่อยน้ำ > ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง ใช้วิธีการทดสอบหลายอย่าง คือ การทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ และการทดสอบความสามารถในการคีเลทไอออนโลหะ เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระมีกลไกในการแสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้หลายแบบ อนุมูล DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่มีความเสถียร การทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH มักใช้เป็นการทดสอบเบื้องต้นในการศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสาร โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะให้ไฮโดรเจนอะตอมหรืออิเล็กตรอนกับอนุมูล DPPH เกิดเป็น DPPH-H (diphenyl picrylhydrazyl) ซึ่งเป็นสารที่ไม่เป็นอนุมูลอีกต่อไป สารละลายจะเปลี่ยนจากสีม่วงกลายเป็นสีเหลือง (Li และคณะ, 2007) สีของสารละลายขึ้นกับความสามารถในการต้าน

อนุมูลอิสระ ถ้าสารต้านอนุมูลอิสระมีความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอมหรืออิเล็กตรอนกับอนุมูล DPPH มาก สารละลายสีม่วงจะกลายเป็นสีเหลืองเร็วขึ้น จากการทดลองพบว่าทุกส่วนสกัดของลำต้นใต้ดินของเร่วหอมและว่านสาวหลงมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH และความสามารถเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของส่วนสกัดเพิ่มขึ้น โดยส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH ได้ดีที่สุด ดังตารางที่ 3-2 แต่อย่างไรก็ตามฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH มีค่าต่ำกว่าสารควบคุมแบบบวกคือ กรดแอสคอบิกและ BHT

การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ เป็นการทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันอีกวิธีหนึ่ง สารตัวอย่างสามารถรีดิวซ์สารประกอบเชิงซ้อน Fe^{3+}/ ferricyanide เป็นรูปเฟอร์รัสไอออน และติดตามปริมาณเฟอร์รัสโดยการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน Potassium ferric - ferro cyanide หรือ Perls Prussian blue ที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร (Senevirathne และคณะ, 2006) ถ้าสารต้านอนุมูลอิสระมีความสามารถในการรีดิวซ์ที่ดี Fe^{3+} จะถูกเปลี่ยนเป็น Fe^{2+}ได้มากขึ้น แสดงว่าสารต้านอนุมูลอิสระนี้สามารถหยุดลูกโซ่อนุมูลอิสระ (free radical chain) ได้โดยการให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ (Kumaran และคณะ, 2005) จากการทดลองเปรียบเทียบความสามารถในการรีดิวซ์ของส่วนสกัดต่างๆจากพืชทั้ง 2 ชนิด พบว่าความสามารถในการรีดิวซ์แปรผันตรงกับความเข้มข้นของส่วนสกัด โดยที่ส่วนสกัดจากเร่วหอม มีลำดับความสามารถในการรีดิวซ์ดังนี้ ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท > ส่วนสกัดย่อยน้ำ > ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน ซึ่งสอดคล้องกับความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ในขณะที่ลำดับความสามารถในการรีดิวซ์ของส่วนสกัดลำต้นใต้ดินของว่านสาวหลง คือ ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทมีความสามารถในการรีดิวซ์สูงที่สุด รองลงมา คือ ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน และส่วนสกัดย่อยน้ำ ตามลำดับ

อีกกลไกหนึ่งในการแสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ คือการคีเลทไอออนโลหะโดยในปฏิกิริยาจะเกิดการทำปฏิกิริยาระหว่าง Fe^{2+} กับ ferrozine เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+} - ferrozine เป็นสารสีม่วงแดง ถ้าสารต้านอนุมูลอิสระมีฤทธิ์ในการคีเลทไอออนโลหะได้ดี จะสามารถแย่งจับกับ Fe^{2+} ทำให้ Fe^{2+} ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยากับ ferrozine เพราะสารต้านอนุมูลอิสระรบกวนการเกิดปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+} - ferrozine สีม่วงแดงจึงลดลง (Kumaran และคณะ, 2005) จากการทดสอบความสามารถในการคีเลทไอออนของโลหะ Fe^{2+} ของส่วนสกัดจากพืชทั้ง 2 ชนิด พบว่า ทุกส่วนสกัดของพืชมีความสามารถในการคีเลทไอออน แปรผันตรงตามความเข้มข้นของส่วนสกัด โดยส่วนสกัดจากเร่วหอมมีลำดับความสามารถในการคีเลทไอออนโลหะดังนี้ ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน > ส่วนสกัดย่อยน้ำ > ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท ในขณะที่ลำดับความสามารถในการคีเลทไอออนโลหะของส่วนสกัดจากว่านสางหลง เป็นดังนี้ ส่วนสกัดย่อยน้ำ > ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท > ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน การที่ส่วนสกัดจากลำต้นใต้ดินของเร่วหอมและว่านสาวหลงมีลำดับความสามารถในการคีเลทโลหะที่แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถคีเลทโลหะได้มี

ปริมาณที่แตกต่างกันในแต่ละส่วนสกัด ในการทดลองนี้มีสารควบคุมแบบบวกคือ EDTA ซึ่งมีความสามารถในการคีเลทไอออนที่สูงมากมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.0021 ± 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การทดลองถัดไปคือฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินที่ผิวหนัง โดยเอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยา hydroxylation ของ L-tyrosine ไปเป็น L- DOPA และปฏิกิริยาออกซิเดชันของ DOPA ไปเป็น Dopaquinone ซึ่งเป็นขบวนการในการสังเคราะห์สารประกอบเมลานิน (Wang และคณะ,2006) ในการทดลองนี้ใช้ L-DOPA เป็นสารตั้งต้น เอนไซม์ไทโรซิเนสจะเปลี่ยน L-DOPA ไปเป็น dopachrome intermediate จากการทดลองพบว่าส่วนสกัดที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสกัดย่อยเฮกเซนของพืชทั้งสองชนิดมีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุด มีค่าเท่ากับ 81.16 ±3.30 และ 77.14 ± 0.95 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเร่วหอม และว่านสาวหลงตามลำดับ ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่าฤทธิ์ต้านไทโรซิเนสของส่วนสกัดเมทานอลจากใบของพืชในสกุล *Etlingera* ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในช่วง 55.2 ± 3.1 ถึง 22.0 ± 5.2 เปอร์เซ็นต์ (Chan และคณะ, 2007) นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนสกัดจากลำต้นใต้ดินของว่านสาวหลงนี้มีความสามารถสูงกว่าส่วนสกัดที่ได้จากใบว่านสาวหลงซึ่งที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเพียง 34.11 ± 0.41 ถึง 20.14 ± 0.43 เปอร์เซ็นต์ (Charoensuk และคณะ, 2011)

การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบทำในเซลล์ไลน์แมคโครฟาจหนู RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย เป็นการจำลองการติดเชื้อจุลชีพในเซลล์แมคโครฟาจ ทำให้มีการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบต่างๆ รวมทั้งไนตริกออกไซด์ และโพรสตาแกลนดิน E2 ออกมาในขณะที่มีการอักเสบ ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการตอบสนองในระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือจุลชีพ จากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ ของส่วนสกัดย่อยเฮกเซน ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท และส่วนสกัดย่อยน้ำจากลำต้นใต้ดินของเร่วหอมและว่านสาวหลง ที่ความเข้มข้นของส่วนสกัดเท่ากับ 50 µg/mL พบว่า ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของพืชทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว โดยไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ (ตารางที่ 3-3 และ 3-4) แสดงให้เห็นว่าการลดลงของปริมาณไนตริกออกไซด์ เกิดจากผลการยับยั้งของส่วนสกัดไม่ได้เป็นผลมาจากการตายของเซลล์ จากการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าที่พบว่า พืชบางชนิดในวงศ์ Zingiberaceae เช่น กระวาน กระชายดำ ข่าเล็ก และกระทือ สามารถลดปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ได้และยังไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์อีกด้วย (Kwon และคณะ 2003; Chien และคณะ 2008; Tewtrakul และ Subhadhirasakul ,2008; Lee และคณะ 2009) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของพืชทั้งสองชนิด พบว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของเร่วหอมมีประสิทธิภาพสูงกว่าว่านสาวหลง ดังนั้นจึงเลือกส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของเร่วหอมไปทดสอบกลไกการยับยั้งการผลิตไนตริก

ออกไซด์ โดยนำส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของเร่วหอมมาทดสอบผลต่อการแสดงออกของยีน iNOS พบว่า ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของเร่วหอมสามารถลดการแสดงออกของยีน iNOS ได้ในระดับ mRNA และโปรตีน ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น (รูปที่ 3-1 และ 3-2) ซึ่งผลของ mRNA ที่ได้มีความสัมพันธ์กับการลดปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์เมื่อได้รับ ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของเร่วหอมที่ความเข้มข้นต่างๆ (ตารางที่ 3-5) ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Aktan (2004) ที่พบว่าขั้นตอนสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของ iNOS ในเซลล์แมคโครฟาจอยู่ที่ระดับการถอดรหัสพันธุกรรม และระดับของไนตริกออกไซด์ที่สูงขึ้นจากการผลิตโดย iNOS ซึ่งเป็นผลมาจากการแสดงออกของ iNOS ในแมคโครฟาจ ที่ถูกกระตุ้นโดยตัวเหนี่ยวนำที่จำเพาะและมีส่วนร่วมในพยาธิวิทยาของโรคอักเสบต่างๆ (Buttery et al., 1994)

โพรสตาแกลนดิน E2 เป็นสารสื่อกลางในการอักเสบที่สำคัญอีกชนิดนอกเหนือจากไนตริกออกไซด์ที่ถูกผลิตจากเซลล์แมคโครฟาจในขณะที่เกิดกระบวนการอักเสบ โดยเอนไซม์ COX-2 ซึ่งเป็นไอโซฟอร์มที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกในขณะที่มีการอักเสบ ในการศึกษานี้พบว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของเร่วหอมสามารถลดการผลิตโพรสตาแกลนดิน E2 ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นดังแสดงผลในตารางที่ 3.6 ดังนั้นฤทธิ์ต้านการอักเสบของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของเร่วหอมส่วนหนึ่งเกิดจากความสามารถในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และโพรสตาแกลนดิน E2

NF-KB เป็น transcription factor สำคัญที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โปรตีน NF-KB อยู่ในกลุ่มโปรตีน Rel มีลักษณะเป็น homodimer หรือ heterodimer ที่เกิดจากการรวมตัวของหน่วยย่อย RelA (p65), RelB, c-Rel, p50 (NF-KB1) และ p52 (NF-KB2) โดยที่การจับคู่ของ p50/p65 เป็นรูปที่พบบ่อย (Luqman and Pezzuto, 2010) NF-KB ที่พบในแมคโครฟาจในสภาวะปกติเซลล์จะจับกับโปรตีน inhibitory-kappaB (IKB) ทำให้ NF-KB คงอยู่ในไซโทซอล (Bauerle and Baltimore, 1996) แต่เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS โปรตีน IKB จะถูกฟอสโฟรีเลชันโดยเอนไซม์ IKB kinase (IKK) เป็นผลให้ IKB สลายตัว (Yates and Górecki, 2006) ดังนั้น NF-KB จึงเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสและจับกับโปรโมเตอร์ของยีน iNOS และ COX-2 และเหนี่ยวนำให้เกิดการถอดรหัสพันธุกรรมของ iNOS และ COX-2 นำไปสู่การเพิ่มจำนวนของไนตริกออกไซด์ และโพรสตาแกลนดิน (Yates and Górecki, 2006) ดังนั้นเราจึงทดสอบผลของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของเร่วหอมต่อปริมาณ p65 NF-KB ในนิเคลียสเนื่องจากการจับคู่ของ p50/p65 เป็นรูป NF-KB ที่พบบ่อย จากการศึกษาพบว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของเร่วหอมสามารถลดปริมาณ p65 NF-KB ในนิวเคลียสได้ ดังนั้นส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของเร่วหอมสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และโพรสตาแกลนดิน E2 ได้ โดยการลดปริมาณ p65 NF-KB ในนิวเคลียส ทำให้มีการยับยั้งการแสดงออกของ iNOS ในระดับ mRNA และนำไปสู่การลดลงของโปรตีน iNOS ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS

4.2 สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าส่วนสกัดของลำต้นใต้ดินของเร่วหอมและว่านสาวหลงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และโพรสตาแกลนดิน E2 จากการทดลองที่ได้สามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำลำต้นใต้ดินของเร่วหอมและว่านสาวหลงมาใช้ประโยชน์โดยอาจนำไปเป็นส่วนประกอบของยาหรือเครื่องสำอางต่อไปในอนาคต.และยังเป็นข้อมูลพื้นฐานในการค้นหายาต้านอักเสบชนิดใหม่จากสมุนไพรทั้งสองชนิดนี้ อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบว่าสารใดในส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของเร่วหอมเป็นสารออกฤทธิ์ในการลดการผลิตไนตริกออกไซด์ และโพรสตาแกลนดิน E2 ดังนั้นการศึกษาขั้นต่อไปควรทำการแยกสารบริสุทธิ์ที่เป็นสารออกฤทธิ์ เพื่อนำมาซึ่งข้อมูลที่จะใช้ในการพัฒนาเป็นยาต้านอักเสบตัวใหม่ในอนาคต