บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

การแยกผลิตภัณฑ์ธรรมชาติบริสุทธิ์ ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี และทำการตกผลึกจากส่วนสกัดเฮกเซนของรากลำบิดดง (*Diospyros filipendula*)ได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิด และจากส่วนสกัดเฮกเซนของรากท้าวแสนปม *(Diospyros cauliflora)* ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด นำสารบริสุทธิที่ได้ทั้งหมดมาพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยวิธีทางสเปคโตรสโคปี ด้วยเทคนิค ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, DEPT-90 และ DEPT-135 และเปรียบเทียบข้อมูลทางสเปคโตรสโคปีกับสารอ้างอิง พบว่าสารบริสุทธิ์ที่ได้จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากลำบิดดงคือ stigmasterol, taraxerol และ จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากท้าวแสนปมคือ lupeol

จากผลการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสรรพคุณทางยา พบว่า เกือบทุกส่วนของพืชในสกุล Diospyros ได้มีการตรวจสอบโครงสร้างทางเคมี และพบสารสำคัญในส่วนต่างๆดังแสดงในตาราง 1 พบว่า triterpenoids และ naphthoquinones กระจายเกือบทุกส่วนของพืชชนิดนี้ สารในกลุ่ม terpenoids พบว่า 90% ของพืชใน Diospyros species เป็นชนิด triterpenes: pentacyclic core ได้แก่ lupine, ursane, oleanane, taraxerane, friedelane ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anti-cancer), anti-HIV และ anti-inflammation (Mallavadhani *et al.,* 1998) ดังนั้นสารจากพืชในสกุล Diospyros จึงได้รับความสนใจในการศึกษาเพื่อพัฒนาเป็นยารักษามะเร็ง ซึ่งแนวทางหนึ่งในการรักษาโรคมะเร็งคือการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งตายแบบ apoptosis ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาประสิทธิภาพของสารบริสุทธิ์ ที่ได้จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากลำบิดดงคือ stigmasterol, taraxerol และจากส่วนสกัดเฮกเซนของรากท้าวแสนปมคือ lupeol ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cells) การแตกของนิวเคลียส และการแตกของ DNA

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสาร stigmasterol, taraxerol และ lupeol ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก และใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย จึงทดสอบด้วย 0.5% DMSO เป็นกลุ่ม negative control ส่วน doxorubicin ซึ่งเป็นยารักษาโรคมะเร็งที่ใช้ในปัจจุบัน (Primeau *et al.,* 2005) พบว่าสาร stigmasterol, taraxerol และ lupeol ทั้ง3 ชนิดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ตามขนาดความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น (dose dependent) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 37 ± 2.49, 10 ± 1.3 และ 20 ± 2.6 µg/ml ตามลำดับ ในขณะที่ DOX มีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.8 ± 0.86 µg/ml

Doxorubicin ประสิทธิภาพดีกว่าสาร stigmasterol, taraxerol และ lupeol มาก เนื่องจาก doxorubicin มีโครงสร้างเป็น quinone-containing anthracycline ซึ่งมีเป้าหมายออกฤทธิ์เฉพาะเจาะจงที่

DNA บริเวณหมู่น้ำตาลใน minor groove ทำให้เอนไซม์ topoisomerase II ซึ่งทำหน้าที่ในการคลายเกลียวของ double helix ไม่สามารถทำงานได้ การสังเคราะห์ DNA จึงหยุดลง และเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis (Fornari *et al.*, 1994) แต่อย่างไรก็ตามการใช้ doxorubicin ยังมีผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์มาก เนื่องจากออกฤทธิ์ทำลายเซลล์ปกติด้วย จึงยังมีข้อจำกัดในการใช้ แต่สารจากพืชในสกุล Diospyros มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายชนิดดังแสดงในตาราง 2 และอาจมีผลข้างเคียงน้อยกว่ายาแผนปัจจุบัน อย่างไรก็ตามสารเมตาโบลัยซ์ในพืชวงศ์ Diospyros นั้นขึ้นกับวิธีการสกัด สภาพภูมิประเทศและสิ่งแวดล้อมด้วย (Gu *et al.*, 2004)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสาร naphthoquinone สกัดได้จาก *Diospyros maritime* (Higa *et al.*, 2002) มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ในระดับหลอดทดลอง และเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis (Chakrabarty *et al.*, 2002) ผ่านทางการยับยั้งเอนไซม์ DNA topoisomerases (Ting *et al.*, 2003) การศึกษาสารสกัดด้วย 70% EtOH จากส่วนใบของ *Diospyros Seychellarum* มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ Jurkat T lymphocytes โดยจำนวนเซลล์ที่ตายเพิ่มตามขนาดความเข้มข้น (dose-dependent response) มีกลไกการตายแบบ apoptosis คือ สูญเสียความต่างศักดิ์ในไมโตคอนเดรีย และมี chromatin condensation (Buenz *et al.*, 2007)

การที่เซลล์เกิด apoptosis ซึ่งเกิดจากการชักนำให้เกิดสัญญาณภายในเซลล์แล้วให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเฉพาะ คือ เซลล์หดตัว (cell shrinkage) เยื่อหุ้มเซลล์มีลักษณะเป็นถุง (plasma membrane blebbing) นิวเคลียสรวมตัวกันแน่น (nuclear condensation) โครมาตินเกาะกลุ่ม (chromatin aggregation) DNA ถูกย่อยเป็นชิ้นเล็กๆ (DNA fragmentation) และในระยะสุดท้ายส่วนของเซลล์มีการแตกย่อยเป็นชิ้นเล็กๆ เรียก apoptotic bodies ซึ่งหากอยู่ในร่างกาย ส่วนของ apoptotic bodies จะถูกกำจัดโดยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ macrophage จึงไม่เกิดการกระจายของสารไปยังเซลล์ข้างเคียง คือไม่ทำให้เกิดการอักเสบเหมือนกับการตายแบบ necrosis ที่จะพบลักษณะของเซลล์บวม ไม่มีการหดตัวของโครมาติน เยื่อหุ้มเซลล์แตกออกและทำให้ของเหลวรั่วออกมาสู่ภายนอกเซลล์ (Elmore, 2007) ดังนั้นการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis จึงเป็นแนวทางที่น่าสนใจสำหรับการพัฒนายารักษาโรคมะเร็ง ซึ่งยารักษามะเร็งที่มีกลไกในการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งตายแบบ apoptosis ได้แก่ doxorubicin (Wang et al., 2004) เป็นต้น

การศึกษาด้วย agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (qualitative analysis) พบว่าสาร stigmasterol, taraxerol และ lupeol ทำให้เกิดการแตกของ DNA โดยพบลักษณะของ smear band เช่นเดียวกับเซลล์ที่บ่มด้วย doxorubicin ซึ่ง smear band เป็นตัวบ่งชี้ว่า DNA ถูกตัดแบบไม่มีแบบแผนสุ่ม (non-random digestion) ซึ่งเป็นลักษณะของการตายแบบ necrosis (Lieberthal *et*

al., 1996) แต่การตายแบบ apoptosis จะพบลักษณะ ladder band ซึ่งเกิดจากการทำงานของ caspase 3 และcaspase activated DNase (CAD) ไปตัดสาย DNA ที่บริเวณ internucleosome ได้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 180-200 bp จึงมีสาย DNA ปรากฏทั้ง mono-nucleosome และ oligo-nucleosome เพราะฉะนั้น จึงเป็นไปได้ว่าสารทั้ง 3 ชนิด ทำให้เซลล์มะเร็งปากมดลูกตายแบบ apoptosis และสุดท้ายเซลล์เปลี่ยนแปลงเป็น secondary necrotic cells จึงพบ smear band ที่เกิดจาก DNA fragment ของ late apoptotic cells และคาดว่าน่าจะพบ ladder band ที่เกิดจาก DNA fragment ของ early apoptotic cells ร่วมด้วย แต่เห็นได้ไม่ชัดเจน ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปควรทำการศึกษาที่เวลาต่างๆ กันเพื่อหาเวลาที่เหมาะสมที่ทำให้เกิด early apoptotic cells และ ladder band จึงจะบ่งชี้ได้แน่ชัดว่าเซลล์ตายแบบ apoptosis

การศึกษาการแตกของนิวเคลียสด้วยวิธี DAPI & PI staining ซึ่งเป็นการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (quantitative analysis) พบว่าในกลุ่มเซลล์ที่บ่มด้วยสารทั้ง 3 ชนิด พบ early apoptotic cells (นิวเคลียสแตก และติดสี DAPI แต่ไม่ติดสี PI) ซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์มีชีวิต (สี PI เข้าเซลล์ไม่ได้) มีการรวมกลุ่มของเส้นใยโครมาติน และเกิดการแตกของนิวเคลียส ขณะเดียวกันพบ late apoptotic cells หรือ necrotic cells เช่นกัน โดยการทดลองนี้เป็นการทดลองในระดับหลอดทดลอง (*in vitro*) จึงไม่มีกระบวนการกำจัด early apoptotic cells โดยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (Kurosaka *et al.*, 2003) จึงทำให้ early apoptotic cells เปลี่ยนแปลงเป็น late apoptotic cells (Hebert *et al.*, 1996) และเยื่อหุ้มเซลล์เสื่อมสภาพ (loss of membrane integrity) มี permeability เพิ่มมากขึ้น ซึ่งมีลักษณะเยื่อหุ้มเซลล์เหมือน necrotic cells ทำให้ late apoptotic cells ติดสี PI ที่นิวเคลียส ซึ่งไม่สามารถแยก late apoptotic cell และ necrotic cells ออกจากกันได้ด้วยการย้อมสี PI

ในการทดลองครั้งนี้ได้เน้นศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่ลักษณะนิวเคลียสและ DNA เท่านั้น จึงไม่สามารถตอบคำถามถึงกลไกในระดับไซโตพลาซึม และไมโตคอนเดรียได้ เช่น caspase และ Bcl2-family เป็นต้น อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยครั้งนี้พบว่าสารทั้ง 3 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกโดยเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการแตกของนิวเคลียส และเกิดการแตกของ DNA ที่เป็นลักษณะหนึ่งที่สำคัญในกระบวนการเกิด apoptosis ซึ่งแตกต่างกันอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับกลุ่มที่บ่มเซลล์ด้วย 0.5% DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลาย และได้พิสูจน์แล้วว่าขนาดความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองนี้ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก

สารบริสุทธิ์ที่ได้จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากลำบิดดงคือ stigmasterol, taraxerol และ จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากท้าวแสนปมคือ lupeol น่าจะมีศักยภาพที่จะนำมาพัฒนา เพื่อให้ร่วมกับเคมีบำบัดเป็นการรักษาแบบผสมผสาน (complementary therapies) ลดการการพัฒนาลุกลามของ

เซลล์มะเร็ง และลดผลข้างเคียงที่จะเกิดจากการรักษาด้วยเคมีบำบัด หรืออาจใช้เป็นสารจากธรรมชาติเพื่อป้องกันหรือยับยั้งการเกิดโรคมะเร็งในระยะยาว (chemopreventive agent) ซึ่งสอดคล้องกับการรับประทานผักและผลไม้ จะมีอัตราการเกิดโรคมะเร็งบางชนิดน้อยกว่าผู้ที่ไม่รับรับประทานผักและผลไม้ เนื่องจากผักและผลไม้เหล่านี้เป็นอาหารจึงไม่มีพิษต่อเซลล์ปกติ

สรุปผลการทดลอง

การทดสอบสาร stigmasterol, taraxerol และ lupeol ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cells) พบว่าสารทั้ง 3 ชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้แบบ dose-dependent และเมื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารทั้ง 3 ชนิด จากการวิเคราะห์การแตกของ DNA ด้วยเทคนิค agarose gel eletrophoresis พบว่าทำให้ DNA แตก โดยเห็นเป็น smear band ซึ่งเป็นลักษณะของการตายแบบ apoptosis (late apoptosis) และสอดคล้องการวิเคราะห์การแตกของนิวเคลียสด้วยเทคนิค DAPI & PI staining พบว่าทำให้เกิด chromatin condensation และ nuclear fragmentation ซึ่งจากหลักฐานดังกล่าวนี้พอที่จะสรุปได้ว่าสารทั้ง 3 ชนิดที่นำมาทดลองมีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งปากมดลูกตายแบบ apoptosis

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารทั้ง 3 ชนิด ในระดับไซโตพลาซึมหรือไมโตคอนเดรีย เพื่อยืนยันการตายแบบ apoptosis
2. ควรมีการทดลองในเซลล์ปกติเปรียบเทียบกับการทดลองในเซลล์มะเร็ง
3. ควรมีการทดลองในเซลล์มะเร็งชนิดอื่น