บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

ตัวอย่างสาหร่ายสีน้ำตาลชนิด *Sargassum oligocystum* Montagne บริเวณจังหวัดชลบุรีและจังหวัดระยองช่วงระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2550 ถึงเดือนเมษายน 2551 นำมาสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนและเอทธิลอะซีเตด ในอัตราส่วน 1:1 ได้เป็นสารสกัดหยาบ (SOM extracts) จากนั้นทำการประเมินประสิทธิภาพของสารสกัด SOM ต่อการต้านการเจริญเติบโตต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Hela cells) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 132 ± 5.6 µg/ml เมื่อเปรียบเทียบผลของ Doxorubicin ที่ใช้เป็นยารักษามะเร็งในปัจจุบัน พบว่ามี Doxorubicin มีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีกว่าสารสกัด SOM โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2 ± 0.35 µg/ml โดย Doxorubicin เป็นสารบริสุทธิ์ แต่สารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาลเป็นสารสกัดหยาบมีโมเลกุลหลายชนิดรวมอยู่ด้วยกัน อาจจะทำให้มีการออกฤทธิ์เสริมกัน (synergist) หรือหักล้างกัน (agonist) โดยการทดลองครั้งนี้ Doxorubicin มีเป้าหมายการออกฤทธิ์ที่ DNA บริเวณหมู่น้ำตาลใน minor groove ทำให้เอ็นไซม์ topoisomerase II ที่ทำหน้าที่ในการคลายเกลียวของ double helix ไม่สามารถทำงานได้ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจึงหยุดลง และเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis (Fornari *et al.*, 1994) และเมื่อให้ Doxorubicin ที่ความเข้มข้น 2 µg/ml พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่อยู่ในสภาพไม่สมบูรณ์และติดสีแดงของ PI จำนวนมาก สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องจาก Doxorubicin เป็นยารักษามะเร็งที่มีประสิทธิภาพสูง ดังนั้นเมื่อบ่มในเวลาที่เท่ากับสารสกัด SOM ในระบบหลอดทดลอง (*in Vitro*) ซึ่งไม่มีเซลล์กลุ่ม macrophage (*in vivo*) ที่คอยจับกินเซลล์ผิดปกติ ดังนั้นจึงทำให้เซลล์พัฒนาเป็น late apoptosis หรือ necrosis ได้มากกว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัด SOM

การศึกษาการแตกของ DNA ใน agarose gel ซึ่งเป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (quanlitative analysis) มีลักษณะของ smear band และความยาวของ smear band จะมีสัมพันธ์กับความเข้มข้นสารสกัด SOM ที่เพิ่มขึ้น (dose-dependent) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สาเหตุที่ DNA แตกหักนั้นน่าจะเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่ม endonuclease (caspase-activated DNase; CAD) ซึ่งจะตัดสาย DNA ระหว่าง nucleosome (internucleosomal region) ซึ่งจะได้สาย DNA มีความยาวต่างกันประมาณ 180-200 base pairs (BP) (Linfert *et al.*, 1997) ดังนั้น การวิเคราะห์โดยใช้วิธี agarose gel electrophoresis จะได้ลักษณะเป็น 'ladder' ในแต่ละช่วงต่างกันประมาณ 200 BP ซึ่งในทางตรงข้ามการเกิด late apoptosis หรือ necrosis จะได้ลักษณะเป็น 'smear' บน agarose gel เพราะมีเอนไซม์หลายชนิดทำหน้าที่ตัด chromatin DNA แบบสุ่มเป็นลักษณะของ random DNA fragmentation (Walker *et al.*, 1999)

การศึกษากลไกการตายที่เหนี่ยวนำโดยสารสกัด SOM โดยศึกษาลักษณะของนิวเคลียสด้วยการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์คือ DAPI และ PI พบว่าในกลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัด SOM มีการเปลี่ยนแปลงทางด้าน surface morphology คือ เซลล์มีลักษณะกลมไม่เหยียดออกเป็นรูปกระสวย การเกาะที่พื้นผิวไม่แน่นสามารถหลุดจากพื้นผิวได้ง่าย มีตุ่มที่ผนังเซลล์ (membrane blebing) มี apoptotic bodies กระจายอยู่ในซัยโต พลาสมหรือออกมานอกเซลล์ ในการศึกษาเชิงปริมาณ (quantitation) โดยการวิเคราะห์ทาง nuclear morphology ของสารสกัด SOM พบว่า มีการรวมกลุ่มกันของเส้นใยโครมาติน (condensed chromatin) และมีการแตกของนิวเคลียส (nuclear fragmentation) ซึ่งลักษณะที่พบนี้แสดงถึงเซลล์ติดสี DAPI แต่ไม่ติดสี PI เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ยังคงมีความสมบูรณ์ สี PI จึงไม่สามารถผ่านได้ จึงเรียกว่าเป็นการตายแบบ early apoptosis (ติดสี DAPI เป็นหย่อม ๆ) ส่วนในกลุ่มที่บ่มด้วยของ Doxorubicin พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่มีการติดสีของ PI เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์เกิดรูรั่วทำให้สีของ PI เข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์ที่ตายแบบ late apoptosis หรือ necrosis

การเกิด apoptosis ในระบบร่างกาย (*in vivo*) จะมีส่งสัญญาณให้มีการกำจัดเซลล์ที่ตายด้วยกระบวนการ phagocytosis โดยมี macrophage จะมาเก็บกินซากเซลล์ที่ตาย แต่ในระบบหลอดทดลอง (*in vitro*) เซลล์ที่อยู่ในกระบวนการเกิด apoptosis ไม่ถูกทำลายโดย macrophage จึงเข้าสู่ระยะ late apoptosis ซึ่งไม่ต่างกับ necrosis ซึ่งมีการบวมของ organelles ต่างๆ รวมถึงการบวมของเซลล์ด้วย ในการทดลองครั้งนี้ ภายในภาชนะเลี้ยงเซลล์อันเดียวกันสามารถมีเซลล์ที่เกิด apoptosis ในระยะที่แตกต่างกัน (heterogeneity) ผสมอยู่ในภาชนะเดียวกัน ผลการทดลองที่ได้จากการแตกของดีเอ็นเอ (DNA fragmentation) บน agarose gel จึงเป็นผลรวมระหว่าง early apoptosis กับ late apoptosis (Linfert *et al.*, 1997)

ผลการทดลองครั้งนี้ สอดคล้องกับการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีน้ำตาล ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ เช่นเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) (Park *et al*, 2002), เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว humen pro-myelocytic leukemia (HL-60) (Bhaskar *et al.*, 2004) กลไกการออกฤทธิ์ของสาร fucoxanthin สกัดจากสาหร่ายชนิด *Undaria pinnatifida* คือกระตุ้น DNA fragmentation และ apoptosis ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่หลายชนิดเช่น Caco-2, HT-29 และ DLD-1 (Hosokawa *et al.*, 2004) สารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจาก *Sargassum latifolium* มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด (lymphoblastic leukemia 1301 cells) โดยยับยั้งการทำลาย DNA และกระตุ้นในเกิด apotosis ได้ (Gamal-Eldeen *et al.*, 2009) และยังสอดคล้องกับการศึกษาสารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีน้ำตาล Turbinaria conoides และ Sagassum binderi มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cell) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 20 และ 90 ug/ml ตามลำดับพบนิวเคลียสแตก โครมาตินหนาแน่น และมี

การแตกของ DNA ฟุ้งกระจายใน agarose gel ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของการตายแบบ apoptosis (Saengkhae *et al.*, 2009B; Saengkhae *et al.*, 2010)

รงควัตถุของสาหร่ายสีน้ำตาล คือ carotenoid ชนิด fucoxanthin ในผนังเซลล์ของสาหร่ายสีน้ำตาลมี alginic acid เซลล์ลูโลส และ sulfated fucan (fucoidan) เป็นองค์ประกอบหลักมีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย เช่นต้านอนุมูลอิสระ (Sachindra *et al.*, 2007) ลดภาวะโรคอ้วน (antiobesity) (Maeda *et al.*, 2005; Hosokawa *et al.*, 2010) ลดการเป็นเบาหวาน (Maeda *et al.*, 2009) และยับยั้งการอักเสบ (Shiratori et al., 2005) สารประกอบในกลุ่มซัลเฟตโพลีแซคคาไรด์ เช่น fucan) และ fucoidan พบมากในสาหร่ายสีน้ำตาล และเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่มีน้ำตาลฟูโคส (fucose) เป็นองค์ประกอบหลักในโมเลกุล มีการแทนที่หมู่ไฮดรอกซิลด้วยซัลเฟตที่ตำแหน่งต่างๆ ทำให้สารดังกล่าวมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง เช่นกัน

ถึงแม้ว่าสารสกัด SOM จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งต่ำกว่ายาแผนปัจจุบัน ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีความเป็นพิษกับเซลมะเร็งที่กำลังเติบโตอย่างรวดเร็ว แต่ขณะเดียวกัน ก็ทำลายเซลล์ปกติที่กำลังเติบโตอย่างรวดเร็วในไขกระดูก ทำลายระบบทางเดินอาหาร ฯลฯ และเป็นสาเหตุทำให้เกิดผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์ ประเทศไทยอุดมสมบูรณ์ไปด้วยทรัพยากรธรรมชาติ มีสิ่งแวดล้อมที่หลากหลาย และมีการใช้สาหร่ายทะเลต่อเนื่องเป็นเวลานานนับพันปีเพื่อใช้เป็นยารักษาโรค เนื่องจาก มีแร่ธาตุสำคัญหลายชนิดโดยเฉพาะธาตุไอโอดีน ใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น นม ไอศกรีม ขนมปัง และอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง นอกจากนี้ยังใช้ประกอบอาหารรับประทานได้หลายชนิด ซึ่งเป็นหลักฐานที่แสดงถึงความเป็นพิษค่อนข้างต่ำ (กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์, 2527; 2550) และจากหลักฐานทางวิทยาศาสตร์พบว่า การที่สาหร่ายสีน้ำตาลมีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย เช่น เพิ่มระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ต้านอนุมูลอิสระ ถ้าร่างกายมีภูมิต้านทานที่ดีมีความสมบูรณ์ แข็งแรง ก็จะสามารถต่อสู้กับโรคมะเร็งได้ ดังนั้นจึงควรมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสาหร่ายสีน้ำตาลอย่างเป็นระบบ เพื่อนำมาใช้ร่วมกับยาแผนปัจจุบัน ทำให้ใช้ขนาดยาแผนปัจจุบันลดลง (Philchenkov *et al.*, 2007)

อย่างไรก็ตามการวิจัยครั้งนี้ไม่ได้มุ่งหวังเพื่อหา novel compound เนื่องจากต้องใช้งบประมาณ กำลังคน เครื่องมือ เป็นจำนวนมหาศาล และจะใช้เวลานานในการพัฒนาผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาสารสกัดหยาบ (crude) จึงไม่ทราบว่าฤทธิ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Hela cells) เกิดจากสารสำคัญเพียงตัวเดียวหรือเกิดจากหลายตัวทำงานร่วมกัน ซึ่งสาหร่ายชนิดเดียวกันแต่เก็บมาจากสถานที่ที่แตกต่างกัน พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ต่างกัน อาจเนื่องมาจากสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

นั้น อาจเป็นสารทุติยภูมิที่เกิดขึ้นในธรรมชาติระหว่างกระบวนการเติบโต ภายใต้สิ่งแวดล้อมที่เฉพาะ สาหร่ายชนิดเดียวกันที่เกิดในสิ่งแวดล้อมต่างกัน จึงมีการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันได้ ดังนั้นก่อนที่จะนำสาหร่ายสีน้ำตาลชนิด *Sargassum oligocystum* Montagne มาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ ควรมีการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ให้แน่ชัด โดยนำมาทดลองกับเซลล์มะเร็งชนิดอื่น ๆ และในสัตว์ทดลองด้วย

สรุปผลการทดลอง

สารสกัดหยาบจากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล *Sargassum oligocystum* Montagne ถูกสกัดด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนและเอทธิลอะซีเตด อัตรส่วน 1:1 สามาถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cells) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 132 ± 5.63 µg/ml มีการแตกของ DNA เป็น smear band ใน agarose gel เซลล์มีลักษณะกลม มีตุ่มที่ผนังเซลล์ มี apoptotic bodies กระจายอยู่ในซัยโต นิวเคลียสติดสี DAPI เป็นหย่อม ๆ ไม่สม่ำเสมอ (nuclear fragmentation)

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษากลไกการออกฤทธิ์ ในระดับไซโตพลาซึมหรือไมโตคอนเดรีย เพื่อยืนยันการตายแบบ apoptosis
2. ควรมีการทดลองในเซลล์ปกติเปรียบเทียบกับการทดลองในเซลล์มะเร็ง
3. ควรมีการทดลองในเซลล์มะเร็งชนิดอื่น