บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง (skin toxicity test) ของแอนโทไซยานินสกัดจากดอกอัญชันสีน้ำเงิน นาโนซีโอไลต์ที่เกิดจากการสังเคราะห์ทางเคมี และสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดจากแอนโทไซยานินที่ดูดซับใน นาโนซีโอไลต์ นาโนซีโอไลต์นั้นเป็นสารที่มีรูพรุนทำให้มีคุณสมบัติในการดูดซับสารพิษ และการมีรูพรุนที่เป็นระเบียบของซีโอไลต์ ซึ่งอาจใช้เป็นตัวกรองสารที่ต้องการ โดยโมเลกุลที่เล็กกว่าขนาดโพรงซีโอไลต์ก็จะสามารถผ่านไปได้ ในขณะที่โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จะไม่สามารถผ่านออกมา และโมเลกุลที่ต้องการซึ่งมีขนาดพอดีกับโพรงซีโอไลต์ก็จะถูกกักไว้ภายในรูพรุน จึงเล็งเห็นว่าหากนำมาดูดซับและปลดปล่อยสารแอนโทไซยานินสู่บริเวณที่ต้องการได้ก็จะเป็นประโยชน์ เนื่องจากว่าการนำสารสกัดที่มีสีเข้มของดอกอัญชันไปใช้กับผิวหนังโดยเฉพาะเพื่อเสริมความงามที่ไม่ต้องการให้สีเปื้อนส่วนอื่น ๆ ของร่างกาย หรือเสื้อผ้าทำให้ต้องการตัวดูดซับที่ดีเพื่อกักเก็บสีทำให้ไม่เปรอะเปื้อน

การเลือกใช้เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงในการทดสอบเพื่อทดแทนการใช้สัตว์ทดลอง เพื่อให้ได้ผลในการทดสอบที่ดีที่สุด เพื่อลดข้อจำกัดในการแปลผลจากสัตว์มาสู่มนุษย์ เนื่องจากสัตว์มีขนปกคลุมผิวหนังมากกว่ามนุษย์ และตั้งแต่เดือนมีนาคม พ.ศ. 2552 เป็นต้นมา มีข้อกำหนดทางการค้าระหว่างประเทศโดยเฉพาะที่กำหนดโดยกลุ่มประเทศในสหภาพยุโรป (European Union) ห้ามการใช้สัตว์ทดลองในการทดสอบสารที่ใช้ทำผลิตภัณฑ์รวมทั้งผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเพื่อการจำหน่ายจึงมีการพัฒนาวิธีการทดสอบความเป็นพิษของผิวหนังโดยใช้เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงทดแทนการทดสอบโดยใช้สัตว์ทดลอง การกำหนดวิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนังขององค์การเพื่อความร่วมมือทางเศรษฐกิจและการพัฒนา (Organization for Economic Cooperation and Development, OECD) เป็นแนวทางที่สำคัญ แต่มีข้อจำกัดในการปฏิบัติเนื่องด้วยปัญหาการจัดส่งเซลล์ทดสอบภายในระยะเวลาและเงื่อนไขที่กำหนดไม่อาจทำได้ โดยเฉพาะเมื่อต้องจัดส่งเซลล์ข้ามทวีปโดยต้องให้เซลล์มีชีวิตและดำรงอยู่ในสภาพพร้อมใช้ในการทดสอบทันทีที่จัดส่งถึงปลายทาง ดังนั้นจึงต้องมีการพัฒนาวิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนังโดยใช้เซลล์ผิวหนังเป็นวิธีการที่เลือกนำมาใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนังทดแทนการใช้สัตว์ทดลอง โดยจะมีตัวชี้วัด (endpoints) ในการทดสอบฤทธิ์ระคายเคืองและกัดกร่อนผิวหนังได้แก่ร้อยละจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (cell viability) และการวัดระดับสาร อินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา (IL-1α) (OECD, 2008)

เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มี 2 ชนิด คือ เซลล์ไฟโบรบลาสต์ และเซลล์เคอราติโนไซต์ ซึ่งเป็นเซลล์ผิวหนังที่พบมากที่สุดในผิวหนังชั้นหนังแท้และชั้นหนังกำพร้าตามลำดับ เครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบ คือ ระบบเอ็กเซลลิเจนซ์ (xCELLigence system) ซึ่งเป็นทางเลือกใหม่ในการวิเคราะห์เซลล์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเอ็มทีที ซึ่งเป็นวิธีที่วัดการอยู่รอดของเซลล์ ณ จุดสุดท้ายนั้น วิธีการวัดโดยระบบเอ็กเซลลิเจนซ์จะทำให้เห็นจุดที่เซลล์เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงได้ชัดเจนกว่า โดยในการทำงานระบบจะวัดความต้านทานที่เกิดขึ้น และแปลงสัญญาณจากความต้านทานไฟฟ้าที่เกิดขึ้นภายในถาดเลี้ยงเซลล์ โดยแรงต้านที่เกิดขึ้นแปรผันตามจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่เกาะอยู่ ทำให้สามารถติดตามผลการทดสอบแบบเวลาจริงได้อย่างแม่นยำและ

ต่อเนื่องหลังจากเซลล์สัมผัสสารได้ทุกช่วงเวลา ตั้งแต่เริ่มการสัมผัสสารไปจนครบเวลาทดสอบ ซึ่งวิธีการเอ็มทีทีจะวัดการอยู่รอดของเซลล์ที่จุดสิ้นสุดการทดสอบเท่านั้น นอกจากนี้ยังสามารถลดปัญหาเรื่องสีของสารทดสอบรบกวนในการวัดการมีชีวิตรอดของเซลล์แบบวิธีการเอ็มทีทีได้อีกด้วย โดยก่อนการทดสอบความเป็นพิษของสารได้มีการทดสอบรูปแบบการแบ่งตัวของเซลล์ทั้งสองเพื่อการกำหนดจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ค่าดัชนีเซลล์ที่เหมาะสม

ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นข้อมูลสำคัญของวัตถุดิบ ซึ่งจากการศึกษาทำให้ทราบถึงค่า IC_{50} ของแอนโทไซยานินในการทดสอบด้วยเซลล์เคอราติโนไซต์ และเซลล์ไฟโบรบลาสต์เท่ากับ 1.7 และ 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่า IC_{50} ของนาโนซีโอไลต์ในการทดสอบด้วยเซลล์เคอราติโนไซต์ และเซลล์ไฟโบรบลาสต์เท่ากับ 0.9 และ 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และค่า IC_{50} ของสารประกอบเชิงซ้อนในการทดสอบด้วยเซลล์เคอราติโนไซต์ และเซลล์ไฟโบรบลาสต์เท่ากับ 2.7 และ 1.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ นอกจากนี้ผลการทดสอบจากเซลล์ทั้งสองชนิดให้ผลเหมือนกัน คือ เมื่อสารทดสอบมีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นก็จะส่งผลเกิดพิษต่อเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงเพิ่มมากขึ้น

กลไกการตายของเซลล์นั้น พบว่านาโนซีโอไลต์นั้นทำให้เซลล์เคอราติโนไซต์ และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ตายด้วยกลไกอะพอพโทซิส ร้อยละ 51.49 และ21.9 ตามลำดับ ซึ่งไม่พบกลไกการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสเมื่อทดสอบด้วยแอนโทไซยานิน และเมื่อทดสอบด้วยสารประกอบเชิงซ้อนพบกลไกการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส ของเซลล์เคอราติโนไซต์ และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ร้อยละ 21.56 และ 13.72 ตามลำดับ จากผลการทดสอบจะเห็นว่านาโนซีโอไลต์นั้นมีพิษต่อเซลล์มากที่สุด เนื่องจากนาโนซีโอไลต์เป็นอนุภาคขนาดนาโน เมื่อทดสอบกับเซลล์ ทำให้นาโนซีโอไลต์เข้าไปคลุม และสัมผัสกับเยื่อหุ้มเซลล์โดยตรง ทำให้การทำงานของโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ทำงานไม่ได้ ทำให้เซลล์ลดการเจริญเติบโตและลดการแบ่งตัวเมื่อทดสอบด้วยนาโนซีโอไลต์ แต่เมื่อนาโนซีโอไลต์ดูดซับแอนโทไซยานินทำให้ความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้งสองชนิดลดลง เนื่องจากว่าแอนโทไซยานินไปมีผลลดความเป็นพิษจากนาโนซีโอไลต์ ทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตดีกว่าเมื่อสัมผัสเฉพาะนาโนซีโอไลต์ มีผลทำให้เซลล์สามารถที่จะเจริญเติบโต และแบ่งตัวได้มาก แสดงให้เห็นว่าเมื่อนำแอนโทไซยานินมากักเก็บในนาโนซีโอไลต์ทำให้ความเป็นพิษต่อเซลล์ของนาโนซีโอไลต์ลดลงได้

ผลการทดสอบความระคายเคืองต่อผิวหนังโดยวัดระดับการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา ของเซลล์ผิวหนังทั้งสองชนิด โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป (ELISA Development Kit) ซึ่งชุดทดสอบจะสามารถตรวจจับกับอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา โดยวัดหลังจากที่เซลล์รับสัมผัสสารทดสอบเป็นเวลา 15 นาที และ 48 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าการปลอดปล่อยระดับสารอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา ของทั้งสองเซลล์ เป็นไปในลักษณะพิษสัมพันธ์กับขนาด คือ เมื่อรับสัมผัสกับสารที่มีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น ระดับสารอินเตอร์ลิวคิน–1 แอลฟา ที่วัดได้ก็มีปริมาณที่มากขึ้นด้วย และยังพบว่าเซลล์เคอราติโนไซต์ มีการปลดปล่อยระดับสารอินเตอร์ลิวคิน–1 แอลฟามากกว่าในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เมื่อรับสัมผัสกับสารที่ความเข้มข้นเท่ากัน อาจจะเนื่องมาจากเซลล์เคอราติโนไซต์เป็นเซลล์ที่อยู่บนผิวหนังในชั้นหนังกำพร้า หน้าที่สำคัญของหนังกำพร้าคือเป็นด่านปกป้องสารหรือเชื้อจุลชีพรวมทั้งอนุภาคเข้าสู่ร่างกาย ทำให้การตอบสนองมากกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ซึ่งเป็นเซลล์ผิวหนังที่อยู่ในชั้นหนังแท้ที่ลึกลงไป

ในการทดสอบครั้งนี้ได้ใช้สารควบคุมเชิงบวก คือ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) เมื่อเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงได้รับสัมผัสกับโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต จะเห็นว่ามีการปลดปล่อยสารอินเตอร์ลิวคิน–1 แอลฟามากที่สุด เนื่องจากว่าสารโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต เป็นสารที่ก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง ทำให้เกิดการหลั่งสารอินเตอร์ลิวคิน–1 แอลฟา ออกมามากจากเซลล์ทั้งสองชนิด ผลการทดสอบด้วยแอนโทไซยานิน พบว่าเซลล์เคอราติโนไซต์ มีการหลั่งสารอินเตอร์ลิวคิน–1 แอลฟามากที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขึ้นไป แต่ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ไม่พบการระคายเคืองต่อเซลล์ของแอนโทไซยานิน เมื่อเซลล์รับสัมผัสกับสารเป็นเวลา 15 นาที

ผลการทดสอบด้วยนาโนซีโอไลต์ไม่พบความระคายเคืองต่อเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงทั้งสองชนิด แต่เมื่อทดสอบด้วยสารประกอบเชิงซ้อน กลับพบว่าที่ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบความระคายเคืองต่อเซลล์เคอราติโนไซต์ แต่ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ไม่พบความระคายเคือง เมื่อเซลล์สัมผัสกับสารเป็นเวลา 15 นาที

เมื่อเซลล์ทั้งสองชนิดรับสัมผัสสารเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเซลล์เคอราติโนไซต์ มีการหลั่งของอินเตอร์ลิวคิน–1 แอลฟามากขึ้นจนถึงระดับที่ก่อให้เกิดการระคายเคือง ในการทดสอบด้วยแอนโทไซยานินที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นาโนซีโอไลต์ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารประกอบเชิงซ้อนที่ความเข้มข้น 1, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่พบความระคายเคืองในเซลล์ไฟโบรบลาสต์เมื่อทดสอบด้วยสารทั้งสามชนิด

จากผลการทดสอบการระคายเคืองต่อเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง พบว่าเมื่อทดสอบด้วยนาโนซีโอไลต์เซลล์ผิวหนังเกิดการหลั่งของอินเตอร์ลิวคิน–1 แอลฟาน้อยที่สุด เมื่อเทียบกับการทดสอบด้วยแอนโทไซยานินและสารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งในการทดสอบการกัดกร่อนต่อผิวหนังกลับพบว่านาโนซีโอไลต์มีพิษต่อเซลล์ผิวหนังมากที่สุด อาจเป็นไปได้ว่านาโนซีโอไลต์ทำให้เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงตายไปก่อนที่จะเกิดการหลั่งอินเตอร์ลิวคิน–1 แอลฟา ทำให้ผลการทดสอบด้วยนาโนซีโอไลต์พบการหลั่งของอินเตอร์ลิวคิน–1 แอลฟาน้อยที่สุด หรืออาจเป็นไปได้ว่ารูพรุนของนาโนซีโอไลต์ดูดซับอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟาไว้ได้ ทำให้ไม่สามารถตรวจพบค่าที่แท้จริงได้

จากการศึกษาการดูดซับแอนโทไซยานินด้วยนาโนซีโอไลต์ พบว่าการดูดซับแอนโทไซยานินเป็นไปตามสมการของแลงเมียร์ ไอโซเทอร์ม ได้ทำการหาปริมาณของแอนโทไซยานินที่ถูกดูดซับในนาโนซีโอไลต์ ด้วยวิธีการโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง และอ่านผลด้วยเครื่องฟลูออเรสเซนท์ พบว่านาโนซีโอไลต์ 1 กรัม สามารถดูดซับแอนโทไซยานินได้ 0.1 กรัม และเมื่อได้นำไปทดสอบหาค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของแอนโทไซยานิน นาโนซีโอไลต์ และสารประกอบเชิงซ้อน ด้วยวิธีการโอแรคก็ทำให้สามารถยืนยันถึงความถูกต้องได้ เนื่องจากผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าแอนโทไซยานิน และสารประกอบเชิงซ้อนนั้น พบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยในแอนโทไซยานินมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารประกอบเชิงซ้อน และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารทั้งสองชนิด ก็พบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นด้วย และเมื่อทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของนาโนซีโอไลต์ พบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ต่ำมาก ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบเชิงซ้อนนั้น เกิดจากแอนโทไซยานินที่ถูกดูดซับในนาโนซีโอไลต์ และสามารถปลดปล่อย

แอนโทไซยานินที่ถูกดูดซับออกมาได้ โดยพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบเชิงซ้อนกับแอนโทไซยานินเดี่ยว ๆ เป็นไปในเชิงเส้นตรง

จากผลการศึกษาทำให้ทราบถึงช่วงความเข้มข้นที่ปลอดภัยที่ไม่ก่อให้เกิดพิษทางผิวหนัง และเป็นข้อพิจารณาในการเลือกความเข้มข้นของแอนโทไซยานิน นาโนซีโอไลต์ และสารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งการนำนาโนซีโอไลต์มาใช้ในการดูดซับสารสำคัญมีประโยชน์ในการนำไปพัฒนาตำรับที่จะนำมาใช้กับผิวหนัง แต่นาโนซีโอไลต์ก็มีความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง หากได้มีการนำไปศึกษาและพัฒนาปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสาร เพื่อทำให้พิษที่เกิดน้อยลงก็จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์พร้อมใช้ในรูปแบบอนุภาคนาโนต่อไปในอนาคต

การทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนังโดยเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงในการศึกษาครั้งนี้ ทดสอบโดยนำสารทดสอบสัมผัสกับเซลล์ผิวหนังโดยตรง โดยไม่ผ่านการซึมผ่านของชั้นผิวหนัง ซึ่งต่างจากแนวปฏิบัติที่องค์การเพื่อความร่วมมือทางเศรษฐกิจและการพัฒนา ได้กำหนดในการทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนังซึ่งกำหนดให้ใช้เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงที่ได้ที่เกิดการเปลี่ยนโครงสร้าง (differentiation) เป็นอวัยวะปกคลุมเต็มรูปคือมีเซลล์ชั้นสตราตัมคอร์เนียม (stratum corneum) ที่ไม่มีชีวิตและเซลล์ชั้นอื่น ๆ ของหนังกำพร้า (epidermis) ที่ยังมีชีวิตอยู่ แต่แหล่งของการจัดซื้อเซลล์ผิวหนังชนิดนี้อยู่ในทวีปอเมริกา และยังไม่สามารถจัดส่งเซลล์ข้ามทวีปโดยควบคุมให้เซลล์มีชีวิตและดำรงอยู่ในสภาพพร้อมใช้ในการทดสอบทันทีที่จัดส่งถึงปลายทางตามเงื่อนไขของการทดสอบ ดังนั้นการปฏิบัติตามแนวทาง แม้ว่าจะเป็นวิธีที่ดีแต่ยังเป็นไปไม่ได้ในทางปฏิบัติ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการศึกษาเพื่อพัฒนาวิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนัง (skin toxicity test) โดยใช้เซลล์ผิวหนัง โดยเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทดสอบประกอบด้วยเซลล์เคอราติโนไซต์ (keratinocyte cell) และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast cell) ซึ่งหากมีการนำไปศึกษาต่อเพิ่มเติมในส่วนของการซึมผ่านของสารในชั้นผิวหนังแล้วนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกัน จะเป็นแนวทางปฏิบัติในการทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนังที่สามารถนำมาทดแทนเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงตามที่องค์การเพื่อความร่วมมือทางเศรษฐกิจและการพัฒนากำหนดได้

การศึกษาความเป็นพิษในรูปแบบเวลาจริง (real time cell analysis) นับเป็นวิธีการที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในระหว่างที่มีการสัมผัสสารทดสอบ ทั้งการเปลี่ยนแปลงของการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation) เมื่อวิธีการนี้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาความเป็นพิษก็สามารถช่วยให้การสังเกตความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารทดสอบมีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น