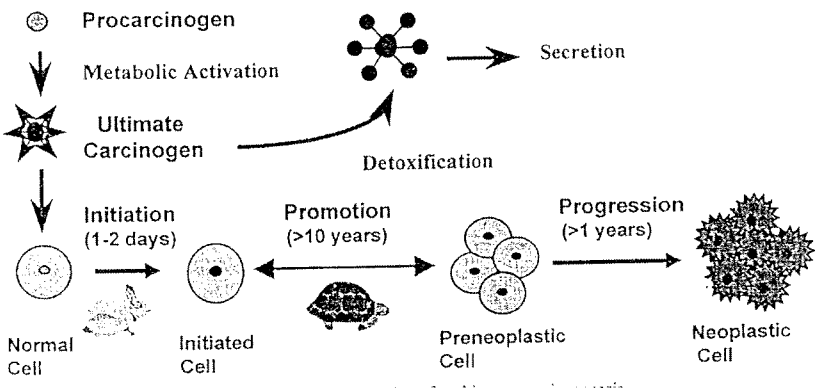
การทบทวนวรรณกรรม

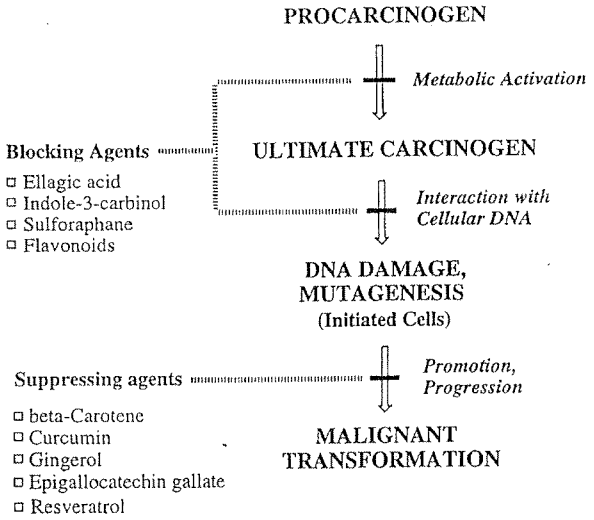
1. <u>การกลายพันธุ์และต้านการกลายพันธุ์</u>

1.1 <u>การกลายพันธุ์</u> (mutation) หมายถึงการที่ DNA ผิดปกติไปจากเดิม ทำให้มีการถอดรหัสผิดปกติ เป็นกระบวนการแรกที่สำคัญในกระบวนการเกิดมะเร็งจากสารเคมีก่อมะเร็ง ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเป็นการเกิดความผิดปกติต่อเบสบนสายของ DNA ทำให้เซลล์มีการแสดงออกเปลี่ยนไป เรียกว่า initiation ทำให้เซลล์เปลี่ยนเป็น initiated cell ขั้นตอนที่สอง หากมีสารเคมีหรือปัจจัยอื่นๆ มาทำให้เซลล์ที่เปลี่ยนเป็นเซลล์มะเร็ง เรียกขั้นตอนนี้ว่า promotion และขั้นตอนต่อมาอาจเกิด progression กลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด สารก่อกลายพันธุ์ (mutagen) อาจเป็นสารก่อมะเร็งได้โดยตรง หรือบางครั้งอาจต้องถูกเมตาโบไลซ์โดยเอนไซม์ที่ตับก่อน (รูปที่ 1)

1.2 <u>การต้านการกลายพันธุ์</u> สารที่ต้านการกลายพันธุ์อาจยับยั้งกระบวนการเกิดมะเร็งโดยสารเคมีและป้องกันมะเร็งได้ มีข้อมูลว่าพืชหลายชนิดสามารถต้านมะเร็งได้ เนื่องจากต้านการเปลี่ยนแปลง เป็นเซลล์มะเร็ง โดยอาจเป็น blocking agents เช่น ฟลาโวนอยด์, ellagic acid หรืออาจเป็น suppressing agents เช่น เบตาแคโรทีน, curcumin จากขมิ้นชัน, gingerol จากขิง, epigallocatechin gallate จากชาเขียว หรือ reveratrol จากเมล็ดองุ่น เป็นต้น (รูปที่ 2)



รูปที่ 1 ขั้นตอนการเกิดมะเร็ง



รูปที่ 2 สารสำคัญจากสมุนไพรที่มีผลยับยั้งการเกิดมะเร็ง

2. <u>การทดสอบการกลายพันธุ์และต้านการกลายพันธุ์</u>

การทดสอบเพื่อหาฤทธิ์ต้านมะเร็งนั้น มักเริ่มต้นทำการทดสอบคัดกรองที่ง่ายและสะดวกก่อนทดสอบในสัตว์ทดลองต่อไป และการทดสอบที่นิยม คือ การใช้แบคทีเรียที่พัฒนาขึ้นโดย Bruce Ames และคณะ(1973) ที่นิยมใช้ คือ *Salmonella typhimurium* ที่เปลี่ยนแปลงยีนให้เป็นชนิดที่ต้องการกรดอมิโน histidine ในการเจริญเติบโต และหากมีสารก่อกลายพันธุ์ (mutagen) มันจะถูกเปลี่ยนให้ไม่ต้องการ histidine ในการเจริญเติบโต เรียกว่า revertant colony เรียกวิธีนี้ว่า Bacterial mutation assay ต่อมา Matsushima และคณะ (1976) ได้ดัดแปลงวิธีการทดสอบโดยแบคทีเรียนี้ให้ใช้ทดสอบสารก่อมะเร็งที่ต้องถูกกระตุ้นในกระบวนการเมตาโบลิสมโดยเอนไซม์จากตับก่อน และเรียกว่า Preincubation bacterial mutation method โดยใช้เอนไซม์จากตับหนูในส่วน soluble fraction หรือเรียกสั้นๆ ว่า S-9 ซึ่งวิธีนี้นิยมใช้ในการทดสอบฤทธิ์กลายพันธุ์ของสารก่อมะเร็ง ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการเกิดมะเร็งในสัตว์ทดลอง และทำให้ค้นพบสารก่อมะเร็งมากมายในสิ่งแวดล้อม และอาหาร (Sugimura, 1988) บังอร ศรีพานิชกุลชัย และคณะ (2544) ได้ดัดแปลงวิธีดังกล่าวมาใช้ทดสอบฤทธิ์กลายพันธุ์ และต้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดสมุนไพร พบว่าสามารถทดสอบฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดลูกใต้ใบ (Sripanidkulchai et al, 2002) และสมุนไพรท้องถิ่นอีกหลายชนิด ได้แก่ ขมิ้นชัน, กระเทียม, ตะไคร้, ฟ้าทะลายโจร, ว่านหางจระเข้, หญ้าปักกิ่ง, คำฝอย, เปลือกมังคุด (บังอร ศรีพานิชกุลชัย และคณะ, 2544)

ดังนั้นการทดสอบฤทธิ์กลายพันธุ์จึงเป็นประโยชน์ในการให้ข้อมูลว่าสมุนไพรนั้นปลอดภัยไม่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการเกิดมะเร็ง และการทดสอบฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์นั้น จะให้ข้อมูลว่าสมุนไพรนั้น อาจมีศักยภาพในการต้านการเกิดมะเร็งได้

3. สารปรับภูมิคุ้มกันจากพืช

การรักษาแผนการแพทย์อายุรเวทมีแนวคิดเรื่องใช้การปรับภูมิคุ้มกันรักษาโรคโดยใช้วิธีกระตุ้นภูมิคุ้มกัน สำหรับกรณีใช้ยากดภูมิคุ้มกัน หรือใช้วิธีกดภูมิคุ้มกัน กรณีที่มีภูมิคุ้มกันมากเกินไป (Patwardhan *et al*., 1990) สารที่มีฤทธิ์ดังกล่าว เรียกว่า สารปรับภูมิคุ้มกัน (immunomodulatory agents) (Wagner, 1983) สารปรับภูมิคุ้มกันที่สังเคราะห์ขึ้น และรู้จักกันดีคือ cyclophosphamide ซึ่งมีผลต่อการแบ่งเซลล์ และกดภูมิคุ้มกัน เนื่องจากเป็น alkylating agent ยับยั้งการสังเคราะห์ DNA (Shand and Howard, 1979; Goodman, 1994) แต่มีอาการข้างเคียงอย่างรุนแรง (Hardman *et al*., 1996) จึงมีความสนใจศึกษาหาสารปรับภูมิคุ้มกันจากพืชมาใช้เพิ่มขึ้น ซึ่งได้มีรายงานไว้หลายชนิด เช่น *Withania somnifara* (L) Dunal (Solanaceae) เป็นพืชสมุนไพรที่ใช้ในแผนการแพทย์อายุรเวท สำหรับโรคหลายชนิด และใช้เป็นอาหารด้วย ก็มีผลต้านการกดภูมิคุ้มกัน โดย cyclophosphamide ในหนู (Agarwal *et al*., 1999) สารสกัดส่วน ฟลาโวนอยด์จาก *Tephrosia purpurea* L. (Leguminosae) มีผลยับยั้งการชักนำให้เกิดปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันที่เกิดจากเม็ดเลือดแดงแกะ (Damre *et al*., 2003) สารสกัดน้ำจาก *Tridax procumbens* Linn (Compositae) มีผลเพิ่มภูมิคุ้มกันทั้งชนิด HIR และ CMIR โดยเพิ่ม phagocytic index, เม็ดเลือดขาว, spleenic antibody secreting cells, heamagglutination antibody titer (Tiwari *et al*., 2004) เป็นต้น

การศึกษาฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันของพืชสมุนไพรมีรายงานไว้หลายชนิด เช่น Puri และคณะ(2000) รายงานว่าผลไม้แห้งจากพืชพื้นเมืองประเทศอินเดียที่อยู่ในวงศ์ Rosaceae, Anacardiacae, Nymphocaceae, Aracaceae และ Zingiberaceae การศึกษาโดย Smit และคณะ(2000) พบว่า Pierorhiza scrophulariflora ในวงศ์ Scrophulariaceae มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ Mathew และ Kuttan(1999) ได้รายงานว่าชิงช้าชาลีที่อยู่ในวงศ์ Minispermaceae มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันและลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง และยังมีพืชอีกหลายชนิดที่อยู่ในวงศ์ Meliaceae เช่น สะเดาอินเดีย (Azadirachta indica) และเลี่ยน (Melia azedarach) มีฤทธิ์ต้านระบบภูมิคุ้มกัน พืชในวงศ์อื่นๆ ที่เคยมีรายงานผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ วงศ์ Poaceae, Solanaceae, Ranunculaceae, Amaranthauae, Oleaceae และ Celastraceae (Courreges *et al*., 1994; Benencia *et al*., 1995;2000; Agarwal *et al*., 1999; Swamy and Tan, 2000; Pieroni *et al*., 2000; Duan *et al*., 2001) บังอร และคณะ(2551) ได้รายงานว่า สารสกัดจากพืชในพื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ คือ รสสุคนธ์ มะขามเครือ จานา และเร่วเสริมการออกฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันสารของ PHA โดยที่สารสกัดติ้วขนมีฤทธิ์ยับยั้ง และยังพบว่าสารสกัดมะขามเครือ จานา และรสสุคนธ์เสริมฤทธิ์ของ PWM ได้ด้วย

4. MTT assay

เป็นวิธีที่นิยมใช้หาความมีชีวิตของเซลล์ และใช้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ที่มีการนำมาใช้ศึกษาผลความเป็นพิษในเซลล์เพาะเลี้ยง เช่น HepG2 (Tully *et al.*, 2000) และเซลล์บุผิวจากปอดของหนูขาวที่ได้รับแคดเมียมคลอไรด์ (Hart *et al.*, 1999) ตลอดจนศึกษาหาความมีชีวิตของเซลล์โอลิโกเดนโดรไซต์ (Almazan *et al.*, 2000) MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide เป็นเกลือเตตราโซเลียมที่ละลายน้ำ ซึ่งสามารถถูกเปลี่ยนเป็นฟอร์มาซานที่มีสีม่วง และไม่ละลายน้ำ โดยเอนไซม์ซัคซิเนตดีไฮโดรจิเนสในไมโตรคอนเดรีย ทำให้วงแหวนเตตราโซเลี่ยมแตกออก ผลิตผลฟอร์มาซานที่เกิดขึ้น ไม่สามารถซึมผ่านเซลล์เมมเบรนจึงสะสมอยู่ในเซลล์ที่แข็งแรง ซึ่งวิธี MTT assay นี้ได้นำมาใช้ศึกษาเซลล์เพาะเลี้ยงหลายชนิด (Mossmann, 1983) และเป็นวิธีที่มีความไวสูงกว่าการใช้วิธีวัดการปลดปล่อยเอนไซม์แลคเตตดีไฮโดรจิเนส และการวัดปริมาณโปรตีน (Fotakis and Timbrell, 2006) จึงนิยมนำมาใช้ศึกษาหาความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพร หรือโลหะหนักต่อเซลล์เพาะเลี้ยงต่างๆ (Tiwari *et al.*, 2004; Tully *et al.*, 2000)