

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

“ศักยภาพของไมโรเอสโตรอลในการต้านการเหนี่ยวนำสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 1 เอ 1 โดยสารก่อมะเร็ง”

บทนำ

กวาวเครือขาว หรือ *Pueraria candollei* Wall. ex Benth. var *mirifica* (Airy Shaw & Suvat.) Niyomdham วงศ์ Leguminosae เป็นสมุนไพรไทยที่มีการใช้อย่างแพร่หลายและยาวนาน ตามตำรายาของหลวงอนุสรสุนทรใช้เป็นอายุวัฒนะได้ทั้งชายและหญิง หัวกวาวเครือขาวมีสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoids) เป็นองค์ประกอบหลัก โดยสารในกลุ่มโครเมน (chromenes) ได้แก่ ไมโรเอสโตรอล (miroestrol) มีฤทธิ์เป็นไฟโตเอสโตรเจนสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ แต่พบปริมาณน้อยมากในธรรมชาติ (0.002-0.004%) การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาจากสารสกัดกวาวเครือขาวพบว่า มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนในเซลล์เพาะเลี้ยงและสัตว์ทดลอง และมีผลป้องกันการสูญเสียกระดูกในหนูที่ตัดรังไข่ มีการศึกษาประสิทธิภาพและความปลอดภัยเพื่อนำมาใช้เป็นฮอร์โมนทดแทนในสตรีวัยทอง นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และเมื่อกล่าวถึงการใช้สมุนไพรทดแทนการใช้ยาแผนปัจจุบัน การศึกษาความเป็นพิษหรือกลไกการเปลี่ยนแปลงยาและสารทางชีวภาพ (drug metabolism or biotransformation) เป็นอีกกระบวนการหนึ่งที่สำคัญและจำเป็นต้องศึกษาควบคู่ไปกับการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ซึ่งปัจจุบันการศึกษาทางด้านพิษวิทยาและกลไกการเปลี่ยนแปลงยาและสารทางชีวภาพของกวาวเครือขาวตลอดจนสารในกลุ่มโครเมนนี้ยังมีอยู่น้อยมากและไม่ครอบคลุมถึงกลไกการออกฤทธิ์ เป็นเหตุให้ขาดข้อมูลการศึกษาทางด้านการแพทย์และเภสัชกรรมอย่างเป็นระบบที่ชัดเจนและเชื่อถือได้ที่จะสนับสนุนการนำสมุนไพรและยาในตำรับยาแผนโบราณมาใช้ประโยชน์จริงในทางคลินิก

เอนไซม์ไซโตโครม พี 450 เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่พบมากในเซลล์ตับ ทำหน้าที่หลักในการเปลี่ยนแปลงยา (drugs) และสารต่างๆ (xenobiotics) ที่ร่างกายได้รับให้อยู่ในสภาพหรือรูปแบบที่ร่างกายสามารถกำจัดออกได้โดยง่าย และมีความเป็นพิษต่อร่างกายลดลง เนื่องจากเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 จะมีอยู่ในปริมาณที่จำกัดในอวัยวะต่างๆ สำหรับสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่ง การได้รับยาหรือสารใดๆ เข้าสู่ร่างกายร่วมกันจึงมีผลต่อการถูกกำจัดของยาหรือสารต่างๆ เหล่านั้นนอกจากร่างกายโดยเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในเชิงสัมพัทธ์ทั้งในแง่ของปริมาณและอัตราเร็วในการกำจัด ผลิตภัณฑ์ที่มีความจำเป็นต้องบริโภคอย่างต่อเนื่องทั้งผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ยา และเครื่องดื่มต่างๆ ต้องได้รับการตรวจสอบให้ชัดเจนว่าไม่ก่อให้เกิดผลลัพธ์ต่อร่างกายในเชิงลบ การศึกษาผลของยาสมุนไพรรวมทั้งสารบริสุทธิ์จากสมุนไพรต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 เป็นการศึกษาทางด้านพิษวิทยาในระดับเซลล์และชีวโมเลกุลแขนงหนึ่งที่ยังไม่มีการรายงานอย่างชัดเจน และการศึกษายังไม่แพร่หลายเท่าที่ควรเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในยาแผนปัจจุบัน ดังนั้นเพื่อสามารถให้ข้อมูลเชิงวิทยาศาสตร์ของความปลอดภัย ตลอดจนผลการปฏิสัมพันธ์กันของยาตำรับสมุนไพรด้วยกันเองหรือต่อยาแผนปัจจุบันตำรับอื่นๆ ที่อาจได้รับร่วมด้วย และเพื่อเป็นแนวทางในการพิจารณาขนาดรับประทานที่ให้ผลการรักษาที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัยของตำรับยาต่างๆ ที่ให้ร่วมกัน

การศึกษาก่อนหน้าได้ยืนยันศักยภาพในการเป็นไฟโตเอสโตรเจนของไมโรเอสโตรลจากกวาวเครือขาว โดยการเพิ่มขนาดและน้ำหนักของ uterus ของหนูเมาส์เพศเมียได้เทียบเท่ากับเอสตราไดออลในปริมาณและระยะเวลาที่เท่ากันสอดคล้องกับรายงานอื่นๆ แล้ว ยังพบว่าไมโรเอสโตรลสามารถเหนี่ยวนำสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 2B9/10 ในหนูเมาส์ได้ในระดับที่ใกล้เคียงกับเอสตราไดออล นอกจากนี้ยังพบศักยภาพของไมโรเอสโตรลในการลดสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 1A2 ในหนูเมาส์ด้วย ดังนั้น การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นต่อยอดศึกษาศักยภาพของไมโรเอสโตรลในการต้านการเหนี่ยวนำเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ในเซลล์ตับโดยสารก่อมะเร็งต้นแบบเบต้าแนฟโทฟลาโวนเปรียบเทียบกับเอสตราไดออล เพื่อสนับสนุนข้อดีของไมโรเอสโตรลที่เหนือกว่าการใช้เอสตราไดออลในกรณีหวังผลการเป็นฮอร์โมนทดแทน (hormone replacement therapy) ในแง่ผลกระทบต่อกลไกการแปลงรูปของสารทางชีวภาพ เพื่อการแสดงศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาต่อไป ทั้งนี้เพื่อมุ่งหวังให้เกิดผลลัพธ์ที่สอดคล้องกับนโยบายสาธารณสุขมูลฐานของประเทศไทยและจะช่วยส่งเสริมการแพทย์ทางเลือกในกระบวนการพัฒนายาจากสมุนไพรทดแทนการใช้ยาแผนปัจจุบันได้ด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของไมโรเอสโตรลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของ reproductive organs ในหนูเมาส์เพศเมีย ตลอดจนน้ำหนักตัวและพฤติกรรมตามธรรมชาติทั่วไปที่ถูกเหนี่ยวนำโดยไมโรเอสโตรลเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสารก่อมะเร็งต้นแบบเบต้าแนฟโทฟลาโวน
2. เพื่อศึกษาศักยภาพของไมโรเอสโตรลในการต้านการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ที่เกี่ยวข้องโดยสารก่อมะเร็งต้นแบบเบต้าแนฟโทฟลาโวนในหนูเมาส์

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาศักยภาพของไมโรเอสโตรลในการต้านการเหนี่ยวนำสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 1 เอ 1 โดยสารก่อมะเร็งแบบในกาย ในหนูเมาส์ สายพันธุ์ ICR เพศเมีย วัยเจริญพันธุ์ โดยทำการศึกษาผลของไมโรเอสโตรลต่อลักษณะทางกายภาพของ uterus ตลอดจนน้ำหนักตัวและพฤติกรรมทั่วไปของหนูเมาส์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารก่อมะเร็งต้นแบบเบต้าแนฟโทฟลาโวน ตลอดจนผลต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 1A1, 1A2 และ 2B9/10 เปรียบเทียบกับหนูปกติและหนูที่ได้รับฮอร์โมนเพศสังเคราะห์เอสตราไดออล ซึ่งเป็นไปตามข้อเสนอโครงการที่ได้รับการเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยบรรณการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น รหัสอนุมัติ AEKKU27/2553

หนูเมาส์ถูกแบ่งโดยการสุ่มออกเป็น 8 กลุ่ม กลุ่ม ให้ได้รับสารดังต่อไปนี้ เอสตราไดออล (estradiol หรือ ES) ขนาด 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน หรือ ไมโรเอสโตรล (miroestrol หรือ Miro) ขนาด 0.5 และ 5.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน โดยการฉีดเข้าชั้นใต้ผิวหนัง (subcutaneous) วันละครั้ง ติดต่อกันทุกวัน เป็นระยะเวลา 7 วัน หรือได้รับร่วมกับเบต้าแนฟโทฟลาโวน (Beta-naphthoflavone หรือ BNF) ขนาด 30 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน โดยการฉีดเข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal) วันละครั้ง ติดต่อกันทุกวัน เป็นระยะเวลา 3 วัน หรือน้ำมันข้าวโพด (corn oil) ปริมาตร 0.1 มล./ตัว/วัน โดยการฉีดเข้าชั้นใต้ผิวหนัง วันละ

ครั้ง ติดต่อกันทุกวัน เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้น 24 ชั่วโมง ภายหลังการให้สารข้างต้นครั้งสุดท้ายทำการแยกตัวไปเก็บรักษาที่ -80 องศาเซลเซียสทันที เพื่อสกัดสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอทั้งหมด (Total RNA) ต่อไป

การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากตับหนูเมาส์โดยใช้สารละลาย Trizol ตามวิธีการของ Jarukamjorn et al., 2006 จากนั้นทำการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของตัวอย่างอาร์เอ็นเอ ก่อนนำไปตรวจวัดการแสดงออกของยีนที่ระดับทรานสคริปชัน ด้วยเทคนิค Real time RT-PCR

การวิเคราะห์การแสดงออกของ mRNA ที่ระดับทรานสคริปชันโดยการเปลี่ยน Total RNA เป็น cDNA ก่อนทำการเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจศึกษา ได้แก่ *Cyp1a1* และ *Cyp1a2* ด้วยเทคนิค Real time PCR โดยใช้ specific TaqMan[®] Gene Expression Assays (Inventory) สำหรับ *Cyp1a2* และ specific TaqMan[®] Gene Expression Detection kit สำหรับ *Cyp1a1* โดยมีลำดับฟอร์เวอร์สและรีเวอร์สไพร์เมอร์ และไพรเมอร์ตามลำดับ ดังนี้ 5'-GAC ATT TGA GAA GGG CCA CAT C-3', 5'-CCA AAG AGG TCC AAA ACA ATC G-3', และ 5'-FAM-CGA GAA TGC CAA TGT CCA GCT GTC A-TAMRA-3' และใช้ SYBR[®] Premix Ex TaqTM (Perfect Real Time) สำหรับ *Gapdh* โดยมีลำดับฟอร์เวอร์สและรีเวอร์สไพร์เมอร์ ตามลำดับ ดังนี้ 5'-TCC ACT CAC GGC AAA TTC AAC G-3' และ 5'-TAG ACT CCA CGA CAT ACT CAG C-3' แสดงผลการแสดงออกของยีน *Cyp1a1* หรือ *Cyp1a2* ที่ระดับทรานสคริปชัน เป็นค่าเฉลี่ยการแสดงออกสัมพันธ์ระหว่างยีนที่ศึกษากับ *Gapdh* จากตัวอย่างอาร์เอ็นเอเดียวกันจากปฏิกิริยาเดียวกัน

ผลการทดลองจะถูกวิเคราะห์และแสดงผลในรูปแบบของ ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD) ก่อนการทดสอบความแตกต่างทางสถิติภายในกลุ่มทดลองด้วย ANOVA และระหว่างกลุ่มทดลองด้วย Tukey *post hoc* test ค่าความแตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$ จะถูกรายงานผลเป็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการวิจัย

การศึกษานี้พบว่าไมโรเอสโทรลไม่มีผลต่อพฤติกรรมและลักษณะภายนอกทั่วไป ตลอดจนน้ำหนักตัวของหนูเมาส์ที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากเอสตราไดออลในสภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเบต้าแนฟโทพลาโวน แต่เป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งที่พบว่าไมโรเอสโทรลสามารถลดการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 1A1 และ 1A2 ในตับหนูเมาส์ในสภาวะที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเบต้าแนฟโทพลาโวนได้อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่เอสตราไดออลไม่สามารถให้ผลในเชิงบวกต่อยีนทั้งสอง ซึ่งเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 1A1 และ 1A2 เป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่หลักในการแปลงรูปสารจำพวก procarcinogen ที่พบได้ทั่วไปในชีวิตประจำวัน ได้แก่ ควินจากเครื่องยนต์ บุหรี่ อาหารปิ้งย่าง หรือมลพิษในสภาวะแวดล้อม ไปเป็นสารก่อมะเร็งที่มีฤทธิ์ (active carcinogen) ในขณะเดียวกันไมโรเอสโทรลไม่มีผลรบกวนสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 2B9/10 ในตับหนูเมาส์แตกต่างจากเอสตราไดออล ทั้งในสภาวะปกติและที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเบต้าแนฟโทพลาโวน จึงเป็นข้อมูลสนับสนุนข้อดีของการใช้ไมโรเอสโทรลที่เหนือกว่าเอสตราไดออล ในการลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งผ่านกลไกการแปลงรูปทางชีวภาพของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 1A1 และ 1A2 เนื่องจากสภาวะการดำรงชีวิตในปัจจุบันที่มีอาจหลีกเลี่ยงการสัมผัสกับสารกลุ่มสารประกอบอะโรมาติกเอมีนต่างๆ ได้แก่ ควินจากการประกอบอาหาร อาหารปิ้งย่าง หรือควินบุหรี่หรือท่อไอเสียเครื่องยนต์ หรือมลภาวะต่างๆ ซึ่งเป็นเหตุให้

เอนไซม์ไซโตโครม พี 450 1A1 และ 1A2 ได้รับการกระตุ้นอยู่โดยตลอดนั้น จึงจัดเป็นข้อได้เปรียบของการพิจารณาเลือกใช้กาวหรือพลาสติกเสริมอาหารที่มีไมโรเอสโตรอลเป็นส่วนประกอบในการแพทย์ทางเลือก ในลักษณะฮอร์โมนทดแทนในผู้มีภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจน (menopausal syndromes) แทนการใช้เอสตราไดออลในการแพทย์แผนปัจจุบันได้

ข้อเสนอด้านการวิจัย

จากผลการศึกษาที่พบว่าไมโรเอสโตรอลมีศักยภาพในการลดการแสดงออกของทั้งยีนและสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 1A1 และ 1A2 ในตับหนูเมาส์ในสถานะที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเบต้าแนฟโทฟลาโวนได้อย่างมีนัยสำคัญ จึงมีความจำเป็นและน่าสนใจเป็นอย่างยิ่งที่จะศึกษาต่อยอดถึงศักยภาพของไมโรเอสโตรอลในการต้านการเกิดมะเร็งที่สัมพันธ์กับวิถีเมแทบอลิซึมของฮอร์โมนเอสโตรเจนในตับหนูเมาส์เพศเมีย เพื่อให้ได้ข้อมูลยืนยันศักยภาพของไมโรเอสโตรอลในการใช้เป็นฮอร์โมนทดแทน ในแง่ของผลกระทบต่อกลไกการแปลงรูปของสารทางชีวภาพ (biotransformation) ที่เกี่ยวข้องกับกลไกของการเกิดมะเร็ง ทั้งในภาวะปกติและภาวะคุกคามของมะเร็ง ตลอดจนเป็นข้อมูลสนับสนุนข้อดีของไมโรเอสโตรอลที่เหนือกว่าฮอร์โมนเพศสังเคราะห์เอสตราไดออลในการพัฒนาเป็นยา เวชภัณฑ์ หรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เพื่อเป็นฮอร์โมนทดแทน (hormone replacement therapy) ในการแพทย์ทางเลือกที่สอดคล้องกับสภาพการดำรงชีวิตจริงต่อไป อันเป็นข้อมูลสนับสนุนการนำสมุนไพรและยาในตำรับยาแผนโบราณมาใช้ประโยชน์ และเป็นการส่งเสริมการแพทย์ทางเลือกในกระบวนการพัฒนายาจากสมุนไพรทดแทนการใช้ยาแผนปัจจุบันด้วยมุ่งหวังให้เกิดผลลัพธ์ที่สอดคล้องกับนโยบายสาธารณสุขมูลฐานของประเทศไทย