

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

ไมโรเอสโตรลและไดออกซีไมโรเอสโตรลในแคลลัสและเซลล์แขวนลอยเพาะเลี้ยงกาวเครือขาว

กาวเครือขาวเป็นสมุนไพรไทยที่มีการนำมาใช้และเป็นที่รู้จักมานานในด้านที่ใช้เป็นยาอายุวัฒนะ กาวเครือขาวได้จากพืชที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pueraria candollei* Wall. ex Benth. var. *mirifica* (Airy Shaw & Suwat.) Niyomdham จัดเป็นพืชในวงศ์ Leguminosae โดยพืชชนิดนี้จะพบมากในบริเวณป่าเบญจพรรณในภาคเหนือ ภาคตะวันตก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกาวเครือขาวคือ เป็นไม้เถาเลื้อยพาดพันต้นไม้ใหญ่ เถามีความยาวประมาณ 5 เมตร หัวมีลักษณะกลมอยู่ใต้ดินคล้ายหัวมันแกว หัวกาวเครือตามตำรายาของหลวงอนุสรสุนทร ใช้เป็นอายุวัฒนะได้ทั้งชายและหญิง ทำให้ผิวหนังที่เหี่ยวกลับมาเต่งตึง เสริมหน้าอก ทำให้เส้นผมดกดำ และ บำรุงเลือด จากรายงานการศึกษาพบว่าหัวกาวเครือขาวมีองค์ประกอบหลักเป็นสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoids) โดยแบ่งเป็น กลุ่ม isoflavones glycosides ได้แก่ puerarin, daidzin และ genistin กลุ่ม isoflavones ได้แก่ daidzein และ genistein กลุ่ม chromenes ได้แก่ miroestrol และ deoxymiroestrol ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์เป็นไฟโตเอสโตรเจน (phytoestrogen) หรือฮอร์โมนเอสโตรเจนจากพืช โดยสารในกลุ่ม chromenes เป็นกลุ่มที่มีฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ แต่พบปริมาณน้อยในธรรมชาติ (0.002-0.004%) จากการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาจากสารสกัดกาวเครือขาวพบว่า มีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนในเซลล์เพาะเลี้ยงและสัตว์ทดลองและมีผลในการป้องกันการสูญเสียกระดูกในหนูที่ดัดรังไข่ โดยมีการศึกษาถึงประสิทธิภาพและความปลอดภัยเพื่อนำมาใช้เป็นฮอร์โมนทดแทนในสตรีวัยทอง นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากรายงานการศึกษาพบว่า กาวเครือขาวที่ปลูกจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทยมีความแปรปรวนอย่างมากตามสภาวะแวดล้อมทำให้ปริมาณสารที่ได้นั้นไม่มีความแน่นอน

ปัจจุบันการศึกษาและประยุกต์งานทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ในเชิงอุตสาหกรรมกำลังเป็นที่แพร่หลาย สืบเนื่องมาจากความต้องการในการผลิตสารประกอบทุติยภูมิ (secondary metabolite) เพื่อที่จะนำไปศึกษาและใช้ในการผลิตเชิงอุตสาหกรรมไม่ว่าจะเป็นยาหรืออาหารเสริม การที่จะนำมาซึ่งสารปริมาณสูงย่อมจะต้องอาศัยกลวิธีที่รวดเร็วในการได้ผลผลิตสูง วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อผลิตสารทุติยภูมิโดยการเหนี่ยวนำให้เกิดแคลลัสและเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวในรูปแบบของเซลล์แขวนลอย เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการเพิ่มปริมาณของสารในพืชที่สนใจศึกษา เพื่อให้ได้สารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ในระยะเวลาอันสั้นเนื่องจากเซลล์แขวนลอยสามารถเจริญเติบโตได้อย่างต่อเนื่องและเพิ่มปริมาณการผลิตในถังเพาะเลี้ยงได้ รวมทั้งมีศักยภาพในการนำมาเพิ่มผลผลิตในการสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในพืช ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย รวมทั้งการหาปัจจัยที่เพิ่มศักยภาพในการสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางยาเข้ามาประยุกต์ใช้โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารกลุ่ม chromenes ได้แก่ miroestrol และ deoxymiroestrol ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ ที่พบในต้นกาวเครือขาว แม้ว่าจะมีการศึกษาวิจัยในหลายการศึกษาได้รายงานเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกาวเครือขาวทั้งในรูปแบบการเพาะเลี้ยงแคลลัส การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยรวมทั้งการเพาะเลี้ยงรากลอย จะเห็นได้ว่าการศึกษาดังกล่าวได้ทำการวิจัยเฉพาะผลของการเพาะเลี้ยงต่อการ

สร้างสารในกลุ่ม isoflavonoid ได้แก่ daidzin, puerarin, genistin, daidzein และ genistein (บุญส่ง หวังสินทวีกุล, 2546; สุตารัตน์ ถนนแก้ว, 2549; Thanonkeo, Panichajakul, 2006; Udomsuk *et al.*, 2009a; b; Boonsongcheep *et al.*, 2010; Korsangruang *et al.*, 2010) แต่ยังไม่มียางานการวิจัยใดมีข้อมูลของการศึกษาการเพาะเลี้ยงในรูปแบบแคลลัสและเซลล์แขวนลอยที่มีศักยภาพในการสร้างสาร miroestrol และ deoxymiroestrol รวมถึงการศึกษาปัจจัยต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงที่มีผลต่อการสร้างสาร miroestrol และ deoxymiroestrol ซึ่งปัจจัยที่ส่งผลต่อการสร้างในกลุ่มนี้อาจมีความแตกต่างจากการเพิ่มการสร้างสารในกลุ่ม isoflavonoid ส่วนหนึ่งอาจเนื่องมาจากสารดังกล่าวที่พบในพืชมีปริมาณที่ต่ำและไม่มีสารมาตรฐานที่จะนำมาใช้ในการหาปริมาณทั้งจากในหัวธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คณะผู้วิจัยได้ทำการสกัดแยกสาร miroestrol และ deoxymiroestrol จากรากกวาวเครือขาวเพื่อนำมาใช้ศึกษาและทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารทั้งสองชนิดด้วยวิธี HPLC โดยนำมาใช้ตรวจสอบปริมาณสารทั้งจากธรรมชาติและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และอยู่ในระหว่างการศึกษาปัจจัยต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงที่มีผลต่อการสร้างสารดังกล่าวจากรากของต้นกวาวเครือขาว ทำให้สามารถนำวิธีการวิเคราะห์ที่คณะผู้วิจัยพัฒนาขึ้นมาใช้ในการตรวจสอบปริมาณสาร miroestrol และ deoxymiroestrol จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในรูปแบบแคลลัสและเซลล์แขวนลอยได้

การศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นถึงการศึกษาเพื่อเพิ่มขีดความสามารถในการผลิตสาร miroestrol และ deoxymiroestrol ในแคลลัสและเซลล์แขวนลอย จากเซลล์เพาะเลี้ยงกวาวเครือขาวที่ตรวจสอบแล้วว่าสามารถสร้างสารกลุ่มนี้ได้ รวมถึงปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารกลุ่ม chromenes ซึ่งเป็นสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางยาของกวาวเครือขาว

วัตถุประสงค์ของการวิจัย ทำการเหนี่ยวนำกวาวเครือขาวให้เกิดแคลลัสที่สามารถผลิตสาร miroestrol และ deoxymiroestrol ได้ จากนั้นทำการคัดเลือกแคลลัสที่ผลิตสารได้ miroestrol และ deoxymiroestrol มาเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในอาหารเหลวและเพื่อศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสาร miroestrol และ deoxymiroestrol ในเซลล์แขวนลอยต้นกวาวเครือขาว ได้แก่ ผลของชนิดน้ำตาล ผลของสารกระตุ้นชนิดต่างๆ เป็นต้น

วิธีดำเนินการวิจัย ทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสและเซลล์แขวนลอยของต้นกวาวเครือขาวในอาหารเหลวที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ เพื่อให้ได้เซลล์แขวนลอยที่มีการเจริญเติบโตรวดเร็ว จากนั้นศึกษาศักยภาพในการผลิตสาร miroestrol และ deoxymiroestrol ของเซลล์แขวนลอยและศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการสร้างสาร ได้แก่ ผลของชนิดน้ำตาลที่เพาะเลี้ยงต่อการสร้างสาร ผลของสารกระตุ้นชนิดต่างๆ โดยจะทำการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบต่างๆ ในอาหารเพาะเลี้ยง และทำการตรวจสอบสาร miroestrol และ deoxymiroestrol ที่พบในแคลลัสและเซลล์แขวนลอยโดยวิธี HPLC

ผลการวิจัย เมื่อนำชิ้นส่วนใบและก้านของต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ดมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ วางบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่างๆ จำนวน 8 สูตร เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดแคลลัสเป็นเวลา 8 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงเป็นแคลลัสจากการศึกษาพบว่า สูตรอาหารทั้ง 8 สูตรสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นแคลลัสได้โดยแคลลัสที่ได้มีสีเขียวและสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ผลการศึกษาพบว่า แคลลัสที่ได้จากการเหนี่ยวนำโดยใช้ชิ้นส่วนของใบให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสอยู่ในช่วง 50-91 %

ในขณะที่แคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนก้านมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสอยู่ในช่วง 56-100% อัตราการเกิดยอดพบได้สูงสุด 9.38% ในแคลลัสที่เหนี่ยวนำจากส่วนก้านในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 0.5 mg/l และ NAA 1.0 mg/l และในแคลลัสที่ได้จากส่วนใบในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 0.5 mg/l, NAA 1.0 mg/l และ BA 0.5 mg/l

เมื่อทำการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสร้างสาร miroestrol และ deoxymiroestrol ในแคลลัสที่ได้จากการเหนี่ยวนำเป็นเวลา 8 สัปดาห์ (1st cycle) และแคลลัสที่ได้หลังจากย้ายลงอาหารใหม่ 4 สัปดาห์ (2nd cycle) พบว่า มีสูตรอาหารจากส่วนใบและลำต้นบางสูตรเท่านั้นที่สามารถผลิตสาร miroestrol และ deoxymiroestrol ได้ โดยมีแคลลัสในสูตรอาหารทั้งหมด 7 สูตรที่ตรวจพบสารกลุ่ม chromenes โดยสูตรอาหารที่ให้ปริมาณสารสูงสุดได้จากสูตรอาหารที่มีส่วนประกอบของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 0.1 mg/l, NAA 1 mg/l และ BA 0.5 mg/l และได้จากการเหนี่ยวนำส่วนของลำต้น มีปริมาณสาร miroestrol 82.40 ± 0.01 µg/g น้ำหนักแห้ง และ deoxymiroestrol 102.43 ± 0.01 µg/g น้ำหนักแห้ง คิดเป็นปริมาณสารกลุ่ม chromenes รวม 184.83 ± 20.09 µg/g น้ำหนักแห้ง แคลลัสที่ได้จากสูตรอาหารดังกล่าวได้นำไปทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

เมื่อทำการศึกษาผลของการเจริญเติบโตต่อการสร้างสาร พบว่า ลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยเริ่มมีการเจริญเป็นแบบ log phase ที่สัปดาห์ที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงและเจริญไปจนถึงสัปดาห์ที่ 3 ซึ่งเข้าสู่ช่วงปลายของ log phase โดยปริมาณเซลล์แขวนลอยสูงสุดพบที่สัปดาห์ที่ 3 มีน้ำหนักแห้งคิดเป็น 0.57 ± 0.05 g/ขวด หลังจากนั้นการเจริญเติบโตของเซลล์จะคงที่ เมื่อนำเซลล์แขวนลอยที่เลี้ยงไปหาปริมาณสารกลุ่ม chromenes พบว่า เซลล์เพาะเลี้ยงสามารถสร้างสารกลุ่ม chromenes เฉพาะ deoxymiroestrol เท่านั้น โดยไม่สามารถตรวจพบสาร miroestrol โดยการผลิตสาร deoxymiroestrol จะเริ่มมีการผลิตอย่างรวดเร็วในสัปดาห์ที่ 2 จนถึงสัปดาห์ที่ 4 โดยการผลิตสารทุกยี่งูมิในเซลล์เพาะเลี้ยงจะพบสูงสุดที่สัปดาห์ที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง พบการสร้างสาร deoxymiroestrol 45.06 ± 3.50 µg/g น้ำหนักแห้ง

เมื่อทำการศึกษาผลของชนิดของน้ำตาลต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสาร พบว่า น้ำตาล sucrose ให้น้ำหนักของเซลล์แขวนลอยสูงสุด คิดเป็น 0.56 ± 0.05 g/ขวด น้ำหนักแห้ง ส่วนปริมาณการสร้างสาร deoxymiroestrol พบได้สูงสุดในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีน้ำตาล fructose คิดเป็นปริมาณ 41.94 ± 4.90 µg/g น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

จากการศึกษาผลของสารกระตุ้นชนิดต่างๆ ต่อการผลิตสาร deoxymiroestrol แสดงให้เห็นว่าสาร methyl jasmonate ที่ความเข้มข้น 200 µM สามารถเพิ่มการสร้างสาร deoxymiroestrol ได้สูงสุดภายหลังจากเติมเป็นเวลา 3 วัน ได้ปริมาณสารเพิ่มเป็น 281.51 ± 16.28 µg/g น้ำหนักแห้ง ซึ่งเพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุม 3.2 เท่า ในขณะที่การเติมสารสกัดยีสต์ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml มีผลเพิ่มการสร้างสาร deoxymiroestrol อย่างมีนัยสำคัญภายหลังจากเติมสารกระตุ้น 1 วัน โดยพบว่า สารสกัดยีสต์สามารถเพิ่มการสร้างสารได้สูงสุดคิดเป็น 190.70 ± 27.30 µg/g น้ำหนักแห้ง สูงกว่ากลุ่มควบคุม 2.2 เท่า ส่วน chitosan ที่ความเข้มข้น 100 mg/l สามารถเพิ่มการสร้างสารกลุ่ม deoxymiroestrol ได้สูงสุดเป็น 160.48 ± 1.62 µg/g น้ำหนักแห้ง คิดเป็น 1.8 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่ม

ควบคุม จะเห็นได้ว่า การกระตุ้นด้วย methyl jasmonate ที่ความเข้มข้น 200 μM เป็นระยะเวลา 3 วัน สามารถเพิ่มการสร้างสาร deoxymiroestrol ได้สูงสุด เมื่อเทียบกับการใช้สารกระตุ้นชนิดอื่นๆ จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ปริมาณสาร deoxymiroestrol ที่ผลิตได้ภายหลังเติมสารกระตุ้นสูงกว่าปริมาณที่พบในรากกวาวเครือจากธรรมชาติ 18 เท่า ดังนั้น การเติม methyl jasmonate จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจในการเพิ่มการสร้างสาร deoxymiroestrol ในเซลล์แขวนลอยกวาวเครือขาว

ข้อเสนอแนะการวิจัย

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า แคลลัสและเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีศักยภาพในการสร้างสารที่มีฤทธิ์เป็นเอสโตรเจนจากการผลิตสารกลุ่ม chromenes ได้แก่ miroestrol และ deoxymiroestrol โดยปริมาณที่พบในการเพาะเลี้ยงสูงกว่าที่พบในหัวกวาวเครือขาวจากธรรมชาติ แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการนำมาผลิตในระดับที่สูงขึ้นโดยอาจทำการเพาะเลี้ยงในถังเพาะเลี้ยง (bioreactor) และนำผลการศึกษาจากการใช้สารกระตุ้นมาเพิ่มศักยภาพในการสร้างสาร deoxymiroestrol ในเซลล์แขวนลอยกวาวเครือขาวเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในถังเพาะเลี้ยง