

บทที่ 4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การเกิด endothelial dysfunction เป็นขั้นตอนแรกๆ ของการพัฒนาเป็นโรคหลอดเลือดแดงและหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) ในเวลาต่อมา การเกิด endothelial dysfunction มีลักษณะจำเพาะคือ มีชีวปริมาณออกฤทธิ์ (bioavailability) ของไนตริกออกไซด์ลดลง ปัจจัยเสี่ยงที่ส่งเสริมการเกิดโรคคือ ความดันโลหิตสูง ภาวะไขมันในเลือดสูง น้ำตาลในเลือดสูง และเป็นเบาหวาน ซึ่งปัจจัยเสี่ยงเหล่านี้จะนำไปสู่ภาวะ oxidative stress เร่งกระบวนการเกิดการอักเสบผ่านทาง adhesion molecules และ inflammatory cytokines และมีส่วนสำคัญในการทำลายเซลล์เยื่อหลอดเลือด และสัมพันธ์กับการลดลงของชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ ดังนั้น การป้องกันการทำลายหรือเร่งการซ่อมแซมเซลล์เยื่อหลอดเลือดจึงมีความสำคัญในการป้องกันการเกิดโรคหลอดเลือดแดงและหลอดเลือดแดงแข็ง ซึ่งจะนำไปสู่โรคหัวใจและหลอดเลือดต่อไปได้

ในปัจจุบัน นอกจากการฉายาในการบำบัดโรคแล้ว ยังมีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ เกี่ยวกับการใช้สมุนไพร หรือสารที่เป็นตัวต้านออกซิเดชันในการลดปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด โครงการวิจัยนี้ศึกษาฤทธิ์ของน้ำคั้นมะขามป้อมในด้านศักยภาพในการเป็นตัวต้านออกซิเดชัน และตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบที่มีฤทธิ์เป็นตัวต้านออกซิเดชัน ได้แก่ วิตามินซี และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด พบว่าน้ำคั้นมะขามป้อมเมื่อทำให้อยู่ในรูป freeze-dried powder มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันเมื่อศึกษาด้วยวิธี FRAP assay พบว่ามีค่า FRAP value ในเดือนที่ 0 เท่ากับ $3,643 \pm 192.5 \mu\text{mole/mg}$ และค่าไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเก็บผง freeze-dried ไว้ที่ 4°C เป็นเวลา 12 เดือน น้ำคั้นมะขามป้อมมีศักยภาพในการเป็นตัวต้านออกซิเดชันค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับสมุนไพรชนิดอื่นๆ ของไทยที่ เช่น ใบฝรั่ง (27) ขมิ้นชัน ใบหม่อน ดีปลี เป็นต้น (28) เมื่อวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดพบว่า น้ำคั้นมะขามป้อมในรูปผงแห้ง 1 mg มีค่าเทียบเท่ากับ gallic acid $0.361 \pm 0.007 \text{ mg}$ หรือเทียบเท่ากับ gallic acid 58.21 mg/mL เมื่อตรวจวัดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay และใช้สาร gallic acid เป็นมาตรฐาน และเมื่อเปรียบเทียบกับสมุนไพรชนิดอื่นๆ แล้วพบว่าสูงกว่าใบฝรั่ง (27) และสารสกัดเมทานอลของพืชอีก 10 ชนิดจากไนจีเรีย (29) สารอีกชนิดหนึ่งที่เป็นองค์ประกอบสำคัญที่ทำให้ น้ำคั้นมะขามป้อมออกฤทธิ์เป็นตัวต้านออกซิเดชัน คือ วิตามินซี หรือ ascorbic

acid ซึ่งพบในปริมาณสูงคือ $1.574\% \pm 0.046\%$ (w/w) เมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ ที่พบปริมาณ ascorbic acid สูงระหว่าง 1.1%-1.7% (w/w) (22)

ฤทธิ์เร่งการเจริญของเซลล์เป็นกลไกหนึ่งในกระบวนการสมานแผลและซ่อมแซมเซลล์ที่ถูกทำลาย ดังนั้น จึงทดสอบฤทธิ์ของน้ำคั้นมะขามป้อมต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์เยื่อหลอดเลือด พบว่าน้ำคั้นมะขามป้อมที่ความเข้มข้น $0.1 - 100 \mu\text{g/mL}$ ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ แต่ที่ความเข้มข้น $1000 \mu\text{g/mL}$ กลับทำให้เซลล์ลดจำนวนลงอย่างมีนัยสำคัญ เหลือเซลล์รอดชีวิตประมาณ 62% ($p < 0.05$) แสดงถึงความเป็นพิษของมะขามป้อมเมื่อใช้ในขนาดสูง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่ผ่านมาที่แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากผลมะขามป้อมมีฤทธิ์ทำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ osteoclasts ที่ความเข้มข้น $50 \mu\text{g/mL}$ (30), ในเซลล์มะเร็งของมนุษย์ชนิด Dalton's Lymphoma Ascites (DLA) และ CeHa cell lines ที่ความเข้มข้น $200 \mu\text{g/mL}$ (31)

การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการสมานแผลด้วยวิธี scratch wound closure assay พบว่า มะขามป้อมที่ความเข้มข้น $0.1 \mu\text{g/mL}$ มีฤทธิ์กระตุ้นการสมานแผล และกระตุ้นการเกิด sprouting ได้ดีที่สุด และใกล้เคียงกับการใช้ vascular endothelial growth factor (VEGF) ที่ความเข้มข้น 50 ng/mL กลไกของ VEGF ในการเร่งการสมานแผล คือ การเร่งการแบ่งตัวของเซลล์และการเพิ่มการเคลื่อนย้ายเซลล์ไปในพื้นที่ที่เซลล์ถูกทำลาย (32) แต่มะขามป้อมที่ความเข้มข้นสูงตั้งแต่ $10 \mu\text{g/mL}$ ขึ้นไป ให้ผลยับยั้งการสมานแผล ซึ่งอาจเป็นผลมาจากปริมาณวิตามินซีที่เป็นองค์ประกอบ จากการศึกษาของ Mikirova และคณะ (33) พบว่า วิตามินซีในปริมาณสูง 3 mg/mL ยับยั้งการสร้างหลอดเลือด ทดสอบโดยการเกิด tube formation และที่ความเข้มข้น $10-20 \text{ mg/mL}$ ลดการเกิด cell migration ได้ 50-60% ที่เวลา 8 ชั่วโมง กลไกการเร่งการสมานแผลน่าจะเกิดจากการเพิ่ม cell migration แต่ไม่ได้เกิดจากการเพิ่มจำนวนเซลล์เนื่องจากมะขามป้อมในความเข้มข้นที่ให้ผลเร่งสมานแผล ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการแบ่งเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ และไม่น่าจะเกิดจากการกระตุ้นด้วย VEGF เนื่องจากการวัดปริมาณ VEGF ไม่เห็นผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และ ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน VEGF เมื่อให้มะขามป้อมในความเข้มข้นที่ให้ผลดีต่อการเกิดการสมานแผล ($0.1 \mu\text{g/mL}$) แต่การให้มะขามป้อมในปริมาณสูง กลับให้ผลในทางตรงกันข้าม คือ ลดการแสดงออกของยีน VEGF ซึ่งอาจสอดคล้องกับการให้วิตามินซีในปริมาณที่สูงขึ้นตามสัดส่วนที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในมะขามป้อม และการศึกษาที่ผ่านมาที่แสดงให้เห็นว่า วิตามินซีในปริมาณสูงสามารถลดการแสดงออกของยีน VEGF ได้ (34) อย่างไรก็ตาม ปริมาณ และระยะเวลาของการได้รับวิตามินซีมี

ความสำคัญมากต่อทิศทางของการส่งสัญญาณกระตุ้นหรือยับยั้งการงอกหลอดเลือดใหม่ เช่น การให้วิตามินซี 1 กรัม/วัน ในหนูน้ำหนัก 50-60 กก. เป็นเวลา 12 สัปดาห์ กระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่ที่โต และการทดลองใน HUVEC แสดงให้เห็นว่า วิตามินซีที่ความเข้มข้นต่ำกระตุ้นการงอกของหลอดเลือด และการแสดงออกของ VEGF แต่ในทางตรงกันข้าม วิตามินซีที่ความเข้มข้นสูง จะยับยั้งการเกิด angiogenesis เมื่อทดสอบแบบ in vitro ซึ่งการตอบสนองในลักษณะ biphasic ขึ้นกับความสมดุลของสภาวะรีดอกซ์ภายในเซลล์ (35)

การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการงอกของหลอดเลือดใหม่ด้วยวิธี endothelial sprouting assay พบว่า มะขามป้อมที่ความเข้มข้น 0.1 µg/mL เพิ่มการเกิด endothelial sprouting ได้ดีที่สุด ซึ่งเป็นความเข้มข้นเดียวกันที่ให้ผลดีในการสมานแผลเซลล์เยื่อหลอดเลือด เมื่อให้มะขามป้อมที่ความเข้มข้น 10 µg/mL ไม่พบความเปลี่ยนแปลงของการเกิด endothelial sprouting เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ปริมาณมะขามป้อมอาจมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลง redox status ของเซลล์เยื่อหลอดเลือด ซึ่งสัมพันธ์กับการเกิด angiogenesis ในสภาวะที่ไม่มี growth factor มาเหนี่ยวนำ

กล่าวโดยสรุปคือ การทำหน้าที่ผิดปกติของเซลล์เยื่อหลอดเลือด (endothelial dysfunction) รวมทั้งการเกิด endothelial damage เป็นปัจจัยเสี่ยงอันหนึ่งที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพของโรคหัวใจและหลอดเลือด การให้สารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและกระตุ้นการเจริญหรือเร่งการสมานแผลที่อาจเกิดขึ้นได้จากภาวะ oxidative stress จึงมีประโยชน์ในการสร้างเสริมสุขภาพของเซลล์เยื่อหลอดเลือด และป้องกันการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดได้ โครงการวิจัยนี้ได้ทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของน้ำคั้นจากผลมะขามป้อม ซึ่งพบว่ามีคุณสมบัติการเป็นตัวต้านออกซิเดชัน และเมื่อให้ในปริมาณต่ำสามารถเร่งการสมานแผลของเซลล์เยื่อหลอดเลือด และเพิ่มการเกิด endothelial sprouting ซึ่งบ่งบอกถึงความสามารถในการงอกหลอดเลือดใหม่ แต่การให้ในปริมาณสูงทำให้เกิดผลตรงกันข้าม ดังนั้น การนำสมุนไพรมะขามป้อมไปศึกษาต่อยอดหรือประยุกต์ใช้ควรคำนึงถึงปริมาณที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาตามที่พึงประสงค์