

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตนั้นได้มีกลไกการป้องกันอันตรายจากสภาวะเครียดโดยเอนไซม์ที่มีความสำคัญและเกี่ยวข้องด้วยเป็นอย่างมากคือเอนไซม์เฟส 2 ซึ่งถือว่าเป็นกลไกสำคัญที่ใช้ป้องกันอันตรายจากสารเคมีหรือสภาวะเครียด อีกทั้งยังสามารถเหนี่ยวนำให้สร้างได้จากสารธรรมชาติหรือสารที่สังเคราะห์ขึ้น พืชหลายชนิดที่พบได้ในพืชสมุนไพรหรือพืชที่ใช้เป็นอาหารมีความสามารถที่จะเหนี่ยวนำเอนไซม์เฟส 2 ได้นอกจากนี้จากการวิจัยพบว่า การรับประทานอาหารประเภทผักและผลไม้สามารถลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งซึ่งมีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระ พืชเคมีที่นิยมรับประทานและทราบฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์เช่น เคอร์คูมินจากขมิ้น (Scapagnini et al. 2002., Balogun et al., 2003, Jeong et al., 2009) caffeic acid phenethyl ester (Scapagnini et al. 2002.) และ carnosol (Martin et al., 2009) สารเหล่านี้สามารถที่จะเหนี่ยวนำเอนไซม์ ซีมออกซีจีเนส 1 ได้ เอนไซม์นี้มีหน้าที่ในการกำจัดซีมซึ่งเป็นสารที่สร้างอนุมูลอิสระทำลายเซลล์การเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์นี้จึงเป็นประโยชน์ในการกำจัดอนุมูลอิสระเพื่อป้องกันโรคอันมีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระ จากงานวิจัยข้างต้นจึงมีความสนใจที่จะนำพืชเคมีโดยคัดเลือกกรดคาเฟอิก ซึ่งจัดเป็นสารกลุ่มฟีนอลิกมีสมบัติที่ดีในการต้านอนุมูลอิสระ มาเปลี่ยนแปลงโครงสร้างให้อยู่ในรูปของอนุพันธ์เอสเทอร์และเอไมด์และทดสอบฤทธิ์เหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์เอนไซม์ ซีมออกซีจีเนส 1 โดยใช้เซลล์ Hep G2 และศึกษาผลของกรดคาเฟอิกและอนุพันธ์ต่อเอนไซม์เอนไซม์ ซีมออกซีจีเนส 1 ในหลอดทดลองโดยใช้ไมโครโซมที่ปั่นแยกจากตับหนูเป็นแหล่งเอนไซม์เอนไซม์ ซีมออกซีจีเนส 1 และโปรเวอรติน รีดักเทส โดยศึกษาถึงผลของหมู่ฟังก์ชันต่อการเหนี่ยวนำเอนไซม์เอนไซม์ ซีมออกซีจีเนส 1

จากการศึกษาผลของกรดคาเฟอิกและอนุพันธ์ในการเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ซีมออกซีจีเนส ในเซลล์เพาะเลี้ยง Hep G2 พบว่ากรดคาเฟอิกและอนุพันธ์มีความสามารถเหนี่ยวนำเอนไซม์เอนไซม์ ซีมออกซีจีเนส 1 ได้มากกว่าเคอร์คูมินซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำเอนไซม์ ซีมออกซีจีเนส 1 จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าหมู่ไฮดรอกซิลในตำแหน่งออริโอที่อยู่ในวงแหวนเบนซินนั้นสามารถเพิ่มศักยภาพในการเหนี่ยวนำเอนไซม์ ซีมออกซีจีเนส 1 (Foresti et al., 2005) เมื่อพิจารณาโครงสร้างของกรดคาเฟอิกและอนุพันธ์ภายในโครงสร้างนั้นมีหมู่ไฮดรอก

ซิลตรงตำแหน่งออร์โธแต่ว่าเคอร์คูมินไม่มีหมู่ไฮดรอกซิล นี่อาจจะเป็นสาเหตุที่กรดคาเฟอิกและอนุพันธ์สามารถเหนี่ยวนำเอนไซม์ ฮีโมออกซีจีเนส 1 ได้ดีกว่าเคอร์คูมิน

ในการวิจัยครั้งนี้ได้เปรียบเทียบความสามารถในการเหนี่ยวนำเอนไซม์ ฮีโมออกซีจีเนส 1 ของหมู่ฟังก์ชันระหว่างเอสเทอร์กับเอไมด์พบว่าอนุพันธ์เอสเทอร์มีความสามารถในการเหนี่ยวนำเอนไซม์ ฮีโมออกซีจีเนส- 1 ได้ดีกว่าอนุพันธ์เอไมด์ อนุพันธ์ที่อยู่ในรูปเอสเทอร์นั้นสลายตัวได้ง่ายกลายเป็น กรดคาเฟอิกและแอลกอฮอล์ (Celli et al., 2007., Lee et al., 2007, Wang et al., 2007., Rajan et al., 2001) เอนไซม์ ฮีโมออกซีจีเนส 1 นั้นถูกเหนี่ยวนำด้วยแอลกอฮอล์ สารที่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ไตรเทอร์ปีนอยด์ และไลโปโพลีแซ็กคาไรด์ (Drechsler et al., 2006, Hsu et al., 2008) การทดสอบการเหนี่ยวนำเอนไซม์ ฮีโมออกซีจีเนส 1 ด้วยอนุพันธ์เอสเทอร์นั้นสามารถเหนี่ยวนำเอนไซม์ด้วยอนุพันธ์เอสเทอร์ กรดคาเฟอิก และ แอลกอฮอล์แต่อนุพันธ์เอไมด์เป็นอนุพันธ์ที่มีความเสถียรมากกว่าเอสเทอร์จึงทำให้มีสารที่ไปกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ ฮีโมออกซีจีเนส- 1 น้อยกว่าอนุพันธ์เอสเทอร์และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างอะลิฟาติกและอะโรมาติกพบว่าโครงสร้างของอนุพันธ์กรดคาเฟอิกที่มีสายคาร์บอนยาวนั้นมีสมบัติแทรกเข้าไปในเซลล์เมมเบรนได้ดีกว่าสายคาร์บอนสั้นดังนั้นสารที่เข้าสู่เซลล์ได้ง่ายกว่าจึงเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ ฮีโมออกซีจีเนส 1 ได้ดีกว่า (Ardhaouia et al, 2004)

Nrf-2 เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน ฮีโมออกซีจีเนส 1 ผ่านกลไกที่ซับซ้อนในภาวะปกติของร่างกาย Nrf-2 จะจับกับ Keap-1 ในไซโทพลาสซึมทำให้ไม่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการผลิตเอนไซม์เฟส2 แต่เมื่อมีภาวะเครียดหรือได้รับสารที่มีคุณสมบัติต้านออกซิเดชันสารเหล่านี้จะทำลายพันธะซัลไฮดริลที่ยึด Nrf-2 และ Keap-1 ไว้ด้วยกันทำให้ Nrf-2 หลุดออกเป็นอิสระจากนั้นก็แพร่เข้าสู่นิวเคลียสเพื่อไปกระตุ้นการสร้างเอนไซม์เฟส 2 จากการศึกษาของ Wang และคณะ (2008,2010) โดยใช้สาร caffeic acid phenethyl ester (CAPE) ในการศึกษาครั้งนี้คือสาร PAL กลไกของ PAL นั้นน่าจะไปรบกวนสารประกอบ Nrf-2- Keap 1 ทำให้เพิ่มปริมาณของ Nrf-2 ซึ่งจะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอในส่วนที่เรียกว่า ARE ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการสร้าง mRNA ของเอนไซม์ ฮีโมออกซีจีเนส 1 (Balogun et al., 2003) ผู้วิจัยคาดว่าอนุพันธ์ของกรดคาเฟอิกตัวอื่นๆอาจมีกลไกการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ ฮีโมออกซีจีเนส 1 ในกลไกเดียวกันเพราะเนื่องจากว่าสารเหล่านี้มีโครงสร้างโมเลกุลที่ใกล้เคียงกัน และกลไกเหล่านี้ก็ต้องทำการพิสูจน์กันต่อไป

เมื่อพิจารณาผลการทดลองระหว่างเซลล์ Hep G2 กับการใช้ไมโครโชมจากตับหนูพบว่าผลการทดลองนั้นตรงกันข้ามกันโดยการทดลองในเซลล์จะกระตุ้นแอกติวิตีเอนไซม์ ฮีโมออกซีจีเนส 1 แต่การทดสอบในหลอดทดลองโดยใช้เอนไซม์จากตับหนูกลับยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ฮีโมออกซีจีเนส 1 โดยกลไกการยับยั้งนั้นเป็น

แบบแข่งขันไม่สมบูรณ์ กลไกการยับยั้งในหลอดทดลองนั้นอาจเนื่องจากกรดคาเฟอิกและอนุพันธ์มีสมบัติเป็น สารต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน และมีสมบัติเป็นรีดิวซิงเอเจนต์ (reducing agent) สมบัติเหล่านี้ อาจรีดิวซ์เหล็กจาก Fe^{3+} เป็น Fe^{2+} ทำให้การทำงานของฮีโมออกซีจีเนส 1 สูญเสียไปส่งผลให้แอกติวิตีของ เอนไซม์ถูกยับยั้งไปด้วย และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดคาเฟอิกและอนุพันธ์พบว่าแอกติวิตีลดลงด้วยเช่นกัน กลไกการยับยั้งเชิงโมเลกุลควรได้รับการศึกษากันต่อไปเพื่อนำไปใช้ป้องกันการเกิดโรคต่างๆอันเกิดจากอนุมูล อิสระ