บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดจากเปลือกของกระแจะ *(Hesperethusa crenulata)* ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH, ความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกจากผิวหนังมนุษย์, ผลของสารสกัดต่อการกระตุ้นการสร้าง type I procollagen และการผลิตเอนไซม์ MMP-1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกได้จากผิวหนังบริเวณที่มีริ้วรอยและถูกกระตุ้นด้วยแสง UV (UVB-irradiated fibroblasts from wrinkles) และผลของสารสกัดต่อการฟื้นฟูศักยภาพในการจัดระเบียบ (reorganization) เส้นใย collagen และการหดตัว (contraction) ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกได้จากผิวหนังบริเวณที่มีริ้วรอย

สำหรับการควบคุมคุณภาพของสารสกัด ในงานวิจัยนี้ได้ทำการแยกสารสำคัญที่มีในสารสกัดโดยวิธี column chromatography ซึ่งใช้ hexane และ ethyl acetate ในอัตราส่วน 50:50 เป็น mobile phase นำสารที่ได้มาตรวจสอบด้วย TLC ได้ผลดังรูปที่ 1 คือสามารถมองเห็นที่ภายใต้ UV 366 nm เพียงจุดเดียว แสดงให้เห็นว่าสารที่ได้มีสารชนิดเดียว จากนั้นนำไปวิเคราะห์เพื่อหาโครงสร้างโดยวิธี NMR ผลจาก NMR แสดงให้เห็นดังรูปที่ 2 แต่จากการวิเคราะห์พบว่า สารยังไม่บริสุทธิ์เพียงพอที่จะแปรผลเป็นโครงสร้างของสาร การควบคุมคุณภาพของสารสกัดใช้วิธีวิเคราะห์คือ HPLC โดยใช้น้ำและ acetonitrile ในอัตราส่วน 50:50 โครมาโตแกรมของสารสกัดแสดงดังรูปที่ 3 แต่สำหรับสารสำคัญเนื่องจากสารที่แยกได้ยังไม่มีความบริสุทธิ์มากพอ จึงยังไม่ได้นำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC

จากนั้นสารสกัดถูกนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH หลักการของวิธีนี้คือ DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่มีความคงตัว เป็นสารละลายสีม่วง ถ้าสารสกัดมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH จะถูกเปลี่ยนไปอยู่ในรูปรีดิวซ์และสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง โดยในการทดลองนี้ ค่าการดูดกลืนแสงจะถูกคำนวณให้อยู่ในรูป % free radical scavenging ดังสมการ

$$([(A_{control} - A_{sample})/A_{control}] \times 100\%)$$

ความสามารถในการยับยั้งของสารสกัดจากเปลือกกระแจะแสดงดังตารางที่ 1 คือสารสกัดจากเปลือกกระแจะที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลอง คือ 1666.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร(เนื่องจากความสามารถในการละลายของสารสกัด) สามารถยับยั้งได้ประมาณ 55 เปอร์เซ็นต์ และสามารถหาค่า

EC_{50} ได้เท่ากับ 316.5667 ± 52.94 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการทดลองนี้ได้ทดสอบเปรียบเทียบกับสารที่มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่เป็นที่รู้จัก ได้แก่วิตะมินซี ซึ่งความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของวิตะมินซีแสดงดังตารางที่ 2 คือ วิตะมินซีที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลอง คือ 333.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งได้ประมาณ 87 เปอร์เซ็นต์และสามารถหาค่า EC_{50} ได้เท่ากับ 4.7437 ± 0.45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การศึกษาผลของสารสกัดต่อการกระตุ้นการเพิ่มจำนวน (proliferation) ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกได้จากผิวหนังมนุษย์บริเวณที่เป็นริ้วรอย โดยวิธี XTT ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้วัดจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ โดยอาศัยหลักการที่ว่าเซลล์ที่มีชีวิตจะปลดปล่อยเอนไซม์ที่สามารถรีดิวซ์ (reduce) สาร XTT ไปเป็นสารสีส้มที่มีคุณสมบัติละลายได้ในน้ำ โดยปรับให้ค่าการดูดกลืนตัวแสงที่วัดได้จากตัวอย่างที่เซลล์ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ มีเปอร์เซ็นต์ที่เซลล์มีชีวิตอยู่ (% cell viability) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้รูปร่างของเซลล์ (cell morphology) ที่มีชีวิตอยู่จะถูกประเมินด้วยสายตาผ่านกล้องจุลทรรศน์ เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่มีชีวิตอยู่เมื่อได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆแสดงดังตารางที่ 3 พบว่าหลังจากเซลล์ได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ (ในการศึกษานี้ใช้ความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 100 μg/ml) เปอร์เซ็นต์ที่เซลล์มีชีวิตไม่แตกต่างจากเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัด นอกจากนี้รูปร่างของเซลล์หลังได้รับสารสกัดแสดงดังรูปที่ 6 พบว่ารูปร่างของเซลล์ไม่แตกต่างจากเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัด

การศึกษาผลของสารสกัดต่อการกระตุ้นการสร้าง type I procollagen และการผลิตเอนไซม์ MMP-1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกได้จากผิวหนังบริเวณที่มีริ้วรอยและถูกกระตุ้นด้วยแสง UVB (UVB-irradiated fibroblasts from wrinkles) ในการศึกษานี้จะทดสอบความสามารถของสารสกัดในการป้องกันเซลล์ก่อนได้รับรังสี UVB คือเซลล์จะได้รับสารสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนได้รับ UVB หลังจากได้รับ UVB เราจะเก็บ supernatant ที่ 4 และ 24 ชั่วโมงเนื่องจากการสังเคราะห์โปรตีนหลังได้รับรังสียูวีจะเริ่มที่ 1 ชั่วโมงและมากที่สุดที่ 4 ชั่วโมง ส่วนที่ 24 ชั่วโมงจะดูการฟื้นตัวของเซลล์หลังได้รับรังสียูวี กล่าวคือเมื่อได้รับรังสียูวีเซลล์จะถูกกระตุ้นให้ผลิตเอนไซม์ MMP-1 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำลายคอลลาเจน และจะก่อให้เกิดการยับยั้งการผลิต type I procollagen ดังนั้น ณ เวลา 4 ชั่วโมงจะเห็นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย UVB และที่ 24 ชั่วโมงถ้าเซลล์สามารถกลับคืนสู่สภาวะปกติปริมาณโปรตีนจะต้องใกล้เคียงกับเซลล์ที่ไม่ได้รับรังสี UVB หรือถ้าสารสกัดมีคุณสมบัติในการ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ช่วยฟื้นตัวต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ปริมาณ MMP-1 ของเซลล์ที่ได้รับสารสกัดและ UVB ก็จะน้อยกว่าของเซลล์ที่ไม่ได้รับ UVB ส่วนปริมาณ type I procollagen ของเซลล์ที่ได้รับสาสกัดและ UVB ก็จะต้องมากกว่าเซลล์ที่ไม่ได้รับ UVB ผลของการทดลองนี้ ปริมาณของ type I procollagen หลังได้รับสารสกัดและได้รับ UVB แสดงดังตารางที่ 4 และแสดงในรูปกราฟแท่ง ดังรูปที่ 7 สำหรับปริมาณของ type I procollagen หลังได้รับ UVB เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และรูปที่ 8 สำหรับปริมาณของ type I procollagen หลังได้รับ UVB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าที่ 4 ชั่วโมง ปริมาณของ type I procollagen ไม่แตกต่างกันทั้งที่ไม่ได้รับสารสกัดและไม่ได้รับ UVB, ไม่ได้รับสารสกัดแต่ได้รับ UVB, ได้รับสารสกัดหรือวิตะมินซีและได้รับ UVB ส่วนที่ 24 ชั่วโมงพบว่าปริมาณของ type I procollagen ในเซลล์ที่ได้รับสารสกัดหรือวิตะมินซีและได้รับ UVB มีปริมาณมากกว่าในเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัดและไม่ได้รับ UVB และไม่ได้รับสารสกัดแต่ได้รับ UVB สามารถกล่าวได้ว่าสารสกัดจากเปลือกกระแจะสามารถช่วยกระตุ้นการผลิต type I procollagen ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้ ปริมาณของ MMP-1 หลังได้รับสารสกัดและได้รับ UVB แสดงดังตารางที่ 5 และแสดงในรูปกราฟแท่ง ดังรูปที่ 9 สำหรับปริมาณของ MMP-1 หลังได้รับ UVB เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และรูปที่ 10 สำหรับปริมาณของ MMP-1 หลังได้รับ UVB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าที่ 4 ชั่วโมงปริมาณของ MMP-1 ในเซลล์ที่ได้รับสารสกัดหรือวิตะมินซีและได้รับ UVB มีปริมาณน้อยกว่าในเซลล์ไม่ได้รับสารสกัดแต่ได้รับ UVB แต่ไม่น้อยกว่าเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัดและไม่ได้รับ UVB และที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 μg/ml ปริมาณ MMP-1 น้อยกว่าในเซลล์ที่ได้รับแต่ UVB อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนที่ 24 ชั่วโมงพบว่าปริมาณของ MMP-1 ในเซลล์ที่ได้รับสารสกัดและได้รับ UVB ไม่แตกต่างกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัดแต่ได้รับ UVB จากกราฟแท่ง (รูปที่ 10) จะเห็นว่าปริมาณ MMP-1 ในเซลล์ที่ได้รับวิตะมินซีและได้รับ UVB มีปริมาณใกล้เคียงกับเซลล์ที่ไม่ได้รับ UVB แสดงให้เห็นว่าวิตะมินซีมีคุณสมบัติช่วยฟื้นฟูให้เซลล์กลับสู่สภาวะปกติได้หลังได้รับ UVB

การศึกษาผลของสารสกัดต่อการฟื้นฟูศักยภาพในการจัดระเบียบ (reorganization) เส้นใย collagen และการหดตัว (contraction) ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกได้จากผิวหนังบริเวณที่มีริ้วรอย ศึกษาโดยการเตรียมเป็น fibroblasts-embedded collagen matrix (FECM) คือเป็น matrix คอลลาเจนที่มีเซลล์ไฟโบรบลาสต์ฝังตัวอยู่ และประเมินผลโดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ matrix ศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง DMEM กับ DMEM ที่มีสารสกัดที่ความเข้มข้น 100 μg/ml เส้นผ่าศูนย์กลางที่วัดได้เป็นเวลา 3 วัน แสดงดังตารางที่ 6 พบว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ matrix ทั้งที่ได้รับ DMEM และ

สารสกัด ไม่แตกต่างกันทั้ง 3 วัน รูปของ FECM แสดงดังรูปที่ 11 ทั้งนี้อาจมีการศึกษาเพิ่มเติม คือเพิ่มระยะเวลาในการศึกษาให้ถึง 7 วัน อาจทำให้เห็นความแตกต่างชัดเจนกว่านี้