วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ เป็นการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลไม้ทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่ มังคุด, มะม่วงเขียวเสวยดิบ, มะม่วงน้ำดอกไม้สุก, ส้มโอ, มะละกอดิบ, มะละกอสุก, กล้วยน้ำว้า และฝรั่ง ในการป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจและเบาหวาน โดยใช้โมเดลในหลอดทดลอง (*in vitro* study) ศึกษาในด้านต่างๆ ดังนี้คือ 1) ฤทธิ์การยับยั้ง Lipoprotein oxidation และ plasma peroxidation โดยการตรวจวัด malondialdehydyde (MDA) ด้วยวิธี Thiobarbituric acid reactive substance assay (TBARS) 2) ฤทธิ์ป้องกันการเกิดออกซิเดชันของโปรตีน BSA ที่ชักนำด้วย Cu^{2+}/H_2O_2 โดยใช้วิธี SDS-PAGE 3) ฤทธิ์การยับยั้งออกซิเดชันของโปรตีน BSA จากการชักนำด้วยกลูโคสความเข้มข้นสูง (*in vitro* protein glycation) โดยการตรวจวัด protein carbonyl content 4) ฤทธิ์ Fibrinolytic activities โดยวิธี modified fibrin plate assay

สารสกัดจากผลไม้ไทยทั้ง 8 ชนิด เป็น aqueous extracts เตรียมโดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวสกัด ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่ที่พบได้แก่ polyphenols, flavonoids, anthocyanins, tannins และวิตามินที่ละลายในน้ำ ได้แก่ วิตามินซี เป็นต้น ผลที่ได้จากการทดลองต่างๆ ในการต้านออกซิเดชันต่อลิโปโปรตีน พลาสมา และ โปรตีน BSA จะเป็นผลของการทำงานร่วมกันระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิดแบบ cocktails เนื่องจากสารสกัดที่ใช้นั้นเป็นสารสกัดหยาบ (crude extracts) ไม่ได้ผ่านขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์ โดยทั่วไปขั้นตอนการเตรียมสารสกัด อาจใช้ตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ ที่นิยมใช้กัน ได้แก่ methanol หรือ ethanol ก็ได้ ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมและสภาพธรรมชาติของ สิ่งที่ต้องการศึกษา ตัวอย่างเช่น การสกัดด้วย 80% ethanol จะได้สารต้านอนุมูลอิสระทั้งที่มีขั้วและไม่มีขั้วรวมกัน หากทดสอบแล้วให้ผลที่น่าสนใจ จึงค่อยผ่านขั้นตอนแยกบริสุทธิ์บางส่วนเพื่อระบุสารสำคัญ (active ingredients) ในภายหลัง แต่การศึกษาครั้งนี้ เลือกใช้น้ำกลั่นเป็น Water/Aqueous extracts เนื่องจากต้องการให้เหมือนกับการรับประทานน้ำคั้นผลไม้สด สารที่ออกฤทธิ์จึงอยู่ในกลุ่มที่ละลายน้ำได้ดี อย่างไรก็ตาม ผลที่ได้จากการทำในหลอดทดลอง (*in vitro* study) เป็นเพียง

การทดสอบคัดกรองเบื้องต้น เพื่อนำไปศึกษาในเชิงลึกต่อไป และไม่อาจจะอุปมาว่า ผลที่ได้จะใกล้เคียงกับการทดลองในร่างกาย เพราะมีปัจจัยอื่นๆอีกมากที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารสกัด ไม่ว่าจะเป็นการดูดซึม การเปลี่ยนรูปโดยกระบวนการเมตาบอลิสมในร่างกาย ตัวอย่างเช่น สารประเภท flavonoids ที่พบมากในผลไม้ อาจจะถูกดูดซึมระหว่างการย่อย หรือหลังจากการ hydrolysis ซึ่งจะมีการ form ในรูปอนุพันธ์ ของ flavonoids เช่น sulphate, glucoronide ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้ จะทำให้มีผลต่อ biovailability และการออกฤทธิ์ (16)

โมเลกุลของ LDL ที่ถูกดัดแปลงไปโดยกระบวนการออกซิเดชัน มีส่วนเกี่ยวข้องกับการดำเนินไปของโรคแห่งความเสื่อมทั้งหลายได้แก่ ภาวะหลอดเลือดหัวใจตีบแข็ง โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคชรา (17,18) วิธีมาตรฐานที่ใช้ในการเตรียม LDL จากพลาสมาคือ วิธีปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง (ultracentrifugation) อย่างไรก็ตาม การทดลองนี้ ได้ใช้วิธีเลือกตกตะกอน (selective precipitation) แทน ซึ่งเป็นวิธีทั่วไปที่นิยมเลือกใช้ในห้องปฏิบัติการเพื่อวัดปริมาณโคเลสเตอรอลที่ประกอบอยู่ในโมเลกุลของลิโปโปรตีนชนิดต่างๆ เนื่องจากไม่ต้องอาศัยเครื่องมือราคาแพง สิ่งสำคัญคือต้องแน่ใจว่าตะกอนที่ได้นั้นไม่ปนเปื้อนด้วย non-LDL serum proteins เนื่องจากผลแสดงอยู่ในรูปที่คิดต่อ LDL protein content ซึ่งความแปรปรวนจากสาเหตุนี้หลีกเลี่ยงได้โดยการล้างตะกอน LDL ให้สะอาด การเติม Triton X-100 ก็ช่วยละลายตะกอนได้ดี (19) ปฏิกิยาลิปิดออกซิเดชันภายใต้การชักนำ ของ Cu^{2+} ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ 1) latency 2) propagation และ 3) decomposition ซึ่งระยะเวลาการเกิด dienes, TBARS และ lipid hydroperoxide อยู่ในช่วง latency, propagation และ early stages ของ decomposition phase (20, 21) วิธีการเลือกตกตะกอนนี้ ใช้หลักการเกิดปฏิกิริยากับ glycosaminoglycans (GAGs) ทั้ง lipid composition และ content ของ sialic acid สามารถปรับเปลี่ยน (modulate) การเกิด ปฏิกิริยากับ GAGs ในที่นี้หมายถึง particles เช่น small dense LDL สามารถเกิดปฏิกิริยากับ GAGs ด้วยความชอบจับสูง (high affinity) นอกจากนั้น วิธีการตกตะกอนยังช่วยเพิ่ม susceptibility ต่อออกซิเดชันโดย Cu^{2+} เนื่องจาก Cu^{2+} แทรกซึมเข้าสู่ LDL particle ได้ง่ายขึ้นหลังจากตกตะกอน (22 , 23)

ในการทดลองช่วงแรก ใช้ $CuCl_2$ ในการออกซิไดซ์ลิโปโปรตีน พบว่าให้ค่าการดูดกลืนแสงของ MDA ต่ำ จึงได้ทดลองใช้ $CuSO_4$ ร่วมกับ H_2O_2 แทน ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Arshad และคณะ ที่พบว่าการใช้ $CuSO_4$ กับ H_2O_2 ร่วมกัน ให้ผลการออกซิไดซ์ลิโปโปรตีนดีกว่าการใช้ $CuSO_4$ หรือ H_2O_2 เพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง (24)

จากการทดลองดังกล่าว พบว่า Basal Lipoprotein oxidation มีค่าเฉลี่ย 0.12 nmol MDA/mg protein ซึ่งมีค่าต่ำ เมื่อนำมาออกซิไดซ์ภายใต้สภาวะที่ใช้คือ Cu^{2+} 250 μM และ H_2O_2 0.193 mM ที่ 37°C, 3 ชั่วโมง สามารถเร่งการออกซิไดซ์ลิโปโปรตีนได้เฉลี่ยเป็น 12.06 nmol MDA/mg protein คิดเป็น ~ 100.5 เท่าจากเดิม (basal level) สภาวะเช่นนี้จัดว่ารุนแรงไม่ค่อยพบในร่างกาย แต่การใช้ Cu^{2+} และ H_2O_2 เป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดออกซิเดชัน เป็นโมเดลที่ได้รับความนิยมนำมาทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารสกัดต่างๆ และสามารถคำณวนออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งออกซิเดชันและหาค่า IC_{50} ได้ เมื่อนำลิโปโปรตีนมาออกซิไดซ์ในสภาวะที่มีสารสกัดจากผลไม้ไทยอยู่ด้วย พบว่า สารสกัดจากผลไม้ไทย ทั้ง 8 ชนิด มีฤทธิ์ลดการเกิด lipoprotein oxidation แบบขึ้นกับความเข้มข้น (concentration-dependent manners) โดยมีค่า IC_{50} เรียงตามลำดับดังนี้คือ ฝรั่ง (59.7 μg/ml) < มะละกอดิบ (85.0 μg/ml) < กล้วยน้ำว้า (144.9 μg/ml) ~ มะละกอสุก (146.9.0 μg/ml) ~ มะม่วงน้ำดอกไม้สุก (148.5.0 μg/ml) < ส้มโอ (231.6 μg/ml) < มังคุด (236.5 μg/ml) < มะม่วงเขียวเสวยดิบ (522.7 μg/ml) ดังนั้น ฝรั่งจึงมีฤทธิ์ในการยับยั้งลิโปโปรตีนออกซิเดชันสูงที่สุด สาเหตุที่ฝรั่งสามารถยับยั้งการออกซิเดชันได้ดีที่สุด อาจเนื่องมาจากการที่ฝรั่งมีวิตามินซีสูง โดยฝรั่งน้ำหนัก 100 กรัมจะมีปริมาณวิตามินซีอยู่ถึง 230 มิลลิกรัม อย่างไรก็ตาม วิตามินซีในปริมาณที่สูงมากเกินไป ก็พร้อมเป็นสารก่ออนุมูลอิสระได้ ที่เรียกว่า "Pro-oxidant" (25)

งานวิจัยของ Salleh และคณะ ในปี 2002 พบว่า สารสกัดจากมะละกอที่ความเข้มข้น 12.5 μg/ml สามารถยับยั้งการเกิด oxidation ของ LDL ได้ 20% โดยการทดสอบหา MDA ด้วยวิธี TBARS (26) สำหรับในการทดลองครั้งนี้ สารสกัดจากมะละกอดิบ และมะละกอสุก สามารถยับยั้งการเกิด oxidation ของ LDL ได้ 28.3 ± 9.76 % และ 25.1 ± 5.78 % ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 5 μg/ml นอกจากนั้น ยังมีรายงานถึงสาร β-carotene, lycopene, วิตามิน อี

(α - tocopherol) ที่มีในผลไม้ไทย โดย R. Charoensiri และ คณะพบว่า มังคุดมีวิตามินอี ส่วนมะม่วงเขียวเสวย, ฝรั่ง และกล้วยน้ำว้า มี β-carotene และ วิตามินอี สำหรับมะม่วงน้ำดอกไม้และส้มโอมี β-carotene, lycopene และวิตามินอี ส่วนมะละกอมี β-carotene และ lycopene (38)

อาจกล่าวได้ว่า Glutathione (GSH) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญและมีประสิทธิภาพมากที่สุดในเซลล์ มีคุณสมบัติ reducing power รวมถึงยังสามารถรีไซเคิลสารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆให้กลับมาทำหน้าที่ใหม่ได้ การทำงานของวิตามินซีและวิตามินอีจึงขึ้นอยู่กับปริมาณของ GSH (39) จากการทดลองจะเห็นว่า glutathione ที่นำมาใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน แสดงฤทธิ์การยับยั้งลิโปโปรตีนออกซิเดชันได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเป็นแบบขึ้นกับความเข้มข้น กล่าวคือ ที่ความเข้มข้น 50 μg/ml ยับยั้งลิโปโปรตีนออกซิเดชันได้ถึง 73.2 % เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 400 μg/ml ยับยั้งลิโปโปรตีนออกซิเดชันได้ถึง 92.9 %

ต่อไปคือการทดสอบ Whole plasma susceptibility ต่อ peroxidation โดยมี Cu^{2+}/ H_2O_2 เป็นตัวเร่ง การยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในสภาวะที่มีสารสกัดผลไม้ โดยดูจากผลการทำปฏิกิริยากับ thiobarbituric acid (thiobarbituric acid reactive substances-TBARS) ถึงแม้จะถูกจัดว่าเป็นวิธีที่ไม่จำเพาะเจาะจง แต่ขั้นตอนการทำนั้นง่ายและสามารถทำได้หลายตัวอย่างทดสอบพร้อมกันทีเดียว จากการทดลองเปรียบเทียบในพลาสมาของคนที่มีสุขภาพดีกับพลาสมาของผู้ป่วยเบาหวาน พบว่า ระดับ basal MDA ในผู้ป่วยเบาหวานสูงกว่าในคนที่มีสุขภาพดี (2.4 $\pm$ 0.28 *S* 1.3 $\pm$ 0.36 μmol/L) ซึ่งน่าจะบ่งชี้ถึงการมี oxidative stress ที่มากกว่า สำหรับผลไม้ที่ลด plasma peroxidation ได้ดีที่สุดคือ ฝรั่ง ดังตารางที่ 6 ส่วนสารสกัดผลไม้ชนิดอื่น ยับยั้งการเกิด plasma peroxidation ได้น้อยกว่า และต้องใช้ความเข้มข้นที่ 400 μg/ml จึงจะให้ผลการยับยั้งที่ประมาณ 50% จึงไม่อาจคำนวณ ค่า IC_{50} ได้ เนื่องจากจะให้ค่าคลาดเคลื่อนไป เพราะกราฟไม่เป็นแบบ dose response curve สาเหตุที่เปอร์เซ็นต์การยับยั้งพลาสมาออกซิเดชันของสารสกัดผลไม้ ต่ำกว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งลิโปโปรตีนออกซิเดชัน อาจเนื่องมาจากการที่สารสกัดผลไม้แทรกซึมไปยับยั้งในโมเลกุลของลิโปโปรตีนที่ได้จากแยกบริสุทธิ์บางส่วนจากการตกตะกอนได้ดีกว่าส่วนที่ล่องลอยอยู่ในพลาสมา

การทดลองถัดไปคือ การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดผลไม้ในการต้านโปรตีนเสียสภาพจากกระบวนการออกซิเดชัน (oxidative protein damage) ด้วยวิธี SDS-PAGE สารอนุมูลอิสระที่สำคัญคือ Hydroxyl radicals ($^{\bullet}OH$) เป็นตัวก่อให้เกิดความเสียหายต่อสารชีวโมเลกุลต่างๆ ในเซลล์ (27) โดยกลไกที่มีธาตุโลหะหนักเป็นตัวเร่งให้เกิดการสร้าง Hydroxyl radicals ($^{\bullet}OH$) จากการสลายของ superoxide และ hydrogen peroxide (28) การใช้ Cu^{2+}/H_2O_2 เป็นการจำลองจากสิ่งที่เกิดขึ้นในร่างกาย เพื่อผลิต Hydroxyl radicals ($^{\bullet}OH$) ออกมาทำลายโปรตีน ในที่นี้คือ BSA โดยจะก่อให้เกิดการเลี่ยนแปลงในเชิงโครงสร้างใหญ่ (gross structural modification) โปรตีนแตกเป็นชิ้นส่วนเอง (spontaneous protein fragmentation) และเกิดการเชื่อมสายระหว่างโปรตีนไปมา (cross-linking) หรือไวต่อการย่อยสลายมากขึ้น (more susceptible to proteolysis) (29, 30) Hydroxyl radicals ($^{\bullet}OH$) ทำให้โปรตีนเสียหายที่ตำแหน่งเฉพาะ โดยไปออกซิไดซ์วงแหวน imidazole ของกรดอะมิโน histidine ทำให้โปรตีนไม่สามารถทำงานได้หรืออาจสลายตัวไป (degradation) (31) สังเกตว่า แถบโปรตีนที่ปรากฏลดลงในสภาวะที่ถูกออกซิไดซ์ (treated) คงอยู่ในตำแหน่งเดิม ไม่ปรากฏว่ามีแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลสูงขึ้น แสดงว่าสภาวะการชักนำให้เกิดออกซิเดชัน ไม่ทำให้เกิดการ cross-link ที่นำไปสู่ protein aggregation แต่ทำให้เกิด protein degradation แทน นอกจากนั้นปฏิกิริยาการออกซิเดชันยังเป็นปฏิกิริยาแบบต่อเนื่อง เนื่องจากแถบโปรตีนยิ่งจางลงเมื่อปล่อยให้เวลานานขึ้น Protein degradation เริ่มต้นจากการถูกทำลายโดย Hydroxyl radicals ($^{\bullet}OH$) ตามด้วยการเกิด alkyl, alkoxyl และ alkylperoxyl radical intermediates แล้วลงเอยที่การตัดพันธะเปปไทด์ (29) สำหรับผลการยับยั้งโปรตีนออกซิเดชันที่ดีที่สุดคือสารสกัดจากมังคุด รองลงมาคือสารสกัดมะม่วงน้ำดอกไม้สุกและ สารสกัดส้มโอ โดยกลไกน่าจะเป็นการจับกับสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นโดยตรง (direct scavengers) ส่วนกลไกการออกฤทธิ์ในเซลล์ของสารจำพวก polyphenols ที่พบมากในผลไม้ พบว่าผ่านทาง receptors หรือเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการนำส่งสัญญาณในเซลล์ (signal transduction) ซึ่งส่งผลเปลี่ยนแปลง redox status และ ปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้อง (32, 33)

จากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านโปรตีนออกซิเดชันที่ถูกชักนำด้วยกลูโคสความเข้มข้นสูง (*in vitro* Glycation of BSA) ด้วยวิธีวัด protein carbonyl content ได้ใช้ BSA เป็นโมเดล cell-free solution เสมือนอัลบูมินที่เป็นโปรตีนส่วนใหญ่ในพลาสมาแล้วสัมผัสกับน้ำตาลกลูโคสเป็นระยะเวลานานต่อเนื่องเช่นในผู้ป่วยเบาหวาน ผลการทดลองพบว่า กลูโคสความเข้มข้นสูงชักนำให้เกิดโปรตีนออกซิเดชัน โดยดูจากปริมาณโปรตีน carbonyl content ที่เพิ่มขึ้นตามลำดับเมื่อโปรตีน BSA บ่มกับน้ำตาลกลูโคสเป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ จากการศึกษาที่ผ่านมาก่อนหน้านี้ในหลอดทดลอง พบว่าจะมีการสร้าง superoxide radicals ออกมาจากกลูโคสที่ความเข้มข้นสูงโดยกระบวนการออกซิเดชันด้วยตัวมันเอง (auto-oxidation) (34) ส่วน Marker สำหรับโปรตีนออกซิเดชันที่มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย คือ protein carbonyl group เกิดจากออกซิเดชันของ side chain ของกรดอะมิโน lysine, proline, arginine และ threonine (35, 36) กลูโคสในกระแสเลือด ของผู้ป่วยเบาหวานที่ควบคุมระดับน้ำตาลไม่ดี อาจสูงถึง 50 mM หรือ 1000 mg% (ค่าอ้างอิงในคนที่มีสุขภาพดี 70-110 mg%) การทดลองนี้ใช้ 2 ความเข้มข้นคือ 100, 500 mM ที่ต้องใช้ความเข้มข้นสูงขนาดนี้ เนื่องจากในสภาวะจริงของการเกิดพยาธิสภาพในผู้ป่วยเบาหวานต้องใช้ระยะเวลาที่ยาวนานนับปี ในการที่จะเกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆ จาก advanced glycation end products ของกระบวนการออกซิเดชัน (37) อย่างไรก็ตาม สารสกัดผลไม้ทั้ง 8 ชนิดไม่ได้แสดงผลการยับยั้งโปรตีนออกซิเดชันที่ถูกชักนำด้วยกลูโคสความเข้มข้นสูง (100 mM) ที่เวลา 4 และ 8 สัปดาห์ แต่มีเพียงสารสกัดมะละกอดิบที่แสดงฤทธิ์การยับยั้งการเกิดโปรตีน carbonyl ในเวลา 8 สัปดาห์ ที่กลูโคสความเข้มข้น 500 mM สำหรับวิตามินซีที่ใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ทำควบคู่ไปกับสารสกัดผลไม้แทนที่จะยับยั้งการเกิด protein carbonyl แต่กลับพบว่า ยิ่งทำให้ค่า protein carbonyl content สูงขึ้น ผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานของ Jain AK และคณะ ปี2002 ที่พบว่า วิตามินซีรบกวนการตรวจวัด protein carbonyl content โดยทำให้ค่าสูงกว่าความเป็นจริง (14)

ในการทดสอบ Fibrinolytic activity ด้วยวิธี modified fibrin plate assay สารสกัดจากมะละกอสุก 40 mg/ml ในปริมาตรที่หยดลงไป 50 µl คิดเป็นปริมาณ 2 mg สามารถ

ทำให้เกิดส่วนใสมากที่สุด คิดเป็นพื้นที่เท่ากับ 1.69 CM^2 แต่ไม่อยู่ในช่วง กราฟมาตรฐาน จึงรายงานเพียงว่า fibrinolytic activity เทียบได้กับ plasmin ที่ความเข้มข้น < 2 µg

การศึกษาทางระบาดวิทยา แสดงให้เห็นว่า การรับประทานผักและผลไม้เป็นประจำ มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของ activity ใน fibrinolytic system และช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดก้อนลิ่มเลือดและโรคหลอดเลือดหัวใจ สารสกัดมะละกอสุกมีศักยภาพในการนำไปศึกษาการสลายก้อนลิ่มเลือดต่อในร่างกาย (*in vivo*)

จาการศึกษาในครั้งนี้ ช่วยสนับสนุนการรับประทานผลไม้ไทยที่มีรสชาดอร่อย มีอยู่ทุกฤดูกาล และยังมีคุณค่าในการป้องกันการเกิดออกซิเดชันต่อลิโปโปรตีน พลาสมาและโปรตีน ซึ่งเป็นพื้นฐานในการก่อให้เกิดโรคแห่งความเสื่อมต่างๆ โดยเฉพาะโรคเบาหวาน และโรคหลอดเลือดหัวใจ รวมทั้งช่วยสลายไฟบรินด้วย