



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “ประสิทธิภาพของเนื้อผลมะละกอและกล้วย  
ในการป้องกันผิวหนังเสื่อมสภาพก่อนวัยเนื่องจากรังสี UVB :  
การศึกษาในสัตว์ทดลอง”

(Efficacy of *Carica papaya* and *Musa sapientum* fruits  
on prevention of UVB-induced skin aging : *In vivo* study)

โดย

นางสาวจรรุภา วิโยชน์และคณะ  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ตุลาคม 2553

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “ประสิทธิภาพของเนื้อผลมะละกอและกล้วย  
ในการป้องกันผิวหนังเสื่อมสภาพก่อนวัยเนื่องจากรังสี UVB :  
การศึกษาในสัตว์ทดลอง”

(Efficacy of *Carica papaya* and *Musa sapientum* fruits  
on prevention of UVB-induced skin aging : *In vivo* study)

### คณะผู้วิจัย

1. นางสาวจรรุภา วิโยชน์
2. นางสาวกรรณก อิงคนินันท์

### สังกัด

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

ฝ่ายเกษตร

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ฝ่ายเกษตร ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนในการดำเนินโครงการวิจัยเรื่อง ประสิทธิภาพของเนื้อผลมะละกอและกล้วย ในการป้องกันผิวหนังเสื่อมสภาพก่อนวัยเนื่องจากรังสี UVB : การศึกษาในสัตว์ทดลอง

ขอขอบคุณ นางสาวขวัญฤดี มหิงษา ผู้ช่วยนักวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ผู้มีส่วนทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จไปด้วยดี

ขอขอบคุณศูนย์นิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร สำหรับความอนุเคราะห์ให้ใช้เครื่องมือในการตัดชิ้นเนื้อเพื่อศึกษาลักษณะพยาธิสภาพ

ขอขอบคุณ ข้าราชการ พนักงาน นักวิทยาศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวรทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกต่างๆ ในการโครงการวิจัยนี้เป็นอย่างดี

และท้ายสุดนี้ขอขอบคุณบิดา มารดา ที่เป็นกำลังใจในการทำงานตลอดมา

นางสาวจรรุภา วิโยชน์

ผู้ดำเนินการวิจัย

ตุลาคม 2553

### บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ก็เพื่อประเมินศักยภาพของผลไม้ไทย ในการป้องกันการเสื่อมสภาพของผิวหนังอันเนื่องมาจากการได้รับแสงยูวีบี ในชั้นแรกผลกล้วยน้ำว้า กล้วยไข่และมะละกอกอสุกพันธุ์แขกดำถูกนำมาประเมินปริมาณฟีนอล (เทียบเท่ากับกรดแกลลิก) และความสามารถในการต้านออกซิเดชัน โดยการใส่สารโพลีโน-ซีโอคาลเทอร์เราพบว่าสารสกัดกล้วยน้ำว้า กล้วยไข่และมะละกอกอสุกพันธุ์แขกดำ (โดยใช้เอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์) มีฟีนอลเทียบเท่ากับกรดแกลลิกในปริมาณ  $144.1 \pm 5.0$ ,  $304.8 \pm 5.4$  และ  $302.4 \pm 4.4$  มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของเนื้อผลไม้สดโดยลำดับ จากวิธีดีพีพีเอพบว่าคุณสมบัติของสารสกัดกล้วยน้ำว้า กล้วยไข่และมะละกอกอสุกพันธุ์แขกดำที่มีฤทธิ์ในการต้านการเกิดออกซิเดชันเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ ของการต้านการเกิดออกซิเดชันสูงสุดมีค่าเท่ากับ 108.3, 16.2 และ 33.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยลำดับ ในขณะที่ของวิตามินซีมีค่าเท่ากับ 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อมาจึงทำการศึกษาผลของผลไม้สดต่อการป้องกันการเสื่อมสภาพของผิวหนังอันเนื่องมาจากการได้รับแสงยูวีบีโดยใช้หนูเม้าส์เพศผู้ สายพันธุ์ไอซีอาร์ หนูได้รับวิตามินซีปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน หรือผลกล้วยน้ำว้า กล้วยไข่หรือมะละกอกอสุกพันธุ์แขกดำในปริมาณ 0.5, 1 หรือ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ในขณะที่เดียวกันด้านหลังของหนูก็ได้รับแสง UVB จากหลอดไฟ (ได้รับ 3 ครั้งต่อสัปดาห์) ปริมาณของแสงที่ได้รับค่อยๆ เพิ่มขึ้นจาก 54 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตรในสัปดาห์ที่ 1 จนถึง 126 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตรในสัปดาห์ที่ 11 การป้องกันการเสื่อมสภาพของผิวหนังอันเนื่องมาจากการได้รับแสงยูวีบีถูกประเมินจากลักษณะที่ปรากฏของผิวหนัง ความหนาและความยืดหยุ่น นอกจากนี้ยังทำการประเมินระดับของทีจีเอฟ-เบต้า1และกลูตาไทโอน และการแสดงออกของโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 และ 3 ในผิวหนังของหนู เราพบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มปกติ (หนูที่ไม่ได้รับแสงยูวีบี) การได้รับแสงยูวีบีติดต่อกันเป็นเวลา 12 สัปดาห์ส่งผลให้ผิวหนังหนาขึ้น และความยืดหยุ่น การแสดงออกของโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 และ 3 และระดับของของโปรตีนกลูตาไทโอนและทีจีเอฟ-เบต้า1ลดลง การได้รับวิตามินซี กล้วยไข่ (ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน) หรือมะละกอกอสุกพันธุ์แขกดำ (ปริมาณ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน) ทำให้ค่าความยืดหยุ่นของผิวหนังของหนูที่ได้รับแสงยูวีบีเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (หนูที่ได้รับแสงยูวีบีพร้อมกับน้ำเปล่า) และมีค่าใกล้เคียงกับหนูกลุ่มปกติ การแสดงออกของโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 และ 3 ในผิวหนังของหนูกลุ่มเหล่านี้ยังคงกลับมาใกล้เคียงกับหนูกลุ่มปกติอีกด้วย ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ยังพบการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของทั้งระดับโปรตีนกลูตาไทโอนและทีจีเอฟ-เบต้า1 ในกลุ่มหนูที่ได้รับกล้วยไข่ (ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน) หรือมะละกอกอสุกพันธุ์แขกดำ (ปริมาณ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน) ผลที่ได้จากการศึกษาทั้งหมดชี้ให้เห็นศักยภาพของกล้วยไข่และมะละกอกอสุกพันธุ์แขกดำ ในการป้องกันการเสื่อมสภาพของผิวหนังอันเนื่องมาจากการได้รับแสงยูวีบี

### Abstract

The aim of the present study was to evaluate the potential of Thai fruits on prevention of UVB-induced skin aging. Firstly, ripe fresh fruits of *Musa sapientum* Linn. (kluai nam wa), *Musa suerier* (kluai khai), and *Carica papaya* Linn. (khaek dum) were determined phenolic content (gallic acid equivalent) and antioxidant activity. By using Folin-Ciocalteu's reagent, we found that phenolic content of *M. Sapientum*, *M. suerier* and *C. papaya* extracts (50% ethanol) was  $144.1 \pm 5.0$ ,  $304.8 \pm 5.4$  and  $302.4 \pm 4.4$  mg gallic acid equivalent/100 g of the fresh fruit, respectively. According to DPPH assay, EC50 on antioxidant activity of *M. Sapientum*, *M. suerier* and *C. papaya* extracts was 108.3, 16.2 and 33.9 mg/ml, respectively while that of ascorbic acid was 0.06 mg/ml. Next, the study on effects of the fresh fruits on prevention of UVB-induced skin aging was performed in male ICR mice. Animals were orally administered 50 mg/day ascorbic acid or the ripe *M. Sapientum*, *M. suerier* or *C. papaya*'s pulp at dose of 0.5, 1 or 1.5 mg/g body weight/day for 12 weeks. At the same period, the backs of animals were irradiated with UVB that was supplied by an array of Toshiba FL8BLB lamps for 12 weeks (3 times a week). The intensity of irradiation was progressively increased, from 54 mJ/cm<sup>2</sup> per exposure at week 1 to 126 mJ/cm<sup>2</sup> at week 11. The prevention on UVB-induced skin aging was determined from skin characteristics, thickness and skin elasticity. Furthermore, levels of TGF- $\beta$ 1 and glutathione proteins, and the expressions of type I and III collagen proteins in the irradiated skin were observed. We found that, as comparison to the normal group (non-irradiated mice), chronic UVB exposure for 12 weeks caused increase in skin thickness, and decrease in skin elasticity, collagen type I and III protein expressions and levels of glutathione and TGF- $\beta$ 1 proteins. Administration of ascorbic acid, *M. suerier* (kluai khai, 1 mg/g body weigh/day) or *C. papaya* (khaek dum, 1.5 mg/g body weigh/day) significantly improved ( $p < 0.05$ ) skin elasticity value in UVB-irradiated mice as compared to that of the control group (UVB-irradiated mice with administration of water), and such improvement value closed to that of the normal group. The expressions of collagen type I and III proteins in the skin tissues isolated from these groups also returned closely to those from the normal group. Moreover, as comparison to the control group, the significant increases ( $p < 0.05$ ) in both TGF- $\beta$ 1 and glutathione protein levels were found in the group of mice received *M. suerier* (kluai khai, 1 mg/g body weigh/day) or *C. papaya* (khaek dum, 1.5 mg/g body weigh/day). All obtained results indicated the potential of *M. suerier* (kluai khai) and *C. papaya* (khaek dum) on prevention of UVB-induced skin aging in mice.

## สารบัญเรื่อง

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	II
บทคัดย่อ	II
สารบัญเรื่อง	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญรูป	VII
เนื้อหางานวิจัย	
<b>บทที่ 1</b>	
1. ความเป็นมาและความสำคัญของเรื่อง	1
2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
<b>บทที่ 2 วิธีการทดลอง</b>	
1. สารเคมี สัตว์ทดลอง อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์	5
2. วิธีการทดลอง	8
2.1 การสกัดตัวอย่างผลไม้เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณฟีนอล (เทียบเท่ากับปริมาณของ gallic acid) และฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน	8
2.2 การศึกษาผลของกล้วยน้ำว้าสุก กล้วยไข่สุกและมะละกอสุก	11
พันธุ์แขกดำ ต่อการป้องกันการเสื่อมสภาพของผิวหนังเนื่องจากรังสี UVB: การศึกษาในสัตว์ทดลอง	
2.3 การวัดความหนาและความยืดหยุ่นของผิวหนังหนู	13
2.4 การตรวจสอบโครงสร้างของผิวหนังในระดับจุลกายวิภาคศาสตร์	14
2.5 การวัดปริมาณ TGF- $\beta$ 1 และ glutathione	14
2.6 การตรวจสอบการแสดงออกของ collagen type I และ III	14
2.7 การวิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผล	15
<b>บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผล</b>	
1. ปริมาณฟีนอล (เทียบเท่ากับ gallic acid) และฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน	16
2. ลักษณะทางกายภาพ ความหนาและความยืดหยุ่นของผิวหนังหนู	20
3. โครงสร้างในระดับจุลกายวิภาคศาสตร์	21
4. ปริมาณ TGF- $\beta$ 1 และ glutathione	31
5. การแสดงออกของ collagen type I และ III	33

## สารบัญเรื่อง (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	41
เอกสารอ้างอิง	47
ภาคผนวกที่ 1 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอล (เทียบเท่ากับปริมาณ gallic acid) ที่มีอยู่ในตัวอย่าง	51
ภาคผนวกที่ 2 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay	55
ภาคผนวกที่ 3 การวัดความหนาและความยืดหยุ่นของผิวหนังหนู	64
ภาคผนวกที่ 4 การย้อมเนื้อเยื่อเพื่อตรวจสอบโครงสร้างในระดับจุลกายวิภาคศาสตร์	68
ภาคผนวกที่ 5 การสกัดโปรตีนจากผิวหนังบริเวณส่วนหลังของหนู โดยใช้ protein extraction reagent	69
ภาคผนวกที่ 6 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในผิวหนังบริเวณส่วนหลังของหนู โดยใช้ DC Protein Assay Kit	70
ภาคผนวกที่ 7 การวิเคราะห์ปริมาณ TGF- $\beta$ 1 ในผิวหนังบริเวณส่วนหลังของหนู โดยใช้ TGF- $\beta$ 1 ELISA Kit	77
ภาคผนวกที่ 8 การวิเคราะห์ปริมาณ Glutathione ในผิวหนังบริเวณส่วนหลังของหนู โดยใช้ Total Glutathione Quantification Kit	84
ภาคผนวกที่ 9 การย้อมเนื้อเยื่อเพื่อตรวจสอบปริมาณและการกระจายตัวของ Collagen โดยใช้หลักการ Immunofluorescence	91
ภาคผนวกที่ 10 เอกสารการรับรองจากคณะกรรมการจริยบรรณการใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยนเรศวร	92
ภาคผนวกที่ 11 แผนกิจกรรมหลักที่วางแผนไว้ รวมทั้งผลลัพธ์ (Output) ที่ได้รับ	93

## สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านการเกิดออกซิเดชัน โดย free radical scavenging เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์	16
ตารางที่ 2 แสดงผลค่าความหนาของผิวหนังและความยืดหยุ่นของผิวหนังหนู เมื่อได้รับ แสง UVB ร่วมกับน้ำเปล่า วิตามินซีหรือผลไม้สุก ควบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์ (N=3)	25
ตารางที่ 3 ปริมาณโปรตีนทั้งหมด ในตัวอย่างผิวหนังหนูแต่ละกลุ่มเมื่อได้รับแสง UVB ร่วมกับน้ำเปล่า วิตามินซีหรือผลไม้สุก ควบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์ (N=3)	34
ตารางที่ 4 ปริมาณของ TGF- $\beta$ 1 และ glutathione ในตัวอย่างผิวหนังหนูแต่ละกลุ่มเมื่อ ได้รับแสง UVB ร่วมกับน้ำเปล่า วิตามินซีหรือผลไม้สุก ควบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์ (N=3)	35

## สารบัญรูป

รูป	หน้า
รูปที่ 1 แสดงขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างผลไม้	10
รูปที่ 2 แสดงวิธีการบดผลไม้โดยใช้หลอดบดอาหารสัตว์ทดลอง	12
รูปที่ 3 UVB chamber ที่ใช้เป็นแหล่งกำเนิดแสง UVB โดยสามารถให้ความเข้มแสงได้สูงสุด 128 จูลต่อตารางเซนติเมตร	13
รูปที่ 4 แสดงบริเวณผิวหนังที่ถอนขนออกโดยใช้ sodium sulphide ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์	13
รูปที่ 5 แสดงการวัดความหนาของผิวหนังโดยใช้เครื่อง Dial Thickness Gage	14
รูปที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Log ความเข้มข้นของ L-ascorbic acid กับค่า free radical scavenging	17
รูปที่ 7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Log ความเข้มข้นของสารสกัดจากผลกล้วยน้ำว้าสุกกับค่า free radical scavenging	17
รูปที่ 8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Log ความเข้มข้นของสารสกัดจากผลกล้วยไข่สุกกับค่า free radical scavenging	18
รูปที่ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Log ความเข้มข้นของสารสกัดจากผลมะละกอสุกพันธุ์แขกดำกับค่า free radical scavenging	18
รูปที่ 10 แสดงลักษณะตัวอย่างผิวหนังบริเวณหลังหนู เมื่อได้รับแสง UVB ร่วมกับน้ำเปล่า วิตามินซีหรือผลไม้สุก ครอบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์	22-24
รูปที่ 11 ความยืดหยุ่นของผิวหนังหนูก่อน เมื่อได้รับแสง UVB ร่วมกับน้ำเปล่า วิตามินซีหรือผลไม้สุก ครอบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์ (N=3) (*, p < 0.05, Wilcoxon rank-sum test โดยเปรียบเทียบในกลุ่มควบคุม)	26
รูปที่ 12 แสดงลักษณะทางจุลกายวิภาค (histology) ของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนูก่อน เมื่อได้รับแสง UVB ร่วมกับน้ำเปล่า วิตามินซีหรือผลไม้สุก ครอบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์	27-29
รูปที่ 13 ปริมาณ TGF- $\beta$ 1 ในผิวหนังหนูก่อน เมื่อได้รับแสง UVB ร่วมกับน้ำเปล่า วิตามินซีหรือผลไม้สุก ครอบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์ (N=3) (*, p < 0.05, Wilcoxon rank-sum test โดยเปรียบเทียบในกลุ่มควบคุม)	36
รูปที่ 14 ปริมาณ glutathione ในผิวหนังหนูก่อน เมื่อได้รับแสง UVB ร่วมกับน้ำเปล่า วิตามินซี หรือผลไม้สุก ครอบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์ (N=3) (*, p < 0.05, Wilcoxon rank-sum test โดยเปรียบเทียบในกลุ่มควบคุม)	37

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูป	หน้า
รูปที่ 15 แสดงการกระจายตัวของ collagen type I และ III ของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนัง หนู เมื่อได้รับแสง UVB ร่วมกับน้ำเปล่า วิตามินซีหรือผลไม้สุก ครบตาม ระยะเวลา 12 สัปดาห์	38-40

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1. ความเป็นมาและความสำคัญของเรื่อง

ความแก่ (aging) เกิดจากการที่ร่างกายมีการสะสมโมเลกุลที่เสื่อมสภาพที่ร่างกายผลิตขึ้นมา อาจกล่าวได้ว่าความแก่เป็นวัฏจักรของชีวิต หรือเป็นขบวนการที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ (natural/ chronological/ intrinsic aging) ส่วนการสะสมโมเลกุลที่ถูกทำลายที่มีสาเหตุหรือถูกกระตุ้นจากสภาวะแวดล้อม เรียกว่าเป็นการแก่ก่อนวัย (accelerated/ extrinsic aging) พื้นฐานทางพันธุกรรมในแต่ละบุคคลมีความสำคัญอย่างมากต่อการเกิด ความแก่ เพราะว่าถึงแม้จะอยู่ในสภาวะแวดล้อมเดียวกัน การเกิดความแก่ก็แตกต่างกัน สำหรับผิวหนัง การเสื่อมถอยหรือการแก่มีผลมาจากรูปแบบของการดำเนินชีวิตมากกว่าพื้นฐานทางพันธุกรรม ปัจจัยต่างๆ เช่น รังสี UV การสูบบุหรี่ การดื่มแอลกอฮอล์ มลภาวะ การสูบบุหรี่ รวมทั้งความเครียดมีผลทำให้ผิวหนังเสื่อมสภาพหรือแก่ก่อนถึงเวลาอันสมควร อย่างไรก็ตามจากปัจจัยที่กล่าวมาทั้งหมด อาจกล่าวได้ว่าปัจจัยภายนอกที่สำคัญที่ทำให้ผิวหนังเกิดการแก่ก่อนวัยคือ รังสี UV จากแสงอาทิตย์ ซึ่งรวมถึง UVB (ความยาวคลื่น 280-320 นาโนเมตร) และ UVA (ความยาวคลื่น 320-400 นาโนเมตร) เนื่องจากแสงแดดเป็นสิ่งที่ทุกคนต้องสัมผัสอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้

การสัมผัสกับแสงแดดเป็นประจำ จะทำให้ผิวหนังมีลักษณะเป็นริ้วรอยที่ลึก หย่อนยาน หนาคล้ายหนังสัตว์ สีผิวเข้มขึ้นในบางจุด บางครั้งพบว่าเกิดเป็นตุ่มน้ำที่ผิวและเป็นแผลง่าย และถ้าเกิดเป็นแผลแล้วจะหายช้า เมื่อพิจารณาในระดับจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อ จะพบชั้นหนังกำพร้าที่หนาขึ้น ร่วมกับการจัดเรียงตัวและปริมาณของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน collagen และ elastin ในชั้นหนังแท้มีการเปลี่ยนแปลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งปริมาณของ collagen type I และ III รวมทั้ง elastin จะลดลง [1] นอกจากนี้ยังพบการฝังตัวของ glycosaminoglycans และองค์ประกอบต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเสริมสร้างความยืดหยุ่นของผิวหนังที่ผิวหนัง เช่น microfibrillar ที่เป็นองค์ประกอบของ fibrillin ในบริเวณชั้นหนังแท้ที่อยู่ลึกลงไป [2, 3] นอกเหนือไปจากการเปลี่ยนแปลงในปริมาณและโครงสร้างของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เซลล์ fibroblast ก็มีรูปร่างที่เปลี่ยนไป ยิ่งไปกว่านั้นจำนวนเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ เช่น mast cells, mononuclear cells และ neutrophils ถูกพบมากขึ้น [4, 5] เมื่อพิจารณาถึงเซลล์ melanocyte ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ melain ก็พบว่าทั้งปริมาณเซลล์และปริมาณ melain ของผิวหนังที่แก่ก่อนวัยมีเพิ่มขึ้น ทำให้สีผิวเข้มขึ้น

จากการศึกษาพบว่ากระบวนการทางชีววิทยาและชีวโมเลกุล ที่เกี่ยวข้องกับการทำให้ผิวหนังแก่ซึ่งมีผลมาจากปัจจัยภายในและรังสี UV นั้น มีกระบวนการบางส่วนเหมือนกัน ได้แก่ 1) เส้นทางการส่งสัญญาณ (signal transduction pathway) ซึ่งส่งผลให้ปริมาณของเอนไซม์ matrix-metalloproteinase (MMP) ที่ทำลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเพิ่มมากขึ้น และ 2) การสังเคราะห์ procollagen ลดลง ซึ่งรังสี UV จะทำให้กระบวนการ และ/หรือกลไกทางชีวโมเลกุลเหล่านี้เกิดมากขึ้น

ในปัจจุบันมีทฤษฎีที่เชื่อกันว่า reactive oxygen species (ROS) หรืออนุมูลอิสระ (free radicals) เกี่ยวข้องกับการแก่ของผิวหนังภายหลังได้รับรังสี UV อนุมูลอิสระหมายถึง โมเลกุลหรืออิออนที่มีอิเล็กตรอนโดด

เดี่ยวอยู่รอบนอก ได้แก่ superoxide anion radical ( $O_2^-$ ), hydroxyl radical ( $HO^\cdot$ ), peroxide radical ( $ROO^\cdot$ ), peroxy radical ( $LOO^\cdot$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), ozone ( $O_3$ ) singlet oxygen ( $^1O_2$ ), hydrogen radical ( $H^\cdot$ ) และ methyl radical ( $CH_3^\cdot$ ) เป็นต้น จัดว่าเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียร วงโคจรต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมีและเป็นตัวก่อให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ อนุมูลอิสระสามารถเกิดขึ้นเองในร่างกายซึ่งเป็นผลมาจากกระบวนการ metabolism ของร่างกายเอง หรืออนุมูลอิสระที่มีสาเหตุจากสิ่งแปลกปลอมหรือกระตุ้นจากภายนอก เช่น รังสี UV จากการศึกษาค้นพบว่านอกจากที่รังสี UVB จะถูกดูดซับโดย DNA ได้โดยตรง ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ DNA แล้ว การผลิต ROS โดยรังสี UVA และ UVB ยังเกิดจากการดูดซับรังสีเหล่านี้โดยโมเลกุลที่ไวต่อแสงอาทิตย์ที่มีอยู่ในร่างกาย (endogenous photosensitizer molecules) เช่น trans-urocancic acid ซึ่งเป็น chromophore ที่พบในผิวหนัง และสามารถดูดซับรังสี UV [6] ภายหลังจากการดูดซับรังสีเข้าไป photosensitizers ที่ถูกกระตุ้นเหล่านี้จะทำปฏิกิริยากับออกซิเจน ได้เป็น  $O_2^-$  และ  $^1O_2$  นอกจากนี้  $O_2^-$  และ  $^1O_2$  ยังผลิตได้จาก neutrophils ซึ่งจะมีจำนวนเพิ่มขึ้นมากในผิวหนังที่ถูกทำลายโดยแสงอาทิตย์ โดยปกติร่างกายสามารถป้องกันการทำลายจากอนุมูลอิสระที่ความเข้มข้นต่ำๆ โดยการสร้างระบบป้องกันตัวเอง ได้แก่ สารต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidants) ซึ่งประกอบไปด้วยสารหรือเอนไซม์ต่างๆ เช่น glutathione, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR), glutathione S-reductase (GST) เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้จะชะลอหรือป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ของสาร (substrate) ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาโดยสารเหล่านี้ รวมถึงสารเกือบทุกชนิดในร่างกาย เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต DNA แต่อย่างไรก็ตามมีบางภาวะที่ปริมาณอนุมูลอิสระมีมากเกินไปกว่าที่ระบบต้านออกซิเดชันของร่างกายจะจัดการได้ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น การทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ DNA โปรตีน คาร์โบไฮเดรตและเยื่อหุ้มเซลล์ ก่อให้เกิดผลเสียต่อเซลล์และการทำลายเซลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุของการแก่

มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่ารังสี UV ก่อให้เกิดการผลิต  $O_2^-$  จากปฏิกิริยา reduction ของโมเลกุลออกซิเจน โดยเอนไซม์ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase [7] ที่พบในเซลล์ผิวหนัง (keratinocytes) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จำนวนหนึ่งของ  $O_2^-$  ที่เกิดขึ้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็น  $H_2O_2$  ซึ่งมีศักยภาพในการทำลายเซลล์น้อยลง และทำหน้าที่เป็น co-substrate สำหรับเอนไซม์ peroxidase อย่างไรก็ตาม  $H_2O_2$  นั้นสามารถข้ามผนังเซลล์ได้ง่าย แล้วเชื่อมต่อกับ transitional Fe (II) ได้เป็น ROS ตัวอื่นๆ เช่น  $HO^\cdot$  และ  $^1O_2$  ที่มีความเป็นพิษสูง ซึ่ง ROS ทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นตัวเริ่มทำให้เกิด lipid peroxidation ที่ผนังเซลล์ร่วมกับการผลิต carbonyls [8]

นอกจากนี้ จากการรวบรวมการศึกษา ทำให้สามารถสรุปได้ว่า รังสี UV สามารถกระตุ้นการทำงานของ cytokine และ growth factor receptor ที่อยู่บริเวณเซลล์ผิวหนัง ได้แก่ epidermal growth factor (EGF), interleukin (IL) และ tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) [9] การกระตุ้นการทำงานของ receptors เหล่านี้ยังไม่เป็นที่เข้าใจกันดี แต่คาดว่าอาจจะเกิดจากการที่รังสี UV ไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ tyrosine kinase ที่ทำหน้าที่เติมหมู่ phosphate ที่ tyrosine residue ของ receptor แล้วส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการ

ทำงานของ receptor [10, 11] หรืออาจเกิดจาก ROS ที่เป็นผลผลิตจากการที่ผิวหนังสัมผัสกับรังสี UV ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosine phosphatase ที่มีความจำเพาะกับโปรตีนแต่ละชนิด โดยเอนไซม์ชนิดนี้จะทำหน้าที่เอาหมู่ phosphate ออกจาก receptor [12-14] (ซึ่งจะมีหน้าที่ตรงข้ามกับเอนไซม์ tyrosine kinase) หรือเกิดจากการที่ ROS ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโปรตีนของ receptor ส่งผลให้เกิดกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ตามมา [11]

รังสี UV จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ผิวหนังภายใน 1 ชั่วโมง และถึงจุดสูงสุดภายใน 4 ชั่วโมงหลังจากได้รับรังสี โดยส่งสัญญาณผ่านการกระตุ้นเอนไซม์ protein kinase [15, 16] การกระตุ้นเอนไซม์นี้ส่งผลให้เกิดการกระตุ้น การแสดงออกและการทำงานของ nuclear transcription factor ชนิด AP-1 เช่น โปรตีน Jun และ Fos ทำให้การแสดงออกของยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทำลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในชั้น dermis เพิ่มขึ้น ยีนเหล่านี้ได้แก่ metalloproteinase (MMP)-1 ซึ่งจะแสดงออกเอนไซม์ MMP-1 (interstitial collagenase หรือ collagenase 1) ที่ทำหน้าที่ย่อยสลาย collagen type I และ III ในเบื้องต้น, MMP-9 ซึ่งจะแสดงออกเอนไซม์ MMP-9 (92-kd gelatinase, gelatinase B) ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายชิ้นส่วนของโปรตีนที่เหลือจากการย่อยสลายโดยเอนไซม์ collagenase และ MMP-3 ซึ่งจะแสดงออกเอนไซม์ MMP-3 (stromelysin 1) ที่ทำหน้าที่ย่อยสลาย collagen type IV และกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ proMMP-1 [17] นอกจากนี้รังสี UV ยังกระตุ้นการทำงานของ transcription factor NF- $\kappa$ B [18] ซึ่งส่งผลให้ยีนของ cytokine ชนิดต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบมีการแสดงออกมากขึ้น ยีนเหล่านี้ได้แก่ IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 และ IL-8 [19] โปรตีนที่เป็นผลผลิตของยีนเหล่านี้จะจับกับ receptor ทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ AP-1 และ NF- $\kappa$ B ซึ่งเท่ากับเป็นการขยายผลของรังสี UV ต่อ การตอบสนองของเซลล์ผิวหนัง

นอกเหนือไปจากการกระตุ้น signal transduction pathway แล้วทำให้ปริมาณของเอนไซม์ MMP ที่ทำลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเพิ่มมากขึ้นแล้ว รังสี UV ทำให้การสังเคราะห์ collagen ลดลง โดยเฉพาะทำให้การแสดงออกของยีน procollagen type I และ type III ลดลง [20] รวมทั้งทำให้โครงสร้างของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีการเปลี่ยนแปลง จากที่กล่าวในข้างต้นว่ารังสี UV ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการแสดงออก และการทำงานของ AP-1 ที่มีผลต่อการแสดงออกของยีน MMP แล้ว จากการศึกษาต่อมาพบว่า AP-1 นี้ยังรบกวนการสังเคราะห์ collagen โดยการจับกับองค์ประกอบที่เป็นส่วนหนึ่งของโมเลกุล ที่ทำหน้าที่ก่อให้เกิดการแสดงออกยีน procollagen type I ได้แก่ ยีน COL1A1 และ COL1A2 นอกจากนี้ยังพบว่า AP-1 ก่อให้เกิดการสังเคราะห์ collagen น้อยลงโดยเกี่ยวข้องกับ transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [21-23] ซึ่งเป็น cytokine สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน รวมทั้งการแสดงออกของเอนไซม์ MMP-1 และ MMP-3 อีกด้วย

เป็นที่ทราบกันดีว่าผลไม้หลายชนิดอุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งช่วยในการลดการเกิดอุบัติการณ์ของโรคที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมถอยของอวัยวะภายในร่างกาย เช่น มะเร็ง ข้อเสื่อม โรคหัวใจและหลอดเลือด เป็นต้น รวมทั้งการแก้ก่อนวัยอันเนื่องมาจากสิ่งกระตุ้นจากภายนอก [24, 25] สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในผลไม้ส่วนใหญ่ ได้แก่ สารในกลุ่ม flavonoids, วิตามิน ซี, เอ, บี และ อี รวมทั้ง carotenoids ที่พบในผลไม้บางชนิด เช่น

มะละกอ เมื่อเร็วๆ นี้มีผลงานวิจัยที่ชี้ให้เห็นว่ามะละกอ (*Carica papaya* L., solo cultivar) และกล้วย (*Musa sapientum*, pisang mas cultivar) เป็นผลไม้ที่น่าสนใจในแง่ที่มีประสิทธิภาพสูงในการจับกับ (chelating activity) Fe (II) [26] ซึ่งเป็นโลหะที่เกี่ยวข้องกับการเกิด ROS นอกจากนี้ยังพบว่ามะละกอ และกล้วยมีค่า ascorbic acid equivalent antioxidant capacity (AEAC) เท่ากับ  $106 \pm 28$  และ  $27.8 \pm 5.5$  มิลลิกรัมต่อเนื้อผลไม้ 100 กรัม ตามลำดับ [26] ด้วยเหตุนี้ผู้ดำเนินการวิจัยจึงมีความสนใจที่จะนำผลไม้ไทย 3 ชนิด ได้แก่ กล้วยน้ำว้าสุก กล้วยไข่สุก และมะละกอสุกพันธุ์แขกดำ ที่เป็นพืชเศรษฐกิจที่ปลูกกันมากในประเทศไทย รวมทั้งที่จังหวัดพิษณุโลก มาศึกษาในเชิงลึกถึงประสิทธิภาพในการป้องกันการเสื่อมสภาพก่อนวัยของผิวหนังอันเนื่องมาจากได้รับรังสี UVB ติดต่อกัน (photo-aging) โดยได้ออกแบบการศึกษาในสัตว์ทดลอง ได้แก่ หนูที่ได้รับแสง UVB ติดต่อกันเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ซึ่งประสิทธิภาพในการป้องกัน photo-aging ประเมินจากลักษณะทางกายภาพของผิวหนังในระดับจุลกายภาคศาสตร์ รวมทั้งระดับของโปรตีน TGF- $\beta$ 1, glutathione, collagen type I และ III ที่มีอยู่ในผิวหนังหนูกุ่มที่ได้รับแสง UVB เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับแสงและสารสกัดจากเนื้อผลมะละกอหรือกล้วย ผลที่ได้จากการศึกษานี้จะเป็นหลักฐานที่ชี้ให้เห็นประโยชน์ของผลไม้ไทยในการป้องกันผิวหนังเสื่อมสภาพก่อนวัยเนื่องจากรังสี UV ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อนหน้านี้

## 2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาผลของเนื้อผลมะละกอสุกพันธุ์แขกดำ กล้วยน้ำว้าสุก และกล้วยไข่สุก ต่อประสิทธิภาพในการต้านการเกิดการเสื่อมสภาพของผิวหนังหนูที่ได้รับแสง UVB

## บทที่ 2

### วิธีการทดลอง

#### 1. สารเคมี สัตว์ทดลอง อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์

##### 1.1 สารเคมี

1. มะละกอ (*Carica papaya* L., พันธุ์แขกดำ, จังหวัดพิษณุโลก)
2. กลัวยน้ำว้า (*Musa sapientum* L., จังหวัดพิษณุโลก)
3. กลัวยไข่ (*Musa sapientum* L., จังหวัดพิษณุโลก)
4. Ascorbic acid (TTK Science Co., Ltd., Bangkok, Thailand)
5. Bovine serum albumin (BSA, Lot. 036K07341, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA)
6. DC protein Assay Reagent A (Control. 21005950, BIO-RAD Laboratories, Hercules, California, USA)
7. DC protein Assay Reagent B (Control. 21005954, BIO-RAD Laboratories, Hercules, California, USA)
8. 2, 2 Diphenyl- 1- picrylhydrazyl, freie Radikal (Lot. S43869-348, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA)
9. Eosin (Lot no. NOV2009, C.V. Laboratories Co.,LTD., Thailand)
10. Ethanol (Batch. 09050034, RCI Labscan Ltd., Bangkok, Thailand)
11. Ethylenediaminetetraacetic acid (Batch no. 2053583, Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland)
12. Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Lot. HC823238, Merck, Darmstadt, Germany)
13. Gallic acid (Batch No. 044K0183, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA)
14. Hematoxylin (Lot no. NOV2009, C.V. Laboratories Co.,LTD., Thailand)
15. Human TGF- $\beta$ 1 CytoSet™ Immunoassay Kit (Lot no. 090401, Biosource Europe S.A., Nivelles, Belgium)
16. Methanol (Batch. 08100116, RCI Labscan Ltd., Bangkok, Thailand)
17. Permout (Lot no. 1813446, Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey, USA)
18. Potassium Chloride (Batch no. AF501339, Ajax Finechem Pty Ltd., New South Wales, Australia)

19. Potassium dihydrogen orthophosphate (Batch No.AF501339, Ajax Finechem Pty Ltd., New South Wales, Australia)
20. Protein Extract Reagent (Lot no. LC144879, ThermoScientific, Rockford, Illinois, USA)
21. Sodium carbonate (Lot. A756429 630, VWR International Ltd., Poole, UK)
22. Sodium Chloride (Batch no. 0811292, Ajax Finechem Pty Ltd., New South Wales, Australia)
23. Sodium sulphide x-hydrate (Lot. 0000190568, Panreac, Castellar del Valles, Barcelona, Spain)
24. Sterile water for injection (A.N.B. Laboratories Co., Ltd., Bangkok, Thailand)
25. di- Sodium hydrogen orthophosphate anhydrous (Batch No.9909123199, Fisher Scientific UK Ltd., Loughborough, Leics, UK)
26. 5-Sulfosalicylic acid dehydrate (Batch no. 079K0015, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA)
27. Sulfuric acid (Lot. H44T01, JT Baker, Mallinckrodt Baker.Inc, Phillipsburg, New Jersey, USA)
28. Thiopental (Batch no. 30817, Bigpharma Chemicals.Co.LTD., Bangkok, Thailand)
29. Tetramethylbenzidine (TMB, Lot. 501734A, Invitrogen, Carlsbad, California, USA)
30. Triton X-100 (Batch no. 0265700, Fisher Scientific UK Ltd., Loughborough, Leics, UK)
31. Total Glutathione Quantification Kit (Lot no. JP694, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)
32. Tris (Hydroxymethyl) aminomethane (Lot. 8382A003 734, Merck, Darmstadt, Germany)
33. Tween 20 (Lot. S4571815 619, VWR International Ltd., Poole, UK)
34. Rabbit polyclonal to Collagen I (Lot. 310062, Abcam plc, Cambridge, UK)
35. Mouse monoclonal [FH-74] to Collagen III (Lot. 724022, Abcam plc 3, Cambridge, UK)
36. Goat polyclonal to Rabbit IgG - H&L (Cy5<sup>®</sup>) (Lot. 298345, Abcam plc, Cambridge, UK)

37. Goat polyclonal to Mouse IgG - H&L (FITC) (Lot. 865129, Abcam plc, Cambridge, UK)

## 1.2 สัตว์ทดลอง

1. หนูทดลองเพศผู้ (หนูเมาส์สายพันธุ์ ICR, อายุ 5 สัปดาห์, สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล, จังหวัดนครปฐม)

## 1.3 อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์

1. Blender (Moulinex Model AY46, Moulinex, China)
2. Dial Thickness Gage (0.01 mm-10 mm, Mitutoyo Model 7301, Mitutoyo Asia Pacific Pte., Ltd., Japan)
3. Hot plate stirrer (HL Instrument, Thailand)
4. Microplate reader (Spectra Count, Perkin Elmer, USA)
5. Microplate reader (Beckman coulter Model DTX 880, Beckman Instruments, Inc., USA)
6. Cryostat (LEICA Model M1850, Southeast Pathology Instrument Services, Folly Beach, South Carolina, USA)
7. Microscope digital camera (Olympus Model DP12, E for L International Co.,Ltd., Bangkok, Thailand)
8. Reflected Fluorescence Attachment (Olympus Model CX-RFL-2, Olympus Optical, Co., Ltd., Japan)
9. Fluorescence microscope (Olympus Model BX50F, Olympus Optical, Co., Ltd., Japan)
10. Digital camera (Canon Model A640, Canon Marketing (Thailand) Co.,Ltd, Thailand)
11. pH meter (Mettler Toledo Model S20-K, GmbH Schwerzenbach, Switzerland)
12. UV-VIS Spectrophotometer (Varian Model Gray 1E, Thaiunique Co., Ltd. Bangkok, Thailand)
13. Ultracentrifuge (Hettich Model Mikro 120, Bangkok Equipment & Chemical Co., Ltd., Bangkok, thailand)
14. Ultracentrifuge (Beckman Model J2-MC, Beckman Instruments, Inc., USA)

15. Fluorescent sunlamps emitting rays between 275-305 nm (Toshiba FL8BLB, Japan)

## 2. วิธีการทดลอง

### 2.1 การสกัดตัวอย่างผลไม้เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณฟีนอล (เทียบเท่ากับปริมาณของ gallic acid) และฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน

โดยขั้นตอนการสกัดมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. นำผลไม้ที่ผ่านการล้างแล้ว มาปอกเปลือกหรือแยกเมล็ดออก แล้วตัดเป็นชิ้นเล็กๆ
2. นำตัวอย่างผลไม้ที่ได้ไปชั่งให้ได้ปริมาณ 15-30 กรัม แล้วบดให้ละเอียด
3. นำตัวอย่างผลไม้ที่บดแล้วใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์
4. นำไปทำการเขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 10 นาที
5. นำตัวอย่างที่ได้ไปกรองด้วยผ้าขาวบาง
6. นำเอาสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
7. นำส่วนใสที่ได้ไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอล (แสดงค่าเป็น gallic acid equivalent) และความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

ผลไม้ที่ใช้ในการศึกษานี้มี 3 ชนิดคือ กัลยน้ำว่าสุก, กัลยไข่สุก และมะละกอสุกพันธุ์แขกดำ ภาพแสดงขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างผลไม้แสดงในรูปที่ 1



กล้วยน้ำว้าสุก

กล้วยไข่สุก

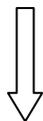
มะละกอสุกพันธุ์แขกดำ



นำไปปั่นให้ละเอียด



ปรับปริมาตรด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์





กรองด้วยผ้าขาวบาง



นำส่วนใสที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที



สารสกัดที่ได้ ซึ่งจะไปวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลและความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

รูปที่ 1 แสดงขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างผลไม้

สารสกัดที่ได้ ถูกนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลโดยแสดงในรูป gallic acid equivalent ที่มีใน ตัวอย่าง (ภาคผนวกที่ 1) และความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดย DPPH assay (ภาคผนวกที่ 2)

## 2.2 การศึกษาผลของกล้วยน้ำว้าสุก กล้วยไข่สุกและมะละกอสุกพันธุ์แขกดำ ต่อการ ป้องกันการเสื่อมสภาพของผิวหนังเนื่องจากรังสี UVB : การศึกษาในสัตว์ทดลอง

### 2.2.1 สัตว์ทดลองที่ใช้

หนูเม้าส์สายพันธุ์ ICR เพศผู้ อายุ 5 สัปดาห์ ซึ่งถูกเลี้ยงในสภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ (25 องศาเซลเซียส) และความชื้นสัมพัทธ์ ( $55 \pm 5$  เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลาอย่างน้อย 1 สัปดาห์ ก่อนนำมาทดลอง โดยหนูได้รับอาหารและน้ำในปริมาณที่ต้องการ และโครงการการศึกษาที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้รับการรับรอง จากคณะกรรมการจริยบรรณการใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ตามเลขที่โครงการ 52 04 0001 เดือน กุมภาพันธ์ 2552 (ภาคผนวกที่ 10)

### 2.2.2 การแบ่งกลุ่มหนูและปริมาณการป้อนวิตามินซีและเนื้อผลไม้

หนูถูกแบ่งเป็น 12 กลุ่ม กลุ่ม ละ 3 ตัว ดังนี้

1. กลุ่มปกติ - ได้รับน้ำเปล่าในปริมาณ 1 มิลลิลิตร (ให้วันละ 2 ครั้ง เข้า-เย็น) และไม่ได้ รับแสง UVB

2. กลุ่มควบคุม (control) - ได้รับน้ำเปล่าในปริมาณ 1 มิลลิลิตร (ให้วันละ 2 ครั้ง เข้า-เย็น) และได้รับแสง UVB

3. กลุ่ม positive control - ได้รับวิตามินซี ประมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน (แบ่งให้วันละ 2 ครั้ง เข้า-เย็น) และได้รับแสง UVB

4. กลุ่มทดลอง - ได้รับผลไม้สุกบดละเอียดในขนาด 0.5 -1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัม (3) โดย แบ่งเป็นกลุ่มย่อย คือ

4.1 ได้รับกล้วยน้ำว้าสุกบดละเอียด 0.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน (แบ่งให้วันละ 2 ครั้ง เข้า-เย็น) และได้รับแสง UVB

4.2 ได้รับกล้วยน้ำว้าสุกบดละเอียด 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน (แบ่ง ให้วันละ 2 ครั้ง เข้า-เย็น) และได้รับแสง UVB

4.3 ได้รับกล้วยน้ำว้าสุกบดละเอียด 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน (แบ่งให้วันละ 2 ครั้ง เข้า-เย็น) และได้รับแสง UVB

4.4 ได้รับกล้วยไข่สุกบดละเอียด 0.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน (แบ่งให้ วันละ 2 ครั้ง เข้า-เย็น) และได้รับแสง UVB

4.5 ได้รับกล้วยไข่สุกบดละเอียด 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน (แบ่งให้ วันละ 2 ครั้ง เข้า-เย็น) และได้รับแสง UVB

4.6 ได้รับกล้วยไข่สุกบดละเอียด 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน (แบ่งให้ วันละ 2 ครั้ง เข้า-เย็น) และได้รับแสง UVB

4.7 ได้รับมะละกอสุกพันธุ์แขกดำบดละเอียด 0.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัม ต่อวัน (แบ่งให้วันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น) และได้รับแสง UVB

4.8 ได้รับมะละกอสุกพันธุ์แขกดำบดละเอียด 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อ วัน (แบ่งให้วันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น) และได้รับแสง UVB

4.9 ได้รับมะละกอสุกพันธุ์แขกดำบดละเอียด 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัม ต่อวัน (แบ่งให้วันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น) และได้รับแสง UVB

**หมายเหตุ** - หนูทุกกลุ่มได้รับอาหารและน้ำเปล่าตามปกติ

- สารละลายวิตามินซีและเนื้อผลไม้สดบดละเอียดถูกเตรียมใหม่ทุกวัน



**รูปที่ 2** แสดงวิธีการป้อนผลไม้โดยใช้หลอดป้อนอาหารสัตว์ทดลอง

### 2.2.3 การได้รับแสง UVB

แสง UVB ที่ใช้มีแหล่งกำเนิดจาก UVB Lamp (ชนิด 8 วัตต์, ความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 275-305 นาโนเมตร, Toshiba, Japan) UVB chamber ที่ประกอบด้วยหลอดไฟ UVB ที่ใช้ในการศึกษา ครั้งนี้ แสดงในรูปที่ 3

โดยหนูจะได้รับแสงสัปดาห์ละ 3 ครั้ง (จันทร์, พุธและศุกร์) ติดต่อกันเป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยแบ่งเป็นช่วงดังนี้

- ช่วงสัปดาห์ที่ 1-4 ความเข้มแสงที่หนูได้รับคือ 54 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร
- ช่วงสัปดาห์ที่ 5-7 ความเข้มแสงที่หนูได้รับคือ 72 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร
- ช่วงสัปดาห์ที่ 8-10 ความเข้มแสงที่หนูได้รับคือ 108 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร
- ช่วงสัปดาห์ที่ 11-12 ความเข้มแสงที่หนูได้รับคือ 126 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร



**รูปที่ 3** UVB chamber ที่ใช้เป็นแหล่งกำเนิดแสง UVB โดยสามารถให้ความเข้มแสงได้สูงสุด 128 จูลต่อตารางเซนติเมตร

โดยส่วนหลังของหนู (ตั้งแต่บริเวณขาหน้าถึงขาหลัง) จะถูกถอนขนออกโดยใช้ sodium sulphide ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้พื้นที่ประมาณ 4x7 ตารางเซนติเมตร แสดงในรูปที่ 4



**รูปที่ 4** แสดงบริเวณผิวหนังที่ถอนขนออกโดยใช้ sodium sulphide ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์

### 2.3 การวัดความหนาและความยืดหยุ่นของผิวหนังหนู

ความหนาของผิวหนังบริเวณส่วนหลังจะวัดสัปดาห์ที่ 12 หลังจากหนูได้รับแสง UVB โดยใช้เครื่อง Dial Thickness Gage ดังแสดงในรูปที่ 5 ส่วนความยืดหยุ่นของผิวหนังหนูจะทำการวัดในสัปดาห์ที่ 12 ในช่วงขั้นตอนการเก็บตัวอย่างผิวหนังหนู โดยจะทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง รายละเอียดของวิธีการประเมินความยืดหยุ่นและวิธีการคำนวณแสดง



รูปที่ 5 แสดงการวัดความหนาของผิวหนังหนูโดยใช้เครื่อง Dial Thickness Gauge

ในภาคผนวกที่ 3

#### 2.4 การตรวจสอบโครงสร้างของผิวหนังในระดับจุลกายวิภาคศาสตร์

หลังจากการทดลองเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ผิวหนังบริเวณส่วนหลังจะถูกตัดออกมา (ประมาณ 3 ตารางเซนติเมตร) เพื่อทำการ fix และตัดตามขวางให้มีความหนา 7-10 ไมโครเมตร แล้วนำไปย้อมด้วยสี hematoxylineosin เพื่อดูลักษณะการจัดเรียงตัวของเซลล์ และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในชั้นผิวหนังแท้ (dermis) โดยจะทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง (รายละเอียดของการเตรียมตัวอย่างแสดงในภาคผนวกที่ 4)

#### 2.5 การวัดปริมาณ TGF- $\beta$ 1 และ glutathione

หลังจากการทดลองเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ผิวหนังบริเวณส่วนหลังจะถูกตัด เพื่อนำมาสกัดโปรตีนโดยใช้ protein extraction reagent (ภาคผนวกที่ 5) ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ได้จากการสกัด โดยใช้ DC protein assay (ภาคผนวกที่ 6) ปริมาณ TGF- $\beta$ 1 และ glutathione ที่มีจะถูกวิเคราะห์โดยใช้ TGF- $\beta$ 1 ELISA kit (ภาคผนวกที่ 7) และ Total Glutathione Quantification kit (ภาคผนวกที่ 8) ตามลำดับ

#### 2.6 การตรวจสอบการแสดงออกของ collagen type I และ III

หลังจากการทดลองเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ผิวหนังบริเวณส่วนหลังจะถูกตัดออกมา เพื่อทำการ fix และตัดตามขวางให้มีความหนา 7-10 ไมโครเมตร แล้วนำไปย้อมโดยใช้หลักการ Immunofluorescence (ภาคผนวกที่ 9) แล้วสังเกตผ่านกล้อง fluorescence

## 2.7 การวิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผล

ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม โดยใช้ Wilcoxon rank-sum test ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95 เปอร์เซ็นต์ (p < 0.05)

### บทที่ 3

#### ผลการทดลองและอภิปรายผล

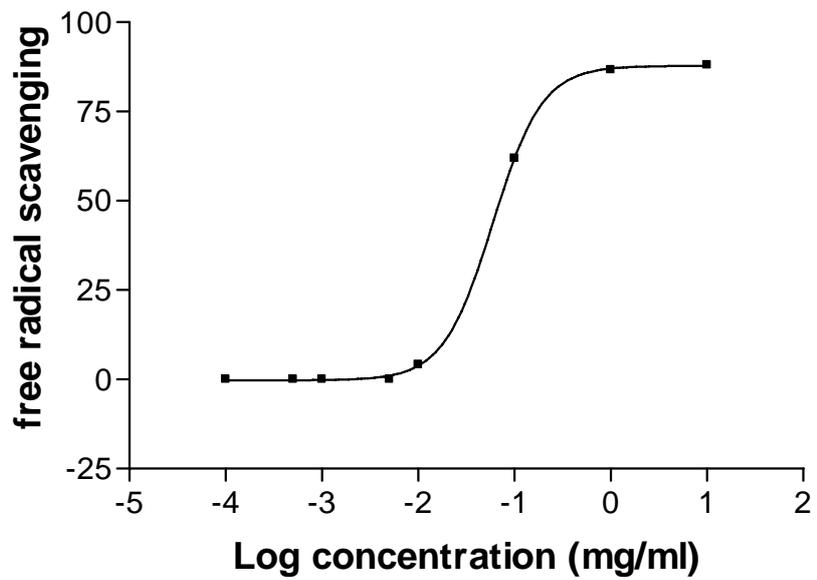
##### 1. ปริมาณฟีนอล (เทียบเท่ากับ gallic acid) และฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน

จากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลทั้งหมดที่มีอยู่ในสารสกัดโดยใช้ Folin-Ciocalteu's reagent พบว่าสารสกัดจากกล้วยน้ำว้าสุกมีปริมาณฟีนอลเทียบเท่ากับ gallic acid ในปริมาณ  $144.1 \pm 5.0$  มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของเนื้อผลไม้สด สารสกัดจากกล้วยไข่สุกมีปริมาณฟีนอลเทียบเท่ากับ gallic acid ในปริมาณ  $304.8 \pm 5.4$  มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของเนื้อผลไม้สด และสารสกัดจากมะละกอสุกพันธุ์แขกดำมีปริมาณฟีนอลเทียบเท่ากับ gallic acid ในปริมาณ  $302.4 \pm 4.4$  มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของเนื้อผลไม้สด (รายละเอียดของข้อมูลดิบและตัวอย่างการคำนวณแสดงในภาคผนวกที่ 1) จะเห็นว่าสารสกัดจากกล้วยไข่สุกและมะละกอสุกพันธุ์แขกดำมีปริมาณฟีนอลที่สูงกว่าสารสกัดจากกล้วยน้ำว้าสุก

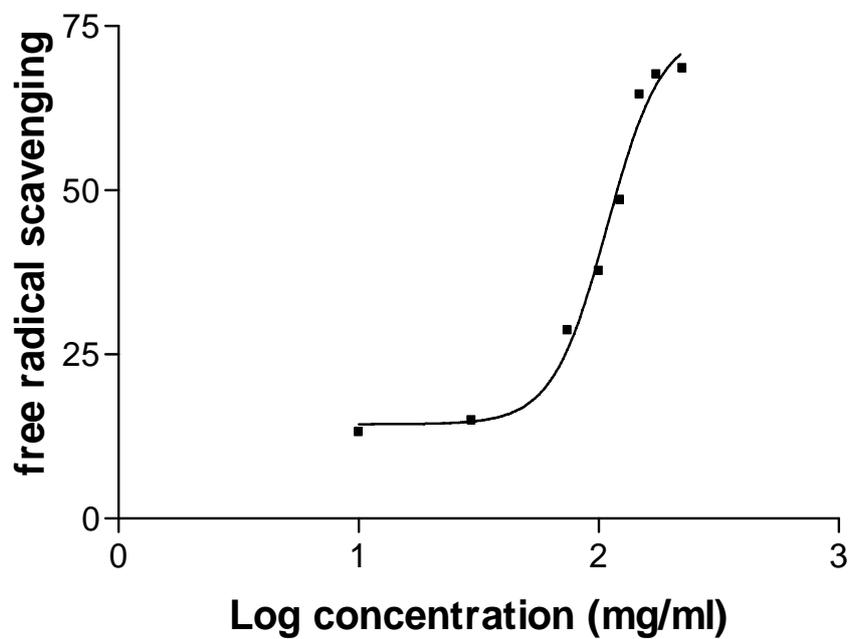
ส่วนการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของวิตามินซี (L-ascorbic acid) ที่ใช้เป็นสารอ้างอิง (positive control) และสารสกัดจากผลไม้ชนิดต่างๆ โดยใช้ DPPH assay สรุปในตารางที่ 1 (รายละเอียดของข้อมูลดิบและตัวอย่างการคำนวณแสดงในภาคผนวกที่ 2) ซึ่งแสดงค่าในรูปของ EC50 (ความเข้มข้นของสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านการเกิดออกซิเดชัน โดย free radical scavenging เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์) และกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Log ความเข้มข้นของ L-ascorbic acid หรือสารสกัดจากผลไม้ชนิดต่างๆ กับค่า free radical scavenging แสดงในรูปที่ 6 ถึง 9 พบว่าวิตามินซีมีค่า EC50 เท่ากับ 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากกล้วยน้ำว้าสุกมีค่า EC50 เท่ากับ 108.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากกล้วยไข่สุกมีค่า EC50 เท่ากับ 16.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดจากมะละกอสุกพันธุ์แขกดำมีค่า EC50 เท่ากับ 33.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากกล้วยไข่สุกมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูงที่สุด รองลงมาคือสารสกัดจากมะละกอสุกพันธุ์แขกดำและกล้วยน้ำว้าสุก ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับปริมาณฟีนอลทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้จากเนื้อผลไม้สุก

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านการเกิดออกซิเดชัน โดย free radical scavenging เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์

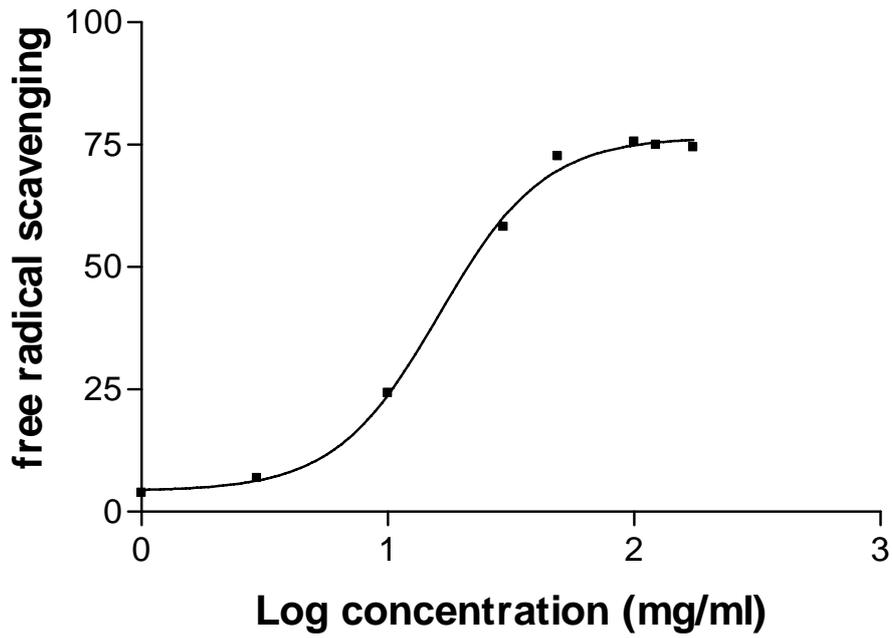
ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน	วิตามินซี (L-ascorbic acid)	สารสกัดจาก		
		ผลกล้วยน้ำว้าสุก	ผลกล้วยไข่สุก	ผลมะละกอสุกพันธุ์แขกดำ
EC50 (มิลลิกรัมมิลลิลิตร)	0.06	108.3	16.2	33.9



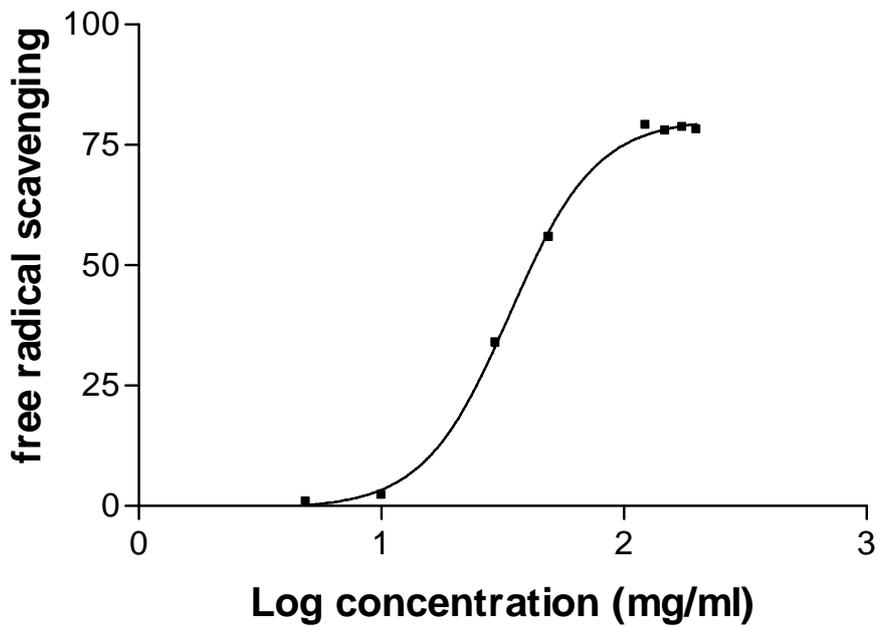
รูปที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Log ความเข้มข้นของ L-ascorbic acid กับค่า free radical scavenging



รูปที่ 7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Log ความเข้มข้นของสารสกัดจากผลกล้วยน้ำว้าสุกกับค่า free radical scavenging



รูปที่ 8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Log ความเข้มข้นของสารสกัดจากผลกล้วยไม้สุกกับค่า free radical scavenging



รูปที่ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Log ความเข้มข้นของสารสกัดจากผลมะละกอสุกพันธุ์แขกดำกับค่า free radical scavenging

ในปัจจุบันมีทฤษฎีที่เชื่อกันว่า reactive oxygen species (ROS) หรืออนุมูลอิสระ (free radicals) เกี่ยวข้องกับการแก่ของผิวหนังภายหลังได้รับรังสี UV อนุมูลอิสระหมายถึง โมเลกุลหรืออิออนที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอยู่รอบนอก ได้แก่ superoxide anion radical ( $O_2^-$ ), hydroxyl radical ( $HO\cdot$ ), peroxide radical ( $ROO\cdot$ ), peroxy radical ( $LOO\cdot$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), ozone ( $O_3$ ) singlet oxygen ( $^1O_2$ ), hydrogen radical ( $H\cdot$ ) และ methyl radical ( $CH_3\cdot$ ) เป็นต้น จัดว่าเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียร ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมีและเป็นตัวก่อให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ อนุมูลอิสระสามารถเกิดขึ้นเองในร่างกายซึ่งเป็นผลมาจากกระบวนการเผาผลาญ (metabolism) ของร่างกายเองหรืออนุมูลอิสระที่มีสาเหตุจากสิ่งแวดล้อมหรือกระตุ้นจากภายนอก เช่น รังสี UV พบว่านอกจากที่รังสี UV จะถูกดูดซับโดย DNA ได้โดยตรง ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ DNA แล้ว การผลิต ROS โดยรังสี UVA และ UVB ยังเกิดจากการดูดซับรังสีเหล่านี้โดยโมเลกุลที่ไวต่อแสงที่มีอยู่ในร่างกาย (endogenous photosensitizer molecules) เช่น trans-urocancic acid ซึ่งเป็น chromophore ที่พบในผิวหนังและสามารถดูดซับรังสี UV [6] ภายหลังจากการดูดซับรังสีเข้าไป photosensitizers ที่ถูกกระตุ้นเหล่านี้จะทำปฏิกิริยากับออกซิเจน ได้เป็น  $O_2^-$  และ  $^1O_2$  นอกจากนี้  $O_2^-$  และ  $^1O_2$  ยังผลิตได้จาก neutrophils ซึ่งจะมีจำนวนเพิ่มขึ้นมากในผิวหนังที่ถูกทำลายโดยแสงอาทิตย์ โดยปกติร่างกายสามารถป้องกันการทำลายจากอนุมูลอิสระที่ความเข้มข้นต่ำๆ โดยการสร้างระบบป้องกันตัวเอง ได้แก่ สารต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidants) ซึ่งประกอบไปด้วยสารหรือเอนไซม์ต่างๆ เช่น superoxide dismutase (SOD) และ catalase (CAT) เป็นต้น รวมทั้ง glutathione ซึ่งสารเหล่านี้จะชะลอหรือป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ของสาร (substrate) ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาโดยสารเหล่านี้ รวมถึงสารเกือบทุกชนิดในร่างกาย เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต DNA แต่อย่างไรก็ตามมีบางภาวะที่ปริมาณอนุมูลอิสระมีมากเกินไปที่ระบบต้านออกซิเดชันของร่างกายจะจัดการได้ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น การทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ DNA โปรตีน คาร์โบไฮเดรตและเยื่อหุ้มเซลล์ ก่อให้เกิดผลเสียต่อเซลล์และการทำลายเซลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุของการแก่ นอกจากนี้มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่ารังสี UV ก่อให้เกิดการผลิต  $O_2^-$  จากปฏิกิริยา reduction ของโมเลกุลออกซิเจน โดยเอนไซม์ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase [7] ที่พบในเซลล์ผิวหนัง (keratinocytes) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จำนวนหนึ่งของ  $O_2^-$  ที่เกิดขึ้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็น  $H_2O_2$  ซึ่งมีศักยภาพในการทำลายเซลล์น้อยลง และทำหน้าที่เป็น co-substrate สำหรับเอนไซม์ peroxidase อย่างไรก็ตาม  $H_2O_2$  นั้นสามารถข้ามผนังเซลล์ได้ง่าย แล้วเชื่อมต่อกับ transitional Fe (II) ได้เป็น ROS ตัวอื่นๆ เช่น  $HO\cdot$  และ  $^1O_2$  ที่มีความเป็นพิษสูง ซึ่ง ROS ทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นตัวเริ่มทำให้เกิด lipid peroxidation ที่ผนังเซลล์ร่วมกับการผลิต carbonyls [8]

ดังนั้นจากการศึกษานี้ที่พบว่า สารสกัดจากผลไม้ที่ใช้ในการศึกษานี้มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันโดย radical scavenging activity โดยเฉพาะกล้วยไข่และมะละกอสุกพันธุ์แขกดำมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่ดี ดังนั้นการได้รับผลไม้ทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นประจำ อาจส่งผลต่อความสามารถในการป้องกัน

การเสื่อมสภาพของผิวหนังอันเนื่องมาจากอนุมูลอิสระที่เกิดจากผิวหนังได้รับแสง UVB ซึ่งข้อสันนิษฐานนี้ จะได้รับการพิสูจน์จากผลการทดลองในขั้นต่อไปของการศึกษานี้

## 2. ลักษณะทางกายภาพ ความหนาและความยืดหยุ่นของผิวหนังหนู

ภายหลังจากที่บริเวณส่วนหลังของหนูได้รับแสง UVB เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ตามลำดับความแรงที่กำหนด พร้อมกับได้รับน้ำเปล่า วิตามินซี ผลกล้วยน้ำว้าสุก กล้วยไข่สุก หรือมะละกอสุกพันธุ์แขกดำ ลักษณะทางกายภาพของผิวหนังหนูแสดงในรูปที่ 10 พบว่าผิวหนังของหนูกลุ่มที่ได้รับแสง UVB ร่วมกับการได้รับน้ำเปล่า (กลุ่มควบคุม) มีลักษณะหยาบ ขรุขระ มีริ้วรอย ร่วมกับมีรอยแดง ขณะหนูกลุ่มหนูที่ได้รับวิตามินซีปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน ความขรุขระและริ้วรอยดังกล่าวลดลง เป็นที่น่าสังเกตว่ากลุ่มของหนูที่ได้รับผลกล้วยไข่สุกที่ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน หรือผลมะละกอสุกพันธุ์แขกดำที่ปริมาณ 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ลักษณะทางกายภาพของผิวหนังใกล้เคียงกับกลุ่มที่ได้รับวิตามินซี ขณะที่กลุ่มของหนูที่ได้รับผลกล้วยน้ำว้าสุกในปริมาณสูงสุดที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ยังพบริ้วรอยบางๆ บริเวณผิวหนังหนูที่ได้รับแสง UVB

นอกจากลักษณะทางกายภาพแล้ว ความหนาและยืดหยุ่นของตัวอย่างผิวหนังหนูได้ถูกประเมินผลความหนาของผิวหนังจากการวัดโดยใช้เครื่อง Dial Thickness Gage และความยืดหยุ่นของผิวหนังบริเวณส่วนหลังของหนูหลังจากหนูได้รับแสง UVB เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พร้อมกับได้รับน้ำเปล่า วิตามินซี ผลกล้วยน้ำว้าสุก กล้วยไข่สุก หรือมะละกอสุกพันธุ์แขกดำ แสดงในตารางที่ 2 (รายละเอียดของวิธีการประเมิน วิธีการคำนวณและผลการทดลองที่ได้ แสดงในภาคผนวกที่ 3) จากผลที่ได้จะเห็นได้ว่าความหนาของผิวหนังหนูไม่แตกต่างกันมากนัก ยกเว้นกลุ่มที่ได้รับแสง UVB พร้อมน้ำเปล่า (กลุ่มควบคุม) พบว่าผิวหนังของหนูมีแนวโน้มที่หนามากขึ้น อย่างไรก็ตามพบว่าคุณสมบัติของผิวหนังที่มีความแตกต่างในแต่ละกลุ่มอย่างเห็นได้ชัด ได้แก่ ความยืดหยุ่น ซึ่งในการทดลองนี้ทำการประเมินความยืดหยุ่นโดยวัดความสามารถของผิวหนังในการกลับคืนสู่สภาพเดิมเมื่อหยุดให้แรงกระทำ โดยยิ่งค่าใกล้เคียงกับ 1 มากเท่าไร หมายความว่าผิวหนังมีความสามารถในการกลับคืนสู่สภาพเดิมเมื่อหยุดให้แรงกระทำหรือมีความยืดหยุ่นดีนั่นเอง จากการใช้หลักการนี้พบว่าผิวหนังของหนูกลุ่มที่ได้รับแสง UVB พร้อมน้ำเปล่า (กลุ่มควบคุม) มีความยืดหยุ่นลดลงและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูปกติ (ไม่ได้รับแสง UVB) (รูปที่ 11) การได้รับวิตามินซีในขนาดที่ใช้ในการศึกษา ผลกล้วยน้ำว้าสุกในปริมาณ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ผลกล้วยไข่สุกที่ปริมาณ 0.5 หรือ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน หรือผลมะละกอสุกพันธุ์แขกดำที่ปริมาณ 0.5 ถึง 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน จะทำให้ความยืดหยุ่นของผิวหนังดีขึ้น (แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม) อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่า การได้รับผลกล้วยไข่สุกที่ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน หรือผลมะละกอสุกพันธุ์แขกดำที่ปริมาณ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน จะทำให้

ความยืดหยุ่นของผิวหนังใกล้เคียงกับหนูกลุ่มปกติ ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าผลที่ได้จากการสังเกตลักษณะทางกายภาพของผิวหนังหนูและความยืดหยุ่นของหนูเป็นไปในทางเดียวกัน กล่าวคือการได้รับผลกล้วยไข่สุกที่ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน หรือผลมะละกอสุกพันธุ์แขกดำที่ปริมาณ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน สามารถลดหรือป้องกันการเสื่อมสภาพของผิวหนังเนื่องมาจากรังสี UVB

เป็นที่ทราบกันดีว่าการสัมผัสกับแสงแดดเป็นประจำ จะทำให้ผิวหนังมีลักษณะเป็นริ้วรอยที่ลึกหย่อนยานและหนา บางครั้งพบว่าเกิดเป็นตุ่มน้ำที่ผิวและเป็นแผลง่าย และถ้าเกิดเป็นแผลแล้วจะหายช้า เมื่อพิจารณาในระดับจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อ จะพบชั้นหนังกำพร้าที่หนาขึ้น ร่วมกับการจัดเรียงตัวของปริมาณของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน collagen และ elastin ในชั้นหนังแท้มีการเปลี่ยนแปลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งปริมาณของ collagen ชนิดที่ I และ III รวมทั้ง elastin จะลดลง [1] นอกจากนี้ glycosaminoglycans และองค์ประกอบต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเสริมสร้าง ความยืดหยุ่นของผิวหนังที่อยู่ในบริเวณชั้นหนังแท้ (dermis) [2, 3] ยังมีปริมาณลดลง นอกเหนือไปจากการเปลี่ยนแปลงในปริมาณและโครงสร้างของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน จำนวนเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ เช่น mast cells, mononuclear cells และ neutrophils ถูกพบมากขึ้น [4, 5] ด้วย ดังนั้นความยืดหยุ่นที่ลดลงหลังจากหนูได้รับแสง UVB น่าเป็นผลมาจากปริมาณของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ลดลง และการได้รับวิตามินซี ผลกล้วยไข่สุกที่ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน หรือผลมะละกอสุกพันธุ์แขกดำที่ปริมาณ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ขณะที่ได้รับแสง UVB อาจช่วยลดการเปลี่ยนแปลงหรือทำลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันได้แก่ collagen ซึ่งข้อสันนิษฐานนี้จะได้รับการพิสูจน์ในการทดลองถัดไปของการศึกษานี้

### 3. โครงสร้างในระดับจุลกายวิภาคศาสตร์

หลังจากการทดลองเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ผิวหนังบริเวณส่วนหลังของหนูถูกตัดออกมา (ประมาณ 3 ตารางเซนติเมตร) เพื่อทำการ fix แล้วนำไปย้อมด้วยสี hematoxylineosin เพื่อดูลักษณะการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในชั้นผิวหนังแท้ (dermis) โดยจะทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 12

ผลการทดลองที่ได้มีแนวโน้มสอดคล้องกับผลที่ได้จากศึกษาลักษณะทางกายภาพ ความหนาและความยืดหยุ่นของผิวหนังหนู กล่าวคือปริมาณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในชั้นผิวหนังแท้ของหนูกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB ร่วมกับน้ำเปล่า) ลดลงและมีลักษณะของการเกิดการเชื่อมโยงระหว่างสายไฟบริล (crosslink) ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน การได้รับวิตามินซี ผลกล้วยไข่สุกที่ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน หรือผลมะละกอสุกพันธุ์แขกดำที่ปริมาณ 1 ถึง 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ขณะที่ได้รับแสง UVB ช่วยลดการเปลี่ยนแปลงหรือทำลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในชั้นผิวหนังแท้

ตัวอย่างเนื้อเยื่อ	ลักษณะผิวหนังบนหลังหนู
<p>กลุ่มที่ 1 (กลุ่มปกติ)</p>	
<p>กลุ่มที่ 2 (กลุ่มควบคุม ได้แก่ กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และน้ำเปล่า)</p>	 <p>ผิวหนังหยาบ ขรุขระ มีริ้วรอย ร่วมกับมีรอยแดง</p>
<p>กลุ่มที่ 3 (กลุ่ม positive control ได้แก่ กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และวิตามินซี ปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน)</p>	
<p>กลุ่มที่ 4 (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และกล้วยน้ำว้าสุกบดละเอียด 0.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน)</p>	 <p>ผิวหนังหยาบ ขรุขระ มีริ้วรอย ร่วมกับมีรอยแดง</p>

รูปที่ 10 แสดงลักษณะตัวอย่างผิวหนังบริเวณหลังหนู เมื่อได้รับแสง UVB ร่วมกับน้ำเปล่า วิตามินซี หรือผลไม้สุก ครบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์

ตัวอย่างเนื้อเยื่อ	ลักษณะผิวหนังบนหลังหนู
<p>กลุ่มที่ 5 (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และ กล้วยน้ำว้าสุกบดละเอียด 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน)</p>	 <p>ผิวหนังมีริ้วรอยบาง ๆ ร่วมกับมีรอยแดง</p>
<p>กลุ่มที่ 6 (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และ กล้วยน้ำว้าสุกบดละเอียด 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน)</p>	 <p>ผิวหนังมีริ้วรอยบาง ๆ ร่วมกับมีรอยแดง</p>
<p>กลุ่มที่ 7 (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และ กล้วยไข่สุกบดละเอียด 0.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน)</p>	 <p>ผิวหนังมีริ้วรอยบาง ๆ ร่วมกับมีรอยแดง</p>
<p>กลุ่มที่ 8 (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และ กล้วยไข่สุกบดละเอียด 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน)</p>	

รูปที่ 10 (ต่อ) แสดงลักษณะตัวอย่างผิวหนังบริเวณหลังหนู เมื่อได้รับแสง UVB ร่วมกับน้ำเปล่า วิตามินซี หรือผลไม้สุก ครบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์

ตัวอย่างเนื้อเยื่อ	ลักษณะผิวหนังบนหลังหนู
<p>กลุ่มที่ 9 (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และ กล้วยไข่สุกบดละเอียด 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน)</p>	
<p>กลุ่มที่ 10 (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และ มะละกอสุกพ่นตู้แช่กดน้ำ บดละเอียด 0.5 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน)</p>	
<p>กลุ่มที่ 11 (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และ มะละกอสุกพ่นตู้แช่กดน้ำ บดละเอียด 1 มิลลิกรัมต่อ น้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน)</p>	
<p>กลุ่มที่ 12 (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และ มะละกอสุกพ่นตู้แช่กดน้ำ บดละเอียด 1.5 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน)</p>	

รูปที่ 10 (ต่อ) แสดงลักษณะตัวอย่างผิวหนังบริเวณหลังหนู เมื่อได้รับแสง UVB ร่วมกับน้ำเปล่า วิตามินซี หรือผลไม้สุก ครบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์

ตารางที่ 2 แสดงผลค่าความหนาของผิวหนังและความยืดหยุ่นของผิวหนังหนูก เมื่อได้รับแสง UVB ร่วมกับ น้ำเปล่า วิตามินซีหรือผลไม้สุก ครบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์ (N=3)

ตัวอย่าง กลุ่มที่	ความหนาของผิวหนังหนูก (เห็นติเมตร)	p value	ความยืดหยุ่นของ ผิวหนังหนูก	p value
1	1.40 ± 0.06	0.2752	0.82 ± 0.02	0.0463
2	1.61 ± 0.22	-	0.30 ± 0.13	-
3	1.46 ± 0.13	0.2752	0.72 ± 0.01	0.0463
4	1.53 ± 0.17	0.3758	0.45 ± 0.05	0.1266
5	1.50 ± 0.08	0.5127	0.42 ± 0.08	0.2752
6	1.46 ± 0.02	0.5127	0.53 ± 0.05	0.0463
7	1.35 ± 0.08	0.1266	0.55 ± 0.05	0.0495
8	1.40 ± 0.13	0.2752	0.84 ± 0.06	0.0495
9	1.36 ± 0.21	0.1266	0.49 ± 0.03	0.1266
10	1.52 ± 0.18	0.5127	0.60 ± 0.06	0.0495
11	1.49 ± 0.32	0.5127	0.69 ± 0.05	0.0495
12	1.45 ± 0.24	0.2752	0.75 ± 0.08	0.0495

หมายเหตุ กลุ่ม 1 – ปกติ (ไม่ได้รับแสง UVB)

กลุ่ม 2 – ความคุม (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และน้ำเปล่า)

กลุ่ม 3 - positive control (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และวิตามินซีในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน)

กลุ่ม 4-6 - ได้รับแสง UVB และผลกล้วยน้ำว้าสุกบดละเอียดในปริมาณ 0.5, 1 และ 1.5

มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ตามลำดับ

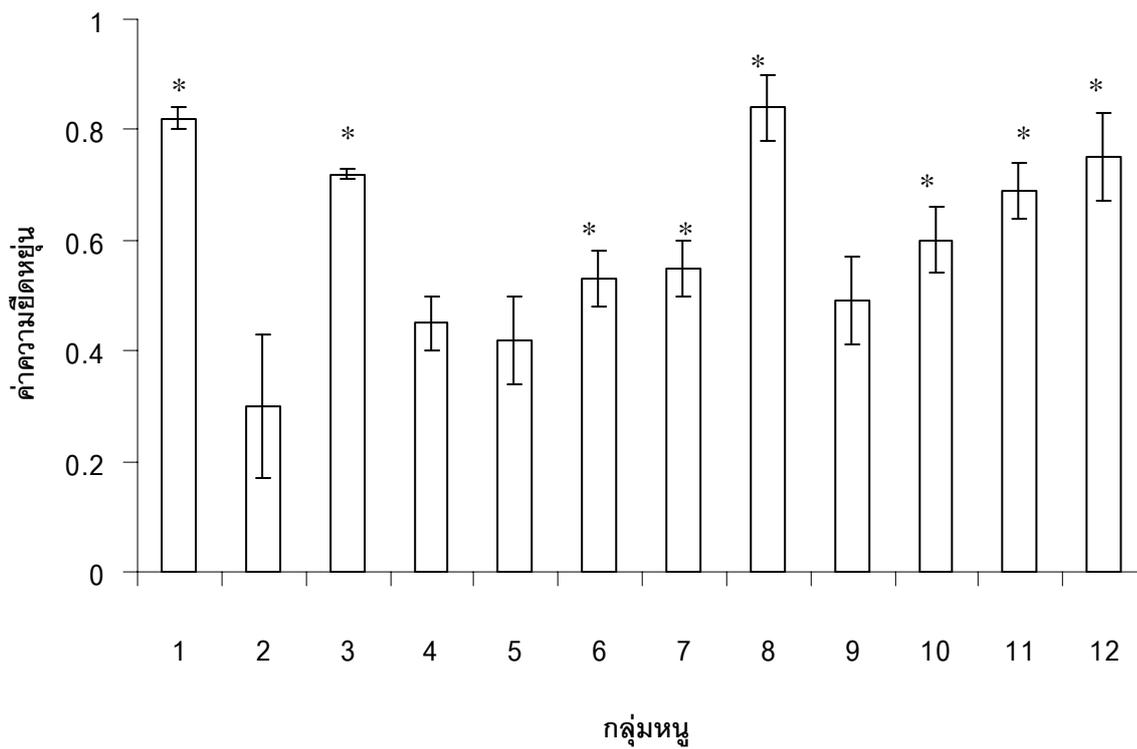
กลุ่ม 7-9 - ได้รับแสง UVB และผลกล้วยไข่สุกบดละเอียดในปริมาณ 0.5, 1 และ 1.5

มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ตามลำดับ

กลุ่ม 10-12 - ที่ได้รับแสง UVB และผลมะละกอสุกพันธุ์แขกดำบดละเอียดในปริมาณ 0.5, 1 และ

1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ตามลำดับ

p value ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Wilcoxon rank-sum test ทำการเปรียบเทียบกับกลุ่ม  
ความคุม



**รูปที่ 11** ความยี่ดหยุ่นของผิวหนังหนูก เมื่อได้รับแสง UVB ร่วมกับน้ำเปล่า วิตามินซีหรือผลไม้สุก ควบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์ (N=3) (\*,  $p < 0.05$ , Wilcoxon rank-sum test โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)

**หมายเหตุ** กลุ่ม 1 – ปกติ (ไม่ได้รับแสง UVB)

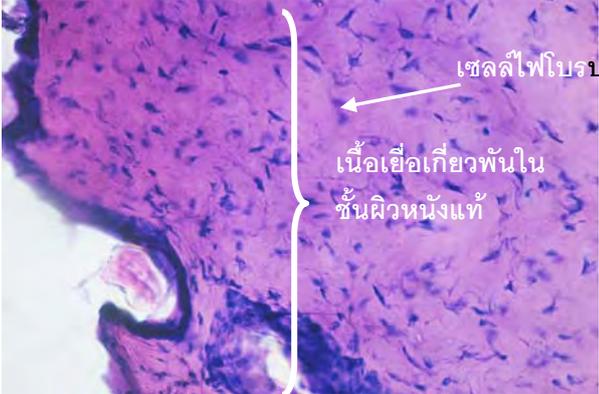
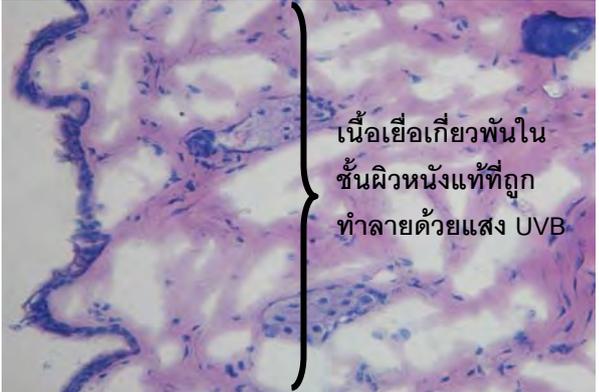
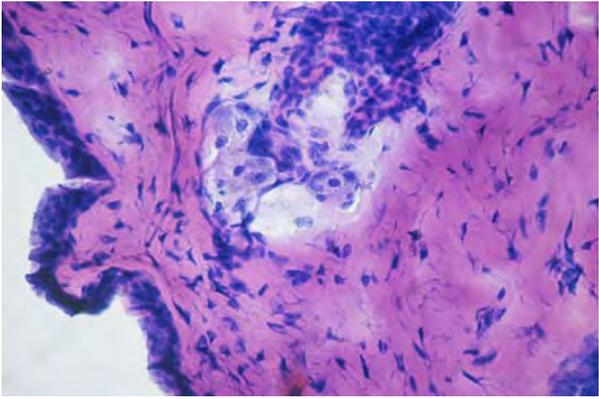
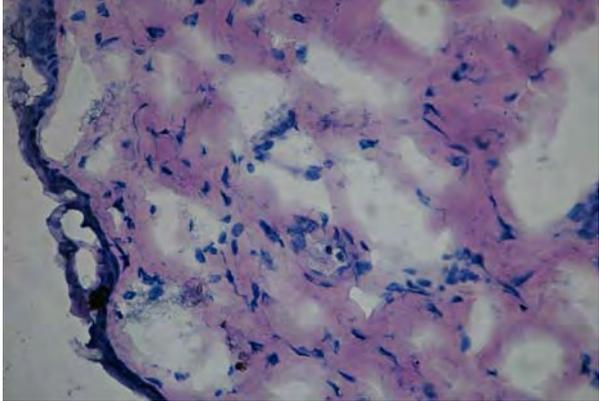
กลุ่ม 2 – ควบคุม (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และน้ำเปล่า)

กลุ่ม 3 - positive control (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และวิตามินซีในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน)

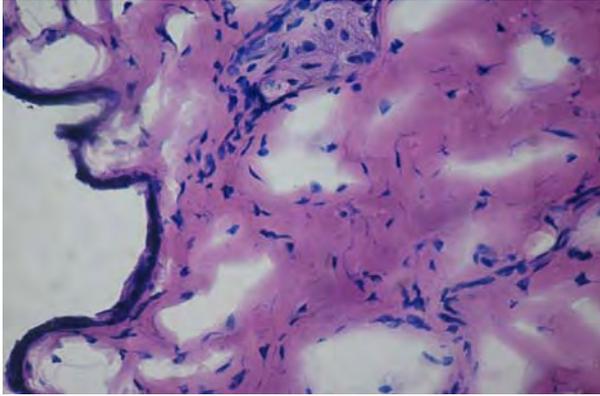
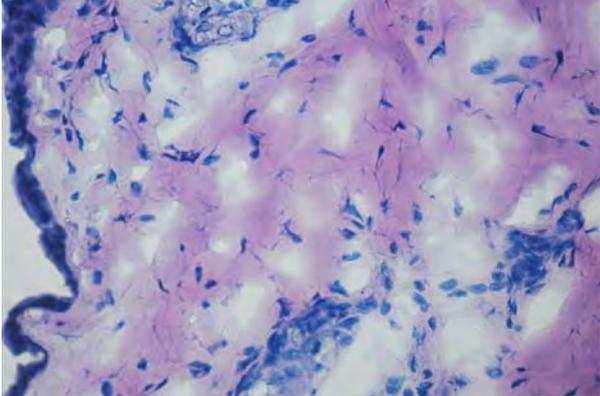
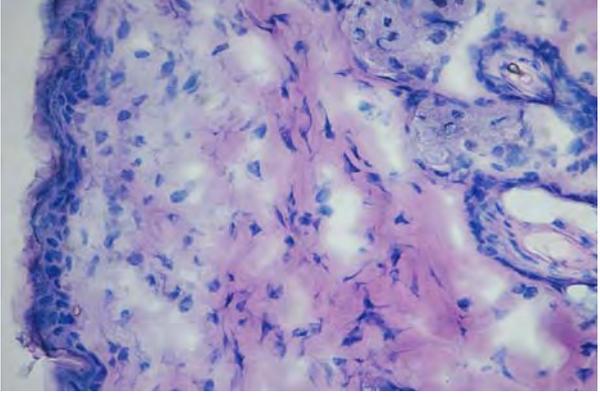
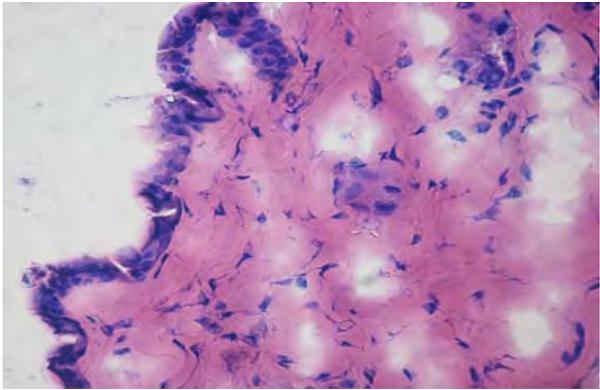
กลุ่ม 4-6 - ได้รับแสง UVB และผลกล้วยน้ำว้าสุกบดละเอียดในปริมาณ 0.5, 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ตามลำดับ

กลุ่ม 7-9 - ได้รับแสง UVB และผลกล้วยไข่สุกบดละเอียดในปริมาณ 0.5, 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ตามลำดับ

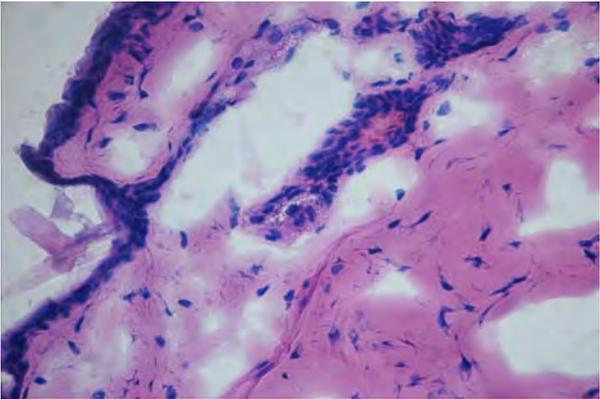
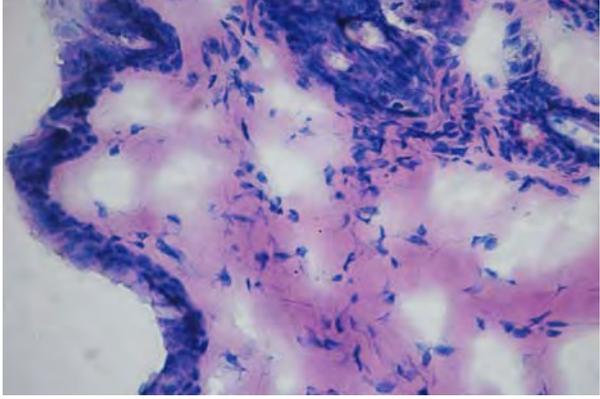
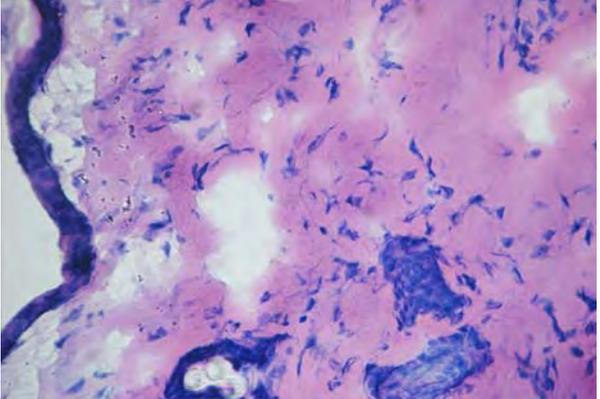
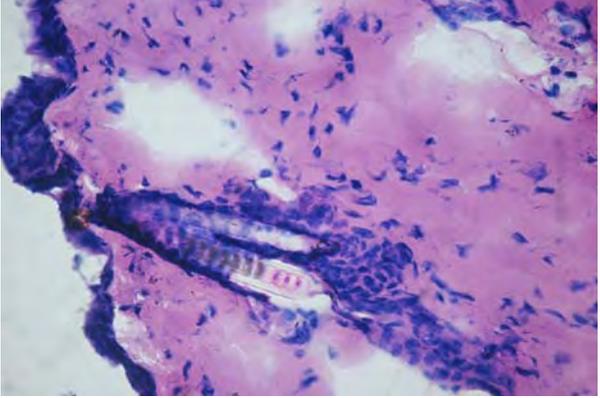
กลุ่ม 10-12 - ที่ได้รับแสง UVB และผลมะละกอสุกพั่นชิ้นแช่แข็งบดละเอียดในปริมาณ 0.5, 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ตามลำดับ

ตัวอย่างเนื้อเยื่อ	กำลังขยาย 400 เท่า
<p>กลุ่มที่ 1 (กลุ่มปกติ)</p>	 <p>เซลล์ไฟโบรบลาสต์</p> <p>เนื้อเยื่อเกี่ยวพันในชั้นผิวหนังแท้</p>
<p>กลุ่มที่ 2 (กลุ่มควบคุม ได้แก่ กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และน้ำเปล่า)</p>	 <p>เนื้อเยื่อเกี่ยวพันในชั้นผิวหนังแท้ที่ถูกทำลายด้วยแสง UVB</p>
<p>กลุ่มที่ 3 (กลุ่ม positive control ได้แก่ กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และวิตามินซี ปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน)</p>	
<p>กลุ่มที่ 4 (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และกล้วยน้ำว้าสุกบดละเอียด 0.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน)</p>	

รูปที่ 12 แสดงลักษณะทางจุลกายวิภาค (histology) ของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนู เมื่อได้รับแสง UVB ร่วมกับน้ำเปล่า วิตามินซีหรือผลไม้สุก ครบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์

ตัวอย่างเนื้อเยื่อ	กำลังขยาย 400 เท่า
<p>กลุ่มที่ 5 (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และ กล้วยน้ำว้าสุกบดละเอียด 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน)</p>	
<p>กลุ่มที่ 6 (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และ กล้วยน้ำว้าสุกบดละเอียด 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน)</p>	
<p>กลุ่มที่ 7 (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และ กล้วยไข่สุกบดละเอียด 0.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน)</p>	
<p>กลุ่มที่ 8 (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และ กล้วยไข่สุกบดละเอียด 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน)</p>	

รูปที่ 12 (ต่อ) แสดงลักษณะทางจุลกายวิภาค (histology) ของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนูก เมื่อได้รับแสง UVB ร่วมกับน้ำเปล่า วิตามินซีหรือผลไม้สุก ครบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์

ตัวอย่างเนื้อเยื่อ	กำลังขยาย 400 เท่า
<p>กลุ่มที่ 9 (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และ กล้วยไข่สุกบดละเอียด 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน)</p>	
<p>กลุ่มที่ 10 (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และ มะละกอสุกพันธุ์แขกดำ บดละเอียด 0.5 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน)</p>	
<p>กลุ่มที่ 11 (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และ มะละกอสุกพันธุ์แขกดำ บดละเอียด 1 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน)</p>	
<p>กลุ่มที่ 12 (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และ มะละกอสุกพันธุ์แขกดำ บดละเอียด 1.5 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน)</p>	

รูปที่ 12 (ต่อ) แสดงลักษณะทางจุลกายวิภาค (histology) ของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนูก เมื่อได้รับแสง UVB ร่วมกับน้ำเปล่า วิตามินซีหรือผลไม้สุก ครบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์

จากการรวบรวมรายงานการศึกษาทำให้สามารถสรุปได้ว่า รังสี UV สามารถกระตุ้นการทำงานของ cytokine และ growth factor receptor ที่อยู่บริเวณเซลล์ผิวหนัง ได้แก่ epidermal growth factor (EGF), interleukin (IL) และ tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) [9] การกระตุ้นการทำงานของ receptors เหล่านี้ยังไม่เป็นที่เข้าใจกันดี แต่คาดว่าอาจจะเกิดจากการที่รังสี UV ไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ tyrosine kinase ที่ทำหน้าที่เติมหมู่ phosphate ที่ tyrosine residue ของ receptor แล้วส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ receptor [10, 11] หรืออาจเกิดจาก ROS ที่เป็นผลผลิตจากการที่ผิวหนังสัมผัสกับรังสี UV ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosine phosphatase ที่มีความจำเพาะกับโปรตีนแต่ละชนิด โดยเอนไซม์ชนิดนี้จะทำหน้าที่เอาหมู่ phosphate ออกจาก receptor [12-14] (ซึ่งจะมีหน้าที่ตรงข้ามกับเอนไซม์ tyrosine kinase) หรือเกิดจากการที่ ROS ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโปรตีนของ receptor ส่งผลให้เกิดกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ตามมา [11] รังสี UV จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ผิวหนังภายใน 1 ชั่วโมง และถึงจุดสูงสุดภายใน 4 ชั่วโมง หลังจากได้รับรังสี โดยส่งสัญญาณผ่านการกระตุ้นเอนไซม์ protein kinase [15, 16] การกระตุ้นเอนไซม์นี้ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการแสดงออกและการทำงานของ nuclear transfection factor ชนิด AP-1 เช่น โปรตีน Jun และ Fos ทำให้การแสดงออกของยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทำลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในชั้นผิวหนังแท้เพิ่มขึ้น ยีนเหล่านี้ได้แก่ metalloproteinase (MMP)-1 ซึ่งจะแสดงออกเอนไซม์ MMP-1 (interstitial collagenase หรือ collagenase 1) ที่ทำหน้าที่ย่อยสลาย collagen type I และ III ในเบื้องต้น, MMP-9 ซึ่งจะแสดงออกเอนไซม์ MMP-9 (92-kd gelatinase, gelatinase B) ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายชิ้นส่วนของโปรตีนที่เหลือจากการย่อยสลายโดยเอนไซม์ collagenase และ MMP-3 ซึ่งจะแสดงออกเอนไซม์ MMP-3 (stromelysin 1) ที่ทำหน้าที่ย่อยสลาย collagen type IV และกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ proMMP-1 [17] นอกจากนี้รังสี UV ยังกระตุ้นการทำงานของ transcription factor NF- $\kappa$ B [18] ซึ่งส่งผลให้ยีนของ cytokine ชนิดต่างๆที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบมีการแสดงออกมากขึ้น ยีนเหล่านี้ได้แก่ IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 และ IL-8 [19] โปรตีนที่เป็นผลผลิตของยีนเหล่านี้จะจับกับ receptor ทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ AP-1 และ NF- $\kappa$ B ซึ่งเท่ากับเป็นการขยายผลของรังสี UV ต่อการตอบสนองของเซลล์ผิวหนัง

ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า การลดลงหรือการเปลี่ยนแปลงปริมาณและโครงสร้างของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในชั้นผิวหนังแท้ที่พบในการศึกษานี้ เป็นผลมาจากอนุมูลอิสระที่สะสมที่ผิวหนังอันเป็นผลเนื่องมาจากการสัมผัสกับแสง UVB เป็นเวลานาน ส่งผลให้เกิดกระบวนการทางชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ metalloproteinase ในระดับยีนและโปรตีน และการได้รับวิตามินซี ผลลัพธ์สูงสุดที่ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน หรือผลมะละกอสุกพันธุ์แขกดำที่ปริมาณ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ขณะที่ได้รับแสง UVB อาจช่วยลดกระบวนการทางชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ metalloproteinase โดยผ่านทางความสามารถในการเป็น free radical scavenging และ/หรือกลไกอื่นๆ

เช่น มีผลในการกระตุ้นการสร้างซีโมเลกุล ที่สามารถทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชันที่มีอยู่แล้วในร่างกาย (endogenous antioxidants) ได้แก่ glutathione เป็นต้น

#### 4. ปริมาณ TGF- $\beta$ 1 และ glutathione

นอกเหนือไปจากการกระตุ้น signal transduction pathway ส่งผลให้ปริมาณของเอนไซม์ MMP ที่ทำลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเพิ่มมากขึ้นแล้ว รังสี UV ทำให้การสังเคราะห์ collagen ลดลง โดยเฉพาะทำให้การแสดงออกของยีน procollagen type I และ type III ลดลง [20] รวมทั้งทำให้โครงสร้างของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีการเปลี่ยนแปลง จากที่กล่าวในข้างต้นว่ารังสี UV ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการแสดงออกและการทำงานของ AP-1 ที่มีผลต่อการแสดงออกของยีน MMP จากการศึกษามากมายพบว่า AP-1 นี้ยังรบกวนการสังเคราะห์ collagen โดยการจับกับองค์ประกอบที่เป็นส่วนหนึ่งของโมเลกุลที่ทำหน้าที่ก่อให้เกิดการแสดงออกยีน procollagen type I ได้แก่ ยีน COL1A1 และ COL1A2 นอกจากนี้ยังพบว่า AP-1 ก่อให้เกิดการสังเคราะห์ collagen น้อยลงโดยเกี่ยวข้องกับ transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [21-23] ซึ่งเป็น cytokine สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน หรืออาจกล่าวได้ว่า TGF- $\beta$  เป็นกลุ่มซีโมเลกุลที่สำคัญที่ส่งผลต่อการผลิตคอลลาเจน

และจากที่กล่าวข้างต้นว่า โดยปกติร่างกายสามารถป้องกันการทำลายจากอนุมูลอิสระที่ความเข้มข้นต่ำๆ โดยการสร้างระบบป้องกันตัวเอง ได้แก่ สารต้านการเกิดออกซิเดชัน (endogenous antioxidants) ซึ่งประกอบไปด้วยสารหรือเอนไซม์ต่างๆ เช่น superoxide dismutase (SOD) และ catalase (CAT) เป็นต้น รวมทั้ง glutathione ซึ่งสารเหล่านี้จะชะลอหรือป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ของสาร (substrate) ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ ด้วยเหตุนี้คณะผู้ดำเนินการวิจัยจึงได้ทำการประเมินระดับของสารในกลุ่ม TGF- $\beta$  ได้แก่ TGF- $\beta$ 1 โดยใช้ TGF- $\beta$ 1 ELISA kit และระดับของสาร glutathione โดยใช้ Total Glutathione Quantification kit ในตัวอย่างผิวหนังหนู เพื่อพิสูจน์ว่าการได้รับวิตามินซี ผลกล้วยไข่สุกหรือผลมะละกอสุกพันธุ์แขกดำขณะที่ได้รับแสง UVB ซึ่งช่วยลดการเปลี่ยนแปลงหรือทำลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในชั้นผิวหนังแท้นั้น สัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงระดับของ TGF- $\beta$ 1 และ glutathione หรือไม่

หลังจากการทดลองเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ผิวหนังบริเวณส่วนหลังของหนูถูกตัดเพื่อนำมาสกัดโปรตีนโดยใช้ protein extraction reagent แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ได้จากการสกัดโดยใช้ DC protein assay (รายละเอียดของข้อมูลและวิธีการคำนวณ แสดงในภาคผนวกที่ 6) ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 3 พบว่าปริมาณโปรตีนในผิวหนังของกลุ่มหนูที่ได้รับแสง UVB พร้อมน้ำเปล่า (กลุ่ม control) มีแนวโน้มลดลง แต่อย่างไรก็ตามค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ได้จากกลุ่มปกติหรือกลุ่มอื่นๆ

เมื่อพิจารณาที่ระดับของ TGF- $\beta$ 1 ดังแสดงในตารางที่ 4 และรูปที่ 13 (รายละเอียดของข้อมูลและวิธีการคำนวณ แสดงในภาคผนวกที่ 7) พบว่าผิวหนังของกลุ่มหนูที่ได้รับแสง UVB พร้อมน้ำเปล่า (กลุ่มควบคุม) มีระดับของ TGF- $\beta$ 1 ลดลง แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูปกติ (ไม่ได้รับแสง UVB) การได้รับวิตามินซีในขนาดที่ใช้ในการศึกษา มีผลให้ระดับของ TGF- $\beta$ 1 เพิ่มขึ้น โดยมีระดับใกล้เคียงกับกลุ่มหนูปกติ เป็นที่น่าสังเกตที่พบว่าการได้รับผลกล้วยไข่สุกที่ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ทำให้ระดับของ TGF- $\beta$ 1 เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน (แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม) การได้รับผลมะละกอสุกพันธุ์แขกดำที่ปริมาณ 1 ทำให้ระดับของ TGF- $\beta$ 1 เพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับหนูกลุ่มปกติถึงแม้จะไม่มีมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อได้รับผลมะละกอสุกเพิ่มสูงขึ้นเป็น 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน พบว่าระดับของ TGF- $\beta$ 1 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

สำหรับระดับของ glutathione ดังที่แสดงในตารางที่ 4 และรูปที่ 14 (รายละเอียดของข้อมูลและวิธีการคำนวณ แสดงในภาคผนวกที่ 8) พบว่าผิวหนังของกลุ่มหนูที่ได้รับแสง UVB พร้อมน้ำเปล่า (กลุ่มควบคุม) มีระดับของ glutathione ลดลงและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูปกติ (ไม่ได้รับแสง UVB) การได้รับวิตามินซีในขนาดที่ใช้ในการศึกษา มีผลให้ระดับของ glutathione เพิ่มขึ้น โดยมีระดับใกล้เคียงกับกลุ่มหนูปกติ เป็นที่น่าสังเกตที่พบว่าการได้รับผลกล้วยน้ำว้าในขนาดกลางและสูง คือ 1 หรือ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน หรือการได้รับผลกล้วยไข่สุกหรือมะละกอสุกพันธุ์แขกดำในทุกขนาดที่ใช้ในการศึกษา ทำให้ระดับของ glutathione เพิ่มขึ้น (แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม) โดยเฉพาะกลุ่มที่ได้รับผลกล้วยไข่สุกที่ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน และมะละกอสุกพันธุ์แขกดำที่ปริมาณ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน

จากข้อสมมติฐานที่ว่า การลดการเปลี่ยนแปลงหรือทำลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในชั้นผิวหนังแท้ อันเนื่องมาจากการได้รับวิตามินซีปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน ผลกล้วยไข่สุกที่ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน หรือมะละกอสุกพันธุ์แขกดำที่ปริมาณ 1 ถึง 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ในขณะที่ได้รับแสง UVB ติดต่อกันเป็นเวลา 12 สัปดาห์นั้นสัมพันธ์กับระดับของ TGF- $\beta$ 1 และ glutathione หรือไม่ คำตอบที่ได้ก็คือพบว่าแนวโน้มมีความสัมพันธ์กัน จากการประมวลผลการศึกษาของนักวิจัยอื่นๆ ที่ผ่านมาในแง่ผลของรังสี UVB ต่อระดับของโปรตีน TGF- $\beta$ 1 และ glutathione นั้น พบว่ามีความหลากหลาย ขึ้นกับสายพันธุ์ของสัตว์ทดลองที่ใช้ รูปแบบของการให้แสง (ให้ครั้งเดียวหรือให้ติดต่อกัน) และช่วงความยาวคลื่นและความเข้มที่ให้ เป็นต้น [27 – 30] อย่างไรก็ตามผลของการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการที่หนูเมาส์ ICR เพศผู้ ได้รับแสง UVB ในช่วงความยาวคลื่น 275 – 305 นาโนเมตร ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ส่งผลให้ระดับของ TGF- $\beta$ 1 และ glutathione ลดลง ร่วมกับการ

เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของผิวหนัง ได้แก่ ริ้วรอยและความยืดหยุ่น การได้รับผลไม้สุก ได้แก่ กล้วยไข่ ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน และมะละกอพันธุ์แขกดำในปริมาณ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน นอกจากจะช่วยรักษาสภาพและคุณสมบัติของผิวหนังและช่วยเพิ่มระดับของ glutathione ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชันโดยธรรมชาติแล้ว ยังส่งผลให้ช่วยรักษาระดับ TGF- $\beta$ 1 ที่มีผลต่อการสร้าง procollagen อีกด้วย

ในการศึกษานี้พบว่า การได้รับผลกล้วยน้ำว้าสุกในขนาด 0.5 ถึง 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ไม่ส่งผลชัดเจนในการป้องกันการเสื่อมสภาพของผิวหนังโดยรังสี UVB และการคงสภาพของชีวโมเลกุล ได้แก่ TGF- $\beta$ 1 ซึ่งอาจเนื่องมาจากคุณสมบัติในการเป็น free radical scavenging น้อยกว่าผลกล้วยไข่สุกถึง 10 เท่า (ประเมินจากค่า EC50) แต่เป็นที่น่าสงสัยว่า กล้วยไข่สุกในปริมาณ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ไม่มีผลในการป้องกันการเสื่อมสภาพของรังสี UVB เช่นกัน อาจเป็นไปได้ที่ในผลไม้สุกนั้นมีปริมาณน้ำตาลค่อนข้างสูง การได้รับเข้าไปในปริมาณที่มากเกินไปเกินความต้องการ (ในที่นี้คือ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน) อาจส่งผลต่อระดับน้ำตาลในเลือด และในที่สุดส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของ collagen เนื่องจากมีรายงานที่แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างระดับน้ำตาลในเลือด การสะสมของ glycation end products และการเสื่อมสภาพของ collagen [31, 32]

## 5. การแสดงออกของ collagen type I และ III

หลังจากการทดลองเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ผิวหนังบริเวณส่วนหลังของหนูถูกตัดออกมา เพื่อสังเกตการกระจายของโปรตีน collagen type I และ III โดยใช้หลักการ Immunofluorescence แล้วสังเกตผ่านกล้อง fluorescence โดยสารเรืองแสงสีส้มของ Cy5<sup>®</sup> แสดงโปรตีน collagen type I และสารเรืองแสงสีเขียวของ FitC แสดงโปรตีน collagen type III ดังที่แสดงในรูปที่ 15 ผลที่ได้เป็นการยืนยันผลการศึกษาข้างต้น กล่าวคือ การได้รับวิตามินซีปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน ผลกล้วยไข่สุกที่ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน และมะละกอสุกพันธุ์แขกดำที่ปริมาณ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ในขณะที่ได้รับแสง UVB ติดต่อกันเป็นเวลา 12 สัปดาห์ จะส่งผลชัดเจนในการลดการเปลี่ยนแปลงหรือทำลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง collagen type I ในชั้นผิวหนังแท้ อันเนื่องมาจากรังสี UVB

ตารางที่ 3 ปริมาณโปรตีนทั้งหมด ในตัวอย่างผิวหนังหนุแต่ละกลุ่มเมื่อได้รับแสง UVB ร่วมกับน้ำเปล่า วิตามินซีหรือผลไม้สุก ครบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์ (N=3)

ตัวอย่างกลุ่มที่	ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างผิวหนังหนุ (เปอร์เซ็นต์)
1	39.4 ± 7.3
2	38.7 ± 2.2
3	43.9 ± 3.4
4	42.1 ± 1.9
5	43.9 ± 5.7
6	45.5 ± 1.9
7	43.7 ± 2.2
8	45.5 ± 8.6
9	47.5 ± 8.9
10	47.7 ± 4.9
11	46.9 ± 0.8
12	49.9 ± 2.9

หมายเหตุ กลุ่ม 1 - ปกติ (ไม่ได้รับแสง UVB)

กลุ่ม 2 - ควบคุม (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และน้ำเปล่า)

กลุ่ม 3 - positive control (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และวิตามินซีในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน)

กลุ่ม 4-6 - ได้รับแสง UVB และผลกล้วยน้ำว้าสุกบดละเอียดในปริมาณ 0.5, 1 และ 1.5

มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ตามลำดับ

กลุ่ม 7-9 - ได้รับแสง UVB และผลกล้วยไข่สุกบดละเอียดในปริมาณ 0.5, 1 และ 1.5

มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ตามลำดับ

กลุ่ม 10-12 - ที่ได้รับแสง UVB และผลมะละกอสุกพันธุ์แขกดำบดละเอียดในปริมาณ 0.5, 1 และ

1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ตามลำดับ

ตารางที่ 4 ปริมาณของ TGF- $\beta$ 1 และ glutathione ในตัวอย่างผิวหนังหนุแต่ละกลุ่มเมื่อได้รับแสง UVB ร่วมกับน้ำเปล่า วิตามินซีหรือผลไม้สุก ครอบคลุมระยะเวลา 12 สัปดาห์ (N=3)

ตัวอย่าง กลุ่มที่	ปริมาณ TGF- $\beta$ 1 (พิโคกรัม) ในตัวอย่างผิวหนัง 1 มิลลิกรัม	p value	ปริมาณ Total glutathione (นาโนกรัม) ในตัวอย่างผิวหนัง 1 มิลลิกรัม	p value
1	3.9 $\pm$ 0.3	0.184	76.4 $\pm$ 7.6	0.0495
2	2.9 $\pm$ 0.8	-	48.3 $\pm$ 2.9	-
3	3.7 $\pm$ 0.4	0.2752	85.9 $\pm$ 7.3	0.0495
4	2.8 $\pm$ 0.6	0.8248	51.5 $\pm$ 4.8	0.3758
5	2.9 $\pm$ 0.6	0.8273	56.3 $\pm$ 4.7	0.0495
6	3.1 $\pm$ 0.3	0.5127	62.4 $\pm$ 5.5	0.0495
7	3.4 $\pm$ 0.4	0.2752	60.7 $\pm$ 4.6	0.0495
8	4.7 $\pm$ 0.4	0.0495	107.8 $\pm$ 9.5	0.0495
9	3.2 $\pm$ 0.6	0.8273	73.4 $\pm$ 7.0	0.0495
10	3.3 $\pm$ 0.6	0.3758	75.0 $\pm$ 7.8	0.0495
11	4.0 $\pm$ 0.9	0.1266	90.0 $\pm$ 6.9	0.0495
12	4.3 $\pm$ 0.4	0.0495	107.1 $\pm$ 4.2	0.0495

หมายเหตุ กลุ่ม 1 – ปกติ (ไม่ได้รับแสง UVB)

กลุ่ม 2 – ควบคุม (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และน้ำเปล่า)

กลุ่ม 3 - positive control (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และวิตามินซีในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน)

กลุ่ม 4-6 - ได้รับแสง UVB และผลกล้วยน้ำว้าสุกบดละเอียดในปริมาณ 0.5, 1 และ 1.5

มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ตามลำดับ

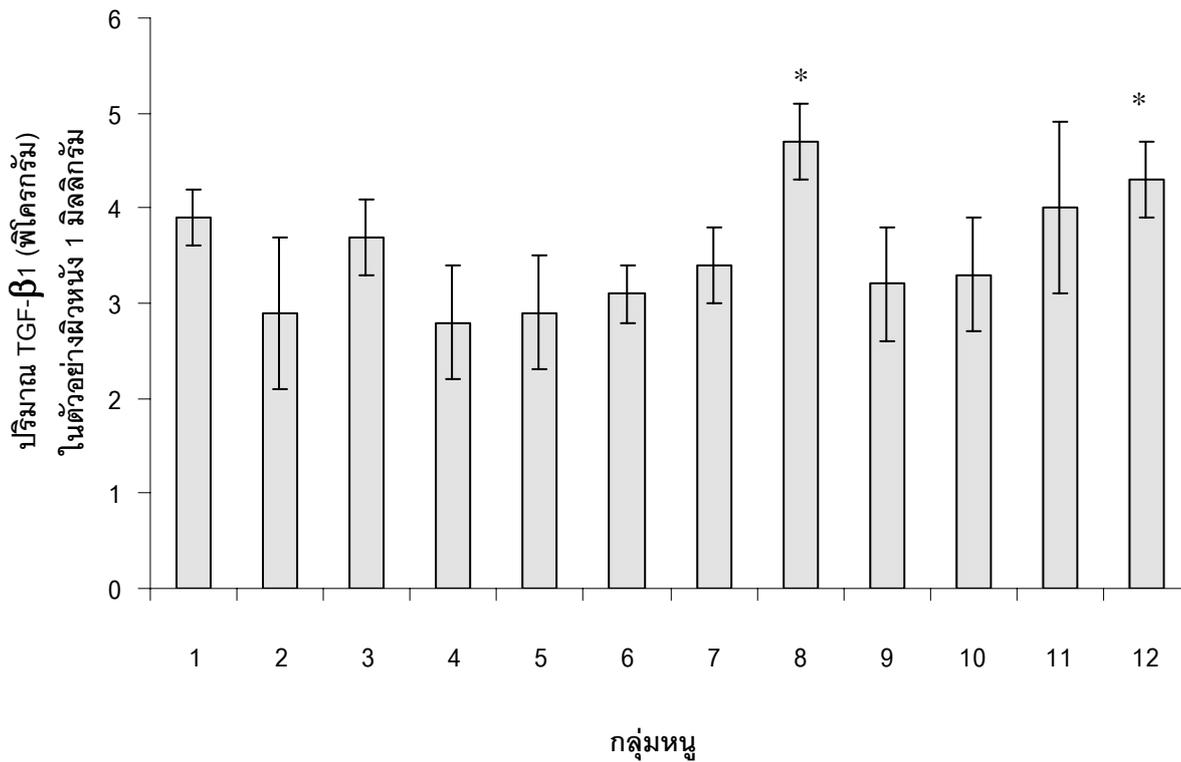
กลุ่ม 7-9 - ได้รับแสง UVB และผลกล้วยไข่สุกบดละเอียดในปริมาณ 0.5, 1 และ 1.5

มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ตามลำดับ

กลุ่ม 10-12 - ที่ได้รับแสง UVB และผลมะละกอสุกพันธุ์แขกดำบดละเอียดในปริมาณ 0.5, 1 และ

1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ตามลำดับ

p value ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Wilcoxon rank-sum test ทำการเปรียบเทียบกับกลุ่ม  
ควบคุม



**รูปที่ 13** ปริมาณ TGF-β1 ในผิวหนังหนุ เมื่อได้รับแสง UVB ร่วมกับน้ำเปล่า วิตามินซีหรือผลไม้สุก ครบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์ (N=3) (\*, p < 0.05, Wilcoxon rank-sum test โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)

**หมายเหตุ** กลุ่ม 1 – ปกติ (ไม่ได้รับแสง UVB)

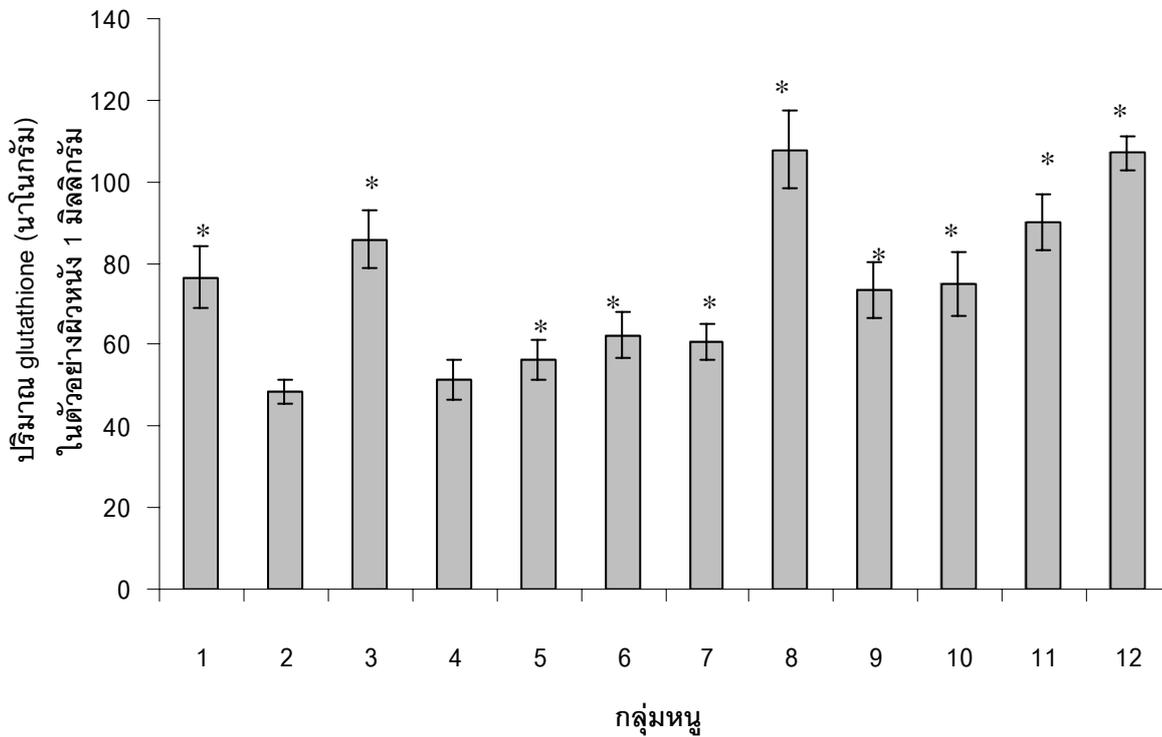
กลุ่ม 2 – ควบคุม (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และน้ำเปล่า)

กลุ่ม 3 - positive control (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และวิตามินซีในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน)

กลุ่ม 4-6 - ได้รับแสง UVB และผลกล้วยน้ำว้าสุกบดละเอียดในปริมาณ 0.5, 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ตามลำดับ

กลุ่ม 7-9 - ได้รับแสง UVB และผลกล้วยไข่สุกบดละเอียดในปริมาณ 0.5, 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ตามลำดับ

กลุ่ม 10-12 - ที่ได้รับแสง UVB และผลมะละกอสุกพันธุ์แขกดำบดละเอียดในปริมาณ 0.5, 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ตามลำดับ



**รูปที่ 14** ปริมาณ glutathione ในผิวหนังหนู เมื่อได้รับแสง UVB ร่วมกับน้ำเปล่า วิตามินซีหรือผลไม้สุก ครบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์ (N=3) (\*, p < 0.05, Wilcoxon rank-sum test โดยเปรียบเทียบกับ กลุ่ม ควบคุม)

**หมายเหตุ** กลุ่ม 1 – ปกติ (ไม่ได้รับแสง UVB)

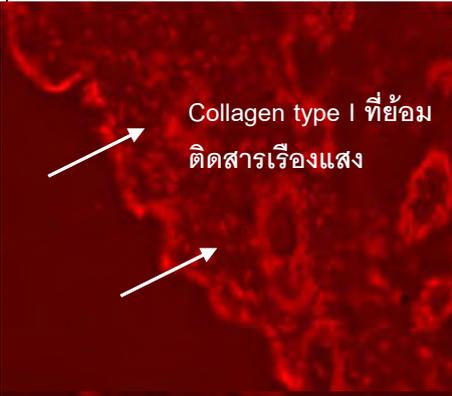
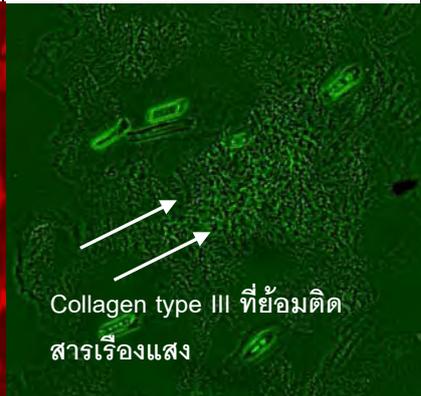
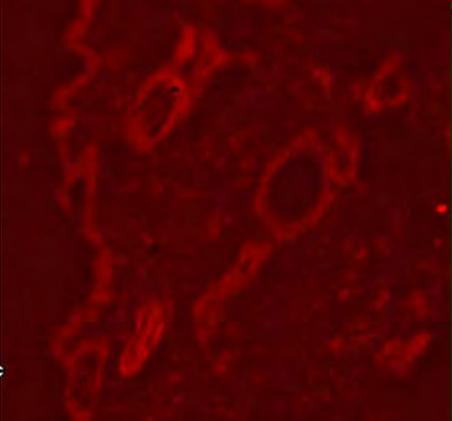
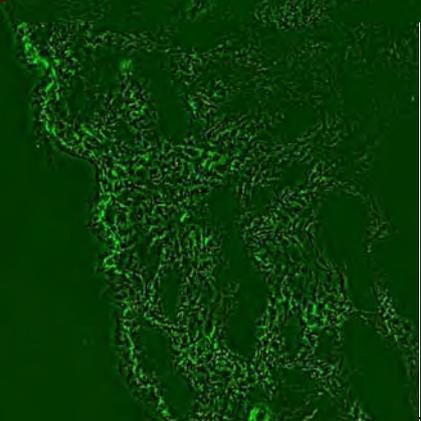
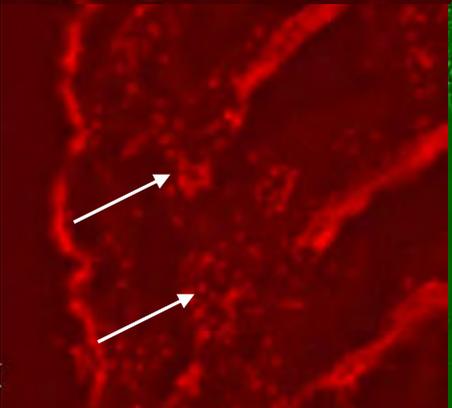
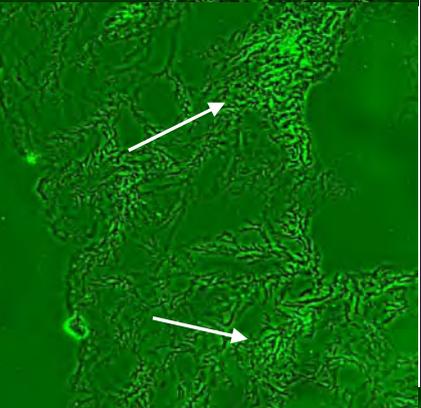
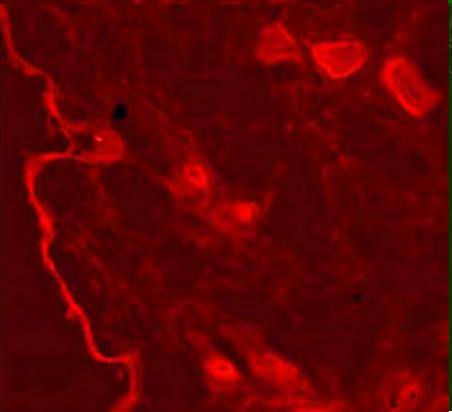
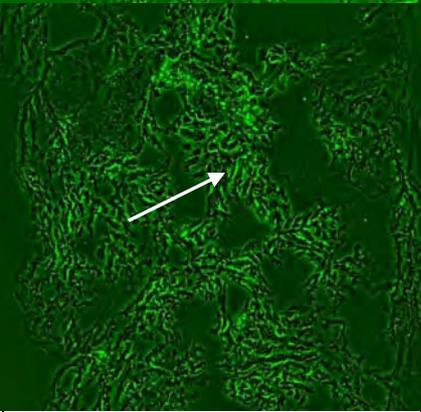
กลุ่ม 2 – ควบคุม (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และน้ำเปล่า)

กลุ่ม 3 - positive control (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และวิตามินซีในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน)

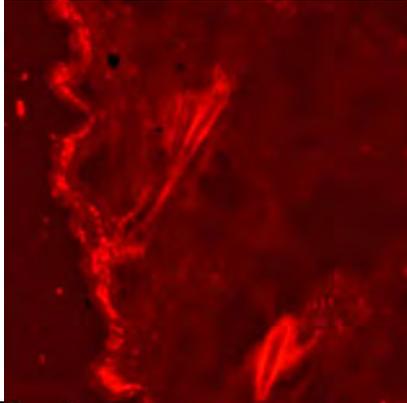
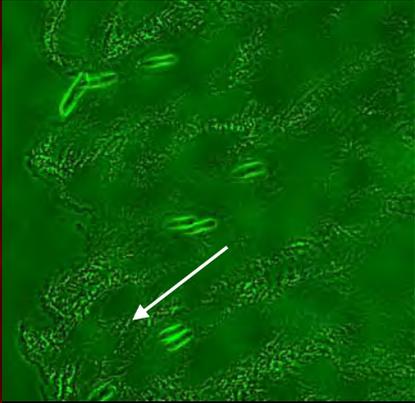
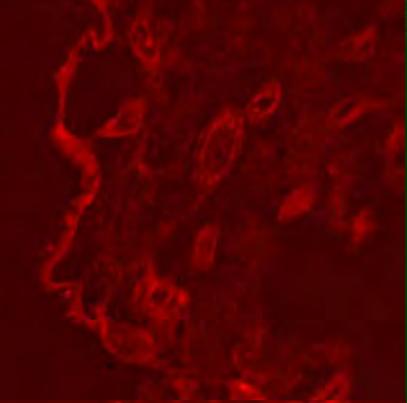
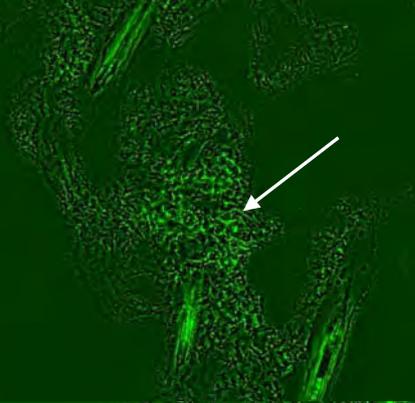
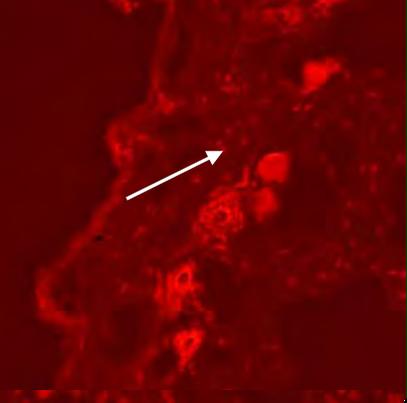
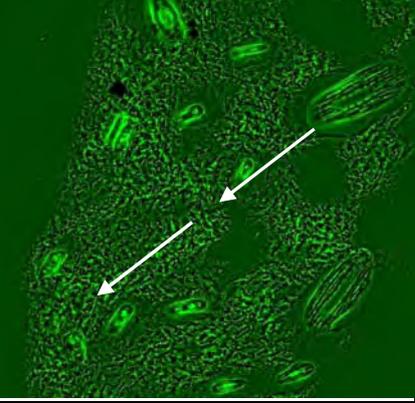
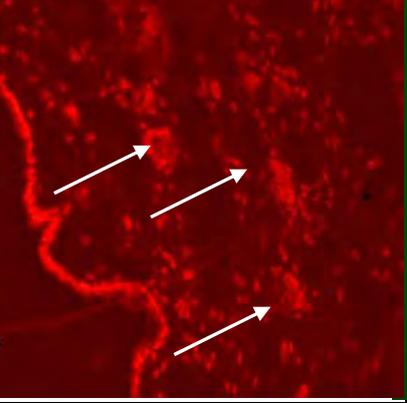
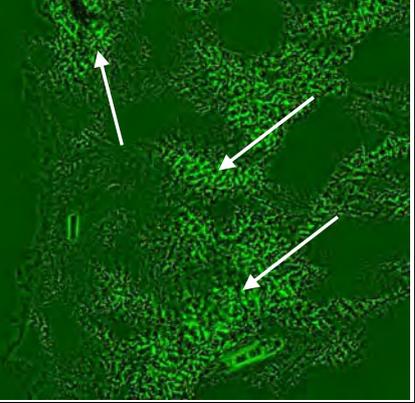
กลุ่ม 4-6 - ได้รับแสง UVB และผลกล้วยน้ำว้าสุกบดละเอียดในปริมาณ 0.5, 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ตามลำดับ

กลุ่ม 7-9 - ได้รับแสง UVB และผลกล้วยไข่สุกบดละเอียดในปริมาณ 0.5, 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ตามลำดับ

กลุ่ม 10-12 - ที่ได้รับแสง UVB และผลมะละกอสุกพันธุ์แขกดำบดละเอียดในปริมาณ 0.5, 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ตามลำดับ

ตัวอย่างเนื้อเยื่อ	กำลังขยาย 100 เท่า	
	Collagen type I (Cy5 <sup>®</sup> )	Collagen type III (FitC)
<p>กลุ่มที่ 1 (กลุ่มปกติ)</p>	 <p>Collagen type I ที่ย้อม ติดสารเรืองแสง</p>	 <p>Collagen type III ที่ย้อมติด สารเรืองแสง</p>
<p>กลุ่มที่ 2 (กลุ่มควบคุม ได้แก่ กลุ่มที่ ได้รับแสง UVB และ น้ำเปล่า)</p>		
<p>กลุ่มที่ 3 (กลุ่ม positive control ได้แก่ กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และ วิตามินซี ปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน)</p>		
<p>กลุ่มที่ 4 (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และ กล้วยน้ำว้าสุกบดละเอียด 0.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน)</p>		

รูปที่ 15 แสดงการกระจายตัวของ collagen type I และ III ของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนู เมื่อได้รับแสง UVB ร่วมกับน้ำเปล่า วิตามินซีหรือผลไม้สุก ครบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์

ตัวอย่างเนื้อเยื่อ	กำลังขยาย 100 เท่า	
	Collagen type I (Cy5 <sup>®</sup> )	Collagen type III (FitC)
<p>กลุ่มที่ 5 (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และ กล้วยน้ำว้าสุกบดละเอียด 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน)</p>		
<p>กลุ่มที่ 6 (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และ กล้วยน้ำว้าสุกบดละเอียด 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน)</p>		
<p>กลุ่มที่ 7 (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และ กล้วยไข่สุกบดละเอียด 0.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน)</p>		
<p>กลุ่มที่ 8 (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และ กล้วยไข่สุกบดละเอียด 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน)</p>		

รูปที่ 15 (ต่อ) แสดงการกระจายตัวของ collagen type I และ III ของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนู เมื่อได้รับแสง UVB ร่วมกับน้ำเปล่า วิตามินซีหรือผลไม้สุก ครบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์

ตัวอย่างเนื้อเยื่อ	กำลังขยาย 100 เท่า	
	Collagen type I (Cy5 <sup>®</sup> )	Collagen type III (FitC)
<p>กลุ่มที่ 9 (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และ กล้วยไข่สุกบดละเอียด 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน)</p>		
<p>กลุ่มที่ 10 (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และ มะละกอสุกพันธุ์แขกดำ บดละเอียด 0.5 มิลลิกรัมต่อ น้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน)</p>		
<p>กลุ่มที่ 11 (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และ มะละกอสุกพันธุ์แขกดำ บดละเอียด 1 มิลลิกรัมต่อ น้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน)</p>		
<p>กลุ่มที่ 12 (กลุ่มที่ได้รับแสง UVB และ มะละกอสุกพันธุ์แขกดำ บดละเอียด 1.5 มิลลิกรัมต่อ น้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน)</p>		

รูปที่ 15 (ต่อ) แสดงการกระจายตัวของ collagen type I และ III ของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนู เมื่อได้รับแสง UVB ร่วมกับน้ำเปล่า วิตามินซีหรือผลไม้สุก ครบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์

## บทที่ 4

### สรุปผลการทดลอง

เป็นที่ทราบกันดีว่าผลไม้หลายชนิดอุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งช่วยในการลดการเกิดอุบัติการณ์ของโรคที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมถอยของอวัยวะภายในร่างกาย เช่น มะเร็ง ข้อเสื่อม โรคหัวใจ และหลอดเลือด เป็นต้น รวมทั้งการแก่ก่อนวัยอันเนื่องมาจากสิ่งกระตุ้นจากภายนอก สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในผลไม้ส่วนใหญ่ ได้แก่ สารในกลุ่ม flavonoids, วิตามิน ซี, เอ, บี และอี รวมทั้ง carotenoids ที่พบในผลไม้บางชนิด เช่น มะละกอ เมื่อเร็วๆ นี้มีผลงานวิจัยที่ชี้ให้เห็นว่ามะละกอ (*Carica papaya* L., solo cultivar) และกล้วย (*Musa sapientum*, pisang mas cultivar) เป็นผลไม้ที่น่าสนใจในแง่ที่มีประสิทธิภาพสูงในการจับกับ (chelating activity) Fe (II) ซึ่งเป็นโลหะที่เกี่ยวข้องกับการเกิด ROS ด้วยเหตุนี้คณะผู้ดำเนินการวิจัยจึงมีความสนใจที่จะนำผลไม้ไทย 3 ชนิด ได้แก่ กล้วยน้ำว้าสุก กล้วยไข่สุก และมะละกอสุกพันธุ์แขกดำ ที่เป็นพืชเศรษฐกิจที่ปลูกกันมากในประเทศไทย รวมทั้งที่จังหวัดพิษณุโลก มาศึกษาในเชิงลึกถึงประสิทธิภาพในการป้องกันการเสื่อมสภาพก่อนวัยของผิวหนังอันเนื่องมาจากได้รับรังสี UVB ติดต่อกัน (photo-aging) โดยได้ออกแบบการศึกษาในสัตว์ทดลอง ได้แก่ หนูที่ได้รับแสง UVB ติดต่อกันเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ซึ่งประสิทธิภาพในการป้องกัน photo-aging ประเมินจากลักษณะทางกายภาพของผิวหนังในระดับจุลกายภาคศาสตร์ รวมทั้งระดับของโปรตีน TGF- $\beta$ 1, glutathione, collagen type I และ III ที่มีอยู่ในผิวหนังหนูกุ่มที่ได้รับแสง UVB เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับแสงและสารสกัดจากเนื้อผลมะละกอ หรือกล้วย

การศึกษาเริ่มจากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอล (เทียบเท่ากับ gallic acid) ที่มีอยู่ในสารสกัดจากผลไม้สุก โดยใช้ Folin-Ciocalteu's reagent พบว่าสารสกัดจากกล้วยน้ำว้าสุกมีปริมาณฟีนอลเทียบเท่ากับ gallic acid ในปริมาณ  $144.1 \pm 5.0$  มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของเนื้อผลไม้สด สารสกัดจากกล้วยไข่สุกมีปริมาณฟีนอลเทียบเท่ากับ gallic acid ในปริมาณ  $304.8 \pm 5.4$  มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของเนื้อผลไม้สด และสารสกัดจากมะละกอสุกพันธุ์แขกดำมีปริมาณฟีนอลเทียบเท่ากับ gallic acid ในปริมาณ  $302.4 \pm 4.4$  มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของเนื้อผลไม้สด ในส่วนของการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของวิตามินซี (L-ascorbic acid) ที่ใช้เป็นสารอ้างอิง (positive control) และสารสกัดจากผลไม้ชนิดต่างๆ โดยใช้ DPPH assay ซึ่งแสดงค่าในรูปของ EC50 (ความเข้มข้นของสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านการเกิดออกซิเดชัน โดย free radical scavenging เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์) พบว่าวิตามินซีมีค่า EC50 เท่ากับ 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากกล้วยน้ำว้าสุกมีค่า EC50 เท่ากับ 108.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากกล้วยไข่สุกมีค่า EC50 เท่ากับ 16.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดจากมะละกอสุกพันธุ์แขกดำมีค่า EC50 เท่ากับ 33.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สำหรับการศึกษาผลของกล้วยน้ำว้าสุก กล้วยไข่สุก และมะละกอสุกพันธุ์แขกดำ ต่อการป้องกันการเสื่อมสภาพของผิวหนังเนื่องจากรังสี UVB ซึ่งเป็นการศึกษาในสัตว์ทดลอง โดยใช้หนูเมาส์สายพันธุ์ ICR เพศผู้ ภายหลังจากที่บริเวณส่วนหลังของหนูได้รับแสง UVB เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ตามลำดับความแรงที่กำหนด พร้อมกับได้รับน้ำเปล่า วิตามินซีหรือผลกล้วยน้ำว้าสุก กล้วยไข่สุก หรือมะละกอสุกพันธุ์แขกดำ พบว่าผิวหนังของหนูกลุ่มที่ได้รับแสง UVB ร่วมกับการได้รับน้ำเปล่ามีลักษณะหยาบ ขรุขระ มีริ้วรอย ร่วมกับมีรอยแดง ขณะที่หนูกลุ่มที่ได้รับวิตามินซีปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน ความขรุขระและริ้วรอยดังกล่าวลดลง เป็นที่น่าสังเกตว่ากลุ่มของหนูที่ได้รับผลกล้วยไข่สุกที่ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน หรือผลมะละกอสุกพันธุ์แขกดำที่ปริมาณ 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ลักษณะทางกายภาพของผิวหนังใกล้เคียงกับกลุ่มที่ได้รับวิตามินซี ขณะที่กลุ่มของหนูที่ได้รับผลกล้วยน้ำว้าสุกในปริมาณสูงสุดที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ยังพบริ้วรอยบางๆ บริเวณผิวหนังหนูที่ได้รับแสง UVB

นอกจากลักษณะทางกายภาพแล้ว ความหนาและยืดหยุ่นของตัวอย่างผิวหนังหนูได้ถูกประเมินจากผลที่ได้พบว่าความหนาของผิวหนังหนูไม่แตกต่างกันมากนัก ยกเว้นกลุ่มที่ได้รับแสง UVB พร้อมน้ำเปล่า (กลุ่มควบคุม) พบว่าผิวหนังของหนูมีแนวโน้มที่หนามากขึ้น อย่างไรก็ตามพบว่าคุณสมบัติของผิวหนังที่มีความแตกต่างในแต่ละกลุ่มอย่างเห็นได้ชัดได้แก่ ความยืดหยุ่น กล่าวคือผิวหนังของกลุ่มหนูที่ได้รับแสง UVB พร้อมน้ำเปล่า (กลุ่มควบคุม) มีความยืดหยุ่นลดลงและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูปกติ (ไม่ได้รับแสง UVB) การได้รับวิตามินซีในขนาดที่ใช้ในการศึกษา ผลกล้วยน้ำว้าสุกในปริมาณ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ผลกล้วยไข่สุกที่ปริมาณ 0.5 หรือ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน หรือผลมะละกอสุกพันธุ์แขกดำที่ปริมาณ 0.5 ถึง 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน จะทำให้ความยืดหยุ่นของผิวหนังดีขึ้น (แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม) อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสนใจว่าการได้รับผลกล้วยไข่สุกที่ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน หรือผลมะละกอสุกพันธุ์แขกดำที่ปริมาณ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน จะทำให้ความยืดหยุ่นของผิวหนังใกล้เคียงกับหนูกลุ่มปกติ ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าผลที่ได้จากการสังเกตลักษณะทางกายภาพของผิวหนัง และความยืดหยุ่นของหนูเป็นไปในทางเดียวกัน กล่าวคือการได้รับผลกล้วยไข่สุกที่ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน หรือผลมะละกอสุกพันธุ์แขกดำที่ปริมาณ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน สามารถลดหรือป้องกันการเสื่อมสภาพของผิวหนังเนื่องมาจากรังสี UVB ผลการทดลองที่ได้นี้มีแนวโน้มสอดคล้องกับผลที่ได้จากการศึกษาโครงสร้างในระดับจุลกายวิภาคศาสตร์ และการแสดงออกของโปรตีน collagen type I และ III กล่าวคือปริมาณของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในผิวหนังของหนูกลุ่มควบคุม ได้แก่ กลุ่มที่ได้รับแสง UVB ร่วมกับน้ำเปล่าลดลงและมีลักษณะของการเกิดการเชื่อมโยงระหว่างสายไฟบริล (crosslink) ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน การได้รับวิตามินซี ผลกล้วยไข่สุกที่ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน หรือผลมะละกอสุกพันธุ์แขก

ดำที่ปริมาณ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ขณะที่ได้รับแสง UVB ช่วยลดการเปลี่ยนแปลงหรือทำลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในชั้นผิวหนังแท้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง collagen type I

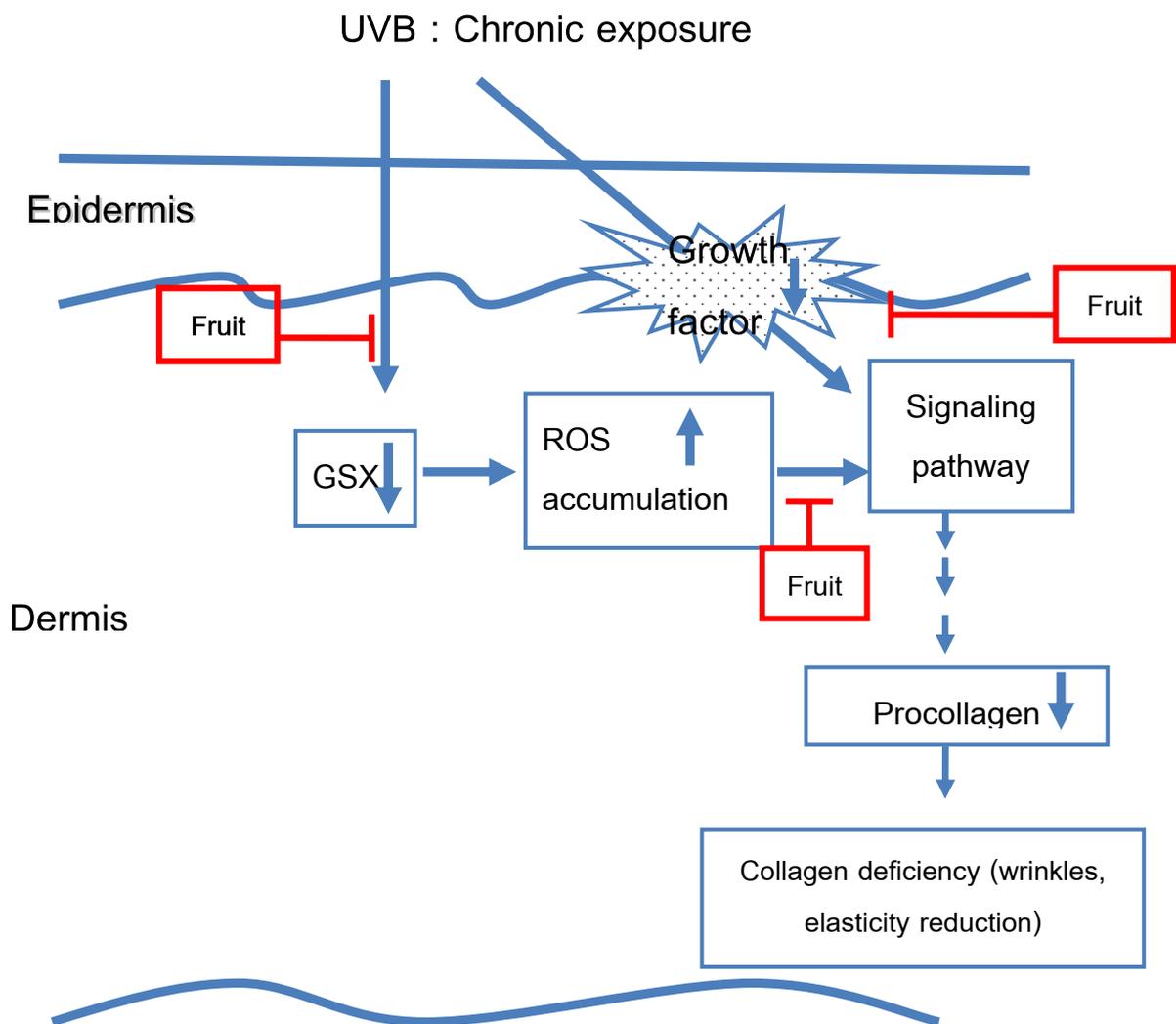
เพื่อพิสูจน์ว่าการได้รับวิตามินซี ผลกล้วยไข่สุกหรือผลมะละกอสุกพันธุ์แขกดำขณะที่ได้รับแสง UVB ซึ่งช่วยลดการเปลี่ยนแปลงหรือทำลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในชั้นผิวหนังแท้ นั้น เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงระดับของ TGF- $\beta$ 1 และ glutathione หรือไม่ คณะผู้ดำเนินการวิจัยจึงได้ทำการประเมินระดับของสารในกลุ่ม TGF- $\beta$  ได้แก่ TGF- $\beta$ 1 โดยใช้ TGF- $\beta$ 1 ELISA kit และระดับของสาร glutathione โดยใช้ Total Glutathione Quantification kit ในตัวอย่างผิวหนังหนู

เมื่อพิจารณาที่ระดับของ TGF- $\beta$ 1 พบว่าผิวหนังของกลุ่มหนูที่ได้รับแสง UVB พร้อมน้ำเปล่า (กลุ่มควบคุม) มีระดับของ TGF- $\beta$ 1 ลดลง แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูปกติ (ไม่ได้รับแสง UVB) การได้รับวิตามินซีในขนาดที่ใช้ในการศึกษา มีผลให้ระดับของ TGF- $\beta$ 1 เพิ่มขึ้น โดยมีระดับใกล้เคียงกับกลุ่มหนูปกติ เป็นที่น่าสังเกตที่พบว่าการได้รับผลกล้วยไข่สุกที่ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ทำให้ระดับของ TGF- $\beta$ 1 เพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจน (แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม) การได้รับผลมะละกอสุกพันธุ์แขกดำที่ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ทำให้ระดับของ TGF- $\beta$ 1 เพิ่มสูงขึ้นใกล้เคียงกับหนูกลุ่มปกติถึงแม้จะไม่มี ความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อได้รับผลมะละกอสุกเพิ่มสูงขึ้นเป็น 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน พบว่าระดับของ TGF- $\beta$ 1 เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

สำหรับระดับของ glutathione พบว่าผิวหนังของกลุ่มหนูที่ได้รับแสง UVB พร้อมน้ำเปล่า (กลุ่มควบคุม) มีระดับของ glutathione ลดลงและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูปกติ (ไม่ได้รับแสง UVB) การได้รับวิตามินซีในขนาดที่ใช้ในการศึกษาส่งผลให้ระดับของ glutathione เพิ่มขึ้น โดยมีระดับใกล้เคียงกับกลุ่มหนูปกติ นอกจากนี้ยังพบว่า การได้รับผลกล้วยน้ำว้าในปริมาณ 1 หรือ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน หรือกล้วยไข่สุกหรือมะละกอสุกพันธุ์แขกดำที่ปริมาณ 0.5 ถึง 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ทำให้ระดับของ glutathione เพิ่มขึ้น (แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม) อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสนใจที่สังเกตว่ากลุ่มที่ได้รับผลกล้วยไข่สุกที่ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัม และมะละกอสุกพันธุ์แขกดำที่ปริมาณ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน มีระดับของ glutathione ในผิวหนังสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ

ผลที่ได้จากการศึกษานี้ เป็นหลักฐานที่ชี้ให้เห็นประโยชน์ของผลไม้ไทยในการป้องกันผิวหนังเสื่อมสภาพก่อนวัยเนื่องจากรังสี UVB ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อนหน้านี้ โดยชี้ให้เห็นว่าการที่หนูเมาส์ ICR เพศผู้ ได้รับแสง UVB ในช่วงความยาวคลื่น 280 – 305 นาโนเมตร ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ส่งผลให้ระดับของ TGF- $\beta$ 1 และ glutathione ลดลง ร่วมกับการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของผิวหนัง ได้แก่ ริ้วรอยและความยืดหยุ่น การได้รับผลไม้สุก ได้แก่ กล้วยไข่และมะละกอพันธุ์แขกดำใน

ปริมาณที่เหมาะสม นอกจากจะช่วยรักษาสภาพและคุณสมบัติของผิวหนังและช่วยรักษาระดับของ glutathione ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชันโดยธรรมชาติแล้ว ยังส่งผลให้ช่วยรักษาระดับ TGF- $\beta$ 1 ที่มีผลต่อการสร้าง procollagen อีกด้วย นอกจากนี้จากผลการวิจัยบ่งชี้ว่าการได้รับผลกล้วยน้ำว้าสุกในขนาดที่ใช้ศึกษา ไม่ส่งผลอย่างชัดเจนในการป้องกันการเสื่อมสภาพของรังสี UVB ซึ่งอาจเนื่องมาจากฤทธิ์ในการเป็น free radical scavenging น้อยกว่าผลกล้วยไข่สุกและมะละกอสุกพันธุ์แขกดำประมาณ 10 เท่า และ 3 เท่า ตามลำดับ (พิจารณาจากค่า EC50, ความเข้มข้นของสารสกัดจากผลไม้ที่มีฤทธิ์ในการต้านการเกิดออกซิเดชัน โดย free radical scavenging เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยสารสกัดจากกล้วยน้ำว้าสุกมีค่า EC50 เท่ากับ 108.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากกล้วยไข่สุกมีค่า EC50 เท่ากับ 16.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดจากมะละกอสุกพันธุ์แขกดำมีค่า EC50 เท่ากับ 33.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าความสามารถในการป้องกันการเสื่อมสภาพของผิวหนัง มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันโดย radical scavenging activity ของสารประกอบในกล้วยไข่สุกและมะละกอสุกพันธุ์แขกดำ หรืออาจกล่าวอีกนัยหนึ่งก็คือ การได้รับผลไม้กล้วยไข่สุกและมะละกอสุกพันธุ์แขกดำในปริมาณที่เหมาะสมเป็นประจำ จะส่งผลต่อความสามารถในการป้องกันการเสื่อมสภาพของผิวหนังอันเนื่องมาจากอนุมูลอิสระที่เกิดจากผิวหนังได้รับแสง UVB ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาทั้งหมดอาจสรุปเป็นแผนภาพได้ ดังรูปที่ 13



รูปที่ 13 แผนภาพแสดงผลของการได้รับแสง UVB ในช่วงความยาวคลื่น 275 – 305 นาโนเมตร ติดต่อกัน เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ ส่งผลให้ระดับของ glutathione (GSX) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชันที่พบในผิวหนัง (endogenous antioxidants) และ growth factor เช่น TGF- $\beta$ 1 ลดลง การลดลงของ glutathione ก่อให้เกิดการสะสมของอนุมูลอิสระ เช่น radical oxygen species (ROS) ร่วมกับการลดลงของ growth factor นำไปสู่กระบวนการที่ส่งผลให้การผลิต collagen ในผิวหนังลดลง และในที่สุดนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของผิวหนัง เช่น ริ้วรอยที่เพิ่มขึ้นและความยืดหยุ่นที่ลดลง การได้รับผลไม้สุก เช่น กัวยี่ไขหรือมะละกอบพันธุ์แขกดำ ในปริมาณที่พอเหมาะจะช่วยลดปรากฏการณ์เหล่านี้

หากต้องการนำผลที่ได้จากการศึกษานี้นำไปใช้ในมนุษย์ เพื่อการป้องกันการเสื่อมสภาพก่อนวัยของผิวหนังอันเนื่องมาจากได้รับรังสี UVB ติดต่อกัน (photo-aging) อาจนำหลักการคำนวณ human equivalent dose (HED) [33] มาใช้ ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{HED (mg/kg)} = \frac{\text{animal dose (mg/kg)} \times \text{animal Km factor}}{\text{human Km factor}}$$

ซึ่ง ค่า Km factor ได้มาจากน้ำหนักของสัตว์หรือมนุษย์หารด้วยพื้นที่ผิว (body surface area) ซึ่งโดยทั่วไปค่า Km factor ของหนูเมาส์เท่ากับ 3 และของมนุษย์เท่ากับ 37 [34] จากการศึกษาพบว่าการที่หนูเมาส์ได้รับผลกล้วยไข่สุกที่ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัม และมะละกอสุกพันธุ์แขกดำที่ปริมาณ 1.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ส่งผลให้มีความสามารถในการป้องกันการเสื่อมสภาพของผิวหนังอันเนื่องมาจากการได้รับแสง UVB ติดต่อกัน ดังนั้นหากเป็นมนุษย์ก็สามารถประมาณการได้ว่าควรรับประทานผลกล้วยไข่สุกหรือมะละกอสุกพันธุ์แขกดำในปริมาณ 0.08 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม หรือ 0.12 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ตามลำดับ และถ้าหากประมาณการว่ามนุษย์มีน้ำหนักประมาณ 60 กิโลกรัม ดังนั้นจึงควรรับประทานกล้วยไข่สุกในปริมาณ 5 กรัม (1 ผลเล็ก) หรือมะละกอสุกพันธุ์แขกดำในปริมาณ 7 กรัม (มะละกอขนาดพอดีคำ 3-4 ชิ้น) เป็นประจำทุกวัน ซึ่งการรับประทานผลไม้สดนั้น นอกจากจะส่งผลต่อการป้องกันการเสื่อมสภาพของผิวหนังก่อนวัยอันเนื่องมาจากมลภาวะ เช่น แสง UVB ซึ่งเป็นผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้แล้ว ผลไม้ยังให้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ เช่น พลังงานที่พร้อมใช้จากซูโครส (Sucrose), ฟรุคโตส (Fructose) และ กลูโคส (Glucose) แร่ธาตุที่ส่งผลต่อการทำงานของอวัยวะภายในร่างกาย เช่น โพแทสเซียม (potassium) และแมกนีเซียม (magnesium) และเส้นใยอาหารซึ่งช่วยในการขับถ่าย อีกด้วย

## เอกสารอ้างอิง

- [1] Wlaschek, M., Tantcheva-Poor, I., Naderi, L., Ma, W., Schneider, L.A., Razi-Wolf, Z., Schuller, J. and Scharffetter-Kochanek, K. Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J Photochem Photobiol B*, 63, 41-51 (2001).
- [2] Mitchell, R.E. Chronic solar dermatosis: A light and electron microscopic study of the dermis. *J Invest Dermatol*, 43, 203-230 (1967).
- [3] Werth, V.P., Kalathil, S.E. and Jaworsky C. Elastic fiber-associated proteins of skin in development and photoaging. *Photochem Photobiol*, 63, 308-313 (1996).
- [4] Kligman, L.H. and Murphy, G.F. Ultraviolet B radiation increases hairless mouse mast cells in a dose-dependent manner and alters distribution of UV-induced mast cell growth factor. *Photochem Photobiol*, 63, 123-127 (1996).
- [5] Lavker, R.M. and Kligman, A.M. Chronic heliodermatitis: A morphologic evaluation of chronic actinic dermal damage with emphasis on the role of mast cells. *J Invest Dermatol*, 90, 325-330 (1988).
- [6] Hanson, K.M. and Simon, J.D. Epidermal trans-urocanic acid and the UV-A-induced photoaging of the skin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 10576-10578 (1998).
- [7] Fisher, G.J., Kang, S., Varani, J., Bata-Csorgo, Z., Wan, Y., Datta, S. and Voorhees, J. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol*, 138, 1462-1470 (2002).
- [8] Brenneisen, P., Wenk, J., Klotz, L.O., Wlaschek, M., Briviba, K., Krieg, T., Sies, H. and Scharffetter-Kochanek, K. Central role of Ferrous/Ferric iron in the ultraviolet B irradiation-mediated signaling pathway leading to increased interstitial collagenase (matrix-degrading metalloprotease (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) mRNA levels in cultured human dermal fibroblasts. *J Biol Chem*, 273, 5279-5287 (1998).
- [9] Kondo, S. The roles of cytokines in photoaging. *J Dermatol Sci*, 23 (1 Suppl), S30-S36 (2000).
- [10] Ullrich, A. and Schlessinger, J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 61, 203-212 (1990).
- [11] van der Geer, P., Hunter, T. and Lindberg, R.A. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol*, 10, 251-337 (1994).

[12] Denu, J.M. and Tanner, K.G. Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: Evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry*, 37, 5633-5642 (1998).

[13] Gross, S., Knebel, A., Tenev, T., Neininger, A., Gaestel, M., Herrlich, P. and Bohmer, F.D. Inactivation of protein-tyrosine phosphatases as mechanism of UV-induced signal transduction. *J Biol Chem*, 374, 26378-26386 (1999).

[14] Meng, T-C., Fukuda, T. and Tonks, N.K. Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol Cell*, 9, 387-399 (2002).

[15] Cobb, M.H. MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol*, 71, 479-500 (1999).

[16] Fisher, G.J., Talwar, H.S., Lin, J., Lin, P., McPhillips, F., Wang, Z., Li ,X., Wan, Y., Kang, S. and Voorhees, J.J. Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin in vivo. *J Clin Invest*, 101, 1432-40 (1998).

[17] Angel, P., Szabowski, A. and Schorpp-Kistner, M. Function and regulation of AP-1 sub-units in skin physiology and pathology. *Oncogene*, 20, 2413-2423 (2001).

[18] Yamamoto, Y. and Gaynor, R.B. Therapeutic potential of inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest*, 107, 135-142 (2001).

[19] Senftleben, U. and Karin, M. The IKK/ NF- $\kappa$ B pathway. *Crit Care Med*, 30 (1 suppl), S18-S26 (2002).

[20] Fisher, G.J., Datta, S., Wang, Z., Li, X.Y., Quan, T., Chung, J.H., Kang, S. and Voorhees, J.J. c-Jun-dependent inhibition of cutaneous procollagen transcription following ultraviolet irradiation is reversed by all-trans retinoic acid. *J Clin Invest*, 106, 663-670 (2000).

[21] Massague, J. TGF- $\beta$  signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 67, 753-791 (1998).

[22] Verrecchia, F., Tacheau, C., Schorpp-Kistner, M., Angel, P. and Mauviel, A. Induction of the AP-1 members c-Jun and JunB by TGF-beta/Smad suppresses early Smad-driven gene activation. *Oncogene*, 20, 2205-2211 (2001).

[23] Pessah, M., Marais, J., Prunier, C., Ferrand, N., Lallemand, F., Mauviel, A. and Atfi, A. c-Jun associates with the oncoprotein Ski and suppresses Smad2 transcriptional activity. *J Biol Chem*, 277, 29094-29100 (2002).

- [24] Feskanich, D., Ziegler, R.G., Michaud, D.S., Giovannucci, E.L., Speizer, F.E., Willett, W.C. and Colditz, G.A. Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women. *J Natl Cancer Inst*, 92, 1812-1823 (2000).
- [25] Gordon, M.H. Dietary antioxidants in disease prevention. *Nat Prod Rep*, 13, 265-273 (1996).
- [26] Lim, Y.Y., Lim, T.T. and Tee, J.J. Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food Chem*, 103, 1003-1008 (2007).
- [27] Erden Inal, M., Kahraman, A. and Kökent, T. Beneficial effects of quercetin on oxidative stress induced by ultraviolet A. *Clin Exp Dermatol*, 26, 536-539 (2001).
- [28] Han, K.H., Choi, H.R., Won, C.H., Chung, J.H., Cho, K.H., Eun, H.C. and Kim, K.H. Alteration of the TGF-beta/SMAD pathway in intrinsically and UV-induced skin aging. *Mech Ageing Dev*, 126, 560-567 (2005).
- [29] Kim, Y.G., Sumiyoshi, M., Sakanaka, M. and Kimura, Y. Effects of ginseng saponins isolated from red ginseng on ultraviolet B-induced skin aging in hairless mice. *Eur J Pharmacol*, 602, 148-156 (2009).
- [30] Hou, H., Li, B., Zhao, X., Zhuang, Y., Ren, G., Yan, M., Cai, Y., Zhang, X. and Chen, L. The effect of pacific cod (*Gadus macrocephalus*) skin gelatin polypeptides on UV radiation-induced skin photoaging in ICR mice. *Food Chem*, 115, 945-950 (2009).
- [31] Dominiczak, M.H., Bell, J., Cox, N.H., McCrudden, D.C., Jones, S.K., Finlay, A.Y., Percy-Robb, I.W. and Frier, B.M. Increased collagen-linked fluorescence in skin of young patients with Type I diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 13, 468-472 (1990).
- [32] Dyer, D.G., Dunn, J.A., Thorpe, S.R., Bailie, K.E., Lyons, T.J., McCance, D.R. and Baynes, J.W. Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *J Clin Invest*, 9, 2463-2469 (1993).
- [33] Reagan-Shaw, S., Nihal, M. and Ahmad, N. Dose translation from animal to human studies revisited. *The FASEB Journal*, 22, 659-661 (2007).
- [34] Center for Drug Evaluation and Research, Center for Biologics Evaluation and Research. *Estimating the safe starting dose in clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers*, U.S. Food and Drug Administration, Rockville, Maryland, USA (2002).

# ภาคผนวก

## ภาคผนวกที่ 1

### การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอล (เทียบเท่ากับปริมาณ gallic acid) ที่มีอยู่ในตัวอย่าง

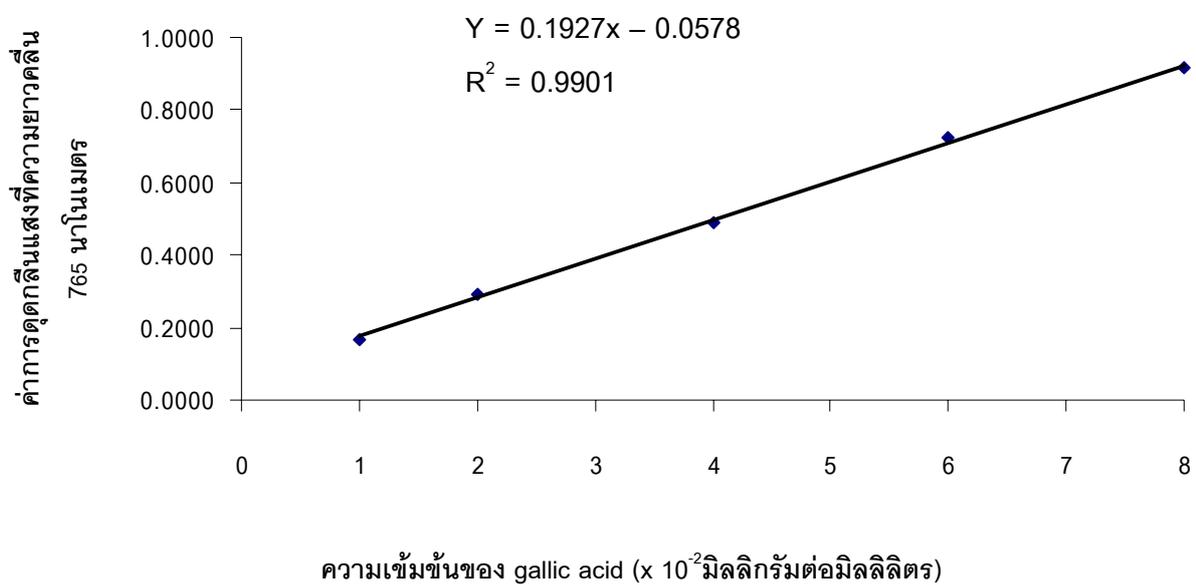
การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอล (เทียบเท่ากับ gallic acid) ที่มีในสารสกัดโดยใช้ Folin-Ciocalteu's reagent มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานโดยใช้ gallic acid ละลายในน้ำให้ได้ความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.04, 0.06 และ 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
2. ปิเปตสารสกัดตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐานลงหลอดทดลองขนาดกลาง ในปริมาณ 0.3 มิลลิลิตรต่อหลอด
3. เติม Folin-Ciocalteu's reagent (เจือจางด้วยน้ำ 10 เท่า) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองขนาดกลางแต่ละหลอดที่มีตัวอย่างและสารละลายมาตรฐาน
4. เติม Sodium carbonate (ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาดกลางแต่ละหลอด เขย่าเบาๆ นาน 5 วินาที
5. วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
6. นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยใช้ UV-VIS Spectrophotometer

ผลการดูดกลืนแสงของ gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ และกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ gallic acid และค่าการดูดกลืนแสงแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 1 และผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลทั้งหมดที่มีในสารสกัดจากกล้วยน้ำว้าสุก กล้วยไข่สุก และมะละกอสุกพันธุ์แขกดำ แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 แสดงผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตรของ gallic acid ที่ใช้เป็น  
สารมาตรฐาน

ความเข้มข้นของ gallic acid (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร ของตัวอย่างที่			ค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร ของตัวอย่าง - Blank			Mean ± SD
	1	2	3	1	2	3	
Blank	0.0026	0.0028	0.0026	-	-	-	-
0.01	0.1745	0.1691	0.172	0.1719	0.1663	0.1694	0.1692 ± 0.003
0.02	0.2871	0.2954	0.2985	0.2845	0.2926	0.2959	0.2910 ± 0.006
0.04	0.4933	0.4818	0.499	0.4907	0.479	0.4964	0.4887 ± 0.009
0.06	0.715	0.7353	0.7283	0.7124	0.7325	0.7257	0.7235 ± 0.010
0.08	0.9172	0.9261	0.9147	0.9146	0.9233	0.9121	0.9167 ± 0.006



รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ gallic acid กับค่าการดูดกลืนแสง  
ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

ตารางที่ 2 แสดงผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ของตัวอย่างสารสกัดจากกล้วยน้ำว้าสุก กล้วยไข่สุก และมะละกอสุกพันธุ์แขกดำ

ชนิด	Batch ที่	ปริมาณ (กรัม) ต่อ 100 มิลลิลิตร	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร ของ			ปริมาณ gallic acid ( $\times 10^{-2}$ มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ปริมาณฟีนอล (เทียบเท่ากับมิลลิกรัม gallic acid ต่อ 100 กรัม ของเนื้อผลไม้ปั่น)
			Blank	ตัวอย่าง	ตัวอย่าง - Blank		
กล้วยน้ำว้าสุก	1	15.1	0.0027	0.3494	0.3467	2.09	138.4
	2	15.1		0.3715	0.3688	2.21	146.3
	3	15.3		0.3801	0.3774	2.26	147.7
Mean $\pm$ SD				0.3643 $\pm$ 0.02	2.19 $\pm$ 0.09	144.1 $\pm$ 5.0	
กล้วยไข่สุก	1	15.2	0.0027	0.8240	0.8213	4.56	300.0
	2	15.2		0.8358	0.8331	4.62	303.9
	3	15.1		0.8496	0.8469	4.69	310.6
Mean $\pm$ SD				0.8338 $\pm$ 0.01	4.62 $\pm$ 0.07	304.8 $\pm$ 5.4	
มะละกอสุกพันธุ์แขกดำ	1	15.0	0.0027	0.8047	0.8020	4.46	297.3
	2	15.1		0.8304	0.8277	4.60	304.6
	3	15.0		0.8267	0.8240	4.58	305.3
Mean $\pm$ SD				0.8179 $\pm$ 0.01	4.55 $\pm$ 0.08	302.4 $\pm$ 4.4	

ตัวอย่างการคำนวณ : สารสกัดจากกล้วยน้ำว้าสุก batch ที่ 1

จากตาราง พบการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 0.342

นำค่าที่ได้ไปหาความเข้มข้น โดยแทนค่า Y ในสมการ

$$Y = 0.1927X - 0.0578$$

$$0.3467 = 0.1927X - 0.0578$$

$$X = (0.3467 + 0.0578) / 0.1927$$

$$= 2.09 \times 10^{-2} \text{ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร}$$

ปริมาณ gallic acid ที่มีในสารละลายของสารสกัดเนื้อผลไม้สดปริมาณ 100 มิลลิลิตร

$$= 2.09 \times 10^{-2} \times 3 / 0.3 \times 100$$

$$= 20.9 \text{ มิลลิกรัม}$$

ดังนั้นปริมาณฟีนอล (เทียบเท่ากับ gallic acid) ที่มีอยู่ในเนื้อผลไม้สดปริมาณ 100 มิลลิกรัม

$$= 20.9 / 15.1 \times 100$$

$$= 138.4 \text{ มิลลิกรัมต่อกรัมของเนื้อผลไม้ปั่น}$$

## ภาคผนวกที่ 2

### การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay

การวิเคราะห์หาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกล้วยน้ำว้าสุก กล้วยไข่สุก และมะละกอสุกพันธุ์แขกดำ โดยใช้ 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

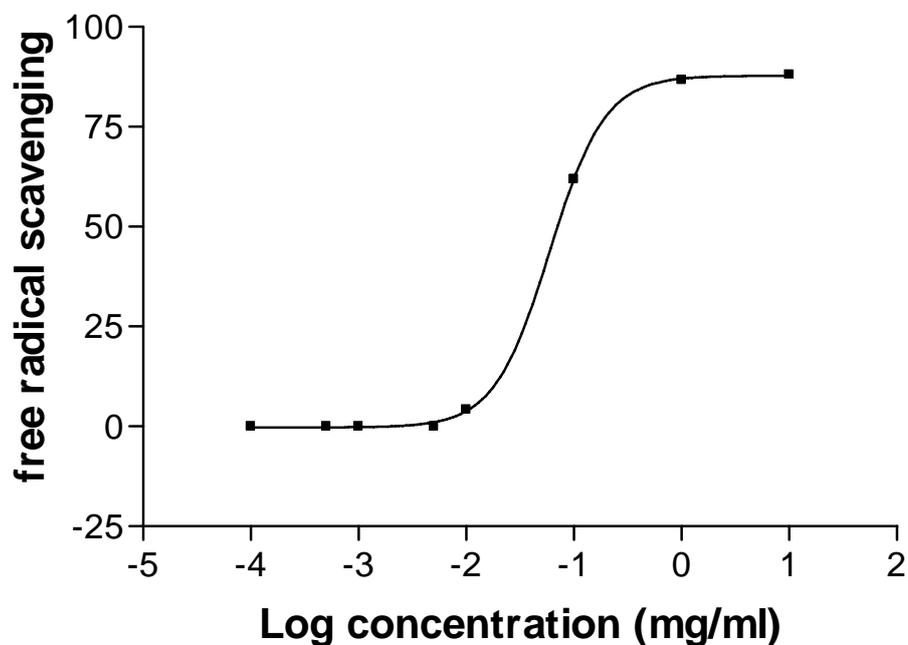
1. นำตัวอย่างสารสกัดกล้วยน้ำว้า กล้วยไข่หรือมะละกามาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นระดับต่างๆ
2. เตรียมสารละลายมาตรฐานโดยใช้ L-ascorbic acid (vitamin C) ละลายใน methanol ให้ได้ความเข้มข้น 0.0001, 0.0005, 0.001, 0.005, 0.01, 0.1, 1 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
3. ปิเปตสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานลงใน 96 well plate อย่างละ 75 ไมโครลิตร ต่อ well
4. เติม DPPH solution ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงในแต่ละ well ที่มีตัวอย่าง เขย่าเบาๆ โดยใช้ microplate shaker นาน 5 วินาที
5. วางทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
6. นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้ microplate reader

ผลการดูดกลืนแสงของ L-ascorbic acid (vitamin C) ที่ความเข้มข้นต่างๆ และกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ L-ascorbic acid (vitamin C) และค่าการดูดกลืนแสงแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 1 และผลการวิเคราะห์หาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกล้วยน้ำว้าสุก กล้วยไข่สุก และมะละกอสุกพันธุ์แขกดำ แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 แสดงผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ของ L-ascorbic acid ที่ใช้เป็น  
 สารมาตรฐาน

ความเข้มข้นของ L-ascorbic acid (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ของตัวอย่างที่			Mean $\pm$ SD
	1	2	3	
0.0001	0.784	0.718	0.863	0.778 $\pm$ 0.07
0.0005	0.927	0.808	0.891	0.875 $\pm$ 0.06
0.001	0.859	0.901	0.906	0.892 $\pm$ 0.03
0.005	0.793	0.854	0.837	0.828 $\pm$ 0.03
0.01	0.756	0.723	0.756	0.745 $\pm$ 0.02
0.1	0.298	0.287	0.304	0.296 $\pm$ 0.01
1	0.079	0.082	0.147	0.103 $\pm$ 0.04
10	0.092	0.098	0.088	0.093 $\pm$ 0.01

IC 50 ของ L-ascorbic



รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Log ความเข้มข้นของ L-ascorbic acid กับค่า free radical scavenging

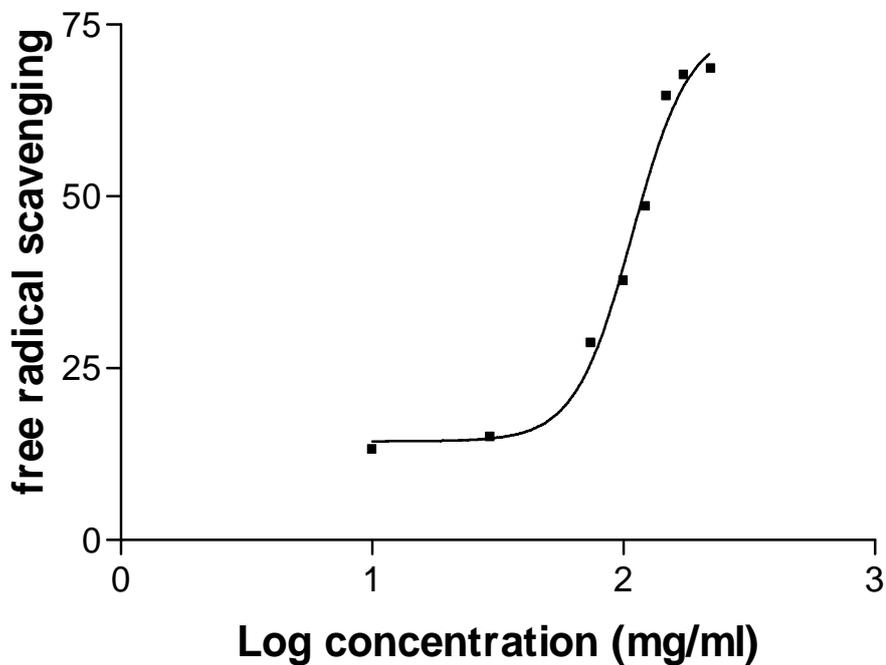
ตารางที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์ค่า IC 50 ของ L-ascorbic acid

Equation 1	
Variables	
BOTTOM	-0.2619
TOP	87.78
LOGEC50	-1.226
HILLSLOPE	1.692
EC50	0.05948
Std. Error	
BOTTOM	0.3542
TOP	0.4639
LOGEC50	0.01342
HILLSLOPE	0.07992
95% Confidence Intervals	
BOTTOM	-1.245 to 0.7213
TOP	86.49 to 89.07
LOGEC50	-1.263 to -1.188
HILLSLOPE	1.470 to 1.914
EC50	0.05459 to 0.06481
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	4
R <sup>2</sup>	0.9999
Absolute Sum of Squares	1.586
Sy.x	0.6296
Data	
Number of X values	8
Number of Y replicates	1
Total number of values	8
Number of missing values	0

ตารางที่ 3 แสดงผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ของสารสกัดกล้วยน้ำว้า

ความเข้มข้นของ กล้วยน้ำว้า (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ของตัวอย่างที่			Mean $\pm$ SD
	1	2	3	
10	0.607	0.638	0.653	0.633 $\pm$ 0.023
30	0.630	0.621	0.610	0.620 $\pm$ 0.010
75	0.507	0.515	0.539	0.520 $\pm$ 0.017
100	0.451	0.449	0.462	0.454 $\pm$ 0.007
125	0.379	0.361	0.384	0.375 $\pm$ 0.012
150	0.250	0.257	0.266	0.258 $\pm$ 0.008
175	0.237	0.229	0.243	0.236 $\pm$ 0.007
225	0.232	0.226	0.230	0.229 $\pm$ 0.003

IC 50 ของกล้วยน้ำว้า



รูปที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Log ความเข้มข้นของกล้วยน้ำว้ากับค่า free radical scavenging

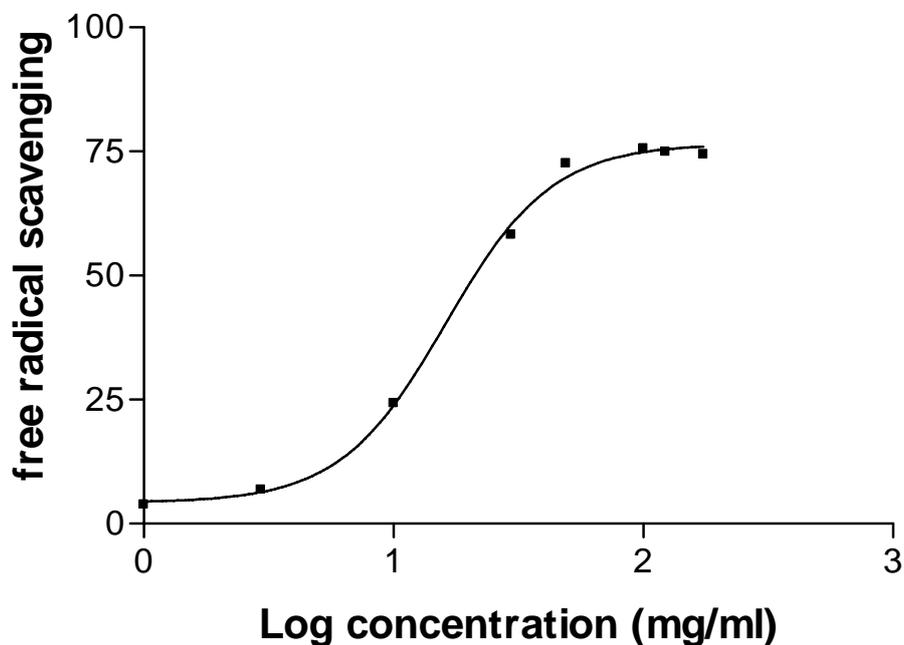
ตารางที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์ค่า IC 50 ของ กลั้วย่น้ำว้า

Equation 1	
Variables	
BOTTOM	14.36
TOP	74.49
LOGEC50	2.035
HILLSLOPE	3.836
EC50	108.3
Std. Error	
BOTTOM	2.566
TOP	5.764
LOGEC50	0.03193
HILLSLOPE	0.9703
95% Confidence Intervals	
BOTTOM	7.242 to 21.49
TOP	58.48 to 90.49
LOGEC50	1.946 to 2.123
HILLSLOPE	1.143 to 6.530
EC50	88.33 to 132.9
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	4
R?	0.9867
Absolute Sum of Squares	48.98
Sy.x	3.499
Data	
Number of X values	10
Number of Y replicates	1
Total number of values	8
Number of missing values	2

ตารางที่ 5 แสดงผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ของสารสกัดกล้วยไข่

ความเข้มข้นของ กล้วยไข่ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ของตัวอย่างที่			Mean $\pm$ SD
	1	2	3	
1	0.733	0.732	0.771	0.745 $\pm$ 0.022
3	0.702	0.703	0.762	0.722 $\pm$ 0.034
10	0.593	0.573	0.596	0.587 $\pm$ 0.013
30	0.288	0.345	0.338	0.324 $\pm$ 0.031
50	0.196	0.213	0.227	0.212 $\pm$ 0.016
100	0.193	0.188	0.185	0.189 $\pm$ 0.004
125	0.204	0.194	0.183	0.194 $\pm$ 0.011
175	0.192	0.205	0.197	0.198 $\pm$ 0.007
200	0.195	0.201	0.194	0.197 $\pm$ 0.004

IC 50 ของกล้วยไข่



รูปที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Log ความเข้มข้นของกล้วยไข่กับค่า free radical scavenging

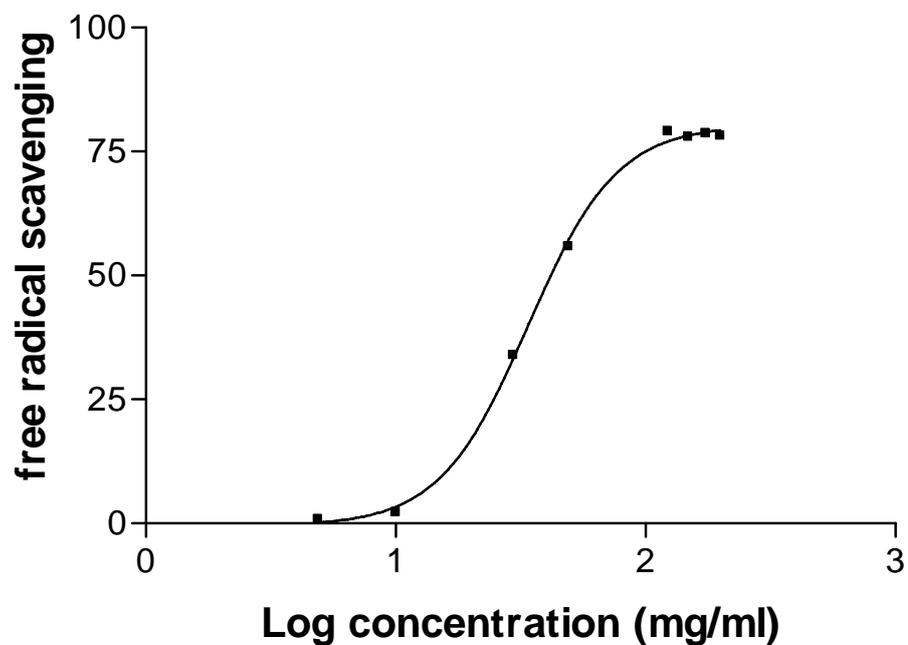
ตารางที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์ค่า IC 50 ของ กัญชงไข

Equation 1	
Variables	
BOTTOM	4.227
TOP	76.56
LOGEC50	1.210
HILLSLOPE	2.047
EC50	16.21
Std. Error	
BOTTOM	1.667
TOP	1.446
LOGEC50	0.02862
HILLSLOPE	0.2143
95% Confidence Intervals	
BOTTOM	-0.4009 to 8.854
TOP	72.54 to 80.57
LOGEC50	1.130 to 1.289
HILLSLOPE	1.452 to 2.642
EC50	13.50 to 19.47
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	4
R <sup>2</sup>	0.9977
Absolute Sum of Squares	16.19
Sy.x	2.012
Data	
Number of X values	11
Number of Y replicates	1
Total number of values	8
Number of missing values	3

ตารางที่ 7 แสดงผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ของสารสกัดมะละกอพันธุ์แขกดำ

ความเข้มข้นของ มะละกอพันธุ์แขกดำ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ของตัวอย่างที่			Mean $\pm$ SD
	1	2	3	
5	0.770	0.761	0.774	0.768 $\pm$ 0.007
10	0.755	0.749	0.767	0.757 $\pm$ 0.009
30	0.493	0.526	0.518	0.512 $\pm$ 0.017
50	0.342	0.345	0.338	0.342 $\pm$ 0.004
125	0.151	0.169	0.165	0.162 $\pm$ 0.009
150	0.176	0.169	0.169	0.171 $\pm$ 0.004
175	0.156	0.178	0.162	0.165 $\pm$ 0.011
200	0.168	0.176	0.162	0.169 $\pm$ 0.007

IC 50 ของมะละกอพันธุ์แขกดำ



รูปที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Log ความเข้มข้นของมะละกอพันธุ์แขกดำกับค่า free radical scavenging

ตารางที่ 8 แสดงผลการวิเคราะห์หาค่า IC 50 ของ มะละกอพันธุ์แขกดำ

Equation 1	
Variables	
BOTTOM	-0.5453
TOP	80.35
LOGEC50	1.530
HILLSLOPE	2.444
EC50	33.91
Std. Error	
BOTTOM	1.473
TOP	1.167
LOGEC50	0.01371
HILLSLOPE	0.2540
95% Confidence Intervals	
BOTTOM	-4.633 to 3.543
TOP	77.11 to 83.59
LOGEC50	1.492 to 1.568
HILLSLOPE	1.739 to 3.149
EC50	31.07 to 37.02
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	4
R?	0.9989
Absolute Sum of Squares	9.062
Sy.x	1.505
Data	
Number of X values	10
Number of Y replicates	1
Total number of values	8
Number of missing values	2

ภาคผนวกที่ 3

การวัดความหนาและความยืดหยุ่นของผิวหนัง

การวัดความหนาของผิวหนัง จะวัด 3 บริเวณ ซึ่งแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงผลค่าความหนาของผิวหนังในแต่ละกลุ่ม (N=3)

กลุ่มที่	ตัวอย่างที่	ความหนาของผิวหนัง (เซ็นติเมตร) บริเวณที่			Mean
		1	2	3	
1	1	1.46	1.49	1.43	1.46
	2	1.37	1.26	1.39	1.34
	3	1.39	1.42	1.37	1.39
	Mean ± SD				1.40 ± 0.06
2	1	1.74	1.77	1.53	1.68
	2	1.41	1.33	1.36	1.37
	3	1.89	1.84	1.63	1.79
	Mean ± SD				1.61 ± 0.22
3	1	1.63	1.59	1.54	1.59
	2	1.47	1.38	1.53	1.46
	3	1.21	1.36	1.42	1.33
	Mean ± SD				1.46 ± 0.13
4	1	1.58	1.55	1.78	1.68
	2	1.56	1.53	1.60	1.56
	3	1.23	1.33	1.49	1.35
	Mean ± SD				1.53 ± 0.17
5	1	1.55	1.47	1.46	1.49
	2	1.47	1.31	1.48	1.42
	3	1.68	1.42	1.65	1.58
	Mean ± SD				1.50 ± 0.08
6	1	1.55	1.53	1.28	1.45
	2	1.39	1.48	1.57	1.48
	3	1.47	1.38	1.45	1.43
	Mean ± SD				1.46 ± 0.02

ตารางที่ 1 (ต่อ) แสดงผลค่าความหนาของผิวหนังในแต่ละกลุ่ม (N=3)

กลุ่มที่	ตัวอย่างที่	ความหนาของผิวหนัง (เซ็นติเมตร) บริเวณที่			Mean
		1	2	3	
7	1	1.41	1.35	1.29	1.35
	2	1.31	1.21	1.30	1.27
	3	1.32	1.47	1.48	1.42
	Mean ± SD				1.35 ± 0.08
8	1	1.64	1.43	1.54	1.54
	2	1.23	1.32	1.31	1.29
	3	1.32	1.28	1.54	1.38
	Mean ± SD				1.40 ± 0.13
9	1	1.61	1.59	1.62	1.61
	2	1.45	1.14	1.20	1.26
	3	1.23	1.20	1.22	1.22
	Mean ± SD				1.36 ± 0.21
10	1	1.71	1.70	1.68	1.7
	2	1.60	1.46	1.52	1.53
	3	1.41	1.38	1.21	1.33
	Mean ± SD				1.52 ± 0.18
11	1	1.79	1.92	1.87	1.86
	2	1.47	1.17	1.14	1.26
	3	1.4	1.38	1.3	1.36
	Mean ± SD				1.49 ± 0.32
12	1	1.64	1.73	1.55	1.64
	2	1.29	1.12	1.13	1.18
	3	1.54	1.49	1.53	1.52
	Mean ± SD				1.45 ± 0.24

การประเมินความยืดหยุ่นของผิวหนังหนู มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ตัดตัวอย่างผิวหนังหนูให้มีขนาด 1x3 ตารางเซนติเมตร
2. จากนั้นทำการวัดความยาวของตัวอย่างผิวหนังหนูดังนี้
  - ความยาวก่อนยืด
  - ความยาวหลังจากถูกยืดด้วยแรงประมาณ 0.1 นิวตัน นาน 20 วินาที (ขณะยืด)
  - ความยาวหลังจากหยุดให้แรง (หลังยืด)
3. นำค่าที่ได้มาคำนวณตามสมการ

การคำนวณ

ความยาวหลังจากถูกยืดด้วยแรง (ขณะยืด)-ความยาวหลังจากหยุดให้แรง (หลังยืด)

ความยาวหลังจากถูกยืดด้วยแรง (ขณะยืด)-ความยาวก่อนยืด

**ตารางที่ 2** แสดงผลค่าความยืดหยุ่นของผิวหนังหนูในแต่ละกลุ่ม (N=3)

กลุ่มที่	ตัวอย่างที่	ความยาว (cm)			ความยืดหยุ่น
		ก่อนยืด	ขณะยืด	หลังยืด	
1	1	3.00	3.60	3.10	0.83
	2	3.00	3.50	3.10	0.80
	3	3.00	3.60	3.10	0.83
	Mean ± SD				0.82 ± 0.02
2	1	3.00	3.50	3.40	0.20
	2	3.00	3.90	3.50	0.44
	3	3.00	3.40	3.30	0.25
	Mean ± SD				0.30 ± 0.13
3	1	3.00	3.70	3.20	0.71
	2	3.00	4.10	3.30	0.73
	3	3.00	4.10	3.30	0.73
	Mean ± SD				0.72 ± 0.01
4	1	3.00	3.60	3.30	0.50
	2	3.00	4.10	3.60	0.45
	3	3.00	3.50	3.30	0.40
	Mean ± SD				0.45 ± 0.05
5	1	3.00	3.60	3.30	0.50
	2	3.00	4.20	3.70	0.42
	3	3.00	3.60	3.40	0.33
	Mean ± SD				0.42 ± 0.08
6	1	3.00	4.00	3.50	0.50
	2	3.00	4.20	3.50	0.58
	3	3.00	4.20	3.60	0.50
	Mean ± SD				0.53 ± 0.05

ตารางที่ 2 (ต่อ) แสดงผลค่าความยืดหยุ่นของผิวหนังหนูในแต่ละกลุ่ม (N=3)

กลุ่มที่	ตัวอย่างที่	ความยาว (cm)			ความยืดหยุ่น
		ก่อนยืด	ขณะยืด	หลังยืด	
7	1	3.00	4.00	3.40	0.60
	2	3.00	4.30	3.60	0.54
	3	3.00	4.20	3.60	0.50
	Mean ± SD				0.55 ± 0.05
8	1	3.00	4.10	3.20	0.82
	2	3.00	4.00	3.20	0.80
	3	3.00	4.10	3.10	0.91
	Mean ± SD				0.84 ± 0.06
9	1	3.00	4.00	3.60	0.40
	2	3.00	4.30	3.60	0.54
	3	3.00	4.10	3.50	0.55
	Mean ± SD				0.49 ± 0.08
10	1	3.00	4.10	3.50	0.55
	2	3.00	4.20	3.50	0.58
	3	3.00	4.20	3.40	0.67
	Mean ± SD				0.60 ± 0.06
11	1	3.00	4.10	3.30	0.73
	2	3.00	4.00	3.30	0.70
	3	3.00	4.10	3.40	0.64
	Mean ± SD				0.69 ± 0.05
12	1	3.00	4.30	3.30	0.77
	2	3.00	3.90	3.30	0.67
	3	3.00	4.10	3.20	0.82
	Mean ± SD				0.75 ± 0.08

#### ภาคผนวกที่ 4

### การย้อมเนื้อเยื่อเพื่อตรวจสอบโครงสร้างในระดับจุลกายวิภาคศาสตร์

1. ขั้นตอน Fixation and Embedding โดยนำชิ้นเนื้อมา Fix ใน Tissue Freezing Medium แล้วเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส
2. จากนั้นทำการตัดชิ้นเนื้อที่ Fix ใน Tissue Freezing Medium ด้วยเครื่อง Cryotome หนา 7-10 ไมโครเมตร ปล่อยให้แข็งไว้ข้ามคืนเพื่อให้สไลด์แห้ง
3. ขั้นตอนการย้อมด้วยสี Hematoxylineosin มีขั้นตอนดังนี้
  - แช่ใน Absolute ethanol เป็นเวลา 90 วินาที
  - แช่ใน 75 % ethanol เป็นเวลา 90 วินาที
  - นำสไลด์ไปล้างน้ำ เป็นเวลา 2 นาที
  - แช่ใน Hematoxyline เป็นเวลา 2 นาที
  - ล้างน้ำจนสไลด์ใส
  - แช่ใน 75 % ethanol เป็นเวลา 90 วินาที
  - จุ่มขึ้นลง (Dip) ใน Eosin 10 ครั้ง
  - ล้างน้ำจนสไลด์ใส
  - แช่ใน 75 % ethanol เป็นเวลา 90 วินาที
  - แช่ใน Absolute ethanol เป็นเวลา 90 วินาที
  - แล้วทำการ Mount ปิดทับตัวอย่างด้วย Cover glass

**ภาคผนวกที่ 5**  
**การสกัดโปรตีนจากผิวหนังบริเวณส่วนหลังของหนู**  
**โดยใช้ protein extraction reagent**

การสกัดปริมาณโปรตีนจากผิวหนังบริเวณส่วนหลังของหนู โดยใช้ Protein Extraction Reagent มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ชั่งตัวอย่างผิวหนังหนูในแต่ละกลุ่มประมาณ 50 มิลลิกรัม
2. เติม protein extraction reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไป homogenize
3. นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000Xg นาน 5 นาที
4. เก็บส่วนใสด้านบนเพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนต่อไป

**ภาคผนวกที่ 6**  
**การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในผิวหนังบริเวณส่วนหลังของหนู**  
**โดยใช้ DC Protein Assay Kit**

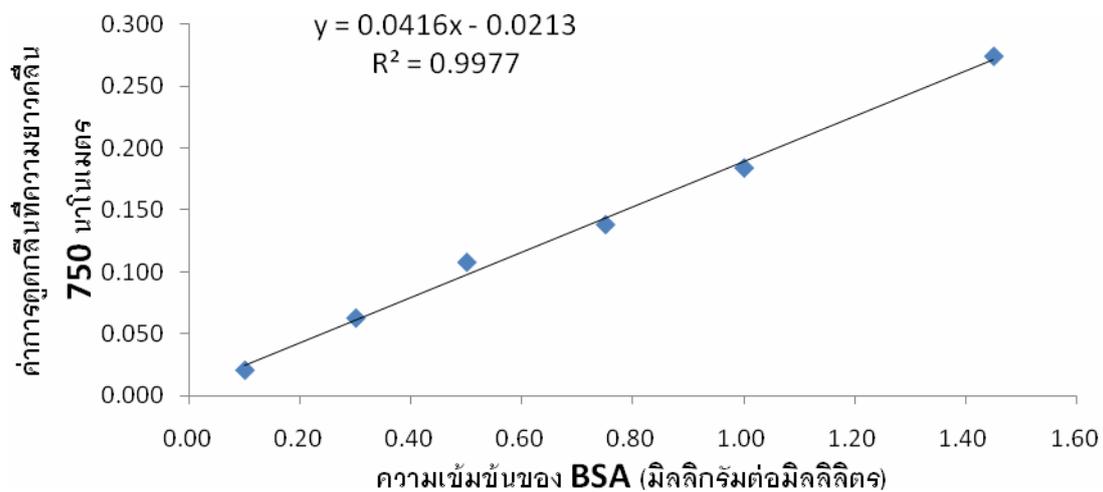
การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนจากสารสกัดโดยใช้ DC Protein Assay Kit มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. นำตัวอย่างสารสกัดโปรตีนของแต่ละตัวอย่างมาเจือจางให้ความเข้มข้นที่ต้องการ
2. เตรียมสารละลายมาตรฐานโดยใช้ BSA ละลายในน้ำ deionized ให้ความเข้มข้น 0.1, 0.3, 0.5, 0.75, 1.0 และ 1.45 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
3. ปิเปตสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานลงใน 96-well plate อย่างละ 5 ไมโครลิตรต่อ well
4. เติม reagent A ปริมาตร 25 ไมโครลิตรลงในแต่ละ well ที่มีตัวอย่าง
5. เติม reagent B ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละ well เขย่าเบาๆ โดยใช้ microplate shaker นาน 5 วินาที
6. วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที
7. นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยใช้ microplate reader

ผลการดูดกลืนแสงของ BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ และกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ BSA และค่าการดูดกลืนแสงแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 1 และผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารสกัดจากผิวหนังบริเวณส่วนหลังของหนู แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 แสดงผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตรของ BSA ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน

ความเข้มข้นของ BSA (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ของตัวอย่างที่			ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ของตัวอย่าง - Blank			
	1	2	3	1	2	3	Mean $\pm$ SD
Blank	0.054	0.055	0.053	-	-	-	0.054 $\pm$ 0.001
0.10	0.073	0.079	0.073	0.019	0.024	0.020	0.021 $\pm$ 0.003
0.30	0.113	0.118	0.120	0.059	0.063	0.067	0.063 $\pm$ 0.004
0.50	0.149	0.178	0.159	0.095	0.123	0.106	0.108 $\pm$ 0.014
0.75	0.191	0.193	0.193	0.137	0.138	0.140	0.138 $\pm$ 0.002
1.00	0.237	0.255	0.222	0.183	0.200	0.169	0.184 $\pm$ 0.016
1.45	0.318	0.343	0.323	0.264	0.288	0.270	0.274 $\pm$ 0.012



รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ BSA กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

ตารางที่ 2 แสดงผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ของตัวอย่างสารสกัดจากผิวหนังกัญชู่ ( $N=3$ )

กลุ่มที่	ตัวอย่างที่	น้ำหนักตัวอย่าง (มิลลิกรัม) ต่อ 1 มิลลิลิตร	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ของตัวอย่าง			ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร) หลังจากเจือ จาง 10 เท่า	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (เปอร์เซ็นต์)
			Blank	ตัวอย่าง	ตัวอย่าง -Blank			
1	1	50.15	0.210	0.274	0.064	2.05	20.5	41.0
	2	50.71		0.254	0.044	1.57	15.7	31.4
	3	50.70		0.284	0.074	2.29	22.9	45.8
Mean $\pm$ SD				0.061 $\pm$ 0.015		1.97 $\pm$ 0.4	19.7 $\pm$ 4.0	39.4 $\pm$ 7.3
2	1	50.32	0.210	0.269	0.059	1.93	19.3	38.6
	2	50.40		0.265	0.055	1.83	18.3	36.6
	3	50.53		0.274	0.064	2.05	20.5	41.0
Mean $\pm$ SD				0.059 $\pm$ 0.005		1.94 $\pm$ 0.1	19.4 $\pm$ 1.0	38.7 $\pm$ 2.2
3	1	50.51	0.210	0.283	0.073	2.27	22.7	45.4
	2	50.24		0.272	0.062	2.00	20.0	40.0
	3	50.23		0.285	0.075	2.31	23.1	46.2
Mean $\pm$ SD				0.070 $\pm$ 0.007		2.19 $\pm$ 0.2	21.9 $\pm$ 2.0	43.9 $\pm$ 3.4

ตารางที่ 2 (ต่อ) แสดงผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ของตัวอย่างสารสกัดจากผิวหนังกัญชู่ ( $N=3$ )

กลุ่มที่	ตัวอย่างที่	น้ำหนักตัวอย่าง (มิลลิกรัม) ต่อ 1 มิลลิลิตร	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ของตัวอย่าง			ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร) หลังจากเจือ จาง 10 เท่า	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (เปอร์เซ็นต์)
			Blank	ตัวอย่าง	ตัวอย่าง -Blank			
4	1	50.32	0.210	0.277	0.067	2.12	21.2	42.4
	2	50.58		0.272	0.062	2.00	20.0	40.0
	3	50.71		0.280	0.070	2.19	21.9	43.8
Mean $\pm$ SD				0.066 $\pm$ 0.004		2.10 $\pm$ 0.1	21.0 $\pm$ 1.0	42.1 $\pm$ 1.9
5	1	50.64	0.210	0.290	0.080	2.44	24.4	48.8
	2	50.50		0.267	0.057	1.88	18.8	37.6
	3	50.94		0.283	0.073	2.27	22.7	45.4
Mean $\pm$ SD				0.070 $\pm$ 0.012		2.20 $\pm$ 0.3	22.0 $\pm$ 3.0	43.9 $\pm$ 5.7
6	1	50.05	0.210	0.287	0.077	2.36	23.6	47.2
	2	50.75		0.279	0.069	2.17	21.7	43.4
	3	50.36		0.284	0.074	2.29	22.9	45.8
Mean $\pm$ SD				0.073 $\pm$ 0.004		2.27 $\pm$ 0.1	22.7 $\pm$ 1.0	45.5 $\pm$ 1.9

ตารางที่ 2 (ต่อ) แสดงผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ของตัวอย่างสารสกัดจากผิวหนังหนู (N=3)

กลุ่มที่	ตัวอย่างที่	น้ำหนักตัวอย่าง (มิลลิกรัม) ต่อ 1 มิลลิลิตร	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ของตัวอย่าง			ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร) หลังจากเจือ จาง 10 เท่า	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (เปอร์เซ็นต์)
			Blank	ตัวอย่าง	ตัวอย่าง -Blank			
7	1	50.77	0.210	0.277	0.067	2.12	21.2	42.4
	2	50.99		0.285	0.075	2.31	23.1	46.2
	3	50.34		0.277	0.067	2.12	21.2	42.4
Mean $\pm$ SD				0.070 $\pm$ 0.005		2.18 $\pm$ 0.1	21.8 $\pm$ 1.0	43.7 $\pm$ 2.2
8	1	50.97	0.210	0.275	0.065	2.07	20.7	41.4
	2	50.08		0.304	0.094	2.77	27.7	55.4
	3	50.09		0.271	0.061	1.98	19.8	39.6
Mean $\pm$ SD				0.073 $\pm$ 0.018		2.27 $\pm$ 0.4	22.7 $\pm$ 4.0	45.5 $\pm$ 8.6
9	1	50.62	0.210	0.298	0.088	2.63	26.3	52.6
	2	50.54		0.266	0.056	1.86	18.6	37.2
	3	50.28		0.298	0.088	2.63	26.3	52.6
Mean $\pm$ SD				0.077 $\pm$ 0.019		2.37 $\pm$ 0.4	23.7 $\pm$ 4.0	47.5 $\pm$ 8.9

ตารางที่ 2 (ต่อ) แสดงผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ของตัวอย่างสารสกัดจากผิวหนังกัญชง ( $N=3$ )

กลุ่มที่	ตัวอย่างที่	น้ำหนักตัวอย่าง (มิลลิกรัม) ต่อ 1 มิลลิลิตร	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ของตัวอย่าง			ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร) หลังจากเจือ จาง 10 เท่า	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (เปอร์เซ็นต์)
			Blank	ตัวอย่าง	ตัวอย่าง -Blank			
10	1	50.10	0.210	0.297	0.087	2.60	26.0	52.0
	2	50.33		0.277	0.067	2.12	21.2	42.4
	3	50.61		0.290	0.080	2.44	24.4	48.8
Mean $\pm$ SD				0.076 $\pm$ 0.010		2.39 $\pm$ 0.2	23.9 $\pm$ 2.0	47.7 $\pm$ 4.9
11	1	50.93	0.210	0.286	0.076	2.34	23.4	46.8
	2	50.38		0.285	0.075	2.31	23.1	46.2
	3	50.93		0.288	0.078	2.39	23.9	47.8
Mean $\pm$ SD				0.076 $\pm$ 0.002		2.35 $\pm$ 0.0	23.5 $\pm$ 0.4	46.9 $\pm$ 0.8
12	1	50.18	0.210	0.287	0.077	2.36	23.6	47.2
	2	50.65		0.292	0.082	2.48	24.8	49.6
	3	50.39		0.299	0.089	2.65	26.5	53.0
Mean $\pm$ SD				0.082 $\pm$ 0.006		2.50 $\pm$ 0.1	25.0 $\pm$ 1.0	49.9 $\pm$ 2.9

**ตัวอย่างการคำนวณ :** สารสกัดจากผิวหนังกู ตัวอย่างที่ 1

จากตาราง พบการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 0.064

นำค่าที่ได้ไปหาความเข้มข้น โดยแทนค่า Y ในสมการ

$$Y = 0.0416x - 0.0213$$

$$0.064 = 0.0416x - 0.0213$$

$$X = (0.064 - 0.0213) / 0.0416$$

$$= 2.05 \text{ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร}$$

ปริมาณสารสกัดที่นำมาวิเคราะห์มีความเข้มข้นเท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเจือจางจาก Stock ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (เจือจาง 10 เท่า)

ดังนั้นที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีความเข้มข้น

$$= 2.05 \times 10$$

$$= 20.5 \text{ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร}$$

ดังนั้นปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในสารสกัด

$$= 20.5 / 50 \times 100$$

$$= 41.0 \text{ เปอร์เซ็นต์}$$

## ภาคผนวกที่ 7

### การวิเคราะห์ปริมาณ TGF- $\beta$ 1 ในผิวหนังบริเวณส่วนหลังของหนู โดยใช้ TGF- $\beta$ 1 ELISA Kit

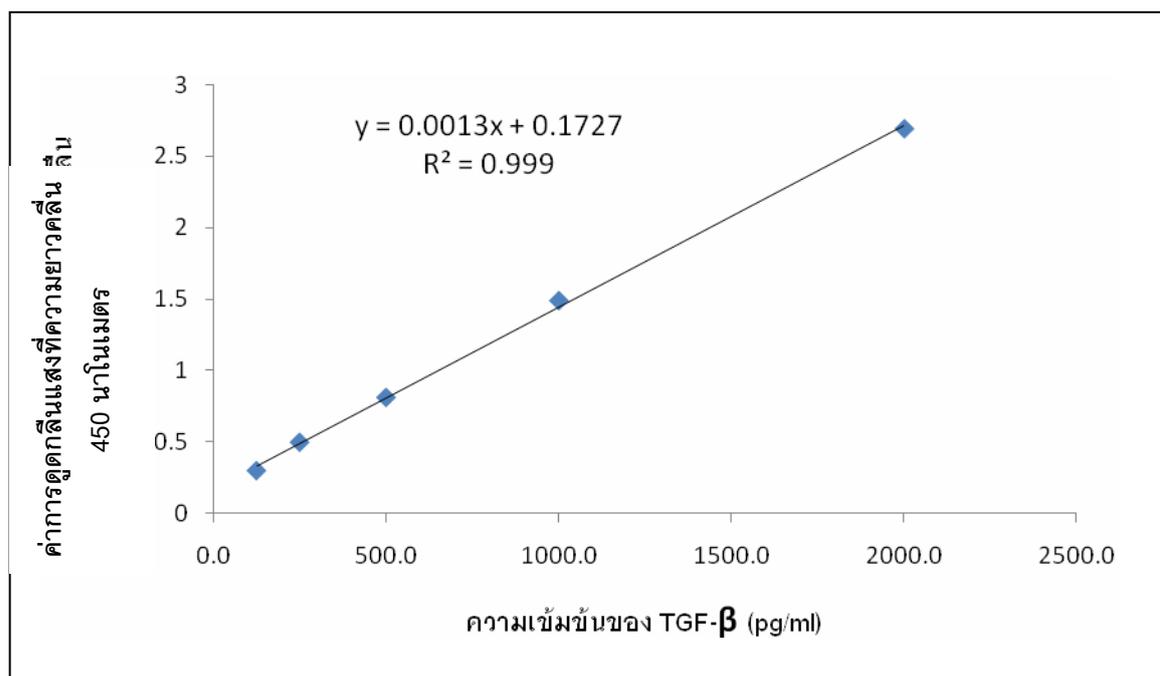
การวิเคราะห์หาปริมาณ TGF- $\beta$ 1 จากสารสกัดโดยใช้ TGF- $\beta$ 1 ELISA Kit ได้ทำตามที่กำหนดไว้ในคู่มือที่ได้จากบริษัทผู้ผลิต และมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ทำการเคลือบ plates โดยปิเปต coating solution ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละ well ปิด plate แล้วบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส overnight (12-18 ชั่วโมง)
2. เท coating solution ที่ล้างด้วย wash buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อ well 1 ครั้ง แล้วตบ plate ให้แห้ง
3. Block plate โดยปิเปต assay buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อ well แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. เท assay buffer ที่ล้างด้วย wash buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อ well 1 ครั้ง แล้วตบ plate ให้แห้ง
5. เตรียม standard และตัวอย่าง โดยเจือจางใน assay buffer
6. ปิเปต standard และตัวอย่าง ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในแต่ละ well
7. เติม working detection antibody ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในแต่ละ well แล้วเขย่าที่ 400 รอบต่อนาที ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
8. เท working detection antibody ที่ล้างด้วย wash buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อ well 5 ครั้ง แล้วตบ plate ให้แห้ง
9. เติม working streptavidin-HRP solution ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในแต่ละ well แล้วเขย่าที่ 400 รอบต่อนาที ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
10. เท working streptavidin-HRP solution ที่ล้างด้วย wash buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อ well 5 ครั้ง แล้วตบ plate ให้แห้ง
11. เติม TMB substrate ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในแต่ละ well แล้วเขย่าที่ 400 รอบต่อนาที ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
12. เติม stop solution ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในแต่ละ well
13. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร (reference absorbance: 620 nm)

ผลการดูดกลืนแสงของ TGF- $\beta$ 1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ และกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ TGF- $\beta$ 1 และค่าการดูดกลืนแสงแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 1 และผลการวิเคราะห์ปริมาณ TGF- $\beta$ 1 สารสกัดจากผิวหนังบริเวณส่วนหลังของหนู แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 แสดงผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร (reference absorbance: 620 nm) ของ TGF- $\beta$ 1 ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน

ความเข้มข้นของ TGF- $\beta$ 1 (พิโคกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ของตัวอย่างที่		Mean $\pm$ SD
	1	2	
125	0.262	0.336	0.299 $\pm$ 0.05
250	0.473	0.522	0.497 $\pm$ 0.03
500	0.844	0.778	0.811 $\pm$ 0.05
1000	1.521	1.457	1.489 $\pm$ 0.04
2000	2.681	2.704	2.693 $\pm$ 0.02



รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ TGF- $\beta$ 1 กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

ตารางที่ 2 แสดงผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร (reference absorbance: 620 nm) ของตัวอย่างสารสกัดจากผิวหนังกัญชู่ ( $N=3$ )

กลุ่มที่	ตัวอย่างที่	น้ำหนักตัวอย่าง (มิลลิกรัม) ต่อ 1 มิลลิลิตร	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ของตัวอย่าง	ความเข้มข้นที่คำนวณได้ จากสมการ (พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณของ TGF- $\beta$ 1 (พิโคกรัม) ในตัวอย่าง 1 มิลลิกรัม
1	1	100.44	0.724	424.1	4.2
	2	100.85	0.654	370.2	3.7
	3	100.14	0.665	378.7	3.8
	Mean $\pm$ SD		0.681 $\pm$ 0.038	391.0 $\pm$ 28.9	3.9 $\pm$ 0.3
2	1	100.71	0.665	378.7	3.8
	2	100.23	0.526	271.8	2.7
	3	100.48	0.468	226.8	2.3
	Mean $\pm$ SD		0.553 $\pm$ 0.10	292.5 $\pm$ 77.9	2.9 $\pm$ 0.8
3	1	100.89	0.603	331.0	3.3
	2	100.08	0.709	412.5	5.1
	3	100.72	0.669	381.8	3.0
	Mean $\pm$ SD		0.660 $\pm$ 0.05	375.1 $\pm$ 41.2	3.7 $\pm$ 0.4

ตารางที่ 2 (ต่อ) แสดงผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร (reference absorbance: 620 nm) ของตัวอย่างสารสกัดจากผิวหนังกัญชู่ ( $N=3$ )

กลุ่มที่	ตัวอย่างที่	น้ำหนักตัวอย่าง (มิลลิกรัม) ต่อ 1 มิลลิลิตร	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ของตัวอย่าง	ความเข้มข้นที่คำนวณได้ จากสมการ (พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณของ TGF- $\beta$ 1 (พิโคกรัม) ในตัวอย่าง 1 มิลลิกรัม
4	1	100.40	0.628	350.2	3.5
	2	100.39	0.491	244.9	2.4
	3	100.39	0.486	241.0	2.4
	Mean $\pm$ SD		0.535 $\pm$ 0.08	278.7 $\pm$ 62.0	2.8 $\pm$ 0.6
5	1	100.80	0.635	355.6	3.5
	2	100.42	0.488	242.5	2.4
	3	100.46	0.550	290.2	2.9
	Mean $\pm$ SD		0.558 $\pm$ 0.07	296.1 $\pm$ 56.8	2.9 $\pm$ 0.6
6	1	100.70	0.625	347.9	3.5
	2	100.40	0.533	277.2	2.8
	3	100.77	0.590	321.0	3.2
	Mean $\pm$ SD		0.583 $\pm$ 0.05	315.4 $\pm$ 35.7	3.1 $\pm$ 0.3

ตารางที่ 2 (ต่อ) แสดงผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร (reference absorbance: 620 nm) ของตัวอย่างสารสกัดจากผิวหนังกุ้ง (N=3)

กลุ่มที่	ตัวอย่างที่	น้ำหนักตัวอย่าง (มิลลิกรัม) ต่อ 1 มิลลิลิตร	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ของตัวอย่าง	ความเข้มข้นที่คำนวณได้ จากสมการ (พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณของ TGF- $\beta$ 1 (พิโคกรัม) ในตัวอย่าง 1 มิลลิกรัม
7	1	100.28	0.676	387.2	3.9
	2	100.10	0.586	317.9	3.2
	3	100.82	0.601	329.5	3.3
	Mean $\pm$ SD		0.621 $\pm$ 0.05	344.9 $\pm$	3.4 $\pm$ 0.4
8	1	100.49	0.724	424.1	4.2
	2	100.09	0.834	508.7	5.1
	3	100.09	0.788	473.5	4.7
	Mean $\pm$ SD		0.782 $\pm$ 0.055	468.7 $\pm$ 42.5	4.7 $\pm$ 0.4
9	1	100.17	0.606	333.3	3.3
	2	100.17	0.656	371.8	3.7
	3	100.09	0.507	257.2	2.6
	Mean $\pm$ SD		0.590 $\pm$ 0.08	320.8 $\pm$ 58.3	3.2 $\pm$ 0.6

ตารางที่ 2 (ต่อ) แสดงผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร (reference absorbance: 620 nm) ของตัวอย่างสารสกัดจากผิวหนังกัญชู่ ( $N=3$ )

กลุ่มที่	ตัวอย่างที่	น้ำหนักตัวอย่าง (มิลลิกรัม) ต่อ 1 มิลลิลิตร	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ของตัวอย่าง	ความเข้มข้นที่คำนวณได้จากสมการ (พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณของ TGF- $\beta$ 1 (พิโคกรัม) ในตัวอย่าง 1 มิลลิกรัม
10	1	100.74	0.607	334.1	3.3
	2	100.47	0.676	387.2	3.9
	3	100.09	0.530	274.8	2.7
	Mean $\pm$ SD		0.604 $\pm$ 0.07	332.0 $\pm$ 56.2	3.3 $\pm$ 0.6
11	1	100.94	0.706	410.2	4.1
	2	100.48	0.800	482.5	4.8
	3	100.92	0.578	311.8	3.1
	Mean $\pm$ SD		0.695 $\pm$ 0.11	401.5 $\pm$ 85.7	4.0 $\pm$ 0.9
12	1	100.25	0.793	477.2	4.8
	2	100.05	0.695	401.8	4.0
	3	100.15	0.701	406.4	4.1
	Mean $\pm$ SD		0.730 $\pm$ 0.05	428.4 $\pm$ 42.3	4.3 $\pm$ 0.4

ตัวอย่างการคำนวณ : สารสกัดจากผิวหนังหนู ตัวอย่างที่ 1

จากตาราง พบการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 0.628

นำค่าที่ได้ไปหาความเข้มข้น โดยแทนค่า Y ในสมการ

$$Y = 0.0013x + 0.1727$$

$$0.724 = 0.0013x + 0.1727$$

$$X = (0.628 - 0.1727) / 0.0013$$

$$= 424.1 \text{ พิโคกรัมต่อมิลลิตร}$$

แสดงว่า ในตัวอย่างผิวหนังหนู 100.44 มิลลิกรัม มีปริมาณของ TGF- $\beta$ 1 เท่ากับ 424.1 พิโคกรัม

ดังนั้น ในตัวอย่างผิวหนังหนู 1 มิลลิกรัม จะมีความเข้มข้นของ TGF- $\beta$ 1

$$= 424.1 \times 1/100.44$$

$$= 4.2 \text{ พิโคกรัม}$$

## ภาคผนวกที่ 8

### การวิเคราะห์ปริมาณ Glutathione ในผิวหนังบริเวณส่วนหลังของหนู โดยใช้ Total Glutathione Quantification Kit

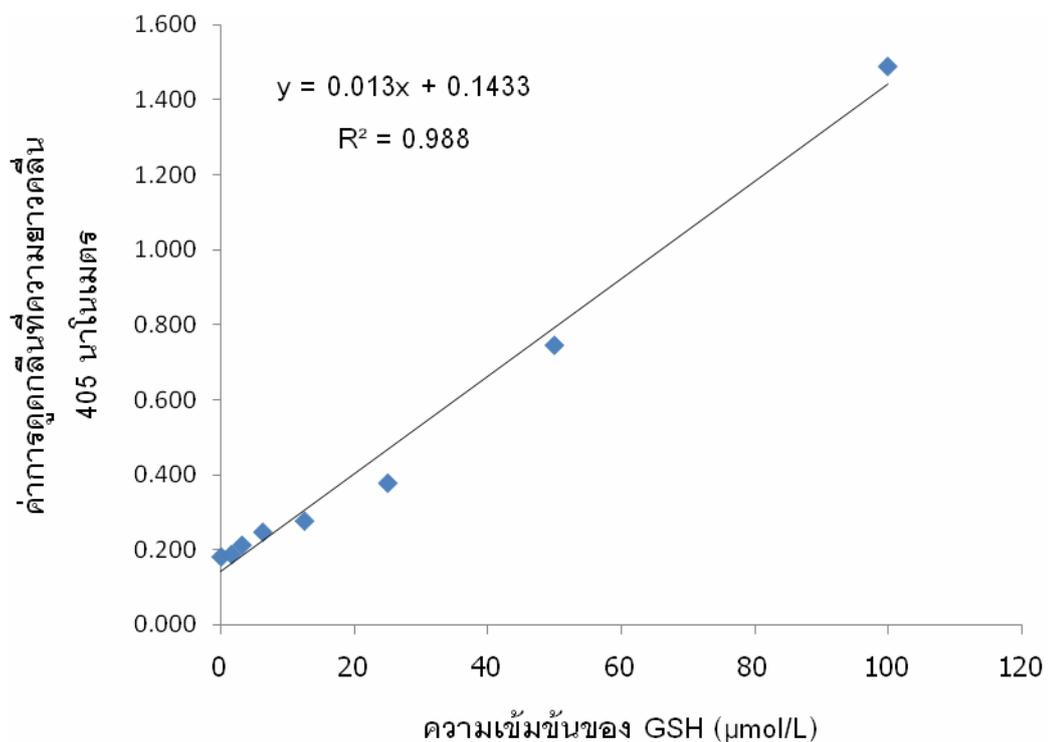
การวิเคราะห์หาปริมาณ Glutathione (GSH) จากสารสกัดโดยใช้ Total Glutathione Quantification Kit ได้ทำตามที่กำหนดไว้ในคู่มือที่ได้จากบริษัทผู้ผลิต โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. นำตัวอย่างผิวหนังหนูในแต่ละกลุ่มมาสกัดโดยใช้ SSA ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์
2. เตรียมสารละลายมาตรฐานโดยใช้ Standard GSH เจือจางใน SSA 0.5-1 เปอร์เซ็นต์ให้  
ได้ความเข้มข้น 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์
3. ปิเปต Coenzyme working solution 20 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate แต่ละ well  
จากนั้นเติม Buffer solution 120 ไมโครลิตร และ Enzyme working solution 20  
ไมโครลิตร ตามลำดับ
4. เก็บ plate ไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
5. เติมสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐาน GSH ลงใน 96-well plate อย่างละ 20  
ไมโครลิตรต่อ well
6. เก็บ plate ไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
7. เติม Substrate working solution 20 ไมโครลิตร แล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10  
นาที
8. นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร โดยใช้ microplate reader

ผลการดูดกลืนแสงของ Standard GSH ที่ความเข้มข้นต่างๆ และกราฟแสดง  
ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Standard GSH และค่าการดูดกลืนแสงแสดงในตารางที่ 1  
และรูปที่ 1 และผลการวิเคราะห์ปริมาณ GSH สารสกัดจากผิวหนังบริเวณส่วนหลังของหนู แสดง  
ในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 แสดงผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ของ GSH ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน

ความเข้มข้นของ GSH (ไมโครโมลาร์)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ของ ตัวอย่างที่			Mean $\pm$ SD
	1	2	3	
0	0.182	0.179	0.183	0.181 $\pm$ 0.001
1.56	0.188	0.186	0.189	0.188 $\pm$ 0.001
3.13	0.213	0.204	0.221	0.212 $\pm$ 0.008
6.25	0.255	0.239	0.247	0.247 $\pm$ 0.008
12.5	0.289	0.269	0.272	0.277 $\pm$ 0.011
25	0.405	0.374	0.353	0.377 $\pm$ 0.026
50	0.763	0.808	0.663	0.745 $\pm$ 0.074
100	1.385	1.452	1.624	1.487 $\pm$ 0.123



รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ GSH กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

ตารางที่ 2 แสดงผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ของตัวอย่างสารสกัดจากผิวหนังกุ้ง ( $N=3$ )

กลุ่มที่	ตัวอย่างที่	น้ำหนักตัวอย่าง (มิลลิกรัม) ต่อ 1 มิลลิลิตร	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ของตัวอย่าง			Total glutathione (ไมโครโมลาร์) หลังจากเจือจาง 10 เท่า	Total glutathione (ไมโครโมลาร์)	Total glutathione (นาโนกรัม) ในตัวอย่าง 1 มิลลิกรัม
			Blank	ตัวอย่าง	ตัวอย่าง -Blank			
1	1	50.15	0.181	0.199	0.018	1.38	13.8	84.8
	2	50.71		0.197	0.016	1.23	12.3	74.5
	3	50.71		0.196	0.015	1.15	11.5	69.9
	Mean $\pm$ SD			0.016 $\pm$ 0.001		1.26 $\pm$ 0.12	12.6 $\pm$ 1.2	76.4 $\pm$ 7.6
2	1	50.93	0.181	0.191	0.010	0.77	7.7	46.4
	2	50.38		0.191	0.010	0.77	7.7	46.9
	3	50.37		0.192	0.011	0.85	8.5	51.6
	Mean $\pm$ SD			0.010 $\pm$ 0.001		0.80 $\pm$ 0.04	7.9 $\pm$ 0.4	48.3 $\pm$ 2.9
3	1	50.32	0.181	0.201	0.020	1.54	15.4	93.9
	2	50.40		0.199	0.018	1.38	13.8	84.3
	3	50.53		0.198	0.017	1.31	13.1	79.5
	Mean $\pm$ SD			0.018 $\pm$ 0.002		1.41 $\pm$ 0.12	14.1 $\pm$ 1.2	85.9 $\pm$ 7.3

ตารางที่ 2 (ต่อ) แสดงผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ของตัวอย่างสารสกัดจากผิวหนังกุ้ง (N=3)

กลุ่มที่	ตัวอย่างที่	น้ำหนักตัวอย่าง (มิลลิกรัม) ต่อ 1 มิลลิลิตร	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ของตัวอย่าง			Total glutathione (ไมโครโมลาร์) หลังจากเจือจาง 10 เท่า	Total glutathione (ไมโครโมลาร์)	Total glutathione (นาโนกรัม) ในตัวอย่าง 1 มิลลิกรัม
			Blank	ตัวอย่าง	ตัวอย่าง-Blank			
4	1	50.18	0.181	0.193	0.012	0.92	9.2	56.5
	2	50.65		0.192	0.011	0.85	8.5	51.3
	3	50.39		0.191	0.010	0.77	7.7	46.9
	Mean ± SD			0.011 ± 0.001		0.85 ± 0.08	8.5 ± 0.8	51.5 ± 4.8
5	1	50.51	0.181	0.193	0.012	0.92	9.2	56.1
	2	50.24		0.192	0.011	0.85	8.5	51.7
	3	50.23		0.194	0.010	1.00	10.0	61.1
	Mean ± SD			0.012 ± 0.001		0.85 ± 0.08	9.2 ± 0.8	56.3 ± 4.7
6	1	50.62	0.181	0.195	0.014	1.08	10.8	65.3
	2	50.54		0.193	0.012	0.92	9.2	56.1
	3	50.28		0.195	0.014	1.08	10.8	65.8
	Mean ± SD			0.013 ± 0.001		1.03 ± 0.09	10.3 ± 0.9	62.4 ± 5.5

ตารางที่ 2 (ต่อ) แสดงผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ของตัวอย่างสารสกัดจากผิวหนังหนู (N=3)

กลุ่มที่	ตัวอย่างที่	น้ำหนักตัวอย่าง (มิลลิกรัม) ต่อ 1 มิลลิลิตร	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ของตัวอย่าง			Total glutathione (ไมโครโมลาร์) หลังจากเจือจาง 10 เท่า	Total glutathione (ไมโครโมลาร์)	Total glutathione (นาโนกรัม) ในตัวอย่าง 1 มิลลิกรัม
			Blank	ตัวอย่าง	ตัวอย่าง-Blank			
7	1	50.32	0.181	0.194	0.013	1.00	10.0	61.0
	2	50.58		0.193	0.012	0.92	9.2	56.0
	3	50.71		0.195	0.014	1.08	10.8	65.2
	Mean ± SD			0.013 ± 0.001		1.00 ± 0.08	10.0 ± 0.8	60.7 ± 4.6
8	1	50.97	0.181	0.204	0.023	1.77	17.7	106.6
	2	50.08		0.202	0.021	1.62	16.2	99.0
	3	50.09		0.206	0.025	1.92	19.2	117.9
	Mean ± SD			0.023 ± 0.002		1.77 ± 0.15	17.7 ± 1.5	107.8 ± 9.5
9	1	50.05	0.181	0.197	0.016	1.23	12.3	75.5
	2	50.75		0.198	0.017	1.31	13.1	79.1
	3	50.36		0.195	0.014	1.08	10.8	65.6
	Mean ± SD			0.016 ± 0.002		1.21 ± 0.12	12.1 ± 1.2	73.4 ± 7.00

ตารางที่ 2 (ต่อ) แสดงผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ของตัวอย่างสารสกัดจากผิวหนังกุ้ง ( $N=3$ )

กลุ่มที่	ตัวอย่างที่	น้ำหนักตัวอย่าง (มิลลิกรัม) ต่อ 1 มิลลิลิตร	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ของตัวอย่าง			Total glutathione (ไมโครโมลาร์) หลังจากเจือจาง 10 เท่า	Total glutathione (ไมโครโมลาร์)	Total glutathione (นาโนกรัม) ในตัวอย่าง 1 มิลลิกรัม
			Blank	ตัวอย่าง	ตัวอย่าง-Blank			
10	1	50.10	0.181	0.196	0.015	1.15	11.5	70.7
	2	50.33		0.196	0.015	1.15	11.5	70.4
	3	50.61		0.199	0.018	1.38	13.8	84.0
	Mean $\pm$ SD			0.016 $\pm$ 0.002		1.23 $\pm$ 0.13	12.3 $\pm$ 1.3	75.0 $\pm$ 7.8
11	1	50.77	0.181	0.202	0.021	1.62	16.2	97.7
	2	50.99		0.200	0.019	1.46	14.6	88.0
	3	50.34		0.199	0.018	1.38	13.8	84.4
	Mean $\pm$ SD			0.019 $\pm$ 0.002		1.49 $\pm$ 0.12	14.9 $\pm$ 1.2	90.0 $\pm$ 6.9
12	1	50.64	0.181	0.204	0.023	1.77	17.7	107.3
	2	50.50		0.203	0.022	1.69	16.9	102.9
	3	50.94		0.205	0.024	1.85	18.5	111.3
	Mean $\pm$ SD			0.023 $\pm$ 0.01		1.77 $\pm$ 0.08	17.7 $\pm$ 0.8	107.1 $\pm$ 4.2

**ตัวอย่างการคำนวณ :** สารสกัดจากผิวหนังกุinea ตัวอย่างที่ 1

จากตาราง พบการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 0.199

การดูดกลืนแสงของ blank มีค่าเท่ากับ 0.181

ค่าของ slope จากกราฟมีค่าเท่ากับ 0.013

นำค่าที่ได้ไปหาความเข้มข้น โดยแทนค่าในสมการ

$$\text{Total glutathione} = (\text{O.D.}_{\text{sample}} - \text{O.D.}_{\text{blank}}) / \text{slope}$$

$$\text{Total glutathione} = (0.199 - 0.181) / 0.013$$

$$\text{Total glutathione} = 1.38 \text{ ไมโครโมลาร์}$$

ปริมาณสารสกัดที่นำมาวิเคราะห์มีความเข้มข้นเท่ากับ 1.38 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเจือจางจากสารละลายเริ่มต้นในปริมาณ 10 เท่า

ดังนั้นในตัวอย่าง 50.15 มิลลิกรัม (ในสารสกัดปริมาตรทั้งหมด 1 มิลลิลิตร) มี Total glutathione ความเข้มข้น 13.8 ไมโครโมลาร์

ดังนั้น ในตัวอย่าง 1 มิลลิกรัม จะมี Total glutathione (น้ำหนักโมเลกุลของ glutathione โดยเฉลี่ยเท่ากับ 307)

$$= (13.8 \times 10^{-9} \times 307) / 50.15$$

$$= 84.8 \text{ นาโนกรัม}$$

## ภาคผนวกที่ 9

### การย้อมเนื้อเยื่อเพื่อตรวจสอบปริมาณและการกระจายตัวของ Collagen

#### โดยใช้หลักการ Immunofluorescence

1. ขั้นตอน Fixation โดยนำชิ้นเนื้อมา Fix ใน Tissue Freezing Medium แล้วเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส
2. จากนั้นทำการตัดชิ้นเนื้อที่ Fix ใน Tissue Freezing Medium ด้วยเครื่อง Cryotome หนา 7-10 ไมโครเมตร เก็บสไลด์ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส
3. ขั้นตอนการย้อมมีขั้นตอนดังนี้
  - นำสไลด์ออกมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 5 นาที
  - Fix สไลด์ โดยแช่ใน acetone (ที่ทำให้เย็นใน -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที) นาน 5-10 นาที
  - ล้างสไลด์ด้วย PBS 3-4 ครั้ง
  - Block สไลด์โดยใช้ 10% normal serum with 1% BSA in TBS หยดบนสไลด์ให้ท่วม แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที
  - เท 10% normal serum with 1% BSA in TBS บนสไลด์ทิ้ง แล้วเช็ดรอบๆ สไลด์
  - ย้อมสไลด์ด้วย primary antibody (เจือจาง 1:200 ใน 1%BSA in TBS) โดยหยดบนสไลด์ให้ท่วม แล้ว incubate ที่ 4 องศาเซลเซียส, overnight
  - ล้างสไลด์ด้วย TBS+0.025% Triton X-100 จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที
  - ย้อมสไลด์ด้วย fluorophore-conjugated secondary antibody (เจือจาง 1:250 ใน 1%BSA in TBS) โดยหยดบนสไลด์ให้ท่วม แล้ววางไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง
  - ล้างสไลด์ด้วย TBS จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที
  - ย้อมสไลด์ด้วย PI (เจือจาง 1:500 ใน PBS) โดยหยดบนสไลด์ให้ท่วม แล้ววางไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที
  - ล้างสไลด์ด้วย PBS 3-4 ครั้ง
  - แล้วทำการ ปิดทับตัวอย่างด้วย cover glass

## ภาคผนวกที่ 10

### เอกสารการรับรองจากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยนเรศวร



เอกสารรับรองโครงการวิจัยในสัตว์ทดลอง  
คณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยนเรศวร

**ชื่อโครงการ** ประสิทธิภาพของเนื้อผลมะละกอ และกล้วยในการป้องกันผิวหนังเสื่อมสภาพ  
ก่อนวัยเนื่องจากรังสี UVB : การศึกษาในสัตว์ทดลอง  
Efficacy of *Carica papaya* and *Musa sapientum* fruits on prevention of  
UVB-induced skin aging : *In vivo* study

**ชื่อหัวหน้าโครงการ** รศ.ดร.จตุภา วิโยชน์

**เลขที่โครงการ/รหัส** 52 04 0001

**สังกัดหน่วยงาน/คณะ** เกษศาสตร์

**การรับรอง** ขอรับรองโครงการวิจัยดังกล่าวข้างบนนี้ ได้ผ่านการพิจารณาและรับรอง  
จากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยนเรศวร  
ประจำเดือน กุมภาพันธ์ 2552

**ลงนาม**

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิบูลย์ วัฒนатор)

ประธานคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ภาคผนวกที่ 11

แผนกิจกรรมหลักที่วางแผนไว้ รวมทั้งผลลัพธ์ (Output) ที่ได้รับ

วัตถุประสงค์	กิจกรรมหลัก	กิจกรรมรอง	ช่วงระยะเวลา ดำเนินการ	จำนวน วันที่ใช้	ผู้รับผิดชอบ
1. เพื่อให้ทราบปริมาณฟีนอล และฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากเนื้อผลไม้	1.1 วิเคราะห์ปริมาณฟีนอล และทดสอบฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากเนื้อผลไม้ในหลอดทดลอง	1.1.1 เตรียมสารสกัดจากเนื้อผลไม้สุก	ก.ค. 52	15	รศ.ดร.จารุภา
		1.1.2 วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลโดย Folin-Ciocalteu's reagent	ก.ค. 52	15	รศ.ดร.กรรณก
		1.1.3 วัดฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันโดย DPPH assay	ส.ค. 52	30	รศ.ดร.กรรณก
2. เพื่อให้ทราบประสิทธิภาพของเนื้อผลไม้สุกที่ใช้ในการศึกษาต่อการป้องกันการเสื่อมสภาพของผิวหนังเนื่องจากรังสี UVB	2.1 ศึกษาในสัตว์ทดลองถึงผลของกล้วยน้ำว้าสุก กล้วยไข่สุกหรือมะละกอสุกพันธุ์แขกดำ ต่อการป้องกันการเสื่อมสภาพของผิวหนัง เนื่องจากรังสี UVB	2.1.1 เตรียมสัตว์ทดลอง	ก.ย. 52	30	รศ.ดร.จารุภา
		2.1.2 ทดสอบประสิทธิภาพของเนื้อผลไม้สุกที่ใช้ในการศึกษาต่อการป้องกันการเสื่อมสภาพของผิวหนัง เนื่องจากรังสี UVB โดยศึกษาในแง่คุณสมบัติทางกายภาพของผิวหนัง	ต.ค. 52 – ก.พ. 53	150	รศ.ดร.จารุภา
		2.1.3 ทดสอบประสิทธิภาพของเนื้อผลไม้สุกที่ใช้ในการศึกษาต่อการป้องกันการเสื่อมสภาพของผิวหนัง เนื่องจากรังสี UVB โดยศึกษาในระดับจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อผิวหนัง และระดับชีวโมเลกุล	มี.ค. – ก.ย. 53	210	รศ.ดร.จารุภา

ผลที่ได้รับในแต่ละช่วงระยะเวลา (แบ่งเป็นราย 6 เดือน) ตามที่วางแผนไว้

เดือนที่	กิจกรรม (activities)	ผลงานที่ได้รับ (outputs)
6 เดือนที่ 1	<ol style="list-style-type: none"> <li>วิเคราะห์ปริมาณฟีนอล และทดสอบฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากเนื้อผลไม้ในหลอดทดลอง</li> <li>ศึกษาในสัตว์ทดลอง ถึงผลของกล้วยไข่ กล้วยน้ำว้า และมะละกอพันธุ์แขกดำในการป้องกันการเสื่อมสภาพของผิวหนัง เนื่องจากรังสี UVB โดยศึกษาในแง่คุณสมบัติทางกายภาพของผิวหนัง</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>ปริมาณฟีนอล และฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากเนื้อผลไม้</li> <li>ทราบผลของกล้วยไข่ กล้วยน้ำว้า และมะละกอพันธุ์แขกดำในการป้องกันการเสื่อมสภาพของผิวหนัง ได้แก่ ความหนา และความยืดหยุ่น</li> </ol>
6 เดือนที่ 2	<ol style="list-style-type: none"> <li>ศึกษาในสัตว์ทดลอง ถึงผลของกล้วยไข่ กล้วยน้ำว้า และมะละกอพันธุ์แขกดำในการป้องกันการเสื่อมสภาพของผิวหนัง เนื่องจากรังสี UVB โดยศึกษาในระดับจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อผิวหนัง และระดับชีวโมเลกุล</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>ทราบผลของกล้วยไข่ กล้วยน้ำว้า และมะละกอพันธุ์แขกดำในการป้องกันการเสื่อมสภาพของผิวหนัง ในระดับเนื้อเยื่อ และระดับชีวโมเลกุล ได้แก่ ปริมาณของ TGF-<math>\beta</math>1 และ glutathione, collagen type I และ III</li> </ol>