

บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

รางจืดที่นำมาใช้ในการวิจัยนี้มาจากบริเวณทางเข้าอุทยานแห่งชาติออบขาน เป็นรางจืดที่ขึ้นเองตามธรรมชาติ โดยเลือกเฉพาะส่วนใบมาใช้ในการวิจัย การสกัดสารออกฤทธิ์โดยนำใบรางจืดแห้งแช่น้ำร้อนต้มเคี่ยว เป็นวิธีการสกัดที่เลียนแบบการชงชาเพื่อคั้น ปัญหาและอุปสรรคในขั้นตอนการสกัด คือ เกิดการอุดตันของกระดาษกรอง Whatman No. 4 ทำให้น้ำสกัดใบรางจืดไม่สามารถผ่านได้ ทำให้เสียเวลาในการเปลี่ยนกระดาษกรองบ่อย ๆ การกรองน้ำสกัดจากพืชสมุนไพรมักกรองยากเนื่องจากมีสารพวก mucilage ดังนั้นควรใช้ filter aid เช่น celite จะช่วยทำให้การกรองสะดวกขึ้น วิธีการสกัดที่ใช้ในงานวิจัยนี้แตกต่างจากวิธีการสกัดของพาณี และคณะ (2523) ซึ่งใช้น้ำสกัดใบรางจืดสด ชีระ และ ชำรง (2521) ใช้รากรางจืดแห้ง ส่วนงานวิจัยของสุพร (2541) และขวัญสิริ (2542) ใช้ ethyl alcohol และ hexane ในการสกัดใบรางจืดสด ในงานวิจัยนี้เป็นสารสกัดใบรางจืดแห้งที่ผ่านการ lyophilized มาละลายในน้ำให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเหนี่ยวนำการเกิดไมโครนิวเคลียสที่เกิดจากสารกำจัดแมลงเมทโธมิล

ผลของสารสกัดใบรางจืดในการต้านการเกิดไมโครนิวเคลียสที่เกิดจากเมโทมิลในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ของคน เมื่อให้สารสกัดใบรางจืดก่อนเมโทมิล โดยเติมสารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแบบ single dose คือเติมสารสกัดใบรางจืดในหลอดทดลองที่เลี้ยงเซลล์ลิมโฟไซต์ครบ 24 ชั่วโมง และแบบ double doses คือเติมสารสกัดใบรางจืดในหลอดทดลองที่เลี้ยงเซลล์ลิมโฟไซต์ครบ 24 และ 36 ชั่วโมง พบว่าสามารถลดจำนวนไมโครนิวเคลียสใน binucleated cell ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งอาสาสมัครชายและหญิงเมื่อเปรียบเทียบกับหลอดทดลองที่เติมเมโทมิลเพียงอย่างเดียว แสดงว่าสารสกัดใบรางจืดสามารถต้านการเกิดไมโครนิวเคลียสโดยลดจำนวนไมโครนิวเคลียสที่เกิดจากเมโทมิล หรือสามารถป้องกันการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมได้ นั่นคือสารสกัดใบรางจืดมีคุณสมบัติในการยับยั้งการกลายพันธุ์ (antimutagenicity) ได้ และเนื่องจากยังไม่ทราบกลไกที่แท้จริงของเมโทมิลในการทำให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ หรือการเกิดความผิดปกติของโครโมโซม แต่จากผลการทดลองที่ได้ในหลอดทดลองพบว่าเมโทมิลสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสเพิ่มขึ้นโดยไม่ต้องอาศัยเอมไซม์ S9 mix ในการกระตุ้น แสดงว่าเมโทมิลอาจจะสามารถเข้าทำปฏิกิริยาโดยตรงกับ DNA ภายในเซลล์ทำให้เกิดความเสียหายได้ ดังนั้นกลไกของสาร

สกัดใบรางจืดในการยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ที่เกิดจากเมโรมิลาอาจเกิดจากการที่สารสกัดใบรางจืดทำปฏิกิริยากับเมโรมิลาโดยตรงทำให้เกิดการยับยั้งการทำปฏิกิริยาระหว่างเมโรมิลา กับ DNA ภายในเซลล์ หรืออาจช่วยยับยั้งการนำเข้าสู่ของสารสู่เซลล์ (up take) ตัวอย่างของสารสกัดจากพืชที่มีกลไกดังกล่าว อาทิเช่น dietary fibre เป็นส่วนประกอบที่พบกระจายอยู่ทั่วไปในผนังเซลล์ของพืช พบว่า fibre ของไม้ก๊อ กข้อปล้องของต้นข้าวสาลี ก้านกะหล่ำปลี และ เปลือกมันฝรั่ง สามารถดูดซับ heterocyclic aromatic amines ในหลอดทดลองได้ (Harris และคณะ; 1996, 1998) และ fibre ของเปลือกมันฝรั่งยังสามารถดูดซับ 1,8-dinitropyrene ได้อีกด้วย (Harris และคณะ, 1991) เช่นเดียวกับ Camire และคณะ (1995) พบว่า fibre ของเปลือกมันฝรั่งสามารถดูดซับ benzo[a]pyrene ในหลอดทดลองทำให้สารก่อกลายพันธุ์ไม่สามารถทำปฏิกิริยาได้ Flora และคณะ (1991) พบว่า retinoids สามารถแข่งขันกับสารก่อกลายพันธุ์ในการจับกับบริเวณ nucleophilic site ของ DNA ทำให้เกิดการยับยั้งการทำปฏิกิริยาระหว่างสารก่อกลายพันธุ์กับ DNA ภายในเซลล์และ ascorbic acid สามารถยับยั้งการสร้างสารก่อกลายพันธุ์จากสารตั้งต้น โดยยับยั้งการสร้าง nitrosocompound จากปฏิกิริยาของ nitrate กับ amine หรือ amide (Marquardt และคณะ, 1977; Khudoley และคณะ, 1981) เช่นเดียวกับ α -tocopherol, sulphur compound (cysteine, glutathione, *N*-acetyl cysteine) และ phenols (cinnamic acid, chlorogenic acid) (Flora, 1998)

สำหรับผลการศึกษาไมโครนิวเคลียสในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) โดยใช้เซลล์ไขกระดูกของหนูขาว พบว่าสารสกัดใบรางจืดไม่มีผลทำให้จำนวนไมโครนิวเคลียสเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของลักขณา และคณะ (2004) ที่ได้ทำการศึกษากาการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสในเซลล์ไขกระดูกของหนูขาวสายพันธุ์ Wistar โดยการป้อนน้ำสกัดใบรางจืดทางปากที่ความเข้มข้น 20, 200 และ 2,000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูขาว 1 กิโลกรัม ติดต่อกันเป็นเวลา 180 วัน พบว่าน้ำสกัดใบรางจืดไม่ทำให้เกิดไมโครนิวเคลียสเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับหนูขาวกลุ่มที่ได้รับน้ำอย่างเดียวนั้นเป็น negative control แสดงว่าสารสกัดใบรางจืดไม่ทำให้เกิดไมโครนิวเคลียสในร่างกายเพิ่มมากขึ้นหรือไม่มีสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้

นอกจากนั้นในหนูขาวเพศผู้กลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบรางจืดอย่างเดียวนั้นที่ความเข้มข้น 25 และ 250 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูขาว 1 กิโลกรัม และหนูขาวเพศเมียกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบรางจืดอย่างเดียวนั้นที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูขาว 1 กิโลกรัมมีจำนวนไมโครนิวเคลียสเฉลี่ยต่ำกว่าในหนูขาวกลุ่มที่ได้รับเฉพาะน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเกิดเนื่องจากมีสารบางอย่างในสารสกัดใบรางจืดไปช่วยลดจำนวนไมโครนิวเคลียสที่มีอยู่แล้วในสภาวะธรรมชาติ (spontaneous micronucleus) ของหนูขาว โดยอาจช่วยลดการเกิดอนุคลิอัสที่เกิดขึ้นตลอดเวลาในภาวะปกติของร่างกาย ซึ่งอธิบายได้โดยการศึกษาของ วิวรรณ (2545) ที่ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดใบรางจืด โดยวัดระดับ malondialdehyde (MDA) ในซีรัมของหนูขาว เนื่องจาก MDA เป็นผลผลิตของปฏิกิริยาของ

oxidation ของ lipid membrane ที่มีอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์และองค์ประกอบของเซลล์ทุกเซลล์จากอนุมูลอิสระ พบว่าระดับของ MDA ในหนูขาวเพศผู้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกันกับ สกลรัตน์ และคณะ (2542) ที่ให้สารสกัดใบรางจืดในการลดพิษพาราควอต โดยพาราควอตมีคุณสมบัติทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (Ecobichon, 1996) สามารถกระตุ้นให้เกิดการทำลายเซลล์ เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไขมันไม่อิ่มตัวเป็น lipid peroxides และ MDA (Gregus and Klaassen, 1996) พบว่าสารสกัดใบรางจืดสามารถลดเปอร์เซ็นต์การตายและลดระดับ MDA ในหนูขาวกลุ่มที่ได้รับพาราควอตได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หรืออาจเกิดจากสารสกัดใบรางจืดที่ใช้ในการทดสอบเป็น crude extract ไม่ใช่สารตัวเดียว เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดใบรางจืดเพิ่มมากขึ้นจึงทำให้สารบางอย่างในสารสกัดใบรางจืดเริ่มออกฤทธิ์ได้

หนูขาวกลุ่มที่ได้รับเมโรมิตหลังจากให้สารสกัดใบรางจืดความเข้มข้น 25, 250 และ 2,500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูขาว 1 กิโลกรัม ติดต่อกันเป็นเวลา 3 วัน พบว่าสารสกัดใบรางจืดสามารถลดจำนวนไมโครนิวเคลียสใน PCEs ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโดยเมโรมิตได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูขาวกลุ่มที่ได้รับเฉพาะเมโรมิตความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูขาว 1 กิโลกรัม แสดงว่าสารสกัดใบรางจืดสามารถต้านการเกิดไมโครนิวเคลียสที่เกิดจากเมโรมิตได้ หรือลดการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมที่เกิดจากเมโรมิตได้ นั่นคือสารสกัดใบรางจืดมีคุณสมบัติในการยับยั้งการกลายพันธุ์ (antimutagenicity) ได้ และเนื่องจากยังไม่ทราบกลไกที่แท้จริงของเมโรมิตในการทำให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ หรือการเกิดความผิดปกติของโครโมโซม แต่จากผลการทดลองที่ได้ในสัตว์ทดลองพบว่าเมโรมิตสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสเพิ่มขึ้น แสดงว่าเมโรมิตและ/หรือสารตัวกลางของเมโรมิตอาจทำให้เกิดความเสียหายต่อ DNA ภายในเซลล์ได้ ดังนั้นกลไกของสารสกัดใบรางจืดในการยับยั้งการก่อการกลายพันธุ์ที่เกิดจากเมโรมิตอาจเกิดจากการทำปฏิกิริยากันระหว่างสารสกัดใบรางจืดหรือสารตัวกลางของสารสกัดใบรางจืดที่เกิดขึ้นใหม่ในร่างกายกับเมโรมิตหรือสารตัวกลางของเมโรมิต ทำให้สารก่อกลายพันธุ์มีโครงสร้างเปลี่ยนไปไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ หรือสารในใบรางจืดอาจสามารถยับยั้งเอนไซม์ที่กระตุ้นให้สารก่อกลายพันธุ์ออกฤทธิ์ได้ หรือกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ให้กำจัดสารพิษ หรืออาจมีผลในการซ่อมแซม DNA โดยตรง ตัวอย่างของสารสกัดจากพืชที่มีกลไกดังกล่าว อาทิเช่น hemin สามารถ form ตัวกับ benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide ซึ่งเป็น metabolite ของ benzo[a]pyrene ทำให้ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ (Arimoto และคณะ, 1995) และ *Cinnamomum cassia* เป็นเครื่องเทศใช้ในการปรุงแต่งอาหาร สามารถเพิ่มระดับของ glutathione และ กระตุ้นการทำงานของ glutathione-dependent antioxidant enzyme (Nidhi และคณะ, 2001) เช่นเดียวกับ allyl sulphides (diallyl disulfide and diallyl sulfide) ใน

กระเทียม สามารถเพิ่มการทำงานของ detoxify enzyme โดยกระตุ้นการสร้าง glutathione S-transferase ที่ตับได้ (Fukushima และคณะ, 1997)

ดังนั้นอาจอนุมานได้ว่า สารยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ในสารสกัดใบรางจืดอาจเป็นสารจำพวก desmutagens คือมีกลไกการเปลี่ยนแปลงสารก่อกลายพันธุ์ภายนอกเซลล์หรือก่อนที่ DNA จะได้รับความเสียหาย หรือ bioantimutagens คือสามารถยับยั้งผลของสารก่อกลายพันธุ์โดยการเปลี่ยนแปลงขบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ได้ หรืออาจเป็นได้ทั้ง 2 ชนิด

สำหรับอัตราส่วนระหว่าง PCEs ต่อ PCEs+NCEs ของหนูขาวแต่ละกลุ่มเพื่อดูภาวะการก่อกการสร้างเซลล์ในไขกระดูก พบว่าหนูขาวกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบรางจืดและกลุ่มที่ได้รับเมโทมิลมีค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกับหนูขาวกลุ่มที่ได้รับเฉพาะน้ำ แสดงว่าสารสกัดใบรางจืดและเมโทมิลในความเข้มข้นที่ใช้ในการวิจัยนี้ไม่ก่อกการสร้างเซลล์ในไขกระดูก ส่วนค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนระหว่าง PCEs ต่อ PCEs+NCEs ของหนูขาวกลุ่มที่ได้รับ cyclophosphamide มีค่าเฉลี่ยต่ำกว่ากลุ่มอื่นเล็กน้อยอาจเป็นไปได้ว่าความเข้มข้นของ cyclophosphamide ที่ใช้เป็น positive control ในการวิจัยนี้ทำให้เกิดภาวะการก่อกการสร้างเซลล์ในไขกระดูกเล็กน้อย แต่ยังเห็น PCEs จำนวนมากและมีรูปร่างปกติ ซึ่งภาวะที่ถือว่าเป็นพิษต่อไขกระดูกคือมีอัตราส่วนน้อยกว่าร้อยละ 20 ของหนูขาวกลุ่มควบคุม (EPA, 1998)

สรุปได้ว่าการให้สารสกัดใบรางจืดก่อนได้รับสารฆ่าแมลงเมโทมิลสามารถด้านการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซท์ของคนและในเซลล์ไขกระดูกของหนูขาว โดยลดจำนวนไมโครนิวเคลียสใน binucleated cells และ polychromatic erythrocytes ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเนื่องจากการทดสอบไมโครนิวเคลียสเป็นการทดสอบการก่อกลายพันธุ์โดยอ้อมที่ใช้ประเมินการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมแสดงว่าสารสกัดใบรางจืดมีคุณสมบัติในการยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ (antimutagenicity) โดยสามารถลดความผิดปกติของโครโมโซมที่เกิดจากสารฆ่าแมลงเมโทมิลได้ ขณะที่สารสกัดใบรางจืดในขนาดที่ใช้ในการศึกษาไม่ทำให้เกิดไมโครนิวเคลียสเพิ่มขึ้นในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซท์ของคนและในเซลล์ไขกระดูกของหนูขาว แสดงว่าสารสกัดใบรางจืดไม่ทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมหรือไม่มีสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์แต่สามารถป้องกันการกลายพันธุ์จากสารฆ่าแมลงเมโทมิลได้ และขนาดของสารสกัดใบรางจืดที่ใช้ในการวิจัยนี้คำนวณมาจากขนาดที่ผู้บริโภครับประทานใน 1 วัน ดังนั้นการบริโภคสารรางจืดเป็นประจำอาจช่วยป้องกันการก่อกลายพันธุ์ของยีนเนื่องจากสารพิษต่าง ๆ จากสิ่งแวดล้อมที่ได้รับเข้าสู่ร่างกายโดยไม่รู้ตัว และอาจช่วยลดอัตราเสี่ยงในการเกิดมะเร็งได้อีกด้วย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการทดสอบสารสกัดใบรางจืดที่สกัดด้วยน้ำเท่านั้น ไม่ได้ทำการแยกสารบริสุทธิ์ออกมา ทำให้ยังไม่ทราบกลไกที่แท้จริงในการด้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดใบรางจืด จากรายงานการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของรางจืด พบว่าสารเคมีส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม flavonoids ได้แก่

apigenin, cosmosin, delphinidin เป็นต้น (Wasuwat, 1967) ซึ่งมีรายงานของสารต่าง ๆ เหล่านี้ไว้ อาทิ เช่น apigenin เป็น flavonoid ที่พบในใบและลำต้นของพืช นอกจากนี้ยังพบได้ในผลไม้และผักหลายชนิด พบว่า apigenin สามารถยับยั้งการกลายพันธุ์ของยีน โปรโตซัว *Euglena gracilis* เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วย ofloxacin ได้ (Krizkova และคณะ, 1998) นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการกลายพันธุ์ของยีนแบคทีเรีย *S. typhimurium* เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วย benzo[a]pyrene และ 2-aminoanthracene ได้ (National Cancer Institute, 2000) และมีรายงานว่า delphinidin ไม่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีนแบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98, TA100, TA1535, TA1537 และ TA1538 ในสภาวะที่มีและไม่มี การกระตุ้นด้วยเอนไซม์ เช่นเดียวกับรังสีที่ไม่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีนแบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ในสภาวะที่มีและไม่มี การกระตุ้นด้วยเอนไซม์ (วิรวรรณ, 2545) ดังนั้นในอนาคตควรมีการแยกสารบริสุทธิ์ออกมา แล้วนำสารแต่ละชนิดมาทดสอบเพื่อจะได้ทราบคุณสมบัติ ในการยับยั้งการกลายพันธุ์ของสารสกัดใบรางจืดที่แท้จริง และทำให้ทราบกลไกที่แน่ชัดในการต้าน การกลายพันธุ์ของสารสกัดใบรางจืด

ประโยชน์ที่ได้รับจากการศึกษา จากการศึกษาทำให้ทราบว่าสารสกัดใบรางจืดในขนาดที่ใช้ในการศึกษาไม่ทำให้เกิดความคิดปกติของโครโมโซมในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซค์ของคน และ เซลล์ไขกระดูกของหนูขาว แต่สารสกัดใบรางจืดมีสารที่สามารถยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ได้ โดยสามารถต้านการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสที่เกิดจากสารฆ่าแมลงเมโทมิลในเซลล์เม็ดเลือดขาว ชนิดลิมโฟไซค์ของคน และเซลล์ไขกระดูกของหนูขาวได้ นอกจากนี้ยังเป็นข้อมูลสนับสนุนสรรพคุณ ของสมุนไพรรางจืดที่ระบุว่ารางจืดสามารถใช้ปรุงเป็นยารักษา มะเร็ง