บทที่ 4

สรุปผลการวิจัยอภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

ตับเป็นอวัยวะที่มีบทบาทหลักในการเป็นศูนย์กลางของกระบวนการเมตาบอลิซึมของร่างกาย ทั้งในด้านการสังเคราะห์ การเปลี่ยนรูป และการกำจัดสารต่าง ๆ สารหรือปัจจัยภายนอกที่มีฤทธิ์ในการทำลายตับ เช่น แอลกอฮอล์ สารเคมี ยารักษาโรค หรือการติดเชื้อไวรัส จึงล้วนมีบทบาทสำคัญต่อการทำให้เกิดความผิดปกติแก่ร่างกายโดยรวม การเสาะหาพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการปกป้องตับจากสิ่งเหนี่ยวนำให้เกิดการทำลายตับประเภทต่าง ๆ จึงได้รับความสนใจในการศึกษาวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ป้องกันการทำลายตับอย่างต่อเนื่อง

มีพืชสมุนไพรจำนวนไม่น้อยที่มีสรรพคุณ/การใช้เพื่อปกป้องตับ รวมทั้งได้มีการทดสอบฤทธิ์ปกป้องตับ จากการทบทวนวรรณกรรม พบว่า

ในประเทศไทยมี 2 ตำรับยาที่ใช้กันอยู่ คือ ตำรับยาสำหรับบำรุงตับ แก้ตับทรุด ตับพิการที่ระบุใน จากตำราแพทย์แผนโบราณทั่วไป สาขาเภสัชกรรม โรงเรียนแพทย์แผนโบราณ และ ตำรับพัทธะปิตตะ สำหรับตำรับพัทธะปิตตะนั้นได้มีการนำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคตับแข็ง ของคลินิกแพทย์แผนไทย แพทย์แผนไทย รพ.พระปกเกล้า จันทบุรี ซึ่งจากติดตามผลการรักษาพบว่าได้ผลน่าพอใจ พืชที่ระบุไว้ใน2 ตำรับดังกล่าว มีพืชที่ยังไม่ได้มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ปกป้องตับ คือ เต่าเกียด เต่ารั้ง ถั่วลันเตา รากสามสิบ ใบเงินใบทอง กำแพงเจ็ดชั้น

สำหรับพืชสมุนไพรในประเทศไทยที่มีสรรพคุณ บำรุง/รักษาตับ ที่ยังไม่มีรายงานการศึกษาคือ ชะเอมไทย (ระบุไว้ในยาสมุนไพรพื้นบ้านจังหวัดอุบลราชธานี)และ หมอกบ่วาย (ระบุไว้ในตำรายาพื้นบ้านอีสาน)

ในการศึกษาฤทธิ์ปกป้องตับส่วนใหญ่ใช้การทดสอบ *in vivo* ในหนูขาว และพบว่ามีการทดสอบพืชที่พบในประเทศไทยซึ่งอยู่ในวงศ์ Combretaceae และ Fabaceae มากกว่าพืชในวงศ์อื่น

สำหรับงานของโครงการวิจัยนี้ เป็นการศึกษาฤทธิ์การปกป้องตับของพืชสมุนไพรโดยใช้การทดสอบกับเซลล์ตับของหนูขาว เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งจัดเป็นการทดสอบแบบ *ex vivo* หรืออาจเรียก *in vitro* ได้เช่นกัน

PAYAP UNIVERSITY

พืชสมุนไพร 5 ชนิด สำหรับใช้ศึกษาในโครงการวิจัยนี้ ได้แก่ ปัญจขันธ์ จักรนารายณ์ มะม่วง สาหร่ายเตา สาหร่ายสไปรูลินา ยังไม่ได้มีการศึกษาฤทธิ์ปกป้องตับในหนูขาวโดยใช้การทดลองแบบ *in vitro* โดยทดสอบต่อเซลล์ตับของหนู สำหรับปัญจขันธ์ได้มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ปกป้องตับในหนูขาว ส่วนจักรนารายณ์และมะม่วงนั้นได้มีการทดสอบฤทธิ์ปกป้องตับในหนูขาว และ/หรือฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยกลุ่มผู้วิจัยชุดเดียวกันนี้ การที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอาจจะเป็นกลไกหนึ่งที่ทำให้สามารถปกป้องตับได้ดังเช่น ยา Silymarin (Legalon®) ซึ่งได้จากพืช *Silybum marianum*

การศึกษาฤทธิ์ในการปกป้องตับ ซึ่งใช้การศึกษาแบบ *in vitro* สามารถทำได้หลายวิธีซึ่งวิธีที่นิยมได้แก่ การวิเคราะห์เมตาบอลิซึมของเซลล์ตับ โดยการวัดการทำงานของเอนไซม์ในไมโตคอนเดรียของเซลล์ตับได้แก่เอนไซม์ succinate dehydrogenase ในการเปลี่ยนแปลงสาร MTT ให้เป็นผลึก formazan เนื่องจากเอนไซม์ชนิดนี้จะออกฤทธิ์ได้ในเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น วิธีการนี้จึงถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการวิเคราะห์อัตราการแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) และอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ (cell viability)

อีกทางหนึ่ง การศึกษาการคงสภาพปกติของเยื่อหุ้มเซลล์เซลล์ตับ (membrane integrity) สามารถวิเคราะห์ได้จากการตรวจวิเคราะห์กัมมันตภาพของเอนไซม์ที่อยู่ภายในไซโตซอลของเซลล์ตับ เช่น เอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST) เอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT) เอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) และเอนไซม์ gamma glutamyl transpeptidase (GGT) เป็นต้น เอนไซม์เหล่านี้ถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์ตับ เป็นเอนไซม์ที่ปกติทำหน้าที่อยู่ในเซลล์ ไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ออกมาสู่ภายนอกได้ เนื่องจากเอนไซม์เป็นสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ และเยื่อหุ้มเซลล์มีคุณสมบัติในการกั้นและเลือกสารผ่านระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ได้เป็นอย่างดี กัมมันตภาพของเอนไซม์เหล่านี้ ที่ตรวจวัดได้นอกเซลล์ จึงมีค่าต่ำในสภาวะปกติ และทำงานอยู่แต่ภายในเซลล์ จึงนิยมใช้ในการตรวจวิเคราะห์การทำงานของตับ รวมเรียกว่า Liver function test

ในกรณีที่เกิดความผิดปกติขึ้นกับเซลล์ เช่น เมื่อเซลล์ตายเนื่องจากภาวะบาดเจ็บ (trama หรือ injury) หรือการได้รับสารเคมีบางชนิด เช่น คาร์บอนเตตระคลอไรด์ พาราเซตามอล กาแลคโตซามีน หรือเอทานอล ซึ่งมีพิษต่อตับ สารเหล่านี้ส่งผลทำให้คุณสมบัติในการกั้นและเลือกสารผ่านเข้าออกของเยื่อหุ้มเซลล์เสียไป เอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ก็จะรั่วออกมาสู่ภายนอก ทำให้ตรวจพบกัมมันตภาพเอนไซม์เหล่านี้ได้สูงขึ้นในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งอาจแสดงได้ว่าเป็นผลที่เกิดจากการตายเพิ่มขึ้นของเซลล์ หรือการที่เยื่อหุ้มเซลล์ตับถูกทำลาย จึงถูกใช้เป็นดัชนีบ่งชี้การทำงานของ

PAYAP UNIVERSITY

เซลล์ตับ และในขณะเดียวกัน สามารถนำไปใช้ในการศึกษาประสิทธิผลของสารสกัดในการปกป้องตับจากการถูกเหนี่ยวนำให้เกิดพิษต่อตับด้วยสารเคมีดังกล่าว

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้สารสองชนิดสำหรับเหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ตับ ซึ่งได้แก่ สารคาร์บอนเตตระคลอไรด์ และ พาราเซตามอล ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้มีผลใกล้เคียงกับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบในมนุษย์

กลไกการทำลายเซลล์ตับของคาร์บอนเตตระคลอไรด์ เชื่อว่าเกิดจากการเหนี่ยวนำการสร้างอนุมูลอิสระชนิด reactive oxygen species (ROS) ขึ้นภายในเซลล์ ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้ เป็นตัวเริ่มต้นให้เกิดกระบวนการออกซิไดส์ของลิปิด (lipid peroxidation) เกิดเป็นอนุมูลลิปิดเปอร์ออกไซด์ ซึ่งทำให้เกิดการทำลายลิปิดที่เป็นโครงสร้างหลักของเยื่อหุ้มเซลล์ (Castro *et al.*, 1974, Recknagel *et al.*, 1989 และ Maddrey, 2005) เมื่อระดับของสารต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ไม่เพียงพอต่อการกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น เยื่อหุ้มเซลล์ตับจึงถูกทำลายในที่สุด

สารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการทำลายเซลล์ตับโดยคาร์บอนเตตระคลอไรด์จึงอาจออกฤทธิ์โดยอาศัยการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เข้าทำลาย ROS หรืออนุมูลลิปิดเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้น หรือออกฤทธิ์โดยการกระตุ้นกระบวนการป้องกันตัวเองจากอนุมูลอิสระของเซลล์ (cellular antioxidant defense system) เช่นการสังเคราะห์ กลูตาไธโอน การทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) เอนไซม์ catalase (CAT) เป็นต้น

พาราเซตามอล เป็นยาแก้ปวดลดไข้ การใช้ในขนาดที่สูงทำให้เกิดพิษต่อตับ ยานี้เมื่อเข้าสู่เซลล์ตับจะถูกเปลี่ยนแปลงให้อยู่ในรูป N-acetyl-p-benzoquinoneimine (NAPQI) โดยอาศัยการทำงานของ cytochrome P-450 ที่อยู่ภายในเซลล์ตับ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเยื่อหุ้มไมโตคอนเดรียของเซลล์ตับ ทำให้เกิดการรั่วของเยื่อหุ้มเซลล์ (Saxena *et al.*, 1993 และ Jamshidzadeh *et al.*, 2005) จึงพบว่ามีระดับกัมมันตภาพเอนไซม์ในไซโตซอลของเซลล์ เช่น AST และ ALT สูงขึ้นในอาหารเลี้ยงเซลล์ สารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการออกฤทธิ์ของพาราเซตามอลจึงสามารถมีบทบาทต่อการปกป้องตับจากการถูกทำลายอย่างรุนแรง

PAYAP UNIVERSITY

การเติมสารคาร์บอนเตตระคลอไรด์และพาราเซตามอลลงในอาหารเลี้ยงเซลล์มีผลต่อการทำลายเซลล์ตับ แสดงได้จากอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ลดต่ำลงและมีระดับเอนไซม์ AST และ ALT ในอาหารเลี้ยงเซลล์เพิ่มสูงขึ้นอย่างเด่นชัดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารดังกล่าว

สารสกัดพืชทั้งห้าชนิดที่ทำการศึกษาฤทธิ์ปกป้องตับ ได้แก่ ปัญจขันธ์ จักรนารายณ์ สาหร่ายเตา สาหร่ายสไปรูลิน่า และมะม่วง พบว่ามีผลต่อการชะลอการตายของเซลล์ และป้องกันการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ตับได้อย่างชัดเจน ถึงแม้ใช้ความเข้มข้นต่ำตั้งแต่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และผลการปกป้องตับของสารสกัดพืชทั้งห้าชนิดเพิ่มขึ้นโดยแปรผันตรงตามความเข้มข้น

การศึกษาฤทธิ์ปกป้องตับ โดยทดสอบกับเซลล์ตับของสัตว์ทดลอง มีข้อดีหลายอย่าง เช่น ไม่ต้องใช้สัตว์ทดลองจำนวนมากเหมือนการทดลอง *in vivo* ซึ่งมีปัญหาเกี่ยวกับด้านจรรยาบรรณของการใช้สัตว์ทดลอง ใช้สารทดสอบปริมาณไม่มากซึ่งเหมาะสมสำหรับทดสอบหาสารออกฤทธิ์ในพืชซึ่งมีปริมาณน้อยอยู่แล้ว เหมาะสำหรับใช้เพื่อเป็น bioassay guided fractionation เพื่อให้ได้สารออกฤทธิ์ นอกจากนั้นยังสามารถใช้สำหรับการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ ข้อเสียคือต้องการห้องปฏิบัติการที่เหมาะสมสำหรับการทำการทดลองโดยใช้ cell culture

ผลของการปกป้องเซลล์ตับของสารสกัดพืชที่ทำการทดสอบนี้ จึงควรจะได้รับการศึกษาต่อไปถึง ฤทธิ์ในการป้องกันเซลล์ตับปกติจากการถูกทำลายด้วยสารพิษชนิดต่าง ๆ ที่เป็นพิษต่อตับ กลไกที่แท้จริงในการออกฤทธิ์ปกป้องตับ เพื่อการพัฒนาการสกัดหาสารออกฤทธิ์สำคัญ รวมถึงการศึกษาฤทธิ์ปกป้องตับในสัตว์ทดลอง (*in vivo* studies) โดยเฉพาะการศึกษาหาขนาดความเข้มข้นที่เหมาะสม และศึกษาความเป็นพิษในสัตว์ทดลองต่อไป

งานวิจัยนี้ได้ทดสอบวิธีการการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดพืชต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) โดยใช้หลักการของวิธี MTT เช่นเดียวกับที่ใช้ในการศึกษา อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ (cell viability)ของเซลล์ตับปฐมภูมิ และใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้เซลล์มะเร็งรอดชีวิตได้ 50 % (IC 50) เป็นค่าเปรียบเทียบความแรงของสารสกัดในการฆ่าเซลล์มะเร็ง

จากการทดสอบส่วนสกัดของพืช 5 ชนิด ได้แก่ จักรนารายณ์ ปัญจขันธ์ สาหร่ายเตา สาหร่ายสไปรูลินา และมะม่วง ได้ผลเบื้องต้นที่น่าสนใจ โดยสารสกัดพืชสี่ชนิดได้แก่ จักรนารายณ์ ปัญจขันธ์ สาหร่ายเตาและสาหร่ายสไปรูลินา มีความสามารถในการทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งในระดับต่าง ๆ กัน พบว่าส่วนสกัดจักรนารายณ์มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากที่สุด โดยมีค่า IC 50 ที่ 55.6 ไมโครกรัม รองลงมาคือ ปัญจขันธ์ 72.6 ไมโครกรัม ในขณะที่ส่วนสกัด

PAYAP UNIVERSITY

สาหร่ายสไปรูลิน่าและสาหร่ายเตา มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับน้อยกว่า ตามลำดับ ส่วนสารสกัดผลมะม่วง ที่ความเข้มข้นที่ใช้คือ 3.125-400 ไมโครกรัม พบว่ามีผลต่อการตายของเซลล์มะเร็งต่ำกว่าร้อยละ 20 จึงสรุปผลว่าสารสกัดผลมะม่วงไม่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำการตายของเซลล์มะเร็งตับที่ความเข้มข้นดังกล่าว อย่างไรก็ดี การมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งตับมีแนวโน้มลดลงตามความเข้มข้นของสารสกัดมะม่วงที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นหากเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดมะม่วงมากเพียงพอเชื่อว่าจะมีผลต่อการฆ่าเซลล์มะเร็งตับได้ดียิ่งขึ้น

ผลงานวิจัยในขั้นนี้สามารถสรุปในเบื้องต้นได้ว่า สารสกัดหยาบจากจักรนารายณ์และปัญจขันธ์มีสารประเภทไม่มีขั้วที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากที่สุดสมควรมีการศึกษาในระดับที่สูงขึ้น เช่น สกัดสารบริสุทธิ์มาทดสอบประสิทธิภาพการต้านมะเร็ง เปรียบเทียบกับยามาตรฐานที่ใช้รักษามะเร็ง

ส่วนสกัดจักรนารายณ์ มีฤทธิ์ปกป้องตับและเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง จากการศึกษาทางพฤกษเคมีเบื้องต้นของส่วนสกัดจักรนารายณ์ พบว่า มีกลุ่มสารฟลาวานอยด์ เทคนิค GC-MS สามารถทำนายชนิดขององค์ประกอบสารต่างๆที่มีอยู่ในสารตัวอย่างได้ค่อนข้างแม่นยำโดยเปรียบเทียบ fingerprint ของเลขมวล (mass number) ของสารที่แยกวิเคราะห์ได้กับข้อมูลที่มีอยู่ library database สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพได้อย่างถูกต้อง ส่วน LC/MS profile ของส่วนสกัดจักรนารายณ์ แสดงให้เห็นสารองค์ประกอบหรือสารเมตาโบไลต์ออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายตัว ซึ่งรวมไปถึงสารประกอบฟีนอลิก

ฟลาวานอยด์จัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก เป็นที่ยอมรับกันว่า พืชและผลไม้ที่มี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนั้น เนื่องจากมีกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก Silymarin (Legalon®) เป็นยากลุ่มฟลาวานอยด์ที่ได้จากพืช *Silybum marianum* มีข้อบ่งใช้คือ ช่วยให้ตับมีสมรรถภาพดีขึ้นในกรณีที่เป็นโรคของตับ โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ในการปกป้องตับหลายกลไกซึ่งรวมถึงการต้านอนุมูลอิสระ (Fraschini *et al.*, 2002 และ Mayer *et al.*, 2005)

เป็นที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาต่อไป การพัฒนาสารสกัดสมุนไพรที่มีคุณสมบัติทั้งปกป้องเซลล์ตับปกติจากการถูกทำลายด้วยสารพิษ และ ฤทธิ์การกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็ง ก็จะทำให้พืชสมุนไพรนี้มีความน่าสนใจในเป็นยาต่อไปมากยิ่งขึ้น

PAYAP UNIVERSITY

สรุป

งานวิจัยนี้ ได้รวบรวมพืชสมุนไพรที่พบในประเทศไทยที่ได้มีการทดสอบฤทธิ์ปกป้องตับ โดยระบุชื่อ วิทยาศาสตร์ วงศ์ ส่วนที่ใช้ และการทดสอบ *in vivo* หรือ *in vitro* รวมทั้งสารที่ใช้กระตุ้นให้เกิดพิษต่อตับ การทดสอบฤทธิ์ปกป้องตับของส่ารสกัดจากพืชสมุนไพร 5 ชนิด ซึ่งได้แก่ ปัญจขันธ์ จักรนารายณ์ มะม่วง สาหร่ายเตา สาหร่ายสไปรูลินา โดยเป็นการศึกษา *ex vivo* (จัดเป็น *in vitro* เช่นกัน) โดยใช้เซลล์ตับจากหนูขาว พบว่า มีผลชะลอการตายของเซลล์ (ประเมินจาก % cell viability) และป้องกันการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ตับได้อย่างชัดเจน (โดยการวิเคราะห์กัมมันตภาพของเอนไซม์ AST และ ALT ที่อยู่หลุดออกมาสู่ อาหารเลี้ยงเซลล์) ปัญจขันธ์ จักรนารายณ์ สาหร่ายเตา สาหร่ายสไปรูลินา เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับในระดับต่าง ๆ กัน จากงานด้านพฤกษเคมีของจักรนารายณ์ได้ตรวจพบกลุ่มสารฟลาวานอยด์

PAYAP UNIVERSITY