



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “ความเป็นพิษของบาราคอลต่อ เซลล์มะเร็งเอ็มบริโอฟีลิบเก๋า”

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงเดือน เมฆสุริเยนทร์ และคณะ

เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2549

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “ความเป็นพิษของบาราคอลต่อ
เซลล์มะเร็งเอ็มบริโอฟีลิกเก๊า”

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1 รศ.ดร. ดวงเดือน เมฆสุริเยนทร์	คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาฯ
2 รศ.ดร. ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ	คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาฯ
3 รศ.ดร. วิมลมาศ ลิปิพันธ์	คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาฯ
4 รศ.ดร. พรเทพ เทียนสีวาทกุล	คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาฯ
5 นายเฉลิมสิน เพิ่มเต็มสิน	สำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ
6 นางสาวสุพิมพ์ วงษ์ทองแท้	นิติตบัณฑิตศึกษา สาขาชีวเวชเคมี

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

บาราคอลเป็นสารออกฤทธิ์คล้ายกังวลศักดิ์ได้จากใบขี้เหล็ก ซึ่งอยู่ในบัญชีรายชื่อสมุนไพรในสารานุกรมสมุนไพร ตำรายาแผนโบราณได้บรรยายสรรพคุณมีฤทธิ์ช่วยหลับ ภูมิปัญญาไทยได้นำใบขี้เหล็กมาประกอบเป็นอาหารพื้นบ้านเป็นเวลานานโดยไม่มีรายงานความเป็นพิษ อย่างไรก็ตาม ได้พบอุบัติการณ์ความเป็นพิษต่อตับเฉียบพลันในผู้ป่วยที่รับประทานผลิตภัณฑ์ใบขี้เหล็กติดต่อกัน โดยปัจจุบันยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจนเกี่ยวกับสาเหตุหรือกลไกความเป็นพิษต่อตับของขี้เหล็ก สาเหตุความเป็นพิษของขี้เหล็กอาจเกิดจากบาราคอลซึ่งเป็นสารสำคัญในใบขี้เหล็ก หรือสารที่เกิดจากการสลายตัวของบาราคอล ดังนั้น วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อประเมินความคงตัวของบาราคอล และหาสาเหตุความเป็นพิษของบาราคอลในระดับชีววิทยาโมเลกุล การศึกษาความคงตัวของบาราคอลได้ประเมินตามข้อกำหนดมาตรฐานสากล ICH ด้วยเทคนิค HPLC-DAD พบว่าบาราคอลสลายตัวอย่างรวดเร็วในสารละลายต่าง และสลายตัวอย่างช้า ๆ เมื่ออยู่ในภาวะที่มีอุณหภูมิสูงและในภาวะที่มี 3% H_2O_2 แต่จะคงตัวได้ดีในสภาวะกรด โดยแสดงค่าคงที่ของอัตราเร็วของการสลายตัว (K_{obs}) ของบาราคอลในสารละลายต่างที่ pH 12 และ pH 13 เท่ากับ 0.00003 และ 0.00960 ต่อนาที ตามลำดับ จาก Arrhenius plot คำนวณค่า activation energy ของบาราคอลในสารละลายต่าง pH 13 ช่วงอุณหภูมิ 12 ถึง 51 องศาเซลเซียสได้เท่ากับ 22.344 กิโลแคลอรีต่อโมล เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างบาราคอลที่สลายตัวในสารละลายต่างและในภาวะอุณหภูมิสูงด้วยเทคนิค LC-MS และยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค NMR พบว่าเป็นตัวเดียวกันคือ cassiachromone และยังพบว่าเป็นสารชนิดเดียวกับเมื่อนำบาราคอลละลายอยู่ในสภาวะเลี้ยงเซลล์

ความเข้าใจในเรื่องความคงตัวของบาราคอลได้นำมาวิเคราะห์ร่วมกับ การประเมินความเป็นพิษของบาราคอลต่อเซลล์ที่สืบเก่าด้วยวิธี XTT พบว่าความเข้มข้นของบาราคอลที่ทำให้เซลล์มีชีวิตรอด 50% (IC_{50}) มีค่าเท่ากับ 1.5 มิลลิโมลาร์ ที่ความเข้มข้นดังกล่าวพบว่าเป็นการตายแบบอะพอพโทซิสถึง 35% เมื่อวิเคราะห์สาเหตุที่บาราคอลทำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิสพบว่า บาราคอลชักนำให้มีการสะสมอนุมูลอิสระชนิด superoxide และ hydroxy ในไมโทคอนเดรียเป็นจำนวนมากเมื่อย้อมเซลล์ด้วยสี DCFH-DA และยังทำให้การแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ลดลงเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Western Blot ส่งผลให้เมมเบรนของไมโทคอนเดรียเสียสภาพทำให้อนุมูลอิสระและ cytochrome c แพร่เข้าสู่ไซโตซอล ไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-9 ตามด้วยเอนไซม์ caspase-3 ซึ่งไปกระตุ้นการลำเลียงโปรตีน CAD เข้านิวเคลียสเพื่อไปย่อยสลายดีเอ็นเอ ทำให้สังเกตเห็น DNA ladder บน agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นรูปแบบที่พบทั่วไปในเซลล์ที่ตายแบบอะพอพโทซิส โดยสรุปสาเหตุที่บาราคอลเป็นพิษต่อเซลล์เกิดจากการสะสมอนุมูลอิสระมากผิดปกติภายในเซลล์ ร่วมกับการส่งสัญญาณผ่านทางโปรตีน Bcl-2 ที่ผิดปกติซึ่งไปกระตุ้นวิถีการทำงานของเอนไซม์ caspase เป็นผลให้ดีเอ็นเอในนิวเคลียสถูกย่อยสลายและทำให้เซลล์ที่สืบเก่าตายแบบอะพอพโทซิส ดังนั้น การพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรขี้เหล็กจะต้องคำนึงสถานะการเก็บผลิตภัณฑ์เพื่อไม่ให้บาราคอลสลายตัว รวมทั้งควบคุมคุณภาพให้ปริมาณบาราคอลในสมุนไพรขี้เหล็กอยู่ในขนาดที่เหมาะสมกับประสิทธิผลทางเภสัชวิทยา โดยต้องกำหนดข้อควรระวังหรือข้อบ่งชี้ความเป็นพิษเมื่อใช้บาราคอลเกินขนาด หรือเมื่อใช้อย่างต่อเนื่อง ซึ่งความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์สมุนไพรขี้เหล็กมาจากได้รับบาราคอลมากเกินไปและ/หรือสารที่ได้จากการสลายตัวของบาราคอล

ABSTRACT

Barakol is a natural anxiolytic agent extracted from young leaves of *Cassia siamea* Lam., which has been used in folk medicine for the treatment of insomnia. Leaves of *C. siamea* has had centuries of use as traditional food without side effects. However, acute hepatitis associated with herbal products containing *C. siamea* leaves was reported in patients. There is still debate whether the hepatotoxicity of *C. siamea* might be related to barakol or the presence of its degradation products. Therefore, the aim of the present study was to investigate the degradation behavior of barakol under different ICH prescribed stress conditions, using reversed-phase HPLC-DAD assay as well as its cytotoxicity at a molecular level. For the stability study, extensive degradation of barakol was found to occur in alkaline condition through a base-catalyzed hydrolysis. Mild degradation of barakol was observed under thermal and oxidative stress while barakol was stable in acidic condition. The characteristic of barakol degradation under alkaline condition at pHs 12 and 13, represented by reaction rate constants (K_{obs}), were 0.00003 and 0.00960 min⁻¹, respectively. The activation energy according to Arrhenius plot was calculated to be 22.344 kcal mol⁻¹ at pH 13 and temperatures between 12 and 51 °C. A major degradation product of barakol under both alkaline and thermal stress conditions was characterized by LC-MS and NMR as cassiachromone, which was also present when barakol dissolved in culture medium.

Understanding degradation behavior of barakol gained a critical impact on the evaluation of its cytotoxicity. Barakol-induced apoptosis in P19 embryonic carcinoma cells was therefore investigated. Treatment with barakol decreased cell viability in a dose-dependent manner with an IC₅₀ of 1.5 mM. Barakol significantly increased intracellular reactive oxygen species (ROS), which was accompanied by Bcl-2 down-regulation. Subsequently, the activation of caspase-9 cascade was induced, leading to the translocation of CAD following by DNA fragmentation, an indication of apoptosis. Pretreatment with antioxidants N-acetylcysteine (NAC) and glutathione (GSH) significantly suppressed barakol-induced ROS generation as well as apoptosis. Additionally, these antioxidants dramatically inhibited barakol-induced Bcl-2 down-regulation. Inhibitory study in the pathway of ROS generation intracellularly using MnTBAP, catalase, and sodium formate also defined that superoxide anion and hydroxyl radical were responsible as the ROS induced by barakol in P19 cells. The present study revealed that barakol induced apoptosis in P19 cells via ROS-dependent mechanism with the involvement of Bcl-2 down-regulation and the activation of caspase cascade. These findings thus provide an explanation for the underlying mechanism of barakol-induced apoptosis in P19 cells. Understanding degradation behavior of barakol as well as its cytotoxicity might be critical in pharmaceutical development of herbal product as barakol and its degradation product might play a significant impacts on drug efficacy, safety profile, and drug toxicity.

หน้าสรุปโครงการ (Executive summary)

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ ต้องการประเมินความคงตัวของบาราคอล และความเป็นพิษของบาราคอลทั้งในระดับเซลล์และระดับชีววิทยาโมเลกุล สำหรับการประเมินความคงตัวของบาราคอลได้ทำการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณบาราคอลด้วยเทคนิค HPLC-DAD โดยใช้คอลัมน์ชนิด reversed phase และเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยเมทานอลและ 1% acetic acid ในอัตราส่วน 20:80 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที วัดที่ความยาวคลื่น 249 นาโนเมตร พบว่าบาราคอลมีค่า retention time เท่ากับ 5.97 นาที จึงได้นำวิธีวิเคราะห์นี้มาศึกษาหาตัวทำลายที่สามารถสกัดบาราคอลออกจากใบขี้เหล็กพบว่าน้ำร้อนสามารถสกัดบาราคอลได้ในปริมาณสูงสุดคือ 0.19 % เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดใบขี้เหล็กด้วย 70% ethanol และ absolute ethanol ดังนั้น จึงได้นำน้ำร้อนมาสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณบาราคอลจากส่วนต่าง ๆ ของขี้เหล็กพบว่าบาราคอลพบที่ใบอ่อนมากที่สุดถึง 0.26 % เปรียบเทียบกับบาราคอลที่พบในใบและในดอก เมื่อทำการสกัดบาราคอลจากใบขี้เหล็กพบว่า % yield ได้เพียง 0.08 ซึ่งต่ำกว่าค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ เนื่องจากในกระบวนการสกัดต้องใช้ความร้อนจึงทำให้บาราคอลในใบขี้เหล็กสลายตัวไปประมาณ 69 % เมื่อศึกษาความคงตัวพบว่าบาราคอลคงตัวได้ดีในสภาวะกรด แต่จะสลายตัวอย่างรวดเร็วในสารละลายต่าง 0.1 N NaOH และสลายตัวอย่างช้า ๆ เมื่ออยู่ในภาวะที่มีอุณหภูมิสูงและในภาวะที่มี 3% H₂O₂ ค่าคงที่ของอัตราเร็วของการสลายตัว (K_{obs}) ของบาราคอลในสารละลายต่างที่ pH 12 และ pH 13 เท่ากับ 0.00003 และ 0.00960 ต่อ นาที ตามลำดับ จาก Arrhenius plot คำนวณค่า activation energy ของบาราคอลในสารละลายต่าง pH 13 ช่วงอุณหภูมิ 12 ถึง 51 องศาเซลเซียสได้เท่ากับ 22.344 กิโลแคลอรีต่อโมล เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างบาราคอลที่สลายตัวในสารละลายต่างและในภาวะอุณหภูมิสูง ด้วยเทคนิค LC-MS และยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค NMR พบว่าเป็นตัวเดียวกันคือ cassiachromone ($M+H^+$: m/z 233.51) และยังพบว่าเป็นสารชนิดเดียวกับเมื่อนำบาราคอลละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์

จากผลการทดลองดังกล่าวนำมาประยุกต์ใช้ในการออกแบบและวิเคราะห์ผลการทดลองของการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์พืชผัก ๓ เวลาต่าง ๆ ของสภาวะเลี้ยงเซลล์ และหาสาเหตุว่าความเป็นพิษต่อเซลล์มาจากบาราคอลหรือบาราคอลที่สลายตัว ผลจากการประเมินความเป็นพิษของบาราคอลต่อเซลล์เพาะเลี้ยงพืชผักด้วยวิธี XTT พบว่าความเป็นพิษต่อเซลล์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและระยะเวลาที่เซลล์ได้รับบาราคอล โดยความเข้มข้นของบาราคอลที่ทำให้เซลล์มีชีวิตรอด 50% (IC_{50}) เท่ากับ 1.5 มิลลิโมลาร์ ยังพบว่าความเป็นพิษที่เกิดขึ้นนี้ทำให้เซลล์ตายแบบอะพอโทสิสเป็นส่วนใหญ่ถึง 35% โดยที่เวลา 24 ชั่วโมงจะเห็นโครมาตินหดตัวแน่นเมื่อย้อมเซลล์ด้วยสี Hoechst 33342 และเมื่อย้อมเซลล์ด้วยสี propidium iodide วิเคราะห์ด้วยเครื่องฟลูออโรมิเตอร์พบว่าเซลล์อยู่ในระยะ subG₀/G₁ ของวัฏจักรเซลล์ จึงศึกษาหาสาเหตุที่บาราคอลทำให้เซลล์ตายแบบอะพอโทสิส โดยทำการย้อมเซลล์ด้วยสี DCFH-DA และวิเคราะห์ด้วยเครื่องฟลูออโรมิเตอร์ พบว่าเซลล์ที่ได้รับ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย การวิจัยครั้งนี้สามารถลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความอนุเคราะห์ให้ใช้ครุภัณฑ์ต่าง ๆ รวมทั้งข้อเสนอแนะดังต่อไปนี้ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชำนาญ ภัทรพานิช ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาฯ สำหรับข้อเสนอแนะอันเป็นประโยชน์ในการศึกษาความคงตัวของบาราคอล รองศาสตราจารย์ ดร. รุทธิ สุทธิศรี ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาฯ สำหรับการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค nuclear magnetic resonance spectroscopy และรองศาสตราจารย์ ดร. สุนันท์ พงษ์สามารถ ภาควิชาชีวเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาฯ สำหรับความอนุเคราะห์ด้านเครื่อง HPLC

รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม ผู้อำนวยการสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาฯ สำหรับความอนุเคราะห์ด้านเครื่อง LC-MS รองศาสตราจารย์ นายแพทย์เกียรติรักษ์รุ่งธรรม คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. รังสินี มหานนท์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาฯ สำหรับความอนุเคราะห์ด้านเครื่อง flow cytometer

ท้ายสุดขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิจัยทางเภสัชศาสตร์ คณาจารย์ บุคลากร และ นิสิตระดับบัณฑิตศึกษาในคณะเภสัชศาสตร์ สำหรับความอนุเคราะห์ด้านครุภัณฑ์ อุปกรณ์ สารเคมี และข้อเสนอแนะอันเป็นประโยชน์ต่อการทำวิจัย จนทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี มา ณ โอกาสนี้

คณะผู้วิจัย

28 เมษายน 2549

บาราคอลมีการสะสมอนุมูลอิสระชนิด superoxide และ hydroxy ในไมโทคอนเดรียมากผิดปกติ เพื่อ ยืนยันผลดังกล่าวจึงให้สารต้านอนุมูลอิสระ NAC และ GSH ก่อนที่เซลล์จะได้รับบาราคอล พบว่า ปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ลดลงเท่ากับกลุ่มควบคุม และเซลล์สามารถอยู่รอดได้ นอกจากนี้บาราคอลยังทำให้การแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ลดลงภายหลังที่เซลล์ได้รับบาราคอลไป 9 ชั่วโมง เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Western Blot ส่งผลให้เมมเบรนด้านนอกของไมโทคอนเดรียเสียสภาพทำให้มีการแพร่ของอนุมูลอิสระพร้อมกับ cytochrome c ออกสู่ไซโตซอล และไปกระตุ้นการทำงานของ เอนไซม์ caspase-9 เพิ่มขึ้นในเวลาต่อมาที่ 24 ชั่วโมง ส่งผลไปชักนำการทำงานของโปรตีน CAD ซึ่งจะถูกลำเลียงเข้านิวเคลียสไปย่อยสลายดีเอ็นเอ โดยสังเกตเห็น DNA ladder เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยสรุปกลไกความเป็นพิษของบาราคอลที่ทำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิสผ่านทางวิธีการสะสมอนุมูลอิสระมากผิดปกติภายในเซลล์ ร่วมกับการส่งสัญญาณผ่านทางโปรตีน Bcl-2 ที่ผิดปกติซึ่งไปกระตุ้นวิธีการทำงานของเอนไซม์ caspase เป็นผลให้ดีเอ็นเอในนิวเคลียสถูกย่อยสลาย และทำให้เซลล์ฟิสิบเก้ตายแบบอะพอพโทซิสในเวลาต่อมา

ความรู้พื้นฐานที่ได้จากการศึกษาความคงตัวของบาราคอล และกลไกความเป็นพิษของบาราคอลต่อเซลล์นั้นสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในเรื่อง การพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรซึ่งหลักนั้นจะต้องคำนึงสภาวะการเก็บผลิตภัณฑ์เพื่อไม่ให้บาราคอลสลายตัว รวมทั้งกระบวนการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สมุนไพรหลักให้มีปริมาณบาราคอลอยู่ในขนาดที่เหมาะสมกับประสิทธิผลทางเภสัชวิทยา โดยต้องระบุข้อควรระวังในการใช้ผลิตภัณฑ์ หรือข้อบ่งชี้ความเป็นพิษเมื่อได้รับบาราคอลเกินขนาด หรือเมื่อใช้อย่างต่อเนื่อง ซึ่งความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์สมุนไพรหลักมาจากได้รับบาราคอลมากเกินไปและ/หรือสารที่ได้จากการสลายตัวของบาราคอล ตลอดจนความเป็นไปได้ในการนำสารต้านอนุมูลอิสระ NAC และ GSH มาบำบัดอาการพิษที่เกิดขึ้นเมื่อได้รับบาราคอลในผลิตภัณฑ์สมุนไพรหลัก

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	i
หน้าสรุปโครงการ (Executive summary)	iii
กิตติกรรมประกาศ	v
สารบัญ	vi
สารบัญตาราง	vii
สารบัญรูปภาพ	viii
สารบัญคำย่อ	x
 บทที่ 1 บทนำ	 1
• ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
• วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
• ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
• ขอบเขตของโครงการวิจัย	4
• ระยะเวลาที่ทำการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง	4
บทที่ 2 การสำรวจแนวคิดและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
บทที่ 3 การศึกษาความคงตัวของบาราคอล	13
• วัสดุ สารเคมี อุปกรณ์	13
• วิธีดำเนินการวิจัย	14
• ผลการวิจัย และการอภิปรายผล	18
บทที่ 4 ความเป็นพิษของบาราคอลต่อเซลล์ฟิสิบเก๋า	35
• วัสดุ สารเคมี อุปกรณ์	35
• วิธีดำเนินการวิจัย	37
• ผลการวิจัย และการอภิปรายผล	42
บทที่ 5 วิเคราะห์และสรุปผลการวิจัย	58
เอกสารอ้างอิง	67
Output ที่ได้จากโครงการ	73
ภาคผนวก	

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดบาราคอลจากใบขี้เหล็กและปริมาณของบาราคอลที่สกัดได้	19
2	ปริมาณบาราคอลที่สกัดด้วยน้ำร้อนโดยใช้ใบอ่อน ใบแก่ และดอกตูมของขี้เหล็ก	20
3	ค่า K_{obs} ค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) ค่า shelf-life (t_{90}) ของบาราคอลเมื่ออยู่ในสารละลายต่างที่ pH 13	28
4	ค่า chemical shift ของโปรตอนและคาร์บอนใน โครงสร้าง cassiachromone	32
5	ค่า IC_{50} ของเซลล์ที่ได้รับบาราคอลที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ กัน	47

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
1	คุณสมบัติทางเคมีและคุณสมบัติทางกายภาพของบาราคอล	3
2	กราฟมาตรฐานของบาราคอลให้ความถูกต้องในช่วงความเข้มข้น 1.43 ถึง 14.30 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร	19
3	HPLC fingerprint ของสารสกัดจากใบอ่อน ใบแก่ และ ดอกตูมของขี้เหล็ก	21
4	โครมาโทแกรมของบาราคอล (I) และบาราคอลสารที่สลายตัว (II) ในสภาวะเร่ง	23
5	อัตราการสลายตัวของบาราคอลในสภาวะต่าง ๆ ณ เวลาแตกต่างกัน	24
6	สเปกตรัมสารละลายบาราคอลในสภาวะเร่ง	25
7	สเปกตรัมของบาราคอลในสารละลาย 3% H ₂ O ₂ เมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง	25
8	อัตราเร็วของการสลายตัวของบาราคอลในสารละลายต่างในช่วง pH 8-12	26
9	รูปแบบจลนพลศาสตร์ของการสลายตัวของบาราคอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในสารละลายต่างที่ pH 13	27
10	อัตราเร็วของการสลายตัวของบาราคอลในสารละลายต่าง	27
11	Arrhenius plot สำหรับอัตราเร็วของการสลายตัวบาราคอลในสารละลายต่าง	28
12	สเปกตรัมที่ได้จากเทคนิค LC-MS	30
13	สเปกตรัม H-1 NMR และ DEPT-NMR ของ cassiachromone	31
14	การศึกษาความคงตัวของบาราคอลในสภาวะที่ใช้เลี้ยงเซลล์พืชสปีด	34
15	รูปร่างเซลล์ที่เลี้ยงด้วยจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ต่างกันในฟลasks ขนาด T25	43
16	การศึกษาหาปริมาณเซลล์พืชสปีดที่เหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยงในช่วงต่อไป	44
17	อัตราการเจริญของเซลล์พืชสปีดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารช่วงเวลา 0-144 ชั่วโมง	45
18	ปัจจัยของความเข้มข้นของบาราคอลที่มีต่ออัตราการรอดของเซลล์พืชสปีด	45
19	ปัจจัยของเวลาที่เซลล์ได้รับบาราคอลที่มีต่ออัตราการรอดของเซลล์พืชสปีด	46
20	ผลของบาราคอลต่อรูปแบบการตายของเซลล์พืชสปีดเมื่อย้อมด้วยสี Hoechst 33342	48
21	ผลของบาราคอลต่อเซลล์พืชสปีดเมื่อย้อมเซลล์ด้วยสี propidium iodide และวิเคราะห์ด้วยวิธี flow cytometry	49
22	รูปแบบการตายของเซลล์พืชสปีดบน agarose gel electrophoresis	50
23	การตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ที่ได้สารต้านอนุมูลอิสระก่อนที่จะได้รับบาราคอล	51

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
24	การวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่สัมพันธ์กับการเรืองแสง DCFH-DA ด้วยเครื่อง flow cytometer ภายหลังเซลล์ได้รับบาราคอล 0.4 มิลลิโมลาร์ บ่ม ณ เวลาต่าง ๆ กัน	52
25	ผลของสารต้านอนุมูลอิสระก่อนที่เซลล์จะได้รับบาราคอล	53
26	การวิเคราะห์ชนิดของอนุมูลอิสระที่มีบทบาททำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส เมื่อเซลล์ได้รับ MnTBAP, catalase หรือ sodium formate ก่อนได้รับบาราคอล 0.4 มิลลิโมลาร์	54
27	ผลของบาราคอลที่ไปลดการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ภายในเซลล์พีสิบแก้ว ด้วยวิธี Western Blot	55
28	ผลของสารต้านอนุมูลอิสระต่อการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ภายในเซลล์พีสิบแก้วที่ได้รับบาราคอลด้วยวิธี Western Blot	56
29	การทำงานของเอนไซม์ caspase-9 ภายในเซลล์พีสิบแก้วที่ได้รับบาราคอลที่ความเข้มข้นในช่วง 0.2-1.5 มิลลิโมลาร์ นาน 24 ชั่วโมง	57
30	ปฏิกิริยาทางเคมีของบาราคอลเมื่ออยู่ในสถานะที่เป็นผลึกแห้ง หรือ เมื่อละลายอยู่ในน้ำ หรือ ในสารละลายต่าง หรือ ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง	61
31	บทบาทของ GSH ในการลดความเป็นพิษของบาราคอลภายในเซลล์พีสิบแก้ว	63
32	วิธีการส่งสัญญาณภายในเซลล์พีสิบแก้วภายหลังได้รับบาราคอล ส่งผลทำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส	66

สารบัญย่อ

AChE	=	acetylcholine esterase
AIF	=	apoptosis-inducing factor
ALT	=	alanine aminotransferase
AMPA	=	alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid
Apaf-1	=	apoptotic protease activating factor 1
AraC	=	cytosine arabinoside
AST	=	aspartate aminotransferase
ATCC	=	American Type Culture Collection
ATP	=	adenosine triphosphate
Bax	=	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	=	B-cell CLL/lymphoma 2
BH3	=	Bcl-2 homology-3 domain
bp	=	base pair
CAD	=	caspase-activated DNase
CD ₅₀	=	50% convulsant dose
°C	=	degree celsius
CDCl ₃	=	deuterated chloroform
CD ₃ OD	=	deuterated methanol
CH ₂ Cl ₂	=	dichloromethane
CO ₂	=	carbon dioxide
DCFH	=	2',7'-dichlorodihydrofluorescein
DCFH-DA	=	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
DCF	=	2',7'-dichlorofluorescein
DFF40	=	DNA fragmentation factor 40
DILI	=	drug-induced liver injury
DMSO	=	dimethylsulfoxide
DMSO- <i>d</i> ₆	=	deuterated dimethylsulfoxide

สารบัญคำย่อ (ต่อ)

DNA	=	deoxyribonucleic acid
DOPAC	=	3,4-dihydroxyphenylacetic acid
DPPH	=	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
E_a	=	energy of activation
EBs	=	embryoid bodies
EC ₅₀	=	50% effective concentration
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate
ESI	=	electrospray ionization
EtOH	=	ethyl alcohol
FADD		Fas associated protein with death domain
FBS	=	fetal bovine serum
G4	=	globular tetramer
GABA	=	gamma-amino butyric acid
GAD	=	glutamic acid decarboxylase
g mol	=	gram mole
GPx	=	glutathione peroxidase
GSH	=	glutathione
h	=	hour
HCl	=	hydrochloric acid
H ₂ O ₂	=	hydrogen peroxide
HOAc	=	glacial acetic acid
HPLC	=	high performance liquid chromatography
HPLC-DAD	=	high performance liquid chromatography coupled with photo- diode array detector
HPLC-ECD	=	high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detector
H ₂ SO ₄	=	sulfuric acid

สารบัญคำย่อ (ต่อ)

5-HT	=	5-hydroxytryptamine; serotonin
IC ₅₀	=	50% inhibitory concentration
ICH	=	International Conference on Harmonization
°K	=	degree Kelvin
K _{obs}	=	degradation rate constant
Kcal mol ⁻¹	=	kilocalorie per mole
LC-MS	=	liquid chromatography and mass spectrometry
LD ₅₀	=	50% lethal dose
MAP2	=	microtubule associated protein 2
MAP5	=	microtubule associated protein 5
mAU	=	milli absorbance unit
α-MEM	=	α-modified minimal essential medium
MeOH	=	methy alcohol
min	=	minute
MnTBAP	=	manganes(III)tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin chloride
MOMP	=	mitochondrial outer membrane permeabilization
MS	=	mass spectrometry
N	=	normality
NAC	=	N-acetyl-L-cysteine
%	=	percent
NaOAc	=	sodium acetate
NaOH	=	sodium hydroxide
Na ₂ CO ₃	=	sodium carbonate
NF200	=	neurofilament 200
nm	=	nanometer
NMDA	=	N-methyl-D-aspartate

สารบัญคำย่อ (ต่อ)

NMR	=	nuclear magnetic resonance
PBS	=	phosphate buffered saline
PMS	=	phenazine methosulfate
PVDF	=	polyvinylidene difluoride
RA	=	all- <i>trans</i> retinoic acid
RNase A	=	ribonuclease A
ROS	=	reactive oxygen species
SDS	=	sodium dodecylsulfate
S.E.M.	=	standard error of the mean
SOD	=	superoxide dismutase
SPE	=	solid phase extraction
RNase A	=	ribonuclease A
TBE	=	Tris-boric acid-EDTA buffer solution
TE	=	Tris -EDTA buffer solution
$t_{1/2}$	=	half-life
t_{90}	=	shelf-life
t_R	=	retention time
TNF	=	tumor necrosis factor
UDP	=	uridine diphosphate
UV	=	ultraviolet
w/v	=	weight by volume
XTT	=	2, 3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

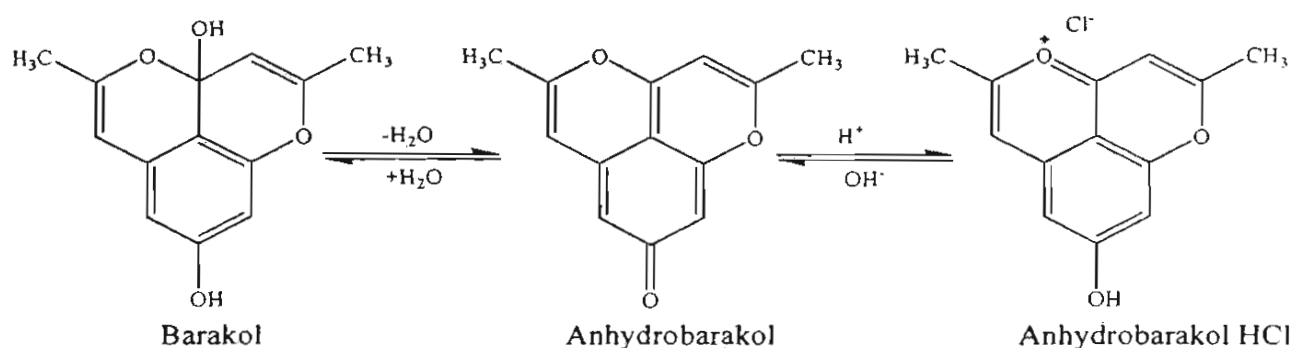
ปัญหาสังคมในปัจจุบันมีผลต่อสุขภาพจิตของคนไทย เป็นผลให้มีผู้ป่วยโรควิตกกังวลเพิ่มมากขึ้นและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี ผู้ที่เป็นโรควิตกกังวลดังกล่าวมักมีอาการนอนไม่หลับ ซึ่งจะเป็นผลเสียอย่างมากต่อสุขภาพ ส่งผลกระทบถึงการทำงานและการดำรงชีวิตประจำวัน ซึ่งแพทย์มักให้การรักษาโดยการปรับพฤติกรรมควบคู่กับการให้ยานอนหลับหรือยาที่มีฤทธิ์ทำให้ง่วง รวมถึงการใช้สารธรรมชาติ หรืออาหารเสริมช่วยการนอน เช่น L-tryptophan แต่พบว่า ยานอนหลับรวมถึง L-tryptophan มีผลข้างเคียงที่ค่อนข้างรุนแรง ดังนั้นในปี พ.ศ. 2532 ประเทศสหรัฐอเมริกาสั่งงดจำหน่าย L-tryptophan เนื่องจากได้มีรายงานกลุ่มอาการ eosinophilia myalgia syndrome ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการรับประทาน L-tryptophan เพื่อใช้รักษาอาการนอนไม่หลับ นอกจากนี้ยานอนหลับบางชนิดจัดเป็นสารเสพติดและบางชนิดมีผลต่อพฤติกรรมการฆ่าตัวตาย (Vasiknanonte, 2000) การใช้ยานอนหลับและยาที่มีฤทธิ์คลายกังวลในประเทศไทยส่วนใหญ่ล้วนต้องนำเข้าจากต่างประเทศ การนำสมุนไพรหรือสารสกัดมาใช้บำบัดอาการนอนไม่หลับแทนยาจากต่างประเทศจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง

ประเทศไทยได้มีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรจืดเหล็ก (ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cassia siamea* Lam. วงศ์ Leguminosae) เป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2490 โดยพบว่าเมื่อให้ใบจืดเหล็กแก่ผู้ป่วยที่มีอาการกระวนกระวายนอน นอนไม่หลับ พบว่าสามารถระงับอาการตื่นเต้นทางประสาทและทำให้ผู้ป่วยนอนหลับดีขึ้น (อุไร อรุณลักษณ์, 2490) ในปี 2513 มีการสกัดสารชื่อบาราคอลได้จากสมุนไพรดังกล่าว (Bycroft et al., 1970) ต่อมาได้มีการศึกษาสารสำคัญจากใบอ่อนต้นจืดเหล็กบ้านของไทย ซึ่งเป็นพืชท้องถิ่นที่หาได้ง่ายและมักนำมาประกอบเป็นอาหารพื้นบ้าน พบว่ามีบาราคอลร้อยละ 0.1 (ชัยโย ชัยชาญทิพบุตร, 2521) ดังนั้น เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ว่าบาราคอลอาจเป็นสารสำคัญในใบจืดเหล็กที่ออกฤทธิ์เป็นยาสงบประสาท จึงได้ทำการศึกษาในสัตว์ทดลองโดยให้บาราคอลแก่หนูถีบจักร พบว่าบาราคอลในขนาดที่ทำให้หนูถีบจักรง่วงหลับ (sedative) นั้นไม่เป็นพิษต่อหนูถีบจักร และขนาดที่ทำให้หนูถีบจักรตายต้องให้บาราคอลในปริมาณสูงถึง 300 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (พิกุล จันทรโยธา, 2531) นอกจากนี้เมื่อให้บาราคอล 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เข้าทางช่องท้องหนูขาวพันธุ์วิสตา พบว่ามีฤทธิ์คลายกังวล (anxiolytic) และเมื่อเพิ่มขนาดของบาราคอลเป็น 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม หนูขาวจะลดพฤติกรรมเคลื่อนไหวไปมา เนื่องจากบาราคอลไปลดการปลดปล่อยสารสื่อประสาทโดปามีนออกจากเซลล์ประสาท (Thongsaard et al., 1996) จากข้อมูลดังกล่าวทำให้ในปี พ.ศ. 2541 องค์การเภสัชกรรมทำการผลิตยาเม็ดจืดเหล็กประกอบด้วยใบจืดเหล็กแห้งอัดเม็ดวางจำหน่ายตามท้องตลาดและเป็นที่ยอมรับของคนทั่วไป ต่อมาในปี 2543 ได้มีการวิจัยทางคลินิกเพื่อยืนยันฤทธิ์โดยให้น้ำสกัดจากใบจืดเหล็ก (มีแอนไฮโดรบาราคอล 16

มิลลิกรัม) และยาเม็ดสกัดจากใบขี้เหล็ก (ใน 1 เม็ด เทียบเท่ากับใบขี้เหล็กแห้ง 400 มิลลิกรัม มีแอนไฮโดรบาราคอล 16 มิลลิกรัม) แก่อาสาสมัครปกติและวัดคลื่นสมองที่เปลี่ยนแปลง พบว่ายาสมนไพรแปรรูปชนิดเม็ดสกัดจากใบขี้เหล็กทำให้เกิดอาการง่วงหลับได้เร็วขึ้น และอาการตื่นกลางดึกลดลง (ประกอบ ผู้วิบูลย์สุข และคณะ, 2543) หลังจากรายงานนี้ไม่นานได้มีรายงานจากโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้าถึงผู้ที่รับประทานยาเม็ดขี้เหล็กจำนวน 8 จาก 12 ราย ว่ามีอาการของโรคตับอักเสบแบบเฉียบพลันโดยวิเคราะห์จากค่าการทำงานของตับ (Hongsinirachorn et al., 2003) ทำให้สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยามีมติสั่งระงับการผลิตและจำหน่ายยาเม็ดขี้เหล็ก

ทำให้ต่อมามีงานวิจัยมากมายเพื่อศึกษาพิษวิทยาของบาราคอล เช่น การศึกษาความเป็นพิษของบาราคอลต่อเซลล์ตับเพาะเลี้ยง พบว่าความเข้มข้นของบาราคอลที่ทำให้เกิดพิษและมีผลให้เซลล์ตายไปร้อยละ 50 ภายในเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 5.70 มิลลิโมลาร์ (Lawanprasert, 2001) การศึกษาความเป็นพิษของบาราคอลต่อตับในสัตว์ทดลอง โดยให้บาราคอลที่ขนาด 100, 200, 300 และ 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เข้าทางปากของหนูถีบจักร เพื่อศึกษาพยาธิสภาพของเซลล์ตับที่เกิดขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และวัดค่าการทำงานของตับจากระดับเอนไซม์ AST, ALT, total bilirubin พบว่าบาราคอลเป็นพิษต่อเซลล์ตับรวมทั้งกระบวนการซ่อมแซมของเซลล์ตับ โดยความเป็นพิษแปรผันตามระยะเวลาของการให้บาราคอลด้วย อย่างไรก็ตามเซลล์ตับสามารถซ่อมแซมตัวเองและกลับคืนสู่สภาพเดิมได้ นอกจากนี้ยังพบว่าบาราคอลทำให้ระดับคอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ และกลูโคสในเลือดลดลงด้วย (วัชรภรณ์ เทวกุล ณ อยุธยา, 2546)

การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาส่วนใหญ่ของบาราคอลพบว่ามียลต่อระบบประสาทส่วนกลาง แต่ก็มีรายงานข้อมูลที่ขัดแย้งกันเกี่ยวกับฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลาง (Thongsaard et al., 1996; Fiorino et al., 1998; Sukma et al., 2002) ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการใช้สัตว์ทดลองต่างชนิดหรือต่างสายพันธุ์ หรืออาจมีสาเหตุมาจากความไม่คงตัวของบาราคอล ทำให้ในเวลาต่อมาได้มีการศึกษาความคงตัวของบาราคอลโดยเทคนิค HPLC-ECD พบว่าสารละลายบาราคอลมีความคงตัวต่ำเมื่ออยู่ในสถานะมีแสงและที่อุณหภูมิสูง แต่จะมีความคงตัวดีที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส และในที่มืด (Thongsaard et al., 2001) เนื่องจากบาราคอล ($C_{13}H_{12}O_4$) มีโครงสร้างเป็นอนุพันธ์ของ chromone จัดเรียงตัวเป็น tricyclic ring ทำให้สามารถเปลี่ยนไปเป็นแอนไฮโดรบาราคอล ($C_{13}H_{10}O_3$) โดยสูญเสีย น้ำออกไป 1 โมเลกุล และเมื่อเติมกรดเกลือเข้มข้นลงในสารละลายของบาราคอลจะอยู่ในรูปแบบเกลือที่มีความคงตัว คือแอนไฮโดรบาราคอล ไฮโดรคลอไรด์ ($C_{13}H_{10}ClO_3$) (รูปที่ 1)



	บาราคอล	แอนไฮโดรบาราคอล	แอนไฮโดรบาราคอล ไฮโดรคลอไรด์
สูตรเคมี	$C_{13}H_{12}O_4$	$C_{13}H_{10}O_3$	$C_{13}H_{12}ClO_3$
มวลโมเลกุล	232	214	251.4
สี	เหลืองอมเขียว	เขียวเข้ม	เหลืองมะนาว
จุดหลอมเหลว ($^{\circ}C$)	166-170	163	208-210

รูปที่ 1 คุณสมบัติทางเคมีและคุณสมบัติทางกายภาพของบาราคอล (Thongsaard et al., 2001)

อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีบทสรุปที่ชัดเจนเกี่ยวกับสาเหตุหรือกลไกความเป็นพิษของจีเหล็กแต่อย่างใด ซึ่งพิษอาจเกิดจากบาราคอลซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท หรือเกิดจากการสลายตัวของบาราคอล หรือสารชนิดอื่นในสารสกัดจีเหล็ก หรืออาจเกิดจากเมแทบอลิต์ของบาราคอลภายในเซลล์ ยังเป็นประเด็นคำถามที่ต้องรอการพิสูจน์

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- (1) วิเคราะห์หาปริมาณบาราคอลจากส่วนต่าง ๆ ของจีเหล็ก เพื่อนำมาใช้กำหนดเงื่อนไขการเก็บส่วนต่าง ๆ ของจีเหล็กที่ให้บาราคอลปริมาณสูง
- (2) ศึกษาความคงตัวของบาราคอล เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ปริมาณสารออกฤทธิ์ระหว่างกระบวนการทดสอบพิษระดับเซลล์
- (3) ทดสอบความเป็นพิษของบาราคอลในระดับเซลล์ เพื่อพิจารณาหาสาเหตุของความเป็นพิษก่อนที่จะพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์
- (4) ศึกษากลไกความเป็นพิษของบาราคอลในระดับชีววิทยาโมเลกุล เพื่อเกิดองค์ความรู้ใหม่

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- (1) ได้ข้อกำหนดของสภาวะการเก็บส่วนของสมุนไพร หรือกรรมวิธีการผลิต ที่จะนำไปสู่กระบวนการควบคุมคุณภาพของสมุนไพร
- (2) ได้ข้อมูลมาวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างประสิทธิภาพ และความปลอดภัยของบาราคอล เพื่อประกอบการตัดสินใจในการนำสมุนไพรซึ่งหลักว่ามีศักยภาพนำมาพัฒนาเพิ่มมูลค่าสมุนไพรไทยเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อช่วยหลับ หรือสงบระงับ หรือฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่น ๆ หรือถ้าความเป็นพิษของบาราคอลมีมากกว่าประโยชน์ก็นำข้อมูลมาประกอบการพิจารณาคัดเลือกรอกจากสมุนไพรสาธารณสุขมูลฐาน
- (3) เข้าใจถึงกลไกความเป็นพิษของบาราคอลในระดับชีววิทยาโมเลกุล เพื่อให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นพื้นฐานต่อการพัฒนา

ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้จะเริ่มจากการสกัด และการวิเคราะห์หาปริมาณของบาราคอลในสารสกัดของส่วนที่เป็นใบอ่อน ใบแก่ ดอกตูม ของขี้เหล็ก เพื่อเป็นดัชนีบ่งชี้ส่วนของสมุนไพรที่ให้ปริมาณบาราคอล จากนั้นศึกษาคุณสมบัติความคงตัวของบาราคอล นำมาประกอบการประเมินความเป็นพิษของบาราคอลต่อเซลล์มะเร็งเอ็มบริโอฟีลลิก้า ดังนั้น ถ้าความเป็นพิษต่อเซลล์มีสาเหตุ

- (1) มาจากบาราคอล ซึ่งเป็นสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ช่วยหลับในขี้เหล็ก อาจใช้เป็นแนวทางนำมาพัฒนาเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์หาอนุพันธ์ของบาราคอลที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา โดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์
- (2) มาจากการสลายตัวของบาราคอล อาจใช้เป็นแนวทางในการควบคุมหรือพัฒนากรรมวิธีการผลิต ไม่ให้เกิดการสลายตัว และอาจใช้เป็นแนวทางการพัฒนาขี้เหล็กไปสู่การใช้จริงอย่างปลอดภัย

ระยะเวลาที่ทำการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง

ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

2 ปี เริ่มตั้งแต่ 1 มีนาคม 2547 ถึง 28 กุมภาพันธ์ 2549

สถานที่ทำการทดลอง

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

การสำรวจแนวคิดและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

บาราคอล: ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติสกัดได้จากจี้เหล็ก

จี้เหล็กเป็นสมุนไพรไทยที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cassia siamea* Lam. ในวงศ์ Leguminosae นอกจากนี้ยังมีชื่อเรียกในท้องถิ่นที่แตกต่างกัน เช่น จี้เหล็กแก่น จี้เหล็กบ้าน จี้เหล็กหลวง จี้เหล็กใหญ่ ผักจี้ลิ และยะหา เป็นต้น ส่วนของดอกและใบจี้เหล็กใช้เป็นอาหารในหลายประเทศเช่น ไทย พม่า อินเดีย และมาเลเซีย เป็นต้น ในตำราการแพทย์แผนไทยได้มีการบันทึกประโยชน์ของจี้เหล็กในหลายด้าน เช่น ใช้แก้อาการท้องผูก ใช้แก้อาการนอนไม่หลับ ใช้ทำความสะอาดเส้นผม ทำให้ผมชุ่มชื้นเป็นเงางาม ไม่มีรังแค ช่วยเจริญอาหาร บำรุงน้ำดี และบำรุงโลหิต เป็นต้น โดยใช้ส่วนของต้นจี้เหล็กเพื่อหวังผลการรักษาที่แตกต่างกัน เช่น ใช้รากถ่ายพิษไข้ ใช้ต้นรักษาโรคผิวหนังและเป็นยาระบาย ส่วนของเปลือกใช้แก้ริดสีดวงทวารและแก้กระษัย ใช้ยอดแก้โรคเบาหวาน และใช้ใบแก้อาการนอนไม่หลับ เป็นต้น (Farnworth and Bunyaphatsara, 1992)

ในปี พ.ศ. 2485 ซึ่งเป็นยุคสงครามโลกครั้งที่ 2 พบว่ายารักษาโรคขาดแคลนเป็นอย่างมาก ศาสตราจารย์ นายแพทย์อวย เกตุสิงห์ จึงได้พยายามค้นหาสมุนไพรไทยที่ใช้เป็นยาแผนโบราณอย่างแพร่หลายมาศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พบว่าใบและดอกจี้เหล็กทำให้เกิดอาการง่วงซึมและมีพิษน้อยกว่าสมุนไพรชนิดอื่น ทำให้มีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดใบจี้เหล็กอีกครั้งโดยใช้แอลกอฮอล์เป็นตัวทำละลาย พบว่าสารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์กดประสาทส่วนกลาง เพิ่มความตึงตัวของกล้ามเนื้อเรียบ และมีฤทธิ์ขับปัสสาวะ (อุไร อรุณลักษณ์, 2490)

ต่อมาได้มีรายงานเกี่ยวกับการสกัดบาราคอลออกจากใบจี้เหล็ก ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม chromone มีชื่อทางเคมีว่า 3 α ,4-dihydro-3 α ,8-dihydroxy-2,5-dimethyl-1,4-dioxaphenalene (Hassanali-Walji et al., 1969) ต่อมา Bycroft และคณะ (1970) ได้สกัดและเสนอวิธีสังเคราะห์ของบาราคอลว่าเกิดจากการรวมตัวของหมู่ acetate 7 โมเลกุลผ่านทาง polyketide pathway ได้สารตัวกลางที่ไม่คงตัวทำให้เกิดปฏิกิริยา cyclization ได้เป็นบาราคอล นอกจากนี้มีรายงานการสกัดบาราคอลจากใบอ่อนของต้นจี้เหล็กบ้าน ได้เป็นผลึกรูปเข็มสีเหลืองได้ถึงร้อยละ 0.1 ของน้ำหนักใบจี้เหล็กเริ่มต้น (ชัยโย ชัยชาญทิพบุตร, 2521) มีการพัฒนาวิธีสกัดสารบาราคอลจากใบจี้เหล็กและทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธี pervaporation ทำให้สามารถสกัดบาราคอลได้เพิ่มขึ้นคิดเป็นร้อยละ 0.8 ของน้ำหนักใบจี้เหล็กเริ่มต้น (พิชัย ตั้งศรีสำโรง, 2540)

บาราคอลเป็นสารที่มีผลึกสีเหลืองเกมเขียวสามารถละลายได้ในน้ำ ในสภาวะปกติบาราคอลมักไม่ค่อยคงตัวเนื่องจากเกิดปฏิกิริยา dehydration คึงน้ำออก 1 โมเลกุลได้เป็นแอนไฮโดรบาราคอล ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับกรดเกลือได้เป็นเกลือแอนไฮโดรบาราคอล ไฮโดรคลอไรด์ (รูปที่ 1) เมื่อนำบารา

คอลเลลายน้ำจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่หมู่ไฮดรอกซิล (Thongsaard et al., 2001) เมื่อเตรียมสารละลายบาราคอลให้อยู่ในสภาวะของบัฟเฟอร์ทางสรีรวิทยา (physiological buffer) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าบาราคอลสามารถคงตัวอยู่ได้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง (Thongsaard et al., 2001)

ฤทธิ์ของบาราคอลต่อระบบประสาทส่วนกลาง

การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของบาราคอลต่อระบบประสาทส่วนกลางพบว่า ใบไม้แห้งสามารถระงับอาการตื่นเต้นกระวนกระวายและทำให้ผู้ป่วยนอนหลับดีขึ้น (อุไร อรุณลักษณ์, 2490) จึงได้นำน้ำสกัดจากใบไม้แห้งทดสอบในหนูขาวโดยใช้เครื่องมือ elevated plus maze ซึ่งใช้ทดสอบยาที่มีฤทธิ์คลายกังวล พบว่าน้ำสกัดใบไม้แห้งมีผลลดความเครียดได้คล้ายกับการให้ diazepam จึงได้ทำการศึกษาค่าโดยใช้บาราคอลซึ่งสกัดได้จากใบไม้แห้งฉีดเข้าทางช่องท้องของหนูขาวในขนาด 10 มิลลิกรัมค่อน้ำหนักตัวหนูขาว 1 กิโลกรัม และสังเกตพฤติกรรมด้วยเครื่องมือ elevated plus maze พบว่ามีผลทำให้หนูขาวลดความเครียดคล้ายกับ diazepam ซึ่งเป็นผลมาจากบาราคอลมีฤทธิ์เป็น dopamine-2 receptor agonist ที่บริเวณ post-synaptic terminal (Thongsaard et al., 1996) สำหรับฤทธิ์ทำให้วังงิมของบาราคอลเป็นผลมาจากบาราคอลมีฤทธิ์เป็น dopamine 3 receptor agonist ที่บริเวณ post-synaptic terminal เพื่อขึ้นย่นกลไกของบาราคอลผ่านทางโดปามีน จึงให้บาราคอลแก่ชิ้นเนื้อเยื่อสมองบริเวณ striatum โดยตรง พบว่าบาราคอลสามารถลดการหลั่งโดปามีนออกจากเนื้อเยื่อสมองบริเวณดังกล่าวคล้ายกับสารในกลุ่ม dopamine-2 receptor agonist และ dopamine-3 receptor agonist (Thongsaard et al., 1997) อย่างไรก็ตาม มีรายงานขัดแย้งกันว่าเมื่อให้บาราคอลขนาด 10-20 มิลลิกรัมค่อน้ำหนักตัวหนูถีบจักร 1 กิโลกรัม กลับพบว่าบาราคอลไม่มีฤทธิ์ลดความเครียดทั้งในรูปแบบการศึกษา elevated plus maze และ shock-probe burying test (Fiorino et al., 1998; Sukma et al., 2002)

บาราคอลเพิ่มพฤติกรรมเคลื่อนที่แบบหมุน (rotational behavior) ในหนูขาวที่ฉีด apomorphine ในขนาด 1 นาโนกรัมค่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม แสดงว่าบาราคอลสามารถกระตุ้นระบบประสาทโดปามีนได้ (พิกุล จันทรโยธา, 2531) เมื่อให้บาราคอลแก่หนูถีบจักรก่อนให้สาร 5-hydroxytryptophan ในขนาด 200 นาโนกรัมค่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมพบว่าบาราคอลลดฤทธิ์การสับัดหัวของหนูที่ชักนำโดย 5-hydroxytryptophan แสดงให้เห็นว่าบาราคอลสามารถลดการทำงานของระบบประสาทซีโรโทนิน (พิกุล จันทรโยธา, 2531) นอกจากนี้บาราคอลยังสามารถต้านฤทธิ์ 5-HT₂ receptor-mediated behaviour ในหนูถีบจักรโดยผ่านทางตัวรับซีโรโทนิน 2 (Thongsaard et al., 1996) แต่เมื่อใช้เทคนิค high performance liquid chromatography ร่วมกับ electrochemical detection (HPLC-ECD) ร่วมกับ punching technique เพื่อวัดระดับโดปามีนและซีโรโทนินในสมองหนูขาวที่ได้รับแอนไฮโดรบาราคอล ไฮโดรคลอไรด์ พบว่าระดับซีโรโทนินและเมแทบอลิต์ของมันในสมองไม่เปลี่ยนแปลง แสดงว่าบาราคอลไม่มีผลต่อเมแทบอลิซึมของซีโรโทนิน อย่างไรก็ตามระดับโดปามีนกลับลดลงที่สมองบริเวณ caudate แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ DOPAC ซึ่งเป็นเมแทบอลิ

โลดด้วหนึ่งของการสลายโคปามีน แสดงว่าการลดลงของโคปามีนไม่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของโคปามีน แต่อาจมีผลต่อตัวรับโคปามีน 2 (นพดล อินทรทัต, 2543) บาราคอลยังสามารถลดระดับโคปามีนนอกเซลล์ในสมองหนูบริเวณ striatum ผ่านทางตัวรับโคปามีน 2 (Thongsaard et al., 1997; Sukma et al., 2002)

นอกจากนี้ เมื่อให้บาราคอลในขนาด 100-200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูถีบจักร 1 กิโลกรัม สามารถลดความเจ็บปวดโดยใช้การทดสอบบนแผ่นความร้อน เนื่องจากบาราคอลมีผลเพิ่มระดับ nociceptive threshold ตามขนาดที่เพิ่มขึ้น แต่ไม่สามารถต้านฤทธิ์ที่เกิดจากยากระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางที่อยู่ในกลุ่ม GABA antagonist เช่น bicucullin และ picrotoxin และในกลุ่ม glycine-mediated post-synaptic inhibition เช่น strychnine เนื่องจากไม่สามารถลดค่า convulsant dose-50 (CD_{50}) และ lethal dose-50 (LD_{50}) ของยาเหล่านี้ได้ แสดงว่าบาราคอลไม่ได้มีผลผ่านทางระบบประสาท GABA หรือ glycine (พิกุล จันทรโยธา, 2531) นอกจากนี้บาราคอลไม่สามารถต้านฤทธิ์ที่ทำให้เกิดการชักของ bicucullin แสดงว่าบาราคอลไม่ได้มีผลผ่านทางตัวรับ $GABA_A$ (Thongsaard et al., 1996) ได้มีการศึกษาการจับบาราคอลที่ติดฉลากสารรังสีคือ 125 I-barakol ในสมองหนูขาวโดยใช้เทคนิค receptor autoradiography สามารถเรียงลำดับความหนาแน่นของบาราคอลที่ติดฉลากสารรังสีได้ตามลำดับดังนี้ caudate-putamen, accumben nucleus, cerebral cortex, hippocampus, thalamic nuclei, granular cell, layer of cerebellum, inferior colliculus และ substantia nigra (สายทิพย์ เฟ่งศรี, 2539)

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อระบบอื่นของบาราคอล

นอกเหนือจากฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางแล้ว บาราคอลยังแสดงฤทธิ์ต่อระบบอื่น ๆ เช่น เมื่อให้บาราคอลในขนาด 0.5-15 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูขาว 1 กิโลกรัมเข้าทางหลอดเลือดดำ พบว่าบาราคอลทำให้ความดันซิสโตลิกและความดันไดแอสโตลิกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ บาราคอลมีฤทธิ์ลดความดันโลหิตได้ทั้งในหนูขาวและในแมวซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์แตกต่างกัน โดยฤทธิ์ลดความดันโลหิตในหนูขาวอาจผ่านทาง 2 กลไกคือ กลไกออกฤทธิ์ผ่านทางเยื่อเอนโดทีเลียม โดยบาราคอลไปกระตุ้นเซลล์เอนโดทีเลียมให้หลั่งสาร endothelium-derived relaxing factor หรือ nitric oxide ซึ่งจะไปทำให้กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดคลายตัว และ/หรืออาจออกฤทธิ์โดยตรงต่อกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด สำหรับฤทธิ์ลดความดันโลหิตในแมวอาจผ่านทางตัวรับ muscarinic เนื่องจาก atropine สามารถยับยั้งฤทธิ์ของบาราคอลที่มีต่อกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดได้ (กิจจา สุวรรณ, 2535) เมื่อให้บาราคอลเข้าทางหลอดเลือดดำของหนูขาวก่อนให้ aconitine พบว่าสามารถลดการเกิด ventricular fibrillation และ ventricular tachycardia และยังคงอัตราการตายของหนูขาวได้รับ aconitine ได้อีกด้วย คาดว่าบาราคอลออกฤทธิ์โดยลดปริมาณไอออนโซเดียมที่สะสมภายในเซลล์ (Chen et al., 1999)

ได้มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของบาราคอล พบว่า บาราคอลมีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ อนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) โดยแสดงค่า EC_{50} เท่ากับ 9.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (0.04 มิลลิโมลาร์) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมบวกที่ใช้ BHT (butylated hydroxyl toluene) ซึ่งแสดงค่า EC_{50} เท่ากับ 12.44 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Subhadhirasakul and Khumfang 2000) บาราคอลที่ความเข้มข้นในช่วง 0.05-1.0 มิลลิโมลาร์ไม่มีผลยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) ทั้งชนิดที่อยู่ในเซลล์และที่อยู่บนเมมเบรนของเซลล์ฟิสิบเก๊า (เฉลิมสิน เพิ่มเติมสิน, 2545)

การศึกษาทางคลินิกของบาราคอล

เนื่องจากคนไทยนิยมบริโภคสมุนไพรเพิ่มขึ้น กอปรกับฤทธิ์คล้ายกังวลของบาราคอลที่พบใน สัตว์ทดลอง ทำให้องค์การเภสัชกรรมสนใจผลิตสมุนไพรจีเห็กในรูปแบบชูลขึ้นจำหน่ายในเดือน สิงหาคม พ.ศ. 2540 เมื่อนำผลิตภัณฑ์สมุนไพรจีเห็กมาศึกษาทางคลินิกพบว่าทำให้เกิดความง่วงหลับ ได้ง่าย โดยวิเคราะห์จากคลื่นสมองที่เปลี่ยนแปลงไปในอาสาสมัครสุขภาพดีโดยพบว่าการตรวจคลื่น สมองที่เกี่ยวข้องกับการง่วงหลับ (N1PI amplitude) 3 ตำแหน่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแสดงว่า อาสาสมัครง่วงมากขึ้น ส่วนในอาสาสมัครที่มีอาการนอนไม่หลับผลิตภัณฑ์สมุนไพรจีเห็กทำให้ คุณภาพการนอนของอาสาสมัครดีขึ้น เช่น หลับได้เร็วขึ้น ตื่นกลางดึกน้อยลงและรู้สึกพึงพอใจกับการ นอนมาก (ประกอบ ผู้วิบูลย์สุข, 2543) ต่อมาในปี พ.ศ. 2542 มีรายงานการติดตามอาการไม่พึง ประสงค์ของผู้บริโภคผลิตภัณฑ์สมุนไพรจีเห็กโดยได้รับในขนาด 800-1,600 มิลลิกรัมต่อวัน นาน ติดต่อกันเป็นเวลา 7-60 วัน พบว่าทำให้เกิดภาวะตับอักเสบเฉียบพลันในผู้ป่วย โดยความสัมพันธ์ของ ภาวะตับอักเสบจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรจีเห็กจัดอยู่ในระดับ probable จนถึงขั้น definite ตามเกณฑ์ มาตรฐานการวินิจฉัย หรือ DILI scale (drug-induced liver injury scale) และมีผู้ป่วย 2 รายได้ทดลอง กินยาจีเห็กซ้ำใหม่หลังรักษาภาวะตับอักเสบเฉียบพลันดีขึ้นแล้วพบว่าอาการของตับอักเสบกลับมา เป็นซ้ำอีก แสดงว่าผลของภาวะตับอักเสบนั้นเกิดขึ้นจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรจีเห็ก จึงทำให้สำนักงาน คณะกรรมการอาหารและยาสั่งระงับการผลิตยาเม็ดใบจีเห็ก (Hongsinirachorn et al., 2003) อย่างไร ก็ตาม ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าการเกิดภาวะตับอักเสบเป็นผลโดยตรงของบาราคอล หรือเกิดจากผล ของสารอื่นที่เป็นองค์ประกอบ

การศึกษาทางพิษวิทยาของบาราคอล

การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันโดยฉีดบาราคอลเข้าทางช่องท้องของหนูถีบจักร พบว่าบารา คอลมีความเป็นพิษต่ำโดยมีค่า convulsant dose-50 (CD_{50}) เท่ากับ 296.17 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมี ค่า lethal dose-50 (LD_{50}) เท่ากับ 324.09 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (พิกุล จันทรโยธา, 2531) ส่วนการ ทดสอบความเป็นพิษใน brine shrimp พบว่าให้ค่า LD_{50} เท่ากับ 930 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Subhadhirasakul and Khumfang 2000) การศึกษาความเป็นพิษของบาราคอลต่อเซลล์ตับเพาะเลี้ยง

พบว่าความเข้มข้นของบาราคอลที่ทำให้เกิดพิษและมีผลให้เซลล์ตายไปร้อยละ 50 ภายในเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 5.70 มิลลิโมลาร์ (Lawanprasert, 2001)

การศึกษาพิษวิทยาของใบขี้เหล็ก พบว่าเมื่อหนูขาวได้รับการป้อนอาหารหนูผสมใบขี้เหล็กในอัตราส่วน 5% เป็นเวลา 14 วัน ทำให้ระดับเอนไซม์ใน phase I คือ aniline hydroxylase และ aminopyrine N-demethylase ลดลง ในทางตรงกันข้ามกลับพบว่าระดับเอนไซม์ใน phase II คือ glutathione-S-transferase และ UDP-glucuronyltransferase เพิ่มขึ้นร้อยละ 250 และ 220 ตามลำดับ (วรรณิ์ คูสำราญ และ อนงค์ เทพสุวรรณ 2540) สำหรับการศึกษาความเป็นพิษของบาราคอลต่อตับของหนูถีบจักร โดยให้บาราคอลที่ขนาด 100, 200, 300 และ 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เข้าทางปากของหนูถีบจักร นำมาศึกษาพยาธิสภาพของเซลล์ตับและวัดค่าการทำงานของตับจากระดับเอนไซม์ AST, ALT, total bilirubin เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าบาราคอลเป็นพิษต่อเซลล์ตับรวมทั้งกระบวนการซ่อมแซมของเซลล์ตับ โดยความเป็นพิษแปรผันตามระยะเวลาของการให้บาราคอลด้วย อย่างไรก็ตามเซลล์ตับสามารถซ่อมแซมตัวเองและกลับคืนสู่สภาพเดิมได้ นอกจากนี้ยังพบว่าบาราคอลทำให้ระดับคอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ และกลูโคสในเลือดลดลงด้วย (วัชรภรณ์ เทวกุล ณ อยุธยา, 2546)

เซลล์ฟิสิบเก่าที่ได้จากเซลล์เอ็มบริโอของหนูถีบจักร

เซลล์ฟิสิบเก่าแยกได้จากเซลล์เอ็มบริโอของหนูถีบจักรตัวผู้ (C3H/He mouse) ที่ฝังตัวในมดลูกของแม่หนูได้ 7 วัน เซลล์ชนิดนี้แสดงคุณสมบัติคล้ายกับ primitive ectoderm สามารถพัฒนาเปลี่ยนเป็นเซลล์ประสาท (Magnuson et al., 1995; Staines et al., 1994; Jones-Villeneuve et al., 1982) เซลล์เกลีย (Staines et al., 1996) เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เซลล์กล้ามเนื้อลาย (Armour et al., 1999) โดยการชักนำให้เป็นเซลล์ประสาทนั้นต้องเลี้ยงเซลล์ฟิสิบเก่าในจานเพาะแบคทีเรีย เพื่อไม่ให้เซลล์ยึดติดพื้นผิวจานเพาะแต่ละเกาะกันเป็นกลุ่มก้อนหรือที่เรียกว่า embryoid bodies (EBs) และชักนำให้เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ประสาทหรือเซลล์เกลียโดยใช้ all-trans-retinoic acid (RA) ในช่วงความเข้มข้น 0.05-1 ไมโครโมลาร์ (Coleman et al., 1996; Jones-Villeneuve et al., 1982) เลี้ยงนานประมาณ 4 วัน เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ลอยเกาะกัน ย้ายถ่ายไปยังจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ใช้กันทั่วไปซึ่งเป็นโพลีเมอร์ที่เซลล์สามารถยึดเกาะอยู่ได้และจะเปลี่ยนรูปร่างคล้ายเซลล์ประสาทและเซลล์เกลีย จำนวนเซลล์ประสาทจะเพิ่มมากขึ้นถ้าได้เลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มี cytosine arabinoside (AraC) ความเข้มข้นประมาณ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมอยู่ด้วย เนื่องจาก AraC ไปยับยั้งการแบ่งเซลล์ในระยะไมโทซิสของเซลล์เกลีย โดยไม่มีผลต่อเซลล์ประสาทที่หยุดการแบ่งเซลล์ทันทีหลังจากพัฒนาเป็นเซลล์ประสาทแล้ว สังเกตเซลล์ประสาทได้จากรูปร่างของ cell bodies ก่อนข้างกลม มีแขนงยื่นออกมาคล้าย neurite เช่นเดียวกับที่เห็นใน primary cell culture และภายในเซลล์มียื่นควบคุมการแสดงออกให้

เอนไซม์ glutamic acid decarboxylase (GAD) ตัวรับ GABA (Bain 1993, Staines 1994, Reynolds 1994) หรือตัวรับ NMDA/kainate/AMPA สำหรับเซลล์เกลียจะค่อนข้างแบน

เทคนิคที่ใช้ตรวจสอบเซลล์ที่สืบเก่าว่าเป็นเซลล์ชนิดใด หลังจากถูกชักนำด้วย RA ได้แก่ เทคนิค in situ immunofluorescence โดยใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน nestin ซึ่งพบในเซลล์เอ็มบริโอของหนูเมื่อเลี้ยงเซลล์ไปได้ 3 วัน หรือใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน O4 ซึ่งพบในเซลล์เกลียจำพวก oligodendrocytes โดยพบเป็นเซลล์เดี่ยวเมื่อเลี้ยงเซลล์ไปได้ 3-9 วัน หรือใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน glial fibrillary acidic protein (GFAP) ที่พบในเซลล์เกลียจำพวก astrocytes ซึ่งมักพบเห็นเป็นกลุ่มก้อน ไม่ค่อยเห็นเป็นเซลล์เดี่ยว หลังจากเลี้ยงเซลล์ไปได้ 3-20 วัน สำหรับเซลล์ประสาทจะใช้แอนติบอดีต่อโปรตีนจำพวก microtubule associated proteins เช่น MAP2, MAP5 หรือ neurofilament-200 หรือ synaptophysin โดยพบมากที่สุดในช่วงที่เลี้ยงไปได้ 20 วัน นอกจากนี้ยังพบการทำงานของเอนไซม์ AChE และ GAD ในเซลล์ประสาทที่ได้นี้ด้วย (Fraichard et al., 1995)

บทบาทของ retinoic acid ที่ชักนำเซลล์ที่สืบเก่าให้เป็นเซลล์คล้ายเซลล์ประสาทและเซลล์เกลีย

เซลล์ที่สืบเก่าสามารถเปลี่ยนเป็นเซลล์ประสาท เซลล์เกลีย หรือเซลล์ fibroblast ได้นั้นจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ RA ในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.05 ไมโครโมลาร์ จะทำให้เซลล์เกาะกลุ่มในรูป embryoid และเปลี่ยนเป็นเซลล์ประสาทหลังจากเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงประมาณ 3 วัน โดยจะพบ microtubules ตรงบริเวณ axon และเมื่อนำมาข้อมสีกและส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นแขนงแยกจากตัวเซลล์และมีแขนงสานต่อกัน ขณะที่เมื่อใช้ RA ความเข้มข้นน้อยกว่า 0.01-0.05 ไมโครโมลาร์จะเปลี่ยนเป็นเซลล์ fibroblast แต่ถ้าใช้ RA ความเข้มข้นน้อยกว่า 0.01 ไมโครโมลาร์ รูปร่างของเซลล์เอ็มบริโอดังเดิม (Jones-Villeneuve et al., 1982) กลไกที่ RA ไปมีผลต่อการพัฒนาเป็นเซลล์ชนิดอื่นได้นั้น เนื่องจาก RA สามารถผ่านเมมเบรนของเซลล์และของนิวเคลียสไปจับกับตัวรับที่อยู่บนนิวเคลียส เพื่อไปควบคุมการแสดงออกของยีนที่สังเคราะห์ให้โปรตีน tubulin, neurofilaments หรือเอนไซม์ เช่น choline acetyltransferase, AChE (Jones-Villeneuve et al., 1982)

บทบาท RA ในการควบคุมยีนที่แสดงออกของเอนไซม์ AChE ในเซลล์ที่สืบเก่า โดยในระยะต้นเซลล์ที่สืบเก่าจะไม่พบเอนไซม์ AChE แต่ภายหลังได้รับการชักนำด้วย RA เซลล์จะเกาะกลุ่มกันและเปลี่ยนเป็นเซลล์ประสาทที่สามารถตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ AChE แต่ถ้าไม่ได้รับการชักนำด้วย RA จะไม่พบเอนไซม์ชนิดนี้ รูปร่างเซลล์จัดอยู่ในกลุ่ม fibroblast ซึ่งไม่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ AChE จากเทคนิค sucrose density gradient analysis พบว่าเอนไซม์ AChE พบในเซลล์เกาะกลุ่มเอ็มบริโอดหลังจากชักนำด้วย RA ส่วนใหญ่อยู่ในรูปของ G1 (globular monomer) ในขณะที่เซลล์ที่ได้เปลี่ยนเป็นเซลล์ประสาทจะอยู่ในรูปของ G1, G2 (globular dimer) และ G4 (globular tetramer) ซึ่งรูปแบบ G4 พบมากในเซลล์ประสาทส่วนกลางของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม อย่างไรก็ตามจะไม่พบเอนไซม์ชนิดนี้ในเซลล์ที่สืบเก่า ดังนั้นเอนไซม์ AChE อาจมีบทบาทสำคัญในระหว่างพัฒนาเป็น

เซลล์ประสาท และอาจนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงพัฒนาการเป็นเซลล์ประสาท (Coleman et al., 1996; Jones-Villeneuve et al., 1982)

รูปแบบและกลไกการตายของเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

รูปแบบการตายของเซลล์โดยทั่วไปมีด้วยกัน 2 รูปแบบ คือ แบบ necrosis และแบบ apoptosis การตายแบบอะพอพโทซิสแตกต่างจากการตายแบบเนโครซิสคือ การตายแบบอะพอพโทซิสจะเป็นการตายแบบธรรมชาติซึ่งเกิดจากปัจจัยภายในเซลล์ที่ได้ตั้งโปรแกรมไว้เมื่อเซลล์มีอายุมากขึ้น หรือในบางครั้งเซลล์ได้รับการกระตุ้นจากสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม การศึกษาทางกายสัณฐานวิทยาของเซลล์พบว่าการเปลี่ยนแปลงรูปร่างที่จำเพาะ โดยเห็นเมมเบรนของเซลล์เหี่ยวแบน โครมาตินในนิวเคลียสขดแน่น สายดีเอ็นเอถูกย่อยสลาย เมมเบรนที่เหี่ยวแบนจะเข้ามาล้อมรอบไมโทคอนเดรีย หรือออร์แกเนลล์อื่นในรูปแบบที่เรียกว่า apoptotic bodies ซึ่งจะถูกล้อมกินโดยเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วยกระบวนการ phagocytosis มีการหลั่งโปรตีนในกลุ่ม cytokine ก่อให้เกิดกระบวนการอักเสบและเหนี่ยวนำเซลล์ข้างเคียงตายแบบเนโครซิส สำหรับการตายแบบเนโครซิสเกิดขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับบาดเจ็บอย่างรุนแรงจากปัจจัยภายนอกเซลล์ เช่น แรงดันออสโมซิส อุณหภูมิ ภาวะขาดออกซิเจน หรือเมื่อเซลล์ได้รับสารพิษ การศึกษาทางกายสัณฐานวิทยาของเซลล์พบว่าเมมเบรนของเซลล์เสียสภาพเป็นผลให้โซเดียม แคลเซียม และน้ำแพร่เข้าเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว ทำให้เซลล์บวมและแตกออกปลดปล่อยสารที่อยู่ภายในไลโซโซมออกมาทำลายเซลล์นั้นๆ รวมทั้งเซลล์ข้างเคียงด้วย (Padanilam, 2003) นอกจากข้อแตกต่างทางกายสัณฐานวิทยาของเซลล์แล้ว ยังพบว่าการตายแบบอะพอพโทซิสต้องอาศัยพลังงานในรูปของ ATP เพื่อใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน ในขณะที่กระบวนการตายแบบเนโครซิสไม่ต้องอาศัยพลังงาน (Kinloch et al., 1999)

โดยทั่วไปปัจจัยแวดล้อมที่ส่งผลให้เซลล์ตายนั้น มักผ่านทางวิธีการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่ไปกระตุ้นการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ caspase และไปทำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส (Padanilam, 2003) หรือผ่านทางวิธีการส่งสัญญาณที่ไม่ต้องอาศัยกลุ่มเอนไซม์แคสเพสซึ่งมักทำให้เซลล์ตายแบบเนโครซิส (Kroemer and Martin, 2005) กลุ่มเอนไซม์แคสเพสมีหน้าที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสเตรทให้เป็นโปรตีนสายสั้น เอนไซม์แคสเพสแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มด้วยกันคือ กลุ่ม initiator caspase ได้แก่ caspase 2, 8, 9, และ 10 และกลุ่ม effector caspase ได้แก่ caspase 3, 6, และ 7 กลุ่มเอนไซม์แคสเพสเหล่านี้จะมีวิธีการส่งสัญญาณที่แตกต่างกันก่อนทำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิสทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมของเซลล์ หรืออาจขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ ตัวอย่างเช่น กรณีที่เซลล์ได้รับสัญญาณภายนอกเซลล์ผ่านทางตัวรับเช่น TNF receptor หรือ death receptor จะส่งสัญญาณไปยัง FADD เพื่อไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-8 และไปตัดสายโปรตีนในวงศ์ Bcl-2 ได้เป็นโปรตีน Bid ซึ่งจะไปกระตุ้นให้เกิดการรวมตัวระหว่างโปรตีน Bax และโปรตีน Bak เข้าด้วยกันเป็น Bax-Bak channel ซึ่งไปรบกวนการทำงานของเมมเบรนด้านนอกของไมโทคอนเดรีย (mitochondrial outer

membrane permeabilization, MOMP) เสียสภาพมีการแพร่ของ cytochrome c เข้าสู่ไซโทซอลเพื่อไปรวมตัวกับโปรตีน Apaf-1 และเอนไซม์ procaspase-9 ในรูปแบบที่เรียกว่า apoptosome นำไปสู่การย่อยสลายเป็น caspase-9 เพื่อไปกระตุ้นการทำงานของ caspase-3 ซึ่งจะไปทำให้เอนไซม์ caspase-activated deoxyribonuclease (CAD) หลุดเป็นอิสระลำเลียงเข้านิวเคลียสและไปย่อยสลายสายดีเอ็นเอ ส่งผลให้เซลล์ตายแบบอะพอพอโทซิสในเวลาต่อมา (Kroemer and Martin 2005) ปัจจุบันโปรตีนในวงศ์ Bcl-2 จำแนกเป็น 3 กลุ่มคือ (1) กลุ่ม proapoptotic protein ได้แก่ Bax, Bak, Bok (2) กลุ่ม antiapoptotic protein ได้แก่ Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1, A1 (3) กลุ่ม BH3-only protein ได้แก่ Bad, Bid, Bik, Bin, BNIP3, Noxa, Puma, และ Hrk ซึ่งจะไปกระตุ้นการทำงานของกลุ่ม proapoptotic protein แต่จะไปยับยั้งการทำงานของกลุ่ม antiapoptotic protein (Adams 2003; Adams and Cory 1998)

สาเหตุหนึ่งที่ทำให้เซลล์ตายแบบอะพอพอโทซิสผ่านทางเอนไซม์แคสเพสนั้น อาจมาจากอนุมูลอิสระของออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) โดยปกติอนุมูลอิสระของออกซิเจนเป็นผลผลิตที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมในปฏิกิริยา electron transport chain และ oxidative phosphorylation บนเมมเบรนด้านในของไมโทคอนเดรีย ซึ่งจะรวมกับโปรตอนเพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำและพลังงานในรูปของ ATP แต่ถ้านเซลล์อยู่ในสภาวะเครียด (oxidative stress) เช่น ได้รับแสงอัลตราไวโอเลต สารพิษ สารแปลกปลอม (Cheng et al., 2005; Bello et al., 2005) หรือเมื่อเซลล์ตกอยู่ในสภาวะขาดออกซิเจน จะทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์เกิดไม่สมบูรณ์มีการสร้างอนุมูลอิสระเป็นจำนวนมาก จนแพร่ออกจากไมโทคอนเดรียเข้าสู่ไซโทซอล ซึ่งจะไปรบกวนการทำงานของโปรตีน เอนไซม์ ที่อยู่ในไซโทซอล ตัวอย่างของอนุมูลอิสระของออกซิเจนที่พบภายในเซลล์ได้แก่ superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radical ($OH^{\cdot}$), alkoxyl radical ($RO^{\cdot}$), nitric oxide ($NO^{\cdot}$) รวมทั้ง hydrogen peroxide (H_2O_2), peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$) (Andersen, 2004)

อย่างไรก็ตามเซลล์จะมีระบบป้องกันตนเองในการกำจัดหรือลดปริมาณอนุมูลอิสระโดยอาศัย 2 ระบบด้วยกันคือ (1) ระบบที่ใช้สารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ภายในเซลล์ เช่น glutathione (GSH), vitamin C หรือ vitamin E (2) ระบบที่ต้องอาศัย antioxidant enzyme เช่น superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase อนุมูลอิสระเกิดจากอิเล็กตรอนที่ได้จากกระบวนการ electron transport chain ภายในไมโทคอนเดรียขนส่งไปยังออกซิเจนให้อยู่ในรูป $O_2^{\cdot-}$ ต้องอาศัยเอนไซม์ SOD เพื่อเปลี่ยนเป็น H_2O_2 ซึ่งถูกเปลี่ยนเป็นน้ำโดยอาศัยสับสเตรท GSH และเอนไซม์ GPx หรือใช้เอนไซม์ catalase ในกรณีที่เซลล์มี Fe^{2+} อยู่เป็นจำนวนมากจะช่วยเปลี่ยน H_2O_2 ให้เป็น $OH^{\cdot}$ ผ่านทางปฏิกิริยา Fenton (Andersen, 2004) หากเซลล์ไม่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระออกได้ทันโดยอาศัยระบบทั้งสอง จะทำให้การสะสมอนุมูลอิสระเป็นจำนวนมากที่จะไปรบกวนการทำงานของโปรตีน เอนไซม์ ลิพิด และดีเอ็นเอ ส่งผลทำให้เซลล์ตายในที่สุด

บทที่ 3

การศึกษาคงตัวของบาราคอล

วัสดุ สารเคมี

1. Dichloromethane (Modern Chemical)
2. Glacial acetic acid (catalog number K 21909063; Merck)
3. Hydrochloric acid (catalog number K33917217; Merck)
4. Methanol HPLC grade (catalog number C217U ; Labscan)
5. Sodium carbonate (catalog number TA690367; Merck)
6. Sodium hydroxide (catalog number 1823; APS Fine Chem)
7. Sulfuric acid (catalog number K29767731; Merck)
8. Deuterated methanol (Aldrich, Wisconsin, สหรัฐอเมริกา)
9. Deuterated chloroform (Merck, Darmstadt, เยอรมนี)

อุปกรณ์

1. เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (Shimadzu LC-10AD VP, ญี่ปุ่น) โดยมี
ส่วนประกอบ ดังนี้

System controller	SCL-10A VP
Degasser	DGU-14A
Auto-injector	SIL-10AD VP
Column oven	CTO-10A VP
Diode array detector	SPD-M10A VP
2. Alltima HP C18 column ขนาด 150 x 4.6 มิลลิเมตร; 3 ไมครอน (Alltech, สหรัฐอเมริกา)
3. All-Guard cartridge system (Alltech, สหรัฐอเมริกา)
4. Millipore Filtration Apparatus (Millipore, สหรัฐอเมริกา)
5. Heat-block (Lab-Line Instruments, สหรัฐอเมริกา)
6. LC-MS ประกอบด้วย

HPLC	Waters 626 pump และ Waters 2487 dual band UV detector (สหรัฐอเมริกา)
MS	Micromass with Q-TOF LCT KA040 model (สหราชอาณาจักร)
7. NMR spectrometer (Bruker Avance DPX-300 FT NMR, เยอรมนี)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสกัดบาราคอลจากใบขี้เหล็ก

ใบอ่อนสดของขี้เหล็กหนัก 7.47 กิโลกรัม นำมาต้มกับ 0.5% H_2SO_4 และตั้งทิ้งให้เดือดนานประมาณ 15 นาที กรองผ่านผ้าขาวบาง กากที่เหลือจากการกรองนำมาต้มกับ 0.5% H_2SO_4 อีกครั้ง กรองด้วยวิธีเดียวกัน ทิ้งให้เย็น นำของเหลวที่กรองได้ทั้งหมดมารวมกันและเติมลงในผง Na_2CO_3 ในสัดส่วน 10% w/v (ควรใส่ผง Na_2CO_3 ลงไปก่อนแล้วจึงเติมน้ำต้มใบลงไป เพื่อลดการเกิดฟองฟูและล้นออกมานอกภาชนะได้) คนให้เข้ากัน จากนั้นนำไปสกัดด้วยไคลคลอโรมีเทนโดยใช้กรวยแยกขนาด 1 ลิตร คอลลอยด์ที่ได้ทำการสกัดด้วยไคลคลอโรมีเทนซ้ำอีก 1 ครั้ง จะได้บาราคอลในชั้นไคลคลอโรมีเทนซึ่งมีสีเหลืองใส รวมชั้นไคลคลอโรมีเทนทั้งหมดมาล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน เพื่อขจัดค่าที่ปนมาออกไปโดยทำการเขย่าในกรวยแยก จากนั้นนำชั้นไคลคลอโรมีเทนที่ผ่านการล้างด้วยน้ำแล้วมาระเหยในเครื่องระเหยลดความดันที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนปริมาตรลดลงเหลือ 300 มิลลิลิตรหรือประมาณ 10% จากนั้น ค่อย ๆ เติมน้ำเย็นลงไปในอัตราส่วน 1:1 และแช่เย็นประมาณ 30 นาที จะเห็นผงบาราคอล สีเหลือง กรองแยกผงบาราคอลและซึ่งได้บาราคอล 6.22 กรัม (%yield เท่ากับ 0.083 ของน้ำหนักใบสด) นำผงบาราคอลที่ได้มาละลายใน 95% EtOH ได้สารละลายสีเหลือง ค่อย ๆ หยดกรดเกลือเข้มข้นลงในสารละลายบาราคอลที่แช่ในน้ำแข็งเพื่อป้องกันความร้อนที่จะเกิดขึ้น คนแล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึกอย่างช้า ๆ นำไปเก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส ที่มีด เพื่อให้ตกผลึกได้มากขึ้น นำไปกรองและผึ่งผลึกให้แห้ง ซึ่งผลึกแอนไฮโดรบาราคอล ไฮโดรคลอไรด์ จะมีรูปเข็มสีเหลืองอ่อน (ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ, 2521)

2. การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณบาราคอลด้วยวิธี HPLC-DAD

สารละลายบาราคอลความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ทำให้เจือจางด้วย mobile phase ในอัตราส่วน 1:50 ความเข้มข้นสุดท้ายของบาราคอล 2 นาโนโมล กรอง วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ในสภาวะดังต่อไปนี้

Mobile phase : Methanol : water (v/v) : 70 : 30; 50:50; 30:70; 20:80

Methanol : 1% HOAc 30:70; 20:80

Flow rate : 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

Detector : ความยาวคลื่น 249 นาโนเมตร

Injection volume : 10 ไมโครลิตร

Temperature : 28 องศาเซลเซียส

3. การหาตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการสกัดบาราคอลจากใบขี้เหล็ก

นำใบขี้เหล็ก จำนวน 0.5 กรัม แช่ในตัวละลายชนิดต่าง ๆ คือ น้ำร้อน 70% EtOH หรือ absolute EtOH โดย sonicate ด้วยเป็นเวลา 30 นาที กรองลงใน volumetric flask ปริมาตรจน

ครบ 10 มิลลิลิตร เจือจางสารละลายด้วย mobile phase ที่ใช้ในการวิเคราะห์ในอัตราส่วน 1:10 กรองและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC วัดที่ความยาวคลื่น 249 นาโนเมตร โดยใช้สภาวะ ดังนี้

Mobile phase : Isocratic : MeOH : 1% HOAc (23 : 77)
 Gradient : 0.01-8.00 นาที MeOH : 1% HOAc (23 : 77)
 8.01-10.00 นาที MeOH : 1% HOAc (23 : 77 -> 30:70)
 10.01 – 13.00 นาที MeOH : 1% HOAc (30 : 70)
 13.01-15.00 นาที MeOH : 1% HOAc (30 : 70 -> 23:77)
 15.01-22.00 นาที MeOH : 1% HOAc (23 : 77)
 Flow rate : 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
 Detector : ความยาวคลื่น 249 นาโนเมตร
 Injection volume : 10 ไมโครลิตร
 Temperature : 28 องศาเซลเซียส

4. การวิเคราะห์หาปริมาณบาราคอลจากส่วนต่าง ๆ ของสมุนไพรขี้เหล็ก

นำส่วนต่าง ๆ ของขี้เหล็ก คือ ใบแก่ ใบอ่อน (ใบอ่อนในที่นี้หมายถึงใบที่เก็บตั้งแต่ยอดลงมาถึงข้อที่ 10 ของกิ่ง ที่เหลือจำแนกเป็นใบแก่) ดอกตูม จำนวนอย่างละ 0.5 กรัม แช่น้ำร้อน และ sonicate เป็นเวลา 30 นาที กรองลงใน volumetric flask ปรับปริมาตรจนครบ 10 มิลลิลิตร เจือจางสารละลายด้วย mobile phase ที่ใช้วิเคราะห์ในอัตราส่วนระหว่างสารละลายและ mobile phase คือ 1:10 กรองและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ดังนี้

Mobile phase : Isocratic : MeOH : 1% HOAc (23 : 77)
 Flow rate : 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
 Detector : ความยาวคลื่น 249 นาโนเมตร
 Injection volume : 10 ไมโครลิตร
 Temperature : 28 องศาเซลเซียส

5. การศึกษาความคงตัวของบาราคอลในสถานะต่าง ๆ

วิเคราะห์หาปริมาณบาราคอลบริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC-DAD ดังนี้

Mobile phase : Isocratic : MeOH : 1% HOAc (20 : 80)
 Flow rate : 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
 Detector : Photo-diode array 249 นาโนเมตร
 Injection volume : 10 ไมโครลิตร
 Temperature : 28 องศาเซลเซียส

สภาวะสำหรับการทดสอบความคงตัวของสารละลายบาราคอลที่เวลาต่าง ๆ ตามข้อกำหนดของ International Conference on Harmonization (ICH) มีดังนี้ (Ojha et al., 2002; Singh, 2000)

5.1 การศึกษาความคงตัวของบาราคอลในสารละลายต่าง

สารละลายบาราคอลความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ จำนวน 1 มิลลิลิตรเติมสารละลาย 0.1 M NaOH จำนวน 9 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง หรือที่ 80 องศาเซลเซียสเมื่อครบกำหนดเวลานำมาทำให้เจือจางด้วย mobile phase ในอัตราส่วน 1:50 กรอง นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

5.2 การศึกษาความคงตัวของบาราคอลในสารละลายกรด

สารละลายบาราคอลความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ จำนวน 1 มิลลิลิตรเติมสารละลาย 0.1 M HCl จำนวน 9 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องหรือที่ 80 องศาเซลเซียสเมื่อครบกำหนดเวลานำมาทำให้เจือจางด้วย mobile phase ในอัตราส่วน 1:50 กรอง นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

5.3 การศึกษาความคงตัวของบาราคอลในน้ำ

สารละลายบาราคอลความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง หรือที่ 80 องศาเซลเซียส เมื่อครบกำหนดเวลานำมาทำให้เจือจางด้วย mobile phase ในอัตราส่วน 1:50 กรอง นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

5.4 การศึกษาความคงตัวของบาราคอลที่อุณหภูมิสูง

สารละลายบาราคอลความเข้มข้น 0.01 โมลาร์วางไว้ในเครื่อง heat block ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เมื่อครบกำหนดเวลานำมาทำให้เจือจางด้วย mobile phase ในอัตราส่วน 1:50 กรอง นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

5.5 การศึกษาความคงตัวของบาราคอลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

สารละลายบาราคอลความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ตั้งทิ้งไว้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่อุณหภูมิห้อง นาน 8 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำมาทำให้เจือจางด้วย mobile phase ในอัตราส่วน 1:50 กรอง นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

5.6 การศึกษาความคงตัวของบาราคอลในสภาวะที่มี H_2O_2

สารละลายบาราคอลความเข้มข้น 0.01 โมลาร์จำนวน 1 มิลลิลิตรเติม 3% H_2O_2 จำนวน 9 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบกำหนดเวลานำมาทำให้เจือจางด้วย mobile phase ในอัตราส่วน 1:50 กรอง นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

6. การศึกษาอัตราเร็วของการสลายตัวของบาราคอลในสารละลายต่างที่ pH ต่าง ๆ

บาราคอล 25 มิลลิกรัมละลายในสารละลายต่าง 0.1 M NaOH จำนวน 1 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย 0.1M HCl จนได้ pH 8, 10, 11, 12, และ 13 จากนั้นนำไป vortex ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0, 15, 30, 45, 60, 120, และ 180 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา ปิเปต 100 ไมโครลิตร เจือจางด้วย mobile phase จนครบ 5 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC (Gadkariem et al., 2003)

7. การศึกษาอัตราเร็วของการสลายตัวของบาราคอลในสารละลายต่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ชั่งบาราคอล 25 มิลลิกรัมละลายในสารละลาย NaOH ที่ความแรง 0.02, 0.05, 0.1 M จำนวน 1 มิลลิลิตร (วัด pH ได้ 11, 12, และ 13 ตามลำดับ) vortex ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาต่าง ๆ คือ 0, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 120, และ 180 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา ปิเปต 100 ไมโครลิตร เจือจางด้วย mobile phase จนครบ 5 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC (Gadkariem et al., 2003)

8. การศึกษาความคงตัวของบาราคอลที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ชั่งบาราคอล 50 มิลลิกรัมละลายใน MeOH 2 มิลลิลิตรแล้วปิเปตมา 100 ไมโครลิตร เติมสารละลายต่าง 0.1 M NaOH จำนวน 900 ไมโครลิตร และน้ำจนครบ 1000 ไมโครลิตร ปรับ pH ด้วย 0.1 M HCl จนได้ pH เท่ากับ 13 จากนั้นนำไป vortex ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 12, 23, 41, 51, และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 10, 20, 30, 40, 50, และ 60 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา ปิเปต 100 ไมโครลิตร เจือจางด้วย mobile phase จนครบ 5 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

9. การวิเคราะห์มวลโมเลกุลของสารที่ได้จากการสลายตัวของบาราคอลด้วยเทคนิค LC-MS

นำบาราคอล 50 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งมา 100 ไมโครลิตรผสมกับ 0.1 M NaOH 900 ไมโครลิตรตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยแบ่งสารละลายบาราคอลในด่างมา 500 ไมโครลิตรเติม mobile phase 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS โดยใช้ positive ESI mode ช่วงมวลระหว่าง 100-2000 amu

10. การสังเคราะห์สารที่ได้จากการสลายตัวของบาราคอลเพื่อยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค NMR

ละลายบาราคอล 100 มิลลิกรัมใน 0.1 M NaOH จำนวน 100 มิลลิลิตรนำไปอุ่นที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการสะเทินด้วย 10% HCl จากนั้นนำมาสกัดด้วย ethyl acetate ในอัตราส่วน 1:1 สกัดซ้ำ 4 ครั้ง คูดจับน้ำออกด้วย anhydrous sodium sulfate นำชั้นของ ethyl acetate ที่ได้ไประเหยแห้ง จากนั้นละลายด้วย dichloromethane ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืนจะได้ผลึกสีเหลืองนวล กรองและล้างตะกอนด้วยเมทานอล และนำไปวิเคราะห์หาโครงสร้างด้วยเทคนิค NMR

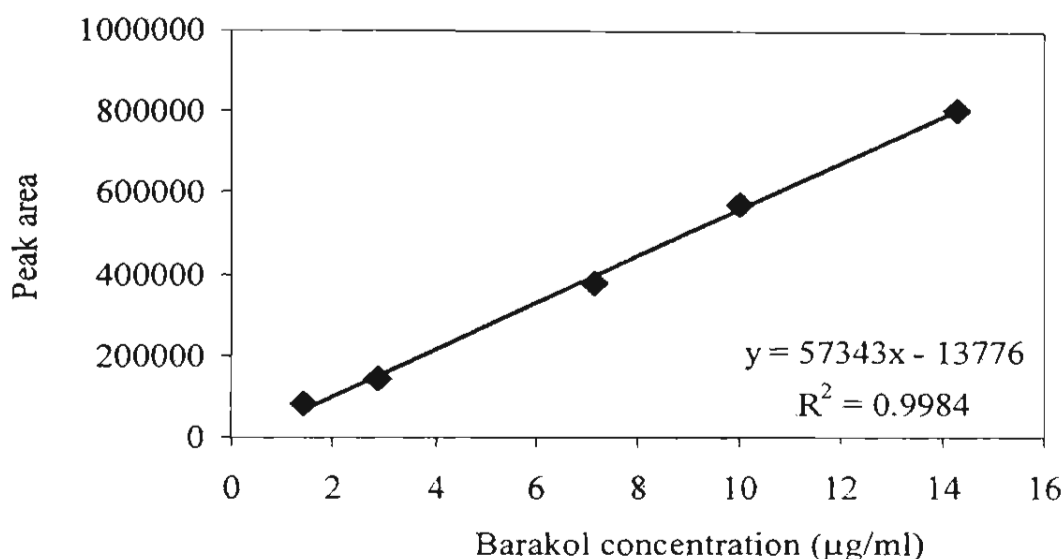
11. การศึกษาความคงตัวของบาราคอลในสถานะของการเลี้ยงเซลล์

ละลายบาราคอลในบัฟเฟอร์ PBS, อาหารเลี้ยงเซลล์ α -MEM, ซีรัม FBS และ α -MEM ผสม FBS จนได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 มิลลิโมลาร์ จากนั้นบ่มในตู้บ่มเซลล์ที่มี 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ณ เวลาต่าง ๆ กันคือ 0, 1, 6, 18, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำตัวอย่างมากรองผ่าน solid phase extraction (SPE) ที่ได้ถูกทำให้สมดุลด้วยเมทธานอล 1 มิลลิลิตรตามด้วยน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตรมาก่อน หลังจากนั้นใส่ตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ 1 มิลลิลิตรลงใน SPE ล้างด้วย washing solution ที่ประกอบด้วยเมทธานอลต่อน้ำกลั่นในอัตราส่วน 0.5 : 9.5 ครั้งละ 3 มิลลิลิตร จำนวน 4 ครั้ง จากนั้น elute ด้วยเมทธานอล นำ eluent ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC (Rouzer *et al.*, 2002)

ผลการวิจัย และการอภิปรายผล

1. การหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณบาราคอลด้วยวิธี HPLC-DAD

เมื่อวิเคราะห์ค่า retention time (t_R) ของโครมาโทแกรมของบาราคอลในสถานะที่ใช้ mobile phase ระหว่าง MeOH และน้ำในอัตราส่วน 70%, 50%, 30%, และ 20% MeOH พบว่าโครมาโทแกรมของ 30% MeOH ให้ค่า t_R เท่ากับ 9.4 นาที อย่างไรก็ตามในโครมาโทแกรมของบาราคอลพบว่ายังเกิด tailing effect จึงได้เติม acetic acid เข้าไปใน mobile phase เพื่อไปลดการเกิด ionization ในโครงสร้างของบาราคอล กล่าวคือมีปริมาณของ MeOH และ 1% HOAc ในอัตราส่วน 30:70 พบว่าค่า tailing factor ลดลงเท่ากับ 1.1 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (ค่า tailing factor ที่ยอมรับได้ < 2) อย่างไรก็ตามการเติมกรดทำให้ค่า t_R ของบาราคอลลดลงไปด้วย กล่าวคือ t_R เท่ากับ 2.6 นาที ดังนั้นเพื่อให้เหมาะกับการวิเคราะห์บาราคอลที่สลายตัวให้สารมีขั้วที่อาจมีขึ้น จึงต้องลดปริมาณ MeOH ใน mobile phase ลงคือใช้ MeOH และ 1% HOAc ในอัตราส่วน 20:80 ทำให้ค่า t_R เพิ่มขึ้นเป็น 5.7 นาที การใช้เทคนิค HPLC สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณบาราคอลนี้จะให้ความถูกต้องในช่วงความเข้มข้น 1.43 ถึง 14.30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งให้ค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 99.84 % (รูปที่ 2) ดังนั้น mobile phase ที่เลือกใช้สำหรับการวิเคราะห์ความคงตัวของบาราคอลคือ MeOH และ 1% HOAc สัดส่วน 20:80



รูปที่ 2 กราฟมาตรฐานของบาราคอลให้ความถูกต้องในช่วงความเข้มข้น 1.43 ถึง 14.30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. การหาตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการสกัดบาราคอลจากใบขี้เหล็ก

หลังจากได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณบาราคอลบริสุทธิ์ได้แล้ว นำไปปรับ mobile phase ทั้งระบบ isocratic และระบบ gradient เพื่อให้ทำการวิเคราะห์บาราคอลในสารสกัดขี้เหล็กได้อย่างชัดเจน เมื่อวิเคราะห์โครมาโทแกรมพบว่าระบบ isocratic เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณบาราคอลในสารสกัดขี้เหล็ก โดยมีสัดส่วนของ MeOH : 1% HOAc เท่ากับ 23:77 จากผลการทดลองเมื่อใช้ mobile phase ดังกล่าวพบว่าน้ำร้อนสามารถสกัดบาราคอลออกได้มากที่สุด คิดเป็น 0.19% รองลงมาเป็นตัวทำละลาย 70% EtOH สกัดบาราคอลได้ 0.16% และสุดท้ายคือ absolute EtOH สกัดได้ 0.10% (ตารางที่ 1) จากผลการทดลองนี้ไปสู่การพัฒนาวิธีการสกัดบาราคอลจากใบขี้เหล็กเพื่อนำมาเตรียมสารมาตรฐานใช้งานและนำมาทดสอบความเป็นพิษ

ตารางที่ 1 ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดบาราคอลจากใบขี้เหล็กและปริมาณของบาราคอลที่สกัดได้ (mean $\pm$ S.E.M. ; n=3 แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ)

ตัวทำละลาย	น้ำหนัก (กรัม)	ปริมาณบาราคอล (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณบาราคอล (%)
น้ำร้อน	0.513 $\pm$ 0.003	9.817 $\pm$ 0.924	0.193 $\pm$ 0.021
70% ethanol	0.508 $\pm$ 0.006	7.970 $\pm$ 0.896	0.157 $\pm$ 0.015
Ethanol	0.508 $\pm$ 0.007	4.943 $\pm$ 0.382	0.097 $\pm$ 0.006

3. การวิเคราะห์หาปริมาณบาราคอลจากส่วนต่าง ๆ ของสมุนไพรขี้เหล็ก

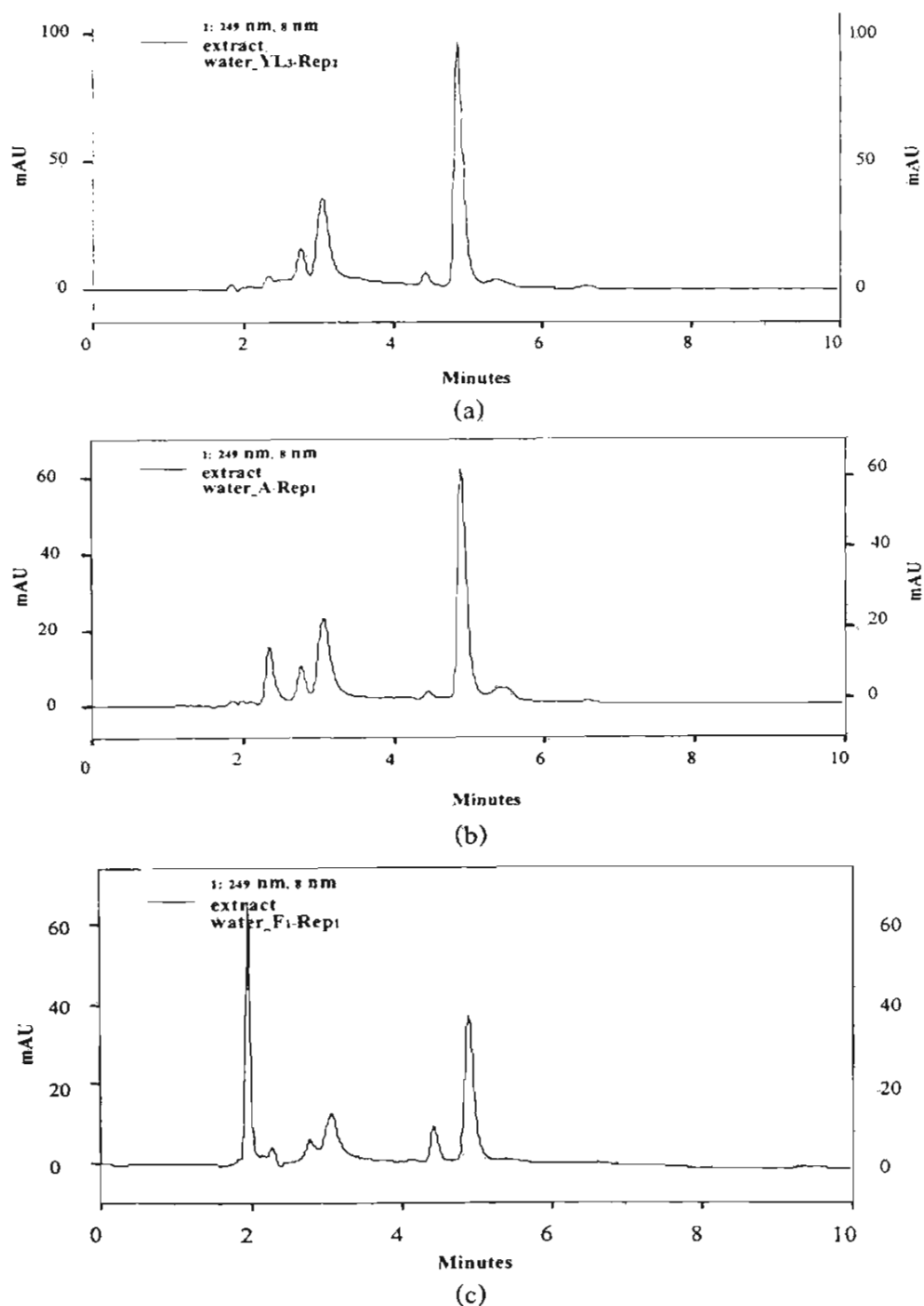
จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่าน้ำร้อนสามารถสกัดบาราคอลได้ปริมาณสูงสุด ดังนั้นจึงเลือกน้ำร้อนในการสกัดบาราคอลและวิเคราะห์หาปริมาณบาราคอลจากส่วนต่าง ๆ ของขี้เหล็ก เหตุผลของการเลือกส่วนของพืชขึ้นอยู่กับปัจจัยดังต่อไปนี้ คือ ปัจจัยของภูมิปัญญาท้องถิ่นและตำรายาพื้นบ้านที่นิยมใช้ส่วนของ ใบอ่อน ใบแก่ และดอกตูม มาบริโภคในรูปของอาหารหรือยาแผนโบราณ และปัจจัยที่เคยนำมาทำเป็นผลิตภัณฑ์เช่น องค์การเภสัชกรรมผลิตในรูปของยาเม็ดใบขี้เหล็ก ขณะที่โรงพยาบาลบางกระทุ่มผลิตในรูปยาเม็ดดอกขี้เหล็ก ดังนั้นเพื่อให้สอดคล้องกับภูมิปัญญาท้องถิ่นและผลิตภัณฑ์ที่เคยวางจำหน่ายในท้องตลาด จึงเป็นที่มาของการวิเคราะห์หาปริมาณบาราคอลจากส่วนต่าง ๆ ของสมุนไพรขี้เหล็ก คือ ใบอ่อน ใบแก่ และดอกตูม จากผลการทดลอง พบบาราคอลในใบอ่อนมากที่สุด ประมาณ 0.26% รองลงมาพบในใบแก่คือ 0.19 % ส่วนของดอกตูมจะพบบาราคอลน้อยที่สุดพบเพียง 0.12% (ตารางที่ 2) เมื่อเปรียบเทียบกับ % yield ที่ได้จากระบวนการสกัดบาราคอลได้เพียง 0.08% นั้น เป็นเพราะในกระบวนการสกัดได้ใช้ความร้อนจึงทำให้บาราคอลสลายตัวไปถึง 69% ดังนั้น จะต้องคำนึงถึงอุณหภูมิในกระบวนการเก็บสมุนไพรขี้เหล็กเพื่อให้มีบาราคอลเป็นปริมาณสูง

ตารางที่ 2 ปริมาณบาราคอลที่สกัดด้วยน้ำร้อนโดยใช้ใบอ่อน ใบแก่ และดอกตูมของขี้เหล็ก (mean $\pm$ S.E.M. ; n=3 แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ)

ส่วนของพืช	น้ำหนักพืช (กรัม)	บาราคอล (ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม)	% Content
ใบอ่อน	0.513 $\pm$ 0.007	13.45 $\pm$ 3.07	0.26 $\pm$ 0.06
ใบแก่	0.513 $\pm$ 0.003	9.82 $\pm$ 0.92	0.19 $\pm$ 0.02
ดอกตูม	0.513 $\pm$ 0.008	5.39 $\pm$ 1.05	0.12 $\pm$ 0.02

ดังนั้น การสกัดบาราคอลจากสมุนไพรขี้เหล็กเพื่อนำมาใช้ศึกษาเรื่องความคงตัว จึงได้เลือกส่วนที่เป็นใบอ่อนซึ่งให้บาราคอลในปริมาณสูง และจากการที่มีรายงานอุบัติการณ์ภาวะตับอักเสบเฉียบพลันในผู้ป่วยโรคผลิตภัณฑ์ยาเม็ดใบขี้เหล็กขององค์การเภสัชกรรม (Hongsinirachorn *et al.*, , 2003) แต่กลับไม่มีรายงานอุบัติการณ์ดังกล่าวในผู้ป่วยโรคผลิตภัณฑ์ยาเม็ดดอกขี้เหล็กของโรงพยาบาลบางกระทุ่ม จึงมีความเป็นไปได้ว่าปริมาณบาราคอลที่พบในใบอ่อนมากกว่าในดอกตูมทำให้ได้รับเกินขนาด และอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่น่าไปสู่ภาวะตับอักเสบเฉียบพลันในผู้ป่วยโรค และการที่ไม่พบรายงานภาวะตับอักเสบเฉียบพลันของผู้บริโภคผลิตภัณฑ์ยาเม็ดดอกขี้เหล็กของโรงพยาบาลบางกระทุ่ม อาจเป็นเพราะได้เลือกส่วนที่เป็นดอกขี้เหล็กที่มีปริมาณบาราคอลน้อยที่สุด ซึ่งอาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้กรรมวิธีปรุงอาหารพื้นบ้านแกงขี้เหล็กจึงต้องนำใบและดอกขี้เหล็กต้มน้ำทิ้งหลายครั้งเสียก่อน

เป็นที่น่าสังเกต คือ เมื่อวิเคราะห์โครมาโทแกรมของสารสกัดที่ได้จากส่วนต่าง ๆ (รูปที่ 3) พบว่าโครมาโทแกรมของสารสกัดจากดอกชี้เหล็กแสดง fingerprint ที่มีลักษณะแตกต่างจากโครมาโทแกรมของสารสกัดที่ได้จากใบอ่อน และใบแก่ อย่างเห็นได้ชัด โดยพบพีคของสารที่ค่า t_R เท่ากับ 4.5 นาทีในปริมาณที่สูงขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างปริมาณของสารดังกล่าวกับของปริมาณบาราคอล (t_R เท่ากับ 4.9 นาที) พบว่าเป็นสัดส่วน 1: 3.7

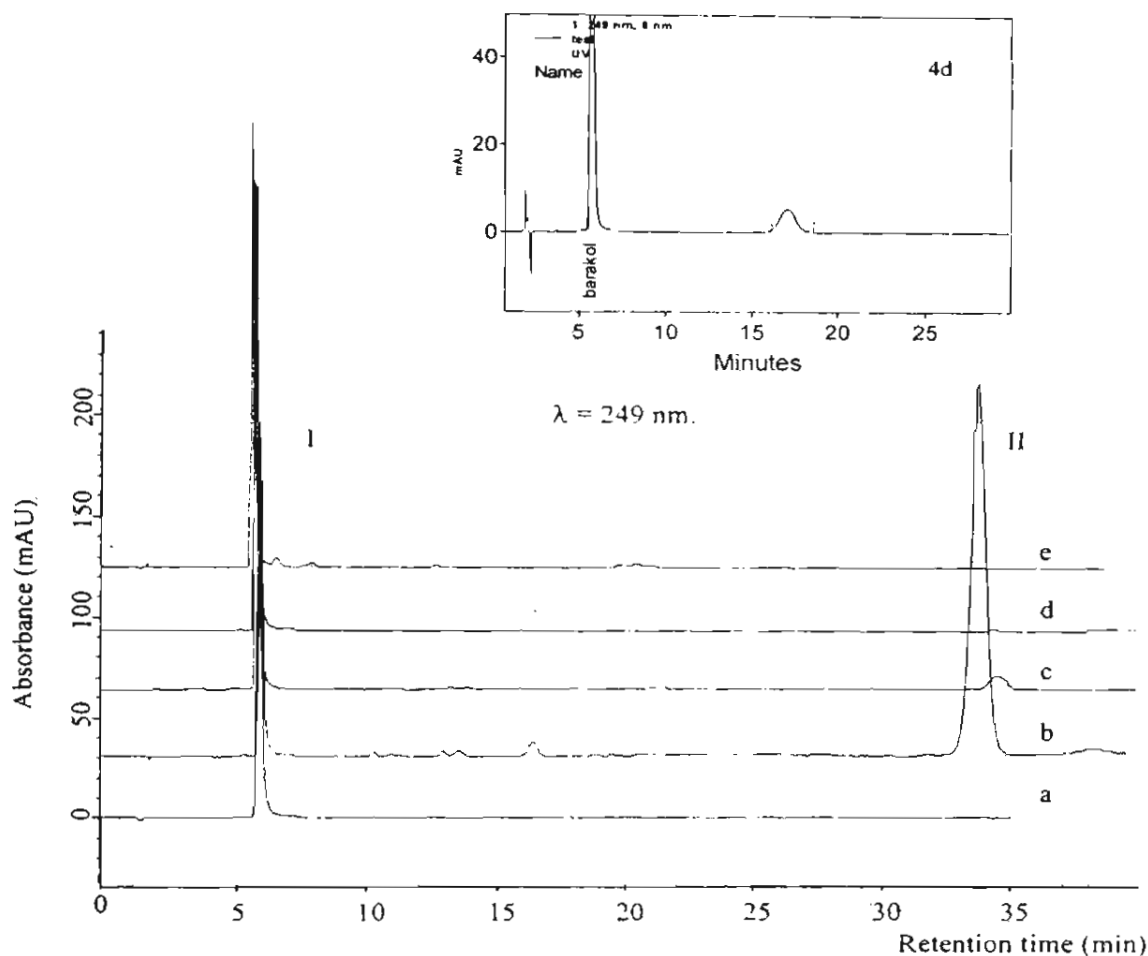


รูปที่ 3 HPLC fingerprint ของสารสกัดจาก (a) ใบอ่อน (b) ใบแก่ และ (c) ดอกตูมของชี้เหล็ก พบพีคของบาราคอลปรากฏที่ค่า t_R เท่ากับ 4.9 นาที

4. การศึกษาความคงตัวของบาราคอลในสภาวะต่าง ๆ

เพื่อศึกษาความคงตัวของบาราคอลและวិถีปฏิกิริยาการสลายตัวของบาราคอล จึงเตรียมสารละลายบาราคอลและทำให้สลายตัวในสภาวะเร่งตามข้อกำหนดของ ICH คือ alkaline hydrolysis, acid hydrolysis, neutral hydrolysis, thermal degradation, oxidation และ photolysis ในเวลาต่าง ๆ กัน และนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-DAD โดยใช้ mobile phase คือ MeOH : 1% HOAc ในอัตราส่วน 20:80 ปฏิกิริยา hydrolysis ของสารละลายบาราคอลที่ pH ต่าง ๆ นั้น พบว่าบาราคอลเมื่ออยู่ในสารละลายต่าง 0.1 M NaOH ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จะสลายตัวอย่างรวดเร็ว โดยพบพีคที่ค่า t_R เท่ากับ 33.91 นาที (รูปที่ 4b) ภายใน 1 ชั่วโมงเป็นปริมาณถึง 65.12 % โดยเหลือบาราคอลอยู่เพียง 33.96 % (t_R ของบาราคอลเท่ากับ 5.97 นาที) และบาราคอลสลายตัวเกือบหมดภายใน 6 ชั่วโมง (รูปที่ 5) สรุปได้ว่าบาราคอลสลายตัวได้อย่างรวดเร็วเมื่อถูกเร่งด้วยด่างโดยอาศัยปฏิกิริยา alkaline hydrolysis แต่ก่อนข้างคงตัวในสารละลายกรด 0.1 M HCl เมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง กล่าวคือโครมาโทแกรมไม่แตกต่างไปจากโครมาโทแกรมของบาราคอลในกลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ไม่ผ่านการเร่งให้สลายตัว แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมงให้กับบาราคอลในสารละลายกรดพบว่ามีพีคที่ค่า t_R เท่ากับ 34.41 นาทีในปริมาณน้อยมากเพียง 0.70% และเมื่อเปรียบเทียบกับบาราคอลที่ละลายในน้ำเมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจะไม่พบการสลายตัว แต่เมื่อให้ความร้อน 80 องศาเซลเซียส จะเกิดพีคที่ค่า t_R 34.41 นาทีเช่นกันแต่พบที่เวลาเพียง 6 ชั่วโมงในปริมาณ 3.11% (รูปที่ 4c) จึงตั้งข้อสังเกตว่า สารละลายบาราคอลในน้ำเมื่อนำไปต้มจะทำให้บาราคอลสลายตัวได้สารที่อาจเป็นพิษต่อเซลล์ได้ ดังนั้น จากภูมิปัญญาท้องถิ่นจะต้องนำไปใช้หลักคัมในน้ำเดือดทั้งหลาย ๆ ครั้ง ก่อนที่จะนำไปใช้หลักไปปรุงเป็นอาหารพื้นบ้าน อาจเท่ากับเป็นการกำจัดสารที่สลายตัวที่อาจเป็นพิษไปแล้วก็ได้ นอกจากนี้ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึง คือวิธีการเก็บ ต้องไม่เก็บไว้ในรูปสารละลายบาราคอลที่อุณหภูมิสูง เพราะความร้อนจะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา neutral hydrolysis ได้เป็นอย่างดี ควรเตรียมสารละลายใหม่ ๆ หรือถ้าจำเป็นต้องเก็บในสารละลายบาราคอลควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ เช่น 4 หรือ -20 องศาเซลเซียส

เพื่อศึกษาปัจจัยของแสงต่อความคงตัวของบาราคอล (photolysis) ได้นำสารละลายบาราคอลในน้ำตั้งไว้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่นสั้น 254 นาโนเมตร นานถึง 24 ชั่วโมง พบพีคที่ค่า t_R เท่ากับ 17 นาทีเพียง 0.12% (รูป 4d) เมื่อนำบาราคอลมาทำปฏิกิริยา oxidation ด้วย 3% H_2O_2 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง พบว่ามีพีคที่ค่า t_R เท่ากับ 7.11 และ 8.38 นาทีในสัดส่วน 2.33% และ 0.32% ตามลำดับ โดยที่บาราคอลยังคงเหลืออยู่ 96.83% (รูปที่ 4e) ดังนั้น ข้อควรระวังสำหรับการศึกษาความเป็นพิษของบาราคอลต่อเซลล์ หรือศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในระดับเซลล์ จะต้องหลีกเลี่ยงการให้บาราคอลร่วมกับสารละลาย 3% H_2O_2

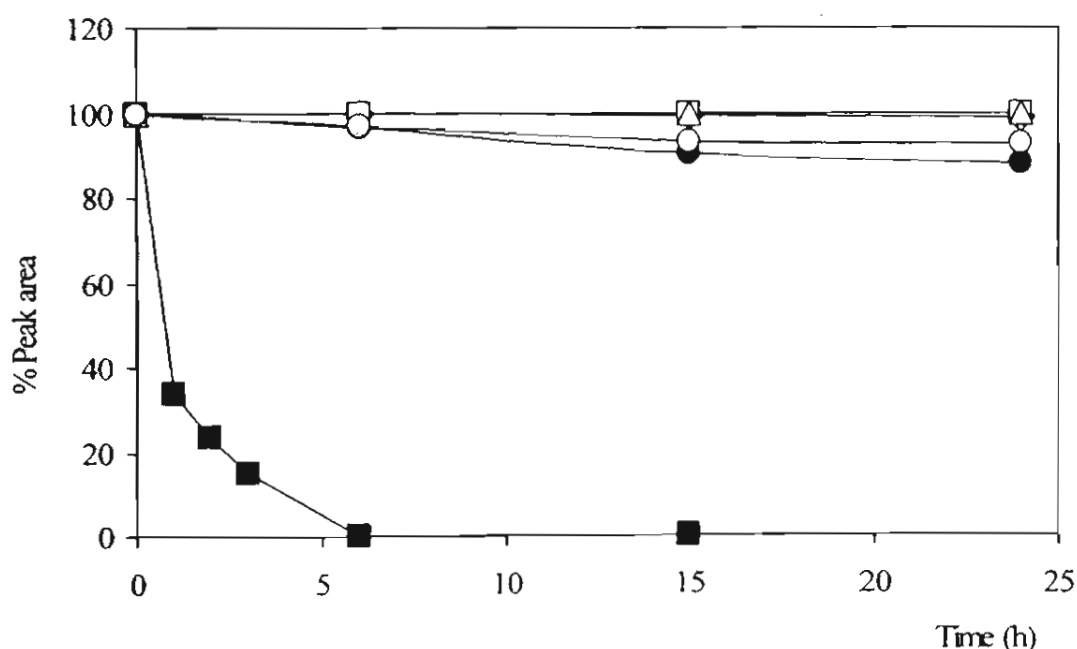


รูปที่ 4 โครมาโทแกรมของบาราคอล (I) และบาราคอลสารที่สลายตัว (II) ในสถานะเร่งคือ (a) กลุ่มควบคุม (b) alkaline hydrolysis (c) thermal degradation (d) photolysis โดยรูปเล็กแสดงภาพขยายเพื่อแสดงพีคที่ t_R เท่ากับ 17 นาที และ (e) oxidation เมื่อบาราคอลอยู่ใน 3% H_2O_2

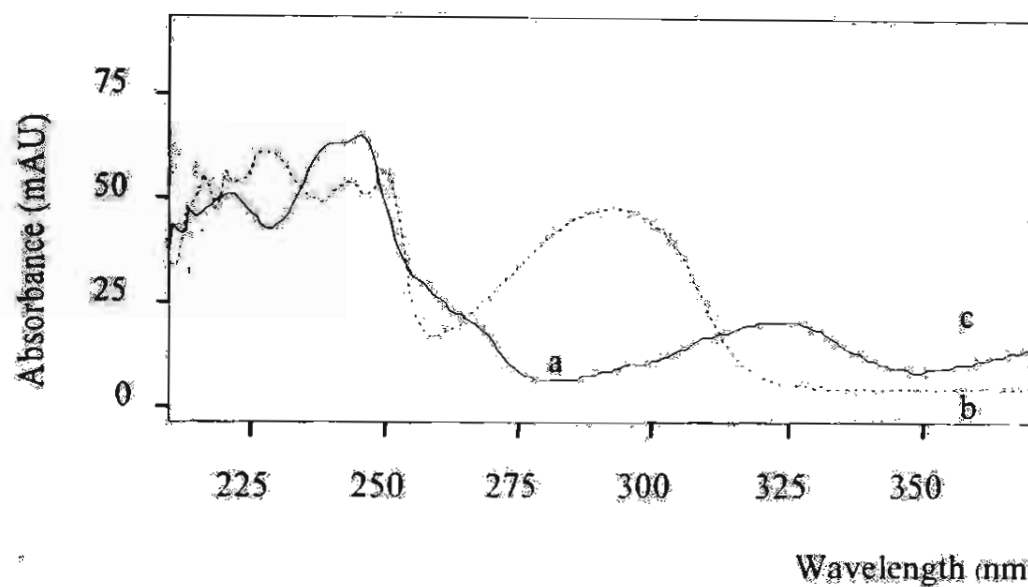
โดยสรุป ความคงตัวของบาราคอลได้ดีที่สุดเมื่ออยู่ในสารละลายกรดที่อุณหภูมิห้อง และจะสลายตัวอย่างรวดเร็วในสารละลายด่างที่อุณหภูมิห้อง สารละลายบาราคอลในน้ำจะสลายตัวอย่างช้า ๆ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นหรือเมื่ออยู่ใน 3% H_2O_2 (รูปที่ 5)

จากปัจจัยของค่าหรืออุณหภูมิที่สูงขึ้นที่ทำให้บาราคอลสลายตัวดังกล่าวข้างต้น และเมื่อวิเคราะห์สเปกตรัมของพีคที่ค่า t_R เท่ากับ 33.91 นาที ในโครมาโทแกรมของบาราคอลในสารละลายต่าง และสเปกตรัมของพีคที่ค่า t_R เท่ากับ 34.41 นาที ในโครมาโทแกรมของสารละลายบาราคอลในน้ำเมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิสูง เปรียบเทียบกับสเปกตรัมของบาราคอลที่ค่า t_R เท่ากับ 5.97 นาที ซึ่งแสดงค่าความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 249 และ 325 นาโนเมตร (รูปที่ 6a) ในขณะที่ค่า t_R เท่ากับ 33.91 นาที (รูปที่ 6b) หรือ 34.41 นาทีนั้น (รูปที่ 6c) สเปกตรัมจะมีรูปแบบคล้ายกันโดยแสดงค่าความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ที่ 292 นาโนเมตร จึงเป็นไปได้ว่าสารที่สลายตัวมาจากบาราคอลเมื่ออยู่ในสถานะด่างและในสถานะที่มีอุณหภูมิสูง อาจมีโครงสร้างที่มี polarity ลดลง เนื่องจากมีค่า t_R

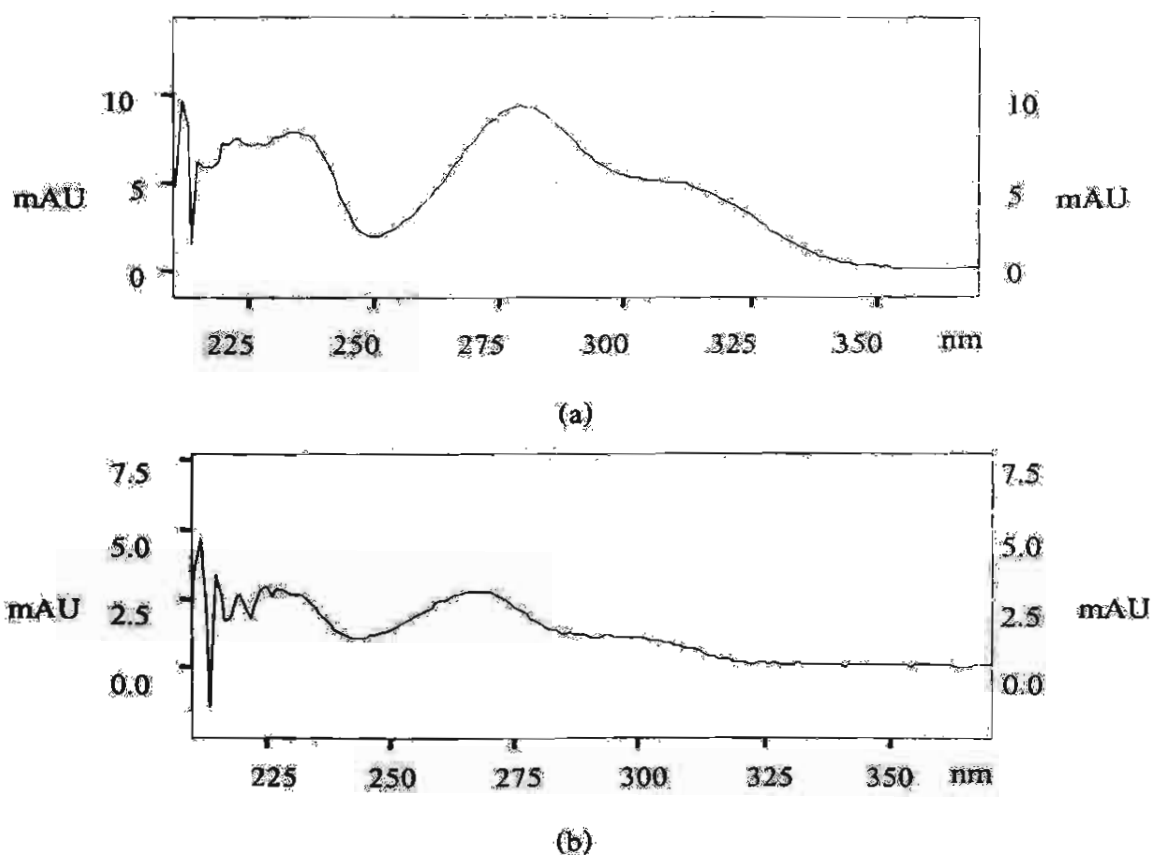
มากขึ้น และ/หรือมีโครงสร้างที่มี conjugation ลดลง (El-Gindy et al., 2003) เนื่องจากค่าความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงสูงสุดลดลง นอกจากนี้ยังสังเกตพบการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายบาราคอลในต่างจากสีเหลืองไปเป็นสีเขียวและไปเป็นสีน้ำตาลในที่สุด แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง chromophore ของบาราคอล จากการนำบาราคอลและแอนไฮโดรบาราคอล ไฮโดรคลอไรด์มาวิเคราะห์ด้วย TLC บนแผ่น silica gel ในตัวทำละลายผสมของ CHCl_3 : MeOH (9:1) พบว่าค่า R_f ของสารทั้งสองมีค่าเท่ากันคือเท่ากับ 0.29 ดังนั้นบาราคอลที่สลายตัวในสารละลายต่างให้ค่า t_R เท่ากับ 33.91 หรือ 34.41 นาที จะเป็นสารใดนั้นต้องทำการพิสูจน์ด้วยเทคนิค LC-MS หรือเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีต่อไป สำหรับสเปกตรัมของบาราคอลในสารละลาย 3% H_2O_2 เมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าการดูดกลืนแสงภายใต้พิคที่ค่า t_R เท่ากับ 7.11 และ 8.38 นาที อยู่ที่ 280 (รูปที่ 7a) และ 265 (รูปที่ 7b) นาโนเมตรตามลำดับ



รูปที่ 5 อัตราการสลายตัวของบาราคอลในสภาวะต่าง ๆ ณ เวลาแตกต่างกัน คือ (■) ในสารละลายต่าง บาราคอลสลายตัวเกือบหมดภายใน 6 ชั่วโมง (●) บาราคอลในสภาวะอุณหภูมิสูง (△) สารละลายบาราคอลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (○) บาราคอลใน 3% H_2O_2 (◇) ในสารละลายกรด (□) กลุ่มควบคุม



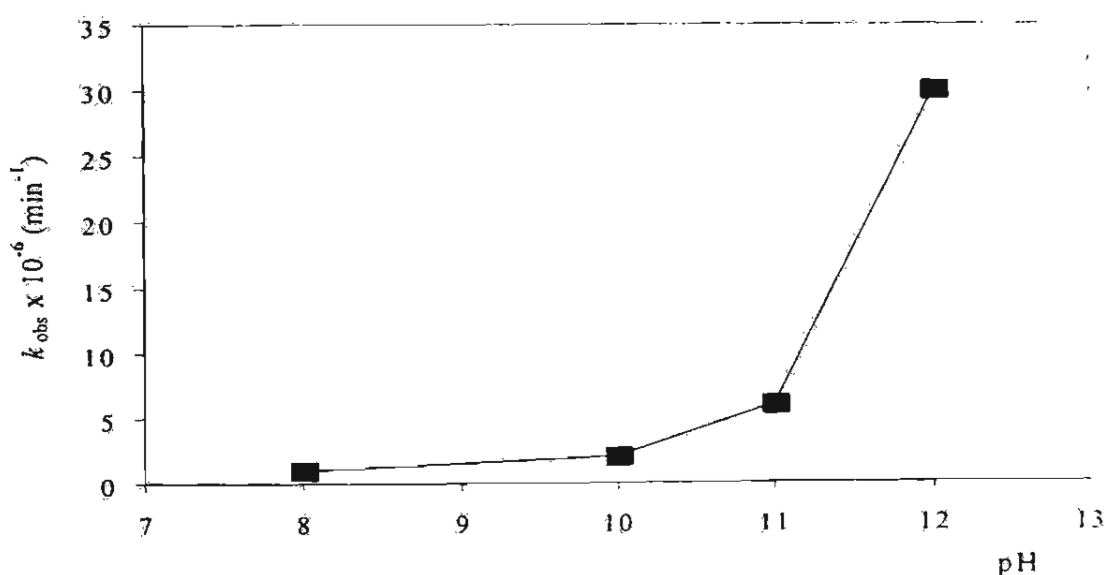
รูปที่ 6 สเปกตรัมสารละลายบาราคอลในสถานะเริ่มมีดังนี้ (a) สเปกตรัมของสารละลายบาราคอลเมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องมีค่า t_R เท่ากับ 5.97 นาที (b) สเปกตรัมของบาราคอลในสารละลายต่างเมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ปรากฏพิคที่ค่า t_R เท่ากับ 33.91 นาที (c) สเปกตรัมของบาราคอลที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ปรากฏพิคที่ค่า t_R เท่ากับ 34.41 นาที



รูปที่ 7 สเปกตรัมของบาราคอลในสารละลาย 3% H_2O_2 เมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้พื้นที่ที่ค่า t_R เท่ากับ (a) 7.11 นาที และ (b) 8.38 นาที

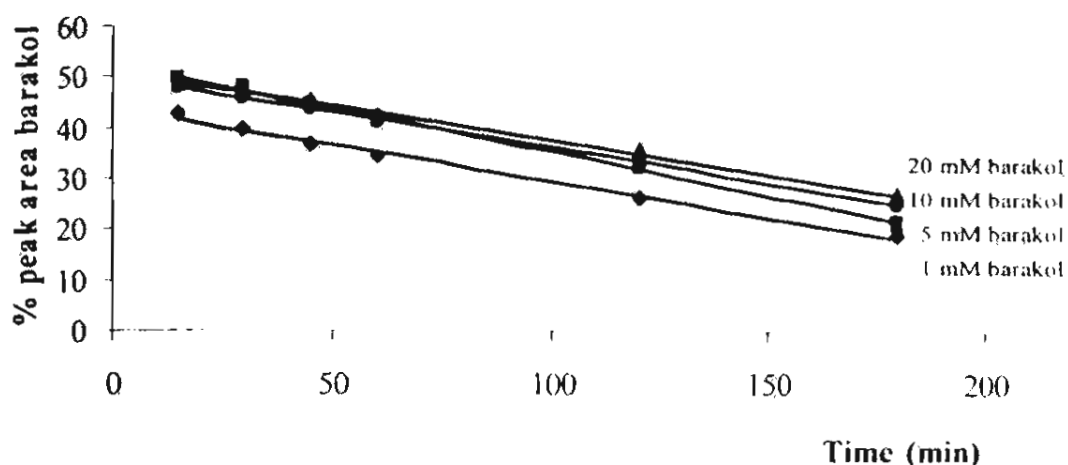
5. การศึกษาอัตราเร็วของการสลายตัวของบาราคอลในสารละลายต่างที่ pH ต่าง ๆ

เพื่อศึกษาปัจจัยของ pH ในสารละลายต่างต่ออัตราเร็วของการสลายตัวของบาราคอล จึงเตรียมบาราคอลในสารละลายต่างที่ pH ต่าง ๆ กัน คือ 8, 10, 11, 12 และ 13 พบว่าอัตราเร็วของการสลายตัวของบาราคอลในสารละลายต่างที่ pH 8-10 จะเป็นไปอย่างช้า ๆ และอัตราเร็วการสลายตัวจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อบาราคอลอยู่ในสารละลายต่างตั้งแต่ pH 11 (รูปที่ 8) โดยที่ในสารละลายต่าง pH 13 ซึ่งมีอัตราการสลายตัวอย่างรวดเร็วโดยเหลือบาราคอลประมาณ 21 % เมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีและสลายไปเกือบหมดเมื่อเวลาผ่านไป 360 นาที เมื่อวิเคราะห์ค่าคงที่ของอัตราเร็วการสลายตัว (degradation rate constant, K_{obs}) ที่ pH 12 และ 13 นั้นมีค่าเท่ากับ 0.00003 และ 0.00960 ต่อนาที ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการเพิ่ม pH ในสารละลายต่างมีบทบาทสำคัญต่ออัตราเร็วของการสลายตัวของบาราคอล



รูปที่ 8 อัตราเร็วของการสลายตัวของบาราคอลในสารละลายต่างในช่วง pH 8-12

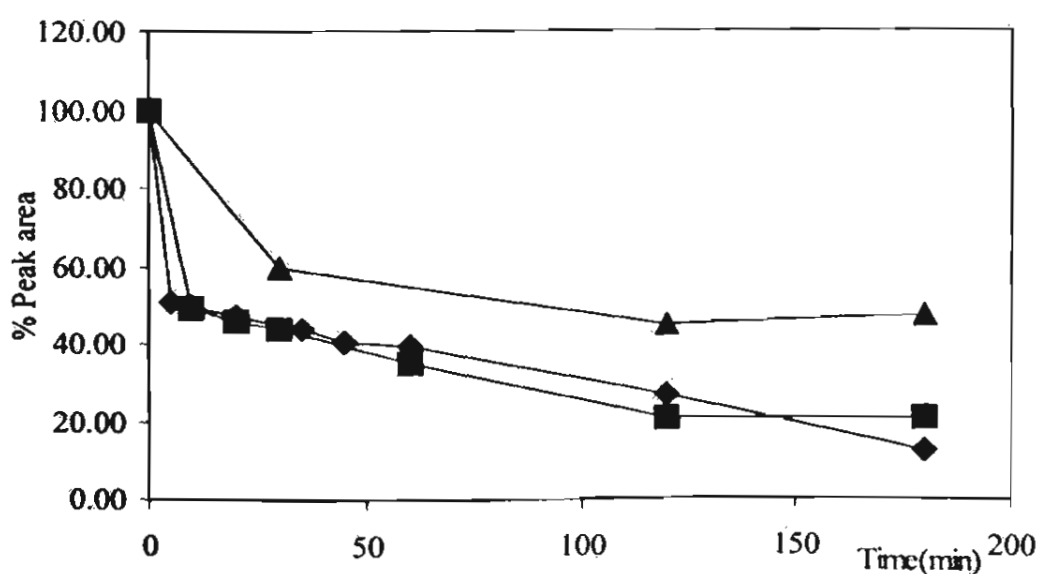
ดังนั้นเพื่อศึกษาจลนพลศาสตร์ (kinetics) ของการสลายตัวของบาราคอลในสารละลายต่างที่ pH 13 จึงใช้บาราคอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 1, 5, 10 และ 20 มิลลิโมลาร์ พบว่าค่าความชันของกราฟทุกความเข้มข้นเป็นไปในทิศทางเดียวกัน (รูปที่ 9) และความสัมพันธ์ระหว่างค่าพื้นที่ใต้กราฟของบาราคอลและเวลามีลักษณะเส้นตรงโดยมีค่า correlation coefficient เท่ากับ 0.99 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอัตราเร็วของการสลายตัวของบาราคอลในสารละลายต่างที่ pH 13 นั้นไม่ได้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของบาราคอล สรุปได้ว่ารูปแบบจลนพลศาสตร์ของการสลายตัวของบาราคอลในสารละลายต่างที่ pH 13 เป็นแบบ zero-order kinetics



รูปที่ 9 รูปแบบจลนพลศาสตร์ของการสลายตัวของบาราคอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในสารละลายต่าง ๆ ที่ pH 13

6. การศึกษาอัตราเร็วของการสลายตัวของบาราคอลในสารละลายต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

นอกเหนือจากปัจจัยด้าน pH แล้ว ปัจจัยด้านความแรงของไอออน (ionic strength) ก็อาจส่งผลต่ออัตราเร็วของการสลายตัวของบาราคอล จึงศึกษาบาราคอลละลายในสารละลายต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือที่ 0.02, 0.05 และ 0.1 M NaOH พบว่าบาราคอลในสารละลายต่าง ๆ ที่ pH 0.02 จะสลายตัวอย่างช้า ๆ ในขณะที่บาราคอลในสารละลายต่าง ๆ ที่ pH 0.05 และ 0.1 M NaOH สลายตัวอย่างรวดเร็วในช่วง 10 นาทีแรก โดยเหลือบาราคอลเพียง 50 % (รูปที่ 10) แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของ NaOH ที่มากขึ้นทำให้ต่างไปจับโปรตอนและดึงออกจากโครงสร้างของบาราคอล หรือเกิดปฏิกิริยาอื่นซึ่งต้องรอการพิสูจน์โครงสร้างของบาราคอลที่สลายตัวด้วยเทคนิค LC-MS ต่อไป



รูปที่ 10 อัตราเร็วของการสลายตัวของบาราคอลในสารละลายต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 0.02 M NaOH (▲), 0.05 M NaOH (■) และ 0.1 M NaOH (◆)

7. การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการสลายตัวของบาราคอลในสารละลายต่าง

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการสลายตัวของบาราคอลในสารละลายต่างที่ pH 13 โดยเลือกช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 12, 23, 41, 51 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส บาราคอลเริ่มสลายตัวไปเกือบหมด 100 % ที่ 10 นาทีแรก เมื่อศึกษาจากค่าคงที่ของอัตราเร็วของการสลายตัว (degradation rate constant, K_{obs}) และนำมาคำนวณค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) และค่า shelf-life (t_{90}) พบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นอัตราเร็วของการสลายตัวเร็วขึ้น โดยค่าครึ่งชีวิตและค่า shelf-life จะลดอย่างรวดเร็ว (ตารางที่ 3) แสดงว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่ไปเร่งการสลายตัวของบาราคอลในสารละลายต่าง

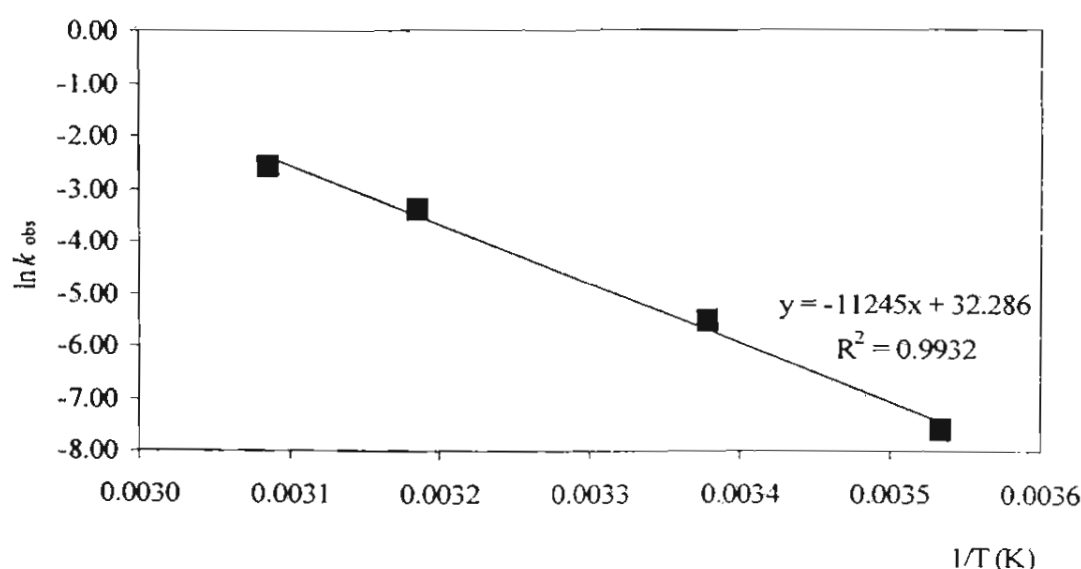
ตารางที่ 3 ค่า K_{obs} ค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) ค่า shelf-life (t_{90}) ของบาราคอลเมื่ออยู่ในสารละลายต่างที่ pH 13

อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	$K_{obs}(\text{min}^{-1})$	$t_{1/2}(\text{min})^*$	$t_{90}(\text{min})^{**}$
12	0.014	49.50	7.53
23	0.17	4.08	0.62
41	0.68	1.02	0.16

* การคำนวณค่าครึ่งชีวิต หรือ $t_{1/2}$ เท่ากับ $0.693 / K_{obs}$

** การคำนวณค่า shelf-life หรือ t_{90} เท่ากับ $0.1054 / K_{obs}$

เพื่อศึกษาปัจจัยของอุณหภูมิต่อจลนพลศาสตร์ของการสลายตัวของบาราคอลในสารละลายต่างที่ pH 13 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 12, 23, 41 และ 51 องศาเซลเซียส จึงได้นำมาสร้างกราฟ Arrhenius plot พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าคงที่อัตราเร็วของการสลายตัวของบาราคอลและอุณหภูมิ เป็นเส้นตรง (รูปที่ 11) คำนวณค่า energy of activation (E_a) เท่ากับ $22.344 \text{ kcal mol}^{-1}$ ซึ่งเป็นค่าที่บ่งชี้ถึงปฏิกิริยา hydrolysis ที่อยู่ในช่วง $10\text{-}30 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Connors 1990)



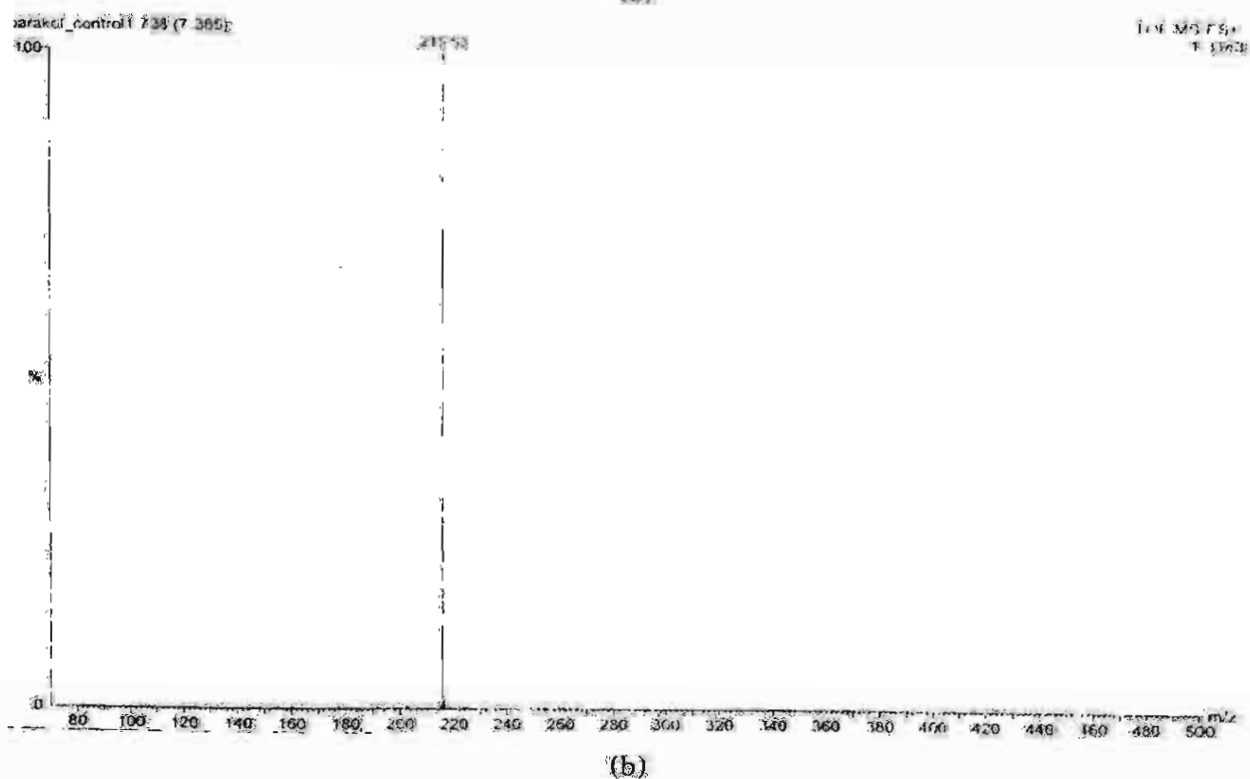
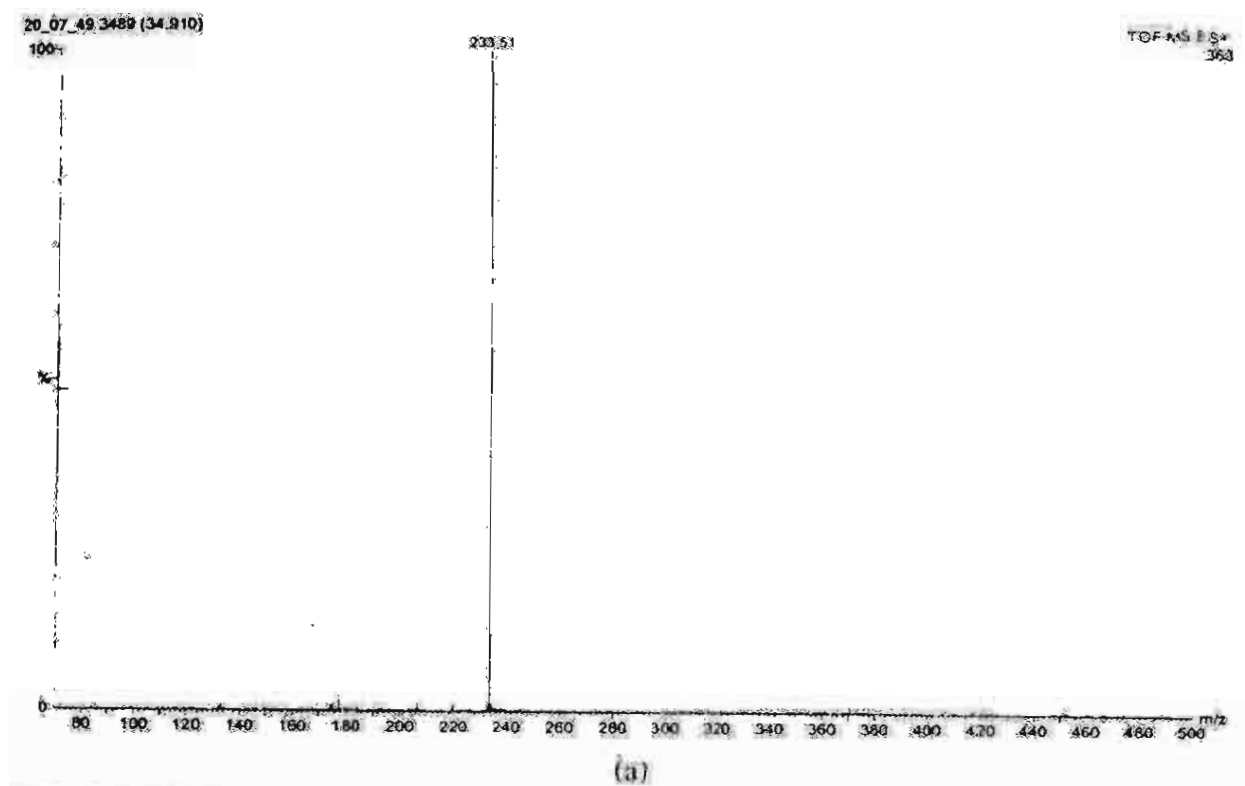
รูปที่ 11 Arrhenius plot สำหรับอัตราเร็วของการสลายตัวบาราคอลในสารละลายต่าง (pH 13) ที่อุณหภูมิ 12, 23, 41 และ 51 องศาเซลเซียส

8. การวิเคราะห์มวลโมเลกุลของสารที่ได้จากการสลายตัวของบาราคอลด้วยเทคนิค LC-MS

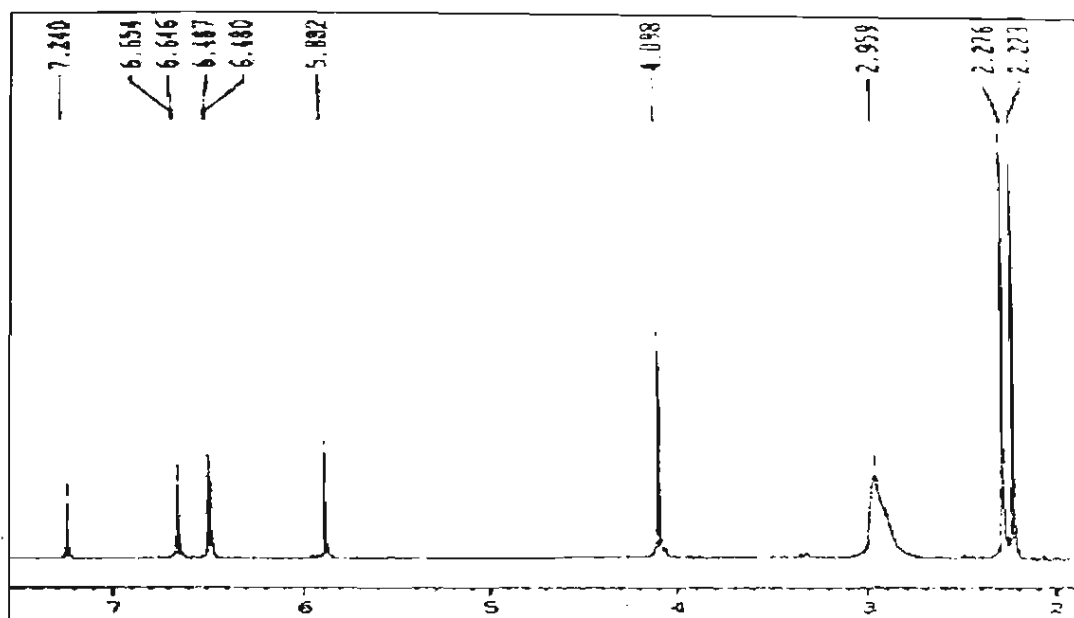
เมื่อวิเคราะห์มวลโมเลกุลของสารที่สลายตัวของบาราคอลเมื่ออยู่ในสารละลายต่างด้วยเทคนิค LC-MS โดยใช้ positive electrospray ionization (ESI) mode พบว่าสเปกตรัมของสารที่สลายตัวและสอดคล้องกับค่า t_R บนโครมาโทแกรมเท่ากับ 33.91 นาทีนั้น (รูปที่ 4b) ปรากฏค่ามวลเท่ากับ 233.51 $[M+H]^+$ (รูปที่ 12a) ในขณะที่มวลของบาราคอล ซึ่งมีค่า t_R บนโครมาโทแกรมเท่ากับ 5.97 นาที จะปรากฏค่ามวลเท่ากับ 215.53 $[M+H]^+$ (รูปที่ 12b) นอกจากนี้สารละลายบาราคอลจะสลายตัวเมื่ออยู่ในสถานะอุณหภูมิสูงโดยปรากฏค่า t_R บนโครมาโทแกรมเท่ากับ 34.41 นาที นั้นไม่สามารถตรวจวัดด้วยเทคนิค LC-MS ได้โดยตรงเนื่องจากปริมาณสารที่สลายตัวพบน้อยมากไม่ถึง 10 % (รูปที่ 4c) จึงได้ประยุกต์วิธีการโดยนำสารละลายบาราคอลในสถานะอุณหภูมิสูงไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ESI mass spectrometry โดยตรง พบว่ามีค่ามวล 232.6 ซึ่งเท่ากับค่ามวลของบาราคอลที่สลายตัวเมื่ออยู่ในสารละลายต่าง และสอดคล้องกับค่ามวลโมเลกุลของ cassiachromone ที่ได้เคยมีรายงานไว้ (Bycroft et al., 1970; Wagner et al., 1978) ดังนั้น จึงต้องทำการพิสูจน์โครงสร้างของสารที่ได้จากการสลายตัวของบาราคอลในสถานะการทดลองดังกล่าวว่าเป็น cassiachromone ด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีต่อไป

9. การพิสูจน์โครงสร้างของสารที่ได้จากการสลายตัวของบาราคอลด้วยเทคนิค NMR

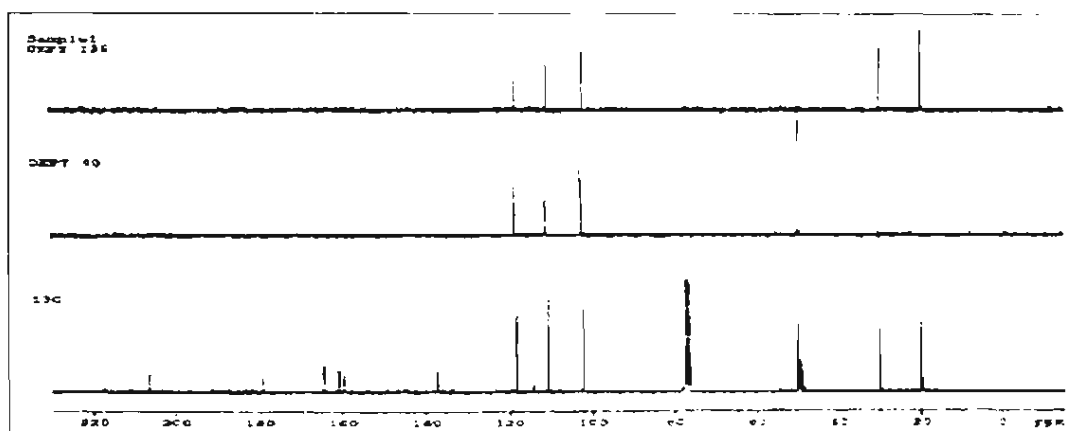
เพื่อพิสูจน์โครงสร้างของบาราคอลที่สลายตัวไปในสถานะต่างและในสถานะอุณหภูมิสูง จึงได้นำบาราคอลมาละลายในสารละลายต่างเช่นเดียวกับสถานะที่ศึกษาศึกษาความคงตัว และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS จากนั้น นำมาดักผลึกและวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค NMR spectroscopy พบว่าสเปกตรัมของ 1H -NMR และ ^{13}C NMR ที่ได้ (รูปที่ 13) นำมาเปรียบเทียบกับค่า chemical shift (ตารางที่ 4) ที่ได้เคยรายงานไว้พบว่าสอดคล้องกับของโครงสร้าง cassiachromone (Bycroft et al., 1970; Wagner et al., 1978) ดังนั้น บาราคอลในสถานะต่างได้สลายตัวไปเป็น cassiachromone และจากผลการทดลองปรากฏมวลในสเปกตรัมที่ได้จากเทคนิค LC-MS ของบาราคอลที่สลายตัวไปเมื่ออยู่ในสารละลายต่างและในสถานะอุณหภูมิสูง (รูปที่ 12a) มีค่าเท่ากับ 233.51 $[M+H]^+$ นอกจากนี้สเปกตรัมของบาราคอลในสารละลายต่างและในสถานะอุณหภูมิสูง แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดที่เดียวกันคือ 292 นาโนเมตร (รูปที่ 6b และ 6c) สรุปได้ว่าโครงสร้างของบาราคอลที่สลายตัวในสถานะต่างและในสถานะอุณหภูมิสูงนั้นเป็นตัวเดียวกันคือ cassiachromone



รูปที่ 12 สเปกตรัมที่ได้จากเทคนิค LC-MS แสดง (a) ค่ามวลของสารที่ได้จากการสลายตัวของบาราคอลเมื่ออยู่ในสารละลายต่าง และ (b) ค่ามวลของบาราคอล



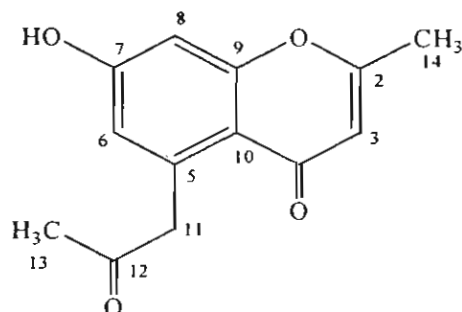
(a)



(b)

รูปที่ 13 สเปกตรัม (a) ^1H NMR และ (b) DEPT-NMR ของ cassiachromone ในตัวทำละลาย CDCl_3 และ CD_3OD

ตารางที่ 4 ค่า chemical shift ของโปรตอนและคาร์บอนในโครงสร้าง cassiachromone เปรียบเทียบกับค่าที่ได้เคยรายงานไว้โดย Wagner และคณะ



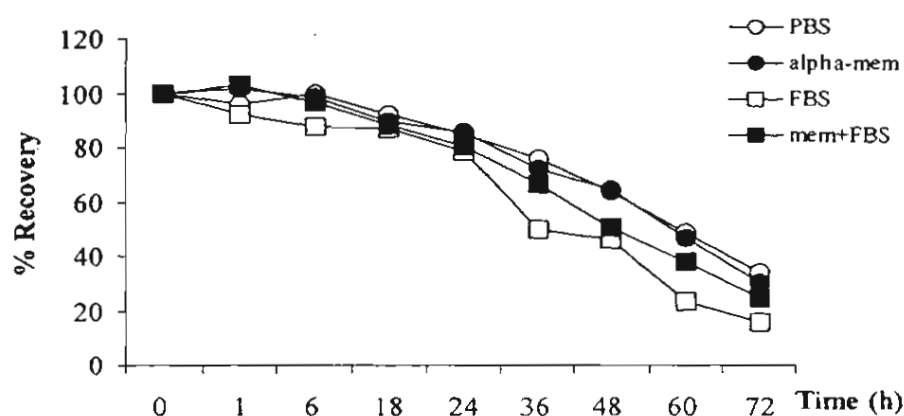
Cassiachromone
 m/z 233.51 $[M+H^+]$

ตำแหน่ง	H-1		C-13	
	$CDCl_3+CD_3OD$	Wagner 1978 ($CDCl_3$)	$CDCl_3+CD_3OD$	Wagner 1978 (DMSO- d_6)
1	-	-	-	-
2	-	-	160.904	160.4
3	5.882 (s)	5.91 (s, br)	110.364	109.9
4	-	-	179.234	177.0
5	-	-	137.361	137.6
6	6.485 (d, 2.13 Hz)	6.60 (d)	118.226	117.6
7	-	-	164.557	163.7
8	6.650 (d, 2.24 Hz)	6.76 (d, 2 Hz)	102.069	101.0
9	-	-	159.534	158.4
10	-	-	114.092	113.5
11	4.098 (s)	4.18	49.663	48.8
12	-	-	206.475	203.5
13	2.223 (s)	2.30, 2.31(s, 6H)	19.969	19.3
14	2.276 (s)	-	29.938	29.7

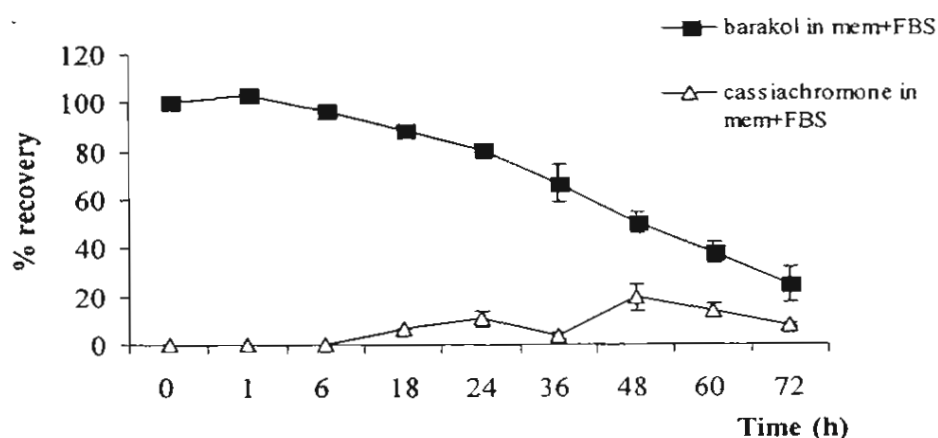
10. การศึกษาความคงตัวของบาราคอลในสภาวะของการเลี้ยงเซลล์

สรุปจากผลการทดลองการศึกษาความคงตัวของบาราคอลในสภาวะเร่งดังกล่าวข้างต้น พบว่าบาราคอลไม่คงตัวในสภาวะต่าง สภาวะอุณหภูมิสูง หรือเมื่อมีสารละลายที่มี oxidant เช่น H_2O_2 ร่วมอยู่ด้วย ดังนั้น ก่อนที่จะศึกษาความเป็นพิษของบาราคอลต่อเซลล์เพาะเลี้ยง จึงต้องศึกษาความคงตัวของบาราคอลในสภาวะของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณบาราคอลจะลดลงในทุกสภาวะ และเมื่อเวลาผ่านไป 18 ชั่วโมง (รูปที่ 14A) อีกทั้งยังพบพิษของสารที่ได้จากการสลายตัวของบาราคอลโดยแสดงค่า t_r เท่ากับ 32.61 นาติ (รูปที่ 14B) นั้นเพิ่มขึ้น ที่น่าสังเกตคือเมื่อเวลานานกว่า 48 ชั่วโมง พบว่าพื้นที่ภายใต้พีคบาราคอลกลับลดลงอย่างรวดเร็ว (รูปที่ 14A) แสดงให้เห็นว่าบาราคอลไม่คงตัวในสภาวะเลี้ยงเซลล์ ณ เวลาดังกล่าว ซึ่งจะต้องพึงระมัดระวังในการวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์นั้นมาจากบาราคอลร่วมกับบาราคอลที่สลายตัว เมื่อวิเคราะห์สเปกตรัมของพื้นที่ใต้พีค t_r เท่ากับ 32.61 นาติ พบว่าค่าความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ที่ 292 นาโนเมตร (รูปที่ 14 Ca) สอดคล้องกับสเปกตรัมของ cassiachromone ที่ได้จากการสลายตัวของบาราคอลเมื่ออยู่ในสารละลายต่าง (รูปที่ 14Cb) หรืออยู่ในสภาวะอุณหภูมิสูง (รูปที่ 14Cc) จึงเป็นไปได้ว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีบาราคอลและบ่มนานกว่า 18 ชั่วโมงนั้น ความเป็นพิษต่อเซลล์นั้นเป็นผลมาจากพิษของบาราคอลร่วมกับพิษของ cassiachromone ซึ่งเป็นสารที่ได้จากการสลายตัวของบาราคอล

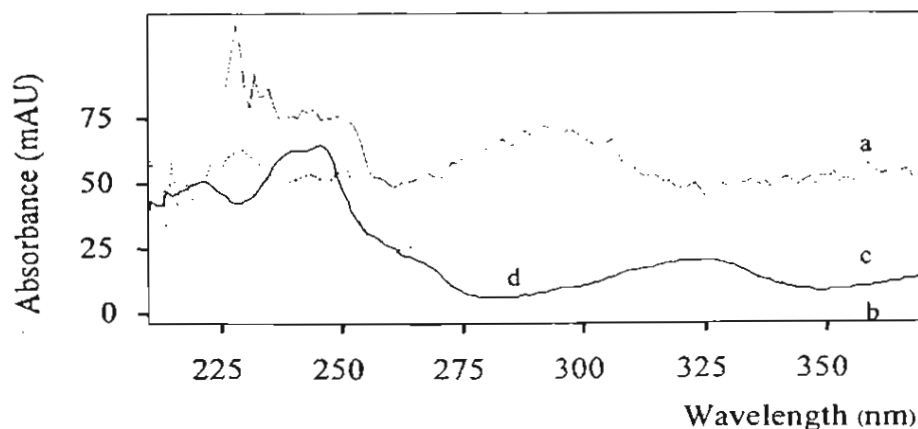
(A)



(B)



(C)



รูปที่ 14 การศึกษาความคงตัวของบาราคอลในสภาวะใช้เลี้ยงเซลล์ฟิสิบเก้า (A) เมื่ออยู่ในบัฟเฟอร์ PBS, alpha MEM, FBS, และ alpha MEM ที่ผสมซีรัม FBS (B) พบฟิเคบาราคอลที่สลายตัว แสดงค่า t_r เท่ากับ 32.61 นาที (C) สเปกตรัมของพื้นที่ได้ฟิเค t_r เท่ากับ 32.61 นาที (a) แสดงค่า การดูดกลืนแสงสูงสุดของบาราคอลที่สลายตัวในสภาวะเลี้ยงเซลล์ ที่ 292 นาโนเมตร เมื่อ เปรียบเทียบกับสเปกตรัมของ (b) cassiachromone ที่ได้จากบาราคอลในสารละลายต่าง (c) บาราคอลในสภาวะอุณหภูมิสูง และ (d) บาราคอล

บทที่ 4

ความเป็นพิษของบาราคอลต่อเซลล์มะเร็งเอ็มบริโอพีสิบแก้ว

สารเคมี

1. Actin (C-2)-HRP antibody (catalog number sc-8432 HRP; Santa Cruz Biotechnology)
2. Agarose gel (catalog number 15510-019; GIBCO)
3. All-*trans* retinoic acid (catalog number R2625; Sigma)
4. α -MEM (catalog number 11900-016; GIBCO)
5. Aprotinin (catalog number A6279; Sigma)
6. Boric acid (catalog number 1128904; Merck)
7. Bovine serum albumin (catalog number A7906; Sigma)
8. Caspase-9 fluorometric assay kit (catalog number K118-25; Biovision)
9. Catalase from bovine liver (catalog number C40; Sigma)
10. Chloroform: isoamyl alcohol (24:1) (catalog number FBRBP 1752I-100; Fisher)
11. Cytosine arabinoside (catalog number C1768; Sigma)
12. 100 base pair DNA ladder (catalog number 27400101; Amersham Pharmacia)
13. Deferoxamine mesylate (catalog number D9533; Sigma)
14. 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) (catalog number D6883; Sigma)
15. Dimethylsulfoxide (catalog number D2650; Sigma)
16. EDTA (catalog number K3101118; Merck)
17. Ethanol (catalog number K32983183; Merck)
18. Ethidium bromide (catalog number 46065; Fluka)
19. Fetal bovine serum (catalog number S0113; BIOCHOM AG)
20. Glutathione (catalog number G4251; Sigma)
21. Hoechst 33342 (catalog number B2261; Sigma)
22. MnTBAP, Manganese (III) tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin chloride (catalog number M-1018; A.G scientific, INC)
23. Mouse Anti-Bcl-2 antibody (catalog number sc-509 HRP; Santa Cruz Biotechnology)
24. N-acetyl-L-cysteine (catalog number A9165; Sigma)
25. Newborn calf serum (catalog number LTG-16010-159; GIBCO)
26. P19 cells (catalog number CRL-1825; ATCC)
27. Pefabloc (catalog number RT-1429868; Roche)

28. Phenazine methosulfate (catalog number P9625; Sigma)
29. Phenol (catalog number K16456006; Merck)
30. Poly-L-lysine (catalog number P6282; Sigma)
31. Propidium iodide (catalog number P4170; Sigma)
32. Proteinase K (catalog number E762304; USB)
33. Ribonuclease A (catalog number R5503; Sigma)
34. Sodium acetate (catalog number TA690367; Merck)
35. Sodium chloride (catalog number K31445404; Merck)
36. Sodium deoxycholate (catalog number D6750; Sigma)
37. Sodium dodecylsulfate (catalog number L488460; Merck)
38. Sodium fluoride (catalog number 1690; Univar)
39. Sodium formate (catalog number 456020; Aldrich)
40. Sodium orthovanadate ((catalog number S6508; Sigma)
41. SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (catalog number PIE 34080; Pierce)
42. Tetrazolium salt XTT (2, 3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (catalog number X4251; Sigma)
43. Tris-HCl (catalog number T3253; Sigma)
44. Trypsin (catalog number T4799; Sigma)
45. 0.25% (w/v) trypsin-1 mM EDTA (catalog number 25200-056; GIBCO)
46. Tween 20 (catalog number BP337-500; Fisher Biotech)

วัสดุ

1. Cryobox (catalog number 5100-0001; Nalgene)
2. Cryovial (catalog number 430659; Corning)
3. Centrifuge tube 15 ml (catalog number 430052; NUNC)
4. Culture flask T 25 (25 cm³) (catalog number 156367; NUNC)
5. 6-well plate (catalog number 140675; NUNC)
6. 96-well plate (catalog number 167008; NUNC)
7. Polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (catalog number P66543; Pall)

อุปกรณ์

1. CO₂ incubator (Forma Scientific 3121, สหรัฐอเมริกา)
2. Bench-top Centrifuge (Hettich, เยอรมัน)

3. Electrophoresis (Bio-Rad Mini-PROTEAN 3, สหรัฐอเมริกา)
4. Power supply สำหรับ electrophoresis (EC minicell EC 370M , สหรัฐอเมริกา)
5. Flow cytometer (FACscan Becton Dickinson, สหรัฐอเมริกา)
6. Fluorescence microplate reader (Perkin Elmer, model VICTOR³, สิงคโปร์)
7. Fluorescence microscope (Olympus IX51, ญี่ปุ่น)
8. Gel documentation (Bio-Rad Universal Hood II; อิตาลี)
9. Hemocytometer (Bright-line; Hausser Scientific, สหรัฐอเมริกา)
10. Laminar flow (ISSO model BV 2225, ไทย)
11. Microplate reader (Anthos htI, ออสเตรีย)
12. UV transilluminator (UVP-CA91786 , สหรัฐอเมริกา)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเลี้ยงเซลล์มะเร็งเอ็มบริโอพีลิกเก้

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์พีลิกเก้จำนวน $2-3 \times 10^5$ เซลล์ต่อฟลาสค์เลี้ยงเซลล์ขนาด T25 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย α -MEM (90%) ผสมกับ 2.5% FBS และ 7.5% NCS บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เลี้ยงจนได้เซลล์ประมาณ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการ passage ด้วยอัตราส่วน 1:10 ทุก 2-3 วัน

วิธีการ passage เซลล์

ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก ทำการล้างผิวหน้าเซลล์ด้วยเอนไซม์ 0.25% (w/v) trypsin จำนวน 0.5 มิลลิลิตรแล้วดูดออก จากนั้นใส่ trypsin จำนวน 1 มิลลิลิตรลงในฟลาสค์ และดูได้กลิ่นสังเกตุเห็นเซลล์เริ่มหลุดตัวกลม (ใช้เวลาประมาณ 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง) เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ 2 มิลลิลิตรเพื่อหยุดปฏิกิริยาของ trypsin จากนั้นใช้ปิเปตดูดเป่าเบา ๆ เพื่อให้เซลล์กระจายตัวเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ นับจำนวนเซลล์บนแผ่นสไลด์ hemocytometer และหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ จากนั้นแบ่งเซลล์ให้มีจำนวนเริ่มต้น $2-3 \times 10^5$ เซลล์ แล้วเติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์จนครบ 5 มิลลิลิตรต่อฟลาสค์ขนาด T25 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์

2. การศึกษาความเป็นพิษของบาราคอลต่อเซลล์พีลิกเก้ด้วยวิธี XTT

2.1 การศึกษาความเป็นพิษของบาราคอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

เลี้ยงเซลล์พีลิกเก้ในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม โดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้น $1-2 \times 10^4$ เซลล์ต่อหลุม บ่มข้ามคืนที่ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมบาราคอลให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.05-4.0 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นาน 24, 36, 48, 60,

และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ดูอาหารเก่าทิ้ง และเติมสี XTT ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ 1 มิลลิลิตรที่มี PMS 25 ไมโครโมลาร์ บ่มไว้ 4 ชั่วโมง จากนั้นอ่านผลด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับบาราคอล คำนวณค่าร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์ โดยใช้สมการ

$$\text{ค่าร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์ (\% cell viability)} = \frac{\text{Absorbance (sample)}}{\text{Absorbance (control)}} \times 100$$

2.2 การศึกษาความเป็นพิษของบาราคอลที่เวลาต่าง ๆ กัน

เลี้ยงเซลล์ที่สปีดเก้าในงานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม โดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้น $1-2 \times 10^4$ เซลล์ต่อหลุม บ่มข้ามคืนที่ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% จากนั้นดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมบาราคอลให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1.5 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลาต่างๆ กัน ดังนี้ 6, 12, 14, 16, 18, และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ดูอาหารเก่าทิ้ง และเติมสี XTT ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ 1 มิลลิลิตรที่มี PMS 25 ไมโครโมลาร์ บ่มไว้ 4 ชั่วโมง จากนั้นอ่านผลด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับบาราคอล คำนวณค่าร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์

3. การศึกษารูปแบบการตายของเซลล์ที่สปีดเก้าด้วยเทคนิคต่าง ๆ

3.1 เทคนิคการย้อมเซลล์ด้วยสี Hoechst 33342

เลี้ยงเซลล์ในงานเพาะเลี้ยงชนิด 6 หลุม บ่มข้ามคืนที่ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% จนได้เซลล์ประมาณ 80% confluence จากนั้นดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมบาราคอลให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.2-1.5 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เติมน้ำสี Hoechst 33342 ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มในที่มืดที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำไปดูได้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเรืองแสง fluorescence

3.2 เทคนิคการย้อมเซลล์ด้วยสี propidium iodide วิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer

เลี้ยงเซลล์ในงานเพาะเลี้ยงชนิด 6 หลุม บ่มข้ามคืนที่ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% จนได้เซลล์ประมาณ 80% confluence จากนั้นดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมบาราคอลให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.4 และ 1.5 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา จากนั้นดูดเซลล์ และล้างเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ PBS นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,300 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทบัฟเฟอร์ PBS ออก แล้วตรึงเซลล์ด้วย 70% EtOH ลงไป บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด นาน 24 ชั่วโมง ปั่นที่ความเร็ว 1,300 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศา

เซลล์เชยส เป็นเวลา 10 นาที ดูด EtOH ออก และเติมบัฟเฟอร์ PBS จำนวน 1 มิลลิลิตร เติมนิวคลีเอส RNase A ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครโมลาร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นย้อมด้วยสี propidium iodide โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด นาน 20-30 นาที นำไปวัดผลด้วยเครื่อง flow cytometer (Warrington et al., 2003)

3.3 เทคนิค agarose gel electrophoresis

เลี้ยงเซลล์ในงานเพาะเลี้ยงชนิด 6 หลุม ที่ความหนาแน่นเริ่มต้น 1×10^6 เซลล์ต่อหลุม บ่มข้ามคืนที่ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมบาราคอลให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการดูดเซลล์ที่ติดกับจานเพาะเลี้ยงรวมกับเซลล์ที่ลอยอยู่ในอาหาร จากนั้นนำไปปั่นที่ 1,200 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดเอาอาหารออกและล้างเซลล์ที่ตกตะกอนอยู่ด้วยบัฟเฟอร์เย็น PBS ทำซ้ำเช่นนี้อีกครั้ง จากนั้นดูดบัฟเฟอร์ PBS ออกและเติมบัฟเฟอร์ lysis (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM NaCl, 10 mM EDTA 100 µg/ml proteinase K และ 0.5% SDS) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วย phenol (ที่ถูกสะเทินด้วยบัฟเฟอร์ TE pH 7.5 มาก่อนหน้าแล้ว) จำนวน 2 มิลลิลิตร และเติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) จำนวน 1 มิลลิลิตร ต่อมานำเฉพาะชั้นน้ำด้านบนมาเติม EtOH ที่เย็นปริมาตร 2-5 เท่า หลังจากนั้นเติม 3 M NaOAc pH 5.2 จำนวน 1 เท่าของปริมาตรชั้นน้ำที่มีดีเอ็นเอ บ่มที่ -20 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ค้างคืน นำมาปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำดีเอ็นเอที่ได้ละลายด้วยบัฟเฟอร์ (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.1 µg/ml RNase A) วัดผลรูปแบบการตายของเซลล์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ดีเอ็นเอประมาณ 20 ไมโครกรัมต่อ 1 หลุมบน 1.5% agarose gel ที่แช่ในบัฟเฟอร์ TBE วิ่งในสนามไฟฟ้ากระแสตรง 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ย้อมดีเอ็นเอบนเจลด้วยสี ethidium bromide นาน 20 นาที ส่องภายใต้ UV transilluminator อ่านผลที่ได้เปรียบเทียบกับระหว่างดีเอ็นเอของเซลล์ที่สับแก้วที่ปล่อยให้ตายตามธรรมชาติโดยเลี้ยงไว้นาน 4 วัน และดีเอ็นเอมาตรฐานคือ 100 base-pair DNA ladder

4. การศึกษากลไกการตายของเซลล์ผ่านทางอนุมูลอิสระ

4.1 การวัดปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ที่ได้รับบาราคอล

หลักการใช้สี 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) เพื่อวัดปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ คือสี DCFH-DA ถูกกล้ำเลี้ยงเข้าเซลล์และถูกเอนไซม์ esterase ย่อยให้เป็นสาร 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระเช่น hydrogen peroxide ได้เป็น 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) ที่เรืองแสง (McArdle et al., 2005) ตรวจวัด

ปริมาณการเรืองแสงซึ่งแปรผันตามปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ด้วยเครื่อง flow cytometer ในการทดลองนำเซลล์ที่อยู่ในช่วง 80% confluence มาล้างด้วยบัฟเฟอร์เย็น PBS จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ PBS ลงไป 15 มิลลิลิตรและเติม DCFH-DA ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 มิลลิโมลาร์ นำไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว คูดส์ออก เติมน้ำบัฟเฟอร์เย็น PBS ทำการขูดเซลล์และนำไปหลอดทดลอง จากนั้นเติมบาราคอลให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.4 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 15 – 180 นาที วิเคราะห์ปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ด้วยเครื่อง flow cytometer โดยตั้งค่าความยาวคลื่น excitation ที่ 488 นาโนเมตร และความยาวคลื่น emission ที่ 525 นาโนเมตร

4.2 การวัดปริมาณอนุมูลอิสระในเซลล์ที่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระก่อนได้รับบาราคอล

นำเซลล์ที่อยู่ในช่วง 80% confluence มาล้างด้วยบัฟเฟอร์เย็น PBS จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ PBS ลงไป 15 มิลลิลิตรและเติม DCFH-DA ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 มิลลิโมลาร์ นำไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว คูดส์ออก เติมน้ำบัฟเฟอร์เย็น PBS ทำการขูดเซลล์รวบรวมใส่หลอดทดลอง เติมสารต้านอนุมูลอิสระ GSH หรือ NAC ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นาน 30 นาที จากนั้น เติมน้ำบาราคอลให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.4 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ด้วยเครื่อง flow cytometer

4.3 การวิเคราะห์ชนิดของอนุมูลอิสระภายในเซลล์เมื่อเซลล์ได้รับบาราคอล

การวิเคราะห์ชนิดของอนุมูลอิสระที่อยู่ในวิธีการกำจัดอนุมูลอิสระโดยใช้ MnTBAP ซึ่งเป็น superoxide dismutase mimetic ที่เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยน superoxide anion ให้เป็น hydrogen peroxide (Lee et al., 2005) ซึ่งจะถูกลำลายได้น้ำและออกซิเจนโดยอะคัยเอนไซม์ catalase หรือเอนไซม์ glutathione peroxidase ถ้าเอนไซม์ทั้งสองชนิดไม่สามารถทำงานได้ จะทำให้มีการสะสม hydrogen peroxide ภายในเซลล์มากขึ้นซึ่งจะเปลี่ยนเป็นอนุมูล hydroxy โดยอาศัยปฏิกิริยา Fenton ซึ่งปฏิกิริยานี้จะถูกยับยั้งด้วย sodium formate ในการทดลองนี้จึงได้ทำการเลี้ยงเซลล์จนได้ 80% confluence ล้างเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์เย็น PBS จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ PBS ลงไป 15 มิลลิลิตรและเติม DCFH-DA ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว คูดส์ออก เติมน้ำบัฟเฟอร์เย็น PBS ทำการขูดเซลล์รวบรวมใส่หลอดทดลอง เติมน้ำสารต้านอนุมูลอิสระ MnTBAP, catalase หรือ sodium formate ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นาน 30 นาที จากนั้น เติมน้ำบาราคอลให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.4 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ด้วยเครื่อง flow cytometer

5. การศึกษาผลกระทบการตายของเซลล์ผ่านทางวิถีโปรตีน Bcl-2

5.1 การวิเคราะห์ระดับโปรตีน Bcl-2 ในเซลล์ที่ได้รับบาราคอลด้วยเทคนิค Western Blot

การเลี้ยงเซลล์ในงานเพาะเลี้ยงชนิด 6 หลุม บ่มข้ามคืน เพื่อให้เซลล์เกาะพื้นงานเพาะเลี้ยงและจนได้เซลล์ประมาณ 80% confluence จากนั้นดูดอาหารออกและเติมบาราคอลที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.4, 1.0 และ 1.5 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นาน 9 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้หยุดการทำงานของเซลล์โดยนำเซลล์มาวางบนน้ำแข็ง แล้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ล้างเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ PBS pH 7.4 จากนั้นย่อยเซลล์ด้วย lysis buffer [ประกอบด้วย 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 10 mM NaF, 1 mM Pefabloc, 1 mM sodium orthovanadate, 5 µg/ml aprotinin] จากนั้นขูดเซลล์ใส่หลอดทดลอง และนำมาแช่ในน้ำแข็ง นาน 30 นาที เมื่อครบเวลานำมาปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดูเอาส่วนน้ำใสมาส่วนหนึ่งไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford อีกส่วนหนึ่งนำไปวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Western Blot โดยปรับความเข้มข้นของโปรตีนให้ได้ 20 ไมโครกรัมต่อเลน จากนั้นนำมาผสมกับ loading buffer [ประกอบด้วย 60 mM Tris pH 6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM 2-mercapthoethanol, 0.1% bromophenol blue] จากนั้นหยอดโปรตีน 20 ไมโครกรัมต่อเลนลงใน 10% SDS-PAGE ที่ความต่างศักย์ 200 โวลต์ จากนั้นถ่ายโปรตีนจากแผ่นเจลไปบนเมมเบรน polyvinylidene difluoride (PVDF) โดยใช้ความต่างศักย์ที่ 90 โวลต์ จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนที่ได้บ่มด้วยนมพร่องมันเนย (5% non-fat milk) ในบัฟเฟอร์ TBST [ประกอบด้วย 10 mM Tris-Cl pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20] บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที จากนั้นติดตามโปรตีน Bcl-2 บนแผ่นเมมเบรนมาบ่มด้วย mouse anti-Bcl-2-HRP-conjugated antibody ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1.5 ชั่วโมง ล้างแผ่นเมมเบรนด้วยบัฟเฟอร์ TBST จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 7 นาที จากนั้นบ่มแผ่นเมมเบรนด้วย SuperSignal West Pico Chemiluminescent substrate นาน 5 นาที ติดตามโปรตีน Bcl-2 ด้วยการนำเมมเบรนประกบแผ่นฟิล์มเอกซเรย์ในห้องมืดนาน 10, 30 วินาที หรือ 1, 5, 10 นาที ล้างและ fix ฟิล์มด้วยน้ำยา developer และ fixer ตามลำดับ

5.2 การวิเคราะห์ระดับโปรตีน Bcl-2 ในเซลล์ที่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระก่อนได้รับบาราคอลด้วยเทคนิค Western Blot

นำเซลล์ที่อยู่ในช่วง 80% confluence เติมสารต้านอนุมูลอิสระ NAC หรือ GSH จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมบาราคอลจนได้ความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 9 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาขูดเซลล์ใส่หลอดทดลอง และนำมาวางบนน้ำแข็ง เติม lysis buffer จากนั้นดูเอาเนื้อมาใส่หลอดทดลอง และวางบนน้ำแข็ง

นาน 30 นาที เมื่อครบเวลา นำมาปั่นที่ 14,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที คัดเอาส่วนน้ำใสส่วนหนึ่งมาวัดปริมาณโปรตีน จากนั้นเตรียมตัวอย่างสำหรับทำอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยใช้ส่วนน้ำใสเติมบัฟเฟอร์ loading buffer ให้มีปริมาณโปรตีนเท่ากันในแต่ละหลอด (โปรตีน 20 ไมโครกรัมต่อหลอด) วิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค Western Blot ดังกล่าวข้างต้น

6. การศึกษากลไกการตายแบบอะพอโทสิสของเซลล์ผ่านทางวิถี caspase 9

นำเซลล์ในงานเพาะเลี้ยงชนิด 6 หลุมและอยู่ช่วง 80% confluence นำมาเติมบาราคอลโดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายระหว่าง 0.2-1.5 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้ว นับเซลล์ให้อยู่ในช่วง $1-5 \times 10^6$ เซลล์ คัดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกและล้างเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ PBS 2-3 ครั้ง นำ cell lysis buffer ที่เย็นจำนวน 50 ไมโครลิตร ชะล้างทั่วหลุมงานเพาะเลี้ยงและตั้งทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นขูดเซลล์ใส่หลอดทดลองชะด้วยบัฟเฟอร์ PBS จำนวน 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที เมื่อครบเวลา ปั่นที่ 14,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำส่วนที่เป็นน้ำใสเติม reaction buffer จำนวน 50 ไมโครลิตร ตามด้วย 1 mM LEHD-AFC substrate จำนวน 5 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครโมลาร์) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง อ่านผลด้วยเครื่อง fluorescence microplate reader โดยตั้งค่าความยาวคลื่น excitation ที่ 400 นาโนเมตร และความยาวคลื่น emission ที่ 505 นาโนเมตร

7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ทำอย่างน้อย 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ควบคุม รายงานผลในรูปของ $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$ การศึกษาความเป็นพิษของบาราคอลต่อเซลล์ที่สืบเก่าที่ขึ้นอยู่กับปัจจัยความเข้มข้น (dose-dependency) และเวลา (time-dependency) วิเคราะห์ด้วยสถิติ one-way analysis of variance ตามด้วย Turkey test เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มเซลล์ควบคุมและกลุ่มเซลล์ที่ทดสอบด้วยบาราคอล สำหรับข้อมูลเพื่อเปรียบเทียบกลุ่มทดลองตั้งแต่ 2 กลุ่มขึ้นไป วิเคราะห์ด้วยสถิติ two-way analysis of variance และ Scheffe ค่าทางสถิติที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อ $p < 0.05$

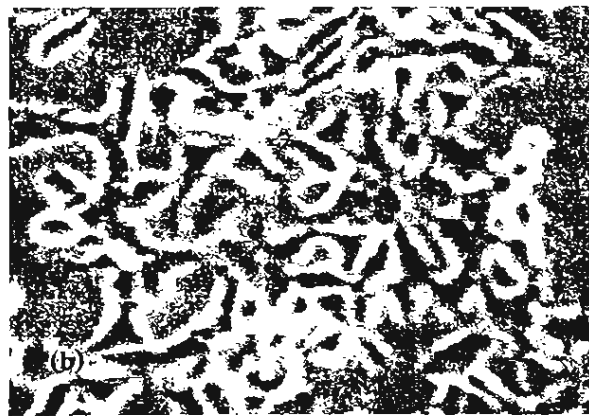
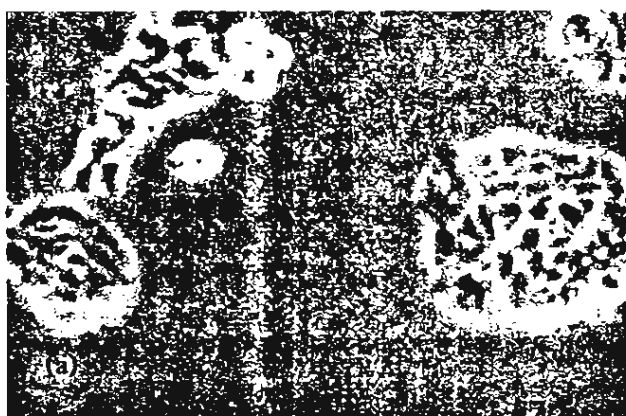
ผลการวิจัย และการอภิปรายผล

1. การเลี้ยงเซลล์มะเร็งเอ็มบริโอที่สืบเก่า

เซลล์ที่สืบเก่าในอาหารซึ่งประกอบด้วย 90% α -MEM ที่มี 2.5% FBS และ 7.5% NCS ที่เลี้ยงไปได้ 1 วันสังเกตเห็นเซลล์จะแผ่เรียงตัวกันเป็นชั้นเดียวบนพื้นพลาสติก (รูปที่ 15) เมื่อเลี้ยงไปได้ 2 วันจำนวนเซลล์จะแผ่เรียงตัวกันมากกว่า 80% ของพื้นที่พลาสติก หลังจากนั้นเซลล์จะกลมและเกาะเป็นกลุ่มก้อนเรียงตัวแน่นและเริ่มตาย โดยสังเกตจากเซลล์จะไม่เกาะกับพื้นพลาสติกแต่จะหลุดลอยตัวใน

อาหารซึ่งย้อมติดสี trypan blue เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ เซลล์ตายหรือใกล้ตายจะสังเกตเห็นทึบแสงอาจพบ granule กระจายอย่างหนาแน่นภายในเซลล์ ในขณะที่เซลล์มีชีวิตจะไม่พบ granule หรือ vacuole จึงเห็นเซลล์โปร่งและสว่าง

ข้อสังเกต เมื่อทำการ passage เซลล์ทุก 2-3 วันนั้น พบว่าเมื่อใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นน้อยเกินไป (ต่ำกว่า 1.6×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) จะทำให้เซลล์เริ่มต้นที่ใส่ลงไปอยู่อย่างกระจัดกระจายภายในพลาสติก และทำการแบ่งเซลล์เป็นทวีคูณภายในกลุ่มเซลล์ของมันเอง สังเกตรูปแบบการเจริญของเซลล์จะเกาะตัวกันเป็นกระจุก เบียดอัดกัน และเจริญเติบโตได้ไม่เต็มที่ (รูปที่ 15a) ดังนั้น จึงแก้ปัญหาโดยการใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นให้มีปริมาณเหมาะสม (ใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ 5×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) และหลังจากเลี้ยงไปได้นาน 2 วันพบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตแผ่เรียงตัวกระจายทั่วพื้นพลาสติกได้อย่างสม่ำเสมอ ได้เซลล์เป็นจำนวนมากประมาณ 2×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หรือ 60% confluence (รูปที่ 15b) เหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะจำนวนเซลล์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม จะทำให้เซลล์สามารถสื่อสารระหว่างกันได้โดยหลังโปรตีนหรือ growth factor เพื่อไปจับกับตัวรับบนเซลล์ข้างเคียงและส่งสัญญาณภายในเซลล์เพื่อกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์เป็นไปตามวัฏจักรเซลล์

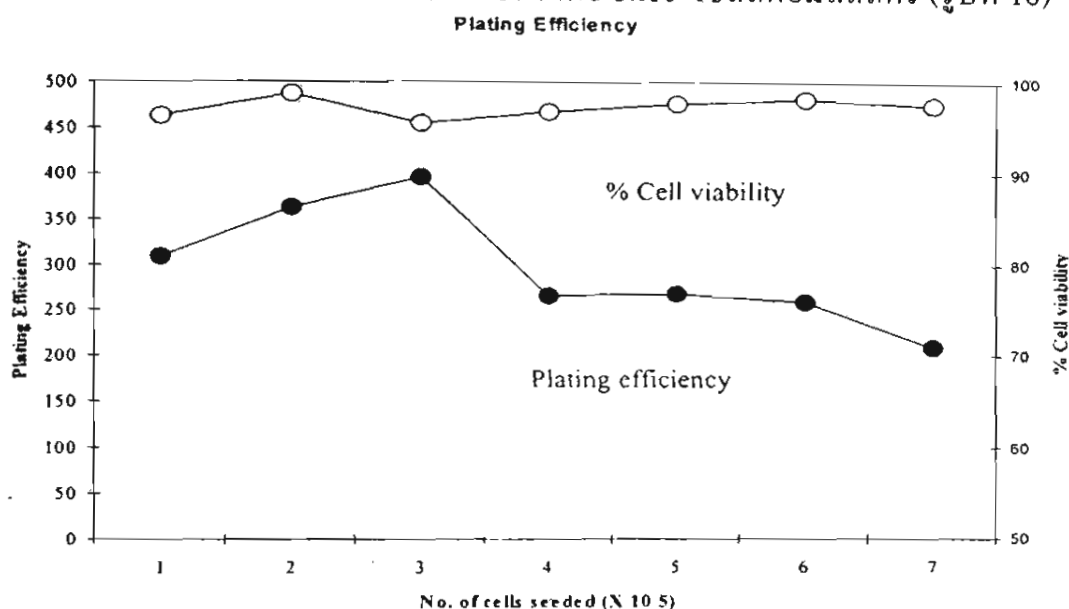


รูปที่ 15 รูปร่างเซลล์ที่เลี้ยงด้วยจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ต่างกันในพลาสติกขนาด T25 โดยใช้ระยะเวลาของการบ่มเท่ากัน (a) จำนวนเซลล์เริ่มต้น 1.6×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (b) จำนวนเซลล์เริ่มต้น 5×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2. การศึกษาหาจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับเริ่มต้นการเพาะเลี้ยง (plating efficiency)

จากปัจจัยที่จำนวนเซลล์เริ่มต้นเพาะเลี้ยงมีผลต่อรูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์ ดังนั้น เพื่อให้ได้เซลล์ที่สมบูรณ์ และมีจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทดสอบความเป็นพิษของบาราคอล จึงต้องหาค่า plating efficiency โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เมื่อใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นตั้งแต่ $1-3 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ค่า plating efficiency เพิ่มขึ้นเมื่อจำนวนเซลล์เริ่มต้นมากขึ้นเรื่อย ๆ

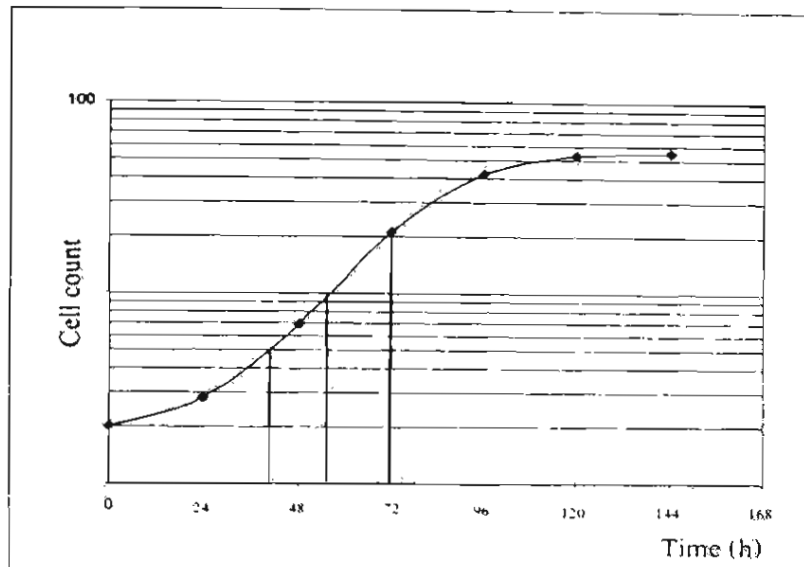
จนถึง 3×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตรซึ่งให้ค่า plating efficiency มากที่สุด หลังจากนั้นจะลดลง ดังนั้นจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมในการเริ่มต้นเพาะเลี้ยงในแต่ละครั้งคือ 3×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 16)



รูปที่ 16 การศึกษาหาปริมาณเซลล์ที่สืบเชื้อที่เหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยงในช่วงต่อไป

3. การศึกษารูปแบบการเจริญของเซลล์ที่สืบเชื้อ (Growth curve determination)

การศึกษาอัตราการเจริญและรูปแบบของเซลล์ในอาหารเลี้ยงของแต่ละช่วงเวลา เพื่อหาช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเซลล์ช่วงต่อไป ทำโดยการเลี้ยงและเก็บเซลล์ทุก 24 ชั่วโมงมานับจำนวนเซลล์ และย้อมด้วยสี trypan blue เพื่อคำนวณหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ จากกราฟของ growth curve เมื่อเลี้ยงเซลล์ไปได้ 24 ชั่วโมงพบว่าจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นไม่มากนัก แสดงถึงช่วงการพักของเซลล์ (lag phase) เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการแบ่งเซลล์ หลังจากนั้นเซลล์จะมีการแบ่งตัวเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็ว เรียกว่าเป็นช่วง log phase เซลล์เจริญอย่างรวดเร็วและเต็มที่เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง หลังจากช่วงเวลานี้เซลล์เริ่มตายและหลุดออกจากพื้นพลาสติกเป็นจำนวนมาก เมื่อคำนวณจากกราฟพบว่าค่า doubling time ของเซลล์ที่สืบเชื้อมีค่าประมาณ 16 ชั่วโมง (รูปที่ 17)

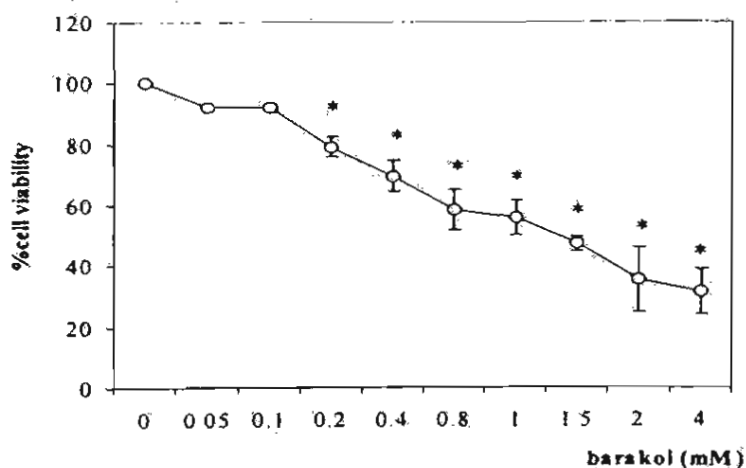


รูปที่ 17 อัตราการเจริญของเซลล์ฟีสบเก้าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารช่วงเวลา 0-144 ชั่วโมง เพื่อหาค่า doubling time ได้เท่ากับ 16 ชั่วโมง

4. การศึกษาความเป็นพิษของบาราคอลในระดับเซลล์ด้วยวิธี XTT

4.1 การศึกษาความเป็นพิษของบาราคอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

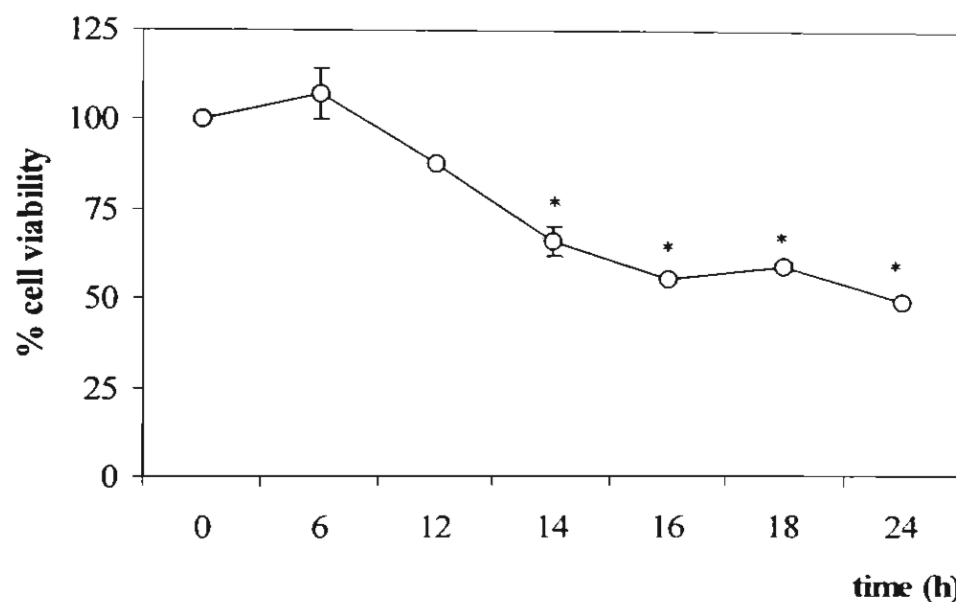
เพื่อศึกษาปัจจัยของความเข้มข้นของบาราคอลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ ได้เลี้ยงเซลล์ฟีสบเก้าในอาหารที่มีบาราคอลที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.05- 4 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง พบว่าเมื่อความเข้มข้นของบาราคอลมากขึ้น อัตราการอยู่รอดของเซลล์จะลดลง ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์เริ่มเป็นพิษต่อเซลล์ฟีสบเก้าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์มีชีวิตรอดได้ 50% (IC_{50}) มีค่าเท่ากับ 1.5 มิลลิโมลาร์ แสดงให้เห็นว่าอัตราการอยู่รอดของเซลล์แปรผกผันกับความเข้มข้นของบาราคอลที่เซลล์ได้รับ (รูปที่ 18)



รูปที่ 18 ปัจจัยของความเข้มข้นของบาราคอลที่มีต่ออัตราการอยู่รอดของเซลล์ฟีสบเก้าด้วยวิธี XTT เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีบาราคอลที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.05-4 มิลลิโมลาร์ นาน 24 ชั่วโมง
* คำนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

4.2 การศึกษาความเป็นพิษของบาราคอลที่เวลาต่าง ๆ กัน

เมื่อนำเซลล์มาเลี้ยงในอาหารที่มีบาราคอลผสมที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1.5 มิลลิโมลาร์ (IC_{50}) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 6, 12, 14, 16, 18, และ 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตลดลงเมื่อเซลล์ได้รับบาราคอลนานขึ้น โดยบาราคอลจะเริ่มเป็นพิษต่อเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ ณ เวลาที่ 14 ชั่วโมง (รูปที่ 19) เป็นที่น่าสังเกตคือ ณ เวลาที่ 18 ชั่วโมง พบว่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์จะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ซึ่งอาจเป็นเพราะอยู่ในช่วง doubling time ของเซลล์ที่ 16 ชั่วโมง (รูปที่ 17)



รูปที่ 19 ปฏิกิริยาของเวลาที่เซลล์ได้รับบาราคอลที่มีต่ออัตราการอยู่รอดของเซลล์ฟิสิบเก้ เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีบาราคอลที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ นาน 24 ชั่วโมง และวัดเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี XTT โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับบาราคอล * ค่ามีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

เมื่อนำมาศึกษาปฏิกิริยาของเวลาต่อเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่อยู่รอดหลังได้รับบาราคอล พบว่าเซลล์ที่ได้รับบาราคอลนาน 24-72 ชั่วโมง แสดงค่าความเข้มข้นของบาราคอลที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 (IC_{50}) แตกต่างกัน (ตารางที่ 5) โดยเมื่อเซลล์ได้รับบาราคอลเป็นเวลา 36-72 ชั่วโมง พบว่าค่า IC_{50} ลดลงมากกว่า 2.42 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับบาราคอลนาน 24 ชั่วโมง เมื่อวิเคราะห์ร่วมกับการศึกษาความคงตัวของบาราคอลในอาหารเลี้ยงเซลล์ (รูปที่ 14) พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปนานกว่า 24 ชั่วโมงบาราคอลจะสลายตัวอย่างรวดเร็ว ขณะเดียวกันสารที่ได้จากการสลายตัวของบาราคอลคือ cassiachromone ได้เพิ่มขึ้น จึงอาจเป็นไปได้ว่าความเป็นพิษที่เพิ่มสูงขึ้นนั้นเนื่องมาจากบาราคอลร่วมกับ cassiachromone ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้นำ cassiachromone มาทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นต่อเซลล์ฟิสิบเก้ โดยบ่มนาน 24 ชั่วโมงด้วยวิธี XTT พบว่ามีค่า IC_{50} ของ cassiachromone เท่ากับ 0.05

มิลลิโมลาร์ ซึ่งแสดงความเป็นพิษมากกว่าบาราคอลถึง 30 เท่า ดังนั้นในการศึกษากลไกความเป็นพิษของบาราคอลต่อไปจึงต้องทำการทดลองให้เซลล์ได้รับบาราคอลภายใน 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 5 ค่า IC_{50} ของเซลล์ที่ได้รับบาราคอลที่ความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ กัน

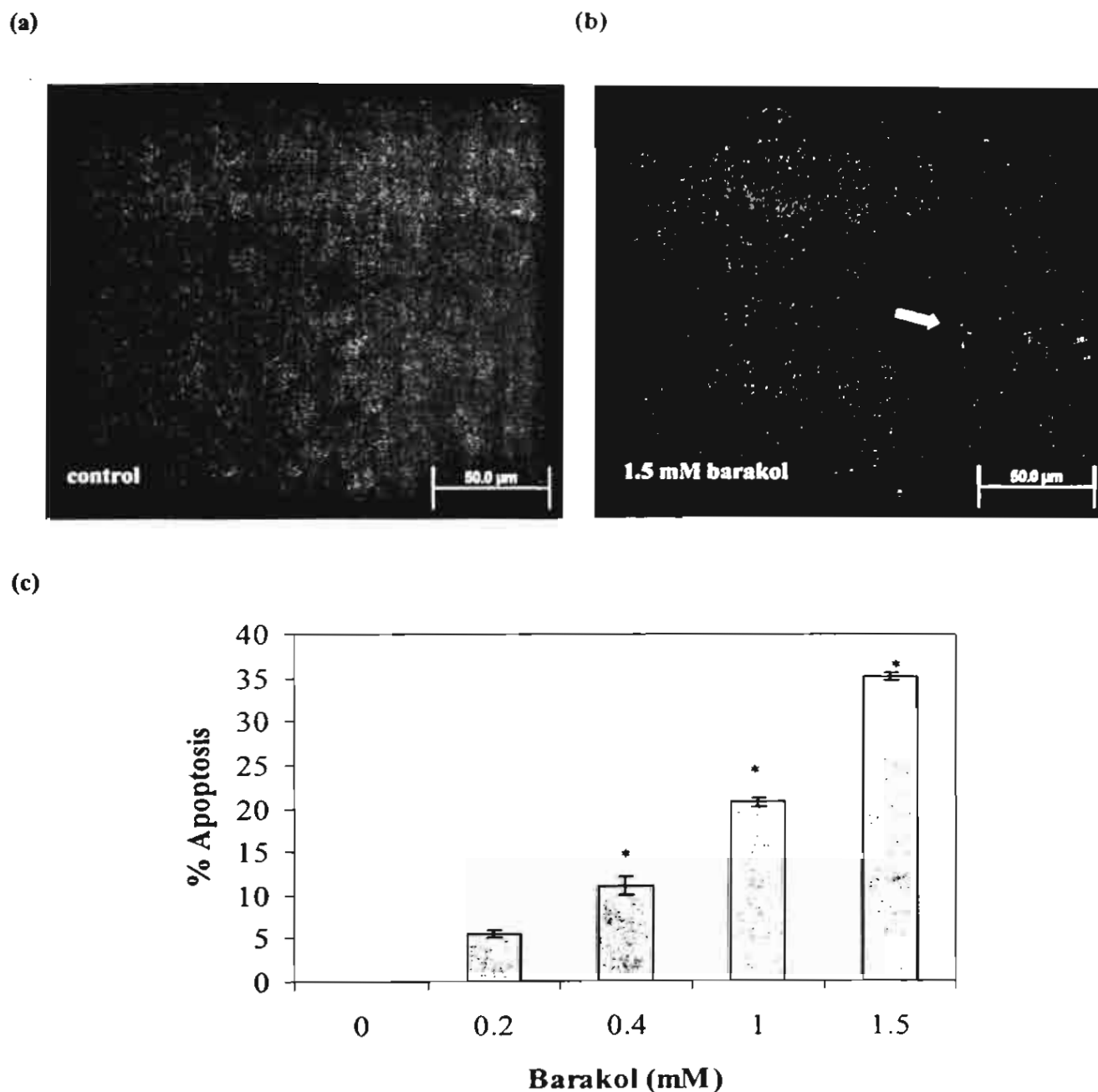
เวลา (ชั่วโมง)	IC_{50} (มิลลิโมลาร์)
24	1.50
36	0.62
48	0.63
60	0.54
72	0.50

5. การศึกษารูปแบบการตายของเซลล์ที่สืบได้ด้วยเทคนิคต่าง ๆ

5.1 การศึกษารูปแบบการตายด้วยการย้อมเซลล์ด้วยสี Hoechst 33342

รูปแบบการตายของเซลล์โดยทั่วไปมีด้วยกัน 2 รูปแบบ คือ แบบ necrosis และแบบ apoptosis โดยการตายแบบแรกจะเกิดการอักเสบก่อนจนทำให้มีระบบภูมิคุ้มกันเข้ามาเกี่ยวข้อง ส่วนการตายแบบอะพอพโทซิสจะเป็นการตายแบบธรรมชาติซึ่งเซลล์ได้ตั้งโปรแกรมไว้เมื่อเซลล์มีอายุมากขึ้นหรือได้รับการกระตุ้นจากสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม วิธีการตรวจวัดการตายแบบอะพอพโทซิสมีหลายวิธี เช่น ย้อมสีเอ็นเอภายในนิวเคลียสด้วยสีเรืองแสงเช่น Hoechst 33342 ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อวิเคราะห์การตายของเซลล์ในช่วง early apoptosis และ late apoptosis หรือย้อมด้วยสี propidium iodide วัดปริมาณเซลล์ที่ตายในช่วง late apoptosis ด้วยวิธี flow cytometry (Boldyrev, 2000) หรือดูรูปแบบการเกิด DNA fragmentation ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เพื่อวิเคราะห์การตายของเซลล์ในช่วง late apoptosis (Woodgate et al., 1999)

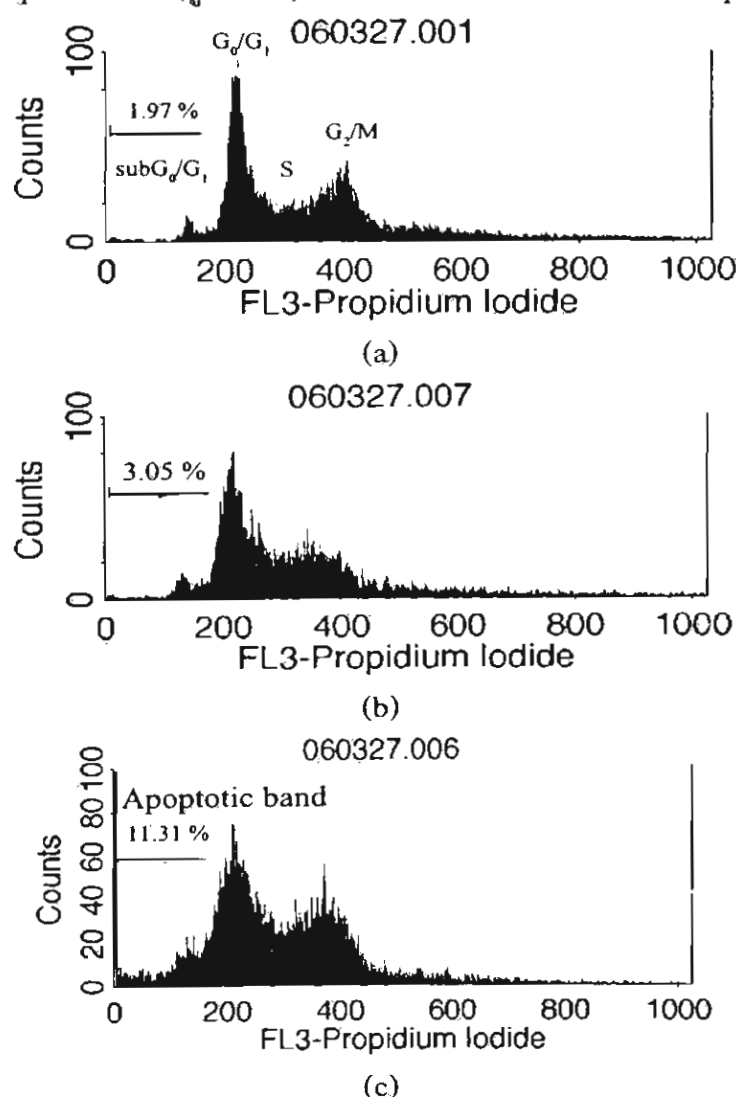
การวิเคราะห์ความเป็นพิษของบาราคอลต่อเซลล์ที่สืบได้ด้วยวิธี XTT พบว่าบาราคอลรบกวนการทำงานของไมโทคอนเดรียจนทำให้เซลล์ตายโดยแสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 1.5 มิลลิโมลาร์ และเพื่อศึกษารูปแบบการตายของเซลล์หลังได้รับบาราคอล จึงย้อมสี Hoechst 33342 พบว่าเซลล์ที่ได้รับบาราคอลที่ความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ นาน 24 ชั่วโมง พบโครมาตินในนิวเคลียสขดแน่นขึ้น แสดงว่าเซลล์เริ่มตายแบบอะพอพโทซิสประมาณ 10% และเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของบาราคอล โดยที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ พบเซลล์ตายแบบอะพอพโทซิสถึง 35% (รูปที่ 20) สรุปได้ว่าความเป็นพิษของบาราคอลต่อเซลล์ที่สืบเกล้าทำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิสเป็นส่วนใหญ่



รูปที่ 20 ผลของบาราคอลต่อรูปแบบการตายของเซลล์ที่สีย้อมด้วย Hoechst 33342 โดยเปรียบเทียบกับ (a) กลุ่มควบคุม (b) กลุ่มเซลล์ที่ได้รับบาราคอล 1.5 มิลลิโมลาร์ พบว่ามีเซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส โดยสังเกตเห็นโครมาตินในนิวเคลียสย้อมติดสีชัดเจน (c) ค่าปริมาณการตายแบบอะพอพโทซิสเพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับบาราคอลมากขึ้น * คำนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

5.2 การศึกษารูปแบบการตายด้วยการย้อมเซลล์ด้วยสี propidium iodide วิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer

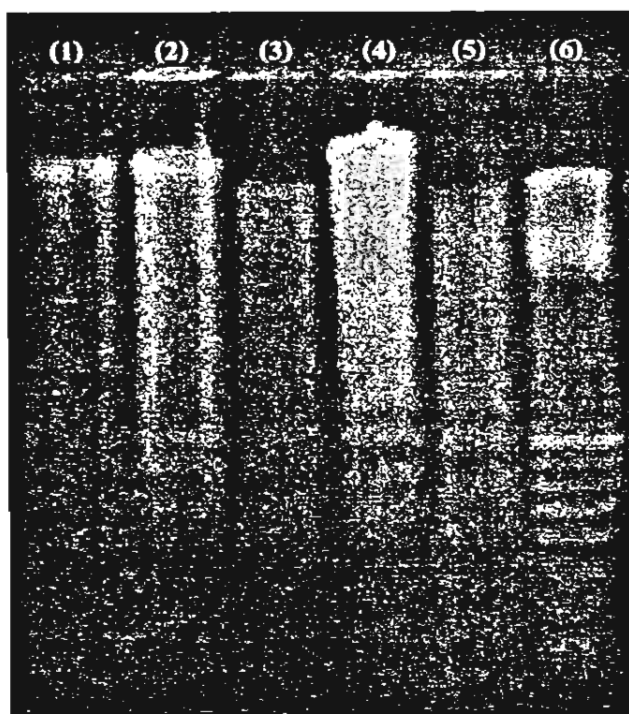
เมื่อขึ้นย่นรูปแบบการตายของเซลล์ฟิสิบเก้าเป็นแบบอะพอพโทสิสในช่วงปลาย (late apoptosis) จึงย้อมเซลล์ด้วยสี propidium iodide ซึ่งเป็นสีที่สามารถแทรกระหว่างเบสของดีเอ็นเอที่ถูกย่อยออกมา หลังจากที่ย้อมเซลล์และตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอที่ย้อมติดสีด้วยวิธี flow cytometry แสดงผลออกมาในรูปฮิสโทแกรมโดยแกน X แสดงถึงปริมาณความเข้มของสี propidium iodide ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอที่ย้อมติดสี และแกน Y คือ จำนวนเซลล์ (Warrington et al., 2003) จะเห็นได้ว่าปริมาณเซลล์ที่ได้รับบาราคอล 1.5 มิลลิโมลาร์ จะพบ apoptotic band ในช่วง subG₀/G₁ ของวัฏจักรเซลล์เพิ่มขึ้นถึง 11.31% (รูปที่ 21) แสดงให้เห็นว่าหลังจากที่บ่มบาราคอลนาน 24 ชั่วโมง นอกจากเซลล์ตายแบบ early apoptosis แล้ว (รูปที่ 20) ยังพบว่าเซลล์ได้ตายแบบ late apoptosis ด้วย



รูปที่ 21 ผลของบาราคอลต่อเซลล์ฟิสิบเก้าเมื่อย้อมเซลล์ด้วยสี propidium iodide และวิเคราะห์ด้วยวิธี flow cytometry โดย (a) กลุ่มควบคุม (b) เซลล์ที่ได้รับบาราคอลความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ และ (c) เซลล์ที่ได้รับบาราคอลความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ บ่มนาน 24 ชั่วโมง

5.3 การศึกษารูปแบบการตายของเซลล์ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

เพื่อศึกษารูปแบบการตายของเซลล์ในช่วง late apoptosis โดยสังเกตจากแถบ DNA ladder เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบแถบ DNA ladder ได้ชัดเจนในกลุ่มเซลล์ได้รับบาราคอล 0.5 มิลลิโมลาร์ นาน 72 ชั่วโมง (รูปที่ 22 แถวที่ 2) และเห็นชัดเจนขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับบาราคอลมากขึ้นที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 22 แถวที่ 3) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ปล่อยให้ตายเองตามธรรมชาติเมื่อเลี้ยงไปได้นาน 96 ชั่วโมง (รูปที่ 22 แถวที่ 5) แสดงให้เห็นว่าการตายของเซลล์ที่ได้รับบาราคอลภายใน 24 ชั่วโมงจะแสดงรูปแบบการตายแบบ early apoptosis โดยโครมาตินในนิวเคลียสหดตัวกันแน่นย้อมติดสี Hoechst 33342 ได้ชัดเจน หลังจากนั้นภายใน 72 ชั่วโมง เอนไซม์ CAD จะย่อยสลายดีเอ็นเอเป็นชิ้นเล็ก ๆ โดยสังเกตเห็นแถบ DNA ladder บนแผ่นเจล ซึ่งมักเกิดในช่วง late apoptosis



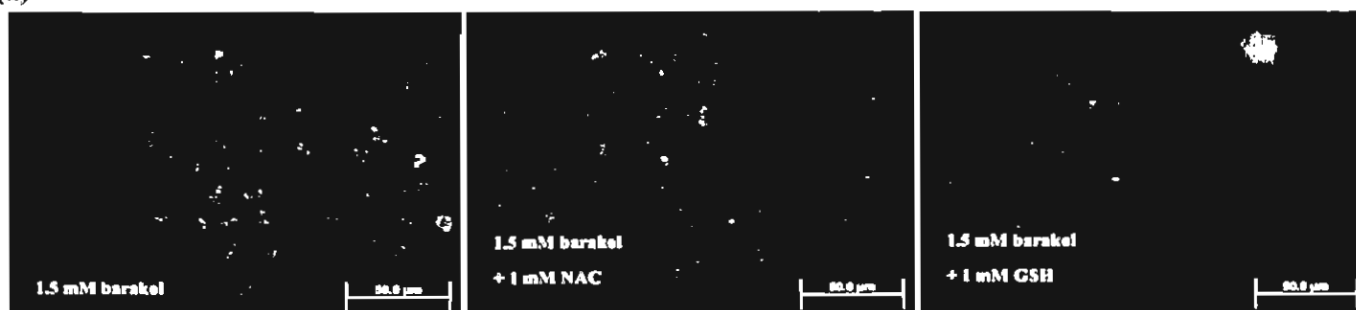
รูปที่ 22 รูปแบบการตายของเซลล์ฟิสิบเก้านบน agarose gel electrophoresis โดยแถวที่ (1) คือกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับบาราคอล แถวที่ (2) และ (3) คือ กลุ่มเซลล์ที่ได้รับบาราคอล 0.5 และ 1 โมลาร์ นาน 72 ชั่วโมง ตามลำดับ แถวที่ (4) คือ กลุ่มเซลล์ที่ได้รับ retinoic acid 0.5 ไมโครโมลาร์ นาน 4 วัน แถวที่ (5) คือกลุ่มเซลล์ที่ตายเองตามธรรมชาติ เมื่อเลี้ยงนาน 4 วัน แถวที่ (6) คือดีเอ็นเอมาตรฐานของ 100 base-pair DNA ladder

6 การศึกษากลไกการตายของเซลล์ผ่านทางวิถีอนุมูลอิสระ

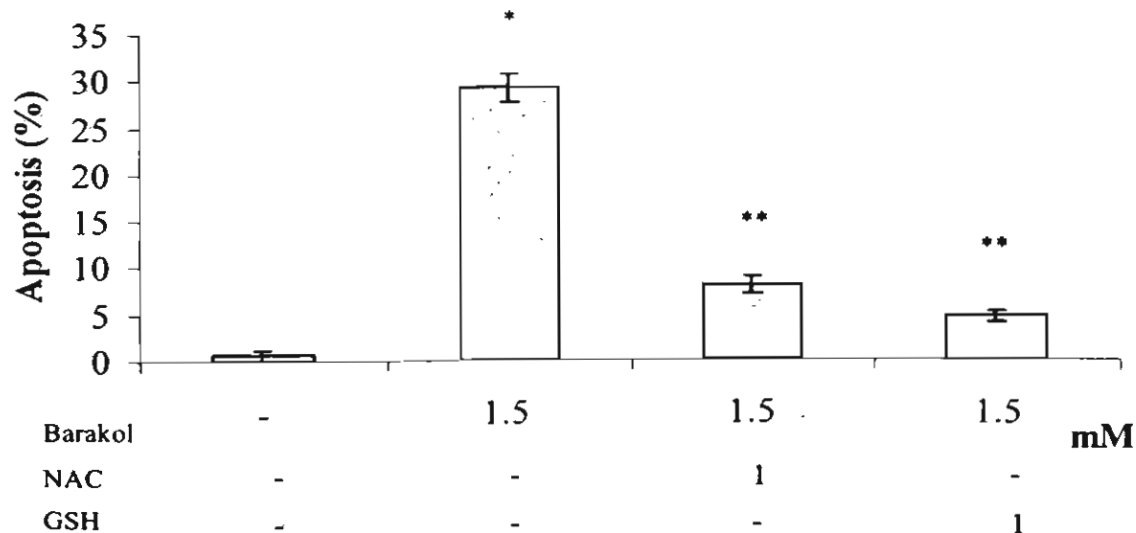
6.1 การศึกษาผลของสารต้านอนุมูลอิสระต่อเซลล์ที่ได้รับบาราคอลด้วยการย้อมสี Hoechst 33342

กลไกการตายแบบอะพอพโทซิสพบว่ามักผ่านทางวิถีเอนไซม์ caspase โดยเริ่มจากการสะสมอนุมูลอิสระภายในไมโทคอนเดรียมากเกินไปจนทำให้อนุมูลอิสระบางชนิดเช่น H_2O_2 และ $OH^\cdot$ หลังเข้าสู่ไซโตซอล และรบกวนการทำงานของโปรตีนส่งผลให้เซลล์ตาย (Ohshima, 2004) จากผลการทดลองพบว่าเมื่อให้เซลล์ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระ NAC หรือ GSH อย่างใดอย่างหนึ่งในความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ก่อนที่จะได้รับบาราคอล 1.5 มิลลิโมลาร์พบว่าเปอร์เซ็นต์ที่เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิสลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับแต่บาราคอล (รูปที่ 23) จึงเป็นไปได้ว่าการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ที่ได้รับบาราคอล เกี่ยวข้องกับการสะสมอนุมูลอิสระมากเกินไปผิดปกติภายในเซลล์ ดังนั้น เมื่อเซลล์ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระที่คอยกำจัดอนุมูลอิสระที่มากเกินไป ผลที่ตามมาจึงสามารถลดอัตราการตายแบบอะพอพโทซิสได้

(a)



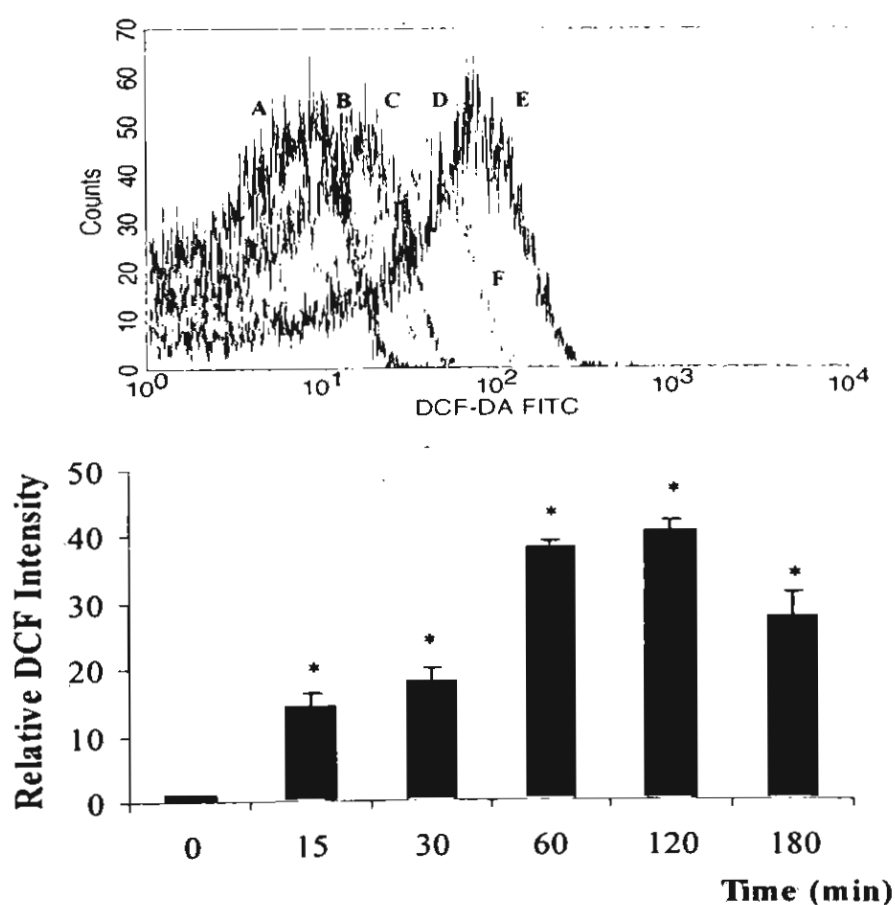
(b)



รูปที่ 23 การตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ที่ได้สารต้านอนุมูลอิสระก่อนได้รับบาราคอล (a) เมื่อย้อมด้วยสี Hoechst 33342 เปรียบเทียบลักษณะการติดสีย้อมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และ (b) คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์อะพอพโทซิส * คำนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ** คำนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับบาราคอล 1.5 มิลลิโมลาร์

6.2 การวัดปริมาณอนุมูลอิสระในเซลล์ที่ได้รับบาราคอลด้วยสีย้อม DCFH-DA

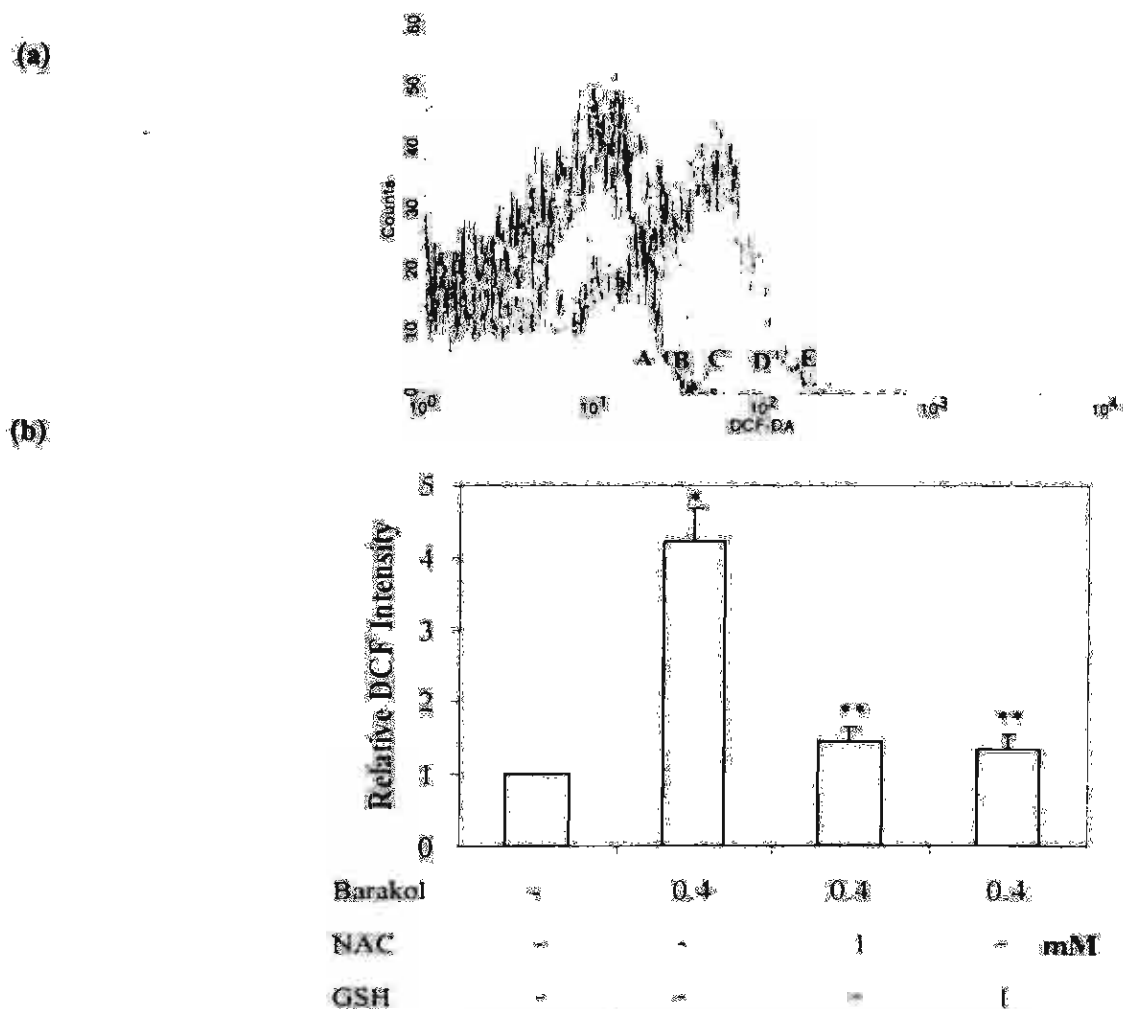
เพื่อยืนยันวิธีการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ที่สืบเก่าที่ได้รับบาราคอลผ่านทางสารอนุมูลอิสระมากผิดปกติ จึงวัดปริมาณการเรืองแสงของสีย้อม DCFH-DA ด้วยเครื่อง flow cytometer ภายหลังทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระภายในเซลล์ที่ได้รับบาราคอล พบว่าปริมาณอนุมูลอิสระในเซลล์ที่ได้รับบาราคอล 0.4 มิลลิโมลาร์เริ่มมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ตั้งแต่เวลา 15 นาที และเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนมากที่สุดโดยมากกว่ากลุ่มควบคุมถึง 40 เท่า ณ เวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นปริมาณอนุมูลอิสระเริ่มลดลง (รูปที่ 24) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเซลล์พยายามปรับระดับอนุมูลอิสระให้เข้าสู่สมดุล อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าบาราคอลกระตุ้นเซลล์ให้สังเคราะห์อนุมูลอิสระในไมโทคอนเดรียมากเกินไปจนหลั่งออกสู่ไซโตซอลเพื่อทำปฏิกิริยากับสีย้อม DCFH-DA การเรืองแสง ปริมาณการเรืองแสงที่วัดได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณอนุมูลอิสระในไซโตซอล



รูปที่ 24 การวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่สัมพันธ์กับการเรืองแสง DCFH-DA ด้วยเครื่อง flow cytometer ภายหลังเซลล์ได้รับบาราคอล 0.4 มิลลิโมลาร์ บ่ม ณ เวลาต่าง ๆ กัน (A) 0 นาที (B) 15 นาที (C) 30 นาที (D) 60 นาที (E) 120 นาที (F) 180 นาที * คำนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

6.3 การศึกษาผลของสารต้านอนุมูลอิสระก่อนที่เซลล์จะได้รับบาราคอล

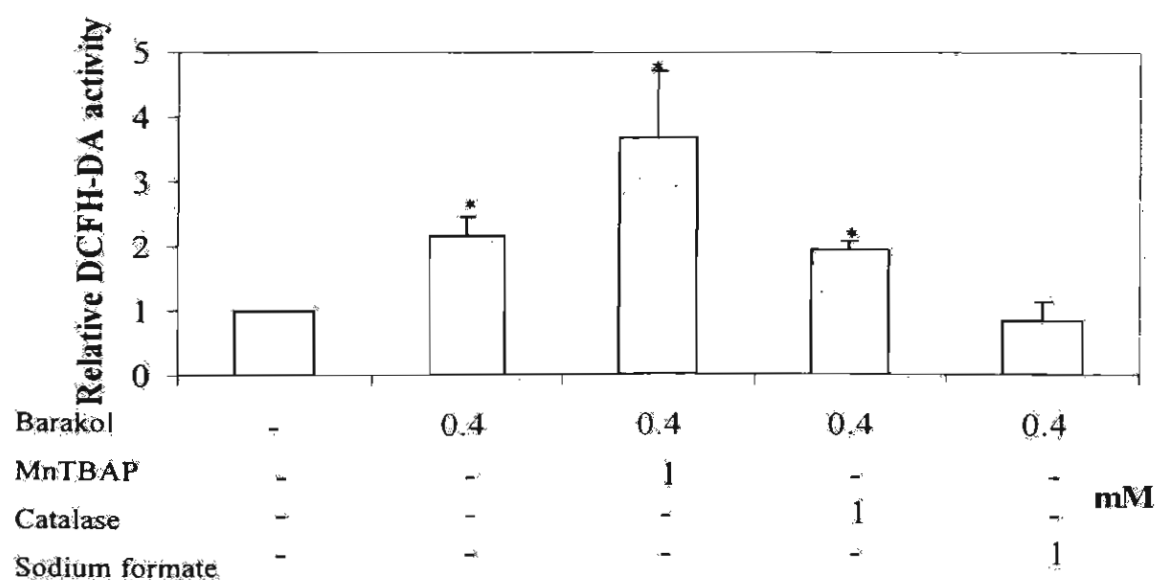
เพื่อยืนยันผลการทดลองข้างต้น โดยเติมสารต้านอนุมูลอิสระเช่น NAC หรือ GSH อย่างใดอย่างหนึ่งที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ก่อนได้รับบาราคอล 0.4 มิลลิโมลาร์ พบว่าปริมาณอนุมูลอิสระลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับบาราคอลและเกือบเท่ากับกลุ่มควบคุม รูปที่ 25 แสดงให้เห็นว่าความเป็นพิษของบาราคอลเป็นผลให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิสเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นผ่านทางวิธีการกระตุ้นให้มีปริมาณอนุมูลอิสระมากผิดปกติภายในเซลล์ที่เกินกว่า และเมื่อเซลล์ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระมาก่อนจะป้องกันความเสียหายของบาราคอลจนเกือบเท่ากับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 25 ผลของสารต้านอนุมูลอิสระก่อนที่เซลล์จะได้รับบาราคอล (a) เมื่อย้อมเซลล์ด้วยสี DCFH-DA และ (b) วัดปริมาณอนุมูลอิสระด้วยเครื่อง flow cytometer * คำนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ** คำนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับบาราคอล ความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์

6.4 การวิเคราะห์ชนิดของอนุมูลอิสระที่มีผลทำให้เซลล์ที่ได้รับบาราคอลตายแบบอะพอพโทซิส

เพื่อวิเคราะห์ชนิดของอนุมูลอิสระที่สะสมภายในเซลล์มากผิดปกติภายหลังได้รับบาราคอลจนทำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส จึงให้เซลล์ได้รับ MnTBAP ก่อนได้รับบาราคอล จากนั้นย้อมเซลล์ด้วยสี DCFH-DA และวัดปริมาณอนุมูลอิสระด้วยเครื่องโฟล ไซโตมิเตอร์ พบว่า ปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ที่ได้รับ MnTBAP กลับไม่ลดลงและยังกลับมากกว่ากลุ่มเซลล์ที่ได้รับบาราคอลอีกด้วย (รูปที่ 26) แสดงให้เห็นว่า MnTBAP ซึ่งทำหน้าที่เลียนแบบเอนไซม์ SOD ไม่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระชนิด superoxide ซึ่งมีจำนวนมากได้ทัน ในทำนองเดียวกันกลุ่มเซลล์ที่ได้รับเอนไซม์ catalase พบว่าปริมาณอนุมูลอิสระไม่ได้ลดลงและยังเท่ากับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับบาราคอล แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ catalase ไม่เพียงพอที่จะกำจัดอนุมูลอิสระ hydrogen peroxide ในกลุ่มเซลล์ที่ได้รับบาราคอล ในทางตรงกันข้ามกลุ่มเซลล์ที่ได้รับ sodium formate ก่อนได้รับบาราคอล พบว่าปริมาณอนุมูลอิสระลดลงอย่างมีนัยสำคัญจนเกือบเท่ากับกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่า hydrogen peroxide ที่สะสมในไมโทคอนเดรียได้เปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระ hydroxy ผ่านทางปฏิกิริยา Fenton ซึ่งอนุมูลอิสระ hydroxy นี้สามารถถูกกำจัดด้วย sodium formate ทำให้วัดระดับอนุมูลอิสระได้ลดลง ซึ่งเป็นข้อพิสูจน์ว่าอนุมูลอิสระที่มีบทบาทสำคัญมากและทำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิสคืออนุมูลอิสระ superoxide และ hydroxy

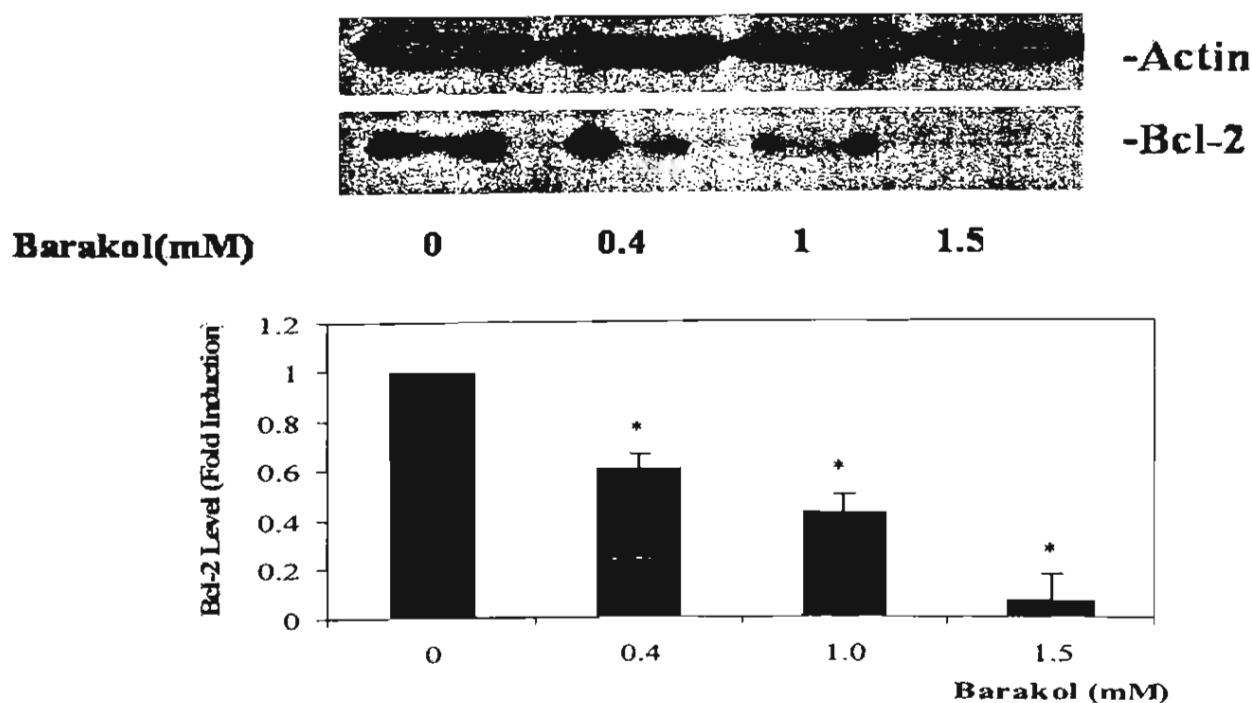


รูปที่ 26 การวิเคราะห์ชนิดของอนุมูลอิสระที่มีบทบาททำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิสเมื่อเซลล์ได้รับ MnTBAP, catalase หรือ sodium formate ก่อนได้รับบาราคอล 0.4 มิลลิโมลาร์ * ค่ามีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

7. การศึกษากลไกการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ที่ได้รับบาราคอลผ่านทางวิถีโปรตีน Bcl-2

7.1 การวิเคราะห์ระดับโปรตีน Bcl-2 ในเซลล์ที่ได้รับบาราคอลด้วยเทคนิค Western Blot

เป็นที่ทราบกันดีว่าโปรตีนในกลุ่ม Bcl-2, Bcl-xL, และ Bax จะรักษาสมดุลซึ่งกันและกันภายในเซลล์เพื่อควบคุมการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ โดยโปรตีน Bcl-2, Bcl-xL ทำหน้าที่เป็น anti-apoptotic protein อยู่บริเวณเยื่อเมมเบรนด้านนอกของไมโทคอนเดรีย คอยควบคุมช่องบนเยื่อเมมเบรนของไมโทคอนเดรียป้องกันไม่ให้อนุมูลอิสระและ cytochrome c ในไมโทคอนเดรียหลุดเข้าสู่ไซโตซอล ในขณะที่โปรตีน Bax ซึ่งเป็น pro-apoptotic protein อยู่ในไซโตซอล จะไปรบกวนการทำงานของโปรตีนกลุ่ม Bcl-2 และทำให้ความต่างศักย์ของเยื่อเมมเบรนของไมโทคอนเดรียเสียไป (Adams and Cory, 1998; Yang et al., 2006) เป็นผลให้ cytochrome c หลุดเข้าสู่ไซโตซอลเพื่อแย่งจับกับโปรตีน Apaf-1 ปลดปล่อยโปรตีน caspase-9 เป็นอิสระซึ่งจะไปกระตุ้นการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ caspase 3,6,7 และทำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิสในที่สุด ดังนั้นเพื่อศึกษาความสัมพันธ์วิธีการส่งสัญญาณภายในเซลล์ระหว่างอนุมูลอิสระกับโปรตีน Bcl-2 จึงได้นำเซลล์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีบาราคอลตั้งแต่ 0.4-1.5 มิลลิโมลาร์ บ่มนาน 9 ชั่วโมง พบว่าเมื่อความเข้มข้นของบาราคอลเพิ่มขึ้น การแสดงออกให้โปรตีน Bcl-2 ภายในเซลล์ลดลง (รูปที่ 27) จึงทำให้การควบคุมการหลั่ง cytochrome c ออกนอกไมโทคอนเดรียลดลง แสดงให้เห็นว่าเซลล์กำลังตกอยู่ในภาวะเสี่ยงต่อการตายแบบอะพอพโทซิส



รูปที่ 27 ผลของบาราคอลที่ไปลดการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ภายในเซลล์ที่เลี้ยงด้วยวิธี Western Blot ซึ่งเป็นสัดส่วนกลับกับความเข้มข้นของบาราคอล * คำนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม