



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “ศักยภาพของผลกล้วยไข่และน้ำว่าในการป้องกันมะเร็งผิวหนัง
ในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยดีเอ็มบีเอและรังสียูวีบี”

Potential of banana (*Musa surier* L., Kluai Khai and
Musa sapientum L., Kluai Namwa) fruit
on prevention of DMBA/UVB-induced skin cancer in mice

โดย

นางจรรุภา วิโยชน์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
พฤษภาคม 2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “ศักยภาพของผลกล้วยไข่และน้ำว่าในการป้องกันมะเร็งผิวหนัง
ในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยดีเอ็มบีเอและรังสียูวีบี”

Potential of banana (*Musa surier* L., Kluai Khai and
Musa sapientum L., Kluai Namwa) fruit
on prevention of DMBA/UVB-induced skin cancer in mice

ผู้วิจัย

นางจรรุภา วิโยชน์

นางสาววิภาดา ศรีนาค

สังกัด

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ชุดโครงการ Thai Fruits - Functional Fruits ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนในการดำเนินโครงการวิจัยเรื่อง ศักยภาพของผลกล้วยไข่และน้ำว่าในการป้องกันมะเร็งผิวหนัง ในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยดีเอ็มบีเอและรังสียูวีบี

ขอขอบคุณ นางสาววิภาดา ศรีนาค และนิสิตบัณฑิตศึกษากลุ่มหน่วยวิจัย Biomaterial for Regenerative Medicine Research Unit คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ผู้มีส่วนทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จไปด้วยดี

ขอขอบคุณศูนย์นิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร สำหรับความอนุเคราะห์ให้ใช้เครื่องมือในการตัดชิ้นเนื้อเพื่อศึกษาลักษณะพยาธิสภาพ

ขอขอบคุณ ข้าราชการ พนักงาน นักวิทยาศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวรทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกต่างๆ ในการโครงการวิจัยนี้เป็นอย่างดี

และท้ายสุดนี้ขอขอบคุณบิดา มารดา ที่เป็นกำลังใจในการทำงานตลอดมา

นางจรรุภา วิโยชน์

ผู้ดำเนินการวิจัย

พฤษภาคม 2560

แบบสรุปโครงการวิจัย (Executive Summary)

สัญญาเลขที่ RDG5820014 **ชื่อโครงการ** ศักยภาพของผลกล้วยไข่และน้ำว่าในการป้องกันมะเร็งผิวหนังในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยดีเอ็มบีเอและรังสียูวีบี

หัวหน้าโครงการ นางจรรยา วิโยชน์ **หน่วยงาน** คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์

โทรศัพท์ 055-961875 **โทรสาร** 055-963731 **อีเมล** jarupav@nu.ac.th, jarupaviyoch4@yahoo.com

ความสำคัญ / ความเป็นมา

อุบัติการณ์ผู้ป่วยโรคมะเร็งผิวหนังทั่วโลกเพิ่มมากขึ้นทุกปี โดยเฉพาะในกลุ่มคอเคเซียน (Caucasian) จำนวนผู้ป่วยจะเพิ่มร้อยละ 3 – 8 สำหรับประเทศในแถบเอเชียรวมทั้งประเทศไทยถึงแม้อุบัติการณ์จะน้อยกว่า เนื่องจากมีการมีสีผิวที่เข้มจะช่วยดูดซับรังสีอัลตราไวโอเลตหรือยูวี (ultraviolet ray, UV) โดยเฉพาะอย่างยิ่งยูวีบีที่เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคนี้อย่างไรก็ตามพบว่าอุบัติการณ์โรคนี้นั้นในคนไทยเพิ่มมากขึ้นทุกปี รวมทั้งประเทศไทยที่มีรายงานว่าในปี 2555 นั้นโรคมะเร็งผิวหนังอยู่ใน 15 อันดับแรกของมะเร็งที่พบในผู้ป่วยรายใหม่ (เผยแพร่โดยกลุ่มงานเทคโนโลยีสารสนเทศ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข) และมีการเผยแพร่ข้อมูลว่าพบผู้ป่วยรายใหม่ที่เป็นโรคมะเร็งผิวหนังจำนวน 300 - 400 รายต่อปี (ข้อมูลจาก **นายแพทย์วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์** หน่วยมะเร็งวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในผู้จัดการออนไลน์ วันที่ 22 กุมภาพันธ์ 2556) ทั้งนี้เนื่องจากมลภาวะต่างๆ ที่เพิ่มมากขึ้น รวมทั้งรูปแบบการใช้ชีวิต เช่น ชนิดของอาหารที่รับประทานเปลี่ยนไป จากที่รับประทานผักและผลไม้เป็นอาหารหลัก ก็เปลี่ยนเป็นอาหารจำพวกเนื้อแดงและไขมันมากขึ้น ส่งผลให้ร่างกายไวต่อสารเหนี่ยวนำที่ทำให้เกิดมะเร็ง ร่วมกับการกระตุ้นจากแสงแดดทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีนที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคนี้นั้น มะเร็งผิวหนังบางชนิด เช่น malignant melanoma นั้นเป็นชนิดที่อันตรายและอาจทำให้เสียชีวิตได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มคนไทย

จากการศึกษาของคณะผู้วิจัยที่นำผลไม้ไทย 3 ชนิด ได้แก่ กล้วยน้ำว้าสุก กล้วยไข่สุก และมะละกอสุกซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่ปลูกกันมากในประเทศไทยมาศึกษาประสิทธิภาพในการป้องกันการเสื่อมสภาพก่อนวัยของผิว หน้ อันเนื่องมาจากได้รับรังสียูวีบี (UVB) ติดต่อกัน โดยการวิจัยดังกล่าวได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ฝ่ายเกษตร (โครงการวิจัยเรื่อง “ประสิทธิภาพของเนื้อผลมะละกอและกล้วยในการป้องกันผิวหน้าเสื่อมสภาพก่อนวัยเนื่องจากรังสี UVB : การศึกษาในสัตว์ทดลอง” สัญญาเลขที่ RDG5220047 และตีพิมพ์ในวารสาร Food and Chemical Toxicology, 50 (2012) 4292–4301, impact factor 2.610) นั้น ผลที่ได้พบว่าการที่หนู ICR เพศผู้ ที่ได้รับรังสียูวีบีในช่วงความยาวคลื่น 275 - 305 นาโนเมตรติดต่อกันเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ มีระดับของกลูตาไธโอน (glutathione) ที่ผิวหนังเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มหนูที่ไม่ได้รับรังสียูวีบี ร่วมกับการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของผิวหนัง ได้แก่ ริ้วรอยที่เพิ่มขึ้นและความยืดหยุ่นที่ลดลง การได้กินผลไม้สุก ได้แก่ กล้วยไข่สุกที่ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน หรือวิตามินซีในขนาด 50 มิลลิกรัมต่อวัน นอกจากจะช่วยรักษาสภาพและคุณสมบัติของผิวหนังแล้ว ยังช่วยรักษาระดับของกลูตาไธโอนในผิวหนังให้ไม่แตกต่างจากระดับของกลูตาไธโอนที่พบในผิวหนังหนูที่ไม่ได้รับรังสียูวีบี อย่างไรก็ตาม หนูที่ได้รับกล้วยน้ำว้าสุกในปริมาณที่เท่ากันกับกล้วยไข่ไม่ส่งผลในการป้องกันผิวหนังจากรังสีและไม่ช่วยรักษาระดับกลูตาไธโอนในผิวหนัง จากการ

วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลทั้งหมดที่มีอยู่ในเนื้อผลไม้โดยใช้ Folin-Ciocalteu's reagent ผลที่ได้พบว่าสารสกัด (ใช้เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 50) จากกล้วยไข่สุกและน้ำว่าสุกมีปริมาณฟีนอลเท่ากับ 30.48 ± 0.54 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของเนื้อผลไม้สดและ 14.41 ± 0.50 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของเนื้อผลไม้สด ตามลำดับ ในส่วนของการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยใช้ DPPH assay ซึ่งแสดงค่าในรูปของ EC_{50} (ความเข้มข้นของสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านการเกิดออกซิเดชันโดย free radical scavenging เท่ากับร้อยละ 50) พบว่าสารสกัดจากผลกล้วยไข่สุกและกล้วยน้ำว่าสุกมีค่า EC_{50} เท่ากับ 16.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 108.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลการศึกษาชิ้นนี้ชี้ให้เห็นว่าผลกล้วยไข่สุกและกล้วยน้ำว่าสุกมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน และความแตกต่างนี้มีผลต่อประสิทธิภาพในการป้องกันอันตรายจากผิวหนังที่ได้รับรังสียูวีบี รวมทั้งการรักษาระดับกลูตาไธโอนที่ผิวหนัง

กลูตาไธโอนเป็นชีวโมเลกุลที่มีฤทธิ์ต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ที่ร่างกายสังเคราะห์ขึ้นมาได้ รวมทั้งเกี่ยวข้องในกระบวนการทางชีววิทยาต่างๆ เช่น การแสดงออกของยีน การตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) และการนำพาสารอินทรีย์เข้าหรือออกจากเซลล์ ทั้งนี้ในเซลล์นั้นกลูตาไธโอนจะมีอยู่ 2 สถานะ คือในรูปที่ถูกออกซิไดซ์ (oxidized form, GSSG) หรือในรูปที่ถูกรีดิวซ์ (reduced form, GSH) การรักษาให้ปริมาณกลูตาไธโอนในรูปที่ถูกรีดิวซ์และออกซิไดซ์อยู่ในสัดส่วนที่เหมาะสม มีความสำคัญต่อการอยู่รอดของเซลล์ มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นความสำคัญของกลูตาไธโอนในการป้องกันการสะสมของอนุมูลอิสระและผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งการสะสมสิ่งเหล่านี้เป็นการเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดโรค เช่น มะเร็งมากขึ้นเมื่อได้รับสิ่งกระตุ้น ด้วยเหตุนี้โครงการวิจัยนี้ จึงมีความสนใจที่จะศึกษาผลของการรับประทานกล้วยไข่ต่อการป้องกันมะเร็งผิวหนังที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยรังสียูวีบี โดยการศึกษานี้จะทำการศึกษาในสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งผิวหนังด้วยสารเคมีร่วมกับการได้รับรังสียูวีบี และได้รับกล้วยไข่สดโดยการให้ทางปาก (oral administration) ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน เป็นเวลา 4 เดือน แล้วทำการประเมินขนาดของเนื้องอก (tumor) และการแสดงออกของโปรตีน 4-hydroxynonenal (4-HNE) และ cyclooxygenase enzyme (COX-2) ที่ผิวหนังซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดเนื้องอกที่ผิวหนัง โดยทำการเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับกล้วยน้ำว่าในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัม และวิตามินซีในขนาด 50 มิลลิกรัมต่อวัน ร่วมกับการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี โดยมีสมมติฐานคือ หากหนูได้รับผลไม้ที่มีสารกลุ่มฟีนอลต่ำ (เช่น กล้วยน้ำว่า) อาจจะทำให้พบชีวโมเลกุลที่เป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาออกซิเดชัน เช่น 4-HNE และสารสื่ออักเสบ COX-2 ในผิวหนังที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งในปริมาณที่สูง ร่วมกับการเกิดเนื้องอก ในทางตรงกันข้ามหากได้รับผลไม้ที่มีสารกลุ่มฟีนอลสูง (เช่น กล้วยไข่) ก็อาจจะพบชีวโมเลกุลดังกล่าวในผิวหนังที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งในปริมาณไม่แตกต่างจากระดับที่พบในหนูปกติและไม่มีเนื้องอกปรากฏ ผลที่ได้จากการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เชิงลึก ที่สามารถนำไปใช้เพื่อส่งเสริมการบริโภคผลไม้ไทยทั้งภายใน ประเทศและต่างประเทศ และเป็นการเพิ่มคุณค่าของผลไม้ไทยให้ได้รับความสนใจทั่วโลก ส่งผลต่อเศรษฐกิจของประเทศในทางอ้อม

วัตถุประสงค์ของโครงการ

วัตถุประสงค์หลัก

เพื่อประเมินประสิทธิภาพของเนื้อผลกล้วยไข่สุกในการป้องกันมะเร็งผิวหนัง ที่เกิดจากการได้รับรังสียูวีบี ต่อเนื่อง รวมทั้งกลไกในการป้องกัน

วัตถุประสงค์เชิงพฤติกรรม

1. เปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมี เช่น gallic acid, catechins และ beta-carotene ที่พบในกล้วยไข่ และกล้วยน้ำว้า
2. เปรียบเทียบการป้องกันการเกิดเนื้องอก ที่ผิวหนังหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งผิวหนังโดยได้รับสารกระตุ้นและรังสียูวีบี ร่วมกับได้รับกล้วยไข่สุก กล้วยน้ำว้าสุก หรือวิตามินซี
3. เปรียบเทียบปริมาณของกลูตาไธโอนทั้งที่อยู่ในรูปที่ถูกรีดิวซ์และออกซิไดซ์ ในผิวหนังหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งผิวหนังโดยได้รับสารกระตุ้นและรังสียูวีบี ร่วมกับได้รับกล้วยไข่สุก กล้วยน้ำว้าสุก หรือวิตามินซี
4. เปรียบเทียบปริมาณของสารที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งผิวหนัง ได้แก่ 4-HNE และ COX-2 ในผิวหนังหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งผิวหนังโดยได้รับสารกระตุ้นและรังสียูวีบี ร่วมกับได้รับกล้วยไข่สุก กล้วยน้ำว้าสุก หรือวิตามินซี

ผลการวิจัย

เริ่มจากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่มีอยู่ในสารสกัดจากผลกล้วยสุกทำแห้ง โดยใช้ Folin-Ciocalteu's reagent พบว่าสารสกัดจากกล้วยน้ำว้าสุกทำแห้งมีปริมาณฟีนอลิกเท่ากับ 46.06 ± 3.80 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของเนื้อผลไม้แห้ง สารสกัดจากกล้วยไข่สุกทำแห้งมีปริมาณฟีนอลิก 126.14 ± 4.01 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของเนื้อผลไม้แห้ง และสำหรับปริมาณ β -carotene นั้น พบว่าในกล้วยไข่มีปริมาณ β -carotene 56.57 ไมโครกรัมต่อ มิลลิกรัม

ในส่วนของการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากผลกล้วยสุกทำแห้ง โดยใช้ DPPH assay ซึ่งแสดงค่าในรูปของ EC50 (ความเข้มข้นของสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านการเกิดออกซิเดชัน โดย free radical scavenging เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์) พบว่าสารสกัดจากกล้วยน้ำว้าสุกทำแห้งมีค่า EC50 เท่ากับ 4.03 ± 0.82 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากกล้วยไข่สุกทำแห้งมีค่า EC50 เท่ากับ 0.17 ± 0.01 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร

สำหรับการศึกษาผลของศักยภาพของผลกล้วยไข่และน้ำว้า ในการป้องกันมะเร็งผิวหนังในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย ดีเอ็มบีเอและรังสียูวีบี ซึ่งเป็นการศึกษาในสัตว์ทดลอง โดยใช้หนูสายพันธุ์ ICR เพศผู้ ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งผิวหนังด้วยสารก่อมะเร็ง DMBA ร่วมกับที่ได้รับแสง UVB เป็นเวลา 16 สัปดาห์ ตามลำดับความเข้มแสงที่กำหนด พร้อมกับได้รับน้ำเปล่า วิตามินซี หรือผลกล้วยน้ำว้าสุก กล้วยไข่สุก พบว่า ระดับความหนาของชั้นหนังกำพร้าหรือ epidermis ของหนูทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับรังสียูวีบี (normal) ไม่มีความผิดปกติของชั้นผิวหนังและการแบ่งตัวของเซลล์ผิวหนัง ในขณะที่หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสารก่อมะเร็งและรังสียูวีบี มีความผิดปกติของการแบ่งเซลล์

ในชั้น epidermis รวมทั้งความหนาของชั้น epidermis ที่ไม่สม่ำเสมอ คือกล่าวได้ว่าเกิด epidermal hyperplasia เป็นจุดๆ และบางจุดที่เกิดมีการแพร่กระจายของเซลล์ keratinocyte จากชั้น epidermis ลงสู่ชั้น dermis ซึ่งเป็นการบ่งบอกว่ามีการแบ่งตัวอย่างมากของเซลล์ จากความผิดปกติของเซลล์ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ และนำไปสู่การเกิดมะเร็งผิวหนังในที่สุด และจากผลการศึกษาปริมาณ 4-HNE และ COX-2 เป็นชีวโมเลกุลที่บ่งบอกว่าเกิดการพัฒนามาของเซลล์ปกติเป็นเซลล์มะเร็ง เนื่องจากการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันอย่างต่อเนื่องด้วยรังสียูวีบี และทำให้เกิดการสะสมของสารสื่อการอักเสบในผิวหนัง ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งผ่านทาง DNA damage และการตอบสนองต่อเซลล์มะเร็งที่แบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณของ 4-HNE และ COX-2 มีการแสดงออกในกลุ่มหนูทดลองที่ได้รับสารก่อมะเร็งร่วมกับการฉายรังสียูวีบีสูงกว่ากลุ่ม normal และพบว่าการได้รับกล้วยน้ำว้า กล้วยไข่ และวิตามินซี ไม่มีผลต่อการลดการแสดงออกของ 4-HNE และ COX-2 ในผิวหนัง ในขณะที่ผลของการศึกษาระดับกลูตาไธโอนทั้งหมดในผิวหนังกลับพบว่า หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับวิตามินซีมีการรักษาระดับของปริมาณกลูตาไธโอนในผิวหนังให้สมดุลเทียบกับกลุ่ม normal และระดับกลูตาไธโอนที่ตรวจวัดได้มีปริมาณสูงกว่ากลุ่ม control และกลุ่มที่ได้รับกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่ อย่างไรก็ตาม ถึงแม้วิตามินซีจะสามารถช่วยรักษาระดับกลูตาไธโอนในผิวหนังของหนูทดลองได้ แต่ก็ไม่สามารถชะลอหรือยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งได้ เนื่องจากกลูตาไธโอนเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายสร้างขึ้นเองโดยธรรมชาติเพื่อป้องกันอันตรายจากสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากการได้รับรังสียูวีบี แต่วิตามินซีไม่สามารถช่วยชะลอการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งได้ ดังที่พบว่า atypical nuclei เกิดขึ้นในชั้น dermis ของหนูกลุ่มที่ได้รับมาวิตามินซี กว่าหนูทดลองกลุ่มอื่นๆ ในขณะที่หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่มีการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งที่น้อยกว่า นั้นแสดงว่าสารสำคัญที่อยู่ในกล้วยทั้ง 2 ชนิดมีผลต่อการชะลอการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง แต่อย่างไรก็ตาม กล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่ก็ยังไม่มีความสมบูรณ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ทั้งนี้ อาจอธิบายได้ว่าเกิดจากการที่หนูได้รับสารสำคัญที่มีอยู่ในกล้วยพร้อมกับการเริ่มการฉายรังสียูวีบีที่ผิวหนังหนูหลังจากที่เกิด DNA damage (อันเนื่องมาจากการทา DMBA ที่มีคุณสมบัติทำให้เกิด DNA adducts ภายในสาย DNA) แล้ว ซึ่งรังสียูวีบีนั้นสามารถทำให้เกิด DNA damage ได้เช่นกัน และการได้รับรังสียูวีบีอย่างต่อเนื่อง ส่งผลทำให้การซ่อมแซม DNA ไม่สามารถทำได้อย่างสมบูรณ์ การเกิดการสะสมเซลล์ที่ DNA damage นี้ เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบและหลั่งสารสื่อการอักเสบออกมาอย่างต่อเนื่อง ดังนั้น ถึงแม้ว่าหนูจะได้รับสารสำคัญในกล้วยที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสะสมของอนุมูลอิสระทุกวัน ก็ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงเซลล์มะเร็งที่เกิดการกลายพันธุ์และไม่สามารถควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์เหล่านี้ได้ อย่างไรก็ตาม เป็นที่น่าสนใจที่พบว่า กล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่สามารถชะลอและ/หรือลดการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งและชะลอการแสดงออกที่บ่งบอกการเป็นมะเร็ง เช่น การเกิด atypical nuclei ได้ดีกว่าวิตามินซี รวมทั้งลักษณะทางกายภาพของผิวหนัง จะเห็นได้ว่ากล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่สามารถชะลอการเกิด skin aging ได้ดีกว่าวิตามินซี

ดังนั้น จากผลการทดลองกล่าวได้ว่า หนูทดลองที่ได้รับกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่ มีแนวโน้มชะลอการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งผิวหนังได้ดีกว่าวิตามินซี เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษการจัดเรียงตัวของเซลล์ epidermis โดยการย้อมสี H&E แต่การได้รับกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่ไม่สามารถรักษามะเร็งผิวหนังที่เกิดขึ้นได้ ทั้งนี้การชะลอการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งอาจเนื่องมาจากสารสำคัญที่อยู่ในกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่ เช่น กรดแกลลิก คาเทชิน

และเบต้า-แคโรทีน มีบทบาทมากกว่าวิตามินซี

คำสืบค้น (Keywords)

ภาษาไทย: มะเร็งผิวหนัง, สารก่อมะเร็งดีเอ็มบีเอ, รังสียูวีบี, กลัวยไข, กลัวยน้ำว่า

ภาษาอังกฤษ: Skin cancer, 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA), Ultraviolet B, Khuai Khai, Khuai Namwa

การนำผลงานวิจัยมีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ ด้านสาธารณะ

ผลที่ได้จากการศึกษานี้อาจจะนำไปใช้เป็นหลักฐานที่ชี้ให้เห็นประโยชน์ของผลไม้ไทย ในการป้องกันผิวหนังถูกทำลายหรือโรคอันตราย อันเนื่องมาจากการได้รับรังสียูวีบีอย่างต่อเนื่อง

หน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ และใช้ประโยชน์ด้านไหน

หน่วยงานของรัฐและเอกชน ที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการส่งออกผลไม้ไทย

การประชาสัมพันธ์

1. สิ่งพิมพ์ทั่วไป -

2. สิ่งพิมพ์ทางวิชาการ -

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อประเมินศักยภาพของผลกล้วยไข่และน้ำว่าในการป้องกันมะเร็งผิวหนังในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยดีเอ็มบีเอและรังสียูวีบี ผลกล้วยน้ำว่าสุกและกล้วยไข่สุกที่ถูกนำมาทำให้แห้ง ถูกนำมาประเมินปริมาณฟีนอลิกรวม เบตา-แคโรทีน และความสามารถในการต้านออกซิเดชัน โดยการใช้สารโพลิน-ซีโอคาลเทอร์ พบว่าสารสกัดกล้วยน้ำว่าและกล้วยไข่แห้ง (โดยใช้เอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์) มีปริมาณฟีนอลทั้งหมดเท่ากับ 46.06 ± 3.80 และ 126.14 ± 4.01 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของผลไม้แห้ง ตามลำดับ ในกล้วยไข่มีปริมาณเบตา-แคโรทีนเท่ากับ 56.57 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมของเนื้อผลไม้แห้ง ในขณะที่ไม่สามารถวัดสารชนิดนี้ได้ในกล้วยน้ำว่า จากวิธีดีพีพีเอพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดกล้วยน้ำว่าและกล้วยไข่แห้งทำแห้ง ที่มีฤทธิ์ในการต้านการเกิดออกซิเดชันเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ ของการต้านการเกิดออกซิเดชัน มีค่าเท่ากับ 4.03 ± 0.82 และ 0.17 ± 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมตามลำดับ ต่อมาจึงทำการศึกษาศักยภาพของผลกล้วยไข่และน้ำว่าในการป้องกันมะเร็งผิวหนังในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยดีเอ็มบีเอและรังสียูวีบี โดยใช้หนูสายพันธุ์ไอซอร์ หนูได้รับวิตามินซีปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน หรือกล้วยน้ำว่าสุก กล้วยไข่สุกในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน เป็นเวลา 16 สัปดาห์ ในขณะเดียวกันผิวหนังด้านหลังของหนูก็ได้รับสารก่อมะเร็งดีเอ็มบีเอ ร่วมกับได้รับรังสียูวีบี (ได้รับ 3 ครั้งต่อสัปดาห์) จากความเข้มข้น 54 จนถึง 126 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร ในสัปดาห์ที่ 3 เป็นต้นไป จนถึงสัปดาห์ที่ 16 การป้องกันมะเร็งผิวหนังอันเนื่องมาจากการได้รับการเหนี่ยวนำด้วยสารก่อมะเร็งดีเอ็มบีเอรวมกับการได้รับรังสียูวีบีถูกประเมินจากลักษณะทางกายภาพที่ปรากฏบนผิวหนัง ความหนาของผิวหนังชั้นหนังกำพร้า นอกจากนี้ยังทำการประเมินระดับของการแสดงออก 4-HNE COX-2 และกลูตาไธโอน ในผิวหนังหนู พบว่าหนูที่ได้รับการเหนี่ยวนำร่วมกับการได้รับรังสียูวีบีเป็นเวลา 16 สัปดาห์ ส่งผลให้ผิวหนังกำพร้าหนาขึ้นอย่างไม่สม่ำเสมอ เกิดการแบ่งตัวของเนื้องอกในชั้นผิวหนังที่ลึกลงไป และการแสดงออกของ 4-HNE และ COX-2 สูงขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารก่อมะเร็งและรังสียูวีบี การได้รับกล้วยน้ำว่า กล้วยไข่ และวิตามินซี ไม่ส่งผลทำให้การแสดงออกของ 4-HNE และ COX-2 ลดลง แต่การได้รับวิตามินซีสามารถรักษาระดับกลูตาไธโอนในผิวหนังไม่ให้ลดลงอันเนื่องมาจากการได้รับรังสียูวีบี อย่างไรก็ตาม พบว่า การได้รับกล้วยไข่หรือน้ำว่าสุกสามารถชะลอและ/หรือลดการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง และชะลอการแสดงออกที่บ่งบอกการเป็นมะเร็ง เช่น การเกิด atypical nuclei ได้ดีกว่าวิตามินซี

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the potential of Thai banana (Namwa & Khai) on prevention of DMBA/UVB-induced skin cancer. Firstly, freeze dried fresh fruits of ripe Namwa and Khai were determined total phenolic content, β -carotene content and antioxidant activity. By using Folin-Ciocalteu's reagent, we found that total phenolic content of Namwa and Khai extracts (by using 50% ethanol) was 46.06 ± 3.80 and 126.14 ± 4.01 mg/100 g of the freeze dried fresh fruits, respectively. The β -carotene content found in Khai was $56.57 \mu\text{g}/\text{mg}$ of the freeze dried fresh fruits while this could not be detectable in Namwa. According to DPPH assay, EC_{50} on antioxidant activity of Namwa and Khai extracts was 4.03 ± 0.82 and $0.17 \pm 0.01 \mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. The study on potential of banana fruit on prevention of DMBA/UVB-induced skin cancer was performed in male ICR mice. Animals were orally administered 50 mg/day vitamin c or the ripe Namwa and Khai at dose of 1 mg/g body weight/day for 16 weeks. At the same period, the dorsal skin of mice were apply 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) in sub-carcinogenic dose and irradiated with UVB for 16 weeks (3 times a week). The intensity of irradiation was progressively increased, from $54 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ per exposure at week 1 to $126 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ at week 3 to week 16. The prevention of DMBA/UVB-induced skin cancer was determined from skin characteristics and skin epidermal thickness. Furthermore, levels of 4-HNE, COX-2 and glutathione in skin were determined. We found that DMBA/chronic UVB exposure for 16 weeks caused increasing in skin epidermal thickness, progression of tumor in dermal layer and increasing in levels of 4-HNE, COX-2 in skin. The administration of Khai or Namwa did not inhibit increasing of 4-HNE and COX-2 expression. The administration of vitamin c could restore glutathione level in DMBA/UVB-induced skin when comparing to non DMBA/UVB-induced skin. However, we found that the administration of ripe Khai or Namwa showed efficiency in slowing down and/or decreasing tumor cell mitosis and slowing down formation of atypical nuclei as compared to group of DMBA/UVB-induced mice receiving vitamin c.

สารบัญเรื่อง

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	II
แบบสรุปโครงการวิจัย (Executive Summary)	III
บทคัดย่อ	VIII
สารบัญเรื่อง	X
สารบัญตาราง	XII
สารบัญรูป	XIII
เนื้อหางานวิจัย	
บทที่ 1 ที่มาและความสำคัญ	
1. ที่มาและความสำคัญ/หลักการและเหตุผล	1
2. ทบทวนเอกสารเชิงสังเคราะห์	3
3. วัตถุประสงค์	7
บทที่ 2 ระเบียบการวิจัย	
1. สารเคมี สัตว์ทดลอง อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์	8
2. วิธีการทดลอง	10
2.1 การทำแห้งกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่แบบเยือกแข็ง (Freeze dried banana)	10
2.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม (total phenolic content) ในสารสกัดกล้วยน้ำว้าแห้งและกล้วยไข่แห้งด้วย Folin-ciocalteu assay	11
2.3 การศึกษาปริมาณกรดแกลลิก (gallic acid) และคาเทชิน (catechin) ที่มีอยู่ในผลกล้วยโดย HPLC analysis	12
2.4 การวิเคราะห์ปริมาณเบตา-แคโรทีน (β -carotene) ในกล้วยแห้ง โดยการวัดค่าดูดกลืนแสง	15
2.5 การวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ของสารสกัดจากกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่แห้ง โดยวิธี DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical assay	16
2.6 การวัดปริมาณ Lipid peroxide inhibition โดยวิธี Thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) assay	17
2.7 การศึกษาศักยภาพของกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่ในการป้องกันการเกิดมะเร็งผิวหนังในหนูทดลองที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งผิวหนังด้วยสารก่อมะเร็ง DMBA และรังสียูวีบี	19

บทที่ 3 ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง

1. ลักษณะทางกายภาพของกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่สุกที่ถูกทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง	27
2. ปริมาณฟีนอลิกรวม (total phenolic content) ในสารสกัดกล้วยน้ำว้าแห้งและกล้วยไข่แห้ง	27
3. ปริมาณสารสำคัญกรดแกลลิก (gallic acid) และคาเทชิน (catechin) ที่มีอยู่ในผลกล้วย	29
4. ปริมาณเบตา-แคโรทีนที่มีอยู่ในผลกล้วย	31
5. ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่แห้ง	32
6. Lipid peroxidation inhibition	33
7. ศักยภาพของกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่ในการป้องกันมะเร็งผิวหนัง ในหนูทดลองที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งด้วยสารก่อมะเร็ง DMBA ร่วมกับการฉายรังสียูวีบี	34
7.1 น้ำหนักของหนูทดลองหลังจากการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งผิวหนัง	34
7.2 ลักษณะทางกายภาพและความหนาของผิวหนังที่กำพวดในระดับจุลกายวิภาคศาสตร์	35
7.3 ปริมาณกลูตาไธโอนทั้งหมด (total glutathione) ในผิวหนังหนูทดลอง	45
7.4 ปริมาณ 4-HNE และ COX-2 ในผิวหนังหนูทดลอง	47
บทที่ 4 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	53
ภาคผนวก	56
เอกสารอ้างอิง	75

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
ตารางที่ 1 เปรียบเทียบน้ำหนักของผลกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่สดกับน้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง	27
ตารางที่ 2 แสดงค่า EC_{50} กล้วยน้ำว้าแห้งและกล้วยไข่แห้ง (mean $\pm$ SD), n=3	32
ตารางที่ 3 แสดงค่าดูดกลืนแสงของกรดแกลลิก, ผลกล้วยน้ำว้าสุก (<i>Musa sapientum</i> L.) และกล้วยไข่สุก (<i>Musa surier</i> L.) ที่ถูกทำให้แห้งก่อนนำมาสกัด เพื่อนำสารสกัดที่ได้มาวัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร	56

สารบัญรูป

รูป	หน้า
รูปที่ 1 ลักษณะทางกายภาพของกล้วยน้ำว้า (<i>Musa sapientum</i> L., ABB Group) และกล้วยไข่ (<i>Musa surier</i> L., AA Group)	10
รูปที่ 2 ขวดยาหม่องที่บรรจุกล้วยสด	10
รูปที่ 3 สารสกัดกล้วยที่ผ่านการแช่เหวี่ยงนาน 72 ชั่วโมง และกรองสารสกัดออกจากส่วนตะกอนด้วยชุดกรองสุญญากาศ	12
รูปที่ 4 ภาพสารสกัดกล้วยน้ำว้า (ขวา) และกล้วยไข่ (ซ้าย) ที่ผ่านการกรองแล้ว	13
รูปที่ 5 ภาพสารสกัดกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่ที่ผ่านการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง evaporator	13
รูปที่ 6 แสดงการทำปฏิกิริยาของ TBARs reagent สีชมพูเข้มที่ปรากฏไม่สารต้านอนุมูลอิสระ และ สีใสเป็นตัวอย่างทดสอบที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ	18
รูปที่ 7 ภาพการเตรียมตัวอย่างผลกล้วยสุก เพื่อนำมาป้อนให้สัตว์ทดลอง	20
รูปที่ 8 (a, b, c) ภาพการเตรียมของเหลวแขวนตะกอนของผลกล้วยสุกสำหรับการป้อนหนูทดลองความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	20
รูปที่ 9 ภาพหนูทดลองหลังการวางยาสลบและการเตรียมหนูทดลองยั้งสัญญาณชีวภาพ	22
รูปที่ 10 แสดงภาพกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่ หลังจากถูกทำให้แห้งโดยเครื่อง Freeze dryer	27
รูปที่ 11 ตัวอย่าง Gallic acid standard reference curve, $R^2 = 0.999$	28
รูปที่ 12 กราฟแสดงความแตกต่างของปริมาณฟีนอลรวมในกล้วยไข่สุก (<i>Musa surier</i> L.) และกล้วยน้ำว้าสุก (<i>Musa sapientum</i> L.) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (Student's <i>t</i> test) (mean $\pm$ SD, $n = 3$, $*p < 0.05$)	28
รูปที่ 13 แสดงภาพโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	29
รูปที่ 14 แสดงภาพโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานคาเทชินความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	30
รูปที่ 15 แสดงภาพโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานผสมระหว่างกรดแกลลิกความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และคาเทชินความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	30
รูปที่ 16 แสดงภาพโครมาโตแกรมของสารสกัดกล้วยไข่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	30
รูปที่ 17 แสดงภาพโครมาโตแกรมของสารสกัดกล้วยน้ำว้าความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อ	31

มิลลิลิตร

รูปที่ 18 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ (% free radical scavenging) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากผลกล้วยน้ำว้าสุก (ที่ถูกทำให้แห้งก่อนนำมาสกัด)	33
รูปที่ 19 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ (% free radical scavenging) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากผลกล้วยไข่สุก (ที่ถูกทำให้แห้งก่อนนำมาสกัด)	33
รูปที่ 20 ผลการทดสอบ Lipid peroxide inhibition ของสารสกัดกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่แห้ง โดยวิธี TBARs assay	34
รูปที่ 21 แสดงน้ำหนักของหนูทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งผิวหนัง (normal) และกลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งผิวหนังร่วมกับการได้รับน้ำเปล่า (control) กล้วยน้ำว้าสุก กล้วยไข่สุก และวิตามินซี ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 (อายุ 6 สัปดาห์) ถึงสัปดาห์ที่ 16 (mean±SD, n = 5)	35
รูปที่ 22 ลักษณะทางกายภาพของผิวหนังหนูทดลองกลุ่มปกติ (normal) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ณ สัปดาห์ที่ 16	36
รูปที่ 23 ลักษณะทางกายภาพของผิวหนังหนูทดลองกลุ่มควบคุม (control) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับ DMBA และการรังสียูวีบี ร่วมกับการถูกป้อนน้ำ ณ สัปดาห์ที่ 16	36
รูปที่ 24 ลักษณะทางกายภาพของผิวหนังหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับการถูกป้อนกล้วยน้ำว้าสุก ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักหนูต่อวัน ณ สัปดาห์ที่ 16	36
รูปที่ 25 ลักษณะทางกายภาพของผิวหนังหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับการถูกป้อนกล้วยไข่สุก ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักหนูต่อวัน ณ สัปดาห์ที่ 16	37
รูปที่ 26 ลักษณะทางกายภาพของผิวหนังหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับการถูกป้อนวิตามินซี ในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน ณ สัปดาห์ที่ 16	37
รูปที่ 27 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของผิวหนังหนูทดลองกลุ่มปกติ (normal) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ณ สัปดาห์ที่ 16 (กำลังขยาย 40 เท่า)	39
รูปที่ 28 (a, b) ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของผิวหนังหนูทดลองกลุ่มควบคุม (control) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบีร่วมกับถูกป้อนน้ำเปล่า ณ สัปดาห์ที่ 16 (กำลังขยาย 40 เท่า), ลูกศรสีน้ำเงิน บ่งชี้ตำแหน่งของการเกิด keratinocyte hyper-proliferation และการแพร่กระจายลงสู่ชั้น dermis	41
รูปที่ 29 (a, b.) ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของผิวหนังหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับการถูกป้อนกล้วยน้ำว้าสุก ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของ	42

- น้ำหนักรหนูต่อวัน ณ สัปดาห์ที่ 16 ที่กำลังขยาย 40 เท่า, ลูกครีสน้ำเงิน บ่งชี้ตำแหน่งของการเกิด keratinocyte hyper-proliferation และการแพร่กระจายลงสู่ชั้น dermis
- รูปที่ 30 (a, b.) ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของผิวหนังหนุทดลองกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนกลัยไซ์สุก ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักรหนูต่อวัน ณ สัปดาห์ที่ 16 ที่กำลังขยาย 40 เท่า, ลูกครีสน้ำเงิน บ่งชี้ตำแหน่งของการเกิด keratinocyte hyper-proliferation และการแพร่กระจายลงสู่ชั้น dermis 43
- รูปที่ 31 (a.) ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของผิวหนังหนุทดลองกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนวิตามินซี ในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน ณ สัปดาห์ที่ 16 ที่กำลังขยาย 20 เท่า และ (b.) ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของผิวหนังหนุที่กำลังขยาย 40 เท่า ลูกครีสีแดง บ่งชี้ตำแหน่งของ acanthosis , ลูกครีสน้ำเงิน บ่งชี้ตำแหน่งของการเกิด keratinocyte hyper-proliferation และการแพร่กระจายลงสู่ชั้น dermis 44
- รูปที่ 32 glutathione standard reference curve, $R^2 = 0.9997$ 46
- รูปที่ 33 ปริมาณกลูตาไธโอนทั้งหมดในผิวหนังหนุทดลองของกลุ่มปกติ (normal) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งผิวหนัง ร่วมกับการถูกป้อนน้ำเปล่า (control) กลัยไซ์สุก กลัยไซ์สุก หรือวิตามินซี ณ 16 สัปดาห์ (mean $\pm$ SD, n = 5, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ และ *** $p < 0.001$, Student's *t*-test) 46
- รูปที่ 34 ภาพถ่ายจากเทคนิค immunofluorescence แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของ 4-HNE (เรืองแสงสีเขียว) ในผิวหนังหนุทดลอง (กำลังขยาย 40 เท่า) ณ สัปดาห์ที่ 16 ทั้งนี้ (a) คือกลุ่มปกติ (normal) (b) คือกลุ่มควบคุม (control) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนน้ำเปล่า (c) คือกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนกลัยไซ์สุก ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักรหนูต่อวัน (d) คือกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนกลัยไซ์สุก ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักรหนูต่อวัน และ (e) คือ กลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนวิตามินซี ในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน 48
- รูปที่ 35 ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence intensity) ที่แปรผันตรงกับปริมาณ 4-HNE ที่อยู่ในชั้นเนื้อตัวอย่างของผิวหนังหนุในแต่ละกลุ่มการทดลอง ทั้งนี้ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของกลุ่มปกติ (normal) ถูกปรับให้เป็น 100 เปอร์เซนต์ (mean $\pm$ SD, n = 5, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Student's *t*-test) 49
- รูปที่ 36 ภาพถ่ายจากเทคนิค immunofluorescence แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของ 50

- COX-2 (เรืองแสงสีแดง) ในผิวหนังหนูทดลอง (กำลังขยาย 40X) ณ สัปดาห์ที่ 16 ทั้งนี้ (a) คือกลุ่มปกติ (normal) (b) คือกลุ่มควบคุม (control) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนน้ำเปล่า (c) คือกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนกล้วยน้ำว้าสุก ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักหนูต่อวัน (d) คือกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนกล้วยไข่สุก ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักหนูต่อวัน และ (e) คือ กลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนวิตามินซี ในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน
- รูปที่ 37 ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence intensity) ที่แปรผันตรงกับปริมาณ COX-2 ที่อยู่ในชั้นเนื้อตัวอย่างของผิวหนังหนูในแต่ละกลุ่มการทดลอง ทั้งนี้ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของกลุ่มปกติ (normal) ถูกปรับให้เป็น 100 เปอร์เซนต์ (mean $\pm$ SD, n = 5, * p < 0.05, ** p < 0.01, Student's t -test) 51
- รูปที่ 38 ลักษณะทางจุลวิภาคศาสตร์ของผิวหนังหนูทดลองกลุ่มปกติ (normal) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ณ สัปดาห์ที่ 16 ที่กำลังขยาย 40 เท่า, (a-e) คือ ภาพการศึกษาระดับจุลวิภาคศาสตร์ของผิวหนังของหนูทดลองตัวที่ 1-5 57
- รูปที่ 39 ลักษณะทางจุลวิภาคศาสตร์ของผิวหนังหนูทดลองกลุ่มควบคุม (control) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบีร่วมกับถูกป้อนน้ำเปล่า ณ สัปดาห์ที่ 16 ที่กำลังขยาย 40 เท่า, (a-e) คือ ภาพการศึกษาระดับจุลวิภาคศาสตร์ของผิวหนังของหนูทดลองตัวที่ 1-5 58
- รูปที่ 40 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของผิวหนังหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนกล้วยน้ำว้าสุก ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักหนูต่อวัน ณ สัปดาห์ที่ 16 ที่กำลังขยาย 40 เท่า, (a-e) คือ ภาพการศึกษาระดับจุลวิภาคศาสตร์ของผิวหนังของหนูทดลองตัวที่ 1-5 59
- รูปที่ 41 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของผิวหนังหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนกล้วยไข่สุก ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักหนูต่อวัน ณ สัปดาห์ที่ 16 ที่กำลังขยาย 40 เท่า, (a-e) คือ ภาพการศึกษาระดับจุลวิภาคศาสตร์ของผิวหนังของหนูทดลองตัวที่ 1-5 60
- รูปที่ 42 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของผิวหนังหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนวิตามินซี ในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน ณ สัปดาห์ที่ 16 ที่กำลังขยาย 40 เท่า, (a-e) คือ ภาพการศึกษาระดับจุลวิภาคศาสตร์ของผิวหนังของหนูทดลองตัวที่ 1-5 61
- รูปที่ 43 ภาพถ่ายจากเทคนิค immunofluorescence staining แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของ 4-HNE (เรืองแสงสีเขียว) ในผิวหนังหนูทดลองกลุ่มปกติ (normal) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ณ สัปดาห์ที่ 16 (กำลังขยาย 40 เท่า) 62

ทั้งนี้ (a) คือ ภาพ negative control ที่ทำการย้อมด้วย secondary antibody (Alexa Fluor®488), ab150077) เพียงอย่างเดียว, (b-f) คือ ภาพการแสดงออกของ 4-HNE ในผิวหนังหนูทดลองตัวที่ 1-5

- รูปที่ 44 ภาพถ่ายจากเทคนิค immunofluorescence staining แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของ 4-HNE (เรืองแสงสีเขียว) ในผิวหนังหนูทดลองกลุ่มควบคุม (control) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนน้ำเปล่า ณ สัปดาห์ที่ 16 (กำลังขยาย 40 เท่า) ทั้งนี้ (a) คือ ภาพ negative control ที่ทำการย้อมด้วย secondary antibody (Alexa Fluor®488), ab150077) เพียงอย่างเดียว, (b-f) คือ ภาพการแสดงออกของ 4-HNE ในผิวหนังหนูทดลองตัวที่ 1-5 63
- รูปที่ 45 ภาพถ่ายจากเทคนิค immunofluorescence staining แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของ 4-HNE (เรืองแสงสีเขียว) ในผิวหนังหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนกล้วยน้ำว้าสุก ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักหนูต่อวัน ณ สัปดาห์ที่ 16 (กำลังขยาย 40 เท่า) ทั้งนี้ (a) คือ ภาพ negative control ที่ทำการย้อมด้วย secondary antibody (Alexa Fluor®488), ab150077) เพียงอย่างเดียว, (b-f) คือ ภาพการแสดงออกของ 4-HNE ในผิวหนังหนูทดลองตัวที่ 1-5 64
- รูปที่ 46 ภาพถ่ายจากเทคนิค immunofluorescence staining แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของ 4-HNE (เรืองแสงสีเขียว) ในผิวหนังหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนกล้วยไข่สุก ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักหนูต่อวัน ณ สัปดาห์ที่ 16 (กำลังขยาย 40 เท่า) ทั้งนี้ (a) คือ ภาพ negative control ที่ทำการย้อมด้วย secondary antibody (Alexa Fluor®488), ab150077) เพียงอย่างเดียว, (b-f) คือ ภาพการแสดงออกของ 4-HNE ในผิวหนังหนูทดลองตัวที่ 1-5 65
- รูปที่ 47 ภาพถ่ายจากเทคนิค immunofluorescence staining แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของ 4-HNE (เรืองแสงสีเขียว) ในผิวหนังหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนวิตามินซี ในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน ณ สัปดาห์ที่ 16 (กำลังขยาย 40 เท่า) ทั้งนี้ (a) คือ ภาพ negative control ที่ทำการย้อมด้วย secondary antibody (Alexa Fluor®488), ab150077) เพียงอย่างเดียว, (b-f) คือ ภาพการแสดงออกของ 4-HNE ในผิวหนังหนูทดลองตัวที่ 1-5 66
- รูปที่ 48 ภาพถ่ายจากเทคนิค immunofluorescence staining แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของ COX-2 (เรืองแสงสีแดง) ในผิวหนังหนูทดลองกลุ่มปกติ (normal) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ณ สัปดาห์ที่ 16 (กำลังขยาย 40 เท่า) ทั้งนี้ (a) คือ ภาพ negative control ที่ทำการย้อมด้วย secondary antibody 67

(Goat anti-rabbit IgG H&L (Cy5), ab6564) เพียงอย่างเดียว, (b-f) คือ ภาพการแสดงออกของ COX-2 ในผิวหนังหนุทดลองตัวที่ 1-5

- รูปที่ 49 ภาพถ่ายจากเทคนิค immunofluorescence staining แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของ COX-2 (เรืองแสงสีแดง) ในผิวหนังหนุทดลองกลุ่มกลุ่มควบคุม (control) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนน้ำเปล่า ณ สัปดาห์ที่ 16 (กำลังขยาย 40 เท่า) ทั้งนี้ (a) คือ ภาพ negative control ที่ทำการย้อมด้วย secondary antibody (Goat anti-rabbit IgG H&L (Cy5), ab6564) เพียงอย่างเดียว, (b-f) คือ ภาพการแสดงออกของ COX-2 ในผิวหนังหนุทดลองตัวที่ 1-5 68
- รูปที่ 50 ภาพถ่ายจากเทคนิค immunofluorescence staining แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของ COX-2 (เรืองแสงสีแดง) ในผิวหนังหนุทดลองกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนกล้วยน้ำว้าสุก ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักหนุต่อวัน ณ สัปดาห์ที่ 16 (กำลังขยาย 40 เท่า) ทั้งนี้ (a) คือ ภาพ negative control ที่ทำการย้อมด้วย secondary antibody (Goat anti-rabbit IgG H&L (Cy5), ab6564) เพียงอย่างเดียว, (b-f) คือ ภาพการแสดงออกของ COX-2 ในผิวหนังหนุทดลองตัวที่ 1-5 69
- รูปที่ 51 ภาพถ่ายจากเทคนิค immunofluorescence staining แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของ COX-2 (เรืองแสงสีแดง) ในผิวหนังหนุทดลองกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนกล้วยไข่สุก ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักหนุต่อวัน ณ สัปดาห์ที่ 16 (กำลังขยาย 40 เท่า) ทั้งนี้ (a) คือ ภาพ negative control ที่ทำการย้อมด้วย secondary antibody (Goat anti-rabbit IgG H&L (Cy5), ab6564) เพียงอย่างเดียว, (b-f) คือ ภาพการแสดงออกของ COX-2 ในผิวหนังหนุทดลองตัวที่ 1-5 70
- รูปที่ 52 ภาพถ่ายจากเทคนิค immunofluorescence staining แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของ COX-2 (เรืองแสงสีแดง) ในผิวหนังหนุทดลองกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนวิตามินซี ในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน ณ สัปดาห์ที่ 16 (กำลังขยาย 40 เท่า) ทั้งนี้ (a) คือ ภาพ negative control ที่ทำการย้อมด้วย secondary antibody (Goat anti-rabbit IgG H&L (Cy5), ab6564) เพียงอย่างเดียว, (b-f) คือ ภาพการแสดงออกของ COX-2 ในผิวหนังหนุทดลองตัวที่ 1-5 71

บทที่ 1

ที่มาและความสำคัญ

ที่มาและความสำคัญ/หลักการและเหตุผล

อุบัติการณ์ผู้ป่วยโรคมะเร็งผิวหนังทั่วโลกเพิ่มมากขึ้นทุกปี โดยเฉพาะในกลุ่มคอเคเซียน (Caucasian) จำนวนผู้ป่วยจะเพิ่มร้อยละ 3 - 8 สำหรับประเทศในแถบเอเชียรวมทั้งประเทศไทยถึงแม้อุบัติการณ์จะน้อยกว่า เนื่องจากการมีสีผิวที่เข้มจะช่วยดูดซับรังสีอัลตราไวโอเลตหรือยูวี (ultraviolet ray, UV) โดยเฉพาะอย่างยิ่งยูวีบีที่เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคนี้อย่างไรก็ตามพบว่าอุบัติการณ์โรคนี้นั้นในคนเอเชียเพิ่มมากขึ้นทุกๆ ปี รวมทั้งประเทศไทยที่มีรายงานว่าในปี 2555 นั้นโรคมะเร็งผิวหนังอยู่ใน 15 อันดับแรกของมะเร็งที่พบในผู้ป่วยรายใหม่ (เผยแพร่โดยกลุ่มงานเทคโนโลยีสารสนเทศ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข) และมีการเผยแพร่ข้อมูลว่าพบผู้ป่วยรายใหม่ที่เป็นโรคมะเร็งผิวหนังจำนวน 300 - 400 รายต่อปี (ข้อมูลจาก นายแพทย์วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์ หน่วยมะเร็งวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในผู้จัดการออนไลน์ วันที่ 22 กุมภาพันธ์ 2556) ทั้งนี้เนื่องจากมลภาวะต่างๆ ที่เพิ่มมากขึ้น รวมทั้งรูปแบบการใช้ชีวิต เช่น ชนิดของอาหารที่รับประทานเปลี่ยนไป จากที่รับประทานผักและผลไม้เป็นอาหารหลัก ก็เปลี่ยนเป็นอาหารจำพวกเนื้อแดงและไขมันมากขึ้น ส่งผลให้ร่างกายไวต่อสารเหนี่ยวนำที่ทำให้เกิดมะเร็ง ร่วมกับการกระตุ้นจากแสงแดดทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีนที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคนี้นั้น มะเร็งผิวหนังบางชนิด เช่น malignant melanoma นั้นเป็นชนิดที่อันตรายและอาจทำให้เสียชีวิตได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มคนเอเชีย

จากการศึกษาของคณะผู้วิจัยที่นำผลไม้ไทย 3 ชนิด ได้แก่ กล้วยน้ำว้าสุก กล้วยไข่สุก และมะละกอสุก ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่ปลูกกันมากในประเทศไทย มาศึกษาประสิทธิภาพในการป้องกันการเสื่อมสภาพก่อนวัยของผิวหนังอันเนื่องมาจากได้รับรังสียูวีบี (UVB ray) ติดต่อกัน โดยการวิจัยดังกล่าวได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ฝ่ายเกษตร (โครงการวิจัยเรื่อง “ประสิทธิภาพของเนื้อผลมะละกอและกล้วยในการป้องกันผิวหนังเสื่อมสภาพก่อนวัยเนื่องจากรังสี UVB : การศึกษาในสัตว์ทดลอง” สัญญาเลขที่ RDG5220047 และตีพิมพ์ในวารสาร Food and Chemical Toxicology, 50 (2012) 4292-4301, impact factor 2.610) นั้น ผลที่ได้พบว่าการที่หนู ICR เพศผู้ ที่ได้รับรังสียูวีบีในช่วงความยาวคลื่น 275 - 305 นาโนเมตรติดต่อกันเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ มีระดับของกลูตาไธโอน (glutathione) ที่ผิวหนังเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มหนูที่ไม่ได้รับรังสียูวีบี ร่วมกับการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของผิวหนัง ได้แก่ รังรอยที่เพิ่มขึ้นและความยืดหยุ่นที่ลดลง การได้กินผลไม้สุก ได้แก่ กล้วยไข่สุกที่ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน หรือวิตามินซีในขนาด 50 มิลลิกรัมต่อวัน นอกจากจะช่วยรักษาสภาพและคุณสมบัติของผิวหนังแล้ว ยังช่วยรักษาระดับของกลูตาไธโอนในผิวหนังให้ไม่แตกต่างจากระดับของกลูตาไธโอนที่พบในผิวหนังหนูที่ไม่ได้รับรังสียูวีบี อย่างไรก็ตาม หนูที่ได้รับกล้วยน้ำว้าสุกในปริมาณที่เท่ากันกับกล้วยไข่ไม่ส่งผลใน

การป้องกันผิวหนังจากรังสีและไม่ช่วยรักษาระดับกลูตาไธโอนในผิวหนัง จากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลทั้งหมดที่มีอยู่ในเนื้อผลไม้โดยใช้ Folin-Ciocalteu's reagent ผลที่ได้พบว่าสารสกัด (ใช้เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 50) จากกล้วยไข่สุกและน้ำว่าวสุกมีปริมาณฟีนอลเท่ากับ 30.48 ± 0.54 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของเนื้อผลไม้สดและ 14.41 ± 0.50 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของเนื้อผลไม้สด ตามลำดับ ในส่วนของการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยใช้ DPPH assay ซึ่งแสดงค่าในรูปของ EC_{50} (ความเข้มข้นของสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านการเกิดออกซิเดชันโดย free radical scavenging เท่ากับร้อยละ 50) พบว่าสารสกัดจากผลกล้วยไข่สุกและกล้วยน้ำว่าวสุกมีค่า EC_{50} เท่ากับ 16.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 108.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าผลกล้วยไข่สุกและกล้วยน้ำว่าวสุกมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน และความแตกต่างนี้มีผลต่อประสิทธิภาพในการป้องกันอันตรายจากผิวหนังที่ได้รับรังสียูวีบี รวมทั้งการรักษาระดับกลูตาไธโอนที่ผิวหนัง

กลูตาไธโอนเป็นชีวโมเลกุลที่มีฤทธิ์ต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ที่ร่างกายสังเคราะห์ขึ้นมาได้ รวมทั้งเกี่ยวข้องในกระบวนการทางชีววิทยาต่างๆ เช่น การแสดงออกของยีน การตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) และการนำพาสารอินทรีย์เข้าหรือออกจากเซลล์ ทั้งนี้ในเซลล์นั้นกลูตาไธโอนจะมีอยู่ 2 สถานะ คือในรูปที่ถูกออกซิไดซ์ (oxidized form, GSSG) หรือในรูปที่ถูกรีดิวซ์ (reduced form, GSH) การรักษาให้ปริมาณกลูตาไธโอนในรูปที่ถูกรีดิวซ์และออกซิไดซ์อยู่ในสัดส่วนที่เหมาะสม มีความสำคัญต่อการอยู่รอดของเซลล์ มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นความสำคัญของกลูตาไธโอนในการป้องกันการสะสมของอนุมูลอิสระและผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งการสะสมสิ่งเหล่านี้เป็นการเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดโรค เช่น มะเร็งมากขึ้นเมื่อได้รับสิ่งกระตุ้น ด้วยเหตุนี้โครงการวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะศึกษาผลของการรับประทานกล้วยไข่ต่อการป้องกันมะเร็งผิวหนังที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยรังสียูวีบี โดยการศึกษานี้จะทำการศึกษาในสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งผิวหนังด้วยสารเคมีร่วมกับการได้รับรังสียูวีบี และได้รับกล้วยไข่สดโดยการให้ทางปาก (oral administration) ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน เป็นเวลา 4 เดือน แล้วทำการประเมินขนาดของเนื้องอก (tumor) และการแสดงออกของโปรตีน 4-hydroxynonenal (4-HNE) และ cyclooxygenase enzyme (COX-2) ที่ผิวหนังซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดเนื้องอกที่ผิวหนัง โดยทำการเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับกล้วยน้ำว่าวในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัม และวิตามินซีในขนาด 50 มิลลิกรัมต่อวัน ร่วมกับการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี โดยมีสมมติฐานคือ หากหนูได้รับผลไม้ที่มีสารกลุ่มฟีนอลต่ำ (เช่น กล้วยน้ำว่าว) อาจจะทำให้พบชีวโมเลกุลที่เป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาออกซิเดชัน เช่น 4-HNE และสารสื่ออักเสบ COX-2 ในผิวหนังที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งในปริมาณที่สูง ร่วมกับการเกิดเนื้องอก ในทางตรงกันข้ามหากได้รับผลไม้ที่มีสารกลุ่มฟีนอลสูง (เช่น กล้วยไข่) ก็อาจจะพบชีวโมเลกุลดังกล่าวในผิวหนังที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งในปริมาณไม่แตกต่างจากระดับที่พบในหนูปกติและไม่มีเนื้องอกปรากฏ ผลที่ได้จากการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เชิงลึก ที่สามารถนำไปใช้เพื่อส่งเสริมการบริโภคผลไม้ไทยทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ และเป็นการเพิ่มคุณค่าของผลไม้ไทยให้ได้รับความสนใจทั่วโลก ส่งผลต่อเศรษฐกิจของประเทศในทางอ้อม

บททวนเอกสารเชิงสังเคราะห์

โรคมะเร็งผิวหนัง โดยเฉพาะชนิดเมลานوما (malignant melanoma) ทั่วโลกพบผู้ป่วยประมาณ 160,000 รายต่อปี และร้อยละ 80 เป็นกลุ่มคอเคเซียน (Caucasian) สำหรับประเทศไทยมีรายงานว่าในปี 2555 นั้นโรคมะเร็งผิวหนังอยู่ใน 15 อันดับแรกของชนิดมะเร็งที่พบในผู้ป่วยรายใหม่ [1] และมีการเผยแพร่ข้อมูลว่าพบผู้ป่วยรายใหม่ 300 - 400 รายต่อปี (ข้อมูลจาก นายแพทย์วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์ หน่วยงานมะเร็งวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในผู้จัดการออนไลน์ วันที่ 22 กุมภาพันธ์ 2556) ถึงแม้ว่ามะเร็งผิวหนังเป็นมะเร็งที่พบได้ไม่บ่อยเมื่อเทียบกับมะเร็งชนิดอื่น และเป็นโรคที่สามารถหายขาดได้ หากทำการรักษาตั้งแต่เบื้องต้น ก็อาจมีอันตรายถึงชีวิตได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มคนเอเชียที่ถึงแม้อุบัติการณ์ในการเกิดโรคนี้น้อยกว่า แต่กลับพบว่าการรุดหน้าของโรคเป็นไปอย่างรวดเร็วกว่ากลุ่มคนคอเคเซียน [2,3] นอกจากนี้สภาวะของโลกโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเปลี่ยนแปลงระดับของโอโซน (ozone) ในชั้นบรรยากาศส่งผลให้ผิวหนังได้รับอันตรายจากรังสียูวี โดยเฉพาะอย่างยิ่งยูวีบีมากขึ้น ทุกๆ ร้อยละ 1 ของโอโซนที่ลดลงจะทำให้ได้รับรังสียูวีบีเพิ่มขึ้นร้อยละ 2.3 [4] ส่งผลให้อุบัติการณ์เกิดมะเร็งผิวหนังเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 4 [5] ร่วมกับการได้รับสารก่อมะเร็ง (carcinogen) ที่ปนเปื้อนมากับอากาศ อาหารและน้ำดื่ม ส่งผลให้อุบัติการณ์ของการเกิดโรคนี้นี้ทั่วโลกเพิ่มมากขึ้นทุกปี

มีรายงานชี้ให้เห็นว่าการได้รับรังสียูวีบีเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งผิวหนัง (เช่น human basal cell carcinoma และ melanoma เป็นต้น) [6-8] ทั้งนี้ก็เนื่องมาจากรังสียูวีบี (ความยาวคลื่น 280 - 320 นาโนเมตร) สามารถแพร่ลงมาถึงหนังกำพร้า (epidermis) ชั้นล่าง (basal layer) ซึ่งเป็นที่อยู่ของเซลล์ต้นกำเนิด (keratinocyte stem cell) ที่จะเปลี่ยนแปลงตัวเองไปเป็นเซลล์คีราติโนไซต์ซึ่งเป็นเซลล์หลักของชั้นหนังกำพร้า [9] และเมลานোসัยต์ (melanocyte) ซึ่งเป็นเซลล์สร้างเม็ดสีผิว (melanin) [10] และการได้รับรังสีชนิดนี้ต่อเนื่องจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเซลล์เหล่านี้และนำไปสู่การเกิดโรคมะเร็งผิวหนัง

ในปัจจุบันมีทฤษฎีที่เชื่อกันว่า reactive oxygen species (ROS) หรืออนุมูลอิสระ (free radicals) เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งผิวหนังภายหลังได้รับรังสียูวี [11-13] อนุมูลอิสระหมายถึงโมเลกุลหรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอยู่รอบนอก ได้แก่ superoxide anion radical (O_2^-), hydroxyl radical ($HO^\cdot$), peroxide radical ($ROO^\cdot$), peroxy radical ($LOO^\cdot$), hydrogen peroxide (H_2O_2), ozone (O_3), singlet oxygen (1O_2), hydrogen radical ($H^\cdot$) และ methyl radical ($CH_3^\cdot$) เป็นต้น จัดว่าเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียร ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี และเป็นตัวก่อให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ อนุมูลอิสระสามารถเกิดขึ้นเองในร่างกายซึ่งเป็นผลมาจากกระบวนการสันดาปของร่างกายเอง หรือจากสิ่งแปลกปลอมหรือกระตุ้นจากภายนอก เช่น รังสียูวี นอกจากที่รังสียูวีจะถูกดูดซับโดยดีเอ็นเอ (DNA) ได้โดยตรงและส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของดีเอ็นเอแล้ว การผลิต ROS โดยรังสียูวียังเกิดจากการดูดซับรังสีเหล่านี้โดยโมเลกุลที่ไวต่อแสงอาทิตย์ที่มีอยู่ที่ผิวหนัง (endogenous photosensitizer molecules) [14] ภายหลังจากการดูดซับรังสีเข้าไป photosensitizers ที่ถูกกระตุ้นเหล่านี้จะทำปฏิกิริยากับออกซิเจน ได้เป็น O_2^- นอกจากนี้ O_2^- ยังผลิตได้จาก

neutrophils ซึ่งจะมีจำนวนเพิ่มขึ้นมากในผิวหนังที่ถูกทำลายโดยแสงอาทิตย์ O_2^- ที่เกิดขึ้นจำนวนหนึ่งจะถูกเปลี่ยนไปเป็น H_2O_2 ซึ่งมีศักยภาพในการทำลายเซลล์น้อยลงและทำหน้าที่เป็น co-substrate สำหรับเอนไซม์ peroxidase อย่างไรก็ตาม H_2O_2 นั้นสามารถข้ามผนังเซลล์ได้ง่าย แล้วเชื่อมต่อกับ transitional Fe (II) ได้เป็น ROS ตัวอื่นๆ เช่น $HO^\cdot$ และ 1O_2 ที่มีความเป็นพิษสูง ซึ่ง ROS ทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นตัวเริ่มทำให้เกิดการผลิต carbonyls [15] ร่วมกับผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการ lipid peroxidation [16] ที่ผนังเซลล์ ซึ่งผลิตผลนี้ก่อให้เกิดการอักเสบโดยเหนี่ยวนำทำให้ยีน COX-2 เพิ่มขึ้นมากขึ้น [17] COX-2 นี้เป็น cyclooxygenase enzyme ที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดเนื้องอกที่ผิวหนัง [18-21] นอกจากนี้ยังพบว่าชีวโมเลกุลที่มีผลการเกิดมะเร็งที่ผิวหนัง เช่น 4-hydroxynonenal (4-HNE) ซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายของ lipid peroxidation [17,22,23] นั้นเพิ่มมากขึ้นด้วย

โดยปกติร่างกายสามารถป้องกันการทำลายจากอนุมูลอิสระที่ความเข้มข้นต่ำๆ โดยการสร้างระบบป้องกันตัวเอง ได้แก่ สารต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidants) ซึ่งประกอบไปด้วยสารหรือเอนไซม์ต่างๆ เช่น วิตามินซี และกลูตาไธโอน (glutathione) เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้จะชะลอหรือป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ของสาร (substrate) ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต ดีเอ็นเอ ที่มีในเซลล์ อาจกล่าวได้ว่าสารเหล่านี้เป็นสารต้านออกซิเดชันตามธรรมชาติที่มีอยู่ในผิว และสามารถทำงานทันทีเมื่อมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นหลังจากผิวหนังสัมผัสกับรังสียูวี มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นความสำคัญของกลูตาไธโอนในการป้องกันการสะสมของอนุมูลอิสระและผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน [24-26] ทั้งนี้กลูตาไธโอนสังเคราะห์จากกรดอะมิโน glycine, cysteine และ glutamic acid และต้องอาศัยเอนไซม์ γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS) และ glutathione synthetase กลูตาไธโอนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์จะทำหน้าที่ป้องกันอันตรายที่เกิดจาก ROS ที่ถูกผลิตออกมาจากกระบวนการสันดาปหรือจากการที่ร่างกายได้รับสิ่งกระตุ้นจากภายนอก เช่น รังสียูวี ทั้งนี้ในเซลล์นั้นกลูตาไธโอนจะมีอยู่ 2 สถานะ คือในรูปที่ถูกออกซิไดซ์ (oxidized form, GSSG) หรือในรูปที่ถูกรีดิวซ์ (reduced form, GSH) กลูตาไธโอนในรูปที่ถูกรีดิวซ์จะทำงานร่วมกับเอนไซม์ glutathione peroxidase (GPx) โดยทำหน้าที่เป็นผู้ให้อิเล็กตรอนในปฏิกิริยารีดักชัน (reduction reaction) เพื่อกำจัด H_2O_2 และจะได้ผลผลิตของปฏิกิริยาคือกลูตาไธโอนในรูปที่ถูกออกซิไดซ์ และผลผลิตนี้จะถูกเอนไซม์ glutathione reductase (GR) เปลี่ยนไปเป็นกลูตาไธโอนในรูปที่ถูกรีดิวซ์ โดยผ่านปฏิกิริยารีดักชันที่ต้องใช้ NADPH การรักษาให้ปริมาณกลูตาไธโอนในรูปที่ถูกรีดิวซ์และออกซิไดซ์อยู่ในสัดส่วนที่เหมาะสม มีความสำคัญต่อการอยู่รอดของเซลล์ [27-29] ในบางสภาวะ เช่น การได้รับรังสียูวีอย่างต่อเนื่อง สารต้านออกซิเดชันตามธรรมชาติที่มีอยู่ในผิวอาจไม่เพียงพอหรือสมดุลกับปริมาณอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น ดังนั้นในปัจจุบันจึงได้มีการพยายามคิดค้นวิธีการที่สามารถป้องกันหรือลดอันตรายอันเนื่องมาจากที่ผิวหนังสัมผัสกับรังสียูวีอย่างต่อเนื่อง ยกตัวอย่างเช่น การใช้สารกันแดด นอกจากนี้ยังมีวิธีการอื่นๆ ที่มีส่วนช่วยในการลดอันตรายหรือผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากรังสียูวี หนึ่งในวิธีการนั้นได้แก่ การรับประทานอาหาร เช่น ผักหรือผลไม้ ที่ส่งเสริมฤทธิ์ในการต้านการเกิดออกซิเดชันให้แก่ร่างกาย [30-32] และมีการวิจัยอย่างแพร่หลายถึงประโยชน์ของอาหาร ที่ช่วยเพิ่มสารต้านออกซิเดชันใน

ร่างกายต่อความสามารถในการป้องกันผิวหนังเป็นโรคอันเนื่องจากรังสียูวีบี [33-35] ทั้งนี้การรับประทานกลูตาไธโอนที่ปัจจุบันมีขายในรูปอาหารเสริมต่อประโยชน์ในการต้านอนุมูลอิสระในร่างกายนั้นยังขาดผลการศึกษาทางคลินิกเพื่อยืนยันประสิทธิภาพ เนื่องจากการยากที่จะรักษาสภาพให้กลูตาไธโอนที่มีในอาหารเสริมนั้นให้อยู่ในรูปที่ถูกรีดิวซ์ ซึ่งเป็นรูปที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

ในอดีตคณะผู้ทำการวิจัยได้นำผลไม้ไทย เช่น กล้วยน้ำว่านสุกและกล้วยไข่สุก ที่เป็นพืชเศรษฐกิจที่ปลูกกันมากในประเทศไทยรวมทั้งที่จังหวัดพิษณุโลก มาศึกษาในเชิงลึกถึงประสิทธิภาพในการป้องกันการเสื่อมสภาพก่อนวัยของผิวหนังอันเนื่องมาจากได้รับรังสียูวีบีติดต่อกัน โดยทำการวิจัยดังกล่าวได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ฝ่ายเกษตร (โครงการวิจัยเรื่อง “ประสิทธิภาพของเนื้อผลไม้ละกอและกล้วยในการป้องกันผิวหนังเสื่อมสภาพก่อนวัยเนื่องจากรังสี UVB : การศึกษาในสัตว์ทดลอง” สัญญาเลขที่ RDG522 0047 และตีพิมพ์ในวารสาร Food and Chemical Toxicology, 50 (2012) 4292–4301, impact factor 2.610 [30]) โดยในการศึกษาขั้นแรกคณะผู้ทำการวิจัยได้สกัดสารจากผลไม้สุกโดยใช้แอทานอล (เอทานอล) ความเข้มข้นร้อยละ 50 เพื่อให้สารสกัดที่ได้ประกอบไปด้วยสารในกลุ่มฟีนอลที่ละลายในน้ำและละลายได้ในแอลกอฮอล์ หรืออีกนัยหนึ่งเพื่อให้ได้ซึ่งสารสกัดที่ประกอบไปด้วยสารที่มีความเป็นขี้ผึ้งที่แตกต่างกัน หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลทั้งหมดที่มีอยู่ในสารโดยใช้ Folin-Ciocalteu's reagent ผลที่ได้พบว่าสารสกัดจากกล้วยไข่สุกและกล้วยน้ำว่านสุกมีปริมาณฟีนอลเท่ากับ 30.48 ± 0.54 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของเนื้อผลไม้สดและ 14.41 ± 0.50 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของเนื้อผลไม้สด ตามลำดับ [30] ในส่วนของการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากผลไม้ชนิดต่างๆ โดยใช้ DPPH assay ซึ่งแสดงค่าในรูปของ EC50 (ความเข้มข้นของสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านการเกิดออกซิเดชันโดย free radical scavenging เท่ากับร้อยละ 50) พบว่าสารสกัดจากกล้วยไข่สุกและกล้วยน้ำว่านสุกมีค่า EC50 เท่ากับ 16.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 108.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ [30] จากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าผลกล้วยไข่สุกและกล้วยน้ำว่านสุกมีองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่แตกต่างกัน

หลังจากนั้นเพื่อให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชัน และความสามารถในการป้องกันผิวหนังเสื่อมสภาพเนื่องมาจากรังสียูวีบี คณะผู้ทำการวิจัยได้ทำการศึกษาในสัตว์ทดลอง โดยให้บริเวณส่วนหลังของหนูสายพันธุ์ ICR เพศผู้ที่โกนขนออกแล้วได้รับรังสียูวีบีติดต่อกันเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ในขณะที่เดียวกันหนูกิ่ได้รับ (oral administration) น้ำเปล่า วิตามินซีปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวันหรือผลไม้สุกในขนาด 0.5 - 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน ซึ่งประสิทธิภาพในการป้องกันผิวหนังเสื่อมสภาพประเมินจากลักษณะทางกายภาพของผิวหนังในระดับจุลกายภาคศาสตร์ รวมทั้งระดับของโปรตีนกลูตาไธโอนที่มีอยู่ในผิวหนังหนูกิ่ที่ได้รับรังสียูวีบี เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับรังสีและกลุ่มที่ได้รับรังสียูวีบีพร้อมกับได้รับน้ำเปล่า วิตามินซี หรือผลไม้สุก ผลการศึกษาที่ได้ชี้ให้เห็นว่าหนู ICR เพศผู้ที่ได้รับรังสียูวีบีติดต่อกันเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของผิวหนัง ได้แก่ ริ้วรอยที่เพิ่มขึ้นและความยืดหยุ่นที่ลดลง ร่วมกับระดับกลูตาไธโอนที่ผิวหนังลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของนักวิจัยกลุ่มอื่นที่พบว่ารังสียูวีบีทำให้การนำซิสเตอีนเข้าสู่เซลล์คีราติโนไซต์ซึ่งเป็นเซลล์หลักของหนังกำพร้าลดลง ส่งผลให้ปริมาณกลู

ทาไฮโอโซนที่ผลิตโดยเซลล์ลดลง [36] เนื่องจากซิสเตอีนเป็นสารตั้งต้นของการผลิตกลูตาไฮโอโซน นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยยังพบว่าหนูในกลุ่มที่ได้รับรังสียูวีพร้อมกับได้รับวิตามินซีในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน หรือเนื้อผลกล้วยไข่สุกที่ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน นอกจากจะช่วยรักษาสภาพและคุณสมบัติของผิวหนังไม่ให้เปลี่ยนแปลงแล้ว ยังช่วยรักษาระดับของกลูตาไฮโอโซนให้ไม่แตกต่างจากระดับที่พบในผิวหนังของหนูกลุ่มที่ไม่ได้รับรังสียูวีอีกด้วย [30]

จากผลการทดลองที่กล่าวมาข้างต้น เป็นผลที่แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเนื้อผลกล้วยไข่ในการป้องกันผิวหนังเสื่อมสภาพเนื่องจากรังสียูวี ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะต่อยอดการศึกษาดังกล่าวโดยจะศึกษาผลของการรับประทานกล้วยไข่ต่อการป้องกันมะเร็งผิวหนัง ซึ่งเป็นการศึกษาในสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งผิวหนังด้วยการทา 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) แล้วตามด้วยการฉายรังสียูวี DMBA เป็นสารเริ่มต้น (initiator) ที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีน ($G \rightarrow A$ transition หรือ $A \rightarrow T$ transversion) ที่อยู่ในเซลล์ของผิวหนัง [37,38] เช่น *Hras1* ซึ่งเป็นยีนที่ผลิตโปรตีน GTPase Hras ที่ทำหน้าที่ควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์จากกระตุ้นโดย growth factor และยีน *Kras* ซึ่งเป็นยีนที่ผลิตโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับส่งสัญญาณต่างๆ ภายในเนื้อเยื่อหลังจากถูกกระตุ้นด้วย growth factor การกลายพันธุ์ของยีนเหล่านี้เป็นจุดเริ่มต้นของการเกิดมะเร็งผิวหนัง การทาที่ผิวหนังด้วย DMBA ในขนาด subcarcinogenic dose เพียงครั้งเดียวไม่ก่อให้เกิดเนื้องอก [37,39] แต่เมื่อผิวหนังบริเวณที่ถูกทา DMBA นี้ถูกฉายรังสียูวีซ้ำๆ ซึ่งก่อให้เกิดการเสียหายของดีเอ็นเอ (oxidative DNA damage) ของเซลล์ที่อยู่บริเวณผิวหนังจนไม่สามารถซ่อมแซมหรือสร้างทดแทนส่วนที่เสียหายได้ ผลก็คือเนื้องอกและการพัฒนาไปเป็นมะเร็งผิวหนังจึงเกิดขึ้น (90-100% ของหนูเกิดมะเร็งผิวหนังชนิด melanoma และ/หรือ nonmelanoma หลังจากได้รับรังสียูวี 2-3 ครั้งต่อสัปดาห์ นาน 15-16 สัปดาห์ [40,41]) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าการได้รับรังสียูวีซ้ำๆ เป็นสิ่งเหนี่ยวนำหรือส่งเสริม (promoter) ให้ผิวหนังปกติเกิดเปลี่ยนแปลงไปเป็นมะเร็งผิวหนัง [37,39,40,42] ซึ่งรูปแบบการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งผิวหนังในลักษณะนี้ (two-stage carcinogenesis ซึ่งหมายถึงการใช้ initiator ร่วมกับการส่งเสริม) สอดคล้องกับปรากฏการณ์ของการเกิดมะเร็งผิวหนังที่มักเกิดจากการได้รับรังสียูวีอย่างต่อเนื่อง ร่วมกับการเคยสัมผัสกับสารก่อมะเร็ง (carcinogen) ที่ปนเปื้อนมากับสิ่งแวดล้อมและผลิตภัณฑ์ต่างๆ ใน การศึกษานี้หนูที่ผิวหนังถูกทาด้วย DMBA จะได้รับรังสียูวีซ้ำๆ อย่างต่อเนื่องพร้อมกับได้รับกล้วยไข่สดโดยการให้ทางปาก (oral administration) ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน (ซึ่งเป็นขนาดที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของคณะผู้วิจัย ดังที่กล่าวไปแล้วข้างต้น) เป็นเวลา 4 เดือน แล้วทำการประเมินขนาดของเนื้องอก (tumor) และปริมาณของ 4-HNE และ COX-2 ที่ผิวหนัง โดยทำการเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับกล้วย น้ำว่าในปริมาณเท่ากัน ซึ่งจากการศึกษาของคณะผู้วิจัยก่อนหน้านี้พบว่าไม่มีผลในการรักษาระดับกลูตาไฮโอโซนในผิวหนังหนูที่ได้รับรังสียูวี และวิตามินซีในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน ที่พบว่าช่วยรักษาระดับกลูตาไฮโอโซน และรักษาสภาพของผิวหนังไม่ให้เปลี่ยนแปลงเนื่องจากรังสียูวี นอกจากนี้สารสำคัญที่อยู่ในผลกล้วยที่อาจมีผลต่อระดับกลูตาไฮโอโซนที่ผิวหนัง เช่น gallic acid, catechins และ beta-carotene จะถูกวิเคราะห์ด้วย HPLC เนื่องจากมีรายงานพบสารสำคัญดังกล่าวในเนื้อผลกล้วย [43,44] และการศึกษาในมนุษย์พบว่า

ได้รับ beta-carotene โดยการรับประทานติดต่อกันเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ส่งผลให้ปริมาณ carotenoids ที่ผิวหนังเพิ่มขึ้น [45] รวมทั้งมีส่วนช่วยป้องกันการเกิดการอักเสบและ/หรือระคายเคืองของผิวหนังที่ได้รับรังสียูวีอย่างต่อเนื่อง [45,46-48] และการศึกษาในหนูพบว่าหนูที่ได้รับ beta-carotene โดยการกินจะทำให้ระดับกลูตาไธโอนในเซลล์มีมากขึ้น [31] นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารในกลุ่ม flavonoids เช่น rosmarinic acid สามารถช่วยลดการเกิดเนื้องอกในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย DMBA [49] และ catechins ช่วยเพิ่มการทำงานของกลูตาไธโอน และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกลูตาไธโอนในรูปที่ถูกรีดิวซ์และถูกออกซิไดซ์ และลดปริมาณ COX-2 ในผิวหนังหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งผิวหนังโดยการทา DMBA และ 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) รวมทั้งป้องกันการเกิดมะเร็งผิวหนัง [50] ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้จะนำไปสู่ความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบทางเคมีที่มีอยู่ในเนื้อผลไม้ และฤทธิ์ในการต้านการเกิดมะเร็งผิวหนังที่ยังไม่เคยมีใครศึกษามาก่อน

วัตถุประสงค์

วัตถุประสงค์หลัก

เพื่อประเมินประสิทธิภาพของเนื้อผลไม้ไล่สุกในการป้องกันมะเร็งผิวหนัง ที่เกิดจากการได้รับรังสียูวีอย่างต่อเนื่อง รวมทั้งกลไกในการป้องกัน

วัตถุประสงค์เชิงพฤติกรรม

- 1) เปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมี เช่น gallic acid, catechins และ beta-carotene ที่พบในกล้วยไข่และกล้วยน้ำว้า
- 2) เปรียบเทียบการป้องกันการเกิดเนื้องอก ที่ผิวหนังหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งผิวหนังโดยได้รับสารกระตุ้นและรังสียูวี ร่วมกับได้รับกล้วยไข่สุก กล้วยน้ำว้าสุก หรือวิตามินซี
- 3) เปรียบเทียบปริมาณของกลูตาไธโอน ในผิวหนังหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งผิวหนังโดยได้รับสาร กระตุ้นและรังสียูวี ร่วมกับได้รับกล้วยไข่สุก กล้วยน้ำว้าสุก หรือวิตามินซี
- 4) เปรียบเทียบปริมาณของสารที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งผิวหนัง ได้แก่ 4-HNE และ COX-2 ในผิวหนังหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งผิวหนังโดยได้รับสารกระตุ้นและรังสียูวี ร่วมกับได้รับกล้วยไข่สุก กล้วยน้ำว้าสุก หรือวิตามินซี

บทที่ 2

ระเบียบการวิจัย

1. สารเคมีและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์

1.1 สารเคมี

- 1) กล้วยน้ำว้า (*Musa sapientum* L., ABB Group) จังหวัดพิษณุโลก (ช่วงเดือนมิถุนายนถึงกันยายน)
- 2) กล้วยไข่ (*Musa surier* L., AA Group) จังหวัดพิษณุโลก (ช่วงเดือนมิถุนายนถึงกันยายน)
- 3) 95% Ethanol (Lot. K31369783 245, Merck, Darmstadt, Germany)
- 4) 99.99% Ethanol (RCI Labscan, Thailand)
- 5) L-ascorbic acid (vitamin C, Lot. 529150113, Poch, Sowińskiego, Poland)
- 6) Trifluoroacetic acid (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA)
- 7) Acetonitrile grade HPLC (RCI Labscan, Thailand)
- 8) Acetone grade reagent (RCI Labscan, Thailand)
- 9) Injection water (A.N.B. LABORATORIES co., Ltd, Thailand)
- 10) Sodium chloride (B/NO. 1306251725, Univar, Australia)
- 11) Hexane (RCI Labscan, Thailand)
- 12) Frozen section compound (Leica, USA)
- 13) Poly-L-lysine solution 0.1% (w/v) in H₂O (Lot. SLBN6266V, Sigma, USA)
- 14) Sodium azide (Lot. BCBJ4642V, Sigma, USA)
- 15) Triton X-100 (Lot. MKBQ0896V, Sigma, USA)
- 16) Tris (hydroxymethyl) aminomethene (Lot. 8382F505 306, Merck, Spain)
- 17) Sodium chloride (B/NO. 1306251725, UNIVAR, Australia)
- 18) Potassium dihydrogen orthophosphate (B/NO. AF501339, UNIVAR, Australia)
- 19) Hydrogen peroxide 30% (Lot. K4543387 415, Merck, Germany)
- 20) Frozen section compound (Lot. 010515, Leica, USA)
- 21) Bovine serum albumin (Lot. 051M1845V Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA)

1.2 สารมาตรฐาน

- 1) Gallic acid (Lot. MKBR0854V, Sigma, China)
- 2) (+)-Catechin hydrate (Lot. WXBB45541, Sigma, China)
- 3) Beta-carotene (Lot. SLBG3787V, Sigma, USA)

1.3 สัตว์ทดลอง

หนูทดลองเพศผู้ (หนูเมาส์ สายพันธุ์ ICR, อายุ 3 สัปดาห์, ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล, จังหวัดนครปฐม)

1.4 ยาสลบ

- 1) Ketamine-hameln (Hameln Pharmaceuticals , Batch no. 408069, Germany)
- 2) Xylazine (L.B.S. laboratory LTD., PART, Lot No. 1790038, Thailand)
- 3) Sodium pentobarbital (Nembital®)

1.5 Antibodies

- 1) Anti-COX2/cyclooxygenase 2 antibody, ab15191 (ABCAM, Cambridge, UK)
- 2) Anti-4 hydroxynonenal antibody, ab46545 (ABCAM, Cambridge, UK)

1.6 อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์

- 1) Microplate Reader (BioTek Instruments, Vermont, USA)
- 2) Ultra centrifuge (Beckman Model J2-MC, Beckman Instruments, Inc., USA)
- 3) Freeze dryer (Heto Model Lyolab 3000, Thermo Electron Corporation, Mukarov, Czech)
- 4) Manual HPLC syringe (Hamilton, Nevada, USA)
- 5) VertiClean nylon syringe filter 0.45 µm (Vertical chromatography Co., Ltd. Thailand)
- 6) NYLON Membrane Filters, 47 mm, 0.45 µm (Lot. 2332, Vertical, Thailand)
- 7) Syringe 1 ml (Nipro, Thailand)
- 8) High profile microtome Blades (Leica 818, Nussloch, Germany)
- 9) Insulin syringe 50 units (BD Ultra-Fine, Lot. 4121921 E, USA)
- 10) Insulin syringe 100 units
- 11) Carl zeiss-axio observer z1 fluorescent microscope (Carl Zeiss Microscopy Ltd, Cambridge, England)

2. วิธีดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย

2.1 การทำแห้งกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่แบบเยือกแข็ง (freeze dried banana)

กระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying) ดำเนินการขึ้นเพื่อลดความแตกต่างของปริมาณฟีนอลิกรวม (total phenolic content) และ β -carotene ที่ได้จากการวิเคราะห์ อันเนื่องมาจากมีปริมาณน้ำในผลที่แตกต่างกัน กระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งนี้ เป็นกระบวนการภายใต้สภาวะอุณหภูมิต่ำและความดันสูง เพื่อคงสภาพโครงสร้าง สี กลิ่น เนื้อสัมผัส รสชาติ และลดปริมาณน้ำภายในกล้วย ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

- 1) นำกล้วยน้ำว้า (*Musa sapientum* L., ABB Group) และกล้วยไข่ (*Musa surier* L., AA Group) ในจังหวัดพิษณุโลก ที่มีสีเหลืองทั่วทั้งลูกและไม่มีจุดสีน้ำตาล ดังรูปที่ 1 มาปอกเปลือกและหั่นเป็นชิ้นขนาดเล็กใส่ในขวดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร



Musa sapientum L.,
ABB Group(กล้วยน้ำว้า)



Musa surier L.,
AA Group (กล้วยไข่)

รูปที่ 1 ลักษณะทางกายภาพของกล้วยน้ำว้า (*Musa sapientum* L., ABB Group) และกล้วยไข่ (*Musa surier* L., AA Group)

- 2) ปิดปากขวดด้วยพาราฟิล์ม ดังรูปที่ 2 แล้วนำไปแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เพื่อลดอุณหภูมิในกล้วยให้ต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง



รูปที่ 2 ขวดยาหม่องที่บรรจุกล้วยสด

- 3) พาราฟิล์มที่หุ้มขวดแก้วจะถูกเจาะก่อนที่จะนำเข้าเครื่อง freeze dryer (Heto Model Lyolab 3000, Thermo Electron Corporation, Mukarov, Czech) นาน 72 ชั่วโมง
- 4) ปิดฝาขวดที่บรรจุกล้วยที่ผ่านการทำให้แห้งแบบเยือกแข็งให้สนิท เพื่อป้องกันความชื้น
- 5) เก็บตัวอย่างกล้วยแห้งไว้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทำการทดสอบหาปริมาณสารสำคัญ

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม (total phenolic content) ในสารสกัดกล้วยน้ำว้าแห้ง และกล้วยไข่แห้งด้วย Folin-ciocalteu assay

สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) เป็นสารที่พบได้ทั่วไปในพืชหลายชนิด รวมทั้งกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่ตามที่ปรากฏในรายงานก่อน [30] และมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ที่สามารถละลายน้ำได้ [51] ก่อนที่จะทำการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม จะต้องทำการเตรียมสารสกัดจากผลกล้วย โดยขั้นตอนการสกัดสารประกอบฟีนอลิกรวม [52] มีดังนี้

- 1) นำกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่แห้งมาบดให้ละเอียด
- 2) ชั่งผงกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่แห้ง 6 กรัม สกัดด้วยเอทานอล (ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์) ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที
- 3) เมื่อครบเวลา นำสารสกัดกล้วยไปปั่นแยกกากตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
- 4) เก็บส่วนใสที่อยู่ด้านบน (supernatant) ลงใน eppendorf หลอดใหม่ เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic compound)

หมายเหตุ : ตลอดการทดลอง การสกัดกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่แห้งจะถูกวิเคราะห์ให้เสร็จภายใน 1 วัน

การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกรวมทำตามวิธี Folin-ciocalteu assay [53] โดยอาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ของสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างสารสกัดกล้วยแห้งกับ Folin-ciocalteu reagent และเติม sodium bicarbonate ทำให้เกิดสภาวะเป็นด่างและเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงินเข้ม ซึ่งจะเปรียบเทียบสารประกอบฟีนอลิกรวมกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid standard reference curve) โดยขั้นตอนการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกรวมมีดังนี้

- 1) นำสารสกัดจากกล้วยน้ำว้าแห้ง กล้วยไข่แห้งและสารมาตรฐานกรดแกลลิก (ความเข้มข้น 0.5, 0.3, 0.25, 0.1, 0.075, 0.0375, 0.01875, 0.01 และ 0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ (blank) หยดลงใน 96-well plate หลุมละ 25 ไมโครลิตร
- 2) เติม Folin-Ciocalteu reagent หลุมละ 125 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด นาน 5 นาที
- 3) เติม sodium bicarbonate (ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด นาน 30 นาที

- 4) วัดค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างสารสกัดกล้วยและสารมาตรฐาน ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยเครื่อง Microplatereader (BioTek Instruments, Vermont, USA) และทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง จึงนำค่าที่ได้มาคำนวณปริมาณฟีนอลิกรวมในหน่วย มิลลิกรัมกรดแกลลิก เทียบเท่า 100 กรัมผลไม้แห้ง (milligram gallic acid equivalents/100 gram dry fruit) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (gallic acid standard reference curve)

2.3 การศึกษาปริมาณกรดแกลลิก (gallic acid) และคาเทชิน (catechin) ที่มีอยู่ในผลกล้วยโดย HPLC analysis

ก่อนที่จะทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC จะทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมอย่างแพร่หลายในการสกัดสารสำคัญจากพืช และกำจัดตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนเหวี่ยง (evaporator)

1) การสกัดสารสกัดรวมจากกล้วย (crude extraction)

เป็นการสกัดสารสกัดรวมจากกล้วยทั้งสองชนิด โดยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้ได้ทั้งสารมีขั้วและไม่มีขั้วในกล้วย ขั้นตอนมีดังนี้

- 1.1) บดกล้วยแห้งให้ละเอียด
- 1.2) เติมผงกล้วยแห้ง 20 กรัม ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 200 มิลลิลิตร และเติมเอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ จนครบ 200 มิลลิลิตร
- 1.3) นำไปเขย่าเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยง (shaker) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 72 ชั่วโมง
- 1.4) นำสารสกัดกล้วยที่ได้ดังรูปที่ 3 มากรองด้วยกระดาษกรอง ขนาด 0.5 ไมโคร-เมตร (Whatman filter, USA)



รูปที่ 3 สารสกัดกล้วยที่ผ่านการเขย่าเหวี่ยงนาน 72 ชั่วโมง และกรองสารสกัดออกจากส่วนตะกอนด้วยชุดกรองสุญญากาศ

- 1.5) นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการกรองดังรูปที่ 4 ไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนเหวี่ยง (evaporator) ใน water bath อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยใช้สภาวะในการกำจัดตัวทำละลายดังนี้

a. น้ำ

ความดัน	83 mBar
เวลา	60 นาที

b. เอทานอล

ความดัน	33 mBar
เวลา	60 นาที



รูปที่ 4 สารสกัดกลั่นน้ำว่า (ขวา) และกลั่นไข่ (ซ้าย) ที่ผ่านการกรองแล้ว

- 1.6) นำสารสกัดที่ผ่านการระเหยตัวทำละลายเทใส่ขวดแก้วดังรูปที่ 5 และนำไปทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying) นาน 72 ชั่วโมง



รูปที่ 5 ภาพสารสกัดกลั่นน้ำว่าและกลั่นไข่ที่ผ่านการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง evaporator

- 1.7) หลังจากนั้นปิดฝาขวดแก้วให้สนิท เพื่อป้องกันความชื้น และเก็บไว้ตู้แช่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์

นำสารสกัดที่ได้ข้างต้น มาทำการตรวจวัดปริมาณสารคาเทชินและกรดแกลลิกในสารสกัดกล้วย โดยเทคนิค HPLC (high performance liquid chromatography) ชนิด isocratic และใช้ detector ชนิด UV/visible เทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิกและคาเทชิน การตรวจวัดปริมาณสารดังกล่าวจะได้จากการวัดค่าดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นแสงอัลตราไวโอเลต (270 นาโนเมตร) และบันทึกผลการตรวจวัดด้วยภาพโครมาโตแกรม คอลัมน์ที่ใช้แยกสาร คือ C18 ยาว 250 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร ปริมาตรของคาเทชินและกรดแกลลิกจะถูกตรวจวัดจากพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน ตามสภาวะดังนี้

สภาวะของการวิเคราะห์ปริมาณคาเทชินและกรดแกลลิก:

อัตราการไหล	1 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรที่ฉีดเข้าคอลัมน์	20 ไมโครลิตร
อุณหภูมิคอลัมน์	30 องศาเซลเซียส
ความดัน	2000 Psi
เวลา	15 นาที
ค่าดูดกลืนแสง	270นาโนเมตร

2) การเตรียมตัวอย่างสารสกัดกล้วย สารมาตรฐานและสารละลายเคลื่อนที่

- 2.1) เตรียมตัวอย่างสารสกัดกล้วยความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กรองด้วย syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร และกำจัดฟองอากาศด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง นาน 10 นาที
- 2.2) เจือจางตัวอย่างสารละลายตัวอย่างจากข้อที่ 2.1 ให้ได้ความเข้มข้น 1, 0.1 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยสารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่ประกอบไปด้วยอะซิโตนไนไตรล์ (acetonitrile) กับน้ำ ในอัตราส่วน 87 ต่อ 13
- 2.3) เตรียมสารละลายมาตรฐานแกลลิกและคาเทชินในตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น 0.1 ถึง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- 2.4) เตรียมสารละลายเคลื่อนที่ ซึ่งประกอบด้วยอะซิโตนไนไตรล์ต่อน้ำ อัตราส่วน 87 ต่อ 13 โดยอัตราส่วนดังกล่าวมี trifluoroacetic acid ร้อยละ 5 และ pH เท่ากับ 2 กรองสารละลายเคลื่อนที่ด้วยชุดกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำสารละลายที่ได้มากำจัดฟองอากาศด้วยคลื่นความถี่สูง นาน 30 นาที

3) การวิเคราะห์ปริมาณสารสกัดด้วยเทคนิค HPLC

- 3.1) การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดกล้วยจะใช้เครื่อง HPLC ชนิด isocratic และใช้คอลัมน์แยกสารชนิด C18 ยาว 250 มิลลิเมตร และเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร
- 3.2) ก่อนการวิเคราะห์ตัวอย่าง ทำการล้างคอลัมน์ ตามขั้นตอนดังนี้

อะซิโตนไตรล์ : น้ำ (50 : 50)	15 นาที
น้ำ (100%)	20 นาที
อะซิโตนไตรล์ (100%)	100 นาที
สารละลายเคลื่อนที่	45 นาที

- 3.3) ตั้งค่าสภาวะของการตรวจวิเคราะห์ปริมาณตัวอย่าง ดังที่กล่าวมาข้างต้น
- 3.4) เมื่อระบบแสดง LC ready ให้เริ่มฉีดตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์
- 3.5) ระบบจะดำเนินการตรวจวิเคราะห์ปริมาณตัวอย่างและแสดงผลเป็นภาพโครมาโตแกรม

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณเบตา-แคโรทีน (β -carotene) ในกล้วยแห้ง โดยการวัดค่าดูดกลืนแสง

สารเบตา-แคโรทีนในกล้วยจะถูกสกัดออกมาโดยใช้เทคนิคการสกัดแบบซอกซ์เลต (Soxhlet extraction) โดยอาศัยหลักการการระเหยของตัวทำละลายตัวความร้อนและไอของตัวทำละลายจะกลั่นตัวเป็นของเหลวผ่านลงไปในสารที่อยู่ในสถานะของแข็ง ตัวทำละลายจะพาสารสกัดที่ต้องการไหลกลับเข้าสู่ขวดรองรับ ในขณะเดียวกัน ตัวทำละลายจะถูกระเหยกลับขึ้นไป ทั้งสารสกัดไว้ในขวดรองรับ ซึ่งวิธีการสกัดนี้จะทำให้ตัวทำละลายหมุนเวียนผ่านตัวอย่างสารสกัดที่อยู่ในกลุ่มสารอินทรีย์ที่ต้องการได้หลายครั้ง จนได้ปริมาณสารสกัดที่มีประสิทธิภาพสูงสุด

การสกัดเบตา-แคโรทีน มีขั้นตอนดังนี้

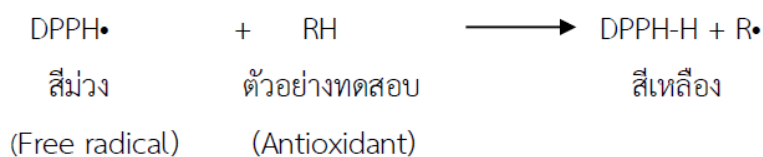
- 1) นำผงกล้วยแห้งใส่ลงใน extraction chamber ในปริมาณ 5 กรัม
- 2) เติมน้ำมันซีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 10 มิลลิลิตร และสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ในเอทานอล ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรองรับหรือ boiling flask
- 3) ให้อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที เพื่อให้เกิดกระบวนการ reflux
- 4) ปลอ่ยให้สารสกัดเย็นลงในอุณหภูมิห้อง เติมหেকเซน (hexane) ปริมาณ 70 มิลลิลิตร ลงไปใน boiling flask เมื่อเกิดการแยกชั้นตัวทำละลาย เคลื่อนย้ายสารสกัดส่วนบนสุด (ชั้นเฮกเซน) ลงในกรวยแยกสาร (funnel) ที่มีสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 50 มิลลิลิตร

- 5) เติมน้ำสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ลงในกรวยแยกสาร
- 6) นำสารสกัดส่วนบนสุดมา กำจัดตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบหมุนเหวี่ยง (evaporator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
- 7) นำสารสกัดเบตา-แคโรทีนที่ได้มาทำให้แห้งโดยก๊าซไนโตรเจน (nitrogen gas)
- 8) เก็บตัวอย่างสารสกัดไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์

เพื่อการวิเคราะห์ปริมาณเบตา-แคโรทีนในกล้วย สารมาตรฐานเบตา-แคโรทีนถูกนำมาละลายในตัวทำละลายเมทานอล (methanol) และเจือจางที่ความเข้มข้น 100, 125, 250, 500 และ 700 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อทำเป็นกราฟมาตรฐาน (standard curve) ตัวอย่างทั้งหมดถูกเตรียมใน 96-well plate จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรโดยเครื่อง Microplatereader นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณเบตา-แคโรทีนที่อยู่ในกล้วยแห้งเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อเทียบหาปริมาณของ β -carotene ที่มีอยู่ในสารสกัดกล้วย

2.5 การวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ของสารสกัดจากกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่แห้ง โดยวิธี DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical assay

DPPH radical assay [54] เป็นการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging) โดยใช้สาร 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ซึ่งเป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงที่ หากสารทดสอบมีคุณสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH radical จะได้รับไฮโดรเจนไอออนจากสารทดสอบ ทำให้สารละลาย DPPH radical เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ตามสมการที่ 1 [55] วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างทดสอบกับสารมาตรฐานวิตามินซี (vitamin C)



สมการที่ 1 การเกิดปฏิกิริยาของ DPPH radical กับ antioxidant

ค่าที่วัดได้จะแสดงความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยการคำนวณดังสมการนี้

$$\text{ร้อยละของประสิทธิภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระ} = [1 - (\text{AS} / \text{AB})] \times 100$$

โดย AS คือ ค่าดูดกลืนแสงของ DPPH โดยมีสารละลายตัวอย่าง

AB คือ ค่าดูดกลืนแสงของ DPPH โดยไม่มีสารละลายตัวอย่าง

ขั้นตอนการวัดความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดจากกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่แห้ง [56, 57]] มีดังนี้

- 1) เจือจางสารสกัดกล้วยน้ำว้าแห้งและกล้วยไข่แห้ง (ที่เตรียมได้จากข้อ 2.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดกล้วยน้ำว้าแห้งและกล้วยไข่แห้งด้วย Folin-ciocalteu assay) ให้มีความเข้มข้น 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1,000, 10,000 และ 100,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยสารละลายเอทานอล ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์
- 2) เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายเอทานอล ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์
- 3) เตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินซี (positive control) ความเข้มข้น 0.5-5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- 4) เตรียมสารละลายตัวอย่างกล้วยแห้ง สารละลายมาตรฐานวิตามินซี และสารละลายที่ไม่มีสารสกัดตัวอย่าง (blank) ลงใน 96-well plate หลุมละ 75 ไมโครลิตร
- 5) เติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ หลุมละ 150 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที
- 6) วัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplatereader ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร
- 7) นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ มาคำนวณร้อยละของประสิทธิภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระและ plot graph sigmoidal curve เพื่อหา EC_{50} ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism

2.6 การประเมิน lipid peroxidation inhibition โดยวิธี thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) assay

เป็นการศึกษาฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชัน โดยการวัดผลิตภัณฑ์สุดท้ายของปฏิกิริยา lipid peroxidation ได้แก่ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นสารประกอบอัลดีไฮด์ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันระหว่างไขมันกับโลหะไอออน เมื่อ TBARs reagent (40% *trichloroacetic acid* : 1.4% thiobarbituric acid : 8% hydrochloric acid อัตราส่วน 1 : 2 : 1) ทำปฏิกิริยากับ MDA จะเกิดสารประกอบสีชมพูเข้ม (red chromogen) ที่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาว 510 นาโนเมตร [58] หากตัวอย่างมีฤทธิ์ในการต้าน lipid peroxidation สารประกอบสีชมพูเข้มจะไม่เกิดขึ้น ดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 แสดงการทำปฏิกิริยาของ TBARS reagent สีชมพูเข้มที่ปรากฏคือตัวอย่างที่ไม่มีสารต้านออกซิเดชัน และสีชมพูใสเป็นตัวอย่างทดสอบที่มีสารต้านออกซิเดชัน

นำผลที่ได้มาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของตัวอย่างทดสอบ เทียบกับสารมาตรฐาน trolox (water-soluble analog ของ vitamin E) ดังสมการด้านล่าง

$$\% \text{ inhibition} = [\text{Abs}_{\text{control}} - (\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}})] / \text{Abs}_{\text{control}} \times 100$$

เมื่อ $\text{Abs}_{\text{control}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างควบคุม

$\text{Abs}_{\text{sample}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างทดสอบหรือสารมาตรฐาน

$\text{Abs}_{\text{blank}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank

ขั้นตอนการวัดปริมาณ lipid peroxidation inhibition โดยวิธี TBARS assay ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลัก ดังนี้

1) การวัดปริมาณโปรตีนในสมองหนูโดยวิธี BCA assay [59] ซึ่งได้รับจากโครงการ “กลไกของกล้วยไทยในการป้องกันการเสื่อมสภาพของผิวหนังหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยรังสียูวีบี” หมายเลขโครงการ NU-AE570513 ที่ผ่านการอนุญาตให้มีการเก็บสมองหนูเพื่อใช้ในการทดลองอื่นๆ

- 1.1) นำสมองหนูมาปั่นให้ละเอียดโดยเครื่อง homogenizer ใน phosphate-buffered saline (PBS) ปริมาณ 1 มิลลิลิตรนาน 1 นาที
- 1.2) เจือจางตัวอย่างสมองหนูที่ได้ด้วย PBS ให้มีความเข้มข้นลดลง 10, 100 และ 1000 เท่า
- 1.3) เตรียมสารมาตรฐานอัลบูมิน (albumin) ความเข้มข้น 1,600, 800, 400, 200, 100, 50 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- 1.4) เติม albumin และตัวอย่างสมองลงใน 96-well plate หลุมละ 20 ไมโครลิตร
- 1.5) เติม BCA reagent ประกอบด้วย reagent A และ reagent B ในอัตราส่วน 50 : 1 หลุมละ 180 ไมโครลิตร และบ่มใน water bath อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ป้องกันแสง นาน 30 นาที
- 1.6) วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วย Microplatereader
- 1.7) นำค่าที่ได้ มาคำนวณปริมาณของโปรตีนทั้งหมดในสมองหนู (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยเทียบกับ protein standard reference curve

2) ทดสอบ lipid peroxidation inhibition โดยวิธี TBARs assay [58]

- 2.1) เติมตัวอย่างสมองหนูความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงใน Eppendorf tube ในปริมาณ 210 ไมโครลิตร
- 2.2) เตรียมสารมาตรฐาน trolox ความเข้มข้น 0.1-1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- 2.3) เติมสารสกัดจากกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่แห้ง สารมาตรฐาน trolox หรือ PBS (blank) ในปริมาณ 30 ไมโครลิตร แล้วบ่มใน water bath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะป้องกันแสง นาน 30 นาที
- 2.4) เติมสารละลาย ferrous sulfate ความเข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ และวิตามินซี ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ อย่างละ 30 ไมโครลิตร บ่มใน water bath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
- 2.5) เติม TBARs reagent ปริมาณ 300 ไมโครลิตร แล้วบ่มใน water bath อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที
- 2.6) ปั่นแยกกากตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนลงใน 96-well plate หลุมละ 200 ไมโครลิตร วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร โดย Microplatereader และนำค่าที่ได้ไปคำนวณ % lipid peroxidation inhibition

2.7 การศึกษาศักยภาพของกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่ในการป้องกันการเกิดมะเร็งผิวหนังในหนูทดลองที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งผิวหนังด้วยสารก่อมะเร็ง DMBA และรังสียูวีบี

1) การเตรียมตัวอย่างเนื้อผลไม้ที่นำมาใช้ศึกษา

ผลกล้วยไข่หรือกล้วยน้ำว้าสุกที่นำมาใช้ศึกษา เป็นผลผลิตทางการเกษตรของจังหวัดพิษณุโลกและจังหวัดใกล้เคียง มีลักษณะผลสุกสีเหลืองที่ไม่มีจุดสีน้ำตาล มีความหวานอยู่ในช่วง 25 - 30% Brix เนื่องจากกล้วยอยู่ในช่วงที่สุกพอดีและมีปริมาณน้ำตาลที่ไม่มากเกินไป จนมีผลต่อน้ำหนักตัวของหนู [30] เพื่อให้ง่ายต่อการป้อนให้สัตว์ทดลอง ผลกล้วยสุกจะถูกนำมาบดให้ละเอียด ดังรูปที่ 7 และเตรียมให้อยู่ในรูปของของเหลวแขวนตะกอน ดังรูปที่ 8 ทั้งนี้ปริมาตรของของเหลวแขวนตะกอนที่ป้อนให้สัตว์ทดลองจะไม่เกิน 20 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัม ตามที่กำหนดใน guideline limit volumes for dosing animal



รูปที่ 7 การเตรียมตัวอย่างผลกล้วยสุก เพื่อนำมาป้อนให้สัตว์ทดลอง

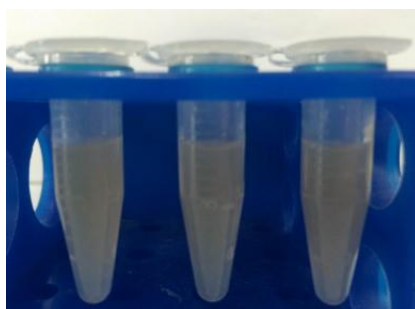
ยกตัวอย่างเช่น ในการเตรียมของเหลวแขวนตะกอนของเนื้อผลไม้ ที่มีเนื้อผลไม้อยู่ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำได้โดยนำเนื้อกล้วยบดปริมาณ 100 มิลลิกรัม มาผสมกับน้ำสะอาดปริมาณ 950 ไมโครลิตร หากหนูมีน้ำหนัก 25 กรัม จะได้รับของเหลวแขวนตะกอนของเนื้อผลไม้ในปริมาณ 0.25 มิลลิลิตร (ในกรณีที่ขนาดที่ให้ หรือ dose เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักหนูต่อวัน) ของเหลวแขวนตะกอนของเนื้อผลไม้ที่เตรียมขึ้นเพื่อจะป้อนให้กับหนูโดยใช้ feeding tube แสดงใน รูปที่ 8 (a, b และ c)

(a)

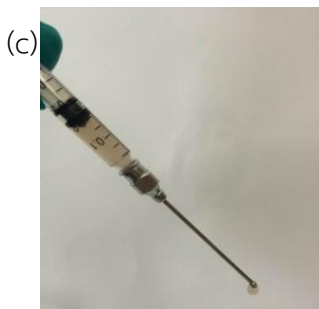


เนื้อกล้วยสุกบดปริมาณ 100 มิลลิกรัม

(b)



ของเหลวแขวนตะกอนของเนื้อกล้วยสุก ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



ของเหลวแขวนตะกอนของเนื้อผลไม้ที่บรรจุใน feeding tube

รูปที่ 8 (a,b,c) การเตรียมของเหลวแขวนตะกอนของผลกล้วยสุกสำหรับการป้อนหนูทดลอง ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2) การศึกษาผลของกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่สุก ในการป้องกันมะเร็งผิวหนังในหนูทดลองที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งด้วยสารก่อมะเร็ง DMBA ร่วมกับการฉายรังสียูวีบี

โครงการนี้ได้รับการรับรองการทำการวิจัยในสัตว์ทดลอง จากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยนเรศวร หมายเลขโครงการ NU-AE580815

สัตว์ทดลองที่ใช้เป็นหนูสายพันธุ์ ICR เพศผู้อายุ 4 สัปดาห์ เลี้ยงในสภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ (24 ± 1 องศาเซลเซียส) และความชื้นสัมพัทธ์ (ร้อยละ 50 ± 10) เป็นเวลาอย่างน้อย 1 สัปดาห์ก่อนนำมาทดลอง โดยหนูจะได้รับอาหารและน้ำในปริมาณที่ควบคุม โดยหนูทดลองถูกแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มดังนี้

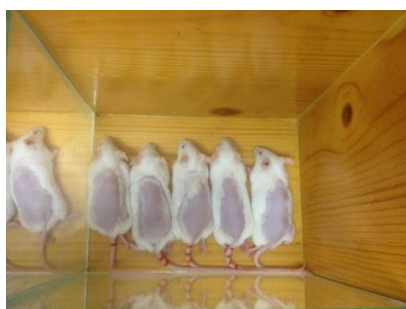
- กลุ่มปกติ (normal) คือกลุ่มหนูที่ไม่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี จำนวน 5 ตัว
- กลุ่มควบคุม (control) คือกลุ่มหนูที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนน้ำเปล่าจำนวน 5 ตัว
- กลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนของเหลวแขวนตะกอนของเนื้อผลกล้วยไข่สุก ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักหนูต่อวัน [30,51] จำนวน 5 ตัว
- กลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนของเหลวแขวนตะกอนของเนื้อผลกล้วยน้ำว้าสุก ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักหนูต่อวัน [30, 51] จำนวน 5 ตัว
- กลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนสารละลายวิตามินซี ในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน [30,51] จำนวน 5 ตัว

หมายเหตุ: ของเหลวแขวนตะกอนของกล้วยบดและสารละลายวิตามินซีถูกเตรียมขึ้นใหม่ทุกวัน

ก่อนจะให้รังสียูวีบีและเนื้อผลกล้วยสุกที่เตรียมในรูปของเหลวแขวนตะกอน หนูจะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งผิวหนังด้วยสารก่อมะเร็ง 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) [49] โดยทาสาร DMBA (ละลายในอะซีโตน (acetone)) ความเข้มข้น 200 นาโนโมล (subcarcinogenic dose)

[40] ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร ที่บริเวณส่วนหลังของหนูที่ถูกโกนขน (พื้นที่ 3×3 เซนติเมตร) จำนวน 1 ครั้ง หลังจากที่ถูกผูกเป็นเวลา 1 สัปดาห์ หนูจะได้รับรังสียูวีบีควบคู่กับการได้รับสารตัวอย่าง โดยขั้นตอนการป้อนสารตัวอย่างและการฉายรังสียูวีบี มีดังนี้

- 1) หนูทดลองจะได้รับน้ำเปล่า ของเหลวแขวนตะกอนของกล้วยสุกบด หรือสารละลายวิตามินซีในขนาดที่กำหนด โดยการป้อนผ่านทาง feeding tube ในตอนเช้า (เวลา 9.00)
- 2) หลังจากหนูทดลองได้รับตัวอย่าง จะถูกผูกเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 3) เมื่อครบเวลาหนูทดลองจะถูกวางยาสลบ ด้วย ketamine ในขนาด 40 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม และ xylazine ในขนาด 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม
- 4) นำหนูทดลองที่สลบแล้ว วางลงในกล่องฉายรังสียูวีบี (UVB box) ดังรูปที่ 9 รังสียูวีบีที่ใช้มีแหล่งกำเนิดมาจาก UVB Lamp ชนิด 8 วัตต์ ความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 275 - 305 นาโนเมตร (Toshiba, Japan) หนูจะได้รับรังสีสัปดาห์ละ 3 ครั้ง (จันทร์ พุธ และศุกร์) ติดต่อกันเป็นเวลา 16 สัปดาห์ ในขณะที่จะถูกป้อนสารตัวอย่างในช่วงเช้าทุกวัน
- 5) เมื่อครบเวลากำหนดฉายรังสียูวีบี ให้ความอบอุ่นกับหนูทดลองโดยใช้ warm pad เพื่อเร่งกระบวนการฟื้นตัวจากยาสลบของหนูทดลอง



รูปที่ 9 ภาพหนูทดลองหลังถูกวางยาสลบและการเตรียมหนูทดลองเพื่อฉายรังสียูวีบีในกล่องฉายยูวีบี

เพื่อลดโอกาสการเกิดผิวหนังไหม้ (skin burn) เนื่องจากการได้รับความเข้มของรังสียูวีบีในขนาดสูง ความเข้มของรังสีจึงถูกปรับให้ค่อยๆ เพิ่มขึ้น จากความเข้มของรังสียูวีบีที่หนูได้รับในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 คือ 54 และ 72 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ เป็น 126 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร ในสัปดาห์ที่เหลือจนครบ 16 สัปดาห์ ทั้งนี้ความเข้มของรังสียูวีบีและช่วงระยะเวลาที่ให้รังสียูวีบีแก่ผิวหนังหนูในการศึกษานี้ ได้ถูกปรับมาจากการศึกษาก่อนหน้านี้ [30,51]

เมื่อครบเวลาการศึกษา (16 สัปดาห์) หนูจะถูกการุณยฆาต โดยขั้นตอนการการุณยฆาตสัตว์ทดลองและการเก็บตัวอย่างอวัยวะ มีดังนี้

- 1) หนูทดลองจะได้รับยาสลบ sodium pentobarbital ในขนาด 100 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (overdose) และทำการดิ่งคอ (cervical) เพื่อยืนยัน การตายอย่างสมบูรณ์
- 2) ตัดผิวหนังบริเวณที่ทดสอบขนาด 3 x 3 ตารางเซนติเมตร หลังจากนั้นส้อมเลือกบริเวณ ผิวหนังดังกล่าวขนาด 2-3 มิลลิเมตร เพื่อทำ frozen section fixation
- 3) เก็บผิวหนังที่เหลือในถังไนโตรเจนเหลว เพื่อทดสอบปริมาณกลูตาไธโอน (total glutathione)

3) การดูลักษณะและวัดความหนาของผิวหนังชั้นหนังกำพร้าในระดับจุลกายวิภาคศาสตร์

frozen section fixation เป็นวิธีการที่รวดเร็วสำหรับการรักษาสภาพและตรึงตัวอย่างเนื้อเยื่อ วิธีนี้เหมาะสมกับตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ต้องการทดสอบสารสำคัญในเนื้อเยื่อที่สลายได้ง่าย เมื่ออยู่ในอุณหภูมิปกติหรือถูกทำลายได้ง่ายหากใช้การรักษาสภาพตัวอย่างด้วยวิธี paraffin เนื้อเยื่อแช่แข็งจะถูกตัดตามขวางให้มีความหนาประมาณ 8 ไมโครเมตร ด้วยเครื่อง microtome (Leica 818, Nussloch, Germany) และตรึงตัวอย่างเนื้อเยื่อบนกระจกสไลด์ที่ผ่านการเคลือบด้วย poly-L-lysine solution เพื่อนำไปใช้ในการย้อมสี (staining) โดยใช้เทคนิคการย้อมสี hematoxylin-eosin (H&E) staining เพื่อศึกษาการจัดเรียงตัวของเซลล์ผิวหนังและความหนาของชั้นหนังกำพร้า (epidermis) และเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างกลุ่ม ขั้นตอนการย้อมตัวอย่างชิ้นเนื้อด้วย H&E staining เริ่มจากนำกระจกสไลด์ที่บรรจุตัวอย่างเนื้อเยื่อซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที และทำการดิ่งน้ำ (dehydration) ออกจากชิ้นเนื้อตัวอย่าง ด้วย อะซีโตน ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วจึงทำการย้อมสี H&E ตามขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	haematoxylin	5
2	น้ำกลั่น	1
3	เอทานอล ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์	1
4	eosin	2
5	น้ำกลั่น	1
6	เอทานอล ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์	1
7	เอทานอล ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์	1
8	เอทานอล ความเข้มข้น 99.99 เปอร์เซ็นต์	1
9	เอทานอล ความเข้มข้น 99.99 เปอร์เซ็นต์	1
10	xylene	1

11	xylene	1
----	--------	---

ปิดสไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์ (cover glass) โดยใช้ mounting medium (Permount) แล้วจึงนำสไลด์ถาวรมาศึกษาลักษณะต่างของเนื้อเยื่อ รวมทั้งวัดความหนาของชั้นหนังกำพร้าด้วยกล้องจุลทรรศน์ พร้อมถ่ายภาพบันทึกไว้

4) การวัดปริมาณกลูตาไธโอนในรูปที่ถูกรีดิวซ์และออกซิไดซ์

ตัวอย่างผิวหนังหนูถูกนำมาสกัด และวิเคราะห์ปริมาณกลูตาไธโอนโดยใช้ Glutathione assay kit (colorimetric) (B0BV02090C00089, lot: 2J210261, Abnova, USA) เพื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณกลูตาไธโอนระหว่างกลุ่มการทดลอง โดยขั้นตอนการสกัดตัวอย่างผิวหนังมีดังนี้

- 1) นำชิ้นเนื้อผิวหนัง ปริมาณ 100 มิลลิกรัม มาย่อยใน glutathione buffer ปริมาณ 0.4 มิลลิลิตร
- 2) เติม sulfosalicylic acid ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 100 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน
- 3) นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
- 4) เก็บส่วนใส (supernatant) ใสในหลอดทดลองใหม่ เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณกลูตาไธโอน

ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณกลูตาไธโอน จากตัวอย่างที่สกัดจากเนื้อเยื่อผิวหนังข้างต้น มีดังนี้

- 1) เตรียม reaction mixture ประกอบด้วย

20 ไมโครลิตร	NADPH Generating Mix
20 ไมโครลิตร	Glutathione Reductase
120 ไมโครลิตร	Glutathione Reaction Buffer

- 2) บ่ม reaction mixture ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที
- 3) เติมสารมาตรฐานกลูตาไธโอนและตัวอย่างที่สกัดจากเนื้อเยื่อผิวหนัง หลุมละ 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที
- 4) เติม substrate solution หลุมละ 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที
- 5) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วย Microplate reader
- 6) คำนวณปริมาณกลูตาไธโอนทั้งหมด โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานกลูตาไธโอน

5) การวัดปริมาณ 4-hydroxynonenal (4-HNE) และ cyclooxygenase enzyme (COX-2)

โดยใช้วิธีทาง immunofluorescence

เช่นเดียวกับการศึกษาการเรียงตัวของเซลล์ผิวหนังและความหนาของชั้นหนังกำพร้า ตัวอย่างชิ้นเนื้อจะถูกตรึงโดยวิธี frozen section fixation จากนั้นนำชิ้นเนื้อไปบ่มใน anti-COX2/cyclooxygenase 2 antibody (ab15191) และ anti-4 hydroxynonenal antibody (ab46545) ด้วยวิธีการย้อม immunofluorescence และวัดค่าความเข้มแสง (intensity light) ที่ปล่อยออกมา เมื่อส่องใต้กล้อง fluorescence microscopy (Axio Observer Z1, Carl Zeiss Microscopy Ltd., Cambridge, UK) ที่กำลังขยาย 40X และเปรียบเทียบปริมาณค่าความเข้มแสงระหว่างกลุ่มการทดลอง

ขั้นตอนทาง immunofluorescence สำหรับ 4-HNE มีดังนี้

ลำดับ ที่	ขั้นตอน	เวลา (นาที่)
1	แช่สไลด์ชิ้นเนื้อตัวอย่างในอะซีโตนอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส	10
2	ปล่อยให้สไลด์ชิ้นเนื้อแห้งที่อุณหภูมิห้อง	10
3	แช่สไลด์ชิ้นเนื้อตัวอย่างใน PBS ที่อุณหภูมิห้อง	10
4	หยด Triton X-100 (ละลายใน tris-buffered saline (TBS)) ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ลงบนสไลด์	5
5	หยด blocking solution ลงบนสไลด์	5
6	เท blocking solution ออกให้มากที่สุด และบ่มสไลด์ชิ้นเนื้อตัวอย่างกับ primary antibody (anti-4 hydroxynonenal antibody, ab46545) อัตราส่วน 1 : 200 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	ข้ามคืน (over night)
7	ล้างสไลด์ชิ้นเนื้อตัวอย่างด้วย Triton X-100 (ละลายใน TBS) ความเข้มข้น 0.025 เปอร์เซ็นต์ 2 รอบ	5
8	บ่มสไลด์ชิ้นเนื้อตัวอย่างกับ secondary antibody (Goat anti-rabbit IgG H&L (Alexa Fluor®488), ab150077) อัตราส่วน 1 : 1000 ที่อุณหภูมิห้อง	60
9	ล้างสไลด์ด้วย TBS 2 รอบ	5
10	บันทึกภาพและวัดค่า intensity light โดยใช้กล้อง fluorescence microscopy	

ขั้นตอนทาง immunofluorescence สำหรับ COX-2 มีดังนี้

ลำดับ ที่	ขั้นตอน	เวลา (นาที)
1	แช่สไลด์ชิ้นเนื้อตัวอย่างในอะซีโตนอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส	10
2	ปล่อยให้สไลด์ชิ้นเนื้อแห้งที่อุณหภูมิห้อง	10
3	แช่สไลด์ชิ้นเนื้อตัวอย่างใน PBS ที่อุณหภูมิห้อง	10
4	หยด Triton X-100 (ละลายใน tris-buffered saline (TBS)) ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ลงบนสไลด์	5
5	หยด blocking solution ลงบนสไลด์	5
6	เท blocking solution ออก และบ่มสไลด์ชิ้นเนื้อตัวอย่างกับ primary antibody (anti-COX2/cyclooxygenase 2 antibody, ab15191) อัตราส่วน 1 : 500 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	120
7	ล้างสไลด์ชิ้นเนื้อตัวอย่างด้วย Triton X-100 (ละลายใน TBS) ความเข้มข้น 0.025 เปอร์เซ็นต์ 2 รอบ	5
8	บ่มสไลด์ชิ้นเนื้อตัวอย่างกับ secondary antibody (Goat anti-rabbit IgG H&L (Cy5), ab6564) อัตราส่วน 1 : 500 ที่อุณหภูมิห้อง	60
9	ล้างสไลด์ด้วย TBS 2 รอบ	5
10	บันทึกภาพและวัดค่า intensity light โดยใช้กล้อง fluorescence microscopy	

บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

1. ลักษณะทางกายภาพของกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่สุกที่ถูกทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง

หลังจากการทำแห้งกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่สุกแบบเยือกแข็ง เพื่อกำจัดน้ำออก นาน 72 ชั่วโมง จะได้ลักษณะของกล้วยดังรูปที่ 10 และน้ำหนักของกล้วยน้ำว้าแห้งที่ได้จะมีน้ำหนักลดลงจากกล้วยสด ประมาณ 15 กรัม ในขณะที่กล้วยไข่จะมีน้ำหนักลดลงจากกล้วยไข่สดประมาณ 12 กรัม ดังที่แสดงในตารางที่ 1



รูปที่ 10 แสดงภาพกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่ หลังจากถูกทำให้แห้งโดยเครื่อง freeze dryer

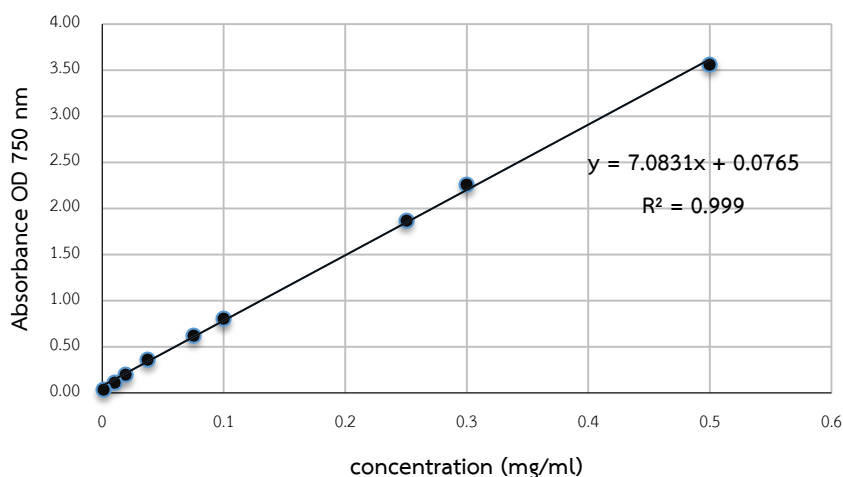
ตารางที่ 1 เปรียบเทียบน้ำหนักของผลกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่สุกกับน้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง

ชนิดของกล้วย	น้ำหนักกล้วยสด (fresh fruit) หน่วย : กรัม	น้ำหนักกล้วยแห้ง (dried fruit) หน่วย : กรัม
กล้วยน้ำว้า (<i>Musa sapientum</i> L., ABB Group)	~15-20	~8-12
กล้วยไข่ (<i>Musa surier</i> L., AA Group)	~12-15	~6-9

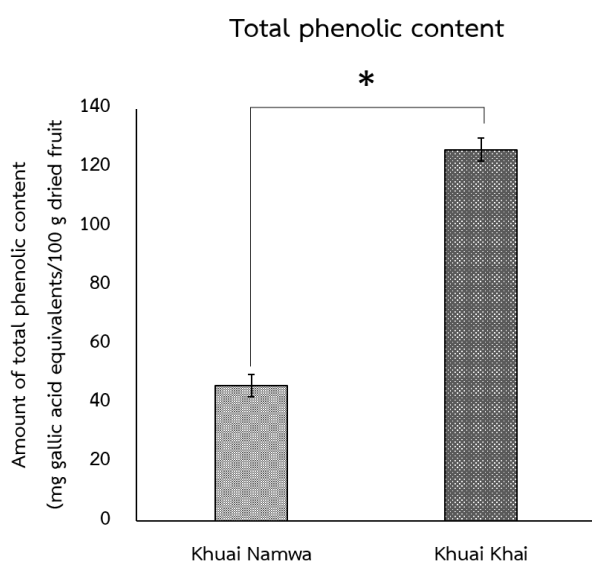
2. ปริมาณฟีนอลิกรวม (total phenolic content) ในสารสกัดกล้วยน้ำว้าแห้งและกล้วยไข่แห้ง

ผลกล้วยไข่และกล้วยน้ำว้าสุกที่ถูกทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง เมื่อนำมาสกัดด้วยเอทานอล (ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์) และนำสารสกัดเอทานอลที่ได้มาทดสอบปริมาณฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin-ciocalteu assay โดยเปรียบเทียบกับกราฟสารมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid standard reference curve) (รูปที่ 11) ผลที่ได้แสดงในรูปที่ 12 จากการศึกษเปรียบเทียบเชิงปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด พบว่าฟีนอลิกรวมในกล้วยไข่แห้งมีปริมาณที่สูงกว่าในกล้วยน้ำว้าแห้งอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยในกล้วยไข่แห้งมีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 126.14 ± 4.01 mg gallic acid

equivalents/100 g dried fruit และกล้วยน้ำว้าแห้งมีฟีนอลิกรวมเท่ากับ 46.06 ± 3.80 mg gallic acid equivalents/100 g dried fruit ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่ากล้วยไข่จะมีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่ากล้วยน้ำว้าประมาณ 2-4 เท่า [30, 51] ทั้งนี้ ในการศึกษาครั้งนี้ ช่วงเวลาที่นำผลไม้มาศึกษาเป็นช่วงเดือนมิถุนายนถึงกันยายน (ฤดูฝน) ซึ่งเป็นช่วงที่แตกต่างกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่นำผลไม้ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงพฤษภาคม (ฤดูร้อน) และเดือนกันยายนถึงธันวาคม (เข้าช่วงฤดูหนาว) มาทำการศึกษา



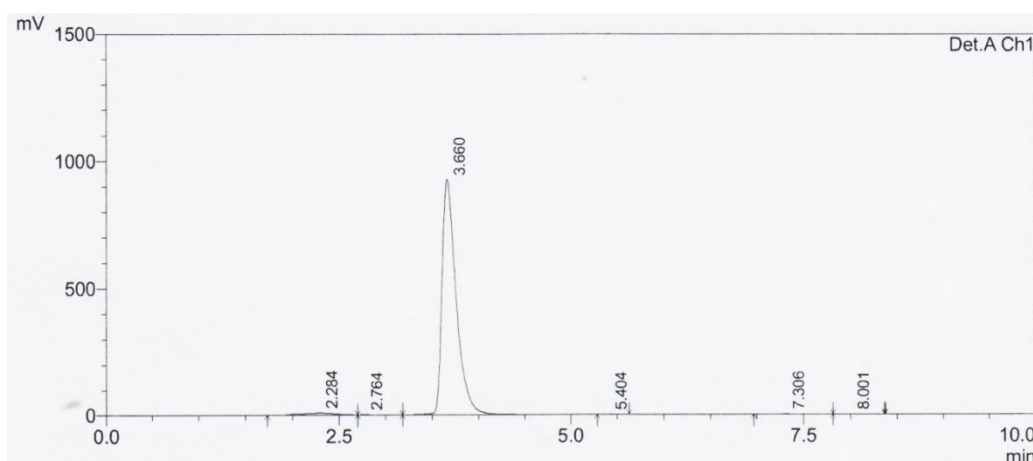
รูปที่ 11 ตัวอย่าง gallic acid standard reference curve, $R^2 = 0.999$



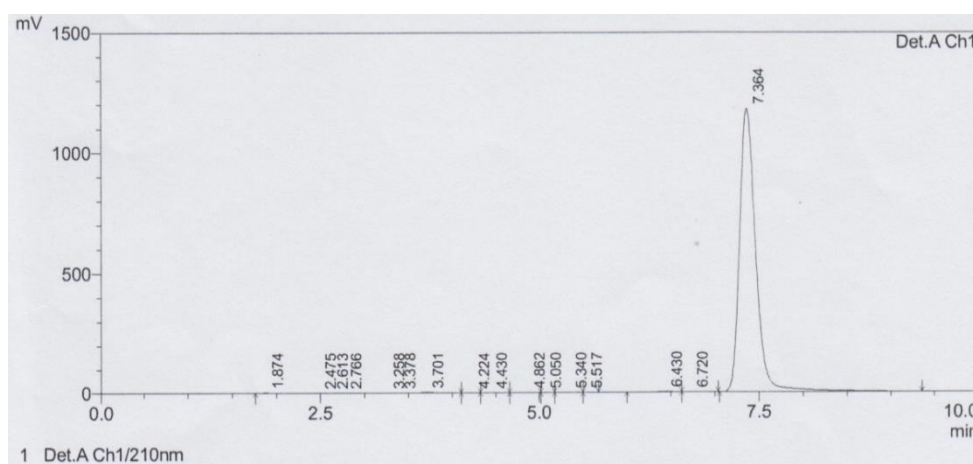
รูปที่ 12 กราฟแสดงความแตกต่างของปริมาณฟีนอลิกรวมในกล้วยไข่สุก (*Musa surier* L.) และกล้วยน้ำว้าสุก (*Musa sapientum* L.) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (Student's *t* test) (mean $\pm$ SD, $n = 3$, $*p < 0.05$)

3. ปริมาณสารสำคัญกรดแกลลิก (gallic acid) และคาเทชิน (catechin) ที่มีอยู่ในผลกล้วย

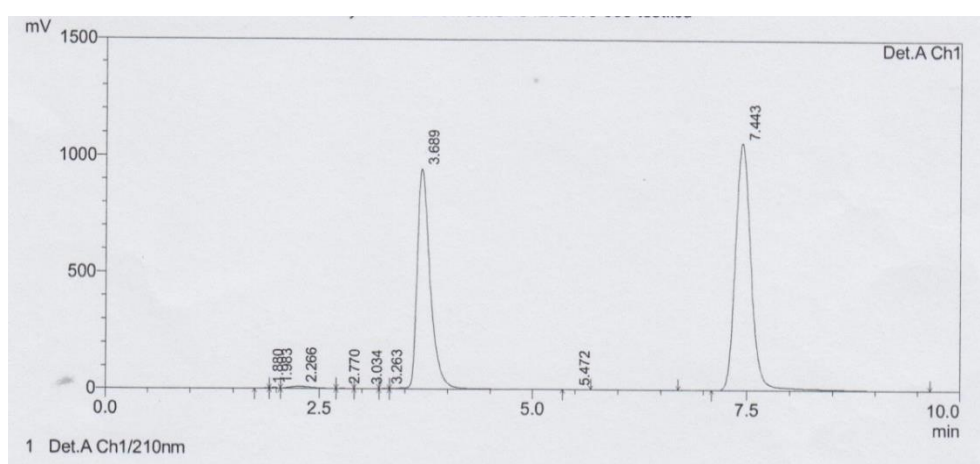
จากการศึกษาปริมาณสารสำคัญกรดแกลลิกและคาเทชินในกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่ด้วย HPLC โดยกำหนดให้อัตราการไหลของตัวอย่างผ่านคอลัมน์เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที และวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 210 นาโนเมตร ภาพโครมาโตแกรม (chromatogram) ของสารมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงในรูปที่ 13 พบว่า peak ของกรดแกลลิกปรากฏตำแหน่งของ retention time ที่ 3.6 นาที และในรูปที่ 14 แสดงตำแหน่ง retention time ของสารมาตรฐานคาเทชินที่ 7.5 นาที รูปที่ 15 เป็นภาพโครมาโตแกรมของสารผสมระหว่างสารมาตรฐานกรดแกลลิกและคาเทชิน เพื่อเป็นการยืนยันว่า peak ของสารสำคัญทั้ง 2 ชนิดจะไม่เกิดการซ้อนทับกัน รูปที่ 16 และ 17 แสดงโครมาโต- แกรมที่ได้จากการฉีดสารสกัดกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่ (ขั้นตอนการสกัดดังที่ระบุในข้อ 2.3 การศึกษาปริมาณ กรดแกลลิก (gallic acid) และคาเทชิน (catechin) ที่มีอยู่ในผลกล้วยโดย HPLC analysis) จากผล การศึกษาพบว่า ไม่สามารถคำนวณหาปริมาณที่แท้จริงของกรดแกลลิกและคาเทชินโดยเทคนิค HPLC ที่ พัฒนาขึ้นมาได้ เนื่องจากพื้นที่ใต้โครมาโตแกรมที่ตรวจวัดได้มีค่าน้อยกว่าช่วงความเข้มข้นที่ใช้เปรียบ เทียบหรือกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานกรดแกลลิกและคาเทชิน อย่างไรก็ตาม รูปแบบโครมาโตแกรม ที่ได้จากการสกัดกล้วยไข่และน้ำว้า มีแนวโน้มสอดคล้องกับผลที่ได้จากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม ด้วยวิธี Folin-ciocalteu assay คือพบ peak ของกรดแกลลิกและคาเทชินที่ปรากฏในโครมาโตแกรมของ สารสกัดจากกล้วยไข่สูงกว่าสารสกัดจากกล้วยน้ำว้า



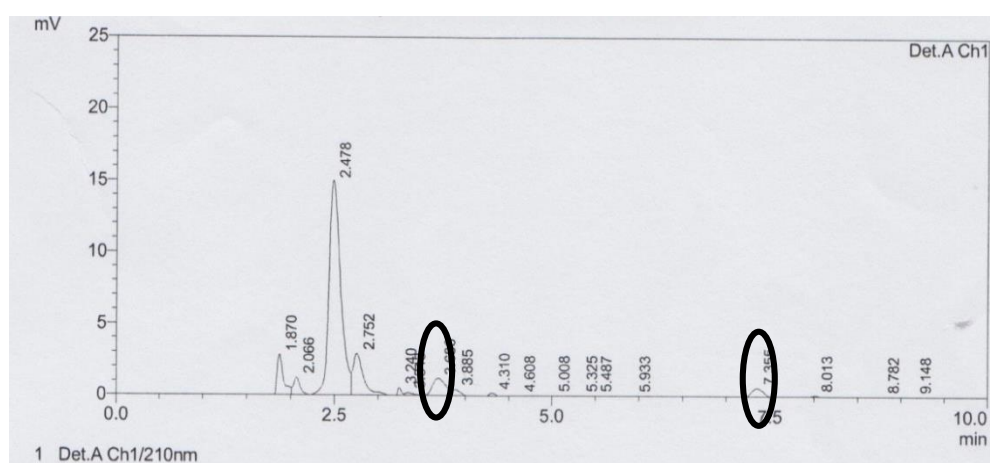
รูปที่ 13 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



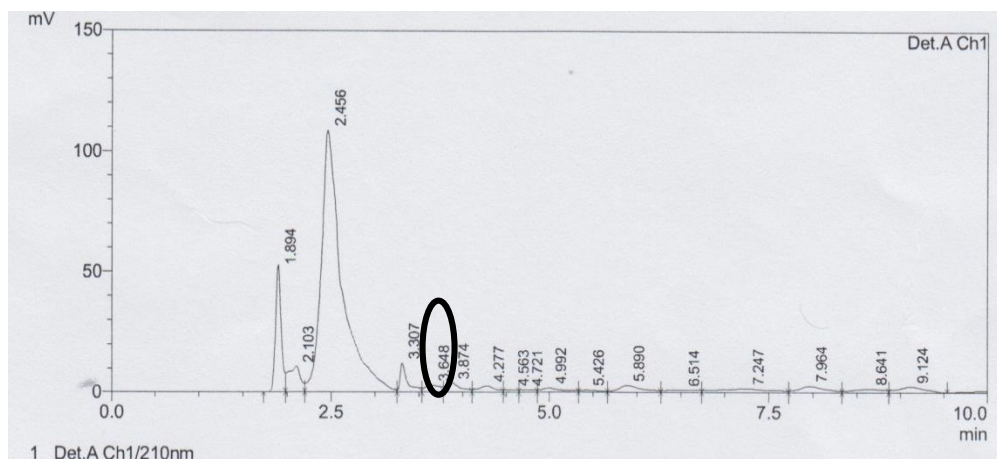
รูปที่ 14 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานคาเทชินความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 15 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานผสมระหว่างกรดแกลลิกความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และคาเทชินความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 16 โครมาโตแกรมของสารสกัดกล้วยไข่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 17 โครมาโตแกรมของสารสกัดกล้วยน้ำว้าความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ก่อนหน้านี้ มีรายงานการศึกษาในผลกล้วยสด สายพันธุ์ Gran Enana และ Pequeña Enana ที่ปลูกในประเทศ Ecuador และ Canary Islands และใช้ HPLC (photodiode array detection) ในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดแกลลิกและคาเทชิน ระบุว่า ในกล้วยนั้นมีสารที่สารกลุ่มฟีนอลิก ได้แก่ กรดแกลลิก ในช่วง 0.8-1 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของกล้วยสด และคาเทชิน ในช่วง 6-10 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของกล้วยสด [44] สำหรับในการศึกษานี้ เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดแกลลิกและคาเทชินคือ HPLC เช่นกัน แต่ใช้ detector ชนิด UV/visible ที่ไม่ใช่ photodiode array ซึ่งส่งผลให้ประสิทธิภาพในการวิเคราะห์แตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ อย่างไรก็ตาม ดังที่กล่าวไปแล้วข้างต้น ผลโครมาโตแกรมที่ได้จาก detector ชนิด UV/visible แสดงให้เห็นแนวโน้มการพบกรดแกลลิกและคาเทชินในกล้วยไข่และน้ำว้าเช่นกัน ซึ่งมีรายการศึกษาระบุว่า สารคาเทชินช่วยเพิ่มการทำงานของกลูตาไธโอน และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกลูตาไธโอน และช่วยลดปริมาณ COX-2 ในผิวหนังที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งผิวหนังโดยการทา DMBA ร่วมกับ 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) รวมทั้งป้องกันการเกิดมะเร็งผิวหนัง [50] ข้อมูลที่ได้นี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของแคทีชินในการป้องกันการเกิดมะเร็งผิวหนัง

4. ปริมาณเบตา-แคโรทีนที่มีอยู่ในผลกล้วย

จากผลการทดลองพบว่า ในกล้วยไข่มีปริมาณเบตา-แคโรทีนเท่ากับ 56.57 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมของเนื้อผลแห้ง สำหรับกล้วยน้ำว้านั้น เบตา-แคโรทีนมีอยู่ในปริมาณต่ำจนไม่สามารถวัดผลได้ด้วยวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ในการศึกษานี้ ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าในกล้วยไข่มีปริมาณเบตา-แคโรทีนสูงกว่าในกล้วยน้ำว้า ผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ [51] ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณเบตา-แคโรทีนในผลกล้วยไข่และน้ำว้าสุกด้วยวิธีเดียวกัน โดยพบว่ากล้วยไข่สุกมีปริมาณเบตา-แคโรทีนเท่ากับ 282.85 ± 16.95 ไมโครกรัมต่อ

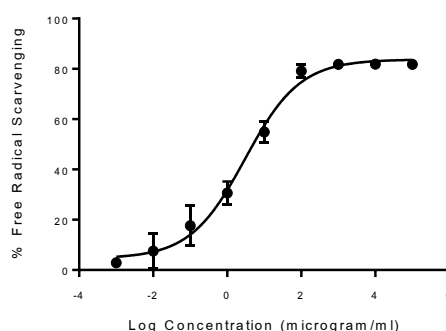
100 กรัมของเนื้อผลแห้ง ทั้งนี้ช่วงเวลาที่นำผลไม้มาศึกษาเป็นช่วงที่ต่างกัน ดังที่กล่าวไปแล้วข้างต้น นอกจากนี้มีรายงานผลการศึกษาระดับเบตา-แคโรทีนในผลกล้วย 17 สายพันธุ์ที่ปลูกใน Papua New Guinea โดยใช้ HPLC ในการวิเคราะห์ พบปริมาณเบตา-แคโรทีนอยู่ในช่วง 100-2,400 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัมของเนื้อผล ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ [43] อาจกล่าวได้ว่าเบตา-แคโรทีนเป็นสารสำคัญอีกชนิดหนึ่งที่พบในกล้วย การศึกษาในมนุษย์พบว่า การได้รับเบตา-แคโรทีนโดยการรับประทานติดต่อกันเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ส่งผลให้ปริมาณ แคโรทีนอยด์ (carotenoids) ที่ผิวหนังเพิ่มขึ้น [45] รวมทั้งมีส่วนช่วยป้องกันการเกิดการอักเสบและ/หรือระคายเคืองของผิวหนังที่ได้รับรังสีอย่างต่อเนื่อง [45,46-48] และการศึกษาในหนูพบว่า หนูที่ได้รับเบตา-แคโรทีน โดยการกินจะทำให้ระดับกลูตาไธโอนในเซลล์ผิวหนังเพิ่มขึ้น [31] ด้วยเหตุนี้ การรับประทานกล้วยที่มีเบตา-แคโรทีนเป็นองค์ประกอบ อาจช่วยป้องกันผิวหนังอักเสบหรือเปลี่ยนแปลงสภาพอันเนื่องมาจากการได้รับรังสีอย่างต่อเนื่องได้

5. ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่แห้ง

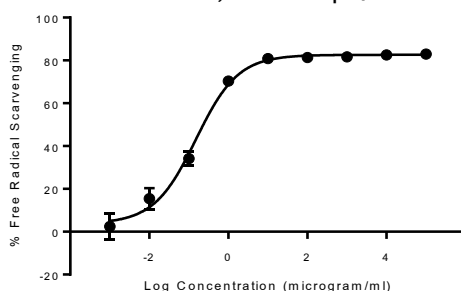
ตารางที่ 2 แสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging) ของกล้วยไข่แห้งและกล้วยน้ำว้าสุก ผลจาก DPPH assay พบว่าสารสกัดจากกล้วยน้ำว้าสุก (ที่ถูกทำให้แห้งก่อนสกัด) มีค่า EC_{50} เท่ากับ 4.03 ± 0.82 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 18) ในขณะที่สารสกัดกล้วยไข่สุก (ที่ถูกทำให้แห้งก่อนสกัด) มีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.17 ± 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 19) ดังนั้น อาจกล่าวได้ว่ากล้วยไข่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่ากล้วยน้ำว้า กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ (% free radical scavenging) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่สุก แสดงในรูปที่ 18 และ 19 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 แสดงค่า EC_{50} ของผลกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่สุก ที่ถูกทำให้แห้งก่อนนำมาสกัด เพื่อนำสารสกัดที่ได้มาวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH assay (mean $\pm$ SD, n = 3)

ชนิดของกล้วย	ค่า EC_{50} (mean $\pm$ SD) หน่วย : ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
กล้วยน้ำว้าสุก (<i>Musa sapientum</i> L., ABB Group)	4.03 ± 0.82
กล้วยไข่สุก (<i>Musa surier</i> L., AA Group)	0.17 ± 0.01

Musa sapientum L., ABB Group (Kluai Namwa)

รูปที่ 18 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ (% free radical scavenging) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากผลกล้วยน้ำว้าสุก (ที่ถูกทำให้แห้งก่อนนำมาสกัด)

Musa surier L., AA Group (Kluai Khai)

รูปที่ 19 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ (% free radical scavenging) กับความเข้มข้นของสารสกัดจากผลกล้วยไข่สุก (ที่ถูกทำให้แห้งก่อนนำมาสกัด)

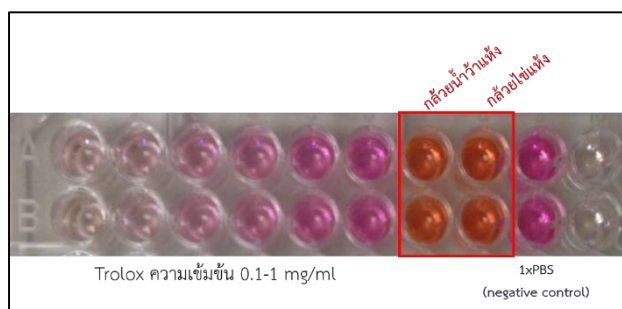
ผลค่า EC_{50} ที่ได้สอดคล้องกับปริมาณเบตา-แคโรทีนและฟีนอลิกรวมที่พบในกล้วยทั้ง 2 ชนิด ดังที่กล่าวไปแล้วข้างต้น รวมทั้งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ [30] ถึงแม้ว่าผลกล้วยที่นำมาศึกษาอยู่ในช่วงฤดูที่ต่างกัน กล่าวคือ กล้วยไข่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่ากล้วยน้ำว้า (ผลจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า EC_{50} ของสารสกัดจากผลกล้วยไข่สุกมีค่าเท่ากับ 16.2 ± 1.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และของผลกล้วยน้ำว้าสุกมีค่าเท่ากับ 108.3 ± 5.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

6. Lipid peroxidation inhibition

จากการวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี BCA assay พบว่าโปรตีนในสมองหนูมีความเข้มข้น 148 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบกับกราฟที่ได้จากสารมาตรฐานอัลบูมิน (albumin standard

reference curve) และเจือจางสมองหนูให้มีความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบ Lipid peroxidation inhibition โดยวิธี TBARs assay

จากรูปที่ 20 จะเห็นได้ว่า ตัวอย่างสารสกัดกล้วยน้ำว้าแห้งและกล้วยไข่แห้งให้สีที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของสารทดสอบแตกต่างจาก negative control (กลุ่มตัวอย่างที่ไม่ใส่สารต้าน lipid peroxidation) ซึ่งมีสีชมพูเข้ม และแตกต่างจาก positive control (กลุ่มตัวอย่างที่ใส่สารต้าน lipid peroxidation ได้แก่ trolox) ซึ่งมีสีจางถึงสีชมพูอ่อน กล่าวคือกลุ่มตัวอย่างที่ใส่สารสกัดกล้วยจะมีสีส้ม และมีค่าดูดกลืนแสงสูงกว่าค่าของกลุ่ม blank ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีสารบางอย่าง (unknown) ในสารสกัดจากผลกล้วยที่รบกวนการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง MDA และ TBARs reagent ด้วยเหตุนี้ จึงยังคงสรุปไม่ได้ว่าสารสกัดจากกล้วยไม่มีความสามารถในการต้าน lipid peroxidation แนวทางในการแก้ปัญหาครั้งนี้ คือ ทำการเปลี่ยนแหล่งไขมันที่นำมาทดสอบ โดยการใช้ไขมันจากอวัยวะส่วนอื่น เช่น ตับ มาใช้ในการทดสอบ หรืออาจเปลี่ยนวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสม



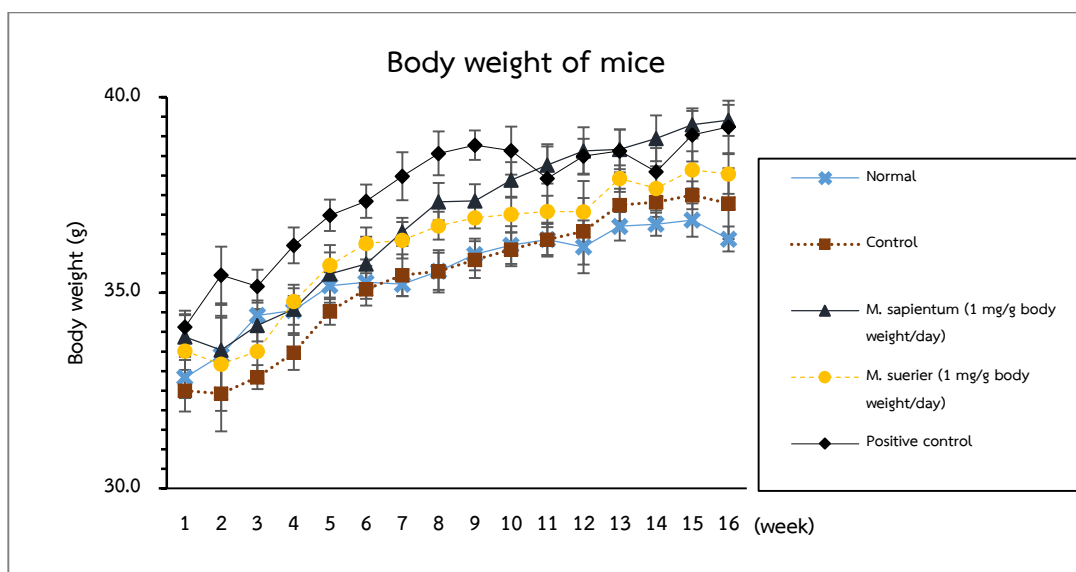
รูปที่ 20 ผลการทดสอบ Lipid peroxidation inhibition ของสารสกัดกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่แห้ง โดยวิธี TBARs assay

7. ศักยภาพของกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่ในการป้องกันมะเร็งผิวหนังในหนูทดลองที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งด้วยสารก่อมะเร็ง DMBA ร่วมกับการฉายรังสียูวีบี

7.1 น้ำหนักของหนูทดลองหลังจากการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งผิวหนัง

หลังจากการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งผิวหนังด้วยสารก่อมะเร็ง DMBA น้ำหนักของหนูทดลองจากสัปดาห์ที่ 1 (อายุ 6 สัปดาห์) ถึงสัปดาห์ที่ 16 ของการทดลองแสดงในรูปที่ 21 หนูกลุ่มปกติ (normal) คือกลุ่มที่ไม่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี กลุ่มควบคุม (control) คือกลุ่มที่ได้รับ DMBA และถูกฉายรังสียูวีบีพร้อมกับถูกป้อนน้ำเปล่า และกลุ่มทดลองอีก 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนของเหลวแขวนตะกอนของเนื้อผลกล้วยสุกในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักหนูต่อวัน กลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนของเหลวแขวนตะกอนของเนื้อผลกล้วยน้ำว้าสุกในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักหนูต่อวัน และกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนสารละลายวิตามินซีในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน พบว่าหนูทดลองทุกกลุ่มมีระดับ

น้ำหนักเพิ่มขึ้นทุกสัปดาห์และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม พบว่าน้ำหนักของหนูทดลองเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 21

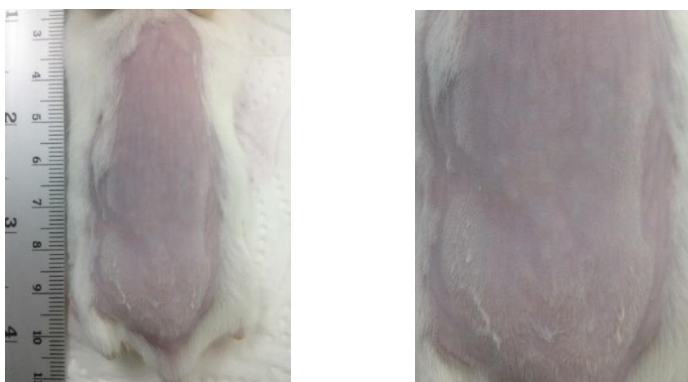


รูปที่ 21 แสดงน้ำหนักของหนูทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งผิวหนัง (normal) และกลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งผิวหนังร่วมกับการได้รับน้ำเปล่า (control) กล้วยน้ำว่าสุก กล้วยไข่สุก และวิตามินซี ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 (อายุ 6 สัปดาห์) ถึงสัปดาห์ที่ 16 (mean±SD, n = 5)

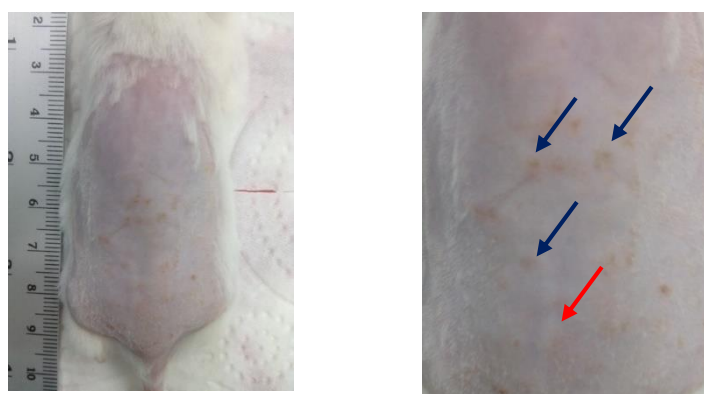
7.2 ลักษณะทางกายภาพและความหนาของผิวหนังก่าพราในระดับจุลกายวิภาคศาสตร์

7.2.1 ลักษณะทางกายภาพของผิวหนังหนูทดลอง

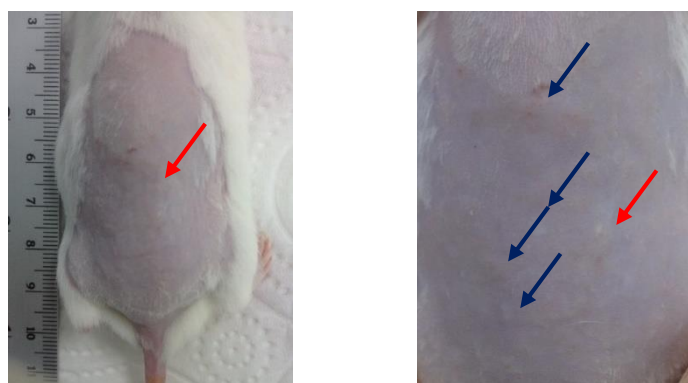
ลักษณะทางกายภาพของผิวหนังหนูเมื่อครบกำหนดการทดลอง 16 สัปดาห์ แสดงในรูปที่ 22 พบว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับ DMBA และการฉายรังสียูวีบี (normal) มีลักษณะของผิวหนังที่เรียบเนียน ไม่มีรอยเหี่ยวย่น ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนน้ำเปล่า (control) ผิวหนังมีลักษณะเหี่ยวย่น หยาบกราน มีตุ่มนูนของเนื้องอกและรอยแผล ดังตามลูกศรสีน้ำเงินชี้ เนื่องจากรังสียูวีบีที่ได้รับมีระดับความเข้มข้นที่สูง จึงทำให้ผิวหนังได้รับการอักเสบ ดังแสดงในรูป 23 ผิวหนังของหนูกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนกล้วยน้ำว่าและกล้วยไข่ ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักหนูต่อวัน แสดงในรูป 24 และ 25 ตามลำดับ พบว่าการที่หนูได้รับกล้วย ส่งผลทำให้เกิดบาดแผลจากการได้รับการฉายรังสียูวีบีอย่างต่อเนื่อง น้อยกว่ากลุ่ม control แต่จากภาพลักษณะทางกายภาพของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับกล้วยน้ำว่า มีรอยเหี่ยวย่นและหยาบกราน (ลูกศรสีแดง) มากกว่าหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับกล้วยไข่



รูปที่ 22 ลักษณะทางกายภาพของผิวหนังหนุทดลองกลุ่มปกติ (normal) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ณ สัปดาห์ที่ 16



รูปที่ 23 ลักษณะทางกายภาพของผิวหนังหนุทดลองกลุ่มควบคุม (control) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับ DMBA และการรังสียูวีบี ร่วมกับการถูกป้อนน้ำ ณ สัปดาห์ที่ 16, ลูกศรสีน้ำเงิน คือ ตุ่มนูนของเนื้องอกและรอยแผล, ลูกศรสีแดง คือ รอยเหี่ยวย่นและริ้วรอยหยาบกราน

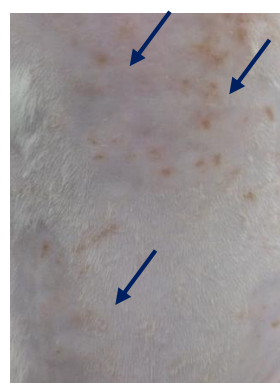
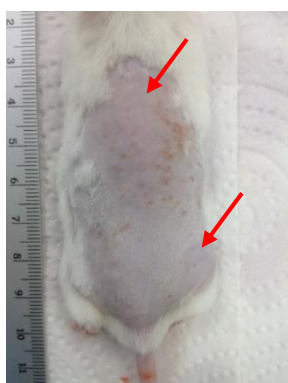


รูปที่ 24 ลักษณะทางกายภาพของผิวหนังหนุทดลองกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับการถูกป้อนกลั้วน้ำว่าสุก ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักหนุต่อ

วัน ณ สัปดาห์ที่ 16, ลูกครีสน้ำเงิน คือ ตุ่มนูนของเนื้องอกและรอยแผล, ลูกครีสีแดง คือ รอยเหี่ยวและริ้วรอยหยาบกราน



รูปที่ 25 ลักษณะทางกายภาพของผิวหนังหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับการถูกป้อนกลัยไซ์สุก ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักหนูต่อวัน ณ สัปดาห์ที่ 16, ลูกครีสน้ำเงิน คือ ตุ่มนูนของเนื้องอกและรอยแผล, ลูกครีสีแดง คือ รอยเหี่ยวและริ้วรอยหยาบกราน



รูปที่ 26 ลักษณะทางกายภาพของผิวหนังหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับการถูกป้อนวิตามินซี ในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน ณ สัปดาห์ที่ 16, ลูกครีสน้ำเงิน คือ ตุ่มนูนของเนื้องอกและรอยแผล, ลูกครีสีแดง คือ รอยเหี่ยวและริ้วรอยหยาบกราน

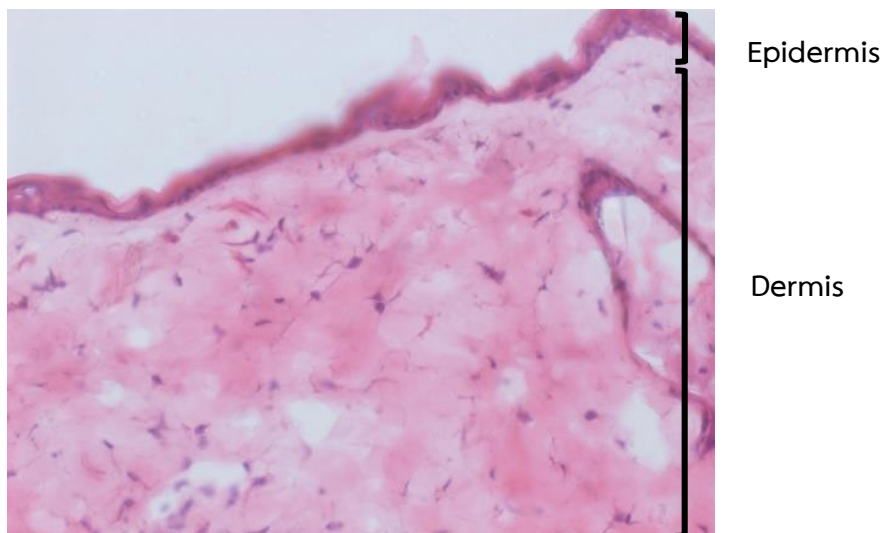
นอกจากนี้ ผิวหนังของหนูทดลองปรากฏตุ่มนูนน้อยกว่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่า หนูทดลองที่ได้รับกลัยไซ์มีแนวโน้มชะลอการปรากฏลักษณะทางกายภาพที่เกิดขึ้นในผิวหนังของหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งผิวหนัง สำหรับลักษณะทางกายภาพของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับการได้รับวิตามินซีในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน แสดงในรูปที่ 26 พบว่า ผิวหนังของหนูทดลองมีความหนาและรอยแผล มากกว่าหนูทดลองกลุ่มอื่นอย่าง

เห็นได้ชัด รวมทั้งการปรากฏของตุ่มนูนของเนื้องอก (ลูกศรสีน้ำเงิน) ดังนั้น การได้รับวิตามินซีของหนูทดลองไม่ชะลอการปรากฏของเนื้องอก จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า วิตามินซีช่วยในการรักษาระดับปริมาณของกลูตาไธโอน และคอลลาเจนในผิวหนังของหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เสื่อมสภาพ โดยการถูกฉายรังสียูวีอย่างต่อเนื่อง [30] แต่จากการศึกษารังนี้พบว่า วิตามินซีไม่สามารถชะลอการเกิดเนื้องอกในผิวหนังของหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งผิวหนังได้ถึงแม้วิตามินซีจะมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี [30] แต่ในกรณีของการศึกษานี้ หนูทดลองถูกเหนี่ยวนำให้เกิด การกลายพันธุ์ในรหัสพันธุกรรม หรือ DNA mutation ที่เซลล์ผิวหนังโดยการถูกทา DMBA ก่อนที่จะได้รับวิตามินซี ร่วมกับการถูกฉายรังสียูวีที่มีคุณสมบัติทำให้เกิด DNA damage ร่วมด้วย ดังนั้น การได้รับวิตามินซีซึ่งถึงแม้จะมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ แต่ไม่มีคุณสมบัติในการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่ได้รับความเสียหายจากสารก่อมะเร็งและการฉายรังสียูวี [60-61] ทำให้อัตราการซ่อมแซมดีเอ็นเอต่ำกว่าอัตราการเกิด DNA damage ทำให้นำไปสู่การพัฒนาของเซลล์มะเร็งในที่สุด

จากภาพลักษณะตุ่มนูนที่เกิดขึ้นในผิวหนังหนูทดลอง ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งเพื่อเป็นการยืนยันว่าลักษณะความผิดปกติที่ปรากฏขึ้นเป็นเนื้องอก จึงทำการศึกษาในระดับจุลกายวิภาคศาสตร์ด้วยเทคนิคการย้อมชิ้นเนื้อ (H&E staining) และตรวจวัดปริมาณโปรตีนเป้าหมายที่แสดงออกในมะเร็งผิวหนังด้วยเทคนิค immunofluorescence staining ต่อไป

7.2.2 ความหนาของผิวหนังชั้นหนังกำพร้าในระดับจุลกายวิภาคศาสตร์

จากการศึกษาการลักษณะการจัดเรียงตัวของเซลล์ในชั้นเนื้อผิวหนังโดยการย้อมสี H&E พบว่า ลักษณะทางกายภาพของผิวหนังหนูทดลองกลุ่มปกติ (normal) ที่ไม่ได้รับ DMBA และรังสียูวี มีลักษณะการจัดเรียงของเซลล์ผิวหนังในชั้นหนังกำพร้า (epidermis) ปกติ ดังปรากฏในรูปที่ 27 ในขณะที่ลักษณะทางกายภาพของผิวหนังหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งผิวหนังโดยสารก่อมะเร็ง DMBA ร่วมกับการฉายรังสียูวี ได้แก่ กลุ่มที่ได้รับน้ำเปล่า (control) กลุ่มที่ได้กลั้วน้ำว่าสุกและกลั้วไขสุก ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักหนูต่อวัน และกลุ่มที่ได้รับวิตามินซี 50 มิลลิกรัมต่อวัน มีลักษณะการจัดเรียงตัวของเซลล์ในชั้น epidermis ที่หนาขึ้นหรือเรียกว่า epidermal hyperplasia ซึ่งเป็นกลไกการปรับตัวของเซลล์ผิวหนังต่อสิ่งเร้า เช่น รังสียูวี ทำให้เซลล์ผิวหนังเกิดการแบ่งตัวจำนวนมากกว่าปกติ เพื่อป้องกันไม่ให้รังสียูวีทำลายเซลล์ผิวหนังชั้นที่สึกลงไป [51] และตอบสนองต่อสิ่งเร้าที่มากระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในชั้นผิวหนัง epidermal hyperplasia ที่เกิดขึ้นโดยการเหนี่ยวนำด้วย DMBA และตามด้วยการฉายรังสียูวีนั้น มีลักษณะที่ไม่สม่ำเสมอ

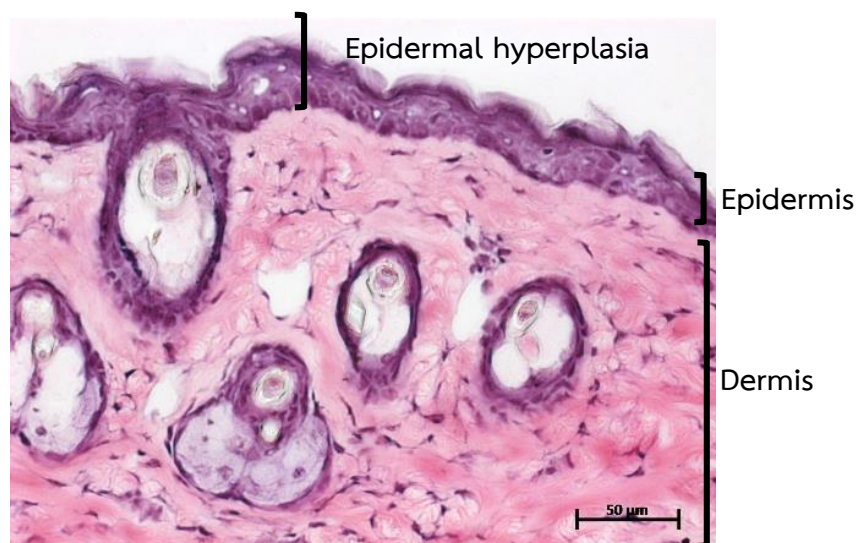


รูปที่ 27 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของผิวหนังหนุทดลองกลุ่มปกติ (normal) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ณ สัปดาห์ที่ 16 (กำลังขยาย 40 เท่า)

ลักษณะทางกายภาพของผิวหนังหนุทดลองในกลุ่มควบคุม (control) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนน้ำเปล่า แสดงในรูปที่ 28 พบว่าผิวหนังชั้นหนังกำพร้าหนาขึ้น ซึ่งเกิดจากการแบ่งตัวของเซลล์คีราติโนไซต์ (keratinocyte cell) ในชั้นหนังกำพร้าเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ ยังพบความแตกต่างที่เกิดขึ้นในชั้นหนังแท้ (dermis) ของหนุทดลองกลุ่ม control เมื่อเทียบกับชั้น dermis ของกลุ่ม normal กล่าวคือ จะพบลักษณะที่ผิดปกติของรากงูขุมขน (root hair follicles) และการแบ่งตัวผิดปกติของเซลล์ในชั้นหนังแท้ ซึ่งเป็นลักษณะบ่งชี้ของการเกิดมะเร็งผิวหนัง ตามลูกศรสีน้ำเงินที่ชี้ในรูปที่ 28 (b) แสดงให้เห็นว่าลักษณะการเกิดมะเร็งผิวหนังของหนุทดลองเป็นไปตามทฤษฎี คือ สารก่อมะเร็ง DMBA เป็นสารที่มีความชอบไขมันสูง [62] จึงสามารถแพร่เข้าสู่ชั้นผิวหนังผ่านทางรูขุมขนที่มีท่อเปิดร่วมกับต่อมไขมัน ซึ่งเซลล์ที่ล้อมรอบรูขุมขนนั้นประกอบไปด้วยเซลล์ต้นกำเนิด (stem cell) ของเซลล์ผิวหนัง และเป็นเซลล์เป้าหมายของสารก่อมะเร็ง DMBA โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายดีเอ็นเอ (DNA mutation) ในการศึกษาี้ หลังจากหนุทดลองถูกเหนี่ยวนำด้วยสารก่อมะเร็ง DMBA หนุทดลองจะถูกพักเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนการฉายรังสียูวีบีครั้งแรก จากนั้นจึงทำการฉายรังสียูวีบีตามความเข้มแสงและระยะเวลาที่กำหนด ในระหว่างที่หนุถูกพักนั้น ดีเอ็นเอที่เสียหายบางส่วนจะได้รับการซ่อมแซม (DNA repair) อย่างไรก็ตาม ดีเอ็นเอที่ถูกซ่อมแซมย่อมมีความไวต่อสิ่งเร้าในการเปลี่ยนแปลง ดังนั้น การฉายรังสียูวีบีอย่างต่อเนื่องจึงเป็นการเหนี่ยวนำให้เกิดความเสียหายแก่ดีเอ็นเอ (DNA damage) ภายในเซลล์ผิวหนัง ส่งผลให้เกิดความผิดปกติในสายดีเอ็นเอ เซลล์ผิวหนังที่มีดีเอ็นเอที่เสียหายนี้ จะถูกแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นจนไม่สามารถควบคุมได้ และนำไปสู่การเกิดมะเร็งผิวหนังในที่สุด

การแบ่งตัวผิดปกติของเซลล์ผิวหนังในชั้นหนังแท้ของหนูที่พบในกลุ่มควบคุม ยังพบในกลุ่มที่ได้กลัวยน้ำว่า กลัวยไข่ และวิตามินซี ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของผิวหนังหนูกุ่มที่ได้รับกลัวยน้ำว่า แสดงในรูปที่ 29 (a) จะเห็นได้ว่า ผิวหนังหนูกุ่มนี้จะมีรากงูขุมขนที่ยาวและตำแหน่งอยู่ลึกลงมาในชั้นหนังแท้มากกว่าผิวหนังของหนูกุ่มปกติ และในชั้นหนังแท้มีการแบ่งตัวของเซลล์คีราติโนไซต์ไม่สม่ำเสมอทั่วทั้งชั้นหนังแท้ ดังลูกศรสีน้ำเงินชี้ และจากรูปที่ 29 (b) แสดงให้เห็นว่ามีการแพร่กระจายของเซลล์คีราติโนไซต์ในชั้นหนังกำพร้าลงสู่ชั้นหนังแท้ และมีการแบ่งตัวของเซลล์ที่ผิดปกติรอบรากงูขุมขน ในขณะที่ในหนูกุ่มปกติไม่พบลักษณะการแพร่กระจายของเซลล์ในชั้นหนังกำพร้าลงมายังชั้นหนังแท้ ทั้งนี้ ความผิดปกติในการแบ่งตัวของเซลล์ผิวหนังยังพบในผิวหนังของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับกลัวยไข่อีกด้วย ดังแสดงในรูปที่ 30 หลังจากหนูทดลองได้รับการฉายรังสีครบ 16 สัปดาห์ พบว่าหนูทดลองเกิด epidermal hyperplasia ไม่สม่ำเสมอทั้งชั้นหนังกำพร้า แต่พบว่าในชั้นหนังแท้ของหนูส่วนใหญ่มีการแพร่กระจายของเซลล์จากชั้นหนังกำพร้าลงมา ดังแสดงในรูป 30 (b) เช่นเดียวกับหนูทดลองอีกกลุ่มที่ได้รับวิตามินซี 50 มิลลิกรัมต่อวัน พบว่าลักษณะทางกายภาพของผิวหนังมีการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างไปจากหนูทดลองกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 31 (a) กลุ่มเซลล์ที่แบ่งตัวผิดปกติแพร่กระจายจากชั้นหนังกำพร้าลงมาในชั้นหนังแท้ จนถึงชั้นไขมัน (hypodermis) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่า สารก่อมะเร็ง DMBA สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด acanthosis และ atypical nuclei ซึ่งเป็นลักษณะทางกายภาพที่บ่งบอกการเกิดมะเร็งผิวหนัง [63] ลักษณะการเกิด epidermal hyperplasia ของหนูทดลองกลุ่มนี้เหมือนกลุ่มอื่นๆ เช่นกัน จากรูปที่ 31 (b) บริเวณที่ลูกศรชี้ คือบริเวณที่เกิด keratinocyte pearl รอบรากงูขุมขน และเมื่อเปรียบเทียบกับภาพการย้อมสี H&E พบว่า หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับวิตามินซี 50 มิลลิกรัมต่อวัน มีลักษณะทางกายภาพของผิวหนังที่บ่งบอกว่าเกิดเนื้องอกภายในผิวหนังมากกว่าหนูทดลองกลุ่มอื่นๆ เนื่องจากพบว่าการเกิด epidermal hyperplasia นั้นไม่สม่ำเสมอทั่วทั้งชั้นหนังแท้ และมีเซลล์คีราติโนไซต์ในชั้นหนังแท้บางบริเวณเริ่มแบ่งตัวแพร่กระจายลงสู่ชั้นหนังแท้ จึงไม่สามารถวัดความหนาของชั้นหนังแท้ในระดับจุลกายวิภาคศาสตร์ได้

a)

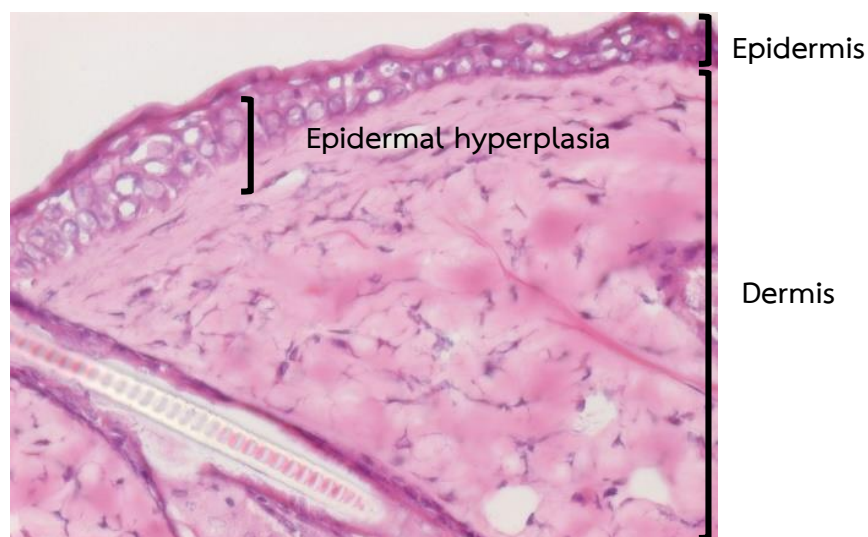


b)

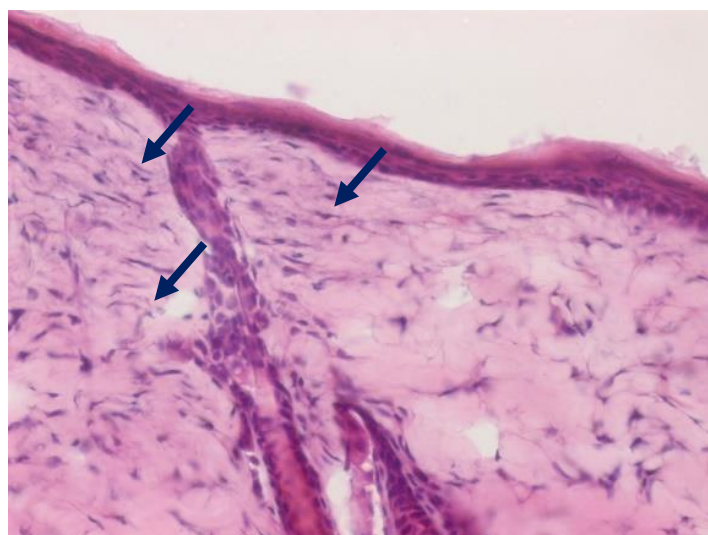


รูปที่ 28 (a, b) ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของผิวหนังหนูทดลองกลุ่มควบคุม (control) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบีพร้อมกับถูกป้อนน้ำเปล่า ณ สัปดาห์ที่ 16 (กำลังขยาย 40 เท่า), ลูกศรสีน้ำเงิน บ่งชี้ตำแหน่งของการเกิด keratinocyte hyper-proliferation และการแพร่กระจายลงสู่ชั้น dermis

a)

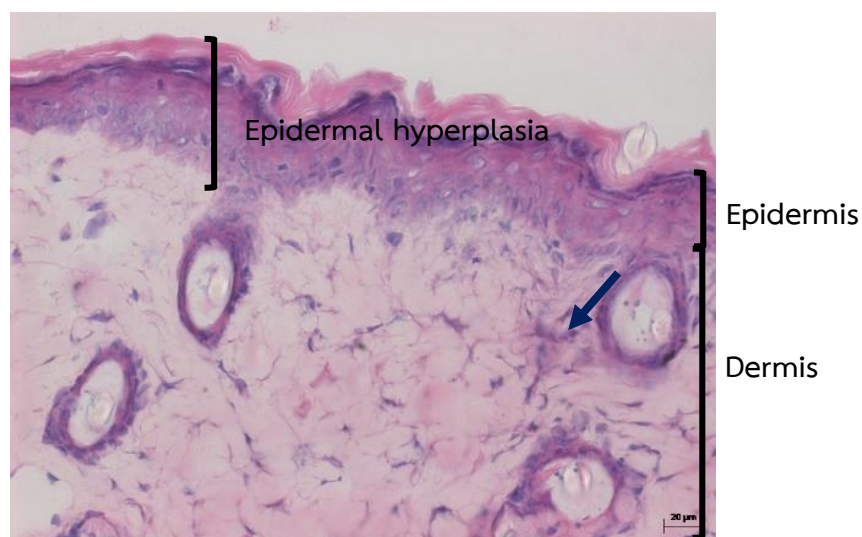


b)

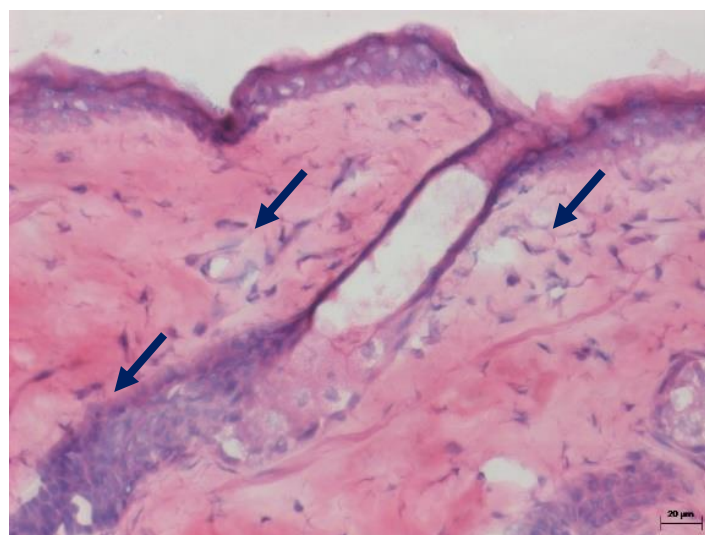


รูปที่ 29 (a., b.) ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของผิวหนังหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนกลัยนาว้าสุก ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักหนูต่อวัน ณ สัปดาห์ที่ 16 ที่กำลังขยาย 40 เท่า, ลูกศรสีน้ำเงิน บ่งชี้ตำแหน่งของการเกิด keratinocyte hyper-proliferation และการแพร่กระจายลงสู่ชั้น dermis

a)

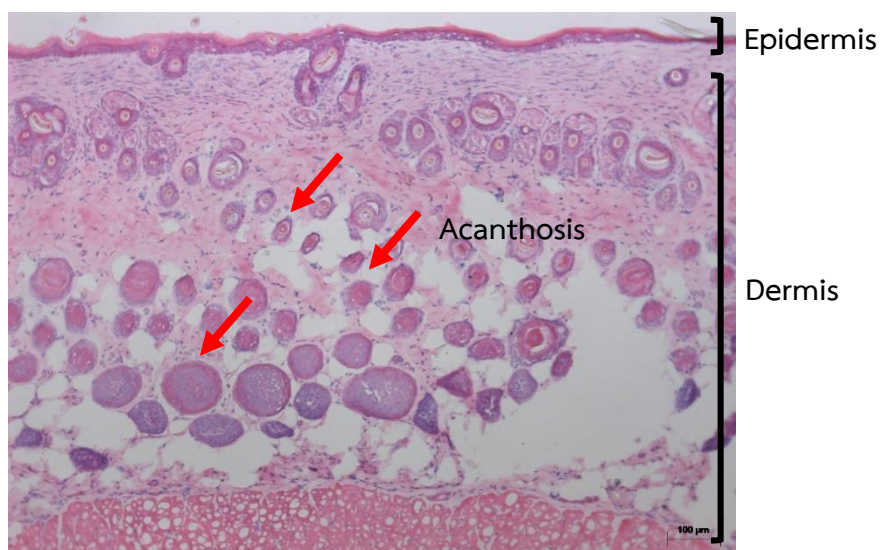


b)

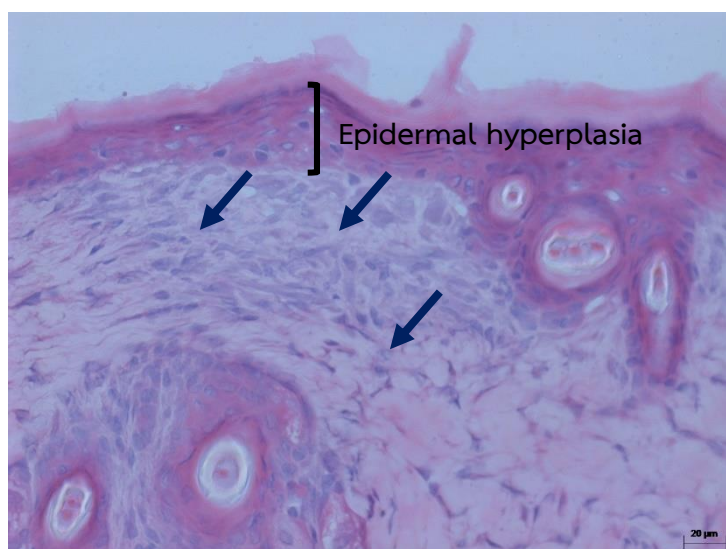


รูปที่ 30 (a., b.) ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของผิวหนังหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนกลัยไซ์สุก ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักหนูต่อวัน ณ สัปดาห์ที่ 16 ที่กำลังขยาย 40 เท่า, ลูกศรสีน้ำเงิน บ่งชี้ตำแหน่งของการเกิด keratinocyte hyper-proliferation และการแพร่กระจายลงสู่ชั้น dermis

a)



b)

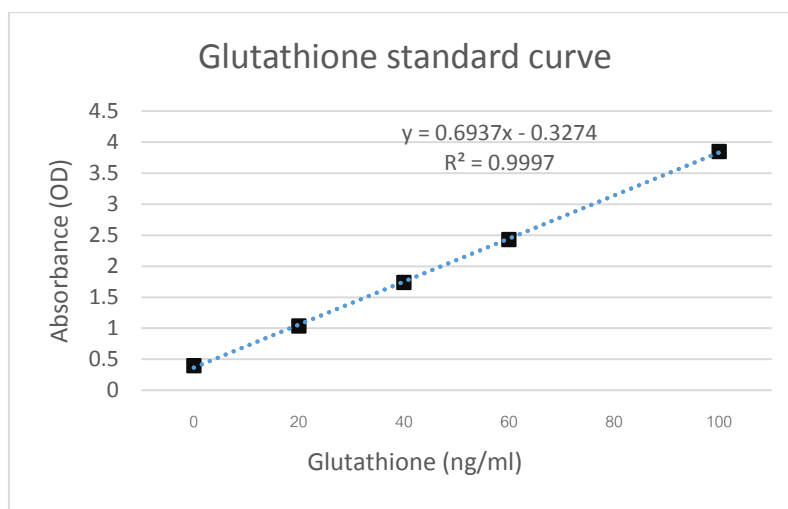


รูปที่ 31 (a.) ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของผิวหนังหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนวิตามินซี ในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน ณ สัปดาห์ที่ 16 ที่กำลังขยาย 20 เท่า และ (b.) ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของผิวหนังหนู ที่กำลังขยาย 40 เท่า, ลูกศรสีแดง บ่งชี้ตำแหน่งของ acanthosis , ลูกศรสีน้ำเงิน บ่งชี้ตำแหน่งของการเกิด keratinocyte hyper-proliferation และการแพร่กระจายลงสู่ชั้น dermis

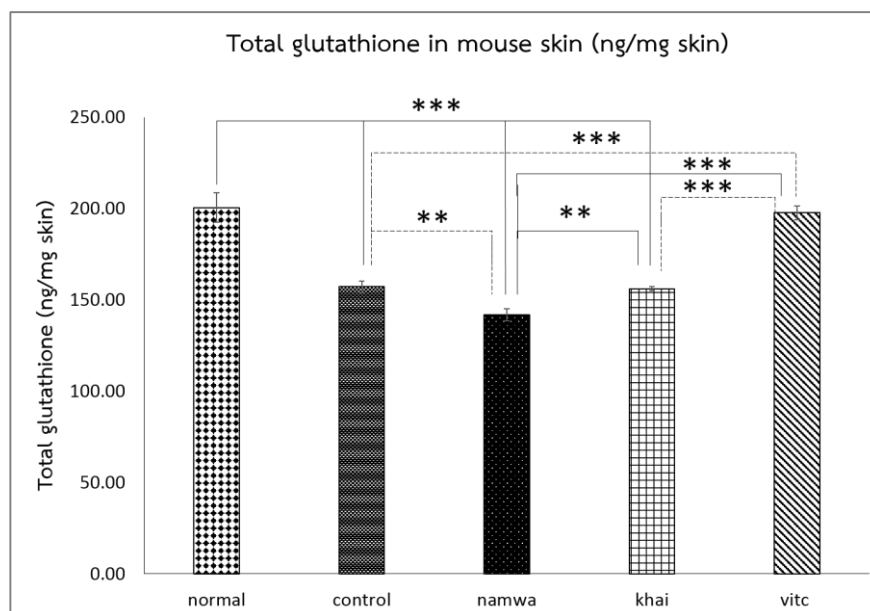
7.3 ปริมาณกลูตาไธโอนทั้งหมด (total glutathione) ในผิวหนังหนูทดลอง

จากการวัดปริมาณกลูตาไธโอนทั้งหมดโดยใช้ Glutathione assay kit (colorimetric) และเปรียบเทียบปริมาณกลูตาไธโอนทั้งหมดระหว่างกลุ่มการทดลอง (รูปที่ 33) พบว่ากลุ่มปกติ (normal) ที่ไม่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี มีปริมาณกลูตาไธโอนทั้งหมดในผิวหนังของหนูทดลอง 200.52 ± 8.08 นาโนกรัมต่อผิวหนังหนูทดลอง 1 มิลลิกรัม และไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99.9% เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกลูตาไธโอนทั้งหมดกับหนูกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนวิตามินซีปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน ซึ่งมีปริมาณกลูตาไธโอนทั้งหมด 197.62 ± 3.74 นาโนกรัมต่อผิวหนังหนูทดลอง 1 มิลลิกรัม ในขณะที่กลุ่มควบคุม (control) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนน้ำเปล่า และกลุ่มทดลอง ซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนกล้วยน้ำว้าสุก หรือไข่สุก ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักหนูต่อวัน มีปริมาณกลูตาไธโอนทั้งหมดในผิวหนังหนูทดลองลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มปกติ ดังนั้น อาจกล่าวได้ว่า การได้รับวิตามินซีมีผลต่อการรักษาระดับปริมาณกลูตาไธโอนในผิวหนังให้อยู่ในระดับสมดุล ในขณะที่การได้รับน้ำเปล่า กล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่ไม่ส่งผลต่อการรักษาระดับปริมาณกลูตาไธโอนในผิวหนัง

การที่ปริมาณกลูตาไธโอนในผิวหนังของกลุ่มควบคุมลดลงนั้น เนื่องจากรังสียูวีบีมีผลทำให้เกิดการสลายตัวของกลูตาไธโอนอันเนื่องมาจากพลังงานที่ได้รับ รวมทั้ง กลูตาไธโอนถูกนำไปใช้ในการกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดในปริมาณมากเมื่อผิวหนังได้รับรังสียูวีบีอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตาม ดูเหมือนว่า ระดับกลูตาไธโอนที่พบในผิวหนังไม่มีความสัมพันธ์กับระดับการเกิดเซลล์มะเร็งที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยด้วย DMBA และยูวีบี เนื่องจากพบว่าผิวหนังของหนูที่ได้รับวิตามินซีมีเซลล์ที่แบ่งตัวผิดปกติแพร่กระจายจากชั้นหนังกำพร้าลงมาในชั้นหนังและชั้นไขมันในปริมาณที่มากกว่ากลุ่มอื่น ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า กลูตาไธโอนมีผลช่วยในการยับยั้งกิจกรรมของอนุมูล-อิสระ แต่ไม่ได้ส่งเสริมให้เกิดการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่ถูกทำลายจากการที่ผิวหนังได้รับ DMBA ร่วมกับการได้รับรังสียูวีบีอย่างต่อเนื่อง



รูปที่ 32 glutathione standard reference curve, $R^2 = 0.9997$



รูปที่ 33 ปริมาณกลูตาไธโอนทั้งหมดในผิวหนังหนุทดลองของกลุ่มปกติ (normal) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งผิวหนัง ร่วมกับการถูกป้อนน้ำเปล่า (control) กล้วยน้ำว่าสูก กล้วยไขสูก หรือวิตามินซี 16 สัปดาห์ (mean $\pm$ SD, n = 5, * p < 0.05, ** p < 0.01 และ *** p < 0.001, Student's t -test)

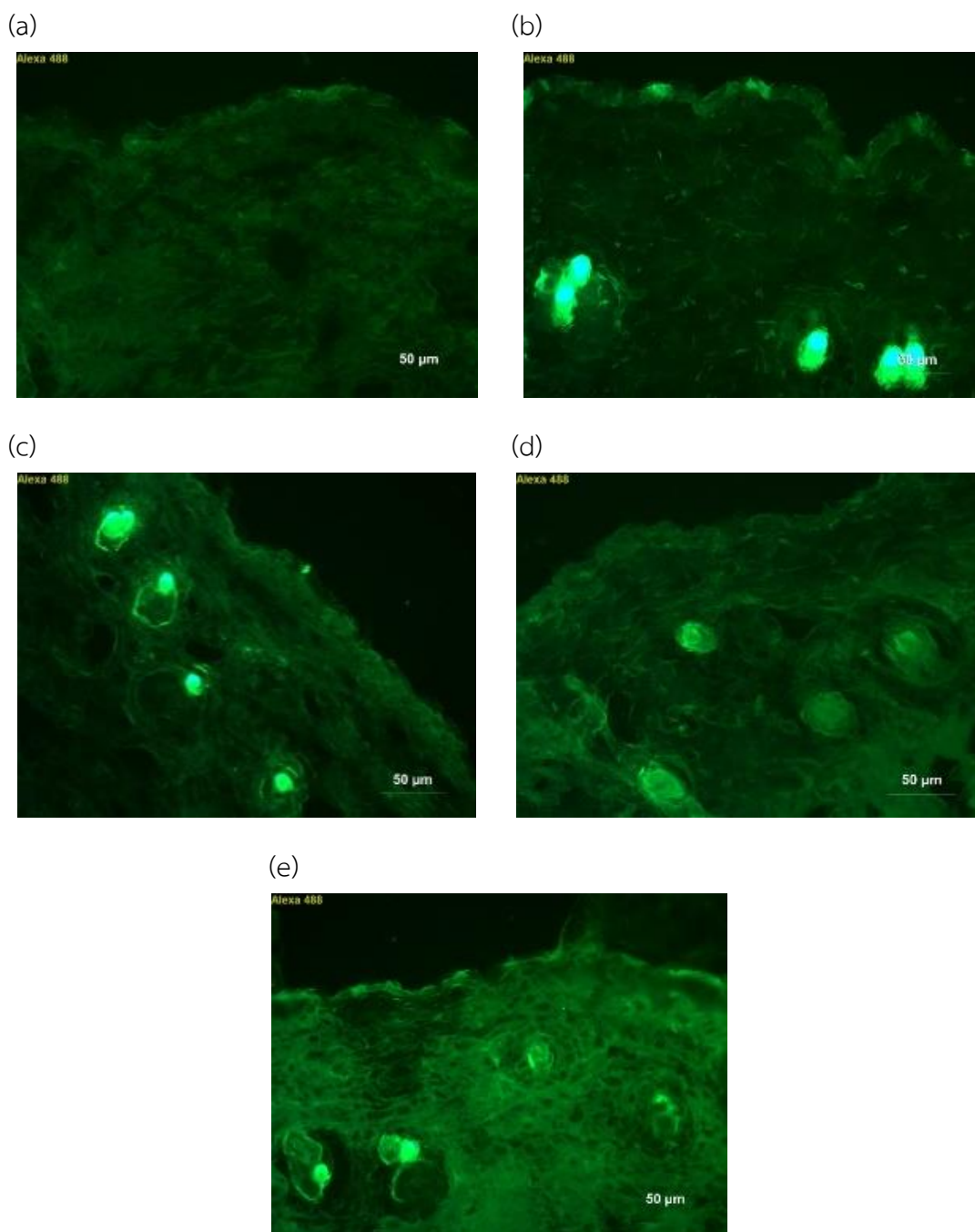
7.4 ปริมาณ 4-HNE และ COX-2 ในผิวหนังหนุทดลอง

เพื่อวัดปริมาณการแสดงออกของ 4-HNE และ COX-2 ในการศึกษานี้ได้ใช้ primary antibody ชนิด anti-4 hydroxynonenal antibody (ab46545) และ anti-COX2/cyclooxygenase 2 antibody (ab15191) ตามลำดับ และใช้ secondary antibody ชนิด fluorescence dye ในการตรวจวัดปริมาณของ 4-HNE และ COX-2 โดยอาศัยหลักการทางวิทยาศาสตร์ภูมิคุ้มกันของการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ถ่ายภาพขึ้นเนื้อตัวอย่างภายใต้กล้อง fluorescence microscopy ที่กำลังขยาย 40X แสดงในรูปที่ 34 และ 35 และค่าความเข้มแสง (intensity light) ที่ถูกปลดปล่อยออกมา ซึ่งแปรผันตรงกับปริมาณโปรตีนชนิดที่สนใจ ถูกวัดโดยใช้โปรแกรม image J [51] เปรียบเทียบค่าความเข้มแสงระหว่างกลุ่มการทดลอง แสดงในรูป 36 และ 37

4-HNE เป็นสารประกอบเชิงซ้อนในกลุ่มอัลดีไฮด์และเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของกระบวนการ lipid peroxidation สารประกอบเชิงซ้อนนี้สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระภายในผิวหนัง ประกอบกับการได้รับรังสียูวีอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้เกิดการสะสมของอนุมูลอิสระที่ผิวหนัง อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นนี้สามารถกระตุ้นเซลล์ผิวหนังให้เกิดการตอบสนอง เช่น กระตุ้นหลั่งสารสื่ออักเสบ เป็นต้น [64] จากผลการศึกษาพบว่า ปริมาณ 4-HNE ในผิวหนังของหนูกลุ่มควบคุม (control) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวี ร่วมกับถูกป้อนน้ำเปล่า มากกว่ากลุ่มปกติ (normal) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับ DMBA และรังสียูวี นอกจากนี้ยังพบว่าการได้รับกลัยซีนน้ำว่าสุก กลัยซีนไข่สุก หรือวิตามินซีในปริมาณที่กำหนดในการศึกษานี้ ไม่ได้ส่งผลให้ปริมาณ 4-HNE ในผิวหนังของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย DMBA และรังสียูวี ลดลง (เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม) ดังแสดงในรูปที่ 35 และ 36 ทั้งนี้ อาจเนื่องจากเกิดภาวะความไม่สมดุลระหว่างการเกิดอนุมูลอิสระและกระบวนการป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระโดยสารต้านอนุมูลอิสระ หรือเรียกภาวะดังกล่าวว่า oxidative stress ดังที่กล่าวไปแล้วข้างต้น การฉายรังสียูวีในระดับความเข้มข้นที่สูงอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้เกิดการสะสมของอนุมูลอิสระ และผลิตผลที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันระหว่างอนุมูลอิสระกับชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ผิวหนัง เช่น ไขมัน เพิ่มขึ้นในผิวหนังของหนู ร่วมกับการได้รับสารก่อมะเร็ง DMBA อาจส่งผลให้เกิดความบกพร่องของกระบวนการป้องกันอันตรายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่ในการต้านการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวไม่เพียงพอหรือทำงานผิดปกติ ดังนั้นผิวหนังจึงเกิดการเปลี่ยนแปลงและเกิดการสะสมของ 4-HNE

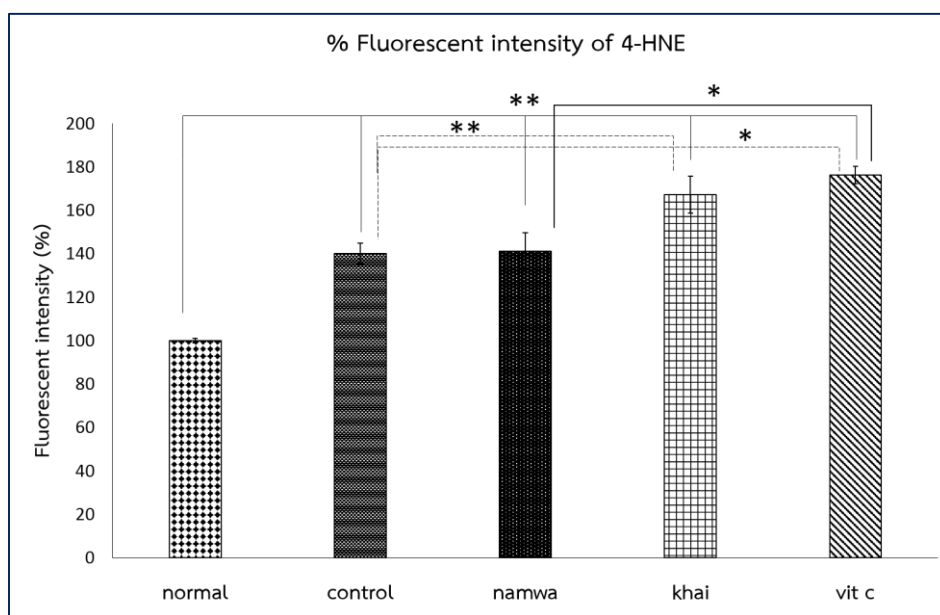
เช่นเดียวกับการแสดงออกของ COX-2 ซึ่งเป็นสารสื่อการอักเสบ เมื่อเซลล์ผิวหนังได้รับความเสียหายจากรังสียูวีอย่างต่อเนื่อง จะทำให้เกิดการสร้าง arachidonic acid ขึ้นมาจาก membrane phospholipids โดยอาศัยเอนไซม์ phospholipase A2 ในการเปลี่ยนเป็น arachidonic acid แล้วจึงถูกเอนไซม์ cyclooxygenase (COX) ชนิด COX-1 และ COX-2 เปลี่ยนเป็นสารสื่อการอักเสบตัวอื่น เช่น prostaglandins ซึ่ง COX-2 มีบทบาทสำคัญและถูกหลั่งออกมาในสภาวะที่เซลล์ได้รับการบาดเจ็บ ดังนั้น การฉายรังสียูวีที่ความเข้มข้นระดับสูงอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้เซลล์ผิวหนังเกิดความ

เสียหาย และด้วยกลไกของภูมิคุ้มกัน จะเกิดการหลั่ง COX-2 อย่างต่อเนื่อง และหากการอักเสบของผิวหนังยังเกิดขึ้นตลอดเวลา จะนำไปสู่การสะสมของสารสื่อการอักเสบในผิวหนังหนุทดลอง ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ผิวหนังเกิดการเสื่อมสภาพหรือเปลี่ยนแปลงและนำไปสู่การพัฒนาเป็นมะเร็งผิวหนัง



รูปที่ 34 ภาพถ่ายจากเทคนิค immunofluorescence แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของ 4-HNE (เรืองแสงสีเขียว) ในผิวหนังหนุทดลอง (กำลังขยาย 40 เท่า) ณ สัปดาห์ที่ 16 ทั้งนี้ (a) คือ กลุ่มปกติ (normal) (b) คือกลุ่มควบคุม (control) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียู

วียี ร่วมกับถูกป้อนน้ำเปล่า (c) คือกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนกล้วยน้ำว้าสุก ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักหนูต่อวัน (d) คือกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนกล้วยไข่สุก ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักหนูต่อวัน และ (e) คือ กลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนวิตามินซี ในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน

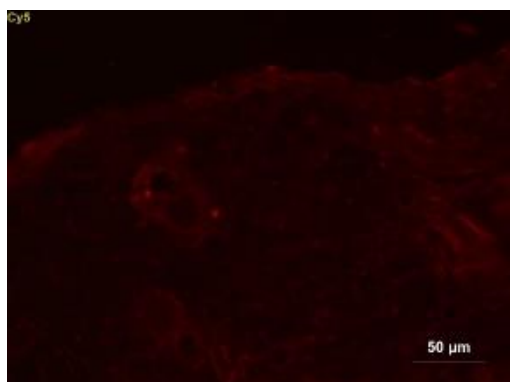


รูปที่ 35 ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence intensity) ที่แปรผันตรงกับปริมาณ 4-HNE ที่อยู่ในชิ้นเนื้อตัวอย่างของผิวหนังหนูในแต่ละกลุ่มการทดลอง ทั้งนี้ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของกลุ่มปกติ (normal) ถูกปรับให้เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (mean $\pm$ SD, n = 5, * p < 0.05, ** p < 0.01, Student's t -test)

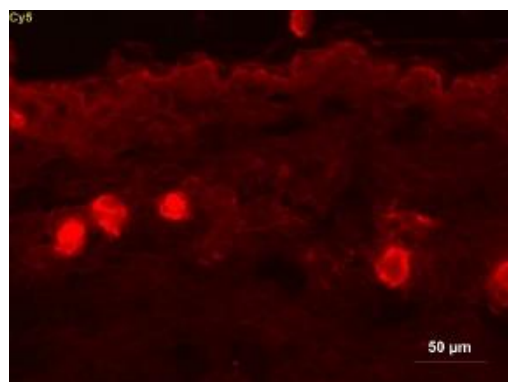
ปริมาณ COX-2 ที่ได้จากการวัดค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ แสดงในรูปที่ 36 และ 37 พบว่า มีการแสดงออกของปริมาณ COX-2 ในควบคุม (control) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนน้ำเปล่า สูงกว่ากลุ่มปกติ (normal) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนวิตามินซี ในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน มีระดับการแสดงออกของ COX-2 ในผิวหนังลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งผลที่ได้สัมพันธ์กับปริมาณกลูตาไธโอน เนื่องจากกลูตาไธโอนมีผลทำให้สารสื่อออกเสบในผิวหนังลดลง [65-66] ในขณะที่การได้รับกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่ในปริมาณที่กำหนดในการศึกษา ไม่สามารถช่วยลดระดับ COX-2 ในผิวหนังหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งโดย DMBA และรังสียูวีบี

อย่างไรก็ตาม ดังที่กล่าวไปแล้วข้างต้นว่า ปริมาณกลูตาไธโอนที่พบไม่สัมพันธ์กับการลดการเกิดเซลล์มะเร็งในผิวหนังหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งผิวหนังด้วยสารก่อมะเร็ง DMBA มีรายงานการศึกษาพบว่า สาร DMBA สามารถสะสมอยู่ในผิวหนังเนื่องจากมีค่าครึ่งชีวิต (half-life) ค่อนข้างยาว (4-5 วัน) [63-64] ดังนั้น ในการพิกหนูทดลอง 1 สัปดาห์ ก่อนการเริ่มฉายรังสียูวีบี ในผิวหนังของหนูทดลองยังคงมีการสะสมสารก่อมะเร็งดังกล่าวไว้ และยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการทำลายดีเอ็นเอในเซลล์ผิวหนังได้ เมื่อผิวหนังถูกฉายรังสียูวีบีจึงเป็นการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างสารอนุมูลอิสระและสารสื่อการอักเสบแบบเรื้อรัง จึงทำให้ตรวจพบปริมาณ COX-2 ในหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสารก่อมะเร็งทุกกลุ่มสูงกว่ากลุ่มปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

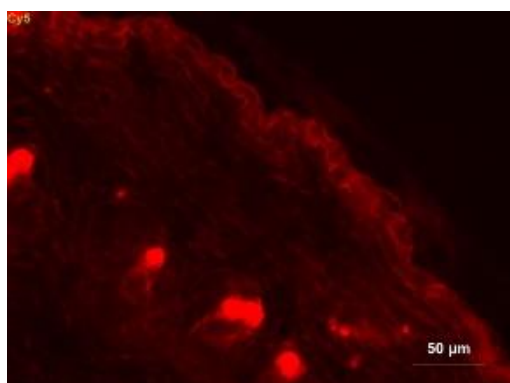
(a)



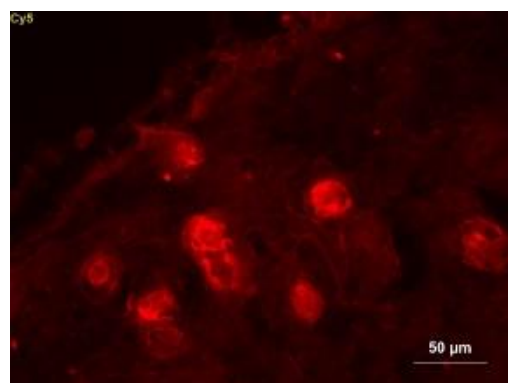
(b)



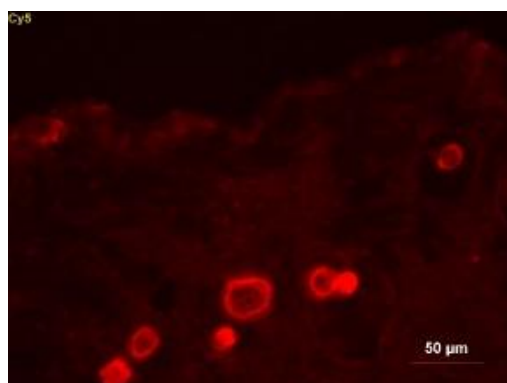
(c)



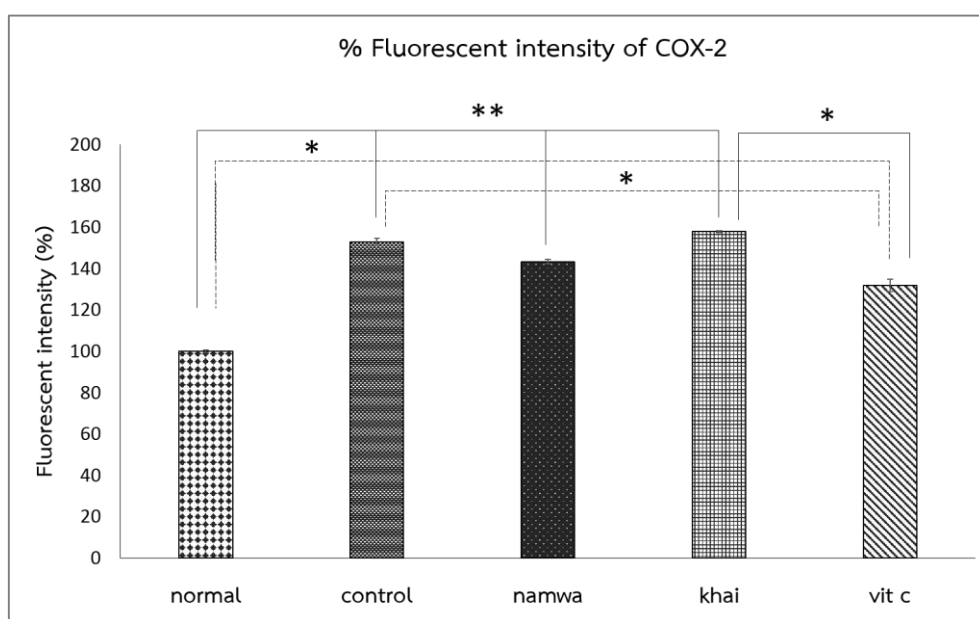
(d)



(e)



รูปที่ 36 ภาพถ่ายจากเทคนิค immunofluorescence แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของ COX-2 (เรืองแสงสีแดง) ในผิวหนังหนุทดลอง (กำลังขยาย 40X) ณ สัปดาห์ที่ 16 ทั้งนี้ (a) คือกลุ่มปกติ (normal) (b) คือกลุ่มควบคุม (control) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนน้ำเปล่า (c) คือกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนกล้วยน้ำว้าสุก ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักหนุต่อวัน (d) คือกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนกล้วยไข่สุก ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักหนุต่อวัน และ (e) คือ กลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนวิตามินซี ในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน



รูปที่ 37 ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence intensity) ที่แปรผันตรงกับปริมาณ COX-2 ที่อยู่ในชั้นเนื้อตัวอย่างของผิวหนังหนุในแต่ละกลุ่มการทดลอง ทั้งนี้ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของกลุ่มปกติ (normal) ถูกปรับให้เป็น 100 เปอร์เซนต์ (mean $\pm$ SD, n = 5, * p < 0.05, ** p < 0.01, Student's t -test)

จากผลการทดลองการศึกษาปริมาณ COX-2 ในผิวหนังของหนุทดลองด้วยวิธีการย้อม immunofluorescence บ่งบอกว่า สารสื่อการอักเสบที่เกิดขึ้น เป็นการตอบสนองต่อสิ่งเร้าภายนอก ที่กระตุ้นให้เซลล์ผิวหนังได้รับความเสียหาย รวมทั้งเป็นการต่อต้านการแบ่งตัวที่ผิดปกติของเซลล์ อันเนื่องมาจากการเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารพันธุกรรม ซึ่งนำไปสู่การพัฒนาเป็นเซลล์มะเร็ง ดังนั้น ด้วยกลไกการป้องกันการเกิดมะเร็ง จึงมีการหลั่งสารสื่ออักเสบออกมา เพื่อป้องกันและทำลายเซลล์ที่เกิดการกลายพันธุ์ แต่หนุทดลองได้รับการฉายรังสียูวีบีในระดับความเข้มแสงที่สูงอย่างต่อเนื่อง นั้นแสดงว่าผิวหนังได้รับการกระตุ้นโดยสิ่งเร้าอย่างต่อเนื่อง ทำให้มีการหลั่งสารสื่อการ

อีกเสบอย่างต่อเนื่อง ซึ่งการหลังสารสื่อการอีกเสบอย่างต่อเนื่องเป็นปัจจัยหนึ่งที่เหนี่ยวนำให้เกิดการพัฒนาของเซลล์ปกติเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด

บทที่ 4

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1) สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองพบว่า ผลกล้วยไข่สุกที่ถูกทำให้แห้ง (freeze dried banana) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ปริมาณสารเบตา-แคโรทีน และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ สูงกว่าผลกล้วยน้ำว้าสุกที่ถูกทำให้แห้ง อย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่ผลการทดสอบ lipid peroxidation inhibition ยังไม่สามารถสรุปผลได้ เนื่องจากผลการทดลองไม่เป็นไปตามที่คาดหวัง อันเนื่องมาจากตัวอย่างแหล่งไขมันไม่เหมาะสมและ/หรือเกิดปฏิกิริยาระหว่างไขมันในสมองหนูและสารสกัดจากกล้วยแห้ง ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนสีที่แตกต่างไปจากทฤษฎี

การตรวจสอบสารสำคัญในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก คือ กรดแกลลิกและคาเทชิน ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ โดยเทคนิค HPLC แบบ isocratic จากภาพโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกรดแกลลิกและคาเทชิน ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระบุตำแหน่ง retention time ของสารมาตรฐานที่เวลาเท่ากับ 3.6 นาที และ 7.5 นาที ตามลำดับ ในส่วนของการวิเคราะห์ปริมาณกรดแกลลิกและคาเทชินในผลกล้วยสุก โดยการสกัดสารสกัดรวมจากกล้วยทั้งสองชนิดเพื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC พบว่าไม่สามารถคำนวณหาปริมาณที่แท้จริงของกรดแกลลิกและคาเทชินโดยเทคนิค HPLC ที่พัฒนาขึ้นมาได้ เนื่องจากพื้นที่ใต้โครมาโตแกรมที่ตรวจวัดได้มีค่าน้อยกว่าช่วงความเข้มข้นที่ใช้เปรียบเทียบ หรือน้อยกว่าช่วงความเข้มข้นที่ปรากฏในกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานกรดแกลลิกและคาเทชิน อย่างไรก็ตาม จากภาพโครมาโตแกรมของสารสกัดกล้วยทั้ง 2 ชนิดนั้น ชี้ให้เห็นแนวโน้มว่าในผลกล้วยมีสารสำคัญกรดแกลลิกและคาเทชิน ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระที่เกิดจากการเหนี่ยวนำโดยรังสียูวีบี

ผลการศึกษาศักยภาพของกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่สุก ในหนูทดลองที่เหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งผิวหนังด้วยสารก่อมะเร็ง DMBA ร่วมกับการฉายรังสียูวีบี นาน 16 สัปดาห์ พบว่า ระดับความหนาของชั้นหนังกำพร้าของหนูทดลองกลุ่มปกติซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ไม่มีความผิดปกติของชั้นผิวหนัง และการแบ่งตัวของเซลล์ผิวหนัง ในขณะที่หนูทดลองกลุ่มอื่นๆ ซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับ DMBA และการรังสียูวีบี ร่วมกับการถูกป้อนน้ำ (กลุ่มควบคุม) ผลกล้วยสุก ผลกล้วยไข่สุก หรือวิตามินซี มีความผิดปกติของการแบ่งเซลล์ในชั้นหนังกำพร้า รวมทั้งมีความหนาของชั้นหนังกำพร้าที่ไม่สม่ำเสมอ คือกล่าวได้ว่า เกิด epidermal hyperplasia เป็นจุดๆ และบางจุดที่เกิดมีการแพร่กระจายของเซลล์คีราติโนไซต์จากชั้นหนังกำพร้าลงสู่ชั้นหนังแท้ ซึ่งเป็นการแบ่งตัวที่ผิดปกติ ทั้งนี้ หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับกล้วยน้ำว้าหรือกล้วยไข่มีการแบ่งตัวของเซลล์อย่างผิดปกติน้อยกว่ากลุ่มที่ถูกป้อนด้วยน้ำหรือวิตามินซี ความผิดปกติในการแบ่งตัวของเซลล์นี้เกิดจากการกลายพันธุ์และนำไปสู่การเกิดมะเร็งผิวหนังในที่สุด

ในการศึกษานี้ ได้ทำการประเมินปริมาณ 4-HNE และ COX-2 ซึ่งเป็นสารชีวโมเลกุลที่สัมพันธ์กับการพัฒนาของเซลล์ปกติไปเป็นเซลล์มะเร็ง การสะสมของสารชีวโมเลกุลเหล่านี้ในผิวหนังเกิดจากการ

กระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันอย่างต่อเนื่องด้วยรังสียูวีบี ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งผ่านทางดีเอ็นเอที่กลายพันธุ์ ส่งผลให้เซลล์ผิวหนังมีศักยภาพในการซ่อมแซมตัวเองลดลง นำไปสู่การสะสมของเซลล์ที่ผิดปกติในผิวหนังที่สามารถแบ่งตัวเพิ่มขึ้นโดยไม่มีขีดจำกัด จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณของ 4-HNE และ COX-2 มีการแสดงออกในกลุ่มหนูทดลองที่ได้รับสารก่อมะเร็ง DMBA และการฉายรังสียูวีบีสูงกว่ากลุ่มปกติ และพบว่าการได้รับกลัยซีน น้ำว่า และวิตามินซี ไม่มีผลต่อการลดการแสดงออกของ 4-HNE และ COX-2 ในผิวหนัง ในขณะที่ผลของการศึกษาระดับกลูตาไธโอนทั้งหมดในผิวหนังกลับพบว่า หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับวิตามินซีมีการรักษาระดับของปริมาณกลูตาไธโอนในผิวหนังให้สมดุลเทียบเท่ากับกลุ่มปกติ และระดับกลูตาไธโอนที่ตรวจวัดได้มีปริมาณสูงกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับกลัยซีน น้ำว่า และกลัยซีน อย่างไรก็ตาม ถึงแม้วิตามินซีจะสามารถช่วยรักษาระดับกลูตาไธโอนในผิวหนังของหนูทดลองได้ แต่ไม่สามารถชะลอหรือยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งได้ เนื่องจากกลูตาไธโอนเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายสร้างขึ้นเองโดยธรรมชาติ เพื่อป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากการได้รับรังสียูวีบี แต่ไม่สามารถช่วยชะลอการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งได้ ดังที่พบว่า atypical nuclei เกิดขึ้นในชั้นหนังแท้ของหนูกลุ่มที่ได้รับวิตามินซี มากกว่าหนูทดลองกลุ่มอื่นๆ ในขณะที่หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับกลัยซีน น้ำว่า และกลัยซีนมีการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งที่น้อยกว่า นั้นแสดงว่า สารสำคัญที่อยู่ในกลัยซีนทั้ง 2 ชนิดมีผลต่อการชะลอการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง แต่อย่างไรก็ตาม กลัยซีน น้ำว่า และกลัยซีนก็ยังไม่มีความสัมพันธ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ทั้งนี้ อาจอธิบายได้ว่าเกิดจากการที่หนูได้รับสารสำคัญที่มีอยู่ในกลัยซีนพร้อมกับการเริ่มการฉายรังสียูวีบีที่ผิวหนังหนู หลังจากที่ดีเอ็นเอถูกทำลายแล้ว (อันเนื่องมาจากการทำ DMBA ที่สามารถจับกับเบสบนสายดีเอ็นเอ (DNA adduct)) ซึ่งรังสียูวีบีนั้นสามารถทำให้ดีเอ็นเอเสียหายได้เช่นกัน ดังนั้นการได้รับรังสียูวีบีอย่างต่อเนื่อง ส่งผลทำให้การซ่อมแซมดีเอ็นเอไม่สามารถทำได้อย่างสมบูรณ์ การเกิดการสะสมเซลล์ที่มีดีเอ็นเอเสียหายนี้ เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบและหลั่งสารสื่ออักเสบออกมาอย่างต่อเนื่อง ดังนั้น ถึงแม้ว่าหนูจะได้รับสารสำคัญในกลัยซีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสะสมของอนุมูลอิสระทุกวัน ก็ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงเซลล์มะเร็งที่เกิดการกลายพันธุ์ และไม่สามารถควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์เหล่านี้ได้ อย่างไรก็ตาม เป็นที่น่าสนใจที่พบว่า กลัยซีน น้ำว่า และกลัยซีนสามารถชะลอและ/หรือลดการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง และชะลอการแสดงออกที่บ่งบอกการเป็นมะเร็ง เช่น การเกิด atypical nuclei ได้ดีกว่าวิตามินซี รวมทั้งจากลักษณะทางกายภาพของผิวหนัง จะเห็นได้ว่ากลัยซีน น้ำว่า และกลัยซีนสามารถชะลอการเกิดการเสื่อมสภาพของผิวหนังได้ดีกว่าวิตามินซี

ดังนั้น จากผลการทดลองกล่าวได้ว่า หนูทดลองที่ได้รับกลัยซีน น้ำว่า และกลัยซีน มีแนวโน้มชะลอการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งผิวหนังได้ดีกว่าวิตามินซี เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษการจัดเรียงตัวของเซลล์ผิวหนังโดยการย้อมสี H&E แต่การได้รับกลัยซีน น้ำว่า และกลัยซีนไม่สามารถรักษามะเร็งผิวหนังที่เกิดขึ้นได้ ทั้งนี้ การชะลอการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งอาจเนื่องมาจากสารสำคัญที่อยู่ในกลัยซีน น้ำว่า และกลัยซีน มีบทบาทต่อกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอหรือกระบวนการพัฒนาของเซลล์มะเร็ง ได้ดีกว่าวิตามินซี ซึ่งสารสำคัญนี้อาจจะเป็นสารสำคัญอื่นๆ ที่มีฤทธิ์ช่วยชะลอการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง นอกเหนือจาก

กรดแกลลิก คาเทชิน และเบตา-แคโรทีน มีรายงานการศึกษาพบว่า ในผลกล้วยมีสารกลุ่ม non-starch polysaccharide [67-68] และมีการศึกษาที่บ่งชี้ว่าสารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ต้านการเกิดเนื้องอก [69, 70, 71]

2) ข้อเสนอแนะ

เพื่อให้การศึกษาศักยภาพของกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่ต่อการป้องกันการเกิดมะเร็งผิวหนัง ในหนูทดลองที่เหนี่ยวนำโดยสารก่อมะเร็ง DMBA ร่วมกับการฉายรังสียูวีบี มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ในอนาคตควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในประเด็นดังต่อไปนี้

2.1 ควรมีการป้อนสารตัวอย่างกล้วยน้ำว้าหรือกล้วยไข่สุก ก่อนเริ่มการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็ง ด้วยสารก่อมะเร็ง DMBA อย่างน้อย 2-4 สัปดาห์ เพื่อเพิ่มระดับสารสำคัญในกล้วยทั้งสองชนิดในระบบไหลเวียนโลหิตของหนูทดลอง และเป็นการรักษาระดับสารสำคัญให้อยู่ในระดับที่สามารถป้องกันอันตรายที่เกิดจากการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งผิวหนัง กล่าวอีกนัย เป็นการทำให้สารสำคัญมีวงจรเป็นไปตามหลัก pharmacokinetics เมื่อสารสำคัญอยู่ในกระแสเลือดเพียงพอแล้ว ทำการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งโดยสารก่อมะเร็ง DMBA หลังจากนั้นจึงป้อนสารตัวอย่าง ควบคู่ไปกับการฉายรังสียูวีบีจนครบ 16 สัปดาห์ [62]

2.2 ควรมีการศึกษาระดับสารสำคัญในกล้วย ในกระแสเลือดของหนูทดลอง (bioavailability) ทั้งก่อนและหลังได้รับการฉายรังสียูวีบี

2.3 ศึกษาการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนสารสำคัญ เช่น กรดแกลลิก แคทีชิน เบตา-แคโรทีน และ/หรือ non-starch polysaccharide ในกล้วยให้อยู่ใน active form ในหนูทดลอง เพื่อเป็นการยืนยันว่าสารสำคัญที่อยู่ในกล้วยมีบทบาทสำคัญในการชะลอการเกิดมะเร็ง โดยเอนไซม์ดังกล่าว ได้แก่ β -glucuronidase เป็นต้น ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในการเปลี่ยน inactive metabolite ของสารในกลุ่ม flavonoids (flavonoid glucuronides) ให้อยู่ใน active form (deconjugate flavonoid glucuronides) [72]

2.4 ศึกษาอันดับของเซลล์มาโครฟาจ (macrophage) ในผิวหนัง เนื่องจากการเกิดเซลล์มะเร็ง ถือว่าเป็นสิ่งแปลกปลอมที่ร่างกายต้องกำจัด หากมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง มีแนวโน้มว่าอาจพบเซลล์มาโครฟาจที่ผิวหนังมากขึ้นกว่าปกติ

เอกสารอ้างอิง

- [1] วารสารทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล พ.ศ. 2555, กลุ่มงานเทคโนโลยีสารสนเทศ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (2557)
- [2] Bellew, S., Del Rosso, J.Q., Kim, G.K. (2009) Skin cancer in Asians. Part 2: Melanoma. *J Clin Aesthet Dermatol*, 2, 34-36
- [3] Cress, R.D., Holly, E.A. (1997) Incidence of cutaneous melanoma among non-Hispanic whites, Hispanics, Asians, and blacks: An analysis of California cancer registry data, 1988-93. *Cancer Causes Control*, 8, 246-252
- [4] Zurer, P.S. (1993) Ozone depletion's recurring surprises challenge atmospheric scientists. *Chem Eng News*, 7, 8-18
- [5] Moan, J., Dahlback, A., Henriksen, T., Magnus, K. (1989) Biological amplification factor for sunlight-induced nonmelanoma skin cancer at high latitudes. *Cancer Res*, 49, 5207-5212
- [6] Afaq, F., Adhami, V.M., Mukhtar, H. (2005) Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. *Mutat Res*, 571, 153-173
- [7] Afaq, F., Malik, A., Syed, D., Maes, D., Matsui, M.S., Mukhtar, H. (2005) Pomegranate fruit extract modulates UV-B-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and activation of nuclear factor kappa B in normal human epidermal keratinocytes paragraph sign. *Photochem Photobiol*, 81, 34-45
- [8] Toichi, E., McCormick, T.S., Cooper, K.D. (2002) Cell surface and cytokine phenotypes of skin immunocompetent cells involved in ultraviolet-induced immunosuppression. *Methods*, 28, 104-110
- [9] Suter, M.M., Cramer, F.M., Olivry, T., Mueller, E., Von Tschanner, C., Jensen, P.J. (1997) Keratinocyte biology and pathology. *Vet Dermatol*, 8, 67-100
- [10] Lin, J.Y., Fisher, D.E. (2007) Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*, 445, 843-850
- [11] Bickers, D.R., Athar, M. (2006) Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J Invest Dermatol*, 126, 2565-2575
- [12] Heck, D.E., Vetrano, A.M., Mariano, T.M., Laskin, J.D. (2003) UVB light stimulates production of reactive oxygen species. *J Biol Chem*, 278, 22432-22436

- [13] Ichihashi, M., Ahmed, N.U., Budiyo, A., Wu, A., Bito, T., Ueda, M., Osawa, T. (2000) Preventive effect of antioxidant on ultraviolet-induced skin cancer in mice. *J Dermatol Sci*, 23, S45-S50
- [14] Regensburger, J., Knak, A., Maisch, T., Landthaler, M., Bäumler, W. (2012) Fatty acids and vitamins generate singlet oxygen under UVB irradiation. *Exp Dermatol*, 21, 135-139
- [15] Chen, M.-H., Tsai, C.-F., Hsu, Y.-W., Lu, F.-J. (2014) Epigallocatechin gallate eye drop protect against ultraviolet B induced corneal oxidative damage in mice. *Mol Vis*, 20, 153-162
- [16] Brenneisen, P., Wenk, J., Klotz, L.O., Wlaschek, M., Briviba, K., Krieg, T., Sies, H., Scharffetter-Kochanek, K. (1998) Central role of ferrous/ferric iron in the ultraviolet B irradiation-mediated signaling pathway leading to increased interstitial collagenase (matrix-degrading metalloproteinase (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) mRNA levels in cultured human dermal fibroblasts. *J Biol Chem*, 273, 5279-5287
- [17] Kumagai, T., Kawamoto, Y., Nakamura, Y., Hatayama, I., Satoh, K., Osawa, T., Uchida, K. (2000) 4-Hydroxy-2-nonenal, the end product of lipid peroxidation, is a specific inducer of cyclooxygenase-2 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 273, 437-441
- [18] Athar, M., An, K.P., Morel, K.D., Kim, A.L., Aszterbaum, M., Longley, J., Epstein, E.H., Bickers, D.R. (2001) Ultraviolet B (UVB)-induced COX-2 expression in murine skin: An immunohistochemical study. *Biochem Biophys Res Commun*, 280, 1042-1047
- [19] Buckman, S.Y., Gresham, A., Hale, P., Hruza, G., Anast, J., Masferrer, J., Pentland, A.P. (1998) COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: Implications for the development of skin cancer. *Carcinogenesis*, 19, 723-729
- [20] Jiao, J., Mikulec, C., Ishikawa, T.O., Magyar, C., Dumlao, D.S., Dennis, E.A., Fischer, S.M., Herschman, H. (2014) Cell-type-specific roles for COX-2 in UVB-induced skin cancer. *Carcinogenesis*, 35, 1310-1319
- [21] Elmet, C.A., Ledet, J.J., Athar, M. (2014) Cyclooxygenases: Mediators of UV-induced skin cancer and potential targets for prevention. *J Invest Dermatol*, 134, 2497-2502
- [22] Zhong, H., Yin, H. (2015) Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: Focusing on mitochondria. *Redox Biol*, 4, 193-199

- [23] Esterbauer, H., Schaur, R.J., Zollner, H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*, 11, 81–128
- [24] Schäfer, M., Dütsch, S., auf dem Keller, U., Navid, F., Schwarz, A., Johnson, D.A., Johnson, J.A., Werner, S. (2010) Nrf2 establishes a glutathione-mediated gradient of UVB cytoprotection in the epidermis. *Genes Dev*, 24, 1045-1058
- [25] Hanada, K., Gange, R.W., Connor, M.J. (1991) Effect of glutathione depletion on sunburn cell formation in the hairless mouse. *J Invest Dermatol*, 96, 838-840
- [26] Tyrrell, R.M. and Pidoux, M. (1986) Endogenous glutathione protects human skin fibroblasts against the cytotoxic action of UVB, UVA and near-visible radiations. *Photochem Photobiol*, 44, 561-564
- [27] Deveci, M., Gilmont, R.R., Dunham, W.R., Mudge, B.P., Smith, D.J., Marcelo, C.L. (2005) Glutathione enhances fibroblast collagen contraction and protects keratinocytes from apoptosis in hyperglycemic culture. *Br J Dermatol*, 152, 217-224
- [28] He, Y.-Y., Huang, J.-L., Ramirez, D.C., Chignell, C.F. (2003) Role of reduced glutathione efflux in apoptosis of immortalized human keratinocytes induced by UVA. *J Biol Chem*, 278, 8058-8064
- [29] Townsend, D.M., Tew, K.D., Tapiero, H. (2003) The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother*, 57, 145-155
- [30] Viyoch, J., Mahingsa, K., Ingkaninan, K. (2012) Effects of Thai Musa species on prevention of UVB-induced skin damage in mice. *Food Chem Toxicol*, 50, 4992-4301
- [31] Takeda, S., Bando, N., Yamanishi, R. (2008) Ingested beta-carotene enhances glutathione level and up-regulates the activity of cysteine cathepsin in murine splenocytes. *Biosci Biotechnol Biochem*, 72, 1595-1600
- [32] F'guyer, S., Afaq, F., Mukhtar, H. (2003) Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 19, 56-72
- [33] Chiang, H.-M., Lin, T.-J., Chiu, C.-Y., Chang, C.-W., Hsu, K.-C., Fan, P.-C., Wen, K.-C. (2011) Coffea arabica extract and its constituents prevent photoaging by suppressing MMPs expression and MAP kinase pathway. *Food Chem Toxicol*, 49, 309-318

[34] Hou, H., Li, B., Zhao, X., Zhuang, Y., Ren, G., Yan, M., Cai, Y., Zhang, X., Chen, Li. (2009) The effect of pacific cod (*Gadus macrocephalus*) skin gelatin polypeptides on UV radiation-induced skin photoaging in ICR mice. *Food Chem*, 115, 945-950

[35] Tomaino, A., Cristana, M., Cimino, F., Speciale, A., Trombetta, D., Bonina, F., Saija, A. (2006) In vitro protective effect of a Jacquez grapes wine extract on UVB-induced skin damage. *Toxicol in Vitro*, 20, 1395-1402

[36] Zhu, M., Bowden, G.T. (2004) Molecular mechanism(s) for UV-B irradiation-induced glutathione depletion in cultured human keratinocytes. *Photochem Photobiol*, 80, 191-196

[37] Abel, E.L., Angel, J.M., Kiguchi, K., DiGiovanni, J. (2009) Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: Fundamentals and applications. *Nat Protoc*, 4, 1350-1362

[38] Xu, C., Huang, M-T., Shen, G., Yuan, X., Lin, W., Khor, T.O., Conney, A.H., Kong, A.N. (2006) Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced skin tumorigenesis in C57BL/6 mice by sulforaphane is mediated by nuclear factor E2-related factor 2. *Cancer Res*, 66, 8293-8296

[39] Atillasoy, E.S., Seykora, J.T., Soballe, P.W., Elenitsas, R., Nesbit, M., Elder, D.E., Montone, K.T., Sauter, E., Herlyn, M. (1998) UVB induced atypical melanocytic lesions and melanoma in human skin. *Am J Pathol*, 152, 1179-1186

[40] Zhaorigetu, S., Yanaka, N., Sasaki, M., Watanabe, H., Kato, N. (2003) Inhibitory effects of silk protein, sericin on UVB-induced acute damage and tumor promotion by reducing oxidative stress in the skin of hairless mouse. *J Photochem Photobiol B*, 71, 11-17

[41] Husain, Z., Pathak, M.A., Flotte, T., Wick, M.M. (1991) Role of ultraviolet radiation in the induction of melanocytic tumors in hairless mice following 7,12-dimethylbenz(a)anthracene application and ultraviolet irradiation. *Cancer Res*, 51, 4964-4970

[42] Kapadia, G.J., Azuine, M.A., Sridhar, R., Okuda, Y., Tsuruta, A., Ichiishi, E., Mukainake, T., Takasaki, M., Konoshima T., Nishino, H., Tokuda, H. (2003) Chemoprevention of DMBA-induced UV-B promoted, NOR-1-induced TPA promoted skin carcinogenesis, and DEN-induced phenobarbital promoted liver tumors in mice by extract of beetroot. *Pharmacol Res*, 47, 141-148

- [43] Fungo, R., Kikafunda, J.K., Pillay, M. (2010) β -carotene, iron and zinc content in Papua New Guinea and East African highland bananas. *Afr J Food Agric Nutr Dev*, 10, 2629-2644
- [44] del Mar Verde Méndez, C., Forster, M.P., Rodríguez-Delgado, M.Á., Rodríguez-Rodríguez, E.M., Romero, C.D. (2003) Content of free phenolic compounds in bananas from Tenerife (Canary Islands) and Ecuador. *Eur Food Res Technol*, 217, 287-290
- [45] Heinrich, U., Gärtner, C., Wiebusch, M., Eichler, O., Sies, H., Tronnier, H., Stahl, W. (2003) Supplementation with beta-carotene or a similar amount of mixed carotenoids protects humans from UV-induced erythema. *J Nutr*, 133, 98-101
- [46] Godic, A., Poljšak, B., Adamic, M., Dahmane, R. (2014) The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. *Oxid Med Cell Longev*, DOI: 10.1155/2014/860479
- [47] Sies, H. and Stahl, W. Carotenoids, UV protection. *Photochem Photobiol Sci*, 3, 749-752 (2004)
- [48] Stahl, W., Heinrich, U., Jungmann, H., Sies, H., Tronnier, H. (2000) Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light-induced erythema in humans. *Am J Clin Nutri*, 71, 795-798
- [49] Sharmila, R., Manoharan, S. (2012) Anti-tumor activity of rosmarinic acid in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) induced skin carcinogenesis in Swiss albino mice. *Indian J Exp Biol*, 50, 187-194
- [50] Monga, J., Aggarwal, V., Suthar, S.K., Monika, Nongalleima K., Sharma M. (2014) Topical (+)-catechin emulsified gel prevents DMBA/TPA-induced squamous cell carcinoma of the skin by modulating antioxidants and inflammatory biomarkers in BALB/c mice. *Food Funct*, 5, 3197-3207
- [51] Leerach, N., Yakaew, S., Phimnuan, P., Soimee, W., Nakyai, W., Luangbudnark, W., Viyoch, J. (2017) Effect of Thai banana (*Musa* AA Group) in reducing accumulation of oxidation end products in UVB-irradiated mouse skin. *J Photochem Photobiol B*, 158, 50-58
- [52] Lim, Y.Y., Lim, T.T., Tee, J.J. (2007) Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food Chem*, 103, 1003-1008

- [53] Slinkard, K., Singleton, V.L. (1977) Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods. *Am J EnolVitic* 28, 49–55
- [54] Hou, W.C., Lee, M.H., Chen, H.J., Liang, W.L., Han, C.H., Liu, Y.W., Lin, Y.H. (2001) Antioxidant activities of dioscorin, the storage protein of yam (*Dioscorea batatas* Decne) tuber. *J Agric Food Chem* 49, 4956-4960
- [55] Blois, M.S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181, 1199-1200
- [56] Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F. (1998) A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Food Agric*, 76, 270–6
- [57] Donsing, P., Limpeanchob, N., Viyoch, J. (2008) Evaluation of the effect of Thai breadfruit's heartwood extract on melanogenesis-inhibitory and antioxidation activities. *J Cosmet Sci*, 59, 41-85
- [58] Dhuley, J.N., Raman, P.H., Mujumdar, A.M., Naik, S.R. (1933) Inhibition of lipid peroxidation by piperine during experimental inflammation in rats. *Indian J ExpBiol*, 31, 443-445
- [59] Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150, 76–85
- [60] Meeran, S.M., Mantena, S.K., Meleth, S., Elmets, C.A., Katiyar, S.K. (2006) Interleukin-12-deficient mice are at greater risk of ultraviolet radiation-induced skin tumors and malignant transformation of papilloma to carcinomas. *Mol Cancer Ther*, 5, 825–832
- [61] Duarte, T. L., Cooke, M. S., Jones, G. D. D. (2009) Gene expression profiling reveals new protective roles for vitamin C in human skin cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 46, 78–87
- [62] Melhem, M.F., Gabriel, H.F., Eskander, E.D., Rao K.N. (1987) Cholestyramine promotes 7,12-dimethylbenzanthracene induced mammary cancer in Wistar rats, *Br. J. Cancer*, 56, 45-48
- [63] Shaarma, J., Goyal, P.K. (2015) Chemoprevention of chemical-induced skin cancer by *Panax ginseng* root extract. *J Ginseng Res*, 39, 265-273

[64] Meeran, S.M., Akhtar, S., Katiyar, S.K. (2009) Inhibition of UVB-Induced skin tumor development by drinking green tea polyphenols is mediated through DNA repair and subsequent inhibition of inflammation. *J Invest Dermatol*, 129, 1258-1270

[65] Ghezzi, P. (2011) Role of glutathione in immunity and inflammation in the lung. *Int J Gen Med*, 4, 105–113

[66] Panich U., Onkoksoong T., Limsaengurai S., Akarasereenont P., Wongkajornsilp A. (2012) UVA-induced melanogenesis and modulation of glutathione redox system in different melanoma cell lines: The protective effect of gallic acid. *J Photochem Photobiol B*, 10, 16-22

[67] Cordenunsi, B.R., Shiga, T.M., Lajolo, F. (2008) Non-starch polysaccharide composition of two cultivars of banana (*Musa acuminata* L.: cvs Mysore and Nanicão). *Carbohydr Polym*, 71, 26-31

[68] Sansone, M., Sansone, A.C.M.B., Shiga, T.M., do Nascimento, J.R.O. (2016) The water-soluble non-starch polysaccharides from bananas display immunomodulatory properties on cultured macrophages. *Food Res Inter*, 87, 125-133

[69] Khotimchenko, Y.S. (2010) Antitumor properties of nonstarch polysaccharides: Fucoidans and chitosans. *Russ J Mar Biol*, 36, 321-330

[70] Khotimchenko, Y.S. (2010) Antitumor properties of nonstarch polysaccharides: Carrageenans, alginates, and pectins. *Russ J Mar Biol*, 36, 401-412

[71] Zhang, M., Cheung, P.C., Zhang, L. (2001) Evaluation of mushroom dietary fiber (nonstarch polysaccharides) from sclerotia of *Pleurotus tuber-regium* (Fries) singer as a potential antitumor agent. *J Agric Food Chem*, 49, 5059-5062

[72] Bartholomé, R., Haenen, G., Hollman, CH, Bast, A., Daqnelie, P.C., Roos, D., Keijer, J., Kroon, P.A., Needs, P.W., Arts, I.C. (2010) Deconjugation kinetics of glucuronidated phase II flavonoid metabolites by beta-glucuronidase from neutrophils. *Drug Metab Pharmacokinet*, 25, 379-387

ภาคผนวก

ตารางที่ 3 แสดงค่าดูดกลืนแสงของกรดแกลลิก, ผลกล้วยน้ำว้าสุก (*Musa sapientum* L.) และกล้วยไข่สุก (*Musa surier* L.) ที่ถูกทำให้แห้งก่อนนำมาสกัด เพื่อนำสารสกัดที่ได้มาวัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

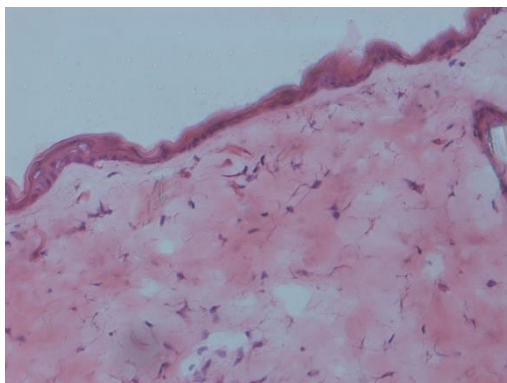
Concentration of gallic acid (mg/mL)	Absorbance at 750 nm			Mean $\pm$ S.D.
	1	2	3	
0.5	3.425	3.425	3.839	3.563 $\pm$ 0.239
0.3	2.121	2.121	2.539	2.260 $\pm$ 0.241
0.25	1.722	1.722	2.180	1.875 $\pm$ 0.264
0.1	0.721	0.721	0.973	0.805 $\pm$ 0.146
0.075	0.615	0.615	0.639	0.623 $\pm$ 0.014
0.0375	0.270	0.270	0.552	0.364 $\pm$ 0.163
0.01875	0.135	0.135	0.321	0.197 $\pm$ 0.107
0.01	0.086	0.086	0.186	0.119 $\pm$ 0.058
0.001	0.011	0.011	0.091	0.037 $\pm$ 0.046
Blank	0.06	0.055	0.062	0.059 $\pm$ 0.004

Concentration of <i>Musa sapientum</i> L. (mg/mL)	Absorbance at 750 nm			Mean $\pm$ S.D.
	1	2	3	
0.3	1.397	1.213	1.39	0.138 $\pm$ 0.104

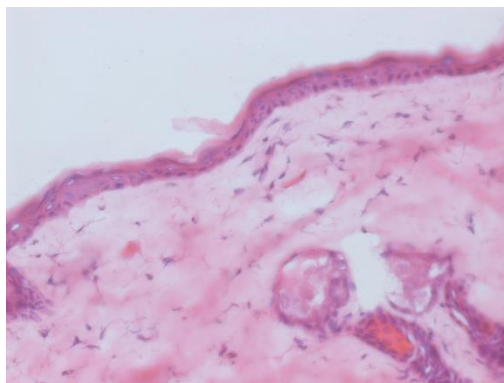
Concentration of <i>Musa surier</i> L. (mg/mL)	Absorbance at 750 nm			Mean $\pm$ S.D.
	1	2	3	
0.3	1.745	1.855	1.801	1.740 $\pm$ 0.055

รูปที่ 38 ลักษณะทางจุลวิภาคศาสตร์ของผิวหนังหนูทดลองกลุ่มปกติ (normal) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ณ สัปดาห์ที่ 16 ที่กำลังขยาย 40 เท่า, (a-e) คือ ภาพการศึกษาระดับจุลวิภาคศาสตร์ของผิวหนังของหนูทดลองตัวที่ 1-5

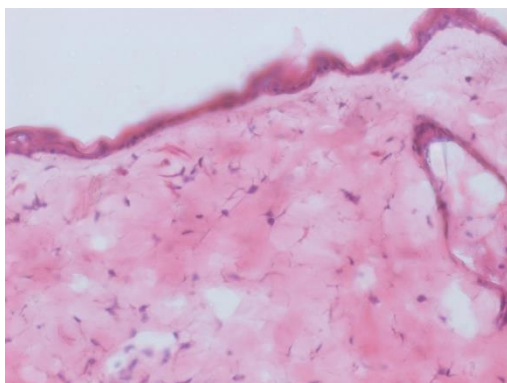
(a)



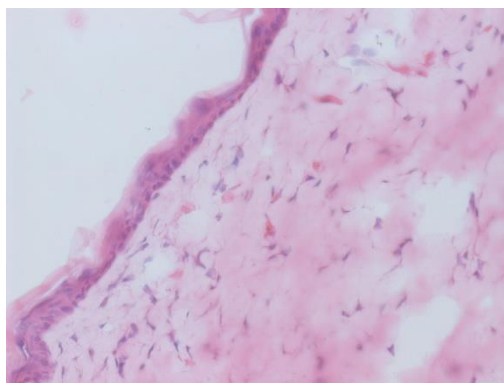
(b)



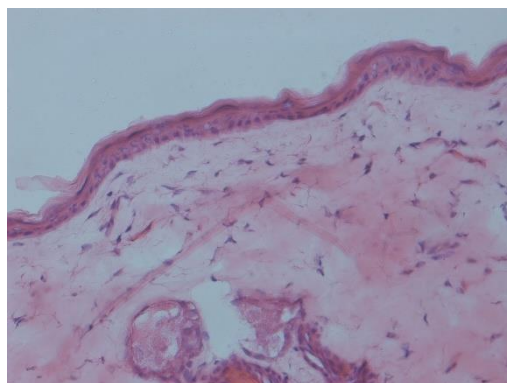
(c)



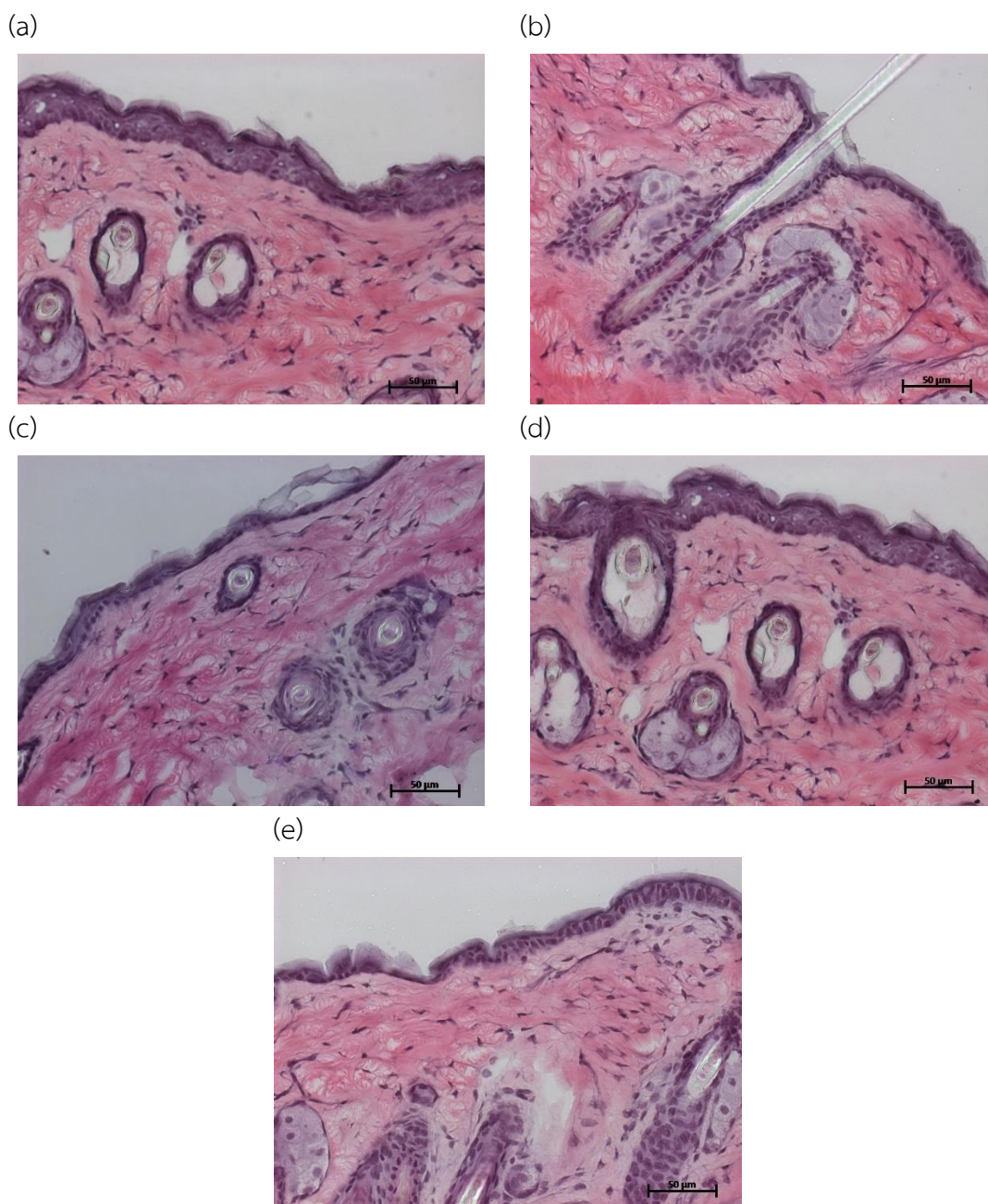
(d)



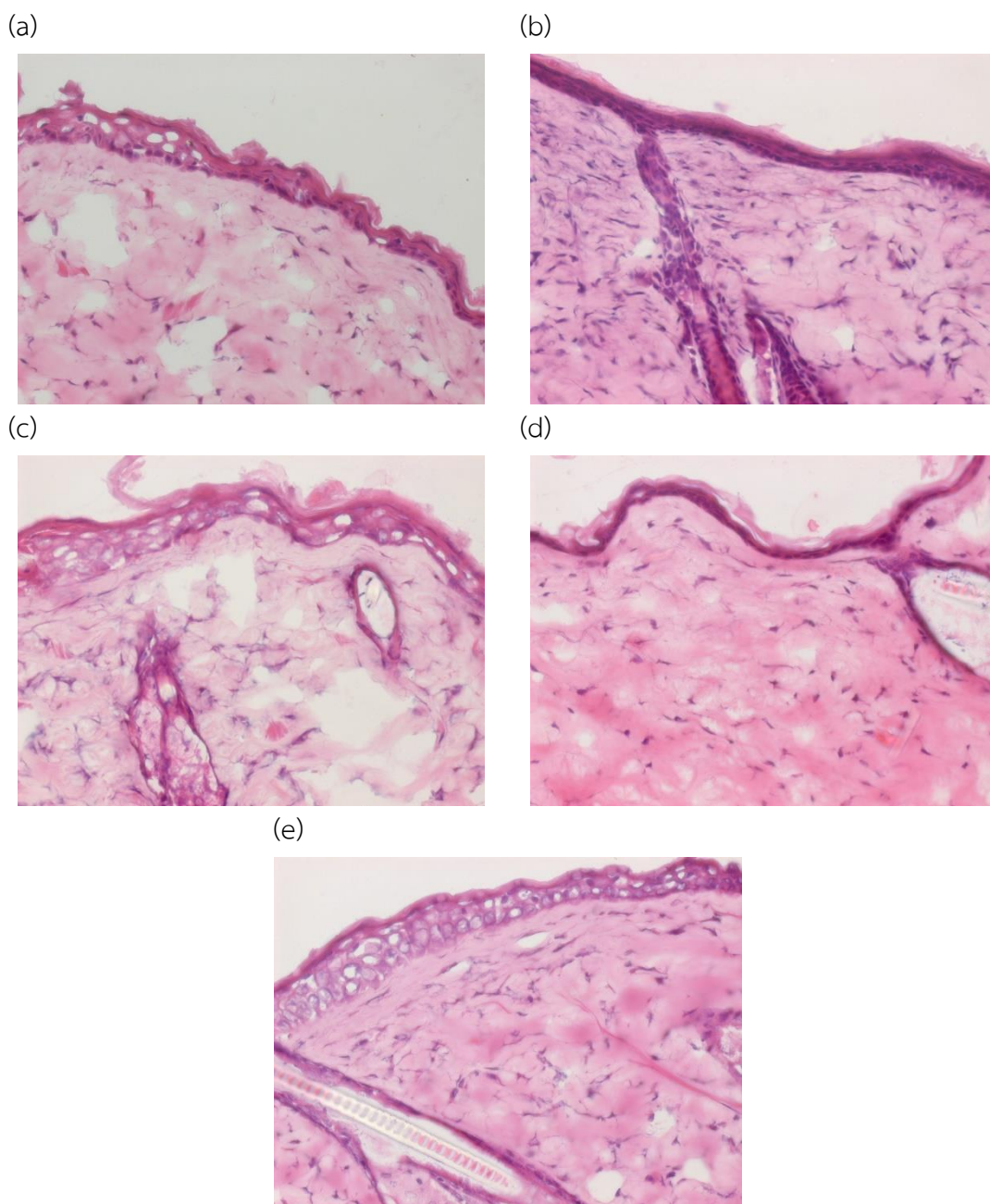
(e)



รูปที่ 39 ลักษณะทางจุลวิภาคศาสตร์ของผิวหนังหนูทดลองกลุ่มควบคุม (control) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบีพร้อมกับถูกป้อนน้ำเปล่า ณ สัปดาห์ที่ 16 ที่กำลังขยาย 40 เท่า, (a-e) คือ ภาพการศึกษาระดับจุลวิภาคศาสตร์ของผิวหนังของหนูทดลองตัวที่ 1-5

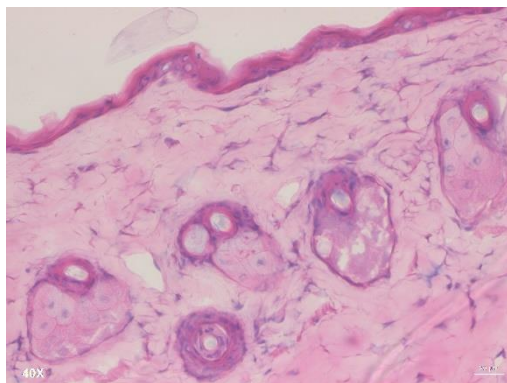


รูปที่ 40 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของผิวหนังหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนกล้วยน้ำว้าสุก ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักหนูต่อวัน ณ สัปดาห์ที่ 16 ที่กำลังขยาย 40 เท่า, (a-e) คือ ภาพการศึกษาในระดับจุลวิภาคศาสตร์ของผิวหนังของหนูทดลองตัวที่ 1-5

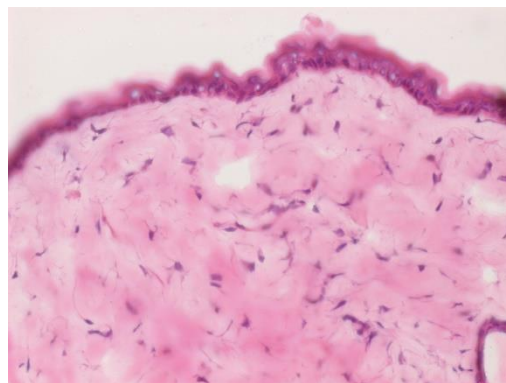


รูปที่ 41 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของผิวหนังหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนกล้วยไข่สุก ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักหนูต่อวัน ณ สัปดาห์ที่ 16 ที่กำลังขยาย 40 เท่า, (a-e) คือ ภาพการศึกษาในระดับจุลกายวิภาคศาสตร์ของผิวหนังของหนูทดลองตัวที่ 1-5

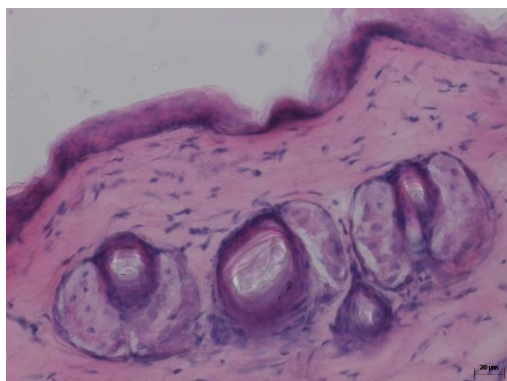
(a)



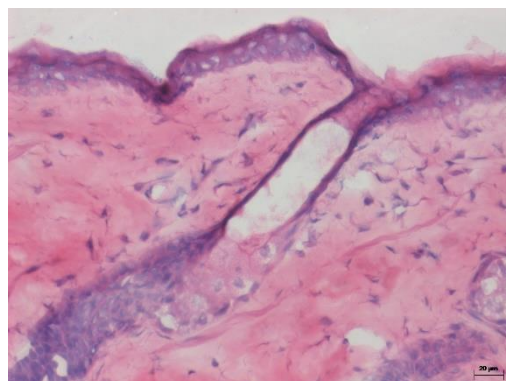
(b)



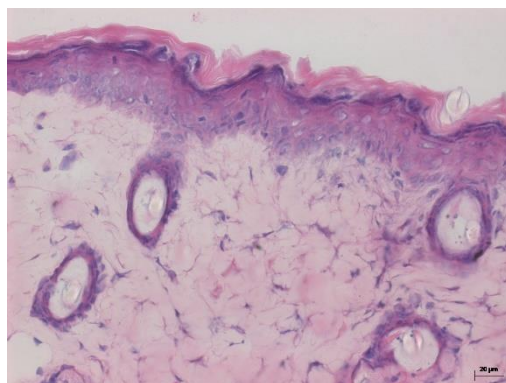
(c)



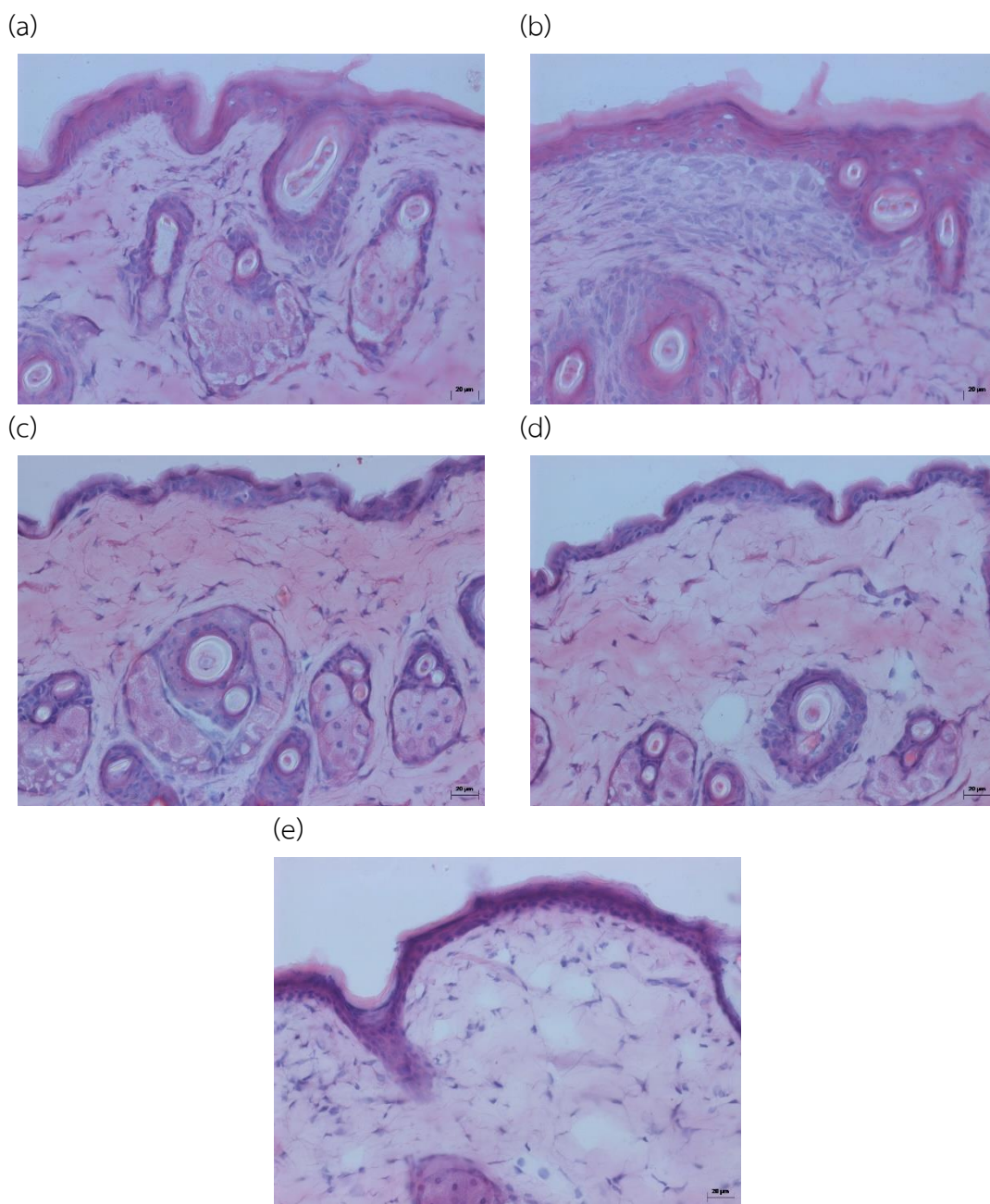
(d)



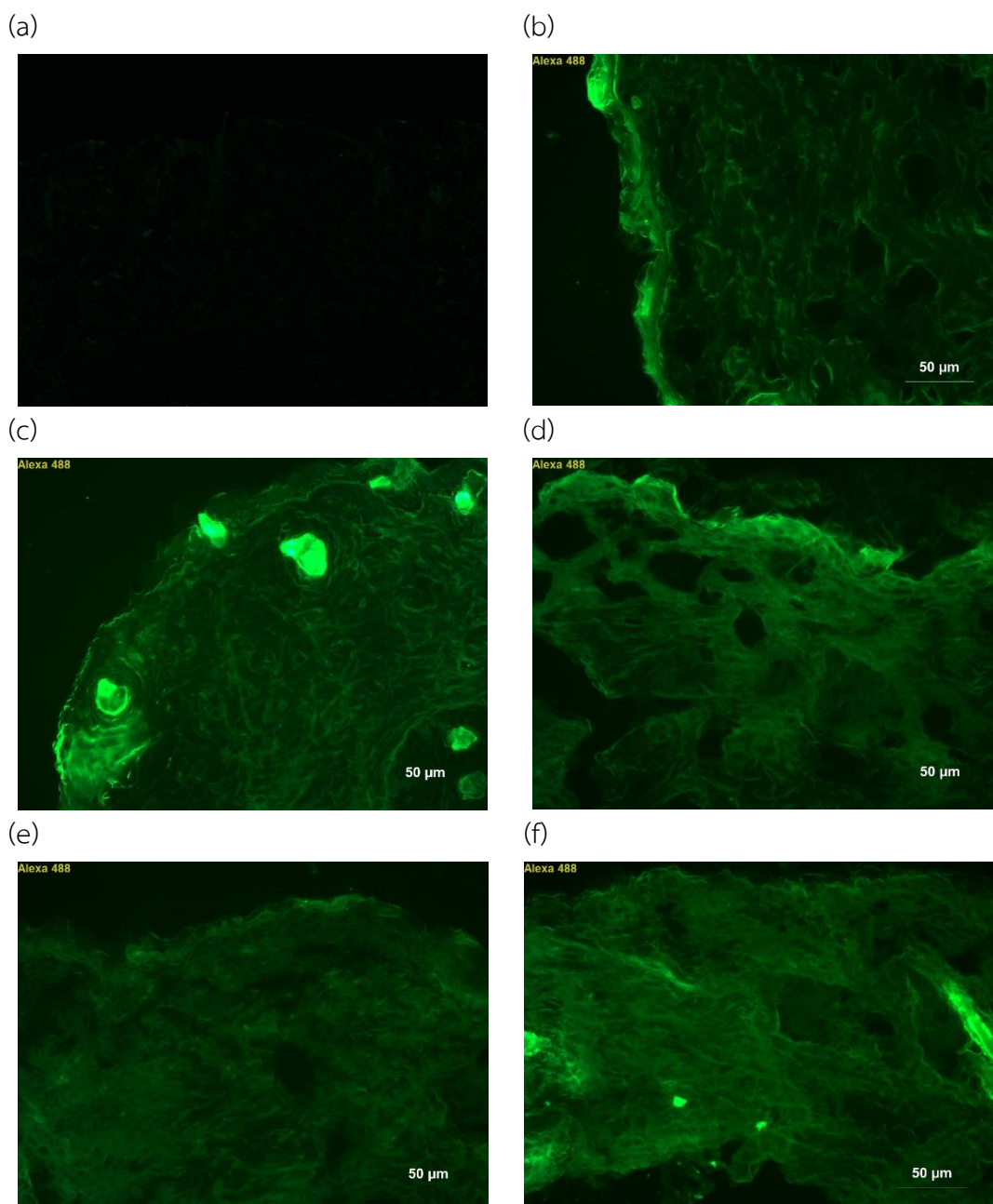
(e)



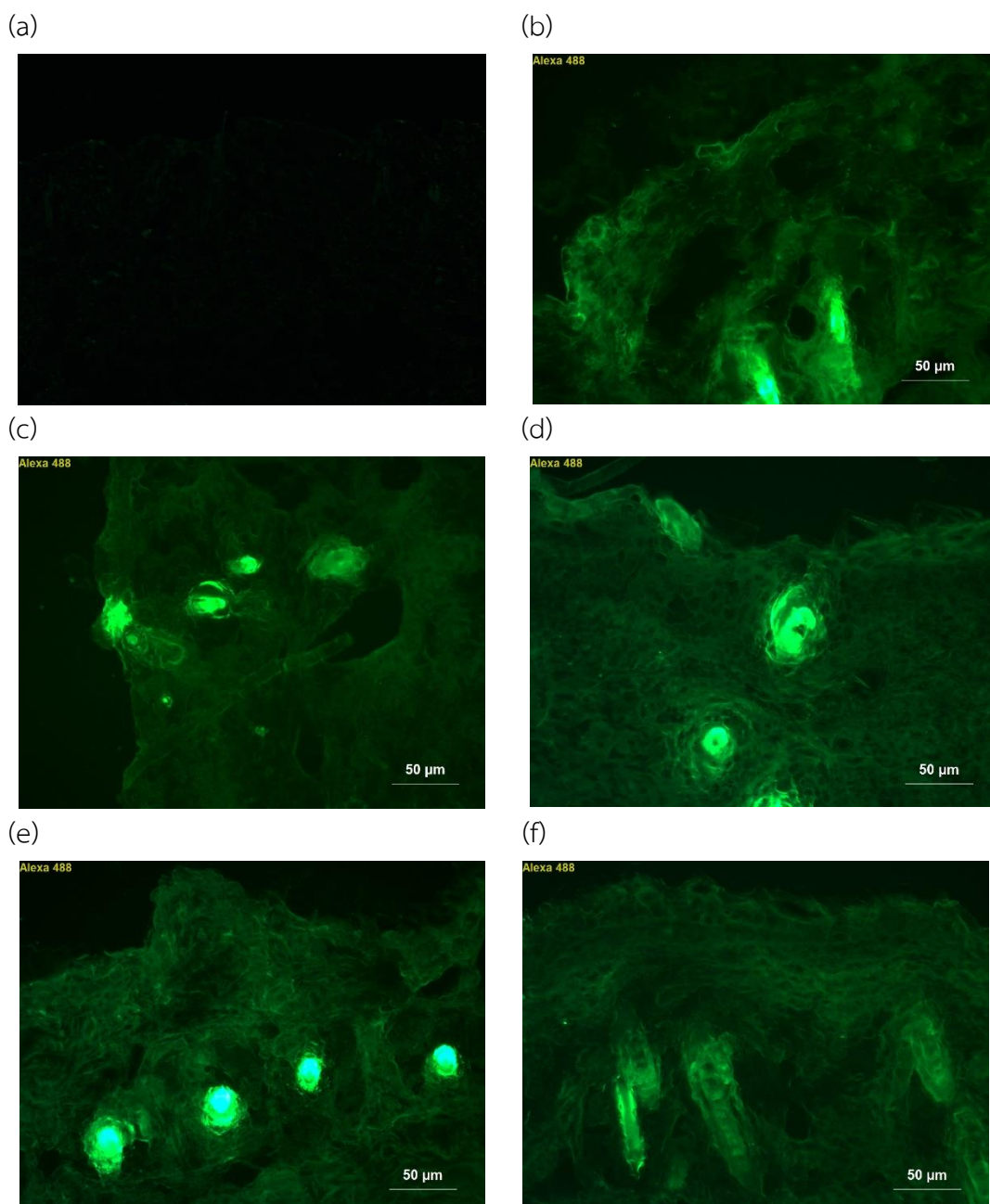
รูปที่ 42 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของผิวหนังหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนวิตามินซี ในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน ณ สัปดาห์ที่ 16 ที่กำลังขยาย 40 เท่า, (a-e) คือ ภาพการศึกษา ระดับจุลวิภาคศาสตร์ของผิวหนังของหนูทดลองตัวที่ 1-5



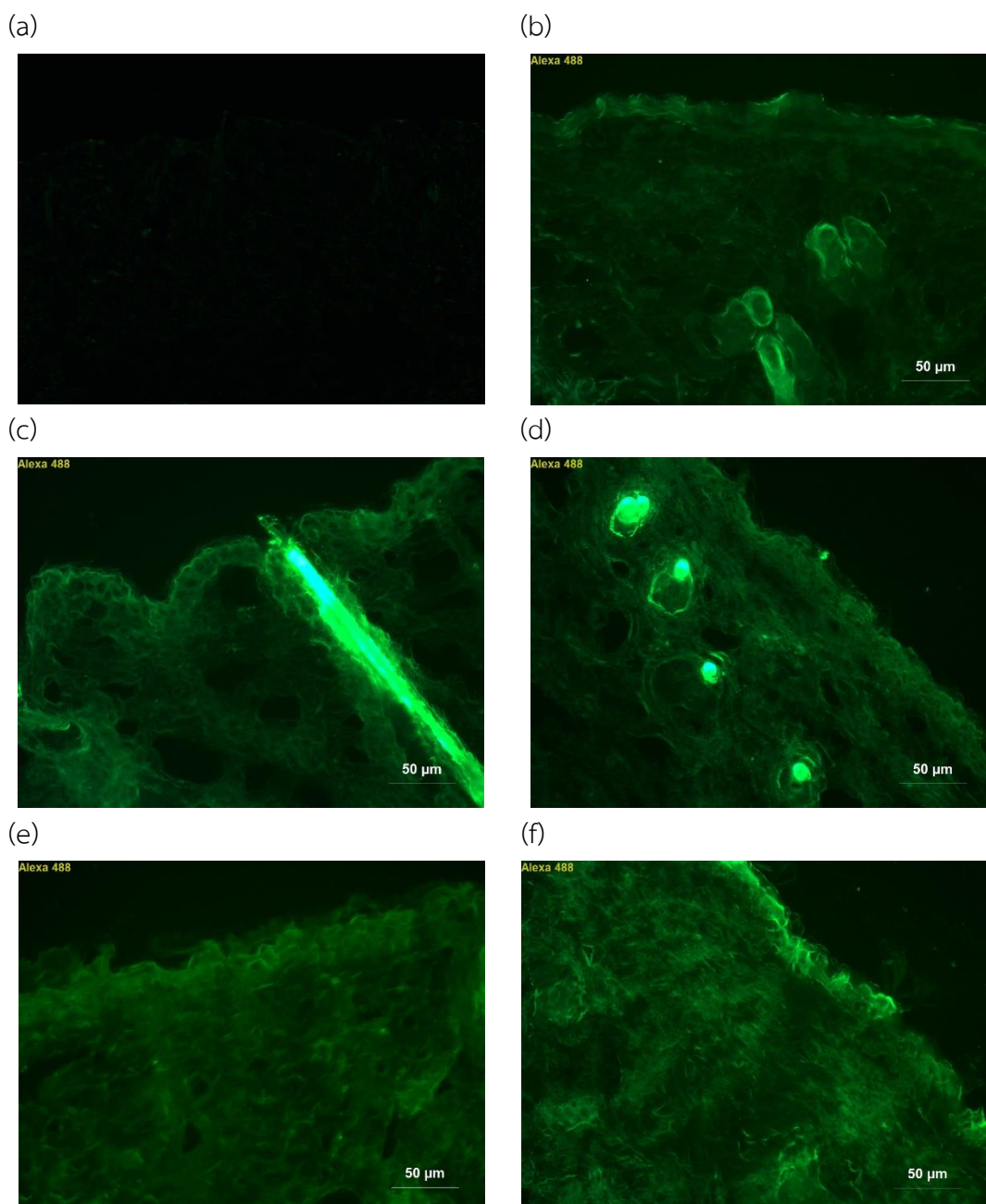
รูปที่ 43 ภาพถ่ายจากเทคนิค immunofluorescence staining แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของ 4-HNE (เรืองแสงสีเขียว) ในผิวหนังหนูทดลองกลุ่มปกติ (normal) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ณ สัปดาห์ที่ 16 (กำลังขยาย 40 เท่า) ทั้งนี้ (a) คือ ภาพ negative control ที่ทำการย้อมด้วย secondary antibody (Alexa Fluor®488), ab150077) เพียงอย่างเดียว, (b-f) คือ ภาพการแสดงออกของ 4-HNE ในผิวหนังหนูทดลองตัวที่ 1-5



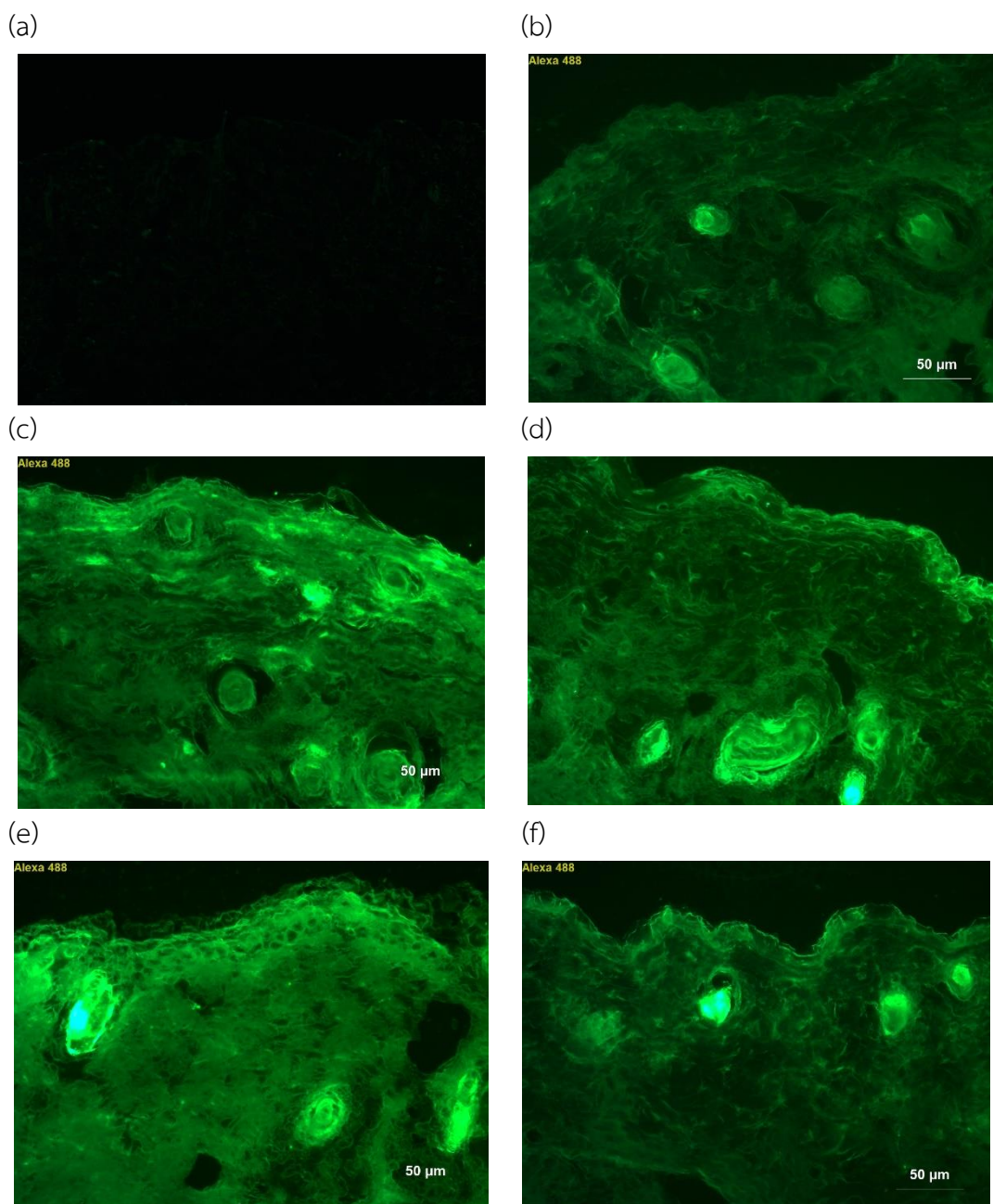
รูปที่ 44 ภาพถ่ายจากเทคนิค immunofluorescence staining แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของ 4-HNE (เรืองแสงสีเขียว) ในผิวหนังหนูทดลองกลุ่มควบคุม (control) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนน้ำเปล่า ณ สัปดาห์ที่ 16 (กำลังขยาย 40 เท่า) ทั้งนี้ (a) คือ ภาพ negative control ที่ทำการย้อมด้วย secondary antibody (Alexa Fluor®488, ab150077) เพียงอย่างเดียว, (b-f) คือ ภาพการแสดงออกของ 4-HNE ในผิวหนังหนูทดลองตัวที่ 1-5



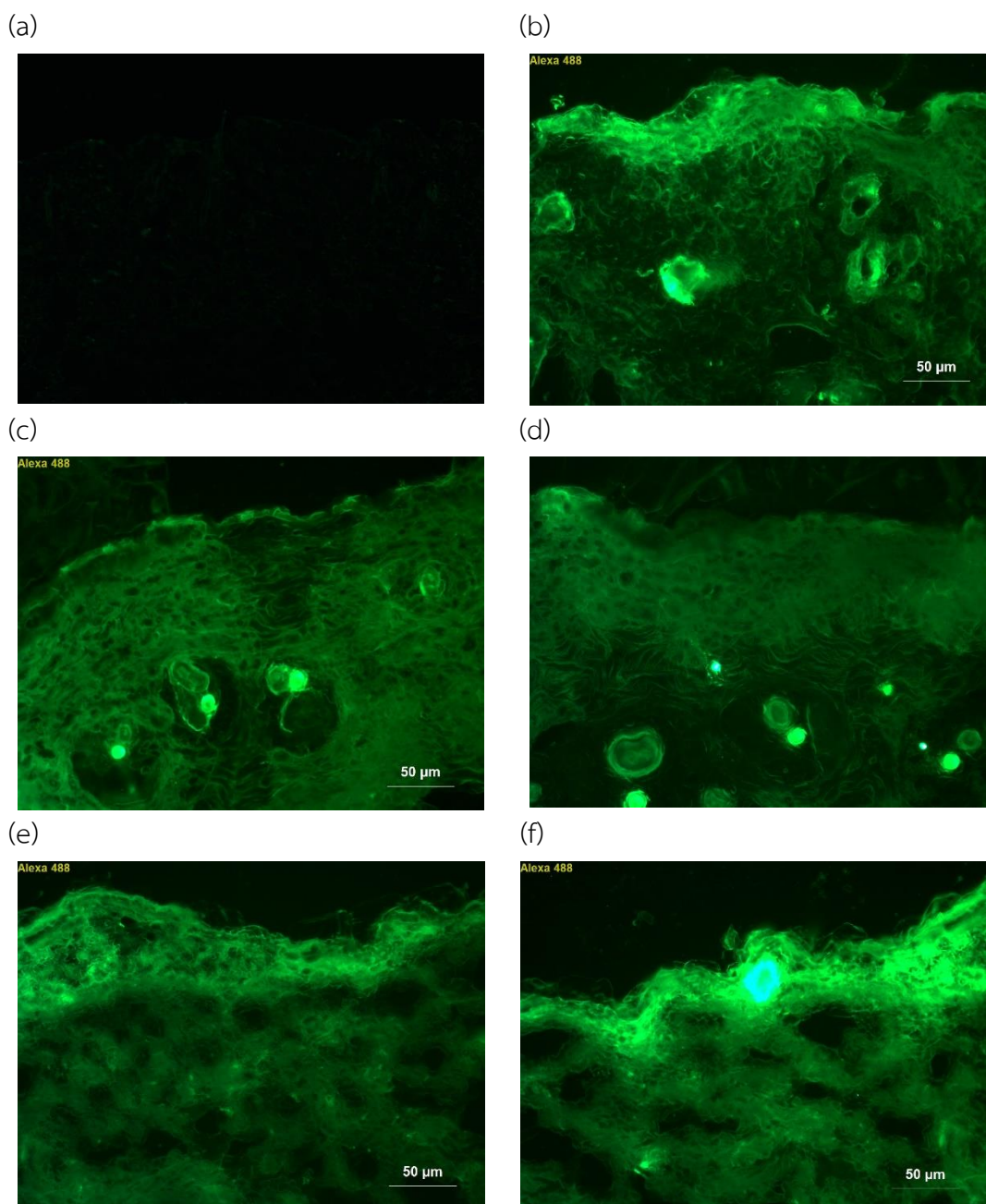
รูปที่ 45 ภาพถ่ายจากเทคนิค immunofluorescence staining แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของ 4-HNE (เรืองแสงสีเขียว) ในผิวหนังหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนกลัยซีนน้ำว่าสุก ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักหนูต่อวัน ณ สัปดาห์ที่ 16 (กำลังขยาย 40 เท่า) ทั้งนี้ (a) คือ ภาพ negative control ที่ทำการย้อมด้วย secondary antibody (Alexa Fluor®488, ab150077) เพียงอย่างเดียว, (b-f) คือ ภาพการแสดงออกของ 4-HNE ในผิวหนังหนูทดลองตัวที่ 1-5



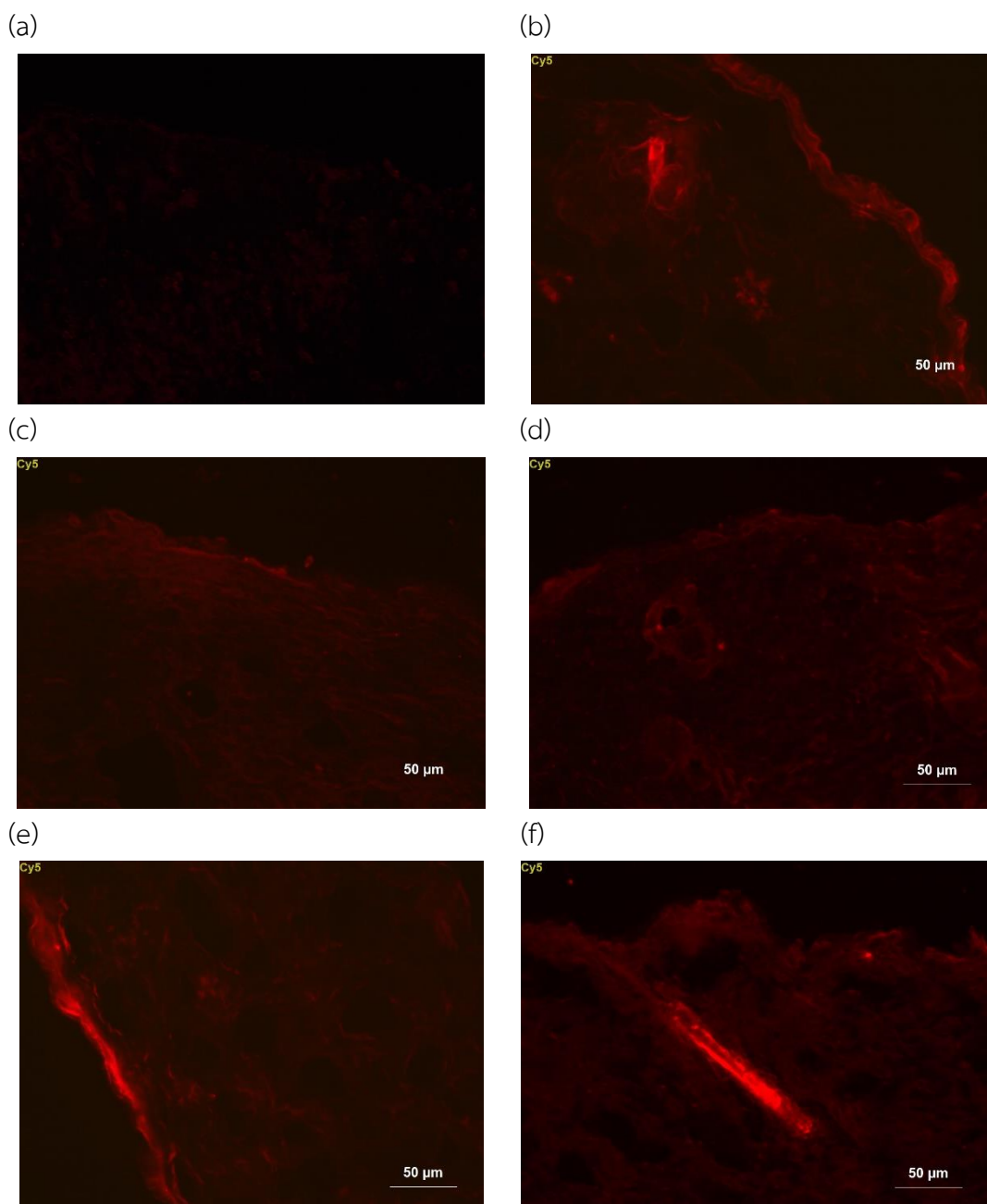
รูปที่ 46 ภาพถ่ายจากเทคนิค immunofluorescence staining แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของ 4-HNE (เรืองแสงสีเขียว) ในผิวหนังหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนกลูตาไธโอน ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักหนูต่อวัน ณ สัปดาห์ที่ 16 (กำลังขยาย 40 เท่า) ทั้งนี้ (a) คือ ภาพ negative control ที่ทำการย้อมด้วย secondary antibody (Alexa Fluor®488), ab150077) เพียงอย่างเดียว, (b-f) คือ ภาพการแสดงออกของ 4-HNE ในผิวหนังหนูทดลองตัวที่ 1-5



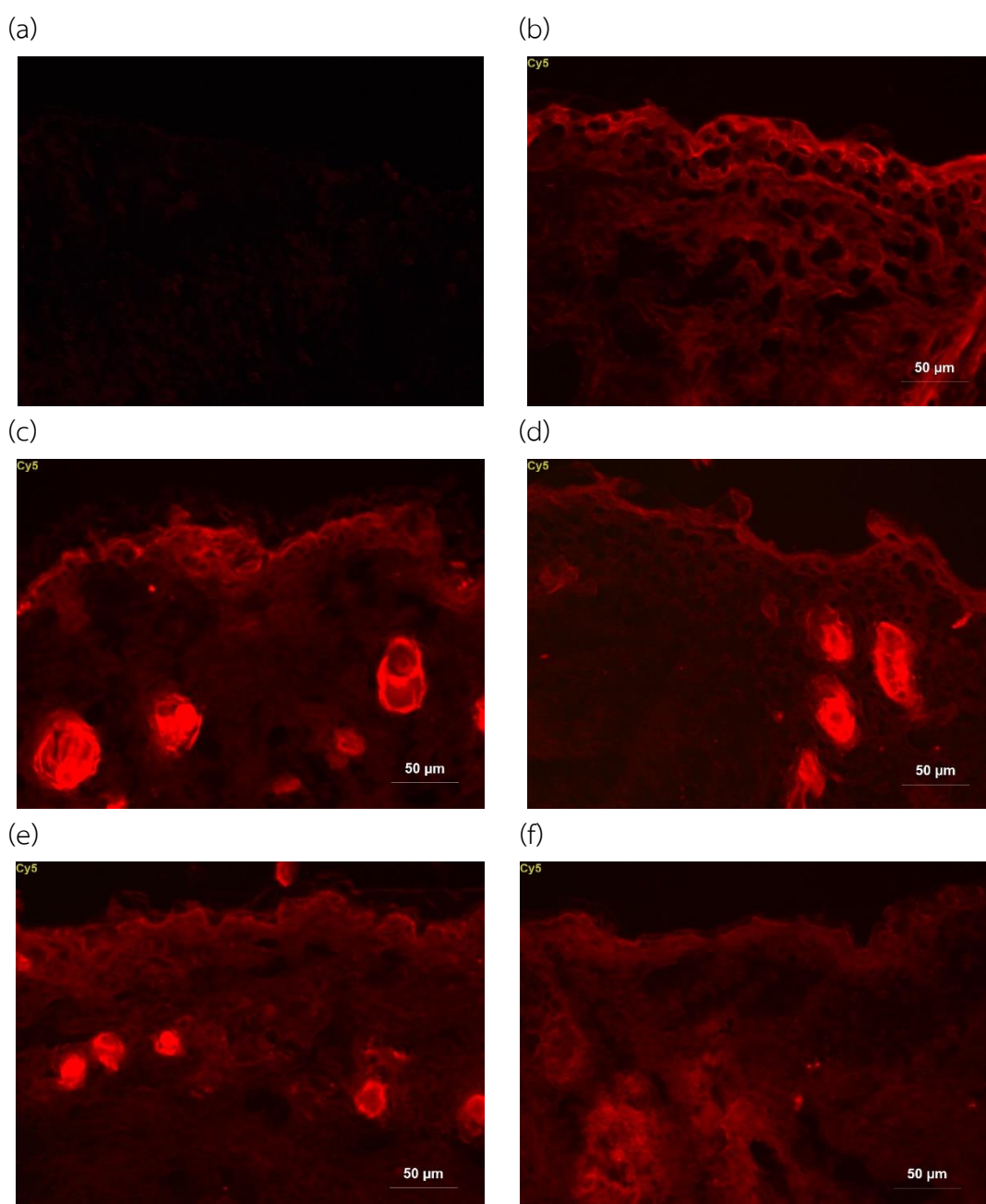
รูปที่ 47 ภาพถ่ายจากเทคนิค immunofluorescence staining แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของ 4-HNE (เรืองแสงสีเขียว) ในผิวหนังหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนวิตามินซี ในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน ณ สัปดาห์ที่ 16 (กำลังขยาย 40 เท่า) ทั้งนี้ (a) คือ ภาพ negative control ที่ทำการย้อมด้วย secondary antibody (Alexa Fluor®488), ab150077) เพียงอย่างเดียว, (b-f) คือ ภาพการแสดงออกของ 4-HNE ในผิวหนังหนูทดลองตัวที่ 1-5



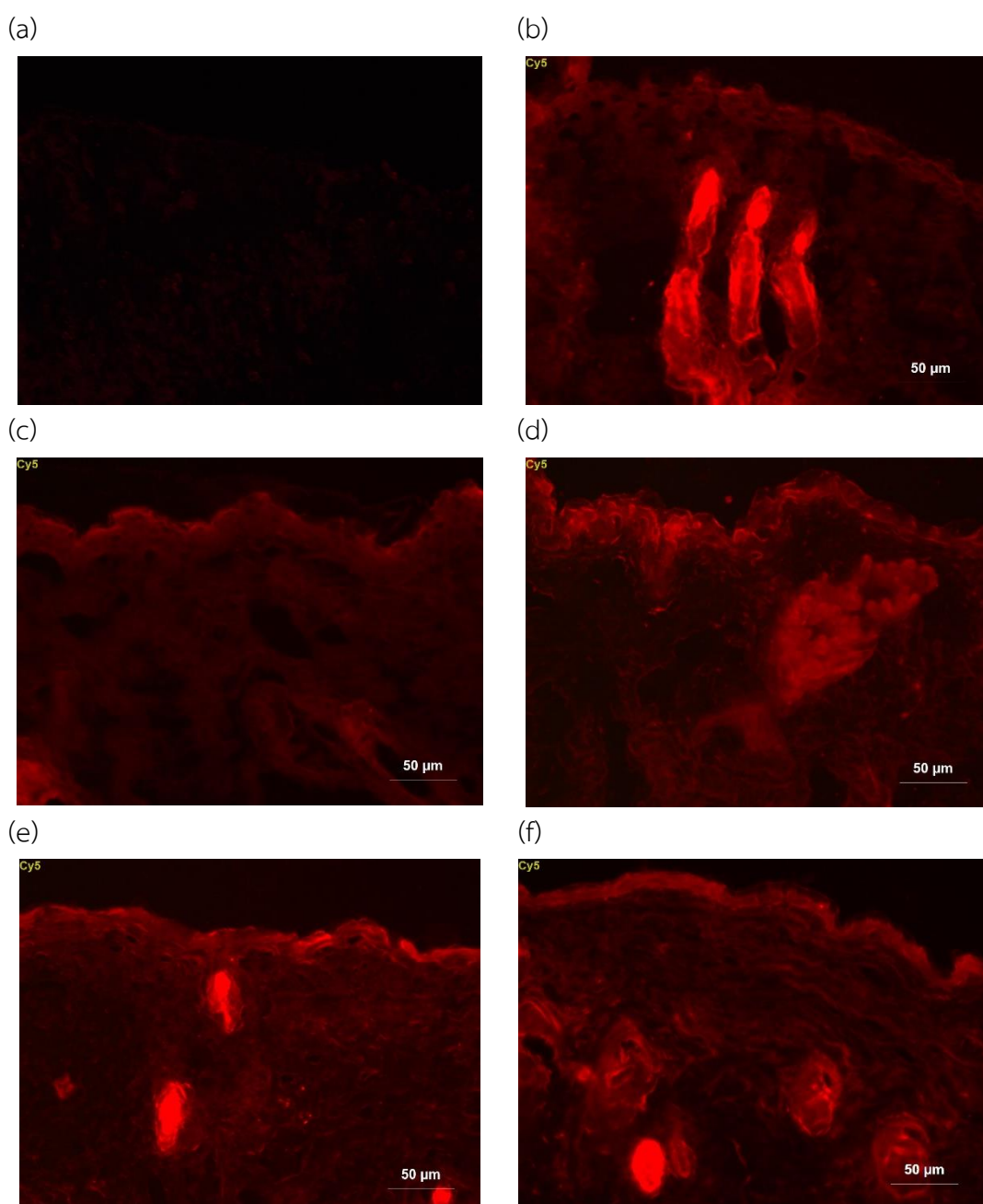
รูปที่ 48 ภาพถ่ายจากเทคนิค immunofluorescence staining แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของ COX-2 (เรืองแสงสีแดง) ในผิวหนังหนูทดลองกลุ่มปกติ (normal) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ณ สัปดาห์ที่ 16 (กำลังขยาย 40 เท่า) ทั้งนี้ (a) คือ ภาพ negative control ที่ทำการย้อมด้วย secondary antibody (Goat anti-rabbit IgG H&L (Cy5), ab6564) เพียงอย่างเดียว, (b-f) คือ ภาพการแสดงออกของ COX-2 ในผิวหนังหนูทดลองตัวที่ 1-5



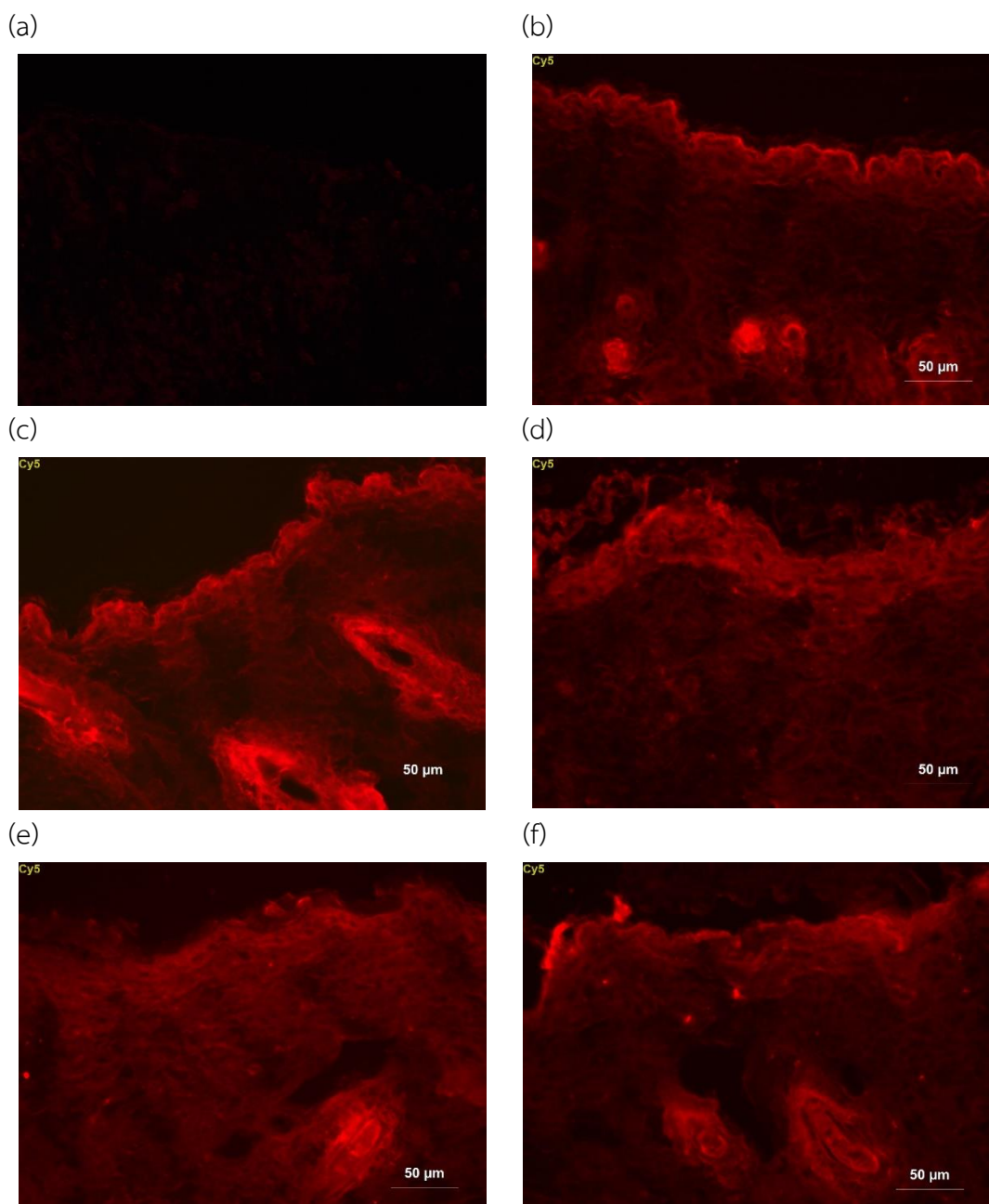
รูปที่ 49 ภาพถ่ายจากเทคนิค immunofluorescence staining แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของ COX-2 (เรืองแสงสีแดง) ในผิวหนังหนูทดลองกลุ่มกลุ่มควบคุม (control) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนน้ำเปล่า ณ สัปดาห์ที่ 16 (กำลังขยาย 40 เท่า) ทั้งนี้ (a) คือ ภาพ negative control ที่ทำการย้อมด้วย secondary antibody (Goat anti-rabbit IgG H&L (Cy5), ab6564) เพียงอย่างเดียว, (b-f) คือ ภาพการแสดงออกของ COX-2 ในผิวหนังหนูทดลองตัวที่ 1-5



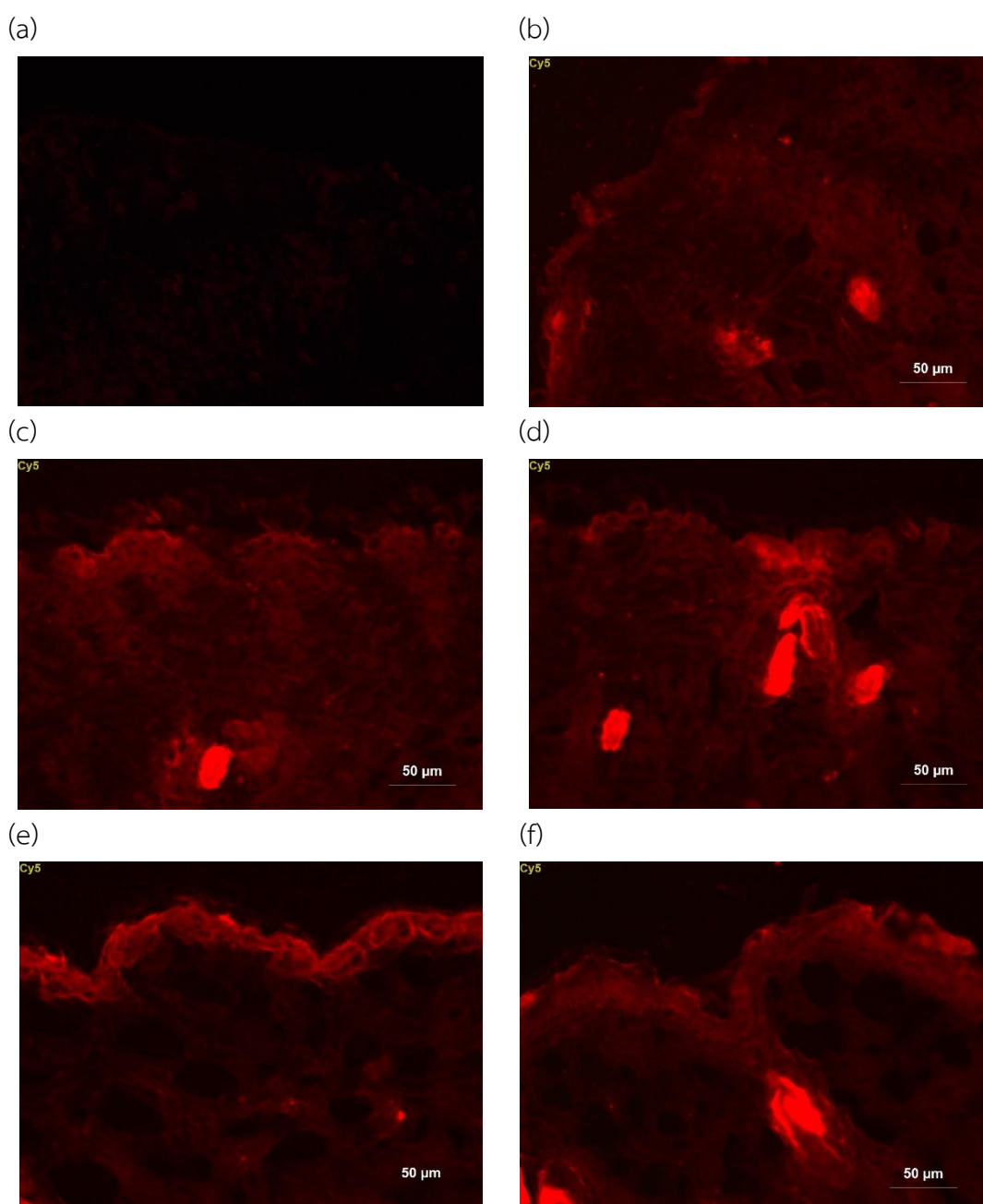
รูปที่ 50 ภาพถ่ายจากเทคนิค immunofluorescence staining แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของ COX-2 (เรืองแสงสีแดง) ในผิวหนังหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนกล้วยน้ำว้าสุก ใน ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักหนูต่อวัน ณ สัปดาห์ที่ 16 (กำลังขยาย 40 เท่า) ทั้งนี้ (a) คือ ภาพ negative control ที่ทำการย้อมด้วย secondary antibody (Goat anti-rabbit IgG H&L (Cy5), ab6564) เพียงอย่างเดียว, (b-f) คือ ภาพการแสดงออกของ COX-2 ในผิวหนังหนูทดลองตัวที่ 1-5



รูปที่ 51 ภาพถ่ายจากเทคนิค immunofluorescence staining แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของ COX-2 (เรืองแสงสีแดง) ในผิวหนังหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนกล้วยไข่สุก ในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักหนูต่อวัน ณ สัปดาห์ที่ 16 (กำลังขยาย 40 เท่า) ทั้งนี้ (a) คือ ภาพ negative control ที่ทำการย้อมด้วย secondary antibody (Goat anti-rabbit IgG H&L (Cy5), ab6564) เพียงอย่างเดียว, (b-f) คือ ภาพการแสดงออกของ COX-2 ในผิวหนังหนูทดลองตัวที่ 1-5



รูปที่ 52 ภาพถ่ายจากเทคนิค immunofluorescence staining แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของ COX-2 (เรืองแสงสีแดง) ในผิวหนังหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกป้อนวิตามินซี ในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน ณ สัปดาห์ที่ 16 (กำลังขยาย 40 เท่า) ทั้งนี้ (a) คือ ภาพ negative control ที่ทำการย้อมด้วย secondary antibody (Goat anti-rabbit IgG H&L (Cy5), ab6564) เพียงอย่างเดียว, (b-f) คือ ภาพการแสดงออกของ COX-2 ในผิวหนังหนูทดลองตัวที่ 1-5



สรุปความเห็นของผู้ทรงคุณวุฒิ นักวิจัย และผู้ประสานงานต่อรายงานฉบับสมบูรณ์

ความเห็นผู้ทรงคุณวุฒิ	คำชี้แจงของนักวิจัย	การจัดการของผู้ประสานงาน
1. ข้อเสนอแนะให้แก้ไข 1.1 แก้ไขคำผิด หน้า 1, 2, 3, 4, 6, 7, 23, เป็นต้น คำผิดเยอะ เช่น EC50 1.2 หน้า 9 แก้ไข คำว่า สำนักทดลองแห่งชาติ 1.3 หน้า 25, 26 และ หน้า 10 ในการวัดปริมาณ 4-HNE ผู้วิจัยใช้ 1st Abs is anti-4-HNE หน้า 10 บอกว่าใช้ ab46545 ซึ่งเป็น rabbit polyclonal Abs แต่ในหน้า 25 เขียนว่าเป็น monoclonal Abs ซึ่งได้จาก mouse ตกลงใช้ตัวไหนในการวัดปริมาณ COX-2 ผู้วิจัยใช้ 1st Abs is anti-COX หน้า 10 บอกว่าใช้ ab15191 ซึ่งเป็น rabbit polyclonal Abs แต่ในหน้า 25 เขียนว่าเป็น goat polyclonal Abs ซึ่งเป็นคนละตัว ตกลงใช้ตัวไหน 1.4 หน้า 25 ใช้กล้อง fluorescence microscopy (ZIEN) ยี่ห้อนี้มีหรือเปล่า ไม่น่าจะมียี่ห้อนี้ 1.5 หน้า IX abstract กำหนดเป็น xxx mg GAE/ 100 g of the freeze dried fresh fruits เนื่องจากเทียบหน่วยกับ gallic acid equivalent 1.6 หน้า 22 งานวิจัยได้รับการอนุญาตให้ทำในสัตว์ทดลอง ควรแนบเอกสารไว้ใน ภาคผนวก 1.7 หน้า 12 การหา total phenolic compound จะใช้ 50% ethanol crude extract หน้า 18 DPPH antioxidant assay ใช้ 50% ethanol crude extract หน้า 16 ทำการสกัดด้วย 70% ethanol ได้เป็น crude extract แต่ในการทดลองในสัตว์ทดลอง ใช้ผลกล้วยสุกมาบดให้ละเอียดในรูปแขวนตะกอน แล้วปั่น ดังนั้นควรอธิบาย หรืออธิบาย ว่า ทำไมถึงไม่ใช้ crude extract ในการทดลองในสัตว์ทดลอง ซึ่ง ethanol crude extract เมื่อเทียบกับ fresh whole banana น่าจะมีสาระสำคัญแตกต่างกัน	ดำเนินการแก้ไขแล้ว แก้ไขเป็น "ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ" แก้ไขเป็น "Anti-4 hydroxynonenal antibody (ab46545) และ Anti-Cox-2/Cyclooxygenase 2 antibody (ab15191) ในหน้าที่ 9, 25 และ 47" ดำเนินการการแก้ไขยี่ห้อของกล้องที่ใช้เป็น fluorescence microscopy (Axio Observer Z1, Carl Zeiss Microscopy Ltd., Cambridge, UK) ในหน้าที่ 9 และ 25 ดำเนินการแก้ไขเปลี่ยนหน่วยแล้ว แนบเอกสารในภาคผนวก ขอขอบพระคุณ ผู้ทรงคุณวุฒิในการตรวจสอบและชี้แนะแนวทางในการแก้ไขรายงาน ในส่วนของการทดสอบ DPPH เป็นการทดสอบเพื่อตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระของกล้วย ในหน้าที่ 16 ทำการสกัดด้วย 50% เอทานอล เช่นเดียวกับการศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวม ทั้งนี้ ขั้นตอนการทดสอบดังกล่าว เป็นการทดสอบคุณสมบัติของกล้วยทางเคมีเบื้องต้น ดังนั้นการทดลองในสัตว์ทดลอง	☐ ชี้แจงได้กระจ่างและเห็นชอบตามคำชี้แจงของนักวิจัย ☐ ชี้แจงไม่กระจ่าง และให้ความเห็นไม่ได้ ☐ ส่งให้ผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาใหม่แล้ว และผู้ทรงคุณวุฒิเห็นชอบด้วยแล้ว ☐ นักวิจัยแก้ไขตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ

1.8 หน้า 22 การแบ่งกลุ่มการทดลอง กลุ่มปกติ ซึ่งเป็นหนูที่ไม่ได้รับรังสี แต่ได้รับสาร DMBA มาก่อน ในการวิจัย ผู้วิจัยได้ศึกษาในกลุ่ม negative control ที่ไม่ได้รับทั้งรังสียูวีบี และ DMBA หรือกลุ่มที่ได้รับเฉพาะรังสียูวีบีอย่างเดียว ด้วยหรือไม่ 1.9 หน้า 22 ในวิธีการทดลอง ควรระบุด้วยว่า ได้ทำสาร DMBA วันละครั้ง ล่วงหน้ากี่วัน ก่อนที่จะให้รังสียูวีบี 1.10 หน้า 22 หนูแต่ละกลุ่ม ใช้จำนวน 5 ตัวต่อกลุ่ม แต่ในผลการทดลอง รูปที่ 22-26 แสดงเพียงหนูตัวเดียว ดังนั้นหนูอีกสี่ตัวที่เหลือ ควรแสดงผลไว้ใน	จึงทำการบ่อนสารแขวนลอยผลกล้วยสด เพื่อให้สอดคล้องกับการดำเนินชีวิตของมนุษย์ (mimic) อย่างไรก็ตาม สาเหตุที่ไม่บ่อนสารตัวอย่าง crude extract เนื่องจากสัตว์ทดลองอาจได้รับสารสำคัญมากเกินไป จนทำให้เกิดความเป็นพิษและเป็นอันตรายต่อสัตว์ทดลอง จากการศึกษานี้ แบ่งกลุ่มหนูทดลองเป็น 5 กลุ่มดังที่กล่าวไว้ในเนื้อหารายงานหน้าที่ 21 ดังนี้ - กลุ่มปกติ (normal) คือกลุ่มหนูที่ไม่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี - กลุ่มควบคุม (control) คือกลุ่มหนูที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกบ่อนน้ำเปล่า - กลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกบ่อนของเหลวแขวนตะกอนของเนื้อผลกล้วยไซสุก - กลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกบ่อนของเหลวแขวนตะกอนของเนื้อผลกล้วยน้ำว้าสุก - กลุ่มที่ได้รับ DMBA และรังสียูวีบี ร่วมกับถูกบ่อนสารละลายวิตามินซี ระบุในหน้าที่ 21 และ 22 ว่า “ทำการทำสาร DMBA (ละลายในอะซิโตน (acetone)) ความเข้มข้น 200 นาโนโมล (subcarcinogenic dose) ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร ที่บริเวณส่วนหลังของหนูที่ถูกโกนขน (พื้นที่ 3 x 3 เซนติเมตร) จำนวน 1 ครั้ง หลังจากที่ถูกโกนขนเป็นเวลา 1 สัปดาห์ หนูจะได้รับรังสียูวีบีควบคู่กับการได้รับสารตัวอย่าง” เพิ่มรูปผลการทดลองในภาคผนวกหน้าที่ 57-61	
--	--	--

ภาคผนวกด้วย 1.11 หน้า 20 ผู้วิจัยใช้กล้วยสุก ที่มีความหวานอยู่ในช่วง 25-30%Brix ควรระบุเหตุผลด้วยว่าทำไมต้องอยู่ในช่วงนี้ 1.12 หน้า 23 “หลังจากนั้นเลือกตัว ผิวหนังขนาดประมาณ” งง?? 1.13 การตรวจสอบสายพันธุ์ผลไม้ ควรระบุด้วยว่าใครเป็นคนตรวจสอบเอกลักษณ์ (Botanist??) 1.14 หน้า 28 รายงานผลเป็น /100 g dry fruit แต่ในรูป 12 รายงานผลเป็น /100 g fresh fruit รูปที่ 11 และ 12 เนื่องจากเป็นการวัดค่า absorbance ควรมีตารางแสดงถึงค่า absorbance ที่วัดได้ในแต่ละครั้ง ในภาคผนวกด้วย 1.15 หน้า IV ควรรายงานผลของ total phenolic content ในหน่วย เดียวกันกับ abstract และ results เช่น หน้า IV 14.41 mg/ 100 g ของเนื้อผลไม้สด หน้า 28 131 mg gallic acid equivalent/ 100 g dry fruit 1.16 หน้า 29 ผู้วิจัยทำการศึกษาหาปริมาณของ gallic acid and catechin แล้วพบว่าไม่สามารถคำนวณหาปริมาณได้ ผู้วิจัยควรเพิ่มการอธิบายผลการทดลองนี้ด้วย ตัวอย่างเช่น ในกล้วยพันธุ์อื่นๆ หรือกล้วยดิบ จากการศึกษาของคนอื่น พบปริมาณ gallic acid และ catechin หรือไม่ ถ้าพบ พบปริมาณเท่าไร	เพื่อกำหนดช่วงความหวานให้อยู่ช่วงกำหนด เหมือนกันทุกครั้งที่ทำการเตรียมตัวอย่างเนื้อกล้วยสุกพอใช้ในการบดหนุทดลอง นอกจากนี้ช่วงความหวานดังกล่าว อยู่ในช่วงที่กล้วยมีความสุกพอดี และมีปริมาณน้ำตาลที่ไม่มากเกินไป จนมีผลต่อน้ำหนักตัวของหนุทดลอง ดำเนินการแก้ไขแล้ว ในหน้าที่ 23 ขอขอบคุณ ผู้ทรงคุณวุฒิ สำหรับข้อเสนอแนะนี้ เพื่อนำไปปรับใช้ในการศึกษาครั้งต่อไป อย่างไรก็ตาม การศึกษารั้งนี้ ทำการตรวจสอบเอกลักษณ์ของกล้วยทั้ง 2 ชนิด โดยการดูการจัดเรียงของเมล็ดกล้วย, แก่นกลางของผลกล้วย และสีของเนื้อกล้วย เพียงเท่านั้น เพิ่มตารางแสดงผลค่าดูดกลืนแสงในภาคผนวกในหน้าที่ 56 ตารางที่ 3 แสดงค่าดูดกลืนแสงของกรดแกลลิก, ผลกล้วยน้ำว้าสุก (<i>Musa sapientum</i> L.) และกล้วยไข่สุก (<i>Musa surier</i> L.) ที่ถูกทำให้แห้งก่อนนำมาสกัด เพื่อนำสารสกัดที่ได้มาวัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ดำเนินการแก้ไขหน่วยของ total phenolic content ให้เป็นหน่วยเดียวกันแล้ว ดำเนินการอธิบายเพิ่มเติมในหน้าที่ 31 “ก่อนหน้านี้ มีรายงานการศึกษาในผลกล้วยสด สายพันธุ์ Gran Enana และ Pequeña Enana ที่ปลูกในประเทศ Ecuador และ Canary Islands และใช้ HPLC (photodiode array detection)	
--	--	--

แล้วควร discuss ต่อว่า ทำไมงานวิจัยนี้ไม่สามารถหา ค่าได้ อาจต้องปรับวิธีการทำ HPLC นอกจากนี้ ควร บอกเหตุผลด้วยว่าทำไมหาปริมาณ gallic acid and catechin สารทั้งสองมีรายงานที่สามารถป้องกัน มะเร็งได้หรือไม่ ในหน้า 7 “สารสำคัญที่อยู่ในผล กล้วย เช่น gallic acid, catechins, beta- carotene xxxxxx เนื่องจากมีรายงานพบสารสำคัญ ดังกล่าวในเนื้อผลกล้วย [43, 44] ดังนั้น ควร เปรียบเทียบกับการศึกษาเหล่านี้ด้วย ว่าทำไมพบสาร เหล่านี้ แต่ทำไมของผู้วิจัยไม่สามารถคำนวณสาร เหล่านี้ได้ 1.17 หน้า 31 ในหัวข้อ 4 ลักษณะการเขียน เป็น การเขียนผลการทดลองอย่างเดียว แต่ใน บทที่ 3 ผล การทดลองและอภิปรายผลการทดลอง ผู้วิจัยควร อภิปรายด้วยว่า beta-carotene สำคัญอย่างไรในการ ป้องกันมะเร็งผิวหนังในหนูที่เหนียวดำด้วยรังสียูวีบี เช่น กล้วยไฟพบ beta-carotene มาก แต่ในกล้วย น้ำว่า ไม่สามารถวัดปริมาณได้ แต่ทั้งนี้กล้วยทั้งสอง ชนิด สามารถชะลอหรือลดการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง ได้ (จาก abstract หน้า VII) ควรอภิปรายด้วยว่า	ในการวิเคราะห์หามหาปริมาณกรดแกลลิก และคาเทชิน ระบุว่า ในกล้วยนั้นไม่มีสารที่ สารกลุ่มฟีนอลิก ได้แก่ กรดแกลลิก ในช่วง 0.8-1 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของ กล้วยสด และคาเทชิน ในช่วง 6-10 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของกล้วยสด [44] สำหรับในการศึกษานี้ เทคนิคที่ใช้ในการ วิเคราะห์ปริมาณกรดแกลลิกและคาเท ชินคือ HPLC เช่นกัน แต่ใช้ detector ชนิด UV/visible ที่ไม่ใช่ photodiode array ซึ่งส่งผลให้ประสิทธิภาพในการ วิเคราะห์แตกต่างจากการศึกษาก่อน หน้านี้ อย่างไรก็ตาม ดังที่กล่าวไปแล้ว ข้างต้น ผลโครมาโตแกรมที่ได้จาก detector ชนิด UV/visible แสดงให้เห็น แนวโน้มการพบกรดแกลลิกและคาเทชิน ในกล้วยไฟและน้ำว่าเช่นกัน ซึ่งมี รายการศึกษาระบุว่า สารคาเทชินช่วย เพิ่มการทำงานของกลูตาไธโอน และ เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกลูตาไธ โอน และช่วยลดปริมาณ COX-2 ใน ผิวหนังหนูที่ถูกเหนียวดำให้เป็นมะเร็ง ผิวหนังโดยการทา DMBA ร่วมกับ 12-O- tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) รวมทั้งป้องกันการเกิดมะเร็ง ผิวหนัง [50] ข้อมูลที่ได้นี้แสดงให้เห็นถึง ความสำคัญของแคทีชินในการป้องกัน การเกิดมะเร็งผิวหนัง” ขอขอบคุณ ผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ชี้แนะการ แก้ไขรายงานฉบับนี้ การผลการศึกษา เบต้า-แคโรทีนดังที่กล่าวในหน้าที่ 31 แล้ว นอกจากนี้มีรายงานผลการศึกษา ปริมาณเบต้า-แคโรทีนในผลกล้วย 17 สายพันธุ์ที่ปลูกใน Papua New Guinea โดยใช้ HPLC ในการวิเคราะห์ พบ ปริมาณเบต้า-แคโรทีนอยู่ในช่วง 100- 2,400 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัมของเนื้อ	
--	--	--

beta-carotene นั้นสำคัญต่อการออกฤทธิ์ของกล้วยทั้งสอง 1.18 หน้า 32 “ซึ่งผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ [30, 51] ควรอภิปรายด้วยว่า สอดคล้องยังไร เช่น การศึกษาก่อนหน้านี้ มีค่า EC50 มากกว่าหรือน้อยกว่า และทั้งงานวิจัยนี้ และ 30, 51 ก็ทำในกล้วยเหมือนกัน มีอะไรที่แตกต่างกันบ้าง เช่น สายพันธุ์ กล้วยดิบหรือสุก crude extract ใช้ 50% ethanol เป็นต้น 1.19 หน้า 34 รูปที่ 21 ไม่ชัดเจน เส้นกราฟหนาเกินไป และไม่ได้แสดง error bar ควรปรับปรุงรูปภาพ 1.20 หน้า 35 “แต่จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า vit C ไม่สามารถชะลอการเกิดเนื้องอกในผิวหนังของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งได้” ผู้วิจัยควรอภิปรายด้วยว่า เหตุใด vit C ถึงไม่ได้ผล	ผล ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ [43] อาจกล่าวได้ว่าเบตา-แคโรทีนเป็นสารสำคัญอีกชนิดหนึ่งที่พบในกล้วย การศึกษาในมนุษย์พบว่า การได้รับเบตา-แคโรทีนโดยการรับประทานติดต่อกันเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ส่งผลให้ปริมาณ แคโรทีนอยด์ (carotenoids) ที่ผิวหนังเพิ่มขึ้น [45] รวมทั้งมีส่วนช่วยป้องกันการเกิดการอักเสบและ/หรือระคายเคืองของผิวหนังที่ได้รับรังสียูวีอย่างต่อเนื่อง [45,46-48] และการศึกษาในหนูพบว่า หนูที่ได้รับเบตา-แคโรทีน โดยการกินจะทำให้ระดับกลูตาไธโอนในเซลล์มีมากขึ้น [31] ด้วยเหตุนี้ การรับประทานกล้วยที่มีเบตา-แคโรทีนเป็นองค์ประกอบ อาจช่วยป้องกันผิวหนังอักเสบหรือเปลี่ยนแปลงอันเนื่องมาจากการได้รับรังสียูวีอย่างต่อเนื่องได้ ในการทดลองครั้งนี้ได้ผลของค่า EC50 ที่น้อยกว่าการศึกษาก่อนหน้านี้ เนื่องจากใช้กล้วยทำแห้ง (freeze died banana) ในการสกัด อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองที่ได้ในครั้งนี้ ยังคงไปในทางเดียวกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ ดำเนินการแก้ไขแล้ว ดำเนินการอภิปรายเพิ่มเติมในเนื้อหา รายงานหน้า 38 แล้ว เนื่องจาก การได้รับวิตามินซีซึ่งถึงแม้จะมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ แต่ไม่มีคุณสมบัติในการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่ได้รับความเสียหายจากสารก่อมะเร็งและการฉายรังสียูวี [60-61] ทำให้อัตราการซ่อมแซมดีเอ็นเอต่ำกว่าอัตราการเกิด DNA damage ทำให้นำไปสู่การพัฒนาของเซลล์มะเร็งใน	
---	---	--

1.21 หน้า 35 รูปที่ 23 พบตุ่มนูนของเนื้องอก ผู้วิจัยแน่ใจได้อย่างไรว่า ตุ่มนูนนั้นเป็นเนื้องอกจริง ควรอธิบายผลด้วย มีรอยเหี่ยวย่นและหยาบกร้าน (ดังลูกศรสีแดง) แต่ถ้ามีตุ่มนูนด้วย ควรระบุว่า บริเวณไหน อาจจะใช้ลูกศรสีน้ำเงินแทนได้ 1.22 หน้า 5 ref 30 ผู้วิจัยได้ใช้สารสกัดจาก ผลไม้สุกด้วย 50% ethanol extract และยังทดสอบฤทธิ์ antioxidant โดยวิธี DPPH และหาปริมาณ total phenolic ซึ่งเหมือนกันกับการวิจัยนี้ เพราะเหตุใดทำซ้ำอีกครั้ง ทั้งๆ ที่สามารถอ้างอิงผลการทดลองเหล่านี้ได้จาก ref 30 1.23 รูปที่ 27-30 เป็นภาพที่ได้จากหนูเพียงตัวเดียว แต่จากวิธีการทดลอง ผู้วิจัยใช้หนูถึง 5 ตัว ดังนั้น ควรแสดงภาพย้อมสี H&E ของหนูที่เหลืออีก 4 ตัว อาจระบุไว้ในภาคผนวกได้ เพื่อให้เห็นว่า หนูที่เหลือก็ให้ผลเหมือนกับรูปที่ 27-30 1.24 หน้า 39 รูปที่ 28 ในรูปภาพควรระบุว่า a คืออะไร b คืออะไร 1.25 รูปที่ 29-31 ควรระบุว่าส่วนไหน คือ epidermis ส่วนไหนคือ dermis เหมือนกับรูปที่ 28 1.26 รูปที่ 28 (control) and 29 (กล้วยน้ำว้า) รูป a กับ b เป็นรูปเดียวกัน โดยใช้กำลังขยาย 10x และ 20x ของภาพเดียวกัน แต่ในรูปที่ 30 (กล้วยไข่) และ 31 (vit C) รูป a กับ b เป็นคนละรูปกัน และใช้กำลังขยาย 20x, 40x ของภาพที่แตกต่างกัน ผู้วิจัยควรระบุเหตุผลด้วยว่า ทำไม รูปที่ 30 และ 31 ใช้รูปภาพ a และ b ที่แตกต่างกัน 1.27 รูปที่ 28-31 คำอธิบายได้รูป ควรใส่ไว้ด้วยว่า ลูกศรสีแดง คืออะไร เช่น รูปที่ 30 คือ Epidermal hyperplasia (a) แต่รูป b ก็มีลูกศรสีแดงอีก ไม่แน่ใจ	ที่สุด. ขอขอบคุณ ผู้ทรงคุณวุฒิ สำหรับคำชี้แนะ ดำเนินการแก้ไขแล้ว ในหน้าที่ 36-37 ลูกศรสีน้ำเงิน แทน ตุ่มนูนของเนื้องอก และรอยแผล ลูกศรสีแดง แทนรอยเหี่ยวย่นและร้อรอย หยาบกร้าน ผลการทดลองจากงานวิจัยที่อ้างอิง ref. 30 สกัดด้วยสุกด้วย 50% ethanol แต่เนื่องจากในระหว่างที่คณะผู้ทำวิจัยดำเนินการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในกล้วยนั้น อยู่ในช่วงฤดูฝน ทำให้การสกัดกล้วยดังที่งานวิจัยที่อ้างอิง ให้ผลการทดลองที่ไม่ดีเท่าที่ควร ดังนั้นจึงมีการนำกล้วยไปทำแห้ง เพื่อกำจัดปริมาณน้ำ (water content) ในผลกล้วยออก แล้วจึงนำมาวิเคราะห์ปริมาณสารที่ต้องการ ดำเนินการเพิ่มเติมผลการทดลองในภาคผนวกหน้า 56-61 ดำเนินการแก้ไขแล้ว ดำเนินการแก้ไขแล้ว ในหน้าที่ 41-44 ดำเนินการแก้ไขแล้ว ดำเนินการแก้ไข และระบุลูกศรสีน้ำเงินบ่งชี้ตำแหน่งของการเกิด keratinocyte hyper-proliferation และการแพร่กระจาย	
---	--	--

ว่าเป็น epidermal hyperplasia มีรูปที่ 31 a ลูกศรสีแดงคือ acanthosis (ข้างล่าง) และลูกศรสีแดง ข้างบน คืออะไร 1.28 หน้า 44 ไม่มีรูป standard curve of glutathione ควรใส่รูปภาพของ standard curve พร้อมทั้งหาสมการ และค่า R-square 1.29 หน้า 44 รูปที่ 32 *, **, *** ควรระบุด้วยว่าอะไรเปรียบเทียบกับอะไร เช่น control vs. namwa 1.30 หน้า 45 ตารางที่ 3 ตัดคำว่า H&E staining ทิ้ง และชื่อกลุ่ม ควรเปลี่ยนเป็นภาษาไทย และตารางที่ 3 ก็แสดงเฉพาะภาพจากหนูตัวเดียว ดังนั้น ควรแสดงภาพของหนูที่เหลืออีก 4 ตัว อาจใส่ไว้ในภาคผนวก 1.31 หน้า 45 ชื่อ Abs ที่ใช้เป็นคนละชนิดกับ ที่ระบุไว้ใน 1.5 antibodies หน้า 10 เช่น หน้า 45 ใช้ affinity-purified goat polyclonal COX-2 antibody แต่ในหน้า 10 ใช้เป็น catalog number ab15191 ซึ่งเป็น rabbit polyclonal 1.32 หน้า 45 ผู้วิจัยแน่ใจได้อย่างไรว่า สีที่เกิดขึ้น เช่น สีเขียว และสีแดง นั้น ไม่ใช่ non-specific binding ได้มีการทำการ staining โดยไม่ใช้ 1st Abs แต่ใช้ 2nd Abs เพียงอย่างเดียวหรือไม่ ยกตัวอย่างเช่น 1. No antibody 2. 1st Abs only (negative control) 3. 2nd Abs only (negative control) 4. 1st Abs + 2nd Abs ถ้าได้ทำ ควรระบุไว้ในผลการทดลอง หรือในภาคผนวกก็ได้ 1.33 หน้า 47, 49 รูปที่ 33-34 *, **, *** ควรระบุด้วยว่า อะไรเปรียบเทียบกับอะไร เช่น control vs. namwa และควรระบุได้รูปภาพด้วยว่า *, ** คือ $p < 0.05$ หรือ < 0.01 1.34 หน้า 51 สองบรรทัดสุดท้าย “ทั้งนี้ การชะลอการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งอาจเนื่องมาจากสารสำคัญที่อยู่ในกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่ เช่น กรด	ดงสู่ชั้น dermis และลูกศรสีแดง บ่งชี้ตำแหน่งของ acanthosis เพิ่ม รูป 3.2 glutathione standard reference curve ในหน้าที่ 46 ดำเนินการระบุแล้ว ดำเนินการแก้ไขแล้วและเพิ่มภาพถ่ายการแสดงออกของ 4-HNE และ COX-2 ในผิวหนังหนูกทดลองทั้ง 5 ตัว ในภาคผนวกหน้า 62-71 ดำเนินการแก้ไขชนิดของแอนติบอดีที่ใช้ดังนี้ - anti-COX2/cyclooxygenase 2 antibody (ab15191). - anti-4-hydroxynonenal antibody (ab46545) ทำการเพิ่มภาพถ่ายการตรวจวัดปริมาณ 4-HNE และ COX-2 ด้วยเทคนิค immunofluorescence staining โดยใช้ secondary antibody ในการย้อมเพียงอย่างเดียว เพื่อเป็น negative control ภาพแสดงในภาคผนวก หน้า 62-71 ดำเนินการแก้ไขแล้ว ขอขอบคุณ ผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ได้ให้คำชี้แนะ และได้ทำการแก้ไขเนื้อหาให้หน้าที่ 53 ว่า “การชะลอการแพร่กระจายของ	
--	--	--

แลกติก คาเทชินและเบต้า-แคโรทีน มีบทบาทมากกว่าวิตามินซี” ผู้วิจัยสรุปจากผลการทดลอง แบบนี้ไม่น่าจะได้ เนื่องจาก ไม่สามารถหาปริมาณกรดแลกติกและคาเทชิน ในตัวอย่างกล้วยทั้งสอง และสารเบต้า-แคโรทีน ก็พบมากเฉพาะกล้วยไข่ ดังนั้น น่าจะมีสารสำคัญอื่นๆ อีก ที่ผู้วิจัยยังไม่ได้วิเคราะห์ ซึ่งน่าจะมีฤทธิ์ช่วยชะลอการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง 1.35 หน้า 52 ข้อ 2.3 ยกตัวอย่างชนิดของเอนไซม์ได้มัย และสารสำคัญอะไรที่พบในกล้วย ที่จะเปลี่ยนไปเป็น active form	เซลล์มะเร็งอาจเนื่องมาจากสารสำคัญที่อยู่ในกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่ มีบทบาทต่อกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอหรือกระบวนการพัฒนาของเซลล์มะเร็ง ได้ดีกว่าวิตามินซี ซึ่งสารสำคัญนี้อาจจะเป็นสารสำคัญอื่นๆ ที่มีฤทธิ์ช่วยชะลอการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง นอกเหนือจาก กรดแลกติก คาเทชิน และเบต้า-แคโรทีน มีรายงานการศึกษา ระบุว่า ในผลกล้วยมีสารกลุ่ม non-starch polysaccharide [67-68] และ มีการศึกษาที่บ่งชี้ว่าสารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ต้านการเกิดเนื้องอก [69, 70, 71].” ทำการยกตัวอย่างชนิดของเอนไซม์ในหน้าที่ 54 “ได้แก่ β-glucuronidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในการเปลี่ยน inactive metabolite ของสารในกลุ่ม flavonoids (flavonoid glucuronides) ให้ อยู่ใน active form (deconjugate flavonoid glucuronides) [72].”	
2. ควรแก้ไขด้านวิชาการ 1. “บทคัดย่อ” ควรระบุด้วยว่า กล้วยทั้งสองชนิดที่นำมาใช้เป็น “กล้วยสุก” 2. “Abstract” ควรระบุด้วยว่า กล้วยทั้งสองชนิดที่นำมาใช้เป็น “กล้วยสุก” ไว้ตั้งแต่แรก โดยย้ายคำว่า “ripe” ในบรรทัดที่ 11 มา 3. “ระเบียบวิธีวิจัย” หัวข้อ “1.5 Antibodies” หน้า 10 บรรทัดที่ 8 และ 9 ยังเติมข้อมูลไม่ครบ “ABCAM, “ 4. “ผลการทดลอง” ไม่ได้เปรียบเทียบปริมาณ gallic acid และ catechin ที่มีในกล้วยทั้งสองชนิดออกมาเป็นตัวเลข (โดยมีเหตุผลว่ามีปริมาณน้อยเกินคือน้อยกว่า 0.1 มก./มล.) จะมีวิธีการใดที่มีความไวมากกว่า HPLC ที่เลือกใช้ในการศึกษานี้หรือไม่? หรืออาจสกัดให้ได้สารที่เข้มข้นขึ้นได้หรือไม่? 5. “ผลการทดลอง” ที่ระบุเป็น “ตารางที่ 3” หน้า 45 หากระบุเป็น “รูปที่...” น่าจะเหมาะสมกว่า เพราะ	ดำเนินการแก้ไขแล้ว ดำเนินการแก้ไขแล้ว ดำเนินการเพิ่มเติมข้อมูลแล้ว (ABCAM, Cambridge, UK) ได้ทำการอธิบายเพิ่มเติมในหน้าที่ 31 เรียบร้อยแล้ว	☐ ชี้แจงได้กระจ่างและเห็นชอบตามคำชี้แจงของนักวิจัย ☐ ชี้แจงไม่กระจ่าง และให้ความเห็นไม่ได้ ☐ ส่งให้ผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาใหม่แล้ว และผู้ทรงคุณวุฒิเห็นชอบด้วยแล้ว ☐ นักวิจัยแก้ไขตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ

จะสอดคล้องกับความเป็นจริงที่เป็นรูปภาพ 6. “ผลการทดลอง” ตรงคำอธิบาย “รูปที่ 32” หน้า 44 ควรเพิ่มเติมรายละเอียดด้วยว่า “ในหนูที่เหนียวทำให้เกิดมะเร็งผิวหนังนาน 16 สัปดาห์ที่ไม่ได้รับ (control) เทียบกับที่ได้รับกล้วยหรือวิตามินซี”	ดำเนินการแก้ไขรูปภาพผลการทดลองแล้ว ดำเนินการแก้ไขแล้ว	
3. ควรแก้ไขด้านทั่วไป 3.1 ควรเว้นช่องระหว่างคำภาษาไทยกับภาษาอังกฤษ, ตัวอักษรกับตัวเลข, ตัวอักษรกับวงเล็บ ฯลฯ เช่น “7.5%Na₂CO₃” (หน้า 12 บรรทัดที่ 6 จากล่าง); “ดังนี้0.001” (หน้า 18 บรรทัดที่ 5); “ความเข้มข้น0.2 มิลลิโมลาร์” (หน้า 18 บรรทัดที่ 12); “1.4%TBA” (หน้า 18 บรรทัดที่ 6 จากล่าง); “8%HCl” (หน้า 18 บรรทัดที่ 5 จากล่าง); “กล้วยน้ำว้าแห้ง (Musa....)” (หน้า 28 บรรทัดที่ 2 จากล่าง) 3.2 แก้ไขคำผิดทั่วไป มีหลายแห่ง เช่น - “pharmaceuticals ,” (หน้า 10 บรรทัดที่ 2) แก้เป็น “Pharmaceuticals,”; “nembutal®” (หน้า 10 บรรทัดที่ 6) แก้เป็น “Nembutal®”; “เส้นผ่าศูนย์กลาง” (หน้า 10 บรรทัดสุดท้าย) แก้เป็น “เส้นผ่านศูนย์กลาง”; “whatman” (หน้า 13 บรรทัดที่ 14) แก้เป็น “Whatman”; “อะซิโตไนไตรท์” (ทุกแห่ง เช่น หน้า 15,16) แก้เป็น “อะซิโตไนไตรล์”; “ตัวทะลาย” (หน้า 16 บรรทัดที่ 6 จากล่าง) แก้เป็น “ตัวทำละลาย (?)”; “[56, 57]]” (หน้า 18 บรรทัดที่ 2) แก้เป็น “[56, 57]”; “สายพันธ์” (หน้า 22 บรรทัดที่ 6) แก้เป็น “สายพันธุ์”; “หนูทดลองทย” (หน้า 23 ตรงคำอธิบายรูปที่ 9 และสารบัญรูปในหน้า XIII); “ปรากฏ” (หน้า 29 บรรทัดที่ 6) แก้เป็น “ปรากฏ”; “Tritonx-100” (ทุกแห่ง เช่น หน้า 26) แก้เป็น “Triton X-100” (ให้เหมือนหน้า 9); “สารต้นอนุมูล” (หน้า 32 ตรงคำอธิบายรูปที่ 18,19 และสารบัญรูปในหน้า XIV) แก้เป็น “สารต้านอนุมูล”; “ลักษณะกายภาพ” (หน้า 35 บรรทัดที่ 1) แก้เป็น “ลักษณะกายภาพ”; “ที่ถูก” (หน้า 35 บรรทัดที่ 9) แก้เป็น “ที่ถูก”	ดำเนินการแก้ไขแล้ว ดำเนินการแก้ไขแล้ว	☐ ชี้แจงได้กระจ่างและเห็นชอบตามคำชี้แจงของนักวิจัย ☐ ชี้แจงไม่กระจ่าง ให้ความเห็นไม่ได้และ ☐ ส่งให้ผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาใหม่แล้ว และผู้ทรงคุณวุฒิเห็นชอบด้วยแล้ว ☐ นักวิจัยแก้ไขตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ

เรียน ผู้ทรงคุณวุฒิ

คณะผู้จัดรายงานฉบับนี้ ขอขอบพระคุณ คณะผู้ทรงคุณวุฒิและผู้ที่เกี่ยวข้อง ในการตรวจสอบและแนะนำแนวทางในการแก้ไข
รายงาน เพื่อให้รายงานฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ทั้งนี้ ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิจะถูกนำไปใช้เป็นแนวทางในการพัฒนา
การศึกษาที่เกี่ยวข้องในครั้งต่อไป

ด้วยความเคารพอย่างสูง

นางจรรุภา วิโชชน์
นางสาววิภาดา ศรีนาค
คณะผู้จัดทำ

แบบสรุปโครงการวิจัย (Executive Summary)

สัญญาเลขที่ RDG5820014 ชื่อโครงการ ศักยภาพของผลกล้วยไข่และน้ำว่าในการป้องกันมะเร็งผิวหนังในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยดีเอ็มบีเอและรังสียูวีบี

หัวหน้าโครงการ นางจรรุภา วิโยชน์

หน่วยงาน คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

โทรศัพท์ 055-961875 โทรสาร 055-963731 อีเมล jarupav@nu.ac.th, jarupaviyoch4@yahoo.com

ความสำคัญ / ความเป็นมา

อุบัติการณ์ผู้ป่วยโรคมะเร็งผิวหนังทั่วโลกเพิ่มมากขึ้นทุกปี โดยเฉพาะในกลุ่มคอเคเซียน (Caucasian) จำนวนผู้ป่วยจะเพิ่มร้อยละ 3 - 8 สำหรับประเทศในแถบเอเชียรวมทั้งประเทศไทยถึงแม้อุบัติการณ์จะน้อยกว่าเนื่องจากการมีสีผิวที่เข้มจะช่วยดูดซับรังสีอัลตราไวโอเลตหรือยูวี (ultraviolet ray, UV) โดยเฉพาะอย่างยิ่งยูวีบีที่เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคนี้อย่างไรก็ตามพบว่าอุบัติการณ์โรคนี้นั้นในคนไทยเพิ่มมากขึ้นทุกๆ ปี รวมทั้งประเทศไทยที่มีรายงานว่าในปี 2555 นั้นโรคมะเร็งผิวหนังอยู่ใน 15 อันดับแรกของมะเร็งที่พบในผู้ป่วยรายใหม่ (เผยแพร่โดยกลุ่มงานเทคโนโลยีสารสนเทศ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข) และมีการเผยแพร่ข้อมูลว่าพบผู้ป่วยรายใหม่ที่เป็นโรคมะเร็งผิวหนังจำ-นวน 300 - 400 รายต่อปี (ข้อมูลจาก นายแพทย์วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์ หน่วยมะเร็งวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในผู้จัดการออนไลน์ วันที่ 22 กุมภาพันธ์ 2556) ทั้งนี้เนื่องจากมลภาวะต่างๆ ที่เพิ่มมากขึ้น รวมทั้งรูปแบบการใช้ชีวิต เช่น ชนิดของอาหารที่รับประทานเปลี่ยนไป จากที่รับประทานผักและผลไม้เป็นอาหารหลัก ก็เปลี่ยนเป็นอาหารจำพวกเนื้อแดงและไขมันมากขึ้น ส่งผลให้ร่างกายไวต่อสารเหนี่ยวนำที่ทำให้เกิดมะเร็ง ร่วมกับการกระตุ้นจากแสงแดดทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีนที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคนี้นั้น มะเร็งผิวหนังบางชนิด เช่น malignant melanoma นั้นเป็นชนิดที่อันตรายและอาจทำให้เสียชีวิตได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มคนไทย

จากการศึกษาของคณะผู้วิจัยที่นำผลไม้ไทย 3 ชนิด ได้แก่ กล้วยน้ำว้าสุก กล้วยไข่สุก และมะละกอสุกซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่ปลูกกันมากในประเทศไทยมาศึกษาประสิทธิภาพในการป้องกันการเสื่อมสภาพก่อนวัยของผิวหนังอันเนื่องมาจากได้รับรังสียูวีบี (UVB) ติดต่อกัน โดยการศึกษาดังกล่าวได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ฝ่ายเกษตร (โครงการวิจัยเรื่อง “ประสิทธิภาพของเนื้อผลมะละกอและกล้วยในการป้องกันผิวหนังเสื่อมสภาพก่อนวัยเนื่องจากรังสี UVB : การศึกษาในสัตว์ทดลอง” สัญญาเลขที่ RDG5220047 และตีพิมพ์ในวารสาร Food and Chemical Toxicology, 50 (2012) 4292-4301, impact factor 2.610) นั้น ผลที่ได้พบว่าการที่หนู ICR เพศผู้ ที่ได้รับรังสียูวีบีในช่วงความยาวคลื่น 275 - 305 นาโนเมตรติดต่อกันเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ มีระดับของกลูตาไธโอน (glutathione) ที่ผิวหนังเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มหนูที่ไม่ได้รับรังสียูวีบี ร่วมกับการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของผิวหนัง ได้แก่ ริ้วรอยที่เพิ่มขึ้นและความยืดหยุ่นที่ลดลง การได้กินผลไม้สุก ได้แก่ กล้วยไข่สุกที่ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน หรือวิตามินซีในขนาด 50 มิลลิกรัมต่อวัน นอกจากจะช่วยรักษาสภาพและคุณสมบัติของผิวหนังแล้ว ยังช่วยรักษาระดับของกลูตาไธโอนในผิวหนังให้ไม่แตกต่างจากระดับของกลูตาไธโอนที่พบในผิวหนังหนูที่ไม่ได้รับรังสียูวีบี อย่างไรก็ตาม หนูที่ได้รับกล้วยน้ำว้าสุกในปริมาณที่เท่ากับกล้วยไข่ไม่ส่งผลในการป้องกันผิวหนังจากรังสีและไม่ช่วยรักษาระดับกลูตาไธโอนใน

ผิวหนัง จากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลทั้งหมดที่มีอยู่ในเนื้อผลไม้โดยใช้ Folin-Ciocalteu's reagent ผลที่ได้พบว่า สารสกัด (ใช้เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 50) จากกล้วยไข่สุกและน้ำว่าสุกมีปริมาณฟีนอลเท่ากับ 30.48 ± 0.54 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของเนื้อผลไม้สดและ 14.41 ± 0.50 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของเนื้อผลไม้สด ตามลำดับ ใน ส่วนของการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยใช้ DPPH assay ซึ่งแสดงค่าในรูปของ EC_{50} (ความเข้มข้นของสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านการเกิดออกซิเดชันโดย free radical scavenging เท่ากับร้อยละ 50) พบว่า สารสกัดจากผลกล้วยไข่สุกและกล้วยน้ำว่าสุกมีค่า EC_{50} เท่ากับ 16.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 108.3 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าผลกล้วยไข่สุกและกล้วยน้ำว่าสุกมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่าง กัน และความแตกต่างนี้มีผลต่อประสิทธิภาพในการป้องกันอันตรายจากผิวหนังที่ได้รับรังสียูวีบี รวมทั้งการรักษา ระดับกลูตาไธโอนที่ผิวหนัง

กลูตาไธโอนเป็นชีวโมเลกุลที่มีฤทธิ์ต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ที่ร่างกายสังเคราะห์ขึ้นมา ได้ รวมทั้งเกี่ยวข้องในกระบวนการทางชีววิทยาต่างๆ เช่น การแสดงออกของยีน การตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) และการนำพาสารอินทรีย์เข้าหรือออกจากเซลล์ ทั้งนี้ในเซลล์นั้นกลูตาไธโอนจะมีอยู่ 2 สถานะ คือใน รูปที่ถูกออกซิไดซ์ (oxidized form, GSSG) หรือในรูปที่ถูกรีดิวซ์ (reduced form, GSH) การรักษาให้ปริมาณกลู ทาไธโอนในรูปที่ถูกรีดิวซ์และออกซิไดซ์อยู่ในสัดส่วนที่เหมาะสม มีความสำคัญต่อการอยู่รอดของเซลล์ มีการศึกษาที่ แสดงให้เห็นความสำคัญของกลูตาไธโอนในการป้องกันการสะสมของอนุมูลอิสระและผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยา ออกซิเดชัน ซึ่งการสะสมสิ่งเหล่านี้เป็นการเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดโรค เช่น มะเร็งมากขึ้นเมื่อได้รับสิ่งกระตุ้น ด้วยเหตุนี้โครงการวิจัยนี้ จึงมีความสนใจที่จะศึกษาผลของการรับประทานกล้วยไข่ต่อการป้องกันมะเร็งผิวหนังที่ถูก เหนี่ยวนำด้วยรังสียูวีบี โดยการศึกษานี้จะทำการศึกษาในสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งผิวหนังด้วยสารเคมี ร่วมกับการได้รับรังสียูวีบี และได้รับกล้วยไข่สดโดยการให้ทางปาก (oral administration) ในปริมาณ 1 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กรัมต่อวัน เป็นเวลา 4 เดือน แล้วทำการประเมินขนาดของเนื้องอก (tumor) และการแสดงออก ของโปรตีน 4-hydroxynonenal (4-HNE) และ cyclooxygenase enzyme (COX-2) ที่ผิวหนังซึ่งมีบทบาทสำคัญ ต่อการเกิดเนื้องอกที่ผิวหนัง โดยทำการเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับกล้วยน้ำว่าในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กรัม และวิตามินซีในขนาด 50 มิลลิกรัมต่อวัน ร่วมกับการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี โดยมีสมมติฐานคือ หากหนู ได้รับผลไม้ที่มีสารกลุ่มฟีนอลต่ำ (เช่น กล้วยน้ำว่า) อาจจะทำให้พบชีวโมเลกุลที่เป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาออกซิเด-ชัน เช่น 4-HNE และสารสื่ออักเสบ COX-2 ในผิวหนังที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งในปริมาณที่สูง ร่วมกับการเกิดเนื่อ งอก ในทางตรงกันข้ามหากได้รับผลไม้ที่มีสารกลุ่มฟีนอลสูง (เช่น กล้วยไข่) ก็อาจจะพบชีวโมเลกุลดังกล่าวในผิวหนัง ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งในปริมาณไม่แตกต่างจากระดับที่พบในหนูปกติและไม่มีเนื้องอกปรากฏ ผลที่ได้จาก การศึกษานี้จะเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เชิงลึก ที่สามารถนำไปใช้เพื่อส่งเสริมการบริโภคผลไม้ไทยทั้งภายใน ประเทศและต่างประเทศ และเป็นการเพิ่มคุณค่าของผลไม้ไทยให้ได้รับความสนใจทั่วโลก ส่งผลต่อเศรษฐกิจของ ประเทศในทางอ้อม

วัตถุประสงค์ของโครงการ

วัตถุประสงค์หลัก

เพื่อประเมินประสิทธิภาพของเนื้อผลกล้วยไข่สุกในการป้องกันมะเร็งผิวหนัง ที่เกิดจากการได้รับรังสียูวีบี ต่อเนื่อง รวมทั้งกลไกในการป้องกัน

วัตถุประสงค์เชิงพฤติกรรม

1. เปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมี เช่น gallic acid, catechins และ beta-carotene ที่พบในกล้วยไข่ และกล้วยน้ำว้า
2. เปรียบเทียบการป้องกันการเกิดเนื้องอก ที่ผิวหนังหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งผิวหนังโดยได้รับสารกระตุ้นและรังสียูวีบี ร่วมกับได้รับกล้วยไข่สุก กล้วยน้ำว้าสุก หรือวิตามินซี
3. เปรียบเทียบปริมาณของกลูตาไธโอนทั้งที่อยู่ในรูปที่ถูกรีดิวซ์และออกซิไดซ์ ในผิวหนังหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งผิวหนังโดยได้รับสารกระตุ้นและรังสียูวีบี ร่วมกับได้รับกล้วยไข่สุก กล้วยน้ำว้าสุก หรือวิตามินซี
4. เปรียบเทียบปริมาณของสารที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งผิวหนัง ได้แก่ 4-HNE และ COX-2 ในผิวหนังหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งผิวหนังโดยได้รับสารกระตุ้นและรังสียูวีบี ร่วมกับได้รับกล้วยไข่สุก กล้วยน้ำว้าสุก หรือวิตามินซี

ผลการวิจัย

เริ่มจากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่มีอยู่ในสารสกัดจากผลกล้วยสุกทำแห้ง โดยใช้ Folin-Ciocalteu's reagent พบว่าสารสกัดจากกล้วยน้ำว้าสุกทำแห้งมีปริมาณฟีนอลิกเท่ากับ 46.06 ± 3.80 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของเนื้อผลไม้แห้ง สารสกัดจากกล้วยไข่สุกทำแห้งมีปริมาณฟีนอลิก 126.14 ± 4.01 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของเนื้อผลไม้แห้ง และสำหรับปริมาณ β -carotene นั้น พบว่าในกล้วยไข่มีปริมาณ β -carotene 56.57 ไมโครกรัมต่อ มิลลิกรัม

ในส่วนของการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากผลกล้วยสุกทำแห้ง โดยใช้ DPPH assay ซึ่งแสดงค่าในรูปของ EC50 (ความเข้มข้นของสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านการเกิดออกซิเดชัน โดย free radical scavenging เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์) พบว่าสารสกัดจากกล้วยน้ำว้าสุกทำแห้งมีค่า EC50 เท่ากับ 4.03 ± 0.82 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากกล้วยไข่สุกทำแห้งมีค่า EC50 เท่ากับ 0.17 ± 0.01 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร

สำหรับการศึกษาผลของศักยภาพของผลกล้วยไข่และน้ำว้า ในการป้องกันมะเร็งผิวหนังในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย ดีเอ็มบีเอและรังสียูวีบี ซึ่งเป็นการศึกษาในสัตว์ทดลอง โดยใช้หนูสายพันธุ์ ICR เพศผู้ ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งผิวหนังด้วยสารก่อมะเร็ง DMBA ร่วมกับที่ได้รับแสง UVB เป็นเวลา 16 สัปดาห์ ตามลำดับความเข้มแสงที่กำหนด พร้อมกับได้รับน้ำเปล่า วิตามินซี หรือผลกล้วยน้ำว้าสุก กล้วยไข่สุก พบว่า ระดับความหนาของชั้นหนังกำพร้าหรือ epidermis ของหนูทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับรังสียูวีบี (normal) ไม่มีความผิดปกติของชั้นผิวหนังและการแบ่งตัวของเซลล์ผิวหนัง ในขณะที่หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสารก่อมะเร็งและรังสียูวีบี มีความผิดปกติของการแบ่งเซลล์

ในชั้น epidermis รวมทั้งความหนาของชั้น epidermis ที่ไม่สม่ำเสมอ คือกล่าวได้ว่าเกิด epidermal hyperplasia เป็นจุดๆ และบางจุดที่เกิดมีการแพร่กระจายของเซลล์ keratinocyte จากชั้น epidermis ลงสู่ชั้น dermis ซึ่งเป็นการบ่งบอกว่าการแบ่งตัวอย่างมากของเซลล์ จากความผิดปกติของเซลล์ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ และนำไปสู่การเกิดมะเร็งผิวหนังในที่สุด และจากผลการศึกษาปริมาณ 4-HNE และ COX-2 เป็นชีวโมเลกุลที่บ่งบอกว่าเกิดการพัฒนาของเซลล์ปกติเป็นเซลล์มะเร็ง เนื่องจากการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันอย่างต่อเนื่องด้วยรังสียูวีบี และทำให้เกิดการสะสมของสารสื่อการอักเสบในผิวหนัง ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งผ่านทาง DNA damage และการตอบสนองต่อเซลล์มะเร็งที่แบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณของ 4-HNE และ COX-2 มีการแสดงออกในกลุ่มหนูทดลองที่ได้รับสารก่อมะเร็งร่วมกับการฉายรังสียูวีบีสูงกว่ากลุ่ม normal และพบว่าการได้รับกลัยน่าว่า กลัยไซ และวิตามินซี ไม่มีผลต่อการลดการแสดงออกของ 4-HNE และ COX-2 ในผิวหนัง ในขณะที่ผลของการศึกษาระดับกลูตาไธโอนทั้งหมดในผิวหนังกลับพบว่า หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับวิตามินซีมีการรักษาระดับของปริมาณกลูตาไธโอนในผิวหนังให้สมดุลเทียบเท่ากับกลุ่ม normal และระดับกลูตาไธโอนที่ตรวจวัดได้มีปริมาณสูงกว่ากลุ่ม control และกลุ่มที่ได้รับกลัยน่าว่าและกลัยไซ อย่างไรก็ตาม ถึงแม้วิตามินซีจะสามารถช่วยรักษาระดับกลูตาไธโอนในผิวหนังของหนูทดลองได้ แต่ก็ไม่สามารถชะลอหรือยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งได้ เนื่องจากกลูตาไธโอนเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายสร้างขึ้นเองโดยธรรมชาติเพื่อป้องกันอันตรายจากสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากการได้รับรังสียูวีบี แต่วิตามินซีไม่สามารถช่วยชะลอการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งได้ ดังที่พบว่า atypical nuclei เกิดขึ้นในชั้น dermis ของหนูกลุ่มที่ได้รับมาวิตามินซี กว่าหนูทดลองกลุ่มอื่นๆ ในขณะที่หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับกลัยน่าว่าและกลัยไซมีการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งที่น้อยกว่า นั้นแสดงว่าสารสำคัญที่อยู่ในกลัยทั้ง 2 ชนิดมีผลต่อการชะลอการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง แต่อย่างไรก็ตาม กลัยน่าว่าและกลัยไซก็ยังไม่มีความสมบูรณ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ทั้งนี้ อาจอธิบายได้ว่าเกิดจากการที่หนูได้รับสารสำคัญที่มีอยู่ในกลัยพร้อมกับการเริ่มการฉายรังสียูวีบีที่ผิวหนังหนูหลังจากที่เกิด DNA damage (อันเนื่องมาจากการทา DMBA ที่มีคุณสมบัติทำให้เกิด DNA adducts ภายในสาย DNA) แล้ว ซึ่งรังสียูวีบีนั้นสามารถทำให้เกิด DNA damage ได้เช่นกัน และการได้รับรังสียูวีบีอย่างต่อเนื่อง ส่งผลทำให้การซ่อมแซม DNA ไม่สามารถทำได้อย่างสมบูรณ์ การเกิดการสะสมเซลล์ที่ DNA damage นี้ เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบและหลั่งสารสื่อการอักเสบออกมาอย่างต่อเนื่อง ดังนั้น ถึงแม้ว่าหนูจะได้รับสารสำคัญในกลัยที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสะสมของอนุมูลอิสระทุกวัน ก็ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงเซลล์มะเร็งที่เกิดการกลายพันธุ์และไม่สามารถควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์เหล่านี้ได้ อย่างไรก็ตาม เป็นที่น่าสนใจที่พบว่า กลัยน่าว่าและกลัยไซสามารถชะลอและ/หรือลดการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งและชะลอการแสดงออกที่บ่งบอกการเป็นมะเร็ง เช่น การเกิด atypical nuclei ได้ดีกว่าวิตามินซี รวมทั้งลักษณะทางกายภาพของผิวหนัง จะเห็นได้ว่ากลัยน่าว่าและกลัยไซสามารถชะลอการเกิด skin aging ได้ดีกว่าวิตามินซี

ดังนั้น จากผลการทดลองกล่าวได้ว่า หนูทดลองที่ได้รับกลัยน่าว่าและกลัยไซ มีแนวโน้มชะลอการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งผิวหนังได้ดีกว่าวิตามินซี เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษการจัดเรียงตัวของเซลล์ epidermis โดยการย้อมสี H&E แต่การได้รับกลัยน่าว่าและกลัยไซไม่สามารถรักษามะเร็งผิวหนังที่เกิดขึ้นได้ ทั้งนี้การชะลอการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งอาจเนื่องมาจากสารสำคัญที่อยู่ในกลัยน่าว่าและกลัยไซ เช่น กรดแกลลิก คาเทชิน

และเบต้า-แคโรทีน มีบทบาทมากกว่าวิตามินซี

คำสืบค้น (Keywords)

ภาษาไทย: มะเร็งผิวหนัง, สารก่อมะเร็งดีเอ็มบีเอ, รังสียูวีบี, กลัวยไข่, กลัวยน้ำว้า

ภาษาอังกฤษ: Skin cancer, 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA), Ultraviolet B, Khuai Khai, Khuai Namwa

การนำผลงานวิจัยมีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ ด้านสาธารณะ

ผลที่ได้จากการศึกษานี้อาจจะนำไปใช้เป็นหลักฐานที่ชี้ให้เห็นประโยชน์ของผลไม้ไทย ในการป้องกันผิวหนังถูกทำลายหรือโรคอันตราย อันเนื่องมาจากการได้รับรังสียูวีบีอย่างต่อเนื่อง

หน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ และใช้ประโยชน์ด้านไหน

หน่วยงานของรัฐและเอกชน ที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการส่งออกผลไม้ไทย

การประชาสัมพันธ์

1. สิ่งพิมพ์ทั่วไป -
2. สิ่งพิมพ์ทางวิชาการ -