การศึกษาผลของสารเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกต่อนิวโตรฟิลและเม็ดเลือดแดงของผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD

Effects of Curcuminoids and Their Analogs on Neutrophils and Erythrocytes in G6PD-deficient Patients

ดวงมณี แสนมั่น
อภิชาต สุขสำราญ
ชัชวาลย์ ช่างทำ
สราวุธ สายจันมา
สุชา จุลสำลี
พรสุรี พงษ์สุชาติ

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ปีการศึกษา 2555

ชื่อเรื่อง : การศึกษาผลของสารเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกต่อนิวโตรฟิลและเม็ดเลือดแดงของผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD

ผู้วิจัย : ดวงมณี แสนมั่น อภิชาต สุขสำราญ ชัชวาลย์ ช่างทำ สราวุธ สายจันมา สุชา จุลสำลี พรสุรี พงษ์สุชาติ

สถาบัน : มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

ปีที่พิมพ์ : 2558

สถานที่พิมพ์ : มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

แหล่งที่เก็บรายงานฉบับสมบูรณ์ : มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

จำนวนหน้างานวิจัย : 79 หน้า

คำสำคัญ : สารต้านอนุมูลอิสระ เคอร์คิวมินอยด์ เม็ดเลือดแดง ภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD นิวโตรฟิล

ลิขสิทธิ์ : มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารเคอร์คิวมินอยด์สามชนิด ได้แก่ curcumin (C1), demethoxycurcumin (C2) และ bis-demethoxycurcumin (C3) และแอนะล็อกสองชนิด คือ di-*O*-demethylcurcumin (C4) และ mono-*O*-demethylcurcumin (C5) ในการยับยั้งออกซิเดชันของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง และได้ศึกษาสาร C1 และ C3 ต่อการทำงานของเม็ดเลือดขาวนิวโตรฟิลในเลือดผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD โดยเปรียบเทียบการออกฤทธิ์ของสารประกอบแต่ละชนิดต่อการยับยั้งเมทฮีโมโกลบิน การแตกเม็ดเลือดแดง และการพร่องรีดิวซ์กลูตาไธโอน และประเมินการทำงานของนิวโตรฟิลด้วยการนับจำนวนเซลล์ที่รีดิวซ์ nitroblue tetrazolium (NBT) ผลการวิจัยพบว่าที่ความเข้มข้น 40 μM สารทั้งห้าชนิดสามารถยับยั้งการเกิดเมทฮีโมโกลบินที่เหนี่ยวนำด้วย sodium nitrite ได้มากกว่าร้อยละ 39 ส่วนฤทธิ์ต้านการแตกของเม็ดเลือดแดงเมื่อเหนี่ยวนำด้วย 2,2'-azobis (2-methypropionamidine) dihydrochloride (AAPH) พบว่า สาร C5 และ C4 ออกฤทธิ์ดีที่สุด รองลงมาคือ C2, C3 และ C1 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกเหล่านี้ไม่สามารถลดการพร่องรีดิวซ์กลูตาไธโอนได้ นอกจากนี้ยังพบว่านิวโตรฟิลทำงานได้ดีขึ้นเมื่อใช้สาร C1 กระตุ้นร่วมกับ phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) โดยร้อยละเซลล์รีดิวซ์ NBT เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเซลล์ที่กระตุ้นด้วย PMA อย่างเดียว (P=0.043) แสดงว่าสารสกัดจากขมิ้นชันและเคอร์คิวมินอยด์ แอนะล็อกช่วยลดความเครียดออกซิเดชันในเม็ดเลือดแดงและทำให้เม็ดเลือดขาวทำลายเชื้อโรคได้ดีขึ้นในผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD

คำสำคัญ: สารต้านอนุมูลอิสระ เคอร์คิวมินอยด์ เม็ดเลือดแดง ภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD
เม็ดเลือดขาว

Research Title : Effects of curcuminoids and their analogs on neutrophils and erythrocytes in G6PD-deficient patients

Researchers : Duangmanee Sanmun, Apichart Suksamrarn, Chatchawan Changtam, Sarawut Saichanma, Sucha Julsomlee, Pornsuri Pongsuchart

Institution : Huachiew Chalermprakiet Univeristy

Year of Publication : 2015

Publisher : Huachiew Chalermprakiet University

Sources : Library of Huachiew Chalermprakiet University

No. of Pages : 79 pages

Keywords : antioxidant, curcuminoids, erythrocyte, G6PD-deficiency, neutrophil

Copyright ; Huachiew Chalermprakiet University

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effect of three kinds of curcuminoids: curcumin (C1), demethoxycurcumin (C2), bis-demethoxycurcumin (C3) and two kinds of analogs: di-*O*-demethylcurcumin (C4) and mono-*O*-demethylcurcumin (C5) on inhibition of hemoglobin oxidation in erythrocytes and to investigate the effect of compound C1 and C3 on G6PD-deficient neutrophils. This study compared the efficiency of each type of compounds on inhibition of methemoglobin formation, oxidative hemolysis, reduced glutathione depletion, and evaluating neutrophil function by nitroblue tetrazolium (NBT) method. The results showed that all five compounds at 40 μM concentration could inhibit sodium nitrite-induced methemoglobin formation by more than 39%. C5 and C4 were found to be the most efficient in inhibition of oxidative hemolysis induced by 2,2'-azobis(2-methypropionamidine) dihydrochloride (AAPH) followed by C2, C3, and C1 respectively. However, none of curcuminoids and analogs could prevent reduced glutathione depletion. Moreover, neutrophil functioned better when stimulated with compound C1 while co-treated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). Neutrophil reduced nitroblue tetrazolium (NBT) was significantly increased upon co-treatment with compound C1 as compared to treatment

with PMA alone (*P*=0.043). These findings indicate that turmeric extracts and curcuminoid analogs are effective in reducing oxidative stress in erythrocytes and perhaps useful in improving killing mechanism of neutrophils in G6PD deficiency.

Key words: antioxidant, curcuminoids, erythrocyte, G6PD-deficiency, neutrophil

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความร่วมมือของคณะผู้วิจัยและผู้เกี่ยวข้องหลายท่าน ขอขอบคุณ ผู้บริหาร คณาจารย์ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ที่คอยติดตามความก้าวหน้าด้านการวิจัย ช่วยสนับสนุนด้านเครื่องมือและสถานที่ อีกทั้งยังช่วยแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างดำเนินงาน และขอบคุณนักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ที่เข้าร่วมโครงการวิจัยและบริจาคเลือดเพื่อใช้ในการทดลอง นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณครอบครัวตลอดจนบุคคลท่านอื่นที่ไม่ได้เอ่ยนาม ที่คอยเป็นกำลังใจและมีความปรารถนาดีเสมอมา

ความดีที่เกิดจากงานวิจัยนี้ ขอมอบแด่อาจารย์ทุกท่านที่ได้ถ่ายทอดประสบการณ์ให้แก่ผู้วิจัย คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าองค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาพืชสมุนไพรขมิ้นชันจะเป็นประโยชน์ต่อกลุ่มผู้ผลิต ผู้บริโภค ผู้ที่ต้องการส่งเสริมสุขภาพด้วยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ และมีคุณค่าต่อการนำไปใช้ในการสาธารณสุขมูลฐานของประเทศไทย

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ที่อุดหนุนทุนวิจัยปีงบประมาณ 2555 จนงานวิจัยฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ดวงมณี แสนมั่น และคณะ ฯ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูปภาพ	ช
อักษรย่อ	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
ขอบเขตของการวิจัย	3
นิยามศัพท์เฉพาะ	4
สมมติฐานของการวิจัย	5
ประโยชน์ของผลการวิจัย	5
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	6
เม็ดเลือดแดง	6
ฟาโกไซโทซิสในเม็ดเลือดขาว (Phagocytosis in white blood cells)	8
ภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD (Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency)	9
อนุมูลอิสระและภาวะเครียดออกซิเดชัน	11
สรรพคุณทางยาของสมุนไพรขมิ้นชัน	11
การใช้ยาสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติ	13
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	14
กรอบแนวคิดในการวิจัย	14
น้ำยา/ สารเคมี และวัสดุ/ อุปกรณ์	16

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
วิธีดำเนินการวิจัย	17
บทที่ 4 ผลการวิจัย	22
การทดสอบประสิทธิภาพของเคอร์คิวมินและแอนะล็อกต่อการยับยั้งเมทฮีโมโกลบิน	22
การทดสอบฤทธิ์ของเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกต่อการยับยั้งเมทฮีโมโกลบินที่ความเข้มข้น 40 µM	25
การเปลี่ยนแปลงของเมทฮีโมโกลบินและออกซีฮีโมโกลบินในสารละลายน้ำฮีโมโกลบิน	27
การทดสอบประสิทธิภาพของเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกต่อการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดง	31
การทดสอบประสิทธิภาพของเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกต่อการป้องกันการพร่องกลูตาไธโอน	37
การทดสอบประสิทธิภาพของเคอร์คิวมินและแอนะล็อกต่อการทำงานของนิวโตรฟิลด้วยวิธี NBT	39
บทที่ 5 อภิปรายผล	45
บทที่ 6 สรุปผล	51
บรรณานุกรม	53
ภาคผนวก	59
ก. สารเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกชนิดต่าง ๆ ที่นำมาใช้ในการศึกษาวิจัย	
ข. สรรพคุณและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อก	
ค. ภาพประกอบนิวโตรฟิลรีดิวซ์สี NBT	
ง. เอกสารรับรองโดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย	
จ. ประวัติย่อคณะผู้วิจัย	

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

1. ค่าเมทฮีโมโกลบินที่เปลี่ยนแปลงเมื่อ pretreat hemolysate ด้วยสารเคอร์คิวมินอยด์ (C1, C2, C3) และแอนะล็อก (C4, C5) 23
2. ค่ามัธยฐาน (mean) และค่าพิสัยควอไทล์ (IQR) ของ hemolysate ที่ pretreat ด้วยสารเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อก เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระวิตามินซี 24
3. การเปลี่ยนแปลงของออกซีฮีโมโกลบิน เมื่อ pretreat ก่อนในเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อก หลังเหนี่ยวนำด้วย sodium nitrite นาน 5 - 45 นาที 28
4. การเปลี่ยนแปลงของเมทฮีโมโกลบินในคนปกติ ที่ pretreat ก่อนด้วยเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกเข้มข้น 40 μM หลังเหนี่ยวนำออกซิเดชันด้วย sodium nitrite นาน 5 - 45 นาที 29
5. การเปลี่ยนแปลงของฮีโมโกลบินในผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD ที่ pretreat ก่อนด้วยเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกเข้มข้น 40 μM หลังเหนี่ยวนำออกซิเดชันด้วย sodium nitrite นาน 0 - 45 นาที 30
6. ร้อยละการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดง เมื่อทดสอบในกลุ่มคนปกติ เพศชาย จำนวน 3 ราย (ทดสอบซ้ำสองครั้ง) 32
7. ค่ามัธยฐานของจำนวนร้อยละ Cells reducing NBT เมื่อนิวโตรฟิลคนปกติได้รับสารกระตุ้นในสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ โดยจำแนกตามสถานภาพด้านเพศ 41
8. ค่ามัธยฐานของจำนวนร้อยละ Cells reducing NBT เมื่อนิวโตรฟิลผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD ได้รับสารกระตุ้นในสภาวะการทดลองต่าง ๆ โดยจำแนกตามสถานภาพด้านเพศ 42
9. ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ในแต่ละสภาวะการทดลอง จำแนกตามกลุ่มตัวอย่างเลือดคนปกติกับเลือดคนที่พร่องเอนไซม์ G6PD และแบ่งตามสถานเพศชายกับเพศหญิง 43

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่

1. เม็ดเลือดแดงสลายกลูโคสผ่านวิถีเพนโทสฟอสเฟตเพื่อสร้าง NADPH สำหรับใช้เปลี่ยนกลูตาไธโอนให้อยู่ในรูปรีดิวซ์ 10
2. โครงสร้างของสารสำคัญที่พบในขมิ้นชัน 12
3. ค่ามัธยฐานเมทฮีโมโกลบินใน hemolysate ที่ pretreat ด้วยเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกที่ความเข้มข้น 10 μM, 20 μM, และ40 μM 24
4. ค่ามัธยฐานเมทฮีโมโกลบินที่ pretreat ก่อนด้วยสาร C1/C2/C3/C4/C5 หรือ AA เปรียบเทียบกันระหว่างชุดทดลองที่ไม่มี sodium nitrite กับชุดทดลองที่เหนี่ยวนำออกซิเดชันด้วย sodium nitire (N = 4) 25
5. ร้อยละการยับยั้งเมทฮีโมโกลบินในสารละลายน้ำฮีโมโกลบินที่ pretreat ด้วยสาร C1/C2/C3/C4/C5 หรือ AA เข้มข้น 40 μM 26
6. การเปลี่ยนแปลงของเมทฮีโมโกลบินในคนปกติเพศชายที่ pretreat ก่อนด้วยเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกเข้มข้น 40 μM 30
7. การเปลี่ยนแปลงของเมทฮีโมโกลบินในผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD เพศชาย ที่ pretreat ก่อนด้วยเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกเข้มข้น 40 μM 31
8. ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดงกับความเข้มข้นของสารทดสอบแต่ละชนิด 33
9. กราฟแสดงร้อยละการแตกของเม็ดเลือดแดง โดยเม็ดเลือดแดง ชุดที่ 1 ไม่เติมสารใด ๆ เลย ชุดที่ 2 ควบคุมด้วย DMSO และ ชุดที่ 3 ให้สารเคอร์คิวมินอยด์หรือแอนะล็อกก่อนแล้วเติมสาร AAPH 33
10. เปรียบเทียบร้อยละการแตกของเม็ดเลือดแดงที่ทดสอบในกลุ่มคนปกติเพศชาย (A) กับกลุ่มคนที่พร่องเอนไซม์ G6PD (B) 35

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่

11. เปรียบเทียบร้อยละการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดงที่ทดสอบในกลุ่มคนปกติเพศชาย (A) กับกลุ่มคนที่พร่องเอนไซม์ G6PD (B) 36
12. แสดงระดับรีดิวซ์กลูตาไธโอนของเม็ดเลือดแดงโดยเปรียบเทียบผลทดสอบในกลุ่มคนปกติเพศชาย (A) กับกลุ่มคนที่พร่องเอนไซม์ G6PD (B) 38
13. ค่ามัธยฐานร้อยละนิวโตรฟิลรีดิวซ์สี NBT และค่าพิสัยควอไทล์ของเพศชายในแต่ละสภาวะการทดลอง 44
14. ค่ามัธยฐานร้อยละนิวโตรฟิลรีดิวซ์สี NBT และค่าพิสัยควอไทล์ของเพศหญิงในแต่ละสภาวะการทดลอง 44
15. โครงสร้างของเคอร์คิวมินและกลไกที่ต้านปฏิกิริยาลูกโซ่จากอนุมูลอิสระ 46
16. กลไกการออกฤทธิ์ด้านลบ (pro-oxidant) ของเคอร์คิวมิน 47
17. เมตาบอไลต์ของเคอร์คิวมินที่พบในพลาสมาของหนูและเซลล์ตับของมนุษย์ 49

อักษรย่อ

AA	Ascorbic acid
AAPH	2, 2'-Azobis (2-methypropionamidine) dihydrochloride
ABS	Absorbance
C1	Cururcumin
C2	Demethoxycurcumin
C3	Bis-demethoxycurcumin
C4	Di-*O*-demethylcurcumin
C5	Mono-*O*-demethylcurcumin
Cont.	Control
CPD	Citrate phosphate dextrose
DMSO	Dimethyl sulfoxide
G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
GPx	Glutathione peroxidase
Methemoglobin	Met-Hb
MPO	Myeloperoxidase
mL	Milliliter
µL	Microliter
µM	Micromolar
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NBT	Nitroblue tetrazolium
N	Subject or number of sample
Oxy-Hb	Oxy-hemoglobin
PBS	Phosphate buffered saline
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)
Reduced GSH	Reduced glutathione

อักษรย่อ (ต่อ)

Reduced Hb	Reduced Hb
ROS	Reactive oxygen species
SD	Standard deviation
SOD	Superoxide dismutase
Superoxide anion	O^{-}_{2}

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาการวิจัย

ภาวะพร่องเอนไซม์ glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) เป็นโรคที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน ทำให้เกิดผลเสียต่อร่างกายโดยเฉพาะเม็ดเลือดแดง ภาวะนี้พบได้บ่อยในประเทศไทยและประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (1) ผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD มีลักษณะอาการของโรคหลายระดับตั้งแต่ไม่มีอาการ จนถึงมีอาการซีดและเหลืองมาก (anemia and jaundice) เนื่องจากเม็ดเลือดแดงแตกเฉียบพลัน อาการแสดงทางคลินิกเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น ได้รับยาหรือสารเคมีประเภท oxidizing agent ภายหลังการติดเชื้อ เนื่องจากยีนนี้อยู่บนโครโมโซมเอ็กซ์ (chromosome X) ทารกแรกเกิดเพศชายที่พร่องเอนไซม์ชนิดนี้จึงมีโอกาสเกิดภาวะตัวเหลืองหลังคลอดมากกว่าปกติ ในผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงน้อยอาการของโรคอาจทุเลาเองได้ แต่ในบางรายอาจต้องให้เลือดเพื่อรักษาภาวะซีด เพื่อป้องกันภาวะเม็ดเลือดแดงแตกผู้ป่วยต้องหลีกเลี่ยงอาหารบางชนิด เช่น ถั่วปากอ้า หรือสารอนุมูลอิสระ (free radical) ที่ก่อให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ดังนั้นการรับประทานวิตามินอี (vitamin E) หรือซีลีเนียม (selenium) เพื่อเสริมความแข็งแรงให้สุขภาพจึงนับเป็นทางเลือกหนึ่ง แต่วิตามินเสริมเหล่านี้ยังให้ผลในการต้านออกซิเดชันได้ไม่ชัดเจนนัก (2)

ความผิดปกติของยีน G6PD ยังส่งผลต่อการทำหน้าที่ของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโตรฟิล (neutrophil) ด้วย เคยมีรายงานผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD มีความบกพร่องในการฆ่าเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม (defective killing) ที่รุกรานเข้ามาในเนื้อเยื่อของร่างกาย เพราะระดับของ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) ในนิวโตรฟิลสร้างได้น้อย จึงทำให้การทำลาย (digestion) เชื้อโรค ลดต่ำลงไปด้วย อีกทั้งยังมีรายงานว่าผู้ที่มีความผิดปกติแบบ complete deficiency มาพบแพทย์หลังจากติดเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* (catalase positive) เนื่องจากเอนไซม์ NADPH ในนิวโตรฟิลไม่เพียงพอต่อการสร้าง antimicrobial oxidant จึงทำให้ต่อการฆ่าเชื้อจุลชีพบกพร่อง (3) นอกจากนี้ยังพบว่าภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD เกี่ยวข้องกับความผิดปกติอื่นๆ ด้วยโดยเฉพาะเมื่อผู้ป่วยมีภาวะ sepsis แพทย์ต้องระมัดระวังในการให้ยา เนื่องจากผู้ป่วยบางรายไม่เคยได้รับการตรวจวินิจฉัยหาความผิดปกติข้างต้นมาก่อน

ควรหลีกเลี่ยงการให้ยาปฏิชีวนะกลุ่มซัลฟาเพื่อต้านการติดเชื้อจุลชีพ เพราะผู้ป่วยอาจมีภาวะเม็ดเลือดแดงแตกตามมาได้ ด้วยการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบด้อยภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD จึงเป็นหนึ่งในโรคที่ก่อให้เหตุปัญหาทางสาธาราณสุขอย่างต่อเนื่อง เพราะพบได้ในประชากรไทยทั่วทุกภูมิภาค

จากประเด็นปัญหาของโรคที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ผู้ที่มีภาวะออกซิเดชันสูงมักมีสาเหตุจากขาดเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ขจัดอนุมูลอิสระ เช่น superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx) คณะผู้วิจัยเล็งเห็นว่าบทบาทของอนุมูลอิสระกับการเกิดโรคต่าง ๆ มีส่วนสัมพันธ์กัน ดังนั้น การให้สารต้านอนุมูลอิสระหรือ antioxidant นับว่าเป็นกลไกสำคัญที่ช่วยควบคุมระดับอนุมูลอิสระในร่างกายให้สมดุล เพื่อเป็นการป้องกันภาวะเครียดออกซิเดชันในผู้ที่มีปริมาณอนุมูลอิสระมากเกินปกติ การดูแลสุขภาพด้วยการรับประทานอาหารที่มาจากพืชสมุนไพร (medicinal plant) เพื่อต้านโรคต่าง ๆ น่าจะคุ้มค่าและเป็นทางเลือกที่ดีต่อผู้ป่วย (4) สารสกัดจากสมุนไพรไทยที่น่าสนใจมีหลายชนิด เช่น กะเพรา ข่า ขมิ้นชัน ตะไคร้ พริกไทย ไพล พลู แฝกหอม ฝรั่ง และ มะกรูด ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงกำหนดให้ “ขมิ้นชัน” เป็นประเด็นของการวิจัยนี้เพราะเป็นสมุนไพรที่แพทย์แผนไทยนิยมใช้กันมานาน มีความเป็นพิษน้อยและมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลายโดยเฉพาะฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ต้านการอักเสบ และ ต้านการติดเชื้อ (5)

ผลงานวิจัยกว่าทศวรรษที่ผ่านมา พบว่า ส่วนที่มีสีเหลืองในเหง้าขมิ้นชัน (turmeric) ประกอบไปด้วยสารกลุ่ม เคอร์คิวมินอยด์ (curcuminoids) มีตัวยาสำคัญ คือ เคอร์คิวมิน (curcumin) ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activities) หลายด้าน เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ฆ่าเชื้อจุลชีพ และฤทธิ์ต้านการอักเสบ เป็นต้น (6) จึงมีการนำมาใช้ผสมในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร (dietary supplement) เพื่อรักษาโรคต่าง ๆ ในมนุษย์โดยเฉพาะโรค Alzheimer (7) นอกจากเคอร์คิวมินอยด์แล้วแอนะล็อก (analog) อื่นๆ ซึ่งเป็นสารประกอบอนุพันธุ์ที่ได้จากการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารตั้งต้น ยังได้มีการนำมาวิจัยอย่างกว้างขวางทั้งในระดับเซลล์และในสิ่งมีชีวิต งานวิจัยนี้สนใจศึกษาฤทธิ์ของสารเคอร์คิวมินอยด์ 3 ชนิด ได้แก่ curcumin (C1), demethoxycurcumin (C2), bis-demethoxycurcumin (C3) และแอนะล็อก 2 ชนิด ได้แก่ di-*O*-demethylcurcumin (C4) และ mono-*O*-demethylcurcumin (C5) ต่อการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันในเม็ดเลือดแดง และการเพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการกลืนกินของ นิวโตรฟิลในเลือดของผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD คณะผู้วิจัยมีความเห็นว่า เคอร์คิวมินอยด์ในขมิ้นชันมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ดีและยังสามารถจับกับสารอนุมูลอิสระได้เร็วกว่าวิตามินอี ซึ่งจากผลการทดลองใน

เซลล์ตับหนูพบว่าเคอร์คิวมินอยด์ป้องกันยการเกิด lipid peroxidation ได้มากกว่าวิตามินอีถึง 8 เท่า (8) อย่างไรก็ตามเคอร์คิวมินอยด์นั้นเป็นสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำ เมื่อรับประทานเข้าไปอาจทำให้การดูดซึมที่ลำไส้ได้ไม่ดี ดังนั้นการปรับแต่งโครงสร้างให้เป็นแอนะล็อกที่ละลายน้ำง่ายขึ้น เช่น di-*O*-demethylcurcumin และ mono-*O*-demethylcurcumin หรือมีลักษณะคล้ายกับรูปเมตาบอไลท์ของเคอร์คิวมิน ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็น dihydrocurcumin, tetrahydrocurcumin และ hexahydrocurcumin น่าจะได้สารประกอบที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า (9) พืชผักสวนครัวเมื่อนำมาสกัดแยกเอาสารสำคัญแล้วดัดแปลงเป็นสารออกฤทธิ์ชนิดต่าง ๆ น่าจะนำมาประยุกต์ใช้เป็นวิตามินบำรุงร่างกายหรือผสมอาหารเสริมสุขภาพในการป้องกันการเสื่อมของเซลล์เม็ดเลือด เพื่อใช้ส่งเสริมคุณภาพชีวิตที่ดีและเป็นประโยชน์ต่อการวางแผนป้องกันภาวะเครียดออกซิเดชันในผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพสูงสุดของเคอร์คิวมินอยด์ (C1, C2, C3) และแอนะล็อก (C4, C5) ต่อภาวะเครียดออกซิเดชันเม็ดเลือดแดงในคนปกติและผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD
2. เพื่อเปรียบเทียบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารเคอร์คิวมินอยด์ (C1, C2, C3) และแอนะล็อกชนิดต่างๆ (C4, C5) ต่อการยับยั้งการแตกเม็ดเลือดแดงในคนปกติและผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD
2. เพื่อศึกษาผลของสารเคอร์คิวมินอยด์ และ C3 ต่อ phagocytic activity ของนิวโตรฟิล โดยเปรียบเทียบผลระหว่างคนปกติและผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. สารเคอร์คิวมินอยด์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ทำการสกัดและแยกมาจากสมุนไพรขมิ้นชัน ส่วนแอนะล็อกของเคอร์คิวมินอยด์ ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.ชัชวาลย์ ช่างทำ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับออกซิเดชันในเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ได้รับสาร curcumin, demethoxycurcumin, bis-demethoxycurcumin, di-*O*-demethylcurcumin และ mono-*O*-demethylcurcumin โดยเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างเลือดของคนปกติซึ่งหมายถึง ไม่มีความผิดปกติของยีน G6PD กับเลือดของผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD โดยเจาะจงทดสอบในเลือดเพศชายที่ให้ผลการตรวจเป็น marked deficiency เนื่องจากเลือดเพศหญิงมักพบว่าระดับการพร่องเอนไซม์เป็นแบบ partial deficiency เพื่อเพิ่มความชัดเจนของการทดลอง

3. ศึกษาการทำงานของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโตรฟิลที่ได้รับสาร curcumin (C1) หรือ bis-demethoxycurcumin (C3) โดยเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างเลือดคนปกติ กับผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD (ทดลองในเพศชายและเพศหญิงเนื่องจากต้องการเพิ่มจำนวนตัวอย่าง)

4. โครงการวิจัยนี้ทำการทดลองโดยเก็บตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครที่มีอายุระหว่าง 20-40 ปี ที่เป็นคนปกติและคนที่พร่องเอนไซม์ G6PD จากนักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

หมายเหตุ นักศึกษาบางคนเป็นเจ้าพนักงานวิทยาศาสตร์ที่เข้าโครงการศึกษาต่อเนื่องจึงกำหนดช่วงอายุไว้สูง และโครงการวิจัยนี้ทำการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างที่เป็นนักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์เนื่องจาก สถานที่เก็บตัวอย่างเลือดมีความสะดวกและอยู่ใกล้ห้องปฏิบัติการ ทำให้การทดลองสามารถใช้ตัวอย่างเลือดได้ทันเวลาตามเป้าหมาย

1.4 **นิยามศัพท์เฉพาะ** (Definition of Terms)

Antioxidant หมายถึง สารที่สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระเพื่อหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดออกซิเดชันสูง

Curcumin หมายถึง สารสำคัญในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากขมิ้นชัน มีสีเหลืองและไม่ละลายน้ำ

Curcuminoids หมายถึง สารที่สกัดแยกได้จากขมิ้นชัน ได้แก่ curcumin, demethoxycurcumin และ bis-demethoxycurcumin

Analogs of curcuminoids หมายถึง สารประกอบอนุพันธ์ที่ได้จากการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของเคอร์คิวมินอยด์ ได้แก่ di-*O*-demethylcurcumin และ mono-*O*-demethylcurcumin

Medicinal plant หมายถึง พืชที่ใช้ทำเป็นเครื่องยาสมุนไพร กำเนิดมาจากธรรมชาติ มีสรรพคุณในการรักษาโรค หรืออาการเจ็บป่วยต่าง ๆ

Oxidative stress หมายถึง การเกิดออกซิเดชันสูงเนื่องจากมีสารอนุมูลอิสระมากเกินสมดุล

Turmeric หมายถึง ขมิ้นชัน ซึ่งเป็นพืชล้มลุกในวงศ์ขิง มีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีเหง้าอยู่ใต้ดิน เนื้อในเหง้าสีเหลืองส้ม มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว

Phagocytosis หมายถึง กระบวนการที่เม็ดเลือดขาวมีการกลืนกินเชื้อโรคแล้วทำลาย

Phagocyte หมายถึง เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ มีบทบาทสำคัญต่อภาวะการตอบสนองของภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด โดยเฉพาะนิวโตรฟิล และแมคโครเฟจ ซึ่งเป็นเซลล์ด่านแรกที่ป้องกันไม่ให้ร่างกายติดเชื้อและช่วยลดการอักเสบของเนื้อเยื่อหลังจากต่อสู้กับเชื้อโรค

1.5 สมมติฐานของการวิจัย

1. เคอร์คิวมินอยด์ (C1, C2, C3) และแอนะล็อก (C4, C5) มีฤทธิ์ยับยั้งออกซิเดชันของฮีโมโกลบินในสภาวะที่เม็ดเลือดแดงมีอนุมูลอิสระสูง (inhibit methemoglobin formation, anti-oxidative hemolysis)

2. เคอร์คิวมินอยด์ (C1, C2, C3) และแอนะล็อก (C4, C5) มีฤทธิ์ลดการพร่องรีดิวซ์กลูตาไธโอน (inhibit reduced GSH depletion)

3. เคอร์คิวมินอยด์ (C1 และ C3) ช่วยเสริมฤทธิ์การทำงานของนิวโตรฟิลโดยการกระตุ้นการกลืนกินผ่านทางกลไกของ oxidative burst

1.6 ประโยชน์ของผลการวิจัย

1. พบเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกที่ให้ประสิทธิผลสูงสุดในการต้านอนุมูลอิสระและต้านการติดเชื้อจุลชีพ

2. สามารถนำผลการวิจัยนี้ไปใช้เป็นแนวทางสำหรับการคัดเลือกหาสารออกฤทธิ์ที่ดีที่สุด ไปพัฒนาเป็นตำรับยาเพื่อใช้ส่งเสริมสุขภาพให้กับผู้ที่มีความบกพร่องของเม็ดเลือดแดงหรือเม็ดเลือดขาว

3. ข้อมูลเชิงประจักษ์ที่ได้จากการวิจัยระดับเซลล์ (*in vitro*) สามารถนำไปใช้ต่อยอดในการศึกษาต่อในสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) ซึ่งจะทำให้บุคลากรทางการแพทย์หรือผู้บริโภคเกิดความเชื่อมั่นต่อศักยภาพของสมุนไพรขมิ้นชันมากขึ้น

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

ทฤษฎีจากเอกสารและประวัติความเป็นมา

2.1 เม็ดเลือดแดง

เม็ดเลือดแดงมีหน้าที่หลักในการขนส่งออกซิเจนจากปอดไปให้เนื่อเยื่อ ช่วยนำของเสียจากคาร์บอนไดออกไซด์กลับไปฟอกที่ปอด และเป็นรักษาสมดุลกรด-ด่างในเลือดโดยมีฮีโมโกลบิน (hemoglobin) เป็นสารสำคัญในการทำงาน ฮีโมโกลบินเป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างประกอบไปด้วย heme และ สาย globin เนื่องจาก heme เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอร์รัส (Fe^{2+}) กับ protoporphyrin IX จึงทำให้เลือดมีสีแดง (10)

2.1.1 เมแทบอลิซึมในเม็ดเลือดแดง (Metabolism in red blood cells)

เม็ดเลือดแดงที่ไหลเวียนอยู่ตามกระแสเลือดเป็นเซลล์ตัวแก่ที่ไม่มีนิวเคลียส จำเป็นต้องมีพลังงานมาใช้อยู่ตลอดเวลาเพื่อคงสภาพรูปร่าง เอนไซม์ และฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดให้อยู่ในสภาวะรีดิวซ์ โดยได้มาจากวิถีต่าง ๆ ดังนี้ (11)

(1) วิถี Glycolysis ปกติเมื่อกลูโคสเข้าสู่เม็ดเลือดแดงประมาณร้อยละ 90 จะถูกเมแทบอไลต์แบบไม่ใช้ออกซิเจนโดยวิถีนี้ ซึ่งมีบทบาทสำคัญมากต่อการสร้างพลังงาน ATP เพื่อคงสมดุลระดับโซเดียมและโปแตสเซียมให้กับเซลล์ ทำให้เม็ดเลือดแดงมีรูปร่างเป็น biconcave และเยื่อหุ้มเซลล์ยืดหยุ่นได้ดี

(2) วิถี Rapoport-Luebering มีบทบาทในการสร้างสารสำคัญ 2,3-DPG เพื่อควบคุมการจับและปล่อยออกซิเจนของฮีโมโกลบินในเซลล์

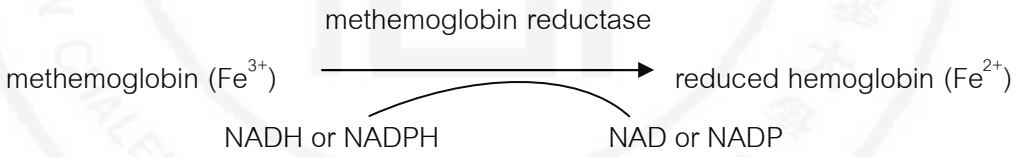
(3) วิถี Hexose monophosphate shunt หรือ Pentose phosphate pathway กลูโคสประมาณร้อยละ 5-10 จะถูกเมแทบอไลต์แบบใช้ออกซิเจน ซึ่งเป็นกระบวนการสลาย glucose-6-phosphate เพื่อสร้าง NADPH มาใช้ในการสร้างและสลายกลูตาไธโอน (glutathione) ปฏิกิริยารีดิวซ์นี้จะช่วยให้ฮีโมโกลบินและเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดไม่ถูกทำลาย

(4) วิถี Methemoglobin reductase มีบทบาทในการสร้าง NADH โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์ methemoglobin reductase ทำให้ methemoglobin (ferric iron) เปลี่ยนเป็น reduced hemoglobin (ferrous iron) ที่มีศักยภาพในการนำพาออกซิเจนได้ดีขึ้น

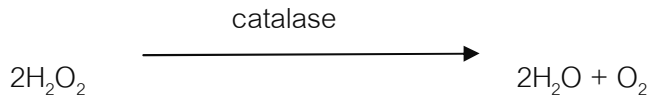
เม็ดเลือดแดงมีหน้าที่นำพาออกซิเจนให้กับเซลล์และเนื้อเยื่อทั่วร่างกาย ในบริเวณใดที่มีออกซิเจนมากย่อมเสี่ยงจากอันตรายของ oxygen radical ตามไปด้วย ในเลือดจึงมีเอนไซม์ G6PD เพื่อเร่งปฏิกิริยาที่เปลี่ยน glucose-6-phosphate ให้เป็น 6-phosphogluconate ซึ่งเกิดร่วมกับ NADP ที่ไวต่อปฏิกิริยารีดักชันทำให้เกิด NADPH เพื่อปกป้องเม็ดเลือดแดงจากพิษของออกซิเจนในภาวะที่มีออกซิเดชันสูง เอนไซม์ G6PD มีความสำคัญมากต่อการสร้างและสลายกลูตาไธโอน ซึ่งทำหน้าที่ป้องกันการเสื่อมของเซลล์จากสารอนุมูลอิสระ (free radical) เม็ดเลือดแดงที่พร่องเอนไซม์ G6PD จะมีระดับ NADPH ลดลง ทำให้กลูตาไธโอนไม่เพียงพอต่อการรักษาสภาพเซลล์ ฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงจึงเปลี่ยนรูปจาก reduced heme เป็น oxidized heme ได้ง่าย ถ้ามีปริมาณมากจะเกิดเป็นเมทฮีโมโกลบิน (methemoglobin) เมื่อเกิด oxidative denaturation จะกลายเป็น hemichrome แล้วตกตะกอนลงบนเซลล์ ทำให้ผิวเซลล์เม็ดเลือดแดงขาดความยืดหยุ่นและแตกง่าย (hemolysis) ได้ (12)

2.1.2 ปฏิกิริยาสำคัญที่มีโคเอนไซม์ NADPH เข้าไปเกี่ยวข้อง

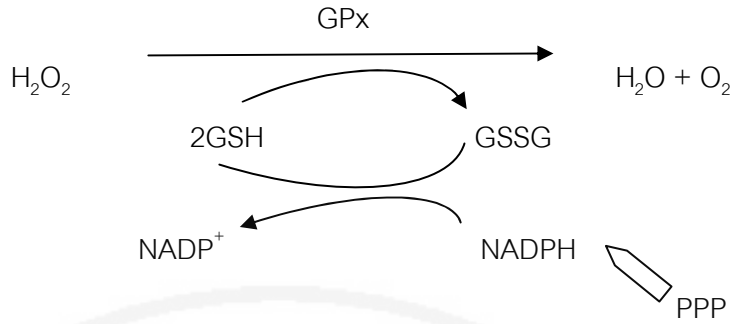
2.1.2.1 Methemoglobin reduction ปฏิกิริยานี้มีบทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยน oxidative denaturation ของฮีโมโกลบินให้กลับคืนสู่สภาพปกติ โดยอาศัยเอนไซม์ methemoglobin reductase (13)



2.1.2.2 H_2O_2 reduction กลุ่มของสารตัวกลางออกซิเจนที่ไวในการทำปฏิกิริยาสูงที่สำคัญได้แก่ H_2O_2, O_2^-, OH^- สารเหล่านี้ล้วนเป็นพิษต่อเซลล์ ร่างกายมีกลไกปกป้องอันตรายโดยอาศัยเอนไซม์ต่าง ๆ อาทิ ใช้ catalase แยกสลาย H_2O_2 .ให้เป็นน้ำและออกซิเจน (14)



หรืออาจใช้ GPx ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เซลล์ได้มาจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน – รีดักชันของกลูตาไธโอน กลไกนี้มี NADPH เป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่ H_2O_2 เพื่อให้เปลี่ยนรูปเป็นน้ำและไม่เกิดอันตรายต่อเซลล์



2.2 ฟาโกไซโทซิสในเม็ดเลือดขาว (Phagocytosis in white blood cells)

เม็ดเลือดขาวมีหน้าที่หลักอยู่ 2 ประการ คือ สร้างภูมิคุ้มกันซึ่งได้แก่ lymphocyte และป้องกันร่างกายจากสิ่งแปลกปลอมซึ่งส่วนมากเป็น granulocyte เม็ดเลือดขาวกลุ่ม granulocyte เป็นเสมือนด่านกีดขวางในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีทั้งชนิดที่เป็นเซลล์ (phagocyte, NK cell) และสารน้ำ (complement, antibody, interferon) phagocyte คือเซลล์กลืนกินเม็ดเลือดขาวชนิดแรก (neutrophil, macrophage) ที่คอยทำลายจุลชีพ ถ้า phagocyte ทำงานบกพร่องก็อาจมีภาวะอักเสบตามมา เนื่องจากมีสารน้ำบางอย่างหลั่งออกมากระตุ้นให้เม็ดเลือดขาวเคลื่อนที่เข้ามายังจุดที่จุลชีพบุกรุก โดยนิวโตรฟิลจะเป็น phagocyte ที่ตอบสนองและมีกระบวนการ phagocytosis ที่รวดเร็ว เพราะมี psuedopod คอยโอบล้อมจุลชีพให้เกิดเป็นถุง phagosome ดังที่แสดงในสมการที่ 1 จากนั้น lysosomal enzyme จะเชื่อมให้กลายเป็น phagolysosome

$$\text{bacteria} + \text{psuedopod} \xrightarrow{\text{ingestion}} \text{phagosome} \qquad (1)$$

นอกจากนี้ยังมีสารและเอนไซม์สำหรับเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันอยู่หลายชนิดเพื่อใช้ในการกำจัดเชื้อจุลชีพภายในถุง phagolysosme โดยอาศัยกลไกล 2 แบบ คือ (1) แบบใช้ออกซิเจน คือใช้เอนไซม์ NADPH oxidase ในการเปลี่ยน oxidative mechanism ให้เป็น respiratory burst ซึ่งจะได้สารสำคัญในการฆ่าเชื้อจุลชีพคือ superoxide anion ที่สามารถสลายตัวต่อได้เป็น H_2O_2 โดยมี SOD เข้าร่วมปฏิกิริยา ดังที่แสดงในสมการที่ 2 (2) แบบไม่ใช้ออกซิเจน คือใช้ granule หรือ lysozyme ในการฆ่าเชื้อจุลชีพ (15)

$$\text{NADPH} + 2O_2 \xrightarrow{\text{oxygen-dependent killing}} NADP^+ + H^+ + 2O_2\text{- (superoxide)} \qquad (2)$$

$$2O_2\text{- (superoxide)} \xrightarrow{\text{SOD}} H_2O_2 + O_2$$

ความผิดปกติของนิวโตรฟิลพบได้บ่อยในกลุ่มของโรคที่มีภาวะบกพร่องของการฆ่า (intracellular killing defect) ซึ่งโรคที่มีความสำคัญทางคลินิก เช่น โรค chronic granulomatous disease และภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ความผิดปกติเหล่านี้เป็นชนิดที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรม โดยเฉพาะโรค chronic granulomatous disease นั้น พบว่ามีความบกพร่องในการสร้างเอนไซม์ NADPH oxidase ทำให้ขาด H_2O_2 และ superoxide anion ซึ่งเป็นสารสำคัญที่นิวโตรฟิลใช้ฆ่าเชื้อจุลชีพ (16)

2.3 ภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD (Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency)

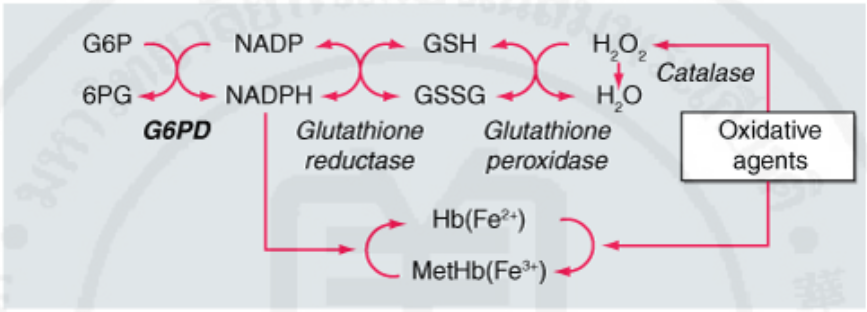
2.3.1 ชีวเคมีของเอนไซม์และความชุกในประชากร

G6PD เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่อยู่ในเซลล์ ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมวิถี hexose monophosphate shunt สารสำคัญที่ได้จากกระบวนการนี้ คือ NADPH ซึ่งใช้ในการกำจัดสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ หรือสิ่งแปลกปลอมออกไป เซลล์ที่มีความจำเป็นต้องพึ่งกระบวนการนี้มาก คือ เม็ดเลือดแดงหรือเซลล์อื่นๆที่ทำหน้าที่ป้องกันความเสื่อมของเซลล์จากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ในคนปกติเมื่อมีออกซิเดชันเพิ่มขึ้น ฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ในเม็ดเลือดแดงมีโอกาสที่จะเสียสภาพจากการถูกออกซิไดซ์ (oxidized) แต่กลูตาไธโอนซึ่งเป็นพันธะเปปไทด์ของกรดอะมิโนที่อยู่ในรูปรีดิวซ์ (reduced glutathione) จะมาช่วยในการป้องกันอันตรายต่อเซลล์จากปฏิกิริยาดังกล่าว โรคพร่องเอนไซม์ G6PD หรือเป็นที่รู้จักกันในชื่อ โรคแพ้ถั่วปากอ้า (Favism) เป็นโรคทางพันธุกรรม มีการถ่ายทอดทางกรรมพันธุ์ผ่านทางโครโมโซมเอกซ์ (X-linked recessive gene) ทำให้มีผลกระทบต่อเพศชายมากกว่าเพศหญิง (1) ความชุกของภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ทั่วโลกมีค่าเฉลี่ยร้อยละ 4.9 หรือประมาณ 330 ล้านคน ซึ่งพบมากที่สุดในประเทศแถบอัฟริกาตะวันตก รองลงมา คือ แถบตะวันออกกลาง แถบเอเชีย แถบอเมริกา และแถบยุโรป ตามลำดับ ส่วนในประเทศไทยนั้นพบความชุกเฉลี่ยของภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ประมาณร้อยละ 5.5-14.8 (17)

2.3.2 ความผิดปกติในเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว

อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตเลี้ยงลูกด้วยนม สามารถหลุดออกมาทำปฏิกิริยาออกซิเดชันก่อให้เกิดความเสียหายต่อลิพิด โปรตีน หรือดีเอ็นเอภายในเซลล์ได้ ร่างกายมนุษย์จึงมีกลไกในการปกป้องอันตรายด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ เช่น SOD, GPx หรือ catalase เพื่อกำจัดอนุมูลเหล่านั้น หากอนุมูลมีมากเกินไปเซลล์จะเกิดภาวะ ที่เรียกว่า oxidative stress ภาวะดังกล่าว ถ้าเกิดขึ้นในเม็ดเลือดแดงของผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD เช่น เมื่อผู้ป่วยเกิดการติดเชื้อหรือได้รับสารพิษ กลูตาไธโอนจะถูกสร้างมากขึ้น (โดยมี NADPH เป็นตัวช่วย) เพื่อเปลี่ยน H_2O_2 ให้

กลายเป็นน้ำ แต่ในเม็ดเลือดแดงที่พร่องเอนไซม์ G6PD จะไม่สามารถสร้าง NADPH ได้เพียงพอ ทำให้กลูตาไธโอนสร้างได้น้อยลง ฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงจะถูกออกซิไดซ์ให้กลายเป็นเมทฮีโมโกลบินที่ไม่สามารถนำพาออกซิเจนได้ ก่อให้เกิดสภาพที่เรียกว่า hemichrome จนเมื่อเหล็กหลุดออกไปจะเปลี่ยนเป็น Heinz bodies ซึ่งพบได้ในเม็ดเลือดแดงที่ย้อม supravital stain เมื่อเซลล์ที่เสื่อมสภาพเหล่านี้ไหลเวียนมายังม้าม ก็จะถูก macrophage จับทำลายจนทำให้เม็ดเลือดแดงแตกในที่สุด (18)



Source: Fauci AS, Kasper DL, Braunwald E, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th Edition: http://www.accessmedicine.com

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

รูปที่ 1 เม็ดเลือดแดงสลายกลูโคสผ่านวิถีเพนโทสฟอสเฟตเพื่อสร้าง NADPH สำหรับใช้เปลี่ยนกลูตาไธโอนให้อยู่ในรูปรีดิวซ์ โดยมีเอนไซม์ G6PD เป็นส่วนสำคัญของเมตาบอลิซึม

นอกจากนี้ยังพบว่า NADPH ที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือดขาว (โดยเฉพาะนิวโตรฟิลและแมโครเฟจ) มีบทบาทสำคัญต่อการทำลายเชื้อโรคแบบพึ่งพาออกซิเจน คือ จะมีการกระตุ้น NADPH ให้สร้าง oxidative burst เพื่อฆ่าเชื้อโรคให้ตาย ซึ่งหากกลไกการป้องกันเชื้อโรคทำงานได้อย่างสมบูรณ์แล้ว บริเวณที่เม็ดเลือดขาวหลั่งซัยโตไคน์ (cytokine) ออกมาก็จะไม่เกิดการอักเสบต่อเนื้อเยื่อ แต่ในผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD นอกจากจะเกิดภาวะโลหิตจางจากเม็ดเลือดแดงแตกแล้ว ในบางรายยังพบว่ามีความผิดปกติในหน้าที่ของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโตรฟิลคล้ายกับกลุ่มผู้ป่วยติดเชื้อซ้ำซาก ส่วนอีกงานวิจัยหนึ่งนั้น พบเด็กชาย 3 ราย ที่พร่องเอนไซม์ G6PD แล้วมีอาการโลหิตจางร่วมกับภาวะอักเสบเรื้อรังจากการติดเชื้อ (19) โดยทั่วไปผู้ที่เป็นพาหะจะไม่แสดงอาการของโรค ยกเว้น กรณีที่มีสิ่งเร้าหรือผู้ป่วยได้รับสิ่งแปลกปลอมเข้ามาในร่างกาย นอกจากนี้ยังมีสาเหตุอื่นๆ อีกที่ทำเม็ดเลือดแดงถูกทำลายได้ง่าย เช่น การติดเชื้อ สารเคมี หรือยาบางชนิด เป็นต้น อย่างไรก็ตามภาวะโลหิตจางเฉียบพลัน (acute hemolysis) ในผู้ใหญ่ หรือภาวะตัวเหลือง

ในเด็กแรกเกิด (neonatal hyperbilirubinemia) ยังพบได้เสมอ การวินิจฉัยและการรักษาได้อย่างรวดเร็วจึงมีความสำคัญ แต่แพทย์มักให้การรักษาตามอาการ เช่น การให้เลือดในผู้ป่วยที่มีเม็ดเลือดแดงแตกเฉียบพลัน หรือการให้โฟเลทเสริมธาตุเหล็กในผู้ป่วยที่มีเม็ดเลือดแดงแตกเรื้อรัง (20) ดังนั้นการป้องกันการเกิดภาวะโลหิตจางโดยการให้สารต้านออกซิเดชันตามธรรมชาตินำจะเป็นทางเลือกหนึ่งให้กับผู้ป่วย

2.4 อนุมูลอิสระและภาวะเครียดออกซิเดชัน

อนุมูลอิสระมีส่วนเกี่ยวข้องกับโรคต่าง ๆ ในมนุษย์ เช่น โรคมะเร็ง โรคระบบประสาทเสื่อม โรคเบาหวาน และโรคทางพันธุกรรมบางชนิด เช่น ภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ทั้งนี้เพราะอนุมูลอิสระเหล่านี้ไปทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารชีวโมเลกุลในเซลล์หรือพลาสมาของร่างกาย โดยมนุษย์เรามีวิธีกำจัดอนุมูลอิสระด้วยสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ที่มีอยู่ในเลือด (SOD, GPx) หรือได้จากภายนอก เช่น อาหาร วิตามิน หรือยาบางชนิด นอกจากนี้ยังพบสารต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพรหลายชนิด ได้แก่ สารกลุ่มฟลาโวนอย์ (flavonoids) ซึ่งพบได้ทั่วไปในพืชสีเขียว ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระที่สังเคราะห์ขึ้น ส่วนใหญ่มีการพัฒนามาจากอนุมูลธรรมชาติ โดยเฉพาะกลุ่มที่มีโครงสร้างสารโพลีฟีนอล (polyphenols) มักจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี เช่น เคอร์คิวมินจากสมุนไพรขมิ้นชันที่พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งลิพิดเพอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) และลดการตายของเซลล์จากภาวะถูกออกซิไดซ์ (21)

2.5 สรรพคุณทางยาของสมุนไพรขมิ้นชัน

ขมิ้นชันมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Curcuma longa* L. อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae เป็นพืชล้มลุก มีเหง้าสีเหลืองจนถึงสีแสดอยู่ใต้ดิน นิยมใช้เหง้าทั้งสดและแห้งประกอบอาหารและใช้เป็นยาแก้ท้องอืด จุกเสียดท้อง รักษาแผลในกระเพาะอาหาร โรคผิวหนัง ตลอดจนใช้ผสมในเครื่องสำอางเพื่อทาให้ผิวสวย สารสำคัญที่พบในเหง้าขมิ้นชันมีองค์ประกอบทางเคมีอยู่ 2 ชนิดหลัก คือ (1) น้ำมันขมิ้น หรือ essential oil เรืองแสงได้เล็กน้อย ได้จากการสกัดด้วยไอน้ำหรือตัวทำละลายอินทรีย์ พบประมาณ 1.4-2.9% ประกอบด้วย ketone และ hydrocarbon (2) สารสีเหลืองหรือเคอร์คิวมินอยด์ (curcuminoids) พบประมาณ 2.7-4.7% สารนี้ไม่ละลายน้ำแต่ละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ (22) ประกอบด้วย curcumin (C1), demethoxycurcumin (C2) และ bis-demethoxycurcumin (C3) ทั้ง C2 และ C3 เป็นอนุพันธุ์ของ C1 เนื่องจาก curcumin เป็นสารสำคัญที่มีปริมาณมากที่สุดที่พบในสารสกัด ซึ่งสารดังกล่าวมีโครงสร้างดังแสดงใน **รูปที่** 2

2.5.1 ผลงานวิจัยที่รับรองสรรพคุณทางยาของขมิ้นชันมีดังนี้

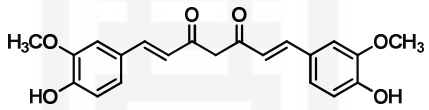
1. มีฤทธิ์ลดการอักเสบในหนูที่เป็นโรคไขข้ออักเสบ โดยพบว่า curcumin จากขมิ้นชันไปลดสารอนุมูลอิสระและซัยโตไคน์ที่เกิดจากการทำงานของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโตรฟิล (23)

2. มีฤทธิ์ต้านเชื้อปรสิตหลายชนิด โดยเฉพาะกลุ่ม *Trypanosoma sp.* และ *Leishmania sp.* ซึ่งสามารถเจริญอยู่ในเนื้อเยื่อหรือกระแสโลหิต (24)

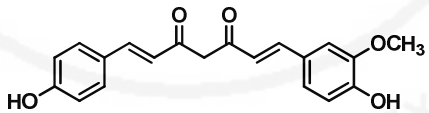
3. มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งด้วยการกดยีน nuclear factor-kappa B และทำลายเซลล์มะเร็งโดยทำให้ตายแบบ apoptosis (25)

4. พบว่าเคอร์คิวมินอยด์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ลดการเกิด lipid peroxidation และทำให้เอนไซม์ต้านออกซิเดชันมีการทำงานได้ดี นอกจากนี้ยังพบว่า tetrahydrocurcuminoids ออกฤทธิ์ดีกว่า กลุ่มเคอร์คิวมินอยด์ในการต้านการแตกของเม็ดเลือดแดง (26)

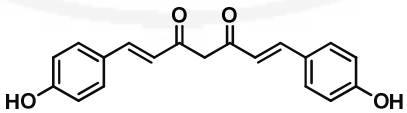
5. ฤทธิ์อื่นๆ เช่น ลดไขมันในเลือด ช่วยสมานแผล ต้านการแข็งตัวของเลือด ต้านเชื้อไวรัส HIV เป็นต้น (27)



curcumin



demethoxycurcumin



bis-demethoxycurcumin

รูปที่ 2 โครงสร้างของสารสำคัญที่พบในขมิ้นชัน

2.5.2 การนำสมุนไพรขมิ้นชันไปใช้ประโยชน์ในประเทศไทย (28, 29, 30)

1. ใช้กำจัดลูกน้ำยุงและป้องกันยุงกัด

2. ใช้ผสมครีมทาผิวเพื่อบรรเทาผื่นคันหรือรักษาโรคผิวหนัง

3. ใช้รับประทานเพื่อรักษาแผลในกระเพาะอาหาร

4. ใช้แคปซูลขมิ้นชันป้องกันและส่งเสริมสุขภาพในผู้ป่วยต่าง ๆ เช่น ข้อเข่าเสื่อม เบาหวาน หรือธาลัสซีเมีย

5. ผสมในเครื่องสำอางบำรุงผิวชนิดต่าง ๆ เช่น สบู่ โลชั่นทาหน้า

6. พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพื่อรับประทานเป็นอาหารเสริม

2.6 การใช้ยาสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติ

ผลจากรายงานวิจัยในปัจจุบันพบว่าขมิ้นชันเป็นพืชสมุนไพรที่มีการนำมาใช้ทดสอบทางคลินิกในมนุษย์อย่างแพร่หลาย จากการทดลองให้เคอร์คิวมินที่ใส่สารกัมมันตภาพรังสีในหนูขาวทางช่องท้อง พบว่าสารกัมมันตภาพรังสีถูกดูดซึมเข้าไปในกระแสเลือดและอวัยวะต่าง ๆ แต่ไม่พบเคอร์คิวมินในรูปเดี่ยว ๆ เนื่องจากเคอร์คิวมินถูกเปลี่ยนรูปก่อนดูดซึมเข้าไปในลำไส้เล็ก นอกจากนี้ยังพบว่าเคอร์คิวมินถูกขับออกมาทางอุจจาระร้อยละ 75 ในน้ำดีร้อยละ 11 ส่วนในปัสสาวะพบเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ภายหลังการให้เคอร์คิวมินทางปากในหนูปริมาณ 0.1 กรัม/ กิโลกรัม เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะพบปริมาณเมตตาบอไลท์เคอร์คิวมินซึ่งส่วนใหญ่เป็น glucoronide form ในลำไส้เล็ก ตับ และไต เท่ากับ 177, 26, 27 และ 7. 5 ไมโครกรัม/ กรัม ตามลำดับ(31, 32)

ประเทศไทยจัดหมวดหมู่ให้ยาจากสมุนไพรแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ (1) กลุ่มบัญชียาจากสมุนไพรที่มีการใช้ตามองค์ความรู้ดั้งเดิม จัดเป็นหมวดหมู่ตามกลุ่มอาการของระบบต่าง ๆ ของร่างกายประกอบด้วย ยารักษากลุ่มอาการทางระบบไหลเวียนโลหิต ยารักษากลุ่มอาการทางระบบทางเดินอาหาร ยารักษากลุ่มอาการทางสุติศาสตร์-นรีเวชวิทยา ยาแก้ไข้ และยาแก้ไอและขับเสมหะ (2) กลุ่มกลุ่มบัญชียาพัฒนาจากสมุนไพร ซึ่งประกอบด้วยยารักษาอาการของระบบทางเดินอาหาร ยารักษากลุ่มอาการของระบบทางเดินหายใจ ยารักษากลุ่มอาการของระบบผิวหนัง และยาใช้ภายนอกสำหรับบรรเทาอาการปวดและอักเสบ ขมิ้นชันถูกจัดอยู่ในบัญชียาพัฒนาจากสมุนไพรเพื่อรักษาอาการของระบบทางเดินอาหาร มีข้อบ่งใช้เพื่อบรรเทาอาการแน่นจุกเสียด และปัจจุบันได้มีการพัฒนาผลิตภัณฑ์เป็นแคปซูลสำหรับรับประทานโดยกำหนดขนาดให้ใช้ครั้งละ 2-4 แคปซูล (500 มิลลิกรัม-1 กรัม) วันละ 4 ครั้ง หลังอาหารและก่อนนอน แต่ยาแคปซูลขมิ้นชันนั้นมีข้อห้ามใช้ในผู้ที่ท่อน้ำดีอุดตัน นอกจากนี้การใช้ยาในหญิงมีครรภ์และเด็กควรอยู่ภายใต้การดูแลของแพทย์ เนื่องจากยังไม่มีข้อมูลรองรับด้านประสิทธิผลหรือความปลอดภัยอย่างเพียงพอ (33)

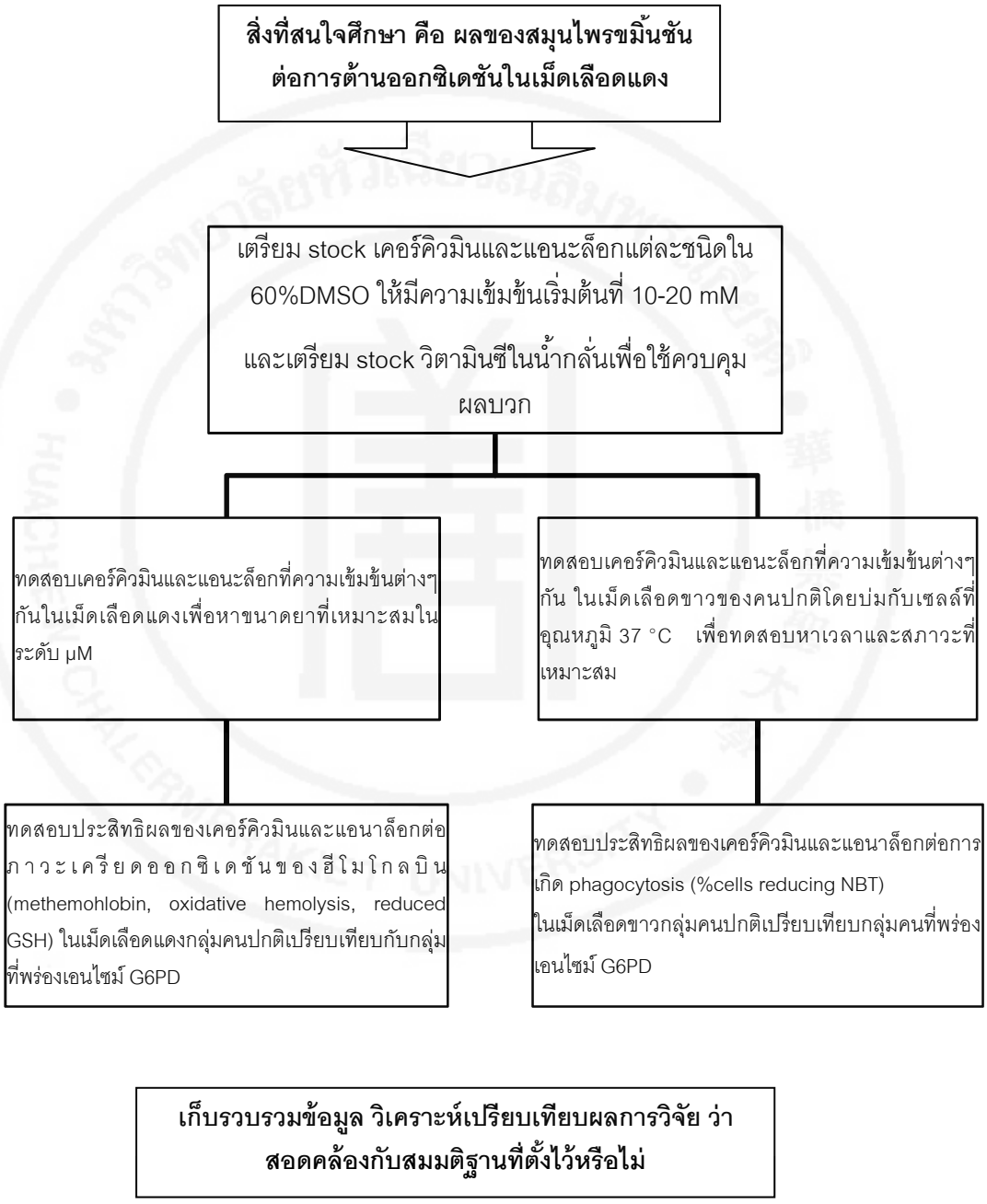
บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 กรอบแนวคิดในการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองที่มุ่งศึกษาประสิทธิภาพของสารสำคัญเคอร์คิวมินอยด์ที่จากสกัดขมิ้นชัน ได้แก่ curcumin (C1), demethoxycurcumin (C2), bis-demethoxycurcumin (C3), di-*O*-demethylcurcumin (C4) และ mono-*O*-demethylcurcumin (C5) ต่อภาวะเครียดออกซิเดชันของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง และศึกษาผลของ C1 และ C3 ต่อการทำงานของเม็ดเลือดขาวนิวโตรฟิล โดยทดลองในกลุ่มตัวอย่างเลือดจากนักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ คนปกติเปรียบเทียบกับผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD ซึ่งเทคนิคและวิธีการที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้แสดงไว้ตามแผนภาพหน้า 14

กลุ่มตัวอย่างคนปกติคัดเลือกจากนักศึกษาเทคนิคการแพทย์ชั้นปีที่ 3 และปีที่ 4 ที่มีอายุใกล้เคียงกัน และเป็นอาสาสมัครสุขภาพดี จำนวนตัวอย่างที่ใช้ประมาณ 3-8 ราย ส่วนกลุ่มตัวอย่างคนที่พร่องเอนไซม์ G6PD ได้มาจากนักศึกษาเทคนิคการแพทย์ชั้นปีที่ 3 และปีที่ 4 ที่เคยตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD ด้วยวิธีมาตรฐานแล้วพบว่าให้ผลการทดสอบเป็นบวก จำนวนตัวอย่างที่ใช้ประมาณ 3-10 ราย และทำการเก็บเลือดอย่างน้อย 3 มิลลิลิตร เพื่อให้เพียงพอต่อทดสอบตัวอย่างละ 2 ซ้ำ (duplicate experiment)

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวัดข้อมูลในเชิงปริมาณและการวิเคราะห์ข้อมูลใช้สถิติแบบไม่ใช้พารามิเตอร์ (non-parametric statistics) ในการทดสอบสมมติฐาน เนื่องจากจำนวนตัวอย่างมีขนาดเล็ก ($N<30$) การแจกแจงข้อมูลและความแปรปรวนของประชากรจึงไม่เท่ากัน


สิ่งที่สนใจศึกษา คือ ผลของสมุนไพรขมิ้นชัน ต่อการต้านออกซิเดชันในเม็ดเลือดแดง
เตรียม stock เคอร์คิวมินและแอนะล็อกแต่ละชนิดใน 60%DMSO ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 10-20 mM
และเตรียม stock วิตามินซีในน้ำกลั่นเพื่อใช้ควบคุมผลบวก
ทดสอบเคอร์คิวมินและแอนะล็อกที่ความเข้มข้นต่างๆ กันในเม็ดเลือดแดงเพื่อหาขนาดยาที่เหมาะสมในระดับ µM
ทดสอบเคอร์คิวมินและแอนะล็อกที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ในเม็ดเลือดขาวของคนปกติโดยบ่มกับเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C เพื่อทดสอบหาเวลาและสภาวะที่เหมาะสม
ทดสอบประสิทธิผลของเคอร์คิวมินและแอนาล็อกต่อภาวะเครียดออกซิเดชันของฮีโมโกลบิน (methemohlobin, oxidative hemolysis, reduced GSH) ในเม็ดเลือดแดงกลุ่มคนปกติเปรียบเทียบกับกลุ่มที่พร่องเอนไซม์ G6PD
ทดสอบประสิทธิผลของเคอร์คิวมินและแอนาล็อกต่อการเกิด phagocytosis (%cells reducing NBT) ในเม็ดเลือดขาวกลุ่มคนปกติเปรียบเทียบกลุ่มคนที่พร่องเอนไซม์ G6PD
เก็บรวบรวมข้อมูล วิเคราะห์เปรียบเทียบผลการวิจัย ว่าสอดคล้องกับสมมติฐานที่ตั้งไว้หรือไม่

3.2 น้ำยา/สารเคมี และ วัสดุ/อุปกรณ์

น้ำยา/สารเคมี

- สารกันเลือดแข็ง Citrate phosphate dextrose (CPD) ได้รับความอนุเคราะห์จากอาจารย์ ดร.ชลันดา กองมะเริง ซึ่งได้เตรียมเองตามวิธีมาตรฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการธนาคารโลหิต และ
- สารกันเลือดแข็ง Heparin: VWR; Philadelphia, US
- สารสำคัญ Curcumin; C1, Demethoxycurcumin; C2, Bis-demethoxycurcumin; C3 สกัดจากเหง้าขมิ้นชันแล้วแยกเอาแต่ละสารและทำให้บริสุทธิ์ ส่วนแอนะล็อก Di-*O*-demethylcurcumin ; C4 และ Mono-*O*-demethylcurcumin ;C5 ได้จากการปรับแต่งโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มเคอร์คิวมินอยด์ (24)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO): Sigma-Aldrich; St. Louis, USA
- Ascorbic acid (AA): VWR Prolabo; Rue Carnot, France
- Nitroblue tetrazolium dye: Sigma-Aldrich; St. Louis, USA
- Histopaque (1.077g/mL): Sigma-Aldrich; St. Louis, USA
- Sodium nitrite: Merck; Darmstadt, Germany
- 2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride or AAPH: Sigma-Aldrich; St. Louis, USA
- Phorbol-12-myristate-13- acetate (PMA): Sigma-Aldrich; St. Louis, USA
- Dextran 500: Sigma-Aldrich; St. Louis, USA
- Dulbecco's PBS (pH 7.4): Invitrogens; Grand Island, USA
- 5,5 Dithiobis (2-Nitrobenzoic acid) or DTNB: Sigma-Aldrich; St. Louis, USA
- Meta-phosphoric acid: Sigma-Aldrich; St. Louis, USA

วัสดุ/อุปกรณ์ (สิ่งที่มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัตการ)

- หลอด Polystyrene ขนาด 12x75 mm
- หลอดแก้ว ขนาด 12x75 mm
- ชุดเจาะเลือด
- Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL
- Filter disc ขนาด 0.2 μm

- Centrifuge tube ขนาด 15 mL- 50 mL
- Pipette tip ขนาด 200 µL-1,000 µL
- Pasteur pipette
- Spectrophotometer: Thermo Scienctific

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การทดสอบออกซิเดชันของฮีโมโกลบิน (Assay for methemoglobin)

หลักการ

ที่สภาวะปกติฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงจะอยู่ในรูปรีดิวซ์และมีสีแดง แต่ถ้าเลือดได้รับสาร sodium nitrite ซึ่งเป็น oxidizing agent ฮีโมโกลบินจะถูกออกซิไดซ์ให้กลายเป็นเมทฮีโมโกลบินที่มีสีน้ำตาล (34)

วิธีการ

1. ปั่นล้างเลือดด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งสุดท้ายเจือจาง packed red cells ด้วย PBS ให้มีความเข้มข้น 40% Hct จากนั้นนำเลือดมาเตรียมเป็นสารละลายน้ำฮีโมโกลบิน (hemolysate) ในอัตราส่วนเลือดต่อน้ำกลั่น 1: 100 แล้วแยก hemolysate ใส่ลงในหลอดอย่างละ 2 mL โดยแบ่งใส่หลอดทดลอง 4 ชุด

ชุดที่ 1 มี hemolysate อย่างเดียว

ชุดที่ 2 hemolysate + 60%DMSO ปริมาตร 1, 2, 4 µL

ชุดที่ 3 hemolysate + เคอร์คิวมินหรือแอนะล็อก 1, 2, 4 µL (จาก stock 20 mM)

ชุดที่ 4 hemolysate + เคอร์คิวมินหรือแอนะล็อก + sodium nitrite 1 µL (จาก stock 1.5 M)

2. pretreat hemolystae กับสารเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 10-40 µM นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นชักนำฮีโมโกลบินให้เกิดออกซิเดชันด้วย 0.75 mM sodium nitrite

3. เมื่อครบเวลา 20 นาที นำสารละลายน้ำฮีโมโกลบินในแต่ละหลอดไปวัดหาปริมาณเมทฮีโมโกลบิน ที่ความยาวคลื่น 630 nm และ ออกซีฮีโมโกลบิน ที่ความยาวคลื่น 540 nm ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมีเตอร์

* vary dose ทดสอบในเลือดคนปกติ 3 ราย จำนวน 2 ซ้ำ

*dose 40 µM ทดสอบในเลือดคนปกติ 4 ราย จำนวน 2 ซ้ำ และเลือดผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD 4 ราย จำนวน 1-2 ซ้ำ

3.3.2 **การทดสอบปริมาณการแตกของเม็ดเลือดแดง** (Assay for oxidative hemolysis)

หลักการ

ในภาวะปกติเม็ดเลือดแดงเมื่ออยู่นอกร่างกายจะมีความยืดหยุ่นและสามารถอยู่ในบัฟเฟอร์ที่ pH 7.4 ได้ในระยะเวลาหนึ่ง แต่ถ้าเลือดได้รับสารก่ออนุมูลอิสระจาก 2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH) เยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงจะเสื่อมและขาดความยืดหยุ่นจนทำให้ฮีโมโกลบินหลุดรั่ว (released Hb) ออกมาจากผนังเซลล์ในที่สุด (35)

วิธีการ

1. เจือจางเม็ดเลือดแดงที่ปั่นล้างแล้วใน PBS ให้มีความเข้มข้นเป็น 4% Hct แบ่งเลือดที่เจือจางอยู่ในบัฟเฟอร์ลงในหลอดอย่างละ 2 mL

2. pretreat เม็ดเลือดแดงกับเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40 µM ตามลำดับ

3. บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที แล้วนำเซลล์มาปั่นล้างด้วยบัฟเฟอร์หนึ่งครั้ง หลังจากนั้นชักนำให้เกิดภาวะเครียดด้วย AAPH 2 µL (จาก stock 25 M) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

4. เมื่อครบกำหนดเวลาจึงนำเซลล์ไปปั่นตกตะกอนเพื่อแยกเอาน้ำใส (supernatant) มาตรวจหาปริมาณของ released Hb จากเม็ดเลือดแดงที่แตกด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมีเตอร์ที่ความยาวคลื่น 540 nm แล้วคำนวณเป็นร้อยละการแตก (%Hemolysis)

* ทดสอบในเลือดคนปกติ 4 ราย จำนวน 3 ซ้ำ และเลือดผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD 3 ราย จำนวน 2-3 ซ้ำ

3.3.3 **การทดสอบระดับรีดิวซ์กลูตาไธโอน** (Assay for reduced GSH level)

หลักการ

หมู่ sulhydryl ของ GSH จะทำปฏิกิริยากับ 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) และ ให้สีเหลืองของ 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) ซึ่งถูกวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 nm โดยความเข้มของสีเหลืองที่เกิดจาก TNB จะเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อปริมาณความเข้มข้นของ reduced GSH ในเม็ดเลือดแดง (36)

วิธีการ

1. นำตะกอนเม็ดเลือดแดงที่ปั่นตกจากข้อ 3.3.2 มาวัดระดับรีดิวซ์กลูตาไธโอนที่คงสภาพละลายเม็ดเลือดแดงในน้ำกลั่นปริมาตร 1.8 mL ทิ้งไว้ 5 นาที จนได้เป็น hemolystae

2. เติม 1.67% meta-phospheric acid ปริมาตร 1.0 mLลงในหลอดเพื่อตกตะกอนฮีโมโกลบิน แล้วกรองสารละลาย hemolysate ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

3. นำส่วนใสที่กรองได้มา 600 µL ผสมกับ 0.3 M Na_2HPO_4 ปริมาตร 1.2 mL ให้เข้ากันดี จึงเติม 0.2% 2-nitrobenzoic acid/1% sodium citrate ปริมาตร 150 µL ผสมให้เข้ากันจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 nm แล้วคำนวณค่าปริมาณ reduced GSH เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

* ทดสอบในเลือดคนปกติ 4 ราย จำนวน 3 ซ้ำ และเลือดผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD 3 ราย จำนวน 2-3 ซ้ำ

3.3.4 การทดสอบ Phagocytic activity ของนิวโตรฟิลด้วยวิธี Nitroblue tetrazolium (NBT) test

<u>หลักการ</u>

NBT เป็นการทดสอบการทำงานของเซลล์นิวโตรฟิลในการรีดิวซ์สี NBT จากสีเหลืองให้กลายเป็นสีน้ำเงินดำ ปฏิกิริยานี้เกิดจากนิวโตรฟิลกินสารประกอบ PMA-stimulated NBT แล้วเกิด respiratory burst ทำให้เปลี่ยนสารที่กินเข้าไปเป็น formazan blue black ซึ่งขบวนการรีดักชั่น (reduction) นี้จะเกิดขึ้นภายในไซโทพลาสซึมของนิวโตรฟิล ผลการทดสอบจะพบว่าผู้ที่มีความผิดปกติของนิวโตรฟิลด้าน function ให้ผลลบ NBT (NBT-negative) ส่วนคนที่มีระดับเอนไซม์ G6PD หรือ NADPH oxidase ในนิวโตรฟิลปกติจะพบเซลล์ที่ให้ผลบวก (NBT-positive) (32)

<u>วิธีการ</u>

1. ปั่นเลือดครบส่วนด้วยความเร็วรอบ 3,000 rpm นาน 5 นาที แล้วแยกเอาเฉพาะ buffy coat มาเจือจางลงใน PBS อัตราส่วน 1:1

2. จากนั้น overlay ลงบน Histopaque แล้วนำไปปั่นที่ 1,500 rpm นาน 30 นาที เพื่อแยกเอา mononuclear cells ที่ลอยอยู่บนชั้น PBS ทิ้งไป

3. นำนิวโตรฟิลที่ปนอยู่ในชั้น packed red cells มาผสมกับสารละลาย 5%dextran/0.9% NaCl แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จะได้เซลล์นิวโตรฟิลแขวนลอยอยู่บนสารละลาย

4. ต่อมากำจัดเม็ดเลือดแดงที่ปนมาด้วยการเติมน้ำกลั่นลงไปหนึ่งเท่าตัว นาน 2 นาที จากนั้นเติม 2.7%NaCl ปริมาตรครึ่งเท่าตามลงไปทันที แล้วนำเซลล์ไปปั่นล้างใน PBS อีกครั้ง จะได้เฉพาะเซลล์นิวโตรฟิล (มีอัตรารอดชีวิตและความบริสุทธิ์ประมาณ ร้อยละ 90)

5. เจือจางนิวโตรฟิล 1x10^6 cells ลงในบัฟเฟอร์ที่มีส่วนผสมของ 2% human serum ปริมาตร 4 mL แยกเซลล์เป็น 4 ชุด ตามสภาวะการทดลอง ต่าง ๆ

ชุดที่ 1: Unstimulated neutrophils (เติม 60%DMSO 3 µL)

ชุดที่ 2: PMA-stimulated neutrophils (1µL จาก stock 50 mg/mL)

ชุดที่ 3: Cur.-stimulated neutrophils (C1/C3, 3 µL จาก stock 10 mM)

ชุดที่ 4: PMA+Cur.-stimulated neutrophils

6. กระตุ้นนิวโตรฟิลด้วยสารชนิดต่าง ๆ ข้างต้นที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 15 นาที แล้วเติมผงสี 0.075% NBT ลงในทุกหลอด ปล่อยให้เซลล์รีดิวซ์สีประมาณ 30 นาที

7. นำเซลล์นิวโตรฟิลไปปั่นตกที่ 2,000 rpm นาน 5 นาที แล้วใช้ pasteur pipette ดูด supernatant ทิ้ง จากนั้นเขย่าหลอดทดลองเบา ๆ แล้วสเมียร์ sediment ที่เหลือบนสไลด์

8. เมื่อสเมียร์แห้งแล้วจึงย้อมสไลด์ด้วยสี Wright's stain เพื่อประเมินผลการเกิด oxidative burst ของนิวโตรฟิลในหลอดทดลอง โดยดูความสามารถในการรีดิวซ์สี NBT จากสีเหลืองเป็นสีน้ำเงิน (formazan blue) ด้วยกล้องจุลทรรศน์หัว oil ที่กำลังขยาย 1,000x

9. นับนิวโตรฟิลจำนวน 100 ตัว แล้วรายงานจำนวนนิวโตรฟิลที่ให้ผล NBT-positive เป็นร้อยละ Cells reducing NBT

* ทดสอบในเลือดคนปกติ 6 ราย และเลือดผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD 8 ราย จำนวน 1 ครั้ง

3.3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยกำหนดนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่น 95% (*P*-value<0.05)

1. เลือกใช้สถิติแบบไม่ใช้พารามีเตอร์ เนื่องจากกลุ่มตัวอย่างมีขนาดเล็ก การแจกแจงข้อมูลไม่เป็นแบบปกติและความแปรปรวนของประชากรไม่เท่ากัน ข้อมูลที่วัดได้จากกลุ่มตัวอย่างจึงนำเสนอเป็นค่ามัธยฐาน (Median) ± ค่าพิสัยระหว่างควอไทล์ (IQR)

2. ใช้สถิติ Kruskal-Wallis test, Jonckheere-Terpstra test และ Mann-Whitney U test เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่ามัธยฐานปริมาณเมทฮีโมโกลบินระหว่างเลือดที่ไม่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระ กับเลือดที่ได้รับสารเคอร์คิวมินอยด์หรือแอนะล็อก ในสภาวะที่มีการเหนี่ยวนำออกซิเดชันด้วย sodium nitrite

3. ใช้สถิติ Kruskal-Wallis test, Jonckheere-Terpstra test และ Mann-Whitney U test เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่ามัธยฐานร้อยละการแตกของเม็ดเลือดแดง ระหว่างเลือดที่ไม่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระ กับเลือดที่ได้รับสารเคอร์คิวมินอยด์หรือแอนะล็อก ในสภาวะที่มีในภาวะที่มีการเหนี่ยวนำออกซิเดชันด้วย AAPH

5 ใช้สถิติ Spearman's rho วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดงกับการยับยั้งการพร่องกลูตาไธโอนของสารทดสอบแต่ละชนิด (C1/C2/C3/C4/C5)

4. ใช้สถิติ Spearman's rho วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ว่าเพศหรือภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD มีผลต่อระดับนิวโตรฟิลรีดิวซ์สี NBT ในแต่ละสภาวะการทดลอง (treatment condition)หรือไม่

5. ใช้สถิติ Kruskal-Wallis test, Jonckheere-Terpstra test และ Mann-Whitney U test เพื่อทดสอบความแตกต่างของค่ามัธยฐานร้อยละนิวโตรฟิลรีดิวซ์สี NBT ระหว่างกลุ่มที่มาจากแต่ละสภาวะการทดลอง

3.4 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

3.4.1 คณะผู้วิจัยคัดเลือกอาสาสมัครคนปกติและอาสาสมัครผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD อย่างละ 3-8 ราย หลังจากได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ เลขที่รับรอง อ.082/2555 โดยให้อาสาสมัครลงนามยินยอมก่อนทำการเจาะเลือดปริมาตร 3-10 มิลลิลิตร (mL)

3.4.2 ประชากรที่ผู้วิจัยสนใจทำการศึกษาคือ นักศึกษามหาวิทยาลัยหัวเฉียวที่อยู่ในวัยผู้ใหญ่ ซึ่งผู้วิจัยพบว่ากลุ่มตัวอย่างที่เป็นนักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ชั้นปีที่ 3 และ 4 เป็นอาสาสมัครสุขภาพดีที่เคยผ่านการตรวจคัดกรองภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD มาก่อนด้วยวิธี Fluorescent spot test ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ International Committee for Standardization in Hematology แนะนำให้ใช้ได้

3.4.3 เก็บเลือดใส่สารกันเลือดแข็ง citrate phosphate dextrose (CPD) เพื่อใช้สำหรับการทดสอบ methemoglobin, oxidative hemolysis และ reduced glutathione โดยเลือดที่ใช้ต้องเก็บไว้ไม่เกิน 1 วัน

3.4.4 เก็บเลือดใส่สารกันเลือดแข็ง heparin เพื่อใช้สำหรับการทดสอบ Nitroblue tetrazolium (NBT) test โดยเลือดที่ใช้ต้องเก็บไว้ไม่เกิน 6 ชั่วโมง

บทที่ 4
ผลการวิจัย

คณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบสารสำคัญจากขมิ้นชันที่ออกฤทธิ์ได้แก่ เคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกชนิดต่าง ๆ โดยให้รหัสไว้ดังนี้ Curcumin, C1; Demethoxycurcumin, C2; Bis-demethoxycurcumin, C3; Di-*O*-demethylcurcumin, C4; Mono-*O*-demethylcurcumin, C5 เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพระหว่างสารแต่ละชนิด วิธีดำเนินการวิจัยประกอบไปด้วยการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน/ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งการพร่องกลูตาไธโอน และฤทธิ์กระตุ้นการทำหน้าที่ของเม็ดเลือดขาวนิวโตรฟิล

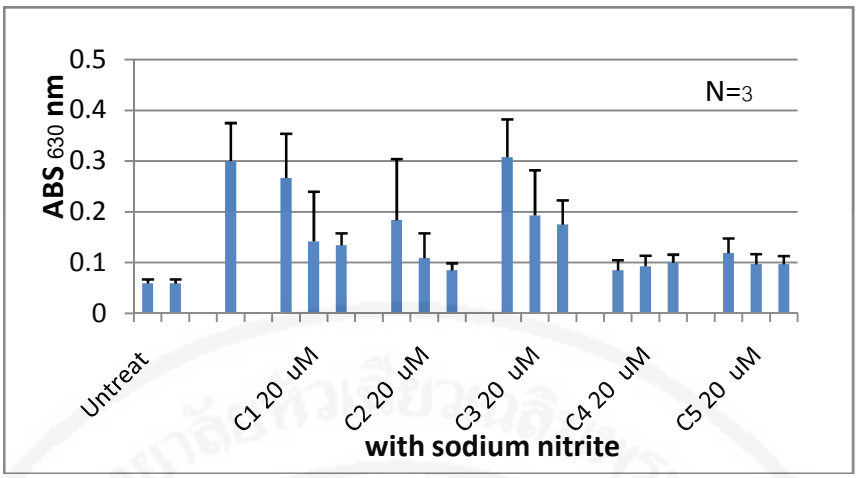
4.1 การทดสอบประสิทธิภาพของเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกต่อการยับยั้งเมทฮีโมโกลบิน

แม้ร่างกายได้รับ sodium nitrite เพียงปริมาณเล็กน้อย ถ้าสารนี้เข้าไปในเลือดจะไปจับกับฮีโมโกลบินออกซิไดซ์ให้เป็นเมทฮีโมโกลบิน ทำให้เลือดขาดออกซิเจน ดังนั้นเลือดที่ขาดกลูโคสหรือขาดเอนไซม์ G6PD มักเกิดความผิดปกติได้ง่ายกว่าปกติ (38) การศึกษานี้จึงใช้เม็ดเลือดแดงคนปกติเตรียมเป็น hemolysate โดยกำหนดให้หลอดควบคุมผลลบ (hemolysate+DMSO) เป็นสภาวะที่ฮีโมโกลบินอยู่ในรูปรีดิวซ์ และหลอดควบคุมผลบวก (hemolysate+DMSO+sodium nitrite) เป็นภาวะที่ฮีโมโกลบินเกิดออกซิเดชันสูงสุด ผลการวิจัยพบว่า ระดับเมทฮีโมโกลบินหลังจากชักนำออกซิเดชันด้วย 0.75 mM sodium- nitrite นาน 20 นาที ในหลอด hemolysate+DMSO+sodium nitrite (ABS =0.300 ± 0.075) มีค่ามากกว่าหลอด hemolysate ที่ pretreat ด้วยเคอร์คิวมินหรือแอนะล็อกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน หลังจากชักนำออกซิเดชันด้วย 0.75 mM sodium nitrite นาน 20 นาที (ทำ pilot experiment ในเลือดคนปกติ 3 ราย) โดยพบว่าความสามารถในการยับยั้งเมทฮีโมโกลบินของสารสกัดขมิ้นชันทั้ง 5 ชนิดแปรผันตามความเข้มข้นของสาร กล่าวคือ ที่ความเข้มข้น 40 µM มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเมทฮีโมโกลบินได้มากที่สุด รองลงมา คือ ที่ 20 µM และ 10 µM ตามลำดับ (**ตารางที่ 1**)

กราฟแท่ง **รูปที่** 3 แสดงการวัดหาปริมาณเมทฮีโมโกลบินที่ความยาวคลื่น 630 nm โดยจำแนกตามความเข้มข้น เมื่อเปรียบเทียบกันในแต่ละสภาวะการทดลอง พบว่าในชุดทดลองที่มี C1/C2/C3/C4/C5 เข้มข้น 10-40 μM สาร C5 และ C4 สามารถยับยั้งการเกิดเมทฮีโมโกลบินได้ดีใกล้เคียงกัน รองลงมาคือ C2, C1 และ C3 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ค่าเมทฮีโมโกลบินที่เปลี่ยนแปลงเมื่อ pretreat hemolysate ด้วยสารเคอร์คิวมิ นอยด์จากขมิ้นชัน (C1, C2, C3) และแอนะล็อก (C4, C5)

Treatment conditions	Met-Hb (ABS 630 nm)			
	ความเข้มข้นของเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกที่ใช้ทดสอบ 10-40 μM			
	Hemolysate Without sodium nitrite	C1/C2/C3/C4/C5 10 μM + sodium nitrite	C1/C2/C3/C4/C5 20 μM + sodium nitrite	C1/C2/C3/C4/C5 40 μM + sodium nitrite
Untreat	0.059 ± 0.008	-	-	-
DMSO	0.059 ± 0.008	0.300 ± 0.075	0.300 ± 0.075	0.300 ± 0.075
C1	-	0.267±0.087	0.142±0.098	0.134±0.024
C2	-	0.184±0.120	0.109±0.049	0.085±0.014
C3	-	0.308±0.074	0.193±0.089	0.175±0.048
C4	-	0.085±0.020	0.093±0.021	0.100±0.016
C5	-	0.119±0.029	0.097±0.020	0.097±0.016



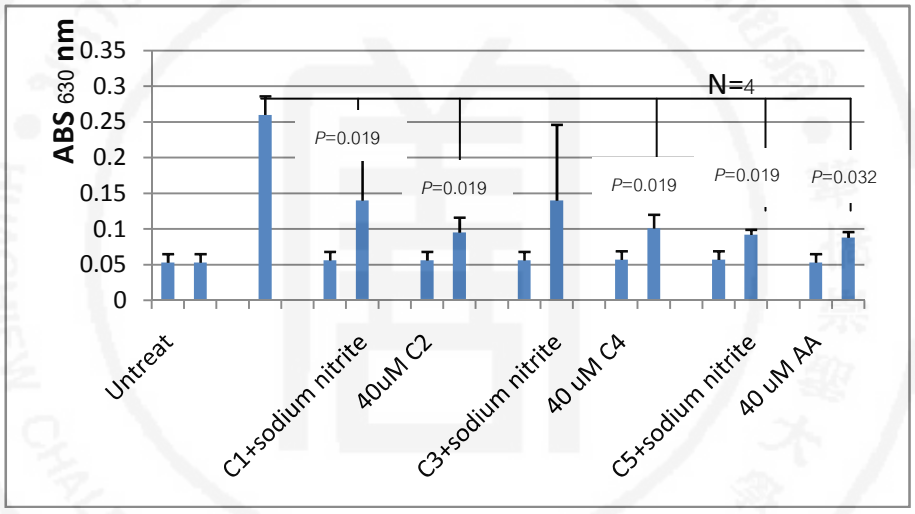
รูปที่ 3 ค่ามัธยฐานเมทฮีโมโกลบินใน hemolysate ที่ pretreat ด้วยเคอร์คิวมินอยด์และแอนะ-ล็อกที่ความเข้มข้น 10 μM, 20 μM, และ 40 μM (ทดสอบซ้ำ 2 ครั้งในเลือดคนปกติจำนวน 3 ราย) จากกราฟกล่าวได้ว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารเคอร์คิวมินและแอนะ-ล็อกเป็นปฏิภาคโดยตรงต่อความเข้มข้น โดยพบว่าที่ความเข้มข้น 20 μM ถึง 40 μM สาร C4 และ C5 ต้านการเกิดออกซิเดชันของฮีโมโกลบินได้ดีที่สุด

ตารางที่ 2 ค่ามัธยฐาน (median) และค่าพิสัยควอไทล์ (IQR) ของ hemolysate ที่ pretreat ด้วยสารเคอร์คิวมินอยด์ (C1, C2, C3) และแอนะล็อก (C4, C5) เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระวิตามินซี

Treatment conditions	**ค่ามัธยฐานและค่าพิสัยควอไทล์ของสารละลายน้ำฮีโมโกลบิน ที่ค่าการดูดกลืนแสง** 630 nm		
	Without sodium nitrite	+ 0.75 mM sodium nitrite	% Inhibition of met-Hb
Untreat	0.053±0.012	-	-
Cont. DMSO	0.053±0.012	0.260±0.026	0
40 μM C1	0.056±0.012	0.140±0.065	40.92
40 μM C2	0.056±0.012	0.095±0.021	60.72
40 μM C3	0.056±0.012	0.140±0.106	39.26
40 μM C4	0.057±0.012	0.101±0.019	58.70
40 μM C5	0.057±0.012	0.092±0.007	62.37
40 μM AA	0.053±0.012	0.088±0.008	63.77

4.2 การทดสอบฤทธิ์ของเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกต่อการยับยั้งเมทฮีโมโกลบินที่ความเข้มข้น 40 µM

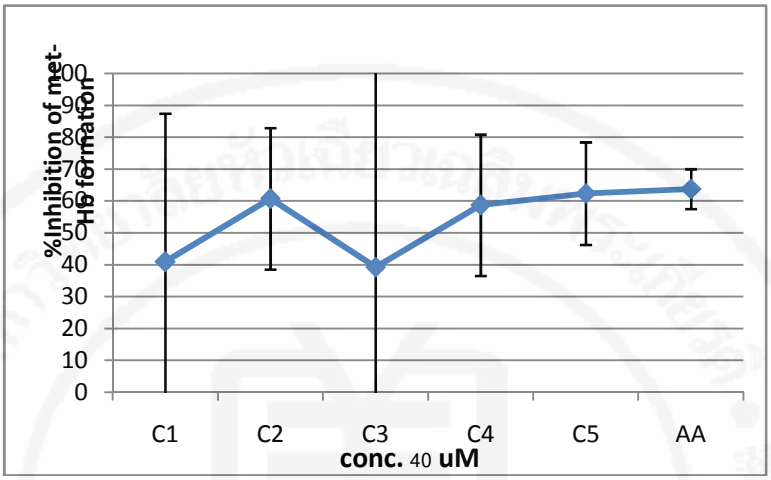
เพื่อหาประสิทธิภาพของสารแต่ละชนิดต่อการต้านออกซิเดชันในฮีโมโกลบิน และเปรียบเทียบความสามารถของสารทั้ง 5 ชนิดกับสารต้านอนุมูลอิสระที่ออกฤทธิ์สูง คือ วิตามินซี (ascorbic acid; AA) ซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็น radical scavenger ที่พบได้ทั่วไปในพืชสมุนไพร และสามารถเสริมฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่น ๆ เช่น วิตามินอี ฟลาโวนอยด์ (39) การศึกษานี้ทดสอบในเลือดคนปกติเพศชาย จำนวน 4 ราย โดยประเมินผลที่ความเข้มข้น 40 µM ที่เวลา 20 นาที หลังจากชักนำด้วย 0.75 mM sodium nitrite



รูปที่ 4 ค่ามัธยฐานเมทฮีโมโกลบินที่ pretreat ก่อนด้วยสาร C1/ C2/ C3/ C4/ C5 หรือ AA เปรียบเทียบกันระหว่างชุดทดลองที่ไม่มี sodium nitrite กับ ชุดทดลองที่เหนี่ยวนำออกซิเดชันด้วย sodium nitire (N = 4)

เมื่อไม่มีสารต้านออกซิเดชัน hemolysate หลอด DMSO+sodium nitrite เกิดออกซิเดชันของฮีโมโกลบินในระดับสูงที่สุด (0.260±0.026) แต่ในหลอด hemolysate ที่ pretreat ก่อนด้วย C1/ C2/ C3/ C4/ C5 หรือ AA กลับพบว่าปริมาณออกซิเดชันเกิดได้น้อยแม้ว่าจะชักนำด้วย 0.75 mM sodium nitrite โดย AA ที่ความเข้มข้น 40 µM ทำให้ปริมาณเมทฮีโมโกลบินเกิดขึ้นน้อยที่สุด (0.085±0.009) เมื่อเทียบกับกลุ่มสารสกัดขมิ้นชันและกลุ่มสารแอนะล็อก ผลการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติ Mann-Whitney U test โดยการเปรียบเทียบระหว่างหลอดควบคุมที่ไม่เติมสารใด ๆ (DMSO+sodium nitrite) กับหลอดที่มีสาร C1/ C2/ C3/ C4/ C5+sodium nitrite พบว่าค่า

มัธยฐานเมทฮีโมโกลบินใน hemolystae ที่เติมสาร C1, C2, C4, C5 และ AA มีระดับต่ำกว่าหลอดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ยกเว้น C3 ที่พบว่าค่ามัธยฐานเมทฮีโมโกลบินไม่ต่างจากหลอดควบคุม DMSO, $P = 0.080$ (**ตารางที่** 2 และ **รูปที่** 4)



รูปที่ 5 ร้อยละการยับยั้งเมทฮีโมโกลบินในสารละลายน้ำฮีโมโกลบินที่ pretreat ด้วยสาร C1/ C2/ C3/ C4/ C5 หรือ AA เข้มข้น 40 µM เมื่อเปรียบเทียบในระหว่างสารทั้ง 5 ผลการวิเคราะห์พบว่าความสามารถในการยับยั้งเมทฮีโมโกลบินของสารแต่ละชนิดมีระดับที่แตกต่างกัน (ทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง)

ร้อยละการยับยั้งเมทฮีโมโกลบินใน **ตารางที่** 2 คำนวณมาจากสมการ (3) ผลการวิเคราะห์พบว่า C5, C4 และ C2 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของฮีโมโกลบินได้ดีและใกล้เคียงกับ AA ส่วน C1 และ C3 มีร้อยละยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของฮีโมโกลบินได้น้อยที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าสาร C1 และ C3 ให้ค่าพิสัยควอไทล์กว้างมาก ซึ่งน่าจะเกิดจากความไม่คงตัวของสารที่ใช้ทดสอบหรืออาจเกิดจากจำนวนการทดสอบซ้ำยังไม่มากพอ (**รูปที่** 5)

$$\%\text{Inhibition of met-Hb} = \frac{(ABS_{\text{dmso+sodium nitrite}} - ABS_{\text{cur+sodium nitrite}})}{ABS_{\text{dmso+sodium nitrite}}} \times 100 \qquad (3)$$

*กำหนดให้ $ABS_{\text{dmso+sodium nitrite}}$ เป็นค่าการดูดกลืนแสงของเมทฮีโมโกลบินในหลอด DMSO ที่มี sodium nitrite ชักนำให้เกิดออกซิเดชัน โดยอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 630 nm

* $ABS_{cur+sodium\ nitrite}$ เป็นค่าการดูดกลืนแสงของเมทฮีโมโกลบินในหลอดที่ทดสอบด้วยเคอร์คิวมินอยด์หรือแอนะล็อก ที่มี sodium nitrite ชักนำให้เกิดออกซิเดชันโดยอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 630 nm

4.3 การเปลี่ยนแปลงของเมทฮีโมโกลบินและออกซีฮีโมโกลบินในสารละลายน้ำฮีโมโกลบิน

เมื่อนำสารสกัดขมิ้นชันในรูปเคอร์คิวมินอยด์มาใช้เป็นอาหารเสริมในผู้ป่วยโลหิตจางธาลัสซีเมียที่มีภาวะเหล็กเกิน จากผลการวิจัยพบว่าสารสกัดขมิ้นชันมีฤทธิ์ลด oxidative stress และลดระดับ carbonyl protein ในพลาสมาของผู้ป่วยอย่างมีนัยสำคัญ (40, 41) เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากขมิ้นชันต่อการลดออกซิเดชันของฮีโมโกลบินในผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD คณะผู้วิจัยได้ตรวจวัดระดับออกซีฮีโมโกลบิน (oxy-hemoglobin) ที่ค่าการดูดกลืนแสง 540 nm ควบคู่การตรวจวัดระดับเมทฮีโมโกลบินที่ความยาวคลื่น 630 nm ด้วยเครื่องสเปคโทรโฟโตมีเตอร์ เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง reduced hemoglobin และ oxidized hemoglobin

จาก **ตารางที่** 3 แสดงผลการตรวจติดตามรีดิวซ์ฮีโมโกลบิน (reduced Hb) ที่ค่าการดูดกลืนแสง 540 nm ผลการวิจัยพบว่า hemolysate ที่ไม่ได้เติมสารใด ๆ มีปริมาณออกซีฮีโมโกลบินในระดับสูง แต่ใน hemolysate ที่ควบคุมด้วย DMSO พบว่าหลังจากชักนำออกซิเดชันด้วย 0.75 mM sodium nitrite เพียง 5 นาทีระดับออกซีฮีโมโกลบินลดต่ำลงอย่างรวดเร็ว (ส่งผลให้ระดับออกซิไดซ์ฮีโมโกลบินเพิ่มขึ้นแทน) สำหรับ hemolysate ที่ pretreat ก่อนด้วยสาร C1/ C2/ C3/ C4/ C5 หรือ AA นั้นกลับพบว่า เมื่อเติม 0.75 mM sodium nitrite ลงไป ปริมาณออกซีฮีโมโกลบินจะค่อย ๆ ลดลงและลดต่ำชัดเจนหลังชักนำออกซิเดชันนานมากกว่า 15 นาที โดยการเปลี่ยนแปลงของระดับรีดิวซ์ฮีโมโกลบินของกลุ่มคนปกติและกลุ่มคนที่พร่องเอนไซม์ G6PD ที่วัดจากค่าออกซีฮีโมโกลบินเป็นไปในทิศทางเดียวกัน

ตารางที่ 3 การเปลี่ยนแปลงของออกซีฮีโมโกลบิน เมื่อ pretreat ก่อนในสารเคอร์คิวมินอยด์ และแอนะล็อก หลังจากเหนี่ยวนำด้วย sodium nitrite นาน 5 - 45 นาที

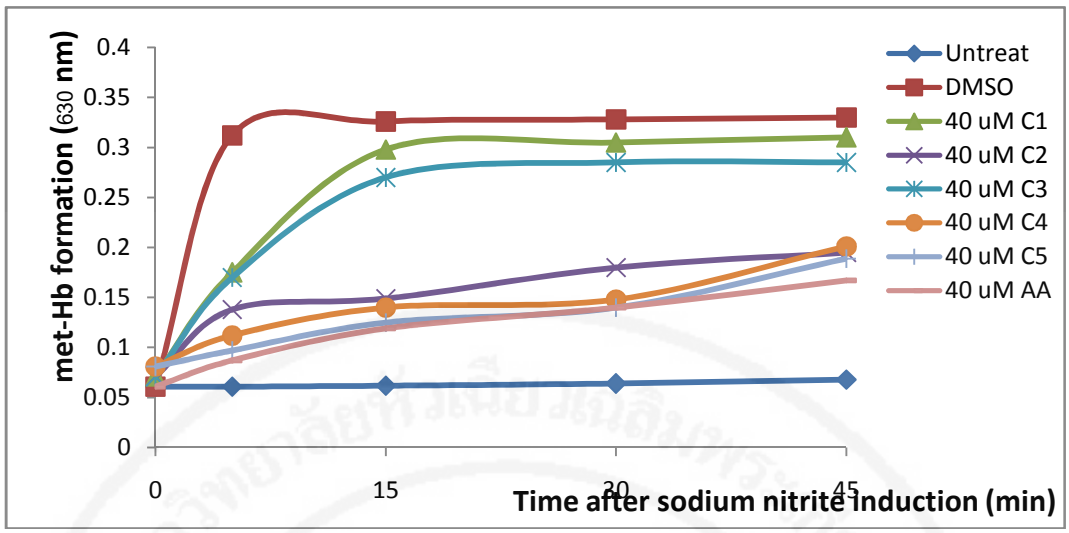
Normal hemolysate	Oxy-Hb (ABS 540 nm)				
	Without sodium nitrite	With sodium nitrite			
	0 min	5 min	15 min	30 min	45 min
Untreat	*1.316*	-	-	-	1.316
Cont. DMSO	1.316	0.688	0.688	0.687	0.687
40 µM C1	1.331	1.186	0.879	0.856	0.840
40 µM C2	1.331	1.212	1.260	1.208	1.164
40 µM C3	1.331	1.267	1.221	0.987	0.715
40 µM C4	1.331	1.269	1.214	1.163	1.120
40 µM C5	1.331	1.250	1.225	1.184	1.123
40 µM AA	1.331	1.267	1.214	1.167	1.126
G6PD def. hemolysate	Without sodium nitrite	With sodium nitrite			
	0 min	5 min	15 min	30 min	45 min
Untreat	1.046	-	-	-	1.046
Cont. DMSO	1.046	0.540	0.539	0.539	0.539
40 µM C1	1.095	0.982	0.919	0.878	0.841
40 µM C2	1.095	1.015	0.968	0.929	0.890
40 µM C3	1.095	1.022	0.978	0.940	0.900
40 µM C4	1.095	1.120	1.055	1.004	0.958
40 µM C5	1.095	1.125	1.057	1.004	0.962
40 µM AA	1.095	1.103	1.035	0.980	0.933

หมายเหตุ แสดงค่ามัธยฐานออกซีฮีโมโกลบินจากการวัดด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมีเตอร์ (Normal = 2, G6PD = 2)

การทดลองนี้ได้เทียบเปรียบผลการต้านออกซิเดชันของสารแต่ละชนิดกับวิตามินซีซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดี โดยทดสอบในเลือดคนปกติเพศชาย จำนวน 3 ราย และเลือดผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD จำนวน 4 ราย จากผลการวิเคราะห์ในเม็ดเลือดแดงคนปกติ (**ตารางที่** 4 และ **รูปที่** 6) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเมทฮีโมโกลบิน หลังจากชักนำออกซิเดชันด้วย 0.75 mM sodium nitrite ที่เวลา 30 นาที พบว่าสารกลุ่มแอนะล็อกมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ดีกว่าสาร เคอร์คิวมินอยด์จากขมิ้นชันเรียงลำดับจากมากไปน้อยได้ดังนี้ C5 = C4 > C2 > C3 > C1 ตามลำดับ ส่วนผลการวิเคราะห์ในเม็ดเลือดแดงผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน (**ตารางที่** 5 และ **รูปที่** 7) พบว่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันของฮีโมโกลบินได้ผลในแตกต่างกันเล็กน้อย คือ C5 > C4 > C2 > C1 > C3 ตามลำดับ เพื่อให้ผลการศึกษาสอดคล้องกับการทดสอบในข้อ 4.1 การเพิ่มจำนวนตัวอย่างและทดสอบซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้งน่าจะช่วยยืนยันผลการเปรียบเทียบฤทธิ์ได้ชัดเจนขึ้น

ตารางที่ 4 การเปลี่ยนแปลงของเมทฮีโมโกลบินในคนปกติ ที่ pretreat ก่อนด้วยเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกเข้มข้น 40 μM หลังจากเหนี่ยวนำออกซิเดชันด้วย sodium nitrite นาน 5 - 45 นาที

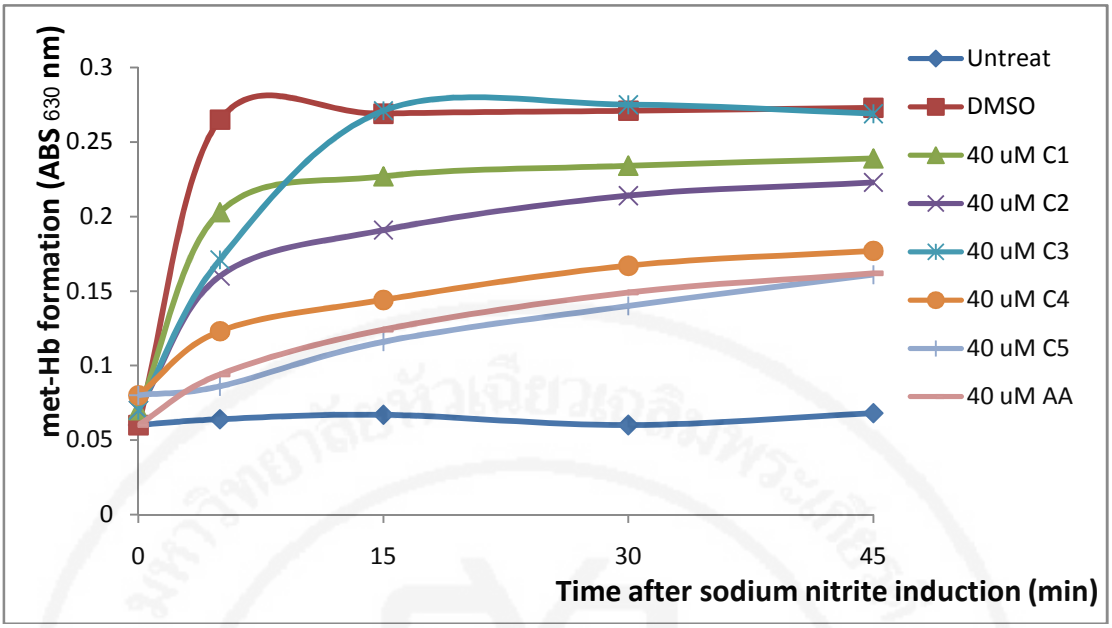
Normal hemolysate (N=3)	Met-Hb (ABS 630 nm)				
	0 min	5 min	15 min	30 min	45 min
Untreat (hemolysate alone)	0.061	0.061	0.062	0.064	0.068
Cont. DMSO	0.061	0.312	0.326	0.328	0.330
40 μM C1	0.071	0.175	0.298	0.305	0.310
40 μM C2	0.071	0.138	0.149	0.180	0.195
40 μM C3	0.071	0.170	0.270	0.285	0.285
40 μM C4	0.081	0.112	0.140	0.148	0.201
40 μM C5	0.081	0.097	0.125	0.140	0.189
40 μM AA	0.061	0.087	0.119	0.140	0.167



รูปที่ 6 การเปลี่ยนแปลงของเมทฮีโมโกลบินในคนปกติเพศชายที่ pretreat ก่อนด้วยเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกเข้มข้น 40 µM โดยตรวจวัดที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน (ทดสอบในตัวอย่างเลือดจำนวน 3 ราย แต่ละรายทดสอบ 2 ซ้ำ)

ตารางที่ 5 การเปลี่ยนแปลงของฮีโมโกลบินในผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD ที่ pretreat ก่อนด้วยเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกเข้มข้น 40 µM หลังจากชักนำออกซิเดชันด้วย sodium nitrite นาน 0 - 45 นาที

G6PD def. hemolysate (N=4)	Met-Hb (ABS 630 nm)				
	0 min (hemolysate alone)	5 min	15 min	30 min	45 min
Untreat	0.060	0.064	0.067	0.060	0.068
Cont-DMSO	0.060	0.265	0.269	0.271	0.273
40 µM C1	0.070	0.203	0.227	0.234	0.239
40 µM C2	0.070	0.160	0.191	0.214	0.223
40 µM C3	0.080	0.171	0.271	0.275	0.269
40 µM C4	0.080	0.123	0.144	0.167	0.177
40 µM C5	0.080	0.086	0.116	0.140	0.161
40 µM AA	0.060	0.094	0.124	0.149	0.162



รูปที่ 7 การเปลี่ยนแปลงของเมทฮีโมโกลบินในผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD เพศชาย ที่ pretreat ก่อนด้วยเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกเข้มข้น 40 µM โดยตรวจติดตามที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน (ทดสอบในตัวอย่างเลือดจำนวน 4 ราย แต่ละรายทดสอบ 1-2 ซ้ำ)

4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกต่อการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดง

สารสกัดขมิ้นชันเป็นสมุนไพรที่มีการนำมาใช้ทดลองลดภาวะเครียดออกซิเดชันกันในผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่มีอนุมูลอิสระในร่างกายสูง (42, 43, 44) ดังนั้นการศึกษาผลของเคอร์คิวมินอยด์ต่อระบบต้านภาวะ oxidative stress ในเม็ดเลือดแดงที่ถูกชักนำออกซิเดชันด้วย AAPH จึงเป็นหนึ่งในวิธีพิสูจน์คุณค่าของสมุนไพรจากธรรมชาติ การศึกษานี้ทดสอบโดยบ่มเซลล์เม็ดเลือดในสารจากขมิ้นชัน นาน 30 นาที จากนั้นปั่นล้างด้วย PBS จึงเติม AAPH เข้มข้น 25 mM ลงไป เมื่อครบ 3 ชั่วโมง นำเซลล์ไปปั่นแล้วดูดน้ำส่วนใสไปวัดหาฮีโมโกลบินที่หลั่งออกมาจากเซลล์ที่แตก โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm แล้วคำนวณหา %Hemolysis และ %Inhibition hemolysis ส่วนตะกอนเม็ดเลือดแดงที่เหลือนำไปทำปฏิกิริยากับน้ำยา DTNB แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 nm จากนั้นคำนวณกลับเป็นหน่วย µmole/g Hb

4.4.1 ทดสอบเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ผลของเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกในการป้องกันการแตกของเม็ดเลือดแดง โดยเปรียบเทียบระหว่างเม็ดเลือดแดงที่ควบคุมด้วย DMSO กับเม็ดเลือดแดงที่ได้รับสาร C1/C2/C3/C4/C5 เข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 μM ตามลำดับ การยับยั้งภาวะเครียดออกซิเดชันในเม็ดเลือดแดง โดยเฉลี่ยทั้ง 4 dose พบว่าทั้ง C4 และ C5 สามารถป้องกันการแตกของเม็ดเลือดแดงจากอนุมูลอิสระ peroxyl ของ AAPH ได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่ C2, C3 และ C1 ตามลำดับ โดยร้อยละการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดงเป็นปฏิภาคโดยตรงต่อความเข้มข้นของสารเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อก (**ตารางที่ 6 และ รูปที่ 8**) ส่วนปริมาณของ resleased Hb เมื่อพิจาณาจากค่า %Hemolysis พบว่า ร้อยละการแตกของเม็ดเลือดแดงมีสัดส่วนผกผันกับขนาดความเข้มข้นของสารทดสอบทั้ง 5 ชนิด (**รูปที่ 9**)

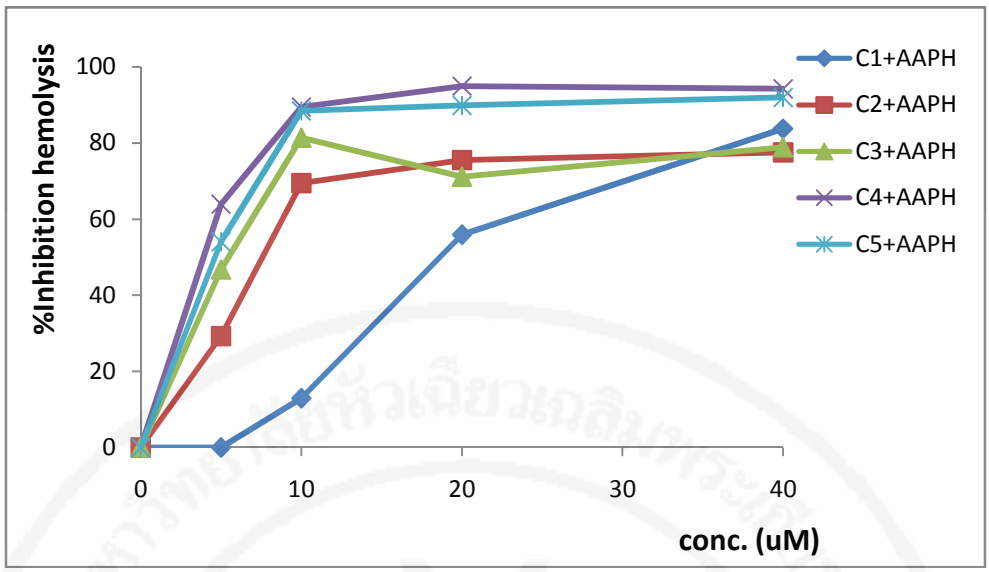
ตารางที่ 6 ร้อยละการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดง เมื่อทดสอบในกลุ่มคนปกติ เพศชาย จำนวน 3 ราย (ทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง)

% Inhibition hemolysis				
Concentration	5 μM	10 μM	20 μM	40 μM
DMSO+AAPH	0	0	0	0
C1+AAPH	0±*15.70*	12.95±6.91	55.88±6.91	83.76±10.78
C2+AAPH	29.28±11.44	69.46±2.07	75.53±2.07	77.54±4.01
C3+AAPH	46.78±13.91	81.42±6.18	71.10±6.18	78.82±11.91
C4+AAPH	63.90±11.02	89.42±1.77	94.91±1.77	94.21±2.49
C5+AAPH	54.05±17.02	88.42±0.85	89.84±0.85	91.95±3.90

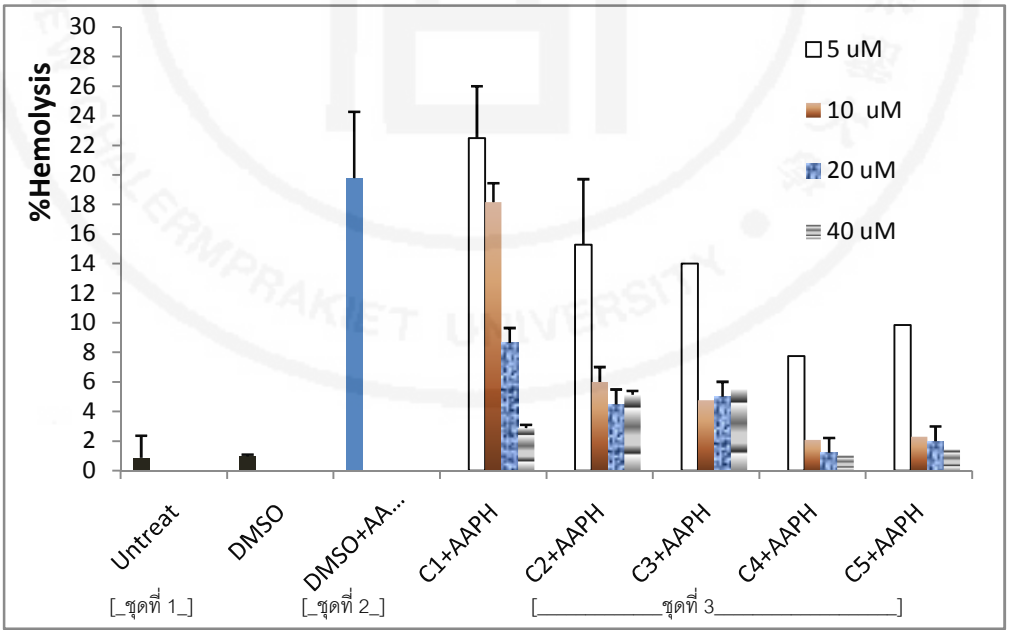
$$\% \text{ Inhibition hemolysis} = \frac{(ABS_{dmso+AAPH} - ABS_{cur+AAPH}) \times 100}{ABS_{dmso+AAPH}} \quad (4)$$

*กำหนดให้ $ABS_{dmso+AAPH}$ เป็นค่าการดูดกลืนแสงของฮีโมโกลบินในหลอด DMSO ที่มี AAPH ชักนำให้เกิดออกซิเดชัน โดยอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm

* $ABS_{cur+AAPH}$ เป็นค่าการดูดกลืนแสงของฮีโมโกลบินในหลอดที่ทดสอบด้วยเคอร์คิวมินอยด์ หรือแอนะล็อกอื่น ๆ ที่มี AAPH ชักนำให้เกิดออกซิเดชัน โดยอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm



รูปที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดงกับความเข้มข้นของสารทดสอบแต่ละชนิด

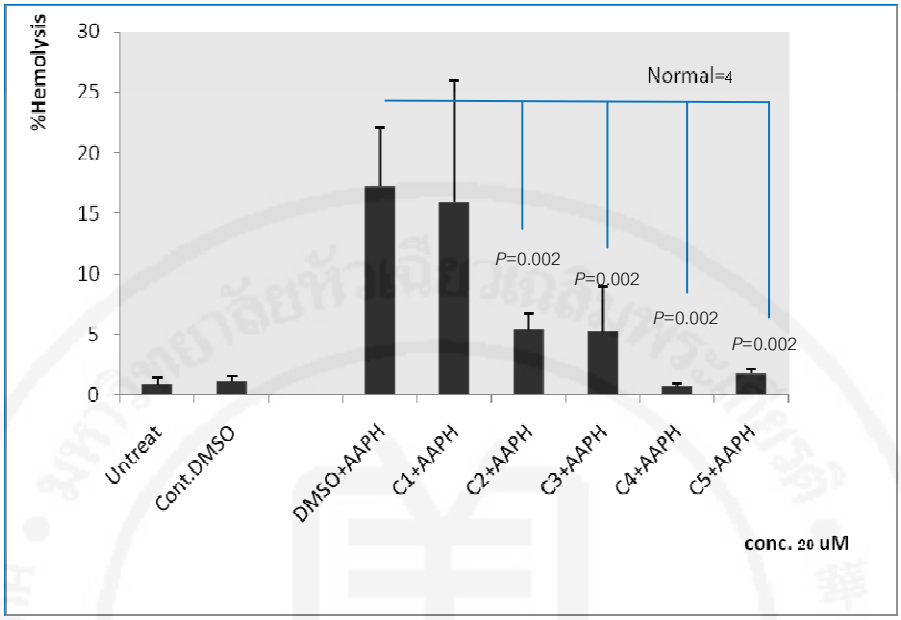


รูปที่ 9 กราฟแสดงร้อยละการแตกของเม็ดเลือดแดง โดยเม็ดเลือดแดง ชุดที่ 1 ไม่เติมสารใด ๆ เลย ชุดที่ 2 ควบคุมด้วย DMSO และ ชุดที่ 3 ให้สารเคอร์คิวมินอยด์หรือแอนะล็อกก่อนแล้วเติมสาร AAPH (ทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง)

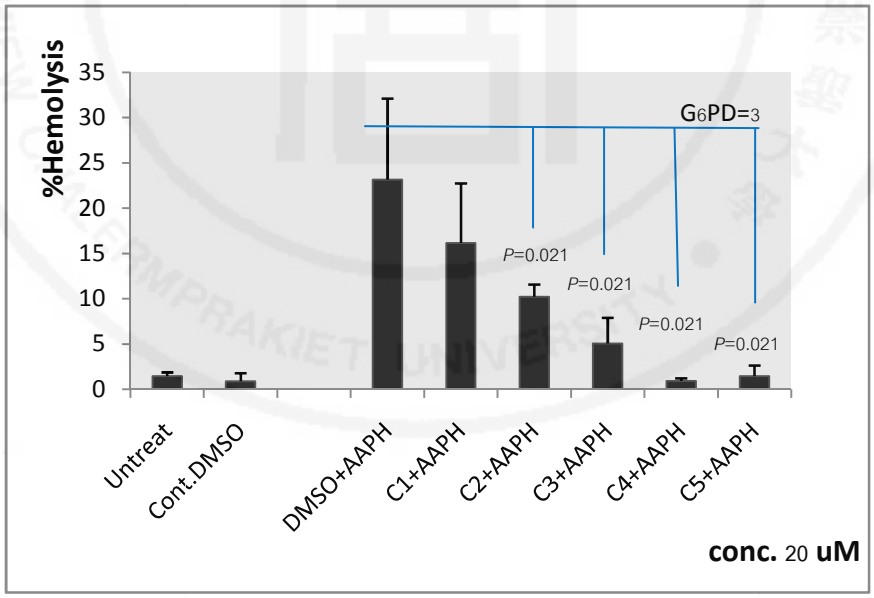
4.4.2 ทดสอบเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกที่ความเข้มข้น 20 μM ต่อการเกิด oxidative hemolysis

รูปที่ 10: A แสดงข้อมูลเปรียบเทียบความแตกต่างของ %Hemolysis ในกลุ่มคนปกติเพศชาย จากการทดสอบพบว่า เลือดที่ pretreat ก่อนด้วยสาร C2/C3/C4/C5 มีการแตกสลายของเม็ดเลือดแดงน้อยกว่าหลอดควบคุม DMSO อย่างชัดเจนและค่ามัธยฐานร้อยละการแตกของเม็ดเลือดแดงลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ยกเว้นหลอด C1 ที่พบว่าการแตกลดลงเพียงเล็กน้อย (P=0.406) ส่วนผลการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบความแตกต่างของ %Hemolysis ในกลุ่มคนที่พร่องเอนไซม์ G6PD เพศชาย พบว่าให้ผลในลักษณะเดียวกันกับกลุ่มคนปกติ (**รูปที่ 10**: B) โดยสารเกือบทุกตัวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและช่วยลดการแตกสลายของเม็ดเลือดแดงได้ดี ผลการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติเป็นรายคู่โดยการเปรียบเทียบระหว่างหลอดควบคุมที่ไม่เติมสารใด ๆ (DMSO+AAPH) กับหลอดที่มีสาร C1/ C2/ C3/ C4/ C5+sodium nitrite พบว่าค่ามัธยฐานร้อยละการแตกของเม็ดเลือดแดงในหลอดที่มีสาร C2, C3, C4 และ C5 มีระดับต่ำกว่าหลอดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (P < 0.05) ยกเว้นหลอด C1 ที่พบว่าการแตกของเม็ดเลือดแดงลดลงแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.149)

สรุป แอนะล็อกเคอร์คิวมินอยด์สามารถยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดงได้ดี โดยพบว่าแอนะล็อก C5 และ C4 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจาก AAPH ได้ดีที่สุด รองลงมาคือสารในกลุ่มเคอร์คิวมินอยด์ C2 และ C3 ส่วน C1 มีฤทธิ์น้อยที่สุด (**รูปที่ 11**: A และ B) อย่างไรก็ตาม การทดลองนี้จำนวนตัวอย่างยังน้อยและได้ทดสอบซ้ำเพียง 2-3 ครั้ง จึงทำให้ค่าการวัดการดูดกลืนแสงของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงที่แตกยังแปรปรวนอยู่มาก ดังที่เห็นได้จากหลอด C1 และ C3 ซึ่งให้ค่ พิสัยควอไทล์ที่ค่อนข้างสูง ดังนั้นการวัดตัวบ่งชี้ภาวะต้านออกซิเดชันอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่น รีดิวซ์กลูตาไธโอน เพื่อเปรียบเทียบการออกฤทธิ์ของสารแต่ละตัวจึงมีความจำเป็น

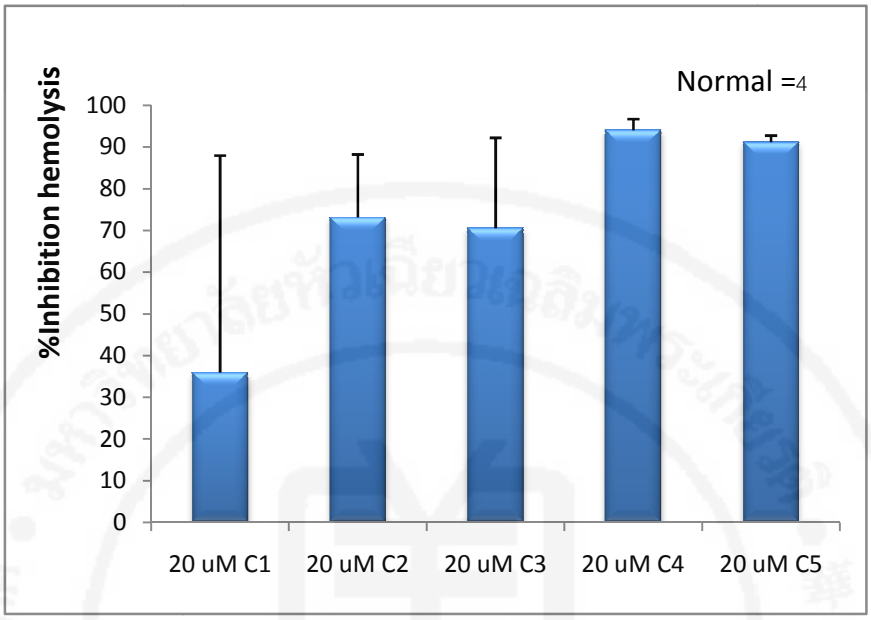


A

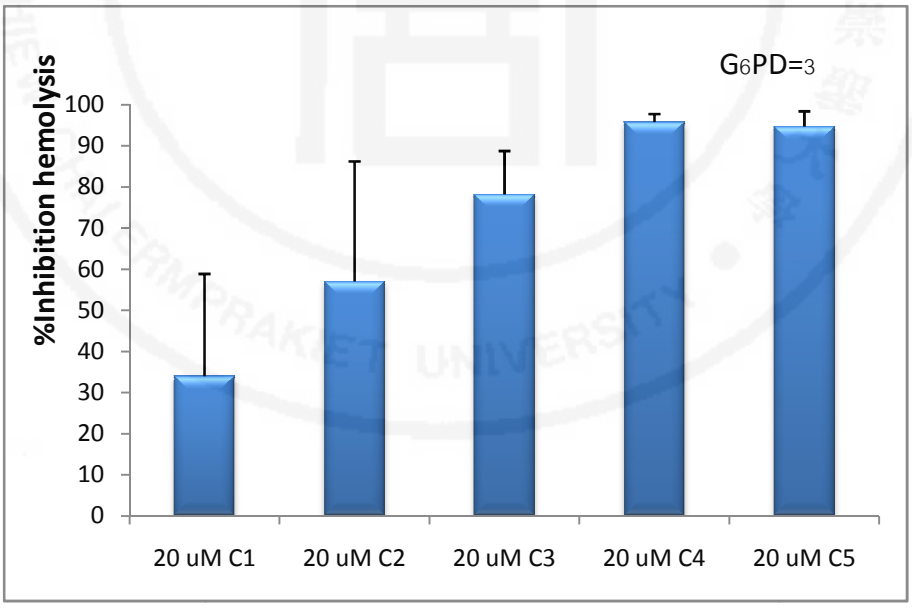


B

รูปที่ 10 เปรียบเทียบร้อยละการแตกของเม็ดเลือดแดงที่ทดสอบในกลุ่มคนปกติเพศชาย (A) กับกลุ่มคนที่พร่องเอนไซม์ G6PD (B) (ทดสอบซ้ำ 2-3 ครั้ง)



A



B

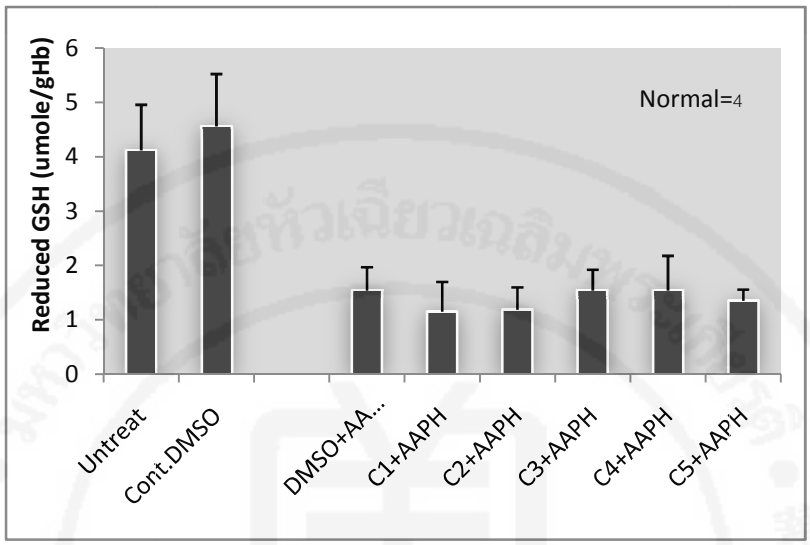
รูปที่ 11 เปรียบเทียบร้อยละการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดงที่ทดสอบในกลุ่มคนปกติเพศชาย (A) กับกลุ่มคนที่พร่องเอนไซม์ G6PD (B)

4.5 การทดสอบประสิทธิภาพของเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกต่อการป้องกันการพร่องกลูตาไธโอน

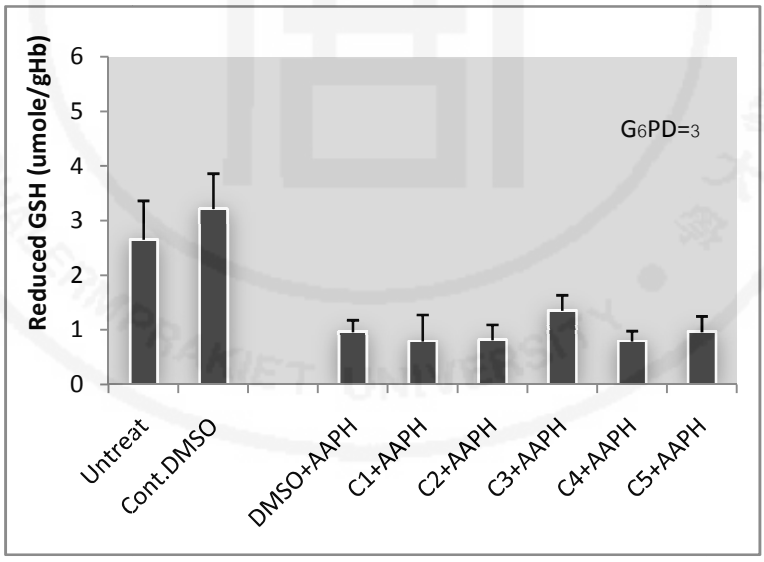
กลูตาไธโอนจัดเป็นสาร antioxidant ที่พบในร่างกายที่ไม่จัดเป็นเอนไซม์ จากการศึกษาพบว่าเซลล์ที่ขาดรีดิวซ์กลูตาไธโอนนั้นส่งผลให้เกิดการบาดเจ็บต่อเซลล์ (cell damage) จากสารพิษต่าง ๆ ได้ง่ายขึ้น (45) ดังนั้นการป้องกันการพร่องกลูตาไธโอน (glutathione depletion) ด้วยสารเคอร์คิวมินอยด์จากขมิ้นชันอาจเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถป้องกันการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันในเม็ดเลือดแดงของผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD

เม็ดเลือดแดงที่ pretreat ด้วยสาร C1/ C2/ C3/ C4/ C5 เข้มข้น 20 μM แล้วชักนำด้วย 25 mM AAPH ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ผลการทดสอบพบว่าสารทั้ง 5 ชนิดไม่สามารถยับยั้งการพร่องของรีดิวซ์กลูตาไธโอนในเม็ดเลือดแดงที่ถูกเหนี่ยวนำได้ นอกจากนี้ยังพบว่าค่ามัธยฐานระดับกลูตาไธโอนในกลุ่มคนที่พร่องเอนไซม์ G6PD ต่ำกว่ากลุ่มคนปกติเล็กน้อย ซึ่งน่าจะเกิดจากกัมมันตภาพเอนไซม์ G6PD ในคนปกติสร้าง NADPH ได้เพียงพอต่อการนำไปใช้เปลี่ยนออกซิไดซ์กลูตาไธโอนให้เป็นรีดิวซ์กลูตาไธโอน (**รูปที่ 12**) อย่างไรก็ตาม การทดลองนี้อาจยังไม่สามารถหาข้อสรุปที่แน่ชัดได้ เนื่องจาก condition ที่ใช้ทดสอบยังไม่ครอบคลุมปัจจัยเกื้อหนุนอื่นๆ (ATP, glucose, NAD, etc.) ที่จำเป็นต่อกลไกป้องกันออกซิเดชันของเม็ดเลือดแดง เพราะในเซลล์ของร่างกายมีระบบต้านออกซิเดชันหลายทาง เช่น ปฏิกิริยารีดักชันทำให้กำจัดพิษอนุมูลอิสระได้ โดยเซลล์จะใช้รีดิวซ์กลูตาไธโอนให้โปรตอนแก่สารอนุมูลอิสระให้เปลี่ยนเป็นน้ำ ในขณะที่โมเลกุลของกลูตาไธโอนจะเปลี่ยนเป็นรูปออกซิไดซ์ ต่อมาเอนไซม์ G6PD ในเม็ดเลือดแดงจะผลิต NADPH โดยอาศัยกลูโคส เพื่อให้กลูตาไธโอนกลับมาอยู่ในรูปรีดิวซ์ได้อีกครั้ง

สรุป เคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกช่วยปกป้องเม็ดเลือดแดงจากสารพิษและลดการแตกของเม็ดเลือดแดงจากสภาวะเครียดออกซิเดชันได้ แต่ไม่สามารถเพิ่มระดับรีดิวซ์กลูตาไธโอนหรือยับยั้งการพร่องกลูตาไธโอนในเม็ดเลือดแดงที่ได้รับสารก่ออนุมูลอิสระจาก AAPH มีเพียงสารประกอบ C3 เท่านั้นที่ช่วยคงระดับรีดิวซ์กลูตาไธโอนได้ใกล้เคียงกับหลอดควบคุม (DMSO+AAPH) แสดงว่าขีดความสามารถที่จำกัดในการต้านอนุมูลอิสระหรือกลไกการกำจัดสารพิษในเม็ดเลือดแดงของสารจากขมิ้นชัน อาจต้องการปัจจัยหนุนจากเอนไซม์อื่นร่วมด้วย เช่น SOD, glutathione peroxidase, glutathione reductase เป็นต้น



A



B

รูปที่ 12 แสดงระดับรีดิวซ์กลูตาไธโอนของเม็ดเลือดแดง โดยเปรียบเทียบผลทดสอบในกลุ่มคนปกติเพศชาย (A) กับกลุ่มคนที่พร่องเอนไซม์ G6PD เพศชาย (B)

4.6 การทดสอบประสิทธิภาพสารเคอร์คิวมินอยด์จากขมิ้นชันต่อการทำงานของนิวโตรฟิลด้วยวิธี NBT

สารสกัดขมิ้นชันพบว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายด้าน เช่น ต้านการอักเสบโดยลดการเคลื่อนที่ของนิวโตรฟิลและยั้บยั้งการหลั่งไซโตไคน์ของแมคโครเฟจ (46, 47) รวมทั้งต้านเชื้อจุลชีพก่อโรคหลายชนิด ทั้งนี้ความสมารถในการออกฤทธิ์ต่อการทำงานของเม็ดเลือดขาว ยังขึ้นกับขนาดความเข้มข้นของเคอร์คิวมินอยด์ที่ใช้ด้วย (48) ผลการศึกษาก่อนหน้านี้ยังพบด้วยว่า bis-demethoxycurcumin (C3) เกี่ยวข้องกับเม็ดเลือดขาวชนิด phagocyte โดยไปเพิ่มการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาวในระบบอิมมูนของผู้ป่วย Alzheimer (49) แม้เป็นที่ทราบกันดีว่านิวโตรฟิลเป็นเม็ดเลือดขาวที่ทำหน้าที่ในการจับกินสิ่งแปลกปลอม แต่ยังไม่มีผลการวิจัยใดเป็นที่ประจักษ์ว่าสารสกัดจากขมิ้นชันมีผลต่อกระบวนการ phagocytosis ของนิวโตรฟิลผ่านทางกลไกใด และออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพได้อย่างไร ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาถึงผลของสารสำคัญ curcumin (C1) เปรียบเทียบกับ bis-demethoxycurcumin (C3) เพื่อประเมินประสิทธิภาพการทำงานของนิวโตรฟิลโดยอาศัยเอนไซม์ oxidase เพื่อเร่งปฏิกิริยารีดักชันของออกซิเจนเป็น superoxide anion ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสารต้านจุลชีพที่มีศักยภาพสูง

การศึกษาผลของ C1 และ C3 ที่ความเข้มข้น 3 μM ต่อกิจกรรม phagocytosis ได้เปรียบเทียบผลกับ สารกระตุ้น PMA ที่ความเข้มข้น 50 ng/mL และได้ทดลองให้ C1 และ C3 เสริมฤทธิ์ PMA ในการกระตุ้นนิวโตรฟิล โดยการทดสอบนี้แบ่งออกเป็น 6 สภาวะการทดลอง ได้แก่ 1: Cont.DMSO, 2: PMA, 3: C1, 4: PMA+C1, 5: C3 และ 6: PMA+C3

การประเมินระดับการทำงานของนิวโตรฟิลด้วยการนับจำนวนนิวโตรฟิลที่รีดิวซ์สี พบว่าในภาวะที่ไม่มีสารกระตุ้น (Cont. DMSO) ร้อยละ Cells reducing NBT มีค่ามัธยฐานต่ำที่สุด เมื่อเปรียบทียบกับภาวะที่มีสารกระตุ้นจาก C1, C3 หรือ PMA และพบว่าหลอด PMA+C1 มีจำนวนนิวโตรฟิลที่รีดิวซ์สี NBT ได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับหลอดในสภาวะการทดลองอื่น ๆ ซึ่งผลการวิเคราะห์นี้สอดคล้องกันเมื่อศึกษาในนิวโตรฟิลคนปกติเทียบกับนิวโตรฟิลผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD (**ตารางที่** 7 และ **ตารางที่** 8)

การทดสอบนี้ตั้งข้อสังเกตได้ว่า ค่ามัธยฐานจำนวนร้อยละนิวโตรฟิลรีดิวซ์สีในทุกสภาวะการทดลองในกลุ่มคนปกติเพศชายมีร้อยละ Cells reducing NBT สูงกว่ากลุ่มคนที่พร่องเอนไซม์ G6PD แต่ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสองกลุ่มพบว่าไม่มีความแตกต่างกันในทำนองเดียวกันกับกลุ่มคนปกติเพศหญิงแม้ว่าจำนวนร้อยละนิวโตรฟิลรีดิวซ์สีในทุกสภาวะการทดลองมีค่ามัธยฐานสูงกว่ากลุ่มคนที่พร่องเอนไซม์ G6PD แต่ผลการวิเคราะห์ไม่พบว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

การศึกษาผลของเลือด(คนปกติหรือคนที่พร่องเอนไซม์ G6PD) และสถานเพศ (ชายหรือหญิง) ต่อค่าร้อยละ Cells reducing NBT ในแต่ละสภาวะการทดลอง ด้วยสถิติ Spearman's rho ซึ่งแสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ดังตารางที่ 9 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่อยู่ระหว่าง $0 \leq r \leq 1$ แสดงความสัมพันธ์เชิงบวก ในขณะที่ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่อยู่ระหว่าง $-1 \geq r \geq 0$ แสดงความสัมพันธ์เชิงลบ และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับศูนย์หมายถึงไม่มีความสัมพันธ์กัน จากผลการศึกษาพบว่า เลือดหรือเพศไม่มีผลต่อความสามารถในการรีดิวซ์สี NBT ของ นิวโตรฟิล ในทุกสภาวะการทดลอง ($P>0.05$)

ผลทดสอบการทำงานของนิวโตรฟิลจากเลือดของเพศชายเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่ามัธยฐานร้อยละร้อยละ Cells reducing NBT ในแต่ละสภาวะการทดลอง เมื่อวิเคราะห์ด้วยสถิติพบว่าจาก 6 สภาวะการทดลองมีอย่างน้อยหนึ่งคู่ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์เป็นรายคู่ด้วยโดยเปรียบเทียบระหว่างค่ามัธยฐานจำนวนนิวโตรฟิลรีดิวซ์สีของกลุ่มคนพร่องเอนไซม์ G6PD ในหลอด PMA กับ หลอด PMA+C1 พบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P=0.043$) ส่วนกลุ่มคนปกติพบว่าค่ามัธยฐานจำนวนนิวโตรฟิลรีดิวซ์สี ทั้ง 6 สภาวะการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (**รูปที่** 13)

ผลทดสอบการทำงานของนิวโตรฟิลจากเลือดของเพศหญิง เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่ามัธยฐานร้อยละ Cells reducing NBT ในแต่ละสภาวะการทดลอง เมื่อวิเคราะห์ด้วยสถิติพบว่ากลุ่มคนปกติ มีค่ามัธยฐานร้อยละนิวโตรฟิวที่รีดิวซ์สีแตกต่างกันทั้ง 6 สภาวะการทดลองอย่างน้อยหนึ่งคู่ โดยหลอด PMA กับหลอด C1 พบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P=0.046$) ส่วนกลุ่มพร่องเอนไซม์ G6PD พบว่าค่ามัธยฐานร้อยนิวโตรฟิวที่รีดิวซ์สีทั้ง 6 สภาวะการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ **(รูปที่** 14 **)**

สรุป ความสามารถในการรีดิวซ์สี NBT ของนิวโตรฟิลน่าจะแปรผันกับประสิทธิภาพในการสร้าง superoxide anion ของเม็ดเลือดขาวที่ใช้กำจัดเชื้อจุลชีพ ผลการศึกษานี้แสดงว่าสารที่มีฤทธิ์เสริมการทำงานของนิวโตรฟิลมากที่สุด คือ C1 > C3 > PMA โดยพบว่าเมื่อกระตุ้นนิวโตรฟิลด้วย PMA แล้วเสริมด้วย C1 เซลล์จะเกิดกิจกรรมได้สูงที่สุด

ตารางที่ 7 ค่ามัธยฐานของจำนวนร้อยละ Cells reducing NBT เมื่อนิวโตรฟิลคนปกติได้รับสารกระตุ้นในสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ โดยจำแนกตามสถานภาพด้านเพศ

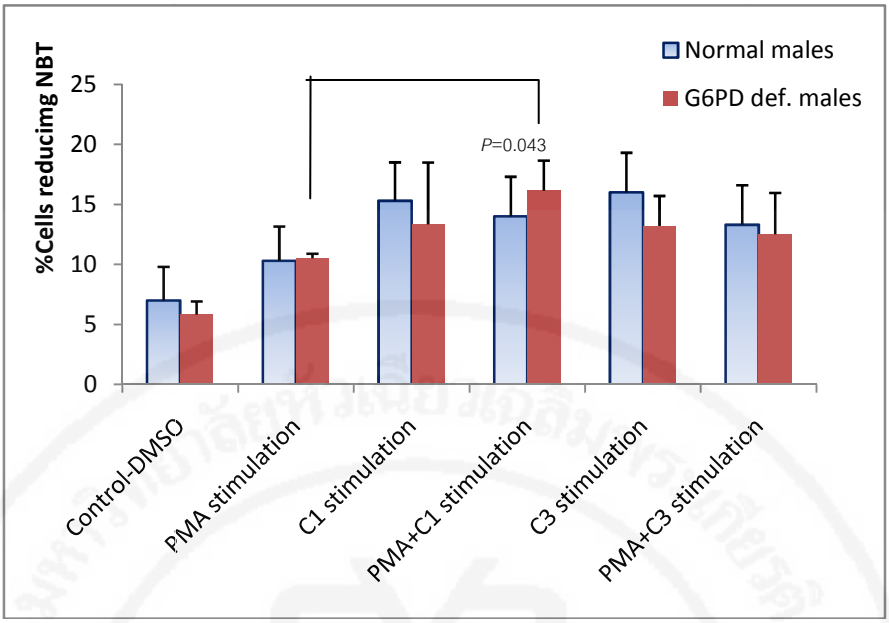
Normals (N = 6)	% Cells reducing NBT					
	Control-DMSO	Pretreated with PMA	Pretreated with C1	Pretreated with PMA+C1	Pretreated with C3	Pretreated with PMA+C3
1-Male	7.0	10.3	12.3	12.7	9.7	13.3
2-Male	11.3	15.0	19.7	19.3	16.3	17.3
3-Male	5.7	9.3	15.3	14.0	16.0	10.7
Median	7.00	11.30	15.30	14.00	16.00	13.30
IQR	2.80	2.85	3.20	3.30	3.30	3.30
1-Female	8.0	10.0	16.3	15.0	9.5	11.5
2-Female	11.3	13.7	16.3	18.0	19.3	19.0
3-Female	12.0	15.3	16.7	20.0	16.3	17.0
Median	11.33	13.67	16.33	18.00	16.33	17.00
IQR	1.99	2.67	0.17	2.50	4.91	3.75

ตารางที่ 8 ค่ามัธยฐานของจำนวนร้อยละ Cells reducing NBT เมื่อนิวโตรฟิลผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD ได้รับสารกระตุ้นในสภาวะการทดลองต่าง ๆ โดยจำแนกตามสถานภาพด้านเพศ

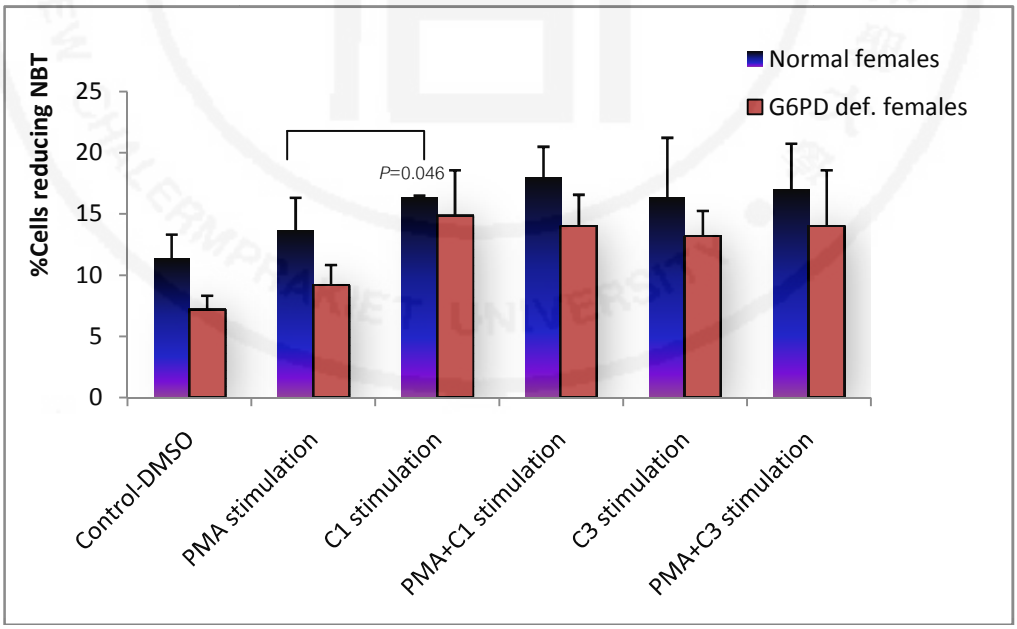
G6PD def. (N = 8)	% Cell reducing NBT					
	Control-DMSO	Pretreated with PMA	Pretreated with C1	Pretreated with PMA+C1	Pretreated with C3	Pretreated with PMA+C3
1-Male	6.7	13.3	17.3	20.7	14.3	19.3
2-Male	6.3	10.7	11.7	14.3	12.7	12.7
3-Male	5.3	10.3	15.0	18.0	13.7	12.3
4-Male	5.3	6.0	8.7	11.3	7.3	6.7
Median	5.83	10.50	13.35	16.15	13.20	12.50
IQR	1.09	0.39	5.13	2.50	2.50	3.45
1-Female	7.3	9.3	16.0	13.0	12.7	15.7
2-Female	5.7	8.3	8.7	11.0	11.0	9.7
3-Female	9.3	14.0	16.7	15.3	16.3	18.0
4-Female	7.0	9.0	13.7	15.0	13.7	12.3
Median	7.17	9.17	14.84	14.00	13.17	14.00
IQR	1.16	1.67	3.75	2.58	2.10	4.59

ตารางที่ 9 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ในแต่ละสภาวะการทดลอง จำแนกตามกลุ่มตัวอย่างเลือดคนปกติกับเลือดคนที่พร่องเอนไซม์ G6PD และแบ่งตามสถานเพศชายกับเพศหญิง

Treatment conditions	Blood	
	Correlation coefficient (r)	*P*-value
Control-DMSO	0.324	0.532
PMA	0.464	0.354
C1	-0.426	0.395
PMA+C1	0.203	0.354
C3	0.203	0.700
PMA+C3	0.638	0.173
Treatment conditions	Sex	
	Correlation coefficient (r)	*P-value*
Control-DMSO	0.455	0.306
PMA	0.273	0.554
C1	0.661	0.106
PMA+C1	-0.187	0.688
C3	0.455	0.306
PMA+C3	0.270	0.558



รูปที่ 13 ค่ามัธยฐานร้อยละนิวโตรฟิลรีดิวซ์สี NBT และค่าพิสัยควอไทล์ของเพศชายในแต่ละสภาวะการทดลอง (แต่ละรายทดสอบเพียงครั้งเดียว)



รูปที่ 14 ค่ามัธยฐานร้อยละนิวโตรฟิลรีดิวซ์สี NBT และค่าค่าพิสัยควอไทล์ของในเพศหญิงในแต่ละสภาวะการทดลอง (แต่ละรายทดสอบเพียงครั้งเดียว)

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
華僑崇聖大學
HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY

บทที่ 5
อภิปรายผล

การวิจัยสามารถวิจารณ์ผลได้ดังนี้

1. ผลของเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกต่อการยับยั้งเมทฮีโมโกลบิน

จากผลการวิเคราะห์ พบว่าผลการทดสอบสอดคล้องกับงานวิจัยของ Venkatesan P และคณะ (2003) ซึ่งรายงานว่าเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกสามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของฮีโมโกลบินและลดการแตกของเม็ดเลือดแดงที่ถูกชักนำด้วยไนไตรท์ โดยประสิทธิภาพของเตตราไฮโดรเคอร์คิวมิน (tetrahydrocurcumin) ออกฤทธิ์ได้ดีกว่าเคอร์คิวมินและแอนะล็อกอื่น ๆ เนื่องจากสารละลายน้ำได้ดีและมีโครงสร้างส่วน side chain ที่ saturate (50) อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้ทดสอบกับเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อก C1-C5 เท่านั้น แต่ยังไม่ได้ศึกษาในแอนะล็อกตัวอื่น ๆ เช่น tetrahydrocurcumin หรือ hexahydrocurcumin นอกจากนี้ จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบยังน้อย ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจึงเปรียบเทียบได้ไม่ครอบคลุม

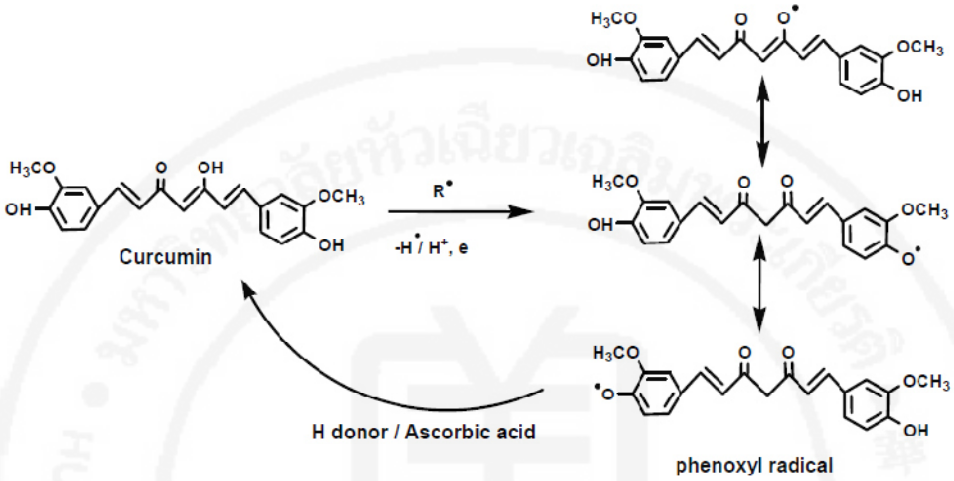
เป็นไปได้ว่าถ้าผสมสารเตตราไฮโดรแอนะล็อกหรือเคอร์คิวมินอยด์แอนาล็อกลงไปน่าจะทำให้สารประกอบมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงกว่าเคอร์คิวมินเดี่ยว ๆ เนื่องจากกลไกการออกฤทธิ์นั้นเกี่ยวข้องกับโครงสร้างโมเลกุลที่ตำแหน่งหมู่ไฮดรอกซิล (-OH group)

2. ผลของเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกต่อการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดง

เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาครั้งนี้กับการศึกษาของ Somparn และคณะ (2007) พบว่าผลที่ได้แตกต่างกันที่การจัดลำดับประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและกำจัดอนุมูลอิสระ ซึ่งรายงานฤทธิ์ต้านการแตกของเม็ดเลือดแดงจากมากไปหาน้อยดังนี้

curcumin > demethoxycurcumin > bis-demethoxycurcumin ตามลำดับ (51) ผลที่ได้ลักษณะนี้น่าจะแปรผันตามจำนวน methoxyl group (-OCH_3) ที่วงแหวนเบนซิน (benzene ring) ซึ่งเมื่อพิจารณาจากโครงสร้างทางเคมีจะพบว่า curcumin มีหมู่ methoxy ทั้งสองข้างอย่างสมดุลกัน ส่วน demethoxycurcumin มีหมู่ methoxy เพียง 1 ตำแหน่ง ในขณะที่ bis-demethoxycurcumin นั้นไม่มีหมู่ methoxy เลย (ดังที่แสดงโครงสร้างในบท ภาคผนวก ก.)

อย่างไรก็ตาม การที่เคอร์คิวมินกำจัดอนุมูลอิสระและต้านออกซิเดชันได้นั้นเพราะมีหมู่ methoxylated phenol และมีการให้ H-atom จาก phenolic-OH หรืออาจขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นก็ได้ เช่น *ortho*-diphenoxyl functionality หรือ การให้ H-atom จากหมู่ methylene-CH_2 (52, 53)



รูปที่ 15 โครงสร้างของเคอร์คิวมินและกลไกที่ต้านปฏิกิริยาลูกโซ่จากอนุมูลอิสระ

ตำแหน่งโครงสร้างของเคอร์คิวมินที่ทำหน้าที่กันการออกซิเดชัน คือ สาร phenol ซึ่งโมเลกุลประกอบด้วยวงแหวนเบนซินและหมู่ไฮดรอกซิลที่ให้ไฮโดรเจนกับอนุมูลอิสระ การเกิดอนุมูลอิสระเริ่มจากโมเลกุลของสารตั้งต้นถูกกระตุ้นหรือได้รับอิเล็กตรอนจากสารรีดิวซ์ซิง จากนั้นอนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับออกซิเจนได้ peroxyl radical เมื่อ peroxyl radical มาเจอเคอร์คิวมินจะเข้าทำปฏิกิริยาที่ตำแหน่งพันธะคู่ (keto-enol structure) ทำให้ได้โมเลกุล phenoxyl radical ที่มีสภาพคงตัว จึงเป็นการลดความเครียดออกซิเดชัน

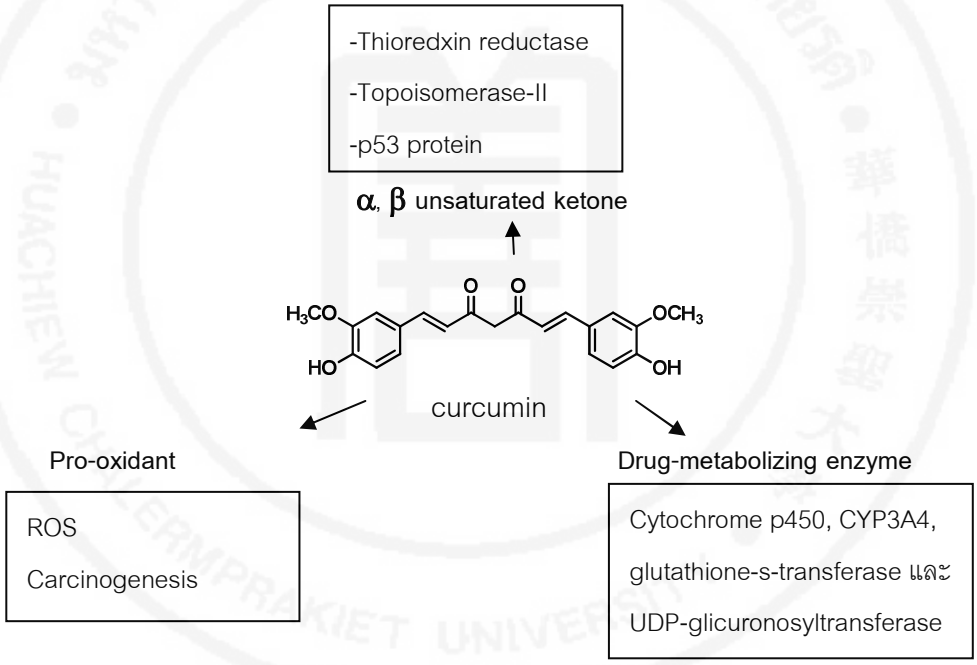
ที่มา: Priyadarsini KI. Molecules. 2014

จะเห็นว่าเคอร์คิวมินออกฤทธิ์คล้ายกับวิตามินซีและวิตามินอี คือมีคุณสมบัติต้านออกซิเดชันโดยกำจัดอนุมูลออกซิเจนที่ไวต่อปฏิกิริยาออกซิเดชัน (ROS) ด้วยการทำงานผ่านกลไก 2 ทาง คือ Quenching oxygen reaction และ Chain breaking reaction

- Quenching oxygen reaction เป็นปฏิกิริยาที่ลดพลังงานอิเล็กตรอนของออกซิเจนไม่ให้ไวต่อการจับสารอื่นมากเกินไป ซึ่งเป็นการป้องกันการออกซิไดซ์ในด่านแรก
- Chain breaking reaction ปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นหลังจากมี ROS แล้ว เป็นการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่เพื่อไม่ให้ ROS ที่มีอยู่เพิ่มมากขึ้น

3. ผลของเคอร์คิวมินและแอนะล็อกต่อการป้องกันการพร่องกลูตาไธโอน

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า AAPH ทำให้รีดิวซ์กลูตาไธโอนลดลงอย่างรวดเร็ว และมีแนวโน้มว่าเคอร์คิวมินทำให้เสถียรภาพกลูตาไธโอน (glutathione stability) ต่ำลง เป็นไปได้ว่าการเพิ่ม ROS ในเซลล์ ทำให้เม็ดเลือดแดงต้องใช้กลูตาไธโอนกำจัดสารอนุมูลอิสระ จนส่งผลให้ระดับรีดิวซ์กลูตาไธโอนลดลง กลไกดังกล่าวนี้พบได้ในกระบวนการเกิด apoptosis ของเซลล์มะเร็งบางชนิด ซึ่งเคยรายงานไว้ในปี 2004 ว่า เมื่อให้เคอร์คิวมินกับเซลล์ MDAMB จะเกิดอนุมูลอิสระ superoxide anion และลดระดับกลูตาไธโอนในเซลล์ จนเซลล์เกิดความเสียหายและตายในที่สุด (54)



รูปที่ 16 กลไกการออกฤทธิ์ด้านลบ (pro-oxidant) ของเคอร์คิวมิน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Ananya D. Journal of Thai traditional medical research. 2013

4. ผลของสาร curcumin และ bis-demethoxycurcumin ต่อการทำงานของนิวโตรฟิล

เมื่อร่างกายมีการติดเชื้อ นิวโตรฟิลซึ่งเป็นด่านแรกในการทำหน้าที่ต่อต้านสิ่งแปลกปลอม จะเป็นเซลล์ชนิดแรกเคลื่อนที่มายังบริเวณที่มีการติดเชื้อ เมื่อนิวโตรฟิลพบกับเชื้อโรคจะกลืนกินและสร้างสาร ROS ออกมาฆ่าเชื้อโรค ดังนั้นการวัดการสร้างสาร superoxide anion ซึ่งเป็นหนึ่งในกลุ่มของสาร ROS โดยวิธีการรีดิวซ์ NBT จึงเป็นหนึ่งในวิธีการวัดประสิทธิภาพการทำงานของนิวโตรฟิล

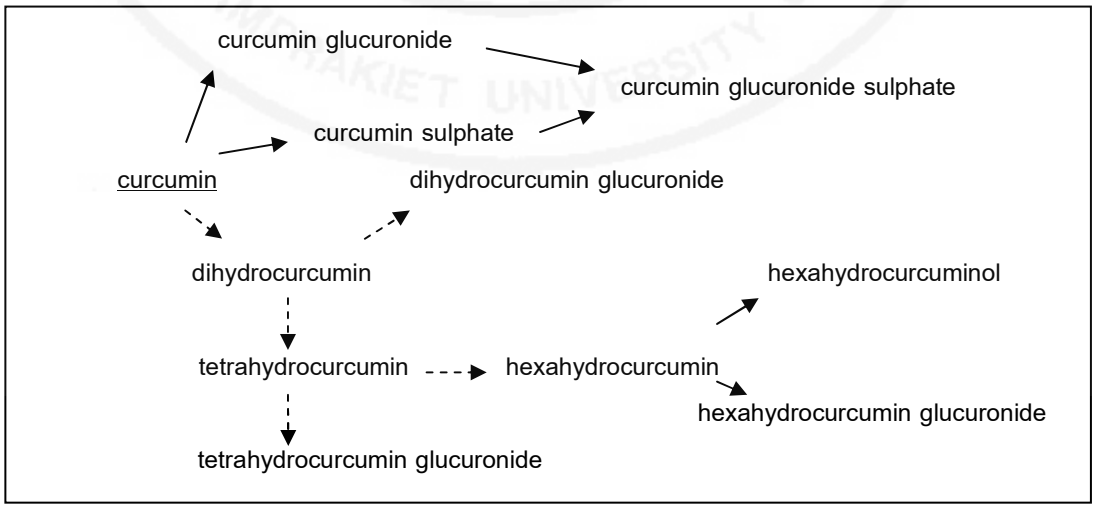
ด้วยข้อจำกัดในการเก็บเลือดตัวอย่าง คณะผู้วิจัยจึงศึกษาผลการของสารเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกต่อการเพิ่ม phagocytosis ในนิวโตรฟิลได้เพียงขนาดความเข้มข้นเดียว คือ 3 μM ซึ่งเลือกทดสอบในสารสำคัญเพียง 2 ชนิดคือสาร C1 และ C3 และการทดลองนี้ต้องใช้เลือดในปริมาณมากจึงไม่สามารถทดสอบซ้ำหลายครั้ง ผลการวิเคราะห์ข้อจากข้อ 4.6 พบว่าผลการศึกษายังไม่ชัดเจนและไม่สัมพันธ์กับผลการวิจัยก่อนหน้านี้ เนื่องจากผลการวิจัยที่ผ่านมาพบว่า curcumin (NDS27) ที่เป็นชนิดละลายน้ำ สามารถยับยั้ง ROS และ MPO ส่วนเกินในนิวโตรฟิลของม้าและเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว HL-60 ที่ถูกกระตุ้นให้เกิด stress (55) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเคอร์คิวมินช่วยลดการอักเสบได้โดยยับยั้งกระบวนการจับกินเชื้อโรคและการเคลื่อนที่ของนิวโตรฟิล รวมทั้งยับยั้งการสร้าง pro-inflammatory cytokines ในบริเวณช่องท้องหนูที่ติดเชื้อ (56) แต่เมื่อพิจารณาผลการทดสอบเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 10 μM กลับพบว่าเคอร์คิวมินช่วยเพิ่มแสดงออกของยีน TLR2 ในนิวโตรฟิล ซึ่ง TLR2 เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันและกระบวนการอักเสบของร่างกาย (43) การศึกษานี้จึงใช้ curcumin และ bis-demethoxycurcumin ที่ความเข้มข้นต่ำ (3 μM) โดยเลือกทดสอบในสารสกัดขมิ้นชัน 2 ชนิด เนื่องจากจำนวนนิวโตรฟิลที่คัดแยกได้จากเลือดมีปริมาณน้อย จากผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับนิวโตรฟิลควบคุมที่ไม่ได้รับสารกระตุ้น จะเห็นว่านิวโตรฟิล (PMA-stimulated) ที่บ่มร่วมกับ curcumin หรือ bis-demethoxycurcumin ที่ความเข้มข้น 3 μM พบจำนวนผลึกสีน้ำเงินจากปฏิกิริยาการรีดิวซ์สี NBT ของนิวโตรฟิลมากขึ้น (ดูภาพประกอบจากภาคผนวก) แสดงว่าเซลล์มีการหายใจแบบใช้ออกซิเจนโดยเร่งผ่านเอนไซม์ NADPH-oxidase เพิ่มขึ้น ซึ่งการรีดิวซ์ของ NADPH นั้นก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ superoxide anion ผลการศึกษานี้จึงเป็นไปได้ว่า curcumin และ bis-demethoxycurcumin น่าจะช่วยให้นิวโตรฟิลในผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD หรือผู้ป่วยที่มีความผิดปกติด้านคุณภาพของเม็ดเลือดขาว เช่น ผู้ป่วย chronic granulomatous disease ให้มีการจับกินและทำลายเชื้อโรคได้ดีขึ้น

ข้อเสนอแนะ

1. มีรายงานว่าการให้เคอร์คิวมินอยด์กับหนูทดลองทางปาก เคอร์คิวมินจะถูกเมตาบอไลต์อย่างรวดเร็ว ดังนั้น curcumin, demethoxycurcumin และ bis-demethoxycurcumin (57) ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ของขมิ้นชันจึงไม่น่าจะเป็นอันตรายต่อมนุษย์ อย่างไรก็ตามขมิ้นชันแคปซูลที่มีจำหน่ายในท้องตลาดทั่วไปผู้ใช้ควรคำนึงถึงปริมาณและระยะเวลาของการบริโภค เพื่อลดการเกิดผลข้างเคียงต่อตับหรือเป็นอันตรายต่อสุขภาพตามมาภายหลัง

2. การศึกษาผลของขมิ้นชันต่อการทำงานของนิวโตรฟิลที่กระตุ้นด้วย PMA พบว่าสารจากขมิ้นชันทั้ง C1 และ C3 ช่วยเสริม phagocytic activity ผลการวิจัยจึงสรุปได้ว่า curcumin และ bis-demethoxycurcumin กระตุ้นการทำงานของนิวโตรฟิลได้มากกว่าหรือเทียบเท่า PMA ซึ่งเป็นสารที่สามารถกระตุ้นเมตาบอลิซึมของนิวโตรฟิลให้สร้างอนุมูลอิสระขึ้นมาทำลายสิ่งแปลกปลอม อย่างไรก็ตามผลการวิจัยนี้เป็นเพียงการศึกษาในระดับเซลล์เท่านั้น การพิสูจน์ว่าขมิ้นชันทำให้เม็ดเลือดขาวทำหน้าที่ต้านการติดเชื้อได้ดีขึ้น ควรมีการศึกษาต่อในระดับโมเลกุลหรือสัตว์ทดลอง เพื่อหาข้อสรุปที่แน่ชัดต่อไป

3. สารแอนะล็อกของเคอร์คิวมินอยด์ คือ di-*O*-demethylcurcumin และ mono-*O*-demethylcurcumin มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่แรงกว่าสารสำคัญในกลุ่มเคอร์คิวมินอยด์ (curcumin, demethoxycurcumin, bis-demethoxycurcumin) อาจเป็นไปได้ว่าการต้านอนุมูลอิสระของสารจากขมิ้นชันน่าจะขึ้นอยู่กับการ demethylate หมู่ OCH_3 ใน benzene ring เพื่อเพิ่ม -OH อิสระ แต่ในส่วนของ β-diketone หรือ double bond นั้น อาจเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติต้านออกซิเดชันน้อยกว่า เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า phenolic hydroxy group เป็นโครงสร้างที่สำคัญของสารกลุ่ม tetrahydrocurcuminoids ในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (58) จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจศึกษาวิจัยเปรียบเทียบต่อไประหว่างสารกลุ่ม curcuminoids กับ tetrahydrocurcuminoids ซึ่งเป็นเมตาบอไลต์ที่พบได้ในพลาสมาของคนที่รับประทานสารสกัดขมิ้นชัน เพื่อพิสูจน์สมมติฐานดังกล่าวนี้ต่อไป



รูปที่ 17 เมตาบอไลต์ของเคอร์คิวมินที่พบในพลาสมาหนูและเซลล์ตับของมนุษย์

ที่มา: ดัดแปลงจาก Sharma RA, *et al*. European Journal of Cancer. 2005

4. ความเข้มข้นของรีดิวซ์กลูตาไธโอนที่วัดจากตัวอย่างเลือด จัดว่ามีความสำคัญต่อระดับการต้านออกซิเดชันของเซลล์เม็ดเลือดแดง ถ้ามีสารพิษหรืออนุมูลอิสระเกิดขึ้นมากความเครียดจะกระตุ้นการขับของกลูตาไธโอนภายในเซลล์ออกสู่ภายนอกเซลล์ซึ่งมีผลทำให้ระดับของกลูตาไธโอนในกระแสเลือดสูงขึ้น ซึ่งมีความสัมพันธ์กับค่า total antioxidant capacity ที่เพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้นการศึกษาการทำงานของเอนไซม์อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับ antioxidant status ได้แก่ เอนไซม์ superoxide dismutase, glutathione peroxidase และ catalase เป็นต้น น่าจะช่วยให้การประเมินค่าความเครียดจากภาวะออกซิเดชันได้ชัดเจนมากขึ้น

5. การศึกษาประโยชน์ในการต้านออกซิเดชันของสมุนไพรขมิ้นชันในด้านอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่น ในด้านสุขภาพ ต้านการอักเสบ เสริมภูมิคุ้มกัน และความต้านทานโรคที่สำคัญ จะช่วยให้ได้องค์ความรู้ที่เป็นประโยชน์และมีรูปธรรมที่ชัดเจนมากขึ้น

บทที่ 6
สรุปผล

ผลการวิจัยสรุปได้ดังนี้

1. ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเกิดเมทฮีโมโกลบินสรุปได้ว่า เคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกที่ขนาดความเข้มข้น 40 μM กลุ่มที่สามารถลดการเกิดเมทฮีโมโกลบินได้ดีคือ สาร C5 (mono-*O*-demethylcurcumin), C4 (di-*O*-demethylcurcumin) และ C2 (demethoxycurcumin) และกลุ่มที่มีความสามารถน้อยที่สุด คือ สาร C1 (curcumin) และ C3 (bis-demethoxycurcumin) อย่างไรก็ตามสารประกอบเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจาก sodium nitrite ได้น้อยกว่าวิตามินซี เนื่องจากวิตามินซีเป็น strong reducing agent ที่ทำปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระได้โดยตรง จึงยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของฮีโมโกลบินได้ดีกว่า

สรุปได้ว่า ผลการศึกษาเมื่อเติม sodium nitrite ลงไปในสารละลายน้ำฮีโมโกลบินที่มีสาร แอนะล็อกเคอร์คิวมินอยด์ แนวโน้มการเกิดเมทฮีโมโกลบินเป็นไปอย่างช้า ๆ ในขณะเดียวกันปริมาณออกซีฮีโมโกลบินจะลดลง เมื่อเทียบกับสารละลายน้ำฮีโมโกลบินที่มีเฉพาะ sodium nitrite อย่างเดียว ซึ่งพบว่าการเพิ่มขึ้นของเมทฮีโมโกลบินและการลดลงของออกซีฮีโมโกลบินเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วส่วนกลุ่มสารเคอร์คิวมินอยด์ โดยเฉพาะ C3 นั้นมีฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงได้เพียงร้อยละ 39 เท่านั้น

2. การศึกษาฤทธิ์ของเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกต่อการยับยั้งการเกิดแตกของเม็ดเลือดแดง ผลการวิจัยนี้พบว่า สารทั้ง 5 ชนิด (C1/C2/C3/C4/C5) ที่ขนาดความเข้มข้น 5-40 μM ช่วยลดปริมาณการแตกของเม็ดเลือดแดงได้ โดยการออกฤทธิ์แปรผันตรงกับขนาดความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบ จึงสรุปได้ว่าแอนะล็อก C5 และ C4 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด ส่วนสารสำคัญจากขมิ้นชัน C1 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจาก AAPH ได้น้อยที่สุด ผลการศึกษานี้แสดงว่า โครงสร้างของสารประกอบฟีนอล (phenolic hydroxyl group) มีส่วนสำคัญต่อการแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ กล่าวคือเมื่อมีจำนวนหมู่ไฮดรอกซีอิสระ (-OH) ที่ benzene ring มากขึ้น จะทำให้สารดังกล่าวจับอนุมูลอิสระได้ดี จึงทำให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นในระดับเซลล์ลดลง เยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงไม่เสื่อมสภาพเร็วเกินไป จึงทำให้การแตกลดลงนั่นเอง

ผลการวิจัยนี้เป็นไปตามสมมติฐานที่ตั้งไว้และสอดคล้องกับผลการวิจัยอื่น ๆ ที่เคยมีการศึกษามาก่อนหน้านี้

ผลการศึกษาฤทธิ์ของเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกต่อการป้องกันการพร่องกลูตาไธโอนของเม็ดเลือดแดงสรุปได้ว่า สารทั้ง 5 ชนิด (C1/C2/C3/C4/C5) ที่ความเข้มข้น 20 μM ไม่สามารถยับยั้งการพร่องระดับรีดิวซ์กลูตาไธโอนในเม็ดเลือดแดงที่ได้รับสารก่ออนุมูลอิสระจาก AAPH

3. จากผลการทดสอบสรุปได้ว่า นิวโตรฟิลที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร C1 หรือ C3 มีการรีดิวซ์สี NBT ได้มากกว่าเซลล์ที่ไม่ได้รับสารกระตุ้น (unstimulated neutrophils) โดยพบว่าการรีดิวซ์สี NBT เพิ่มขึ้นมากกว่าหลอดควบคุมที่กระตุ้นด้วย PMA เพียงอย่างเดียว และนิวโตรฟิลสามารถทำหน้าที่ได้ดีที่สุดเมื่อ pretreat ด้วย PMA ร่วมกับ C1 หรือ C3 แสดงว่าเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกน่าจะช่วยเร่งปฏิกิริยาในเม็ดเลือดขาวนิวโตรฟิล หรืออาจทำให้ NADPH oxidase ในผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD ทำงานได้ดีขึ้นและทำให้สร้างสารอนุมูลออกซิเจนที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาออกมาทำลายเชื้อโรคได้ทัดเทียมเม็ดเลือดขาวปกติ

ผลการวิจัยนี้สรุปได้ว่า สารสำคัญที่พบในเหง้าขมิ้นชันมีโครงสร้างทางเคมีที่สัมพันธ์กับความสามรถในการกำจัดอนุมูลอิระ (radical scavenging activity) คือ phenolic OH group และ methyllene CH2 group ที่ติดอยู่กับ Beta-diketone moiety (ดูบททบทวนวรรณกรรม **รูปที่** 2) โดยมีบทบาทต่อการให้ไฮโดรเจนอะตอมหรือให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ สารประกอบแอนะล็อกของเคอร์คิวมินจึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารประกอบเคอร์คิวมินอยด์ นอกจากนี้ยังพบว่าแอนะล็อก C4 และ C5 ช่วยลดภาวะเครียดจากออกซิเดชันได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับสารประกอบ C1, C2 และ C3 ส่วนการออกฤทธิ์เสริมการทำงานของเม็ดเลือดขาวนั้น พบว่าเมื่อกระตุ้นการทำงานของนิวโตรฟิลด้วยสาร PMA ร่วมกับ C1 สามารถช่วยในการเกิดกิจกรรมทำลายสิ่งแปลกปลอมได้ดีกว่านิวโตรฟิลที่ไม่ได้รับสารกระตุ้นใด ๆ หรือได้รับสาร C3 หรือ PMA ร่วมกับ C3

บรรณานุกรม

1. Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a historical perspective. Blood. 2008;111(1):16-24.
2. พรรณวดี วัฒนบุญยงเจริญ. Essential hematology for general practictioners. ใน: ธัญญพงษ์ ณ นคร, พลภัทร โรจน์นครินทร์, บรรณาธิการ. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency.พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2553. หน้า 61-9.
3. Cooper MR, DeChatelet LR, McCall CE, LaVia MF, Spurr CL, Baehner RL. Complete deficiency of leukocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase with defective bactericidal activity. J Clin Invest. 1972;51(4):769-78.
4. Brahmachari G. Bioactive natural products: opportunities and challenges in medicinal chemistry. Singapore: World scientific publishing; 2012.
5. Manosroi A, Manosroi J. Aromatic volatile oil and extracts from Thai medicinal plants: Applications in pharmaceuticals and cosmetics. Chiangmai: Krongchang publishing; 2005.
6. Araújo CC, Leon LL. Biological activities of Curcuma longa L. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001;96(5):723-8.
7. Parachikova A, Green KN, Hendrix C, LaFerla FM. Formulation of a medical food cocktail for Alzheimer's disease: beneficial effects on cognition and neuropathology in a mouse model of the disease. PLoS One. 2010;5(11):e14015.
8. ดร.ชฎา พิศาลพงศ์. เรื่องน่ารู้ของขมิ้นชัน [อินเตอร์เน็ต] 2008. [สืบค้นเมื่อ 28 พฤษภาคม 2557]. แหล่งข้อมูล: https://www.gpo.or.th/rdi1/html/turmeric.html
9. ประคองศิริ บุญคง. บทความฟื้นฟูวิชาการ ขมิ้นชันสารพัดประโยชน์. วารสารองค์การเภสัชกรรม. 2546;29(1):31-38.
10. Hoffbrand AV, Moss PAH. Essential haematology. 6th ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2011. p. 454.

11. อานนท์ บุณยะรัตเวช. โลหิตวิทยาเม็ดเลือดแดง. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: ฟันนี่พับบลิชชิ่ง; 2535.

12. อิศรางค์ นุชประยูร. Glucose-6-Phosphase Dehydrogenase Deficiency: Molecular and Clinical Aspects. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: จรัลสนิทวงศ์การพิมพ์; 2553.

13. Turgeon ML. Clinical Hematology: Therory & Procedures. 5th ed. Philadelphia: Lippicott Williams & Wilkins; 2012.

14. ปนัดดา โรจน์พิบูลสถิต. Medical Biochemistry: Metabolism of macronutrients, the integrated approach for health sciences students. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: บุ๊คเน็ท; 2546.

15. Sarasombath S. Immunodeficiency. In: Sarasombath S, editor. Immunology. 4 ed. Bangkok: PPS Science Technical; 2000. p. 291-3.

16. Root RK. Host defenses against infection: importance of phagocytic mechanisms from the study of genetic disorders of leukocyte function. Bull N Y Acad Med. 1982;58(8):669-80.

17. Nkhoma ET, Poole C, Vannappagari V, Hall SA, Beutler E. The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a systematic review and meta-analysis. Blood Cells Mol Dis. 2009;42(3):267-78.

18. Murray RK. Red & white blood cells. In: Murray R, Bender D, Botham K, Kennelly P, Rodwell V, Weil P, editors. Harper's Illustrated Biochemistry. 29 ed. New York: McGraw-Hill; 2012. p. 660-75.

19. Gray GR, Stamatoyannopoulos G, Naiman SC, Kliman MR, Klebanoff SJ, Austin T, et al. Neutrophil dysfunction, chronic granulomatous disease, and non-spherocytic haemolytic anaemia caused by complete deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase. Lancet. 1973;2(7828):530-4.

20. Prchal JT, Gregg XT. Red cell enzymes. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2005:19-23.

21. โอภา วัชระคุปต์, มาลีรักษ์ อัตต์สินทอง. สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์. ใน: โอภา วัชระคุปต์, บรรณาธิการ. Radical scavenging agents.พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: พี. เอส. พริ้นท์; 2549. หน้า 75-86.

22. Singh G, Kapoor IP, Singh P, de Heluani CS, de Lampasona MP, Catalan CA. Comparative study of chemical composition and antioxidant activity of fresh and dry rhizomes of turmeric (Curcuma longa Linn.). Food Chem Toxicol. 2010;48(4):1026-31.

23. Miquel J, Bernd A, Sempere JM, Díaz-Alperi J, Ramírez A. The curcuma antioxidants: pharmacological effects and prospects for future clinical use. A review. Arch Gerontol Geriatr. 2002;34(1):37-46.

24. Changtam C, de Koning HP, Ibrahim H, Sajid MS, Gould MK, Suksamrarn A. Curcuminoid analogs with potent activity against Trypanosoma and Leishmania species. Eur J Med Chem. 2010;45(3):941-56.

25. Sandur SK, Pandey MK, Sung B, Ahn KS, Murakami A, Sethi G, et al. Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism. Carcinogenesis. 2007;28(8):1765-73.

26. รุ่งระวี เต็มศิริกฤษ์กุล. องค์ความรู้จากงานวิจัยสมุนไพรไทย 10 ชนิด: กระชายดำ กวาวเครือ ขมิ้นชัน ขิง บัวบก พริกไทย ไพล ฟ้าทะลายโจร มะขามป้อม มะระขี้นก. พิมพ์ครั้งที่ 1.. กรุงเทพมหานคร: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ; 2550.

27. Itokawa H, Shi Q, Akiyama T, Morris-Natschke SL, Lee KH. Recent advances in the investigation of curcuminoids. Chin Med. 2008;3:11.

28. องค์การเภสัชกรรม. สารสกัดขมิ้นชัน: Health channel magazine [อินเตอร์เน็ต] 2011. [สืบค้นเมื่อ 16 กรกฎาคม 2557]. แหล่งข้อมูล: https://www.gpo.or.th/LinkClick.aspx?fileticket=iGX%2BUaekAfo%3D&tabid=185&mid=694&language=th-TH

29. วงการแพทย์. สารสกัดขมิ้นชัน สมุนไพรเก่ากับทางเลือกใหม่ [อินเตอร์เน็ต] 2013. [สืบค้นเมื่อ 16 กรกฎาคม 2557]. แหล่งข้อมูล: http://www.wongkarnpat.com/viewya.php?id=261#.UvhSEGJ_tWI

30. ธวัชสิน อ, ถาวระ อ, เตชะดำรงสิน เ. ขมิ้นชัน: ประสิทธิภาพในการกำจัดป้องกันยุงลาย: ศูนย์ข้อมูลโรคติดเชื้อและภาหะนำโรค [อินเตอร์เน็ต] 2002. [สืบค้นเมื่อ 16 กรกฎาคม 2557].แหล่งข้อมูล: http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_5_001c.asp?info_id=409

31. Hermann PA, Martin AW. Pharmacology of Curcuma longa. Planta Med. 1991;57:1-6.

32. MH Pan, TM Huang, JK Lin. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. Drug Metab and dispos. 1999; 27(1); 486-94.

33. คณะกรรมการแห่งชาติด้านยา. บัญชีจากสมุนไพร พ.ศ. 2549. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย; 2006.

34. Lewis S, Roper D. Laboratory methods used in the investigation of the haemolytic anaemias. In: Lewis S, Bane B, I B, editors. Dacie and Lewis Practical Haematology. 10 ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2006. p. 199-202.

35. Niki E, Komuro E, Takahashi M, Urano S, Ito E, Terao K. Oxidative hemolysis of erythrocytes and its inhibition by free radical scavengers. J Biol Chem. 1988;263(36):19809-14.

36. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. J Lab Clin Med. 1963;61:882-8.

37. Levinsky RJ, Harvey BA, Rodeck CH, Soothill JF. Phorbol myristate acetate stimulated NBT test: a simple method suitable for antenatal diagnosis of chronic granulomatous disease. Clin Exp Immunol. 1983;54(2):595-8.

38. Harley J, Robin H. The effect of the nitrite ion on intact human erythrocytes. Blood. 1962;20:710-21.

39. Niki E. Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radials. Am J Clin Nutr. 1991;54:119S-24S.

40. อาณาดี นิติธรรมยง,บรรณาธิการ. การวิจัยและพัฒนาสมุนไพรขมิ้นชันเป็นยา อาหารเสริมสุขภาพ เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์เพื่อที่ใช้กับคนและสัตว์. การเผยแพร่ผลงานวิจัยด้านการพัฒนาสมุนไพรสู่ระดับอุตสาหกรรม ครั้งที่ 2; 2552; โรงแรมมิราเคิล กรุงเทพมหานคร: ห้างหุ้นส่วนจำกัด สามลดา.

41. Weeraphan C, Srisomsap C, Chokchaichamnankit D, Subhasitanont P, Hatairaktham S, Charoensakdi R, et al. Role of curcuminoids in ameliorating oxidative modification in β-thalassemia/Hb E plasma proteome. J Nutr Biochem. 2013;24(3):578-85.

42. Ramirez Bosca A, Soler A, Carrion Gutierrez M, Laborda A. Antioxidant curcuma extracts decrease the blood peroxide levels of human subjects. Age. 1995;18:167-9.

43. Srichairatanakool S, Thephinlap C, Phisalaphong C, Porter JB, Fucharoen S. Curcumin contributes to in vitro removal of non-transferrin bound iron by deferiprone and desferrioxamine in thalassemic plasma. Med Chem. 2007;3(5):469-74.

44. Bukhari S, Jantan I, Jasamai M, Ahmed W, Amjad M. Synthesis and biological evaluation of curcumin analogues. J Med Sci. 2013;13(7):501-13.

45. Rakesh S, Patil P, Mane S. Use of antioxidants to scavenge free radicals: A major cause of diseases. Int J Pharmtech Res. 2010;2(2):1074-81.

46. Larmonier CB, Midura-Kiela MT, Ramalingam R, Laubitz D, Janikashvili N, Larmonier N, et al. Modulation of neutrophil motility by curcumin: implications for inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis. 2011;17(2):503-15.

47. Gaddipati JP, Sundar SV, Calemine J, Seth P, Sidhu GS, Maheshwari RK. Differential regulation of cytokines and transcription factors in liver by curcumin following hemorrhage/resuscitation. Shock. 2003;19(2):150-6.

48. Shuto T, Ono T, Ohira Y, Shimasaki S, Mizunoe S, Watanabe K, et al. Curcumin decreases toll-like receptor-2 gene expression and function in human monocytes and neutrophils. Biochem Biophys Res Commun. 2010;398(4):647-52.

49. Cashman JR, Ghirmai S, Abel KJ, Fiala M. Immune defects in Alzheimer's disease: new medications development. BMC Neurosci. 2008;9 Suppl 2:S13.

50. Venkatesan P, Unnikrishnan M, Kumar M, Rao M. Effect of curcumin analogues on oxidation of haemoglobin and lysis of erythrocytes. Current science. 2003;84(1):74-8.

51. Somparn P, Phisalaphong C, Nakornchai S, Unchern S, Morales NP. Comparative antioxidant activities of curcumin and its demethoxy and dehydrogenated derivatives. Biol pharm Bull. 2007; 30(1):74-8.

52. Deng S, Chen W, Zhou B, Yang L, Liu Z. Protective effects of curcumin and its analogues against free radical-induced oxidative haemolysis of human red blood cells. Food Chemistry. 2006; 98:112-9.

53. Barzegar A. Moosavi-Movahedi AA. Intracellular ROS Protection Efficiency and Free Radical-Scavenging Activity of Curcumin. Plos One. 2011;6(10):e26012.

54. Syng-Ai C, Kumari AL, Khar A. Effect of curcumin on normal and tumor cells: role of glutathione and bcl-2. Mol Cancer Ther. 2004;3(9):1101-8.

55. Derochette S, Franck T, Mouithys-Mickalad A, Deby-Dupont G, Neven P, Serteyn D. Intra- and extracellular antioxidant capacities of the new water-soluble form of curcumin (NDS27) on stimulated neutrophils and HL-60 cells. Chem Biol Interact. 2013;201(1-3):49-57.

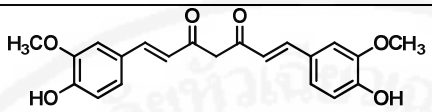
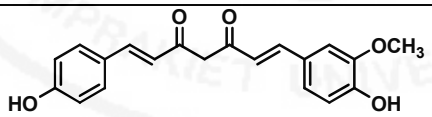
56. Pukdee W. Apoptosis and nitroblue tetrazolium reduction activity of neutrophils infected with *Mycobacterium tuberculosis*. Chiangmai: Chiangmai university; 2005.

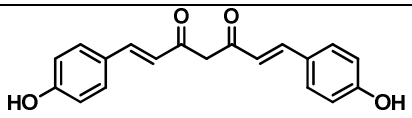
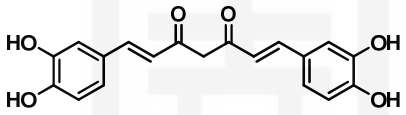
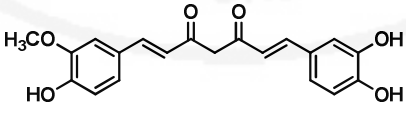
57. Sharma RA, Euden SA, Platton SL, Cooke DN, Shafayat A, Hewitt HR, et al. Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. Clin Cancer Res. 2004;10(20):6847-54.

58. Portes E, Gardrat C, Castellan A. A comparative study on the antioxidant properties of tetrahydrocurcuminoids and curcuminoids. Tetrahedron. 2007;. 63:9093-99.

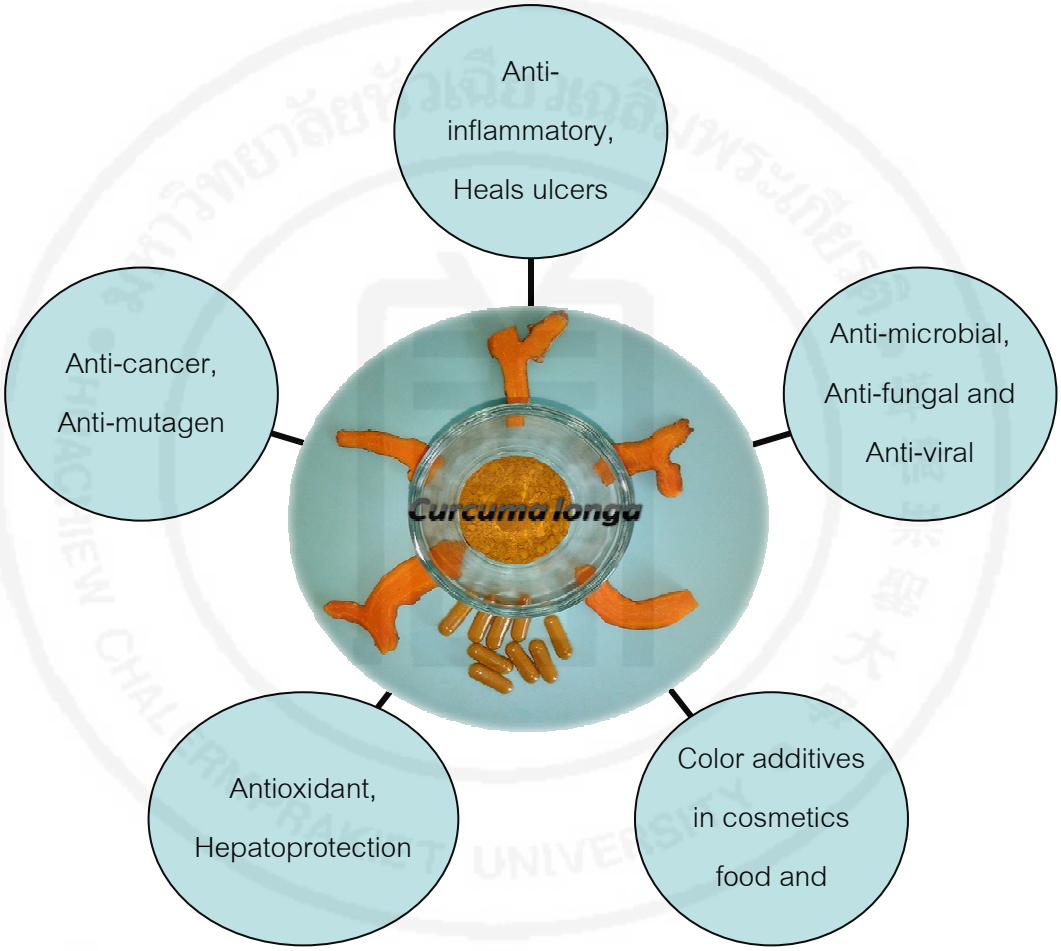
ภาคผนวก

ก. สารเคอร์คิวมินอยด์และแอนะล็อกชนิดต่าง ๆ ที่นำมาใช้ในการศึกษาวิจัย

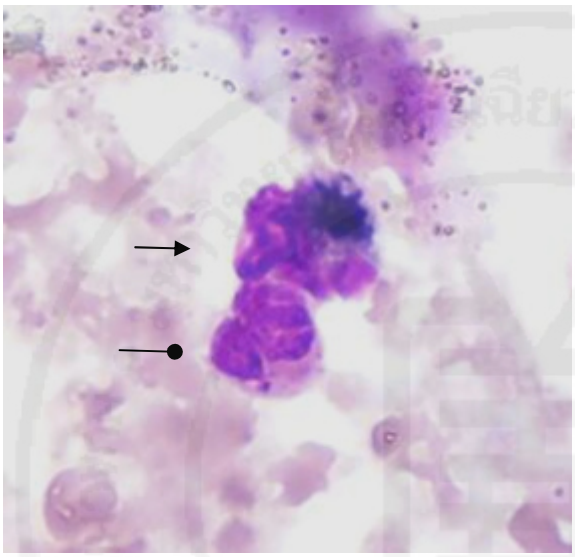
IUPAC name	Chemical structure	Name/ M.W.	Biological activities
(1*E*,6*E*)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione	 possesing 2 methoxy group linked through the α,β-unsaturated β-diketone moiety	Curcumin 368.38	-ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งเพิ่มระบบภูมิคุ้มกัน (Maheshwari RK, *et al*. Life Sci. 2006) -ยับยั้งการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีในหนูที่เป็นโรคพยาธิใบไม้ตับและสามารถฆ่าเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อนน้ำดี (Onsurathum S, *et al*. Srinagarind Med J. 2012) -ป้องกันเซลล์ประสาทเสื่อมจาก beta-amayloid (Park SY, *et al*. Jouranl of Natural Products 2002)
(1*E*,6*E*)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-(4-hydroxyphenyl) hepta-1,6-diene-3,5-dione	 has an asymmetric structure with one of the phenyl rings having o-methoxy substitution	Demethoxy curcumin 338.35	- ยับยั้งการเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก และฆ่าเซลล์มะเร็งสมอง (Ni X, *et al*. Oncol Rep. 2012, Huang TY. eCAM 2012) - ลดการเกิด Hb oxidation (Unnikrishnan MK and Rao MN. Phamazie.1995)

(1*E*,6*E*)-1,7-bis(4-hydroxyphenyl) hepta-1,6-diene-3,5-dione	 lacks two o-methoxy substitutions	Bis-demethoxy curcumin 308.33	- ลดออกซิเดชันและป้องกันเซลล์ตับถูกทำลายจาก CCL4 (Kamalakkannan N, *et al*. Basic Clin Pharm toxicol. 2005) - ยับยั้งการแสดงออกของยีนดื้อยา MDR-1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Anuchapreeda S, *et al*. Chiang Mai Med Bull. 2002)
(1*E*,6*E*)-1,7-bis(3,4-dihydroxyphenyl)hepta-1,6-diene-3,5-dione	 two of -CH_3 were removed	Di-*O*-demethyl curcumin 340.33	- ยับยั้งไซโตไคน์ IL-1b-induced IL-6 และลดการอักเสบ (Aroonrerk N, *et al*. J Dental Sci. 2012) - ยับยั้งการสร้าง NO ในเซลล์เพาะเลี้ยงไมโครเกลีย (Tocharus J, *et al*. J Nat Med. 2012)
(1*E*,6*E*)-1-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) hepta-1,6-diene-3,5-dione	 one of -CH_3 was removed	Mono-*O*-demethyl curcumin 354.35	- ต้านโปรโตซัว *Trypanosoma and Leishmania* spp. (Changtam C, et al. Eur J Med Chem. 2010) และยับยั้งการสร้าง NO ได้คล้ายกับ di-O-demethylcurcumin)

ข. สรรพคุณและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของขมิ้นชัน



ค. นิวโตรฟิลรีดิวซ์สี NBT



G6PD-deficient neutrophils

NBT non-redution of neutrophil

NBT reduction of neutrophil

Normal neutrophils

NBT non-redution of neutrophil

NBT reduction of neutrophil

ง. เอกสารรับรองโดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย

เรียนรู้เพื่อรับใช้สังคม

เอกสารรับรอง

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

วันที่ 29 กุมภาพันธ์ 2555

ชื่อเรื่อง การศึกษาผลของสารเคอร์คิวมินและแอนาลอกต่อนิวโตรฟิลและเม็ดเลือดแดงของผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD ในหลอดทดลอง

ชื่อนักวิจัย/หัวหน้าโครงการ อ.ดร.ดวงมณี แสนมั่น

คณะวิชา/หลักสูตร คณะเทคนิคการแพทย์

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

ขอรับรองว่า งานวิจัยดังกล่าวข้างต้นได้ผ่านการพิจารณาเห็นชอบโดยสอดคล้องกับประกาศเฮลซิงกิ จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

ลงนาม .....

(รองศาสตราจารย์ ดร.จริยาวัตร คมพยัคฆ์)

ประธานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

วันที่รับรอง วันที่ 29 กุมภาพันธ์ 2555

เลขที่รับรอง อ.082/2555

จ. ประวัติย่อผู้วิจัย

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ-นามสกุล ดร.ดวงมณี แสนมั่น

ประวัติการศึกษา วทบ. (เทคนิคการแพทย์) เกียรตินิยมอันดับสอง มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Ph.D. (Medical Technology) มหาวิทยาลัยมหิดล

Research Fellow, Nanyang Technological University, Singapore

สถานที่ติดต่อ กลุ่มวิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ต.บางโฉลง อ. บางพลี จ.สมุทรปราการ 10540 โทรศัพท์ 0-2312-6300-79 ต่อ 1170

E-mail: dsanmun@gmail.com

ผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล ศ.ดร.อภิชาต สุขสำราญ

ประวัติการศึกษา Ph.D. (Organic chemistry), Cambridge University

สถานที่ติดต่อ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง แขวงหัวหมาก เขตบางกะปิ กรุงเทพฯ 10240 โทรศัพท์ 0-2319-0931

ผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล ดร.ชัชวาลย์ ช่างทำ

ประวัติการศึกษา วทบ. (เคมี) มหาวิทยาลัยรามคำแหง

ปร.ด. (เคมีประยุกต์) มหาวิทยาลัยรามคำแหง

สถานที่ติดต่อ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์กายภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ต.บางโฉลง อ. บางพลี จ.สมุทรปราการ 10540 โทรศัพท์ 02-3126300 ต่อ 1180

ผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล ดร.สราวุธ สายจันมา

ประวัติการศึกษา วทบ. (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยขอนแก่น

วทม. (พยาธิวิทยาคลินิก) มหาวิทยาลัยมหิดล

Ph.D. (Clinical Pathology) มหาวิทยาลัยมหิดล

สถานที่ติดต่อ กลุ่มวิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัย
หัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ต.บางโฉลง อ. บางพลี จ.สมุทรปราการ
10540 โทรศัพท์ 0-2312-6300-79 ต่อ 1170

ผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล อ.สุชา จุลสำลี

ประวัติการศึกษา B.A. (Clinical Lab. Science) University of Maine

ALM (Biotechnology) Harvard University

สถานที่ติดต่อ กลุ่มวิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัย
หัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ต.บางโฉลง อ. บางพลี จ.สมุทรปราการ
10540 โทรศัพท์ 0-2312-6300-79 ต่อ 1170

ผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล อ.พรสุรี พงษ์สุชาติ

ประวัติการศึกษา วทบ. (เทคนิคการแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วทม. (วิทยาศาสตร์การแพทย์ แขนงวิชาอณูชีววิทยาทางการแพทย์และ
พันธุศาสตร์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถานที่ติดต่อ กลุ่มวิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัย
หัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ต.บางโฉลง อ. บางพลี จ.สมุทรปราการ
10540 โทรศัพท์ 0-2312-6300-79 ต่อ 1170