บทที่ 5
อภิปรายผลการทดลอง สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการทดลอง

การศึกษาผลของแคปไซซินต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เคยมีการศึกษามาบ้างแล้วแต่เป็นการศึกษาในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากชิ้นเนื้อผิวหนังภายนอกช่องปาก[37] นอกจากนี้มีการศึกษาผลของสารสกัดจากพริก ซึ่งผู้ศึกษามิได้ระบุว่าเป็นแคปไซซิน โดยศึกษาผลต่อการเจริญเติบโตของ เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เพาะเลี้ยงจากเยื่อเมือกด้านแก้ม และใช้วิธีการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วย hemocytometer[36] ซึ่งการวัดผลด้วยวิธีนี้ความละเอียดถูกต้องขึ้นกับประสบการณ์และความชำนาญของผู้ศึกษา สำหรับผลของแคปไซซินต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากชิ้นเนื้อเยื่อภายในช่องปากยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของแคปไซซินซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าที่สกัดจากพริก (Capsicum frutescens) ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เพาะเลี้ยงจากเหงือกของคนไทยและผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะเซลล์ การวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในการทดลองนี้ใช้ MTT assay ซึ่งเป็นการวัดเฉพาะเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ที่ให้ความถูกต้องแม่นยำสูง[38, 39] ส่วนการศึกษาผลของแคปไซซินต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ใช้ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนเช่นเดียวกัน สำหรับเซลล์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากเนื้อเยื่อเหงือกของคนไทย ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นตัวแทนในการศึกษาผลของแคปไซซินต่อเซลล์ของเนื้อเยื่อภายในช่องปากได้

การวัดผลของแคปไซซินต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ MTT assay ซึ่งเป็นวิธีการวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต โดยดูจากผลผลิตของเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ วิธีการนี้ Mossman[38] ได้ศึกษาและสรุปว่าเหมาะสำหรับการศึกษาการคงมีชีวิต (cell survival) และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (proliferation) ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากวิธีการดังกล่าวมีข้อดีหลายประการคือเป็นวิธีการที่ง่ายและรวดเร็ว ใช้วัดความมีชีวิตของเซลล์ได้ดี เนื่องจากเป็นการวัดปริมาณเอนไซม์ mitochondrial dehydrogenase ซึ่งจะพบได้เฉพาะใน mitochondria ของเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ จึงเหมาะที่จะใช้วัดเซลล์ที่มีชีวิต นอกจากนี้ MTT assay ยังเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการนำมาใช้ศึกษาความเป็นพิษของยาหรือวัสดุทางการแพทย์ที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์วิธีหนึ่ง ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้ MTT assay ในการวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์และค่าการดูดซับแสงในช่วงของจำนวนเซลล์ที่ทำการทดลองเพื่อทำกราฟมาตรฐาน คือ 2,500 – 50,000 เซลล์ พบว่าค่าทั้งสองมีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงโดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) = 0.994 ซึ่งหมายถึงจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นจะมีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรง ดังนั้นจึงสามารถใช้ค่าการดูดกลืนแสงในการเปรียบเทียบแทนการนับจำนวนเซลล์โดยตรงได้เฉพาะในช่วงค่าการดูดกลืนแสงของจำนวนเซลล์เท่ากับ 0.057 – 0.646 ซึ่งเป็นช่วงของจำนวนเซลล์ที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐาน สำหรับการทดลองผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของแคปไซซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่าง ๆ กันนั้น พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากการทดลองอยู่ในช่วงดังกล่าวคือวัดได้ 0.052–0.643 ซึ่งอยู่ในช่วงที่มีความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์และค่าการดูดกลืนแสงเป็นเส้นตรง ยกเว้นในกลุ่มควบคุมที่ระยะเวลา 96 และ 120 ชั่วโมง ที่มีค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.829–0.965 แต่ไม่มีผลต่อการวิเคราะห์เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่กลุ่มควบคุมแตกต่างจากกลุ่มอื่นหมดทุกกลุ่ม

ผลของแคปไซซินต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ครั้งนี้ พบว่าความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้ทดสอบมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ โดยผลที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นร้อยละ 0.002 เท่านั้นที่จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) สำหรับความเข้มข้นที่เหลือมีผลทำให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อคิดเป็นร้อยละเทียบกับกลุ่มควบคุมของแต่ละความเข้มข้นพบว่าลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตแปรผกผันกับความเข้มข้นของแคปไซซิน

ผลการศึกษามีลักษณะดังกล่าวทุกช่วงเวลา คือ 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง ยกเว้นกลุ่มที่ทดสอบด้วยแคปไซซินความเข้มข้นร้อยละ 0.002 ซึ่งมีผลทำให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ภายหลัง 48 ชั่วโมงขึ้นไปผลการทดลองนี้คล้ายคลึงกับการศึกษาของ Ko และคณะ[37] ซึ่งเป็นการศึกษาผลของแคปไซซินต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เพาะเลี้ยงจากผิวหนัง โดยความเข้มข้นของแคปไซซินที่ใช้ในการทดลองคือ ร้อยละ 0.030, 0.050, 0.100, 0.150 และ 0.200 พบว่าปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น และที่ 48 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของทุกความเข้มข้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แม้ว่าการศึกษาของ Ko และคณะ[37] จะให้ผลสอดคล้องกับการศึกษานี้ แต่ระยะเวลาที่พบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในกลุ่มศึกษาแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญในการศึกษาของ Ko และคณะ[37] นั้นยาวนานกว่า (48 ชั่วโมง) ซึ่งต่างจากการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าแตกต่างกันตั้งแต่ระยะเวลา 6 ชั่วโมงแรก ซึ่ง

อาจเกิดจากความแตกต่างของชนิดเซลล์ที่ใช้ทดสอบ Ko และคณะ[37] ได้ใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เพาะเลี้ยงจากผิวหนังภายนอกช่องปาก แต่ในการศึกษานี้ใช้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงจากเหงือกซึ่งเป็นเนื้อเยื่อในช่องปากจึงอาจทำให้มีการตอบสนองของเซลล์แตกต่างกัน สาเหตุอีกประการหนึ่งที่ทำให้ผลการศึกษาแตกต่างกันอาจเนื่องมาจากใช้วิธีการวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตต่างกัน Ko และคณะ[37] ใช้การย้อมสีเซลล์ด้วย trypan blue ซึ่งใช้นับเซลล์ที่ไม่มีการติดสีเป็นเซลล์ที่มีชีวิตทั้งนี้เนื่องจาก เซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่จะมี intact plasma membrane สีจะไม่สามารถซึมเข้าสู่ตัวเซลล์ได้ ในขณะที่เซลล์ที่ตายแล้วมีการทำลายของ plasma membrane ทำให้สีซึมเข้าสู่ตัวเซลล์เกิดการติดสีภายในเซลล์ขึ้น ดังนั้นเซลล์ที่ตายแล้วแต่ plasma membrane ยังไม่ถูกทำลายจะไม่ติดสีทำให้ถูกนับเป็นเซลล์ที่มีชีวิตด้วย แต่ในการทดลองครั้งนี้ใช้ MTT assay ซึ่งอาศัยการที่สารละลาย MTT ทำปฏิกิริยากับ mitochondrial dehydrogenase ดังได้กล่าวไปแล้วข้างต้น เอนไซม์นี้สร้างโดย mitochondria ซึ่งเป็น organelle ที่ sensitive ต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์มากหากเกิดการตายของเซลล์ mitochondria ไม่สามารถสร้าง mitochondrial dehydrogenase จึงไม่เกิดปฏิกิริยากับสารละลาย MTT และไม่ถูกนับเป็นเซลล์ที่มีชีวิต ดังนั้น MTT assay จึงเป็นวิธีการที่วัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตได้แม่นยำกว่า อย่างไรก็ตามผลสรุปของการทดลองนี้ได้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาของ Ko และคณะ[37] คือความเข้มข้นของแคปไซซินที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดน้อยลง

การทดลองครั้งนี้มีสิ่งที่น่าสนใจอีกประการหนึ่งคือเรื่องของระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบ จากผลการทดลองพบว่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยพิจารณาในแต่ละความเข้มข้น พบว่าเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นจำนวนร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมจะลดลงตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4 ยกเว้นความเข้มข้นร้อยละ 0.002 ในช่วง 48 ชั่วโมงแรก ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ผลการทดลองสรุปได้ว่าระยะเวลาที่ใช้ทดสอบมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์คือเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นทำให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลดลง ซึ่งเหมือนกับข้อสรุปของการศึกษาของ Ko และคณะ[37] นอกจากนี้ผลการศึกษาของ van Wyke และคณะ[36] พบว่าในกลุ่มที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากพริกที่ระดับความเข้มข้น 300, 400 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อระยะเวลาที่ใช้ทดสอบนานขึ้น จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจะลดลง เช่นเดียวกับการทดลองครั้งนี้

จากผลการทดลองที่พบว่าเมื่อระยะเวลาที่ใช้ทดสอบนานขึ้นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจะลดลงในทุกความเข้มข้นของแคปไซซิน แต่เมื่อเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปของแต่ละความเข้มข้นเมื่อระยะเวลาเปลี่ยนแปลงไป (ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 5) พบว่าที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง ทั้งกลุ่ม

ควบคุมและกลุ่มที่ทดสอบด้วยแคปไซซินความเข้มข้นร้อยละ 0.002 และ 0.003 จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นมากกว่าเมื่อเริ่มทดลองและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนกลุ่มที่ทดสอบด้วยแคปไซซินความเข้มข้นร้อยละ 0.004, 0.006. 0.010, 0.020 และ 0.030 จำนวนเซลล์จะลดน้อยลงกว่าเมื่อตอนเริ่มต้นและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อพิจารณาเฉพาะในกลุ่มที่จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น พบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.002 ตั้งแต่ระยะเวลาเริ่มต้นจนถึง 48 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ที่มีการเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม แต่ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมงเป็นต้นไป การเพิ่มของจำนวนเซลล์ก็ยังคงมีความต่อเนื่อง แต่อัตราการเพิ่มจะน้อยกว่ากลุ่มควบคุม การทดลองนี้ได้ผลคล้ายกับการศึกษาของ van Wyke[36] และคณะ ซึ่งพบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากพริกที่ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์จะทำให้มีการเพิ่มของจำนวนเซลล์คล้ายกับกลุ่มควบคุมแต่อัตราการเพิ่มน้อยกว่าซึ่ง van Wyke และคณะ ได้อธิบายถึงการที่เซลล์ได้รับสารที่เป็นอันตรายต่อเซลล์แต่ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำและเซลล์ยังสามารถเพิ่มจำนวนได้แต่เพิ่มในอัตราที่น้อยกว่ากลุ่มควบคุมนั้นว่า เกิดจากเซลล์มีการปรับตัวที่เรียกว่า "metabolic- adaptation" จากผลการทดลองในส่วนนี้สามารถใช้อธิบายถึงกลไกการตอบสนองของเซลล์ต่อการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อมได้ว่าโดยปกติแล้วเซลล์ทั่วไปจะมีการปรับสภาพสมดุลในการทำงานของเซลล์ (homeostasis) ตลอดเวลาหากมีการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมที่ไม่มากนัก เช่น การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ การเปลี่ยนแปลงปริมาณออกซิเจน หรือการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของประจุและปริมาณของน้ำ เป็นต้น ในทำนองเดียวกันเซลล์ก็จะพยายามปรับสมดุลเมื่อได้รับการกระตุ้นจากปัจจัยภายนอก เช่น สารเคมี หรือสารอื่นที่อาจเป็นอันตรายต่อเซลล์ เช่น แคปไซซินที่ใช้ในการทดลองนี้ การปรับสมดุลของเซลล์นั้นมีขอบเขตจำกัดทั้งนี้ขึ้นกับปริมาณของสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ ระยะเวลาที่สัมผัสสาร และกลไกการออกฤทธิ์ของสารนั้นว่าออกฤทธิ์ที่ส่วนประกอบใดของเซลล์ เช่นที่ plasma membrane, mitochondria หรือ lysosome เป็นต้น ถ้าเซลล์ได้รับสารพิษในระดับต่ำที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ (sublethal dose) เซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงแตกต่างไปจากภาวะปกติ (altered steady state) และพยายามปรับสภาพให้เกิดสภาวะสมดุลกลับมาที่สภาวะปกติได้ (normal steady state) แต่ถ้าเซลล์ได้รับสารพิษเข้าไปในระดับสูง (lethal dose) เซลล์ไม่สามารถปรับตัวได้ การทำงานของเซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงไปในทางเสื่อม (degeneration) จนอาจทำให้เซลล์ตายได้ ดังนั้นจากผลการทดลองนี้ สรุปได้ว่าแคปไซซินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.002 เป็นความเข้มข้นที่ปลอดภัยสำหรับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เพาะเลี้ยงจากเหงือก เนื่องจากพบว่าเซลล์ยังคงสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้เช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม แม้อัตราการเพิ่มจะน้อยกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องจากบางเซลล์ไม่สามารถปรับตัวได้เมื่อได้รับแคปไซซิน แต่ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.003 แม้ว่าที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง จำนวนเซลล์จะมากกว่าเมื่อเริ่มต้น แต่เมื่อดูจำนวนเซลล์ในแต่ละช่วงเวลา (ภาพที่ 5) จะพบว่าการเปลี่ยนแปลงไม่คงที่ คือ บางช่วงเซลล์มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น บางช่วงลดน้อยลง ซึ่งบ่งชี้ว่าเซลล์ไม่สามารถปรับสภาพให้

เกิดสภาวะสมดุลกลับมาสู่สภาวะปกติได้ ซึ่งต่างจากการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้อย่างต่อเนื่องเหมือนที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.002 และกลุ่มควบคุม สำหรับแคปไซซินความเข้มข้นร้อยละ 0.004, 0.006, 0.010, 0.020 และ 0.030 เป็นความเข้มข้นที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ดังแสดงในภาพที่ 5 เซลล์ไม่สามารถปรับสภาพสมดุลกลับสู่สภาวะปกติ ไม่สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์เช่นเดียวกับกลุ่มควบคุมได้

การศึกษาผลของแคปไซซินต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์-เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับ พบการเสื่อมของเซลล์สัมพันธ์กับความเข้มข้นของแคปไซซิน โดยพบว่าเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นและระยะเวลานานขึ้น การเสื่อมของเซลล์มากขึ้น สังเกตได้จากลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปและการยึดเกาะกับจานเพาะเลี้ยงเซลล์ลดลง ผลการศึกษาพบว่าในกลุ่มควบคุมเซลล์มีการแผ่ตัวและยึดเกาะดี ตั้งแต่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง จนถึงระยะเวลา 120 ชั่วโมง ไม่ค่อยพบเซลล์ที่มีรูปร่างกลมและลอยตัวอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งเป็นข้อบ่งชี้ถึงลักษณะของเซลล์ที่ไม่ปกติ การลอยตัวของเซลล์เกิดจากการที่เซลล์ไม่สามารถสร้างโปรทีนที่ช่วยในการยึดเกาะ จึงสูญเสียความสามารถในการยึดเกาะอันมีสาเหตุจากความผิดปกติหรือการตายของเซลล์ สำหรับกลุ่มความเข้มข้นร้อยละ 0.020 และ 0.030 พบว่าเซลล์มีความเสื่อมค่อนข้างมาก โดยเซลล์เกือบทั้งหมดมีลักษณะกลมและลอยตัวอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยเริ่มพบตั้งแต่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง ลักษณะนี้พบต่อเนื่องจนถึงระยะเวลา 120 ชั่วโมง ส่วนความเข้มข้นที่ร้อยละ 0.003, 0.004, 0.006 และ 0.010 ในช่วงระยะเวลาต้น ๆ ของการทดลองพบเซลล์ที่ปกติและเซลล์ที่เสื่อมสภาพปะปนกัน แต่ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.002 จะพบว่าเซลล์ส่วนใหญ่มีลักษณะปกติคือมีการแผ่ตัวและยึดเกาะดี มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ผลการทดลองในส่วนที่สองเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการทดลองแรก เพียงแต่แตกต่างกันโดยการทดลองแรกเป็นการศึกษาในเชิงปริมาณ แต่การทดลองที่ 2 แสดงให้เห็นลักษณะของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไป

ผลจากการทดลองพบว่าแคปไซซินความเข้มข้นร้อยละ 0.020 เป็นความเข้มข้นที่มีผลทั้งต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและลักษณะของเซลล์อย่างชัดเจน โดยตั้งแต่ระยะเริ่มแรกจนถึงเวลา 120 ชั่วโมง ดังนั้นในการศึกษาผลของแคปไซซินต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดจึงเลือกใช้แคปไซซินความเข้มข้นร้อยละ 0.020 ในการทดสอบดังกล่าว ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า แคปไซซินในขนาดที่เป็นอันตรายต่อเซลล์มีผลต่อการยึดเกาะของเซลล์ และต่อ plasma membrane ของเซลล์ โดยพบว่าทำให้เกิด bleb และรูที่ plasma

membrane ในแง่ของระยะเวลาที่ใช้ทดสอบพบว่า ความผิดปกติจะรุนแรงมากขึ้นเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีแคปไซซินเป็นระยะเวลาที่นานขึ้น

จากการทดลองสรุปได้ว่าแคปไซซินมีผลต่อทั้งการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์และลักษณะของเซลล์ โดยสัมพันธ์กับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้ทดสอบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแคปไซซินมีพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ กลไกการเกิดพิษของแคปไซซินต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ยังไม่มีผู้ศึกษาและอธิบายมาก่อน โดยทั่วไปแล้วการออกฤทธิ์ของสารต่าง ๆ ต่อเซลล์ แบ่งได้เป็น 2 รูปแบบ คือ (1) ออกฤทธิ์ด้วยสารที่มีโครงสร้างทางเคมีที่เป็นอยู่ (parent compound) หรือ (2) เป็นการออกฤทธิ์โดยสารที่เป็นโครงสร้างใหม่ซึ่งเป็นผลิตผลที่เปลี่ยนแปลงไปจากโครงสร้างเดิม (active metabolite) ในกรณีของแคปไซซินยังไม่มีผู้ใดศึกษามาก่อน จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าแคปไซซินที่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์อยู่ในรูปแบบใด แต่อย่างไรก็ตามไม่ว่าสารนั้นจะอยู่ในรูปแบบใดก็จะมีกลไกการออกฤทธิ์หรือกลไกที่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ด้วยกลไกที่สำคัญ 2 กลไก คือ กลไกที่ทำให้เกิดพิษโดยตรง (direct toxic action) คือ สารพิษจะออกฤทธิ์ต่อ plasma membrane หรือต่อ organelles ต่าง ๆ เช่น mitochondria, lysosome, endoplasmic reticulum หรือ nucleus เป็นต้น และหลังจากนั้นก็จะทำให้ metabolism ของเซลล์นั้นผิดปกติ หรืออีกรูปแบบหนึ่งคือ กลไกที่ทำให้เกิดพิษโดยการออกฤทธิ์โดยอ้อม (indirect toxic action) กรณีนี้สารพิษจะออกฤทธิ์ต่อ metabolism ภายในเซลล์ก่อนแล้วจึงทำให้เกิดการทำลาย plasma membrane หรือ organelles ต่าง ๆ จนเซลล์ตายในที่สุด

จากภาพถ่ายของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดสองกราด พบว่าแคปไซซินมีผลทำให้เกิด bleb ที่ plasma membrane และเมื่อระยะเวลานานขึ้นพบลักษณะเป็นรูที่ plasma membrane ซึ่งเกิดขึ้นมากตามระยะเวลาที่นานขึ้น การเกิด bleb บริเวณ plasma membrane ถือว่าเป็นตัวชี้วัดว่าสารที่ใช้ทดสอบมีพิษต่อ plasma membrane เนื่องจากการเกิด bleb จะเกิดขึ้นค่อนข้างเร็ว คือในช่วงระยะเวลาเป็นวินาทีหรือเป็นนาทีเท่านั้นภายหลังได้รับสารพิษ การเกิด bleb เป็นการสูญเสียความสามารถในการเชื่อมต่อระหว่าง plasma membrane กับ cytoskeleton ของเซลล์จึงเกิดลักษณะพองนูนขึ้นมา สำหรับการเกิดรูที่ plasma membrane อาจเกิดจากการที่ bleb แตกออก (ภาพที่ 14) จึงทำให้เกิดรูและมีการหลุดลอกของ plasma membrane Hoyes และคณะ[40] ได้ศึกษาผลของแคปไซซินต่อ nerve fibers ในชั้น epithelium ของ trachea ที่แยกมาจากหนู พบว่าเมื่อใช้แคปไซซิน 640 ไมโครโมลาร์ สัมผัสกับ nerve fibers เป็นระยะเวลา 5 นาที นำมาศึกษาลักษณะโครงสร้างโดยละเอียด พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปในทางเสื่อมลง คือ axon มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากขึ้น microtubules หายไป axonal membrane ถูกทำลาย ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าแคปไซซินมีผลทำให้เกิดการทำลาย

plasma membrane โดยอาจเกิดจากการทำลายกรดไขมันไม่อิ่มตัวในชั้น plasma membrane หรือมีการทำลายส่วนของ plasma membrane ที่เป็นโปรทีน หรืออีกกลไกหนึ่งแคปไซซินอาจไปจับกับ receptor ที่เฉพาะบน plasma membrane ทำให้การทำหน้าที่ของ plasma membrane เสียไปและทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ Beven และ Forbes[41] ศึกษาผลของแคปไซซินต่อ plasma membrane ของ dorsal root ganglion neurons ที่ได้จากหนูโดยเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ พบว่าแคปไซซินกระตุ้นให้มีการเปิดของ nonselective cations บน plasma membrane เช่นเดียวกับการศึกษาของ Bleakman และคณะ[42] ที่พบว่าแคปไซซินมีผลกระตุ้น nonselective cations โดยเฉพาะพบว่า Ca^{2+} ในเซลล์จะมากขึ้น ดังนั้นกลไกการเกิดพิษของแคปไซซินที่อาจอธิบายได้อีกประการหนึ่งก็คือ แคปไซซินทำให้ permeability ของ plasma membrane ผิดปกติ มี Ca^{2+} เคลื่อนเข้าสู่เซลล์มากขึ้น ทำให้เกิดสภาวะความเข้มข้นของ Ca^{2+} ภายใน cytoplasm สูงกว่าปกติ (ความเข้มข้นปกติของ free $Ca^{2+} \leq 10^{-7}$ M) ซึ่งจะทำให้เกิดความผิดปกติต่าง ๆ ภายในเซลล์เช่น เกิดความผิดปกติกับ actin filaments, ยับยั้ง microtubule assembly ซึ่ง filaments ทั้งสองเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของ cytoskeleton ของเซลล์ นอกจากนี้ Ca^{2+} ที่เคลื่อนเข้าสู่เซลล์มากขึ้น เซลล์มีกลไกจัดการโดยนำไปเก็บไว้ที่ mitochondria ในรูปของ matrix granules และถ้ามีมากเกินไปอาจทำให้การทำงานของ mitochondria ผิดปกติหรือไม่สามารถทำงานได้ มีผลทำให้เซลล์ตายได้

กลไกการเกิดพิษของแคปไซซินนอกจากจะเกิดที่ plasma membrane ดังกล่าวมาแล้วยังอาจเกิดจากสาเหตุอื่นได้เช่น อาจเกิดพิษต่อ organelles ต่าง ๆ ภายในเซลล์ จากการศึกษาของ Nopanitaya และ Nye[43] ซึ่งให้แคปไซซินความเข้มข้นร้อยละ 0.014 แก่หนูโดยวิธี intraduodenal injection และนำ duodenal mucosa มาศึกษาด้วย light microscopy และ transmission electron microscopy (TEM) ผลการศึกษาด้วย light microscopy พบว่าเมื่อได้รับแคปไซซินนาน 2 นาที มีการบวมน้ำ (edema) ของ villi มี capillary congestion ในชั้น lamina propria แต่เมื่อศึกษาด้วย TEM พบว่า mitochondria มีการบวม (swell) มี rarefied matrix และพบ disorganized cristae นอกจากนี้ยังพบว่า free ribosomes และ lysosomes มีจำนวนเพิ่มขึ้น ซึ่งการที่ organelles มีความผิดปกติอาจทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ได้ โดยเฉพาะ mitochondria ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการสร้างพลังงานให้แก่เซลล์เพื่อใช้ในกระบวนการ metabolism ต่าง ๆ ภายในเซลล์ รวมทั้งใช้ในการขนส่งสารที่ต้องใช้พลังงาน (active- transport) ถ้า mitochondria ถูกทำลายหรือทำหน้าที่ผิดปกติจะมีผลทำให้เซลล์ตายได้ ผลการศึกษาของ Chudapongse และ Janthasoot[44] สนับสนุนการเกิดพิษของแคปไซซินในประเด็นนี้ โดยศึกษาผลของแคปไซซินต่อ liver mitochondria ที่แยกจากหนู พบว่าแคปไซซินสามารถยับยั้งการสร้างพลังงานของ mitochondria ในช่วงของการส่งผ่านอิเล็กตรอนในกระบวนการ oxidative

phosphorylation แต่ตำแหน่งที่ออกฤทธิ์ยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัด ดังนั้นการที่แคปไซซินมีผลต่อ mitochondria โดยยับยั้งการสร้างพลังงานอาจทำให้การทำงานของเซลล์ผิดปกติมีผลทำให้สมดุลต่าง ๆ ภายในเซลล์เสียไปและทำให้เซลล์ตายได้

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองผลของแคปไซซินต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เพาะเลี้ยงจากเหงือกของคนครั้งนี้ พบว่าแคปไซซินความเข้มข้นร้อยละ 0.002 เป็นความเข้มข้นที่ปลอดภัยสำหรับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เพาะเลี้ยงจากเหงือกของคน โดยผลการศึกษาในช่วง 48 ชั่วโมงแรก ร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) แต่ตั้งแต่ระยะเวลา 48 ชั่วโมงขึ้นไป พบว่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของความเข้มข้นร้อยละ 0.002 มีจำนวนน้อยกว่ากลุ่มควบคุมและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ถ้าเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ของแต่ละความเข้มข้นที่ระยะเวลาต่าง ๆ กันพบว่ากลุ่มที่ทดสอบด้วยแคปไซซินร้อยละ 0.002 มีการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะ 48 ชั่วโมงแรกเพิ่มในอัตราใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม แต่ตั้งแต่ระยะเวลา 48 ชั่วโมงขึ้นไป การเพิ่มยังคงต่อเนื่องแต่เพิ่มในอัตราน้อยกว่ากลุ่มควบคุม สำหรับความเข้มข้นอื่นได้แก่ 0.003, 0.004, 0.006, 0.010, 0.020 และ 0.030 เป็นความเข้มข้นที่เป็นอันตรายสำหรับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เพาะเลี้ยงจากเหงือกของคน เนื่องจากผลการทดสอบพบว่ามีผลทำให้ร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตมีจำนวนน้อยกว่ากลุ่มควบคุม และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กลไกการออกฤทธิ์ของแคปไซซินไม่สามารถสรุปได้แน่ชัด แต่อาจเกิดจากแคปไซซินมีผลต่อ plasma membrane โดยทำให้เกิด bleb และรูที่ plasma membrane หรืออาจเกิดจากแคปไซซินมีผลต่อ organelles ต่าง ๆ ภายในเซลล์โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ mitochondria ทำให้การสร้างพลังงานลดลงหรือสร้างไม่ได้ซึ่งมีผลต่อ metabolism ของเซลล์ นอกจากนี้อาจมีผลต่อการส่งผ่านสารของเซลล์แบบ active transport ซึ่งต้องใช้พลังงานทำให้ไม่สามารถขนส่งสารผ่านเข้าออกเซลล์ทำให้เซลล์ตายได้ในกรณีได้รับแคปไซซินความเข้มข้นสูง แต่ในกรณีความเข้มข้นต่ำอาจทำให้การเพิ่มจำนวนเซลล์ลดน้อยลง

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้ได้ข้อสรุปว่าแคปไซซินความเข้มข้นร้อยละ 0.002 เป็นความเข้มข้นที่ปลอดภัยสำหรับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เพาะเลี้ยงจากเหงือกของคน แต่อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ยังน้อยกว่ากลุ่มควบคุม ดังนั้นจึงน่าที่จะทำการศึกษาให้ทราบกลไกที่ทำให้การเพิ่มจำนวนเซลล์ลดน้อยลง แม้ว่าแคปไซซินความเข้มข้นร้อยละ 0.002 จะทำให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวนได้แต่อาจมีผลต่อการสร้างสารบางอย่างของเซลล์ผิดปกติไป เช่นการสร้าง cytoskeleton proteins นอกจากนี้ความผิดปกติของการสร้างเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) ก็อาจมีส่วนเกี่ยวข้องได้เช่นกัน สังเกตได้จากความสัมพันธ์ระหว่างการรับประทานอาหารเผ็ดกับการเกิด submucous fibrosis. De Waal และคณะ[45] ได้ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ไฟโบรบลาสต์ชนิดต่าง ๆ ระหว่างกลุ่มที่เป็น oral submocous fibrosis และกลุ่มไม่เป็นซึ่งถือเป็นกลุ่มควบคุม โดยแบ่งลักษณะเซลล์ไฟโบรบลาสต์เป็น 3 type คือ F1, F2 และ F3 ตามลักษณะของเซลล์ ผลการศึกษาพบว่าอัตราส่วนระหว่าง F3 และ F1 ของกลุ่มที่เป็น oral submucous fibrosis สูงกว่ากลุ่มควบคุม และจากผลการศึกษาของ Mollenhaver และ Bayreuther[46] พบว่าเซลล์ชนิด F3 ใน connective tissue ของหนูจะสร้าง collagen type I และ III มากกว่าเซลล์ชนิด F1 ดังนั้นการศึกษากลไกที่แคปไซซินมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในการทำหน้าที่ของส่วนประกอบของเซลล์รวมทั้งการสร้างสารต่าง ๆ ของเซลล์ผิดปกติไปได้อาจนำมาอธิบายกลไกการเกิดความผิดปกติของเซลล์ได้

สำหรับการนำแคปไซซินมาประยุกต์ใช้ เช่นใช้ทาเฉพาะที่ระงับอาการปวดควรมีการศึกษาถึงความเข้มข้นของแคปไซซินที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ชนิดต่าง ๆ ในบริเวณที่ทา Sirsat[33,34] ศึกษาผลของแคปไซซินที่ใช้ทาเฉพาะที่ โดยใช้แคปไซซินความเข้มข้นร้อยละ 2 ทาบริเวณเพดานปากของหนู และศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อทางพยาธิวิทยาพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในชั้น connective tissue นอกจากนี้ Richeux และคณะ[47] ได้ทดลองใช้ topical capsaicin ความเข้มข้นร้อยละ 0.075 ทาเฉพาะที่บริเวณผิวหนัง และวัดปริมาณแคปไซซินที่ซึมผ่านเข้าในกระแสโลหิต พบว่ามีปริมาณแคปไซซินในกระแสโลหิตร้อยละ 5 ของปริมาณทั้งหมดที่ใช้ทา ซึ่งแสดงว่าแคปไซซินสามารถซึมผ่านชั้นต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อได้ ดังนั้นจึงน่าที่จะศึกษาเพื่อหาข้อมูลให้เพียงพอก่อนนำมาประยุกต์ใช้ในคน