



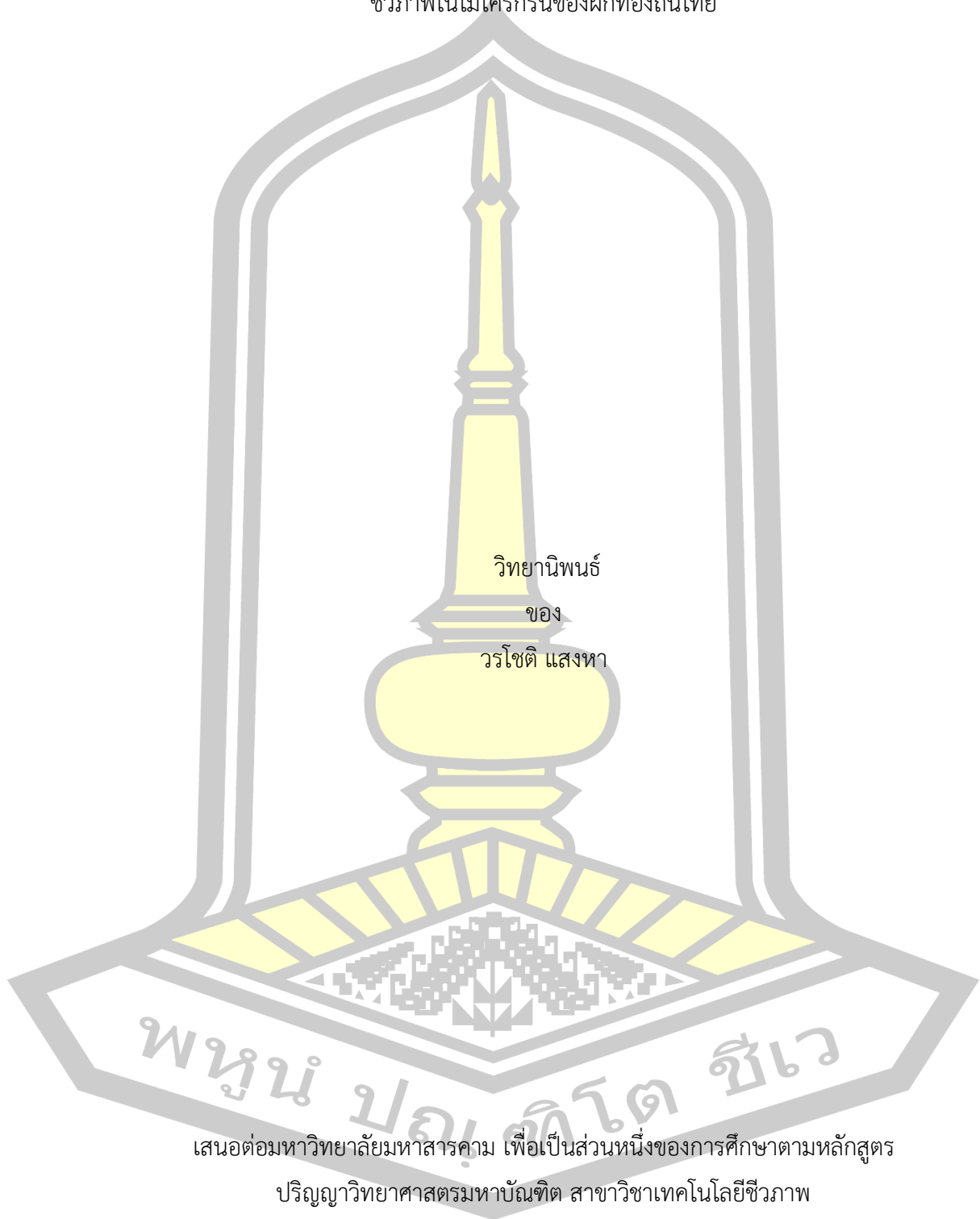
อิทธิพลของเทคโนโลยีพลาสติกและสารกระตุ้นอินทรีย์ต่อสารไอโซโทไซยานาท และฤทธิ์ทาง
ชีวภาพในไมโครกรีนของผักท้องถิ่นไทย

วิทยานิพนธ์
ของ
วรโชติ แสงหา

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
กุมภาพันธ์ 2563

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

อิทธิพลของเทคโนโลยีพลาสติกมาเย็นและสารกระตุ้นอินทรีย์ต่อสารไอโซโทปไฮยาเนท และฤทธิ์ทาง
ชีวภาพในไมโครกรีนของผักท้องถิ่นไทย



วิทยานิพนธ์
ของ
วรชิตี แสงหา

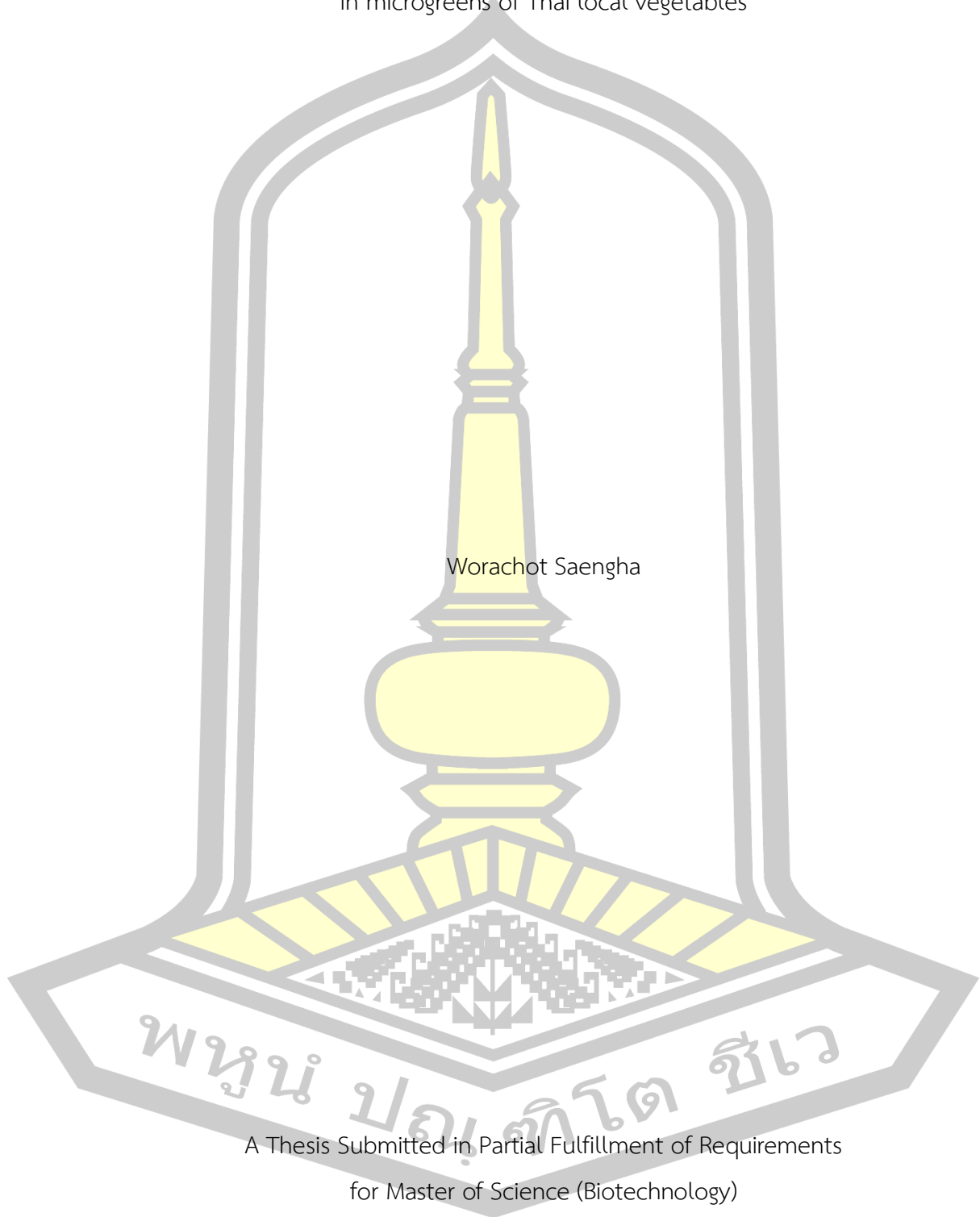
พูน ปอญ คีโต ชีวะ

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

กุมภาพันธ์ 2563

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Effects of plasma treatment and organic elicitors on isothiocyanates and bioactivities
in microgreens of Thai local vegetables



Worachot Saengha

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for Master of Science (Biotechnology)

February 2020

Copyright of Mahasarakham University



คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนายวรโชติ แสงหา แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ประธานกรรมการ

(ผศ. ดร. คณิต วิชิตพันธ์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผศ. ดร. วิจิตรา หลวงอินทร์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผศ. ดร. ศิริรัตน์ ดีศีลธรรม)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รศ. ดร. เบญจพร บุราณรัตน์)

กรรมการ

(ผศ. ดร. ลือชัย บุตคุป)

กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก

(รศ. ดร. ยานี ครอบพานิชย์)

มหาวิทยาลัยขอนแก่นให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

(รศ. ดร. อนุชิตา มุ่งงาม)

คณบดีคณะเทคโนโลยี

(รศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

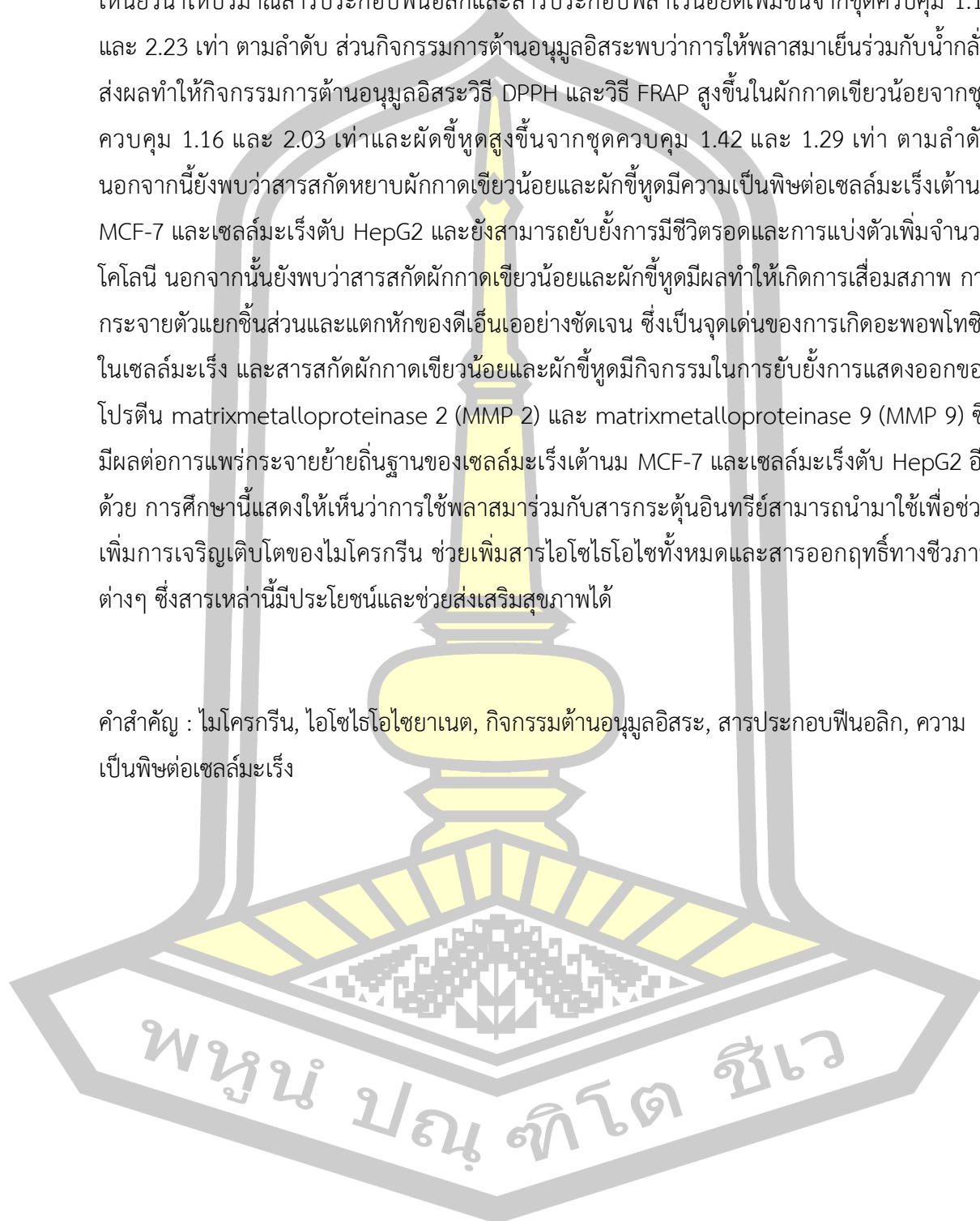
ชื่อเรื่อง	อิทธิพลของเทคโนโลยีพลาสมาเย็นและสารกระตุ้นอินทรีย์ต่อสารไอโซโทไซยาเนท และฤทธิ์ทางชีวภาพในไมโครกรีนของผักท้องถิ่นไทย		
ผู้วิจัย	วรโชติ แสงหา		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิจิตรา หลวงอินทร์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ ดีศีลธรรม รองศาสตราจารย์ ดร. เบญจพร บุราณรัตน์		
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัย	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม	ปีที่พิมพ์	2563

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของเทคโนโลยีพลาสมาเย็นและสารกระตุ้นอินทรีย์ต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด ความสูง น้ำหนักสดและปริมาณสารไอโซโทไซยาเนท รวมทั้งความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของไมโครกรีนที่ได้รับพลาสมา 19 kV เป็นเวลา 5 นาที บนเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียวอ่อน (*Brassica juncea* (L.) Czern. et Coss) และผักชีหูด (*Raphanus sativus* var. *caudatus*) 21 kV เป็นเวลา 5 นาที ที่ปลูกบนเวอร์มิคูไรท์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสง 12 ชั่วโมง และมีด 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน ฉีดพ่นด้วยสารกระตุ้นอินทรีย์ที่แตกต่างกันคือ น้ำตาลซูโครส 176 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ 160 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ และน้ำกลั่น (ชุดควบคุม) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการให้พลาสมาเย็นร่วมกับสารกระตุ้นอินทรีย์และการให้สารกระตุ้นอินทรีย์ไม่มีผลต่อการงอกของเมล็ดพันธุ์และความยาวของผักกาดเขียวอ่อนและผักชีหูด ส่วนน้ำหนักสดพบว่าการให้พลาสมาเย็นส่งผลต่อการเพิ่มความยาวของลำต้นผักกาดเขียวอ่อนโดยเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 1.36 เท่า ส่วนผักชีหูดพบว่าการให้โซเดียมคลอไรด์ส่งผลต่อการเพิ่มความยาวของลำต้นโดยเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 1.07 และ 1.08 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการให้พลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่นส่งผลให้ปริมาณสารไอโซโทไซยาเนททั้งหมดเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 3.31 เท่าของผักกาดเขียวอ่อน ส่วนผักชีหูดพบว่าการให้พลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่นและแคลเซียมคลอไรด์ส่งผลให้ปริมาณสารไอโซโทไซยาเนททั้งหมดเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 1.18 และ 1.25 เท่า ตามลำดับ ซึ่งในผักกาดเขียวอ่อนพบชนิดของสารไอโซโทไซยาเนทชนิดอัลลิลไอโซโทไซยาเนทและ 3 บิวทีนิวไอโซโทไซยาเนท ส่วนผักชีหูดพบราฟาซาตินและ 3 บิวทีนิวไอโซโทไซยาเนท ส่วนปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระพบว่าการให้พลาสมาเย็นร่วมกับซูโครสสามารถเหนี่ยวนำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้นได้ในผักกาดเขียวอ่อนจากชุดควบคุม 1.82 และ 47.3 เท่า

ตามลำดับ ส่วนผักขี้หูดพบว่าการใช้พลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่นและแคลเซียมคลอไรด์สามารถเหนี่ยวนำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 1.18 และ 2.23 เท่า ตามลำดับ ส่วนกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระพบว่าการใช้พลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่นส่งผลทำให้กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH และวิธี FRAP สูงขึ้นในผักกาดเขียวน้อยกว่าชุดควบคุม 1.16 และ 2.03 เท่าและผักขี้หูดสูงขึ้นจากชุดควบคุม 1.42 และ 1.29 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดผักกาดเขียวและผักขี้หูดมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และเซลล์มะเร็งตับ HepG2 และยังสามารถยับยั้งการมีชีวิตรอดและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนโคโลนี นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดผักกาดเขียวและผักขี้หูดมีผลทำให้เกิดการเสื่อมสภาพ การกระจายตัวแยกชิ้นส่วนและแตกหักของดีเอ็นเออย่างชัดเจน ซึ่งเป็นจุดเด่นของการเกิดอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็ง และสารสกัดผักกาดเขียวและผักขี้หูดมีกิจกรรมในการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน matrixmetalloproteinase 2 (MMP 2) และ matrixmetalloproteinase 9 (MMP 9) ซึ่งมีผลต่อการแพร่กระจายย้ายถิ่นฐานของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และเซลล์มะเร็งตับ HepG2 อีกด้วย การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการใช้พลาสมาเย็นร่วมกับสารกระตุ้นอินทรีย์สามารถนำมาใช้เพื่อช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของไมโครกรีน ช่วยเพิ่มสารไอโซโทไซโททั้งหมดและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ซึ่งสารเหล่านี้มีประโยชน์และช่วยส่งเสริมสุขภาพได้

คำสำคัญ : ไมโครกรีน, ไอโซโทไซยานต, กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ, สารประกอบฟีนอลิก, ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง



TITLE	Effects of plasma treatment and organic elicitors on isothiocyanates and bioactivities in microgreens of Thai local vegetables		
AUTHOR	Worachot Saengha		
ADVISORS	Assistant Professor Vijitra Luang-In , Ph.D. Assistant Professor Sirirat Deeseenthum , Ph.D. Associate Professor Benjaporn Buranrat , Ph.D.		
DEGREE	Master of Science	MAJOR	Biotechnology
UNIVERSITY	Maharakham University	YEAR	2020

ABSTRACT

This work aims to study the effects of plasma treatment and organic elicitors on physiological, isothiocyanate content and antioxidant capacity of Thai local vegetable microgreens. The plasma treatment was applied by cooperating with power level of 19 kV for 5 min on mustard green seeds (*Brassica juncea* (L.) Czern. et Coss) and 21 kV for 5 min on Thai rat-tailed radish microgreen seeds (*Raphanus sativus* var. *caudatus*), germinated on the vermiculite at 25°C with 12 h light/12 h dark cycle for 7 days. They were sprayed with 20 mL of 10 mM CaCl₂, 176 mM sucrose, 160 mM NaCl or distilled (DI) water (control) once a day. The results showed that plasma treated with organic elicitors and individual organic elicitors have no effect on % seed germination and length of mustard green microgreens and Thai rat-tailed radish microgreens. Plasma treatment increased the length of mustard green microgreens by 1.36 times whereas the length of Thai rat-tailed radish microgreens treated with sodium chloride and calcium chloride has been increased by 1.07 and 1.08 times compared with mustard green microgreens. Total isothiocyanate contents (Total ITCs) of Thai rat-tailed radish microgreens treated with plasma cooperated with distilled water or calcium chloride were increased by 3.31 times compared with the control whereas ITCs of Thai rat-tailed radish microgreens treated with plasma cooperated with distilled water or calcium chloride were increased by 1.18 and 1.25

times compared with the control, respectively. Total ITCs derivatives consisted of allylisoithiocyanate (AITC) and 3-butynylisoithiocyanate in mustard green microgreens whereas raphasatin and 3-butynylisoithiocyanate derivatives were found in Thai rat-tailed radish microgreens based on GC-MS analyses. The results of the bioactive compounds and antioxidant capacity found that using plasma cooperated with sucrose could induce the total phenolic content (TPC) and total flavonoid content (TFC) of mustard green microgreens by 1.82 and 47.3 times compared with the control whereas plasma cooperated with distilled water and calcium chloride could increase TPC and TFC by 1.82 and 2.23 times compared with the control, respectively. The antioxidant activity using DPPH and FRAP assays was increased in mustard green microgreens treated with plasma cooperated with DI water by 1.16 and 2.03 times and increased in Thai rat-tailed radish microgreens by 1.42 and 1.29 times compared with the control respectively. Moreover, %cytotoxicity of mustard green microgreens and Thai rat-tailed radish microgreens extracts on the breast adenocarcinoma MCF-7 and hepatocellular carcinoma HepG2 was higher than the control and indicated that extracts could inhibit cells availability and colony formation, and induced apoptosis. The mustard green microgreens and Thai rat-tailed radish microgreens extracts also inhibited the gene expression of matrixmetalloproteinase 2 (MMP 2) and matrixmetalloproteinase 9 (MMP 9) which affected cell migration. This study indicated that microgreens treated with plasma cooperated with organics elicitors can be used for enhancing the physiological, total isothiocyanate content and its bioactive compounds to produce functional foods for human health benefits.

Keyword : Microgreens, Isothiocyanates, Antioxidant activities, Phenolic compound, Cytotoxicity

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก สวทช โครงการพัฒนาศักยภาพบุคลากร STEM เพื่อการวิจัย และพัฒนาอุตสาหกรรม พ.ศ. 2561 และทุนการวิจัยภายใต้แผนงานเสริมสร้าง ศักยภาพและพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ ตามทิศทางการยุทธศาสตร์การวิจัยและนวัตกรรม ประจำปี พ.ศ. 2562 ประเภทบัณฑิตศึกษา

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างสูงยิ่งจาก ผู้ช่วย ศาสตราจารย์ ดร.วิจิตรา หลวงอินทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ ดีศีลธรรม รองศาสตราจารย์ ดร.เบญจพร บุราณรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วย ศาสตราจารย์ ดร.คณิต วิชิตพันธ์ุ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.ยานี ตรอง พานิชย์ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ลือชัย บุตุคูป กรรมการสอบ วิทยานิพนธ์ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่อบรมสั่ง สอนให้ความรู้ต่อศิษย์

ขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือในการวิจัย

ขอขอบพระคุณทุกชีวิตที่มีส่วนร่วมและเกี่ยวข้องในงานวิจัยนี้ที่สำคัญขอกราบขอบพระคุณ บิดามารดาที่คอยให้กำลังใจและช่วยเหลือในทุกสิ่งด้วยดีตลอดมา ทั้งคำปรึกษาและกำลังใจ ตลอด ระยะเวลาในการทำวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

คุณค่าและคุณประโยชน์จากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ผู้วิจัยขอมอบเป็นเครื่องบูชาพระคุณบุพการี บุรพจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่าน

วรโชติ แสงหา

พนุน ปณ ทิโต ชีเว

สารบัญ

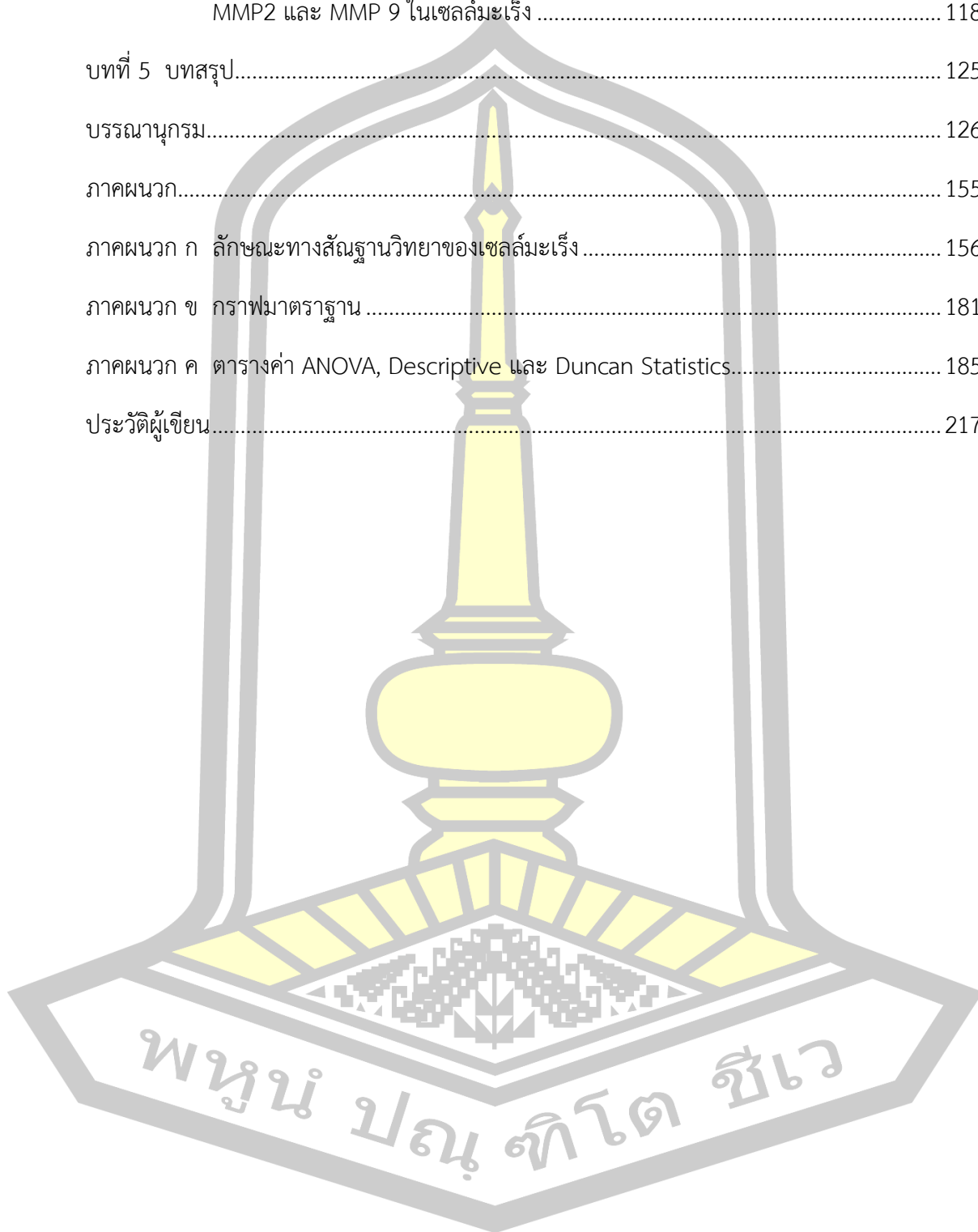
	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ณ
สารบัญตาราง.....	ฐ
สารบัญรูปภาพ.....	ณ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	4
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 ไมโครกรีน (Microgreens).....	5
2.2 ผักกาดเขียวหน้อย (Mustard Green).....	7
2.3 ผักชี้หู (Thai rat-tailed radish).....	8
2.4 กลูโคซิโนเลท (Glucosinolates).....	9
2.5 เอนไซม์ไมโรซิเนส (Myrosinase).....	11
2.6 ไอโซไธโอไซยาเนท (Isothiocyanates).....	12
2.7 เทคโนโลยีพลาสมา (Plasma Technology).....	23
2.8 สารกระตุ้นอินทรีย์ (Organic elicitors).....	29
2.9 สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds).....	35
2.10 สารประกอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoids).....	37

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	40
3.1 อาหาร สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย.....	40
3.2 การเตรียมทรีตเมนต์ลีดพังก์ด้วยพลาสติกและทำให้สารกระตุ้นอินทรีย์	42
3.4 การเพาะปลูกเมล็ดพังก์.....	45
3.5 การวิเคราะห์ผล	46
3.6 การวิเคราะห์สารไอโซโทโอไซยานเท	46
3.7 การวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ	47
3.7.1 การสกัดตัวอย่างไมโครกรีน	47
3.7.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด.....	47
3.7.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด.....	48
3.7.4 การวิเคราะห์หากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH.....	48
3.7.5 การวิเคราะห์หากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP.....	48
3.8. การคัดเลือกสภาวะทรีตเมนต์ลีดพังก์และทำให้สารกระตุ้นอินทรีย์.....	49
3.9 ศึกษาผลของสารสกัดไมโครกรีนผักท้องถิ่นไทยต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง.....	49
3.9.1 การสกัดสารไอโซโทโอไซยานเทจากไมโครกรีนสำหรับทดสอบเซลล์ไลน์	49
3.9.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง	49
3.9.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง.....	50
3.9.4 การทดสอบการมีชีวิตรอดและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง.....	51
3.9.5 ศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็ง	51
3.9.6 การวิเคราะห์การแตกหักเสียหายของดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโทรโฟเรซิสเพื่อการตรวจสอบ การตายแบบอะพอพโทซิส	52
3.9.7 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน Matrixmetalloproteinase 2 (MMP 2) และ Matrixmetalloproteinase 9 (MMP 9) ด้วยวิธี Gelatin zymography.....	53
3.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ	54

บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการทดลอง	55
4.1 ผลของการใช้ของเทคโนโลยีพลาสมาเย็นต่อการเจริญและฤทธิ์ทางชีวภาพของไมโครกรีนเบื้องต้น.....	55
4.2 ผลการศึกษาผักกาดเขียวอ่อน.....	59
4.2.1 ผลของพลาสมาเย็นและสารกระตุ้นอินทรีย์ต่อเปอร์เซ็นต์การงอก ความยาวของและน้ำหนักสดของผักกาดเขียวอ่อน.....	59
4.2.2 ผลของพลาสมาเย็นและสารกระตุ้นอินทรีย์ต่อปริมาณสารไอโซโรโอไซยานาททั้งหมดและชนิดของสารไอโซโรโอไซยานาทในผักกาดเขียวอ่อน	64
4.2.3 ผลของพลาสมาเย็นและสารกระตุ้นอินทรีย์ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH และวิธี FRAP ในผักกาดเขียวอ่อน.....	69
4.2.4 ผลของสารสกัดหยาบผักกาดเขียวอ่อนต่อการยับยั้งการมีชีวิตรอดและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง.....	73
4.2.5 ผลของสารสกัดหยาบผักกาดเขียวอ่อนต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็ง .	83
4.2.6 ผลของสารสกัดหยาบผักกาดเขียวอ่อนต่อการแตกหักของดีเอ็นเอและการแสดงออกของโปรตีน MMP 2 และ MMP 9 ในเซลล์มะเร็ง.....	86
4.3 ผลการศึกษาผักขี้หูด	91
4.3.1 ผลของพลาสมาเย็นและสารกระตุ้นอินทรีย์ต่อเปอร์เซ็นต์การงอก ความยาวของและน้ำหนักสดของผักขี้หูด.....	91
4.3.2 ผลของพลาสมาเย็นและสารกระตุ้นอินทรีย์ต่อปริมาณสารไอโซโรโอไซยานาททั้งหมดและชนิดของสารไอโซโรโอไซยานาทในผักขี้หูด.....	96
4.3.3 ผลของพลาสมาเย็นและสารกระตุ้นอินทรีย์ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH และวิธี FRAP ในผักขี้หูด.....	101
4.3.4 ผลของสารสกัดหยาบผักขี้หูดต่อการยับยั้งการมีชีวิตรอดและการแบ่งตัวในเซลล์มะเร็ง	105
4.3.5 ผลของสารสกัดหยาบผักขี้หูดต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็ง	115

4.3.6 ผลของสารสกัดยาบפקี้หูดต่อการแตกหักของดีเอ็นเอและการแสดงออกของโปรตีน

MMP2 และ MMP 9 ในเซลล์มะเร็ง	118
บทที่ 5 บทสรุป.....	125
บรรณานุกรม.....	126
ภาคผนวก.....	155
ภาคผนวก ก ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็ง	156
ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐาน	181
ภาคผนวก ค ตารางค่า ANOVA, Descriptive และ Duncan Statistics.....	185
ประวัติผู้เขียน.....	217



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ชนิดของกลูโคซิโนเลท และไอโซโรโอไซยาเนท	15
ตารางที่ 2 ผลของความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ต่อปริมาณกลูโคซิโนเลทในบร็อคโคลี่	32
ตารางที่ 3 ผลของการใช้สารกระตุ้นอินทรีย์ในบร็อคโคลี่ต่อปริมาณสารกลูโคซิโนเลท และไอโซโรโอไซยาเนท	34
ตารางที่ 4 สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย.....	40
ตารางที่ 5 แสดงสภาวะการทดลองในการทรีตเม้นต์ผักกาดเขียวอ่อนและผักชีหูด.....	44
ตารางที่ 6 ผลของเทคโนโลยีพลาสมาเย็นต่อเปอร์เซ็นต์การงอก ความยาว น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของผักกาดเขียวอ่อน	56
ตารางที่ 7 ผลของเทคโนโลยีพลาสมาเย็นต่อเปอร์เซ็นต์การงอก ความยาว น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของผักชีหูด.....	56
ตารางที่ 8 ผลของเทคโนโลยีพลาสมาเย็นต่อปริมาณสารไอโซโรโอไซยาเนททั้งหมดในผักกาดเขียวอ่อน	57
ตารางที่ 9 ผลของเทคโนโลยีพลาสมาเย็นต่อปริมาณสารไอโซโรโอไซยาเนททั้งหมดในผักชีหูด	57
ตารางที่ 10 ผลของเทคโนโลยีพลาสมาเย็นต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH วิธี FRAP สารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมด และฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของผักกาดเขียวอ่อน.....	58
ตารางที่ 11 ผลของเทคโนโลยีพลาสมาเย็นต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH วิธี FRAP สารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมด และฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของผักชีหูด	59
ตารางที่ 12 ตารางแสดงผลของพลาสมาเย็นและสารกระตุ้นอินทรีย์ต่อเปอร์เซ็นต์การงอก ความยาว และน้ำหนักสดของผักกาดเขียวอ่อน.....	60
ตารางที่ 13 ตารางแสดงผลของพลาสมาเย็นและสารกระตุ้นอินทรีย์ต่อปริมาณสารไอโซโรโอไซยาเนททั้งหมดในผักกาดเขียวอ่อน.....	65

ตารางที่ 14 ตารางแสดงผลของพลาสมาเย็นและสารกระตุ้นอินทรีย์ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH และวิธี FRAP ในผักกาดเขียวอ่อน	70
ตารางที่ 15 แสดงค่า E_{max} และ IC_{50} ของสารสกัดหยาบผักกาดเขียวอ่อนต่อเซลล์มะเร็ง	77
ตารางที่ 16 ตารางแสดงผลของพลาสมาเย็นและสารกระตุ้นอินทรีย์ต่อเปอร์เซ็นต์การงอก ความยาวและน้ำหนักสดของผักชีหูด	92
ตารางที่ 17 ตารางแสดงผลของพลาสมาเย็นและสารกระตุ้นอินทรีย์ต่อปริมาณสารไอโซโทไอโซยานาททั้งหมดในผักชีหูด	97
ตารางที่ 18 แสดงผลของพลาสมาเย็นและสารกระตุ้นอินทรีย์ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH และวิธี FRAP ในผักชีหูด	102
ตารางที่ 19 แสดงค่า E_{max} and IC_{50} ของสารสกัดหยาบผักชีหูดต่อเซลล์มะเร็ง	109
ตารางที่ 20 แสดงตาราง Descriptive การเจริญเติบโต กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของผักกาดเขียวอ่อน	186
ตารางที่ 21 แสดงตาราง ANOVA การเจริญเติบโต กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของผักกาดเขียวอ่อน	192
ตารางที่ 22 แสดงตาราง Duncan เปอร์เซ็นต์การงอกของผักกาดเขียวอ่อน	194
ตารางที่ 23 แสดงตาราง Duncan ความยาวของผักกาดเขียวอ่อน	195
ตารางที่ 24 แสดงตาราง Duncan น้ำหนักสดของผักกาดเขียวอ่อน	196
ตารางที่ 25 แสดงตาราง Duncan กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH ของผักกาดเขียวอ่อน	197
ตารางที่ 26 แสดงตาราง Duncan กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP ของผักกาดเขียวอ่อน	198
ตารางที่ 27 แสดงตาราง Duncan ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของผักกาดเขียวอ่อน	199
ตารางที่ 28 แสดงตาราง Duncan ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของผักกาดเขียวอ่อน	200
ตารางที่ 29 แสดงตาราง Duncan ปริมาณสารไอโซโทไอโซยานาททั้งหมดของผักกาดเขียวอ่อน ...	201

ตารางที่ 30 แสดงตาราง Descriptive การเจริญเติบโต กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของผักชีหูด.....	202
ตารางที่ 31 แสดงตาราง ANOVA การเจริญเติบโต กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของผักชีหูด	207
ตารางที่ 32 แสดงตาราง Duncan เปอร์เซนต์การงอกของผักชีหูด	209
ตารางที่ 33 แสดงตาราง Duncan ความยาวของผักชีหูด.....	210
ตารางที่ 34 แสดงตาราง Duncan น้ำหนักสดของผักชีหูด	211
ตารางที่ 35 แสดงตาราง Duncan กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH ของผักชีหูด.....	212
ตารางที่ 36 แสดงตาราง Duncan กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP ของผักชีหูด	213
ตารางที่ 37 แสดงตาราง Duncan ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของผักชีหูด	214
ตารางที่ 38 แสดงตาราง Duncan ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของผักชีหูด.....	215
ตารางที่ 39 แสดงตาราง Duncan ปริมาณสารไอโซโทไซยานเนททั้งหมดของผักชีหูด.....	216



สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ไมโครกรีน.....	5
ภาพที่ 2 ลักษณะของไมโครกรีนและต้นงอก.....	6
ภาพที่ 3 ผักกาดเขียวอ่อน.....	8
ภาพที่ 4 ผักชีหูด.....	9
ภาพที่ 5 วิธีการสังเคราะห์สารกลูโคซิโนเลท.....	10
ภาพที่ 6 ระบบกลูโคซิโนเลทและเอนไซม์ไมโรซิเนสที่ทำให้เกิดการย่อยสลายกลูโคซิโนเลทด้วย เอนไซม์ไมโรซิเนสเพื่อผลิตไอโซโรโอไซยาเนท.....	11
ภาพที่ 7 กลไกการย่อยสลายกลูโคซิโนเลทโดยเอนไซม์ไมโรซิเนส.....	12
ภาพที่ 8 โครงสร้างทางเคมีของไอโซโรโอไซยาเนทและไนไตรล์.....	13
ภาพที่ 9 การปรับการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์มะเร็งโดยไอโซโรโอไซยาเนท.....	14
ภาพที่ 10 กลไกระดับโมเลกุลในการกำจัดมะเร็งของไอโซโรโอไซยาเนท.....	15
ภาพที่ 11 การย่อยสลายกลูโคราฟานินให้ได้ซัลโฟราเฟนโดยเอนไซม์ไมโรซิเนสในพืช.....	16
ภาพที่ 12 รูปแบบของพลาสมา.....	24
ภาพที่ 13 เครื่องฉายลำพลาสมาอุณหภูมิต่ำฉายพลาสมาลงบนเมล็ดหัวไชเท้าด้วยเครื่องฉายลำ พลาสมาอุณหภูมิต่ำต้นแบบ.....	25
ภาพที่ 14 ความสามารถในการดูดซับหยดน้ำบนเมล็ดถั่วเหลืองที่ผ่านการฉาย.....	27
ภาพที่ 15 ผิวเปลือกเมล็ดข้าวสาลีผ่านการฉายและไม่ผ่านการฉายพลาสมาจากกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM).....	27
ภาพที่ 16 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของการงอกระหว่างเมล็ดพืชที่ผ่านการฉายด้วยพลาสมาและ ไม่ได้ผ่านการฉายด้วยพลาสมา.....	28
ภาพที่ 17 โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิก.....	36
ภาพที่ 18 โครงสร้างทางเคมีและการจำแนกฟลาโวนอยด์.....	39

ภาพที่ 19 เครื่องสร้างลำพลาสมาอุณหภูมิต่ำที่สภาวะบรรยากาศ	45
ภาพที่ 20 โคโรมาโตรแกรมของสารไอโซไธโอไซยาเนทชนิดราฟาซาติน (4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate ;Raphasatin) จากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS	58
ภาพที่ 21 ผักกาดเขียวอ่อนที่มีการให้พลาสมาเย็นร่วมกับสารกระตุ้นอินทรีย์	61
ภาพที่ 22 โคโรมาโตรแกรมของสารไอโซไธโอไซยาเนทที่พบในผักกาดเขียวอ่อน	66
ภาพที่ 23 แมสสเปกตรัมของสารไอโซไธโอไซยาเนทที่พบในผักกาดเขียวอ่อน	67
ภาพที่ 24 ผลของสารสกัดหยาบผักกาดเขียวอ่อนต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7	75
ภาพที่ 25 ผลของสารสกัดหยาบผักกาดเขียวอ่อนต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ HepG2	76
ภาพที่ 26 ผลของสารสกัดหยาบผักกาดเขียวอ่อนต่อการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนโคโลนีของเซลล์มะเร็ง .	78
ภาพที่ 27 ผลของสารสกัดหยาบผักกาดเขียวอ่อนต่อสัญญาณวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7..	84
ภาพที่ 28 ผลของสารสกัดหยาบผักกาดเขียวอ่อนต่อสัญญาณวิทยาของเซลล์มะเร็งตับ HepG2.....	85
ภาพที่ 29 ผลของสารสกัดหยาบผักกาดเขียวอ่อนต่อการแตกหักของดีเอ็นเอในเซลล์มะเร็ง	87
ภาพที่ 30 ผลของสารสกัดหยาบผักกาดเขียวอ่อนต่อการแสดงออกของโปรตีน MMP2 และ MMP9 ในเซลล์มะเร็ง	87
ภาพที่ 31 ผักชีหูดที่มีการให้พลาสมาเย็นร่วมกับสารกระตุ้นอินทรีย์	93
ภาพที่ 32 โคโรมาโตรแกรมของสารไอโซไธโอไซยาเนทที่พบในผักชีหูด	98
ภาพที่ 33 แมสสเปกตรัมของสารไอโซไธโอไซยาเนทที่พบในผักชีหูด	99
ภาพที่ 34 ผลของสารสกัดหยาบผักชีหูดต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7	107
ภาพที่ 35 ผลของสารสกัดหยาบผักชีหูดต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2	108
ภาพที่ 36 ผลของสารสกัดหยาบผักชีหูดต่อการมีชีวิตรอดและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง	110
ภาพที่ 37 ผลของสารสกัดหยาบผักชีหูดต่อสัญญาณวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7	117
ภาพที่ 38 ผลของสารสกัดหยาบผักชีหูดต่อสัญญาณวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7	118
ภาพที่ 39 ผลของสารสกัดหยาบผักชีหูดต่อการแตกหักของดีเอ็นเอในเซลล์มะเร็ง	120

ภาพที่ 40 ผลของสารสกัดหยาบผักชีหูดต่อการแสดงออกของโปรตีน MMP2 และ MMP9 ในเซลล์มะเร็ง.....	120
ภาพที่ 41 สันฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ของสารสกัดหยาบจากผักกาดเขียวอ่อน (ชุดควบคุม).....	157
ภาพที่ 42 สันฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ของสารสกัดหยาบจากผักกาดเขียวอ่อน (ชุดควบคุม).....	158
ภาพที่ 43 สันฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ของสารสกัดหยาบจากผักกาดเขียวอ่อนที่ได้รับพลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่น.....	159
ภาพที่ 44 สันฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ของสารสกัดหยาบจากผักกาดเขียวอ่อนที่ได้รับพลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่น.....	160
ภาพที่ 45 สันฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ของสารสกัดหยาบจากผักชีหูด (ชุดควบคุม).....	161
ภาพที่ 46 สันฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ของสารสกัดหยาบจากผักชีหูด (ชุดควบคุม).....	162
ภาพที่ 47 สันฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ของสารสกัดหยาบจากผักชีหูดที่มีการให้พลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่น.....	163
ภาพที่ 48 สันฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ของสารสกัดหยาบจากผักชีหูดที่มีการให้พลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่น.....	164
ภาพที่ 49 สันฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ของสารสกัดหยาบจากบร็อคโคลี่ (ชุดควบคุม).....	165
ภาพที่ 50 สันฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ของสารสกัดหยาบจากบร็อคโคลี่ (ชุดควบคุม).....	166
ภาพที่ 51 สันฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ของสารเบนซิลไฮโดรโอไซยานเนท (ตัวอย่างควบคุม).....	167
ภาพที่ 52 สันฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ของสารเบนซิลไฮโดรโอไซยานเนท (ตัวอย่างควบคุม).....	168

ภาพที่ 53 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 ของสารสกัดหยาบจากผักกาดเขียวอ่อน (ชุดควบคุม).....	169
ภาพที่ 54 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 ของสารสกัดหยาบจากผักกาดเขียวอ่อน (ชุดควบคุม).....	170
ภาพที่ 55 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 ของสารสกัดหยาบจากผักกาดเขียวอ่อนที่ได้รับพลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่น.....	171
ภาพที่ 56 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 ของสารสกัดจากผักกาดเขียวอ่อนที่ได้รับพลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่น.....	172
ภาพที่ 57 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 ของสารสกัดหยาบจากผักขี้หูด (ชุดควบคุม).....	173
ภาพที่ 58 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 ของสารสกัดหยาบจากผักขี้หูด (ชุดควบคุม).....	174
ภาพที่ 59 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 ของสารสกัดหยาบจากผักขี้หูดที่มีการให้พลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่น.....	175
ภาพที่ 60 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 ของสารสกัดหยาบจากผักขี้หูดที่มีการให้พลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่น.....	176
ภาพที่ 61 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 ของสารสกัดหยาบจากบร็อคโคลี่ (ชุดควบคุม).....	177
ภาพที่ 62 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 ของสารสกัดหยาบจากบร็อคโคลี่ (ชุดควบคุม).....	178
ภาพที่ 63 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 ของสารเบนซิลไฮโดรโอไฮยาเนท (ตัวอย่างควบคุม).....	179
ภาพที่ 64 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 ของสารเบนซิล ไฮโดรโอไฮยาเนท.....	180
ภาพที่ 65 กราฟของสารมาตรฐานสารเบนซิลไฮโดรโอไฮยาเนท.....	182
ภาพที่ 66 กราฟของสารมาตรฐานโทรล๊อกซ์ (Trolox).....	182
ภาพที่ 67 กราฟของสารมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต (FeSO ₄ •7H ₂ O).....	183
ภาพที่ 68 กราฟของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid).....	183
ภาพที่ 69 กราฟของสารมาตรฐานรูติน (Rutin).....	184

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำวิจัย

ในปัจจุบันการใช้ชีวิตของคนในสังคมเป็นไปอย่างเร่งรีบ การบริโภคอาหารที่ไม่มีประโยชน์ต่อร่างกายรวมถึงการบริโภคผักผลไม้ที่ไม่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกายมาจากสาเหตุหลักคือความไม่สะดวก เวลาที่จำกัดและไม่สามารถเข้าถึงอาหารหรือหาอาหารที่ปลอดภัยมาบริโภคได้อย่างเพียงพอ (กมล เลิศรัตน์ และคณะ 2553) สังคมเมืองในปัจจุบัน ที่พักอาศัยส่วนใหญ่มักเป็นรูปแบบของคอนโดมิเนียม อพาร์ทเมนต์ จากสภาพพื้นที่ที่จำกัดจึงทำให้การเพาะปลูกผัก และการดูแลรักษาทำได้ยาก ทำให้ผู้คนได้รับสารอาหารที่จำเป็นไม่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย นอกจากนี้ข้อจำกัดของพื้นที่ในการเพาะปลูกแล้ว ความต้องการอาหารเพื่อสุขภาพที่มีมากขึ้นของผู้บริโภคยังเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดความไม่สมดุลของแหล่งอาหารนั้นด้วย (กรรณิกา บุญพาธรรม และ ดนุพล เกษไชยสง, 2017)

ในปัจจุบันผู้บริโภคมีความต้องการผลิตภัณฑ์ผักที่ปลอดภัยและมีประโยชน์ต่อสุขภาพในรูปแบบของการห่อด้วยระบบสุญญากาศ หรือผักผสมพร้อมรับประทาน (Ready-to-eat mixed vegetables) คาดการณ์ว่าภายในปี ค.ศ. 2050 ประชากรในทวีปเอเชียประมาณ 63 เปอร์เซ็นต์จะอาศัยอยู่ในสังคมเมือง ดังนั้น แต่ละประเทศจึงควรเตรียมตัวที่จะขยายเกษตรกรรมแบบเมืองได้แก่การเพาะปลูกผักไมโครกรีนและต้นอ่อน การปลูกผักไฮโดรโปนิก การเพาะปลูกผักแอโรโปนิก การปลูกแบบฟาร์มในแนวตั้ง หรือการเพาะปลูกผักในอาคาร เป็นต้น

พืชผัก เป็นแหล่งสารอาหารรอง (Micronutrient) ที่สำคัญสำหรับมนุษย์ และมีบทบาทสำคัญในอาหารแต่ละมื้อ สารอาหารรองเหล่านี้ ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของกระดูกและสมองในเด็ก ผู้เชี่ยวชาญจากองค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติ และองค์การอนามัยโลกได้แนะนำให้คนเรารับประทานผักและผลไม้ 400 กรัมต่อวัน เพื่อป้องกันโรคขาดสารอาหาร โรคหัวใจ โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน และโรคอ้วน จึงถือได้ว่าพืชผัก คือ อาหารเป็นยา (Nutraceutical) หรืออาหารฟังก์ชัน (Functional food) แต่ในประเทศที่กำลังพัฒนาในทวีปเอเชีย กลับมีการบริโภคผักและผลไม้ เพียงแค่ 100 กรัมต่อวัน ถือว่าเป็นปริมาณที่น้อยมากเมื่อเทียบกับการบริโภคผักและผลไม้ของชาวยุโรป 450 กรัมต่อวัน (Production & Security, 2014) ดังนั้น ปัญหาการบริโภคผักในปริมาณน้อยในทวีปเอเชีย จึงควรได้รับการแก้ไขโดยการเผยแพร่องค์ความรู้เกี่ยวกับสารอาหาร สารชีวภาพและประโยชน์ของการบริโภคผักต้นงอก (sprout) และไมโครกรีน (microgreen) พร้อมกระตุ้นให้ประชาชนทั่วไปหันมาปลูกต้นอ่อนและไมโครกรีนไว้รับประทานเองมากขึ้น ไมโครกรีนได้รับ

ความนิยมมากขึ้นในปัจจุบัน เช่น ในร้านอาหารในช่วงหลายปีที่ผ่านมา เป็นพืชใบอ่อนที่มีสีสดใสจัดเสิร์ฟสดใหม่เป็นส่วนผสมในสลัดและแซนด์วิชหรือใช้เป็นเครื่องปรุง (Treadwell, Hochmuth, Landrum, & Laughlin, 2010) ในการศึกษาเมื่อไม่นานมานี้พบว่าไมโครกรีนเป็นแหล่งที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงและสารอาหารที่สำคัญสูง เช่น แอลฟาโทโคฟีรอล (alpha-tocopherol) เบต้าแคโรทีน (beta-carotene) และกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) มากกว่าต้นที่โตเต็มที่ (Xiao *et al.*, 2012)

การเพาะปลูกต้นอ่อนและไมโครกรีนนี้ใช้ต้นทุนต่ำกว่าการเพาะปลูกผักเต็มวัย ใช้น้ำน้อยกว่าการปลูกแบบทั่วไป หรืออาจไม่ต้องใช้ดินในการเพาะปลูก สามารถควบคุมสภาวะการเพาะปลูกได้ง่าย ไม่มีปัญหาเรื่องศัตรูพืช โรคพืช ดูแลรักษาง่ายกว่าต้นแก่ ปลอดภัยจากสารเคมี สามารถเพาะปลูกได้ในอาคารบ้านเรือนหรือพื้นที่ที่จำกัด และให้สารอาหารและสารชีวภาพในปริมาณที่มากกว่าผักเต็มวัย ระยะเวลาเก็บเกี่ยวเร็วคือประมาณ 1-2 สัปดาห์ ดังนั้น เกษตรกรผู้สูงวัยสามารถทำการเพาะปลูกเองได้ง่าย ด้วยเหตุนี้ การเพาะปลูกต้นอ่อนและไมโครกรีนจึงเป็นหนทางที่สำคัญที่จะทำให้เกษตรกรมีรายได้ดีและมีความเป็นอยู่ที่ดีอย่างยั่งยืน เกษตรกรเองก็จะเป็นแรงผลักดันให้เกิดความมั่นคงทางการเกษตรและสารอาหารทั้งในระดับครัวเรือนและระดับชุมชน และช่วยบรรเทาปัญหาความยากจนได้อย่างมาก หรือแม้แต่ประชาชนทั่วไป หรือผู้สูงวัยใน Aging society ก็สามารถเพาะปลูกเองได้ แต่อย่างไรก็ตาม การเพาะปลูกต้นอ่อนและไมโครกรีนยังต้องการการวิจัยและการพัฒนา เพื่อให้ได้วิธีการกระตุ้นการงอกของเมล็ด วิธีการเพาะปลูกที่ส่งผลให้ได้ผลผลิต สารอาหาร และสารชีวภาพสูงสุด และได้กระบวนการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ต้นอ่อนและไมโครกรีน ที่ทำให้เก็บรักษาไว้ได้นาน คงคุณค่าทางโภชนาการและสารชีวภาพไว้ได้มากที่สุด เพื่อให้เกิดการเพิ่มมูลค่าให้กับต้นอ่อนและไมโครกรีน และผลให้เกษตรกรมีรายได้เพิ่มขึ้นจากผลิตภัณฑ์นี้ด้วย

รายงานวิจัยในประเทศสหรัฐอเมริกา ได้ประเมินไว้ว่าโรคมะเร็งที่เกิดกับประชากร 20,000 คนต่อปี สามารถป้องกันได้โดยการบริโภคผักและผลไม้ ในรายงานวิจัยจำนวนมาก พบว่าการรับประทานผักตระกูลกะหล่ำ (Cruciferae family) ส่งผลดีต่อกระบวนการเมตาบอลิซึม และมีฤทธิ์ต้านอาการเจ็บป่วยต่างๆ และโรคเรื้อรัง เนื่องจากผักตระกูลนี้มีสารกลูโคซิโนเลท (Glucosinolates; GSLs) ในปริมาณที่สูงซึ่งเป็นสารตั้งต้นของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ไอโซไธโอไซยาเนท (Isothiocyanates; ITCs) เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ด้วยเอนไซม์ไมโรซิเนส (beta-thioglucoside glucohydrolase; E.C. 3.2.1.147) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในเนื้อเยื่อพืช หรือแบคทีเรียหลายชนิดที่อาศัยอยู่ในลำไส้ (Fahey *et al.*, 2001) หนึ่งในผลิตภัณฑ์ไอโซไธโอไซยาเนทที่ได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวาง คือ ซัลโฟราเฟน (Sulforaphane) ซึ่งเป็นผลผลิตจากเมตาบอไลต์ไอโซไธโอไซยาเนทจากการย่อยสลายของกลูโคราฟานิน (Glucoraphanin) ที่พบมากในผักบร็อกโคลี่ด้วยเอนไซม์ไมโรซิเนส

สารซัลโฟราเฟนนี้ สามารถป้องกันหนูกจากการชักนำให้เป็นมะเร็งด้วยสารเคมีได้ และยับยั้ง การพัฒนาของเซลล์มะเร็งในหนูได้ อีกทั้งยังพบว่าซัลโฟราเฟนสามารถป้องกันการเจริญของ เซลล์มะเร็งในมนุษย์ได้ รวมถึงการหยุดวงจรชีวิตของเซลล์ร้าย ขึ้นอยู่กับสารประกอบที่มีออกซิเจนใน โมเลกุล (Sharma *et al.*, 2010) นอกจากนี้สารไอโซโรไฮยานเทที่พบในพืชสกุล Cruciferae แล้วยังมี สารแอนโทไซยานิน (anthocyanin) ซึ่งเป็นสารสำคัญในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งอยู่ในกลุ่มฟินอลที่ ป้องกันโอกาสเสี่ยงเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจ มะเร็งและอาการผิดปกติเนื่องมาจากความเสื่อมถอยของ การทำงานของโครงสร้างของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะลงเมื่อเวลาผ่านไป ยิ่งไปกว่านั้นไอโซโรไฮยานเท และแอนโทไซยานิน อาจส่งผลให้เกิดการเหนี่ยวนำระบบการส่งและรับรู้สัญญาณกิจกรรมป้องกัน มะเร็ง กล่าวคือชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีนต้าน ITC ออกซิเดชันโดยการจับบนลำดับ นิวคลีโอไทด์จำเพาะที่เหมือนกันทุกยีน (Antioxidant responsive element) (Fimognari *et al.*, 2008)

ถึงแม้ว่างานวิจัยส่วนใหญ่ในต่างประเทศจะมุ่งเน้นไปยังบร็อคโคลี่และสารซัลโฟราเฟนแต่ก็ ยังมีงานวิจัยในประเทศไทยที่แสดงว่าผักท้องถิ่น (เต็มวัย) ในประเทศไทยในตระกูล Cruciferae มีสาร กลูโคซิโนเลทและไอโซโรไฮยานเท เช่น ผักขี้หูด (*Raphanus sativus* Linn.) มีซัลโฟราเฟน และซัลโฟราเฟน 2253.05 ± 246.18 และ 111.94 ± 16.49 ไมโครกรัมต่อกรัม สารสกัดอย่างหยาบ ตามลำดับ (Sangthong & Weerapreeyakul, 2016) กลูโคติไฮโดรอีรูชิน และกลูโคนาฟิน (Songsak & Lockwood, 2002) ซึ่งซัลโฟราเฟนและซัลโฟราเฟน แสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งลำไส้โดย เหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอโทซิสในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 อีกทั้งผักกาดเขียวอ่อน (*Brassica juncea* (L.) Czern. et Coss) ซึ่งอยู่ในผักตระกูล Cruciferae ก็พบว่ามีซินิกรินและ อัลลิลไอโซโรไฮยานเท (Ishida, Hara, Fukino, Kakizaki, & Morimitsu, 2014) แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับชนิดและปริมาณของสาร กลูโคซิโนเลทและไอโซโรไฮยานเทในไมโครกรีน ของผักทั้งสามชนิดที่กล่าวมานี้ รวมถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากไมโครกรีนด้วย

ในรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ ได้แสดงว่าการใช้เทคโนโลยีพลาสมาทำให้ต้นอ่อนแรดิช เจริญเติบโตได้ดีและเร็วขึ้น 9-12 เปอร์เซ็นต์ (Matra, 2016) เพราะพลาสมาทำให้ผิวหน้าของเมล็ดมี หนุม์ฟังก์ชันที่มีออกซิเจนมากขึ้น ทำให้เมล็ดตั้งโมเลกุลของน้ำได้มากขึ้น ซึ่งจะช่วยในการงอกที่ง่ายขึ้น และพลาสมายังเป็นแหล่งผลิต Reactive Oxygen Species (ROS) ช่วงคร่าวระหว่างการทำทริตเมนต์ ต่อเมล็ด ซึ่งไปเหนี่ยวนำวิถีเมตาบอลิซึมของสารทุติยภูมิโดยความเครียด เช่น วิธีการสังเคราะห์ ฟลาโวนอยด์โดยปราศจากการทำลายเนื้อเยื่อพืชที่นำมาศึกษา (Baier *et al.*, 2013) (Bußler *et al.*, 2015)

นอกจากนี้ ยังพบว่าการใช้สารกระตุ้นอินทรีย์ เช่น เกลือ หรือน้ำตาล สามารถทำให้ปริมาณ กลูโคซิโนเลทในพืชเปลี่ยนแปลงได้ เช่น เกลือความเข้มข้นสูงทำให้เกิดความเครียดทางกายภาพต่อ

ต้นอ่อนบร็อคโคลี่ ทำให้เกิดการกระตุ้นการแสดงออกของยีนเอ็นไซม์ไมโรซิเนสเพิ่มขึ้นเอ็นไซม์ไมโรซิเนสจะไปย่อยกลูโคซิโนเลทให้ได้ไอโซโริซาเนทในปริมาณที่มากขึ้นตามไปด้วย (Esfandiari *et al.*, 2017) ส่วนการใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูง พบว่าสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่สังเคราะห์กลูโคซิโนเลทชนิดอะลิฟาติกและสารแอนไอโซยานินในต้นอ่อนบร็อคโคลี่ได้ (Guo *et al.*, 2011a) แต่ยังไม่มียางานการใช้เทคโนโลยีพลาสมาหรือสารกระตุ้นอินทรีย์ในการเพาะปลูกไมโคร กรีนผักท้องถิ่นไทย ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะศึกษาอิทธิพลของเทคโนโลยีพลาสมาและสารกระตุ้นอินทรีย์ต่ออัตราการงอก การเจริญเติบโต สารชีวภาพและฤทธิ์ทางชีวภาพของไมโครกรีนผักท้องถิ่นไทย ซึ่งจะเป็นองค์ความรู้ใหม่ที่จะเกิดขึ้น และสามารถนำเทคโนโลยีพลาสมาหรือสารกระตุ้นอินทรีย์มาใช้ในการเพาะปลูกพืชเพื่อเพิ่มผลผลิตและมูลค่าให้แก่พืชผักสมุนไพรท้องถิ่นได้ด้วย

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษาสภาวะของพลาสมาเย็นและสารกระตุ้นอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ด ความยาว น้ำหนักสดของไมโครกรีนผักท้องถิ่นไทย

1.2.2 เพื่อศึกษาสภาวะของพลาสมาเย็นและสารกระตุ้นอินทรีย์ที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณสารไอโซโริซาเนท สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

1.2.3 เพื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดไมโครกรีนผักท้องถิ่นไทย

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ทราบสภาวะของพลาสมาเย็นและสารกระตุ้นอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ด ความยาว น้ำหนักสดของไมโครกรีนผักท้องถิ่นไทย

1.3.2 ทราบสภาวะของพลาสมาเย็นและสารกระตุ้นอินทรีย์ที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณสารไอโซโริซาเนท สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

1.3.3 ทราบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบไมโครกรีนผักท้องถิ่นไทย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไมโครกรีน (Microgreens)

ผักไมโครกรีนเป็นผลผลิตที่เกิดจากการนำเมล็ดผักหรือสมุนไพรมาเพาะในถาดและเจริญเติบโตหลังจากงอกออกมาจากเมล็ดแล้วใบเลี้ยงคลี่เต็มที่ มีอายุการเก็บเกี่ยวประมาณ 7-14 วัน หลังการเพาะปลูก (กรรณิกา บุญพาธรรม และ ดนุพล เกษโรสง, 2017) นิยมรับประทานส่วนที่อยู่เหนือดินขึ้นมา มีคุณค่าทางอาหารสูงเป็นแหล่งของวิตามิน เกลือแร่ และแร่ธาตุต่างๆเมื่อเปรียบเทียบกับผักชนิดเดียวกันที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่ ผักไมโครกรีนจึงถูกนำมาประกอบเป็นอาหารเพื่อสุขภาพที่กำลังได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในกลุ่มของคนรักสุขภาพ เนื่องจากมีคุณค่าทางอาหารสูงมีสารพฤกษเคมี ซึ่งเป็นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีฤทธิ์ต้านอาการอักเสบ สามารถลดภาวะของโรคต่างๆ ได้แก่ โรคหัวใจขาดเลือด โรคเส้นเลือดในสมองตีบ ลดอัตราการป่วยและอัตราการเสียชีวิตจากโรคมะเร็ง นอกจากนี้ผักไมโครกรีนนี้ยังมีสีสวยงาม เนื้อสัมผัสกรอบอร่อย และมีรสชาติที่เข้มข้นกว่าผักที่เจริญเติบโตทั่วไปจึงนิยมนำมารับประทานสดมากกว่าการนำไปประกอบอาหารหรือทำให้สุก (Xiao *et al.*, 2012) (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ไมโครกรีน

ที่มา : Fowler (1988)

พืชไมโครกรีนมีคุณค่าทางอาหารสูงและรสชาติดี แต่มีราคาค่อนข้างสูง แต่อย่างไรก็ตามเราสามารถปลูกพืชไมโครกรีนเพื่อรับประทานเอง และมีค่าใช้จ่ายน้อยกว่าการซื้อมาจากห้างสรรพสินค้ามากเพียงแค่มีพื้นที่เล็ก ๆ ที่แสงแดดสามารถส่องถึง ใช้ภาชนะขนาดเล็กที่สามารถใส่ดินและน้ำสำหรับการเพาะปลูก ที่สำคัญคือต้องมีเมล็ดพืชที่ต้องการปลูกซึ่งคนเมืองที่มีพื้นที่ที่จำกัดก็สามารถปลูกได้ เช่น หน้าต่าง ระเบียง หรือทางหนีไฟก็ได้

ต้นอ่อน (Sprouts) (ภาพที่ 2B) และไมโครกรีน (ภาพที่ 2A) ล้วนเป็นผลผลิตที่ได้จากการนำเมล็ดมากระตุ้นให้งอกซึ่งไมโครกรีน เป็นต้นกล้าที่เจริญเติบโตต่อหลังจากต้นอ่อน ซึ่งใช้เวลาประมาณ 1-2 สัปดาห์ปลูกในที่ที่มีแสงสว่าง ส่วนของใบเลี้ยงจึงไม่มีสารอาหารหลงเหลืออยู่และหลุดร่วง ในขณะที่มีการเติบโตของใบแท้จำนวน 2-3 ใบ มักบริโภคส่วนลำต้นเหนือดินขึ้นมา ส่วนต้นอ่อน เป็นต้นกล้าที่งอกแล้วยังมีส่วนของใบเลี้ยงที่ทำหน้าที่เก็บสะสมสารอาหารอยู่ มักปลูกในที่มืดจึงมักบริโภคทั้งต้น

เพื่อเป็นอีกหนึ่งทางเลือกสำหรับผู้บริโภคที่รักสุขภาพและเหมาะสมกับคนเมืองที่มีพื้นที่น้อยและไม่ค่อยมีเวลา ไม่ว่าจะ เป็นต้นอ่อน หรือ ไมโครกรีนก็ล้วนแล้วแต่มีคุณค่าทางสารอาหารที่อุดมไปด้วยวิตามิน C , E , K , เบตาแคโรทีนและสาซิลโฟราเฟน เป็นต้น ในการเลือกซื้อผลผลิตที่ยังสด ก่อนรับประทานควรล้างน้ำให้สะอาด สามารถใช้ประกอบอาหารได้หลากหลาย อีกทั้งสามารถนำมาคั้นเป็นน้ำรับประทานอาทิ เช่น ต้นอ่อนข้าวสาลีที่อุดมไปด้วยสารอาหารที่มีประโยชน์ทั้งสิ้น



ภาพที่ 2 ลักษณะของไมโครกรีนและต้นงอก

ที่มา : Fowler (1988)

ความนิยมในต่างประเทศ ธุรกิจการทำฟาร์มผักไมโครกรีนในร่มในสหรัฐอเมริกากำลังเป็นที่นิยมและเติบโตอย่างมากตามใจกลางเมืองต่างๆ โดยข้อดี คือ มีผลผลิตออกจำหน่ายตลอดทั้งปีและความสดใหม่ ที่ส่งถึงมือผู้บริโภคอย่างรวดเร็ว Edenworks ตั้งอยู่ในเมือง Brooklyn ในมหานครนิวยอร์กเป็นหนึ่งในพื้นที่ทางการเกษตรแบบในร่ม เจ้าแรกๆ ที่ตั้งอยู่ใจกลางเมือง โดยเป็นการเกษตร

ที่ใช้การควบคุมสภาพแวดล้อมแบบปิด ผึ่งเมล็ดพันธุ์ลงในสภาพพิเศษ และแสงอาทิตย์ถูกทดแทนด้วยแสงไฟจากหลอด LED รวมถึงน้ำ และไอน้ำ ที่หมุนเวียนด้วยระบบอัจฉริยะโดยใช้ระบบแอร์โรพอนิกส์ และไฮโดรโปนิกส์ ข้อดีของระบบนี้ คือ ทำให้ผักโตเร็ว และสะอาดปลอดภัย มีน้ำหนักและขนาดที่ได้มาตรฐาน รวมถึงพื้นที่การผลิตที่อยู่ใจกลางเมือง ทำให้ผักที่ถูกส่งไปตามร้านอาหารและตลาดในเมืองมีความสดใหม่มากกว่าการรับผักมาจากเมืองเกษตรกรรมห่างไกลแถบชานเมือง โดยเจ้าของสวนผักเล่าว่า การปลูกผักในรูปแบบนี้จะทำให้ผู้บริโภคได้ผักสลัดที่เต็มไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระและสารอาหารจุลินทรีย์ที่มีสูงกว่าผักที่ปลูกแบบเดิมถึง 40 เท่า และมั่นใจได้ถึงความปลอดภัยในสารฆ่าแมลง เนื่องจากพาร์มดังกล่าว ไม่มีความจำเป็นต้องใช้สารเคมีเพื่อกำจัดศัตรูพืช อีกทั้งการปลูกผักในลักษณะนี้ยังช่วยประหยัดทรัพยากรโลกอีกด้วย เพราะใช้น้ำน้อยลงถึง 90 เปอร์เซ็นต์จากระบบการปลูกผักแบบเกษตรกรทั่วไป โดยสามารถสร้างผลผลิตได้ตลอดปีในระยะเวลาการเติบโตทุก 12-16 วันอีกด้วย ประเทศไทยนิยมเพาะต้นอ่อนหรือไมโครกรีนได้ เช่น บร็อคโคลี่ กะหล่ำปลี ผักบุ้งจีน โหระพา กะเพรา แรดชิ กวางตุ้ง คะน้า เขียวน้อย ขี้หูด โสน กระถิน แค ผักปลังขาว ผักปลังแดง ผักโขม แมงลัก ทานตะวัน เป็นต้น

2.2 ผักกาดเขียวอ่อน (Mustard Green)

ผักกาดเขียวพันธุ์ผักกาดฮีน (*Brassica juncea* (Linn.) Czern and Coss) เป็นผักพื้นบ้านที่ปลูกมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เนื่องจากปลูกได้ตลอดทั้งปีและขึ้นได้ในดินเกือบทุกชนิด ผักกาดฮีนมีลักษณะเฉพาะตัวที่โดดเด่น คือ รสชาติเผ็ดและกลิ่นฉุนขึ้นจมูกคล้ายคลึงกับวาซาบิทำให้นิยมนำมาบริโภคกับอาหารอีสานที่มีรสจัด เช่น ลาบ ก้อย และปน เปนตน อายุในการเก็บเกี่ยวผักกาดฮีนเพื่อการบริโภคนั้นยังไม่มีกำหนดอย่างแน่ชัด อย่างไรก็ตามเกษตรกรมักเก็บเกี่ยวผักกาดฮีนเพื่อจำหน่ายเมื่อผักเติบโตเต็มที่โดยมีอายุอยู่ในช่วงประมาณ 20-30 วันหลังการหว่านเมล็ด (ภาพที่ 3) ในขณะที่ผู้บริโภคส่วนใหญ่นิยมบริโภคผักกาดฮีนที่มีอายุประมาณ 15 วันหลังการหว่านเมล็ดเนื่องจากให้ลักษณะเนื้อสัมผัสที่ดีกว่า (อังคณา น้อยสุวรรณ และคณะ, 2013) พบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบผักกาดเขียวอ่อนมีซินิกรินและอัลลิลไอโซไซยาเนท (Ishida *et al.*, 2014) รวมถึงฤทธิ์ทางชีวภาพด้วย



ภาพที่ 3 ผักกาดเขี้ยวน้อย

ที่มา : อังคณา น้อยสุวรรณ และคณะ (2013)

2.3 ผักชีหูด (Thai rat-tailed radish)

ผักชีหูด (*Raphanus sativus* var. *caudatus*) เป็นพืชผักพื้นเมืองทางภาคเหนือของประเทศไทย จัดอยู่ในสกุล และชนิดเดียวกับผักกาดหัวหรือหัวไชเท้า (*Raphanus sativus* var. *longipinnatus*) (ภาพที่ 4) การนำเมล็ดมาเพาะเป็นต้นกล้าสามารถเพิ่มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและวิตามินเอ วิตามินซี และโพแทสเซียมสูง ซึ่งการเพาะต้นกล้าเป็นวิธีที่ปรับปรุงคุณค่าทางอาหารของพืชโดยเพิ่มคุณค่าสารอาหารในพืชได้ (ทวีป เสนาคำวงศ์ และคณะ, 2016)

ผักชีหูดมีซัลโฟราฟีนและซัลโฟราเฟน (Sangthong & Weerapreeyakul, 2016) กลูโคติไฮโดรอีรูซินและกลูโคนาฟีน (Songsak & Lockwood, 2002) ซึ่งซัลโฟราฟีนและซัลโฟราเฟนแสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งลำไส้ทำให้เกิดการตายแบบอะพอโทซิสของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116

พจนานุกรมพืชโต ชีเว



ภาพที่ 4 ผักชีหูด

ที่มา : ลลิตา วีรเสถียร (2552)

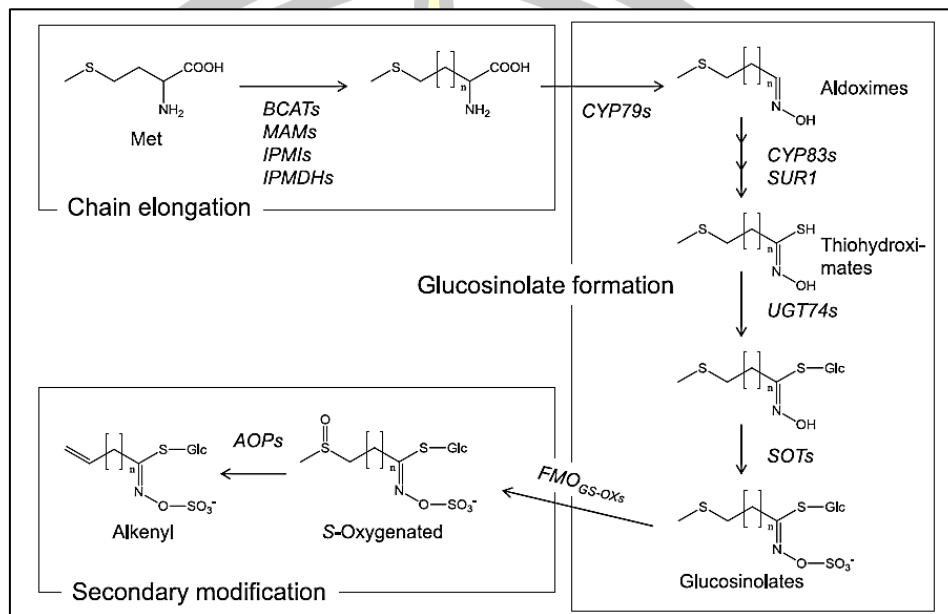
2.4 กลูโคซิโนเลท (Glucosinolates)

กลูโคซิโนเลทเป็นสารทุติยภูมิเป็นอนุพันธ์ที่เกิดจากน้ำตาลและกรดอะมิโนมาจับกัน (ภาพที่ 5) พบมากใน *Arabidopsis thaliana* และผักตระกูลกะหล่ำ (*Cruciferae* sp.) (Chen & Andreasson, 2001) (Fahey *et al.*, 2001) ภายใต้สภาวะเมตาบอลิกที่เหมาะสมโดยปกติ กลูโคซิโนเลทเป็นสารประกอบที่ค่อนข้างเสถียรอยู่ในเซลล์พืชที่เรียกว่า แวกคิวโอล แต่เมื่อเนื้อเยื่อและเซลล์ถูกทำลายกลูโคซิโนเลทจะออกจากแวกคิวโอล ปกติจะอยู่แยกกันกับเอนไซม์ไมโรซิเนส

เอนไซม์ไมโรซิเนสเป็นโปรตีนจำเพาะเจาะจงกับกลูโคซิโนเลทที่พบอยู่ในเซลล์พืช (Van Eylen *et al.*, 2006) ที่เรียกว่าไมโรซินเซลล์ เอนไซม์ไมโรซิเนสพบกระจายอยู่ทั่วไปตามส่วนต่างๆ ของพืช ได้แก่ ใบ ราก ดอก ผล และเมล็ด (Kissen *et al.*, 2009) กลูโคซิโนเลทมีหน้าที่เป็นสารที่เป็นส่วนหนึ่งในกลไกการป้องกันตนเองของพืช ไอโซโรโอไซยานเทที่เกิดขึ้นจะเป็นพิษและส่งผลต่อหนอนศัตรูพืชที่มากัดกินเนื้อเยื่อพืชให้ตายทำให้พืชจะปลอดภัยจากศัตรูพืช เช่น แมลง แบคทีเรีย หนอน หอยทาก รา และยังเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ฮอร์โมนออกซินที่ชื่อว่า กรดอินโดล-3-แอซิดิก (Indole-3-acetic acid, IAA) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่สำคัญสำหรับการเจริญเติบโตของพืช

วิธีการสังเคราะห์กลูโคซิโนเลทใน *Arabidopsis* กลูโคซิโนเลทถูกสังเคราะห์จากกรดอะมิโนทั้ง 3 ชนิด ซึ่งอะลิฟาติกกลูโคซิโนเลทได้มาจาก อะลานิน ลิวซีน ไอโซลิวซีน วาลีนและเมทไธโอนีน ส่วนอินโดลกลูโคซิโนเลทและอะโรมาติกกลูโคซิโนเลท ได้มาจาก ทริปโทแฟนและฟีนอลอะลานินหรือไทโรซีน อะลิฟาติกกลูโคซิโนเลทมีโซ่ด้านต่างๆที่มีความยาวแตกต่างกันตามขั้นตอน

การยืดตัวของโซ่ขั้นตอนแรกของการยืดคือของกรดอะมิโนเช่นเมทไธโอนีนกับ 2-oxo acids ที่สอดคล้องกัน โดย Branched-chain amino acid aminotransferase (BCAT) (Ishida *et al.*, 2014) (ภาพที่ 5)

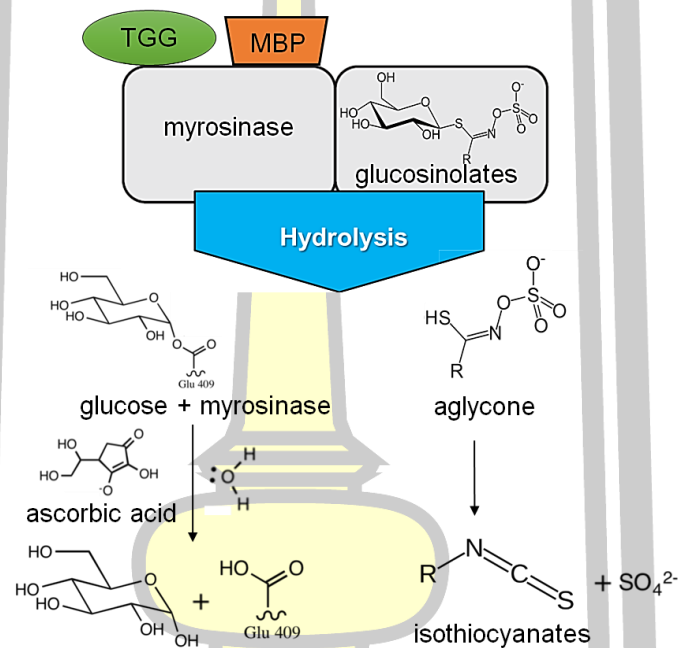


ภาพที่ 5 วิธีการสังเคราะห์สารกลูโคซิโนเลท

ที่มา : Ishida *et al.* (2014)

กลูโคซิโนเลทและเอนไซม์ไมโรซิเนสเป็นระบบเอกลักษณ์ของซัสเตรทและเอนไซม์ (ภาพที่ 6) โดยเอนไซม์ไมโรซิเนสจะตอบสนองต่อกลูโคซิโนเลทที่หลั่งออกมา กลูโคซิโนเลทจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ก่อนเพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ แต่เมื่อเนื้อเยื่อพืชถูกทำลาย โดยการย่อยของพืชหรือโดยแมลงศัตรูพืช เอนไซม์ไมโรซิเนสและกลูโคซิโนเลทจะกระจายออกสู่เซลล์ทำให้เอนไซม์ไมโรซิเนสเข้าทำปฏิกิริยากับกลูโคซิโนเลทได้ และให้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคไซด์และอะไกลโคนที่ไม่เสถียร จากนั้นอะไกลโคนจะจัดเรียงตัวกันใหม่ได้เป็นผลิตภัณฑ์หลายชนิด ได้แก่ ไฮโดรเจนซัลเฟตและไอโซไฮโอไซยานเท ไนไตรล์ ไฮโอไซยานเท และอีพิไฮโอไซยานเท (Van Eylen *et al.*, 2006) หนึ่งในผลิตภัณฑ์ที่ได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวาง ได้แก่ ซัลโฟราเฟน ซึ่งผลิตจากผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายของกลูโคราฟานินโดยเอนไซม์ ไมโรซิเนส สารซัลโฟราเฟนนี้สามารถป้องกันหนูกจากการชักนำให้เป็นมะเร็งด้วยสารเคมีได้ และยับยั้งการพัฒนาของเซลล์มะเร็งในหนูได้ อีกทั้งยังพบว่าซัลโฟราเฟนสามารถป้องกันการเจริญของเซลล์มะเร็งในมนุษย์ได้รวมถึงการหยุดวงจรชีวิตของเซลล์ และทำให้เซลล์มะเร็งตายซึ่งขึ้นอยู่กับสารประกอบที่มีออกซิเจนในโมเลกุล (Sharma *et al.*, 2010)

กรดแอสคอร์บิกเป็นปัจจัยร่วมที่รู้จักกันของเอนไซม์ไมโรซิเนสซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการย่อยสลายกลูโคซิโนเลท (Lee *et al.*, 2017) ตัวอย่าง เช่น เอนไซม์ไมโรซิเนสที่แยกได้จากรากผักกาดมีการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมจาก 2.06 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมของโปรตีน ในกรณีที่ไม่มีกรดแอสคอร์บิก และมี 280 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมของโปรตีน ในกรณีที่มีกรดแอสคอร์บิก 500 ไมโครกรัมบนสารตั้งต้นอัลลิลกลูโคซิโนเลท (Shikita *et al.*, 1999)

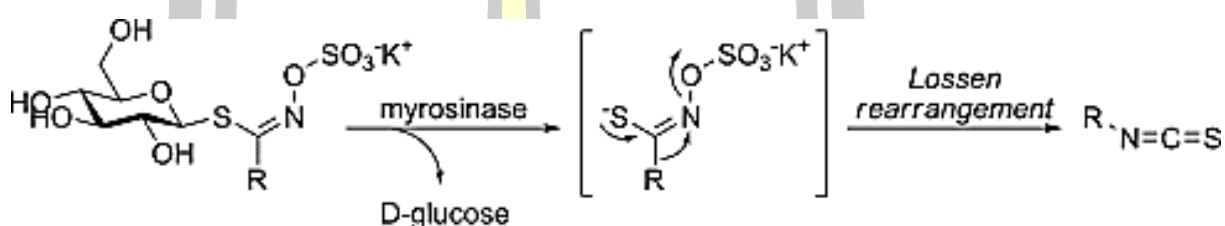


ภาพที่ 6 ระบบกลูโคซิโนเลทและเอนไซม์ไมโรซิเนสที่ทำให้เกิดการย่อยสลายกลูโคซิโนเลทด้วยเอนไซม์ไมโรซิเนสเพื่อผลิตไอโซโรไอโซยานเท
ที่มา : Lee *et al.* (2017)

2.5 เอนไซม์ไมโรซิเนส (Myrosinase)

เอนไซม์ไมโรซิเนส (beta-thio glucosidase glucohydrolase (E.C. 3.2.3.1) เป็นไกลโคโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายกลูโคซิโนเลท (ภาพที่ 7) ซึ่งเป็นกลุ่มของสารประกอบที่มีกำมะถันอยู่ในพืชตระกูล Cruciferae ผลิตภัณฑ์ไฮโดรไลซิสของกลูโคซิโนเลท ได้แก่ ไอโซโรไอโซยานเท ไนไตรล์ อีพิธิโอไนไตรล์ และโรไอโซยานเท (Halkier & Gershenzon, 2006) ไอโซโรไอโซยานเทโดยเฉพาะอย่างยิ่งอัลโฟราเฟนถือเป็นการประกอบที่ช่วยส่งเสริมสุขภาพที่มีประสิทธิภาพ (Dinkova-Kostova & Kostov, 2012) กลูโคซิโนเลทอื่นๆ ที่ได้ไอโซโรไอโซยานเทเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดย อัลคินิล กลูโคซิโนเลท (alkenyl glucosinolate) อินโดลกลูโคซิ

โนเลท (indole glucosinolate) และ อะโรมาติกกลูโคซิโนเลต (aromatic glucosinolate) (Hansch *et al.*, 2012) เอนไซม์ไมโรซิเนสเป็นกลุ่ม เบต้าไธโอ กลูโคซิเดส (beta-thio glucosidase) ในธรรมชาติใช้กลูโคซิโนเลทเป็นสารตั้งต้น เอนไซม์ไมโรซิเนสส่วนใหญ่รวมทั้งเอนไซม์ไมโรซิเนส MYR1 พบใน *Brassica napus* (Chen & Halkier, 1999) อย่างไรก็ตามพบว่าเอนไซม์ไมโรซิเนสบางชนิดมาจาก *Brassica napus* และ *Crambe abyssinica* ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงมากกับกลูโคซิโนเลท (Bernardi *et al.*, 2003)



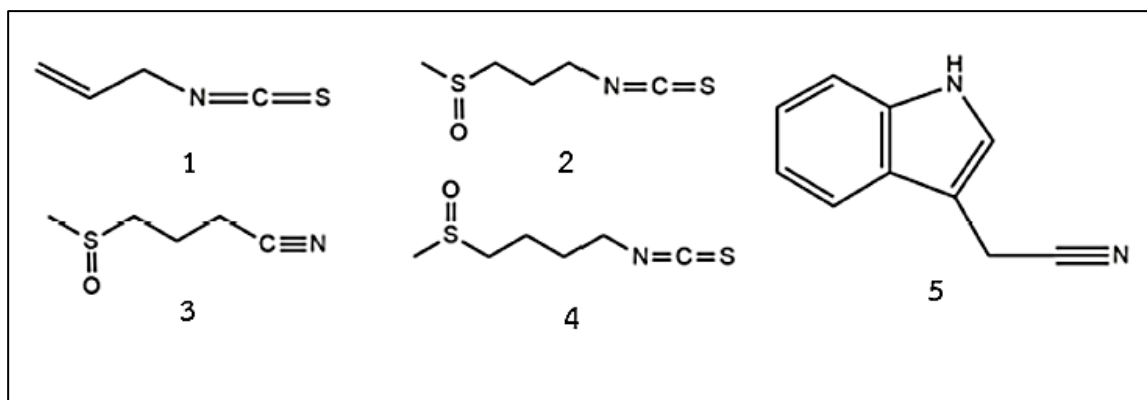
ภาพที่ 7 กลไกการย่อยสลายกลูโคซิโนเลทโดยเอนไซม์ไมโรซิเนส

ที่มา : Vastenhout *et al.* (2014)

2.6 ไอโซไธโอไซยาเนท (Isothiocyanates)

ไอโซไธโอไซยาเนท (ITCs; $R-N=C=S$) เป็นผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาของกลูโคซิโนเลทกับเอนไซม์ไมโรซิเนสที่ปล่อยออกมาจากการถูกทำลายของเนื้อเยื่อพืช ระบบนี้มีอยู่ในพืชตระกูล *Cruciferae* ไอโซไธโอไซยาเนทเป็นสารระเหยที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคได้หลายชนิดในระดับความเข้มข้นต่ำ นอกจากนี้คุณสมบัติของไอโซไธโอไซยาเนทเป็นสารต้านแบคทีเรีย ราและมะเร็งได้ดี ซึ่งได้รับความสนใจเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร (Singh & Singh, 2012) ไอโซไธโอไซยาเนทมีบทบาทในการป้องกันพืชต่อการติดเชื้อของแมลงและเชื้อจุลินทรีย์ (Bending & Lincoln, 2000) (Fahey *et al.*, 2001) กลูโคซิโนเลทจะถูกแปลงเป็น ไอโซไธโอไซยาเนทต่างๆ เช่น ไอโซไธโอไซยาเนท ไนไตรล์ อีพิธิโอไนไตรล์ ไธโอไซยาเนทและ ออกซาโซลิดีนไธโอน

ภาพที่ 8 แสดงโครงสร้างทางเคมีของไอโซไธโอไซยาเนทและไนไตรล์ (1) อัลลิลไอโซไธโอไซยาเนท ; (2) ไอเบอร์ลินไนไตรล์; (3) ไอเบอร์ลิน; (4) ซัลโฟราเฟน และ (5) กรดอินโดล-3-แอซิติคไนไตรล์ (Fahey *et al.*, 2001; Dinkova-Kostova & Kostov, 2012)

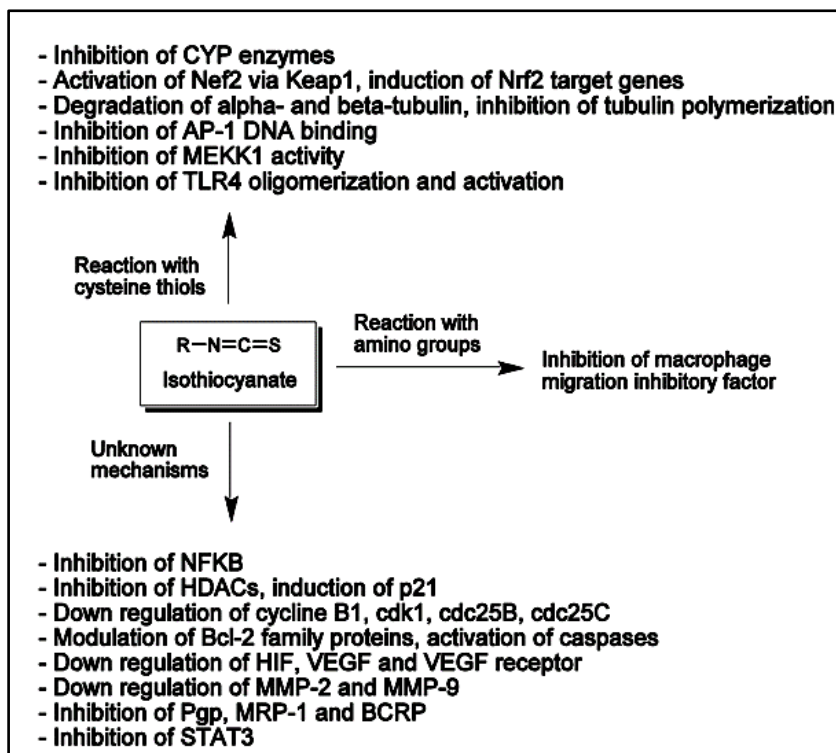


ภาพที่ 8 โครงสร้างทางเคมีของไอโซไธโอไซยาเนทและไนไตรล์

ที่มา : Luang-In *et al.* (2018)

ไอโซไธโอไซยาเนทเป็นที่รู้จักในสารควบคุมการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเซลล์มะเร็งเป็นจำนวนมาก เช่นยับยั้งเอนไซม์ cytochrome P450 (CYP) (Weyarn *et al.*, 2007) เหนี่ยวนำเอนไซม์เฟส II ผ่านการแสดงออกของ NF-E2-related factor-2 (Nrf2) (Thimmulappa *et al.*, 2002; Zhang and Hannink 2003) ยับยั้ง histone deacetylases (HDACs) (Myzak *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008) ปรับวงจรชีวิตของเซลล์มะเร็งและควบคุมการแสดงออกของ Bcl-2 โปรตีน (Xiao *et al.*, 2006; Zhang and Tang 2007; Geng *et al.*, 2011) และกระตุ้นการทำงานของ caspases (Wu *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2007) ลดควบคุมการแสดงออก alpha and beta tubulins และยับยั้ง tubulin polymerization (Mi *et al.*, 2009; Mi, Gan, and Chung 2010) ลดควบคุมการแสดงออกของ endothelial growth factor (VEGF) (Boreddy *et al.*, 2011) และยับยั้งตัวรับและปัจจัยของ nuclear factor kappa B (NF- κ B) (Xu *et al.*, 2005) กระตุ้น Protein-1 (AP-1) (Li *et al.*, 2005; Gopalakrishnan & Tony Kong 2008) กระตุ้น mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MEKK1) (Cross *et al.*, 2007) กระตุ้นตัวส่งสัญญาณ transcription factor 3 (STAT3) และ Toll-like receptor 4 (TLR4) (Youn *et al.*, 2010) (ภาพที่ 9)

พูน ปณ ทิโต ชีเว

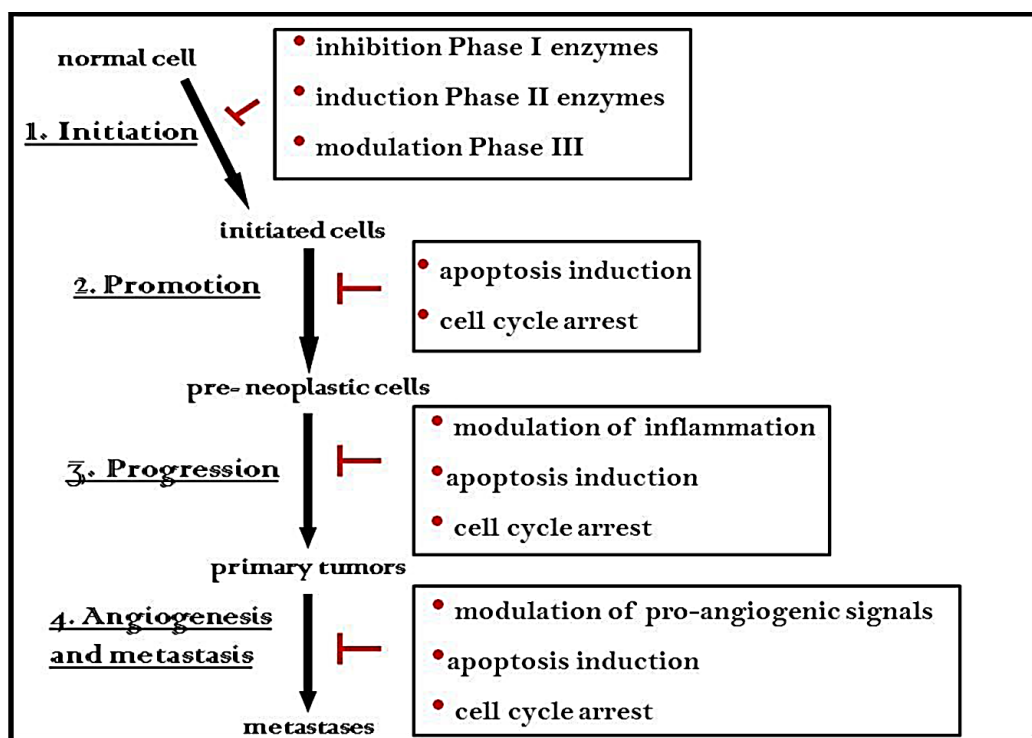


ภาพที่ 9 การปรับการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์มะเร็งโดยไอโซไธโอไซยาเนท

ที่มา : Zhang (2011)

ไอโซไธโอไซยาเนทเป็นสารที่ชอบอเล็กตรอนหรืออเล็กโตรไฟล์ เนื่องจากมีหมู่ $-N=C=S$ จึงทำปฏิกิริยากับสารนิวคลีโอไฟล์เพราะมีหมู่ไอโซไธโอไซยาเนทหลายชนิด จึงทำให้ไอโซไธโอไซยาเนท สามารถทำปฏิกิริยากับสารหลายชนิด transcription factors ในหลายๆวิธีเมตาบอลิซึม (Zhang, 2011) ไอโซไธโอไซยาเนทกระตุ้นให้ Nrf2 (transcription factor) ไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนตรงตำแหน่ง Antioxidant Response Element ซึ่ง จะเพิ่ม การผลิต Phase II enzymes (detox enzymes) และ Antioxidant enzymes (เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ) และเอนไซม์ Phase II enzymes (เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ) (Melchini & Traka, 2010) รายงานว่ากลไกการต้านมะเร็งของไอโซไธโอไซยาเนทซึ่งไอโซไธโอไซยาเนทเข้าไปมีบทบาทตั้งแต่การยับยั้งการเริ่มเป็นเซลล์มะเร็ง การเจริญ การแพร่กระจาย โดยวิธีดังนี้

1. ยับยั้ง phase I enzyme เช่น CYP ไม่ให้สร้างสาร reactive species
2. เหนี่ยวนาให้ phase II enzyme สร้างเอนไซม์ glutathione-S-transferase enzyme ที่ใช้ดีทอกสารพิษที่เกิดขึ้นในร่างกาย มักเป็นเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ
3. เหนี่ยวนาทำให้เกิดการตายอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็ง
4. ยับยั้งการแบ่งจำนวนของเซลล์ จึงหยุดการเจริญของเซลล์มะเร็ง (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 กลไกระดับโมเลกุลในการกำจัดมะเร็งของของไอโซไธโอไซยาเนต

ที่มา : Melchini and Traka (2010)

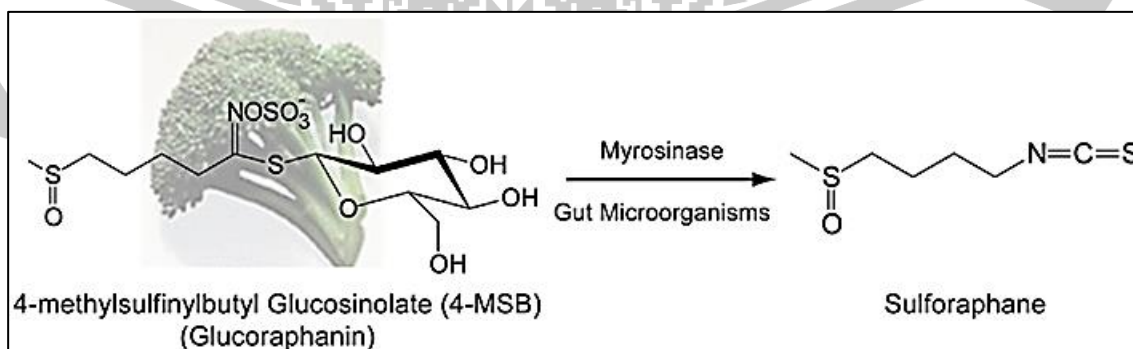
ตารางที่ 1 ชนิดของกลูโคซิโนเลต และไอโซไธโอไซยาเนต

Side chain	Side chain name	Trivial name	Isothiocyanate
	Glucosinolate		
CH ₃ -	Methyl	Glucocapparin	Methyl ITC
CH ₃ -CH ₂ -	Ethyl	Glucolepidiin	Ethyl ITC
CH ₃ -CH ₂ -CH(CH ₃)-	1-Methylpropyl	Glucocochlearin	Methylpropyl ITC
CH ₂ CH=CH-	Prop-2-enyl	Sinigrin	Allyl ITC
CH ₃ -S-(CH ₂) ₄ -	4-Methylthiobutyl	Glucoerucin	Erucin
CH ₃ -SO-(CH ₂) ₄ -	3-Methylsulfinylpropyl	Glucioiberin	Iberin
CH ₃ -SO-(CH ₂) ₅ -	3-Methylsulfinylbutyl	Glucoraphanin	Sulforaphane
C ₆ H ₅ -CH ₂ -	Benzyl	Glucopaeolin	Benzyl ITC
C ₆ H ₅ -(CH ₂) ₂ -	2-Phenylethyl	Gluconasturtiin	Phenylethyl ITC

ที่มา : Dufour *et al.* (2017)

ประโยชน์ของพืชตระกูลกะหล่ำที่ถูกรายงานนั้นเป็นผลมาจากซัลโฟราเฟนที่ได้จากการย่อยสลายของกลูโคราฟานิน ซึ่งเป็นสารที่พบในไมโครกรีนบรอกโคลี ซัลโฟราเฟนเป็น สารกระตุ้นวิถี Keap1, Nrf2, ARE ที่มีศักยภาพและพบในธรรมชาติและซัลโฟราเฟน แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติที่หลากหลายในกระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์และสัตว์ทดลองไม่ว่าจะเป็นกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระต้านอาการอักเสบ ด้านการสร้างหลอดเลือดปกป้องการตายของเซลล์ประสาท (Calabrese *et al.*, 2012) ยิ่งไปกว่านั้นการศึกษาในกลุ่มคนที่รับประทานไมโครกรีน บร็อคโคลี่สด แสดงให้เห็นว่าการต้านเชื้อ *Helicobacter pylori* ซึ่งเชื่อกันว่ามีความเกี่ยวข้องกับมะเร็งในกระเพาะอาหาร (Yanaka *et al.*, 2009)

กลไกการทำงานของซัลโฟราเฟนต่อการต้านมะเร็งได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวางและมีการตอบสนองหลายแบบขึ้นอยู่กับระยะของมะเร็ง (Juge *et al.*, 2007) ซัลโฟราเฟนสามารถเหนี่ยวนำการตายของเซลล์มะเร็ง แต่ไม่ทำอันตรายเซลล์ปกติ ด้วยเหตุผลนี้ทำให้ซัลโฟราเฟนมีศักยภาพในการนำไปใช้เป็นสารต้านมะเร็ง (Clarke *et al.*, 2012) ซัลโฟราเฟนเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากการย่อยสลายของสารกลูโคราฟานินซึ่งเป็นสารกลูโคซิโนเลทชนิดหนึ่งในผักบรอกโคลี่ รายงานวิจัยที่ผ่านมา ได้แสดงให้เห็นว่าหลังจากอาสาสมัครบริโภคหัวบรอกโคลี่และผงกลูโคราฟานินจะพบ sulforaphane N-acetyl cysteine conjugate ในน้ำปัสสาวะภายใน 24 ชั่วโมง (Clarke *et al.*, 2012; Cramer *et al.*, 2012) ซึ่งหมายถึงการเปลี่ยนแปลงของกลูโคราฟานินไปเป็นซัลโฟราเฟนโดยแบคทีเรียที่อยู่ในช่องท้องของอาสาสมัคร จนถึงวันนี้ มีเพียงแบคทีเรีย *Enterococcus casseliflavus* CP1 ซึ่งถูกแยกมาจากช่องท้องมนุษย์ที่มีรายงานว่าสามารถผลิตซัลโฟราเฟนจากกลูโคราฟานินได้ (Luang-In *et al.*, 2014) (ภาพที่ 11) ดังนั้นการเติมเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ลงในอาหารที่อุดมสมบูรณ์ไปด้วยกลูโคซิโนเลทอาจช่วยเพิ่มผลิตภัณฑ์ไอโซไธโอไซยาเนทซึ่งมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและต้านมะเร็งให้กับผู้บริโภค



ภาพที่ 11 การย่อยสลายกลูโคราฟานินให้ได้ซัลโฟราเฟนโดยเอนไซม์ไมโรซิเนสในพืช

ที่มา : Boddupalli *et al.* (2012)

ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยกลูโคบราสสิซินถูกนำไปทดลองในหนูทอง (C57BL/6 mice) ซึ่งเป็นหนูที่มีไขมันสูง พบว่าปริมาณกลูโคสในเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Poornima & Mirunalini, 2014) ยิ่งไปกว่านั้นผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิด II (Type II diabetes) แสดงให้เห็นถึงพัฒนาการที่ดีของระดับน้ำตาลในเลือดหลังอดอาหาร และระดับอินซูลินที่ต่ำลงโดยวัดค่า HOMA-IR (homeostasis model assessment of insulin resistance; HOMA-IR) หลังการบริโภคไมโครกรีนบร็อคโคลี่ในปริมาณ 10 กรัมต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (Bahadoran *et al.*, 2012) นอกจากนี้ไมโครกรีนแรดิชถูกนำมาศึกษาเนื่องจากมีปริมาณกลูโคซิโนเลทสูง (Papi *et al.*, 2008; Baenas *et al.*, 2014; Baenas *et al.*, 2015) ซึ่งหลังจากที่เกิดการฉีกขาดของเนื้อเยื่อพืช สารประกอบหลักอย่างกลูโคราฟิโนนและกลูโคราฟาซาตินจะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไมโรซิเนสในเนื้อเยื่อพืช (Thioglucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.147) ไปเป็นซัลโฟราฟิโนนและราฟาซาติน ตามลำดับ (Kim *et al.*, 2015) เช่นเดียวกับอินโดลกลูโคซิโนเลท เช่น กลูโคบราสสิซิน (glucobrassicin) และ 4-เมทอกซีกลูโคบราสสิซิน (4-methoxy glucobrassicin) ที่มีอยู่ในไมโครกรีนแรดิช และถูกนำมาศึกษาเพราะผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการของสารดังกล่าว อย่าง อินโดล-3-คาร์บินอล (Indole-3-carbinol ; I3C) มีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของน้ำตาล และเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ไขมันเพื่อควบคุมการทำงานของอวัยวะอื่นๆ (Chang *et al.*, 2011)

การศึกษาก่อนหน้าจำนวนมากแสดงให้เห็นว่าสารประกอบจากธรรมชาติสามารถยับยั้งการเริ่มต้นการพัฒนาของโรคมะเร็ง (Pandey *et al.*, 2017) จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Sayeed *et al.* (2018) พบว่าอัลลิลไอโซไทโอไซยาเนทสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ที่สำคัญสังเกตเห็นว่าอัลลิลไอโซไทโอไซยาเนทส่งผลกระทบต่อเซลล์เต้านมที่ไม่ใช่เนื้องอก MCF-10A อัลลิลไอโซไทโอไซยาเนทไม่ได้ทำให้เกิดอะพอพโทซิสและการหยุดวงจรชีวิตของเซลล์ในเซลล์MDA-MB-231 ตามที่ตรวจวัดโดย Flow cytometry นอกจากนี้ยังพบว่าอัลลิลไอโซไทโอไซยาเนทไม่สามารถแก้ไขการแสดงออกของยีน Caspase-8 Caspase-9 PARP และ p-mTOR proteins แต่สามารถลดการแสดงออกของ Beclin-1 proteins นอกจากนี้ อัลลิลไอโซไทโอไซยาเนทยังเพิ่มการแสดงออกของยีน BCL-2 และ mTOR แต่ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน PRKAA1 และ PER2

ในรายงานก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าอัลลิลไอโซไทโอไซยาเนทสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน Caspase-8 และ Caspase-9 ในเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 (Bo *et al.*, 2016) เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว HL60 (Xu *et al.*, 2000) เพิ่มการแสดงออกของ Caspase-9 ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 (Bo *et al.*, 2016) MDA-MB-468 (Tsai *et al.*, 2012) ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ UM-UC-3 (Geng *et al.*, 2011) ในเซลล์มะเร็งสมอง GBM8401

(Chen *et al.*, 2010) ลดการแสดงออกของยีน BCL-2 ในเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 (Bo *et al.*, 2016) ในเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-468 (Tsai *et al.*, 2012) และในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ในการศึกษาระดับหลอดทดลอง (Xiao *et al.*, 2003) และในระดับสัตว์ทดลอง (Srivastava *et al.*, 2003) เพิ่ม PARP ในมะเร็งเต้านม MDA-MB-231 (Bo *et al.*, 2016) และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW620 (Lau *et al.*, 2010) การศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่าอัลลิไซโซไทโอไซยาเนทเหนี่ยวนำให้เกิดการหยุดวงจรชีวิตของเซลล์ระยะเฟส S ในมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (Savio *et al.*, 2014) มะเร็งปอด (Tripathi *et al.*, 2015) และเหนี่ยวนำให้เกิดการหยุดวงจรชีวิตระยะเฟส G2/M ในมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (Savio *et al.*, 2014) มะเร็งปอด (Tripathi *et al.*, 2015) มะเร็งเต้านม MDA-MB-468 (Tsai *et al.*, 2012) มะเร็งสมอง (Chen *et al.*, 2010) มะเร็งต่อมลูกหมาก (Xiao *et al.*, 2003) และมะเร็งเม็ดเลือดขาว (Xu and Thornalley 2000) การศึกษารายงานว่า Beclin-1 ที่แสดงออกมากเกินไปอาจส่งเสริมกระบวนการกลืนกินตัวเองของเซลล์ (autophagy) ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่บกพร่องของกระบวนการกลืนกินตัวเองของเซลล์ (Liang *et al.*, 1999)

ในการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Arora *et al.* (2016) ทำการศึกษาปัจจุบันแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของ 3 บิวทีนิวไอโซไธโอไซยาเนท (3-butenyl isothiocyanate) ที่แยกได้จาก *Brassica juncea* L. Czern var. Pusa Jaikisan พบว่ามีกิจกรรมการยับยั้งเซลล์มะเร็ง ได้แก่ เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก เซลล์มะเร็งกระดูก เซลล์มะเร็งปากมดลูก เซลล์มะเร็งตับ โรคมะเร็งของเนื้อเยื่อประสาท และมะเร็งเต้านมและพบว่า 3 บิวทีนิวไอโซไธโอไซยาเนทมีประสิทธิภาพมากต่อเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก และมีรายงานว่า 3 บิวทีนิวไอโซไธโอไซยาเนทลดศักย์ไฟฟ้าของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย (mitochondria membrane potential) ของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 หลังได้รับการทรีตด้วย 3 บิวทีนิวไอโซไธโอไซยาเนท ในทางตรงกันข้ามมีการเพิ่มขึ้นของ ROS หลังจากได้รับ 3 บิวทีนิวไอโซไธโอไซยาเนท มีการลดลงของโปรตีน MMPs และมีการเพิ่มขึ้นของ mitochondrial ROS มักจะเชื่อมโยงกับการเริ่มต้นการตายแบบอะพอพโทซิส (Gottlieb *et al.*, 2003; Kwang-Youn *et al.*, 2011) จากรายงานก่อนหน้านี้ของ Núñez-Iglesias *et al.* (2018) พบว่า 3 บิวทีนิวไอโซไธโอไซยาเนทเหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมงหลังการบ่ม นอกจากนี้ 3 บิวทีนิวไอโซไธโอไซยาเนทยังแสดงให้เห็นถึงการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ต่อมลูกหมาก PC-3 แต่ 3 บิวทีนิวไอโซไธโอไซยาเนทไม่มีผลต่อเซลล์มะเร็ง DU145PC

มีรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Papi *et al.* (2008b) รายงานว่าราฟาซาทิน (4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate ;Raphasatin) จาก *Raphanus sativus* L. มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ LoVo HCT-116 และ HT-29 ลดการเจริญของเซลล์มะเร็งและเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (LoVo, HCT-116, และ HT-29 จากรายงานก่อนหน้านี้

พบว่าเซลล์มะเร็งหลอดอาหาร KYSE510 ที่ได้รับการทรีตเมนต์ด้วยยาต้านมะเร็งที่มีการแสดงออกของโปรตีน Bcl2 ที่ลดลง เหนี่ยวนำ caspase-3, caspase-9 และ PARP-1 บ่งชี้ว่าการมีชีวิตของเซลล์ลดลงเกิดขึ้นผ่านทางวิถี mitochondrial apoptotic นอกจากนี้ยังเหนี่ยวนำให้เกิดการหยุดวงจรชีวิตของเซลล์ในระยะเฟส G2/M มีการเหนี่ยวนำ Chk1, Akt phosphorylations และลดการแสดงออกของโปรตีน p27 (Hirata *et al.*, 2019) มีรายงานหลายฉบับเกี่ยวกับไอโซโรโซยานาเททที่แสดงให้เห็นว่าไอโซโรโซยานาเททมีกิจกรรมยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเช่นการเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งเนื่องจากการผลิต ROS (Schumacker 2006; Trachootham *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2014) ซัลโฟราเฟนได้สามารถหยุดวงจรชีวิตของเซลล์และกระตุ้นการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์แสดงให้เห็นว่าทำให้เกิดการหยุดวงจรชีวิตของเซลล์ G1/G2 และชักนำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสโดยการลดการแสดงออกของยีนต้านการเกิดการตายแบบอะพอพโทซิสคือยีน Bcl-2 และมีการแสดงออกของยีนที่เหนี่ยวนำให้เซลล์มีการตายแบบอะพอพโทซิสเพิ่มมากขึ้นคือยีน Bax ในเซลล์ลำไส้ใหญ่ (Dexheimer *et al.*, 2006; Chen and Wong 2008) ในปัจจุบันพบว่าเซลล์ในเฟส S/G2/M ลดลงเนื่องจากซัลโฟราเฟนมีการจัดการให้เซลล์นำไปสู่การเกิดการตายของเซลล์มะเร็งรังไข่ นอกจากนี้ยังเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิสซึ่งถูกวิเคราะห์โดยเทคนิค flow cytometry และ western blot พบว่ามีการลดลงของยีน Bcl-2 และมีการเพิ่มการแสดงออกของยีน Bax และ Caspase-3

มีรายงานวิจัยของ Pham *et al.* (2004); Hutzen *et al.* (2009); Kallifatidis *et al.* (2009) พบว่าซัลโฟราเฟนกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งมีการตายแบบอะพอพโทซิสผ่านการเปิดการทำงานของ caspase-3 เหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีน p21 และ p27 ที่มากขึ้นและยับยั้งการแสดงออกของยีน cyclin D1 ซัลโฟราเฟนกระตุ้นให้เกิดการทำงาน FOXO transcription factors กระตุ้นให้มีการเกิดอะพอพโทซิสผ่านการยับยั้งการทำงานของวิถี PI3K/AKT และ MEK/ERK ซึ่งเกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของเซลล์ เมตาบอลิซึมของเซลล์ การเคลื่อนที่ของเซลล์ และการสร้างหลอดเลือด มีผลต่อกระบวนการแบ่งจำนวนของเซลล์มะเร็ง และกระตุ้นการทำงานของ transcription factor รวมถึงควบคุมการแสดงออกของยีน การยับยั้งวิถี PI3K/AKT และ MEK/ERK ทำหน้าที่ร่วมกันเพื่อเปิดการทำงานของ FOXO transcription factors และทำให้เกิด phosphorylation deficient mutants

รายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารกลุ่มสารไอโซโรโซยานาเทท สารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์มีผลต่อการก่อตัวแบ่งจำนวนโคโลนีของเซลล์มะเร็ง กลไกการทำงานอาจเกิดการเหนี่ยวนำให้เกิด ROS เกิดการเพิ่มขึ้นของกิจกรรม caspase-3 ที่เกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดอะพอพโทซิสและอาจเกิดการลดศักย์ไฟฟ้าของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย ซึ่งวิถีภายในหรือวิถีไมโทคอนเดรีย (intrinsic pathway หรือ mitochondrial pathway) ซึ่งเกิดจากการที่ไมโทคอนเดรีย

รียเกิดความเสียหายทำให้มีการปลดปล่อยของโปรตีนไซโตโครม C (cytochrome c) ออกมาสู่ไซโตพลาซึมและจะไปรวมตัวกับโปรตีน Apaf-1 ทำให้เกิดเป็นอะพอพโทโซมซึ่งจะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-9 และ caspase-9 ที่ถูกกระตุ้นนี้จะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspases-3, -6, และ -7 ซึ่งก็จะส่งผลให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (สุพักตร์ โยไรสง และคณะ 2012; Steelman *et al.*, 2004)

มีรายงานของ Kandasamy *et al.* (2003); Shankar *et al.* (2007) ว่าซัลโฟราเฟนเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีน proapoptotic proteins (Bax, Bak, PUMA, Noxa, and Bim) death receptors (TRAIL-R1/DR4 and TRAIL-R2/DR5) และยับยั้งการแสดงออกของยีน antiapoptotic proteins (Bcl-2 and Bcl-XL) นอกจากนี้ซัลโฟราเฟนยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ที่ปลูกถ่ายในหนูแรทโดยซัลโฟราเฟนมีการกระตุ้นอะพอพโทซิสยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์เนื้องอก ยับยั้งการบุกรุก ยับยั้งระยะการกระจายและยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ซัลโฟราเฟนยังยับยั้งกระบวนการ phosphorylation ของ AKT, ERK1/2, FOXO3A, และ p53-NF- κ B ในเนื้องอก กลุ่มโปรตีน Bcl-2 นั้นมีบทบาทที่สำคัญในการตายของเซลล์ประกอบด้วย prosurvival และ proapoptotic ที่เชื่อมโยงกับมะเร็งหลายชนิด ในการทดลองระดับหลอดทดลองพบว่าซัลโฟราเฟนลดการแสดงออกของยีน Bcl-2 และ Bcl-XL และเพิ่มการแสดงออกของ Bax, Bak, PUMA, Noxa และ Bim ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3

การกระจายตัวของโอลิโกนิวคลีโอโซมของดีเอ็นเอที่เป็นเครื่องหมายรับรองการตายของเซลล์ late-stage apoptosis การแตกหักของดีเอ็นเอถูกเร่งปฏิกิริยาโดย DFF40/CAD DNase โดยส่วนใหญ่แล้วจะผ่าน caspase-3 ผ่าน proteolytic เฉพาะของ DFF45/ICAD ยีน caspases-3 caspases -6 และ caspases -7 มีหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส เช่นการแตกหักของดีเอ็นเอ การเกิดกระบวนการอะพอพโทซิสซึ่งสังเกตจากการเกิดหดของเซลล์ กระจายตัวของโอลิโกนิวคลีโอโซม การแตกหักของดีเอ็นเอ โครมาตินมีการหดตัวเล็กกลง ซึ่งทำให้เกิดการแยกสลายของเซลล์เป็นรูปแบบที่เรียกว่าอะพอพโทติก (apoptotic bodies) ซึ่งจะถูเก็บกินและย่อยสลายอย่างรวดเร็วโดยเซลล์แมโครเฟจ (macrophage) หรือเซลล์ข้างเคียง เกิดการลดการแสดงออกของยีน Bcl-2 และ Birc 5 ในขณะที่มีการเพิ่มการแสดงออกของยีน Bax-alpha ซึ่งการเกิดการแตกหักของดีเอ็นเอส่งผลจากการแสดงออกของยีน caspase-3, caspases -6 caspases -7 และ caspases -14 ที่มีมากขึ้น โดยการแสดงออกของ caspase-3 caspases -6 caspases -7 และ caspases -14 มีผลทำให้เกิดย่อยสลายโปรตีนโครงสร้างต่างๆ อันได้แก่ actin fodrin และ lamin กระตุ้นให้เซลล์เกิดการแยกตัวและนิวเคลียสหดตัว ส่งเสริมการทำงานของ caspase-activated DNase/DNA fragmentation factor (CAD/DFF) ดังนั้นเมื่อเราพบลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เรียง

ตัวกันเหมือนชั้นบันที่เรียกว่าการแตกหักของดีเอ็นเอ (DNA fragmentation) ป่งบอกถึงเซลล์กำลังเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส

มีรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ Murata *et al.* (2000) พบว่าอัลลิลไอโซไธโอไซยาเนททำให้กลไกของความเสียหายที่เกิดจากการทำลายดีเอ็นเอ ยีนต่อต้านและยีน c-Ha-ras-1 proto-oncogene ถูกเปิดการทำงานโดยอัลลิลไอโซไธโอไซยาเนท เช่นเดียวกับ เบนซิลไอโซไธโอไซยาเนท (Benzyl isothiocyanate ;BITC) และฟีนีทิวไอโซไธโอไซยาเนท (Phenethyl isothiocyanate ;PITC) ซึ่งตรวจวัดความเสียหายของดีเอ็นเอโดยใช้อิเล็กโทรโฟรีซิส นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Papi *et al.* (2008b) พบว่าการทดลองด้วยราฟาซาตินเกิดการกระตุ้นการตายด้วยการเพิ่มการทำงานของยีน Bax และลดลงของการทำงานของยีน Bcl-2 ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่หลังจากได้รับสารสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเป็นกลไกที่มีการควบคุมอย่างเป็นระเบียบแบบแผนอาศัยโปรตีนและเอนไซม์หลายชนิด กลไกหนึ่งที่สำคัญคืออาศัยเอนไซม์ matrixmetalloproteinase 2 (MMP 2) และ matrixmetalloproteinase 9 (MMP 9) ในเซลล์มะเร็งชนิดรุกราน gelatinase A (MMP 2) และ gelatinase B (MMP 9) แตกต่างจาก MMP ชนิดอื่น ๆ (Murata *et al.*, 2000) MMP 2 และ MMP 9 มีความสัมพันธ์กับระยะลุกลามของมะเร็ง เนื่องจากความสามารถในการย่อยสลายคอลลาเจนประเภท IV ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน (basement membrane) ไอโซไธโอไซยาเนทมีผลยับยั้งมะเร็งเป็นอย่างดีในหลาย ๆ ในระดับสัตว์ทดลอง สันนิษฐานได้จากการปรับเอนไซม์ xenobiotic-metabolizing เช่นโดยการยับยั้ง cytochrome P-450 หรือเหนี่ยวนำของเฟส II detoxifying enzymes นอกจากนี้ยังพบว่าฟีนีทิวไอโซไธโอไซยาเนท (phenyl isothiocyanate) ไม่เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งปากมดลูก Hela ตามเวลาและปริมาณยา การได้รับการทรมานด้วยไอโซไธโอไซยาเนททำให้เกิดการเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิส ทำให้เกิดการเหนี่ยวนำของกิจกรรมที่ caspase-3/CPP32 นอกจากนี้ไอโซไธโอไซยาเนทยกเว้นฟีนีทิวไอโซไธโอไซยาเนทกระตุ้นการทำงานของกลุ่มเอนไซม์โปรติโอไลติก (proteolytic enzyme) และกระตุ้นให้เกิดการแยก poly (ADP-ribose) polymerase ซึ่งมีผลตามมาคือเกิดกิจกรรมของ caspase และเกิดการกระจายแตกหักของดีเอ็นเอในเซลล์มะเร็ง (Yu *et al.*, 1998)

ในรายงานก่อนหน้านี้พบว่าฟีนีทิวไอโซไธโอไซยาเนท (Phenethyl isothiocyanate) ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งตับอ่อน MIAPaca2, PL-45, and BxPC3 นอกจากนี้ยังชะลอวงจรชีวิตของเซลล์โดยการยับยั้งวงจรชีวิตเซลล์มะเร็งตับอ่อนระยะเฟส G2/M และปรับระดับโปรตีนในกลุ่ม Bcl-2 นอกจากนี้ยังพบว่าฟีนีทิวไอโซไธโอไซยาเนทเหนี่ยวนำให้เกิดการแยก PARP และเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอ (Stan *et al.*, 2014) และยังมีรายงานวิจัยพบความเป็นพิษของซิลิฟราเฟนต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MFC-7 เซลล์มะเร็งลำไส้

ใหญ่ HT-29 และเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 นอกจากนั้นพบว่าซัลโฟราเฟนแสดงความเป็นพิษสูงสุดในเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 หลังจากการบ่มที่ 24 48 และ 72 ชั่วโมงแต่ในทางตรงกันข้ามพบว่ากลูโคซิโนเลทไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่อเซลล์มะเร็ง นอกจากนั้นยังพบว่าซัลโฟราเฟนกระตุ้นให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส ทำให้เกิดการการหดตัวของเซลล์ การอัดแน่นของโครมาตินและเกิดการกระจายแตกหักของดีเอ็นเอ มีการเพิ่มกิจกรรมการทำงานของ caspases -3 caspases -7 และ caspases -9 ในขณะที่มีการลดลงของกิจกรรม caspase-8 การมีจำนวนลดลงของเซลล์มะเร็งถูกเหนี่ยวนำโดยการหยุดวงจรการทำงานของเซลล์ในเฟส G0/G1 อาจสรุปได้ว่าซัลโฟราเฟนทำให้เกิดพิษต่อเซลล์และกระตุ้นการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์ HepG2 ยกเว้นกลูโคซิโนเลทและกลูโคราฟานิน (Ibrahim *et al.*, 2018) มีรายงานวิจัยพบว่ากลไกระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของสารประกอบจากการวิเคราะห์พบการหยุดการทำงานของวงจรชีวิตเซลล์ (Geng *et al.*, 2011) ตัวอย่างเช่นทำให้เกิดการตายของเซลล์และทำให้เกิดจากการกระจายแตกหักของดีเอ็นเอและหยุดการทำงานของเซลล์ระยะเฟส subG0/G1 และเหนี่ยวนำให้ดีเอ็นเอมีขนาดเล็กลงและเกิดการกระจายแตกหักต่อไป ดังนั้นซัลโฟราเฟนจึงมีศักยภาพที่จะทำให้เกิดการกระจายแตกหักของดีเอ็นเอและหยุดวงจรชีวิตของเซลล์ที่ระยะ subG0/G1 ในเซลล์HepG2 (Savio *et al.*, 2014)

มีรายงานวิจัยของ Murata *et al.* (2000) พบว่าอัลลิลไอโซโธไซยานาเนททำให้กลไกของความเสียหายที่เกิดจากการทำลายดีเอ็นเอ ยีนต่อต้านการตายและยีน c-Ha-ras-1 proto-oncogene ถูกเปิดการทำงานโดยอัลลิลไอโซโธไซยานาเนทเช่นเดียวกับเบนซิลไอโซโธไซยานาเนทและฟีนีทิวไอโซโธไซยานาเนท ซึ่งตรวจวัดความเสียหายของดีเอ็นเอโดยใช้อิเล็กโทรโพริซิส ไอโซโธไซยานาเนทซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของการย่อยสลายกลูโคซิโนเลทในผักตระกูลกะหล่ำมีฤทธิ์รุนแรงต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิด จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่าเบนซิลไอโซโธไซยานาเนท ฟีนีทิวไอโซโธไซยานาเนทและซัลโฟราเฟนยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งโดยควบคุมการแสดงออกของโปรตีน MMP 9 ไอโซโธไซยานาเนทโดยเฉพาะ ฟีนีทิวไอโซโธไซยานาเนทยับยั้ง 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) ยับยั้งการทำงานของโปรตีน MMP 9 และยับยั้งการบุกรุกแพร่กระจายในเซลล์มะเร็งต่างๆ โดยแสดงให้เห็นว่าเบนซิลไอโซโธไซยานาเนท ฟีนีทิวไอโซโธไซยานาเนทและซัลโฟราเฟนยับยั้งการแสดงออกของ TMP-induced MMP 9 โดยการยับยั้ง AP-1 และ NF- κ B ในเซลล์เซลล์มะเร็งกระดูก U-2 OS นอกจากนั้นยังลดกระบวนการ phosphorylation ของ FAK, ERK1/2, และ Akt ไอโซโธไซยานาเนทจะยับยั้ง FAK phosphorylation ยับยั้ง phosphorylation ของ ERK1/2 และ Akt ในเซลล์มะเร็งกระดูก U2OS และเซลล์มะเร็งปอด A549 พร้อมกับการโยกย้ายของ p53 และ c-Fos นอกจากนั้นยังพบว่าเบนซิลไอโซโธไซยานาเนทมากกว่า ฟีนีทิวไอโซโธไซยานาเนทมากกว่าซัลโฟราเฟน ที่มีกิจกรรมในการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน MMP 9 และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Jeong *et al.*, 2017) ผลลัพธ์เหล่านี้แสดงให้เห็นว่า

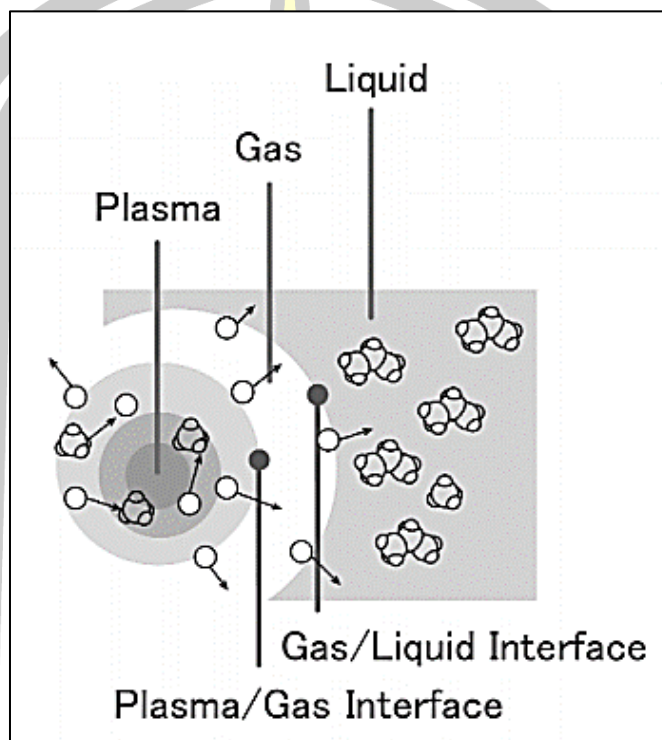
การยับยั้งกิจกรรม MMP 9 มีความสำคัญมากกว่าการยับยั้งกิจกรรม MMP 2 ในแง่ของผลการต่อต้านการแพร่กระจายในเซลล์มะเร็งของสารไอโซโธไอไซยานเท

ทั่วไปสารประกอบที่มีโครงสร้างคาร์บอนอิลีกโทรไฟล์ ($-N=C=S$) จะมีความแข็งแรงและยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง (Ahn *et al.*, 2010) ไอโซโธไอไซยานเทนั้นยับยั้งทั้งกิจกรรม MMP 9 และการย้ายถิ่นของเซลล์มะเร็งมีการจัดอันดับดังต่อไปนี้ เบนซิลไอโซโธไอไซยานเทมากกว่า ฟีนีทิวไอโซโธไอไซยานเทมากกว่า ซัลโฟราเฟน ไอโซโธไอไซยานเทมีผลต่อเซลล์มะเร็งต่าง ๆ รวมถึงการตายของเซลล์แบบอะพอโทซิส เหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันและยับยั้งวงจรชีวิตของเซลล์มะเร็ง (Wu *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011) ไอโซโธไอไซยานเทยับยั้งการย้ายของ p65 และ c-fos รวมทั้งยับยั้งการทำงานของโปรโมเตอร์ MMP-9-WT, MMP-9-mAP-1 และ MMP-9-mNF-kB AP-1 และ NF-kB เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ MMP 9 ผ่านทาง MAPK หรือเส้นทาง PI3K/Akt (Hsiang *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008) ไอโซโธไอไซยานเทยับยั้งกระบวนการ phosphorylation ของ ERK และ Akt ในเซลล์มะเร็งกระดูก U-2 OS แต่ไม่ส่งผลกระทบต่อ phosphorylation ของ JNK p38 และ PI3K ในรายงานของ Lee *et al.* (2015) พบไอโซโธไอไซยานเทยับยั้งการหลั่งและการแสดงออกของโปรตีน PMA-induced MMP 9 ผลของการยับยั้งของไอโซโธไอไซยานเทต่อการแสดงออกของ PMA-MMP-9 ที่เกิดจาก PMA นั้นพบว่าเกี่ยวข้องกับการยับยั้งระดับการถอดรหัส MMP 9 ผ่านการ NF-kB และ Activator protein-1 (AP-1) ลดการส่งสัญญาณ MMP-9-mediated เช่น FAK และ JNK ในขณะที่ไม่มีผลต่อการควบคุมการ phosphorylation ของ ERK และ p38

2.7 เทคโนโลยีพลาสมา (Plasma Technology)

พลาสมาคือแก๊สที่มีสถานะเป็นไอออนและถือเป็นสถานะหนึ่งของสสาร ซึ่งเป็นแก๊สที่แตกตัวได้อย่างสมบูรณ์อยู่ในสภาพที่เป้นกลุ่มของไอออนและอิเล็กตรอน การมีสภาพเป็นไอออนดังกล่าวนี้ซึ่งจะมีอิเล็กตรอนอย่างน้อย 1 ตัว ถูกดึงออกจากโมเลกุลประจุไฟฟ้าอิสระทำให้พลาสมามีสภาพการนำไฟฟ้าเกิดขึ้น พลาสมาสามารถเกิดได้โดยการไหลพลังงานที่มากเพียงพอแก๊สสารในสถานะแก๊สจนทำให้แก๊สเกิดการแตกตัวเป็นไอออน (ionization) ตัวอย่าง เช่น การสร้างสนามไฟฟ้าความเข้มสูงให้แก๊สซึ่งจะทำให้อิเล็กตรอนอิสระได้รับพลังงานจากสนามไฟฟ้าและเคลื่อนที่ชนกับอะตอม (จิราภรณ์พรหมพิงค์, 2555) (ภาพที่ 12) เทคโนโลยีพลาสมาเป็นสถานะทางกายภาพของการนำไฟฟ้าสูงที่มีคุณสมบัติเป็นก๊าซ พลาสมาสามารถสร้างขึ้นได้โดยการส่งผ่านกระแสไฟฟ้าผ่านแก๊ส ความร้อนจะเกิดขึ้นเมื่ออิเล็กตรอนถูกเร่งขึ้นระหว่างสองขั้วในสภาพแวดล้อมที่เป็นก๊าซ อิเล็กตรอนจะเคลื่อนที่ไปที่ขั้วบวกเพื่อทำปฏิกิริยาชนและกระตุ้นกับอะตอมหรือโมเลกุลในแก๊ส การกระตุ้นอาจทำให้เกิดเป็นไอออนได้ทั้งหมดหรือบางส่วน อิเล็กตรอนอิสระไอออนจะเร่งไปทางขั้วบวกและก่อให้เกิดการชนกัน

มากขึ้น เป็นผลกระแสน้ำที่เพิ่มขึ้น การชนกันระหว่างอิเล็กตรอนและอนุภาคขนาดใหญ่จะเกิดขึ้นเรื่อยๆ การชนเหล่านี้จะส่งพลังงานจลน์ของอิเล็กตรอนและการรวมตัวของอนุภาคที่มีประจุจะเพิ่มอุณหภูมิของแก๊ส การนำไฟฟ้าของพลาสมาขึ้นอยู่กับจำนวนอิเล็กตรอนที่ชั่ววอก (Li *et al.*, 2016)



ภาพที่ 12 รูปแบบของพลาสมา

ที่มา : Takai (2008)

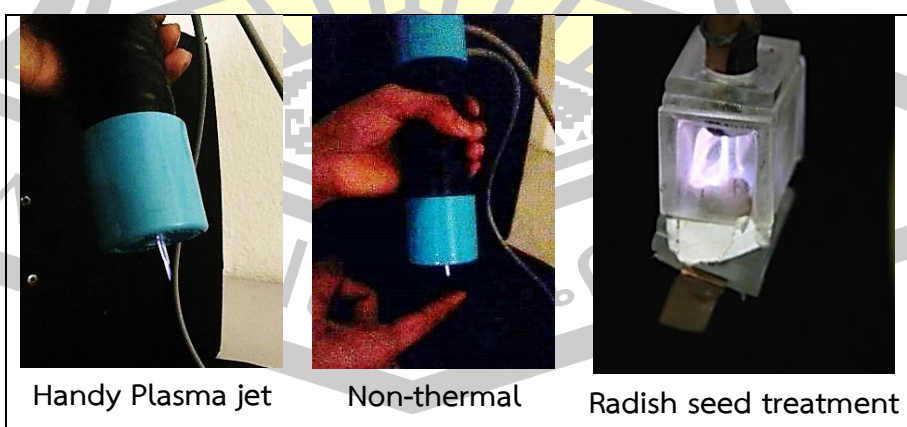
ในปัจจุบัน พบว่าการใช้เทคโนโลยีพลาสมาในการปรับปรุงผิวเมล็ดพันธุ์สามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การงอกและเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน (Dobrin *et al.*, 2015; Butscher *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017) เนื่องจากในพลาสมาจะประกอบด้วยอนุภาคอิสระ ไอออน อิเล็กตรอน และแสงยูวี

พลาสมาเย็น (cold plasma) คือแก๊สที่ได้รับพลังงานจลน์ทำให้บางส่วนเกิดการแตกตัวและอยู่ในสถานะพลาสมาโดยที่มีอุณหภูมิใกล้เคียงอุณหภูมิห้อง ดังนั้นพลาสมาเย็นจึงสามารถทำอันตรกิริยากับเมล็ดพันธุ์ ทำให้ผิวเมล็ดพันธุ์มีพลังงานอิสระเชิงผิวเพิ่มขึ้น (increasing surface free energy) สามารถดูดซับน้ำ ความชื้น และออกซิเจนได้มากและเร็วขึ้น นอกจากนั้นพลาสมาเย็นยังทำให้เกิดการฆ่าเชื้อ (plasma sterilization) โดยไม่ไปทำลายโครงสร้างภายในของเมล็ด อีกทั้ง งานวิจัยเมื่อเร็วๆ นี้ได้แสดงว่าการใช้พลาสมาทรีตเมนต์ร่วมกับน้ำที่กระตุ้นด้วยพลาสมาสามารถเพิ่มความสูง

ของต้นมะเขือเทศและต้นพริกหยวกได้ถึง 60 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (Sivachandiran & Khacef, 2017)

เทคโนโลยีพลาสมาอุณหภูมิต่ำที่ระดับความดันบรรยากาศ (atmospheric non-thermal plasma) กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมากอันเนื่องมาจากคุณสมบัติเด่นหลายประการ เช่น มีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนสูง มีขนาดเล็ก ใช้พลังงานในการผลิตต่ำ ประหยัดต้นทุน ควบคุมอุณหภูมิได้ และเป็นเทคโนโลยีสะอาด (Sankaran & Giapis, 2003) เทคโนโลยีพลาสมาอุณหภูมิต่ำที่ระดับความดันบรรยากาศนี้จึงได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้กับศาสตร์หลายๆ ด้าน เช่น กระบวนการทางวัสดุศาสตร์ (material processing) งานประยุกต์ด้านชีวการแพทย์ (biomedical science) การปรับปรุงพื้นผิวของวัสดุ (surface modification) ปฏิกิริยาเคมี (chemical reaction) การสังเคราะห์วัสดุนาโน (nano particle synthesis) และการเกษตรกรรม เป็นต้น (Papadakis 2012)

การประยุกต์งานวิจัยด้านพลาสมาอุณหภูมิต่ำกับการเกษตรกรรมโดยเฉพาะอย่างยิ่งเรื่อง การปรับปรุงอัตราการงอกของเมล็ดพันธุ์พืช ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเมื่อไม่นานมานี้ โดยการ ใช้ประโยชน์จากอนุพลูอิอิสระ (reactive species) ในพลาสมาซึ่งประกอบไปด้วยประจุบวก (positive ion) ประจุลบ (negative ion or electron) และโมเลกุลหรืออะตอมของแก๊สตั้งต้นที่ นำมาใช้สร้างพลาสมาที่มีสถานะเป็นกลาง (neutral molecule or atom) ในการปรับเปลี่ยนพื้นผิว ของเมล็ดพันธุ์หรือผลของพืชด้วยพลาสมาอุณหภูมิต่ำ จากการศึกษาวิจัยได้แนะนำว่าผลการ ตอบสนองของเมล็ดพืชต่อพลาสมาอุณหภูมิต่ำนั้นจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์พืชและเวลาที่ได้รับการฉาย พลาสมา (Bogaerts *et al.*, 2002; Sankaran 2004; Franklin & Braithwaite, 2009; Matra, 2016) ตัวอย่างของการฉายพลาสมาลงบนเมล็ดหัวไชเท้า (ภาพที่ 13)



Handy Plasma jet

Non-thermal

Radish seed treatment

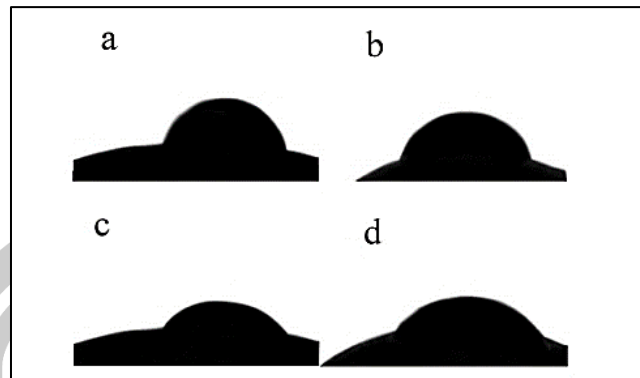
ภาพที่ 13 เครื่องฉายลำพลาสมาอุณหภูมิต่ำฉายพลาสมาลงบนเมล็ดหัวไชเท้าด้วยเครื่องฉายลำพลาสมาอุณหภูมิต่ำต้นแบบ

ที่มา : Matra, (2016)

แม้ว่าปัจจุบันจะยังไม่สามารถอธิบายถึงเหตุผลที่ชัดเจนได้ว่า สาเหตุใดจึงทำให้พลาสติก อุดหนุนสามารถช่วยเร่งอัตราการงอกของเมล็ดพันธุ์พืช และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญ พันธ์ของต้นอ่อนพืชบางชนิดได้นั้นแต่ก็พอที่จะจับประเด็นได้ว่าภายในพลาสติกนั้นจะประกอบไปด้วย องค์ประกอบหลายๆ ชนิด เช่น แก๊สโมเลกุล แก๊สอะตอม ไอออนบวกและลบของแก๊สอนุมูลของธาตุ อะตอม และ โมเลกุลที่อยู่ในสถานะที่มีพลังงานสูง การแผ่รังสีเหนือม่วง (UV) ตลอดจนพลังงานจาก ปฏิกิริยาทางเคมีภายในพลาสติก ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้อาจมีส่วนช่วยปรับปรุงการงอกของเมล็ด พันธุ์พืชได้ สอดคล้องกับผลการวิจัยรายงานว่าอนุมูลอิสระของออกซิเจนที่เกิดจากออกซิเจนพลาสติก สามารถช่วยให้เปลือกของเมล็ดพืชมีความนุ่มมากขึ้นและบางลง จึงสามารถดูดซับความชื้นได้ดีขึ้น ซึ่งเป็นผลช่วยให้เมล็ดพืชสามารถงอกได้เร็วขึ้น บางงานวิจัยรายงานว่าอนุมูลอิสระของออกซิเจนยังสามารถช่วยทำลายสปอร์ของรา โดยปราศจากการทำลายเนื้อเยื่อหรือเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทาง พันธุกรรมของเมล็ดพืช (Carvalho *et al.*, 2005; Selcuk *et al.*, 2008; Dobrynin *et al.*, 2009)

จากการศึกษาผลจากพลาสติกอุดหนุนการงอกของเมล็ดข้าวสาลีและเมล็ดถั่วเหลือง โดย Ling *et al.* (2015) พบว่าเมล็ดพันธุ์พืชที่ถูกฉายด้วยพลาสติกอุดหนุนจะสามารถดูดซับ ความชื้นได้ดีแตกต่างกันขึ้นอยู่กับกำลังไฟฟ้าที่ใช้ในการสร้างพลาสติกทั้งนี้เนื่องจากพลาสติกอุดหนุน ดำเนินไปทำปฏิกิริยากับโครงสร้างทางเคมีและพื้นผิวเปลือกของเมล็ดพันธุ์พืช ทำให้เมล็ดพันธุ์พืช สามารถดูดซับไอน้ำจากด้านนอกได้ดีขึ้น (ภาพที่ 14) แสดงความสามารถในการดูดซับหยดน้ำบน เมล็ดถั่วเหลืองที่ผ่านการฉายด้วยพลาสติกอุดหนุนที่กัลังไฟฟ้า อักษร a 60 วัตต์ อักษร b 80 อักษร c 100 และอักษร d 120 วัตต์ตามลำดับ

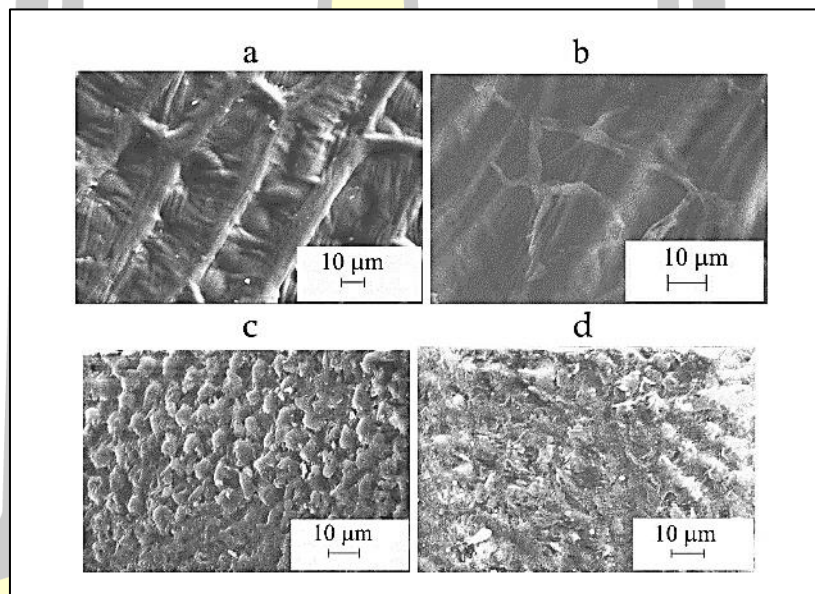
ภาพที่ 15 แสดงภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของผิวเปลือก เมล็ดข้าวสาลีที่ไม่ผ่านการฉายด้วยพลาสติก (a, c) และ หลังจากผ่านการฉายด้วยพลาสติก (b, d) ของผิวเปลือกเมล็ดข้าวสาลีที่ผ่านการฉายและไม่ผ่านการฉายด้วยพลาสติก ซึ่งพบว่าเมล็ดพืชหลังจาก ผ่านการฉายด้วยพลาสติก นั้น ผิวจะมีลักษณะที่แตกต่างไปจากเดิม เมื่อผ่านการฉายด้วยพลาสติกจะ มีลักษณะที่นุ่มและไม่มีเหลี่ยมมุมมากเช่นเดิม ซึ่งจากผลงานวิจัยนี้จึงสามารถอนุมานถึงเหตุที่ทำให้ ให้เมล็ดพันธุ์พืชนั้นสามารถดูดซับสารอาหารจากด้านนอกเปลือกได้ดีขึ้นซึ่งส่งผลให้เมล็ดพันธุ์พืชนั้น สามารถเจริญเติบโตได้เร็วขึ้นก็คือผิวที่ถูกตัดแปลงทางกายภาพโดยพลาสติกนั่นเอง (Filatova *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; Dobrin *et al.*, 2015; Ling *et al.*, 2015)



ภาพที่ 14 ความสามารถในการดูดซับหยดน้ำบนเมล็ดถั่วเหลืองที่ผ่านการฉายด้วยพลาสมาอุณหภูมิต่ำ

a 60 วัตต์ b 80 วัตต์ c 100 วัตต์ และ d 120 วัตต์ตามลำดับ

ที่มา : Ling *et al.* (2015)



ภาพที่ 15 ผิวเปลือกเมล็ดข้าวสาลีผ่านการฉายและไม่ผ่านการฉายพลาสมาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

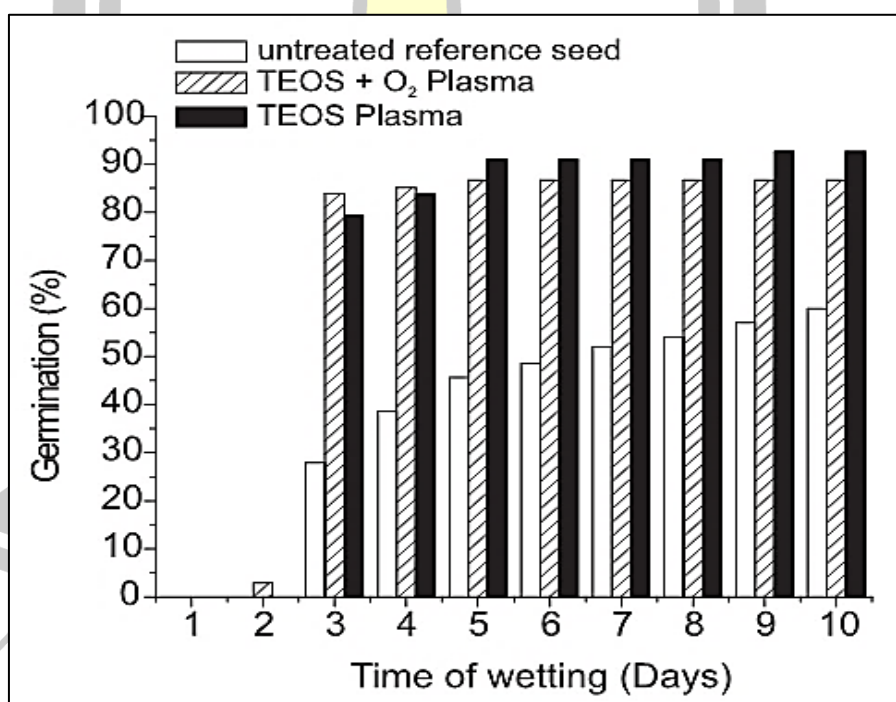
เมล็ดข้าวสาลีที่ไม่ผ่านการฉายด้วยพลาสมา (a, c) และ หลังจากผ่านการฉายด้วยพลาสมา (b, d)

ที่มา : Filatova *et al.* (2013)

ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยในปีในปี ค.ศ. 2005 ของ Carvalho *et al.* (2005) จากผลการวิจัยพบว่าอัตราการงอกของเมล็ดถั่วที่ผ่านการเคลือบด้วยเตตระเอทิลออร์โทซิลิเกตพลาสมา (Tetraethylorthosilicate, TEOS plasma) ในช่วงแรกมีค่าสูงกว่าเมล็ดที่ไม่ได้ผ่านการเคลือบด้วย

TEOS พลาสมา โดยเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดถั่วที่ผ่านการเคลือบด้วย TEOS พลาสมา มีค่ามากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเมล็ดถั่วที่ทำการเพาะภายในวันที่ 3 หลังที่ได้ทำการเพาะเมล็ด ซึ่งต่างจากกรณีของเมล็ดถั่วที่ไม่ได้ผ่านการเคลือบด้วย TEOS พลาสมา ซึ่งอัตราการงอกของเมล็ดถั่วค่อยๆ เพิ่มขึ้นในเปอร์เซ็นต์ที่ต่ำกว่า ไม่เพียงแต่พลาสมาอุณหภูมิต่ำจะสามารถช่วยกระตุ้นอัตราการงอกของเมล็ดพืชแล้ว (ภาพที่ 16) แสดงกราฟเปรียบเทียบอัตราการงอกระหว่างเมล็ดพืชที่ผ่านการฉายด้วยพลาสมา (TEOS+O₂ plasma, TEOS plasma) และไม่ได้ผ่านการฉายด้วยพลาสมา (untreated reference seed) ไปทดลองปลูก พลาสมาทำให้ผิวหน้าของเมล็ดมีหุ้มฟุ้งค์ชั้นที่มีออกซิเจนมากขึ้น ทำให้เมล็ดดั่งโมเลกุลของน้ำได้มากขึ้น ซึ่งจะช่วยในการงอกที่ง่ายขึ้น

จากผลการวิจัยของ Filatova *et al.* (2013) ยังพบว่าเมื่อนำเอาเมล็ดข้าวสาลีที่ผ่านกระบวนการฉายด้วยพลาสมาอุณหภูมิต่ำไปปลูกในไร่ขนาด 12 เฮกเตอร์ เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ผ่านการฉายด้วยพลาสมา พบว่าให้ผลผลิตสุทธิดีกว่าถึง 5.89 เปอร์เซ็นต์ ของผลผลิตสุทธิต้นต่อเฮกเตอร์



ภาพที่ 16 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของการงอกระหว่างเมล็ดพืชที่ผ่านการฉายด้วยพลาสมาและไม่ได้ผ่านการฉายด้วยพลาสมา

ที่มา : Carvalho *et al.* (2005)

รายงานวิจัย Zhang *et al.* (2017) แสดงให้เห็นว่าพลาสมาทำให้เกิดการกระตุ้นของยีน growth regulating factor, antioxidant enzymes energy metabolic genes ได้ รายงานวิจัย Bußler *et al.* (2015) กล่าวว่าพลาสมาสามารถเหนี่ยวนำให้เกิด ROS หรือ UV ซึ่งไปเหนี่ยวนำความเครียดในพืช จึงทำให้พืชเกิดการตอบสนองต่อความเครียดโดยจะเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างสารทุติยภูมิ สารต้านอนุมูลอิสระ และเอนไซม์มาช่วยต้านความเครียดนี้โดยพืชจะกระตุ้นการสร้าง Type I and II signaling networks เพื่อให้พืชสามารถอยู่รอดได้ จากรายงานก่อนหน้านี้นี้ มีทั้งผลที่เพิ่มขึ้นและทำให้ลดลงขึ้นอยู่กับสถานะที่ใช้ ยังไม่มีข้อสรุป และกลไกที่ชัดเจน ยังไม่เป็นที่เข้าใจมากนัก แต่ก็สันนิษฐานว่าไอออนพลาสมาเหนี่ยวนำความเครียดแก่พืช พืชจึงสร้างสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น

2.8 สารกระตุ้นอินทรีย์ (Organic elicitors)

ปริมาณกลูโคซิโนเลทในบร็อคโคลี่สามารถกระตุ้นโดยใช้สารอินทรีย์ (organic elicitor) เช่น กรดจัสโมนิก (JA) กรดซาลิไซลิก (SA) เอทิลีน (ET) กรดแอสคอร์บิก (ABA) (Lorenzo & Solano, 2005) น้ำตาลซูโครส (Guo *et al.*, 2011) โซเดียมคลอไรด์ (Yuan *et al.*, 2010) กรดอะมิโนดีแอลเมทไธโอนีน (DL-methionine) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นยีนต่างๆ ของกลไกในพืชส่งผลต่อการเผาผลาญของพืชและการสังเคราะห์สารพิษทุกชนิด โดยทั่วไปจะใช้สารกระตุ้นอินทรีย์ทุกวัน โดยการฉีดพ่นบนใบอ่อน สารโซเดียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์และซูโครส สามารถเหนี่ยวนำให้พืชเกิดความเครียด (Bußler *et al.*, 2015) เมื่อพืชเกิดความเครียดพืชจะเกิดการสร้างสารอนุมูลอิสระ เช่น อนุมูลอิสระ ซุปเปอร์ออกไซด์ (superoxide free radicals) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide ; H₂O₂) และ อนุมูลอิสระไฮดรอกซี (hydroxyl radicals ;OH[•]) ซึ่งจะทำลายส่วนต่างๆ ของเซลล์ เช่น โพรตีน กรดนิวคลีอิก เยื่อหุ้มเซลล์ เป็นต้น โดยพืชจะกระตุ้นการสร้าง Type I และ Type II signaling networks เพื่อสร้างสารต้านอนุมูลอิสระในรูปเอนไซม์ (enzymatic antioxidants) เช่น ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutases ;SOD) หรือสร้างสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ได้อยู่ในรูปของเอนไซม์ (non-enzymatic antioxidants) เช่น กลูต้าไธโอน (glutathione ;GSH) กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid ;AA) สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้จะสามารถช่วยให้พืชมีความอยู่รอดไปได้และเปลี่ยนสารอนุมูลอิสระที่เป็นอันตรายให้ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์พืชด้วย เช่น ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสจะเปลี่ยนเป็นออกซิเจนเดี่ยว (singlet oxygen ;O₂⁻) ส่วน CAT, APX และ GPX จะเปลี่ยน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้กลายเป็นน้ำ (สุมาลี ชูกำแพง, 2007)

ในการเจริญเติบโตของพืช เช่น การใส่ปุ๋ยไนโตรเจนและซัลเฟตและความเครียดจากสภาพแวดล้อมเช่นอุณหภูมิและแสง (Valente Pereira *et al.*, 2002; López-Berenguer *et al.*, 2008) มีรายงานว่ามียธิพลต่อปริมาณกลูโคซิโนเลท เมื่อไม่นานมานี้การศึกษาจำนวนมากแสดงให้เห็นว่าความเครียดที่เกิดจากเกลือสามารถเพิ่มปริมาณกลูโคซิโนเลทในบร็อคโคลี่ได้ (López-

Berenguer *et al.*, 2008; López-Berenguer *et al.*, 2009) เกลือมีผลต่อคุณภาพและคุณค่าทางโภชนาการของสตรอเบอร์รี่ (Keutgen & Pawelzik, 2008) และผักกาดหอม (Kim *et al.*, 2015) เพิ่มปริมาณสารโพลีฟีนอลและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใน halophyte *Cakile maritime* (Ksouri *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตามข้อมูลที่มีอยู่ยังมีน้อยเกี่ยวกับอิทธิพลของความเครียดที่เกิดจากเกลือต่อสารประกอบที่ส่งเสริมสุขภาพคุณค่าทางโภชนาการของบร็อคโคลี่

น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลซูโครสเป็นที่รู้จักในฐานะโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพของพืชโดยกระบวนการในการเผาผลาญ การสังเคราะห์แสง การเผาผลาญคาร์บอนและไนโตรเจน การออกดอก การตอบสนองต่อความเครียด การทดลองก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าการใช้กรดอะมิโนเมทาไธโอนีน (methionine) ในฐานะสารตั้งต้นสังเคราะห์นำไปสู่การเพิ่มปริมาณกลูโคซิโนเลทในหัวไชเท้า เช่นเดียวกับในหัวผักกาดขาว (Schreiner 2005) มีรายงานของ Hara *et al.* (2004; Lea *et al.* (2007); Cominelli *et al.* (2008) รายงานว่าแอนโทไซยานินถูกควบคุมโดยแสงและน้ำตาลทำให้เกิดความเครียด น้ำตาลเป็นตัวส่งสัญญาณหลักในกระบวนการถ่ายทอดสัญญาณที่ควบคุมกระบวนการที่สำคัญหลายอย่างในทุกขั้นตอนของวัฏจักรของพืช (Rolland *et al.*, 2006) ในน้ำตาลซูโครสที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวคือน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโทส (Nishikawa *et al.*, 2005) นอกจากนี้ยังได้รับรายงานก่อนหน้านี้ว่าน้ำตาลช่วยเพิ่มการสะสมของแอนโทไซยานินในพืชหลายชนิด การสังเคราะห์แอนโทไซยานินในหัวไชเท้าเกิดจากน้ำตาลในไฮโปคอติล (Hypocotyl) (Hara *et al.*, 2004) เพื่อกระตุ้นการเกิดสารกลูโคซิโนเลทในบร็อคโคลี่ ความเครียดออสโมติกเกิดจากการใช้ซูโครสในพืช จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Gigolashvili *et al.* (2007) รายงานว่าการแสดงออกของ HAG1/MYB28 ซึ่งเป็นปัจจัยการถอดรหัสที่ควบคุมการสังเคราะห์อะลิฟาติกกลูโคซิโนเลท และรายงานวิจัยของ Guo *et al.* (2011) พบว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณกลูโคซิโนเลทในบร็อคโคลี่ที่ผ่านการให้ซูโครสเป็นผลมาจากความเครียดออสโมติกที่เกิดจากน้ำตาลซูโครสไม่ได้เกิดจากการควบคุมการแสดงออกของยีน กิจกรรมของเอนไซม์ไมโรซิเนสในบร็อคโคลี่ที่ให้ด้วยซูโครส 176 มิลลิโมลาร์ แสดงให้เห็นว่ากิจกรรมเอนไซม์ไมโรซิเนสสามารถควบคุมได้โดยซูโครสเป็นสัญญาณกระตุ้นให้เกิดความเครียดออสโมซิส (Osmosis stress) เนื่องจากซูโครส กลูโคส และฟรุคโตส ช่วยในการสังเคราะห์กลูโคซิโนเลทและแอนโทไซยานินในพืชตระกูลกะหล่ำและซูโครสเป็นสารที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการกระตุ้นการสะสมของสารทุติยภูมิ ข้อมูลเหล่านี้สอดคล้องกับข้อมูลของ Koornneef & Smeekens, (2005) รายงานว่าระดับของแอนโทไซยานินและกลูโคซิโนเลทอาจเพิ่มขึ้นตามความเครียด เช่น การขาดสารอาหาร (Lea *et al.*, 2007) ความเครียดที่เกิดจากเกลือ (Yuan *et al.*, 2010) เมื่อเร็วๆ นี้การศึกษาหลายชิ้นแสดงให้เห็นว่าความเครียดของเกลือสามารถเพิ่มปริมาณกลูโคซิโนเลทในบร็อคโคลี่ได้ (López-Berenguer *et al.*, 2008) นอกจากนี้ความเครียดที่เกิดจากเกลียยังมีอิทธิพลต่อการเผาผลาญอาหารในพืช และยังคงแสดงให้เห็นว่าปริมาณของกลูโคซิโนเลทในเรดิช (Yuan

et al., 2010) และบร็อคโคลี่ (López-Berenguer *et al.*, 2008) สามารถเปลี่ยนแปลงได้โดยการใช้โซเดียมคลอไรด์ นักวิจัยพบว่าการใช้สารโซเดียมคลอไรด์มีผลต่อปริมาณกลูโคซิโนเลทในบร็อคโคลี่ และหัวไชเท้าโดยความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์มีความสำคัญต่อการสะสมหรือการสลายไปของกลูโคซิโนเลท ในรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ López-Berenguer *et al.* (2008); Guo *et al.* (2013) รายงานว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงบร็อคโคลี่ในโซเดียมคลอไรด์ 40 มิลลิโมลาร์ และ 80 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์สามารถเพิ่มปริมาณกลูโคซิโนเลทของต้นอ่อนบร็อคโคลี่ที่อายุ 20 วันได้ ซึ่งมีปริมาณซัลโฟราเฟนและกลูโคราฟานินสูงและมีกิจกรรมของเอนไซม์ไมโรซิเนสที่สูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 160 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้นยังช่วยการงอกของหัวไชเท้าได้อย่างดี (Yuan *et al.*, 2010) ดังนั้นกลไกการควบคุมกลูโคซิโนเลทภายใต้ความเค็มจึงมีความซับซ้อนอยู่ (Martínez-Ballesta *et al.*, 2013) นอกจากนี้งานวิจัยของ Yuan *et al.* (2010) พบว่า 10 มิลลิโมลาร์ และ 50 มิลลิโมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์ช่วยเพิ่มน้ำหนักสดของ ต้นอ่อนของเรดิช ซึ่งอาจเป็นเพราะมี Na^+ และ Cl^- ไอออนทำให้ต้นอ่อนสามารถปรับตัวให้เข้ากับความเครียดออสโมซิสและปล่อยให้มีการเจริญเติบโตของกะหล่ำ (Yuan *et al.*, 2009)

Ca^{2+} มีความสำคัญต่อการถ่ายโอนสัญญาณในพืช เป็นตัวเชื่อมโยงระหว่าง Calmodulin protein (CaM) และโปรตีนไคเนสส์ (Protein Kinase) เป็นเป้าหมายของการส่งสัญญาณเพื่อควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Tuna *et al.*, 2007) นอกจากนี้ Ca^{2+} ยังช่วยเพิ่มการสะสมของสารทุติยภูมิในพืชภายใต้สภาวะธรรมชาติหรือความเครียด ตัวอย่าง เช่น Ca^{2+} เพิ่มการสังเคราะห์สารฟีนอลิกและแอนโทไซยานินในแครอท (Singh & Singh, 2012) กลไกความเครียดของพืชนอกเหนือจากการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา การตอบสนองต่อความเครียดนี้จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกันในกระบวนการเปลี่ยนแปลงทุติยภูมิซึ่งส่งผลให้เกิดการสะสมของสารพิษทุติยภูมิ นอกจากนี้รายงานก่อนหน้านี้ของ Yang *et al.* (2016) ระบุว่าการใช้แคลเซียมคลอไรด์ช่วยเพิ่มคุณสมบัติทางชีวเคมีในสังเคราะห์กลูโคซิโนเลทโดยการเสริมสร้างยีน BrST5b (sulfotransferase 5b) และยีน BrAOP2 (2-oxoglutarate-dependent dioxygenase 2) ให้มีการแสดงออก (Verkerk *et al.*, 2009) ยังตรวจพบยีนหลายตัวรวมทั้ง BrST, BrFMOGSOX ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กลูโคซิโนเลทด้วย ในรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Yang *et al.* (2016) พบว่าเมื่อให้ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์เป็น 10 มิลลิโมลาร์ช่วยเพิ่มปริมาณกลูโคซิโนเลท จากชุดควบคุม 1.7 เท่า แสดงผลของความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ต่อปริมาณกลูโคซิโนเลทในบร็อคโคลี่

จากตารางที่ 2 GSLs คือ กลูโคซิโนเลท 4HGB คือ 4 ไฮดรอกซี กลูโคบราสสิซิน (4-hydroxy glucobrassicin); GB คือ กลูโคบราสสิซิน (glucobrassicin) 4MGB คือ 4 เมทอกซี กลูโคบราสสิซิน (4-methoxy glucobrassicin); GNA คือ ออกกลูโคนาพิน (gluconapin) GRA คือ กลูโคราฟานิน (glucoraphanin) GER คือ กลูโคอีรูซิน (glucoerucin) และ ND คือ ตรวจไม่พบ

ตารางที่ 2 ผลของความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ต่อปริมาณกลูโคซิโนเลทในบร็อกโคลี่

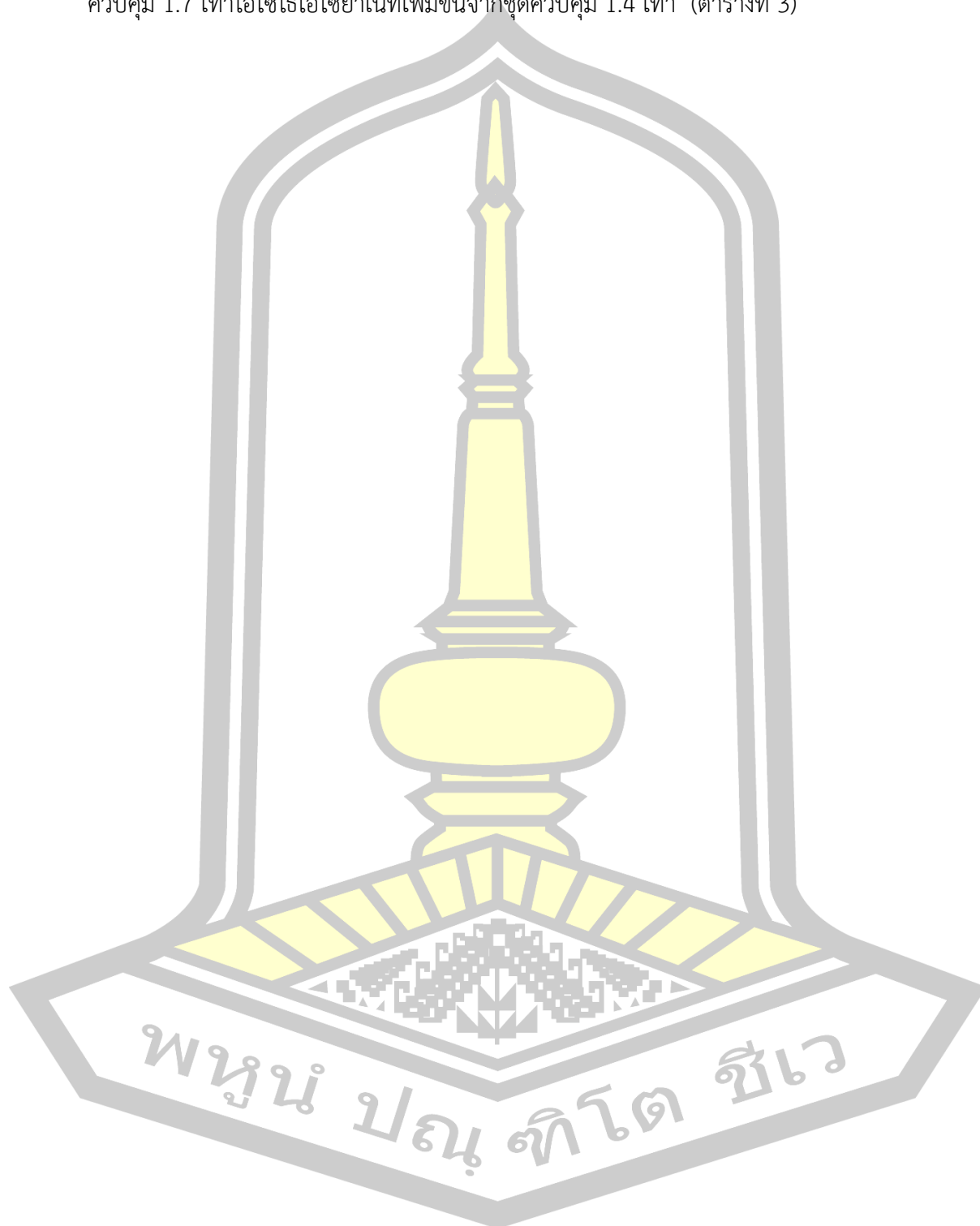
กลูโคซิโนเลท	ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์			
	0 มิลลิโมลาร์	5 มิลลิโมลาร์	10 มิลลิโมลาร์	15 มิลลิโมลาร์
GB	02 ±0.00 ^b	0.03 ±0.00 ^a	0.03 ±0.00 ^a	0.00 ±0.00 ^b
4MGB	0.02 ±0.00 ^b	0.06 ±0.00 ^a	0.05 ±0.00 ^a	0.02 ±0.00 ^b
GNA	0.29 ±0.04 ^c	0.43 ±0.01 ^a	0.30 ±0.04 ^b	0.021±0.00 ^c
GRA	ND	ND	0.01 ±0.00 ^a	0.00 ±0.00 ^b
GER	1.40 ±0.05 ^b	2.19 ±0.08 ^a	2.38 ±0.10 ^a	1.42 ±0.09 ^b
4HGB	1.99 ±0.06 ^b	3.48 ±0.09 ^a	3.40 ±0.11 ^a	1.98 ±0.12 ^b
Total GSL	0.24 ±0.00 ^b	0.65 ±0.03 ^a	0.55 ±0.04 ^a	0.28 ±0.07 ^b

ที่มา: Yang *et al.* (2016)

การเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีนสำหรับการสังเคราะห์กลูโคซิโนเลทและการแสดงออกของยีนผลิตเอนไซม์ไมโรซิเนสจะช่วยเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ไมโรซิเนส ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของไอโซไซโทไอชยานะที่ เกิดจากการให้แคลเซียมคลอไรด์เป็นผลมาจากการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์และการย่อยสลายกลูโคซิโนเลท จากรายงานของ Guo *et al.* (2011b) พบว่าหลังการให้ซูโครส 176 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ในต้นงอกบร็อกโคลี่ มีการเพิ่มขึ้นของอะลิฟาติกกลูโคซิโนเลทรวม เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 44.7 เปอร์เซ็นต์ กลูโคซิโนเลทรวมเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 45.1 เปอร์เซ็นต์ ซัลโฟราเฟนเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 29 เปอร์เซ็นต์ และ ให้ซูโครส 146 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 5 วันกลูโคราฟานินเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 51.1 เปอร์เซ็นต์

จากรายงาน Baenas *et al.* (2014) การให้ซูโครส 146 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 5 วันต้นงอกบร็อกโคลี่กลูโคราฟานินจาก 183 มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม เพิ่มขึ้นเป็น 294 มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม จากรายงาน Natella *et al.* (2016) รายงานว่าการให้ให้โซเดียมคลอไรด์ 176 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 5 วัน ในต้นงอกบร็อกโคลี่ กลูโคซิโนเลทรวมเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุมเป็น 82 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในรายงานของ Guo *et al.* (2013) พบว่าให้โซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์เป็น เวลา 7 วันต้นงอกบร็อกโคลี่ ซัลโฟราเฟนเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 2.1 เท่า รายงานวิจัย Esfandiari *et al.* (2017b) รายงานว่าการให้ให้โซเดียมคลอไรด์ 160 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 7 วันในต้นงอกบร็อกโคลี่ ซัลโฟราเฟนเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 6 เท่า และรายงานของ Yang *et al.* (2016) พบว่าการให้

แคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 9 วันในต้นงอกบร็อกโคลี่ กลูโคซิโนเลทเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 1.7 เท่าไอโซโทไอโซยานาเนทเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 1.4 เท่า (ตารางที่ 3)



ตารางที่ 3 ผลของการใช้สารกระตุ้นอินทรีย์ในบรีดโคเคิลต่อปริมาณสารกลูโคซิโนเลท และไอโซไธยาเนท

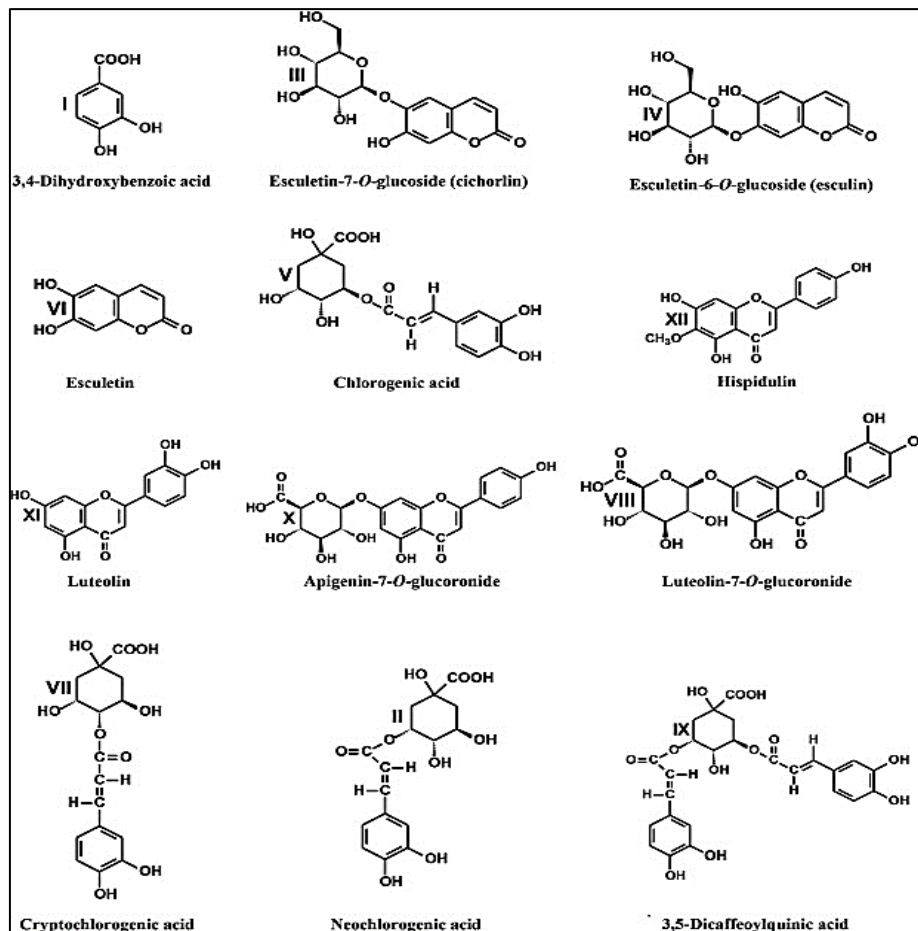
การทดลอง	ชื่อผู้ศึกษา	กลูโคซิโนเลท	ไอโซไธยาเนท	Reference
ให้ซูโครส 176 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน	ต้นนอกบรีดโคเคิล	อะลฟาดิกกลูโคซิโนเลทรวมเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 44.7%	ซัลโฟราเฟนเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 29%	Guo et al. (2011)
ให้ซูโครส 146 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 5 วัน	ต้นนอกบรีดโคเคิล	กลูโคซิโนเลทรวมเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 45.1%	-	Guo et al. (2011b)
ให้ซูโครส 146 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 5 วัน	ต้นนอกบรีดโคเคิล	กลูโคราฟานินเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 51.1%	-	Baenas et al. (2014)
ให้ไซเตียมคลอไรด์ 176 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 5 วัน	ต้นนอกบรีดโคเคิล	กลูโคราฟานินจาก 183 มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม เพิ่มขึ้นเป็น 294 มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม	-	Natella et al. (2016)
ให้ไซเตียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน	ต้นนอกบรีดโคเคิล	กลูโคซิโนเลทรวมเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุมเป็น 82%	ซัลโฟราเฟนเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 2.1 เท่า	Guo et al. (2013)
ให้ไซเตียมคลอไรด์ 160 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน	ต้นนอกบรีดโคเคิล	-	ซัลโฟราเฟนเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 6 เท่า	Esfandiari et al. (2017)
ให้แคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 9 วัน	ต้นนอกบรีดโคเคิล	กลูโคซิโนเลทเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 1.7 เท่า	ไอโซไธยาเนทเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 1.4 เท่า	Yang et al. (2016)
ให้แคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 10 วัน	ต้นนอกบรีดโคเคิล	อะลฟาดิกกลูโคซิโนเลท กลูโคซิโนเลทอีรูซิน เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 35% 42% ตามลำดับ	-	Lu et al. 2017)
ให้แคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน	ต้นนอกบรีดโคเคิล	กลูโคซิโนเลทเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 174.09 มิลลิโมลาร์ ต่อ 10 ต้นงอก	ไอโซไธยาเนทเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 3.54 ไมโครโมลาร์ต่อ 10 ต้นงอก	Tian et al. (2016)
ให้แคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 10 วัน	ต้นนอกบรีดโคเคิล	กลูโคซิโนเลทเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 51.62 ไมโครโมลาร์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เป็น 56.99 ไมโครโมลาร์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง	-	Sun et al. (2015)

2.9 สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds)

สารโพลีฟีนอลจัดเป็นสารทุติยภูมิหรือสารพิษเคมีที่พืชสร้างขึ้นตามส่วนต่างๆของพืช เพื่อทำหน้าที่ต่างๆ รวมทั้งปกป้องตัวเองจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ต้านแบคทีเรีย ต้านรา ต้านแมลง ต้านรังสียูวีจากแสงแดด กำจัดโลหะหนัก และต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์แสงหรือสภาวะเครียด สารประกอบฟีนอลมีลักษณะเป็นโมเลกุลรูปร่างวงแหวนฟีนอลเชื่อมต่อกันเป็นสารประกอบโมเลกุลใหญ่ โมเลกุลเป็นรูปร่างวงแหวนฟีนอลเพียงวงเดียว ที่มีหมู่แอลกอฮอล์ หมู่อัลดีไฮด์ หรือหมู่คาร์บอกซิลิกมาเชื่อมต่อกับวงแหวนฟีนอล พบมากกว่า 8,000 ชนิด ซึ่งจำแนกตามโครงสร้างออกเป็น 5 ประเภทขึ้นอยู่กับจำนวนของวงแหวนฟีนอล (ภาพที่ 17) และองค์ประกอบอื่นของโครงสร้างที่เชื่อมวงแหวนดังกล่าว (มณฑนา วีระวัฒนากร, 2013) ได้แก่

1. ไดเฟอรูลอยล์มีเทน (Diferuloylmethane)
2. สติลเบน (Stilbenes)
3. ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)
4. กรดฟีนอลิก (Phenolic acids)
5. แทนนิน (Tannins)





ภาพที่ 17 โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิก

ที่มา: Farid *et al.* (2018)

โพลีฟีนอลเป็นสารพบมากที่สุดในพื้นที่และได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน ถึงแม้ว่าโพลีฟีนอลไม่จัดเป็นสารอาหารตามเนื่องจากไม่ให้พลังงานโดยตรงหรือไม่เป็นสารช่วยให้เกิดพลังงานและไม่ช่วยในด้านการเจริญเติบโตของร่างกาย แต่สารมีส่วนช่วยในด้านต่างๆ ของร่างกาย รักษาโรคต่างๆ มากมาย โดยเฉพาะการป้องกัน โรคหัวใจ โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคความจำเสื่อม โรคมะเร็ง อีกทั้งนำมาใช้ในการชะลอความเสื่อมของเซลล์ต่างๆ ของร่างกาย มีคุณสมบัติในการต้านแบคทีเรีย การต้านการอักเสบ และมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย (มณฑนา วีระวัฒนากร, 2013)

จากรายงานวิจัยก่อนหน้าของ Loreti *et al.* (2008) รายงานว่าผักกาดหอมพันธุ์เรดโอ๊ค เป็นผักที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงมีปริมาณแอนโทไซยานินและสารประกอบฟีนอลิกรวมคือ 25.90 และ 322.10 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด นอกจากนี้ยังงานวิจัยของ นันท์นภัส เต็มวงศ์, (2551)

พบว่ากะหล่ำม่วงและผักกาดขาวมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 73.1, 6.1 มิลลิโมลาร์กรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสดตามลำดับ

ในรายงานก่อนหน้านี้ Lafarga *et al.* (2018) ทำการศึกษาที่มีวัตถุประสงค์เพื่อหาปริมาณสารประกอบฟีนอลในส่วนต่างๆ ของผักตระกูลผักกะหล่ำพบปริมาณฟีนอลิกสูงสุดในใบสดซึ่งมีปริมาณฟีนอลิกรวม 158.8 ± 3.5 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ผลที่ได้นี้สูงกว่าเมื่อเทียบกับรายงานของ Leja *et al.* (2001) ที่พบในบร็อคโคลี่มีปริมาณฟีนอลิก 56.2 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด ผลการวิจัยที่คล้ายกันนี้รายงานโดย Zhang & Hamazu, (2004) ที่พบปริมาณฟีนอลิก 34.5 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด จากรายงานวิจัยก่อนหน้า Oniszczuk & Olech, (2016) ได้ทำการวิเคราะห์ กรดฟีนอลิกจาก *Brassica oleracea* L. Var. sabellica พบว่ามีกรดฟีนอลิกทั้งหมด 13 ชนิด ได้แก่ Protocatechuic acid, 4-OH-benzoic acid, Vanilic acid, trans-Caffeic acid, cis-Caffeic acid, trans-p-Coumaric acid, cis-p-Coumaric acid, trans-Ferulic acid, Salicylic acid, 3-OH-cinnamic acid, cis-Ferulic acid, trans-Sinapic acid และ cis-Sinapic acid

2.10 สารประกอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

ฟลาโวนอยด์เป็นกลุ่มของสารประกอบ ที่มีโครงสร้างพื้นฐานเป็นฟีนิลเบนโซไพโรน (phenylbenzopyrones) ซึ่งมีโมเลกุลขนาดเล็กและมีโครงสร้างประกอบ ด้วยการจัดเรียงตัวของคาร์บอน 15 ตัว (C6 - C3 - C6) เป็น วงแหวน 3 วง ได้แก่ วงแหวนเบนซีน (benzene ring) 2 วง (A and B) เชื่อมต่ออยู่กับวงแหวนไพแรน (heterocyclic pyran ring) ซึ่งอยู่ตรงกลางของโครงสร้าง C8 (ภาพที่ 18) โดยสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยตามตำแหน่งของหมู่ฟังก์ชัน ซึ่งแทนที่ในโครงสร้างพื้นฐานได้เป็น 7 กลุ่ม ได้แก่

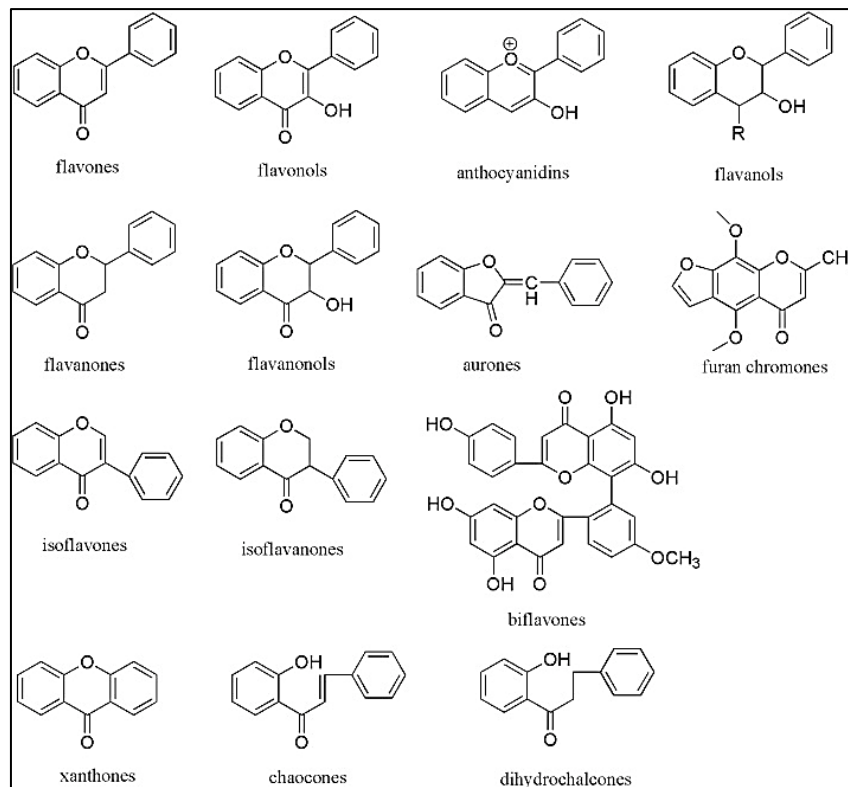
1. ฟลาโวนอล (flavonols) เช่น เคอร์ซีติน (quercetin) แคมป์เฟอรอล (kaempferol) ไมริซิติน (myricetin)
2. ฟลาโวน (flavones) เช่น ลูทีโอลิน (luteolin), อาพิจินิน (apigenin) ไครซิน (chrysin)
3. ฟลาวาโนน (flavanones) เช่น เฮสเพอริติน (hesperetin) นารินจินิน (naringenin) อีริโอดีคทีออล (eriodictyol)
4. ฟลาวานอล (flavanols) เช่น แคทิจิน (catechin), แกลโลแคทิจิน (gallocatechin) อีพิกัติจิน (epicatechin) อีพิกัลโลแคทิจิน (epigallocatechin) อีพิกัติจิน-3-แกลเลต (epicatechin-3-gallate) อีพิกัลโลแคทิจิน-3-แกลเลต (epigallocatechin-3-gallate)
5. ฟลาวาโนนอล (flavanonols) เช่น แทกซิโฟลีน (taxifolin)

6. ไอโซฟลาโวน (isoflavones) เช่น เดดซีน (daidzein), จีนิสตี (genistein) ไกลซีทีน (glycitein) ฟอร์โมนอนเนติน (formononetin)

7. แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins) เช่น ไชยานิดิน (cyanidin), เดลฟินิดิน (delphinidin) มาลวิดิดิน (malvidin) เปลาร์โกนิดีน (pelargonidin) พีโอนิดิน (peonidin) พิทูนิดีน (petunidin)

จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Thomas *et al.* (2018) ได้ทำการศึกษาศึกษาคุณลักษณะของสารจากพืชตระกูลกะหล่ำ พบว่าปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม 2.4 ± 0.1 ถึง 5.4 ± 0.6 มิลลิกรัมเคอซีตินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Lin & Tang, (2006) พบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในการศึกษานี้อยู่ในช่วง 0.4-13.3 มิลลิกรัมเคอซีตินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง จากผลรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Jaiswal *et al.* (2012) พบปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 17.5 มิลลิกรัมเคอซีตินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง แต่สูงกว่าค่าที่รายงานโดย Koh *et al.* (2009) ซึ่งพบปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด 0.003-1.1 มิลลิกรัมเคอซีตินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในบร็อคโคลี่ ปริมาณฟลาโวนอยด์ที่พบในเมล็ดของบร็อคโคลี่พบปริมาณ 0.17 ± 0.01 ถึง 0.67 ± 0.01 มิลลิกรัมเคอซีตินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ยังพบรายงานวิจัยของ Harbaum *et al.* (2007) ทำการศึกษาชนิดของฟลาโวนอยด์ซึ่งพบใน *Brassica campestris* L. ssp. โดยวิธี HPLC-DAD-ESI-MS ซึ่งพบ 11 อนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์ 17 อนุพันธ์ของ hydroxycinnamic acid พบฟลาโวนอยด์ที่สำคัญอยู่ 3 กลุ่ม คือ isorhamnetin, Hydroxycinnamic acid และ esters (quinic acid, glycosides, และ malic acid)

พจน ปรณ ทิโต ชีเว



ภาพที่ 18 โครงสร้างทางเคมีและการจำแนกฟลาโวนอยด์
ที่มา : Wang *et al.* (2017)



บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อาหาร สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย

ตารางที่ 4 สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย

รายการสารเคมี	รุ่น / บริษัทผู้ผลิต / ประเทศ
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	Ajax Finechem Pty Ltd, Australia and New Zealand
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	Ajax Finechem Pty Ltd, Australia and New Zealand
เมทานอล (CH ₃ OH)	BDH (Poole, UK)
เมทานอล (C ₂ H ₅ OH)	BDH (Poole, UK)
ไดคลอโรมีเทน (CH ₂ Cl ₂)	BDH (Poole, UK)
กรดอะซิติก (CH ₃ COOH)	Ajax Finechem Pty Ltd, Australia and New Zealand
ซูโครส (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	Fluka / USA
โซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO ₃)	Ajax Finechem Pty Ltd,
แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl ₂)	Ajax Finechem Pty Ltd, Australia and New Zealand
โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O)	BDH Prolabo, UK
ไดโซเดียมไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต ไดเดคะไฮเดรต (Na ₂ HPO ₄ •12H ₂ O)	Ajax Finechem Pty Ltd, Australia and New Zealand
แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO ₄)	Ajax Finechem Pty Ltd, Australia and New Zealand
โซเดียมอะซิเตรต (CH ₃ COONa•3H ₂ O)	Ajax Finechem Pty Ltd, Australia and New Zealand
กรดซิตริก (C ₆ H ₁₀ O ₈)	Ajax Finechem Pty Ltd, Australia and New Zealand

ตารางที่ 4 สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย (ต่อ)

รายการสารเคมี (ต่อ)	รุ่น / บริษัทผู้ผลิต / ประเทศ
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	Ajax Finechem Pty Ltd, Australia and New Zealand
ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4)	BDH Prolabo, UK
เฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)	BDH (Poole, UK)
2,4,6-ไตร(2-ไพริดีล)-1,3,5-ไตรอะซีน (TPTZ)	Fluka Chemical Co.
เบนซีน 1,2 ไดไธออล (Benzene 1,2 dithiol)	Sigma / Germany
เบนซิลไอโซโธไซยานาท (BITC)	Sigma / Germany
2,2-ไดฟีนิล-1-พิกิลไฮดราซิลไฮเดรต (DPPH)	Fluka Chemical Co.
โฟลีน-ไซโอแคลทู (Folin Ci-ocalteu)	Fluka Chemical Co., USA
โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)	Ajax Finechem Pty Ltd, Australia and New Zealand
อลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3 \cdot 6H_2O$)	Ajax Finechem Pty Ltd, Australia and New Zealand
โทรล็อกซ์ (Trolox)	Fluka Chemical Co.
เฟอร์รัส ซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	Ajax Finechem Pty Ltd,
กรดแกลลิก (Gallic acid)	Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
รูติน (Rutin)	Sigma / Germany
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco / USA
Fetal bovine serum (FBS)	Gibco / USA
เพนิซิลลิน-สเตรปโตมัยซิน	Gibco / USA
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide (MTT)	Sigma / Germany
เอนไซม์ทริปซิน อีดีทีเอ (Trypsin EDTA)	Gibco / USA
ทริปแฟนบลู (Trypan blue)	Gibco / USA
ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)	BDH (Poole, UK)

ตารางที่ 4 สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย (ต่อ)

รายการวัสดุและเครื่องมือ	รุ่น / บริษัทผู้ผลิต / ประเทศ
ฟลั๊กเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell tissue culture flasks)	Cole-parmer / USA
ขวดเก็บตัวอย่าง (Chemical Bottle)	Duran made / Germany
หลอดทดลอง (Tube)	Pyrex / USA
บีกเกอร์ (Beaker)	Pyrex / USA
เครื่องดูดจ่ายสารละลายขนาดเล็ก (Micropipette)	Finnpipette F1 / Thermo scientific / Finland
ทิป (Tip)	Finn / Thermo scientific / Finland
เครื่องไมโครเวฟ	Sharp / Japan
ตู้เก็บตัวอย่าง -20 องศาเซลเซียส (Freezer -20 °C)	Panasonic / Thailand
เครื่อง (Blender machine)	MX-900M / Panasonic
เครื่องชั่งแบบละเอียด (Analytical Balance)	Presica 25A / Switzerland
เพลต 96 หลุม (96 well plate)	Cole-parmer / USA
เครื่องผสมตัวอย่าง (Vortex mixer)	Harmony / Japan
เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter)	Mettler Toledo FiveEASYSPlus / FEP20
ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)	Binder / Germany
ตู้อบ (CO ₂ Incubator)	Binder / Germany
เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator)	Buchi R-114 / Switzerland
เครื่องบ่มแบบเขย่า (Shaking Incubators)	LSI-1005R / LabTech / Korea
เครื่องเหวี่ยงหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)	Universal 320R / Germany
เครื่องอ่านค่าไมโครเพลต (Microplate reader)	M965 / mastertech/ Taiwan
เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dehydration)	Heto PowerDry PL3000 / Czech Republic
เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS)	QP2010 / Shimadzu / Japan

3.2 การเตรียมทริตยเมล็ดพันธุ์ด้วยพลาสติกและทำให้สารกระตุ้นอินทรีย์

เมล็ดยี่หวุ่นน้อย (*Brassica juncea* (L.) Czern. et Coss) พันธุ์ล้านนา ตราครแดง และ เมล็ดผักชีหูด (*Raphanus sativus* var. *caudatus*) พันธุ์ถิ่นไท ตราครแดง ซึ่งมาจากร้านค้าออนไลน์พันธุ์ทวีมอลล์ (<https://www.pwcmallonline.com>) (Lot. No 304333 สิ้นอายุพันธุ์ 18/03/2563) ทำการเตรียมเมล็ดพันธุ์แต่ละชนิด จำนวน 100 เมล็ดต่อหนึ่งทริตเม้นท์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเตรียมชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการทริต จำนวน 100 เมล็ด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ทำการศึกษาอิทธิพลของการใช้เทคโนโลยีพลาสมาเย็นและสารกระตุ้นอินทรีย์ ได้แก่ ผักกาดเขียวอ่อนให้พลาสมาเย็น 19 กิโลโวลต์ เป็นเวลา 5 นาที และผักขี้หูดให้พลาสมาเย็น 21 กิโลโวลต์ เป็นเวลา 5 นาที ให้สารละลายที่แตกต่างกันได้ ซูโครส 176 มิลลิโมลาร์ ตามรายงานก่อนหน้า นี้ของ Guo *et al.* (2011b) โซเดียมคลอไรด์ 160 มิลลิโมลาร์ ตามรายงานก่อนหน้า นี้ของ Esfandiari *et al.* (2017) และแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ ตามรายงานก่อนหน้า นี้ของ Yang *et al.* (2016) (ตารางที่ 5) สามารถกระตุ้นให้มีการเพิ่มขึ้นของกลูโคซิโนเลท ไอโซไรโอโซยานาเทและฤทธิ์ทางชีวภาพในบร็อคโคลี่ได้จึงทำการเลือกมาใช้ในงานวิจัยของเราต่อไป

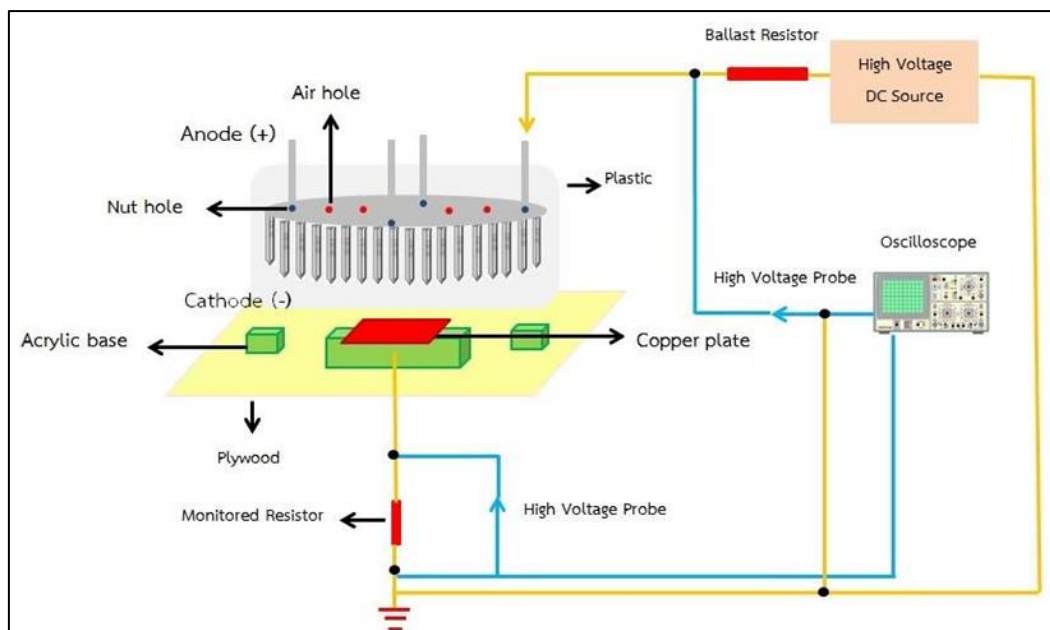
สำหรับการทรีตเมนต์ด้วยเทคโนโลยีพลาสมาเย็น จะดำเนินการ ณ ห้องปฏิบัติการ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จังหวัดนครนายก โดยใช้เมล็ดพันธุ์แต่ละชนิด จำนวน 100 เมล็ดต่อหนึ่งทรีตเมนต์ มาทำการทรีตต์ด้วยเทคโนโลยีพลาสมาเย็นตามวิธีของ Matra, (2016) โดยกาดเขียวอ่อนให้พลาสมาเย็น 19 กิโลโวลต์ เป็นเวลา 5 นาที และผักขี้หูดให้พลาสมาเย็น 21 กิโลโวลต์ เป็นเวลา 5 นาที เพราะจากการวิเคราะห์เบื้องต้นของเราพบว่าผักกาดเขียวอ่อนที่ให้พลาสมาเย็น 19 กิโลโวลต์ เป็นเวลา 5 นาที และผักขี้หูดที่ให้พลาสมาเย็น 21 กิโลโวลต์ เป็นเวลา 5 นาที ช่วยเพิ่มความยาว น้ำหนักแห้ง ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระแะยีนละสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่เพิ่มขึ้นดีที่สุดและที่สำคัญยังพบชนิดของสารไอโซไรโอโซยานาเทชนิดราฟาซาติน (4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate ;Raphasatin) จากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS ซึ่งแสดงผลการทดลองดังหัวข้อที่ 4.1



ตารางที่ 5 แสดงสภาวะการทดลองในการทรีตเมนต์ผักกาดเขียวอ่อนและผักชีหูด

ชุดการทดลอง	การทรีตเมนต์ด้วยพลาสมาเย็น	สารกระตุ้นอินทรีย์
ชุดควบคุม ปรีอคโคลี	-	น้ำกลั่น
1 ผักกาดเขียวอ่อน	-	น้ำกลั่น
2 ผักกาดเขียวอ่อน	19 กิโลโวลต์ เป็นเวลา 5 นาที	น้ำกลั่น
3 ผักกาดเขียวอ่อน	19 กิโลโวลต์ เป็นเวลา 5 นาที	ซูโครส 176 มิลลิโมลาร์
4 ผักกาดเขียวอ่อน	19 กิโลโวลต์ เป็นเวลา 5 นาที	โซเดียมคลอไรด์ 160 มิลลิโมลาร์
5 ผักกาดเขียวอ่อน	19 กิโลโวลต์ เป็นเวลา 5 นาที	แคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์
6 ผักกาดเขียวอ่อน	-	ซูโครส 176 มิลลิโมลาร์
7 ผักกาดเขียวอ่อน	-	โซเดียมคลอไรด์ 160 มิลลิโมลาร์
8 ผักกาดเขียวอ่อน	-	แคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์
1 ผักชีหูด	-	น้ำกลั่น
2 ผักชีหูด	21 กิโลโวลต์ เป็นเวลา 5 นาที	น้ำกลั่น
3 ผักชีหูด	21 กิโลโวลต์ เป็นเวลา 5 นาที	ซูโครส 176 มิลลิโมลาร์
4 ผักชีหูด	21 กิโลโวลต์ เป็นเวลา 5 นาที	โซเดียมคลอไรด์ 160 มิลลิโมลาร์
5 ผักชีหูด	21 กิโลโวลต์ เป็นเวลา 5 นาที	แคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์
6 ผักชีหูด	-	ซูโครส 176 มิลลิโมลาร์
7 ผักชีหูด	-	โซเดียมคลอไรด์ 160 มิลลิโมลาร์
8 ผักชีหูด	-	แคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์

ภาพที่ 19 แสดงส่วนประกอบของเครื่องสร้างพลาสมาอุณหภูมิต่ำที่สภาวะบรรยากาศที่ได้ทำการออกแบบไว้ในเบื้องต้น ในงานวิจัยนี้เลือกที่จะใช้อากาศ ในการสร้างพลาสมา ส่วนแอโนดจะใช้แผ่น ปรีนทีไชปลา 3 แผ่นซ้อนทับกันแล้วตัดเป็นวงกลมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 16 เซนติเมตร จากนั้นยึดเข็มปลายแหลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตร เข้ากับแผ่นปรีนทีไชปลาโดยใช้วิธีการบัดกรีตะกั่วโดยวางเข็มรูไว้รูเพื่อให้มีรูว่างให้อากาศไหลผ่านทั่วถึงเครื่องต้นแบบ ส่วนแคโทดใช้แผ่นทองแดงตัดเป็นสี่เหลี่ยมเป็นตัวนำ โดยใช้แผ่นอะคริลิกเป็นฐานสำหรับวางแผ่นทองแดง โดยที่แอโนดจะถูกเชื่อมต่อกับตัวต้านทานจำกัดกระแส (ballast resistor) ขนาด 30 เมกะโอห์ม ซึ่งต่ออนุกรมอยู่กับแหล่งจ่ายไฟฟ้าแรงดันสูง (high voltage power supply)



ภาพที่ 19 เครื่องสร้างลำพลาสมาอุณหภูมิต่ำที่สภาวะบรรยากาศ
ที่มา : Matra, (2016)

เมื่อป้อนแรงดันไฟฟ้าจากแหล่งจ่ายไฟกระแสตรงแรงดันสูง (HIGH VOLTAGE POWER SUPPLY, Matsusada, AU-30P10) เกินขนาดค่าแรงดันเบรกดาวน์ (breakdown voltage) ของแก๊สที่ใช้ แก๊สจะเปลี่ยนสถานะเป็นพลาสมา โดยลักษณะทางไฟฟ้าของพลาสมา (plasma characteristics) รูปคลื่นแรงดันและกระแสดิซชาร์จ (discharge voltage and current waveforms) จะถูกสำรวจโดยเครื่องออสซิลอโคป (Oscilloscope, SIGLENT SDS 2304) โดยรูปคลื่นกระแสดิซชาร์จจะถูกวัดผ่านตัวต้านทานขนาดเล็ก (monitored Resistor) ที่ต่อคั่นไว้ระหว่างอิเล็กโทรดขึ้นล่างและสายดิน (Matra, 2016) จากนั้นซึ่งน้ำหนักของเมล็ดที่ฉายพลาสมาทุกทริตเมนต์ เก็บเมล็ดผักไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนทำการทดลองต่อไป

3.4 การเพาะปลูกเมล็ดพันธุ์

ดำเนินการทดลองตามรายงานก่อนหน้านี้นี้ของ Yang *et al.* (2016) โดยล้างเมล็ดพันธุ์ด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง และแช่เมล็ดในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ซึ่งน้ำหนักของเมล็ดผักที่ผ่านการแช่น้ำ จากนั้นนำเมล็ด 100 เมล็ดต่อหนึ่งทริตเมนต์มาวางในระยะห่างที่เท่าๆ กัน ในสภาพเพาะปลูกพลาสติกที่รองด้วยวัสดุเพาะปลูกเวอร์มิคูไลท์ (vermiculite) ที่ปลอดเชื้อ ณ ห้องเพาะปฏิบัติการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จากนั้นสเปรย์น้ำกลั่น (ชุดควบคุม) หรือสารกระตุ้นอินทรีย์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตรบน

เมล็ดพันธุ์ทุกเมล็ดหรือใบอ่อนให้ทั่วทุกต้น ทุกๆ 12 ชั่วโมง ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ควบคุมการให้แสงความเข้มข้น 42 ไมโครโมลต่อวินาทีต่อตารางเมตรเป็นเวลา 12 ชั่วโมงและความมืด 12 ชั่วโมงต่อวัน จนครบ 7 วัน ทำการเก็บไมโครกรีนต่อไป

3.5 การวิเคราะห์ผล

ทำการเก็บไมโครกรีนเมื่ออายุได้ 7 วันใช้กรรไกรตัดลำต้นบริเวณเหนือรากขึ้นมา 1 เซนติเมตร หาเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด วัดความยาวของลำต้น และชั่งน้ำหนักสด และเก็บในถุงโพลีไสตรีน และแช่แข็งที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส (Panasonic / Thailand) จนกว่าจะนำวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

3.6 การวิเคราะห์สารไอโซโทโอไซยานเท

สกัดตัวอย่างไมโครกรีนดำเนินการตามวิธีของ Luang-In *et al.* (2018); Saengha *et al.* (2019) นำตัวอย่างไมโครกรีนที่ทำแห้งด้วยวิธีเยือกแข็ง (Freeze-dried) ปริมาณ 250 มิลลิกรัมผสมกับสารละลายซิเตรต-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Citrate-phosphate buffer) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.0 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงด้วยเครื่องบ่มเขย่า (shaking incubator, LSI-1005R / LabTech / Korea) ความเร็ว 250 รอบต่อนาที จากนั้นเติมไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane ;DCM) ในอัตราส่วน 1:1 เพื่อทำการสกัดสารไอโซโทโอไซยานเทให้มาอยู่ในชั้นของไดคลอโรมีเทน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาทีด้วยเครื่องบ่มเขย่า ความเร็ว 250 รอบต่อนาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที (Centrifuge, Universal 320R / Germany) ปิเปตเอาส่วนใสชั้นล่างซึ่งเป็นชั้นของไดคลอโรมีเทนผสมแมกนีเซียมซัลเฟตปริมาณ 0.5 กรัม เพื่อกำจัดความชื้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณและชนิดของสารไอโซโทโอไซยานเทในขั้นตอนต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณของสารไอโซโทโอไซยานเททั้งหมดตามรายงานก่อนหน้านี้นี้ของ Lola-Luz *et al.* (2014); Amron & Konsue, (2018); Saengha *et al.* (2019) นำส่วนใสเจือจางในเมทานอลในอัตราส่วน 1:4 (ตัวอย่าง:เมทานอล) โดยปิเปตเมทานอลปริมาตร 90 ไมโครลิตรลงในเพลต 96 หลุม (96 well plate) ผสมกับตัวอย่างที่เจือจางแล้วปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 8.0 ปริมาตร 90 ไมโครลิตรแล้วเติม 0.08 โมลาร์เบนซีน 1,2 ไดไธออล (Benzene 1,2 dithiol) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมงจากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตรโดยใช้เครื่องอ่านถาดไมโครเพลท (Microplate reader M965, Mastertech,Taiwan) คำนวณปริมาณสารไอ

โซไรโอโซยานาทั้งหมดในหน่วยมิลลิโมลต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง (mmol/100gDW) โดยใช้กราฟมาตรฐานของสารเบนซิลโอโซไรโอโซยานาทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การวิเคราะห์หาชนิดของสารโอโซไรโอโซยานาตามขั้นตอนการวิเคราะห์หาชนิดของสารโอโซไรโอโซยานาด้วยเครื่องเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปคสเปคโตรมิเตอร์ (Gas Chromatograph Mass Spectrometer ;GCMS, QP2010/Shimadzu/Japan) ตามวิธีของ Luang-In *et al.* (2014) โดยใช้คอลัมน์ Agilent HP-5MS (5 เปอร์เซ็นต์ Phenylmethylsiloxane, 30 เมตร × 0.25 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร) ใช้แก๊สฮีเลียมเป็นตัวนำพา อุณหภูมิห้องที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเพิ่มเป็น 150 องศาเซลเซียส และ 250 องศาเซลเซียสที่อัตรา 4 องศาเซลเซียสต่อนาที รวมเวลาปฏิบัติ 40 นาทีต่อตัวอย่าง ปริมาตรของการฉีด 1 ไมโครลิตรต่อตัวอย่าง อัตราการไหล 1 มิลลิตรต่อนาที ความเร็วเฉลี่ย 36 เซนติเมตรต่อวินาที ความดันที่ 7.56 กิโลพาสคา (Kpa) ทำการวิเคราะห์หาชนิดของโอโซไรโอโซยานา โดยการเปรียบเทียบกับอ้างอิงฐานข้อมูลจากเครื่อง (Fragment Ion Fingerprint) ในแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปคสเปคโตรมิเตอร์

3.7 การวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

3.7.1 การสกัดตัวอย่างไมโครกรีน

ดำเนินการตามรายงานก่อนหน้าของ Zhang *et al.* (2016) นำตัวอย่างไมโครกรีนที่ทำแห้งด้วยวิธีเยือกแข็งมาปริมาณ 100 มิลลิกรัมผสมกับเมทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิตร บ่มด้วยเครื่องบ่มเยื่อความเร็ว 250 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมงหลังจากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาทีกรองอีกครั้งโดยใช้กระดาษกรอง Whatman No .1 และเก็บส่วนใสของตัวอย่างที่ได้ไว้ -20 องศาเซลเซียส (Panasonic / Thailand) สำหรับการวิเคราะห์ต่อไป

3.7.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด

ดำเนินการตามรายงานก่อนหน้าของ Radošević *et al.* (2017); ZThomas *et al.* (2018b) โดยมีการดัดแปลงเล็กน้อย ปิเปตตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ลงในเพลต 96 หลุม ผสมกับสารละลายฟอลิน-ไซโอแคลทู (Folin Ci-ocalteu) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นเติมโซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO₃) ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรโดยใช้เครื่องอ่านค่าไมโครเพลต คำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดจากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (Gallic acid) และรายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัม น้ำหนักแห้ง (mgGAE/gDW) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.7.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

ดำเนินการตามรายงานก่อนหน้าของ Tian *et al.* (2016) โดยมีการดัดแปลงเล็กน้อย โดยปีเปตตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 60 ไมโครลิตร ลงในเพลต 96 หลุม เติมสารละลายโซเดียมไนเตรต (NaNO_3) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และอลูมิเนียมคลอไรด์ ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งให้เกิดปฏิกิริยา 1 นาที จากนั้นเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตรโดยใช้เครื่องอ่านถาดไมโครเพลท คำนวณหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานรูติน (Rutin) และรายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมรูตินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (mg RE/g DW) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.7.4 การวิเคราะห์หากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH

ดำเนินการตามรายงานก่อนหน้าของ Zhang *et al.* (2016) โดยมีการดัดแปลงเล็กน้อย ปีเปตตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ลงในเพลต 96 หลุม เติมสารละลาย 2,2-ไดฟีนิล-1-พิกิลไฮดราซิลไฮเดรต (DPPH) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ที่ละลายในเมทานอลปริมาตร 180 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรโดยใช้เครื่องอ่านถาดไมโครเพลท คำนวณค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH ในหน่วยมิลลิกรัมโทรลออกซ์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (mg Trolox/g DW) โดยใช้กราฟมาตรฐานของสารโทรลออกซ์ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.7.5 การวิเคราะห์หากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP

ดำเนินการตามรายงานก่อนหน้าของ Wei *et al.*, (2011) โดยมีการดัดแปลงเล็กน้อย เตรียมสารละลาย FRAP (Ferric reducing antioxidant power) โดยผสมอะซิเตตบัฟเฟอร์ (Acetate buffer) pH 3.6 ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์กับเฟอร์ริกคลอไรด์ ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และ 2,4,6-ไตร (2-ไพริดีล)-1,3,5-ไตรอะซีน (TPTZ) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ในที่มืด จากนั้นทำการปีเปตตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย FRAP ปริมาตร 180 ไมโครลิตรใน ลงในเพลต 96 หลุม ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตรโดยใช้เครื่องอ่านถาดไมโครเพลท คำนวณค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP ในหน่วยมิลลิกรัมเฟอ

รัสซัลเฟต (Fell) ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (mgFe(II)/gDW) โดยใช้กราฟมาตรฐานของสารเฟอร์รัสซัลเฟต ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.8. การคัดเลือกสภาวะที่รีดิวซ์เหล็กและการให้สารกระตุ้นอินทรีย์

การคัดเลือกสภาวะที่รีดิวซ์เหล็กที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการเพิ่ม เปอร์เซ็นต์การงอก ความยาว น้ำหนักสด ปริมาณสารไอโซโพรินอีนอลิก กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ สารฟีนอลิก ทั้งหมด และปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากที่สุดไป มาปลูกเพื่อทำการทดลองขั้นต่อไป ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนโคโลนีของเซลล์มะเร็ง ศึกษาการแตกหักเสียหายของดีเอ็นเอและการแสดงออกของโปรตีน MMP 2 และ MMP 9 ในเซลล์มะเร็งต่อไป

3.9 ศึกษาผลของสารสกัดไมโครกรีนผักท้องถิ่นไทยต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง

3.9.1 การสกัดสารไอโซโพรินอีนอลิกจากไมโครกรีนสำหรับทดสอบเซลล์ไลน์

ดำเนินการตามรายงานก่อนหน้าของ Pocasap *et al.* (2013); Saengha *et al.* (2019) นำตัวอย่างต้นสดไมโครกรีนมาปริมาณ 50 กรัมผสมมาผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันในโถรงบดกับ สารละลายซีเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมงด้วยเครื่องบดแบบเขย่า ความเร็ว 250 รอบต่อนาที หลังจากนั้นเติมไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 1:1 เพื่อทำการสกัดสารไอโซโพรินอีนอลิกให้มาอยู่ในชั้น ของไดคลอโรมีเทน บดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาทีด้วยเครื่องบดแบบเขย่า ความเร็ว 250 รอบต่อนาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำ ส่วนใสที่ได้ไปทำการระเหยโดยเครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator) แล้วนำไปทำ แห้งแบบเยือกแข็งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง แล้วทำการละลายตัวอย่างกลับด้วยสารละลาย ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide ;DMSO) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

3.9.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

ดำเนินการตามรายงานก่อนหน้าของ Buranrat, Mairuae, & Konsue, (2017); Buranrat, Mairuae, & Kanchanarach, (2017) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ATCC® HTB-22™ (human breast adenocarcinoma) และเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ATCC® HB-8065™ (human hepatocellular carcinoma) ได้มาจาก American Type Culture Collections (ATCC, Manassas, VA, USA) เซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิดถูกเพาะเลี้ยงอาหาร Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ที่ผสมด้วย Fetal bovine serum ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ L-glucose 4500 มิลลิกรัมต่อลิตร L-glutamine 4 มิลลิโมลาร์ penicillin 100 ยูนิตต่อ

มิลลิลิตร และ Streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตรในฟาล์กเลี้ยงเซลล์ ขนาด 75 ลูกบาศก์เซนติเมตร บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 วันจนกว่าเซลล์จะได้ 80 เปอร์เซ็นต์ confluency จากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วย Phosphate-buffered saline (PBS) พีเอช 7.4 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร 1 ครั้ง จากนั้นทำการชะเซลล์ให้หลุดจากฟาล์กด้วยเอนไซม์ทริปซิน (Trypsin-EDTA) ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ในอัตราส่วน 1:1 เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ทริปซินจากนั้นนำปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตรวจสอบเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Inverted Microscope) โดยใช้ Hemocytometer ทำการย้อมสีเซลล์ด้วยทริปแฟนบลู (Trypan blue) เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.9.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

เซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งตับถูกนำมาทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ด้วยวิธี MTT 3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) หลักการคือ การตรวจการทำงานของเอนไซม์ สาร MTT จะเข้าไปในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตและจะถูกรีดิวส์โดยเอนไซม์ในไมโทคอนเดรียให้อยู่ในรูปของผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซาน (Formazan) ซึ่งเป็นผลึกสีม่วง อยู่ภายในเซลล์ที่มีชีวิต แล้วทำการละลาย ผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซาน ด้วยสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ และ วัดค่าการดูดกลืนแสง ใช้ความยาวคลื่นที่สัมพันธ์กับสีฟอร์มาซาน การทดสอบความเป็นพิษต่อ เซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT มีดำเนินการตามรายงานก่อนหน้านี้ของ Buranrat & Connor, (2015); Tusskorn *et al.* (2019); Saengha *et al.* (2019) ถูกทำการทดลองในไมโครเพลท 96 หลุม โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ปิเปตเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และเซลล์มะเร็งตับ HepG2 7.5×10^3 เซลล์ต่อหลุม บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเติมสารสกัดให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดอยู่ ระหว่าง 0 ถึง 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรืออาหารเลี้ยงเซลล์ (ชุดควบคุมลบ) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง เติมน้ำละลาย MTT ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ละลายด้วย PBS พีเอช 7.4 ปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงในหลุมทุกหลุม บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ต่อจากนั้นทำการแทนที่สารสกัดที่มีสารละลาย MTT ด้วย ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปิเปตขึ้นลงเพื่อทำการละลาย ผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซานให้อยู่ในรูปสารละลายสีม่วง นำไปวัดระดับการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรโดย

ใช้เครื่องอ่านถาดไมโครเพลท ทำการลบค่าสัญญาณของ Blank ก่อนที่จะคำนวณหาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเป็นค่า IC_{50} ถ้า % cytotoxicity < 50% แสดงว่า ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (Non-cytotoxic) ถ้า % cytotoxicity \geq 50% แสดงว่า เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (Cytotoxic) คำนวณหาค่า IC_{50} value ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % cytotoxicity กับ ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง

3.9.4 การทดสอบการมีชีวิตรอดและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง

การทดสอบการมีชีวิตรอดและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งด้วยวิธี Colony formation เป็นการศึกษาการมีชีวิตและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์หลังจากที่เซลล์ได้รับสารสกัดเพื่อตรวจสอบความสามารถในการเจริญเติบโตของเซลล์เมื่ออยู่ในสภาวะปิดปกติเนื่องจากมีสิ่งมากระตุ้นซึ่งอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมหรือการหยุดวงจรชีวิตของเซลล์โดยดำเนินการตามวิธี Buranrat, Mairuae, & Konsue, (2017); Buranrat, Mairuae, & Kanchanarach, (2017) เซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งตับถูกนำมาทำการทดลองในไมโครเพลท 6 หลุมโดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ทำการปิเปตเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และเซลล์มะเร็งตับ HepG2 800 เซลล์ต่อหลุม ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุมและบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสารสกัดให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดอยู่ระหว่าง 0 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วย PBS พีเอช 7.4 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร 2 ครั้ง แล้วเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่แล้วทำการเลี้ยงเซลล์ต่ออีกเป็นเวลา 14 วันโดยทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 3 วัน หลังจากครบ 14 วันแล้ว หลังจากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วย PBS พีเอช 7.4 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร 2 ครั้ง ตีเซลล์มะเร็งบนไมโครเพลท 6 หลุมด้วยฟอร์มาลินความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการเติมคริสตัลไวโอเลตความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายในเมทานอลความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการล้างสีของคริสตัลไวโอเลตออกด้วยน้ำกลั่นทำการตรวจนับจำนวนโคโลนีของเซลล์แล้วบันทึกผลคำนวณหา % Colony formation

3.9.5 ศึกษาสัญญาณวิทยาของเซลล์มะเร็ง

ดำเนินการตามรายงานก่อนหน้าของ Buranrat & Connor, (2015); Saengha *et al.* (2019) เซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งตับถูกนำมาทำการทดลองในไมโครเพลท 24 หลุมโดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ทำการปิเปตเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และเซลล์มะเร็งตับ HepG2 7.5×10^3 เซลล์ต่อหลุม บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความ

เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเติมสารสกัดให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดอยู่ระหว่าง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรืออาหารเลี้ยงเซลล์ (ชุดควบคุมลบ) บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Inverted microscopy) เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็ง (Cell morphology)

3.9.6 การวิเคราะห์การแตกหักเสียหายของดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อการตรวจสอบการตายแบบอะพอพโทซิส

การวิเคราะห์การแตกหักเสียหายของดีเอ็นเอในเซลล์มะเร็งดำเนินการตามรายงานก่อนหน้าของ Arbab *et al.* (2013) โดยเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งตับถูกนำมาทำการทดลองในไมโครเพลท 6 หลุม โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ทำการปิเปตเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และเซลล์มะเร็งตับ HepG2 จำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อหลุม ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุมและบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสารสกัดให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วทำการล้างเซลล์ด้วย PBS พีเอช 7.4 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร 2 ครั้ง จากนั้นทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วย DNA extraction kit (vivantis) ขั้นตอนทั้งหมดจะต้องดำเนินการที่อุณหภูมิห้อง ยกเว้นที่ระบุไว้เป็นอย่างอื่นหากมีการตกตะกอนในบัฟเฟอร์ PB ให้นำขวดไปบ่มที่ 55-65 องศาเซลเซียสและผสมเป็นครั้งคราวจนกระทั่งตะกอนละลายได้อย่างสมบูรณ์ โดยทำการการย่อยตะกอนเซลล์เติม 280 ไมโครลิตรของ Buffer PL ลงในตะกอนเซลล์และทำให้ตะกอนเซลล์แขวนลอยโดย vortex 1 นาทีตรวจสอบให้แน่ใจว่าเซลล์แขวนลอยสมบูรณ์โดยไม่มีตะกอนหลงเหลืออยู่และเติม 20 ไมโครลิตรของ Proteinase K ลงในตะกอนเซลล์ใน Eppendorf ผสมอย่างทั่วถึงโดยการ invert ห้าครั้ง บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมงในเครื่องบ่มที่เขย่าโดยอัตโนมัติ หลังจากนั้น lysate ควรมีความใสขึ้นในตอนท้ายของการบ่ม ปั่นเหวี่ยงเซลล์แขวนลอยที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นค่อยๆรินส่วนใสลงในหลอด Eppendorf (1.5 มิลลิลิตร) ที่สะอาดทั้งหมดที่มีตะกอนเซลล์ ปิเปต 20 ไมโครลิตรของ RNase (20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ละลายใน Elution buffer ลงไปในตัวอย่างและบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เติม 640 ไมโครลิตรของ buffer PB ลงไปในตัวอย่างและผสมอย่างทั่วถึงโดยการ invert หลอดหลายครั้งจนเป็นเนื้อเดียวกันบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติม 200 ไมโครลิตรของเอทานอล ผสมโดยการเขย่าหลอดหลายครั้งจนเป็นเนื้อเดียวกันโดยทันทีถ่ายโอนตัวอย่างลงใน collection tube โดยทันที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ซึ่งส่วนที่ไหลผ่านออกมา จาง

แนวของคอลัมน์ในลักษณะเดียวกันตลอดเวลาระหว่างการปั่นเหวี่ยง เดิม 650 ไมโครลิตรของ Wash Buffer และปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ซึ่งส่วนที่ไหลผ่าน ออกมา ปั่นเหวี่ยง คอลัมน์ที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อขจัดเอทานอลที่เหลือให้หมดไปมีฉะนั้นเอทานอล จะส่งผลกระทบต่อคุณภาพของดีเอ็นเอได้ วางคอลัมน์ลงในหลอด Eppendorf ที่สะอาด เดิม 50 ไมโครลิตรของ Elution buffer ลงไปยังศูนย์กลาง ของเมมเบรนคอลัมน์ ห้ามแทงทะลุเมมเบรน และ ตั้งคอลัมน์ไว้เป็นเวลา 2 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อชะดีเอ็นเอและ เก็บดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียสเขียนชื่อย่อเป็นภาษาอังกฤษ และเขียนหมายเลขของตัวอย่างไว้บน ฝา

วัดค่าความเข้มข้นของจีโนมดีเอ็นเอโดย ปิเปต 7 ไมโครลิตรของสารสกัดดีเอ็นเอใส่ใน หลอด Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติม Nuclease free water ปริมาตร 63 ไมโครลิตรลง ไป ผสมให้เข้ากัน (1:10 dilution) ใส่ cuvette นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรโดยเครื่องยว วิสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-spectrophotometer) ใช้ Nuclease free water เป็น blank วัดค่า การดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 230 260 และ 280 นาโนเมตร คำนวณหาความ เข้มข้นของดีเอ็นเอได้จากสูตร DNA concentration (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = (A₂₆₀) × (dilution factor) × (50 ไมโครกรัม/ DNA/มิลลิลิตร) และนำ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของดีเอ็นเอที่ สกัดได้ไปทำการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ด้วยความเข้มข้น ของเจลประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ที่มี SYBR Safe dye (Vivantis, Malaysia) ในอัตราส่วน 10 ไมโครลิตร/สารละลายเจล 100 มิลลิลิตร ผสมสารละลายจีโนมดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับ 6X Loading dye ในอัตราส่วน 2:1 โดยปริมาตร ใช้ 1Kb DNA (Vivantis, Malaysia) 100 นาโน กรัมเป็นดีเอ็นเอมาตรฐานเมื่อเทียบขนาดดีเอ็นเอใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาทีตรวจสอบแถบดีเอ็นเอผ่านเครื่อง Gel documentation (Syngene Gene Flash ,UK) และทำการถ่ายรูป

3.9.7 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน Matrixmetalloproteinase 2 (MMP 2) และ Matrixmetalloproteinase 9 (MMP 9) ด้วยวิธี Gelatin zymography

การวิเคราะห์วิธี Gelatin zymography เพื่อตรวจสอบผลกระทบของสารสกัดมีผลต่อ โปรตีน MMP2 และ MMP9 ในเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งตับโดยดำเนินการตามรายงานก่อน หน้านี้ ของ Buranrat, Mairuae, & Konsue, (2017); Buranrat, Mairuae, & Kanchanarach, (2017) ทำการปิเปตเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และเซลล์มะเร็งตับ HepG2 1×10^5 เซลล์ต่อหลุม บ่ม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็น เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเติมสารสกัดความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มอุณหภูมิ 37

องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อจะถูกนำปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามรายงานก่อนหน้านี้ของ Bradford (Bradford, 1976) ตัวอย่างโปรตีน 20 ไมโครกรัมถูกนำมาผสมกับ 2X Non-reducing sample buffer บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีที่ ตัวอย่างถูกแยกบนเจล SDS-polyacrylamide ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ที่มีเจลลาดิน 0.05 เปอร์เซ็นต์เป็นซับสเตรท (substrate) โปรตีนจะถูกแยกด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ กระแสไฟฟ้า 150 โวลต์เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเจลถูกล้างเป็นเวลา 30 นาที 2 ครั้งบนเครื่องเขย่า ด้วย Washing buffer (2.5% Triton X-100, 50 mM Tris-Cl buffer, pH 7.5, 10 mM CaCl₂, 1 μM ZnCl₂) และล้างด้วย Developing buffer (50 mM Tris-Cl pH 7.5, 10 mM CaCl₂, 1 μM ZnCl₂) เป็นเวลา 15 นาที บนเครื่องเขย่า จากนั้นเปลี่ยน Developing buffer ใหม่ลงบนเจลแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน เจลถูกย้อมด้วย Coomassie brilliant blue g-250 R250 (BIO-RAD) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในเมทานอล 45 เปอร์เซ็นต์ และกรดอะซิติก 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างสีส่วนเกินออกด้วย Destaining buffer ที่มีเมทานอล 30 เปอร์เซ็นต์ และกรดอะซิติก 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ล้างจนกว่าจะเห็นแถบแบรอนแล้ว ตรวจสอบแถบและถ่ายภาพแบรอนโปรตีนผ่านเครื่อง Gel documentation

3.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการทดลองทุกอย่าง 3 ซ้ำ เพื่อหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± Standard deviation) โดยใช้ One-way ANOVA กับ Duncan's Multiple Range Test ด้วย SPSS version 19.0 (IBM, Armonk, NY, US) โดยพิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อ $p < 0.05$

พหุ ประถมศึกษา ชีวะ

บทที่ 4

ผลและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 ผลของการใช้ของเทคโนโลยีพลาสมาเย็นต่อการเจริญและฤทธิ์ทางชีวภาพของไมโครกรีนเบื้องต้น

จากการวิเคราะห์เบื้องต้นของเราพบว่าเมื่อนำเมล็ดผักกาดเขียวอ่อนและผักชีหูดมาฉายพลาสมาเย็น 19 กิโลโวลต์ 21 กิโลโวลต์ 23 กิโลโวลต์ เป็นเวลา 5 นาที และมีการแช่เมล็ดก่อนให้พลาสมาเย็น 21 กิโลโวลต์ เป็นเวลา 5 นาที โดยทำการเพาะปลูกบนเวอร์มิคูไลต์ (vermiculite) สเปรย์น้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตรทุกๆ 12 ชั่วโมงที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ควบคุมการให้แสงความเข้มข้น 42 ไมโครโมลต่อวินาทีต่อตารางเมตรเป็นเวลา 12 ชั่วโมงและความมืด 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองพบว่าทรีตเมนต์ที่มีการให้พลาสมาเย็นกับเมล็ดผักกาดเขียวอ่อนไม่มีการเพิ่มขึ้นของเปอร์เซ็นต์การงอกและความยาว แต่พบว่าการให้พลาสมาเย็นช่วยเพิ่มน้ำหนักสดของผักกาดเขียวอ่อนเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (ตารางที่ 6) การให้เทคโนโลยีพลาสมาเย็นกับเมล็ดผักกาดเขียวอ่อนช่วยเพิ่มปริมาณสารไอโซไทโอไซยาเนทให้มีปริมาณที่เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม (19 kV > 21 kV > 23 kV > 21 kV > Control) (ตารางที่ 8) และที่สำคัญยังพบชนิดของสารไอโซไทโอไซยาเนทชนิดราฟาซาทิน (4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate ;Raphasatin) จากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS (ภาพที่ 20) นอกจากนี้ยังพบว่าการให้เทคโนโลยีพลาสมาเย็นยังช่วยเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดด้วยและยังช่วยเพิ่มกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระในผักชีหูด (ตารางที่ 10)

ทรีตเมนต์ที่มีการให้พลาสมาเย็นกับเมล็ดผักชีหูดมีการเพิ่มขึ้นของเปอร์เซ็นต์การงอก (21 kV > 21 > 19 kV > 23 kV > Control) ความยาวและน้ำหนักสด (21 kV > 19kV > 23 kV > 21 kV > Control) ของผักชีหูดเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (ตารางที่ 7) การให้เทคโนโลยีพลาสมาเย็นกับเมล็ดผักชีหูดยังช่วยเพิ่มปริมาณสารไอโซไทโอไซยาเนทให้มีปริมาณที่เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม (21 kV > 19 kV > 21 kV > Control > 23 kV) (ตารางที่ 9) และที่สำคัญยังพบชนิดของสารไอโซไทโอไซยาเนทชนิดราฟาซาทิน (4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate ;Raphasatin) จากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS (ภาพที่ 20) นอกจากนี้ยังพบว่าการให้เทคโนโลยีพลาสมาเย็นยังช่วยเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดด้วยและยังช่วยเพิ่มกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระในผักชีหูด (ตารางที่ 11) จึงทำการคัดเลือกทรีตเมนต์ที่มีการให้พลาสมาเย็น 19 เย็นเป็นเวลา 5 นาทีสำหรับผักกาดเขียวอ่อนและการให้พลาสมาเย็น 21 kV เป็นเวลา 5 นาทีสำหรับผักชีหูดไปทดลองในขั้นตอนต่อไปเพื่อหาอิทธิพลของเทคโนโลยีพลาสมาเย็นร่วมกับสารกระตุ้นอินทรีย์ต่อ

เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด ความยาว น้ำหนักสด สารไอโซโทปไฮยาเนท และฤทธิ์ทางชีวภาพในไมโครกรีนของผักกาดเขียวอ่อนและผักชีหูดในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 6 ผลของเทคโนโลยีพลาสมาเย็นต่อเปอร์เซ็นต์การงอก ความยาว น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของผักกาดเขียวอ่อน

การทดลอง	เปอร์เซ็นต์การงอก (%)	ความยาว (เซนติเมตร/ต้น)	น้ำหนักสด (มิลลิกรัม/ต้น)
เขียวอ่อน ชุดควบคุม	80.00±4.00 ^{bc}	4.76±0.40 ^a	9.18±0.17 ^b
เขียวอ่อน 19 kV	78.33±2.08 ^c	4.90±0.17 ^a	11.13±0.64 ^a
เขียวอ่อน 21 kV	85.00±3.00 ^{ab}	4.63±0.11 ^a	12.26±0.23 ^a
เขียวอ่อน 23 v	88.66±3.05 ^a	4.46±0.04 ^a	9.40±1.00 ^b
เขียวอ่อน 21 kV (แช่น้ำ)	76.00±4.00 ^c	4.80±0.17 ^a	9.80±0.17 ^b

อักษร a,b,c,... ที่แตกต่างกันหมายถึงในข้อมูลคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยใช้ One-way ANOVA กับ Duncan's Multiple Range Test

ตารางที่ 7 ผลของเทคโนโลยีพลาสมาเย็นต่อเปอร์เซ็นต์การงอก ความยาว น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของผักชีหูด

การทดลอง	เปอร์เซ็นต์การงอก (%)	ความยาว (เซนติเมตร/ต้น)	น้ำหนักสด (มิลลิกรัม/ต้น)
ชีหูด ชุดควบคุม	76.00±1.41 ^b	5.25±0.35 ^b	18.80±0.56 ^b
ชีหูด 19 kV	86.00±2.82 ^a	6.87±0.18 ^a	22.70±0.98 ^a
ชีหูด 21 kV	98.00±1.41 ^a	6.90±0.14 ^a	25.00±1.41 ^a
ชีหูด 23 kV	82.00±2.82 ^a	6.35±0.21 ^a	23.60±0.56 ^a
ชีหูด 21 kV (แช่น้ำ)	88.00±1.41 ^a	5.55±0.07 ^a	18.00±0.56 ^b

อักษร a,b,c,... ที่แตกต่างกันหมายถึงในข้อมูลคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยใช้ One-way ANOVA กับ Duncan's Multiple Range Test

ตารางที่ 8 ผลของเทคโนโลยีพลาสมาเย็นต่อปริมาณสารไอโซโทไอโซยานนท์ทั้งหมดในผักกาดเขียว
น้อย

ตัวอย่าง	ไอโซโทไอโซยานนท์ทั้งหมด mmol/100g DW
เขียวน้อย ชุดควบคุม	0.86±0.02 ^c
เขียวน้อย 19 kV	2.85±0.1 ^a
เขียวน้อย 21 kV	1.50±0.01 ^b
เขียวน้อย 23 kV	1.57±0.05 ^b
เขียวน้อย 21 kV (แช่น้ำ)	1.62±0.21 ^b

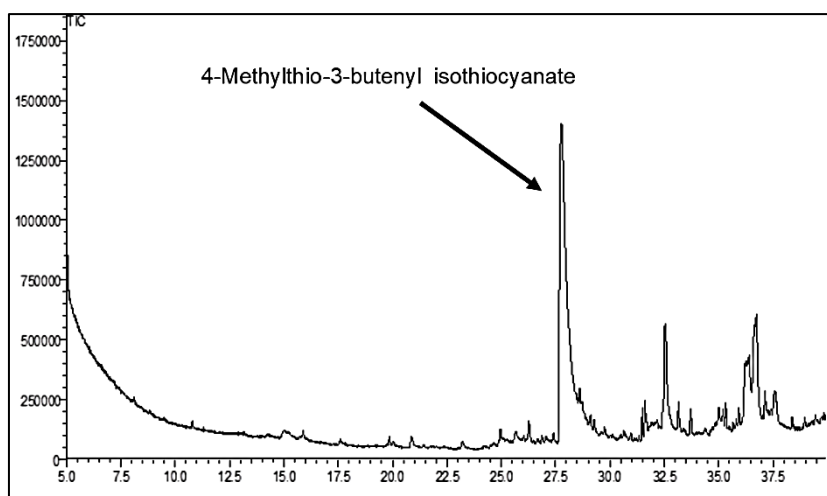
อักษร a,b,c,... ที่แตกต่างกันหมายถึงในข้อมูลคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยใช้ One-way ANOVA กับ Duncan's Multiple Range Test

ตารางที่ 9 ผลของเทคโนโลยีพลาสมาเย็นต่อปริมาณสารไอโซโทไอโซยานนท์ทั้งหมดในผักขี้หูด

ตัวอย่าง	ไอโซโทไอโซยานนท์ทั้งหมด mmol/100g DW
ขี้หูด ชุดควบคุม	1.05±0.02 ^c
ขี้หูด 19 kV	1.37±0.03 ^{ab}
ขี้หูด 21 kV	1.20±0.06 ^a
ขี้หูด 23 kV	0.55±0.08 ^d
ขี้หูด 21 kV (แช่น้ำ)	1.44±0.01 ^{ab}

อักษร a,b,c,... ที่แตกต่างกันหมายถึงในข้อมูลคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยใช้ One-way ANOVA กับ Duncan's Multiple Range Test





ภาพที่ 20 โครมโตแกรมของสารไอโซไทโอไซยานเนทชนิดราฟาซาทิน (4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate ;Raphasatin) จากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS

ตารางที่ 10 ผลของเทคโนโลยีพลาสมาเย็นต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH วิธี FRAP สารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมด และฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของผักกาดเขียวอ่อน

ตัวอย่าง	TPC (mg GAE/g DW)	TFC (mg RE /g DW)	DPPH (mg TE/g DW)	FRAP (mg Fe(II)/g DW)
เขียวอ่อน ชุดควบคุม	2.94±0.01 ^e	0.03±0.01 ^c	6.22±0.15 ^b	7.58±0.08 ^d
เขียวอ่อน 19 kV	5.08±0.04 ^b	0.70±0.07 ^a	7.44±0.02 ^a	15.42±0.60 ^a
เขียวอ่อน 21 kV	3.57±0.06 ^d	0.14±0.01 ^b	6.50±0.37 ^b	13.08±0.05 ^{bc}
เขียวอ่อน 23 v	6.76±0.13 ^a	0.16±0.01 ^b	6.42±0.37 ^b	14.95±0.42 ^{ab}
เขียวอ่อน 21 kV (แช่น้ำ)	3.98±0.10 ^c	0.13±0.01 ^b	6.63±0.25 ^b	13.12±1.20 ^c

อักษร a,b,c... ที่แตกต่างกันหมายถึงในข้อมูลคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยใช้ One-way ANOVA กับ Duncan's Multiple Range Test

พหุ ประถมศึกษา

ตารางที่ 11 ผลของเทคโนโลยีพลาสมาเย็นต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH วิธี FRAP สารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมด และฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของผักชีหูด

ตัวอย่าง	TPC (mg GAE/g DW)	TFC (mg RE/g DW)	DPPH (mg TE/g DW)	FRAP (mg Fe(II)/g DW)
ชีหูด ชุดควบคุม	6.28±0.45 ^b	0.72±0.01 ^a	5.11±0.07 ^c	16.18±0.77 ^d
ชีหูด 19 kV	7.66±0.02 ^a	0.70±0.01 ^b	5.54±0.08 ^b	21.14±0.36 ^a
ชีหูด 21 kV	7.38±0.01 ^a	0.71±0.01 ^a	7.70±0.04 ^a	21.83±0.14 ^a
ชีหูด 23 kV	6.35±0.03 ^b	0.68±0.01 ^b	1.95±0.20 ^d	19.70±0.63 ^b
ชีหูด 21 kV (แช่น้ำ)	6.22±0.04 ^b	0.72±0.02 ^a	5.78±0.11 ^b	18.24±0.57 ^c

อักษร a,b,c,... ที่แตกต่างกันหมายถึงในข้อมูลคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยใช้ One-way ANOVA กับ Duncan's Multiple Range Test

4.2 ผลการศึกษาผักกาดเขียวอ่อน

4.2.1 ผลของพลาสมาเย็นและสารกระตุ้นอินทรีต่อเปอร์เซ็นต์การงอก ความยาวของและน้ำหนักสดของผักกาดเขียวอ่อน

จากการเปรียบเทียบระหว่างการให้พลาสมาเย็น การให้พลาสมาเย็นร่วมกับสารกระตุ้นอินทรี หรือการให้สารกระตุ้นอินทรีในเมล็ดผักกาดเขียวอ่อนพบว่าทรีตเมนต์ที่มีการให้พลาสมาเย็นทรีตเมนต์ที่มีการให้พลาสมาเย็นร่วมกับสารกระตุ้นอินทรี และทรีตเมนต์ที่มีการให้สารกระตุ้นอินทรี ไม่มีผลต่อการงอกของเมล็ดผักกาดเขียวอ่อนยกเว้นการให้พลาสมาเย็นร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ และการให้โซเดียมคลอไรด์พบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดผักกาดเขียวอ่อนลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม 1.15 และ 1.19 เท่าตามลำดับ (ตารางที่ 12)

ความยาวของผักกาดเขียวอ่อนทรีตเมนต์ที่มีการให้พลาสมาเย็น (ภาพที่ 21C) ทรีตเมนต์ที่มีการให้พลาสมาเย็นร่วมกับสารกระตุ้นอินทรี (ภาพที่ 21D-F) และทรีตเมนต์ที่มีการให้สารกระตุ้นอินทรี (ภาพที่ 21G-I) ไม่มีผลต่อความยาวของผักกาดเขียวอ่อนยกเว้นการให้พลาสมาเย็นร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ (ภาพที่ 21E) และการให้โซเดียมคลอไรด์ (ภาพที่ 21H) ส่งผลให้ความยาวของลำต้นผักกาดเขียวอ่อนลดลง 1.28 และ 1.4 เท่าตามลำดับ (ตารางที่ 12)

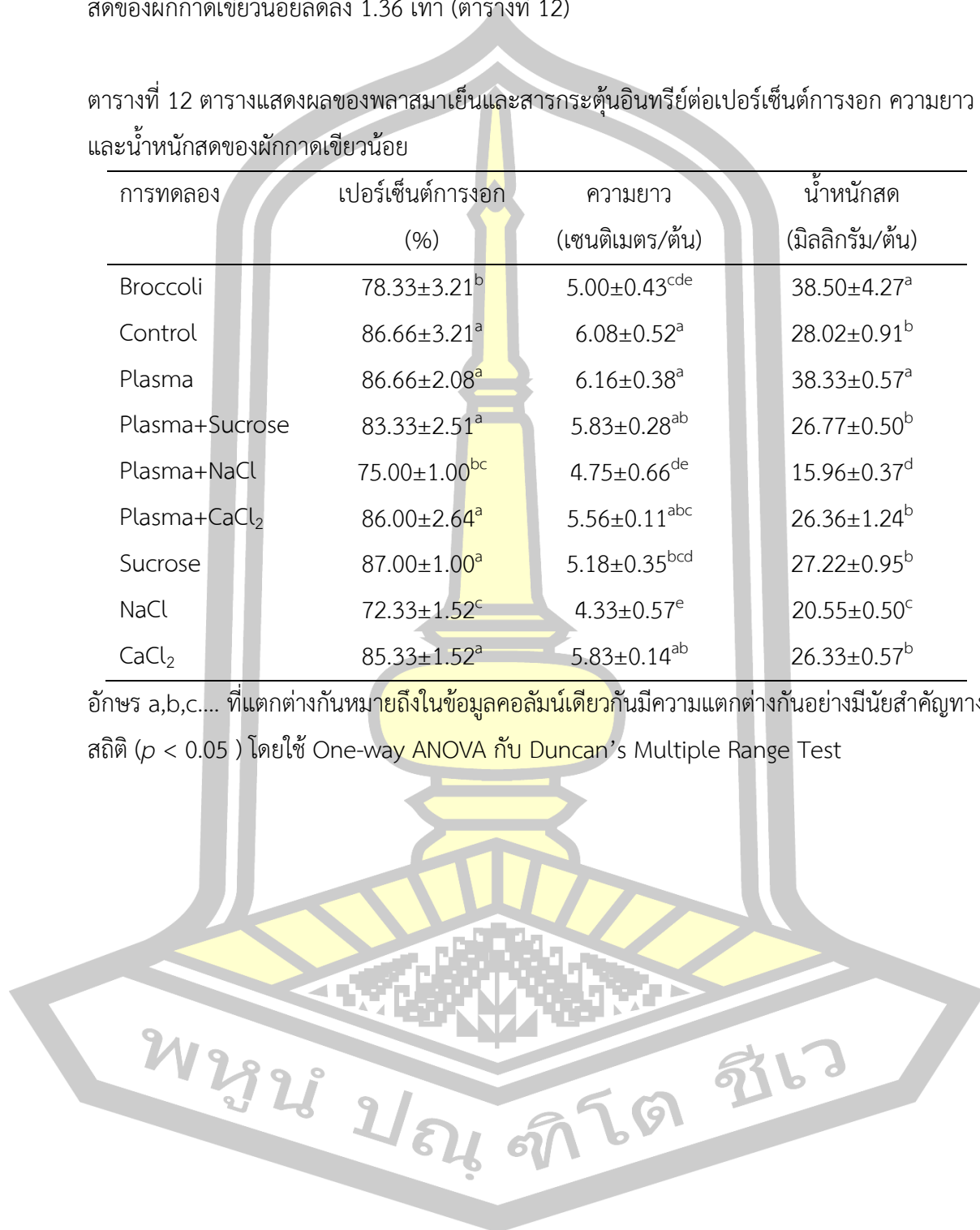
ส่วนน้ำหนักสดของผักกาดเขียวอ่อนพบว่าทรีตเมนต์ที่มีการให้พลาสมาเย็นช่วยเพิ่มน้ำหนักสดของผักกาดเขียวเมื่อเทียบกับชุดควบคุม 1.15 เท่า แต่การให้พลาสมาเย็นร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ส่งผลให้น้ำหนักสดของผักกาดเขียวอ่อนลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ส่วนทรีตเมนต์ที่มีการให้สาร

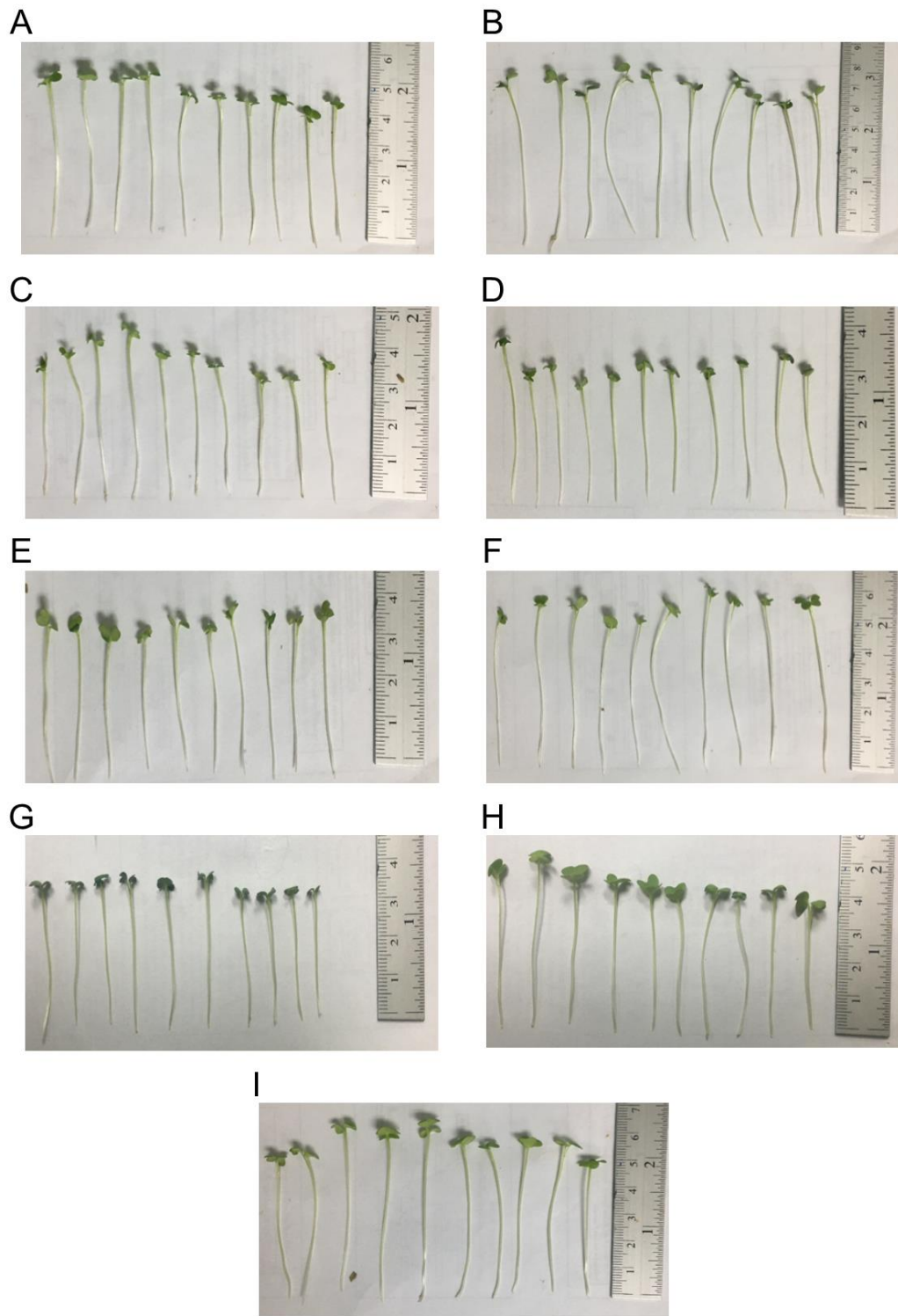
กระตุ้นอินทรีย์พบว่าไม่มีผลต่อน้ำหนักสดของผักกาดเขียวอ่อนยกเว้นการให้ซูโครสส่งผลให้น้ำหนักสดของผักกาดเขียวอ่อนลดลง 1.36 เท่า (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ตารางแสดงผลของพลาสมาเย็นและสารกระตุ้นอินทรีย์ต่อเปอร์เซ็นต์การงอก ความยาว และน้ำหนักสดของผักกาดเขียวอ่อน

การทดลอง	เปอร์เซ็นต์การงอก (%)	ความยาว (เซนติเมตร/ต้น)	น้ำหนักสด (มิลลิกรัม/ต้น)
Broccoli	78.33±3.21 ^b	5.00±0.43 ^{cde}	38.50±4.27 ^a
Control	86.66±3.21 ^a	6.08±0.52 ^a	28.02±0.91 ^b
Plasma	86.66±2.08 ^a	6.16±0.38 ^a	38.33±0.57 ^a
Plasma+Sucrose	83.33±2.51 ^a	5.83±0.28 ^{ab}	26.77±0.50 ^b
Plasma+NaCl	75.00±1.00 ^{bc}	4.75±0.66 ^{de}	15.96±0.37 ^d
Plasma+CaCl ₂	86.00±2.64 ^a	5.56±0.11 ^{abc}	26.36±1.24 ^b
Sucrose	87.00±1.00 ^a	5.18±0.35 ^{bcd}	27.22±0.95 ^b
NaCl	72.33±1.52 ^c	4.33±0.57 ^e	20.55±0.50 ^c
CaCl ₂	85.33±1.52 ^a	5.83±0.14 ^{ab}	26.33±0.57 ^b

อักษร a,b,c... ที่แตกต่างกันหมายถึงในข้อมูลคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยใช้ One-way ANOVA กับ Duncan's Multiple Range Test





ภาพที่ 21 ผักกาดเขียวขนาดเล็กที่มีการให้พลาสมาเยื่อร่วมกับสารกระตุ้นอินทรีย์
 A=น้ำกลั่น (ชุดควบคุม) B=บรีอคโคลี่ (ชุดควบคุม) C=พลาสมาเยื่อร่วมกับน้ำกลั่น D=พลาสมาเยื่อ
 ร่วมกับซูโครส E=พลาสมาเยื่อร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ F=พลาสมาเยื่อร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์
 G=ซูโครส H=โซเดียมคลอไรด์ I=แคลเซียมคลอไรด์

การให้พลาสมาเย็นเป็นปัจจัยสำคัญ ถ้ากำลังของพลาสมาเย็นต่ำเกินไปก็จะมีผลต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของพืช ในขณะที่ถ้าให้กำลังของพลาสมาเย็นมากเกินไปก็จะส่งผลเสียต่อเมล็ด ซึ่งจากการทดลองของเราพบว่า การให้พลาสมาเย็นส่งผลให้ลำต้นของผักกาดเขียวอ่อนยาวเพิ่มขึ้นและส่งผลให้เมล็ดงอกเร็วขึ้นสอดคล้องกับงานวิจัย Matra, (2016) รายงานว่าอนุมูลอิสระของออกซิเจนที่เกิดจากออกซิเจนพลาสมาเย็นสามารถช่วยให้เปลือกของเมล็ดพืชมีความนุ่มมากขึ้นและบางลง จึงสามารถดูดซับความชื้นได้ดีขึ้น ซึ่งเป็นผลช่วยให้เมล็ดพืชสามารถงอกได้เร็วขึ้น มีงานวิจัยรายงานว่าอนุมูลอิสระของออกซิเจนยังสามารถช่วยทำลายสปอร์ของเชื้อรา โดยปราศจากการทำลายเนื้อเยื่อหรือเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางพันธุกรรมของเมล็ดพืช (Carvalho *et al.*, 2005; Selcuk *et al.*, 2008; Dobrynin *et al.*, 2009b)

รายงานวิจัยของ Ling *et al.* (2015) พบว่าเมล็ดพันธุ์พืชที่ถูกฉายด้วยพลาสมาอุณหภูมิต่ำจะสามารถดูดซับความชื้นได้ดีแตกต่างกันขึ้นอยู่กับกำลังไฟฟ้าที่ใช้ในการสร้างพลาสมาเนื่องจากพลาสมาอุณหภูมิต่ำนี้จะไปทำปฏิกิริยากับโครงสร้างทางเคมีและพื้นผิวเปลือกของเมล็ดพันธุ์พืช ทำให้เมล็ดพันธุ์พืชสามารถดูดซับไอน้ำจากด้านนอกได้ดีขึ้น มีหลายข้อมูลที่แสดงให้เห็นว่าหลังจากการทรีตด้วยพลาสมาเย็นพบว่าเมล็ดพืชสามารถดูดซับน้ำได้ดีขึ้นและเพิ่มอัตราการงอกภายใต้สภาวะแวดล้อมที่เครียดหลายอย่างรวมถึงการเตรียมความพร้อมในกระบวนการเมตาบอลิซึม เห็นได้ว่าพลาสมาเย็นส่งผลเชิงบวกต่อการงอก การดูดซับน้ำ

การศึกษาก่อนหน้านี้ของ Sivachandiran & Khacef, (2017) แสดงให้เห็นถึงผลลัพธ์ที่หลากหลายของมะเขือเทศและพริกไทยหลังได้รับพลาสมาเย็น ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าความชุ่มชื้นของผิวเมล็ดเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการทรีตพลาสมาเย็นและยังพบว่าพื้นผิวที่ขอบน้ำของเมล็ดยังคงไม่มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากได้รับพลาสมาเย็นเป็นเวลาหลายเดือนในการทำงานเดียวกันจากการทดลองของ Jiayun *et al.* (2014) แสดงให้เห็นว่าการทรีตด้วยพลาสมาสามารถเปลี่ยนการซึมผ่านของน้ำในเมล็ด *Andrographis paniculate* และลดเซลล์ที่มีลักษณะเป็นขนที่เรียกว่า ไทรโคม (trichome) บนพื้นผิวของเมล็ดข้าวนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของความสามารถในการดูดซับน้ำซึ่งส่งผลต่อความยาวของเมล็ด นอกจากนี้งานวิจัยของ Duesterhaus, (2000) พบว่าโดยทั่วไปแล้วความแตกต่างในการดูดน้ำของวัสดุที่มีความชื้นต่ำ เช่น เมล็ดพืชที่กำลังงอก มักเกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระของน้ำ หรือปริมาณของความสามารถในการดูดซับน้ำของเมล็ด นอกจากนี้ยังพบว่านอกจากนี้ H_2O_2 ร่วมกับ ROS อื่น ๆ มักจะถูกพิจารณาว่าเป็นสาเหตุหลักของการเสื่อมสภาพของเมล็ดและการสูญเสียความแข็งแรงของเมล็ด (Jeevan *et al.*, 2015) หลังได้รับการทรีตด้วยพลาสมา นอกจากนั้น H_2O_2 และ ROS ยังช่วยปกป้องเชื้อก่อโรคพืช จากผลการทดลอง Yuan *et al.* (2010) พบว่าความเค็มของเกลือมีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของต้นอ่อนเรดิคและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาค สรีรวิทยา และมีผลต่อการงอกของเมล็ด ส่วนรายงานของ Zapata *et al.* (2004) พบว่าต้นงอกที่ได้รับไฮเดียม

คลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์มีความเป็นไปได้ว่าพืชมีการปรับค่าออสโมติกบางอย่างไม่ทันจากความเครียดที่เกิดจากเกลือส่งผลทำให้น้ำหนักสดของต้นงอกที่ 5 ถึง 7 วันไม่แตกต่างกันซึ่งสอดคล้องกับรายงาน Esfandiari *et al.* (2017b) พบว่าการให้โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 160 มิลลิโมลาร์ในบร็อกโคลีไม่ได้แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักในบร็อกโคลีซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของเรา และรายงานของ Lee *et al.* (2010) พบว่าเกลือจะมีผลต่อยับยั้งการงอกของเมล็ดโดยจะผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ส่วนน้ำตาลซูโครส กลูโคสและฟรุกโตสนั้นจะช่วยส่งเสริมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในบร็อกโคลีและซูโครสเป็นสารที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการกระตุ้นการสะสมสารอาหาร

จากรายงานก่อนหน้าของ ชนกขวัญ ศรีคำ และคณะ, (2561) พบว่าแคลเซียมช่วยให้น้ำเซลล์และ เยื่อหุ้มเซลล์มีความแข็งแรง และควบคุมการเข้าออกของสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane permeability) เมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนต่ำส่งผลให้เกิดการรั่วไหลของไอออนและสารเมตาบอไลต์ (Hepler, 2005) นอกจากนี้แคลเซียมไอออนยังทำหน้าที่ควบคุมการสื่อสารของเซลล์ (cell signaling) ส่งผลให้เมตาบอลิซึมภายในเซลล์เกิดขึ้นได้ตามปกติ (Harmon *et al.*, 2001; Zhang and Hannink 2003) รวมทั้งควบคุมกระบวนการแบ่งเซลล์ (Zhang *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1992) นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Lolaei, (2012) พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมจะสามารถช่วยเพิ่มผลผลิตของพืช แคลเซียมเป็นธาตุที่มีบทบาทด้านการงอกของเมล็ดเนื่องจากเป็นโคแฟกเตอร์ที่สำคัญของเอนไซม์หลายชนิด นอกจากนี้ยังมีรายงานของ ยงยุทธ โอสภสกา (2558) รายงานว่าแคลเซียมความเข้มข้นต่ำสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์โปรตีนไคเนสและแอลฟาอะไมเลสได้ ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิดเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในการเคลื่อนย้ายแป้งและช่วยย่อยแป้งในเอนโดสเปิร์มของเมล็ดสำหรับใช้ในกระบวนการงอกดังนั้นการใช้แคลเซียมคลอไรด์ในความเข้มข้นจึงมีแนวโน้มในการช่วยให้เมล็ดพืชสามารถงอกได้ดีขึ้น แต่หากใช้ในปริมาณสูงก็จะมีผลในการยับยั้งการงอก แคลเซียมนั้นช่วยให้ผนังเซลล์และต้นพืชแข็งแรงและมีบทบาทด้านการยึดตัวของเซลล์ทำให้ลำต้นพืชยาวขึ้นซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของเรา และมีรายงานของ อธิษานะมิกิ และคณะ, (2560) และ Turmanidze *et al.* (2017) พบว่าการใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ทำให้มีปริมาณสารแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นโดยการกระตุ้นการแสดงออกยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานินได้อีกด้วย

มีรายงานวิจัยก่อนหน้าของ ยุพาภรณ์ จิโรภาสภานุวงศ์, (2559) และ Tsai *et al.* (2005) รายงานว่าน้ำตาลซูโครสนอกจากจะเป็นแหล่งพลังงานที่จำเป็นกับเซลล์พืชแล้วยังสามารถนำไปใช้ในการเติมหมู่น้ำตาลให้กับสาร aglycone ในกระบวนการไกลโคซิเลชัน (glycosylation) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาสุดท้ายของกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Mano *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังส่งผลต่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโท

ไซยานินใน *Arabidopsis* เช่น flavanone 3 beta-hydroxylase chalcone synthase chalcone isomerase และ anthocyanidin synthase เป็นต้น ซูโครส กลูโคส และฟรุคโตส ช่วยในการสังเคราะห์กลูโคซิโนเลทและแอนโทไซยานินในพืชตระกูลกะหล่ำและซูโครสเป็นสารที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการกระตุ้นการสะสมของสารทุติยภูมิ

4.2.2 ผลของพลาสมาเย็นและสารกระตุ้นอินทรีย์ต่อปริมาณสารไอโซไรโอไซยานเนททั้งหมดและชนิดของสารไอโซไรโอไซยานเนทในผักกาดเขียวอ่อน

จากการเปรียบเทียบระหว่างการให้พลาสมาเย็น การให้พลาสมาเย็นร่วมกับสารกระตุ้นอินทรีย์และการให้สารกระตุ้นอินทรีย์ในผักกาดเขียวอ่อนผลการทดลองพบว่าพริตต์แมนที่มีการให้พลาสมาเย็น พริตต์แมนที่มีการให้พลาสมาเย็นร่วมกับสารกระตุ้นอินทรีย์และพริตต์แมนที่มีการให้สารกระตุ้นอินทรีย์ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของสารไอโซไรโอไซยานเนทเมื่อเทียบกับชุดควบคุมโดยพริตต์แมนที่มีการให้พลาสมาเย็นมีปริมาณสารไอโซไรโอไซยานเนทมากที่สุดโดยเพิ่มจากชุดควบคุมถึง 3.31 เท่า รองลงมาคือพริตต์แมนที่มีการให้พลาสมาเย็นร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์โดยเพิ่มจากชุดควบคุม 2.24 เท่า ยกเว้นพริตต์แมนที่มีการให้พลาสมาเย็นร่วมกับซูโครสและการให้โซเดียมคลอไรด์ (ตารางที่ 13)

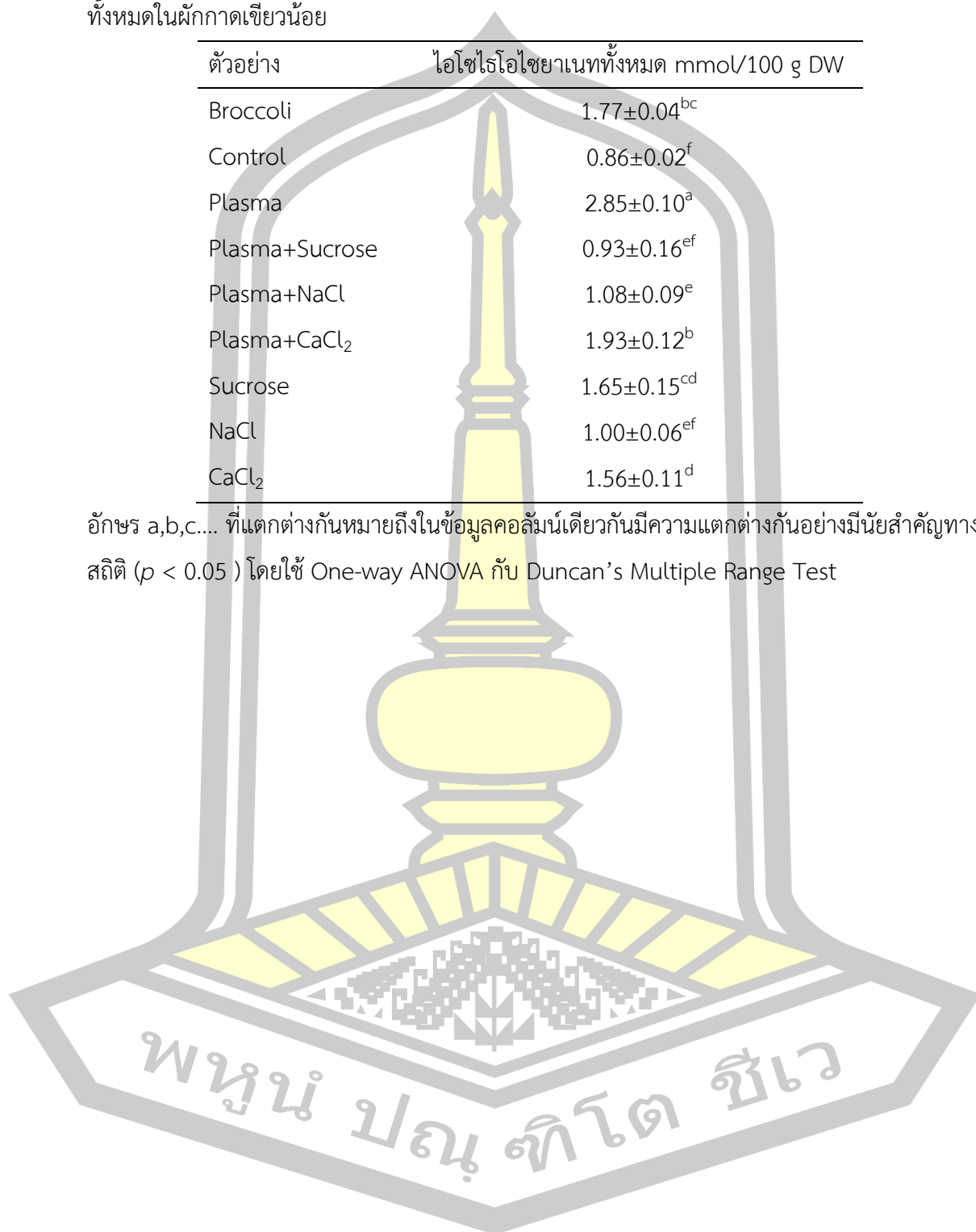
การวิเคราะห์หาชนิดของสารไอโซไรโอไซยานเนทในผักกาดเขียวอ่อนพบชนิดของสารไอโซไรโอไซยานเนททั้งหมด 2 ชนิด คือสารไอโซไรโอไซยานเนทชนิดอัลลิลไอโซไรโอไซยานเนทที่เวลา 7.2 นาที (ภาพที่ 22A) โดยมีกลูโคซิโนเลทชนิดซินิกรินเป็นสารตั้งต้นและสารไอโซไรโอไซยานเนทชนิด 3 บิวทีนิวไอโซไรโอไซยานเนทที่เวลา 9.7 นาที (ภาพที่ 22B) โดยมีกลูโคซิโนเลทชนิด 3 บิวทีนิวกลูโคซิโนเลทเป็นสารตั้งต้น ส่วนในบรีอคโคลิฟพบเฉพาะสารไอโซไรโอไซยานเนทชนิดซัลโฟราเฟนที่เวลา 28 นาที (ภาพที่ 22C) โดยมีกลูโคซิโนเลทชนิดกลูโคราฟานินเป็นสารตั้งต้น โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลแมสสเปกตรัมของเครื่อง เพื่อเทียบขนาดมวลโมเลกุลสเปกตรัมของสาร (ภาพที่ 23)

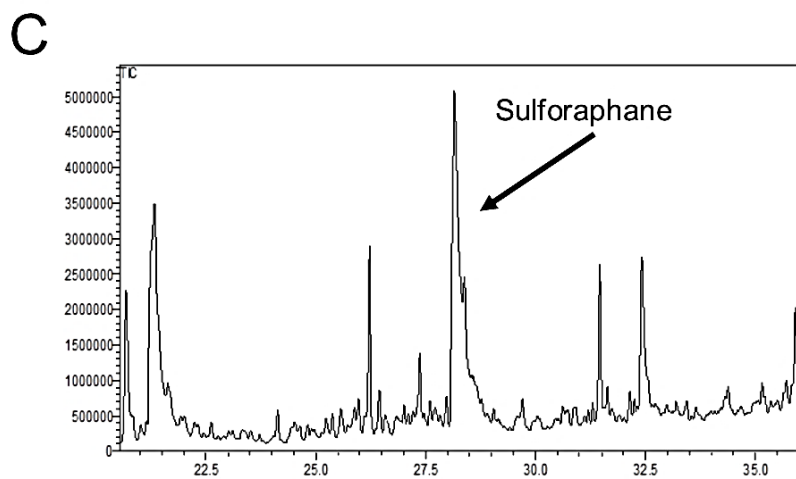
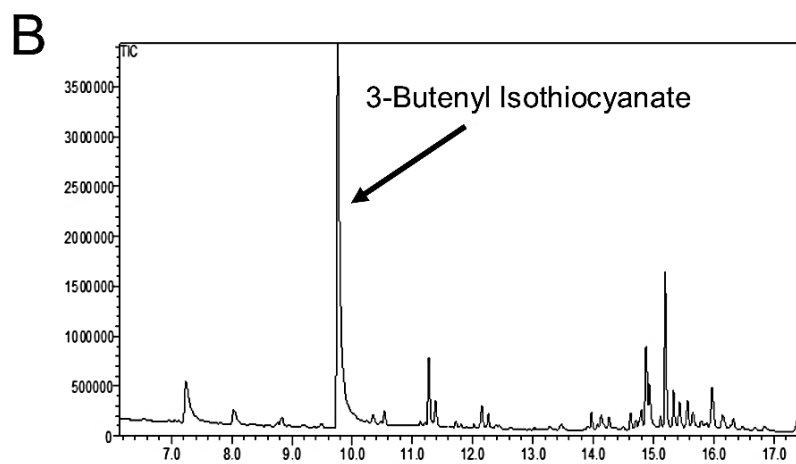
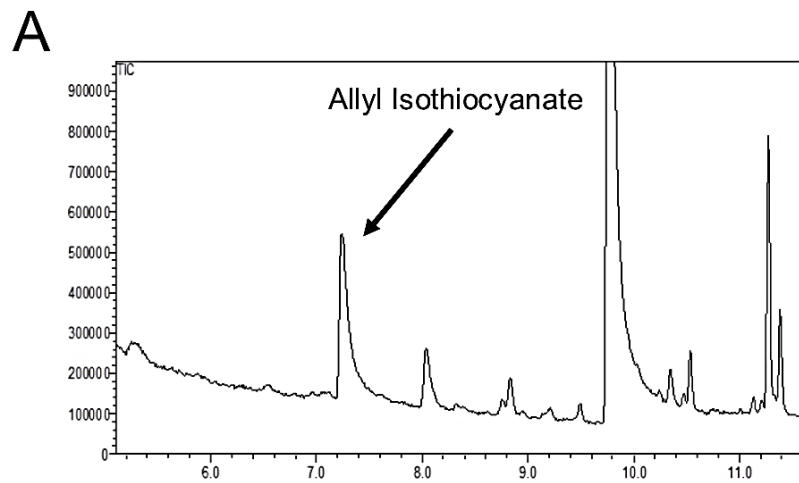
พจนานุกรมพืชโต ชีเว

ตารางที่ 13 ตารางแสดงผลของพลาสมาเย็นและสารกระตุ้นอินทรีย์ต่อปริมาณสารไอโซโทไอไซยานเนททั้งหมดในผักกาดเขียวอ่อน

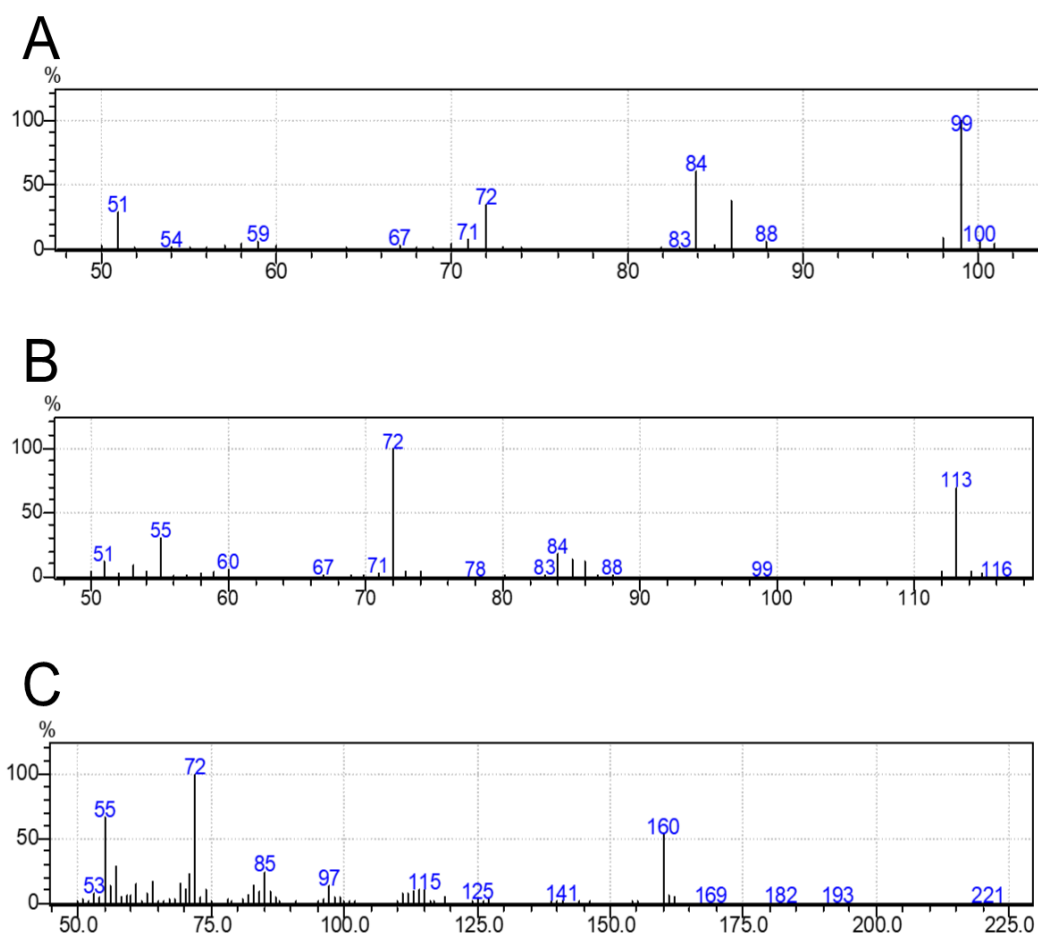
ตัวอย่าง	ไอโซโทไอไซยานเนททั้งหมด mmol/100 g DW
Broccoli	1.77±0.04 ^{bc}
Control	0.86±0.02 ^f
Plasma	2.85±0.10 ^a
Plasma+Sucrose	0.93±0.16 ^{ef}
Plasma+NaCl	1.08±0.09 ^e
Plasma+CaCl ₂	1.93±0.12 ^b
Sucrose	1.65±0.15 ^{cd}
NaCl	1.00±0.06 ^{ef}
CaCl ₂	1.56±0.11 ^d

อักษร a,b,c,... ที่แตกต่างกันหมายถึงในข้อมูลคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยใช้ One-way ANOVA กับ Duncan's Multiple Range Test





ภาพที่ 22 โครมาโตแกรมของสารไอโซโรไอโซยานนท์ที่พบในผักกาดเขียวอ่อน
A=อัลลิลไอโซโรไอโซยานนท์ B= 3 บิวทีนิลไอโซโรไอโซยานนท์ และ C=ซัลโฟราเฟน



ภาพที่ 23 แมสสเปกตรัมของสารไอโซไรโอโซยานเทที่พบในผักกาดเขียวอ่อน
 A=อัลลิลไอโซไรโอโซยานเท B= 3 บิวทีนิวไอโซไรโอโซยานเท และ C=ซัลโฟราเฟน

จากรายงานของ Guo *et al.* (2011b) พบว่าหลังการให้ซูโครส 176 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ในต้นงอกบร็อกโคลี่ มีการเพิ่มขึ้นของอะลิฟาติกกลูโคซิโนเลทรวม เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 44.7 เปอร์เซ็นต์ กลูโคซิโนเลทรวมเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 45.1 เปอร์เซ็นต์ ซัลโฟราเฟนเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 29 เปอร์เซ็นต์ และ ให้ซูโครส 146 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 5 วันกลูโคราฟานินเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 51.1 เปอร์เซ็นต์ จากรายงาน Baenas *et al.* (2014) การให้ซูโครส 146 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 5 วันต้นงอกบร็อกโคลี่กลูโคราฟานินจาก 183 มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม เพิ่มขึ้นเป็น 294 มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม จากรายงาน Natella *et al.* (2016) รายงานว่าการให้ให้โซเดียมคลอไรด์ 176 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 5 วัน ในต้นงอกบร็อกโคลี่ กลูโคซิโนเลทรวมเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม เป็น 82 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในรายงานของ Guo *et al.* (2013) พบว่าให้โซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 7 วันต้นงอกบร็อกโคลี่ ซัลโฟราเฟนเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 2.1 เท่า รายงานวิจัย Esfandiari *et al.* (2017b) รายงานว่าการให้ให้โซเดียมคลอไรด์ 160 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 7 วันใน

ต้นงอกบร็อกโคลี่ ซัลโฟราเฟนเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 6 เท่า และรายงานของ Yang *et al.* (2016) พบว่าการให้แคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 9 วันในต้นงอกบร็อกโคลี่ กลูโคซิโนเลทเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 1.7 เท่า ไอโซโรโอโซยานาเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 1.4 เท่า

จากรายงานของ Yang *et al.* (2016) ระบุว่าการใช้แคลเซียมคลอไรด์ช่วยเพิ่มคุณสมบัติทางชีวเคมีในการสังเคราะห์กลูโคซิโนเลทโดยการเสริมสร้างยีน BrST5b (sulfotransferase 5b) และยีน BrAOP2 (2-oxoglutarate-dependent dioxygenase 2) ให้มีการแสดงออกและพบว่าเมื่อให้ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์เป็น 10 มิลลิโมลาร์ช่วยเพิ่มปริมาณกลูโคซิโนเลทในบร็อกโคลี่ ซึ่งเมื่อปริมาณกลูโคซิโนเลทที่สูงขึ้นการแสดงออกของยีนสังเคราะห์เอนไซม์ไมโรซิเนสก็จะสูงขึ้นด้วย ซึ่งจะส่งผลให้สารไอโซโรโอโซยานาสูงขึ้นไปด้วยและมีรายงานของ Verkerk *et al.* (2009) ยังตรวจพบยีนหลายตัวรวมทั้ง BrST BrFMOGSOX ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กลูโคซิโนเลทด้วย

อัลลิลไอโซโรโอโซยานา (AITC) เป็น ไอโซโรโอโซยานาที่รู้จักกันว่ามีกิจกรรมต่อต้านการอักเสบ ต้านจุลชีพและต้านมะเร็ง (Zhang, 2010) ผักตระกูลกะหล่ำส่วนใหญ่รวมถึงกะหล่ำดาว กะหล่ำปลี กะหล่ำดอกและคะน้า มีปริมาณอัลลิลไอโซโรโอโซยานา ซึ่งให้รสชาติที่เผ็ดร้อนกับอาหารเหล่านี้ พบอัลลิลไอโซโรโอโซยานาปริมาณสูงในฮอร์สแรดิช (*Armoracia lapathifolia*) (1,500–9,000 mg / kg), มัสตาร์ดและวาซาบิ (*Wasabi japonica*) (*Japanese horseradish*) (9,585 mg/kg, 34 μ mol sinigrin/AITC per gram of fresh wasabi) (Sultana *et al.*, 2003)

ซูโครสเป็นตัวควบคุมการทำงานของกระบวนการเมตาบอลิซึมและกรดแอสคอบิกในบร็อกโคลี่ (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) (Nishikawa *et al.*, 2005) และยังควบคุมกระบวนการสังเคราะห์ของแอนโธไซยานินใน *Arabidopsis thaliana* (Teng *et al.*, 2005) นอกจากนี้ซูโครส กลูโคสและฟรุกโตสก็ยังช่วยส่งเสริมการสังเคราะห์ในต้นงอกบร็อกโคลี่และซูโครสยังเป็นสารที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์สารทุติยภูมิในพืช และจากรายงานวิจัยของ Teng *et al.* (2005) ทำการทดลองใน *Arabidopsis thaliana* ระดับของแอนโธไซยานินและกลูโคซิโนเลทอาจเพิ่มขึ้นจากความเครียด เช่น การขาดสารอาหารหรือเกิดจากความเครียดที่เกิดจากความเค็มของเกลือ (Lea *et al.*, 2007b; Yuan *et al.*, 2010) นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Guo *et al.* (2011b) พบว่าน้ำตาลแมนนิทอลสามารถเพิ่มการสะสมของแอนโธไซยานินและกลูโคซิโนเลทในบร็อกโคลี่ได้แต่ไม่มีผลมากเท่ากับซูโครสในทำนองเดียวกันมีผลยืนยันว่าซูโครสทำหน้าที่เหมือนสัญญาณในการควบคุมกระบวนการที่สำคัญมากมายในทุกขั้นตอนของวงจรชีวิตของพืช (Rolland *et al.*, 2006) ยีนสังเคราะห์สารทางชีวภาพทั้งหมดได้รับการช่วยให้มีการเพิ่มขึ้นหลังการได้รับซูโครสเป็นเวลา 12 ชั่วโมงในบร็อกโคลี่ นอกจากนี้ยังกระตุ้นการทำงานของ MYB transcriptional factors และเหนี่ยวนำให้สะสมแอนโธไซยานินใน *Arabidopsis thaliana* อีกด้วย (Gonzalez *et al.*, 2008) มีรายงานวิจัยพบว่าแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของ Aliphatic

glucosinolates (glucoerucin, glucoiberin, glucoiberin, glucoraphanin, pentyl glucosinolate, and hexyl glucosinolate) and indolic glucosinolates (glucobrassicin, neoglucobrassicin และ 4-hydroxyglucobrassicin) อย่างมีนัยสำคัญ จากรายงานของ Lu *et al.* (2018) พบว่าหลังจากได้รับแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ก่อนการเก็บเกี่ยวและได้รับ UV-B หลังการเก็บเกี่ยวพบการเพิ่มขึ้นของกลูโคราฟานินกลูโคอิรูซิน และอลิฟาติกกลูโคซิโนเลทอย่างมีนัยสำคัญในไมโครกรีน นอกจากนี้ยังช่วยยืดเวลาในการเก็บรักษาทำให้สามารถเก็บต้นงอกของบร็อคโคลี่ได้นานขึ้น

4.2.3 ผลของพลาสมาเย็นและสารกระตุ้นอินทรีย์ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH และวิธี FRAP ในผักกาดเขียวอ่อน

จากการเปรียบเทียบระหว่างการให้พลาสมาเย็น การให้พลาสมาเย็นร่วมกับสารกระตุ้นอินทรีย์และการให้สารกระตุ้นอินทรีย์พบว่ามีผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ พบว่าทรีตเมนต์ที่มีการให้พลาสมาเย็น การให้พลาสมาเย็นร่วมกับสารกระตุ้นอินทรีย์ส่งผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ โดยพบว่าซูโครสโดยส่งผลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 1.8 และ 47.33 เท่าตามลำดับ ส่วนทรีตเมนต์ที่มีการให้สารกระตุ้นอินทรีย์พบว่าส่งผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์เช่นกัน โดยทรีตเมนต์ที่มีการให้แคลเซียมคลอไรด์ช่วยเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์จากชุดควบคุม 1.73 และ 42.33 เท่าตามลำดับ (ตารางที่ 7)

จากการเปรียบเทียบระหว่างการให้พลาสมาเย็น การให้พลาสมาเย็นร่วมกับสารกระตุ้นอินทรีย์ส่งผลต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นโดยพบว่าทรีตเมนต์ที่มีการให้พลาสมาเย็นส่งผลให้กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH และวิธี FRAP เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 1.16 และ 2.03 เท่าตามลำดับส่วนทรีตเมนต์ที่มีการให้สารกระตุ้นอินทรีย์พบว่าทำให้โซเดียมคลอไรด์และแคลเซียมคลอไรด์ส่งผลให้กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH ลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ส่วนกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP พบว่าทรีตเมนต์ที่มีการให้สารกระตุ้นอินทรีย์ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP ยกเว้นการให้โซเดียมคลอไรด์ส่งผลให้กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP ลดลงเช่นเดียวกับวิธี DPPH (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 ตารางแสดงผลของพลาสมาเย็นและสารกระตุ้นอินทรีย์ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH และวิธี FRAP ในผักกาดเขียวอ่อน

ตัวอย่าง	TPC	TFC	DPPH	FRAP
	(mg GAE/g DW)	(mg RE/g DW)	(mg TE/g DW)	(mg Fe(II)/g DW)
Broccoli	5.78±0.32 ^a	0.01±0.10 ^f	7.43±00.18 ^a	22.07±0.34 ^a
Control	2.94±0.01 ^f	0.03±0.01 ^{ef}	6.39±0.09 ^b	7.58±0.08 ^g
Plasma	5.08±0.04 ^c	0.70±0.07 ^c	7.44±0.02 ^a	15.42±0.60 ^b
Plasma+Sucrose	5.37±0.18 ^b	1.42±0.03 ^a	6.46±0.04 ^b	13.50±0.47 ^d
Plasma+NaCl	3.93±0.10 ^e	0.49±0.06 ^d	6.67±0.45 ^b	10.57±0.28 ^f
Plasma+CaCl ₂	3.84±0.03 ^e	0.45±0.02 ^d	5.55±0.06 ^c	7.62±0.26 ^g
Sucrose	4.62±0.10 ^d	0.67±0.07 ^c	6.40±0.09 ^b	11.16±0.17 ^e
NaCl	0.25±0.02 ^g	0.11±0.02 ^e	2.23±0.20 ^e	7.21±0.17 ^g
CaCl ₂	5.11±0.06 ^c	1.27±0.07 ^b	4.84±0.11 ^d	14.79±0.17 ^c

อักษร a,b,c.... ที่แตกต่างกันหมายถึงในข้อมูลคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยใช้ One-way ANOVA กับ Duncan's Multiple Range Test

จากงานวิจัยของเราสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Guo *et al.* (2014) สารต้านอนุมูลอิสระในต้นงอกบร็อกโคลี่ประกอบด้วยสารกลูโคซิโนเลทและสารฟีนอลิก หลังจากที่ได้รับแคลเซียมคลอไรด์พบว่าปริมาณสารกลูโคซิโนเลทเพิ่มขึ้นซึ่งนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดของต้นงอกบร็อกโคลี่ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 'OH และ DPPH' ที่เพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ของต้นงอกบร็อกโคลี่ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแคลเซียมคลอไรด์สามารถเพิ่มกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดในบร็อกโคลี่ (Liu *et al.*, 2015) แนวโน้มของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดและความสามารถในการยับยั้ง DPPH* ของไฮโดรไลสเสตหลังได้รับแคลเซียมคลอไรด์ การก่อตัวของไอโซโรไฮยานเทของไฮโดรไลสเสตมีผลอย่างมากในการต้านอนุมูลอิสระและเพิ่มความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH* และวิจัยของเราสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Yuan *et al.* (2010) พบว่ามีการลดลงของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดหลังจากต้นอ่อนของเรดิช อายุ 5 และ 7 วัน ที่ได้รับไซติมคลอไรด์อาจเป็นเพราะการเติบโตอย่างรวดเร็วของต้นอ่อนเรดิช การศึกษาในปัจจุบันโดยทั่วไปสารประกอบฟีนอลิกในพืชจะถูกผลิตผ่านวิถี Phenylpropanoid และยังสามารถเหนี่ยวนำโดยความเครียดจากสิ่งแวดล้อมและสารกระตุ้น (Elicitor) (Kim *et al.*, 2006; Giorgi *et al.*, 2009) สารประกอบฟีนอลิกในพืชสามารถ

เปลี่ยนแปลงได้โดยความเครียดจากเกลือแต่สิ่งนี้ขึ้นอยู่กับช่วงวิกฤตกับความไวของของพืช (Kim *et al.*, 2008)

จากรายงานวิจัยของ Baenas *et al.* (2015) พบว่ามีการผลิตสารทุติยภูมิทุติยภูมิในต้นอ่อนบร็อกโคลี่ที่ได้รับน้ำตาลซูโครส 88 และ 176 มิลลิโมลาร์ซึ่งเพิ่มแอนโธไซยานินรวม 26 และ 44 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ มีรายงานของ Hara *et al.* (2004; Lea *et al.* (2007); Cominelli *et al.* (2008) รายงานว่าแอนโธไซยานินถูกควบคุมโดยแสงและน้ำตาลทำให้เกิดความเครียด น้ำตาลเป็นตัวส่งสัญญาณหลักในกระบวนการถ่ายทอดสัญญาณที่ควบคุมกระบวนการที่สำคัญหลายอย่างในทุกขั้นตอนของวัฏจักรของพืช (Rolland *et al.*, 2006) ในน้ำตาลซูโครสที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวคือน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโทส (Nishikawa *et al.*, 2005) นอกจากนี้ยังได้รับรายงานก่อนหน้านี้ว่าน้ำตาลช่วยเพิ่มการสะสมของแอนโธไซยานินในพืชหลายชนิด การสังเคราะห์แอนโธไซยานินในหัวไชเท้าเกิดจากน้ำตาลในไฮโปคอติล (Hypocotyl) (Hara *et al.*, 2004) น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลซูโครสเป็นที่รู้จักในฐานะสารชีวโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพของพืชในกระบวนการเมตาบอลิซึม การสังเคราะห์แสง การเผาผลาญคาร์บอนและไนโตรเจน การออกดอกการตอบสนองต่อความเครียด (Moreno *et al.*, 2008) การทดลองก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าการใช้กรดอะมิโนเมทไธโอนีน (methionine) ในฐานะสารตั้งต้นการสังเคราะห์ นำไปสู่การเพิ่มปริมาณกลูโคซิโนเลทในเรดิช (Schreiner, 2005; Moreno *et al.*, 2008)

จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Yang *et al.* (2016) พบว่ากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับสารประกอบฟีนอลิกของต้นอ่อนเรดิช อย่างไรก็ตามการศึกษาอื่น ๆ ได้รายงานว่า กลูโคราฟาคาตินจากต้นอ่อนเรดิชแสดงกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ (Kim *et al.*, 2006) และมีส่วนทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวมของสารสกัดจากเรดิช (Barillari *et al.*, 2005; Barillari *et al.*, 2006) ความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างสารประกอบฟีนอลิก กลูโคราฟาคาตินและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดประเมินโดยวิธี FRAP ซึ่งจากรายงาน Steyn *et al.* (2002) พบว่าสารประกอบฟีนอลิก กลูโคราฟาคาตินมีแนวโน้มส่งผลให้กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP สูงขึ้นซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของเรา

จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Williamson *et al.* (1998) รายงานว่าแอนโธไซยานินและกลูโคซิโนเลทได้รับการพิสูจน์ว่ามีหน้าที่ในการรักษาระดับอนุมูลอิสระของพืช น้ำตาลเป็นตัวควบคุมเมตาบอลิซึมของกรดวิตามินซีในบร็อกโคลี่ (Nishikawa *et al.*, 2005) และการสังเคราะห์ทางชีวภาพของแอนโธไซยานินใน *Arabidopsis thaliana* (Teng *et al.*, 2005) น้ำตาลซูโครส กลูโคสและฟรุกโทสนั้นส่งเสริมการสังเคราะห์กลูโคซิโนเลทและแอนโธไซยานินในบร็อกโคลี่ จากรายงานก่อนหน้านี้ของ Teng *et al.* (2005) รายงานว่าการสะสมของแอนโธไซยานินในเรดิชสีแดง (Hara *et al.*, 2004) และกะหล่ำปลีแดง (Yuan *et al.*, 2009) มีการเพิ่มขึ้นของของยีนสังเคราะห์

แอนโทไซยานิน ซึ่งแอนโทไซยานินและกลูโคซิโนเลทที่เกิดจากซูโครสที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของบร็อกโคลี่ที่สูงขึ้นซึ่งบ่งชี้โดยค่า FRAP ซึ่งสอดคล้องกับการสำรวจในอดีตเกี่ยวกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของแอนโทไซยานินและกลูโคซิโนเลท (Williamson *et al.*, 1998; Steyn *et al.*, 2002) โซเดียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์และซูโครส สามารถเหนี่ยวนำให้พืชเกิดความเครียด (Bußler *et al.*, 2015) เมื่อพืชเกิดความเครียดพืชจะเกิดการสร้างสารอนุมูลอิสระ เช่น อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide free radicals) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide ; H_2O_2) และ อนุมูลอิสระไฮดรอกซี (hydroxyl radicals ;OH) ซึ่งจะทำลายส่วนต่างๆ ของเซลล์ เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิก เยื่อหุ้มเซลล์ เป็นต้น โดยพืชจะกระตุ้นการสร้าง Type I และ Type II signaling networks เพื่อสร้างสารต้านอนุมูลอิสระในรูปเอนไซม์ (enzymatic antioxidants) เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutases ;SOD) หรือสร้างสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ได้อยู่ในรูปของเอนไซม์ (non-enzymatic antioxidants) เช่น กลูต้าไธโอน (glutathione ;GSH) กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid ;AA) สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้จะสามารถช่วยให้พืชมีความอยู่รอดไปได้และเปลี่ยนสารอนุมูลอิสระที่เป็นอันตรายให้ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์พืชด้วย เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสจะเปลี่ยนเป็นออกซิเจนเดี่ยว (singlet oxygen ; O_2^-) ส่วน CAT, APX และ GPX จะเปลี่ยน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้กลายเป็นน้ำ (สุมาลี ชูกำแพง, 2007)

มีรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ ยุพภรณ์ จิโรภาสภาณุวงศ์, (2559) และ Tsai *et al.*, (2005) น้ำตาลซูโครสนอกจากจะเป็นแหล่งพลังงานที่จำเป็นกับเซลล์พืชแล้วยังสามารถนำไปใช้ในการเติมหมู่น้ำตาลให้กับสาร aglycone ในกระบวนการไกลโคซิเลชัน (glycosylation) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาสุดท้ายของกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Mano *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังส่งผลต่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินใน *Arabidopsis* เช่น flavanone 3 beta-hydroxylase chalcone synthase chalcone isomerase และ anthocyanidin synthase เป็นต้น ซูโครส กลูโคส และฟรุคโตส ช่วยในการสังเคราะห์กลูโคซิโนเลทและแอนโทไซยานินในพืชตระกูลกะหล่ำและซูโครสเป็นสารที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการกระตุ้นการสะสมของสารทุติยภูมิ นอกจากนี้ยังมีรายงานของ อธิชา นะมิกิ และคณะ, (2560) และ Turmanidze *et al.* (2017) พบว่าการใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ทำให้มีปริมาณสารแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นโดยการกระตุ้นการแสดงออกยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานินได้อีกด้วย

4.2.4 ผลของสารสกัดหยาบผักกาดเขียวต่อการยับยั้งการมีชีวิตรอดและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

จากการเปรียบเทียบระหว่างการให้พลาสมาเย็น การให้พลาสมาเย็นร่วมกับสารกระตุ้นอินทรี และการให้สารกระตุ้นอินทรี พบว่าทริตย์เม้นที่มีการให้พลาสมาเย็นมีปริมาณสารไอโซไฮโอไซยานเนทเพิ่มมากที่สุดและยังมีปริมาณสารออกฤทธิ์ที่เพิ่มขึ้นอีกด้วย จึงทำการคัดเลือกทริตย์เม้นการให้พลาสมาเย็นมาทำการศึกษาต่อโดยศึกษาผลของสารสกัดหยาบผักกาดเขียวต่อการยับยั้งการมีชีวิตรอดและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ด้วยเทคนิค MTT (แสดงผลดังข้อ 4.2.2 และ 4.2.3)

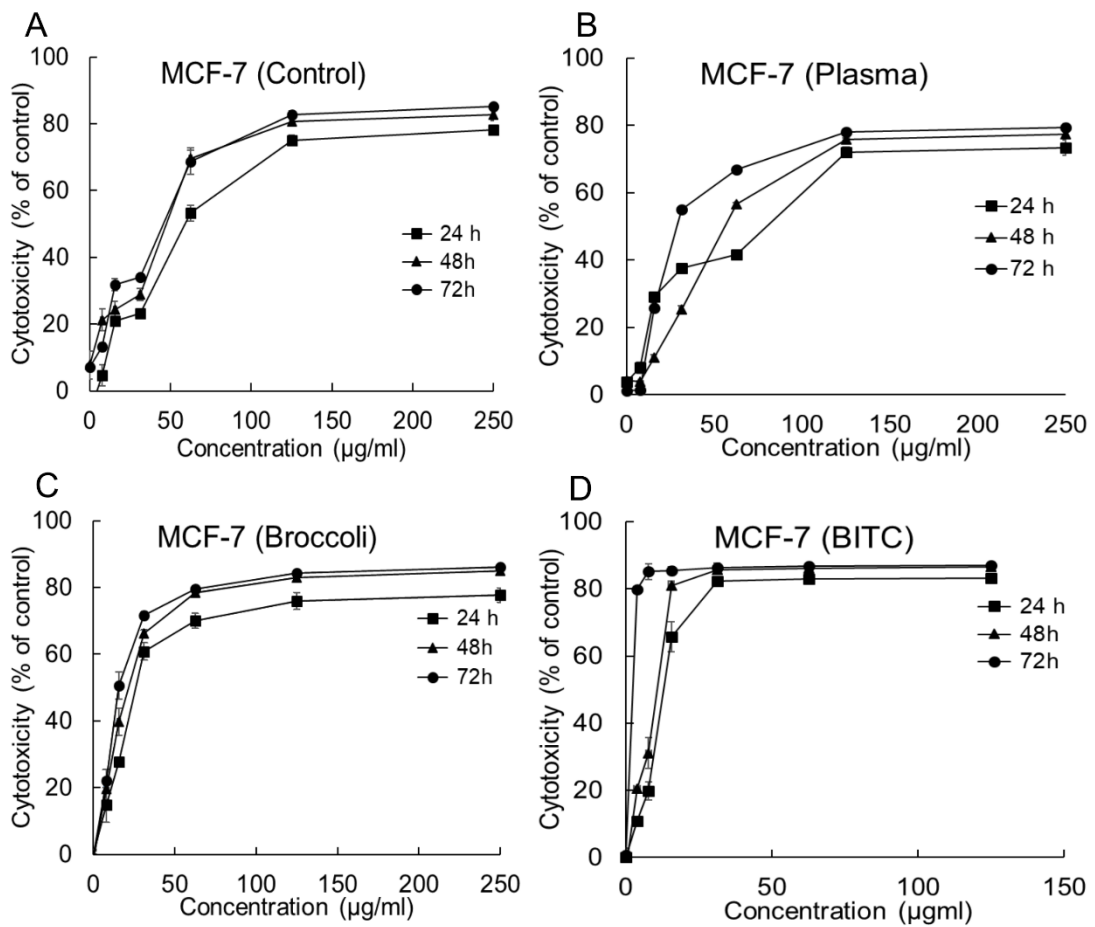
หลักการทํางานของ MTT คือเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่มี Enzyme succinate dehydrogenase ซึ่งจะเปลี่ยน tetrazolium salt ให้เป็นผลึกฟอร์มาซานโดยปฏิกิริยาการรีดิวซ์ (Reduction) และผลึกฟอร์มาซานมีสีม่วงน้ำเงินที่ไม่ละลายในน้ำต้องละลายด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของฟอร์มาซานซึ่งจะแปรผันโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิต ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ได้รับสารสกัดหยาบผักกาดเขียวที่มีการให้พลาสมาเย็นความเข้มข้น 0 ถึง 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรหลังการบ่มที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดหยาบของผักกาดเขียวที่มีการให้พลาสมาเย็นมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 มากที่สุดที่เวลาการบ่ม 72 ชั่วโมง มีค่า E_{max} เท่ากับ 90.08 ± 1.27 และมีค่า IC_{50} ต่ำที่สุดเท่ากับ 28.35 ± 0.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (แสดงภาพที่ 24B) เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบของผักกาดเขียวตัวอย่างควบคุม (แสดงภาพที่ 24A) โดยสารสกัดหยาบของผักกาดเขียวที่มีการให้พลาสมาเย็นมีค่า IC_{50} ต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 มากกว่าโดยสารสกัดหยาบของผักกาดเขียวตัวอย่างควบคุม 1.6 เท่า และเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบของบร็อคโคลี่ (แสดงภาพที่ 24C) และสารเบนซิลไอโซไฮโอไซยานเนท (แสดงภาพที่ 24D) พบว่าสารสกัดหยาบบร็อคโคลี่และสารเบนซิลไอโซไฮโอไซยานเนท มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ที่เวลาการบ่ม 72 ชั่วโมงมีค่า IC_{50} ต่ำกว่าสารสกัดหยาบของผักกาดเขียวที่มีการให้พลาสมาเย็น (ตารางที่ 17)

จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดหยาบของผักกาดเขียวที่มีการให้พลาสมาเย็นมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 มากที่สุดที่เวลาการบ่ม 72 ชั่วโมง มีค่า E_{max} เท่ากับ 94.07 ± 0.75 และมีค่า IC_{50} ต่ำที่สุดเท่ากับ 14.79 ± 1.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (แสดงภาพที่ 25B) เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบของผักกาดเขียวตัวอย่างควบคุม (แสดงภาพที่ 25A) โดยสารสกัดหยาบของผักกาดเขียวที่มีการให้พลาสมาเย็นมีค่า IC_{50} ต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 มากกว่าโดยสารสกัดหยาบผักกาดเขียวตัวอย่างควบคุมถึง 1.29 เท่า และเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบบร็อคโคลี่

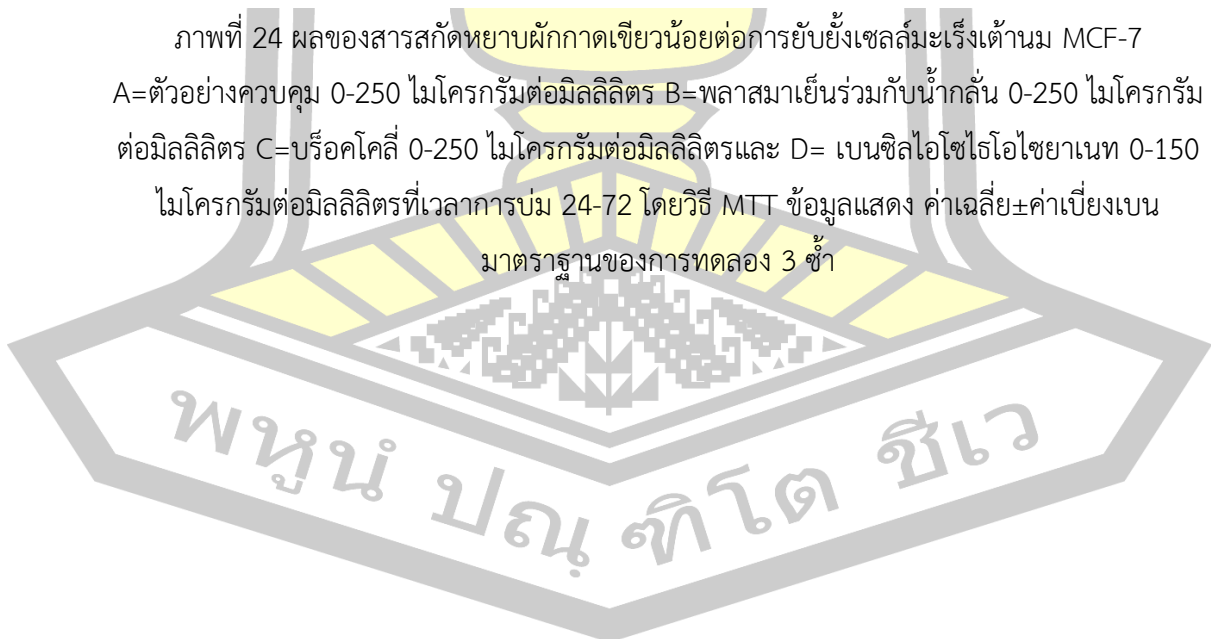
(แสดงภาพที่ 25C) และสารเบนซิลไฮดรอกซีไอโซชายานเท (แสดงภาพที่ 25D) พบว่าสารสกัดหยาบของบร็อกโคลี่และสารเบนซิลไฮดรอกซีไอโซชายานเท มีค่า IC_{50} ต่อเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 ที่เวลาการบ่ม 72 ชั่วโมง ต่ำกว่าสารสกัดหยาบของผักกาดเขียวอ่อนที่มีการให้พลาสมาเย็น (ตารางที่ 17) สารสกัดหยาบจากผักกาดเขียวอ่อนมีค่า IC_{50} ก่อนข้างต่ำแสดงถึงประสิทธิภาพที่ดีตั้งนั้นหากสารสกัดหยาบนี้ได้รับการพัฒนาด้วยการเตรียมเป็นสารบริสุทธิ์อาจทำให้เห็นถึงประสิทธิภาพได้ชัดเจนกว่านี้

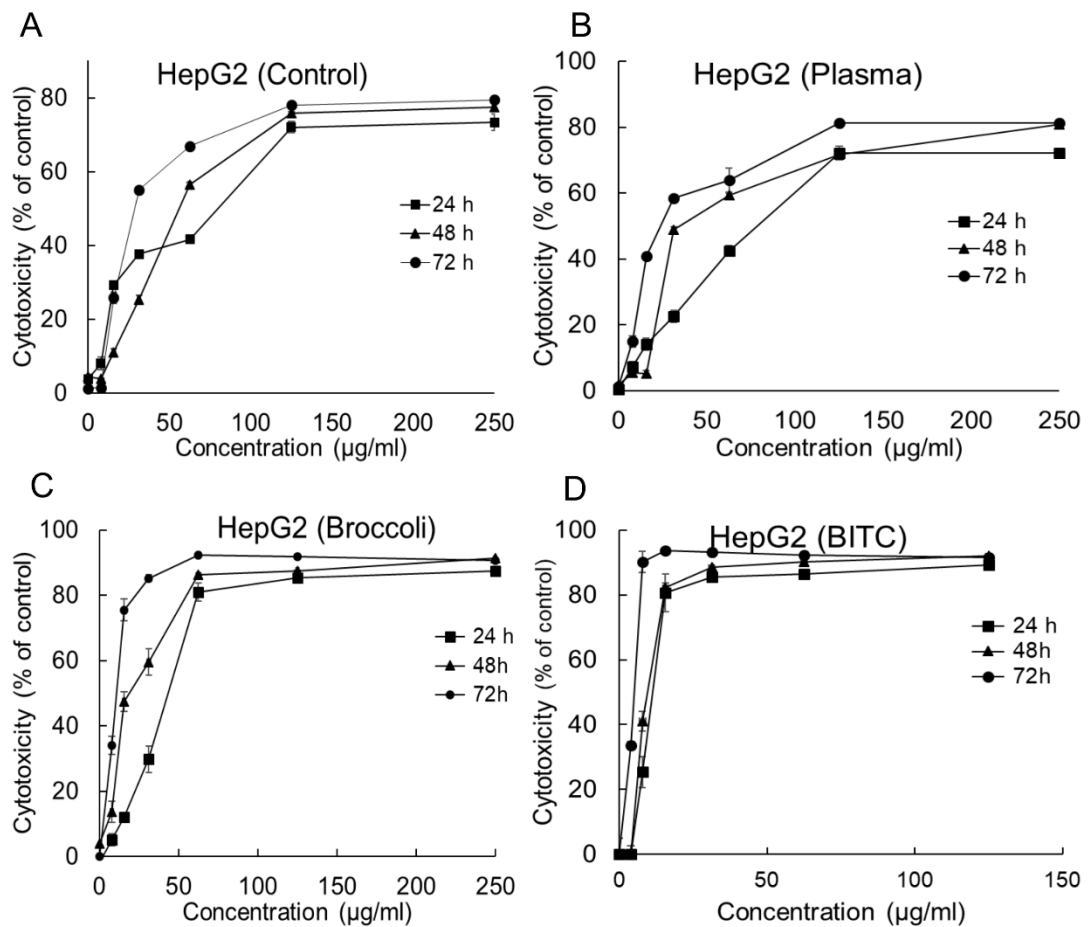
ส่วนการศึกษาการมีชีวิตรอดและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนด้วยวิธี Colony formation เป็นการศึกษาการมีชีวิตและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์หลังจากที่เซลล์ได้รับสารสกัดไมโครกรีนเพื่อตรวจสอบความสามารถในการเจริญเติบโตของเซลล์เมื่ออยู่ในสภาวะผิดปกติเนื่องจากมีสิ่งมากระตุ้นซึ่งอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมหรือการหยุดวงจรชีวิตของเซลล์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 ในกลุ่มทดลองที่เตรียมด้วยสารสกัดหยาบของผักกาดเขียวอ่อน (0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เวลาการบ่ม 24 ชั่วโมงแล้วเลี้ยงต่อในอาหารใหม่เป็นเวลา 14 วัน ย้อมเซลล์ด้วยคริสตัล ไวโอเลต ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์พบว่าโคโลนีของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 (แสดงภาพที่ 26A,C) และเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 (แสดงภาพที่ 26B,D) มีชีวิตและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของโคโลนีที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญหลังจากได้รับสารสกัดหยาบผักกาดเขียวอ่อนที่มีการให้พลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่น เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ที่รอดชีวิตมีจำนวนลดลงมากกว่าเซลล์มะเร็งระดับพบว่าความรุนแรงของการมีชีวิตและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 แปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบผักกาดเขียวอ่อน นอกจากนี้คุณภาพของโคโลนีที่รอดชีวิตยังลดลงด้วยโดยเมื่อวิเคราะห์สัณฐานของโคโลนีพบว่าโคโลนีมีขนาดเล็กและมีรูปร่างผิดปกติไปอาจเกิดจากความสามารถในการเจริญเติบโตของเซลล์ลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะผิดปกติเนื่องจากมีสารสกัดผักกาดเขียวอ่อนมากระตุ้นซึ่งเกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมหรือการหยุดวงจรชีวิตของเซลล์

พจนัน ปณฺ ทิโต ชีเว

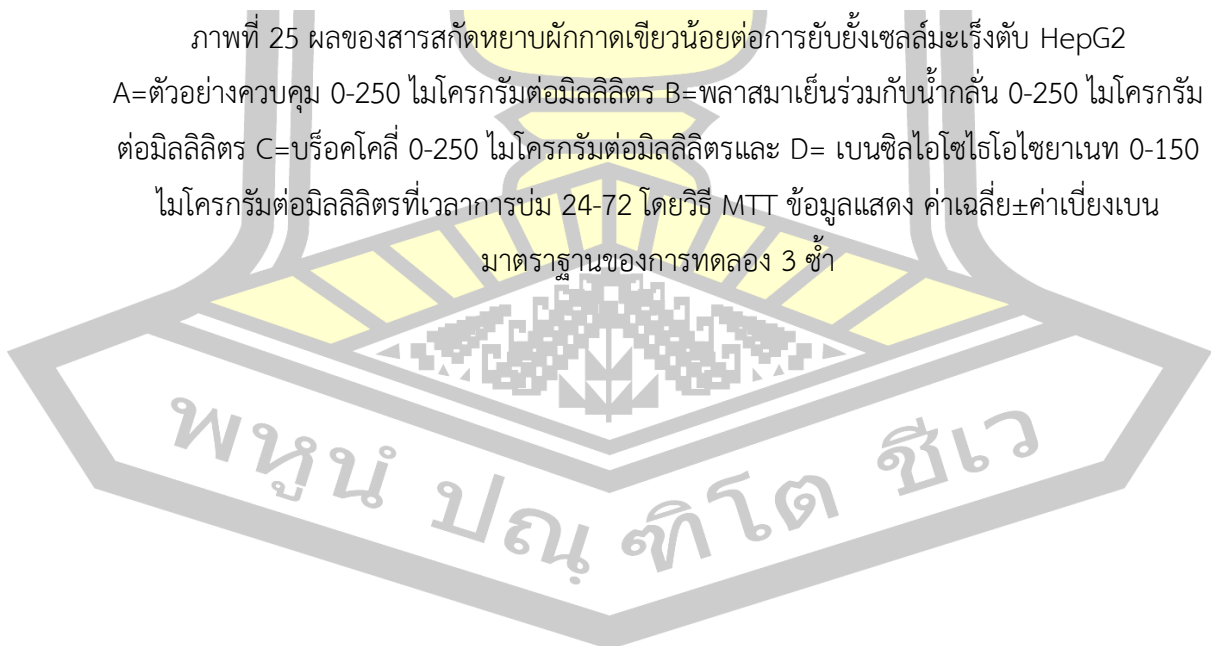


ภาพที่ 24 ผลของสารสกัดหยาบผักกาดเขียวต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7
 A=ตัวอย่างควบคุม 0-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร B=พลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่น 0-250 ไมโครกรัม
 ต่อมิลลิลิตร C=บร็อกโคลี่ 0-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ D= เบนซิลไอโซไซโทไซยานนท์ 0-150
 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่เวลาการบ่ม 24-72 โดยวิธี MTT ข้อมูลแสดง ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบน
 มาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ





ภาพที่ 25 ผลของสารสกัดหยาบผักกาดเขียวต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ HepG2
 A=ตัวอย่างควบคุม 0-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร B=พลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่น 0-250 ไมโครกรัม
 ต่อมิลลิลิตร C=บร็อกโคลี่ 0-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ D= เบนซิลไอโซไทโอไซยานเนต 0-150
 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่เวลาการบ่ม 24-72 โดยวิธี MTT ข้อมูลแสดง ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบน
 มาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

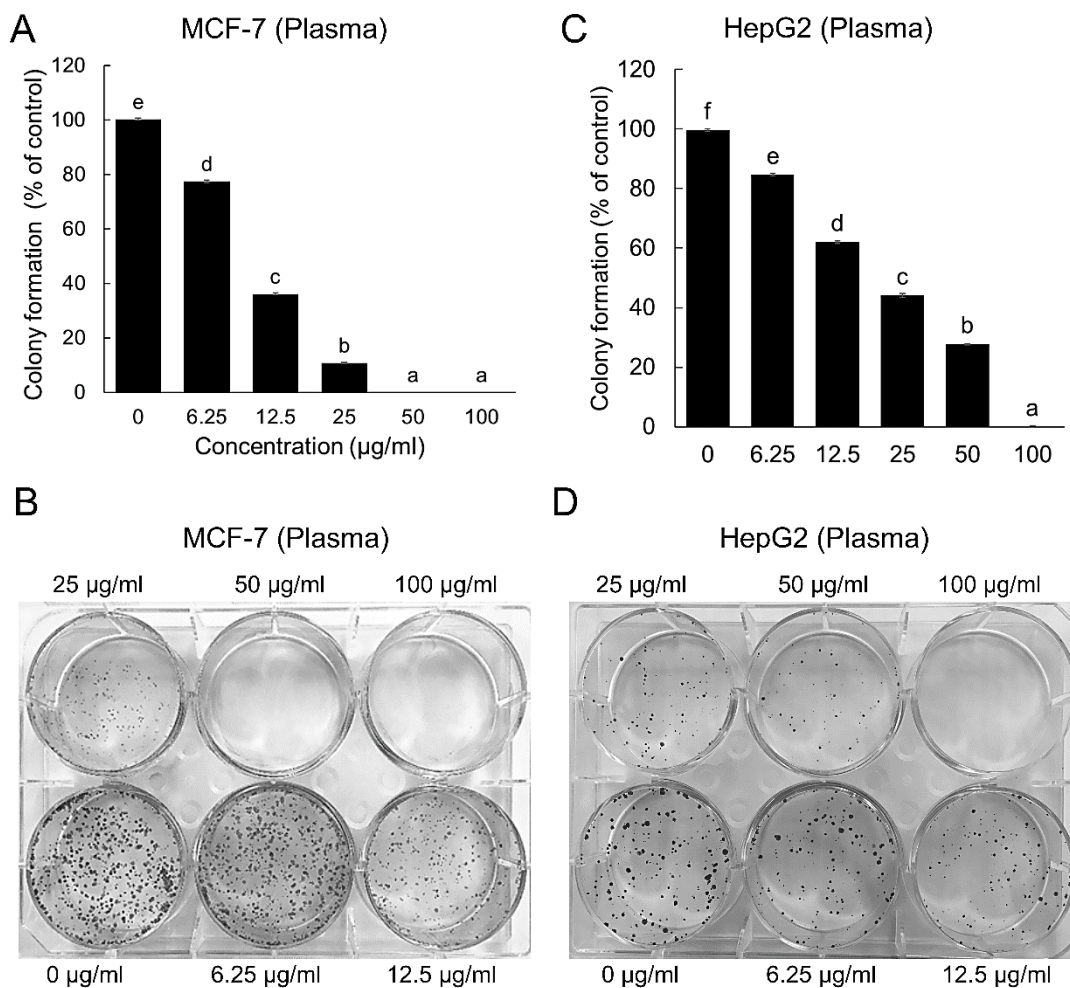


ตารางที่ 15 แสดงค่า E_{max} และ IC_{50} ของสารสกัดหยาบผักกาดเขียวอ่อนต่อเซลล์มะเร็ง

การทดลอง	เวลาบ่ม (h)	MCF-7		HepG2	
		E_{max} (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	E_{max} (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Control	24 h	72.25 \pm 1.45 ^b	72.06 \pm 2.57 ^b	78.91 \pm 1.28 ^b	73.59 \pm 2.59 ^c
	48 h	77.84 \pm 0.21 ^a	53.58 \pm 6.69 ^a	74.77 \pm 1.26 ^a	32.04 \pm 0.69 ^b
	72 h	76.66 \pm 0.52 ^a	49.79 \pm 1.64 ^a	79.58 \pm 1.58 ^a	19.11 \pm 0.35 ^a
Plasma	24 h	84.48 \pm 2.38 ^b	75.03 \pm 1.89 ^c	84.61 \pm 0.30 ^c	70.34 \pm 2.64 ^c
	48 h	83.11 \pm 1.34 ^b	55.30 \pm 0.48 ^b	89.85 \pm 0.50 ^b	37.52 \pm 1.90 ^b
	72 h	90.08 \pm 1.27 ^a	28.35 \pm 0.23 ^a	94.07 \pm 0.75 ^a	14.79 \pm 1.25 ^a
Broccoli	24 h	77.66 \pm 2.13 ^b	36.10 \pm 1.47 ^c	87.38 \pm 0.26 ^b	42.60 \pm 1.75 ^c
	48 h	84.96 \pm 0.54 ^a	25.65 \pm 5.31 ^b	91.23 \pm 0.16 ^a	23.75 \pm 1.47 ^b
	72 h	86.09 \pm 0.98 ^a	19.15 \pm 0.32 ^a	91.78 \pm 0.60 ^a	10.15 \pm 0.56 ^a
BITC	24 h	83.24 \pm 0.78 ^b	16.67 \pm 0.41 ^c	89.23 \pm 0.00 ^c	12.03 \pm 1.14 ^c
	48 h	86.55 \pm 0.37 ^a	8.54 \pm 0.37 ^b	91.99 \pm 0.52 ^a	6.70 \pm 0.52 ^b
	72 h	87.01 \pm 0.26 ^a	1.26 \pm 0.21 ^a	91.58 \pm 0.21 ^b	4.06 \pm 0.18 ^a

อักษร a,b,c.... ที่แตกต่างกันหมายถึงในข้อมูลคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยใช้ One-way ANOVA กับ Duncan's Multiple Range Test





ภาพที่ 26 ผลของสารสกัดหยาบผักกาดเขียวร่อนต่อการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนโคโลนีของเซลล์มะเร็ง

A= เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และ B=เซลล์มะเร็งตับ HepG2

การศึกษาก่อนหน้าจำนวนมากแสดงให้เห็นว่าสารประกอบจากธรรมชาติสามารถยับยั้งการเริ่มต้นการพัฒนาของโรคมะเร็ง (Pandey *et al.*, 2017) จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Sayeed *et al.* (2018) พบว่าอัลลิลไอโซไทโอไซยานเนทสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ที่สำคัญสังเกตเห็นว่าอัลลิลไอโซไทโอไซยานเนทส่งผลกระทบต่ออย่างมีนัยสำคัญต่อเซลล์เต้านมที่ไม่ใช่เนื้องอก MCF-10A อัลลิลไอโซไทโอไซยานเนทไม่ได้ทำให้เกิดอะพอพโทซิสและการหยุดวงจรชีวิตของเซลล์ในเซลล์MDA-MB-231 ตามที่ตรวจวัดโดย Flow cytometry นอกจากนี้ยังพบว่าอัลลิลไอโซไทโอไซยานเนทไม่สามารถแก้ไขการแสดงออกของยีน Caspase-8 Caspase-9 PARP และ p-mTOR proteins แต่สามารถลดการแสดงออกของ Beclin-1 proteins นอกจากนี้อัลลิลไอโซไทโอไซ

ยาเนทยังเพิ่มการแสดงออกของยีน BCL-2 และ mTOR แต่ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน PRKAA1 และ PER2

ในรายงานก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าอัลลิลไอโซไทโอไซยาเนทสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน Caspase-8 และ Caspase-9 ในเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 (Bo *et al.*, 2016) เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว HL60 (Xu *et al.*, 2000) เพิ่มการแสดงออกของ Caspase-9 ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 (Bo *et al.*, 2016) MDA-MB-468 (Tsai *et al.*, 2012) ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ UM-UC-3 (Geng *et al.*, 2011) ในเซลล์มะเร็งสมอง GBM8401 (Chen *et al.*, 2010) ลดการแสดงออกของยีน BCL-2 ในเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 (Bo *et al.*, 2016) ในเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-468 (Tsai *et al.*, 2012) และในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ในการศึกษาระดับหลอดทดลอง (Xiao *et al.*, 2003) และในระดับสัตว์ทดลอง (Srivastava *et al.*, 2003) เพิ่ม PARP ในมะเร็งเต้านม MDA-MB-231 (Bo *et al.*, 2016) และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW620 (Lau *et al.*, 2010) การศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่าอัลลิลไอโซไทโอไซยาเนทเหนี่ยวนำให้เกิดการหยุดวงจรชีวิตของเซลล์ระยะเฟส S ในมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (Savio *et al.*, 2014) มะเร็งปอด (Tripathi *et al.*, 2015) และเหนี่ยวนำให้เกิดการหยุดวงจรชีวิตระยะเฟส G2/M ในมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (Savio *et al.*, 2014) มะเร็งปอด (Tripathi *et al.*, 2015) มะเร็งเต้านม MDA-MB-468 (Tsai *et al.*, 2012) มะเร็งสมอง (Chen *et al.*, 2010) มะเร็งต่อมลูกหมาก (Xiao *et al.*, 2003) และมะเร็งเม็ดเลือดขาว (Xu and Thornalley 2000) การศึกษารายงานว่า Beclin-1 ที่แสดงออกมากเกินไปอาจส่งเสริมกระบวนการกลืนกินตัวเองของเซลล์ (autophagy) ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่บกพร่องของกระบวนการกลืนกินตัวเองของเซลล์ (Liang *et al.*, 1999)

ในการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Arora *et al.* (2016) ทำการศึกษาปัจจุบันแสดงให้เห็นถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ของ 3 บิวทีนิวไอโซไทโอไซยาเนท (3-butenyl isothiocyanate) ที่แยกได้จาก *Brassica juncea* L. Czern var. Pusa Jaikisan พบว่ามีกิจกรรมการยับยั้งเซลล์มะเร็ง ได้แก่ เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก เซลล์มะเร็งกระดุก เซลล์มะเร็งปากมดลูก เซลล์มะเร็งตับ โรคมะเร็งของเนื้อเยื่อประสาท และมะเร็งเต้านมและพบว่า 3 บิวทีนิวไอโซไทโอไซยาเนทมีประสิทธิภาพมากต่อเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก และมีรายงานว่า 3 บิวทีนิวไอโซไทโอไซยาเนทลดศักย์ไฟฟ้าของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย (mitochondria membrane potential) ของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 หลังได้รับการทรีตด้วย 3 บิวทีนิวไอโซไทโอไซยาเนท ในทางตรงกันข้ามมีการเพิ่มขึ้นของ ROS หลังจากได้รับ 3 บิวทีนิวไอโซไทโอไซยาเนท มีการลดลงของโปรตีน MMPs และมีการเพิ่มขึ้นของ mitochondrial ROS มักจะเชื่อมโยงกับการเริ่มต้นการตายแบบอะพอพโทซิส (Gottlieb *et al.*, 2003; Kwang-Youn *et al.*, 2011) จากรายงานก่อนหน้านี้ของ Núñez-Iglesias *et al.* (2018) พบว่า 3 บิวทีนิวไอโซไทโอไซยาเนทเหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ที่เวลา 24 48 และ

72 ชั่วโมงหลังการบ่ม นอกจากนั้น 3 บิวทีนิวไอโซไทโอไซยาเนทยังแสดงให้เห็นถึงการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ต่อมลูกหมาก PC-3 แต่ 3 บิวทีนิวไอโซไทโอไซยาเนทไม่มีผลต่อเซลล์มะเร็ง DU145PC

มีรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Papi *et al.* (2008b) รายงานว่าราราฟาซาทิน (4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate ;Raphasatin) จาก *Raphanus sativus* L. มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ LoVo HCT-116 และ HT-29 ลดการเจริญของเซลล์มะเร็งและเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (LoVo, HCT-116, และ HT-29 จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่าเซลล์มะเร็งหลอดอาหาร KYSE510 ที่ได้รับการทรีตย์ราราฟาซาทินพบว่าการแสดงออกของโปรตีน Bcl2 ที่ลดลง เหนี่ยวนำ caspase-3, caspase-9 และ PARP-1 บ่งชี้ว่าการมีชีวิตของเซลล์ลดลงเกิดขึ้นผ่านทางวิถี mitochondrial apoptotic นอกจากนั้นยังเหนี่ยวนำให้เกิดการหยุดวงจรชีวิตของเซลล์ในระยะเฟส G2/M มีการเหนี่ยวนำ Chk1, Akt phosphorylations และลดการแสดงออกของโปรตีน p27 (Hirata *et al.*, 2019) มีรายงานหลายฉบับเกี่ยวกับไอโซไทโอไซยาเนทที่แสดงให้เห็นว่าไอโซไทโอไซยาเนทมีกิจกรรมยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเช่นการเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งเนื่องจากการผลิต ROS (Schumacker 2006; Trachootham *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2014) ซัลโฟราเฟนได้สามารถหยุดวงจรชีวิตของเซลล์และกระตุ้นการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์แสดงให้เห็นว่าทำให้เกิดการหยุดวงจรชีวิตของเซลล์ G1/G2 และชักนำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสโดยการลดการแสดงออกของยีนต้านการเกิดการตายแบบอะพอพโทซิสคือยีน Bcl-2 และมีการแสดงออกของยีนที่เหนี่ยวนำให้เซลล์มีการตายแบบอะพอพโทซิสเพิ่มมากขึ้นคือยีน Bax ในเซลล์ลำไส้ใหญ่ (Dexheimer *et al.*, 2006; Chen and Wong 2008) ในปัจจุบันพบว่าเซลล์ในเฟส S/G2/M ลดลงเนื่องจากซัลโฟราเฟนมีการจัดการให้เซลล์นำไปสู่การเกิดการตายของเซลล์มะเร็งรังไข่ นอกจากนั้นยังเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิสซึ่งถูกวิเคราะห์โดยเทคนิค flow cytometry และ western blot พบว่ามีการลดลงของยีน Bcl-2 และมีการเพิ่มการแสดงออกของยีน Bax และ Caspase-3

มีรายงานวิจัยของ Pham *et al.* (2004); Hutzen *et al.* (2009); Kallifatidis *et al.* (2009) พบว่าซัลโฟราเฟนกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งมีการตายแบบอะพอพโทซิสผ่านการเปิดการทำงานของ caspase-3 เหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีน p21 และ p27 ที่มากขึ้นและยับยั้งการแสดงออกของยีน cyclin D1 ซัลโฟราเฟนกระตุ้นให้เกิดการทำงานของ FOXO transcription factors กระตุ้นให้มีการเกิดอะพอพโทซิสผ่านการยับยั้งการทำงานของวิถี PI3K/AKT และ MEK/ERK ซึ่งเกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของเซลล์ เมตาบอลิซึมของเซลล์ การเคลื่อนที่ของเซลล์ และการสร้างหลอดเลือด มีผลต่อกระบวนการแบ่งจำนวนของเซลล์มะเร็ง และกระตุ้นการทำงานของ transcription factor รวมถึงควบคุมการแสดงออกของยีน การยับยั้งวิถี PI3K/AKT และ MEK/ERK ทำหน้าที่

ร่วมกันเพื่อเปิดการทำงาน FOXO transcription factors และทำให้เกิด phosphorylation deficient mutants

รายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารกลุ่มสารไอโซโรโอโซนาเทท สารประกอบฟีนอลิกและ สารประกอบพลาโวนอยด์มีผลต่อการก่อตัวแบ่งจำนวนโคโลนีของเซลล์มะเร็ง กลไกการทำงานอาจ เกิดการเหนี่ยวนำให้เกิด ROS เกิดการเพิ่มขึ้นของกิจกรรม caspase-3 ที่เกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำ ให้เซลล์เกิดอะพอพโทซิสและอาจเกิดการลดศักยภาพของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย ซึ่งวิถีภายในหรือวิถี ไมโทคอนเดรีย (intrinsic pathway หรือ mitochondrial pathway) ซึ่งเกิดจากการที่ไมโทคอนเดรียเกิดความเสียหายทำให้มีการปลดปล่อยของโปรตีนไซโตโครม C (cytochrome c) ออกมาสู่ไซโตพลาซึมและจะไปรวมตัวกับโปรตีน Apaf-1 ทำให้เกิดเป็นอะพอพโทโซมซึ่งจะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-9 และ caspase-9 ที่ถูกกระตุ้นนี้จะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspases-3, -6, และ -7 ซึ่งก็จะส่งผลให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (สุพักตร์ โยไธสง และคณะ 2012; Steelman *et al.*, 2004)

มีรายงานของ Kandasamy *et al.* (2003); Shankar *et al.* (2007) ว่าซัลโฟราเฟนเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีน proapoptotic proteins (Bax, Bak, PUMA, Noxa, and Bim) death receptors (TRAIL-R1/DR4 and TRAIL-R2/DR5) และยับยั้งการแสดงออกของยีน antiapoptotic proteins (Bcl-2 and Bcl-XL) นอกจากนี้ซัลโฟราเฟนยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ที่ปลูกถ่ายในหนูแรทโดยซัลโฟราเฟนมีการกระตุ้นอะพอพโทซิสยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์เนื้องอก ยับยั้งการบุกรุก ยับยั้งระยะการกระจายและยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ซัลโฟราเฟนยังยับยั้งกระบวนการ phosphorylation ของ AKT, ERK1/2, FOXO3A, และ p65-NF- κ B ในเนื้องอก กลุ่มโปรตีน Bcl-2 นั้นมีบทบาทที่สำคัญในการตายของเซลล์ประกอบด้วย pro-survival และ proapoptotic ที่เชื่อมโยงกับมะเร็งหลายชนิด ในการทดลองระดับหลอดทดลองพบว่าซัลโฟราเฟนลดการแสดงออกของยีน Bcl-2 และ Bcl-XL และเพิ่มการแสดงออกของ Bax, Bak, PUMA, Noxa และ Bim ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3

มีรายงานวิจัยของ Murata *et al.* (2000) พบว่าอัลลิลไอโซโรโอโซยาเนททำให้กลไกของความเสียหายที่เกิดจากการทำลายดีเอ็นเอ ยีนต้านต่อการตายและยีน c-Ha-ras-1 proto-oncogene ถูกเปิดการทำงานโดยอัลลิลไอโซโรโอโซยาเนทเช่นเดียวกับเบนซิลไอโซโรโอโซยาเนท และฟีนีทิวไอโซโรโอโซยาเนทซึ่งตรวจวัดความเสียหายของดีเอ็นเอโดยใช้ อิเล็กโทรโฟริซิส ไอโซโรโอโซยาเนทซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของการย่อยสลายกลูโคซิโนเลทในผักตระกูลกะหล่ำมีฤทธิ์รุนแรงต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิด จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่าเบนซิลไอโซโรโอโซยาเนท ฟีนีทิวไอโซโรโอโซยาเนทและซัลโฟราเฟนยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งโดยควบคุมการแสดงออกของโปรตีน MMP 9 ไอโซโรโอโซยาเนทโดยเฉพา ฟี นี ทิว ไอ โซ โร โอ โซ ยา เน ท ยับ ยั้ง 12-O-

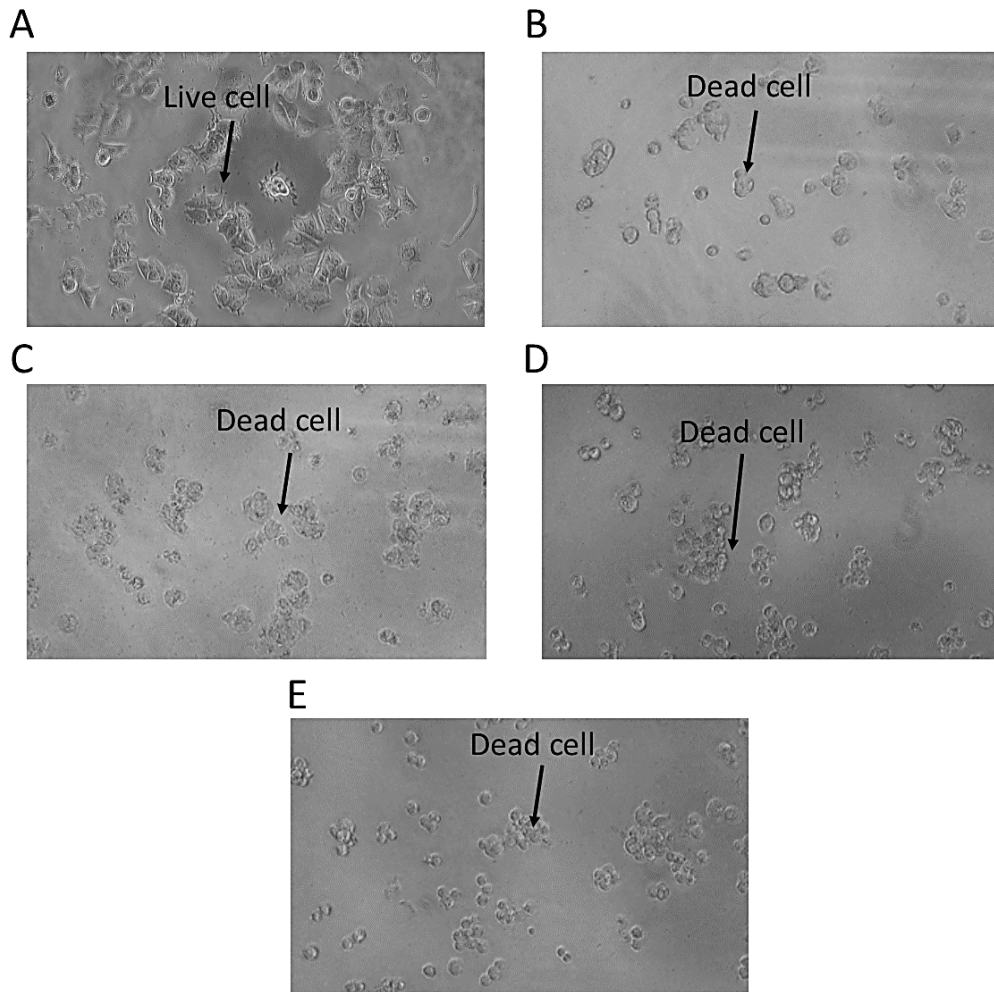
tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) ยับยั้งการทำงานของโปรตีน MMP 9 และยับยั้งการบูรณาการแพร่กระจายในเซลล์มะเร็งต่างๆ โดยแสดงให้เห็นว่าเบนซิลไฮดรอกซีไอโซชาเนท ฟีนีทิวไฮดรอกซีไอโซชาเนทและซัลโฟราเฟนยับยั้งการแสดงออกของ TMP-induced MMP 9 โดยการยับยั้ง AP-1 และ NF-kB ในเซลล์มะเร็งกระดูก U-2 OS นอกจากนี้ยังลดกระบวนการ phosphorylation ของ FAK, ERK2, และ Akt ไฮดรอกซีไอโซชาเนทจะยับยั้ง FAK phosphorylation ยับยั้ง phosphorylation ของ ERK1/2 และ Akt ในเซลล์มะเร็งกระดูก U2OS และเซลล์มะเร็งปอด A549 พร้อมกับการโยกย้ายของ p65 และ c-Fos นอกจากนี้ยังพบว่าเบนซิลไฮดรอกซีไอโซชาเนทมากกว่าฟีนีทิวไฮดรอกซีไอโซชาเนทมากกว่าซัลโฟราเฟน ที่มีกิจกรรมในการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน MMP 9 และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Jeong *et al.*, 2017) ผลลัพธ์เหล่านี้แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งกิจกรรม MMP 9 มีความสำคัญมากกว่าการยับยั้งกิจกรรม MMP 2 ในแง่ของผลการต่อต้านการแพร่กระจายในเซลล์มะเร็งของสารไฮดรอกซีไอโซชาเนท ทั่วไปสารประกอบที่มีโครงสร้างคาร์บอนอเล็กโตรไฟล์ (-N=C=S) จะมีความแข็งแรงและยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง (Ahn *et al.*, 2010) PEITC analog และ NMPEA ซึ่งขาดโครงสร้างคาร์บอนอเล็กโตรไฟล์แสดงให้เห็นถึงผลกระทบของการแยกตัวของเซลล์มะเร็งต่อการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งความแรงของสัมพัทธ์ซึ่งไฮดรอกซีไอโซชาเนทนั้นยับยั้งทั้งกิจกรรม MMP 9 และการย้ายถิ่นของเซลล์มะเร็งมีการจัดอันดับดังต่อไปนี้ เบนซิลไฮดรอกซีไอโซชาเนทมากกว่าฟีนีทิวไฮดรอกซีไอโซชาเนทมากกว่าซัลโฟราเฟน ไฮดรอกซีไอโซชาเนทมีผลต่อเซลล์มะเร็งต่างๆ รวมถึงการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันและยับยั้งวงจรชีวิตของเซลล์มะเร็ง (Wu *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011) ไฮดรอกซีไอโซชาเนทยับยั้งการย้ายของ p65 และ c-fos รวมทั้งยับยั้งการทำงานของโปรโมเตอร์ MMP-9-WT, MMP-9-mAP-1 และ MMP-9-mNF-kB AP-1 และ NF-kB เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ MMP 9 ผ่านทาง MAPK หรือเส้นทาง PI3K/Akt (Hsiang *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008) ไฮดรอกซีไอโซชาเนทยับยั้งกระบวนการ phosphorylation ของ ERK และ Akt ในเซลล์มะเร็งกระดูก U-2 OS แต่ไม่ส่งผลกระทบต่อ phosphorylation ของ JNK p38 และ PI3K

ในรายงานของ Lee *et al.* (2015) พบไฮดรอกซีไอโซชาเนทยับยั้งการหลั่งและการแสดงออกของโปรตีน PMA-induced MMP 9 ผลของการยับยั้งของไฮดรอกซีไอโซชาเนทต่อการแสดงออกของ PMA-MMP-9 ที่เกิดจาก PMA นั้นพบว่าเกี่ยวข้องกับการยับยั้งระดับการถอดรหัส MMP 9 ผ่านการ NF-kB และ Activator protein-1 (AP-1) ลดการส่งสัญญาณ MMP-9-mediated เช่น FAK และ JNK ในขณะที่ไม่มีผลต่อกระบวนการ phosphorylation ของ ERK และ p38

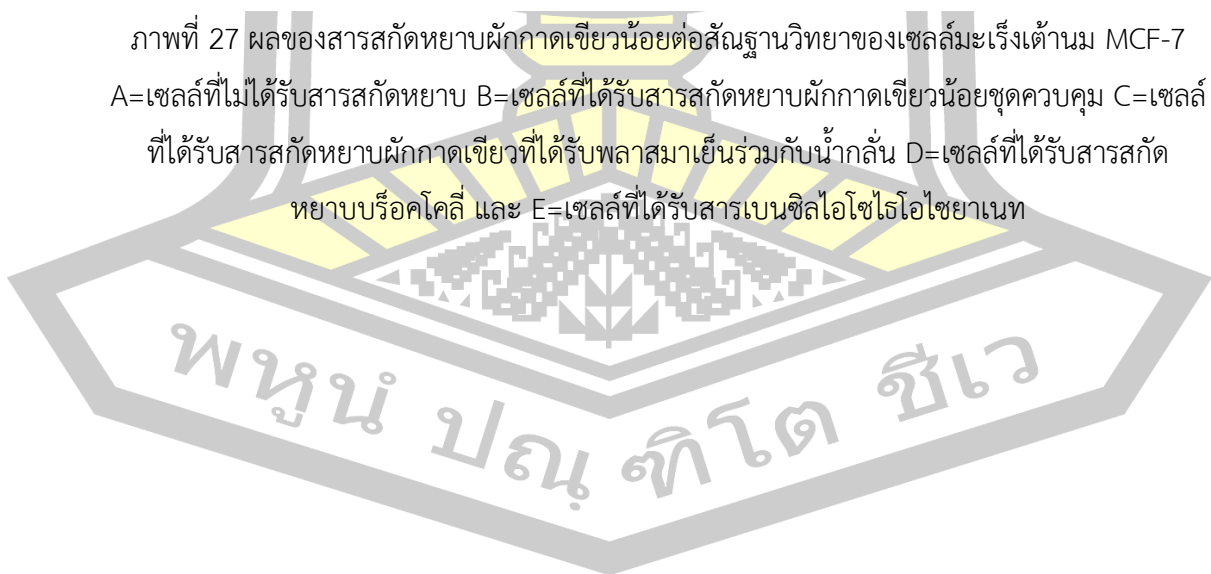
4.2.5 ผลของสารสกัดหยาบผักกาดเขียวอ่อนต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็ง

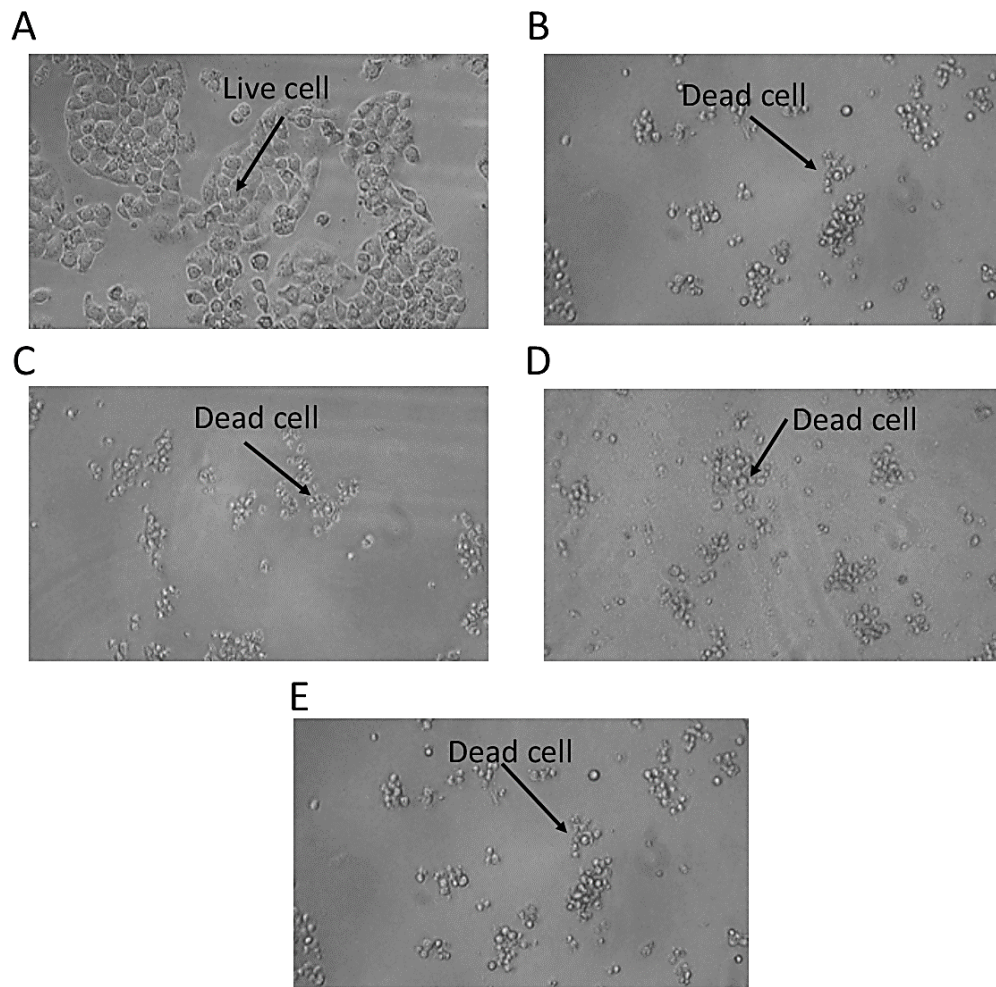
เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ตามปกติเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 เซลล์มีลักษณะแบนหัวแหลมท้ายแหลมมีเหลี่ยมมีการยึดเกาะกับ substratum มีการเจริญแผ่กระจายเป็นเป็นชั้นเดียวแบบ monolayer และเซลล์มะเร็งตับ HepG2 เซลล์มีลักษณะยาวเรียวยาวแหลมเป็นเหลี่ยม การเจริญแผ่กระจายเป็นเป็นชั้นเดียวแบบ monolayer จากผลการทดลองพบว่า เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ที่ได้รับสารสกัดหยาบจากผักกาดเขียวอ่อนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบมีการลดจำนวนลงของเซลล์มะเร็งและมีลักษณะของเซลล์ที่ขนาดเล็กกลองอีกด้วย มีการหดตัวของเซลล์ที่แสดงถึงลักษณะคล้ายการตายแบบอะพอพโทซิสจากการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 (แสดงภาพที่ 27) และเซลล์มะเร็งตับ HepG2 (แสดงภาพที่ 28) ที่ได้รับสารสกัดหยาบผักกาดเขียวอ่อนที่เวลาบ่มสารสกัด 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิดมีลักษณะที่ค่อนข้างกลมลง ขอบเซลล์มีลักษณะไม่เรียบมีรอยหยักซึ่งเป็นลักษณะของ blebbing membrane เซลล์ไม่เกาะแผ่และลอยเป็นเซลล์แขวนลอย มีการหดตัวของเซลล์ (cell shrinkage) และผิวเซลล์มีการโป่งพอง (membrane blebbing) มีการรวมตัวอัดแน่นของออร์แกเนลภายในเซลล์ (organelle condensation) โดยเป็นลักษณะของการตายแบบอะพอพโทซิสซึ่งมองเห็นเป็นลักษณะเป็นจุดสีดำอยู่ภายในเซลล์ ขอบเขตของเซลล์ไม่ชัดเจน และมีลักษณะชิ้นส่วนของเซลล์ที่แยกจากกันเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ เซลล์มีลักษณะเหมือนถุงใสซึ่งอาจเป็น ghost cell พบในระยะปลายของการตายแบบอะพอพโทซิสและพบว่าความรุนแรงของการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์แปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารสกัด

ลักษณะการตายของเซลล์มะเร็งนับเป็นจุดที่น่าสนใจอีกประเด็นหนึ่งโดยพบการหดตัวของเซลล์มีการแตกออกเป็นชิ้นส่วนเล็ก ๆ และมีการโป่งพองของเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับเซลล์ที่ตายด้วยกระบวนการอะพอพโทซิสกลไกการตายแบบหนึ่งที่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน เซลล์ที่ตายด้วยกระบวนการอะพอพโทซิสจะมีลักษณะเด่นที่สำคัญคือมีการหดตัวของเซลล์ cell shrinkage มีการหดตัวของโครมาติน (chromatin condensation การแตกออกของนิวเคลียส (nuclear fragmentation) และมีการโป่งพองของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane blebbing) และในระยะสุดท้ายส่วนของเซลล์มีการแตกแยกออกเป็นชิ้นส่วนเล็ก ๆ เรียกว่า apoptotic bodies หากอยู่ในร่างกายส่วนของ apoptotic bodies นี้จะถูกกำจัดโดยระบบภูมิคุ้มกันจึงไม่เกิดการกระจายของสารหรือของเสียไปยังเซลล์ข้างเคียงนั่นคือไม่ทำให้เกิดการอักเสบเหมือนกับการตายแบบ necrosis ที่จะมีลักษณะของเซลล์บวมไม่มีการหดตัวของโครมาตินเยื่อหุ้มเซลล์แตกออกทำให้ของเหลวภายในเซลล์รั่วออกสู่ภายนอก การตายแบบอะพอพโทซิสจะเป็นที่น่าสนใจมากในการพัฒนายาเพื่อการนำไปใช้ต่อไป (วัลยา อุทัยสง และไพศาล ขาวสัก, 2008)



ภาพที่ 27 ผลของสารสกัดหยาบผักกาดเขียวอ่อนต่อสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7
 A=เซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัดหยาบ B=เซลล์ที่ได้รับสารสกัดหยาบผักกาดเขียวอ่อนชุดควบคุม C=เซลล์
 ที่ได้รับสารสกัดหยาบผักกาดเขียวที่ได้รับพลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่น D=เซลล์ที่ได้รับสารสกัด
 หยาบบร็อคโคลี่ และ E=เซลล์ที่ได้รับสารเบนซิลไฮโดรโอไซยานเนท





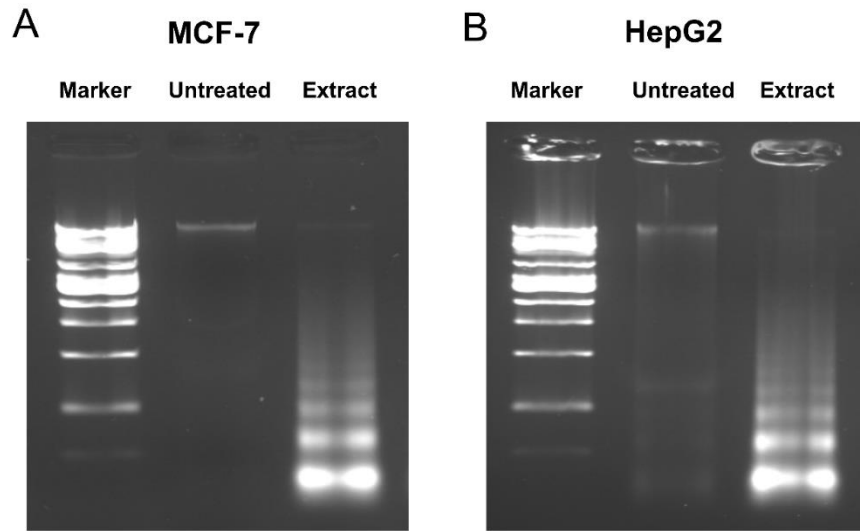
ภาพที่ 28 ผลของสารสกัดหยาบผักกาดเขียวอ่อนต่อสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งตับ HepG2
 A=เซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัดหยาบ B=เซลล์ที่ได้รับสารสกัดหยาบผักกาดเขียวอ่อนชุดควบคุม C=เซลล์
 ที่ได้รับสารสกัดหยาบผักกาดเขียวที่ได้รับพลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่น D=เซลล์ที่ได้รับสารสกัด
 หยาบบร็อคโคลี่ และ E=เซลล์ที่ได้รับสารเบนซิลไฮโดรโอไซยานเนท



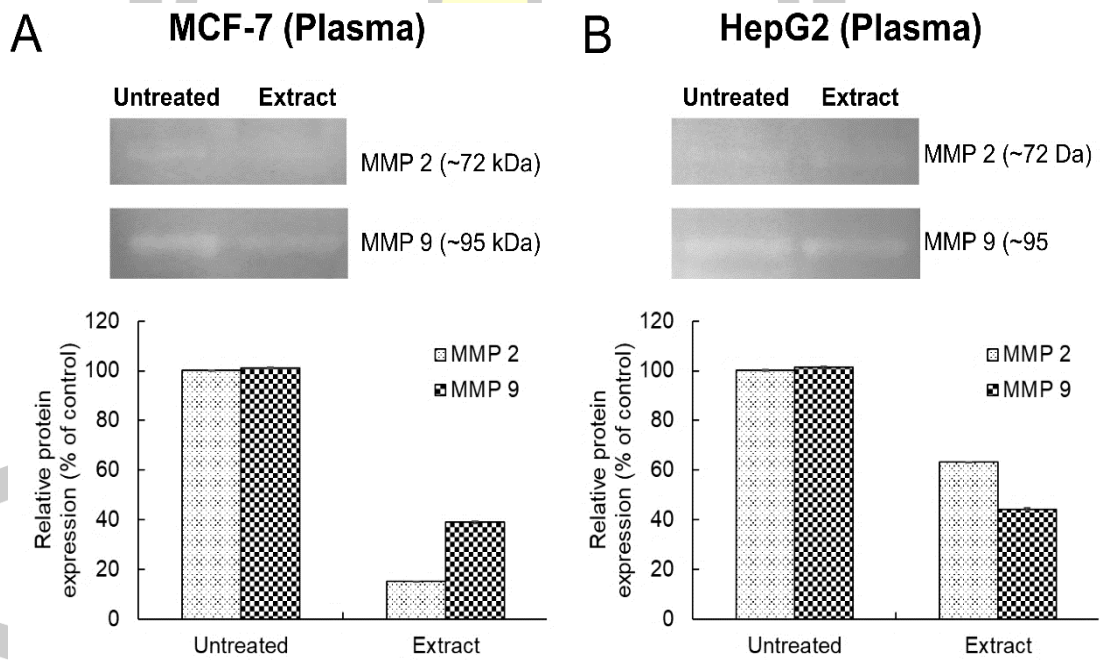
4.2.6 ผลของสารสกัดหยาบผักกาดเขียวอ่อนต่อการแตกหักของดีเอ็นเอและการแสดงออกของโปรตีน MMP 2 และ MMP 9 ในเซลล์มะเร็ง

การศึกษาการแตกหักเสียหายของดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อการตรวจสอบการตายแบบอะพอพโทซิส ซึ่งการแตกหักเสียหายของดีเอ็นเอเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็ง เป็นประเภทของการตายของเซลล์ที่ตั้งโปรแกรมไว้โดยจะกระตุ้นของ endogenous endonucleases โดยเฉพาะ caspase-3 ซึ่งเปิดใช้งาน DNase (CAD) โดยการศึกษาการแตกหักเสียหายของดีเอ็นเอครั้งนี้เพื่อระบุการเกิดอะพอพโทซิสเต้านม MCF-7 และเซลล์มะเร็งตับ HepG2 โดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 (แสดงภาพที่ 29A) และเซลล์มะเร็งตับ HepG2 (แสดงภาพที่ 29B) เมื่อได้รับการทรีตด้วยสารสกัดหยาบผักกาดเขียวที่มีการทรีตด้วยพลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วทำการสกัดดีเอ็นเอแล้วแยกดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้ 1 kb Ladder DNA เป็น Marker โดยเปรียบเทียบกับควบคุมซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิดที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์สมบูรณ์ที่ไม่มีการทรีตด้วยสารสกัด ผลการทดลองพบว่านำไปสู่การเสื่อมสภาพการกระจายตัวแยกชิ้นส่วนและแตกหักของดีเอ็นเออย่างชัดเจน ซึ่งเป็นจุดเด่นของการเกิดอะพอพโทซิสในทางตรงกันข้ามชุดทดลองที่ไม่มีการทรีตด้วยสารสกัดไม่พบการกระจายตัวแยกชิ้นส่วนและแตกหักของดีเอ็นเอ โดยแสดงผล DNA Fragment Length

การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเป็นกลไกที่มีการควบคุมอย่างเป็นระเบียบแบบแผน อาศัยโปรตีนและเอนไซม์หลายชนิด กลไกหนึ่งที่สำคัญ คือ อาศัยเอนไซม์ matrix metalloproteinase 2 (MMP 2) และ matrix metalloproteinase 9 (MMP 9) ในเซลล์มะเร็งชนิดรุกราน gelatinase A (MMP-2) และ gelatinase B (MMP-9) แตกต่างจาก MMP ชนิดอื่น ๆ (Murata *et al.*, 2000) MMP-2 และ MMP-9 มีความสัมพันธ์กับระยะลุกลามของมะเร็งเนื่องจากความสามารถในการย่อยสลายคอลลาเจนประเภท IV ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน (basement membrane) จากผลการทดลองพบว่าหลังจากเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 (แสดงภาพที่ 30A) และเซลล์มะเร็งตับ HepG2 (แสดงภาพที่ 30B) เมื่อได้รับการทรีตด้วยสารสกัดหยาบผักกาดเขียวที่มีการทรีตด้วยพลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำส่วนในของอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรวจวัดการแสดงออกของ MMP-2 และ MMP-9 ใน 10% SDS-polyacrylamide gel ที่มีสารตั้งต้นเจลาติน 0.05 % ด้วยเทคนิค zymography โดยเปรียบเทียบกับควบคุมซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิดที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์สมบูรณ์ที่ไม่มีการทรีตด้วยสารสกัด พบว่าสารสกัดหยาบผักกาดเขียวอ่อนมีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน MMP 2 และ MMP 9 อย่างดีที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในอาหารเลี้ยงเซลล์ แสดงถึงสามารถในการยับยั้งการเคลื่อนที่ย้ายถิ่นของเซลล์มะเร็งได้



ภาพที่ 29 ผลของสารสกัดหยาดผักกาดเขียวต่อการแตกหักของดีเอ็นเอในเซลล์มะเร็ง
 A= เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และ B=เซลล์มะเร็งตับ HepG2



ภาพที่ 30 ผลของสารสกัดหยาดผักกาดเขียวต่อการแสดงออกของโปรตีน MMP2 และ MMP9 ในเซลล์มะเร็ง

A= เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และ B=เซลล์มะเร็งตับ HepG2

มีรายงานของ Kandasamy *et al.* (2003) และ Shankar *et al.* (2007) พบว่าซัลโฟราเฟนเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีน proapoptotic proteins (Bax, Bak, PUMA, Noxa, and Bim) และ death receptors (TRAIL-R1/DR4 and TRAIL-R2/DR5) และยับยั้งการแสดงออกของยีน antiapoptotic proteins (Bcl-2 and Bcl-XL) นอกจากนี้ซัลโฟราเฟนยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ที่ปลูกถ่ายในหนูแรทโดยซัลโฟราเฟนมีการกระตุ้นอะพอพโทซิส ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์เนื้องอก ยับยั้งการบุกรุก ยับยั้งระยะการกระจายและยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ซัลโฟราเฟนยังยับยั้งกระบวนการ phosphorylation ของ AKT, ERK1/2, FOXO3A, และ p53-NF- κ B ในเนื้องอก กลุ่มโปรตีน Bcl-2 นั้นมีบทบาทที่สำคัญในการตายของเซลล์ประกอบด้วย pro-survival และ proapoptotic ที่เชื่อมโยงกับมะเร็งหลายชนิด ในการทดลองระดับหลอดทดลองพบว่าซัลโฟราเฟนลดการแสดงออกของยีน Bcl-2 และ Bcl-XL และเพิ่มการแสดงออกของ Bax, Bak, PUMA, Noxa และ Bim ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3

การกระจายตัวของโอลิโกนิวคลีโอโซมของดีเอ็นเอที่เป็นเครื่องหมายรับรองการตายของเซลล์ late-stage apoptosis การแตกหักของดีเอ็นเอถูกเร่งปฏิกิริยาโดย DFF40/CAD DNase โดยส่วนใหญ่แล้วจะผ่าน caspase-3 ผ่าน proteolytic เฉพาะของ DFF45/ICAD ยีน caspases-3 caspases -6 และ caspases -7 มีหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส เช่นการแตกหักของดีเอ็นเอ การเกิดกระบวนการอะพอพโทซิสซึ่งสังเกตจากการเกิดหดของเซลล์ กระจายตัวของโอลิโกนิวคลีโอโซม การแตกหักของดีเอ็นเอ โครมาตินมีการหดตัวเล็กกลง ซึ่งทำให้เกิดการแยกสลายของเซลล์เป็นรูปแบบที่เรียกว่าอะพอพโทติก (apoptotic bodies) ซึ่งจะถูกล้อมและย่อยสลายอย่างรวดเร็วโดยเซลล์แมโครเฟจ (macrophage) หรือเซลล์ข้างเคียง เกิดการลดการแสดงออกของยีน Bcl-2 และ Birc 5 ในขณะที่มีการเพิ่มการแสดงออกของยีน Bax-alpha ซึ่งการเกิดการแตกหักของดีเอ็นเอส่งผลจากการแสดงออกของยีน caspase-3, caspases -6 caspases -7 และ caspases -14 ที่มีมากขึ้น โดยการแสดงออกของ caspase-3 caspases -6 caspases -7 และ caspases -14 มีผลทำให้เกิดย่อยสลายโปรตีนโครงสร้างต่างๆ อันได้แก่ actin fodrin และ lamin กระตุ้นให้เซลล์เกิดการแยกตัวและนิวเคลียสหดตัว ส่งเสริมการทำงานของ caspase-activated DNase/DNA fragmentation factor (CAD/DFF) ดังนั้นเมื่อเราพบลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เรียงตัวกันเหมือนขั้นบันไดที่เรียกว่าการแตกหักของดีเอ็นเอ (DNA fragmentation) บ่งบอกถึงเซลล์กำลังเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส

มีรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ Murata *et al.* (2000) พบว่าอัลลิลไอโซโทไอโซยานเทททำให้กลไกของความเสียหายที่เกิดจากการทำลายดีเอ็นเอ ยีนต่อต้านและยีน c-Ha-ras-1 proto-oncogene ถูกเปิดการทำงานโดยอัลลิลไอโซโทไอโซยานเทท เช่นเดียวกับ เบนซิลไอโซโทไอโซยานเทท

(Benzyl isothiocyanate ;BITC) และฟีนีทิวไอโซไทโอไซยาเนท (Phenethyl isothiocyanate ;PITC) ซึ่งตรวจวัดความเสียหายของดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์โพรทีนชิส นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Papi *et al.* (2008b) พบว่าการทดลองด้วยราฟาซาตินเกิดการกระตุ้นการตายด้วยการเพิ่มการทำงานของยีน Bax และลดลงของการทำงานของยีน Bcl-2 ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่หลังจากได้รับสารสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเป็นกลไกที่มีการควบคุมอย่างเป็นระเบียบแบบแผนอาศัยโปรตีนและเอนไซม์หลายชนิด กลไกหนึ่งที่สำคัญคืออาศัยเอนไซม์ matrix metalloproteinase 2 (MMP 2) และ matrix metalloproteinase 9 (MMP 9) ในเซลล์มะเร็งชนิดรุกราน gelatinase A (MMP 2) และ gelatinase B (MMP 9) แตกต่างจาก MMP ชนิดอื่น ๆ (Murata *et al.*, 2000) MMP 2 และ MMP 9 มีความสัมพันธ์กับระยะลุกลามของมะเร็ง เนื่องจากความสามารถในการย่อยสลายคอลลาเจนประเภท IV ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน (basement membrane) ไอโซไทโอไซยาเนทมีผลยับยั้งมะเร็งเป็นอย่างดีในหลาย ๆ ในระดับสัตว์ทดลอง สันนิษฐานได้จากการปรับเอนไซม์ xenobiotic-metabolizing เช่นโดยการยับยั้ง cytochrome P-450 หรือเหนี่ยวนำของเฟส II detoxifying enzymes นอกจากนี้ยังพบว่าฟีนีทิวไอโซไทโอไซยาเนท (phenyl isothiocyanate) ไม่เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งปากมดลูก Hela ตามเวลาและปริมาณยา การได้รับการทรีตด้วยไอโซไทโอไซยาเนททำให้เกิดการเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิส ทำให้เกิดการเหนี่ยวนำของกิจกรรมที่ caspase-3/ CPP32 นอกจากนี้ไอโซไทโอไซยาเนทยกเว้นฟีนีทิวไอโซไทโอไซยาเนทกระตุ้นการทำงานของกลุ่มเอนไซม์โปรตีโอไลติก (proteolytic enzyme) และกระตุ้นให้เกิดการแยก poly (ADP-ribose) polymerase ซึ่งมีผลตามมาคือเกิดกิจกรรมของ caspase และเกิดการกระจายแตกหักของดีเอ็นเอในเซลล์มะเร็ง (Yu *et al.*, 1998)

ในรายงานก่อนหน้านี้พบว่าฟีนีทิวไอโซไทโอไซยาเนท (Phenethyl isothiocyanate) ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งตับอ่อน MIAPaca2, PL-45, and BxPC3 นอกจากนี้ยังชะลอวงจรชีวิตของเซลล์โดยการยับยั้งวงจรชีวิตเซลล์มะเร็งตับอ่อนระยะเฟส G2/M และปรับระดับโปรตีนในกลุ่ม Bcl-2 นอกจากนี้ยังพบว่าฟีนีทิวไอโซไทโอไซยาเนทเหนี่ยวนำให้เกิดการแยก PARP และเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอ (Stan *et al.*, 2014) และยังมีรายงานวิจัยพบความเป็นพิษของซัลโฟราเฟนต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MFC-7 เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HT-29 และเซลล์มะเร็งตับ HepG2 นอกจากนี้พบว่าซัลโฟราเฟนแสดงความเป็นพิษสูงสุดในเซลล์มะเร็งตับ HepG2 หลังการบ่มที่ 24 48 และ 72 ชั่วโมงแต่ในทางตรงกันข้ามพบว่ากลูโคซิโนเลทไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่อเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ยังพบว่าซัลโฟราเฟนกระตุ้นให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส ทำให้เกิดการหดตัวของเซลล์ การอัดแน่นของโครมาตินและเกิดการกระจายแตกหักของดีเอ็นเอ มีการเพิ่มกิจกรรมการทำงานของ caspases -3 caspases -7 และ

caspases -9 ในขณะที่มีการลดลงของกิจกรรม caspase-8 การมีจำนวนลดลงของเซลล์มะเร็งถูกเหนี่ยวนำโดยการหยุดวงจรการทำงานของเซลล์ในเฟส G0/G1 อาจสรุปได้ว่าซัลโฟราเฟนทำให้เกิดพิษต่อเซลล์และกระตุ้นการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์ HepG2 ยกเว้นกลูโคซิโนเลทและกลูโคราฟานิน (Ibrahim *et al.*, 2018) มีรายงานวิจัยพบว่ากลไกระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของสารประกอบจากการวิเคราะห์พบการหยุดการทำงานของวงจรชีวิตเซลล์ (Geng *et al.*, 2011) ตัวอย่างเช่นทำให้เกิดการตายของเซลล์และทำให้เกิดจากกระจายแตกหักของดีเอ็นเอและหยุดการทำงานของเซลล์ระยะเฟส subG0/G1 และเหนี่ยวนำให้ดีเอ็นเอมีขนาดเล็กลงและเกิดการกระจายแตกหักต่อไป ดังนั้นซัลโฟราเฟนจึงมีศักยภาพที่จะทำให้เกิดการกระจายแตกหักของดีเอ็นเอและหยุดวงจรชีวิตของเซลล์ที่ระยะ subG0/G1 ในเซลล์HepG2 (Savio *et al.*, 2014)

มีรายงานวิจัยของ Murata *et al.* (2000) พบว่าอัลลิลไอโซโพรินอลไอโซยานเททำให้กลไกของความเสียหายที่เกิดจากการทำลายดีเอ็นเอ ยีนต่อต้านการตายและยีน c-Ha-ras-1 proto-oncogene ถูกเปิดการทำงานโดยอัลลิลไอโซโพรินอลไอโซยานเทเช่นเดียวกับเบนซิลไอโซโพรินอลไอโซยานเทและฟีนีทิวไอโซโพรินอลไอโซยานเท ซึ่งตรวจวัดความเสียหายของดีเอ็นเอโดยใช้อิเล็กโทรโฟริซิส ไอโซโพรินอลไอโซยานเทซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของการย่อยสลายกลูโคซิโนเลทในผักตระกูลกะหล่ำมีฤทธิ์รุนแรงต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิด จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่าเบนซิลไอโซโพรินอลไอโซยานเท ฟีนีทิวไอโซโพรินอลไอโซยานเทและซัลโฟราเฟนยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งโดยควบคุมการแสดงออกของโปรตีน MMP 9 ไอโซโพรินอลไอโซยานเท โดยเฉพาะ ฟีนีทิว ไอโซโพรินอลไอโซยานเท ยับยั้ง 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) ยับยั้งการทำงานของโปรตีน MMP 9 และยับยั้งการบุกรุกแพร่กระจายในเซลล์มะเร็งต่างๆ โดยแสดงให้เห็นว่าเบนซิลไอโซโพรินอลไอโซยานเท ฟีนีทิวไอโซโพรินอลไอโซยานเทและซัลโฟราเฟนยับยั้งการแสดงออกของ TMP-induced MMP 9 โดยการยับยั้ง AP-1 และ NF- κ B ในเซลล์เซลล์มะเร็งกระดูก U-2 OS นอกจากนี้ยังลดกระบวนการ phosphorylation ของ FAK, ERK1/2, และ Akt ไอโซโพรินอลไอโซยานเท จะยับยั้ง FAK phosphorylation ยับยั้ง phosphorylation ของ ERK1/2 และ Akt ในเซลล์มะเร็งกระดูก U2OS และเซลล์มะเร็งปอด A549 พร้อมกับการโยกย้ายของ p65 และ c-Fos นอกจากนี้ยังพบว่าเบนซิลไอโซโพรินอลไอโซยานเทมากกว่า ฟีนีทิวไอโซโพรินอลไอโซยานเทมากกว่าซัลโฟราเฟน ที่มีกิจกรรมในการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน MMP 9 และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Jeong *et al.*, 2017) ผลลัพธ์เหล่านี้แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งกิจกรรม MMP 9 มีความสำคัญมากกว่าการยับยั้งกิจกรรม MMP 2 ในแง่ของผลการต่อต้านการแพร่กระจายในเซลล์มะเร็งของสารไอโซโพรินอลไอโซยานเท

ทั่วไปสารประกอบที่มีโครงสร้างคาร์บอนอิลีทโรไฟล์ ($-N=C=S$) จะมีความแข็งแรงและยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง (Ahn *et al.*, 2010) ไอโซโพรินอลไอโซยานเทนั้นยับยั้งทั้งกิจกรรม MMP 9 และการย้ายถิ่นของเซลล์มะเร็งมีการจัดอันดับดังต่อไปนี้ เบนซิลไอโซโพรินอลไอโซยานเทมากกว่า

พีอีทีวไอโซโรโอไฮยเนทมากกว่าซัลโฟราเฟน ไอโซโรโอไฮยานเนทมีผลต่อเซลล์มะเร็งต่าง ๆ รวมถึงการตายของเซลล์แบบอะพอโทซิส เหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันและยับยั้งวงจรชีวิตของเซลล์มะเร็ง (Wu *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011) ไอโซโรโอไฮยานเนทยับยั้งการย้ายของ p65 และ c-fos รวมทั้งยับยั้งการทำงานของโปรโมเตอร์ MMP-9-WT, MMP-9-mAP-1 และ MMP-9-mNF-kB AP-1 และ NF-kB เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ MMP 9 ผ่านทาง MAPK หรือเส้นทาง PI3K/Akt (Hsiang *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008) ไอโซโรโอไฮยานเนทยับยั้งกระบวนการ phosphorylation ของ ERK และ Akt ในเซลล์มะเร็งกระดูก U-2 OS แต่ไม่ส่งผลกระทบต่อ phosphorylation ของ JNK p38 และ PI3K ในรายงานของ Lee *et al.* (2015) พบไอโซโรโอไฮยานเนทยับยั้งการหลั่งและการแสดงออกของโปรตีน PMA-induced MMP 9 ผลของการยับยั้งของไอโซโรโอไฮยานเนทต่อการแสดงออกของ PMA-MMP-9 ที่เกิดจาก PMA นั้นพบว่าเกี่ยวข้องกับการยับยั้งระดับการถอดรหัส MMP 9 ผ่านการ NF-kB และ Activator protein-1 (AP-1) ลดการส่งสัญญาณ MMP-9-mediated เช่น FAK และ JNK ในขณะที่ไม่มีผลต่อกระบวนการ phosphorylation ของ ERK และ p38

4.3 ผลการศึกษาผักชีหูด

4.3.1 ผลของพลาสมาเย็นและสารกระตุ้นอินทรีย์ต่อเปอร์เซ็นต์การงอก ความยาวของและน้ำหนักสดของผักชีหูด

จากการเปรียบเทียบระหว่างการให้พลาสมาเย็น การให้พลาสมาเย็นร่วมกับสารกระตุ้นอินทรีย์และการให้สารกระตุ้นอินทรีย์ในเมล็ดผักชีหูดพบว่าทรีตเมนต์ที่มีการให้พลาสมาเย็นเพียงอย่างเดียวหรือ ทรีตเมนต์ที่มีการให้พลาสมาเย็นร่วมกับสารกระตุ้นอินทรีย์ ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดผักชีหูดแต่พลาสมาเย็นช่วยทำให้เมล็ดผักชีหูดใช้เวลาในการงอกที่เร็วขึ้น ยกเว้นทรีตเมนต์ที่มีการให้สารกระตุ้นอินทรีย์ คือการให้โซเดียมคลอไรด์ส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดผักชีหูดเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 1.04 เท่า และพบว่าเมื่อมีการให้แคลเซียมคลอไรด์เมล็ดผักชีหูดมีการงอกที่ลดลงจากชุดควบคุม 1.06 เท่า (ตารางที่ 16)

ส่วนความยาวของผักชีหูดพบว่าทรีตเมนต์ที่มีการให้พลาสมาเย็น (ภาพที่ 31C) ทรีตเมนต์ที่มีการให้พลาสมาเย็นร่วมกับสารกระตุ้นอินทรีย์ (ภาพที่ 31D-F) และทรีตเมนต์ที่มีการให้สารกระตุ้นอินทรีย์ (ภาพที่ 31G-I) ไม่มีผลต่อความยาวของผักชีหูดยกเว้นทรีตเมนต์ที่มีการให้พลาสมาเย็นร่วมกับซูโครส และการให้ซูโครส ส่งผลให้ความยาวของผักชีหูดลดลงจากชุดควบคุม 1.24 และ 1.20 เท่า ตามลำดับ (ตารางที่ 16) นอกจากนั้นยังพบว่า การให้พลาสมาเย็นร่วมกับซูโครสหรือการให้ซูโครสส่งผลทำให้ลำต้นของผักชีหูดแคระและสั้นลงแต่เป็นที่น่าสังเกตว่าลำต้นผักชีหูดมีสีม่วงเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม(ภาพที่ 31D,G)

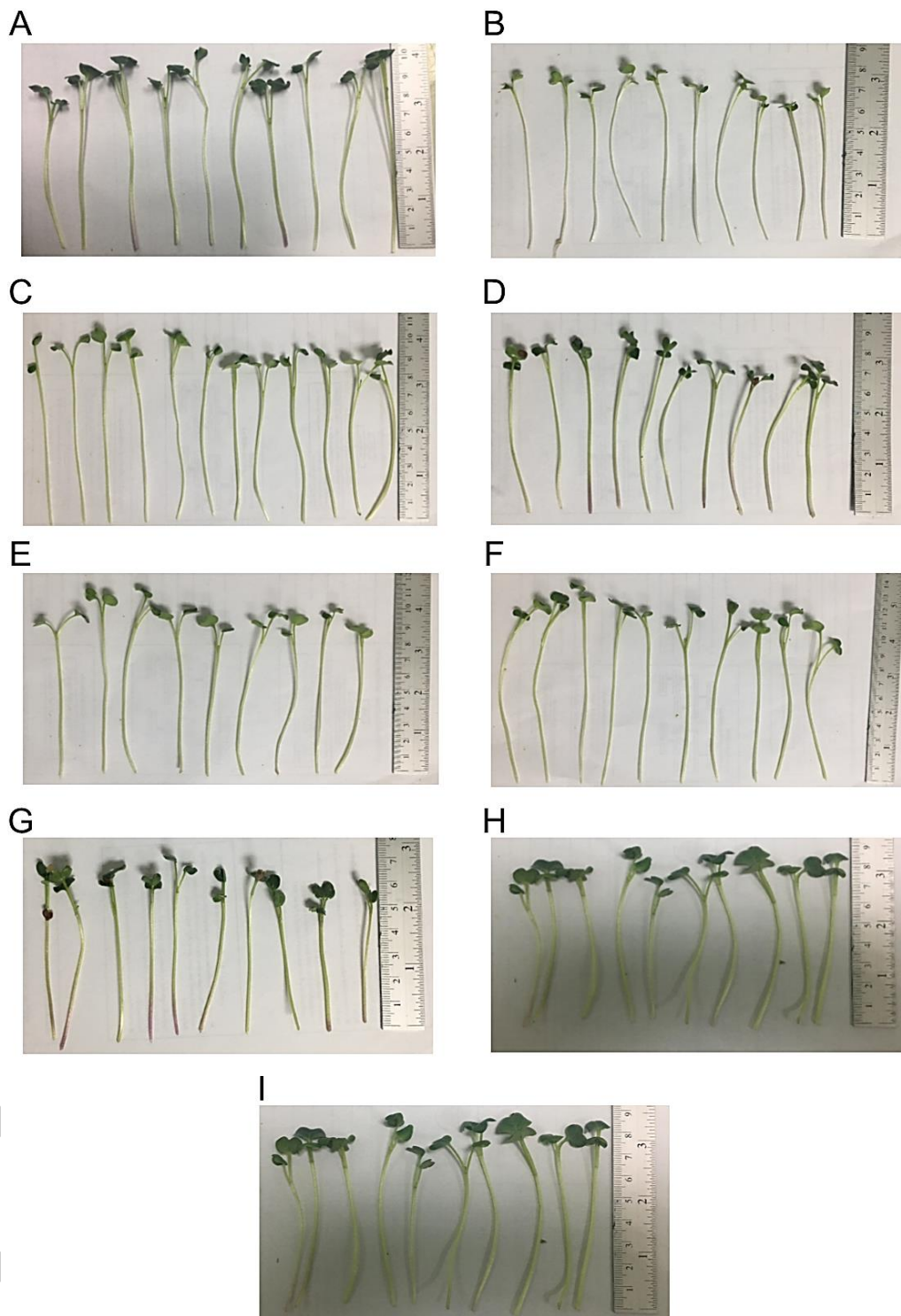
ส่วนน้ำหนักสดของผักชีหูดพบว่าพริตย์เม้นที่มีการให้พลาสมาเย็นไม่มีผลต่อน้ำหนักสด ส่วนพริตย์เม้นที่มีการให้พลาสมาเย็นร่วมกับซูโครสและการให้พลาสมาเย็นร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ ส่งผลให้น้ำหนักสดของผักชีหูดลดลง ส่วนพริตย์เม้นที่มีการให้สารกระตุ้นอินทรีย์พบว่า การให้โซเดียมคลอไรด์และแคลเซียมคลอไรด์ส่งผลให้น้ำหนักสดของผักชีหูดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เพิ่มขึ้นจากชุดควบ 1.07 และ 0.89 เท่า ตามลำดับ (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 16 ตารางแสดงผลของพลาสมาเย็นและสารกระตุ้นอินทรีย์ต่อเปอร์เซ็นต์การงอก ความยาว และน้ำหนักสดของผักชีหูด

การทดลอง	เปอร์เซ็นต์การงอก (%)	ความยาว (เซนติเมตร/ต้น)	น้ำหนักสด (มิลลิกรัม/ต้น)
Broccoli	78.33±3.21 ^c	5.00±0.43 ^c	38.50±4.27 ^e
Control	92.66±4.16 ^{ab}	14.25±0.25 ^a	253.83±7.01 ^b
Plasma	91.66±2.88 ^{ab}	14.66±0.38 ^a	246.50±4.78 ^b
Plasma+Sucrose	89.66±4.93 ^{ab}	11.41±0.38 ^b	172.83±1.01 ^d
Plasma+NaCl	91.00±4.58 ^{ab}	14.50±0.75 ^a	206.58±4.26 ^c
Plasma+CaCl ₂	93.66±2.08 ^{ab}	14.00±1.14 ^a	253.67±2.74 ^b
Sucrose	89.33±2.51 ^{ab}	11.83±0.29 ^b	163.00±17.41
NaCl	96.66±1.52 ^a	14.50±0.87 ^a	273.11±6.47 ^a
CaCl ₂	87.33±7.50 ^b	14.25±0.10 ^a	274.77±9.64 ^a

อักษร a,b,c,... ที่แตกต่างกันหมายถึงในข้อมูลคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยใช้ One-way ANOVA กับ Duncan's Multiple Range Test

พจนัน ปณุกิตโต ชีเว



ภาพที่ 31 ผักชีหูดที่มีการให้พลาสมาเย็นร่วมกับสารกระตุ้นอินทรีย์

A=น้ำกลั่น (ชุดควบคุม) B=บรีอคโคลี (ชุดควบคุม) C=พลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่น D=พลาสมาเย็นร่วมกับชูโครส E=พลาสมาเย็นร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ F=พลาสมาเย็นร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์ G=ชูโครส H=โซเดียมคลอไรด์ I=แคลเซียมคลอไรด์

การให้พลาสมาเย็นเป็นปัจจัยสำคัญ ถ้ากำลังของพลาสมาเย็นต่ำเกินไปก็จะมีผลต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของพืช ในขณะที่ถ้าให้กำลังของพลาสมาเย็นมากเกินไปก็จะส่งผลเสียต่อเมล็ด ซึ่งจากการทดลองของเราพบว่า การให้พลาสมาเย็นส่งผลให้ลำต้นของผักชีหุดน้อยเพิ่มมากขึ้นและส่งผลให้เมล็ดงอกเร็วขึ้นสอดคล้องกับงานงานวิจัย Matra, (2016) รายงานว่าอนุโมลอิสระของออกซิเจนที่เกิดจากออกซิเจนพลาสมาเย็นสามารถช่วยให้เปลือกของเมล็ดพืชมีความนุ่มมากขึ้นและบางลง จึงสามารถดูดซับความชื้นได้ดีขึ้น ซึ่งเป็นผลช่วยให้เมล็ดพืชสามารถงอกได้เร็วขึ้น มีงานวิจัยรายงานว่าอนุโมลอิสระของออกซิเจนยังสามารถช่วยทำลายสปอร์ของเชื้อรา โดยปราศจากการทำลายเนื้อเยื่อหรือเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางพันธุกรรมของเมล็ดพืช (Carvalho *et al.*, 2005; Selcuk *et al.*, 2008; Dobrynin *et al.*, 2009b)

รายงานวิจัยของ Ling *et al.* (2015) พบว่าเมล็ดพันธุ์พืชที่ถูกฉายด้วยพลาสมาอุณหภูมิต่ำจะสามารถดูดซับความชื้นได้ดีแตกต่างกันขึ้นอยู่กับกำลังไฟฟ้าที่ใช้ในการสร้างพลาสมาเนื่องจากพลาสมาอุณหภูมิต่ำนี้จะไปทำปฏิกิริยากับโครงสร้างทางเคมีและพื้นผิวเปลือกของเมล็ดพันธุ์พืช ทำให้เมล็ดพันธุ์พืชสามารถดูดซับไอน้ำจากด้านนอกได้ดีขึ้น มีหลายข้อมูลที่แสดงให้เห็นว่าหลังจากการทรีตด้วยพลาสมาเย็นพบว่าเมล็ดพืชสามารถดูดซับน้ำได้ดีขึ้นและเพิ่มอัตราการงอกภายใต้สภาวะแวดล้อมที่เครียดหลายอย่างรวมถึงการการเตรียมความพร้อมในกระบวนการเมตาบอลิซึม เห็นได้ว่าพลาสมาเย็นส่งผลเชิงบวกต่อการงอก การดูดซับน้ำ

การศึกษาก่อนหน้านี้ของ Sivachandiran & Khacef, (2017) แสดงให้เห็นถึงผลลัพธ์ที่หลากหลายของมะเขือเทศและพริกไทยหลังได้รับพลาสมาเย็น ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าความชุ่มชื้นของผิวเมล็ดเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการทรีตพลาสมาเย็นและยังพบว่าพื้นผิวที่ขอบน้ำของเมล็ดยังคงไม่มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากได้รับพลาสมาเย็นเป็นเวลาหลายเดือนในการทำงานเดียวกันจากการทดลองของ Jiayun *et al.* (2014) แสดงให้เห็นว่าการทรีตด้วยพลาสมาสามารถเปลี่ยนการซึมผ่านของน้ำในเมล็ด *Andrographis paniculate* และลดเซลล์ที่มีลักษณะเป็นขนที่เรียกว่าไทรโคม (trichome) บนพื้นผิวของเมล็ดข้าวนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของความสามารถในการดูดซับน้ำซึ่งส่งผลต่อความยาวของเมล็ด นอกจากนี้งานวิจัยของ Duesterhaus, (2000) พบว่าโดยทั่วไปแล้วความแตกต่างในการดูดน้ำของวัสดุที่มีความชื้นต่ำ เช่น เมล็ดพืชที่กำลังงอก มักเกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระของน้ำ หรือปริมาณของความสามารถในการดูดซับน้ำของเมล็ด นอกจากนี้ยังพบว่านอกจากนี้ H_2O_2 ร่วมกับ ROS อื่น ๆ มักจะถูกพิจารณาว่าเป็นสาเหตุหลักของการเสื่อมสภาพของเมล็ดและการสูญเสียความแข็งแรงของเมล็ด (Jeevan *et al.*, 2015) หลังได้รับการทรีตด้วยพลาสมา นอกจากนั้น H_2O_2 และ ROS ยังช่วยปกป้องเชื้อก่อโรคพืช จากผลการทดลอง Yuan *et al.* (2010) พบว่าความเค็มของเกลือมีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของต้นอ่อนเรดิชและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาค สรีรวิทยาและมีผลต่อการงอกของเมล็ด ส่วนรายงานของ Zapata *et al.* (2004) พบว่าต้นงอกที่

ได้รับโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์มีความเป็นไปได้ว่าพืชมีการปรับค่าออสโมติกบางอย่างไม่ทันจากความเครียดที่เกิดจากเกลือส่งผลทำให้น้ำหนักสดของต้นงอกที่ 5 ถึง 7 วันไม่แตกต่างกันซึ่งสอดคล้องกับรายงาน Esfandiari *et al.* (2017b) พบว่าการให้โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 160 มิลลิโมลาร์ในบร็อกโคลี่ไม่ได้แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักในบร็อกโคลี่ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของเรา และรายงานของ Lee *et al.* (2010) พบว่าเกลือจะมีผลต่อยับยั้งการงอกของเมล็ดโดยจะผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ส่วนน้ำตาลซูโครส กลูโคสและฟรุกโตสนั้นจะช่วยส่งเสริมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในบร็อกโคลี่และซูโครสเป็นสารที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการกระตุ้นการสะสมสารอาหาร

จากรายงานก่อนหน้าของ ชนกขวัญ ศรีคำ และคณะ, (2561) พบว่าแคลเซียมช่วยให้ผนังเซลล์และ เยื่อหุ้มเซลล์มีความแข็งแรง และควบคุมการเข้าออกของสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane permeability) เมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนต่ำส่งผลให้เกิดการรั่วไหลของไอออนและสารเมตาบอไลต์ (Hepler, 2005) นอกจากนี้แคลเซียมไอออนยังทำหน้าที่ควบคุมการสื่อสารของเซลล์ (cell signaling) ส่งผลให้เมตาบอไลต์ภายในเซลล์เกิดขึ้นได้ตามปกติ (Harmon *et al.*, 2001; Zhang and Hannink 2003) รวมทั้งควบคุมกระบวนการแบ่งเซลล์ (Zhang *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1992) นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Lolaei, (2012) พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมจะสามารถช่วยเพิ่มผลผลิตของพืช แคลเซียมเป็นธาตุที่มีบทบาทด้านการงอกของเมล็ดเนื่องจากเป็นโคแฟกเตอร์ที่สำคัญของเอนไซม์หลายชนิด นอกจากนี้ยังมีรายงานของ ยงยุทธ โอสดสภา (2558) รายงานว่าแคลเซียมความเข้มข้นต่ำสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์โปรตีนไคเนสและแอลฟาอะไมเลสได้ ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิดเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในการเคลื่อนย้ายแป้งและช่วยย่อยแป้งในเอนโดสเปิร์มของเมล็ดสำหรับใช้ในกระบวนการงอกดังนั้นการใช้แคลเซียมคลอไรด์ในความเข้มข้นจึงมีแนวโน้มในการช่วยให้เมล็ดพืชสามารถงอกได้ดีขึ้น แต่หากใช้ในปริมาณสูงก็จะมีผลในการยับยั้งการงอก แคลเซียมนั้นช่วยให้ผนังเซลล์และต้นพืชแข็งแรงและมีบทบาทด้านการยึดตัวของเซลล์ทำให้ลำต้นพืชยาวขึ้นซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของเรา และมีรายงานของ อิชยานะมิ และคณะ, (2560) และ Turmanidze *et al.* (2017) พบว่าการใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ทำให้มีปริมาณสารแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นโดยการกระตุ้นการแสดงออกยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานินได้อีกด้วย

มีรายงานวิจัยก่อนหน้าของ ยุกาภรณ์ จิโรภาสภาณุวงศ์, (2559) และ Tsai *et al.* (2005) รายงานว่าน้ำตาลซูโครสนอกจากจะเป็นแหล่งพลังงานที่จำเป็นกับเซลล์พืชแล้วยังสามารถนำไปใช้ในการเติมหมู่น้ำตาลให้กับสาร aglycone ในกระบวนการไกลโคซิลเลชัน (glycosylation) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาสุดท้ายของกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Mano *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังส่งผลต่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโท

ไซยานินใน *Arabidopsis* เช่น flavanone 3 beta-hydroxylase chalcone synthase chalcone isomerase และ anthocyanidin synthase เป็นต้น ซูโครส กลูโคส และฟรุคโตส ช่วยในการสังเคราะห์กลูโคซิโนเลทและแอนโทไซยานินในพืชตระกูลกะหล่ำและซูโครสเป็นสารที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการกระตุ้นการสะสมของสารทุติยภูมิ

4.3.2 ผลของพลาสมาเย็นและสารกระตุ้นอินทรีย์ต่อปริมาณสารไอโซไธโอไซยานาททั้งหมดและชนิดของสารไอโซไธโอไซยานาทในผักชีหูด

จากการเปรียบเทียบระหว่างการให้พลาสมาเย็น การให้พลาสมาเย็นร่วมกับสารกระตุ้นอินทรีย์และการให้สารกระตุ้นอินทรีย์ในผักชีหูด ผลการทดลองพบว่าทรีตเมนต์ที่มีการให้พลาสมาเย็นร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของสารไอโซไธโอไซยานาทโดยเพิ่มขึ้น 1.31 เท่าเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ยกเว้นการให้พลาสมาเย็นร่วมกับโซเดียมคลอไรด์พบว่าการลดลงของสารไอโซไธโอไซยานาท ส่วนทรีตเมนต์ที่มีการให้สารกระตุ้นอินทรีย์ก็ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของสารไอโซไธโอไซยานาทเช่นเดียวกัน โดยทรีตเมนต์ที่มีการให้แคลเซียมคลอไรด์ส่งผลให้สารไอโซไธโอไซยานาทเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 1.23 เท่ายกเว้นทรีตเมนต์ที่มีการให้โซเดียมคลอไรด์พบว่าการลดลงของสารไอโซไธโอไซยานาทอย่างเห็นได้ชัด (ตารางที่ 17)

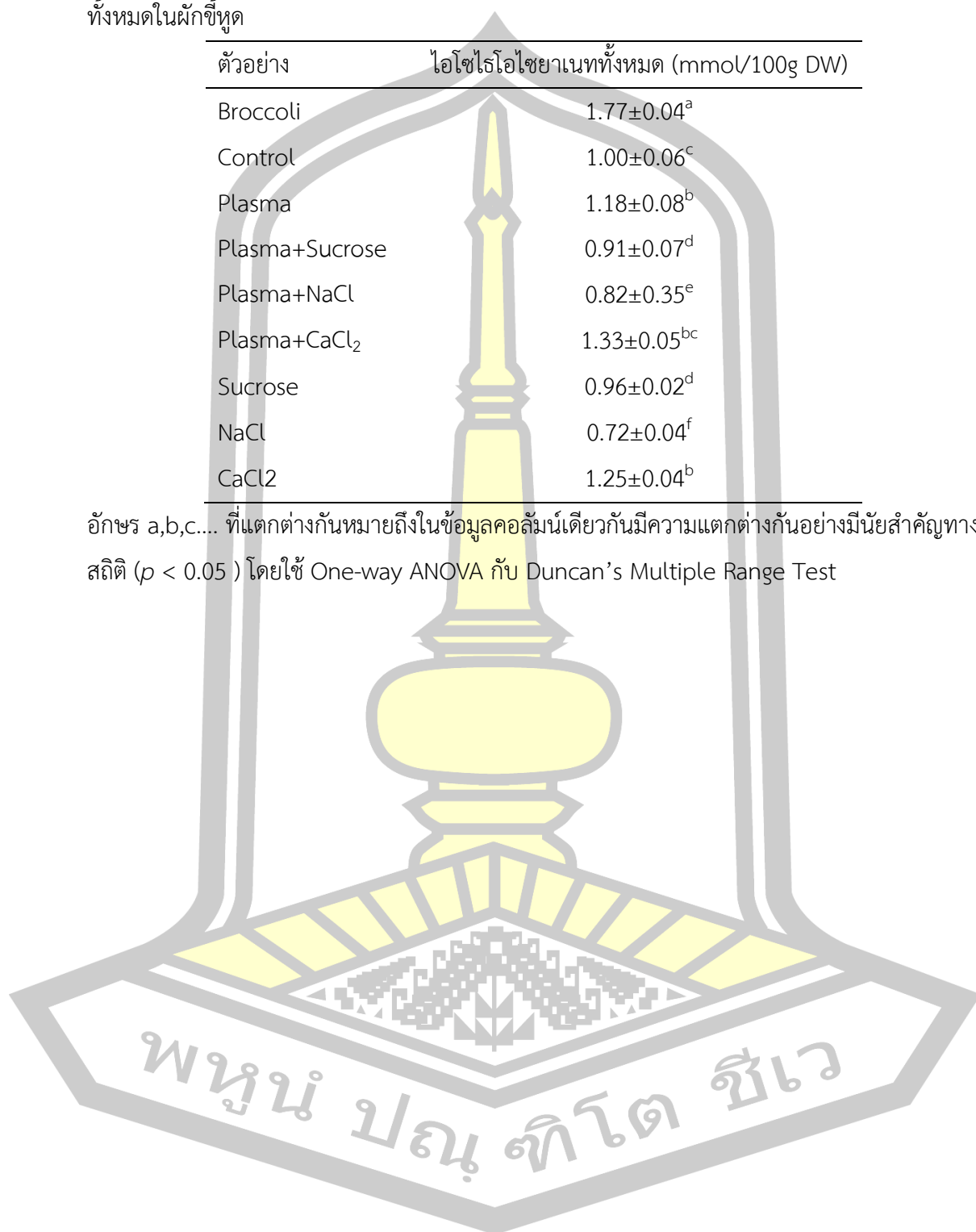
การวิเคราะห์หาชนิดของสารไอโซไธโอไซยานาทในผักชีหูดพบชนิดของสารไอโซไธโอไซยานาททั้งหมด 2 ชนิด คือสารไอโซไธโอไซยานาทชนิด 3 บิวทีนิวไอโซไธโอไซยานาท (3-Butenyl Isothiocyanate) ที่เวลา 9.7 นาที (ภาพที่ 32A) โดยมี 3 บิวทีนิวไอโซไธโอไซยานาทกลูโคซิโนเลทเป็นสารตั้งต้น และพบสารไอโซไธโอไซยานาทชนิดราฟาซาทิน (4-Methylthio-3-butenyl Isothiocyanate) ที่เวลา 27.7 นาที (ภาพที่ 32B) โดยมีกลูโคราฟาซาทินเป็นสารตั้งต้น ส่วนในบรีคโคลีพบเฉพาะสารไอโซไธโอไซยานาทชนิดซิลโฟราเฟนที่เวลา (RT) 28 นาที (ภาพที่ 32C) โดยมีกลูโคซิโนเลทชนิดกลูโคราฟานินเป็นสารตั้งต้นโดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลแมสสเปกตรัมของเครื่อง เพื่อเทียบขนาดมวลโมเลกุลสเปกตรัมของสาร (ภาพที่ 33)

พหุบัน ปณฺ ทิโต ชีเว

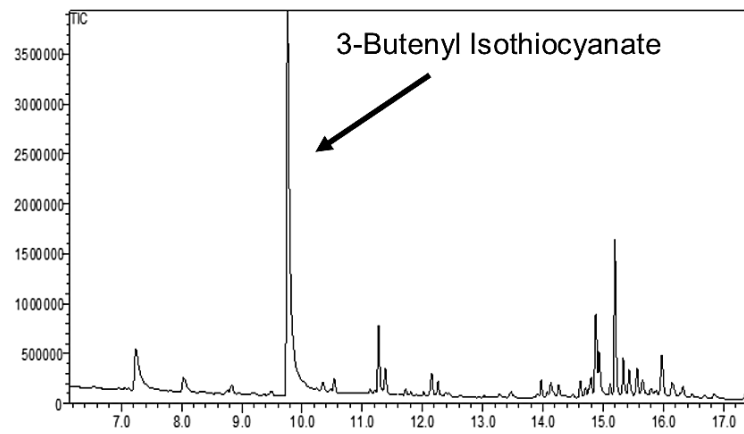
ตารางที่ 17 ตารางแสดงผลของพลาสมาเย็นและสารกระตุ้นอินทรีย์ต่อปริมาณสารไอโซโทโอไซยานาททั้งหมดในผักชีหูด

ตัวอย่าง	ไอโซโทโอไซยานาททั้งหมด (mmol/100g DW)
Broccoli	1.77±0.04 ^a
Control	1.00±0.06 ^c
Plasma	1.18±0.08 ^b
Plasma+Sucrose	0.91±0.07 ^d
Plasma+NaCl	0.82±0.35 ^e
Plasma+CaCl ₂	1.33±0.05 ^{bc}
Sucrose	0.96±0.02 ^d
NaCl	0.72±0.04 ^f
CaCl ₂	1.25±0.04 ^b

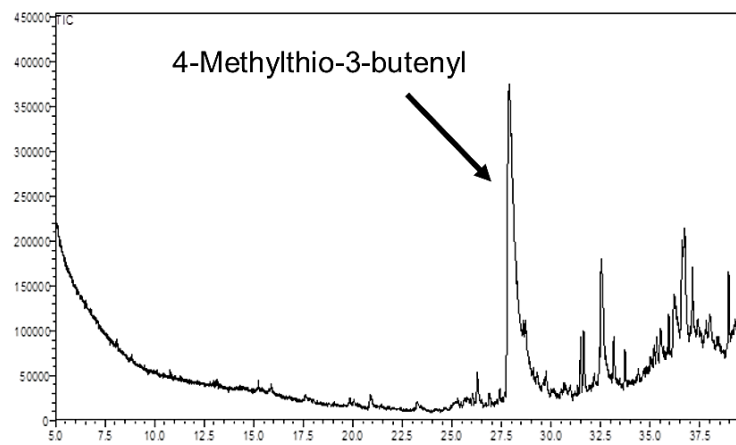
อักษร a,b,c.... ที่แตกต่างกันหมายถึงในข้อมูลคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยใช้ One-way ANOVA กับ Duncan's Multiple Range Test



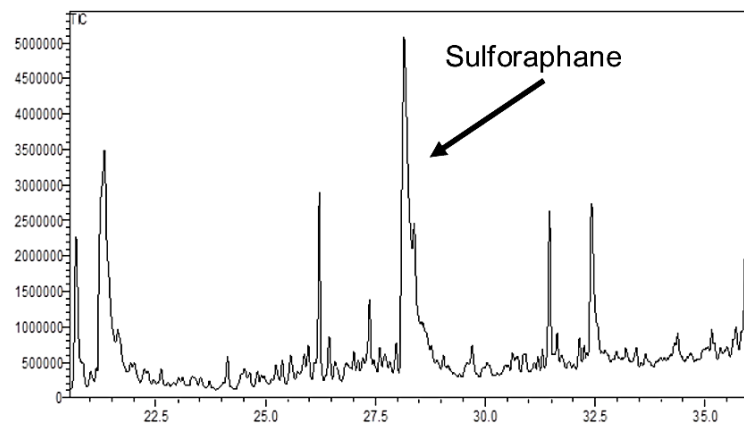
A



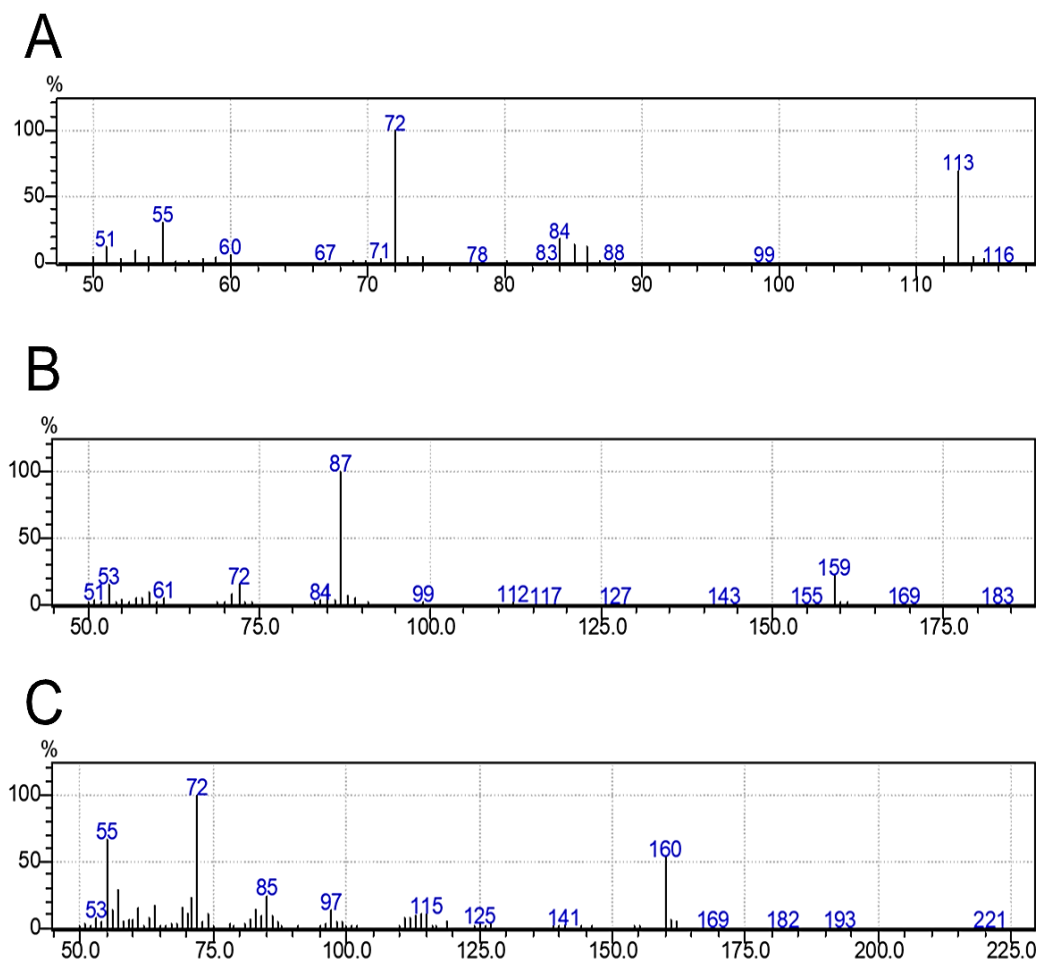
B



C



ภาพที่ 32 โครมาโตแกรมของสารไอโซโรโอไซยานที่พบในผักขี้หูด
A=3 บิวทีนิวไอโซโรโอไซยาน B= ราฟาซาทิน และ C=ซัลโฟราเฟน



ภาพที่ 33 แมสสเปกตรัมของสารไอโซไฮโอไซยานที่พบในผักขี้หูด
A=3 บิวทีนิวไอโซไฮโอไซยาน B= ราฟาซาดิน และ C=ซัลโฟราเฟน

จากรายงานของ Guo *et al.* (2011b) พบว่าหลังการให้ซูโครส 176 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ในต้นงอกบร็อกโคลี่ มีการเพิ่มขึ้นของอะลิฟาติกกลูโคซิโนเลทรวม เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม ร้อยละ 44.7 กลูโคซิโนเลทรวมเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุมร้อยละ 45.1 ซัลโฟราเฟนเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุมร้อยละ 29 และ ให้ซูโครส 146 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 5 วันกลูโคราฟานินเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุมร้อยละ 51.1 จากรายงาน Baenas *et al.* (2014) การให้ซูโครส 146 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 5 วันต้นงอกบร็อกโคลี่กลูโคราฟานินจาก 183 มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม เพิ่มขึ้นเป็น 294 มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 100 กรัม จากรายงาน Natella *et al.* (2016) รายงานว่าการให้ให้โซเดียมคลอไรด์ 176 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 5 วัน ในต้นงอกบร็อกโคลี่ กลูโคซิโนเลทรวมเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุมเป็นร้อยละ 82 ส่วนในรายงานของ Guo *et al.* (2013) พบว่าให้โซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 7 วันต้นงอกบร็อกโคลี่ ซัลโฟราเฟนเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 2.1 เท่า รายงานวิจัย Esfandiari *et al.* (2017b)

รายงานว่าการให้ไอโซติเยมคลอไรด์ 160 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 7 วันในต้นงอกบร็อกโคลี่ ซัลโฟราเฟนเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 6 เท่า และรายงานของ Yang *et al.* (2016) พบว่าการให้แคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 9 วันในต้นงอกบร็อกโคลี่ กลูโคซิโนเลทเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 1.7 เท่า ไอโซโรไอโซยานเนทเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 1.4 เท่า

จากรายงานของ Yang *et al.* (2016) ระบุว่าการใช้แคลเซียมคลอไรด์ช่วยเพิ่มคุณสมบัติทางชีวเคมีในสังเคราะห์กลูโคซิโนเลทโดยการเสริมสร้างยีน BrST5b (sulfotransferase 5b) และยีน BrAOP2 (2-oxoglutarate-dependent dioxygenase 2) ให้มีการแสดงออกและพบว่าเมื่อให้ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์เป็น 10 มิลลิโมลาร์ช่วยเพิ่มปริมาณกลูโคซิโนเลทในบร็อกโคลี่ ซึ่งเมื่อปริมาณกลูโคซิโนเลทที่สูงขึ้นการแสดงออกของยีนสังเคราะห์เอนไซม์ไมโรซิเนสก็จะสูงขึ้นด้วยซึ่งจะส่งผลให้สารไอโซโรไอโซยานเนทสูงขึ้นไปด้วยและมีรายงานของ Verkerk *et al.* (2009) ยังตรวจพบยีนหลายตัวรวมทั้ง BrST BrFMOGSOX ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กลูโคซิโนเลทด้วย

อัลลิลไอโซโรไอโซยานเนท (AITC) เป็น ไอโซโรไอโซยานเนทที่รู้จักกันว่ามีกิจกรรมต่อต้านการอักเสบ ด้านจุลชีพและต้านมะเร็ง (Zhang, 2010) ผักตระกูลกะหล่ำส่วนใหญ่รวมถึงกะหล่ำดาว กะหล่ำปลี กะหล่ำดอกและคะน้า มีปริมาณอัลลิลไอโซโรไอโซยานเนท ซึ่งให้รสชาติที่เผ็ดร้อนกับอาหารเหล่านี้ พบอัลลิลไอโซโรไอโซยานเนทปริมาณสูงในฮอร์สแรดิช (*Armoracia lapathifolia*) (1,500–9,000 mg / kg), มัสตาร์ดและวาซาบิ (*Wasabi japonica*) (*Japanese horseradish*) (9,585 mg/kg, 34 μ mol sinigrin/AITC per gram of fresh wasabi) (Sultana *et al.*, 2003)

ซูโครสเป็นตัวควบคุมการทำงานของกระบวนการเมตาบอลิซึมและกรดแอสคลออปิคในบร็อกโคลี่ (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) (Nishikawa *et al.*, 2005) และยังคงควบคุมกระบวนการสังเคราะห์ของแอนโธไซยานินใน *Arabidopsis thaliana* (Teng *et al.*, 2005) นอกจากนี้ซูโครส กลูโคสและฟรุกโตสก็ยังช่วยส่งเสริมการสังเคราะห์ในต้นงอกบร็อกโคลี่และซูโครสยังเป็นสารที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์สารทุติยภูมิในพืช และจากรายงานวิจัยของ Teng *et al.* (2005) ทำการทดลองใน *Arabidopsis thaliana* ระดับของแอนโธไซยานินและกลูโคซิโนเลทอาจเพิ่มขึ้นจากความเครียด เช่น การขาดสารอาหารหรือเกิดจากความเครียดที่เกิดจากความเค็มของเกลือ (Lea *et al.*, 2007b; Yuan *et al.*, 2010) นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Guo *et al.* (2011b) พบว่าน้ำตาลแมนนิทอลสามารถเพิ่มการสะสมของแอนโธไซยานินและกลูโคซิโนเลทในบร็อกโคลี่ได้แต่ไม่มีผลมากเท่ากับซูโครสในทำนองเดียวกันมีผลยืนยันว่าซูโครสทำหน้าที่เหมือนสัญญาณในการควบคุมกระบวนการที่สำคัญมากมายในทุกขั้นตอนของวงจรชีวิตของพืช (Rolland *et al.*, 2006) ยีนสังเคราะห์สารทางชีวภาพทั้งหมดได้รับการช่วยให้มีการเพิ่มขึ้นหลังการได้รับซูโครสเป็นเวลา 12 ชั่วโมงในบร็อกโคลี่ นอกจากนี้ยังกระตุ้นการทำงานของ MYB transcriptional factors และเหนี่ยวนำให้สะสมแอนโธไซยานิน *Arabidopsis thaliana* (Gonzalez *et al.*, 2008) กลูโคซิโน

เลทเป็นสารพิษเคมีที่สำคัญในบร็อคโคลี่และที่สำคัญยังพบว่าเมื่อได้รับแคลเซียมเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์มีการเพิ่มขึ้นของ Aliphatic glucosinolates (glucoerucin, glucoiberin, glucoiberberin, glucoraphanin, pentyl glucosinolate, and hexyl glucosinolate) and indolic glucosinolates (glucobrassicin, neoglucobrassicin และ 4-hydroxyglucobrassicin) อย่างมีนัยสำคัญ จากรายงานของ Lu *et al.* (2018) พบว่าหลังจากได้รับแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ก่อนการเก็บเกี่ยวและได้รับ UV-B หลังการเก็บเกี่ยวพบการเพิ่มขึ้นของกลูโคราฟานินกลูโคอิรูซิน และอลิฟาติกกลูโคซิโนเลทอย่างมีนัยสำคัญในไมโครกรีน นอกจากนี้ยังช่วยยืดเวลาในการเก็บรักษา

4.3.3 ผลของพลาสมาเย็นและสารกระตุ้นอินทรีย์ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH และวิธี FRAP ในผักชีหูด

จากการเปรียบเทียบระหว่างการให้พลาสมาเย็น การให้พลาสมาเย็นร่วมกับสารกระตุ้นอินทรีย์และการให้สารกระตุ้นอินทรีย์มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ โดยพบว่า การให้พลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่นส่งผลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 1.18 เท่า ลองลงมาก็คือการให้พลาสมาเย็นร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์ ยกเว้นการให้พลาสมาเย็นร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ส่งผลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกลดลงจากชุดควบคุม ส่วนทรีตเมนต์ที่มีการให้สารกระตุ้นอินทรีย์พบว่า การให้โซเดียมคลอไรด์ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจากชุดควบคุม 1.06 เท่า ยกเว้นการให้ซูโครสและแคลเซียมคลอไรด์ส่งผลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ลดลงจากชุดควบคุม ส่วนสารประกอบฟลาโวนอยด์พบว่า การให้พลาสมาเย็นร่วมกับซูโครสส่งผลให้มีสารประกอบฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม ยกเว้นการให้พลาสมาเย็น การพลาสมาเย็นร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ และการให้พลาสมาเย็นร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์ส่งผลให้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ส่วนทรีตเมนต์ที่มีการให้สารกระตุ้นอินทรีย์พบว่า การให้แคลเซียมคลอไรด์ส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของสารประกอบฟลาโวนอยด์มากที่สุดโดยเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม 2.32 เท่า ยกเว้นการให้ซูโครสส่งผลให้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (ตารางที่ 18)

ส่วนกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH พบว่า การให้พลาสมาเย็น การให้พลาสมาเย็นร่วมกับสารกระตุ้นอินทรีย์ และการให้สารกระตุ้นอินทรีย์ส่งผลให้กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH ที่เพิ่มมากขึ้น ยกเว้นการให้แคลเซียมคลอไรด์ส่งผลให้กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระมีการลดลงเล็กน้อย ส่วนกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP พบว่าทรีตเมนต์ที่มีการพลาสมาเย็นส่งผลให้กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP เพิ่มขึ้นมากที่สุดจากชุดควบคุม 1.29 เท่า ลองลงมาเป็น การ

ให้พลาสมาเย็นร่วมกับซูโครสและการให้พลาสมาเย็นร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ ตามลำดับ ส่วนทรีตเมนต์ที่มีการให้สารกระตุ้นอินทรีย์พบว่าทำให้โซเดียมคลอไรด์ส่งผลให้มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP เพิ่มขึ้นมากที่สุดจากชุดควบคุม 1.32 เท่า ยกเว้นการให้ซูโครสไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP (ตารางที่ 18)

ตารางที่ 18 แสดงผลของพลาสมาเย็นและสารกระตุ้นอินทรีย์ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH และวิธี FRAP ในผักชีหูด

ตัวอย่าง	TPC (mg GAE/g DW)	TFC (mg RE/g DW)	DPPH (mg TE/g DW)	FRAP (mg Fe(II)/g DW)
Broccoli	5.78±0.32 ^e	0.01±0.10 ^f	7.43±0.18 ^a	22.07±0.34 ^a
Control	6.36±0.12 ^d	0.71±0.07 ^c	5.42±0.11 ^b	16.83±0.79 ^e
Plasma	7.56±0.10 ^a	0.02±0.01 ^f	7.70±0.08 ^a	21.72±0.31 ^{ab}
Plasma+Sucrose	6.89±0.09 ^{bc}	0.96±0.09 ^b	7.42±0.24 ^a	20.82±0.18 ^{bc}
Plasma+NaCl	5.53±0.05 ^e	0.44±0.11 ^d	7.40±0.21 ^a	20.33±0.74 ^{cd}
Plasma+CaCl ₂	7.21±0.18 ^b	0.02±0.01 ^f	7.57±0.13 ^a	19.24±1.82 ^d
Sucrose	5.67±0.26 ^e	0.15±0.05 ^e	7.45±0.14 ^a	17.25±0.16 ^e
NaCl	6.77±0.18 ^c	0.95±0.06 ^b	7.68±0.24 ^a	22.31±0.24 ^a
CaCl ₂	4.02±0.24 ^f	1.65±0.05 ^a	4.74±0.24 ^c	10.05±0.12 ^f

อักษร a,b,c.... ที่แตกต่างกันหมายถึงในข้อมูลคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยใช้ One-way ANOVA กับ Duncan's Multiple Range Test

จากงานวิจัยของเราสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Guo *et al.* (2014) สารต้านอนุมูลอิสระในต้นงอกบร็อกโคลี่ประกอบด้วยสารกลูโคซิโนเลทและสารฟีนอลิก หลังจากที่ได้รับแคลเซียมคลอไรด์พบว่าปริมาณสารกลูโคซิโนเลทเพิ่มขึ้นซึ่งนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดของต้นงอกบร็อกโคลี่ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 'OH และ DPPH' ที่เพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ของต้นงอกบร็อกโคลี่ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแคลเซียมคลอไรด์สามารถเพิ่มกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดในบร็อกโคลี่ (Liu *et al.*, 2015) แนวโน้มของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดและความสามารถในการยับยั้ง DPPH* ของไฮโดรไลเสตหลังได้รับแคลเซียมคลอไรด์ การก่อกำเนิดของไฮโดรไลโซยานะทของไฮโดรไลเสตมีผลอย่างมากในการต้านอนุมูลอิสระและเพิ่มความสามารถในการกำจัด DPPH* และวิจัยของเราสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Yuan *et al.* (2010) พบว่ามีการลดลงของปริมาณฟีนอลิก

ทั้งหมดหลังจากต้นอ่อนของเรดิช อายุ 5 และ 7 วัน ที่ได้รับไซโตมคลอไรด์อาจเป็นเพราะการเติบโตอย่างรวดเร็วของต้นอ่อนเรดิช การศึกษาในปัจจุบันโดยทั่วไปสารประกอบฟีนอลิกในพืชจะถูกผลิตผ่านวิถี Phenylpropanoid และยังสามารถเหนี่ยวนำโดยความเครียดจากสิ่งแวดล้อมและสารกระตุ้น (Elicitor) (Kim *et al.*, 2006; Giorgi *et al.*, 2009) สารประกอบฟีนอลิกในพืชสามารถเปลี่ยนแปลงได้โดยความเครียดจากเกลือแต่สิ่งนี้ขึ้นอยู่กับช่วงวิกฤตกับความไวของของพืช (Kim *et al.*, 2008)

จากรายงานวิจัยของ Baenas *et al.* (2015) พบว่ามีการผลิตสารทุติยภูมิทุติยภูมิในต้นอ่อนบร็อกโคลี่ที่ได้รับน้ำตาลซูโครส 88 และ 176 มิลลิโมลาร์ซึ่งเพิ่มแอนโทไซยานินรวม 26 และ 44 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ มีรายงานของ Hara *et al.* (2004; Lea *et al.* (2007); Cominelli *et al.* (2008) รายงานว่าแอนโทไซยานินถูกควบคุมโดยแสงและน้ำตาลทำให้เกิดความเครียด น้ำตาลเป็นตัวส่งสัญญาณหลักในกระบวนการถ่ายทอดสัญญาณที่ควบคุมกระบวนการที่สำคัญหลายอย่างในทุกขั้นตอนของวัฏจักรของพืช (Rolland *et al.*, 2006) ในน้ำตาลซูโครสที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวคือน้ำตาลกลูโคสและฟรักโทส (Nishikawa *et al.*, 2005) นอกจากนี้ยังได้รับรายงานก่อนหน้านี้ว่าน้ำตาลช่วยเพิ่มการสะสมของแอนโทไซยานินในพืชหลายชนิด การสังเคราะห์แอนโทไซยานินในหัวไชเท้าเกิดจากน้ำตาลในไฮโปคอติล (Hypocotyl) (Hara *et al.*, 2004) น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลซูโครสเป็นที่รู้จักในฐานะสารชีวโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพของพืชในกระบวนการเมตาบอลิซึม การสังเคราะห์แสง การเผาผลาญคาร์บอนและไนโตรเจน การออกดอกการตอบสนองต่อความเครียด (Moreno *et al.*, 2008) การทดลองก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าการใช้กรดอะมิโนเมทไธโอนีน (methionine) ในฐานะสารตั้งต้นการสังเคราะห์ นำไปสู่การเพิ่มปริมาณกลูโคซิโนเลทในเรดิช (Schreiner, 2005; Moreno *et al.*, 2008)

จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Yang *et al.* (2016) พบว่ากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับสารประกอบฟีนอลิกของต้นอ่อนเรดิช อย่างไรก็ตามการศึกษาอื่น ๆ ได้รายงานว่า กลูโคราฟาคาตินจากต้นอ่อนเรดิชแสดงกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ (Kim *et al.*, 2006) และมีส่วนทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวมของสารสกัดจากเรดิช (Barillari *et al.*, 2005; Barillari *et al.*, 2006) ความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างสารประกอบฟีนอลิก กลูโคราฟาคาตินและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดประเมินโดยวิธี FRAP ซึ่งจากรายงาน Steyn *et al.* (2002) พบว่าสารประกอบฟีนอลิก กลูโคราฟาคาตินมีแนวโน้มส่งผลให้กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP สูงขึ้นซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของเรา

จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Williamson *et al.* (1998) รายงานว่าแอนโทไซยานินและกลูโคซิโนเลทได้รับการพิสูจน์ว่ามีหน้าที่ในการรักษาระดับอนุมูลอิสระของพืช น้ำตาลเป็นตัวควบคุมเมตาบอลิซึมของกรดวิตามินซีในบร็อกโคลี่ (Nishikawa *et al.*, 2005) และการสังเคราะห์

ทางชีวภาพของแอนโทไซยานินใน *Arabidopsis thaliana* (Teng *et al.*, 2005) น้ำตาลซูโครส กลูโคสและฟรุกโตสนั้นส่งเสริมการสังเคราะห์กลูโคซิโนเลทและแอนโทไซยานินในบร็อกโคลี่ จากรายงานก่อนหน้านี้ของ Teng *et al.* (2005) รายงานว่าการสะสมของแอนโทไซยานินในเรดิซสีแดง (Hara *et al.*, 2004) และกะหล่ำปลีแดง (Yuan *et al.*, 2009) มีการเพิ่มขึ้นของของยีนสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ซึ่งแอนโทไซยานินและกลูโคซิโนเลทที่เกิดจากซูโครสที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของบร็อกโคลี่ที่สูงขึ้นซึ่งบ่งชี้โดยค่า FRAP ซึ่งสอดคล้องกับการสำรวจในอดีตเกี่ยวกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของแอนโทไซยานินและกลูโคซิโนเลท (Williamson *et al.*, 1998; Steyn *et al.*, 2002) โซเดียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์และซูโครส สามารถเหนี่ยวนำให้พืชเกิดความเครียด (Bußler *et al.*, 2015) เมื่อพืชเกิดความเครียดพืชจะเกิดการสังเคราะห์อนุมูลอิสระ เช่น อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide free radicals) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide ; H_2O_2) และ อนุมูลอิสระไฮดรอกซี (hydroxyl radicals ; $OH\cdot$) ซึ่งจะทำลายส่วนต่างๆ ของเซลล์ เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิก เยื่อหุ้มเซลล์ เป็นต้น โดยพืชจะกระตุ้นการสร้าง Type I และ Type II signaling networks เพื่อสังเคราะห์อนุมูลอิสระในรูปเอนไซม์ (enzymatic antioxidants) เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutases ;SOD) หรือสังเคราะห์อนุมูลอิสระที่ไม่ได้อยู่ในรูปของเอนไซม์ (non-enzymatic antioxidants) เช่น กลูตาไธโอน (glutathione ;GSH) กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid ;AA) สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้จะสามารถช่วยให้พืชมีความอยู่รอดไปได้และเปลี่ยนสารอนุมูลอิสระที่เป็นอันตรายให้ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์พืชด้วย เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสจะเปลี่ยนเป็นออกซิเจนเดี่ยว (singlet oxygen ; O_2^-) ส่วน CAT, APX และ GPX จะเปลี่ยน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้กลายเป็นน้ำ (สุมาลี ชูกำแพง, 2007)

มีรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ ยุพากรณ์ จิโรภาสภานุวงศ์, (2559) และ Tsai *et al.*, (2005) น้ำตาลซูโครสนอกจากจะเป็นแหล่งพลังงานที่จำเป็นกับเซลล์พืชแล้วยังสามารถนำไปใช้ในการเติมหมู่ น้ำตาลให้กับสาร aglycone ในกระบวนการไกลโคซิเลชัน (glycosylation) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาสุดท้ายของกระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Mano *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังส่งผลต่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินใน *Arabidopsis* เช่น flavanone 3 beta-hydroxylase chalcone synthase chalcone isomerase และ anthocyanidin synthase เป็นต้น ซูโครส กลูโคส และฟรุกโตส ช่วยในการสังเคราะห์กลูโคซิโนเลทและแอนโทไซยานินในพืชตระกูลกะหล่ำและซูโครสเป็นสารที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการกระตุ้นการสะสมของสารทุติยภูมิ นอกจากนั้นยังมีรายงานของ อธิชา นะมิกิ และคณะ, (2560) และ Turmanidze *et al.* (2017) พบว่าการใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ทำให้มีปริมาณสารแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นโดยการกระตุ้นการแสดงออกยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานินได้อีกด้วย

4.3.4 ผลของสารสกัดหยาบผักชีหูดต่อการยับยั้งการมีชีวิตรอดและการแบ่งตัวในเซลล์มะเร็ง

จากการเปรียบเทียบระหว่างการให้พลาสมาเย็น การให้พลาสมาเย็นร่วมกับสารกระตุ้นอินทรี และการให้สารกระตุ้นอินทรี พบว่าพริตย์เม้นที่มีการให้พลาสมาเย็นมีปริมาณสารไอโซไฮโอไซยานเทเพิ่มมากที่สุดและยังมีปริมาณสารออกฤทธิ์ที่เพิ่มขึ้นอีกด้วย จึงทำการคัดเลือกพริตย์เม้นการให้พลาสมาเย็นมาทำการศึกษาต่อโดยศึกษาผลของสารสกัดหยาบผักชีหูดต่อการยับยั้งการมีชีวิตรอดและการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ด้วยเทคนิค MTT (แสดงผลดังข้อ 4.3.2 และ 4.3.3)

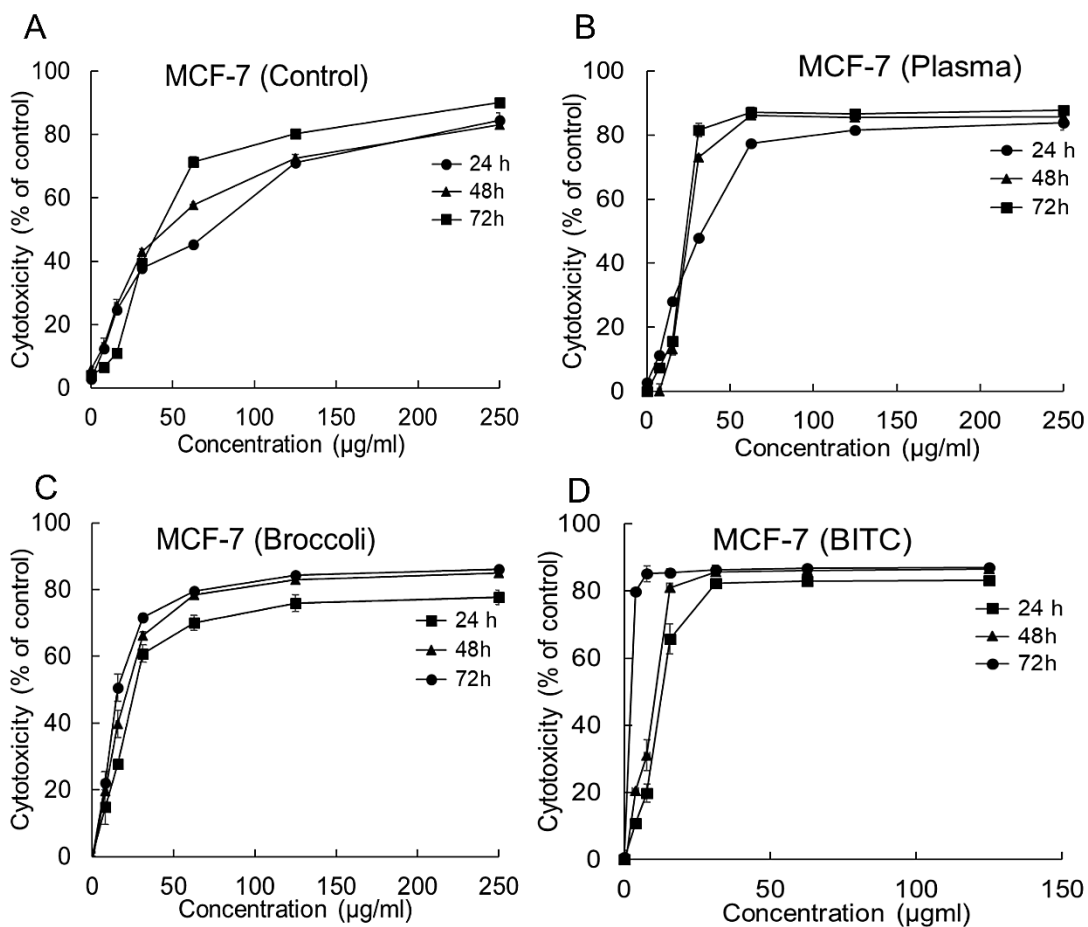
หลักการทํางานของ MTT คือเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่มี Enzyme succinate dehydrogenase ซึ่งจะเปลี่ยน tetrazolium salt ให้เป็นผลึกฟอร์มาซานโดยปฏิกิริยาการรีดิวซ์ (Reduction) และผลึกฟอร์มาซานมีสีม่วงน้ำเงินที่ไม่ละลายในน้ำต้องละลายด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของฟอร์มาซาน ซึ่งจะแปรผันโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิต ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ได้รับสารสกัดหยาบผักชีหูดที่ความเข้มข้น 0 ถึง 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรหลังการบ่มที่เวลา 24 28 และ 72 ชั่วโมง จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ได้รับสารสกัดหยาบของผักชีหูดที่ความเข้มข้น 0 ถึง 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังการบ่มที่เวลา 24 28 และ 72 ชั่วโมง ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดหยาบของผักชีหูดที่มีการให้พลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่นมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ที่เวลาการบ่ม 72 ชั่วโมง มีค่า E_{max} เท่ากับ 90.08 ± 1.27 และมีค่า IC_{50} ต่ำที่สุดเท่ากับ 28.35 ± 0.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (แสดงภาพที่ 34B) เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบของผักชีหูดตัวอย่างควบคุม (แสดงภาพที่ 34A) โดยสารสกัดหยาบของผักชีหูดที่มีการให้พลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่นมีค่า IC_{50} ต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 มากกว่าโดยสารสกัดหยาบของผักชีหูดตัวอย่างควบคุม 1.6 เท่า และเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบของบร็อคโคลี่ (แสดงภาพที่ 34C) และสารเบนซิลไอโซไฮโอไซยานเท (แสดงภาพที่ 34D) พบว่าสารสกัดบร็อคโคลี่และสารเบนซิลไอโซไฮโอไซยานเท มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ที่เวลาการบ่ม 72 ชั่วโมงมีค่า IC_{50} ต่ำกว่าสารสกัดหยาบของผักชีหูดที่มีการให้พลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่น (ตารางที่ 19)

จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ที่เวลา 24 28 และ 72 ชั่วโมง ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดหยาบของผักชีหูดที่มีการให้พลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่นมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ที่เวลาการบ่ม 72 ชั่วโมง มีค่า E_{max} เท่ากับ 94.07 ± 0.75 และมีค่า IC_{50} ต่ำที่สุดเท่ากับ 14.79 ± 1.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (แสดงภาพที่ 35B) เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบของผักชีหูดตัวอย่างควบคุม (แสดงภาพที่ 35A) โดยสารสกัดหยาบของผักชีหูดที่มีการให้

พลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่นมีค่า IC_{50} ต่อเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 มากกว่าโดยสารสกัดหยาบผักเขียว น้อยตัวอย่างควบคุมถึง 1.29 เท่า และเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบของบร็อคโคลี่ (แสดงภาพที่ 35C) และสารเบนซิลไฮโซไรโอไซยานเท (แสดงภาพที่ 35D) พบว่าสารสกัดหยาบของบร็อคโคลี่และสารเบนซิลไฮโซไรโอไซยานเท มีค่า IC_{50} ต่อเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 ที่เวลาการบ่ม 72 ชั่วโมง ต่ำกว่าสารสกัดหยาบของผักขี้หูดที่มีการให้พลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่น (ตารางที่ 19) สารสกัดหยาบจากผักขี้หูดมีค่า IC_{50} ค่อนข้างต่ำแสดงถึงประสิทธิภาพที่ดีตั้งนั้นหากสารสกัดหยาบนี้ได้รับการพัฒนาด้วยการเตรียมเป็นสารบริสุทธิ์อาจทำให้เห็นถึงประสิทธิภาพได้ชัดเจนกว่านี้

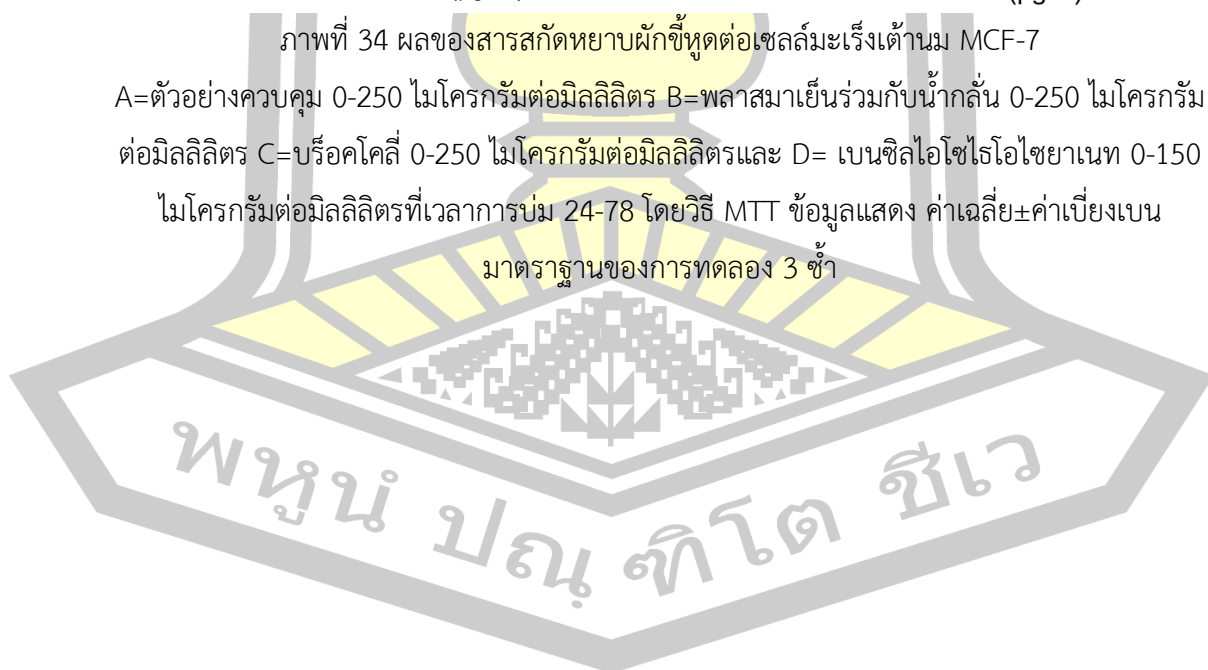
ส่วนการศึกษาการมีชีวิตรอดและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนด้วยวิธี Colony formation เป็นการศึกษาการมีชีวิตและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์หลังจากที่เซลล์ได้รับสารสกัดหยาบไมโครกรีนเพื่อตรวจสอบความสามารถในการเจริญเติบโตของเซลล์เมื่ออยู่ในสภาวะผิดปกติเนื่องจากมีสิ่งมากระตุ้นซึ่งอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมหรือการหยุดวงจรชีวิตของเซลล์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 ในกลุ่มทดลองที่พรีตัยด้วยสารสกัดหยาบไมโครกรีนที่ความเข้มข้นต่างๆ (0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เวลาการบ่ม 24 ชั่วโมงแล้วเลี้ยงต่อในอาหารใหม่เป็นเวลา 14 วันแล้วย้อมเซลล์ด้วยคริสตัล ไวโอเลต ความเข้มข้น 0.5เปอร์เซ็นต์ พบว่าโคโลนีของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 มีชีวิตและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของโคโลนีที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 (แสดงภาพที่ 36A,C) ที่รอดชีวิตมีจำนวนลดลงมากกว่าเซลล์มะเร็งระดับ (แสดงภาพที่ 36B,D) พบว่าความรุนแรงของการยับยั้งการมีชีวิตและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 แปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารสกัด นอกจากนี้คุณภาพของโคโลนีที่รอดชีวิตยังลดลงด้วย โดยเมื่อวิเคราะห์พื้นฐานของโคโลนีพบว่าโคโลนีมีขนาดเล็กลงและมีรูปร่างผิดปกติไป

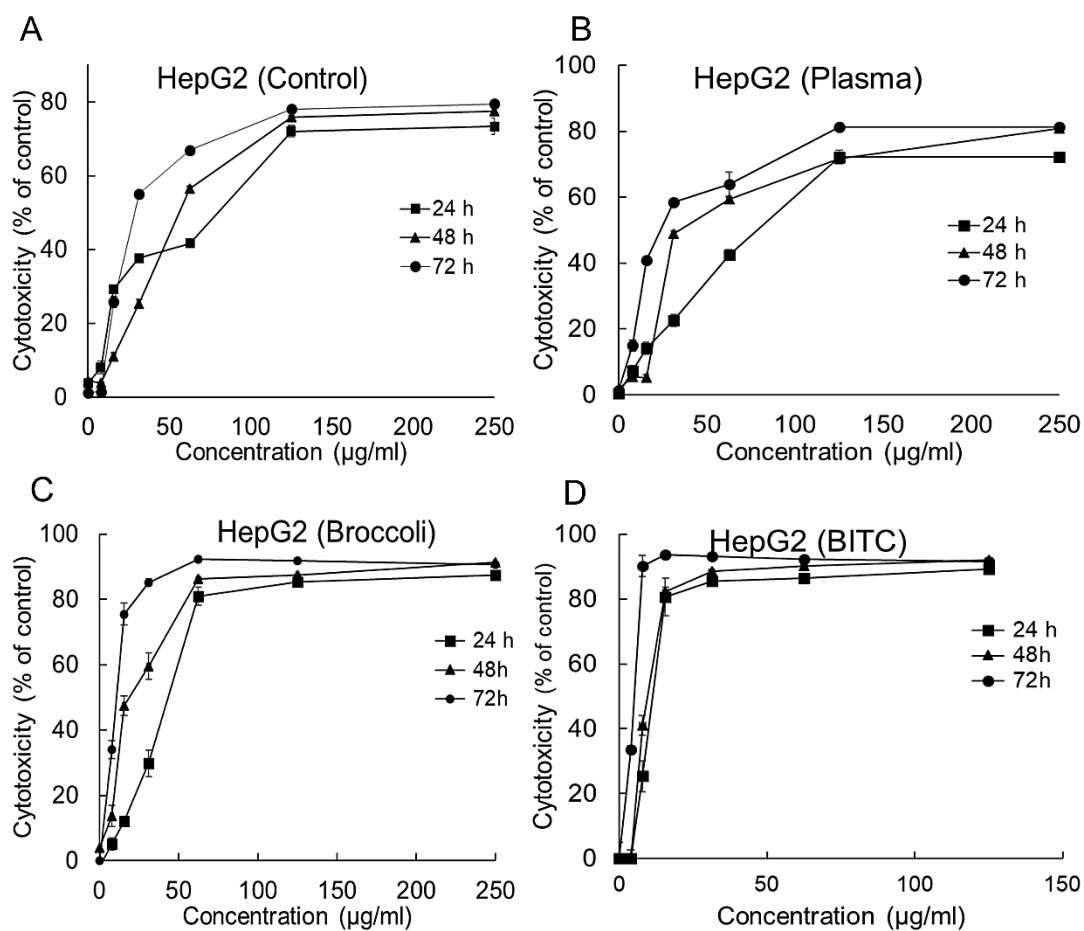
พหุ ประถมศึกษา



ภาพที่ 34 ผลของสารสกัดหยาบผักชีหูดต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7

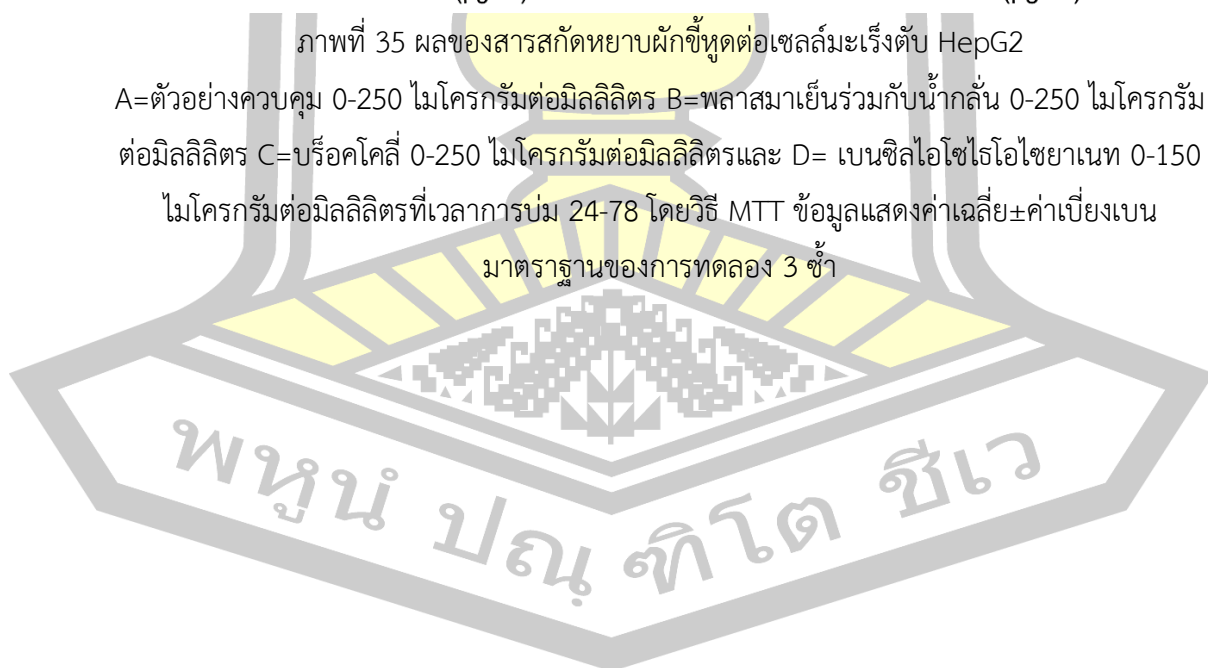
A=ตัวอย่างควบคุม 0-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร B=พลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่น 0-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร C=บร็อคโคลี่ 0-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ D= เบนซิลไอโซไทโอไซยาเนท 0-150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่เวลาการบ่ม 24-78 โดยวิธี MTT ข้อมูลแสดง ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ





ภาพที่ 35 ผลของสารสกัดหยาบผักชีหูดต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2

A=ตัวอย่างควบคุม 0-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร B=พลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่น 0-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร C=บร็อกโคลี่ 0-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรและ D= เบนซิลไอโซไซยาเนต 0-150 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรที่เวลาการบ่ม 24-78 โดยวิธี MTT ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

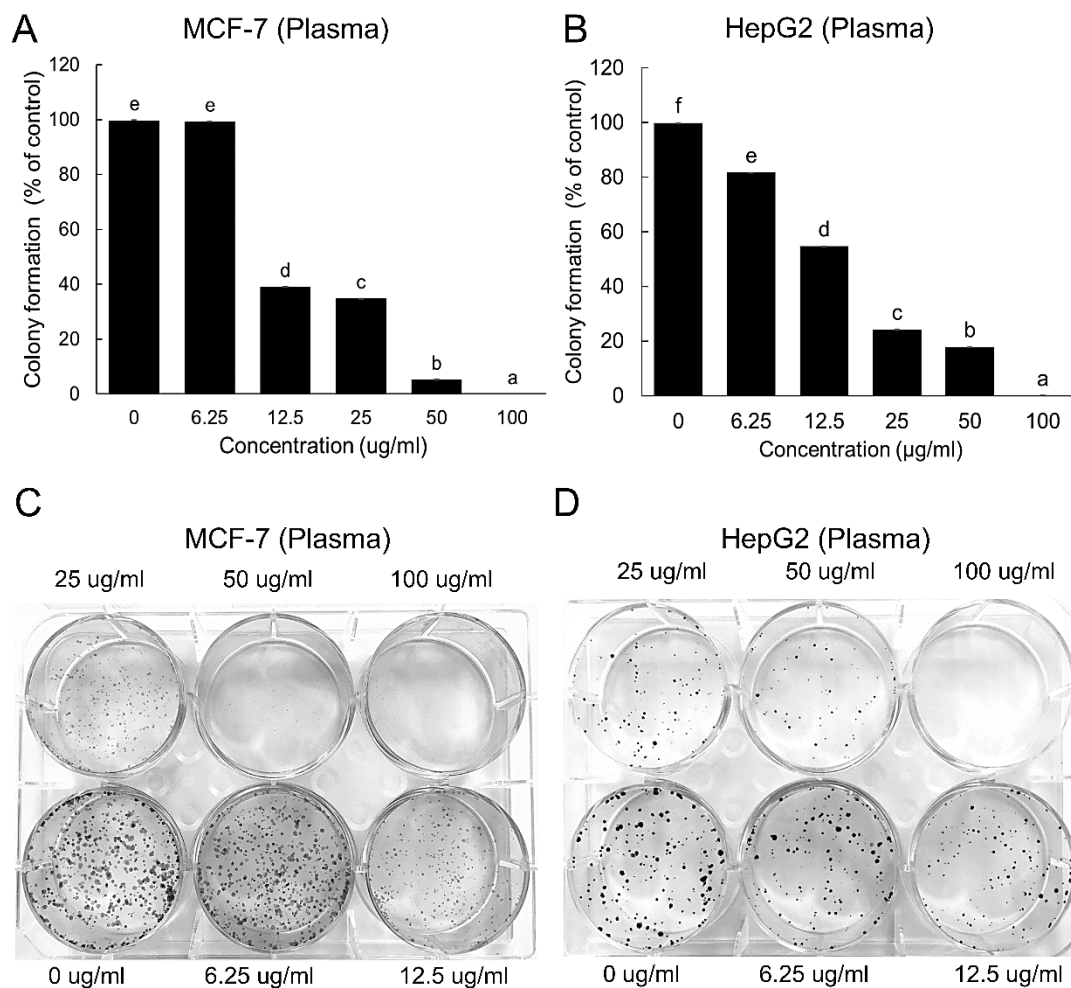


ตารางที่ 19 แสดงค่า E_{max} and IC_{50} ของสารสกัดหยาบผักขี้หนูต่อเซลล์มะเร็ง

ตัวอย่าง	เวลาบ่ม (h)	MCF-7		HepG2	
		E_{max} (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	E_{max} (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Control	24 h	84.48±2.38 ^a	72.14±0.53 ^b	78.91±1.28 ^a	72.17±1.00 ^b
	48 h	86.44±5.64 ^a	58.88±2.30 ^a	74.77±1.26 ^b	56.80±0.63 ^a
	72 h	90.08±1.12 ^a	57.63±1.58 ^a	79.58±1.58 ^a	56.93±0.73 ^a
Plasma	24 h	83.85±0.79 ^c	36.82±0.16 ^c	75.22±1.92 ^c	41.62±0.13 ^c
	48 h	85.73±1.18 ^b	30.62±0.14 ^b	81.66±1.44 ^b	29.61±1.10 ^b
	72 h	87.87±0.45 ^a	29.28±1.07 ^a	98.16±1.44 ^a	13.83±0.32 ^a
Broccoli	24 h	77.66±2.13 ^b	36.10±1.47 ^c	87.38±0.26 ^b	42.60±1.75 ^c
	48 h	84.96±0.54 ^a	25.65±5.31 ^b	91.23±0.16 ^a	23.75±1.47 ^b
	72 h	86.09±0.98 ^a	19.15±0.32 ^a	91.78±0.60 ^a	10.15±0.56 ^a
BITC	24 h	83.24±0.78 ^b	16.67±0.41 ^c	89.23±0.00 ^c	12.03±1.14 ^c
	48 h	86.55±0.37 ^a	8.54±0.37 ^b	91.99±0.52 ^a	6.70±0.52 ^b
	72 h	87.01±0.26 ^a	1.26±0.21 ^a	91.58±0.21 ^b	4.06±0.18 ^a

อักษร a,b,c... ที่แตกต่างกันหมายถึงในข้อมูลคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยใช้ One-way ANOVA กับ Duncan's Multiple Range Test





ภาพที่ 36 ผลของสารสกัดขี้หูดต่อการมีชีวิตรอดและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง

A= เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และ B=เซลล์มะเร็งตับ HepG2

จากรายงาน Beevi *et al.* (2010) พบว่าสารสกัดจาก *Raphanus sativus* L. แสดงถึงการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งซึ่งขึ้นอยู่กับเวลาโดยทำการทดสอบในเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa เซลล์มะเร็งปอด A549 เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และเซลล์มะเร็ง PC-3 ของมนุษย์ ค่า IC_{50} บ่งบอกถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง สิ่งที่น่าสนใจคือกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งภายใน 24 ชั่วโมงสำหรับเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa เซลล์มะเร็งปอด A549 เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 อย่างไรก็ตามในกรณีของเซลล์มะเร็ง PC-3 จะค่อยเป็นค่อยไปและสูงสุดที่ 72 ชั่วโมงผลการวิจัยของเราชี้ให้เห็นว่าความสามารถของสารสกัดจาก *Raphanus sativus* L. ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งนั้นสัมพันธ์กับชนิดของเซลล์นอกจากนี้สารสกัดจาก *Raphanus sativus* L. ที่ความเข้มข้นที่ใช้ในกิจกรรมการต้านเซลล์พบว่าไม่มีผลกระทบต่อความมีชีวิตของเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ ซึ่งแสดงถึงกิจกรรมการคัดเลือกต่อเซลล์มะเร็ง ๓๖๖๖การ

เปรียบเทียบฤทธิ์ด้านการเจริญของสารสกัดจาก *Raphanus sativus* L. พบว่าสารสกัดจากมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งสูงกว่า etoposide

จากรายงาน Pocasap *et al.* (2013) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีความเข้มข้นสูงสุดในการยับยั้งครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) ซึ่งสารสกัดผักขึ้นหูดต้นโตเต็มวัย (*Raphanus sativus* L. var. caudatus Alef) ทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 สารสกัดมีความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุด ($IC_{50} = 9.42 \pm 0.46$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และจัดเป็นสารออกฤทธิ์ (อ้างอิงจาก Nationa Cancer Research Institute) เนื่องจาก IC_{50} นั้นน้อยกว่า 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Colegate & Molyneux, 2007) การปรากฏตัวของซัลโฟราเฟนและซัลโฟราฟีนได้ถูกรายงานไปแล้วสำหรับพืชตระกูลกะหล่ำ (Lim *et al.*, 2009; Songsak & Lockwood 2002) รวมถึงความเป็นพิษ (Kim *et al.*, 2010; Papi *et al.*, 2008a; Zeng *et al.*, 2011) ในการศึกษาปัจจุบันซัลโฟราเฟนและซัลโฟราฟีนแสดงให้เห็นความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่ายาเคมีบำบัด ($IC_{50} = 6.67 \pm 0.07$ และ 10.67 ± 2.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) สารสกัดผักขึ้นหูด (*Raphanus sativus* L. var. caudatus Alef) มีค่า IC_{50} ต่ำซึ่งแสดงถึงความเป็นพิษต่อเซลล์และกิจกรรมต้านมะเร็งที่ดี

การศึกษาก่อนหน้าจำนวนมากแสดงให้เห็นว่าสารประกอบจากธรรมชาติสามารถยับยั้งการเริ่มต้นการพัฒนาของโรคมะเร็ง (Pandey *et al.*, 2017) จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Sayeed *et al.* (2018) พบว่าอัลลิลไอโซไทโอไซยานเนทสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ที่สำคัญสังเกตเห็นว่าอัลลิลไอโซไทโอไซยานเนทส่งผลกระทบต่อเซลล์เต้านมที่ไม่ใช่นีออน MCF-10A อัลลิลไอโซไทโอไซยานเนทไม่ได้ทำให้เกิดอะพอโทซิสและการหยุดวงจรชีวิตของเซลล์ในเซลล์MDA-MB-231 ตามที่ตรวจวัดโดย Flow cytometry นอกจากนี้ยังพบว่าอัลลิลไอโซไทโอไซยานเนทไม่สามารถแก้ไขการแสดงออกของยีน Caspase-8 Caspase-9 PARP และ p-mTOR proteins แต่สามารถลดการแสดงออกของ Beclin-1 proteins นอกจากนี้อัลลิลไอโซไทโอไซยานเนทยังเพิ่มการแสดงออกของยีน BCL-2 และ mTOR แต่ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน PRKAA1 และ PER2

ในรายงานก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าอัลลิลไอโซไทโอไซยานเนทสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน Caspase-8 และ Caspase-9 ในเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 (Bo *et al.*, 2016) เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว HL60 (Xu *et al.*, 2000) เพิ่มการแสดงออกของ Caspase-9 ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 (Bo *et al.*, 2016) MDA-MB-468 (Tsai *et al.*, 2012) ในเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ UM-UC-3 (Geng *et al.*, 2011) ในเซลล์มะเร็งสมอง GBM8401 (Chen *et al.*, 2010) ลดการแสดงออกของยีน BCL-2 ในเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 (Bo *et al.*, 2016) ในเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-468 (Tsai *et al.*, 2012) และในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ในการศึกษาระดับหลอดทดลอง (Xiao *et al.*, 2003) และในระดับสัตว์ทดลอง

(Srivastava *et al.*, 2003) เพิ่ม PARP ในมะเร็งเต้านม MDA-MB-231 (Bo *et al.*, 2016) และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW620 (Lau *et al.*, 2010) การศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่าอัลลิลไอโซไทโอไซยาเนทเหนี่ยวนำให้เกิดการหยุดวงจรชีวิตของเซลล์ระยะเฟส S ในมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (Savio *et al.*, 2014) มะเร็งปอด (Tripathi *et al.*, 2015) และเหนี่ยวนำให้เกิดการหยุดวงจรชีวิตระยะเฟส G2/M ในมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (Savio *et al.*, 2014) มะเร็งปอด (Tripathi *et al.*, 2015) มะเร็งเต้านม MDA-MB-468 (Tsai *et al.*, 2012) มะเร็งสมอง (Chen *et al.*, 2010) มะเร็งต่อมลูกหมาก (Xiao *et al.*, 2003) และมะเร็งเม็ดเลือดขาว (Xu and Thornalley 2000) การศึกษารายงานว่า Beclin-1 ที่แสดงออกมากเกินไปอาจส่งเสริมกระบวนการกลืนกินตัวเองของเซลล์ (autophagy) ในเซลล์มะเร็งเต้านมที่บกพร่องของกระบวนการกลืนกินตัวเองของเซลล์ (Liang *et al.*, 1999)

ในการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Arora *et al.* (2016) ทำการศึกษาปัจจุบันแสดงให้เห็นถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ของ 3 บิวทีนิวไอโซไธโอไซยาเนท (3-butenyl isothiocyanate) ที่แยกได้จาก *Brassica juncea* L. Czern var. Pusa Jaikisan พบว่ามีกิจกรรมการยับยั้งเซลล์มะเร็ง ได้แก่ เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก เซลล์มะเร็งกระดุก เซลล์มะเร็งปากมดลูก เซลล์มะเร็งตับ โรคมะเร็งของเนื้อเยื่อประสาท และมะเร็งเต้านมและพบว่า 3 บิวทีนิวไอโซไธโอไซยาเนทมีประสิทธิภาพมากต่อเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก และมีรายงานว่า 3 บิวทีนิวไอโซไธโอไซยาเนทลดศักย์ไฟฟ้าของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย (mitochondria membrane potential) ของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 หลังได้รับการทรีตด้วย 3 บิวทีนิวไอโซไธโอไซยาเนท ในทางตรงกันข้ามมีการเพิ่มขึ้นของ ROS หลังจากได้รับ 3 บิวทีนิวไอโซไธโอไซยาเนท มีการลดลงของโปรตีน MMPs และมีการเพิ่มขึ้นของ mitochondrial ROS มักจะเชื่อมโยงกับการเริ่มต้นการตายแบบอะพอพโทซิส (Gottlieb *et al.*, 2003; Kwang-Youn *et al.*, 2011) จากรายงานก่อนหน้านี้ของ Núñez-Iglesias *et al.* (2018) พบว่า 3 บิวทีนิวไอโซไธโอไซยาเนทเหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมงหลังการบ่ม นอกจากนี้ 3 บิวทีนิวไอโซไธโอไซยาเนทยังแสดงให้เห็นถึงการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ต่อมลูกหมาก PC-3 แต่ 3 บิวทีนิวไอโซไธโอไซยาเนทไม่มีผลต่อเซลล์มะเร็ง DU145PC

มีรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Papi *et al.* (2008b) รายงานว่าราฟาซาทิน (4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate ;Raphasatin) จาก *Raphanus sativus* L. มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ LoVo HCT-116 และ HT-29 ลดการเจริญของเซลล์มะเร็งและเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (LoVo, HCT-116, และ HT-29) จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่าเซลล์มะเร็งหลอดอาหาร KYSE510 ที่ได้รับการทรีตด้วยราฟาซาทินพบว่าการแสดงออกของโปรตีน Bcl2 ที่ลดลง เหนี่ยวนำ caspase-3, caspase-9 และ PARP-1 บ่งชี้ว่าการมีชีวิตของเซลล์ลดลงเกิดขึ้นผ่านทางวิถี mitochondrial apoptotic นอกจากนี้ยังเหนี่ยวนำให้เกิดการหยุดวงจร

ชีวิตของเซลล์ในระยะเฟส G2/M มีการเหนี่ยวนำ Chk1, Akt phosphorylations และลดการแสดงออกของโปรตีน p27 (Hirata *et al.*, 2019) มีรายงานหลายฉบับเกี่ยวกับไอโซโทปไอโซยานาเทที่แสดงให้เห็นว่าไอโซโทปไอโซยานาเทมีกิจกรรมยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเช่นการเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งเนื่องจากการผลิต ROS (Schumacker 2006; Trachootham *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2014) ซัลโฟราเฟนได้สามารถหยุดวงจรชีวิตของเซลล์และกระตุ้นการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 75 ไมโครโมลาร์แสดงให้เห็นว่าทำให้เกิดการหยุดวงจรชีวิตของเซลล์ G1/G2 และชักนำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสโดยการลดการแสดงออกของยีนต้านการเกิดการตายแบบอะพอพโทซิสคือยีน Bcl-2 และมีการแสดงออกของยีนที่เหนี่ยวนำให้เซลล์มีการตายแบบอะพอพโทซิสเพิ่มมากขึ้นคือยีน Bax ในเซลล์ลำไส้ใหญ่ (Dexheimer *et al.*, 2006; Chen and Wong 2008) ในปัจจุบันพบว่าเซลล์ในเฟส S/G2/M ลดลงเนื่องจากซัลโฟราเฟนมีการจัดการให้เซลล์นำไปสู่การเกิดการตายของเซลล์มะเร็งรังไข่ นอกจากนี้ยังเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิสซึ่งถูกวิเคราะห์โดยเทคนิค flow cytometry และ western blot พบว่ามีการลดลงของยีน Bcl-2 และมีการเพิ่มการแสดงออกของยีน Bax และ Caspase-3

มีรายงานวิจัยของ Pham *et al.* (2004); Hutzen *et al.* (2009); Kallifatidis *et al.* (2009) พบว่าซัลโฟราเฟนกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งมีการตายแบบอะพอพโทซิสผ่านการเปิดการทำงานของ caspase-3 เหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีน p21 และ p27 ที่มากขึ้นและยับยั้งการแสดงออกของยีน cyclin D1 ซัลโฟราเฟนกระตุ้นให้เกิดการทำงานของ FOXO transcription factors กระตุ้นให้มีการเกิดอะพอพโทซิสผ่านการยับยั้งการทำงานของวิถี PI3K/AKT และ MEK/ERK ซึ่งเกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของเซลล์ เมตาบอลิซึมของเซลล์ การเคลื่อนที่ของเซลล์ และการสร้างหลอดเลือด มีผลต่อกระบวนการแบ่งจำนวนของเซลล์มะเร็ง และกระตุ้นการทำงานของ transcription factor รวมถึงควบคุมการแสดงออกของยีน การยับยั้งวิถี PI3K/AKT และ MEK/ERK ทำหน้าที่ร่วมกันเพื่อเปิดการทำงานของ FOXO transcription factors และทำให้เกิด phosphorylation deficient mutants

รายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารกลุ่มสารไอโซโทปไอโซยานาเท สารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์มีผลต่อการก่อตัวแบ่งจำนวนโคโลนีของเซลล์มะเร็ง กลไกการทำงานอาจเกิดการเหนี่ยวนำให้เกิด ROS เกิดการเพิ่มขึ้นของกิจกรรม caspase-3 ที่เกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดอะพอพโทซิสและอาจเกิดการลดศักย์ไฟฟ้าของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย ซึ่งวิถีภายในหรือวิถีไมโทคอนเดรีย (intrinsic pathway หรือ mitochondrial pathway) ซึ่งเกิดจากการที่ไมโทคอนเดรียเกิดความเสียหายทำให้มีการปลดปล่อยของโปรตีนไซโตโครม C (cytochrome c) ออกมาสู่ไซโตพลาซึมและจะไปรวมตัวกับโปรตีน Apaf-1 ทำให้เกิดเป็นอะพอพโทโซมซึ่งจะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-9 และ caspase-9 ที่ถูกกระตุ้นนี้จะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์

caspases-3, -6, และ -7 ซึ่งก็จะส่งผลให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโตซิส (สุพักตร์ โยไรสง และคณะ 2012; Steelman *et al.*, 2004)

มีรายงานของ Kandasamy *et al.* (2003); Shankar *et al.* (2007) ว่าซัลโฟราเฟนเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีน proapoptotic proteins (Bax, Bak, PUMA, Noxa, and Bim) death receptors (TRAIL-R1/DR4 and TRAIL-R2/DR5) และยับยั้งการแสดงออกของยีน antiapoptotic proteins (Bcl-2 and Bcl-XL) นอกจากนี้ซัลโฟราเฟนยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ที่ปลูกถ่ายในหนูแรทโดยซัลโฟราเฟนมีการกระตุ้นอะพอพโตซิสยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์เนื้องอก ยับยั้งการบุกรุก ยับยั้งระยะการกระจายและยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ซัลโฟราเฟนยังยับยั้งกระบวนการ phosphorylation ของ AKT, ERK1/2, FOXO3A, และ p65-NF- κ B ในเนื้องอก กลุ่มโปรตีน Bcl-2 นั้นมีบทบาทที่สำคัญในการตายของเซลล์ประกอบด้วย pro-survival และ proapoptotic ที่เชื่อมโยงกับมะเร็งหลายชนิด ในการทดลองระดับหลอดทดลองพบว่าซัลโฟราเฟนลดการแสดงออกของยีน Bcl-2 และ Bcl-XL และเพิ่มการแสดงออกของ Bax, Bak, PUMA, Noxa และ Bim ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3

มีรายงานวิจัยของ Murata *et al.* (2000) พบว่าอัลลิลไอโซโธไซยานาเนททำให้กลไกของความเสียหายที่เกิดจากการทำลายดีเอ็นเอ ยีนต้านต่อการตายและยีน c-Ha-ras-1 proto-oncogene ถูกเปิดการทำงานโดยอัลลิลไอโซโธไซยานาเนทเช่นเดียวกับเบนซิลไอโซโธไซยานาเนทและพีนีทิวไอโซโธไซยานาเนทซึ่งตรวจวัดความเสียหายของดีเอ็นเอโดยใช้ อิเล็กโทรโฟริซิส ไอโซโธไซยานาเนทซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของการย่อยสลายกลูโคซิโนเลทในผักตระกูลกะหล่ำมีฤทธิ์รุนแรงต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิด จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่าเบนซิลไอโซโธไซยานาเนท พีนีทิวไอโซโธไซยานาเนทและซัลโฟราเฟนยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งโดยควบคุมการแสดงออกของโปรตีน MMP 9 ไอโซโธไซยานาเนทโดยเฉพาะ พีนีทิวไอโซโธไซยานาเนทยับยั้ง 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) ยับยั้งการทำงานของโปรตีน MMP 9 และยับยั้งการบุกรุกแพร่กระจายในเซลล์มะเร็งต่างๆ โดยแสดงให้เห็นว่าเบนซิลไอโซโธไซยานาเนท พีนีทิวไอโซโธไซยานาเนทและซัลโฟราเฟนยับยั้งการแสดงออกของ TMP-induced MMP 9 โดยการยับยั้ง AP-1 และ NF- κ B ในเซลล์มะเร็งกระดูก U-2 OS นอกจากนี้ยังลดกระบวนการ phosphorylation ของ FAK, ERK2, และ Akt ไอโซโธไซยานาเนทจะยับยั้ง FAK phosphorylation ยับยั้ง phosphorylation ของ ERK1/2 และ Akt ในเซลล์มะเร็งกระดูก U2OS และเซลล์มะเร็งปอด A549 พร้อมกับบล็อกรายการย้ายของ p65 และ c-Fos นอกจากนี้ยังพบว่าเบนซิลไอโซโธไซยานาเนทมากกว่าพีนีทิวไอโซโธไซยานาเนทมากกว่าซัลโฟราเฟน ที่มีกิจกรรมในการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน MMP 9 และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Jeong *et al.*, 2017) ผลลัพธ์เหล่านี้แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งกิจกรรม MMP 9 มีความสำคัญมากกว่าการยับยั้งกิจกรรม MMP 2 ในแง่ของผลการ

ต่อต้านการแพร่กระจายในเซลล์มะเร็งของสารไอโซโธไซยานาเท ทัวไปสารประกอบที่มีโครงสร้างคาร์บอนอเล็กโตรไฟล์ ($-N=C=S$) จะมีความแข็งแรงและยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง (Ahn *et al.*, 2010) PEITC analog และ NMPEA ซึ่งขาดโครงสร้างคาร์บอนอเล็กโตรไฟล์แสดงให้เห็นถึงผลกระทบของการแยกตัวของเซลล์มะเร็งต่อการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งความแข็งแรงของสัมพัทธ์ซึ่งไอโซโธไซยานาเทนั้นยับยั้งทั้งกิจกรรม MMP 9 และการย้ายถิ่นของเซลล์มะเร็งมีการจัดอันดับดังต่อไปนี้ เบนซิลไอโซโธไซยานาเทมากกว่าฟีนีทิวไอโซโธไซยานาเทมากกว่าซัลโฟราเฟน ไอโซโธไซยานาเทมีผลต่อเซลล์มะเร็งต่าง ๆ รวมถึงการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันและยับยั้งวงจรชีวิตของเซลล์มะเร็ง (Wu *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011) ไอโซโธไซยานาเทยับยั้งการย้ายของ p65 และ c-fos รวมทั้งยับยั้งการทำงานของโปรโมเตอร์ MMP-9-WT, MMP-9-mAP-1 และ MMP-9-mNF-kB AP-1 และ NF-kB เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ MMP 9 ผ่านทาง MAPK หรือเส้นทาง PI3K/Akt (Hsiang *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008) ไอโซโธไซยานาเทยับยั้งกระบวนการ phosphorylation ของ ERK และ Akt ในเซลล์มะเร็งกระดูก U-2 OS แต่ไม่ส่งผลกระทบต่อ phosphorylation ของ JNK p38 และ PI3K

ในรายงานของ Lee *et al.* (2015) พบไอโซโธไซยานาเทยับยั้งการหลั่งและการแสดงออกของโปรตีน PMA-induced MMP 9 ผลของการยับยั้งของไอโซโธไซยานาเทต่อการแสดงออกของ PMA-MMP-9 ที่เกิดจาก PMA นั้นพบว่าเกี่ยวข้องกับกลไกการยับยั้งระดับการถอดรหัส MMP 9 ผ่านการ NF-kB และ Activator protein-1 (AP-1) ลดการส่งสัญญาณ MMP-9-mediated เช่น FAK และ JNK ในขณะที่ไม่มีผลต่อกระบวนการ phosphorylation ของ ERK และ p38

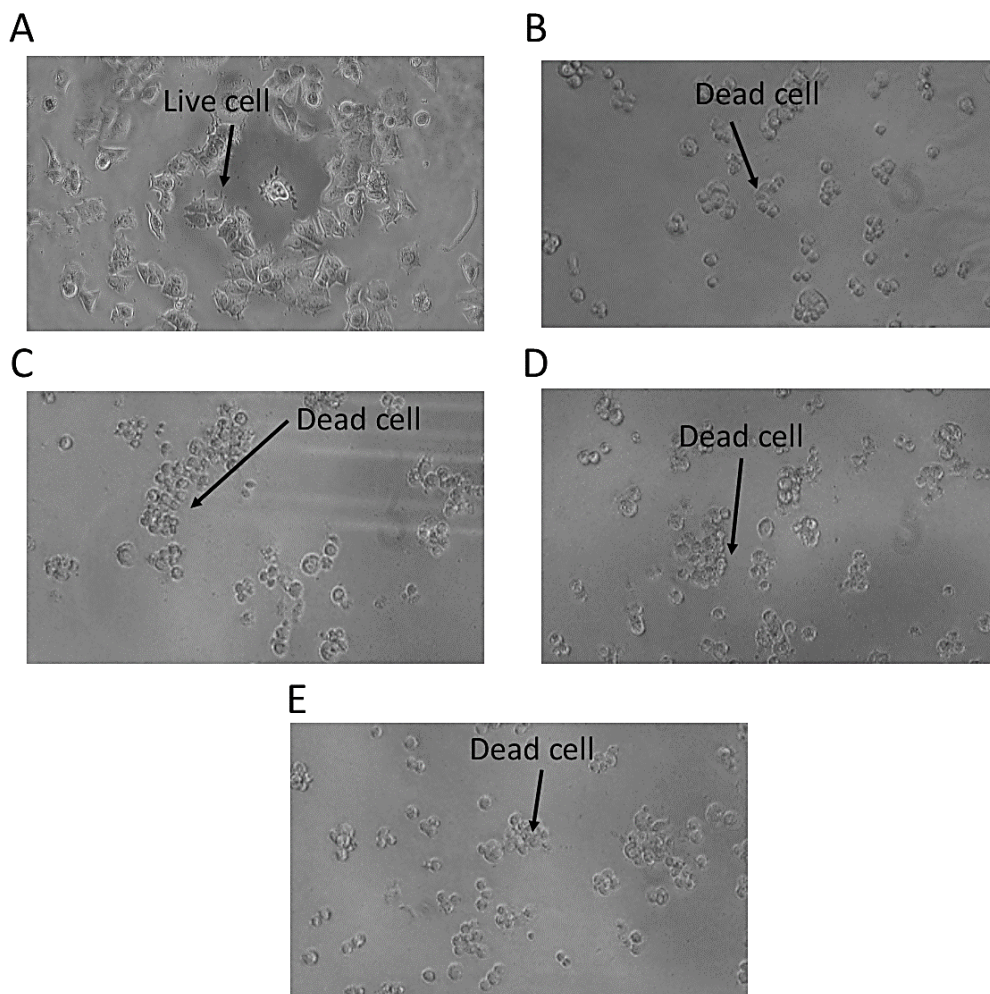
4.3.5 ผลของสารสกัดหยาบผักขี้หูดต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็ง

เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ตามปกติเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 เซลล์มีลักษณะแบนหัวแหลมท้ายแหลมมีเหลี่ยมมีการยึดเกาะกับ substratum มีการเจริญแผ่กระจายเป็นเป็นชั้นเดียวแบบ monolayer และเซลล์มะเร็งตับ HepG2 เซลล์มีลักษณะยาวเรียวยแหลมเป็นเหลี่ยม การเจริญแผ่กระจายเป็นเป็นชั้นเดียวแบบ monolayer จากผลการทดลองพบว่าเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ที่ได้รับสารสกัดหยาบจากผักขี้หูดที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบมีการลดจำนวนลงของเซลล์มะเร็งและมีลักษณะของเซลล์ที่ขนาดเล็กกลองอีกด้วย มีการหดตัวของเซลล์ที่แสดงถึงลักษณะการตายแบบอะพอพโทซิส จากการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 (แสดงภาพที่ 37) และเซลล์มะเร็งตับ HepG2 (แสดงภาพที่ 38) ที่ได้รับสารสกัดหยาบผักขี้หูดที่เวลาบ่มสารสกัด 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิดมีลักษณะที่ค่อนข้างกลมลง ขอบเซลล์มีลักษณะไม่เรียบมีรอยหยักซึ่งเป็นลักษณะของ blebbing membrane เซลล์ไม่เกาะแผ่และลอยเป็นเซลล์แขวนลอย มีการหดตัวของเซลล์ (cell shrinkage)

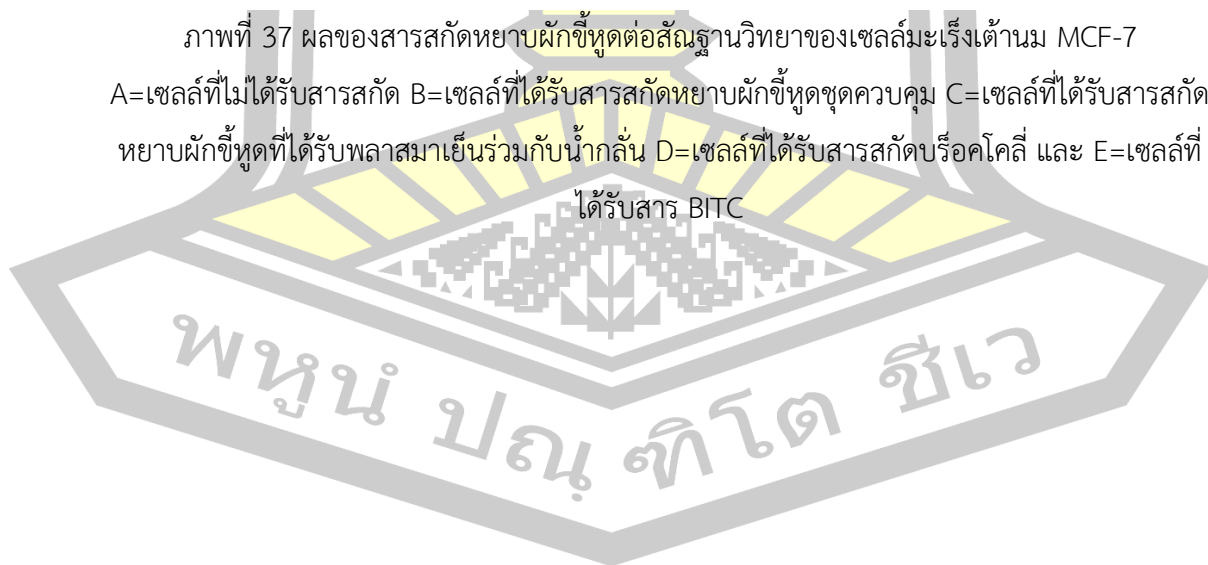
และผิวเซลล์มีการโป่งพอง (membrane blebbing) มีการรวมตัวอัดแน่นของออร์แกเนลภายในเซลล์ (organelle condensation) โดยเป็นลักษณะของการตายแบบอะพอพโทซิส ซึ่งมองเห็นเป็นลักษณะเป็นจุดสีดำอยู่ภายในเซลล์ ขอบเขตของเซลล์ไม่ชัดเจน และมีลักษณะชิ้นส่วนของเซลล์ที่แยกจากกันเป็นเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ เซลล์มีลักษณะเหมือนถุงใสซึ่งอาจเป็น ghost cell พบในระยะปลายของการตายแบบอะพอพโทซิสและพบว่าความรุนแรงของการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์แปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารสกัด

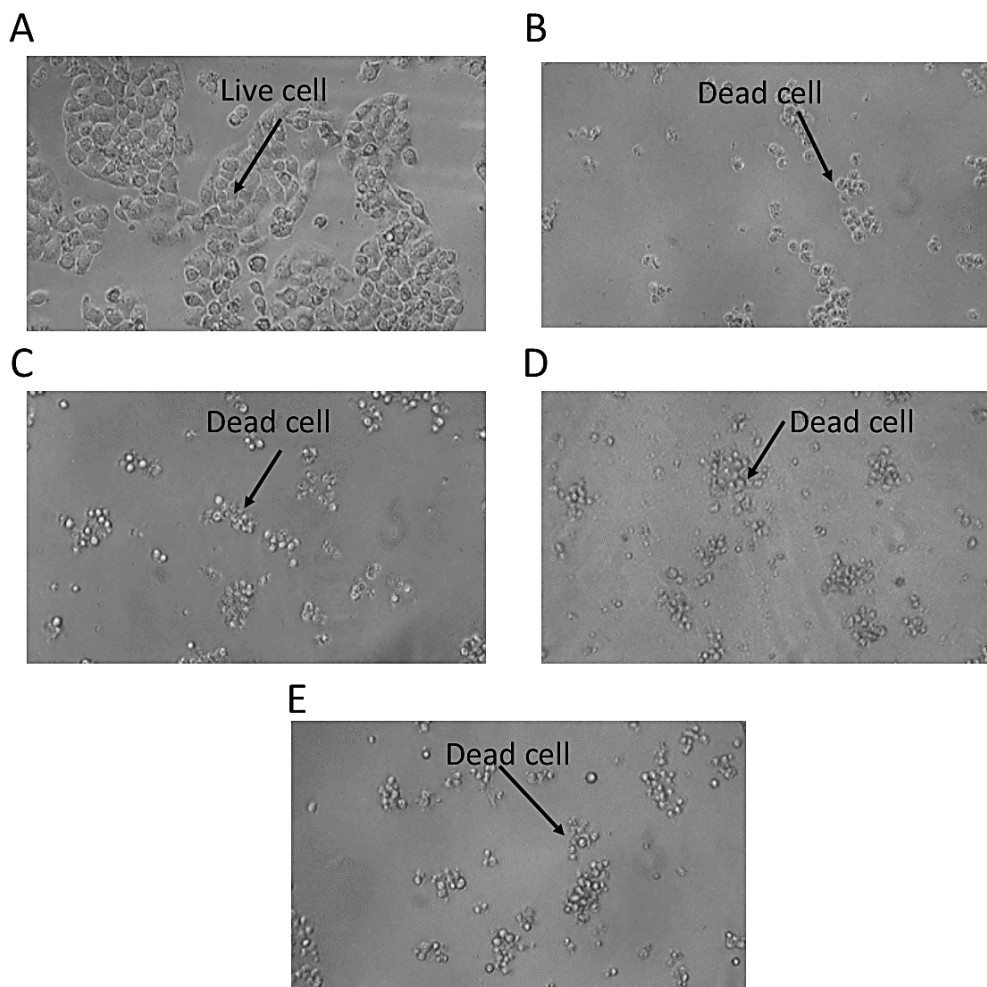
ลักษณะการตายของเซลล์มะเร็งนับเป็นจุดที่น่าสนใจอีกประเด็นหนึ่งโดยพบการหดตัวของเซลล์มีการแตกออกเป็นชิ้นส่วนเล็ก ๆ และมีการโป่งพองของเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับเซลล์ที่ตายด้วยกระบวนการอะพอพโทซิสกลไกการตายแบบหนึ่งที่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน เซลล์ที่ตายด้วยกระบวนการอะพอพโทซิสจะมีลักษณะเด่นที่สำคัญคือมีการหดตัวของเซลล์ cell shrinkage มีการหดตัวของโครมาติน (chromatin condensation การแตกออกของนิวเคลียส (nuclear fragmentation) และมีการโป่งพองของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane blebbing) และในระยะสุดท้ายส่วนของเซลล์มีการแตกแยกออกเป็นชิ้นส่วนเล็ก ๆ เรียกว่า apoptotic bodies หากอยู่ในร่างกายส่วนของ apoptotic bodies นี้จะถูกกำจัดโดยระบบภูมิคุ้มกันจึงไม่เกิดการกระจายของสารหรือของเสียไปยังเซลล์ข้างเคียงนั่นคือไม่ทำให้เกิดการอักเสบเหมือนกับการตายแบบ necrosis ที่จะมีลักษณะของเซลล์บวมไม่มีการหดตัวของโครมาตินเยื่อหุ้มเซลล์แตกออกทำให้ของเหลวภายในเซลล์รั่วออกสู่ภายนอก การตายแบบอะพอพโทซิส จะเป็นที่น่าสนใจมากในการพัฒนายาเพื่อการนำไปใช้ต่อไป (วัลยา อุทัยสาธ และไพศาล ขาวสั๊ก, 2008)





ภาพที่ 37 ผลของสารสกัดหยาบผักชีหูดต่อสัญญาณวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7
 A=เซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัด B=เซลล์ที่ได้รับสารสกัดหยาบผักชีหูดชุดควบคุม C=เซลล์ที่ได้รับสารสกัด
 หยาบผักชีหูดที่ได้รับพลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่น D=เซลล์ที่ได้รับสารสกัดบร็อกโคลี่ และ E=เซลล์ที่
 ได้รับสาร BITC





ภาพที่ 38 ผลของสารสกัดหยาบผักชีหูดต่อสัญญาณวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7
 A=เซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัดหยาบ B=เซลล์ที่ได้รับสารสกัดหยาบผักชีหูดชุดควบคุม C=เซลล์ที่ได้รับ
 สารสกัดหยาบผักชีหูดที่ได้รับพลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่น D=เซลล์ที่ได้รับสารสกัดหยาบบร็อคโคลี่
 และ E=เซลล์ที่ได้รับสาร BITC

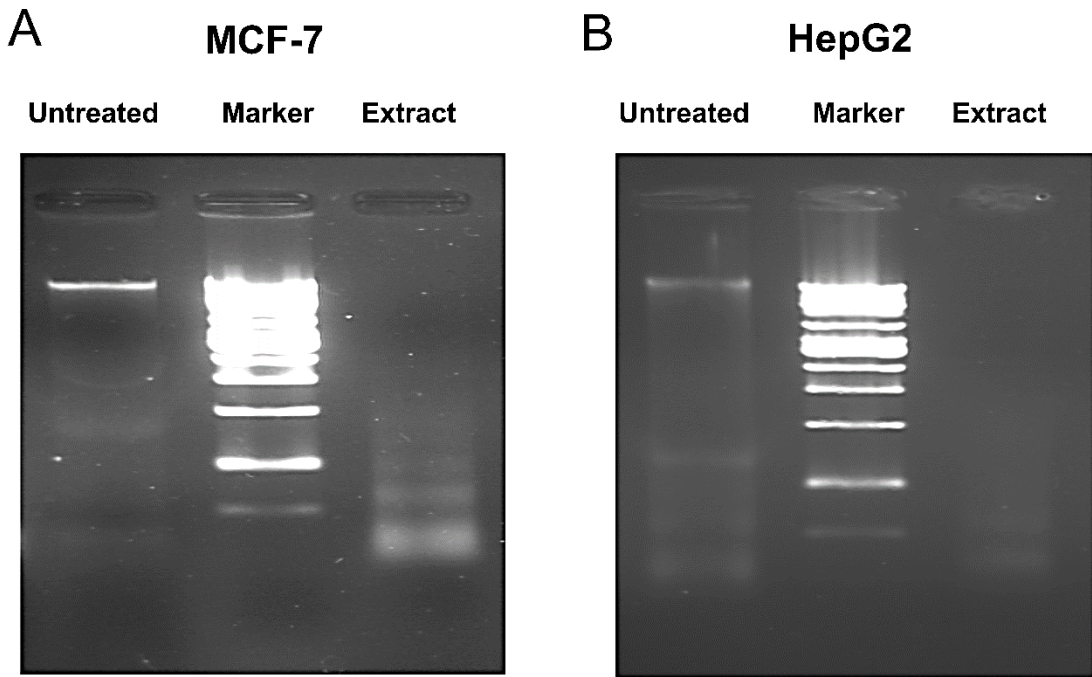
4.3.6 ผลของสารสกัดหยาบผักชีหูดต่อการแตกหักของดีเอ็นเอและการแสดงออกของโปรตีน MMP2 และ MMP-9 ในเซลล์มะเร็ง

การศึกษาการแตกหักเสียหายของดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อการตรวจสอบการตายแบบอะพอพโทซิส ซึ่งการแตกหักเสียหายของดีเอ็นเอเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็ง เป็นประเภทของการตายของเซลล์ที่ตั้งโปรแกรมไว้โดยจะกระตุ้นของ endogenous endonucleases โดยเฉพาะ caspase-3 ซึ่งเปิดใช้งาน DNase (CAD) โดยการศึกษาการแตกหักเสียหายของดีเอ็นเอครั้งนี้เพื่อระบุการเกิดอะพอพโทซิสเต้านม MCF-7 และเซลล์มะเร็งตับ HepG2 โดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 (แสดงภาพที่ 39A) และ

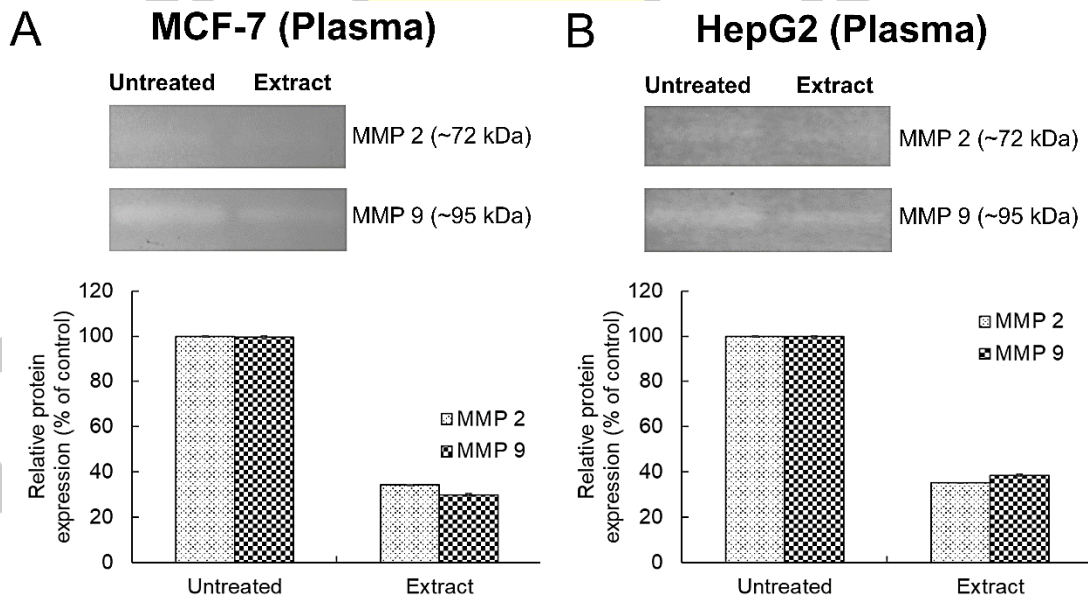
เซลล์มะเร็งตับ HepG2 (แสดงภาพที่ 39B) เมื่อได้รับการทรีตด้วยสารสกัดหยาบผักขี้หูดที่มีการทรีตด้วยพลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการสกัดดีเอ็นเอแล้วแยกดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้ 1 kb Ladder DNA เป็น Marker โดยเปรียบเทียบควบคุมกับกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิดที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์สมบูรณ์ที่ไม่มีการทรีตด้วยสารสกัดพบว่านำไปสู่การเสื่อมสภาพ การกระจายตัวแยกชิ้นส่วนและแตกหักของดีเอ็นเออย่างชัดเจน ซึ่งเป็นจุดเด่นของการเกิดอะพอพโทซิสในทางตรงกันข้ามชุดทดลองที่ไม่มีการทรีตด้วยสารสกัดไม่พบการกระจายตัวแยกชิ้นส่วนและแตกหักของดีเอ็นเอ โดยแสดงผล DNA Fragment Length

การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเป็นกลไกที่มีการควบคุมอย่างเป็นระเบียบแบบแผน อาศัยโปรตีนและเอนไซม์หลายชนิด กลไกหนึ่งที่สำคัญ คือ อาศัยเอนไซม์ matrixmetalloproteinase 2 (MMP 2) และ matrixmetalloproteinase 9 (MMP 9) ในเซลล์มะเร็งชนิดรุกราน gelatinase A (MMP-2) และ gelatinase B (MMP-9) แตกต่างจาก MMP ชนิดอื่น ๆ (Murata *et al.*, 2000) MMP-2 และ MMP-9 มีความสัมพันธ์กับระยะลุกลามของมะเร็งเนื่องจากความสามารถในการย่อยสลายคอลลาเจนประเภท IV ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน (basement membrane) จากผลการทดลองพบว่าหลังจากเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 (แสดงภาพที่ 40A) และเซลล์มะเร็งตับ HepG2 (แสดงภาพที่ 40B) เมื่อได้รับการทรีตด้วยสารสกัดหยาบผักขี้หูดที่มีการทรีตด้วยพลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร จากนั้นนำส่วนในของอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรวจวัดการแสดงผลออกของ MMP-2 และ MMP-9 ใน 10% SDS-polyacrylamide gel ที่มีสารตั้งต้นเจลาติน 0.05 % ด้วยเทคนิค zymography โดยเปรียบเทียบควบคุมกับกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิดที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์สมบูรณ์ที่ไม่มีการทรีตด้วยสารสกัด พบว่าสารสกัดหยาบผักขี้หูดมีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงผลออกของโปรตีน MMP 2 และ MMP 9 อย่างดีที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรในอาหารเลี้ยงเซลล์ แสดงถึงความสามารถในการยับยั้งการเคลื่อนที่ยานถิ่นของเซลล์มะเร็งได้

พญ. ปณ. ทิโต ชีเว



ภาพที่ 39 ผลของสารสกัดหยาบผักชีหูดต่อการแตกหักของดีเอ็นเอในเซลล์มะเร็ง
 A= เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และ B=เซลล์มะเร็งตับ HepG2



ภาพที่ 40 ผลของสารสกัดหยาบผักชีหูดต่อการแสดงออกของโปรตีน MMP2 และ MMP9 ใน
 เซลล์มะเร็ง

A= เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และ B=เซลล์มะเร็งตับ HepG2

มีรายงานของ Kandasamy *et al.* (2003) และ Shankar *et al.* (2007) พบว่าซัลโฟราเฟนเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีน proapoptotic proteins (Bax, Bak, PUMA, Noxa, and Bim) และ death receptors (TRAIL-R1/DR4 and TRAIL-R2/DR5) และยับยั้งการแสดงออกของยีน antiapoptotic proteins (Bcl-2 and Bcl-XL) นอกจากนี้ซัลโฟราเฟนยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 ที่ปลูกถ่ายในหนูแรทโดยซัลโฟราเฟนมีการกระตุ้นอะพอพโทซิส ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์เนื้องอก ยับยั้งการบุกรุก ยับยั้งระยะการกระจายและยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ซัลโฟราเฟนยังยับยั้งกระบวนการ phosphorylation ของ AKT, ERK1/2, FOXO3A, และ p65-NF- κ B ในเนื้องอก กลุ่มโปรตีน Bcl-2 นั้นมีบทบาทที่สำคัญในการตายของเซลล์ประกอบด้วย pro-survival และ proapoptotic ที่เชื่อมโยงกับมะเร็งหลายชนิด ในการทดลองระดับหลอดทดลองพบว่าซัลโฟราเฟนลดการแสดงออกของยีน Bcl-2 และ Bcl-XL และเพิ่มการแสดงออกของ Bax, Bak, PUMA, Noxa และ Bim ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3

การกระจายตัวของโอลิโกนิวคลีโอโซมของดีเอ็นเอที่เป็นเครื่องหมายรับรองการตายของเซลล์ late-stage apoptosis การแตกหักของดีเอ็นเอถูกเร่งปฏิกิริยาโดย DFF40/CAD DNase โดยส่วนใหญ่แล้วจะผ่าน caspase-3 ผ่าน proteolytic เฉพาะของ DFF45/ICAD ยีน caspases-3 caspases -6 และ caspases -7 มีหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส เช่นการแตกหักของดีเอ็นเอ การเกิดกระบวนการอะพอพโทซิสซึ่งสังเกตจากการเกิดหดของเซลล์ กระจายตัวของโอลิโกนิวคลีโอโซม การแตกหักของดีเอ็นเอ โครมาตินมีการหดตัวเล็กลง ซึ่งทำให้เกิดการแยกสลายของเซลล์เป็นรูปแบบที่เรียกว่าอะพอพโทติก (apoptotic bodies) ซึ่งจะถูกล้อมและย่อยสลายอย่างรวดเร็วโดยเซลล์แมโครเฟจ (macrophage) หรือเซลล์ข้างเคียง เกิดการลดการแสดงออกของยีน Bcl-2 และ Birc 5 ในขณะที่มีการเพิ่มการแสดงออกของยีน Bax-alpha ซึ่งการเกิดการแตกหักของดีเอ็นเอส่งผลจากการแสดงออกของยีน caspase-3, caspases -6 caspases -7 และ caspases -14 ที่มีมากขึ้น โดยการแสดงออกของ caspase-3 caspases -6 caspases -7 และ caspases -14 มีผลทำให้เกิดย่อยสลายโปรตีนโครงสร้างต่างๆ อันได้แก่ actin fodrin และ lamin กระตุ้นให้เซลล์เกิดการแยกตัวและนิวเคลียสหดตัว ส่งเสริมการทำงานของ caspase-activated DNase/DNA fragmentation factor (CAD/DFF) ดังนั้นเมื่อเราพบลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เรียงตัวกันเหมือนขั้นบันไดที่เรียกว่าการแตกหักของดีเอ็นเอ (DNA fragmentation) บ่งบอกถึงเซลล์กำลังเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส

มีรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ Murata *et al.* (2000) พบว่าอัลลิโลไซโรโอไซยานเทททำให้กลไกของความเสียหายที่เกิดจากการทำลายดีเอ็นเอ ยีนต่อต้านและยีน c-Ha-ras-1 proto-oncogene ถูกเปิดการทำงานโดยอัลลิโลไซโรโอไซยานเทท เช่นเดียวกับ เบนซิลโอไซโรโอไซยานเทท

(Benzyl isothiocyanate ;BITC) และฟีนีทิวไอโซไทโอไซยาเนท (Phenethyl isothiocyanate ;PITC) ซึ่งตรวจวัดความเสียหายของดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์โพรทีนอซิส นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Papi *et al.* (2008b) พบว่าการทดลองด้วยราฟาซาตินเกิดการกระตุ้นการตายด้วยการเพิ่มการทำงานของยีน Bax และลดลงของการทำงานของยีน Bcl-2 ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่หลังจากได้รับสารสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเป็นกลไกที่มีการควบคุมอย่างเป็นระเบียบแบบแผนอาศัยโปรตีนและเอนไซม์หลายชนิด กลไกหนึ่งที่สำคัญคืออาศัยเอนไซม์ matrix metalloproteinase 2 (MMP 2) และ matrix metalloproteinase 9 (MMP 9) ในเซลล์มะเร็งชนิดรุกราน gelatinase A (MMP 2) และ gelatinase B (MMP 9) แตกต่างจาก MMP ชนิดอื่น ๆ (Murata *et al.*, 2000) MMP 2 และ MMP 9 มีความสัมพันธ์กับระยะลุกลามของมะเร็ง เนื่องจากความสามารถในการย่อยสลายคอลลาเจนประเภท IV ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน (basement membrane) ไอโซไทโอไซยาเนทมีผลยับยั้งมะเร็งเป็นอย่างดีในหลาย ๆ ในระดับสัตว์ทดลอง สันนิษฐานได้จากการปรับเอนไซม์ xenobiotic-metabolizing เช่นโดยการยับยั้ง cytochrome P-450 หรือเหนี่ยวนำของเฟส II detoxifying enzymes นอกจากนี้ยังพบว่าฟีนีทิวไอโซไทโอไซยาเนท (phenyl isothiocyanate) ไม่เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งปากมดลูก Hela ตามเวลาและปริมาณยา การได้รับการทรีตด้วยไอโซไทโอไซยาเนททำให้เกิดการเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิส ทำให้เกิดการเหนี่ยวนำของกิจกรรมที่ caspase-3/CPP32 นอกจากนี้ไอโซไทโอไซยาเนทยกเว้นฟีนีทิวไอโซไทโอไซยาเนทกระตุ้นการทำงานของกลุ่มเอนไซม์โปรตีโอไลติก (proteolytic enzyme) และกระตุ้นให้เกิดการแยก poly (ADP-ribose) polymerase ซึ่งมีผลตามมาก็คือเกิดกิจกรรมของ caspase และเกิดการกระจายแตกหักของดีเอ็นเอในเซลล์มะเร็ง (Yu *et al.*, 1998)

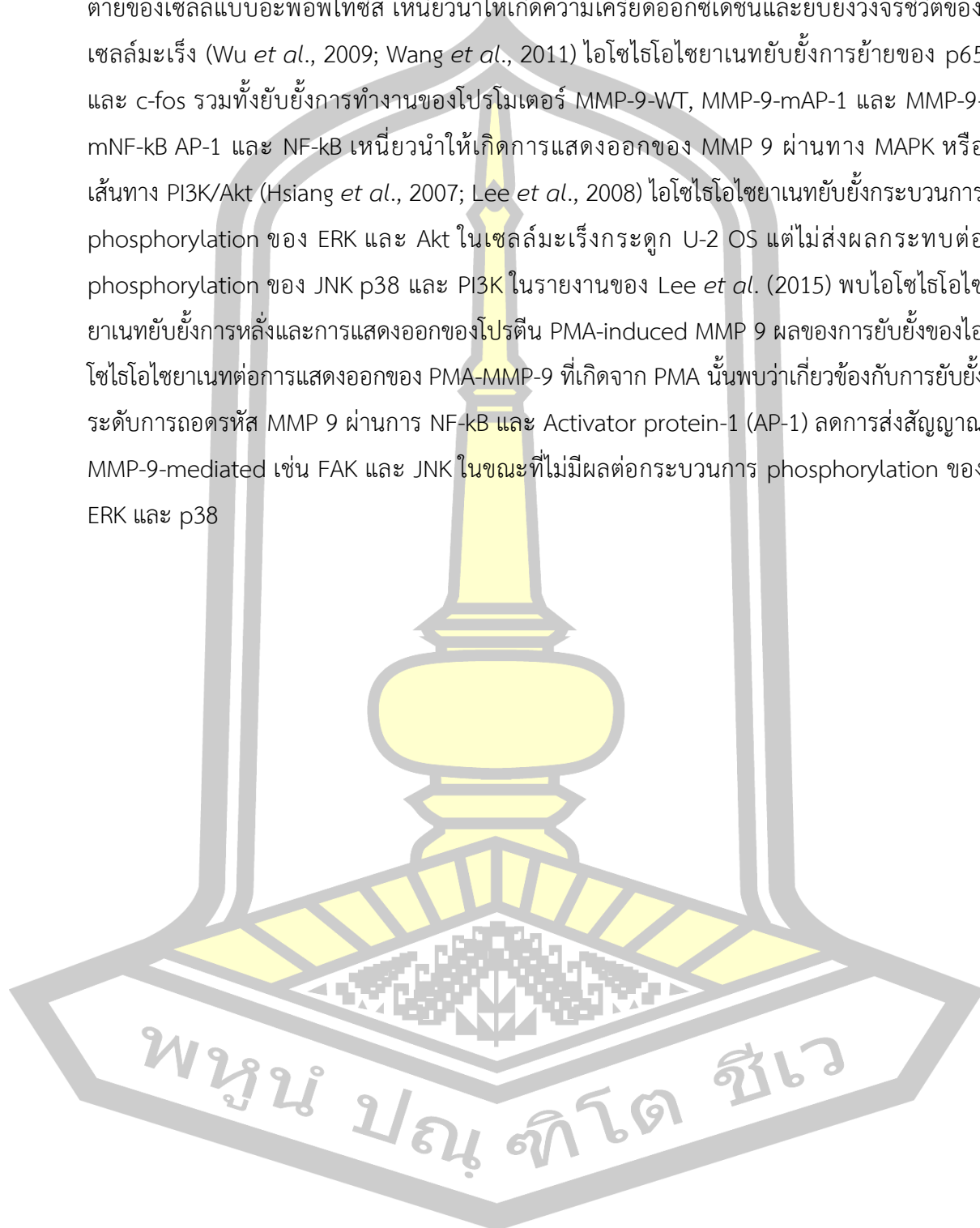
ในรายงานก่อนหน้านี้พบว่าฟีนีทิวไอโซไทโอไซยาเนท (Phenethyl isothiocyanate) ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งตับอ่อน MIAPaca2, PL-45, and BxPC3 นอกจากนี้ยังชะลอวงจรชีวิตของเซลล์โดยการยับยั้งวงจรชีวิตเซลล์มะเร็งตับอ่อนระยะเฟส G2/M และปรับระดับโปรตีนในกลุ่ม Bcl-2 นอกจากนี้ยังพบว่าฟีนีทิวไอโซไทโอไซยาเนทเหนี่ยวนำให้เกิดการแยก PARP และเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอ (Stan *et al.*, 2014) และยังมีรายงานวิจัยพบความเป็นพิษของซัลโฟราเฟนต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MFC-7 เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HT-29 และเซลล์มะเร็งตับ HepG2 นอกจากนี้พบว่าซัลโฟราเฟนแสดงความเป็นพิษสูงสุดในเซลล์มะเร็งตับ HepG2 หลังการบ่มที่ 24 48 และ 72 ชั่วโมงแต่ในทางตรงกันข้ามพบว่ากลูโคซิโนเลทไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่อเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ยังพบว่าซัลโฟราเฟนกระตุ้นให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส ทำให้เกิดการหดตัวของเซลล์ การอัดแน่นของโครมาตินและเกิดการกระจายแตกหักของดีเอ็นเอ มีการเพิ่มกิจกรรมการทำงานของ caspases -3 caspases -7 และ

caspases -9 ในขณะที่มีการลดลงของกิจกรรม caspase-8 การมีจำนวนลดลงของเซลล์มะเร็งถูกเหนี่ยวนำโดยการหยุดวงจรการทำงานของเซลล์ในเฟส G0/G1 อาจสรุปได้ว่าซัลโฟราเฟนทำให้เกิดพิษต่อเซลล์และกระตุ้นการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์ HepG2 ยกเว้นกลูโคซิโนเลทและกลูโคราฟานิน (Ibrahim *et al.*, 2018) มีรายงานวิจัยพบว่ากลไกระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของสารประกอบจากการวิเคราะห์พบการหยุดการทำงานของวงจรชีวิตเซลล์ (Geng *et al.*, 2011) ตัวอย่างเช่นทำให้เกิดการตายของเซลล์และทำให้เกิดจากกระจายแตกหักของดีเอ็นเอและหยุดการทำงานของเซลล์ระยะเฟส subG0/G1 และเหนี่ยวนำให้ดีเอ็นเอมีขนาดเล็กลงและเกิดการกระจายแตกหักต่อไป ดังนั้นซัลโฟราเฟนจึงมีศักยภาพที่จะทำให้เกิดการกระจายแตกหักของดีเอ็นเอและหยุดวงจรชีวิตของเซลล์ที่ระยะ subG0/G1 ในเซลล์HepG2 (Savio *et al.*, 2014)

มีรายงานวิจัยของ Murata *et al.* (2000) พบว่าอัลลิลไอโซโธไซยานาเททำให้กลไกของความเสียหายที่เกิดจากการทำลายดีเอ็นเอ ยีนต่อต้านการตายและยีน c-Ha-ras-1 proto-oncogene ถูกเปิดการทำงานโดยอัลลิลไอโซโธไซยานาเทเช่นเดียวกับเบนซิลไอโซโธไซยานาเทและฟีนีทิวไอโซโธไซยานาเท ซึ่งตรวจวัดความเสียหายของดีเอ็นเอโดยใช้อิเล็กโทรโฟริซิส ไอโซโธไซยานาเทซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของการย่อยสลายกลูโคซิโนเลทในผักตระกูลกะหล่ำมีฤทธิ์รุนแรงต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิด จากรายงานก่อนหน้าพบว่าเบนซิลไอโซโธไซยานาเท ฟีนีทิวไอโซโธไซยานาเทและซัลโฟราเฟนยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งโดยควบคุมการแสดงออกของโปรตีน MMP 9 ไอโซโธไซยานาเทโดยเฉพา ะ ฟีนีทิวไอโซโธไซยานาเทยับยั้ง 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) ยับยั้งการทำงานของโปรตีน MMP 9 และยับยั้งการบุกรุกแพร่กระจายในเซลล์มะเร็งต่างๆ โดยแสดงให้เห็นว่าเบนซิลไอโซโธไซยานาเท ฟีนีทิวไอโซโธไซยานาเทและซัลโฟราเฟนยับยั้งการแสดงออกของ TMP-induced MMP 9 โดยการยับยั้ง AP-1 และ NF- κ B ในเซลล์เซลล์มะเร็งกระดูก U-2 OS นอกจากนี้ยังลดกระบวนการ phosphorylation ของ FAK, ERK1/2, และ Akt ไอโซโธไซยานาเทจะยับยั้ง FAK phosphorylation ยับยั้ง phosphorylation ของ ERK1/2 และ Akt ในเซลล์มะเร็งกระดูก U2OS และเซลล์มะเร็งปอด A549 พร้อมกับการโยกย้ายของ p65 และ c-Fos นอกจากนี้ยังพบว่าเบนซิลไอโซโธไซยานาเทมากกว่า ฟีนีทิวไอโซโธไซยานาเทมากกว่าซัลโฟราเฟน ที่มีกิจกรรมในการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน MMP 9 และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (Jeong *et al.*, 2017) ผลลัพธ์เหล่านี้แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งกิจกรรม MMP 9 มีความสำคัญมากกว่าการยับยั้งกิจกรรม MMP 2 ในแง่ของผลการต่อต้านการแพร่กระจายในเซลล์มะเร็งของสารไอโซโธไซยานาเท

ทั่วไปสารประกอบที่มีโครงสร้างคาร์บอนอิเล็กโทรไฟล์ ($-N=C=S$) จะมีความแข็งแรงและยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง (Ahn *et al.*, 2010) ไอโซโธไซยานาเทนั้นยับยั้งทั้งกิจกรรม MMP 9 และการย้ายถิ่นของเซลล์มะเร็งมีการจัดอันดับดังต่อไปนี้ เบนซิลไอโซโธไซยานาเทมากกว่า

พีพีทีวไอโซโรโอไฮเซนมากกว่าซัลโฟราเฟน ไอโซโรโอไฮยานเทมีผลต่อเซลล์มะเร็งต่าง ๆ รวมถึงการตายของเซลล์แบบอะพอโทซิส เหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันและยับยั้งวงจรชีวิตของเซลล์มะเร็ง (Wu *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011) ไอโซโรโอไฮยานเทมียับยั้งการย้ายของ p65 และ c-fos รวมทั้งยับยั้งการทำงานของโปรโมเตอร์ MMP-9-WT, MMP-9-mAP-1 และ MMP-9-mNF-kB AP-1 และ NF-kB เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ MMP 9 ผ่านทาง MAPK หรือเส้นทาง PI3K/Akt (Hsiang *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008) ไอโซโรโอไฮยานเทมียับยั้งกระบวนการ phosphorylation ของ ERK และ Akt ในเซลล์มะเร็งกระดูก U-2 OS แต่ไม่ส่งผลกระทบต่อ phosphorylation ของ JNK p38 และ PI3K ในรายงานของ Lee *et al.* (2015) พบไอโซโรโอไฮยานเทมียับยั้งการหลั่งและการแสดงออกของโปรตีน PMA-induced MMP 9 ผลของการยับยั้งของไอโซโรโอไฮยานเทมีต่อการแสดงออกของ PMA-MMP-9 ที่เกิดจาก PMA นั้นพบว่าเกี่ยวข้องกับการยับยั้งระดับการถอดรหัส MMP 9 ผ่านการ NF-kB และ Activator protein-1 (AP-1) ลดการส่งสัญญาณ MMP-9-mediated เช่น FAK และ JNK ในขณะที่ไม่มีผลต่อกระบวนการ phosphorylation ของ ERK และ p38

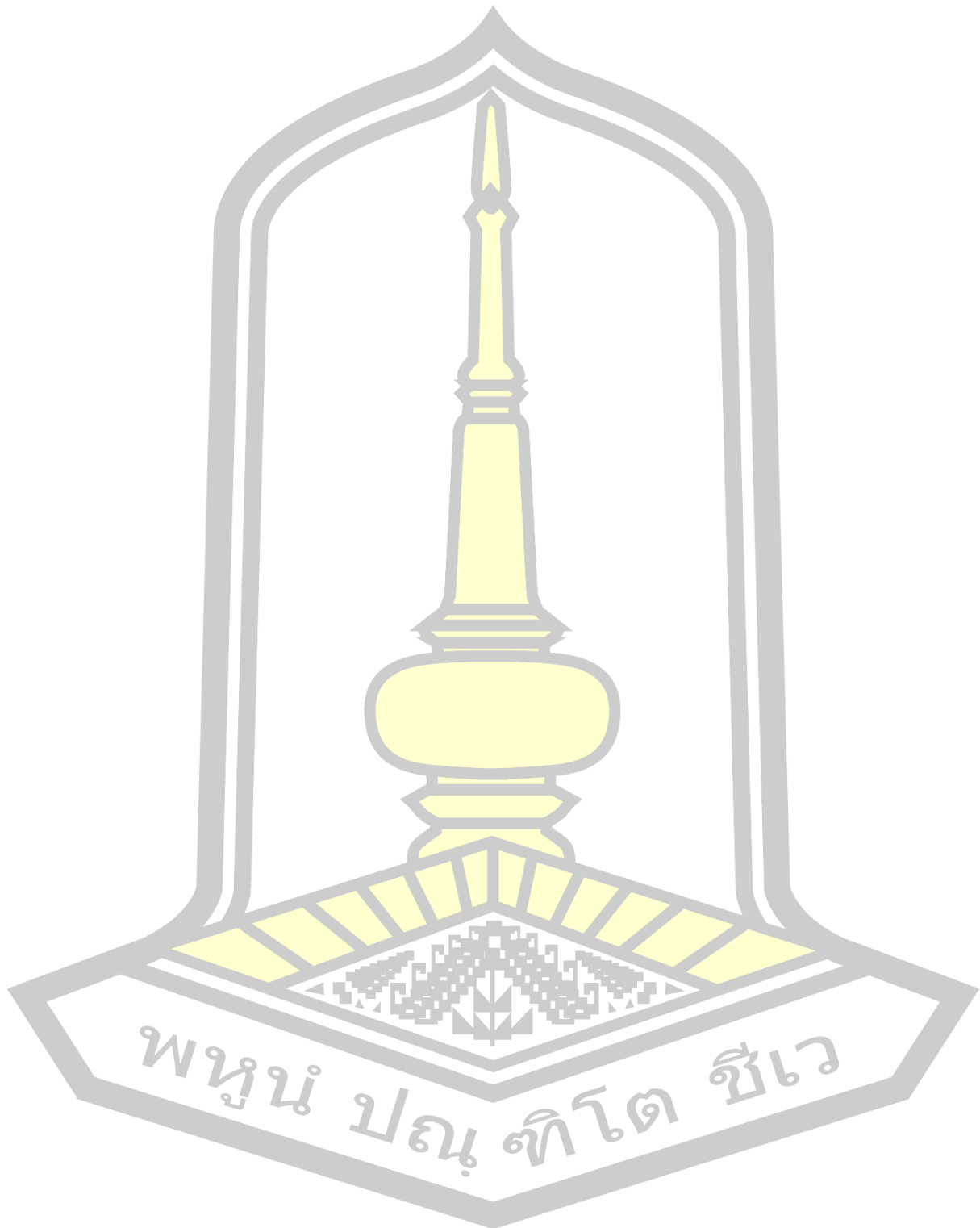


บทที่ 5

บทสรุป

จากการเปรียบเทียบระหว่างการให้พลาสมาเย็น การให้พลาสมาเย็นร่วมกับสารกระตุ้นอินทรีและ การให้สารกระตุ้นอินทรีในเมล็ดผักกาดเขียวอ่อนและผักชีหูดพบว่าไม่มีผลต่อการเพิ่มความยาวของเมล็ดพันธุ์และความยาว ส่วนน้ำหนักสดพบว่าการให้พลาสมาเย็นส่งผลต่อการเพิ่มความยาวของลำต้นผักกาดเขียวอ่อน ส่วนผักชีหูดพบว่าการให้โซเดียมคลอไรด์และแคลเซียมคลอไรด์ส่งผลต่อการเพิ่มความยาวของลำต้น นอกจากนี้ยังพบว่าการให้พลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่นส่งผลให้ปริมาณสารไอโซโทไอโซยานาเททั้งหมดเพิ่มขึ้นถึงสามเท่า ส่วนผักชีหูดพบว่าการให้พลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่นและแคลเซียมคลอไรด์ส่งผลให้ปริมาณสารไอโซโทไอโซยานาเททั้งหมดเพิ่มขึ้น ซึ่งในผักกาดเขียวอ่อนพบชนิดของสารไอโซโทไอโซยานาเทชนิดอัลลิลไอโซโทไอโซยานาเทและ 3 บิวทีนิวไอโซโทไอโซยานาเท ส่วนผักชีหูดพบราฟาซาตินและ 3 บิวทีนิวไอโซโทไอโซยานาเท ส่วนปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระพบว่าการให้พลาสมาเย็นร่วมกับซูโครสสามารถเหนี่ยวนำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้นได้ในผักกาดเขียวอ่อน ส่วนผักชีหูดพบว่าการให้พลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่น และแคลเซียมคลอไรด์สามารถเหนี่ยวนำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้น ตามลำดับ ส่วนกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระพบว่าการให้พลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่นส่งผลทำให้กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH และวิธี FRAP สูงขึ้นในผักกาดเขียวอ่อนและผักชีหูด นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดหยาบผักกาดเขียวอ่อนและผักชีหูดมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและยังสามารถยับยั้งการมีชีวิตรอดและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนโคโลนีของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และเซลล์มะเร็งตับ HepG2 นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดมีผลทำให้เกิดการเสื่อมสภาพและแตกหักของดีเอ็นเออย่างชัดเจน ซึ่งเป็นจุดเด่นของการเกิดอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็ง และมีกิจกรรมในการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน MMP 2 และ MMP 9 ซึ่งมีผลต่อการแพร่กระจายย้ายถิ่นฐานของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และเซลล์มะเร็งตับ HepG2 อีกด้วย งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่นำเอาพลาสมาเย็นมาใช้ในพืชท้องถิ่นไทยซึ่งการใช้เทคโนโลยีพลาสมาเย็นและสารกระตุ้นอินทรีมาใช้ในการเพาะปลูกพืชเพื่อเพิ่มผลผลิตสารอาหารและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุด เพื่อให้เกิดการเพิ่มมูลค่าให้กับต้นอ่อนและไม่โครกรีนผักท้องถิ่นไทยและมีผลให้เกษตรกรมีรายได้เพิ่มขึ้นจากผลิตภัณฑ์นี้ด้วย และสารสกัดหยาบผักกาดเขียวอ่อนและผักชีหูดที่สกัดได้จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปพัฒนาและศึกษาวิจัยต่อยอดเกี่ยวกับกลไกการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนาเป็นยารักษามะเร็งได้ ซึ่งจะช่วยพัฒนาจากพืชสมุนไพรในการรักษาโรคมะเร็งแทนยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ

บรรณานุกรม



บรรณานุกรม

- กมล เลิศรัตน์, มนัชญา งามศักดิ์ และอานูภาพ สังข์ศรี. (2553). R & D เพื่อการบริโภคผักและผลไม้: บนเส้นทางสู่คุณภาพชีวิต. *โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา*.
- กรรณิกา บุญพาธรรม และ ดนุพล เกษไชยสง. (2017). การประเมินผลผลิตและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในผักไมโครกรีน 13 ชนิด. *บทความวิจัยก้าวหน้าทางโลกวิทยาศาสตร์*.
- จิราภรณ์ พรหมพิงค์. (2555). การศึกษาพลาสมาในเครื่องโศคาแมคขนาดเล็กโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์แบบรวม. *มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์*.
- ชนกขวัญ ศรีคำ, ศรีสุลักษณ์ ธีรานุพัฒนา, กิตติศักดิ์ โชตติเดชาณรงค์, สิริพร โรจน์อารยานนท์. (2561). ผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อการลดอาการปลายยอดไหม้ของฮาน (*Elsholtzia stachyodes*) ในหลอดทดลอง. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 23(ฉบับที่ 3), 1770-1778.
- ทวีป เสนอคำวงศ์ ฉันทนา วิชรัตน์ ปรีชา รัตน์ และ สุเทพ วัชรเวชศฤงคาร. (2016). ศึกษาผลของวัสดุเพาะ อัตราเมล็ดพันธุ์ และอายุการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมต่อการผลิตต้นกล้าของผักชีหูด. *วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ ปีที่ 3 ฉบับพิเศษ*, 3, 17-23.
- นันทน์ภัส เต็มวงศ์. (2551). ปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระสารประกอบฟีนอลิกและวิตามินซีในผักและสมุนไพร. *บทความวิจัยก้าวหน้าทางโลกวิทยาศาสตร์ ปีที่ 8(1)*.
- มณฑนา วีระวัฒนากร. (2013). ปฏิกริยาเคมีระหว่างโปรตีนและพอลิฟีนอลและผลต่อระบบชีวภาพของปฏิกริยา. *Burapha Sci. J.*, 18, 210-218.
- ยงยุทธ โอสภสภ. (2558). ธาตุอาหารพืช. *Panyapiwat Journal*, 8, 1-15.
- ยุพาภรณ์ จิโรภาสภานวงศ์. (2559). ผลของน้ำตาลซูโครสต่อการชักนำแคลลัสและปริมาณแอนโธไซยานินในกุหลาบหนู. *วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ ปีที่ 3 ฉบับพิเศษ*, 3(1), 7-11.
- ลลิตา วีระเสถียร. (2552). รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการฤทธิ์ต้านเชื้อ *Helicobacter pylori* ของพืชที่เป็นอาหารท้องถิ่น. *มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร*.
- วัลยา อุทัยสง และ ไพศาล ขาวสัก. (2008). การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบจากต้นบานบุรีเหลือง แก้วเจ้าจอมและการเวก. *วารสารการแพทย์และวิทยาศาสตร์สุขภาพ (Journal of Medicine and Health Science)*, 12(2).
- สุพักตร์ โยไธสง. (2012). วิถีการส่งสัญญาณ PI3K/Akt ในเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็ง. *ศรีนครินทร์เวชสาร*, 27(1), 66-76.
- สุมาลี ชุกำแพง. (2007). พืชในสภาวะเครียดเกลือ. *วารสารพฤกษศาสตร์ไทย*, 4(February), 15-24.
<https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001300.pub2>

- อังคณา น้อยสุวรรณ, กัญญวรา ชุมกาแสง และ อารยา ชัยปัญญา. (2013). ผลของระยะเวลาการเก็บเกี่ยวต่อองค์ประกอบทางเคมีและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในผักกาดเขียว พันธุ์ผักกาดอื่น. *ว. วิทย.เกษตรศาสตร์*, 44 : 3 (พิเศษ) : 217-220, 3, 217-220.
- อิชยา นะมิกิ, สุภาวดี วงษ์ภมร, ภาณุมาศ โคตรพงศ์, การิตา จงเจือกกลาง. (2560). ผลของการใช้แคลเซียมคลอไรด์ก่อนการเก็บเกี่ยวต่อคุณภาพภายหลังการเก็บเกี่ยวของผลหม่อนพันธุ์เชียงใหม่ 60. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร ฉบับที่ 48 : 3 (พิเศษ) : 173-176*, 3(3), 173-176.
- เอี่ยมเดือน ประวาท และวีรพล คู่คงวิริยพันธุ์. (2012). เป้าหมายใหม่ของเคมีป้องกันในมะเร็งท่อน้ำดี. *บทฟื้นฟูวิชาการ .ศรินครินทร์เวชสาร ฉบับพิเศษ*, 397-404.
- Ahn, Y. H., Hwang, Y., Liu, H., Wang, X. J., Zhang, Y., Stephenson, K. K., ... Cole, P. A. (2010). Electrophilic tuning of the chemoprotective natural product sulforaphane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(21), 9590-9595. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004104107>
- Amron, N. A., & Konsue, N. (2018). Antioxidant capacity and nitrosation inhibition of cruciferous vegetable extracts. *International Food Research Journal*, 25(1), 65-73.
- Arbab, I. A., Abdul, A. B., Sukari, M. A., Abdullah, R., Syam, S., Kamalidehghan, B., ... & Mohan, S. (2013). Dentatin isolated from *Clausena excavata* induces apoptosis in MCF-7 cells through the intrinsic pathway with involvement of NF κ B signalling and G0G1 cell cycle arrest A bioassay guided approach.pdf. *Journal of Ethnopharmacology*, 145(1), 343-354.
- Arora, R., Kumar, R., Mahajan, J., Vig, A. P., Singh, B., Singh, B., & Arora, S. (2016). 3-Butenyl isothiocyanate: a hydrolytic product of glucosinolate as a potential cytotoxic agent against human cancer cell lines. *Journal of Food Science and Technology*, 53(9), 3437-3445. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2316-7>
- Baenas, N., Ferreres, F., García-viguera, C., & Moreno, D. A. (2015). Radish sprouts — Characterization and elicitation of novel varieties rich in anthocyanins. *FRIN*, 69, 305-312. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.009>
- Baenas, N., Garc, C., & Moreno, D. A. (2014). *Biotic Elicitors E f f e c t i v e l y I n c r e a s e t h e Glucosinolates Content in Brassicaceae Sprouts.* <https://doi.org/10.1021/jf404876z>

- Baenas, N., García-Viguera, C., & Moreno, D. A. (2014). Biotic elicitors effectively increase the glucosinolates content in Brassicaceae sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(8), 1881–1889. <https://doi.org/10.1021/jf404876z>
- Bahadoran, Z., Mirmiran, P., Hosseinpanah, F., Rajab, A., Asghari, G., & Azizi, F. (2012). Broccoli sprouts powder could improve serum triglyceride and oxidized LDL/LDL-cholesterol ratio in type 2 diabetic patients: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 96(3), 348–354. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2012.01.009>
- Baier, M., Foerster, J., Schnabel, U., Knorr, D., Ehlbeck, J., Herppich, W. B. (2013). Direct non-thermal plasma treatment for the sanitation of fresh corn salad leaves. Evaluation of physical and physiological effects and antimicrobial efficacy. *Postharvest Biology and Technology*, 84, 81–87.
- Barillari, J., Cervellati, R., Costa, S., Guerra, M. C., Speroni, E., Utan, A., & Iori, R. (2006). Antioxidant and choleric properties of *Raphanus sativus* L. sprout (Kaiware Daikon) extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 9773–9778.
- Barillari, J., Cervellati, R., Paolini, M., Tatibouët, A., Rollin, P., & Iori, R. (2005). Isolation of 4-methylthio-3-butenyl glucosinolate from *Raphanus sativus* sprouts (Kaiware Daikon) and its redox properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(26), 9890–9896.
- Beevi, S. S., Mangamoori, L. N., Subathra, M., & Edula, J. R. (2010). Hexane Extract of *Raphanus sativus* L. Roots Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis in Human Cancer Cells by Modulating Genes Related to Apoptotic Pathway. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(3), 200–209. <https://doi.org/10.1007/s11130-010-0178-0>
- Bending, G. D., & Lincoln, S. D. (2000). Inhibition of soil nitrifying bacteria communities and their activities by glucosinolate hydrolysis products. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(8–9), 1261–1269. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00043-2](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00043-2)

- Bernardi, R., Finiguerra, M. G., Rossi, A. A., & Palmieri, S. (2003). Isolation and biochemical characterization of a basic myrosinase from ripe *Crambe abyssinica* seeds, highly specific for epi-progoitrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(9), 2737–2744. <https://doi.org/10.1021/jf020796g>
- Bo, P.; Lien, J.C.; Chen, Y.Y.; Yu, F.S.; Lu, H.F.; Yu, C.S.; Chou, Y.C.; Yu, C.C.; Chung, J. G. (2016). Allyl Isothiocyanate Induces Cell Toxicity by Multiple Pathways in Human Breast Cancer Cells. *American Journal of Chinese Medicine*, *44*, 415–437.
- Boddupalli, S., Mein, J. R., Lakkanna, S., & James, D. R. (2012). Induction of phase 2 antioxidant enzymes by broccoli sulforaphane: Perspectives in maintaining the antioxidant activity of vitamins A, C, and E. *Frontiers in Genetics*, *3*(JAN), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00007>
- Bogaerts, A., Neyts, E., Gijbels, R., & Van der Mullen, J. (2002). Gas discharge plasmas and their applications. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, *57*(4), 609–658. [https://doi.org/10.1016/S0584-8547\(01\)00406-2](https://doi.org/10.1016/S0584-8547(01)00406-2)
- Boreddy, S. R., Sahu, R. P., & Srivastava, S. K. (2011). Benzyl isothiocyanate suppresses pancreatic tumor angiogenesis and invasion by inhibiting HIF- α /VEGF/Rho-GTPases: Pivotal role of STAT-3. *PLoS ONE*, *6*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025799>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Buranrat, B., & Connor, J. R. (2015). Cytoprotective effects of ferritin on doxorubicin - induced breast cancer cell death. (11), 2790–2796. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4250>
- Buranrat, B., Mairuae, N., & Kanchanarach, W. (2017). Cytotoxic and antimigratory effects of *Cratoxy formosum* extract against HepG2 liver cancer cells. *Biomedical Reports*, *6*(4), 441–448. <https://doi.org/10.3892/br.2017.871>

- Buranrat, B., Mairuae, N., & Konsue, A. (2017). Cratoxy formosum leaf extract inhibits proliferation and migration of human breast cancer MCF-7 cells. *Biomedicine et Pharmacotherapy*, *90*, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.03.032>
- Bußler S., Herppich WB, Neugart S, Schreiner M, Ehlbeck J, R. S. and S. O. (2015). Impact of cold atmospheric pressure plasma on physiology and flavonol glycoside profile of peas ('Salamanca'). *Food Research International*, *76*, 132–141.
- Bußler, S., Herppich, W. B., Neugart, S., Schreiner, M., Ehlbeck, J., Rohn, S., & Schlüter, O. (2015). Impact of cold atmospheric pressure plasma on physiology and flavonol glycoside profile of peas (Pisum sativum 'Salamanca'). *FRIN*, *76*, 132–141. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.03.045>
- Butscher, D., Van Loon, H., Waskow, A., Rudolf von Rohr, P., & Schuppler, M. (2016). Plasma inactivation of microorganisms on sprout seeds in a dielectric barrier discharge. *International Journal of Food Microbiology*, *238*, 222–232. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.006>
- Calabrese, V., Cornelius, C., Dinkova-Kostova, A. T., Iavicoli, I., Di Paola, R., Koverech, A., ... Calabrese, E. J. (2012). Cellular stress responses, hormetic phytochemicals and vitagenes in aging and longevity. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1822*(5), 753–783. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.11.002>
- Carvalho, R. A. M., Carvalho, A. T., Da Silva, M. L. P., Demarquette, N. R., & Assis, O. B. G. (2005). Use of thin films obtained by plasma polymerization for grain protection and germination enhancement. *Quimica Nova*, *28*(6), 1006–1009. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000600014>
- Chang, H. P., Wang, M. L., Chan, M. H., Chiu, Y. S., & Chen, Y. H. (2011). Antiobesity activities of indole-3-carbinol in high-fat-diet-induced obese mice. *Nutrition*, *27*(4), 463–470. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2010.09.006>
- Chen, N.G.; Chen, K.T.; Lu, C.C.; Lan, Y.H.; Lai, C.H.; Chung, Y.T.; Yang, J.S.; Lin, Y. C. (2010). Allyl isothiocyanate triggers G2/M phase arrest and apoptosis in human brain malignant glioma GBM 8401 cells through a mitochondria-dependent pathway. *Oncology Reports*, *24*, 449–455.

- Chen, S., & Andreasson, E. (2001). Update on glucosinolate metabolism and transport. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(9), 743–758. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(01\)01301-8](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(01)01301-8)
- Chen, S., & Halkier, B. A. (1999). Functional expression and characterization of the myrosinase MYR1 from *Brassica napus* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expression and Purification*, 17(3), 414–420. <https://doi.org/10.1006/prep.1999.1158>
- Chen T and Wong Y. (2008). Selenocystine induces reactive oxygen species-mediated apoptosis in human cancer cells. *Biomed Pharmacother*, 63, 105–113.
- Cominelli, E., Gusmaroli, G., Allegra, D., Galbiati, M., Wade, H. K., Jenkins, G. I., & Tonelli, C. (2008). Expression analysis of anthocyanin regulatory genes in response to different light qualities in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology*, 165(8), 886–894. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.06.010>
- Cramer, J. M., Teran-Garcia, M., & Jeffery, E. H. (2012). Enhancing sulforaphane absorption and excretion in healthy men through the combined consumption of fresh broccoli sprouts and a glucoraphanin-rich powder. *British Journal of Nutrition*, 107(09), 1333–1338. <https://doi.org/10.1017/S0007114511004429>
- Cross, J. V., Foss, F. W., Rady, J. M., Macdonald, T. L., & Templeton, D. J. (2007). The isothiocyanate class of bioactive nutrients covalently inhibit the MEKK1 protein kinase. *BMC Cancer*, 7, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-7-183>
- Dexheimer, T. S., Sun, D., & Hurley, L. H. (2006). Deconvoluting the structural and drug-recognition complexity of the G-quadruplex-forming region upstream of the bcl-2 P1 promoter. *Journal of the American Chemical Society*, 128(16), 5404–5415. <https://doi.org/10.1021/ja0563861>
- Dinkova-Kostova, A. T., & Kostov, R. V. (2012). Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 18(6), 337–347. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.04.003>
- Dobrin, D., Magureanu, M., Mandache, N. B., & Ionita, M. D. (2015). The effect of non-thermal plasma treatment on wheat germination and early growth. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 29, 255–260. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.02.006>

- Dobrynin, D., Fridman, G., Friedman, G., & Fridman, A. (2009a). Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. *New Journal of Physics*, *11*. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/11/11/115020>
- Dobrynin, D., Fridman, G., Friedman, G., & Fridman, A. (2009b). Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. *New Journal of Physics*, *11*. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/11/11/115020>
- Duesterhaus, B. (2000). *Laboratory screening test for the evaluation of cold tolerance in cotton (Doctoral dissertation, Texas Tech University)*.
- Dufour, V., Stahl, M., & Baysse, C. (2017). *The antibacterial properties of isothiocyanates*. (May), 229–243. <https://doi.org/10.1099/mic.0.082362-0>
- Esfandiari, A., Saei, A., McKenzie, M. J., Matich, A. J., Babalar, M., & Hunter, D. A. (2017). Plant Physiology and Biochemistry Preferentially enhancing anti-cancer isothiocyanates over glucosinolates in broccoli sprouts : How NaCl and salicylic acid affect their formation. *Plant Physiology et Biochemistry*, *115*, 343–353. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.04.003>
- Esfandiari, A., Saei, A., McKenzie, M. J., Matich, A. J., Babalar, M., & Hunter, D. A. (2017a). Preferentially enhancing anti-cancer isothiocyanates over glucosinolates in broccoli sprouts: How NaCl and salicylic acid affect their formation. *Plant Physiology and Biochemistry*, *115*, 343–353. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.04.003>
- Esfandiari, A., Saei, A., McKenzie, M. J., Matich, A. J., Babalar, M., & Hunter, D. A. (2017b). Preferentially enhancing anti-cancer isothiocyanates over glucosinolates in broccoli sprouts: How NaCl and salicylic acid affect their formation. *Plant Physiology and Biochemistry*, *115*, 343–353. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.04.003>
- Fahey, J. W., Salcmann, A. T., & Talalay, P. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, *56*(1), 5–51.

- Farid, O., Khallouki, F., Akdad, M., Breuer, A., Owen, R. W., & Eddouks, M. (2018). Phytochemical characterization of polyphenolic compounds with HPLC-DAD-ESI-MS and evaluation of lipid-lowering capacity of aqueous extracts from Saharan plant *Anabasis aretioides* (Coss & Moq.) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Integrative Medicine*, *16*(3), 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.joim.2018.03.003>
- Filatova, I., Azharonok, V., Lushkevich, V., Zhukovsky, A., Gadzhieva, G., & Spasi, K. (2013). Plasma seeds treatment as a promising technique for seed germination improvement. *31st ICPIG*, 4–7.
- Fimognari C., L. M. and H. P. (2008). Chemoprevention of cancer by isothiocyanates and anthocyanins: Mechanism of action and structure–activity relationship. *Current Medicinal Chemistry*, *12*(August), 440–447.
- Fowler, D. (n.d.). *So it ' s -40 Below*.
- Franklin, R. N., & Braithwaite, N. S. J. (2009). 80 Years of Plasma. *Plasma Sources Science and Technology*, *18*(1), 10–12. <https://doi.org/10.1088/0963-0252/18/1/010201>
- Geng, F., Tang, L., Li, Y., Yang, L., Choi, K. S., Kazim, A. L., & Zhang, Y. (2011). Allyl isothiocyanate arrests cancer cells in mitosis, and mitotic arrest in turn leads to apoptosis via Bcl-2 protein phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(37), 32259–32267. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.278127>
- Gigolashvili, T., Yatusovich, R., Berger, B., Müller, C., & Flügge, U. I. (2007). The R2R3-MYB transcription factor HAG1/MYB28 is a regulator of methionine-derived glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, *51*(2), 247–261. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03133.x>
- Giorgi, A., Mingozi, M., Madeo, M., Speranza, G., & Cocucci, M. (2009). Effect of nitrogen starvation on the phenolic metabolism and antioxidant properties of yarrow (*Achillea collina* Becker ex Rchb.). *Food Chemistry*, *114*(1), 204–211.
- Gonzalez, A., Zhao, M., Leavitt, J. M., & Lloyd, A. M. (2008). Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal*, *53*(5), 814–827.

- Gopalakrishnan, A., & Tony Kong, A. N. (2008). Anti-carcinogenesis by dietary phytochemicals: Cytoprotection by Nrf2 in normal cells and cytotoxicity by modulation of transcription factors NF- κ B and AP-1 in abnormal cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, *46*(4), 1257–1270.
- Gottlieb, E., Armour, S. M., Harris, M. H., & Thompson, C. B. (2003). Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, *10*(6), 709–717. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401231>
- Guo, L., Yang, R., Wang, Z., Guo, Q., & Gu, Z. (2014). Effect of NaCl stress on health-promoting compounds and antioxidant activity in the sprouts of three broccoli cultivars. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *65*(4), 476–481.
- Guo, Rong-fang, Yuan, G., & Wang, Q. (2013). *Effect of NaCl treatments on glucosinolate metabolism in broccoli sprouts* *. *14*(2), 124–131. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1200096>
- Guo, Rongfang, Yuan, G., & Wang, Q. (2011a). Scientia Horticulturae Effect of sucrose and mannitol on the accumulation of health-promoting compounds and the activity of metabolic enzymes in broccoli sprouts. *Scientia Horticulturae*, *128*(3), 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.01.014>
- Guo, Rongfang, Yuan, G., & Wang, Q. (2011b). Sucrose enhances the accumulation of anthocyanins and glucosinolates in broccoli sprouts. *Food Chemistry*, *129*(3), 1080–1087. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.078>
- Halkier, B. A., & Gershenzon, J. (2006). Biology and Biochemistry of Glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology*, *57*(1), 303–333. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105228>
- Hansch, F. S., Bauer, A., Mewis, I., Keil, C., Schreiner, M., Rohn, S., & Kroh, L. W. (2012). Thermally induced degradation of aliphatic glucosinolates: Identification of intermediary breakdown products and proposed degradation pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(39), 9890–9899. <https://doi.org/10.1021/jf302744y>

- Hara, M., Oki, K., Hoshino, K., & Kuboi, T. (2004). Effects of sucrose on anthocyanin production in hypocotyl of two radish (*Raphanus sativus*) varieties. *Plant Biotechnology*, 21(5), 401–405. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.21.401>
- Harbaum, B., Hubbermann, E. M., Wolff, C., Herges, R., Zhu, Z., & Schwarz, K. (2007). Identification of Flavonoids and Hydroxycinnamic Acids in Pak Choi Varieties (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *communis*) by HPLC–ESI-MSⁿ and NMR and Their Quantification by HPLC–DAD. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(20), 8251–8260. <https://doi.org/10.1021/jf071314+>
- Harmon, A. C., Gribskov, M., Gubrium, E., & Harper, J. F. (2001). The CDPK superfamily of protein kinases. *New Phytologist*, 151(1), 175–183.
- Hepler, P. K. (2005). Calcium: a central regulator of plant growth and development. *The Plant Cell*, 17(8), 2142–2155.
- Hirata, T., Cho, Y. M., Suzuki, I., Toyoda, T., Akagi, J. I., Nakamura, Y., ... Ogawa, K. (2019). 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate (Mtbitc) induced apoptotic cell death and g2/m cell cycle arrest via ros production in human esophageal epithelial cancer cells. *Journal of Toxicological Sciences*, 44(2), 73–81. <https://doi.org/10.2131/jts.44.73>
- Hsiang CY, Wu SL, Chen JC, Lo HY, Li CC, Chiang SY, Wu HC, H. T. (2007). Acetaldehyde induces matrix metalloproteinase-9 gene expression via nuclear factor-kappaB and activator protein 1 signaling pathways in human hepatocellular carcinoma cells. *Toxicology Letter*, 171, 78–86.
- Hutzen, B., Willis, W., Jones, S., Cen, L., Deangelis, S., Fuh, B., & Lin, J. (2009). Dietary agent, benzyl isothiocyanate inhibits signal transducer and activator of transcription 3 phosphorylation and collaborates with sulforaphane in the growth suppression of PANC-1 cancer cells. *Cancer Cell International*, 9, 24. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-9-24>
- Ibrahim, M. D., Kntayya, S. B., Mohd Ain, N., Iori, R., Ioannides, C., & Razis, A. F. A. (2018). Induction of apoptosis and cytotoxicity by raphasatin in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. *Molecules*, 23(12). <https://doi.org/10.3390/molecules23123092>

- Ishida, M., Hara, M., Fukino, N., Kakizaki, T., & Morimitsu, Y. (2014). Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of Brassicaceae vegetables. *Breeding Science*, *64*(1), 48–59. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.64.48>
- Jaiswal, A. K., Abu-Ghannam, N., & Gupta, S. (2012). A comparative study on the polyphenolic content, antibacterial activity and antioxidant capacity of different solvent extracts of Brassica oleracea vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, *47*(2), 223–231. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02829.x>
- Jeevan Kumar, S. P., Rajendra Prasad, S., Banerjee, R., & Thammineni, C. (2015). Seed birth to death: dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. *Annals of Botany.*, *116*(4), 663–668.
- Jeong, Y. J., Cho, H. J., Chung, F. L., Wang, X., Hoe, H. S., Park, K. K., ... Chang, Y. C. (2017). Isothiocyanates suppress the invasion and metastasis of tumors by targeting FAK/MMP-9 activity. *Oncotarget*, *8*(38), 63949–63962. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19213>
- Jiayun, T., Rui, H. E., Xiaoli, Z., Ruoting, Z., Weiwen, C., & Size, Y. (2014). Effects of atmospheric pressure air plasma pretreatment on the seed germination and early growth of *Andrographis paniculata*. *Plasma Science and Technology*, *16*(3), 260.
- John D. Clarke^{1, 2}, Anna Hsu², Zhen Yu², Roderick H. Dashwood^{3, 4}, and Emily Ho^{2, 3}. (2012). Differential effects of sulforaphane on histone deacetylases, cell cycle arrest and apoptosis in normal prostate cells versus hyperplastic and cancerous prostate cells. *Mol Nutr Food Res*, *55*(7), 999–1009. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000547>. Differential
- Juge, N., Mithen, R. F., & Traka, M. (2007). Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: A comprehensive review. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *64*(9), 1105–1127. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6484-5>
- Kallifatidis G, Rausch V, Baumann B, Apel A, Beckermann BM, G. A., & Mattern J, Li Z, Kolb A, Moldenhauer G, et al. (2009). Sulforaphane targets pancreatic tumor-initiating cells by NF- κ B-induced anti-apoptotic signaling. *Gut Journal*, *58*, 946–963.

- Kandasamy, K., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Thompson, C. B., Korsmeyer, S. J., Bryant, J. L., & Srivastava, R. K. (2003). Involvement of proapoptotic molecules Bax and Bak in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced mitochondrial disruption and apoptosis: Differential regulation of cytochrome c and Smac/DIABLO release. *Cancer Research*, *63*(7), 1712–1721.
- Keutgen, A. J., & Pawelzik, E. (2008). Quality and nutritional value of strawberry fruit under long term salt stress. *Food Chemistry*, *107*(4), 1413–1420. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.071>
- Kim, H. J., Chen, F., Wang, X., & Choi, J. H. (2006). Effect of methyl jasmonate on phenolics, isothiocyanate, and metabolic enzymes in radish sprout (*Raphanus sativus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(19), 72.
- Kim, H. J., Fonseca, J. M., Choi, J. H., Kubota, C., & Kwon, D. Y. (2008). Salt in irrigation water affects the nutritional and visual properties of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(10), 3772–3776.
- Kim, M. J., Kim, S. H., & Lim, S. J. (2010). Comparison of the apoptosis-inducing capability of sulforaphane analogues in human colon cancer cells. *Anticancer Research*, *30*(9), 3611–3619.
- Kim, J. W., Kim, M. B., & Lim, S. Bin. (2015). Formation and stabilization of raphasatin and sulforaphene from radish roots by endogenous enzymolysis. *Preventive Nutrition and Food Science*, *20*(2), 119–125. <https://doi.org/10.3746/pnf.2015.20.2.119>
- Kissen, R., Rossiter, J. T., & Bones, A. M. (2009). The “mustard oil bomb”: Not so easy to assemble?! Localization, expression and distribution of the components of the myrosinase enzyme system. *Phytochemistry Reviews*, *8*(1), 69–86. <https://doi.org/10.1007/s11101-008-9109-1>
- Koh, E., Wimalasiri, K. M. S., Chassy, A. W., & Mitchell, A. E. (2009). Content of ascorbic acid, quercetin, kaempferol and total phenolics in commercial broccoli. *Journal of Food Composition and Analysis*, *22*(7–8), 637–643. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.01.019>

- Koornneef, M., & Smeekens, S. (2005). Sucrose-Specific Induction of Anthocyanin Biosynthesis in Arabidopsis Requires the MYB75 / PAP1 Gene 1. *Society*, 139(December), 1840–1852. <https://doi.org/10.1104/pp.105.066688.1840>
- Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., & Abdelly, C. (2007). Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(3–4), 244–249. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.02.001>
- Kwang-Youn K, Yu SN, Lee SY, Chun SS, Choi YL, Park YM, Song CS, Chatterjee B, A. S. (2011). Salinomycin-induced apoptosis of human prostate cancer cells due to accumulated reactive oxygen species and mitochondrial membrane depolarization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 413, 80–86.
- Lafarga, T., Viñas, I., Bobo, G., Simó, J., & Aguiló-Aguayo, I. (2018). Effect of steaming and sous vide processing on the total phenolic content, vitamin C and antioxidant potential of the genus Brassica. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 47(April), 412–420. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.04.008>
- Lau, W. S., Chen, T., & Wong, Y. S. (2010). Allyl isothiocyanate induces G2/M arrest in human colorectal adenocarcinoma SW620 cells through down-regulation of Cdc25B and Cdc25C. *Molecular Medicine Reports*, 3(6), 1023–1030. <https://doi.org/10.3892/mmr.2010.363>
- Lea, U. S., Slimestad, R., Smedvig, P., & Lillo, C. (2007a). Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway. *Planta*, 225(5), 1245–1253. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0414-x>
- Lea, U. S., Slimestad, R., Smedvig, P., & Lillo, C. (2007b). Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway. *Planta*, 225(5), 1245–1253. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0414-x>

- Lee, S., Kim, S. G., & Park, C. M. (2010). Salicylic acid promotes seed germination under high salinity by modulating antioxidant activity in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, *118*(2), 626–637.
- Lee, C. S., Cho, H. J., Jeong, Y. J., Shin, J. M., Park, K. K., Park, Y. Y., ... Chang, Y. C. (2015). Isothiocyanates inhibit the invasion and migration of C6 glioma cells by blocking FAK/JNK-mediated MMP-9 expression. *Oncology Reports*, *34*(6), 2901–2908. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4292>
- Lee, J. G., Lim, S., Kim, J., & Lee, E. J. (2017). The mechanism of deterioration of the glucosinolate-myrosinase system in radish roots during cold storage after harvest. *Food Chemistry*, *233*, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.104>
- Lee SO, Jeong YJ, Kim M, Kim CH, L. I. (2008). Suppression of PMA-induced tumor cell invasion by capillarisin via the inhibition of NF-kappaB-dependent MMP-9 expressio. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *366*, 1019–1024.
- Leja, M., Mareczek, A., Starzyńska, A., & Rozek, S. (2001). Antioxidant ability of broccoli flower buds during short-term storage. *Food Chemistry*, Vol. 72, pp. 219–222. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00224-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00224-7)
- Li, J., Yao, S., & Zhang, Y. (2005). The role of c-Jun in the AP-1 activation induced by naturally occurring isothiocyanates. *Food and Chemical Toxicology*, *24*(28), 4486–4495.
- Li, J., Liu, K., Yan, S., Li, Y., & Han, D. (2016). Application of thermal plasma technology for the treatment of solid wastes in China: An overview. *Waste Management*, *58*, 260–269. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.06.011>
- Li, L., Jiang, J., Li, J., Shen, M., He, X., Shao, H., & Dong, Y. (2014). Effects of cold plasma treatment on seed germination and seedling growth of soybean. *Scientific Reports*, *4*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep05859>
- Liang, X.H.; Jackson, S.; Seaman, M.; Brown, K.; Kempkes, B.; Hibshoosh, H.; Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, *420*, 672–676.

- Lim, S., Lee, J., & Kim, J. K. (2009). Analysis of isothiocyanates in newly generated vegetables, Baemuchae (\times Brassicoraphanus) as affected by growth. *International Journal of Food Science & Technology*, *44*(7), 1401–1407.
- Lin, J. Y., & Tang, C. Y. (2006). Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry*, *101*(1), 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.014>
- Ling, L., Jiafeng, J., Jiangang, L., Minchong, S., Xin, H., Hanliang, S., & Yuanhua, D. (2015). Effects of cold plasma treatment on seed germination and seedling growth of soybean. *Scientific Reports*, *4*(1), 5859. <https://doi.org/10.1038/srep05859>
- Liu, Y. F., Zhang, G. X., Qi, M. F., & Li, T. L. (2015). Effects of calcium on photosynthesis, antioxidant system, and chloroplast ultrastructure in tomato leaves under low night temperature stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, *34*(2), 263–273.
- Lola-Luz, T., Hennequart, F., & Gaffney, M. (2014). Effect on yield, total phenolic, total flavonoid and total isothiocyanate content of two broccoli cultivars (*Brassica oleracea* var *italica*) following the application of a commercial brown seaweed extract (*Ascophyllum nodosum*). *Agricultural and Food Science*, *23*(1), 28–37. <https://doi.org/10.23986/afsci.8832>
- Lolaei, A. (2012). Effect of calcium chloride on growth and yield of tomato under sodium chloride stress. *Journal of Horticulture, Plants 2*, 155–160.
- López-Berenguer, C., Martínez-Ballesta, M. C., García-Viguera, C., & Carvajal, M. (2008). Leaf water balance mediated by aquaporins under salt stress and associated glucosinolate synthesis in broccoli. *Plant Science*, *174*(3), 321–328. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.11.012>
- López-Berenguer, C., Martínez-Ballesta, M. D. C., Moreno, D. A., Carvajal, M., & García-Viguera, C. (2009). Growing hardier crops for better health: Salinity tolerance and the nutritional value of broccoli. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(2), 572–578. <https://doi.org/10.1021/jf802994p>

- Lorenzo, O., & Solano, R. (2005). Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(5), 532–540. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.07.003>
- Loreti, E., Povero, G., Novi, G., Solfanelli, C., Alpi, A., & Perata, P. (2008). Gibberellins, jasmonate and abscisic acid modulate the sucrose-induced expression of anthocyanin biosynthetic genes in Arabidopsis. *New Phytologist*, 179(4), 1004–1016. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02511.x>
- Lu, A. Y., Dong, W., & Alcazar, J. (2017). SC. *Journal of Food Composition and Analysis*. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.035>
- Lu, Y., Dong, W., Alcazar, J., Yang, T., Luo, Y., Wang, Q., & Chen, P. (2018). Effect of preharvest CaCl₂ spray and postharvest UV-B radiation on storage quality of broccoli microgreens, a richer source of glucosinolates. *Journal of Food Composition and Analysis*, 67, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.035>
- Luang-In, V., Deeseenthum, S., Udomwong, P., Saengha, W., & Gregori, M. (2018). Formation of sulforaphane and iberin products from Thai cabbage fermented by myrosinase-positive bacteria. *Molecules*, 23(4), 3–5. <https://doi.org/10.3390/molecules23040955>
- Luang-In, Vijitra, Narbad, A., Nueno-Palop, C., Mithen, R., Bennett, M., & Rossiter, J. T. (2014). The metabolism of methylsulfinylalkyl- and methylthioalkyl-glucosinolates by a selection of human gut bacteria. *Molecular Nutrition and Food Research*, 58(4), 875–883. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300377>
- Mano, H., Ogasawara, F., Sato, K., Higo, H., & Minobe, Y. (2007). Isolation of a regulatory gene of anthocyanin biosynthesis in tuberous roots of purple-fleshed sweet potato. *Plant Physiology*, 143(3), 1252–1268.
- Martinez-Ballesta, M. del C., Moreno, D. A., & Carvajal, M. (2013). The physiological importance of glucosinolates on plant response to abiotic stress in Brassica. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 11607–11625. <https://doi.org/10.3390/ijms140611607>
- Matra, K. (2016). Non-thermal Plasma for Germination Enhancement of Radish Seeds. *Procedia Computer Science*, 86, 132–135. <https://doi.org/10.1016/j.procs.2016.05.033>

- Melchini, A., & Traka, M. H. (2010). Biological profile of erucin: A new promising anticancer agent from cruciferous vegetables. *Toxins*, 2(4), 593–612. <https://doi.org/10.3390/toxins2040593>
- Mi, L., Gan, N., Cheema, A., Dakshanamurthy, S., Wang, X., Yang, D. C. H., & Chung, F. L. (2009). Cancer 338 preventive isothiocyanates induce selective degradation of cellular α - and β -tubulins by proteasomes. *Journal of Biological Chemistry*, 284(25), 17039–17051.
- Mi, L., Gan, N., & Chung, F. L. (2010). Isothiocyanates inhibit proteasome activity and proliferation of multiple myeloma cells. *Carcinogenesis*, 32(2), 216–223. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq242>
- Moreno, D. A., López-Berenguer, C., Martínez-Ballesta, M. C., Carvajal, M., & García-Viguera, C. (2008). Basis for the new challenges of growing broccoli for health in hydroponics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(8), 1472–1481.
- Murata M, Yamashita N, Inoue S, K. S. (2000). Mechanism of oxidative DNA damage induced by carcinogenic allyl isothiocyanate. *Free Radical Biology & Medicine*, 28(5), 797–805.
- Myzak, M. C., Hardin, K., Wang, R., Dashwood, R. H., & Ho, E. (2006). Sulforaphane inhibits histone deacetylase activity in BPH-1, LnCaP and PC-3 prostate epithelial cells. *Carcinogenesis*, 27(4), 811–819. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgi265>
- Natella, F., Maldini, M., Nardini, M., Azzini, E., Stella, M., Maria, A., ... Scaccini, C. (2016). Improvement of the nutraceutical quality of broccoli sprouts by elicitation. *FOOD CHEMISTRY*, 201, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.063>
- Nishikawa, F., Kato, M., Hyodo, H., Ikoma, Y., Sugiura, M., & Yano, M. (2005). Effect of sucrose on ascorbate level and expression of genes involved in the ascorbate biosynthesis and recycling pathway in harvested broccoli florets. *Journal of Experimental Botany*, 56(409), 65–72. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri007>
- Núñez-Iglesias, M. J., Novio, S., García-Santiago, C., Cartea, M. E., Soengas, P., Velasco, P., & Freire-Garabal, M. (2018). Effects of 3-butenyl isothiocyanate on phenotypically different prostate cancer cells. *International Journal of Oncology*, 53(5), 2213–2223. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4545>

- Oniszczuk, A., & Olech, M. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction and LC-ESI-MS/MS analysis of phenolic acids from *Brassica oleracea* L. var. *sabellica*. *Industrial Crops and Products*, 83, 359–363. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.01.015>
- P. Papadakis, A. (2012). Microplasmas: A Review. *The Open Applied Physics Journal*, 4(1), 45–63. <https://doi.org/10.2174/1874183501104010045>
- Pandey, M.K.; Gupta, S.C.; Nabavizadeh, A.; Aggarwal, B. B. (2017). Regulation of cell signaling pathways by dietary agents for cancer prevention and treatment. *Semin Cancer Biol Journal*, 46, 158–181.
- Papi, A., Orlandi, M., Bartolini, G., Barillari, J., Iori, R., Paolini, M., ... Valgimigli, L. (2008a). Cytotoxic and antioxidant activity of 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate from *Raphanus sativus* L. (kaiware daikon) sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 875–883. <https://doi.org/10.1021/jf073123c>
- Papi, A., Orlandi, M., Bartolini, G., Barillari, J., Iori, R., Paolini, M., ... Valgimigli, L. (2008b). Cytotoxic and antioxidant activity of 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate from *Raphanus sativus* L. (kaiware daikon) sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 875–883. <https://doi.org/10.1021/jf073123c>
- Park, S. Y., Kim, G. Y., Bae, S. J., Yoo, Y. H., & Choi, Y. H. (2007). Induction of apoptosis by isothiocyanate sulforaphane in human cervical carcinoma HeLa and hepatocarcinoma HepG2 cells through activation of caspase-3. *Oncology Reports*, 18(1), 181–187. <https://doi.org/10.3892/or.18.1.181>
- Pham, N. A., Jacobberger, J. W., Schimmer, A. D., Cao, P., Gronda, M., & Hedley, D. W. (2004). The dietary isothiocyanate sulforaphane targets pathways of apoptosis, cell cycle arrest, and oxidative stress in human pancreatic cancer cells and inhibits tumor growth in severe combined immunodeficient mice. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3(10), 1239–1248.
- Pocasap, P., Weerapreeyakul, N., & Barusux, S. (2013). Cancer preventive effect of Thai rat-tailed radish (*Raphanus sativus* L. var. *caudatus* Alef). *Journal of Functional Foods*, 5(3), 1372–1381. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.05.005>

- Poornima, J., & Mirunalini, S. (2014). Regulation of carbohydrate metabolism by indole-3-carbinol and its metabolite 3,3'-diindolylmethane in high-fat diet-induced C57BL/6J mice. *Molecular and Cellular Biochemistry*, Vol. 385, pp. 7–15. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1808-2>
- Production, S. V., & Security, N. (2014). *SEAVEG2014 : Families , Farms , Food Regional Symposium on Sustaining Small- Scale Vegetable Production and Marketing Systems for Food and Nutrition Security*.
- Radošević, K., Srček, V. G., Bubalo, M. C., Rimac Brnčić, S., Takács, K., & Redovniković, I. R. (2017). Assessment of glucosinolates, antioxidative and antiproliferative activity of broccoli and collard extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 61, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.02.001>
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., & Sheen, J. (2006). SUGAR SENSING AND SIGNALING IN PLANTS: Conserved and Novel Mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 675–709. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105441>
- Saengha, W., Karirat, T., Buranrat, B., & Matra, K. (2019). Plasma Technology and Abiotic Elicitor Effectively Increased Isothiocyanates , Bioactive Compounds and Cytotoxicity against Caco2 Cells in Mustard Green Microgreen Extract Plasma Technology and Abiotic Elicitor Effectively Increased Isothiocyanates , Bioa. *Doi:10.14457/MSU.Res.2019.23*, (October). <https://doi.org/10.14457/MSU.res.2019.23>
- Sangthong, S., & Weerapreeyakul, N. (2016). Simultaneous quantification of sulforaphene and sulforaphane by reverse phase HPLC and their content in *Raphanus sativus* L. var. caudatus Alef extracts. *Food Chemistry*, 201, 139–144. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.081>
- Sankaran, R. Mohan, & Giapis, K. P. (2003). High-pressure micro-discharges in etching and deposition applications. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 36(23), 2914–2921. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/36/23/008>
- Sankaran, Ramanathan Mohan. (2004). *High-pressure microdischarges as microreactors for materials applications*. 2004, 144. <https://doi.org/10.1002/ppap.200730903>

- Savio, A.L.; da Silva, G.N.; de Camargo, E.A.; Salvadori, D. M. (2014). Cell cycle kinetics, apoptosis rates, DNA damage and TP53 gene expression in bladder cancer cells treated with allyl isothiocyanate (mustard essential oil). *Mutation Research*, 762, 40–46.
- Sayeed, M. A., Bracci, M., Ciarapica, V., Malavolta, M., Provinciali, M., Pieragostini, E., ... Santarelli, L. (2018). Allyl isothiocyanate exhibits no anticancer activity in MDA-MB-231 breast cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms19010145>
- Schreiner, M. (2005). Vegetable crop management strategies to increase the quantity of phytochemicals. *European Journal of Nutrition*, 44(2), 85–94. <https://doi.org/10.1007/s00394-004-0498-7>
- Schumacker, P. T. (2006). Reactive oxygen species in cancer cells: Live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell*, 10(3), 175–176. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.08.015>
- Selcuk, M., Oksuz, L., & Basaran, P. (2008). Decontamination of grains and legumes infected with *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. by cold plasma treatment. *Bioresource Technology*, 99(11), 5104–5109. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.076>
- Shankar, S., Chen, Q., Sarva, K., Siddiqui, I., & Srivastava, R. K. (2007). Curcumin enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in prostate cancer cells: Molecular mechanisms of apoptosis, migration and angiogenesis. *Journal of Molecular Signaling*, 2, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1750-2187-2-10>
- Sharma, R., Sharma, A., Chaudhary, P., Pearce, V., Vatsyayan, R., Singh, S. V., ... Awasthi, Y. C. (2010). Role of Lipid Peroxidation in Cellular Responses to d,l-Sulforaphane, a Promising Cancer Chemopreventive Agent. *Biochemistry*, 49(14), 3191–3202. <https://doi.org/10.1021/bi100104e>
- Shikita, M., Fahey, J. W., Golden, T. R., Holtzclaw, W. D., & Talalay, P. (1999). An unusual case of “uncompetitive activation” by ascorbic acid: Purification and kinetic properties of a myrosinase from *Raphanus sativus* seedlings. *Biochemical Journal*, 341(3), 725–732. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3410725>

- Singh, S. V., & Singh, K. (2012). Cancer chemoprevention with dietary isothiocyanates mature for clinical translational research. *Carcinogenesis*, *33*(10), 1833–1842. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs216>
- Sivachandiran, L., & Khacef, A. (2017). Enhanced seed germination and plant growth by atmospheric pressure cold air plasma: combined effect of seed and water treatment. *RSC Adv.*, *7*(4), 1822–1832. <https://doi.org/10.1039/C6RA24762H>
- Songsak, T., & Lockwood, G. B. (2002). Glucosinolates of seven medicinal plants from Thailand. *Fitoterapia*, *73*(3), 209–216.
- Songsak, T., & Lockwood, G. B. (2002). Glucosinolates of seven medicinal plants from Thailand. *Fitoterapia*, *73*(3), 209–216. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(02\)00061-8](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00061-8)
- Srivastava, S. K., Xiao, D., Lew, K. L., Hershberger, P., Kokkinakis, D. M., Johnson, C. S., ... Singh, S. V. (2003). Allyl isothiocyanate, a constituent of cruciferous vegetables, inhibits growth of PC-3 human prostate cancer xenograft in vivo. *Carcinogenesis*, *24*(10), 1665–1670. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgg123>
- Stan, S. D., Singh, S. V., Whitcomb, D. C., & Brand, R. E. (2014). Phenethyl isothiocyanate inhibits proliferation and induces apoptosis in pancreatic cancer cells in vitro and in a MIAPaca2 xenograft animal model. *Nutrition and Cancer*, *66*(4), 747–755. <https://doi.org/10.1080/01635581.2013.795979>
- Stelman, L. S., Pohnert, S. C., Shelton, J. G., Franklin, R. A., Bertrand, F. E., & McCubrey, J. A. (2004). JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia*, *18*(2), 189–218. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403241>
- Steyn, W. J., Wand, S. J. E., Holcroft, D. M., & Jacobs, G. (2002). Anthocyanins in vegetative tissues: A proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist*, *155*, 349–3.
- Sultana, T., Porter, N. G., Savage, G. P., & McNeil, D. L. (2003). Comparison of isothiocyanate yield from wasabi rhizome tissues grown in soil or water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(2), 3586–3591.

- Sun, J., Kou, L., Geng, P., Huang, H., Yang, T., Luo, Y., & Chen, P. (2015). Metabolomic assessment reveals an elevated level of glucosinolate content in CaCl₂treated broccoli microgreens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(6), 1863–1868. <https://doi.org/10.1021/jf504710r>
- Takai, O. (2008). Solution plasma processing (SPP). *Pure and Applied Chemistry*, *80*(9), 2003–2011. <https://doi.org/10.1351/pac200880092003>
- Teng, S., Keurentjes, J., Bentsink, L., Koornneef, M., & Smeekens, S. (2005). Sucrose-specific induction of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* requires the MYB75/PAP1 gene. *Plant Physiology*, *139*(4), 1840–1852.
- Thimmulappa, R. K., Mai, K. H., Srisuma, S., Kensler, T. W., Yamamoto, M., & Biswal, S. (2002). Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Research*, *62*(18), 5196–5203.
- Thomas, M., Badr, A., Desjardins, Y., Gosselin, A., & Angers, P. (2018a). Characterization of industrial broccoli discards (*Brassica oleracea* var. *italica*) for their glucosinolate, polyphenol and flavonoid contents using UPLC MS/MS and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, Vol. 245, pp. 1204–1211. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.021>
- Thomas, M., Badr, A., Desjardins, Y., Gosselin, A., & Angers, P. (2018b). Characterization of industrial broccoli discards (*Brassica oleracea* var. *italica*) for their glucosinolate, polyphenol and flavonoid contents using UPLC MS/MS and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, *245*(July 2017), 1204–1211. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.021>
- Tian, M., Xu, X., Liu, Y., Xie, L., & Pan, S. (2016). Effect of Se treatment on glucosinolate metabolism and health-promoting compounds in the broccoli sprouts of three cultivars. *Food Chemistry*, *190*, 374–380. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.098>
- Trachootham, D., Zhou, Y., Zhang, H., Demizu, Y., Chen, Z., Pelicano, H., ... Huang, P. (2006). Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by β -phenylethyl isothiocyanate. *Cancer Cell*, *10*(3), 241–252. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.08.009>

- Treadwell, D. D., Hochmuth, R., Landrum, L., & Laughlin, W. (2010). Microgreens: A New Specialty Crop. *University of Florida IFAS Extension*, (July), 1–3.
- Tripathi, K., Hussein, U. K., Anupalli, R., Barnett, R., Bachaboina, L., Scalici, J., ... Palle, K. (2015). Allyl isothiocyanate induces replication-associated DNA damage response in NSCLC cells and sensitizes to ionizing radiation. *Oncotarget*, *6*(7), 5237–5252. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3026>
- Tsai, P. J., Delva, L., Yu, T. Y., Huang, Y. T., & Dufosse, L. (2005). Effect of sucrose on the anthocyanin and antioxidant capacity of mulberry extract during high temperature heating. *Tsai, P. J., Delva, L., Yu, T. Y., Huang, Y. T., & Dufosse, L., 38*(8–9), 1059–1065.
- Tsai, S.C.; Huang, W.W.; Huang, W.C.; Lu, C.C.; Chiang, J.H.; Peng, S.F.; Chung, J.G.; Lin, Y.H.; Hsu, Y.M.; Amagaya, S. . et al. (2012). ERK-modulated intrinsic signaling and G(2)/M phase arrest contribute to the induction of apoptotic death by allyl isothiocyanate in MDA-MB-468 human breast adenocarcinoma cells. *International Journal of Oncology*, *41*, 2065–2072.
- Tuna, A. L., Kaya, C., Ashraf, M., Altunlu, H., Yokas, I., & Yagmur, B. (2007). The effects of calcium sulphate on growth, membrane stability and nutrient uptake of tomato plants grown under salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, *59*(2), 173–178. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.12.007>
- Turmanidze, T., Gulua, L., Jgenti, M., & Wicker, L. (2017). Potential antioxidant retention and quality maintenance in raspberries and strawberries treated with calcium chloride and stored under refrigeration. *Brazilian Journal of Food Technology*, *20*.
- Tuskorn, O., Khunluck, T., Prawan, A., Senggunprai, L., & Kukongviriyapan, V. (2019). Mitochondrial division inhibitor-1 potentiates cisplatin-induced apoptosis via the mitochondrial death pathway in cholangiocarcinoma cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *111*(December 2018), 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.051>

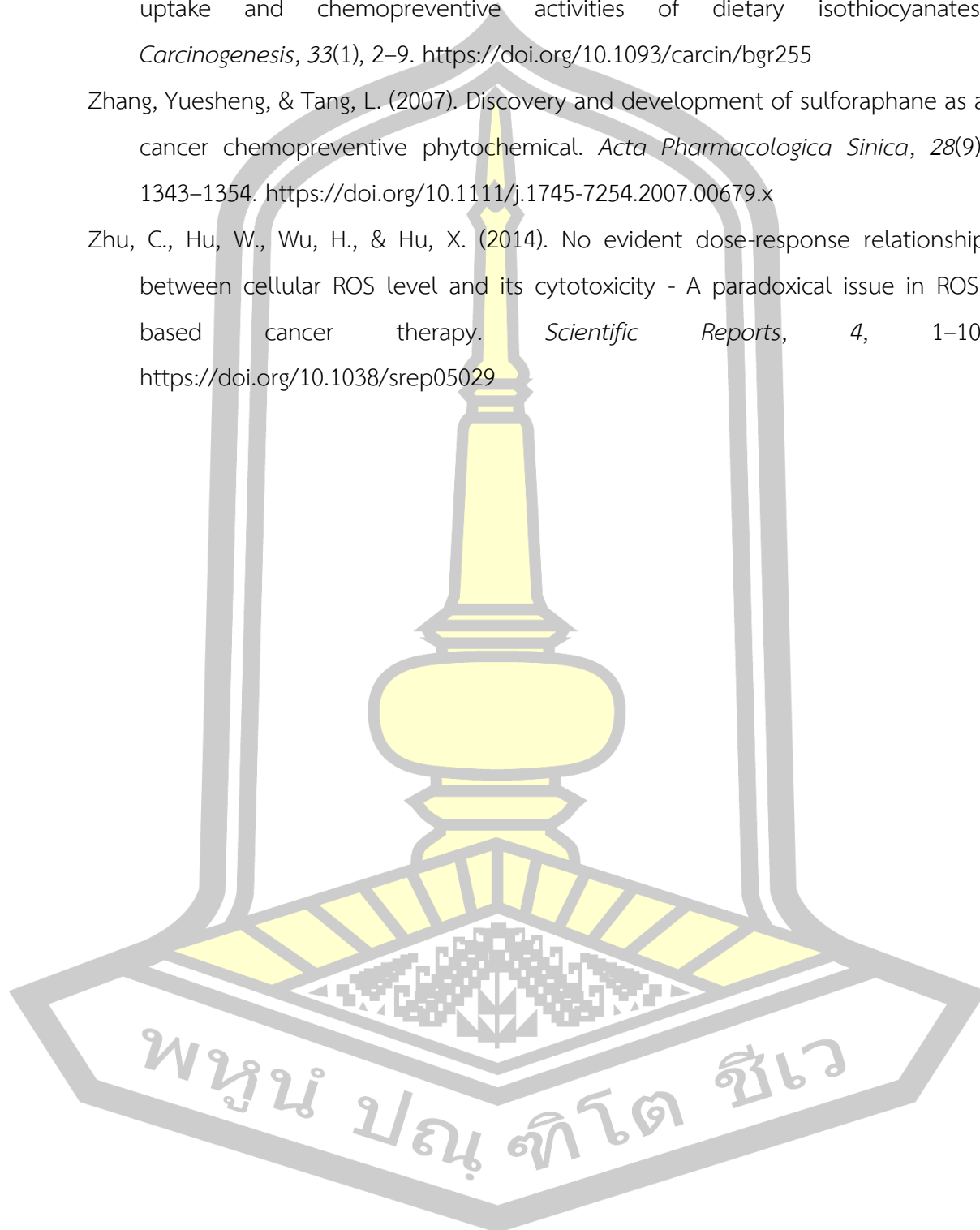
- Valente Pereira, F. M., Rosa, E., Fahey, J. W., Stephenson, K. K., Carvalho, R., & Aires, A. (2002). Influence of temperature and ontogeny on the levels of glucosinolates in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) sprouts and their effect on the induction of mammalian phase 2 enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(21), 6239–6244. <https://doi.org/10.1021/jf020309x>
- Van Eylen, D., Indrawati, Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2006). Temperature and pressure stability of mustard seed (*Sinapis alba* L.) myrosinase. *Food Chemistry*, *97*(2), 263–271. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.03.046>
- Vastenhout, K. J., Tornberg, R. H., Johnson, A. L., Amolins, M. W., & Mays, J. R. (2014). High-performance liquid chromatography-based method to evaluate kinetics of glucosinolate hydrolysis by *Sinapis alba* myrosinase. *Analytical Biochemistry*, *465*, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.07.017>
- Verkerk, R., Schreiner, M., Krumbein, A., Ciska, E., Holst, B., Rowland, I., ... Dekker, M. (2009). Glucosinolates in Brassica vegetables: The influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health. *Molecular Nutrition and Food Research*, *53*(SUPPL. 2), 219–265. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800065>
- von Weymarn, L. B., Chun, J. A., Knudsen, G. A., & Hollenberg, P. F. (2007). Effects of eleven isothiocyanates on P450 2A6- and 2A13-catalyzed coumarin 7-hydroxylation. *Chemical Research in Toxicology*, *20*(9), 1252–1259.
- Wang, L. G., Liu, X. M., Fang, Y., Dai, W., Chiao, F. B., Puccio, G. M., et al. (2008). De-repression of the p21 promoter in prostate cancer cells by an isothiocyanate via inhibition of HDACs and c-Myc. *International Journal of Oncology*, *33*(2), 375–380.
- Wang, T. yang, Li, Q., & Bi, K. shun. (2017). Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *13*(1), 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.08.004>
- Wang, X., Di Pasqua, A. J., Govind, S., McCracken, E., Hong, C., Mi, L., ... Chung, F. L. (2011). Selective depletion of mutant p53 by cancer chemopreventive isothiocyanates and their structure-activity relationships. *Journal of Medicinal Chemistry*, *54*(3), 809–816. <https://doi.org/10.1021/jm101199t>

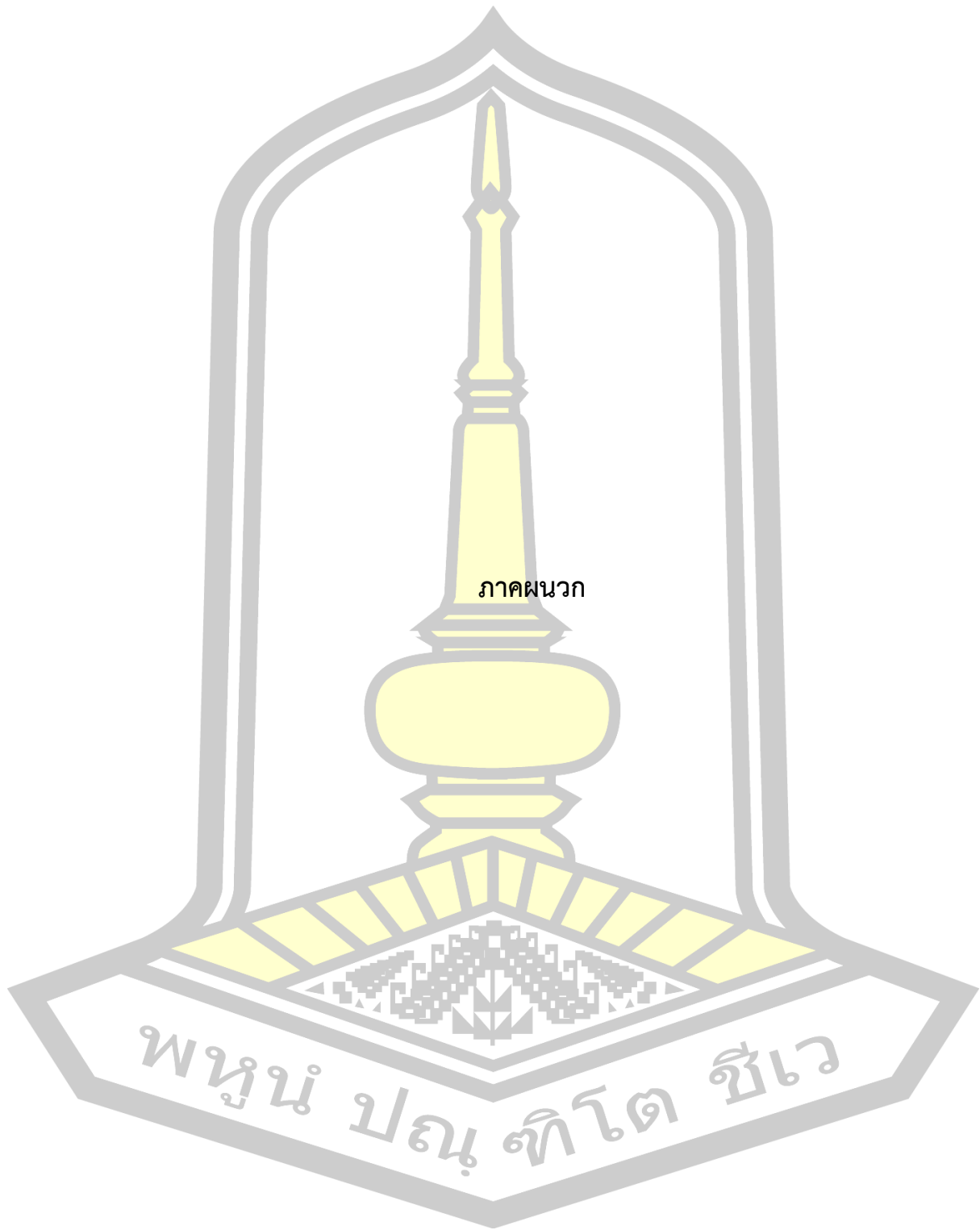
- Wei, J., Miao, H., & Wang, Q. (2011). Scientia Horticulturae Effect of glucose on glucosinolates , antioxidants and metabolic enzymes in Brassica sprouts. *Scientia Horticulturae*, 129(4), 535–540. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.04.026>
- Williamson, G., Faulkner, K., & Plumb, G. W. (1998). Glucosinolates and phenolics as antioxidants from plant foods. *European Journal of Cancer Prevention: The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation*, 7(1), 17–21.
- Wu, S. J., Ng, L. T., & Lin, C. C. (2005). Effects of antioxidants and caspase-3 inhibitor on the phenylethyl isothiocyanate-induced apoptotic signaling pathways in human PLC/PRF/5 cells. *European Journal of Pharmacology*, 518(2–3), 96–106.
- Wu X, Zhou QH, X. K. (2009). Are isothiocyanates potential anticancer drugs? *Acta Pharmacologica Sinica*, 30, 501–512.
- Xiao, D., Srivastava, S. K., Lew, K. L., Zeng, Y., Hershberger, P., Johnson, C. S., ... Singh, S. V. (2003). Allyl isothiocyanate, a constituent of cruciferous vegetables, inhibits proliferation of human prostate cancer cells by causing G2/M arrest and inducing apoptosis. *Carcinogenesis*, 24(5), 891–897. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgg023>
- Xiao, D., Vogel, V., & Singh, S. V. (2006). Benzyl isothiocyanate-induced apoptosis in human breast cancer cells is initiated by reactive oxygen species and regulated by Bax and Bak. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(11), 2931–2945. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0396>
- Xiao, Z., Lester, G. E., Luo, Y., & Wang, Q. (2012). Assessment of vitamin and carotenoid concentrations of emerging food products: Edible microgreens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(31), 7644–7651. <https://doi.org/10.1021/jf300459b>
- Xu, K.; Thornalley, P. (2000). Studies on the mechanism of the inhibition of human leukaemia cell growth by dietary isothiocyanates and their cysteine adducts in vitro. *Biochem Pharmacol Journal*, 600, 221–231.

- Xu, C., Shen, G., Chen, C., G elinas, C., & Kong, A. N. T. (2005). Suppression of NF-**KB** and NF-**KB**-regulated gene expression by sulforaphane and PEITC through **IKB **, IKK pathway in human prostate cancer PC-3 cells. *Oncogene*, *24*(28), 4486–4495. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208656>
- Yanaka, A., Fahey, J. W., Fukumoto, A., Nakayama, M., Inoue, S., Zhang, S., ... Yamamoto, M. (2009). Dietary sulforaphane-rich broccoli sprouts reduce colonization and attenuate gastritis in *Helicobacter pylori*-infected mice and humans. *Cancer Prevention Research*, *2*(4), 353–360. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-08-0192>
- Yang, R., Hui, Q., Gu, Z., & Zhou, Y. (2016). Effects of CaCl₂ on the metabolism of glucosinolates and the formation of isothiocyanates as well as the antioxidant. *Journal of Functional Foods*, *24*, 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.04.007>
- Youn, H. S., Kim, Y. S., Park, Z. Y., Kim, S. Y., Choi, N. Y., Joung, S. M., ... Lee, J. Y. (2010). Sulforaphane Suppresses Oligomerization of TLR4 in a Thiol-Dependent Manner. *The Journal of Immunology*, *184*(1), 411–419. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803988>
- Yu, R., Mandlekar, S., Harvey, K. J., Ucker, D. S., & Kong, A. N. T. (1998). Chemopreventive isothiocyanates induce apoptosis and caspase-3-like protease activity. *Cancer Research*, *58*(3), 402–408.
- Yuan, Gao-feng, Sun, B., Yuan, J., & Wang, Q. (2009). Effects of different cooking methods on health-promoting compounds of broccoli. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, *10*(8), 580–588. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0920051>
- Yuan, Gaofeng, Wang, X., Guo, R., & Wang, Q. (2010). Effect of salt stress on phenolic compounds, glucosinolates, myrosinase and antioxidant activity in radish sprouts. *Food Chemistry*, *121*(4), 1014–1019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.040>
- Zapata, P. J., Serrano, M., Pretel, M. T., Amor os, A., & Botella, M.  . (2004). Polyamines and ethylene changes during germination of different plant species under salinity. *Plant Science*, *167*(4), 781–788.

- Zeng, H., Trujillo, O. N., Moyer, M. P., & Botnen, J. H. (2011). Prolonged sulforaphane treatment activates survival signaling in nontumorigenic NCM460 colon cells but apoptotic signaling in tumorigenic HCT116 colon cells. *Nutrition and Cancer*, *63*(2), 248–255.
- Zhang, D. H., Wadsworth, P., & Hepler, P. K. (1992). Modulation of anaphase spindle microtubule structure in stamen hair cells of *Tradescantia* by calcium and related agents. *Journal of Cell Science*, *102*(1), 79–89.
- Zhang, D. D., & Hannink, M. (2003). Distinct Cysteine Residues in Keap1 Are Required for Keap1-Dependent Ubiquitination of Nrf2 and for Stabilization of Nrf2 by Chemopreventive Agents and Oxidative Stress. *Molecular and Cellular Biology*, *23*(22), 8137–8151. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.22.8137-8151.2003>
- Zhang, D., & Hamazu, Y. (2004). Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. *Food Chemistry*, *88*(4), 503–509. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.065>
- Zhang, J. J., Jo, J. O., Huynh, D. L., Mongre, R. K., & Ghosh, M. (2017). Growth-inducing effects of argon plasma on soybean sprouts via the regulation of demethylation levels of energy metabolism-related genes. *Nature Publishing Group*, (January), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep41917>
- Zhang, L., Tu, Z. C., Yuan, T., Wang, H., Xie, X., & Fu, Z. F. (2016). Antioxidants and α -glucosidase inhibitors from *Ipomoea batatas* leaves identified by bioassay-guided approach and structure-activity relationships. *Food Chemistry*, Vol. 208, pp. 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.079>
- Zhang, Q., Kong, J., Dong, S., Xu, W., & Sun, W. (2017). Metformin exhibits the anti-proliferation and anti-invasion effects in hepatocellular carcinoma cells after insufficient radiofrequency ablation. *Cancer Cell International*, *17*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12935-017-0418-6>
- Zhang, Y. (2010). Allyl isothiocyanate as a cancer chemopreventive phytochemical. *Molecular Nutrition & Food Research*, *54*(1), 127–135.

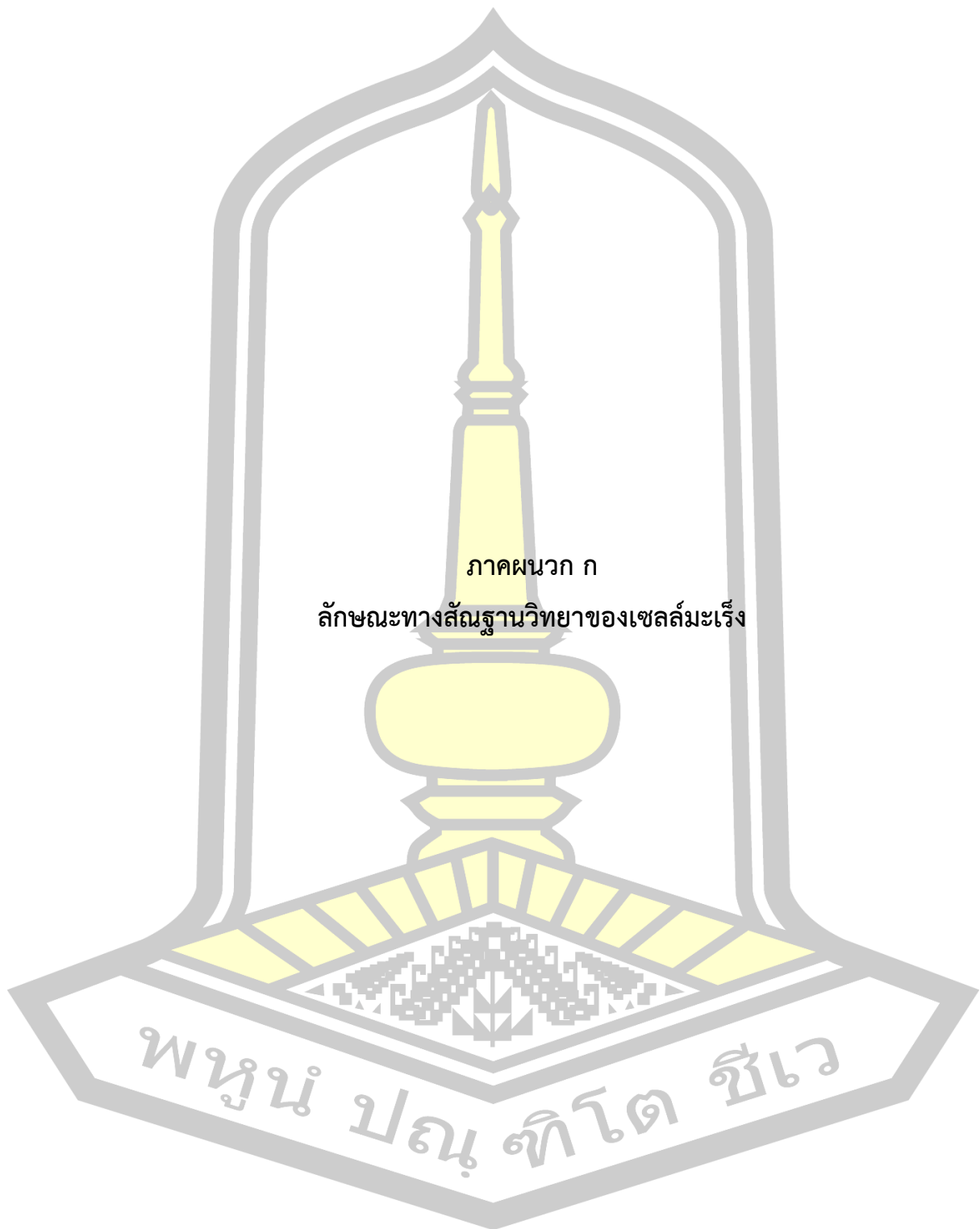
- Zhang, Yuesheng. (2011). The molecular basis that unifies the metabolism, cellular uptake and chemopreventive activities of dietary isothiocyanates. *Carcinogenesis*, 33(1), 2–9. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr255>
- Zhang, Yuesheng, & Tang, L. (2007). Discovery and development of sulforaphane as a cancer chemopreventive phytochemical. *Acta Pharmacologica Sinica*, 28(9), 1343–1354. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2007.00679.x>
- Zhu, C., Hu, W., Wu, H., & Hu, X. (2014). No evident dose-response relationship between cellular ROS level and its cytotoxicity - A paradoxical issue in ROS-based cancer therapy. *Scientific Reports*, 4, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep05029>

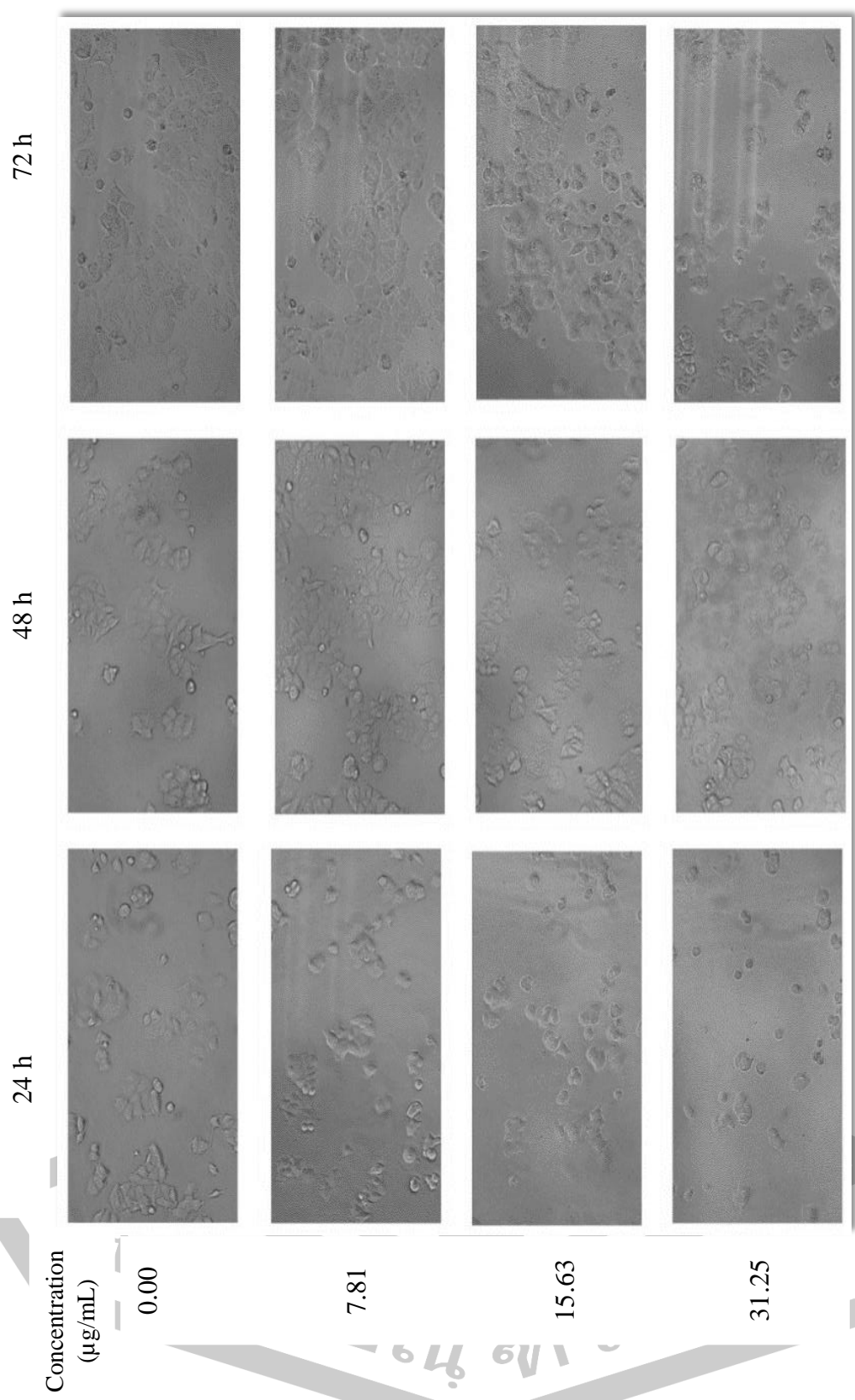




ภาคผนวก

พหุณฺ์ ปณฺุ ทิโต ชีเว





ภาพที่ 41 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ของสารสกัดหยาบจากผักกาดเขียวอ่อน (ชุดควบคุม) ความเข้มข้นจาก 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรถึง 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลาการบ่ม 24 28 และ 72 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 400X

72 h

48 h

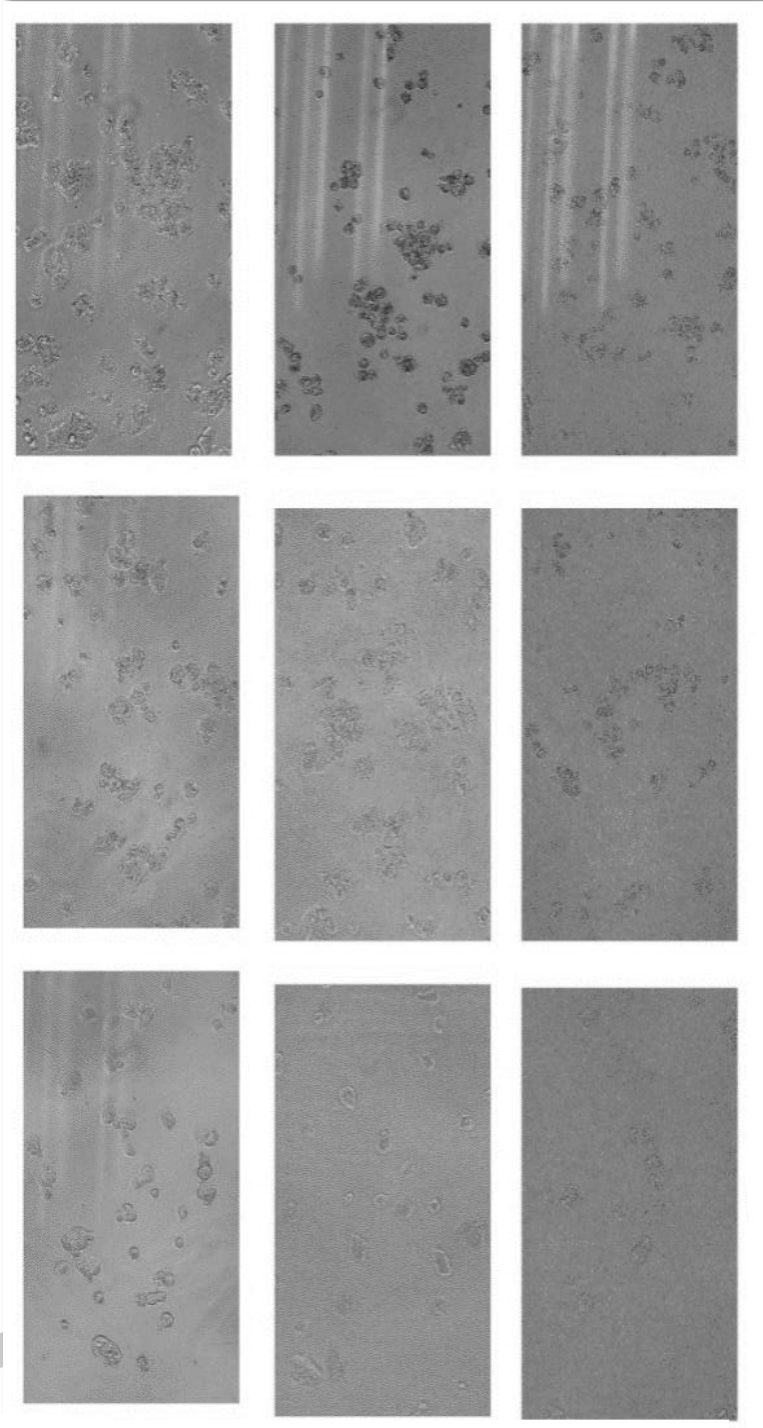
24 h

Concentration
($\mu\text{g/mL}$)

62.5

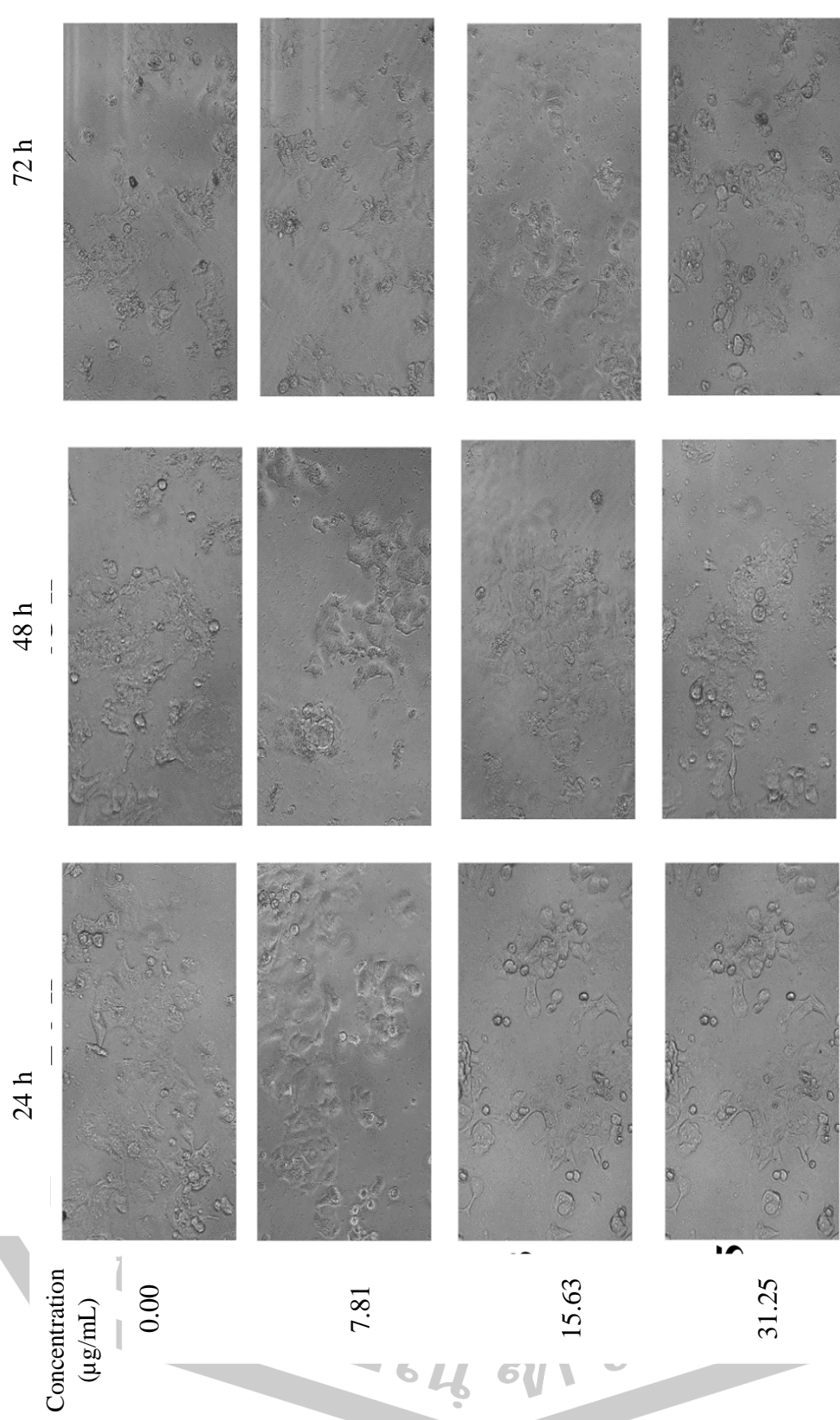
125

250



ภาพที่ 42 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ของสารสกัดหยาบจากผักกาดเขียวฉ่ำน้อย (ชุดควบคุม)

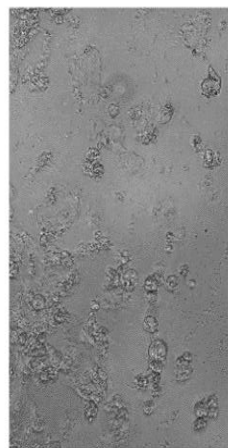
ความเข้มข้นจาก 62.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรถึง 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ที่เวลาการบ่ม 24 28 และ 72 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 400X



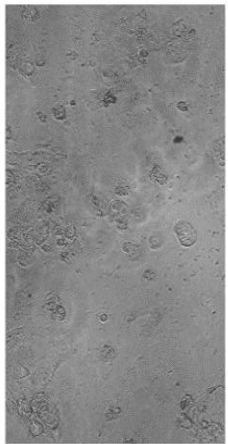
ภาพที่ 43 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ของสารสกัดหยาบจากผักกาดเขียวฉ่ำน้อยที่ได้รับพลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่น ความเข้มข้นจาก 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรถึง 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลาการบ่ม 24 28 และ 72 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 400X

160

72 h



48 h

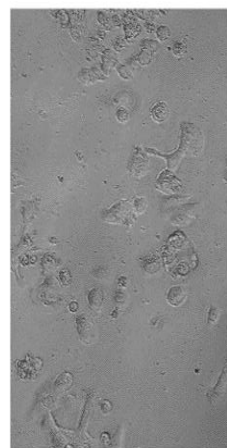
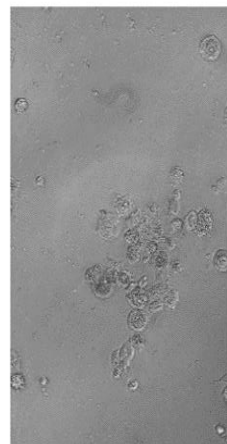
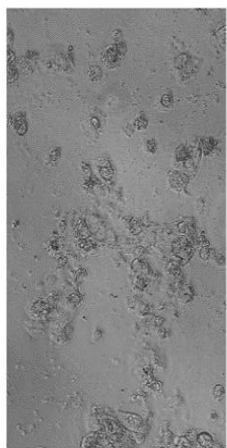


24 h

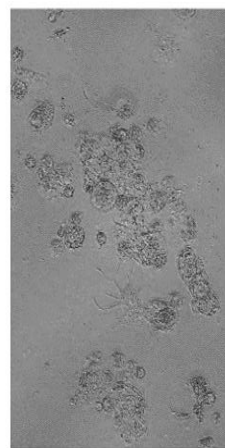
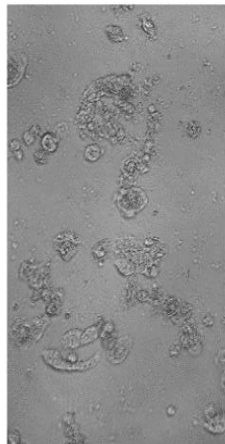
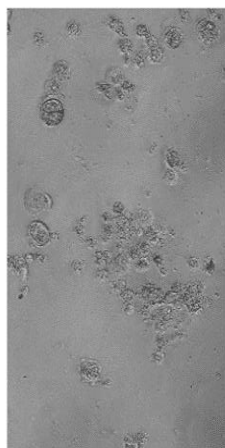


Concentration
(µg/mL)

62.5

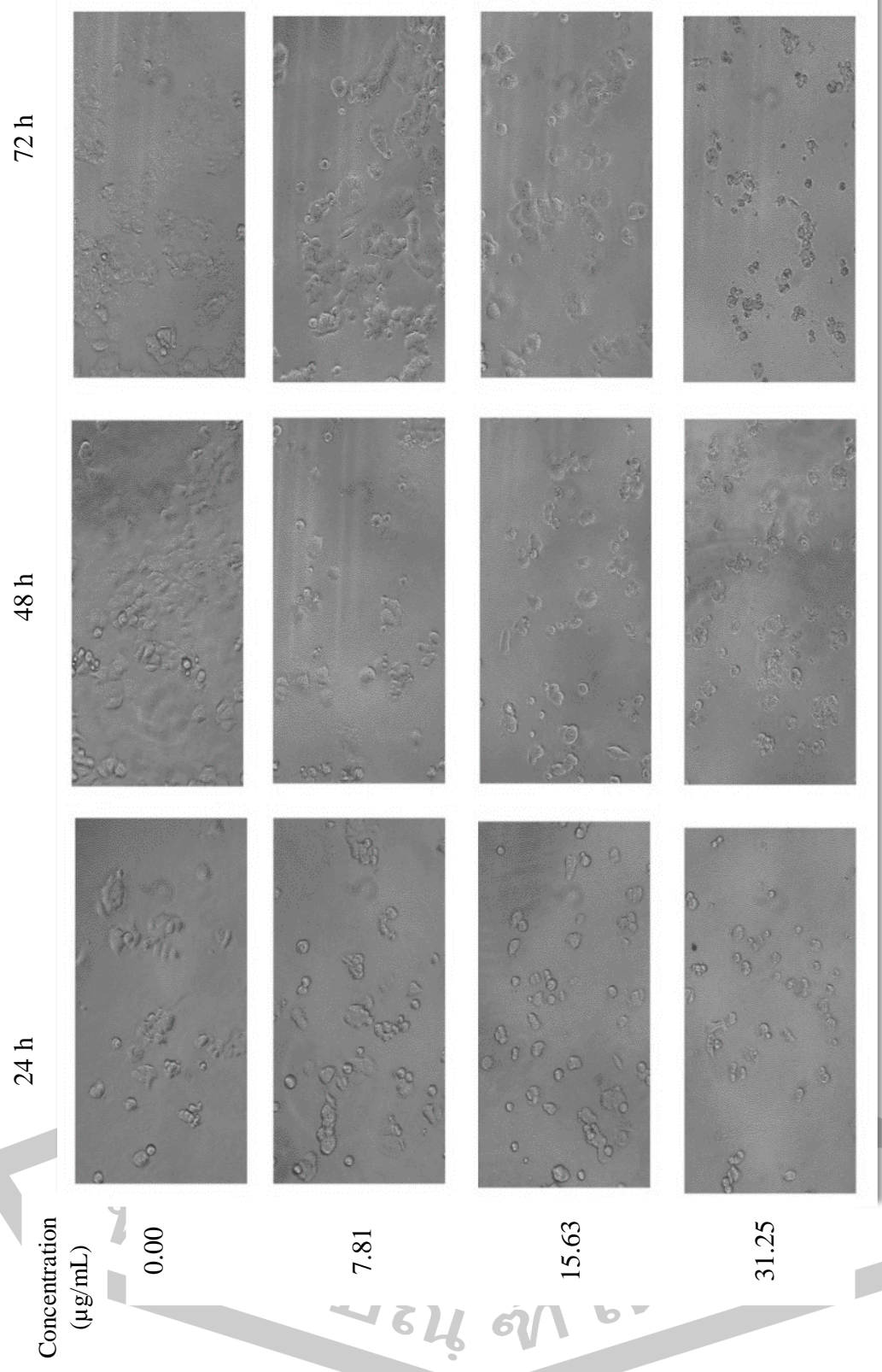


125



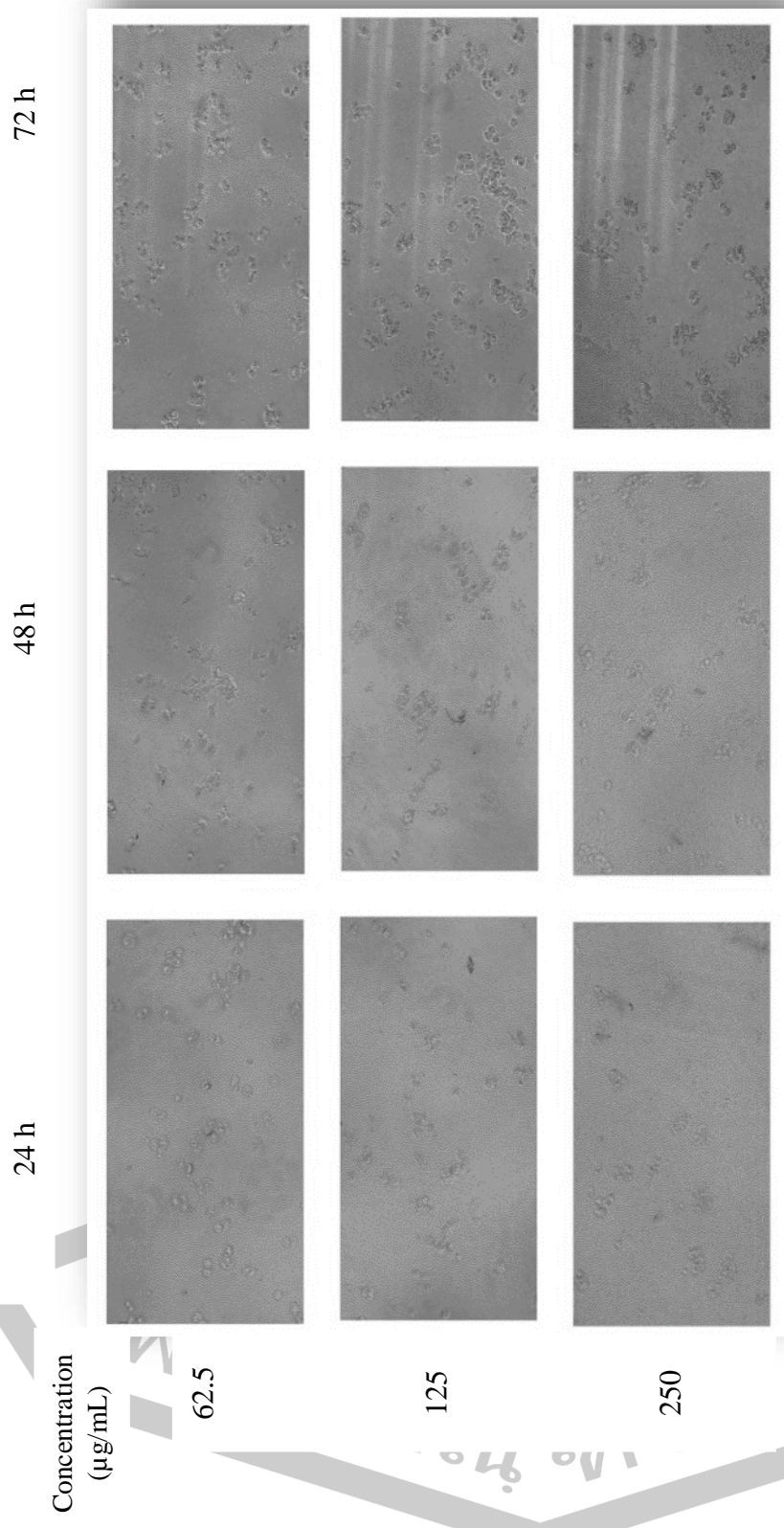
250

ภาพที่ 44 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ของสารสกัดหยาดจากผักกาดเขียวอ่อนที่ได้รับพลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่น ความเข้มข้นจาก 62.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรถึง 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ที่เวลาการบ่ม 24 28 และ 72 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 400X

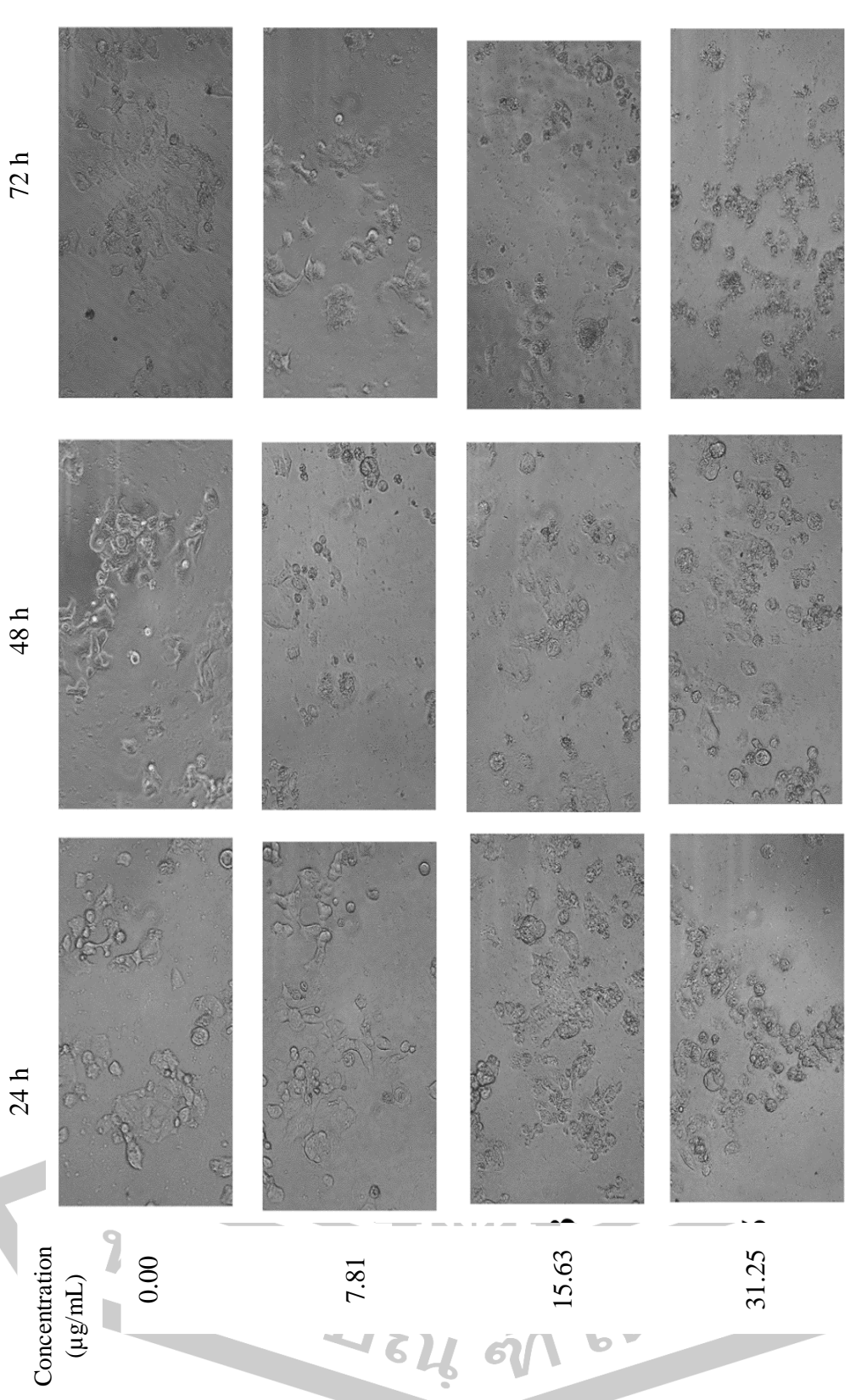


ภาพที่ 45 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ของสารสกัดหยาบจากผักชีทูต (ชุดควบคุม)

ความเข้มข้นจาก 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรถึง 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ที่เวลาการบ่ม 24 28 และ 72 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 400X



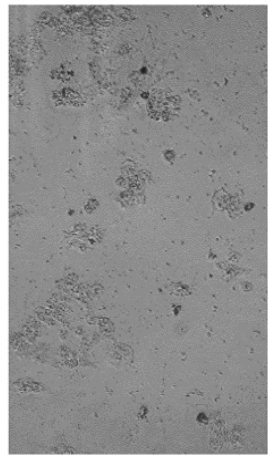
ภาพที่ 46 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ของสารสกัดหยาบจากผักชีฝรั่ง (ชุดควบคุม) ความเข้มข้นจาก 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรถึง 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ที่เวลาการบ่ม 24 28 และ 72 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 400X



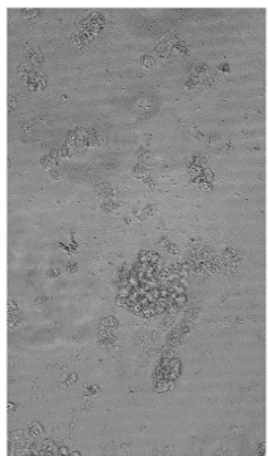
ภาพที่ 47 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ของสารสกัดหยาบจากผักชีหูดที่มีการให้พลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่น ความเข้มข้นจาก 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรถึง 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลาการบ่ม 24 28 และ 72 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 400X

164

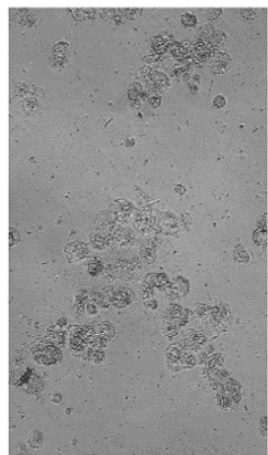
72 h



48 h

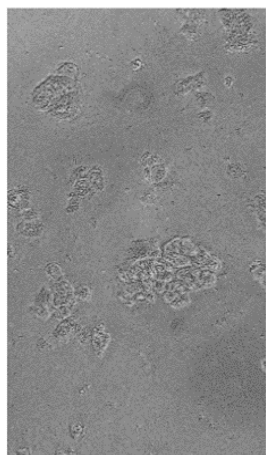
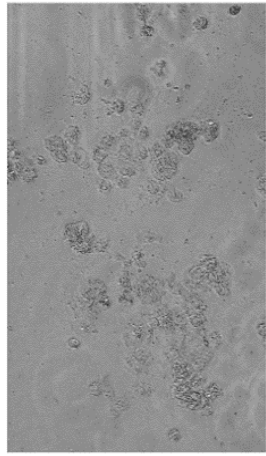
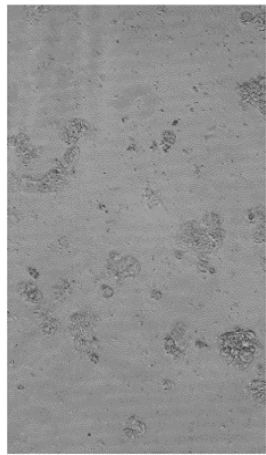


24 h

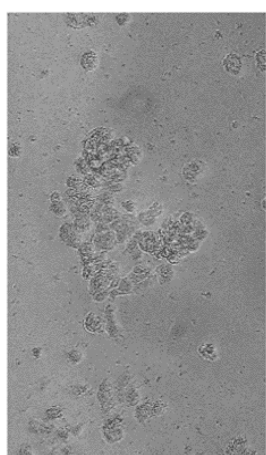
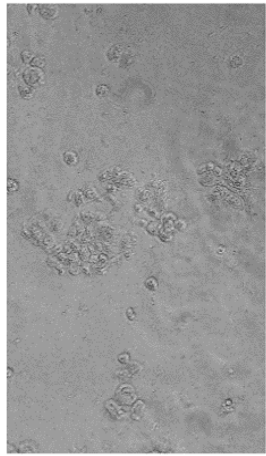
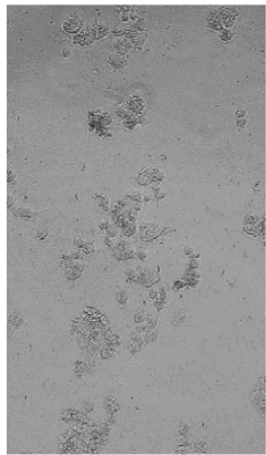


Concentration
(µg/mL)

62.5

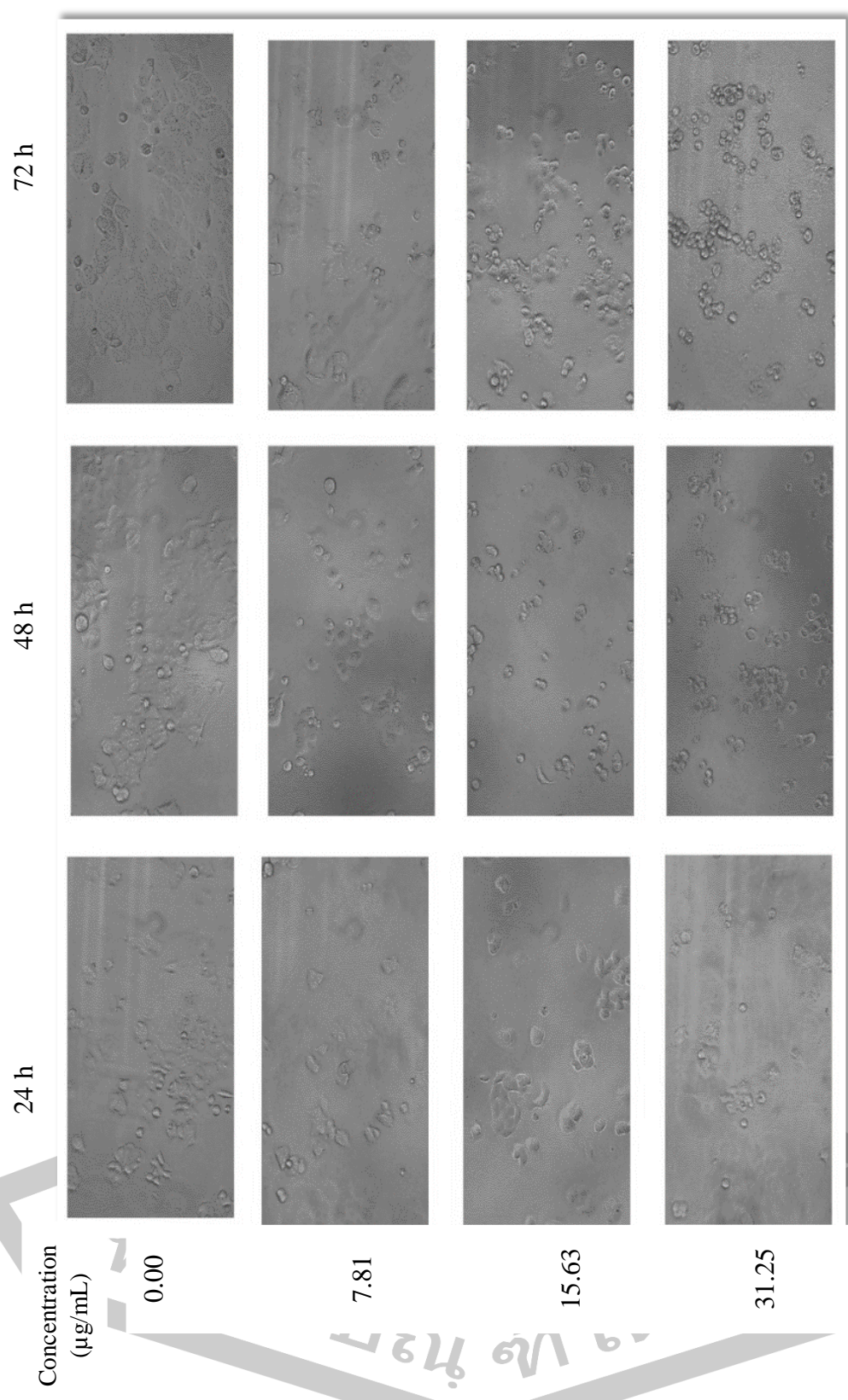


125



250

ภาพที่ 48 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ของสารสกัดหยาบจากผักขี้หนูที่มีการให้พลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่น ความเข้มข้นจาก 62.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรถึง 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลาการบ่ม 24 28 และ 72 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 400X



ภาพที่ 49 สันฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ของสารสกัดหยาบจากบร็อกโคลี (ชุดควบคุม) ความเข้มข้นจาก 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรถึง 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ที่เวลาการบ่ม 24 28 และ 72 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 10X

72 h

48 h

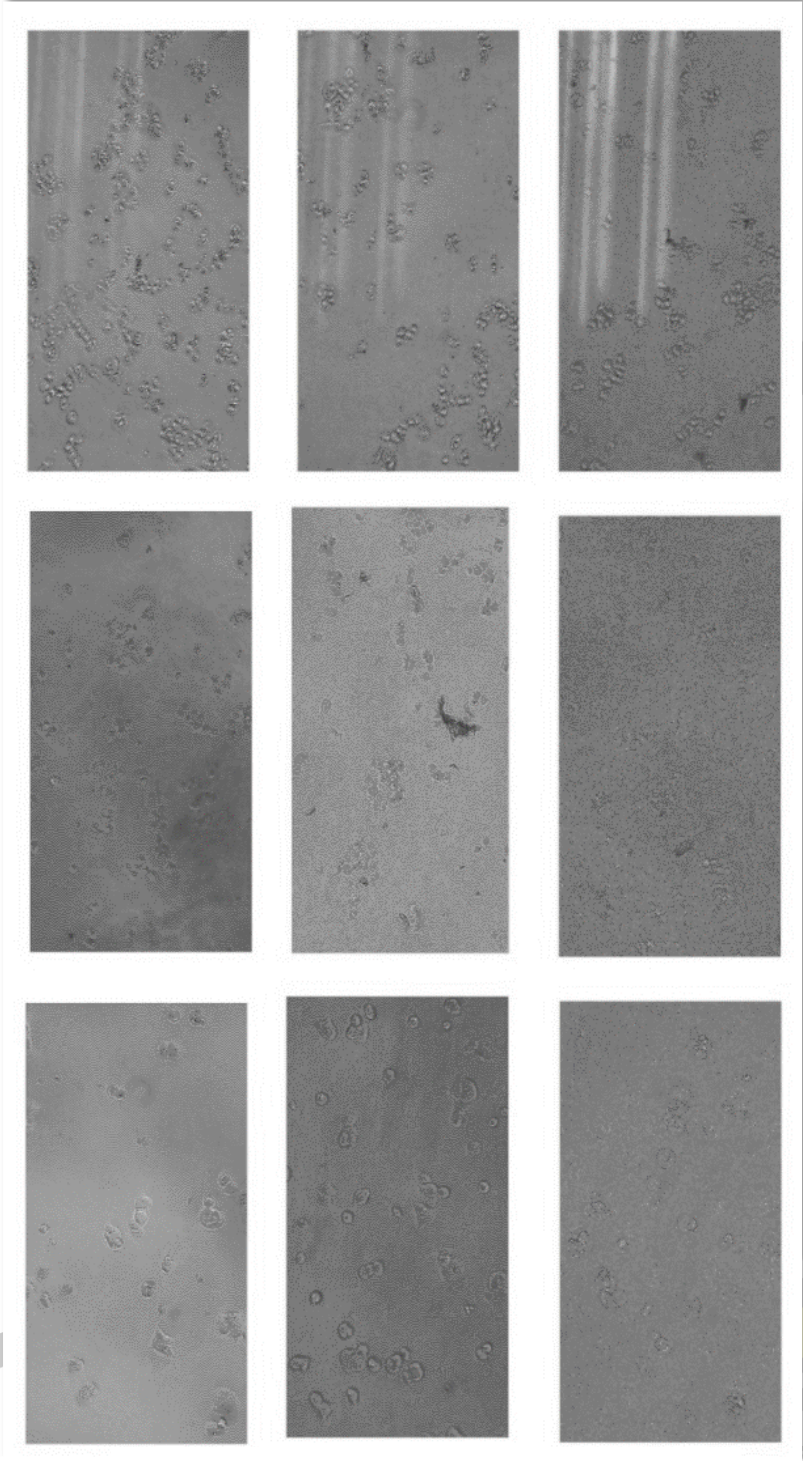
24 h

Concentration
($\mu\text{g/mL}$)

62.5

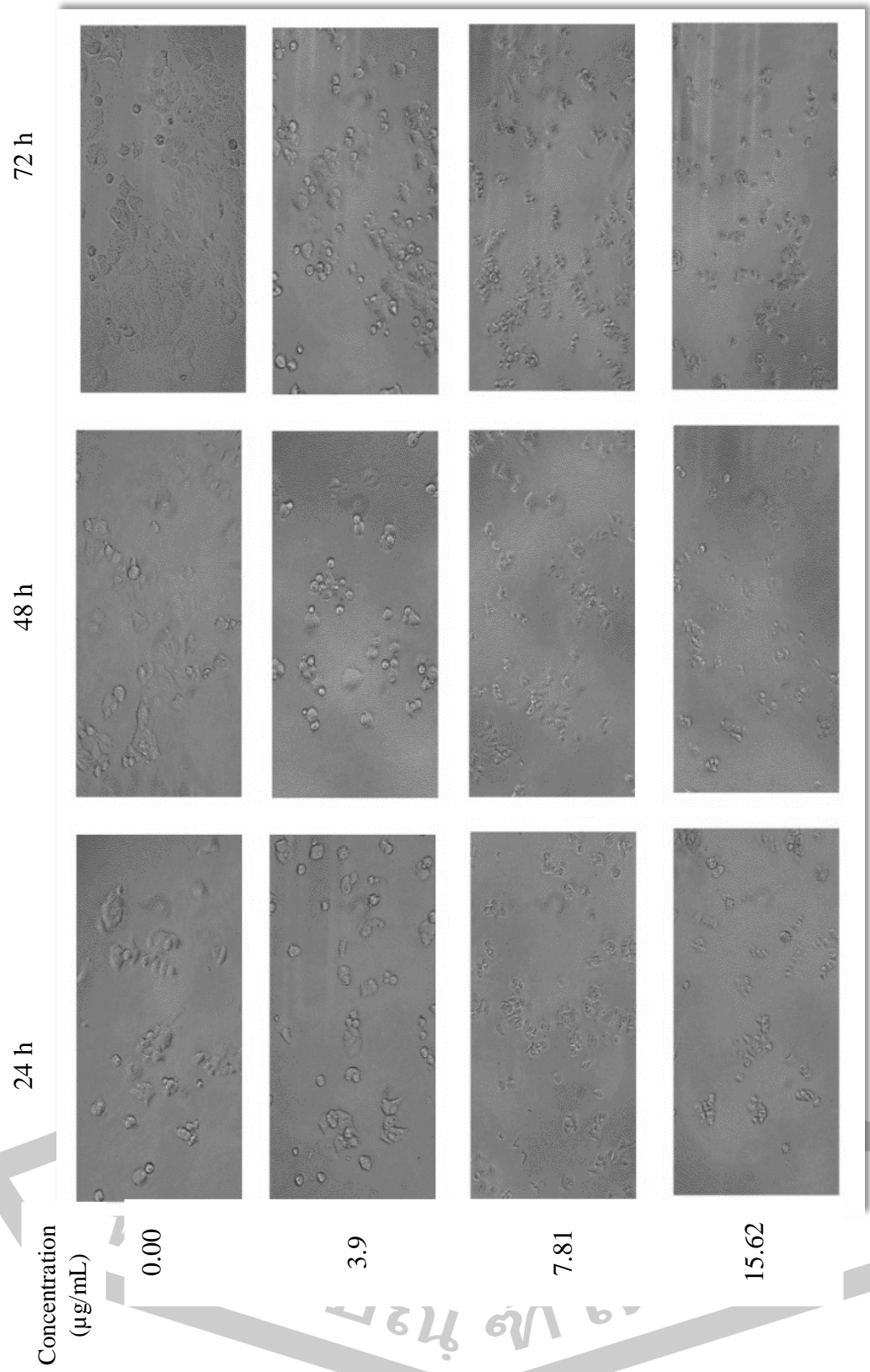
125

250



ภาพที่ 50 สถาบันวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ของสารสกัดหยาบจากบร็อกโคลี (ชุดควบคุม)

ความเข้มข้นจาก 62.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรถึง 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลาการบ่ม 24 28 และ 72 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 400X



ภาพที่ 51 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ของสารเบนซิลไฮโดรไอโซยานาเท (ตัวอย่างควบคุม)

ความเข้มข้นจาก 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรถึง 15.62 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ที่เวลาการบ่ม 24 28 และ 72 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 400X

72 h

48 h

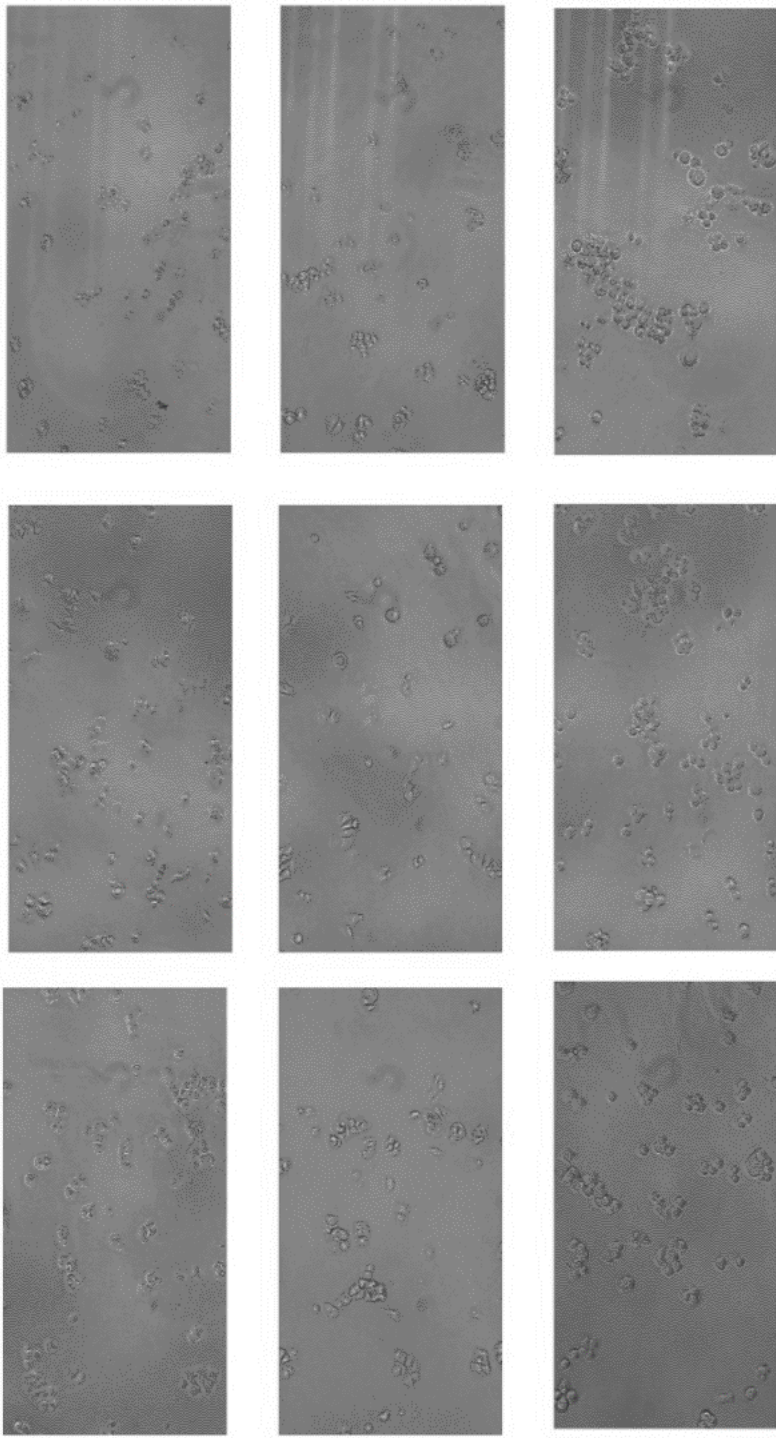
24 h

Concentration
($\mu\text{g/mL}$)

31.25

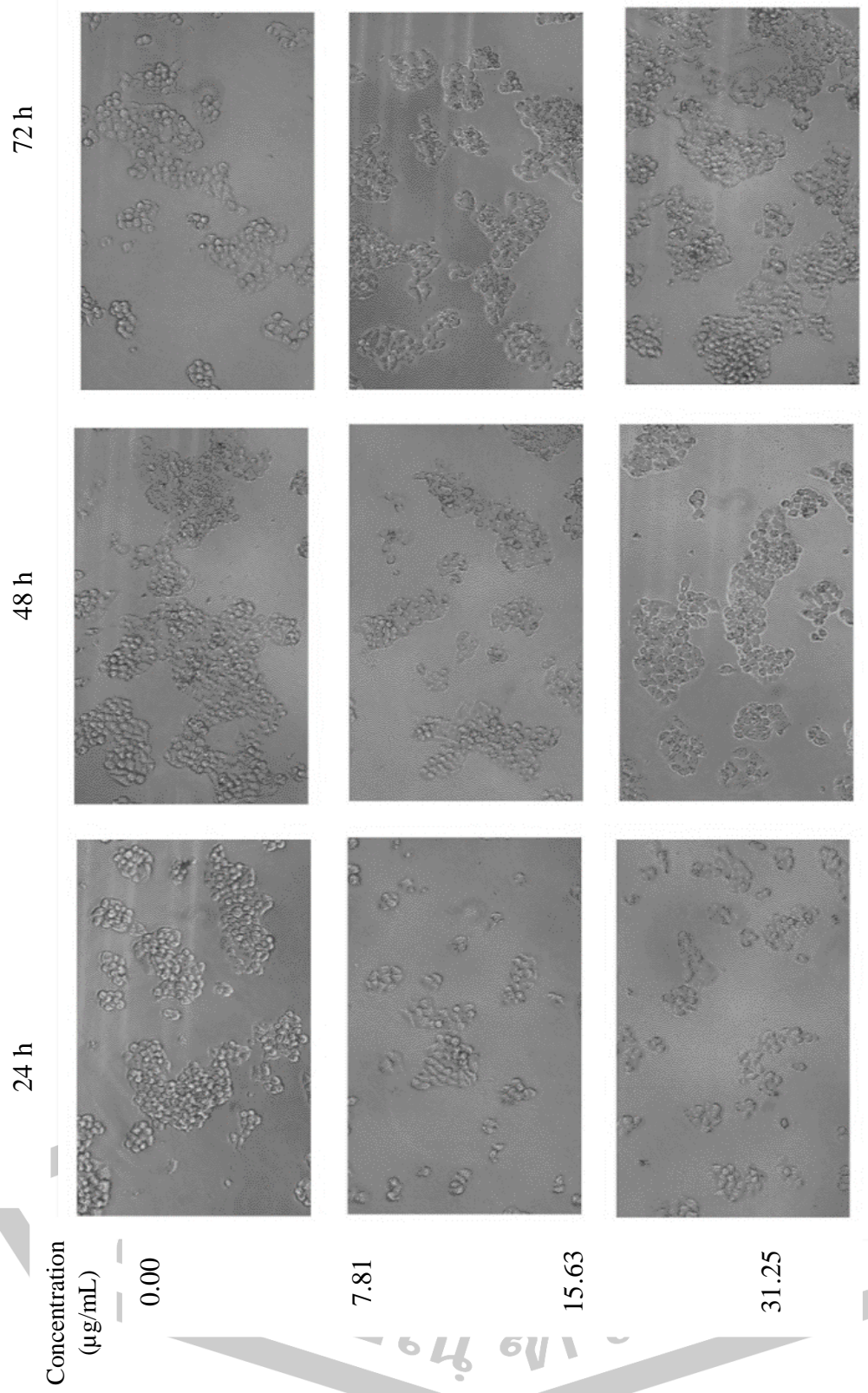
62.5

125

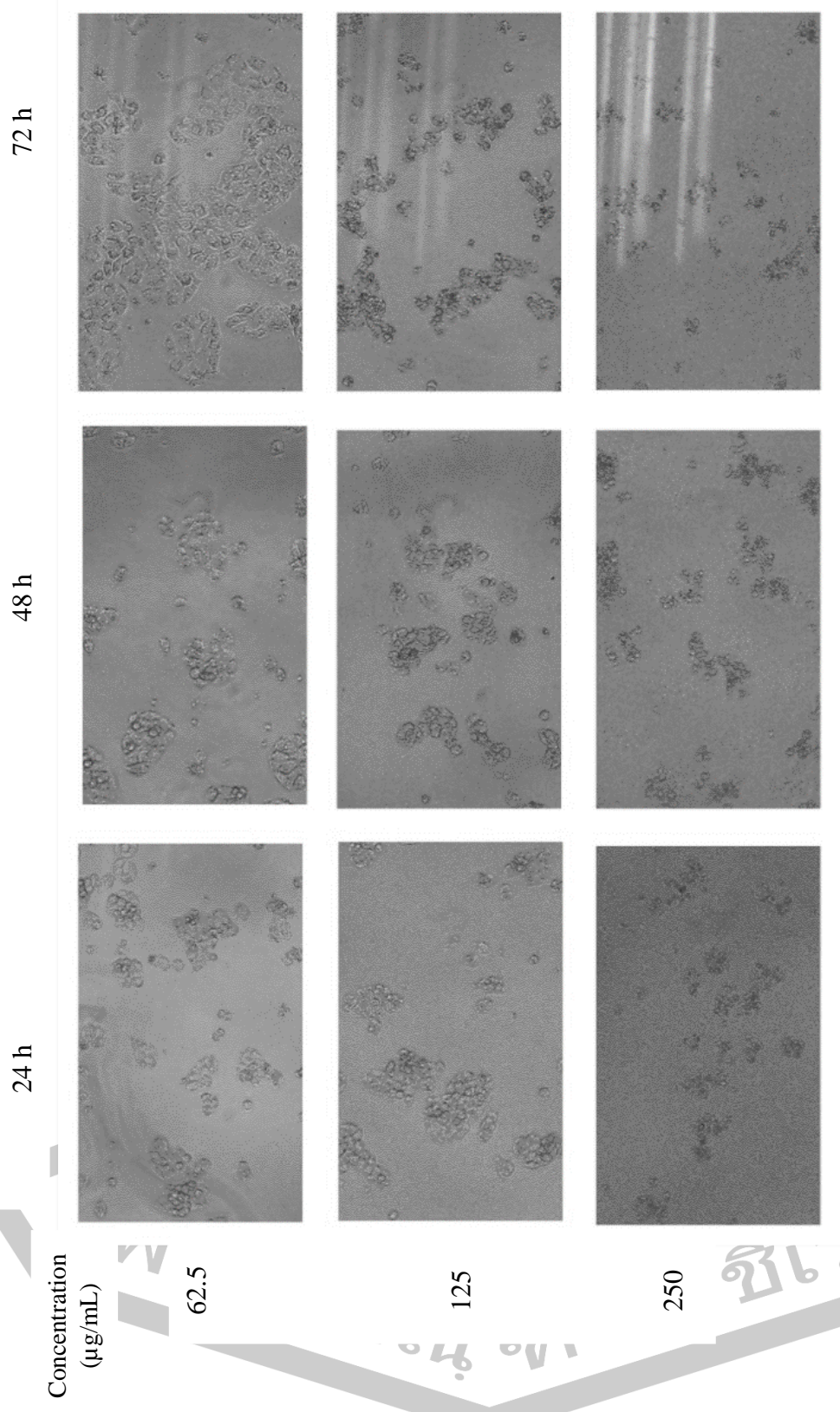


ภาพที่ 52 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ของสารเบนซิลไฮโดรไอโซไซยานเท (ตัวอย่างควบคุม)

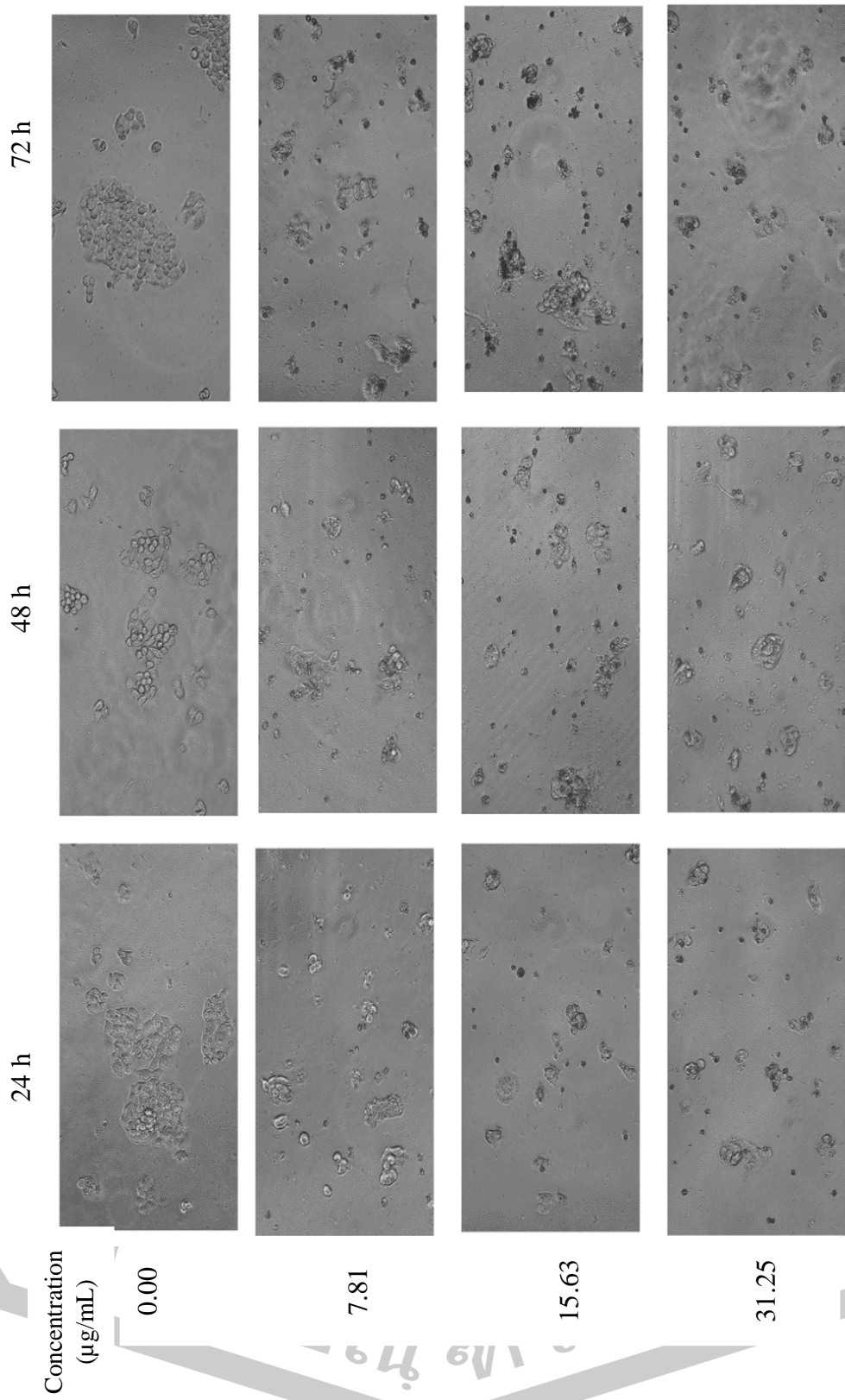
ความเข้มข้นจาก 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรถึง 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ที่เวลาการบ่ม 24 28 และ 72 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 400X



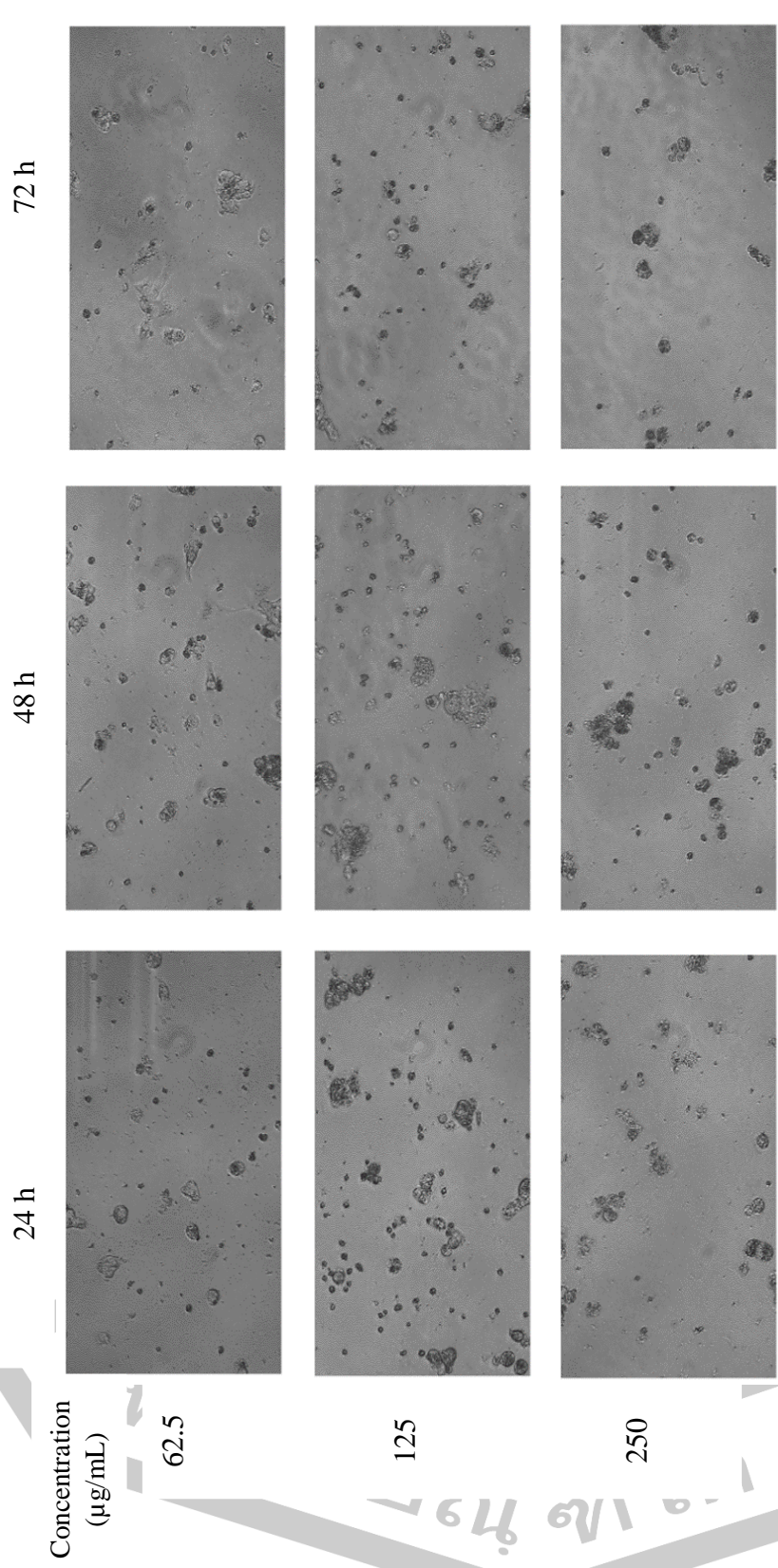
ภาพที่ 53 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ของสารสกัดหยาบจากผักกาดเขียวอ่อน (ชุดควบคุม) ความเข้มข้นจาก 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรถึง 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ที่เวลาการบ่ม 24 28 และ 72 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 400X



ภาพที่ 54 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ของสารสกัดเหยาจากผักกาดเขียวอ่อน (ชุดควบคุม) ความเข้มข้นจาก 62.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรถึง 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ที่เวลาการบ่ม 24 28 และ 72 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 400X



ภาพที่ 55 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ของสารสกัดหยากจากผักกาดเขียวอ่อนที่ได้รับพลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่น ความเข้มข้นจาก 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรถึง 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลาการบ่ม 24 28 และ 72 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 400X



ภาพที่ 56 สันฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ของสารสกัดจากผักกาดเขียวอ่อนที่ได้รับพลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่น ความเข้มข้นจาก 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรถึง 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลาการบ่ม 24 28 และ 72 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 400X

72 h

48 h

24 h

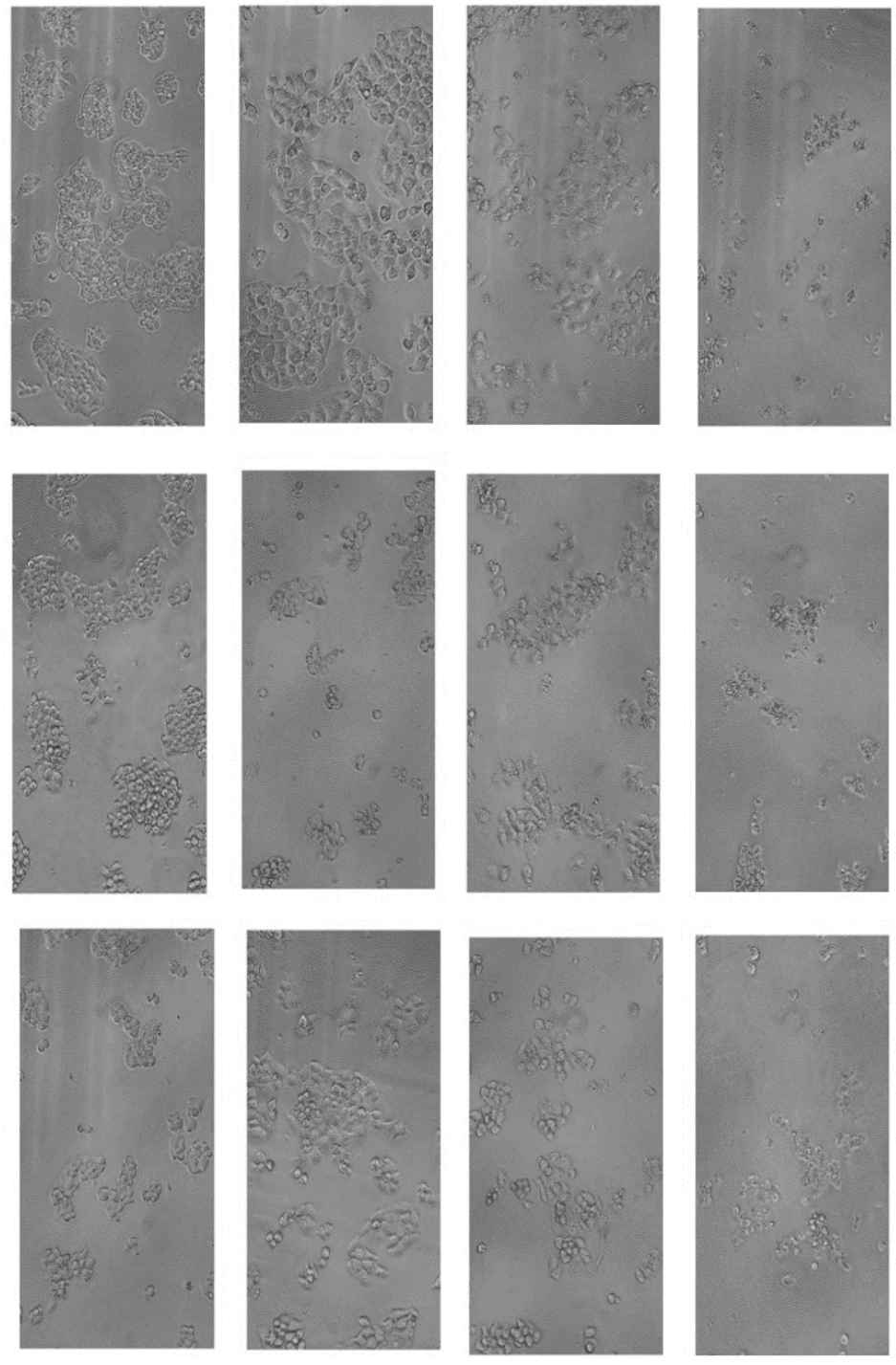
Concentration
($\mu\text{g/mL}$)

0.00

7.81

15.63

31.25



ภาพที่ 57 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ของสารสกัดหยาบจากผักชีฝรั่ง (ชุดควบคุม)

ความเข้มข้นจาก 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรถึง 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ที่เวลาการบ่ม 24 28 และ 72 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 400X

72 h

48 h

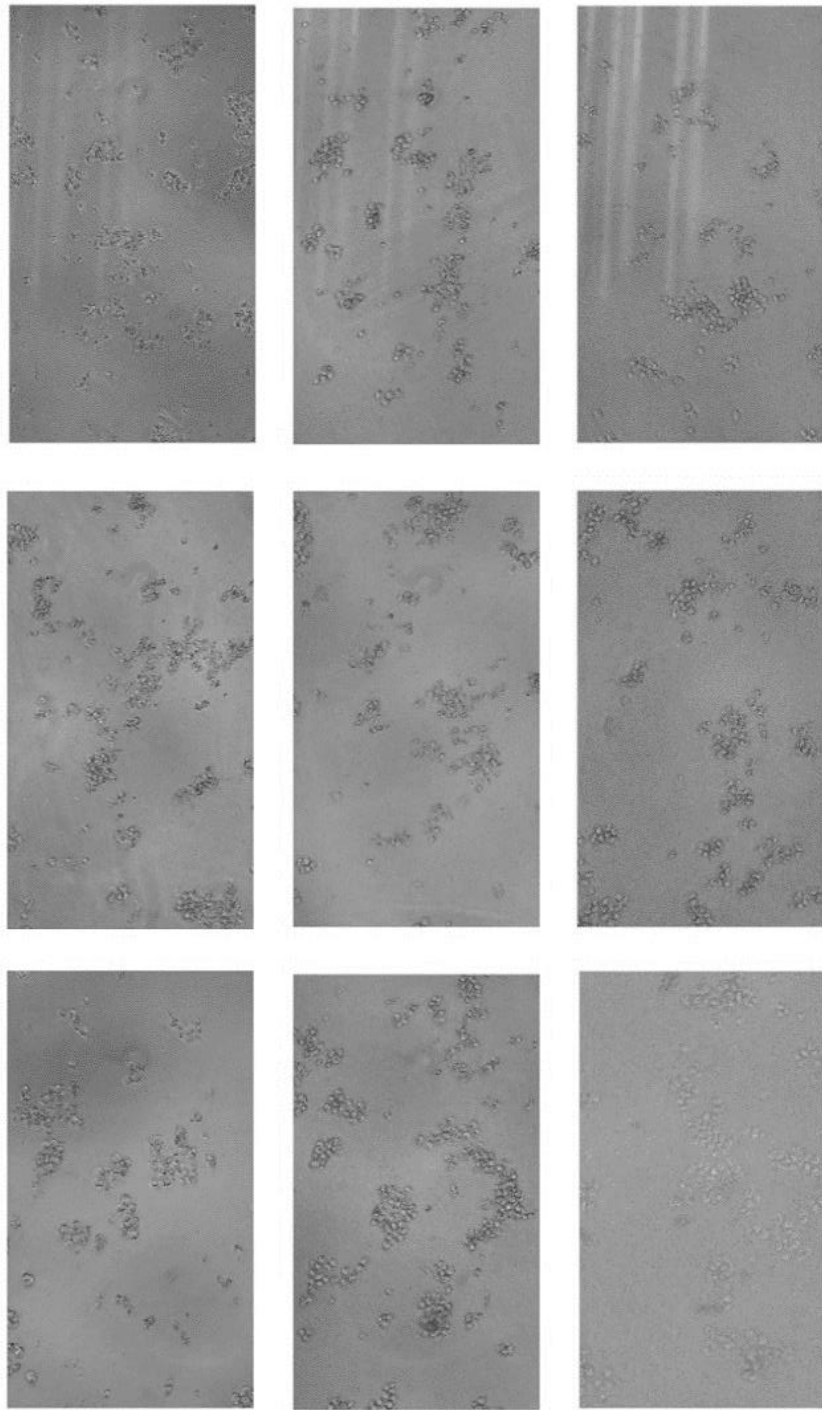
24 h

Concentration
($\mu\text{g/mL}$)

62.5

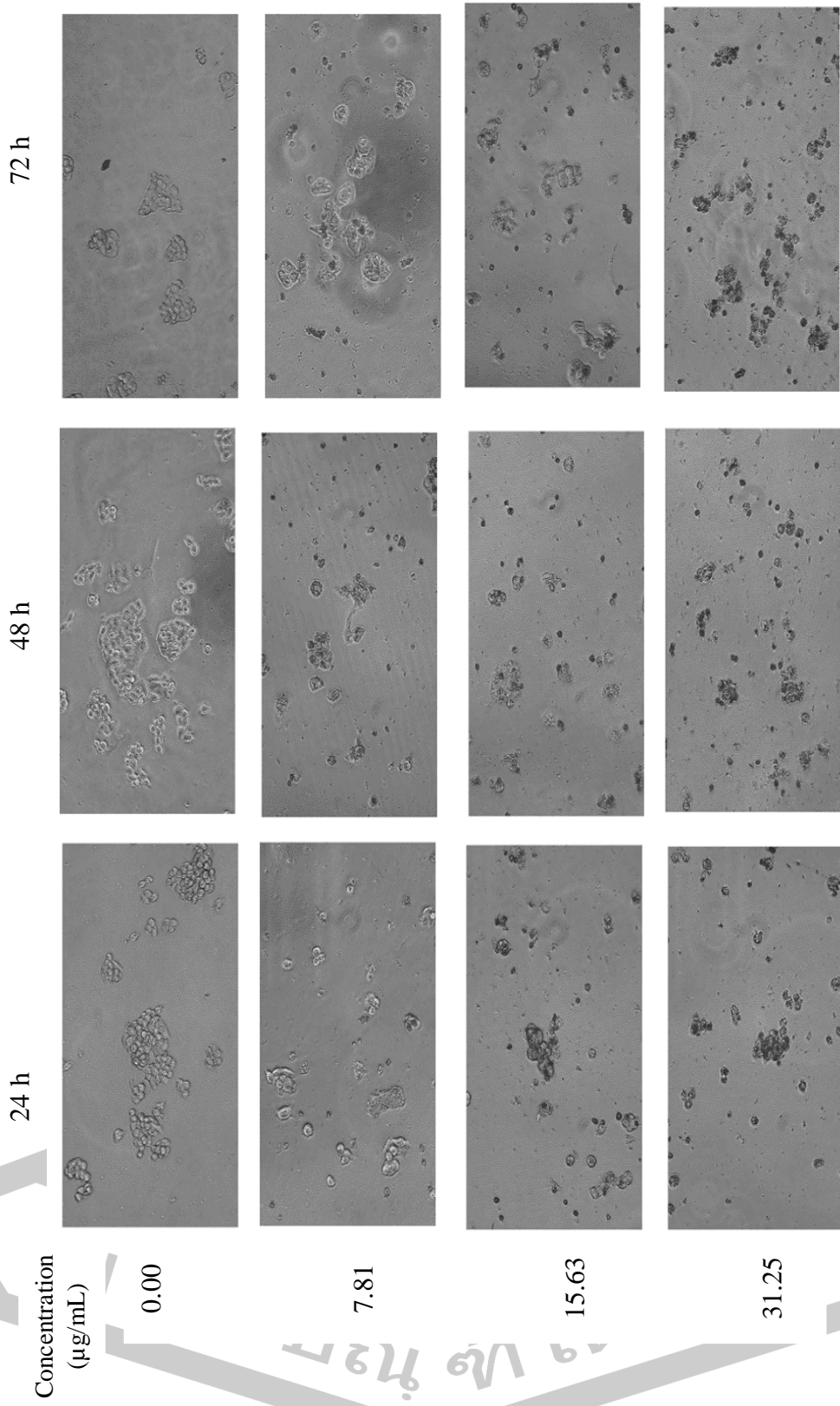
125

250



ภาพที่ 58 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ของสารสกัดหยาบจากผักชีหูด (ชุดควบคุม)

ความเข้มข้นจาก 62.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรถึง 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร เวลาการบ่ม 24 28 และ 72 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 400X



ภาพที่ 59 สันฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ของสารสกัดหยาบจากผักชีหูดที่มีการให้พลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่น ความเข้มข้นจาก 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรถึง 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เวลาการบ่ม 24 28 และ 72 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 400X

72 h

48 h

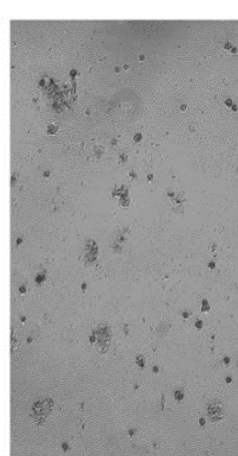
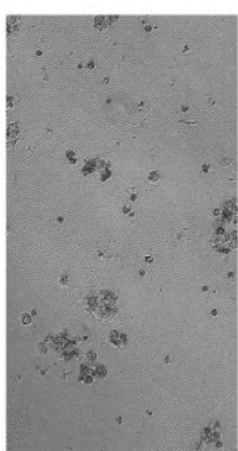
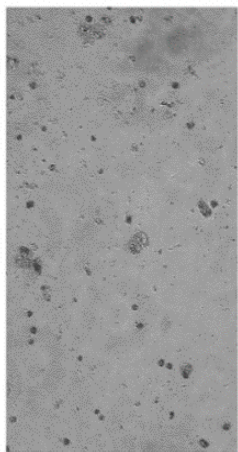
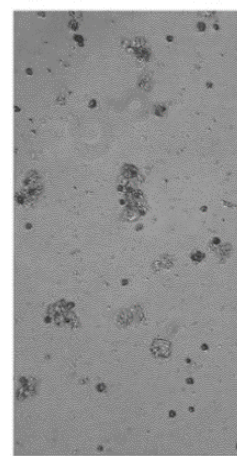
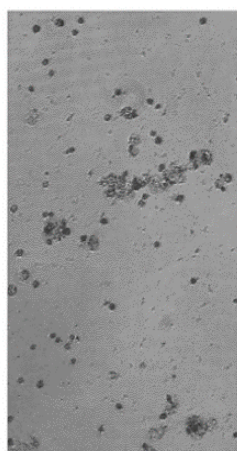
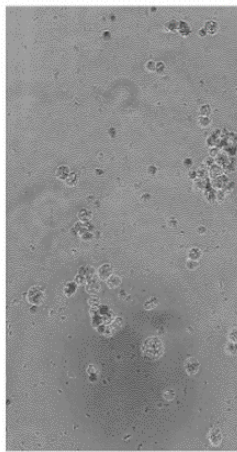
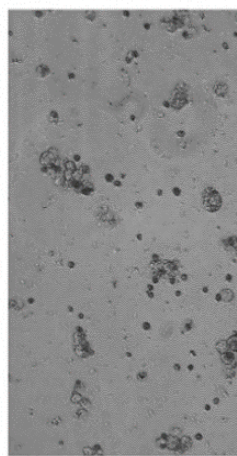
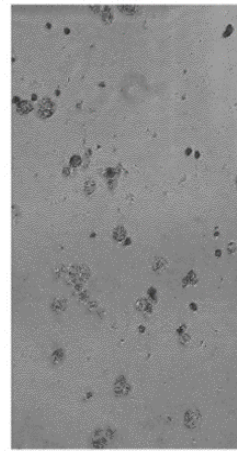
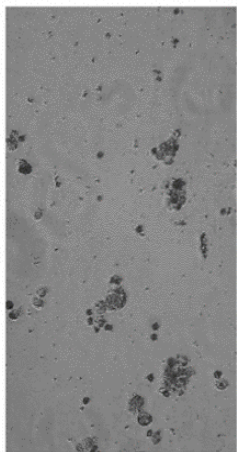
24 h

Concentration
($\mu\text{g/mL}$)

62.5

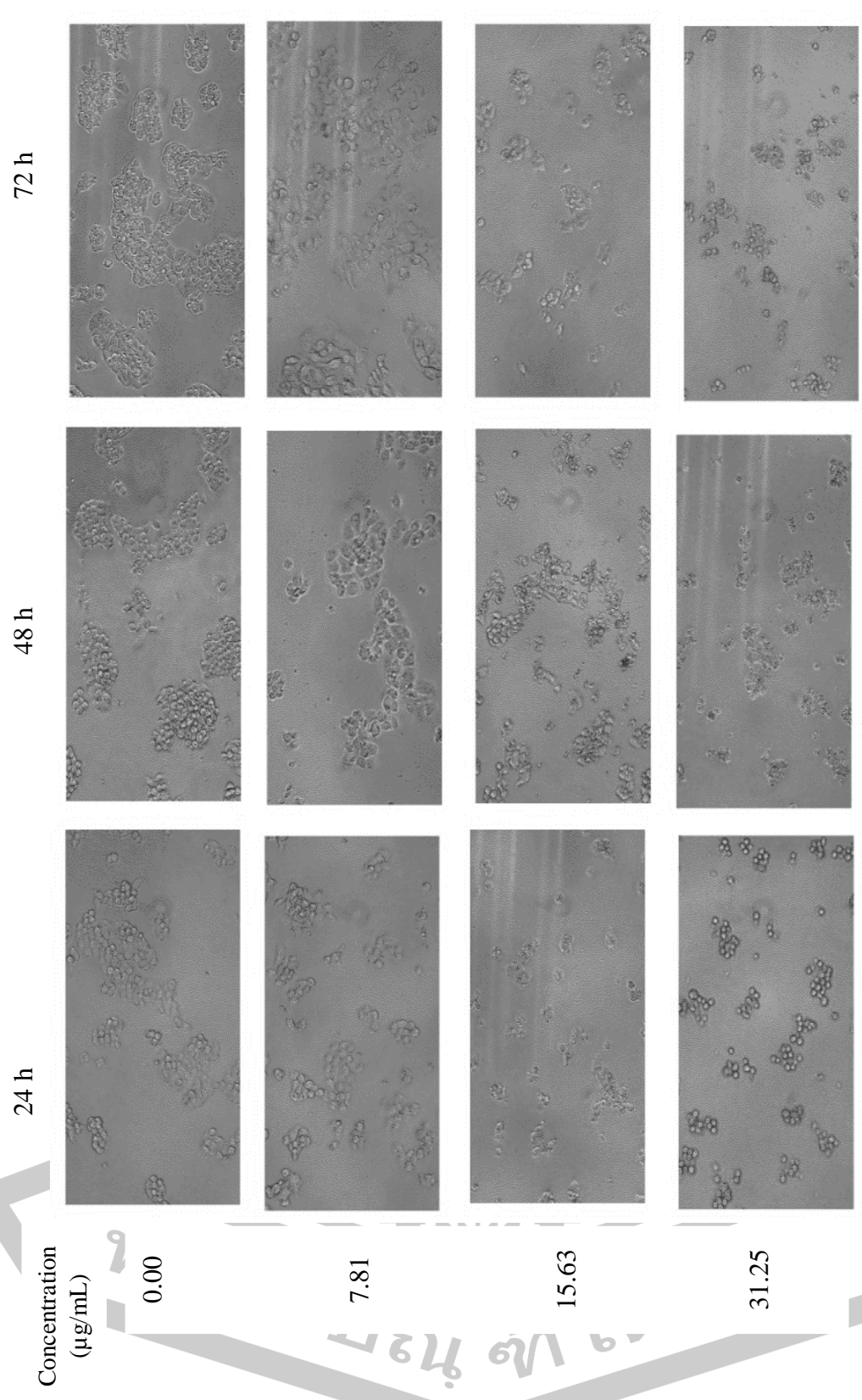
125

250



ภาพที่ 60 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ของสารสกัดหยาบจากผักชีหูดที่มีการให้พลาสมาเย็นร่วมกับน้ำกลั่น

ความเข้มข้นจาก 62.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรถึง 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร เวลาการบ่ม 24 28 และ 72 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 400X



ภาพที่ 61 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ของสารสกัดหยาบจากบร็อคโคลี่ (ชุดควบคุม)

ความเข้มข้นจาก 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรถึง 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร เวลาการบ่ม 24 28 และ 72 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 400X

72 h

48 h

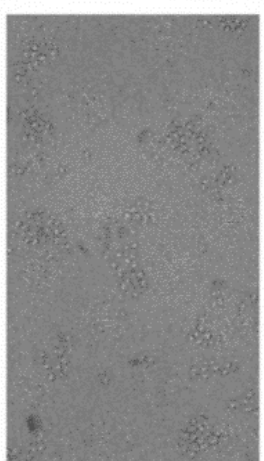
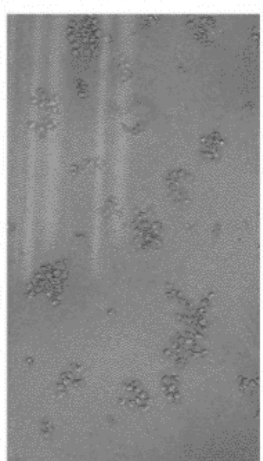
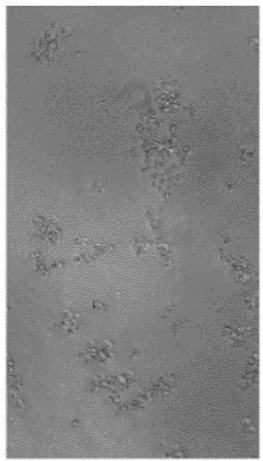
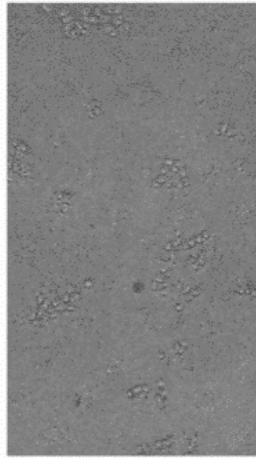
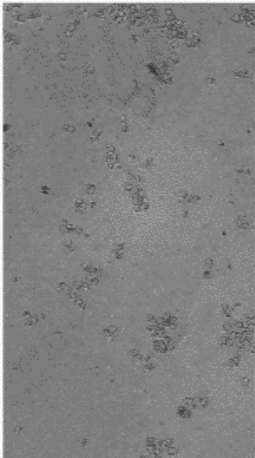
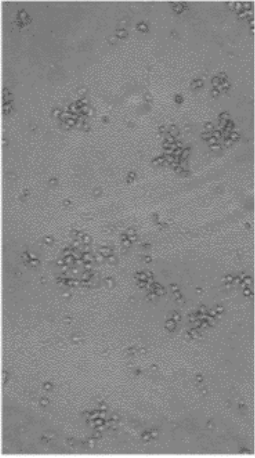
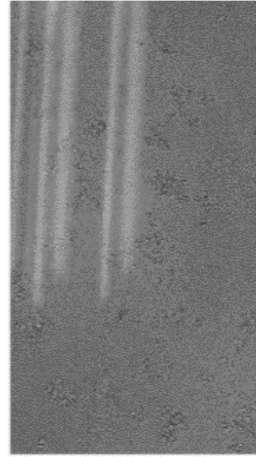
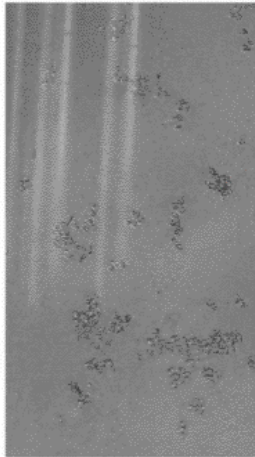
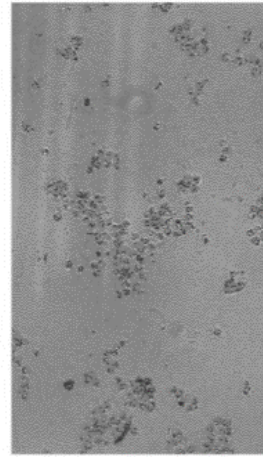
24 h

Concentration
($\mu\text{g/mL}$)

62.5

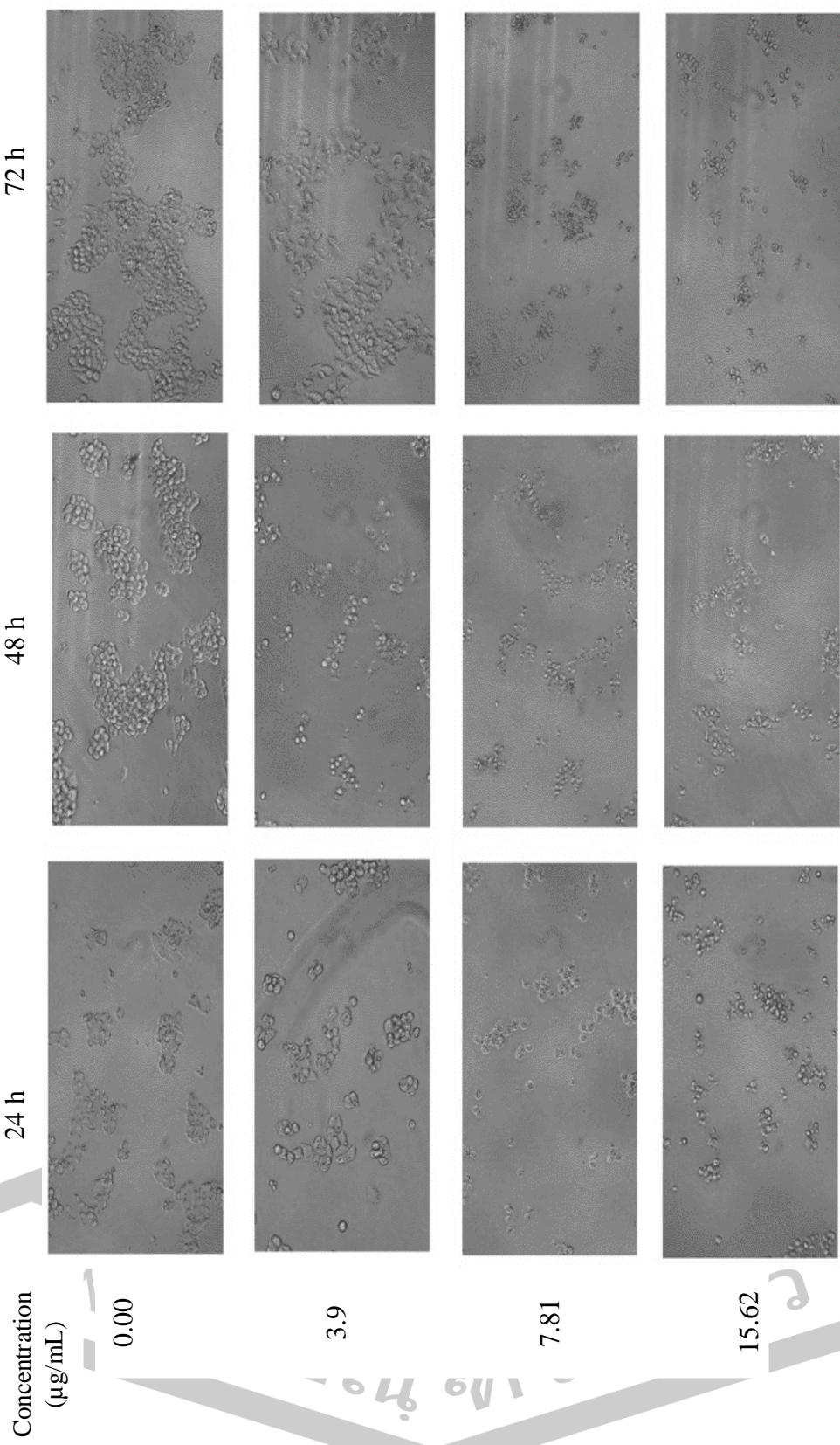
125

250

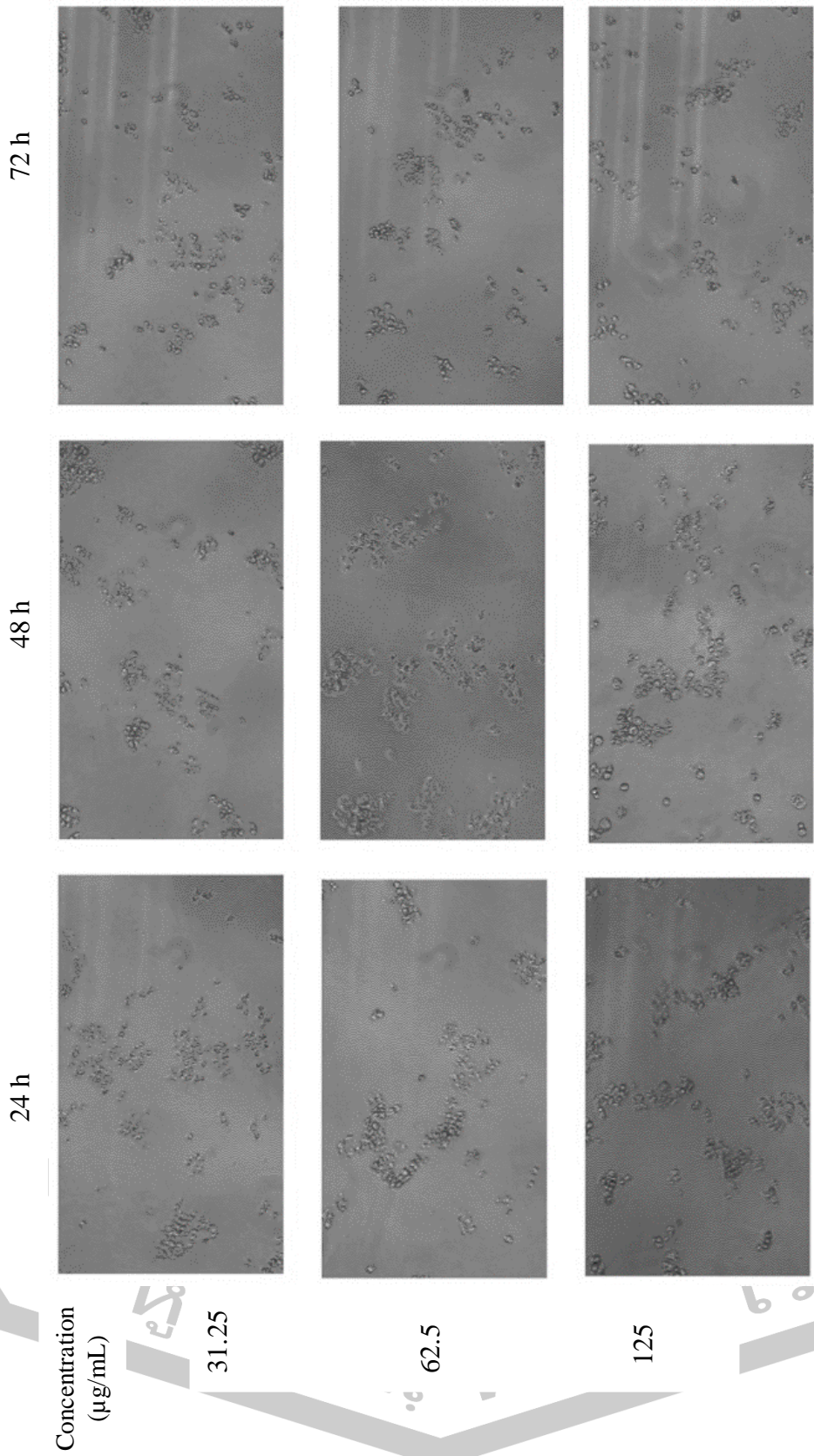


ภาพที่ 62 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ของสารสกัดหยาบจากปรีออคโคลิ (ชุดควบคุม)

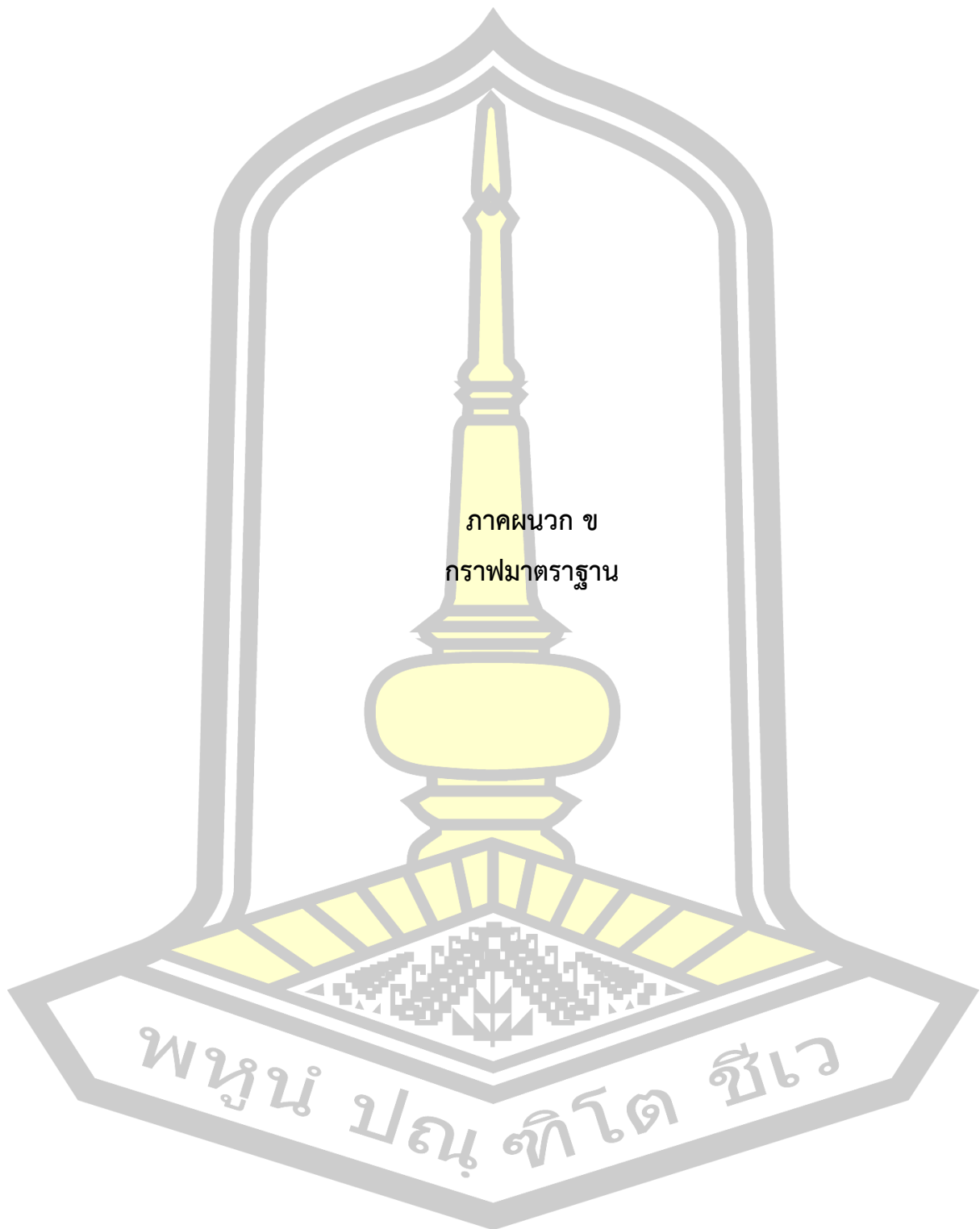
ความเข้มข้นจาก 62.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรถึง 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เวลาการบ่ม 24 28 และ 72 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 400X

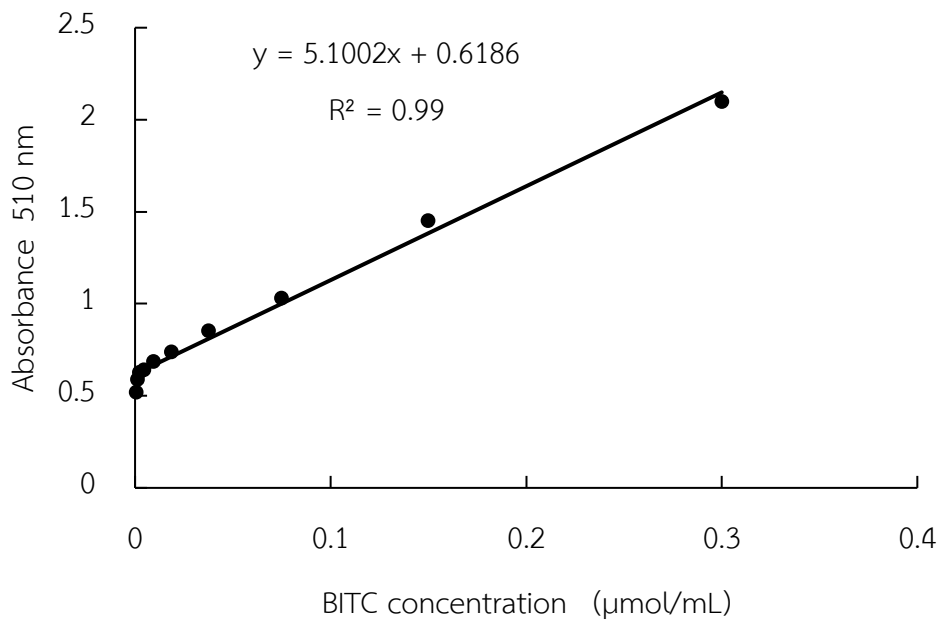


ภาพที่ 63 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ของสารเบนซิลไฮโดรโอไซยานาท (ตัวอย่างควบคุม) ความเข้มข้นจาก 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรถึง 15.62 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เวลาการบ่ม 24 28 และ 72 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 400X

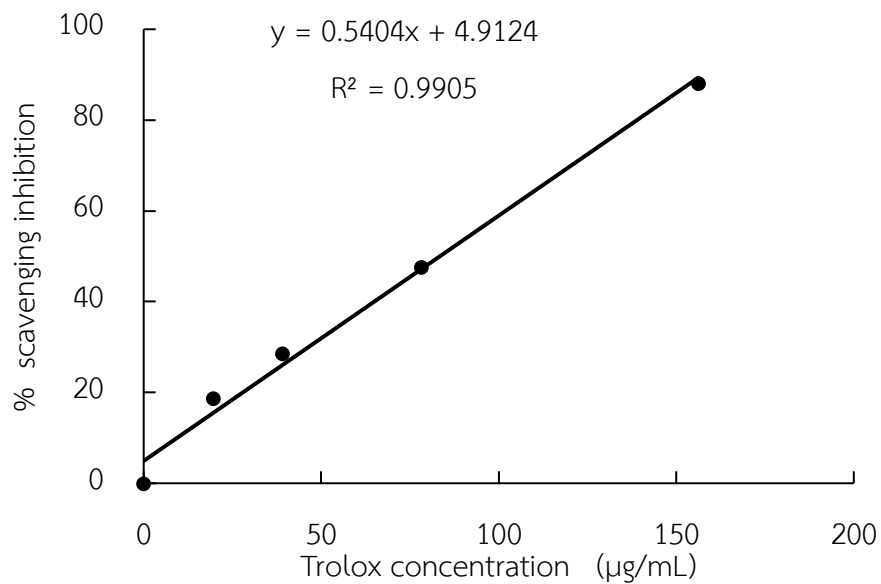


ภาพที่ 64 สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ของสารเบนซิล ไฮโซไฮเอโซยานาเท ความเข้มข้นจาก 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรถึง 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เวลาการบ่ม 24 28 และ 72 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 400X

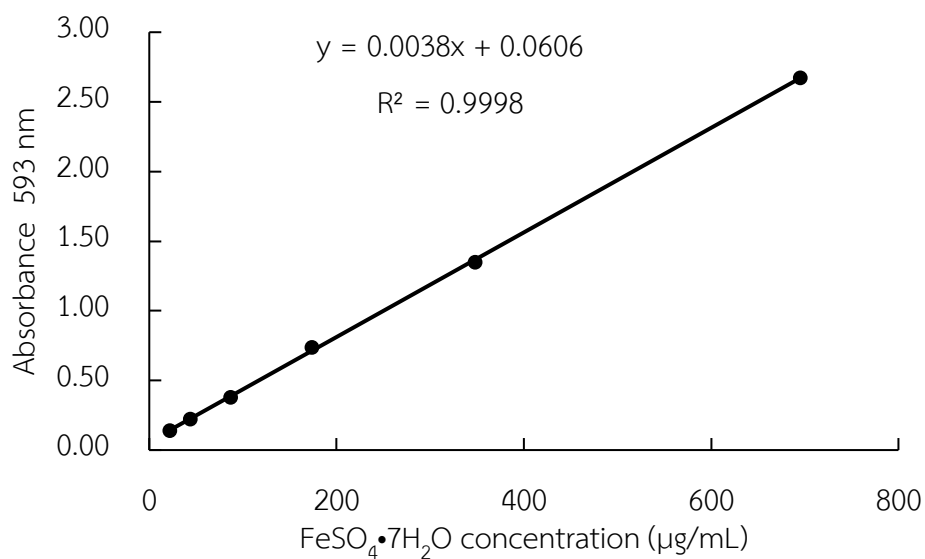




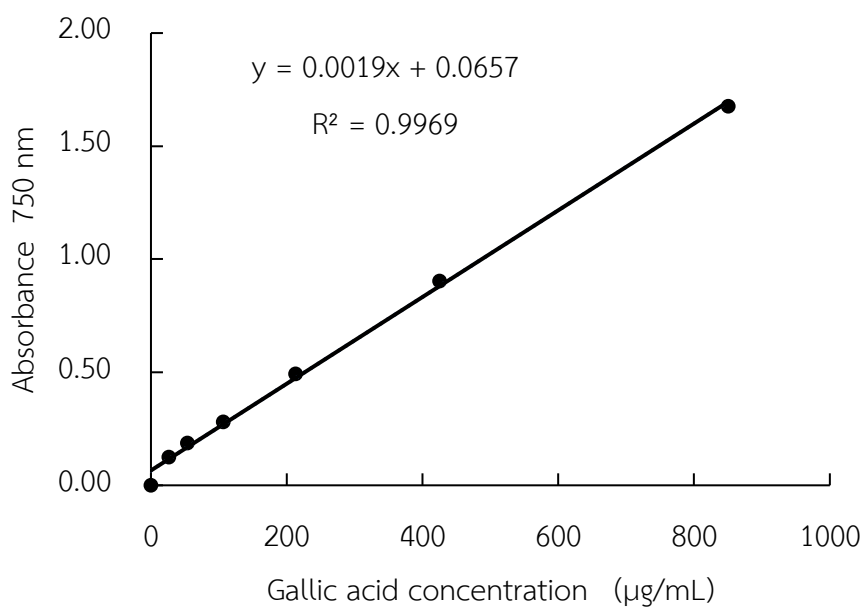
ภาพที่ 65 กราฟของสารมาตรฐานสารเบนซิลไฮโซโรไฮยานนท์



ภาพที่ 66 กราฟของสารมาตรฐานโทรลล๊อกซ์ (Trolox)

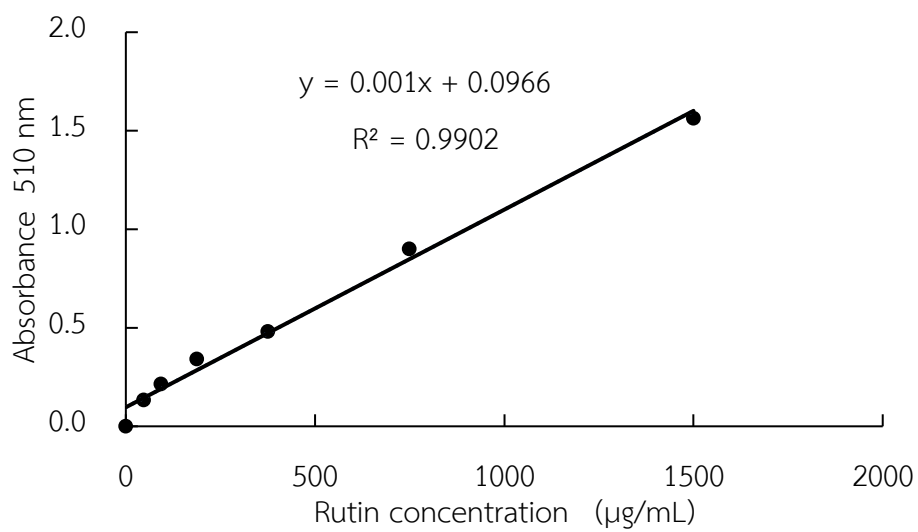


ภาพที่ 67 กราฟของสารมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)



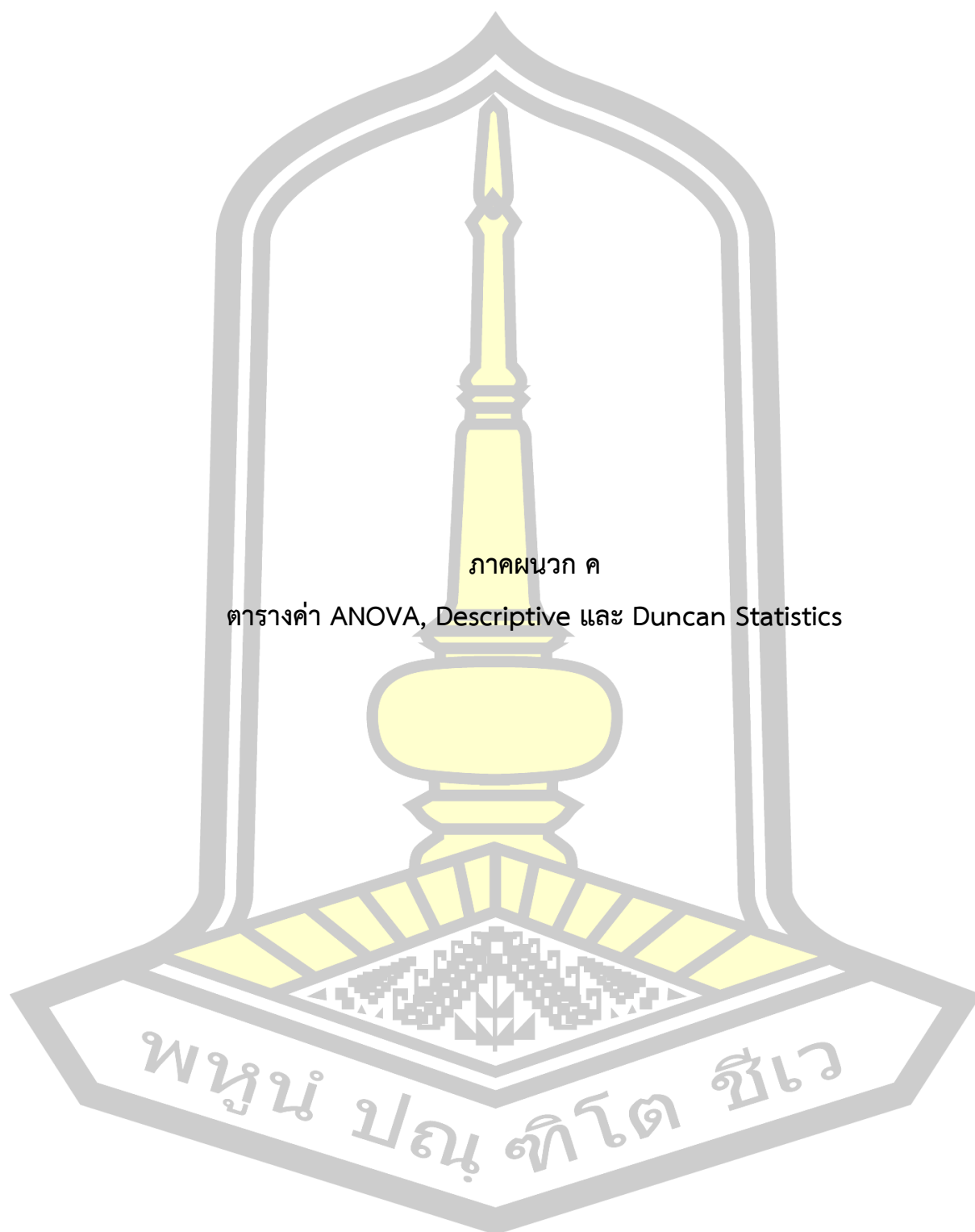
ภาพที่ 68 กราฟของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid)

พหุบัณฑิต ชีว



ภาพที่ 69 กราฟของสารมาตรฐานรูติน (Rutin)





ตารางที่ 20 แสดงตาราง Descriptive การเจริญเติบโต กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของผักกาดเขียวฉ่ำน้อย

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Germination								
Broccoli	3	85.6667	2.08167	1.20185	80.4955	90.8378	84.00	88.00
Control	3	86.6667	3.21455	1.85592	78.6813	94.6521	83.00	89.00
Plasma	3	86.6667	2.08167	1.20185	81.4955	91.8378	85.00	89.00
Plasma+Sucrose	3	83.3333	2.51661	1.45297	77.0817	89.5849	81.00	86.00
Plasma+NaCl	3	75.0000	1.00000	.57735	72.5159	77.4841	74.00	76.00
Plasma+CaCl ₂	3	86.0000	2.64575	1.52753	79.4276	92.5724	84.00	89.00
Sucrose	3	87.0000	1.00000	.57735	84.5159	89.4841	86.00	88.00
NaCl	3	72.3333	1.52753	.88192	68.5388	76.1279	71.00	74.00
CaCl ₂	3	85.3333	1.52753	.88192	81.5388	89.1279	84.00	87.00
Total	27	83.1111	5.56316	1.07063	80.9104	85.3118	71.00	89.00
Length of stem	3	5.3333	.14434	.08333	4.9748	5.6919	5.25	5.50

Control	3	6.0833	.52042	.30046	4.7905	7.3761	5.50	6.50
Plasma	3	6.1667	.38188	.22048	5.2180	7.1153	5.75	6.50
Plasma+Sucrose	3	5.8333	.28868	.16667	5.1162	6.5504	5.50	6.00
Plasma+NaCl	3	4.7500	.66144	.38188	3.1069	6.3931	4.25	5.50
Plasma+CaCl ₂	3	5.5667	.11547	.06667	5.2798	5.8535	5.50	5.70
Sucrose	3	5.1833	.35473	.20480	4.3021	6.0645	4.80	5.50
NaCl	3	4.3333	.57735	.33333	2.8991	5.7676	4.00	5.00
CaCl ₂	3	5.8333	.14434	.08333	5.4748	6.1919	5.75	6.00
Total	27	5.4537	.68035	.13093	5.1846	5.7228	4.00	6.50
Fresh weight								
Broccoli	3	22.4000	.36056	.20817	21.5043	23.2957	22.00	22.70
Control	3	28.0267	.91358	.52746	25.7572	30.2961	27.00	28.75
Plasma	3	38.3333	.57735	.33333	36.8991	39.7676	38.00	39.00
Plasma+Sucrose	3	26.7767	.50846	.29356	25.5136	28.0398	26.33	27.33
Plasma+NaCl	3	15.9667	.37528	.21667	15.0344	16.8989	15.75	16.40

Plasma+CaCl ₂	3	26.3600	1.24952	.72141	23.2560	29.4640	25.33	27.75
Sucrose	3	27.2233	.95840	.55333	24.8425	29.6041	26.67	28.33
NaCl	3	20.5567	.50954	.29418	19.2909	21.8224	20.00	21.00
CaCl ₂	3	26.3333	.57735	.33333	24.8991	27.7676	26.00	27.00
Total	27	25.7752	5.92785	1.14082	23.4302	28.1202	15.75	39.00
DPPH								
Broccoli	3	7.7467	.77520	.44756	5.8210	9.6724	7.14	8.62
Control	3	6.3900	.09644	.05568	6.1504	6.6296	6.32	6.50
Plasma	3	7.4400	.02000	.01155	7.3903	7.4897	7.42	7.46
Plasma+Sucrose	3	6.4667	.04163	.02404	6.3632	6.5701	6.42	6.50
Plasma+NaCl	3	6.6700	.45033	.26000	5.5513	7.7887	6.15	6.93
Plasma+CaCl ₂	3	5.5567	.06351	.03667	5.3989	5.7144	5.52	5.63
Sucrose	3	6.4067	.09815	.05667	6.1628	6.6505	6.35	6.52
NaCl	3	2.2300	.20664	.11930	1.7167	2.7433	2.00	2.40
CaCl ₂	3	4.8433	.11719	.06766	4.5522	5.1344	4.71	4.93

	Total	27	5.9722	1.60908	.30967	5.3357	6.6088	2.00	8.62
FRAP	Broccoli	3	22.7133	.35218	.20333	21.8385	23.5882	22.51	23.12
	Control	3	7.5800	.08718	.05033	7.3634	7.7966	7.48	7.64
	Plasma	3	15.4200	.60622	.35000	13.9141	16.9259	14.72	15.77
	Plasma+Sucrose	3	13.5000	.47885	.27647	12.3105	14.6895	13.06	14.01
	Plasma+NaCl	3	10.5733	.28746	.16597	9.8592	11.2874	10.25	10.80
	Plasma+CaCl ₂	3	7.6267	.26690	.15409	6.9637	8.2897	7.38	7.91
	Sucrose	3	11.1667	.17616	.10171	10.7291	11.6043	10.98	11.33
	NaCl	3	7.2133	.17898	.10333	6.7687	7.6579	7.06	7.41
	CaCl ₂	3	14.7933	.20207	.11667	14.2914	15.2953	14.56	14.91
		Total	27	12.2874	4.81276	.92622	10.3835	14.1913	7.06
TPC	Broccoli	3	5.7867	.32332	.18667	4.9835	6.5898	5.60	6.16
	Control	3	2.9467	.00577	.00333	2.9323	2.9610	2.94	2.95
	Plasma	3	5.0867	.04619	.02667	4.9719	5.2014	5.06	5.14

	Plasma+Sucrose	3	5.3733	.18475	.10667	4.9144	5.8323	5.16	5.48
	Plasma+NaCl	3	3.9300	.10392	.06000	3.6718	4.1882	3.81	3.99
	Plasma+CaCl ₂	3	3.8467	.03786	.02186	3.7526	3.9407	3.82	3.89
	Sucrose	3	4.6200	.10392	.06000	4.3618	4.8782	4.56	4.74
	NaCl	3	.2567	.02082	.01202	.2050	.3084	.24	.28
	CaCl ₂	3	5.1100	.06928	.04000	4.9379	5.2821	5.03	5.15
	Total	27	4.1063	1.63038	.31377	3.4613	4.7513	.24	6.16
TFC	Broccoli	3	1.6533	.05132	.02963	1.5259	1.7808	1.61	1.71
	Control	3	.0300	.01732	.01000	-.0130	.0730	.01	.04
	Plasma	3	.7033	.07506	.04333	.5169	.8898	.66	.79
	Plasma+Sucrose	3	1.4200	.03606	.02082	1.3304	1.5096	1.39	1.46
	Plasma+NaCl	3	.4967	.06028	.03480	.3469	.6464	.44	.56
	Plasma+CaCl ₂	3	.4567	.02887	.01667	.3850	.5284	.44	.49

Sucrose	3	.6700	.07937	.04583	.4728	.8672	.61	.76
NaCl	3	.1133	.02517	.01453	.0508	.1758	.09	.14
CaCl ₂	3	1.2700	.06928	.04000	1.0979	1.4421	1.19	1.31
Total	27	.7570	.55137	.10611	.5389	.9752	.01	1.71
Total ITCs	3	1.6100	.16523	.09539	1.1996	2.0204	1.50	1.80
Broccoli	3	.8633	.02309	.01333	.8060	.9207	.85	.89
Control	3	2.8567	.10408	.06009	2.5981	3.1152	2.74	2.94
Plasma	3	.9367	.16743	.09667	.5207	1.3526	.84	1.13
Plasma+Sucrose	3	1.0867	.09815	.05667	.8428	1.3305	1.03	1.20
Plasma+NaCl	3	1.9333	.12702	.07333	1.6178	2.2489	1.86	2.08
Plasma+CaCl ₂	3	1.6567	.15011	.08667	1.2838	2.0296	1.57	1.83
Sucrose	3	1.0033	.06351	.03667	.8456	1.1611	.93	1.04
NaCl	3	1.5667	.11547	.06667	1.2798	1.8535	1.50	1.70
CaCl ₂	27	1.5015	.61686	.11872	1.2575	1.7455	.84	2.94

ตารางที่ 21 แสดงตาราง ANOVA การเจริญเติบโต กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของผักกาดเขียวอ่อน

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Germination	Between Groups	8	90.833	20.962	.000
	Within Groups	18	4.333		
	Total	26			
Length of stem	Between Groups	8	.994	2.385	.060
	Within Groups	18	.417		
	Total	26			
Fresh weight	Between Groups	8	114.074	12.955	.000
	Within Groups	18	8.805		
	Total	26			
DPPH	Between Groups	8	8.125	11.386	.000
	Within Groups	18	.714		
	Total	26			

	Total	77.846	26			
FRAP	Between Groups	600.670	8	75.084	655.690	.000
	Within Groups	2.061	18	.115		
	Total	602.731	26			
TPC	Between Groups	69.321	8	8.665	363.517	.000
	Within Groups	.429	18	.024		
	Total	69.750	26			
TFC	Between Groups	7.852	8	.982	338.891	.000
	Within Groups	.052	18	.003		
	Total	7.904	26			
Total ITCs	Between Groups	8.109	8	1.014	39.261	.000
	Within Groups	.465	18	.026		
	Total	8.574	26			

ตารางที่ 22 แสดงตาราง Duncan เปอร์เซนต์การงอกของผักกาดเขียวอ่อน

Germination				
Duncan ^a				
Sample	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Broccoli	3	72.3333		
Control	3	75.0000	75.0000	
Plasma	3		78.3333	
Plasma+Sucrose	3			83.3333
Plasma+NaCl	3			85.3333
Plasma+CaCl ₂	3			86.0000
Sucrose	3			86.6667
NaCl	3			86.6667
CaCl ₂	3			87.0000
Total		.161	.085	.090
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.				
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.				

พหุ ประถมศึกษา

ตารางที่ 23 แสดงตาราง Duncan ความยาวของผักกาดเขียวอ่อน

Length of stem						
Duncan ^a						
Subset for alpha = 0.05						
Sample	N	1	2	3	4	5
Broccoli	3	4.3333				
Control	3	4.7500	4.7500			
Plasma	3	5.0000	5.0000	5.0000		
Plasma+Sucrose	3		5.1833	5.1833	5.1833	
Plasma+NaCl	3			5.5667	5.5667	5.5667
Plasma+CaCl ₂	3				5.8333	5.8333
Sucrose	3				5.8333	5.8333
NaCl	3					6.0833
CaCl ₂	3					6.1667
Sig.		.084	.251	.138	.100	.135
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.						
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.						



ตารางที่ 24 แสดงตาราง Duncan น้ำหนักสดของผักกาดเขียวอ่อน

Fresh weight					
Duncan ^a					
Sample	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Broccoli	3	15.9667			
Control	3		20.5567		
Plasma	3			26.3333	
Plasma+Sucrose	3			26.3600	
Plasma+NaCl	3			26.7767	
Plasma+CaCl ₂	3			27.2233	
Sucrose	3			28.0267	
NaCl	3				38.3333
CaCl ₂	3				38.5000
Sig.		1.000	1.000	.256	.900
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.					
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.					



ตารางที่ 25 แสดงตาราง Duncan กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH ของผักกาดเขียวอ่อน

DPPH						
Duncan ^a						
Subset for alpha = 0.05						
Sample	N	1	2	3	4	5
Broccoli	3	2.2300				
Control	3		4.8433			
Plasma	3			5.5567		
Plasma+Sucrose	3				6.3900	
Plasma+NaCl	3				6.4067	
Plasma+CaCl ₂	3				6.4667	
Sucrose	3				6.6700	
NaCl	3					7.4384
CaCl ₂	3					7.4400
Sig.		1.000	1.000	1.000	.092	.992
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.						
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.						



ตารางที่ 26 แสดงตาราง Duncan กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP ของผักกาดเขียวอ่อน

FRAP								
Duncan ^a								
Subset for alpha = 0.05								
Sample	N	1	2	3	4	5	6	7
Broccoli	3	7.2133						
Control	3	7.5800						
Plasma	3	7.6267						
Plasma+Sucrose	3		10.5733					
Plasma+NaCl	3			11.1667				
Plasma+CaCl ₂	3				13.5000			
Sucrose	3					14.7933		
NaCl	3						15.4200	
CaCl ₂	3							22.7123
Sig.		.164	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.								
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.								



ตารางที่ 27 แสดงตาราง Duncan ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของผักกาดเขียวอ่อน

TPC								
Duncan ^a								
Subset for alpha = 0.05								
Sample	N	1	2	3	4	5	6	7
Broccoli	3	.2567						
Control	3		2.9467					
Plasma	3			3.8467				
Plasma+Sucrose	3			3.9300				
Plasma+NaCl	3				4.6200			
Plasma+CaCl ₂	3					5.0867		
Sucrose	3					5.1100		
NaCl	3						5.3733	
CaCl ₂	3							5.7846
Sig.		1.000	1.000	.469	1.000	.838	1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.								
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.								



ตารางที่ 28 แสดงตาราง Duncan ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของผักกาดเขียวอ่อน

TFC							
Duncan ^a							
Sample	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
Broccoli	3	.0183					
Control	3	.0300	.0300				
Plasma	3		.1133				
Plasma+Sucrose	3			.4567			
Plasma+NaCl	3			.4967			
Plasma+CaCl ₂	3				.6700		
Sucrose	3				.7033		
NaCl	3					1.2700	
CaCl ₂	3						1.4200
Sig.		.784	.062	.352	.436	1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.							
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.							



ตารางที่ 29 แสดงตาราง Duncan ปริมาณสารไอโซโทไอไซยานเนททั้งหมดของผักกาดเขียวอ่อน

Total ITCs							
Duncan ^a							
Sample	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
Broccoli	3	.8633					
Control	3	.9367	.9367				
Plasma	3	1.0033	1.0033				
Plasma+Sucrose	3		1.0867				
Plasma+NaCl	3			1.5667			
Plasma+CaCl ₂	3			1.6567	1.6567		
Sucrose	3				1.7767	1.7767	
NaCl	3					1.9333	
CaCl ₂	3						2.8567
Sig.		.152	.127	.325	.194	.095	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.							
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.							



ตารางที่ 30 แสดงตาราง Descriptive การเจริญเติบโต กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของผักชีทูต

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Germination								
Broccoli	3	78.3333	3.21455	1.85592	70.3479	86.3187	76.00	82.00
Control	3	92.6667	4.16333	2.40370	82.3244	103.0090	88.00	96.00
Plasma	3	91.6667	2.88675	1.66667	84.4956	98.8378	90.00	95.00
Plasma+Sucrose	3	89.6667	4.93288	2.84800	77.4127	101.9206	84.00	93.00
Plasma+NaCl	3	91.0000	4.58258	2.64575	79.6163	102.3837	87.00	96.00
Plasma+CaCl ₂	3	93.6667	2.08167	1.20185	88.4955	98.8378	92.00	96.00
Sucrose	3	89.3333	2.51661	1.45297	83.0817	95.5849	87.00	92.00
NaCl	3	96.6667	1.52753	.88192	92.8721	100.4612	95.00	98.00
CaCl ₂	3	87.3333	7.50555	4.33333	68.6885	105.9782	80.00	95.00
Total	27	90.0370	6.00949	1.15653	87.6598	92.4143	76.00	98.00
Length of stem								
Broccoli	3	5.0000	.43301	.25000	3.9243	6.0757	4.50	5.25
Control	3	14.2500	.25000	.14434	13.6290	14.8710	14.00	14.50
Plasma	3	14.6667	.38188	.22048	13.7180	15.6153	14.25	15.00

	Plasma+Sucrose	3	11.4167	.38188	.22048	10.4680	12.3653	11.00	11.75
	Plasma+NaCl	3	14.5000	.75000	.43301	12.6369	16.3631	13.75	15.25
	Plasma+CaCl ₂	3	14.0000	1.14564	.66144	11.1541	16.8459	13.00	15.25
	Sucrose	3	11.8333	.28868	.16667	11.1162	12.5504	11.50	12.00
	NaCl	3	14.5000	.86603	.50000	12.3487	16.6513	14.00	15.50
	CaCl ₂	3	14.2500	0.10000	0.00000	14.2500	14.2500	14.25	14.25
	Total	27	12.7130	3.05141	.58724	11.5059	13.9201	4.50	15.50
Fresh weight	Broccoli	3	38.5000	4.27200	2.46644	27.8878	49.1122	34.50	43.00
	Control	3	253.8333	7.00595	4.04489	236.4296	271.2371	246.00	259.50
	Plasma	3	246.5000	4.76970	2.75379	234.6514	258.3486	241.00	249.50
	Plasma+Sucrose	3	172.8333	1.01036	.58333	170.3235	175.3432	171.75	173.75
	Plasma+NaCl	3	206.5833	4.25979	2.45939	196.0014	217.1652	202.50	211.00
	Plasma+CaCl ₂	3	253.6667	2.74241	1.58333	246.8541	260.4792	250.50	255.25
	Sucrose	3	163.0000	17.41407	10.05402	119.7410	206.2590	149.00	182.50
	NaCl	3	273.1110	6.46605	3.73318	257.0484	289.1736	265.67	277.33
	CaCl ₂	3	274.7777	9.64019	5.56576	250.8301	298.7252	267.33	285.67
	Total	27	209.2006	73.42022	14.12973	180.1565	238.2447	34.50	285.67

DPPH	Broccoli	3	7.4384	.01847	.01066	7.3926	7.4843	7.42	7.46
	Control	3	5.4255	.11533	.06659	5.1390	5.7120	5.33	5.55
	Plasma	3	7.7093	.08530	.04925	7.4974	7.9212	7.66	7.81
	Plasma+Sucrose	3	7.4200	.24220	.13984	6.8183	8.0216	7.16	7.64
	Plasma+NaCl	3	7.4083	.21372	.12339	6.8773	7.9392	7.22	7.64
	Plasma+CaCl ₂	3	7.5782	.13398	.07735	7.2454	7.9110	7.43	7.70
	Sucrose	3	7.4508	.14813	.08552	7.0828	7.8187	7.31	7.60
	NaCl	3	7.6872	.24844	.14344	7.0701	8.3044	7.40	7.85
	CaCl ₂	3	4.7483	.24103	.13916	4.1495	5.3470	4.52	5.00
	Total	27	6.9851	1.06259	.20450	6.5648	7.4055	4.52	7.85
	FRAP	Broccoli	3	22.7123	.34945	.20175	21.8442	23.5804	22.51
Control		3	16.8351	.79878	.46117	14.8508	18.8194	16.12	17.69
Plasma		3	21.7211	.31906	.18421	20.9285	22.5136	21.35	21.91
Plasma+Sucrose		3	20.8263	.18232	.10526	20.3734	21.2792	20.62	20.93
Plasma+NaCl		3	20.3351	.74448	.42982	18.4857	22.1845	19.91	21.19
Plasma+CaCl ₂		3	19.2474	1.82321	1.05263	14.7183	23.7765	18.19	21.35
Sucrose		3	17.2561	.16713	.09649	16.8410	17.6713	17.06	17.35

	NaCl	3	22.3175	.24309	.14035	21.7137	22.9214	22.04	22.46
	CaCl ₂	3	10.0544	.12155	.07018	9.7524	10.3563	9.98	10.19
	Total	27	19.0339	3.84851	.74065	17.5115	20.5563	9.98	23.12
TPC	Broccoli	3	5.7846	.32666	.18860	4.9732	6.5961	5.60	6.16
	Control	3	6.3680	.12436	.07180	6.0590	6.6769	6.23	6.46
	Plasma	3	7.5610	.10635	.06140	7.2968	7.8252	7.44	7.62
	Plasma+Sucrose	3	6.8943	.09876	.05702	6.6490	7.1396	6.78	6.95
	Plasma+NaCl	3	5.5346	.05318	.03070	5.4026	5.6667	5.50	5.60
	Plasma+CaCl ₂	3	7.2189	.18153	.10481	6.7679	7.6698	7.08	7.43
	Sucrose	3	5.6706	.26588	.15351	5.0101	6.3311	5.52	5.98
	NaCl	3	6.7759	.18992	.10965	6.3041	7.2477	6.56	6.89
	CaCl ₂	3	4.0259	.24309	.14035	3.4220	4.6298	3.89	4.31
	Total	27	6.2038	1.05161	.20238	5.7878	6.6198	3.89	7.62
TFC	Broccoli	3	.0183	.01443	.00833	-.0175	.0542	.01	.04
	Control	3	.7183	.07638	.04410	.5286	.9081	.64	.79
	Plasma	3	.0267	.01443	.00833	-.0092	.0625	.01	.04
	Plasma+Sucrose	3	.9683	.09465	.05465	.7332	1.2035	.86	1.04
	Plasma+NaCl	3	.4433	.11815	.06821	.1498	.7368	.31	.54

Total ITCs	Plasma+CaCl ₂	3	.0267	.01443	.00833	-.0092	.0625	.01	.04
	Sucrose	3	.1517	.05774	.03333	.0082	.2951	.09	.19
	NaCl	3	.9517	.06292	.03632	.7954	1.1080	.89	1.01
	CaCl ₂	3	1.6517	.05204	.03005	1.5224	1.7809	1.61	1.71
	Total	27	.5507	.54826	.10551	.3339	.7676	.01	1.71
	Broccoli	3	1.7767	.04041	.02333	1.6763	1.8771	1.73	1.80
	Control	3	1.0067	.06110	.03528	.8549	1.1584	.94	1.06
	Plasma	3	1.1800	.08660	.05000	.9649	1.3951	1.13	1.28
	Plasma+Sucrose	3	.9167	.07095	.04096	.7404	1.0929	.84	.98
	Plasma+NaCl	3	.8200	.03464	.02000	.7339	.9061	.78	.84
	Plasma+CaCl ₂	3	1.3333	.04619	.02667	1.2186	1.4481	1.28	1.36
	Sucrose	3	.9600	.01732	.01000	.9170	1.0030	.94	.97
	NaCl	3	.7233	.04041	.02333	.6229	.8237	.70	.77
	CaCl ₂	3	1.2467	.04041	.02333	1.1463	1.3471	1.20	1.27
	Total	27	1.1070	.31105	.05986	.9840	1.2301	.70	1.80

ตารางที่ 31 แสดงตาราง ANOVA การเจริญเติบโต กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของผักชีทูต

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Germination	Between Groups	637.630	8	79.704	4.761	.003
	Within Groups	301.333	18	16.741		
	Total	938.963	26			
Length of stem	Between Groups	235.588	8	29.448	81.550	.000
	Within Groups	6.500	18	.361		
	Total	242.088	26			
Fresh weight	Between Groups	139044.200	8	17380.525	281.966	.000
	Within Groups	1109.528	18	61.640		
	Total	140153.727	26			
DPPH	Between Groups	28.787	8	3.598	113.645	.000
	Within Groups	.570	18	.032		
	Total	29.357	26			
FRAP	Between Groups	375.336	8	46.917	86.610	.000
	Within Groups	9.751	18	.542		

	Total	385.086	26			
TPC	Between Groups	28.063	8	3.508	91.543	.000
	Within Groups	.690	18	.038		
	Total	28.753	26			
TFC	Between Groups	7.736	8	.967	221.041	.000
	Within Groups	.079	18	.004		
	Total	7.815	26			
Total ITCs	Between Groups	2.783	8	.348	57.695	.000
	Within Groups	.109	18	.006		
	Total	2.892	26			

ตารางที่ 32 แสดงตาราง Duncan เปอร์เซนต์การงอกของผักชีหูด

Germination				
Duncan ^a				
Sample	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Broccoli	3	78.3333		
Control	3		87.3333	
Plasma	3		89.3333	89.3333
Plasma+Sucrose	3		89.6667	89.6667
Plasma+NaCl	3		91.0000	91.0000
Plasma+CaCl ₂	3		91.6667	91.6667
Sucrose	3		92.6667	92.6667
NaCl	3		93.6667	93.6667
CaCl ₂	3			96.6667
Sig.		1.000	.111	.068
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.				
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.				

พหุ ประถมศึกษา ชีวะ

ตารางที่ 33 แสดงตาราง Duncan ความยาวของผักขี้หูด

Length of stem				
Duncan ^a				
Sample	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Broccoli	3	5.0000		
Control	3		11.4167	
Plasma	3		11.8333	
Plasma+Sucrose	3			14.0000
Plasma+NaCl	3			14.2500
Plasma+CaCl ₂	3			14.2500
Sucrose	3			14.5000
NaCl	3			14.5000
CaCl ₂	3			14.6667
Sig.		1.000	.407	.242
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.				
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.				

ตารางที่ 34 แสดงตาราง Duncan น้ำหนักสดของผักชีหูด

Fresh weight						
Duncan ^a						
		Subset for alpha = 0.05				
Sample	N	1	2	3	4	5
Broccoli	3	38.5000				
Control	3		163.0000			
Plasma	3		172.8333			
Plasma+Sucrose	3			206.5833		
Plasma+NaCl	3				246.5000	
Plasma+CaCl ₂	3				253.6667	
Sucrose	3				253.8333	
NaCl	3					273.1110
CaCl ₂	3					274.7777
Sig.		1.000	.142	1.000	.293	.798
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.						
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.						

ตารางที่ 35 แสดงตาราง Duncan กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH ของผักชีหูด

DPPH				
Duncan ^a				
Sample	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Broccoli	3	4.7483		
Control	3		5.4255	
Plasma	3			7.4083
Plasma+Sucrose	3			7.4200
Plasma+NaCl	3			7.4384
Plasma+CaCl ₂	3			7.4508
Sucrose	3			7.5782
NaCl	3			7.6872
CaCl ₂	3			7.7093
Sig.		1.000	1.000	.084
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.				
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.				
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.				

ตารางที่ 36 แสดงตาราง Duncan กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP ของผักขี้หูด

FRAP							
Duncan ^a							
Sample	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
Broccoli	3	10.0544					
Control	3		16.8351				
Plasma	3		17.2561				
Plasma+Sucrose	3			19.2474			
Plasma+NaCl	3			20.3351	20.3351		
Plasma+CaCl ₂	3				20.8263	20.8263	
Sucrose	3					21.7211	21.7211
NaCl	3						22.3175
CaCl ₂	3						22.7123
Sig.		1.000	.492	.087	.424	.154	.135
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.							
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.							

พหุ ประถมศึกษา

ตารางที่ 37 แสดงตาราง Duncan ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของผักชีหูด

TPC							
Duncan ^a							
Sample	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
Broccoli	3	4.025 9					
Control	3		5.5346				
Plasma	3		5.6706				
Plasma+Sucrose	3		5.7846				
Plasma+NaCl	3			6.3680			
Plasma+CaCl ₂	3				6.7759		
Sucrose	3				6.8943	6.8943	
NaCl	3					7.2189	
CaCl ₂	3						7.5610
Sig.		1.000	.155	1.000	.468	.057	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.							
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.							

ตารางที่ 38 แสดงตาราง Duncan ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของผักชีหูด

TFC							
Duncan ^a							
Sample	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
Broccoli	3	.0183					
Control	3	.0267					
Plasma	3	.0267					
Plasma+Sucrose	3		.1517				
Plasma+NaCl	3			.4433			
Plasma+CaCl ₂	3				.7183		
Sucrose	3					.9517	
NaCl	3					.9683	
CaCl ₂	3						1.6517
Sig.		.886	1.000	1.000	1.000	.761	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.							
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.							

ตารางที่ 39 แสดงตาราง Duncan ปริมาณสารไอโซโอสายานะทั้งหมดของผักชีหูด

TotalITCMmol3							
Duncan ^a							
Sample	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
Broccoli	3	.7233					
Control	3		.8200				
Plasma	3			.9167			
Plasma+Sucrose	3			.9600			
Plasma+NaCl	3			1.0067			
Plasma+CaCl ₂	3				1.1800		
Sucrose	3				1.2467	1.2467	
NaCl	3					1.3333	
CaCl ₂	3						1.7767
Sig.		1.000	1.000	.061	.137	.058	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.							
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.							

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายวรโชติ แสงหา
วันเกิด	วันที่ 28 มีนาคม พ.ศ. 2536
สถานที่เกิด	จังหวัดขอนแก่น ประเทศไทย
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	42 หมู่ 2 ตำบลนาคำ อำเภออุบลรัตน์ จังหวัดขอนแก่น 40250
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2556 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ประเทศไทย พ.ศ. 2560 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ประเทศไทย
ทุนวิจัย	<p>1. พ.ศ. 2560 ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยและส่งเสริมการทำปริญญานิพนธ์สำหรับนิสิตระดับปริญญาตรี คณะเทคโนโลยีงบประมาณเงินรายได้ ประจำปี พ.ศ. 2560 เรื่อง การจำแนกจุลินทรีย์และผู้ผลิตเอ็กโซโพลีแซกคาไรด์จากคีเฟอร์น้ำในประเทศไทย จำนวน 2,500 บาท</p> <p>2. พ.ศ. 2561 ได้รับทุน สวทช. โครงการพัฒนาศักยภาพบุคลากร STEM เพื่อการวิจัย และพัฒนาอุตสาหกรรม พ.ศ. 2561 เรื่องนวัตกรรมเทคโนโลยีพลาสมาเย็นกระตุ้นการเจริญเติบโตและการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในไมโครกรีนของผักท้องถิ่นไทย จำนวน 120,000 บาท</p> <p>3. พ.ศ. 2561ได้รับทุนการวิจัยภายใต้แผนงานเสริมสร้างศักยภาพและพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ ตามทิศทางการยุทธศาสตร์การวิจัยและนวัตกรรม ประจำปี พ.ศ. 2562 ประเภทบัณฑิตศึกษา เรื่องอิทธิพลของเทคโนโลยีพลาสมาเย็นและสารกระตุ้นอินทรีย์ต่อสารกลูโคซิโนเลท ไอโซไรโอไซยานาทและฤทธิ์ทางชีวภาพในไมโครกรีนของผักท้องถิ่นไทย จำนวน 67,500 บาท</p>
ผลงานวิจัย	<p>ผลงานวิจัยระดับนานาชาติ</p> <p>1. Saengha, W.*, Karirat, T., Buranrat, B., Matra, K., Deeseenthum, D. & Luang-In, V. (2019) Plasma Technology and Abiotic Elicitor Effectively Increased Isothiocyanates, Bioactive Compounds and Cytotoxicity against Caco2 Cells in Mustard Green Microgreen Extract. The 6th ICoFAB 2019 Proceedings, 26 & 27 AUGUST 2019 at Taksila Hotel, Maha Sarakham Province,</p>

Thailand. doi:10.14457/MSU.res.2019.23

2. Luang-In, V.*, Yotchaisarn, M., Saengha, W., Udomwong, P., Deeseenthum, S. & Maneewan, K. (2019) Isolation and Identification of Amylase-producing Bacteria from Soil in Nasinuan Community Forest, Maha Sarakham, Thailand. *Biomedical & Pharmacology Journal*. Vol. 12(3), p. 1061-1068. Scopus Q4.

3. Luang-In, V.*, Yotchaisarn, M., Saengha, W., Udomwong, P., Deeseenthum, S. & Maneewan, K. (2019) Protease-Producing Bacteria from Soil in Nasinuan Community Forest, Mahasarakham Province, Thailand. *Biomedical & Pharmacology Journal*. Vol. 12(2), p. 587-595. Scopus Q4.

4. Yotchaisarn, M. *, Saengha, W., Karirat, T., Deeseenthum, S., Maneewan, K. & Luang-In, V. (2018) Identification of Cellulase-Producing Bacteria from Soil in Nasinuan Forest, Kantarawichai District, Mahasarakham Province. *The 5th ICoFAB 2018 Proceedings*, 30-31 August 2018, Mahasarakham University, Thailand. Doi. 10.14457/MSU.res.2018.31

5. Luang-In, V.*, Saengha, W., Yotchaisarn, M., Halaslova, M., Udomwong, P. & Deeseenthum, S. (2018) Microbial Strains and Bioactive Exopolysaccharide Producers from Thai Water Kefir. *Microbiology and Biotechnology Letters*. 46(4),403-415. Scopus Q4.

6. Luang-In, V.*, Deeseenthum, S., Udomwong, P., Saengha, W., & Gregori, M. (2018) Formation of sulforaphane and iberin products from Thai cabbage fermented by myrosinase-positive bacteria. *Molecules*. 23(4). Impact Factor = 3.06 (ISI Q2).

7. Luang-In, V.*, Saengha, W. & Deeseenthum, S. (2018) Characterization and bioactivities of a novel exopolysaccharide produced from lactose by *Bacillus tequilensis* PS21 isolated

from Thai milk kefir. *Microbiology and Biotechnology Letters*. 46(1),9–17. Scopus Q4.

การนำเสนอผลงานทางวิชาการระดับนานาชาติ

1. Saengha, W.* , Karirat, T., Buranrat, B., Matra, K., Deeseenthum, D., and Luang-In, V. (2019) Effect of Non-Thermal Plasma Treatment on Isothiocyanate, Bioactive Compounds and Cytotoxicity in Mustard Green Microgreen. The 6th ICoFAB 2019 Proceedings, 26 & 27 AUGUST 2019 at Taksila Hotel, Maha Sarakham Province, Thailand. (Poster presentation)

2. Sangsopha, J., Saengha, W., Luang-In, V., and Moongngarm, A.* (2019) Different Drying Methods Affected Bioactive Compounds, Antioxidant Capacity, and Cytotoxicity of Mulberry Leaf Tea. The 6th ICoFAB 2019 Proceedings, 26 & 27 AUGUST 2019 at Taksila Hotel, Maha Sarakham Province, Thailand. (Poster presentation)

3. Karirat, T.* , Saengha, W., Luang-In, V., and Deeseenthum, D. (2019) Exopolysaccharide Production from Riceberry Broken Rice by *Bacillus* spp. and Bioactivity Aspects. The 6th ICoFAB 2019 Proceedings, 26 & 27 AUGUST 2019 at Taksila Hotel, Maha Sarakham Province, Thailand. (Poster presentation)

4. Saengha, W.* , Luang-In, V., Matra, K., Deeseenthum, S. (2018) Non-thermal Plasma treatment on Bioactive Compounds of Thai Local Cruciferous Microgreens. The 5th International Conference on Food, Agriculture and Biotechnology (ICoFAB 2018), 30th August 2018, Siamtara Palace Hotel, Mahasarakham, Thailand. (Poster presentation)

5. Luang-In, V.* , Saengha, W., Udomwong, P., Deeseenthum, S. & Rossiter, J.T. Glucosinolate-metabolizing bacteria isolated from Thai fermented foods as a starter culture for a traditional Thai fermented cabbage to produce

chemopreventive sulforaphane and iberin. The 4th International Postgraduate Symposium on Food, Agriculture & Biotechnology in ASEAN 2017 (IPSFAB2017), 30-31 August, 2017. Faculty of Technology, Maharakham University, Thailand. (Poster presentation)

6. Luang-In, V*, Saengha, W., Deeseenthum, S.

Characterization and bioactivities of a novel exopolysaccharide produced from lactose by *Bacillus tequilensis* PS21 isolated from Thai milk kefir. The 4th International Postgraduate Symposium on Food, Agriculture & Biotechnology in ASEAN 2017 (IPSFAB2017), 30-31 August, 2017. Faculty of Technology, Maharakham University, Thailand. (Poster presentation)

7. Luang-In, V.*, Saengha, W., Chachai, K., Deeseenthum, S.

Identification of microbes and exopolysaccharide producers from Thai water kefir. The 3rd International Postgraduate Symposium on Food, Agriculture & Biotechnology in ASEAN 2016 (IPSFAB2016), 7-8 September, 2016. Faculty of HUSOC, Maharakham University, Thailand. (Poster presentation)

8. Saengha, W., Puykamsing, P., Tangthong, P., Luang-In, V*.

Exopolysaccharide-producing microbes isolated from water kefir. The 2nd International Postgraduate Symposium on Food, Agriculture & Biotechnology 2015 (IPSFAB2015), 17-18 August, 2015. Faculty of Technology, Maharakham University, Thailand. (Poster presentation)

REFEREES

1. Assistant Professor Vijitra Luang-In PhD. Natural Antioxidant Innovation Research Unit, Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Maharakham University. E-mail: vijitra.l@msu.ac.th

2. Assistant Professor Sirirat Deeseenthum PhD. Natural Antioxidant Innovation Research Unit, Department of

Biotechnology, Faculty of Technology, Mahasarakham
University. E-mail: sirirat.d@msu.ac.th

3. Associate Professor Benjaporn Buranrat PhD. Faculty of
Medicine, Mahasarakham University. E-mail: buranrat@gmail.com

