

รหัสโครงการ SUT1-104-45-24-14



รายงานการวิจัย

การศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นต่อระบบภูมิคุ้มกันของสารสกัดจาก
เปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม (*Tamarindus indica* Linn)

A Preliminary Study of Immunomodulatory Activity of Extracts
from Seed Coat of Ma Khaam (*Tamarindus indica* Linn)

ผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เบญจมาศ จิตรสมบูรณ์

สาขาวิชาชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2545

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤษภาคม 2561

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2545 ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความสำคัญและให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยนี้อย่างต่อเนื่องรวมทั้งความอดกลั้นที่โครงการนี้ล่าช้ากว่ากำหนดมาก ขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สำหรับสถานที่ทำการวิจัย อุปกรณ์และเครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัย ตลอดจนการอำนวยความสะดวกและบริการในทุก ๆ ส่วนที่เกี่ยวข้อง ผู้วิจัยขอขอบคุณ ผศ. ดร. ฐานยา โกมุทรินทร์ คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ซึ่งในขณะนั้นเป็นนักศึกษาปริญญาเอกกาญจนาภิเษก และผู้ช่วยวิจัยของโครงการ ขอขอบคุณ Prof. Dr. Albert E Munson และ Dr. Jean Meade อาจารย์ที่ปรึกษาที่ให้คำแนะนำ เอื้ออำนวยสถานที่วิจัย รวมทั้งดูแลนักศึกษาเป็นอย่างดีในขณะที่ทำวิจัยในห้องปฏิบัติการวิจัยที่ National Institute for Occupational Safety and Health, West Virginia, ประเทศสหรัฐอเมริกา ขอขอบคุณ Prof. Dr. Kimber White ที่เอื้ออำนวยให้ผู้วิจัยไปใช้ห้องปฏิบัติการ immunotoxicology ที่ Medical College of Virginia, VA ประเทศสหรัฐอเมริกา ในการทดสอบ Mishell Dutton assay และขอขอบคุณ ดร. วิมลณัฐ อัดโชติ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกและดูแลเป็นอย่างดีในขณะที่ทำวิจัยในขณะนั้น ขอขอบคุณศาสตราจารย์ ดร. ไมตรี สุทธิจิตต์ที่ช่วยประสานหาทุนให้ไปทำวิจัยที่ Medical College of Virginia ผ่านโครงการพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพื่อเสริมสุขภาพและความงาม ในโครงการส่งเสริมสมรรถนะและขีดความสามารถในการแข่งขันของประเทศ คณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ประจำปี 2546

ท้ายสุดขอกราบบูชาพระคุณของคุณพ่อ-คุณแม่ ที่ให้ความรัก ความอบอุ่น อบรมสั่งสอนและดูแลลูกอย่างดีที่สุด ขอกราบขอบพระคุณครูอาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้ ความรักและเมตตาอบรมสั่งสอนศิษย์เสมอมา ท้ายสุดขอขอบคุณครอบครัว รศ. ดร. ทวีข จิตรสมบุญ และ นายโพธิพล จิตรสมบุญที่เป็นขวัญและกำลังใจ เป็นน้ำหล่อเลี้ยงให้มีพลังในการทำงาน จนสามารถฟันฝ่าอุปสรรคทั้งปวง

เบญจมาศ จิตรสมบุญ

หัวหน้าโครงการวิจัย

บทคัดย่อ

สารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม (TAM) มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากมีงานวิจัยที่แสดงว่าพืชสมุนไพรที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ สามารถออกฤทธิ์ต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันร่วมด้วย งานวิจัยนี้ จึงศึกษาผลของ TAM ต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันทั้งแบบไม่จำเพาะ (innate immunity) และแบบจำเพาะ (acquired immunity) ในโมเดลของหนูเม้าส์ เซลล์ม้ามจากหนูเม้าส์ B6C3F1 ที่ได้รับสารสกัด TAM 0.1-10 µg/ml ใน *in vitro* ไม่มีการเปลี่ยนการเจริญและการแบ่งเซลล์ของ lymphocyte ในการตอบสนองต่อ T เซลล์ mitogen concanavalin A สารสกัด TAM 10 µg/ml สามารถลดการตอบสนองต่อ allogeneic เซลล์ซึ่งเป็นเซลล์ม้ามของหนูเม้าส์ DBA/2 ในวิธีการทดสอบแบบ one-way mixed lymphocyte reaction การศึกษาการใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงแกะกระตุ้นเซลล์ม้าม เพื่อให้สร้าง antibody ใน *in vitro* ด้วยวิธีทดสอบ Mishell Dutton พบว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม TAM ที่ 1 และ 5 µg/ml สามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ที่สร้าง antibody (AFC) ต่อ culture ได้ร้อยละ 32 และ ร้อยละ 43 ตามลำดับ ($p < 0.05$) หรือเมื่อแสดงค่าเป็น AFC ต่อ 1 ล้านเซลล์เท่ากัน TAM ที่ 1 และ 5 µg/ml มีค่า AFC/ 10^6 เซลล์ เพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมร้อยละ 33.5 และ ร้อยละ 58 ตามลำดับ การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ใน *in vitro* พบว่า เซลล์มะเร็งสายพันธุ์มีความไวต่อสารสกัด TAM แตกต่างกัน นอกจากนั้น เซลล์สายพันธุ์ RAW264.7 ที่ได้รับ TAM 0.2-200 µg/ml ใน *in vitro* มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO) ที่ถูกชักนำให้สร้างขึ้นโดย 10 µg/ml lipopolysaccharide (LPS) และ 10 ng/ml interferon-gamma (IFN- γ) โดยการยับยั้งเกิดได้สูงสุดถึงร้อยละ 68 ($p < 0.01$) และการยับยั้งแปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น นอกจากนั้น การกระตุ้นการสร้าง NO ด้วย 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, LPS และ/หรือ IFN- γ ในเซลล์ macrophage ที่เตรียมได้จากช่องท้องของหนูเม้าส์ B6C3F1 ที่ได้รับการป้อนทางปากด้วยสารสกัด TAM 100-500 mg/kg เป็นเวลา 14 วัน ก็ถูกยับยั้งได้เช่นกัน โดยการยับยั้งขึ้นกับปริมาณสารสกัดที่ได้รับเข้าสู่ร่างกาย ผลการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับความเป็นพิษในหนูเม้าส์ B6C3F1 พบการลดน้ำหนักตัวชั่วคราวของกลุ่มที่ได้รับสารสกัด TAM สูงสุดที่ 1,000 mg/kg โดยไม่แสดงความเป็นพิษอื่นใด รวมทั้งไม่มีการเปลี่ยนแปลงการทำหน้าที่ของ natural killer เซลล์

โดยภาพรวม งานวิจัยนี้ชี้แนะว่าสารสกัด TAM มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันโดยกระทบต่อการสร้าง NO ของเซลล์ macrophage สูงสุด ดังนั้น งานวิจัยเกี่ยวกับกลไกการยับยั้งการสร้าง NO ของเซลล์ macrophage และ ประโยชน์ของ TAM ต่อการบรรเทาโรคต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง NO ในปริมาณที่สูงเกินควร จึงควรค่าต่อการทำวิจัยต่อยอดในอนาคต

Abstract

The seed coat extract of *Tamarindus indica* Linn. (TAM) has been shown to have antioxidant properties. As several medicinal plants possess antioxidant property also display immunomodulating activity, the present study explored the effects of TAM on both innate and acquired immunity in a murine model. *In vitro* exposure of splenocytes from B6C3F1 mice to TAM at 0.1-10 µg/ml did not alter the lymphoproliferative response to T cell mitogen, concanavalin A. At 10 µg/ml, TAM could significantly reduce the allogeneic response to DBA/2 splenocytes in a one-way mixed lymphocyte reaction. The study of *in vitro* sensitization with sheep red blood cells for antibody production in the Mishell Dutton assay revealed that when compared to the corresponding vehicle controls, 1 and 5 µg/ml TAM significantly increased antibody forming cell (AFC)/culture by 32 % and 43%, respectively ($p < 0.05$). Exposure of TAM at 1 and 5 µg/ml also enhanced the AFC/ 10^6 splenocytes by 33.5% and 58.0%, respectively. *In vitro* cytotoxicity of TAM to six cancer cell lines showed selectivity towards some cancer cells. Furthermore, *In vitro* exposure of RAW264.7 cells to 0.2-200 µg/ml significantly attenuated nitric oxide (NO) production, induced by 10 µg/ml lipopolysaccharide (LPS) and 10 ng/ml interferon-gamma (IFN- γ), as much as 68% in a concentration-dependent manner ($p < 0.01$). TAM at the concentration range of 100-500 mg/kg also showed a dose dependent suppression of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, LPS and/or IFN- γ -induced NO production in isolated peritoneal macrophages from B6C3F1 mice exposed to TAM via oral gavage for 14 days. The preliminary safety studies in B6C3F1 mice showed a transient decrease in body weight at only the highest dose (1000 mg/kg) without alteration of any general toxicities and natural killer cell activity.

Overall, the present studies suggest that the immunomodulating effects of TAM is most pronounced in the suppression of NO production by macrophages. Further studies to gain insight for inhibitory mechanisms and the beneficial roles of TAM on alleviation of diseases associated with overproduction of NO are worthwhile for investigation in the future.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ช
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1-4
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
ขอบเขตของการวิจัย.....	5
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย.....	5
บทที่ 2 การวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
มะขามและสรรพคุณทางแพทย์แผนไทย	6-7
งานวิจัยส่วนประกอบและฤทธิ์ชีวภาพของมะขาม.....	7-9
ระบบภูมิคุ้มกันและการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน	9-12
การศึกษาฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันของมะขาม	12-14
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
สารเคมี น้ำ และ วัสดุที่ใช้ในการวิจัย.....	15-17
เครื่องมือและอุปกรณ์การวิจัย.....	17-18
สถานที่ทำการวิจัย	18
สารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม	19
สัตว์ทดลอง	19-20
เซลล์สายพันธุ์	20
การเพาะเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์	20
การtrypsinize เซลล์ที่เกาะยึดพื้นที่ผิว	20-21
การเตรียมเซลล์ภูมิคุ้มกันจากม้าม.....	21-23
การประเมินปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต	24-26
การหาความเข้มข้นของ TAM ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ม้าม	26-27
การศึกษาผลของ TAM ต่อการตอบสนองใน mitogenesis assay	27-28
การศึกษาผลของ TAM ต่อ Mixed Lymphocyte Response	28-30
การศึกษาผลของ TAM ต่อการสร้าง antibody ใน <i>in vitro</i>	30-34
ความเป็นพิษของสารสกัด TAM ต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์.....	34
การทดสอบความเป็นพิษของ TAM ในหนูเม้าส์.....	34-35

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
การศึกษาผลของ TAM ต่อ Natural killer (NK) Cell Activity	35-36
การศึกษาผลของ TAM ต่อการสังเคราะห์ NO.....	36-38
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	38-39
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
ความเข้มข้นของ TAM ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง.....	40-43
ผลของ TAM ต่อการตอบสนองของเซลล์มะเร็งต่อ Mitogen	43-45
ผลของ TAM ต่อการตอบสนองใน Mixed Lymphocyte Reaction	45-46
ผลของ TAM ต่อการสร้าง antibody in vitro ใน Mishell Dutton Assay	46-48
ความเป็นพิษของ TAM ต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์	48-49
การทดสอบความเป็นพิษของ TAM ในหนูเมาส์ B6C3F1	50-57
ผลของ TAM ต่อการทำงานของ Natural killer (NK) เซลล์.....	58
ผลของ TAM ต่อการสร้าง NO ของเซลล์ macrophage	59-66
บทที่ 5 การวิจารณ์	67-83
บทที่ 6 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย.....	84
ข้อเสนอแนะ	84-85
บรรณานุกรม.....	86-102
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมีสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์.....	103-106
ภาคผนวก ข ผลงานตีพิมพ์.....	107-117
ประวัติผู้วิจัย	118

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงการคัดกรอง (screen) สารที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน โดยใช้ การทดสอบ Tier I15-17	11
2.2 แสดงการคัดกรอง (screen) สารที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน โดยใช้ การทดสอบ Tier II	12
4.1 แสดงร้อยละปริมาณเซลล์ตายของเซลล์มะเร็งที่ปนเปื้อนกับ VH หรือ TAM ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นเวลา 24 ชม. ก่อนประเมินการตายของเซลล์ด้วยสี PI	43
4.2 ผลของสารสกัด TAM ต่อการตอบสนองของเซลล์มะเร็งจาก หนู B6C3F1 ต่อ 10 µg/ml Con A ใน <i>in vitro</i> ที่ระยะเวลา 72 ชม	45
4.3 น้ำหนักของอวัยวะต่าง ๆ ของหนูเมาส์ B6C3F1 หลังจากได้รับ สารสกัด TAM ด้วยการป้อนทางปากเป็นระยะเวลา 14 วัน	53
4.4 ข้อมูลของ serum chemistry ของหนูเมาส์ B6C3F1 ที่ได้รับ การป้อนด้วย TAM เป็นระยะเวลา 14 วัน	54
4.5 ค่าโลหิตวิทยาของหนูเมาส์ B6C3F1 ที่ได้รับการป้อนด้วย TAM เป็นระยะเวลา 14 วัน	55
4.6 ค่าดัชนีบ่งชี้คุณลักษณะของเม็ดเลือดแดงของหนูเมาส์ B6C3F1 ที่ได้รับการป้อนด้วย TAM	56
4.7 แสดงค่าการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวของหนูเมาส์ B6C3F1 ที่ได้รับการป้อนด้วย TAM	57

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 แสดงส่วนต่างๆ ของมะขาม (<i>Tamarindus indica</i> L.)	7
3.1 แสดงรูปม้ามของหนูเมาส์ใน petridish (A) ม้ามที่วางบน ด้าน frosted end ของ slide (B) และการบดม้ามระหว่าง 2 slides ที่ด้าน frosted end (C และ D).....	22-23
3.2 แสดงเครื่องนับเซลล์อัตโนมัติ (Coulter Counter)	23
3.3 แสดง Mishell Dutton Box ที่ใช้บ่ม culture plate เป็นเวลา 4 วันภายใต้ความดัน 6 Psi และอุณหภูมิ 37 °C	32
3.4 แสดง 2 plaques ซึ่งเป็นวงใสรอบเซลล์ที่สามารถสร้าง Ab ที่จำเพาะต่อ SRBC antigen เมื่อมองภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แสดง ประโยชน์และโทษของ NO ในขบวนการสรีรวิทยา (physiological)	34
4.1 ปริมาณเซลล์ม้ามที่บ่มร่วมกับ TAM ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 48 ชม. ที่ได้จาก 2 การทดลอง การนับเซลล์กระทำโดยใช้เครื่อง นับเซลล์อัตโนมัติ Coulter counter.....	40
4.2 ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์ม้ามที่บ่มร่วมกับ TAM ที่ ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อประเมินโดยการย้อมด้วย PI (A) และ trypan blue exclusion (B).....	41
4.3 แสดงการตอบสนองของเซลล์ม้ามจากหนูเมาส์ B6C3F1 ต่อ Con A mitogen ที่ความเข้มข้น 1-10 µg/ml ที่ระยะเวลา 72 ชม.	44
4.4 ผลของสารสกัด TAM ต่อการตอบสนอง allogeneic เซลล์ (DBA/2) ของเซลล์ม้ามหนูเมาส์ B6C3F1.....	46
4.5 ผลของ TAM ต่อการสร้าง antibody <i>in vitro</i> เพื่อตอบสนอง ต่อ SRBC antigen เมื่อแสดงผลเป็น AFC/ culture (A) และ AFC/10 ⁶ recovered cells (B)	47-48
4.6 ความเป็นพิษของสารสกัด TAM ต่อเซลล์มะเร็ง <i>in vitro</i>	49
4.7 น้ำหนักตัว (A) และการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว (B) ของ หนูเมาส์ B6C3F1 ในช่วงระหว่าง 14 วันของการศึกษา ความเป็นพิษของสารสกัด TAM	52
4.8 NK activity ของหนูเมาส์ B6C3F1 (n = 5) ที่ได้รับการป้อนด้วย TAM หรือ vehicle control หรือ vitamin C เป็นเวลา 14 วัน	58
4.9 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ LPS และ IFN-γ สำหรับใช้กระตุ้น RAW26.47 เซลล์.....	60

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.10 การสังเคราะห์ NO (A) และ ร้อยละของเซลล์ที่ยังคงมีชีวิต (B) ของ RAW264.7 เซลล์ที่ป้อนร่วมกับสารสกัด TAM ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ หรือ vitamin C (500 μ M), vitamin E (141.3 μ M), หรือ β -carotene (2.5 mM) พร้อมกับการกระตุ้นด้วย LPS (5 μ g/ml) และ IFN- γ (10 ng/ml) เป็นเวลา 24 ชม.....	61
4.11 การสร้าง nitrite โดยเซลล์ macrophage ในช่องท้องของหนูเม้าส์ ที่ได้รับการป้อนด้วย TAM ที่ 50, 250 และ 500 mg/kg เป็นเวลา 14 วัน และกระตุ้น <i>in vitro</i> ด้วย LPS (A), IFN- γ (B) หรือ LPS ร่วมกับ IFN- γ เป็นเวลา 24 ชม.....	62-63
4.12 ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์ macrophage จากช่องท้องของ หนู B6C3F1 ที่ได้รับการป้อนด้วย VH (10% DMSO ใน PBS) หรือ TAM ที่ dosage ต่าง ๆ และถูกกระตุ้น <i>in vitro</i> ด้วย LPS (A), IFN- γ (B) และ LPS ร่วมกับ IFN- γ (C) เป็นเวลา 24 ชม.....	64
4.13 การสร้าง nitrite (A) และ ร้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ (B) ของเซลล์ในช่องท้อง macrophages จากหนูเม้าส์ B6C3F1 ที่ได้รับการป้อนด้วย VH1 (10% DMSO ใน PBS) หรือ สารสกัด TAM ที่ dosage ต่าง ๆ หรือ vitamin C (100 mg/kg) เป็นเวลา 14 วัน ก่อนการกระตุ้นการสร้าง NO ด้วย TPA (0.1 μ g/mL) <i>in vitro</i>	65-66
5.1 แสดงการทำงานร่วมกันระหว่างเซลล์ในการชักนำให้เกิดภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ.....	73
5.2 ปฏิกิริยา Griess สาร nitrosating agent N ₂ O ₃ ทำปฏิกิริยากับ sulfanilamide ได้อนุพันธ์ของ diazonium ซึ่งทำปฏิกิริยาต่อกับ N-1 naphthylethylenediamine ได้ diazo product ที่ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 540 nm	80

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ปัจจุบัน ประชาชนทั่วโลกได้ตระหนักถึงคุณค่าของพืชสมุนไพร และนำมาประยุกต์ใช้ในด้านส่งเสริมสุขภาพ ความงาม การป้องกัน หรือ การรักษาโรคภัยไข้เจ็บต่าง ๆ โดยอาจใช้ร่วม หรือ เสริมกับยาแผนปัจจุบัน เช่นเดียวกับประเทศไทยที่รัฐบาลก็ได้เล็งเห็นถึงความสำคัญของพืชสมุนไพรไทย และได้ส่งเสริมให้มีโครงการต่าง ๆ เพื่อประยุกต์ใช้พืชสมุนไพรไทยให้เกิดประโยชน์สูงขึ้น เช่นการส่งเสริมใช้พืชสมุนไพรในโครงการสาธารณสุขมูลฐานของกระทรวงสาธารณสุข โครงการตามพระราชดำริสวนป่าสมุนไพรของพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวในรัชกาลที่ 9 โครงการวิจัยด้านพืชสมุนไพรตามมหาวิทยาลัยและสถาบันต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นมากมาย เป็นต้น

มะขาม (*Tamarindus indica* Linn) เป็นพืชที่พบในประเทศไทย และคนไทยคุ้นเคยกับการนำเนื้อมะขามและใบอ่อนมาใช้เป็นเครื่องเทศสำหรับปรุงอาหาร และตำราแพทย์แผนไทยระบุสรรพคุณในส่วนต่างๆ ของมะขามและใช้เป็นยารักษาโรคแตกต่างกัน เช่น ผลมีสรรพคุณช่วยในการย่อย บำรุงเลือด ระบายและขับลม เมล็ดมีฤทธิ์ต้านอาการท้องร่วง ช่วยขับพยาธิและทำให้อาเจียน ส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดช่วยสมานแผลที่โดนไฟไหม้ได้ แม้ภูมิปัญญาของบรรพบุรุษไทยได้ใช้ประโยชน์จากมะขามในด้านต่าง ๆ มาช้านาน แต่ปัจจุบัน องค์ความรู้ ความเข้าใจและข้อมูลสนับสนุนทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับสรรพคุณและกลไกการออกฤทธิ์ของมะขามตามที่อ้างอิงในตำราแพทย์แผนไทยโบราณยังมีปริมาณจำกัด (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2541; คณะกรรมการสภาวิจัยแห่งชาติ, มหาวิทยาลัยขอนแก่น, สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช, สมาคมสมุนไพรแห่งประเทศไทย และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, 2540) โดยเฉพาะส่วนเปลือกนอกหุ้มเมล็ดมะขาม ซึ่งมักเป็นส่วนเหลือทิ้งจากการรับประทานและจากอุตสาหกรรม หรืออาจถูกนำมาใช้ประโยชน์บ้างเป็นบางส่วน เช่น ในบางท้องถิ่นของประเทศไทยผสมผงบดจากเมล็ดมะขามในกาแฟโบราณ (Suttajit, 1985; Sittikijyothin and Cherdwongchroensuk, 2011) งานวิจัยเกี่ยวกับมะขาม ที่มีอยู่ส่วนใหญ่มักจะเป็นการวิเคราะห์หาส่วนประกอบของสารเคมีในใบ เนื้อ เปลือกและเมล็ดมะขาม ส่วนการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีพอสรุปได้ว่า มะขามสามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย รา และไวรัสบางชนิด ยับยั้งเอนไซม์ polygalacturonase แต่ไม่มีผลต่อ protopectinase (Farnsworth and Bunyapraphatsara, 1992) มี

สาร OPCs เป็น metabolite สำคัญที่พบในเปลือกต้นสน เมล็ดองุ่น และในเมล็ดพืชอื่น เช่น ถั่ว pistachio OPCs ยังพบได้ทั่วไปในผัก ผลไม้ และในดอก สารกลุ่มนี้ถูกค้นพบโดย professor Jacques Masquelier ที่สกัดสารนี้จากเปลือกต้นสน (French Maritime pine bark) และจดสิทธิบัตรภายใต้ชื่อทางการค้าว่า pycnogenols ในกลุ่มประเทศยุโรป และชื่อ MASQUELIER'S® ในประเทศสหรัฐอเมริกา และในวงการนิยมเรียกสารกลุ่มนี้ว่า OPC หรือ procyanidolic oligomers (PCOs) (Fine, 2000) มีรายงานการวิจัยมากมายเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆของสารกลุ่ม OPCs หรือ proanthocyanidin ว่าสามารถประยุกต์ใช้ในการบำบัดหรือป้องกันการเกิดโรคต่าง ๆ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าวิตามิน C และวิตามิน E หลายสิบเท่า เพิ่มความแข็งแรงและยืดหยุ่นให้ collagen ช่วยให้หลอดเลือดขยายตัว ไม่เกิดการเกาะติดของเกร็ดเลือด (platelets) ช่วยป้องกันโรคหัวใจ และโรคไขข้ออักเสบ สามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส ต้านมะเร็งและขบวนการส่งเสริมมะเร็ง บำบัดอาการอักเสบ อาการโรคภูมิแพ้ กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน นอกจากนั้น การศึกษาทางคลินิกยังพบว่า OPCs ช่วยลดอาการของโรค attention deficit disorder และโรคสภาวะภูมิไวเกิน (hypersensitivity) (Fine, 2000; Bagchi et al., 2000; Ray, Kumar, and Bagchi, 1999; Dhanalakshmi et al., 2003; Cos et al., 2003; Gentile et al., 2012) ญรัฐาพร ดาลัย (2550) ได้สกัดสารจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามด้วย methanol และพบว่ามีปริมาณ condense tannins (proanthocyanidins) และฟีนอลิกสูงซึ่งสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงของสารสกัด ข้อดีของ OPCs คือมีพิษต่อคนต่ำ (Naturesmiracles.com, 2000) Dr. Bagchi และ คณะพบว่า GSPE สามารถป้องกันความเสียหายของเนื้อเยื่อในตับและไตโดยอนุมูลอิสระที่เกิดจากสารเคมี ลดการสร้าง lipid peroxidation และลดการแตกหักของ DNA (DNA fragmentation) ในกระบวนการ apoptosis (Bagchi et al. 2000; Ray et al., 1999) นอกจากนั้น การทดลองใน *in vitro* สารสกัดจากเมล็ดองุ่น GSPE มีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งหลายชนิด ในขณะที่ส่งเสริมการเจริญของเซลล์ปกติ (Bagchi et al., 2002; Ye et al., 1999)

องค์ความรู้ปัจจุบันชี้ชัดว่าอนุมูลอิสระมีผลกระทบต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น oxygen radicals ก่อให้เกิดการสูญเสียสภาวะความเป็นของไหล (fluidity) ของเยื่อหุ้มผิวเซลล์ในเม็ดเลือดขาว ทำให้เม็ดเลือดขาวทำหน้าที่ได้ไม่เหมือนปกติ ทำความเสียหายต่อ DNA อาจชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ หรือมีผลกระทบต่อการผลิตโปรตีนต่าง ๆ ซึ่งควบคุมการเจริญ (proliferation) ของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น (Bendich, 1999) ในทางกลับกัน งานวิจัยพบว่าสารต้านอนุมูลอิสระ หรือ ต้านออกซิเดชัน (anti-oxidants) สามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น β -carotene เพิ่มความสามารถในการฆ่า natural killer cell (NK) และการเพิ่มการผลิต tumor necrosis factor (เป็น cytokine ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ และกระตุ้น endothelial cell) ของ onocytes มีรายงานว่า การขาด antioxidant ที่สำคัญบางชนิด ลดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบ delayed type hypersensitivity หรือทำให้ไวต่อการเกิดโรคติดเชื้อต่าง ๆ รวมทั้งก่อให้เกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับการทำงานที่ผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น โรคภูมิคุ้มกันตนเอง (autoimmunity) โรคไขข้ออักเสบ (rheumatoid arthritis) และโรคพุ่มพวง หรือ โรคลูปัส (systemic lupus erythematosus) (Bendich, 1999) การรับประทาน vitamin E 200 mg ทุกวันเป็นระยะเวลา 3 เดือน ช่วยลดปัญหาการเกาะยึด (adherence) ของเซลล์ lymphocyte และกระตุ้นการเจริญและการแบ่งเซลล์ของ lymphocyte เพื่อตอบสนองต่อ mitogen ซึ่งเป็นปัญหาในผู้สูงอายุ นอกจากนั้น การฉีด N-acetylcystein ช่วยลดปัญหา adherence ของ lymphocyte และเพิ่มการเคลื่อนไหวยเพื่อตอบสนองต่อสิ่งเร้า (chemotaxis) ในโมเดลของหนูเมาส์ที่ถูกชักนำให้เกิด endotoxic shock ด้วย 100 mg/kg LPS (De la Fuene, 2000) การได้รับ multivitamins ร่วมกับ selenium ช่วยชะลอระยะก้าวหน้า (progression) และการพัฒนาของโรค HIV/AIDS และเพิ่มจำนวน $CD4^+$ T เซลล์ให้สูงขึ้นในผู้ป่วย สืบเนื่องจาก บทบาทของ antioxidative vitamins B6, B12, C, E, β carotene และโดยเฉพาะ vitamin A ที่มีความสำคัญต่อการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกันและจำเป็นต่อการเจริญและการพัฒนาการ (differentiation) ของเซลล์เม็ดเลือดขาว (Singh and Pai, 2015) ดังนั้นจึงไม่เหนือความคาดหมายว่า สาร OPCs ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง จึงสามารถส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ เช่น pcynogenol สามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน โดยการเพิ่มการทำงานของ NK เพิ่มการทำงานของเม็ดเลือดขาว รักษาความสมดุลของ cytokines โดยควบคุมระดับ IL-1, IL-6 และ IL-10 และลดระดับของ histamine ที่ทำให้เกิดอาการภูมิแพ้ (Natural Health Essential, 2000; Chishier et al., 1996) ปัจจุบัน สาร resveratrol ซึ่งเป็นสารกลุ่ม polyphenolic ในองุ่นถูกนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับยาแผนปัจจุบัน ในการรักษาโรค HIV/AIDS ผลการศึกษาทางคลินิกพบว่า resveratrol สามารถส่งเสริมประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของยา didanosine ได้ถึง 200 เท่า โดยมีฤทธิ์ช่วยทำลาย Tat ซึ่งเป็นโปรตีนที่ HIV สร้างขึ้นเพื่อกระตุ้นโปรตีนอื่นที่ใช้ในการจำลองตนเอง (replication) ของไวรัส ทั้งนี้ resveratrol โดยออกฤทธิ์ผ่านการกระตุ้น SIRT1 ที่มีฤทธิ์ทำลาย Tat (Lin et al., 2014;

Singhand Pai, 2015). สาร flavonoids เฉพาะชนิดในพืชสมุนไพรสามารถยับยั้ง enzymes หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการกระตุ้น (activation) เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น protein kinase C, protein tyrosine kinase, phospholipase A2 เป็นต้น และ flavonoids หลายชนิดมีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเซลล์ต่าง ๆ ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น B เซลล์, T เซลล์, macrophages, neutrophils, basophils และ eosinophils เป็นต้น (Middleton, 1998; Janeway and Travers, 1996)

จากการทบทวนวรรณกรรมเบื้องต้น สารกลุ่ม flavonoids เช่น OPCs หรือกลุ่มสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ มีความสำคัญต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ดังนั้น เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่มีสารกลุ่ม OPCs เป็นส่วนหนึ่งขององค์ประกอบ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงจึงน่าจะมีฤทธิ์ทางระบบภูมิคุ้มกันเช่นกัน และควรค่าต่อการวิจัยยิ่งว่าสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามสามารถมีฤทธิ์ต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันทัดเทียมกับสารสกัดจากเมล็ดองุ่น GSPE หรือสารสกัดจากเปลือกต้นสน pycnogenol ที่มีมูลค่าสูงทางการค้าหรือไม่ เนื่องจากสารกลุ่ม OPCs ในเปลือกเมล็ดมะขามอาจจะมีฤทธิ์เหมือน หรือแตกต่างจากกลุ่ม OPCs ที่สกัดได้จากเปลือกต้นสน หรือ เมล็ดองุ่น เพราะองค์ประกอบอื่นในเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามอาจจะมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างกัน (interaction) กับสาร OPCs ก่อให้เกิดการเสริม หรือ ต้านฤทธิ์ทางชีวภาพของ OPCs เกิดขึ้น ดังรายงานของ Suttajit et al. (1987) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพ (structure activity relationship) และรายงานว่า degree of polymerization, ชนิดของ linkage และ หมู่ side chain ในสูตรโครงสร้างของสารสามารถให้ฤทธิ์ที่แตกต่างกันในการต้านเชื้อ HSV, HIV, เชื้อแบคทีเรีย ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และการทำงานของระบบ complement ของภูมิคุ้มกันได้ นอกจากนี้ ปัจจุบัน แทบจะไม่มีงานวิจัยที่เกี่ยวกับเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม โดยเฉพาะฤทธิ์ต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ดังนั้น งานวิจัยนี้ จึงเสนอเพื่อศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับผลของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่มีต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อเป็นโครงการนำร่องให้ได้ข้อมูลประกอบการพิจารณาศักยภาพของการพัฒนาชุดโครงการวิจัยศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามในด้านต่าง ๆ เพื่อการพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพจากพืชสมุนไพรไทยให้มีมูลค่าเพิ่มทางเศรษฐกิจอันสอดคล้องกับนโยบายส่งเสริมพืชสมุนไพรไทยของรัฐบาลไทย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย เพื่อศึกษาเบื้องต้นผลของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามต่อ:

1. การตอบสนองด้านเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน
2. การตอบสนองด้านสารน้ำของระบบภูมิคุ้มกัน
3. ฤทธิ์ต้านมะเร็งต่อเซลล์สายพันธุ์ชนิดต่าง ๆ
4. การยับยั้งการสร้าง nitric oxide ของเซลล์ macrophage

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้จำกัดการทดลองการศึกษาลักษณะของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามใน *in vitro* ต่อการตอบสนองแบบจำเพาะด้านเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน (cellular specific immunity) โดยวัดการตอบสนองของเซลล์ม้าม (splenocytes) ของหนูเม้าส์ ต่อ allogeneic cell ใน mixed lymphocyte response สำหรับการตอบสนองแบบจำเพาะด้านสารน้ำ (humoral immunity) เลือก Mishell Dutton assay เพื่อวัดผลของสารสกัดต่อการสร้าง antibody ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะ (sheep red blood cell antigen) สำหรับการวัดผลของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามต่อการตอบสนองแบบไม่จำเพาะที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) เลือกการทดสอบ mitogenesis assay ใน *in vitro* และความสามารถในการฆ่าเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ต่าง ๆ ใน *in vitro* ใน direct cytotoxicity test รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดใน *in vivo* ต่อ natural killer cell activity นอกจากนั้น ยังศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านการอักเสบโดยยับยั้งการสร้าง nitric oxide ทั้งในโมเดล *in vitro* และ *in vivo* โดยโมเดล *in vitro* เลือกใช้เซลล์มะเร็งสายพันธุ์ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ mouse IFN- γ เป็นสารกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์ NO สำหรับ *in vivo* โมเดล เลือกสาร tumor promoter TPA เป็นตัวกระตุ้นเซลล์ macrophage จากช่องท้องของหนูเม้าส์ B6C3F1 ที่ได้รับการป้อนทางปากด้วยสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเป็นเวลา 14 วัน

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ได้ข้อมูลฤทธิ์เบื้องต้นต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงด้านเซลล์และด้านสารน้ำของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม
2. ได้ข้อมูลฤทธิ์เบื้องต้นของฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดที่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษโดยตรง และการทำงานของ natural killer cell ซึ่งเป็นภูมิคุ้มกันที่มีแต่กำเนิด
3. ได้ข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการยับยั้งการสร้างสารสื่อกลางอักเสบ nitric oxide ที่สร้างโดยเซลล์ macrophage ซึ่งเป็นเซลล์สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบที่เป็นสาเหตุ หรือ เกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของโรคเรื้อรังหลายชนิด
4. ข้อมูลเกี่ยวกับการทดสอบต่าง ๆ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในเชิงเภสัชวิทยา หรือเพื่อพัฒนาเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามให้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพต่อไปในอนาคตในงานวิจัยต่อยอดต่าง ๆ
5. ได้ข้อมูลเชิงวิทยาศาสตร์ในการสนับสนุนและส่งเสริมการใช้มะขามของประชากรไทยที่ใช้มะขามเป็นเครื่องเทศหรือยารักษาโรคต่างๆ เป็นการสนับสนุนและส่งเสริมองค์ความรู้ หรือ ภูมิปัญญาของบรรพบุรุษไทย

บทที่ 2

การวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 มะขามและสรรพคุณทางแพทย์แผนไทย

มะขาม (*Tamarindus indica* Linn) เป็นพืชในวงศ์ Leguminosae (Fabaceae) ไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ สูง 15-25 เมตรและมีขนาดรอบต้นไม้ 7 เมตร (รูปที่ 2.1) มีชื่อท้องถิ่น มะขามไทย (ภาคกลาง) ขาม (ภาคใต้) ตะลูป (นครราชสีมา) ม่วงโคล้ง (กาญจนบุรี) และอำเปยล (เขมร-สุรินทร์) จัดเป็นพืชตระกูลถั่ว (Leguminosae หรือ Fabaceae) อยู่ในวงศ์ Leguminosae มะขามมีดอกช่อออกที่ซอกใบและปลายกิ่ง กลีบดอกสีเหลือง ลายสีม่วงแดง ผลเป็นฝัก มีเนื้อหุ้มเมล็ด สีสน้ำตาล หวานฉ่ำ (ยุวดี จอมพิทักษ์, 2539; พร้อมจิต ศรลัมพ์และคณะ, 2539) พบในประเทศแถบร้อนชื้น โดยเฉพาะประเทศอินเดียและประเทศไทย เกือบทุกส่วนของมะขามสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ มะขามมีคุณค่าทั้งทางด้านสารอาหาร และใช้เป็นยารักษาโรค (De Caluwé *et al.*, 2010) สำหรับคนไทยซึ่งใช้ประโยชน์จากส่วนต่างๆ ของมะขามมาช้านานและถือว่ามะขามมีสรรพคุณมากมาย ตำราแพทย์แผนไทยโบราณใช้ส่วนต่าง ๆ ของมะขามเป็นยารักษาโรคแตกต่างกันดังนี้ ส่วนเนื้อ หรือที่เรียกว่ามะขามเปียก ใช้เป็นยาระบาย ยาแก้ไอ ยาละลายขี้บรรดู บำรุงโลหิต แก้อาการท้องผูก โลหิตไหลในช่องคลอด บวมเป็นหนอง แผลงัดต่อย แก้ไข้และขับลม ส่วนรากและเปลือกใช้สมานแผล รักษาโรคติดเชื้อจาก herpes simplex virus ส่วนเปลือกยังใช้เป็นยาสมานคุมธาตุ และรักษาโรคแผลเปื่อยในปาก สมานแผลพุพอง ลดการเกิดพิษและรักษาโรคบิด แก้ไข้ ขับเสมหะ เพิ่มการไหลเวียนของระบบโลหิต รักษาความผิดปกติของระดู หนองในมดลูก และกามโรคต่าง ๆ เมล็ดใช้เป็นยาฆ่าพยาธิไส้เดือน แก้ท้องเดิน อาเจียน และเป็นยาบำรุงกำลัง ใบและยอดอ่อนใช้ในการอาบอบสมุนไพร เพิ่มการไหลเวียนของระดู ช่วยขับเสมหะ รักษาอาการไอและหวัด แก้โรคท้องร่วง นอกจากนั้น ส่วนเปลือกและรากยังใช้เป็นยาขับเหงื่อ ขับลม และรักษาโรคบิด (ยุวดี จอมพิทักษ์, 2539; พร้อมจิต ศรลัมพ์และคณะ, 2539; จินดาพร ภูริพัฒนาวงษ์ 2556; ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร, 2556; หน่วยบริการฐานข้อมูลสมุนไพร, 2556; Farnsworth and Bunyapraphatsara, 1992; Kuru, 2014) ในบางประเทศใช้มะขามบรรเทาอาการเจ็บคอ รักษาโรคมาลาเรีย รักษาบาดแผลและการบวมเนื่องจากการอักเสบ และรักษาโรคเบาหวาน (De Caluwé *et al.*, 2010)



รูปที่ 2.1 แสดงส่วนต่างๆ ของมะขาม (*Tamarindus indica* L.) (De Caluwé *et al.*, 2010)

2.2 งานวิจัยส่วนประกอบและฤทธิ์ชีวภาพของมะขาม

ปัจจุบัน มีนักวิจัยหลายคนสนใจศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากส่วนต่างๆ ของมะขาม และพบว่าไม่ว่าจะเป็นผล ดอก ใบ หรือ เปลือก ล้วนมีฤทธิ์ชีวภาพ และอุดมด้วยสารอาหารมากมาย โดยส่วนผล และเมล็ด อุดมไปด้วยกรดอะมิโนจำเป็น (essential amino acids) ยกเว้น tryptophan (Glew *et al.*, 2005) จากการวิเคราะห์สารพฤกษเคมี (phytochemicals) พบว่า phenolics compounds ในมะขามประกอบด้วย catenin, procyanidin B2, epicatechin, tartaric acid, mucilage, pectin, arabinose, xylose, galactose, glucose, uronic acid และ triterpen (Bhadoriya *et al.*, 2012) ผลมะขามที่คนโบราณใช้เป็นยาระบายอุดมไปด้วย malic acid, tartaric acid และ potassium (Havinga *et al.*, 2010; Bhadoriya *et al.*, 2011; Kuru, 2014) ส่วนผล (Martinello *et al.*, 2006) ดอก (Al-Fatimi *et al.*, 2007) หรือใบ (El-Siddig *et al.*, 2006) ล้วนมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ Martinello *et al.* (2006) พบว่าสารสกัดจากผลมะขามยังมีฤทธิ์ลดระดับคอเลสเตอรอลสูงในเลือด (hypercholesterolemic) ของหนู hamsters ลดปริมาณ LDL และ triglyceride ในขณะที่เพิ่มไขมันดี HDL สารสกัดส่วนผลช่วยทำให้กล้ามเนื้อเรียบผ่อนคลายผ่านกลไกการยับยั้งช่องผ่านของแคลเซียม (calcium channel blockage) (Ali and Shah, 2010) ส่วนสารสกัดจากเมล็ดมีฤทธิ์ช่วยป้องกันแผลในกระเพาะอาหาร (peptic ulcer) ในโมเดลที่ชักนำโดย ibuprofen, alcohol และ การใช้ pyloric ligation (การผูกที่รอยต่อระหว่างกระเพาะอาหารกับลำไส้เล็ก) โดยส่วนประกอบในสารสกัดที่ออกฤทธิ์น่าจะเป็นสารประกอบ polyphenolic โดยเฉพาะ procyanidin, epicatechin และ polymeric tannins เพราะสารเหล่านี้ล้วนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ช่วยลดความเสียหายของแผลในกระเพาะอาหารได้ และ tannin ยังช่วยป้องกันการพัฒนาของแผลในกระเพาะโดยทำให้โปรตีนตกตะกอน และทำให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือด (vasoconstriction) (Kalra *et al.*, 2011; Kuru, 2014) สารสกัดส่วนใบและเมล็ดสามารถต้านการอักเสบ แต่ยังมีฤทธิ์ต่ำกว่า

acetylsalicylic acid และยังสามารถระงับปวดเมื่อทดลองในโมเดลที่ใช้วิธีทางกายภาพ สารเคมีและความร้อนในการชักนำให้เกิดความเจ็บปวด (Landi Librandi et al., 2007; Kuru, 2014) โดยฤทธิ์ด้านการอักเสบคล้ายคลึงกับ diclofenac ที่เกิดผ่านกลไกการยับยั้งการสร้าง NO และ prostaglandins (Bhadoriya et al., 2012) ทั้งนี้ ความสามารถด้านอาการอักเสบและบรรเทาอาการเจ็บปวด (antinociceptive effect) น่าจะเกี่ยวข้องกับ polyphenols และ flavonoid ในสารสกัด และความสามารถของมะขามที่ช่วยรักษาเสถียรภาพของเยื่อหุ้มผิวของ lysosome ซึ่งถ้าเกิดการเสียหายของเอนไซม์ phospholipase A2 ที่เยื่อหุ้มผิว จะก่อให้เกิดสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเกิดขึ้นผ่านการ hydrolysis ของ phospholipids (Kuru, 2014) สารสกัดจากเมล็ดมะขามมีฤทธิ์ด้านเบาหวานโดยมีผลต่อ insulin โดยช่วยป้องกัน pancreatic β cell ช่วยควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด และฟื้นฟูความเสียหายของเนื้อเยื่อตับอ่อน (Maiti et al., 2004) นอกจากนี้ มีรายงานว่ามะขามสามารถต้านจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย รา และปรสิตต่าง ๆ โดยสารสกัดจากใบมะขามสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยยับยั้งเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella paratyphi*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* (Choudhury and Sengupta, 1970; Havinga et al., 2010; Bhadoriya et al., 2011; De Caluw et al., 2010; Escalona-Arranz, 2010; Djeussi et al., 2013; Kuru, 2014) ทั้งนี้ มีรายงานว่าความสามารถต้านแบคทีเรียของมะขามมีความเกี่ยวข้องกับปริมาณของ lupeol ในสารสกัด (Al-Fatimi et al., 2007)

ส่วนงานวิจัยนี้ สนใจเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเพราะเป็นส่วนเหลือทิ้งจากการรับประทานและยังมีการศึกษาวิจัยเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ไม่มากนัก อย่างไรก็ตาม ในบางท้องถิ่นของประเทศไทยได้มีการนำผงบดจากเมล็ดมะขามมาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยผสมกับกาแฟโบราณ สำหรับประเทศอินโดนีเซียใช้เป็นยาสมุนไพรหรือเป็นยาห้ามเลือด (De Caluwé et al., 2010) Pumthong (1999) ได้ศึกษาองค์ประกอบของสารสกัด ethanol จากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม พบว่าประกอบด้วยสารกลุ่ม phenolics ในปริมาณสูง โดยเฉพาะกลุ่มสาร oligomeric proanthocyanidin complexes (OPCs) และแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างดียิ่งด้วยการทำลายอนุมูลอิสระชนิด peroxy, hydroxyl และ superoxide anions เมื่อทำการทดลองใน *in vitro* นอกจากนี้ยังแสดงผลปกป้อง lipid peroxidation และความเสียหายอันสืบเนื่องจากภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ในเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tsuda et al. (1994) ที่พบว่าสารสกัด ethanol และ ethyl acetate ที่เตรียมจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คนไทยนิยมใช้ทั้งมะขามดิบและแห้งหรือเรียกอีกอย่างว่ามะขามสุกเป็นเครื่องเทศประกอบอาหาร โดยเฉพาะมะขามหวานซึ่งเป็นมะขามสุกที่ชาวไทยนิยมบริโภค ดังนั้นจึงมีงานวิจัยค้นหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากมะขามทั้ง 2 ชนิดนี้ Siddhuraju (2007) พบว่าเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามดิบและแห้งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใน linoleic acid emulsion system โดยมีฤทธิ์ต่ำกว่า

butylated-hydroxy-anisole (BHA) แต่สูงกว่า ascorbic acid งานวิจัยของ Sittikijyothin และ Cherdwongchroensuk (2011) เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัด ethanol จากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามแห้งระหว่างมะขามเปรี้ยวและมะขามหวาน พบว่ามะขามเปรี้ยวมีปริมาณ phenolic และยับยั้ง DPPH radical (DPPH[•]) สูงกว่าสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามหวาน นอกจากนั้น การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัด methanol จากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามบ่งชี้ว่าสารประกอบ polyphenol หลัก ได้แก่ procyanidin dimer และ procyanidin trimer มีความปลอดภัยต่อหนู ไม่เหนียวนาให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน และเพิ่มระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระต่าง ๆ ในตับ คือเอนไซม์ glutathione peroxidase, heme oxygenase และ glutathione S-transferase สารสกัดยังมีฤทธิ์ป้องกันการเกิดมะเร็งตับในระยะเริ่มต้น โดยยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ตับที่ผิดปกติและส่งเสริมเอนไซม์กำจัดสารพิษในตับ (รวิวรรณ วงศ์ภูมิชัย 2554) งานวิจัยนี้สอดคล้องกับการทดลองของ ณัฐพร ดาลัย (2550) ซึ่งสกัดสารจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามคั่วด้วย methanol และพบว่ามีปริมาณ condense tannins (proanthocyanidins) และ phenolics สูง รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย นอกจากนั้น สารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามยังมีฤทธิ์ต้านการปวดตามข้อ (antiarthritic) โดย Babaria *et al.* (2011) ทำการทดลองให้สารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่สกัดด้วย ethanol และ น้ำกับหนู rat พบว่าสารสกัดทั้ง 2 ชนิดสามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนู (paw edema) ที่ชักนำโดย Freud's complete adjuvant

2.3 ระบบภูมิคุ้มกันและการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน

ระบบภูมิคุ้มกันเป็นระบบการทำงานที่ซับซ้อน แต่มีความเป็นระเบียบสูง เซลล์ชนิดต่าง ๆ ของระบบภูมิคุ้มกันทำงานร่วมกันอย่างมีระบบ เซลล์แต่ละชนิดทำหน้าที่แตกต่างกัน ทำงานร่วมกันและควบคุมซึ่งกันและกันในการตอบสนองต่อจุลินทรีย์หรือสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ และรักษาความสมดุลภายในร่างกาย (homeostasis) โดยการสื่อสารระหว่างเซลล์ผ่านตัวรับรู้ที่ผิวเซลล์ (surface cell receptor) และ/หรือผ่านสารน้ำที่เซลล์สร้างขึ้น เช่น cytokines และ lymphokines ชนิดต่าง ๆ (Roitt *et al.*, 1996; Murphy *et al.*, 2008) ตัวอย่างเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ T lymphocytes, B lymphocytes, macrophages, dendritic cells, natural killer cells และ polymorphonuclear granulocytes ชนิดต่าง ๆ คือ basophils, neutrophils และ eosinophils ตัวอย่างสารน้ำในระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ antibody ที่สร้างโดย plasma cells ซึ่งพัฒนาจาก B lymphocytes, ระบบ complement proteins ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน 30 กว่าชนิดทำงานร่วมกันอย่างเป็นลูกโซ่ (cascade), interferon, chemokines และ cytokines ชนิดต่าง ๆ เป็นต้น (Roit *et al.*, 1998; Murphy *et al.*, 2008)

การศึกษาสารที่มีฤทธิ์ต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันอาจตรวจสอบผลของสารต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันทั้งแบบไม่จำเพาะ (nonspecific immunity) ซึ่งเป็นภูมิคุ้มกันที่มีแต่กำเนิด

(innate immunity) และแบบจำเพาะ (specific immunity) ซึ่งเป็นภูมิคุ้มกันที่ต้องผ่านการเรียนรู้และจดจำ ซึ่งจัดเป็น acquired immunity โดยทั่วไป การประเมินผลของสารต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันสามารถทดสอบด้วยการได้รับสารในหลอดทดลอง (*in vitro*) หรือ ในร่างกายของสัตว์ทดลอง (*in vivo*) และการวัดผลการทดลองอาจวัดผลการทำงาน หรือ การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในหลอดทดลอง หรือ ในร่างกายสัตว์ทดลอง หรือนำเซลล์ออกจากสัตว์ทดลองที่ได้รับสารตามระยะเวลาที่กำหนด เพื่อวัดการตอบสนองในหลอดทดลองก็ได้ แล้วแต่วิธีการทดสอบที่เลือกใช้ ตัวอย่างวิธีการทดสอบมาตรฐานที่สำคัญในด้านพิษวิทยาของระบบภูมิคุ้มกันได้แก่ การวัดการสร้าง antibody ด้วยวิธี plaque forming cell assay หรือวิธี ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) เพื่อศึกษาผลกระทบของสารต่อการทำงานของ B lymphocytes ในการตอบสนองแบบสารน้ำ (humoral immunity) หรือใช้วิธี ELISPOT (Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay) ที่สามารถประยุกต์ใช้วัดปริมาณของ antibody และ cytokines ต่าง ๆ ตลอดจนวัดปริมาณของ cytotoxic T lymphocyte ที่ถูกกระตุ้นด้วย antigen จำเพาะ สำหรับการวัดผลกระทบของสารต่อการตอบสนองด้านเซลล์ (cellular immunity) ได้แก่ cytotoxic T cell assay, mitogenesis assay, mixed lymphocyte response และ delayed type hypersensitivity การวัดการตอบสนองแบบไม่จำเพาะด้าน innate immunity ได้แก่ การทดสอบ phagocytosis, antigen processing และ presentation และการสร้าง nitric oxide ในเซลล์ macrophage รวมทั้งการทดสอบ natural killer cell activity การวัดภูมิคุ้มกันโดยรวมในร่างกายต่อเชื้อโรค หรือต่อการเกิดมะเร็งอันสืบเนื่องจากสารพิษหรือสารเคมีใช้วิธี host resistance studies หรือ วัดผลกระทบต่อการควบคุมการทำงานขององค์ประกอบในระบบภูมิคุ้มกันโดยวัดปริมาณ lymphokines หรือการแสดงออกของ genes ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับ lymphokines (Burns et al., 2001; Burleson et al., 1955a และ 1955b)

เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายเป็นระบบที่สลับซับซ้อนดังกล่าว พิษสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันอาจมีอิทธิพลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ หรือแบบจำเพาะ โดยอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อจำนวน หรือระดับการทำงานของเซลล์ต่าง ๆ ของระบบภูมิคุ้มกัน เช่นมีผลต่อ T เซลล์, B เซลล์, macrophage, natural killer cell หรืออาจมีผลต่อระบบ complement proteins หรือมีผลต่อการหลั่งของสารที่ติดต่อและควบคุมการทำงานร่วมกันระหว่างเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น lymphokines ชนิดต่าง ๆ นอกจากนั้น พิษสมุนไพรอาจเปลี่ยนแปลงความสามารถในการต้านทานเชื้อโรคต่าง ๆ เช่น กระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ช่วยต้านการเกิดมะเร็ง ต้านเชื้อไวรัส แบคทีเรีย หรือโรคติดเชื้ออื่น ๆ สารสกัดจากพิษสมุนไพร ก็คล้ายกับสารเคมีหลากหลายชนิดที่อาจมีผลกระทบต่อการทำหน้าที่ของเซลล์ หรือสารน้ำชนิดต่าง ๆ ในระบบภูมิคุ้มกันเพียงชนิดเดียว หรือหลายชนิดพร้อมกัน ดังนั้น การตรวจสอบว่าสารสกัดพิษสมุนไพร สามารถส่งผลกระทบต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันหรือไม่ จึง

ยากที่จะใช้วิธีการทดสอบเพียงชนิดเดียว แต่ควรใช้วิธีการทดสอบหลายชนิดร่วมกันเป็นลำดับขั้น (tier approach) ตามหลักการทดสอบมาตรฐานสากลที่พัฒนาโดย US National Toxicology Program (Luster et al., 1988, 1992, 1993) โดยใช้การทดสอบในเบื้องต้น เรียกว่า tier I เป็นการทดสอบว่าสารมีผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันหรือไม่ และถ้ามีผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกัน จึงทำการทดสอบในขั้นต่อไป คือ tier II เพื่อศึกษาว่า เซลล์ หรือ สารนำชนิดใดในระบบภูมิคุ้มกันเป็นเป้าหมายของกลไกการออกฤทธิ์ของสารชนิดนั้น ตารางที่ 1 และ 2 แสดงตัวอย่างการทดสอบที่ใช้ในการประเมินผลกระทบของสารต่อระบบภูมิคุ้มกันในระยะ tier I และ tier II ตามลำดับ

ตารางที่ 2.1 แสดงการคัดกรอง (screen) สารที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันโดยใช้ การทดสอบ Tier I*

Parameter	วิธีทดสอบ
Immunopathology	- การตรวจสอบทาง hematology: complete blood และ differential count - ข้อมูลทั่วไปทางพิษวิทยา: น้ำหนักตัว น้ำหนักม้าม thymus ตับ ไต รวมทั้งการตรวจ histopathology ของอวัยวะต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับอวัยวะของภูมิคุ้มกันเหล่านี้
Humoral-mediated immunity	การตอบสนองต่อ mitogen ของ B เซลล์ เช่น LPS หรือ F(ab) ₂ การวัดการตอบสนองของ primary antibody เช่น การนับจำนวน plaque ของ IgM antibody forming cells ต่อ T-dependent antigen (เม็ดเลือดแดงแกะ) ปริมาณ IgM ในซีรัม
Cell-mediated immunity	การตอบสนองต่อ mitogen ของ T เซลล์ เช่น concanavalin A และ mixed lymphocyte response ต่อ allogeneic lymphocytes, local lymph node assay
Nonspecific immunity	Natural killer cell activity

*ดัดแปลงจาก Luster et al., 1988, 1992

ตารางที่ 2.2 แสดงการคัดกรอง (screen) สารที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันโดยใช้ การทดสอบ Tier II*

Parameter	วิธีทดสอบ
Immunopathology	การนับจำนวน และ subsets ของ T และ B เซลล์ การทำ immunocytochemistry ของ lymphoid tissue การนับชนิด และปริมาณของเซลล์ในไขกระดูก
Humoral-mediated immunity	การวัดการตอบสนองของ secondary antibody (IgG) ต่อเม็ดเลือดแดงแกะ
Cell-mediated immunity	การวัดความสามารถในการฆ่าของ cytotoxic T เซลล์ การวัด delayed type hypersensitivity, mouse ear swelling test (MEST), guinea pig maximization test
Nonspecific immunity	การวัดการทำงานของ macrophage ต่าง ๆ เช่น <i>in vitro</i> phagocytosis ของ covasphere ที่ติดฉลากด้วย fluorescent, การฆ่า <i>Listeria monocytogenes</i> หรือการทำลายเซลล์มะเร็ง ของ macrophage ในสภาวะปกติ หรือเมื่อถูกกระตุ้นโดย macrophage activating factor (MAF)
Host resistance studies	- โมเดลของแบคทีเรีย: <i>Listeria monocytogenes</i> (ดูการตายของสัตว์ทดลองหรือความสามารถของสัตว์ทดลองในการกำจัดแบคทีเรีย) และ <i>Streptococcus</i> sp. (ดูการตายของสัตว์ทดลองเท่านั้น) - โมเดลของไวรัส: influenza (ดูการตายของสัตว์ทดลอง) - โมเดลของปรสิต เช่น <i>Plasmodium yoelii</i> หรือ <i>Trichinella spiralis</i> (นับปริมาณตัวอ่อนของปรสิตในกล้ามเนื้อ และการถูกขับออก (expulsion) ของปรสิต) โมเดลของ syngeneic tumor: PYB6 sarcoma (ดูการเกิดมะเร็งในตำแหน่งที่ปลูกถ่าย), B16F10 melanoma (ดูการเกิดมะเร็งที่ลุกลาม หรือเกิด metastasizeไปที่ปอด)

*ดัดแปลงจาก Luster et al., 1988, 1992

2.4 การศึกษาฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันของมะขาม

ปัจจุบัน รายงานวิจัยที่สนับสนุนว่ามะขามสามารถออกฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันยังมีปริมาณจำกัด สารสกัดจากเปลือกมะขาม (bark extract) มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของ *Salmonella typhi* ได้บางส่วน และช่วยกระตุ้นการเจริญของ lymphocyte ในสภาวะที่มี และ ไม่มี mitogen

phytohemagglutinin รายงานนี้จึงสนับสนุนความนิยมในการใช้เปลือกมะขามเพื่อรักษาโรคมะเร็ง เนื่องจากมีฤทธิ์กระตุ้นการเจริญของเซลล์ภูมิคุ้มกันจำเพาะ lymphocyte และยังช่วยทำลายปรสิตในกระแสเลือด (parasitemia) โดยงานวิจัยชี้แนะว่า tannin ในมะขามสามารถฆ่าปรสิตได้โดยจับกับโปรตีนอิสระในช่องของกระเพาะและลำไส้ (gastrointestinal canal) ของปรสิต หรือ glycoproteins ที่ผิวนอกของเซลล์ (Nguta and Mbaria, 2013) polysaccharide ที่สกัดจากมะขามสามารถกระตุ้นการกลืนกินของ phagocytes ยับยั้งการเคลื่อนที่ของ leukocyte ใน leukocyte migration inhibition test และยับยั้งขบวนการ proliferation ของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (Sreelekha et al., 1993) สารสกัดจากเมล็ดมะขามช่วยบรรเทาพิษเฉียบพลันต่อไต (nephrotoxicity) และการเกิดเซลล์มะเร็งที่เยื่อหุ้มไต (renal cell carcinoma) ในโมเดลที่ชักนำโดย N-diethylnitrosamine และ ferric nitrilotriacetate ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์น่าจะเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด ที่ช่วยลด oxidative damage ที่มีผลต่อการเกิดมะเร็งได้ ทั้งนี้กลุ่มสารประกอบ polyphenols ในสารสกัดจากเมล็ดมะขามประกอบด้วย 2-hydroxybenzoate, 3,4-dihydroxyphenylacetate, (-) epicatechin, tannin, anthocyanidine และ oligomeric proanthocyanidins ที่สามารถชักนำ antioxidant enzymes และยับยั้งวิถีทางของสัญญาณภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของโรคมะเร็ง (cancer related signaling pathways) (Vargas-Olvera et al., 2012) Paula et al., 2009 รายงานว่า สารกลุ่ม polyphenol ในสารสกัดจากผลและเมล็ดของมะขามมีผลควบคุมเซลล์เม็ดเลือดขาว neutrophil นอกจากนั้น มะขามยังช่วยบรรเทาอาการของโรคภูมิแพ้ โดยช่วยบรรเทาอาการหอบหืด (asthma) และอาการไอโดยมีฤทธิ์ต้าน histamine ซึ่งเป็นหนึ่งในสารสื่อกลางสำคัญที่ก่อให้เกิดอาการภูมิแพ้ มีฤทธิ์ปรับสมดุลภายในร่างกาย (adaptogenic) และช่วยรักษาความเสถียรของ mast cell (mast cell stabilizing effect) ไม่ให้เกิดการหลั่งสารก่อภูมิแพ้ออกจากเซลล์ (Bhadoriya et al., 2011) ส่วนการศึกษาผลของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามต่อระบบภูมิคุ้มกันเท่าที่สืบค้นมาไม่มีเพียงรายงานวิจัยที่ระบุว่า polyphenol ที่สกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามสามารถลดสภาวะความเครียดจากความร้อนในไก่เนื้อ (Gallus domesticus) โดยกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้ความร้อนอุณหภูมิ 38°C และได้รับสารสกัด 400 mg/kg ในอาหาร มีปริมาณของ lymphocyte และ basophil เพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณของ heterophil และ monocyte มีค่าลดลง นอกจากนั้น สารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามมีคุณสมบัติคล้าย antibiotics สามารถเพิ่มค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวของไก่เนื้อต่อวัน และยังสามารถลดสภาวะเครียดออกซิเดชันได้ (Aengwanich et al., 2009a, b; Aengwanich and Suttajit, 2010)

การแสวงหาสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่สามารถควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันมีความสำคัญยิ่ง เนื่องจากปัจจุบัน วงการแพทย์ได้ตระหนักถึงศักยภาพและความสำคัญของการรักษาโรคด้วยการกระตุ้น หรือ ควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยการแพทย์สมัยใหม่เลือกใช้พืช

สมุนไพรเพื่อรักษา หรือ ใช้เป็นอาหารเสริมร่วมกับยาแผนปัจจุบัน (Yoshida et al., 1988; วิณา จิระจรรย์ยา กุล, 2541) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา โดยเฉพาะโรคที่มักมีปัญหาการดื้อยา ผลข้างเคียงจากการใช้ ยาเป็นระยะเวลานาน (Goldstein et al., 1974; Brunton et al., 2006) การรักษาโรคเมเร็ง และโรคที่มี สาเหตุจากไวรัส รวมทั้งโรค AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome) ที่ปัจจุบัน ยังไม่มียา หรือ วิธีการรักษาใดที่ดีเพียงพอ เมื่อเทียบกับความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันใน ผู้ป่วยเอง (Janeway and Travers, 1996; Roitt et al., 1996; Stites and Terr, 1991) งานวิจัยนี้สนใจ ศึกษาผลของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อต้องการเพิ่มมูลค่าเพิ่มให้กับส่วน ของมะขามซึ่งปกติเหลือทิ้ง หรือใช้ประโยชน์ได้เพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับส่วนผลซึ่งเป็นที่ยอมรับในหมู่ ผู้บริโภคอยู่แล้ว และจากการทบทวนวรรณกรรมเบื้องต้น พบว่าเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามมีฤทธิ์ต้านอนุมูล อิสระสูงทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* และมีรายงานด้านการอักเสบในสัตว์ทดลอง นอกจากนี้ เปลือกหุ้ม เมล็ดมะขามมีกลุ่มสาร polyphenolics สูง และประกอบด้วยสารกลุ่ม OPCs ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย รวมทั้งความสามารถในการส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน (Fine, 2000; Bagchi et al., 2000; Masquelier, 2000) แม้เคยมีรายงานเกี่ยวกับผลของมะขามต่อระบบภูมิคุ้มกันมาก่อน แต่ก็เป็นการศึกษาสารสกัดจาก เมล็ด หรือ จากผล ไม่ใช่จากเปลือกหุ้มเมล็ด งานวิจัยเกี่ยวกับผลของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามต่อระบบ ภูมิคุ้มกันมีเพียงรายงานเกี่ยวกับผลต่อปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ ในไก่เนื้อ (Aengwanich et al., 2009a) และยังไม่มีการศึกษาผลของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามต่อระบบภูมิคุ้มกันด้วยวิธีทดสอบที่ประเมิน ทั้งภูมิคุ้มกันที่มีแต่กำเนิดใน innate immunity และ ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะที่ต้องผ่านการกระตุ้นล่วงหน้า ใน acquired immunity ตามวิธีทดสอบมาตรฐานสากลที่พัฒนาโดย US National Toxicology Program (Luster et al., 1988, 1992, 1993) ดังนั้น โครงการวิจัยนี้จึงศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับฤทธิ์ของ สารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันทั้ง innate และ acquired immunity รวมทั้ง ตรวจสอบผลของสารสกัดต่อความเป็นพิษต่อเซลล์เมเร็งสายพันธุ์หลากหลายชนิด และตรวจสอบผลของ สารสกัดต่อการสังเคราะห์ NO ซึ่งเป็นสารสื่อกลางเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบที่สังเคราะห์โดยเซลล์ macrophage ในสถานะที่ถูกกระตุ้น (activated macrophage)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมี น้ำ และ วัสดุที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 สารเคมี

Acetone (Sigma)

Anti-Asialo GM1 (Wako Chemicals)

Bacto-Agar (Becton Dickinson)

Con A: Concanavalin A (Pharmacia)

Corn oil (Sigma)

DEAE dextran (Sigma)

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco BRL)

DMSO (dimethyl sulfoxide) (Sigma)

EBSS (Earle's balanced salt solution) (Gibco BRL)

Ethanol (Sigma)

FCS: Fetal calf serum (Gibco BRL)

Glutamine (Sigma)

Guinea pig complement (Life Technologies)

[³H]-thymidine (1 mCi/ml) (ICN)

Hepes buffer (Gibco BRL)

IFN- γ (interferon gamma) (Research Diagnostics)

Mercaptoethanol (Sigma)

LPS: Lipopolysaccharide: Escherichia coli serotype 0111: B4 (Sigma)

Mitomycin C (Sigma)

MTT: [3(4,5-dimethylthiazol 2 -yl) 2, 5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma)

Penicillin/Streptomycin (Gibco BRL)

RPMI: Roswell Park Memorial Institute (Gibco BRL)

TPA (12-o-tetradecanolyphorbol-13-acetate) (Sigma)

Vitamin C (ascorbic acid) (Sigma)

ZAPOGLOBIN lytic reagent (Coulter Corporation)

3.1.2 น้ำ

น้ำที่ใช้ในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดเป็น ultra pure water ที่ได้จากการผ่าน ionized-double distilled water ในเครื่องกรองน้ำ nanopure (Barnsted)

3.1.3 วัสดุปลอดเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์

15 ml และ 50 ml conical tubes (Sarstedt)

24 well and 48 well plate (flat bottom) (Costar)

5 ml snap cap culture tubes (Falcon)

60 x15 mm petri plates (Falcon)

96 well flat and U bottom plate (Nunc)

Acrodisc 2.5 ml (0.2 μ m; Gelman)

Cell scraper (SPL Life Science Inc.)

Culture flasks ขนาด 25 และ 75 cm² (Nunc)

Glass pipettes (1, 5, 10, 25 ml) (Pyrex)

Haemocytometer และ cover slip (Fisher Scientific)

Pasteur pipettes (Fisher Scientific)

Sterile filter unit ขนาด 1000 ml (0.2 μ m, Gelman)

วัสดุอื่น ๆ

12 x75 mm glass test tubes (Pyrex)

Cover slip ขนาด 40x50 mm, ขนาด 22x22 mm, หนา 0.1-0.7 mm (Fisher)

Petri dish ขนาด 30x100 mm (ไม่ต้องปลอดเชื้อ)

Single frosted end slide (25.4x72 mm) (Fisher)

Slide (25.4x72 mm) (Fisher)

ถุงมือ ผ้าปิดจมูก เสื้อและหมวกเพื่อใช้ในอาคารสัตว์ทดลอง

อาหารหนูเม้าส์ (เบอร์ 082, ซีพี)

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์การวิจัย

8, 12 Multichannel pipettes (Gibco)

Autoclave (Hirayama)

Biohazard safety carbinet class II (Holton)

CO₂ incubator (SHEL LAB)

Compound microscope (Ziess)

Coulter counter (Beckman)

ELISA plate reader (Biorad)

FACScan Flow cytometry (Becton Dickinson)

Hot air oven (Gallenkamp)

Inverted microscope (Nikon)

Liquid nitrogen tank (Thermo Scientific)

Micropipettes ขนาด 10, 20, 200, 1000 และ 5000 μl (Pipetman, Gilson)

pH meter (Metrohm)

Stirrer และ hot plate (IKA[®])

UV-Vis spectrophotometer (Perkin Elmer)

Water bath (SHEL LAB)

เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง และ 2 ตำแหน่ง (Mettler)

เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ (SORVALL)

กรงเลี้ยงหนูแบบมีฝาซึ่งบุ Hepa filter เพื่อให้ปลอดเชื้อ

ตู้เย็น (Sharp)

ตู้แช่แข็ง (-20°C), (-80°C) (Whirpool)

อุปกรณ์ผ่าตัดขนาดเล็ก

3.3 สถานที่ทำการวิจัย

ทุกการทดลองที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture) กระทำในตู้ปลอดเชื้อ (Biohazard laminar flow hood class II) ใช้วัสดุและอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ปลอดเชื้อ และใช้เทคนิคปลอดเชื้อ ส่วนความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ที่ระบุในการทดลองเกี่ยวกับเซลล์เป็นความเข้มข้นสุดท้ายของสารใน culture การบ่มเซลล์กระทำในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37°C และ 5% CO_2 การทดลองอื่น ๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเซลล์กระทำในห้องปฏิบัติการพิษวิทยา ผลการทดลองที่แสดงทุกการทดลองเป็นตัวแทนของการทดลองแบบเดียวกันอย่างน้อย 2-3 ซ้ำ ทั้งห้องเพาะเลี้ยงเซลล์และห้องปฏิบัติการพิษวิทยาอยู่ที่อาคารเฉลิมพระเกียรติ 80 พรรษา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ส่วนการทดลองเกี่ยวกับ NK cell assay และการทดลองที่ต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสีกระทำในห้องปฏิบัติการพิษวิทยาระบบภูมิคุ้มกันที่ National Institute for Occupational Safety and Health, Morgantown, West Virginia และที่ Immunotoxicology Laboratory, Medical College of Virginia, Virginia Commonwealth University, Richmond ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

ในโครงการวิจัยนี้ ตรวจสอบผลของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ ในภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะโดยใช้ mitogenesis assay และ natural killer cell (NK) assay และวัดผลต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ในภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะโดยใช้วิธีทดสอบ mixed lymphocyte response สำหรับการตรวจสอบผลต่อการตอบสนองแบบจำเพาะด้านสารน้ำ (humoral immunity) เลือก Mishell Dutton assay ตรวจสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งเบื้องต้นด้วยการใช้ *in vitro* direct cytotoxicity test ต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้ MTT assay และ ศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นในการต้านการอักเสบผ่านการยับยั้งการสร้าง nitric oxide โดยใช้ทั้ง *in vitro* และ *in vivo* โมเดล

3.4.1 สารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

สารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม (TAM) ที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้ ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศาสตราจารย์ ดร. ไมตรี สุทธิจิตต์ ที่เตรียมโดยการสกัดผงบดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามแห้งใน 50% acetone ด้วยเครื่อง soxlet ตามด้วยการระเหยแห้ง เพื่อให้เข้มข้นด้วยการใช้ rotary evaporator นำสารสกัดเข้มข้นแช่แข็งที่ -80°C เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 16 ชม. ก่อนทำให้แห้งเป็นผงในขณะเย็นจนแข็ง ด้วยเครื่อง lyophilizer เก็บสารสกัดที่ได้เป็นผงแห้งไว้ที่ -20°C เพื่อนำไปทดลองต่อไป สารสกัด TAM ที่ได้ถูกตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระชนิด 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical (DPPH•) ใน DPPH assay (Saha et al., 2004) และ FRAP (ferric reducing/antioxidant power) assay (Benzie and Strain, 1996) ก่อนจัดส่งมาให้ใช้ในโครงการวิจัยนี้

การทดลองใน cell mitogenesis assay, MLR และ Mishell Dutton assay เตรียมสารละลาย TAM 10 mg/ml โดยชั่ง TAM 0.02 กรัม ละลายใน 2 ml dimethyl sulfoxide (DMSO) และเจือจางด้วย RPMI complete media ให้ได้ความเข้มข้นของสารตามที่ต้องการ สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งต่อเซลล์สายพันธุ์ต่าง ๆ และในการทดลอง *in vivo* ละลาย TAM ใน 10% DMSO ใน sterile complete media

3.4.2. สัตว์ทดลอง

เนื่องจากหนูเมาส์เพศผู้เมื่อเลี้ยงร่วมกรงเดียวกัน มักเกิดปัญหาการต่อสู้ ทำให้เกิดความเครียดซึ่งสามารถส่งผลกระทบต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ โครงการวิจัยนี้จึงเลือกศึกษาเฉพาะในหนูเมาส์เพศเมีย หนูเมาส์ (B6C3F1 และ DBA/2) เพศเมีย อายุ 6-8 สัปดาห์ ถูกเลี้ยงที่อาคารสัตว์ทดลอง เป็นระยะเวลา 1-2 สัปดาห์เป็นอย่างต่ำ เพื่อปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมใหม่

(acclimatization) ก่อนนำมาใช้ในงานทดลอง หนู ถูกเลี้ยงในกรงพลาสติกขนาด 7.5 X 11.5 X 5 นิ้ว ที่ปูด้วยขี้กบ (ห่างหุ้ส่วนจำกัดอึดไม้พาเหรด) ปลอดเชื้อ (อุณหภูมิ 121°C 20 นาที) และใช้ที่ปิดด้วยผ้า ซึ่งมีกระดาษกรองชนิด hepa filter โดยมีหนู 4 ตัวต่อ 1 กรง หนูได้รับน้ำและอาหารตามความต้องการ (*ad libitum*) ในห้องสัตว์ทดลองที่ควบคุมอุณหภูมิ $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ และไฟเปิดเปิดอัตโนมัติทุก 12 ชม ตามเวลา กลางวันและกลางคืน กรงหนู และอาหารจะได้รับการเปลี่ยนใหม่ทุก 2 วัน

3.4.3 เซลล์สายพันธุ์ (Cell Lines)

เซลล์มะเร็งสายพันธุ์ในคนต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (human gastric adenocarcinoma) AGS, เซลล์มะเร็งผิวหนัง (human epidermal keratinocyte) HaCat, เซลล์มะเร็งทรวงอก (human mammary adenocarcinoma) MCF-7, เซลล์มะเร็งปอด (human lung carcinoma) A427 และเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ของหนูเมาส์ คือ เซลล์มะเร็งผิวหนังที่สร้างเม็ดสี (murine melanoma) B16F10, เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (murine lymphocytic leukemia cell) L1210, เซลล์มะเร็งแมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW264.7 gamma NO (-) สั่งซื้อจาก American Type Culture Collection (Bethesda, MD)

3.4.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์

อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ (complete media) คือ RPMI-1640 ที่ประกอบด้วย 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 1.5 g/L ของ sodium carbonate, 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin และ 100 µg/mL streptomycin หรือในบางการศึกษา ใช้ 50 µg/ml gentamicin แทน penicillin และ streptomycin การบ่มเซลล์กระทำในตู้บ่ม (incubator) ภายใต้สภาวะ 37°C, 5% CO₂ และเลี้ยงเซลล์จนกระทั่งเซลล์เจริญเติบโตคลุมพื้นที่ผิวใน culture flask (confluence) ประมาณ 80-90% ทุกครั้งก่อนถ่ายเซลล์ไปเลี้ยงต่อ (passage cell) ใน culture flask ใหม่ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ หรือนำเซลล์ไปใช้ในการทดลองต่าง ๆ

3.4.5 การ trypsinize เซลล์ที่เกาะยึดพื้นที่ผิว

ในกรณีที่เซลล์สายพันธุ์เป็นชนิดเกาะยึดพื้นที่ผิว (adherent cell) เมื่อปริมาณเซลล์เจริญคลุมพื้นที่ผิวเพาะเลี้ยงใน culture flask ตามต้องการ ประมาณ 80-90% สามารถเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการ trypsinize เซลล์เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากพื้นที่ผิวเกาะยึดใน flak ที่ใช้เพาะเลี้ยง ดังมีรายละเอียดของขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้คือ

1. Pipette RPMI media ออกจากเซลล์ที่อยู่ใน culture flask

2. ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย PBS
3. Trypsinize เซลล์ออกด้วยการใช้สารละลาย trypsin (0.25% trypsin 1 mM EDTA ใน 0.85% NaCl) โดยใช้ปริมาตรของสารละลาย trypsin ให้น้อยที่สุด แต่สามารถคลุมพื้นที่ผิวทั้งหมดของเซลล์ ซึ่งกระทำโดยขยับ flask ไปมาอย่างนิ่มนวลให้ trypsin ไหลคลุมผิวเซลล์ให้ทั่ว
4. บ่มเซลล์ร่วมกับ trypsin ที่ตุ้ม 37 °C 5% CO₂ เป็นระยะเวลาประมาณ 5-10 นาที ในระหว่างการบ่ม นำเซลล์ออกมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (invert microscope) เป็นระยะเพื่อดูว่าเซลล์ได้หลุดออกจากพื้นที่ผิวเกาะยึดหมดแล้วหรือไม่ ทั้งนี้สามารถเคาะ flask เบา ๆ และหมั่นกลิ้ง trypsin ให้คลุมพื้นที่ผิวให้ทั่ว flask เพื่อช่วยให้เซลล์หลุดง่ายขึ้น ระยะเวลาของการบ่มเซลล์กับ trypsin ควรใช้ระยะเวลาให้สั้นที่สุดเท่าที่จะกระทำได้ในกรณีของเซลล์ RAW264.7 จะค่อนข้าง trypsinize ออกยาก ในบางครั้งอาจใช้เวลานานกว่า 10 นาที แต่ไม่ควรใช้เวลามากกว่า 15 นาที เพราะ trypsin เป็น protease ถ้าสัมผัสกับเซลล์นานเกิน จะเป็นพิษต่อเซลล์
5. เมื่อเซลล์หลุดออกจากพื้นที่ผิวเรียบร้อยแล้ว รีบทำการต้านฤทธิ์ (neutralize) ของ trypsin ด้วยการใส่ complete RPMI media ซึ่งมี 10% FCS
6. ทำการปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่ 1,500 rpm เป็นระยะเวลา 10 นาที
7. ล้างเซลล์ 1 ครั้งด้วย PBS
8. Resuspend เซลล์ใน media ที่ต้องการใช้ในการทดลอง

3.4.6 การเตรียมเซลล์ภูมิคุ้มกันจากม้าม

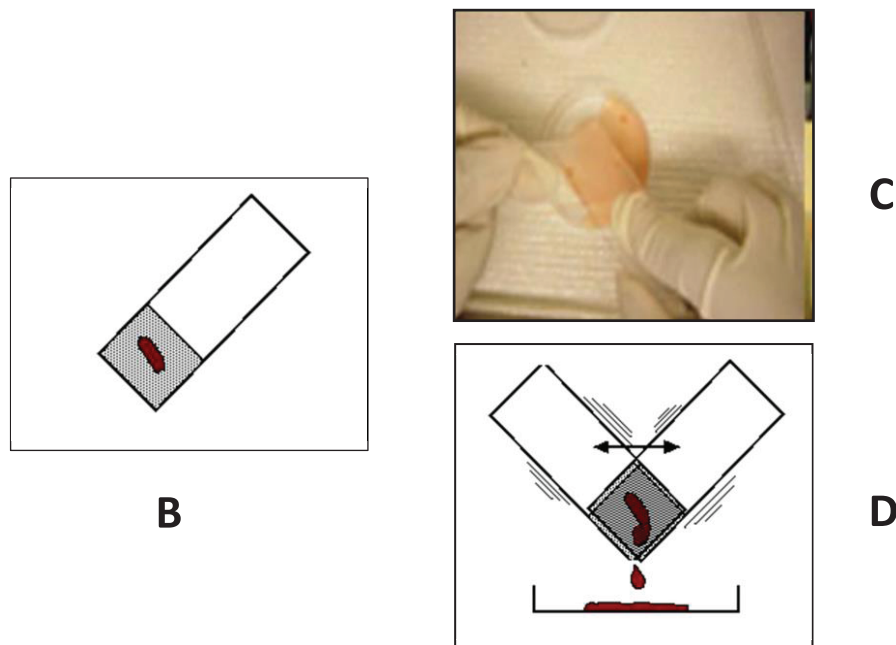
การเตรียมเซลล์เดี่ยว ๆ (single cell suspension) ของ lymphocytes จากม้ามของหนูเมาส์มีขั้นตอนดังนี้คือ

1. กระทำการุณยฆาต (sacrifice) หนู 1 กลุ่ม (ประมาณ 3-4 ตัว) ด้วยวิธีการหักกระดูกต้นคอ (cervical dislocation)
2. นำม้าม (spleen) ของหนูแต่ละตัวออกด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ซึ่งกระทำโดยสเปรย์ alcohol ที่ตำแหน่งของม้าม ก่อนผ่าเอาม้ามออกด้วยกรรไกร และปากคีบปลอดเชื้อ นำม้ามทั้งหมดใส่ใน centrifuge tube ขนาด 15 ml ซึ่งบรรจุ Earle's balanced salt solution (EBSS) (ภาคผนวก) ที่แช่เย็นไว้ที่ 4 °C (ใช้ EBSS 3 ml ต่อ 1 ม้าม)

3. ภายใต้อุณหภูมิห้อง เชื้อ เท้ามที่อยู๋ใน EBSS ลงใน petridish ขนาด 60 x 15 mm (รูปที่ 3.1 A) และเตรียม single cell suspension โดยบด้ามระหว่างส่วนปลายที่ด้าน (frosted end) ของ สไลด์ 2 แผ่น (รูปที่ 3.1 B-D)
4. ใช้ pasteur pipette ดูด EBSS ใน petri plate เพื่อชะเซลล์ที่อาจติดสไลด์ และดูด เซลล์ขึ้นลง (resuspend cell) อย่างนุ่มนวลเพื่อแยกเซลล์ที่เป็นกลุ่มเล็ก ๆ ให้แยกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ดูดเซลล์กลับเข้าสู่หลอด centrifuge เดิม
- 5.ปั่น (centrifuge) หลอดที่ความเร็ว 1,200 rpm, 4°C เป็นเวลา 5 นาที
6. เท supernatant ของเซลล์ออกและ resuspend เซลล์ใน complete RPMI media
7. นับปริมาณเซลล์ด้วยเครื่องนับเซลล์อัตโนมัติ ZBII Coulter counter (รูปที่ 3.2) โดยใช้ ZAPOGLOBIN II lytic reagent เพื่อกำจัดเซลล์เม็ดเลือดแดง เมื่อทราบความเข้มข้นของเซลล์ ปรับให้มีความเข้มข้นที่ต้องการโดยเจือจางใน RPMI complete media

A





รูปที่ 3.1 แสดงรูปม้ามของหนูเมาส์ใน petridish (A) ม้ามที่วางบนด้าน frosted end ของ slide (B) และการบดม้ามระหว่าง 2 slides ที่ด้าน frosted end (C และ D)



รูปที่ 3.2 แสดงเครื่องนับเซลล์อัตโนมัติ (Coulter Counter) ([https://www.ebay.com/itm/ Coulter-Electronics-Particle-Counter-Model-ZF-Parts-/162489104606](https://www.ebay.com/itm/Coulter-Electronics-Particle-Counter-Model-ZF-Parts-/162489104606))

3.4.7 การประเมินปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (Cell Viability)

วิธีการประเมินปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตในโครงการวิจัยนี้ใช้ 3 วิธีคือการใช้สีย้อม trypan blue exclusion ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน ใช้กันมาแต่ดั้งเดิม หรือใช้สีย้อม propidium iodide ซึ่งทั้ง 2 วิธี อาศัยหลักการว่า คุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ที่ไม่มีชีวิต จะไม่สามารถป้องกันการผ่านของสีเข้าสู่เซลล์ ทำให้สีย้อมติดเฉพาะเซลล์ที่ตาย ส่วนอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการประเมินคือ MTT assay ที่ไม่ได้วัดการตายของเซลล์โดยตรง แต่เป็นการวัด metabolic activity ของเซลล์ โดยอาศัยหลักการว่า เซลล์ที่ไม่มีชีวิต จะสูญเสีย metabolic activity รายละเอียดของหลักการและวิธีการทดสอบของแต่ละวิธีมีดังนี้คือ

A. Trypan blue exclusion

การประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยการใช้สีย้อม trypan blue อาศัยหลักการว่า สีย้อม trypan blue ไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีชีวิตได้ ดังนั้น เมื่อส่องดูเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สามารถนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และเซลล์ตายได้ เพราะเซลล์ที่มีชีวิตจะใส ย้อมไม่ติดสีของ trypan blue เฉพาะเซลล์ที่ไม่มีชีวิตเท่านั้นที่ย้อมติดสีน้ำเงินของ trypan blue การประเมินความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์มะเร็ง หรือ เซลล์สายพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยวิธีการย้อมสีด้วย trypan blue มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. หลังจากบ่มเซลล์ด้วยสารสกัด ล้างสารสกัดออกจากเซลล์ 3 ครั้งด้วย PBS
2. ย้อมเซลล์ด้วย 0.4% (w/v) trypan blue (เตรียมใน PBS) โดยใช้อัตราส่วนเซลล์ต่อ trypan blue 1:1 (v/v) เช่นนำ single cell suspension 100 μ l ใส่ในหลอดทดลอง และใส่ 100 μ l 0.4% trypan blue เป็นต้น
3. Pipet เซลล์ที่ผสมอยู่กับสีย้อม trypan blue ลงไปในช่องของ haemocytometer สำหรับนับเซลล์และปิดด้วย cover glass
4. นับเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์มีลักษณะใสเพราะไม่ติดสีน้ำเงิน) และเซลล์ที่ไม่มีชีวิต (เซลล์ติดสีน้ำเงิน) ใน haemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบพินสว้าง (light microscope)
5. คำนวณเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตโดยใช้สมการ:

$$\text{เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิต} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด} - \text{จำนวนเซลล์ที่ตาย}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}} \times 100$$

B. Propidium iodide staining

หลักการของการทดสอบคือ propidium iodide (PI) เป็นโมเลกุลเรืองแสง (fluorescent molecule) ที่ไม่สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ที่มีชีวิตได้ เฉพาะเซลล์ซึ่งมีเยื่อหุ้มเซลล์ที่เสียหาย ซึ่งอาจเป็นเซลล์ที่กำลังตาย หรือเซลล์ที่ตายแล้วเท่านั้น ที่ยอมให้ PI ผ่านเข้าสู่เซลล์ เมื่อเข้าสู่เซลล์ PI ซึ่งเป็น intercalating agent จะแทรกตัว (intercalate) เข้าไปในระหว่าง base pair ของ double stranded DNA สี PI มี excited wavelengths 400-600 nm และ emission wavelength ระหว่าง 600-700 nm จึงทำให้สามารถตรวจวัดปริมาณเซลล์ที่ตายซึ่ง DNA ย้อมติดสีเรืองแสงของ PI ด้วยการใช้ flow cytometry หรือกล้องจุลทรรศน์ fluorescence (Crowley et al., 2016) วิธีการย้อมสี PI ดำเนินตามวิธีการของ Döchler และ Stepnik (2008) ที่ดัดแปลงเล็กน้อย ดังมีรายละเอียดของขั้นตอน ดังนี้

1. หลังจากปั่นเซลล์ด้วยสารสกัด ล้างสารสกัดออกจากเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้ง
2. ย้ายเซลล์ที่อยู่ใน PBS ลงไปใน 5 ml ของ flow-tube
3. ปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่อยู่ใน flow-tube เท PBS ออก ล้างเซลล์ด้วย staining buffer (PBS ที่มี 1% BSA และ 0.1% sodium azide) และย้อมเซลล์โดยใส่ 100 μ l ของ PI solution (1 mg/ml stock solution ที่เจือจาง 1:200 ด้วย staining buffer) บ่มเซลล์ร่วมกับ PI ในที่มืด (ห่อ culture plate ด้วย Aluminium foil) เป็นเวลา 10 นาที
4. หลังจากนั้นล้างเซลล์ด้วย staining buffer 1 ครั้ง และ resuspend เซลล์ใน 100 μ l staining buffer และย้ายเซลล์สู่หลอดทดลองที่มี 500 μ l staining buffer
5. วิเคราะห์ % การติดสีย้อม PI โดยการใช้ BD FACSCalibur flow cytometer

C. MTT Assay

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) เป็นสีสังเคราะห์ ประเภท tetrazolium salt การใช้ MTT assay ประเมินปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตนั้น อาศัยหลักการว่า เฉพาะเซลล์ที่มีชีวิต หรือมี metabolically active เท่านั้น ที่สามารถใช้เอนไซม์ succinate dehydrogenase ใน mitochondria เปลี่ยน MTT ให้เป็น formazan product โดยปฏิกิริยา reduction ผลลัพธ์จากปฏิกิริยา คือ formazan product ที่เกิดขึ้นมีสีม่วงน้ำเงินที่ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 550-600 nm (Mosman 1983; Denizot และ Lang, 1986) ดังนั้น ค่าการดูดกลืนแสงที่เป็นสัดส่วน

โดยตรงกับ formazan product จึงแปรผันโดยตรงกับปริมาณของ succinate dehydrogenase ซึ่งขึ้นกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตนั่นเอง การประเมินความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ด้วย MTT assay ที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Chun et al. (2007) มีรายละเอียดของขั้นตอนดังนี้

1. ภายหลังการบ่มเซลล์ร่วมกับสารสกัดใน 96 well plate เติม 100 μ l 0.5 mg/ml ของ MTT dye solution (เตรียมใน PBS) ลงไปในแต่ละหลุมของ 96 well plate และ บ่มที่ 37°C, 5% CO₂ เป็นเวลา 4 ชม.
2. เมื่อครบ 4 ชม. นำ 96 well plate ไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 rpm, 4°C เป็นเวลา 10 นาที เท supernatant ออกจาก plate
3. เติม 100 μ l DMSO ลงไปในแต่ละหลุมเพื่อละลาย formazan crystal ให้อยู่ในรูปของสารละลายสีม่วง
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ด้วย Benchmark Plus Microplate Spectrophotometer System
5. คำนวณเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตด้วยสมการดังต่อไปนี้

$$\% \text{ เซลล์มีชีวิต} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ย OD กลุ่มทดสอบ}}{\text{ค่าเฉลี่ย OD กลุ่มทดลอง}} \times 100$$

3.4.8 การหาความเข้มข้นของ TAM ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ม้าม (splenocytes)

เพื่อให้แน่ใจว่าผลการทดลองที่เกิดขึ้นเป็นฤทธิ์ของสารสกัดที่มีต่อการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันจริง ไม่ใช่ผลทางอ้อมเนื่องจากความเป็นพิษของสารสกัด ก่อนนำสารไปทดสอบใน *in vitro* จำเป็นต้องหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัด TAM ที่สามารถบ่มร่วมกับเซลล์ม้าม โดยไม่ก่อให้เกิดพิษหรือเพิ่มการตายของเซลล์ การหาความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เริ่มด้วยการบ่มสารสกัดที่ความเข้มข้นแตกต่างกันร่วมกับเซลล์ เป็นระยะเวลา 24 ชม. หลังจากนั้น หาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ ภายหลังการบ่ม ด้วยการใช้ trypan blue exclusion, PI staining หรือ MTT assay (แล้วแต่การทดลอง) ดังมีรายละเอียดของขั้นตอนดังนี้

1. ใส่ 100 μl ของ singl cell suspension ของเซลล์ม้าม (ความเข้มข้น 5×10^6 cell/ml) ลงไปในแต่ละหลุมของ 96 well plate เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์ 5×10^5 cell/หลุม

2. หลังจากนั้นใส่ 20 μl ของสารสกัด TAM ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงไปในแต่ละหลุม ให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ TAM เป็น 10^{-5} - 10^3 $\mu\text{g/ml}$ (ในกรณีที่เตรียมโดยละลายสารสกัดใน 10% DMSO) ส่วนการทดลองที่ละลายผง TAM ใน DMSO ก่อน แล้วค่อยเจือจางด้วย media ทดสอบโดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.002-50 $\mu\text{g/ml}$ นำเซลล์เข้าตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37°C , 5% CO_2 บ่มเป็นระยะเวลา 24 ชม.

3. เมื่อครบกำหนดเวลาของการบ่ม ทำการประเมินความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ด้วยการใช้ วิธี trypan blue exclusion, PI staining หรือ MTT ดังรายละเอียดในหัวข้อที่ 3.4.7 A -C ตามลำดับ

3.4.9 การศึกษาผลของ TAM ต่อการตอบสนองใน mitogenesis assay

Mitogenesis assay เป็นการวัดการตอบสนองของ lymphocytes ต่อ mitogen ซึ่งเป็นสารที่สามารถกระตุ้นการตอบสนองของ lymphocyte ได้หลายกลุ่มเป็นจำนวนมาก มีฤทธิ์ไม่จำเพาะกับตัวรับรู้ (receptor) ใด ๆ B หรือ T เซลล์มีการตอบสนองต่อ mitogen ต่างชนิดกัน mitogen ที่นิยมใช้กระตุ้น T lymphocyte ได้แก่ lectin 2 ชนิดคือ phytohaemagglutinin (PHA) และ concanavalin A (Con A) โครงการนี้เลือกใช้ Con A เป็น mitogen ใน mitogenesis assay เพื่อตรวจสอบว่าสารสกัด TAM ส่งผลต่อการตอบสนองของ T lymphocyte ต่อ Con A mitogen หรือไม่ รายละเอียดการทดสอบที่ดัดแปลงจาก Burleson et al. (1995) มีดังนี้

1. เตรียม stock solution ของ mitogen Con A (1.5 mg/ml) ใน EBSS

2. ทำการรณยฆาตหนู B6C3F1 จำนวน 4 ตัว ในการทดลองแต่ละครั้ง นำม้ามมาเตรียม single cell suspension ของ lymphocyte ตามวิธีที่ระบุใน 3.4.6

3. ภายหลัง resuspend single cell suspension ของเซลล์ม้ามใน RPMI complete media (ใช้ 3 ml ต่อ 1 ม้าม) นับจำนวนเซลล์ด้วยการใช้เครื่องนับเซลล์อัตโนมัติ ZBII Coulter counter โดยใช้ ZAPOGLUBULIN II lytic agent เพื่อกำจัดเซลล์เม็ดเลือดแดง และปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้มีปริมาณตามต้องการ

4. ในแต่ละหลุมของ 96 well microtiter flat bottom plate (Costar, Cambridge, MA) ใส่ 50 μ l complete media ในหลุมที่เป็น control หรือ 50 μ l ของ mitogen Con A ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน (1.25, 2.5, 5 และ 10 μ g/ml) และใส่ 50 μ l ของสารสกัด TAM ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ หรือตัวทำละลายของสารสกัด สุดท้ายใส่ 50 μ l เซลล์ ปริมาตรสุดท้ายในแต่ละหลุมมีค่าเท่ากับ 150 μ l

5. บ่ม culture plate ที่ตู้บ่มที่มี อุณหภูมิ 37°C 5% CO₂ incubator เป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชม.

6. ภายหลังการบ่ม culture ตามระยะเวลาที่กำหนด นำแต่ละ plate มาวัดการเจริญและการแบ่งเซลล์ของ T เซลล์เพื่อตอบสนองต่อ Con A โดยวัดการสังเคราะห์ DNA ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งกระทำดังนี้

6.1 ใส่ 20 μ l ของ [³H]-thymidine (1 mCi/ml) (ICN) ในแต่ละ culture เพื่อติดฉลาก DNA ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นใหม่

6.2 หลังจากนั้น 16 ชม เก็บเกี่ยว (harvest) เซลล์ไว้บนเยื่อกรอง (membrane filter) ด้วยการใช้เครื่องเก็บเกี่ยวเซลล์ (cell harvester) ในระหว่างการเก็บเกี่ยวเซลล์ สารกัมมันตภาพรังสีใน culture ที่ไม่ได้ถูกนำเข้า (uptake) สู่เซลล์จะถูกชะล้างออกจากเซลล์

6.3 สลายเซลล์ที่อยู่บนเยื่อกรองด้วยน้ำ ตามด้วยแอลกอฮอล์ เพื่อให้เยื่อกรองแห้งเร็วขึ้น สิ่งที่ติดบนเยื่อกรองคงเหลือแต่ DNA (เนื่องจากเซลล์ได้แตกแล้วเมื่อล้างด้วยน้ำ) ของเซลล์

6.4 ภายหลังฝังเยื่อกรองให้แห้งข้ามคืน (อย่างน้อย 16 ชม.) เจาะรูในเยื่อกรองซึ่งตรงกับแต่ละหลุมของ culture ใน 96-well plate (ตามการออกแบบของ cell harvester) นำแต่ละเยื่อกรองซึ่งเป็นตัวแทนของแต่ละหลุมของ culture ใส่ใน scintillation vial

6.5 เติม 1 ml scintillation cocktail (Beckman Ready Solv EP) และ อ่านค่าสารกัมมันตภาพรังสีของ tritium [³H] ด้วยเครื่อง LKB liquid scintillation counter ทั้งนี้ ปริมาณสารกัมมันตภาพรังสีของ DNA บนเยื่อกรองในแต่ละหลุม เป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับการสังเคราะห์ DNA ขึ้นใหม่ของแต่ละ culture หรือปริมาณการแบ่งเซลล์ของ T lymphocyte ที่ตอบสนองต่อ Con A mitogen

3.4.10 การศึกษาผลของ TAM ต่อ Mixed Lymphocyte Response

สำหรับการทดสอบ mixed lymphocyte response (MLR) เป็นการวัดการตอบสนองของ T เซลล์ต่อ allogeneic antigen ที่มีความแตกต่างกันที่ major histocompatibility complex (MHC) allogeneic antigen หมายถึง antigen บนผิวเซลล์ของสัตว์ species เดียวกันที่มีความแตกต่าง

กันทางพันธุกรรม ส่วน MHC เป็นโปรตีนบนผิวเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในเรื่องการไม่ยอมรับการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ ในโครงการวิจัยนี้ ใช้เซลล์เดี่ยวจากม้ามของหนูเม้าส์ B6C3F1 เป็นเซลล์ตอบสนอง (responder) และ เซลล์เดี่ยวจากม้ามของหนูเม้าส์ DBA2 เป็นเซลล์กระตุ้น (stimulator) โดยการทดสอบ วัดการตอบสนองแบบ one-way mixed lymphocyte reaction ซึ่งหมายถึงให้เฉพาะเซลล์ของ responder สามารถแบ่งเซลล์เพื่อตอบสนองต่อ stimulator เท่านั้น แต่ไม่ให้เซลล์ของ stimulator สามารถแบ่งเซลล์เพื่อตอบสนองต่อ responder ขั้นตอนของการทดสอบดังัดแปลงจาก Burleson et al. (1995) มีรายละเอียดดังนี้

1. เตรียม stimulator cell โดยใช้ม้ามจากหนู DBA/2 จำนวน 4-5 ม้าม เพื่อเตรียม single cell suspension ตามวิธีที่ระบุในหัวข้อ 3.4.6 แต่ ภายหลังการปั่นในชั้นสุดท้าย resuspend เซลล์ใน 10 ml EBSS
2. นับ stimulator cell โดยใช้ trypan blue exclusion method (หัวข้อ B ใน 3.4.7) ปรับความเข้มข้นของเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell) ให้เป็น 2×10^7 cell/ml
3. ปิเปต 20-30 ml ของ stimulator 2×10^7 cell/ml ใส่ใน 50 ml conical tube
4. เตรียม mitomycin C (5000 $\mu\text{g/ml}$) (ภาคผนวก ก) ด้วยความระมัดระวัง เนื่องจาก mitomycin C เป็นสารก่อมะเร็งและสารก่อกลายพันธุ์ (ใส่ถุงมือ และเตรียมใน biohazard safety cabinet)
5. ใช้ 0.1 ml mitomycin C (5000 $\mu\text{g/ml}$) ต่อ 10 ml 2×10^7 cell/ml stimulator cell เพื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ mitomycin C เป็น 50 $\mu\text{g/ml}$ ห่อหลอดทดลองของ stimulator cell ที่ได้รับ mitomycin C ด้วย aluminium foil เพราะ mitomycin C มีความไวต่อแสง
6. นำเซลล์ stimulator ที่ได้รับ mitomycin C เข้าตู้บ่ม 37°C 5% CO_2 โดยคลายเกลียวของ conical tube เล็กน้อย (แต่ไม่ใช่เปิดฝา เพื่อมิให้เกิดปัญหาการปนเปื้อน) บ่มเซลล์เป็นเวลา 45 นาที เขย่าหลอดอย่างนุ่มนวล ทุก ๆ 10 นาที ระหว่างช่วงเวลาของการบ่ม
7. ในขณะที่บ่ม stimulator cell เตรียม responder cell โดยใช้ม้ามจากหนู B6C3F1 จำนวน 3-4 ตัว เตรียม single cell suspension จากม้ามตามวิธีที่ระบุในหัวข้อ 3.4.6 ภายหลังการปั่นเหวี่ยงชั้นสุดท้าย resuspend เซลล์ใน RPMI complete media ที่มี 50 μM 2 ME (2 - mercaptoethanol) เพิ่มเติม (ภาคผนวก)

8. นับจำนวน responder cell โดย trypan blue exclusion method และปรับความเข้มข้นของ viable cells ให้มีความเข้มข้น 1×10^6 cell/ml เก็บเซลล์ไว้ที่ 4°C ระหว่างรอความพร้อมจาก stimulator cell

9. เมื่อครบกำหนดเวลา 45 นาที เขย่าหลอดทดลอง stimulator cell ที่ได้รับ mitomycin C อีกครั้งหนึ่งอย่างนัวนวล ทำการล้างเซลล์โดยใส่ 20 ml EBSS แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงทันทีที่ 1,200 rpm 4°C เป็นเวลา 10 นาที

10. เมื่อสิ้นสุดการปั่นเหวี่ยง เท supernatant ออก และ resuspend เซลล์ใน 20 ml EBSS และทำการล้างเซลล์ซ้ำอีก 3 ครั้ง เพื่อให้แน่ใจว่าล้าง mitomycin C ที่ไม่ได้ถูก uptake เข้าสู่เซลล์ออกไปจนหมด

11. หลังการล้างเซลล์ stimulator ที่ได้รับ mitomycin C ครึ่งสุดท้าย resuspend stimulator cell ใน complete media นับและปรับเซลล์ให้มีความเข้มข้น 8×10^6 cell/ml

12. ในแต่ละหลุมของ 96 well microtiter U bottom plate ใส่ 100 μl 1×10^6 cell/ml ของ responder ร่วมกับ 50 μl 8×10^6 cell/ml ของ stimulator และ 50 μl ของ media หรือของสารสกัด TAM ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน หรือใช้ตัวทำละลาย DMSO ที่มี เปอร์เซ็นต์ต่างกันตามสารสกัดในแต่ละความเข้มข้น

13. ปั่นเหวี่ยง plate อย่างนัวนวล ด้วยการใช้ความเร็วต่ำประมาณ 600 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4°C ก่อนนำ culture plate เข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37°C , 5% CO_2 เป็นเวลา 5 วัน

14. ในเย็นวันที่ 4 ของการบ่ม ติดฉลาก (labeled) เซลล์ด้วยการใส่ 20 μl [^3H]-thymidine 1 mCi/ml ก่อนที่จะวัดการตอบสนองของ responder ในวันที่ 5 โดยการวัดการสังเคราะห์ DNA ที่เกิดขึ้นใหม่ตามรายละเอียดที่ระบุในขั้นที่ 6 ของการทดสอบ mitogenesis ในหัวข้อที่ 3.4.

3.4.11 การศึกษาผลของ TAM ต่อการสร้าง antibody ใน *in vitro*

โครงการวิจัยนี้ ตรวจสอบผลของ TAM ต่อการทำงานของ B lymphocyte โดยใช้ Mishell Dutton assay (Tucker et al., 1988; Ban et al., 1995) ซึ่งเป็นการวัดความสามารถของ B เซลล์ในการสร้าง antibody (Ab) ที่จำเพาะต่อ antigen ใน *in vitro* สำหรับ antigen ที่เลือกใช้ในงานวิจัยนี้ คือเซลล์เม็ดเลือดแดงแกะ (sheep red blood cell, SRBC) การทดสอบใน Mishell Dutton assay แบ่งเป็น 2 ระยะ คือ ระยะแรกเป็นการ sensitize ด้วย SRBC antigen โดยบ่มเซลล์จากม้ามร่วมกับ SRBC antigen

เมื่อมี หรือ ไม่มีสารสกัดร่วมอยู่ด้วยเป็นระยะเวลา 4 วัน ระยะที่ 2 เป็น plaque forming cell assay ซึ่งเป็นการหาปริมาณ B lymphocyte ที่สามารถสร้าง antibody ที่จำเพาะต่อ SRBC antigen โดยอาศัยหลักการว่า B lymphocyte ที่ถูก sensitize เมื่อ ได้พบกับ SRBC antigen อีกครั้ง plasma เซลล์ (คือ B lymphocyte ที่สามารถสร้าง antibody) จะสร้าง Ab ที่จำเพาะจับกับผิวบนของ SRBC antigen เกิดเป็น antigen-antibody complex ที่สามารถตรึง complement ทำให้ SRBC แตก เห็นเป็น วงใส ที่เรียกว่า “plaque” ท่ามกลางฉากพื้นสีแดงของ SRBC หนึ่งวงใสที่เกิดขึ้น คือ 1 plaque หรือ 1 antibody forming cell นั่นเอง

A. Sensitization phase

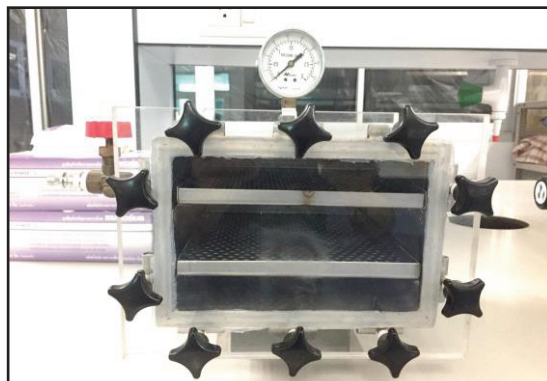
โครงการวิจัยนี้ เลือกการทำ sensitization phase เป็น 2 ขั้น คือขั้นแรก sensitize ล่วงหน้า (prime) ในหนูเม้าส์เป็นเวลา 4 วัน ก่อนนำม้ามออกมา sensitize อีกรอบด้วย antigen ชนิดเดียวกันใน *in vitro* เมื่อมี หรือ ไม่มีสารสกัดอยู่ร่วม รายละเอียดของวิธีการทดสอบมีดังนี้

1. นำ SRBC ที่เก็บที่ 4°C ภายใต้ Alsever's solution มาปั่นเหวี่ยงที่ 2,500 rpm 4°C เป็นระยะเวลา 10 นาที
2. ตูด Alsever's solution ออกด้วยการใช้ pasteur pipette ล้างด้วย EBSS อีก 3 ครั้ง โดยการล้างครั้งแรก ให้ใช้ pasteur pipette ดูดชั้นที่เป็นฝ้าขาว (buffy coat) เนื้อเซลล์เม็ดเลือดแดงออก ภายหลังการล้างครั้งสุดท้าย resuspend เซลล์ใน PBS
3. นับเซลล์โดยใช้เครื่องเซลล์อัตโนมัติ ZBII Coulter counter และปรับเซลล์ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 3.75×10^8 cell/ml
4. ฉีด SRBC ที่เตรียมไว้เข้าหลอดเลือดดำที่หาง (intravenous injection) ในหนู B6C3F1 โดยใช้ 0.2 ml/หนู 1 ตัว หรือ 7.5×10^7 cell/หนู
5. เตรียมเซลล์เดี่ยวจากม้ามของหนู B6C3F1 ที่ถูก sensitized ด้วย SRBC เป็นเวลาอย่างน้อย 4 วัน (ไม่ควรใช้หนูที่ sensitized แล้วเกิน 3 เดือนในการทดสอบ) ปรับความเข้มข้นเซลล์ม้ามเป็น 2×10^7 cell/ml ใน complete RPMI media ที่มี 50 μM 2-ME
6. ล้าง SRBC ด้วย EBSS ตามวิธีที่ระบุในข้อ 1-2 ปรับความเข้มข้น SRBC เป็น 4×10^7 cell/ml

7. ในแต่ละหลุมของ culture plate แบบ 48 หลุม ใส่ $0.5 \text{ ml } 2 \times 10^7 \text{ cell/ml}$ ของ เซลล์มาวมร่วมกับ $0.25 \text{ ml } 4 \times 10^7 \text{ cell/ml}$ SRBC และ 0.25 ml media หรือ สารสกัด TAM ที่ความเข้มข้น ต่าง ๆ กัน หรือ vehicle control ซึ่งเป็น DMSO ที่มี เปอร์เซ็นต์ต่างกันตามแต่ละความเข้มข้นของ สารสกัด TAM สำหรับ background control เพาะเลี้ยงเซลล์ กับ media โดยไม่ต้อง sensitize ด้วย SRBC

8. นำ plate ใส่ใน Mishell Dutton Box (MD box) (รูปที่ 3.3) นำผ้า gauge ใส่ใน จานเพาะเชื้อขนาดเล็ก ซึ่งมีน้ำกลั่นปลอดเชื้ออยู่ เพื่อให้ภายใน MD box มีความชื้นสำหรับเซลล์ ภายหลัง การปิด MD box อัดก๊าซ ผสมพิเศษ ($7\% \text{ O}_2$, $10\% \text{ CO}_2$ balance ด้วย N_2) ไว้ที่ 6 Psi

9. นำ MD box ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C และวางบน rocker ให้มีการเขย่าอย่างนิ่ม นวลในขณะบ่มเป็นระยะเวลา 4 วัน (ต้องนำ MD box มาเช็คทุกวันว่ายังคงมีความดันอยู่ที่ประมาณ 6 Psi ถ้าความดันลดลง ให้เติมก๊าซเพิ่ม เพื่อพยายามรักษาความดันให้คงที่ในระดับนี้



รูปที่ 3.3 แสดง Mishell Dutton Box ที่ใช้บ่ม culture plate เป็นเวลา 4 วันภายใต้ความดัน 6 Psi และอุณหภูมิ 37°C

B. Plaque Forming Cell Assay

เมื่อครบกำหนด 4 วัน หาปริมาณเซลล์ที่สร้าง Ab ที่จำเพาะต่อ SRBC ด้วยการ ใช้ plaque forming cell assay การทดลองใน phase นี้ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ที่ปลอดเชื้อ เนื่องจาก สามารถอ่านผลได้ในวันเดียวกัน ขั้นตอนการทดสอบมีดังนี้

1. ล้าง SRBC ตามวิธีที่ระบุใน A 1-2 แต่ภายหลังการล้างด้วย EBSS ครั้งสุดท้ายให้ resuspend เซลล์ใน EBSS ด้วยปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของ cell pellet ของ SRBC เก็บเซลล์พักไว้ที่ 4°C

2. นำ plate ออกจาก MD box โดยค่อย ๆ เปิด valve ของ MD box อย่างช้า ๆ เพื่อให้ความดันภายใน MD box ค่อย ๆ ลดลง (การลดความดันอย่างรวดเร็วมีผลให้เซลล์ใน plate เกิดความเสียหาย)

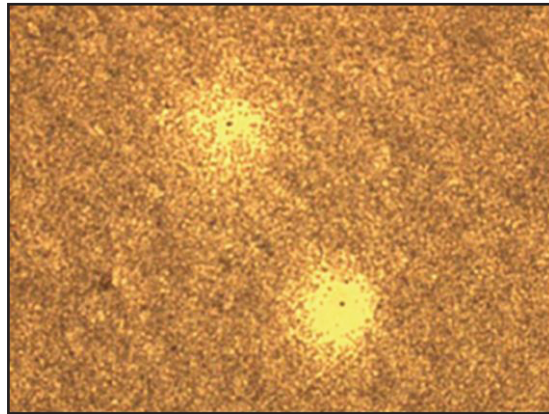
3. ใช้ micropipette ขนาด 1 ml ปิเปตเซลล์ขึ้นลงในแต่ละหลุมเพื่อผสมเซลล์ให้ทั่วกัน วาง plate (ที่ผสมเซลล์เรียบร้อยแล้ว) ไว้ที่ 4°C ระหว่างรอการเตรียมความพร้อมของการจัดหลอดทดลองใน water bath ของขั้นตอนถัดไป

4. ตั้งอุณหภูมิ water bath ที่ 45°C วางหลอดทดลองแก้วขนาด 12x75 mm เรียงไว้ในตะแกรงใส่หลอดทดลอง (test tube rack) ที่แช่อยู่ใน water bath

5. ในแต่ละหลอดทดลอง ให้ใส่สารดังนี้ 0.5 ml agar-dextran (0.5% Bacto-Agar และ 0.05% DEAE dextran ใน EBSS), 25 μl SRBC (ที่เตรียมไว้ใน B1), 100 μl เซลล์จาก MD box, และ 25 μl guinea pig complement

6. นำแต่ละหลอดทดลองขึ้นจาก water bath ผสมสารในหลอดด้วยการ vortex และรีบเทสารลงในจานเพาะเชื้อขนาด 13x100 mm (ที่จัดเรียงล่วงหน้า พร้อม labeled เรียบร้อยว่าเป็นตัวอย่างใด) แล้วปิดด้วย cover slip-ขนาด 40x50 mm. อย่างรวดเร็ว ปล่อยให้วุ้นแข็งตัว ก่อนนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37°C (ใช้ตู้บ่มที่ไม่มี CO_2) เป็นเวลา 3 ชม.

7. นับปริมาณเซลล์ที่สร้าง antibody ด้วยการนับจำนวน plaque ที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่อง Bellco plaque viewer รูปที่ 3.4 แสดงตัวอย่าง plaque (ตำแหน่งของเซลล์ที่สร้าง antibody จำเพาะ) ซึ่งเป็นวงใส ตัดกับฉากพื้นสีแดงของ SRBC



รูปที่ 3.4 แสดง 2 plaques ซึ่งเป็นวงใสรอบเซลล์ที่สามารถสร้าง Ab ที่จำเพาะต่อ SRBC antigen เมื่อมองภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (https://www.medicine.mcgill.ca/physio/vlab/Other_exps/Immunology/PFC.htm)

3.4.12 ความเป็นพิษของสารสกัด TAM ต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์

การทดสอบความเป็นพิษโดยตรงของสารสกัด TAM ต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ HaCat, AGS, MCF-7, A427, B16F10 และ L1210 มีขั้นตอนดังนี้คือ

1. ใส่ 500 μ l เซลล์มะเร็งแต่ละสายพันธุ์ลงใน 48-well plate โดยให้มีปริมาณเซลล์ 5×10^4 เซลล์/หลุม ตามด้วย 20 μ l สารสกัด TAM ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1-20 μ g/หลุม
2. บ่มเซลล์ร่วมกับสารสกัดที่ตุ้ม อุณหภูมิ 37°C และ 5% CO_2 เป็นระยะเวลา 48 ชม.
3. ทดสอบการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ด้วยวิธี MTT ดังรายละเอียดที่ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.7 C

3.4.13 การทดสอบความเป็นพิษของ TAM ในหนูเมาส์

เนื่องจากการทดสอบผลของสารสกัด TAM ต่อการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกันในร่างกายสัตว์ทดลอง (*in vivo* exposure) จำเป็นต้องใช้ความเข้มข้น (dosage) ของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อสัตว์ทดลอง ดังนั้น จึงได้ทำการศึกษาเบื้องต้นเพื่อทดสอบความเป็นพิษของสารสกัด TAM ในหนูเมาส์ B6C3F1 เพื่อหาความเข้มข้น (dosage) ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลอง *in vivo* ต่อไป ขั้นตอนการทดลองมีดังนี้คือ

1. หนูเมาส์ B6C3F1 ได้รับการชั่งน้ำหนัก 1 วันก่อนการทดลอง และแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม โดยจัดแบ่งกลุ่มให้แต่ละกลุ่มมีน้ำหนักตัวเฉลี่ยที่ใกล้เคียงกัน (homogenous weight group)
2. หนูได้รับการป้อนทางปาก (oral gavage) ด้วยตัวทำละลาย 10% DMSO ในกลุ่มควบคุม หรือสารสกัด TAM ที่ความเข้มข้น 50, 100, 500 และ 1,000 mg/kg ทุกวัน วันละครั้งเป็นระยะเวลา 14 วัน (ใช้เข็ม 18 gauge feeding tube และ 1 cc syringe)
3. ในวันที่ 15 ชั่งน้ำหนักสัตว์ทดลอง ก่อนทำการุณยฆาตด้วยการดม CO₂ เก็บตัวอย่างเลือดเพื่อนำมาวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยา (haematology) และทางซีรัมเคมี (serum chemistry analysis) รวมทั้งตรวจดูความผิดปกติ และชั่งน้ำหนักของอวัยวะสำคัญต่าง ๆ

3.4.14 การศึกษาผลของ TAM ต่อ Natural killer (NK) Cell Activity

การทำงานของ NK เซลล์เป็น innate immunity ที่มีความสามารถฆ่าเซลล์มะเร็งเป้าหมาย โดยไม่จำเป็นต้องผ่านการกระตุ้นมาก่อน ในงานวิจัยนี้ ตรวจสอบผลของสารสกัด TAM ต่อความสามารถในการฆ่าเซลล์มะเร็งเป้าหมาย (Yac-1) ใน *in vitro* ของ NK เซลล์ที่ได้จากหนูเมาส์ B6C3F1 ที่ได้รับการป้อนด้วยสารสกัด TAM ต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 14 วัน หลักการทดสอบคือเมื่อบ่ม NK เซลล์ร่วมกับเซลล์มะเร็งเป้าหมายที่ได้ติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี ⁵¹Cr เมื่อเซลล์เป้าหมายแตกเพราะถูกฆ่าโดย NK เซลล์ สารกัมมันตภาพรังสี ⁵¹Cr จะถูกหลั่งออกนอกเซลล์ ปริมาณ ⁵¹Cr ใน supernatant จึงเป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับความสามารถในการฆ่าของ NK cell ขั้นตอนการทดสอบที่ดัดแปลงจาก Holsapple et al. (1988) มีดังนี้คือ

1. ป้อนหนูเมาส์ B6C3F1 (5 ตัว/กลุ่ม) ด้วยสารสกัด TAM ที่ dosage ต่าง ๆ (50, 250 และ 500 mg/kg) หรือด้วยตัวทำละลาย 10% DMSO (กลุ่มควบคุม) ด้วย oral gavage ครั้งต่อวัน ต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 14 วัน สำหรับกลุ่มที่เป็น positive control ในวันสุดท้ายฉีด 0.2 ml anti-asialo GM1 (เจือจาง 1: 10 เท่า) ที่ช่องท้อง (intraperitoneal injection)
2. ในวันที่ 15 หลังจากได้รับการป้อนครั้งสุดท้ายเป็นระยะเวลา 24 ชม. หนูทุกตัวถูกทำการุณยฆาตด้วยการใช้ก๊าซ CO₂ และนำม้ามใส่ใน culture tube บรรจุสารละลาย EBSS 3 ml
3. เตรียมเซลล์เดี่ยว (single cell suspension) จากม้ามตามวิธีที่ระบุในหัวข้อ 3.4.6 ปรับความเข้มข้นของเซลล์ม้ามให้มีความเข้มข้น 2×10^7 cell/ml เก็บเซลล์ที่เตรียมเสร็จใน culture tube ที่ 4°C ระหว่างรอความพร้อมจากเซลล์เป้าหมาย

4. ในขณะที่เตรียม single cell suspension ของ splenocytes นำเซลล์สายพันธุ์ Yac-1 cell มาติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี ^{51}Cr (ใช้ 500 μCi ของ sodium chromate ต่อ $1.5\text{-}2\times 10^7$ cells) ด้วยการบ่มกับ sodium chromate เป็นเวลา 1 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง ภายหลังการบ่ม ล้างสารกัมมันตภาพรังสีที่ไม่ถูก uptake เข้าสู่ Yac-1 เซลล์ออกด้วยการใช้ PBS หรือ EBSS เป็นจำนวน 3 ครั้ง

5. ภายหลังการล้างครั้งสุดท้าย นับเซลล์ด้วยการใช้ haemocytometer (ที่ใช้เฉพาะงานด้านสารกัมมันตภาพรังสี) และปรับความเข้มข้นของ Yac-1 เซลล์ที่ติดฉลากด้วย ^{51}Cr (^{51}Cr -Yac-1) ให้มีความเข้มข้น 1×10^5 cell/ml

6. ใน 96-well plate (U bottom) plate 100 μl เซลล์จากม้ามที่เตรียมไว้แล้ว (ในข้อ 3) ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ตอบสนอง (Responder cell; R) ร่วมกับ 100 μl ของ ^{51}Cr -Yac-1 ที่ทำหน้าที่เป็นเซลล์เป้าหมาย (Target cell; T) ที่ถูกฆ่าโดย NK เซลล์ใน responder ในอัตราส่วนของ R: T เป็น 200:1, 100:1, 50:1, 25:1, 12.5:1. 6.25:1 โดยใช้อัตราส่วนละ 3 ซ้ำ ในหลุมที่เป็น spontaneous release (การรั่วของ ^{51}Cr จาก Yac-1 เซลล์ที่เกิดเองโดยไม่ได้ถูกฆ่า) plate target cell ร่วมกับ 100 μl culture media แทน responder cell และ สำหรับการชักนำให้เซลล์เป้าหมายหลั่ง ^{51}Cr ออกจากเซลล์ทั้งหมด (maximum release) กระทำโดยการ plate เซลล์เป้าหมายร่วมกับ 100 μl 0.1% Triton X 100

7. บ่ม culture plate ที่ตู้บ่ม 37°C , 5% CO_2 เป็นระยะเวลา 4 ชม.

8. ภายหลัง 4 ชม. นำ plate มาปั่นเหวี่ยงที่ 1500 rpm 10 นาที และเก็บ 100 μl supernatant ใส่ scintillation vial เพื่อนำไปวัดค่าสารกัมมันตภาพรังสีโดยใช้ gamma counter แสดงความสามารถในการฆ่าของ NK เซลล์เป็น % specific lysis โดยใช้สูตรดังนี้

$$\% \text{ Specific lysis} = \frac{\text{Experimental release} - \text{Spontaneous release}}{\text{Maximum release} - \text{Spontaneous release}} \times 100$$

3.4.15 การศึกษาผลของ TAM ต่อการสังเคราะห์ NO

ผลของ TAM ต่อการสร้าง NO ของเซลล์ macrophage ถูกตรวจสอบโดยการได้รับสารสกัดทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* เซลล์ macrophage ที่ใช้ใน *in vitro* และ *in vivo* โมเดลคือ เซลล์สายพันธุ์ RAW264.7 และ เซลล์ในช่องท้องหนู (peritoneal cells) ตามลำดับ สำหรับการวัดปริมาณของ NO ที่สังเคราะห์ขึ้นโดยเซลล์ macrophage กระทำใน *in vitro* โดยวัดปริมาณของ nitrite ที่เป็นผลผลิตอันเสถียรของ NO โดยใช้ Griess reagent (de Oliveira et al., 2012) เนื่องจาก NO ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น

เมื่ออยู่ใน culture media จะถูก oxidize เป็น nitrite อย่างรวดเร็ว ดังนั้น ปริมาณของ nitrite ที่เกิดขึ้น จึงเป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับปริมาณของ NO ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น

A ผลของการได้รับ TAM *in vitro* ต่อการสร้าง NO ใน RAW264.7

ในโมเดล *in vitro* ใช้เซลล์สายพันธุ์ RAW264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ NO รายละเอียดของการทดลองมีขั้นตอนดังนี้คือ

1. Plate เซลล์ RAW264.7 cells (2×10^5 เซลล์/หลุม) ลงไปในแต่ละหลุมของ 96-well plate และบ่มไว้เป็นเวลา 2 ชม. เพื่อให้เซลล์ยึดเกาะติดพื้นผิวของหลุม
2. เติม สารสกัด TAM (0.2 200 $\mu\text{g/mL}$) หรือ antioxidant positive controls ได้แก่ vitamin C (500 μM) หรือ vitamin E (141.3 μM) และ β -carotene (2.5 mM) ลงไปในแต่ละหลุมที่มี RAW264.7 เซลล์ บ่มไว้ล่วงหน้าแล้ว
3. หลังจากการบ่มเป็นเวลา 30 นาที กระตุ้นการสร้าง NO ด้วยการใส่ LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ ร่วมกับ IFN- γ 10 ng/mL และบ่มเซลล์ต่ออีกเป็นระยะเวลา 24 ชม.
4. เมื่อครบกำหนดเวลาการบ่ม นำ 96-well plate ไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 rpm 10 นาที แล้ว pipet 100 μL ของ supernatant ไปยัง 96-well plate ใหม่ (ใช้ non-sterile plate ได้ในขั้นตอนนับจากนี้)
5. เติม 100 μL ของ Griess reagent [1% sulfanilamide, 0.1% naphthyl-ethylenediamine dihydrochloride (NED) และ 3% phosphoric acid] ลงไปใน plate ที่มี supernatant อยู่ ผสมให้เข้ากันด้วยการปิเปตขึ้นลงอย่างฉับพลัน พยายามหลีกเลี่ยงการเกิดฟอง บ่มเซลล์ในที่มืดเป็นระยะเวลา 10 นาที
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 545 nm โดยการใช้ spectrophotometric microplate reader
7. ปริมาณของ nitrite ในตัวอย่าง คำนวณได้โดยการเปรียบเทียบกับ calibration curve ของสารมาตรฐาน sodium nitrite ที่มีความเข้มข้น 1.56 μM – 200 μM

B. ผลของTAM ใน *in vivo* ต่อการสร้าง NO ของ peritoneal macrophage

ใน *in vivo* model ใช้เซลล์ macrophage จากช่องท้องของหนูเมาส์ B6C3F1 ที่ได้รับการป้อนด้วยสารสกัด TAM เป็นระยะเวลา 14 วัน ดังมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

1. หนูเมาส์เพศเมียได้รับการป้อน (oral gavage) 1 ครั้งต่อวันด้วยสารสกัด TAM (50, 250 หรือ 500 mg/kg), vitamin C (100 mg/kg) หรือ vitamin E (100 mg/kg) หรือ β -carotene (50 mg/kg) เป็นระยะเวลา 14 วัน
2. หลังจากได้รับการป้อนครั้งสุดท้าย 24 ชม. หนูทุกกลุ่มทดลองถูกการุณยฆาตด้วยการใช้ CO₂ และเก็บเซลล์ในช่องท้อง (peritoneal lavage) ด้วยการใส่ 7 ml ของสารละลายแช่เย็น (4°C) ของ PBS ที่มี 10% FCS
3. เก็บ peritoneal cells ที่ใส่ในหลอดทดลองที่ 4°C ปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 rpm 4 °C เป็นเวลา 10 นาที และ suspend เซลล์ใน complete RPMI media
4. นับเซลล์ด้วยการใช้เครื่องนับเซลล์อัตโนมัติ โดยใช้ Coulter counter
5. Plate เซลล์ 2×10^5 เซลล์/หลุม ลงในแต่ละหลุมของ 96-well plate และบ่มเซลล์ที่ 37°C เป็นระยะเวลา 2 ชม. กำจัดเซลล์ที่ไม่ได้ยึดเกาะกับ plate (non-adherent cells) โดยการล้าง plate ด้วย culture media ที่อุ่นล่วงหน้าไว้ที่ 37 °C
6. บ่ม adherent เซลล์ (เป็น macrophage ใน peritoneal cells) กับสารซึ่งกระตุ้นให้ macrophage สร้าง NO โดยการใช้ 5 μ g/ml LPS ร่วมกับ 10 ng/ml IFN- γ เป็นตัวกระตุ้น หรือใช้ 0.1 μ g/ml TPA เป็นตัวกระตุ้น และบ่มเซลล์ต่อเป็นระยะเวลา 24 ชม.
7. เมื่อครบกำหนดเวลาการบ่ม หาปริมาณ NO โดยวัดปริมาณ nitrite ด้วยการใช้ Griess reagent ตามวิธีที่ระบุใน A 4-7 ของหัวข้อ 3.4.15

3.4.16 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variances) ด้วยการใช้โปรแกรม Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) ชนิดข้อมูลที่มีการกระจายตัวแบบเดียวกัน (homogenous data) ประเมินด้วย One-way analysis of variance (ANOVA) โดยเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมด้วยการใช้ Dunnett's two tail Test สำหรับข้อมูลที่มีการกระจายต่างกัน (non-homogeneous data) ประเมินโดยการใช้ความแปรปรวนแบบสถิติการแจกแจงอิสระ (non-parametric analysis of variance) โดยเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่ม

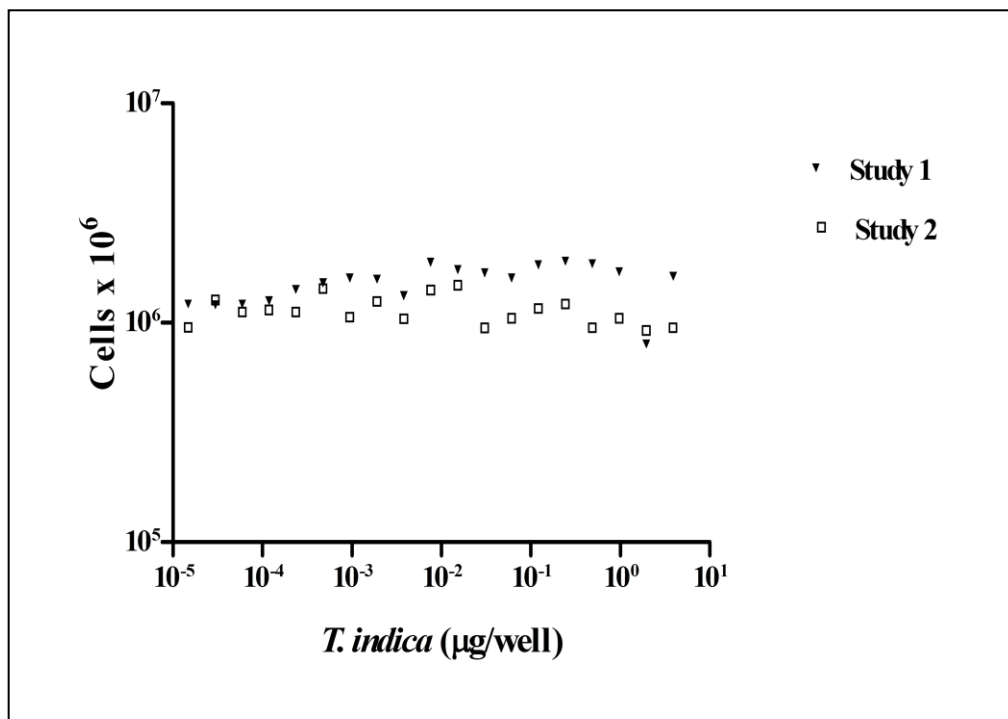
ควบคุมด้วยการใช้ Wilcoxon rank test สำหรับการเปรียบเทียบข้อมูลที่มีเฉพาะ 2 กลุ่มใช้ independent T test ข้อมูลมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญอย่างน้อยที่ $p \leq 0.05$

บทที่ 4

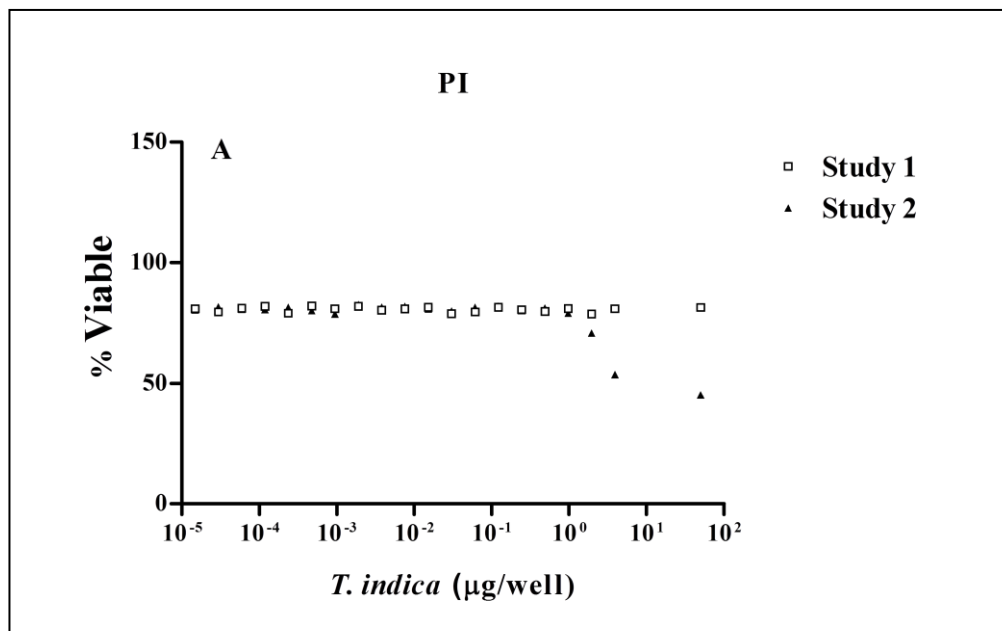
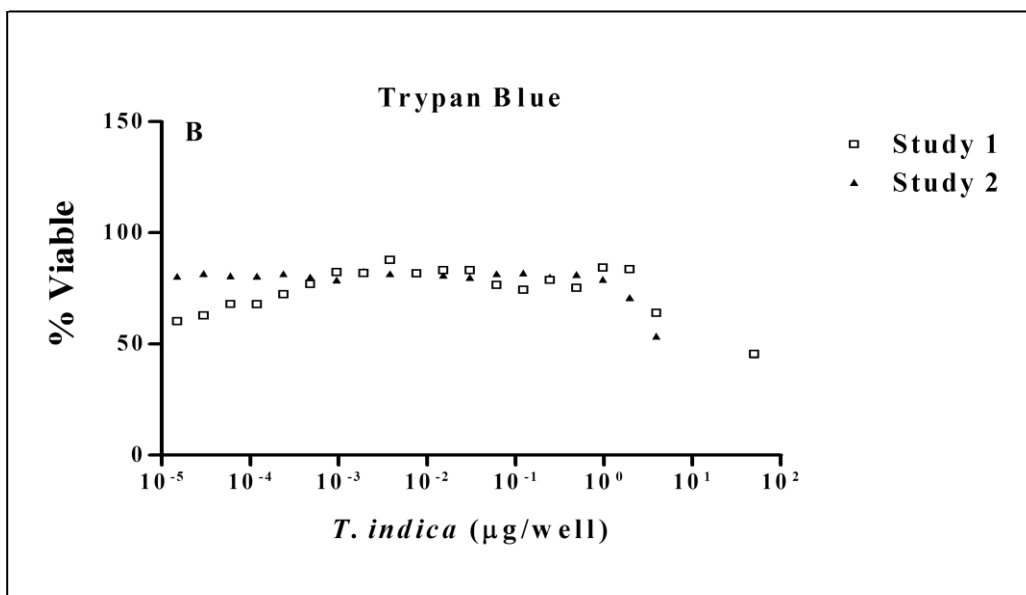
ผลการวิจัย

4.1 ความเข้มข้นของ TAM ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

ผลการศึกษาหาความเข้มข้นสูงสุดของ TAM (ซึ่งเตรียมโดยละลายใน 10% DMSO) ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของหนูเม้าส์ B6C3F1 แสดงในรูปที่ 4.1 ผลการทดลองทั้ง 2 ครั้งให้ผลในทิศทางเดียวกัน ที่แสดงว่า ปริมาณของสารสกัด TAM ที่ความเข้มข้น 10^{-5} - 10^2 $\mu\text{g}/\text{หลุม}$ ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงต่อปริมาณเซลล์ใน culture (รูปที่ 4.1 A) และ จากการวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (cell viability) ด้วยวิธีการย้อมด้วย PI และวิเคราะห์ด้วย flow cytometry (รูปที่ 4.2 A) หรือจากการนับเซลล์ที่มีชีวิตโดยตรงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หลังจากย้อมด้วย trypan blue (รูปที่ 4.2 B) พบว่า TAM ที่ความเข้มข้นที่มากกว่า 10 $\mu\text{g}/\text{หลุม}$ เริ่มแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ ดัง % cell viability เริ่มมีค่าลดลง ดังนั้น ในการทดลองครั้งต่อไป ความเข้มข้นสูงสุดของ TAM ที่ใช้กับเซลล์ใน culture จะใช้ไม่เกิน 20 $\mu\text{g}/\text{หลุม}$



รูปที่ 4.1 ปริมาณเซลล์มะเร็งที่บ่มร่วมกับ TAM ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 48 ชม. ที่ได้จาก 2 การทดลอง การนับเซลล์กระทำโดยใช้เครื่องนับเซลล์อัตโนมัติ Coulter counter

A**B**

รูปที่ 4.2 ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์มะเร็งที่บ่มร่วมกับ TAM ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อประเมินโดยการย้อมด้วย PI (A) และ trypan blue exclusion (B)

เนื่องจากในการละลาย TAM ใน 10% DMSO เมื่อตั้งทิ้งไว้จะมีการตกตะกอนบางส่วนออกมา ดังนั้น ก่อนทำการทดลองใส่ใน culture หรือป้อนกับสัตว์ทดลอง ได้มีการนำสารละลาย TAM ไปปั่นเหวี่ยง (quick spin) ด้วยการใช้ microfuge ดังนั้น ในงานทดลองชุดหลังที่ทำการศึกษเกี่ยวกับผลของ TAM ใน mitogenesis assay, mixed lymphocyte reaction และ Mishell Dutton assay จึงได้ทดลองวิธีการละลายสารสกัด TAM ใหม่โดยพยายามทำให้ละลายได้ดีขึ้น เพื่อป้องกันปัญหาการตกตะกอน โดยนำ TAM ไปละลายใน DMSO 100% ก่อน เพื่อเป็น stock solution ก่อนทำการเจือจางด้วยการใช้ complete media การทดลองพบว่าได้สารละลายที่มีสีเข้มแดงของมะขามเพิ่มขึ้น และไม่สังเกตเห็นตะกอน

สืบเนื่องจากการใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย TAM ความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดที่สามารถใช้ได้ในการทดลอง *in vitro* จึงถูกจำกัดโดย % DMSO สูงสุดที่ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์มาจากการทดลองเบื้องต้น (preliminary experiment) พบว่า 0.1-0.25% DMSO เป็นความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถใช้ได้ในการทดลอง โดยไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ใน culture ดังนั้น ความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดที่ใช้ใน culture ไม่ควรมี % DMSO สูงกว่า 0.1-0.25% อนึ่ง ในการเตรียมความเข้มข้นของสารสกัด TAM ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ โดยการเจือจาง TAM ซึ่งละลายอยู่ใน DMSO โดยใช้ complete media ค่า % DMSO ของสารสกัดในแต่ละความเข้มข้นได้ถูกเจือจางลงตามความเข้มข้นของสารสกัดที่ลดลง ดังนั้น งานวิจัยนี้ จึงทำการทดลอง TAM ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันควบคู่ไปกับ VH control ซึ่งมี % DMSO เท่ากับ % DMSO ของ TAM ในแต่ละความเข้มข้น ทั้งนี้ เพื่อให้มั่นใจในการแปลผลว่าผลที่เกิดขึ้นจากการทดลองเป็นผลของ TAM เท่านั้น ไม่ใช่เป็นผลสืบเนื่องจาก % DMSO ที่มีความแตกต่างกันในแต่ละความเข้มข้นของ TAM

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของหนูเมาส์ B6C3F1 ด้วยวิธีการละลาย TAM ล่วงหน้าด้วย 100% DMSO แสดงในตารางที่ 4.1 ซึ่งชี้แนะว่า ถึงแม้ที่ 0.1 และ 0.04% DMSO ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ (เมื่อเทียบกับ media control) ความเข้มข้นของ TAM ในระดับ vehicle ดังกล่าวคือ 50 µg/ml TAM ยังคงแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อเทียบกับ vehicle control ของแต่ละความเข้มข้น ดังนั้น ความเข้มข้น TAM สูงสุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์อยู่ที่ 20 µg/ml

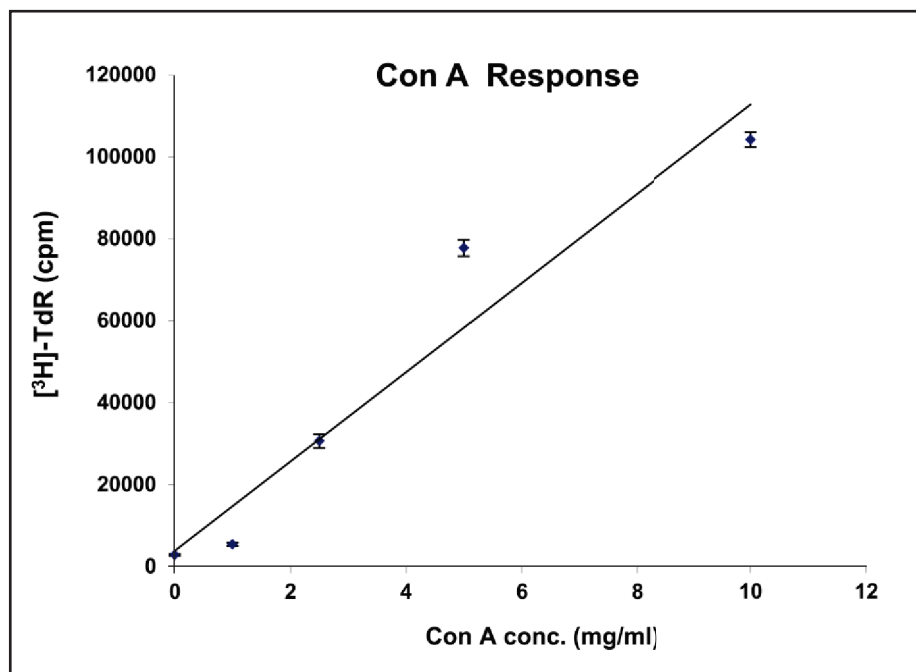
ตารางที่ 4.1 แสดงร้อยละปริมาณเซลล์ตายของเซลล์ม้ามที่ป้อนร่วมกับ VH หรือ TAM ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นเวลา 24 ชม. ก่อนประเมินการตายของเซลล์ด้วยสี PI (* ค่าเฉลี่ยของร้อยละปริมาณเซลล์ตายของแต่ละคู่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$) เมื่อทดสอบด้วย Student's t test

Treatment	% Dead Cells (Ave $\pm$ SD)
Cells + media	25.50 $\pm$ 2.16
Cells+ DMSO 0.1%	26.24 $\pm$ 1.88
Cells + TAM 50 μ g/ml	* 54.56 $\pm$ 0.51
Cells+ DMSO 0.04%	30.32 $\pm$ 1.01
Cells + TAM 20 μ g/ml	46.49 $\pm$ 3.13
Cells+ DMSO 0.01 %	30.78 $\pm$ 0.35
Cells + TAM 5.0 μ g/ml	31.09 $\pm$ 3.02
Cells+ DMSO 0.001%	25.90 $\pm$ 0.00
Cells + TAM 0.50 μ g/ml	32.02 $\pm$ 2.33
Cells+ DMSO 0.0002%	29.89 $\pm$ 3.56
Cells + TAM 0.1 μ g/ml	31.02 $\pm$ 2.33
Cells+ DMSO 0.00004%	23.67 $\pm$ 0.00
Cells + TAM 0.02 μ g/ml	26.75 $\pm$ 2.33
Cells+ DMSO 0.000004%	24.94 $\pm$ 1.65
Cells + TAM 0.002 μ g/ml	26.70 $\pm$ 2.55

4.2 ผลของ TAM ต่อการตอบสนองของเซลล์ม้ามต่อ Mitogen

ในการศึกษาผลของสารสกัด TAM ต่อการตอบสนองของเซลล์ม้ามใน mitogenesis assay งานวิจัยนี้ใช้ Con A ซึ่งเป็น mitogen ที่กระตุ้น T เซลล์ เนื่องจาก Con A แต่ละ lot มีความสามารถในการกระตุ้น T lymphocyte แตกต่างกัน ดังนั้นในการทดลองเบื้องต้น จึงจำเป็นต้องหาความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการกระตุ้น ก่อนทำการทดลองจริงกับสารสกัด การทดลองในรูปแบบที่ 4.3 แสดง dose response curve ของการตอบสนองของ B6C3F1 splenocyte ต่อ Con A ที่ระยะเวลา 72 ชม. ผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้น Con A ที่ชักนำให้เกิดการตอบสนองสูงสุดของเซลล์ม้ามอยู่ที่ประมาณ 5 หรือ 10 μ g/ml ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ Con A 10 μ g/ml เพื่อทดลองผลของ TAM ต่อการตอบสนองของ

เซลล์ม้ามต่อ mitogen ผลการทดลองในตารางที่ 4.2 ชี้ชัดว่า mitogenesis assay ให้ผลดีตามที่ต้องการ คือในเซลล์ม้ามที่บ่มร่วมกับ Con A mitogen ให้การตอบสนองสูงถึง 104,105 cpm ซึ่งสูงกว่า culture ที่ไม่มี mitogen ถึง 38 เท่า ($p < 0.05$) ส่วนการบ่มเซลล์ม้ามร่วมกับสารสกัด TAM ในระดับที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ คือ 0.1-20 $\mu\text{g/ml}$ ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการตอบสนองของ T เซลล์ต่อ Con A mitogen แต่อย่างใด ดังค่า $[^3\text{H}]$ TdR incorporation ของแต่ละคู่ของ TAM และ VH ที่มี % DMSO เท่ากันทุกคู่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนค่า $[^3\text{H}]$ TdR incorporation ของเซลล์ม้าม ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย Con A แต่ได้รับ TAM หรือ VH ที่มี % DMSO เท่ากันกับ TAM ในแต่ละความเข้มข้น มีค่าต่ำเทียบเท่ากับ baseline เพราะไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วย mitogen คือค่า $[^3\text{H}]$ TdR incorporation อยู่ที่ประมาณ 2,500-3,000 cpm และไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญแต่ประการใด (ไม่ได้แสดงข้อมูล)



รูปที่ 4.3 แสดงการตอบสนองของเซลล์ม้ามจากหนูเม้าส์ B6C3F1 ต่อ Con A mitogen ที่ความเข้มข้น 1-10 $\mu\text{g/ml}$ ที่ระยะเวลา 72 ชม.

ตารางที่ 4.2 ผลของสารสกัด TAM ต่อการตอบสนองของเซลล์ม้ามจากหนู B6C3F1 ต่อ 10 $\mu\text{g/ml}$ Con A ใน *in vitro* ที่ระยะเวลา 72 ชม.

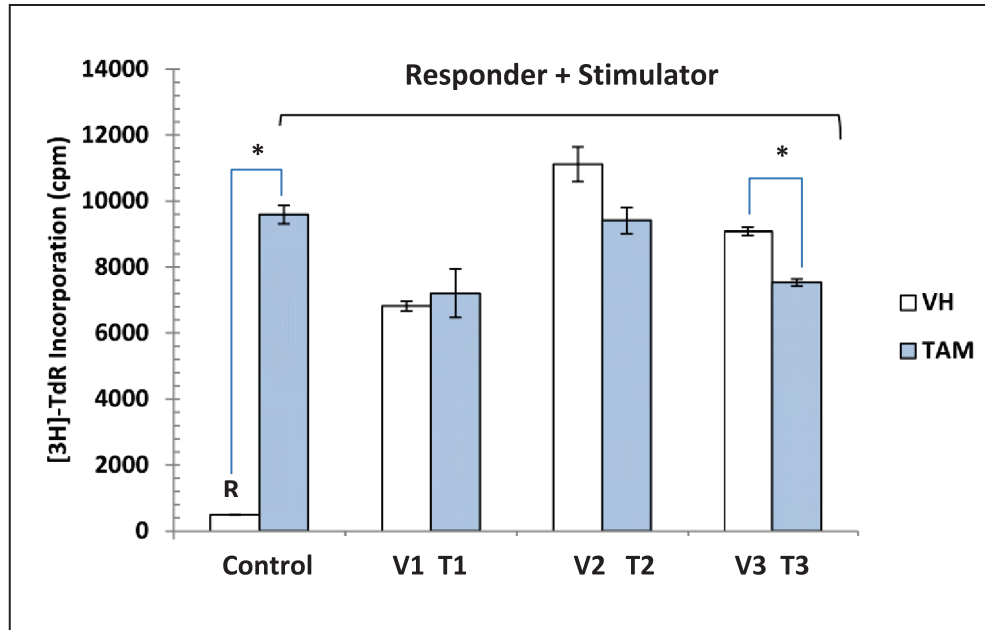
Treatment	[³ H] TdR incorporation (cpm)
Cell (without Con A)	2,748 $\pm$ 248
Cell+media	104,195 $\pm$ 9,585*
Cells+ DMSO 0.04%	109,617 $\pm$ 12,883
Cells + TAM 20 $\mu\text{g/ml}$	89,097 $\pm$ 10,202
Cells+ DMSO 0.01%	92,880 $\pm$ 8,431
Cells + TAM 5 $\mu\text{g/ml}$	98,361 $\pm$ 19,199
Cells+ DMSO 0.002%	99,288 $\pm$ 14,443
Cells + TAM 1 $\mu\text{g/ml}$	93,961 $\pm$ 15,891
Cells+ DMSO 0.0002%	90,953 $\pm$ 7,323
Cells + TAM 0.1 $\mu\text{g/ml}$	86,498 $\pm$ 5,887

* ค่า [³H] TdR incorporation ของแต่ละคู่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ ($p < 0.05$)

4.3 ผลของ TAM ต่อการตอบสนองใน Mixed Lymphocyte Reaction

รูปที่ 4.4 แสดงผลของ TAM ต่อการตอบสนองของเซลล์ม้ามจากหนูเม้าส์ B6C3F1 ที่มีต่อเซลล์ allogeneic (เซลล์ม้ามจากหนู DBA.2) ผลการทดลองชี้แนะว่า ในกลุ่ม control ซึ่งไม่ได้รับสารสกัด TAM หรือ DMSO (ซึ่งเป็น VH control ของ TAM) เซลล์ม้ามจากหนู B6C3F1 ซึ่งเป็น H-2^b สามารถตอบสนองต่อเซลล์ม้ามของหนูเม้าส์ DBA/2 ที่เป็น H-2^d ซึ่งมีความแตกต่างกันทาง major histocompatibility complex class II ได้สูง คือมีการตอบสนองเพิ่มขึ้นถึง 19.5 เท่า และการตอบสนองเป็นแบบ one-way mixed lymphocyte reaction เฉพาะเซลล์ม้ามของ B6C3F1 ซึ่งเป็น responder เท่านั้นที่สามารถตอบสนอง ส่วนเซลล์ม้าม DBA/2 ทำหน้าที่เป็นเพียง stimulator ไม่สามารถตอบสนองต่อเซลล์ B6C3F1 ได้ ดัง culture ที่มีแต่เซลล์ม้าม DBA/2 (ที่ถูกบ่มร่วมกับ mitomycin C ล่วงหน้า) เมื่อได้รับ Con A หรือไม่ได้รับ Con A มีค่า [³H] TdR incorporation เท่ากับ 491.67 ± 61.4 cpm และ 399.67 ± 157.91 cpm ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าเซลล์ที่เป็น stimulator ไม่สามารถตอบสนองต่อ mitogen ได้ การวัดการตอบสนองที่เกิดขึ้นจึงเป็นการตอบสนองของ responder หรือของเซลล์ม้าม B6C3F1 ที่ได้รับสาร

เท่านั้น สำหรับผลของ TAM ที่ความเข้มข้น 1-10 $\mu\text{g/ml}$ ต่อการตอบสนองใน MLR พบว่า เมื่อเทียบกับ vehicle control คือ DMSO ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ต่างกันขึ้นกับแต่ละความเข้มข้นของสารสกัด TAM การตอบสนองต่อ allogeneic เซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ TAM 10 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$)



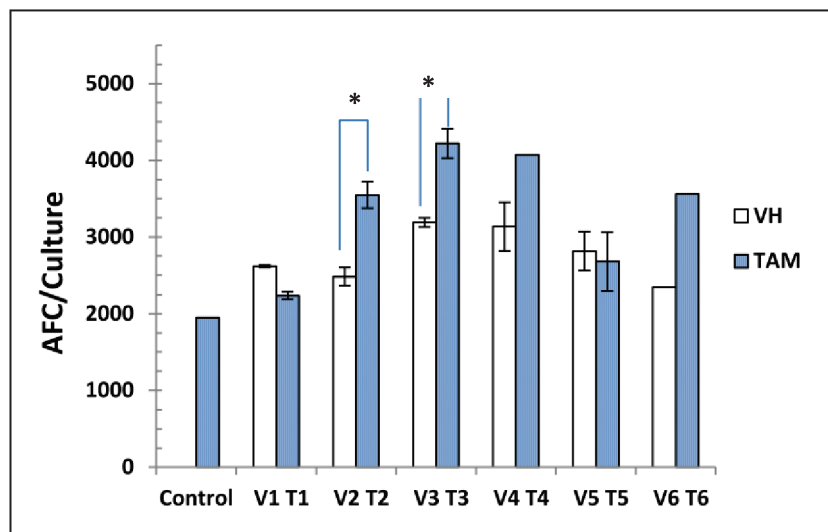
รูปที่ 4.4 ผลของสารสกัด TAM ต่อการตอบสนอง allogeneic เซลล์ (DBA/2) ของเซลล์ม้ามหนูเม้าส์ B6C3F1. T1, T2, T3, คือ TAM ที่ความเข้มข้น 10, 5 และ 1 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ V1, V2, V3 หมายถึง vehicle control ของ TAM แต่ละความเข้มข้น ซึ่งเป็น 0.1, 0.05 และ 0.01 % DMSO ตามลำดับ R คือ responder หมายถึง culture ของเซลล์ม้ามที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยเซลล์ allogeneic stimulator (*) หมายถึง culture ที่ responder บ่มร่วมกับ stimulator มีค่าแตกต่างจาก culture ที่มีแต่ responder อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

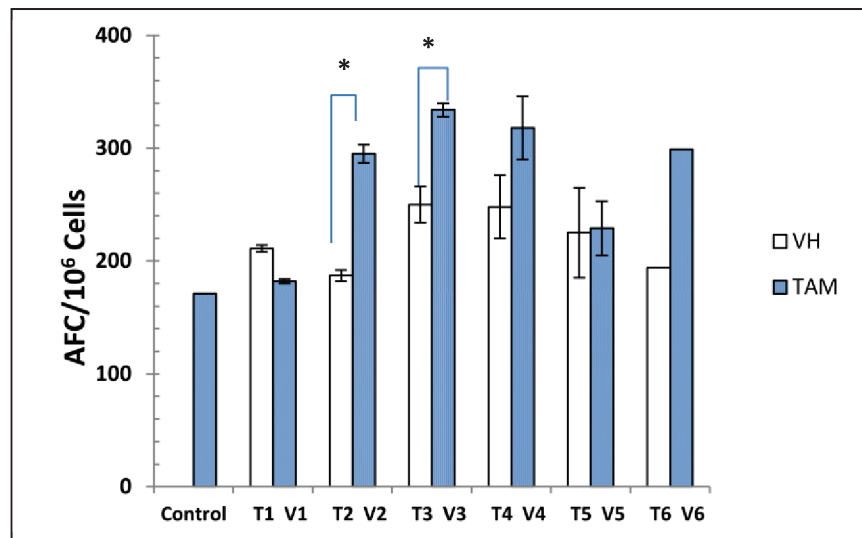
4.4 ผลของ TAM ต่อการสร้าง antibody *in vitro* ใน Mishell Dutton Assay

ในกลุ่มควบคุม (control ในรูปที่ 4.5) ซึ่งไม่ได้รับสารสกัด TAM หรือ vehicle control เซลล์ม้ามของ B6C3F1 สามารถถูกกระตุ้นโดย SRBC ให้เกิดการตอบสนองโดยสร้าง antibody ต่อ SRBC ใน *in vitro* ได้ใน Mishell Dutton assay ดัง culture ใน *in vitro* ที่ไม่ได้ใส่ SRBC ไม่พบเซลล์ที่สามารถสร้าง antibody (รายงานค่าเป็น antibody forming cell; AFC) ที่จำเพาะต่อ SRBC ได้ แต่ใน culture ที่มี

SRBC เมื่อป้อนเป็นระยะเวลา 4 วัน จำนวนเซลล์ที่สร้าง antibody ที่จำเพาะต่อ SRBC (จำนวน plaque) นับได้ 1950 AFC/culture แสดงว่าวิธีการทดสอบ Mishell Dutton ถูกต้อง ให้ผลอย่างที่ควรจะเป็น สำหรับผลของสารสกัด TAM ต่อการสร้าง antibody ใน *in vitro* ในรูปที่ 4.5 A และ B พบว่า เมื่อเทียบกับ VH (DMSO) control ที่มี % DMSO เท่ากันในแต่ละความเข้มข้นของ TAM สารสกัดที่ความเข้มข้น 5 และ 1 µg/ml สามารถกระตุ้นการทำงานของ B เซลล์ในการสร้าง antibody ที่จำเพาะต่อ SRBC antigen ได้ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ไม่ว่าจะวิเคราะห์ในรูปแบบของเซลล์ที่สามารถสร้าง antibody ได้ต่อ culture (AFC/culture) หรือ เซลล์ที่สร้าง antibody ได้ต่อ 1 ล้านเซลล์เท่ากัน ($\text{AFC}/10^6 \text{ cells}$) ก็ให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน (รูปที่ 4.5 A และ B ตามลำดับ) คือ จำนวนเซลล์ที่สร้าง Ab ต่อ culture ของ TAM ที่ 5 µg/ml และ 1 µg/ml มีค่าสูงกว่า VH control ของแต่ละความเข้มข้นประมาณ 43% และ 32.3 % ตามลำดับ ($p < 0.05$) โดยค่าจำนวนเซลล์ที่สร้าง Ab ต่อ SRBC ใน 1 ล้านเซลล์ของ TAM ที่ 5 µg/ml และ 1 µg/ml มีค่าสูงกว่า VH control ของแต่ละความเข้มข้นประมาณ 58% และ 34 % ตามลำดับ

A

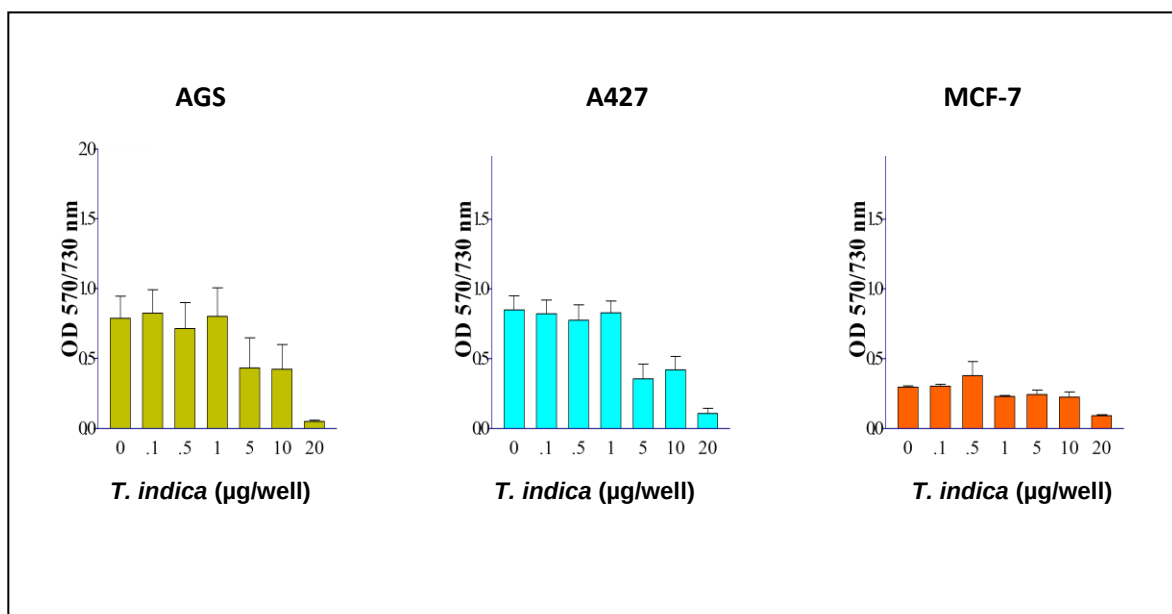
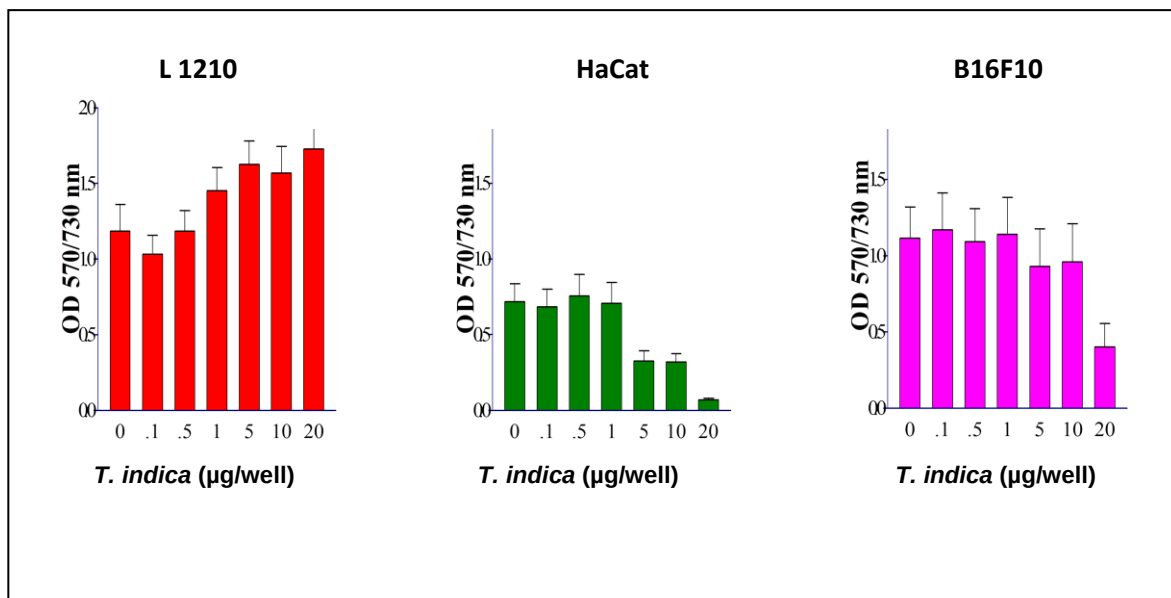


B

รูปที่ 4.5 ผลของ TAM ต่อการสร้าง antibody *in vitro* เพื่อตอบสนองต่อ SRBC antigen เมื่อแสดงผลเป็น AFC/ culture (A) และ AFC/10⁶ recovered cells (B) T1, T2, T3, T4, T5 และ T6 คือ TAM ที่ความเข้มข้น 10, 5, 1, 0.1, 0.01, และ 0.001 µg/ml ตามลำดับ V1, V2, V3, V4, V5 และ V6 หมายถึง vehicle control ของ TAM แต่ละความเข้มข้น ซึ่งเป็น 0.025, 0.0125, 0.0025, 0.00025, 0.000025 และ 0.0000025 % ตามลำดับ

4.5 ความเป็นพิษของ TAM ต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์

การทดสอบความเป็นพิษของ TAM ต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ต่าง ๆ ใน *in vitro* ประเมินผลปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตด้วยการใช้ MTT assay ผลทดลอง (รูปที่ 4.6) พบว่าเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ต่างชนิดมีความไวต่อความเป็นพิษของสารสกัด TAM แตกต่างกัน โดยเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ที่มีความทนทานต่อ TAM มากที่สุดคือ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว L1210 ที่ความเข้มข้นของ TAM ตั้งแต่ 0.1-20 µg/หลุม ไม่มีผลกระทบต่อปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตแต่อย่างใด รองลงมาคือเซลล์มะเร็งทรวงอก MCF-7 และเซลล์มะเร็งผิวหนังที่สร้างเม็ดสี B16F10 ที่ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตลดลงที่ความเข้มข้น TAM 20 µg/หลุม ส่วนเซลล์มะเร็งผิวหนัง HaCat, เซลล์มะเร็งกระเพาะ AGS และเซลล์มะเร็งปอด A427 ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มมีปริมาณลดลงเมื่อได้รับ TAM ที่ความเข้มข้น 5-20 µg/หลุม

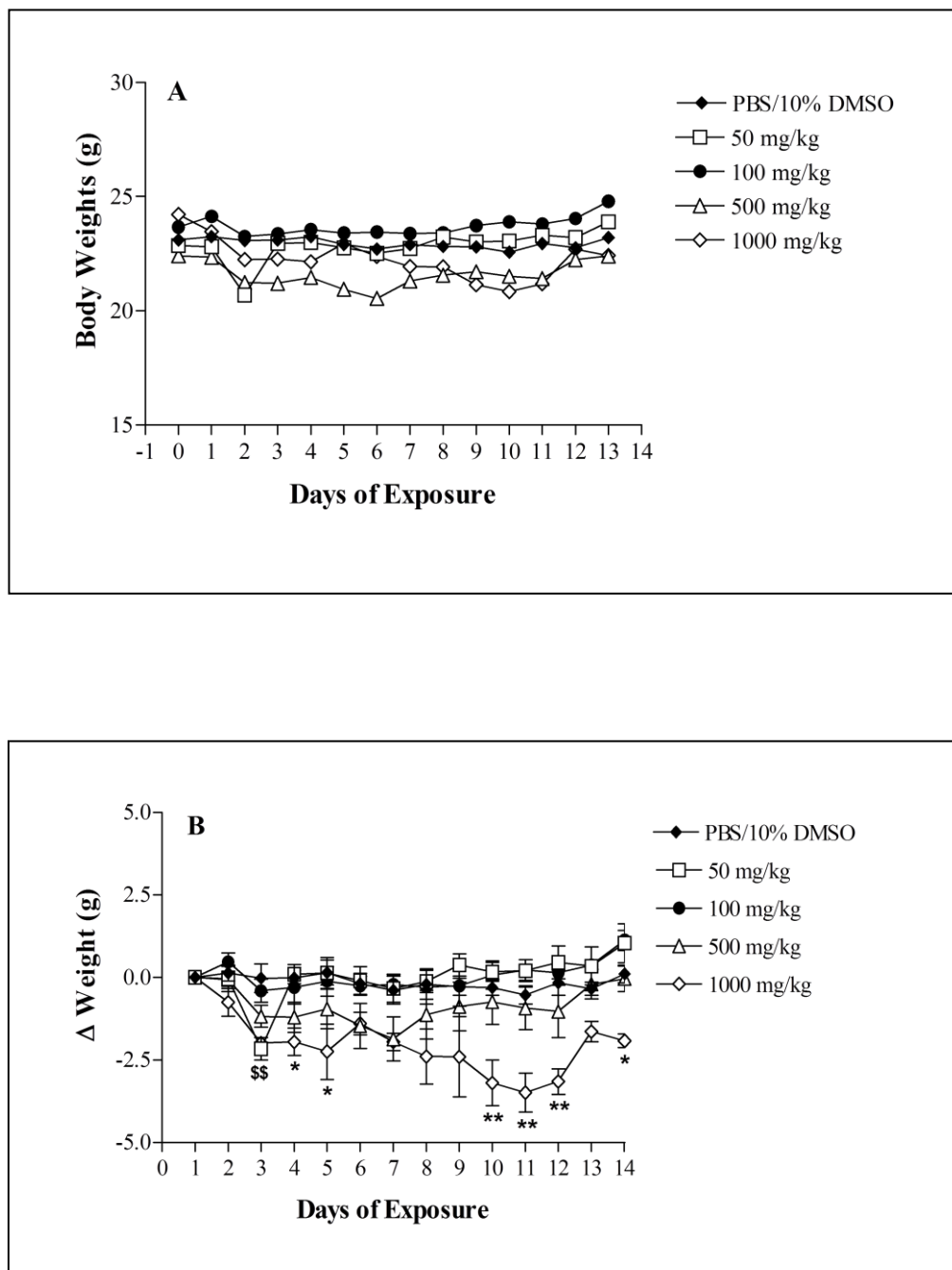


รูปที่ 4.6 ความเป็นพิษของสารสกัด TAM ต่อเซลล์มะเร็ง *in vitro*

4.6 การทดสอบความเป็นพิษของ TAM ในหนูเมาส์ B6C3F1

ผลการทดสอบความเป็นพิษของ TAM ในหนูเมาส์ B6C3F1 เพื่อหา dosage ของ TAM ที่ไม่ก่อให้เกิดพิษในสัตว์ทดลองในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดใน *in vivo* พบว่า หนูเมาส์ B6C3F1 ที่ได้รับการป้อนด้วย TAM (50-1,000 mg/kg) ทาง oral gavage วันละครั้ง ต่อเนื่องเป็นเวลา 14 วัน ไม่แสดงอาการเกิดพิษทางคลินิกจากสารสกัด TAM ยกเว้นในกรณีของ TAM ที่ 500 mg/kg และ 1,000 mg/kg ที่เกิดการตายเกิดขึ้น รูปที่ 4.7 A แสดงค่าน้ำหนักตัวของสัตว์ทดลอง ของทุกกลุ่มที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จากกลุ่มควบคุม ที่ไม่ได้รับสารสกัด แต่ได้รับ 10% DMSO ที่เป็น vehicle control (ซึ่งผลการทดลองก่อนหน้า พบว่า กลุ่มควบคุมที่ได้รับ DMSO 10% ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มทดลองที่ได้รับ PBS แต่อย่างใด) รูปที่ 4.7 B แสดงการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวของสัตว์ทดลองจากวันแรกของการทดลอง (day 0) จนกระทั่งถึงวัดสุดท้าย (day 14) ซึ่งผลการทดลองชี้ชัดว่า ทุกกลุ่ม ไม่มีการลดลงของน้ำหนักตัวจากวันแรกของการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้น ในกลุ่มที่ได้รับ dose สูงสุด 1,000 mg/kg มีการลดลงของน้ำหนักตัวชั่วคราวอย่างมีนัยสำคัญ จากวันแรกของการทดลอง โดยเฉพาะวันที่ 11 มีการลดของน้ำหนักตัวสูงสุด 14% ($p < 0.01$) หรือน้ำหนักลดลงประมาณ 3 กรัม แต่หลังจากนั้น น้ำหนักตัวเริ่มสูงขึ้นเล็กน้อย จนกระทั่งถึงวันที่ 14 ซึ่งเป็นวัดสุดท้ายของการป้อนสารสกัด น้ำหนักตัวในกลุ่มนี้ยังคงลดลงเมื่อเทียบกับวันแรกที่ได้รับ TAM ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตาม การได้รับ TAM (50-1,000 mg/kg) ทาง oral gavage วันละครั้ง ต่อเนื่องเป็นเวลา 14 วัน ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของอวัยวะสำคัญภายในร่างกาย คือ สมอง ม้าม ไต ปอด หรือ ไทมัส (thymus) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แม้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่มีข้อสังเกตว่า น้ำหนักของตับเพิ่มขึ้นเล็กน้อยที่กลุ่มที่ได้รับ TAM 100 mg/kg และน้ำหนักหัวใจมีแนวโน้มที่มีค่าลดลงเล็กน้อยในกลุ่มที่ได้รับ TAM 50, 500 และ 1,000 mg/kg (ตารางที่ 4.3) นอกจากนั้น ผลวิเคราะห์ทาง serum chemistry ซึ่งวิเคราะห์เอนไซม์ ALP (alkaline phosphatase), ALT (alanine transaminase หรือ serum glutamic pyruvate transaminase; SGPT), AST (aspartate transaminase หรือ serum glutamic oxaloacetic transaminase; SGPT), BUN (blood urea nitrogen), uric acid, bilirubin และ creatine ซึ่งสะท้อนการทำงานของตับและไต (ตารางที่ 4.4) และผลวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยา ที่วิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดแดง (red blood cell count; RBC), HCT (haematocrit), HGB (haemoglobin), MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration) และ MCH (mean corpuscular hemoglobin) (ตารางที่ 4.5 – 4.6) พบว่า ไม่มีความผิดปกติ และไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม หรือมีการเปลี่ยนแปลงที่สัมพันธ์กับ dosage ของ TAM ที่เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับไม่มีการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเม็ดเลือดขาว (white blood cell count; WBC) และจำนวนเกร็ดเลือด (platelet) ยกเว้นกลุ่มที่ได้รับ TAM 50 และ 100 mg/kg มีค่า MCV ซึ่งเป็นค่า ปริมาตรเฉลี่ยของเม็ดเลือดแดงมีค่าสูงขึ้นเล็กน้อยอย่างมีนัยสำคัญ ประมาณ 3.7 และ 2.6 % ตามลำดับ

(ตารางที่ 4.6) อย่างไรก็ตาม ในกลุ่มที่ได้รับ TAM สูงสุดที่ 1,000 mg/kg มีแนวโน้มของ % neutrophil ที่เพิ่มขึ้น และมี % lymphocyte ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ผลจากการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว (differential white blood cell count) (ตารางที่ 4.7) พบว่าไม่มีความแตกต่างของ % monocytes, % eosinophils และ % basophils ของทุกกลุ่มการทดลอง โดยรวม ผลจากการทดสอบความเป็นพิษของ สารสกัด TAM ในหนูเมาส์ B6C3F1 (รูปที่ 4.7 ตารางที่ 4.3 ถึง 4.7) ชี้แนะว่า สารสกัดจากเปลือกหุ้ม เมล็ดมะขามมีความเป็นพิษค่อนข้างต่ำในสัตว์ทดลอง แต่ที่ dose 1,000 mg/kg สารสกัดสามารถก่อให้เกิด การตาย 40% ในสัตว์ทดลอง ผลการชันสูตรหนูที่ตายพบตะกอนของ TAM ในระบบทางเดินอาหาร ดังนั้น สาเหตุการตายน่าจะเกี่ยวข้องกับปัญหาทางกายภาพที่เกิดจากตะกอนของ TAM เมื่อได้รับในปริมาณสูง ดังนั้น ปริมาณ dose 50, 250 และ 500 mg/kg จึงถูกเลือกใช้ในการทดลองของการรับสารสกัดใน *in vivo* ครั้งหน้าต่อไป



รูปที่ 4.7 น้ำหนักตัว (A) และการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว (B) ของหนูเม้าส์ B6C3F1 ในช่วงระหว่าง 14 วันของการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัด TAM

ตารางที่ 4.3 ^๕ น้ำหนักของอวัยวะต่าง ๆ ของหนูเมาส์ B6C3F1 หลังจากได้รับสารสกัด TAM ด้วยการป้อนทางปากเป็นระยะเวลา 14 วัน

กลุ่มทดลอง	สมอง (mg)	ตับ (mg)	ม้าม (mg)	ไต (mg)	ไทมัส (mg)	หัวใจ (mg)	ปอด (mg)	N
Vehicle	395.2 ± 5.8	1067.2 ± 2.6	70.0 ± 3.4	304.6 ± 2.2	51.4 ± 2.5	125.2 ± 2.9	203.8 ± 3.1	5
50 mg/kg	423.2 ± 6.2	1088.2 ± 3.7	69.8 ± 2.5	304.6 ± 3.2	64.4 ± 2.7	107.4 ± 3.4	192.4 ± 4.2	5
100 mg/kg	417.4 ± 4.9	1199.0 ± 2.4	74.4 ± 6.4	280.0 ± 4.1	58.0 ± 3.5	119.60 ± 2.1	185.4 ± 3.2	5
500 mg/kg	425.0 ± 5.1	1015.5 ± 5.4	72.0 ± 3.3	292.5 ± 1.5	55.0 ± 4.4	107.25 ± 1.5	189.25 ± 4.9	4
1000 mg/kg	436.67 ± 8.9	979.0 ± 4.1	67.33 ± 5.1	308.33 ± 1.7	48.33 ± 2.3	107.33 ± 2.4	186.67 ± 2.4	3

^๕ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± SD ของน้ำหนักของอวัยวะต่าง ๆ ในหนู B6C3F1 ที่ได้รับการป้อนด้วย TAM จำนวนสัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มเท่ากับ 5 ยกเว้นในกลุ่มที่ได้รับการป้อนด้วย TAM 500 และ 1,000 mg/kg มีหนูตายจากการทดลอง 1 และ 2 ตัวตามลำดับ

ตารางที่ 4.4 ข้อมูลของ serum chemistry ของหนูเมาส์ B6C3F1 ที่ได้รับการป้อนด้วย TAM เป็นระยะเวลา 14 วัน

กลุ่มทดลอง	ALP (U/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dl)	Uric Acid (mg/dl)	Bilirubin (mg/dl)	Creatine (mg/dl)	N
Vehicle	153.8 ± 4.6	36.0 ± 1.7	75.0 ± 5.8	26.4 ± 0.9	1.2 ± 0.7	0.22 ± 0.02	0.56 ± 0.07	5
50 mg/kg	121.8 ± 7.0	31.6 ± 10.5	82.2 ± 3.0	15.8 ± 6.4	0.9 ± 0.5	0.12 ± 0.06	0.15 ± 0.05	5
100 mg/kg	138.6 ± 4.8	64.8 ± 17.3	96.4 ± 34.3	26.9 ± 1.0	0.8 ± 0.1	0.16 ± 0.02	0.36 ± 0.07	5
500 mg/kg	122.8 ± 18.8	36.0 ± 1.7	30.3 ± 15.3	17.0 ± 5.6	0.6 ± 0.2	0.05 ± 0.03	0.33 ± 0.03	4
1000 mg/kg	116.7 ± 4.8	160.3 ± 121.8	53.7 ± 19.5	9.0 ± 8.8	0.5 ± 0.3	0.07 ± 0.007	0.50 ± 0.00	3

ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± SD ของค่า serum chemistry ในหนูเมาส์ B6C3F1 ที่ได้รับการป้อนด้วย TAM จำนวนสัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มเท่ากับ 5 ยกเว้นในกลุ่มที่ได้รับการป้อนด้วย TAM 500 และ 1,000 mg/kg มีหนูตายจากการทดลอง 1 และ 2 ตัวตามลำดับ

ตารางที่ 4.5 ค่าโลหิตวิทยาของหนูเมาส์ B6C3F1 ที่ได้รับการป้อนด้วย TAM เป็นระยะเวลา 14 วัน

Exposure	Leukocytes (10 ³ /μL)	Erythrocytes (10 ⁶ /μL)	Hematocrit (%)	Hemoglobin (g/dl)	Platelets (10 ⁵ /mm)	N
Saline	5.0 ± 0.9	10.7 ± 0.2	48.9 ± 0.6	16.1 ± 0.2	955 ± 22	5
50 mg/kg	4.8 ± 0.5	10.5 ± 0.2	49.9 ± 0.8	15.9 ± 0.2	983 ± 123	5
100 mg/kg	5.3 ± 0.7	10.6 ± 0.1	49.8 ± 0.5	16.0 ± 0.1	1107 ± 29	5
500 mg/kg	6.5 ± 0.4	10.6 ± 0.1	48.7 ± 0.5	15.8 ± 0.2	1112 ± 39	4
1000 mg/kg	5.3 ± 1.0	10.8 ± 0.3	49.3 ± 1.0	15.9 ± 0.3	1137 ± 80	3

ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± SD ของค่าโลหิตวิทยาในหนูเมาส์ B6C3F1 ที่ได้รับการป้อนด้วย TAM จำนวนสัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มเท่ากับ 5 ยกเว้นในกลุ่มที่ได้รับการป้อนด้วย TAM 500 และ 1,000 mg/kg มีหนูตายจากการทดลอง 1 และ 2 ตัวตามลำดับ

ตารางที่ 4.6 ค่าดัชนีบ่งชี้คุณลักษณะของเม็ดเลือดแดงของหนูเมาส์ B6C3F1 ที่ได้รับการป้อนด้วย TAM

กลุ่มทดลอง	MCV (fl)	MCHC (g/dl)	MCH (pg)	N
Vehicle	45.7 ± 0.3	32.9 ± 0.3	15.1 ± 0.1	5
50 mg/kg	47.4 ± 0.2 ^{**}	31.9 ± 0.5	15.1 ± 0.3	5
100 mg/kg	46.9 ± 0.3 [*]	32.1 ± 0.3	15.1 ± 0.1	5
500 mg/kg	46.1 ± 0.3	32.5 ± 0.4	15.1 ± 0.1	4
1000 mg/kg	45.8 ± 0.4	32.4 ± 0.8	14.8 ± 0.3	3

ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± SD ของค่าดัชนีบ่งชี้คุณลักษณะของเม็ดเลือดแดงในหนูเมาส์ B6C3F1 ที่ได้รับการป้อนด้วย TAM จำนวนสัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มเท่ากับ 5 ยกเว้นในกลุ่มที่ได้รับการป้อนด้วย TAM 500 และ 1,000 mg/kg มีหนูตายจากการทดลอง 1 และ 2 ตัวตามลำดับ

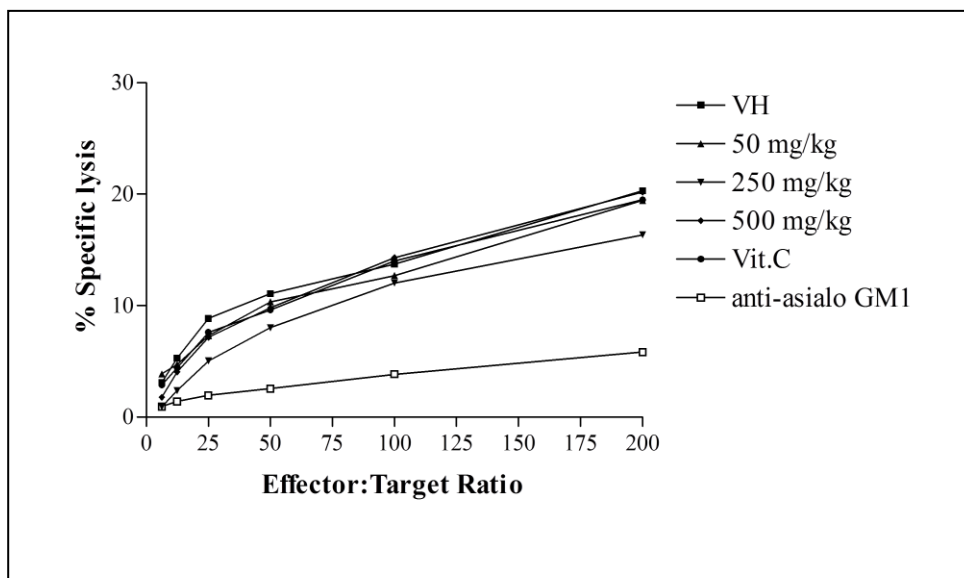
ตารางที่ 4.7 แสดงค่าการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวของหนูเมาส์ B6C3F1 ที่ได้รับการป้อนด้วย TAM

กลุ่มทดลอง	Neutrophils (%)	Lymphocytes (%)	Monocytes (%)	Eosinophils (%)	Basophils (%)	N
Vehicle	10.7 ± 1.2	85.3 ± 2.1	2.9 ± 1.3	1.0 ± 0.03	0.01 ± 0.01	5
50 mg/kg	10.3 ± 1.0	84.5 ± 2.3	4.8 ± 2.3	0.4 ± 0.2	0.05 ± 0.05	5
100 mg/kg	12.2 ± 2.0	82.2 ± 1.4	4.8 ± 1.4	0.8 ± 0.5	0.03 ± 0.03	5
500 mg/kg	13.9 ± 1.5	82.4 ± 1.7	3.3 ± 1.3	0.4 ± 0.2	0.01 ± 0.01	4
1000 mg/kg	20.1 ± 5.3	73.1 ± 3.9**	5.9 ± 2.7	0.9 ± 0.4	0.03 ± 0.03	3

ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± SD ของค่าการนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาวในหนูเมาส์ B6C3F1 ที่ได้รับการป้อนด้วย TAM จำนวนสัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มเท่ากับ 5 ยกเว้นในกลุ่มที่^{***}ได้รับการป้อนด้วย TAM 500 และ 1,000 mg/kg มีหนูตายจากการทดลอง 1 และ 2 ตัวตามลำดับ

4.7 ผลของ TAM ต่อการทำงานของ Natural killer (NK) เซลล์

โครงการนี้ทดสอบผลของ TAM ต่อการทำงานของ NK เซลล์โดยการนำเซลล์มะเร็งของหนูเม้าส์ B6C3F1 ที่ได้รับการป้อนด้วยสารสกัด TAM (50, 250 และ 500 mg/kg) เป็นระยะเวลา 14 วัน มาหา NK activity ด้วยการตรวจสอบความสามารถในการฆ่าเซลล์มะเร็งเป้าหมายใน *in vitro* กลุ่ม VH control ใช้ 10% DMSO และ vitamin C (100 mg/kg) เป็น antioxidant control นอกจากนี้ ยังมีกลุ่มที่ได้รับ anti-asialo GM1 antibody ที่ฉีดเข้าช่องท้องหนู 24 ชม. ก่อนทำการทดสอบ เพื่อนำมาทดสอบหา NK activity ใน *in vitro* ผลการทดสอบแสดงในรูปที่ 4.8 ผลการทดสอบ NK activity พบว่าที่อัตราส่วนของ responder เซลล์ ต่อ เซลล์มะเร็งเป้าหมาย (effector to target ratio) ที่ 200: 1 ของกลุ่มควบคุมที่ได้รับ สารละลาย (VH control) มีความสามารถในการฆ่าเซลล์เป้าหมาย ได้ 20% ซึ่งถือว่ามีความ NK activity ที่สูง ในหนูเม้าส์ กลุ่มที่ได้รับ anti-asialo GM1 ซึ่งเป็น antibody ที่สามารถกำจัด NK เซลล์ใน *in vivo* ได้ (Grosso et al., 2004 และ López-Soto, et al., 2017) สามารถลด NK activity ได้ถึง 72% แต่การได้รับสารสกัด TAM ที่ 50-500 mg/kg หรือ ได้รับ antioxidant vitamin C 100 mg/kg ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของ NK เซลล์แต่อย่างใด (รูปที่ 4.8)



รูปที่ 4.8 NK activity ของหนูเม้าส์ B6C3F1 (n = 5) ที่ได้รับการป้อนด้วย TAM หรือ vehicle control หรือ vitamin C เป็นเวลา 14 วัน ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SE. Anti-asialo GM1 ใช้เป็นกลุ่มควบคุมเพื่อให้แน่ใจว่าการถูกทำลายของเซลล์มะเร็งเป้าหมายเกิดผ่าน NK เซลล์

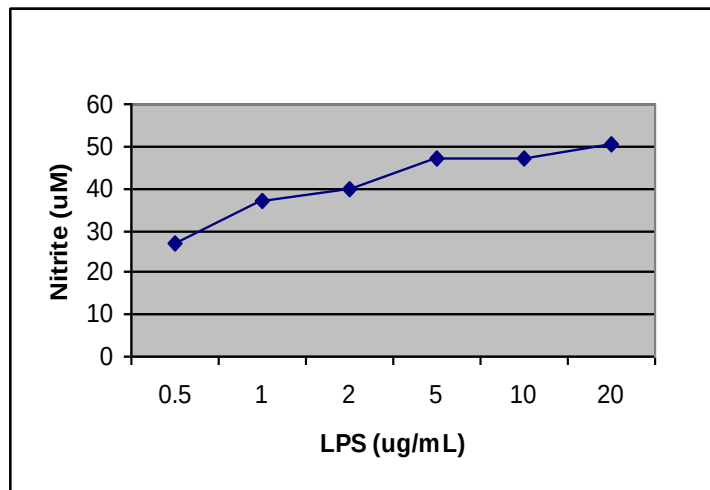
4.8 ผลของ TAM ต่อการสร้าง NO ของเซลล์ macrophage

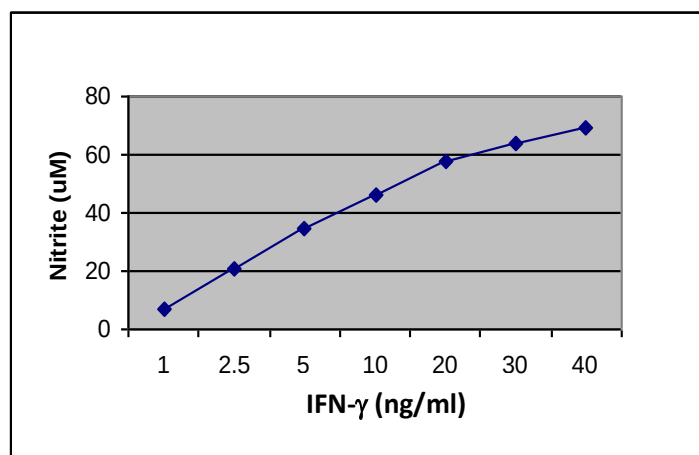
4.8.1 การศึกษาโดยใช้โมเดลของ RAW 264.6 เซลล์ที่ได้รับ TAM *in vitro*

4.8.1.1 การหาปริมาณที่เหมาะสมของ LPS และ IFN- γ

ก่อนทำการทดสอบผลของการได้รับ TAM *in vitro* ต่อการสร้าง NO ของ RAW264.7 เซลล์ จำเป็นต้องหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ LPS และ IFN- γ ในการเหนี่ยวนำให้ RAW264.7 เซลล์สร้าง NO ซึ่งในโครงการวิจัยนี้ ประเมินปริมาณของ NO ทางอ้อมโดยวัดปริมาณ nitrite ซึ่งเป็น metabolite product ที่เสถียรของ NO แทนด้วยการใช้ Griess reagent ผลการทดสอบที่ใช้ปริมาณ LPS 0.5, 1, 2, 5, 10 และ 20 $\mu\text{g/ml}$ และ IFN- γ 1, 2.5, 5, 10, 20, 30 และ 40 ng/ml ในการกระตุ้น RAW264.7 เซลล์ให้สร้าง NO แสดงในรูปที่ 4.9 A-B ที่ชี้แนะว่า ปริมาณ LPS ที่สูงกว่า 5 $\mu\text{g/ml}$ ขึ้นไป หรือ IFN- γ ที่สูงกว่า 20 ng/ml ไม่ได้เพิ่มปริมาณของ NO ให้มากขึ้นสักเท่าใด ดังนั้น งานวิจัยนี้ จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของ LPS 5 $\mu\text{g/ml}$ และ IFN- γ 10 ng/ml ร่วมกันในการกระตุ้น RAW264.7 เซลล์

A

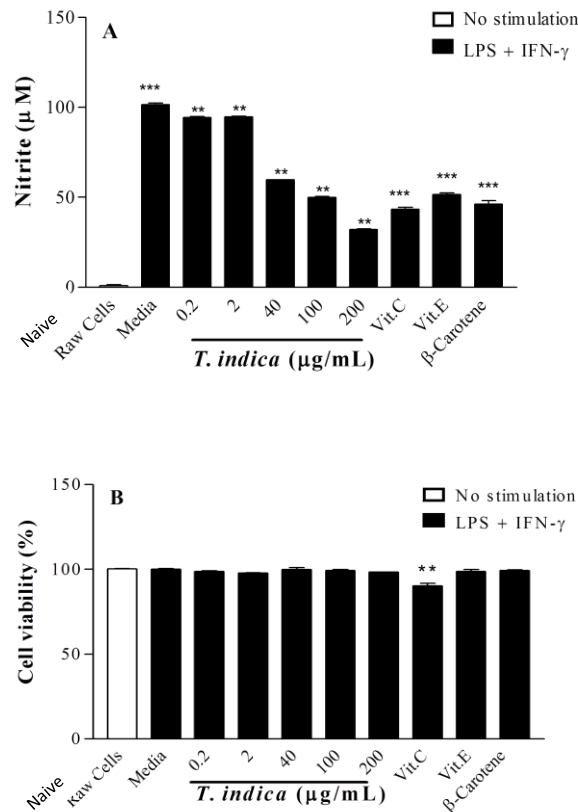


B

รูปที่ 4.9 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ LPS และ IFN- γ สำหรับใช้กระตุ้น RAW264.7 เซลล์ ซึ่งกระทำได้โดยการ plate RAW264.7 เซลล์ที่ความเข้มข้น 2×10^5 เซลล์ ต่อ หลุมและบ่ม ร่วมกับความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ LPS (0.5, 1, 2, 5, 10 และ 20 μ g/ml) หรือ IFN- γ (1, 2.5, 5, 10, 20, 30 และ 40 ng/ml) เป็นเวลา 24 ชม.

4.8.1.2 ผลของการได้รับ TAM *in vitro* ต่อการสร้าง NO ของ RAW264.7

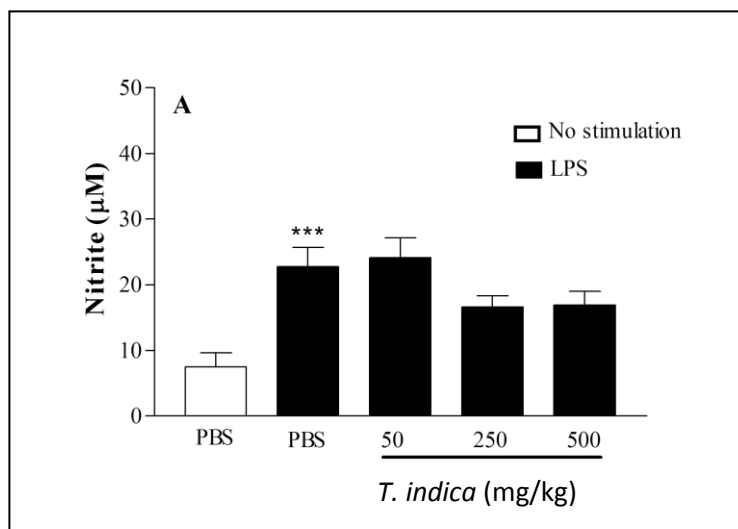
ผลของ TAM ต่อการสร้าง NO ของ RAW264.7 เซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย 5 μ g/ml LPS ร่วมกับ IFN- γ 10 ng/ml แสดงในรูปที่ 4.10 A ซึ่งชี้ชัดว่า การได้รับสารสกัด TAM 0.2-200 μ g/ml เป็นเวลา 24 ชม. พร้อม LPS (5 μ g/ml) และ IFN- γ (10 ng/ml) สามารถยับยั้งการสร้าง NO ที่สังเคราะห์โดย RAW 264.7 โดยการยับยั้งเพิ่มขึ้น ตามความเข้มข้นของสารสกัดที่สูงขึ้น (dose dependent) การยับยั้งการสร้าง NO โดยสารสกัด TAM ที่ความเข้มข้นสูงสุด (200 μ g/ml) อยู่ที่ 68% ในขณะที่ antioxidant control อื่นคือ vitamin C (500 μ M), vitamin E (141.3 μ M) หรือ β -carotene (2.5 μ M) สามารถยับยั้งได้ใกล้เคียงกัน คืออยู่ที่ประมาณ 54% และผลจากการยับยั้งการสร้าง NO ไม่ได้ขึ้นกับความเข้มข้นของสาร เพราะความเข้มข้นของสารสกัด TAM, vitamin C, vitamin E และ β -carotene ที่ใช้ในการศึกษาไม่ได้แสดงความเป็นพิษต่อ RAW264.7 เซลล์ เมื่อประเมิน % cell viability ด้วยการใช้ MTT assay ยกเว้นในกรณีของ vitamin C ที่ลด cell viability ไปเล็กน้อยประมาณ 10% ($p < 0.05$) (รูปที่ 4.10 B)

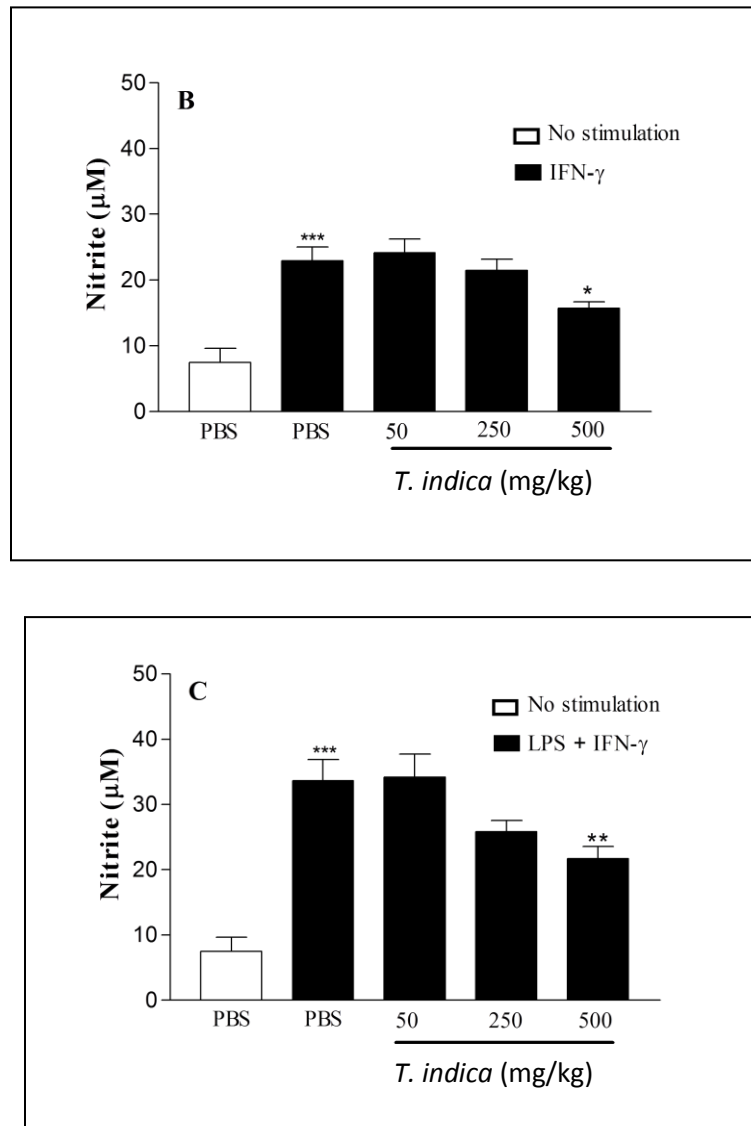


รูปที่ 4.10 การสังเคราะห์ NO (A) และ ร้อยละของเซลล์ที่ยังคงมีชีวิต (B) ของ RAW264.7 เซลล์ที่บ่มร่วมกับสารสกัด TAM ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ หรือ vitamin C (500 μM), vitamin E (141.3 μM), หรือ β -carotene (2.5 mM) พร้อมกับการกระตุ้นด้วย LPS (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) และ IFN- γ (10 ng/ml) เป็นเวลา 24 ชม. ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SE ($n = 5$) ปริมาณ nitrite ของ RAW264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ เทียบกับ naïve RAW264.7 (ไม่ได้รับการกระตุ้น) วิเคราะห์ด้วย student's t test (***) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.001$) กลุ่มที่ได้รับสารสกัด TAM เทียบกับ VH control วิเคราะห์ด้วย one way ANOVA ตามด้วย Dunnett's test (** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.01$) สำหรับแต่ละ antioxidant control vitamin C, vitamin E และ β -carotene เทียบกับ media control วิเคราะห์ด้วย student's t test (** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.001$, *** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.0001$)

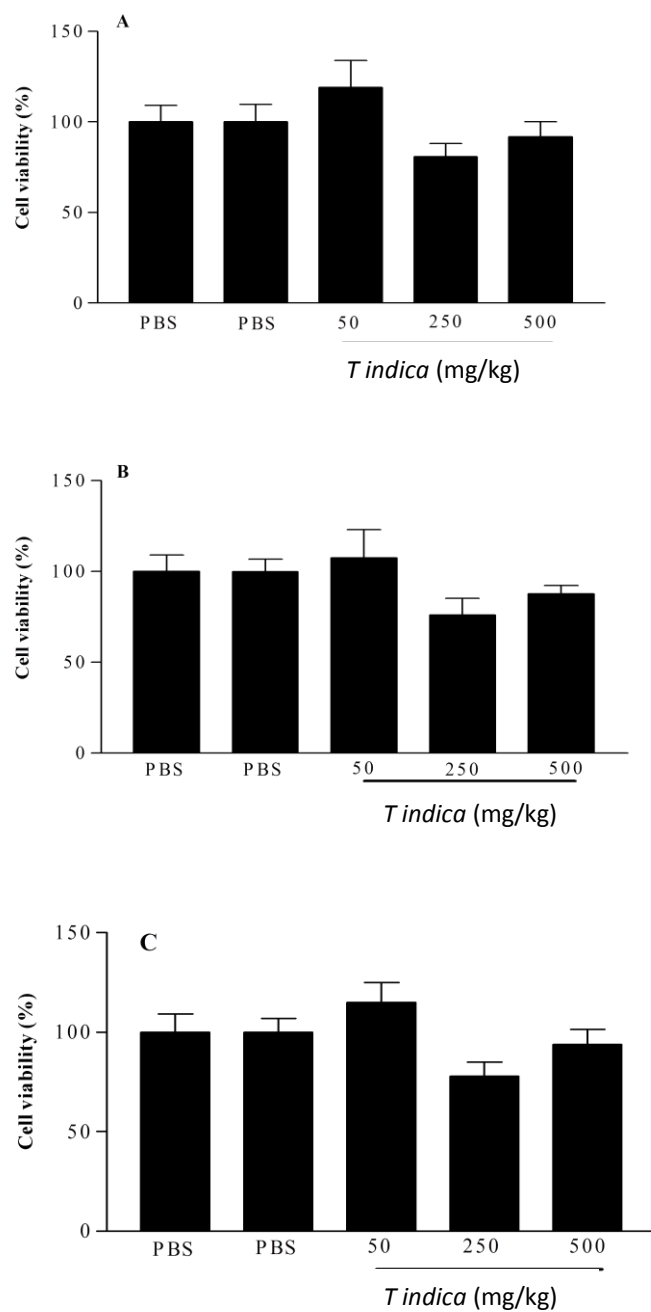
4.8.2 การสร้าง NO ของ peritoneal macrophage เซลล์ที่ได้รับ TAM *in vivo*

เพื่อให้แน่ใจว่าความสามารถของ TAM ในการยับยั้งการสร้าง NO ไม่ได้เกิดเฉพาะเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ macrophage RAW264.7 งานวิจัยนี้จึงตรวจสอบความสามารถของ TAM ในการยับยั้งการสร้าง NO ของเซลล์ macrophage ที่อยู่ในช่องท้อง (peritoneal cells) ของหนูเม้าส์ โดยทำการป้อนสารสกัด TAM (50, 250 และ 500 mg/kg) หรือ VH control (10% DMSO ใน PBS) ในหนูเม้าส์ต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 14 วัน ก่อนนำเซลล์ออกจากช่องท้องของหนูเม้าส์ เลือกเอาเฉพาะเซลล์ที่สามารถเกาะยึด (adherent) กับ culture plate ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะของเซลล์ macrophage ดังนั้น จึงสามารถแยก adherent เซลล์ออกจาก non-adherent ซึ่งเป็นเซลล์แบบไม่เกาะยึด ก่อนทำการกระตุ้น adherent เซลล์ (ซึ่งเป็นเซลล์ macrophage) ด้วย LPS (5 µg/ml), IFN-γ (10 ng/ml) หรือใช้ LPS (5 µg/ml) ร่วมกับ IFN-γ (10 ng/ml) เพื่อให้เกิดการสร้าง NO ใน *in vitro* ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.11 A-C ซึ่งแสดงว่า การกระตุ้นด้วย LPS และ/หรือ IFN-γ สามารถกระตุ้น peritoneal macrophage ให้สร้าง NO ให้เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับ culture ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น และการใช้ LPS ร่วมกับ IFN-γ สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้าง NO ได้ดีกว่าการใช้เพียง LPS หรือใช้ IFN-γ เพียงชนิดเดียวในการกระตุ้น ($p < 0.05$) (รูปที่ 4.11 A-C) การทดลองพบว่า การยับยั้งการสร้าง NO ของ peritoneal macrophage โดย TAM แปรผันตามความเข้มข้น โดย TAM สามารถยับยั้งการสร้าง NO ใน *in vitro* ได้เมื่อ TAM มี dosage สูงสุดใน *in vivo* ที่ 500 mg/kg และเมื่อได้รับการกระตุ้นการสร้าง NO *in vitro* ด้วย IFN-γ หรือ LPS ร่วมกับ IFN-γ เท่านั้น (รูปที่ 4.11 B-C) และการยับยั้ง NO ไม่ได้เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของ TAM เพราะ % cell viability ของ peritoneal macrophage cell ของทุกกลุ่มที่ได้รับสารสกัด TAM ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่ม VH control และ % cell viability ของทุกกลุ่มมีค่าใกล้เคียงกันคือสูงถึง 90% (รูปที่ 4.12)



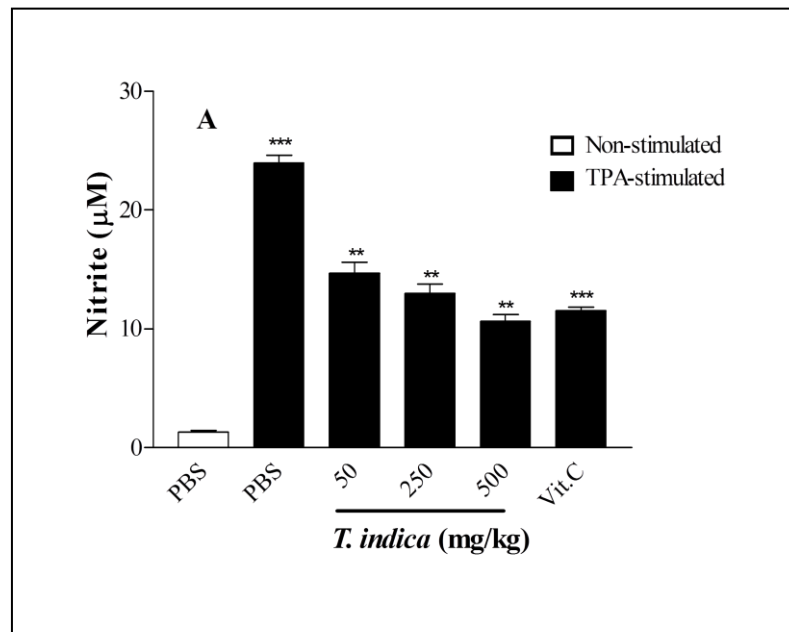


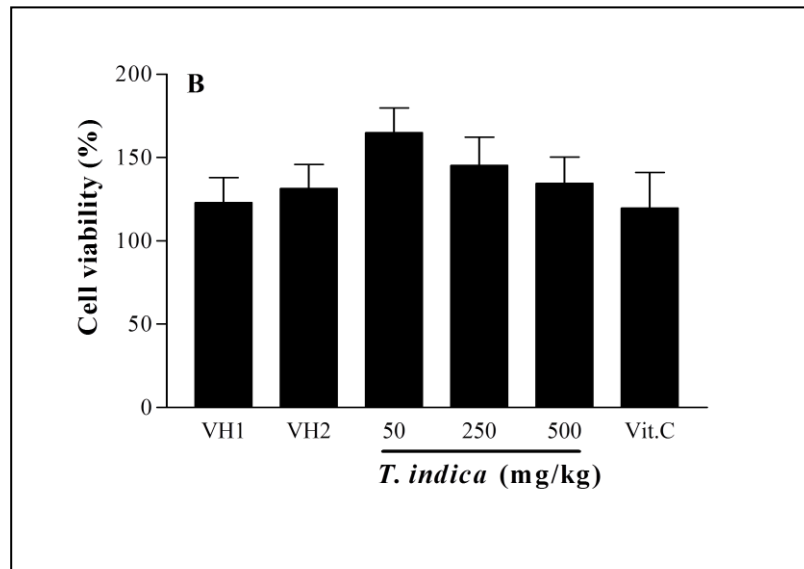
รูปที่ 4.11 การสร้าง nitrite โดยเซลล์ macrophage ในช่องท้องของหนูเมาส์ที่ได้รับการป้อนด้วย TAM ที่ 50, 250 และ 500 mg/kg เป็นเวลา 14 วัน และกระตุ้น *in vitro* ด้วย LPS (A), IFN- γ (B) หรือ LPS ร่วมกับ IFN- γ เป็นเวลา 24 ชม. ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SE (หนู 5 ตัว/กลุ่ม) ความแตกต่างของระดับ nitrite ใน culture ของหนูกลุ่มควบคุมที่กระตุ้นด้วย LPS หรือ IFN- γ หรือ LPS ร่วมกับ IFN- γ เทียบกับ culture ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น ทดสอบด้วย student's t test (***) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.0001$) ความแตกต่างของหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับ TAM เทียบกับกลุ่ม VH control ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS และ/หรือ IFN- γ ทดสอบด้วย one way ANOVA ตามด้วย Dunnett's test (* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$, *** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.0001$)



รูปที่ 4.12 ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์ macrophage จากช่องท้องของหนู B6C3F1 ที่ได้รับการป้อนด้วย VH (10% DMSO ใน PBS) หรือ TAM ที่ dosage ต่าง ๆ และถูกกระตุ้น *in vitro* ด้วย LPS (A), IFN- γ (B) และ LPS ร่วมกับ IFN- γ (C) เป็นเวลา 24 ชม. ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SE ของหนู 5 ตัว/กลุ่ม

สำหรับการทดลองที่นำเซลล์ macrophage จากช่องท้องหนูเมาส์ที่ได้รับการป้อนด้วยสารสกัด TAM เป็นเวลา 14 วัน และชักนำให้เกิดการสร้าง NO *in vitro* ด้วยการใช้ TPA พบว่า การได้รับ TAM *in vivo* สามารถยับยั้งการสร้าง NO ที่ชักนำโดย TPA ได้เช่นเดียวกันกับการสร้าง NO ที่ชักนำโดย LPS และ/หรือ IFN- γ โดยการยับยั้งการสร้าง NO เป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับความเข้มข้นของ TAM ที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.13 A) โดยที่ dosage ของ TAM ที่ 50, 250 และ 500 mg/kg ของ TAM สามารถยับยั้งการสร้าง NO ที่ชักนำโดย TPA ได้ประมาณ 39%, 48% และ 55% ตามลำดับ ($p < 0.05$) ซึ่งความสามารถในการยับยั้งของ TAM ที่ dosage สูงสุดคือ 500 mg/kg มีค่าใกล้เคียงกับ antioxidant control vitamin C คืออยู่ที่ประมาณ 55 % เช่นกัน และผลจากการยับยั้งการสร้าง NO ไม่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของ TAM ต่อเซลล์ช่องท้อง เพราะ % cell viability ของทุกกลุ่มที่ได้รับ TAM ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่ม VH control แต่ประการใด (รูปที่ 4.13 B)





รูปที่ 4.13 การสร้าง nitrite (A) และ ร้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ (B) ของเซลล์ในช่องท้อง macrophages จากหนูเม้าส์ B6C3F1 ที่ได้รับการป้อนด้วย VH1 (10% DMSO ใน PBS) หรือ สารสกัด TAM ที่ dosage ต่าง ๆ หรือ vitamin C (100 mg/kg) เป็นเวลา 14 วัน ก่อนการกระตุ้นการสร้าง NO ด้วย TPA (0.1 µg/mL) *in vitro* ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SE (หนู 5 ตัว/กลุ่ม) ระดับ nitrite ในกลุ่มควบคุมที่กระตุ้นด้วย TPA เทียบกับ กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการกระตุ้น ทดสอบด้วย student's t test (***) $p < 0.0001$) สำหรับ culture ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย TPA, ระดับ nitrite ในกลุ่มที่ได้รับ TAM เทียบกับกลุ่ม VH control ทดสอบด้วย one way ANOVA ตามด้วย Dunnett's test (** $p < 0.01$), กลุ่มที่ได้รับ vitamin C เทียบกับ VH2 (media) ที่ได้รับการกระตุ้น ทดสอบด้วย student's t test (***) $p < 0.0001$)

บทที่ 5

การวิจารณ์

เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามอุดมไปด้วยปริมาณ polyphenolic flavonoids ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง สามารถกำจัด peroxy radicals ที่สร้างโดย ABTS/H₂O₂/FeCl₃ (Fenton reaction) และ superoxide anions ที่สร้างโดย hypoxanthine-xanthine oxidase (neotetrazolium) (Pumthong, 1999) มีงานวิจัยรองรับมากมายว่าสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถออกฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันร่วมด้วย เช่น ส่วนประกอบสำคัญของสารต้านออกซิเดชันส่งเสริมความสามารถในการฆ่าของ NK cell, เพิ่มการหลั่ง tumor necrosis factor, IL-1, IL-6, IL-10 และ cytokines อื่น ๆ ลดการตอบสนองของ delayed hypersensitivity reaction และรบกวนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ signal transduction pathway ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกันต่าง ๆ (Bendich, 1999; Chishier et al., 1996; Middleton, 1998; Janeway and Travers, 1996) โดยเฉพาะ มีรายงานถึงผลประโยชน์ของการประยุกต์ใช้สารต้านออกซิเดชันต่าง ๆ เพื่อส่งเสริมการทำงานและการเจริญของเซลล์ lymphocytes ในโมเดลสัตว์ทดลอง และ ในคนชรา รวมทั้ง ในผู้ป่วย HIV/AIDS ที่มีสภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (De la Fuente and Victor, 2000; Singh and Pai, 2015) สำหรับการศึกษาฤทธิ์ของมะขามต่อระบบภูมิคุ้มกัน ยังมีปริมาณจำกัด มีรายงานว่าสารกลุ่ม polysaccharide ที่ถูกสกัดแยกตามด้วยการทำให้บริสุทธิ์จากเมล็ดมะขามมีฤทธิ์ควบคุมการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันใน *in vitro* โดยส่งเสริมการกลืนกิน (phagocytic enhancement) ของเซลล์ macrophage และการยับยั้ง leukocyte migration และ cell proliferation ของเซลล์เม็ดเลือดขาว (Sreelekha et al., 1993) ดังนั้น งานวิจัยนี้ จึงสนใจศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามต่อระบบภูมิคุ้มกัน

โครงการวิจัยนี้ศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม หรือ TAM ต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันโดยใช้หนูเม้าส์สายพันธุ์ B6C3F1 เพศเมียเป็นโมเดล เนื่องจาก B6C3F1 เป็นหนูเม้าส์ที่เป็น inbred strain (หนูที่มีพ่อแม่เป็นพี่น้องท้องเดียวกัน) หนูเม้าส์แต่ละตัวจึงมี genotype ที่เกือบเหมือนกัน ทั้งนี้ เพื่อลดปัญหาการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันที่แตกต่างกันสืบเนื่องจาก genotype ต่างกัน ความแตกต่างของการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันจะได้ขึ้นกับปัจจัยของสารที่ใช้ทดสอบเท่านั้น นอกจากนั้น หนูเม้าส์ B6C3F1 ยังเป็นหนึ่งในสายพันธุ์นอกเหนือจากสายพันธุ์ C57BL/6 ที่ US National Toxicology Program ใช้ในการทดสอบผลกระทบของสารต่าง ๆ ในสิ่งแวดล้อมต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และมีฐานข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่เพียงพอเกี่ยวกับหนูสายพันธุ์ทั้งสอง (Luster et al., 1988;

Luster et al., 1992) สำหรับเหตุผลที่เลือกเฉพาะหนูเมาส์เพศเมียเพื่อใช้ในการศึกษา เพราะโดยธรรมชาติเมื่อเลี้ยงหนูตัวผู้ร่วมกันในกรงเดียวกัน หนูเพศผู้มักจะกัดกันเอง ทำให้เกิดแผลตามร่างกาย และการต่อสู้กันก่อให้เกิดความเครียด การเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมน ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่า สมอง ความเครียด และระบบฮอร์โมน มีผลกระทบและควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (neuro-endocrine regulation) (Pruett, 2003; Sabioncello et al., 2004) ดังนั้น ในการทดสอบสารที่มีพิษต่อระบบภูมิคุ้มกัน (immunotoxicology) จึงนิยมใช้แต่หนูเมาส์เพศเมียในการทดสอบ ยกเว้นสารที่คาดว่าความแตกต่างทางเพศสามารถเปลี่ยนแปลงการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ในกรณีนั้น มักทำการทดลองโดยใช้สัตว์ทดลองทั้ง 2 เพศ โครงการนี้ ประยุกต์ใช้วิธีทดสอบต่าง ๆ ทางพิษวิทยาาระบบภูมิคุ้มกันมาประยุกต์ใช้ทดสอบสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามว่ามีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันหรือไม่ และเลือกใช้เฉพาะหนูเมาส์เพศเมีย B6C3F1 ในการทดสอบทั้งใน *in vitro* และ *in vivo*

งานวิจัยนี้ใช้เซลล์ที่เตรียมจากม้าม (splenocytes) ของหนูเมาส์ B6C3F1 เป็นแหล่งของเซลล์ภูมิคุ้มกัน เพราะในม้ามมีทั้ง T เซลล์, B เซลล์, dendritic cell, macrophage รวมทั้ง NK เซลล์ โดยทั่วไปในม้ามหนูเมาส์ มี T เซลล์ประมาณ 30-35% (ในจำนวนนี้ 70% เป็น $CD4^+$ -T เซลล์ และ 30% เป็น $CD8^+$ T เซลล์) ส่วน B เซลล์มีประมาณ 40-50% NK เซลล์มีประมาณ 10% ส่วน monocytes, eosinophils และ basophils มีรวมกันประมาณ 10% (https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/brochures /I-076357%20cell%20count%20table%20topp_WEB.pdf) นอกจากนั้น จากประสบการณ์ของผู้วิจัย ม้ามของหนูเมาส์ 1 ม้าม สามารถเตรียมเซลล์ได้มากถึง 9×10^7 เซลล์ หรือ 90 ล้านเซลล์ได้เป็นอย่างดี เทคนิคการเตรียมเซลล์จากม้าม ก็สามารถทำได้ง่าย ดังนั้นในการศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม หรือ TAM ต่อระบบภูมิคุ้มกันในโครงการนี้ จึงใช้เซลล์จากม้ามเป็นแหล่งของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่นเดียวกับการทดสอบทางพิษวิทยาาระบบภูมิคุ้มกันทั่วไป ที่นิยมใช้เซลล์จากม้ามของหนูเมาส์เป็นแหล่งของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเช่นกัน (Klassen, 2008; Luster et al 1992; 1993; Burleson et al., 1995a, 1995b)

ก่อนทำการศึกษาละลายของ TAM ต่อการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน *in vitro* จำเป็นต้องหาความเข้มข้นสูงสุดของ TAM ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ม้ามของหนูเมาส์ B6C3F1 แต่สารสกัด TAM มีปัญหาเรื่องการละลายค่อนข้างยาก โครงการนี้ใช้ 2 วิธีการในเตรียมสารสกัด TAM เพื่อใช้ในการทดลอง โดยการศึกษาในช่วงแรก ละลาย TAM ใน 10% DMSO ที่ใช้ในงานทดลองเกี่ยวกับความเป็นพิษต่อมะเร็งสายพันธุ์ต่าง ๆ การศึกษาความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง การศึกษาใน NK assay และผลกระทบต่อการสร้าง NO ซึ่งทำการศึกษาในระยะแรกของโครงการวิจัย ต่อมาได้สังเกตว่า TAM ไม่สามารถละลายใน 10% DMSO ได้หมด เพราะถ้าทิ้งไว้สักพัก จะสังเกตว่ามีตะกอนแยกออกมาเล็กน้อย ดังนั้น ก่อนทำการทดลองหลังจากละลาย TAM ใน 10% DMSO เมื่อมีตะกอน จึงนำไปปั่นเหวี่ยง เลือกแต่เฉพาะส่วนน้ำใส เพื่อใส่ไปใน cell

culture ในการทดลองทาง *in vitro* หรือใช้ป้อนสัตว์ทดลอง ใน *in vivo* แม้กระนั้น ผลการชันสูตรศพหนูเมาส์ที่ตายจากการทดลอง ในกลุ่ม TAM dosage สูงสุด (1,000 mg/kg) ที่ได้รับต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 14 วัน ยังสามารถพบตะกอนของ TAM ในร่างกาย ซึ่งแนะนำการตกตะกอนของ TAM ดังนั้น การทดลองในครั้งหลังของโครงการที่ทำการศึกษาผลของสารสกัด TAM ใน mitogenesis assay, mixed lymphocyte reaction และ Mishell Dutton assay ได้ปรับเปลี่ยนวิธีเตรียมสารสกัด TAM ให้ละลายได้มากขึ้น โดยละลาย TAM ใน DMSO ที่ไม่ได้เจือจางเพื่อเป็น stock solution ปั่นให้ละลายช้า ๆ โดยตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 ชม. และทำการ vortex เป็นระยะ เพื่อให้ TAM ละลายได้หมดก่อน จึงทำการเจือจางจาก stock ด้วยการใช้ complete media ซึ่งผลการทดสอบความเป็นพิษของ TAM ต่อเซลล์ม้ามที่กระทำโดย 2 วิธีมีความแตกต่างกัน โดยการเตรียมแบบวิธีหลัง ที่ละลายใน DMSO ที่ไม่เจือจาง สารสกัด TAM สามารถละลายได้ดีขึ้น ไม่ตกตะกอน แต่สารสกัดมีความเป็นพิษสูงกว่าการเตรียมแบบวิธีแรกที่ละลาย TAM ใน 10% DMSO โดยวิธีแรก พบว่าความเข้มข้นสูงสุดของ TAM ที่ใช้ในเซลล์ culture ไม่ควรเกิน 20 µg/หลอด (ประมาณ 166 µg/ml) เพราะถ้าปริมาณ TAM สูงกว่านี้ก่อให้เกิดการตายของเซลล์ม้ามเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.2 A-B) ส่วนการละลาย TAM ใน DMSO ที่ไม่เจือจาง พบว่าความเข้มข้นสูงสุดของ TAM อยู่ที่ 20 µg/ml (ตารางที่ 4.1) ซึ่งมีความเป็นพิษมากกว่าแบบแรกประมาณ 8 เท่า ซึ่งอาจเป็นเพราะสารใน TAM ละลายได้ดีขึ้น และไม่มีการกำจัดตะกอนออกไปเหมือนกับแบบแรก ส่วนประกอบบางอย่างในสารสกัดหยายจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่ไม่ได้ตกตะกอนและถูกกำจัดออกไปก่อนเหมือนวิธีแรก อาจมีพิษต่อเซลล์ม้าม จึงทำให้ความเป็นพิษเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม เนื่องจากมีข้อจำกัดต่าง ๆ โครงการวิจัยนี้ ไม่ได้ย้อนกลับไปทำการทดลองซ้ำสำหรับการศึกษาต่าง ๆ ที่ได้ทดลองเสร็จสิ้นแล้ว โดยใช้วิธีการละลาย TAM ตามที่ได้ปรับปรุงใหม่

การทดสอบใน mitogenesis assay ในโครงการวิจัยนี้ ใช้ concanavalin A (Con A) เป็น mitogen เพื่อประเมินผลกระทบของ TAM ต่อการแบ่งตัวของ T เซลล์ในการตอบสนองต่อ mitogen โดยปกติทั้ง phytohaemagglutinin (PHA) และ Con A สามารถกระตุ้นการตอบสนองของ T เซลล์ ซึ่ง T เซลล์ตอบสนองด้วยการแบ่งเซลล์ ทั้งนี้ mitogen สามารถกระตุ้น T เซลล์หลายกลุ่ม (population) ให้ตอบสนองได้ โดยการตอบสนองเป็นแบบไม่จำเพาะ PHA เป็นสารที่สกัดจาก red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) ส่วน Con A เป็นสารที่สกัดจาก jack bean (*Canavalia ensiformis*) (Smialowicz, 1995) โดยทั่วไป ทั้งคู่สามารถกระตุ้นให้ T เซลล์ตอบสนองได้ แต่จากการศึกษาเบื้องต้น (preliminary study) ในห้องปฏิบัติการนี้ พบว่า Con A มีความสามารถสูงกว่า PHA ในการกระตุ้น T เซลล์ การทดสอบในโครงการวิจัยนี้ จึงเลือกใช้เฉพาะ Con A mitogen ผลการทดลองพบว่า TAM ที่ความเข้มข้น 0.1 µg/ml-20µg/ml ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการตอบสนองของ T เซลล์ต่อ Con A mitogen โดยไม่มีทั้งฤทธิ์ยับยั้ง หรือ ฤทธิ์ส่งเสริมการตอบสนองของ T เซลล์ต่อ Con A mitogen แต่

อย่างไร (ตารางที่ 4.2) นอกจากนั้น ผลของการเปรียบเทียบ culture ที่ไม่ได้ใส่ mitogen แต่มีเซลล์ม้ามที่ ไม่ได้บ่ม หรือ บ่มร่วมกับสารสกัด TAM ก็ไม่ได้มีความแตกต่างของการเจริญของเซลล์ (cell proliferation) เช่นกัน (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ซึ่งชี้แนะว่า สารสกัด TAM นอกจากไม่มีฤทธิ์ส่งเสริมการตอบสนองของ T เซลล์ต่อ mitogen ตัวสารสกัดเองก็ไม่มี mitogenic activity เช่นกัน (ไม่สามารถส่งเสริมการแบ่งเซลล์) งานวิจัยนี้ ไม่ได้ตรวจสอบผลของสารสกัด TAM ต่อการตอบสนองของ B เซลล์ mitogen ซึ่งสามารถกระทำได้โดยการทดลองอย่างเดียวกัน แต่ใช้ B เซลล์ mitogen แทน Con A โดยทั่วไป mitogen ที่ใช้กระตุ้น B lymphocyte ได้แก่ lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งสกัดจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ ส่วน mitogen ที่สามารถกระตุ้นได้ทั้ง T และ B lymphocytes คือ pokeweed mitogen ที่สกัดจากรากของ *Phytolacca americana* ซึ่งประกอบด้วย 5 mitogen ย่อยคือ Pa1-5 ที่ทั้งหมดกระตุ้น T lymphocyte ส่วน PWM Pa-1 สามารถกระตุ้น B lymphocyte ให้แบ่งเซลล์และสร้าง immunoglobulin เมื่อมี macrophage และ T lymphocyte (Smialowicz, 1995)

การทดสอบ mixed lymphocyte response หรือ mixed lymphocyte (reaction) หรือ MLR เป็นการวัดการตอบสนองของ T เซลล์ ต่อ allogeneic antigen ที่มีความแตกต่างกันที่ major histocompatibility complex (MHC) allogeneic antigen หมายถึง antigen บนผิวเซลล์ของสัตว์ species เดียวกันที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม ส่วน MHC เป็นโปรตีนบนผิวเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในเรื่องการไม่ยอมรับการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ MLR เป็นการทดสอบที่ประยุกต์ใช้ในการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ เพื่อตรวจสอบปฏิกิริยาตอบสนองการเข้ากันได้ (compatibility) หรือการไม่ยอมรับ (rejection) ของผู้รับ (recipient) ต่อเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ปลูกถ่าย (graft) การทดสอบอาศัยหลักการว่า เมื่อนำ lymphocyte 2 กลุ่มที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมาเพาะเลี้ยง (culture) ร่วมกัน เซลล์ lymphocyte จะเกิดการตอบสนองซึ่งกันและกันต่อ MHC antigen ที่แตกต่างกัน โดยเซลล์มีขนาดขยายใหญ่ขึ้น (blast formation) เกิดการสังเคราะห์ DNA และแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว ในการทดสอบทางพิษวิทยาระบบภูมิคุ้มกัน นิยมวัดการตอบสนองเฉพาะกลุ่ม lymphocyte ที่ได้จากสัตว์ทดลองที่ได้รับสารเคมีเพียงฝ่ายเดียว เพื่อตรวจสอบว่าสารเคมีที่ทดสอบมีผลเปลี่ยนแปลงความสามารถของ lymphocyte ในการตอบสนองต่อ MHC antigen ที่ต่างกันหรือไม่ lymphocyte ที่ถูกตรวจสอบความสามารถในการตอบสนองเรียกว่า responder ส่วน lymphocyte อีกกลุ่มหนึ่งที่เลี้ยงร่วมกันใน culture จะถูกยับยั้งความสามารถในการตอบสนองโดยการฉายรังสี หรือใช้สารเคมี mitomycin C เพื่อยับยั้งการแบ่งเซลล์ เซลล์กลุ่มนี้ทำหน้าที่เป็นเพียงตัวกระตุ้นให้ responder ตอบสนองเท่านั้น เรียกเซลล์ที่ทำหน้าที่กระตุ้นว่า stimulator การวัดความสามารถในการตอบสนองของ lymphocyte ต่อ allogeneic MHC ฝ่ายเดียวใน MLR เรียกว่า one-way mixed lymphocyte reaction หลักการของวิธีวัดการตอบสนองใน MLR ใช้ $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ เพื่อติดตาม DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่เช่นเดียวกับ mitogenesis assay ที่อธิบายเบื้องต้น

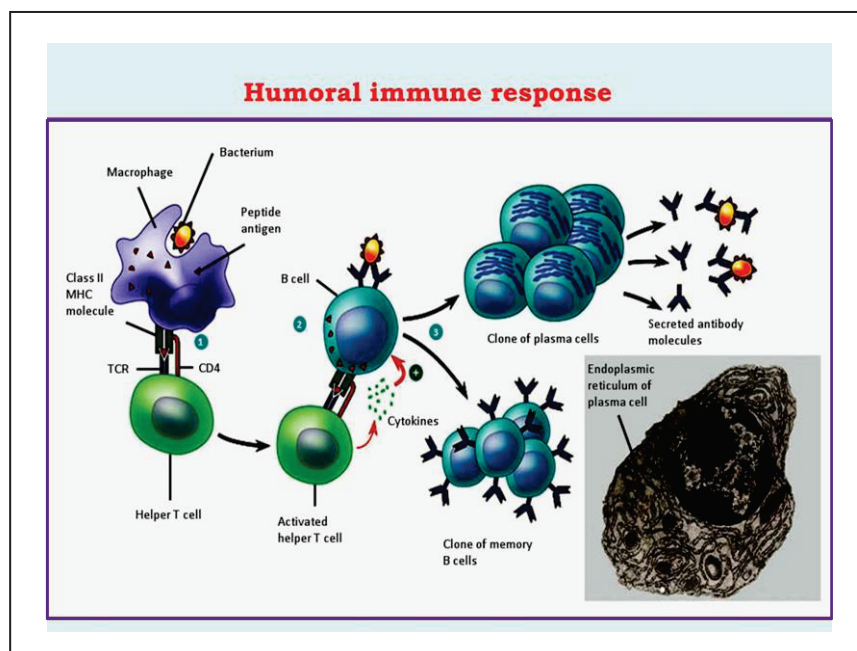
(Smialowicz, 1995) โครงการนี้ใช้เซลล์ม้ามของ B6C3F1 เป็น responder ซึ่งมี MHC เป็น H-2^b ส่วนเซลล์ม้ามของหนู DBA/2 เป็น stimulator ซึ่งมี MHC เป็น H-2^d และมีความแตกต่างกันที่ MHC class II ส่วนที่เป็น major histocompatibility complex ในหนูเม้าส์เรียกว่า H-2 complex และตั้งอยู่บน chromosome ที่ 17 ซึ่งมี gene ที่จำเป็นและสำคัญต่อการทำหน้าที่และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน โปรตีนที่ code โดย gene ในบริเวณนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphism) สูงสุด และลักษณะโดดเด่นที่สุดของ MHC คือความสามารถในการจับกับ peptide ขนาดเล็ก ซึ่งการจับกับ peptide ขนาดเล็กที่บริเวณจำเพาะของ MHC เป็นโครงสร้างที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ (interact) กับตัวรับรู้ของ T เซลล์ (T cell receptor) เพราะ T cell receptor ไม่ได้จดจำ antigen ในรูปของ naive form เหมือนการจดจำ antigen ของ B เซลล์ แต่จดจำ antigen ในรูปของ peptide ขนาดเล็กที่ถูกนำเสนอ (presentation) ร่วมกับ MHC class I หรือ MHC class II โดย antigen presenting cell ขึ้นกับว่าเป็น CD4⁺ หรือ CD8⁺ -T เซลล์ (Janeway and Travers, 1996; Stuart, 2015) ดังนั้นโมเลกุลของ MHC จึงมีความจำเพาะกับความสามารถในการกระตุ้น T เซลล์ที่จำเพาะให้เกิดการตอบสนอง การทดสอบ MLR จึงเป็นการวัดความสามารถของ T เซลล์ในการเจริญ หรือ แบ่งเซลล์เพื่อตอบสนองต่อเซลล์ของบุคคลอื่นใน species เดียวกัน เช่นในกรณีของการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ เป็นต้น ผลการทดสอบเซลล์ม้ามที่บ่มร่วมกับสารสกัด TAM พบว่าสารสกัด TAM เฉพาะที่ 1 µg/ml สามารถลดการตอบสนองของ T เซลล์ต่อ allogeneic antigen ได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับ VH control ($p < 0.05$) (รูปที่ 4.4) แต่ความเข้มข้นที่สูงขึ้นของ TAM กลับไม่มีผลต่อการตอบสนองของ MLR โดยรูปที่ 4.4 ชี้แนะว่า การตอบสนองของ T เซลล์ต่อ allogeneic cell มีแนวโน้มลดลง เมื่อลดความเข้มข้นของ TAM ใน culture อย่างไรก็ดี การลดการตอบสนองของ T เซลล์ต่อ allogeneic cell ใน MLR reaction จะมีความสำคัญทางชีววิทยา (biological relevant) หรือไม่ จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

Mishell Dutton assay เป็นการทดสอบความสามารถของสารว่ามีผลกระทบใน *in vitro* ต่อการพัฒนาของ B เซลล์ที่สร้าง antibody ที่จำเพาะหรือไม่ Mishell Dutton assay จัดเป็นวิธีการทดสอบที่ค่อนข้างยากวิธีหนึ่ง เมื่อเทียบกับการทดลองใน *in vivo* ที่กระทำโดยป้อนสัตว์ทดลองให้ได้รับสารที่สนใจตามช่วงระยะเวลาที่กำหนดก่อนที่จะกระตุ้นด้วย antigen ที่จำเพาะด้วยการฉีด antigen เข้าทางหลอดเลือดดำ (intravenous injection) และทิ้งระยะห่างประมาณ 3-4 วัน ปลอຍให้มีการพัฒนาของ B เซลล์ที่สามารถสร้าง antibody ที่จำเพาะต่อ antigen ได้ หลังจากนั้น นำเซลล์ม้ามออกจากหนูมาทำการหา AFC ด้วยการทำ plaque forming cell assay ซึ่งมีหลักการว่าเซลล์ม้ามจากสัตว์ทดลองที่ได้รับการ prime ด้วย antigen จำเพาะ เช่น SRBC เมื่อได้รับ antigen อีกครั้งหนึ่งใน *in vitro* ที่มี complement B เซลล์ที่สามารถสร้าง antibody ที่จำเพาะจะสร้าง antibody ที่มาจับ antigen ที่ผิวของ SRBC เมื่อ antibody จับกับ antigen เกิดการตรึง complement โดย classic pathway ส่งผลให้เกิดการแตกของเซลล์ที่มีการ

ตรึง complement (cellular lysis) เห็นเป็นวงใสท่ามกลางฉากพื้นแดงของ SRBC หนึ่งวงใสคือ 1 plaque หรือ 1 เซลล์ที่สร้าง antibody (Janeway and Travers, 1996) Mishell Dutton assay เป็นวิธีทดสอบที่ชักนำให้ B เซลล์ (ในเซลล์ม้าม) ที่บ่มร่วม หรือ ไม่ได้บ่มร่วมกับสารสกัดให้สามารถสร้าง antibody ได้โดยการ prime antigen ใน *in vitro* ภายหลังการบ่มร่วมกับ antigen 4-5 วัน นำเซลล์ใน culture มาประเมินเซลล์ที่สร้าง antibody (antibody forming cell) ด้วยวิธี plaque forming cell assay เหมือนกับขั้นตอนที่กระทำใน *in vivo* โดยหลักการแล้ว ใน Mishell Dutton assay สามารถกระทำได้โดยเริ่มจาก naïve splenocyte หรือเซลล์ม้ามจากหนูเมาส์ปกติธรรมดาที่ไม่เคยได้รับสารใดมาก่อนได้ แต่เนื่องจาก Mishell Dutton assay เป็นวิธีทดสอบที่ยาก เพราะต้องใช้ Mishell Dutton box ที่ออกแบบเฉพาะกับวิธีการทดสอบนี้ จุดวิกฤต (critical point) ที่สำคัญในวิธีการทดสอบคือต้องมีการใช้ความดันที่เหมาะสมอัดเข้าไปใน Mishell Dutton box โดยเฉพาะในช่วงระยะของการ prime antigen ใน *in vitro* ถ้า Mishell Dutton box เกิดการรั่ว ทำให้ความดันลดต่ำลง หรือ สูญเสียความดันไปในช่วง 3 วันแรกของการบ่ม การทดสอบจะไม่ได้ผล ซึ่งหมายความว่าในวันที่ทดสอบ plaque forming cell assay ไม่สามารถวัดปริมาณเซลล์ที่สร้าง antibody ได้ หรือไม่มี plaque เกิดขึ้นนั่นเอง เพื่อป้องกันปัญหาดังกล่าว งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เซลล์ม้ามที่ได้รับการ prime ด้วย SRBC ใน *in vivo* ล่วงหน้าก่อนนำมาทำการทดลองบ่มร่วมกับสารสกัดใน *in vitro* และ prime ด้วย SRBC antigen อีกครั้งใน *in vitro* ทั้งนี้ จากประสบการณ์ของผู้วิจัย การเลือกใช้เซลล์ม้ามที่ได้รับการ prime ด้วย antigen ล่วงหน้าแทนการเริ่มจากเซลล์ม้ามที่เป็น naïve เซลล์ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการทดลองให้สูงขึ้น โดยมีจำนวน plaque หรือ เซลล์ที่สร้าง antibody ได้สูงขึ้น

ผลการศึกษาในโครงการนี้ชี้ชัดว่า สารสกัด TAM มีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (humoral immunity) ดังผลทดสอบใน Mishell Dutton assay (รูปที่ 4.5 A-B) ที่ชี้ชัดว่า TAM ที่ 5 และ 1 $\mu\text{g/ml}$ สามารถส่งเสริม B เซลล์ให้สร้าง antibody ที่จำเพาะต่อ SRBC ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับ VH control ที่มี % DMSO เท่ากัน ไม่ว่าจะแสดงข้อมูลเป็นเซลล์ที่สร้าง antibody (antibody forming cell; AFC) ต่อ culture (รูปที่ 4.5 A) หรือ AFC ต่อ 1 ล้านเซลล์ (รูปที่ 4.5 B) ที่ชี้แนะว่า การกระตุ้นการตอบสนองของ B เซลล์ในการสร้าง antibody ของสารสกัด TAM ไม่ได้ขึ้นกับการเพิ่มปริมาณของ plasma cell (เซลล์ที่เป็นพัฒนาการของ B เซลล์เมื่อพร้อมสร้าง antibody) ในแต่ละ culture เท่านั้น แต่เมื่อปรับปริมาณเซลล์เป็น 1×10^6 เซลล์เท่ากัน สารสกัด TAM ที่ความเข้มข้นดังกล่าวก็ยังสามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ที่สามารถสร้าง antibody ได้ เนื่องจาก SRBC ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ จัดเป็น T-cell dependent antigen ซึ่งหมายความว่า การกระตุ้น B เซลล์ให้สร้าง antibody ได้นั้น จำเป็นต้องอาศัยสัญญาณช่วยจาก T-helper เซลล์ โดยเริ่มแรก T-helper เซลล์จะต้องถูกกระตุ้นโดยการจดจำ antigen ในรูป peptide สั้น ๆ ที่ถูกนำเสนอร่วมกับ MHC class II โดย antigen presenting cell เช่น

macrophage หรือ dendritic เซลล์ก่อน การกระตุ้น T-helper เซลล์ก่อให้เกิดการสร้าง cytokine และ differentiation factor ต่าง ๆ ที่ชักนำให้ B เซลล์เจริญและพัฒนา (growth and differentiation) เกิดเป็น plasma เซลล์ที่สามารถสร้าง antibody ที่จำเพาะได้ (รูปที่ 5.1) ดังนั้น กลไกการกระตุ้นให้เกิดเซลล์ที่สามารถสร้าง antibody ที่จำเพาะต่อ SRBC โดยสารสกัด TAM นั้น อาจเกิดได้หลายขั้นตอน เช่น การกระตุ้นการทำงานของ antigen presenting cell ของเซลล์ macrophage หรือ dendritic เซลล์ให้นำเสนอ antigen ให้ T-helper เซลล์ได้ดีขึ้น หรือ กระตุ้นการทำงานของ T-helper เซลล์ในการสร้าง cytokine หรือ differentiation factor เพิ่มขึ้น เพื่อเพิ่มการเจริญของ B เซลล์ เป็นต้น ส่วนกลไกที่เกิดขึ้นจริงจะเป็นกลไกใดนั้น จำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาต่อเนื่องต่อไป อนึ่ง มีข้อสังเกตว่า การส่งเสริมการสร้าง antibody ของ B เซลล์เกิดที่ความเข้มข้นของ TAM ที่ 5 และ 1 $\mu\text{g/ml}$ แต่ที่ความเข้มข้นสูงกว่า หรือ ต่ำกว่าความเข้มข้นช่วงนี้ ไม่มีผลต่อการสร้าง antibody ของ B เซลล์ ซึ่งการตอบสนองแบบนี้เป็น biphasic dose response ที่ส่วนใหญ่เกิดกับสารประเภทที่เป็น essential nutrients (Klassen, 2008) เช่น การได้รับ vitamin ต้องอยู่ในช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสม ถ้ามาก หรือ น้อยเกินไปจะไม่เกิดผล หรือ อาจก่อให้เกิดโทษได้เป็นต้น



รูปที่ 5.1 แสดงการทำงานร่วมกันระหว่างเซลล์ในการชักนำให้เกิดภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ
(<http://slideplayer.com/slide/10779254>)

การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัด TAM กระทำการทดสอบเบื้องต้นใน *in vitro* โดยทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยตรง (direct cytotoxicity) ผลการตรวจสอบพบว่าสารสกัด TAM สามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งสายพันธุ์ต่าง ๆ เกิดการตายเกิดขึ้น โดยเซลล์มะเร็งต่างกันจะมีความไวต่อสารสกัด TAM ต่างกัน เซลล์มะเร็งสายพันธุ์ที่ทนต่อสารสกัด TAM มากที่สุดคือเซลล์มะเร็งในเม็ดเลือดขาวของหนูเม้าส์ L1210 ที่ความเข้มข้น TAM ตั้งแต่ 1-20 $\mu\text{g}/\text{หลุม}$ นอกจากไม่สามารถชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ L1210 ได้แล้ว ยังดูเหมือนว่าความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของ TAM มีแนวโน้มให้เซลล์มะเร็งเจริญได้ดีขึ้น แม้จะไม่มี ความแตกต่างทางสถิติอย่างนัยสำคัญ ส่วนเซลล์มะเร็งสายพันธุ์เม็ดสีในหนูเม้าส์ B16F10 ต้องใช้ความเข้มข้นสูงสุดของ TAM ถึง 20 $\mu\text{g}/\text{หลุม}$ ในการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด TAM ส่วนผลของสารสกัด TAM ต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ของมนุษย์พบว่า เซลล์มะเร็งทรวงอกในคน MCF-7 มีความทนทานต่อสารสกัด TAM สูงสุด โดยสารสกัด TAM ตั้งแต่ 1-20 $\mu\text{g}/\text{หลุม}$ ไม่ก่อให้เกิดการตายของเซลล์แต่อย่างใด ส่วนเซลล์ผิวหนังในคน (human epidermal keratinocyte) HaCat และเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารในคน (human gastric adenocarcinoma) A427 ที่ความเข้มข้นของ TAM ตั้งแต่ 5-20 $\mu\text{g}/\text{หลุม}$ สามารถชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ การที่เซลล์มะเร็งสายพันธุ์ต่างชนิดในหนู และ ในคนมีความไวต่อความเป็นพิษโดยตรงของสารสกัด TAM ต่างกัน และกลไกของ TAM ที่ชักนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ต่าง ๆ แตกต่างกันหรือไม่ อย่างไร จำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาต่อไป อนึ่ง การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัด TAM ในงานวิจัยนี้ ยังเป็นเพียงระยะเริ่มแรก ควรมีการศึกษาต่อเนื่องโดยเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด TAM ให้สูงขึ้น และสิ่งที่สำคัญสุดในการศึกษาครั้งนี้ คือ ตรวจสอบว่าความเข้มข้นเดียวกันของสารสกัด TAM ที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งสายพันธุ์จะแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์สายพันธุ์ปกติหรือไม่ โดยอาจใช้เซลล์สายพันธุ์ที่เตรียมจากเซลล์ปกติ ที่ไม่ใช่เซลล์มะเร็ง หรือใช้เซลล์ปกติที่เป็น primary เซลล์ เช่น เซลล์ที่มีนิวเคลียสเดียวจากเลือด (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) เป็นต้น เพราะการประยุกต์ใช้ฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัด TAM เพื่อพัฒนาให้เกิดประโยชน์ได้นั้น จำเป็นต้องแสดงว่าสารสกัด TAM มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติ

สำหรับการประเมินความเป็นพิษของสารสกัด TAM ในหนูเม้าส์ B6C3F1 เพื่อหาปริมาณของสารสกัดที่ใช้ในการทดลองใน *in vivo* พบว่ากลุ่มที่ได้รับ dose สูงสุด (1,000 mg/kg) มีน้ำหนักตัวลดลงเฉลี่ยประมาณ 3 กรัมในวันที่ 11 แต่น้ำหนักตัวได้ปรับเพิ่มกลับขึ้นมาเมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 14 น้ำหนักตัวที่ลดลงนี้ อาจไม่ใช่ผลจากความพิษของสารสกัด เพราะมีการปรับเพิ่มกลับขึ้นทั้ง ๆ ที่ยังได้รับสารสกัดอย่างต่อเนื่อง ดังนั้น น้ำหนักบางส่วนที่ลดไปอาจเป็นสาเหตุจากความเครียดของการป้อนสารสกัดด้วยการ gavage ทุก ๆ วัน ผลการตรวจสอบน้ำหนักของอวัยวะสำคัญต่าง ๆ ในร่างกายสัตว์ทดลองพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารละลายของสารสกัด (10% DMSO)

($p < 0.05$) อย่างไรก็ตาม มีแนวโน้มของการเพิ่มน้ำหนักตับ และการลดของน้ำหนักหัวใจในกลุ่มทดลอง แต่การเปลี่ยนแปลงไม่เป็นปฏิกิริยากับปริมาณสารสกัดที่สัตว์ทดลองได้รับ (ไม่มี dose dependent) ดังนั้นแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงที่สังเกตเห็นจึงไม่น่าจะเป็นการเปลี่ยนแปลงที่แท้จริงและมีความสำคัญในเชิงชีววิทยา (biologically relevant) น้ำหนักของหัวใจที่มีแนวโน้มลดลง อาจเป็นผลสืบเนื่องจากการเก็บเลือดจากหัวใจ เพื่อนำมาวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยาและทางชีวเคมี ด้วยการใช้เทคนิคการใช้เข็มแทงและดึงเลือดออกจากหัวใจที่เรียกเทคนิคนี้ว่า cardiac puncture จึงอาจทำให้ปริมาตรของเลือดที่ยังคงเหลืออยู่ในหัวใจภายหลังการเก็บเลือดจากหัวใจมีปริมาณที่แตกต่างกัน แปรผันตามปริมาตรของเลือดที่ถูกดูดออกซึ่งแตกต่างกันได้ในการเก็บเลือดแต่ละครั้ง อันสามารถส่งผลต่อน้ำหนักของหัวใจให้แตกต่างกัน การรายงานผลเป็นอัตราส่วนของปริมาณน้ำหนักของอวัยวะต่อน้ำหนักตัวในสัตว์ทดลองจะช่วยขจัดปัญหาเกี่ยวกับน้ำหนักอวัยวะเพิ่มขึ้นในสัตว์ทดลองที่มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม แม้รายงานผลเป็นอัตราส่วนของน้ำหนักอวัยวะต่อน้ำหนักสัตว์ทดลอง ก็ยังคงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญแต่ประการใด ในกลุ่มที่ได้รับ TAM ในปริมาณสูงคือที่ 500 และ 1,000 mg/kg พบการตายของหนูเมาส์ 1 ตัวและ 2 ตัวตามลำดับ ซึ่งการตายที่เกิดขึ้น อาจเกี่ยวข้องกับการได้รับ TAM ใน dosage ที่สูงมาก และการเตรียมสารสกัด TAM ในการทดลองนี้ ละลายผงของสารสกัด TAM ใน 10% DMSO ซึ่งถ้าตั้งทิ้งไว้จะกิดตะกอนขึ้น ดังนั้น จึงมีแนวโน้มว่าในสัตว์ทดลองที่ได้รับการป้อนด้วยสารสกัดใน dose ที่สูง เป็นเวลาต่อเนื่องกัน 14 วัน สัตว์ทดลองบางตัวอาจเกิดความปั่นป่วนสืบเนื่องจากคุณสมบัติทางกายภาพของสารสกัด คือเกิดจากการตกตะกอนของ TAM ในร่างกาย เกิดการอุดตันในอวัยวะสำคัญต่าง ๆ อันอาจเป็นสาเหตุการตายเกิดขึ้น ดังนั้น การศึกษาต่อเนื่องจากงานวิจัยนี้ ควรต้องปรับปรุงวิธีการเตรียมสารสกัดให้สามารถละลายได้ดีกว่าเทคนิคที่ใช้อยู่ปัจจุบัน เช่น อาจเพิ่มขั้นตอนการกำจัดสารที่ไม่ละลายน้ำออก ด้วยสกัดด้วยตัวทำละลายตามด้วยเทคนิคการแยกส่วน (fraction) ในการเตรียมสารสกัด และแยกเอาเฉพาะส่วนที่ละลายน้ำได้ดีออกมา แต่ทั้งนี้ ทั้งนั้น จำเป็นต้องตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวภาพของสารสกัดร่วมกับการแยก fraction ซึ่งอาจใช้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งกระทำได้ง่ายกว่าการทดสอบทางระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อใช้เป็นแนวทางในการเลือก fraction ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

ส่วนผลการศึกษาทางโลหิตวิทยา พบว่าใน dosage ที่เพิ่มขึ้น สารสกัด TAM มีแนวโน้มเพิ่มร้อยละของ neutrophil (ไม่มีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$) และลดร้อยละของ lymphocyte อย่างมีนัยสำคัญเมื่อได้รับ TAM 1000 mg/kg ($p < 0.05$) ในขณะที่ร้อยละของเซลล์เม็ดเลือดขาวอื่นคือ monocyte, eosinophil และ basophil ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงจากการได้รับสารสกัด (ตารางที่ 4.7) อย่างไรก็ตาม มีข้อสังเกตว่า แนวโน้มการเพิ่มของ neutrophil และการเพิ่มของ lymphocyte ของสัตว์ทดลองมีความสัมพันธ์กับกลุ่มสัตว์ทดลองที่มีน้ำหนักตัวลดลง ดังนั้น ค่าแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงนี้ อาจเกี่ยวข้องกับสภาวะเครียดในสัตว์ทดลอง สำหรับผลทางโลหิตวิทยาของเซลล์เม็ดเลือดแดง ในตารางที่ 4.5 ไม่ได้

แสดงว่าสารสกัด TAM ก่อให้เกิดปัญหาโลหิตจาง หรือการเปลี่ยนแปลงปริมาณ hematocrit, hemoglobin หรือปริมาณเกร็ดเลือดอย่างมีนัยสำคัญแต่ประการใด เช่นเดียวกับค่าดัชนีบ่งชี้คุณลักษณะของเม็ดเลือดแดงในตารางที่ 4.6 ที่ไม่มีความแตกต่างของกลุ่มทดลองจากกลุ่มควบคุมแต่ประการใด แม้กลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัด TAM ที่ dose ต่ำคือ 50 และ 100 mg/kg มีค่า MCV ที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ผลที่เกิดขึ้นไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณของสารสกัดที่สัตว์ทดลองได้รับเพิ่มขึ้น คือไม่มี dose response relationship การเปลี่ยนแปลงจึงไม่น่ามีนัยสำคัญในเชิงชีววิทยา (non-biological relevant) ในทำนองเดียวกัน ผลทางชีวเคมีของหนูเม้าส์ที่ได้รับสารสกัด TAM เป็นระยะเวลา 14 วันไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์สำคัญในตับ การทำงานของไต และปริมาณของ uric acid แต่ประการใด ดังนั้น การทดลองชี้แนะว่า สารสกัด TAM มีความเป็นพิษต่ำในหนูเม้าส์ B6C3F1 ซึ่ง Sano et al. (1996) ได้รายงานไว้ว่า สาร polysaccharide ที่เตรียมจากเมล็ดของมะเขามมีความเป็นพิษต่ำ และไม่มีคุณสมบัติเป็นสารก่อมะเร็งในหนูเม้าส์ B6C3F1 ทั้งเพศผู้และเพศเมีย จากการได้รับสารสกัด TAM ที่ผสมในอาหารเป็นระยะเวลายาว

การทดสอบผลของสารสกัด TAM ต่อความสามารถในการฆ่าเซลล์มะเร็งของ natural killer cell กระทำโดย expose สารสกัด *in vivo* โดยป้อนสารสกัด TAM หรือ VH control ด้วยวิธี oral gavage ในหนูเม้าส์ B6C3F1 เป็นระยะเวลา 14 วัน และในวันที่ 15 เตรียมเซลล์จากม้ามของหนูออกมาทดสอบ NK activity ใน *in vitro* NK เซลล์จัดเป็น innate immunity ที่มีความสามารถในการฆ่าเซลล์มะเร็งโดยไม่มี ความเจาะจง และไม่มีการจดจำ เซลล์มะเร็งเป้าหมายที่ใช้คือ Yac-1 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งของ T เซลล์ (T cell lymphoma) เกิดจากการชักนำด้วยการ inoculate moloney leukemia virus เข้าสู่หนูเม้าส์ A/Sn ที่เกิดใหม่ Yac-1 เป็นเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ที่มีความไวต่อการถูกทำลายโดย NK เซลล์ในหนู (Kiessling et al., 1975) ผลการทดลองชี้ชัดว่า การได้รับสารสกัด TAM ที่ 50-500 mg/kg เป็นเวลา 14 วัน ไม่มีผลกระทบต่อการทำงานของ NK เซลล์ (รูปที่ 4.8) ทุกอัตราส่วนของ effector (เซลล์ม้ามที่มี NK อยู่รวม) ต่อ target (Yac-1 ที่ติดฉลากด้วย ^{51}Cr) เซลล์ ตั้งแต่ 200:1, 100:1, 50:1, 25:1 และ 12.5:1 มีร้อยละของการทำลายเซลล์เป้าหมายในเซลล์ม้ามของหนูที่ได้รับ TAM หรือ ตัวทำลายละลายควบคุมมีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แม้ว่า TAM ที่ 250 mg/kg มีแนวโน้มลดการทำงานของ NK เซลล์ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มที่เป็นสารละลายควบคุม และ ไม่ได้เป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับปริมาณสารที่ได้รับ (ไม่มี dose dependent) ข้อที่น่าสังเกตคือ การได้รับการป้อนด้วยสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ vitamin C 100 mg/kg ก็ไม่สามารถส่งเสริมการทำงานของ NK เซลล์ได้ ซึ่งขัดกับผลการวิจัยที่รายงานความสามารถของ vitamin C ในการส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในคน Heuser และ Vojdani (1997) พบว่า ภายหลังการได้รับ vitamin C (ในรูปของ granulated buffered vitamin C ในน้ำ) 60 mg/kg เป็นระยะเวลา 24 ชม. ของผู้ป่วยที่ได้รับสารพิษ vitamin C สามารถเพิ่มการทำงานของ NK เซลล์ และช่วยให้การตอบสนองของ T และ B เซลล์ต่อ mitogen ที่ลดระดับลงสืบเนื่องจากสารพิษกลับคืนเข้าสู่ระดับปกติได้ในผู้ป่วย และผู้วิจัยเสนอว่ากลไกการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของ vitamin C น่าจะเกิดผ่านการกระตุ้น

protein kinase C ที่เป็นสารสื่อกลางสำคัญในหลายวิถีทางของการส่งสัญญาณสื่อสารระหว่างเซลล์ (mediator of signal transduction pathways) ในทำนองเดียวกัน Toliopoulos et al. (2012) ได้รายงานความสามารถของ vitamin C ในการส่งเสริมการทำหน้าที่ของ NK เซลล์ ได้ทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* ในกลุ่มคนที่มีสุขภาพดี ที่ได้รับประทานวิตามิน C ปริมาณ 1 กรัมต่อวัน เป็นระยะเวลาต่อเนื่องกัน รวมเป็น 45 วัน อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาการส่งเสริมการทำงานของ vitamin C ในสัตว์ทดลองมีความแตกต่างจากที่พบในคน โดย Siegel และ Morton (1983) ทำการศึกษาผลของการดื่มน้ำที่มี 250 mg% ของ vitamin C ในหนู inbred -3 strains เป็นระยะเวลา 4-5 สัปดาห์ พบว่า vitamin C ไม่มีผลต่อการทำหน้าที่ ของ NK เซลล์ในหนูเมาส์ NZB strain ที่มีแนวโน้มในการเป็นโรคมะเร็งด้านตนเองและการเกิดมะเร็งของเซลล์เม็ดเลือดขาว รวมทั้งในหนูปกติที่มีโอกาสของการเกิดมะเร็งต่ำในหนูเมาส์ Balb/c และ DBA/2 ในขณะที่ Ghoneum et al. (1990) รายงานว่าคางคก (*Bufo marinus*) ที่ได้รับ vitamin C *in vitro* และ *in vivo* ส่งผลยับยั้งการทำงานของ NK เซลล์ ดังนั้น ผลของ vitamin C ต่อการทำงานของ NK เซลล์ยังมีรายงานที่ขัดแย้งกันระหว่างการศึกษาในคนและในสัตว์ทดลอง สำหรับโครงการวิจัยนี้ พบว่า vitamin C ที่ 100 mg/kg ไม่ได้กีดการทำงานของ NK เซลล์ และไม่ได้ส่งเสริมการทำงานของ NK เซลล์ในหนูเมาส์ เช่นเดียวกับผลที่พบในสารสกัด TAM ที่ไม่ส่งผลใด ๆ ต่อการทำงานของ NK เซลล์ สำหรับกลุ่มสัตว์ทดลองที่ได้รับ anti-asialo GM1 ซึ่งเป็น antibody ที่ใช้ในการกำจัด NK เซลล์ (Yoshino et al., 2000; Grosso et al., 2018) ให้ผลตามที่คาดหมายไว้คือ สามารถลด NK activity ได้ทุกอัตราส่วนของ effector ต่อ target แสดงว่าร้อยละของการทำลาย Yac-1 เซลล์เกิดผ่านการทำหน้าที่ของ NK เซลล์

ในบรรดาสารสื่อกลางที่เป็นอนุมูลอิสระ (free radical mediators) ที่หลั่งออกจากเซลล์ macrophage ที่ถูกกระตุ้น (activated macrophage) radical gas nitric oxide (NO) เป็นโมเลกุลทางชีวภาพที่มีบทบาทสำคัญยิ่งในกระบวนการทางสรีรวิทยา (physiological) และทางพยาธิสภาพ (pathological) สามารถก่อให้เกิดทั้งประโยชน์และโทษต่อร่างกาย ทั้งนี้ ขึ้นกับปริมาณของ NO ที่ผลิตในร่างกาย ในปริมาณต่ำ NO ช่วยควบคุมขบวนการต่าง ๆ ทางสรีรวิทยาต่าง ๆ เช่น การขยายตัวของหลอดเลือด (vasodilation) การสื่อสารระหว่างเซลล์ประสาท (neural signal transmission) การป้องกันการเกาะตัวของเกร็ดเลือด (platelet aggregation) การแข็งตัวขององคชาติ (penile erection) การควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ควบคุมการทำงานของ NK เซลล์และการแสดงออก (expression) ของ cytokines เช่น IFN- γ หรือ transforming growth factor- β มีฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์ (antimicrobial) และต้านมะเร็ง (antitumor) เป็นต้น อย่างไรก็ตามในระหว่างการติดเชื้อและการอักเสบ NO ถูกชักนำให้มีการสังเคราะห์เพิ่มขึ้นผ่านเอนไซม์ induced nitric oxide synthase (iNOS) ระดับของ NO ที่สูงผิดปกติสามารถก่อให้เกิดโทษต่อร่างกายด้วยการสร้างสารก่อมะเร็ง N-nitroso compounds การเกิด deamination ของ DNA base การเกิดออกซิเดชันของ DNA base การกลายพันธุ์ (mutation) ที่นำไปสู่การเกิดมะเร็ง และการก่อให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อด้วยการเกิดออกซิเดชัน (Liu and Hotchkiss, 1995; Ohshima and Bartsch, 1994; Tamir and Tannenbaum, 1996; Bogdan et al., 2000;

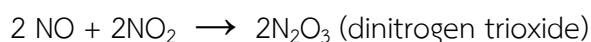
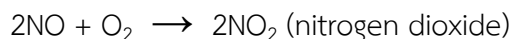
Bernstein *et al.*, 2005; Korde *et al.*, 2012) ที่สำคัญคือ NO ที่สร้างโดย rate-limiting enzyme iNOS นี้เป็นสารสื่อกลาง (mediator) สำคัญที่เกี่ยวข้องในกลไกของการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคไขข้ออักเสบ (rheumatoid arthritis) กระแสโลหิตเป็นพิษ (septic shock) โรคภูมิคุ้มกันตนเอง (autoimmunity) รวมถึงโรคต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการบวนการอักเสบเฉียบพลัน และเรื้อรัง (Karpuzoglu and Ahmed, 2006; Robbins and Sisson, 1996; Moncada and Rosa, 1991; Kolb and Kolb-Bachofen, 1992; Ialenti *et al.*, 1992) นอกจากนั้น NO ยังสามารถทำปฏิกิริยากับ superoxide เกิด peroxynitrite (ONOO-) ซึ่งเป็น oxidant ที่รุนแรงขึ้น (more potent oxidant) และมีพิษต่อเซลล์ (Ischiropoulos *et al.*, 1992)

การสร้าง NO โดย activated macrophage ถูกควบคุมโดยสิ่งเร้า (stimuli) ต่าง ๆ เช่นถูกกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้นโดย LPS, IFN- γ , tumor necrosis factor alpha (TNF- α), IL-12, สารซึ่งเพิ่มปริมาณ cAMP (c AMP-elevating agents), แสง UV และ โอโซน (Lorsbach *et al.*, 1993; Xie *et al.*, 1994; Nathan and Xie, 1994) หรือถูกยับยั้งให้สร้าง NO น้อยลงโดย transforming growth factor (TGF- β), IL-4 และ IL-10 (Hinz *et al.*, 2000) เป็นต้น flavonoids ซึ่งมีโครงสร้างเป็น phenolic หลายกลุ่มสามารถดับสัญญาณ (quench) ของอนุมูลอิสระได้โดยทำให้เกิดเป็น oxidized product ที่เสถียรขึ้น มีงานวิจัยมากมายที่รายงานว่า polyphenolic flavonoids ที่เกิดตามธรรมชาติ เช่น rutin, quercetin, apigenin, wogonin, luteolin, tectorigenin, galangin, morin, naringenin (van Acker *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1999; Raso *et al.*, 2001), epigallocatechin gallate จากใบชา (Lin and Lin, 1997; Chan *et al.*, 1997), Ginkgo biloba extract (Egb 761) (Kobuchi *et al.*, 1997), silymarin (Kang *et al.*, 2002) สามารถยับยั้งการสร้าง NO ดังนั้น งานวิจัยนี้ จึงตรวจสอบศักยภาพของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม TAM ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อการสร้าง NO ในเซลล์ macrophage ที่ได้รับสาร TAM ทั้งใน *in vitro* และ *in vivo*

ผลการวิจัยในโครงการนี้ ชี้ชัดว่า สารสกัด TAM สามารถยับยั้งการสร้าง NO ของเซลล์ macrophage เมื่อได้รับสารสกัด TAM ทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* (รูปที่ 4. และ 4. ตามลำดับ) ใน *in vitro* โมเดล เซลล์ macrophage ที่ใช้คือเซลล์สายพันธุ์ RAW264.7 gamma NO (-) ที่เป็นเซลล์ สายพันธุ์ macrophage จากหนูเมาส์ (murine macrophage cell line) ที่สามารถสร้าง NO เพื่อตอบสนองต่อ LPS หรือ LPS ร่วมกับ IFN- γ การกระตุ้นเซลล์ macrophages ให้สร้าง NO จำเป็นต้องใช้การส่งสัญญาณถึงสองครั้ง IFN- γ เป็นตัวกระตุ้นที่สำคัญต่อการตอบสนองจากสัญญาณที่กระตุ้นโดย LPS แม้สัญญาณที่เกิดจากการกระตุ้นโดย IFN- γ จะไม่ใช่สัญญาณหลัก แต่การกระตุ้นเซลล์ RAW264.7 ด้วย IFN- γ เพียงชนิดเดียวก็สามารถชักนำให้เกิดการสังเคราะห์ NO ได้เช่นกัน (Scuro *et al.*, 2004) งานวิจัยนี้ เลือกใช้

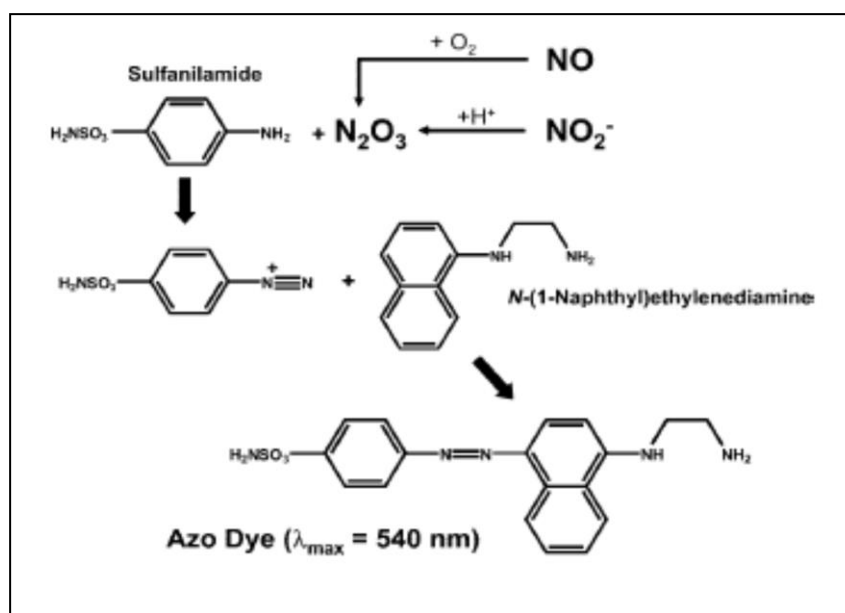
LPS 5 µg/ml และ IFN-γ 10 ng/ml ร่วมกันในการกระตุ้น RAW264.7 เซลล์ ความเข้มข้นของ LPS และ IFN-γ ที่ใช้ในการศึกษาได้จากการ titrate หาปริมาณ LPS และ IFN-γ ที่เหมาะสมในการศึกษาเบื้องต้นล่วงหน้า และการที่เลือกใช้ทั้ง LPS และ IFN-γ ร่วมกันในการกระตุ้น เนื่องจากมีรายงานวสารทั้งสองเสริมฤทธิ์ซึ่งกันและกัน (synergistic effect) ในการกระตุ้น RAW264.7 เซลล์ให้สังเคราะห์ NO ได้ดีกว่าใช้แค่สารใดสารหนึ่งเพียงชนิดเดียว (Lorsbach et al., 1993) ซึ่งผลการศึกษาในรูปที่ 4.11 A-C ยืนยันว่าทั้ง LPS และ IFN-γ เสริมฤทธิ์กันในการกระตุ้นการสังเคราะห์ NO ของเซลล์ macrophage ในช่องท้องเดียวกับเซลล์ macrophage สายพันธุ์ RAW264.7

การวัดปริมาณของ NO โดยตรงกระทำได้ยาก เนื่องจาก NO มีปริมาณน้อย และเมื่อเกิดใน *in vitro* สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว งานวิจัยส่วนใหญ่จึงไม่นิยมวัดปริมาณ NO โดยตรง ปัจจุบัน การวัด NO กระทำได้หลากหลายวิธี อาทิเช่น chemiluminescence (Gladwin et al., 2000), ultraviolet (UV) visible spectroscopic (Kelm et al., 1997) และ electron paramagnetic resonance (ERP) (Kuppusamy et al., 1996) รวมถึง colorimetric assay ซึ่งเป็นการวัดปริมาณของ NO ทางอ้อม เนื่องจาก NO ที่เกิดใน cell culture ไม่เสถียร ในสภาวะที่มีก๊าซ oxygen ก๊าซ NO เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว โดย autoxidize ได้ nitrogen oxides ในรูปต่าง ๆ ดังนี้คือ (Tarpey et al., 2004)



ในบรรดาผลผลิตของ nitrogen oxide ต่าง ๆ ที่เกิดจาก autoxidation ของ NO ในสารละลายที่มี oxygen ผลผลิตเดียวที่เสถียรคือ nitrite ซึ่งสามารถตรวจหาโดย Griess reagent ที่มีส่วนผสมของ sulfanilamide, phosphoric acid และ N-(1-naphthyl) ethylenediamine ใน Griess reaction สภาวะที่เป็นกรดทำให้ nitrite เปลี่ยนเป็น nitrous acid ซึ่งไม่เสถียร และอยู่ในรูปของ anhydride คือ N_2O_3 จากปฏิกิริยาที่แสดงข้างต้น N_2O_3 ยังอาจเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง NO และ NO_2 ใน Griess reaction ปฏิกิริยา 2 ขั้นตอนหลักของการเกิด diazotization (รูปที่ 5.2) คือ N_2O_3 ซึ่งเป็น nitrosating agent ที่ได้จาก สามารถทำปฏิกิริยากับ sulfanilic acid ได้ diazonium ion ซึ่งจับคู่ (couple) กับ N-(1-naphthyl) ethyl-enediamine ใน Griess reagent ได้สารประกอบ azo ที่มีสี (chromophoric azo product) ที่ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 540 nm (Tarpey et al., 2004) ค่าการดูดกลืนแสงเป็นปฏิกิริยาโดยตรง

กับความเข้มข้นของ nitrite ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของ NO ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นนั่นเอง ดังนั้นเมื่อเติม Griess reagent ลงไปในตัวอย่างที่มี nitrite ตัวอย่างจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูออกแดง และปริมาณของ nitrite สามารถหาได้โดยเทียบกับกราฟที่ใช้สารมาตรฐาน nitrite ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (Sun *et al.*, 2003)



รูปที่ 5.2 ปฏิกิริยา Griess สาร nitrosating agent N_2O_3 ทำปฏิกิริยากับ sulfanilamide ได้อนุพันธ์ของ diazonium ซึ่งทำปฏิกิริยาต่อกับ N -1 naphthylethylenediamine ได้ diazo product ที่ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 540 nm (Tarpey *et al.*, 2004)

ผลการทดลองในรูปที่ 4.10 A ชี้ชัดว่า เมื่อไม่ได้รับสารกระตุ้นใด ๆ เซลล์ RAW264.7 มีการสร้าง NO ในปริมาณต่ำมาก และ LPS 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ร่วมกับ IFN- γ 10 ng/ml สามารถชักนำให้ RAW264.7 เซลล์สร้าง NO ให้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญกว่าค่าใน baseline เกือบ 100 เท่า สารสกัด TAM ทุกความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.2-200 $\mu\text{g}/\text{หลุม}$ สามารถยับยั้งการสร้าง NO ของ RAW264.7 เซลล์อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยการยับยั้งมีปริมาณสูงขึ้น เมื่อความเข้มข้น TAM เพิ่มขึ้น TAM ที่ 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ NO ที่ถูกชักนำโดย LPS และ IFN- γ ได้เกือบ 70% ซึ่งสูงกว่าการยับยั้งโดย antioxidant control vitamin C, vitamin E และ β -carotene ที่สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ NO ได้ใกล้เคียงกัน คือ อยู่ที่ประมาณ 55% (รูปที่ 4.10A) ซึ่งแสดงว่าสาร TAM มีศักยภาพสูงมากในการยับยั้งการสร้าง NO ของ

เซลล์ RAW264.7 เมื่อถูกกระตุ้น เพราะสารสกัด TAM ที่ใช้เป็นเพียงสารสกัดหยาบ ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมล้วนเป็นสารบริสุทธิ์ ซึ่งระบุว่าสารสกัด TAM มีแนวโน้มของการมีศักยภาพในการยับยั้งการสร้าง NO ที่สูงมาก และอาจสูงกว่า antioxidant control ทั้งสาม เมื่อเทียบกับงานวิจัยอื่นที่ศึกษาใน model ของ RAW264.7 เดียวกัน ที่ 100 $\mu\text{g/ml}$ ของ TAM สามารถยับยั้งการสร้าง NO ได้ประมาณ 50% .ในขณะที่ Pycnogenol จากสารสกัดจากเมล็ดองุ่นที่เป็นผลิตภัณฑ์อันเลื่องชื่อ หรือ สารสกัดจากแปะก๊วย (*Ginkgo biloba*) สามารถยับยั้ง NO ใน โมเดลของ RAW264.7 เดียวกันนี้ได้ประมาณ 70% และ 55% ตามลำดับ (Virgili et al., 1998; Kobuchi et al., 1997)

การยับยั้งการสร้าง NO ไม่ได้เป็นผลสืบเนื่องจากความเป็นพิษของ TAM เพราะช่วงความเข้มข้นที่ใช้ไม่มีผลกระทบต่อร้อยละเซลล์ที่มีชีวิตของ RAW264.7 (รูปที่ 4.10 B) มีข้อน่าสังเกตว่า vitamin C ที่ความเข้มข้น 500 μM ทำให้เกิดการตายของเซลล์ 10% ($p < 0.001$) ความเป็นพิษของ vitamin C อาจเกี่ยวข้องกับบทบาทของ vitamin C ที่เปลี่ยนไปชักนำให้เกิดอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น (pro-oxidant effect) ที่สามารถเกิดขึ้นได้ในบางสภาวะเมื่อ vitamin C มีความเข้มข้นสูง ซึ่งขัดแย้งกับบทบาทของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ความเข้มข้นต่ำของ vitamin C ผลของ vitamin C ที่เป็น pro-oxidant สามารถชักนำให้ RAW264.7 เซลล์เกิดความเสียหายและตายได้ (Galloway and Painter, 1979; Speit et al., 1980)

เพื่อให้แน่ใจว่าการยับยั้งการสร้าง NO ไม่ได้เกิดเฉพาะ macrophage ที่เป็นเซลล์สายพันธุ์ของ RAW264.7 และไม่ได้เกิดเฉพาะการได้รับ TAM ทาง *in vitro* เท่านั้น งานวิจัยนี้จึงตรวจสอบการยับยั้งของ TAM ใน *in vivo* model เพื่อดูความสามารถของ TAM ในการยับยั้งการสังเคราะห์ NO ในเซลล์ macrophage ที่เตรียมได้จากช่องท้องของหนูเม้าส์ B6C3F1 ที่ได้รับการป้อนทางปากด้วยสารสกัด TAM เป็นระยะเวลา 14 วัน ซึ่งผลทดลองชี้ชัดว่า TAM สามารถยับยั้งการสร้าง NO โดยเซลล์ macrophage จากช่องท้องของหนูเม้าส์ที่ได้รับ TAM *in vivo* และได้รับการกระตุ้น *in vitro* ด้วย LPS หรือ IFN- γ หรือ LPS ร่วมกับ IFN- γ พร้อมกัน (รูปที่ 4.11 A, B และ C ตามลำดับ) ($p < 0.05$) และการยับยั้ง NO ไม่ได้ขึ้นกับความเป็นพิษโดยตรงของสารสกัด เพราะทุก dose ของ TAM ที่ใช้ไม่เปลี่ยนแปลงร้อยละปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์ macrophage ในช่องท้อง (รูปที่ 4.12)

TAM นอกจากสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ NO ของเซลล์ macrophage ในช่องท้องของหนูเม้าส์ที่ถูกกระตุ้นด้วย IFN- γ หรือ LPS ร่วมกับ IFN- γ ได้แล้ว ยังสามารถยับยั้งการสร้าง NO ที่ถูกกระตุ้นโดย tumor promoting agent 12-O-tetradecanoylphorbol- 13-acetate (TPA) ใน *in vitro* ได้ ซึ่งผลการทดลองในรูปที่ 4.13 A ชี้ชัดว่าทุก dosage ของ TAM ตั้งแต่ 50-500 mg/kg สามารถยับยั้งการ

สร้าง NO ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) โดย TAM ที่ 500 mg/kg มีฤทธิ์ใกล้เคียงกับ 100 mg/kg vitamin C ที่ใช้เป็น antioxidant positive control (รูปที่ 4.13 A) และการยับยั้งไม่ได้เป็นผลทางอ้อมอันเกิดจากพิษของสารสกัด TAM เพราะ dosage ที่ใช้ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงร้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์ macrophage จากช่องท้องของหนู (รูปที่ 4.13 B) เป็นที่ทราบกันดีว่า TPA มีโครงสร้างคล้าย diacylglycerol (DAG) และสามารถเลียนแบบ DAG ในการกระตุ้น protein kinase C (PKC) โปรตีน PKC อยู่ใน family ของ serine/threonine protein kinase ที่ควบคุมโดยไขมัน (lipid-regulated) PKC แบ่งออกเป็น 3 class คือ แบบ conventional หรือ classic, แบบ novel, และแบบที่แตกต่าง (atypical PKC) isoform ของ conventional PKC ถูกกระตุ้นโดย Ca^{+2} หรือ DAG ส่วน novel isoform ถูกกระตุ้นโดย DAG เท่านั้น และ atypical PKC isoform ไม่ถูกกระตุ้นโดยทั้ง Ca^{+2} และ DAG สำหรับ สำหรับ phorbol ester TPA สามารถจับและกระตุ้นทั้ง classic และ novel PKC isoform รวมทั้งจับกับ nonkinase DAG/phorbol ester receptors โดยทั่วไป PKC ที่ถูกกระตุ้นมักส่ง (transduce) สัญญาณภายในเซลล์ผ่าน mitogen-activated protein kinases pathways, c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) หรือ phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) รวมทั้ง transcription factors สำคัญต่าง ๆ ที่เกี่ยวกับ PKC เช่น AP-1 complex, cyclic AMP binding protein (CREB), nuclear factors (NF)-KB หรือ Sp1 (Miakotina and Snyder, 2004; Deak et al., 1998; Kazanietz, 2000; Krappmann et al., 2001; Ron and Kazanietz, 1999; Vuong et al., 2002; Zheng et al., 2000) ทำให้เป้าหมายของ TPA มักเกี่ยวข้องกับการควบคุม gene สำคัญเกี่ยวข้องกับการเจริญ และการพัฒนาการ (differentiation) ของเซลล์ และเป็นส่วนหนึ่งของหลายวิถีทางของการส่งสัญญาณของเซลล์ (signal transduction pathways) โดยเฉพาะ growth factors และ cytokines ต่าง ๆ ผลการทดลองในโครงการนี้ ที่แสดงว่า TAM สามารถยับยั้งการสร้าง NO ของเซลล์ macrophage ในช่องท้องของหนูเม้าส์เมื่อถูกกระตุ้นโดย TPA ชี้แนะว่า การยับยั้งการสร้าง NO ของ TAM อาจเกิดผ่านวิถีทางของ protein kinase C (PKC) เนื่องจากการกระตุ้น PKC โดย TPA ก่อให้เกิด signal transduction ที่เพียงพอในการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ iNOS โปรตีนในเซลล์ macrophage ของช่องท้อง รวมทั้ง RAW264.7 ซึ่งเป็นเซลล์ macrophage สายพันธุ์ (Hortelano et al., 1993; Paul et al., 1995) กลไกการยับยั้งการสร้าง NO ของเซลล์ macrophage โดยสารสกัด TAM อาจเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการแสดงออกของ iNOS (iNOS expression) หรือ การทำงานของ iNOS (iNOS activity) รวมทั้งการออกฤทธิ์ผ่าน transcription factors ต่าง ๆ ที่ควบคุมการแสดงออกของ cytokines และ lymphokines ต่าง ๆ ที่ควบคุมโปรตีน iNOS อีกทอดหนึ่ง ซึ่งควรมีการศึกษาต่อยอดต่อไปในอนาคต เนื่องจากปริมาณ NO ในรูปที่ถูกชักนำให้สังเคราะห์ขึ้น (induced NO) โดยตัวกระตุ้น เช่น LPS และ/หรือ IFN- γ หรือ TPA มีปริมาณสูง สามารถก่อให้เกิดความเสียหายกับเซลล์หรือเนื้อเยื่อและเป็นสารสื่อกลาง (mediator) สำคัญในกระบวนการอักเสบ

(Korhonen *et al.*, 2005) ดังนั้น สารสกัด TAM ที่มีศักยภาพสูงในการยับยั้งการสร้าง NO ที่ถูก induced จึงน่าจะสามารถออกฤทธิ์ด้านการอักเสบได้ รวมทั้งอาจมีศักยภาพในเชิงเภสัชวิทยาที่ช่วยบรรเทาอาการของโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเรื้อรังต่าง ๆ ที่ควรค่าต่อการตรวจสอบต่อไปในอนาคต

บทที่ 6

บทสรุป

6.1 สรุปผลการวิจัย

1. สารสกัด TAM ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการตอบสนองด้าน innate immunity ซึ่งชี้แนะโดยไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการตอบสนองของ T เซลล์ในเซลล์ม้ามของหนูเมาส์ B6C3F1 ต่อ Con A mitogen และไม่สามารถกระตุ้นการทำงานของ NK เซลล์
2. สารสกัด TAM มีผลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะของทั้ง T และ B เซลล์ โดย TAM ที่ความเข้มข้น 1 $\mu\text{g/ml}$ ช่วยลดการเจริญของ T เซลล์ในการตอบสนองต่อ allogeneic เซลล์ใน mixed lymphocyte response และ TAM ที่ความเข้มข้น 1 และ 5 $\mu\text{g/ml}$ สามารถส่งเสริมการสร้าง antibody ของ B เซลล์ในการตอบสนองต่อ SRBC ซึ่งเป็น T-cell dependent antigen
3. เซลล์มะเร็งสายพันธุ์ต่าง ๆ มีความไวต่อความเป็นพิษของสารสกัด TAM ต่างกัน
4. สารสกัด TAM มีความเป็นพิษต่ำในหนูเมาส์ B6C3F1 โดย dosage ของ TAM ที่ 50, 250 และ 500 mg/kg ไม่แสดงความเป็นพิษต่อหนูเมาส์ที่ได้รับการป้อนทางปากวันละครั้งเป็นเวลาต่อเนื่อง 14 วัน
5. ฤทธิ์โดดเด่นที่สุดของสารสกัด TAM คือการยับยั้งการสร้าง NO ของเซลล์ macrophage ที่เกิดทั้งการได้รับสารสกัด TAM ใน *in vitro* และ *in vivo* และการยับยั้งสามารถเกิดขึ้นกับเซลล์ macrophage ทั้งเซลล์สายพันธุ์ RAW264.7 และเซลล์ macrophage ที่เก็บจากช่องท้องของหนูเมาส์

6.2 ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่าเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามซึ่งเป็นแหล่งที่อุดมสมบูรณ์ไปด้วยสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีฤทธิ์ต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ โดยส่งผลที่แตกต่างกันต่อการทำงานของเซลล์ต่างชนิดกันในระบบภูมิคุ้มกัน จากการศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามพบว่าสารสกัดมีผลต่อการทำงานของเซลล์ macrophage โดดเด่นที่สุด เมื่อเทียบกับการทำงานของ T และ B lymphocyte อย่างไรก็ตามยังมีความจำเป็นต้องศึกษาต่อเพิ่มเติมเกี่ยวกับฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันเพิ่มเติมดังนี้คือ

1. ควรปรับปรุงวิธีการเตรียมสารสกัดให้สามารถละลายได้ดีขึ้น เพราะความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในงานวิจัยทั้ง *in vitro* และ ปริมาณ dosage ของสารสกัดที่ใช้ในสัตว์ทดลอง ถูกจำกัดโดย

ความสามารถในการละลายตัวของสาร ที่ต้องใช้ตัวทำละลาย DMSO ที่มีข้อจำกัดของความเข้มข้นสูง มีพิษต่อเซลล์และต่อสัตว์ทดลอง จึงควรปรับปรุงวิธีการสกัดทางเคมี ให้ได้สารสกัดที่สามารถละลายได้ดีขึ้น และไม่ก่อให้เกิดปัญหาของการตกตะกอน

2. เนื่องจากสารสกัด TAM ที่บางความเข้มข้น สามารถส่งเสริมการสร้าง antibody ของ B lymphocyte ใน *in vitro* จึงควรทำการทดลองซ้ำเพื่อยืนยันผลใน *in vivo* ว่าสารสกัด TAM สามารถส่งเสริมการสร้าง antibody ของ B lymphocyte ได้ พร้อมทั้งยืนยันลักษณะ biphasic dose-response relationship ที่พบใน *in vitro* study

3. ศึกษากลไกการส่งเสริมการทำงานของ B เซลล์ในการสร้าง antibody ว่าเกี่ยวข้องกับการทำงานของ T helper เซลล์ การนำเสนอของ antigen presenting cell หรือกระตุ้นการทำงานของ B เซลล์ได้โดยตรง โดยอาจใช้ model ของ Mishell Dutton assay ในการศึกษาเกี่ยวกับกลไกที่เกิดขึ้น

4. เนื่องจากสารสกัด TAM ช่วยส่งเสริมการทำงานของ B เซลล์ได้ จึงควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลของ TAM ต่อ mitogenesis assay แต่ศึกษาโดยใช้ mitogen ที่กระตุ้นการตอบสนองของ B เซลล์เพิ่มเติม เช่น ใช้ LPS เป็นต้น

5. เนื่องจากฤทธิ์โดดเด่นที่สุดของสารสกัด TAM อยู่ที่ความสามารถในการยับยั้งการสร้าง NO ของเซลล์ macrophage และ NO ที่ถูกชักนำให้สร้างขึ้นนี้มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ จึงควรศึกษาต่อยอดเกี่ยวกับกลไกการยับยั้งการสร้าง NO ใน RAW264.7 เซลล์ซึ่งกระทำได้สะดวกกว่าการเก็บเซลล์ macrophage จากช่องท้องของหนู เช่น ศึกษาว่ากลไกการยับยั้งเกิดจากการลดการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS หรือไม่ หรือเกิดจากการลดการแสดงออกของ cytokines ที่เกี่ยวข้อง รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัด TAM เพิ่มเติม เช่น นอกจากการศึกษาการยับยั้ง iNOS ควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการลดระดับของเอนไซม์ cyclooxygenase-2 (COX-2) การลดระดับของ prostaglandins รวมทั้งศึกษาผลกระทบของเปลือกหุ้มเมลิตมะขามต่อ proinflammatory cytokines ต่าง ๆ เช่น IL-1, IL-6 และ TNF เป็นต้น รวมทั้งความสามารถในการยับยั้ง transcription factors ที่อาจเกี่ยวข้อง เช่น ผลต่อ NF- κ B, AP-1 เป็นต้น

6. ศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของ สารสกัด TAM ใน *in vivo* model หรือสำรวจความสามารถของ TAM ต่อการต้านภูมิแพ้ ผลต่อการทำงานของ cellular immunity เพิ่มเติม เช่น delayed hypersensitivity response, T-cell mediated sensitization ใน Local lymph node assay รวมถึงโมเดลในสัตว์ทดลองที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบซึ่งเกี่ยวข้องกับการชักนำการสังเคราะห์ NO ให้สูงผิดปกติ เช่น carrageenan-induced paw edema, acetic acid-induced vascular permeability หรือ arachidonic-acid-induced ear edema เป็นต้น

บรรณานุกรม

- คณะกรรมการสภาวิจัยแห่งชาติ สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช มหาวิทยาลัยขอนแก่น สมาคมสมุนไพรแห่งประเทศไทย และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (2540). รายงานการสัมมนาทางวิชาการเรื่อง สมุนไพรไทย: เถลิ้มพระเกียรติพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงครองสิริราชสมบัติ ครบ 50 ปี. 23-25 มกราคม.
- จินดาพร ภูมิพัฒนางษ์. (2556). **ศูนย์สมุนไพรทักษิณ** [ออนไลน์]. ได้จาก http://herbal.pharmacy.psu.ac.th/index.php?option=com_content&task=view&id=118&Itemid=42.
- ณัฐพร ดาลัย. (2550). ผลของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามต่อระบบต้านอนุมูลอิสระในตับหนูขาว. **วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่** 40(2): 126.
- พร้อมจิต ศรีลัมพ์., รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล, วงศ์สถิต ฉั่วกุล., อาทร รุ่งไพบูลย์., สมภาพ ประธานธรรารักษ์ จุฬามณี สุทธิสีสังข์ เพชรรัตน์ พงษ์เจริญสุข. 2539. **สมุนไพรสวนสิริรุกขชาติ**. บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้ง แอนด์ พบลิชซิ่ง, กรุงเทพฯ
- ยุวดี จอมพิทักษ์. 2539. **รักษาโรคด้วยสมุนไพร**. สำนักพิมพ์หอสมุดกลาง 09. กรุงเทพฯ
- รวีวรรณ (พัธนาโชคชัย) วงศ์ภูมิชัย. (2554). ผลของสารสกัดเชิงซ้อนโพลีเมอริก โปรแอนโทราซัยยานิน ดินจากสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามต่อการเกิดมะเร็งตับในระยะเริ่มต้นและกลไกที่เกี่ยวข้องกับระบบป้องกันอนุมูลอิสระ. ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย-เชียงใหม่. (รายงานฉบับสมบูรณ์).
- วีณา จิระฉริยากุล 2541. ยาจากสมุนไพร. **จุลสารข้อมูลสมุนไพร** 15 (3): 5-17.
- ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร. (2556). **สรรพคุณของมะขาม**. [ออนไลน์]. ได้จาก <http://www.moe.go.th/moe/th/blog/view-blog.php?memberid=159&blogid=67>.
- ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (2541). เอกสารการฝึกอบรมเรื่อง **การตรวจสอบหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชและจุลินทรีย์**. 22-24 กรกฎาคม. กรุงเทพฯ

หน่วยบริการฐานข้อมูลสมุนไพร. (2556). **ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ (มะขาม)**. [ออนไลน์]. ได้จาก <http://www.medplant.mahidol.ac.th/pubhealth/>.

Aengwanich, W. and Suttajit, M. (2010). Effect of polyphenols extracted from Tamarind (*Tamarindus indica* L.) seed coat on physiological changes, heterophil/lymphocyte ratio, oxidative stress and body weight of broilers (*Gallus domesticus*) under chronic heat stress. **Animal Science Journal** 81(2): 264-270.

Aengwanich, W., Suttajit, M. and Narkkong, N. (2009a). Effects of polyphenols extracted from tamarind (*Tamarindus indica* L.) seed coat on differential white blood cell count in broilers (*Gallus domesticus*) exposed to high environmental temperature. **International Journal of Poultry Science** 8(10): 957-962.

Aengwanich, W., Suttajit, M., Srikhun, T. and Boonsorn, T. (2009b). Antibiotic effect of polyphenolic compound extracted from tamarind (*Tamarindus indica* L.) seed coat on productive performance of broilers. **International Journal of Poultry Science** 8(8): 749-751.

Al-Fatimi, M., Wurster, M., Schröder, G. and Lindequist, U. (2007). Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. **Journal of Ethnopharmacology** 111(3): 657-666.

Ali, N. and Shah, S. 2010. Spasmolytic activity of fruits of *Tamarindus indica* L. **Journal of Young Pharmacists** 2(3): 261-264.

Babaria, P., Mute, V., Awari, D. and Ghodasara, J. (2011). In vivo evaluation of antiarthritic activity of seed coat of *Tamarindus indica* Linn. **Internatinal Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** 3(4): 204-207.

Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S. J., Das, D.K., Ray, S. D., Kuszynski, C.A., Joshi, S.S. and Pruess, H. G. 2000. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. **Toxicology** 148(2-3): 187-197.

- Bagchi, D., Ray, S. D., Bagchi, M., Preuss, H. G. and Stohs, S. J. (2002). Mechanistic pathways of antioxidant cytoprotection by a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract. **Indian Journal of Experimental Biology** 40(6): 717-726.
- Ban, M., Hettich, D., Cavelier, C. 1995. Use of Mishell-Dutton culture for the detection of the immunosuppressive effect of iron-containing compounds. **Toxicology Letter** 81(2-3): 183-188.
- Bendich, A. 1999. Immunological role of antioxidant vitamins. In: **Antioxidants in human health**. T.K. Basu, N.J. Temple and M.L. Garg (eds.) pp 27-40. CAB International, Tucson.
- Benzie, I. F. and Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry** 239(1): 70-76.
- Bernstein, H. G., Bogerts, B. and Keilhoff, G. (2005). The many faces of nitric oxide in schizophrenia. A review. **Schizophrenia Research** 78(1): 69-86.
- Bhadoriya, S.S., Mishra, V., Raut, S., Ganeshpurkar, A. and Jain, S.K. 2012. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of a hydroethanolic extract of *Tamarindus indica* leaves. **Scientia Pharmaceutica** 80(3): 685-700.
- Bhadoriya, S.S., Ganeshpurkar, A., Narwaria, J., Rai, G. and Jain, A.P. 2011. *Tamarindus indica*: extent of explored potential. **Pharmacognosy Reviews** 5(9): 73-81.
- Bin-Hafeez, B., Haque, R., Parvez, S., Pandey, S., Sayeed, I and Raisuddin, S. 2003. Immunomodulatory effects of fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) extract in mice. **International Immunopharmacology** 3: 257-265.
- Bogdan, C., Rollinghoff, M., Diefenbach, A. (2000). The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunological Reviews** 173: 17-26.
- Brunton, L.L., Parker, K. L, Murri, N., Blumenthal, D.K., and Knollmann, B.C. 2006. **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. (Online

edition) Available URL: <http://www.accessmedicine.com/resourceTOC.aspx?resourceID=28>

Burleson, G. R., Dean, J. H. and Munson, A. E. 1995a. **Methods in Immunotoxicology**. V.I. Wiley-Liss, New York.

Burleson, G. R., Dean, J. H. and Munson, A. E. 1995b. **Methods in Immunotoxicology**. V.II. Wiley-Liss, New York.

Burns-Naas, L.A., Meade, B.J., and Munson, A.E. 2001. Toxic responses of the immune system. In **Casarett & Doull's Toxicology: The basic science of poisons**. 6th ed. C.D. Klaassen (ed.) pp. 419-470. McGraw-Hill Medical Pub. Division, New York.

Chan, M. M., Fong, D., Ho, C., and Huang, H. 1997. Inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity by epigallocatechin gallate, a natural product from green tea. **Biochemical Pharmacology** 54: 1281-1286.

Cheshier, J.E., Ardestani-Kaboudanian, S., Liang, B., Araghiniknam, M., Chung, S., Lane, L., Castro, A. and Watson, R.R. 1996. Immunomodulation by pycnogenol in retrovirus-infected or ethanol-fed mice. **Life Science** 58(5): PL87-96.

Choudhury, B.P. and Sengupta, M. 1970. Observation on the bacteriostatic property of extract of *Tamarindus indica* leaf (TIL). 2. **Journal of the All-India Ophthalmological Society** 18(2): 52-55.

Cos, P., De Bruyne, T., Hermans, N., Apers, S., Vanden Berghe, D. and Vlietinck, A.J. (2003). Proanthocyanidins in health care: Current and new trends. **Current Medicinal Chemistry** 10: 1345-1359.

Crowley, L.C., Scott, A.P., Marfell, B.J., Boughaba, J.A., Chojnowski, G., and Waterhouse, N.J. 2016. Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry. **Cold Spring Harbor Protocol** 2016(7): pdb.prot087163. doi: 10.1101/pdb.Prot087163.

- De Caluw, E., Halamov, K. and Van Damme, P. 2010. *Tamarindus indica* L.: A review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Afrika Focus** 23(1): 53-83.
- De la Fuente, M. and Victor, V.M. 2000. Anti-oxidants as modulators of immune function. **Immunology and Cell Biology** 78(1): 49-54.
- de Oliveira, M. G., Marques, R. B., de Santana, M. F., Santos, A. B., Brito, F. A., Barreto, E. O., De Sousa, D. P., Almeida, F. R., Badaue-Passos, D., Jr., Antonioli, A. R. and Quintans-Junior, L. J. (2012). Alpha-terpineol reduces mechanical hypernociception and inflammatory response. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology** 111(2): 120-125.
- Deak, M., Clifton, A.D., Lucocq, L.M., and Alessi, D.R. 1998. Mitogen and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. **EMBO Journal** 17: 4426-4441.
- Denizot F, Lang R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods** 89: 271–277.
- Dhanalakshmi, S., Agarwal, R., and Agarwal, C. 2003. Inhibition of NF-kappa B pathway in grape seed extract-induced apoptotic death of human prostate carcinoma DU145 cells. **International Journal of Oncology** 23(3):721-727.
- Djeussi, D.E., Noumedem, J.A., Seukep, J.A., Fankam, A.G., Voukeng, I.K., Tankeo, S.B., Akuete, A.H.L., Kuete, V. 2013. Antibacterial activities of selected edible plants extracts against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. **BMC Complementary and Alternative Medicine** 13(1): 164
- Düchler, M., and Stepnik, M. 2008. Cytotoxic effects of a combination of three natural compounds to leukemia cells *in vitro*. **Cancer Therapy**. 6: 733-740.

- El-Siddig, K., Gunasena, H.P.M., Prasa, B.A., Pushpakumara, D.K.N.G., Ramana, K.V.R., Vijayanand. P., and Williams, J.T. (2006). **Tamarind-*Tamarindus indica* L. Fruits for the future 1**. Southampton, UK: Southampton Centre for Underutilized Crops.
- Escalona-Arranz, J.C., Péres-Roses, R., Urdaneta-Laffita, I., Camacho-Pozo, M.I., Rodriguez-Amado, J., Licea-Jimenez, I. 2010. Antimicrobial activity of extracts from *Tamarindus indica* L. leaves. **Pharmacognosy Magazine** 6(23): 242-247.
- Farnsworth, N.R., and Bunyaphrathasara, N. (1992). **Thai medicinal plants recommended for primary health care system**. Prachachon, Bangkok.
- Fine, A. M., 2000. Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and phytopharmaceutical applications. **Alternative Medicine Review** 5(2): 144-151.
- Galloway, S.M., and Painter, R.B. (1979). Vitamin C is positive in the DNA synthesis inhibition and sister-chromatid exchange tests. **Mutation Research** 60: 321-7.
- Gentile, C., Allegra, M., Angileri, F., Pintaudi, A.M., Livrea, M.A., and Tesoriere, L. (2012). Polymeric proanthocyanidins from Sicilian pistachio (*Pistacia vera* L.) nut extract inhibit lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells. **European Journal of Nutrition** 51:353-363.
- Ghoneum, M., Sadek, I.A., Gill, G., and Cooper, E.L. 1990. Ascorbic acid suppresses natural killer cell activity in *Bufo marinus*. **Diseases of Aquatic Organisms** 9: 1-4.
- Gladwin, M. T., Shelhamer, J. H., Schechter, A. N., Pease-Fye, M. E., Waclawiw, M. A., Panza, J. A., Ognibene, F. P. and Cannon, R. O. (2000). Role of circulating nitrite and S-nitrosohemoglobin in the regulation of regional blood flow in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 97(21): 11482-11487.
- Glew, R.S., Erjagt, D.J., Chuang, L.T.S., Huang, Y., Millson, M. and Glew, R.H. 2005. Nutrient content of four edible wild plants from west Africa. **Plants Foods for Human Nutrition** 60(4): 187-193.

- Goldstein, A., Aronow, L., and Kalman, S. M. 1974. **Principles of Drug Action: The Basis of Pharmacology.** pp. 517-567. John Wiley & Sons, New York.
- Grosso, J.F., Herbert, L.M., Owen, J. L., and Lopez, D.M. 2018. MUC1/sec-expressing tumors are rejected *in vivo* by a T cell-dependent mechanism and secrete high levels of CCL2. **Journal of Immunology** 173: 1721-1730.
- Grosso, J.F., Herbert, L.M., Owen, J.L. and Lopez, D.M. 2004. MUC1/sec-expressing tumors are rejected *in vivo* by a T cell-dependent mechanism and secrete high levels of CCL2. **Journal of Immunology** 173: 1721-1730. Doi 10.4049/jimmunol 173.3.1721.
- Havinga, R.M., Harl, A., Putscher, J., Prehsler, S., Buchmann, C., Vogl, C.R. 2010. *Tamarindus indica* L. (Fabaceae): patterns of use in traditional African medicine. **Journal of Ethnopharmacology** 127(3): 573-588.
- Heuser, G., and Vojdani, A. 1997. Enhancement of natural killer cell activity and T and B cell function by buffered vitamin C in patients exposed to toxic chemicals: the role of protein kinase-C. **Immunopharmacology and Immunotoxicology** 19(3): 291-312.
- Hinz, B., Brune, K., and Pahl, A. (2000). Nitric oxide inhibits inducible nitric oxide synthase mRNA expression in RAW264.7 macrophages. **Biochemical Biophysical Research Communication** 271: 353-357.
- Holsapple, M.P., White, K.L.JR, McCay, J.A., Bradley, S.G., and Munson, A.E. (1988). An immunotoxicological evaluation of 4,4'-thiobis-(6-t-butyl-m-cresol) in female B6C3F1 mice. 2. Humoral and cell-mediated immunity, macrophage function, and host resistance. **Fundamental and Applied Toxicology** 10: 701-16.
- Hortelano, S., Genaro, A.M., and Bosca, L. (1993). Phorbol esters induce nitric oxide synthase and increase arginine influx in cultured peritoneal macrophages. **Federation of European Biochemical Societies** 320: 135-9.

- Ialenti, A., Iannaro, A., Moncada, S., and Di Rosa, M. (1992). Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. **European Journal of Pharmacology** 211: 177-82.
- Ischiropoulos, H., Zhu, L., Chen, J., Tsai, M., Martin, J.C., Smith, C.D., and Beckman, J.S. (1992). Peroxynitrite mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 298: 431-7.
- Janeway, C.A. and Travers, P. 1996. **Immunobiology: The immune system in health and disease**. Current Biology Ltd, London.
- Kalra, P., Sharma, S., and Suman, Kumar, S. 2011. Antiulcer effect of the methanolic extract of Tamarindus indica seeds in different experimental models. **Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences** 3(2): 236-241.
- Kang, J. S., Jeon, Y. J., Kim, H. M., Han, S. H. and Yang, K.-H. (2002). Inhibition of inducible nitric-oxide synthase expression by silymarin in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 302(1): 138-144.
- Karpuzoglu, E. and Ahmed, S. A. (2006). Estrogen regulation of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune cells: Implications for immunity, autoimmune diseases, and apoptosis. **Nitric Oxide** 15(3): 177-186.
- Kazanietz, M.G. 2000. Eyes wide shut: protein kinase C isozymes are not the only receptors for the phorbol ester tumor promoters. **Molecular Carcinogenesis** 28: 5-11.
- Kelm, M., Dahmann, R., Wink, D. and Feelisch, M. (1997). The nitric oxide/superoxide assay insights into the biological chemistry of the NO/O₂ interaction. **Journal of Biological Chemistry** 272(15): 9922-9932.

- Kiessling, R., Klein, E., and Wigzell, H. 1975. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. **European Journal of Immunology**. 5(2):112-117.
- Kim, H. K., Cheon, B. S., Kim, Y. H., Kim, S. Y. and Kim, H. P. (1999). Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure–activity relationships. **Biochemical Pharmacology** 58(5): 759-765.
- Klaassen, C.D. 2008. **Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons**. 7th ed. McGraw-Hill, New York.
- Kobuchi, H., Kroy-Lefaux, M. T., Christen, Y., and Packer, L. 1997. Ginkgo biloba extract (Egb 761): Inhibitory effect on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW254.7. **Biochemical Pharmacology** 53:897-903.
- Kolb, H. and Kolb-Bachofen, V. (1992). Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity. **Immunology Today** 13(5): 157-160.
- Korde, S., Sridharan, G., Gadgil, A. and Poornima, V. (2012). Nitric oxide and oral cancer: A review. **Oral Oncology** 48(6): 475-483.
- Korhonen, R., Lahti, A., Kankaanranta, H. and Moilanen, E. (2005). Nitric oxide production and signaling in inflammation. **Current Drug Targets-Inflammation and Allergy** 4(4): 471-479.
- Krappmann, D., Patke, A., Heissmeyer, V. and Scheidereit, C. 2001. B-cell receptor-and phorbol ester-induced NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase activation in B cells requires novel protein kinase C's. **Molecular and Cellular Biology** 21: 6640-6650.
- Kuppusamy, P., Wang, P., Samouilov, A. and Zweier, J. L. (1996). Spatial mapping of nitric oxide generation in the ischemic heart using electron paramagnetic resonance imaging. **Magnetic Resonance in Medicine** 36(2): 212-218.

- Kuru, P. 2014. Tamraindus indica and its health related effects. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine** 4(9): 676-681.
- Landi Librandi, A.P., Chryso'stomo,T.N., Azzolini, A.E.C.S., Recchia, C.G.V., Se'rgio Akira Uyemura, S.A., de Assis-Pandochi, A.I. 2007. Effect of the extract of the tamarind (Tamarindus indica) fruit on the complement system: Studies *in vitro* and in hamsters submitted to a cholesterol-enriched diet. **Food and Chemical Toxicology** 45: 1487-1495.
- Lin, Y.L., and Lin, J.K. (1997). (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthesis by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor-KB. **Molecular Pharmacology** 52: 464-72.
- Lin, Z., Li, J., and Fang, D. 2014. SIRT1 involvement in virus-mediated diseases. **JSM Microbiology** 2(1): 1006-1010.
- Liu, R. H. and Hotchkiss, J. H. (1995). Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: a review. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology** 339(2): 73-89.
- Lorsbach, R.B., Murphy, W.J., Lowenstein, C.J., Snyder, S.H., and Russell, S.W. (1993). Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon-gamma and lipopolysaccharide. **Journal of Biological Chemistry** 268: 1908-1913.
- Luster, M.L., Munson, A.E., Thomas, P.T., Holsapple, M.P., and Fenters, J.D., and White, K.L. 1988. Development of a testing battery to assess chemical-induced immunotoxicity National Toxicology Program's criteria for immunotoxicity evaluation in mice. **Fundamental and Applied Toxicology** 10: 2-19.
- Luster, M.L., Portier, C., Pait, D.G., Rosenthal, G.J., Germolec, D.R., Comment, C.E., Corsini, E., Blaylock, B.L., Pollock, P., Kouchi, Y., Craig, W., Munson, A.E., and White, K.L. 1993. Risk assessment in immunotoxicology II. Relationships between immune and host resistant tests. **Fundamental and Applied Toxicology** 21:71-82.

- Luster, M.I., Portier, C., Pait, D.G., White, K.L., Gennings, C., Munson, A.E., Rosenthal, G.J. 1992. Risk assessment in immunotoxicology I. Sensitivity and predictability of immune tests. **Fundamental and Applied Toxicology** 18:200-210.
- Maiti, R., Jana, D., Das, U., Ghosh, D. 2004. Antidiabetic effect of seed of *Tamarindus indica* in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology** 92(1): 85-91.
- Martinello, F., Soares, S., Franco, J., Santos, A., Sugohara, A., Garcia, S., Curti, C. and Uyemura, S. (2006). Hypolipemic and antioxidant activities from *Tamarindus indica* L. pulp fruit extract in hypercholesterolemic hamsters. **Food and Chemical Toxicology** 44(6): 810-818.
- Masquelier, J. 2000. **Attention deficit disorder and hyperactivity** [On-line]. Available: Wysiwyg://19/http://www.healthysource.com/add.html.
- Miakotina, O.L., and Snyder, J.M. 2004. Signal transduction events involved in TPA downregulation of SP-A gene expression. **American journal of Physiology- Lung Cellular and Molecular Physiology** 286: L 1210-L1219.
- Middleton, E. Jr/ 1998. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. **Advances in Experimental Medicine and Biology** 439: 175-182.
- Moncada, S., Palmer, R.M.J. and Higgs, E.A. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews** 43: 109-42.
- Mosmon, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods** 65: 55-63.
- Murphy, K.P., Travers, P., and Walport, M. 2008. **Janeway's immunobiology**. 7th ed. Garland Science, New York.
- Nathan, C. (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB Journal** 6: 3051-64.

- Nathan, C. and Xie, Q. W. (1994). Regulation of biosynthesis of nitric oxide. **The Journal of Biological Chemistry** 269(19): 13725-13728.
- Nature Health Essentials 2000. **Arthritis relief** [On-line]. Available: <http://www.naturalessentials.com/arthritis.htm>.
- Naturemiracles.com 2000. **Research reveals the proven safety of Masquelier's original OPCs** . [On-line]. Available: <http://www.naturesmiracles.com/safety.html>.
- Nguta. J.M., Mbaria, J.M. 2013. Brine shrimptoxicity and antimalarial activity of some plants traditionally jused in treatment of malaria in Msambweni district of kenya.. **Journal of Ethnopharmacology** 148(3): 988-992.
- Ohshima, H., and Bartsch, H. (1994). Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. **Mutation Research** 305: 253-64.
- Paul, A., Pendreigh, R.H., and Plevin, R. (1995). Protein kinase C and tyrosine kinase pathways regulate lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase activity in RAW 264.7 murine macrophages. **British Journal of Pharmacology** 114: 482-8.
- Paula, F.S., Kabeya, L.M., Kanashiro, A., de F'igueiredo, A.S.G., Azzolini, AECS., Uyemura, S.A., Lucisano-Valim, Y.M 2009. Modulaton of human neutrophil oxidative metabolism and degranulation by extract of *Tamarindus indica* L. fruit pulp. **Food and Chemical Toxicology** 47(1): 163-170.
- Pruett, S.B. 2003. Stress and the immune system. **Pathophysiology** 9: 133-153.
- Pumthong, G. (1999). **Antioxidative activity of polyphenolic compounds extracted from seed coat of *Tamarindus indica* Linn.** M.S. thesis, Chiang Mai University, Thailand.
- Raso, G. M., Meli, R., Carlo, G.D., Pacilio, M., and Carlo, R.D. 2001. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. **Life Science** 68: 921-931.

- Ray, S. D., Kumar, M. A. and Bagchi, D. 1999. A novel proanthocyanidin IH636 grape seed extract increases *in vivo* Bcl-XL expression and prevents acetaminophen-induced programmed and unprogrammed cell death in mouse liver. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 369(1): 42-58.
- Robbins, R.A., and Sisson, J.H. (1996). Nitric Oxide. In R.G., Townley and D.K., Agrawal (eds). **Immunopharmacology of Allergic Disease** pp 415-432. Marcel Dekker, New York
- Roitt, I.M., Brostoff, J. and Male, D.K. 1996. **Immunology**. 4th ed. Gower Medical Publishing Ltd., London.
- Ron, D., and Kazanietz, M.G. 1999. New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. **FASEB Journal** 13: 1558-1676.
- Sabioncello, A., Gotovac, K., Vidovic, A., Gagro, A., Markotic, A., Rabatic, S., and Dekaris, D. 2004. The immune system under stress. **Periodicum Biologorum** 106(4): 317-323.
- Saha, K., Lajis, N. H., Israfi, D. A., Hamzah, A. S., Khozirah, S., Khamis, S. and Syahida, A. (2004). Evaluation of antioxidant and nitric oxide inhibitory activities of selected Malaysian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology** 92(2-3): 263-267.
- Sano, M., Miyata, E., Tamano, S., Hagiwara, A., Ito, N., and Shirai, T. (1996). Lack of carcinogenicity of tamarind seed polysaccharide in B6C3F1 mice. **Food and Chemical Toxicology** 34: 463-7.
- Scuro, L. S., Simioni, P., Grabriel, D., Saviani, E. E., Modolo, L. V., Tamashiro, W. M. and Salgado, I. (2004). Suppression of nitric oxide production in mouse macrophages by soybean flavonoids accumulated in response to nitroprusside and fungal elicitation. **BMC Biochemistry** 5(1): 1-8.
- Siddhuraju, P. (2007). Antioxidant activity of polyphenolic compounds extracted from defatted raw and dry heated *Tamarindus indica* seed coat. **LWT-Food Science and Technology** 40(6): 982-990.

- Siegel, B.V., and Moeron, J.I. 1983. Vitamin C and immunity: natural killer (NK) cell factor. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research** 53(2): 179-183.
- Singh, G. and Pai, R.S. 2015. Dawn of antioxidants and immune modulators to stop HIV-progrssion and boost the immune system in HIV/AIDS patients: An updated comprehensive and critical review. **Pharmacological Reports** 67: 600-605.
- Sittikijyothin, W. and Cherdwongchroensuk, D. (2011). Free radical sacavenging activity of seed coat extracts of sweet and sour Tamarinds. **Burapha Science Journal** 16(1): 47-55.
- Smialowicz, R.J. 1995. *In vitro* lymphocyte proliferation assays: The mitogen-stimulated response and the mixed-lymphocyte reaction in immunotoxicity testing. In **Methods in immunotoxicology**. V. I. G.R. Burleson, J.H. Dean, and A.E. Munson (eds). pp. 197-210. Wiley-Liss, New York.
- Speit, G., Wolf, M., and Vogel, W. (1980). The SCE-inducing capacity of vitamin C: investigations *in vitro* and *in vivo*. **Mutation Research** 78: 273-8.
- Sreelekha, T.T., Vijayakumar, T., Ankanthil, R., Vijayan, K.K. and Nair, M.K. 1993. Imuunomodulatory effects of a polysaccharide from Tamarindus indica. **Anticancer drugs** 4(2): 209-212.
- Stites, D.P. and Terr, A.I. 1991. **Basic and Clinical Immunology**. Lange medical publications, Connecticut.
- Stuart, P.M. 2015. **Major histocompatibility complex (MHC): Mouse**. Wiley Online Library. 15 June 2015. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000921.pub4 [online]. Available: <http://www.els.net/WileyCDA/ElsArticle/refId-a0000921.html>.
- Sun, J., Zhang, X., Broderick, M. and Fein, H. (2003). Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. **Sensors** 3(8): 276-284.

- Suttajit, M. 1987. **Environmental monitoring of aflatoxins and other mutagens in Thailand, Current Status of Cancer Research in Asia, the Middle East and Other Countries**, edited by T. Wada, K. Aoki, and A. Yachi (eds) pp. 201-204. The University of Nagoya Press, Nagoya.
- Suttajit, M. (1985). Natural toxicants and hazardous substances. **Journal of The Science Society of Thailand** 39: 205-222.
- synthase mRNA expression in RAW 264.7 macrophages. **Biochemical Biophysical Research Communication** 271: 353-7.
- Tamir, S., and Tannenbaum, S.R. (1996). The role of nitric oxide (NO) in the carcinogenic process. **Biochemical Biophysical Acta** 1288: F31-6.
- Tarpey M.M., Wink, D.A. and Grisham, M.B. 2004. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: *in vitro* and *in vivo* considerations. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology** 286: R431-R444.
- Toliopoulos, I., Simos, Y., Verginadis, I., Oikonomidis, S., and Karkabounas, S. 2012. NK cell stimulation by administration of vitamin C and Aloe vera juice *in vitro* and *in vivo*: A pilot study. **Journal of Herbal Medicine** 2: 29-33.
- Tsuda, T., Watanabe, M., Ohshima, K., Yamamoto, A., Kawakishi, S. and Osawa, T. (1994). Antioxidative components isolated from the seed of Tamarind (*Tamarindus indica* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 42(12): 2671-2674.
- Tucker, A.N., Sanders, V.M., Hallett, P., Kauffmann, B.M. and Munson, A.E. 1982. In vitro immunotoxicological assays for detection of compounds requiring metabolic activation. **Environmental Health Perspectives** 43: 123-127.
- van Acker, S.A.B.E., Tromp, M.N.J.L., Haenen, G.R.M.M., van der Vijgh, W.J.F. and Bast, A. (1995). Flavonoids as scavenger of nitric oxide radical. **Biochemical and Biophysical Research Communication** 214: 755-9.

- Vargas-Olvera, C.Y., Sanchez-Gonzalez, D.J., Solano, J.D., Aguilar-Alonso, F.A., Montalvo-Munoz, F., Martinez-Martinez, C.M., Medina-Campos, O.N., and Ibarra-Rubio, M.E. 2012. Characterization of N-diethylnitrosamine-initiated and ferric nitrilotriacetate-promoted renal cell carcinoma experimental model and effect of a tamarind seed extract against acute nephrotoxicity and carcinogenesis. **Molecular and Cellular Biochemistry** 369(1-2): 105-117.
- Virgili, F., Kobuchi, H., and Packer, L. (1998). Procyanidins extracted from *Pinus maritima* (PYCNOGENOL[®]): scavengers of free radical species and modulators of nitrogen monoxide metabolism in activated murine RAW 264.7 macrophages. **Free Radical Biological and Medicine** 24: 1120-9.
- Vuong, H., Patterson, T., Adiseshaiah, P., Shapiro, P., Kalvakolanu, D.V., and Reddy, S.P. 2002. JNK1 and AP-1 regulate PMA-inducible squamous differentiation marker expression in Clara-like H441 cells. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology** 282: L215-L225.
- www.moe.go.th/moe/th/blog/view-blog.php?memberid=159&blogid=67.
- Xie, Q.W.Y., Kashiwabara, and Nathan, C. (1994). Role of transcription factor NF- κ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. **Journal of Biological Chemistry** 269: 4705-4708.
- Ye, X., Krohn, R.L., Liu, W., Joshi, S.S., Kuszynski, C.A., McGinn, T.R., Bagchi, M., Pruess, H.G., Stohs, S.J. and Bagchi, D. 1999. The cytotoxic effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cultured human cancer cells. **Molecular and Cellular Biochemistry** 196 (1-2): 99-108.
- Yoshida, O., Nakashima, H., Yoshida, T., Kaneko, Y., Yamamoto, I., Matsuzaki, K., Uryu, T., and Yamamoto, N. 1988. Sulfation of the immunomodulating polysaccharide lentinan: a novel strategy for antivirals to human immunodeficiency virus (HIV). **Biochemical Pharmacology** 37(15):2884-2891.

- Yoshino, H., Ueda, T., Kawahata, M., Kobayashi, K., Ebihara, Y., Manabe, A., Tanaka, R., Asano, I.S., Nakahata, T and Tsuji, K. 2000. **Bone Marrow Transplantation** 26: 1211-1216.
- Zheng, X.L., Matsubara, S., Diao, C., Hollenberg, M.D. and Wong, N.C. 2000. Activation of apolipoprotein AI gene expression by protein kinase A and kinase C through transcription factor, Sp1. **Journal of Biological Chemistry** 275: 31747-31754.

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมีสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์

EBSS 10X (Earle's balanced salt solution)

<u>ส่วนประกอบ</u>	<u>กรัม</u>
CaCl ₂	0.20
KCl	0.40
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.20
NaCl	6.80
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.14
D-Glucose	1.00
Phenol red	0.01

เติมน้ำปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ml ทำให้ปลอดเชื้อโดย autoclave ที่ 121 °C 20 นาที

EBSS 1X

<u>ส่วนประกอบ</u>	<u>จำนวน ml</u>
EBSS 10X	10.0
1M HEPES buffer	1.5
Penicillin/Streptomycin	1.0
(10,000 U/ml/10,000 U/ml)	
น้ำปลอดเชื้อ	ปรับให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100

PBS (phosphate-buffered saline)

<u>ส่วนประกอบ</u>	<u>กรัม</u>
NaH ₂ PO ₄ (anhydrous)	0.23
Na ₂ HPO ₄ (anhydrous)	1.15
NaCl	9.00

เติมน้ำ 900 ml ปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 7.2-7.4 ด้วย 1 M NaOH หรือ 1 M HCl ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 ml ทำให้ปลอดเชื้อโดย autoclave ที่ 121°C 20 นาที

Heat-inactivated fetal calf serum (FCS)

นำขวด FCS (500 ml) ที่เก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C มาหลอมละลาย (thaw) อย่างช้า ๆ โดยใส่ขวด FCS ใน beaker ที่เติมน้ำ ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชม. หลังจากนั้น นำไปหลอมละลายต่อที่ water bath อุณหภูมิ 37°C จนละลายเป็นของเหลวหมด (เขย่าขวดอย่างนึ่มนวลทุก 15 -20 นาที หลีกเลี่ยงการเกิดฟอง) inactivate complement protein ใน FCS โดยนำไปต้มที่ water bath อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 20 นาที aliquot ใส่ sterile culture tube (ใช้เทคนิคปลอดเชื้อ) และเก็บที่ -20°C

1X RPMI media

ละลาย 10X RPMI (Gibco BRL; Cat. No. 31800-022) 1 ขงในน้ำ nanopure ประมาณ 900-950 ml ใส่ 2 g NaHCO₃ คนบนเครื่องกวนแม่เหล็ก ปรับ pH ด้วย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl จนได้ pH ประมาณ 6.8-7.2 ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 ml กรองด้วย sterile filter unit 0.2 µm (pH ของ media จะเพิ่มขึ้นประมาณ 0.2-0.3 เมื่อผ่านการกรอง) pH ของ 1X RPMI ควรอยู่ที่ 7-7.4

Complete RPMI media สำหรับ mitogenesis assay

<u>ส่วนประกอบ</u>	<u>จำนวน ml</u>
FCS	10.0
1M Hepes buffer	1.5
Penicillin/Streptomycin	1.0
(10,000 U/ml/10,000 U/ml)	
1X RPMI	ปรับให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100

Complete RPMI media สำหรับ mixed lymphocyte reaction

<u>ส่วนประกอบ</u>	<u>จำนวน ml</u>
FCS	10.0
1M Hepes buffer	1.5
Penicillin/Streptomycin	1.0
(10,000 U/ml/10,000 U/ml)	
5000 μ M 2 ME	1
1X RPMI	ปรับให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100

Griess reagent

<u>ส่วนประกอบ</u>	<u>จำนวน ml หรือ gm</u>
Phosphoric acid	3.5 mL
Sulfanilamide	1 g
N-(1-naphthyl)-ethylenediamine (NED)	0.1 g
เติม DI water ไปจนกระทั่งมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 mL	
(กรอง และเก็บไว้ที่ 4° C)	

Concanavalin A (Pharmacia Biotech. 17-0450-01)

เตรียม stock solution 1500 µg/ml โดย ชั่ง 0.015 กรัมใส่ใน 10 ml EBSS เขย่าเบา ๆ ให้ละลาย ทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่าน sterile filter disc 0.2 µm แบ่งใส่หลอดปลอดเชื้อ eppendorf tube เก็บแช่แข็งที่ -20 °C

ในวันที่ทดลอง mitogenesis assay เมื่อเตรียมความเข้มข้นสูงสุดของ Con A เรียบร้อยแล้ว ทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่าน sterile filter disc 0.2 µm ก่อนเจือจางเพื่อเตรียมความเข้มข้นอื่นที่ต้องการ

2-Mercaptoethanol (2ME)

เตรียม stock solution 5000 µM (โดยประมาณ) 2-mercaptoethanol หรือ 2-hydroxyethylmercaptan (Sigma M 7522 ความเข้มข้น 14.3 M) โดยใช้ 18 µl ใส่ใน 50 ml EBSS เขย่าสารอย่างนุ่มนวลให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน เจือจาง stock solution ที่เตรียม 100 เท่าใน media เพื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ 2 ME เป็น 50 µM เช่นใส่ 1 ml 5000 µM 2 ME ใน media 100 ml

Mitomycin C

ใช้เข็มฉีดยาปลอดเชื้อ ใส่ 0.4 ml EBSS ใน vial ที่บรรจุ mitomycin C 2 mg (Sigma M4287) ใช้เข็มฉีดยาเดิมดูดสารละลายขึ้นลงอย่างนุ่มนวลประมาณ 2-3 ครั้ง เพื่อละลาย mitomycin C ได้สารละลายสีม่วงซึ่งไวต่อแสง (ห่อ vial ด้วย aluminium foil และเก็บในที่มืดที่ 4°C เพื่อรอระหว่างใช้งาน) เนื่องจากสารละลายไม่เสถียร เก็บที่ 4°C ในที่มืดได้ไม่เกิน 2-3 วัน ดังนั้น ควรเตรียมใหม่ทุกครั้ง ต้องระมัดระวังการใช้งาน mitomycin C เป็นพิเศษ เนื่องจากเป็นสารก่อกลายพันธุ์ (mutagen) และก่อลูกวิรูป (teratogen)

ภาคผนวก ข

ผลงานตีพิมพ์

Komutarin, T., Azadi, S., Butterworth, L., Keil, D., Chitsomboon, B., Suttajit, M., and Meade, B.J. 2004. Extract of the seed coat of *Tamarindus indica* inhibits nitric oxide production by murine macrophages *in vitro* and in vivo. **Food and Chemical Toxicology** 42: 649-658



Extract of the seed coat of *Tamarindus indica* inhibits nitric oxide production by murine macrophages in vitro and in vivo

T. Komutarin^a, S. Azadi^b, L. Butterworth^b, D. Keil^b, B. Chitsomboon^a, M. Suttajit^c,
B.J. Meade^{b,*}

^aSchool of Biology, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

^bNational Institute for Occupational Health and Safety, Morgantown, WV 26505, UK

^cFaculty of Science, Maharakham University, Maharakham 44150, Thailand

Received 19 May 2003; accepted 1 December 2003

Abstract

The seed coat extract of *Tamarindus indica*, a polyphenolic flavonoid, has been shown to have antioxidant properties. The present studies investigated the inhibitory effect of the seed coat extract of *T. indica* on nitric oxide production in vitro using a murine macrophage-like cell line, RAW 264.7, and in vitro and in vivo using freshly isolated B6C3F1 mouse peritoneal macrophages. In vitro exposure of RAW 264.7 cells or peritoneal macrophages to 0.2–200 µg/mL of *T. indica* extract significantly attenuated (as much as 68%) nitric oxide production induced by lipopolysaccharide (LPS) and interferon gamma (IFN-γ) in a concentration-dependent manner. In vivo administration of *T. indica* extract (100–500 mg/kg) to B6C3F1 mice dose-dependently suppressed TPA, LPS and/or IFN-γ induced production of nitric oxide in isolated mouse peritoneal macrophages in the absence of any effect on body weight. Exposure to *T. indica* extract had no effect on cell viability as assessed by the MTT assay. In B6C3F1 mice, preliminary safety studies demonstrated a decrease in body weight at only the highest dose tested (1000 mg/kg) without alterations in hematology, serum chemistry or selected organ weights or effects on NK cell activity. A significant decrease in body weight was observed in BALB/c mice exposed to concentrations of extract of 250 mg/kg or higher. Oral exposure of BALB/c mice to *T. indica* extract did not modulate the development of T cell-mediated sensitization to DNFB or HCA as measured by the local lymph node assay, or dermal irritation to nonanoic acid or DNFB. These studies suggest that in mice, *T. indica* extract at concentrations up to 500 mg/kg may modulate nitric oxide production in the absence of overt acute toxicity.

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Tamarindus indica*; Nitric oxide; Macrophage

1. Introduction

Plant materials have long been used as traditional medicines for the treatment of a wide variety of ailments and diseases. Components of *Tamarindus indica*, a tree indigenous to India and South East Asia, have been used as a spice, food component, and snack. According to Thai traditional medicine, the fruit of *T. indica* is regarded as a digestive, carminative, laxative, expectorant and blood tonic. In addition, the seeds of *T. indica* are used as an anthelmintic, antidiarrheal, and an emetic, and the seed coat is used to treat burns and aid in

wound healing as well as an antidysenteric (Farnsworth and Bunyaphatsara, 1992).

Recently, Pumthong (1999) demonstrated the antioxidant activity of the seed coat extract of *T. indica*. The extract is composed of flavonoids including tannins, polyphenols, anthocyanidin, and oligomeric proanthocyanidins. Many of these flavonoids are also components of Pycnogenol®, a nutritional supplement which has been shown to have vasorelaxant activity, increase capillary permeability and participate in the cellular antioxidant network as indicated by its ability to regenerate the ascorbyl radical and to protect endogenous vitamin E and glutathione from oxidative stress (Packer et al., 1999; Rohdewald, 2002). Flavonoids found in various medicinal plants are natural antioxidants with free radical scavenging activity and they have also been

* Corresponding author. Tel.: +44-304-285-5809; fax: +44-304-285-6126.

E-mail address: bhms@cdc.gov (B.J. Meade).

shown to prevent free radical formation via inhibition of oxido-reductases (Middleton et al., 1986; Chen et al., 1993; Krol et al., 1995; Carlo et al., 1999).

Based on the reported antioxidant activity of the seed coat extract of *T. indica* which contains flavonoids among its major constituents, and the limited toxicological data available, the purpose of the present studies was to assess the anti-inflammatory potential of this extract and begin to access its safety. In vitro studies using *T. indica* seed coat extract were conducted to evaluate the modulation of nitric oxide (NO) production by RAW 264.7 macrophages using LPS and IFN- γ as stimulants. Confirmation of the effect in vivo was tested by orally exposing B6C3F1 mice to *T. indica* extract for 14 days and evaluating NO production by freshly isolated peritoneal macrophages following stimulation in vitro with lipopolysaccharide (LPS) and/or interferon gamma (IFN- γ), and in vivo or in vitro with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA). A 14-day toxicity study and studies to evaluate the effect of *T. indica* seed coat extract on components of innate and cellular immunity were performed to begin to assess safety.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

The seed coat extract of *T. indica* was kindly provided by Dr. Maitree Suttajit (Chiang Mai University). Tamarind seeds were obtained from ripened tamarind fruits after removing the edible parts. The seeds were heated in a hot air oven at 140 °C, for 45 min, cooled and cracked to separate their outside brown layer. Only brown-red seed coats were collected and these were then ground into fine powder. In a separating funnel, 10 ml of 70% ethanol was added to 0.5 g of the ground tamarind seed coat. After vigorous shaking for 10 min the solution was passed through filter paper. This procedure was repeated until the filtrate became colorless. Five millilitres of the filtrate was further fractionated by mixing with 5 ml of chloroform. The mixture was shaken well and allowed to stand until the 2 layers were separated. Two millilitres of the upper aqueous layer was added to 5 ml of ethyl acetate. The mixture was shaken and left to separate into 2 layers. The lower layer containing a large amount of ethyl acetate was removed and the remaining layer was dissolved in 5 ml of methanol. Thin layer chromatography of the extract following acid hydrolysis demonstrated 6 distinct components each with different R_f values. The UV absorption spectra and IR spectra of the *T. indica* extract was found to be comparable with that of OPC extracted from grape seed and pine bark (Pumthong, 1999). Proximate analysis (conducted by Midwest Labora-

tories, Omaha, NE) revealed that the dried extract consisted of 89.87% carbohydrates, 0.32% protein and 0.38% fat. Using the Folin-Cicalteau method (Taga et al., 1984) the extract was shown to contain 247.25 mg/g of phenolic compounds.

The extract was suspended in 10% dimethylsulfoxide (DMSO) in sterile complete DMEM (Gibco, Grand Island, NY) for in vitro exposure or in phosphate buffered saline (PBS) for in vivo studies. IFN- γ was obtained from Research Diagnostics (Flanders, NJ). Dye solution 3(4,5-dimethyl thiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium Bromide (MTT) and the Solubilization/Stop Solution in CellTiter 96 were obtained from Promega Corporation (Madison, WI). LPS (*Escherichia coli* serotype 0111:B4), vitamin C (ascorbic acid), vitamin E (α -tocopherol), β -carotene, TPA, 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB; purity $\geq 99\%$), acetone, α -hexylcinnamaldehyde (HCA; 85% purity), nonanoic acid (pelargonic acid; purity $\geq 97\%$), anti-asialo GM1, and all other reagents were obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO).

2.2. Animals and maintenance

Female B6C3F1 mice were used for in vivo toxicity and NK studies and as a source of splenocytes for in vitro studies. Female BALB/c mice were used for local lymph node and irritancy studies. Mice were obtained from Taconic Farms (Germantown, NY) or Charles Rivers Laboratories in Wilmington, MA. Mice were maintained in the NIOSH animal facility (Morgantown, WV) under conditions specified within NIH guidelines (NIH, 1996) and experiments were conducted under an approved NIOSH Animal Care and Use Committee protocol. Mice were housed in polycarbonate "shoe-box" cages with hardwood bedding and were provided tap water, and Agway Prolab Animal Diet (5% fat) *ad libitum*. Animals were weighed, individually identified by tail mark and assigned into homogeneous weight groups. Animal rooms were maintained between 18–26 °C and 40–70% relative humidity with light/dark cycles of 12 h intervals.

2.3. Cell culture

The murine macrophage cell line RAW 264.7 gamma NO (–) (ATCC CRL-2278) used in these studies was kindly provided by Dr. Gabriel K. Harris (National Institute for Occupational Safety and Health, Morgantown, WV). Cells were cultured and maintained in DMEM containing 10% heat-inactivated fetal calf serum (Hyclone, Utah), 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin (Gibco, Grand Island, NY) and grown at 37 °C with 5% CO₂ in humidified air. Exponentially growing cells were used for experiments when they reached 80% confluency.

2.4. *In vivo exposure*

B6C3F1 mice (5 animals/group) were administered increasing concentrations of *T. indica* seed coat extract (50, 250, 500 or 1000 mg/kg) or vitamin C (100 mg/kg) by oral gavage once a day for 14 days. The dose of vitamin C was chosen based on the previous studies by Bagchi et al. (1998). Twenty-four hours following the final exposure, animals were sacrificed by CO₂ inhalation and peritoneal macrophages were collected. In studies where peritoneal macrophages were stimulated *in vivo* with TPA, animals were injected intraperitoneally with 0.1 µg TPA diluted in 1 ml of PBS 2 h prior to sacrifice.

2.5. *Collection of peritoneal macrophages*

Murine peritoneal cells were removed by peritoneal lavage with 7 ml of ice cold PBS with 10% fetal calf serum. Differentials of the peritoneal cells indicated an average of 70% macrophages. Cells were kept cold on ice until transfer to a complete medium consisting of RPMI-1640 with 10% FCS, and penicillin (0.05 U/ml)-streptomycin (0.05 mg/ml). Cells were counted and 2×10^5 cells were plated in Costar 96-well flat-bottom plates (Corning, Corning, NY) and incubated for 2 h at 37 °C. Non-adherent cells were removed by washing with pre-warmed (37 °C) culture medium.

2.6. *In vitro exposure*

For *in vitro* studies, peritoneal macrophages or RAW cells, were plated at a concentration of 2×10^5 cells per well and incubated with test article or comparative controls at 37 °C for 24 h in the presence or absence of NO stimulants. The following stimulants and concentrations were selected based on the references cited; TPA (0.1 µg/ml, Bagchi et al., 1998), LPS (5 µg/ml, Lin and Lin, 1997), and IFN-γ (10 ng/ml, Virgili et al., 1997). The following comparative controls and concentrations were selected based on the references cited: 500 µM, vitamin C (Sandoval, 1977), 141.3 µM vitamin E (Bagchi, 1997) and 2.5 µM β-carotene, (Murakami et al., 2000). The concentrations of *T. indica* extract tested ranged from 0.2 to 200 µg/ml.

2.7. *Measurement of nitrite and cell viability*

Nitrite concentration was determined using the Griess reagent as described by Padgett and Pruett (1992). Following 24 h incubation with the stimulant and test article, 100 µl of cell-free supernatant from each well was transferred to another 96-well flat-bottom plate. Griess reagent (100 µl, 1% sulfanilamide in 30% glacial acetic acid and 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride in 60% glacial acetic acid) was added. The absorbance

of samples was measured at 545 nm with a spectrophotometric microplate reader (Spectra MAX 340). Nitrite in the samples was quantitated by comparison with a standard curve. A nitrite multi-point linear standard curve was generated using known concentrations of NaNO₂ ranging from 1.56 µM/ml to 200 µM/ml added to the complete culture media and analyzed with Softmax 3.3.3 ELISA software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Once 100 µl cell-free supernatant was removed from each well to determine nitrite concentration, cell viability was evaluated in the original plates by the addition of 15 µl of Dye Solution-MTT for 4 h. After washing 2 times with DMEM, the supernatant was removed and the formed insoluble formazan product was dissolved with 100 µl of Solubilization/Stop Solution. The optical densities of the culture wells were measured using a spectrophotometric microplate reader (Spectra MAX 340) at reference wavelengths of 570 and 730 nm. The optical density of formazan formed in control (untreated) cells was taken as 100%. Percent viability of test samples were determined as: % Viability = (average OD for test group/average OD for control group) × 100.

2.8. *Fourteen day toxicity study*

Animals were weighed and assigned into homogenous weight groups. Animals were dosed with 50, 100, 500, or 1000 mg/kg of *T. indica* seed coat extract in 0.2 ml PBS per 20 g of body weight via oral gavage daily for 14 consecutive days. Animals were weighed daily and observed for signs of morbidity and mortality. On the final day of study, 24 h after the last dose, animals were weighed and sacrificed by CO₂ inhalation. Blood was collected for hematology (white blood cell count and differential, red blood cell count, hematocrit, hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular volume, platelet count and mean platelet volume) and serum chemistry analysis (alkaline phosphatase, alanine transferase, aspartic transferase, blood urea nitrogen, uric acid, bilirubin, and creatine), and selected organ weights were taken including liver, brain, heart, spleen, kidneys, lungs, and thymus.

2.9. *Irritancy assay*

An irritancy study was performed to investigate the effects of oral exposure to the seed coat extract of *T. indica* on the development of dermal irritation to the moderate irritant nonanoic acid (NA) and the potent irritant DNFB. BALB/c mice were administered increasing concentrations of the seed coat extract of *T. indica* (50, 100 or 200 mg/kg) by oral gavage once a day for 14 days. On days 12, 13, and 14 separate groups of animals were dosed dermally with 50 µl of 60% nonanoic acid or 0.15% DNFB in acetone on the dorsal surface of each

ear (25 µl/ear). Ear thickness was measured prior to the first dermal exposure (day 11), and 24 h after the final exposure (day 15) to evaluate the irritant response as previously described by Woolhiser et al. (1998).

2.10. Local lymph node assay (LLNA)

The LLNA was conducted in female BALB/c mice following oral exposure to *T. indica* extract to evaluate the modulatory effect of *T. indica* seed coat extract on the development of a T cell-mediated contact hypersensitivity response. The assay was conducted as previously described by Woolhiser et al. (1998). Five mice per treatment group received vehicle or increasing concentrations of *T. indica* extract by oral gavage for 14 consecutive days. On days 10, 11 and 12, separate groups of mice were dosed with 50 µl of either 30% HCA or 0.15% DNFB on the dorsal surface of both ears (25 µl on each ear). On day 15, the mice were injected intravenously via the lateral tail vein with 0.2 ml (20 µCi) of ³H-thymidine (specific activity of 0.2 µCi/ml). Five h later the mice were sacrificed by CO₂ inhalation. The left and right draining cervical lymph nodes of each animal, located at the bifurcation of the jugular vein, were excised and placed into 4 ml cold phosphate-buffered saline (PBS). A single cell suspension was generated by dissociating the lymph nodes between the frosted ends of two microscope slides. Cells were washed twice with 10 ml PBS and precipitated in 3 ml 5% trichloroacetic acid (TCA) overnight at 4 °C. Following resuspension in 1 ml TCA, the cells were transferred to 5 ml of scintillation cocktail. ³H-thymidine incorporation was determined with a Packard, Tri-carb 2500TR Beta Counter. Samples were counted for 5 min each and mean DPM-background was calculated for each dose group. The stimulation index for each test group was calculated by dividing the group mean by the mean for the vehicle control group.

When evaluating the potential immunomodulatory effect of *T. indica* extract following DNFB exposure, the LLNA and irritancy assays were combined to reduce animal usage (Woolhiser, 1998). Prior to the first topical DNFB exposure in the LLNA, animals' ears were pre-measured and then post-exposure measurements were taken 24 h following the final exposure and prior to injection with ³H-thymidine.

2.11. Natural killer cell (NK) activity

Following 14 days of oral exposure to *T. indica* extract or VH (*n* = 5), an in vitro cytotoxicity assay as described previously (Holsapple et al., 1988; Duke et al., 1985) was used to evaluate NK cell function. Positive control animals were administered 0.2 ml of a 1:10 dilution of anti-asialo GM1 by i.p. injection 24 h prior to assay. All animals were sacrificed and spleens were

collected 24 h following the final exposure. Single cell suspensions were made and splenocytes were adjusted to 2×10^7 cells per ml in complete media (RPMI, 10% fetal calf serum, 50 IU penicillin and 50 µg streptomycin). Splenocyte and ⁵¹Cr-labeled Yac-1 cells (ATCC, TIB 160, Manassas, VA) were prepared in ratios of 200:1, 100:1, 50:1, 25:1, 12.5:1, 6.25:1 and replicate wells plated for each concentration. After a 4-h incubation at 37 °C and 5% CO₂, 100 µl of supernatant was transferred to tubes and counted on a gamma counter (Packard Cobra II Auto-Gamma). Maximum release was determined by lysing ⁵¹Cr-labeled Yac-1 cells with 0.1% Triton X in complete media. Spontaneous release was determined by incubating Yac-1 tumor cells in complete media. The results were expressed in percent lysis for each of the effector to target ratios.

2.12. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Graph Pad Prism version 3.0 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA). For multiple comparisons, data were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's test when significant differences were detected ($P \leq 0.05$). Comparison between two groups was made using a student *t*-test. Linear regression was used to determine dose-responsiveness. Data were considered statistically significant at $P \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Modulation of NO production by LPS & IFN-γ stimulated RAW 264.7 cells following in vitro exposure to seed coat extract of *T. indica*

To investigate the effect of the seed coat extract of *T. indica* on NO production, the accumulation of nitrite, the stable metabolite of NO, was measured in the culture media of RAW 264.7 cells using Greiss reagent. Resting RAW 264.7 cells were stimulated with LPS (5 µg/ml) and/or IFN-γ (10 ng/ml) to stimulate NO production. Cells were simultaneously treated with increasing concentrations of the seed coat extract of *T. indica* or with vitamin C (500 µM), vitamin E (141.3 µM), or beta-carotene (2.5 µM) for 24 h. As shown in Fig. 1a, in vitro exposure to seed coat extract of *T. indica* at concentrations ranging from 0.2 to 200 µg/ml inhibited nitrite production in a concentration-dependent manner reaching a 68% suppression at the high dose. An approximate 54% suppression in NO production was observed in cells treated with the comparative controls, vitamin C (500 µM), vitamin E (141.3 µM), or beta-carotene (2.5 µM). Based on the MTT assay, the observed decrease in NO production by mice exposed to *T. indica* extract, vitamin E or β-carotene occurred in the absence

of any effect on cell viability (Fig. 1b). An approximate 10% reduction in cell viability was seen following exposure to vitamin C.

3.2. Fourteen day oral toxicity study

Prior to accessing the modulatory effects of *in vivo* *T. indica* extract exposure on NO production, a 14-day toxicity study was conducted to select the doses to be administered. No deaths or abnormal clinical signs were observed in any of the mice treated with the seed coat

extract of *T. indica* throughout the 14 days of the study. Exposure of B6C3F1 mice to 1000 mg/kg of the extract resulted in a decrease in body weight, reaching a maximum of 14% weight loss on day 11 (Fig. 2a). Treatment with the seed coat extract of *T. indica* at concentrations up to 1000 mg/kg had no significant effects on hematological parameters or serum chemistries (data not shown). Furthermore, organ weights including, spleen, lungs, thymus, brain, kidney and liver, were not altered by treatment with the seed coat extract of *T. indica* (data not shown). Based on this data, 500 mg/kg was chosen as the highest dose to be used in the subsequent *in vivo* studies using B6C3F1 mice. Given that weight loss was observed in BALB/c mice exposed to 500 µg/kg for 14 days (Fig. 2b), 200

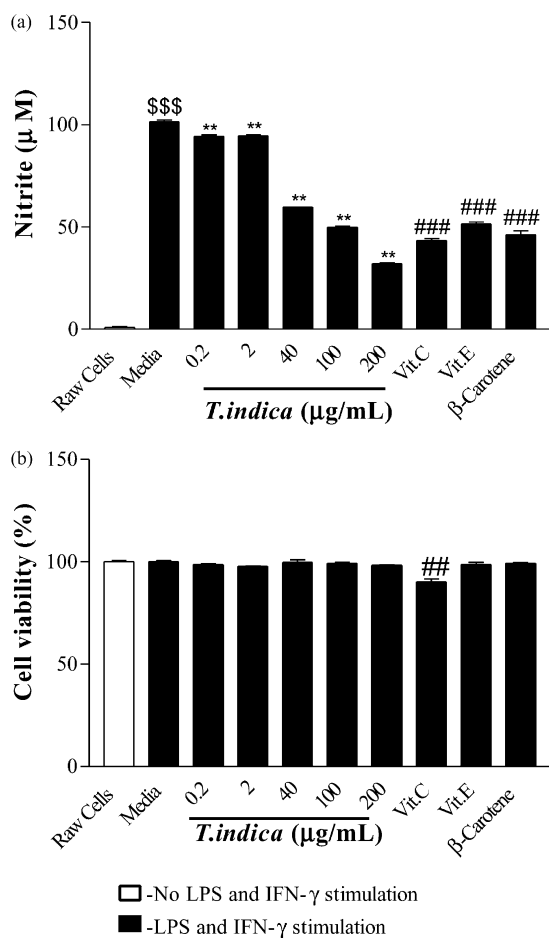


Fig. 1. Nitrite production (a) and percent cell viability (b) of RAW 264.7 cells treated with increasing concentrations of *T. indica* extract, Vit C (500 µM), Vit E (141.3 µM) or β-carotene (2.5 µM) and simultaneously stimulated with LPS (5 µg/ml) and IFN-γ (10 ng/ml) for 24 h. Results are expressed as mean±SE for groups of 5 mice. Nitrite production by LPS and IFN-γ stimulated RAW cells was compared to non-stimulated cells by student's *t*-test (\$\$\$ represents $p < 0.0001$). For LPS and IFN-γ stimulated cells, data from *T. indica* extract exposed groups were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's test when significant differences were detected ($P \leq 0.05$), ** represents $P < 0.01$. Vit.C, Vit.E, and β-carotene exposed groups were individually compared to the media exposed RAW cells using *t*-test (## represents $P < 0.001$, ### represents $P < 0.0001$).

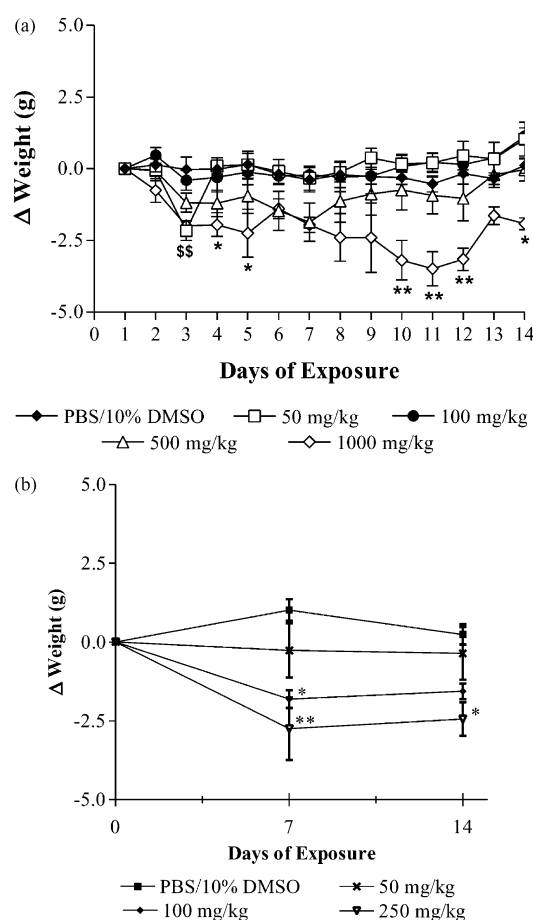


Fig. 2. Change in body weight (g) during the 14-day time course of oral exposure to VH (PBS/10% DMSO) or increasing concentrations of *T. indica* extract in B6C3F1 mice (a) or BALB/c mice (b). Results are expressed as mean±SE for groups of 5 mice. For each time point, data were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's test when significant differences were detected ($P \leq 0.05$). * represents $P < 0.05$, and ** represents $P < 0.01$ as compared to VH control. \$\$ represents $P < 0.01$ in both the 50 and 1000 mg/kg groups as compared to VH control.

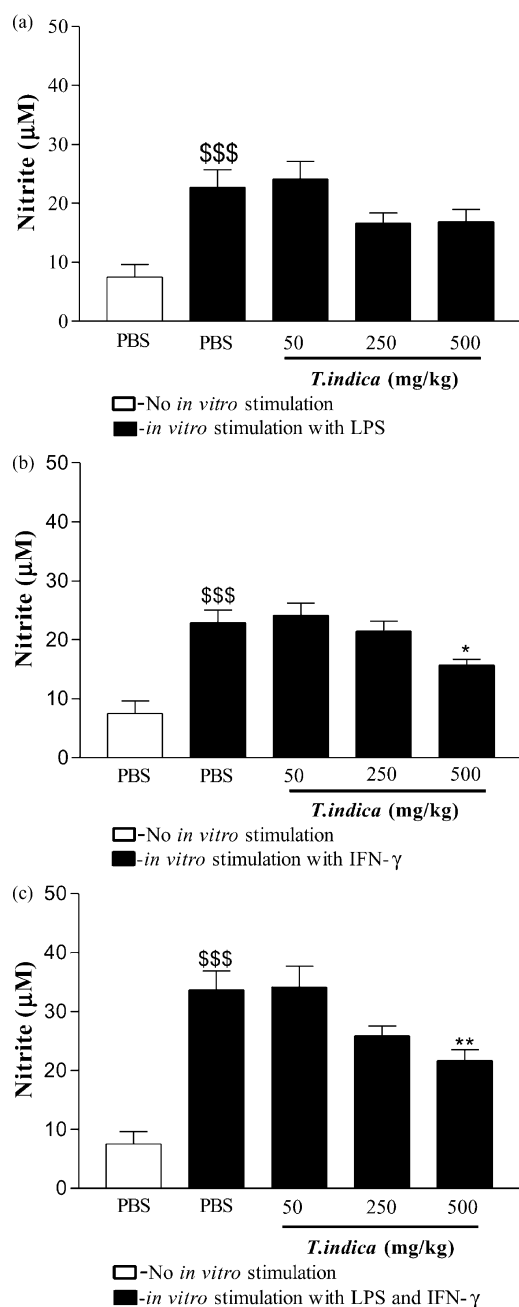


Fig. 3. Nitrite production by peritoneal macrophages from mice treated with PBS (PBS/10% DMSO) or increasing concentrations of *T. indica* extract and stimulated *in vitro* with LPS (a), IFN-γ (b), or LPS and IFN-γ (c). Results are expressed as mean ± SE for groups of 5 mice. Levels of nitrite from IFN-γ and/or LPS stimulated macrophages from PBS control animals were compared with levels from non-stimulated macrophages using student's *t*-test (\$\$\$ represents $P < 0.0001$). Levels of nitrite from *T. indica* extract treatment groups and IFN-γ and/or LPS stimulated macrophages from PBS control data were compared by one-way ANOVA followed by Dunnett's test when significant differences were detected ($P \leq 0.05$). (*represents $P < 0.05$, ***represents $P < 0.0001$).

mg/kg was chosen as the highest dose in studies using BALB/c mice.

3.3. Modulation of NO production by peritoneal macrophages following *in vivo* exposure to seed coat extract of *T. indica*

To assess the potential for *T. indica* extract to modulate NO production *in vivo*, female B6C3F1 mice were treated with vehicle, 10% DMSO in PBS, or increasing concentrations of the extract (50, 250, 500 mg/kg) by oral gavage for 14 days. On day 15 animals were sacrificed and peritoneal macrophages were collected and treated with LPS (5 µg/ml), IFN-γ (10 ng/ml), or LPS and IFN-γ for 24 h. As shown in Fig. 3a, b, and c, treatment with LPS and/or IFN-γ induced a significant increase in nitrite production when compared with unstimulated peritoneal macrophages. Combined exposure to LPS & IFN-γ increased nitrite production greater than exposure to either LPS or IFN-γ alone ($P < 0.05$). Exposure to *T. indica* extract dose-dependently inhibited NO production by IFN-γ and LPS and IFN-γ stimulated cells reaching statistical significance in the highest *T. indica* extract exposure group (500 mg/kg). No effect on the viability of peritoneal macrophages due to test article exposure was observed in this study (data not shown). Cell viability was greater than 90% for all groups.

Following oral exposure to *T. indica* extract, when TPA was used as the *in vitro* stimulant, NO production by peritoneal macrophages was significantly inhibited in a dose-dependent manner reaching 55% inhibition at the 500 mg/kg dose, a level comparable to that seen following exposure to 100 mg/kg Vit. C (Fig. 4A). As shown in Fig. 4B, nitrite production induced by intra-peritoneal exposure to TPA was also inhibited dose-dependently by oral exposure to the seed coat extract of *T. indica*, reaching statistical significance at 250 mg/kg dose and showing 70% inhibition at the 500 mg/kg dose. Cell viability was not affected by exposure to either *T. indica* extract or TPA in either of these studies (data not shown).

3.4. Modulation of the dermal irritant response to nonanoic acid and DNFB following *in vivo* exposure to the seed coat extract of *T. indica*

Topical exposure to the moderate irritant nonanoic acid (60%) induced an approximate 28% increase in ear swelling in BALB/c mice. Fourteen days of oral exposure to the seed coat extract of *T. indica* (up to 200 mg/kg) did not have any modulatory effect on this response (Fig. 5). Likewise, no effect was seen following 14-day oral exposure to *T. indica* seed coat extract in a similar study using 0.15% DNFB as the irritant (data not shown).

3.5. Modulation of the induction of T-cell mediated sensitization and NK cell activity following in vivo exposure to seed coat extract of *T. indica*

Topical exposure to 0.15% DNFB, a potent sensitizer, induced lymphocyte proliferation in the draining lymph nodes of BALB/c mice with a stimulation index of 31. Fourteen days of oral exposure to the seed coat extract of *T. indica*, at concentrations up to 200 mg/kg, or Vit C (100 mg/kg) did not have any modulatory effect on this response (Fig. 6). A similar study was conducted using the more moderate sensitizer HCA at a concentration of 30% with no modulatory effect on

lymph node cell proliferation observed following oral exposure to *T. indica* extract (data not shown).

NK activity in vehicle exposed B6C3F1 mice demonstrated a 20% lysis at the 200:1 effector to target ratio. A 72% suppression in NK activity was observed in animals exposed to the positive control, anti-asialo GM1. Fourteen day oral exposure to the seed coat extract of *T. indica* at doses up to 500 mg/kg or to the comparative control, Vit.C (100 mg/kg), had no effect on NK activity (Fig. 7).

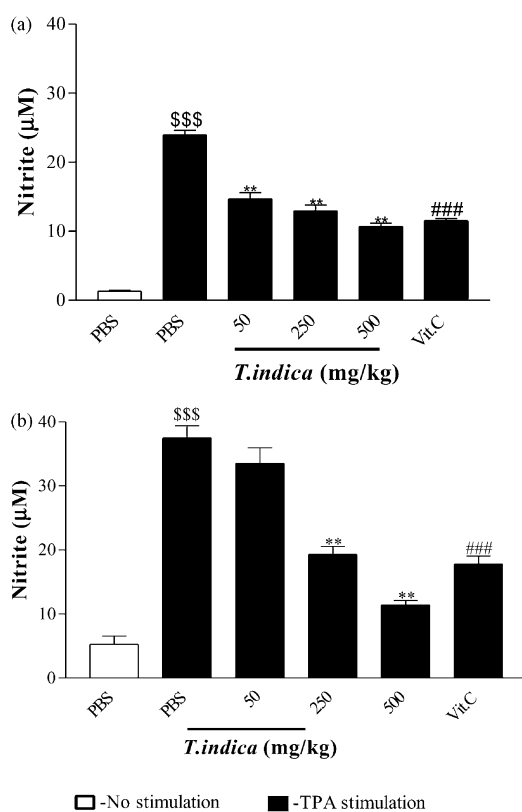


Fig. 4. Nitrite production by peritoneal macrophages from mice orally gavaged with PBS (PBS/10% DMSO), increasing concentrations of *T. indica* extract or Vit.C (100mg/kg) and stimulated in vitro (a) or in vivo (b) with 0.1 µg/ml of TPA. Results are expressed as mean±SE for groups of 5 mice. The PBS exposed (TPA stimulated and unstimulated) mice were compared using a student's *t*-test (\$\$\$ represents $P < 0.0001$). For TPA stimulated groups, *T. indica* extract exposed groups and the PBS exposed group were compared using ANOVA followed by Dunnett's post test when significant differences ($P < 0.05$) occurred. **represents $P < 0.01$. The Vit.C exposed group was compared with the PBS exposed group using a student's *t*-test (### represents $P < 0.0001$).

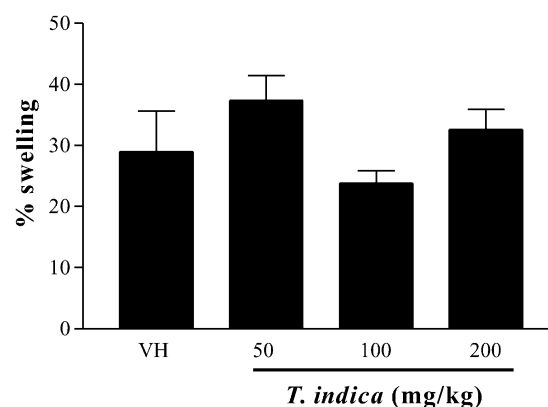


Fig. 5. BALB/c mice ($n = 5$) were orally exposed to either VH (PBS/10% DMSO) or the concentration of the seed coat extract of *T. indica* shown for 14 days. Starting on the 12th day following initial oral exposure, animals were exposed topically with 60% nonanoic acid for 3 consecutive days. Ear thickness was measured pre-exposure and 24 hrs post-final exposure. Bars represent mean±SE of the calculated percent ear swelling.

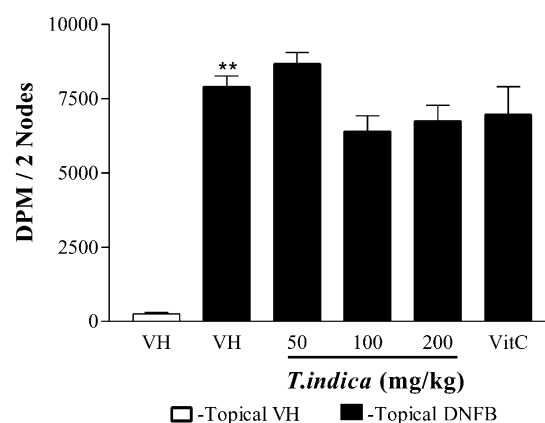


Fig. 6. BALB/c mice ($n = 5$) were dosed orally with either vehicle (PBS/10% DMSO) or increasing concentrations of the seed coat extract of *T. indica* as shown. Open bar indicates topical exposure to vehicle (acetone), and closed bars represent topical exposure to 0.15% DNFB. Bars represent mean±SE. **represent $P < 0.01$ as compared to the open bar by student's *t*-test.

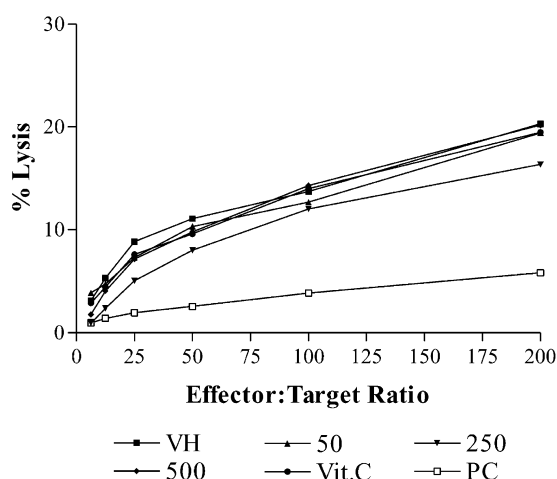


Fig. 7. Natural killer cell activity in female B6C3F1 mice ($n=5$) following a 14-day exposure to the seed coat extract of *T. indica* or vitamin C. Data are presented as mean $\pm$ SE. Anti-asialo GM1 was used as a positive control (PC).

4. Discussion

Although individual components have not been identified, the seed coat extract of *T. indica* contains high amounts of polyphenolic flavonoids which are known to exhibit strong antioxidant scavenging activity against peroxyl radicals generated by ABTS/ H_2O_2 /peroxidase and ABTS/ H_2O_2 /myoglobin systems, hydroxyl radicals produced by ABTS/ H_2O_2 / $FeCl_3$ (Fenton reaction) and superoxide anions generated by hypoxanthine-xanthine oxidase (neotetrazolium) system (Pumthong, 1999). Due to the multiple phenolic groups in their structure, flavonoids are potentially able to quench free radicals by forming more stable oxidized products. Various other naturally occurring polyphenolic flavonoids such as rutin, quercetin, apigenin, wogonin, luteolin, tectorigenin, galangin, morin, naringenin (van Acker et al., 1995; Kim et al., 1999 and Raso et al., 2001), epigallocatechin gallate from tea (Lin, 1997; Chan et al., 1997), Ginkgo biloba extract (EGb 761) (Kobuchi, et al., 1997), silymarin (Kang et al., 2002) and Pycnogenol (Virgili et al., 1998) have been reported to inhibit NO production. Therefore, the present studies were designed to investigate the potential for the seed coat extract of *T. indica* in modulation of NO production.

Although first recognized for its role as a vasodilator and in the regulation of blood flow and pressure, nitric oxide has been identified as an important intra- and intercellular regulatory molecule with functions as diverse as neural communication, the generation of memory and host defense (for review see, Garthwaite, 1991; Moncada and Higgs, 1993; Rand, 1992; Moncada et al., 1991; Ignarro, 2002). NO produced by the endothelium and/or platelets inhibits platelet aggregation and adhesion, inhibits leukocyte activation and mod-

ulates smooth muscle cell proliferation (Moncada and Higgs, 1993). In the peripheral nervous system, NO is released by a widespread network of nerves, previously recognized as nonadrenergic and noncholinergic. These nerves mediate some forms of neurogenic vasodilation and regulate certain gastrointestinal, respiratory and genitourinary functions (Rand, 1992). NO is also synthesized in neurons of the central nervous system, where it acts as a neuromediator with many physiological functions, including the formation of memory, coordination between neuronal activity and blood flow (Garthwaite, 1991; Snyder and Bredt, 1992; Prast and Philippu, 2001). In contrast to its role as an antioxidant and neuroprotectant, altered NO formation and function have been shown to play a role in the pathophysiology of neurological diseases including Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, cerebral ischemia and hepatic encephalopathy (Rao, 2002).

Low concentrations of NO from activated macrophages are beneficial as, along with other reactive nitrogen intermediates, they are responsible for cytostatic and cytotoxic activity against infectious organisms and tumor cells. In addition, NO plays a regulatory role in the function of natural killer cells and the expression of cytokines such as IFN- γ and transforming growth factor- β (Bogdan et al., 2000). However, overproduction of NO has been found to be associated with various diseases such as septic shock, autoimmune diseases, and chronic inflammation by increasing vascular permeability and the extravasations of fluid and proteins at the inflammatory site (Moncada, et al., 1991; Kolb and Kolb-Bachofen, 1992; Ialenti et al., 1992). Excess NO can react with DNA, causing mutations and eventually carcinogenicity (Ohshima and Bartsch, 1994; Tamir and Tannenbaum, 1996). Furthermore, NO can react with superoxide to form peroxynitrite ($ONOO^-$), a more potent oxidant and cytotoxic agent (Ischiroopoulos et al., 1992). Therefore, inhibition of high-output NO production could be a useful strategy for treatment of various inflammatory diseases.

Several studies have investigated the therapeutic potential and safety of components of *T. indica*. A polysaccharide isolated and purified from the seeds of *T. indica* has been shown *in vitro* to have immunomodulatory activity such as phagocytic enhancement and inhibition of leukocyte migration and cell proliferation (Sreelekha et al., 1993). Tamarind seed polysaccharide has been tested in B6C3F1 mice with results demonstrating the absence of carcinogenicity in mice of either sex following long-term dietary exposure (Sano et al., 1996).

The *in vivo* and *in vitro* studies presented here demonstrated the suppressive effect of the seed coat extract of *T. indica* on NO production using both a murine macrophage cell line and freshly isolated peritoneal macrophages. This effect was dose-dependent and

occurred at concentrations below which cytotoxicity occurred *in vitro* and in the absence of systemic toxicity *in vivo*. Additionally, at the concentrations required to suppress NO production, no effect was seen on NK cell activity or the development of a T cell-mediated sensitization response. Results from these studies were comparable to those reported for more well known natural dietary supplements. Using a similar model, LPS and IFN- γ stimulated RAW 264.7 cells, NO production was demonstrated to be inhibited approximately 70% or 55% by Pycnogenol or *Ginkgo biloba* extract respectively (Virgili et al., 1998; Kobuchi et al., 1997).

Excess NO production has been associated with many diseases such as autoimmunity, rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease and septic shock (Moncada et al., 1991; Nathan, 1992). The results of these acute and *in vitro* studies which demonstrated suppression of NO production at concentrations of the crude seed coat extract of *T. indica* while producing no measured adverse effects suggests that further chemical analysis, identification and testing of the active components of the extract is warranted.

Acknowledgements

This work was funded in part by The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program, The Thailand Research Fund.

References

- Bagchi, D., Garg, A., Krohn, R.L., Bagchi, M., Tran, M.X., Stohs, S.J., 1997. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamin C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract *in vitro*. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology* 95, 179–189.
- Bagchi, D., Garg, A., Krohn, R.L., Bagchi, M., Bagchi, D.J., Balmoori, J., Stohs, S.J., 1998. Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice. *General Pharmacology* 30, 771–776.
- Bogdan, C., Rollinghoff, M., Diefenbach, A., 2000. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunological Reviews* 173, 17–26.
- Carlo, G.D., Mascolo, N., Izzo, A.A., Capasso, F., 1999. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences* 65, 337–353.
- Chan, M.M., Fong, D., Ho, C.T., Huang, H.T., 1997. Inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity by epigallocatechin gallate, a natural product from green tea. *Biochemical Pharmacology* 54, 1281–1286.
- Chen, S., Hwang, J., Deng, P.S.K., 1993. Inhibition of NAD(P)H: Quinone acceptor oxidoreductase by flavones: a structure activity study. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 302, 72–77.
- Duke, S.S., Schook, L.B., Holsapple, M.P., 1985. Effects of N-nitrosodimethylamine on tumor susceptibility. *Journal of Leukocyte Biology* 37, 383–394.
- Farnsworth, N.R., Bunyapraphatsara, N., 1992. Thai Medicinal Plants Recommended for Primary Health Care System. Prachachon, Thailand.
- Garthwaite, J., 1991. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends in Neurosciences* 14, 60–67.
- Holsapple, M.P., White Jr., K.L., McCay, J.A., Bradley, S.G., Munson, A.E., 1988. An immunotoxicological evaluation of 4,4'-thiobis-(6-t-butyl-m-cresol) in female B6C3F1 mice. 2. Humoral and cell-mediated immunity, macrophage function, and host resistance. *Fundamental and Applied Toxicology* 10, 701–716.
- Ialenti, A., Ianaro, A., Moncada, S., Rosa, M.D., 1992. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. *European Journal of Pharmacology* 211, 177–182.
- Ignarro, L.J., 2002. Nitric oxide in the regulation of vascular function: an historical overview. *J Card Surg* 17, 301–306.
- Ischiropoulos, H., Zhu, L., Chen, J., Tsai, M., Martin, J.C., Smith, C.D., Beckman, J.S., 1992. Peroxynitrite mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 298, 431–437.
- Kang, J.S., Jeon, Y.J., Kim, H.M., Han, S.H., Yang, K.H., 2002. Inhibition of inducible nitric-oxide synthase expression by silymarin in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 302, 138–144.
- Kim, H.K., Cheon, B.S., Kim, Y.H., Kim, S.Y., Kim, H.P., 1999. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Biochemical Pharmacology* 58, 759–765.
- Kobuchi, H., Droy-Lefaix, M.T., Christen, Y., Packer, L., 1997. *Ginkgo biloba* extract (Egb 761): Inhibitory effect on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7. *Biochemical Pharmacology* 53, 897–903.
- Kolb, H., Kolb-Bachofen, V., 1992. Nitric oxide: A pathogenic factor in autoimmunity. *Immunological Today* 13, 157–160.
- Krol, W., Czuba, Z.P., Thereadgill, M.D., Cunningham, B.D.M., Pietsz, G., 1995. Inhibition of nitric oxide (NO) production in murine macrophages by flavones. *Biochemical Pharmacology* 50, 1031–1035.
- Lin, Y.L., Lin, J.K., 1997. (–)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthesis by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor- κ B. *Molecular Pharmacology* 52, 464–472.
- Middleton, E., Kandaswami, C., 1986. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: Implications for immunity, inflammation and cancer. In: Harborne, J.B., Chapman & Hall, London, pp. 619–652.
- Moncada, S., Higgs, E.A., 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *The New England Journal of Medicine* 329, 2002–2012.
- Moncada, S., Palmer, R.M.J., Higgs, E.A., 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Reviews* 43, 109–142.
- Murakami, A., Nakashima, M., Koshiba, T., Maoka Nishino, H., Yano, M., Sumida, T., Kim, O.K., Koichi, K., Ohigashi, H., 2000. Modifying effects of carotenoids on superoxide and nitric oxide generation from stimulated leukocytes. *Cancer Letters* 149, 115–123.
- Nathan, C., 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB Journal* 6, 3051–3064.
- NIH, 1996. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Academy Press, Washington, DC.
- Ohshima, H., Bartsch, H., 1994. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutation Research* 305, 253–264.
- Packer, L., Rimbach, G., Virgili, F., 1999. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, Pycnogenol. *Free Radical Biology & Medicine* 27, 704–724.
- Padgett, E.L., Pruett, S.B., 1992. Evaluation of nitrite production by human monocyte-derived macrophages. *Biochemical Biophysical Research Communication* 186, 775–781.
- Prast, H., Philippu, A., 2001. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Progress in Neurobiology* 64, 51–68.

- Pumthong, G., 1999. Antioxidative activity of polyphenolic compounds extracted from seed coat of *Tamarindus indica* Linn. Chiang Mai University, Thailand.
- Rand, M.J., 1992. Nitroergic transmission: nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, non-cholinergic neuro-effector transmission. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 19, 147–169.
- Rao, V.L., 2002. Nitric oxide in hepatic encephalopathy and hyperammonemia. *Neurochemistry International* 41, 161–170.
- Raso, G.M., Meli, R., Carlo, G.D., Pacilio, M., Carlo, R.D., 2001. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. *Life Sciences* 68, 921–931.
- Rohdewald, P., 2002. A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol®), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 40, 158–168.
- Sandoval, M., Zhang, X.J., Liu, X., Mannick, E.E., Clark, D.A., Miller, M.J.S., 1997. Peroxynitrite-induced apoptosis in T84 and RAW 264.7 cells: attenuation by L-ascorbic acid. *Free Radical Biology & Medicine* 22, 489–495.
- Sano, M., Miyata, E., Tamano, S., Hagiwara, A., Ito, N., Shirai, T., 1996. Lack of carcinogenicity of tamarind seed polysaccharide in B6C3F1 mice. *Food and Chemical Toxicology* 34, 463–467.
- Snyder, S.H., Bredt, D.S., 1992. Biological roles of nitric oxide. *Scientific American* 266 (5), 68–71, 74–77.
- Sreelekha, T.T., Vijayakumar, T., Ankanthil, R., Vijayan, K.K., Nair, M.K., 1993. Immunomodulatory effects of a polysaccharide from *Tamarindus indica*. *Anti-Cancer Drugs* 4, 209–212.
- Taga, M.S., Miller, E.E., Pratt, D.E., 1984. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society* 61, 928–931.
- Tamir, S., Tannenbaum, S.R., 1996. The role of nitric oxide (NO) in the carcinogenic process. *Biochimica et Biophysica acta* 1288, F31–F36.
- van Acker, S.A.B.E., Tromp, M.N.J.L., Haenen, G.R.M.M., van der Vijgh, W.J.F., Bast, A., 1995. Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 214, 755–759.
- Virgili, F., Kobuchi, H., Packer, L., 1998. Procyanidins extracted from *Pinus maritima* (Pycnogenol®) scavengers of free radical species and modulators of nitrogen monoxide metabolism in activated murine RAW 264.7 macrophages. *Free Radical Biology and Medicine* 24, 1120–1129.
- Woolhiser, M.R., Hayes, B.B., Meade, B.J., 1998. A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitization and irritancy potential of chemicals. *Toxicology Methods* 8, 245–256.

ประวัตินักวิจัย

ผศ.ดร.เบญจมาศ จิตรสมบูรณ์ เกิดวันที่ 25 พฤษภาคม 2497 จังหวัดกรุงเทพมหานคร จบการศึกษาปริญญาตรีสาขาวิทยาศาสตร์ทั่วไป (เคมี-ชีววิทยา) คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (พ.ศ.2516-2520) ได้รับทุนการศึกษารัฐบาลไทย (กรรมการข้าราชการพลเรือน) ไปศึกษาต่อระดับปริญญาโทสาขาวิชา Environmental Health (Toxicology) ที่ University of Michigan ในประเทศสหรัฐอเมริกา (พ.ศ. 2521-2523) และทุนการศึกษาระดับปริญญาเอกสาขาวิชา Toxicology ของมหาวิทยาลัย Utah State University ในประเทศสหรัฐอเมริกา (พ.ศ. 2525-2629) ก่อนปฏิบัติงานที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เคยเป็นผู้ช่วยวิจัยสาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยมหิดล (พ.ศ. 2525-2529) นักวิจัยสถาบันวิจัยสภาวะแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (พ.ศ. 2523-2525) postdoctoral fellow ที่ Medical College of Virginia (พ.ศ. 2529-2532) special fellow ที่ Cleveland Clinic Foundation (พ.ศ. 2529-2532) และ research associate ที่ Case Western Reserve University (พ.ศ. 2533-2537) ประเทศสหรัฐอเมริกา ปัจจุบันดำรงตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาชีวเวชศาสตร์ สำนักวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี มีความชำนาญพิเศษทางด้าน Immunology และ immunotoxicology