



รายงานฉบับสมบูรณ์

ผลของสารประกอบเชิงซ้อนโอลิโกเมอร์ค โปรแอนโทรซัยยานิดินจาก
สารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามต่อการเกิดมะเร็งตับในระยะเริ่มต้นและ
กลไกที่เกี่ยวข้องกับระบบป้องกันอนุมูลอิสระ

**Effect of Oligomeric proanthocyanidin complexes from Tamarind
(*Tamarindus indica* L.) husk on early stages of rat hepatocarcinogenesis
and its possible mechanism for antioxidant system**

ผศ.ดร. รวีวรรณ (พัธนาโชคชัย) วงศ์ภูมิชัย

สิงหาคม 2553

รายงานฉบับสมบูรณ์

ผลของสารประกอบเชิงซ้อนโอลิโกเมอร์ค โปรแอนโทแรซยานิดินจากสารสกัด
เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามต่อการเกิดมะเร็งตับในระยะเริ่มต้นและ
กลไกที่เกี่ยวข้องกับระบบป้องกันอนุมูลอิสระ

**Effect of Oligomeric proanthocyanidin complexes from Tamarind
(*Tamarindus indica* L.) husk on early stages of rat hepatocarcinogenesis
and its possible mechanism for antioxidant system**

ผศ.ดร. รวิวรรณ (พัธนาโชคชัย) วงศ์ภูมิชัย
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา (สกอ.) ประจำปีพ.ศ. 2549 ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศ.ดร.ไมตรี สุทธิจิตต์ และ Prof.Dr. Shoji Fukushima, MD. ที่ให้คำแนะนำและคำปรึกษาตลอดงานวิจัยและขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี ขอขอบคุณ รศ.ดร.สุกัญญา วงศ์พรชัย ที่ช่วยวิเคราะห์โครงสร้างสารสำคัญของสารสกัด และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือสำหรับวิจัยทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนอุปกรณ์และเครื่องมือในการทำวิจัย ขอขอบคุณหน่วยสัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่เลี้ยงหนูทดลอง นอกจากนี้ขอขอบคุณ รศ.ดร.พญ. นิรัชร์ เลิศประเสริฐสุข ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในการให้คำปรึกษาทางด้านจุลพยาธิวิทยา และ Prof. Hideki Wanibuchi Department of Pathology, School of Medicine, Osaka City University, เมืองโอซาก้า ประเทศญี่ปุ่น ที่เอื้อเฟื้อให้ใช้เครื่องมือ Image analyzer ในการวิเคราะห์ผลการย้อม GST-P positive foci ของชิ้นเนื้อตับ สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ น.ส.ณัฐพร ดาลัยและ นส. อุษณีย์ ตั้งจิตรพิทักษ์ นักศึกษาปริญญาตรี คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่ช่วยเหลือในงานวิจัยครั้งนี้

ผศ.ดร.รวิวรรณ (พัชณาโชคชัย) วงศ์ภูมิชัย

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG4980171

ชื่อโครงการ : ผลของสารประกอบเชิงซ้อนโพลิโกเมอร์ค โปรแอนโทรซัยยานินจากสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามต่อการเกิดมะเร็งตับในระยะเริ่มต้นและกลไกที่เกี่ยวข้องกับระบบป้องกันอนุมูลอิสระ

ชื่อนักวิจัย : ผศ.ดร.รวิวรรณ วงศ์ภูมิชัย (พัชราโชคชัย)

สถาบัน : ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย เชียงใหม่

E-mail Address : rawibiochem@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

มะขามมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Tamarindus indica* L. จัดเป็นพืชกินได้ที่สำคัญของประชากรไทยที่ถูกใช้เป็นยาสมุนไพรและในอุตสาหกรรมอาหาร การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง การศึกษาครั้งนี้จึงทำการศึกษาความปลอดภัยในการใช้สารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามในสัตว์ทดลองและผลต่อการเกิดมะเร็งตับในระยะเริ่มต้นและกลไกที่เกี่ยวข้องกับระบบป้องกันอนุมูลอิสระ ทำการสกัดเอาส่วนไขมันในเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามออกด้วยเฮกเซนและสกัดด้วยเมทานอล ผลการทดลองพบว่า มีองค์ประกอบของสารประกอบโพลีฟีนอล สารฟลาโวนอยด์และโปรแอนโทรซัยยานิน เท่ากับ 235.9, 168.0 และ 9.0 มิลลิกรัมต่อผงมะขามหนึ่งกรัม ตามลำดับ โดยสารประกอบโพลีฟีนอลหลักที่พบในสารสกัดส่วนเมทานอลนี้ ได้แก่ Procyanidin dimer และ Procyanidin trimer

จากการศึกษาความเป็นพิษพบว่าสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามมีความปลอดภัยแก่หนูทดลองและเมื่อให้สารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเข้มข้น 20-500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 14 วัน พบว่าไม่เหนี่ยวนำภาวะเครียดออกซิเดชัน แต่มีระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ Glutathione peroxidase, Heme oxygenase และ Glutathione S-transferase ในตับเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามกลุ่มที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 500 มก.ต่อกิโลกรัมมีแนวโน้มน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นน้อยกว่ากลุ่มควบคุม

จากการทดสอบฤทธิ์ก่อมะเร็งและต้านมะเร็งตับหนูขาว โดยการให้สารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม 20, 100 และ 500 มก.ต่อกิโลกรัมทางปาก เป็นเวลา 6 สัปดาห์ หลังจากฉีดสารก่อมะเร็งไดเอทิลเอมีน 200 มก.ต่อกิโลกรัมทางช่องท้องในสัปดาห์แรกของการทดลองและในสัปดาห์ที่ 3 ทำการตัดตับออกบางส่วนเพื่อกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ตับที่ผิดปกติ พบว่าสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามไม่เหนี่ยวนำการเกิดรอยโรคก่อนเกิดมะเร็ง GST-P positive foci ในตับแต่ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ลดจำนวนและขนาดของ GST-P

positive foci ในหนูที่ฉีดไดเอทิลไนโตรซามีน นอกจากนี้พบว่าสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม ที่ความเข้มข้นต่ำยังยับยั้งจำนวน PCNA ซึ่งเป็น marker ของการเพิ่มจำนวนเซลล์ในเซลล์ตับ ทั้งส่วนที่เกิดรอยโรคมะเร็งตับ (ใน GST-P positive foci) และเซลล์ตับบริเวณรอบๆ positive foci และสารสกัดอย่างใดมีผลเหนี่ยวนำกัมมันตภาพของเอนไซม์ Glutathione S- transferase ในตับ แต่ไม่มีผลต่อระดับกลูตาไธโอนในตับเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารก่อมะเร็งไดเอทิลไนโตรซามีนเพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตามพบว่าการให้สารสกัดที่ความเข้มข้นสูงไม่มีผลป้องกันการเกิดมะเร็งตับ ทั้งนี้อาจเนื่องจากมีปริมาณแทนนินสูง จึงส่งผลกระทบต่อเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยและระบบการดูดซึมในทางเดินอาหาร

จากผลการวิจัยโดยสรุป สารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่มีองค์ประกอบของ Procyanidin dimer และ Procyanidin trimer มีฤทธิ์ป้องกันการเกิดมะเร็งตับในระยะเริ่มต้นโดยไปยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ตับที่ผิดปกติและส่งเสริมเอนไซม์กำจัดสารพิษในตับ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาฤทธิ์ป้องกันมะเร็งชนิดอื่นรวมทั้งความเป็นไปได้ในการรักษามะเร็งต่อไปในอนาคต

คำหลัก : มะขาม มะเร็งตับ การป้องกันการเกิดมะเร็ง

Abstract

Project Code : MRG4980171

Project Title : Effect of Oligomeric proanthocyanidin complexes from Tamarind (*Tamarindus indica* L.) husk on early stages of rat hepatocarcinogenesis and its possible mechanism for antioxidant system.

Investigator : Assistant Professor Rawiwan Wongpoomchai (Puatanachokchai)

Department of biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University

E-mail Address : rawibiochem@yahoo.com

Project Period : 2 years

Tamarind (*Tamarindus indica* L.) has been used as food seasoning and traditional medicines. The previous study found its methanolic extract presented in vitro antioxidant activity. No study has been published in the scientific literature about its toxicological profile and antitumor activity in animal model. The recent study aimed to investigate the toxicity and the effect on early stages of hepatocarcinogenesis in rat of tamarind husk extract including its protective mechanism. The tamarind husk was defatted by hexane and extracted by methanol to obtain crude methanolic extract. The amount of total phenolic compounds, total flavonoids and proanthocyanidins were 235.9, 168.0 and 9.0 milligram per a gram of dried tamarind husk powder, respectively. By using LC-MS, the main polyphenol compounds in tamarind husk extract were proanthocyanidin dimer and proanthocyanidin trimer.

In the acute toxicity test, oral administration of 5000 mg/kg of tamarind husk extract produced neither mortality nor significant changes in behavior and gross appearance of the internal organs of male wistar rats. In subacute toxicity study, no mortality and some blood biochemical changes were observed when the three doses of 20, 100 or 500 mg/kg/day of tamarind husk extracts when tamarind husk extracts were administered orally for a period of 14 days. Furthermore, crude extract of tamarind husk did not affect on some oxidative stress markers but it enhanced

some antioxidant enzyme activities including glutathione peroxidase, heme oxygenase and glutathione S- transferase in the liver. However, the high dose of tamarind extract, 500 mg/kg bw tended to decrease body weight change.

Next, the study aimed to investigate inhibitory effects of tamarind husk extract on the early stages of rat hepatocarcinogenesis. Male wistar rats were divided into 6 groups. Groups 1- 4 were intraperitoneally injected by diethylnitrosamine (DEN), a genotoxic hepatocarcinogen, at the first week of an experiment and groups 5 and 6 were received saline injection. All rats were partially hepatectomized at the third week to amplify initiated hepatocytes. Groups 2 and 3 were fed with extract at concentrations of 20 and 100 mg/kg bw, respectively for 6 weeks. Groups 4 and 6 were administered high dose of crude extract. All rats were sacrificed at the end of week 8. Tamarind husk extract did not affect on body weight change, some vital organ weights and liver function test. It did not affect on preneoplastic lesions, glutathione-S-transferase placental form, in the rat livers. However, the extract at low concentration, 20 mg/kg bw, reduced both number and area of preneoplastic lesions in liver initiated by DEN. It also decreased number of PCNA, a cellular proliferation marker, and increased glutathione and glutathione S-transferase activity in the rat liver treated with DEN. High concentration of tamarind husk extract, 500 mg/kg bw, did not show any protective effect. It might cause from high content of tannin which interfere the absorption and protein utilization in the body.

It might be concluded that the tamarind husk extract, mainly containing procyanidin dimer and procyanidin trimer presented inhibitory effect of on the early stages of hepatocarcinogenesis in rat after initiated by diethylnitrosamine. The inhibitory mechanism might be due to enhancement detoxifying system and suppression of cellular proliferation in the rat liver. These results

Keywords: Cancer Chemoprevention, Hepatocarcinogenesis, Tamarind

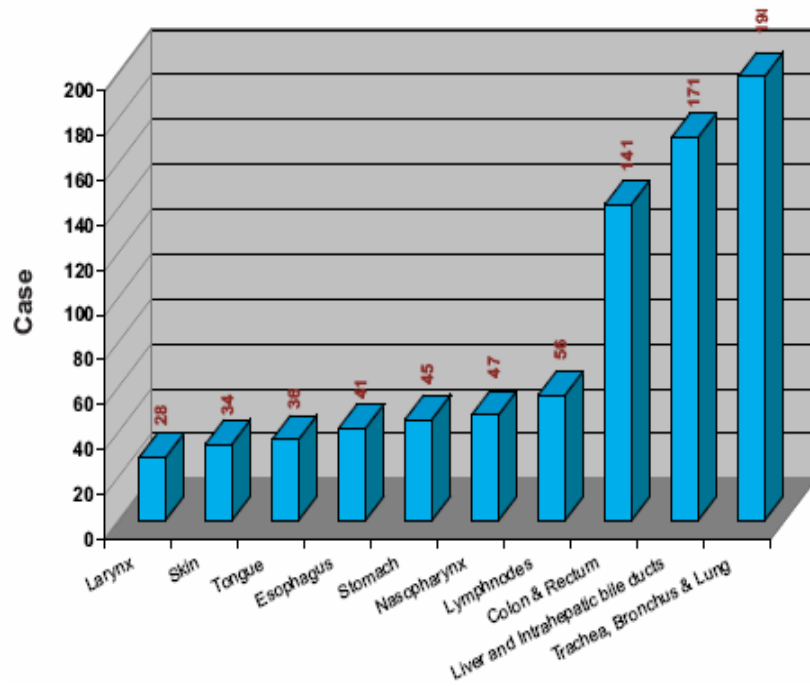
บทนำ

โรคมะเร็งเป็นสาเหตุการตายที่สำคัญทั่วโลก รวมทั้งของประเทศไทย โรคมะเร็งปอดเป็นสาเหตุการตายที่เป็นอันดับ 1 ของชายไทยรองลงมาคือ มะเร็งตับและท่อน้ำดี และมะเร็งลำไส้ ตามลำดับ ดังรูปที่ 1 สำหรับในหญิงไทยพบว่ามะเร็งเต้านม เป็นสาเหตุการตายที่เป็นอันดับ 1 รองลงมาคือ มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งลำไส้ ตามลำดับดังรูปที่ 2 สาเหตุการเกิดมะเร็งที่สำคัญในคน เกิดจากสิ่งแวดล้อมในชีวิตประจำวัน เช่น อาหารและสิ่งปนเปื้อนหรือสารก่อมะเร็งที่เกิดขึ้นในระหว่างประกอบอาหาร แอลกอฮอล์และการสูบบุหรี่ ดังตารางที่ 1

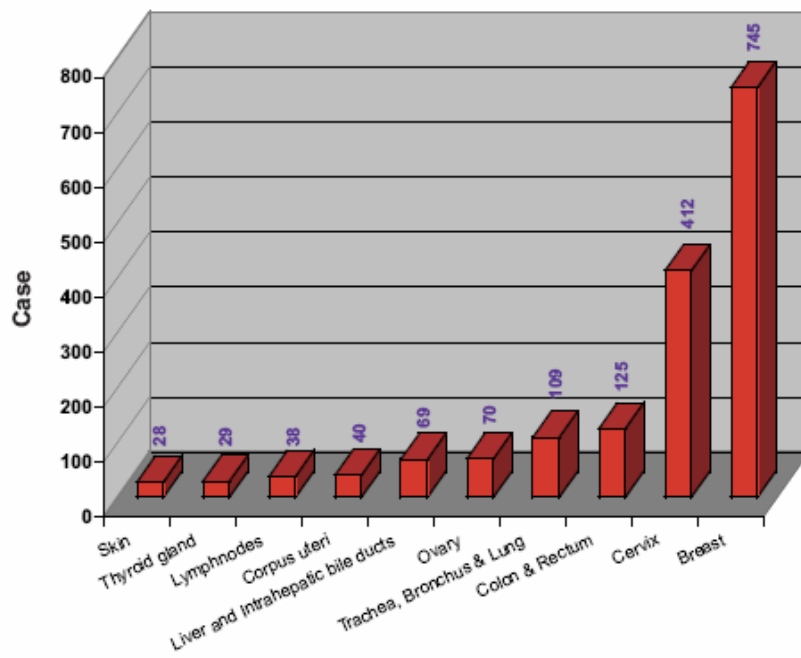
ตารางที่ 1 สาเหตุการเกิดมะเร็ง

ปัจจัย	ร้อยละโดยประมาณของการตายจากโรคมะเร็ง
อาหาร	35
การสูบบุหรี่	30
การติดเชื้อ	10
เพศสัมพันธ์	7
อาชีพ	4
แอลกอฮอล์	3
สภาพภูมิประเทศ	3
มลพิษ	2
ผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับอุตสาหกรรม	1
ยาและอุปกรณ์ทางการแพทย์	1
สารปนเปื้อนในอาหาร	<1

ดัดแปลงและแปลจาก Doll & Peto (1981)

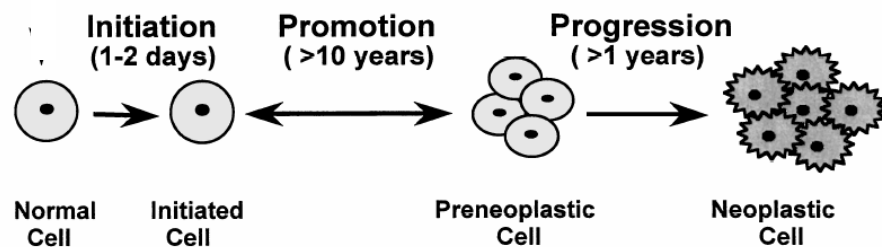


รูปที่ 1 ชนิดของโรคมะเร็งที่พบในชายไทย



รูปที่ 2 ชนิดของโรคมะเร็งที่พบในหญิงไทย

การเกิดมะเร็งจากสารเคมี เกิดขึ้นได้จากหลายๆขั้นตอนร่วมกัน ได้แก่ ระยะเริ่มต้น (Initiation) ระยะส่งเสริม(Promotion) และระยะลุกลาม (Progression) ดังรูปที่ 3 ส่งผลให้เกิดการกลาย(Mutation) ของดีเอ็นเอในส่วน Somatic cells และเป็นผลให้ Tumor suppressor genes และ/หรือProto-oncogenes มีความผิดปกติของการถอดรหัส(Encode)โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมวัฏจักรของเซลล์ การส่งสัญญาณภายในเซลล์ (Signal transduction) และการควบคุมการ Transcription ของยีนอื่น เป็นต้น ทำให้มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่มากเกินไป ซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์จากลักษณะ (Phenotype) ปกติ เป็น Hyperplastic และ Dysplasia จนกระทั่งเป็นเซลล์มะเร็ง (Malignant) ในที่สุด



รูปที่ 3 ขั้นตอนการเกิดมะเร็งจากสารเคมี

Cancer Chemoprevention เป็นการป้องกันมะเร็งโดยใช้สารเคมีที่พบในผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติหรือจากสารสังเคราะห์เลียนแบบสารจากธรรมชาติ มีจุดประสงค์หลักคือ หยุดยั้งขบวนการเกิดมะเร็งหรือทำให้ขบวนการเกิดมะเร็งนั้นถดถอยกลับ Cancer Chemoprevention สามารถใช้ได้ทั้งในคนที่มีสุขภาพดีและผู้ที่เสี่ยงต่อการเกิดมะเร็ง รวมทั้งผู้ป่วยโรคมะเร็งเพื่อป้องกันการลุกลามของโรคมะเร็งเพิ่มมากขึ้น

กลไกป้องกันมะเร็งโดยสารเคมีแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

1. **Primary prevention** สำหรับคนที่มีสุขภาพดี สารป้องกันมะเร็งกลุ่มนี้มีบทบาทใน ระยะเริ่มต้นการเกิดมะเร็งและยับยั้งการกลาย โดยสารเหล่านี้จะกระตุ้นกลไกปกป้องทั้งใน ภายในและนอกเซลล์ โดยส่งผลต่อ การขนส่งสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ เมตาบอลิซึมของสารก่อมะเร็ง ชัดขวางอนุมูลอิสระ การเพิ่มจำนวนเซลล์ รักษาสภาพโครงสร้างของดีเอ็นเอ เมตาบอลิซึมและการซ่อมแซมดีเอ็นเอ และควบคุมการแสดงออกของยีนและยังมีผลต่อระยะส่งเสริมการเกิดมะเร็ง สารเหล่านี้มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ยับยั้งเอนไซม์

Proteases และ cell proliferation กระตุ้น Cell differentiation และ Apoptosis รวมทั้งมีผลต่อ Signal transduction pathways และปกป้องการสื่อสารระหว่างเซลล์ (Intercellular communications)

2. Secondary prevention ในกรณีที่พบรอยโรคก่อนเกิดมะเร็ง (Premalignant lesion) สารเคมีในกลุ่มนี้สามารถยับยั้งการลุกลามและความรุนแรงของมะเร็งโดยกลไกที่เหมือนกับกลุ่มแรก และนอกจากนั้นยังมีผลต่อระบบฮอร์โมนและภูมิคุ้มกัน และยับยั้ง Tumor angiogenesis

3. Tertiary prevention สำหรับใช้ในผู้ป่วยโรคมะเร็งหลังการรักษา นอกจากสารเคมีในกลุ่มนี้มีผลเหมือนกับกลุ่มแรกและสองแล้วยังมีผลต่อ Cell-adhesion molecules กระตุ้น Antimetastasis genes และยับยั้งเอนไซม์ Proteases ที่เกี่ยวข้องกับการสลาย Basement membrane

อนุมูลอิสระ (free radicals) คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่ไม่เสถียรเนื่องจากโครงสร้างมีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวจึงทำให้สามารถไปทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับโมเลกุลอื่นๆ เพื่อให้ตัวมันเสถียรขึ้น โมเลกุลเหล่านั้นอาจเป็น กรดไขมัน กรดนิวคลีอิก โปรตีน ซึ่งปฏิกิริยาออกซิเดชันนี้มีผลทำให้เซลล์ภายในร่างกายถูกทำลายหรือได้รับบาดเจ็บแล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในโครงสร้างหรือหน้าที่ของเซลล์เหล่านั้นซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดโรคต่างๆรวมทั้งโรคมะเร็ง

อนุมูลอิสระในทางชีววิทยาสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่คือ

1. กลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ(Reactive oxygen species : ROS) เช่น Superoxide anion($O_2^{\cdot-}$), Hydroxyl radical($\cdot OH$), Hydrogen peroxide(H_2O_2) และ Peroxide radical($ROO^{\cdot}$) เป็นต้น
2. กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ(Reactive nitrogen species : RNS) เช่น Nitric oxide($NO^{\cdot}$), Nitrogen dioxide($NO_2^{\cdot}$) และ Nitrate radical($NO_3^{\cdot}$) เป็นต้น
3. กลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบ(Reactive chlorine species : RCS) เช่น Atomic chlorine และ Hypochlorite($OCl^{\cdot}$) เป็นต้น

อนุมูลอิสระเกิดได้ทั้งภายในร่างกายและภายนอก ร่างกาย ซึ่งอนุมูลอิสระภายในร่างกายเกิดจากกระบวนการเผาผลาญอาหารที่ใช้ออกซิเจน ก่อให้เกิดออกซิเจนที่มีประจุลบ ($O^{\cdot-}$) นั่นคืออนุมูลอิสระ สำหรับอนุมูลอิสระภายนอก ร่างกายเกิดจากการติดเชื้อทั้งจากแบคทีเรียและไวรัส การอักเสบชนิดไม่ทราบสาเหตุ (autoimmune diseases) เช่น ข้ออักเสบ รูมาตอยด์ โรคเก๊าท์ เป็นต้น รังสี สิ่งแวดล้อมที่เป็นมลพิษ เช่น โอโซน โลหะหนัก คาร์บอน หรือจากสิ่งแวดล้อม เช่น แสงอาทิตย์ซึ่งมีรังสีอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet) การแผ่รังสี (radiation) รังสี x-ray ก๊าซจากท่อไอเสียรถยนต์ เป็นต้น ในภาวะที่ผิดปกติ เช่น ภาวะของโรค หรือภาวะที่

ร่างกายแวดล้อมด้วยมลพิษโดยในภาวะที่ผิดปกติจะส่งผลให้ร่างกาย เกิดการสะสมของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจำเป็นที่ร่างกายต้องหาทางป้องกันการโดนทำลายจากอนุมูลอิสระเหล่านั้น สิ่งที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อปกป้องตัวเอง คือ ระบบต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ซึ่งประกอบไปด้วยสารหรือเอนไซม์ต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่ำๆ สามารถชะลอหรือป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา ได้แก่ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต ดีเอ็นเอ เป็นต้น ภาวะที่ปริมาณอนุมูลอิสระมีมากเกินไปกว่าที่ระบบต้านอนุมูลอิสระจะสามารถต้านทานได้ จะเกิดภาวะที่เรียกว่าภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) ขึ้นมา ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น การทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของดีเอ็นเอ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และเกิดการทำลายของกลุ่มโมเลกุลที่มีพันธะไฮโดรเจน และเยื่อหุ้มเซลล์ ก่อให้เกิดผลเสียต่อเซลล์และการทำลายเซลล์

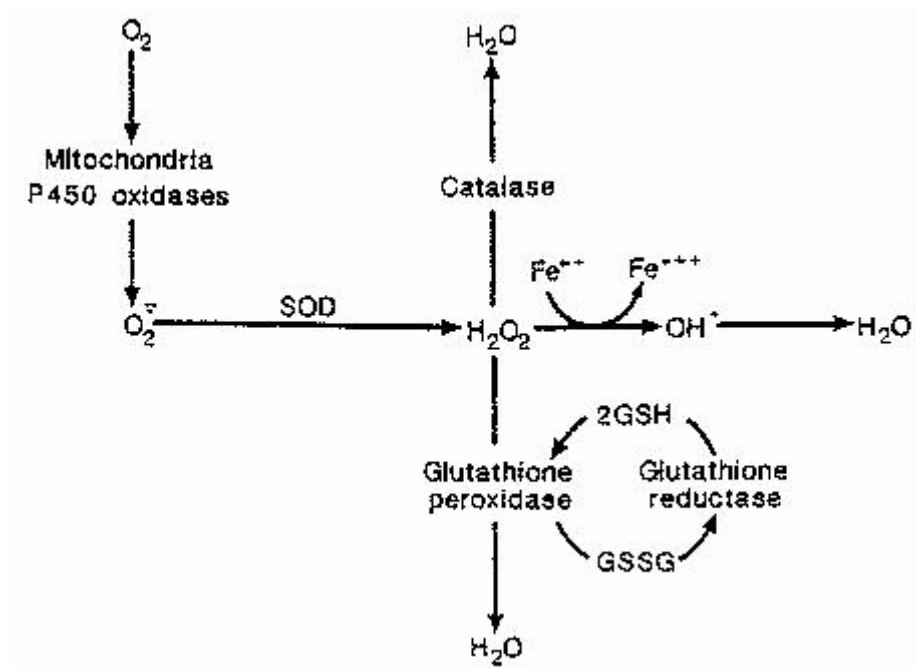
ปกติร่างกายมีระบบควบคุมสมดุลของระดับอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระพบได้จากทั้งที่เกิดขึ้นภายในร่างกายและได้รับจากอาหาร สามารถจำแนกชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระตามกลไกการทำงานของมันได้ดังนี้

1. สารที่มีคุณสมบัติจับอนุมูลอิสระที่ได้รับมาจากภายนอกร่างกาย เช่น Tocopherol, Carotenoids, Ascorbic acid, Ubiquinones, Thiols, Inosine และ Flavonoid เป็นต้น

2. สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกายมีทั้งชนิดที่เป็นเอนไซม์และไม่เป็นเอนไซม์

- 2.1 ชนิดที่จัดเป็นเอนไซม์ เป็นสารชีวโมเลกุลที่เมตาบอลิซึมสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นให้มีความเป็นพิษลดลงหรือปราศจากพิษ(non-reactive products) ได้แก่ Antioxidant enzymes ต่างๆ เช่น Superoxide dismutase(SOD), Catalase(CAT), Glutathione peroxidase(GPx), Glutathione reductase(GR) และ Glutathione-S-transferase เป็นต้น ดังรูปที่ 4 นอกจากนี้ยังรวมถึงเอนไซม์ที่ซ่อมแซมดีเอ็นเอที่เสียหายจากอนุมูลอิสระ (Oxidative DNA damage) ได้แก่ DNA repairing enzymes ต่างๆ เช่น 8-Oxoguanine DNA glycosylase (OGG) Formamidopyrimidine glycosylase (MutM/fpg) N-methylpurine-DNA glycosylase (MPG) และ AP endonuclease (APE1) เป็นต้น

- 2.2 ชนิดที่ไม่ได้จัดเป็นเอนไซม์ เช่น Glutathione, Bilirubin, Cysteine, Uric acid, Transferrin, Albumin และ Haptoglobin เป็นต้น



รูปที่ 4 กลไกการกำจัดอนุมูลอิสระโดยเอนไซม์ภายในร่างกาย

ในสภาวะที่ร่างกายเกิดความไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นกับระบบต่อต้านอนุมูลอิสระ จะก่อให้เกิดผลเสียต่อร่างกาย โดยสารอนุมูลอิสระที่มีมากกว่าปกติเหล่านี้ จะส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอ(DNA oxidative damage) ซึ่งนำไปสู่การกลายของดีเอ็นเอภายในเซลล์ ถ้าส่วนของดีเอ็นเอที่ผิดปกตินั้น เป็นยีนที่ควบคุมต่อการเจริญของเซลล์และ/หรือยีนที่ควบคุมกลไกการฆ่าตัวตายของเซลล์ จะส่งผลให้เกิดความไม่สมดุลในระดับเซลล์และก่อให้เกิดมะเร็งได้ในที่สุด ดังนั้นอนุมูลอิสระจึงอาจเป็นเป้าหมายที่สำคัญในการป้องกันมะเร็งด้วยสารจากผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ

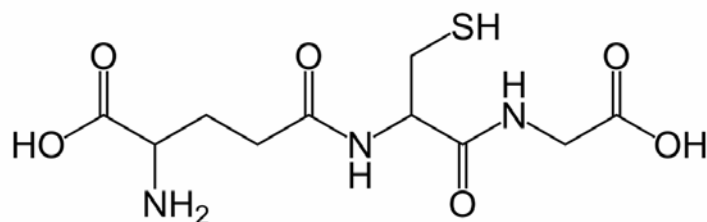
จากการศึกษาทดลองในครั้งที่ได้ทำการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระและเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ คือ Glutathione, Glutathione-S-transferase, Glutathione peroxidase และ Heme oxygenase

Glutathione

ร่างกายสามารถสร้างกลูตาไธโอนได้เองในตับ จากการที่เรารับประทานเนื้อสัตว์หรือโปรตีนเข้าไปในร่างกาย โดยกลูตาไธโอน ดังรูปที่ 5 เป็นอนุพันธ์ของกรดอะมิโนที่มีอยู่ในเนื้อสัตว์ ประกอบด้วยกรดอะมิโน 3 ชนิด ได้แก่ ซิสทีอีน (Cysteine) ไกลซีน (Glycine) และ กรดกลูตามิก (Glutamic Acid) โดยสารดังกล่าวช่วยสร้างเอ็นไซม์ชนิดต่างๆ เพื่อจัดสารพิษออกจากร่างกาย ทั้งยาฆ่าแมลง โลหะหนัก เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่ร่างกายได้รับ นอกจากนี้ยังช่วยในการสร้างเอ็นไซม์ต้านอนุมูลอิสระ โดยทำหน้าที่ร่วมกับวิตามินซี ซึ่งได้ร่วมกันซ่อมแซมสารพันธุกรรมที่อาจเปลี่ยนแปลงการเป็นมะเร็งได้ และยังช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย

หน้าที่ของกลูตาไธโอน ประกอบด้วย

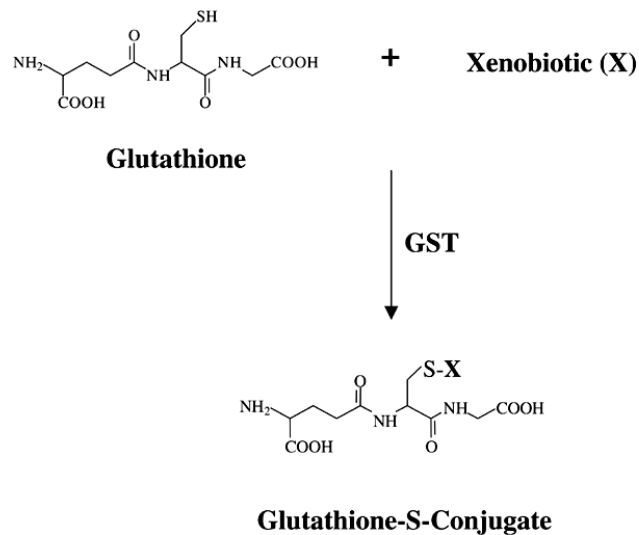
1. **Detoxification** กลูตาไธโอนช่วยสร้างเอ็นไซม์ชนิดต่าง ๆ ในร่างกายโดยเฉพาะ Glutathione-S-transferase ที่ช่วยในการกำจัดพิษออกจากร่างกายโดยไปเปลี่ยนสารพิษชนิดไม่ละลายในน้ำ (ละลายในน้ำมัน) เช่น พริกไทยหนัก สารระเหย ยาฆ่าแมลง แม้แต่ยาบางชนิดให้เป็นสารที่ละลายน้ำได้ดีขึ้นและง่ายต่อการกำจัดออกจากร่างกาย นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันตับจากการถูกทำลายโดย แอลกอฮอล์ สารพิษจากบุหรี่ ยาพาราเซตามอลเกินขนาด (Overdose) เป็นต้น
2. **Antioxidant** กลูตาไธโอนมีคุณสมบัติเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (Antioxidant) ที่มีความสำคัญตัวหนึ่งในร่างกาย และหากขาดไป วิตามินซีและอี อาจจะทำงานได้ไม่เต็มที่
3. **Immune Enhancer** ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันในร่างกาย โดยกระตุ้นการทำงานของเอ็นไซม์หลายชนิดเพื่อให้ร่างกายต่อต้านสิ่งแปลกปลอมรวมถึงเชื้อแบคทีเรียและไวรัส นอกจากนี้ กลูตาไธโอนยังช่วยสร้างและซ่อมแซม DNA สร้างโปรตีนและprostaglandin



รูปที่ 5 สูตรโครงสร้างโมเลกุลของ Glutathione

Glutathione-S-transferase

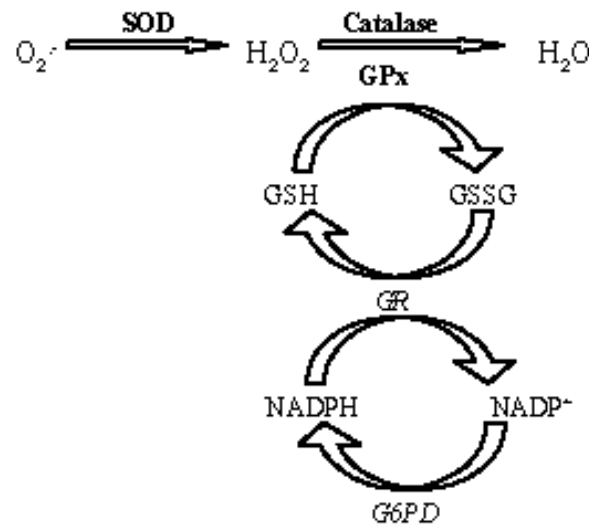
Glutathione-S-transferase เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Glutathione สามารถพบได้ทั้งในไซโตพลาสซึมและไมโทครอนเดรีย โดยจะไปทำปฏิกิริยากับสารเคมีที่พบทั้งในร่างกายและสารแปลกปลอม หน้าที่สำคัญของ Glutathione-S-transferase คือช่วยในการ conjugate ของ Glutathione ผ่านหมู่ sulfhydryl กับสารแปลกปลอมดังรูปที่ 6 ซึ่งหน้าที่นี้มีประโยชน์ในการกำจัดสารพิษและสารอนุมูลอิสระต่าง ๆ เช่น ลดการเกิด lipid peroxidation ช่วยในการ metabolite สารแปลกปลอม เป็นต้น



รูปที่ 6 หน้าที่การทำงานของ Glutathione-S-transferase ต่อสารแปลกปลอม

Glutathione peroxidase

เอนไซม์ Glutathione peroxidase มีธาตุซีลีเนียมเป็นองค์ประกอบที่สำคัญอยู่ในโครงสร้างของเอนไซม์ หน้าที่สำคัญของ Glutathione peroxidase คือทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยารีดักชันสารประกอบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ดังรูปที่ 7 ได้แก่ ลิพิดเปอร์ออกไซด์ (ROOH) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยมีกลูตาไธโอนร่วมในปฏิกิริยาด้วย เอนไซม์นี้ปกป้องเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมไม่ให้ทำลายหรือเสียหายจากภาวะที่ร่างกายถูกออกซิไดซ์หรือมีอนุมูลอิสระมากเกินไป

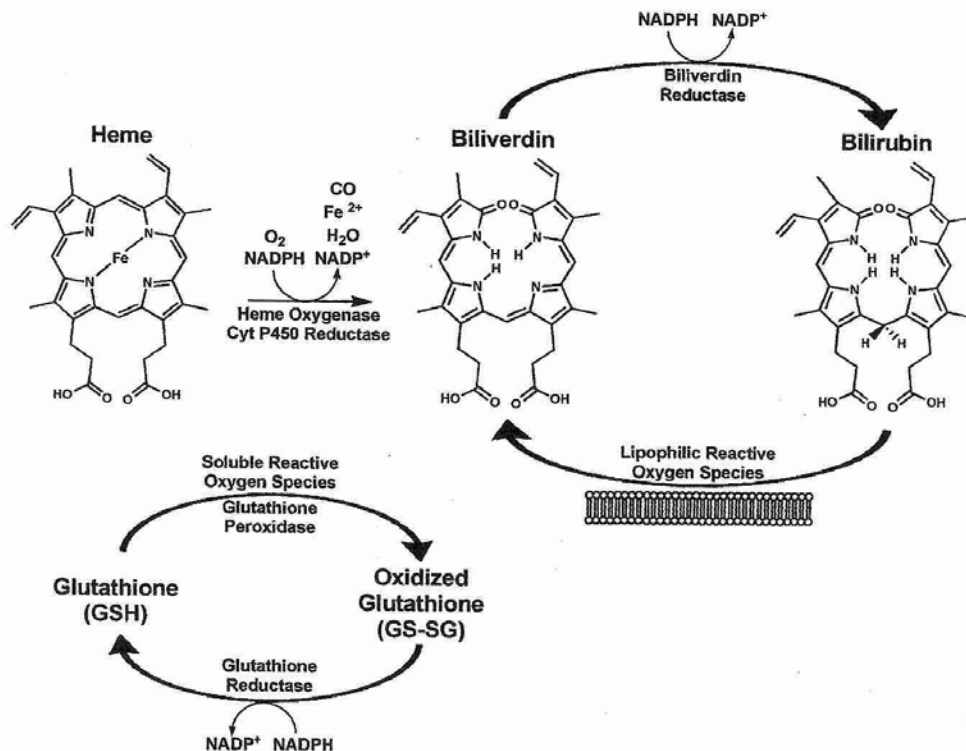


รูปที่ 7 หน้าที่การทำงานของ Glutathione peroxidase ในร่างกาย

Heme oxygenase

บิลิรูบินเกิดจากการสลายเม็ดเลือดแดงที่หมดอายุโดย reticuloendothelial system ที่ตับ ม้าม ไชกระดูก และ ต่อม้ำเหลือง การสลายฮีม (heme) เป็นบิลิรูบินเกิดได้ในเนื้อเยื่อทุกชนิดในร่างกาย เมื่อมีการสลายโปรตีนที่มีฮีมเป็นส่วนประกอบ (hemoprotein) ฮีมที่ถูกปล่อยออกมาจะถูกสลายโดยเอนไซม์ heme oxygenase ทำให้ porphyrin ring แตกออกที่ alpha-methene bridge (-CH=) ระหว่าง pyrrole ring A และ B ได้เป็น biliverdin ซึ่งมีสีเขียว จากนั้น biliverdin ถูกรีดิวซ์ต่อไปโดยเอนไซม์ biliverdin reductase ได้เป็น unconjugated bilirubin

บิลิรูบินจากเนื้อเยื่อต่างๆจะถูกส่งไปที่ตับ เพื่อเปลี่ยนเป็น bilirubin glucuronide และถูกส่งออกทางน้ำดี โดยบิลิรูบินทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ



รูปที่ 6 หน้าที่การทำงานของ Heme oxygenase ในร่างกาย

อาหาร จัดได้ว่าเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญโดยมีบทบาทในการป้องกันการเกิดโรคต่างๆ ซึ่งผลการศึกษาจากงานวิจัยทางคลินิกและระบาดวิทยาจำนวนมากได้ยืนยันว่าการบริโภคผักผลไม้ ธัญพืชที่ไม่ผ่านการขัดสีและพืชสมุนไพรต่างๆ ซึ่งเป็นแหล่งอาหารสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระนั้นช่วยลดความเสี่ยงและเพิ่มอัตราการป้องกันการเกิดโรคเรื้อรังที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระได้ ซึ่งในพืชผักผลไม้ดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารประเภท วิตามินซี เบต้า-แคโรทีน แคโรทีนอยด์ รวมถึงกลุ่มโพลีฟีนอลิก เช่น ฟลาโวนอยด์ ฟีนิลโพรพานอยด์ เป็นต้น ซึ่งโดยปัจจุบันพบว่าสารประกอบในกลุ่มโพลีฟีนอลิกนี้เป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ

สารประกอบฟีนอลิก(Phenolic compounds) คือสารที่สูตรโครงสร้างมีหมู่ไฮดรอกซิลเป็นองค์ประกอบในวงแหวนเบนซีนตั้งแต่ 1 กลุ่มขึ้นไป สารในกลุ่มนี้จึงมีคุณสมบัติที่จะละลายน้ำได้ดี พบได้ในพืช ผักและ ผลไม้ทั่วไป อาจแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

1. Simple phenols หรือ phenolic acid และอนุพันธ์เช่น gallic acid, ellagic acid, tannic acid, vanillin, catechol, resorcinol และ salicylic acid เป็นต้น สารกลุ่มนี้พบได้ในผลไม้หลายชนิด เช่น ราสเบอร์รี่ และ แบล็คเบอร์รี่ เป็นต้น

2. Phenylpropanoids ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกที่วงแหวนเบนซีนของมันมีโซ่แขนงข้างเป็นคาร์บอน 3 หมู่ ได้แก่ กลุ่ม hydroxycinnamic acids เช่น ferulic acid, caffeic acid และ coumaric acid เป็นต้น กลุ่ม coumarins เช่น umbelliferone, scopoletin, aesculetin และ psoralen เป็นต้น และ กลุ่ม lignans เช่น pinoresinol, eugenol และ myristicin เป็นต้น พบได้ใน แอปเปิ้ล แพร์ และ กาแฟ

3. Flavonoids เป็นกลุ่มสำคัญของ phenolic compounds เป็นสารที่มีสูตรโครงสร้างเป็น C6-C3-C6 แยกย่อยออกได้เป็นหลายกลุ่ม ได้แก่ catechins, proanthocyanins, anthocyanidins, flavones, flavonols, flavonones และ isoflavones จากการที่พบ flavonoids ได้อย่างกว้างขวางทั้งพืช ผัก ผลไม้รวมทั้งเครื่องดื่มที่เตรียมมาจากพืช เช่น ชา ซึ่งพบว่าในใบชาจะมี catechins อยู่ถึง 30%ของน้ำหนักแห้งและเชื่อว่าเป็นสารสำคัญในการออกฤทธิ์เป็นแอนติออกซิแดนท์ และสารป้องกันมะเร็ง สำหรับแอนโทไซยานิน(Anthocyanins) เป็นสารที่มีสีในพืช ส่วนกลุ่ม flavones, flavonols และ isoflavones จะพบได้ทั่วไปและเชื่อว่าเป็นสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย

แทนนิน (Tannins) เป็นสารประกอบจำพวกโพลีฟีนอลที่มีหมู่ hydroxyl เป็นจำนวนมาก และโมเลกุลมีโครงสร้างที่ซับซ้อน น้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 500-3,000 นอกจากนี้สารกลุ่มนี้ยังสามารถแสดงคุณสมบัติของการเกิดปฏิกิริยาที่เฉพาะเจาะจงของฟีนอลได้ เช่น สามารถตกตะกอนกับโปรตีน, อัลคาลอยด์ รวมทั้งสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น เซลลูโลส (cellulose) และ เพคติน (pectin) ได้ สารประกอบแทนนินสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

1. **Hydrolyzable tannins** เป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างประกอบด้วย 2 ส่วนใหญ่ๆ คือ ส่วนที่หนึ่งเป็นส่วนของน้ำตาล มักเป็นน้ำตาลกลูโคสเป็นส่วนใหญ่หรือสารประกอบ polyols อื่นๆ ส่วนที่สองเป็น phenolic acid เช่น gallic acid หรือ hexahydroxydiphenic acid (HHDP) หรืออนุพันธ์ของ HHDP ที่มักอยู่ในรูปออกซิไดซ์ โดยส่วนที่เป็น phenolic acid จะมากกว่าส่วนของน้ำตาลหรือ polyols มาเชื่อมโยงกันด้วยพันธะเอสเทอร์ (ester linkage) ที่เรียกว่า depside linkage ซึ่งพันธะเอสเทอร์จะถูก ไฮโดรไลซิสในสภาวะที่มีน้ำและถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยกรด ดังหรือเอนไซม์ tannase ให้ phenolic acids และ น้ำตาลหรือ polyols เมื่อนำไปกลั่นแบบ dry distillation สารประกอบ phenolic acid จะเปลี่ยนเป็น pyrogallol ดังนั้น hydrolyzable tannins จึงเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า pyrogallol tannins มี free hydroxy group 3 หมู่ เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย ferric chloride จะให้สีน้ำเงิน

สารประกอบกลุ่ม hydrolyzable tannins แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อยดังนี้

1 Gallotannins

Gallotannins เป็นสารประกอบที่ประกอบด้วย gallic acid เชื่อมต่อกับน้ำตาลกลูโคส ด้วยพันธะเอสเทอร์ เมื่อสลายตัว acid hydrolysis จะได้ gallic acid และน้ำตาลกลูโคส ตัวอย่างของ Gallotannins ได้แก่ tannic acid (chinese gallotannin) และ tara gallotannin พืชที่ใช้เป็นยาที่ใช้เป็นแหล่งของ gallotannins ได้แก่ โกฐน้ำเต้า กานพลู กลีบกุหลาบแดง ใบเมเปิล เหลือก (hamamelis) เป็นต้น

2 Ellagitannin

Ellagitannins เป็นสารประกอบโพลีฟีนอล ที่ประกอบด้วย hexahydroxy diphenic acid หรือ modified form เช่น chebulic acid, dehydrohexahydroxydiphenic acid เป็นต้น อยู่รวมกับน้ำตาล ellagitannins เมื่อสลายตัวแบบ acid hydrolysis ส่วนของ hexahydroxydiphenic acid จะแยกออกและเกิดปฏิกิริยา lactonization ให้ ellagic acid ตัวอย่างของ Ellagitannins ได้แก่ pedunculagin, chebulagic acid ตัวอย่างพืชที่ใช้เป็นยาที่เป็นแหล่งของ Ellagitannins ได้แก่ เปลือกผลทับทิม ผลสมอไทย เปลือกต้นโอ๊ค และใบยูคาลิปตัส

2. Condensed tannins (Proanthocyanidins) เป็นสารประกอบโพลีฟีนอลที่มีความซับซ้อน การสลายตัวด้วยน้ำยากกว่ากลุ่ม Hydrolyzable tannins โครงสร้างโพลีฟีนอล นั้นเป็นอนุพันธ์ของสารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) อยู่ในรูปโพลีเมอร์หรือโอลิโกเมอร์ ที่โครงสร้างโมโนเมอร์ ในรูป flavan-3-ols เช่น (+)-catechin และ (-)-Epicatechin สารประกอบกลุ่มนี้เมื่อนำมาต้มกับกรดเจือจางหรือนำมาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ จะได้สารประกอบที่เป็น polymer รูปอสัณฐานสีแดงไม่ละลายน้ำ ซึ่งเรียกว่า phlobaphenes หรือ tannin red จึงเรียกสารกลุ่มนี้ว่า phobatanins เมื่อนำสารประกอบกลุ่มนี้มากลั่นแบบ dry distillation จะได้สารประกอบที่เป็น catechol tannins สารประกอบกลุ่มนี้จึงถูกเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า catechol tannins ทั้ง catechol tannins หรือ Condensed tannins มี free hydroxy group อยู่ 2 หมู่ เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย ferric chloride จะให้สีเขียว พืชที่เป็นแหล่งของ Condensed tannins ได้แก่ เปลือกอบเชย เปลือกชินโคนา เปลือกหลิว เปลือกโอ๊ค เปลือกและใบของ hamamelis ราก krameria ราก male fern เปลือกโกโก้ ใบชา ส่วนสารประกอบเชิงซ้อนโอลิโกเมอร์ค โปรแอนโทไซยานิดินจากพืช โดยเฉพาะเมล็ดองุ่น เป็นสารที่มีการศึกษากันมากเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) และยังพบว่าสารประกอบเชิงซ้อนโอลิโกเมอร์ค โปรแอนโทไซยานิดิน มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและไวรัส ต้านการอักเสบและการแพ้ รวมทั้งมีฤทธิ์ขยายหลอดเลือด นอกจากนี้ยังพบว่าป้องกันการรวมกลุ่มของเกล็ดเลือด ป้องกันการแตกหักของหลอดเลือดฝอยและมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ Phospholipase A2, Cyclooxygenase และ Lipoxygenase

มะขาม มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Tamarindus indica* L. จัดอยู่ในตระกูล Leguminosae เป็นพืชเมืองร้อนชนิดไม้ยืนต้นขนาดกลางจนถึงขนาดใหญ่แตกกิ่งก้านสาขามาก เปลือกต้นขรุขระและหนา สีน้ำตาลอ่อน ใบ เป็นใบประกอบ ใบเล็กออกตามกิ่งก้านใบเป็นคู่ ใบย่อยเป็นรูปขอบขนาน ปลายใบและโคนใบมน ดอก ออกเป็น ช่อเล็กๆ ตามปลายกิ่ง หนึ่งช่อมี 10-15 ดอก ดอกย่อยขนาดเล็ก กลีบดอกสีเหลืองและมีจุดประสีแดงอยู่กลางดอก ผล เป็นฝักยาว รูปร่างยาวหรือโค้ง ยาว 3-20 ซม. ฝักอ่อนมีเปลือกสีเขียวอมเทา สีน้ำตาลเกรียม เนื้อในติดกับเปลือก เมื่อแก่ฝักเปลี่ยนเป็นเปลือกแข็งกรอบหักง่าย สีน้ำตาล เนื้อในกลายเป็นสีน้ำตาลหุ้มเมล็ด เนื้อมีรสเปรี้ยว และหวาน มะขามขึ้นได้ดีกับดินทุกชนิด เจริญเติบโตได้ดีในดินร่วนในดินเหนียวทนแล้งได้ดี เหมาะที่จะปลูกในฤดูฝน ใช้น้ำพันธุ์ปลูกโดยการขุดหลุมและใส่ปุ๋ยที่ก้นหลุมก่อน ดูแลรักษาเหมือนกับพืชโดยทั่วไป นิยมขยายพันธุ์โดยการทาบกิ่ง ติดตาหรือต่อกิ่ง เพราะได้ผลเร็วและไม่ทำให้กลายพันธุ์

สำหรับในประเทศไทยมีมะขาม 2 ชนิดหลัก ได้แก่ มะขามเปรี้ยวและมะขามหวาน มะขามเป็นพืชกินได้ที่สำคัญของประชากรไทย ส่วนเนื้อหุ้มเมล็ด ดอก และใบ สามารถใช้รับประทานได้ มะขามถูกใช้เป็นยาระบาย แก้อาการท้องผูก ยาขับพยาธิไส้เดือน และยาขับ

เสมหะ คุณค่าทางโภชนาการของมะขามพบว่า ยอดอ่อนและฝักอ่อนมีวิตามิน เอ มาก มะขามเปียกรสเปรี้ยว ทำให้ชุ่มคอ ลดความร้อนของร่างกายได้ดี ส่วนเนื้อหุ้มเมล็ดที่เป็นเนื้อในฝักของมะขามที่แก่จัด เรียกว่า มะขามเปียกประกอบด้วยกรดอินทรีย์หลายตัว เช่น กรดทาร์ทาริก กรดซิตริก เป็นต้น ทำให้ออกฤทธิ์ ระบายและลดความร้อนของร่างกายลงได้ แพทย์ไทยเชื่อว่า รสเปรี้ยวนี้จะกัดเสมหะให้ละลายได้ด้วยและยังถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการทำอาหาร

นอกจากนี้ มีรายงานพบว่าสารสกัดจากเมล็ดมะขาม มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยลดการเกิด Lipid peroxidation และ ยับยั้งการเกิดไนตริกออกไซด์ทั้งในหลอดทดลองและหนูถีบจักร (Mouse) และมีฤทธิ์ต้านจุลชีพ นอกจากนี้ยังลดระดับน้ำตาลและลิปิดที่สูงในเลือดของหนูที่เบาหวานจากการเหนี่ยวนำด้วย Streptozotocin และไม่มีฤทธิ์ก่อการกลายใน *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 และ TA102

นอกจากนี้ยังพบว่า สารสำคัญในเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการทดสอบในหลอดทดลอง คือ Polymeric Tannins และ Oligomeric Procyanidins จากการศึกษาระียบเทียบชนิดของโปรซัยยานิดิน (Proanthocyanidin) ที่พบในเมล็ดและเปลือกหุ้มเมล็ดของมะขามพื้นเมืองนั้น มีความใกล้เคียงกับที่พบในเมล็ดองุ่น พลัม และ Pinto Bean ด้วยเหตุนี้ ส่วนเมล็ดและเปลือกหุ้มเมล็ดของมะขามอาจมีบทบาทสูงต่อสุขภาพโดยมีฤทธิ์ป้องกันการเกิดมะเร็ง จากการศึกษที่ผ่านมาของ Sudjareon และคณะ พบว่า การสกัดสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในมะขามด้วยเมธานอล ส่วนเมล็ดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (6.54 กรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักแห้ง) มากกว่า ในส่วนของเปลือกหุ้มเมล็ด (2.82 กรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักแห้ง) แต่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามมีมากกว่าในเมล็ดของมัน ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

การทดสอบมะเร็งฤทธิ์ก่อมะเร็งแบบระยะกลาง (Medium-term Carcinogenicity Test) หรือ Ito Model ที่ทำการทดสอบฤทธิ์ก่อมะเร็งและ/หรือฤทธิ์ต้านมะเร็งตับของหนูขาว (Rat) ซึ่งใช้เวลาในการทดลองเพียง 8 สัปดาห์ โดยมี Glutathione-S-transferase placental form (GST-P) positive foci เป็น End point marker ของโมเดลนี้ พบว่า GST-P positive foci เป็นรอยโรคก่อนการเกิดมะเร็งตับ (Preneoplastic lesion) หนูขาวที่สัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับ ทำให้ Ito Model เป็นวิธีการทดสอบที่สามารถบ่งบอกคุณสมบัติความเป็นสารก่อมะเร็งและต้านมะเร็งของสารทดลองได้โดยไม่แตกต่างจากการศึกษาฤทธิ์ก่อมะเร็งจากการทดสอบระยะยาว 2 ปี (Long Term Carcinogenicity Test) ดังนั้นเพื่อเป็นการลดต้นทุนและระยะเวลาในการทดสอบฤทธิ์ก่อมะเร็งในสัตว์ทดลอง Ito model จึงเป็นที่ยอมรับในวงการศึกษามะเร็งในปัจจุบัน

มะขามเป็นพืชที่พบมากในประเทศไทย ส่วนเมล็ดมะขามเป็นส่วนที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมแปรรูปทางการเกษตรในประเทศ ส่วนที่เหลือทิ้งเหล่านี้อาจมีคุณสมบัติป้องกันการเกิดโรค ผลงานวิจัยและองค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้ จะเป็นแนวทางในการช่วยเพิ่มมูลค่าของผลผลิตทางการเกษตรที่เหลือใช้ อีกทั้งยังสามารถช่วยลดดุลการค้าจากการซื้อผลิตภัณฑ์อาหารเสริมจากต่างประเทศได้อีกด้วย อย่างไรก็ตามการศึกษานี้มีข้อจำกัดที่ค่อนข้างสูง เนื่องจากเมล็ดนั้น ยังอยู่ในช่วงการทดสอบในหลอดทดลองเกือบทั้งสิ้น ดังนั้นการศึกษาในสัตว์ทดลองจึงจำเป็นอย่างยิ่งในการช่วยยืนยันผลการทดสอบที่ได้ศึกษาผ่านมาก่อนการนำไปศึกษาในมนุษย์ต่อไป

วัตถุประสงค์

- 1) ศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันและกึ่งเฉียบพลันของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามในหนูขาว
- 2) ศึกษาผลของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามต่อการเกิดอนุมูลอิสระและต้านการเกิดอนุมูลอิสระในตับของหนูขาว
- 3) ศึกษาผลของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามต่อรอยโรคก่อนการเกิดมะเร็งในตับของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำโดยสารไนโตรซามีนและศึกษากลไกที่เกี่ยวข้อง

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

นำเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามสกัดด้วยเฮกเซนเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อกำจัดส่วนไขมันลิปิด หลังจากสกัดเอาเฮกเซน ออกทำการสกัดส่วนที่เหลือสกัดในเมทานอล 3 ครั้ง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วระเหยส่วนเมทานอลออกโดยใช้ Rotary evaporator นำส่วนสารสกัดที่ได้ละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เพื่อใช้ป้อนหนูขาวต่อไป

2. การตรวจวัด องค์ประกอบเคมีที่สำคัญในสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

2.1 การตรวจวัดระดับ Total phenolic compounds โดยวิธี Folin-Ciocalteu

Method

เติม Folin-Ciocalteu reagent ลงในหลอดที่มีสารมาตรฐานหรือสารตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เติม 7% Na_2HCO_3 นำไปอุ่นที่ 45°C เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm หาความเข้มข้นของสารประกอบโพลีฟีนอล โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน

2.2 การตรวจวัดระดับ Total flavonoids content ด้วยวิธี Aluminum chloride colorimetric method

เติม 5% NaNO_2 และ 10% $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ลงในหลอดที่มีสารมาตรฐานหรือสารตัวอย่าง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง พอลบเวลาเติม 1 M NaOH ซึ่งจะทำให้ได้สารประกอบเชิงซ้อนสีเหลืองสวัด ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร

2.3 การตรวจวัดระดับ Condensed tannins (proanthocyanidins) โดยวิธี Vanillin

Assay

เติม Standard หรือ สารตัวอย่าง ลงในหลอดทดลองที่มี Vanillin reagent ผสมให้เข้ากัน เติม 4% conc. HCl นำไปอุ่นที่ 30°C เป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 nm หาความเข้มข้นของสาร โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน

2.4 การศึกษา Phenolic compounds ด้วยวิธี Chromatography-Electrospray ionization mass spectrometry

เตรียมตัวอย่างสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามด้วยเมทานอลมาทำการละลายในตัวทำละลายเมทานอลที่มีกรดผสมอยู่ จากนั้นนำไประเหยโดยใช้เครื่อง rotary evaporator นำสารสกัดที่แห้งแล้วมาปรับปริมาตรให้มีปริมาตรให้เป็น 5 มล. นำสารละลายที่ได้มากรองแล้วฉีดเข้าเครื่อง LC-MS เพื่อทำการวิเคราะห์ผลต่อไป รายละเอียดและผลการทดลองอยู่ในภาคผนวก

3. การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

ใช้หนูพันธุ์ Wistar เพศผู้ อายุ 6 สัปดาห์ แบ่งเป็น 2 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม ใช้หนู 5 ตัว ป้อนน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวในวันแรกของการทดลอง

กลุ่มที่ 2 ใช้หนู 8 ตัว ป้อนสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเข้มข้น 2 กรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวในวันแรกของการทดลอง

สังเกตลักษณะเปลี่ยนแปลงโดยทั่วไป จำนวนการตายของหนูภายใน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น สังเกตต่อจนครบ 2 สัปดาห์ แล้วจึงทำการสลับด้วยไดเอทิลอีเธอร์ ซึ่งน้ำหนักของอวัยวะต่อไปนี้ ตับ ไต ม้าม และปอด บันทึกน้ำหนักตัวหนู ปริมาณอาหารและน้ำดื่ม 2 ครั้งต่อสัปดาห์

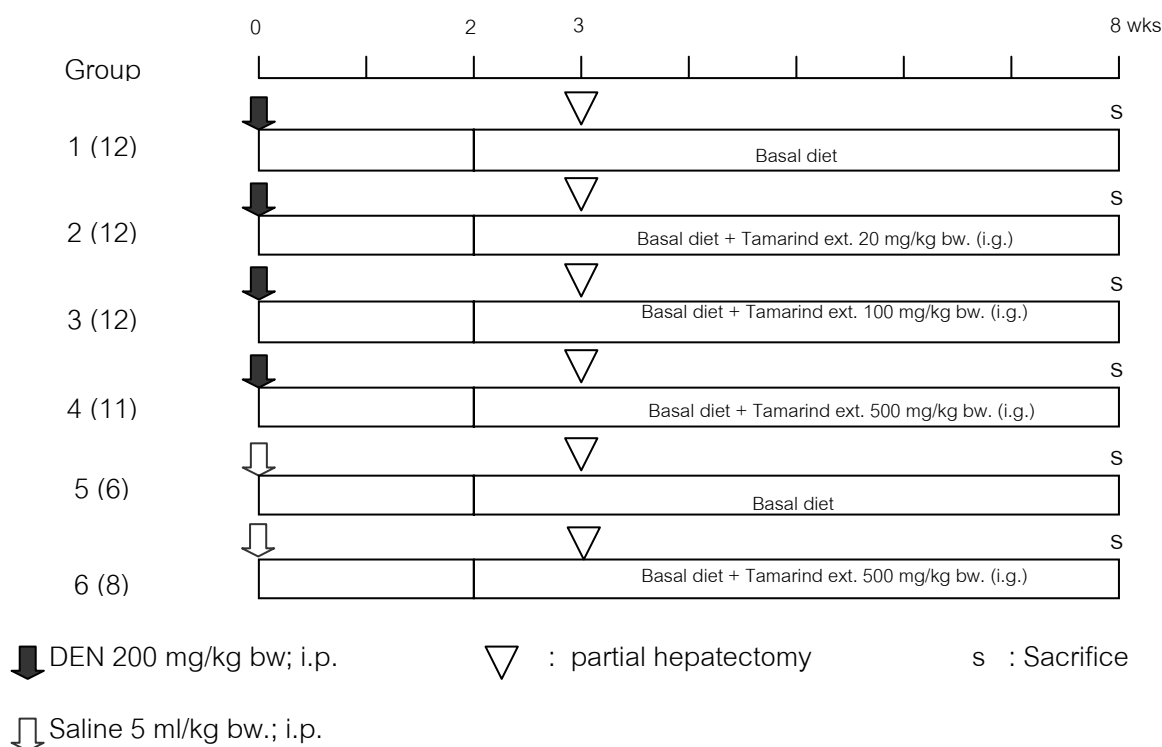
4. การทดสอบพิษกึ่งเฉียบพลันของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

แบ่งหนูพันธุ์ Wistar เพศผู้ ออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มแรก เป็นกลุ่มควบคุม ใช้หนู 6 ตัว ป้อนน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว ทุกวัน เป็นเวลา 14 วัน กลุ่มที่ 2 ถึง 4 เป็นกลุ่มทดลอง ใช้หนูกลุ่มละ 8 ตัว ป้อนด้วยสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม 20, 100 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว ตามลำดับ เป็นเวลา 14 วัน

บันทึกน้ำหนักตัวหนู ปริมาณอาหารและน้ำดื่ม 2 ครั้งต่อสัปดาห์ วันที่ 15 ของการทดลอง ทำการสลับด้วยไดเอทิลอีเธอร์ และเปิดช่องท้องเพื่อเก็บเลือดสำหรับวิเคราะห์ค่า AST, ALT และ ALP ซึ่งน้ำหนักของอวัยวะต่อไปนี้ ตับ ไต ม้าม และปอด ส่วนตับเก็บใน Eppendorf tube แช่ในไนโตรเจนเหลว และเก็บในตู้แช่แข็ง -80°C เพื่อใช้ในการทดสอบทางชีวเคมีต่อไป

5. การทดสอบฤทธิ์ก่อมะเร็งและต้านมะเร็งตับหนูขาวของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม (Ito Model; Medium-term rat liver carcinogenicity test)

ใช้หนู Wistar เพศผู้ อายุ 6 สัปดาห์ จำนวน 56 ตัว แบ่งออกเป็น 6 กลุ่มทดลองตั้งรูปภาพ โดยเริ่มต้นการทดลองด้วย กลุ่มที่ 1-4 ฉีด Diethylnitrosamine (DEN) 200 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว และกลุ่มที่ 5-6 ฉีด Normal Saline Solution (NSS) 5 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว หลังจากนั้น 2 สัปดาห์เริ่มป้อนสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม 20, 100 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว (กลุ่มที่ 2-4 และ 6) และกลุ่มที่ 1 และ 5 ป้อนน้ำ 5 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ในสัปดาห์ที่ 3 ของการทดลอง ทำการตัดตับออกบางส่วน (Partial Hepatectomy) เมื่อครบ 8 สัปดาห์ของการทดลอง ทำการสลับหนูด้วย Diethylether เปิดช่องท้องเพื่อเก็บเลือดหนูสำหรับวิเคราะห์ค่า AST, ALT และ ALP ชั่งน้ำหนักตับ ไต ม้าม และปอด หลังจากนั้นส่วนตัดตับส่วน Right, Median และ Left lateral lobe ส่วนละ 1 ชิ้นขนาดหนา 4-5 มิลลิเมตร แช่ใน 10% Buffered formalin เพื่อใช้ในการศึกษาในระดับชิ้นเนื้อ (Hematoxylin&Eosin staining, Immunohistochemistry of GST-P and PCNA) ต่อบริเวณที่เหลืเก็บใน Eppendorf tube แช่ในไนโตรเจนเหลว และเก็บในตู้แช่แข็ง -80°C เพื่อใช้ในการทดสอบทางชีวเคมีต่อไป บันทึกน้ำหนักตัวหนู ปริมาณอาหารและน้ำดื่มทุกสัปดาห์



6. การตรวจพยาธิสภาพของชิ้นเนื้อตับหนู

หลังจากชิ้นเนื้อตับแช่ในสารละลายฟอर्मาลินบัฟเฟอร์ 72 ชั่วโมง ทำการ Dehydration และฝังส่วนชิ้นเนื้อตับในพาราฟิน หั่นชิ้นเนื้อให้มีความหนา 4 ไมครอน สำหรับย้อมด้วย Hematoxylin & Eosin แล้วเช็คการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์

7. การตรวจนับจำนวน GST-P positive foci และ PCNA จากชิ้นเนื้อตับหนู

GST-P (Glutathione S-transferase placental form) positive foci เป็นรอยโรคก่อนการเกิดมะเร็ง (Preneoplastic lesions) ตับที่สัมพันธ์กับมะเร็งที่เกิดขึ้นในตับของหนูขาว ย้อมชิ้นเนื้อตับที่มีความหนา 4 ไมครอน ด้วย Rabbit polyclonal Anti rat GST-P antibody ตามวิธีของ Puatanachokchai และคณะ นับจำนวน Foci ที่ย้อมติดสีที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางอย่างน้อย 0.2 มิลลิเมตร

PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) index เป็นดัชนีชนิดหนึ่งบ่งบอกการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ย้อมชิ้นเนื้อตับที่มีความหนา 4 ไมครอน การทดลองนี้เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ PCNA ในส่วนชิ้นเนื้อตับที่ให้ผลบวกกับ GST-P กับด้วยส่วนชิ้นเนื้อตับที่ให้ผลลบกับ GST-P โดยใช้วิธี Double-immunohistostaining ด้วย Mouse monoclonal Anti PCNA antibody และ Rabbit polyclonal Anti rat GST-P antibody ตามวิธีของ Puatanachokchai และคณะ PCNA จะถูกย้อมติดในส่วนนิวเคลียสของ Hepatocytes ด้วยสีน้ำตาลของ DAB (3'-3'-Diaminobenzidine) และ GST-P จะถูกย้อมติดในส่วน Cytoplasm ของ Hepatocytes ด้วยสีแดงของ New fuchsin substrate system นับจำนวน PCNA positive cell ต่อ Hepatocytes อย่างน้อย 3000 เซลล์

8. การตรวจระดับ AST, ALT และ ALP ในซีรัมหนูขาว

ปั่นแยกซีรัมจากเลือดที่เจาะได้ด้วยเครื่อง Centrifuge 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 °C นำส่วนซีรัมที่ได้ ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร ตรวจวัด activity ของ AST, ALT และ ALP ด้วยน้ำยาสำเร็จรูป เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานของแต่ละเอนไซม์

9. การวัดปริมาณ TBARS ในตับ

ปั่นชิ้นเนื้อตับในสารละลาย sodium phosphate-EDTA buffer pH 7.0 อุณหภูมิ 4 °C นำ homogenate ที่ได้มาตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลาย trichloroacetic acid ที่ 100 °C 5 นาที แล้วทำการปั่นแยกตะกอนโปรตีนด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เก็บส่วนใสชั้นบน (supernatant) มาทำการวิเคราะห์ปริมาณของมาลอนไดอัลดีไฮด์ โดยนำส่วน supernatant มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย thiobarbituric acid ที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 10 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 0 °C แล้วแยก

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา (2TBA-MDA complex) ด้วย butanol แล้วนำชั้นของ butanol ไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตร โดยเทียบความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ได้ในตัวอย่างกับกราฟมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ในช่วงความเข้มข้น 0-100 ไมโครโมลาร์ แล้วนำค่าที่ได้เทียบกับปริมาณโปรตีน

10. การวัดปริมาณกลูตาไธโอนโดยวิธี glutathione reductase recycling method

ปั่นชั้นตะกอนใน Sodium phosphate-EDTA buffer pH 7.5 แล้วทำการปั่นแยกเอาส่วน supernatant ด้วยเครื่อง centrifuge อุณหภูมิ 4 °ซ นำส่วน supernatant ที่ได้มาหาปริมาณกลูตาไธโอนโดยทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลาย metaphosphoric acid ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการปั่นแยก supernatant ด้วยเครื่อง centrifuge

ทำการหาปริมาณกลูตาไธโอนโดยนำตัวอย่างที่ทำการตกตะกอนโปรตีนแล้วมาเติมสารละลายผสมของ sodium phosphate-EDTA buffer pH 7.5, B-NADPH และเอนไซม์ glutathione reductase ในเพลท 96 หลุม ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ จากนั้นทำการเติมสารละลาย 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic) acid (DTNB) แล้วทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ เมื่อครบเวลาจะได้สารละลายสีเหลืองแล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร เทียบหาความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐาน แล้วนำค่าที่ได้เทียบกับปริมาณโปรตีน

11. การเตรียม Homogenate จากชิ้นเนื้อตับเพื่อหาค่ามัมตภาพของเอนไซม์

ปั่นชิ้นเนื้อตับใน perfusion buffer ด้วยเครื่อง tissue homogenizer นำ homogenate ที่ได้ไปปั่นแยก supernatant ออกจากตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 14,000 รอบต่อ นาที นำ supernatant ที่แยกได้ไปปั่นแยกต่อด้วยเครื่อง ultracentrifuge ความเร็ว 105,000 g เป็นเวลา 60 นาที 4 °C จากนั้นดูดแยกส่วนใส ซึ่งเป็นส่วนไซโตซอล และส่วนไมโครโซมได้จากละลาย pellet ด้วย microsome suspension buffer pH 7.4 เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป โดยทำการหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry ก่อนการวิเคราะห์

12. การวัดปริมาณโปรตีนในชิ้นเนื้อตับ โดยวิธี Lowry method

นำ homogenate, supernatant หรือ microsome ที่ต้องการหาปริมาณโปรตีนในแต่ละการทดลองมาเจือจางในน้ำกลั่นตามอัตราส่วนที่เหมาะสม แล้วเติมสารละลายผสมของ sodium carbonate, copper sulfate, potassium sodium tartrate ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายเจือจาง folin-ciocalteus ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาทำการวัดสารละลายสีน้ำเงินที่ได้ ณ ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ทำการเทียบปริมาณโปรตีนกับกราฟมาตรฐาน bovine serum albumin

13. การวัดกัมมันตภาพของเอนไซม์ glutathione S-transferase (GST)

นำส่วนไซโตซอลที่เตรียมได้จากข้อ 11 มาทำการวัดกัมมันตภาพของเอนไซม์โดยทำปฏิกิริยากับสารละลายผสมของ potassium phosphate-EDTA pH 6.5 และกลูตาไรโอนที่อุณหภูมิ 37°C เมื่อครบเวลาและเติมสารละลาย 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) ทำการตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร คำนวณกัมมันตภาพของเอนไซม์โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์โมลาร์ (molar extinction coefficient) $9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ แล้วนำกัมมันตภาพของเอนไซม์ที่ได้เทียบกับปริมาณโปรตีน

14. การวัดกัมมันตภาพของเอนไซม์ Glutathione peroxidase

เติม 10U Glutathione reductase และ 2 mM NADPH ลงในหลอดทดลองที่มี reaction mixture แล้วเติม ส่วนไซโตซอลจากตับ ที่เจือจาง 20 เท่า ผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นที่ 37 °C นาน 2 นาที เติม t-BHP 10 μl ผสมให้เข้ากัน หากกัมมันตภาพของเอนไซม์โดย วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 nm

15. การวัดกัมมันตภาพของเอนไซม์ Heme oxygenase

เติมส่วนไมโครโซม ที่ปรับปริมาณโปรตีนเป็น 2.5 mg/ml ลงใน Potassium phosphate buffer ที่มี Hemin , Glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase, B-NADPH และ Biliverdin reductase เป็นองค์ประกอบ ผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นที่ 37 °C ในที่มีदनาน 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม Chloroform ในที่เย็น นำไป centrifuge 10,000 rpm 4 °C นาน 10 นาที หา Heme oxygenase activity โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460nm และ 530 nm

16. การวิเคราะห์ทางสถิติ

การหาความแตกต่างของค่าตรวจวัดที่ได้ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองแต่ละกลุ่มใช้วิธี ANOVA test และ Bonferroni-Dunnet สำหรับ post-hoc test

ผลการทดลอง

จากการสกัดผงเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม 100 กรัมด้วยเฮกเซนและเมทานอล ทำให้ได้สารสกัดหยาบเท่ากับ 38.2 กรัม โดยส่วนสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามนี้ มีองค์ประกอบของสารประกอบโพลีฟีนอล สารฟลาโวนอยด์และโปรแอนโธซัยยานิดิน เท่ากับ 235.9, 168.0 และ 9.0 มิลลิกรัมต่อผงมะขามหนึ่งกรัม ตามลำดับ

จากการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม พบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเข้มข้น 2 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ยूरอดทุกตัวหลังได้รับสารสกัด 24 ชั่วโมงและเมื่อเลี้ยงต่อเป็นเวลา 14 วัน สำหรับน้ำหนักตัวและตับ และการบริโภคน้ำและอาหารไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ดังตารางที่ 2

จากการศึกษาความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม พบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเข้มข้น 20-500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ยूरอดทุกตัวหลังได้รับสารสกัดทุกวันเป็นเวลา 14 วัน น้ำหนักตัวและน้ำหนักของตับ ไต ม้าม หัวใจ และปอดไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม การบริโภคน้ำและอาหารและระดับเอนไซม์ ALT, AST และ ALPในซีรัมไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามพบว่าน้ำหนักตัวของหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามความเข้มข้น 500 มก.ต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นน้อยกว่ากลุ่มควบคุม ดังตารางที่ 3-5 นอกจากนี้ระดับ TBARSและกลูต้าไธโอนในตับ ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ดังตารางที่ 6 สำหรับกัมมันตภาพของเอนไซม์ Glutathione S- transferase ในตับมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดมะขาม และกัมมันตภาพของเอนไซม์ Glutathione peroxidase และ Heme oxygenase เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดมะขาม ดังตารางที่ 7

จากการทดสอบฤทธิ์ก่อมะเร็งและต้านมะเร็งตับหนูขาวของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของหนูทุกตัวในการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 7 หนูที่ได้รับสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว 5 วันต่อสัปดาห์เป็นเวลา 6 สัปดาห์ (กลุ่มที่ 6) มีน้ำหนักตัวและน้ำหนักของตับ ไต ม้าม หัวใจ ปอด ต่อมไทมัส และอวัยวะอื่น ๆ ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 5) การบริโภคน้ำและอาหารและระดับเอนไซม์ ALT, AST และ ALPในซีรัมไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ดังตารางที่ 8 และ 9 อย่างไรก็ตามพบว่า น้ำหนักตัวของหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามความเข้มข้น 500 มก.ต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นน้อยกว่ากลุ่มควบคุม ดังตารางที่ 8

นอกจากนี้พบว่าน้ำหนักตัวของหนูที่ได้รับไดเอทิลไนโตรซามีนอย่างเดียว (กลุ่มที่ 1) น้อยกว่ากลุ่มควบคุม(กลุ่มที่ 5) อย่างมีนัยสำคัญ และมีแนวโน้มน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นในหนูที่ได้รับสารสกัดมะขามหลังจากการฉีดไดเอทิลไนโตรซามีน สำหรับน้ำหนักตับ ไต ม้าม หัวใจ

ปอด ต่อมไทมัสและอวัยวะ การบริโภคน้ำและอาหารและระดับเอนไซม์ ALP ในซีรัมไม่มีความแตกต่างในระหว่างกลุ่มการทดลอง ดังตารางที่ 8 และ 9 สำหรับระดับเอนไซม์ ALT และ AST ในซีรัมในหนูที่ได้รับไดเอทิลไนโตรซามีนอย่างเดียว (กลุ่มที่ 1) สูงกว่ากลุ่มควบคุม(กลุ่มที่ 5) อย่างมีนัยสำคัญ และระดับเอนไซม์ AST ในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม ความเข้มข้น 100 และ 500 มก.ต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวหลังจากการฉีดไดเอทิลไนโตรซามีน (กลุ่มที่ 3 และ 4)ต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับไดเอทิลไนโตรซามีนอย่างเดียว ดังตารางที่ 9

จากการย้อมชิ้นเนื้อตับด้วย Hematoxylin & Eosin พบว่าเซลล์ตับมีลักษณะปกติ ไม่มีความแตกต่างทางจุลพยาธิวิทยาในระหว่างกลุ่มการทดลอง ดังรูปที่ 8 ส่วนผลการย้อมชิ้นเนื้อตับด้วยวิธี Immunohistochemistry พบว่า ไม่พบ Glutathione S-transferase Placental form (GST-P) positive foci ในตับของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดมะขามเข้มข้น 500 มก.ต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว แต่พบ GST-P positive foci ในตับหนูกลุ่มที่ได้รับไดเอทิลไนโตรซามีนอย่างเดียวและได้รับสารสกัดมะขามหลังจากการฉีดไดเอทิลไนโตรซามีน รูปที่ 9 แสดง GST-P positive foci ในตับหนูที่ได้รับการฉีดไดเอทิลไนโตรซามีนอย่างเดียว ที่น่าสนใจคือ จำนวน GST-P positive foci ซึ่งเป็นรอยโรคก่อนการเกิดมะเร็งตับในหนูทดลองอย่างมีนัยสำคัญ เฉพาะในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามความเข้มข้น 20 มก.ต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว หลังจากการฉีดไดเอทิลไนโตรซามีน(กลุ่มที่ 2)เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับการฉีดไดเอทิลไนโตรซามีนอย่างเดียว สำหรับจำนวนและขนาดของ GST-P positive foci ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามความเข้มข้น 100 และ 500 มก.ต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวหลังจากการฉีดไดเอทิลไนโตรซามีนลดลงเช่นกันแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ดังตารางที่ 10

จากการย้อมเซลล์ตับโดยใช้แอนติเจน 2 ชนิด คือ GST-P และ PCNA (Proliferating cellular nuclear antigen) ด้วยวิธี Double-stain immunohistochemistry ดังรูปที่ 10 สำหรับ PCNA จัดเป็น marker ของการเพิ่มจำนวนเซลล์ พบว่าสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่ความเข้มข้นต่ำยังยับยั้งจำนวน PCNA ในเซลล์ตับทั้งส่วนที่เกิดรอยโรคมะเร็งตับ (ใน GST-P positive foci) และเซลล์ตับบริเวณรอบๆ positive foci ดังตารางที่ 10 และรูปที่ 11

ในรูปที่ 12 แสดงให้เห็นถึงสารก่อมะเร็งไดเอทิลไนโตรซามีนมีผลลดระดับกัมมันตภาพของเอนไซม์ Glutathione S-transferase ในตับเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารก่อมะเร็ง ส่วนหนูที่ได้รับสารก่อมะเร็งร่วมกับสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม มีผลเหนี่ยวนำกัมมันตภาพของเอนไซม์ Glutathione S-transferase ในตับ แต่ไม่มีผลต่อระดับกลูตาไธโอนในตับเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารก่อมะเร็งไดเอทิลไนโตรซามีนเพียงอย่างเดียว ดังรูปที่ 13

ตารางที่ 2 แสดงผลของการให้สารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามปริมาณ 2 กรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวและตับ และการบริโภคน้ำและอาหาร

กลุ่มทดลอง	จำนวน หนู	น้ำหนัก (กรัม)		%น้ำหนักตัว ที่ เปลี่ยนแปลง	ปริมาณ อาหาร(กรัม/ ตัว/วัน)	ปริมาณน้ำ (มล./ตัว/วัน)	น้ำหนักตับ	
		เริ่มต้น	สุดท้าย				(กรัม)	(%เทียบกับ น.น.ตัว)
น้ำกลั่น	5	277 $\pm$ 3	332 $\pm$ 14	19.8 $\pm$ 3.9	21	36	12.8 $\pm$ 1.0	3.9 $\pm$ 0.2
สารสกัดเปลือก หุ้มเมล็ดมะขาม	8	280 $\pm$ 7	331 $\pm$ 12	18.1 $\pm$ 5.0	18	35	12.6 $\pm$ 1.0	3.8 $\pm$ 0.2

ตารางที่ 3 แสดงผลของการให้สารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเป็นเวลา 14 วันต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว และการบริโภคน้ำและอาหาร

กลุ่มทดลอง	จำนวน หนู	น้ำหนัก (กรัม)		%น้ำหนักตัวที่ เปลี่ยนแปลง	ปริมาณอาหาร (กรัม/ตัว/วัน)	ปริมาณน้ำ (มล./ตัว/วัน)
		เริ่มต้น	สุดท้าย			
น้ำกลั่น	5	300 $\pm$ 9	361 $\pm$ 15	20.3 $\pm$ 2.5	42	19
สารสกัด 20 มก./กก. น.น.ตัว	7	299 $\pm$ 9	362 $\pm$ 16	20.2 $\pm$ 4.0	41	20
สารสกัด 100 มก./กก. น.น.ตัว	7	296 $\pm$ 8	351 $\pm$ 18	20.9 $\pm$ 3.8	40	18
สารสกัด 500 มก./กก. น.น.ตัว	6	296 $\pm$ 10	347 $\pm$ 22	16.6 $\pm$ 5.8	37	20

ตารางที่ 4 แสดงผลของการให้สารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเข้มข้นเป็นเวลา 14 วันต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักอวัยวะสำคัญต่างๆ

กลุ่มทดลอง	น้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์(%เทียบกับน้ำหนักตัว)				
	ตับ	ไต	ม้าม	ปอด	หัวใจ
น้ำกลั่น	4.0 $\pm$ 0.5	0.60 $\pm$ 0.08	0.20 $\pm$ 0.03	0.41 $\pm$ 0.04	0.32 $\pm$ 0.01
สารสกัด 20 มก./กก. น.น.ตัว	3.9 $\pm$ 0.4	0.61 $\pm$ 0.07	0.22 $\pm$ 0.02	0.39 $\pm$ 0.04	0.30 $\pm$ 0.02
สารสกัด 100 มก./กก. น.น.ตัว	3.9 $\pm$ 0.3	0.60 $\pm$ 0.05	0.23 $\pm$ 0.02	0.39 $\pm$ 0.04	0.31 $\pm$ 0.02
สารสกัด 500 มก./กก. น.น.ตัว	3.9 $\pm$ 0.1	0.60 $\pm$ 0.04	0.21 $\pm$ 0.02	0.38 $\pm$ 0.05	0.31 $\pm$ 0.02

ตารางที่ 5 แสดงผลของการให้สารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเข้มข้นเป็นเวลา 14 วันต่อระดับกัมมันตภาพเอนไซม์บางชนิดในซีรัม

กลุ่มทดลอง	กัมมันตภาพเอนไซม์ (IU/l)		
	ALT	AST	ALP
น้ำกลั่น	33.3 $\pm$ 15.9	80.9 $\pm$ 10.7	108.5 $\pm$ 15.3
สารสกัด 20 มก./กก. น.น.ตัว	26.0 $\pm$ 17.0	70.2 $\pm$ 6.7	128.9 $\pm$ 31.1
สารสกัด 100 มก./กก. น.น.ตัว	17.7 $\pm$ 6.1	62.6 $\pm$ 10.5	137.8 $\pm$ 25.2
สารสกัด 500 มก./กก. น.น.ตัว	26.6 $\pm$ 12.7	75.9 $\pm$ 10.8	117.6 $\pm$ 14.8

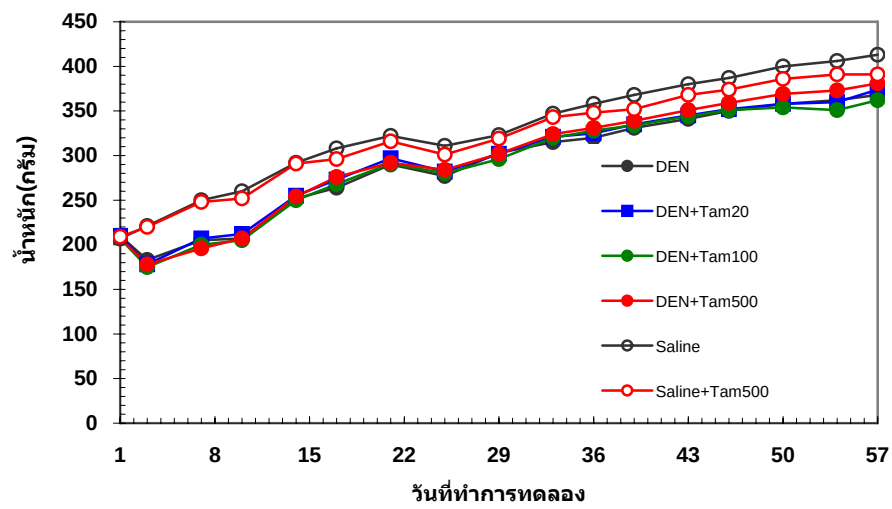
ตารางที่ 6 แสดงผลของการให้สารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเข้มข้นเป็นเวลา 14 วันต่อระดับ Thiobarbituric acid reactive substances และ กลูต้าไธโอน ในตับ

กลุ่มทดลอง	TBARS formation (pmol MDA eq./mg prot)	Glutathione (mM/mg prot)
น้ำกลั่น	21.8 ± 8.9	10.94 ± 2.04
สารสกัด 20 มก./กก. น.น.ตัว	17.1 ± 9.5	10.62 ± 2.25
สารสกัด 100 มก./กก. น.น.ตัว	24.7 ± 6.3	13.28 ± 3.07
สารสกัด 500 มก./กก. น.น.ตัว	19.1 ± 6.0	13.30 ± 2.19

ตารางที่ 7 แสดงผลของการให้สารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเข้มข้นเป็นเวลา 14 วันต่อกัมมันตภาพเอนไซม์ Glutathione S-transferase, Glutathione peroxidase และ Heme oxygenase ในตับ

กลุ่มทดลอง	Glutathione S-transferase (U/mg prot)	Glutathione peroxidase (U/mg prot)	Heme oxygenase (U/mg prot)
น้ำกลั่น	1.66 ± 0.11	0.0172 ± 0.003	356 ± 86
สารสกัด 20 มก./กก. น.น.ตัว	1.71 ± 0.09	0.0224 ± 0.003*	509 ± 153
สารสกัด 100 มก./กก. น.น.ตัว	1.72 ± 0.32	0.0220 ± 0.004*	906 ± 156*
สารสกัด 500 มก./กก. น.น.ตัว	1.78 ± 0.21	0.0230 ± 0.004*	640 ± 92*

*p<0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม(น้ำกลั่น)



รูปที่ 7 แสดงการเจริญเติบโตของหนูที่ได้รับสารก่อมะเร็งและป้องกันด้วยสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

ตารางที่ 9 แสดงระดับกัมมันตภาพเอนไซม์ AST, ALT และ ALP ในเลือดหนู

กลุ่มทดลอง	กัมมันตภาพเอนไซม์ (IU/l)		
	ALT	AST	ALP
DEN	62.4 $\pm$ 14.1	117.8 $\pm$ 13.4*	87.5 $\pm$ 16.8
DEN + สารสกัด 20 mg./kg bw.	66.3 $\pm$ 22.8	103.2 $\pm$ 15.4	90.9 $\pm$ 11.5
DEN + สารสกัด 100 mg./kg bw.	58.5 $\pm$ 10.1	75.7 $\pm$ 17.4	91.0 $\pm$ 22.5
DEN + สารสกัด 500 mg./kg bw.	49.1 $\pm$ 10.3	75.7 $\pm$ 8.8	73.7 $\pm$ 12.1
Saline	47.1 $\pm$ 15.9	58.5 $\pm$ 13.5	81.3 $\pm$ 18.6
Saline + สารสกัด 500 mg./kg bw.	38.6 $\pm$ 8.1	47.5 $\pm$ 14.5	67.4 $\pm$ 13.1

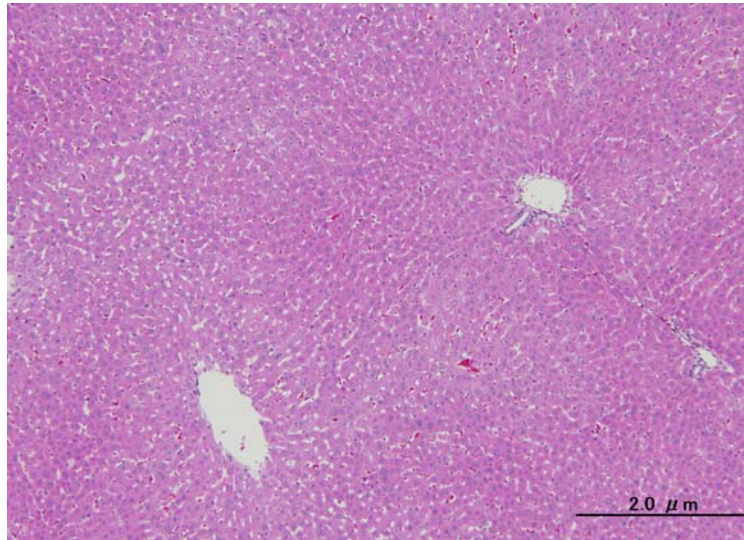
* p< 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ Saline

** p< 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ DEN อย่างเดียว

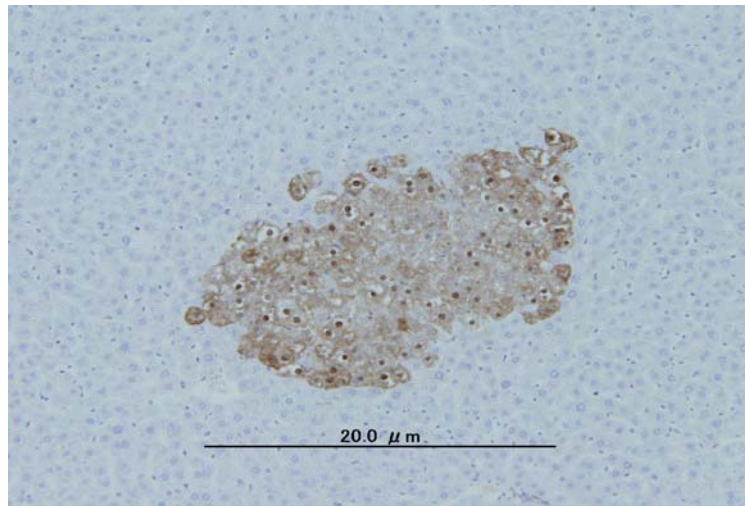
ตารางที่ 10 แสดงจำนวนและขนาดของ Glutathione S-transferase Placental form (GST-P) positive foci ในตับหนู

กลุ่มทดลอง	Glutathione-S-transferase placental form		PCNA positive cells	
	positive foci		(จำนวนPCNA/ 1000 hepatocytes)	
	จำนวน (จำนวน/cm ²)	ขนาด (mm ² /cm ²)	GST-P positive foci	Surrounding GST-P positive foci
DEN	2.9±1.6	0.178±0.103	37.5±23.4	7.4±3.2
DEN + สารสกัด 20 mg./kg bw.	1.3±0.5**	0.110±0.069	22.2±13.1	2.8±1.8*
DEN + สารสกัด 100 mg./kg bw.	1.6±1.1	0.121±0.112	30.9±9.6	7.2±1.9
DEN + สารสกัด 500 mg./kg bw.	2.3±0.9	0.125±0.052	29.2±12.9	5.1±0.4
Saline	0	0	-	3.5±2.6
Saline + สารสกัด 500 mg./kg bw.	0	0	-	2.9±2.5

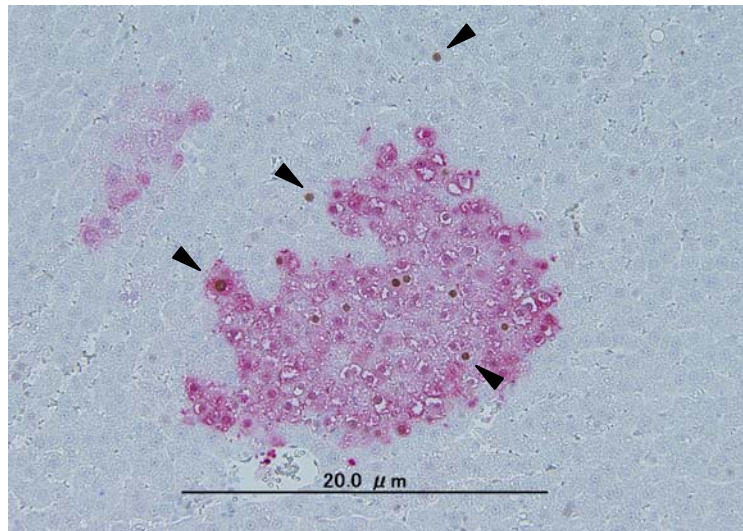
- p< 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ DEN อย่างเดียว



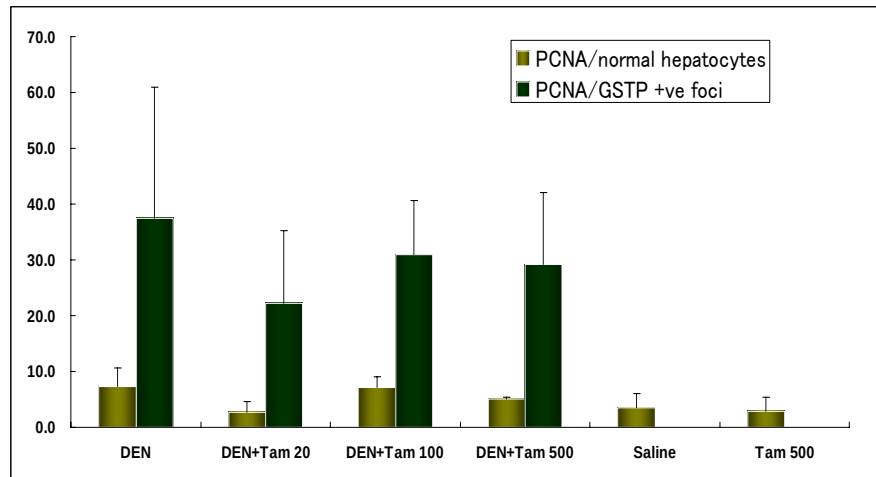
รูปที่ 8 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของตับหนูที่ได้รับไดเอทิลไนโตรซามีน ความเข้มข้น 200 มก.ต่อ กิโลกรัม น้ำหนักตัว (ย้อมด้วย Hematoxylin&Eosin)



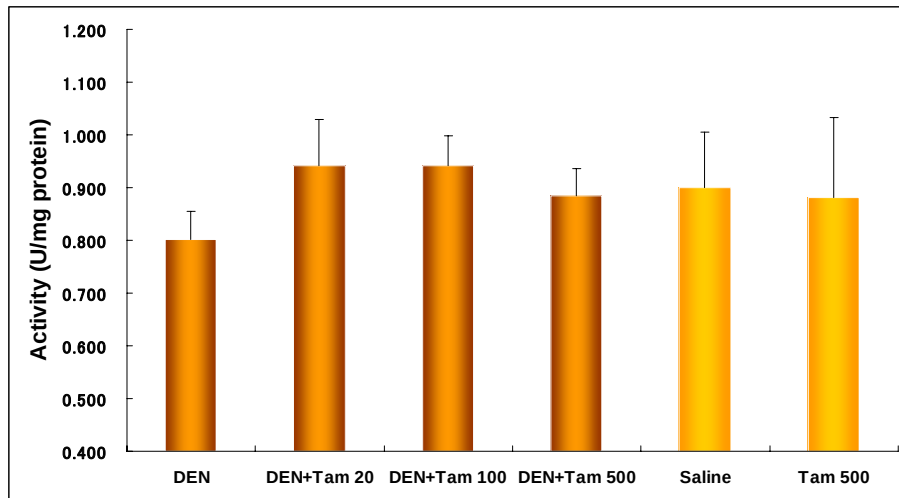
รูปที่ 9 Glutathione S-transferase Placental form positive foci ในตับหนูที่ได้รับไดเอทิลไนโตรซามีน ความเข้มข้น 200 มก.ต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว



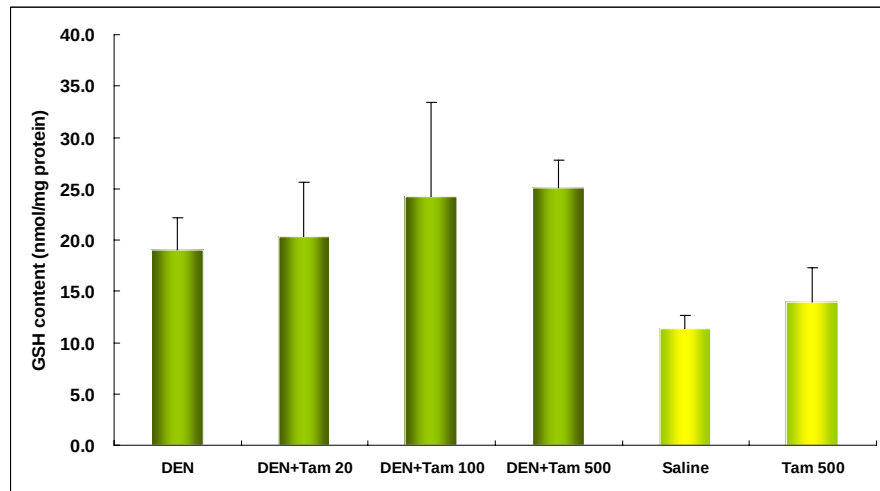
รูปที่ 10 Double-stain immunohistochemistry ระหว่าง GST-P positive foci (ส่วนที่ย้อมติดสีแดง) กับ PCNA (ส่วนที่ย้อมติดสีน้ำตาล) ในตับหนูที่ได้รับไดเอทิลไนโตรซามีนความเข้มข้น 200 มก.ต่อ กิโลกรัม น้ำหนักตัว



รูปที่ 11 แสดงจำนวน PCNA ในกลุ่มเซลล์ตับที่ย้อมติด GST-P และจำนวน PCNA บริเวณรอบๆกลุ่มเซลล์ตับที่ย้อมติด GST-P ในหนูขาว



รูปที่ 12 แสดงกัมมันตภาพเอนไซม์ Glutathione S-transferase ในตับหนูขาว



รูปที่ 13 แสดงระดับกลูตาไธโอนในตับหนูขาว

บทวิจารณ์

สารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่ความเข้มข้น 2 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีความปลอดภัยต่อหนูขาว และการให้สารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่ความเข้มข้น 20-500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 14 วัน ไม่มีความเป็นพิษต่อหนูขาวและไม่มีผลต่อระดับเอนไซม์บ่งชี้การทำงานของตับในซีรัม นอกจากนี้สารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามยังเหนี่ยวนำกัมมันตภาพเอนไซม์ Heme oxygenase, Glutathione peroxidase และ Glutathione S-transferase ในตับหนู และไม่มีผลเหนี่ยวนำต่อการเกิด Lipid peroxidation

จากงานวิจัยนี้ยังพบว่าสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามไม่มีเหนี่ยวนำการเกิด GST-P positive foci ซึ่งเป็นรอยโรคก่อนการเกิดมะเร็งในตับหนูแรท แต่สามารถลดจำนวนและขนาดของ GST-P positive foci ในตับหนูที่ได้รับสารก่อมะเร็งไดเอทิลไนโตรซามีน โดยการให้สารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวร่วมกับสารก่อมะเร็ง สามารถลดจำนวนและขนาดของ GST-P positive foci และสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามยังลดจำนวนเซลล์ตับที่ให้ผลบวกกับ Proliferating cellular nuclear antigen (PCNA) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และช่วยเหนี่ยวนำการทำงานของเอนไซม์ Glutathione S-transferase แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามยับยั้งรอยโรคก่อนการเกิดมะเร็งตับหนูที่เหนี่ยวนำด้วยสารก่อมะเร็งตับ โดยอาจไปมีผลต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ตับที่ผิดปกติร่วมกับการส่งเสริมเอนไซม์กำจัดสารพิษในตับหนู

อย่างไรก็ตามผลยับยั้งการเกิดมะเร็งตับดังกล่าวไม่พบในหนูที่ได้รับสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่ความเข้มข้นสูง และเมื่อพิจารณาในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามขนาดสูงอย่างเดียวเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่ามีแนวโน้มของการเพิ่มน้ำหนักตัวน้อยกว่ากลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าการได้รับสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่สูงเป็นเวลานาน อาจทำให้เกิดผลเสียแก่ร่างกาย ถ้าเปรียบเทียบผลของสารสกัดต่อการเจริญเติบโตและค่าการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในตับหนูที่ได้รับเพียง 14 วัน จะเห็นได้ว่าการออกฤทธิ์ของกลุ่มที่ได้รับความเข้มข้น 500 มก./กก. น้ำหนักตัวดีกว่ากลุ่มที่ได้รับความเข้มข้น 20 มก./กก. น้ำหนักตัว ในทางตรงกันข้ามพบว่าการที่ได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้น 20 มก./กก. น้ำหนักตัว เป็นเวลา 6 สัปดาห์มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดมะเร็งตับในหนูที่ได้รับสารก่อมะเร็ง จากผลการวิจัยอาจวิเคราะห์ได้ว่าสารบางชนิดที่อยู่ในสารสกัดส่วนเมธานอลของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม ที่อาจทำให้เกิดโทษต่อสุขภาพถ้าร่างกายได้รับในปริมาณสูง

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า สารสกัดส่วนเมธานอลนี้ประกอบด้วยแทนนิน ซึ่งเป็นสารประกอบโพลีฟีนอลที่มีโครงสร้างซับซ้อน น้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 500-3,000 สารกลุ่มนี้ยังสามารถแสดงคุณสมบัติในการเกิดปฏิกิริยาเคมี เช่น สามารถตกตะกอนกับโปรตีน, อัลคา

ลอยด์ รวมทั้งสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น เซลลูโลส(cellulose) และ เพคติน(pectin) ได้ ด้วยเหตุนี้จึงอาจมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และโปรตีนในทางเดินอาหารที่ทำหน้าที่ในการย่อยและดูดซึมสารอาหาร ทำให้น้ำหนักตัวของหนูลดลงและความสามารถในการนำสารสำคัญในสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเข้าสู่กระแสเลือดลดลงเมื่อได้รับสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเป็นระยะเวลานาน ด้วยข้อจำกัดของเครื่องมือและความชำนาญจึงทำให้งานวิจัยนี้ไม่สามารถตรวจวัดปริมาณของ condensed tannin ที่มีโครงสร้างเป็น polymer ได้ อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์โครงสร้างสำคัญในสารสกัดเมธานอลพบว่าองค์ประกอบส่วนใหญ่ คือ Procyanidin dimer และ Procyanidin trimer ซึ่งจัดเป็น Oligomeric proanthocyanidins หรือ condensed tannin มีการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารประกอบเชิงซ้อนโอลิโกเมอร์ิก โปรแอนโทไซยานิดินจากพืชโดยเฉพาะเมล็ดองุ่น มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยังพบว่ามีฤทธิ์ต้านมะเร็งยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและไวรัส ด้านการอักเสบและการแพ้ รวมทั้งมีฤทธิ์ขยายหลอดเลือด นอกจากนี้ยังพบว่าป้องกันการรวมกลุ่มของเกล็ดเลือด ป้องกันการแตกหักของหลอดเลือดฝอย และมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ Phospholipase A2, Cyclooxygenase และ Lipoxygenase ดังนั้นสารที่ออกฤทธิ์ต้านมะเร็งส่วนหนึ่งในงานวิจัยนี้ คือ Procyanidin dimer และ Procyanidin trimer

จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าสารสกัดส่วนเมธานอลของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม ในความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองมีความปลอดภัยและไม่มีความเป็นพิษ และเมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ต้านการเกิดมะเร็งตับในระยะเริ่มต้นในหนูที่ได้รับสารก่อมะเร็งตับไดเอทิลไนโตรซามีนพบว่า สารสกัดส่วนเมธานอลของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม สามารถในการยับยั้งการเกิดรอยโรคก่อนเกิดมะเร็งตับหนูขาวได้ โดยอาจไปมีผลต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ตับที่ผิดปกติร่วมกับการส่งเสริมเอนไซม์กำจัดสารพิษในตับหนู งานวิจัยที่ควรทำต่อไปในอนาคตควรมีการศึกษาการแยกเฉพาะส่วน oligomeric proanthocyanidins ออกจากแทนนินทั้งหมดเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ต่อร่างกายได้ดีขึ้น นอกจากนี้การศึกษาหาสารต้านมะเร็งจากเมล็ดของพืชเพื่อช่วยเพิ่มมูลค่าของพืชควรมีการส่งเสริมให้ทำวิจัยต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Arimoto-Kobayashi S, Machida M, Okamoto K, Yamaguchi A. Evaluation of photo-mutagenicity and photo-cytotoxicity of food coloring agents. *Mutagenesis*. 2005, 20: 229-33.
2. Bagchi D, Garg A, Krohn RL, Bagchi M, Bagchi DJ, Balmoori J, Stohs SJ, 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 Pharmacol.*, 1998, 30:771-8.
3. Castillo J, Benavente-Garcia O, Lorente J, Alcaez M, Redondo A, Ortuno A, Del Rio JA. Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo by X-ray of flavan-3-ols (procyanidins) from grape seeds (*Vitis vinifera*): comparative study versus other phenolic and organic compounds. *J. Agri. Food Chem.*, 2000, 48: 1738-1745.
4. De Flora S., Ferguson LR, Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutation Res.*, 2005, 591): 8-15.
5. De M, Krishna De A, Baneerjee AB, Antimicrobial screening of some Indian spices. *Phytotherapy Res.*, 1999, 13: 616-618.
23. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem. Biophys.*, 1959, 82: 70-77.
6. Gu L, Kelm MA, Hammerstone JF, Zhang Z, Beecher G, Holden J, Haytowitz D, Prior RL. Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric studies of procyanidins in food. *J. Mass Spec.*, 2003, 38: 1272-1280.
7. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 1974, 249: 7130-7139.
2. Kelloff, GJ 2000. Perspectives on cancer chemoprevention research and drug development. *Adv. Cancer Res.* 78: 199-334.
8. Ito N, Tamano S. and Shirai T. A medium-term rat liver bioassay for rapid in vivo detection of carcinogenic potential of chemicals. *Cancer Sci.* 2003, Jan; 94(1):3-8.
9. Ito N, Tatematsu M, Hasegawa R, Tsuda H, Medium-term bioassay system for detection of carcinogens and modifiers of hepatocarcinogenesis utilizing the GST-P positive liver cell focus as an end point marker. *Toxicol. Pathol.* 1989, 17: 630-641.

10. Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004, 44: 239-67
11. Komutarin T, Azadi S, Butterworth L, Keil D, Chitsomboon B, Suttajit M, Meade BJ. Extract of the seed coat of *Tamarindus indica* inhibits nitric oxide production by murine macrophages in vitro and in vivo. *Food Chem Toxicol.* 2004, 42: 649-58.
12. Matti R, Das UK, Ghosh D. Attenuation of hyperglycemia and hyperlipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats by aqueous extract of seed of *tamarindus indica*. *Biol Pharm Bull.*, 2005, 28: 1172-1176.
13. Nakae D, Kobayashi Y, Akai H, Andoh K, Satoh H, Ohashi K, Tsutsumi M, Konishi Y, Involvement of 8-hydroxyguanine formation in the initiation of rat liver carcinogenesis by low dose levels of N-diethylnitrosamine. *Cancer Res.*, 1997, 57, 1281-1287.
14. Ogiso T, Tatematsu M, Tamano S, Hasegawa R, Ito N, Correlation between medium-term liver bioassay system data and results of long-term testing in rats. *Carcinogenesis*, 1990, 11: 561-566.
15. Puatanachokchai R, Morimura K, Wanibuchi H, Oka M, Kinoshita A, Mitsuru F, Yamaguchi S, Funae Y, Fukushima S. Alpha-benzene hexachloride exerts hormesis in preneoplastic lesion formation of rat hepatocarcinogenesis with the possible role for hepatic detoxifying enzymes. *Cancer Lett.* 2005 Oct 21; [Epub ahead of print]
16. Pumthong G, Antioxidant activity of polyphenolic compounds extracted from seed coat of *Tamarind indica* Linn., Master degree thesis, Chiang Mai University, Thailand.
17. Ray RD, Parikh H and Bagchi D, Proanthocyanidin exposure to B6C3F1 mice significantly attenuates dimethylnitrosamine-induced liver tumor induction and mortality by differentially modulating programmed and unprogrammed cell deaths. *Mutation Res*, 2005, Sep26(Epub ahead of print)
18. Rotruck JT, Pope AL, Gauthier HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstna WG. Selenium: biochemical roles as a component of glutathione peroxidase. *Science*, 1973, 179: 588-590.
19. Sriplung H, Sontipong S, Martin N, Wiangnon S, Vootiprux V, Cheirsilpa A, Kanchanabat C, Khuhaprema, Cancer Incidence in Thailand, 1995-1997. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 2005, 6: 276-281.
20. Sudjaroen Y, Haubner R, Wurtele G, Hull WE, Erben G, Spiegelhalder B, Changbumrung S, Bartsch H, Owen RW. Isolation and structure elucidation of phenolic

antioxidants from Tamarind (*Tamarindus indica L.*) seeds and pericarp. Food Chem Toxicol. 2005, 43: 1673-82.

21. Yamakoshi J et al, Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. Food Chem Toxicol, 2002, 40: 599-607.

22. Yu C.L. and Swaminathan B., Mutagenicity of proanthocyanidins. Food Chem Toxicol, 1987, 25:135-9.

23. Zhang XY et al, Proanthocyanidin from grape seeds enhances anti-tumor effect of doxorubicin both in vitro and in vivo. Pharmazie, 2005, 60: 533-8.

ภาคผนวก

การศึกษาสารฟีนอลิกในสารสกัดหยาบจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามด้วยวิธี Liquid chromatography-Electrospray ionization mass spectrometry โดยรศ.ดร.สุกัญญา วงศ์พรชัย ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

HPLC condition:

Column LC column, Zorbax Eclipse-C18 (3.5 μ m, 4 $\times$ 100 mm), Agilent Technologies, USA

Mobile phase A: Methanol; B: 0.5% Acetic acid in water

Gradient profile:	0	min	95	% B
	0-100	min	0	% B
	100-120	min	0	% B
Flow rate	0.2 ml/min			

MS condition:

Ion Source (Electrospray Ionization)

Capillary (kV)	3.0 k
Cone (eV)	30(eV)
Extractor (V)	10 V
RF Lens (V)	0.5 V
Source Temperature ($^{\circ}$ C)	100 $^{\circ}$ C
Desolvation Temperature ($^{\circ}$ C)	200 $^{\circ}$ C

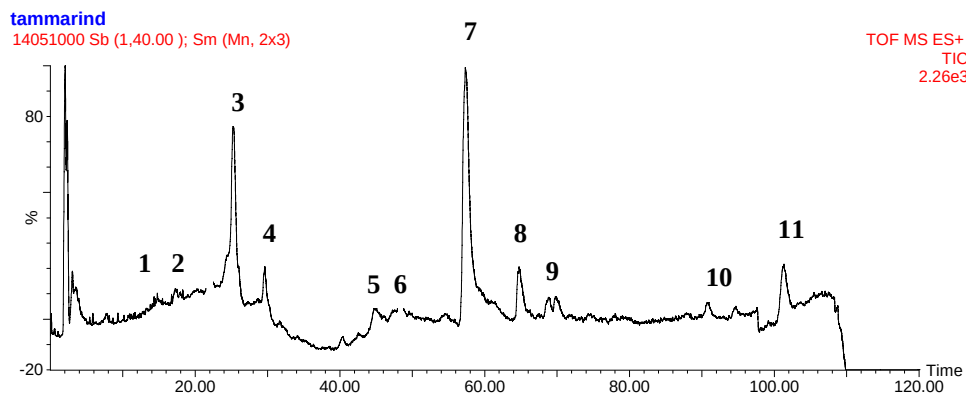
MS 1 (Quadrupole)

LM Resolution	5.0
HM Resolution	5.0
Collision Energy (eV)	10.0 eV
Ion Energy (V)	2.0 V
Steering (V)	2.0 V
Entrance (eV)	65.0 eV
Pre-filter (V)	5.0 V

MS 2 (Time-of-Fight)

Transport (V)	4.0
Aperture 2 (V)	14.6
Acceleration (V)	200
Focus (V)	0
Tube Lens	75
Offset 1, Offset 2	-0.1, 0.0
Pusher (V)	980
TOF (kV)	9.1
Reflectron	35.25
Pusher Cycle Time (μ s)	Auto
Pusher Frequency (Hz)	16129.03
Multiplier (V)	650
MCP (V)	2000

ผลการวิเคราะห์ พบว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามด้วยเมธานอล ประกอบด้วย Procyanidin dimer 78.12%, Procyanidin trimer 19.64% และ Procyanidin tetramer 0.04% ดังรูปและตาราง สำหรับ Peak 11 คาดว่าเป็น contaminate จากพลาสติก

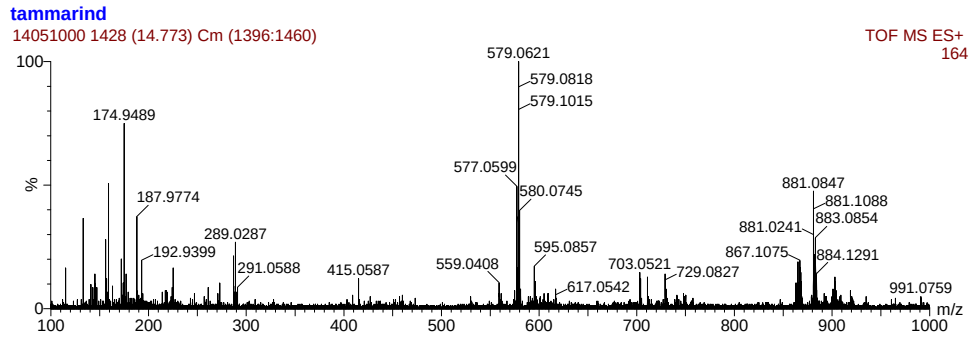


LC-MS chromatogram of the Tamarind extract obtained by LC-MS

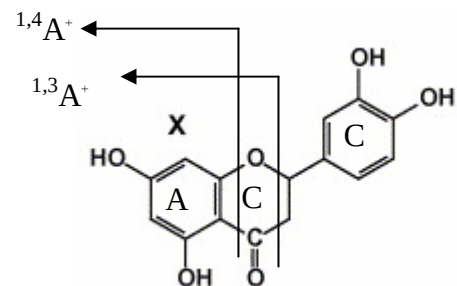
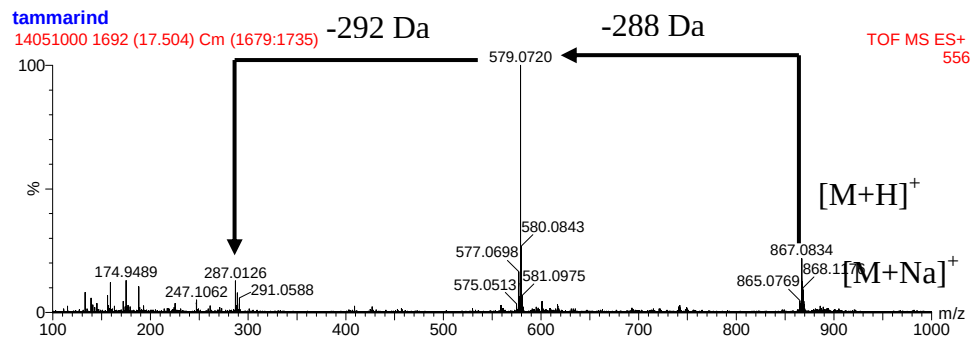
Identified Compounds	Peak number	Retention time [min]	Peak area	% Relative abundance of compounds	% Relative abundance of each group
Procyanidin dimer	3	25.24	1452.35	28.56	78.1172
	7	57.42	2302.29	45.27	
	9	68.8	109.05	2.14	
	10	87.77	109.31	2.15	
Procyanidin trimer	1	14.77	76.86	1.51	19.6443
	2	17.5	106.18	2.09	
	4	29.6	225.22	4.43	
	5	45.06	234.50	4.61	
	8	64.74	356.34	7.01	
Procyanidin tetramer	6	48.31	113.85	2.24	0.0440

ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของแต่ละ Peak ด้วย Mass Spectrometry

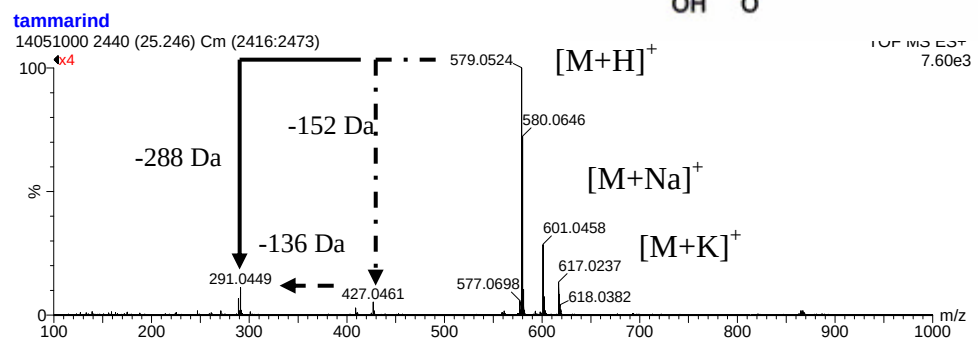
Peak number 1; Retention time 14.77 min

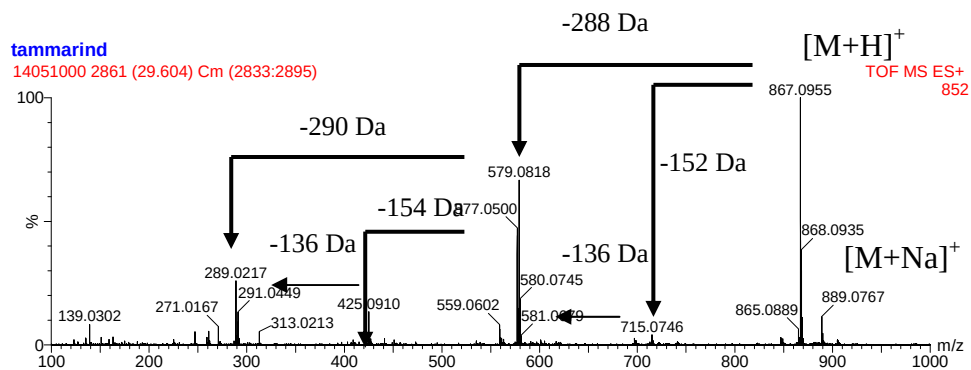
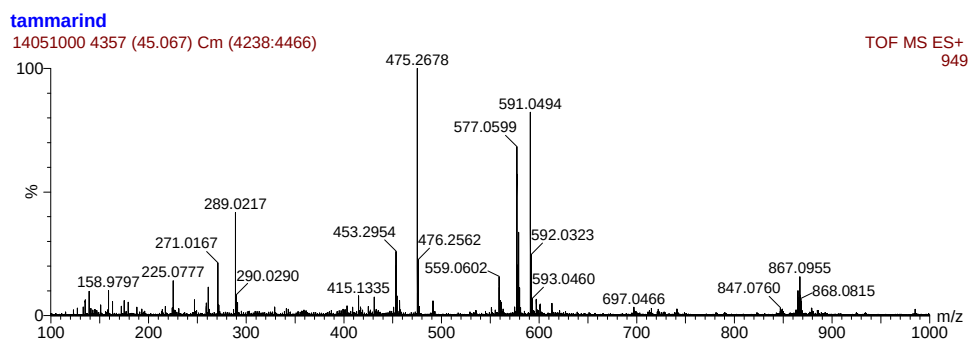
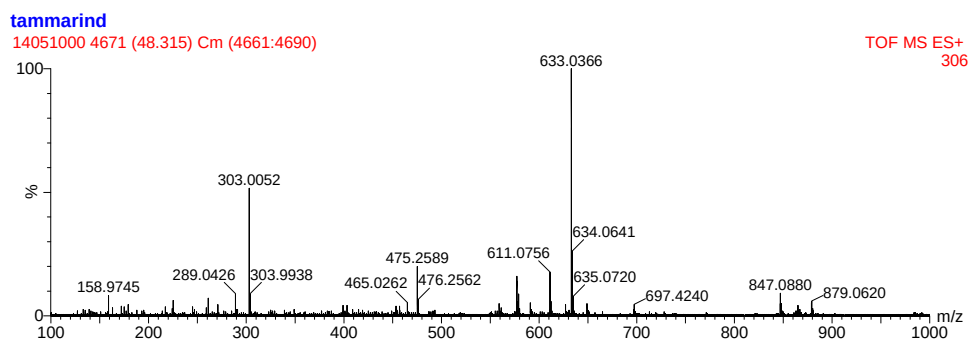


Peak number 2; Retention time 17.50 min

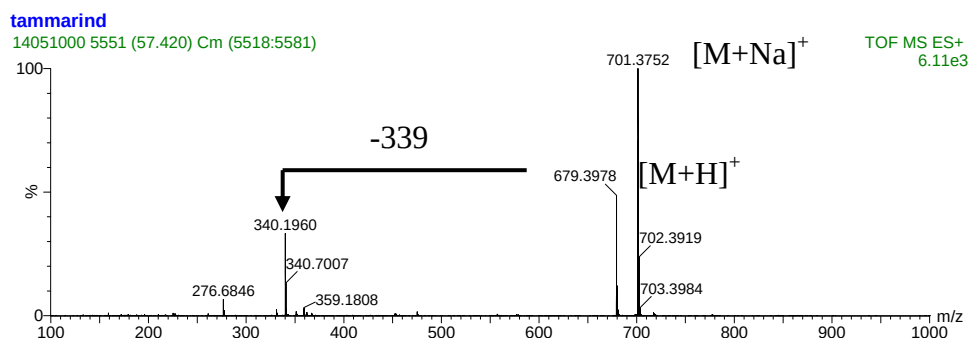


Peak number 3; Retention time 25.24 min

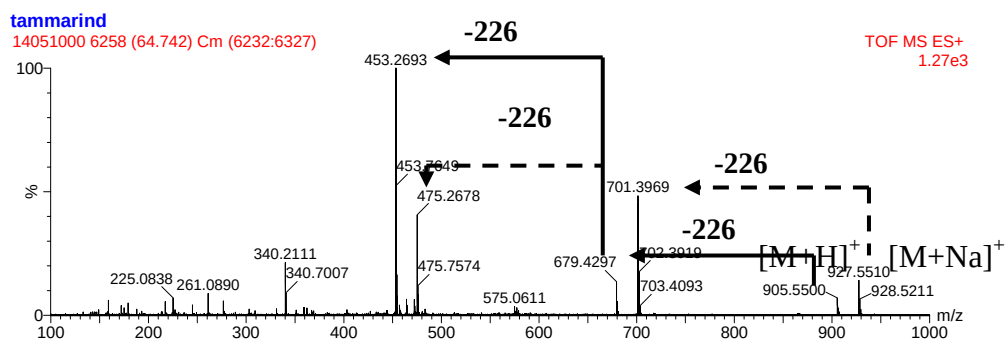


Peak number 4; Retention time 29.60 min**Peak number 5; Retention time 45.06 min****Peak number 6; Retention time 48.31 min**

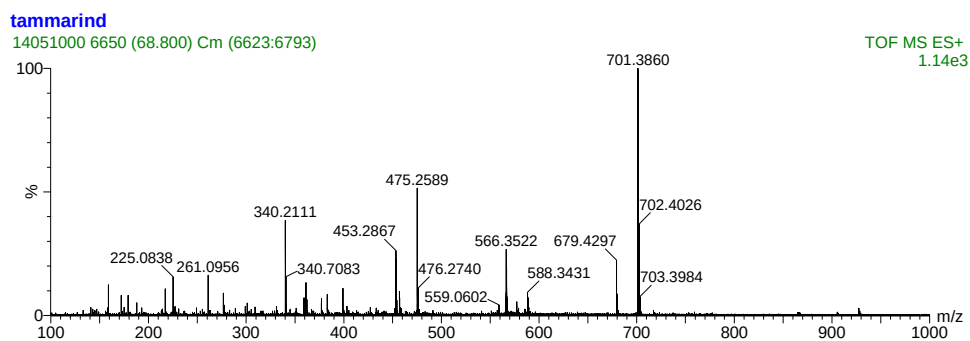
Peak number 7; Retention time 57.42 min

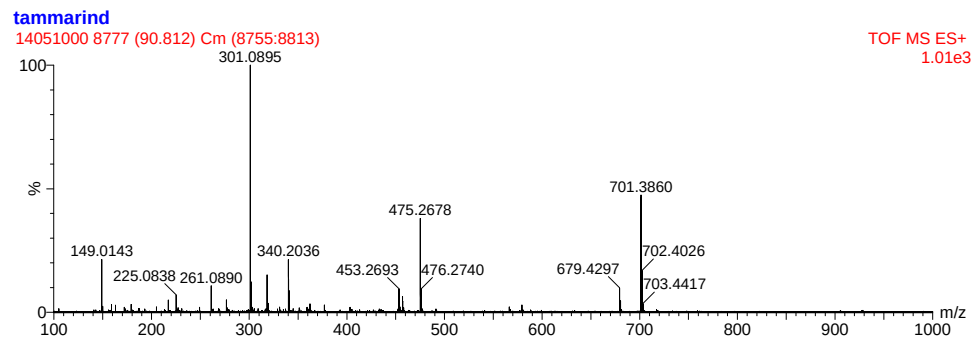
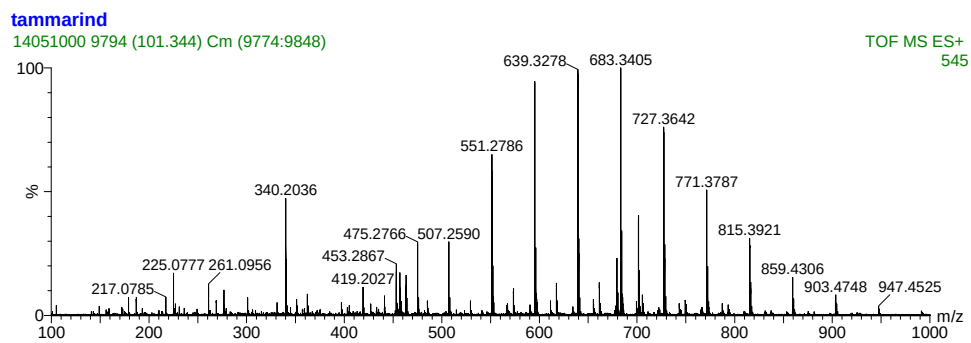


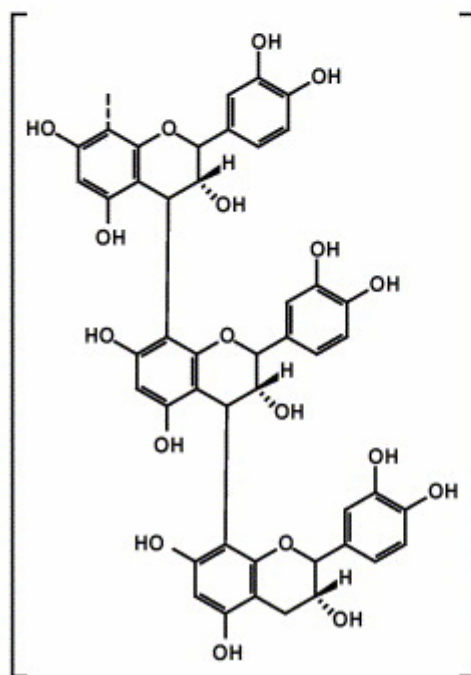
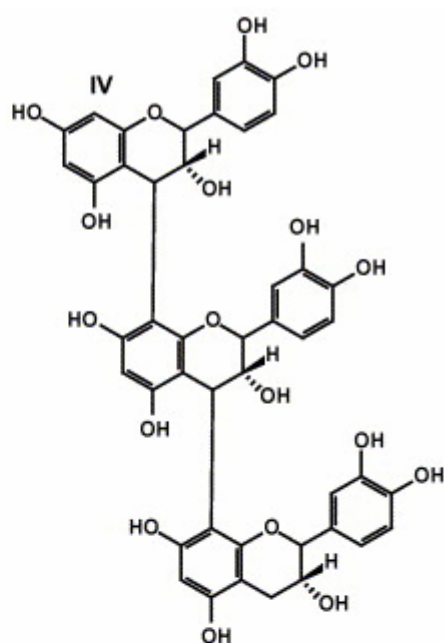
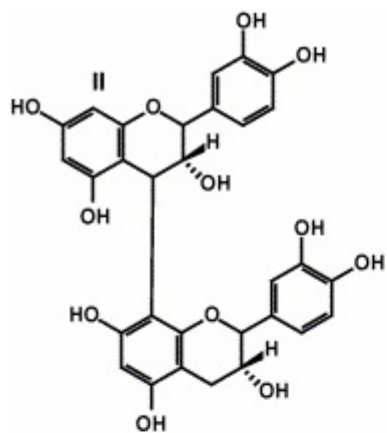
Peak number 8; Retention time 64.74 min (น่าจะเป็น Triimer ของ ฟลาโวนอยด์)



Peak number 9; Retention time 68.80 min



Peak number 10; Retention time 87.77 min**Peak number 11; Retention time 101.34 min**



$$\text{V-VII} = 866 + 288n$$

The structures of the oligomeric flavonoids are procyanidin B₂ (II), procyanidin trimer (IV), procyanidin tetramer (V), procyanidin pentamer (VI) and procyanidin hexamer (VII)

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

Wongpoomchai R., Charoensin S., Suttajit M., Wanibuchi H. and Fukushima S. Chemopreventive effects of Tamarind (*Tamarindus indica* L) husk extract on the early stages of rat hepatocarcinogenesis. กำลังเตรียม Manuscript เพื่อลงตีพิมพ์

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

-เชิงวิชาการ :

-ใช้องค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้ในการเรียนการสอนนักศึกษาระดับปริญญาตรีและบัณฑิตศึกษาของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

-จากการพัฒนาโมเดลทดสอบในหนูทดลองนี้ที่ไม่เคยมีการวิจัยมาก่อนในประเทศไทย ทำให้ได้เทคนิคและวิธีในการทดสอบฤทธิ์ก่อมะเร็งและต้านมะเร็งตับของสมุนไพรไทยเพิ่มขึ้น และใช้เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา

-เชิงสาธารณะ:

-ทำให้มีเครือข่ายความร่วมมือกับ Department of Pathology, Graduate School of Medicine, Osaka City University เมืองโอซาก้า ประเทศญี่ปุ่น

-ทำให้มีความร่วมมือกับนักวิชาการที่ทำงานวิจัยทางด้านสมุนไพร โดยใช้โมเดลทดสอบฤทธิ์ก่อมะเร็งและต้านมะเร็งตับในหนูทดลองจากงานวิจัยนี้ในการขยายผลการทดลองที่ได้ทำมาก่อน เช่น ดำริยาตรีผลาของกลุ่มนักวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และ กระชายดำของกลุ่มนักวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น

3. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

-ต่างประเทศ

Wongpoomchai R., Charoensin S., Petra R., Wanibuchi H., Fukushima S., and Suttajit M. Chemopreventive effects of Tamarind (*Tamarindus indica* L) husk extract on the early stages of rat hepatocarcinogenesis. Oral presentation in 1st Asian Conference on Environmental Mutagens. Kitakyushu, Japan. November 29- November 30, 2007.

-ในประเทศ

1. Wongpoomchai R., Dalai N., Suttajit M., Wanibuchi H., and Fukushima S. Chemopreventive effects of tamarind (*Tamarindus indica* L.) seed coat extract on the early stages of hepatocarcinogenesis in rat. Poster presentation in The Second International Conference on Natural Products for Health and Beauty. Phayao, Thailand. December 17-19, 2008.