รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ ฤทธิ์ลดการอักเสบและลดอนุมูลอิสระในเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ชนิดโมโนไซต์ที่เหนี่ยวนำด้วยไลโปโปลีแซคคาไรด์ ของสารสกัดจากมะละกอ ส้มโอ ฝรั่ง เงาะ และ ทุเรียน

โดย ศิริพร ตันติโพธิ์พิพัฒน์ และคณะ

มกราคม พ.ศ. 2556

สัญญาเลขที่ RDG5420059

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ ฤทธิ์ลดการอักเสบและลดอนุมูลอิสระในเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ชนิดโมโนไซต์ที่เหนี่ยวนำด้วยไลโปโปลีแซคคาไรด์ ของสารสกัดจากมะละกอ ส้มโอ ฝรั่ง เงาะ และ ทุเรียน

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. ผศ. ดร.ศิริพร ตันติโพธิ์พิพัฒน์	สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล
2. นายชาญณรงค์ เมืองน้อย	สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “ฤทธิ์ลดการอักเสบและลดอนุมูลอิสระในเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ชนิดโมโนไซต์ที่เหนี่ยวนำด้วยไลโปโปลีแซคคาไรด์ ของสารสกัดจากมะละกอ ส้มโอ ฝรั่ง เงาะ และ ทุเรียน” เป็นโครงการวิจัยที่ได้รับทุนสนับสนุนจากฝ่ายเกษตร สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ซึ่งให้ทุนสนับสนุนโครงการนี้ให้สามารถดำเนินการจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ทั้งนี้คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณท่านผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านที่ให้คำแนะนำที่มีประโยชน์อย่างมากซึ่งทำให้งานการวิจัยนี้มีความสมบูรณ์มากขึ้น

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยขอขอบคุณนางสาวพิมพ์ใจ ฉิ่งสุวรรณโรจน์ นักวิจัยที่ช่วยดำเนินการวิจัยส่วนหนึ่งของโครงการนี้ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ท่านอื่นๆที่มิได้กล่าวไว้ ณที่นี้

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

โครงการ ฤทธิ์ลดการอักเสบและลดอนุมูลอิสระในเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ชนิดโมโนไซต์ที่เหนี่ยวนำด้วยไลโปโปลีแซคคาไรด์ ของสารสกัดจากมะละกอ ส้มโอ ฝรั่ง เงาะ และ ทุเรียน

ความเป็นมา โรคไม่ติดต่อเรื้อรัง (non-communicable chronic diseases) เช่น โรคมะเร็ง โรคอ้วน เบาหวาน ความดันโลหิตสูง เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของโลก รวมทั้งประเทศไทยด้วย ภาวะการอักเสบเรื้อรังและ oxidative stress ภายในร่างกายเป็นปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคดังกล่าว ผลจากการศึกษามากมายพบว่าการบริโภคอาหารจากพืช เช่น ผัก ผลไม้ เครื่องเทศในปริมาณที่มากพอสามารถลดการเกิดภาวะ oxidative stress และ ลดตัวชี้วัดการอักเสบได้ ซึ่งน่าจะช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรังที่มีสาเหตุจากการเกิดภาวะ oxidative stress และภาวะอักเสบเรื้อรังได้

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ และ ต้านการอักเสบของสารสกัดจากมะละกอ ส้มโอ ฝรั่ง เงาะ และ ทุเรียน ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะการอักเสบด้วย LPS จากเซลล์เม็ดเลือดขาว PMA-induced U937 และ เหนี่ยวนำให้เกิด oxidative stress ด้วย H_2O_2 จากเซลล์โมโนไซต์ U937

วิธีการทดลอง สกัดผลไม้ที่ทำให้แห้ง (freeze-dry) ด้วย 90% แอลกอฮอล์ และนำมาเลี้ยงกับ PMA-induced U937 ก่อนเหนี่ยวนำด้วย LPS และ นำน้ำเลี้ยงเซลล์มาวัดปริมาณTNF-α, IL-6, IL-8 และMCP-1 ในขณะที่การต้านภาวะ oxidative stress ศึกษาโดยนำสารสกัดเลี้ยงร่วมกับเซลล์โมโนไซต์ U937 ก่อนเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress ด้วย H_2O_2หลังจากนั้นวัดปริมาณ reactive oxygen species ในเซลล์โมโนไซต์

ผลการทดลอง

จากการศึกษานี้พบว่าสารสกัดจากผลไม้เหล่านี้มีความสามารถในการลดตัวชี้วัดการอักเสบ และ ลดอนุมูลอิสระแตกต่างกัน โดยสารสกัดจากส้มโอทองดีลดการอักเสบได้ดีที่สุดโดยลดปริมาณตัวชี้วัดการอักเสบได้ 3 ตัว ตามด้วยสารสกัดจากส้มโอขาวน้ำผึ้ง ทุเรียน และ ฝรั่งทั้งสองสายพันธุ์ซึ่งลดปริมาณตัวชี้วัดการอักเสบได้ 2 ตัว และ เงาะทั้งสองสายพันธุ์ลดได้เฉพาะ TNF-α ในขณะที่สารสกัดจากมะละกอไม่พบประสิทธิภาพในการลดไซโตไคน์ในระบบการทดสอบนี้ ในแง่การลดอนุมูลอิสระพบว่าสารสกัดจากส้มโอทองดี และ ฝรั่งแป้นสีทองมีประสิทธิภาพดีที่สุดเนื่องจากสารสกัดของผลไม้ทั้งสองชนิดสามารถลดทั้ง Spontaneous และ H_2O_2-induced ROS ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกความเข้มข้น ตามด้วยสารสกัดจากส้มโอขาวน้ำผึ้ง และ ฝรั่งกิมจู ลดได้เฉพาะ H_2O_2-induced ROS ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกความเข้มข้น ตามด้วยสารสกัดจากทุเรียนหมอนทอง มะละกอทั้งสองพันธุ์ และ ทุเรียนชะนี ตามลำดับในขณะที่สารสกัดจากเงาะทั้งสองสายพันธุ์ไม่พบประสิทธิภาพในการลด ROS สรุปได้ว่าสารสกัดจากส้มโอทองดีมีศักยภาพดีที่สุดในการลดการอักเสบ และ ลดอนุมูลอิสระ และ ผลไม้ต่างชนิดกันมีประสิทธิภาพที่แตกต่างกัน ดังนั้นผู้บริโภคควรรับประทานผลไม้ที่หลากหลาย เพื่อช่วยลดปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรังได้ ข้อมูลที่ได้นี้เป็นเพียงการทดสอบในหลอดทดลองเพื่อเป็นการคัดกรองผลไม้ที่มีศักยภาพดี นำไปทำการศึกษาในสัตว์ทดลองและในมนุษย์ต่อไปเพื่อรับรองประโยชน์ต่อสุขภาพของผลไม้ไทยที่ชัดเจน

คำสำคัญ สารพฤกษเคมี ผลไม้ไทย การต้านการอักเสบ ลดอนุมูลอิสระ

Abstract

Anti-inflammatory and antioxidant activities in Lipopolysaccharide-induced human monocyte U-937 cell line of extract from Papaya, Pomelo, Guava, Rambutan and Durian

Background: Non-communicable chronic diseases are global public health problem including Thailand. Chronic inflammation and oxidative stress are risk factors and play critical roles on pathogenesis development of several chronic diseases. Several studies showed that high consumption of fruits, vegetables and spices could decrease inflammatory cytokines and reduce reactive oxygen species which may help to reduce risk factors of some chronic diseases.

Objective: Assess anti-inflammatory and antioxidant activities of Thai fruit extract in LPS-stimulated PMA-induced U937 cells and H_2O_2-induced U937 cells

Method: The 90% ethanol extract from freeze-dry fruits were incubated PMA-induced U937 cells prior to stimulation with LPS. The culture media were collected to measure TNF-α, IL-6, IL-8 and MCP-1. Antioxidant activity of the fruit extract was evaluated by measured spontaneous and H_2O_2-induced ROS levels from U937 cells.

Result: The ethanol extraction of these fruits demonstrated different anti-inflammatory and antioxidant potencies in U937 cells. The results indicated that the extract from pomelo (thongdee variety) possessed the highest anti-inflammatory activity by decreasing levels of 3 inflammatory parameters following with pomelo (khawnumpheng), durian, guava and finally rambutan, respectively. The anti-inflammatory activity was not observed in papaya extract in this cell model. The extract from pomelo (thongdee) and guava (panseethong) had the highest antioxidant capacity by decreasing both spontaneous and H_2O_2-induced ROS while reduction of H_2O_2-induced ROS was observed from the extract of pomelo (khawnumpheng), guava (Kimju), durian (mhonthong), papaya (holland), papaya (khakdum) and durian (Chanee variety), respectively. Rambutan didn't show antioxidant activity in this cell model. Pomelo (thongdee variety) has the highest potency on anti-inflammatory and antioxidant activities.

Data showed that different fruits exerted on different targets. Thus, consumers should consume wide variety of fruits to reduce risk factors of chronic diseases. This *in vitro* cell model could be used as a screening tool for ranking potential items to further investigate in more complex system such as experiment animal or high risk chronic disease human population.

Key Words: Phytochemicals, Thai fruits, Anti-inflammation and Antioxidant

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	**i**
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	**ii**
สารบัญเรื่อง	**iii**
สารบัญตาราง	**vii**
สารบัญภาพ	**viii**
เนื้อหางานวิจัย	**1**
1. ความเป็นมาและความสำคัญของเรื่อง	**1**
2. วัตถุประสงค์	**5**
3. ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย	**5**
3.1. การเตรียมตัวอย่าง	7
3.2. การสกัดตัวอย่าง	7
3.3. การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ของมนุษย์ (U937 cell line)	8
3.3.1. การเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ U937	8
3.3.2 การเตรียมเซลล์แมคโครฟาจ	8
3.3.3 การนำเซลล์แมคโครฟาจไปทำการทดลอง	8
3.4. การทดสอบประสิทธิภาพต้านการอักเสบของสารสกัดจากผลไม้ไทยในเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นการอักเสบด้วย LPS	9
3.5. การทดสอบประสิทธิภาพการลดอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลไม้ในเซลล์โมโนไซต์	10
3.6. การทดสอบทางสถิติ	12
4. ผลการศึกษา	**13**
4.1. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากผลไม้ไทยในเซลล์แมคโครฟาจ	13
4.1.1. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากส้มโอในเซลล์แมคโครฟาจ	13
4.1.2. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากทุเรียนในเซลล์แมคโครฟาจ	16
4.1.3. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากฝรั่งในเซลล์แมคโครฟาจ	18

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.1.4. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากมะละกอในเซลล์แมคโครฟาจ	20
4.1.5. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากเงาะในเซลล์แมคโครฟาจ	22
4.1.6. เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากผลไม้ทั้ง 5 ชนิด	24
4.2. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากตัวอย่างผลไม้ต่อเซลล์แมคโครฟาจ (Cell viability) หลังการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดผลไม้	24
4.3. การศึกษาประสิทธิภาพในการลดอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลไม้	26
4.3.1. ผลของสารสกัดจากส้มโอต่อ spontaneous และ H_2O_2 induced ROS formation	26
4.3.2. ผลของสารสกัดจากทุเรียนต่อ spontaneous และ H_2O_2 induced ROS formation	27
4.3.3. ผลของสารสกัดจากฝรั่งต่อ spontaneous และ H_2O_2 induced ROS formation	30
4.3.4 ผลของสารสกัดจากมะละกอต่อ spontaneous และ H_2O_2 induced ROS formation	30
4.3.5 ผลของสารสกัดจากเงาะต่อ spontaneous และ H_2O_2 induced ROS formation	31
4.3.6. เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านการเกิดอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลไม้ทั้ง 5 ชนิด	35
4.4. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากตัวอย่างผลไม้ต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Cell viability) หลังการทดสอบฤทธิ์ลดอนุมูลอิสระ	35
5. อภิปรายผลการศึกษา	**39**
5.1. การเหนี่ยวนำให้เซลล์ U937 เกิดภาวะอักเสบ	39
5.2. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากผลไม้ต่อปริมาณ TNF-α, IL-6, IL-8 และ MCP-1 จากเซลล์ PMA-induced U937 ที่เหนี่ยวนำด้วย LPS	41
5.3. การเหนี่ยวนำให้เซลล์ U937 ให้เกิดภาวะ oxidative stress	46

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5.4. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากผลไม้ในการลดอนุมูลอิสระ	47
6. สรุปผลการวิจัย	**50**
บรรณานุกรม	**52**
ภาคผนวก1	**62**
ภาคผนวก2	**63**
ภาคผนวก3	**79**
ภาคผนวก4	**90**
ภาคผนวก5	**94**
เอกสารสำหรับการเผยแพร่	
ตารางเปรียบเทียบกิจกรรมตามแผน	

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบความสามารถของสารสกัดจากผลไม้ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในการลดปริมาณ TNF-α, IL-6, IL-8 และ MCP-1 24

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบร้อยละการมีชีวิต (% Cell viability) ของเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับสารสกัดจากตัวอย่างผลไม้ในแต่ละความเข้มข้นเลี้ยงร่วมกับ LPS 26

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบความสามารถของสารสกัดจากผลไม้ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในการลดปริมาณ spontaneous ROS และ H_2O_2- induced ROS 35

ตารางที่4 เปรียบเทียบร้อยละการมีชีวิต (% Cell viability) ของเซลล์โมโนไซต์ U937 ที่ได้รับสารสกัดจากตัวอย่างผลไม้ในแต่ละความเข้มข้น 37

ตารางที่5 เปรียบเทียบร้อยละการมีชีวิต (% Cell viability) ของเซลล์โมโนไซต์ U937 ที่ได้รับสารสกัดจากตัวอย่างผลไม้ในแต่ละความเข้มข้นเลี้ยงร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 38

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 แผนการดำเนินงานในการวิจัย 6

รูปที่ 2 ผลของสารสกัดจากส้มโอทองดี และขาวน้ำผึ้งต่อการหลั่งไซโตไคน์ และคีโมไคน์จากเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะอักเสบด้วย LPS 15

รูปที่ 3 ผลของสารสกัดจากทุเรียนหมอนทอง และชะนีต่อการหลั่งไซโตไคน์ และคีโมไคน์จากเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะอักเสบด้วย LPS 17

รูปที่ 4 ผลของสารสกัดจากฝรั่งแป้นสีทอง และ กิมจูต่อการหลั่งไซโตไคน์ และคีโมไคน์จากเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะอักเสบด้วย LPS 19

รูปที่ 5 ผลของสารสกัดจากมะละกอฮอลแลนด์ และ แขกดำต่อการหลั่งไซโตไคน์ และคีโมไคน์จากเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะอักเสบด้วย LPS 21

รูปที่6 ผลของสารสกัดจากเงาะพันธุ์สีชมพู และ โรงเรียนต่อการหลั่งไซโตไคน์ และคีโมไคน์จากเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะอักเสบด้วย LPS 23

รูปที่ 7 ผลของสารสกัดจากส้มโอทองดี และ ขาวน้ำผึ้งต่อปริมาณอนุมูลอิสระที่เกิดโดยธรรมชาติ (spontaneous ROS) ภายในเซลล์โมโนไซด์ U937 28

รูปที่8 ผลของสารสกัดจากส้มโอทองดี และ ขาวน้ำผึ้งต่อปริมาณอนุมูลอิสระที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2 induced ROS) 28

รูปที่ 9 ผลของสารสกัดจากทุเรียนหมอนทอง และ ชะนีต่อปริมาณอนุมูลอิสระที่เกิดโดยธรรมชาติ (spontaneous ROS) ภายในเซลล์โมโนไซด์ U937 29

รูปที่ 10 ผลของสารสกัดจากทุเรียนหมอนทอง และ ทุเรียนชะนีต่อปริมาณอนุมูลอิสระที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2 induced ROS) 29

รูปที่ 11 ผลของสารสกัดจากแป้นสีทอง และ กิมจูต่อปริมาณอนุมูลอิสระที่เกิดโดยธรรมชาติ (spontaneous ROS) ภายในเซลล์โมโนไซด์ U937 32

รูปที่ 12 ผลของสารสกัดจากฝรั่งแป้นสีทอง และ กิมจูต่อปริมาณอนุมูลอิสระที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2 induced ROS) 32

รูปที่ 13 ผลของสารสกัดจากมะละกอฮอลแลนด์ และ แขกดำต่อปริมาณอนุมูลอิสระที่เกิดโดยธรรมชาติ (spontaneous ROS) ภายในเซลล์โมโนไซด์ U937 33

รูปที่ 14 ผลของสารสกัดจากมะละกอฮอลแลนด์ และแขกดำต่อปริมาณอนุมูลอิสระที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2 induced ROS) 33

รูปที่ 15 ผลของสารสกัดจากเงาะสีชมพู และโรงเรียน ต่อปริมาณอนุมูลอิสระที่เกิดโดยธรรมชาติ (spontaneous ROS) ภายในเซลล์โมโนไซด์ U937 34

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 16 ผลของสารสกัดจากเงาะสีชมพู และ โรงเรียนต่อปริมาณอนุมูลอิสระที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2 induced ROS)	34

คำเต็มของอักษรย่อ

ANOVA	Analysis of variance
BMI	Body mass index
COX-2	Cyclooxygenase 2
DCFH-DA	2',7'-dichlorfluorescein-diacetate
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Erks	extracellular-signal-regulated kinases
H_2O_2	Hydrogen peroxide
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IL-6	Interleukin six
IL-8	Interleukin-8
iNOS	Inductible Nitric Oxide Synthase
JNKs	c-Jun N-terminal kinase
LBP	Lipopolysaccharide -binding protein
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar
MAPKs	mitogen-activated protein kinases
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
Met Syn	Metabolic Syndrome
mg	Milligram
ml	Milliliter
NAC	N-Acetyl-L-cysteine
NADPH oxidase	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
PBS	Phosphate buffer saline
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
Rfu	Relative fluorescent unit
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
SRB	Sulphorhodamine B
TLR-4	Toll-like receptor 4
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha

คำเต็มของอักษรย่อ (ต่อ)

VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
µg	Microgram
ng	Nanogram
µl	Microliter

เนื้อหางานวิจัย

1.ความเป็นมาและความสำคัญของเรื่อง

โรคไม่ติดต่อเรื้อรัง เช่น โรคเบาหวาน (Diabetes mellitus) โรคอ้วน (Obesity) โรคความดันโลหิตสูง (hypertension) โรคหลอดเลือดหัวใจแข็ง (atherosclerosis) และโรคมะเร็ง (cancer) นับเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของโลก สาเหตุสำคัญของการเกิดโรคดังกล่าวมาจากภาวะ Metabolic syndrome (MetSyn) ซึ่งมีกลุ่มอาการดังต่อไปนี้ 1) Abdominal obesity, 2) atherogenic dyslipidemia, 3) Raised blood pressure, 4) insulin resistance ± glucose intolerance, 5) proinflammation state และ 6) prothrombotic state (Grundy et al 2004) ซึ่งเกิดจากปัจจัยมากกว่าหนึ่งปัจจัยโดยเชื่อว่าเป็นผลมาจาก พันธุกรรม และ พฤติกรรมในการดำรงชีวิตของแต่ละคน (individual life style) ทั้งการบริโภคที่ไม่สมดุลย์ตามหลักโภชนาการ และขาดการออกกำลังกาย โดยอุบัติการณ์ของกลุ่มอาการ MetSyn มักมีความสัมพันธ์โดยตรงกับ obesity และอายุที่เพิ่มมากขึ้น

เนื่องจากโรคไม่ติดต่อเรื้อรังหลายโรคมีสาเหตุ และ มีพัฒนาการมาจากภาวะ MetSyn ซึ่งโรคดังกล่าวส่วนใหญ่ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ ต้องใช้เวลารักษายาวนาน อีกทั้งยาที่ใช้รักษาส่วนใหญ่มีราคาแพง ทำให้มีค่าใช้จ่ายในการรักษาสูง เป็นภาระหนักที่หลีกเลี่ยงไม่ได้ของภาครัฐ ดังนั้นการดำเนินกลยุทธ์ในเชิงป้องกัน (Prevention) จึงมีความสำคัญมากกว่าการรักษา เนื่องจากใช้งบประมาณน้อยกว่าการรักษาอย่างมาก โดยเฉพาะการใช้อาหารในการป้องกันเป็นกลยุทธ์ที่ใช้งบประมาณน้อย มีความปลอดภัยสูง เนื่องจากในชีวิตประจำวันเราต้องรับประทานอาหารอยู่แล้ววันละ 3 มื้อ อีกทั้งโรคไม่ติดต่อเรื้อรังดังกล่าวสาเหตุส่วนหนึ่งเกิดจากการบริโภคสารอาหารไม่สมดุลย์ และ ขาดการออกกำลังกาย มีข้อแนะนำว่าการควบคุมน้ำหนักให้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานกล่าวคือ BMI < 23 Kg/m^2 (ดัชนีมวลกาย) และมีการออกกำลังกายเป็นกิจวัตรประจำวัน เช่นการเดินเร็วๆอย่างน้อย 30 นาที ต่อวัน จะส่งผลทำให้ระดับไขมัน น้ำตาลในเลือด และ ความดันโลหิตอยู่ในระดับปกติ ซึ่งเป็นการลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรังดังกล่าวได้ นอกจากนี้การงดสิ่งเสพติดต่างๆ ไม่ว่าจะเป็น เครื่องดื่มของมึนเมา และบุหรี่ ซึ่งล้วนเป็นปัจจัยที่ส่งเสริมให้เกิดอนุมูลอิสระ(free radical) ทำให้เกิดภาวะขาดความสมดุลย์ของระดับอนุมูลอิสระ กับ ระดับสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants)ในเซลล์ และเนื้อเยื่อต่างๆ ส่งผลทำให้เซลล์เนื้อเยื่อในร่างกายเกิดภาวะ oxidative stress ทำให้ผนังเซลล์ (cell membrane), สารพันธุกรรม (DNA), โปรตีน (protein) และไขมัน (lipid) ถูก oxidized (Valko et al 2007) สูญเสียคุณสมบัติทางธรรมชาติซึ่งเป็นโทษต่อร่างกายโดยรวม เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรังได้ในที่สุด นอกจากภาวะ oxidative stress แล้ว ภาวะการอักเสบเรื้อรังก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่พบว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรังหลายโรคเช่นกัน โดยในขณะเกิดกระบวนการอักเสบเซลล์เม็ดเลือดขาวพวก neutrophil และ monocyte/macrophage จะถูกเหนี่ยวนำให้มีการเคลื่อนย้ายมายังบริเวณที่มีสิ่งแปลกปลอมหรือบริเวณที่เนื้อเยื่อถูกทำลาย พร้อมกับมีการหลั่งสารจำพวก pro-inflammatory cytokines, chemokines, enzymes และ coagulation proteins ออกมาเพื่อกำจัดสิ่ง

แปลกปลอม และ เพื่อช่วยซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายให้เข้าสู่สภาวะปกติ นอกจากเม็ดเลือดขาวซึ่งเป็น professional immune cells แล้ว เซลล์ในร่างกายอีกหลายชนิด เช่น epithelium จากหลายอวัยวะ ก็สามารถหลั่งสารจำพวก pro-inflammatory mediators ดังกล่าวได้เมื่อถูกกระตุ้นจากตัวกระตุ้น (stimulators) ในสภาวะที่ร่างกายถูกกระตุ้นและเกิดกระบวนการอักเสบแบบเฉียบพลัน (acute inflammation) ร่างกายจะตอบสนองต่อตัวกระตุ้นนั้นๆโดยใช้เวลาช่วงสั้นๆรวดเร็วและในที่สุดร่างกายจะสามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย และ สามารถปรับตัวเข้าสู่ภาวะปกติได้ อย่างไรก็ตามถ้าร่างกายเกิดพยาธิสภาพบางอย่างซึ่งทำให้สูญเสียการควบคุมกระบวนการดังกล่าวจะทำให้เกิดสภาวะการอักเสบแบบเรื้อรังขึ้นซึ่งสภาวะดังกล่าวนั้นได้มีการพิสูจน์พบว่ามีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคหลายชนิดโดยเฉพาะโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง (Non-communicable chronic diseases) เช่น โรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว (atherosclerosis) โรคหัวใจ (cardiovascular diseases) (Puntmann et al 2011, Ross 1999)โรคมะเร็ง (cancer) เบาหวาน (diabetes) โรคไขข้ออักเสบ (arthritis) และโรคแพ้ภูมิตนเอง (autoimmune diseases) (Aggarwal and Shishodia 2004) โดยพบว่าการเกิดพยาธิสภาพ และ ความรุนแรงของโรคไม่ติดต่อเรื้อรังเหล่านี้เกิดจากบทบาทของสาร pro-inflammatory cytokines เช่น TNF-α, IL-6 chemokines เช่น IL-8, MCP-1 adhesion molecules เช่น ICAM-1, VCAM-1 และ pro-inflammatory enzymes เช่น inducible nitric oxide synthase (iNOS) และ cyclooxygenase-2 (COX-2) เป็นต้น ซึ่งสารเคมีเหล่านี้หลั่งจากเซลล์เม็ดเลือดขาว และ เซลล์อื่นๆเพื่อทำหน้าที่ตอบสนองต่อตัวกระตุ้นในกระบวนการดังกล่าว นอกจากหลั่งสาร pro-inflammatory mediators ดังกล่าวแล้ว เซลล์เม็ดเลือดขาวยังผลิตอนุมูลอิสสระพวก Reactive Oxygen Species (ROS) Reactive Nitrogen Species (RNS) ในขณะเกิดกระบวนการอักเสบ (Aggarwal et al 2006) โดยสรุปแล้วทั้งสภาวะการอักเสบชนิดเรื้อรัง (chronic inflammation) และ การเกิดอนุมูลอิสระในปริมาณที่ไม่สมดุลย์ เป็นภาวะเสี่ยงต่อการชักนำไปสู่การเกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรังดังกล่าว

การเลือกรับประทานอาหารที่ถูกต้องและพอเหมาะตามหลักโภชนาการโดยเฉพาะอย่างยิ่ง การเพิ่มการบริโภคผักและผลไม้ในปริมาณที่มากพอพบว่าสามารถลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรังหลายโรคได้ (Block et al 1992, Reddy et al 2003, Steinmetz and Potter 1996) เนื่องจากผักและผลไม้ นอกจากอุดมไปด้วยสารอาหาร และ ใยอาหารแล้ว ยังเป็นแหล่งสะสมของสารพฤกษเคมีสำคัญ (bioactive compounds or phytochemicals) หลากหลายชนิด ซึ่งมีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์มากมายพบว่าสารเหล่านี้ออกฤทธิ์ในการป้องกันหรือลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรังต่างๆได้ สารกลุ่มใหญ่ที่สำคัญได้แก่สารกลุ่มกรดฟินอลลิค (phenolic acid) สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) สารกลุ่มคาโรทีนอยด์ (carotenoids) สเตอรอล (plant sterols) และ สารกลุ่มออกอโนซัลเฟอร์ (organosulfur compounds) เป็นต้น สารพฤกษเคมีในพืชหลากหลายชนิดได้รับความสนใจและมีการศึกษาวิจัยกันอย่างกว้างขวางเนื่องจากคุณสมบัติที่ตรวจพบทั้งในหลอดทดลองและสัตว์ทดลองพบว่ามีฤทธิ์ช่วยลดการอักเสบ ต้านการเกิดอนุมูลอิสระ และ ป้องกันการเกิดมะเร็ง เป็นต้น (Liu 2004) Pan และคณะ (2010) ได้รวบรวมงานวิจัยต่างๆ ที่

กล่าวถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารพฤกษเคมีกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบมากในพืชผัก และ ผลไม้ต่อการลดตัวชี้วัดภาวะอักเสบเรื้อรังซึ่งเป็นปัจจัยส่งเสริม หรือ เป็นสาเหตุของการเกิดพยาธิสภาพของโรคไม่ติดเรื้อรังต่างๆ เช่น โรคหัวใจ โรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ โรคมะเร็ง โรคที่มีสาเหตุจากความอ้วน โรคข้ออักเสบ โรคลำไส้อักเสบ เป็นต้น

จากจุดแข็งที่ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมมีภูมิอากาศร้อนชื้นเหมาะต่อการเจริญเติบโตของพันธุ์พืชหลากหลายชนิด (Biodiversity) จึงมีความได้เปรียบด้านวัตถุดิบ โดยเฉพาะพืชผัก เครื่องเทศต่างๆ และ ผลไม้นานาชนิด ประเทศไทยมีผลไม้หลากหลายชนิดมาก มีทั้งชนิดที่ออกผลผลิตทั้งปี และ ออกตามฤดูกาล ผลไม้ไทยมีรสชาตดี หลายชนิดเป็นที่นิยมของต่างชาติ เป็นสินค้าส่งออกที่ทำรายได้มหาศาล นอกจากรสชาตดีแล้วผลไม้เหล่านั้นเป็นแหล่งของสารอาหารมากมาย และ สารพฤกษเคมี (phytochemicals) มากมายหลายชนิดโดยเฉพาะผลไม้ที่มีสีสันเป็นแหล่งสะสมของสารสำคัญดังกล่าวซึ่งมีบทบาทมากในการส่งเสริมสุขภาพ และ การรับประทานผลไม้ที่อุดมไปด้วยสารเหล่านี้ในปริมาณที่พอเหมาะน่าจะช่วยป้องกันการเกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรังต่างๆ ดังกล่าวได้

มะละกอมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Carica papaya* เป็นไม้ผลที่ให้ผลผลิตเร็ว ให้ผลได้ตลอดทั้งปี เหมาะสำหรับการทำการเกษตรเพื่อเป็นธุรกิจหรือปลูกเพื่อบริโภคโดยทั่วไป รับประทานได้ทั้งผลดิบและผลสุก มะละกอสุกนิยมรับประทานในรูปผลไม้สด มีรสชาติหวานหอม มีสารเบต้าแคโรทีนซึ่งเป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอในปริมาณสูง มะละกอสุกมีสรรพคุณช่วยบำรุงและทำให้ผิวพรรณดี ช่วยชะลอความแก่และชะลอการเกิดริ้วรอยก่อนวัย ช่วยบำรุงอวัยวะต่างๆ ภายในร่างกาย บำรุงโลหิต บำรุงระบบประสาท บำรุงสายตา และช่วยให้ระบบขับถ่ายทำงานได้ดี แก้ท้องผูก ป้องกันโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ นอกจากนี้ในมะละกอสุกยังพบสารพฤกษเคมีที่สำคัญอื่นๆอีกหลายชนิด เช่น ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) และ กลุ่มกรดฟีนอลลิค (phenolic acid) (Kongkachuichai et al 2010) ซึ่งสารดังกล่าวมีฤทธิ์ในการต้านการเกิดการอักเสบ ป้องกันการเกิดมะเร็ง การเกิดเนื้องอก และ ต้านการเกิดอนุมูลอิสระ (Liu 2004, Yokomizo and Moriwaki 2006) นอกจากสารดังกล่าวแล้ว ผลมะละกอสุกยังมีสารกลุ่ม isothiocyanate (Rossetto et al 2008) ซึ่งมีฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็ง (Nakamura 2009) ข้อมูลการศึกษาในสัตว์ทดลองยังพบว่าหนูที่ได้รับน้ำมะละกอสุกสามารถลดการเกิด lipid peroxidation ในเลือดได้ประมาณ 30-40% (Mehdipour et al 2006) และ จากการศึกษาโดยการสำรวจประสิทธิภาพของสารสกัดจากผลไม้ในตลาดของประเทศสิงคโปร์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีทางเคมีพบว่า สารสกัดจากมะละกอสุกมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีมาก (Leong and Shui 2002) นอกจากนี้ข้อมูลในหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย streptocotozin เมื่อได้รับสารสกัดจากผลมะละกอสุกสามารถลดขนาดของแผลได้ดีกว่าหนูกลุ่มควบคุม (Nayak et al 2007) ข้อมูลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสำคัญในมะละกอน่าจะมีส่วนช่วยในการสมานแผล ลดพยาธิสภาพของการอักเสบ อย่างไรก็ตามยังไม่ได้มีการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดดังกล่าว

ส้มโอมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Citrus maxima* Merr. เป็นไม้ผลตระกูลส้มที่สามารถปลูกและเจริญเติบโตได้ดีในทุกภูมิภาคของประเทศไทย ส้มโอนิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายทั้งในและต่างประเทศ

จึงเป็นผลไม้ส่งออกที่สำคัญของไทยชนิดหนึ่ง เนื้อส้มโอโดยทั่วไปมีรสชาติหวานหรือหวานอมเปรี้ยว มีวิตามินซีในปริมาณสูง และมีสารออกฤทธิ์สำคัญหลายชนิด ได้แก่ สารคาโรทีนอยด์ กรดฟีนอลิก ไลโคปีน แอนโธรไซยานิน และ สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ซึ่งมีคุณสมบัติในการลดการอักเสบ ต้านการเกิดอนุมูลอิสระ ต้านมะเร็ง และ รักษาโรคหัวใจ (Benavente-Garcia and Castillo 2008) จากการศึกษาของ Choi และ คณะ (2007) พบว่าสารสกัดจากเปลือกของ citrus fruit สามารถยับยั้งการแสดงออกของ NF-ĸB (activation) ซึ่งเป็น transcription factor ที่ควบคุมการแสดงออกของยีนส์มากกว่า 200 ชนิดรวมทั้งยีนส์ในกลุ่ม pro-inflammatory mediators ด้วย นอกจากนี้เปลือกของ citrus fruit ยังสามารถลดการเกิด ROS จากเซลล์ macrophage ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPSได้ดีมากเช่นกัน ล่าสุด Benavente-Garcia และ Castillo (2008) พบว่า ฟลาโวนอยด์ในกลุ่ม citrus ทำให้เส้นเลือดหัวใจขยายตัวได้ดีขึ้น ช่วยลดการแข็งตัวของเลือดจากเกล็ดเลือด และลดการเกิด oxidized-LDL นอกจากนี้ฟลาโวนอยด์ใน citrus ยังมีฤทธิ์ลดการอักเสบโดยลดการสังเคราะห์ arachidonic acid derivatives เช่น prostaglandins E2, F2, และ thromboxane A2 อีกทั้งสารสำคัญต่างๆในกลุ่ม citrus หลายชนิดมีฤทธิ์ในการลดอนุมูลอิสระสูงมากเช่นกัน

ฝรั่ง (*Psidium guajava* Linn.) ผลเป็นส่วนที่นิยมรับประทานสด ซึ่งอุดมไปด้วยวิตามิน โดยเฉพาะวิตามินซีพบมากที่เปลือก และ สารพฤกษเคมีที่สำคัญ เช่น β-carotene, lycopene, phenolic acids และ flavonoids (Oliveira et al 2010) นอกจากนี้สารสกัดจากผลยังมี essential oil หลายชนิด (Gutierrez et al 2008) สารพฤกษเคมีดังกล่าวหลายชนิดมีการศึกษาพบว่าช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง เนื่องจากสารพฤกษเคมีดังกล่าวออกฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ลดความดันโลหิต และ ลดการเกิดอนุมูลอิสระ (Gutierrez et al 2008) และ จากการศึกษาโดยการทดสอบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากฝรั่งด้วยวิธีทางเคมี (ABTS, DPPH, FRAP และ ORAC) พบว่า สารสกัดจากฝรั่งนั้นมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธีดังกล่าวทั้ง 4 วิธี (Thaipong et al 2006) และจากการศึกษาทางเภสัชวิทยาพบว่าสารสกัดจากฝรั่งมีประสิทธิภาพในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูที่ถูกกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานได้ดี (Rai et al 2009).

ทุเรียน (*Durio zibethinus* Linn.) เป็นผลไม้ที่มีรสชาติกลมกล่อม ถึงแม้จะมีกลิ่นค่อนข้างรุนแรง เป็นผลไม้ที่มีชื่อเสียงชนิดหนึ่งของไทย นิยมรับประทานทั้งในประเทศ และ ต่างประเทศโดยเฉพาะชาวเอเชีย เช่น จีน ไต้หวัน สิงคโปร์ และ มาเลเซีย เป็นต้น เนื้อทุเรียนมีสีเหลืองพบสารพฤกษเคมีในกลุ่ม carotenoids และ polyphenol เช่น flavonoids (Haruenkit et al 2007, Kongkachuichai et al 2010) ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง (antioxidant) ทั้งในหลอดทดลอง และ สัตว์ทดลอง (Haruenkit et al 2007, Leontowicz et al 2007, Toledo et al 2008).

เงาะ (*Nephelium lappaccum* Linn) เป็นผลไม้ที่มีชื่อเสียงอีกชนิดหนึ่งของไทย โดยสายพันธุ์ที่นิยมมากที่สุดคือ เงาะโรงเรียน เนื้อมีสีขาว รสหอมหวาน ข้อมูลการศึกษาการออกฤทธิ์มีเฉพาะจากเปลือก ใบ

และ เม็ด ซึ่งไม่ใช่ส่วนที่เรานำมารับประทาน มีเพียงการศึกษาเดียวที่วิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเนื้อเงาะ (เจริญศิริ และ คงคาฉุยฉาย, 2551)

จากข้อมูลที่ได้รายงานดังกล่าวจะเห็นว่า มะละกอ ส้มโอ ฝรั่ง ทุเรียน และ เงาะ นั้นอุดมไปด้วยสารอาหาร และ สารที่มิใช่อาหาร เช่นสารพฤษเคมีหลากหลายชนิด ซึ่งได้มีการศึกษาในเชิงวิทยาศาสตร์อยู่บ้าง ในแง่ฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น antioxidant capacity โดยวิธีทางเคมี อย่างไรก็ตามการศึกษาประสิทธิภาพในการลดตัวชี้วัดภาวะการอักเสบ และ ลดปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ซึ่งจะเป็นตัวชี้วัดประสิทธิภาพทางชีวภาพได้ดีกว่าทางเคมีนั้นมีข้อมูลค่อนข้างจำกัด ดังนั้นผู้วิจัยจึงเล็งเห็นความจำเป็นในการศึกษาประสิทธิภาพของผลไม้ดังกล่าวในการลดตัวชี้วัดภาวะการอักเสบ และ ลดอนุมูลอิสระในเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ชนิดโมโนไซต์ที่เหนี่ยวนำด้วยไลโปโปลีแซคคาไรด์ของสารสกัดจากมะละกอ ส้มโอ ฝรั่ง ทุเรียน และ เงาะ ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงของโรคไม่ติดต่อเรื้อรังหลายชนิดดังกล่าวมาแล้ว

2. วัตถุประสงค์

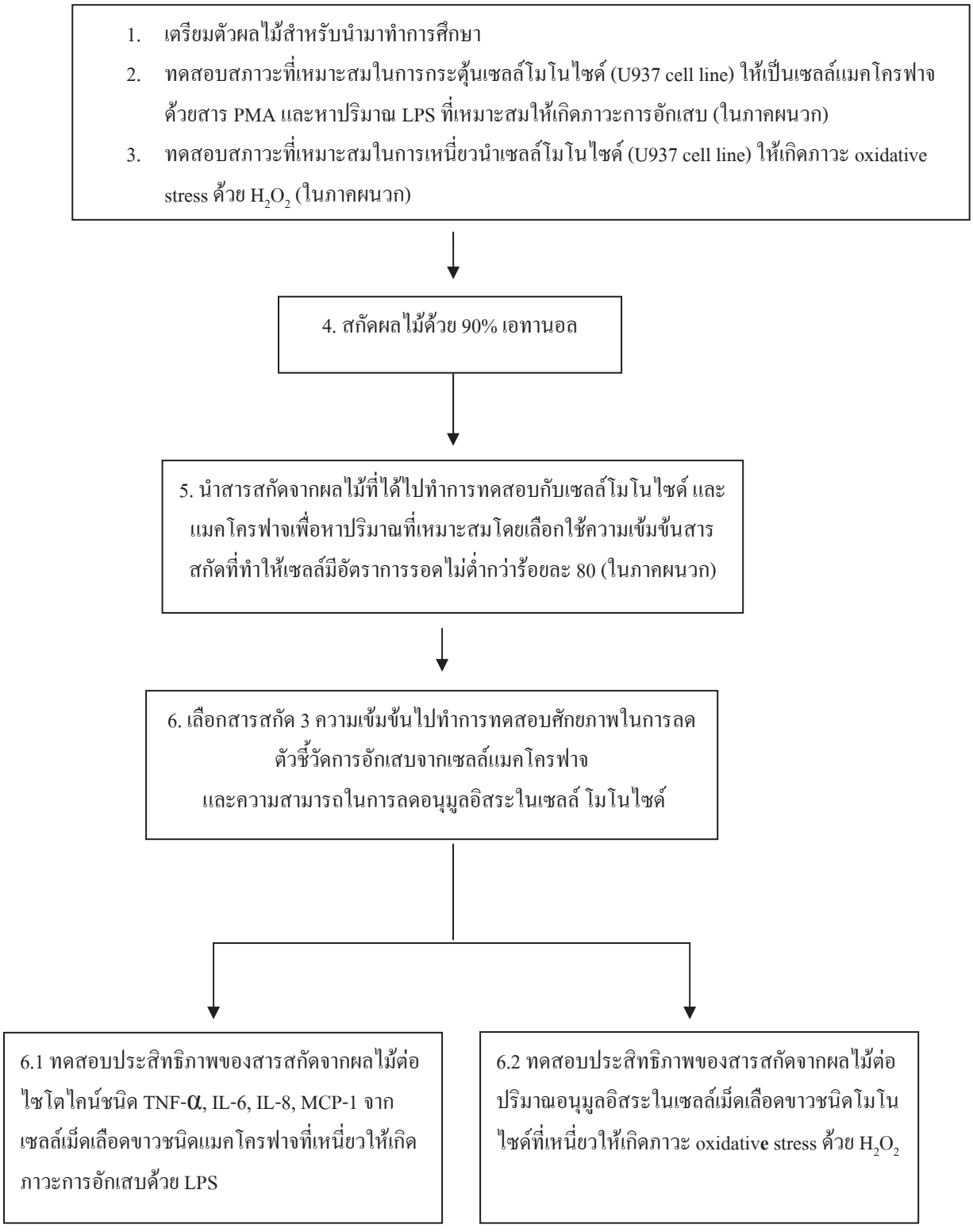
1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ลดการอักเสบ ของสารสกัดจากมะละกอ ส้มโอ ฝรั่ง ทุเรียน และ เงาะ ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ชนิดโมโนไซต์หลังจากถูกกระตุ้นให้เป็นเซลล์แมคโครฟาจด้วยสาร Phorbol Myristate Acetate (PMA) และเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วยไลโปโปลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide; LPS)

2.ประสิทธิภาพของสารสกัดจากมะละกอ ส้มโอ ฝรั่ง ทุเรียน และ เงาะในการลดอนุมูลอิสระในเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ชนิดโมโนไซต์ที่เหนี่ยวนำให้เกิด Oxidative stress ด้วย ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

3. ขั้นตอนดำเนินการวิจัย

1. การศึกษาประสิทธิภาพในการลดตัวชี้วัดการอักเสบ ดำเนินการวิจัยโดยเลี้ยงเม็ดเลือดขาวของมนุษย์ชนิดโมโนไซต์ (U937 cell line) หลังจากถูกกระตุ้นให้มีคุณสมบัติเป็นเซลล์แมคโครฟาจด้วยสาร Phorbol Myristate Acetate (PMA) และ เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะการอักเสบด้วยสารไลโปโปลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide or LPS) กับสารสกัดจากมะละกอ ส้มโอ ฝรั่ง เงาะ และ ทุเรียน หลังจากนั้นวัดระดับไซโตไคน์ TNF-α, IL-6, IL-8, MCP-1

2. การศึกษาความสามารถในการลดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ดำเนินการวิจัยโดยเลี้ยงเม็ดเลือดขาวของมนุษย์ชนิดโมโนไซต์ (U937 cell line) ที่เหนี่ยวนำให้เกิด oxidative stress ด้วย H_2O_2 กับสารสกัดจากผลไม้ทั้ง 5 ชนิด หลังจากนั้นนำเซลล์ดังกล่าวมาวัดปริมาณ fluorescent signal ซึ่งแปรผันตามปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ดังแผนการดำเนินงานในการทำการวิจัยในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แผนการดำเนินงานในการวิจัย

การทดลองประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

3.1 การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างผลไม้มีทั้งหมด 5 ชนิด ชนิดละ 2 สายพันธุ์ คือ

1. มะละกอสุก 2 สายพันธุ์ (แขกดำ และ ฮอลแลนด์)
2. ส้มโอ 2 สายพันธุ์ (ทองดี และขาวน้ำผึ้ง)
3. ฝรั่ง 2 สายพันธุ์ (กิมจู และแป้นสีทอง)
4. เงาะ 2 สายพันธุ์ (โรงเรียน และ สีชมพู)
5. ทุเรียน 2 สายพันธุ์ (หมอนทอง และ ชะนี)

ตัวอย่างผลไม้ทั้งหมดซื้อจากตลาดศาลายา ตลาดมหานาค ตลาดท่าน้ำนนทบุรี ยกเว้น ทุเรียนบางตัวอย่างซื้อจากจันทบุรี นำมารวมกันเพื่อให้เกิดความหลากหลายของแหล่งผลิตของผลไม้แต่ละชนิด แยกส่วนที่กินได้ หาร้อยละของส่วนที่กินได้ เพื่อเปรียบเทียบกับหน่วยบริโภค เตรียมเป็น lot เดียว และ ทำให้แห้งโดย Freeze dry แบ่งเก็บในซอง aluminum foil ป้องกันแสง โดยใส่เพียง 2 กรัมต่อซอง vacuum ป้องกันการ oxidized และ เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำออกมาทดสอบ เมื่อนำออกมาใช้แล้วจะใช้เพียงครั้งเดียว ไม่ใช้ซ้ำ

3.2 การสกัดสารตัวอย่าง

การเตรียมสารสกัดผลไม้มีขั้นตอนดังนี้ สกัดผงผลไม้แห้ง 1.0 กรัม ด้วย 90% เอธานอล 30 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่าสารละลาย 2 นาที นำไป sonicate อีก 10 นาที เขย่าอย่างแรงอีกครั้งด้วยเครื่องเขย่าสารละลาย 2 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 7500 รอบต่อนาที 25 องศาเซลเซียส 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่ขวดก้นกลมสีชา นำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ (Rotary Evaporator) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส จนกระทั่งแห้งสนิท

ละลายกลับด้วย basal media phenol red-free สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ หรือละลายกลับด้วย complete media phenol red free สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ได้สารสกัดผลไม้ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.4 กรัมต่อมิลลิลิตร กรองสารสกัดผ่านหัวกรองขนาด 0.2 ไมครอน เพื่อทำให้ปลอดเชื้อก่อนนำไปใช้

3.3 การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ของมนุษย์ (U937 cell line)

เซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ของมนุษย์ (U937) ซื้อจาก ATCC เป็นเซลล์ประเภทลอยตัวในอาหารเลี้ยงเซลล์ (Suspended cell line) มีคุณสมบัติเป็นเซลล์โมโนไซต์ ในการทดสอบประสิทธิภาพในการลดการอักเสบต้องเหนี่ยวนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติ (differentiation) เป็นเซลล์แมคโครฟาจก่อน ในการศึกษานี้ใช้สาร Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Wiederholt et al 1988) เป็นตัวเหนี่ยวนำก่อนนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการต้านการอักเสบของสารสกัดจากผลไม้ที่เราสนใจ

3.3.1 การเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ U937

อาหารเลี้ยงเซลล์ (Complete medium) ประกอบด้วย Basal RPMI-1640 (Sigma; R6504), โซเดียมไบคาร์บอเนต 2 กรัมต่อลิตร, fetal bovine serum 10%, penicillin 100,000 ยูนิตต่อลิตร streptomycin 0.1 กรัมต่อลิตร ใช้ขวดสำหรับเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ตารางเซ็นติเมตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ควบคุมความหนาแน่นของเซลล์ให้อยู่ในช่วง $2x10^5$-$2x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน

3.3.2 การเตรียมเซลล์แมคโครฟาจ

การกระตุ้นเซลล์โมโนไซต์ให้กลายเป็นเซลล์แมคโครฟาจ (Hosoya and Marunouchi 1992, Sokol et al 1987) มีขั้นตอนดังนี้

1. เลี้ยงเซลล์ U937 ใน tissue culture flask ขนาด 75 ตารางเซนติเมตรให้ได้ความหนาแน่นประมาณ 1.5-1.8 $x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดูดเซลล์ใส่หลอดขนาด 15 มิลลิลิตร ปั่นที่ 1500 รอบต่อนาที 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง
2. ล้างเซลล์ด้วย Basal media 10 มิลลิลิตร ปั่นเก็บเซลล์ที่ 1200 รอบต่อนาที 5 นาที อุณหภูมิห้อง ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง ปรับให้เซลล์มีความหนาแน่น 1 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วย Complete media ใส่เซลล์ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงใน tissue culture flask ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร
3. ใส่ PMA ให้มีความเข้มข้นสุทธิ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อกระตุ้นให้เซลล์กลายเป็นแมคโครฟาจ
4. เมื่อครบเวลา เซลล์จะลงไปเกาะที่ผิวขวด (Hosoya and Marunouchi 1992) ดูดสารละลายทั้งหมดในขวดเลี้ยงเซลล์ทิ้งไป จากนั้นเติม complete media 15 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5% ต่ออีก 24 ชั่วโมง จะได้เซลล์แมคโครฟาจที่พร้อมทำการทดสอบประสิทธิภาพในการลดการอักเสบ **(ซึ่งเราทดสอบคุณสมบัติการเป็นแมคโครฟาจโดยนำเซลล์ก่อนใส่ PMA และ หลังใส่ PMA โดยเอาเฉพาะ attached cells ไปย้อมด้วย anti-CD11b (Ji 2012) ซึ่งเป็น marker ของเซลล์แมคโครฟาจและวิเคราะห์ด้วย Flow cytometer ผลการศึกษาอยู่ในภาคผนวก)**
5. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก เติมเอนไซม์ทริปซิน ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำให้เซลล์หลุดออกจากพื้นพลาสติก ใส่ Fresh complete media ลงไป 7.5 มิลลิลิตร เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ ปั่นเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ออกที่ 1200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
6. ปรับเซลล์ให้มีความหนาแน่น 1 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรั่ม และไม่มี phenol red (Basal media phenol red-free) ใส่เซลล์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรต่อหลุม ใน 24 well plate เพื่อทำการทดสอบ

3.4 การทดสอบประสิทธิภาพต้านการอักเสบของสารสกัดจากผลไม้ไทยในเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นการอักเสบด้วย LPS

รายละเอียดขั้นตอนการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการกระตุ้นเซลล์โมโนไซต์ให้เป็นเซลล์แมคโครฟาจและ หาปริมาณ LPS ที่เหมาะสมให้เกิดภาวะการอักเสบอยู่ในภาคผนวก 2

เตรียมสกัดสารจากตัวอย่างตามข้อ 3.2 ซึ่งจะได้สารสกัดผลไม้ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.4 กรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำการเจือจางโดยใช้ basal RPMI phenol red- free เป็นตัวทำละลาย ซึ่งความเข้มข้นสุทธิที่ใช้ทดสอบคือ 0.2, 0.1 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมเซลล์แมคโครฟาจตามข้อ 3.3.2 ปรับเซลล์ให้มีความหนาแน่น 1 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรั่ม และไม่มี phenol red (Basal media phenol red-free) ใส่เซลล์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรต่อหลุม ใน 24 well plate เลี้ยงร่วมกับสารสกัดผลไม้ที่ความเข้มข้นสุทธิ 0.2, 0.1 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนกระตุ้นด้วย LPS ที่ความเข้มข้นสุทธิ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเลี้ยงเซลล์ต่ออีก 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ส่วนบนมาวิเคราะห์หาตัวชี้วัดการอักเสบ ได้แก่ TNF-α, IL-6, IL-8 และ MCP-1 ด้วยวิธี ELISA (วิธีอยู่ในภาคผนวก) ในการทดสอบนี้จะใช้ N-acetyl-L-cysteine (NAC) ความเข้มข้นสุทธิ 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติลดความเครียดของเซลล์จากสภาวะ oxidative stress และ ลดการอักเสบเป็นสารมาตรฐานในการทดลองร่วมด้วยทุกครั้ง (Geiler et al 2010, Kröger et al 1999, Sung et al 2012) แบ่งเซลล์ที่ทำการทดลองเป็น 8 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่	LPS (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	สารที่ใช้ทดสอบ
1	-	Basal media phenol red-free
2	-	10 มิลลิโมลาร์ NAC
3	-	สารสกัดผลไม้ความเข้มข้นสุทธิ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
4	+	Basal media phenol red-free
5	+	10 มิลลิโมลาร์ NAC
6	+	สารสกัดผลไม้ความเข้มข้นสุทธิ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
7	+	สารสกัดผลไม้ความเข้มข้นสุทธิ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
8	+	สารสกัดผลไม้ความเข้มข้นสุทธิ 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี resazurin

ทดสอบการตายของเซลล์โดย resazurin assay หลักการของการใช้สี resazurin ในการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์คือการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ภายในเซลล์ที่ยังมีชีวิต ซึ่งจะออกซิไดซ์สี resazurin จากสีน้ำเงินเป็นสีชมพูเข้ม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร โดยใช้ความยาวคลื่นที่ 600 นาโนเมตร เป็นค่าอ้างอิง ความเข้มสีชมพูที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับเซลล์ที่มีชีวิต การคำนวณอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ ใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากกลุ่มควบคุมลบ (negative control) คิดเป็น 100 เปอร์เซนต์ และ เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทดสอบแต่ละกลุ่มกับกลุ่มควบคุมลบ คิดเป็นร้อยละ ส่วนขั้นตอนการทดสอบมีดังนี้

หลังจากเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์มาวิเคราะห์ไซโตไคน์แล้ว ใส่สี resazurin ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปหลุมละ 50 ไมโครลิตร แล้วเลี้ยงต่อ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เปลี่ยนสี resazurin จากนั้นดูดสารละลายมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรโดยใช้ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เป็นค่าอ้างอิง

3.5 การทดสอบประสิทธิภาพการลดอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลไม้ในเซลล์โมโนไซต์

รายละเอียดขั้นตอนการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำเซลล์โมโนไซต์ให้เกิดภาวะ Oxidative stress อยู่ในภาคผนวก 3

1.ใช้เซลล์ U937 ที่เลี้ยงจนได้ confluent ประมาณ 1.5-1.8 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปรับเซลล์ให้มีความเข้มข้น 2 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตรด้วย complete RPMI phenol red free media เลี้ยงเซลล์โมโนไซต์ U937 ใน 6 well plate หลุมละ 1 มิลลิลิตร ร่วมกับสารสกัดผลไม้หลุมละ 1 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นสุทธิ 40, 20 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนกลุ่มควบคุมบวกให้ใส่ NAC ที่เตรียมไว้ลงไป 1 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นสุทธิ 10 มิลลิโมลาร์ และใส่ complete media phenol red free 1 มิลลิลิตร สำหรับกลุ่มควบคุมลบ บ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่ 37 ° C (pre-treatment)

2. ย้ายเซลล์ใส่หลอดขนาด 2 มิลลิลิตร ปั่นที่ 1500 รอบ เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง ปั่นล้างเซลล์อีกครั้งด้วย basal media phenol red free 2 มิลลิลิตร ดูดสารละลายส่วนบนทิ้งใส่ DCFH-DA ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ลงไปหลอดละ 2 มิลลิลิตร ดูดขึ้นลงด้วยไปเปตต์ให้เซลล์กระจายตัวดี

3. ย้ายเซลล์ลงในถาดเลี้ยงเซลล์ 6 well plate บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 30 นาที

4. ย้ายเซลล์ใส่หลอดขนาด 2 มิลลิลิตร ปั่นที่ 1500 รอบ เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง ปั่นล้างเซลล์อีกครั้งด้วย basal media phenol red free 2 มิลลิลิตร ดูดสารละลายส่วนบนทิ้งปรับเซลล์ให้มีความหนาแน่น 2 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วย complete media phenol red free

5. ใส่เซลล์ในข้อ 4 หลุมละ 50 ไมโครลิตรลงใน 96 well black plate สำหรับวัดฟลูออเรสเซนต์ โดยใส่ลงไป 3 หลุม (triplicate) สำหรับแต่ละ treatment

6. ใส่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เตรียมไว้ลงไปหลุมละ 50 ไมโครลิตร ให้ได้ความเข้มข้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สุทธิ 400 ไมโครโมลาร์ สำหรับกลุ่มควบคุมลบให้ใส่ basal media phenol red free ลงไปหลุมละ 50 ไมโครลิตร วัดค่าฟลูออเรสเซนต์ ที่ excitation 485 nm, emission 530 nm ที่เวลา 20 นาที

ในการทดสอบนี้จะใช้ N-acetyl-L-cysteine (NAC) ความเข้มข้นสุทธิ 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติลดความเครียดของเซลล์จากสภาวะ oxidative stress และ ต้านการอักเสบเป็นสารมาตรฐาน (positive control) ในการทดลองร่วมด้วยทุกครั้ง จากนั้นทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี SRB assay แบ่งเซลล์ที่ทำการทดลองเป็น 10 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่	H_2O_2 (400 µM)	สารที่ใช้ทดสอบ
1	-	Basal media phenol red-free
2	-	10 มิลลิโมลาร์ NAC
3	-	สารสกัดผลไม้ความเข้มข้นสุทธิ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
4	-	สารสกัดผลไม้ความเข้มข้นสุทธิ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
5	-	สารสกัดผลไม้ความเข้มข้นสุทธิ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
6	+	Basal media phenol red-free
7	+	10 มิลลิโมลาร์ NAC
8	+	สารสกัดผลไม้ความเข้มข้นสุทธิ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
9	+	สารสกัดผลไม้ความเข้มข้นสุทธิ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
10	+	สารสกัดผลไม้ความเข้มข้นสุทธิ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ในการรายงานผลจะรายงานผลเป็น % inhibition of spontaneous ROS และ % inhibition of H_2O_2 induced ROS ซึ่งจะทำการคำนวณดังนี้

$$\textbf{\% inhibition of spontaneous ROS formation} = \frac{\textbf{(ROS without extract – ROS with extract) x 100}}{\textbf{ROS without extract}}$$

$$\textbf{\% inhibition of } \mathbf{H_2O_2} \textbf{ induced ROS formation} = \frac{\textbf{(ROS without extract – ROS with extract) x 100}}{\textbf{ROS without extract}}$$

การวัดอัตราการตายของเซลล์ด้วยวิธี SRB assay

1. หลังจากทำการทดสอบแล้ว ดูดสารละลายในถาดเลี้ยงเซลล์ออกทั้งหมดด้วย multichannel pipette ใส่ PBS (แช่เย็น) ลงไปหลุมละ 100 ไมโครลิตร

2. ใส่ 50% Trichloroacetic acid (แช่เย็น) ลงไปหลุมละ 20 ไมโครลิตรแช่ถาดเลี้ยงเซลล์ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งสารละลายในถาด ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 รอบ ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

3. ใส่ 0.4% sulforhodamine B ที่อยู่ใน 1%acetic acid ลงไปหลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อย้อมโปรตีนภายในเซลล์ เขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

4. ล้างสีส่วนเกินด้วย 1%acetic acid 4 รอบ ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องละลายสีกลับด้วย Tris-base ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม เขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ย้ายสารละลายที่ได้ไปยังถาดหลุมใสขนาด 96 หลุม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 565 นาโนเมตร ค่าพื้นหลัง 690 นาโนเมตร

คำนวนหาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ โดยแยกคำนวนในชุดการทดลองที่ศึกษา

% inhibition of spontaneous ROS formation คำนวนดังนี้

$$\text{\% viability} = \frac{\text{(A565/690 cell with extract) x 100}}{\text{A565/690 cell without extract}}$$

% inhibition of H_2O_2 induced ROS formation คำนวนดังนี้

$$\text{\% viability} = \frac{\text{(A565/690 cell with } H_2O_2 \text{ and extract) x 100}}{\text{A565/690 with } H_2O_2 \text{ without extract}}$$

3.6 การทดสอบทางสถิติ

ปริมาณไซโตไคน์ หรือตัวชี้วัดการอักเสบ และ ปริมาณอนุมูลอิสระจากเซลล์แมคโครฟาจ และ โมโนไซด์ ที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะการอักเสบด้วย LPS และ H_2O_2 ตามลำดับของการศึกษานี้ จะแสดงในรูปของ Mean ± SD และใช้ One Way ANOVA สำหรับทำการวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่ม ถ้ามีความแตกต่างจะทำการทดสอบต่อด้วย Tukey multiple comparison ถ้าค่า $p < 0.05$ ถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4. ผลการศึกษา

4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากผลไม้ไทยในเซลล์แมคโครฟาจ

เมื่อเซลล์แมคโครฟาจถูกกระตุ้นด้วย LPS จะหลั่งไซโตไคน์ออกมาหลายชนิดรวมทั้ง TNF-α และ IL-6 ไซโตไคน์ทั้ง 2 ชนิดมีบทบาทสำคัญในกระบวนอักเสบ (Aggarwal et al 2006) นอกจากนี้เซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ยังผลิตสารจำพวกคีโมไคน์ เช่น IL-8 และ MCP-1 ซึ่งมีบทบาทในการดึงดูดให้เม็ดเลือดขาวชนิดอื่นๆจากกระแสเลือดมาสู่บริเวณที่มีการอักเสบ เพื่อกำจัดสาเหตุของการอักเสบนั้น

4.1.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากส้มโอในเซลล์แมคโครฟาจ

จากการทดสอบพบว่าเซลล์แมคโครฟาจมีการหลั่ง TNF-α อยู่แล้ว (basal level) ประมาณ 273 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเซลล์แมคโครฟาจถูกกระต้นด้วย LPS 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 18 ชั่วโมงเซลล์แมคโครฟาจหลั่ง TNF-α เพิ่มขึ้นประมาณ 4 เท่า (1028 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อ pre-treatment เซลล์ด้วยสารสกัด 2 ชั่วโมงก่อนกระตุ้นด้วย LPS พบว่าสารสกัดจากส้มโอทองดีปริมาณ 0.2

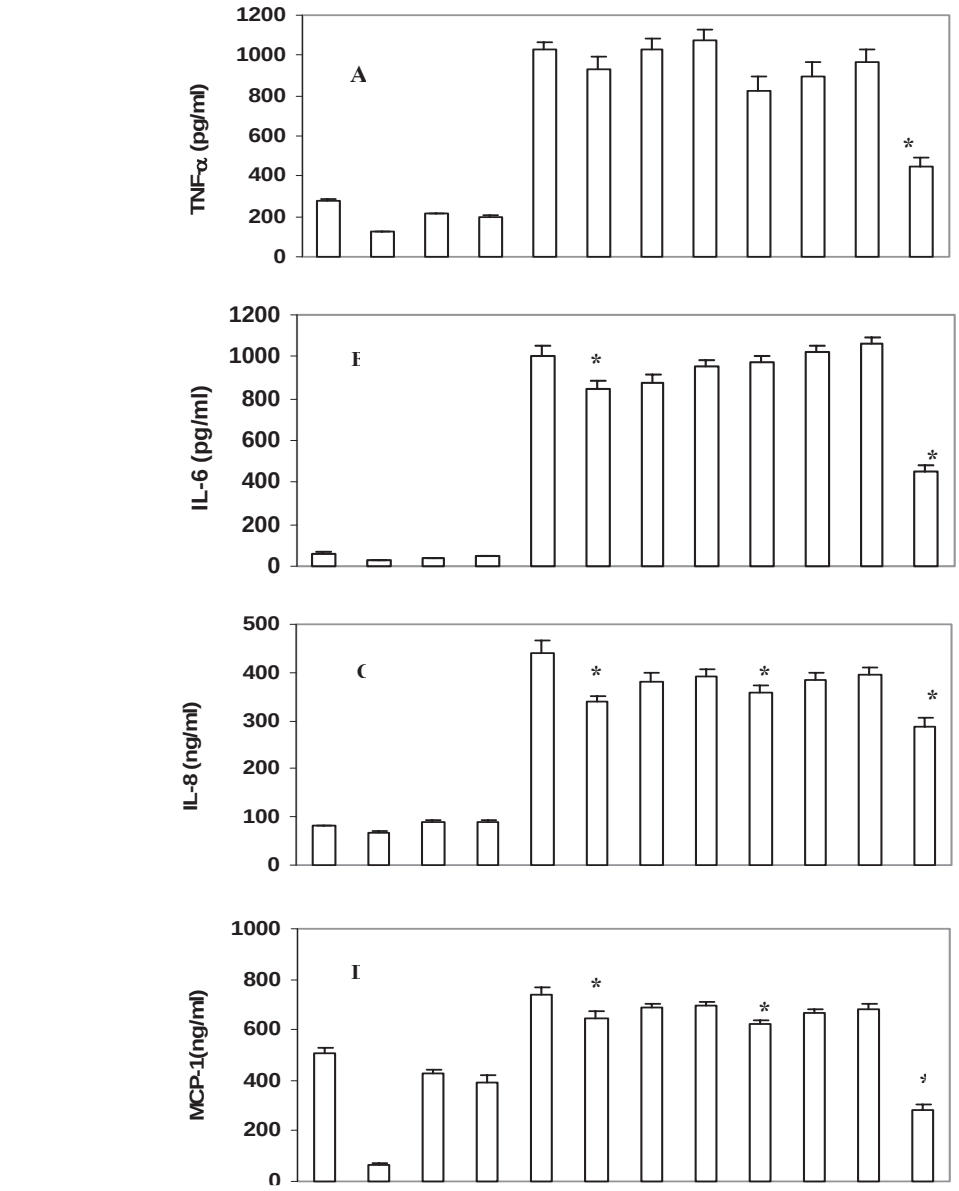
มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรลดระดับ LPS-induced TNF-α ได้เพียง 9% แต่เมื่อทดสอบทางสถิติแล้วพบว่าไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และที่ความเข้มข้นต่ำก็ไม่มีผลต่อระดับ TNF-α เช่นกัน ในขณะที่สารสกัดจากส้มโอขาวน้ำผึ้งสามารถลดระดับ TNF-α ตามความเข้มข้นของสารสกัดที่มากขึ้นจาก 0.05 – 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลด 6%, 13%, 20% ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อทดสอบทางสถิติแล้วพบว่าไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เทียบกับกลุ่มที่ใส่ LPS อย่างเดียว ทั้ง 3 ความเข้มข้นของสารสกัด ในขณะที่กลุ่มที่ใส่ NAC 10 มิลลิโมลาร์ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมบวก (positive control) สามารถลดระดับ LPS-induced TNF-α ได้ 57% **(รูปที่2A)**

เซลล์แมคโครฟาจมีการหลั่ง IL-6 อยู่แล้ว (basal level) ประมาณ 62 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS ผลิต IL-6 เพิ่มขึ้นประมาณ 16 เท่า (1002 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และพบว่าว่าสารสกัดจากส้มโอทองดีสามารถลดระดับ LPS-induced IL-6 ได้ตามความเข้มข้นของสารสกัดที่มากขึ้นจาก 4%, 13%, 15% แต่เมื่อทดสอบทางสถิติแล้วพบว่าเฉพาะสารสกัดทองดีที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้นที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ใส่ LPS อย่างเดียวในขณะที่สารสกัดจากส้มโอขาวน้ำผึ้งไม่มีผลต่อระดับ IL-6 ทั้ง 3 ความเข้มข้น ในขณะที่ NAC 10 มิลลิโมลาร์สามารถลดระดับ LPS-induced IL-6 ได้ 55% **(รูปที่2B)**

นอกจากไซโตไคน์แล้ว เซลล์แมคโครฟาจผลิตคีโมไคน์เช่น IL-8 และ MCP-1 ด้วย **จากรูปที่ 2C** เซลล์แมคโครฟาจหลั่ง IL-8 อยู่แล้ว (basal level) ประมาณ 81 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ LPS เหนี่ยวนำให้เซลล์แมคโครฟาจผลิต IL-8 เพิ่มขึ้น 5.4 เท่า (440 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และพบว่าสารสกัดจากส้มโอทองดีสามารถลดระดับ LPS-induced IL-8 ได้ตามความเข้มข้นของสารสกัดที่มากขึ้นจาก 11%, 13%, 23% แต่เฉพาะสารสกัดทองดีที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้นที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ใส่ LPS อย่างเดียว และสารสกัดจากส้มโอขาวน้ำผึ้งสามารถลดระดับ IL-8 ได้แปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัดที่มากขึ้นจาก 10%, 12%, 19% แต่เฉพาะสารสกัดจากส้มโอขาวน้ำผึ้งที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้นที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ใส่ LPS อย่างเดียว ในขณะที่ NAC 10 มิลลิโมลาร์สามารถลดระดับ LPS-induced IL-8 ได้ 35% **(รูปที่2C)**

จากรูปที่ 2D จะเห็นว่าเซลล์แมคโครฟาจหลั่ง MCP-1 อยู่แล้ว (basal level) ประมาณ 506 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร LPS สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์แมคโครฟาจผลิต MCP-1 เพิ่มขึ้นเพียง 1.5 เท่าของ basal level (743 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และพบว่าสารสกัดจากส้มโอทองดีสามารถลดระดับ LPS-induced MCP-1 ได้ตามความเข้มข้นของสารสกัดที่มากขึ้นจาก 6%, 8%, 13% และ เฉพาะสารสกัดทองดีที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้นที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ใส่ LPS อย่างเดียว ในขณะที่สารสกัดจากส้มโอขาวน้ำผึ้งสามารถลดระดับ MCP-1 ได้ตามความเข้มข้นของสารสกัดที่มากขึ้นจาก 8%, 10%, 16% เฉพาะที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้นที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ใส่ LPS อย่างเดียว เช่นเดียวกับที่พบในสารสกัดจากส้มโอทองดี ในขณะที่ NAC 10 มิลลิโมลาร์สามารถลดระดับ LPS-induced MCP-1 ได้ 62%

สรุปว่าสารสกัดจากส้มโอทั้งสองสายพันธุ์ไม่มีฤทธิ์ลดปริมาณ TNF-α อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่สารสกัดทองดีที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้นสามารถลดปริมาณ IL-6 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสารสกัดจากส้มโอทั้งสองสายพันธุ์สามารถลดปริมาณ IL-8 และ MCP-1 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



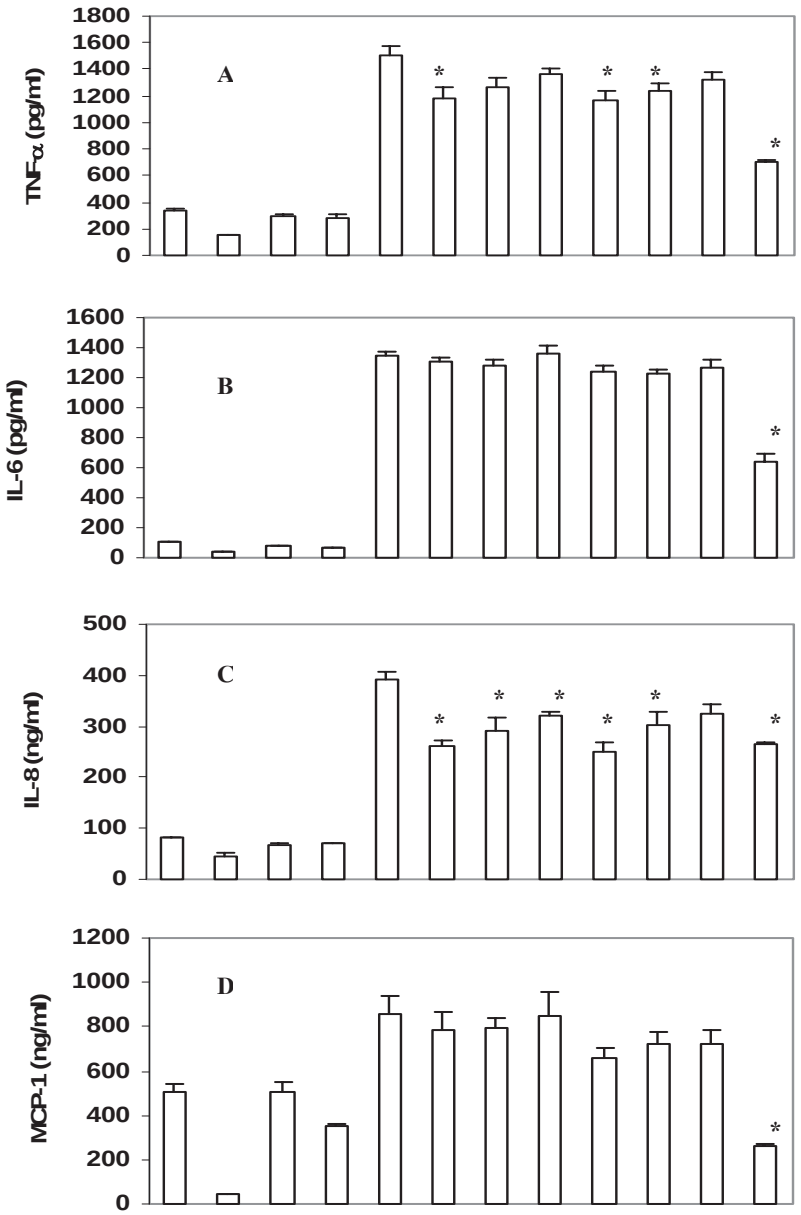
รูปที่ 2 ผลของสารสกัดจากส้มโอทองดี และขาวน้ำผึ้งต่อการหลั่งไซโตไคน์และคีโมไคน์จากเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะอักเสบด้วย LPS โดยทำการเลี้ยงเซลล์ที่มีหรือไม่มีสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.05-0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ NAC 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนกระตุ้นด้วย LPS 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์เพื่อวัดปริมาณ TNF-α (A), IL-6 (B), IL-8 (C) และ MCP-1(D) ทำการเปรียบเทียบค่าระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารสกัดค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n = 3) ทำ 3 ครั้ง * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มี LPS อย่างเดียว ($p < 0.05$)

4.1.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากทุเรียนในเซลล์แมคโครฟาจ

เซลล์แมคโครฟาจมีการหลั่ง TNF-α ประมาณ 341 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS ผลิต TNF-α เพิ่มขึ้นประมาณ 4.4 เท่า (1502 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และสารสกัดจากทุเรียนหมอนทองสามารถลดระดับ LPS-induced TNF-α ได้ตามความเข้มข้นของสารสกัดที่มากขึ้นจาก 10%, 16%, 21% แต่เฉพาะสารสกัดจากทุเรียนหมอนทองที่ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้นที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ใส่ LPS อย่างเดียว ในขณะที่สารสกัดจากทุเรียนชะนีลดระดับ LPS-induced TNF-α ได้ตามความเข้มข้นของสารสกัดที่มากขึ้นจาก 12%, 18%, 22% เฉพาะสารสกัดจากทุเรียนชะนีที่ 0.2 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้นที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ใส่ LPS อย่างเดียว และกลุ่มที่ใส่ NAC 10 มิลลิโมลาร์ลดระดับ TNF-α ได้ 53% **(รูปที่ 3A)** เซลล์แมคโครฟาจหลั่ง IL-6 ประมาณ 103 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS ผลิตเพิ่มขึ้นประมาณ 13 เท่า (1306 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และสารสกัดจากทุเรียนทั้งสองสายพันธุ์ไม่มีผลต่อระดับ LPS-induced IL-6 ในขณะที่ NAC 10 มิลลิโมลาร์ลดระดับ LPS-induced IL-6 ได้ 52% **(รูปที่ 3B)**

จากรูปที่ 3C เซลล์แมคโครฟาจหลั่ง IL-8 ประมาณ 81 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ LPS เหนี่ยวนำให้เซลล์ผลิต IL-8 เพิ่มขึ้นประมาณ 5 เท่า (391 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และสารสกัดจากทุเรียนหมอนทองลดระดับ LPS-induced IL-8 ได้แปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัดจาก 18%, 26%, 33% และการลดลงของปริมาณ IL-8 ทั้ง 3 ความเข้มข้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ใส่ LPS อย่างเดียว เช่นเดียวกันสารสกัดจากทุเรียนชะนีลดระดับ IL-8 ได้แปรตามความเข้มข้นของสารสกัดจาก 17%, 23%, 36% เฉพาะสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.2 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้น ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในขณะที่กลุ่มที่ใส่ NAC 10 มิลลิโมลาร์สามารถลดระดับ LPS-induced IL-8 ได้ 32% **(รูปที่ 3C) จากรูปที่ 3D** เซลล์แมคโครฟาจหลั่ง MCP-1 ประมาณ 503 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร LPS เหนี่ยวนำให้เซลล์ผลิต MCP-1 เพิ่มขึ้นเพียง 1.7 เท่าของbasal level (858 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และสารสกัดจากทุเรียนหมอนทองไม่มีผลในการลดระดับ LPS-induced MCP-1 ถึงแม้ว่าสารสกัดจากทุเรียนชะนีสามารถลดระดับ MCP-1 ได้ตามความเข้มข้นจาก 15%, 16%, 23% แต่เมื่อทดสอบทางสถิติแล้วพบว่าไม่มีนัยสำคัญทางสถิติทั้ง 3 ความเข้มข้น ในขณะที่กลุ่มที่ใส่ NAC 10 มิลลิโมลาร์สามารถลดระดับ LPS-induced MCP-1 ได้ 69%

สรุปว่าสารสกัดจากทุเรียนทั้งสองสายพันธุ์ไม่มีฤทธิ์ลดปริมาณ IL-6 และ MCP-1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่สารสกัดจากทุเรียนชะนีที่ความเข้มข้น 0.2 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้นสามารถลดปริมาณ TNF-α และ IL-8ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่สารสกัดจากทุเรียนหมอนทองลด IL-8 ได้ทุกความเข้มข้น แต่ลด TNF-α ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้น



LPS (10 ng/ml)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
สารสกัดทุเรียนหมอนทอง (mg/ml)	-	-	0.2	-	-	0.2	0.1	0.05	-	-	-	-
สารสกัดทุเรียนชะนี(mg/ml)	-	-	-	0.2	-	-	-	-	0.2	0.1	0.05	-
NAC 10 mM	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

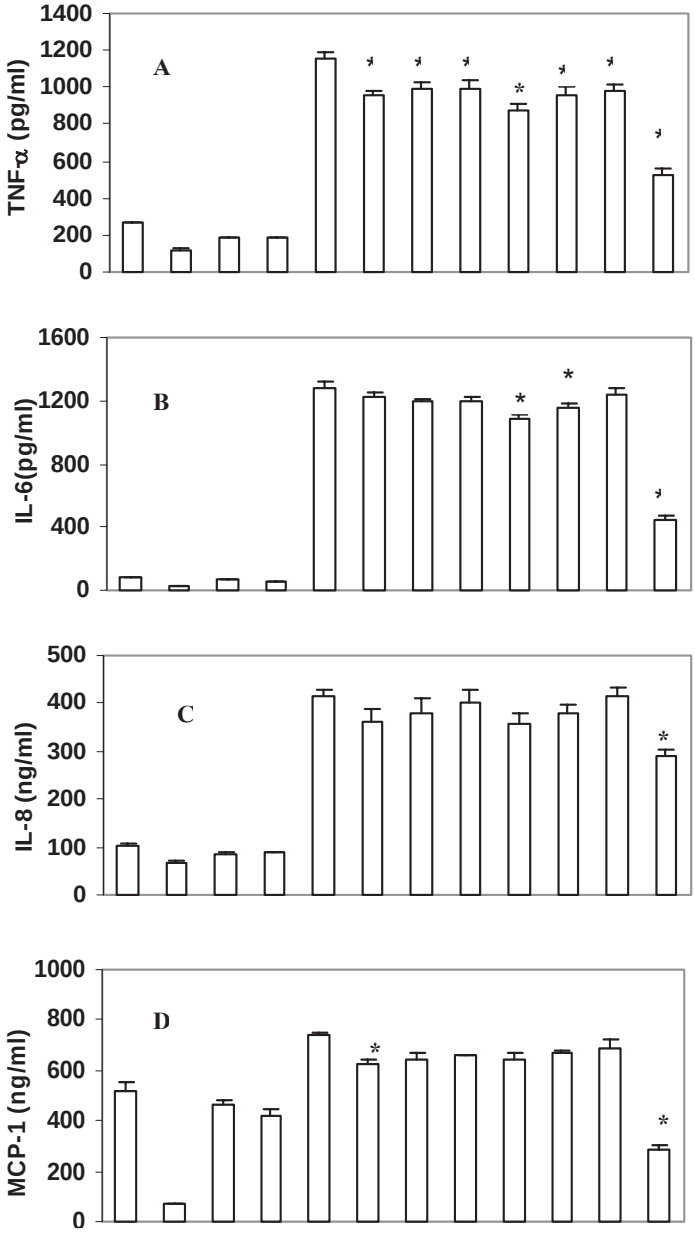
รูปที่ 3 ผลของสารสกัดจากทุเรียนหมอนทองและชะนีต่อการหลั่งไซโตไคน์และคีโมไคน์จากเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะอักเสบด้วย LPS โดยทำการเลี้ยงเซลล์ที่มีหรือไม่มีสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.05-0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ NAC 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนกระตุ้นด้วย LPS 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์เพื่อวัดปริมาณ TNF-α (A), IL-6 (B), IL-8 (C) และ MCP-1(D) ทำการเปรียบเทียบค่าระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารสกัดค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n = 3) ทำ 3 ครั้ง * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มี LPS อย่างเดียว ($p < 0.05$)

4.1.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากฝรั่งในเซลล์แมคโครฟาจ

เซลล์แมคโครฟาจหลั่ง TNF-α ประมาณ 266 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ ผลิตTNF-α เพิ่มขึ้นประมาณ 4.3 เท่า (1155 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และสารสกัดจากฝรั่งแป้นสีทองลด LPS-induced TNF-α ได้จาก 14%, 14%, 17% และ ทั้ง 3 ความเข้มข้นระดับ TNF-α มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ใส่ LPS อย่างเดียว ในทำนองเดียวกันสารสกัดจากฝรั่งกิมจูก็ลดระดับ LPS-induced TNF-α ได้ตามความเข้มข้นของสารสกัดที่มากขึ้นจาก 16%, 17%, 24% และ ทั้ง 3 ความเข้มข้นของสารสกัดจากฝรั่งกิมจูมีระดับ TNF-α แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ใส่ LPS อย่างเดียว และกลุ่มที่ใส่ NAC 10 มิลลิโมลาร์ลดระดับ LPS-induced TNF-α ได้ 55% **(รูปที่ 4A)** เซลล์แมคโครฟาจหลั่ง IL-6 ประมาณ 81 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย LPS ผลิตเพิ่มขึ้นประมาณ 16 เท่า (1281 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งสารสกัดจากฝรั่งแป้นสีทองไม่สามารถลดระดับ LPS-induced IL-6 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้ง 3 ความเข้มข้นของสารสกัด ในขณะที่สารสกัดจากฝรั่งกิมจูสามารถลดระดับ LPS-induced IL-6 ได้ตามความเข้มข้นของสารสกัดที่มากขึ้นจาก 3%, 10%, 15% แต่เฉพาะที่ความเข้มข้นของสารสกัด 0.2 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้นที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ใส่ LPS อย่างเดียวส่วนกลุ่มที่ใส่ NAC 10 มิลลิโมลาร์ สามารถลดระดับ LPS-induced IL-6 ได้ 65% **(รูปที่ 4B)**

จากรูปที่ 4C พบว่า เซลล์แมคโครฟาจหลั่ง IL-8 ประมาณ 102 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ LPS เหนี่ยวนำให้เซลล์ผลิต IL-8 เพิ่มขึ้นประมาณ 4 เท่า (415 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่สารสกัดจากฝรั่งทั้ง 2 สายพันธุ์ไม่สามารถลดระดับ LPS-induced IL-8 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ NAC 10 มิลลิโมลาร์สามารถลดระดับ LPS-induced IL-8 ได้ 30% เซลล์แมคโครฟาจหลั่ง MCP-1 ประมาณ 518 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร LPS เหนี่ยวนำให้เซลล์ผลิต MCP-1 เพิ่มขึ้นเพียง 1.4 เท่าของbasal level (739 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และสารสกัดจากฝรั่งแป้นสีทองลดระดับ LPS-induced MCP-1 ได้ตามความเข้มข้นของสารสกัดที่มากขึ้นจาก 11%, 13%, 15% และ เฉพาะที่ความเข้มข้นของสารสกัด 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้นที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ใส่ LPS อย่างเดียว ถึงแม้ว่าสารสกัดจากฝรั่งกิมจูสามารถลดระดับ MCP-1 ได้ตามความเข้มข้นของสารสกัดที่มากขึ้นจาก 7%, 9%, 13% แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติทั้ง 3 ความเข้มข้น ในขณะที่กลุ่มที่ใส่NAC 10 มิลลิโมลาร์สามารถลดระดับ LPS-induced MCP-1 ได้ 61% **(รูปที่ 4D)**

สรุปว่าสารสกัดจากฝรั่งทั้งสองสายพันธุ์ไม่มีฤทธิ์ลดปริมาณ IL-8 และ MCP-1 ยกเว้นสารสกัดจากฝรั่งแป้นสีทองที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้นที่ลด MCP-1ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่สารสกัดจากฝรั่งทั้งสองสายพันธุ์ทุกความเข้มข้นลดปริมาณ TNF-α ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ สารสกัดจากฝรั่งกิมจูเท่านั้นลด IL-6 ได้ที่ความเข้มข้น 0.2 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



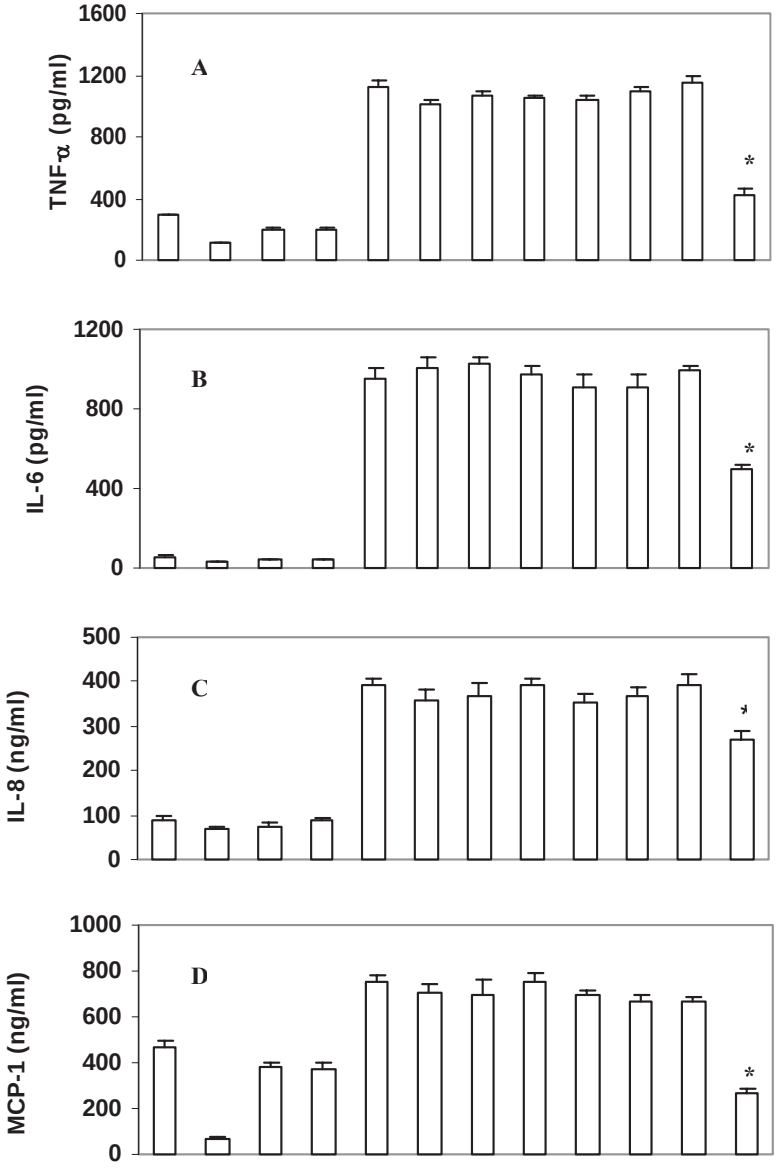
รูปที่ 4 ผลของสารสกัดจากฝรั่งแป้นสีทอง และ กิมจูต่อการหลั่งไซโตไคน์และคีโมไคน์จากเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะอักเสบด้วย LPS โดยทำการเลี้ยงเซลล์ที่มีหรือไม่มีสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.05-0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ NAC 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนกระตุ้นด้วย LPS 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์เพื่อวัดปริมาณ TNF-α (A), IL-6 (B), IL-8 (C) และ MCP-1(D) ทำการเปรียบเทียบค่าระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารสกัดค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n = 3) ทำ 3 ครั้ง * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มี LPS อย่างเดียว ($p < 0.05$)

4.1.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากมะละกอในเซลล์แมคโครฟาจ

เซลล์แมคโครฟาจมีการหลั่ง TNF-α ประมาณ 288 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ ผลิต TNF-α เพิ่มขึ้นประมาณ 4 เท่า (1121 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สารสกัดจากมะละกอทั้ง 2 สายพันธุ์ ไม่สามารถลดระดับ LPS-induced TNF-α ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใส่ LPS ในขณะที่ NAC 10 มิลลิโมลาร์สามารถลดระดับ LPS-induced TNF-α ได้ 62% **(รูปที่5A) ในรูปที่ 5B** แสดงให้เห็นว่าเซลล์แมคโครฟาจมีการหลั่ง IL-6 ได้ประมาณ 55 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อกระตุ้นด้วย LPS ผลิตเพิ่มขึ้นประมาณ 17 เท่า (954 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งสารสกัดจากมะละกอทั้ง 2 สายพันธุ์ ไม่สามารถลดระดับ LPS-induced IL-6 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใส่ LPS ในขณะที่ NAC 10 มิลลิโมลาร์สามารถลดระดับ LPS-induced IL-6 ได้ 48%

เซลล์แมคโครฟาจหลั่ง IL-8 ได้ประมาณ 89 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ LPS เหนี่ยวนำให้เซลล์แมคโครฟาจผลิต IL-8 เพิ่มขึ้นประมาณ 4.4 เท่า (394 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่สารสกัดจากมะละกอทั้ง 2 สายพันธุ์ไม่สามารถลดระดับ LPS-induced IL-8 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ NAC 10 มิลลิโมลาร์สามารถลดระดับ LPS-induced IL-8 ได้ 32% **(รูปที่ 5C**) เซลล์ผลิต MCP-1 ได้ประมาณ 471 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร LPS สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์แมคโครฟาจผลิต MCP-1 เพิ่มขึ้นเพียง 1.6 เท่าของbasal level (756 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และในทำนองเดียวกันสารสกัดจากมะละกอทั้ง 2 สายพันธุ์ไม่สามารถลดระดับ LPS-induced MCP-1 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ NAC 10 มิลลิโมลาร์สามารถลดระดับ LPS-induced MCP-1 ได้ 64% **(รูปที่ 5D**)

สรุปว่าสารสกัดจากมะละกอทั้งสองสายพันธุ์ที่ความเข้มข้น 0.05-0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรไม่มีฤทธิ์ลดปริมาณตัวชี้วัดการอักเสบทั้ง 4 ตัวในการศึกษานี้



LPS (10 ng/ml)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
สารสกัดมะละกอฮอลแลนด์ (mg/ml)	-	-	0.2	-	-	0.2	0.1	0.05	-	-	-	-
สารสกัดมะละกอแขกดำ (mg/ml)	-	-	-	0.2	-	-	-	-	0.2	0.1	0.05	-
NAC 10 mM	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

รูปที่ 5 ผลของสารสกัดจากมะละกอฮอลแลนด์ และ แขกดำต่อการหลั่งไซโตไคน์และคีโมไคน์จากเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะอักเสบด้วย LPS โดยทำการเลี้ยงเซลล์ที่มีหรือไม่มีสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.05-0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ NAC 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนกระตุ้นด้วย LPS 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์เพื่อวัดปริมาณ TNF-α (A), IL-6 (B), IL-8 (C) และ MCP-1(D) ทำการเปรียบเทียบค่าระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารสกัดค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n = 3) ทำ 3 ครั้ง * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มี LPS อย่างเดียว ($p < 0.05$)

4.1.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากเงาะในเซลล์แมคโครฟาจ

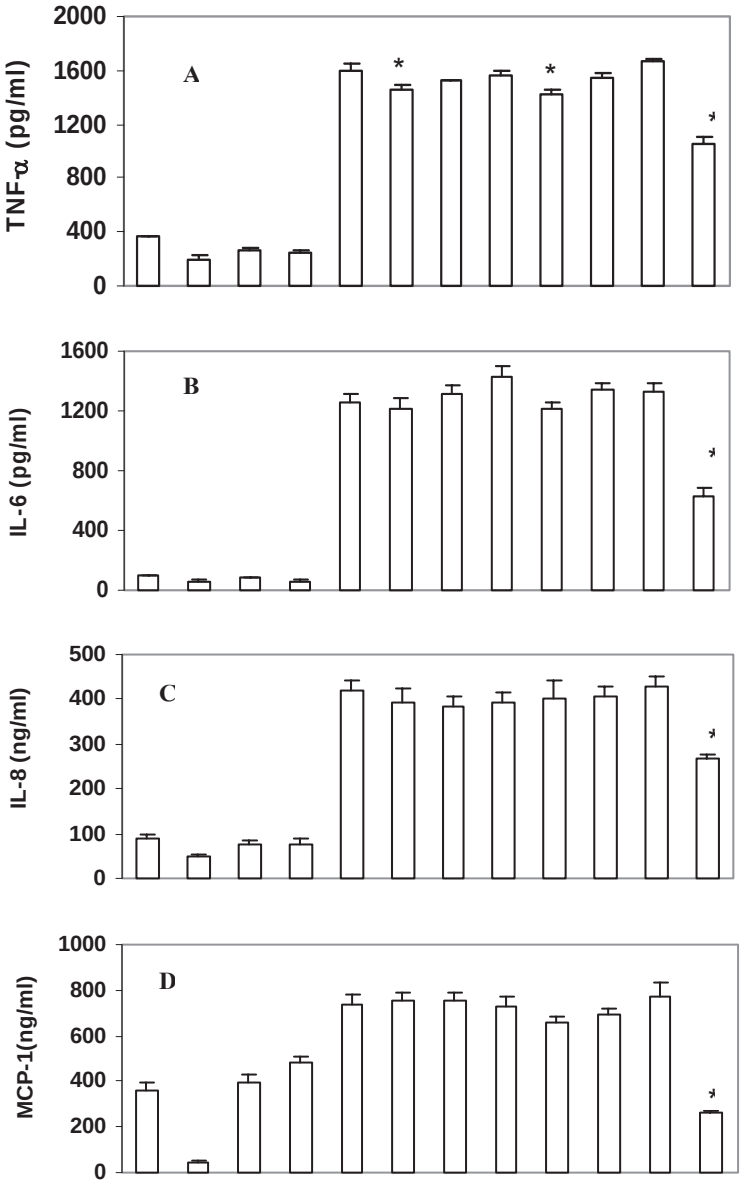
เซลล์แมคโครฟาจผลิต TNF-α ได้ประมาณ 362 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจะผลิต TNF-α เพิ่มขึ้นประมาณ 4.4 เท่า (1592 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และสารสกัดจากเงาะทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถลดระดับ LPS-induced TNF-α ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใส่ LPS เฉพาะที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัดจากเงาะสีชมพูลด LPS-induced TNF-α ได้เพียง 8% และ สารสกัดจากเงาะโรงเรียนลดระดับ LPS-induced TNF-α ได้ 11% ในขณะที่ NAC 10 มิลลิโมลาร์ สามารถลดระดับ LPS-induced TNF-α ได้ 34% **(รูปที่ 6A)**

จากรูปที่ 6B เซลล์แมคโครฟาจมีการหลั่ง IL-6 ได้ประมาณ 96 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย LPS ผลิตเพิ่มขึ้นประมาณ 13 เท่า (1264 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งสารสกัดจากเงาะทั้ง 2 สายพันธุ์ ไม่สามารถลดระดับ LPS-induced IL-6 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใส่ LPS ในขณะที่ NAC 10 มิลลิโมลาร์สามารถลดระดับ LPS-induced IL-6 ได้ 50%

เซลล์แมคโครฟาจหลั่ง IL-8 ได้ประมาณ 89 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ LPS เหนี่ยวนำให้เซลล์แมคโครฟาจผลิต IL-8 เพิ่มขึ้นประมาณ 4.7 เท่า (418 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่สารสกัดจากเงาะทั้ง 2 สายพันธุ์ไม่สามารถลดระดับ LPS-induced IL-8 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ NAC 10 มิลลิโมลาร์สามารถลดระดับ LPS-induced IL-8 ได้ 36% **(รูปที่ 6C)**

เซลล์แมคโครฟาจผลิต MCP-1 ได้ประมาณ 361 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร LPS เหนี่ยวนำให้เซลล์แมคโครฟาจผลิต MCP-1 เพิ่มขึ้น 2 เท่าของ basal level (738 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และในทำนองเดียวกันสารสกัดจากเงาะทั้ง 2 สายพันธุ์ไม่สามารถลดระดับ LPS-induced MCP-1 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ NAC 10 มิลลิโมลาร์สามารถลดระดับ LPS-induced MCP-1 ได้ 64% **(รูปที่ 6D)**

สรุปว่าสารสกัดจากเงาะทั้งสองสายพันธุ์มีฤทธิ์ลดเฉพาะ TNF-α ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้น ในขณะที่สารสกัดจากเงาะทั้งสองสายพันธุ์ทุกความเข้มข้นไม่มีฤทธิ์ลดตัวชี้วัดการอักเสบตัวอื่นได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



LPS (10 ng/ml)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
สารสกัดเงาะสีชมพู (mg/ml)	-	-	0.2	-	-	0.2	0.1	0.05	-	-	-	-
สารสกัดเงาะโรงเรียน (mg/ml)	-	-	-	0.2	-	-	-	-	0.2	0.1	0.05	-
NAC 10 mM	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

รูปที่ 6 ผลของสารสกัดจากเงาะพันธุ์สีชมพู และ โรงเรียนต่อการหลั่งไซโตไคน์และคีโมไคน์จากเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะอักเสบด้วย LPS โดยทำการเลี้ยงเซลล์ที่มีหรือไม่มีสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.05-0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ NAC 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนกระตุ้นด้วย LPS 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์เพื่อวัดปริมาณ TNF-α (A), IL-6 (B), IL-8 (C) และ MCP-1(D) ทำการเปรียบเทียบค่าระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารสกัดค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n = 3) ทำ 3 ครั้ง * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มี LPS อย่างเดียว ($p < 0.05$)

4.1.6 เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากผลไม้ทั้ง 5 ชนิด

ในตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบความสามารถของสารสกัดจากผลไม้ทั้ง 5 ชนิดที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในการลดปริมาณ TNF-α, IL-6, IL-8 และ MCP-1 คิดเป็นร้อยละเทียบกับกลุ่มที่ใส่ LPS อย่างเดียว (% inhibition relative to LPS treatment alone) จากตารางที่1 จะเห็นว่าส้มโอทองดีมีประสิทธิภาพดีที่สุดโดยสามารถลดตัวชี้วัดการอักเสบได้ถึง 3 ตัว (IL-6, IL-8 และ MCP-1) ตามด้วยส้มโอขาวน้ำผึ้งลดตัวชี้วัดการอักเสบได้ 2 ตัว (IL-8 และ MCP-1) ทุเรียนทั้ง 2 สายพันธุ์ลด TNF-α และ IL-8 ฝรั่งแป้นสีทองลด TNF-α และ MCP-1 ฝรั่งกิมจูลด TNF-α และ IL-6 ในขณะที่เงาะทั้ง 2 สายพันธุ์ลดเฉพาะ TNF-α เท่านั้น

ตารางที่ 1 ความสามารถของสารสกัดจากผลไม้ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในการลดปริมาณ TNF-α, IL-6, IL-8 และ MCP-1 คิดเป็นร้อยละเทียบกับกลุ่มที่ใส่ **LPS** อย่างเดียว (% inhibition relative to LPS treatment alone)

ตัวอย่างผลไม้	% inhibition relative to LPS alone at concentration 0.2 mg/ml			
	TNF-α	IL-6	IL-8	MCP-1
ส้มโอทองดี	NS*	15%	23%	13%
ส้มโอขาวน้ำผึ้ง	NS	NS	19%	16%
ทุเรียนหมอนทอง	21%	NS	33%	NS
ทุเรียนชะนี	22%	NS	36%	NS
ฝรั่งแป้นสีทอง	17%	NS	NS	15%
ฝรั่งกิมจู	24%	16%	NS	NS
มะละกอฮอลแลนด์	NS	NS	NS	NS
มะละกอแขกดำ	NS	NS	NS	NS
เงาะสีชมพู	8%	NS	NS	NS
เงาะโรงเรียน	11%	NS	NS	NS

*No statistical significant

4.2 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากตัวอย่างผลไม้ต่อเซลล์แมคโครฟาจ (Cell viability) หลังการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดผลไม้

หลังจากบ่มเซลล์แมคโครฟาจร่วมกับสารสกัดผลไม้ที่ความเข้มข้นสุทธิ 0.2, 0.1 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในถาดเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนกระตุ้นการอักเสบด้วย LPS ที่ความเข้มข้นสุทธิ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วบ่มเซลล์ต่ออีกเป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ส่วนบนมาวิเคราะห์หาตัวชี้วัดการอักเสบ ได้แก่ TNF-α, IL-6, IL-8 และ MCP-1 ด้วยวิธี ELISA แล้ว ทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยการออกซิไดซ์สี resazurin จากสีน้ำเงินเป็นสีชมพูเข้ม วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร โดยใช้ความยาวคลื่นที่ 600 นาโนเมตร เป็นค่าอ้างอิง

ความเข้มสีชมพูที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับเซลล์ที่มีชีวิต การคำนวณอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากกลุ่มที่ใส่ LPS อย่างเดียวคิดเป็น 100 เปอร์เซนต์ และเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทดสอบของแต่ละกลุ่มทดลอง

จากตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากตัวอย่างผลไม้ทั้ง 5 ชนิด ชนิดละ 2 สายพันธุ์นั้น ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เมื่อเลี้ยงร่วมกับ LPS 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 18 ชั่วโมงโดยดูจากค่าของ % Cell viability มากกว่าร้อยละ 80 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ใส่ LPS อย่างเดียว ดังนั้นผลการทดลองที่พบการลดลงของ LPS-induced cytokines และ chemokines ในการศึกษานี้จึงเป็นผลของสารสกัดจากผลไม้ ไม่ใช่ลดลงเพราะเซลล์ตายทำให้ผลิต cytokines และ chemokines น้อยลง นอกจากนี้เราได้ทดสอบความเป็นพิษของ NAC ซึ่งเป็นสารลดอนุมูลอิสระ และ ลดการอักเสบ ด้วย พบว่า % Cell viability มากกว่าร้อยละ 80 (ผลอยู่ในหมายเหตุ)

สรุปว่าความเข้มข้นของสารสกัดจากผลไม้ในการลดไซโตไคน์ และ คีโมไคน์ในการศึกษานี้ใช้ได้มีผลต่อจำนวนเซลล์ในระดับที่ยอมรับได้ ดังนั้นฤทธิ์ลดไซโตไคน์ และ คีโมไคน์ที่ได้แสดงในผลมาจากสารสกัดในผลไม้จริง นอกจากนี้ในทุกการทดลองจะมีกลุ่มควบคุมบวกทำควบคู่ไปทุกครั้งเพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพของการทดสอบซึ่งในกลุ่มที่ใส่ NAC (กลุ่มควบคุมบวก) ให้ผลการลดการผลิตโดยเฉลี่ยสำหรับ TNF-α, IL-6, IL-8 และ MCP-1 ดังนี้ 52%, 54%, 33% และ 64% ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ร้อยละการมีชีวิต (% Cell viability) ของเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับสารสกัดจากตัวอย่างผลไม้ในแต่ละความเข้มข้นเลี้ยงร่วมกับ LPS 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (mean ± SD; n = 3) ทำ 3 ครั้ง

ตัวอย่างผลไม้	ความเข้มข้นของสารสกัดจากตัวอย่าง (mg/ml)					
	0	0.2	0.2	0.1	0.05	0
	No LPS	No LPS	with LPS	with LPS	wth LPS	with LPS
ส้มโอขาวน้ำผึ้ง	100 ± 7	99 ± 3	101± 2	104 ± 5	107 ± 2	100
ส้มโอทองดี	100 ± 7	96 ± 8	97 ± 4	102 ± 5	105 ± 5	100
ทุเรียนหมอนทอง	99 ± 5	98 ± 3	101 ± 4	106 ± 4	108 ± 5	100
ทุเรียนชะนี	99 ± 5	96 ± 4	102 ± 3	104 ± 3	105 ± 2	100
ฝรั่งกิมจู	97± 2	95 ± 5	99 ± 5	103 ± 5	106 ± 4	100
ฝรั่งแป้นสีทอง	97± 2	99 ± 4	104 ± 4	107 ± 6	109 ± 2	100
มะละกอฮอล์แลนด์	100 ± 2	99 ± 7	104 ± 6	109 ± 7	113 ± 3	100
มะละกอแขกดำ	100 ± 2	94 ± 5	98 ± 5	101 ± 4	107 ± 5	100
เงาะสีชมพู	99 ± 5	95 ± 2	100 ± 4	104 ± 6	106 ± 5	100
เงาะโรงเรียน	99 ± 5	93 ± 2	103 ± 9	102 ± 5	106 ± 9	100

หมายเหตุ: กลุ่ม NAC without LPS มี % Cell viability = 94 ± 5

กลุ่ม NAC with LPS มี % Cell viability = 94 ± 2

4.3 การศึกษาประสิทธิภาพในการลดอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลไม้

4.3.1 ผลของสารสกัดจากส้มโอต่อ spontaneous และ H_2O_2 induced ROS formation

จากการทดสอบพบว่าเซลล์โมโนไซต์ U937 มีการผลิต ROS โดยธรรมชาติ (spontaneous formation) 94 unit เมื่อเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารสกัดจากส้มโอทองดีปริมาณ 10-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลดระดับ spontaneous ROS ได้แปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัดที่มากขึ้นจาก 9%, 12%, 28% ตามลำดับ และ เฉพาะสารสกัดเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (67 unit) เท่านั้นที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใส่สารสกัด ถึงแม้ว่าสารสกัดจากส้มโอขาวน้ำผึ้งสามารถลดระดับ spontaneous ROS ได้ตามความเข้มข้นของสารสกัดที่มากขึ้นจาก 9%, 11%, 22% ตามลำดับ แต่เมื่อทดสอบทางสถิติแล้วพบว่าไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เทียบกับกลุ่มที่ไม่ใส่สารสกัด ในขณะที่กลุ่มที่ใส่ NAC 10 มิลลิโมลาร์ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมบวก (positive control) สามารถลดระดับ spontaneous ROS ได้ 35% **(รูปที่ 7)**

เมื่อเซลล์โมโนไซต์ U937 ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ผลิต ROS เพิ่มขึ้นประมาณ 6.2 เท่า (590 unit) และสารสกัดจากส้มโอทองดี10-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรลดระดับ H_2O_2-

induced ROS ได้แปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัดจาก 19%, 29%, 48% ตามลำดับ และ ROS จากสารสกัดทั้ง 3 ความเข้มข้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ใส่ H_2O_2 อย่างเดียว ในทำนองเดียวกันสารสกัดจากส้มโอขาวน้ำผึ้งก็ลด H_2O_2-induced ROS ได้แปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัดเช่นกันจาก 24%, 33%, 43% ตามลำดับ และ ROS ทั้ง 3 ความเข้มข้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ใส่ H_2O_2อย่างเดียวในขณะที่ NAC 10 มิลลิโมลาร์สามารถลดระดับ H_2O_2-induced ROS ได้ 33% **(รูปที่ 8)**

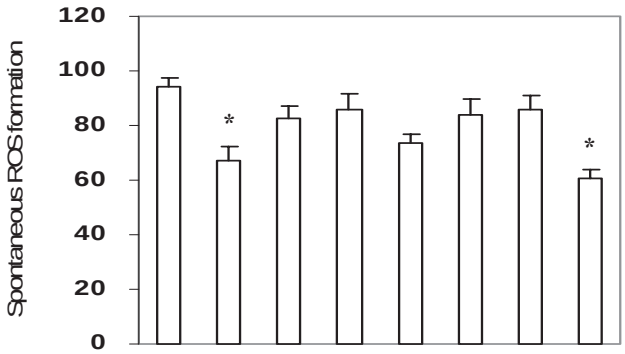
สรุปว่าเฉพาะสารสกัดจากส้มโอทองดี 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้นที่ลด spontaneous ROS ได้ ในขณะที่สารสกัด 10-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากส้มโอทั้งสองพันธุ์สามารถลดระดับ H_2O_2-induced ROS ได้ใกล้เคียงกัน

4.3.2 ผลของสารสกัดจากทุเรียนต่อ spontaneous และ H_2O_2 induced ROS formation

จากรูปที่9 เซลล์โมโนไซต์ U937 ผลิต spontaneous ROS ได้ 116 unit เมื่อเลี้ยงร่วมกับสารสกัดจากทุเรียนหมอนทอง 10-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลด ROS ได้เฉพาะที่ความเข้มข้น 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 13% และ 25% ตามลำดับ แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใส่สารสกัด ในขณะที่สารสกัดจากทุเรียนชะนีทั้ง 3 ความเข้มข้นไม่มีผลต่อระดับ spontaneous ROS กลุ่มที่ใส่ NAC 10 มิลลิโมลาร์ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมบวก (positive control) สามารถลดระดับ spontaneous ROS ได้ 42%

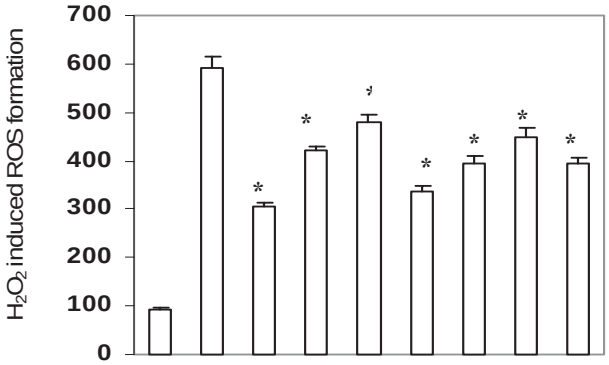
เมื่อเซลล์โมโนไซต์ ถูกเหนี่ยวนำด้วย H_2O_2 ผลิต ROS เพิ่มขึ้นประมาณ 5.2 เท่า (600 unit) และพบว่าสารสกัดจากทุเรียนหมอนทอง 10-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลดระดับ H_2O_2-induced ROS ได้แปรตามความเข้มข้นของสารสกัดจาก 10%, 18%, 30% ตามลำดับ พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้นที่ค่า ROS มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ใส่ H_2O_2อย่างเดียว ในทำนองเดียวกันสารสกัดจากทุเรียนชะนีลดระดับ H_2O_2-induced ROS ได้แปรตามความเข้มข้นของสารสกัดเช่นกันจาก 6%, 10%, 21% ตามลำดับ แต่เฉพาะที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้นที่มีค่า ROS แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ใส่ H_2O_2 อย่างเดียวในขณะที่ NAC 10 มิลลิโมลาร์สามารถลดระดับ H_2O_2-induced ROS ได้ 41% **(รูปที่ 10)**

สรุปว่าสารสกัดจากทุเรียนทั้งสองพันธุ์ไม่มีฤทธิ์ลด Spontaneous ROS ได้ และที่สารสกัด 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากทุเรียนหมอนทองเท่านั้นที่ลดระดับ H_2O_2-induced ROS ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ สารสกัดจากทุเรียนชะนีลดระดับ H_2O_2-induced ROS ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้น



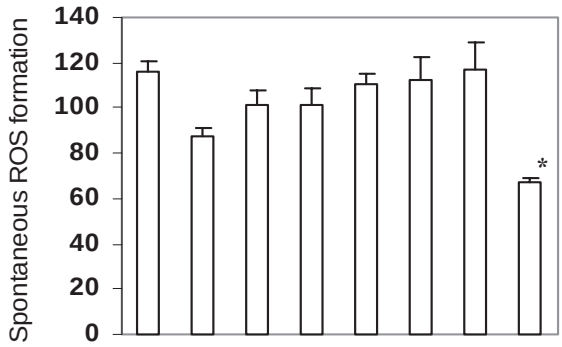
สารสกัดส้มโอทองดี (mg/ml)	-	40	20	10	-	-	-	-
สารสกัดส้มโอขาวน้ำผึ้ง(mg/ml)	-	-	-	-	40	20	10	-
NAC 10 mM	-	-	-	-	-	-	-	+

รูปที่ 7 ผลของสารสกัดจากส้มโอทองดี และ ขาวน้ำผึ้งต่อปริมาณอนุมูลอิสระที่เกิดโดยธรรมชาติ (spontaneous ROS) ภายในเซลล์โมโนไซต์ U937 โดยทำการเลี้ยงเซลล์ที่มีหรือไม่มีสารสกัดที่ความเข้มข้น 10-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ NAC 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนย้อมด้วย DCFH-DA 20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที ปั่นล้างสีออก วัดค่า intracellular ROS ที่เกิดขึ้นที่ excitation 485 nm, emission 530 nm ที่เวลา 20 นาที ทำการเปรียบเทียบค่าระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารสกัดค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n = 3) ทำ 3 ครั้ง * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใส่สารสกัด ($p < 0.05$)



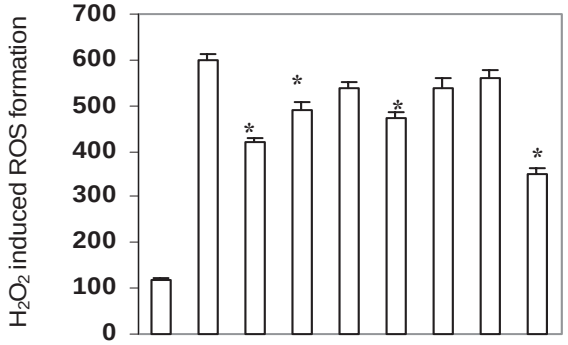
สารสกัดส้มโอทองดี (mg/ml)	-	-	40	20	10	-	-	-	-
สารสกัดส้มโอขาวน้ำผึ้ง(mg/ml)	-	-	-	-	-	40	20	10	-
NAC 10 mM	-	-	-	-	-	-	-	-	+
H_2O_2 (400 µM)	-	+	+	+	+	+	+	+	+

รูปที่ 8 ผลของสารสกัดจากส้มโอทองดี และ ขาวน้ำผึ้งต่อปริมาณอนุมูลอิสระที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2 induced ROS) ภายในเซลล์โมโนไซต์ U937 โดยทำการเลี้ยงเซลล์ที่มีหรือไม่มีสารสกัดที่ความเข้มข้น 10-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ NAC 10 มิลลิโมลาร์ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนย้อมด้วย DCFH-DA 20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที ปั่นล้างสีออก ก่อนใส่ H_2O_2 ให้ได้ความเข้มข้นสุทธิ 400ไมโครโมลาร์ หรือ ใส่ basal media เป็นกลุ่มควบคุมลบ (negative control) วัดค่า intracellular ROS ที่เกิดขึ้นที่ excitation 485 nm, emission 530 nm ที่เวลา 20 นาที ทำการเปรียบเทียบค่าระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมที่ใส่ H_2O_2 อย่างเดียวค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n = 3) ทำ 3 ครั้ง * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใส่ H_2O_2 อย่างเดียว ($p < 0.05$)



สารสกัดทุเรียนหมอนทอง (mg/ml)	-	40	20	10	-	-	-	-
สารสกัดทุเรียนชะนี (mg/ml)	-	-	-	-	40	20	10	-
NAC 10 mM	-	-	-	-	-	-	-	+

รูปที่ 9 ผลของสารสกัดจากทุเรียนหมอนทอง และ ชะนีต่อปริมาณอนุมูลอิสระที่เกิดโดยธรรมชาติ (spontaneous ROS) ภายในเซลล์โมโนไซต์ U937 โดยทำการเลี้ยงเซลล์ที่มีหรือไม่มีสารสกัดที่ความเข้มข้น 10-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ NAC 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนย้อมด้วย DCFH-DA 20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที ปั่นล้างสีออก วัดค่า intracellular ROS ที่เกิดขึ้นที่ excitation 485 nm, emission 530 nm ที่เวลา 20 นาที ทำการเปรียบเทียบค่าระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารสกัดค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n = 3) ทำ 3 ครั้ง * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใส่สารสกัด ($p < 0.05$)



สารสกัดทุเรียนหมอนทอง (mg/ml)	-	-	40	20	10	-	-	-	-
สารสกัดทุเรียนชะนี (mg/ml)	-	-	-	-	-	40	20	10	-
NAC 10 mM	-	-	-	-	-	-	-	-	+
H_2O_2 (400 µM)	-	+	+	+	+	+	+	+	+

รูปที่ 10 ผลของสารสกัดจากทุเรียนหมอนทอง และ ทุเรียนชะนีต่อปริมาณอนุมูลอิสระที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2 induced ROS) ภายในเซลล์โมโนไซต์ U937 โดยทำการเลี้ยงเซลล์ที่มีหรือไม่มีสารสกัดที่ความเข้มข้น 10-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ NAC 10 มิลลิโมลาร์ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนย้อมด้วย DCFH-DA 20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที ปั่นล้างสีออก ก่อนใส่ H_2O_2 ให้ได้ความเข้มข้นสุทธิ 400 ไมโครโมลาร์ หรือ ใส่ basal media เป็นกลุ่มควบคุมลบ (negative control) วัดค่า intracellular ROS ที่เกิดขึ้นที่ excitation 485 nm, emission 530 nm ที่เวลา 20 นาที ทำการเปรียบเทียบค่าระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมที่ใส่ H_2O_2 อย่างเดียวค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n = 3) ทำ 3 ครั้ง * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใส่ H_2O_2 อย่างเดียว ($p < 0.05$)

4.3.3 ผลของสารสกัดจากฝรั่งต่อ spontaneous และ H_2O_2 induced ROS formation

จากรูปที่11 เซลล์โมโนไซด์ ผลิต spontaneous ROS 107 unit เมื่อเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารสกัดจากฝรั่งแป้นสีทอง 10-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลด ROS ได้แปรตามความเข้มข้นของสารสกัดจาก 20%, 27%, 35% ตามลำดับ แต่เฉพาะที่ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้นที่ค่า ROS มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใส่สารสกัด ในขณะที่สารสกัดจากฝรั่งกิมจูทั้ง 3 ความเข้มข้นลดระดับ spontaneous ROS ได้ใกล้เคียงกัน ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใส่สารสกัด กลุ่มที่ใส่ NAC 10 มิลลิโมลาร์สามารถลดระดับ ROS ได้ 46%

H_2O_2เหนี่ยวนำเซลล์ผลิต ROS เพิ่มขึ้นประมาณ 5.4 เท่า (576 unit) สารสกัดจากฝรั่งแป้นสีทองลดระดับ H_2O_2-induced ROS ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ใส่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างเดียว ของสารสกัดทั้ง 3 ความเข้มข้น (15%, 27%, 39%) ในทำนองเดียวกันสารสกัดจากฝรั่งกิมจูก็ลด H_2O_2-induced ROS ได้ตามความเข้มข้นของสารสกัดที่มากขึ้นเช่นกันจาก 26%, 33%, 43% และค่า ROS ทั้ง 3 ความเข้มข้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ NAC 10 มิลลิโมลาร์สามารถลดระดับ H_2O_2-induced ROS ได้ 27% **(รูปที่12)**

สรุปว่าเฉพาะสารสกัดจากฝรั่งแป้นสีทอง 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้นที่ลด spontaneous ROS ได้ ในขณะที่สารสกัด 10-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากฝรั่งทั้งสองพันธุ์สามารถลดระดับ H_2O_2-induced ROS ได้ใกล้เคียงกัน

4.3.4 ผลของสารสกัดจากมะละกอต่อ spontaneous และ H_2O_2 induced ROS formation

จากรูปที่13 เซลล์ผลิต spontaneous ROS ประมาณ 103 unit เมื่อเลี้ยงร่วมกับสารสกัดจากมะละกอฮอลแลนด์ 10-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรลด spontaneous ROS ได้แปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัดเฉพาะที่ความเข้มข้น 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 6%, 16% แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใส่สารสกัด ในขณะที่สารสกัดจากมะละกอแขกดำทั้ง 3 ความเข้มข้นไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใส่สารสกัด เช่นกัน กลุ่มที่ใส่ NAC 10 มิลลิโมลาร์สามารถลดระดับ spontaneous ROS ได้ 41%

H_2O_2เหนี่ยวนำเซลล์โมโนไซด์ให้ผลิต ROS เพิ่มขึ้นประมาณ 5.5 เท่า (560 unit) และสารสกัดจากมะละกอฮอลแลนด์ลด H_2O_2-induced ROS ได้แปรตามความเข้มข้นของสารสกัดจาก 4%, 24%, 38% ตามลำดับ เฉพาะสารสกัดที่ 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้นที่ค่า ROS มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ใส่H_2O_2อย่างเดียว และสารสกัดจากมะละกอแขกดำลดระดับ H_2O_2-induced ROS ได้ตามความเข้มข้นที่มากขึ้นเช่นกันจาก 6%, 10%, 21% ตามลำดับ แต่เฉพาะที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้นที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ใส่ H_2O_2อย่างเดียว ในขณะที่ NAC 10 มิลลิโมลาร์สามารถลดระดับ H_2O_2-induced ROS ได้ 36% **(รูปที่14)**

สรุปว่าสารสกัดจากมะละกอทั้ง 2 พันธุ์ไม่มีฤทธิ์ลด Spontaneous ROS ได้ และ สารสกัด 20 -40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากมะละกอฮอลแลนด์ และ สารสกัดที่ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากมะละกอ

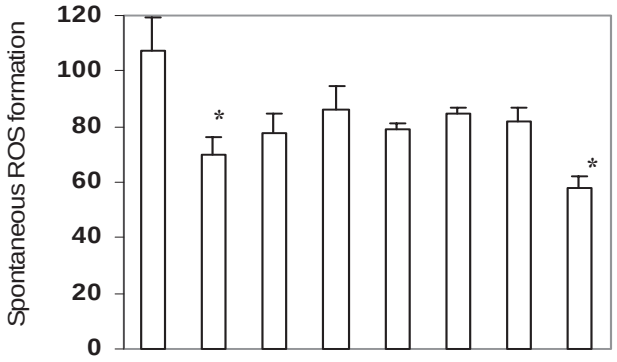
แขกดำ เท่านั้นที่ลดระดับ H_2O_2-induced ROS ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ใส่ H_2O_2 อย่างเดียว

4.3.5 ผลของสารสกัดจากเงาะต่อ spontaneous และ H_2O_2 induced ROS formation

จากรูปที่15 พบว่าเซลล์มี spontaneous ROS ประมาณ 92 unit เมื่อเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารสกัดจากเงาะสีชมพู สามารถลดระดับ spontaneous ROS ได้ตามความเข้มข้นของสารสกัดที่มากขึ้นจาก 7%, 13%, 23% แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใส่สารสกัด ในขณะที่สารสกัดจากเงาะโรงเรียนกลับเหนี่ยวนำให้เซลล์ผลิต ROS เพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใส่สารสกัดเช่นกัน กลุ่มที่ใส่ NAC 10 มิลลิโมลาร์สามารถลดระดับ spontaneous ROS ได้ 43%

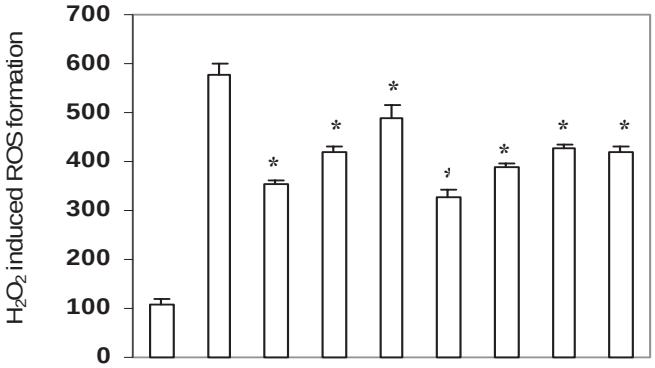
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เหนี่ยวนำเซลล์โมโนไซด์ U937 ให้ผลิต ROS เพิ่มขึ้นประมาณ 5.3 เท่า (487 unit) และสารสกัดจากเงาะสีชมพู สามารถลดระดับ H_2O_2-induced ROS ได้ตามความเข้มข้นของสารสกัดที่มากขึ้นจาก 6%, 17%, 25% ตามลำดับ แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ใส่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างเดียว ในขณะที่สารสกัดจากเงาะโรงเรียนไม่มีผลต่อปริมาณ H_2O_2-induced ROS ในขณะที่ NAC 10 มิลลิโมลาร์สามารถลดระดับ H_2O_2-induced ROS ได้ 34% **(รูปที่16)**

สรุปว่าสารสกัดจากเงาะทั้งสองพันธุ์ไม่มีฤทธิ์ลดทั้ง Spontaneous และ H_2O_2-induced ROS ทุกความเข้มข้น



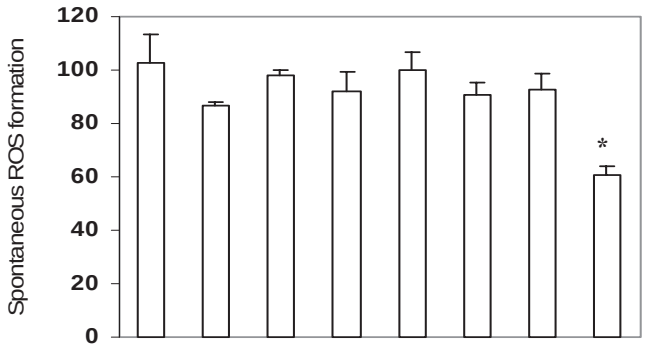
สารสกัดฝรั่งแป้นสีทอง (mg/ml)	-	40	20	10	-	-	-	-
สารสกัดฝรั่งกิมจู (mg/ml)	-	-	-	-	40	20	10	-
NAC 10 mM	-	-	-	-	-	-	-	+

รูปที่ 11 ผลของสารสกัดจากแป้นสีทอง และ กิมจูต่อปริมาณอนุมูลอิสระที่เกิดโดยธรรมชาติ (spontaneous ROS) ภายในเซลล์โมโนไซต์ U937 โดยทำการเลี้ยงเซลล์ที่มีหรือไม่มีสารสกัดที่ความเข้มข้น 10-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ NAC 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนย้อมด้วย DCFH-DA 20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที ปั่นล้างสีออก วัดค่า intracellular ROS ที่เกิดขึ้นที่ excitation 485 nm, emission 530 nm ที่เวลา 20 นาที ทำการเปรียบเทียบค่าระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารสกัดค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n = 3) ทำ 3 ครั้ง * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใส่สารสกัด ($p < 0.05$)



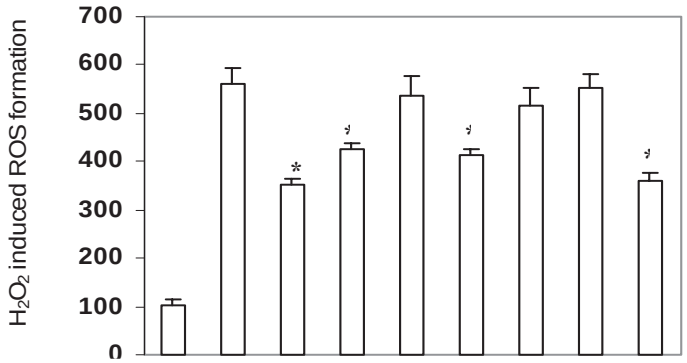
สารสกัดฝรั่งแป้นสีทอง (mg/ml)	-	-	40	20	10	-	-	-	-
สารสกัดฝรั่งกิมจู (mg/ml)	-	-	-	-	-	40	20	10	-
NAC 10 mM	-	-	-	-	-	-	-	-	+
H_2O_2 (400 µM)	-	+	+	+	+	+	+	+	+

รูปที่ 12 ผลของสารสกัดจากฝรั่งแป้นสีทอง และ กิมจูต่อปริมาณอนุมูลอิสระที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2 induced ROS) ภายในเซลล์โมโนไซต์ U937 โดยทำการเลี้ยงเซลล์ที่มีหรือไม่มีสารสกัดที่ความเข้มข้น 10-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ NAC 10 มิลลิโมลาร์ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนย้อมด้วย DCFH-DA 20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที ปั่นล้างสีออก ก่อนใส่ H_2O_2 ให้ได้ความเข้มข้นสุทธิ 400 ไมโครโมลาร์ หรือ ใส่ basal media เป็นกลุ่มควบคุมลบ (negative control) วัดค่า intracellular ROS ที่เกิดขึ้นที่ excitation 485 nm, emission 530 nm ที่เวลา 20 นาที ทำการเปรียบเทียบค่าระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมที่ใส่ H_2O_2 อย่างเดียวค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n = 3) ทำ 3 ครั้ง * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใส่ H_2O_2 อย่างเดียว ($p < 0.05$)



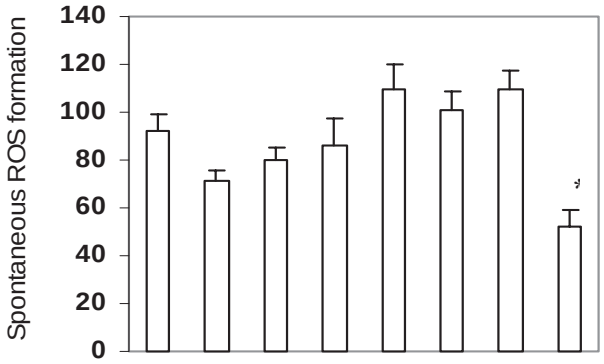
สารสกัดมะละกอฮอลแลนด์ (mg/ml)	-	40	20	10	-	-	-	-
สารสกัดมะละกอแขกดำ (mg/ml)	-	-	-	-	40	20	10	-
NAC 10 mM	-	-	-	-	-	-	-	+

รูปที่ 13 ผลของสารสกัดจากมะละกอฮอลแลนด์ และ แขกดำต่อปริมาณอนุมูลอิสระที่เกิดโดยธรรมชาติ (spontaneous ROS) ภายในเซลล์โมโนไซด์ U937 โดยทำการเลี้ยงเซลล์ที่มีหรือไม่มีสารสกัดที่ความเข้มข้น 10-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ NAC 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนย้อมด้วย DCFH-DA 20 μM เป็นเวลา 30 นาที ปั่นล้างสีออก วัดค่า intracellular ROS ที่เกิดขึ้นที่ excitation 485 nm, emission 530 nm ที่เวลา 20 นาที ทำการเปรียบเทียบค่าระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารสกัดค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n = 3) ทำ 3 ครั้ง * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใส่สารสกัด ($p < 0.05$)



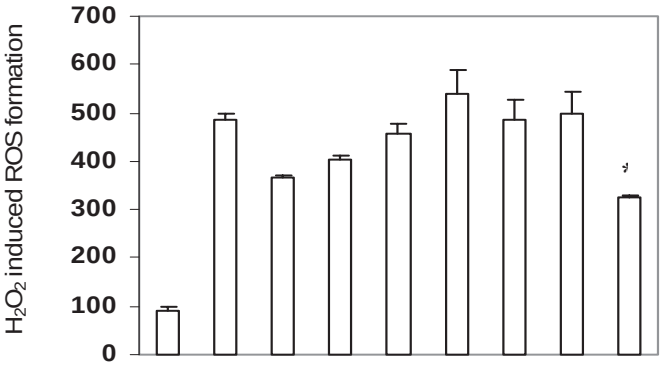
สารสกัดมะละกอฮอลแลนด์ (mg/ml)	-	-	40	20	10	-	-	-	-
สารสกัดมะละกอแขกดำ (mg/ml)	-	-	-	-	-	40	20	10	-
NAC 10 mM	-	-	-	-	-	-	-	-	+
H_2O_2 (400 μM)	-	+	+	+	+	+	+	+	+

รูปที่ 14 ผลของสารสกัดจากมะละกอฮอลแลนด์ และแขกดำต่อปริมาณอนุมูลอิสระที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2 induced ROS) ภายในเซลล์โมโนไซด์ U937 โดยทำการเลี้ยงเซลล์ที่มีหรือไม่มีสารสกัดที่ความเข้มข้น 10-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ NAC 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนย้อมด้วย DCFH-DA 20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที ปั่นล้างสีออก ก่อนใส่ H_2O_2 ให้ได้ความเข้มข้นสุทธิ 400 ไมโครโมลาร์ หรือ ใส่ basal media เป็นกลุ่มควบคุมลบ (negative control) วัดค่า intracellular ROS ที่เกิดขึ้นที่ excitation 485 nm, emission 530 nm ที่เวลา 20 นาที ทำการเปรียบเทียบค่าระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมที่ใส่ H_2O_2 อย่างเดียวค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n = 3) ทำ 3 ครั้ง * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใส่ H_2O_2 อย่างเดียว ($p < 0.05$)



สารสกัดเงาะสีชมพู (mg/ml)	-	40	20	10	-	-	-	-
สารสกัดเงาะโรงเรียน (mg/ml)	-	-	-	-	40	20	10	-
NAC 10 mM	-	-	-	-	-	-	-	+

รูปที่ 15 ผลของสารสกัดจากเงาะสีชมพู และโรงเรียน ต่อปริมาณอนุมูลอิสระที่เกิดโดยธรรมชาติ (spontaneous ROS) ภายในเซลล์โมโนไซต์ U937 โดยทำการเลี้ยงเซลล์ที่มีหรือไม่มีสารสกัดที่ความเข้มข้น 10-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ NAC 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนย้อมด้วย DCFH-DA 20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที ปั่นล้างสีออก วัดค่า intracellular ROS ที่เกิดขึ้นที่ excitation 485 nm, emission 530 nm ที่เวลา 20 นาที ทำการเปรียบเทียบค่าระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารสกัดค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n = 3) ทำ 3 ครั้ง * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใส่สารสกัด ($p < 0.05$)



สารสกัดเงาะสีชมพู (mg/ml)	-	-	40	20	10	-	-	-	-
สารสกัดเงาะโรงเรียน (mg/ml)	-	-	-	-	-	40	20	10	-
NAC 10 mM	-	-	-	-	-	-	-	-	+
H_2O_2 (400 µM)	-	+	+	+	+	+	+	+	+

รูปที่ 16 ผลของสารสกัดจากเงาะสีชมพู และ โรงเรียนต่อปริมาณอนุมูลอิสระที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2 induced ROS) ภายในเซลล์โมโนไซต์ U937 โดยทำการเลี้ยงเซลล์ที่มีหรือไม่มีสารสกัดที่ความเข้มข้น 10-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ NAC 10 มิลลิโมลาร์ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนย้อมด้วย DCFH-DA 20 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที ปั่นล้างสีออก ก่อนใส่ H_2O_2 ให้ได้ความเข้มข้นสุทธิ 400 ไมโครโมลาร์ หรือ ใส่ basal media เป็นกลุ่มควบคุมลบ (negative control) วัดค่า intracellular ROS ที่เกิดขึ้นที่ excitation 485 nm, emission 530 nm ที่เวลา 20 นาที ทำการเปรียบเทียบค่าระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมที่ใส่ H_2O_2 อย่างเดียวค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SD (n = 3) ทำ 3 ครั้ง * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใส่ H_2O_2 อย่างเดียว ($p < 0.05$)

4.3.6 เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านการเกิดอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลไม้ทั้ง 5 ชนิด

ในตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบความสามารถของสารสกัดจากผลไม้ทั้ง 5 ชนิดที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในการลดปริมาณ spontaneous ROS (% inhibition relative to control without extract addition) และ H_2O_2-induced ROS (% inhibition relative to control with H_2O_2 only) จากตารางที่3 จะเห็นว่าส้มโอทองดี และ ฝรั่งแป้นสีทอง มีประสิทธิภาพดีที่สุดเนื่องจากสามารถลดปริมาณ ROS ได้ทั้งแบบ spontaneous ROS และ H_2O_2-induced ROS ในขณะที่สารสกัดจากผลไม้อื่นลดเฉพาะ H_2O_2-induced ROS เท่านั้น โดยสารสกัดจากส้มโอขาวน้ำผึ้ง และ ฝรั่งกิมจูลด H_2O_2-induced ROS ได้เท่ากัน ตามด้วยสารสกัดจากมะละกอฮอลแลนด์ ทุเรียนหมอนทอง ทุเรียนชะนี และ มะละกอแขกดำ

ตารางที่ 3 ความสามารถของสารสกัดจากผลไม้ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในการลดปริมาณ spontaneous ROS (% inhibition relative to control without extract addition) และ H_2O_2- induced ROS (% inhibition relative to control with H_2O_2 only)

ตัวอย่างผลไม้	% inhibit spontaneous ROS formation	% inhibit H_2O_2- induced ROS formation
ส้มโอทองดี	28%	48%
ส้มโอขาวน้ำผึ้ง	NS*	43%
ทุเรียนหมอนทอง	NS	30%
ทุเรียนชะนี	NS	21%
ฝรั่งแป้นสีทอง	35%	39%
ฝรั่งกิมจู	NS	43%
มะละกอฮอลแลนด์	NS	38%
มะละกอแขกดำ	NS	21%
เงาะสีชมพู	NS	NS
เงาะโรงเรียน	NS	NS

*No statistical significant

4.4 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากตัวอย่างผลไม้ต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Cell viability) หลังการทดสอบฤทธิ์ลดอนุมูลอิสระ

หลังจากบ่มเซลล์โมโนไซต์ U937 กับสารสกัดผลไม้ที่ความเข้มข้นสุทธิ 40, 20 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน complete media phenol red free เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วย้อม intracellular ROS ของเซลล์ด้วย DCFH-DA ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วใส่สารละลายเซลล์ (cell suspension) ดังกล่าว ลงในถาดหลุมสีดำขนาด 96 หลุม ก่อนใส่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้ได้ความเข้มข้นสุทธิ 400 ไมโครโมลาร์ หรือ ใส่ basal media phenol red free สำหรับกลุ่มควบคุมลบ (negative

control) วัดค่า intracellular ROS ที่เกิดขึ้นที่ excitation 485 nm, emission 530 nm ที่เวลา 20 นาที ในการทดสอบนี้จะใช้ N-acetyl-L-cysteine (NAC) ความเข้มข้นสุทธิ 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติลดความเครียดของเซลล์จากสภาวะ oxidative stress และ ต้านการอักเสบเป็นกลุ่มควบคุมบวก (positive control) ในการทดลองร่วมด้วย จากนั้นหาปริมาณจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี SRB assay การหาปริมาณจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตแยกเป็น 2 ชุดการทดลอง

ในการศึกษา % inhibition of spontaneous ROS formation คำนวณอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากกลุ่มที่ไม่ใส่สารสกัด มีเฉพาะ basal medium อย่างเดียว คิดเป็น 100 เปอร์เซนต์ และ เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทดสอบของกลุ่มที่ใส่สารสกัดความเข้มข้นของผลไม้ 40, 20 และ 10 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร

ในการศึกษา % inhibition of H_2O_2 induced ROS formation คำนวณอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากกลุ่มที่ไม่ใส่สารสกัด มี basal medium กับ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ คิดเป็น 100 เปอร์เซนต์ และ เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทดสอบของกลุ่มที่ใส่สารสกัดความเข้มข้นของผลไม้ 40, 20 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

จากตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากตัวอย่างผลไม้ทั้ง 5 ชนิด ชนิดละ 2 สายพันธุ์นั้น ไม่เป็นพิษต่อเซลล์โดยดูจากค่าของ % Cell viability มากกว่าร้อยละ 80 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ใส่ basal medium อย่างเดียว และ ใน**ตารางที่ 5** เมื่อเลี้ยงร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 400 μM อัตราการมีชีวิตของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงกับสารสกัดและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ก็ยังมากกว่าร้อยละ 80 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ใส่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างเดียว ดังนั้นผลการทดลองที่พบการลดลงของทั้ง spontaneous และ H_2O_2 induced ROS formation จึงเป็นผลของสารสกัดจากผลไม้ ไม่ใช่ลดลงเพราะจำนวนเซลล์น้อย นอกจากนี้เราได้ทดสอบความเป็นพิษของ NAC ด้วยซึ่งพบว่า % Cell viability มากกว่าร้อยละ 80 เช่นกัน (ผลอยู่ในหมายเหตุ)

สรุปว่าความเข้มข้นของสารสกัดจากผลไม้ที่ใช้ในการศึกษานี้ใช้ได้ มีผลต่อจำนวนเซลล์ในระดับที่ยอมรับได้ ดังนั้นฤทธิ์ ROS ที่ได้แสดงในผลมาจากสารสกัดในผลไม้จริง นอกจากนี้ในทุกการทดลองจะมีกลุ่มควบคุมบวกทำควบคู่ไปทุกครั้งเพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพของการทดสอบซึ่งในกลุ่มที่ใส่ NAC (กลุ่มควบคุมบวก) ให้ผลการลดการผลิต Spontaneous ROS 41% เทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด และ H_2O_2 induced ROS 34% เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ H_2O_2 อย่างเดียว

ตารางที่4 ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต (% Cell viability) ของเซลล์โมโนไซต์ U937 ที่ได้รับสารสกัดจากตัวอย่างผลไม้ในแต่ละความเข้มข้น (mean ± SD; n = 3) ทำ 3 ครั้ง

ตัวอย่างผลไม้	ความเข้มข้นของสารสกัดจากตัวอย่าง (mg/ml)			
	0	**40**	**20**	**10**
ส้มโอขาวน้ำผึ้ง	100	92 ± 7	97 ± 7	103 ± 3
ส้มโอทองดี	100	111 ± 11	106 ± 6	98 ± 9
ทุเรียนหมอนทอง	100	91 ± 3	87 ± 0	97 ± 2
ทุเรียนชะนี	100	96 ± 2	102 ± 3	100 ± 2
ฝรั่งกิมจู	100	102 ± 11	107 ± 8	105 ± 14
ฝรั่งแป้นสีทอง	100	111 ± 12	109 ± 11	102 ± 11
มะละกอฮอล์แลนด์	100	99 ± 4	99 ± 3	104 ± 3
มะละกอแขกดำ	100	131 ± 5	114 ± 4	108 ± 7
เงาะสีชมพู	100	96 ± 4	101 ± 3	96 ± 2
เงาะโรงเรียน	100	94 ± 3	100 ± 3	101 ± 5

หมายเหตุ: กลุ่ม NAC without H_2O_2 มี % Cell viability = 98 ± 4 (n=15)

ตารางที่5 ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต (% Cell viability) ของเซลล์โมโนไซต์ U937 ที่ได้รับสารสกัดจากตัวอย่างผลไม้ในแต่ละความเข้มข้นร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (mean ± SD; n = 3) ทำ 3 ครั้ง

ตัวอย่างผลไม้	ความเข้มข้นของสารสกัดจากตัวอย่าง (mg/ml)			
	0	**40**	**20**	**10**
ส้มโอขาวน้ำผึ้ง	100	100 ± 4	96 ± 2	99 ± 5
ส้มโอทองดี	100	105 ± 3	106 ± 2	100 ± 5
ทุเรียนหมอนทอง	100	92 ± 1	89 ± 1	97 ± 1
ทุเรียนชะนี	100	97 ± 3	102 ± 2	100 ± 3
ฝรั่งกิมจู	100	99 ± 7	98 ± 5	105 ± 5
ฝรั่งแป้นสีทอง	100	102 ± 3	107 ± 8	97 ± 0
มะละกอฮอล์แลนด์	100	106 ± 4	105 ± 2	112 ± 5
มะละกอแขกดำ	100	122 ± 6	118 ± 4	114 ± 7
เงาะสีชมพู	100	101 ± 3	108 ± 9	100 ± 2
เงาะโรงเรียน	100	101 ± 1	102 ± 1	111 ± 6

หมายเหตุ: กลุ่ม NAC with H_2O_2 มี % Cell viability = 104 ± 6 (n=15)

กลุ่ม Basal medium without H_2O_2มี % Cell viability = 106 ± 10 (n=15)

5. อภิปรายผลการศึกษา

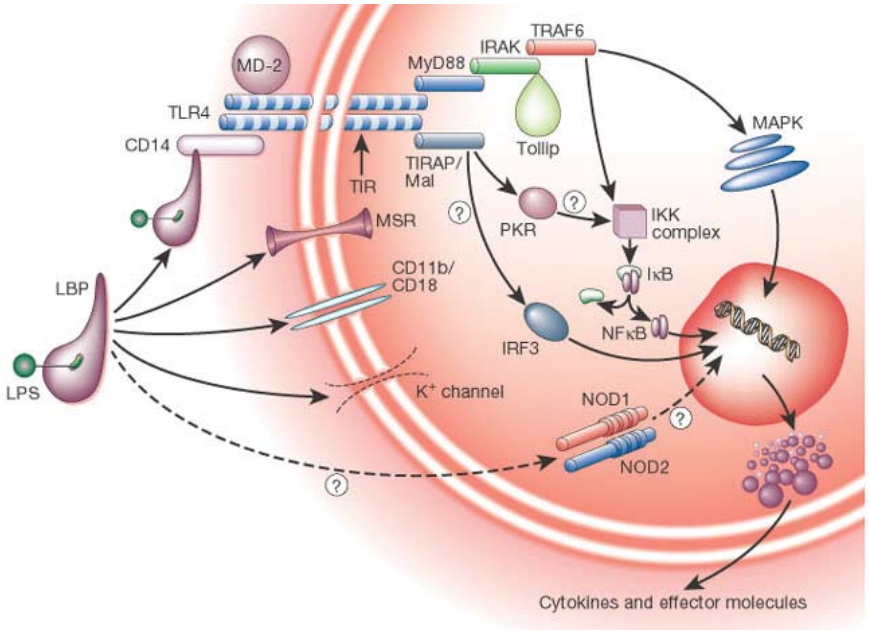
5.1. การเหนี่ยวนำให้เซลล์ U937 เกิดภาวะอักเสบ

กระบวนการอักเสบเป็นกระบวนการที่ซับซ้อน และมีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต เพื่อใช้ในการตอบสนองต่อตัวกระตุ้นจากภายในและภายนอกร่างกาย ในสภาวะการอักเสบแบบเฉียบพลันเซลล์หลายชนิดที่มีหน้าที่จะถูกเหนี่ยวนำให้เข้ามาในบริเวณที่ถูกบุกรุก เซลล์ที่เข้าทำหน้าที่ในบริเวณดังกล่าวจะมีการเคลื่อนย้ายเข้าสู่บริเวณที่อักเสบเป็นลำดับ โดยเซลล์เหล่านี้จะหลั่งสาร เช่น cytokines และ acute phase protein ออกมากำจัดตัวกระตุ้น หรือซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย ทำให้ร่างกายสามารถเข้าสู่สภาวะปกติได้ อย่างไรก็ตามถ้ากระบวนดังกล่าวเกิดเป็นเวลานานหรือเกิดบ่อยอาจเนื่องจากมีการสัมผัสกับตัวกระตุ้นเป็นเวลายาวนาน หรือร่างกายอยู่ในสภาวะบางอย่างที่ควบคุมกระบวนการดังกล่าวไม่ได้ เช่น immunodeficiency หรือ aging มีผลให้กระบวนการอักเสบพัฒนาไปเป็นแบบเรื้อรัง ซึ่งเป็นผลเสียต่อร่างกาย โดยได้มีการศึกษามากมายรายงานว่าในระหว่างที่เกิดกระบวนการอักเสบสารคัดหลั่งหลายๆชนิด รวมถึง ไซโตไคน์ และ คีโมไคน์ ที่ผลิตขึ้นจากเซลล์ที่ทำหน้าที่เหล่านั้นเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพของโรคเรื้อรังหลายชนิด ดังนั้นถ้าสามารถทำให้เซลล์ลดการหลั่งสารคัดหลั่งดังกล่าวได้ ก็น่าจะมีส่วนทำให้ลดปัจจัยเสี่ยง หรือ ลดระดับความรุนแรงของโรคที่มีสาเหตุมาจากกระบวนการอักเสบแบบเรื้อรังได้ด้วย

ในขณะเกิดกระบวนการอักเสบ เซลล์เม็ดเลือดขาวในระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity จะเริ่มทำงานก่อนโดย เซลล์ macrophages/monocytes เป็นเม็ดเลือดขาวที่มีบทบาทมากและมักสะสมอยู่ในบริเวณที่มีการอักเสบ ซึ่ง macrophages ทำหน้าที่เป็น antigen presenting cells ทำหน้าที่กินสิ่งแปลกปลอม นอกจากนี้ยังทำหน้าที่ผลิต inflammatory cytokines หลายชนิด รวมถึง cytokines ที่ทำหน้าที่กระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte ซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที่อยู่ในระบบ adaptive immunity ทำให้เซลล์ lymphocyte active ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย inflammatory cytokines ที่มีบทบาทสำคัญดังกล่าว เช่น IL-1, TNF-α, IL-6 นอกจากนี้ macrophages ยังหลั่ง inflammatory enzymes เช่น COX-2, iNOS และ NO ซึ่งมักพบว่ามีการแสดงออกมากในเซลล์มะเร็งหลายชนิด TNF-α เป็นสารสื่อสำคัญ (key mediator)ในกระบวนการอักเสบซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้นโปรตีน NF-κB ซึ่งเป็น master transcription factor ที่ควบคุมการแสดงออกของ pro-inflammatory mediators อื่นๆในเซลล์เป้าหมาย (Balkwill, 2002) หลายชนิด เช่น IL-6, IL-8 และ MCP-1 เป็นต้น เนื่องจาก TNF-α มีบทบาทควบคุมการหลั่ง pro-inflammatory mediators อื่นๆอีกทีหนึ่ง ดังนั้นจึงมีการนำ TNF-α neutralizing monoclonal antibodies ชื่อ inflixmab และ adalimubab มาใช้ในการลดอาการอักเสบในคนไข้โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (Rheumatoid arthritis) (Kavanaugh et al 2000, Torrance et al 2004) นอกจากนี้ยังมีการใช้ยาลดการอักเสบชนิด nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) ในการรักษาอาการปวดข้อ อย่างไรก็ตามยาดังกล่าวมีผลข้างเคียงไม่พึงประสงค์โดยเฉพาะยาชื่อ Vioxx และ Celebrex มีผลต่อเส้นเลือดในหัวใจ (Couzin, 2004; Davies & Jamali, 2004) ดังนั้นจึงมีความสนใจที่จะนำสารจากธรรมชาติในพืชซึ่งเป็นแหล่งสำคัญของสารพฤกษเคมีมากมาย

หลายพันชนิดซึ่งมีคุณประโยชน์ต่อสุขภาพหลายด้าน โดยเฉพาะอย่างยิ่งคุณประโยชน์ในแง่การต้านการอักเสบและลดอนุมูลอิสระโดยได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางในการใช้สารสกัดจากพืชหลายชนิด รวมถึงผักสมุนไพร ผลไม้ และ เครื่องเทศที่ใช้เป็นอาหารในชีวิตประจำวัน ในการศึกษาถึงกลไกในระดับอณูชีววิทยาของสารสกัดในการลดการอักเสบ และ ลดอนุมูลอิสระ (Yoon & Baek, 2005; Aggarwal & Shishodia, 2006; Kaefer & Milner, 2008)

ในการศึกษานี้เราใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ U937 ซึ่งจะมีคุณสมบัติเปลี่ยนเป็นเซลล์แมคโครฟาจเมื่อกระตุ้นด้วยสาร PMA หลังจากนั้นจำลองสภาวะการอักเสบโดยเหนี่ยวนำให้เซลล์อักเสบด้วยเลี้ยงเซลล์ร่วมกับผนังเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียชนิดกรัมลบ คือ lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งเป็นระบบที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการทดสอบศักยภาพในการลดการอักเสบของสารเคมีสังเคราะห์ หรือ สารจากธรรมชาติในพืช (Chiavaroli et al 2008, Del Bufalo et al 2011, La et al 2010) จาก**รูป A** เมื่อเซลล์แมคโครฟาจจับกับ LPS-binding protein (LBP) แล้ว LPS-LBP complex จะเข้าจับกับ Toll-like receptor 4 (TLR-4) และโปรตีน MD-2 บนผิวเซลล์ ซึ่งกระตุ้นโปรตีนที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์อีกหลายชนิด (signal transduction protein) รวมถึง Mitogen activated protein kinases (MAPKs) มีผลกระตุ้น transcription factors ชนิด NF-ΚB ซึ่งมีบทบาทควบคุมการแสดงออกของยีนส์กว่า 200 ชนิดรวมถึง pro-inflammatory mediators ยีนส์ด้วย เช่น TNF-α, IL-6, IL-8 และ MCP-1(Cohen 2002)



รูป A Cell surface recognition of lipopolysaccharide (Cohen 2002)

จากระบบการทดสอบในการศึกษานี้ใช้ LPS 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะอักเสบจากเซลล์ PMA-induced differentiated U937 เป็นเวลา 18 ชั่วโมงซึ่งจากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าเป็นเวลาที่เหมาะสมในการผลิตไซโตไคน์ส่วนใหญ่ (Garrelds et al 1999, La et al 2010, Meja et al 2008) ในการศึกษานี้โดยเฉลี่ย LPS เหนี่ยวนำให้เซลล์ PMA-induced differentiated U937 ผลิต TNF-α ได้เพิ่มขึ้นประมาณ 4.2 เท่าของระดับพื้นฐาน (Basal level) ผลิต IL-6 ได้เพิ่มขึ้นประมาณ 15 เท่าของระดับพื้นฐาน ผลิต IL-8ได้เพิ่มขึ้นประมาณ 4.9 เท่าของระดับพื้นฐาน ในขณะที่เหนี่ยวนำให้ผลิต MCP-1 ได้เพิ่มขึ้นเพียง 1.7 เท่าของระดับพื้นฐาน โดยระบบการทดสอบดังกล่าวไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นในการศึกษาศักยภาพของสารสกัดจาก มะละกอ ส้มโอ ฝรั่ง เงาะ และ ทุเรียนชนิดละ 2 สายพันธุ์ เราจึงใช้ระบบนี้ในการติดตามประสิทธิภาพของสารสกัดจากผลไม้ดังกล่าวต่อปริมาณ TNF-α, IL-6, IL-8 และ MCP-1 นอกจากนี้เรายังใช้สาร N-acetylcysteine (NAC) ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ลดการอักเสบทั้งในเซลล์ (Geiler et al 2010) และ ในหนูทดลองที่เหนี่ยวนำให้เกิดอาการข้ออักเสบด้วยคอลลาเจน (Collagen II induced arthritis)(Kröger et al 1999) เป็นกลุ่มควบคุมบวก (positive control) ในการทดสอบทุกครั้ง เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพของระบบการทดสอบ โดยเฉลี่ย NAC 10 มิลลิโมลาร์ สามารถลดการผลิต TNF-α และ IL-6 จาก LPS induced PMA-activated U937 cells ได้ 52% และ 54% ตามลำดับ ในขณะเดียวกันก็สามารถลด IL-8 และ MCP-1 ได้ 33% และ 64% ตามลำดับ

5.2. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากผลไม้ต่อปริมาณ TNF-α, IL-6, IL-8 และ MCP-1 จากเซลล์ PMA-induced U937 ที่เหนี่ยวนำด้วย LPS

ในการศึกษานี้เราทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากผลไม้ต่อระดับไซโตไคน์ 2 ชนิดคือ TNF-α และ IL-6 ซึ่งเป็นไซโตไคน์หลักที่ผลิตโดยเซลล์ที่มีหน้าที่ตอบสนองในกระบวนการอักเสบ (Stow et al 2009) TNF-α เป็นไซโตไคน์ตัวแรกๆที่ผลิตขึ้นเมื่อเซลล์แมคโครฟาจถูกกระตุ้นด้วย LPS ผ่านระบบ NF-κB (Guha and Mackman 2001) TNF-α สามารถกระตุ้นให้เซลล์อื่นๆผลิต pro-inflammatory mediators อื่นๆได้ด้วย เช่น NO, IL-1 และ IL-6 (Sethi et al 2008) ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคต่างๆที่มีสาเหตุจากการอักเสบ มีรายงานพบว่าระดับ TNF-α ที่สูงในซีรั่มมีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของความเสียหายในกระดูกข้อต่อในผู้ป่วยโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (Choy and Panayi 2001) และการรักษาโดยให้ยาที่ขัดขวางการผลิต TNF-α จะทำให้การผลิตไซโตไคน์อื่นๆ เช่น IL-1, IL-6 และ IL-8 จาก synovial cells ของคนไข้โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ลดลงด้วย (Butler et al 1995) ทำให้อาการของโรคบรรเทาลง นอกจากนี้ TNF-α ที่หลั่งจาก adipose tissue และ macrophage ที่แทรกอยู่ระหว่างเซลล์ไขมัน ยังเป็นตัวการทำให้เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลินจากคนที่เป็นโรคอ้วน (Tilg & Moschen, 2006) ที่สำคัญ TNF-α ยังเป็น intrinsic tumor promoter ซึ่งมีบทบาทต่อกระบวนการเกิดมะเร็ง (carcinogenesis) พบว่ามะเร็งจากเนื้อเยื่อหลายๆชนิดมีการแสดงออกของ TNF-α สูง (overexpression) (Ahmed et al 2001, Ferrajoli et al

2002, Szlosarek et al 2006) ระดับการแสดงออกของ TNF-α แปรผันตามความรุนแรงของโรคมะเร็งด้วย เช่น มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งเต้านม และ มะเร็งปากมดลูก (Ahmed et al 2001, García-Tuñón et al 2006, Michalaki et al 2004) นอกจากนี้ระดับ serum TNF-α ยังมีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษามะเร็งด้วย ซึ่งชี้ให้เห็นว่าระดับ serum TNF-α มีบทบาทอย่างมากต่อการพัฒนาการเกิดมะเร็ง และ ยังเป็นตัวชี้วัดที่ดีในการติดตามผลการรักษา และ บ่งบอกภาวะการเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็ง หลักฐานในสัตว์ทดลองพบว่า หนูที่เป็น Knockout TNF-α หรือ Knockout TNFR-1 จะทนต่อการเหนี่ยวนำมะเร็งผิวหนัง (Arnott et al 2003) นอกจากนี้ยังพบการเกิดเนื้องอกน้อยกกว่ากลุ่มควบคุมที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ด้วยสาร azoxymethane และ dextran sulfate sodium (Popivanova et al 2008) TNF-α ยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการ tumor angiogenesis, invasive และ metastasis โดยกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ cytokines, chemokines และ angiogenic factors ซึ่งเป็นตัวส่งเสริมให้มีการสร้างเส้นเลือดไปเลี้ยงก้อนเนื้องอกทำให้เนื้อร้ายมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (Kulbe et al 2007, Nabors et al 2003) จากบทบาทที่สำคัญของ TNF-α ต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคเรื้อรังหลายๆโรคดังกล่าว ถ้าสารใดสามารถลดการผลิต TNF-α หรือ ลดการแสดงออกของ TNF-α ได้ก็น่าจะช่วยลดปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรังที่มีสาเหตุมาจากการอักเสบได้ จากผลการทดลองในการศึกษานี้พบว่าสารสกัดจากทุเรียน ฝรั่ง และ เงาะทั้งสองสายพันธุ์สามารถลดการผลิต TNF-α จาก LPS induced PMA-activated U937 cells ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่สารสกัดจาก ส้มโอ และ มะละกอไม่พบศักยภาพดังกล่าวในการศึกษานี้

Interleukine-6 (IL-6) ก็เช่นเดียวกันกับ TNF-α เป็นไซโตไคน์ ที่มีหน้าที่ตอบสนองในกระบวนการอักเสบ (Stow et al 2009) โดยผ่านการกระตุ้นระบบ NF-κB เช่นเดียวกัน IL-6 เป็นโปรตีนหลักในกระบวนการ acute phase response ซึ่งมีบทบาทในการตอบสนองการอักเสบทั้งในระดับ systemic และ local โดย IL-6 จะกระตุ้นให้เซลล์บริเวณผนังหลอดเลือดหลั่งสารพวกคีโมไคน์เช่น IL-8 และ MCP-1 ซึ่งโปรตีนดังกล่าวจะเหนี่ยวนำให้เม็ดเลือดขาวจากกระแสเลือดเข้ามาสะสมในบริเวณที่มีการอักเสบมากขึ้นเพื่อทำหน้าที่กำจัดสิ่งแปลกปลอม (Kaplanski et al 2003) หน้าที่สำคัญอีกอย่างของ IL-6 คือเป็นตัวกระตุ้นให้เซลล์ตับผลิต C-reactive protein และ amyloid A ซึ่งจะส่งเสริมให้มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันมากขึ้นระดับ IL-6 มีส่วนทำให้พยาธิสภาพของโรคต่างๆที่มีสาเหตุจากการอักเสบรุนแรงเช่นเดียวกับ TNF-α (Cronstein 2007, Pradhan et al 2001) โดยระดับ IL-6 ในซีรั่มแปรผันตามระดับความรุนแรงของโรคในผู้ป่วยโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (Hennigan and Kavanaugh 2008) นอกจากนี้ระดับ IL-6 ยังมีความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพของมะเร็งที่มีสาเหตุเริ่มต้นจากการอักเสบ (Hodge et al 2005) มีการศึกษาแสดงให้เห็นว่าระดับ IL-6, TNF-α, IL-1β ที่สูงขึ้นในซีรั่มหนูมีความสัมพันธ์ในการส่งเสริมให้เกิดการสร้างเส้นเลือดเข้าไปเลี้ยงก่อนเนื้องอก (Sunila and Kuttan 2006) และ อีกการศึกษาหนึ่งรายงานว่าระดับ IL-6 เป็นตัวชี้วัดภาวะการกระจายของโรคมะเร็งในผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก (Drachenberg et al 1999) ในหนูสายพันธุ์ genetic susceptible to collagen-induced arthritis (CIA) ที่มีภาวะพร่อง IL-6 จะแสดงอาการของโรคข้อ

อักเสบช้ากว่า และ มีอาการข้ออักเสบรุนแรงน้อยกว่าหนูที่มี IL-6 ปกติเมื่อมีการฉีดคอลลาเจนเข้าข้อ และการศึกษาทางคลินิกพบว่าการให้ tocilizumab ซึ่งเป็น humanized monoclonal antibody ต่อ soluble IL-6R สามารถลดอาการทางคลินิก และ ลดความรุนแรงของโรคในผู้ป่วยโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (Plushner 2008) และการรักษาด้วย anti-IL-6 มีผลทำให้ผู้ป่วยมี physical function ดีขึ้น ข้อถูกทำลายช้าลง และ ลดภาวะโลหิตจาง (Nishimoto et al 2000, Tanaka et al 2010) ดังนั้นการลดระดับ IL-6 น่าจะเป็นเป้าหมายหนึ่งในการลดอาการเจ็บป่วยจากการอักเสบได้ดีเช่นกัน จากการศึกษานี้พบว่าสารสกัดจากส้มโอทองดี และ ฝรั่งกิมจูเท่านั้นที่สามารถลด IL-6 จาก LPS induced PMA-activated U937 cells ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่สารสกัดจาก ส้มโอขาวน้ำผึ้ง ฝรั่งแป้นสีทอง ทุเรียน มะละกอ และ เงาะทั้งสองสายพันธุ์ไม่พบบศักยภาพดังกล่าวในการศึกษานี้

นอกจากไซโตไคน์แล้วเม็ดเลือดขาวก็หลั่งคีโมไคน์ด้วยเมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS สารคีโมไคน์มีบทบาทในการเหนี่ยวนำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวมาสะสมบริเวณที่มีการอักเสบเพื่อกำจัดสาเหตุของการอักเสบออกจากร่างกาย ในกรณีที่มีภาวะการอักเสบเรื้อรัง เช่น ในคนไข้ข้ออักเสบรูมาตอยด์เซลล์เม็ดเลือดขาวจะไปสะสมบริเวณเนื้อเยื่อข้อส่งผลให้มีการอักเสบมากขึ้นส่งเสริมให้มีการอักเสบรุนแรงขึ้น IL-8 หรือ CXC chemokine เป็นคีโมไคน์ที่เหนี่ยวนำให้ neutrophil เข้ามาสะสมบริเวณที่มีการอักเสบนอกจากนี้ยังทำให้มีการปล่อยสารเคมีออกจาก granule ที่อยู่ในเซลล์ neutrophil ด้วย เซลล์มะเร็งจากหลายๆอวัยวะ, endothelial cells, infiltrating neutrophils และ tumor-associated macrophages โดยเฉพาะมะเร็งลำไส้ใหญ่พบว่ามีการแสดงออกของ IL-8 และ/หรือ receptor มากขึ้น (Ning and Lenz 2012) ซึ่งบ่งบอกถึงบทบาทของ IL-8 ในการควบคุมสภาวะ tumor microenvironment IL-8 เป็นตัวส่งสัญญาณส่งเสริมให้มีการสร้างเส้นเลือด (angiogenesis) กระตุ้นให้เซลล์มะเร็งแบ่งตัวมากขึ้น ส่งเสริมให้เซลล์มะเร็งมีการเคลื่อนตัวแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่น พร้อมทั้งเหนี่ยวนำให้ neutrophils เข้ามาสะสมในบริเวณที่เกิดมะเร็งเพิ่มความรุนแรงของโรคมากขึ้น นอกจากนี้ IL-8 ยังมีส่วนทำให้เซลล์มะเร็งดื้อต่อการใช้รังสีรักษา (Waugh and Wilson 2008) นอกจากโรคมะเร็งแล้ว ในคนไข้โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ยังพบว่ามี IL-8 ใน serum และ synovial fluid สูง (Szekanecz et al 2010) ซึ่งพบว่าการใช้ anti-TNF-α (infliximab) ร่วมกับ methotrexate ในการรักษาคนไข้โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ ทำให้ serum IL-8 ลดลงซึ่งมีความสัมพันธ์กับการลดลงของตัวชี้วัดที่บ่งบอกถึงความรุนแรงของโรคข้ออักเสบเช่น Erythrocyte sedimentation rate (ESR), C-rective protein (CRP), Diseases activity score (DAS), จำนวนข้อที่บวม และ ภาวะข้อนิ้วเท้า และ นิ้วมือแข็งตอนเช้า (Klimiuk et al 2006) ดังนั้นการลดปริมาณ IL-8 น่าจะเป็นเป้าหมายหนึ่งของการรักษามะเร็ง และ ช่วยบรรเทาอาการโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ได้ จากผลการศึกษานี้พบว่าสารสกัดจากส้มโอ และ ทุเรียนทั้งสองสายพันธุ์เท่านั้นที่มีฤทธิ์ลด IL-8 จาก LPS induced PMA-activated U937 cells ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่สารสกัดจาก ฝรั่ง มะละกอ และ เงาะทั้งสองสายพันธุ์ไม่พบศักยภาพดังกล่าวในการศึกษานี้

MCP-1 หรือ CCL2 เป็นคีโมไคน์ที่เหนี่ยวนำเซลล์โมโนไซต์ memory T cells, natural killer (NK) cells และ dendritic cells เข้ามาสะสมบริเวณที่มีการอักเสบ (Balkwill 2004) CCL2 ส่งเสริมให้เซลล์มะเร็ง

ต่อมลูกหมากแบ่งตัวมากขึ้น และ ส่งเสริมให้เซลล์มะเร็งเคลื่อนตัวแพร่กระจายไปอวัยวะอื่นได้เร็วขึ้น นอกจากนี้ยังกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งมีการแสดงออกโปรตีน survivin มากขึ้นซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำให้เซลล์รอดจากการถูกทำลายจากระบบ autophagic death (Zhang et al 2010) ในมะเร็งเต้านมพบว่าระดับ CCL2 มีความสัมพันธ์กันในทางบวกกับ tumor associated macrophage (TAM) infiltration และ กระบวนการสร้างเส้นเลือดใหม่เข้าไปเลี้ยงก้อนมะเร็ง (Valkovi$\acute{c}$ et al 2002) การให้ neutralizing antibody ต่อ CCL2 สามารถลดความหนาแน่นของเส้นเลือดที่ไปเลี้ยงก้อนเนื้อมะเร็งต่อมลูกหมากได้ (Loberg et al 2007) ซึ่งจะทำให้ก้อนมะเร็งไม่โต นอกจากนี้ MCP-1 ยังมีบทบาทสำคัญต่อโรคที่มีสาเหตุจากความอ้วน และ เบาหวาน (obesity- and diabetes-related diseases) (Panee 2012) เช่น บทบาทของ MCP-1 ต่อพยาธิสภาพจากโรคหัวใจ (cardiovascular diseases) มีการศึกษาในกลุ่มประชากรพบความสัมพันธ์เชิงบวกของระดับ MCP-1 และ ปัจจัยเสี่ยงของโรคหัวใจขาดเลือด (atherosclerosis) เช่น serum high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) และ plasma fibrinogen (Deo et al 2004, Piemonti et al 2009) เนื่องจาก MCP-1ดึงดูดเซลล์โมโนไซต์จากกระแสเลือดเข้ามาสู่ผนังหลอดเลือดทำให้เกิดเป็น foam cells และกลายเป็น atherosclerotic plaque ในที่สุดทำให้หลอดเลือดตีบลงเลือดไหลได้ไม่คล่อง ที่สุดเลือดไม่ไปเลี้ยงหัวใจ MCP-1 ทำให้เกิด ischaemic angiogenesis (Niu and Kolattukudy 2009) นอกจากนี้ใน mucosa ของคนไข้ inflammatory bowel diseases (IBD) ยังพบการเพิ่มขึ้นของ MCP-1 mRNA และโปรตีน(Atreya and Neurath 2010) ด้วย และในหนูที่มีภาวะพร่อง MCP-1 เมื่อเหนี่ยวนำให้อักเสบจะมีอาการรุนแรงน้อยกว่า มีอัตราการตายต่ำกว่าหนู wild-type (Khan et al 2006) ระดับ MCP-1ยังมีความสัมพันธ์ทางบวกกับ clinical severity score ในหมาที่เป็นโรค IBD (Maeda et al 2011) จากบทบาทสำคัญของ MCP-1 ต่อการเกิดโรค และ การเกิดพยาธิสภาพของโรคต่างๆดังกล่าว การลดปริมาณ MCP-1 น่าจะช่วยลดปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดดังกล่าวได้ จากผลการศึกษานี้พบว่าสารสกัดจากส้มโอทั้งสองสายพันธุ์ และ ฝรั่งแป้นสีทอง เท่านั้น ที่มีฤทธิ์ลด MCP-1 จาก LPS induced PMA-activated U937 cells ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่สารสกัดจากฝรั่งกิมจู ทุเรียน มะละกอ และ เงาะทั้งสองสายพันธุ์ไม่พบศักยภาพดังกล่าวในการศึกษานี้

โดยสรุป ถ้าเปรียบเทียบศักยภาพของสารสกัดส้มโอขาวน้ำผึ้ง และ ทองดีพบว่าสารสกัดส้มโอทองดี มีศักยภาพในการลดการอักเสบดีกว่าสารสกัดจากส้มโอขาวน้ำผึ้งเนื่องจากสามารถลด IL-6, IL-8 และ MCP-1 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่สารสกัดจากส้มโอขาวน้ำผึ้งที่ความเข้มข้นเดียวกันลดได้เฉพาะ IL-8 และ MCP-1ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเท่านั้น ดังแสดงใน**รูปที่2** เป็นไปได้ว่าส้มโอทองดีมีสารพฤกษเคมีที่ออกฤทธิ์ลดการอักเสบสูงกว่าส้มโอขาวน้ำผึ้ง ถึงแม้ว่าในการศึกษานี้ไม่ได้วิเคราะห์หาสารพฤกษเคมี แต่ได้มีการวิเคราะห์สารพฤกษเคมีบางชนิดในการศึกษาอื่น พบว่า ส้มโอทองดีมีสารฟลาโวนอยด์รวม (total flavonoids as Myricetin, Luteolin, Hesperetin, Kaempferol and Apigenin) 17, 534 ไมโครกรัมต่อกรัม ในขณะที่ส้มโอขาวน้ำผึ้งมีเพียง 7,454 ไมโครกรัมต่อกรัม เท่านั้น สารกลุ่มในผลไม้นี้มีการศึกษาศักยภาพในการลดการอักเสบมากมาย (Benavente-Garcia and Castillo 2008, González-Gallego et al 2010, Spencer et al 2012) นอกจากนี้ส้มโอทองดียังพบสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (β-carotene, Lycopene)

และ vitamin E สูงกว่าส้มโอขาวน้ำผึ้ง (Kongkachuichai et al 2010) lycopene ช่วยลด IL-8 ที่ผลิตจากแมคโครฟาจได้ (Simone et al 2011) และลดการอักเสบของเซลล์บุหลอดเลือด (Hung et al 2008) ในขณะที่ β-carotene ลดการแสดงออกไซโตไคน์จาก LPS-induced murine macrophage (Bai et al 2005)

ในขณะที่สารสกัดจากทุเรียนทั้งสองสายพันธุ์มีฤทธิ์ลดการอักเสบใกล้เคียงกันเนื่องจากสามารถลดปริมาณ TNF-α และ IL-8ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเท่าๆกัน ดังแสดงใน**รูปที่3** Kongkachuichai และคณะ (2010) พบว่าทุเรียนทั้งสองพันธุ์มีสารฟลาโวนอยด์รวม (total flavonoids as Myricetin, Luteolin, Hesperetin, Kaempferol และ Apigenin) และ สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (α-carotene, β-carotene, β-cryptoxanthin, Lutein, Zeaxanthin, Lycopene) ซึ่งน่าจะเป็นสารที่มีบทบาทดังกล่าว

และสารสกัดจากฝรั่งทั้งสองสายพันธุ์มีฤทธิ์ใกล้เคียงกันคือทุกความเข้มข้นของสารสกัดจากทั้งสองสายพันธุ์ลดปริมาณ TNF-α ได้เหมือนกัน สารสกัดจากฝรั่งกิมจูเท่านั้นลด IL-6 ในขณะที่สารสกัดจากฝรั่งแป้นสีทองเท่านั้นที่ลด MCP-1ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติดังแสดงใน**รูปที่4** ในผลฝรั่งทั้งสองพันธุ์มี Hesperetin, Kaempferol และ Apigenin แต่เฉพาะแป้นสีทองเท่านั้นที่มี Myricetin, Luteolin และ Quercetin (Kongkachuichai et al 2010) ผลต่อสุขภาพของฝรั่งส่วนใหญ่มักทำในใบ ในผลฝรั่งพบว่าสามารถลดน้ำตาลและไขมัน ในเลือด (Gutierrez et al 2008) ได้

น่าแปลกที่เราไม่พบฤทธิ์ลดปริมาณตัวชี้วัดการอักเสบทั้ง 4 ตัว ในสารสกัดจากมะละกอทั้งสองสายพันธุ์ที่ความเข้มข้น 0.05-0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรดังแสดงใน**รูปที่5** ทั้งๆที่มะละกอมีสารฟลาโวนอยด์รวม (total flavonoids as Myricetin, Luteolin, Hesperetin และ Kaempferol) (Kongkachuichai et al 2010) กลุ่ม phenolic acids และ กลุ่มแคโรทีนอยด์ (Rivera-Pastrana et al 2010) เป็นไปได้ว่าความเข้มข้นของสารพฤกษเคมีในสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.05-0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่ำเกินไป ที่จะแสดงผลการลดการหลั่งไซโตไคน์ในระบบการทดสอบนี้ อย่างไรก็ตามได้มีการศึกษาในมนุษย์พบว่าการรับประทานมะละกอสุก 100 กรัมเป็นเวลา 5 วันทำให้ปริมาณ regulatory-T cells (Treg) เพิ่มขึ้น และ เมื่อนำ peripheral blood mononuclear cells จากอาสาสมัครดังกล่าวมาเลี้ยงกับสารสกัดจากมะละกอ 4 และ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เซลล์ผลิต TNF-α, IL-6, IL-8 ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดปริมาณเดียวกันก็มีผลลบเช่นกันคือทำให้ IL-1β เพิ่มขึ้น (Abdullah et al 2011) ซึ่งในการศึกษาของเราใช้ปรมาณสารสกัดเพียง 0.05-0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เท่านั้น ซึ่งเมื่อเราเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดขึ้นเซลล์กลับผลิต TNF-α มากขึ้น

สุดท้ายเงาะทั้งสองสายพันธุ์มีฤทธิ์ลดการอักเสบใกล้เคียงกัน โดยสารสกัดจากเงาะทั้งสองสายพันธุ์มีฤทธิ์ลดเฉพาะ TNF-α ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเท่านั้น ดังแสดงใน**รูปที่6** การศึกษาส่วนใหญ่วิเคราะห์หาสารพฤกษเคมีในเปลือก (Ling et al 2010, Thitilertdecha et al 2010) มี 2 การศึกษาที่ศึกษาในผลโดยรัชนี และ คณะ (2551) พบเฉพาะ แคทิชิน โพลีฟีนอล ไฟเทต ในขณะที่ Ong และ คณะ (1998) วิเคราะห์พบ

สาร odor-active compounds หลายชนิด เช่น β-damascenone, ethyl 2-methylbutyrate, 2,6-nonadienal, (*E*)-2-nonenal และ nonanal

5.3. การเหนี่ยวนำให้เซลล์ U937 เกิดภาวะ oxidative stress

วิธีการศึกษาประสิทธิภาพการต้าน หรือ ลดอนุมูลอิสระของสารในอาหารนั้นมีหลายวิธีทั้งในหลอดทดลอง (*In vitro*) และ ในสิ่งมีชีวิติ (*In vivo*) (Hoelzl et al 2005) ในการศึกษานี้เราใช้เซลล์โมโนไซต์ U937 ที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็น ROS generating chemicals และวัด ROS ที่เกิดขึ้นโดยใช้ fluorescent probe ชนิด dichlorofluorescine diacetate (DCFH-DA) เป็นตัวติดตามซึ่งปริมาณ ROS ที่เกิดขึ้นจะแปรผันตาม fluorescent signal สภาวะที่ใช้ในการเหนี่ยวนำในการศึกษานี้เราใช้วิธีการเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้ซึ่งใช้ระบบนี้ทดสอบประสิทธิภาพของสารในอาหารต่อสภาวะ oxidative stressในเซลล์ U937 (Macone et al 2004, O'Brien et al 2006) ในการศึกษานี้พบว่าเซลล์โมโนไซต์ U937 มีปริมาณ ROS เฉลี่ยที่เกิดโดยธรรมชาติ (spontaneous ROS) อยู่ที่ 102 หน่วย เมื่อเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 400 ไมโครโมลาร์ 20 นาที เซลล์ U397 ผลิต ROS เพิ่มขึ้นเฉลี่ย 562 หน่วย หรือเพิ่มขึ้นประมาณ 5.5 เท่า

หลังจากนั้นได้ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากผลไม้ต่อปริมาณ ROS ทั้งชนิด spontaneous และ H_2O_2 induced ROS โดยใช้ N-acetyl-L-cysteine (NAC) 10 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวควบคุมบวก (Sung et al 2012) โดยเลี้ยงเซลล์โมโนไซต์ U937 กับสารสกัดผลไม้ที่ความเข้มข้นสุทธิ 10-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ เพิ่มหลุมที่ใส่ NAC ความเข้มข้นสุทธิ 10 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวควบคุมบวกใน complete media phenol red free เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนปั่นสารสกัดผลไม้ออกแล้วย้อม ROS ด้วย DCFH-DA ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ก่อนใส่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้ได้ความเข้มข้นสุทธิ 400 ไมโครโมลาร์ วัดค่า ROS โดยวัดค่า fluorescent signal ที่เวลา 20 นาที ซึ่งสภาวะดังกล่าวทำให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตอยู่ในเกณฑ์ที่รับได้ (มากกว่าร้อยละ 80) ในกลุ่มควบคุมบวกที่ใส่ NAC สามารถลด spontaneous ROS ได้เฉลี่ย 41% และ ลด H_2O_2 induced ROS ได้เฉลี่ย 34% สภาวะการทดสอบดังกล่าวทำให้เรามั่นใจในการใช้ระบบนี้ในการทดสอบประสิทธิภาพการต้าน หรือ ลดอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลไม้ในเซลล์โมโนไซต์ U937

5.4. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากผลไม้ในการลดอนุมูลอิสระ

สภาวะ oxidative stress เป็นสภาวะเสียสมดุลย์ระหว่างการเกิด oxygen free radicals และความสามารถของเซลล์ในร่างกายในการต้าน หรือ ลด oxygen free radicals เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์ถูกทำลาย Reactive oxygen species (ROS) หมายรวมถึง free radicals [hydroxyl radical ($^{\bullet}OH$), superoxide anion ($O_2^{\bullet}$), peroxyl radical ($ROO^{\bullet}$) เป็นต้น] และ non-radical compounds [hydrogen peroxide (H_2O_2), singlet oxygen ($_1O^2$) เป็นต้น] สารเหล่านี้เกิดขึ้นในกระบวนการ incomplete reaction of oxygen ใน

กระบวนการ aerobic metabolism ในร่างกาย เซลล์ในร่างกายสามารถปรับตัวในการลดสภาวะ oxidative stress เพื่อป้องกันตนเองโดย up-regulate ระบบ cellular antioxidant ทั้งชนิดที่เป็น enzymes เช่น superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), Catalase (CAT) และ non-enzymes เช่น Vitamin C, Vitamin E, glutathione (GSH), carotenoids, flavonoids เป็นต้น ภาวะ oxidative stress เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคไม่ติดต่อหลายโรค เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ โรคอัลไซเมอร์ โรคเบาหวาน เป็นต้น (Valko et al 2007)

Oxidative stress ทำให้สารพันธุกรรม DNA ถูกทำลายได้ โดยทำให้เบส และ น้ำตาล deoxyribose มีการเปลี่ยนโครงสร้าง ทำให้เกิดทั้ง arrest หรือ induction ในกระบวนการ transcription, เกิด replication errors, genomic instability ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็ง (carcinogenesis)(Valko et al 2006) marker หรือตัวชี้วัดของ DNA damage ที่ใช้กันคือ 8-OH-guanosine นอกจากมีผลต่อ DNA แล้ว oxygen radicals ยังมีผลต่อ phospholipids membrane permeability และ เปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนทำให้หน้าที่ของโปรตีนเปลี่ยนแปลง ในกรณีที่เกิดขึ้นในเซลล์หัวใจ (myocytes) จะทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ malondialdehyde (MDA) (ซึ่งเป็น oxidized lipid product) ใน sarcolemma ของกล้ามเนื้อหัวใจ นอกจากนี้ในสัตว์ทดลองยังพบว่าหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิด atherosclerosis ด้วยการให้อาหารที่มีไขมันสูงมีการสะสมของ iron-catalysed formation of free radicals (Fenton reaction) ตรงบริเวณ atherosclerotic lesion (Yuan and Li 2003) นอกจากนี้การเกิด oxidized LDL สูงๆทำให้เกิด Ox-LDL mediated plaque formation ซึ่งเป็น key step ในการเกิด atherosclerosis (Podrez et al 2000) และ ส่วนหนึ่งของคนไข้ที่มีอาการความดันโลหิตสูง พบว่ามีระดับ antioxidant ต่ำ เช่น Vitamin E, glutathione, SOD (Romero and Reckelhoff 1999) นอกจากนี้ยังพบอีกว่า superoxide radical ที่ผลิตออกมาในภาวะ oxidative stress จะทำปฏิกริยากับ nitric oxide radical ที่ผลิตขึ้นในขณะเกิดการอักเสบจะทำปฏิกริยากันทำให้เกิดเป็น peroxynitrite ซึ่งมีส่วนทำให้ผนังเซลล์หลอดเลือดหัวใจผิดปกติ (endothelium cells) ซึ่งทำให้เกิดภาวะความดันโลหิตสูงได้ (Li and Förstermann 2000) นอกจากนี้ภาวะ oxidative stress ยังทำให้เกิดความผิดปกติของ oxidative phosphorylation machinery และ mitochondrial β-oxidation เกิดการสะสม intracellular triglyceride มากเกินไปในกล้ามเนื้อ และ ตับ ทำให้นำไปสู่ภาวะ insulin resistance (Rosca et al 2005) ด้วย จากการศึกษาหนึ่งพบว่า β-cell ในตับอ่อนค่อนข้างไวต่อ ROS เนื่องจากβ-cell มีปริมาณ antioxidant enzymes เช่น catalase, GPx, SOD ต่ำ มีผลทำให้ β-cell สูญเสียความสามารถในการหลั่ง insulin (Evans et al 2003) จากบทบาทของ ROS ดังกล่าวถ้าสามารถลดปริมาณ ROS ได้ น่าจะลดปัจจัยเสี่ยงของสาเหตุ หรือ ลดความรุนแรงการเกิดโรคดังกล่าวได้

ถ้าเปรียบเทียบกันสารสกัดส้มโอทองดีมีศักยภาพในการลดอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดจากส้มโอขาวน้ำผึ้งเนื่องจาก เฉพาะสารสกัดจากส้มโอทองดี 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้น ที่ลดปริมาณ spontaneous ROS ได้ **(ดังแสดงในรูปที่7)** ในขณะที่สารสกัด 10-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากส้มโอทั้งสองพันธุ์สามารถลดระดับ H_2O_2-induced ROS ได้ใกล้เคียงกันได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ **(ดังแสดงในรูปที่8)** เป็นไปได้ว่าส้มโอทองดีมีสารพฤกษเคมีที่ออกฤทธิ์ลดอนุมูลอิสระมากกว่าส้มโอขาวน้ำผึ้งซึ่งไปในทิศทาง

เดียวกับศักยภาพในการลดการอักเสบ โดยจากการวิเคราะห์สารพฤกษเคมีบางชนิดในการศึกษาของ Kongkachuichai และคณะ (2010) พบว่า ส้มโอทองดีมีสารฟลาโวนอยด์รวม (total flavonoids as Myricetin, Luteolin, Hesperetin, Kaempferol and Apigenin) 17, 534 ไมโครกรัมต่อกรัม ในขณะที่ส้มโอขาวน้ำผึ้งมีเพียง 7,454 ไมโครกรัมต่อกรัม เท่านั้น ซึ่งสารพฤกษเคมีดังกล่าวนอกจากมีฤทธิ์ลดการอักเสบแล้วยังเป็น antioxidant ซึ่งทำให้อนุมูลอิสระลดลงได้ (Choi et al 2012, Jacob et al 2012, Palozza et al 2012) นอกจากนี้ส้มโอทองดียังพบสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (β-carotene, Lycopene) และ vitamin E สูงกว่าส้มโอขาวน้ำผึ้ง (Kongkachuichai et al 2010) ซึ่งสารพฤกษเคมีดังกล่าวมีฤทธิ์เป็น antioxidant ซึ่งทำให้อนุมูลอิสระลดลงได้ (Choi et al 2012, Jacob et al 2012, Palozza et al 2012)

ในขณะที่สารสกัด 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เฉพาะทุเรียนหมอนทองเท่านั้นที่ลดระดับ H_2O_2-induced ROS ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ใส่ H_2O_2 อย่างเดียว **(ดังแสดงในรูปที่10)** มีการศึกษาพบว่าทุเรียน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีทั้งในหลอดทดลอง และ ในสิ่งมีชีวิต (Haruenkit et al 2007) จากการศึกษาของ Toledo และ คณะ พบว่า ทุเรียนหมอนทอง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในทางเคมีสูงกว่าทุเรียนพันธุ์อื่น (Toledo et al 2008) ซึ่งผลการทดลองในการศึกษานี้เป็นไปในทิศทางเดียวกับของ Teledo และ คณะ

สารสกัดจากฝรั่งแป้นสีทอง 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้นที่ลด spontaneous ROS ได้ **(ดังแสดงในรูปที่11)** ในขณะที่สารสกัดทุกความเข้มข้นจากฝรั่งทั้งสองพันธุ์สามารถลดระดับ H_2O_2-induced ROS ได้ใกล้เคียงกัน **(ดังแสดงในรูปที่12)** มีการศึกษาพบว่าผลฝรั่งสุกเป็นแหล่งที่ดีของสารต้านอนุมูลอิสระ (Gull et al 2012, Jiménez-Escrig et al 2001, Pereira et al 2012, Thuaytong and Anprung 2011) นอกจากนี้ยังพบว่าหนูที่เหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วยสาร Streptotozocin เมื่อได้รับน้ำฝรั่งมีการหลั่ง insulin มากขึ้น ตับอ่อนถูกทำลายน้อยลง และ ทำให้ β-cells ผลิต antioxidant enzymes (SOD, catalase, GPx) มากขึ้น (Huang et al 2011) เป็นการสนับสนุนประสิทธิภาพในการลดอนุมูลอิสระของผลฝรั่ง

สารสกัดจากมะละกอทั้ง 2 พันธุ์ไม่มีฤทธิ์ลด Spontaneous ROS ได้ ในขณะที่สารสกัด 20 - 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร **(ดังแสดงในรูปที่13)** จากมะละกอฮอลแลนด์ และ สารสกัดที่ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจากมะละกอแขกดำ เท่านั้นที่ลดระดับ H_2O_2-induced ROS ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ใส่ H_2O_2 อย่างเดียว **(ดังแสดงในรูปที่14)** จากการที่มะละกอสุกมีสารฟลาโวนอยด์รวม (total flavonoids as Myricetin, Luteolin, Hesperetin และ Kaempferol) (Kongkachuichai et al 2010) สารกลุ่ม phenolic acids และ กลุ่มแคโรทีนอยด์ (Rivera-Pastrana et al 2010) โดยเฉพาะ β-carotene สูงน่าจะมีฤทธิ์ลดอนุมูลอิสระ ซึ่งจากการศึกษาของ Mahattanatawee และคณะ (2006) พบว่ามะละกอสุกมีฤทธิ์ลดอนุมูลอิสระได้ดีเช่นกัน

สารสกัดจากเงาะทั้งสองสายพันธุ์ที่ความเข้มข้น 10-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรไม่มีฤทธิ์ลดทั้ง Spontaneous และ H_2O_2-induced ROS ในการศึกษานี้ **(ดังแสดงในรูปที่15-16)** การศึกษาผลต่อสุขภาพในผลเงาะมีน้อยมาก

สรุปโดยรวมจะเห็นว่าสารสกัดจากส้มโอทองดีมีประสิทธิภาพดีที่สุดเมื่อเทียบกับผลไม้อื่นในการศึกษานี้เนื่องจากสารสกัดจากส้มโอทองดีสามารถลดตัวชี้วัดการอักเสบได้ถึง 3 ตัว และ ยังลดอนุมูลอิสระได้ทั้งชนิดที่เป็น spontaneous และ H_2O_2-induced ตามด้วย ฝรั่งแป้นสีทอง ส้มโอขาวน้ำผึ้ง ฝรั่งกิมจู ทุเรียนทั้งสองพันธุ์ ผลจากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าผลไม้ต่างชนิดกันจะมีความสามารถในการออกฤทธิ์แตกต่างกัน ซึ่งน่าจะมาจากสารออกฤทธิ์ในผลไม้มีความแตกต่างกัน ทำให้มีผลต่อการลด inflammatory cytokine ที่แตกต่างกัน บ่งบอกว่าเราควรรับประทานผลไม้ให้หลากหลายเพื่อให้ได้รับสารออกฤทธิ์ที่มีหลายเป้าหมาย ซึ่งน่าจะช่วยลดปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรังได้

จากการที่สารสกัดจากผลไม้ มีผลลดการอักเสบที่ความเข้มข้นต่ำมาก 0.2 มก./มล. ส่วนความเข้มข้นสูง 20-40 มก./มล. กลับมีผลเพิ่มการอักเสบ ในขณะที่การต้านอนุมูลอิสระต้องใช้ความเข้มข้นของสารสกัดสูงถึง 20-40 มก./มล. ซึ่งจะเห็นว่ามีอาจจะมีความขัดแย้งกัน ถ้าต้องการผลลดการอักเสบ ก็จะไม่มีฤทธิ์ลดอนุมูลอิสระ แต่ถ้าต้องการผลในการลดอนุมมูลอิสระก็จะทำให้การอักเสบเพิ่มขึ้น

ผู้วิจัยมีความเห็นว่าเนื่องจากการศึกษานี้เป็นการทดสอบในหลอดทดลอง ใช้ระบบเซลล์ในการทดสอบ เป็นการทดสอบแบบคัดกรอง ผู้วิจัยต้องพยายามหาสภาวะการเลี้ยง การใช้สารกระตุ้นเซลล์ที่เหมาะสม สามารถแสดงให้เห็นฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากผลไม้ก่อนที่จะเริ่มทดสอบกับสารสกัดจากผลไม้ โดยที่ความเข้มข้นที่ใช้ต้องไม่มีผลต่อจำนวนเซลล์เพื่อให้สามารถแปรผลของสารสกัดจากผลไม้ได้ ด้วยเหตุผลดังกล่าวทำให้เราจำเป็นต้องใช้สภาวะของเซลล์ U937 ที่แตกต่างกันในการทดสอบตัวชี้วัดดังกล่าว ทำให้มีผลต่อความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบที่แตกต่างกัน โดยการทดสอบฤทธิ์ในการลดการอักเสบนั้นเซลล์ U937 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์แมคโครฟาจด้วย PMA เป็นเวลา 48 ชั่วโมงนั้น เซลล์อยู่ในในสภาวะ low-grade inflammation ในระดับหนึ่ง ข้อมูลจากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า เซลล์ U937 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์แมคโครฟาจด้วย PMA มีการแสดงออกของ IL-1β สูงขึ้น (up-regulation) IL-1β มีคุณสมบัติเป็น pro-inflammatory cytokines (Nishida et al. 1988) นอกจากนี้ Barbieri และ คณะ (2003) ยังพบว่า เซลล์ U937 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์แมคโครฟาจด้วย PMA มีการแสดงออกของ cyclooxygenase-2 (COX-2) สูงขึ้น COX-2 เป็น pro-inflammatory enzyme ชนิดหนึ่งเช่นกัน ในการศึกษาเดียวกันยังพบว่าการแสดงออกของ COX-2 เกิดจากการกระตุ้น NF-κB (transcription factor) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ควบคุมการแสดงออกของ pro-inflammatory cytokines อีกหลายชนิด จะเห็นว่าเซลล์ในสภาวะที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการลดการอักเสบนั้นมีสภาวะ low-grade inflammation อยู่แล้ว เซลล์ในสภาวะนี้จึงมีความไวต่อสารเคมี หรือ สารพฤกษเคมีในผลไม้ ซึ่งสารสกัดจากผลไม้ที่ใช้เป็นสารสกัดแบบหยาบ (crude extract) เราไม่ทราบส่วนประกอบในสารสกัดว่ามีอะไรบ้าง ปริมาณเท่าไหร ซึ่งในสารสกัดอาจจะมีตัวที่ออกฤทธิ์ทั้งในแง่ลดการอักเสบ และ ส่งเสริมการอักเสบก็ได้ถ้าเซลล์สัมผัสกับความเข้มข้นของสารสกัดไม่เหมาะสม ในสารสกัดผลไม้ที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.2 มก./มล. สารที่ส่งเสริมการอักเสบอาจจะมีประสิทธิภาพมากกว่าในขณะที่เมื่อเจือจางลงต่ำกว่า 0.2 มก./มล. สารที่ลดการอักเสบมีประสิทธิภาพมากกว่า

ในขณะที่เซลล์ที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ในการลดอนุมูลอิสระนั้นเซลล์ U937 ไม่ได้ถูกเหนี่ยวนำด้วยสารเคมีทำให้เซลล์ไม่เกิดสภาวะความเครียด หรือ low-grade inflammation แบบ PMA-induced U937 ทำให้เซลล์ทนต่อความเข้มข้นของสารสกัดที่สูงกว่ามากถึง 20-40 มก./มล.ได้ ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นว่าเราต้องหาระบบ และ สภาวะของเซลล์ที่ทำให้สามารถแสดงให้เห็นฤทธิ์ในการลดอนุมูลอิสระ ถึงแม้ว่าต้องใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่ค่อนข้างสูงจึงจะเห็นผลก็ตาม

การทดสอบนี้เป็นเพียงการคัดกรอง และ เป็นผลที่เห็นในเซลล์เท่านั้น ซึ่งเป็นข้อมูลที่ให้แนวทางคร่าวๆว่าผลไม้ใดมีประสิทธิภาพ และ ชนิดไหนมีศักยภาพสูง ควรให้ความสนใจเลือกมาทำในแนวลึกขึ้น ปริมาณสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบนี้ค่อนข้างสูงโดยเฉพาะปริมาณที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ในการลดอนุมูลอิสระ ในชีวิตจริงผลไม้ที่กินต้องผ่านระบบการย่อยอาหาร ผ่านการดูดซึม เข้าสู่กระแสเลือด ไปออกฤทธิ์ในอวัยวะเป้าหมาย ร่างกายมีระบบป้องกัน และ รักษาสมดุลย์อีกมากมายหลายระบบที่ช่วยในการคัดเลือก หรือรับสารที่มีประโยชน์ในปริมาณที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในร่างกาย

6.สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารสกัดจากผลไม้ได้แก่ส้มโอขาวน้ำผึ้ง ส้มโอทองดี ทุเรียนหมอนทอง ทุเรียนชะนี ฝรั่งแป้นสีทอง ฝรั่งกิมจู มะละกอฮอล์แลนด์ มะละกอแขกดำ เงาะโรงเรียน เงาะสีชมพู โดยศึกษาถึงศักยภาพในการลดการอักเสบใน PMA-induced U937 cells ที่เหนี่ยวนำให้อักเสบด้วย LPS และ ศึกษาศักยภาพในการลดอนุมูลอิสระในเซลล์โมโนไซด์ U937 ที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress ด้วย H_2O_2 จากการศึกษานี้พบว่า สารสกัดจากผลไม้เหล่านี้มีความสามารถในการลดตัวชี้วัดการอักเสบ (TNF-α, IL-6, IL-8, MCP-1) แตกต่างกันแล้วแต่ชนิดของผลไม้ โดยสารสกัดจากส้มโอทองดีลดการอักเสบได้ดีที่สุดเนื่องจากสารสกัดเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรลดตัวชี้วัดการอักเสบได้ถึง 3 ตัว คือ IL-6, IL-8, MCP-1 ตามด้วยสารสกัดจากส้มโอขาวน้ำผึ้ง ทุเรียน และ ฝรั่งทั้งสองสายพันธุ์เนื่องจากที่สารสกัดความเข้มข้นเดียวกัน (0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ลดตัวชี้วัดการอักเสบได้ 2 ตัว และ เงาะทั้งสองสายพันธุ์ลดได้เฉพาะ TNF-α ในขณะที่สารสกัดจากมะละกอที่ความเข้มข้น 0.05- 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรไม่พบประสิทธิภาพในการลดตัวชี้วัดการอักเสบในระบบการทดสอบนี้

ในแง่การลดอนุมูลอิสระทั้งแบบ Spontaneous และ เหนี่ยวนำด้วย H_2O_2ในเซลล์โมโนไซด์ U937 โดยติดตามการลดปริมาณ ROS พบว่าสารสกัดจากส้มโอทองดี และ ฝรั่งแป้นสีทองมีประสิทธิภาพดีที่สุดเนื่องจากสารสกัดของผลไม้ทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลด Spontaneous ROS ได้ และ ที่ 10-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถลด H_2O_2 induced ROS ได้ดีเช่นกัน ตามด้วยสารสกัดจากส้มโอขาวน้ำผึ้ง และ ฝรั่งกิมจู เนื่องจากสารสกัดที่ 10-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถลดได้เฉพาะ H_2O_2 induced ROS ตามด้วยสารสกัดจากทุเรียนหมอนทอง มะละกอฮอลแลนด์ และ มะละกอแขกดำ ทุเรียนชะนี ตามลำดับ ในขณะที่เงาะทั้งสองสายพันธุ์ไม่พบประสิทธิภาพในการลด ROS ในระบบการทดสอบนี้

จะเห็นว่าส้มโอทองดีให้ผลดีที่สุดในแง่ลดการอักเสบ และ ลดอนุมูลอิสระ ตามด้วย ฝรั่งแป้นสีทอง ส้มโอขาวน้ำผึ้ง ฝรั่งกิมจู ทุเรียนทั้งสองพันธุ์ ผลจากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นประโยชน์ต่อสุขภาพที่แตกต่างกันของผลไม้ต่างชนิดกัน จึงควรรับประทานผลไม้ให้หลากหลายซึ่งน่าจะช่วยลดปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรังได้ แต่ข้อมูลที่ได้นี้ก็เป็นเพียงการทดสอบในหลอดทดลองที่มีระบบไม่ซับซ้อน ซึ่งใช้เป็นแนวทางในการคัดเลือกตัวที่มีศุกยภาพดีในลำดับต้นๆ ไปทำการศึกษาต่อในสัตว์ทดลอง และ ในมนุษย์ต่อไปเพื่อรับรองประโยชน์ต่อสุขภาพของผลไม้ไทยที่แน่นอน

บรรณานุกรม

ริญ เจริญศิริ และ รัชนี คงคาฉุยฉาย. โภชนาการกับผลไม้. กรุงเทพ: สารคดี, 2551, 263.

Abdullah M, Chai P-S, Loh C-Y, Chong M-Y, Quay H-W, Vidyadaran S *et al* (2011). Carica papaya increases regulatory T cells and reduces IFN-γ+ CD4+ T cells in healthy human subjects *Nutr Food Res*. Mol **55:** 803-806.

Aggarwal B, Shishodia S (2004). Suppression of the Nuclear Factor-kappa B Activation Pathway by Spice-Derived Phytochemicals: Reasoning for Seasoning. *Ann N Y Acad Sci* **1030:** 434-441.

Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G (2006). Inflammation and cancer: How hot is the link? *Biochem Pharmacol Special Issue: Cell Signalling, Transcription and Translation as Therapeutic Targets* **72:** 1605-1621.

Ahmed MI, Salahy E-E, Fayed ST, El-Hefnawy NG, Khalifa A (2001). Human papillomavirus infection among Egyptian females with cervical carcinoma: relationship to spontaneous apoptosis and TNF-α. *Clin Biochem* **34:** 491-498.

Arnott CH, Scott KA, Moore RJ, Robinson SC, Thompson RG, Balkwill FR (2003). Expression of both TNF-[alpha] receptor subtypes is essential for optimal skin tumour development. *Oncogene* **23:** 1902-1910.

Atreya R, Neurath M (2010). Chemokines in inflammatory bowel diseases. *Dig Dis* **28:** 386-394.

Bai S, Lee S, Na H, Ha K, Han J, Lee H *et al* (2005). Beta-Carotene inhibits inflammatory gene expression in lipopolysaccharide-stimulatedmacrophages by suppressing redox-based NF-kB activation. *Exp Mol Med* **37:** 323-334.

Balkwill F (2004). Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* **4:** 540-550.

Benavente-Garcia O, Castillo J (2008). Update on Uses and Properties of Citrus Flavonoids: New Findings in Anticancer, Cardiovascular, and Anti-inflammatory Activity. *J Agric Food Chem* **56:** 6185-6205.

Block G, Patterson B, Subar A (1992). Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer* **18:** 1 - 29.

Brenner D, Krammer PH, Arnold R (2008). Concepts of activated T cell death. *Crit Rev Oncol Hematol* **66:** 52-64.

Butler D, Maini R, Feldmann M, Brennan F (1995). Modulation of proinflammatory cytokine release in rheumatoid synovial membrane cell cultures. Comparison of monoclonal anti TNF-alpha antibody with the interleukin-1 receptor antagonist. *Eur Cytokine Netw* **6:** 225-230.

Chiavaroli A, La V, Orlando G, Menghini L, Epifano F, Grenier D (2008). *Rhamnus alpinus* Leaf Extract Suppresses Lipopolysaccharide-Induced, Monocyte-Derived Macrophage Chemokine Secretion. *Inflammation* **31:** 313-318.

Choi D-Y, Lee Y-J, Hong JT, Lee H-J (2012). Antioxidant properties of natural polyphenols and their therapeutic potentials for Alzheimer's disease. *Brain Res Bull* **87:** 144-153.

Choi S-Y, Ko H-C, Ko S-Y, Hwang J-H, Park J-G, Kang S-H *et al* (2007). Correlation between flavonoid content and the NO production inhibitory activity of peel extracts from various citrus fruits. *Biol Pharm Bull* **30:** 772-778.

Choy EH, Panayi GS (2001). Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* **344:** 907-916.

Cohen J (2002). The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* **420:** 885-891.

Cronstein B (2007). Interleukin-6: A key mediator of systemic and local symptoms in rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis* **65:** S11-15.

Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MKB, Dockrell DH (2010). The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS ONE* **5:** e8668.

Del Bufalo A, Bernad J, Dardenne C, Verda D, Meunier JR, Rousset F *et al* (2011). Contact sensitizers modulate the arachidonic acid metabolism of PMA-differentiated U-937 monocytic cells activated by LPS. *Toxicol Appl Pharmacol* **256:** 35-43.

Deo R, Khera A, McGuire DK, Murphy SA, de P. Meo Neto J, Morrow DA *et al* (2004). Association among plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1, traditional cardiovascular risk factors, and subclinical atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* **44:** 1812-1818.

Donjerkovic D, Scott DW (2000). Activation-induced cell death in B lymphocytes. *Cell Res* **10:** 179-192.

Drachenberg DE, Elgamal A-AA, Rowbotham R, Peterson M, Murphy GP (1999). Circulating levels of interleukin-6 in patients with hormone refractory prostate cancer. *The Prostate* **41:** 127-133.

Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM (2003). Are oxidative stress - Activated signaling pathways mediators of insulin resistance and β-cell dysfunction? *Diabetes* **52:** 1-8.

Ferrajoli A, Keating MJ, Manshouri T, Giles FJ, Dey A, Estrov Z *et al* (2002). The clinical significance of tumor necrosis factor-α plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **100:** 1215-1219.

Gaipl U, Meister S, Lödermann B, Rödel F, Fietkau R, Herrmann M *et al* (2009). Activation-induced cell death and total Akt content of granulocytes show a biphasic course after low-dose radiation. *Autoimmunity* **42:** 340-342.

García-Tuñón I, Ricote M, Ruiz A, Fraile B, Paniagua R, Royuela M (2006). Role of tumor necrosis factor-α and its receptors in human benign breast lesions and tumors (in situ and infiltrative). *Cancer Sci* **97:** 1044-1049.

Garrelds I, van Hal P, Haakmat R, Hoogsteden H, Saxena P, Zijlstra F (1999). Time dependent production of cytokines and eicosanoids by human monocytic leukaemia U937 cells; effects of glucocorticosteroids. *Mediators Inflamm* **8:** 229-235.

Geiler J, Michaelis M, Naczk P, Leutz A, Langer K, Doerr H-W *et al* (2010). N-acetyl-l-cysteine (NAC) inhibits virus replication and expression of pro-inflammatory molecules in A549 cells infected with highly pathogenic H5N1 influenza A virus. *Biochem Pharmacol* **79:** 413-420.

González-Gallego J, García-Mediavilla M, Sánchez-Campos S, Tuñón M (2010). Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *Br J Nutr* **104 Suppl 3:** S15-27.

Green D, Scott D (1994). Activation-induced apoptosis in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* **6:** 476-487.

Grundy SM, Brewer HB, Cleeman JI, Smith SC, Lenfant C, Participants ftC (2004). Definition of Metabolic Syndrome. *Circulation* **109:** 433-438.

Guha M, Mackman N (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* **13:** 85-94.

Gull J, Sultana B, Anwar F, Naseer R, Ashraf M, Ashrafuzzaman M (2012). Variation in antioxidant attributes at three ripening stages of guava (*Psidium guajava* L.) fruit from different geographical regions of Pakistan. *Molecules* **17:** 3165-3180.

Gutierrez RMP, Mitchell S, Solis RV (2008). *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol* **117:** 1-27.

Haruenkit R, Poovarodom S, Leontowicz H, Leontowicz M, Sajewicz M, Kowalska T *et al* (2007). Comparative study of health properties and nutritional value of Durian, Mangosteen, and Snake Fruit: experiments *in vitro* and *in vivo*. *J Agric Food Chem* **55:** 5842-5849.

Hennigan S, Kavanaugh A (2008). Interleukin-6 inhibitors in the treatment of rheumatoid arthritis. *Ther Clin Risk Manag* **4:** 767-775.

Hodge DR, Hurt EM, Farrar WL (2005). The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur J Cancer* **41:** 2502-2512.

Hoelzl C, Bichler J, Ferk F, Simic T, Nersesyan A, Elbling L *et al* (2005). Methods for the detection of antioxidants which prevent age related diseases: a critical review with particular emphasis on human intervention studies. *J Physiol Pharmacol* **56:** 49-64.

Hosoya H, Marunouchi T (1992). Differentiation and dedifferentiation of the human monocytic leukemia cell line, U937. *Cell Struct Funct* **17:** 263-193.

Huang C-S, Yin M-C, Chiu L-C (2011). Antihyperglycemic and antioxidative potential of Psidium guajava fruit in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol* **49:** 2189-2195.

Hung C-F, Huang T-F, Chen B-H, Shieh J-M, Wu P-H, Wu W-B (2008). Lycopene inhibits TNF-α-induced endothelial ICAM-1 expression and monocyte-endothelial adhesion. *Eur J Pharmacol* **586:** 275-282.

Jacob JK, Tiwari K, Correa-Betanzo J, Misran A, Chandrasekaran R, Paliyath G (2012). Biochemical Basis for Functional Ingredient Design from Fruits. *Ann Rev Food Sci Tech* **3:** 79-104.

Ji R-C (2012). Macrophages are important mediators of either tumor- or inflammation-induced lymphangiogenesis. *Cell Mol Life Sci* **69:** 897-914.

Jiménez-Escrig A, Rincón M, Pulido R, Saura-Calixto F (2001). Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *J AgricFood Chem* **49:** 5489-5493.

Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C (2003). IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol* **24:** 25-29.

Kavanaugh A, St Clair E, McCune W, Braakman T, Lipsky P (2000). Chimeric anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody treatment of patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate therapy. *J Rheumatol* **27:** 841-850.

Khan WI, Motomura Y, Wang H, El-Sharkawy RT, Verdu EF, Verma-Gandhu M *et al* (2006). Critical role of MCP-1 in the pathogenesis of experimental colitis in the context of immune and enterochromaffin cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **291:** G803-G811.

Klimiuk P, Sierakowski S, Domyslawska I, Chwiecko J (2006). Regulation of serum chemokines following infliximab therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* **24:** 529-533.

Kongkachuichai R, Charoensiri R, Sungpuag P (2010). Carotenoid, flavonoid profiles and dietary fiber contents of fruits commonly consumed in Thailand. *Int J Food Sci Nutr* **61:** 536-548.

Krejsa CM, Schieven GL (2000). Detection of Oxidative Stress in Lymphocytes Using Dichlorodihydrofluorescein Diacetate. In: Keyse SM (ed). *Stress Response : Methods and Protocols*. pp 35-47.

Kröger H, Hauschild A, Ohde M, Bache K, Voigt W, Ehrlich W (1999). Enhancing the inhibitory effect of nicotinamide upon collagen II induced arthritis in mice using N-acetylcysteine. *Inflammation* **23:** 111-115.

Kruzel ML, Actor JK, Radak Z, Bacsi A, Saavedra-Molina A, Boldogh I (2010). Lactoferrin decreases LPS-induced mitochondrial dysfunction in cultured cells and in animal endotoxemia model. *Innate Immunity* **16:** 67-79.

Kulbe H, Thompson R, Wilson JL, Robinson S, Hagemann T, Fatah R *et al* (2007). The inflammatory cytokine tumor necrosis factor-α generates an autocrine tumor-promoting network in epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Res* **67:** 585-592.

La VD, Lazzarin F, Ricci D, Fraternale D, Genovese S, Epifano F *et al* (2010). Active principles of Grindelia robusta exert antiinflammatory properties in a macrophage model. *Phytother Res* **24:** 1687-1692.

Leong LP, Shui G (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem* **76:** 69-75.

Leontowicz M, Leontowicz H, Jastrzebski Z, Jesion I, Haruenkit R, Poovarodom S *et al* (2007). The nutritional and metabolic indices in rats fed cholesterol-containing diets supplemented with durian at different stages of ripening. *BioFactors* **29:** 123-136.

Li H, Förstermann U (2000). Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* **190:** 244-254.

Ling L, Radhakrishnan A, Subramaniam T, Cheng H, Palanisamy U (2010). Assessment of antioxidant capacity and cytotoxicity of selected Malaysian plants. *Molecules* **15:** 2139-2151.

Liu H, Perlman H, Pagliari LJ, Pope RM (2001). Constitutively activated Akt-1 is vital for the survival of human monocyte-differentiated macrophages. *J Exp Med* **194:** 113-126.

Liu RH (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr* **134:** 3479S-3485.

Loberg R, Ying C, Craig M, Yan L, Snyder L, Pienta K (2007). CCL2 as an important mediator of prostate cancer growth in vivo through the regulation of macrophage infiltration. *Neoplasia* **9:** 556-562.

Macone A, Matarese R, Gentili V, Antonucci A, Duprè S, Nardini M (2004). Effect of aminoethylcysteine ketimine decarboxylated dimer, a natural sulfur compound present in human plasma, on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress in human monocytic U937 cells. *Free Radic Res* **38:** 705-714.

Maeda S, Ohno K, Nakamura K, Uchida K, Nakashima K, Fukushima K *et al* (2011). Quantification of chemokine and chemokine receptor gene expression in duodenal mucosa of dogs with inflammatory bowel disease. *Vet Immunol Immunopathol* **144:** 290-298.

Mahattanatawee K, Manthey JA, Luzio G, Talcott ST, Goodner K, Baldwin EA (2006). Total antioxidant activity and fiber content of select Florida-grown tropical fruits. *J Agric Food Chem* **54:** 7355-7363.

Mehdipour S, Yasa N, Dehghan G, Khorasani R, Mohammadirad A, Rahimi R *et al* (2006). Antioxidant potentials of Iranian Carica papaya juice *in vitro* and *in vivo* are comparable to α-tocopherol. *Phytother Res* **20:** 591-594.

Meja K, Rajendrasozhan S, Adenuga D, Biswas S, Sundar I, Spooner G *et al* (2008). Curcumin restores corticosteroid function in monocytes exposed to oxidants by maintaining HDAC2. *Am J Respir Cell Mol Biol* **39:** 312-323.

Michalaki V, Syrigos K, Charles P, Waxman J (2004). Serum levels of IL-6 and TNF-[alpha] correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer. *Br J Cancer* **90:** 2312-2316.

Munn DH, Beall AC, Song D, Wrenn RW, Throckmorton DC (1995). Activation-induced apoptosis in human macrophages: developmental regulation of a novel cell death pathway by macrophage colony-stimulating factor and interferon gamma. *J Exp Med* **181:** 127-136.

Nabors LB, Suswam E, Huang Y, Yang X, Johnson MJ, King PH (2003). Tumor necrosis factor α induces angiogenic factor up-regulation in malignant glioma cells. *Cancer Res* **63:** 4181-4187.

Nakamura Y (2009). Chemoprevention by isothiocyanates: molecular basis of apoptosis induction. *Forum Nutr* **61:** 170-181.

Nayak S, Pinto Pereira L, Maharaj D (2007). Wound healing activity of Carica papaya L. in experimentally induced diabetic rats. *Indian J Exp Biol* **45:** 739-743.

Ning Y, Lenz H-J (2012). Targeting IL-8 in colorectal cancer. *Expert Opin Ther Targets* **16:** 491-497.

Nishida T,Takano M, Kawakami T, Nishino N, Nakai S, Hirai Y (1988). The transcription of the interleukin 1β gene is induced with PMA and inhibited with dexamethasone in U937 cells. *Biochem Biophy Res Comm* **156**: 269-274.

Nishimoto N, Sasai M, Shima Y, Nakagawa M, Matsumoto T, Shirai T *et al* (2000). Improvement in Castleman's disease by humanized anti-interleukin-6 receptor antibody therapy. *Blood* **95:** 56-61.

Niu J, Kolattukudy PE (2009). Role of MCP-1 in cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical implications. *Clin Sci* **117:** 95-109.

O'Brien N, Carpenter R, O'Callaghan Y, O'Grady M, Kerry J (2006a). Modulatory effects of resveratrol, citroflavan-3-ol, and plant-derived extracts on oxidative stress in U937 cells. *J Med Food* **9:** 187-195.

Oliveira DDS, Lobato AL, Ribeiro SnMR, Santana AnMC, Chaves JBcP, Pinheiro-Sant'Ana HM (2010). Carotenoids and vitamin C during handling and distribution of Guava (*Psidium guajava* L.), Mango (*Mangifera indica* L.), and Papaya (*Carica papaya* L.) at commercial restaurants. *J Agric Food Chem* **58:** 6166-6172.

Ong PKC, Acree TE, Lavin EH (1998). Characterization of volatiles in Rambutan fruit (*Nephelium lappaceum* L.) *J Agric Food Chem* **46:** 611-615.

Palozza P, Catalano A, Simone R, Cittadini A (2012). Lycopene as a guardian of redox signalling. *Acta Biochim Pol* **59:** 21-25.

Pan M-H, Lai C-S, Wu J-C, Ho C-T (2010). Molecular mechanisms for chemoprevention of colorectal cancer by natural dietary compounds. *Mol Nutr Food Res* **55:** 32-45.

Panee J (2012). Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) in obesity and diabetes. *Cytokine* **60:** 1-12.

Pereira MC, Steffens RS, Jablonski A, Hertz PF, de O. Rios A, Vizzotto M *et al* (2012). Characterization and antioxidant potential of Brazilian fruits from the Myrtaceae Family. *J Agri Food Chem* **60:** 3061-3067.

Piemonti L, Calori G, Lattuada G, Mercalli A, Ragogna F, Garancini MP *et al* (2009). Association between plasma monocyte chemoattractant protein-1 concentration and cardiovascular disease mortality in middle-aged diabetic and nondiabetic individuals. *Diabetes Care* **32:** 2105-2110.

Plushner SL (2008). Tocilizumab: An interleukin-6 receptor inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis. *Ann Pharmacother* **42:** 1660-1668.

Podrez EA, Abu-Soud HM, Hazen SL (2000). Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* **28:** 1717-1725.

Popivanova B, Kitamura K, Wu Y, Kondo T, Kagaya T, Kaneko S *et al* (2008). Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J Clin Invest* **118:** 560-570.

Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM (2001). C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing Type 2 diabetes mellitus. JAMA **286:** 327-334.

Puntmann V, Taylor P, Mayr M (2011). Coupling vascular and myocardial inflammatory injury into a common phenotype of cardiovascular dysfunction: systemic inflammation and aging - a mini-review. *Gerontol* **57:** 295-303.

Rai P, Jaiswal D, Mehta S, Watal G (2009). Anti-hyperglycaemic potential of *Psidium guajava* raw fruit peel. *Indian J Med Res* **129:** 561-565.

Reddy L, Odhav B, Bhoola KD (2003). Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacol Ther* **99:** 1-13.

Rivera-Pastrana DM, Yahia EM, González-Aguilar GA (2010). Phenolic and carotenoid profiles of papaya fruit (*Carica papaya* L.) and their contents under low temperature storage. *J Sci Food Agric* **90:** 2358-2365.

Romero JC, Reckelhoff JF (1999). Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension* **34:** 943-949.

Rosca M, Mustata T, Kinter M, Ozdemir A, Kern T, Szweda L *et al* (2005). Glycation of mitochondrial proteins from diabetic rat kidney is associated with excess superoxide formation. *Am J Physiol-Renal Physiol* **289:** F420–F430.

Ross R (1999). Atherosclerosis--An inflammatory disease. *N Engl J Med* **340:** 115-126.

Rossetto MRM, Oliveira do Nascimento JoR, Purgatto E, Fabi JoP, Lajolo FM, Cordenunsi BR (2008). Benzylglucosinolate, Benzylisothiocyanate, and myrosinase activity in papaya fruit during development and ripening. *J Agric Food Chem* **56:** 9592-9599.

Sethi G, Sung B, Aggarwal B (2008). TNF: a master switch for inflammation to cancer. *Front Biosci* **1:** 5094-5107.

Simone RE, Russo M, Catalano A, Monego G, Froehlich K, Boehm V *et al* (2011). Lycopene inhibits NF-kB-mediated IL-8 expression and changes redox and PPARγ signalling in cigarette smoke–stimulated macrophages. *PLoS ONE* **6:** e19652.

Sokol R, Hudson G, James N, Frost I, Wales J (1987). Human macrophage development: a morphometric study. *J Anat* **151:** 27-35.

Spencer JPE, Vafeiadou K, Williams RJ, Vauzour D (2012). Neuroinflammation: Modulation by flavonoids and mechanisms of action. *Mol Aspects Med* **33:** 83-97.

Steinmetz K, Potter J (1996). Vegetables, fruit, and cancer prevention: A Review. *J Am Diet Assoc* **96:** 1027-1039.

Stow JL, Ching Low P, Offenh ̈user C, Sangermani D (2009). Cytokine secretion in macrophages and other cells: Pathways and mediators. *Immunobiol* **214:** 601-612.

Sung H, Kim J, Kim Y, Jang S-W, Ko J (2012). N-acetyl cysteine suppresses the foam cell formation that is induced by oxidized low density lipoprotein via regulation of gene expression. *Mol Biol Rep* **39:** 3001-3007.

Sunila E, Kuttan G (2006). *Piper longum* inhibits VEGF and proinflammatory cytokines and tumor-induced angiogenesis in C57BL/6 mice. *Int Immunopharmacol* **6:** 733-741.

Szekanecz Z, Vegvari A, Szabo Z, Koch A (2010). Chemokines and chemokine receptors in arthritis. *Front Biosci (Schol Ed)* **2:** 153-167.

Szlosarek P, Grimshaw M, Kulbe H, Wilson J, Wilbanks G, Burke F *et al* (2006). Expression and regulation of tumor necrosis factor alpha in normal and malignant ovarian epithelium. *Mol Cancer Ther* **5:** 382-390.

Tanaka T, Ogata A, Narazaki M (2010). Tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis. *Expert Rev Clinic Immunol* **6:** 843-854.

Thaipong K, Boonprakob B, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Byrne D (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Comp Anal* **19:** 669-675.

Thitilertdecha N, Teerawutgulrag A, Kilburn J, Rakariyatham N (2010). Identification of major phenolic compounds from Nephelium lappaceum L. and their antioxidant activities. *Molecules* **15:** 1453-1465.

Thuaytong W, Anprung P (2011). Bioactive compounds and prebiotic activity in Thailand-Grown red and white guava fruit (*Psidium guajava* L.) *Food Sci Tech Int* **17:** 205-212.

Toledo F, Arancibia-Avila P, Park Y-S, Jung S-T, Kang S-G, Gu Heo B *et al* (2008). Screening of the antioxidant and nutritional properties, phenolic contents and proteins of five durian cultivars. *Int J Food Sci Nutr* **59:** 415-427.

Torrance GW, Tugwell P, Amorosi S, Chartash E, Sengupta N (2004). Improvement in health utility among patients with rheumatoid arthritis treated with adalimumab (a human anti-TNF monoclonal antibody) plus methotrexate. *Rheumatol* **43:** 712-718.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* **160:** 1-40.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* **39:** 44-84.

ValkoviĆ T, Dobrila F, Melato M, Sasso F, Rizzardi C, JonjiĆ N (2002). Correlation between vascular endothelial growth factor, angiogenesis, and tumor-associated macrophages in invasive ductal breast carcinoma. *Virchows Archiv* **440:** 583-588.

Vichai V, Kirtikara K (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc* **1:** 1112-1116.

Waugh DJJ, Wilson C (2008). The interleukin-8 pathway in cancer. *Clinic Cancer Res* **14:** 6735-6741.

Wiederholt M, Anderson K, Harris J (1988). Labelling of lipids and phospholipids with [3H] arachidonic acid and the biosynthesis of eicosanoids in U937 cells differented by phorbol ester. *Biochem Biophys Acta* **959:** 296-304.

Wolfe KL, Liu RH (2007). Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *J Agric Food Chem* **55:** 8896-8907.

Yokomizo A, Moriwaki M (2006). Effect of uptake of flavonoids on oxidative stress induced by hydrogen peroxide in human intestinal Caco-2 cells. *Biosci Biotechmol Biochem* **70:** 1317-1324.

Yolcu ES, Ash S, Kaminitz A, Sagiv Y, Askenasy N, Yarkoni S (2008). Apoptosis as a mechanism of T-regulatory cell homeostasis and suppression. *Immunol Cell Biol* **86:** 650-658.

Yuan XM, Li W (2003). The iron hypothesis of atherosclerosis and its clinical impact. *Ann Med* **35:** 578-591.

Zhang J, Patel L, Pienta KJ (2010). CC chemokine ligand 2 (CCL2) promotes prostate cancer tumorigenesis and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev* **21:** 41-48.

ภาคผนวก

ภาคผนวก 1

ตารางแสดงร้อยละของความชื้น (% moisture) ร้อยละของส่วนที่ได้กินได้ (% edible portion) ของตัวอย่างผลไม้ที่ทำการศึกษา

ผลไม้	ความชื้น (%)	% ส่วนที่ได้กินได้
มะละกอแขกดำ	86.4	74
มะละกอฮอล์แลนด์	87.6	71
ส้มโอขาวน้ำผึ้ง	88.7	47
ส้มโอทองดี	89.6	56
ฝรั่งกิมจู	83.2	84
ฝรั่งแป้นสีทอง	83.0	66
เงาะโรงเรียน	77.8	49
เงาะสีชมพู	78.6	45
ทุเรียนหมอนทอง	68.6	83
ทุเรียนชะนี	65.3	75

ภาคผนวก 2

การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการกระตุ้นเซลล์โมโนไซต์ให้เป็นเซลล์แมคโครฟาจ และ หาปริมาณ LPS ที่เหมาะสมให้เกิดภาวะการอักเสบ

1. การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ของมนุษย์ (U937 cell line)

เซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ของมนุษย์ (U937) ซื้อจาก ATCC เป็นเซลล์ประเภทลอยตัวในอาหารเลี้ยงเซลล์ (Suspended cell line) มีคุณสมบัติเป็นเซลล์โมโนไซต์ ในการทดสอบประสิทธิภาพในการลดการอักเสบต้องเหนี่ยวนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติ (differentiation) เป็นเซลล์แมคโครฟาจก่อน ในการศึกษานี้ใช้สาร Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Wiederholt et al 1988) เป็นตัวเหนี่ยวนำก่อนนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการต้านการอักเสบของสารสกัดจากผลไม้ที่เราสนใจ

1.1 การเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ U937

อาหารเลี้ยงเซลล์ (Complete medium) ประกอบด้วย Basal RPMI-1640 (Sigma; R6504), โซเดียมไบคาร์บอเนต 2 กรัมต่อลิตร, fetal bovine serum 10%, penicillin 100,000 ยูนิตต่อลิตร streptomycin 0.1 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเซลล์ใน tissue culture flask ขนาด 75 ตารางเซ็นติเมตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ความหนาแน่นของเซลล์ $2x10^5$- $2x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน

1.2 การเตรียมเซลล์แมคโครฟาจ

การกระตุ้นเซลล์โมโนไซต์ให้กลายเป็นเซลล์แมคโครฟาจ (Hosoya and Marunouchi 1992, Sokol et al 1987) มีขั้นตอนดังนี้

1. เลี้ยงเซลล์ U937 tissue culture flask ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร ที่ความหนาแน่นประมาณ 1.5-1.8 $x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดูดเซลล์ใส่หลอดขนาด 15 มิลลิลิตร ปั่นที่ 1500 รอบต่อนาที 5 นาที

2. ล้างเซลล์ด้วย Basal media 10 มิลลิลิตร ปั่นที่ 1200 รอบต่อนาที 5 นาที อุณหภูมิห้อง ดูดส่วนบนทิ้ง ปรับให้เซลล์ที่ความหนาแน่น 1 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วย Complete media ใส่เซลล์ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ใน tissue culture flask ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร

3. ใส่ PMA ให้มีความเข้มข้นสุทธิ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อกระตุ้นให้เซลล์กลายเป็นแมคโครฟาจ

4. เมื่อครบเวลา เซลล์จะลงไปเกาะที่ผิว tissue culture flask (Hosoya and Marunouchi 1992) ดูดสารละลายทั้งหมดในขวดเลี้ยงเซลล์ทิ้งไป จากนั้นเติม complete media 15 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5% ต่ออีก 24 ชั่วโมง จะได้เซลล์แมคโครฟาจที่พร้อมทำการทดสอบประสิทธิภาพในการลดการอักเสบ (ซึ่งเราทดสอบคุณสมบัติการเป็นแมคโครฟาจโดยนำเซลล์ก่อนใส่ PMA และ หลังใส่ PMA โดย

เอาเฉพาะ attached cells ไปย้อมด้วย anti-CD11b (Ji 2012) ซึ่งเป็น marker ของเซลล์แมคโครฟาจและวิเคราะห์ด้วย Flow cytometer (ผลการศึกษาอยู่ในภาคผนวก)

1.3 การนำเซลล์แมคโครฟาจไปทำการทดลอง

การนำเซลล์แมคโครฟาจไปใช้ในการทดลอง มีขั้นตอนดังนี้

1. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก เติมเอนไซม์ทริปซินปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำให้เซลล์หลุดออกจากพื้นพลาสติก

2. ใส่ Fresh complete media ลงไป 7.5 มิลลิลิตร เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ ปั่นเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ออกที่ 1200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ปรับเซลล์ให้มีความหนาแน่น 1 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรั่ม และไม่มี phenol red (Basal media phenol red-free)

3. ใส่เซลล์ที่เตรียมจากข้อ 2. ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรต่อหลุม ใน 24-well plate

1.4 การกระตุ้นภาวะการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจโดยใช้ Lipopolysaccharide (LPS)

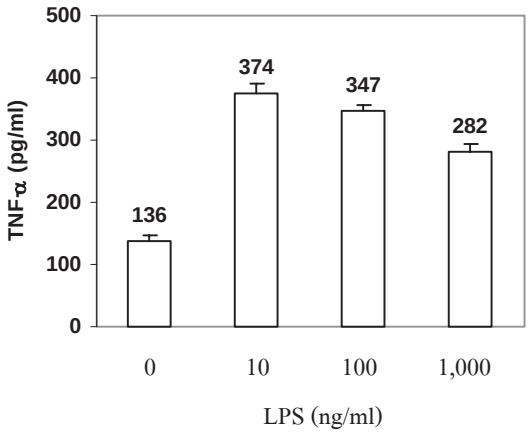
Lipopolysaccharide เป็นสารประกอบหลักของผนังเซลล์แบคทีเรียประเภทแกรมลบ ซึ่งสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้มีการตอบสนองเลียนแบบการเกิดสภาวะการอักเสบ เช่น การหลั่งไซโตไคน์และคีโมไคน์ชนิดต่างๆจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ในการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อความเข้มข้นของ LPS ที่สามารถกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจให้เกิดการอักเสบ โดยหาปริมาณไซโตไคน์ TNF-α เป็นตัวชี้วัดการอักเสบ และความเข้มข้นของ LPS ที่ใช้ต้องไม่มีผลกระทบต่ออัตราการรอดของเซลล์ หลังการกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจแล้วจึงต้องทดสอบความเป็นพิษของ LPS ที่ใช้ด้วยวิธี resazurin

1.4.1 การหาความเข้มข้นของ LPS ที่เหมาะสมในการกระตุ้นการอักเสบ

ความเข้มข้นของ LPS ที่ใช้ทดสอบคือ 10, 100 และ 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีวิธีการทดลองดังนี้

เตรียมเซลล์แมคโครฟาจตามข้อ 1.3 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรต่อหลุมใน 24-well plate เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ลงมาเกาะที่ก้นถาด ใส่ LPS ที่เตรียมให้มีความเข้มข้น 10 เท่า ลงในหลุม ให้ความเข้มข้นสุทธิของ LPS เป็น 10, 100 และ 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และใส่ basal media phenol red-free ปริมาตรเท่ากัน สำหรับกลุ่มควบคุมลบ (negative control) เลี้ยงต่อเป็นเวลา 18 ชั่วโมง

เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์มาวิเคราะห์หาระดับ TNF-α โดยวิธี ELISA



รูปผ1. กราฟแสดงการหลั่ง TNF-α โดยการกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจ U937 ด้วย LPS ที่ความเข้มข้น 10, 100 และ 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (n=3)

ผลการศึกษา

จากรูปผ1. แสดงให้เห็นว่า เซลล์แมคโครฟาจ U937 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จะหลั่ง TNF-α เพิ่มขึ้นประมาณ 3 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่ LPS ถึงแม้ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นของ LPS เป็น 100 และ 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์กลับหลั่ง TNF-α ลดลง

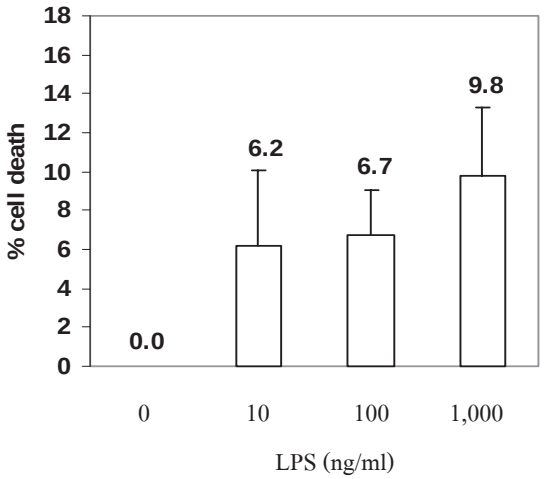
เหตุผลที่เลือกการกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจ U937 ด้วย LPS เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เนื่องจากได้ทบทวนวรรณกรรมที่ใช้เซลล์แมคโครฟาจ U937 ที่กระตุ้นด้วย LPS เป็นต้นแบบในการศึกษากลไกการอักเสบและฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสำคัญต่างๆ พบว่า เซลล์แมคโครฟาจเริ่มมีการหลั่งไซโตไคน์ TNF-α หลังการกระตุ้นด้วย LPS ประมาณ 6 ชั่วโมง และมีระดับไซโตไคน์คงที่ จนกระทั่ง 24 ชั่วโมงไปแล้วจึงเริ่มมีระดับลดลง ส่วนไซโตไคน์ตัวอื่น เช่น IL-6 มีการหลั่งเพิ่มขึ้นในช่วง 6-24 ชั่วโมงหลังการกระตุ้น และมีระดับคงที่หลัง 24 ชั่วโมง (plateau phase) (Garrelds et al 1999) และพบว่าในการศึกษาอื่นๆที่วัดระดับไซโตไคน์จากการกระตุ้นแมคโครฟาจ U937 ด้วย LPS จะเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ในช่วง 18-24 ชั่วโมงหลังการกระตุ้น (La et al 2010, Meja et al 2008) จากข้อมูลสนับสนุนดังกล่าว ผู้วิจัยจึงเลือกวัดระดับไซโตไคน์ที่เวลา 18 ชั่วโมงหลังการกระตุ้นด้วย LPS ซึ่งน่าจะเป็นช่วงเวลาที่มีระดับไซโตไคน์หลายชนิดสูงที่สุด ส่วนการที่ทุกความเข้มข้นของ LPS ให้ผลการกระตุ้นใกล้เคียงกัน น่าจะเป็นเพราะเซลล์เริ่มตายจากการเพิ่มความเข้มข้นของ LPS (ดังแสดงในกราฟผลการทดลอง **รูปB**)

1.4.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี resazurin

หลักการของการใช้สี resazurin ในการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์คือการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ภายในเซลล์ที่ยังมีชีวิต ซึ่งจะออกซิไดซ์สี resazurin จากสีน้ำเงินเป็นสีชมพูเข้ม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่

ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร โดยใช้ความยาวคลื่นที่ 600 นาโนเมตร เป็นค่าอ้างอิง ความเข้มสีชมพูที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับเซลล์ที่มีชีวิต การคำนวณอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ ใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากกลุ่มควบคุมลบ (negative control) คิดเป็น 100 เปอร์เซนต์ และ เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทดสอบแต่ละกลุ่มกับกลุ่มควบคุมลบ คิดเป็นร้อยละ ส่วนขั้นตอนการทดสอบมีดังนี้

หลังจากทดสอบตามขั้นตอนในข้อ **1.4.1** และเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์มาวิเคราะห์หา TNF-α แล้วจึงทดสอบการตายของเซลล์ โดยใส่สี resazurin ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปหลุมละ 50 ไมโครลิตร แล้วเลี้ยงต่อ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เปลี่ยนสี resazurin จากนั้นดูดสารละลายมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรโดยใช้ค่าที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เป็นค่าอ้างอิง



รูปผ2. กราฟแสดงผลของ LPS ต่ออัตราการตายของเซลล์แมคโครฟาจ U937 (n=3)

ผลการศึกษา

จากรูปผ2. เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เซลล์ตายร้อยละ 6.2 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่ LPS และอัตราการตายเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 6.7 และ 9.8 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ LPS เป็น 100 และ 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า การเพิ่มความเข้มข้น LPS นอกจากไม่ได้เพิ่มระดับการหลั่งไซโตไคน์ แล้ว ยังทำให้เซลล์ตายเพิ่มขึ้นด้วย

ดังนั้น จากผลการทดลองในรูปที่ 2 และ 3 เราจึงเลือกระดับความเข้มข้น LPS ที่ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในการกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจให้เกิดการอักเสบโดยหลั่ง TNF-α เพิ่มขึ้นประมาณ 3 เท่า และอัตราการตายร้อยละ 6.2 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งอยู่ในระดับที่ยอมรับได้

1.4.3 หาปริมาณซีรั่มในอาหารเลี้ยงที่เหมาะสมในการกระตุ้นการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจ

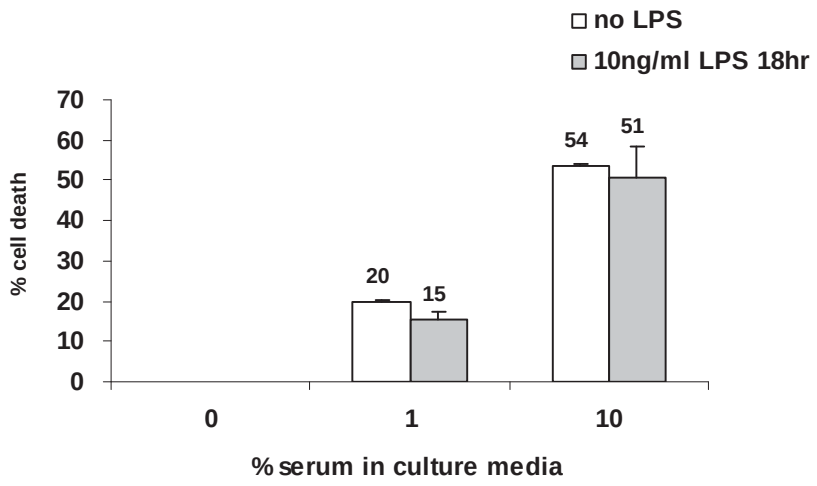
เนื่องจากเซลล์ U937 เป็นเซลล์ที่ไวต่อการกระตุ้น สภาวะการเลี้ยงที่ไม่เหมาะสมอาจทำให้เซลล์เกิดความเครียด และ หลั่งไซโตไคน์ออกมาโดยที่ยังไม่ได้มีการกระตุ้น (spontaneous production) หรือเซลล์ตาย หรือ เซลล์อาจตอบสนองต่อตัวกระตุ้น (เช่น LPS) ต่ำกว่าที่ควรจะเป็น ปริมาณซีรั่มในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นปัจจัยหลักอย่างหนึ่งที่มีผลต่อการตอบสนองของเซลล์ ดังนั้นในการทดลองนี้ จึงกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจด้วย LPS ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (เป็นปริมาณที่เหมาะสมจากผลการทดสอบในข้อ 1.4.2) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะการเลี้ยงเซลล์ 3 แบบ คือ 1) อาหารเลี้ยงปราศจากซีรั่ม (serum free media) 2) อาหารเลี้ยงเซลล์มีซีรั่ม 1% และ 3) อาหารเลี้ยงเซลล์มีซีรั่ม 10% จากนั้นจึงทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี resazurin

วิธีการทดลองมีดังนี้

1. เตรียมเซลล์แมคโครฟาจตามข้อ 1.3 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก เติมเอนไซม์ทรปซิน ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำให้เซลล์หลุดออกจากพื้นพลาสติก ใส่ fresh complete media ลงไป 7.5 มิลลิลิตร เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ ปั่นเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ออกที่ 1200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ปรับเซลล์ให้มีความหนาแน่น 1 x10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 3 แบบ คือ 1) อาหารเลี้ยงปราศจากซีรั่ม (serum free media) 2) อาหารเลี้ยงเซลล์มีซีรั่ม 1% และ 3) อาหารเลี้ยงเซลล์มีซีรั่ม 10%

2. ใส่เซลล์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรต่อหลุม ใน 24-well plate เลี้ยงต่อ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ใส่ LPS ให้ความเข้มข้นสุทธิ เป็น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงต่อ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3. ทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี resazurin



รูปผ3. ผลของปริมาณซีรั่มในอาหารเลี้ยงต่ออัตราการตายของเซลล์แมคโครฟาจ U937 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (n=3)

ผลการศึกษา

จากรูปผ3. แสดงให้เห็นว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรั่ม 0, 1 และ 10% พบว่าอัตราการตายเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณซีรั่ม โดยใส่ซีรั่ม 10% จะมีอัตราการตายถึง 54% เมื่อเทียบกับการเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีซีรั่ม แต่ปริมาณซีรั่มในอาหารเลี้ยงไม่มีผลต่อความแตกต่าง ระหว่างอัตราการตายของกลุ่มที่ใส่ กับ ไม่ใส่ LPS ซึ่งอธิบายผลได้ดังนี้

เซลล์โมโนไซต์มีการตอบสนองจากการกระตุ้นรูปแบบต่างๆ เช่น แสงยูวี, สภาวะ oxidative stress ระดับสูง และ สภาวะปราศจาก pro-survival cytokine หรือ growth factor บางชนิดโดยมีการตายแบบ apoptosis (Liu et al 2001) แต่ในทางกลับกัน เมื่อเซลล์โมโนไซต์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์แมคโครฟาจ จะมีการเพิ่มความทนทานต่อ apoptosis stimuli เหล่านี้เพื่อยืดชีวิตให้ยาวนานขึ้น เมื่อย้ายที่จากระบบไหลเวียนโลหิตซึ่งเต็มไปด้วย growth factorไปอยู่ในเนื้อเยื่อต่างๆ ที่มีระดับ growth factor และ cytokine ต่ำกว่า (long-live tissue cell) (Munn et al 1995) อย่างไรก็ดี เนื่องจากเซลล์แมคโครฟาจสามารถผลิต อนุมูลอิสระ, lytic enzyme และ ไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ซึ่งสารเหล่านี้สามารถทำลายเนื้อเยื่อแวดล้อม และอาจนำไปสู่สภาวะการอักเสบในบริเวณกว้าง จึงจำเป็นต้องมีระบบการควบคุมแมคโครฟาจที่เข้มงวดเช่นกัน โดยกลไกที่สำคัญอย่างหนึ่งคือ การเหนี่ยวนำการตายแบบ apoptosis โดย pro-survival signal (Activation-induced cell death) กล่าวคือ pro-survival signal ที่ตามปกติจะเป็นสัญญาณกระตุ้นให้เซลล์มีชีวิตรอด (รวมทั้งเซลล์โมโนไซต์) กลับให้ผลตรงกันข้ามในเซลล์แมคโครฟาจ คือเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis แทน (Munn et al 1995) ซึ่งกลไกการควบคุมนี้ยังพบในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบชนิดอื่นๆ เช่น T-cell (Brenner et al 2008, Yolcu et al 2008), B-cell (Donjerkovic and Scott 2000, Green and Scott 1994) และ granulocyte (Gaipl et al 2009) ในการรักษาสมดุลของระบบภูมิคุ้มกัน

การใช้ซีรั่มเป็นส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเซลล์ นอกจากส่วนประกอบหลักคืออัลบูมิน ซึ่งเป็นโปรตีนที่ช่วยเพิ่มความหนืดให้อาหารเลี้ยงเซลล์แล้ว ยังมีส่วนประกอบของ Growth factor ต่างๆที่ช่วยกระตุ้นให้เซลล์มีชีวิตรอดมากขึ้น จากผลการทดลอง เมื่อเซลล์โมโนไซต์ U937 ถูกกระตุ้นด้วย PMA ให้เปลี่ยนไปเป็นเซลล์แมคโครฟาจ แล้วถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรั่ม 0, 1 และ 10% พบว่าอัตราการตายเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณซีรั่ม หากเลี้ยงโดยใส่ซีรั่ม 10% จะมีอัตราการตายถึง 54% เมื่อเทียบกับการเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีซีรั่ม ซึ่งตามปกติแล้ว การใส่ซีรั่มในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นการกระตุ้นให้เซลล์เจริญเติบโตและมีการแบ่งตัว แต่การตายของเซลล์แมคโครฟาจที่เกิดขึ้นจากการผสมซีรั่มลงในอาหารเลี้ยงนี้ น่าจะเกิดจากกลไก Activation-induced cell death ที่กล่าวไว้ข้างต้น ผลการทดลองนี้ยังเป็นการยืนยันว่าการกระตุ้นเซลล์โมโนไซต์ให้กลายเป็นแมคโครฟาจด้วย PMA ประสบความสำเร็จ เนื่องจากความต้านทานต่อกระบวนการ apoptosis ที่เกิดขึ้นจากการขาดซีรั่ม

(serum-withdrawal) นั้นเป็นลักษณะเฉพาะตัว (defining feature) ที่สำคัญอย่างหนึ่งของเซลล์แมคโครฟาจ (Daigneault et al 2010, Munn et al 1995)

ดังนั้นเราจึงสรุปขั้นตอนและวิธีการทดสอบประสิทธิภาพการต้านการอักเสบของสารสกัดจากผลไม้ โดยทดสอบสารสกัดในเซลล์แมคโครฟาจที่เลี้ยงใน Serum free medium จากนั้นจึงกระตุ้นด้วย LPS 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ไปวัดไซโตไคน์ และ คีโมไคน์

2. การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดผลไม้เพื่อใช้ทดสอบประสิทธิภาพลดการอักเสบ

2.1 การหาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์แมคโครฟาจหลังได้รับสารสกัดผลไม้

การเตรียมสารสกัดผลไม้โดยสกัดผงผลไม้แห้ง 1.0 กรัม ด้วย 90% เอธานอล 30 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารละลาย 2 นาที นำไป sonicate อีก 10 นาที และ เขย่าอย่างแรงอีกครั้งด้วยเครื่องเขย่าสารละลาย 2 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 7500 รอบต่อนาที 25 องศาเซลเซียส 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่ขวดก้นกลมสีชา นำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ (Rotary Evaporator) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส จนกระทั่งแห้งสนิท ละลายกลับด้วย basal media phenol red-free สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยใช้ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ได้สารสกัดผลไม้ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.4 กรัมต่อมิลลิลิตร กรองสารสกัดผ่านหัวกรองขนาด 0.2 ไมครอน เพื่อทำให้ปลอดเชื้อก่อนนำไปใช้

ทดสอบหาความเข้มข้นของสารสกัดผลไม้ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ โดยเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจร่วมกับสารสกัดผลไม้ที่ความเข้มข้นสุทธิ 40, 20, 10, 5, 2.5 และ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 24-well plate เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แบ่งเซลล์ในการทดลองออกเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มที่ใส่สารสกัดแต่ไม่มี LPS และ กลุ่มที่ใส่สารสกัดร่วมกับ LPS ความเข้มข้นสุทธิ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเลี้ยงเซลล์ต่ออีก 18 ชั่วโมง ทดสอบอัตราการรอดชีวิตด้วยวิธี resazurin คำนวนอัตราการรอดชีวิตเป็นร้อยละเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารสกัด โดยอัตราการรอดที่ยอมรับได้คือมากกว่าร้อยละ 80 ผลการทดลองแสดงใน**ตารางที่ 1 และ 2**

ผลการทดสอบพบว่าเซลล์แมคโครฟาจกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากผลไม้ความเข้มข้น 1.25-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งไม่ได้กระตุ้นด้วย LPS ทั้ง 10 ชนิด มีอัตราการรอดชีวิตอยู่ในช่วงร้อยละ 84 ± 0 ถึง 112 ± 6 **(ตารางที่ ผ1.)** ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดผลไม้ร่วมกับ LPS มีอัตราการรอดชีวิตอยู่ในช่วงร้อยละ 93±0 ถึง 111±3 **(ตารางที่ ผ2.)** ซึ่งอัตรารอดชีวิตของทั้งสองกลุ่มอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ผู้วิจัยจึงเลือกสารสกัดผลไม้ความเข้มข้น 40, 20 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบหาฤทธิ์ลดการอักเสบในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ผ1. อัตราการรอดชีวิตของเซลล์หลังเลี้ยงร่วมกับสารสกัดจากผลไม้ความเข้มข้นสุทธิ 1.25-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 20 ชั่วโมง (n=3)

10ng/ml LPS	-						
ความเข้มข้นตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	40	20	10	5	2.5	1.25	0
ส้มโอทองดี	100±2	101±1	101±2	98±1	95±2	98±1	100
ส้มโอขาวน้ำผึ้ง	95±2	98±2	97±2	97±1	97±2	98±1	100
มะละกอแขกดำ	98±3	97±4	92±1	94±3	88±1	91±1	100
มะละกอฮอลแลนด์	106±5	104±4	105±2	107±2	105±6	107±2	100
ฝรั่งกิมจู	93±1	99±5	104±4	95±6	91±2	96±3	100
ฝรั่งแป้นสีทอง	84±0	84±0	95±3	102±6	103±5	103±4	100
เงาะโรงเรียน	108±3	112±2	112±6	106±1	107±3	106±0	100
เงาะสีชมพู	105±3	106±2	104±6	101±6	102±4	102±3	100
ทุเรียนชะนี	105±3	106±1	104±6	101±5	102±3	102±3	100
ทุเรียนหมอนทอง	107±3	111±2	112±6	106±1	106±3	106±0	100

ตารางที่ ผ2. อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ หลังจากเลี้ยงร่วมกับสารสกัดจากผลไม้ความเข้มข้นสุทธิ 1.25-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนกระตุ้นการอักเสบด้วยการใส่ LPS ความเข้มข้นสุทธิ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเลี้ยงเซลล์ต่ออีก 18 ชั่วโมง (n=3)

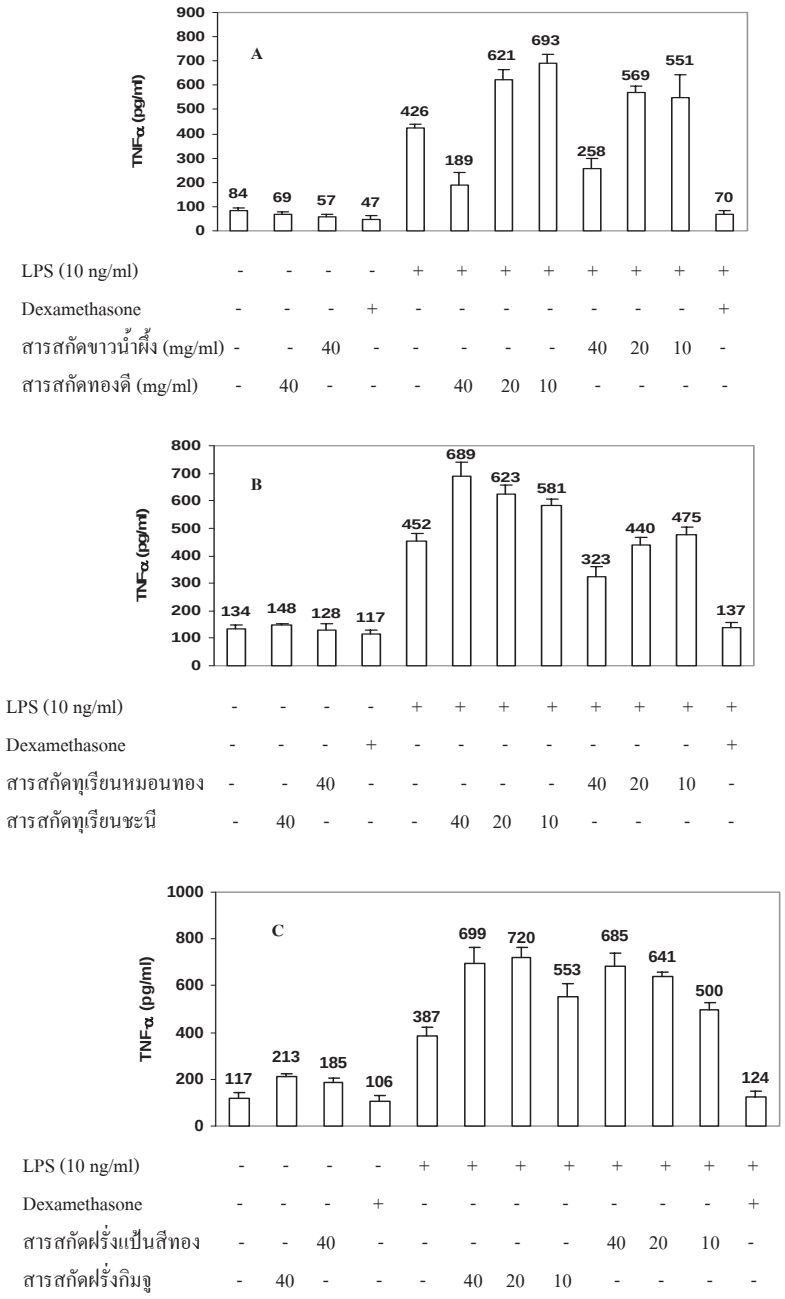
10ng/ml LPS	+						
ความเข้มข้นตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	40	20	10	5	2.5	1.25	0
ส้มโอทองดี	98±3	100±1	99±1	97±1	97±1	97±1	100
ส้มโอขาวน้ำผึ้ง	97±2	97±2	99±1	96±1	97±1	97±3	100
มะละกอแขกดำ	107±5	104±3	104±2	101±4	94±6	109±3	100
มะละกอฮอลแลนด์	109±3	101±5	106±4	106±1	104±2	104±3	100
ฝรั่งกิมจู	98±4	103±1	103±3	95±4	96±9	99±1	100
ฝรั่งแป้นสีทอง	93±0	93±0	104±7	101±5	104±6	103±5	100
เงาะโรงเรียน	109±2	111±3	109±3	110±1	108±3	107±6	100
เงาะสีชมพู	110±2	111±2	110±2	106±2	107±1	103±3	100
ทุเรียนชะนี	110±2	111±1	110±2	106±2	106±0	102±3	100
ทุเรียนหมอนทอง	109±2	111±3	110±2	110±1	108±3	107±6	100

2.2 ทดสอบสารสกัดที่ความเข้มข้น 10-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อระดับ TNF-α จากเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS

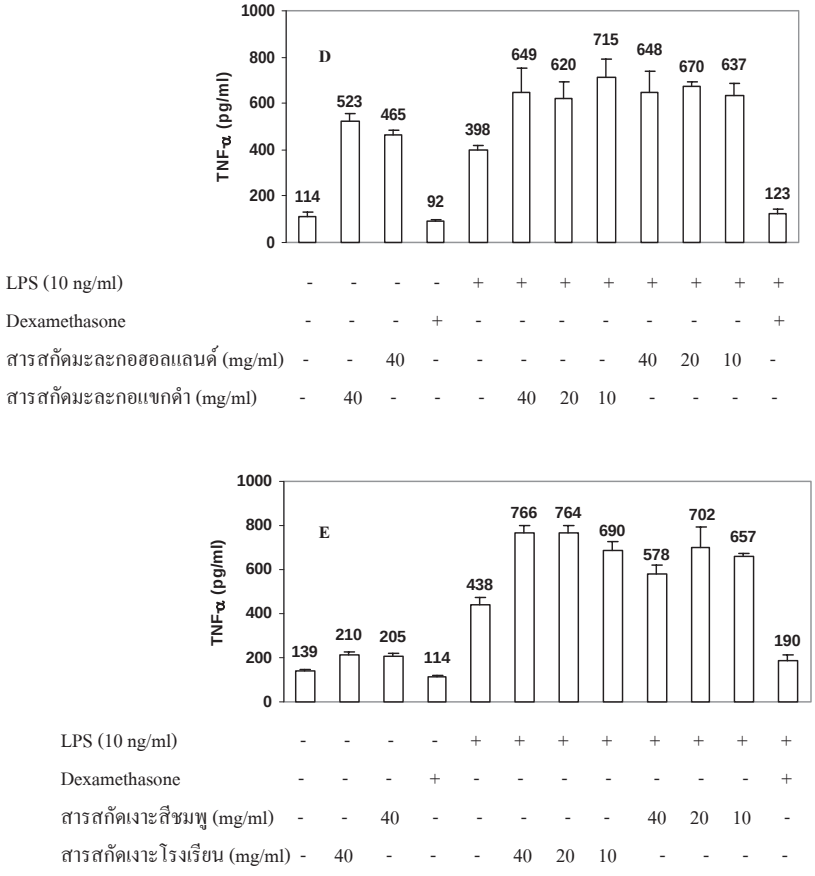
จากผลการทดสอบความเป็นพิษใน ข้อ2.1 ทดสอบต่อโดยเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจร่วมกับสารสกัดผลไม้ที่ความเข้มข้นสุทธิ 40, 20 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 24 well plate เลี้ยงเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนกระตุ้นด้วย LPS ที่ความเข้มข้นสุทธิ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเลี้ยงเซลล์ต่ออีกเป็นเวลา 18 ชั่วโมง เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ส่วนบนมาวิเคราะห์หา TNF-α และใช้ Dexamethasone ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ซึ่งเป็นยาที่ใช้ลดการอักเสบเป็นสารมาตรฐาน หรือ กลุ่มควบคุมบวก (positive control) ในแต่ละการทดลอง โดยแบ่งเซลล์ในการทดลองเป็น 8 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่	LPS (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	สารที่ใช้ทดสอบ
1	-	Basal media phenol red-free
2	-	1 ไมโครโมลาร์ Dexamethasone
3	-	สารสกัดผลไม้ความเข้มข้นสุทธิ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
4	+	Basal media phenol red-free
5	+	1 ไมโครโมลาร์ Dexamethasone
6	+	สารสกัดผลไม้ความเข้มข้นสุทธิ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
7	+	สารสกัดผลไม้ความเข้มข้นสุทธิ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
8	+	สารสกัดผลไม้ความเข้มข้นสุทธิ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากรูปผ4. สารสกัดผลไม้ที่สามารถลดการหลั่ง TNF-α จากเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ได้แก่ ส้มโอทองดีและส้มโอขาวน้ำผึ้ง ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และทุเรียนหมอนทองความเข้มข้น 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่กลุ่มทดลองอื่นๆ แม้แต่ ส้มโอทั้ง 2 ชนิด และ ทุเรียนหมอนทองที่ความเข้มข้นต่ำลงมา กลับเสริมฤทธิ์ร่วมกับ LPS เพิ่มการหลั่ง TNF-α มากขึ้น ส่วนเซลล์ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแต่ไม่ได้รับ LPS พบว่าส้มโอทองดีและส้มโอขาวน้ำผึ้ง ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดการหลั่ง TNF-α ได้เช่นกัน แต่สารสกัดจากผลไม้ชนิดอื่นกลับเพิ่มการหลั่ง TNF-α โดยมะละกอแขกดำ และ ฮอลแลนด์ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงผลการกระตุ้นการหลั่ง TNF-α มากที่สุด โดยเพิ่มขึ้นถึง 4.6 และ 4 เท่าของ กลุ่มควบคุมลบตามลำดับ



รูปผ4. ผลของสารสกัดจากส้มโอ (A), ทุเรียน (B) และ ฝรั่ง (C) ในการหลั่ง TNF-αจากเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะอักเสบด้วย LPS โดยทำการเลี้ยงเซลล์ที่มีหรือไม่มีสารสกัดที่ความเข้มข้น 10-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ dexamethasone 1 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนกระตุ้นด้วย LPS 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์เพื่อวัดปริมาณ TNF-α (n=3)



รูปผ4. (ต่อ**)** ผลของสารสกัดจากมะละกอ (D) และ เงาะ (E) ในการหลั่ง TNF-αจากเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะอักเสบด้วย LPS โดยทำการเลี้ยงเซลล์ที่มีหรือไม่มีสารสกัดที่ความเข้มข้น 10-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ dexamethasone 1 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนกระตุ้นด้วย LPS 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์เพื่อวัดปริมาณ TNF-α (n=3)

จากผลการทดสอบโดยรวมพบว่าแมคโครฟาจได้รับสารสกัดผลไม้ 10- 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับ LPS กระตุ้นการอักเสบเพิ่มขึ้นแทนที่จะยับยั้ง

ส่วนสารสกัดส้มโอทั้ง 2 ชนิด ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงค่าการยับยั้งการหลั่ง TNF-α นั้น จากการสังเกตุขณะทำการทดลองพบว่า เมื่อละลายสารสกัดส้มโอกลับด้วย basal media ที่ผสม phenol red แล้ว สีของสารละลายเปลี่ยนจากสีส้มแดงเป็นสีเหลืองมะนาวแสดงถึงความเป็นกรดที่ค่อนข้างสูง ผู้วิจัยจึงได้ทำการวัดค่า pH ของสารสกัดผลไม้ทั้ง 10 ชนิด ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร **(ตามที่ผู้ทรงคุณวุฒิเสนอให้วัดจากรายงานครั้งแรก)** ได้ผลการทดลองดังแสดงใน**ตารางที่ ผ3.**

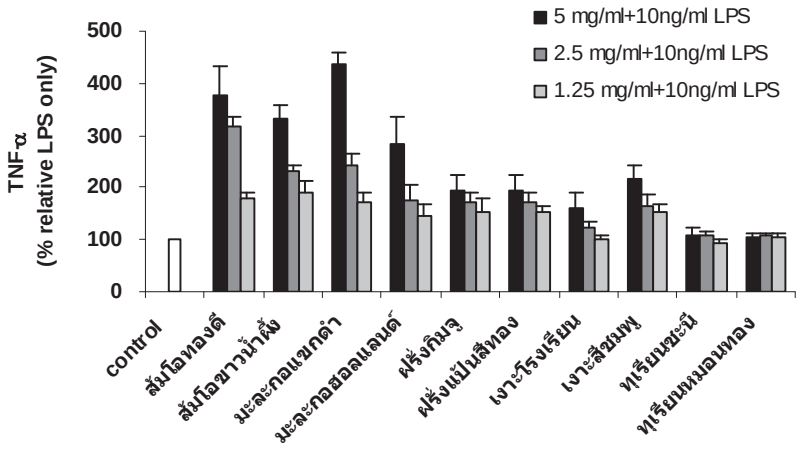
ตารางที่ ผ3. แสดงค่า pH ของสารสกัดผลไม้ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยใช้ basal media เป็นตัวเจือจาง (n=3)

ความเข้มข้นตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	pH		
	40	20	10
ส้มโอทองดี	6.58	7.21	7.37
ส้มโอขาวน้ำผึ้ง	6.53	7.20	7.37
มะละกอแขกดำ	7.33	7.32	7.36
มะละกอฮอลแลนด์	7.36	7.35	7.36
ฝรั่งกิมจู	7.23	7.24	7.30
ฝรั่งแป้นสีทอง	7.24	7.26	7.3
เงาะโรงเรียน	7.34	7.35	7.37
เงาะสีชมพู	7.37	7.37	7.38
ทุเรียนชะนี	7.39	7.39	7.39
ทุเรียนหมอนทอง	7.39	7.39	7.40

จากผลการทดลองใน**ตารางที่ ผ3.** พบว่าสารสกัดส้มโอทองดี และส้มโอขาวน้ำผึ้งที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า pH ค่อนไปทางกรดคือ 6.58 และ 6.53 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากผลไม้ชนิดอื่นมีค่า pH อยู่ในช่วง 7.2-7.4 ซึ่งเป็นช่วง physiological pH ซึ่งไม่น่าจะมีผลต่อกิจกรรมของเซลล์ และ การทำปฏิกริยาของแอนติเจน และ แอนติบอดี้ในการหาปริมาณ TNF-α ด้วยวิธี ELISA ดังนั้น การที่สารสกัดจากส้มโอทั้ง 2 ชนิดแสดงผลการยับยั้งการหลั่ง TNF-α อาจจะเป็นผลจากความเป็นกรดของตัวอย่าง ส่วนการที่สารสกัดทุเรียนหมอนทองความเข้มข้น 40 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรแสดงผลการยับยั้ง TNF-α แบบ dose dependent นั้น ก็ยังคงแสดงการกระตุ้นการอักเสบเล็กน้อยที่ความเข้มข้นที่เจือจางลงมาที่ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ดี การที่ตัวอย่างส่วนใหญ่แสดงผลการกระตุ้น TNF-α นั้น แสดงให้เห็นว่า การใช้สารสกัดจากผลไม้ที่ความเข้มข้น 10-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการทดสอบประสิทธิภาพต้านการอักเสบที่ความเข้มข้นนี้น่าจะยังไม่เหมาะสม ดังนั้นผู้วิจัยได้ลองทำซ้ำ โดยลดความเข้มข้นของสารสกัดลงเป็น 5, 2.5 และ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.3 การทดสอบผลของสารสกัดจากผลไม้ในช่วงความเข้มข้น 1.25 - 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับ LPS

เลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจร่วมกับสารสกัดผลไม้ที่ความเข้มข้นสุทธิ 1.25, 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 24 well plate เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนกระตุ้นด้วยการใส่ LPS เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ส่วนบนมาวิเคราะห์หา TNF-α ได้ผลการทดลองดังแสดงใน**รูปผ5.**



รูปผ5. สารสกัดจากผลไม้ต่อการหลั่ง TNF-αจากเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะอักเสบด้วย LPS โดยทำการเลี้ยงเซลล์ที่มีหรือไม่มีสารสกัดที่ความเข้มข้น 1.25-5 mg/ml เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนกระตุ้นด้วย LPS 10 ng/ml เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์เพื่อวัดปริมาณ TNF-α (แสดงค่าเป็นร้อยละของกลุ่มที่ได้รับ LPS อย่างเดียว) (n=3)

จากผลการทดลอง**รูปผ5.** เซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับสารสกัดผลไม้ไทย 10 ชนิดที่ความเข้มข้น 1.25, 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับ LPS 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ยังคงแสดงผลในการกระตุ้นการอักเสบมากขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ LPS อย่างเดียว โดยตัวอย่างที่มีแนวโน้มกระตุ้นการหลั่ง TNF-α มากที่สุด คือ ส้มโอ และ มะละกอทั้ง 2 สายพันธุ์ คาดว่าความเข้มข้นที่ปรับลดลงมานี้ยังคงไม่เหมาะสม ในขั้นต่อไปผู้วิจัยจึงออกแบบการทดลองเพิ่มเติมโดยสุ่มเลือกตัวอย่างจากกลุ่มที่แสดงผลการกระตุ้น TNF-α ค่อนข้างสูงมาทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยไม่กระตุ้นการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ

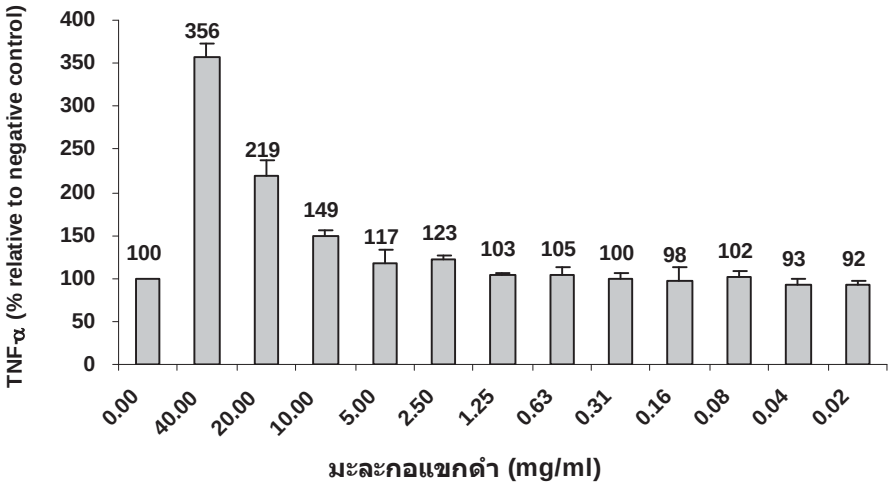
2.4 การทดสอบหาความเข้มข้นของสารสกัดผลไม้ ที่ไม่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ

แบ่งการทดสอบเป็น 2 ลักษณะ คือ

ก) การทดสอบหาความเข้มข้นของสารสกัดมะละกอแขกดำ ที่ไม่เหนี่ยวนำด้วย LPS

การทดสอบนี้สุ่มเอาตัวอย่างมะละกอแขกดำซึ่งแสดงค่าในการกระตุ้นการหลั่ง LPS-induced TNF-α **(รูปผ5)** และกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจหลั่ง TNF-αโดยไม่กระตุ้นด้วย LPS (spontaneous production) **(รูปที่ ผ4D)** เพื่อทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจร่วมกับสารสกัดมะละกอแขก

ดำที่ช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0.02-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำเป็น 2-fold dilutionใน 24 well plate เป็นเวลา 20 ชั่วโมง เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์มาวัด TNF-α ได้ผลการทดลองดังแสดงใน**รูปผ6**

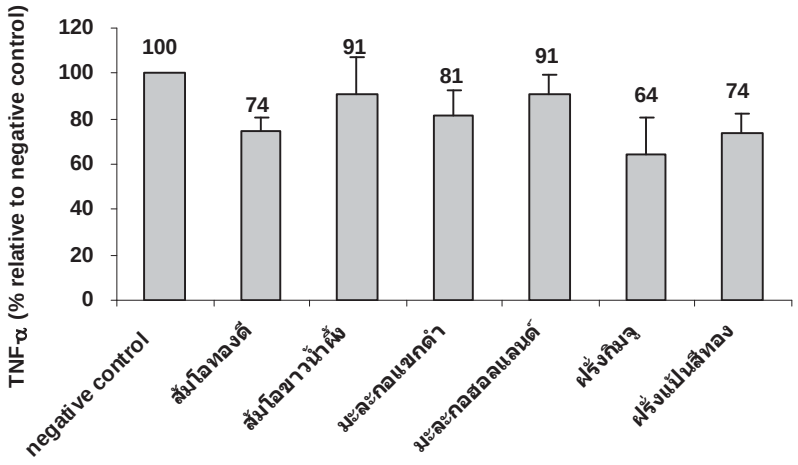


รูปผ6. ผลของสารสกัดจากมะละกอแขกดำต่อการหลั่ง TNF-α จากเซลล์แมคโครฟาจโดยเลี้ยงเซลล์ร่วมกับ basal media (negative control) หรือ สารสกัดมะละกอแขกดำ ที่ความเข้มข้น 0.02-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 20 ชั่วโมง เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์เพื่อวัดปริมาณ TNF-α (แสดงค่าเป็นร้อยละของกลุ่มควบคุมลบ) (n=3)

จากผลการทดลองใน**รูปผ6.** เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ (เซลล์แมคโครฟาจที่ไม่ได้รับสารสกัด) พบว่าสารสกัดมะละกอแขกดำที่ไม่แสดงฤทธิ์กระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจให้หลั่ง TNF-α คือความเข้มข้นที่เจือจางกว่า 0.31 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นต้นไป ในขั้นต่อไป ผู้วิจัยจึงเลือกสารสกัดผลไม้บางชนิดจากกลุ่มที่แสดงฤทธิ์กระตุ้นการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ **(รูปผ5)** คือ ส้มโอ, มะละกอ และ ฝรั่ง ทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยใช้ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมาทำการทดสอบซ้ำ

ข) การทดสอบหาความเข้มข้นของสารสกัดส้มโอ, มะละกอ และ ฝรั่ง ที่ไม่เหนี่ยวนำให้เซลล์แมคโครฟาจผลิตไซโตไคน์

เลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจร่วมกับสารสกัดส้มโอทองดี,ขาวน้ำผึ้ง,มะละกอแขกดำ, ฮอลแลนด์, ฝรั่งกิมจู และ แป้นสีทอง ที่ความเข้มข้นสุทธิ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 24 well plate เป็นเวลา 20 ชั่วโมง เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์มาหา TNF-α ได้ผลการทดลองดังแสดงใน**รูปที่ ผ7.**



รูปผ7. ผลของสารสกัดจากผลไม้ต่อการหลั่ง TNF-α จากเซลล์แมคโครฟาจโดยเลี้ยงเซลล์ร่วมกับ basal media (negative control) หรือ สารสกัดจากส้มโอ มะละกอ และ ฝรั่ง ทั้งสองสายพันธุ์ ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 20 ชั่วโมง เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์เพื่อวัดปริมาณ TNF-α (แสดงค่าเป็นร้อยละของกลุ่มควบคุมลบ) (n=3)

จากผลการทดลองในรูปผ7. สารสกัดส้มโอทองดี, ส้มโอขาวน้ำผึ้ง, มะละกอแขกดำ, มะละกอฮอลแลนด์, ฝรั่งกิมจู และ ฝรั่งแป้นสีทอง ที่ความเข้มข้นสุทธิ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่กระตุ้นให้เซลล์หลั่ง TNF-α เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกใช้สารสกัดผลไม้ทุกชนิด ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการทดสอบประสิทธิภาพต้านการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจที่เหนี่ยวนำการอักเสบด้วย LPS ในขั้นตอนต่อไป

โดยสรุปสภาวะที่เหมาะสม ในการกระตุ้นเซลล์โมโนไซต์ให้เป็นเซลล์แมคโครฟาจ

คือเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจร่วมกับสารสกัดผลไม้ที่ความเข้มข้นสุทธิ 0.2, 0.1 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 24 well plate เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนกระตุ้นด้วย LPS ที่ความเข้มข้นสุทธิ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเลี้ยงเซลล์ต่ออีก 18 ชั่วโมง เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ส่วนบนมาวิเคราะห์หาตัวชี้วัดการอักเสบ ได้แก่ TNF-α, IL-6, IL-8 และ MCP-1 ด้วยวิธี ELISA ในการทดสอบนี้จะใช้ N-acetyl-L-cysteine (NAC) ความเข้มข้นสุทธิ 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติลดความเครียดของเซลล์จากสภาวะ oxidative stress และ ลดการอักเสบเป็นสารมาตรฐานในการทดลองร่วมด้วยทุกครั้ง (Geiler et al 2010, Kröger et al 1999, Sung et al 2012) หลังจากเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ส่วนบนแล้ว เติม Basal media phenol red-free ลงไปหลุมละ 0.5 มิลลิลิตร หาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี resazurin คำนวนหาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ โดยคิดเป็นร้อยละของกลุ่มที่ใส่ LPS อย่างเดียว

ภาคผนวก 3

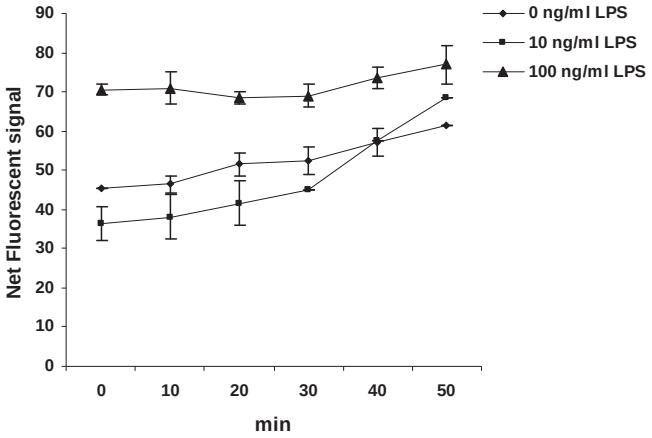
การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำเซลล์โมโนไซต์ให้เกิดภาวะ Oxidative stress

3. การทดสอบประสิทธิภาพการลดอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลไม้ในเซลล์โมโนไซต์

ตามโครงร่างวิจัยเดิม ได้นำเสนอการทดสอบฤทธิ์การลดอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลไม้ไทยโดยใช้ต้นแบบการศึกษาเป็นเซลล์แมคโครฟาจ U937 ที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress ด้วย LPS เหมือนวิธีทดสอบ**ฤทธิ์ต้านการอักเสบ** และวัดค่า intracellular ROS ที่เกิดขึ้น

ทำการทดลองโดยกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจ U937 ด้วย LPS ความเข้มข้น 10 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ก่อนย้อมด้วย Dichlorodihydrofluorescein Diacetate (DCFH-DA) ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 30 นาที เก็บเซลล์โดยการใส่ทริปซิน 5 นาที และ ปั่นเอาทริปซินออก และใส่ basal media phenol red free ลงไป จากนั้นใส่เซลล์ที่ความหนาแน่น 1.8 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในถาดหลุมสีดำขนาด 96 หลุมๆละ 200 ไมโครลิตร วัดค่าฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นที่ excitation 485 นาโนเมตร และ emission 530 นาโนเมตร ทุกๆ 10 นาที เป็นเวลา 50 นาที รายงานผลเป็นค่า net Fluorescent (F_{net}) โดยคำนวนจาก

$$F_{net} = F_{stained\ cell} - F_{unstained\ cell}$$



รูปผ8. การเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระในเซลล์แมคโครฟาจ U937 โดยเหนี่ยวนำเซลล์ด้วย LPS ที่ความเข้มข้น 10 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ล้างเซลล์ และ ย้อมเซลล์ด้วย DCFH-DA เป็นเวลา 30 นาที ล้างเซลล์ที่ลอยออกจากผิว plate หลังจาก trypsinize มาวัดค่าฟลูออเรสเซนต์ (n=3)

ผลการทดลองในรูปผ8. จากการเหนี่ยวนำด้วย LPS 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 10 นาที อัตราการเกิด intracellular ROS สูงสุดอยู่ที่ 1.5 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบที่ไม่ใส่ LPS ถ้าใช้สภาวะการเหนี่ยวนำoxidative stress ลักษณะนี้จะทำให้การแปลผลประสิทธิภาพของสารสกัดผลไม้ในการลดอนุมูลอิสระ

ไม่ชัดเจน ดังนั้นผู้วิจัยจึงทบทวนวรรณกรรมเพิ่มเติมเพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมในการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดผลไม้ในการลดอนุมูลอิสระ

จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าส่วนใหญ่การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารที่สนใจมักทดสอบในเซลล์โมโนไซด์ U937 มากกว่า เนื่องจากเซลล์โมโนไซด์ยังไม่ถูกเหนี่ยวนำด้วยตัวกระตุ้นใดๆ เมื่อทบทวนวรรณกรรมดูพบว่ามีการใช้สารหลายชนิดเหนี่ยวนำเซลล์ชนิดนี้ให้เกิด oxidative stress ได้ดี ให้เห็นผลแตกต่างจากกลุ่มควบคุมลบอย่างชัดเจน เช่น ไฮโดนเจนเปอร์ออกไซด์ และ LPS (Kruzel et al 2010, O'Brien et al 2006b) จึงลองเปลี่ยนการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลไม้เป็นการใช้เซลล์โมโนไซด์แทนเซลล์แมคโครฟาจ มีรายละเอียดการทดสอบดังนี้

3.1 การหาความเข้มข้นสี Dichlorodihydrofluorescein Diacetate (DCFH-DA) ที่เหมาะสมในการย้อม ROS ภายในเซลล์ U937

การหาระดับ intracellular ROS ทำได้โดยการใช้สาร DCFH-DA หลักการของวิธีการนี้คือ สาร DCFH-DA ซึ่งเป็นสารที่ไม่เรืองแสงเมื่อซึมผ่านผนังเซลล์เข้าไปในเซลล์ เอนไซม์ esterase ในเซลล์จะตัดกลุ่ม diacetate ออกได้เป็น DCFH ซึ่งจะถูกออกซิไดซ์ด้วย reactive oxygen species (ROS) ภายในเซลล์ให้กลายเป็นสารเรืองแสง DCF ดังนั้นปริมาณ intracellular ROS จะแปรผันตามระดับ fluorescent signal ที่วัดได้จากเซลล์ที่ย้อมด้วย DCFH-DA (Krejsa and Schieven 2000, Wolfe and Liu 2007)

เนื่องจากเซลล์แต่ละชนิดมีอัตราการทำงานของ esterase ต่างกัน ทำให้มีการรับ DCFH-DA เข้าเซลล์ได้ไม่เท่ากัน ดังนั้นจึงต้องหาปริมาณของ DCFH-DA ที่เหมาะสมกับเซลล์ก่อนที่จะใช้ความเข้มข้นของ DCFH-DA ในการย้อมเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress โดยมีหลักการคือ เซลล์ทุกชนิดจะมี intracellular ROS เกิดขึ้นในปริมาณเล็กน้อยจากปฏิกริยา oxidation-reduction ของเซลล์ (Spontaneous ROS) แม้ว่าจะไม่ได้สัมผัสกับตัวเหนี่ยวนำใดๆ ต้องใช้ความเข้มข้น DCFH-DA ที่เหมาะสมจึงจะเห็นค่าความแตกต่างของระดับ fluorescent ระหว่างเซลล์ที่ย้อมกับเซลล์ที่ไม่ได้ย้อมด้วย DCFH-DA

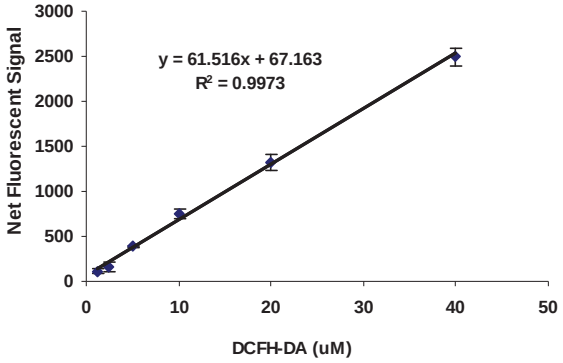
ทดลองโดยย้อมเซลล์โมโนไซด์ U937 ด้วย DCFH-DA ที่ความเข้มข้น 1.25- 40 ไมโครโมลาร์ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ก่อนวัดค่าฟลูออเรสเซนต์ที่ excitation 485 นาโนเมตร emission ที่ 530 นาโนเมตร โดยมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

3.1.1 ใช้เซลล์ U937 ที่เลี้ยงจนได้ confluent ประมาณ 1.5-1.8 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เก็บเซลล์โดยการปั่นที่ 1200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์ด้วย basal RPMI phenol red free media 2 ครั้ง ปรับเซลล์ให้มีความหนาแน่น 1.8 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตรด้วย basal RPMI phenol red free mediaใส่เซลล์หลุมละ 0.2 มิลลิลิตรใน 96 well black plate เลี้ยงเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เซลล์ U937 ในสภาวะ serum-free จะลงไปเกาะที่ก้นถาด ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกโดยใช้ multi-channel pipette

3.1.2 ใส่ DCFH-DA ความเข้มข้นสุทธิ 1.25- 40 ไมโครโมลาร์ ลงไปหลุมละ 0.2 มิลลิลิตร ส่วนหลุมที่เป็น unstained cell ให้ใส่ basal RPMI phenol red free media 0.2 มิลลิลิตร เลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 30 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกโดยใช้ multi-channel pipette

3.1.3 ล้างเซลล์ด้วย basal RPMI phenol red free media 2 ครั้ง โดยปั่นที่ 1500 rpm 5 นาที (ใช้ centrifuge สำหรับปั่น microplate) ใส่ basal RPMI phenol red free media ลงไปหลุมละ 0.1 มิลลิลิตร วัด fluorescent ที่ excitation 485 นาโนเมตร emission ที่ 530 นาโนเมตรรายงานผลเป็นค่า net Fluorescent (F_{net}) โดยคำนวนจาก

$$F_{net} = F_{stained\ cell} - F_{unstained\ cell}$$



รูปผ9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของ DCFH-DA (μM) กับ ผลต่างของ Fluorescent signal ของหลุมที่ย้อมเซลล์ด้วย DCFH-DA กับ หลุมที่ไม่ได้ใส่ DCFH-DA (n=3)

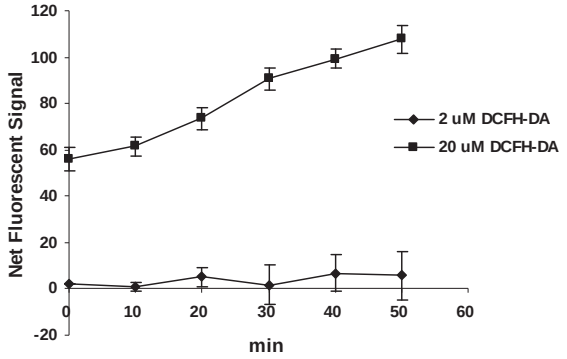
ผลการทดลอง

จากรูปผ9. แสดงผลต่างของ fluorescent signal ของหลุมที่ย้อมด้วย DCFH-DA กับ หลุมที่ไม่ได้ใส่ DCFH-DA ที่ 485/530 นาโนเมตร ที่อ่านได้จากการย้อมเซลล์ U937 ซึ่งแปรผันตามความเข้มข้นของสี DCFH-DA ตั้งแต่ 1.25-40 ไมโครโมลาร์ โดยมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ดังนั้น เราสามารถเลือกใช้ความเข้มข้นของ DCFH-DA ระหว่าง 1.25-40 ไมโครโมลาร์ สำหรับย้อม intracellular ROS ที่เกิดขึ้นในเซลล์ U937 ได้

จากนั้นเราทำการทดสอบแบบเดิมซ้ำอีกครั้งโดยเลือกความเข้มข้น DCFH-DA ที่ 2 และ 20 ไมโครโมลาร์ แล้ววัดค่าฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นทุก 10 นาที ตั้งแต่นาทีที่ 0-50 และเนื่องจากผลการทดลองใน **รูปผ 9.** เซลล์ U937 มีระดับ spontaneous ROS ค่อนข้างสูงอาจเนื่องมาจากเกิดความเครียดจากการเลี้ยงเซลล์ใช้อาหาร

เลี้ยงเซลล์ที่เป็น serum-free ดังนั้นในการทดลองซ้ำเพื่อลดระดับ spontaneous ROS ที่เกิดขึ้น จึงเปลี่ยนมาใช้ complete media phenol red free ในการย้อมเซลล์แทน

จากรูปผ10. จะเห็นว่าการย้อมเซลล์โดยใช้ DCFH-DA ความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์นั้น มีความแปรปรวน (standard variation) ของค่า intracellular ROS มากกว่าการใช้ DCFH-DA 20 ไมโครโมลาร์ นอกจากนี้ เซลล์ที่มีชีวิตจะมีการผลิต spontaneous ROS ออกมาอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาที่เลี้ยงเซลล์ ดังนั้นสี DCF ที่ถูกออกซิไดซ์โดย intracellular ROS จึงควรแสดงค่าฟลูออเรสเซนต์ที่เพิ่มขึ้นในระดับต่ำๆอย่างต่อเนื่องด้วยเช่นกัน ซึ่งการใช้ DCFH-DA ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ แสดงให้เห็นภาวะดังกล่าว และ เมื่อมีการเปลี่ยนจาก serum free media เป็น complete media ในการทดสอบ สามารถลด oxidative stress ที่เกิดขึ้นระหว่างการย้อมเซลล์ลงได้ หากพิจารณาการย้อมด้วยสีความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ที่ 0 นาที การใช้ serum free media แสดงค่า spontaneous ROS ประมาณ 1300 Relative fluorescent unit (Rfu) **(รูปผ9)** ขณะที่เมื่อใช้ complete media แสดงค่าประมาณ 55 Rfu **(รูปผ10)** ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้ DCFH-DA ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ที่ละลายใน complete media ในการย้อม intracellular ROS ของเซลล์โมโนไซต์ U937



รูปผ10. กราฟแสดงค่า Fluorescent signal (ROS) ของเซลล์โมโนไซต์ U937 จากการย้อมเซลล์ด้วย DCFH-DA ที่ความเข้มข้น 2 และ 20 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 นาที (n=3)

3.2 การหาสารเหนี่ยวนำและสภาวะการเหนี่ยวนำภาวะ Oxidative stress ในเซลล์ U937

สารที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะ oxidative stress ในเซลล์ U937 มีหลายชนิด ในการทดลองนี้จะเลือกทดสอบสารที่มีคุณสมบัติเพิ่ม intracellular ROS 2 ชนิด ซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ Lipopolysaccharide (LPS) (Kruzel et al 2010) และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (O'Brien et al 2006b) โดยทำการย้อมเซลล์ด้วย DCFH-DA ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ จากนั้นกระตุ้นด้วย LPS ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อ

มิลลิลิตร หรือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 25, 50,100 และ 400 ไมโครโมลาร์ แล้ววัดค่าฟลูออเรสเซนต์จาก ROS ที่เกิดขึ้นทุก 10 นาที เป็นเวลา 50 นาที ซึ่งมีรายละเอียดการทดสอบดังนี้

3.2.1 การทดสอบการเหนี่ยวนำสภาวะ oxidative stress โดยใช้ LPS

1. ใช้เซลล์ U937 ที่เลี้ยงจนได้ confluent ประมาณ 1.5-1.8 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เก็บเซลล์โดยการปั่นที่ 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์ด้วย basal RPMI phenol red free media 2 ครั้ง ปรับเซลล์ให้มีความเข้มข้น 1 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้ complete RPMI phenol red free mediaใส่เซลล์ปริมาตรหลุมละ 2 มิลลิลิตร ใน 6 well plate เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่ 37 º C

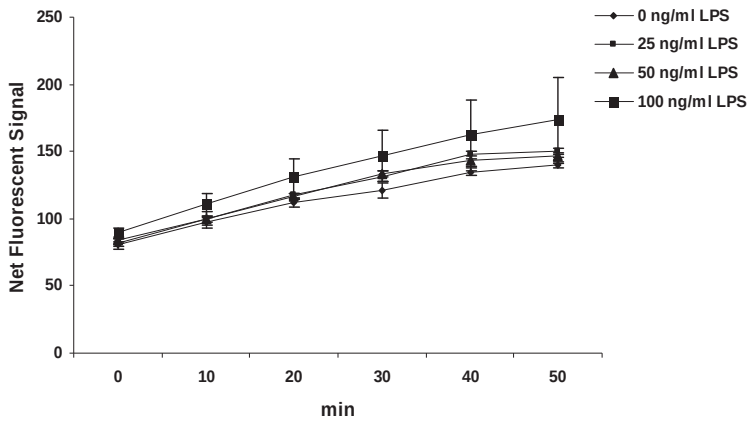
2. ย้ายเซลล์ใส่หลอดขนาด 2 มิลลิลิตร ปั่นที่ 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบนทิ้งปั่นล้างเซลล์อีกครั้งด้วย basal media phenol red free 2 มิลลิลิตร ดูดสารละลายส่วนบนทิ้งใส่ DCFH-DA ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ใน basal RPMI phenol red free media ลงไปหลอดละ 2 มิลลิลิตร ดูดขึ้นลงด้วยไปเปตต์ให้เซลล์กระจายตัวดี ย้ายเซลล์ลงใน 6 well plate บ่มที่ 37 º C เป็นเวลา 30 นาที

3. ย้ายเซลล์ใส่หลอดขนาด 2 มิลลิลิตร ปั่นที่ 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง ปั่นล้างเซลล์ด้วย basal media phenol red free 2 มิลลิลิตร ดูดสารละลายส่วนบนทิ้งปรับเซลล์ให้มีความหนาแน่น 2 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วย complete media phenol red free

4. ใส่เซลล์หลุมละ 50 ไมโครลิตร ลงใน 96 well black plate สำหรับวัดฟลูออเรสเซนต์ โดยใส่ลงไป 3 หลุม (triplicate) สำหรับแต่ละ treatment

5. ใส่ LPS ที่เตรียมไว้เป็นความเข้มข้น 2 เท่า ของความเข้มข้นสุทธิลงไปหลุมละ 50 ไมโครลิตร ให้ได้ความเข้มข้น LPS สุทธิ 25, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับกลุ่มควบคุมลบให้ใส่ basal media phenol red free ลงไปหลุมละ 50 ไมโครลิตร วัดค่าฟลูออเรสเซนต์ ที่ excitation 485 นาโนเมตร / emission 530 นาโนเมตร ทุก 10 นาที เป็นเวลา 50 นาที รายงานผลเป็นค่า net Fluorescent (F_{net}) โดยคำนวนจาก

$$F_{net} = F_{stained\ cell} - F_{unstained\ cell}$$



รูปผ11. กราฟแสดงความสัมพันธ์ของ Net Fluorescent Signal กับ เซลล์ U937 โดยมี LPS เป็นตัวกระตุ้นตั้งแต่ปริมาณ 0-100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ DCFH-DA 20 ไมโครโมลาร์ ที่เวลา 0-50 นาที (n=3)

ผลการทดสอบ

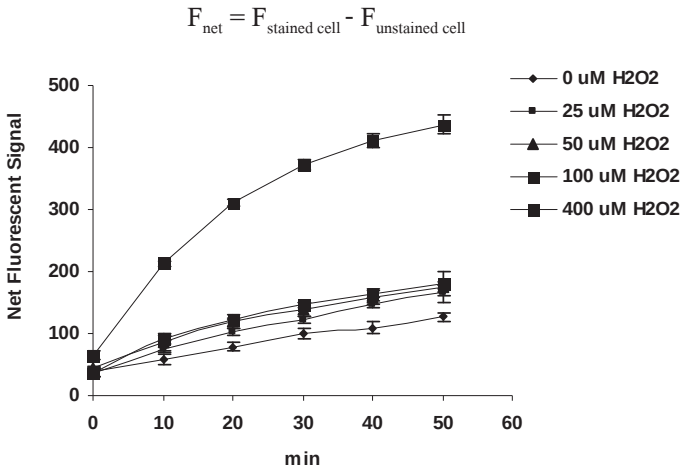
จากรูปผ11. การใช้ LPS เป็นสารเหนี่ยวนำไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด ROS ได้ชัดเจนเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ อัตราการเกิด ROS สูงสุดเพียง 1.2 เท่า ถ้าใช้สภาวะการเหนี่ยวนำลักษณะนี้จะทำให้เห็นฤทธิ์ของผลไม้ไม่ชัดเจน จึงได้ทดลองใช้สารเหนี่ยวนำตัวอื่นคือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แทน

3.2.2 การทดสอบการเหนี่ยวนำสภาวะ oxidative stress โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

การเตรียมเซลล์ก่อนการย้อม และการย้อมเซลล์ด้วย DCFH-DA เช่นเดียวกับข้อ3.2.1 และ เหนี่ยวนำเซลล์ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1.ใส่เซลล์หลุมละ 50 ไมโครลิตร ลงใน 96 well black plate โดยใส่ลงไป 3 หลุม (triplicate) สำหรับแต่ละ treatment

2. ใส่ไฮโดรเจรเปอร์ออกไซด์ ที่เตรียมไว้เป็นความเข้มข้น 2 เท่า ของความเข้มข้นสุทธิลงไปหลุมละ 50 ไมโครลิตร ให้ได้ความเข้มข้นไฮโดรเจรเปอร์ออกไซด์สุทธิ 25, 50, 100 และ 400 ไมโครโมลาร์ สำหรับกลุ่มควบคุมลบ (negative control) ให้ใส่ basal media phenol red free วัดค่าฟลูออเรสเซนต์ ที่ excitation 485 นาโนเมตร, emission 530 นาโนเมตร ทุก 10 นาที เป็นเวลา 50 นาที รายงานผลเป็นค่า net Fluorescent (F_{net}) โดยคำนวนจาก



รูปที่ผ12. กราฟแสดงความสัมพันธ์ของ Net Fluorescent Signal กับ เซลล์ U937โดยมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นตัวกระตุ้นตั้งแต่ปริมาณ 0-400 ไมโครโมลาร์ (μM) และ DCFH-DA 20 ไมโครโมลาร์ (μM) ที่เวลา 0-50 นาที (n=3)

ผลการทดสอบ

จากรูปผ12. แสดงให้เห็นว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ 25, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ เหนี่ยวนำให้เซลล์ผลิต ROS ได้ใกล้เคียงกัน โดยผลิต maximum ROS ที่เวลา 10-20 นาทีหลังใส่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อัตราการเพิ่มของ ROS เทียบกับ negative control อยู่ที่ประมาณ 1.3-1.6 เท่า ในขณะที่การกระตุ้นด้วย ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 400 ไมโครโมลาร์ สามารถกระตุ้นให้เกิด ROS ได้อย่างชัดเจนที่ 20 นาที โดยมีอัตราการเพิ่มของ ROS เทียบกับ negative control เป็น 4 เท่า จึงเลือกใช้การเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 400 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 20 นาทีในการทดสอบผลไม้

3.2.3 การทดสอบความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อเซลล์โมโนไซด์ U937

จากการทดลองหาความเข้มข้น และ ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำสภาวะ Oxidative stress ในเซลล์ U937 ได้เลือกไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นสุทธิ 400 ไมโครโมลาร์ เป็นตัวเหนี่ยวนำเป็นเวลา 20 นาที ในการทดสอบต่อไปจะดูว่าสภาวะดังกล่าวมีความเป็นพิษต่อเซลล์หรือไม่ โดยดูอัตราการมีชีวิตของเซลล์ U937 ด้วยวิธี sulforhodamine B (SRB) assay (Vichai and Kirtikara 2006) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

1. ทำการกระตุ้นเซลล์ U937 ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นสุทธิ 400ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 20 นาทีตามวิธีการทดสอบในข้อ 3.2.2. ดูดสารละลายออกด้วย multichannel pipetteใส่ PBS (แช่เย็น) ลงไปหลุมละ 100 ไมโครลิตร ใส่ 50% Trichloroacetic acid (แช่เย็น) ลงไปหลุมละ 20 ไมโครลิตร แช่ถาดเลี้ยงเซลล์ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2. ทิ้งสารละลายในถาด ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 รอบ ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ใส่ 0.4% sulforhodamine B ที่อยู่ใน 1% acetic acid ลงไปหลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อย้อมโปรตีนภายในเซลล์ เขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

3. ล้างสีส่วนเกินด้วย 1% acetic acid 4 รอบ ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายสีกลับด้วย Tris-base ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม เขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

4. ย้ายสารละลายที่ได้ไปยัง 96 well plate (transparent) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 565 นาโนเมตร ค่าพื้นหลัง 690 นาโนเมตร

5. คำนวนหาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ โดยคิดเป็นร้อยละของกลุ่มควบคุมลบที่ไม่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์คิดเป็น 100%

จากการทดสอบพบว่าเซลล์โมโนไซด์ U937 หลังได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 400 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 20 นาที มีอัตรารอดชีวิตของเซลล์อยู่ที่ร้อยละ 91± 3 ซึ่งโดยทั่วไปยอมรับที่อัตรารอดชีวิตที่ร้อยละ 80 ดังนั้น จึงสามารถใช้สภาวะดังกล่าวเพื่อเหนี่ยวนำ oxidative stress ในเซลล์ชนิดนี้เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดผลไม้ไทยได้

3.2.4 การหาความเข้มข้นสารสกัดผลไม้ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์โมโนไซต์ U937

การเตรียมสารสกัดผลไม้โดยสกัดผงผลไม้แห้ง 1.0 กรัม ด้วย 90% เอธานอล 30 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารละลาย 2 นาที นำไป sonicate อีก 10 นาที และ เขย่าอย่างแรงอีกครั้งด้วยเครื่องเขย่าสารละลาย 2 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 7500 รอบต่อนาที 25 องศาเซลเซียส 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่ขวดก้นกลมสีชา นำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ (Rotary Evaporator) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส จนกระทั่งแห้งสนิท ละลายกลับด้วย complete media phenol red free โดยใช้ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ได้สารสกัดผลไม้ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.4 กรัมต่อมิลลิลิตร กรองสารสกัดผ่านหัวกรองขนาด 0.2 ไมครอน เพื่อทำให้ปลอดเชื้อก่อนนำไปใช้

เนื่องจากผู้วิจัยออกแบบการทดลองให้มีการ pre-treatment เซลล์ด้วยสารสกัดจากผลไม้เป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนล้างสารสกัดผลไม้ออกจากเซลล์ แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress การทดสอบในขั้นตอนนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความเข้มข้นของผลไม้ที่ไม่ทำให้เซลล์ตายในช่วงระยะเวลาการเลี้ยง 2 ชั่วโมงขึ้นไป โดย pre-treatment เซลล์ด้วยสารสกัดจากผลไม้ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วตามด้วยการทดสอบความเป็นพิษของผลไม้ต่อเซลล์ (cytotoxic test) เพื่อยืนยันว่าความเข้มข้นของสารสกัดผลไม้ที่เลือกใช้ในการ pre-treatment ดังกล่าวไม่มีผลต่อการตายของเซลล์อย่างแน่นอน

ทดลองโดยสุ่มเลือกทุเรียนชะนีและทุเรียนหมอนทอง เพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์โมโนไซต์ โดยเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารสกัดผลไม้ทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้น 0.004-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำเป็น 10-fold dilution เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนทดสอบอัตราการรอดชีวิต ยอมรับความเข้มข้นสารสกัดที่ทำให้เซลล์รอดชีวิตมากกว่าร้อยละ 80 เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่สารสกัด ได้ผลการทดลองใน **ตารางผ4**

ตารางผ4. อัตราการรอดชีวิตของเซลล์โมโนไซต์ U937 หลังบ่มร่วมกับสารสกัดทุเรียนชะนีและหมอนทองความเข้มข้น 0.004-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 3 ชั่วโมง (n=3)

ความเข้มข้นสุทธิ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	**0**	**40**	**4**	**0.4**	**0.04**	**0.004**
ทุเรียนชะนี	100	109±4	100.±3	97±2	97±2	95±1
ทุเรียนหมอนทอง	100	114±5	105±2	104±3	101±4	100±3

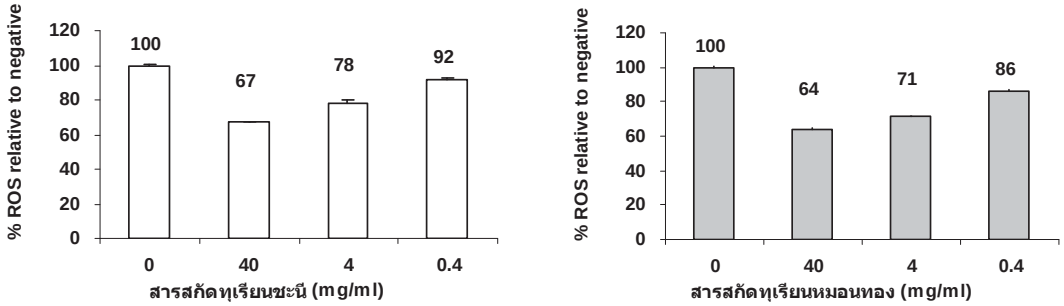
จาก**ตารางผ4.** เซลล์โมโนไซต์ที่ได้รับสารสกัดทุเรียนทั้ง 2 สายพันธุ์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง มีอัตราการรอดชีวิตในช่วงที่ยอมรับได้คือมากกว่าร้อยละ 80 ดังนั้นเราสามารถใช้สารสกัดทุเรียนในช่วงความเข้มข้น 0.004-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบเซลล์โมโนไซต์ในช่วงระยะเวลาต่ำกว่า 3 ชั่วโมงได้โดยไม่มีผลกระทบต่อปริมาณเซลล์

3.2.4.1การหาช่วงความเข้มข้นสารสกัดทุเรียนชะนีและหมอนทองที่ไม่กระตุ้น Spontaneous intracellular ROS ของเซลล์โมโนไซต์ U937

เช่นเดียวกับการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ การใช้สารสกัดที่ความเข้มข้นไม่เหมาะสมอาจมีผล เหนี่ยวนำให้เกิด oxidative stress ในขั้นตอนนี้จึงเป็นการทดสอบหาความเข้มข้นสารสกัดที่ไม่ส่งผลในการเพิ่ม spontaneous intracellular ROS ของเซลล์โมโนไซต์ โดยเลี้ยงเซลล์โมโนไซต์กับสารสกัดทุเรียนชะนีและหมอนทองที่ช่วงความเข้มข้น 0.4-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นย้อม intracellular ROS ที่เกิดขึ้นโดยใช้ DCFH-DA ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ วัดค่าฟลูออเรสเซนต์ที่ excitation 485 นาโนเมตร emission 530 นาโนเมตรที่เวลา 20 นาที ได้ผลการทดลอง**ดังรูปผ13.**

จาก**รูปผ13.** เซลล์โมโนไซต์ที่ได้รับสารสกัดทุเรียนทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ความเข้มข้น 0.4-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีระดับ intracellular ROS ต่ำกว่าเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัด นอกจากนี้

สารสกัดยังลด intracellular ROS แบบ dose-dependent ด้วย ดังนั้น ขั้นตอนต่อไปจึงทำการทดสอบหาช่วงความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์โมโนไซต์ U937 จากผลไม้อีก 4 ชนิดที่เหลือ



รูปผ13. ระดับ Intracellular ROS ของ เซลล์โมโนไซต์ U937 หลังบ่มร่วมกับสารสกัดทุเรียนชะนีและหมอนทองความเข้มข้น 0.4-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (n=3)

3.2.4.2. การหาช่วงความเข้มข้นสารสกัดผลไม้ไทยที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์โมโนไซต์

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.4.1 กับสารสกัดผลไม้ที่เหลือ โดยใช้สารสกัดส้มโอทองดี, ส้มโอขาวน้ำผึ้ง, ฝรั่งกิมจู, ฝรั่งแป้นสีทอง, มะละกอแขกดำ, มะละกอฮอลแลนด์, เงาะโรงเรียน และ เงาะสีชมพู โดยลดช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบลงมาเป็นช่วงความเข้มข้นสุทธิ 0.4-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงเซลล์โมโนไซต์ร่วมกับสารสกัด โดยทำเป็น 10-fold dilution เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนทดสอบอัตราการรอดชีวิตยอมรับความเข้มข้นสารสกัดที่ทำให้เซลล์รอดชีวิตมากกว่าร้อยละ 80 เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่สารสกัด ได้ผลการทดลองใน**ตารางผ5.**

จาก**ตารางผ5.** เซลล์โมโนไซต์ที่ได้รับผลไม้ทั้ง 8 ชนิด ที่ความเข้มข้นสุทธิในช่วง 0.4-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง มีอัตราการรอดชีวิตในช่วงที่ยอมรับได้คือร้อยละ 80 ขึ้นไป ดังนั้น เราสามารถใช้สารสกัดผลไม้ในช่วงความเข้มข้น 0.4-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบเซลล์โมโนไซต์ในช่วงระยะเวลาต่ำกว่า 3 ชั่วโมงได้โดยไม่มีผลกระทบต่อการตายของเซลล์

ตารางผ5. อัตราการรอดชีวิตของเซลล์โมโนไซต์ U937 หลังบ่มร่วมกับสารสกัดผลไม้ความเข้มข้น 0.04-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 3 ชั่วโมง (n=3)

ความเข้มข้นตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	0	40	4	0.4
ส้มโอทองดี	100	101±3	101±2	87±2
ส้มโอขาวน้ำผึ้ง	100	101±1	98±10	80±3
มะละกอแขกดำ	100	93±6	90±1	80±5
มะละกอฮอลแลนด์	100	99±3	95±4	89±1
ฝรั่งกิมจู	100	103±1	90±2	91±2
ฝรั่งแป้นสีทอง	100	103±3	94±3	90±3
เงาะโรงเรียน	100	101±7	93±2	90±1
เงาะสีชมพู	100	102±4	91±4	88±3

โดยสรุปสภาวะที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำเซลล์โมโนไซต์ให้เกิดภาวะ Oxidative stress

คือเลี้ยงเซลล์โมโนไซต์ U937 กับสารสกัดผลไม้ที่ความเข้มข้นสุทธิ 40, 20 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน complete media phenol red free เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนปั่นสารสกัดผลไม้ออกแล้วย้อม intracellular ROS ของเซลล์ด้วย DCFH-DA ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ที่ 37 ºC เป็นเวลา 30 นาที ปั่นล้างสีออก แล้วใส่เซลล์ (cell suspension) ดังกล่าว ลงใน 96 well black plate ก่อนใส่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้ได้ความเข้มข้นสุทธิ 400 ไมโครโมลาร์ หรือ ใส่ basal media phenol red free สำหรับกลุ่มควบคุมลบ (negative control) วัดค่า intracellular ROS ที่เกิดขึ้นที่ excitation 485 nm, emission 530 nm ที่เวลา 20 นาที ในการทดสอบนี้จะใช้ N-acetyl-L-cysteine (NAC) ความเข้มข้นสุทธิ 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติลดความเครียดของเซลล์จากสภาวะ oxidative stress และ ต้านการอักเสบเป็นสารมาตรฐาน (positive control) ในการทดลองร่วมด้วยทุกครั้ง จากนั้นทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี SRB assay

ภาคผนวก4

การหาะดับความเข้มข้นของ TNF-α ด้วยวิธี ELISA(PETROTECH 900-K25)

1. เจือจาง capture แอนติบอดี ด้วย PBS pH 7.2-7.4 ให้มีความเข้มข้นสุทธิ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เคลือบถาดสำหรับทำ ELISA โดยใช้ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม (Maxisorp, NUNC) วางถาดลงใน moist chamber ปิดฝาถาดให้แน่นแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน
2. สะบัดถาดเพื่อทิ้งสารละลาย ล้างด้วย PBST 0.05% 1 ครั้ง
3. บล็อกด้วย 1%BSA ใน PBS ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม วางถาดลงใน moist chamber ปิดฝาถาดแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง
4. ล้างด้วย PBST 0.05% 1 ครั้ง เป็นเวลา 3 นาที ซับถาดให้หมาดด้วยกระดาษชำระอย่างหนา
5. เตรียม standard TNF-α (จากสต็อกความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ให้มีช่วงความเข้มข้น 500 ถึง 7.8 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำเป็น 2-fold dilution มี 1%BSA ใน PBST 0.05% เป็นตัวทำละลาย ใช้ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม
6. ปิดฝาถาดให้แน่นแล้วแช่ตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืน
7. ล้างด้วย PBST 0.05% 3 ครั้ง เป็นเวลา 3 นาที ซับถาดให้หมาดด้วยกระดาษชำระอย่างหนา
8. เจือจาง biotin-labeled detecting Abให้มีความเข้มข้นสุทธิ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้1% BSA in PBST0.05% เป็นตัวทำละลาย ใส่ลงไปหลุมละ 50 ไมโครลิตรปิดฝาถาดให้แน่นแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง
9. ล้างด้วย PBST 0.05% 3 ครั้ง เป็นเวลา 3 นาที ซับถาดให้หมาดด้วยกระดาษชำระอย่างหนา
10. เจือจาง HRP-conjugated Streptavidin (Invitrogen) 1:5000 มี 1% BSA ใน PBST 0.05% เป็นตัวทำละลาย ใส่สารละลายลงไปหลุมละ 50 ไมโครลิตร ปิดฝาถาดให้แน่นแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องครึ่ง ชั่วโมง
11. ล้างด้วย PBST 0.05% 3 ครั้ง เป็นเวลา 3 นาที ซับถาดให้หมาดด้วยกระดาษชำระอย่างหนา
12. ใส่ TMB substrate solution (TMB component HRP Microwell substrate, Bio Fx, Surmodic, cat No. TMBW-0100-01) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม and incubate at RT (20-25 degree) for 20 min
13. หยุดปฏิกิริยาดดยใส่ 2 M H_2SO_4 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม
14. วัดค่าการดูกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 และ 540 นาโนเมตร พล็อตกราฟโดยใช้ค่าส่วนต่างของ OD450-OD540

การหาะดับความเข้มข้นของ IL-6 ด้วยวิธี ELISA (PETROTECH 900-K16)

1. เจือจาง capture แอนติบอดี ด้วย PBS pH 7.2-7.4 ให้มีความเข้มข้นสุทธิ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เคลือบถาดสำหรับทำ ELISA โดยใช้ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม (Maxisorp, NUNC) วางถาดลงใน moist chamber ปิดฝาถาดให้แน่นแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน
2. สะบัดถาดเพื่อทิ้งสารละลาย ล้างด้วย PBST 0.05% 1 ครั้ง
3. บล็อกด้วย 1%BSA ใน PBS ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม วางถาดลงใน moist chamber ปิดฝาถาดแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง
4. ล้างด้วย PBST 0.05% 1 ครั้ง เป็นเวลา 3 นาที ซับถาดให้หมาดด้วยกระดาษชำระอย่างหนา
5. เตรียม standard IL-6 (จากสต็อกความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ให้มีช่วงความเข้มข้น 500 ถึง 7.8 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำเป็น 2-fold dilution มี 1%BSA ใน PBST 0.05% เป็นตัวทำละลาย ใช้ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม
6. ปิดฝาถาดให้แน่นแล้วแช่ตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืน
7. ล้างด้วย PBST 0.05% 3 ครั้ง เป็นเวลา 3 นาที ซับถาดให้หมาดด้วยกระดาษชำระอย่างหนา
8. เจือจาง biotin-labeled detecting Abให้มีความเข้มข้นสุทธิ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้1% BSA in PBST0.05% เป็นตัวทำละลาย ใส่ลงไปหลุมละ 50 ไมโครลิตรปิดฝาถาดให้แน่นแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง
9. ล้างด้วย PBST 0.05% 3 ครั้ง เป็นเวลา 3 นาที ซับถาดให้หมาดด้วยกระดาษชำระอย่างหนา
10. เจือจาง HRP-conjugated Streptavidin (Invitrogen) 1:5000 มี 1% BSA ใน PBST 0.05% เป็นตัวทำละลาย ใส่สารละลายลงไปหลุมละ 50 ไมโครลิตร ปิดฝาถาดให้แน่นแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องครึ่ง ชั่วโมง
11. ล้างด้วย PBST 0.05% 3 ครั้ง เป็นเวลา 3 นาที ซับถาดให้หมาดด้วยกระดาษชำระอย่างหนา
12. ใส่ TMB substrate solution (TMB component HRP Microwell substrate, Bio Fx, Surmodic, cat No. TMBW-0100-01) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม and incubate at RT (20-25 degree) for 20 min
13. หยุดปฏิกิริยาดดยใส่ 2 M H_2SO_4 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม
14. วัดค่าการดูกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 และ 540 นาโนเมตร พล็อตกราฟโดยใช้ค่าส่วนต่างของ OD450-OD540

การหาะดับความเข้มข้นของ IL-8 ด้วยวิธี ELISA (PETROTECH 900-K18)

1. เจือจาง capture แอนติบอดี ด้วย PBS pH 7.2-7.4 ให้มีความเข้มข้นสุทธิ 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เคลือบถาดสำหรับทำ ELISA โดยใช้ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม (Maxisorp, NUNC) วางถาดลงใน moist chamber ปิดฝาถาดให้แน่นแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน
2. สะบัดถาดเพื่อทิ้งสารละลาย ล้างด้วย PBST 0.05% 1 ครั้ง
3. บล็อกด้วย 1%BSA ใน PBS ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม วางถาดลงใน moist chamber ปิดฝาถาดแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง
4. ล้างด้วย PBST 0.05% 1 ครั้ง เป็นเวลา 3 นาที ซับถาดให้หมาดด้วยกระดาษชำระอย่างหนา
5. เตรียม standard IL-8 (จากสต็อกความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ให้มีช่วงความเข้มข้น 500 ถึง 7.8 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำเป็น 2-fold dilution มี 1%BSA ใน PBST 0.05% เป็นตัวทำละลาย ใช้ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม
6. ปิดฝาถาดให้แน่นแล้วแช่ตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืน
7. ล้างด้วย PBST 0.05% 3 ครั้ง เป็นเวลา 3 นาที ซับถาดให้หมาดด้วยกระดาษชำระอย่างหนา
8. เจือจาง biotin-labeled detecting Abให้มีความเข้มข้นสุทธิ 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้1% BSA in PBST0.05% เป็นตัวทำละลาย ใส่ลงไปหลุมละ 50 ไมโครลิตรปิดฝาถาดให้แน่นแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง
9. ล้างด้วย PBST 0.05% 3 ครั้ง เป็นเวลา 3 นาที ซับถาดให้หมาดด้วยกระดาษชำระอย่างหนา
10. เจือจาง HRP-conjugated Streptavidin (Invitrogen) 1:5000 มี 1% BSA ใน PBST 0.05% เป็นตัวทำละลาย ใส่สารละลายลงไปหลุมละ 50 ไมโครลิตร ปิดฝาถาดให้แน่นแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องครึ่ง ชั่วโมง
11. ล้างด้วย PBST 0.05% 3 ครั้ง เป็นเวลา 3 นาที ซับถาดให้หมาดด้วยกระดาษชำระอย่างหนา
12. ใส่ TMB substrate solution (TMB component HRP Microwell substrate, Bio Fx, Surmodic, cat No. TMBW-0100-01) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม and incubate at RT (20-25 degree) for 20 min
13. หยุดปฏิกิริยาดดยใส่ 2 M H_2SO_4 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม
14. วัดค่าการดูกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 และ 540 นาโนเมตร พล็อตกราฟโดยใช้ค่าส่วนต่างของ OD450-OD540

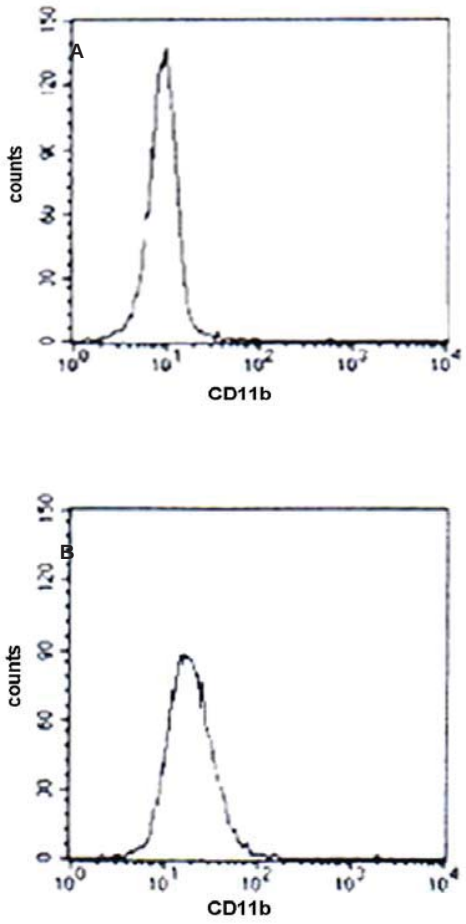
การหาะดับความเข้มข้นของ MCP-1 ด้วยวิธี ELISA (PETROTECH 900-K31)

1. เจือจาง capture แอนติบอดี ด้วย PBS pH 7.2-7.4 ให้มีความเข้มข้นสุทธิ 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เคลือบถาดสำหรับทำ ELISA โดยใช้ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม (Maxisorp, NUNC) วางถาดลงใน moist chamber ปิดฝาถาดให้แน่นแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน
2. สะบัดถาดเพื่อทิ้งสารละลาย ล้างด้วย PBST 0.05% 1 ครั้ง
3. บล็อกด้วย 1%BSA ใน PBS ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม วางถาดลงใน moist chamber ปิดฝาถาดแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง
4. ล้างด้วย PBST 0.05% 1 ครั้ง เป็นเวลา 3 นาที ซับถาดให้หมาดด้วยกระดาษชำระอย่างหนา
5. เตรียม standard MCP-1 (จากสต็อกความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ให้มีช่วงความเข้มข้น 500 ถึง 7.8 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำเป็น 2-fold dilution มี 1%BSA ใน PBST 0.05% เป็นตัวทำละลาย ใช้ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม
6. ปิดฝาถาดให้แน่นแล้วแช่ตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืน
7. ล้างด้วย PBST 0.05% 3 ครั้ง เป็นเวลา 3 นาที ซับถาดให้หมาดด้วยกระดาษชำระอย่างหนา
8. เจือจาง biotin-labeled detecting Abให้มีความเข้มข้นสุทธิ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้1% BSA in PBST0.05% เป็นตัวทำละลาย ใส่ลงไปหลุมละ 50 ไมโครลิตรปิดฝาถาดให้แน่นแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง
9. ล้างด้วย PBST 0.05% 3 ครั้ง เป็นเวลา 3 นาที ซับถาดให้หมาดด้วยกระดาษชำระอย่างหนา
10. เจือจาง HRP-conjugated Streptavidin (Invitrogen) 1:5000 มี 1% BSA ใน PBST 0.05% เป็นตัวทำละลาย ใส่สารละลายลงไปหลุมละ 50 ไมโครลิตร ปิดฝาถาดให้แน่นแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องครึ่ง ชั่วโมง
11. ล้างด้วย PBST 0.05% 3 ครั้ง เป็นเวลา 3 นาที ซับถาดให้หมาดด้วยกระดาษชำระอย่างหนา
12. ใส่ TMB substrate solution (TMB component HRP Microwell substrate, Bio Fx, Surmodic, cat No. TMBW-0100-01) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม and incubate at RT (20-25 degree) for 20 min
13. หยุดปฏิกิริยาดดยใส่ 2 M H_2SO_4 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม
14. วัดค่าการดูกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 และ 540 นาโนเมตร พล็อตกราฟโดยใช้ค่าส่วนต่างของ OD450-OD540

ภาคผนวก 5

Flow-cytometric analysis

การวิเคราะห์การแสดงออกของ CD11b ซึ่งเป็นโปรตีน marker ของเซลล์แมคโครฟาจ ย้อมเซลล์ U937 กลุ่มที่เป็น suspension และกลุ่ม attached ที่ถูกกระตุ้นด้วย PMA จำนวนกลุ่มละ 1 ล้านเซลล์ ด้วยfluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-CD11b ใน Hanks balanced salt solution [HBSS], 20 mM HEPES, 0.2% sodium azide และ 2% FBS ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บนน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที ก่อนล้างด้วย buffer จากนั้นจึง resuspended ด้วย 0.5% paraformaldehyde ใน PBS ก่อนทำการวิเคราะห์ด้วย BD FACSCalibur flow cytometer โดยมีจำนวนเซลล์ 100,000 events



รูป A แสดงผลการย้อม CD11b จากเซลล์ U937 ที่ไม่ได้กระตุ้นด้วย PMA มีค่า G_0 mean fluorescent intensity =8.78

รูป B แสดงผลการย้อม CD11b จากเซลล์ U937 ที่ได้รับการกระตุ้นจาก PMA ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีค่า G_0 mean fluorescent intensity =18.38
ผู้เชี่ยวชาญด้านการใช้ flow cytometer ในการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์แปรผลว่าถ้าเซลล์ที่กระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นในการทดสอบนี้เป็น PMA มีค่า mean fluorescent intensity มากกว่า 2 เท่าของ mean fluorescent intensity ใน non-stimulated cells (suspended U937 cells) หมายความว่า CD11b มีการแสดงออกมากขึ้น (up-regulation) จากผลในรูป A และ B จะเห็นว่าค่า G_0 mean fluorescent intensity of stimulated/unstimulated = 2.09 ดังนั้นสภาวะการกระตุ้น suspended U937 cells ด้วย PMA 20 ng/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมงทำให้เซลล์ U937 มีการ differentiate เป็นเซลล์แมคโครฟาจ ซึ่งเราอ้างอิงจากการศึกษาของ Garcia และ คณะ (1999)

García A, Serrano A, Abril E, Jimenez P, Real LM, Cantón J, Garrido F, Ruiz-Cabello F.(1999). Differential effect on U937 cell differentiation by targeting transcriptional factors implicated in tissue- or stage-specific induced integrin expression. Experimental Hematology 27(2): 353-364.

เอกสารสำหรับการเผยแพร่

โรคไม่ติดต่อเรื้อรัง (non-communicable chronic diseases) เช่น โรคมะเร็ง โรคอ้วน เบาหวาน ความดันโลหิตสูง เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญทั้งในระดับชาติ และ นานาชาติรวมทั้งประเทศไทยด้วย เนื่องจากค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาผู้ป่วยเหล่านี้ค่อนข้างสูง อัตราความชุกของโรคเหล่านี้นับวันยิ่งสูงขึ้นเป็นทวีคูณทั่วโลก ปัจจัยของการเกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรังเหล่านี้มีทั้งปัจจัยทางด้านพันธุกรรมของมนุษย์เอง ปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อมภายนอก และ ภายในร่างกาย เช่นภาวะการอักเสบเรื้อรัง และ การมีอนุมูลอิสระมากเกินไปซึ่งเกิดจากความไม่สมดุลระหว่างปริมาณอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ หรือภาวะที่ร่างกายมีอนุมูลอิสระมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระ ภาวะการอักเสบเป็นการตอบสนองต่อเชื้อโรค หรือ การตอบสนองต่อเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย เป็นระบบป้องกันตนเองของร่างกายมักเกิดขึ้นเร็ว ใช้เวลาสั้นในการกำจัดเชื้อโรค หรือซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย แต่ในบางสภาวะกระบวนการอักเสบเกิดเป็นเวลายาวนาน หรือเกิดขึ้นบ่อยๆ หรือ มีภาวะแพ้ภูมิตัวเอง จะทำให้เกิดการอักเสบเรื้อรังขึ้น ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรังดังกล่าวได้ในกรณีของการเกิดอนุมูลอิสระเกิดมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในการเผาผลาญอาหาร และ จากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายในการป้องกันตนเอง นอกจากนี้สิ่งแวดล้อมจากภายนอกเช่น ควันพิษ ควันบุหรี่ รังสียูวีจากแสงแดด มลภาวะ ยาบางชนิด ก็เป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระภายในร่างกายเพิ่มขึ้นได้เช่นเดียวกัน ในร่างกายเราเองจะมีระบบต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant system) เพื่อลดความเป็นพิษของอนุมูลอิสระดังกล่าว นอกจากแหล่งภายในร่างกายแล้ว จากข้อมูลทางระบาดวิทยา และ การศึกษาในเชิงทดลองพบว่ากลุ่มประชากรหรือ หนูทดลองที่บริโภค พืช ผัก ผลไม้ และ เครื่องเทศในปริมาณที่มากพอมักมีอุบัติการณ์การเกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรังดังกล่าวต่ำกว่ากลุ่มที่รับประทาน พืช ผัก ผลไม้ และ เครื่องเทศในปริมาณน้อย ในสัตว์ทดลองพบว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารดังกล่าวมีระดับตัวชี้วัดการอักเสบต่ำในขณะเดียวกันมีปริมาณ antioxidant enzymes, nonenzymatic antioxidants และ detoxifying enzymes สูงขึ้นส่งผลให้กำจัดอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นได้ ซึ่งถือได้ว่าเป็นการลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรังที่มีสาเหตุจากการเกิดภาวะ oxidative stress และ การอักเสบได้

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม มีสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช ทำให้มีความหลากหลายทางด้านชีวภาพ อุดมสมบูรณ์ไปด้วยพืชผัก ผลไม้ และเครื่องเทศต่างๆ โดยเฉพาะผลไม้นานาชนิด ซึ่งล้วนแต่อุดมสมบูรณ์ไปด้วยสารอาหารมากมาย เช่น วิตามิน แร่ธาตุต่างๆ และ ใยอาหาร เป็นต้น นอกจากสารอาหารแล้วผลไม้ต่างๆ โดยเฉพาะผลไม้ที่มีสีสันยังเป็นแหล่งสำคัญของสารพฤกษเคมี (phytonutrients) ซึ่งพบในพืชผักต่างๆ ซึ่งมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางพบว่า สารพฤกษเคมีเหล่านี้มีบทบาทในการส่งเสริมสุขภาพและช่วยป้องกันการเกิดโรคโดยลดปัจจัยเสี่ยงที่อาจชักนำไปสู่การเกิดความผิดปกติต่อระบบต่าง ๆ ของร่างกายได้ เป็นต้น

ดังนั้นเพื่อให้ได้ข้อมูลสำหรับส่งเสริมให้ผู้บริโภคตระหนักถึงคุณค่าของผลไม้ไทย และ เพื่อเป็นประโยชน์ต่อผู้ผลิตในการเผยแพร่ประชาสัมพันธ์ในแง่ของผลไม้ไทยที่ช่วยลดการอักเสบ และลดอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง จึงได้มีความสนใจในการศึกษาถึงคุณค่าเชิงสุขภาพของผลไม้ไทย ได้แก่ ส้มโอขาวน้ำผึ้ง ส้มโอทองดี ทุเรียนหมอนทอง ทุเรียนชะนี ฝรั่งกิมจู ฝรั่งแป้นสีทอง มะละกอฮอล์แลนด์ มะละกอแขกดำ เงาะโรงเรียน เงาะสีชมพู โดยทำการศึกษาผลของสารสกัดจากผลไม้เหล่านี้ในการลดตัวชี้วัดการอักเสบ และ ศักยภาพในการลดอนุมูลอิสระ โดยใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะการอักเสบ และ เกิด oxidative stress เป็นต้นแบบในการศึกษา ผลการวิจัยในโครงการ พบว่า สารสกัดจากผลไม้เหล่านี้มีความสามารถในการลดตัวชี้วัดการอักเสบ (TNF-α, IL-6, IL-8, MCP-1) แตกต่างกันโดยสารสกัดจากส้มโอทองดีลดการอักเสบได้ดีที่สุดเนื่องจากสารสกัดเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรลดตัวชี้วัดการอักเสบได้ 3 ตัว ตามด้วยสารสกัดจากส้มโอขาวน้ำผึ้ง ทุเรียน และ ฝรั่งทั้งสองสายพันธุ์เนื่องจากสารสกัดเข้มข้นเดียวกันลดตัวชี้วัดการอักเสบได้ 2 ตัว และ เงาะทั้งสองสายพันธุ์ลดได้เฉพาะตัวชี้วัดการอักเสบได้ตัวเดียว ในขณะที่สารสกัดจากมะละกอไม่พบประสิทธิภาพในการลดไซโตไคน์ในระบบการทดสอบนี้

ในแง่การลดอนุมูลอิสระทั้งแบบธรรมชาติ (Spontaneous) และ เหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในเซลล์โมโนไซด์ U937 โดยติดตามการลดปริมาณ ROS พบว่าสารสกัดจากส้มโอทองดี และ ฝรั่งแป้นสีทองมีประสิทธิภาพดีที่สุดเนื่องจากสารสกัดของผลไม้ทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดอนุมูลอิสระจากธรรมชาติได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และที่ 10-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถลดอนุมูลอิสระที่เหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ดีเช่นกัน ตามด้วยสารสกัดจากส้มโอขาวน้ำผึ้ง และ ฝรั่งกิมจู เนื่องจากสารสกัดทั้งสามความเข้มข้นสามารถลดได้เฉพาะอนุมูลอิสระที่เหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ตามด้วยสารสกัดจากทุเรียนหมอนทองมะละกอทั้งสองพันธุ์ และ ทุเรียนชะนีในขณะที่สารสกัดจาก เงาะทั้งสองสายพันธุ์ไม่พบประสิทธิภาพในการลดอนุมูลอิสระในระบบการทดสอบนี้

จะเห็นว่าส้มโอทองดีให้ผลดีที่สุดในแง่ลดการอักเสบ และ ลดอนุมูลอิสระ ตามด้วย ฝรั่งแป้นสีทอง ส้มโอขาวน้ำผึ้ง ฝรั่งกิมจู ทุเรียนทั้งสองพันธุ์ ผลจากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นประโยชน์ต่อสุขภาพที่แตกต่างกันของผลไม้ต่างชนิดกัน จึงควรรับประทานผลไม้ให้หลากหลายซึ่งน่าจะช่วยลดปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรังได้ แต่ข้อมูลที่ได้นี้ก็เป็นเพียงการทดสอบในหลอดทดลองที่มีระบบไม่ซับซ้อน ซึ่งใช้เป็นแนวทางในการคัดเลือกตัวที่มีศุกยภาพดีในลำดับต้นๆ ไปทำการศึกษาต่อในสัตว์ทดลอง และ ในมนุษย์ต่อไปเพื่อรับรองประโยชน์ต่อสุขภาพของผลไม้ไทยที่แน่นอน

ตารางเปรียบเทียบกิจกรรมตามแผน

6 เดือนแรก

วัตถุประสงค์ของโครงการ	กิจกรรม (ตามแผน)	กิจกรรมที่ดำเนินงานตามจริง	ผลที่ได้รับ	หมายเหตุ
1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการลดการอักเสบของสารสกัดจากผลไม้ต่อระดับ TNF-α,IL-6, IL-8, MCP-1 ที่หลั่งจากเซลล์โมโนไซต์ที่ differentiate เป็นแมคโครฟาจด้วย PMA และ เหนี่ยวนำให้อักเสบด้วย LPS	1. ทำการเตรียมตัวอย่างสำหรับการทดสอบ 2. ทำการตรวจสอบ condition ในการเลี้ยงเซลล์เพิ่มจำนวนเซลล์ U937 3. ทดสอบหาปริมาณและเวลาของPMA ในการ differentiate U937 monocyte ให้เป็น macrophage และ condition การเลี้ยงก่อนกระตุ้นด้วย LPS 4. ทดสอบcondition ในการเหนี่ยวนำเซลล์ macrophage โดยหาปริมาณ LPS ที่ไม่เป็นพิษ และ ผลิต TNF-α ได้มากที่สุด	1. ทำการเตรียมตัวอย่างสำหรับการทดสอบ 2. ทำการตรวจสอบ condition ในการเลี้ยงเซลล์สำหรับในการทดสอบ 3.ทดสอบหาปริมาณและเวลาของ PMA ในการ differentiate U937 monocyte ให้เป็น macrophage และ หาปริมาณการใส่/ไม่ใส่ serumเพื่อเลี้ยงก่อนกระตุ้นด้วย LPS 4. ทดสอบความเป็นพิษของ LPS และ condition ที่เหมาะสม ในการเหนี่ยวนำเซลล์ macrophage ให้ผลิต TNF-α ได้มากที่สุด	1. ได้ตัวอย่างสำหรับทำการทดสอบ 2. ได้ condition สำหรับการเลี้ยงเซลล์ที่ใช้สำหรับการศึกษานี้ 3. ทราบถึงปริมาณและเวลาเหมาะสมของ PMAในการ differentiate U937 monocyte ให้เป็น macrophage และต้องใช้ serum free medium เพื่อเลี้ยงก่อนกระตุ้นด้วย LPS 4. ทราบถึงความเข้มข้นของ LPS และ condition ในการเหนี่ยวนำเซลล์ macrophage	-

6 เดือนแรก (ต่อ)

วัตถุประสงค์ของโครงการ	กิจกรรม (ตามแผน)	กิจกรรมที่ดำเนินงานตามจริง	ผลที่ได้รับ	หมายเหตุ
1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการลดการอักเสบของสารสกัดจากผลไม้ต่อระดับ TNF-α,IL-6, IL-8, MCP-1 ที่หลั่งจากเซลล์โมโนไซต์ที่ differentiate เป็นแมคโครฟาจด้วย PMA และ เหนี่ยวนำให้อักเสบด้วย LPS	5. ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากผลไม้เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบในเซลล์ PMA-induced U937 ก่อนกระตุ้นด้วย LPS	5. เริ่มต้นใช้สารสกัดจากผลไม้ในความเข้มข้นค่อนข้างสูงสำหรับการทดสอบในเซลล์ PMA-induced U937(40, 20, 10, 5, 2.5 และ 1.25 mg/ml) ร่วมกับการกระตุ้นด้วย LPS	5. สารสกัดจากผลไม้ในความเข้มข้นช่วงนี้เมื่อเลี้ยงร่วมกับ LPS มีอัตรารอดชีวิตที่ยอมรับได้ แต่ในสารสกัดส้มโอน้ำเลี้ยงเซลล์มี pHค่อนไปทางกรด	-

6 เดือนที่ 2

	กิจกรรม (ตามแผน)	กิจกรรมที่ดำเนินงานตามจริง	ผลที่ได้รับ	หมายเหตุ
1.เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการลดการอักเสบของสารสกัดจากผลไม้ต่อระดับ TNF-α,IL-6, IL-8, MCP-1 ที่หลั่งจากเซลล์โมโนไซต์ที่ differentiate เป็นแมคโครฟาจด้วย PMA และ เหนี่ยวนำให้อักเสบด้วย LPS	1.1 ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากผลไม้ที่ความเข้มข้น 40, 20, 10, 5, 2.5 และ 1.25 mg/ml) ต่อระดับ TNF-α เลี้ยงร่วมกับการกระตุ้นด้วย LPS พร้อมทั้งหาอัตรารอดชีวิตของเซลล์ 1.2.การทดสอบสารสกัดจากผลไม้ในช่วงความเข้มข้น 1.25 - 5 mg/ml ต่อระดับ TNF-α จากเซลล์แมคโครฟาจ 1.3.การทดสอบสารสกัดจากผลไม้ในช่วงความเข้มข้น น้อยกว่า 0.2 mg/ml ต่อระดับ TNF-α จากเซลล์แมคโครฟาจ	1.1 ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากผลไม้ต่อระดับเข้มข้น 40, 20, 10, 5, 2.5 และ 1.25 mg/ml) ต่อระดับ TNF-α เลี้ยงร่วมกับการกระตุ้นด้วย LPS พร้อมทั้งหาอัตรารอดชีวิตของเซลล์ 1.2.การทดสอบผลของสารสกัดจากผลไม้ในช่วงความเข้มข้น 1.25 - 5 mg/ml ต่อระดับ TNF-α จากเซลล์แมคโครฟาจ 1.3.การทดสอบผลของสารสกัดจากผลไม้ในช่วงความเข้มข้น น้อยกว่า 0.2 mg/ml ต่อระดับ TNF-α จากเซลล์แมคโครฟาจ	1.1 สารสกัดจากผลไม้ส่วนใหญ่เพิ่มการหลั่งTNF-α โดยเฉพาะมะละกอความเข้มข้น 40 mg/ml กระตุ้นการหลั่ง TNF-α มากที่สุดเพิ่มขึ้นถึง 4.6 เท่าของ กลุ่มควบคุมลบ 1.2.สารสกัดจากผลไม้ส่วนใหญ่ก็ยังเพิ่มการหลั่งTNF-α ในช่วง 1.25 - 5 mg/ml 1.3. ได้ความเข้มข้นของสารสกัดที่ 0.05-0.2 mg/ml ซึ่งไม่เหนี่ยวนำให้เซลล์แมคโครฟาจผลิต TNF-αมากกว่ากลุ่มควบคุมลบ	โครงการนี้ได้มีการขอขยายเวลาเพิ่มขึ้น 3 เดือน เป็นเวลาทั้งหมด 15 เดือนเนื่องจาก 1. เกิดมหาอุทกภัยน้ำท่วมมในช่วงเดือนกันยายน – พฤศจิกายน 2554 ทำให้มหาวิทยาลัยปิดทำการไม่สามารถเข้ามาทำการวิจัยได้ 2. ต้องหาปริมาณสารสกัดใหม่เนื่องจากความเข้มข้นตอนเริ่มต้นสูงเกินไปทำให้เซลล์ผลิตไซโตไคน์มากกว่ากลุ่มที่มี LPS อย่างเดียว 3. ต้องหาสภาวะที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ U937 เกิด oxidative stress ซึ่งเป็นสภาวะที่แตกต่างจากการศึกษา anti-inflammation

6 เดือนที่ 2 (ต่อ)

	กิจกรรม (ตามแผน)	กิจกรรมที่ดำเนินงานตามจริง	ผลที่ได้รับ	หมายเหตุ
1.เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการลดการอักเสบของสารสกัดจากผลไม้ต่อระดับ TNF-α,IL-6, IL-8, MCP-1 ที่หลั่งจากเซลล์โมโนไซต์ที่ differentiate เป็นแมคโครฟาจด้วย PMA และ เหนี่ยวนำให้อักเสบด้วย LPS	1.4. การทดสอบประสิทธิภาพต้านการอักเสบของสารสกัดจากผลไม้ไทยในเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นการอักเสบด้วย LPS	1.4.การทดสอบผลของสารสกัดจากผลไม้ในช่วงความเข้มข้น น้อยกว่า 0.05-0.2 mg/ml ร่วมกับการกระตุ้นด้วย LPS ต่อระดับ TNF-α,IL-6, IL-8, MCP-1 ที่หลั่งจากเซลล์โมโนไซต์ที่differentiate เป็นแมคโครฟาจด้วย PMA และเหนี่ยวนำให้อักเสบด้วย LPS	1.4. ทราบถึงประสิทธิภาพของสารสกัดจากผลไม้ต่อระดับระดับ TNF-α,IL-6, IL-8, MCP-1 ที่หลั่งจากเซลล์โมโนไซต์ที่differentiate เป็นแมคโครฟาจด้วย PMA และเหนี่ยวนำให้อักเสบด้วย LPS	4. ได้ย้อมเซลล์ PMA-induced U937 ด้วย CD11b ซึ่งเป็น marker ของเซลล์แมคโครฟาจ และวิเคราะห์ด้วย Flow-cytometer เพื่อให้มั่นใจว่าเซลล์มีการ differentiate เป็นแมคโครฟาจแล้ว จากผลการศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง unstimulated U937 กับ stimulated cells พบว่า stimulated cells มี mean fluorescent intensity เพิ่มขึ้นมากกว่า 2 เท่าซึ่งเป็นที่ยอมรับว่าเซลล์โมดนไซดีมีการ differentiate แล้ว
2.เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากผลไม้ในการลด spontaneous oxidative stress induce ROS จากเซลล์โมโนไซต์	2.1.ตามโครงร่างวิจัยเดิมจะทดสอบฤทธิ์การลดอนุมูลอิสระโดยใช้ต้นแบบเดียวกับการศึกษาเป็นเซลล์แมคโครฟาจ U937 ที่เหนี่ยวนำ ด้วย LPS และวัดค่า ROS ที่เกิดขึ้น	2.1.การทดสอบผลการกระตุ้น LPS ต่อระดับ ROS ที่หลั่งจากเซลล์โมโนไซต์ที่differentiate เป็นแมคโครฟาจด้วย PMA และ เหนี่ยวนำให้อักเสบด้วย LPS 10 และ 100 ng/ml	2.1.จากการเหนี่ยวนำด้วย LPS 1เกิด ROS เพิ่มขึ้นเพียง 1.5 เท่าของกลุ่มควบคุมลบ ถ้าใช้สภาวะนี้เหนี่ยวนำ จะทำให้การแปลผลประสิทธิภาพของสารสกัดผลไม้ในการลดอนุมูลอิสระไม่ชัดเจน	

6 เดือนที่ 2 (ต่อ)

	กิจกรรม (ตามแผน)	กิจกรรมที่ดำเนินงานตามจริง	ผลที่ได้รับ	หมายเหตุ
2.เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากผลไม้ในการลด spontaneous oxidative stress induce ROS จากเซลล์โมโนไซด์	2.2 ต้องปรับการทดลองใหม่ตั้งแต่การหาความเข้มข้นสี Dichlorodihydrofluorescein Diacetate (DCFH-DA) ที่เหมาะสมในการย้อม ROS ภายในเซลล์โมโนไซด์ U937 และหา condition ที่เหมาะสม 2.3 การหาสารเหนี่ยวนำและสภาวะการเหนี่ยวนำภาวะ Oxidative stress ในเซลล์ U937	2.2 การหาความเข้มข้นสี DCFH-DA ที่เหมาะสมในการย้อม ROS ภายในเซลล์โมโนไซด์ U937และหา condition ในการเลี้ยงเซลล์ให้มีปริมาณ ROS ต่ำที่สุด (เซลล์เครียดน้อยที่สุด) 2.3 ทดสอบเหนี่ยวนำเซลล์ด้วย LPS และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ วัด ROS	2.2 ได้ DCFH-DA ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ที่ละลายใน complete media ในการย้อม intracellular ROS ของเซลล์โมโนไซต์ U937 2.3 LPS เหนี่ยวนำเซลล์ผลิต ROS เพียง 1.2 เท่า ในขณะที่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นสุทธิ 400 μM เป็นตัวเหนี่ยวนำเป็นเวลา 20 นาที เหนี่ยวนำเซลล์ผลิตROS ได้ถึง 4 เท่า	

6 เดือนที่ 2 (ต่อ)

	กิจกรรม (ตามแผน)	กิจกรรมที่ดำเนินงานตามจริง	ผลที่ได้รับ	หมายเหตุ
2.เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากผลไม้ในการลด spontaneous oxidative stress induce ROS จากเซลล์โมโนไซต์	2.4 หาความเข้มข้นสารสกัดผลไม้ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์โมโนไซต์ U937และ หาช่วงความเข้มข้นสารสกัดที่ไม่กระตุ้น Spontaneous ROS ของเซลล์โมโนไซต์ U937 และหาอัตรารอดของเซลล์ 2.5 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากผลไม้ในการลดอนุมูลอิสระในเซลล์ U937 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และหาอัตรารอดของเซลล์	2.4 ทดสอบช่วงความเข้มข้นสารสกัดจากผลไม้(0.4-40 mg/ml)ที่ไม่กระตุ้น Spontaneous intracellular ROS ของเซลล์โมโนไซต์ U937 และหาอัตรารอดของเซลล์ 2.5 ทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดจากผลไม้(10-40 mg/ml) ต่อระดับ spontaneous และ H_2O_2 induced ROS จากเซลล์โมโนไซต์ U937 และหาอัตรารอดของเซลล์	2.4 เซลล์โมโนไซต์ที่ได้รับสารสกัดจากผลไม้ที่ความเข้มข้น 0.4-40 mg/ml เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ไม่ทำให้ระดับ intracellular ROS เพิ่มขึ้น และเซลล์มีอัตรารอดที่มากกว่า 80% 2.5ได้ผลประสิทธิภาพของสารสกัดจากผลไม้ต่อต่อระดับ spontaneous และ H_2O_2 induced ROS	