โครงการวิจัยย่อยที่ 7 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV จากเลือดจระเข้
Study on Cytotoxicity against Human Cancer and Anti-HIV Activity of Crocodile Blood

ได้รับทุนวิจัยประจำปี 2554 **จำนวนเงิน** 1,416,789 **บาท**

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 **ปี ตั้งแต่** มกราคม 2555 **ถึง** มกราคม 2556

ชื่อผู้วิจัย

นางอรุณพร อิฐรัตน์ Ph.D (Pharmacognosy)
ศูนย์การแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
โทร 02-9269749 โทรสาร 02-9269749

นางสาวศรีโสภา เรืองหนู Ph.D (Medical Sciences)
ศูนย์การแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
โทร 02-9269749 โทรสาร 02-9269749

นางสาวจินดาวรรณ สิรันทวิเนติ Ph.D. (Agricultural Science)
ภาควิชาสัตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
โทรศัพท์ 0-2562-5555, 0-2562- 5444 ต่อ 3262

นางสาวอรมณี ประจวบจินดา Master of Science (Applied Thai Traditional Medicine)
ศูนย์การแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
โทร 02-9269749 โทรสาร 02-9269749

บทคัดย่อ

เลือดจระเข้เป็นเครื่องยาที่เป็นสัตว์วัตถุ วัตถุประสงค์ของการศึกษาศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ของสารสกัดจากเลือดจระเข้ไทย ฤทธิ์ต้านเชื้อเอชไอวี ของผลิตภัณฑ์จากจากเลือดจระเข้ โดยการศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 4 ชนิด คือ เต้านม (MCF-7) ปอด (COR-L23) ตับ (HepG2) และปากมดลูก (Hela) โดยวิธี SRB พบว่าเลือดจระเข้ในส่วนของเลือดครบ (Whole blood) ซีรัม และพลาสมา (PE) ที่ละลายด้วยตัวทำละลายต่างๆ เช่น PBS, DMSO, 95%Ethanol, 10%HCl และ10%$NaHCO_3$ ไม่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้งสี่ชนิด โดยค่า IC_{50}>100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ซึ่งตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ละลายด้วย 10% HCl มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าตัวอย่างที่เลือดจระเข้ละลายด้วยตัวทำละลายตัวอื่น โดยทดสอบกับเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และ ตับ (HepG2) มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 60-90 µg/ml ส่วนฤทธิ์ต้าน HIV-1 protease และฤทธิ์ต้าน HIV-1 integrase (HIV-1 IN) ไม่มีฤทธิ์ต้าน HIV-1 protease และ HIV-1 integrase (IC_{50} > 100 µg/ml) และตัวอย่างเลือดจระเข้ไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH **มี**ค่า EC_{50} >100 µg/ml ส่วนฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยการศึกษาฤทธิ์ยับยั้ง Nitric Oxide วิธี Griess reagent ตัวอย่างเลือดจระเข้ไม่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ แต่เมื่อการยับยั้งฤทธิ์ต้านการก่อภูมิแพ้ พบว่าตัวอย่างเลือดจระเข้ส่วนของพลาสมา (PE) ที่ละลายด้วย DMSO มีค่า IC_{50} เท่ากับ 12.91 µg/ml และส่วน Whole blood Serum และPlasma (PE) ละลายด้วย 10%HCl มีค่า IC_{50} อยู่ใน 30 – 50 µg/ml จากการทดสอบฤทธิ์ต่างๆ พบว่า ตัวอย่างเลือดจระเข้มีฤทธิ์ต้านการก่อภูมิแพ้ดีที่สุด และเมื่อตัวอย่างเลือดจระเข้ถูกละลายด้วยตัวทำละลาย คือ 10%HCl ซึ่งเป็นกรด จะพบว่ามีฤทธิ์ต่อการทดสอบเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นในการสกัดเลือดจระเข้ควรอยู่ในภาวะกรด

Abstract

Crocodile blood is pharmaceutical products from animal. The objective of this research was to study the cytotoxic activity against cancer cell lines (breast cancer cell (MCF-7) lung cancer cell (COR-L23) liver cancer cell (HepG2) and cervical cancer cell (Hela) by SRB assay. HIV protease and HIV 1 Integrase were also tested. Crocodile blood in the whole blood, serum and plasma (PE) dissolved with PBS, DMSO, 95% ethanol, 10%HCl and 10%$NaHCO_3$ had no cytotoxic activity against four cancer cell lines with IC_{50} values of > 100 µg/ml. While crocodile blood dissolved in 10%HCl more exhibited than cytotoxicity against cancer on crocodile blood dissolved in solvent another. The crocodile blood dissolved in 10%HCl exhibited breast and liver cancer cell line (MCF-7, HepG2) with an IC_{50} value 60 – 90 µg/ml. The HIV-1 protease and integrase (HIV-1 IN) activities had no HIV-1 protease and HIV-1 integrase (IC_{50} > 100 µg/ml). The extract of crocodile blood no displayed antioxidant activity by DPPH assay with EC_{50} >100 µg/ml, and the anti-inflammatory activity by nitric oxide inhibition assay had no activity too. However, the plasma of crocodile blood in DMSO showed IC_{50} value = 12.91 µg/ml and the whole blood, serum and plasma (PE) of in 10%HCl with IC_{50} 30-50 µg/ml against anti-allergy activity. These results of overall activities showed that the extract of crocodile blood good exhibited anti-allergy activity. Furthermore, the crocodile blood dissolved with 10%HCl showed increased values of activities. Thus the extraction of crocodile blood should be in acid condition.

บทนำ

มะเร็งเป็นสาเหตุการตายอันดับ 1 ของคนไทย (Subchareon, 1998) มะเร็งเป็นหนึ่งในบรรดาโรคร้ายในปัจจุบัน ที่มีผลกระทบต่อชีวิต และสังคม นอกจากนี้ยังไม่พบวิธีการรักษาใดๆ ที่รักษาได้อย่างเด็ดขาด ทั้งนี้เพราะมะเร็งเป็นเซลล์เนื้อร้ายที่เจริญแทรกซึมเข้าไปในเซลล์ที่ดีที่อยู่โดยรอบ เมื่อเข้าไปในเส้นเลือดและน้ำเหลืองก็จะกระจายและทำลาย เนื้อเยื่ออวัยวะนั้นจนทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตอย่างรวดเร็ว การรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบันจะใช้วิธีการรักษาแบบ Chemotherapy เป็นส่วนใหญ่ แต่หลักการรักษาโดยใช้ Chemotherapy จะต้องพยายามหายาที่รักษาโดยยาไปฆ่าเซลล์มะเร็ง แต่มีผลน้อยต่อเซลล์ปกติ (Halliwell and Gutteridge, 1988)

โรคเอดส์ (AIDS, acquired immunodeficiency syndrome) เป็นโรคที่มีการแพร่ระบาดอย่างรวดเร็วไปทั่วโลก ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มียารักษาโรคนี้ให้หายขาดได้ ทำให้นักวิจัยหลายกลุ่มพยายามคิดค้นยาเพื่อนำมาใช้ในการรักษาโรคนี้ รวมทั้งอาการแทรกซ้อนที่เกิดจากเชื้อฉกฉวยต่างๆ หลังจากผู้ป่วยติดเชื้อเอดส์ เชื้อเอดส์หรือ human immunodeficiency virus (HIV) แยกได้ครั้งแรกจากต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วยเอดส์เมื่อปี ค.ศ. 1983 (Barre Sinoussi ***et al.***, 1983) HIV สามารถแพร่กระจายได้ในเซลล์หลายชนิด แต่มีความจำเพาะต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cells ที่มี CD4 receptors และเมื่อติดเชื้อเป็นระยะเวลานาน จะทำให้ CD4+ T-lymphocytes ลดจำนวนลง อย่างรวดเร็ว มีผลทำให้เกิดภูมิคุ้มกันบกพร่อง และเกิดโรคแทรกซ้อนต่าง ๆ ตามมา (เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม, 2539) วิธีการหนึ่งที่สามารถยับยั้งเชื้อเอดส์ได้คือ การคิดค้นยาที่สามารถเข้าไปขัดขวางวงจรชีวิตของเชื้อไวรัสชนิดนี้ โดยการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อ (viral replication) เอนไซม์ที่สำคัญต่อวงจรชีวิตของเชื้อ HIV มีอยู่ด้วยกัน 3 ชนิด ได้แก่ HIV-1 protease (PR), HIV-1 reverse transcriptase (RT) และ HIV-1 integrase (IN) ดังนั้นถ้าสามารถคิดค้นยาที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้ได้ ก็จะเป็นหนทางหนึ่งที่จะช่วยลดจำนวนเชื้อเอดส์ในผู้ป่วย HIV-1 PR เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม aspartic protease ที่มีความจำเพาะเจาะจงที่ต่าง จาก protease ชนิดอื่น โดยสามารถย่อยเปปไทด์ระหว่าง Phe-Pro, Phe-Tyr และ Leu-Phe ได้ เอนไซม์ชนิดนี้มีความสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อ HIV และการสร้างอนุภาคที่สมบูรณ์ของไวรัส ดังนั้น ถ้าสมุนไพรหรือยาใดที่ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ จะทำให้ไวรัสไม่สามารถเพิ่มจำนวนหรือไม่สมบูรณ์ และไม่สามารถติดเชื้อต่อไปได้ HIV-1 PR จึงเป็นเป้าหมายหนึ่งที่น่าสนใจในการคิดค้นยารักษาโรคเอดส์ในปัจจุบัน ยาต้านเชื้อเอดส์ที่ยับยั้งเอนไซม์ในวงจรชีวิตของไวรัสมีอยู่หลายชนิด HIV-1 PR inhibitors ได้แก่ saquinavir (SQV), nelfinavir (NFV) และ amprenavie (APV) เป็นต้น HIV-1 RT inhibitors ได้แก่ zidovudine (AZT), didanosine (DDI) และ abacavir (1592U89) (Hirsch ***et al.***,1998) เป็นต้น ในปัจจุบันมีการวิจัยอย่างกว้างขวางในการคิดค้นยาที่ได้จากธรรมชาติสำหรับต้านเชื้อ HIV-1 เนื่องจากยาแผนปัจจุบันที่ใช้อยู่ขณะนี้มีอัตราการดื้อยา (drug resistance) และฤทธิ์ข้างเคียง (side effects) สูง

ในการสืบค้นข้อมูลสิทธิบัตรพบว่าได้มีการจดสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับเลือดจระเข้และส่วนประกอบ ในกลุ่มประเทศยุโรป ประเทศอเมริกา และประเทศออสเตรเลีย เพื่อใช้เป็นในการต้านเนื้องอก (WO03007874, 2003 ; US20040247589, 2004 ; AU2002354891, 2004) ในประเทศจีนเพื่อใช้เป็นอาหารเม็ดกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านมะเร็ง (CN1465351, 2004) การประยุกต์เลือดจระเข้ในกระบวนการเพื่อเตรียมยาและอาหารเสริมสุขภาพต่อต้านมะเร็ง ไวรัส และเสริมภูมิคุ้มกัน (CN1634147, 2005) ข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าต่างประเทศให้ความสนใจ ในเรื่องมะเร็ง และเอดส์ แต่ยังไม่มีรายงานที่ทดสอบเลือดจระเข้ของไทย

การศึกษาในเรื่องฤทธิ์ต้านมะเร็งและฤทธิ์ต้านเอชไอวี จากเลือดจระเข้พันธุ์อเมริกา เคยมีงานวิจัยว่าใช้รักษาโรคมะเร็งและเอดส์ ดังนั้นน่าจะศึกษาเลือดจระเข้พันธ์เมืองไทยที่ว่ามีฤทธิ์เช่นเดียวกันหรือไม่ อีกทั้งในขณะนี้มีการใช้ในลักษณะการบริโภคเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในคนป่วยมะเร็งและเอดส์แล้ว

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

จระเข้พันธุ์ไทย (Siamese crocodile, ***Crocodylus siamensis***) เป็นสัตว์เศรษฐกิจสำคัญของประเทศ ผู้บริโภคนิยมใช้เนื้อ เลือด และผลิตภัณฑ์อื่นๆ ของจระเข้เป็นอาหาร อาหารเสริม และเครื่องยาสัตววัตถุ จระเข้จัดเป็นสัตว์สมุนไพรที่สำคัญ ชาวจีนรู้จักใช้ประโยชน์จากส่วนต่างๆของจระเข้มากกว่า 2,000 ปี โดยใช้ดี เลือด กระดูก และหนัง เป็นยาสมุนไพร (ชยันต์ และวิเชียร, 2546) ในหลายปีที่ผ่านมามีการศึกษาวิจัยจำนวนมากที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติที่ดีและฤทธิ์ทางชีวภาพของเลือดจระเข้ เช่น ความสามารถที่ดีในการจับออกซิเจนของฮีโมโกลบินในเลือดจระเข้ (Perutz ***et al.***, 1981; Komiyama ***et al.***, 1995) คุณสมบัติในการต้านจุลชีพ (วิน เชยชมศรี และคณะ, 2546; Siruntawineti ***et al.***, 2003, 2004a) เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ (anti-microbial peptides) ทั้งในส่วนของน้ำเลือด (Merchant ***et al.***, 2005) และเม็ดเลือดขาว (Merchant ***et al.***, 2006)

เลือดครบของจระเข้พบโปรตีนมีปริมาณมากที่สุด (87.4 g/100g) รองลงมาคือ ไขมัน (2.4 g/100g) และคาร์โบไฮเดรต (0.6 g/100g) ส่วนในซีรัมพบมีโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน ปริมาณ 69.0, 8.2 และ 6.9 g/100g ตามลำดับ โดยในเลือดครบมีโปรตีน ฟอสฟอรัส (547.0 mg/100g) และเหล็ก (132.1 mg/100g) มากกว่าในซีรัม (Siruntawineti ***et al.***, 2010) อีกทั้งยังศึกษารูปแบบโปรตีนด้วยวิธีการเคลื่อนสู่ขั้วไฟฟ้าแบบเอสดีเอสพอลิอะคริลาไมด์ (SDS-PAGE) ในภาวะที่มีเมอร์เคปโทเอทานอลเป็นสารรีดิวซ์เมื่อเจลส่วนแยกเป็น10% (w/v) ของตัวอย่างเลือดจากจระเข้พันธุ์ไทย (***Crocodylus siamensis***) จำแนกตามเพศ แหล่งเพาะเลี้ยง(ภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคใต้) องค์ประกอบต่างๆ ของเลือด (เลือดครบ ซีรัม และ ส่วนสกัดจากเม็ดเลือด) และกระบวนการทำ แห้งแบบเยือกแข็ง พบว่ารูปแบบโปรตีนในเลือดจระเข้ไม่แตกต่างกันตาม เพศ แหล่งเพาะเลี้ยง และกระบวนการทำแห้ง แต่ความแตกต่างของแบบโปรตีนจากส่

วนต่างๆของเลือดดังนี้ โปรตีนจากตัว อย่างเลือดครบ แสดง 7 แถบ ที่น้ำหนักโมเลกุล119, 91, 67, 62, 59, 45 และ25 kDa ตามลำดับ โปรตีนจากซีรัม แสดง 6 แถบ ที่น้ำหนักโมเลกุล225, 121, 67, 62, 45 และ 25 kDa ตามลำดับ และโปรตีนจากส่วนเม็ดเลือด แสดง2 แถบ ที่น้ำหนักโมเลกุล45 และ25 kDa แถบโปรตีนที่เข้มและกว้างที่สุดคือ แถบโปรตีนแอลบูมิน ที่ น้ำหนักโมเลกุล 67 kDa (เอกวิทย์ จินดาวรรณ และ วิน, 2554)

การสืบค้นข้อมูลสิทธิบัตรพบว่าได้มีการจดสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับเลือดจระเข้ และส่วนประกอบ ในกลุ่มประเทศยุโรป ประเทศอเมริกา และประเทศออสเตรเลีย เพื่อใช้เป็นในการต้านเนื้องอก (WO03007874, 2003 ; US20040247589, 2004 ; AU2002354891, 2004) ในประเทศจีนเพื่อใช้เป็นอาหารเม็ดกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านมะเร็ง (CN1465351, 2004) การประยุกต์เลือดจระเข้ในกระบวนการเพื่อเตรียมยาและอาหารเสริมสุขภาพต่อต้านมะเร็ง ไวรัส และเสริมภูมิคุ้มกัน (CN1634147, 2005)

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

๑. การทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเต้านม ปอด ตับ ปากมดลูก โดยใช้ SRB assay

(Skehan *et al.*,1990; Keawpradub *et al.*, 1997; Wilson, 1992 and Itharat *et al.*, 2004)

นำส่วนสกัดทั้งหมดมาทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ปอด (COR-L23) ตับ (HepG2) และปากมดลูก (Hela) โดยดูฤทธิ์อย่างหยาบต่อเซลล์ เปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ 1 ชนิด คือ fibroblast (MRC5) เซลล์เหล่านี้จะนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมในขวดเลี้ยงเซลล์ โดยให้เซลล์เกาะขวดเลี้ยงเซลล์ ทำการถ่ายเซลล์ลงใน 96-well microplate หลุมละ 100 µl โดยให้ความหนาแน่นของ MCF-7, COR-L23, HepG2 และ Hela เท่ากับ 3000, 1000, 3000 และ 3000 cell/well และความหนาแน่นของ MRC-5 เท่ากับ 5,000 cell/well (ค่านี้ได้จากการหาอัตราการเจริญเติบโตของ cell ใน 96 well plate) ปล่อยให้ cell เจริญเติบโตติดกับหลุมเป็น monolayer ในตู้ CO_2 incubator จากนั้นนำมาเติมสารละลายตัวอย่างที่อยู่ใน culture media ความเข้มข้นระดับต่างๆ อย่างน้อย 4 ความเข้มข้น เป็น serial dilution concentration โดยเติมหลุมละ 100 µl ทำซ้ำ 4 หลุม (4 replicates) เลี้ยงใน CO_2 incubator เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นค่อยๆ ดูด culture media ออก แล้วล้าง cell ที่เป็น monolayer ด้วย PBS จำนวน 1 ครั้ง จากนั้นเติม culture media อีก 200 µl นำไปเลี้ยงในตู้ CO_2 incubator เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อดูการรอดของเซลล์มะเร็ง เมื่อเทียบกับ non-treated control และ solvent control โดยวิธี SRB assay (Sulphorhodamine B assay) โดยการ fix cell ที่มีชีวิตรอดด้วย 40% Trichloroacetic acid และย้อมสีเซลล์ด้วย SRB จากนั้นจึงไปละลายสีด้วย Trisma base ที่ pH = 10 แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง UV ด้วย Micro plate reader ที่ความยาวคลื่น 492 nm นำค่าที่ได้มาคำนวณค่าทางสถิติ และหาค่า IC_{50} จากค่า dose response curve ซึ่งเป็นดัชนีบ่งถึงความเป็นพิษต่อ cell (Cytotoxic activity) ด้วย Prism

Program การทดลองจะทำซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อยืนยันผลและนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย และค่า standard error mean (SEM)

- การสรุปว่าสารสกัดสมุนไพรมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งจะต้องมีค่า IC_{50} ไม่เกิน 30 µg/ml ซึ่งเป็นค่ามาตรฐานของ National Cancer Institute หรือ NCI (สหรัฐอเมริกา)

๒. การทดสอบฤทธิ์ต้าน HIV-1 protease (Ma *et al.*, 1998)

การทดสอบฤทธิ์ต้าน HIV-1 protease (HIV-1 PR) มีวิธีการดังต่อไปนี้

นำสายของ peptide (2.5 µg) (modified peptide) [His-Lys-Ala-Arg-Val-Leu-(pNO_2-Phe)-Glu-Ala-Nle-Ser-NH_2] ซึ่งเป็น substrate มาละลายใน HIV-1 PR buffer 25 µl หลังจากนั้นเติม sample solution จำนวน 2.5 µl ลงไป (ใช้ DMSO เป็น solvent) เติม HIV-1 PR solution ความเข้มข้น 0.02 mg/ml จำนวน 12.5 µl ลงใน tube เขย่าให้เข้ากัน นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 45 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการ heat หลอดทดลองที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 1 นาที สายเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยของ HIV-1 PR (hydrolysate, pNO_2-Phe-Glu-Ala-Nle-Ser-NH_2) และสารตั้งต้นที่เหลือ (remaining substrate) จะถูกนำมาวิเคราะห์โดย reversed-phase HPLC ที่ความยาวคลื่น 280 nm. Substrate และ hydrolysate จะถูกชะออกจาก column ในเวลาที่แตกต่างกัน โดยมีการคำนวณ % inhibitory activity ของ HIV-1 PR ดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(A \text{ control} - A \text{ sample})}{A \text{ control}} \times 100$$

โดยที่ A = relative peak area ของ hydrolysate, Acetyl pepstatin เป็น positive control

๓. การทดสอบฤทธิ์ต้าน HIV-1 integrase (Tewtrakul *et al.*, 2006)

การทดสอบฤทธิ์ต้าน HIV-1 integrase (HIV-1 IN) มีวิธีการดังนี้

นำ Oligonucleotide (LTR-D) และ target substrates (TS) DNA มาทำ Integration reaction ในแต่ละหลุม ของ -96 well plate หลังจากนั้น เติม เอนไซม์ integrase ใส่ลงไปใน plate นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37^0c เป็นเวลา 80 นาที ล้างด้วย PBS และเติม alkaline phosphate (AP) labeled anti-digoxigenin antibody ใส่ลงไป และ incubate ที่อุณหภูมิ 37^0c เป็นเวลา ชั่วโมง ล้าง 1 plate อีกรอบ ด้วย washing buffer ประกอบด้วย 0.05% Tween 20 ใน PBS จากนั้น เติม AP buffer ใส่ลงไปใน

หลุม และ incubate ที่อุณหภูมิ 37^0c เป็นเวลา ชั่วโมง สุดท้ายนำ 1plate ไปวัดด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 405 nm

การคำนวณ

% inhibitory against HIV- 1IN = [(OD control - OD sample) / OD control] x100

๔.การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Free Radical-Scavenging Assay

(Yamaski *et al*., 1994)

DPPH หรือ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl เป็นสารอนุมูลอิสระ (free radical) สามารถรับ electron หรือ hydrogen radical ได้ ซึ่งเมื่อ DPPH อยู่ในรูปสารละลายใน absolute ethanol จะมีสีม่วง และเมื่อทำปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ antioxidant จะทำให้มีสีจางลง ในการทดสอบจะใช้ BHT (Butylated hydroxytoluene) เป็นสารมาตรฐานที่ให้ผลบวกในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีนี้ ค่าที่ได้จากการทดสอบจะแสดงเป็นค่า EC_{50} โดยต้องมีค่าต่ำกว่า 100 µm/ml จึงจะถือว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ทดสอบโดยเตรียมสารตัวอย่างและสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 100, 50, 10, 1 µg/ml เตรียมสารละลาย DPPH โดยชั่ง DPPH มา 1.2 mg ถ่ายลงใน volumetric flask ขนาด 50 ml ปรับปริมาตรด้วย Absolute Ethanol จนครบ 50 ml แล้วปิดกันแสงด้วย foil นำมาทดสอบใส่สารทดสอบแต่ละ dilution ใส่ลงในหลอดทดลอง 100 µl เติม DPPH 100 µl ทิ้งไว้ 30 นาที และวัดการดูดกลืนแสงที่ 520 nm นำไปคำนวณ % inhibition จากสมการ

$$\%Inhibition = \frac{ODcontrol - ODsample}{ODcontrol} \times 100$$

หมายเหตุ

Control = ตัวทำละลายของตัวอย่างนั้น + DPPH

Blank = ตัวทำละลายของตัวอย่างนั้น + สารละลายตัวอย่าง

Blk Control น้ำ = น้ำ (100 µg/ml) + absolute EtOH (100 µg/ml)

Blk Control EtOH = absolute EtOH (200 µg/ml)

หาค่า EC_{50} จากค่า % Inhibition ด้วยโปรแกรม Prism analysis

๕. การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory activity)

การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการหลั่ง Nitric oxide (Tewtrakul and Itharat, 2007; Tewtrakul and Subhadhirasakul, 2008)

เลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ใน 96 well-plates (cell มีความเข้มข้น 1×10^5 cells/well) medium ที่ใช้เลี้ยง cell คือ RPMI-1640 ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 units/ml) และ streptomycin (100 µg/ml) โดย incubate cells ใน CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37^0C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดสารละลายเก่าออก เติม LPS (lipopolysaccharide) 100 µg/ml ที่อยู่ใน RPMI ลงไปหลุมละ 100 µl เฉพาะหลุม control และ sample ส่วน blank จะใส่ RPMI จากนั้นเติมสารสกัดสมุนไพร (sample solution) จำนวน 100 µl ในหลุมของ sample และ blank of sample ส่วนหลุม control และ blank of control ให้เติม RPMI แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37^0C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูด supernatant แต่ละหลุมมา 100 µl ใส่ใน 96 well-plates เติม Griess reagent หลุมละ 100 µl เคาะ plate เบาๆ วัด OD ที่ 570 nm ส่วน supernatant ที่เหลือใน plate แรก เติม MTT หลุมละ 10 µl เคาะ plate เบาๆ แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37^0C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ดูด supernatant ออกทุกหลุม เติม isopropanol ใน 0.04 M HCl 100 µl เขย่า วัด OD ที่ 570 nm

การคำนวณ % inhibition of NO production มีดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = \frac{A - B}{A - C} \times 100$$

โดยที่ A – C: NO_2^- concentration (µM)

A: LPS (+), sample (-)

B: LPS (+), sample (+)

C: LPS (-), sample (-)

๖.การทดสอบฤทธิ์ต้านการแพ้ (Anti-allergic activity)

การทดสอบฤทธิ์ต้านการแพ้ โดยวิธีทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการหลั่งของเอนไซม์ β-hexosaminidase

1. เลี้ยงเซลล์ RBL-2H3 cells ใน 250 ml flask ดูด media MEM เก่าออก

2. ล้างเซลล์ด้วย 0.05% Tripsin-EDTA 2 ml

3. เติม 0.05% Trypsin-EDTA 3 ml และเขย่า plates ไปมาเบาๆ Incubate 10 นาที ที่ 37°C เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากผนัง flask สังเกตเห็นสารละลายขุ่น

4. เติม media MEM ลงไป 3 ml ดูดออกใส่ tube ขนาด 50 ml แล้วล้างด้วย media MEM อีก 3 ml ดูดออกใส่ tube เดิม (ในกรณีที่ต้องการเลี้ยงเซลล์ที่เหลือใน flask ต่อให้เติม media MEM 12 ml เก็บในตู้ incubate ที่ 37°C)

5. นำ tube ไป centrifuge ที่ 1000 rpm เป็นเวลา 6 นาที Pipette เอา supernatant ออกไป ใส่ media MEM ลงไป 10 ml (mix ให้เข้ากัน)

6. Pipette สารละลายเซลล์มา 50 µl ใส่ eppendorf ที่มี 0.4% trypan blue 50 µl (mix ให้เข้ากัน) นับเซลล์ด้วย hematocytometer เติม media MEM ลงไปเพื่อ dilute cells ให้ได้ 5×10^5 cells/ml แล้วเขย่าให้เซลล์กระจาย

7. ดูดสารละลายที่มีเซลล์มา 400 µl ลงใน 24 well-plates ทุกหลุม โดย label ที่ฝาเป็น blank, control และ sample ต่างๆ ที่ทดสอบ Incubate 2 ชั่วโมง ที่ 37°C

8. เติม DNP-IgE (antibody) ที่อยู่ใน media MEM โดยเติมหลุม control และ sample หลุมละ 40 µl ยกเว้น blank ให้เติม media MEM 40 µl แล้ว mix wells หลังจากนั้น incubate 1 วัน ที่ 37°C

9. ดูดสารละลายเก่าออกก่อน แล้วล้างด้วย buffer A 400 µl เติม buffer A หลุมละ 160 µl ทุกหลุม นำไป Incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 10 นาที

10. เตรียม sample solution ใน buffer A ตามความเข้มข้นที่ต้องการ 100, 50, 10, 1 µg/ml

11. เติม buffer A ในหลุม blank และ control หลุมละ 20 µl ส่วนหลุม sample เติม sample solution หลุมละ 20 µl แล้ว mix wells นำไป incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 10 นาที

12. เติม buffer A ในหลุม blank หลุมละ 20 µl ส่วนหลุม control และ sample เติม DNP-BSA (antigen) หลุมละ 20 µl แล้ว mix wells นำไป incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 20 นาที

13. Pipette solution 50 µl ลงใน 96 well-plates เติม 1 mM PNAG in citric acid buffer 50 µl ใน 48 wells ด้านบน ส่วนด้านล่างเติม citric acid 50 µl แล้ว incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง

14. เติม Na_2CO_3 buffer 200 µl ลงในแต่ละ well นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm

<u>การคำนวณ % inhibitory activity on β-hexosaminidase release</u>

$$\% \text{ inhibition} = 1 - \frac{(T-B-N)}{(C-N)} \times 100$$

โดยที่ Control (C): DNP-BSA (+), test sample (-)

Test (T): DNP-BSA (+), test sample (+)

Normal (N): DNP-BSA (-), test sample (-)

Blank (B): DNP-BSA (-), test sample (+)

การคำนวณค่า IC_{50}

หาค่าโดยใช้โปรแกรม Prism

๗.การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

๗.๑ การเตรียมการละลายสารตัวอย่างเลือดจระเข้ เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยจระเข้พันธุ์ไทย จากอำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี จำนวน 10 ตัว แบ่งเป็นเพศผู้ 5 ตัว และเพศเมีย 5 ตัว สำหรับเลือดจระเข้ 1 ตัว จะแบ่งออกเป็น 7 ส่วน ได้แก่

ส่วนที่ 1 Whole blood

ส่วนที่ 2 Serum (Activated clot blood)

แบ่ง ออกเป็น Serum และ Clot blood

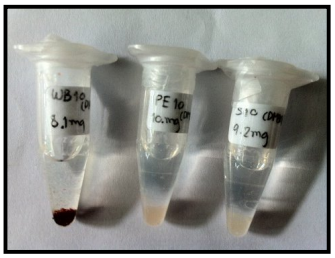
ส่วนที่ 3 Plasma

ส่วน Heparinized blood แบ่งออกเป็น PH และ BH

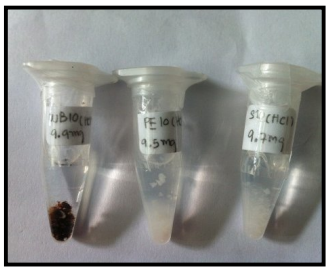
ส่วน EDTA blood แบ่งออกเป็น PE และ blood cell

เมื่อนำตัวอย่างของเลือดจระเข้ ทั้งหมด 7 ส่วน มาทำการละลายด้วยน้ำ พบว่า ส่วนของตัวอย่างทั้ง 5 ส่วน (Whole blood, Clot blood, PH, BH, blood cell) ไม่ละลายในน้ำ มีเพียง 2 ส่วน ของตัวอย่างเลือดจระเข้เท่านั้น ที่สามารถละลายในน้ำได้บ้าง แต่ก็ไม่สามารถละลายได้ทั้งหมด คือ ส่วนของ Serum และ PE ดังนั้นจึงนำส่วนที่สามารถละลายในตัวทำละลายมาทำการทดสอบ และได้พิจารณานำส่วน Whole blood ของเลือดจระเข้มาทดสอบด้วย เนื่องจาก Whole blood เป็นส่วนที่นำมาใช้ในการทำยาและอาหารเสริม

เตรียมตัวอย่างที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 mg/ml โดยตัวทำละลายที่ใช้ คือ dimethyl sulfoxide (DMSO), Phosphate buffered saline (PBS), 10% HCl, 10% $NaHCO_3$ และ 95% Ethanol โดย แบ่งเป็น Activate และ Inactivate ที่ความร้อน 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง พบว่าสารตัวอย่างเลือดจระเข้สามารถละลายใน PBS ได้ดีที่สุด



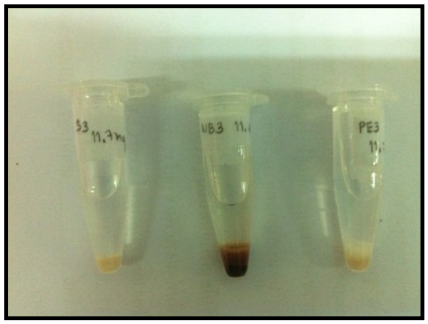
รูปที่ 1 ส่วนของ Whole blood, Serum และ PE ละลายในตัวทำละลาย DMSO



รูปที่ 2 ส่วนของ Whole blood, Serum และ PE ละลายในตัวทำละลาย 1 M HCl

๗.๒ เตรียมสารละลายตัวอย่างเลือดจระเข้ เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ HIV1 protease HIV1 integrase

โดยละลายสารที่ความเข้มข้น 10 mg/ml ซึ่งใช้ตัวทำละลาย คือ Absolute Ethanol พบว่าสารตัวอย่างเลือดจระเข้ ไม่ค่อยละลายในตัวทำละลาย หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนแล้วนำส่วนใสไปทำแห้งด้วยวิธี lyophilization หลังจากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ HIV1 protease HIV1 integrase



รูปที่ 3 ส่วนของ Whole blood, Serum และ PE ละลายในตัวทำละลาย Absolute Ethanol

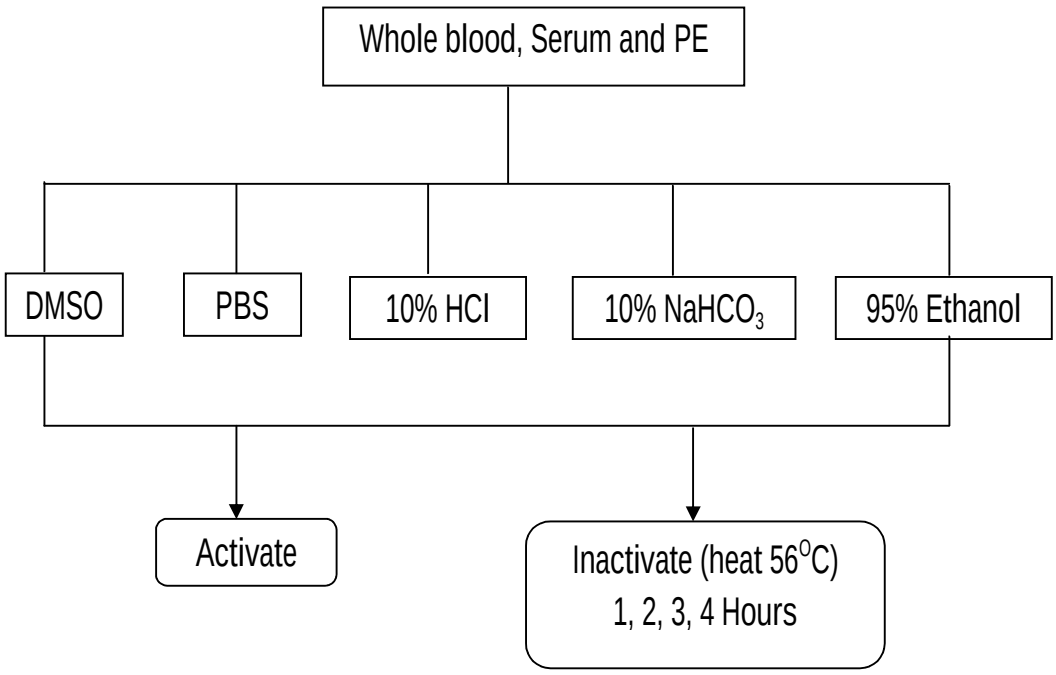
ผลการวิจัย

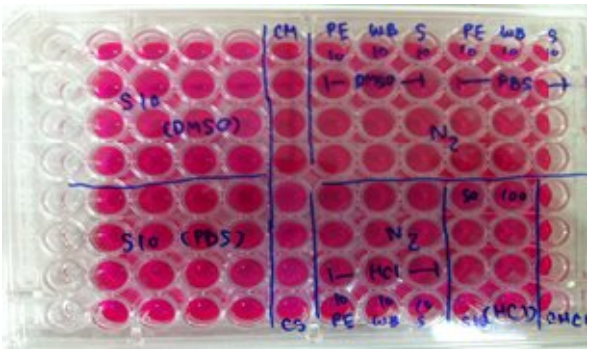
การศึกษาวิจัย เลือดจระเข้ของไทย โดยศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ต้านเอชไอวี ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ต้านภูมิแพ้

๑. การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

นำสารละลายตัวอย่างเลือดจระเข้มาทดสอบฤทธิ์ต้านความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) มะเร็งปอด (COR-L23) มะเร็งตับ (HepG2) และมะเร็งปากมดลูก (Hela) พบว่า ตัวอย่างเลือดจระเข้ในส่วน ของ Whole blood, Serum และ PE ที่ละลายในตัวทำละลาย คือ dimethyl sulfoxide (DMSO), Phosphate buffered saline (PBS), 10% HCl, 10% $NaHCO_3$ และ 95% Ethanol โดยแบ่งเป็น Activate และ Inactivate ที่ความร้อน 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง มาทำการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

แผนภูมิที่ 1 แสดง การละลายสารตัวอย่าง





รูปที่ 4 แสดง 96 well plate ที่ทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ด้วยวิธี SRB assay

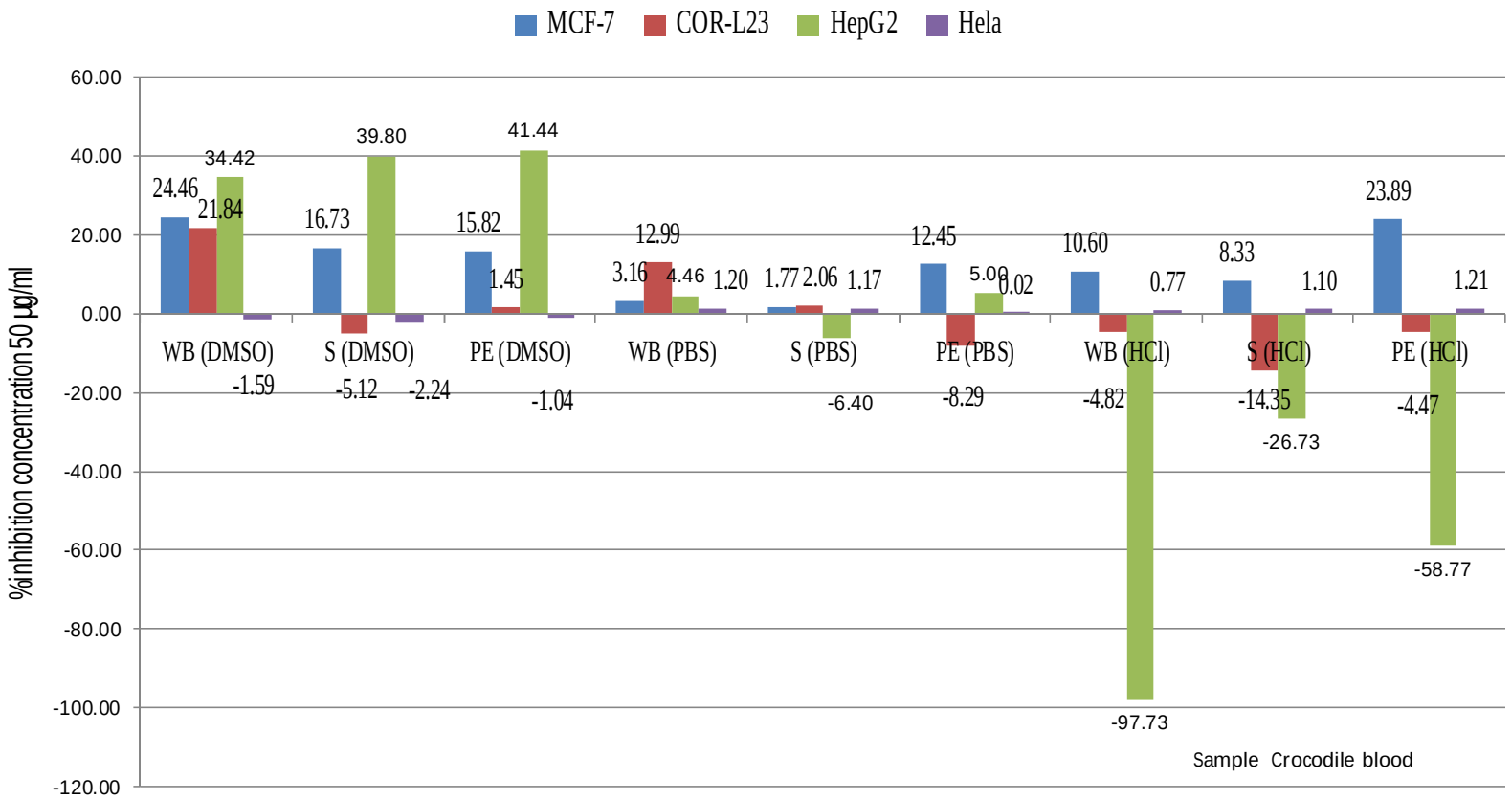
ตารางที่ 1 แสดงค่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml ของตัวอย่างเลือดจระเข้ ต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7), มะเร็งปอด (COR-L23) และมะเร็งตับ (HepG2) (n=2)

ตัวอย่าง	ตัวทำละลาย	%การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 50 µg/ml					
		มะเร็งเต้านม (MCF-7)			มะเร็งปอด (COR-L23)		
		N1	N2	Mean ± SEM	N1	N2	Mean ± SEM
Whole blood	DMSO	26.02	22.9	24.46±1.56	36.22	7.46	21.84±14.38
	PBS	4.46	1.86	3.16±1.3	14.86	11.12	12.99 ± 1.87
	1 M HCl	14.6	6.6	10.60±4.0	-2.08	-7.55	-4.82±2.74
Serum	DMSO	20.43	13.02	16.73±3.71	3.31	-13.54	-5.12±8.43
	PBS	2.61	0.93	1.77±0.84	13.19	-9.08	2.06 ± 11.14
	1 M HCl	13.42	3.24	8.33±5.09	-19.86	-8.85	-14.35±5.51
PE	DMSO	18.21	13.42	15.82±2.39	9.99	-7.08	1.45 ± 8.54
	PBS	13.88	11.01	12.45± 1.44	-12.3	-4.29	-8.29± 4.05
	1 M HCl	20.75	27.02	23.89±3.14	-11.54	2.6	-4.47±7.07

ตารางที่ 2 แสดงค่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml ของตัวอย่างเลือดจระเข้ ต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และมะเร็งปากมดลูก (Hela) (n=2)

ตัวอย่าง	ตัวทำละลาย	%การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 50 µg/ml					
		มะเร็งตับ (HepG2)			มะเร็งปากมดลูก (Hela)		
		N1	N2	Mean ± SEM	N1	N2	Mean ±SEM
Whole blood	DMSO	35.95	32.89	34.42±1.53	3.26	-6.43	-1.59±4.85
	PBS	-1.34	10.27	4.46± 5.81	-0.58	-3.90	-2.24±1.66
	1 M HCl	-100	-95.45	-97.73±2.27	2.36	-4.43	-1.04±3.40
Serum	DMSO	36.62	42.98	39.80±3.18	5.40	-3.01	1.20±4.21
	PBS	2.01	-14.8	-6.40±8.40	2.18	0.16	1.17±1.01
	1 M HCl	-15.44	-38.01	-26.73±11.29	2.30	-2.26	0.02±2.28
PE	DMSO	48.85	34.02	41.44±7.42	3.84	-2.31	0.77±3.08
	PBS	-0.57	10.56	5.00±5.56	0.04	2.15	1.10±1.06
	1 M HCl	-71.81	-45.73	-58.77±13.04	2.70	-0.29	1.21±1.50

กราฟที่ 1 เปรียบเทียบค่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml ของตัวอย่างเลือดจระเข้ ต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7), เซลล์มะเร็งปอด (COR-L23), เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และมะเร็งปากมดลูก (Hela) (n=2)



เนื่องจากตัวอย่างเลือดจระเข้สามารถละลายได้ใน PBS ดีที่สุด จึงเลือกนำตัวอย่างที่ละลายด้วย PBS มาทำการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด ตับ ปากมดลูก และเต้านม โดยทดสอบ 4 ความเข้มข้น เพื่อหาค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยังเซลล์ได้ 50% (IC_{50}) ซึ่งผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3-6

ตารางที่ 3 แสดงค่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด (COR-L23) ที่ความเข้มข้น 1, 10, 50 และ 100 µg/ml และค่า IC_{50} (µg/ml) ของตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ละลายด้วย PBS (n=2)

ตัวอย่าง	มะเร็งปอด (COR-L23)				
	%การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (mean ± SD, µg/ml)				IC_{50} (µg/ml)
	1	10	50	100	
Whole blood	28.01±15.05	15.61±6.72	-5.92±2.44	14.17±17.25	>100
Serum	-7.83±23.40	17.92±19.70	-14.36±21.80	16.79±2.35	>100
PE	10.33±18.11	2.84±5.71	9.75±16.74	9.51±11.88	>100

ตารางที่ 4 แสดงค่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ที่ความเข้มข้น 1,10,50 และ 100 µg/ml และค่า IC_{50} (µg/ml) ของตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ละลายด้วย PBS (n=2)

ตัวอย่าง	มะเร็งตับ (HepG2)				
	%การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง(mean ± SD, µg/ml)				IC_{50} (µg/ml)
	1	10	50	100	
Whole blood	0.21±0.06	0.13±0.07	0.11±0.14	0.14±0.01	>100
Serum	0.18±0.02	0.25±0.05	9.85±3.75	14.99±4.94	>100
PE	6.17±12.49	1.46±9.48	4.63±3.86	2.38±4.77	>100

ตารางที่ 5 แสดงค่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Hela) ที่ความเข้มข้น 1,10,50 และ 100 µg/ml และค่า IC_{50} (µg/ml) ของตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ละลายด้วยตัวทำละลาย PBS (n=2)

ตัวอย่าง	มะเร็งปากมดลูก (Hela)				
	%การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง(mean ± SD, µg/ml)				IC_{50}(µg/ml)
	1	10	50	100	
Whole blood	-2.40±1.18	-0.70±0.39	0.30±1.07	-0.52±0.87	>100
Serum	2.01±2.86	2.37±0.12	3.52±0.22	1.71±0.85	>100
PE	-0.90±1.77	-0.54±2.45	0.87±4.86	4.18±5.78	>100

ตารางที่ 6 แสดงค่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ที่ความเข้มข้น 1,10,50 และ 100 µg/ml และค่า IC_{50} (µg/ml) ของตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ละลายด้วยตัวทำละลาย DMSO (n=2)

ตัวอย่าง	มะเร็งเต้านม (MCF-7)				
	%การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (mean ± SD, µg/ml)				IC_{50} (µg/ml)
	1	10	50	100	
Whole blood	5.53±4.86	11.80±5.34	18.69±5.35	35.76±1.97	>100
Serum	12.54±2.64	10.82±0.73	24.34±1.69	51.03±3.25	>100
PE	3.14±4.32	6.26±2.59	11.61±1.78	37.86±1.12	>100

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7), มะเร็งปอด (COR-L23), มะเร็งตับ (HepG2) และมะเร็งปากมดลูก (Hela) โดยทดสอบ ตัวอย่างเลือดจระเข้ในส่วน ของ Whole blood, Serum และ PE ที่ละลายในตัวทำละลาย คือ DMSO, PBS และ 1 M HCl พบว่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7), มะเร็งปอด (COR-L23), มะเร็งตับ (HepG2) และมะเร็งปากมดลูก (Hela) ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml มีความน้อยกว่า 50 หลังจากนั้นนำมาหาค่า IC_{50} พบว่ามีค่ามากกว่า 100 µg/ml แสดงว่าไม่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ในเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7), มะเร็งปอด (COR-L23), มะเร็งตับ (HepG2) และมะเร็งปากมดลูก (Hela) แต่เมื่อนำมาเปรียบเทียบระหว่างเซลล์มะเร็งทั้ง 4 พบว่า เซลล์มะเร็งเต้านม ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml มีแนวโน้มในการยับยั้งเซลล์เพิ่มขึ้น จึงนำมาทำการทดสอบต่อไป

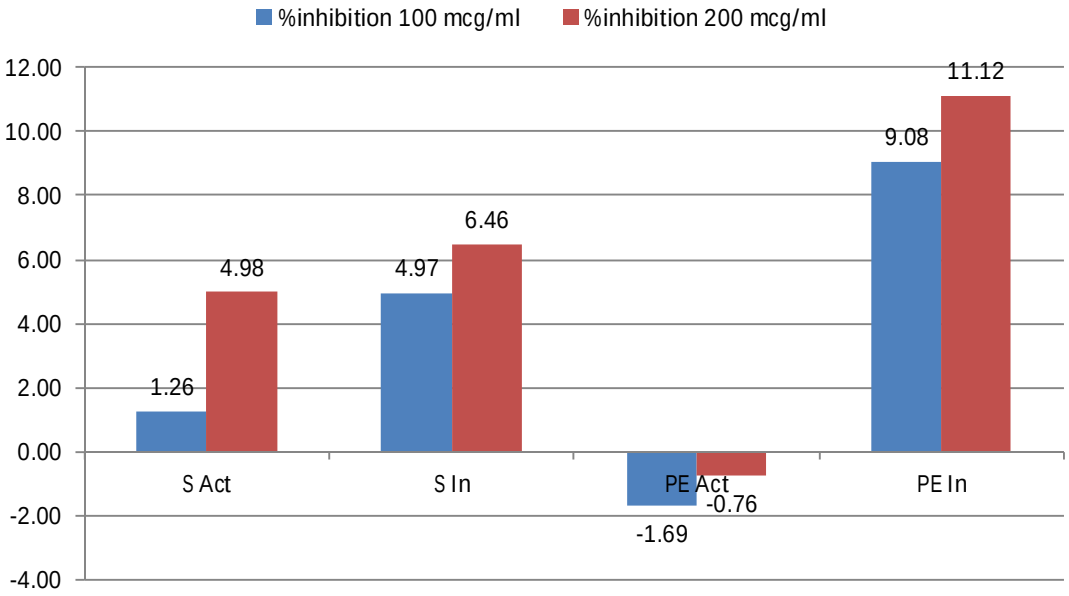
ตารางที่ 7 แสดงค่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 µg/ml ของตัวอย่างเลือดจระเข้ส่วนของ serum ที่ละลายด้วยตัวทำละลาย PBS โดย Activate และ Inactivate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (n=1)

ตัวอย่างเลือดจระเข้	วิธีการเตรียม	MCF-7	
		%inhibition (mean±SD) µg/ml	
		100	200
Serum 1	Activate	6.23	7.47
	Inactivate	3.75	9.19
Serum 2	Activate	-5.25	0.81
	Inactivate	7.21	-0.59
Serum 3	Activate	-1.29	6.95
	Inactivate	-3.80	-1.59
Serum 4	Activate	4.48	7.83
	Inactivate	5.65	4.52
Serum 5	Activate	-7.71	1.39
	Inactivate	-1.69	1.33
Serum 6	Activate	1.05	1.96
	Inactivate	3.59	10.93
Serum 7	Activate	10.51	6.30
	Inactivate	13.01	15.99
Serum 8	Activate	1.56	0.74
	Inactivate	10.79	14.81
Serum 9	Activate	5.03	11.15
	Inactivate	3.17	3.61
Serum 10	Activate	-1.97	5.22
	Inactivate	8.03	6.42

ตารางที่ 7 (ต่อ) แสดงค่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 µg/ml ของตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ละลายด้วยตัวทำละลาย PBS โดย Activate และ Inactivate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (n=1)

ตัวอย่างเลือดจระเข้	**วิธีการเตรียม**	**MCF-7**	
		%inhibition (mean±SD) µg/ml	
		100	**200**
PE 1	Activate	-3.86	-2.89
	Inactivate	9.52	7.78
PE 2	Activate	-4.91	-7.01
	Inactivate	6.09	5.73
PE 3	Activate	-3.35	3.86
	Inactivate	13.58	11.20
PE 4	Activate	1.28	-1.18
	Inactivate	9.59	6.60
PE 6	Activate	-0.56	4.04
	Inactivate	9.03	19.40
PE 9	Activate	-0.54	-1.99
	Inactivate	10.28	13.14
PE 10	Activate	0.13	-0.18
	Inactivate	5.46	13.98

กราฟที่ 2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์ ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 µg/ml ของตัวอย่างเลือดจระเข้ละลายด้วยตัวทำละลาย PBS ต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) โดย Activate และ Inactivate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (n=3)



จากตารางที่ 7 และ กราฟที่ 2 แสดงให้เห็นว่า เมื่อนำตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ละลายด้วยตัวทำละลาย PBS ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่ามีค่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 100 และ 200 µg/ml เพิ่มมากขึ้น เมื่อเทียบกับตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ Activate ดังนั้นแสดงว่า ความอุณหภูมิที่สูงขึ้นในการเตรียมสารละลายเลือดจระเข้ ทำให้เลือดจระเข้มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพิ่มมากขึ้น

ตารางที่ 8 แสดงค่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml ของตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ละลายด้วยตัวทำละลาย DMSO โดย Activate และ Inactivate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (n=1)

ตัวอย่างเลือดจระเข้	**วิธีการเตรียม**	**%การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml**
Serum 3	Activate	-0.54
	Inactivate-1hr	6.57
Serum 4	Activate	-14.44
	Inactivate-1hr	25.45
Serum 9	Activate	-17.92
	Inactivate-1hr	21.91
Serum 10	Activate	16.22
	Inactivate-1hr	6.62
PE3	Activate	16.91
	Inactivate-1hr	11.68
PE4	Activate	1.24
	Inactivate-1hr	2.67
PE9	Activate	-24.17
	Inactivate-1hr	9.47
PE10	Activate	-33.20
	Inactivate-1hr	14.24

ตารางที่ 9 แสดงค่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml ของตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ละลายด้วยตัวทำละลาย 95%EtOH โดย Activate และ Inactivate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (n=1)

ตัวอย่างเลือดจระเข้	**วิธีการเตรียม**	**%การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 50 µg/ml**
Serum 3	Activate	5.57
	Inactivate-1hr	21.47
Serum 4	Activate	5.04
	Inactivate-1hr	-0.25
Serum 9	Activate	6.53
	Inactivate-1hr	9.12
Serum 10	Activate	3.29
	Inactivate-1hr	-7.18
PE3	Activate	5.04
	Inactivate-1hr	-0.29
PE4	Activate	19.11
	Inactivate-1hr	-16.31
PE9	Activate	14.42
	Inactivate-1hr	7.93
PE10	Activate	11.22
	Inactivate-1hr	-4.09

ตารางที่ 10 แสดงค่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml ของตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ละลายด้วยตัวทำละลาย 10%HCl โดย Activate และ Inactivate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (n=1)

ตัวอย่างเลือดจระเข้	**วิธีการเตรียม**	**%การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 50 µg/ml**
Serum 1	Activate	40.15
	Inactivate-1hr	45.32
Serum 2	Activate	93.64
	Inactivate-1hr	35.63
Serum 3	Activate	99.89
	Inactivate-1hr	90.92
Serum 6	Activate	99.71
	Inactivate-1hr	77.80
Serum 9	Activate	99.93
	Inactivate-1hr	89.62
Serum 10	Activate	99.88
	Inactivate-1hr	56.80
PE1	Activate	97.94
	Inactivate-1hr	97.94
PE2	Activate	51.01
	Inactivate-1hr	51.01
PE3	Activate	99.97
	Inactivate-1hr	39.67
PE6	Activate	99.92
	Inactivate-1hr	75.91
PE9	Activate	99.77
	Inactivate-1hr	53.72
PE10	Activate	99.80
	Inactivate-1hr	89.28

ตารางที่ 11 แสดงค่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml ของตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ละลายด้วยตัวทำละลาย 10%$NaHCO_3$ โดย Activate และ Inactivate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (n=1)

ตัวอย่างเลือดจระเข้	วิธีการเตรียม	%การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 50 µg/ml
Serum 1	Activate	-14.44
	Inactivate-1hr	-7.28
Serum 2	Activate	-5.32
	Inactivate-1hr	-7.21
Serum 3	Activate	-3.94
	Inactivate-1hr	-12.15
Serum 6	Activate	-2.25
	Inactivate-1hr	-9.47
Serum 9	Activate	-13.71
	Inactivate-1hr	-3.54
Serum 10	Activate	-13.66
	Inactivate-1hr	-3.74
PE1	Activate	-12.23
	Inactivate-1hr	-8.01
PE2	Activate	-4.24
	Inactivate-1hr	-11.00
PE3	Activate	1.32
	Inactivate-1hr	-10.07
PE6	Activate	-1.44
	Inactivate-1hr	-5.40
PE9	Activate	-11.60
	Inactivate-1hr	-15.22
PE10	Activate	-14.72
	Inactivate-1hr	-7.51

ตารางที่ 12 แสดงค่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml ของตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ละลายด้วยตัวทำละลาย DMSO, 95%EtOH, 10%HCl และ 10%$NaHCO_3$ โดย Activate และ Inactivate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (n=1)

ตัวอย่างเลือดจระเข้	**%การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7)**							
	DMSO		**95%EtOH**		**10%HCl**		**10%NaHCO3**	
	Activate	Inactivate-1hr	Activate	Inactivate-1hr	Activate	Inactivate-1hr	Activate	Inactivate-1hr
Serum 3	-0.54	6.57	5.57	21.47	99.89	90.92	-3.94	-12.15
Serum 4	-14.44	25.45	5.04	-0.25	99.71	77.80	-2.25	-9.47
Serum 9	-17.92	21.91	6.53	9.12	99.93	89.62	-13.71	-3.54
Serum 10	16.22	6.62	3.29	-7.18	99.88	56.80	-13.66	-3.74
PE3	16.91	11.68	5.04	-0.29	99.97	39.67	1.32	-10.07
PE4	1.24	2.67	19.11	-16.31	99.92	75.92	-1.44	-5.40
PE9	-24.17	9.47	14.42	7.93	99.77	99.77	-11.60	-15.22
PE10	-33.20	14.24	11.22	2.64	99.80	99.80	-14.72	-7.51

จากตารางที่ 8-12 แสดงค่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml ของตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ละลายด้วยตัวทำละลาย DMSO, 95%EtOH, 10%HCl และ 10%$NaHCO_3$ โดย activate และ inactivate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ผลการทดลอง พบว่า ตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ละลายด้วยตัวทำละลาย 10%HCl ที่ activate มีค่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml มากกว่าตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ละลายด้วยตัวทำละลายตัวอื่น แต่เมื่อนำไป inactivate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ค่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลดลงเล็กน้อย แสดงว่า เลือดจะเข้ที่ละลายในกรด (10%HCl) มีค่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml ดีที่สุด แสดงว่าเลือดจระเข้อยู่ในภาวะกรดมีฤทธิ์ต้านมะเร็งดีที่สุด ดังนั้นการรับประทานเลือดจระเข้ และให้เลือดจระเข้อยู่ในสภาวะกรด ในกระเพาะอาหารของมนุษย์ก็น่าจะเป็นสิ่งที่ดีเพราะทำให้ฤทธิ์ต้านมะเร็งดีขึ้น

ในทางตรงกันข้าม เมื่อตัวอย่างเลือดจระเข้ละลายด้วยตัวทำละลายที่เป็นเบส (10% $NaHCO_3$) พบว่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml มีค่าติดลบ แสดงว่า เซลล์มะเร็งมีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น กว่าเซลล์มะเร็งที่เป็นเซลล์ควบคุม **(Control)**

ตารางที่ 13 แสดงค่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ที่ความเข้มข้น 1, 10, 50 และ 100 µg/ml และค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ออกฤทธิ์ยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งได้ 50% (IC_{50}) ของตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ละลายด้วยตัวทำละลาย 10%HCl โดย Activate และ Inactivate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (n=1)

ตัวอย่างเลือดจระเข้	**วิธีการเตรียม**	**%การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ที่ความเข้มข้นต่างๆ (µg/ml)**				**IC_{50}**
		1	**10**	**50**	**100**	
Serum 1	Activate	-137.29	-112.31	16.26	85.34	66.25
Serum 4	Activate	-110.82	-82.00	27.89	90.35	62.44
Serum 10	Activate	-155.97	-118.20	25.73	85.96	61.57
Serum 1	Inactivate-1hr	-93.51	-75.08	18.61	86.52	68.40
Serum 4	Inactivate-1hr	-93.51	-82.93	39.46	85.03	54.27
Serum 9	Inactivate-1hr	-144.82	-70.52	83.84	83.10	**33.59**
Serum 10	Inactivate-1hr	-160.05	-114.90	9.34	85.10	73.73
PE1	Activate	-155.16	-131.97	-3.53	86.02	74.48
PE4	Activate	-148.18	-130.92	-0.80	88.99	71.74
PE1	Inactivate-1hr	-143.78	-124.80	21.46	86.64	61.14
PE4	Inactivate-1hr	-156.77	-129.87	84.29	85.41	42.58
PE9	Inactivate-1hr	-128.08	-89.49	45.21	80.33	52.39
PE10	Inactivate-1hr	-146.82	-87.63	10.14	84.29	79.43

ตารางที่ 14 แสดงค่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ที่ความเข้มข้น 1, 10, 50 และ 100 µg/ml และค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ออกฤทธิ์ยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งได้ 50% (IC_{50}) ของตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ (n=2)

ตัวอย่างเลือดจระเข้	**%การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ที่ความเข้มข้นต่างๆ**				**IC_{50} (µg/ml)**
	1 µg/ml	**10 µg/ml**	**50 µg/ml**	**100 µg/ml**	
BC enzyme Water	3.92±4.16	0.74±1.12	2.30±2.89	-3.30±1.00	>100
WB enzyme Water	-3.81±2.20	-3.87±2.62	-3.01±0.79	-3.28±0.89	>100
BC enzyme DMSO	13.25±10.66	3.66±2.44	8.73±3.86	29.58±4.77	>100
WB enzyme DMSO	4.54±2.01	3.41±1.03	10.76±1.47	29.98±4.58	>100

หมายเหตุ : BC = blood cell, WB = Whole blood

(โดย **อาจารย์สิรินดา กุสุมภ์** จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์)

จากตารางที่ 13 พบว่าตัวอย่างเลือดจระเข้ ละลายใน 10%HCl โดยวิธีการ Activate และ Inactivate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม มีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเซลล์ได้ 50% (IC_{50}) อยู่ในช่วงประมาณ 50 -70 µg/ml เมื่อเทียบกับการละลายด้วยตัวทำละลายตัวอื่น เช่น DMSO, PBS และ95%EtOH และตารางที่ 14 **แต่มีเลือดจระเข้ บางตัวมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ซึ่งมีค่า IC_{50} ต่ำกว่า 50** µg/ml ดังนั้นจะต้องศึกษาว่าลักษณะจรเข้อย่างไรจึงให้ค่าที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ดังนั้นการทดสอบในสัตว์จึงมีความแตกต่างกันเนื่องจากปัจจัยต่างๆในตัวสัตว์ เมื่อนำเลือดจระเข้ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ พบว่ามีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเซลล์ได้ 50% (IC_{50}) >100 µg/ml แสดงว่าเลือดจระเข้ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไม่สามารถยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม

ตารางที่ 15 แสดงค่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml ของตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ละลายด้วยตัวทำละลาย DMSO โดย Activate และ Inactivate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (n=1)

ตัวอย่างเลือดจระเข้	**วิธีการเตรียม**	**%การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 50 µg/ml**
Serum 3	Activate	24.97
	Inactivate-1hr	11.97
Serum 4	Activate	11.38
	Inactivate-1hr	12.04
Serum 9	Activate	3.43
	Inactivate-1hr	12.44
Serum 10	Activate	13.45
	Inactivate-1hr	21.52
PE3	Activate	16.44
	Inactivate-1hr	19.90
PE4	Activate	18.09
	Inactivate-1hr	23.22
PE9	Activate	16.36
	Inactivate-1hr	18.84
PE10	Activate	12.79
	Inactivate-1hr	9.98

ตารางที่ 16 แสดงค่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml ของตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ละลายด้วยตัวทำละลาย 95% Ethanol โดย Activate และ Inactivate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (n=1)

ตัวอย่างเลือดจระเข้	**วิธีการเตรียม**	**%การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 50 µg/ml**
Serum 3	Activate	0.03
	Inactivate-1hr	2.90
Serum 4	Activate	0.01
	Inactivate-1hr	-0.10
Serum 9	Activate	0.03
	Inactivate-1hr	1.83
Serum 10	Activate	0.01
	Inactivate-1hr	2.86
PE3	Activate	0.01
	Inactivate-1hr	1.41
PE4	Activate	0.00
	Inactivate-1hr	-0.22
PE9	Activate	-0.02
	Inactivate-1hr	-0.77
PE10	Activate	-0.05
	Inactivate-1hr	-3.14

ตารางที่ 17 แสดงค่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml ของตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ละลายด้วยตัวทำละลาย 10% HCl โดย Activate และ Inactivate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (n=1)

ตัวอย่างเลือดจระเข้	**วิธีการเตรียม**	**%การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 50 µg/ml**
Serum 1	Activate	84.43
	Inactivate-1hr	62.42
Serum 2	Activate	83.92
	Inactivate-1hr	88.97
Serum 3	Activate	77.06
	Inactivate-1hr	50.19
Serum 6	Activate	71.79
	Inactivate-1hr	53.94
Serum 9	Activate	72.02
	Inactivate-1hr	85.59
Serum 10	Activate	75.00
	Inactivate-1hr	76.37
PE1	Activate	84.75
	Inactivate-1hr	38.79
PE2	Activate	83.46
	Inactivate-1hr	20.20
PE3	Activate	67.89
	Inactivate-1hr	88.09
PE6	Activate	75.00
	Inactivate-1hr	50.83
PE9	Activate	32.11
	Inactivate-1hr	78.96
PE10	Activate	68.81
	Inactivate-1hr	58.76

ตารางที่ 18 แสดงค่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml ของตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ละลายด้วยตัวทำละลาย 10% $NaHCO_3$ โดย Activate และ Inactivate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (n=1)

ตัวอย่างเลือดจระเข้	**วิธีการเตรียม**	**%การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 50 µg/ml**
Serum 1	Activate	2.88
	Inactivate-1hr	-0.27
Serum 2	Activate	-7.55
	Inactivate-1hr	-9.53
Serum 3	Activate	21.95
	Inactivate-1hr	-2.83
Serum 6	Activate	-3.51
	Inactivate-1hr	-2.52
Serum 9	Activate	-6.47
	Inactivate-1hr	-3.69
Serum 10	Activate	-3.10
	Inactivate-1hr	-1.18
PE1	Activate	11.89
	Inactivate-1hr	-2.39
PE2	Activate	-1.02
	Inactivate-1hr	-3.03
PE3	Activate	-1.41
	Inactivate-1hr	-4.12
PE6	Activate	-5.02
	Inactivate-1hr	-2.98
PE9	Activate	-3.68
	Inactivate-1hr	1.56
PE10	Activate	-4.15
	Inactivate-1hr	7.00

ตารางที่ 19 แสดงค่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml ของตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ละลายด้วยตัวทำละลาย DMSO, 95%EtOH, 10%HCl และ 10%$NaHCO_3$ โดย Activate และ Inactivate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (n=1)

ตัวอย่างเลือดจระเข้	**%การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2)**							
	DMSO		**95%EtOH**		**10%HCl**		**10%NaHCO3**	
	Activate	Inactivate-1hr	Activate	Inactivate-1hr	Activate	Inactivate-1hr	Activate	Inactivate-1hr
Serum 3	24.97	11.97	0.03	2.90	77.06	50.19	21.95	-2.83
Serum 4	11.38	12.05	0.01	-0.10	71.79	53.94	-3.51	-2.52
Serum 9	3.43	12.44	0.03	1.83	72.02	85.59	-6.47	-3.69
Serum 10	13.45	21.52	0.01	2.86	75.00	76.37	-3.10	-1.18
PE3	16.45	19.90	0.01	1.41	67.89	88.09	-1.41	-4.12
PE4	18.09	23.22	0.00	-0.22	75.00	50.83	-5.02	-2.98
PE9	16.36	18.84	-0.02	-0.77	32.11	78.96	-3.68	1.56
PE10	18.26	9.92	-0.05	-3.14	68.81	68.81	-4.15	7.00

จากตารางที่ 13-19 แสดงค่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml ของตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ละลายด้วยตัวทำละลาย DMSO, 95%EtOH, 10%HCl และ 10%$NaHCO_3$ โดย activate และ inactivate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ผลการทดลอง พบว่า ตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ละลายด้วยตัวทำละลาย 10% HCl ที่ activate มีค่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml มากกว่าตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ละลายด้วยตัวทำละลายตัวอื่น แต่เมื่อนำไป inactivate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ค่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ activate แสดงว่า เลือดจะเข้ที่ละลายในกรด (10%HCl) มีค่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml ดีที่สุด ผลการวิจัยนี้มีความชัดเจนในเรื่องของการใช้ กรดเป็นตัวทำละลายเลือดจระเข้ และมีผลเพิ่มฤทธิ์ให้กับการต้านมะเร็งตับได้ดี

ในทางตรงกันข้าม เมื่อตัวอย่างเลือดจระเข้ละลายด้วยตัวทำละลายที่เป็นเบส (10% $NaHCO_3$) พบว่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml มีค่าติดลบ แสดงว่า เซลล์มะเร็งมีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น กว่าเซลล์มะเร็งที่ควบคุม

ตารางที่ 20 แสดงค่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ที่ความเข้มข้น 1, 10, 50 และ 100 µg/ml และค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ออกฤทธิ์ยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งได้ 50% (IC_{50}) ของตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ละลายด้วยตัวทำละลาย 10%HCl โดย Activate และ Inactivate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (n=1)

ตัวอย่างเลือดจระเข้	**วิธีการเตรียม**	**%การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ที่ความเข้มข้นต่างๆ (µg/ml)**				**IC_{50}**
		1	**10**	**50**	**100**	
Serum 1	Activate	-732.26	-504.84	-8.06	73.12	66.49
Serum 4	Activate	-698.39	-496.06	55.73	59.50	49.11
Serum 10	Activate	-758.96	-560.04	24.73	70.25	53.77
Serum 1	Inactivate-1hr	-681.72	-510.22	-2.15	75.27	59.75
Serum 4	Inactivate-1hr	-674.37	-444.09	61.83	70.97	**47.59**
Serum 9	Inactivate-1hr	-686.92	-411.47	-57.89	63.26	95.82
Serum 10	Inactivate-1hr	-771.51	-494.44	40.86	67.92	52.41
PE1	Activate	-603.05	-488.35	65.41	76.52	48.33
PE4	Activate	-712.54	-463.80	-2.33	66.31	72.81
PE1	Inactivate-1hr	-709.86	-515.59	10.57	75.99	57.35
PE4	Inactivate-1hr	-709.14	-520.79	5.38	69.53	58.36
PE9	Inactivate-1hr	-673.30	-352.69	-25.09	58.78	97.17
PE10	Inactivate-1hr	-681.72	-323.84	-26.16	70.43	95.20

ตารางที่ 21 แสดงค่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ที่ความเข้มข้น 1, 10, 50 และ 100 µg/ml และค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ออกฤทธิ์ยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งได้ 50% (IC_{50}) ของตัวอย่างเลือดจระเข้ถูกย่อยด้วย เอนไซม์ (n=1)

ตัวอย่างเลือดจระเข้	**%การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ที่ความเข้มข้นต่างๆ**				**IC_{50} (µg/ml)**
	1 µg/ml	**10 µg/ml**	**50 µg/ml**	**100 µg/ml**	
BC enzyme Water	1.09±1.26	1.64±1.21	-1.51±0.61	-8.52±4.63	>100
WB enzyme Water	-2.38±2.10	-3.89±1.32	-7.72±1.36	-5.25±0.39	>100
BC enzyme DMSO	7.73±4.70	1.74±0.27	11.72±3.21	43.91±0.50	>100
WB enzyme DMSO	0.16±0.48	1.79±0.73	14.88±0.56	49.86±7.29	>100

หมายเหตุ : BC = blood cell, WB = Whole blood

(โดย อาจารย์สิรินดา กุสุมภ์ จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์)

จากตารางที่ 20 พบว่าตัวอย่างเลือดจระเข้ ละลายใน 10%HCl โดยวิธีการ Activate และInactivate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา1 ชั่วโมง ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ มีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเซลล์ได้ 50% (IC_{50}) อยู่ในช่วงประมาณ 50 -90 µg/ml เมื่อเทียบกับการละลายด้วยตัวทำละลายตัวอื่น เช่น DMSO, PBS และ95%EtOH และตารางที่ 21 เมื่อนำเลือดจระเข้ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ พบว่า มีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเซลล์ได้ 50% (IC_{50}) >100 µg/ml แสดงว่าเลือดจระเข้ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไม่สามารถยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ

<u>สรุปผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง</u>

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7), มะเร็งปอด (COR-L23), มะเร็งตับ (HepG2) และมะเร็งปากมดลูก (Hela) โดยทดสอบ ตัวอย่างเลือดจระเข้ในส่วน ของ Whole blood, Serum และ PE และตัวอย่างเลือดจระเข้ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ ที่ละลายในตัวทำละลาย คือ DMSO, PBS, 1 M HCl, 10%HCl, 10%$NaHCO_3$, 95%EtOH และน้ำ พบว่าตัวอย่างเลือดจระเข้สามารถละลาย PBS ได้ดีที่สุด ส่วนตัวอย่างเลือดที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์สามารถละลายน้ำ และDMSO ได้ดีที่สุด แต่เมื่อนำไปทำสอบฤทธิ์กลับพบว่าตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ละลายด้วย 10%HCl มีฤทธิ์ต้านความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมและตับ ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ละลายด้วยตัวทำละลายตัวอื่น

ค่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7), มะเร็งปอด (COR-L23), มะเร็งตับ (HepG2) และมะเร็งปากมดลูก (Hela) ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml พบว่ามีค่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งน้อยกว่า 50 หลังจากนั้นนำมาหาค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเซลล์ได้ 50% (IC_{50}) พบว่ามีค่ามากกว่า 100 µg/ml แสดงว่าสารสกัดเลือดจระเข้ไม่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ในเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7), มะเร็งปอด (COR-L23), มะเร็งตับ (HepG2) และมะเร็งปากมดลูก (Hela) แต่เมื่อนำมาเปรียบเทียบระหว่างเซลล์มะเร็งทั้ง 4 พบว่าเซลล์มะเร็งเต้านม ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml มีแนวโน้มในการยับยั้งเซลล์เพิ่มขึ้น พบว่าตัวอย่างเลือดจระเข้ ละลายใน 10%HCl โดยวิธีการ Activate และInactivate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม มีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเซลล์ได้ 50% (IC_{50}) อยู่ในช่วง 50 -70 µg/ml และมีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเซลล์ได้ 50% (IC_{50}) ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ อยู่ในช่วง 50 -90 µg/ml เมื่อเทียบกับการละลายด้วยตัวทำละลายตัวอื่น แต่เมื่อนำเลือดจระเข้ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ พบว่า มีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเซลล์ได้ 50% (IC_{50}) >100 µg/ml แสดงว่าเลือดจระเข้ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไม่สามารถยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และตับ (HepG2) ได้

ในทางตรงกันข้าม เมื่อตัวอย่างเลือดจระเข้ละลายด้วยตัวทำละลายที่เป็นเบส (10% $NaHCO_3$) พบว่า % การยับยั้งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml มีค่าติดลบ แสดงว่า เซลล์มะเร็งมีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น กว่าเซลล์มะเร็งที่ถูกควบคุม **(**Control) ดังนั้นในการสกัดสารตัวอย่างเลือดจระเข้ ควรสกัดในสภาวะกรด ดีกว่าสกัดด้วยตัวทำละลายอย่างอื่น

จากการทดลองสรุปได้ว่าเลือดจระเข้ในสภาวะกรดอ่อนเหมือนสภาวะในกระเพาะอาหาร มีฤทธิ์ต้านมะเร็งดีกว่าสภาวะอื่น แต่ในส่วนของเอ็นไซม์ไม่สามารถทำให้ฤทธิ์ดีขึ้น ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่ว่าเลือดจระเข้อยู่ในกระเพาะอาหารอาจเปลี่ยนแปลงสูตรโครงสร้างและออกฤทธิ์ต้านมะเร็งดีขึ้น

๒.การทดสอบฤทธิ์ต้าน HIV-1 protease (Ma *et al.*, 1998)

ตารางที่ 22 แสดงค่า % การยับยั้งHIV-Protease (n=3)

ตัวอย่าง	HIV1-Protease				IC_{50} (µg/ml)
	%การยับยั้ง HIV1-Pro (mean ± SD, µg/ml)				
	1	10	30	100	
Whole blood	-	-	-	ไม่ละลาย หาค่าไม่ได้	>100
Serum	-	-	-	34.1±3.1	>100
PE	-	-	-	16.7±1.5	>100

จากตารางที่ 22 แสดงให้เห็นว่า สารละลายตัวอย่างเลือดจระเข้ ในส่วนของ Whole blood, Serum และ PE โดยที่ค่า IC_{50} มากกว่า 100 µg/ml แสดงว่าไม่มีฤทธิ์ต่อ การยับยั้ง HIV1-Protease

๓.การทดสอบฤทธิ์ต้าน HIV-1 integrase (Tewtrakul *et al.*, 2006)

ตารางที่ 23 แสดงค่า % การยับยั้งHIV-IN (N=3)

ตัวอย่าง	HIV1-IN				IC_{50} (µg/ml)
	%การยับยั้ง HIV1-IN (mean ± SD, µg/ml)				
	1	10	30	100	
Whole blood	-	-	-	ไม่ละลาย หาค่าไม่ได้	>100
Serum	-	-	-	10.1±1.1	>100
PE	-	-	-	27.4±1.9	>100

จากตารางที่ 23 แสดงให้เห็นว่า สารละลายตัวอย่างเลือดจระเข้ ในส่วนของ Whole blood, Serum และ PE โดยที่ค่า IC_{50} มากกว่า 100 µg/ml แสดงว่าไม่มีฤทธิ์การยับยั้ง HIV1-integrase

๔. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ตารางที่ 24 แสดง ค่า % การยับยั้งอนุมูลอิสระ ที่ความเข้มข้น 1, 10, 50 และ 100 µg/ml และค่า EC_{50} (µg/ml) ของตัวอย่างเลือดจระเข้ ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH Free Radical-Scavenging Assay (n=2)

ตัวอย่าง	ตัวทำละลาย	% การยับยั้งอนุมูลอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ				EC_{50} (µg/ml)
		1 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	
Whole blood	Absolute Ethanol	-5.91±1.32	-2.31±0.45	-2.51±1.85	-1.81±1.15	>100
	Water	-10.56±10.30	-11.23±12.66	-8.39±12.94	-2.42±15.20	>100
Serum	Absolute Ethanol	0.29±0.41	3.27±5.18	-0.99±2.23	-0.50±0.98	>100
	Water	0.13±0.52	-2.57±0.23	-2.55±1.15	-4.93±2.89	>100
PE	Absolute Ethanol	-3.83±0.56	-4.47±1.29	-4.94±0.42	-4.84±0.56	>100
	Water	0.49±5.05	-3.10±1.34	-0.35±5.23	-0.13±2.55	>100

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH Free Radical-Scavenging Assay พบว่า ตัวอย่างเลือดจระเข้ในส่วน ของ Whole blood, Serum และ PE ที่ละลายในตัวทำละลาย คือ Absolute Ethanol และ น้ำ พบว่า ค่าความเข้มข้นที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ค่า EC_{50} มากกว่า 100 µg/ml แสดงว่าไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ

๕. ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

ตารางที่ 25 แสดง ค่า % การยับยั้งและการรอดชีวิตของเซลล์ ที่ความเข้มข้น 50,100 µg/ml ของตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ละลายด้วยตัวทำละลาย PBS ต่อฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยการยับยั้ง Nitric Oxide inhibition assay โดยวิธี Griess reagent และ ความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay (n=2)

ตัวอย่าง	% การยับยั้งการต้านการอักเสบ ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml			% การรอดชีวิตของเซลล์ ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml		
	N1	N2	Mean ± SEM	N1	N2	Mean ± SEM
Whole blood	18.36	20.58	19.47±1.11	63.79	74.23	69.01±5.22
Serum	23.16	25.50	24.33±1.17	61.15	62.68	61.19±0.77
PE	21.52	24.91	23.22±1.69	64.81	61.64	63.23±1.59

ตัวอย่าง	% การยับยั้งการต้านการอักเสบ ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml			%การรอดชีวิตของเซลล์ ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml		
	N1	N2	Mean ± SEM	N1	N2	Mean ± SEM
Whole blood	18.71	22.34	20.53±1.82	64.66	60.22	62.44±2.22
Serum	23.86	23.74	23.80±0.06	62.51	57.41	59.96±2.55
PE	17.08	20.00	18.54±1.46	56.63	79.42	68.03±11.39

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยการยับยั้ง Nitric Oxide ของตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ละลายด้วยตัวทำละลาย PBS พบว่า % การยับยั้งการต้านการอักเสบ ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 µg/ml มีค่าน้อยกว่า 50 แสดงว่าไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการต้านการอักเสบ และเมื่อทดสอบ ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ ด้วยวิธี MTT พบว่า %การรอดชีวิตของเซลล์ ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 µg/ml มีค่าน้อยกว่า 70 แสดงว่าตัวอย่างเลือดจระเข้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ตั้งแต่ความเข้มข้นที่ 50 µg/ml

๖. ฤทธิ์ต้านภูมิแพ้

ตารางที่ 26 แสดง ค่า % การยับยั้งฤทธิ์ต้านการก่อภูมิแพ้ โดยวิธีทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการหลั่งของเอนไซม์ β-hexosaminidase ที่ความเข้มข้น1,10, 50,100 µg/ml และ ค่า IC_{50} (µg/ml) ของตัวอย่างเลือดจระเข้

ตัวอย่าง	%Inhibition ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml	%การยับยั้งฤทธิ์ต้านการก่อภูมิแพ้ ที่ความเข้มข้นต่างๆ (µg/ml)				IC_{50} (µg/ml)
		1	1	1	1	
S10 (PBS) (n=1)	-4.74	-72.64	-9.37	3.01	-4.74	>100
PE10 (PBS) (n=1)	1.38	-29.13	-2.10	1.73	1.38	>100
WB10 (PBS) (n=1)	3.03	-67.45	-0.95	4.11	3.03	>100
S10 (DMSO) (n=3)	85.34±1.44	-44.22±9.12	22.01±3.33	64.91±1.31	84.34±1.44	16.56±2.19
PE10 (DMSO) (n=3)	88.15±3.13	-61.50±31.77	23.16±10.21	66.79±6.50	88.15±3.13	17.47±5.50
WB10 (DMSO) (n=3)	83.04±5.37	-18.41±32.12	37.41±16.37	69.59±9.48	83.04±5.37	12.37±3.65
S10 (HCl) (n=3)	94.07±4.23	-8.12±3.85	6.23±9.86	61.08±1.40	94.07±4.23	36.87±4.76
PE10 (HCl) (n=3)	90.52±5.91	-21.71±13.00	10.35±10.83	68.15±7.02	90.52±5.91	29.09±9.40
WB10 (HCl) (n=3)	91.88±3.70	-15.01±7.93	-1.93±1.64	41.74±7.01	91.88±3.70	58.57±5.88

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านการก่อภูมิแพ้ โดยวิธีทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการหลั่งของเอนไซม์ β-hexosaminidase ของตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ละลายด้วยตัวทำละลาย PBS พบว่า % การยับยั้งฤทธิ์ต้านการก่อภูมิแพ้ ที่ความเข้มข้น 1, 10, 50 และ 100 µg/ml มีค่าน้อยกว่า 50 และค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเซลล์ได้ 50% (IC_{50}) >100 µg/ml แสดงว่าไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการต้านการก่อภูมิแพ้ ส่วนตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ละลายด้วยตัวทำละลาย DMSO พบว่า % การยับยั้งฤทธิ์ต้านการก่อภูมิแพ้ ที่ความเข้มข้น 1, 10, 50 และ 100 µg/ml มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่มากขึ้นตามลำดับ ส่วนที่มีฤทธิ์ต้านการก่อภูมิแพ้ที่ดีที่สุด คือ ส่วนของ Plasma (PE) ที่ละลายด้วย DMSO มีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเซลล์ได้ 50% (IC_{50}) เท่ากับ 12.91 µg/ml และเมื่อส่วน Whole blood Serum และPlasma (PE) ละลายด้วย 10%HCl มีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเซลล์ได้ 50% (IC_{50}) อยู่ในช่วง 30 – 50 µg/**ml**

อภิปรายและวิจารณ์ผล

จากการศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 4 ชนิด คือ เต้านม (MCF-7) ปอด (COR-L23) ตับ (HepG2) และปากมดลูก (Hela) โดยวิธี SRB พบว่าเลือดจระเข้ในส่วนของ Whole blood ซีรัม และพลาสมา (PE) ที่ละลายด้วยตัวทำละลายต่างๆ เช่น PBS, DMSO, 95%Ethanol, 10%HCl และ 10%$NaHCO_3$ ไม่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้งสี่ชนิด โดยค่า IC_{50}>100 ไ มโครกรัมต่อมิลลิตร ซึ่งตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ละลายด้วย 10% HCl มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าตัวอย่างเลือดจระเข้ละลายด้วยตัวทำละลายตัวอื่น โดยทดสอบกับเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และ ตับ (HepG2) มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 60-90 µg/ml แสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างเลือดจระเข้ที่ละลายในสภาวะกรดมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพิ่มมากขึ้น ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้าน HIV-1 protease และฤทธิ์ต้าน HIV-1 integrase (HIV-1 IN) ไม่มีฤทธิ์ต้าน HIV-1 protease และ HIV-1 integrase โดยค่า IC_{50} > 100 µg/ml และตัวอย่างเลือดจระเข้ไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH มีค่า EC_{50} >100 µg/ml แสดงว่าสารละลายเลือดจระเข้ไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ส่วนฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการยับยั้ง Nitric Oxide inhibition assay วิธี Griess reagent ตัวอย่างเลือดจระเข้ไม่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ แต่การยับยั้งฤทธิ์ต้านการก่อภูมิแพ้ พบว่าตัวอย่างเลือดจระเข้ส่วนของพลาสมา (PE) ที่ละลายด้วย DMSO มีค่า IC_{50} เท่ากับ 12.91 µg/ml และส่วน Whole blood Serum และPlasma (PE) ละลายด้วย 10%HCl มีค่า IC_{50} อยู่ใน 30 – 50 µg/ml

จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆพบว่า ตัวอย่างเลือดจระเข้มีฤทธิ์ต้านการก่อภูมิแพ้ดีที่สุดและเมื่อตัวอย่างเลือดจระเข้ถูกละลายด้วยตัวทำละลาย คือ 10%HCl ซึ่งเป็นกรด จะพบว่ามีฤทธิ์ต่อการทดสอบเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นในการสกัดเลือดจระเข้ควรอยู่ในภาวะกรด

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ในการสกัดสารเลือดจระเข้ ควรอยู่ในสภาวะที่เป็นกรด ทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ต้านภูมิแพ้ เป็นต้น

บรรณานุกรม (Bibliography)

ชยันต์ พิเชียรสุนทร และวิเชียร จีรวงส์ (2546) คู่มือเภสัชกรรมแผนไทย เล่ม3: เครื่องยาสัตว์วัตถุ. สำนักพิมพ์อมรินทร์, กรุงเทพฯ

วิน เชยชมศรี จินดาวรรณ สิรันทวิเนติ บุญเกื้อ วัชรเสถียร มณี ตันติรุ่งกิจ สุดาวรรณ เชยชมศรี ยศ พงษ์ เต็มศิริพงศ์ และเริงฤทธิ์ สัปปพัน (2546) ประสิทธิภาพของซีรัมจระเข้น้ำจืดพันธุ์ไทยในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด.15 (1) (พิเศษ): S120.

เอกวิทย์ ตรีเนตร จินดาวรรณ สิรันทวิเนติ และวิน เชยชมศรี (2554). รูปแบบโปรตีนชองเลือดจระเข้พันธุ์ไทย. การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49 : สาขาวิทยาศาสตร์, 346-352

Keawpradub, N., Houhton, P. J., Eno-Amooguaye, E. and Burke, P.J. 1997. Activity Of extracts and alkaloids of Thai *Alstonia* species against human lung cancer cell lines. *Planta Med*., 63: 97–101.

Komiyama, N. H., G. Miyazaki, J.Tame and K. Nagai. 1995. Transplanting a unique allosteric effect from crocodile into human hemoglobin. Nature373: 244 – 246.

Perutz, M. F., C. Bauer, G. Gros, F. Leclercq, C. Vandecasserie, A.G. Schnek, G. Braunitzer, A.E. Friday and K. A. Jeysey. 1981. Allosteric regulation of crocodilian hemoglobin. Nature 291: 682 – 684.

Cragg, G.M., Newman, D.J., Weiss, R.B. (1997) Coral reefs, forests, and thermal vents: the worldwide exploration of nature for novel antitumor agents Sem. Oncol. 24: 156-163.

Farnsworth, N.R., Akerele, O., Bingel, A.S., Soejarto, D.D. and Guo. Z. (1985) Medicinal plants in therapy Bull. WHO 63: 965-981.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1988) Free radicals in biology and medicine 2 edn. pp 481, Oxford, Charendon Press

Houghton, P. (1995) The role of plants in traditional medicine and current therapy. The Journal of Alternative and Complementary Medicine 1(3): 131-143.

Itharat A., Houghton P.J., Eno-Amooquaye E., Burke P.J., Sampson J. and Raman A., In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer, *Journal of Ethnopharmacology* 90 (2004), pp. 33–38.

Merchant, M. E., Leger N., Jerkins E., Mills K., Pallansch M.B., Paulman R.L. and Ptak R. (2006) Broad spectrum antimicrobial activity of leukocyte extracts from of the American alligator (Alligator mississippiensis). Vet Immun. Immuno. 110 : 221-228.

Skehan, P., Storeng, R., Scudier., D., Monks, A., Mc Mahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M.R. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. J. Natl. Cancer Inst., 82: 1107-1112.

Siruntawineti, J., Chaeychomsri W., Vajarasathira B., Tuntirungkij M. and Temsiripong Y. (2003) Complement activity of Thai freshwater crocodile (Crocodylus siamensis) serum. In Proceeding of the 29th Congress on Science and Technology of Thailand.20-22 October, 2003. Khon Kaen.

Siruntawineti, J., Chaeychomsri W., Vajarasathira B., Ong-aat T. and Temsiripong Y. (2004a). Efficacy of Siamese crocodile (Crocodylus siamensis) serum on bacterial growth inhibition. In Proceeding of the 17th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group.24–29 May 2004, Darwin Australia.

Subchareon, P. (1998). Handbook of anticancer: Thai traditional medicine : new concept for treated cancer . p-3, Bangkok, Thai Traditional Medicine Institute, Ministry of Public Health.

Tewtrakul, S., Itharat, A.,Ratnasuwan, P. Anti HIV1 protease and HIV1 integrase of Thai traditional plants known as Hua-Khao-Yen J. Ethnopharmacology 2005, 105: 312-315

Wilson, A. P. 1992. Cytotoxicity and viability assays. In: R.I. Freshney, Animal Cell Culture. A Pratical Approach. 2nd ed. IRI Press, Oxford, pp.263-303.