ผลการทดลอง

จากการสกัดผงเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม 100 กรัมด้วยเฮกเซนและเมทธานอล ทำให้ได้สารสกัดหยาบเท่ากับ 38.2 กรัม โดยส่วนสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามนี้ มีองค์ประกอบของสารประกอบโพลี่ฟีนอล สารฟลาโวนอยด์และโปรแอนโธซัยยานิดิน เท่ากับ 235.9, 168.0 และ 9.0 มิลลิกรัมต่อผงมะขามหนึ่งกรัม ตามลำดับ

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

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

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

นอกจากนี้พบว่าน้ำหนักตัวของหนูที่ได้รับไดเอทธิลไนโตรซามีนอย่างเดียว (กลุ่มที่ 1) น้อยกว่ากลุ่มควบคุม(กลุ่มที่ 5) อย่างมีนัยสำคัญ และมีแนวโน้มน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นในหนูที่ได้รับสารสกัดมะขามหลังจากการฉีดไดเอทธิลไนโตรซามีน สำหรับน้ำหนักตับ ไต ม้าม หัวใจ

ปอด ต่อมไธมัสและอัณฑะ การบริโภคน้ำและอาหารและระดับเอนไซม์ ALP ในซีรั่มไม่มีความแตกต่างในระหว่างกลุ่มการทดลอง ดังตารางที่ 8 และ 9 สำหรับระดับเอนไซม์ ALT และ AST ในซีรั่มในหนูที่ได้รับไดเอทธิลไนโตรซามีนอย่างเดียว (กลุ่มที่ 1) สูงกว่ากลุ่มควบคุม(กลุ่มที่ 5) อย่างมีนัยสำคัญ และระดับเอนไซม์ AST ในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามความเข้มข้น 100 และ 500 มก.ต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวหลังจากการฉีดไดเอทธิลไนโตรซามีน (กลุ่มที่ 3 และ 4)ต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับไดเอทธิลไนโตรซามีนอย่างเดียว ดังตารางที่ 9

จากการย้อมชิ้นเนื้อตับด้วย Hematoxylin& Eosin พบว่าเซลล์ตับมีลักษณะปกติ ไม่มีความแตกต่างทางจุลพยาธิวิทยาในระหว่างกลุ่มการทดลอง ดังรูปที่ 8 ส่วนผลการย้อมชิ้นเนื้อตับด้วยวิธี Immunohistochemistry พบว่า ไม่พบ Glutathione *S*-transferase Placental form (GST-P) positive foci ในตับของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดมะขามเข้มข้น 500 มก.ต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว แต่พบ GST-P positive foci ในตับหนูกลุ่มที่ได้รับไดเอทธิลไนโตรซามีนอย่างเดียวและได้รับสารสกัดมะขามหลังจากการฉีดไดเอทธิลไนโตรซามีน รูปที่ 9 แสดง GST-P positive foci ในตับหนูที่ได้รับการฉีดไดเอทธิลไนโตรซามีนอย่างเดียว ที่น่าสนใจคือ จำนวน GST-P positive foci ซึ่งเป็นรอยโรคก่อนการเกิดมะเร็งตับในหนูลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เฉพาะในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามความเข้มข้น 20 มก.ต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว หลังจากการฉีดไดเอทธิลไนโตรซามีน(กลุ่มที่ 2)เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับการฉีดไดเอทธิลไนโตรซามีนอย่างเดียว สำหรับจำนวนและขนาดของ GST-P positive foci ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามความเข้มข้น 100 และ 500 มก.ต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวหลังจากการฉีดไดเอทธิลไนโตรซามีนลดลงเช่นกันแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ดังตารางที่ 10

จากการย้อมเซลล์ตับโดยใช้แอนติเจน 2 ชนิด คือ GST-P และ PCNA (Proliferating cellular nuclear antigen) ด้วยวิธี Double-stain immunohistochemistry ดังรูปที่ 10 สำหรับ PCNA จัดเป็น marker ของการเพิ่มจำนวนเซลล์ พบว่าสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่ความเข้มข้นต่ำยังยับยั้งจำนวน PCNA ในเซลล์ตับทั้งส่วนที่เกิดรอยโรคมะเร็งตับ (ใน GST-P positive foci) และเซลล์ตับบริเวณรอบๆ positive foci ดังตารางที่10 และรูปที่ 11

ในรูปที่ 12 แสดงให้เห็นถึงสารก่อมะเร็งไดเอทธิลไนโตรซามีนมีผลลดระดับกัมมันตภาพของเอนไซม์ Glutathione S- transferaseในตับเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบที่ไม่ได้รับสารก่อมะเร็ง ส่วนหนูที่ได้รับสารก่อมะเร็งร่วมกับสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม มีผลเหนี่ยวนำกัมมันตภาพของเอนไซม์ Glutathione S- transferase ในตับ แต่ไม่มีผลต่อระดับกลูต้าไธโอนในตับเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารก่อมะเร็งไดเอทธิลไนโตรซามีนเพียงอย่างเดียว ดังรูปที่ 13

ตารางที่ 2 แสดงผลของการให้สารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามปริมาณ 2 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวและตับ และการบริโภคน้ำและอาหาร

กลุ่มทดลอง	จำนวนหนู	น้ำหนัก (กรัม)		%น้ำหนักตัวที่เปลี่ยนแปลง	ปริมาณอาหาร(กรัม/ตัว/วัน)	ปริมาณน้ำ (มล./ตัว/วัน)	น้ำหนักตับ	
		เริ่มต้น	สุดท้าย				(กรัม)	(%เทียบกับน.น.ตัว)
น้ำกลั่น	5	277±3	332±14	19.8±3.9	21	36	12.8±1.0	3.9±0.2
สารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม	8	280±7	331±12	18.1±5.0	18	35	12.6±1.0	3.8±0.2

ตารางที่ 3 แสดงผลของการให้สารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเป็นเวลา 14 วันต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว และการบริโภคน้ำและอาหาร

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

ตารางที่ 4 แสดงผลของการให้สารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเข้มข้นเป็นเวลา 14 วันต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักอวัยวะสำคัญต่างๆ

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

ตารางที่ 5 แสดงผลของการให้สารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเข้มข้นเป็นเวลา 14 วันต่อระดับกัมมันตภาพเอนไซม์บางชนิดในซีรั่ม

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

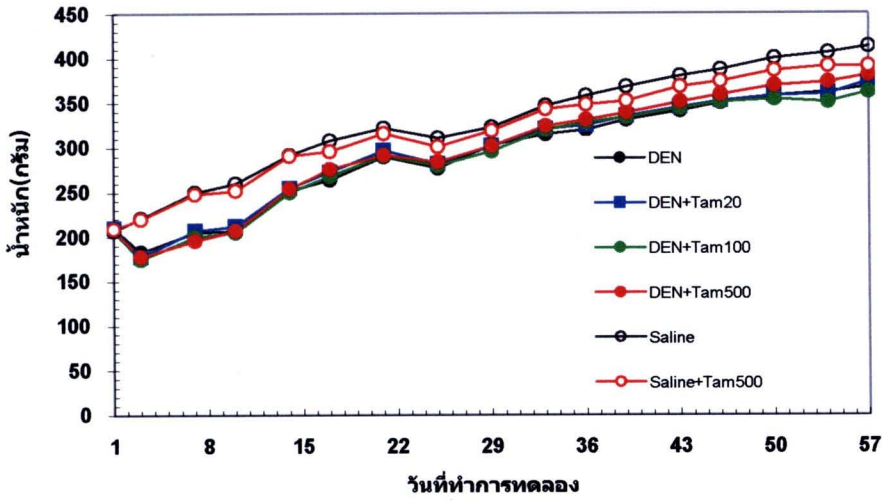
ตารางที่ 6 แสดงผลของการให้สารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเข้มข้นเป็นเวลา 14 วันต่อระดับ Thiobarbituric acid reactive substances และ กลูต้าไธโอน ในตับ

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

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

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

*$p<0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม(น้ำกลั่น)



รูปที่ 7 แสดงการเจริญเติบโตของหนูที่ได้รับสารก่อมะเร็งและป้อนด้วยสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

ตารางที่ 8 แสดงผลของการให้สารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวและน้ำหนักอวัยวะภายในที่สำคัญและการบริโภคน้ำและอาหาร

กลุ่มทดลอง	จำนวนหนู	น้ำหนัก(กรัม)		%น้ำหนักตัวที่เปลี่ยนแปลง	ปริมาณอาหารเฉลี่ย (กรัม/ตัว/วัน)	ปริมาณน้ำเฉลี่ย (มล./ตัว/วัน)	น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ (%เทียบกับน้ำหนักตัว)						
		เริ่มต้น	สุดท้าย				ตับ	ไต	ม้าม	ปอด	หัวใจ	ต่อมไธมัส	อัณฑะ
1. DEN	12	210±10	368±9*	75±7	38±8	41±6	3.0±0.2	0.60±0.07	0.21±0.02	0.53±0.09	0.31±0.02	0.14±0.03	1.1±0.1
2. DEN+สารสกัด 20 mg/kg bw	12	210±11	374±26	76±11	37±9	38±8	3.1±0.2	0.61±0.04	0.23±0.03	0.53±0.06	0.31±0.03	0.16±0.05	1.1±0.1
3. DEN+สารสกัด 100 mg/kg bw	12	207±13	362±29	75±15	38±10	35±9	3.2±0.3	0.60±0.06	0.22±0.03	0.55±0.11	0.32±0.03	0.17±0.04	1.1±0.1
4. DEN+สารสกัด 500 mg/kg bw	12	207±10	381±27	84±6	38±11	35±8	3.3±0.4	0.60±0.08	0.22±0.05	0.48±0.05	0.30±0.04	0.15±0.02	1.0±0.2
5. Saline	12	207±19	413±21	101±20	43±8	38±6	3.4±0.2	0.63±0.02	0.23±0.03	0.53±0.09	0.32±0.02	0.16±0.06	1.0±0.1
6. Saline+สารสกัด 500 mg/kg bw	12	209±11	391±18	87±7	39±9	37±6	3.3±0.3	0.59±0.04	0.23±0.03	0.49±0.05	0.31±0.02	0.16±0.03	1.0±0.1

* $p<0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ saline

ตารางที่ 9 แสดงระดับกัมมันตภาพเอนไซม์ AST, ALT และ ALP ในเลือดหนู

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

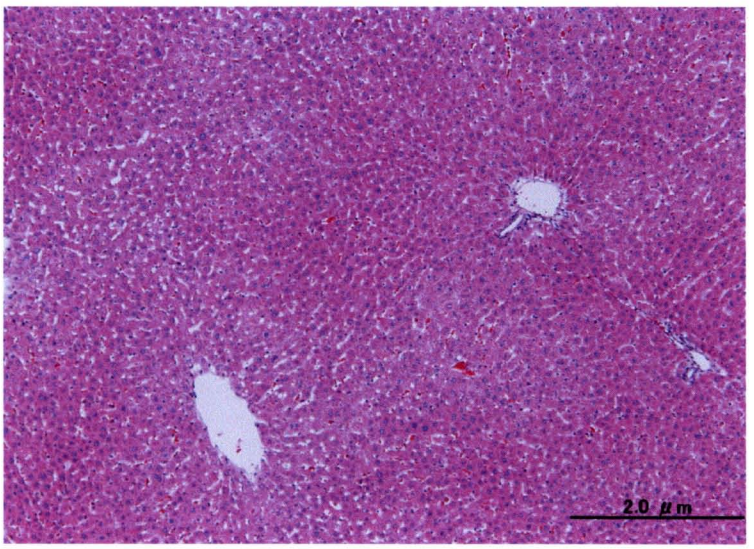
* $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ Saline

** $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ DEN อย่างเดียว

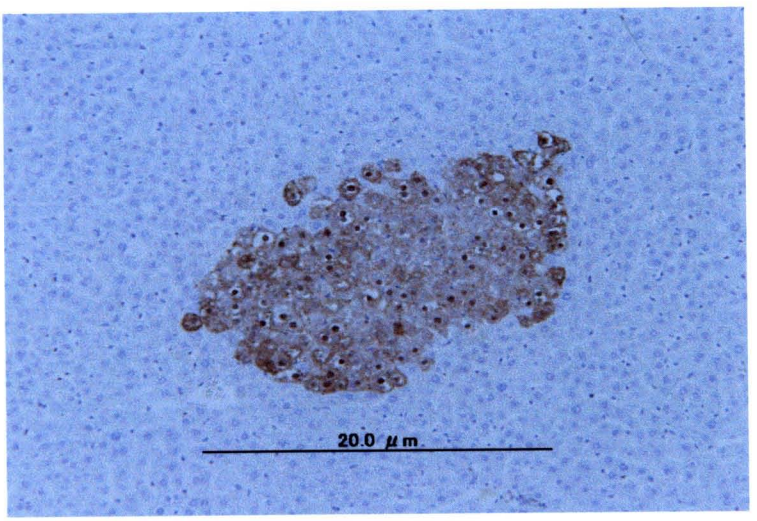
ตารางที่ 10 แสดงจำนวนและขนาดของ Glutathione S-transferase Placental form (GST-P) positive foci ในตับหนู

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

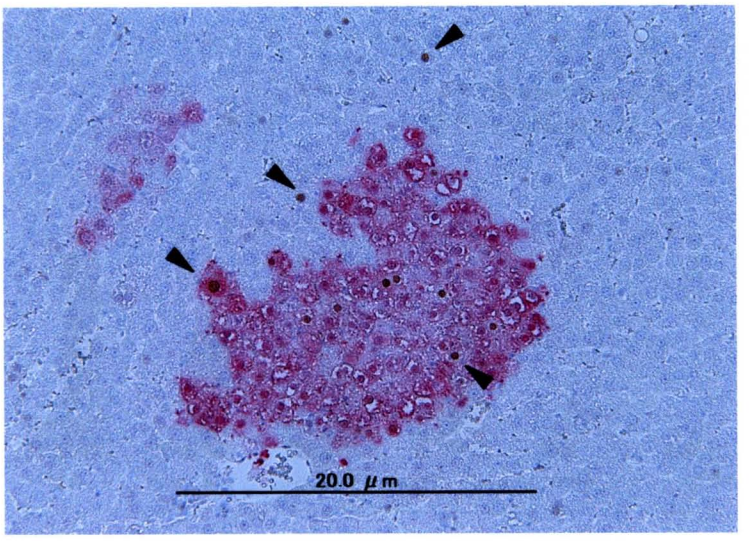
- $p< 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ DEN อย่างเดียว



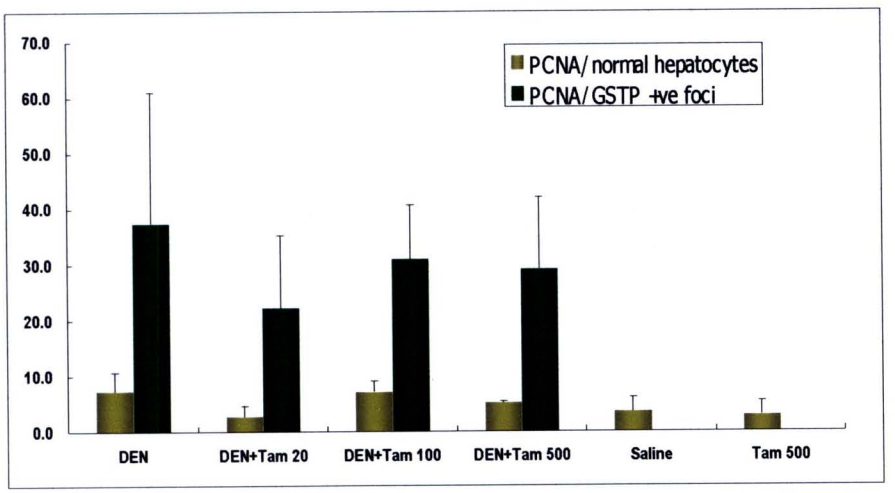
รูปที่ 8 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของตับหนูที่ได้รับไดเอทธิลไนโตรซามีน ความเข้มข้น 200 มก.ต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว (ย้อมด้วย Hematoxylin&Eosin)



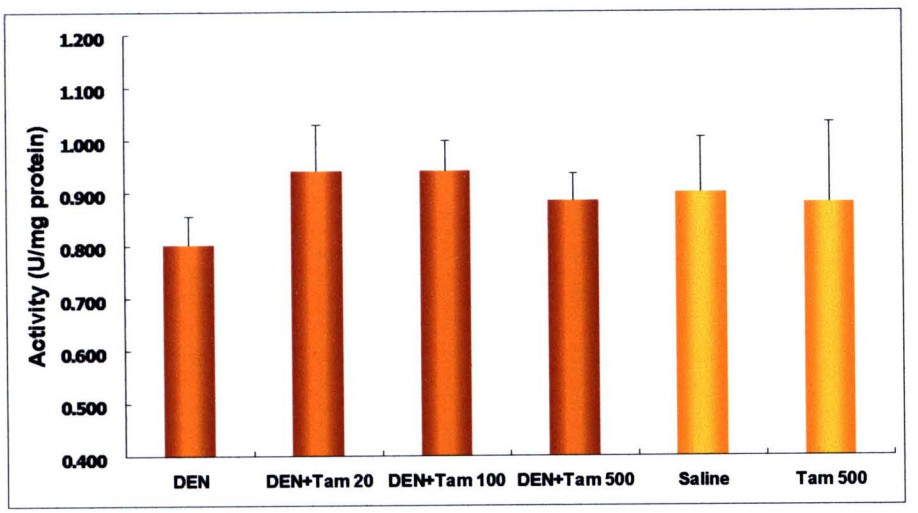
รูปที่ 9 Glutathione S-transferase Placental form positive foci ในตับหนูที่ได้รับไดเอทธิลไนโตรซามีน ความเข้มข้น 200 มก.ต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว



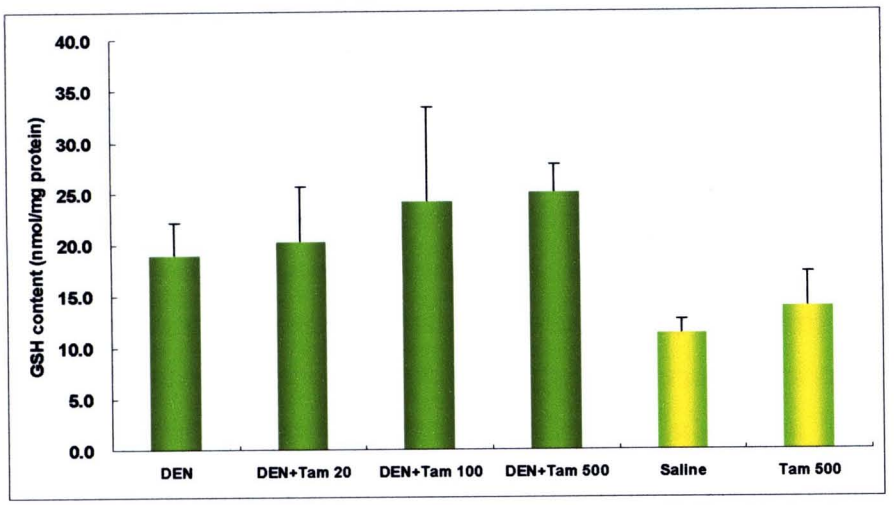
รูปที่ 10 Double-stain immunohistochemistry ระหว่าง GST-P positive foci (ส่วนที่ย้อมติดสีแดง) กับ PCNA (ส่วนที่ย้อมติดสีน้ำตาล) ในตับหนูที่ได้รับไดเอทธิลไนโตรซามีนความเข้มข้น 200 มก.ต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว



รูปที่ 11 แสดงจำนวน PCNA ในกลุ่มเซลล์ตับที่ย้อมติด GST-P และจำนวน PCNA บริเวณรอบ ๆกลุ่มเซลล์ตับที่ย้อมติด GST-Pในหนูขาว



รูปที่ 12 แสดงกัมมันตภาพเอนไซม์ Glutathione S-transferase ในตับหนูขาว



รูปที่ 13 แสดงระดับกลูต้าไธโอนในตับหนูขาว