

<b>Thesis Title</b>	Effect of Curcumin on Phagocytosis, Inflammatory Cells Migration and Histamine Activity
<b>Author</b>	Miss Ratchaneeya Netirat
<b>Degree</b>	Master of Science (Microbiology)
<b>Thesis Advisor</b>	Dr. Volaluck Supajatura

## ABSTRACT

Curcumin, the principal curcuminoid found in *Curcuma longa*, used in traditional medicine. It has been shown to have a wide spectrum of biological actions, including anti-inflammatory activity. In fact there has been shown that neutrophils is the principle circulating phagocyte which is the first and most abundant leukocyte delivers to a site of infection or inflammation, and is thus an integral component of the innate immune system. There is still no evidence of efficacy of curcumin on this inflammatory cell. Moreover curcumin is commonly used as anti-pruritus in relieving itch in allergic reaction, but how its function especially on histamine is not clear. Thus, attention was then directed toward study the effects of curcumin on neutrophils by studying *in vitro* phagocytosis, *in vivo* neutrophil migration and pro-inflammatory cytokines production in controlled trial septic inflammatory conditions and on histamine activity.

To study the effect of curcumin on phagocytosis, the human leucocytes were cultured with *C. albicans*, supplemented with various concentrations of curcumin, and incubated at various times. The percentage of phagocytosis (%Pg) and phagocytic index (PI) were determined. The results were shown that in control human phagocytes, the %Pg was dramatically increased with time and reached a maximum at 30 min-incubation. Not only the number, but also the ability to ingest *C. albicans* of active neutrophils was also increased with time. Whereas in curcumin

supplementation (1-100  $\mu\text{M}$ ), the %Pg and PI were decreased in dose and time dependent manner, significantly at 15, 30 and 60 mins.

To study the effect of curcumin on the inflammatory cells migration and pro-inflammatory cytokines production in the site of infection, the *in vivo* acute septic peritonitis mouse model was done. BALB/c mice were treated with various concentrations of curcumin. Mice were fed with curcumin-mixed drinking water available *ad libitum* for 2 weeks, or intraperitoneal administration of curcumin 5 minutes, before cecal puncture were done. After 4 hrs, the peritoneal fluids were harvested. The number of inflammatory cells migration was evaluated and pro-inflammatory cytokines,  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  were measured by ELISA. The results were shown that, within 4 hrs after inducing acute septic peritonitis, the large number of leucocytes, particularly neutrophils were recruited into peritoneal cavity, together with an increasing of  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  productions. The reciprocal results were observed in the presence of curcumin, similarly in oral (10, 50, 100  $\mu\text{M}/\text{ml}$ ) and intraperitoneal (300  $\mu\text{l}$  of 50, 100, 200  $\mu\text{M}/\text{ml}$ ) curcumin-treated groups. The number of migrated leucocytes and neutrophils were significantly decreased in dose dependent manner. In parallel with the reduction of leucocytes in curcumin-oral treated groups, the level of cytokines  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  were also significantly gradually decline in a dose dependent manner.

The direct activity of histamine on skin blood vessels was shown by vasodilatation and increasing vascular permeability, observed within 15 minutes after histamine intradermally injection at pinna. This reaction was inhibited by curcumin, since mice prior fed with curcumin-mixed drinking water showed no response to histamine. This result suggested that curcumin involved in histamine-induced vasodilatation by inhibiting this phenomena.

Both studies *in vitro* and *in vivo* administration of curcumin indicated that curcumin could inhibit neutrophils recruitment and pro-inflammatory cytokines  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  production. The anti-inflammatory activities appear to mediate through the inhibition of phagocytosis and migration of neutrophils to the site of infection. In fact, inflammation not only harmful to microbes, but also damage to host tissue, especially in expanding inflamed condition. Our finding suggested that in

certain circumstance such as infectious inflammation, treatment with curcumin may have a beneficial in relieving severity of symptoms caused by neutrophils. Corticosteroid and NSAID are drugs commonly prescribed, and have been the major modes of therapy against various chronic conditions, especially in non-infectious inflammations. The clinically used these anti-inflammatory drugs suffer from the disadvantage of side effects and high cost of treatment. Naturally occurring anti-inflammatory substance, such as curcumin in this study, has been increasing considered as safer nutraceutical since no adverse effect or toxicity was observed so far. Concerning the over side effects and high costs of conventional medicines, the changing trends could be the substitution of curcumin for corticosteroid as the anti-inflammatory medicines use in inflammation and allergy, or for NSAIDS use in non-infectious inflammation.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ผลของเคอร์คิวมินต่อกระบวนการฟาโกไซโตซิส การเคลื่อนที่ของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ และฤทธิ์ของฮิสตามีน
ผู้เขียน	นางสาวรัชชานีญา เนติรัตน์
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ดร. วรลักษณ์ สัจจาตุระ

### บทคัดย่อ

เคอร์คิวมิน (curcumin) เป็นสารในกลุ่มเคอร์คิวมินนอยด์ที่พบมากในเหง้าของขมิ้น ขมิ้นเป็นสมุนไพรที่ถูกนำมาใช้ประกอบอาหารมานานแล้ว ในตำรับยาสมุนไพรพบว่า curcumin มีฤทธิ์ทางชีววิทยาหลายอย่าง เช่น ด้านเชื้อจุลชีพ รวมทั้งมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ แม้จะเป็นที่ทราบกันดีว่านิวโทรฟิล (neutrophil) เป็นเม็ดเลือดขาวที่ทำหน้าที่ในการกินสิ่งแปลกปลอม เป็นเซลล์ชนิดแรกที่เคลื่อนที่มายังบริเวณที่มีการติดเชื้อและทำให้เกิดการอักเสบ ซึ่งเป็นกลไกที่สำคัญของการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด แต่จนถึงปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาถึงผลของ curcumin ต่อเซลล์อักเสบนี้ นอกจากนั้นยังพบว่ามีการนำขมิ้นมาใช้ในการรักษาอาการคันที่เกิดจากปฏิกิริยาแพ้ต่างๆ แต่ก็ยังไม่มียารายงานการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าขมิ้นรักษาอาการคันได้อย่างไร โดยเฉพาะมีผลต่อฮิสตามีน (histamine) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดอาการคัน หรือไม่ว่าอย่างไร ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาถึงผลของ curcumin ต่อกระบวนการจับกินเชื้อโรค (phagocytosis) การเคลื่อนที่ของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบและการสร้างไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (pro-inflammatory cytokines) ในบริเวณที่มีการติดเชื้อ และผลต่อฤทธิ์ของ histamine

การศึกษาผลของ curcumin ต่อ phagocytosis พบว่าร้อยละของจำนวนนิวโทรฟิลที่กำลังทำงาน (the percentage of phagocytosis, %Pg) และค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อยีสต์ที่ถูกกินโดยนิวโทรฟิลที่กำลังทำงาน 1 เซลล์ (phagocytic index, PI) ในภาวะปกติมีค่าเพิ่มมากขึ้นตามเวลา และถึงระดับสูงสุดที่เวลา 30 นาที แต่ในภาวะที่มี curcumin อยู่ด้วย พบว่าค่า %Pg และ PI ลดลงและแปร

ผันตามปริมาณ curcumin ที่เพิ่มขึ้น ค่าที่ลดลงมีความแตกต่างจากค่าที่ได้ในภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 15, 30 และ 60 นาที

การศึกษาผลของ curcumin ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์อักเสบและการสร้าง pro-inflammatory cytokines ในบริเวณที่มีการติดเชื้อในช่องท้องของหนู ทำได้โดยวิธีการเจาะลำไส้ (cecal puncture, CP) จากนั้น 4 ชั่วโมงนำน้ำในช่องท้องมานับจำนวนเซลล์และวัดระดับ TNF $\alpha$ , IL-6 และ IL-1 $\beta$  โดยวิธี ELISA พบว่าหนูที่มีการอักเสบติดเชื้อ จะมีจำนวนเม็ดเลือดขาวโดยเฉพาะอย่างยิ่ง neutrophil และปริมาณ cytokines TNF $\alpha$ , IL-6 และ IL-1 $\beta$  ในช่องท้องสูงขึ้นมากกว่าหนูปกติที่ไม่มีการติดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่หนูที่มีการติดเชื้อและได้รับการฉีด curcumin ความเข้มข้น 50, 100, 200  $\mu$ M/ml ปริมาณ 300  $\mu$ l เข้าในช่องท้อง 5 นาทีก่อน CP หรือได้รับ curcumin ความเข้มข้น 10, 50, 100  $\mu$ M/ml ทางน้ำดื่มที่ให้ดื่มตลอดวันเป็นเวลา 2 สัปดาห์ก่อนทำ CP พบว่าจำนวนเม็ดเลือดขาวในช่องท้องลดลง และการลดลงแปรผันตามปริมาณ curcumin ที่ได้รับเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จำนวนเม็ดเลือดขาวโดยเฉพาะ neutrophil ที่เคลื่อนที่เข้ามาในบริเวณที่ติดเชื้อในช่องท้องที่ลดลงนี้แปรผันตามปริมาณ TNF $\alpha$ , IL-6 และ IL-1 $\beta$  ที่ถูกสร้างลดลงในช่องท้องด้วย ซึ่งการลดลงของ TNF $\alpha$ , IL-6 และ IL-1 $\beta$  อาจมีผลต่อการเคลื่อนที่ และการทำงานของ neutrophil โดยตรง

Histamine มีผลโดยตรงต่อหลอดเลือด โดยทำให้หลอดเลือดขยายตัวและสารน้ำซึมผ่านออกนอกหลอดเลือดได้ง่ายทำให้เนื้อเยื่อรอบๆ หลอดเลือดบวม การเปลี่ยนแปลงนี้เห็นได้ชัดภายใน 15 นาทีหลังการฉีด histamine เข้าในผิวหนังที่บริเวณใบหูของหนู พบว่าหนูที่ได้รับ curcumin ทางน้ำดื่มจะไม่ตอบสนองต่อ histamine แสดงว่าฤทธิ์ของ histamine นี้ถูกยับยั้งโดย curcumin

การศึกษาทั้ง *in vitro* และ *in vivo* นี้แสดงให้เห็นชัดว่า curcumin มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยยับยั้งการทำงานและการเคลื่อนที่ของ neutrophil รวมทั้งยับยั้งการสร้าง pro-inflammatory cytokine TNF $\alpha$ , IL-6 และ IL-1 $\beta$  นอกจากนี้ยังต้านฤทธิ์ของ histamine ได้ด้วย โดยทั่วไปไปปฏิบัติการอักเสบที่เกิดขึ้นเป็นกลไกการป้องกันของร่างกายที่ตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม แต่การอักเสบที่มากเกินไปทำให้เกิดผลเสียต่อร่างกายได้ เพราะเกิดการทำลายเนื้อเยื่อในบริเวณรอบๆ ไปด้วยเป็นบริเวณกว้าง Corticosteroid และ NSAIDs เป็นสารสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ดี จึงถูกนำมาใช้เป็นยารักษาการอักเสบอย่างแพร่หลาย แต่ต้องใช้ด้วยความระมัดระวังเพราะยาเหล่านี้มีผลข้างเคียงและมีความเป็นพิษสูง รวมทั้งมีราคาแพง การที่ curcumin มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ด้านฤทธิ์ของ histamine ประกอบกับมีความปลอดภัยสูงเพราะในปัจจุบันยังไม่พบความเป็นพิษ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำ curcumin มาใช้แทนยาในกลุ่ม corticosteroid ในการรักษาการอักเสบและอาการที่เกิดจาก histamine ในโรคมะเร็ง และใช้แทน NSAIDs ในการรักษาการอักเสบที่ไม่ได้เกิด

จากการติดเชื้อ จะเป็นการเพิ่มศักยภาพและมูลค่าของสมุนไพรไทย ลดการนำเข้าของยาที่มีราคาแพง



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved