

ASIAN ARCHIVES OF PATHOLOGY

THE OFFICIAL JOURNAL OF THE ROYAL COLLEGE OF PATHOLOGISTS OF THAILAND



Volume 2
Number 4
October – December 2020

INDEX  COPERNICUS
I N T E R N A T I O N A L

Print ISSN: 1905-9183
Online ISSN: 2673-0499

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

Assistant Professor Dr Chetana Ruangpratheep

MD, FRCPath (Thailand), MSc, PhD

Phramongkutklao College of Medicine, Bangkok, Thailand

Associate Editors

- Associate Professor Dr Mongkol Kunakorn
MD, FRCPath (Thailand)
Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand
- Associate Professor Dr Theerapong Krajaejun
MD, FRCPath (Thailand)
Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand
- Assistant Professor Dr Thirayost Nimmanon
MD, FRCPath (Thailand), MRes, PhD
Phramongkutklao College of Medicine, Bangkok, Thailand
- Assistant Professor Dr Wisarn Worasuwanarak
MD, FRCPath (Thailand)
Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand
- Dr Anirut Worawat
MD, FRCPath (Thailand)
Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand
- Dr Panuwat Chutivongse
MD, FRCPath (Thailand)
Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Editorial Consultant

Professor Dr Vorachai Sirikulchayanonta

MD, FRCPath (Thailand)

Rangsit University, Pathumtani, Thailand

ABOUT THE JOURNAL

Aims and Scope

Asian Archives of Pathology (AAP) is an open access, peer-reviewed journal. The journal was first published in 2002 under the Thai name “วารสารราชวิทยาลัยพยาธิแห่งประเทศไทย” and English name “Journal of the Royal College of Pathologists of Thailand”. The journal is a publication for workers in all disciplines of pathology and forensic medicine. In the first 3 years (volumes), the journal was published every 4 months. Until 2005, the journal has changed its name to be “Asian Archives of Pathology: The Official Journal of the Royal College of Pathologists of Thailand”, published quarterly to expand the collaboration among people in the fields of pathology and forensic medicine in the Asia-Pacific regions and the Western countries.

The full articles of the journal are appeared in either Thai or English. However, the abstracts of all Thai articles are published in both Thai and English languages. The journal features letters to the editor, original articles, review articles, case reports, case illustrations, and technical notes. Diagnostic and research areas covered consist of (1) **Anatomical Pathology** (including cellular pathology, cytopathology, haematopathology, histopathology, immunopathology, and surgical pathology); (2) **Clinical Pathology (Laboratory Medicine)** [including blood banking and transfusion medicine, clinical chemistry (chemical pathology or clinical biochemistry), clinical immunology, clinical microbiology, clinical toxicology, cytogenetics, parasitology, and point-of-care testing]; (3) **Forensic Medicine (Legal Medicine or Medical Jurisprudence)** (including forensic science and forensic pathology); (4) **Molecular Medicine** (including molecular genetics, molecular oncology, and molecular pathology); (5) **Pathobiology**; and (6) **Pathophysiology**.

All issues of our journal have been printed in hard copy since the beginning. Around the late 2014, we developed our website (www.asianarchpath.com) in order to increase our visibility. We would like to acknowledge that our journal has been sponsored by the Royal College of Pathologists of Thailand. We have the policy to disseminate the verified scientific knowledge to the public on a non-profit basis. Hence, we have not charged the authors whose manuscripts have been submitted or accepted for publication in our journal.

On the other hand, if any authors request a printed copy of the journal issue containing the articles, each of the copied journals costs 450 bahts for Thai authors and 30 United States dollars (USD) for international authors.

Publication Frequency

Four issues per year

Disclaimer

The Royal College of Pathologists of Thailand and Editorial Board cannot be held responsible for errors or any consequences arising from the use of information contained in Asian Archives of Pathology. It should also be noted that the views and opinions expressed in this journal do not necessarily reflect those of The Royal College of Pathologists of Thailand and Editorial Board.

MANUSCRIPT REVIEWERS

- **Professor Dr Aileen Wee**
MBBS, FRCPath, FRCPA
National University Hospital, Singapore
- **Professor Dr Eiichi Morii**
MD, PhD
Osaka University Hospital, Osaka, Japan
- **Professor Dr Jasvir Khurana**
MBBS, FCAP

Temple University, Lewis Katz School of Medicine, Pennsylvania, The United States of America

- **Professor Dr Paisit Paueksakon**
MD, FRCPath (Thailand), FCAP
Vanderbilt University School of Medicine, Tennessee, The United States of America
- **Professor Dr Nidhi Chongchitnant**
MD, FRCPath (Thailand)
Bangkok Hospital, Bangkok, Thailand
- **Professor Dr Vorachai Sirikulchayanonta**
MD, FRCPath (Thailand)
Rangsit University, Pathumtani, Thailand
- **Professor Dr Oytip Na-thalang**
PhD
Thammasat University Rangsit Campus, Pathumtani, Thailand
- **Associate Professor Dr Phaibul Punyarit**
MD, FCAP, FRCPath (Thailand)
Bumrungrad International Hospital, Bangkok, Thailand
- **Associate Professor Dr Mongkon Charoenpitakchai**
MD, FRCPath (Thailand)
Phramongkutklao College of Medicine, Bangkok, Thailand

- **Assistant Professor Dr Yingluck Visessiri**
MD, FRCPath (Thailand)
Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand
- **Assistant Professor Dr Pasra Arnutti**
PhD
Phramongkutklao College of Medicine, Bangkok, Thailand
- **Dr Jutatip Kintarak**
MD, FRCPath (Thailand)
Thammasat University Rangsit Campus, Pathumtani, Thailand
- **Dr Kantang Satayasoonorn**
MD, FRCPath (Thailand)
Army Institute of Pathology, Bangkok, Thailand
- **Dr Sivinee Charoenthammaraksa**
MD, FRCPath (Thailand)
Bumrungrad International Hospital, Bangkok, Thailand
- **Dr Sorranart Muangsomboon**
MD, FRCPath (Thailand)

Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

CONTENTS

About the journal	i
Aims and scope	i
Publication frequency	ii
Disclaimer	ii
Manuscript reviewers	iii
Letter to the Editor	1
■ Blood adiponectin and irisin levels in breast cancer patients	1
Napat Petchsrikul	
Original Articles	6
■ Protective effect of angiotensin 2 on cardiomyocytes	6
against simulated ischemic injury	
Piyanch Thitiwuthikiat, Duangduan Siriwittayawan and Teonchit Nuamchit	
■ Cytotoxic effect of lutein extracts from marigold flower	17
in human lens epithelial (HLE) cell line	
Natthawadee Yoisara, Bunyaporn Phongsombun, Sakaoduan Chitnan and Pussadee Paensuwan	
Appendix 1: Information for authors	29
Categories of manuscripts	30
Organisation of manuscripts	32
Proofreading	39
Revised manuscripts	40
Appendix 2: Benefits of publishing with Asian Archives of Pathology	41
Appendix 3: Submission of the manuscripts	42
Appendix 4: Contact the journal	43
Appendix 5: Support the journal	44

LETTER TO THE EDITOR

ระดับโปรตีนอะดิโปเนกทินและไอริซินในเลือด ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม (Blood adiponectin and irisin levels in breast cancer patients)

ณภัทร เพ็ชรศรีกุล

นักเรียนแพทย์ทหารชั้นปีที่ 5 วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า เลขที่ 317 ถนนราชวิถี แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี
กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10400 โทรศัพท์: +66 (0) 91 601 9939 โทรสาร: +66 (0) 2 354 7791
Email: Napat.pet@pcm.ac.th

โปรตีนอะดิโปเนกทิน (Adiponectin) (หรือเรียก ACRP30, GBP28, ADIPOQ, โปรตีนที่สังเคราะห์จากยีน *APM1*) เป็น Adipokine ที่ถูกค้นพบเมื่อปี พ.ศ. 2538 (ค.ศ. 1995)⁽¹⁾ ปัจจุบันได้มีการศึกษาความสัมพันธ์ของโปรตีนอะดิโปเนกทินในโรคต่าง ๆ อย่างแพร่หลาย ได้แก่ โรคเบาหวาน (Diabetes mellitus) โรคไขมันพอกตับที่ไม่ได้เกิดจากการดื่มแอลกอฮอล์ (Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคอ้วน และมะเร็ง⁽²⁾ นอกจากนี้โปรตีนอะดิโปเนกทินยังมีบทบาทในการควบคุมสมดุลพลังงาน การอักเสบ การเพิ่มจำนวนเซลล์ การตอบสนองของหลอดเลือด และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเนื้อเยื่อ⁽³⁾ อีกทั้งโปรตีนอะดิโปเนกทินมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งหลายชนิดอีกด้วย⁽⁴⁻⁸⁾ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเต้านมในผู้ป่วยโรคอ้วน⁽⁹⁻¹¹⁾ ซึ่งจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนอะดิโปเนกทินกับมะเร็งเต้านมที่โรงพยาบาล Northwestern Memorial ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าสตรีที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนอะดิโปเนกทินจะมีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งเต้านมเพิ่มขึ้น⁽¹²⁾

โปรตีนอะดิโปเนกทินสามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ (Biomarker) สำหรับการตรวจคัดกรองมะเร็งเต้านมได้ โดยมีรายงานว่าระดับโปรตีนอะดิโปเนกทินในซีรัมของกลุ่มคนไข้มะเร็งเต้านมจะต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) อย่างไรก็ตามระดับของโปรตีนอะดิโปเนกทินในซีรัมมีความสัมพันธ์กับมะเร็งเต้านมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะในกลุ่มประชากรชาวเอเชียเท่านั้น ($p < 0.001$) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าวในกลุ่มประชากรคอเคซอยด์ ($p = 0.12$) และหากพิจารณาในกลุ่มประชากรชาวเอเชียก็พบว่า กลุ่มควบคุมมีระดับโปรตีนอะดิโปเนกทินในซีรัมสูงกว่าผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ทั้งในกลุ่มสตรีวัยก่อนหมดประจำเดือน ($p = 0.010$) และสตรีวัยหลังหมดประจำเดือน ($p = 0.030$) อนึ่งโปรตีนอะดิโปเนกทินมีความเกี่ยวข้องกับมะเร็งเต้านมชนิด Ductal มากกว่าชนิด Lobular^(13,14)

ในอีกทางหนึ่งพบว่าเฉพาะระดับของโปรตีนอะดิโปเนกทินที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (High molecular weight adiponectin) หรืออัตราส่วนระหว่างระดับของโปรตีนอะดิโปเนกทินที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกับระดับ

ของโปรตีนอะดิพอเนกทินทั้งหมด (High molecular weight adiponectin to total adiponectin ratio) ในซีรัมเท่านั้นที่มีความสัมพันธ์กับมะเร็งเต้านม^(15,16) มิใช่ระดับของโปรตีนอะดิพอเนกทินทั้งหมด (Total adiponectin) ในซีรัม ดังนั้นหากนำการตรวจวัดระดับโปรตีนอะดิพอเนกทินในซีรัมมาใช้เพื่อเป็นวิธีใหม่สำหรับการตรวจคัดกรองมะเร็งเต้านม จะต้องตรวจวัดทั้งระดับของโปรตีนอะดิพอเนกทินที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง และระดับของโปรตีนอะดิพอเนกทินทั้งหมดที่อยู่ในซีรัม

สำหรับโปรตีนไอริซิน (Irisin) เป็น Myokines ที่ได้รับการค้นพบเมื่อปี พ.ศ. 2555 (ค.ศ. 2012) ซึ่งโปรตีนนี้มีความสัมพันธ์กับโรคเบาหวาน โรคอ้วน โรคเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ โรคไตเรื้อรัง และมะเร็งชนิดต่าง ๆ⁽¹⁷⁻²⁷⁾ โดยโปรตีนไอริซินมีบทบาทยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมได้⁽²⁸⁾ เมื่อนำการตรวจวัดระดับโปรตีนไอริซินในซีรัมมาใช้แยกระหว่างกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเต้านมกับสตรีที่มีสุขภาพดี พบว่าค่าจุดตัดที่ใช้จำแนก (Cut-off point) คือ 3.21 µg/mL ค่าความไว (Sensitivity) คือร้อยละ 62.7 และค่าความจำเพาะ (Specificity) คือร้อยละ 91.1⁽²⁴⁾ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำการตรวจวัดระดับโปรตีนไอริซินและโปรตีนอะดิพอเนกทินในซีรัมมาใช้ร่วมกัน เพื่อการตรวจคัดกรองมะเร็งเต้านมได้อย่างมีประสิทธิภาพกว่าการตรวจเต้านมด้วยรังสีเอ็กซ (Mammogram) เพียงอย่างเดียว

เอกสารอ้างอิง

- (1). Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem.* 1995;270(45):26746-9.
- (2). Berg AH, Combs TP, Scherer PE. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2002;13(2):84-9.
- (3). Ryo M, Nakamura T, Kihara S, Kumada M, Shibazaki S, Takahashi M, et al. Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. *Circ J.* 2004;68(11):975-81.
- (4). Chen W, Martindale JL, Holbrook NJ, Liu Y. Tumor promoter arsenite activates extracellular signal-regulated kinase through a signaling pathway mediated by epidermal growth factor receptor and Shc. *Mol Cell Biol.* 1998;18(9):5178-88.
- (5). Luo Z, Saha AK, Xiang X, Ruderman NB. AMPK, the metabolic syndrome and cancer. *Trends Pharmacol Sci.* 2005;26(2):69-76.
- (6). Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, et al. Adipocyte-derived serum protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB-binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell. *Circulation.* 2002;105(24):2893-8.
- (7). Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, et al. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood.* 2000;96(5):1723-32.
- (8). Wang Y, Lam KS, Xu JY, Lu G, Xu LY, Cooper GJ, et al. Adiponectin inhibits cell proliferation by interacting with several growth factors in an oligomerization-dependent manner. *J Biol Chem.* 2005;280(18):18341-7.

- (9). Dieudonne MN, Bussiere M, Dos Santos E, Leneuve MC, Giudicelli Y, Pecquery R. Adiponectin mediates antiproliferative and apoptotic responses in human MCF7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;345(1):271-9.
- (10). Wang Y, Lam JB, Lam KS, Liu J, Lam MC, Hoo RL, et al. Adiponectin modulates the glycogen synthase kinase-3 β /beta-catenin signaling pathway and attenuates mammary tumorigenesis of MDA-MB-231 cells in nude mice. *Cancer Res*. 2006;66(23):11462-70.
- (11). Nakayama S, Miyoshi Y, Ishihara H, Noguchi S. Growth-inhibitory effect of adiponectin via adiponectin receptor 1 on human breast cancer cells through inhibition of S-phase entry without inducing apoptosis. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;112(3):405-10.
- (12). Kaklamani V, Yi N, Sadim M, Siziopikou K, Zhang K, Xu Y, et al. The role of the fat mass and obesity associated gene (FTO) in breast cancer risk. *BMC Med Genet*. 2011;12:52.
- (13). Gu L, Cao C, Fu J, Li Q, Li DH, Chen MY. Serum adiponectin in breast cancer: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(29):e11433.
- (14). Yu Z, Tang S, Ma H, Duan H, Zeng Y. Association of serum adiponectin with breast cancer: A meta-analysis of 27 case-control studies. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(6):e14359.
- (15). Guo MM, Duan XN, Cui SD, Tian FG, Cao XC, Geng CZ, et al. Circulating High-Molecular-Weight (HMW) Adiponectin Level Is Related with Breast Cancer Risk Better than Total Adiponectin: A Case-Control Study. *PLoS One*. 2015;10(6):e0129246.
- (16). Korner A, Pazaitou-Panayiotou K, Kelesidis T, Kelesidis I, Williams CJ, Kaprara A, et al. Total and high-molecular-weight adiponectin in breast cancer: in vitro and in vivo studies. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(3):1041-8.
- (17). Tentolouris A, Eleftheriadou I, Tsilingiris D, Anastasiou IA, Kosta OA, Mourouzis I, et al. Serum Irisin Levels in Subjects with Type 1 Diabetes: Comparison with Healthy Controls. *Horm Metab Res*. 2018;50(11):803-10.
- (18). Du XL, Jiang WX, Lv ZT. Lower Circulating Irisin Level in Patients with Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Horm Metab Res*. 2016;48(10):644-52.
- (19). Shoukry A, Shalaby SM, El-Arabi Bdeer S, Mahmoud AA, Mousa MM, Khalifa A. Circulating serum irisin levels in obesity and type 2 diabetes mellitus. *IUBMB Life*. 2016;68(7):544-56.
- (20). Rodriguez-Carmona A, Perez Fontan M, Sangiao Alvarellos S, Garcia Falcon T, Pena Bello ML, Lopez Muniz A, et al. Serum levels of the adipomyokine irisin in patients with chronic kidney disease. *Nefrologia*. 2016;36(5):496-502.
- (21). Kuloglu T, Celik O, Aydin S, Hanifi Ozercan I, Acet M, Aydin Y, et al. Irisin immunostaining characteristics of breast and ovarian cancer cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2016;62(8):40-4.
- (22). Altay DU, Keha EE, Karaguzel E, Mentese A, Yaman SO, Alver A. The Diagnostic Value of FNDC5/Irisin in Renal Cell Cancer. *Int Braz J Urol*. 2018;44(4):734-9.

- (23). Ugur K, Aydin S, Kuloglu T, Artas G, Kocdor MA, Sahin I, et al. Comparison of irisin hormone expression between thyroid cancer tissues and oncocytic variant cells. *Cancer Manag Res.* 2019;11:2595-603.
- (24). Provatopoulou X, Georgiou GP, Kalogera E, Kalles V, Matiatou MA, Papapanagiotou I, et al. Serum irisin levels are lower in patients with breast cancer: association with disease diagnosis and tumor characteristics. *BMC Cancer.* 2015;15:898.
- (25). Gunaydin M, Ozer V, Kalkan A, Ozer S, Sahin A, Sahin M, et al. The diagnostic value of the serum irisin level in patients with acute pericarditis and acute myopericarditis. *Bratisl Lek Listy.* 2018;119(10):655-9.
- (26). Sarac F, Buyukbese Sarsu S, Yeniocak S, Sahin K, Yucetas E, Yildirim D, et al. The Diagnostic Value of Irisin in Pediatric Patients with Acute Abdominal Pain. *Emerg Med Int.* 2018;2018:3296535.
- (27). Yeniocak S, Karcioğlu O, Kalkan A, Sarac F, Akgul Karadana G, Keklikkiran ZZ, et al. The diagnostic value of irisin in patients with acute abdominal pain: A preliminary study. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2018;24(6):539-44.
- (28). Gannon NP, Vaughan RA, Garcia-Smith R, Bisoffi M, Trujillo KA. Effects of the exercise-inducible myokine irisin on malignant and non-malignant breast epithelial cell behavior in vitro. *Int J Cancer.* 2015;136(4):E197-202.

ORIGINAL ARTICLE

Protective effect of angiotensin 2 on cardiomyocytes against simulated ischaemic injury

Piyanuch Thitiwuthikiat, Duangduan Siriwittayawan
and Teonchit Nuamchit*

*Department of Cardiothoracic Technology, Faculty of Allied Health Sciences,
Naresuan University, Phitsanulok, Thailand*

* Correspondence to: Assistant Professor Dr Teonchit Nuamchit PhD, Department of Cardiothoracic Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University, 99 Moo 9 Phitsanulok-Nakhonsawan Road, Tha-pho, Muang, Phitsanulok 65000 Thailand. Telephone: +66 (0) 87 564 4224, +66 (0) 55 966 286 Fax: +66 (0) 55 966 234 Email: teonchitn@nu.ac.th

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

Abstract

Angiopoietin 1 (Angpt1) and Angiopoietin 2 (Angpt2) are vascular growth factors that play important roles in vascular angiogenesis and adult vasculature maintenance. Previous studies reported that Angpt1 reduced the size of myocardial infarction in *in vivo* myocardial infarction experiment in rats, while Angpt2 protein levels increased in myocardial infarction areas. However, it is not clear whether the role of Angpt1 and Angpt2 protect ischemic cardiomyocyte. This research aimed to examine the effects of Angpt1 and Angpt2 on survival of cardiac myoblast cells (H9c2) after ischemic simulation. Initially, H9c2 cells were cultured and pretreated with Angpt1 and Angpt2 at the concentrations of 400, 600 and 800 ng/mL. After the pretreatment, the cells were exposed to simulated ischaemic solution for 90 minutes. Angiopoietin toxicity and cell viability analysis were performed. The results showed that pretreatment with Angpt2 at the concentration of 800 ng/mL significantly increased the cell viability compared to that of the stimulated ischaemic group ($p < 0.050$). However, there was no significant different in the cell viability between Angpt1 pretreatment and the control group. In summary, pretreatment with Angpt2 works as a cardioprotective molecule in the context of cardiomyocyte ischaemia.

Keywords: angiopoietins; cardioprotective molecule; myocardial ischaemia

Introduction

Ischaemic heart disease is one of a leading cause of death globally. Treatment of myocardial ischaemia is a restoration of myocardial blood flow to the heart muscle or reperfusion. Myocardial reperfusion techniques including percutaneous coronary intervention and antiplatelet and antithrombotic agents has been intensively developed to restoration of myocardial blood flow. However, the protection of myocardial injury after ischaemia is still required. From previous studies, it has been reported that angiotensin-Tie system plays an important role in vascular angiogenesis, vascular quiescence, and vascular survival. Angiotensin (Angpt) is a ligand of Tie receptor and consists of four subtypes; Angpt1, Angpt2, Angpt3, and Angpt4. Angpt1 is well elucidated as a vascular protective molecule for vascular stability^(1,2). Unlike Angpt1, Angpt2 is more versatile and dynamic functions as a vessel-destabilizing molecule⁽³⁾. However, the role of the angiotensin-Tie receptor system in cardiovascular disease is not well known, especially in myocardial damage. Some studies reported that Angpt1 and Angpt2 are involved in pathophysiology of cardiovascular diseases⁽⁴⁾. Previous studies showed that plasma Angpt2, but not Angpt1, levels were higher in patients with ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI)⁽⁵⁻⁷⁾. In addition, research data demonstrated that excessive Angpt2 overexpression exacerbated myocardial fibrosis^(8,9). However, Dallabrida et al. reported that Angpt2 also stimulated myocardial survival but is less efficiency than Angpt1⁽¹⁰⁾. Thus, the effects of angiotensin system and its mechanism is not well understood. Cardiac myocyte apoptosis and necrotic myocyte cell death are the results of myocardial ischaemia caused by imbalance of myocardial oxygen supply and demand. Recent study reported myocardial ischaemia-reperfusion induces disbalance of angiotensins. Angpt1 was likely to protect myocardial ischaemia, while Angpt2 had mysterious effect on cardiac myocytes but the mechanism is still unclear.

There are currently limited data about the effects of angiotensin and its mechanism on cardiomyocyte survival during ischaemia. The signaling pathways responsible for this phenomenon is needed to be explored. Therefore, this study aimed to examine the effects of Angpt1 and Angpt2 on rat embryonic ventricular myocardial cell line (H9c2) during myocardial ischaemia. The experiments are performed to test the hypothesis that Angpt1 would reduce myocardial damage after ischaemia as well as Angpt2 would aggravate or protect cardiomyocyte subjected to simulated ischaemia.

This research will help to understand the roles of Angpt1 and Angpt2 in myocardial ischaemia and extend the knowledge in development of selective angiotensin inhibitor for blocking its interaction with their receptor.

Materials and Methods

Chemical and reagents:

Recombinant human angiopoietin-1 protein and recombinant human angiopoietin-2 protein were purchased from R&D system company (Minneapolis, USA). A 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was purchased from Sigma-Aldrich (Missouri, USA).

Cell culture:

The rat embryonic ventricular myocardial cell line or H9c2 (ATCC number CRL-1446) were cultured in complete medium; Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 1500 mg/L of NaHCO₂ supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin-streptomycin. Cells were incubated with 5% CO₂ at 37 °C. Cells were subcultured for subsequent experiments when 80% confluence was reached. For cell toxicity analysis, cells were cultured and divided into 24-well plates at density of 50,000 cells/cm². After 1 hour of serum deprivation, cells were ready for further experiments.

Experiment protocol:

H9c2 cells at density of 50,000 cells/cm² in 24-well plates were treated with various concentrations (400, 600 and 800 ng/mL) of Angpt1 and Angpt2 for 1 hour before simulated ischemia. Simulated ischaemia was induced by incubating the cells with a simulated ischaemic solution containing 140 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 5mM HEPES, 10mM 2-deoxy-d-glucose, and 10 mM sodium dithionite⁽¹¹⁾. Cells cultured in complete medium was used as a control group. Cells were exposed to simulated ischaemic solution at 37 °C in an atmosphere with 5% CO₂ for 90 minutes.

Cell viability assay:

In order to determine cell viability of cardiomyocyte with simulated ischaemic condition, MTT assay was performed. After 90 minutes of simulated ischaemia, the solution was removed and cells were washed once with phosphate buffer saline (PBS). MTT solution at the concentration of 0.5 mg/ml was added and incubated at 37 °C for 2 hours. After that, the supernatant was gently removed and dimethyl sulfoxide was used to solubilise the purple formazan crystals. The absorbance of the samples was measured using a microplate reader at the wavelength of 570 nm.

Statistical analysis:

Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). All comparisons were analysed using analysis of variance (one-way ANOVA) followed by the Turkey-Post hoc test. The statistical tests were performed using GraphPad Prism version 5 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). The *p*-value less than 0.050 was considered statistically significant.

Results

Effect of angiopoietins on cell viability:

Cells were treated with three concentrations of Angpt1 and Angpt2 (400, 800 and 1,200 ng/mL) for 1 hour before measuring cell viability using MTT assay. The result showed that there was no significant difference between the number of cells treated with Angpt1 and Angpt2 at every concentrations and that of the control group (*Figure 1*). Therefore, these nontoxic concentrations of Angpt1 and Angpt2 were chosen to use in the subsequent experiment.

Effect of the simulated ischaemia in different durations on cell viability:

H9c2 cells were subjected to simulated ischaemia with ischaemic solution. Cells were incubated with the ischaemic solution at various durations including 0, 30, 60, 90 and 120 minutes, and MTT assay was performed. *Figure 2* shows that the number of cells treated at every duration were significantly lower than that of the control group. In addition, the number of cells treated at 90 and 120 minutes were significantly lower than those of the 30 and 60 minutes of simulated ischaemia. Therefore, the optimal simulated ischaemia duration of 90 minutes was selected for the subsequent experiment.

Effect of angiopoietins on H9c2 cell viability after simulated ischaemia:

H9C2 cells were pretreated with different concentrations (400, 600 and 800 ng/ml) of Angpt1 and Angpt2 for 1 hour. After 90 minutes of simulated ischaemia, MTT assay was performed. *Figure 3* shows that the number of cells pretreated with 800 ng/mL of Angpt2 was significantly higher than that of the simulated ischaemic (si) group, approximately a 20% increase. In addition, at 800 ng/mL of Angpt2 pretreatment, the cell viability was significantly higher than those of the Angpt1 groups.

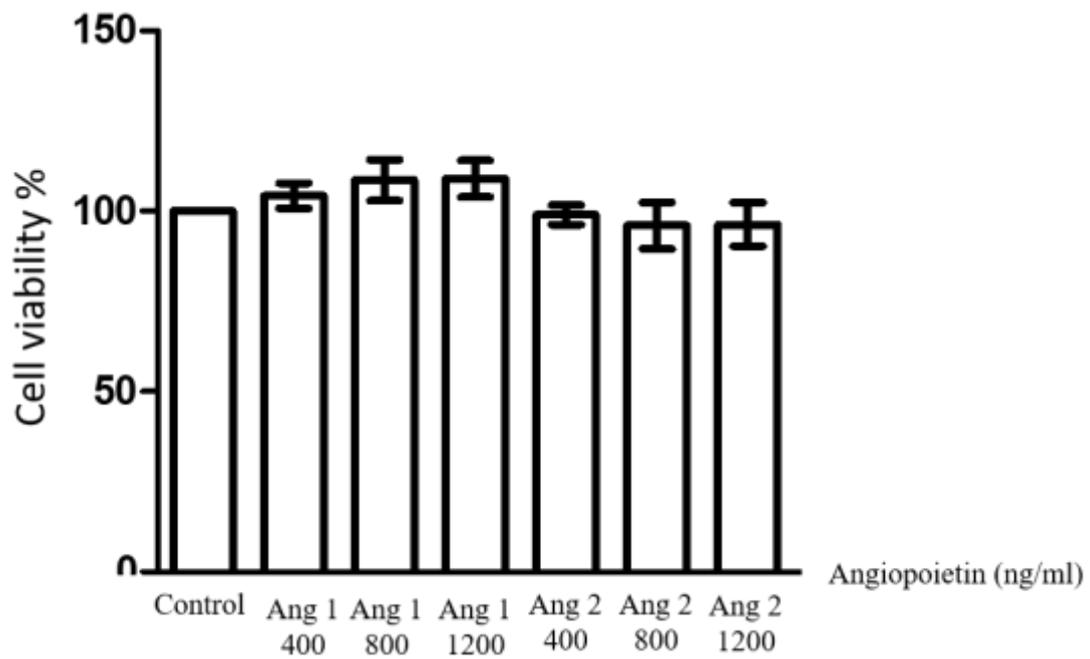


Figure 1 Determination of H9c2 cell viability after treatment with different concentrations of Angpt1 and Angp2 (400, 800 and 1,200 ng/mL). The results are expressed as mean \pm standard error. Three experiments with independent cell preparations were performed.

Note: Angpt1 = Angiopoietin1; and Angpt2 = Angiopoietin2

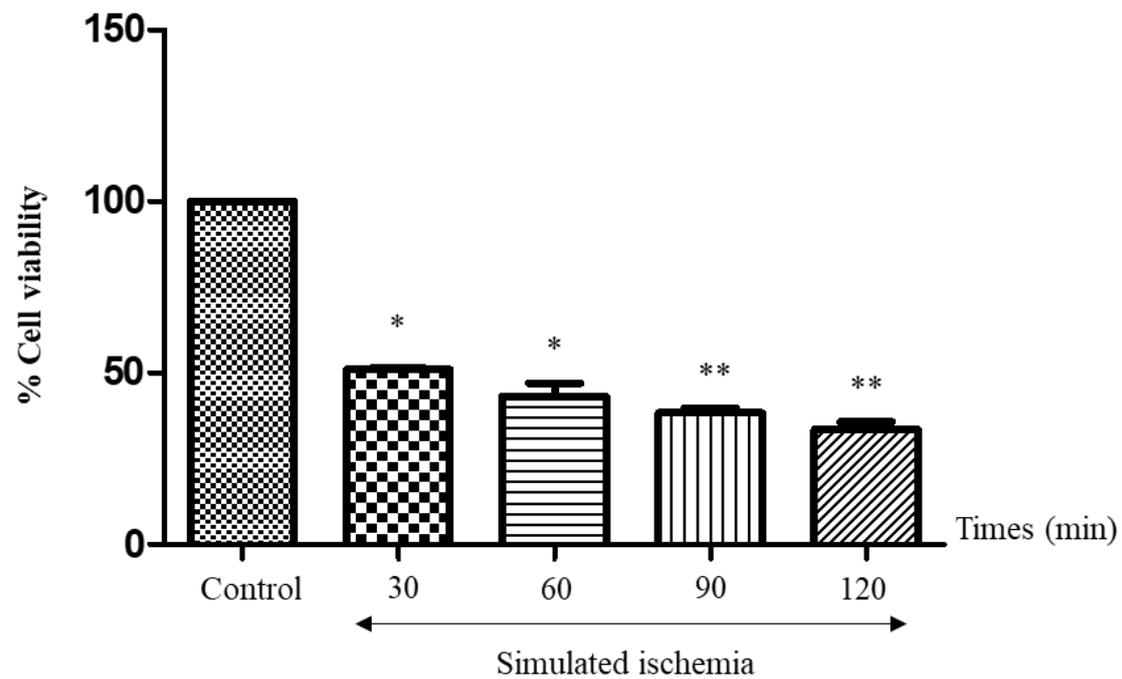


Figure 2 Determination of H9c2 cell viability after simulated ischemia at different durations (30, 60, 90 and 120 minutes). The results are expressed as mean \pm standard error. Three experiments with independent cell preparations were performed.

Note:

* $p < 0.050$ versus control group.

** $p < 0.050$ versus the 30-minutes and 60-minutes exposure group.

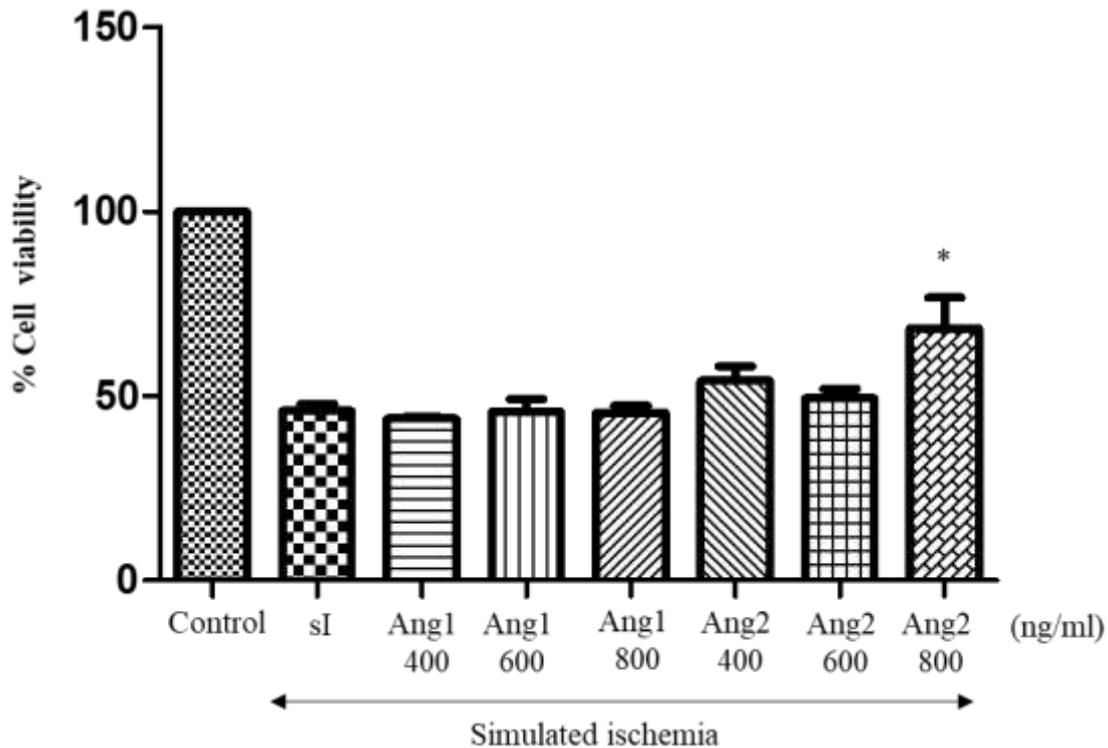


Figure 3 Effects of Angpt1 and Angpt2 on H9c2 cell viability. The results are expressed as mean \pm standard error. Three experiments with independent cell preparations were performed.

Note:

* $p < 0.050$ versus the simulated ischaemic group.

Angpt1 = Angiopoietin1; Angpt2 = Angiopoietin2; and sI = Simulated ischaemia

Discussions

The cardiac myocyte mass loss following myocardial ischaemic-reperfusion (I/R) injury remains the leading cause of morbidity and mortality worldwide. Therefore, molecules that can preserve myocyte viability are candidate therapeutic targets to limit myocardial I/R injury. The present study demonstrates that exogenous human recombinant Angpt2 could preserve cardiac myocyte viability *in vitro* model of simulated ischaemia. The results show that there is significant difference in cell death following simulated ischaemic injury between the untreated group and the cells treated with 800 ng/mL of Angpt2. The data indicates that Angpt2 could suppress simulated ischaemic solution-induced cell death, whereas Angpt1 had no protective effect in this model. Thus, this study reveals that 800 ng/mL of Angpt2 could reduce cardiomyocyte death following simulated ischaemia injury.

The result was consistent with the previous study which reported that 800 ng/mL of Angpt2 could be an apoptosis survival factor for endothelial cells by activation of the

phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K)/Akt signal transduction pathway⁽¹²⁾. It was also reported that 400 ng/mL of Angpt2 could enhance endothelial cell survival through pro-survival PI3K/Akt pathway⁽¹³⁾ and also promote angiogenesis *in vitro* through the direct activation of Tie2 receptor signaling during prolonged exposure or at high concentrations of Angpt2⁽¹⁴⁾. Likewise, Sandhu et al. performed *in vivo* left coronary artery ligation in rat to induce myocardial ischaemia. They found an increase in Angpt2 and decrease in Angpt1 expression, whereas Tie2 expression remained unchanged⁽¹⁵⁾.

These data indicated the elevation of Angpt2 responded to hypoxia or inflammatory in the ischaemic heart. In turn, Chen et al.⁽⁹⁾ suggested that myocardial Tie2 expression was decreased during ischaemia and could be suppressed by high Angpt2 level which was relevant to the studies of Shyu et al.⁽¹⁾ showing the increased Angpt2 expression at the infarct size of rat myocardium. These evidences supported that Angpt2 also increased after ischaemia-reperfusion in the rat ventricular myocardium. However, several studies reported that Angpt2 had a deleterious effect in myocardial I/R injury that predisposed to abnormal vascular remodeling, inflammation, cardiac hypoxia and infarction⁽⁸⁾.

Our findings suggest that the physiological role of Angpt2 is more complex than previously recognised. Further studies should elucidate the molecular mechanism responsible for cardioprotective effect of Angpt2 on myocardial survival against ischaemic-reperfusion injury.

Conclusion

In conclusion, the present study demonstrates that human recombinant angiotensin II could protect cardiomyocytes against myocardial ischaemic injury in *in vitro* cytotoxicity model.

Acknowledgment

This study was supported by the Naresuan University Fund (grant no. R2559C008) and National Science and Technology Development Agency Fund (grant no. SCH-NR2015-851).

References

- (1). Shyu KG, Chang CC, Wang BW, Kuan P, Chang H. Increased expression of angiotensin II and Tie2 receptor in a rat model of myocardial ischaemia/reperfusion. *Clin Sci (Lond)*. 2003;105(3):287-94.
- (2). Augustin HG, Koh GY, Thurston G, Alitalo K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiotensin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(3):165-77.
- (3). Yuan HT, Khankin EV, Karumanchi SA, Parikh SM. Angiotensin II is a partial agonist/antagonist of Tie2 signaling in the endothelium. *Mol Cell Biol*. 2009;29(8):2011-22.

- (4). Puri MC, Bernstein A. Requirement for the TIE family of receptor tyrosine kinases in adult but not fetal hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(22):12753-8.
- (5). Chen S, Guo L, Cui M, Sun L, Mi L. Dynamic changes in serum angiopoietin-1, angiopoietin-2, and angiopoietin-2/angiopoietin-1 ratio in acute myocardial infarction patients treated with primary percutaneous coronary intervention. *Biomarkers*. 2012;17(5):441-6.
- (6). Lee KW, Lip GY, Blann AD. Plasma angiopoietin-1, angiopoietin-2, angiopoietin receptor tie-2, and vascular endothelial growth factor levels in acute coronary syndromes. *Circulation*. 2004;110(16):2355-60.
- (7). Liu KL, Lin SM, Chang CH, Chen YC, Chu PH. Plasma angiopoietin-1 level, left ventricular ejection fraction, and multivessel disease predict development of 1-year major adverse cardiovascular events in patients with acute ST elevation myocardial infarction - a pilot study. *Int J Cardiol*. 2015;182:155-60.
- (8). Lee S-J, Lee C-K, Kang S, Park I, Kim YH, Kim SK, et al. Angiopoietin-2 exacerbates cardiac hypoxia and inflammation after myocardial infarction. *The Journal of clinical investigation*. 2018;128(11):5018-33.
- (9). Chen JX, Zeng H, Reese J, Aschner JL, Meyrick B. Overexpression of angiopoietin-2 impairs myocardial angiogenesis and exacerbates cardiac fibrosis in the diabetic db/db mouse model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;302(4):H1003-12.
- (10). Dallabrida SM, Ismail N, Oberle JR, Himes BE, Rupnick MA. Angiopoietin-1 promotes cardiac and skeletal myocyte survival through integrins. *Circ Res*. 2005;96(4):e8-24.
- (11). Yu Y-P, Huang X-M, Fu Y-F. Curcumin protects H9c2 cardiomyocyte against ischemia/reperfusion injury through inactivation of glycogen synthase kinase-3. *Int J Clin Exp Pathol*. 2016;9(3):3226-32.
- (12). Kim I, Kim J-H, Moon S-O, Kwak HJ, Kim N-G, Koh GY. Angiopoietin-2 at high concentration can enhance endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *Oncogene*. 2000;19(39):4549-52.
- (13). Yuan HT, Khankin EV, Karumanchi SA, Parikh SM. Angiopoietin 2 is a partial agonist/antagonist of Tie2 signaling in the endothelium. *Mol Cell Biol*. 2009;29(8):2011-22.
- (14). Teichert-Kuliszewska K, Maisonpierre PC, Jones N, Campbell AI, Master Z, Bendeck MP, et al. Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2. *Cardiovasc Res*. 2001;49(3):659-70.
- (15). Sandhu R, Teichert-Kuliszewska K, Nag S, Proteau G, Robb MJ, Campbell AI, et al. Reciprocal regulation of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 following myocardial infarction in the rat. *Cardiovasc Res*. 2004;64(1):115-24.

ORIGINAL ARTICLE

Cytotoxic effect of lutein extracts from marigold flower in human lens epithelial (HLE) cell line

Natthawadee Yoisara, Bunyaporn Phongsombun, Sakaoduan Chitnan
and Pussadee Paensuwan*

Department of Optometry, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand

* Correspondence to: Assistant Professor Dr Pussadee Paensuwan, Department of Optometry, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University, 99 Moo 9 Phitsanulok-Nakhonsawan Road, Tha-pho, Muang, Phitsanulok 65000 Thailand. Telephone: +66 (0) 95 307 9713 Fax: +66 (0) 55 966 234 Email: pussadeep@nu.ac.th

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

Abstract

Lutein is a carotenoid found in the lens of the human eyes. Its functions are to protect the eyes by filtering a hazard blue light and to prevent vision loss due to cataract formation. Lutein could not be synthesised in the body and must be taken from the diet, however, lutein is isolated from a marigold flower. Lutein might help to protect or delay the formation of the posterior capsule opacification (PCO). PCO is a complication that might occur after cataract surgery. In this study, the cytotoxic effect of lutein extracts from the marigold flower was investigated against a human lens epithelial (HLE) cell line. The results indicated that the lutein extract at the concentration of 12 µg per ml showed no cytotoxic effect on the HLE. HLE has no change in cell morphology. The percentage of cell inhibition is 17.3. There was no significant difference in cell viability compared to untreated cells at 24 hours. Cells showed a high percentage of cell viability, with about 82%. Therefore, knowing the optimal concentration of the lutein extracts could be used in further study for developing the PCO treatment.

Keywords: cytotoxicity; human lens epithelial cell; lutein; posterior capsule opacification

การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดลูทีนจาก ดอกดาวเรืองต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด เยื่อบุผิวเลนส์แก้วตาของมนุษย์ (เฮชแอลอี)

ณัฐวดี หยอยสระ, บุญยาพร พงศ์สมบุญ, สกาวเดือน จิตนันท์ และมุสดี แผ่นสุวรรณ*

ภาควิชาทัศนมาตรศาสตร์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก ประเทศไทย

* การติดต่อผู้พิมพ์ประสานงาน: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มุสดี แผ่นสุวรรณ ภาควิชาทัศนมาตรศาสตร์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เลขที่ 99 หมู่ 9 ถนนพิษณุโลก-นครสวรรค์ ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก รหัสไปรษณีย์ 65000 ประเทศไทย หมายเลขโทรศัพท์มือถือ: +66 (0) 95 307 9713 หมายเลขโทรสาร: +66 (0) 55 966 234 อีเมล: pussadeep@nu.ac.th

ผลประโยชน์ทับซ้อน: ผู้พิมพ์ทุกคนแจ้งให้ทราบโดยทั่วกันว่าไม่มีผลประโยชน์ทับซ้อนในเนื้อหาของบทความนี้

บทคัดย่อ

สารลูทีน (Lutein) เป็นสารที่พบได้ในเลนส์แก้วตา มีหน้าที่ช่วยปกป้องดวงตาจากแสงสีฟ้าที่เป็นอันตรายต่อดวงตา ลดภาวะการสูญเสียการมองเห็น สามารถช่วยลดการเกิดต้อกระจกได้ แม้ว่าร่างกายจะไม่สามารถสังเคราะห์สารลูทีนได้เอง ต้องได้จากการรับประทานอาหารเท่านั้น แต่สารลูทีนสามารถสกัดได้จากดอกดาวเรือง สารลูทีนอาจมีฤทธิ์ในการป้องกันหรือชะลอการเกิดภาวะขุ่นมัวเลนส์แก้วตาหลังการผ่าตัดต้อกระจก (Posterior Capsule Opacification, PCO) ซึ่งเป็นภาวะแทรกซ้อนที่อาจเกิดขึ้นหลังจากการผ่าตัดรักษาโรคต้อกระจกได้ การทราบฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดลูทีนจากดอกดาวเรืองจึงเป็นสิ่งสำคัญ เพื่อให้เกิดความปลอดภัยในการใช้ประโยชน์จากสารสกัดลูทีน จากผลการศึกษาพบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดเยื่อบุผิวเลนส์แก้วตาของมนุษย์ [Human lens epithelial (HLE) cells] ที่ได้รับสารสกัดลูทีนจากดอกดาวเรืองที่มีความเข้มข้น 12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา สารสกัดลูทีนไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยมีค่าการยับยั้งการเจริญของเซลล์ร้อยละ 17.3 และเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 82 ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ HLE ที่ไม่ได้รับสารสกัดลูทีน ณ เวลา 24 ชั่วโมง ($p > 0.050$) การทราบฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดลูทีนจากดอกดาวเรืองใน HLE นี้ อาจนำไปสู่การพัฒนาการใช้สารสกัดลูทีนจากดอกดาวเรืองในการป้องกันหรือชะลอการเกิดภาวะขุ่นมัวเลนส์แก้วตาหลังจากการผ่าตัดต้อกระจกในเชิงลึกต่อไป

คำสำคัญ: ความเป็นพิษต่อเซลล์; เซลล์เยื่อบุผิวเลนส์แก้วตาของมนุษย์; ภาวะถุงหุ้มเลนส์แก้วตาชุ่นหลังการผ่าตัดต่อกระจก; สารลูทีน

บทนำ

สารลูทีน (Lutein) เป็นสารสกัดจากธรรมชาติ จัดอยู่ในกลุ่มสารที่มีสีเหลืองจำพวกแคโรทีนอยด์ พบมากในไข่แดง ดอกดาวเรือง โกจิเบอร์รี่ และผักที่มีสีเขียวเข้ม เป็นสารแคโรทีนอยด์ที่พบได้ในโครงสร้างต่าง ๆ ของดวงตา ได้แก่ ในชั้นเรตินาโดยเฉพาะบริเวณศูนย์กลางการมองเห็นที่เรียกว่า “จุดเหลืองจอตตา (*Macular lutea*)” และเลนส์แก้วตา เป็นต้น⁽¹⁾ ร่างกายของมนุษย์ไม่สามารถสังเคราะห์ลูทีนได้เอง ต้องได้จากการรับประทานอาหารเท่านั้น สารลูทีนมีฤทธิ์ในการช่วยปกป้องดวงตา โดยการกรองและดูดกลืนแสงสีฟ้าที่เป็นอันตรายต่อดวงตา มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยปกป้องเนื้อเยื่อตาจากการถูกทำลายในสภาวะ Oxidative stress ลดภาวะการสูญเสียการมองเห็น และยับยั้งการดำเนินโรคในผู้ป่วยโรคการเสื่อมจากอายุของ Macula (Age-related macular degeneration, AMD) ได้⁽²⁾ ตลอดจนสามารถช่วยชะลอการเกิดโรคต่อกระจกได้⁽³⁾ มีรายงานพบว่าปริมาณของแคโรทีนอยด์ในตาจะมีปริมาณลดลงเมื่อมีอายุมากขึ้น ดังนั้นจึงสอดคล้องกับการเกิดโรคตาที่มีสาเหตุจากภาวะความเสื่อมจากอายุที่มากขึ้น เช่น โรค AMD และโรคต่อกระจก เป็นต้น⁽⁴⁾

ภาวะถุงเลนส์แก้วตาชุ่นหลังการผ่าตัดต่อกระจก [Posterior capsule opacification (PCO)] คือภาวะแทรกซ้อนที่อาจเกิดขึ้นได้หลังจากการผ่าตัดต่อกระจก พบประมาณร้อยละ 25 หลังจากการผ่าตัดด้วยวิธี Phacoemulsification⁽⁵⁾ มีอัตราการพบได้ในผู้ใหญ่ร้อยละ 34.4 และสูงถึงเกือบร้อยละ 100 ในเด็ก^(6,7) ภาวะ PCO เกิดจากกระบวนการตอบสนองต่อการสมานแผล (Wound healing response) ของ Lens epithelial cell (LEC) ที่หลงเหลือจากการผ่าตัด มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ (Cell proliferation) และมีการเคลื่อนตัวเซลล์ (Cell migration) จากบริเวณถุงหุ้มเลนส์แก้วตาส่วนหน้ามายังบริเวณถุงหุ้มเลนส์แก้วตาส่วนหลัง ทำให้มีการหนาตัวของถุงหุ้มเลนส์แก้วตาส่วนหลังเป็นผลให้เกิดความขุ่นขึ้น ซึ่งหากเกิดในบริเวณแนวแกนกลางสายตา (Visual axis) ก็จะทำให้ส่งผลกระทบต่อความสามารถในการมองเห็นได้^(8,9) ผู้ป่วยจึงจำเป็นต้องกลับมาเข้ารับการรักษาอีกครั้งด้วยวิธีการ Neodymium-doped yttrium aluminum garnet laser (Nd-YAG laser) เป็นการใช้ลำแสงเพื่อไปสลายภาวะ PCO ที่เกิดขึ้น ซึ่งการรักษาด้วยวิธีนี้มีประสิทธิภาพในการรักษาสูงและความเสี่ยงในการรักษาต่ำ⁽¹⁰⁾ อย่างไรก็ตามการรักษาภาวะ PCO ด้วยวิธีนี้ยังคงมีความเสี่ยงในการเกิดผลแทรกซ้อนตามมาได้ เช่น จอประสาทตาหลุดลอก มี Intraocular pitting และความดันลูกตาเพิ่มสูงขึ้น เป็นต้น⁽¹¹⁾ อีกทั้งมีค่าใช้จ่ายในการรักษาที่สูงและจำเป็นต้องมีจักษุแพทย์ที่มีความเชี่ยวชาญในการใช้เครื่องมือในการรักษา^(6,12,13) ทำให้มีข้อจำกัดในการเข้าถึงการรักษาของผู้ป่วย และอาจไม่สามารถทำได้ในบางประเทศกำลังพัฒนา^(13,14) ดังนั้นการใช้ยาที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากสมุนไพรอาจช่วยลดปัญหาและข้อจำกัดในการรักษาดังกล่าวได้

จากที่กล่าวมาข้างต้นการใช้สารสกัดจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนตัวเซลล์ใน Lens epithelial cell ได้ จะเป็นกลไกที่สำคัญในการนำไปสู่การพัฒนาที่มีความมีประสิทธิภาพในการป้องกันหรือชะลอการเกิดภาวะ PCO ได้ในอนาคต⁽¹⁵⁾ ดังนั้นการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดก่อนการนำสารสกัดมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์จึงมีความสำคัญ เพื่อให้เกิดความปลอดภัยในการใช้สารสกัด ในงานวิจัยนี้คณะผู้วิจัยจึงนำสารสกัดลูทีนจากดอกเรืองมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cell cytotoxicity assay) โดยใช้ Human lens epithelial (HLE) cell line เป็นต้นแบบการศึกษา เพื่อศึกษาหาความเข้มข้นของสารสกัดลูทีนจากดอกเรืองที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ และใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาการใช้สารสกัดลูทีนจากดอกเรืองในการยับยั้งการเกิดภาวะ PCO ในเชิงลึกต่อไป

วัสดุและวิธีการ

การเพาะเลี้ยง Human lens epithelium (HLE) cell line:

ทำการเพาะเลี้ยง Human lens epithelium cell line B-3 (HLE B-3) (ATCC[®] CRL-11421[™]) ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ คือ Minimum Essential Medium (MEM) (Gibco[™], 11095-080) ที่มีส่วนผสมของ Foetal bovine serum (Gibco[™], 16000-036) ความเข้มข้นร้อยละ 20 Penicillin/Streptomycin antibiotic reagent (Gibco[™], 10378-016) ความเข้มข้นร้อยละ 1 และ L-Glutamine solution (Gibco[®], 25030-081) ความเข้มข้นร้อยละ 1 ทำการบ่มเซลล์ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์นี้จะทำการติดตามการเจริญเติบโตทุกวันและทำการเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ 3 ครั้งต่อสัปดาห์ หรือเมื่ออาหารเพาะเลี้ยงเซลล์มีการเปลี่ยนสี เมื่อเซลล์มีการเจริญเกาะติดกับพื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยงและเรียงตัวเป็นชั้นเดียว (Monolayer) และมีความหนาแน่นเซลล์ (Cell confluence) ประมาณร้อยละ 80 – 90 ของพื้นที่ผิวภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ ทั้งนี้ทำการเพิ่มจำนวนเซลล์ (Subculture) ด้วย Trypsin/EDTA (0.25%) (Gibco[™], 25200-072)

การเตรียมสารสกัดลูทีนจากดอกดาวเรือง:

ทำการเตรียมสารสกัดลูทีนจากดอกดาวเรืองตั้งต้น (Stock solution) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยนำผงสารสกัดมาละลายด้วยตัวทำละลาย Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, 472301) จากนั้นนำสารละลายมากรองผ่านตัวกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร ทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการทดสอบ

การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cell cytotoxicity assay) ของสารสกัดลูทีนจากดอกดาวเรือง:

ทำการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดลูทีนจากดอกดาวเรือง ด้วยวิธี Resazulin reduction test โดยใช้ Deep blue cell viability[™] kit (Biolegend, 424702) ที่วัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (Viable cell) ด้วยการทดสอบอัตราการเกิดกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะเกิดกระบวนการ Resazurin reduction ของเอนไซม์ Mitochondrial reductase เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ คือ Resorufin แสดงโดยการเปลี่ยนสีจากสีน้ำเงินของ Resazurin เป็นสีชมพูของ Resorufin วิเคราะห์ผลที่ได้ในหน่วยของ Relative fluorescence units (RFU) ด้วยเครื่อง Fluorometer ที่ช่วง Excitation ที่ 530 – 570 นาโนเมตร และช่วง Emission ที่ 590 – 620 นาโนเมตร

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ HLE ลงในถาดหลุมเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม ที่ความเข้มข้นเซลล์ 5,000 เซลล์ต่อหลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 นาน 18 ชั่วโมง ทำการทดสอบ HLE ด้วยสารสกัดลูทีนจากดอกดาวเรืองที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 24, 12, 6 และ 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กำหนดเป็น 0 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบ่มเพิ่มอีกเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดลูทีนจากดอกดาวเรือง โดยการเติม Deep Blue Cell Viability[™] reagent ที่ปริมาตรร้อยละ 10 ของปริมาตรทั้งหมด โดยปฏิบัติตามข้อกำหนดของบริษัทผู้ผลิต ทำการทดสอบซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง (3N) ซึ่งเป็นอิสระต่อกัน คำนวณค่าร้อยละของยับยั้งการเจริญของเซลล์ (% Cell inhibition) ตามสูตรคำนวณด้านล่าง

$$\% \text{ Cell inhibition} = 100 - \left[\frac{\text{RFU of treated sample}}{\text{RFU of untreated sample}} \right] \times 100$$

ทำการวิเคราะห์หาช่วงความเข้มข้นของของสารสกัดลูทีนจากดอกดาวเรืองที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อ HLE น้อยกว่าร้อยละ 30 เมื่อเปรียบเทียบกับ HLE ที่ไม่ได้รับสารสกัดลูทีนจากดอกดาวเรือง โดยอ้างอิงจากข้อกำหนดของ ISO 10993-5 : 1999 Biological evaluation of medical devices Part 5 : Tests for in vitro cytotoxicity ได้กำหนดให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ทดสอบที่น้อยกว่าร้อยละ 70 ให้ระบุว่าสารทดสอบนั้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์

การวิเคราะห์ทางสถิติ:

ทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยแสดงข้อมูลในลักษณะค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย [Mean \pm Standard error of the mean (SEM)] ด้วยสถิติทดสอบ Student's t-test และกำหนดค่านัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $p < 0.050$

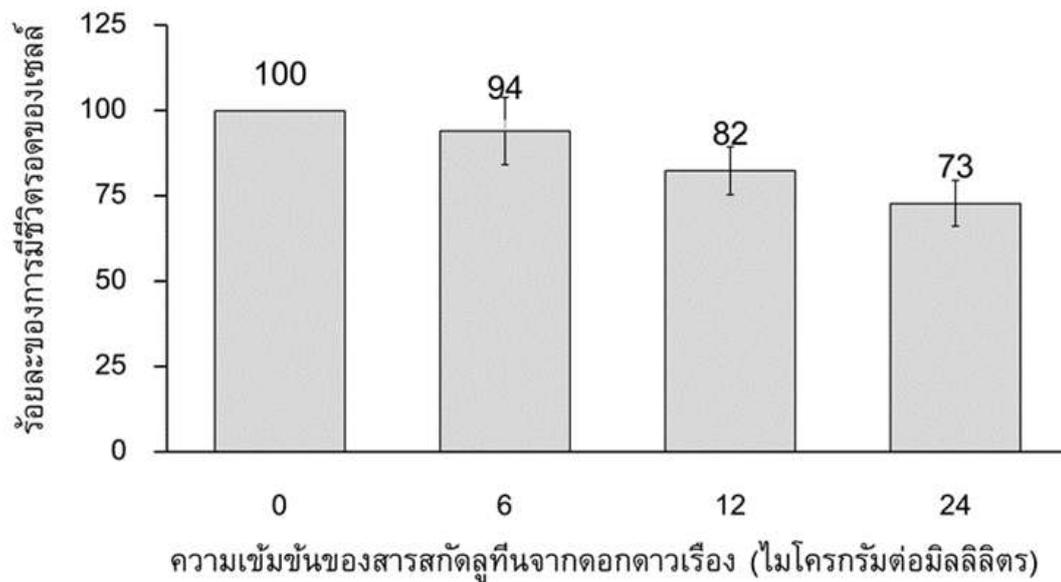
ผลการศึกษา

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเชิงการทดลอง (Experimental study) เพื่อศึกษาอัตราการเจริญของเซลล์ Human lens epithelium (HLE) cell line ซึ่งเป็นเซลล์เยื่อบุผิว (Epithelial cell) ที่เรียงตัวเป็นชั้นเดียวใต้ถุงหุ้มเลนส์แก้วตาส่วนหน้า (Anterior lens epithelial cell) และฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดลูทีนจากดอกดาวเรืองต่อ HLE

ในการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดลูทีนจากดอกดาวเรืองใน HLE ที่ได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างกัน คือ 6, 12 และ 24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ณ เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดลูทีนจากดอกดาวเรืองทั้ง 3 ความเข้มข้น มีค่าร้อยละของการยับยั้งการเจริญของเซลล์น้อยกว่าร้อยละ 30 เมื่อเปรียบเทียบกับ HLE ที่ไม่ได้รับสารสกัดลูทีนจากดอกดาวเรือง (0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) คือ ร้อยละ 6.3, 17.3 และ 27.4 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดลูทีนจากดอกดาวเรืองทั้ง 3 ความเข้มข้นไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ตามข้อกำหนดของ ISO 10993-5 : 1999 Biological evaluation of medical devices Part 5 : Tests for in vitro cytotoxicity หรือเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าร้อยละ 70 (รูปที่ 1)

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยร้อยละของการยับยั้งการเจริญของเซลล์ (% Cell inhibition) ใน Human lens epithelium (HLE) cell line หลังจากได้รับสารสกัดลูทีนจากดอกดาวเรืองที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ณ เวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าเฉลี่ยร้อยละของการยับยั้งการเจริญของเซลล์ (% Cell inhibition)
0	0
6	6.3
12	17.3
24	27.4



รูปที่ 1 แผนภูมิแท่งแสดงร้อยละการมีชีวิตรอดของ Human lens epithelium (HLE) cell line เมื่อได้รับสารสกัดจากดอกดาวเรืองที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ณ เวลา 24 ชั่วโมง

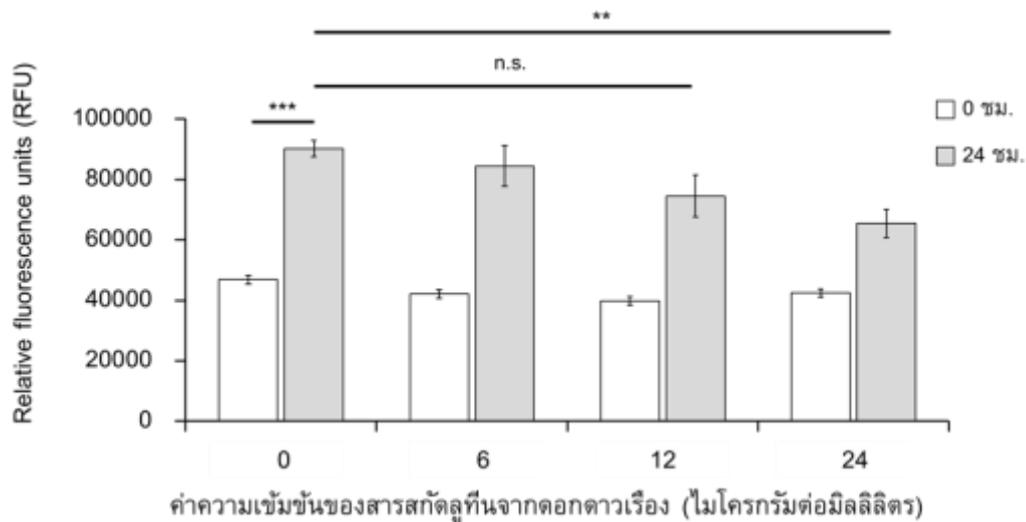
เมื่อทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ HLE ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าสารสกัดจากดอกดาวเรืองที่ความเข้มข้น 6 และ 12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่ทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและขนาดเซลล์ แต่พบการตายของเซลล์ได้เพิ่มขึ้นที่ความเข้มข้น 24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับ HLE ที่ไม่ได้รับสารสกัด (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของ Human lens epithelium (HLE) cell line เมื่อได้รับสารสกัดจากดอกดาวเรืองที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ณ เวลา 24 ชั่วโมง

อย่างไรก็ตามในการศึกษาวิจัยนี้ต้องการศึกษาหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากดอกดาวเรืองที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ และเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ HLE ที่ไม่ได้รับสารสกัด จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์มีอัตราการรอดชีวิต

ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.010$) เมื่อเปรียบเทียบกับ HLE ที่ไม่ได้รับสารสกัด ดังนั้นความเข้มข้นของสารสกัดลูทีนจากดอกดาวเรืองที่ไม่มีความเป็นพิษต่อ HLE และเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตที่สูง โดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ HLE ที่ไม่ได้รับสารสกัด คือ 12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($p > 0.050$) (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 แผนภูมิแท่งแสดงการมีชีวิตรอดของ Human lens epithelium (HLE) cell line เมื่อได้รับสารสกัดลูทีนจากดอกดาวเรืองที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ณ เวลา 24 ชั่วโมง [*n.s.* = ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (No statistical significance)]

การอภิปราย

ภาวะถุงเลนส์แก้วตาขุ่นหลังผ่าตัดต่อกระจก (Posterior capsule opacification, PCO) เกิดจากการที่ Lens epithelial cell (LEC) ซึ่งหลงเหลือจากการผ่าตัดต่อกระจกมีการตอบสนองต่อกระบวนการสมานแผล โดยการเพิ่มจำนวนเซลล์และการเคลื่อนตัวของเซลล์จากบริเวณส่วนของถุงหุ้มเลนส์แก้วตาส่วนหน้ามายังบริเวณถุงหุ้มเลนส์แก้วตาส่วนหลัง ซึ่งส่งผลกระทบต่อความสามารถในการมองเห็นได้⁽¹⁶⁾ จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาถึงการลดความเสี่ยงในการเกิดภาวะ PCO โดยมุ่งเน้นไปที่การยับยั้งหรือชะลอการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนตัวของเซลล์ของ LEC^(17,18) อย่างไรก็ตามยังไม่พบว่ามีรายงานฉบับใดที่สามารถแก้ไขหรือป้องกันการเกิดภาวะ PCO ได้อย่างแท้จริง ดังนั้นการศึกษากลไกกระบวนการเกิดภาวะ PCO จึงเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อเพิ่มทางเลือกในการป้องกันหรือชะลอการเกิดภาวะ PCO หลังจากการผ่าตัดอย่างมีประสิทธิภาพ ในปัจจุบันการนำสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ได้มีความนิยมมากขึ้น มีรายงานพบว่าสารลูทีน (lutein) สามารถยับยั้งกระบวนการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนตัวของเซลล์ได้⁽¹⁹⁾ อย่างไรก็ตามการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดก่อนการนำสารสกัดมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ เป็นสิ่งที่จำเป็นต้องทำก่อนการนำสารสกัดมาใช้เพื่อให้เกิดความปลอดภัยในการใช้สารสกัด ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้นำสารสกัดลูทีนจากดอกดาวเรืองมาศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ LEC ของมนุษย์ โดยใช้ Human lens epithelial cell (HLE) เป็นต้นแบบในการศึกษา

จากการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของสารสกัดลูทีนจากดอกดาวเรืองที่ 12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้ HLE มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ร้อยละ 82 โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ HLE ที่ไม่ได้รับสารสกัด และมีค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของเซลล์คือ ร้อยละ 17.3 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าค่าความเข้มข้น

ของสารสกัดลูทีนจากดอกดาวเรืองที่ 12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนี้ไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อ HLE ซึ่งเป็นไปตามข้อกำหนดของ ISO 10993-5 : 1999 Biological evaluation of medical devices Part 5 : Tests for in vitro cytotoxicity ที่กำหนดให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าร้อยละ 70 จึงจะแสดงได้ว่าสารนั้นไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ แม้ว่าสารสกัดลูทีนจากดอกดาวเรืองที่ 24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรทำให้ HLE มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ร้อยละ 73 แต่พบว่าอัตราการรอดชีวิตของ HLE นี้มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ HLE ที่ไม่ได้รับสารสกัด คณะผู้วิจัยต้องการหาความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้โดยไม่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ ดังนั้นค่าความเข้มข้นของสารสกัดลูทีนจากดอกดาวเรืองที่ 12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจึงเหมาะสมในการนำไปใช้เพื่อศึกษาในลำดับต่อไป

การศึกษาหาความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้โดยไม่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ จะสอดคล้องกับฤทธิ์ของยาไมโตมายซินซี (Mitomycin C) ที่มีรายงานการใช้เป็นยาเสริมในการผ่าตัดต่อกระจก พบว่ามีการขุ่นตัวของถุงหุ้มเลนส์แก้วตาส่วนหลังเกิดขึ้นหลังจากการผ่าตัดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับยา⁽²⁰⁾ แสดงให้เห็นว่ายา Mitomycin C มีประโยชน์ในการป้องกันและชะลอการเกิดภาวะ PCO สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ LEC ได้ โดยการทำให้เซลล์เกิดการหยุดการแบ่งเซลล์ที่ระยะ G2/M เท่านั้น แต่ไม่ทำให้เกิดการตายเซลล์⁽²¹⁾ อย่างไรก็ตามการใช้ยา Mitomycin C อาจเกิดผลข้างเคียงที่อาจเป็นอันตรายต่อดวงตาได้ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเล็งเห็นว่าสารลูทีนนั้นเป็นสารที่สามารถสกัดได้จากธรรมชาติ อีกทั้งยังสามารถพบได้ในโครงสร้างต่าง ๆ ของดวงตามนุษย์ น่าจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยการทำให้เซลล์อยู่ในระยะพักของการแบ่งเซลล์ได้ ดังนั้นการทราบความเข้มข้นของสารสกัดลูทีนจากดอกดาวเรืองที่ทำให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงและไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ จะสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาเชิงลึกเพื่อใช้ในการป้องกันหรือชะลอการเกิดภาวะ PCO ต่อไปได้

อย่างไรก็ตามการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดลูทีนจากดอกดาวเรืองตามที่ได้รายงานในงานวิจัยฉบับนี้เป็นผลการทดสอบในเบื้องต้น โดยทำการวิเคราะห์อัตราการรอดชีวิตของเซลล์เยื่อผิวเลนส์แก้วตาของมนุษย์ หลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวในสภาวะที่มีสารสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและทำการทดสอบเพียง 3 ความเข้มข้น ดังนั้นเพื่อให้สามารถเห็นผลการทดลองที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้น จึงควรทดสอบเซลล์กับสารสกัดที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันมากกว่า 3 ความเข้มข้น โดยใช้ผลการทดสอบในงานวิจัยนี้เป็นค่ากำหนดช่วงความเข้มข้นที่ต้องการศึกษาเพิ่มเติม และทำการวิเคราะห์เพิ่มเติม ณ ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

สรุป

ค่าความเข้มข้นของสารสกัดลูทีนจากดอกดาวเรืองที่ 12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้ HLE มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ร้อยละ 82 โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ HLE ที่ไม่ได้รับสารสกัด และมีค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของเซลล์ คือ ร้อยละ 17.3 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าค่าความเข้มข้นนี้ไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อ HLE

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณการวิจัยจากทุนอุดหนุนการวิจัยเลขที่สัญญา R2560C035 งบประมาณรายได้มหาวิทยาลัยนเรศวร

เอกสารอ้างอิง

- (1). Bone RA, Landrum JT, Friedes LM, Gomez CM, Kilburn MD, Menendez E, et al. Distribution of lutein and zeaxanthin stereoisomers in the human retina. *Experimental eye research*. 1997;64(2):211-8.
- (2). Semba RD, Dagnelie G. Are lutein and zeaxanthin conditionally essential nutrients for eye health? *Medical hypotheses*. 2003;61(4):465-72.
- (3). Chew EY, SanGiovanni JP, Ferris FL, Wong WT, Agron E, Clemons TE, et al. Lutein/zeaxanthin for the treatment of age-related cataract: AREDS2 randomized trial report no. 4. *JAMA ophthalmology*. 2013;131(7):843-50.
- (4). Bernstein PS, Zhao DY, Wintch SW, Ermakov IV, McClane RW, Gellermann W. Resonance Raman measurement of macular carotenoids in normal subjects and in age-related macular degeneration patients. *Ophthalmology*. 2002;109(10):1780-7.
- (5). Yadav UC, Ighani-Hosseini F, van Kuijk FJ, Srivastava SK, Ramana KV. Prevention of posterior capsular opacification through aldose reductase inhibition. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2009;50(2):752-9.
- (6). Vasavada AR, Praveen MR. Posterior Capsule Opacification After Phacoemulsification: Annual Review. *Asia-Pacific journal of ophthalmology (Philadelphia, Pa)*. 2014;3(4):235-40.
- (7). Raj SM, Vasavada AR, Kaid JS, Vasavada VA, Vasavada VA. Post-operative capsular opacification. *Nepalese journal of ophthalmology: a biannual peer-reviewed academic journal of the Nepal Ophthalmic Society: NEPJOPH*. 2009;1(1):43-59.
- (8). Eric Dai MEB. *Ophthalmology*. 3rd edition ed. China: Elsevier; 2009. 381-409 p.
- (9). Nibourg LM, Gelens E, Kuijjer R, Hooymans JM, van Kooten TG, Koopmans SA. Prevention of posterior capsular opacification. *Experimental eye research*. 2015;136:100-15.
- (10). Khambhaphant B, Liumsiri Jarern C, Saehout P. The effect of Nd:YAG laser treatment of posterior capsule opacification on anterior chamber depth and refraction in pseudophakic eyes. *Clinical Ophthalmology (Auckland, NZ)*. 2015;9:557-61.
- (11). Karahan E, Er D, Kaynak S. An Overview of Nd:YAG Laser Capsulotomy. *Medical Hypothesis, Discovery and Innovation in Ophthalmology*. 2014;3(2):45-50.
- (12). Hu Y, Xu Z. Effects of lutein on the growth and migration of bovine lens epithelial cells in vitro. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2008;28(3):360-3.
- (13). Awasthi N, Guo S, Wagner BJ. Posterior capsular opacification: a problem reduced but not yet eradicated. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill: 1960)*. 2009;127(4):555-62.
- (14). Spalton DJ. Posterior capsular opacification after cataract surgery. *Eye (London, England)*. 1999;13 (Pt 3b):489-92.
- (15). Hu Y-h, Huang X-r, Qi M-x, Hou B-y. Curcumin inhibits proliferation of human lens epithelial cells: a proteomic analysis. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2012;13(5):402-7.
- (16). Awasthi N, Guo S, Wagner BJ. Posterior Capsular Opacification: A Problem Reduced but Not Yet Eradicated. *JAMA Ophthalmology*. 2009;127(4):555-62.

- (17). Cortina P, Gómez-Lechón MJ, Navea A, Menezo JL, Terencio MC, Diaz-Llopis M. Diclofenac sodium and cyclosporin A inhibit human lens epithelial cell proliferation in culture. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 1997;235(3):180-5.
- (18). Rieck PW, Kriegsch J, Jaeckel C, Hartmann C. [Effect of suramin on proliferation and migration of lens epithelial cells in vitro]. *Ophthalmologie*. 2004;101(1):73-9.
- (19). Hu Y, Xu Z. Effects of lutein on the growth and migration of bovine lens epithelial cells in vitro. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*. 2008;28(3):360.
- (20). Shin DH, Kim YY, Ren J, Weatherwax AL, Pearlman RB, Kim C, et al. Decrease of capsular opacification with adjunctive mitomycin C in combined glaucoma and cataract surgery. *Ophthalmology*. 1998;105(7):1222-6.
- (21). Kang SG, Chung H, Yoo YD, Lee JG, Choi YI, Yu YS. Mechanism of growth inhibitory effect of Mitomycin-C on cultured human retinal pigment epithelial cells: Apoptosis and cell cycle arrest. *Current Eye Research*. 2001;22(3):174-81.

APPENDIX 1

INFORMATION FOR AUTHORS

All authors listed in a paper submitted to Asian Archives of Pathology (AAP) must have contributed substantially to the work. It is the corresponding author who takes responsibility for obtaining permission from all co-authors for the submission. When submitting the paper, the corresponding author is encouraged to indicate the specific contributions of all authors (the author statement, with signatures from all authors and percentage of each contribution can be accepted). Examples of contributions include: designed research, performed research, contributed vital new reagents or analytical tools, analysed data, and wrote the paper. An author may list more than one type of contribution, and more than one author may have contributed to the same aspect of the work.

Authors should take care to exclude overlap and duplication in papers dealing with related materials. See also paragraph on Redundant or Duplicate Publication in “Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals” at <http://www.icmje.org/index.html>.

The submitted manuscripts will be reviewed by the members of the Editorial Board or the expert reviewers. At the discretion of the Editorial Board, the manuscripts may be returned immediately without full review, if deemed not competitive or outside the realm of interests of the majority of the readership of the Journal. The decision (reject, invite revision, and accept) letter will be coming from the Editorial Board who has assumed responsibility for the manuscript’s review. The editor’s decision is based not just on technical merit of the work, but also on other factors such as the priority for publication and the relevance to the Journal’s general readership. All papers are judged in relation to other submissions currently under consideration.

Categories of Manuscripts

1. Letters to the Editor

The letters to the editor are the reactions to any papers published in AAP. These letters will be reviewed by the Editorial Board and sent to the authors of the original paper

with an invitation to respond. Letters and eventual responses will be published together, when appropriate.

- *Word Count: 300 – 500 words (excluding references and figure or table legends)*
- *Abstract: Not required*
- *References: Maximum of 10*
- *Figure or Table: Maximum of 1 (if needed)*

2. Original Articles

The original articles are the researches describing the novel understanding of anatomical pathology, clinical pathology (laboratory medicine), forensic medicine (legal medicine or medical jurisprudence), molecular medicine or pathobiology. Systematic reviews, meta-analyses and clinical trials are classified as articles. The articles should be clearly and concisely written in the well-organised form (see **Organisation of Manuscripts**): abstract; introduction; materials and methods; results; discussion; and conclusions. The manuscripts that have passed an initial screening by the Editorial Board will be reviewed by two or more experts in the field.

- *Word Count: 3,000 – 5,000 words (excluding abstract, references, and figure or table legends)*
- *Structured Abstract (see Organisation of Manuscripts): 150 – 200 words*
- *References: Maximum of 150*
- *Figures or Tables: Maximum of 6*

3. Review Articles

The review articles are generally invited by the Editor-in-Chief. They should focus on a topic of broad scientific interest and on recent advances. These articles are peer-reviewed before the final decision to accept or reject the manuscript for publication. Therefore, revisions may be required.

- *Word Count: 3,000 – 5,000 words (excluding abstract, references, and figure or table legends)*
- *Unstructured Abstract: 150 – 200 words*
- *References: Maximum of 150*
- *Figures or Tables: Maximum of 4*

4. Case Reports

AAP limits publication of case reports to those that are truly novel, unexpected or unusual, provide new information about anatomical pathology, clinical pathology (laboratory medicine) or forensic medicine (legal medicine or medical jurisprudence). In

addition, they must have educational value for the aforementioned fields. The journal will not consider case reports describing preventive or therapeutic interventions, as these generally require stronger evidence. Case reports that involve a substantial literature review should be submitted as a review article. The submitted case reports will undergo the usual peer-reviewed process.

- *Word Count: 1,200 – 2,000 words (excluding abstract, references, and figure or table legends)*
- *Unstructured Abstract: 150 – 200 words*
- *References: Maximum of 20*
- *Figures or Tables: Maximum of 4*

5. Case Illustrations

Case illustrations are aimed to provide education to readers through multidisciplinary clinicopathological discussions of interesting cases. The manuscript consists of a clinical presentation or description, laboratory investigations, discussion, final diagnosis, and up to 5 take-home messages (learning points). Regarding continuous learning through self-assessment, each of the case illustrations will contain 3 – 5 multiple choice questions (MCQs) with 4 – 5 suggested answers for each question. These MCQs are placed after the final diagnosis and the correct answers should be revealed after the references. The questions and take-home messages (learning points) are included in the total word count. The manuscripts that have passed an initial screening by the Editorial Board will be reviewed by two experts in the field.

- *Word Count: 1,000 – 2,000 words (excluding references and figure or table legends)*
- *Abstract: Not required*
- *References: Maximum of 10*
- *Figures: Maximum of 2*
- *Tables: Maximum of 5*

6. Technical Notes

The technical notes are brief descriptions of scientific techniques used in the anatomical pathology, clinical pathology (laboratory medicine), forensic medicine (legal medicine or medical jurisprudence), molecular medicine or pathobiology. The submitted manuscripts are usually peer-reviewed.

- *Word Count: Maximum of 1,000 words (excluding references and figure or table legends)*
- *Abstract: Not required*
- *References: Maximum of 5*

- *Figures or Tables: Maximum of 2*

Organisation of Manuscripts

1. General Format

The manuscripts written in English language are preferable. However, Thai papers are also acceptable, but their title pages, abstracts, and keywords must contain both Thai and English. These English and Thai manuscripts are prepared in A4-sized Microsoft Word documents with leaving 2.54-cm (1-inch) margins on all sides. All documents are required to be aligned left and double-spaced throughout the entire manuscript. The text should be typed in 12-point regular Times New Roman font for English manuscript and 16-point regular TH SarabunPSK font for Thai manuscript.

The running titles of English and Thai manuscripts are placed in the top left-hand corner of each page. They cannot exceed 50 characters, including spaces between words and punctuation. For the header of English paper, the running title will be typed in all capital letters. The page number goes on the top right-hand corner.

Footnotes are not used in the manuscripts, but parenthetical statements within text are applied instead and sparingly. Abbreviations should be defined at first mention and thereafter used consistently throughout the article. The standard abbreviations for units of measure must be used in conjunction with numbers.

All studies that involve human subjects should not mention subjects' identifying information (e.g. initials) unless the information is essential for scientific purposes and the patients (or parents or guardians) give written informed consent for publication.

2. Title Page

The title page is the first page of the manuscripts and must contain the following:

- The title of the paper (not more than 150 characters, including spaces between words)
- The full names, institutional addresses, and email addresses for all authors (If authors regard it as essential to indicate that two or more co-authors are equal in status, they may be identified by an asterisk symbol with the caption "These authors contributed equally to this work" immediately under the address list.)
- The name, surname, full postal address, telephone number, facsimile number, and email address of the corresponding author who will take primary responsibility for communication with AAP.
- Conflict of interest statement (If there are no conflicts of interest for any author, the following statement should be inserted: "The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.")

3. Abstract

A structured form of abstract is used in all Original Article manuscripts and must include the following separate sections:

- *Background: The main context of the study*
- *Objective: The main purpose of the study*
- *Materials and Methods: How the study was performed*
- *Results: The main findings*
- *Conclusions: Brief summary and potential implications*
- *Keywords: 3 – 5 words or phrases (listed in alphabetical order) representing the main content of the article*

4. Introduction

The Introduction section should clearly explain the background to the study, its aims, a summary of the existing literature and why this study was necessary or its contribution to the field.

5. Materials and Methods

The Materials and Methods section must be described in sufficient detail to allow the experiments or data collection to be reproduced by others. Common routine methods that have been published in detail elsewhere should not be described in detail. They need only be described in outline with an appropriate reference to a full description. Authors should provide the names of the manufacturers and their locations for any specifically named medical equipment and instruments, and all chemicals and drugs should be identified by their systematic and pharmaceutical names, and by their trivial and trade names if relevant, respectively. Calculations and the statistical methods employed must be described in this section.

All studies involving animal or human subjects must abide by the rules of the appropriate Internal Review Board and the tenets of the recently revised Helsinki protocol. Hence, the manuscripts must include the name of the ethics committee that approved the study and the committee's reference number if appropriate.

6. Results

The Results section should concisely describe the findings of the study including, if appropriate, results of statistical analysis which must be presented either in the text or as tables and figures. It should follow a logical sequence. However, the description of results should not simply repeat the data that appear in tables and figures and, likewise, the same data should not be displayed in both tables and figures. Any chemical equations, structural

formulas or mathematical equations should be placed between successive lines of text. The authors do not discuss the results or draw any conclusions in this section.

7. Discussion

The Discussion section should focus on the interpretation and the significance of the findings against the background of existing knowledge. The discussion should not repeat information in the results. The authors will clearly identify any aspects that are novel. In addition, there is the relation between the results and other work in the area.

8. Conclusions

The Conclusions section should state clearly the main summaries and provide an explanation of the importance and relevance of the study reported. The author will also describe some indication of the direction future research should take.

9. Acknowledgements

The Acknowledgements section should be any brief notes of thanks to the following:

- *Funding sources*
- *A person who provided purely technical help or writing assistance*
- *A department chair who provided only general support*
- *Sources of material (e.g. novel drugs) not available commercially*

Thanks to anonymous reviewers are not allowed. If you do not have anyone to acknowledge, please write “Not applicable” in this section.

10. References

The Vancouver system of referencing should be used in the manuscripts. References should be cited numerically in the order they appear in the text. The authors should identify references in text, tables, and legends by Arabic numerals in parentheses or as superscripts. Please give names of all authors and editors. The references should be numbered and listed in order of appearance in the text. The names of all authors are cited when there are six or fewer. When there are seven or more, only the first three followed by “et al.” should be given. The names of journals should be abbreviated in the style used in Index Medicus (see examples below). Reference to unpublished data and personal communications should not appear in the list but should be cited in the text only (e.g. A Smith, unpubl. Data, 2000).

- *Journal article*

1. Sibai BM. Magnesium sulfate is the ideal anticonvulsant in preeclampsia – eclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162: 1141 – 5.
- *Books*
 2. Remington JS, Swartz MN. *Current Topics in Infectious Diseases*, Vol 21. Boston: Blackwell Science Publication, 2001.
- *Chapter in a book*
 3. Cunningham FG, Hauth JC, Leveno KJ, Gilstrap L III, Bloom SL, Wenstrom KD. Hypertensive disorders in pregnancy. In: Cunningham FG, Hauth JC, Leveno KJ, Gilstrap L III, Brom SL, Wenstrom KD, eds. *Williams Obstetrics*, 22nd ed. New York: McGraw-Hill, 2005: 761 – 808.

11. Tables

The tables should be self-contained and complement, but without duplication, information contained in the text. They should be numbered consecutively in Arabic numerals (Table 1, Table 2, etc.). Each table should be presented on a separate page with a comprehensive but concise legend above the table. The tables should be double-spaced and vertical lines should not be used to separate the columns. The column headings should be brief, with units of measurement in parentheses. All abbreviations should be defined in footnotes. The tables and their legends and footnotes should be understandable without reference to the text. The authors should ensure that the data in the tables are consistent with those cited in the relevant places in the text, totals add up correctly, and percentages have been calculated correctly.

12. Figure Legends

The legends should be self-explanatory and typed on a separate page titled “Figure Legends”. They should incorporate definitions of any symbols used and all abbreviations and units of measurement should be explained so that the figures and their legends are understandable without reference to the text.

If the tables or figures have been published before, the authors must obtain written permission to reproduce the materials in both print and electronic formats from the copyright owner and submit them with the manuscripts. These also follow for quotes, illustrations, and other materials taken from previously published works not in the public domain. The original resources should be cited in the figure captions or table footnotes.

13. Figures

All illustrations (line drawings and photographs) are classified as figures. The figures should be numbered consecutively in Arabic numerals (Figure 1, Figure 2, etc.). They are submitted electronically along with the manuscripts. These figures should be referred to

specifically in the text of the papers but should not be embedded within the text. The following information must be stated to each microscopic image: staining method, magnification (especially for electron micrograph), and numerical aperture of the objective lens. The authors are encouraged to use digital images (at least 300 d.p.i.) in .jpg or .tif formats. The use of three-dimensional histograms is strongly discouraged when the addition of these histograms gives no extra information.

14. Components

14.1. Letters to the Editor

The Letter to the Editor manuscripts consist of the following order:

- *Title Page*
- *Main Text*
- *References*
- *Table (if needed)*
- *Figure Legend (if needed)*
- *Figure (if needed)*

14.2. Original Articles

The Original Article manuscripts consist of the following order:

- *Title Page*
- *Structured Abstract*
- *Introduction*
- *Materials and Methods*
- *Results*
- *Discussion*
- *Conclusions*
- *Acknowledgements*
- *References*
- *Table (s)*
- *Figure Legend (s)*
- *Figure (s)*

14.3. Review Articles

The Review Article manuscripts consist of the following order:

- *Title Page*
- *Unstructured Abstract*
- *Introduction*
- *Main Text*
- *Conclusions*
- *Acknowledgements*

- *References*
- *Table (s)*
- *Figure Legend (s)*
- *Figure (s)*

14.4. Case Reports

The Case Report manuscripts consist of the following order:

- *Title Page*
- *Unstructured Abstract*
- *Introduction*
- *Case Description*
- *Discussion*
- *Conclusions*
- *Acknowledgements*
- *References*
- *Table (s)*
- *Figure Legend (s)*
- *Figure (s)*

14.5. Case Illustrations

The Case Illustration manuscripts consist of the following order:

- *Title Page*
- *Clinical Presentation or Description*
- *Laboratory Investigations*
- *Discussion*
- *Final Diagnosis*
- *Multiple Choice Questions (MCQs)*
- *Take-Home Messages (Learning Points)*
- *Acknowledgements*
- *References*
- *Correct Answers to MCQs*
- *Table (s)*
- *Figure Legend (s)*
- *Figure (s)*

14.6. Technical Notes

The Technical Note manuscripts consist of the following order:

- *Title Page*
- *Introduction*
- *Main text*
- *Conclusions*

- *Acknowledgements*
- *References*
- *Table (s)*
- *Figure Legend (s)*
- *Figure (s)*

Proofreading

The authors of the accepted manuscripts will receive proofs and are responsible for proofreading and checking the entire article, including tables, figures, and references. These authors should correct only typesetting errors at this stage and may be charged for extensive alterations. Page proofs must be returned within 48 hours to avoid delays in publication.

Revised Manuscripts

In many cases, the authors will be invited to make revisions to their manuscripts. The revised manuscripts must generally be received by the Editorial Board within 3 months of the date on the decision letter or they will be considered a new submission. An extension can sometimes be negotiated with the Editorial Board.

APPENDIX 2

BENEFITS OF PUBLISHING WITH ASIAN ARCHIVES OF PATHOLOGY

Asian Archives of Pathology (AAP) is an open access journal. Open Access makes your works freely available to everyone in the world. It provides a significant boost to the readership of your articles, and has been shown to have an increase in positive influence on citations and reuse. Hence, open-access leads to more recognition for our esteemed authors.

The journal has been sponsored by the Royal College of Pathologists of Thailand. We have the policy to disseminate the verified scientific knowledge to the public on a non-profit basis. Hence, we have not charged the authors whose manuscripts have been submitted or accepted for publication in our journal.

Since AAP is also a peer-reviewed journal, the submitted manuscripts will be reviewed by the members of the Editorial Board or the expert reviewers. The decision on these manuscripts is processed very fast without any delay and in shortest possible time. The processing period is 1 – 2 weeks. These decisions of the reviewers are unbiased and the decision (reject, invite revision, and accept) letter coming from the Editorial Board is always conveyed to the authors.

APPENDIX 3

SUBMISSION OF THE MANUSCRIPTS

- Step 1:** Access www.asianarchpath.com
- Step 2:** If you did not register before, please create an account first.
- Step 3:** Login with your username and password.
- Step 4:** Click the “+ New Submission” button on the upper right-hand side of the page.
- Step 5:** Proceed to fill up the Submission Form online and follow the directions given therein.
- Step 6:** Upload your manuscript file (s).
- Step 7:** Re-check the content of your manuscript (s) and the uploaded file (s) more carefully prior to the submission. If you have submitted your manuscript file (s) incorrectly, you must contact Editor-in-Chief of Asian Archives of Pathology immediately. The Editor-in-Chief can clear the incorrect attempt and allow you another submission.
- Step 8:** Click the “Submit Manuscript” button under Important Notice.

If you have any further enquiries, please do not hesitate to contact the Journal.

APPENDIX 4

CONTACT THE JOURNAL

The Editorial Office of Asian Archives of Pathology

Department of Pathology, Floor 6, Her Royal Highness Princess Bejaratana Building
Phramongkutklao College of Medicine
317 Rajavithi Road, Rajadevi, Bangkok 10400 Thailand

Telephone: +66 (0) 90 132 2047

Fax: +66 (0) 2 354 7791

Email: editor@asianarchpath.com

APPENDIX 5 SUPPORT THE JOURNAL

Asian Archives of Pathology (AAP) has a mission of disseminating the unbiased and reliable medical knowledge on a non-profit basis. If you consider that this journal is useful for

the public, you can support us by submitting your advertisements via the contact information below.

Dr Chetana Ruangpratheep

The Editorial Office of Asian Archives of Pathology
Department of Pathology, Floor 6, Her Royal Highness Princess Bejaratana Building
Phramongkutklao College of Medicine
317 Rajavithi Road, Rajadevi, Bangkok 10400 Thailand
Telephone: +66 (0) 90 132 2047
Fax: +66 (0) 2 354 7791
Email: editor@asianarchpath.com

Every support, small or big, can make a difference.

Thank you



Dr Chetana Ruangpratheep

MD, FRCPath (Thailand), MSc, PhD
Editor-in-Chief of Asian Archives of Pathology

ACADEMIC MEETINGS AND CONFERENCES

Announcements of academic meetings and conferences that are of interest to the readers of Asian Archives of Pathology (AAP) should be sent to the Editor-in-Chief at least 3 months before the first day of the month of issue. The contact information is shown below.

Dr Chetana Ruangpratheep

The Editorial Office of Asian Archives of Pathology
Department of Pathology, Floor 6, Her Royal Highness Princess Bejaratana Building
Phramongkutklao College of Medicine
317 Rajavithi Road, Rajadevi, Bangkok 10400 Thailand

Telephone: +66 (0) 90 132 2047

Fax: +66 (0) 2 354 7791

Email: editor@asianarchpath.com

WHAT IS INSIDE THIS ISSUE?

Letter to the Editor:

Blood adiponectin and irisin levels in breast cancer patients	1
Napat Petchsrikul	

Original Articles:

Protective effect of angiotensin 2 on cardiomyocytes	6
against simulated ischemic injury	
Piyanuch Thitiwuthikiat, Duangduan Siriwittayawan and Teonchit Nuamchit	
Cytotoxic effect of lutein extracts from marigold flower	17
in human lens epithelial (HLE) cell line	
Natthawadee Yoisara, Bunyaporn Phongsombun, Sakaoduan Chitnan and Pussadee Paensuwan	