ฤทธิ์ต้านการอักเสบจากสารสกัดเปลือกสับปะรดพันธุ์นางแลและพันธุ์ภูแล
ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF NANGLAE AND PHULAE PINEAPPLE PEEL EXTRACT

อนุสรา พงค์จันตา[1]* และนิตยา จันซิว[2]
Anursara Pongjanta[1]*, and Nittaya Chansiw[2]

[1]School of health science, Chiangrai Rajabhat University
[2]School of Medicine, Mae Fah Luang University
*corresponding author e-mail: anurz@hotmail.com
(Received: 9 October 2018; Revised: 30 January 2019; Accepted: 4 February 2019)

บทคัดย่อ

การอักเสบเป็นกระบวนการที่ร่างกายตอบสนองต่อการติดเชื้อจุลชีพ โดยในกระบวนการอักเสบมีการสร้างสารสื่อกลางการอักเสบที่สำคัญคือ ไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide; NO) ซึ่งทำให้เกิดอาการบวม สับปะรดเป็นพืชเศรษฐกิจที่ปลูกกันแพร่หลายในจังหวัดเชียงราย การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน กิจกรรมของเอนไซม์และฤทธิ์ต้านการอักเสบของเปลือกสับปะรดพันธุ์นางแล และพันธุ์ภูแล ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดเปลือกสับปะรดพันธุ์นางแลมีปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์มากกว่าสารสกัดสับปะรดพันธุ์ภูแล คือ 4.56±0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 2.03±3.85 ยูนิตต่อมิลลิลิตร การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเปลือกสับปะรดทั้ง 2 สายพันธุ์ในเซลล์แมคโครฟาจ (RAW 264.7) ที่เหนี่ยวนำด้วย lipopolysaccharide (LPS) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกสับปะรดทั้งสองสายพันธุ์ที่ความเข้มข้น 0-1000 µg/ml ไม่มีผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ และการทดสอบฤทธิ์การต้านการอักเสบ จากการวิเคราะห์การยับยั้งการสร้าง NO พบว่า สารสกัดเปลือกสับปะรดพันธุ์นางแล และพันธุ์ภูแล สามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์โดยมีความแรงแปรตามความเข้มข้นของสารสกัด อย่างไรก็ตาม สารสกัดสับประรดทั้งสองสายพันธุ์มีปริมาณของโปรตีน กิจกรรมของเอมไซม์และฤทธิ์การต้านการอักเสบที่ดี โดยสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันและรักษาโรคต่างที่เกิดจากการอักเสบได้

คำสำคัญ: โบรมีเลน เปลือกสับปะรด ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

Abstract

Inflammation is a process by which tissues respond to foreign organism infection. In the inflammatory process, an important inflammatory mediator was nitric oxide (NO), which causes swelling. Pineapples were an economically grown plant in Chiang Rai province. This study aimed to evaluate protein content, enzyme activity and anti-inflammatory activity of the extract from Nanglae and Phulae pineapple peel. The results showed that the extract of Nanglae pineapple peel had higher protein content and enzyme activity than that of Phulae pineapple peel, 4.56±0.56 mg/ml and

2.03±3.85 unit/ml, respectively. Both of pineapple peel extracts at the concentration of 0-1000 µg/ml did not show cytotoxicity effect in macrophage cells (RAW 264.7) which induced by lipopolysaccharide (LPS) for 24 hours. The analysis of NO inhibitory activity against standard aminoguanidine found that the extraction of Nanglae and Phulae pineapple peels inhibited the formation of nitric oxide, the strength varied depending on the concentration of the extracts. Therefore, both of the pineapple peel extracts showed good protein content, enzyme activity and anti-inflammatory activity. It's can be used to prevent and treat diseases due to inflammation and other appropriate treatment.

Keywords: bromelain, pineapple peel, anti-inflammatory activity

บทนำ

การอักเสบเป็นกระบวนการที่ร่างกายตอบสนองต่อการติดเชื้อจุลชีพ และสิ่งที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย อาการที่ปรากฏของการอักเสบ คือ ปวด บวม แดง และร้อน (Mequanint et al., 2011) ซึ่งกระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้นในร่างกายมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular diseases) โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) โรคเบาหวาน (Diabetics) มะเร็ง (Cancer) และโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (Rheumatoid arthritis) (Aktan, 2004; Guzik et al., 2003; Van der Vilet et al., 2000) โดยในกระบวนการอักเสบมีการสร้างสารสื่อกลางการอักเสบที่สำคัญหลายชนิด โดยเฉพาะไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide; NO) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติเป็นสารสื่อกลางการอักเสบที่สำคัญ (Libby, 2007) โดยปริมาณ NO ที่เพิ่มมากขึ้นนี้จะสามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลในเซลล์ปกติภายในเซลล์และส่งผลทำลายเซลล์และเกิดพิษ โบรมีเลนเป็นสารที่สกัดได้จากเปลือกสับปะรด (*Ananascomosus L.*) อยู่ในกลุ่ม cysteine proteinase ซึ่งมีศึกษามากมายที่แสดงให้เห็นว่า โบรมีเลนมีคุณสมบัติต่าง ๆ ที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นยา เช่น ลดกระบวนการอักเสบ (anti-inflammatory action) (Vellini et al., 1986; Gaspani et al., 2002; Wallace, 2002) กระตุ้มภูมิคุ้มกันของร่างกาย ต่อต้านมะเร็ง เร่งกระบวนการหายของบาดแผล (Maurer, 2001) ช่วยในการเสริมฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ (potentiation of antibiotic) (Shahid et al., 2002) ป้องกันการแข็งตัวของเลือด (platelet aggregation) ลดอาการปวด (pain) เป็นต้น ในพื้นที่จังหวัดเชียงรายมีการปลูกสับปะรดในเชิงธุรกิจเป็นจำนวนมากโดยนิยมปลูกสับปะรดพันธุ์นางแล และภูแล ซึ่งเปลือกสับปะรดเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตสับปะรดที่เป็นผลพลอยได้ จากการปลูกสับปะรดและกำจัดได้ยาก ดังนั้นในงานวิจัยชิ้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์โบรมีเลนในสารสกัดเปลือกสับปะรดและศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากเปลือกสับปะรด

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดจากเปลือกสับปะรด

นำเปลือกสับปะรดพันธุ์นางแลและพันธุ์ภูแลมาล้างทำความสะอาด หั่นให้มีขนาดเล็ก แล้วนำไปทำการปั่นกับน้ำในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 6000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที ซึ่งจะเรียกน้ำที่กรองว่าสารสกัดหยาบโบรมีเลน จากนั้นทำการระเหยสารละลายและทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Bench Top, SP Scientific - Virtis, USA)

2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของโบรมีเลน

นำสารสกัดโบรมีเลนจากเปลือกสับปะรดพันธุ์ภูแลและพันธุ์นางแลมา 10 ไมโครลิตร เติม Alkaline Copper Reagent 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติม Folin Ciocalteau 0.3 มิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐาน Bovine Serum Albumin โดยกำหนดให้ความเข้มข้น 0.01 - 0.1 มิลลิกรัม นำสารสกัดโบรมีเลนจากเปลือกสับปะรดพันธุ์ภูแลและพันธุ์นางแลมา 20 ไมโครลิตร เติม 50 มิลลิโมลาร์ ของบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่าง ๆ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาเติม 0.65 เปอร์เซ็นต์ เคซีน 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C เป็นเวลา 10 นาที ตกตะกอนโปรตีนที่ไม่ถูกย่อยด้วย 110 มิลลิโมลาร์ Trichloro Acetic Acid 2.5 มิลลิลิตร แล้วไปนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C เป็นเวลา 15 นาที สารละลายที่ได้ไปเซนตริฟิวก์ที่ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาทีนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง 280 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานไทโรซีน

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดในเซลล์แมจโครฟาจเพาะเลี้ยง

3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 เริ่มจากการนำเซลล์มาเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) ที่มี 10 % Fetal Bovine Serum (FBS) และ 100 unit/mL penicillin-streptomycin ผสมอยู่ จากนั้นนำไปบ่มที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C และมีปริมาณ CO_2 อยู่ 5% รอจนกว่าเซลล์จะเจริญเติบโตเต็มที่ (70-80% confluent) แล้วทำการ sub-culture

3.2 การทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์ RAW 264.7 ทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยวิธี MTT assay วิธีการทดสอบเริ่มจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ในเพทแบบ 96 หลุม (1.5 x10^5 เซลล์ต่อหลุม) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด 10 % FBS-DMEM และบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C, 5 % CO_2 นาน 12-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และ Lipopolysaccharide (LPS) ความเข้มข้น 1 μg/mL โดย LPS ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจให้หลั่งสารสื่อกลางการอักเสบต่าง ๆ การทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยใช้สาร 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) ได้ผลผลิตเป็นผลึก formazan ที่มีสีม่วง โดยปริมาณ formazan ที่เกิดขึ้นจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับจำนวนความมีชีวิตรอดของเซลล์

3.3 การตรวจวัดความเข้มข้นของไนไตรท์ ทดสอบโดยวิธี Griess (Sudsai et al., 2013) ซึ่งความเข้มข้นของไนไตทร์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นดัชนีบ่งชี้ปริมาณการสร้างไนตริกออกไซด์ เนื่องจากไนไตรท์เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการออกซิเดชันของไนตริกออกไซด์และมีความเสถียร ใช้สาร Aminoguanidine เป็นสารควบคุมแบบบวกในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของผลการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ โดยการวิเคราะห์แบบถดถอยเชิงเส้น (linear regression analysis)

ผลการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดหยาบจากเปลือกสับปะรด

ผลการสกัดเปลือกสับปะรดเพื่อให้ได้ปริมาณเอนไซม์โบรมีเลนโดยใช้น้ำและนำไปเซนตริฟิวก์ต่อเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมาระเหยสารละลายและทำให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilize

จนกระทั่งได้สารสกัดหยาบจากเปลือกสับปะรดพันธุ์ภูแล และพันธุ์นางแลที่มีความเข้มข้นสูง จำนวน % yield เท่ากับ 20.13 และ 25.26 ตามลำดับ

2. การศึกษาปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์จากเปลือกสับปะรด

การศึกษาปริมาณโปรตีนในสารสกัดหยาบจากเปลือกสับปะรดพันธุ์ภูแล และพันธุ์นางแล พบว่าปริมาณโปรตีนของสารสกัดสับปะรดนางแล เฉลี่ยเท่ากับ 4.56 ± 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่ามากกว่าสับปะรดพันธุ์ภูแลซึ่งมีโปรตีนที่สกัดได้เท่ากับ 3.05 ± 0.94 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และจากการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โบรมีเลน พบว่าสารสกัดจากเปลือกสับปะรดนางแลมีกิจกรรมของเอมไซม์เฉลี่ยเท่ากับ 2.03 ± 3.85 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีมากกว่าสับปะรดพันธุ์ภูแล และมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 1.58 ± 6.14 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 1 (Table 1)

Table 1 Protein content and enzyme activity of pineapple peel extract

Sample	Protein content (mg/ml)	Enzyme activity (unit/ml)
Nanglae	4.56 ± 0.56	2.03 ± 3.85
Phulae	3.05 ± 0.94	1.58 ± 6.14

Remark Values are expressed as means ± S.D.

3. การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดเปลือกสับปะรดต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ (RAW 264.7) ด้วยวิธี MTT assay

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเปลือกสับปะรดทั้ง 2 สายพันธุ์ในเซลล์แมคโครฟาจ (RAW 264.7) ที่เหนี่ยวนำด้วย LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0-1,000 µg/ml ด้วยวิธี MTT assay พบว่า สารสกัดหยาบจากเปลือกสับปะรดทั้งสายพันธุ์ภูแล และสายพันธุ์นางแลที่ระดับความเข้มข้น 0-1000 µg/ml ไม่มีผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์มีค่าเกินกว่า 90 % ดังแสดงในภาพที่ 1 (Figure 1)

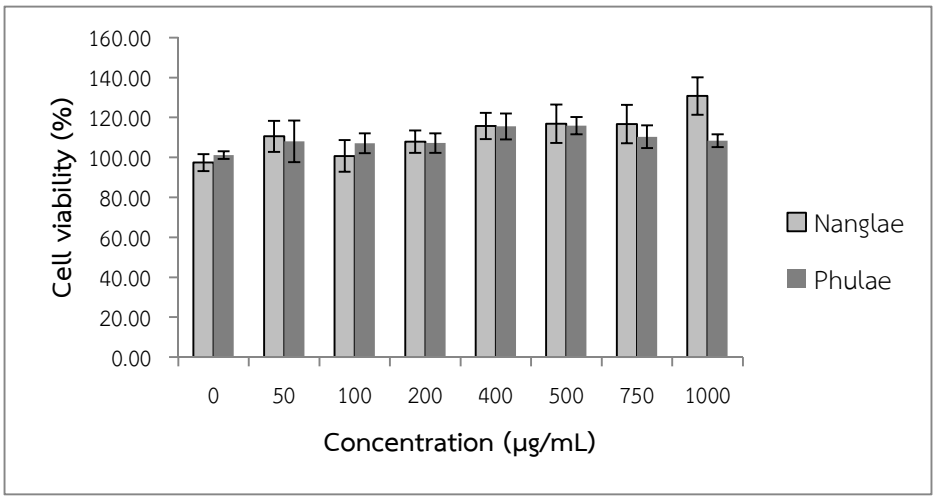

Figure 1 Cell viability of the LPS-induced macrophage RAW 264.7 cells pretreated with pineapple peel at concentration 0-1000 µg/ml for 24 hrs

4. การศึกษาฤทธิ์การต้านการอักเสบของสารสกัดเปลือกสับปะรดต่อการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์

การทดสอบฤทธิ์การต้านการอักเสบของสารสกัดจากเปลือกสับปะรดพันธุ์ภูแล และพันธุ์นางแล จากการวิเคราะห์การยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์โดยเทียบกับสารมาตรฐาน Aminoguanidine พบว่า Aminoguanidine สามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ 97.32% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะ LPS เพียงอย่างเดียว โดยสารสกัดจากเปลือกสับปะรดพันธุ์นางแล สามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ 22.22%, 28.19% และ 35.53% ตามลำดับ และสารสกัดจากเปลือกสับปะรดพันธุ์ภูแล สามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์โดยมีความแรงแปรตามความเข้มข้นของสารสกัด ความเข้มข้น 10, 100 และ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ 33.27%, 34.65% และ 36.33% ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 2 (Figure 2)

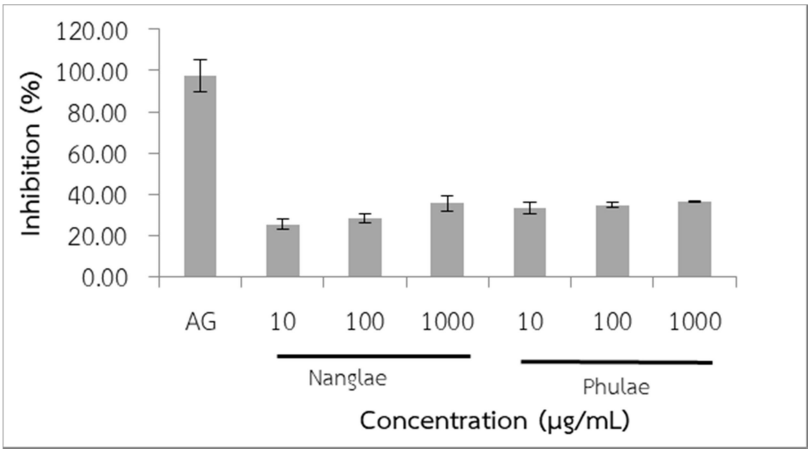

Figure 2 Nitric oxide (NO) inhibitory effect of pineapple peel extract compared with amino guanidine

อภิปรายผล

การศึกษาฤทธิ์การต้านการอักเสบจากสารสกัดเปลือกสับปะรดพันธุ์ภูแลและพันธุ์นางแล โดยในสับปะรดมีเอนไซม์ที่สำคัญคือ เอนไซม์โบรมีเลน เป็นสารสกัดที่ได้จากทุกส่วนของสับปะรดทั้งส่วนของผลและลำต้น จัดเป็นสารในกลุ่ม cysteine proteinase ที่พบมากจากสารสกัดที่ได้จากส่วนของผล ซึ่งปัจจุบันเรียก fruit bromelain ว่า โบรมีลิน bromelin จากงานวิจัยนี้ได้สกัดเอนไซม์โบรมีเลนจากเปลือกสับปะรดพันธุ์ภูแลและพันธุ์นางแลโดยการโฮโมจิไนส์แบบใช้คลื่นความถี่สูงจะทำให้ได้ปริมาณเอนไซม์โบรมีเลนในสารสกัดออกมามากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vall (2007) ได้รายงานว่าเมื่อทำการโฮโมจิไนส์ผลไม้ในการสกัดเอนไซม์จะพบว่าน้ำผลไม้หรือสารละลายเอนไซม์ที่ได้มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้น ไนตริกออกไซด์เป็นสารสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบแบบเรื้อรังของเซลล์แมคโครฟาจ ไนตริกออกไซด์ที่ปลอดปล่อยจำนวนมากนี้เป็นตัวกลางของการก่อพยาธิสภาพต่าง ๆ สารสกัดจากเปลือกสับปะรดที่สามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้จะสามารถจัดว่าเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านกลไกการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ โดยความเข้มข้นของสารสกัดเปลือก

สับปะรดที่ใช้ในครั้งนี้คือ 10, 100 และ 1,000 μg/ml โดยความเข้มข้นที่ใช้ต้องตรวจความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW264.7 ก่อนโดยการใช้ MTT assay ซึ่งเมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่าสารสกัดเปลือกสับปะรดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์อยู่ในช่วง 10-1000 μg/ml ซึ่งเมื่อทดสอบการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ พบว่าสารสกัดจากเปลือกสับปะรดทั้งพันธุ์นางแลและพันธุ์ภูแลมีความสามารถในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์หรือมีความสามารถในการต้านการอักเสบ โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dharma et al., (2015) ที่พบว่าเอนไซม์โบรมีเลนสามารถยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตไนตริกออกไซด์ และลดการสร้าง reactive oxygen species (ROS) ซึ่งส่งผลลดภาวะ oxidative stress ในเซลล์แมคโครฟาจได้ และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vellini et al. (1986) และ Wallace (2002) ซึ่งพบว่าสารโบรมีเลนในสับปะรดช่วยลดกระบวนการอักเสบได้

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกสับปะรดทั้งสายพันธุ์ภูแลและพันธุ์นางแลมีปริมาณโปรตีน ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ และมีคุณสมบัติที่ดีในการต้านการอักเสบ ดังนั้นสารสกัดจากเปลือกสับปะรดสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการป้องกันและรักษาโรคอันเนื่องมาจากการอักเสบร่วมกับการรักษาอื่นที่เหมาะสมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณกลุ่มเกษตรกรผู้ปลูกสับปะรดบ้านนางแล ตำบลนางแล อำเภอเมืองเชียงราย จังหวัดเชียงราย ที่มีส่วนช่วยในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation, *Life Sciences*. 2004; 75: 639-653.

Dharma P, Maluegha M, ArisWidodo. The effects of bromelain on angiogenesis, nitric oxide, and matrix metalloproteinase-3 and -9 in rats exposed to electrical burn injury, *Wound Medicine*. 2015; 9: 5-9.

Gaspani L, Limiroli E, Ferrario P, & Bianchi M. In vivo and in vitro effects of bromelain on PGE (2) and SP concentrations in the inflammatory exudate in rats, *Pharmacology*. 2002; 65: 83-86.

Guzik TJ, Korbut R, & Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation, *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2003; 54: 469-487.

Libby P. Inflammatory Mechanisms: The molecular basis of inflammation and disease, *Nutrition Reviews*. 2007; 65(12): 140-146.

Maurer HR. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use, *Cellular and Molecular Sciences*. 2001; 58: 1234-1245.

Mequanint W, Makonnen E, & Urga K. In vivo Anti-inflammatory activities of leaf extracts of Ocimumlamiifolium in mice model, *Journal of Ethno pharmacology*. 2011; 134: 32-36.

Vall S. Process for the preparation of pineapple stem bromelain, 2007; Available at: http://www.freepatentsonlincom/5106621.html. Accessed September 15, 2017.

Van der Vliet A, Eiserich JP. & Cross CE. Nitric oxide a proinflammatory mediator in Lung Disease, *Respiratory Research*. 2000; 1: 67-72.

Sudsai T, Wattanapiromsakul C, Nakpheng T. & Tewtrakul S. Evaluation of the Wound Healing Property of *Boesenbergia longiflora* Rhizomes. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013; 150: 223-231.

Shahid SK, Turakhia NH, Kundra M. & et al. Efficacy and safety of phlogenzym a protease formulation, in sepsis in children, *Journal of the Association of Physicians of India*. 2002; 50: 527-531.

Vellini M, Desideri D, Milanese A. & et al. Possible involvement of eicosanoids in the pharmacological action of bromelain. *Arzneimittelforschung*. 1986; 36:110-112.

Wallace, J.M. Nutritional and botanical modulation of the inflammatory cascade eicosanoids, cyclooxygenases, and lipoxygenases as an adjunct in cancer therapy. *Integrative Cancer Therapies*, 2002; 1: 7-37.