



Thai Journal of Pharmacology

www.thaipharmacol.org

วารสารเภสัชวิทยา

Official Publication of
Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand

Contents

Research articles

Comparison of Efficacy between Losartan and Irbesartan in Hypertensive Patients at Saraburi Hospital, Thailand 2008

Cytotoxic Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles in Relation to Expression of 70s and 90s Stress Proteins

Effects of a Standardized Extract of *Centella asiatica* ECa 233 on Learning and Memory Impairment Induced by Transient Bilateral Common Carotid Artery Occlusion in Mice

Hypoglycemic Effect and Acute Toxicity of *Momordica charantia* Fruit Juice Product

Review

Antioxidative Stress of Herbal Extracts for Prevention on Parkinson's Disease

Vol.32, No. 2, 2010

ISSN 0125-3832

Thai Journal of Pharmacology

is owed and published every four months by the Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand.

Board of Editors

Advisory Editor Supatra Srichairat

Editor Laddawal Phivthong-ngam

Associate Editors Yamaratee Jaisin Anusorn Thampithak

Editorial Board

Adisak Wongkajornsilp
Bunkerd Kongyingyoes
Chaichan Sangdee
Chandhanee Itthipanichpong
Darawan Pinthong
Kesara Na-Bangchang
Krongtong Yoovathaworn
Mayuree Tantisira
Nongluk Sookvanichsilp
Nisamane Satyapan
Orapin Wongsawatkul
Pornpen Pramyothin

Pravit Akarasereenont
Sirintorn Yipchokanand
Somjai Nakornchai
Somsong Lawanprasert
Sopit Thamaree
Srichan Phornchirasilp
Supeecha Wittayalertpanya
Supatra Srichairat
Veerapol Kukongviriyapan
Wanna Chaicharoenkul
Wichittra Tassaneeyakul
Wongwiwat Tassaneeyakul

Office Department of Pharmacology
Faculty of Medicine, Srinakharinwitot University,
Sukhumwit 23 Road, Klongtoey, Wattana,
Bangkok 10110, Thailand. Tel/Fax 022602233 ext. 4803

Notice The opinions expressed here in are those of the authors and do not necessarily reflect the views of the editors or the publisher.

Printed at Ruen Kaew Press, 947 Arun-Amarin Road, Bangkok 10700. Tel: 024126552

วารสารเภสัชวิทยา (Thai Journal of Pharmacology) นี้เป็นลิขสิทธิ์ของสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย ไม่อนุญาตให้นำส่วนใดส่วนหนึ่งของเอกสารฉบับนี้ไปถ่ายเอกสาร ผลิตหรือพิมพ์ซ้ำ หรือนำไปใช้เพื่อประโยชน์ทางการค้าโดยปราศจากการยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรจากบรรณาธิการ

Thai Journal of Pharmacology

Vol. 32, No. 2, 2010

CONTENTS

Editorial 2

RESEARCH ARTICLES

Comparison of Efficacy between Losartan and Irbesartan in Hypertensive Patients at Saraburi Hospital, Thailand 2008 3
Waraporn Lertwimonchai, Titinun Auamnoy

Cytotoxic Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles in Relation to Expression of 70s and 90s Stress Proteins 11
Rawiwan Maniratanachote, Preyawit Na-Ubon, Kornphimol Kulthong, Nuttapun Supaka, Issara Sramala

Effects of a Standardized Extract of *Centella asiatica* ECa 233 on Learning and Memory Impairment Induced by Transient Bilateral Common Carotid Artery Occlusion in Mice 22
Mayuree H. Tantisira, Boonyong Tantisira, Chamnan Patarapanich, Rutt Suttisri, Suwanna Luangcholatan, Salin Mingmalairak, Aree Wanasuntronwong, Ekarin Saifah

Hypoglycemic Effect and Acute Toxicity of *Momordica charantia* Fruit Juice Product 34
Weena Jiratchariyakul, Srichan Phornchirasilp, Monraudee Chanchai, Atiya Sabsang

REVIEW ARTICLE

Antioxidative Stress of Herbal Extracts for Prevention on Parkinson's Disease 42
Yamaratee jaisin, Piyanee Ratanachamngong

บรรณาธิการแถลง

เรียนสมาชิกทุกท่าน

วารสารของสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย (Thai Journal of Pharmacology) ฉบับนี้ นับเป็นฉบับแรกของคณะบรรณาธิการวารสารชุดใหม่ ต้องขอขอบคุณท่านนายกสมาคมและ คณะกรรมการบริหารสมาคมเภสัชวิทยาทุกท่านที่ไว้วางใจ และอีกหลายๆ ท่านที่ให้ความช่วยเหลือ คณะบรรณาธิการวารสารจะดำเนินงานต่อเนื่องตามนโยบายของคณะกรรมการบริหารสมาคมฯ เพื่อให้วารสารเป็นศูนย์กลางในการแลกเปลี่ยนข้อมูลความรู้ และพัฒนางานวิจัยทางด้านเภสัชวิทยา ต่อไป

การที่วารสารจะมีความพร้อม และสามารถออกได้ตามกำหนดเวลา ส่วนหนึ่งขึ้นอยู่กับ ต้นฉบับ ดังนั้นจึงหวังเป็นอย่างยิ่งว่าจะได้รับความร่วมมือจากชาวเภสัชวิทยาและสาขาใกล้เคียงในการส่งต้นฉบับเพื่อลงตีพิมพ์ในวารสาร หากมีข้อเสนอแนะใดๆ คณะบรรณาธิการวารสารขอน้อมรับ ด้วยความยินดียิ่ง

รองศาสตราจารย์ ดร.ลัดดาวัลย์ ฝิวทองงาม

บรรณาธิการวารสาร

RESEARCH ARTICLE

Comparison of Efficacy between Losartan and Irbesartan in Hypertensive Patients at Saraburi Hospital, Thailand 2008

Waraporn Lertwimonchai¹, Titinun Auamnoy²

¹International Graduate Program In Social and Administrative Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok

²Department of Social and Administrative Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok

Abstract

Objectives: To compare antihypertensive efficacy of 50 mg losartan and 150 mg irbesartan blocking for gender and controlling for (1) baseline SeDBP and SeSBP and (2) age. **Method:** A retrospective study design was performed. Data were collected from computerized Saraburi hospital main database. All hypertensive patients who were prescribed losartan 50 mg once daily or irbesartan 150 mg once daily for hypertensive treatment during January 1-June 30, 2008 were the population framework. Exclusion criteria included concomitant diseases and medications. Simple random technique was employed. The α 0.05, power 0.90 and effect size 0.15 were set to generate 200 samples in each group (n= 400). Baseline SeDBP and SeSBP were used as covariates. After 8 weeks of treatments, SeDBP and SeSBP were measured and compared. **Results:** Total 400 (100%) patients, mostly 270 (67.50%) were female. The average age was 63.36±12.42 years. After treatments, the average SeDBP and SeSBP of losartan group and irbesartan groups were 71.68±9.43, 127.51±12.22 and 69.35±9.64, 126.44±15.16 mmHg respectively. When controlled baseline SeDBP, SeSBP, age and blocked gender, the average SeDBP and SeSBP of losartan group and irbesartan group were 71.68±9.43, 127.51±12.22 and 69.35±9.64, 126.44±15.16 mmHg respectively (p=0.017, p=0.024, Two way ANCOVA without gender interaction).

Conclusions: Both drugs, losartan 50 mg or irbesartan 150 mg once a day could significantly lower SeDBP and SeSBP. Irbesartan 150 mg once daily could significantly lower SeDBP (14 versus 10 mmHg) and SeSBP (34 versus 26 mmHg) better than losartan 50 mg once daily. Gender made no differences on efficacy of the two drugs.

Key words: losartan, irbesartan, hypertension

เปรียบเทียบประสิทธิผลระหว่างยาโลซาร์แทน และเออร์เบซาแทน ในผู้ป่วยโรคความดันโลหิตสูงที่ โรงพยาบาลสระบุรี ประเทศไทย ปี 2551

วรารณณ์ เลิศวิมลชัย¹, ฐิตินันท์ เอื้ออำนวย²

¹หลักสูตรวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต/มหาบัณฑิต สาขาเภสัชศาสตร์สังคมและบริหาร (นานาชาติ)

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ

²ภาควิชาเภสัชศาสตร์สังคมและบริหาร คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ

วัตถุประสงค์: เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิผลในการลดความดันโลหิตของยาโลซาร์แทนขนาด 50 มก. และยาเออร์เบซาแทนขนาด 150 มก. ในผู้ป่วยเพศชายและหญิง โดยควบคุม (1) ความดันโลหิตพื้นฐานค่าล่างและค่าบนขณะนั่งพัก และ (2) อายุ **วิธีวิจัย:** เป็นการศึกษาแบบย้อนหลัง เก็บข้อมูลจากฐานข้อมูลหลักในระบบคอมพิวเตอร์ของโรงพยาบาลสระบุรี ประชากรเป็นผู้ป่วยโรคความดันโลหิตสูงทั้งหมดซึ่งได้รับยาโลซาร์แทน ขนาด 50 มก. วันละ 1 ครั้ง หรือ ยาเออร์เบซาแทน ขนาด 150 มก. วันละ 1 ครั้ง เพื่อรักษาโรคความดันโลหิตสูง ในระหว่างวันที่ 1 มกราคม 2551 ถึง 30 มิถุนายน 2551 เกณฑ์การคัดออก คือ โรคที่เป็นร่วม และการใช้ยาอื่นร่วม ใช้การสุ่มอย่างง่าย ตั้งค่า α 0.05, power 0.90 และ effect size 0.15 ได้ 200 ตัวอย่างในแต่ละกลุ่ม (n=400) กำจัดความดันโลหิตพื้นฐานค่าล่างและค่าบนขณะนั่งพักที่เป็นตัวแปรกวน หลังจากการให้ยา 8 สัปดาห์ ความดันโลหิตค่าล่างและค่าบนขณะนั่งพักถูกนำมาวัดและเปรียบเทียบ **ผลวิจัย:** กลุ่มตัวอย่างทั้งหมด 400 คน (ร้อยละ 100) ส่วนใหญ่เป็นหญิง 270 คน (ร้อยละ 67.50) อายุเฉลี่ย 63.36 ± 12.42 ปี หลังจากได้รับยา ความดันโลหิตเฉลี่ยค่าล่างและค่าบนขณะนั่งพักของกลุ่มที่ได้รับยาโลซาร์แทน และ กลุ่มที่ได้รับยาเออร์เบซาแทน คือ 71.68 ± 9.43 , 127.51 ± 12.22 และ 69.35 ± 9.64 , 126.44 ± 15.16 มม.ปรอท ตามลำดับ เมื่อควบคุมตัวแปรความดันโลหิตพื้นฐานค่าล่างและค่าบนขณะนั่งพัก อายุ และ เพศ ความดันโลหิตเฉลี่ยค่าล่างและค่าบนขณะนั่งพักของกลุ่มที่ได้รับยาโลซาร์แทน และกลุ่มที่ได้รับยาเออร์เบซาแทน คือ 71.68 ± 9.43 , 127.51 ± 12.22 และ 69.35 ± 9.64 , 126.44 ± 15.16 มม.ปรอท ตามลำดับ (p=0.017, p=0.024 Two way ANCOVA ไม่พบปฏิสัมพันธ์ของตัวแปรเพศ) สรุป: ยาโลซาร์แทนขนาด 50 มก. หรือ ยา เออร์เบซาแทนขนาด 150 มก. วันละ 1 ครั้ง สามารถลดความดันโลหิตค่าล่างและค่าบนขณะนั่งพักได้อย่างมีนัยสำคัญ ยาเออร์เบซาแทน สามารถลดความดันโลหิตค่าล่างขณะนั่งพัก (14 เทียบกับ 10 มม.ปรอท) และความดันโลหิตค่าบนขณะนั่งพัก (34 เทียบกับ 26 มม.ปรอท) ได้ดีกว่ายาโลซาร์แทน อย่างมีนัยสำคัญ ตัวแปรเพศไม่ทำให้ประสิทธิผลของยาทั้ง 2 ชนิดแตกต่างกัน

คำสำคัญ: ยาโลซาร์แทน ยาเออร์เบซาแทน ความดันโลหิตสูง

Introduction

Hypertension (HT) is a medical condition in which the blood pressure is chronically elevated. In 2003, the seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC 7 Guideline) defined blood pressure (BP) between 120/80 mmHg as normal BP and 139/89 mmHg as prehypertension. Hypertension is likely to present when a person's SBP is consistently 140 mmHg or greater with or without DBP of 90 mmHg or greater. Further it states individuals with prehypertension are at high risk of developing hypertension¹.

Angiotensin II receptor antagonists (ARBs) is an antihypertensive drug that inhibit the renin-angiotensin system by selectively blocking the AT₁, AT₂ receptors². ARBs are primarily used for the treatment of hypertension where the patient is intolerant of ACE inhibitor therapy. The characteristics of ARBs contribute to treatment success are twenty-four-hour blood pressure control, rapid treatment response, and excellent tolerability profiles. As surges in blood pressure occur in the early morning, 24-hour BP control is necessary to effectively reduce cardiovascular risk. Single doses of ARBs administered in ambulatory BP monitoring studies have been shown to control blood pressure throughout the day and night. In addition, BP reductions have been noted as early as 2 weeks after the start of treatment, and in an irbesartan trial, 33% of severely hypertensive patients reached the primary outcome of blood pressure control (DBP < 90 mmHg) after 5 weeks of treatment³.

Losartan and irbesartan are the active competitive AT₁ receptor antagonist⁴⁻⁶. They are highly selective AT₁ receptor antagonist⁷⁻⁸ and are indicated for treatment of hypertension. Moreover they also can delay

progression of diabetic nephropathy and reduce the renal disease progression in patients with type 2 diabetes, and microalbuminuria or proteinuria⁹.

An experimental design showed that after 8 weeks of treatment with 300 mg irbesartan, reductions from baseline in trough SeDBP and trough SeSBP were greater than with 100 mg losartan ($P < 0.01$ for both comparisons), by 3.0 and 5.1 mmHg, respectively; larger reductions were also demonstrated at weeks 1 and 4 ($P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively, for SeDBP). Throughout the study, the antihypertensive effect of 150 mg irbesartan did not differ significantly from that of 100 mg losartan¹⁰.

Oparil et al. studied in titrated doses according response, the change from baseline in DBP after 8 weeks' monotherapy was significantly greater (by 2 mmHg) in patients receiving irbesartan 150-300 mg once daily than losartan 50-100 mg once daily. Differences in SBP and response rates (including normalisation) were not significant. After a further 4 weeks, when add-on therapy was allowed, significantly greater effects on both DBP and SBP, and also response rate, were reported for the irbesartan group compared with those receiving losartan. Moreover, when hydrochlorothiazide was added to losartan, the dosage of losartan was reduced to 50 mg once daily¹¹. When investigated deeper in recipients who used olmesartan 20 mg once daily had a significantly greater reduction (by approximately 2 mmHg) in SeDBP than patients who received irbesartan 150 mg once daily after 8 weeks' treatment¹². However, there was no significant between group difference neither in the effect on SBP, nor for change in mean 24-hour ambulatory blood pressure, assessed as a secondary parameter (11/7 vs 13/9 mmHg). For

comparing between losartan and irbesartan, they found that the reduction of SeDBP of irbesartan was significantly greater than losartan (9.9 and 8.2 mmHg, respectively). The reduction in mean 24-hour DBP of losartan was lower than irbesartan (6.2 and 7.4 mmHg, respectively). The reduction in mean 24-hour SBP with irbesartan was significantly greater than losartan (11.3 and 9.0 mmHg, respectively)¹².

Ekman et al. concluded his study that irbesartan provides a cost-effective antihypertensive treatment better than losartan¹³.

Dang et al. prescribed 2 groups of patients with losartan 50 mg or irbesartan 150 mg. After 4 weeks, patients with SeDBP <90 mmHg and SeSBP <140 mmHg continued the same dose regimen for another 4 weeks. If BP was not controlled after 4 weeks of treatment, the dose of either regimen was doubled to losartan 100 mg and irbesartan 300 mg. There were 325 patients in completed study (162 in the losartan group and 163 in the irbesartan group). They found that BP declined comparably in both groups from 151/92 mmHg at baseline to 137/83 and 135/83 (losartan and irbesartan, respectively) However, p-value was greater than 0.05¹⁴.

In this study, researcher compared efficacy of 50 mg losartan and 150 mg irbesartan by blocking gender and also controlling for 2 covariates namely (1) baseline SeDBP&SeSBP and (2) age in Thai hypertensive patients.

Methods

A retrospective design was performed. All hypertensive patients who were prescribed losartan 50 mg once a day or irbesartan 150 mg once a day for hypertension during January 1-

June 30, 2008 were the population framework. Exclusion criteria included concomitant diseases that would present safety hazards and concomitant medications that might interfere with the assessment of efficacy or safety e.g., drugs known to affect blood pressure. Simple random technique was employed to select samples from computerized Saraburi hospital main database. The Type I error 0.05, power 0.90 and effect size 0.15 were set to yield 200 samples in each group (total 400) using Cohen's table 4.6 page 348¹⁵. SPSS version 17.0 was employed to analyze all data. Demographic characteristics were expressed as frequency and percentage and means \pm SD. SeDBP and SeSBP between losartan and irbesartan treatments blocking for gender were compared when controlling for baseline SeDBP&SeSBP and age using Two ways Analysis of Covariance. All statistical tests were two-sided with a significance level $\alpha = 0.05$.

Results

Total 400 (100%) patients, most 270 (67.50%) were female, 130 (32.50%) were male.

The average age was 63.36 ± 12.42 years.

When age and the baseline SeDBP were controlled (two covariates) and gender was blocked (the second fixed factors) then treatment with 50 mg losartan or 150 mg irbesartan for 8 weeks, the average SeDBP in losartan group and irbesartan group were 71.68 ± 9.43 mmHg and 69.35 ± 9.64 mmHg respectively ($p = 0.017$, Two way ANCOVA without gender interaction ($p = 0.927$) controlling for baseline SeDBP and age ($p = 0.000, 0.533$) (Table 1, 2 and Figure 1).

Table 1 SeDBP and SeSBP before and after treatment with losartan and irbesartan

	SeDBP (mmHg)		different change	p-value	SeSBP (mmHg)		different change	p-value
	Before	After			Before	After		
losartan	81.57±8.56	71.68±9.43	10	**0.000	153.67±12.04	127.51±12.22	26	**0.000
irbesartan	83.25±12.24	69.35±9.64	14	**0.000	160.04±15.42	126.44±15.16	34	**0.000
Different change	2	2			6	1		
p-value	0.111	**0.000			**0.000	**0.000		

**sig at p<0.01

Table 2 Two way ANCOVA for SeDBP
Dependent Variable: SeDBP after treatment

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	p-value
Corrected Model	4517.227 ^a	5	903.446	11.044	**0.000
Intercept	8244.755	1	8244.755	100.787	**0.000
Age	31.887	1	31.887	0.390	0.533
Baseline SeDBP	3012.725	1	3012.725	36.829	**0.000
Drug	473.706	1	473.706	5.791	*0.017
Male	389.705	1	389.705	4.764	*0.030
Drug * Male	0.687	1	0.687	0.008	0.927
Error	32230.683	394	81.804		
Total	2025694.000	400			
Corrected Total	36747.910	399			

a. R Squared = 0.123 (Adjusted R Squared = 0.112)

** sig at p<0.01,

* sig at p<0.05

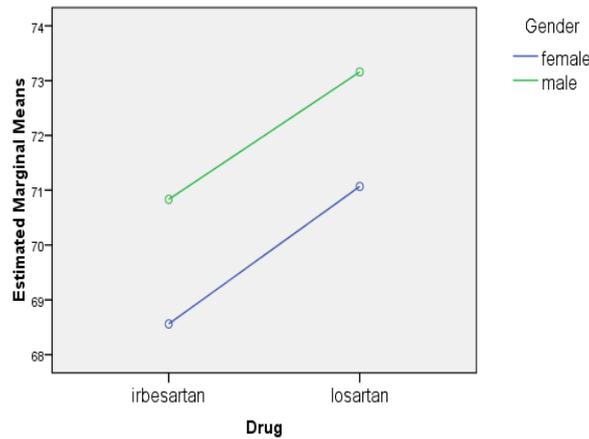


Figure 1 Illustration of estimated marginal means of SeDBP after treatment

Table 2 and Figure 1 demonstrated that there was no interaction effect between drug and gender (Drug * Male) (p=0.927, Two way ANCOVA) therefore only the two main effects (drug and gender) were interpreted. The baseline SeDBP was a significant covariate (p=0.000) whereas age was not a significant covariate (p=0.533). The average SeDBP of female was significantly lower than male (p=0.030). The average SeDBP of irbesartan was significantly lower than losartan (p=0.017, Two way ANCOVA) controlling for age and baseline SeDBP (Table 2 and Figure 1).

When age and the baseline SeSBP were controlled (two covariates) and gender was blocked (the second fixed factors) then treatment with 50 mg losartan or 150 mg irbesartan for 8 weeks, the average SeSBP in losartan group and irbesartan group were

127.51±12.22 mmHg and 126.44±15.16 mmHg respectively (p=0.024, Two way ANCOVA without gender interaction (p=0.714) controlling for baseline SeSBP and age (p=0.000, 0.769) (Table 1,3 and Figure 2).

Table 3 Two way ANCOVA for SeSBP
Dependent Variable: SeSBP after treatment

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	p-value
Corrected Model	13825.837 ^a	5	2765.167	17.650	**0.000
Intercept	9505.197	1	9505.197	60.671	**0.000
Age	13.583	1	13.583	0.087	0.769
Baseline SeSBP	13676.623	1	13676.623	87.297	**0.000
Drug	806.528	1	806.528	5.148	*0.024
Male	504.562	1	504.562	3.221	0.073
Drug * Male	21.047	1	21.047	0.134	0.714
Error	61726.861	394	156.667		
Total	6524359.000	400			
Corrected Total	75552.698	399			

a. R Squared = 0.183 (Adjusted R Squared = 0.173)

** sig at p<0.01

* sig at p<0.05

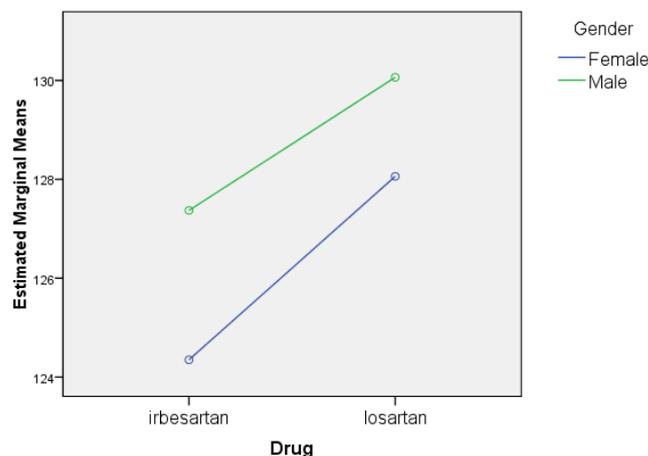


Figure 2 Illustration of estimated marginal means of SeSBP after treatment

Table 3 and Figure 2 demonstrated that there was no moderating effect (interaction effect) between drugs and gender (Drug * Male) (p=0.714, Two way ANCOVA) therefore only the two main effects (drug and gender) were taken into account.

The baseline SeSBP was a significant covariate (p=0.000) whereas age was not a significant covariate (p=0.769). The average SeSBP of female was significantly lower than male (p=0.073). The average SeSBP of irbesartan was significantly lower than losartan (p=0.024, Two way ANCOVA) controlling for age and baseline SeSBP (Table 3 and Figure 2).

Discussion and Conclusion

We concluded that irbesartan 150 mg once a day could significantly lower SeDBP and SeSBP in hypertensive patients better than losartan 50 mg once a day. Gender made no differences on efficacy of the two drugs (no interaction effect). If patients' BMI was recorded and taken into consideration as other covariates, the model would be more accurate. Future study if researchers measure SeDBP and SeSBP more than one time periodically for instant every 4 weeks for 4 times then employ Repeated Measure Two Ways ANCOVA controlling for 3 covariates namely baseline BP, age and BMI they might see more clearly picture of comparing longitudinal hypertensive effects between losartan and irbesartan. Future study should be done in other patients from different sites to verify external validity then claim these generalized findings to all Thai hypertensive patients as a whole.

Acknowledgement

We would like to thank Saraburi hospital for offering very useful and crucial data for this study.

References

1. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, et al. The Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: The JNC 7 report. *JAMA* 2003; 289:2560-72.
2. Timmermans PBMWM, Wong CM, Chiu AT, et al. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 1993; 45:205-51.
3. Venkata C, Ram S. Angiotensin Receptor Blockers: Current Status and Future Prospects. *The AJM* 2008; 121(8):657-63.
4. Wong PC, Price WA, Chiu AT, et al. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. VIII. Characterization of functional antagonism displayed by DuP 753, an orally active antihypertensive agent. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 1990; 252:719 - 25.
5. Wong PC, Price WA, Chiu AT, et al. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. XI. Pharmacology of EXP3174: an active metabolite of DuP 753, an orally active antihypertensive agent. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 1990; 255:211-7.
6. Christophe B, Libon R, Cazaubon C, et al. Effects of irbesartan (SR 47436/BMS-186295) on angiotensin II-induced pressor responses in the pithed rat: potential mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol* 1995; 281:161-71.
7. Dzau VJ, Sasamura H, Hein L. Heterogeneity of angiotensin synthetic pathways and receptor subtypes: physiological and pharmacological implications. *J. Hypertens* 1993; 11(3) suppl 13-22.
8. Reeves RA, Lin CS, Kassler-Taub K, et al. Dose-related efficacy of irbesartan for hypertension: an integrated analysis. *Hypertension* 1998; 31(6):1311-6.
9. Rossi S, editors. *Australian Medicines Handbook 2006*, Adelaide: Australian Medicines Handbook, 2006.
10. Kassler-Taub K, Littlejohn T, Elliott W, et al. Comparative efficacy of two angiotensin II receptor antagonists, irbesartan and losartan, in mild-to-moderate hypertension. Irbesartan/Losartan Study Investigators [published erratum appears in *Am J Hypertension* 11(6 Pt 1) (June 1998): 736]. *Am J Hypertension* 1998; 11(4 Pt 1):445-53.
11. Oparil S, Guthrie R, Lewin AJ, et al. An elective-titration study of the comparative effectiveness of two angiotensin II-receptor blockers, irbesartan and losartan: Irbesartan/Losartan Study Group Investigators. *Clin Ther* 1998; 20(3):398-409.
12. Oparil S, Williams D, Chrysant SG, et al. Comparative efficacy of olmesartan, losartan, valsartan, and irbesartan in the control of essential hypertension [published erratum appears in *J Clin Hypertens (Greenwich)* 3(6) (November-December 2001): 395]. *J. Clin. Hypertens, (Greenwich)* 2001; 3(5):283-91, 318.
13. Ekman M, Bienfait-Beuzon C, and Jackson J. Cost-effectiveness of irbesartan/hydrochlorothiazide in patients with hypertension: an economic evaluation for Sweden. *Journal of Human Hypertension* 2008; 22:845-55.

14. Dang A, Zhang Y, Liu G, et al. Effects of losartan and irbesartan on serum uric acid in hypertensive patients with hyperuricaemia in Chinese population. *Journal of Human Hypertension* 2006; 20:45-50.
15. Cohen J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. Lawrence Erlbaum Associates Publishers, 1988.

RESEARCH ARTICLE

Cytotoxic Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles in Relation to Expression of 70s and 90s Stress Proteins

Rawiwan Maniratanachote*, Preyawit Na-Ubon, Kornphimol Kulthong, Nuttapun Supaka, Issara Sramala

*National Nanotechnology Center, National Science and Technology Development Agency
111 Thailand Science Park, Phahonyothin Rd., Klong Luang, Pathumthani 12120,
Thailand*

Abstract

Titanium dioxide (TiO₂) is one of the most widely used nanomaterials in various fields of technology including food and cosmetics. Thus, increasing exposure to these nanomaterials has raised serious concerns. In this study, toxicity of titanium dioxide nanoparticle (nanoTiO₂), anatase crystalline form, and their effects on stress protein expression in A549 cells were investigated. The cells were exposed to different concentrations of nanoTiO₂ with and without non-toxic intensity of UV light at various lengths of time. It was found that nanoTiO₂ with UV irradiation caused reduction in cell viability in a concentration- and time-dependent manner, whereas nanoTiO₂ alone was likely non-toxic to the cells. These results can be partly explained by the high photocatalytic potential of anatase which can generate reactive oxygen species to harm the cells. It is known that exposure of environmental stress can result in changes of expression of several inducible molecular chaperones. These include the cytosolic resident heat shock proteins (HSPs) and the endoplasmic reticulum resident glucose-regulated proteins (GRPs) which involved in cellular protein quality control. With using immunoblot analysis, changes of expression level of Hsp70, Hsp90, Grp78 and Grp94 proteins were investigated. The data revealed correlation between overexpression of Grp78 and Grp94 proteins and nanoTiO₂-induced cytotoxicity. These effects suggest possible disturbance of protein folding in the cells by photo-activated nanoTiO₂. Thus, further studies are essential to clarify the mechanism underlying toxic effects of this nanomaterial.

Keywords: titanium dioxide, nanoparticle, stress protein, HSP, GRP, cytotoxicity

Introduction

Titanium dioxide (TiO_2) is a naturally occurring mineral and commonly found in three crystalline forms: rutile, anatase and brookite. Anatase crystalline form, having a band gap of 3.2 eV, is the most effective photocatalytic activity. Its mechanism is illustrated in Figure 1. When sufficient energy of the photon from light source is absorbed on a TiO_2 particle, it promotes an electron (e^-) from the valence band to the conduction band resulting in a hole (h^+) in the valence band. Both e^- and h^+ can migrate and react with other species at the surface of TiO_2 particle. The hole has a strong oxidizing power to organic species and water to generate hydroxyl radicals ($\bullet\text{OH}$) (Fujishima *et al.*, 2000). This photocatalytic activity of TiO_2 can decompose both gram positive and gram negative bacteria (Jang and Kim, 2001). Notably, smaller particles of TiO_2 have a higher degree of antibacterial effects. TiO_2 nanoparticles (nanoTiO_2) are

therefore of considerable industrial interest such as in cosmetics and pharmaceutical industries. Thus, safety of this material and health implications become the point of concern.

Several investigations in rodents revealed that exposure to nanoTiO_2 caused development of inflammation, pulmonary fibrosis and lung tumors (Afaq *et al.*, 1998; Baggs *et al.*, 1997; Driscoll and Maurer, 1991; Oberdorster *et al.*, 1992). Smaller size of nanoTiO_2 was more toxic than bulk particle (Oberdorster *et al.*, 1994). In previous study, ultrafine particles can inhibit phagocytosis by macrophages when compared to the fine particles, leading to oxidative stress and inflammation (Donaldson *et al.*, 2001). They caused an increase in the cytokine interleukin-8 production without significant difference in cell viability (Peters *et al.*, 2004). Furthermore, because of its small size, nanoTiO_2 can be readily internalized to

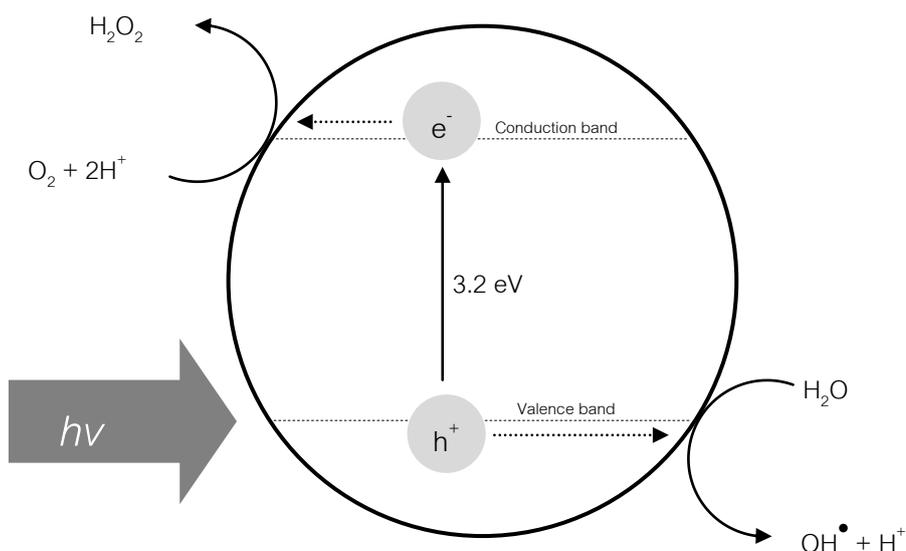


Figure 1 schematic illustration of the mechanism of TiO_2 photocatalysis. (Adapted from Fujishima *et al.*, 2000)

the cells (Sterns et al., 2001). In addition, TiO₂ can induce DNA fragmentation and apoptotic cell death (Rahman *et al.*, 2002). It has been proposed that the mechanism of DNA damage was more likely from the hydroxyl radicals because they can react with bases or deoxyribosyl backbones of the DNA structure (Valko *et al.*, 2006).

The cellular response to stress has been an invaluable tool for investigating the mechanisms and dynamics of inducible gene expression in eukaryotes since it has been well characterized at molecular level. Therefore, study on cell components of the pathways can be a high throughput toxicity screening. The 70s and 90s stress proteins are constitutively expressed at a high level in all eukaryotic cells and induced by a number of stimuli such as drugs, chemicals, and heat stress (Clayton et al., 2005; Maniratanachote et al., 2005; Skandrani et al., 2006a, 2006b). Grp78 and Grp94 are peptide proteins in the endoplasmic reticulum (ER), whereas Hsp70 and Hsp90 are presented in the cytoplasm and nucleus (Gething and Sambrook, 1992; Kaufman, 1999; Pratt et al., 2010). The stress protein response in relation to nanoTiO₂ treatment has not been evaluated so far. The objective of this study is to find out the toxic effects of non-UV and UV-irradiated nanoTiO₂ and the cellular stress response by quantifying changes in expression levels of molecular 70s and 90s stress proteins involved in cellular protein quality control.

Materials and Methods

Source of titanium dioxide nanoparticles

Titanium dioxide nanopowder, anatase crystalline form, was purchased from Sigma (Saint Louis, MO). The product insert information indicates particle size of less than 25 nm and specific surface of 200-220 m²/g.

Particle size and surface charge analysis

The particle size, polydispersity index (PDI) and Zeta potential were measured by dynamic light scattering (Malvern, Zetasizer Nanoseries S4700). One milliliter of TiO₂ water suspension was sonicated in ultrasonic bath (Branson, 2510E-DTH) at 27 °C for 60 min before analyzed by Zetasizer Nanoseries.

Morphology analysis

Nano-TiO₂ morphology was analyzed by transmission electron microscope (TEM; JEM-2010, Jeol) and scanning electron microscope (SEM; SRS-3400N, Hitachi) according to the equipments' operation guide. For TEM, a drop of the TiO₂ solution was placed on a carbon film supported by a 200 mesh copper grid and the solvent was removed by drying overnight in a desiccator. TEM image of the TiO₂ particles were collected at 200 kV and 100,000 times magnification. For SEM, TiO₂ solution was dropped on carbon tape and left to dry at 30 °C for 1 day before analyzing. The detector used for the observation was secondary electron detector (SE) with magnification of 50,000 times. The working distance was approximately 5 mm and the accelerating voltage was 20 kV.

UV irradiation

A black light UV radiator equipped with a mercury-xenon lamp and a BPF365 filter for UVA was used in all experiments. The UV intensity at 365 nm was measured with an UV Intensity Meter Model 1000 (SUSS MicroTec) equipped with a P365 nm sensor.

Cell culture and treatment condition

Human lung carcinoma (A549) cells were obtained from ATCC (Manassas, VA, <http://www.atcc.org>).

The cells were maintained in Ham's F12K medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) at 37 °C in humidified atmosphere with 5% CO₂. Before treatment, A549 cells were grown overnight and reached about 80% confluence. Titanium dioxide nanoparticles were dispersed in FBS-free medium and sonicated before treatment to the cells. Treated cells were incubated with UV irradiation at 37°C for up to 12 h.

Cytotoxicity assay

A549 cells were seeded onto 96-well plate in Ham's F12K medium supplemented with 10% FBS for 48 h before treatment. The medium was then removed and replaced with Nano-TiO₂ suspension in FBS-free medium in various concentrations and incubated in a 37°C temperature-controlled air incubator equipped with or without UV lamp for maximum period of 12 h. Cytotoxicity was assessed by using CellTiter 96 Aqueous One Solution Reagent (Promega, Madison, WI) which contains MTS tetrazolium. The resulting formazan product was measured the absorbance at 490 nm using a SpectraMax M2 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Percent cell viabilities were calculated by comparing them to the absorbance of the control cells.

Cell lysate preparation

The cells were lysed in cell lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH8.0, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 100 mM NaF, 0.2 mM Na₃VO₄) supplemented with protease inhibitor cocktail (Sigma) on ice for 1 h. The insoluble materials were removed by centrifugation at 12,000 rpm for 20 min at 4°C. The supernatant was collected and the protein concentration in each sample was measured by using a Coomassie Plus (Pierce).

Western blot analysis

The cell lysates were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a polyvinylidene fluoride membrane (Pall Life Sciences, Ann Arbor, MI). The specific stress proteins were detected by anti-HSP70 (SPA-820), anti-HSP90 (SPA-830), and anti-KDEL (SPA-827) antibodies (Stressgen, San Diego, CA). The anti-KDEL antibody was used to detect both Grp94 and Grp78 proteins. The membrane was incubated with biotinylated-secondary antibodies at and then with avidin-biotin complex (Santa Cruz). 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) was used as a substrate for peroxidase. The quantitative analysis of protein expression was performed by using GeneTools image analysis software (Syngene, Frederick, MD).

Statistical analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post hoc test using Instat version 2.0 software. A value of $p < 0.01$ was considered statistically significant.

Results

Particle size characterization

According to product information, anatase nanoTiO₂ was 99.9% purity with an average particle size of less than 25 nm and specific surface of 200-220 m²/g. The size was confirmed by dispersing nanoTiO₂ in the solution and measured by a nanosizer. It was found that size distribution was generally approximate 500 nm. The diameter of particles was not significantly reduced when increase sonication time from 5 min to 60 min (Table 1). In addition, particle size investigated by SEM and TEM revealed an agglomeration of the nanoparticles (Figure 2).

Table 1 Particle size and polydispersity index of TiO₂ sample suspension

Sample preparation	Hydrodynamic diameter (nm)	Polydispersity index (nm)
TiO ₂ in DW, sonication for 5 min	542.5 ± 8.21	0.258 ± 0.014
TiO ₂ in DW, sonication for 60 min	498.96 ± 3.21	0.304 ± 0.026

Data are mean ± SD

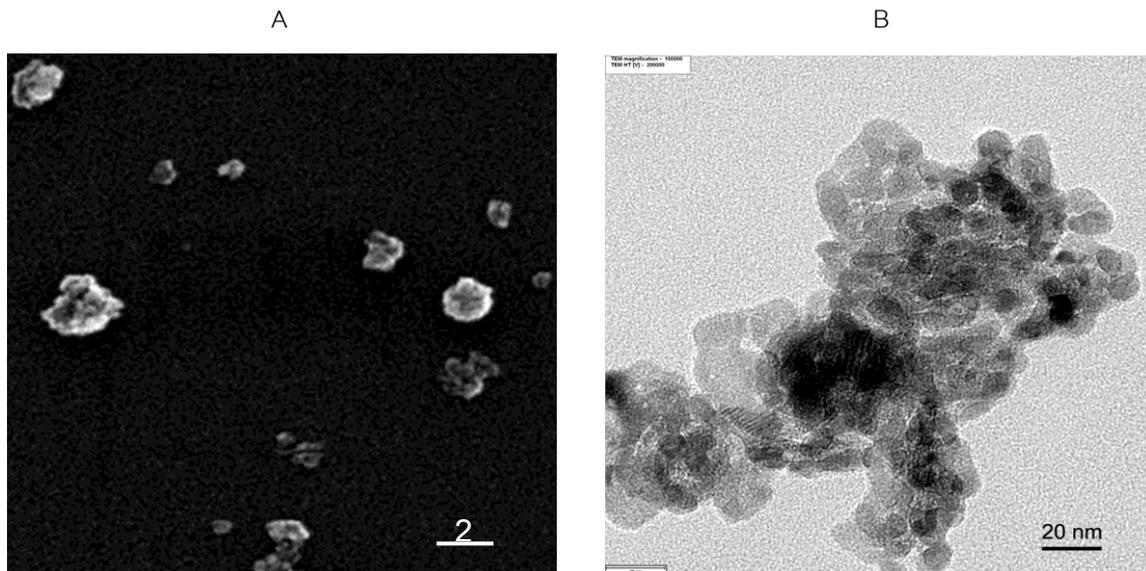


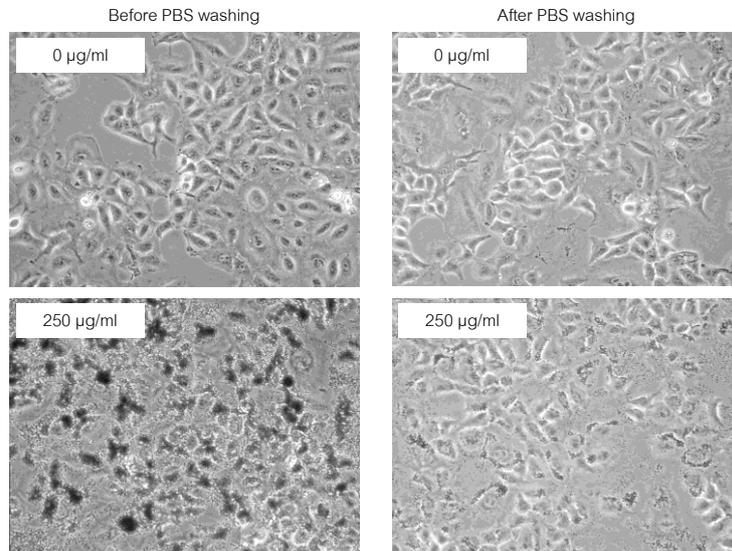
Figure 2. Characterization of nanoTiO₂ particles. The particles were dispersed in DW and sonicated for 5 min. The particle size was analyzed by SEM and imaged with magnification of 50,000 times (A). TEM image presenting anatase crystalline form of nanoTiO₂ particles were showed with magnification of 100,000 times (B).

Cytotoxicity of nanoTiO₂

To investigate cytotoxicity, A549 cells were exposed to various concentrations of nanoTiO₂. Since nanoTiO₂ particles were insoluble in the media, they were precipitated onto the cells after incubation for 12 h (Figure 3A, left panels). After washing with PBS, the cell morphology under microscope showed no change from the control (Figure 3A, right panels). Using MTS assay, incubation of the cells with nanoTiO₂ at concentrations of up to 500 µg/ml for 12 h showed no decrease of cell viability (Figure 3B). To further

determine cytotoxicity of photo activated nanoTiO₂, 40 µW/cm² of UV irradiation was applied together with the treatments. In dark condition, nanoTiO₂ alone for 6 to 12 h showed no toxic to the cells (Figure 4). In this experiment, incubation of the cells with UV irradiation for up to 12 h caused no significant change in cell viability (Figure 4, at 0 µg/ml nanoTiO₂). However, when the cells were exposed with nanoTiO₂ in the presence of UV irradiation, cell viability was significantly decreased in a time- and concentration-dependent manner (Figure 4).

A



B

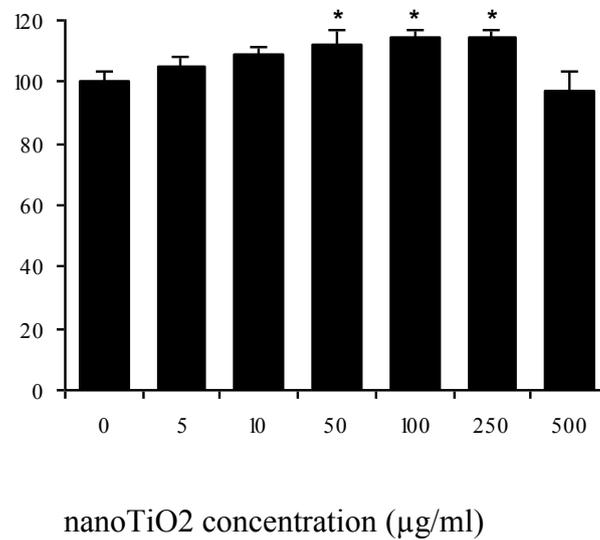


Figure 3. A549 cell morphology and cell viability after treatment with nanoTiO₂ for 12 h. The cells were incubated in an absence or presence of 250 µg/ml nanoTiO₂ for 12 h. Under light microscope, the cells were covered with nanoTiO₂ particles, which were washed out by PBS (A). Cell viability was determined by MTS assay (B). Data are presented as mean ± SD.

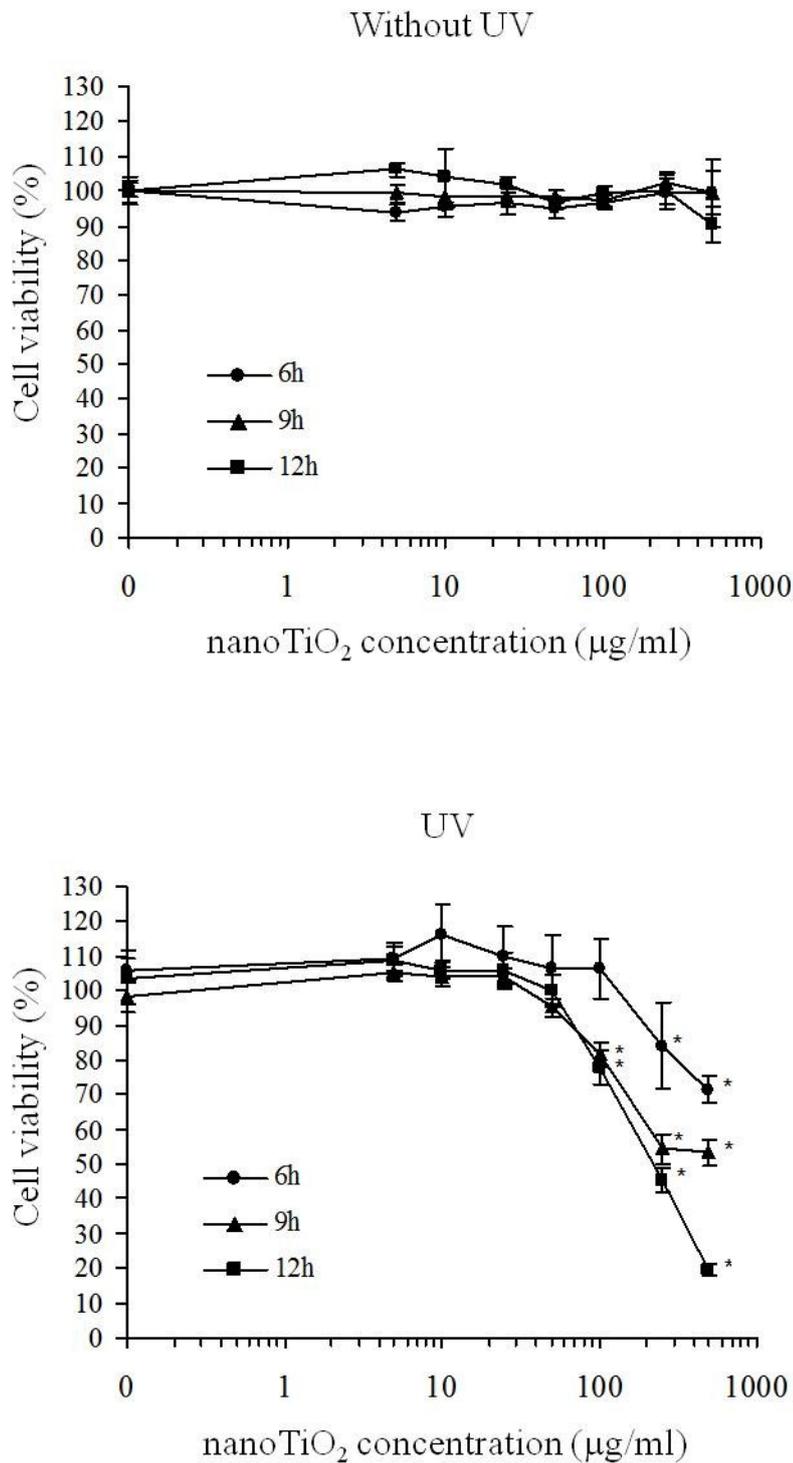


Figure 4. Cytotoxicity of nanoTiO₂ in A549 cells. The cells were incubated in the presence of various concentrations of nanoTiO₂ with or without UV irradiation for 6 h, 9 h and 12 h. Cell viability was determined by MTS assay. In the presence of UV, the results showed an approximate IC₅₀ of 200 µg/ml at 12 h of nanoTiO₂ incubation. Data are presented as mean ± SD.

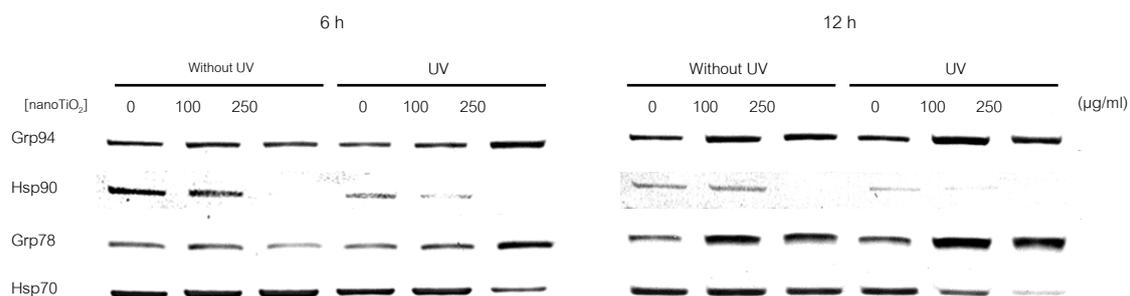


Figure 5. Changes of stress protein expressions in A549 cells. The cells were incubated in the presence of various concentrations of nanoTiO₂ with or without UV irradiation for 6 h and 12 h. The cell lysates were subjected to western blot analysis to detect expression of Hsp70, Grp78, Hsp90 and Grp94 protein levels with specific antibodies

Effects of nanoTiO₂ on expression of stress proteins

After A549 cells were incubated in the presence of various concentrations of nanoTiO₂ in dark or UV conditions for 6 h and 12 h, the cell lysates were subjected to western blot analysis with specific antibodies for detecting stress protein expressions. In the presence of UV, Grp94 and Grp78 protein expressions were increased depending on concentration and time of nanoTiO₂ exposure (Figure 5). In contrast, Hsp90 and Hsp70 proteins were decreased in their expressions. In dark condition, treatment of 250 µg/ml nanoTiO₂ caused a decrease in Hsp90 protein at 6 h and 12 h (Figure 5). This protein was decreased more in the presence of UV irradiation. For Hsp70 protein, it was reduced when the cells exposed with nanoTiO₂ plus UV in a time- and concentration-dependent manner.

Discussion

Nanoparticles are characterized by their size, which have at least one dimension of about 1 nm to 100 nm (ISO/TS 27687, 2008). Their smaller

size has increased in surface area and activities comparing to their bulk particles (Oberdorster et al., 2005; Nel et al., 2006). Therefore, particle size characterization was considered to be important for assessing toxicity of nanoparticles. In this study, results from electron micrograph demonstrated shape of anatase crystalline form of nano-sized TiO₂. The particles were agglomerated in aqueous solution which was unlikely disrupted into single particle by sonication.

Inhalation is one of the potential routes of exposure of airborne nanoparticles (Oberdorster et al., 2005; Nel et al., 2006). A549 lung carcinoma cells were among the widely used to study toxicity of nanoTiO₂ (Stearns et al., 2001; Sayes et al., 2006) and were also used in this study. In normal condition without UV, treatment of nanoTiO₂ at the concentrations up to 500 µg/ml were unlikely decrease in A549 cell viability when observed under microscope and measured by MTS assay. Sayes et al (2006) reported that anatase TiO₂ was more toxic than rutile TiO₂. However, the toxic effects were also dependent on cell types, treatment conditions and the observed

toxicological endpoints. For instance, treatment of nanoTiO₂ induced mononuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts (Rhaman et al., 2002). NanoTiO₂ did not reduce human dermal microvascular endothelial cell viability but caused an increase in the cytokine interleukin-8 production (Peters et al., 2004). In the condition with UV irradiation, nanoTiO₂ caused a decrease in A549 cell viability in a concentration- and time-dependent manner. These results were consistent with previous report in Chinese hamster ovary (CHO) and human colon carcinoma (Ls-174-t) cells (Uchino et al., 2002; Zhang et al., 2004). It was likely that hydroxyl radicals generated from photo-activation of nanoTiO₂ by UV irradiation were responsible for the toxic effects (Uchino et al., 2002).

It is known that exposure to various kinds of environmental insults can cause an induction of expression of several stress proteins, especially HSPs and GRPs at 70 kDa and 90 kDa. This study, therefore, further investigated effect of nanoTiO₂ on expression of four stress proteins, Grp78, Grp94, Hsp70 and Hsp90, in the cells. Grp78 and Grp94 are also related to the highly conserved Hsp70 and Hsp90 families, respectively (Gething and Sambrook, 1992; Kaufman 1999). They are responsible for normal cellular functions such as assisting protein folding, assembly, and disassembly for maintenance, as well as driving them for degradation (Jolly et al., 2000; Kaufman, 1999). While Hsp70 and Hsp90 are significantly induced in response to heat (Clayton et al., 2005; Pratt et al., 2010), Grp78 and Grp94 productions can be induced by various perturbations of ER functions such as the expression of mutant proteins or protein subunits, reductive stress, ER Ca²⁺ depletion, and the inhibition of asparagine (N)-linked glycosylation (Gething and Sambrook, 1992; Kaufman, 1999).

It was found that nanoTiO₂ caused an increase of the ER proteins, Grp78 and Grp94, in a concentration- and time-dependent manner. In addition, the overexpression of these proteins was more prominent in UV-activated nanoTiO₂ particles than nanoTiO₂ alone. These results were correlated with their reduction in cell viability measured by the MTS assay. Upregulation of Grp78 and Grp94 proteins normally indicates an unfolded protein response in the ER (Kaufman, 1999). Induction of Grp78 cooperates with Grp94 to assist protein folding and assembly, by which Grp94 acts after pre-folding step by Grp78 and participate in maturation of proteins that are transported to the cell surface (Melnick et al., 1994). In previous reports, overexpression of Grp78 and Grp94 was also found by treatment of the cells with several drugs and chemicals (Maniratanachote et al, 2005; Skandrani et al., 2006a, 2006b). However, in contrast to the Grps, both Hsp70 and Hsp90 proteins were decreased by nanoTiO₂. Our results are in agreement with the works of Skandrani et al., (2006a, 2006b) which found up-regulation of Grp78 and Grp90, but down-regulation of Hsp27, Hsp72/73, and Hsp90 stress proteins in response to various kinds of insecticides in A549 cells. They also showed that tunicamycin, which inhibit N-linked glycosylation and thus activate the ER unfolded protein response, caused overexpression of Grp78 and Grp94, but inhibits several HSPs including Hsp70 and Hsp90 families (Skandrani et al., 2006b). Our results suggest that nanoTiO₂ may disrupt ER functions, which activates unfolded protein response and subsequently promotes overexpression of Grp78 and Grp94 proteins. The effects were dependent on time of exposure and/or UV irradiation. However, the explanation of how Hsp70 and Hsp90 proteins were conversely expressed by the same treatment is still

unclear. Thus, further studies are essential to clarify the mechanism underlying toxic effects of this nanomaterial.

Acknowledgement

The authors would like to acknowledge the Research, Development and Engineering Fund through National Nanotechnology Center (NANOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Thailand for financial support (Grant number: CR0149).

References

1. Afaq F, Abidi P, Matin R, et al. Cytotoxicity, prooxidant effects and antioxidant depletion in rat lung alveolar macrophages exposed to ultra-fine titanium dioxide. *Journal of Apply Toxicology* 1998; 18:307-12.
2. Baggs RB, Ferin j, Oberdorster G. Regression of pulmonary lesions produced by inhaled titanium dioxide in rats. *Veterinary Pathology* 1997; 34:592-7.
3. Clayton A, Turkes A, Navabi H, et al. Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes. *Journal of Cell Science* 2005; 118:3631-8.
4. Donaldson K, Stone V, Clouter A, et al. Ultrafine particles. *Occupational and Environmental Medicine* 2001; 58:211-8.
5. Driscoll KE, Maurer JK. Cytokine and growth factor release by alveolar macrophages: potential biomarkers of pulmonary toxicity. *Toxicologic Pathology* 1991; 19:398-405.
6. Fujishima A, Rao TN, Tryk DA. Titanium dioxide photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 2000; 1:1-21.
7. Gething MJ, Sambrook J. Protein folding in the cell. *Nature* 1992; 355:33-45. Haas IG, Wabl M. Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature* 1983; 306:387-9. ISO/TS 27687. Nanotechnologies-Terminology and definitions for nano-objects- nanoparticle, Nanofibre and Nanoplate. 2008(E).
8. Jang H, Kim S. Effect of particle size and phase contribution of titanium dioxide nanoparticles on the photocatalytic properties. *Journal of Nanoparticle Research* 2001; 3:141-7.
9. Jolly C, Morimoto RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *Journal of the National Cancer Institute* 2000; 92:1564-72.
10. Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes & Development* 1999; 13:1211-33.
11. Maniratanachote R, Minami K, Katoh M, et al. Chaperone proteins involved in troglitazone-induced toxicity in human hepatoma cell lines *Toxicological Sciences* 2005; 83:293-302.
12. Melnick J, Dul JL, Argon Y. Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immuno globulin chains in the endoplasmic reticulum. *Nature* 1994; 4:373-375.
13. Oberdorster G, Ferin J, Gelein R, et al. Role of the alveolar macrophages in lung injury: studies with ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives* 1992; 97:193-9.
14. Oberdorster G, Ferin J, Lehnert BE. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environmental Health Perspectives* 1994; 102:173-9.
15. Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives* 2005; 113:823-39.
16. Peters K, Unger R, Kirkpatrick J, et al. Effects of nano-scaled particles on endothelial cell function in vitro: studies on viability, proliferation and inflammation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2004; 15:321-5.
17. Pratt WB, Morishima Y, Peng H-M, et al. Proposal for a role of the Hsp90/Hsp70-based chaperone machinery in making triage decisions when proteins undergo oxidative and toxic damage. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* 2010; 3:278-89.
18. Rahman Q, Lohani M, Dopp E, Pemsel H, et al. Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts. *Environmental Health Perspectives* 2002; 110:797-800.
19. Sayes CM, Wahi R, Kurian PA, et al. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicological Sciences* 2006; 92:174-85.

20. Skandrani D, Gaubin Y, Vincent C, et al. Relationship between toxicity of selected insecticides and expression of stress proteins (HSP, GRP) in cultured human cells: Effects of commercial formulations versus pure active molecules. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006a ; 1760:95-103.
21. Skandrani D, Gaubin Y, Beau B, et al. Effect of selected insecticides on growth rate and stress protein expression in cultured human A549 and SH-SY5Y cells. *Toxicology in Vitro* 2006b ; 20:1378-86.
22. Stearns EC, Paulauskis JD, Godleski JJ. Endocytosis of ultrafine particles by A549 cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2001; 24:108-15.
23. Uchino T, Tokunaga H, Ando M, et al. Quantitative determination of OH radical generation and its cytotoxicity induced by TiO₂-UVA treatment. *Toxicology in Vitro* 2002; 16:629-35.
24. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 2006; 160:1-40.
25. Zhang A, Sun Y. Photocatalytic killing effect of TiO₂ nanoparticles on Ls-174-t human colon carcinoma cells. *World Journal of Gastroenterology* 2004; 10:3191-3.

RESEARCH ARTICLE

Effects of a Standardized Extract of *Centella asiatica* ECa 233 on Learning and Memory Impairment Induced by Transient Bilateral Common Carotid Artery Occlusion in Mice

Mayuree H. Tantisira^{*}, Boonyong Tantisira, Chamnan Patarapanich, Rutt Suttisri, Suwanna Luangcholatan, Salin Mingmalairak, Aree Wanasuntronwong, Ekarin Saifah

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

Abstract

The present study aimed to investigate effects of ECa 233, a standardized extract of *Centella asiatica* on learning and memory impairment induced by transient bilateral common carotid artery occlusion (T2VO) in ICR mice. ECa 233 suspended in 0.5% CMC, in distilled water, was orally administered by gavage tubing. Learning and memory deficit induced by T2VO was significantly improved by ECa 233. On day 5 of Morris water maze test, the escape latency of mice treated with 10 and 30 mg/kg of ECa 233 were 15.11 ± 3.17 and 21.10 ± 5.15 sec, respectively, whereas it was 49.67 ± 2.40 sec in T2VO group receiving 0.5% CMC. Similar results were observed in a step-down test while alteration of locomotor activity was not observed in any groups. T2VO significantly generated oxidative stress which was abolished by ECa 233. Cerebral malondialdehyde in T2VO groups receiving ECa 233 in the doses of 10 and 30 mg/kg B.W. was 5.33 ± 0.99 and 3.50 ± 0.27 nmol/g brain tissue, respectively, whereas it was 17.03 ± 5.93 nmol/g in T2VO group receiving 0.5% CMC. In conclusion, the present study demonstrated anti-amnesic effect of ECa 233 which is a standardized extract of *C. asiatica*. It is highly likely that improvement of learning and memory deficit observed in the present study could be accounted by, at least, in part, anti-oxidative property of ECa 233. Some other mechanisms could additionally be responsible for beneficial effects of ECa 233, which should be further developed into health food or adjunctive medication for dementia.

Key words: *Centella asiatica*, standardized extract, ECa 233, T2VO, learning and memory deficit

Address correspondence and reprint request to : Mayuree H. Tantisira, Ph.D. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand Tel: +66-2218-8365 E-mail: tmayuree@chula.ac.th

ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ต่อภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำที่ถูกเหนี่ยวนำโดยการปิดกั้นหลอดเลือดแดงคอมมอนคาโรติคทั้งสองข้างชั่วคราวในหนูเมาส์

มยุรี ตันติสิระ*, บุญยงค์ ตันติสิระ, ชำนาญ ภัทรพานิช, รุทธ์ สุทธิศรี, สุวรรณา เหลืองชลธาร, สลิล มิ่งมาลัยรักษ์, อารี วนสุนทรวงค์ และ เอกรินทร์ สายฟ้า

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กทม. 10330 ประเทศไทย

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ต่อภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำที่ถูกเหนี่ยวนำโดยการปิดกั้นหลอดเลือดแดงคอมมอนคาโรติคทั้งสองข้างชั่วคราว ในหนูเมาส์สายพันธุ์ไอซีอาร์ สารสกัดอีซีเอ 233 ซึ่งแขวนลอยอยู่ใน 0.5% ซีเอ็มซี.ในน้ำกลั่นถูกป้อนเข้าทางปากด้วยหลอดป้อนยา พบว่าอีซีเอ 233 สามารถแก้ไขภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำที่เกิดขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในมอริสวอเตอร์เมซ เวลาที่ใช้ในการหาแท่นพักในวันที่ 5 ของหนูเมาส์กลุ่มที่ได้รับอีซีเอ 233 ในขนาด 10 และ 30 มก/กก คือ 15.11 ± 3.17 และ 21.10 ± 5.15 วินาที ตามลำดับ ในขณะที่หนูเมาส์กลุ่มที่ได้รับ 0.5% ซีเอ็มซีจะใช้เวลาถึง 49.67 ± 2.40 วินาที การทดสอบโดยวิธีสเตปดาวนนี้ให้ผลที่คล้ายคลึงกัน ในขณะที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของโลโคมอเตอร์แอกติวิตีในกลุ่มใด ๆ เลย การปิดกั้นหลอดเลือดแดงคอมมอนคาโรติคทั้งสองข้างชั่วคราวทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันซึ่งถูกปกป้องได้อย่างสมบูรณ์โดยอีซีเอ 233 ปริมาณของมาลอนไดอัลดีไฮด์ในสมองของหนูเมาส์ที่ได้รับอีซีเอ 233 ในขนาด 10 และ 30 มก/กก คือ 5.33 ± 0.99 และ 3.50 ± 0.27 นาโนโมล/กรัมของเนื้อสมองตามลำดับ ในขณะที่ค่าดังกล่าวในหนูเมาส์กลุ่มที่ได้รับ 0.5% ซีเอ็มซี คือ 17.03 ± 5.93 นาโนโมล/กรัมของเนื้อสมอง โดยสรุป การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ต้านการเสื่อมของอีซีเอ 233 ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้สูงที่ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของอีซีเอ 233 จะเป็นกลไกส่วนหนึ่งในการแก้ไขภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ โดย อาจมีกลไกอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกันกับฤทธิ์ที่เป็นประโยชน์ของอีซีเอ 233 ควรจะมีการพัฒนาอีซีเอ 233 ต่อไปเพื่อใช้เป็นอาหารเพื่อสุขภาพหรือยาเสริมสำหรับภาวะหลงลืม

คำสำคัญ บัวบก สารสกัดมาตรฐาน อีซีเอ 233 การปิดกั้นหลอดเลือดแดงคอมมอนคาโรติคทั้งสองข้างชั่วคราว ภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ

Introduction

Age-related deficit in cognitive function is commonly well-recognized in elderly, the most fast-growing population in many countries. In addition to a limited number of available anti-dementia medications, various plants have been advocated as possessing positive effects on impaired learning and memory.¹ Among them, *Centella asiatica* (Linn.) Urban, an edible herb which has been used in Ayurvedic medicine for several medicinal purposes including as a treatment for memory deficit, was subjected to extensive scientific investigation in searching for supporting evidences of its traditional uses.²⁻³ Accordingly, memory enhancing effect of *C. asiatica* has been demonstrated in a number of animal models.⁴⁻⁶ In Thailand, in addition to its medicinal uses, the fresh plant of *C. asiatica* and its aqueous extract are commonly consumed as vegetable and as a drink, respectively. According to Thai traditional medicine, *C. asiatica* is claimed to possess a variety of therapeutic effects, e.g. wound healing, cardiogenic, diuretic and as a treatment of skin diseases. It has been included in the National Essential Herbal Drug lists and, recently, a positive modulatory effect of *C. asiatica* on cognition and mood in Thai healthy elderly volunteers has been reported.⁷

Various chemical constituents have been found to exist in *C. asiatica*. The substances of interest as therapeutics are the triterpenoid saponins and their aglycones, namely, asiaticoside, madecassoside, asiatic acid and madecassic acid.^{2,8} Similar to other herbs, the constituents of *C. asiatica* vary greatly according to many factors including climate, cultivating methods and location. Different procedures used to prepare the extracts certainly amplify the differences

in quality and quantity of *Centella* extracts used in different studies and subsequently resulted to inconsistency of the observed results. To overcome such discrepancy, standardized extracts of *C. asiatica*, with the advantage of being prepared by well-defined and strictly controlled procedures to ensure consistency in physical and chemical constituents of the end product, have been established. At present, there are a few of them and they seem to differ with regards to their active constituents and biological activities. For example, TECA (Titrated Extract of *Centella asiatica*), a reconstituted mixture of asiaticoside, asiatic acid and madecassic acid extracted from the plant, has been found to modulate gene expression involving wound healing⁹ or TTFCA (Total Triterpenic Fraction of *Centella asiatica*) which has been demonstrated to improve capillary permeability in patients with venous hypertension.¹⁰ In an attempt to establish a standardized extract of *C. asiatica* with ameliorating effects on memory impairment, step-by-step activity-guided extraction was conducted in order to identify bioactive constituents to be used as the markers of the extract. Memory deficit was induced in mice using a model of transient bilateral common carotid artery occlusion (T2VO). The standardized extract of *C. asiatica* used in the present study, named ECa 233, can be defined as the white to off-white extract of *C. asiatica* containing triterpenoids not less than 80%, and the ratio of madecassoside and asiaticoside should always be within 1.5±0.5. We hereby report the ameliorating effects of the extract on learning and memory deficit induced by a transient bilateral common carotid artery occlusion in mice.

Materials and Methods

Animals

All experiments were performed on male ICR mice, weighing 25–30 g, obtained from the National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Salaya, Nakornpathom province, Thailand. Prior to testing, the animals were kept in the animal house of the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University and maintained on 12:12 light-dark cycle at controlled temperature ($25\pm 1^\circ\text{C}$) for at least one week. Food and water were given *ad libitum*. All behavioral experiments were carried out between 08:00 – 17:00.

Chemicals and test substance

All chemicals were purchased from Sigma Chemical, Thailand. *C. asiatica*, purchased from the district of Banglana in Nakornpathom province was authenticated and extracted using a patent pending method. Chemical analysis using a high performance liquid chromatography (HPLC) was subsequently carried out. The total triterpenoids of the extract in the present study were found to be 85%, and the madecassoside/asiaticoside ratio was 1.65. The stability of ECa 233 was estimated by stress test and found to be stable for at least 2 years at room temperature.

Treatment protocol

ECa 233 is sparingly soluble in water, it was therefore, suspended in 0.5% carboxymethyl cellulose (CMC) in distilled water. The extract was orally administered to the animals by a gavage tube one hour prior to the behavioral testing. The volume of administration was kept at 0.2-0.4 ml/25 g B.W. Following behavioral testing, the animals were sacrificed by decapitation. The brain was removed,

homogenized and kept at -80°C for the determination of malondialdehyde (MDA). Sham-operated mice ($n=6$) were used as control groups.

Induction of transient cerebral ischemia-induced learning and memory impairment

Impairment of learning and memory was induced by a transient bilateral occlusion of common carotid artery plus hypotension (T2VO) previously described by Xu et al.¹¹ ICR mice were anesthetized with pentobarbital 60 mg/kg B.W., i.p.. A midline incision of the neck skin was made and the two common carotid arteries were exposed and transiently occluded by arterial clips. While the arteries were clamped, the tail tip was cut and 0.3 ml of blood were withdrawn. After 20 min, the arterial clips were removed and the incision was closed. The animals were allowed 24 hours for recovery. Sham-operated mice were subjected to similar procedure but without arterial clamping and bleeding. The mice were randomly divided into six groups of 8-10 animals each. There are 1) Sham-operated group administered with 0.4 ml of NSS 2) Sham-operated group administered with 0.4 ml of 0.5% CMC 3) T2VO group administered with 0.4 ml of NSS 4) T2VO groups administered with 0.4 ml of 0.5% CMC 5) T2VO group administered with ECa 233 (10 mg/kg B.W.) suspended in 0.5% CMC and 6) T2VO groups administered with ECa 233 (30 mg/kg B.W.) suspended in 0.5% CMC.

Morris water maze test (MWM)

The procedure used was slightly modified from the one described by Morris.¹² The test consisted of a black circular pool of water, 70 cm in diameter and 13 cm in depth. The temperature of the water in the pool

was maintained at $25\pm 1^\circ\text{C}$. A black rubber platform (6 cm in diameter) was submerged, 1 cm below the water surface, at the middle of one quadrant of the pool. The pool was placed in a room with various visual cues in fixed positions. Daily swimming consisted of four trials in which a mouse was placed, facing the pool wall, into the water from four different entry points in each quadrant. The time for the mouse to find the platform in each trial was then recorded and averaged as an escape latency of each animal per day. Cut-off time was 60 sec. The day before the surgery for T2VO was considered as training day in which the animal that could not find the platform would be guided by researcher onto platform and allowed to rest there for 10 sec. The mice that failed to locate the hidden platform after 4 trials were excluded from the experiments. After the T2VO operation, the animals were subjected to the test for 5 consecutive days.

Step-down test

The apparatus consisted of a $35 \times 23 \times 20 \text{ cm}^3$ plastic chamber. The cage floor was made of evenly spaced steel bars (3 mm in diameter) placed 11 mm apart and connected to a scrambled shock generator (1Hz, 1 ms, 36 V DC). A wooden platform (5 cm diameter, 4 cm height), serving as a shock free zone was set at one corner of the grid. The training session or acquisition trial of the step-down passive avoidance test was performed on the next day after the MWM test. Initial step-down latency was the time elapsed until the animal stepped down from the platform. Upon electric shock, the mice would escape from the grid floor back to the platform and initial error was counted whenever the animal stepped down from the platform. The training duration was 5 min. Twenty-four

hours after the training, mice were placed on the platform for the retention test. Step-down latency and error were again recorded.¹³

Locomotor activity test

Spontaneous locomotor activity was carried out on the day after retention test of the passive avoidance test using an activity cage connecting to a circuit of counting unit [UGO BASILE model 7430 (7431+7432)]. The inside dimension of the activity cage were: length 35 cm; width 23 cm and height 20 cm). The animal was placed in the cage and the registered number of movement was recorded at 5 min interval. The apparatus was placed in light and sound attenuated room and the locomotor activity was monitored continuously for 5 min.

Lipid peroxidation assay

Following the behavioral testing, the animals were sacrificed by decapitation and the brains were quickly removed, cleaned with ice-cold saline and stored at -80°C . Brain tissue samples were thawed and homogenized with ice-cold 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). Aliquots of homogenates were used to determine the malondialdehyde content (MDA) which is a marker of lipid peroxidation, by the method previously described by Gupta et al.¹⁴ Reagents, including acetic acid 1.5 ml (20%) pH 3.5, 1.5 ml of thiobarbituric acid (0.8%) and 0.2 ml of sodium dodecyl sulphate (8.1%) were added to 0.1 ml of brain tissue samples and then heated at 100°C for 60 min. The mixture was cooled under tap water and 5 ml of *n*-butanol/pyridine (15:1), then 1 ml of distilled water was added and vortexed vigorously. After centrifugation at 2500 rpm for 20 min, the organic layer was separated. The supernatant was collected and the absorbance was measured at 532 nm by spectrophotometry.

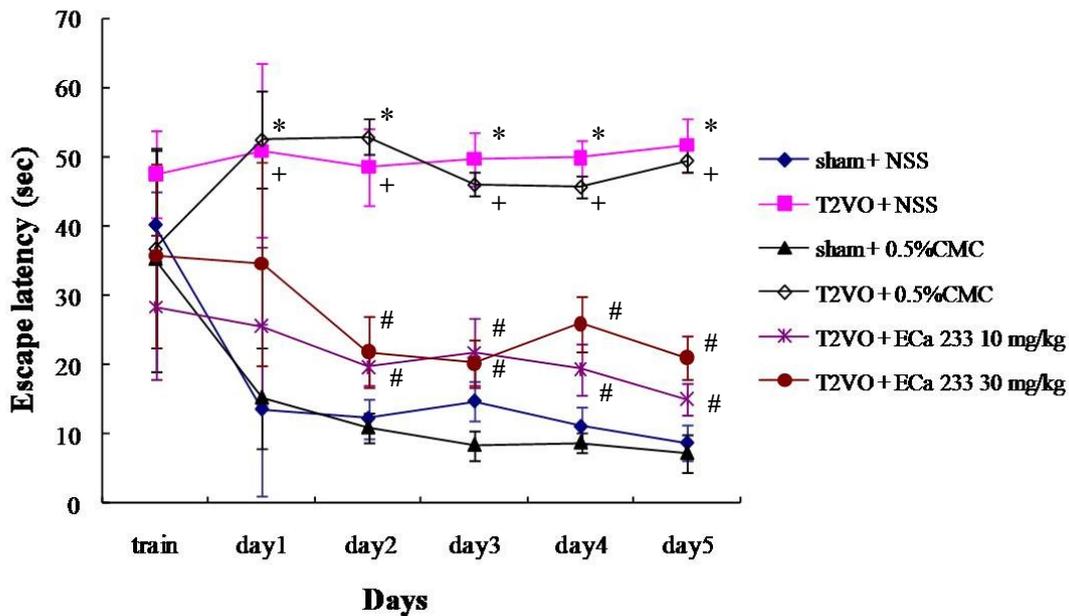


Figure 1. Morris water maze performances of different treatment groups of mice (n=6-10 in each group). Sixty minutes before the first trial session of each day, ECa 233 (10 and 30 mg/kg, p.o.), 0.5%CMC or saline (NSS) was administered to mice. The Morris water maze task was conducted as described in Materials and Methods. Each datum presents the mean±S.E.M. *p < 0.05 versus sham-operated group receiving NSS, +p < 0.05 versus sham-operated group receiving 0.5%CMC, #p < 0.05 versus T2VO group receiving 0.5%CMC (one-way ANOVA followed by Duncan post-hoc test).

The concentration of MDA was expressed as nmol/g tissue.

Statistical analysis

Results are expressed as mean± standard error of the mean (S.E.M.). Differences between various groups were assessed by one-way ANOVA followed by Duncan post-hoc test. Pair comparison between two groups was made by Student’s *t* test. A difference with p<0.05 was considered to be statistically significant.

Results

Effects of ECa 233 on T2VO-induced impairment of learning and memory assessed by the MWM test

As shown in Figure 1, the escape latency to find the hidden platforms demonstrated by different groups of animals did not differ on the training day. The mean search time was found to be 40.17±2.07, 47.67±2.55, 35.33±6.57, 36.83±5.79, 28.44±3.47 and 35.80±4.21

sec for sham operated receiving NSS, T2VO receiving NSS, sham operated receiving 0.5% CMC, T2VO receiving 0.5% CMC, T2VO receiving ECa 233 (10 mg/kg B.W.) and T2VO receiving ECa 233 (30 mg/kg B.W.) respectively. During days 1-5 after bilateral occlusion of common carotid artery, T2VO mice required longer time than those of sham-operated group to locate the platform, indicating an impairment of spatial memory. The escape latency of T2VO on day 5 was 51.83 ± 2.67 and 49.67 ± 2.40 sec (treated with NSS and 0.5% CMC, respectively) and the corresponding values for sham-operated group were 8.83 ± 3.97 and 7.33 ± 1.74 sec, respectively. No statistical difference was noted between sham-operated mice receiving NSS and sham-operated mice receiving 0.5% CMC. Similar result was observed on T2VO mice suggesting lack of effects of 0.5% CMC. Therefore ECa 233-treated groups were further compared exclusively to mice receiving 0.5% CMC. In comparison to T2VO receiving 0.5% CMC, oral administration of ECa 233 in the doses of 10 and 30 mg/kg significantly improved escape latency of T2VO mice. On day 5, the escape latency of mice treated with 10 and 30 mg/kg of ECa 233 were 15.11 ± 3.17 and 21.10 ± 5.15 sec, respectively.

Effects of ECa 233 on T2VO-induced impairment of learning and memory assessed by the step-down test

The initial latency was 10.50 ± 1.70 , 8.33 ± 1.72 , 14.00 ± 4.49 , 9.00 ± 1.63 , 10.56 ± 3.11 and 14.60 ± 2.83 sec and the initial errors were 1.50 ± 0.22 , 5.83 ± 0.70 , 4.33 ± 0.55 , 5.67 ± 0.66 , 4.00 ± 0.47 and 4.70 ± 0.55 in sham-operated receiving NSS, T2VO receiving NSS, sham operated receiving 0.5% CMC, T2VO receiving 0.5% CMC, T2VO receiving ECa 233 (10 mg/kg B.W.) and T2VO

receiving ECa 233 (30 mg/kg B.W.), respectively. As shown in Figure 2, T2VO significantly decreased the latency and increased the number of error in the retention trial. The latency of T2VO receiving NSS and 0.5% CMC was 17.17 ± 3.97 and 14.17 ± 4.26 sec, respectively, whereas they were 140.67 ± 53.91 , 195.50 ± 44.06 sec in their respective sham-operated groups. Accordingly, higher number of errors than those exhibited in sham operated groups receiving NSS and 0.5% CMC was observed in their respective T2VO groups. In agreement with the observation in MWM test, oral administration of ECa 233 in the doses of 10 and 30 mg/kg B.W. significantly improved the performance of T2VO mice. The latency in retention test was 157.33 ± 43.21 and 146.10 ± 29.86 sec in T2VO receiving ECa 233 in the dose of 10 and 30 mg/kg B.W., respectively, and the respective number of errors was found to be 4.00 ± 0.47 and 4.70 ± 0.55 .

Locomotor activity

As illustrated in Figure 3, no significant difference was detected among the six groups of experimental animals. Locomotor activity in sham operated receiving NSS, T2VO receiving NSS, sham-operated receiving 0.5% CMC, T2VO receiving 0.5% CMC, T2VO receiving ECa 233 (10 mg/kg B.W.) and T2VO receiving ECa 233 (30 mg/kg B.W.) was 248.83 ± 25.83 , 226.33 ± 10.24 , 272.17 ± 27.75 , 261.00 ± 20.04 , 230.78 ± 15.66 and 241.20 ± 13.90 , respectively. Neither transient occlusion of bilateral common carotid artery nor oral administration of ECa 233 caused any changes in locomotor activity of the mice.

Lipid peroxidation

Transient occlusion of bilateral common carotid artery followed by

reperfusion caused significant increase in oxidative stress, measured as MDA, in mice. Cerebral MDA was found to be 13.65 ± 4.12 and 17.03 ± 5.93 nmol/g brain tissue in T2VO groups receiving NSS and 0.5% CMC, respectively, whereas they were only 4.20 ± 0.22 and 3.96 ± 0.66 nmol/g in respective sham-operated

groups. Oral administration of ECa 233 significantly abolished T2VO-induced increase in MDA. Cerebral MDA in T2VO groups receiving ECa 233 in the doses of 10 and 30 mg/kg B.W. was 5.33 ± 0.99 and 3.50 ± 0.27 nmol/g brain tissue, respectively (Figure 4).

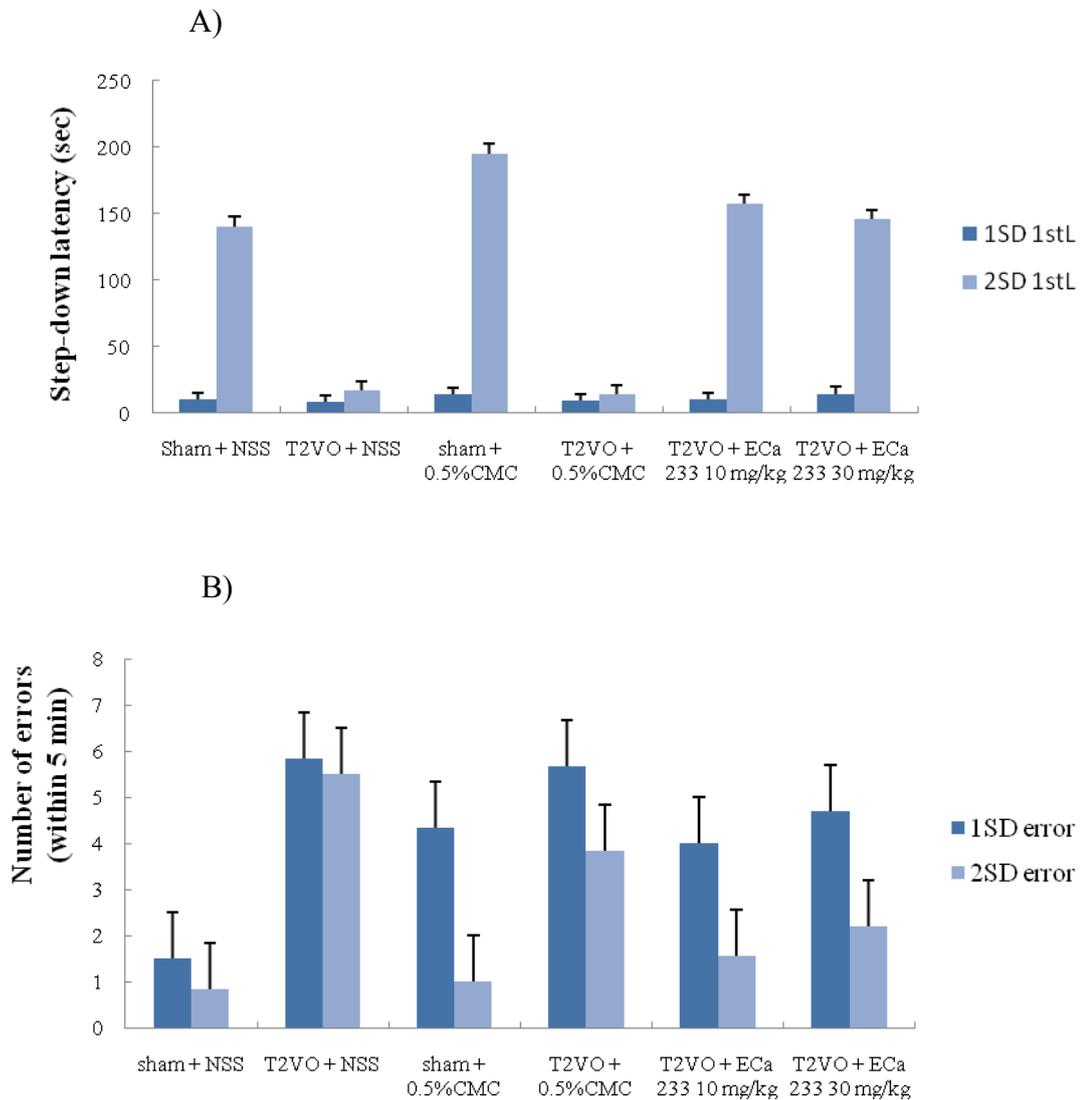


Figure 2. Effects of ECa233 treatment on step-down (SD) performance in mice. Step-down latency (stL) and step-down error were shown in panel A and B, respectively. Mice were treated with ECa 233 (10 and 30 mg/kg, p.o), 0.5%CMC or saline (NSS) once daily for 8 days. Acquisition trial (1SD) of the step-down test was performed after 6 days of the Morris water maze task. At 24 h after the acquisition trials, retention trials (2SD) were carried out. Data were expressed as mean \pm S.E.M. (n=6-10). Comparison between groups was made on retention trial. *p < 0.05 versus sham-operated receiving NSS group (Student's *t*-test), ⁺p < 0.05 versus sham-operated group receiving 0.5%CMC (Student's *t*-test), [#]p < 0.05 versus T2VO group receiving 0.5%CMC (one-way ANOVA followed by Duncan post-hoc test).

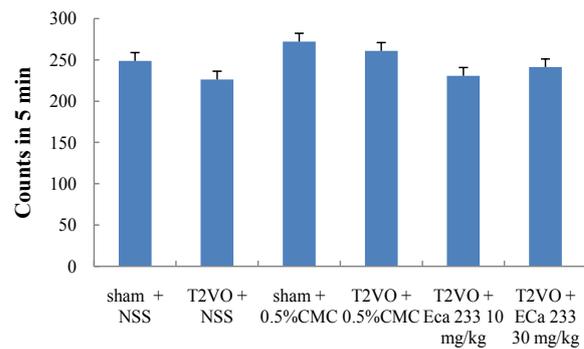


Figure 3. Locomoter activity of different treatment groups of mice. Mice were treated with ECa 233 (10 and 30 mg/kg, p.o), 0.5%CMC or saline (NSS) once daily for 9 days. Final administration was performed 60 minutes before the test. Data are expressed as mean \pm S.E.M. (n=6-10 per group). No significant differences were detected (one-way ANOVA followed by Duncan post-hoc test).

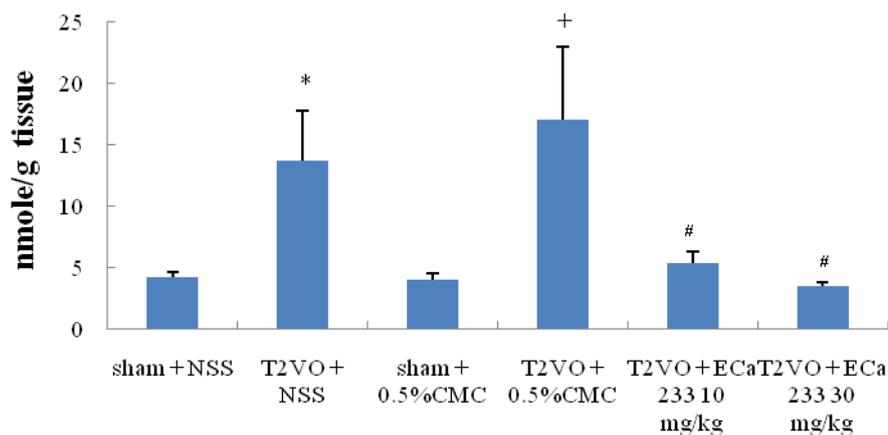


Figure 4. Cerebral MDA levels in different treatment groups of mice (n=5-10). Mice were treated with ECa 233 (10 and 30 mg/kg, p.o), 0.5%CMC or saline (NSS) once daily for 9 days. MDA levels were determined using lipid peroxidation assay. Data are expressed as mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$ versus sham-operated group receiving NSS (Student's *t*-test), + $p < 0.05$ versus sham-operated group receiving 0.5%CMC (Student's *t*-test), # $p < 0.05$ versus T2VO group receiving 0.5%CMC (one-way ANOVA followed by Duncan post-hoc test).

Discussion

In line with previous reports, the occlusion of bilateral common carotid artery followed by reperfusion impaired performances of Morris water maze and step-down tasks, indicating an impairment of learning and memory in mice.^{11, 15-17} At day 5 of the trial, the animals in T2VO group significantly required longer time than those in sham-operated group to find the platform in the Morris water maze test which is the most common test to assess spatial memory.¹⁸ Accordingly, failure to learn and memorize was noted in the same group of animal in step-down test used to assess a passive avoidance behavior. Deficit in both the Morris water maze and the step-down tasks was significantly improved by oral administration of ECa 233 in the doses of 10 and 30 mg/kg B.W. given at about 24 hours after the operation and 1 hour prior to the behavioral tests. Improved performance in the Morris water maze is very unlikely to involve neurological stimulation of motor function as no alteration of locomotor activity was observed in all experimental groups.

Polyunsaturated fatty acids, as a major constituents of the neuronal membrane are among the most vulnerable targets for free radical damage and lipid peroxidation.¹⁹ The membrane phospholipids are converted by peroxidation to malondialdehyde (MDA) which can be analyzed by reactivity to thiobarbituric acid. The brain is highly sensitive to damage by oxidative stress and its prominent role in neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease, have been proposed²⁰⁻²¹, providing a rational approach to combat the diseases by dietary antioxidants and free radical scavengers.²²⁻²⁴ Recently, in addition to their predominant role of

acetylcholinesterase inhibition, donepezil and tacrine have been shown to suppress streptozotocin-induced oxidative stress and this suppression of oxidative stress was proposed to contribute to their beneficial effects against senile dementia.²⁵ Recently, based on the finding that brain lipid peroxidation measured as MDA was significantly increased in T2VO group, impairment of learning and memory observed should be at least, in part, accounted by oxidative stress generated by transient cerebral ischemia followed by reperfusion as previously reported.¹⁷ Preliminary study of ECa 233 on memory deficit induced by an intracerebroventricular injection of β -amyloid peptide, an agent known to cause oxidative stress, has shown its ameliorating effect.²⁶ Anti-oxidative activity of ECa 233 could then, therefore, accounted for an improvement of learning and memory deficit observed in MWM and step-down tests observed in the present study. Oral administration of ECa 233 at the doses of 10 and 30 mg/kg B.W. completely abolished T2VO-induced increase in cerebral MDA, while the deficit in learning and memory was not fully recovered, suggesting that oxidative stress could contribute to, but not solely responsible for, cognitive deficit. Multimodal of treatment between drugs of different mechanisms such as memantine, an NMDA antagonist, and anticholinesterase inhibitor has demonstrated satisfactory outcome.²⁷ The fact that ECa 233 is a standardized extract of *C.asiatica* which is an edible plant that has been shown to produce no sign of significant toxicity upon an ingestion of dried powder in the doses of 20-1200 mg/kg/day²⁸ suggests that ECa 233 deserves further development into pharmaceutical products as an adjunctive therapy to existing anti-dementia drugs or as a health food, providing that its safety is warranted.

Acknowledgements

Financial support of the present work was provided by the National Research Council of Thailand through Chulalongkorn University.

References

- Howes MJ, Houghton PJ. Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. *Pharmacol Biochem and Behav* 2003; 75(3): 513-27.
- Brinkhaus B, Lindner M, Schuppan D, Hahn EG. Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant *Centella asiatica*. *Phytomedicine* 2000; 7(5): 427-48.
- Singh RH, Narsimhamurthy K, Singh G. Neuronutrient impact of Ayurvedic Rasayana therapy in brain aging. *Biogerontology* 2008; 9(6): 369-74.
- Veerendra Kumar MH, Gupta YK. Effect of different extracts of *Centella asiatica* on cognitive and markers of oxidative stress in rats. *J Ethnopharmacol* 2002; 79(2): 253-60.
- Gupta YK., Veerendra Kumar MH, Srivastava AK. Effect of *Centella asiatica* on pentylenetetrazole-induced kindling, cognition and oxidative stress in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2003; 74(3): 579-85.
- Rao SB, Chetana M, Uma Devi P. *Centella asiatica* treatment during postnatal period enhances learning and memory in mice. *Physiol Behav* 2005; 86(4): 449-57.
- Wattanathorn J, Mator L, Muchimapura S, et al. Positive modulation of cognition and mood in the healthy elderly volunteer following the administration of *Centella asiatica*. *J Ethnopharmacol* 2008; 116(2): 352-32.
- Inamdar PK, Yeole RD, Ghogare AB, et al. Determination of biologically active constituents in *Centella asiatica*. *J Chromatogr A* 1996; 742(1-2): 127-130.
- Coldren CD, Hashim P, Ali JM, et al. Gene expression changes in the human fibroblast induced by *Centella asiatica* triterpenoids. *Planta Med* 2003; 69(8): 725-32
- Belcaro GV, Grimaldi R, Guidi G. Improvement of capillary permeability in patients with venous hypertension after treatment with TTFCA. *Angiology* 1990; 41(7): 533-40.
- Xu J, Murakami Y, Matsumoto K, et al. Protective effect of Oren-geoku-to (Huang-Lian-Jie-Du-Tang) against impairment of learning and memory induced by transient cerebral ischemia in mice. *J Ethnopharmacol* 2000; 73(3): 405-13.
- Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 1984; 11(1): 47-60.
- Luo J, Yin JH, Wei Q. The effect of calcineurin activator, extracted from Chinese herbal medicine, on memory and immunity in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2003; 75(4): 749-54.
- Gupta R, Singh M, Sharma A. Neuroprotective effect of antioxidants on ischemia and reperfusion-induced cerebral injury. *Pharmacol Res* 2003; 48(2): 209-15.
- Katsura M, Lino T, Kuriyama K. Changes in content of neuroactive amino acid and acetylcholine in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Neurochem Int* 1992; 21(2): 243-49.
- Watanabe H, Zhao Q, Matsumoto K, et al. Pharmacological evidence for antidementia effect of Choto-san (Gouteng-san), a traditional Kampo medicine. *Pharmacol Biochem Behav* 2003; 75(3): 635-43.
- Zhao Q, Murakami Y, Tohda M, et al. Preventive effect of Chotosan, a Kampo medicine, on transient ischemia-induced learning deficit is mediated by stimulation of muscarinic M1 but not nicotinic receptor. *Biol Pharm Bull* 2005; 28(10): 1873-8.
- Paul CM, Magda G, Abel S. Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behav Brain Res* 2009; 203(2):151-64
- Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 1992; 59(5): 1609-23.
- Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 1997; 23(1): 134-47.
- Smith MA, Rottkamp CA, Nunomura A, et al. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1502(1): 139-44.
- Pratico D, Delanty N. Oxidative injury in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease. *Am J Med* 2000; 109(7): 577-85.
- Butterfield D, Castegna A, Pocernich C., et al. Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem* 2002; 13(8): 444-61.

24. Esposito E, Rotilio D, Matteo VD, et al. A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative process. *Neurobiol Aging* 2002; 23(5): 719-35.
25. Saxena G, Singh SP, Agrawal R, et al. Effect of donepezil and tacrine on oxidative stress in intracerebral streptozotocin-induced model of dementia in mice. *Eur J Pharmacol* 2008; 581(3): 283-89.
26. Kam-eg A, Tantisira B, Tantisira MH. Preliminary study on effects of a standardized extract of *Centella asiatica*, ECa 233 on deficit of learning and memory by an intracerebroventricular injection of β -amyloid peptide in mice. *Thai J Pharmacol* 2009; 31(1): 79-82.
27. McKeage K. Memantine: a review of its use in moderate to severe Alzheimer's disease. *CNS drugs* 2009; 23(10): 811-97.
28. Chivapat S, Chavalittumrong P, Attawish A, et al. Toxicity study of *Centella asiatica* (L) Urban. *J Thai Tradit Altern Med* 2004; 2: 3-17.

RESEARCH ARTICLE

Hypoglycemic Effect and Acute Toxicity of *Momordica charantia* Fruit Juice Product

Weena Jiratchariyakul¹, Srichan Phornchirasilp², Monraudee Chanchai¹,
Atiya Sabsang²

¹Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, 447 Sri-Ayudhya Rd., Rajathevi Bangkok 10400,

²Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, 447 Sri-Ayudhya Rd., Rajathevi Bangkok 10400

Abstract

The fruit juice was spray dried and prepared in form of powder. The product quality was assured according to good manufacturing practice (GMP), using TLC to detect the active marker (charantin). The product was tested for the blood sugar lowering property and the toxicity. It resulted that the product dose of 300 mg/kg bw lowered the blood sugar of streptozotocin-induced diabetes male Wistar rats significantly in 13th week, which was similar to the effect of antidiabetic drug, glibenclamide 10 mg/kg BW. The product doses of 600 and 1,200 mg/kg BW lowered the blood sugar of the test animal in 12th week. The toxicity study in Wistar rats and ICR mice, which were fed by the product at the maximum dose (5 g/kg BW), showed neither death nor the toxic symptoms. The product was thus practically non-toxic. The oral LD₅₀ value, the product dose that caused 50% death of the test animals, ranged from 500-5,000 mg/kg BW. The product was considered to be slightly toxic.

Key words Thai bitter gourd, Toxicity, Blood sugar lowering property, Charantin, *Momordica charantia* fruit juice

ฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดและพิษวิทยาของผลิตภัณฑ์จากน้ำคั้นผลมะระขี้นก

วีณา จิรัจฉริยากุล^{1*}, ศรีจันทร์ พรจิราศิลป์², มลฤดี จันทร์ฉาย¹, อติยา ทรัพย์สังข์²

¹ ภาควิชาเภสัชวินิฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล 447 ถนนศรีอยุธยา ราชเทวี กรุงเทพฯ 10400,

² ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล 447 ถนนศรีอยุธยา ราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

บทคัดย่อ

น้ำคั้นจากผลมะระขี้นกได้ถูกเตรียมขึ้นในรูปผลิตภัณฑ์ผงที่มีการควบคุมคุณภาพตามหลักการการผลิตที่ดี (GMP, Good Manufacturing Practice) โดยตรวจหา active marker คือ charantin ด้วย TLC เมื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติลดน้ำตาลในเลือดและศึกษาพิษวิทยาของผลิตภัณฑ์ พบว่าจากการทดสอบฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดของผลิตภัณฑ์ในหนูขาว (Wistar) เพศผู้ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วยสาร streptozotocin พบว่า เมื่อใช้ขนาด 300 มก./กก.น.ตัว ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 13 ซึ่งให้ผลคล้ายกับยา glibenclamide ขนาด 10 มก./กก.น.ตัว ส่วนผลิตภัณฑ์ขนาด 600 มก./กก.น.ตัว และ 1,200 มก./กก.น.ตัว เห็นผลลดน้ำตาลในเลือดตั้งแต่สัปดาห์ที่ 12 การศึกษาความเป็นพิษในหนูขาว (Wistar) และ หนูถีบจักร (ICR mice) โดยป้อนผลิตภัณฑ์ขนาด 5 กรัม/กก.น.ตัว ทางปาก ซึ่งเป็นขนาดสูงสุดที่ให้ได้ในสัตว์ทดลอง พบว่า สัตว์ทดลองไม่ตายและไม่มีอาการผิดปกติ ผลิตภัณฑ์ผงน้ำคั้นมะระขี้นกจึงจัดว่าไม่มีพิษ (practically non-toxic) จากการหาค่า LD₅₀ พบว่าขนาดที่ทำให้สัตว์ทดลองตายลงครึ่งหนึ่งภายใน 24 ชั่วโมง เมื่อให้สารสกัดด้วยการป้อนทางปากอยู่ในช่วง 500-5,000 มก./กก.น.ตัว จึงจัดเป็นผลิตภัณฑ์มีพิษเล็กน้อย

คำสำคัญ : มะระขี้นก ความเป็นพิษ คุณสมบัติลดน้ำตาลในเลือด ชาแรนติน น้ำคั้นจากผลมะระขี้นก

บทนำ

ผลมะระขี้นกเป็นสมุนไพรในยาแผนโบราณของประเทศต่าง ๆ ผลเล็กผิวขรุขระ มีขนาด 5-8 ซม. สีเขียวเข้ม ในประเทศไทยใช้มะระขี้นกเป็นทั้งอาหารและยาแผนโบราณ น้ำคั้นจากใบมีสรรพคุณเป็นยาเจริญอาหาร ฟอกเลือด และระบายอ่อน ๆ ใช้ในผู้ป่วยโรคตับและท่อน้ำดีอักเสบ หากรับประทานมากเกินไปจะทำให้อาเจียน เนื้อผลเป็นยาขมช่วยเจริญอาหาร บำรุงน้ำดี แก้โรคม้ามและตับ ขับพยาธิ น้ำคั้นจากผลเป็นยาระบายอ่อน ๆ แก้ไข้ อมแก้ปากเปื่อย ปากเป็นขุย ขับระดูในสตรี เนื้อผลตากแห้งชงน้ำดื่มสำหรับผู้ป่วยเบาหวาน (ชยันต์ พิเชียรสุนทร และคณะ, 2544, วันดี กฤษณพันธ์ และคณะ, 2541, เสงี่ยม พงษ์บุญรอด, 2522) ผลมะระขี้นกมีกลุ่มสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ ไทรเทอร์ปีนส์ และสเตียรอยด์ ในรูปอิสระและกลัยโคไซด์ ผลดิบนอกจากจะเป็นแหล่งของวิตามินซี วิตามินเอ ฟอสฟอรัส และเหล็ก (Grover, 2004) ยังมีกลุ่มสารที่แสดงคุณสมบัติลดน้ำตาลในเลือด ได้แก่ ชาแรนติน (charantin) และโพลีเปปไทด์พี น้ำคั้นจากผล แสดงคุณสมบัติลดน้ำตาลในเลือด (Lottikar and Rajarama, 1966, Khanna and Jain, 1984)

โครงการผลิตภัณฑ์สมุนไพรคุณภาพ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้ศึกษาองค์ประกอบเคมีของผงน้ำคั้นมะระขี้นก แยกสารชาแรนติน เพื่อใช้เป็นสารประกอบเครื่องหมาย (marker compound) ในการควบคุมคุณภาพ พัฒนาริธีวิเคราะห์สารชาแรนติน พัฒนาผลิตภัณฑ์ผงน้ำคั้นมะระขี้นกและ

ควบคุมคุณภาพ ทดสอบคุณสมบัติลดน้ำตาลในเลือดในสัตว์ทดลอง และศึกษาความเป็นพิษ

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การเตรียมผลิตภัณฑ์ผงน้ำคั้นผลมะระขี้นก

การศึกษานี้เลือกวิธีการเตรียมยาจากสมุนไพรในรูปน้ำคั้นสด โดยนำผลดิบมะระขี้นก 347 กก. มาผ่าครึ่ง แคะส่วนเมล็ดและเยื่อหุ้มเมล็ดออก ได้เนื้อผล 221 กก. นำไปล้างด้วยน้ำสะอาด 1 ครั้ง แช่ด้วยน้ำผสมต่างทับทิม 30 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาด 3 ครั้ง ตั้งไว้ให้สะเด็ดน้ำ นำไปปั่นจนละเอียด แยกกากออกด้วยเครื่องแยกกาก ได้น้ำคั้น 154 กก. เติม ganulac[®] 1% ของน้ำหนักน้ำคั้น จากนั้นนำไปทำแห้งด้วยวิธี spray dry ได้ผงแห้งสีน้ำตาลอมเขียว 1.65 กก. มีกลิ่นเฉพาะตัว ผงน้ำคั้น 1 กรัม เทียบเท่ากับน้ำคั้น 93 มล.

2. การควบคุมคุณภาพผงน้ำคั้นมะระขี้นก ด้วยวิธี high-performance liquid chromatography (HPLC)

วิธีเตรียมสารมาตรฐาน charantin

charantin เป็นสารผสมของ 3β -O-D-glucopyranosyl-(24 α)-ethylcholest-5-ene และ 3β -O-D-glucopyranosyl-(24 α)-ethyl-stigmasta-5, 25(27)-diene ในอัตราส่วน 1:1 มีคุณสมบัติลดน้ำตาลในเลือด (Lottikar and Rajarama, 1966, Sucrow, 1965) เตรียมสารมาตรฐาน charantin ให้มีความเข้มข้น 0.003, 0.006, 0.009, 0.012

และ 0.015 มก./มล. วิเคราะห์ด้วย HPLC ได้ ความสัมพันธ์เส้นตรงระหว่างพื้นที่ใต้พีคและความเข้มข้นของสารมาตรฐานตามสมการ $y = 83875866.6667 X - 3060$ ($r^2 = 0.999$) กราฟมาตรฐานนี้นำไปใช้ในการคำนวณปริมาณสาร charantin ในผงน้ำคั้นมะระขี้นก

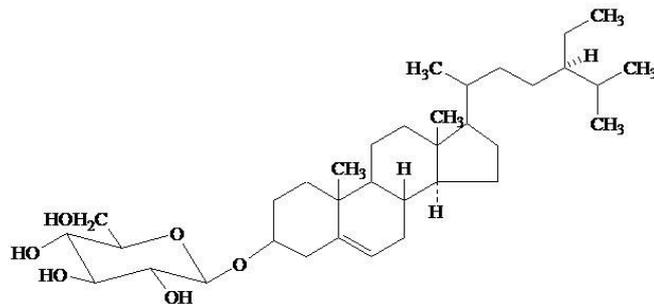
วิธีเตรียมสารตัวอย่าง

ชั่งผลิตภัณฑ์ผงน้ำคั้นมะระขี้นก 8 กรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มล. เติมน้ำกลั่น 20 มล. นำไป sonicate 15 นาที ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล กรองผ่าน Millipore 0.45 μm นำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ผงน้ำคั้นมะระขี้นกมีสาร charantin 0.86 มก.%

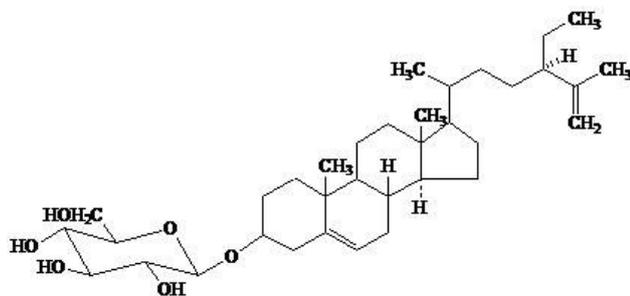
3. การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของผลิตภัณฑ์ผงน้ำคั้นผลมะระขี้นกในหนูขาว (Wistar) และ IRC mice

การศึกษาพิษเฉียบพลันโดยการกิน

แบ่งสัตว์ทดลองทั้ง Wistar rat และ ICR mice ออกเป็นกลุ่มๆ กลุ่มละ 10 ตัว ดังนี้
 กลุ่มที่ 1 เพศผู้ กลุ่มควบคุม ให้น้ำ
 กลุ่มที่ 2 เพศผู้ ให้ผงน้ำคั้นจากผลสด มะระ ขี้นกในขนาด 5 กรัม/ กก.น.น.ตัว
 กลุ่มที่ 3 เพศเมีย กลุ่มควบคุมให้
 กลุ่มที่ 4 เพศเมีย ให้ผงน้ำคั้นจากผลสด มะระขี้นก ในขนาด 5 กรัม/ กก.น.น.ตัว



3β-O-D-glucopyranosyl-(24α)-ethylcholest-5-ene



3β-O-D-glucopyranosyl-(24α)-ethylstigmasta-5, 25(27)-diene

รูปที่ 1 องค์ประกอบเคมีของ charantin

การศึกษาพิษเฉียบพลันโดยการฉีดเข้าช่องท้อง

การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันโดยการฉีดเข้าช่องท้องของ Wistar rat แบ่งออกเป็นกลุ่ม ๆ กลุ่มละ 10 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เพศผู้ กลุ่มควบคุม ให้น้ำ

กลุ่มที่ 2 เพศผู้ ให้ผงน้ำตาลคั้นจากผลสด
มะระขี้นกในขนาด 500 มก./
กก.น.น.ตัว

กลุ่มที่ 3 เพศผู้ ให้ผงน้ำตาลคั้นจากผลสด
มะระขี้นกในขนาด 600 มก./
กก.น.น.ตัว

กลุ่มที่ 4 เพศผู้ ให้ผงน้ำตาลคั้นจากผลสด
มะระขี้นกในขนาด 700 มก./
กก.น.น.ตัว

กลุ่มที่ 5 เพศเมีย กลุ่มควบคุม ให้น้ำ

กลุ่มที่ 6 เพศเมีย ให้ผงน้ำตาลคั้นจากผลสด
มะระขี้นกในขนาด 500 มก./
กก.น.น.ตัวกลุ่มที่ 7 เพศ
เมีย ให้ผงน้ำตาลคั้นจากผลสด
มะระขี้นกในขนาด 600 มก./
กก.น.น.ตัว

กลุ่มที่ 8 เพศเมีย ให้ผงน้ำตาลคั้นจากผลสดมะระ
ขี้นกในขนาด 700 มก./กก.น.น.
ตัว

**การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันโดยการฉีด
เข้าช่องท้องของ ICR mice**

แบ่งออกเป็นกลุ่ม ๆ กลุ่มละ 10 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เพศผู้ กลุ่มควบคุม ให้น้ำ

กลุ่มที่ 2 เพศผู้ ให้ผงน้ำตาลคั้นจากผลสด
มะระขี้นกในขนาด 600 มก./
กก.น.น.ตัว

กลุ่มที่ 3 เพศผู้ ให้ผงน้ำตาลคั้นจากผลสด
มะระขี้นกในขนาด 800 มก./
กก.น.น.ตัว

กลุ่มที่ 4 เพศผู้ ให้ผงน้ำตาลคั้นจากผลสด
มะระขี้นกในขนาด 1,000
มก./กก.น.น.ตัว

กลุ่มที่ 5 เพศเมีย กลุ่มควบคุม ให้น้ำ

กลุ่มที่ 6 เพศเมีย ให้ผงน้ำตาลคั้นจากผลสด
มะระขี้นกในขนาด 600 มก./
กก.น.น.ตัว

กลุ่มที่ 7 เพศเมีย ให้ผงน้ำตาลคั้นจากผลสด
มะระขี้นกในขนาด 800 มก./
กก.น.น.ตัว

กลุ่มที่ 8 เพศเมีย ให้ผงน้ำตาลคั้นจากผลสด
มะระขี้นกในขนาด 1,000
มก./กก.น.น.ตัว

นำผลที่ได้ (% จำนวนหนูที่ตายในแต่ละ
กลุ่ม) ไปคำนวณหาค่า LD₅₀ โดยใช้โปรแกรม
คำนวณ probit plot

**4. การทดสอบผลของผลิตภัณฑ์ผงน้ำตาลคั้นผล
มะระขี้นกต่อระดับน้ำตาลในเลือดของ
หนูขาวที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เป็น
เบาหวานด้วย streptozotocin**

แบ่งหนูขาว (Wistar) ที่เป็นเบาหวาน
ออกเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว โดยแต่ละกลุ่มไม่
มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
ของระดับน้ำตาลในเลือด ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ป้อนด้วยน้ำกลั่นทุกวัน วันละ
ครั้งในตอนเช้า

กลุ่มที่ 2 ป้อนด้วย glibenclamide 10
มก./กก.น.น.ตัว ทุกวัน วันละ
ครั้งในตอนเช้า

กลุ่มที่ 3 ป้อนด้วยน้ำคั้นจากผลมะระขี้นก
300 มก./กก.น.น.ตัว ทุกวัน วัน
ละครั้งในตอนเช้า

กลุ่มที่ 4 ป้อนด้วยน้ำคั้น จากผลมะระ
ขี้นก ขนาด 600 มก./กก.น.น.
ตัว ทุกวันวันละครั้งในตอนเช้า

กลุ่มที่ 5 ป้อนด้วยน้ำคั้น จากผลมะระ
ขี้นก ขนาด 1,200 มก./
กก.น.น.ตัว ทุกวัน วันละครั้งใน
ตอนเช้า

หนูทุกกลุ่มได้รับติดต่อกัน นาน 3 เดือน
เจาะเลือดและวัดระดับน้ำตาลในเลือด สัปดาห์
ที่ 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 13
ตามลำดับ ก่อนการเจาะเลือดในแต่ละครั้งให้
อดอาหารอย่างน้อย 16 ชั่วโมง

การเจาะเลือดหนูใช้วิธีการตัดปลายหาง
และใช้หลอดคาปิลลารีที่ใช้เฉพาะกับเครื่องวัดรี
โพรตรอน เก็บเลือด 32 ไมโครลิตร นำไป
หยอดบนแผ่นตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดที่
ใช้เฉพาะกับเครื่องรีโพรตรอน

ผลการวิจัยและวิจารณ์การทดลอง

การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสมุนไพร
จำเป็นต้องมีหลักฐาน สนับสนุนความปลอดภัย
คุณภาพ และประสิทธิภาพ การพัฒนา
ผลิตภัณฑ์จากน้ำคั้นผลมะระขี้นก เป็นวิธีที่
อาศัยเทคโนโลยีทำให้น้ำคั้นเปลี่ยนเป็นผงแห้ง
โดยไม่ทำให้องค์ประกอบเคมีของน้ำคั้น
เปลี่ยนแปลง ในน้ำคั้น มีสารกลุ่มต่าง ๆ
โดยเฉพาะสารที่แสดงฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลใน
เลือด โครงการผลิตภัณฑ์สมุนไพรคุณภาพ
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้สกัด
แยกสารที่แสดงฤทธิ์ดังกล่าวจากผลมะระขี้นก
และใช้สารเป็น active marker compound ใน

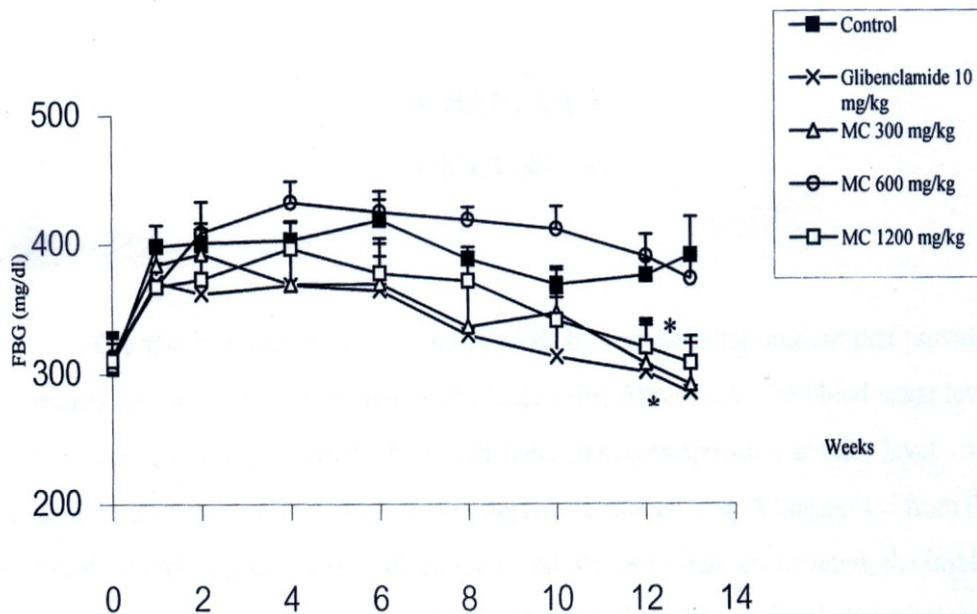
การควบคุมคุณภาพตั้งแต่วัตถุดิบสมุนไพร
ระหว่างการผลิต และ finished product
ผลิตภัณฑ์ผงน้ำคั้นมะระขี้นกที่ผ่านการควบคุม
คุณภาพได้รับการทดสอบคุณสมบัติลดน้ำตาล
ในเลือดในสัตว์ทดลองและศึกษาความเป็นพิษ
จากการป้อนผลิตภัณฑ์ผงน้ำคั้นแก่หนูขาวที่
เป็นเบาหวาน พบว่า ขนาดที่ลดน้ำตาลในเลือด
ในหนู 300 มก./กก.น.น.ตัว (เทียบเท่ากับ
ปริมาณน้ำคั้นผลมะระขี้นก 28 มล.) และ
ปรากฏผลในสัปดาห์ที่ 13 ผลลดน้ำตาลนี้
คล้ายกับผลของยาเบาหวาน glibenclamide
ขนาด 10 มก./กก.น.น.ตัว จากรูปจะเห็นว่าหนู
เบาหวานทุกกลุ่มที่ใช้ในการทดลองมีระดับ
น้ำตาลในเลือดค่อนข้างสูง (fasting blood
sugar ในสัปดาห์ที่ 0 เฉลี่ย 310 mg/dl) จึงทำ
ให้ได้ผลลดน้ำตาลในเลือดอย่างมีนัย-สำคัญ
ทางสถิติต่ำกว่าที่ควรจะเป็น ดังจะเห็นได้จาก
กลุ่มที่ได้รับยา glibenclamide ซึ่งเป็นยาที่มี
ประสิทธิภาพในการลดระดับน้ำตาลในเลือด ก็
ยังต้องรอถึง 13 สัปดาห์ กว่าที่จะแสดงผล
น้ำตาลในเลือดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการศึกษาความเป็นพิษในหนูขาว
โดยการป้อนผลิตภัณฑ์น้ำคั้นมะระขี้นก ขนาด
5 กรัม/กก.น.น.ตัว ซึ่งเป็นขนาดสูงสุดที่ให้ได้ใน
สัตว์ทดลอง ปรากฏว่าสัตว์ทดลองไม่มีอาการ
ผิดปกติใดๆและไม่ตาย และจากการฉีด
ผลิตภัณฑ์น้ำคั้นมะระขี้นกเข้าช่องท้องของหนู
ขาว และ ICR mice พบว่าค่า LD₅₀ อยู่ในช่วง
500-5,000 มก./กก.น.น.ตัว ผลที่ได้นี้เมื่อ
นำไปประเมินความเป็นพิษตาม toxicity
classified : Hodge and Sterner Scale
ผลิตภัณฑ์ผงน้ำคั้นมะระขี้นกนี้เมื่อให้โดยการ
รับประทาน จัดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีพิษเล็กน้อย

(slightly toxic) โดยที่อาการพิษที่พบในหนูขาวหลังจากได้รับการฉีดผลิตภัณฑ์น้ำคั้นมะระขึ้นกเข้าช่องท้องคือ ซึม ไม่เคลื่อนไหว หายใจช้าลง ส่วนหนู ICR มีเลือดออกในตา

ผลิตภัณฑ์ผงน้ำคั้นผลดิบมะระขึ้นกจึงจัดว่ามีความปลอดภัยเมื่อให้โดยการรับประทานจากหลักฐานที่นำมาใช้ตามสรรพคุณพื้นบ้านการใช้เป็นอาหาร และจากการศึกษาวิจัยสนับสนุนด้านความปลอดภัยและประโยชน์ต่อ

สุขภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่มี ระดับน้ำตาลในเลือดสูงกว่าปกติ มีโอกาสพัฒนาขึ้นเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร หรือยาแผนโบราณพัฒนาที่สามารถควบคุมคุณภาพให้สม่ำเสมอ สามารถพัฒนาผลิตภัณฑ์ผงน้ำคั้นมะระขึ้นกเป็นรูปยาเม็ดหรือแคปซูล ทำให้มีรูปแบบหลากหลายและมีคุณภาพ ตลอดจนมีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์สนับสนุนเพียงพอจนสามารถแข่งขันได้ในตลาดโลก



รูปที่ 2 แสดงผลของผลิตภัณฑ์น้ำคั้นมะระขึ้นก หรือ glibenclamide ต่อระดับน้ำตาลในเลือดหนูขาวที่อดอาหารก่อนเจาะเลือด

เอกสารอ้างอิง

1. ชัยนัต พิเชียรสุนทร, แม้นมาส ชาลิต, วิเชียร จีรวงส์. คำอธิบายตำราพระโอสถพระนารายณ์ ฉบับเฉลิมพระเกียรติ 72 พรรษามหาราช 5 ธันวาคม พุทธศักราช 2542. กรุงเทพฯ: บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด; 2544.
2. วันดี กฤษณพันธ์, เอมอร โสมนะพันธุ์, เสาวณีสूरียาภานนท์. สมุนไพรในสวนครัว. บริษัท เมดิคัล มีเดีย จำกัด: 2541.
3. เสี่ยงม พงษ์บุญรอด. ไม้เทศเมืองไทย. กรุงเทพฯ: เกษมบรรณกิจ, 2522.
4. Grover JK, Yadav SP. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. J Ethnopharmacol. 2004; 93(1):123-32.
5. Khanna P., Jain SC. Hypoglycemic activity of polypeptide-p from the plant source. J Nat Prod. 1984; 44(6): 648-655.
6. Lottikar MM, Rajarama Rao MR. Pharmacology of a hypoglycemia principle isolated from the fruits of *Momordica charantia* L. Ind J of Pharm. 1966;28:129-133.
7. Sucrow W. Uber steringlucoside und ein neues stigmastadienol *Momoedica charantia*. Tetrahedron Letters. 1965;26:2217-2221.
9. www.ccohs.ca (Canadian Centre for Occupational Health)

REVIEW

Antioxidative Stress of Herbal Extracts for Prevention on Parkinson's Disease

Yamaratee jaisin¹, Piyanee Ratanachamnong²

¹*Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Srinakarinwirot University*

²*Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University*

Abstracts

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by a selective loss of the dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc). This causes the reduction of dopamine neurotransmitter levels in the brain. Oxidative stress plays a major role in the pathogenesis of PD. At present, there are many studies investigating antioxidative agents and found vegetables and fruits contain various kinds of bioactive compounds possessing antioxidative stress. Thus, we briefly review some of herbal extracts for prevention on Parkinson's disease for example turmeric, Ginkgo, Ginsen, Green tea, Grapes.

Keywords Parkinson's disease, oxidative stress, curcuminoids, polyphenolic, EGb 761, Ginsenosides, Catechin, Resveratrol

สารสกัดจากพืชที่ออกฤทธิ์ต้านภาวะเครียดออกซิเดชันในโรคพาร์กินสัน

ยามาระตี จัยสิน¹, ปิยานี รัตนชานอง²

¹ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

²ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

โรคพาร์กินสันเป็นโรคที่เกิดจากภาวะการเสื่อมของเซลล์ประสาทชนิดโดปามีนเอจิก ที่อยู่ในส่วน substantia nigra pars compacta เป็นสาเหตุให้ปริมาณสารสื่อประสาทโดปามีนลดลง ซึ่งการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันเป็นสาเหตุสำคัญที่กระตุ้นให้มีการดำเนินของโรคพาร์กินสัน ในปัจจุบันมีการศึกษาสารที่สามารถต้านอนุมูลอิสระกันมากและพบว่าในพืชผักและผลไม้มีสารเคมีที่มีศักยภาพในการป้องกันภาวะเครียดออกซิเดชัน ในบทความนี้จะกล่าวถึงสารสำคัญที่สามารถออกฤทธิ์ในเชิงชีวภาพของขมิ้นชัน ไบอะปะก้วย โสม ชาเขียวและองุ่น ในการป้องกันการเกิดโรคพาร์กินสัน

คำสำคัญ โรคพาร์กินสัน, ภาวะเครียดออกซิเดชัน, เคอร์คูมินอยด์, โพลีฟีนอล, EGb 761, Ginsenosides, Catechin, เรสเวอราทรอล

บทนำ

โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) หรือโรคสั่นสันนิบาต เป็นโรคทางสมองซึ่งเกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ของระบบประสาท ที่พบได้ค่อนข้างบ่อย โดยเฉพาะในผู้สูงอายุ รองลงมาจากโรคหลงลืมหรือโรคอัลไซเมอร์ นายแพทย์เจมส์ พาร์กินสัน (James Parkinson) ชาวอังกฤษ เป็นผู้รายงานโรคนี้เป็นคนแรกในปี พ.ศ. 2360

โรคพาร์กินสันเกิดขึ้นในอัตราส่วนที่ใกล้เคียงกันระหว่างผู้หญิงกับผู้ชาย อายุเฉลี่ยของผู้ป่วยอยู่ระหว่าง 60 ถึง 80 ปี มีรายงานว่าประมาณ 5 % ของผู้ป่วยพาร์กินสัน มีอาการของโรคพาร์กินสัน ก่อนอายุ 40 ปี (young - onset Parkinson's disease : YOPD)² โดยผู้ป่วยจะมีพยาธิสภาพเช่นเดียวกับผู้ป่วยพาร์กินสันที่อายุมากแต่การดำเนินของโรคอาจแตกต่างกันไป องค์การอนามัยโลก หรือ WHO รายงานว่า สถิติอัตราการเกิดโรคพาร์กินสัน อยู่ที่ประมาณ 700,000 คน ของประชากรทั้งหมดที่อยู่ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้³ แต่สถิติอัตราการเกิดโรคพาร์กินสันในประชากรของประเทศไทยยังมีไม่มาก ซึ่งรายงานส่วนใหญ่จะอยู่ประมาณ 1% ของประชากรทั้งหมด⁴

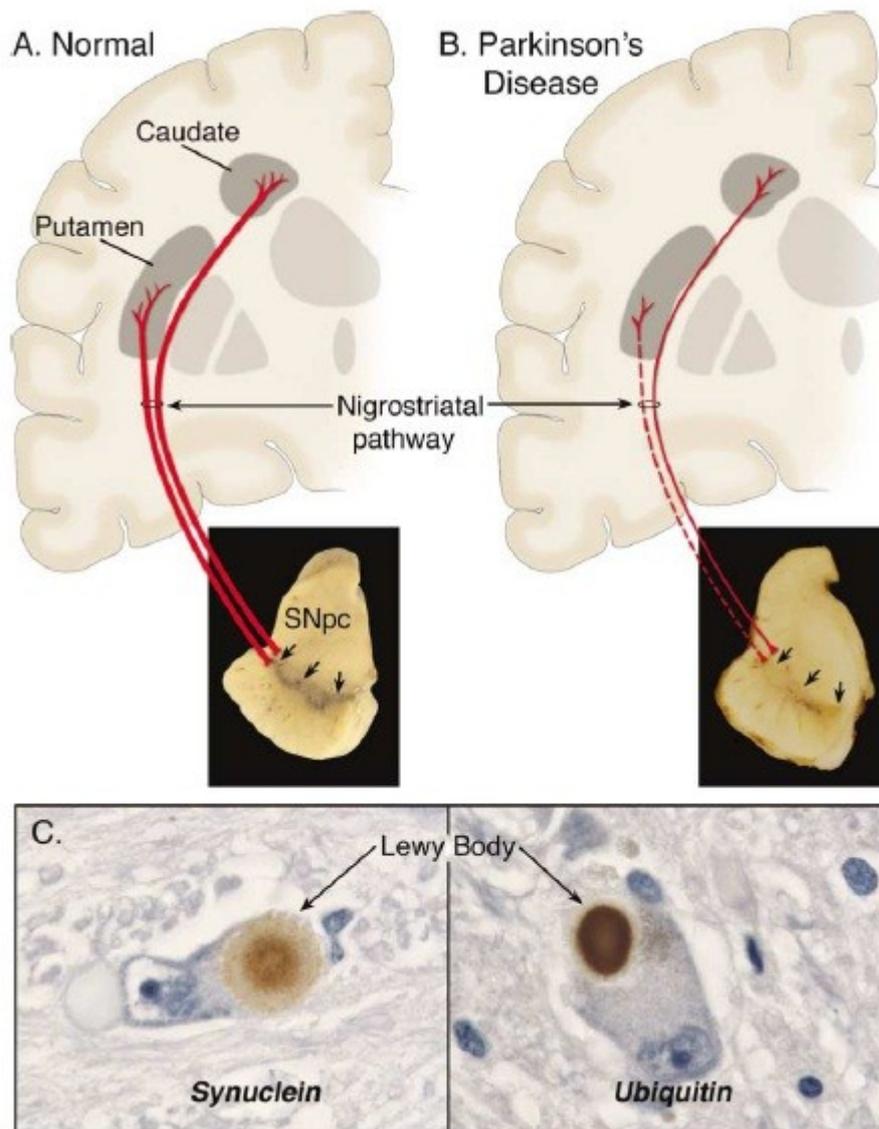
อาการของโรคพาร์กินสัน

เซลล์ประสาทชนิดโดปามีนเอจิก (dopaminergic) ที่อยู่บริเวณในสมองส่วนที่เรียกว่า substantia nigra จะสร้างสารสื่อประสาทที่เรียกว่าโดปามีน สารนี้จะทำหน้าที่เป็นสะพานเชื่อมไปยังสมองส่วนที่เรียกว่า corpus striatum ทำให้การทำงานของ

กล้ามเนื้อที่กำลังและประสานกันได้อย่างดี มีข้อมูลบ่งชี้ว่าหลังจากสมองเกิดบาดเจ็บ จะเกิดอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นมากและจะทำให้เซลล์ประสาทโดปามีนเอจิกตายด้วยกระบวนการ apoptosis มากกว่า necrosis⁵⁻⁷ เมื่อเกิดการตายของเซลล์ประสาทชนิดนี้ เป็นเหตุให้ขาดแคลนสารสื่อประสาทโดปามีน ทำให้เกิดการเสื่อมและสูญเสียสภาพทางระบบประสาทตั้งแต่ nigrostriatal pathway จาก substantia nigra pars compacta ไปสู่ striatum ส่งผลให้การทำงานของกล้ามเนื้อจะไม่ประสานงานกัน ผู้ป่วยโรคพาร์กินสันจะมีอาการมือกระตุกหรือมือสั่น (tremor), อาการเกร็งของแขนและลำตัว (rigidity), การเคลื่อนไหวช้า (bradykinesia), เสียการทรงตัว (postural instability) รวมถึงไม่สามารถทำงานที่ต้องประสานงานของกล้ามเนื้อหลายมัดได้ ผู้ป่วยมักจะไม่มีการเคลื่อนไหวที่เป็นปกติ เช่นการยิ้ม การกระพริบตา การแกว่งแขน การพูดซ้ำเสียงเบา ไม่มีเสียงสูงหรือต่ำ และการกลืนลำบาก⁸⁻⁹

พยาธิสภาพทางสมองของผู้ป่วยโรคพาร์กินสัน

การตรวจทางพยาธิสภาพทางสมองของผู้ป่วยโรคพาร์กินสัน พบว่ามีจำนวนเซลล์ประสาทชนิดโดปามีนเอจิกลดลง สมองส่วน substantia nigra ที่ปกติมีสีค่อนข้างเข้มจะจางลงไป การตรวจทางจุลพยาธิสภาพก็จะพบ Lewy bodies มากขึ้นซึ่งเป็น inclusion ใน cytoplasm ที่พบมากในเซลล์สมองส่วน substantia nigra, locus coeruleus, thalamus และพบบางส่วนใน cerebral cortex¹⁰



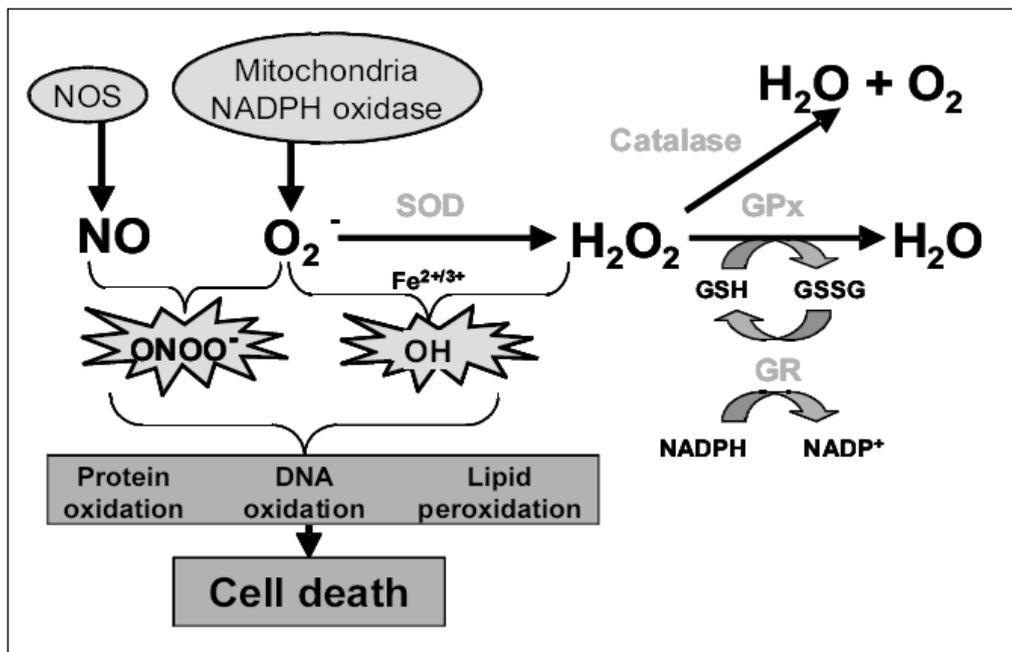
รูปที่ 1 พยาธิสภาพทางสมองของโรคพาร์กินสัน

- A. สภาพทางระบบประสาทของคนปกติตั้งแต่ nigrostriatal pathway จาก substantia nigra pars compacta ไปสู่ striatum
- B. สภาพทางระบบประสาทของผู้ป่วยโรคพาร์กินสัน พบการเสื่อมและสูญเสียสภาพทางระบบ ตั้งแต่ nigrostriatal pathway จาก substantia nigra pars compacta ไปสู่ striatum
- C. ลักษณะของก้อนโปรตีนที่เรียกว่า Lewy body ซึ่งภายในประกอบไปด้วย โปรตีน alpha-synuclein และ ubiquitin¹¹

สาเหตุของโรคพาร์กินสัน

โดยปกติแล้ว ร่างกายของคนเราจะสร้างอนุมูลอิสระตลอดเวลา อนุมูลอิสระเหล่านี้ได้แก่ hydroxyl radicals (OH^\bullet), hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$), nitric oxide (NO) และ peroxynitrite (ONOO^-) ผ่านทางขบวนการเมตาบอลิซึมใน mitochondria เพื่อสร้างพลังงานให้แก่ร่างกาย¹² แต่ร่างกายคนเราต้องมีกลไกในการควบคุมอนุมูลอิสระ เพื่อป้องกันการทำลายโครงสร้าง และรักษาหน้าที่ต่างๆ ของเซลล์ที่อยู่ในร่างกาย โดยร่างกายจะผลิตเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD) และ catalase (CAT) มีหลายรายงานการวิจัยที่อ้างถึงกลไกการเกิดโรคพาร์กินสัน

โดยทฤษฎีที่ได้รับการยอมรับกันมากที่สุดในปัจจุบันคือ คือ ภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ในพยาธิสภาพของโรคพาร์กินสัน การสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระจะลดลง จนไม่เพียงพอที่จะต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นมากมาย ก่อให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันตามมา เป็นผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ เช่น การทำลายของ DNA ภายในเซลล์ (DNA damage) การทำลายโปรตีนภายในเซลล์ (protein damage) หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงในไขมันไม่อิ่มตัว ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ ทำให้เซลล์หยุดทำงาน หยุดการซ่อมแซม การทำหน้าที่ต่างๆ ของเซลล์เสียไป จนนำไปสู่การทำลายเนื้อและเซลล์ประสาทในสมอง¹³⁻¹⁴



รูปที่ 2 การสะสมของ ROS (ROS formation) และการล้างพิษ (detoxification)¹⁵

จากรายงานการวิจัยของผลการตรวจชิ้นเนื้อในสมองส่วน substantia nigra ของผู้ป่วยโรคพาร์กินสัน พบการเพิ่มขึ้นของโปรตีน malonyldialdehyde¹⁶⁻¹⁷, lipid และ cholesterol hydroperoxide¹⁶, 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG)¹⁸ และ 4-hydroxy-2-nonenal (HNE)¹⁹⁻²⁰ เป็นจำนวนมาก โปรตีนเหล่านี้จัดเป็นตัวบ่งชี้ของการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันที่เป็นผลจาก oxidative damage ในสมองของผู้ป่วยโรคพาร์กินสัน ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าภาวะเครียดออกซิเดชัน มีบทบาทสำคัญต่อการเสื่อมสภาพของเซลล์ประสาท และเป็นสาเหตุหลักที่นำไปสู่การเกิดโรคพาร์กินสัน

อีกสมมติฐานหนึ่งซึ่งได้รับการยอมรับเกี่ยวกับการเกิดอนุมูลอิสระในสมองของผู้ป่วยโรคพาร์กินสัน คือ ขบวนการ metabolism ของโดปามีน เมื่อโดปามีนถูกหลั่งออกจากที่เก็บสู่ cytoplasm โดปามีนเองสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (auto-oxidation) รวมถึงผ่านกระบวนการเมตาโบลิซึมโดย เอนไซม์ monoamine-oxidase-A (MAO-A) เปลี่ยน โดปามีน เป็น dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) และ hydrogen peroxide (H₂O₂)²¹⁻²² นอกจากนี้ DOPAC จะถูก oxidized ต่อไปเป็น dopamine quinones²³ ซึ่งเป็น highly reactive molecule ก่อให้เกิดการทำลายดีเอ็นเอ โปรตีนไขมัน และโมเลกุลขนาดเล็กอื่นๆ ที่นำไปสู่การตายของเซลล์ประสาทในสมอง

สมุนไพรกับโรคพาร์กินสัน

มีหลักฐานชัดเจนว่าสารในกลุ่ม polyphenolic ที่พบอยู่ในพืช ผักและผลไม้ มี

ฤทธิ์ในเชิงชีวภาพที่สำคัญคือ การต้านอนุมูลอิสระ ปัจจุบันสาร polyphenolic จึงถูกนำมาศึกษา และวิจัยกันอย่างกว้างขวาง เพื่อที่จะนำมาใช้ ป้องกันการเสื่อมและการตายของเซลล์ประสาทในสมอง

ขมิ้นชัน

เคอร์คูมินอยด์ (curcuminoids) เป็นสารสกัดที่มีสีเหลืองส้ม ถูกสกัดมาจากเหง้าขมิ้นชัน (turmeric) เป็นสารสำคัญที่สามารถออกฤทธิ์ในเชิงชีวภาพ (bioactive compound) ได้ ประกอบด้วย สารหลัก 3 ตัว คือ เคอร์คูมิน (curcumin) 75-80%, ดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน (demethoxycurcumin) 15-20% และ บิสดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน (bisdemethoxycurcumin) 3-5% เนื่องจากสารเคอร์คูมินอยด์ มีโครงสร้างทางเคมีเป็น phenolic compound จึงมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ ยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ป้องกันการเกิดมะเร็ง และฤทธิ์ต้าน virus และ bacteria^{24-25,27} จากการศึกษาในสัตว์ทดลอง การฉีดสารเคอร์คูมินอยด์ในปริมาณต่ำๆ แก่หนู ก่อนการฉีดโดปามีน เข้าทาง intrastriar สามารถช่วยป้องกันการตายของเซลล์สมอง จากภาวะเครียดออกซิเดชัน ที่มีสาเหตุจากโดปามีนได้²⁶ นอกจากนี้ ยังมีรายงานวิจัยจากห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า สารเคอร์คูมินอยด์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ SH-SY5Y ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารพิษต่อสมอง 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) ซึ่งส่งผลช่วยป้องกันการตายของเซลล์ผ่านทางสัญญาณ apoptosis โดยไปช่วยป้องกันการสูญเสียของ mitochondrial membrane

potential (MMP) รวมทั้งไปยับยั้งการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระและโปรตีน iNOS (inducible nitric oxide) และยังไปกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของโปรตีน Bcl-2²⁸

ใบแปะก๊วย

แปะก๊วย มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Ginkgo biloba* L. ประกอบด้วยสารสำคัญที่สามารถออกฤทธิ์ในเชิงชีวภาพอยู่ 2 กลุ่มคือ flavonoids 24 % และ terpenoids 6% ที่ประกอบด้วย ginkgolides และ balobilide²⁹ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และยังมีฤทธิ์ขยายหลอดเลือด ช่วยเพิ่มการไหลเวียนของโลหิตไปสู่สมอง และปลายมือปลายเท้า รวมทั้งช่วยส่งเสริมให้ความจำดีขึ้น Ginkgo biloba extract (EGb 761) คือสารสกัดที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการ จากการศึกษาในสัตว์ทดลอง โดยการให้หนูกินสารสกัด EGb 761 ก่อนการกระตุ้นด้วยสารพิษต่อสมอง พบว่ามีฤทธิ์เป็น superoxide radical scavenger จับกิน superoxide anion ทำให้ปริมาณ superoxide anion ลดลง ลดการทำงานของเอนไซม์ SOD และ CAT ซึ่งสามารถป้องกันการถูกทำลายของเซลล์สมองจากอนุมูลอิสระ และเมื่อให้สารสกัด EGb 761 โดยการฉีดเข้าช่องท้องหนู พบว่า EGb 761 ไปยับยั้งการเปลี่ยนรูปของ membrane ที่เกิดจากการอนุมูลอิสระ รักษาสมดุลการเข้าและออกของ Ca²⁺ ภายในเซลล์ ยับยั้งการเก็บกลับของสารสื่อประสาทโดปามีนและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase และลดการเสื่อมของเซลล์ประสาทโดปามีนเอจิก ส่งผลให้ปริมาณสารสื่อประสาทโดปามีน ในสมองของผู้ป่วยโรคพาร์กินสันเพิ่มขึ้น³⁰⁻³⁵

โสม

โสม เป็นพืชในตระกูล Araliaceae เป็นสมุนไพรที่ค้นพบนิยมใช้อย่างแพร่หลาย และเป็นที่ยอมรับมานานนับพันปีว่าเป็นยาอายุวัฒนะ บำรุงสุขภาพ ส่งเสริมภูมิคุ้มกันของร่างกาย ได้มีการสกัดเอาสารสำคัญที่สามารถออกฤทธิ์ในเชิงชีวภาพของโสมที่มีชื่อว่า Ginsenosides มาวิเคราะห์พบว่าประกอบด้วยสารที่สามารถออกฤทธิ์ในเชิงชีวภาพหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re และ Rg ซึ่งนักวิทยาศาสตร์ได้ให้ความสนใจนำมาใช้ในการทดลองอย่างกว้างขวาง และทำให้ทราบว่าสารสกัดจากรากโสมมีผลต่อการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง เช่น ใช้เป็นยาแก้ช้ำ, ต้านอาการทางจิต, ยาแก้ปวด, ต้านความเมื่อยล้า และ ส่งเสริมให้ความจำดีขึ้น³⁶⁻³⁷ จากการศึกษาในสัตว์ทดลอง โดยการให้หนูกินสารสกัดจากโสมก่อนที่ถูกกระตุ้นด้วยสารพิษต่อสมอง พบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดจากโสมมีปริมาณ เอนไซม์ไทโรซีนไฮดรอกซีเลส (tyrosine hydroxylase) ใน substantia nigra ไม่เปลี่ยนแปลง และลดการทำงานของ glutamate pathway เป็นการยับยั้งการส่งกลับของสารสื่อประสาทโดปามีน ส่งผลให้ลดการทำงานของ dopamine transporter นอกจากนี้ยังมีรายงานจากห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยการให้ lipopolysaccharide (LPS) ไปกระตุ้นการหลั่งของ cytokines และ nitric oxide (NO) พบว่าสารสกัดจากโสมสามารถลดการหลั่งของ cytokines และ NO ที่เป็นพิษต่อสมอง โดยไปจับกับ superoxide anion ลดการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ซึ่งสามารถป้องกันการตายของเซลล์ประสาท³⁸⁻⁴¹

ชาเขียว

ชาเขียว มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Camellia sinensis* มีมากกว่า 2,000 สายพันธุ์ ซึ่งชนิดของชาแบ่งได้เป็นหลายประเภทและที่น่าสนใจอีกประเภทหนึ่ง คือ ชาเขียว (green tea) ได้มาจากการนำ ใบชาแห้งไปคั่วหรืออบไอน้ำเพื่อทำลายเอนไซม์ และป้องกันการออกซิเดชันของสารโพลีฟีนอล (polyphenols) ซึ่งเป็นสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต่าง ๆ เช่น ต้านอนุมูลอิสระและป้องกันการเกิดออกซิเดชันของ LDL ในพลาสมาและในตับ จับกับเหล็กยับยั้งการดูดซึมของเหล็กในลำไส้ ต้านการอักเสบป้องกันการเกิดมะเร็ง ต้านการเจริญที่ผิดปกติของหลอดเลือด, โรคระบบหัวใจและหลอดเลือด⁴²⁻⁴⁷ catechin เป็นสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในเชิงชีวภาพ จำแนกได้ 4 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ epicatechin (EC), epigallo catechin (EGC), epicatechin gallate (ECG), epigallo catechin gallate (EGCG) จากงานวิจัยในห้องปฏิบัติการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่า ECG มีฤทธิ์ในการป้องกันการตายของเซลล์ PC12 และ ECG มีฤทธิ์ในการป้องกันการตายของเซลล์ SH-SY5Y ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารพิษต่อสมอง 6-hydroxydopamine (6-OHDA) โดยไปยับยั้งกลไก ROS-NO pathway ยับยั้งการเพิ่มขึ้นของ Ca^{2+} มีผลทำให้สร้าง NO ลดลง และลดการทำงานของ NF-KB ในเซลล์ SH-SY5Y และ สาร epicatechin ยังสามารถลด LDL oxidation ใน striatal neurons ของหนูทดลองได้⁴⁸⁻⁵²

องุ่น

องุ่น เป็นพืชที่ได้รับความนิยมรับประทานในรูปผลไม้และเครื่องดื่มแล้วหลายส่วนของต้นองุ่นยังใช้สำหรับทำเป็นยาหรือสมุนไพร เนื่องจากมีการค้นพบว่า มีสารสำคัญที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น โอลิโกเมอร์ิก โพรแอนโทไซยานิดินส์ (oligomeric proanthocyanidins) เป็นสารในกลุ่มไบโอฟลาโวนอยด์ (bio-flavonoids) และ เรสเวอราทรอล (resveratrol) จัดอยู่ในกลุ่มของสารประกอบโพลีฟีนอล ซึ่งมีคุณสมบัติที่สำคัญในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระอย่างมีประสิทธิภาพ เรสเวอราทรอล พบมากในองุ่นและไวน์แดง มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ จากการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่า เรสเวอราทรอลสามารถลดการถูกทำลายของระบบประสาทจากสารพิษต่อสมอง 6-OHDA จากผลการตรวจชิ้นเนื้อส่วน substantia nigra พบว่ามีฤทธิ์ลดการอักเสบ โดยยับยั้งการสร้าง prostaglandin และ COX-2 activity⁵³⁻⁵⁵ และยังมีรายงานว่าหนูที่ได้รับเรสเวอราทรอลมีระดับ glutathione เพิ่มขึ้น และมีปริมาณ thiobarbituric acid (TBA) ในสมองน้อยกว่าหนูที่ไม่ได้รับเรสเวอราทรอล ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารพิษต่อสมอง นอกจากนี้ยังยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (auto-oxidation) ของโดปามีน โดยไปเพิ่มเอนไซม์ต้านออกซิเดชันในสมอง⁵⁶

เอกสารอ้างอิง

1. Tanner CM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol Clin* 1992; 10: 317-29.
2. Hatano T, Kubo S, Sato S and Hattori N. Pathogenesis of familial Parkinson's disease: new insights based on monogenic forms of Parkinson's disease. *J Neurochem* 2009; 111:1075-93.
3. World Health Organization. Neurological disorders: Public health challenges. Geneva: WHO 2006
4. รุ่งโรจน์ พิทยศิริ. พาร์กินสันซึม. *คลินิก* 2550; 23: 261-71.
5. Mochizuki H, Goto K, Mori H and Mizuno Y. Histochemical detection of apoptosis in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 1996; 137: 120-3.
6. Anglade P, Vyas S, Javoy-Agid F, Herrero MT, Michel PP, Marquez J and et al. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol* 1997; 12: 25-31.
7. Tatton NA. Increased caspase 3 and Bax immunoreactivity accompany nuclear GAPDH translocation and neuronal apoptosis in Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2000; 166: 29-43.
8. Lang AE and Lozano AM. Parkinson's disease. First of two parts, *N Engl J Med* 1998; 339: 1044-53.
9. Lang AE and Lozano AM. Parkinson's disease. Second of two parts, *N Engl J Med* 1998; 339: 1130-43.
10. Beal MF. Experimental models of Parkinson's disease, *Nat Rev Neurosci* 2001; 2(5): 325-34
11. Dauer W and Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models, *Neuron* 2003; 39(6): 889-909.
12. Lin MT and Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 2006; 443(7113): 787-95.
13. Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003; 53: 26-36.
14. Tsang AH and Chung KK. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792(7): 643-50.
15. Schmitt-Schillig S, Schaffer S, Weber CC, Eckert GP, Muller WE. Flavonoids and the aging brain, *J Physio and Pharmaco* 2005; 56: 23-36.
16. Dexter DT, Holley AE, Flitter WD, Slater TF, Wells FR, Daniel SE and et al. Increased levels of lipid hydroperoxides in the parkinsonian substantia nigra: an HPLC and ESR study. *Mov Disord* 1994; 9(1): 92-7.
17. Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Javoy-Agid F, Agid Y, Lees A and et al. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J Neurochem* 1989; 52(2): 381-9.
18. Shigenaga MK and Ames BN. Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Free Radic Biol Med* 1991; 10(3-4): 211-6.
19. Yoritaka A, Hattori , Uchida K, Tanaka M, Stadtman ER, Mizuno Y and et al. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(7): 2696-701.
20. Picklo MJ, Amarnath V, McIntyre JO, Graham DG, Montine TJ and et al. 4-Hydroxy-2(E)-nonenal inhibits CNS mitochondrial respiration at multiple sites. *J Neurochem* 1999; 72(4): 1617-24.
21. Maker HS, Weiss C, Silides DJ, Cohen G and et al. Coupling of dopamine oxidation (monoamine oxidase activity) to glutathione oxidation via the generation of hydrogen peroxide in rat brain homogenates. *J Neurochem* 1981; 36(2): 589-93.
22. Gesi M, Santinami A, Ruffoli R, Conti G, Fornai F and et al. Novel aspects of dopamine oxidative metabolism (confounding outcomes take place of certainties). *Pharmacol Toxicol* 2001; 89(5): 217-24.
23. Graham DG. Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol Pharmacol* 1978; 14(4): 633-43.
24. Sreejayan and Rao MN. Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation. *J Pharm Pharmacol* 1994; 46: 1013-16.
25. Motterlini R, Foresti R, Bassi R, Green CJ. Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 1303-12.
26. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB, et al. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol* 2008; 75: 787-809.
27. Luo Y, Hattori A, Munoz J, Qin ZH, Roth GS and et al. Intrastriatal dopamine injection induces apoptosis through oxidation-involved activation of transcription factors AP-1 and NF-kappaB in rats. *Mol Pharmacol* 1999; 56: 254-64.

28. Chen J, Tang XQ, Zhi JL, Cui Y, Yu HM, Tang EH and et al. Curcumin protects PC12 cells against 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis by bcl-2-mitochondria-ROS-iNOS pathway. *Apoptosis* 2006; 11: 943-53.
29. Drieu, K. (1986) Preparation and definition of *G. biloba* extract. *Press Med* 1986; 15: 1455-7.
30. Ramassamy, C., Clostre, F., Christen, Y. & Costentin, J. Prevention by a *Ginkgo biloba* extract (GEb761) of the dopaminergic neurotoxicity of MPTP. *J Pharm Pharmacol* 1990; 42: 785-9.
31. Yang SF, Wu Q, Sun AS, Huang XN, Shi JS. Protective effect and mechanism of *Ginkgo biloba* leaf extracts for Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Acta Pharmacol Sin* 2001; 22: 1089-93.
32. Bridi R, Crossetti FP, Steffen VM, Henriques AT. The antioxidant activity of standardized extract of *Ginkgo biloba* (EGb 761) in rats. *Phytotherapy Research* 2001; 15: 449-51.
33. Rojas P, Serrano-García N, Mares-Sámano JJ, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J, Ogren SO. EGb761 protects against nigrostriatal dopaminergic neurotoxicity in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinsonism in mice: role of oxidative stress. *Eur J Neurosci* 2008; 28(1):41-50.
34. Ramassamy C, Naudin B, Chrsiten Y, Clostre F, Costentin J. Prevention by *Ginkgo biloba* extract (EGb761) and trolox C of the decrease in synaptosomal dopamine or serotonin uptake following incubation. *Biochem Pharmacol* 1992; 44: 2395-401.
35. Wu WR, Zhu XZ. Involvement of monoamine oxidase inhibition in neuroprotective and neurorestorative effects of *Ginkgo biloba* extract against MPTP-induced nigrostriatal dopaminergic toxicity in C57 mice. *Life Sci* 1999; 65: 157-64.
36. Paik NH, P MK, Choi KJ, Cho YH. Isolation of Ginsenosides Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf and Rg1 from ginseng root by high performance liquid chromatography. *Arch Pharm Res* 1982; 5: 7-12.
37. Shibata S, Ohtsuka Y, Saito H. Recent Advances in Ginseng Studies. *Kirokawa Publishing* 1990.
38. Van Kampen JM, McGeer EG, Stoessl AJ. Dopamine transporter function assessed by antisense knockdown in the rat: protection from dopamine neurotoxicity. *Synapse* 2000; 37: 171-8.
39. Van Kampen J, Robertson H, Hagg T, Drobitch R. Neuroprotective actions of the ginseng extract G115 in two rodent models of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2003; 184: 521-9.
40. Kitts DD, Wijewickreme AN, Hu C. Antioxidant properties of a North American ginseng extract. *Mol Cell Biochem* 2000; 203: 1-10.
41. Wang CN, Shiao YJ, Kuo YH, Chen CC, Lin YL. Inducible nitric oxide synthase inhibitors from *Saposhnikovia divaricata* and *Panax quinquefolium*. *Planta Med* 2000; 66: 644-647.
42. Sano M, Takahashi Y, Yoshino K, Shimoi K, Nakamura Y, Tomita I, et al. Effect of tea (*Camellia sinensis* L.) on lipid peroxidation in rat liver and kidney: a comparison of green and black tea feeding. *Biol Pharm Bull* 1995; 18: 1006-8.
43. Serafini M, Ghiselli A, Ferro-Luzzi A. In vivo antioxidant effect of green and black tea in man. *Eur J Clin Nutr* 1996; 50: 28-32.
44. Grinberg LN, Newmark H, Kitrossky N, Rahamim E, Chevion M, Rachmilewitz EA. Protective effects of tea polyphenols against oxidative damage to red blood cells. *Biochem Pharmacol* 1997; 54: 973-8.
45. Pan MH, Lin-Shiau SY, Ho CT, Lin JH, Lin JK. Suppression of lypopolysaccharide-induced nuclear factor kappaB activity by theaflavin-3,3'-digallate from black tea and other polyphenols through down-regulation of IkappaB kinase activity in macrophages. *Biochem Pharmacol* 2000; 59: 357-67.
46. Lin JK, Liang YC, Lin-Shiau SY. Cancer chemoprevention by tea polyphenols through mitotic signal transduction blockade. *Biochem Pharmacol* 1999; 58: 911-5.
47. Cao Y, Cao R. Angiogenesis inhibited by drinking tea. *Nature* 1999; 398: 381.
48. Levites Y, Weinreb O, Maor G, Youdim MB, Mandel S. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration. *J Neurochem* 2001; 78: 1073-82.
49. Guo S, Bezar E, Zhao B.: Protective effect of green tea polyphenols on the SH-SY5Y cells against 6-OHDA induced apoptosis through ROS-NO pathway. *Free Rad Biol Med* 2005; 39: 682- 95.
50. Nie G, Jin C, Cao Y, Shen S, Zhao B. Distinct effects of tea catechins on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in

- PC12 cells. *Arch Biochem Biophys* 2002; 397: 84–90.
51. Guo S, Yan J, Yang T, Yang X, Bezdard E, Zhao B. Protective effects of green tea polyphenols in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease through inhibition of ROS-NO pathway. *Biological Psychiatry* 2007; 62 : 1353-62.
 52. Schroeter H, Williams RJ, Matin R, Iversen L, Rice-Evans CA. Phenolic antioxidants attenuate neuronal cell death following uptake of oxidized low-density lipoprotein. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 1222-33.
 53. Corder R, Mullen W, Khan NQ, Marks SC, Wood EG, Carrier MJ, et al. Oenology: Red wine procyanidins and vascular health. *Nature* 2006; 444: 566.
 54. Fremont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci* 2000; 66: 663–73.
 55. Jin F, Wu Q, Lu YF, Gong QH, Shi JS. Neuroprotective effect of resveratrol on 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats. *Eur J Pharmacol* 2008; 600: 78–82.
 56. Khan MM, Ahmada A, Ishrat T, Khand MB, Hoda MN, Khuwaja G, et al. Resveratrol attenuates 6-hydroxydopamine-induced oxidative damage and dopamine depletion in rat model of Parkinson's disease. *Brain Res* 2010; 1328:139-51.

Thai Journal of Pharmacology

Instruction for Authors

The Thai Journal of Pharmacology serves as the official journal of the Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand. The journal is designed to contribute to the publication of researches and information exchanges in the field of pharmacology and related fields. The manuscripts should not have been published before. Original full length scientific research papers, short communication, case report, letter to editor, minireviews, pharmacological digest and new drugs profile will be included in this journal .

Manuscripts

Three copies of manuscripts, diskette(s) and illustration(s) are required. Manuscript of research articles should be written in English, the others can be either English or Thai. The preparation of the manuscript should be in the form of Microsoft Word (font: Times New Roman size 10). Pages should be numbered consecutively, including the title page.

Table and illustration should be numbered with Arabic figures consecutively in the order of first citation in the text and supply a brief title for each. Explain in footnotes all non-standard abbreviation that are used. Illustrations should be professionally drawn and photographed or produced on a laser printer.

Nomenclature should follow the recommendations of the International Union for Pure and Applied Chemistry (IUPAC), and the International Union for Biochemistry (IUB). All measurements must be in System International (SI) units.

Research articles

The research papers should contain a) title, b) abstract, c) keywords, d) introduction, e) material and methods, f) result, g) discussion, h) references.

The title page: Should contain the title of the article, author(s) name and affiliation (s) laboratory or institute of origin and address. Name and complete address of author responsible for correspondence about the manuscript should be also placed at the foot of the title page. **An abstract** limited to approximately 250 words should be carried in this page. It should be informative and state concisely what was done, results obtained and conclusion. Three to ten **keywords** or short phrases appropriate for subject indexing should be typed at the bottom of abstract.

Introduction: State clearly the purpose of article, the rationale for the study or observation. Relevant previous study should be cited and do not review the subject extensively .

Materials and Methods: Describe the sufficient detail of the method, experimental subjects (patients or experimental animals, including controls) clearly. Identify the method, apparatus (manufacturer's name and address in parenthesis). Give references to established method, study design and statistical method .

Results: Present your results in logical sequence in the text, tables, and illustrations. Only important observations should be summarized and emphasized. Do not repeat in the text all the data in the table or illustrations.

Discussion: Comment on the results and integrate them with the existing knowledge and point out the field. Recommendation may also be included.

Acknowledgment: Persons, financial or technical helps which have contributed to the paper should be acknowledged in a paragraph.

References: Place the number references consecutively in the order in which they are first mention in the text. Use the style of the examples below:

Examples

Articles in journals

- (1) Standard journal article (List all authors, but if the number exceeds three give three followed by et al)

You CH, Lee KY, Chen RY, et al. Electrogastrographic study of patients with unexplained nausea, blotting and vomiting . *Gastroenterology* 1980; 79:311-4.

- (2) Organisation as author

The Royal Marsden Hospital Bone-marrow Transplantation Team. Failure of syngeneic bone-marrow graft without preconditioning in post-hepatitis marrow aplasia. *Lancet* 1977;2:742-4.

- (3) No author given

Coffee drinking and cancer of the pancreas (editorial). *BMJ* 1981;283-628.

- (4) Volume with supplement

Magni F, Borghi S, Berti F. BN-52021 protects guinea-pig from heart anaphylaxis. *Pharmacol Res Commun* 1988;20 suppl 5:75-8.

- (5) Books and other monographs

5.1 Personal author(s)

Colson JH, Armour WJ. *Sports injuries and their treatment*. 2nd rev ed. London: S Paul, 1986.

5.2 Editor(s), compiler as author

Diener HC, Wilkinson M, editors. *Drug-induced headache*. New York Springer-Verlag, 1988.

5.3 Chapter in a book

Jaffe JH, Martin WR. Opioid analgesics and antagonists. In: Gilman AG, Goodman LS, Gilman A, editors. *The Pharmacological basis of therapeutics*. 6th ed. New York: MacMillan Publishing, 1980:494-543.

5.4 Conference proceedings

Vivian VL, editor. Child abuse and neglect: a medical community response. *Proceeding of the first AMA National Conference on Child Abuse and Neglect*; 1984; Mar 30-31; Chicago. Chicago: American Medical Association, 1985.

(6) Dissertation

Youseff NM. *School adjustment of children with congenital heart disease* (dissertation). Pittsburg (PA): Univ of Pittsburg, 1988.

(7) In press

Lillywhite HB, Donald JA. Pulmonary blood flow regulation in an aquatic snake. *Science*. In press.

Reviews

All reviews are usually peer-reviewed. If the manuscript is written in Thai, English title and abstract are also required.

Short communication

Short communication should contain new and unpublished results in a short form. It should not exceed 2 print pages and may contain one table and one illustration.

Manuscript submission

All manuscripts are to be submitted to editor or associate editors, Thai Journal of Pharmacology, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Chulalongkorn Hospital, Rama IV Road, Bangkok 10330, Thailand. All paper are critically reviewed by the invited referees. Reviewers' comments are usually returned to the authors. The editorial board will decide upon the time of publication and retain the right to modify the style of contribution. However, major changes will be agreed with the authors. Authors will receive 25 reprints free.

Copyright

The Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand holds the copyright on all material appearing in the journal.

รายนามคณะกรรมการที่ปรึกษาและบริหารสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย
วาระประจำปี พ.ศ. 2553-2554

คณะกรรมการที่ปรึกษา

ภก.พลตรี สุนันท์ โรจนวิภาต
รศ.น.สพ.दानिศ ทวีதியานนท์
รศ.พญ.สุนมา ชมพูทวีป
รศ.ภก.ดร.ชัยชาญ แสงดี
รศ.พลตรี ดร.บพิตร กลางกล้า

คณะกรรมการบริหาร

นายกสมาคม
ผู้รั้งตำแหน่งนายกสมาคม
อุปนายก
เลขาธิการ
ฝ่ายวิชาการ
เหรัญญิก
ปฎิคม
นายทะเบียน
บรรณาธิการวารสาร
กรรมการกลาง

รศ.ภญ.ดร.มยุรี ตันตสิระ
รศ.ภญ.ดร.สุพัตรา ศรีไชยรัตน์
ศ.ดร.เกศรา ณ บางช้าง
ภก.ดร.พิสิฐ เขมาวุฒม์
รศ.ภญ.ดร.ศรีจันทร์ พรจิราศิลป์
ผศ.รท.หญิง ภญ.ดร.ภัสราภา โตวิวัฒน์
พ.อ.หญิง ภญ.นิสามณี สัตยาบัน
รศ.ภญ.สมใจ นครชัย
รศ.ดร.ลัดดาวัลย์ ผิวทองงาม
รศ.ภญ.ดร.จินตนา สัตยาศัย
ผศ.นพ.วีรวัฒน์ มหัทธนตระกูล
ผศ.ดร.พยงค์ วณิเกียรติ
ภญ.ดร.อัญชลี จุฑะพุทธิ
รศ.นพ.อดิศักดิ์ วงศ์ขจรศิลป์



การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 33
สมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย ร่วมกับ
ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
เรื่อง Pharmacological Researches for the Benefit of Mankind
วันที่ 17 – 19 มีนาคม 2554
ณ ห้องประกายเพชร โรงแรมโดมอนด์พลาซ่า อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา

หัวข้อการประชุม

- Memorial Lecture: Antioxidants and free radicals in health, life, disease and death โดย Professor Barry Halliwell, National University of Singapore
- Molecular drug targets and management of pain โดย รศ.ดร.จุฑามณี สุทธิสีสังข์ มหาวิทยาลัยมหิดล และ รศ.พญ.ศศิกานต์ นิมมานรัชต์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- Pharmacogenomics of adverse drug reactions โดย ญญ. วิมล สุวรรณเกษาวงษ์ สำนักงานอาหารและยา และ รศ.ดร.วิจิตรา ทัศนียกุล มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- Medicinal Plant Utilization: costs, risk and rewards โดย ดร.กฤษณา ไกรสินธุ์ ผู้ได้รับรางวัลรามอน แมกไซไซ สาขาบริการสาธารณสุข พ.ศ. 2552
- อื่นๆ ได้แก่ Update on antimicrobials, Pharmacology of melatonergic antidepressant agomelatine, Metabolic syndrome: its importance and management และ Medicinal plants: Research & Development for the community

การลงทะเบียน

สมาชิก : 1,500 บาท ภายในวันที่ 31 มกราคม 2554

2,000 บาท หลังวันที่ 31 มกราคม 2554

ไม่เป็นสมาชิก : 2,000 บาท ภายในวันที่ 31 มกราคม 2554

2,500 บาท หลังวันที่ 31 มกราคม 2554

นิสิต/นักศึกษา 1,000 บาท

สมาชิกผู้เกษียณอายุ นิสิต/นักศึกษา ที่นำเสนอผลงาน ไม่เสียค่าลงทะเบียน

รายละเอียดเพิ่มเติมที่ : ดร.วันดี อุดมอักษร ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

โทร. 0 7428 8185, 0 7428 8171-2 e-mail : ying_wandee@yahoo.com หรือ <http://www.thaipharmacol.org>