



Thai Journal of Pharmacology

www.thaipharmacol.org

วารสารเภสัชวิทยา

Official Publication of
Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand

Contents

Research articles

Inhibitory Effect of a Water Extract from *Stephania venosa* Tubers
on N-methyl D-aspartate Receptor

Effect of Dabigatran Etxilate on Bleomycin-Induced Pulmonary
Inflammation in Mice

Genetic Polymorphisms of *Plasmodium vivax* dihydrofolate
reductase (*pvdhfr*) and Dihydropteroate synthase (*pvdhps*) in
Malaria Endemic Areas of Thailand

Effect of Ethanolic Extract of *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees)
Radlk on CYP450 3A4 in Human Hepatoma HepG2 Cell

Etc.

Reviews

Allium sativum Linn.

Holy basil, Sacred basil

Vol. 34, No. 1, 2012

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
Chandhane Itthipanichpong
Darawan Pinthong
Kesara Na-Bangchang
Krongtong Yoovathaworn
Mayuree Tantisira
Nongluk Sookvanichsilp
Nisamanee Satyapan
Orapin Wongsawatkul
Pornpen Pramyothin

Pravit Akarasereenont
Sirintorn Yipchokanand
Somjai Nakornchai
Somsong Lawanprasert
Sopit Thamaree
Srichan Phornchirasilp
Supeechea 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 ไม่อนุญาต
ให้นำส่วนใดส่วนหนึ่งของเอกสารฉบับนี้ไปถ่ายเอกสาร ผลิตหรือพิมพ์ซ้ำ หรือนำไปใช้เพื่อประโยชน์ทางการค้าโดย
ปราศจากการยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรจากบรรณาธิการ

Thai Journal of Pharmacology

Vol. 33, No. 2, 2011

CONTENTS

Editorial	3
RESEARCH ARTICLES	
Inhibitory Effect of a Water Extract from <i>Stephania venosa</i> Tubers on N-methyl D-aspartate Receptor Pathama Leewanich	5
Effect of Dabigatran Etxilate on Bleomycin-Induced Pulmonary Inflammation in Mice Ninu Shrestha, Nongluck Sookvanichsilp	12
Antibacterial Activity of Extract and an Isolated Steroidal Alkaloid from The Seeds of <i>Combretum quadrangulare</i> Kurz. (Combretaceae) Khesorn Nantachit, Patoomratana Tuchinda, Banyong Khantawa, Somjing Roongjang	19
Genetic Polymorphisms of <i>Plasmodium vivax</i> dihydrofolate reductase (<i>pvdhfr</i>) and Dihydropteroate synthase (<i>pvdhps</i>) in Malaria Endemic Areas of Thailand Pimwan Thongdee, Vithoon Viyanant, Jiraporn Kuesap, Kanchana Rungsihirunrat, Pongsri Tippawangkosol, Kesara Na-Bangchang	27
Investigation on the Association between <i>In Vitro</i> Sensitivity of <i>Plasmodium falciparum</i> isolates in Thailand to Antimalarial Drugs and Polymorphisms of Molecular Markers of Antimalarial Drug Resistance Poonuch Muhamad, Vithoon Viyanant, Wanna Chaijaroenkul, Papichaya Phompradit, Kesara Na-Bangchang	34
Preliminary Proteomics Study of Dihydroartemisinin Action in <i>Plasmodium falciparum</i> Wanna Chaijaroenkul, Vithoon Viyanant, Piyathida Kumsuk, Wipada Kiatkangwankul, Kesara Na-Bangchang	41
Genetic Polymorphisms of <i>Plasmodium Falciparum</i> Merozoite Surface Protein (<i>PfMSP</i>) in Mae Sot Isolates Jiraporn Kuesap, Vithoon Viyanant, Kanchanok Ketprathum, Puntanat Tattiyapong, Kesara Na-Bangchang	47
Preliminary Investigation of <i>In vitro</i> and <i>In vivo</i> Antimalarial Activity of the Ethanolic Extract of <i>Garcinia mangostana</i> Linn. (Mangosteen) Ratchanu Bunyong, Vithoon Viyanant, Wanna Chaijoenkul, Kesara Na – Bangchang	54
Effect of <i>Phyllanthus amarus</i> Aqueous Extract on Human CYP3A4 Activity in HepG2 Cells Kridsada Anuntawuttikul, Sureerut Porntadavity, Pornpen Pramyothin, Somsong Lawanprasert	59
Inhibition of Human CYP1A2 and CYP3A4 Activities by Thai Medicinal Plants with Promising Antimalarial Activity Wiriaporn Sumsakul, Vithoon Viyanant, Wiratchanee Mahavorasirikul, Anurak Cheoymong, Wichitra Tassaneeyakul, Kesara Na-Bangchang	66
Effect of Ethanolic Extract of <i>Pseuderanthemum palatiferum</i> (Nees) Radlk on CYP450 3A4 in Human Hepatoma HepG2 Cell Kornrat Rattanawattanathorn, Sureerut Porntadavity, Chaiyo Chaichantipyuth, Supatra Srichairat	71
Inhibitory Effects of Nomilin on the Cytochrome P450 3A4 Activity Alisa Suk-aim, Nusara Piyapolrungruj, Suree Jianmongkol	77

Preliminary <i>in vitro</i> cytotoxicity of lipophilic extracts against HepG2 (hepatocellular carcinoma cell) and MCF-7 (breast cancer cell) Kridsada Sirisabhabhorn, Pilaiwan Siripurkpong, Srunya Vajrodaya, Oumaporn Rungsuriyawiboon	83
Effects of Genistein on Neointimal Chagnes after Balloon Injury of Carotid Artery in Ovariectomized Rats Jirawan Mala, Sompol Sangaunrungsirikul, Pichet Sampatanukul, Wasan Udayachalern	92
Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Thai Medicinal Plants and Herbal Formulations Artitaya Theingsusuk, Vithoon Viyanant, Wanna Chaijaroenkul, Kesara Na-Bangchang	99
Effects of steam aerosolization on heat shock protein 70 expression in rats Duddao Chaidee, Udomlak Matsathit, Chantana Mekseepralard, Piyanant Chonmaitree, Piyanee Ratanachamnong, Somkiat Wattanasirichaigoon, Laddawal Phivthongngam	106
Screening of Free Radical Scavenging, Antityrosinase and Antibacterial Activities from Extracts of <i>Lannea coromandelica</i> (Houtt.) Duddao Chaidee, Udomlak Matsathit, Chantana Mekseepralard, Piyanant Chonmaitree, Piyanee Ratanachamnong, Somkiat Wattanasirichaigoon, Laddawal Phivthongngam	113
Effect of <i>Morus alba</i> L. Extract on Pain Associated with Osteoarthritis in Rats Arada Khunakornvichaya, Sujinna Lekmeechai, Tasana Pitaksuteepong, Noppawan Phumala Morales, Warinkarn Hemstapat	121
Relationship between Methamphetamine Concentrations in Urine and Blood of Thai Methamphetamine Abusers Rungtip Narapanyakul, Wichian Tungtananuwat, Patramon Yongpanich, Theerin Sinchai, Nantana Thong-ra-ar, Somsong Lawanprasert	126
False Interpretation of Methamphetamine and Amphetamine Abuse in Thai Patients Receiving Selegiline Nunthika Kaewpunya, Wichian Tungtananuwat, Akravudh Viriyavejakul, Patramon Yongpanich, Nantana Thong-ra-ar, Somsong Lawanprasert	133
Investigation of Antioxidant Activities and Hepatoprotective effect of Hoan Ngoc (<i>Pseuderanthemum Palatiferrum</i>) against Hydrogen Peroxide - Induced Oxidative Damage in HepG2 Cells Supaporn Udomsup, Suree Jianmongkol, Chaiyo Chaichantipyuth, Supatra Srichairat	140
Hypocholesterolemic Effect of Sericin and Its Effect on Liver Protein Expression Kanittaporn Trisat, Manote Sutheerawattananonda, Nanteetip Limpeanchob	154
Effect of Iron on LPS Induced Free Radical Production in Microglia cells Samaphorn Maneethep, Ronald E. Morales Vargas, Yupin Sanvarinda, Noppawan Phumala Morales	159
Effect of Water Extract from <i>Piper nigrum</i> on Macrophage J774A.1 Cells Nakuntwalai Wisidsri, Naowarat Suthamanartpong, Usa Suwannasual, Wacharee Limpanasithikul	164
Quantitative Analysis Method for Determination of α -mangostin in Mangosteen rind Extract Anurak Cheoymang, Kesara Na-Bangchang	170
Association of HLA Genotypes and Co-trimoxazole-induced Stevens-Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis in Thai Patients Thachanan Kongpan, Sirimas Kanjanawart, Usanee Khunakornsiri, Prarinya Konyoung, Pansu Chumworathayi, Somsak Tiamkao, and Wichittra Tassaneeyakul	177
Effects of Rhinacanthin-N on Efflux Drug Transporters in Caco-2 cells Ratjika Wongwanakul, Nontima Vardhanabhuti, Suree Jianmongkol	183

Urinary Excretion of Flavonoids after Ingestion of Guava Juice Lalita Chomphen, Paveena Yamanont, Nuntavan Bunyapraphatsara, Noppawan Phumala Morales	190
Anti-nociceptive Effects of Standardized Extract of <i>Centella asiatica</i> ECa 233 in Tail flick Test Pataweekorn Ketkomol, Pasarapa Towiwat, Boonyong Tantisira, Mayuree H. Tantisira	196
Effects of the Standardized Extract of <i>Centella asiatica</i> ECa233 on KCN-Inhibited Mitochondrial Respiration in Mouse Brain Nattanan Losuwannarak, Boonyong Tantisira ¹ , Mayuree H. Tantisira, Ratchanee Rodsiri	204
Efficacy of Bromelain in Rat Model of Anterior Cruciate Ligament Transection -Induced Osteoarthritis Sujinna Lekmeechai, Arada Khunakornvichaya, Piyanee Ratanachamnong, Yupin Sanvarinda, Warinkarn Hemstapat	210
<i>Allium sativum</i> Linn. Puongtip Kunanusorn	216
Holy basil, Sacred basil Nuttatakarn Jiruntanat	229

บรรณาธิการแถลง

เรียนชาวเภสัชวิทยาและท่านผู้อ่าน

วารสารของสมาคมเภสัชวิทยานับนี้เป็นฉบับแรก ของปี 2555 และช่วงเวลาที่ท่านได้รับวารสารก็คงเป็นช่วงเวลาหลังการจัดงานประชุมวิชาการประจำปีของชาวเภสัชวิทยา ครั้งที่ 34 ซึ่งก็ได้ผ่านพ้นไปด้วยความปิติและราบรื่นเป็นอย่างยิ่ง ในงานประชุมวิชาการประจำปีที่ผ่านมาได้จัดขึ้น ณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยความร่วมมือของ 4 คณะด้วยกัน ได้แก่ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ และภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ ดังนั้น ทางคณะบรรณาธิการวารสารจึงต้องขอขอบพระคุณคณะกรรมการจัดการประชุมวิชาการทุกท่านไว้ ณ ที่นี้

สำหรับการประชุมวิชาการในครั้งนี้ได้มีผู้ให้ความสนใจเสนอผลงานเป็นจำนวนมาก ส่งผลให้มีผลงานวิจัยลงตีพิมพ์ในวารสารเป็นจำนวนหลายเรื่อง รวมทั้งบทความวิจัยบางส่วนที่ยังตกค้างไม่ได้ลงตีพิมพ์ในครั้งที่ผ่านมาก็ได้นำมารวบรวมไว้ในวารสารฉบับนี้

นอกจากนี้ ทางคณะบรรณาธิการวารสาร มีความมุ่งมั่นที่จะพัฒนาวารสารของสมาคมฯ ให้มีคุณภาพมากยิ่งขึ้นและจะตั้งใจทำงานเพื่อให้วารสารของสมาคมฯ เป็นที่ยอมรับในฐานะข้อมูลวารสารวิชาการไทย (Thai-Journal Citation Index) ต่อไป และหากมีข้อเสนอแนะใดๆ คณะบรรณาธิการวารสาร ขอน้อมรับด้วยความยินดียิ่ง

สุดท้าย ช่วงนี้เป็นช่วงที่ฤดูกาลเปลี่ยนแปลง ฝนตกมากขึ้น ปริมาณความชื้นในอากาศเพิ่มขึ้น แอ้มบางวันอากาศก็ร้อนมากกว่าปกติ เป็นผลทำให้ร่างกายปรับตัวรับสภาพอากาศที่เปลี่ยนแปลงได้ไม่ทัน นอกจากนี้ยังเป็นฤดูที่มีการระบาดของเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคทางระบบหายใจหลายชนิด ทำให้เกิดการเจ็บป่วยของทางเดินหายใจทั้งในเด็ก และผู้ใหญ่กันถ้วนหน้า ดังนั้น ในฐานะบรรณาธิการวารสารก็ขอฝากความห่วงใยแด่ท่านผู้อ่านที่รักทุกท่าน ขอให้ท่านรักษาสุขภาพร่างกายให้แข็งแรงอยู่เสมอ พักผ่อนให้เพียงพอ และอย่าลืมนพกรรมติดตัวเป็นประจำด้วยนะคะ

รศ.ดร.ลัดดาวัลย์ ผิวทองงาม

บรรณาธิการวารสาร

RESEARCH ARTICLE

Inhibitory Effect of a Water Extract from *Stephania venosa* Tubers on N-methyl D-aspartate Receptor

Pathama Leewanich

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Bangkok 10110, Thailand

Abstract

Water extract from *Stephania venosa* (*S. venosa*) tubers has a sedative effect in an animal experiment. It has been known that sedative activities may involve antagonism of the N-methyl D-aspartate (NMDA), serotonin (5-HT), or glycine receptors. NMDA receptor is particularly interesting because it is involved in several neuronal dysfunctions. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of water extract from *S. venosa* tubers on the NMDA receptor. *Xenopus* oocytes were injected with cRNA mixture of NR1a and NR2B and responses to NMDA were recorded using the two-electrode voltage clamp technique. The extract at 0.1–1000 µg/ml dose-dependently inhibited the NMDA receptor function with an IC_{50} of 200 µg/ml. The inhibitory effect of the extract was reversible when compared to that of the NMDA-channel blocker MK-801. Combinations of the extract and the competitive NMDA receptor antagonist AP-5 showed a more pronounced inhibition than either one alone. Selectivity of the inhibitory effect of the extract was also evaluated. The extract decreased 5-HT receptor function with an upward bell-shaped concentration dependence. The extract at 1–100 µg/ml dose-dependently decreased 5-HT receptor response with an IC_{50} of 3 µg/ml but at 0.1–1 µg/ml the inhibition was gradually increased when the concentration was decreased. The inhibitory effect of the extract on glycine receptors was less potent than the effect on NMDA receptor. These results suggest that the extract reversibly inhibited the NMDA receptor by interacting with a binding site rather than the site for AP-5. Moreover, the inhibition of the extract was more specific to NMDA receptor than glycine receptor. Possible active compound (s) underlying the inhibitory effect of the extract are discussed.

Key Words *Stephania venosa* tubers, water extract, *Xenopus* oocytes, NMDA receptor

Introduction

Stephania venosa Spreng (*S. venosa*), commonly known in Thai as Boraphet-phungchang, Sabu-le-ad or Kling klaang dong, is a plant in the family of Menispermaceae. Many studies have reported that *S. venosa* tuber in Thailand revealed a variety of pharmacological activities including antimalarials (1), acetylcholinesterase inhibitors (2), antiproliferative activity on cancer cells (3,4), and antiinflammatory activity (5). Over thirty isoquinoline alkaloids isolated from the tuber (6-8) exhibit many biological activities, such as aromoline possess antiplasmodial, antiamebic, and cytotoxic activities; berbamine and tetradrine inhibit the production of interleukin-1 and tumor necrosis factor; berbamine and cepharanthine display antiinflammatory and immunosuppressive activities; dicentrine shows antihypertensive; and palmatine has sedative activity (9,10).

Although, most people have used the tuber of *S. venosa* in the form of crude drugs, boiled solution, liquor soaking, or pills, scientific evidences of these formulations have not been clarified. Our previous observation found that animals orally intaking water extract from the tuber of *S. venosa* become sedated. Sedative activity of any compounds may involve inhibition of excitatory neurotransmitter. N-methyl D-aspartate (NMDA) is an excitatory neurotransmitter acting as a specific agonist at the NMDA receptor. NMDA receptor is particular interesting because it mediates many neuronal dysfunctions such as Alzheimer's diseases (11). Therefore, this study aimed to evaluate the effects of water extract from *S. venosa* tubers on NMDA receptor.

Materials and Methods

Plant material and extract preparation

Authentication of the tuber of *S. venosa* (Bl.) Spreng was achieved by comparison with herbarium specimens at the Bangkok Forest Herbarium, Royal Forest Department, Ministry of Agriculture and cooperatives, Bangkok, Thailand.

S. venosa tubers were collected from Rachaburi Province, Thailand. The

fresh tubers were harvested, chopped into small pieces, and dried under the sun light for 2–3 days. The dried tubers were boiled for 5 h. The solutions were then filtered and lyophilized using a freeze dryer to yield a brown powder.

RNA preparation

cDNA clones of NR1a and NR2B were kindly provided by Dr. K. Igarashi (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University). The circular cDNAs of NR1a and NR2B were linearized with NotI and EcoRI, respectively. The linearized NR1a and NR2B cDNAs were then transcribed into cRNAs in vitro with T7 and T3 RNA polymerase, respectively, using an mMessage mMachine transcription kit (Ambion, Austin, TX, USA). NR1a and NR2B cRNAs were diluted with nuclease-free water to approximately 0.5 µg/µl of each and were mixed at a ratio of 1:4 before injection into *Xenopus* oocytes. Total RNA (5 mg/ml) for 5-HT or glycine receptor was prepared from whole brain or spinal cord of adult male rats, respectively, using the Trizol reagent (Gibco-BRL) (12).

Oocyte injection

Defolliculated stage V–VI oocytes were prepared from *Xenopus laevis* (*Xenopus* Express, Cape, South Africa) as described previously (13). Briefly, *Xenopus laevis* were anesthetized in ice-water, and a lobe of the ovary was dissected and placed in sterile modified Barth's solution (MBS: 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0.41 mM CaCl₂, 0.33 mM Ca(NO₃)₂, 0.82 mM MgSO₄, 2.4 mM NaHCO₃, 7.5 mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane, pH 7.6). Oocytes were then isolated manually and defolliculated by incubation in 2 mg/ml collagenase (type IA; Sigma, St. Louis, MO, USA) at 19 °C for 1 h in calcium-free MBS solution. Each oocytes was injected with either 27.6 nl of NR1a/NR2B RNA mixture or 46 nl of the total RNA. After injection, oocytes were incubated in MBS containing 2.5 units/ml penicillin and 2.5 µg/ml streptomycin at 19 °C.

Electrophysiological recording

Responses to NMDA were recorded using a two electrode voltage-

clamp amplifier (GeneClamp 500B; Axon Instrument, Foster City, CA, USA) at a holding potential of -70 mV unless noted otherwise. Electrodes were filled with 3 M KCl and had resistances of 0.5–5 Ω M. Oocytes were positioned in a 50- μ l chamber and continuously perfused with Mg^{2+} -free MBS solution at 1 ml/min at room temperature. The drugs were applied until a plateau or peak of the response was observed. Data were recorded and digitized for analysis (MacLab 200; ADInstruments, Castle Hill, NSW, Australia). The washout period for recovery was 3–5 min, depending on the concentration of drugs applied. Most data are expressed as the mean \pm S.E.M. For statistical analysis, the SigmaStat (ver3.5) program was used. Data were subjected to the paired t-test when effects were compared between before and after drug application in the same oocytes or the unpaired t-test when the experiments

were performed in different oocytes. If the data was compared with 100% control, Mann-Whitney Rank Sum test was used.

Results

Inhibitory effect of the S. venosa extract on the NMDA receptor

To clarify the efficacy of the extract on the expressed NMDA receptor, the inhibitory effect of the extract at 0.1–1000 μ g/ml was tested with 10 μ M glutamate plus 10 μ M glycine. The current response elicited by 10 μ M glutamate plus 10 μ M glycine was dose-dependently reduced by the extract with IC_{50} of 200 μ g/ml (Fig. 1). The inhibitory effect of the extract easily disappeared after washout comparing to that of the noncompetitive NMDA receptor antagonist MK-801 (Fig. 1A).

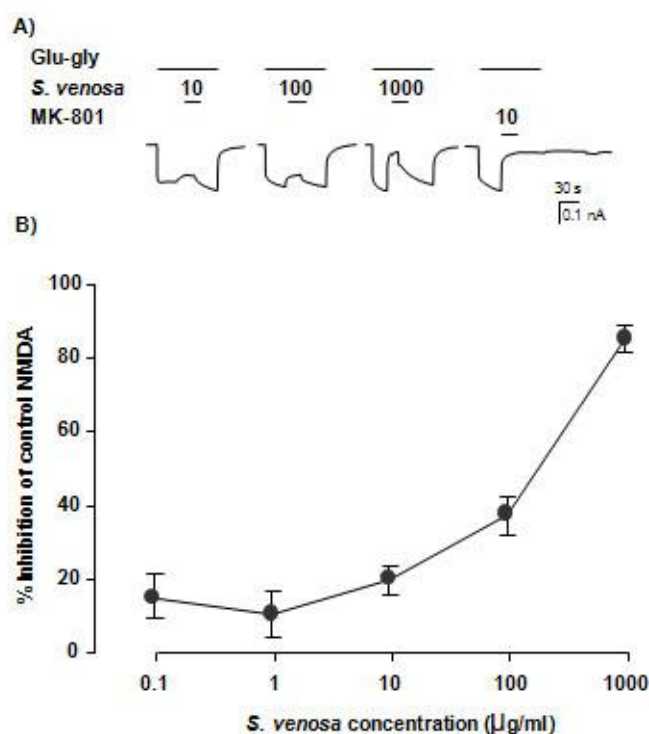


Figure 1 Dose-dependent inhibitory effects of *S. venosa* extract on NMDA receptor. Oocytes injected with NR1a and NR2B cRNAs were applied with 10 μ M glutamate plus 10 μ M glycine (Glu-gly) in the absence (control) or presence of the extract. A) Examples of NMDA currents inhibited by the extract at different concentrations (10–1000 μ g/ml). MK-801 (10 μ M) is a noncompetitive NMDA receptor antagonist was tested as a positive control. B) Data are expressed as the mean \pm S.E.M. of percentages of control NMDA currents from 5–8 oocytes.

Inhibitory effect of the *S. venosa* extract on the NMDA receptor was enhanced by AP-5

To study a possible mechanism by which the extract inhibits the NMDA receptor, the inhibitory effects of the extract in the presence of the competitive NMDA receptor antagonist AP-5 were determined. Simultaneous application of the extract and AP-5 to oocytes caused a significant increase inhibitory effect of the extract when compared to the effect caused by the extract or AP-5 alone (Fig. 2). When the extract at 200 $\mu\text{g/ml}$ and AP-5 at 10 μM were tested, the percentage of inhibition were 32 ± 4.5 , 32 ± 1.7 , and 54 ± 3.3 for the extract, AP-5, and combination of the extract and AP-5, respectively. When the extract at 300 $\mu\text{g/ml}$ and AP-5 at 3 μM were tested, the percentage of inhibition were 67 ± 2.9 , 14 ± 1.5 , and 78 ± 2.6 for the extract, AP-5, and combination of the extract and AP-5, respectively.

Inhibitory effect of the *S. venosa* extract on 5-HT and glycine receptors

To examine the specificity of the inhibitory effect of the extract on NMDA receptor, we tested the effects of the extract on 5-HT and glycine-induced currents in oocytes injected with rat brain or spinal cord mRNA, respectively. The inhibitory effect of the extract at 0.1–100 $\mu\text{g/ml}$ was tested with 0.1 μM 5-HT. The inhibition by the extract gradually decreased during application of the extract in the concentration range of 0.1–1 $\mu\text{g/ml}$ and gradually increased during the extract concentration of 1–100 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 3). IC_{50} of the dose-dependent inhibition of the extract on 5-HT receptor is 3 $\mu\text{g/ml}$. The extract at 30 $\mu\text{g/ml}$ almost completely inhibit the 5-HT receptor (99 %). The 5-HT responses that were reduced by the extract at high concentrations hardly recovered after washout.

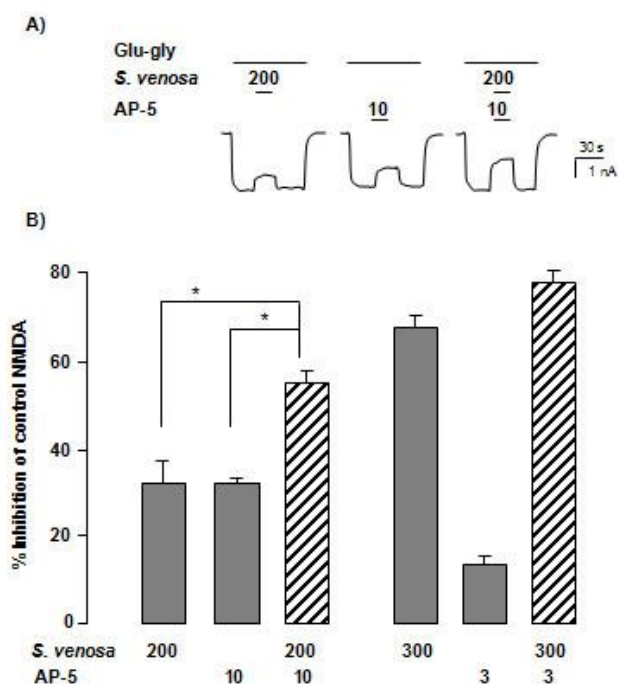


Figure 2 Additive effect of *S. venosa* water extract and AP-5 on NMDA receptor. Oocytes injected with NR1a and NR2B cRNAs were applied with 10 μM glutamate plus 10 μM glycine in the absence (control) or presence of the extract (200 or 300 $\mu\text{g/ml}$) or AP-5 (3 or 10 μM) or the extract plus AP-5. A) Examples of NMDA currents inhibited by the extract or AP-5 alone and the extract plus AP-5. B) Data are expressed as the mean \pm S.E.M. of percentages of control NMDA currents from 3–16 oocytes. * $P < 0.001$, compared with *S. venosa* or AP-5 alone.

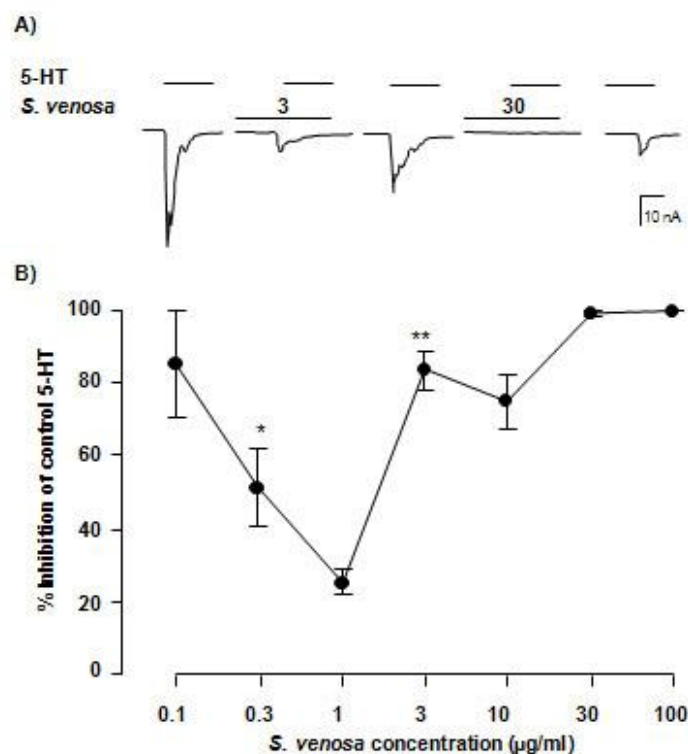


Figure 3 Dual inhibition of *S. venosa* extract on 5-HT receptors. Oocytes injected with total rat brain RNAs were applied with 0.1 µM 5-HT in the absence (control) or presence of the extract at various concentrations (0.1 – 100 µg/ml). A) Examples of traces demonstrated the effects of the extract at 3 and 30 µg/ml. Oocytes were applied with the extract 1 min before simultaneously application with 5-HT. B) Data are expressed as the mean ± S.E.M. of percentages of control response from 2-6 oocytes. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, compared with *S. venosa* at 1 µg/ml.

Discussion

The present study demonstrates that the water extract from *S. venosa* tubers acts as an NMDA receptor antagonist in *Xenopus* oocytes injected with NR1a and NR2B RNA and the inhibitory activity of the extract was more selective to the NMDA receptor than glycine receptor, but not on 5-HT receptor. The *S. venosa* extract inhibited the NMDA function with an IC_{50} of 200 µg/ml while inhibited the 5-HT and glycine receptors with an IC_{50} of 3 and 500 µg/ml, respectively.

The water extract from *S. venosa* tubers is a crude extract. Many constituents in the extract might be involved in the observed inhibitory effect on these receptors. Gas chromatography (GC) and mass spectrometer (MS) studies suggest that domestine and tetrahydropalmatine are

the main components of the water extract from *S. venosa* tubers (14). Biological activity of domestine has not been clearly identified.

In contrast, several lines of evidence have demonstrated that tetrahydropalmatine (THP) possesses various pharmacological activities such as analgesic, sedative, hypnotic (15), and antihypertensive (16). Underlying these activities, THP has been intensively studied for its putative mechanism. Animal experiments have shown that the sedative effect of tetrahydropalmatine results from blocking dopaminergic neurons in the brain, and benzodiazepine receptors mediates, at least in part, such an effect (17). Many reports have shown the antihypertensive and antinociceptive actions of THP involves a serotonin receptor blocking activity (18).

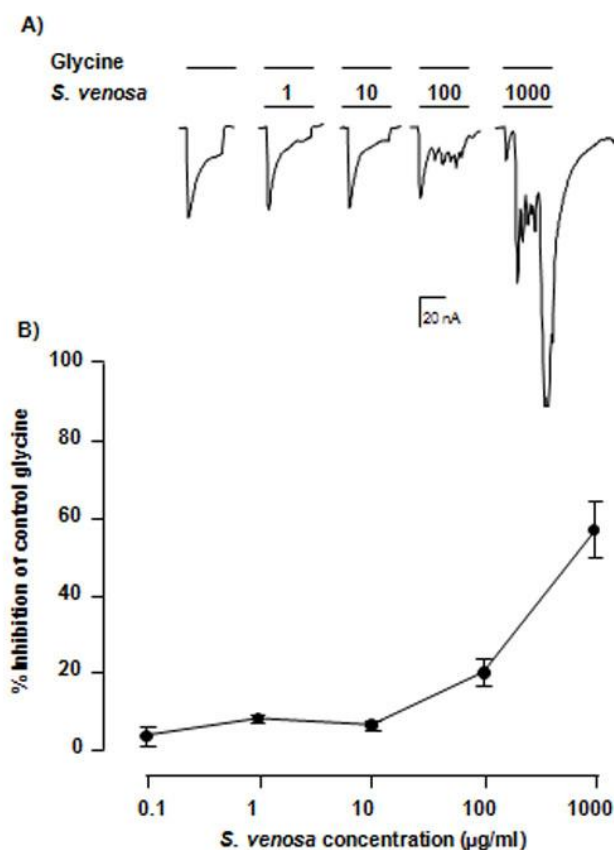


Figure 4 Inhibitory effects of *S. venosa* extract on glycine receptor. Oocytes injected with total rat brain RNAs were applied with 300 µM glycine in the absence (control) or presence of the extract at 0.1 - 1000 µg/ml. A) Examples of traces induced by co-application of the extract and glycine. B) Data are expressed as the mean \pm S.E.M. of percentages of control response from 2-8 oocytes).

Although our previous observation found that animals injected with water extract from *s. venosa* tubers showed a sedative effect, there is no evidence to directly support the involvement of THP and NMDA blocking in sedative action. Then, other constituent(s) rather than THP might involve NMDA blocking in sedative action of the extract. Alternatively, the sedative action of the extract might not involve NMDA receptors but other type of receptor, such as the 5-HT receptor.

AP-5 is a competitive antagonist of NMDA receptor (19). The inhibition of the *S. venosa* extract and that of AP-5 on the NMDA receptor was additive. This suggests that the binding site of the active

compound in the extract differ from that of AP-5.

In summary, our results revealed that the inhibition of the extract was more selective to NMDA receptor than glycine receptors but not to 5-HT receptor. It would be interesting to determine which compound(s) in the water extract from *s. venosa* tubers acted as antagonist of NMDA or 5-HT receptor.

Acknowledgements

This work was supported by a research grant from Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University. The author would like to thank Dr. Alfredo Villarroel for critical reading of the manuscript.

References

1. Likhitwitayawuid K, Dej-adisai S, Jongbunprasert V and Krungkrai J. Antimalarial from *Stephania venosa*, *Prismatomeris sessiliflora*, *Diospyros montana* and *Murraya siamensis*. *Planta Med* 1999;65:754-756.
2. Ingkaninan K, Yuyaem T, Thongnoi W. Anti-cholinesterase activity of *Stephania*. *Naresuan University Journal* 2001;9:35-40.
3. Moongkarndi P, Kosem N, Luanratana O, Jongsomboonkusol S, Pongpan N. Antiproliferative activity of Thai medicinal plant extracts on human breast adenocarcinoma cell line. *Fitoterapia* 2004;75:375-377.
4. Sueblinvong T, Plumchai T, Leewanich P, Limpanasithikul W. Cytotoxic effects of water extract from *Stephania venosa* tubers. *Thai Pharm Health Sci J* 2007; 2:203-208.
5. Potduang B, Kajsongkram T, Limsiriwong P, Giwanon R, Thisayakorn K, Meeploy M, Benmart, Y. Chief constituents and biological activities determination of *Stephania venosa*. *Acta Hort* 2005;(ISHS)677:57-64
http://www.actahort.org/books/677/677_7.htm
6. Banerj J, Chatterjee A, Patra A, Bos P, Das R., Das B, Shamma M, Tantiseurie B. Kamaline, an unusual aporphine alkaloid from *Stephania venosa*. *Phytochemistry*, 1994;36:1053-1056.
7. Tantisewie B, Amurrio S, Guinaudeau H, Shamma M. New bisbenzylisoquinolines from *Stephania pierri*. *Na Prod* 1989;52:846-851.
8. Charles B, Bruneton J, Pharadai K, Tantisewie B, Guinaudeau H, Shamma M. Some unusual proaporphine and aporphine alkaloids from *Stephania venosa*. *J Nat Prod* 1987;50:1113-1117.
9. Likhitwitayawuid K, Angerhofer CK, Chai H, Pezzuto JM, Cordell GA, Ruangrungrasi N. Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the tubers of *Stephania pierrei*. *J Nat Prod* 1993;56:1468-1478.
10. Kewpradub N, Itharat A, Tantikamkul A, Rugleng S, Inruspong P. Cytotoxic alkaloids from the tuber of *Stephania venosa*. *Songklanakarin J Sci Technol* 2001;23:225-234.
11. Danysz W, Parsons CG. The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatological and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease: preclinical evidence. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2003;18:S23-S32.
12. Leewanich P, Tohda M, Matsumoto K, Subhadhirasakul S, Takayama H, Aimi N, Watanabe H. Inhibitory effects of corymine-related compounds, indole alkaloids, on glycine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Jpn J Pharmacol* 1998;77:169-172.
13. Leewanich P, Tohda M, Matsumoto K, Takayama H, Sophasan S, Watanabe H. Corymine potentiates NMDA-induced currents in NR1a/NR2B cRNA injected *Xenopus* oocytes. *J Pharmacol Sci* 2005;98: 58-65.
14. Leewanich P and Prachayasitikul S. *In vitro* study of *Stephania venosa* extracts on anticancer activity. Proceedings of the Srinakharinwirot Academic Meeting; 2008 January 31 – February 1; Bangkok, Thailand. Bangkok: Sahamitree printing and publishing, 2008. p. 373-381.
15. Dhamanada, The story of JIN BU HUAN. *Herbal Gram* 1994;31:28-31.
16. Lin MT, Chueh FY, Hsieh MT, Chen CF. Antihypertensive effects of DL-tetrahydropalmatine: an active principle isolated from corydalis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1996;23:738-745.
17. Leung WC, Zheng H, Huen M, Law SL, Xue H. Anxiolytic-like action of orally administered dl-tetrahydropalmatine in elevated plus-maze. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;27:775-779
18. Chu H, Jin G, Friedman E, Zhen X. Recent development in studies of tetrahydroprotoberberines: mechanism in antinociception and drug addiction. *Cell Mol Neurobiol* 2008;28:491-9.
19. Abizaid A, Liu Z, Andrews Z, Shanabrough M, Borok E, Elsworth J, Roth R, Sleeman M, Picciotto M, Tschöp M, Gao X, Horvath T. Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *J Clin Invest* 2006;116:3229-39.

RESEARCH ARTICLE

Effect of Dabigatran Etexilate on Bleomycin-Induced Pulmonary Inflammation in Mice

Ninu Shrestha, Nongluck Sookvanichsilp

Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Abstract

Chronic inflammation causes pulmonary fibrosis. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis is a serious well-known adverse effect and bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis is generally used as a model of interstitial lung disease. Thrombin plays an important role in the initial phase of pulmonary inflammation. The present study aimed to investigate the effect of dabigatran, a direct thrombin inhibitor at a low antithrombotic dose on bleomycin-induced pathological changes of the lung. Moreover, dabigatran safety profile on the stomach was also studied. Male mice were divided into 3 groups, *i.e.* saline, bleomycin (50 mg/kg/day in two divided doses, intravenously on day 1) and dabigatran (pretreated with bleomycin at the dosage mentioned above and 10 mg/kg/day dabigatran etexilate orally on days 2-9). On day 10 after euthanatization and tissue dissecting, the lung was fixed in 10% formalin solution for pathological study while the stomach was freshly observed under the microscope. From the histological results, a trend of decreasing mean lung inflammation score in dabigatran group (8.85 ± 1.07) compared to bleomycin group (9.60 ± 2.16) was found although the difference was not significant ($p > 0.05$). Mean gastric ulcer index of the dabigatran group (2.57 ± 0.79) was significantly higher than the bleomycin (1.00 ± 0.63 , $p < 0.01$) and the saline (1.16 ± 0.41 , $p < 0.01$) groups. It can be concluded that dabigatran etexilate at a dose of 10 mg/kg/day for 8 days can only show a slight trend of beneficial effect against bleomycin-induced pathological changes of the lung while it can produce gastric ulcers. Therefore, dabigatran alone may not be useful for the prevention of bleomycin-induced lung adverse reactions.

Key Words *bleomycin, dabigatran etexilate, gastric ulcer, pulmonary inflammation*

ผลของ Dabigatran Etxilate ต่อภาวะปอดอักเสบจากยา Bleomycin ในหนูถีบจักร

นิรุ ชเรศทา¹, นงลักษณ์ สุขวานิชย์ศิลป์¹

¹ภาควิชาเภสัชวิทยา, คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล, ประเทศไทย

บทคัดย่อ:

การอักเสบเรื้อรังเป็นเหตุของการเกิดของ pulmonary fibrosis ซึ่ง bleomycin-induced pulmonary fibrosis เป็นอาการไม่พึงประสงค์ที่มีอันตรายรุนแรงและนำมาใช้เป็นโมเดลของ interstitial lung disease พบว่า thrombin มีบทบาทในช่วงแรกของการอักเสบ งานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายที่จะศึกษาผลของ dabigatran ซึ่งเป็น direct thrombin inhibitor ในขนาดที่ใช้ด้านการเกิดลิ่มเลือดต่อพยาธิสภาพที่ปอดอันเกิดจาก bleomycin พร้อมทั้งประเมินความปลอดภัยของ dabigatran ในขนาดที่ใช้ขึ้นต่อกระเพาะอาหารด้วย โดยทำการศึกษาในหนูถีบจักรที่แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม saline, กลุ่ม bleomycin (ให้ 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน แบ่งฉีดเข้าหลอดเลือดดำ 2 ครั้ง ในวันที่ 1) และกลุ่ม dabigatran (ให้ bleomycin ขนาดดังที่กล่าวข้างต้นในวันที่ 1 และป้อน dabigatran etexilate ขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ในวันที่ 2-9) ทำการุณยฆาตในวันที่ 10 และตัดเนื้อเยื่อปอดแช่ใน 10% formalin solution เพื่อศึกษาเนื้อเยื่อทางพยาธิวิทยา ส่วนกระเพาะอาหารนำมาตรวจหาแผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ ผลการศึกษาเนื้อเยื่อปอดเมื่อประเมินการอักเสบด้วย inflammation score พบว่าค่าเฉลี่ยมีแนวโน้มลดลงในกลุ่ม dabigatran (8.85 ± 1.07) เทียบกับกลุ่ม bleomycin (9.60 ± 2.16) แม้จะไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ส่วนการเกิดแผลที่กระเพาะอาหารเมื่อประเมินด้วย ulcer index พบว่าค่าเฉลี่ยในกลุ่ม dabigatran (2.57 ± 0.79) สูงกว่ากลุ่ม bleomycin (1.00 ± 0.63 , $p < 0.01$) และกลุ่ม saline (1.16 ± 0.41 , $p < 0.01$) สรุปได้ว่า dabigatran etexilate ที่ให้ทางปากแก่หนูถีบจักรในขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน นาน 8 วัน อาจให้ประโยชน์เพียงเล็กน้อยต่อพยาธิสภาพด้านการอักเสบที่ปอดอันเกิดจากยา bleomycin ในขณะที่ยาในขนาดดังกล่าวทำให้เกิดแผลที่กระเพาะอาหารได้ ดังนั้น dabigatran โดยลำพังไม่น่าจะมีประโยชน์ในการป้องกันอาการไม่พึงประสงค์ของ bleomycin ที่เกิดกับปอด

คำสำคัญ: bleomycin, dabigatran etexilate, gastric ulcer, pulmonary inflammation

Introduction

Bleomycin is a glycopeptide antineoplastic drug. It is used in different combination regimens for treatments of several cancers such as squamous cell carcinoma and lymphoma (Gallagher et al. 2009). Bleomycin-induced pulmonary fibrosis is a serious well-known adverse effect (Sikic et al. 1978). Pulmonary fibrosis, an irreversible chronic lung disease, can be caused by persistent exposure to different irritant stimuli that promote exaggerated inflammation which sustains the production of proinflammatory and fibrogenic mediators. Therefore by controlling the initial inflammatory phase, pulmonary fibrosis can probably be prevented (Wilson and Wynn 2009).

There are evidences that the thrombin plays an important role in pathogenesis of pulmonary inflammation and fibrosis. The level of thrombin is increased in bronchio-alveolar lavage fluid from patients with pulmonary fibrosis and in bleomycin model of pulmonary inflammation and fibrosis in animals. Immunohistochemical studies showed that expression of thrombin and protease activated receptor-1 (PAR-1) in animal lung tissues increased dramatically after instillation of bleomycin (Howell et al. 2002).

Dabigatran, an active drug of dabigatran etexilate, is a synthetic, competitive and reversible direct thrombin inhibitor (Bogatkevich et al. 2011). It inhibits free thrombin, fibrin bound thrombin and thrombin-induced platelet aggregation. It inhibits both the cellular and coagulation effects of thrombin. By inhibiting the cellular effect, it acts as an anti-inflammatory and antifibrotic drug and by inhibiting the hemostatic effect, it acts as an anticoagulant drug resulting in bleeding side effects (Ryn et al. 2010, Blommel and Blommel 2011, Harper et al. 2012). The present study aimed therefore to investigate the effect of dabigatran at a low antithrombotic dose in prevention of bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis. Moreover,

dabigatran safety profile on the stomach was also studied.

Methods

Animals

Male ICR mice (obtained from the National Laboratory Animal Center, Mahidol University at Salaya) at aged 10-13 weeks old, 40-45 g were used. They were maintained in the animal room under controlled conditions of 12 hours light and dark cycle and $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. The mice were fed with a standard diet and water *ad libitum*. The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee, Faculty of Pharmacy, Mahidol University. Mice were randomly divided into 3 groups with 6-7 mice per group, *i.e.* saline (intravenous sterile normal saline twice on day 1 and distilled water orally once daily on days 2-9, served as the control), bleomycin (50 mg/kg/day bleomycin sulfate, Bleolem[®]–Lemery, Mexico, intravenously in two divided doses, on day 1) and dabigatran (pretreated with bleomycin at the dosage mentioned above, followed by 10 mg/kg/day dabigatran etexilate, Paradaxa[®]–Boehringer Ingelheim, as a suspension in distilled water, given orally once daily on days 2-9). On the day 10, mice were euthanized by a 150 mg/kg dose of phenobarbital sodium (Sigma-Aldrich) and the lung and the stomach were collected.

Histological studies of lung inflammation

Right superior and inferior lobes of lung were fixed in 10% formalin (formaldehyde 35-40%–RCI Labscan) for 24 hours, followed by paraffin embedding and staining with hematoxylin and eosin for inflammation study. Sections were observed under a microscope (Olympus) with a digital compact camera (Olympus) at 400 \times magnifications. Semi-quantitative study was performed by giving scores for inflammation of lung (Ashcroft et al. 1988, Dubin and Kolls 2007, Oku et al. 2008) (Table 1).

Table 1 Scoring of histology of lung for inflammation and fibrosis (Ashcroft et al. 1988, Dubin and Kolls 2007, Oku et al. 2008).

Score	Subpleural infiltration	Peribronchial infiltration	Alveolar duct infiltration	Alveolar infiltration
0	none	none	none	none
1	<25%	<25%	<25%	<100 cells in 1-4 fields
2	25-50%	25-50%	25-50%	<100 cells in 5-8 fields
3	51-70%	51-70%	51-70%	>100 cells in 1-4 fields
4	71-90%	71-90%	71-90%	>100 cells in 5-8 fields
5	>90% or diffused	>90% or diffused	>90% or diffused	diffused

Gastric ulcer detection

Pylorus and cardia were ligated and instilled with 0.5% formalin, excised and then fixed in 0.5% of formalin for 10 minutes. The stomach was cut along the greater curvature, rinsed with normal saline and kept on a glass slide to observe the severity of gastric mucosal damage under a stereo microscope. The macroscopically apparent damage to the glandular and pyloric part was scored by following criteria which were modified from Sener-Muratoğlu et al. (2001): 0 = normal color without small red spot, 1 = 1-5 red spots of less than 1 mm in length, 2 = 6-25 red spots of less than 1 mm in length, 3 = 26-50 red spots or 1-5 small ulcers of 1-2 mm in length, 4 = 50-100 red spots or 5-10 small ulcers or 1 medium ulcer of 2.1-4 mm in length, and 5 = >100 red spots or >10 small ulcers or 1 large ulcer >4 mm in length. Sums of lesion scores for each mouse were expressed as the ulcer index.

Statistical analysis

Values were expressed as means \pm S.D. Mean differences were evaluated by one way ANOVA test. Kruskal-Wallis test was used for non-parametric data. A p-value of less than 0.05 was considered significant difference.

Results***Effect of dabigatran on bleomycin-induced pulmonary inflammation***

In bleomycin-treated mice, more subpleural, peribronchial, alveolar duct and alveolar infiltration (Figure 1) as well as higher ($p < 0.01$) inflammation scores (Table 2) could be observed when compared to saline-treated control mice. Treatment with dabigatran etexilate at a dose of 10 mg/kg/day for 8 days could not reduce the bleomycin-induced pulmonary inflammation ($p > 0.05$) as evaluated by inflammation scores.

Effect of dabigatran on bleomycin-induced gastric ulcer

Bleomycin-treated mice did not show any differences in stomach gross appearance (Figure 2) and in ulcer index scores (Table 2) when compared with saline-treated mice. Treatment with dabigatran etexilate at a dose of 10 mg/kg/day for 8 days produced more number of red spots (less than 1 mm in length) and small ulcers (1-2 mm length) (Figure 2) and higher ulcer index scores ($p < 0.01$) (Table 2) when compared to either treatment with saline or bleomycin alone.

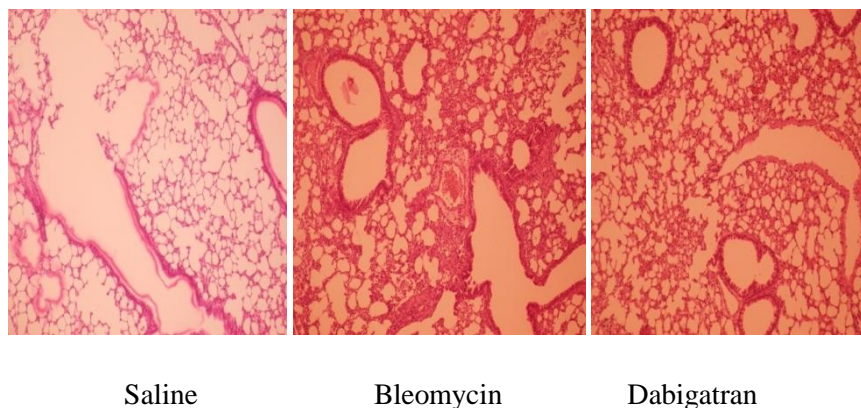


Figure 1 Histological appearance of transverse sections of the murine lung after staining with hematoxylin and eosin, $\times 10$ magnification. Saline = the control, bleomycin = mice treated with 50 mg/kg/day bleomycin sulfate, intravenously in two divided doses on day 1, and dabigatran = mice pretreated with bleomycin at the dosage mentioned above, followed by 10 mg/kg/day dabigatran etexilate, orally once daily on days 2-9.

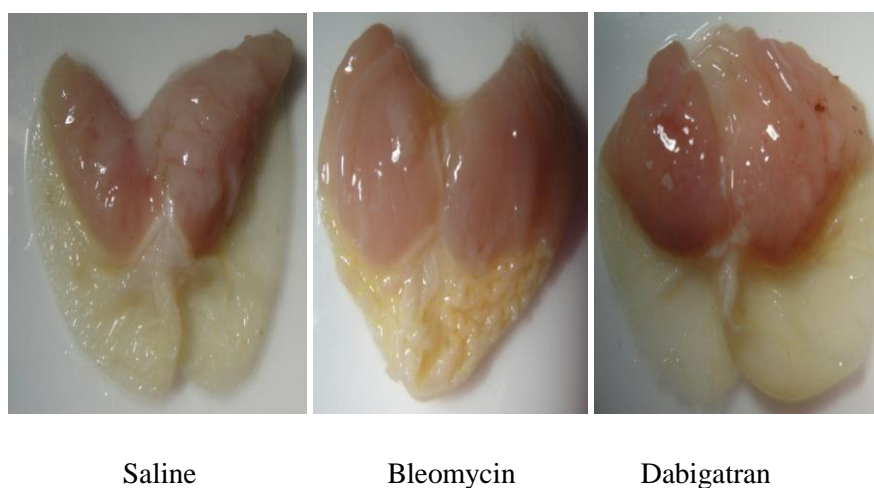


Figure 2 Gross appearance of the stomach. Saline = the control, bleomycin = mice treated with 50 mg/kg/day bleomycin sulfate, intravenously in two divided doses on day 1, and dabigatran = mice pretreated with bleomycin at the dosage mentioned above, followed by 10 mg/kg/day dabigatran etexilate, orally once daily on days 2-9.

Table 2 Inflammation scores of mouse lungs and ulcer index scores of mouse stomachs treated with saline, bleomycin and dabigatran

Treatments	Inflammation scores	Ulcer index scores
Saline	6.00 ± 1.095	1.16 ± 0.41
Bleomycin	9.60 ± 2.16*	1.00 ± 0.63
Dabigatran	8.85 ± 1.07*	2.57 ± 0.79**

Data are expressed as means ± S.D.

Compared with saline group: *p<0.01.

Compared with bleomycin group: †p<0.01.

Saline = the control, bleomycin = mice treated with 50 mg/kg/day bleomycin sulfate, intravenously in two divided doses on day 1, and dabigatran = mice pretreated with bleomycin at the dosage mentioned above, followed by 10 mg/kg/day dabigatran etexilate, orally once daily on days 2-9.

Discussion

To induce pulmonary inflammation, the bleomycin dosage regimen of 10 mg/kg/day intravenously for five consecutive days (Oku et al. 2008) was modified to 50 mg/kg/day in two divided doses (6 hours apart) intravenously on day 1 to reduce sclerodermatous changes (Sikic et al. 1978) and local infections.

Increasing evidences have shown the involvement of coagulation cascade in various fibrotic diseases including pulmonary inflammation and fibrosis. Activation of coagulation forms thrombin, which is a major mediator acting in the initial phase for inflammation and fibrosis. There are evidences that the levels of thrombin were increased in bronchio-alveolar fluid from patients with pulmonary fibrosis and in bleomycin model of pulmonary inflammation and fibrosis in animals. So, thrombin may play a role as an important mediator in pathogenesis of pulmonary inflammation and fibrosis (Howell et al. 2002, Chambers 2008). Recent study by Bogatkevich et al. (2011) showed that dabigatran etexilate, a direct thrombin inhibitor, given for 2 weeks as supplemented chow had anti-inflammatory and antifibrotic effects on bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice. However, the exact dose of dabigatran etexilate was not calculated and they did not study the effect of the drug dose on gastrointestinal bleeding. Gastrointestinal hemorrhage is occurred at high frequency under dabigatran etexilate

treatment (Ryn et al. 2010, Blommel and Blommel 2011), particularly in higher dosage (Garnock-Jones 2011) or in elderly patients with renal impairment (Wychowski and Kouides 2012). In the present study, a dose of dabigatran etexilate at 10 mg/kg instead of 20 mg/kg was chosen for mice to lower the bleeding risk. With this dose, it can only exhibit a slight trend of decreasing pulmonary inflammation while the gastric damage could still occur. Therefore, dabigatran alone may not be useful for the prevention of bleomycin-induced lung adverse reactions.

Conclusion

Dabigatran etexilate at an antithrombotic dose of 10 mg/kg could exhibit only a slight trend of decreasing pulmonary inflammation induced by bleomycin in mice while it can produce gastric damage. To increase the dose of dabigatran may cause more risk of serious gastric hemorrhage/ulcer. Therefore, dabigatran alone may not be useful for the prevention of bleomycin-induced lung adverse reactions or other interstitial lung diseases.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Thailand International Development Co-operation Agency (TICA) for financial support.

References

- Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J Clin Pathol.* 1988; 41(4):467-70.
- Blommel ML, Blommel AL. Dabigatran etexilate: A novel oral direct thrombin inhibitor. *Am J Health Syst Pharm.* 2011; 68(16):1506-19.
- Bogatkevich GS, Ludwicka-Bradley A, Nietert PJ, Akter T, van Ryn J, Silver RM. Antiinflammatory and antifibrotic effects of the oral direct thrombin inhibitor dabigatran etexilate in a murine model of interstitial lung disease. *Arthritis Rheum.* 2011; 63(5):1416-25.
- Chambers RC. Abnormal wound healing responses in pulmonary fibrosis: focus on coagulation signalling. *Eur Respir Rev.* 2008; 17(109):130-7.
- Dubin PJ, Kolls JK. IL-23 mediates inflammatory responses to mucoid *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007; 292(2):519-28.
- Gallagher CJ, Lister TA, Johnson MJ, Davies A. Malignant disease. In: Kumar P, Clark M, editors, *Kumar & Clark's Clinical Medicine*. 7th ed. New York: Elsevier, 2009:449-97.
- Garnock-Jones KP. Dabigatran etexilate: a review of its use in the prevention of stroke and systemic embolism in patients with atrial fibrillation. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2011; 11(1):57-72.
- Harper P, Young L, Merriman E. Bleeding risk with dabigatran in the frail elderly. *N Engl J Med.* 2012; 366(9):864-6.
- Howell DC, Laurent GJ, Chambers RC. Role of thrombin and its major cellular receptor, protease-activated receptor-1, in pulmonary fibrosis. *Biochem Soc Trans.* 2002; 30(2):211-6.
- Oku H, Shimizu T, Kawabata T, Nagira M, Hikita I, Ueyama A, et al. Antifibrotic action of pirfenidone and prednisolone: Different effects on pulmonary cytokines and growth factors in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis. *Eur J Pharmacol.* 2008; 590(1-3):400-8.
- Ryn JV, Stangier J, Haertter S, Liesenfeld KH, Wienen W, Feuring M, et al. Dabigatran etexilate—a novel, reversible, oral direct thrombin inhibitor: interpretation of coagulation assays and reversal of anticoagulant activity. *Thromb Haemost.* 2010; 103(6):1116-27.
- Sener-Muratoğlu G, Paskaloğlu K, Arbak S, Hürdağ C, Ayanoğlu-Dülger G. Protective effect of famotidine, omeprazole, and melatonin against acetylsalicylic acid-induced gastric damage in rats. *Dig Dis Sci.* 2001; 46(2):318-30.
- Sikic BI, Young DM, Mimnaugh EG, Gram TE. Quantification of bleomycin pulmonary toxicity in mice by changes in lung hydroxyproline content and morphometric histopathology. *Cancer Res.* 1978; 38(3):787-92.
- Wilson MS, Wynn TA. Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation. *Mucosal Immunol.* 2009; 2(2):103-21.
- Wychowski MK, Kouides PA. Dabigatran-induced gastrointestinal bleeding in an elderly patient with moderate renal impairment. *Ann Pharmacother.* 2012; 46(4):e10.

RESEARCH ARTICLE

Antibacterial Activity of Extract and an Isolated Steroidal Alkaloid from The Seeds of *Combretum quadrangulare* Kurz. (Combretaceae)

Khesorn Nantachit¹, Patoomratana Tuchinda², Banyong Khantawa³, Somjing Roongjang¹

¹Department of Pharmaceutical Science, Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University 50200, Thailand

²Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Paya Thai 10400, Thailand

³Central Laboratory, Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

Abstract

Objective; To isolate new compound from the seeds of *Combretum quadrangulare* Kurz. that shows antibacterial activity. Method; The seeds were macerated with 95% ethanol. Purified by column chromatography using Avicel as the adsorbent and using 50% methanol in water as the eluting solvent and further purified by Avicel preparative layer chromatogram 2 times by using 80% methanol in water as developing solvent. MIC of pure compound was done by two fold dilution method and Muller Hinton agar was chosen as the media. Conclusion; It was found that the new compound combretin was steroidal alkaloid and showed antibacterial activity against *E. coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 better than *S. aureus* ATCC 25923.

Key Words *Combretin, steroidal alkaloid, antibacterial activity*

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบและของสเตรียรอยด์ดีลแอลคาลอยด์จากเมล็ดสะแกนา (วงศ์คอมเบรทาทซี)

เกษร นันทจิต¹, ปทุมรัตน์ ตูจินดา², บรรยง คั่นธวะ³, สมจริง รุ่งแจ้ง⁴

¹ภาควิชาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม, คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

²ภาควิชาเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล, พญาไท กรุงเทพฯ 10400

³ศูนย์ปฏิบัติการกลาง , โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ , คณะแพทยศาสตร์ , มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อแยกสารใหม่ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากเมล็ดสะแกนา วิธีทดลอง หมักเมล็ดสะแกนาด้วย 95% เอทานอล ทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้อวิเซลเป็นตัวดูดซับและใช้ 50% เมทานอลในน้ำเป็นน้ำยาแยก และทำให้บริสุทธิ์ ต่อด้วยอวิเซล โครมาโตกราฟีแบบบางแบบหนา 2 ครั้ง โดยใช้ 80% เมทานอลในน้ำเป็นน้ำยาแยก หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารบริสุทธิ์โดยวิธีเจือจางเป็น 2 เท่า และใช้มูลเลอร์ฮินตันอะการ์เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ บทสรุป พบสารใหม่คอมเบรทินซึ่งเป็นสเตรียรอยด์ดีลแอลคาลอยด์ มีฤทธิ์ต้าน E. coli ATCC 25922 และ P. aeruginosa ATCC 27853 ได้ดีกว่า S. aureus ATCC 25923

คำสำคัญ: คอมเบรทิน, สเตรียรอยด์ดีลแอลคาลอยด์, ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

Introduction

Combretum quadrangulare Kurz. is found throughout Thailand especially in open wet places. Therapeutic uses of this plant in the country were anthelmintics (the parts used were seeds, roots and leaves) and curing venereal disease (the parts used were roots and wood) (Sachium P.1979).

Aaemorn S et al. 1980 studied the chemical constituents of this plant. They found that alcoholic and other extracts from the roots and seeds could kill earthworms. They also found that crude extracts from seeds showed antibacterial activity. The flavonoid compound found in this plant is combretol. They further found new compounds from roots and seeds which were 3 compounds of pentacyclic triterpene carboxylic acid, viz, 3 β , 6 β , 18 β -trihydroxy-urs-12-en-30-ic acid, 3,6-diketo-olean-12-en-28-oic acid and olean-12-en-28-oic acid. They also found β -sitosterol and β -sitosteryl, 2 compounds of long-chain alcohol and amino compound.

Ian RC et al. 1985 found three flavonoids from the flowers of this plant which were

- 1) 5-hydroxy-3,7-dimethoxy-2-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one (combretol)
- 2) 5-hydroxy-2-(3'-hydroxy-4'-methoxy-phenyl)-3,7-dimethoxy-4H-1-benzopyran-4-one (ayanin) and
- 3) polymorphic forms of 5-hydroxy-2-(4'-hydroxy-3',5'-dimethoxyphenyl)-3,7-dimethoxy-4H-1-benzopyran-4-one.

Perapol Y et al. 1988 studied the anthelmintic activity of seeds of *C. quadrangulare* Kurz for roundworms in young buffalo. They found that after young buffalo ate the seeds once, the number of eggs of *Neoscaris vitulorum* in feces was reduced and completely disappeared within 1-3 weeks. They also studied the toxicity of the seeds of this plant and found that seed extracts were not toxic to albino rat and mice. The dose that they studied did not kill the rat and no side effects was found within 48 hours after giving the extract.

Markus G et al. 1988 found 2 flavonoids, viz., kumatakenin and isokaemferide and also found 3 types of cycloartane triterpenes from the leaves of this plant which were 1 α , 3 β -dihydroxy-cycloart-24-ene-30-carboxylic acid, 1 α ,3 β -dihydroxycycloart-24-ene-30-carboxylic acid methyl ester and 1 α , 3 β -25-trihydroxy-cycloart-21-al-23-ene-30-carboxylic acid methyl ester.

Arjan HB et al. 2000, Ketut A et al. 2001(a) and Ketut A et al. 2001 (b) found that methanol, methanol-water (1:1) and water extracts of the seeds of *C. quadrangulare* Kurz. included triterpene glycosides which showed good hepatoprotective activity.

Arjan HB et al. 2000 found new gallic acid from methanolic extracts of the seeds of this plant which also showed strong hepatoprotective activity.

From our preliminary work, Khesorn N et al. 2006 we found that crude methanolic extracts from the seeds of *C. quadrangulare* Kurz. showed MIC (Minimum inhibitory concentration) against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 at 312 mcg/ml and also showed antibacterial activity against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Klebsiella pneumoniae* ESBL non-producing strain. The objective of this investigation is to isolate new compound that showed antibacterial activity.

Materials and Methods

Sample preparations

Combretum quadrangulare Kurz specimens were collected from around Chiang Mai Province in 2007. Mature seeds were collected (Nantachit, voucher No.2) and kept in CMU's Pharmacy Herbarium. The seeds were dried at 40 °C and powdered. One kilogram of powder were macerated with 3 litres of 95% ethanol. Each replicate was macerated for 1 day, filtered and repeated 2 times. The filtrate was evaporated in a vacuum. The residue (crude extract) was brownish black. The percent yield of material collected was 14.38.

Equipment

2.1 Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectra were recorded by Bruker FT NMR 500 MHz

2.2 Mass spectrum was recorded by micro OTOF

Screening of 95% ethanolic crude extract of *C. quadrangulare* from 2007 and 2010 by agar dilution method. (John AW 1981 and Edwin HL 1988)

Crude ethanolic extracts of 2007 and 2010 (using sample that was collected in 2007 but kept as dried seeds for 4 years in order to confirm the result from 2007 because anti-inflammation action is the objective of the further test in the future.) were screened for antibacterial activity against gram ⁺ and gram ⁻ of 3 types of ATCC strains organisms. (Table 1) Water was chosen to dissolve 95% ethanolic crude extract and then two-fold dilution was done by using water as the solvent and mixed with Muller-Hilton agar.

Purification of 95% crude ethanolic extract in 2010

95% Crude ethanolic extract 1.5 g. was purified by column chromatography. Avicel was used as the adsorbent and the column was eluted with 50% methanol in water. A total of 3 fractions 10 ml each, was collected. Each fraction was found to produce the same spot in thin layer chromatogram. Each fraction was vacuumed by vacuum pump in order to remove methanol in a cool condition because the sample fractions might be heat-labile. The remaining water residue was removed by freeze-drying and the residues combined and further purified with preparative thin layer chromatogram (PTLC) twice. Avicel was used as an adsorbent with 1 mm. thickness and developed with 80% methanol in water. The residue from the first PTLC was separated and purified further with the second PTLC developed in the same solvent 80% methanol in water. The pure compound from second PTLC was tested for antibacterial activity against 3 pathogenic bacteria by agar diffusion method (tested for clear zone) [Table 1] and agar dilution method [tested for MIC [Table 2]. Dimethyl sulfoxide, PEG 200,

methanol, ethanol, ethyl acetate, dichloromethane and hexane were chosen to test for their antibacterial activity by agar diffusion method. The solvents that showed no antibacterial activity were ethyl acetate and hexane.

Determining MIC of the pure compound

The method was done the same as screening method in number 3 but ethyl acetate was used as the solvent because it was miscible with media.

Results and discussion

Antibacterial activity

Three pathogenic bacteria were chosen to test by agar diffusion method (tested for clear zone). Ethyl acetate was chosen as the solvent because it was miscible with media and it also dissolved the pure compound.

From our preliminary work Khesorn N et al 2006, John AW 1981 and Edwin HI. 1988 crude methanolic extract of *C. quadrangulare* showed antibacterial activity against gram ⁺ better than gram ⁻ and also effective against *Acenobacter baumannii* which is the resistant strain in the hospital showed MIC at 937.50 mcg/ml. (unpublished data). When the seeds were kept dry for 4 years the isolated pure compound showed its activity in the opposite way it showed activity against gram ⁺ better than gram ⁻ which was the wonderful thing in the world. (Table 1)

Positive control by agar diffusion method of pure compound (Table 1) was not done because gram ⁺ and gram ⁻ antibiotics should be used as reference standard. One petri dish diameter 8.0 cm. was used for this test. Normally reference standard antibiotics showed large clear zone but the area of one petri dish was not enough so two petri dishes should be used. The amount of pure compound was too small to test in two petri dishes so positive control in agar diffusion method was not done.

True MIC of pure compound could not be determined because the solvent effect of ethyl acetate large amount showed antibacterial action but the results from Table 1 and 2 showed the activity in the

Table 1 MIC of crude extracts and pure compound

No.	Organisms	I (mcg/ml)	II (mcg/ml)	Total (mcg/ml)
MIC of 95% crude ethanolic extract collect in 2007				
1	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	≤ 468.75 (≤ 50.0%)	≤ 468.75 (≤ 50.0%)	≤ 937.5
2	<i>E. coli</i> ATCC 25922	15,000 (50.0%)	15,000 (50.0%)	30,000
3	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1,875.00 (50.0%)	1,875.00 (50.0%)	3,750
MIC of 95% crude ethanolic extract in 2010 (using raw material that collected in 2007 but kept dried seeds for 4 years)				
1	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1,250 (50.0%)	1,250 (50.0%)	2,500
2	<i>E. coli</i> ATCC 25922	5,000 (50.0%)	5,000 (50.0%)	10,000
3	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1,250 (66.7%)	625 (33.3%)	1,875
Screening of pure compound (isolated from crude extract 2010) by agar diffusion method				
1	Control (Ethyl acetate)	No zone	-	-
2	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	No zone	-	-
3	<i>E. coli</i> ATCC 25922	12 (50.0%)	12 (50.0%)	24
4	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	11 (47.8%)	12 (52.2%)	23

Table 2 MIC of pure compound (isolated from crude extract 2010) by agar dilution method using ethyl acetate as the solvent

No.	Concentration (mcg/ml)	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
1	82	Growth	No growth	No growth
2	164	Growth	No growth	No growth
3	328	Growth	No growth	No growth
4	565	Growth	No growth	No growth
5	1,312	Growth	No growth*	No growth
6	2,625	Growth	Growth	No Growth
7	5,250	Growth	Growth	No Growth*
8	10,500	Growth	Growth	Growth
9	21,000	Growth	Growth	Growth
10	Control (Ethyl acetate)	No growth	No growth	No growth

same direction. From Table 1 pure compound showed no effect against *S. aureus* ATCC strain 25923 and the activity against *E. coli* ATCC strain 25922 (average inhibition zone was 12 m.m.) which was better than the effect against *P. aeruginosa* ATCC strain 27853 (average inhibition zone was 11.5 m.m.) the same as Table 2 pure compound showed no effect against *S. aureus* ATCC strain 25923 and the effect against *E. coli* ATCC strain 25922 (MIC was about 2625 mcg/ml) which was better than activity against *P. aeruginosa* ATCC 27853 strain (MIC was about 10,500 mcg/ml) so the results from Table 2 could be accepted.

From MIC testing method of pure compound (Table 2) ethyl acetate showed antibacterial action (control test showed no growth of bacteria) because the solvent used was larger amount than that used in agar diffusion method. MIC of *E. coli* ATCC 25922 was at 1,312 mcg/ml and MIC of *P. aeruginosa* ATCC 27853 was at 5,250 mcg/ml. From agar diffusion method pure compound showed antibacterial action against *E. coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 which ethyl acetate showed no

antibacterial action (Table 1) therefore MIC of *E. coli* ATCC 25922 and MIC of *P. aeruginosa* ATCC 27853 should be higher than 1,312 and 5,250 mcg/ml (Table 2).

Spectroscopic data

1 ¹H NMR Spectra

The structure of isolated pure compound from the seed of *C. quadrangulare* Kurz. based on ¹H NMR was detailed as followed.

First part, 33 protons (Triterpenoid skeleton), $\delta = 4.9$ ppm, 3 protons of aziridine ring, 2 protons (2'' position), $\delta = 4.5$ ppm and 1 proton (1'' position), $\delta = 5.3$ ppm and 1 proton of amino group in aziridine ring (3'' position), $\delta = 7.0$ ppm, 6 protons of 2 methyl groups of isopropyl position (28 & 29 position), $\delta = 0.8$ ppm, 4 protons of ethylenic groups (25 & 26 position), $\delta = 1.6$ ppm, 3 protons of 1 methyl group (24 position), $\delta = 2.0$ ppm and 2 protons of 2 methine groups (23 & 27 position), $\delta = 2.5$ ppm and $\delta = 2.8$ ppm.

Second part, 30 protons (Triterpenoid skeleton), $\delta = 1.3$ ppm, 1 proton of methine group in cyclohexene ring (4' position), $\delta = 2.3$ ppm.

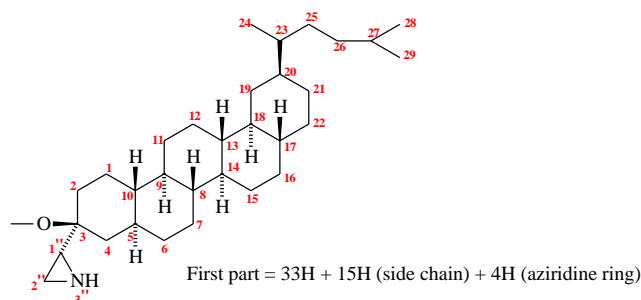


Figure 1 Structure of the first part of pure compound

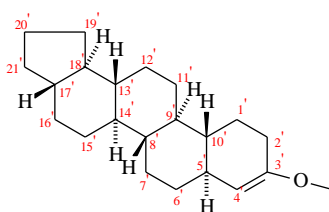


Figure 2 Structure of the second part of pure compound

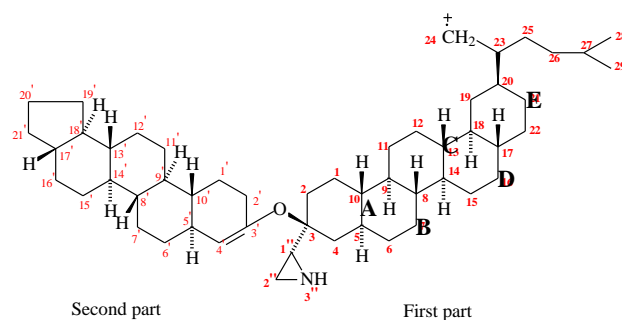


Figure 3 Molecular ion of pure compound

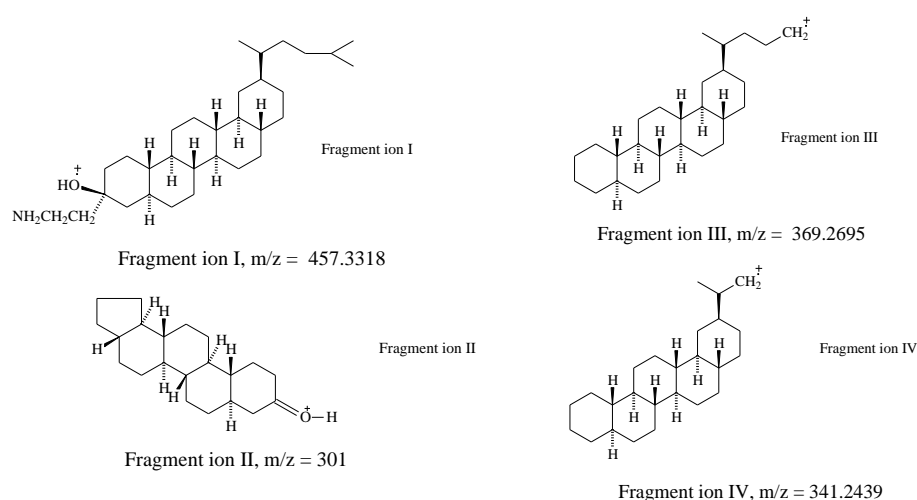


Figure 4 Fragment ions I, II, III and IV

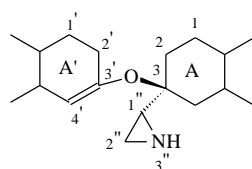


Figure 5 Molecular ion, $m/z = 737.4804$ in micro OTOF corresponding to the molecular formula $C_{52}H_{83}ON$. Fragment ion I $m/z = 457.3318$, Fragment ion II, $m/z = 301$, Fragment ion III, $m/z = 369.2695$ and Fragment ion IV, $m/z = 341.2439$.

2 Mass Spectra

Stereochemistry of ether group was at β -position and aziridine was at α -position [Figure 5] which were the results of substituted group at 3',4' position of ring A' (like hormone androgen e.g. 4-Dihydrotestosterone usually was double bond and hydroxyl group). Aziridine ring substituted at 3-position was low stability so the steric hindered at 3-position was easily occurred so fragment ion I was happened (Figure 4).

Stereochemistry of first part of the pure compound, A-B, B-C, C-D and D-E ring junction should be all trans-configuration in order to form more stability because first and second part of the pure compound were large molecules which steric hindrance should be occurred easily (Figure 3). From the introduction penta-cyclic triterpene carboxylic acid, β -sitosterol and β -sitosteryl were isolated. This is the information which confirms that pure compound is steroidal compound.

Conclusion

From ^1H NMR spectra and Mass spectrum the pure compound was steroidal alkaloid named combretin. Combretin showed antibacterial activity against *E. coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 better than *S. aureus* ATCC 25923 after dried seeds were kept for 4 years.

To solve the problem of solvent effect, control plate should be done first and solvent used should be 50% ethyl acetate in water because the amount of ethyl acetate was reduced and the water could also sparingly dissolved the pure compound.

References

- Aaemorn S, Sukit W, Chanpen V. Chemical constituents of *C. quadrangulare* Kurz. Symposium of herbs and spices of Asia. 4th meeting. 1980.
- Arjan HB, Tezuka YI, Ketut A, Xiang Q, Hase K, Tran KQ, et al. Hepatoprotective constituents of the seeds of *Combretum quadrangulare* Kurz. Biol.Pharm.Bull., 2000;23(4):456-460.
- Arjan HB, Yasuhiro T, Kim QT, Ken T, Ikus S, Shigetoshi K. Methyl Quadrangulare A-D and related triterpenes from *Combretum quadrangulare*. Chem.Pha .Bull. (Tokyo). 2000;48(4):496-504.
- Edwin HI. Manual of Clinical Microbiology, 3th ed., Washington D.C.: American Society for Microbiology; 1988.
- Ian RC, Sydney RH, Surachai N, Somkiat T, Allan HW. The flavonoid of *Combretin quadrangulare*. Crystal Structure of the polymorphic forms of 5-hydroxy-2-(4'-hydroxy-3',5'-dimethoxy-phenyl)-3,7-dimethoxy-4H-1-benzopyran-4-one. Aust. J. Chem. 1985; 38:117-118.
- John AW. Laboratory procedure in Clinical microbiology. New York : Springer-Verlag; 1981.
- In this investigation which was done in small laboratory and there was no advance instrument the stereochemistry of pure compound could be elucidated from the knowledge of the investigator.
- Acknowledgement**
- The author was grateful to Chiang Mai University and Professor Dr.Stang Mongkonsuk who was the first investigator of the work on *C. quadrangulare* Kurz. in Thailand.
- Ketut A, Yasuhiro T, Suresh A, Arjan HB, Kim QT, Shigetoshi I. 1-0-Galloyl-6-0-Galloyl-(4-hydroxy-3,5-dimethoxy) benzoyl- β -D-glucose, A New Hepatoprotective Constituent from *Combretum quadrangulare*. Planta Medica. 2001 (a); 67(4):370-371.
- Ketut A, Yasuhiro T, Arjan HB, Kim QT, Shigestashi K. Three new triterpenes from the seeds of *Combretum quadrangulare* and their hepatoprotective activity. J.Nat.Prod. 2001(b);64(3):360-363.
- Khesorn N, Dumrong S, Banyong K. Antibacterial activity of the Seeds of *Combretum quadrangulare* Kurz. (Combretaceae). CMU. Journal. 2006;5(3):333-339
- Markus G, Ernst P, Ellmerer M, Hermam S. Cycloartane triterpenes from *Combretum quadrangulare*. Phytocemistry,1988; 49(3):835-838.
- Perapol Y, Somporn S, Prame Y. Anthelmintic activity of the seeds of *C.quadrangulare*. Veterinarian Symposium. 15th meeting. 1988.
- Sachium P. Mai Tate Muang Thai. Bangkok; 1979.

RESEARCH ARTICLE

Genetic Polymorphisms of *Plasmodium vivax* dihydrofolate reductase (*pvdhfr*) and Dihydropteroate synthase (*pvdhps*) in Malaria Endemic Areas of Thailand**Pimwan Thongdee¹, Vithoon Viyanant¹, Jiraporn Kuesap¹, Kanchana Rungsihirunrat², Pongsri Tippawangkosol³, Kesara Na-Bangchang¹**¹ Thailand Center of Excellence on Drug Discovery and Development (TCEDD), Thammasat University, Pathumtani, Thailand² Malaria Research Program, College of Public Health Sciences, Chulalongkorn University, Thailand³ Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chiangmai University, Chiangmai, Thailand**Abstract**

The prevalence and patterns of mutations of *pvdhfr* and *pvdhps* were investigated in a total of 41 blood samples collected from patients with *P. vivax* infection who attended the malaria clinics in Mae-hongson (n= 30), Ranong (n= 11) during 2009-2010. SNP-haplotypes at positions 13, 33, 57, 58, 61, 117 and 173 of the *pvdhfr* and positions 383 and 553 of the *pvdhps* were examined by nested PCR-RFLP. All isolates carried mutations at codons 58R, 117N and 117T. Thirteen isolates carried mutations at codons 61M. Mutation at codon 57 consisted of two types, 57I and 57L. For *pvdhps*, the most prevalent alleles were the mutant 383G (63.4%) and the wild-type A553 (100%) alleles. For *pvdhfr*, the most common alleles were triple mutant 57L/58R/117T (34.2%), 57I/58R/117T (29.3%), 58R/61M/117N (7.3%), and 57F/L/58R/117T (2.4%). Two isolates carried double mutant 58R/117N. Ten isolates carried quadruple mutant: 57I/58R/61M/117T (19.6%), 57L/58R/61M/117T (2.4%) and 57F/L/58R/61M/117N/T (2.4%). The most prevalent combination allele was triple *pvdhfr* mutant allele 57I/58R/117T combined with single *pvdhps* mutant allele 383G. Data suggest that the distribution and patterns of polymorphisms of *pvdhfr* and *pvdhps* varies depending on *P. vivax* endemic areas.

Key Words *Plasmodium vivax*, *Plasmodium vivax* dihydrofolate reductase (*pvdhfr*), *Plasmodium vivax* dihydropteroate synthase (*pvdhps*), PCR-RFLP, sulfadoxine-pyrimethamine (SP)

ความหลากหลายของยีนดื้อยาเชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ ไดไฮโดรโฟเลท- รีดักเทส (pvdhfr) และไดไฮดรอบเทอโรเอท- ซินเทส (pvdhps) ในพื้นที่ที่มีการระบาดของเชื้อมาลาเรีย

พิมพ์วรรณ ทองดี¹, วิฑูรย์ ไวยนันท์¹, จิราภรณ์ คัญทรัพย์¹, กาญจนา รังษิทธิรัตน², ผ่องศรี ทิพวงโกศล³, เกศรา ณ บางช้าง¹

¹ศูนย์ความเป็นเลิศทางการวิจัย ค้นคว้า และพัฒนายาแห่งประเทศไทย มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต) ปทุมธานี ประเทศไทย

²วิทยาลัยสาธารณสุขศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย

³ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ ประเทศไทย

บทคัดย่อ

ความชุกและรูปแบบของยีนดื้อยาเชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ ไดไฮโดรโฟเลท- รีดักเทส(pvdhfr) และไดไฮดรอบเทอโรเอท-ซินเทส(pvdhps) ทำการศึกษาจากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย โดยเก็บจากผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาในมาลาเรียคลินิก จำนวนทั้งหมด 41 ตัวอย่าง แบ่ง เป็นที่จังหวัดแม่ฮ่องสอน จำนวน 30 ตัวอย่าง และระนอง จำนวน 11 ตัวอย่าง ในระหว่างปี 2552-2553 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของชุดความแปรผันของยีน (SNP-haplotypes) ไดไฮโดรโฟเลท-รีดักเทส(pvdhfr) ที่ตำแหน่ง 13, 33, 57, 58, 61, 117 และ 173 และไดไฮดรอบเทอโรเอท-ซินเทส(pvdhps) ที่ตำแหน่ง 383 และ553 โดยวิธี nested PCR-RFLP จากการศึกษาพบว่าตัวอย่างทั้งหมดมีการดื้อยาที่ตำแหน่ง 58R, 117N และ 117T และพบว่ามีจำนวน 30 ตัวอย่าง ที่มีการดื้อยาที่ตำแหน่ง 61M โดยการดื้อยาที่ตำแหน่ง 57 แบ่งเป็น 2 แบบ คือ 57I และ 57L สำหรับยีนไดไฮดรอบเทอโรเอท-ซินเทส(pvdhps) พบว่าความชุกของ allele รูปแบบที่มีการดื้อยามากที่สุดคือ 383G (63.4%) และรูปแบบของยีนปกติคือ A553 (100%) สำหรับยีนไดไฮโดรโฟเลท-รีดักเทส(pvdhfr) ความชุกของ allele รูปแบบที่พบมากที่สุด คือการดื้อยาแบบ 3 ตำแหน่ง(triple mutant) : 57L/58R/117T (34.2%), 57I/58R/117T (29.3%), 58R/61M/117N (7.3%), และ57F/L/58R/117T (2.4%) พบว่ามีจำนวน 2 ตัวอย่าง ที่มีการดื้อยาแบบ 2 ตำแหน่ง (double mutant) : 58R/117N และพบว่ามีจำนวน 10 ตัวอย่าง ที่มีการดื้อยาแบบ 4 ตำแหน่ง (quadruple mutant) : 57I/58R/61M/117T (19.6%), 57L/58R/61M/117T (2.4%) และ 57F/L/58R/61M/117N/T (2.4%) สำหรับความชุกของ allele รูปแบบผสมผสานเป็นการดื้อยาแบบ 3 ตำแหน่ง(triple mutant) ของยีนไดไฮโดรโฟเลท-รีดักเทส(pvdhfr) คือ 57I/58R/117T และการดื้อยาแบบ 1 ตำแหน่ง(single mutant) ของยีนไดไฮดรอบเทอโรเอท-ซินเทส(pvdhps) คือ 383G จากการศึกษาพบว่าการกระจายตัวและรูปแบบความหลากหลายของยีนดื้อยาเชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ ไดไฮโดรโฟเลท- รีดักเทส (pvdhfr) และไดไฮดรอบเทอโรเอท-ซินเทส(pvdhps) แปรผันตามพื้นที่ที่มีการระบาดของเชื้อมาลาเรีย

คำสำคัญ: เชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์, ยีนดื้อยาเชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ ไดไฮโดรโฟเลท-รีดักเทส(pvdhfr) , ยีนดื้อยาเชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ ไดไฮดรอบเทอโรเอท- ซินเทส(pvdhps), เทคนิคในการเพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอ ในหลอดทดลอง- เทคนิคที่ใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบ นำมาทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่สนใจที่ถูกแยกเป็นเส้นเดี่ยว และถูกตัดย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ , ยาซัลฟาไดออกซิน-ไพริเมตามีน

Introduction

Chemotherapy remains a key factor in the fight against malaria, but the emergence and spread of resistance of the parasite to an increasing number of antimalarial drugs is one of the greatest challenges for malaria control. (Lu et al. 2010) The antimalarial combination sulfadoxine-pyrimethamine (SP, FansidarTM) was introduced to Thailand in 1972 as the first-line treatment of chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* malaria (Na-Bangchang and Congpuong 2007). Rapidly after its introduction for clinical use, resistance of the parasite to this drug was reported along the Thai-Cambodian border, and by 1982, resistance was widespread throughout the country (Pinichpongse et al. 1982, Thaithong et al. 1988, Hastings et al. 2005). The molecular targets of action of sulfadoxine and pyrimethamine are dihydropteroate synthase (*dhps*) and dihydrofolate reductase (*dhfr*), respectively. As a result, resistance to SP is determined by specific point mutations in the parasite genes (Zakeri et al. 2009). These mutations of the genes, *dhfr* and *dhps*, which encode these two enzymes cause alterations of key amino acid residues in the active sites of these enzymes, which reduce the affinity of the enzyme for the drug (Gregson and Plowe 2005). In Thailand, SP has never been used for treatment of *P. vivax* infections, but *P. vivax* often co-exists with *P. falciparum* with relative equal frequencies (Snounou and White 2004). Therefore, *P. vivax* has often been exposed involuntarily to SP during treatment of *P. falciparum*, and this has caused a progressive selection of SP-resistant alleles in *P. vivax* (Imwong et al. 2003). In this study, we determined the prevalence and diversity of *pvdhfr* and *Pvdhps* mutant alleles in *P. vivax* isolates collected from different malaria endemic areas of Thailand, i.e., Mae-hongson, Ranong.

Materials and Methods

Study areas and sample collection

A total of 41 blood samples with mono-infection of *P. vivax* were collected from patients attending the malaria clinics

in the provinces alone Thai-Myanmar (Mae-hongson, Ranong) during 2009 - 2010. Approval of the study protocol was obtained from the Ethics Committees of Ministry of Public Health of Thailand. Two-hundred to 300 µl finger-prick blood samples were collected onto filter paper (Whatman No. 3).

Extraction of parasite genomic DNA

Parasite genomic DNA was extracted from individual dried blood spots on filter paper using a QIAamp DNA extraction mini-kit (QIAGEN) and used as template for PCR amplification (Qiagen, Valencia, CA).

Amplification of *pvdhfr*

The first reaction of *pvdhfr* was amplified by the primers *pvdhfr*-OF and *pvdhfr*-OR (Imwong et al. 2003). PCR cycling conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 30 cycles of 95°C for 30 sec, 64°C for 30 sec, 72°C for 30 sec, and then 72°C for 5 min.

Amplification of *pvdhps*

The first reaction of *pvdhps* was amplified by the *pvdhps*-OF and *pvdhps*-OR primers (Imwong et al. 2003). PCR cycling conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 25 cycles of 95°C for 1 min, 58°C for 2 min, 72°C for 2 min, and then 72°C for 5 min.

Results

Detection of mutations in the *pvdhfr* and *pvdhps* genes

The frequencies of *pvdhfr* and *pvdhps* mutations in 41 *P. vivax* isolates are summarized in Table 3. Point mutations in *pvdhfr* were detected in 4 (codons 57, 58, 61 and 117) out of 7 codons, while wild-type alleles were detected in 3 codons (13, 33 and 173). Among the mutation alleles, all isolates carried mutations at codons 58 (58R) and 117 (117N, 117T). For *pvdhps*, the most prevalent alleles were the mutant 383G (63.4%) and the wild-type A553 (100%) alleles.

Table 1 Method for amplification of *pvdhfr* (second reactions) and restriction enzymes

Amino acid codon	Locus	PCR primer	Restriction enzymes	References
13, 33, 58 and 61	I13L	<i>pvdhfr</i> -13F <i>pvdhfr</i> -13R	HaeIII	Imwong et al. 2003
	P33L		Cfr42I (SacII)	
	S58R		AluI	
	T61M		Tsp45I	
57 and 173	F57	<i>pvdhfr</i> -OF	XmnI	
	I173L	<i>pvdhfr</i> -NR	Eco130I(StyI)	
57 and 117	F57I/L	<i>pvdhfr</i> -F57	BsrGI	
	S117T/N	<i>pvdhfr</i> -NR	PvuII, BsrI and BstNI	

Table 2 Method for amplification of *pvdhps* (second reactions) and restriction enzymes

Amino acid codon	Locus	PCR primer	Restriction enzymes	References
383	A383G	<i>pvdhps</i> -NF <i>pvdhps</i> -NR	Msp I (HpaII)	Imwong et al. 2003
553	A553G	<i>pvdhps</i> -553OF <i>pvdhps</i> -NR	Msc I	

Table 3 The frequencies of *pvdhfr* and *pvdhps* single nucleotide polymorphisms in 41 *P. vivax* isolates

Gene	Amino acid position	SNPs	Number of isolates (%)
<i>pvdhfr</i>	13	I (wild-type)	41 (100.0%)
		L (mutant)	0 (0.0%)
	33	P (wild-type)	41 (100.0%)
		L (mutant)	0 (0.0%)
	57	F (wild-type)	4 (9.8%)
		I (mutant)	19 (46.3%)
		L (mutant)	16 (39.0%)
		F/L (mutant)	2 (4.9%)
	58	S (wild-type)	0 (0.0%)
		R (mutant)	41 (100.0%)
	61	T (wild-type)	28 (68.3%)
		M (mutant)	13 (31.7%)
	117	S (wild-type)	0 (0.0%)
		N (mutant)	4 (9.8%)
		T (mutant)	36 (87.8%)
		N/T (mutant)	1 (2.4%)
	173	I (wild-type)	41 (100.0%)
		L (mutant)	0 (0.0%)
Gene	Amino acid position	SNPs	Number of isolates (%)
<i>pvdhps</i>	383	A (wild-type)	15 (36.6%)
		G (mutant)	26 (63.4%)
	553	A (wild-type)	41 (100.0%)
		G (mutant)	0 (0.0%)

Table 4 Frequency distribution of *pvdhfr* and *pvdhps* combination alleles in 41 *P. vivax* isolates

Pvdhps		Pvdhfr							Ranong (%) n=11	Mae-hongson (%) n=30	Total (%) n=41
A383G	A553G	I13L	P33L	F57I/L	S58R	T61M	S117T/N	I173L			
G	A	I	P	F	R	T	N	I	1 (2.4%)	-	1 (2.4%)
A	A	I	P	I	R	T	T	I	-	2 (4.9%)	2 (4.9%)
G	A	I	P	I	R	T	T	I	5 (12.2%)	5 (12.2%)	10 (24.4%)
G	A	I	P	F/L	R	T	T	I	-	1 (2.4%)	1 (2.4%)
A	A	I	P	L	R	T	T	I	1 (2.4%)	6 (14.7%)	7 (17.1%)
G	A	I	P	L	R	T	T	I	3 (7.3%)	4 (9.8%)	7 (17.1%)
A	A	I	P	F	R	M	N	I	-	1 (2.4%)	1 (2.4%)
G	A	I	P	F	R	M	N	I	-	2 (4.9%)	2 (4.9%)
A	A	I	P	I	R	M	T	I	1 (2.4%)	3 (7.3%)	4 (9.8%)
G	A	I	P	I	R	M	T	I	-	4 (9.8%)	4 (9.8%)
A	A	I	P	L	R	M	T	I	-	1 (2.4%)	1 (2.4%)
G	A	I	P	F/L	R	M	NT	I	-	1 (2.4%)	1 (2.4%)
G=63.4%	-	-	-	I=46.3% L=39% F/L=4.9%	R=100%	M=31.7%	T=37.3% N=9.8% NT=2.4%	-			

Discussion and Conclusion

A total of 41 blood samples of *P. vivax* isolates collected from antimalarial drug resistant areas of Thailand, *i.e.*, Mae-hongson, Ranong provinces during the year 2009-2010 were investigated in this study. The most prevalent combination allele was a triple *pvdhfr* mutant allele 57I/58R/117T combined with a single *pvdhps* mutant allele 383G found in Mae-hongson and Ranong provinces. This indicate that the distribution and diversity of *pvdhfr* and *pvdhps* mutant alleles in *P. vivax* isolates were found in Thai malaria endemic area, such as Mae-hongson and Ranong province. In this study there have been a

few studies which investigated the prevalence and diversity of *pvdhfr* and *pvdhps* in *P. vivax* isolates from different malaria endemic areas of Thailand. Development of new antifolates drugs that are effective against sulfadoxine-pyrimethamine (SP)-resistant *P. vivax* is required.

Acknowledgements

The study was supported by The Commission on Higher Education (RG and NRU Projects), Ministry of Education of Thailand and the Royal Golden Jubilee Program of the Thailand Research Fund (RGJ-TRF).

References

- Gregson A, Plowe CV. Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates. *Pharmacol Rev.* 2005 Mar;57(1):117-45.
- Hastings MD, Maguire JD, Bangs MJ, Zimmerman PA, Reeder JC, Baird JK, et al. Novel *Plasmodium vivax* dhfr alleles from the Indonesian Archipelago and Papua New Guinea: association with pyrimethamine resistance determined by a *Saccharomyces cerevisiae* expression system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Feb;49(2):733-40.
- Imwong M, Pukrittayakamee S, Renia L, Letourneur F, Charlier JP, Leartsakulpanich U, et al. Novel point mutations in the dihydrofolate reductase gene of *Plasmodium vivax*: evidence for sequential selection by drug pressure. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 May;47(5):1514-21.
- Lu F, Lim CS, Nam DH, Kim K, Lin K, Kim T-S. Mutations in the antifolate-resistance-associated genes dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase in *Plasmodium vivax* isolates from malaria-endemic countries. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;83(3):474-9.
- Na-Bangchang K, Congpuong K. Current malaria status and distribution of drug resistance in East and Southeast Asia with special focus to Thailand. *Tohoku J Exp Med.* 2007 Feb;211(2):99-113.
- Pinichpongse S, Doberstyn E, Cullen J, Yisunsri L, Thongsombun Y, Thimasam K. An evaluation of five regimens for the outpatient therapy of falciparum malaria in Thailand 1980-1981. *Bulletin of the World Health Organization.* 1982;60:907-12.
- Snounou G, White NJ. The co-existence of *Plasmodium*: sidelights from falciparum and vivax malaria in Thailand. *Trends Parasitol.* 2004 Jul;20(7):333-9.
- Thaithong S, Beale G, Chutmongkolkul M. Variability in drug susceptibility among clones and isolates of *Plasmodium falciparum*. *Trans R Trop Med Hyg.* 1988;82:33-6.
- Zakeri S, Motmaen SR, Afsharipad M, Djadid ND. Molecular characterization of antifolates resistance-associated genes, (dhfr and dhps) in *Plasmodium vivax* isolates from the Middle East. *Malar J.* 2009;8:20.

RESEARCH ARTICLE

Investigation on the Association between *In Vitro* Sensitivity of *Plasmodium falciparum* isolates in Thailand to Antimalarial Drugs and Polymorphisms of Molecular Markers of Antimalarial Drug Resistance

Poonuch Muhamad¹, Vithoon Viyanant¹, Wanna Chaijaroenkul¹, Papichaya Phompradit¹, Kesara Na-Bangchang¹

¹Thailand Center of Excellence on Drug Discovery and Development (TCEDD), Thammasat

Abstract

The emergence and spreading of multidrug resistance *Plasmodium falciparum* throughout is a major problem of malaria control in Thailand. The aim of this study was to assess the *in vitro* susceptibility of 25 *P. falciparum* isolates in Thailand to the four standard antimalarial drugs, *i.e.*, chloroquine (CQ), quinine (QN), mefloquine (MQ) and artesunate (AS) including their relationships with polymorphisms (gene mutation of *pfprt*, *pfmdr1* and copy number of *pfmdr1*). *In vitro* sensitivity test was performed using SYBR green I assay. The mutations of *pfprt* and *pfmdr1* were analyzed by PCR-RFLP and copy number of *pfmdr1* was determined by SYBR green I real-time PCR. The median IC₅₀ (95% CI) of CQ, QN, MQ and AS were 96.02 (67.72-132.29), 226.95 (163.88-299.66), 23.88 (19.40-31.29) and 1.73 (1.30-2.04) nM, respectively. All isolates (100%) carried mutation of *pfprt* at codons 76, 220, 271, 326, 356, 371. No mutation of *pfmdr1* at codon 86 was detected; 19 isolates (76%) carried 1 *pfmdr1* copy number while 6 isolates (24%) carried more than 1 *pfmdr1* copy number. MQ resistant phenotype correlated well with the increase in *pfmdr1* copy number. Further investigation should focus on confirmation of these observations in a larger sample size.

Key Words *Plasmodium falciparum*, antimalarial drug resistance, *pfprt*, *pfmdr1*

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความไวของเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียมในประเทศไทยต่อยาต้านมาลาเรียในหลอดทดลองและความหลากหลายของเครื่องหมายระดับโมเลกุลของการดื้อยาต้านมาลาเรีย

ณัฐ มุทะมัด¹, วิฑูรย์ ไวยนันท์¹, วรณา ชัยเจริญกุล¹, ปิยัญญา พรหมประดิษฐ์¹, เกศรา ณ บางช้าง¹

¹ศูนย์ความเป็นเลิศทางด้านการวิจัย คั่นคว่ำ และพัฒนยาแห่งประเทศไทย
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต) ปทุมธานี ประเทศไทย

บทคัดย่อ

การแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียมที่ดื้อยาต้านมาลาเรียหลายชนิดทั่วพื้นที่เป็นปัญหาสำคัญของการควบคุมมาลาเรียในประเทศไทย การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อประเมินความไวของเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียมในหลอดทดลองต่อยาต้านมาลาเรีย คือคลอโรควิน, ควินิน, เมฟโลควินและอาร์ติซูน และความสัมพันธ์กับความหลากหลายของเครื่องหมายระดับโมเลกุลของการดื้อยาต้านมาลาเรีย (การกลายพันธุ์ของยีน *pfcr*, *pfmdr1* และการเพิ่มจำนวนชุดของยีน *pfmdr1*) ซึ่งการประเมินความไวของเชื้อต่อยาในหลอดทดลองทำโดยวิธี SYBR Green I ส่วนการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *pfcr*, *pfmdr1* และการเพิ่มจำนวนชุดของยีน *pfmdr1* ทำโดย PCR-RFLP และ SYBR Green I real-time PCR ตามลำดับ ผลการทดสอบความไวของเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียมในหลอดทดลองต่อยาต้านมาลาเรีย ทั้งหมด 25 ตัวอย่าง พบว่าค่ามัธยฐานของความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ 50 % (IC_{50}) (ช่วงความมั่นใจ 95%) ของยาคลอโรควิน, ควินิน, เมฟโลควินและอาร์ติซูนเท่ากับ 96.02 (67.72–132.29), 226.95 (163.88–299.66), 23.88 (19.40–31.29) และ 1.73(1.30–2.04) นาโนโมลาร์ ตามลำดับ การศึกษาระดับโมเลกุล พบการกลายพันธุ์ของยีน *pfcr* ตำแหน่ง 76, 220, 271, 326, 356 และ 371 เท่ากับ 100% แต่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *pfmdr1* ตำแหน่ง 86 สำหรับการศึกษาการเพิ่มจำนวนชุดของยีน *pfmdr1* พบว่า 19 ตัวอย่าง (76%) มียีน *pfmdr1* จำนวน 1 ชุด และ 6 ตัวอย่าง (24%) มียีน *pfmdr1* มากกว่า 1 ชุด และจากการศึกษานี้พบว่า เชื้อมาลาเรียที่ดื้อยาเมฟโลควินในหลอดทดลองมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวนชุดของยีน *pfmdr1* อย่างไรก็ตาม ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมในตัวอย่างที่มีขนาดใหญ่ขึ้น เพื่อยืนยันผลการทดสอบนี้

คำสำคัญ: เชื้อมาลาเรียชนิดพลาสโมเดียม, การดื้อยาต้านมาลาเรีย, ยีน *pfcr*, ยีน *pfmdr1*

Introduction

The emergence and spreading of multidrug resistance *Plasmodium falciparum* is a major problem of malaria control in Thailand. Chloroquine resistance was initially reported in the late 1950's, followed by sulphadoxine-pyrimethamine (FansidarTM), and mefloquine (Harinasuta et al., 1965). Currently, a three-day artesunate-mefloquine combination is used as the first-line treatment for acute uncomplicated *falciparum* malaria throughout the country (Na-Bangchang and Karbwang, 2009), whereas a seven-day quinine-tetracycline is used as a second-line treatment (Achan et al., 2011). *In vitro* assay for sensitivity of malaria parasites to antimalarial drugs including the monitoring of molecular markers of antimalarial drug resistance provide information complementary to clinical assessment for monitoring emergence of drug resistance, changing trends of drug sensitivity or resistance over time (Basco, 2007). Polymorphisms of the two genes encoding the parasite transporter proteins, *pfcr*t (*Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter) and *pfmdr*1 (*Plasmodium falciparum* multidrug resistance 1) localized in the membrane of digestive vacuole have been linked with resistance of *P. falciparum* to antimalarial drugs (Valderramos and Fidock, 2006). The aim of this study was to assess the *in vitro* susceptibilities of *P. falciparum* isolates in Thailand to the four standard antimalarial drugs, i.e., chloroquine (CQ), quinine (QN), mefloquine (MQ) and artesunate (AS) including their relationships with polymorphisms (gene mutation and copy number of *pfcr*t and *pfmdr*1 genes).

Material and Methods

Sample collection

The study was conducted at Mae Tao clinic for migrant workers, Tak Province in 2009. A total of 25 blood samples (1 ml each) were collected from patients with acute uncomplicated *falciparum* malaria prior to the treatment with the standard regimen of a 3-day artesunate-mefloquine. Written informed

consent for study participation was obtained from all patients. Approval of the study protocol was obtained from the Ethics Committee of the Ministry of Public Health of Thailand.

In vitro drug sensitivity assay

All *P. falciparum* isolates were adapted to culture according to the method of Trager and Jensen with modification (Trager and Jensen, 1976). *In vitro* sensitivity testing of each *P. falciparum* isolate to the four antimalarial drugs were performed in a 96-flat-bottom sterile microtiter plate according to the method of Rieckmann and Bennette (Bennett et al., 2004, Rieckmann et al., 1978). Antimalarial powder was dissolved in 50% ethanol to obtain the stock solution at concentration of 10 mM. Prior to sensitivity testing, stock concentration of each drug was diluted with complete medium in microtiter plate to obtain working concentration ranges of 1,000-7.8, 4,000-31.2, 400-3.1, and 100-0.78 nM for CQ, QN, MQ and ARS, respectively. Dihydroartemisinin (200 µM) was used as positive control. Highly synchronous ring stage parasites were diluted with fresh uninfected RBCs to obtain 2% parasitaemia with 1% haematocrit. Fifty microliters of parasitized erythrocytes were incubated with 50 µl of each working drug concentration for 48 h in a humidified airtight chamber with a gas mixture of 5% O₂, 5% CO₂, and 90% N₂. Evaluation of susceptibility of *P. falciparum* to antimalarial drugs were performed using SYBR green I assay (Bennett et al., 2004). Fluorescent intensity was measured at the excitation and emission wavelengths of 485 and 530 nm, respectively. The concentration-response curves obtained from *in vitro* sensitivity assay were analyzed by nonlinear regression analysis using CalcuSynTM software (Biosoft, Cambridge, UK). Results were expressed as inhibitory concentration (IC)₅₀, which is defined as the concentration of antimalarial drug that produces 50% inhibition of parasite development as compared to the control.

Detection of mutations in the *pfprt* and *pfmdr1* genes and quantification of *pfmdr1* copy number

PCR-RFLP was employed to detect mutations of *pfprt* at the codons 76, 220, 271, 326, 356, 371 (Fidock et al., 2000), and of *pfmdr1* at the codon 86 (Djimé et al., 2001). PCR was performed in a total volume of 25 µl with the following reaction mixture: 0.1 µM of each primer, 2.5 mM MgCl₂, 100 µM deoxynucleotides (dNTPs), 1x PCR buffer (100 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0), 0.5 unit of *Taq* DNA polymerase (Fermentas, Lithuania) and 2 µl of genomic DNA. DNA of G112 (chloroquine sensitive) and K1 (chloroquine resistant) *P. falciparum* served as control clones. *Pfmdr1* copy number was determined by SYBR Green I real-time PCR according to the method designed by Ferreira and coworkers with modification (Ferreira et al., 2006). Individual real-time PCR reaction was carried out in a 25 µl reaction volume in a 96-well plate containing 1x buffer (10x), 3.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 1 µM each of sense and antisense primer, 12.5 µl of PlatinumTM PCR SuperMix (Invitrogen, USA). The 2^{-ΔΔC_t} method of relative quantification was adapted to estimate copy number in *P. falciparum* genes. The *pf-β-actin 1* served as the house-keeping gene in all experiments and genomic DNA extracted from *P. falciparum* 3D7 and Dd2 clones known to harbor a single and 4 copies of each *pfmdr1* were used as controls.

Data analysis

In vitro sensitivity of all parasite isolates to CQ, QN, MQ and AS were expressed as median (95% CI) of the IC₅₀ values. Antimalarial drug susceptibility was categorized into two levels as follows: CQ sensitive (S: IC₅₀ < 25 nM), CQ resistant (R: 25 ≥ nM); QN sensitive (IC₅₀ < 500 nM), and CQ resistant (R: IC₅₀ ≥ 500 nM); MQ sensitive (S: IC₅₀ < 25

nM), and MQ resistant (R: 25 ≥ nM); AS sensitive (S: IC₅₀ ≤ 10.5 nM) and AS resistant (R: IC₅₀ > 10.5 nM) (Cerutti et al., 1999, Pickard et al., 2003, Pradines et al., 2011). Association between the proportion of *pfprt/pfmdr1* mutation or *pfmdr1* amplification and antimalarial drugs sensitivity phenotype was investigated using the Pearson Chi-Squared test at statistical significance level of α = 0.05 (SPSS version 15.0).

Results

A total of the 25 isolates were successfully evaluated for their *in vitro* susceptibilities and molecular markers of antimalarial drug resistance. Results obtained from individual isolate are presented in Table 1. All isolates were resistant to CQ with median IC₅₀ (95%CI) of 96.02 (67.72-132.29) nM. The MQ median IC₅₀ (95%CI) of 25 isolates was 23.88 (19.40-31.29) nM and in the groups classified as MQ-sensitive (n=13, 52%) and MQ-resistant (n=12, 48%) were 19.14 (12.87-21.15) and 32.39 (27.13-61.94) nM, respectively. None was classified as QN- or AS-resistant [median IC₅₀ (95%CI) 226.95 (163.88-299.66) vs 1.73 (1.30-2.04) nM]. Molecular analysis revealed 100% mutation of *pfprt* at codons 76, 220, 271, 326, 356, 371. No mutation of *pfmdr1* at codon 86 was detected; 19 isolates (76%) carried one *pfmdr1* copy number while 6 isolates (24%) carried more than one *pfmdr1* copy number. The IC₅₀ of CQ in isolates carrying one *pfmdr1* copy number was higher than those isolates carrying more than one copy number. On the other hand, the IC₅₀ of QN, MQ and AS of the isolates carrying one copy was lower than that carrying more than one *pfmdr1* copy though not statistically significant. Furthermore, isolates carrying more than one *pfmdr1* copy (67%) were found to be associated with MQ resistant phenotype (*p* < 0.05).

Table 1 *In vitro* sensitivity and analysis of molecular markers of antimalarial drug resistance of 25 *P. falciparum* isolates. R and S represent resistant and sensitive, respectively.

Isolate	IC ₅₀ (nM)				<i>Pfprt</i> K76T/A220S/ Q271E/A326S/I356T/ R371I <i>Pfmdr1</i> N86Y	<i>Pfmdr1</i> copy number
	CQ	QN	MQ	AS		
1	66.93 (R)	294.10 (S)	20.72 (S)	1.22 (S)	TSESTIN	1
2	132.29 (R)	473.01 (S)	89.97 (R)	3.16 (S)	TSESTIN	1
3	162.97 (R)	82.42 (S)	16.49 (S)	0.90 (S)	TSESTIN	1
4	49.80 (R)	163.88 (S)	28.83 (R)	1.73 (S)	TSESTIN	6
5	100.67 (R)	341.50 (S)	32.25 (R)	1.73 (S)	TSESTIN	2
6	46.50 (R)	102.20 (S)	10.57 (S)	1.19 (S)	TSESTIN	3
7	275.30 (R)	329.51 (S)	60.01 (R)	2.87 (S)	TSESTIN	3
8	410.39 (R)	226.95 (S)	31.29 (R)	2.04 (S)	TSESTIN	1
9	76.47 (R)	354.77 (S)	19.40 (S)	3.37 (S)	TSESTIN	1
10	247.32 (R)	204.18 (S)	20.89 (S)	1.58 (S)	TSESTIN	1
11	240.22 (R)	136.45 (S)	27.13 (R)	1.55 (S)	TSESTIN	1
12	523.68 (R)	293.38 (S)	32.54 (R)	1.30 (S)	TSESTIN	1
13	230.46 (R)	149.61 (S)	13.29 (S)	0.64 (S)	TSESTIN	1
14	81.10 (R)	49.18 (S)	12.87 (S)	1.04 (S)	TSESTIN	1
15	129.37 (R)	198.62 (S)	23.88 (S)	3.44 (S)	TSESTIN	1
16	64.75 (R)	261.04 (S)	40.59 (R)	1.99 (S)	TSESTIN	1
17	96.02 (R)	257.24 (S)	26.78 (R)	1.77 (S)	TSESTIN	2
18	71.38 (R)	56.18 (S)	5.97 (S)	0.71 (S)	TSESTIN	1
19	64.60 (R)	299.66 (S)	25.12 (R)	0.94 (S)	TSESTIN	1
20	56.31 (R)	211.98 (S)	22.09 (S)	1.87 (S)	TSESTIN	1
21	67.72 (R)	386.87 (S)	64.84 (R)	3.18 (S)	TSESTIN	4
22	114.75 (R)	181.83 (S)	19.14 (S)	2.17 (S)	TSESTIN	1
23	89.68 (R)	102.30 (S)	17.45 (S)	1.76 (S)	TSESTIN	1
24	63.89 (R)	325.58 (S)	61.94 (R)	4.97 (S)	TSESTIN	1
25	125.89 (R)	474.32 (S)	21.15 (S)	1.63(S)	TSESTIN	1

Discussion

The study investigated the *in vitro* susceptibility of 25 *P. falciparum* isolates, collected from Mae Sot district in 2009, to the four commonly used antimalarial drugs in Thailand (CQ, QN, MQ, and AS) the possible association with candidate molecular markers of resistance (*pfprt* and *pfmdr1*). All isolates (100%) classified based on *in vitro* susceptibilities as CQ resistant isolates carried *pfprt* 76 mutations. This CQ resistant genotype has been detected in *P. falciparum* isolates in Thailand since 1979, even the drug was withdrawn from clinical use as first-line for treatment of falciparum malaria in Thailand (Saito-Nakano et al., 2008). Among several distinct sequence diversity of *pfprt* point mutation detected in individual CQ resistant lines/isolates from different geographical areas, the replacement of lysine (K) with threonine (T) at amino acid 76 is essential for conferring resistance to chloroquine (Fidock et al., 2000). For *pfmdr1*, N86Y mutation was found to be associated with chloroquine resistance *in vitro* both in field isolates and laboratory lines (Duraisingh and Cowman, 2005). However, this mutation was not observed in the isolates collected in this study. Nevertheless, in a previous study, the isolates carrying both the *pfprt* 76 and *pfmdr1* 86 wild type alleles or the single mutant *pfmdr1* 86, showed lower CQ IC₅₀ than that with only the single mutant *pfprt*

76 allele. In addition, isolates carrying both *pfprt* 76 and *pfmdr1* 86 mutation alleles had the highest CQ IC₅₀ (Tinto et al., 2003). For MQ, 12 out of 25 isolates (48%) were identified as MQ resistant. Amplification of *pfmdr1* has been linked with a reduction in *in vitro* susceptibility of *P. falciparum* isolates to QN, MQ and AS, as well as a predictor of treatment failure following artemisinin-based combination therapy (ACT) (Price et al., 2004). The observation in the present study revealed a good correlation of an increase in *pfmdr1* copy number with MQ resistant phenotype ($p < 0.05$).

Conclusion

All of the 25 *P. falciparum* isolates exhibited CQ resistant phenotype carried *pfprt* 76 mutation genotype. All isolates were sensitive to QN and AS. MQ resistant phenotype was associated with the increase in *pfmdr1* copy number. These findings should be confirmed in a larger sample size.

Acknowledgements

We would like to thank the Commission on Higher Education (RG and NRU Projects), Ministry of Education of Thailand, Mae Tao clinic and all volunteers for supporting this study.

References

- Achan J, Talisuna A, Erhart A, Yeka A, Tibenderana J, Baliraine F, et al. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malar J*. 2011;10:144.
- Basco K. Field application of *in vitro* assays sensitivity of human malaria parasites antimalarial drugs. Geneva: World Health Organization 2007.
- Bennett T, Paguio M, Gligorijevic B, Seudieu C, Kosar A, Davidson E, et al. Novel, rapid, and inexpensive cell-based quantification of antimalarial drug efficacy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(5):1807-10.
- Na-Bangchang K, Karbwang J. Current status of malaria chemotherapy and the role of pharmacology in antimalarial drug research and development. *Fundam Clin Pharmacol* 2009;23:387-409.
- Pickard A, Wongsrichanalai C, Purfield A, Kamwendo D, Emery K, Zalewski C, et al. Resistance to antimalarials in Southeast Asia and genetic polymorphisms in *pfmdr1*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:2418-23.
- Pradines B, Bertaux L, Pomares C, Delaunay P, Marty P. Reduced *in vitro* susceptibility to artemisinin derivatives associated with multi-

- Cerutti J, Marques C, Alencar F, Durlacher R, Alween A, Segurado A, et al. Antimalarial drug susceptibility testing of *Plasmodium falciparum* in Brazil using a radioisotope method. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94(6):803-9.
- Djimdé A, Doumbo O, Cortese J, Kayentao K, Doumbo S, Diourté Y, et al. A molecular marker for chloroquine resistant *falciparum* malaria. *N Engl J Med*. 2001;334(4):257-63.
- Duraisingh M, Cowman A. Contribution of the *pfmdr1* gene to antimalarial drug-resistance. *Acta Trop*. 2005;94:180-90.
- Ferreira I, Rosario V, Cravo P. Real-time quantitative PCR with SYBR Green I detection for estimating copy numbers of nine drug resistance candidate genes in *Plasmodium falciparum*. *Malar J*. 2006;5.
- Fidock D, Nomura T, Talley A, Cooper R, Dzekunov S, Ferdig M, et al. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell*. 2000;6(4):861-71.
- Harinasuta T, Suntharasamai P, Viravan C. Chloroquine resistant *falciparum* malaria in Thailand. *Lancet*. 1965;2:660-75.
- resistance in a traveller returning from South-East Asia. *Malar J*. 2011;10:268.
- Price R, Uhlemann A, Brockman A, Brockman A, McGready R, Ashley E, et al. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increase *pfmdr1* gene copy number. *Lancet*. 2004;364(9432):438-47.
- Rieckmann K, Campbell G, Sax L, Mrema J. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum* an in-vitro microtechnique. *Lancet*. 1978;311:22-3.
- Saito-Nakano Y, Tanabe K, Kamei K, Iwagami M, Komaki-Yasuda K, Kawazu S, et al. Genetic evidence for *Plasmodium falciparum* resistance to chloroquine and pyrimethamine in Indochina and the Western Pacific between 1984 and 1998. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;79(4):613-9.
- Tinto H, Ouédraogo J, Erhart A, Van Overmeir C, Dujardin J, Van Marck E, et al. Relationship between the *Pfcr* T76 and the *Pfmdr-1* Y86 mutations in *Plasmodium falciparum* and *in vitro/in vivo* chloroquine resistance in Burkina Faso, West Africa. *Infect Genet Evol*. 2003;3(4):287-92.

RESEARCH ARTICLE

Preliminary Proteomics Study of Dihydroartemisinin Action in *Plasmodium falciparum*

Wanna Chaijaroenkul¹, Vithoon Viyanant¹, Piyathida Kumsuk¹, Wipada Kiatkangwankul¹, Kesara Na-Bangchang¹

¹Thailand Center of Excellence on Drug Discovery and Development (TCEDD), Thammasat

Abstract

The multidrug resistance *Plasmodium falciparum* is a major health problem in the malaria endemic areas of the world including Thailand. To cope with the situation, development of effective and safe antimalarial drugs is urgently required. Artemisinin and derivatives (dihydroartemisinin, artemeter, artesunate, arteether) are currently the mainstay in chemotherapy of multidrug resistance falciparum malaria. The objective of the study was to observe the protein patterns of *P. falciparum* following exposure to dihydroartemisinin (DHA) for 5 hours. Proteins were extracted from G112 *P. falciparum* clone in the presence (3 nM) and absence (control) of DHA. Proteins were separated by two-dimension gel electrophoresis and stained with silver stain. Analysis and comparison of protein patterns between DHA-exposed and non-exposed parasite was done by PDQuest Program. Results showed that approximately 63 spots of protein patterns were similar, but the number of protein spots was markedly lower in the exposed parasite (99 spots) comparing to non-exposed parasite (147 spots).

Key Words *Plasmodium falciparum*, proteomics, dihydroartemisinin (DHA)

การศึกษาเบื้องต้นถึงผลของยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินินที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงทางด้านโปรตีนของเชื้อพลาสมาเรีย

วรรณชัยเจริญกุล¹, วิฑูรย์ ไวยนันท์, ปิยธิดา คุ่มสุ่ย, วิภาดา เกียรติกังวานกุล, เกศรา ณ บางช้าง

¹ศูนย์ความเป็นเลิศทางการวิจัย คั่นคว่ำ และพัฒนยาแห่งประเทศไทย

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต) ปทุมธานี ประเทศไทย

บทคัดย่อ

เชื้อพลาสมาเรียต่อยาด้านมาลาเรียเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย จึงมีความพยายามคิดค้นและพัฒนายาด้านมาลาเรียชนิดใหม่ขึ้นมาเพื่อแก้ปัญหานี้ ยาด้านมาลาเรียกลุ่มใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงในการต้านเชื้อพลาสมาเรียที่ต่อยาในปัจจุบัน คือยาในกลุ่มอาร์ติมิซินิน และอนุพันธ์ (ไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน, อาร์ติมิเตอร์ เป็นต้น ดังนั้นเพื่อเป็นการศึกษาวิจัยการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของโปรตีน อันจะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญในการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่มอาร์ติมิซินิน ทางคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนของเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสมาเรียที่ไม่ได้รับยาและภายหลังได้รับยาไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน (DHA) ด้วยวิธี two-dimension electrophoresis และวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม PDQuest ผลการศึกษาพบว่า ภายหลังเชื้อมาลาเรียชนิดพลาสมาเรียสายพันธุ์ G112 ได้รับยา DHA ที่ความเข้มข้น 3 นาโนโมลาร์เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เชื้อจะยังไม่ตาย แต่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในตัวเชื้อ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับรูปแบบโปรตีนของเชื้อที่ไม่ได้รับยานั้น พบว่าปริมาณโปรตีนของเชื้อที่สัมผัสยาลดน้อยลง โดยพบจุดของโปรตีน 147 จุด และ 99 จุด ในกลุ่มที่ไม่ได้รับยาและกลุ่มที่ได้รับยาตามลำดับ และพบว่าโปรตีนทั้งสองกลุ่มนี้มีส่วนที่เหมือนกันเพียง 63 จุดเท่านั้น

คำสำคัญ: เชื้อมาลาเรียชนิดพลาสมาเรีย, โปรตีนโอมิคส์, ไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน

Introduction

Multi-drug resistance *Plasmodium falciparum* is the major problem in malaria control in Thailand, particularly those areas along Thai-Cambodian and Thai-Myanmar borders (Wongsrichanalai et al. 2001). Artemisinin and derivatives (dihydro-artemisinin, artemeter, artesunate, arteether) are currently the mainstay in chemotherapy of multidrug resistance *falciparum* malaria. Their action is rapid; malaria parasitaemia is cleared from patient's peripheral blood within 48 hours. The major mechanism of action of this group of drugs is related to their unique chemical component of the endoperoxide bridge, which upon being stimulated by malarial haem, is broken and generating free radicals that interact with specific proteins in the parasite and lead to parasite death. The exact mechanisms and consequences of this protein interactions remains to be elucidated (Meshnick 1998).

Proteomics is the large-scale study of proteins, particularly their structures and functions. Proteins are vital parts of living organisms as they are the main components of the physiological metabolic pathways of cells. The proteomics is the next step in the study of biological systems, after genomics and transcriptomics. It is much more complicated than genomics mostly because while an organism's genome is more or less constant, the proteome differs from cell to cell and from time to time. This is because distinct genes are expressed in distinct cell types. This means that even the basic set of proteins which are produced in a cell needs to be determined. A common way to determine protein patterns from organism is two-dimensional gel electrophoresis (2-DE), which simply means that the proteins are electrophoresed first in one allows small differences in a protein to be visualized by separating a modified protein from its unmodified form, thus this method is suitable to investigate the protein target for drug and vaccine development (Gevaert and Vandekerckhove 2000, Bernard et al. 2004). In this study, the protein patterns of *P. falciparum* malaria after exposed to DHA was investigated.

Materials and Methods

Chemicals and Reagents

Dihydroartemisinin (DHA) and SYBR Green I were purchased from Sigma-Aldrich Inc. (USA). The culture medium RPMI and gentamicin were purchased from Gibco BRL Life Technologies (USA). Commercial grade ethanol was purchased from Labscan (Poland). Stock solution of DHA was prepared at the concentration of 10 nM in 50% ethanol. On the day of experiment, stock solution of drug was diluted with serum-free medium in order to obtain required concentrations.

Parasite culture

G112 *Plasmodium falciparum* clone was cultured in RPMI 1640 medium (Gibco, USA) supplemented with 10% human B serum and 25 mM HEPES. Cultures were kept at 37°C under an atmosphere of 5% O₂, 5% CO₂, and 90% N₂ (Trager and Jensen 1976). The level of parasitaemia in the culture was kept at 2% haematocrit.

In vitro sensitivity of *P. falciparum* to DHA

The antimalarial activity DHA in G112 *P. falciparum* clone was determined using SYBR Green I assay (Bennett et al. 2004, Smilkstein et al. 2004). Highly synchronous ring stage parasite was used in each assay. An aliquot of parasite inoculum (50 µl) with 2% parasitaemia and 1% haematocrit, was added into each well of microtiter plate. The 96-well drug plates were dosed with DHA. The experiments were repeated three times (triplicate each). IC₅₀ value (drug concentration that inhibits the parasite growth by 50%) used as an indicator for antimalarial activity, and was determined from a log-dose-response curve plotted using the CalcuSyn version 1.1 (BioSoft, USA).

2-Dimensional gel electrophoresis

Synchronized parasite culture was harvested and cell pellet was resuspended and in 0.15% saponin in PBS and

incubated on ice for 1 hour in order to lyse red cells. The lysate was collected through centrifugation at $13,000 \times g$ for 5 min (4°C) and washed three times with 1 ml of PBS until the supernatant was clear. Red blood cell pellet was washed in 1 ml of 10 mM Tris-HCl pH 7.4 containing $1 \times$ protease inhibitor Cocktail (Roche Co. Ltd.) until red cell ghost was colorless. Pellet was then re-suspended in 500 μl of lysis buffer (8 M urea, 2 M thiourea, 1% CHAPS, 65mM DTT, 0.5% ampholyte pH 3-10) and sample was vortexed and sonicated on ice four times, eight seconds each (21% amplitude, 8 sec, interspersed with 9 sec), followed by centrifugation at $13,000 \times g$ for 1 hr (4°C), and the supernatant was subjected to 2-DE (Nirmalan et al. 2004, Makanga et al. 2005). Quantification of protein concentrations of the extracts was performed by using Bradford reagent (BioRad, USA). Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) was carried out using a 2D electrophoresis system (BioRad,

USA) according to the manufacturer's recommendation with modifications and NRU Projects), Ministry of Education of Thailand, Mae Tao clinic and all volunteers for supporting this study.

Results

In vitro antimalarial activity of DHA

The concentration-response curve of *in vitro* antimalarial activity of DHA against G112 *P. falciparum* is shown in Figure 1. The IC_{50} of DHA of 3.0 nM was used in proteomics study.

Proteomics study

Proteins were extracted from G112 *P. falciparum* clone in the presence (5 hours exposure) and absence (control) of DHA. Results showed that approximately 63 spots of protein patterns were similar, but the number of protein spots was markedly lower in the exposed parasite (99 spots) compared with the non-exposed parasite (147 spots) (Figure 2).

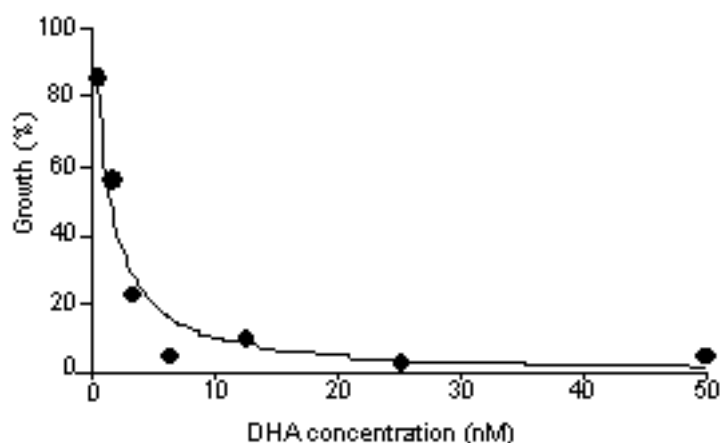


Figure 1 The concentration response curve of DHA

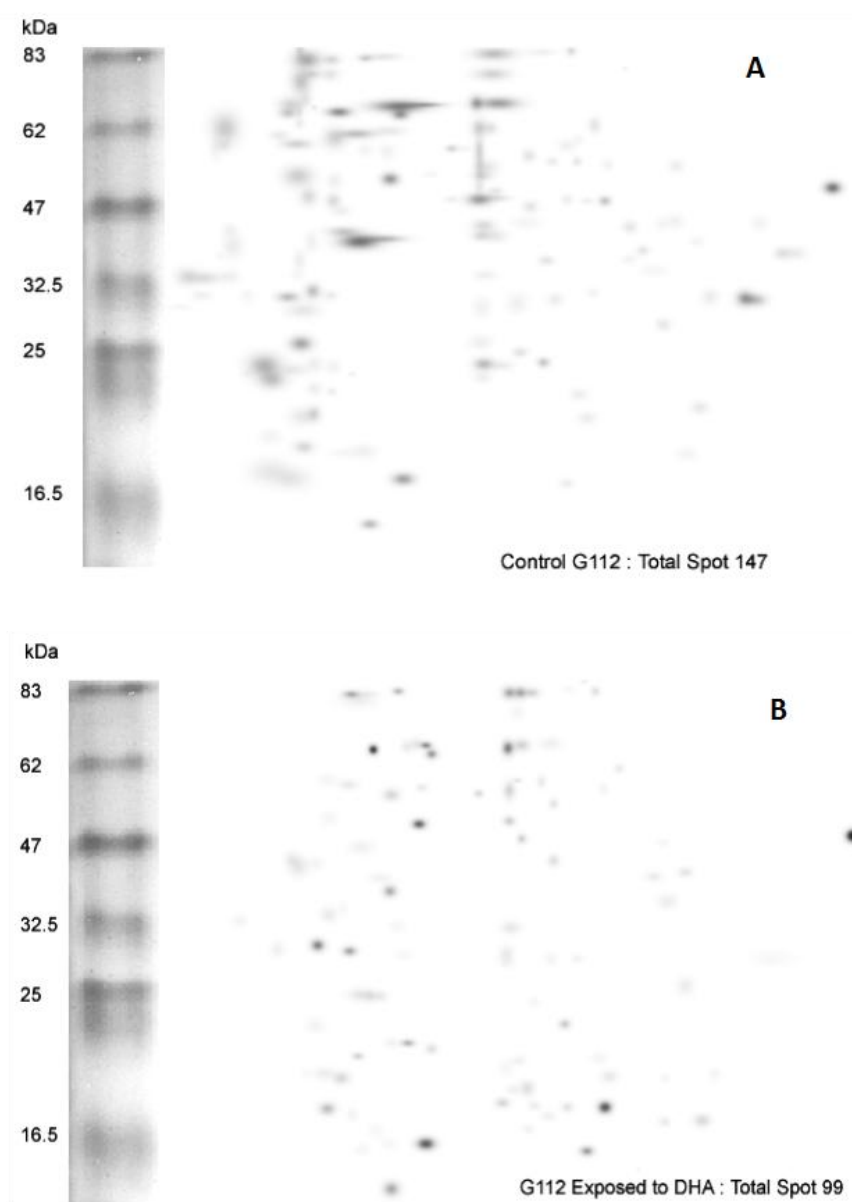


Figure 2 The protein patterns of G112 *P. falciparum* clone; A: without DHA and B with DHA exposure

Discussion

Proteomics approach is a new tool to observe targets for drug and vaccine development. Nevertheless, the application of this approach in malaria parasite is still limited. The proteomics tool have been undertaken to study the mechanisms of action or resistance of antimalarial drugs in *P. falciparum* (Makanga et al. 2005, Prieto et al. 2008, Cooper et al. 2004). In the present study, we observed the protein patterns

of *P. falciparum* following exposure to DHA. Identification of those proteins which were down-regulated after exposure to DHA is underway.

Acknowledgements

The study was supported by Thammasat University, Thailand research fund and The Commission on Higher Education (RG and NRU Projects), Ministry of Education of Thailand.

References

- Bennett TN, Paguio M, Gligorijevic B et al. Novel, rapid, and inexpensive cell-based quantification of antimalarial drug efficacy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 1807-10.
- Bernard KR, Jonscher KR, Resing KA, Ahn NG. Methods in functional proteomics: two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients, in-gel digestion and identification of proteins by mass spectrometry. *Methods Mol Biol.* 2004;250:263-82.
- Cooper RA and Carucci DJ. Proteomic approaches to studying drug targets and resistance in *Plasmodium*. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 2004; 4: 41-51.
- Gevaert K, Vandekerckhove J. Protein identification methods in proteomics. *Electrophoresis.* 2000;21(6):1145-54.
- Makanga M, Bray PG, Horrocks P, Ward SA. Towards a proteomic definition of CoArtem action in *Plasmodium falciparum* malaria. *Proteomics.* 2005; 5: 1849–1858.
- Meshnick SR. Artemisinin antimalarials: mechanisms of action and resistance. *Med Trop (Mars).* 1998;58(3 Suppl):13-7.
- Prieto JH, Koncarevic S, Park SK, Yates J, Becker K. Large-scale differential proteome analysis in *Plasmodium falciparum* under drug treatment. *PLoS ONE.* 2008;3:e4098
- Smilkstein M, Sriwilaijaroen N, Kelly JX, Wilairat P, Riscoe M. Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 1803-6.
- Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science.* 1976; 193: 673-5.
- Wongsrichanalai C, Sirichaisinthop J, Karwacki JJ, Congpuong K, Miller RS, Pang L, et al. Drug resistant malaria on the Thai-Myanmar and Thai-Cambodian borders. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2001;32:41-9.

RESEARCH ARTICLE

Genetic Polymorphisms of *Plasmodium Falciparum* Merozoite Surface Protein (*PfMSP*) in Mae Sot Isolates

Jiraporn Kuesap¹, Vithoon Viyanant¹, Kanchanok Ketprathum¹, Puntanat Tattiyapong¹, Kesara Na-Bangchang¹

¹Thailand Center of Excellence on Drug Discovery and Development (TCEDD), Thammasat

Abstract

Malaria remains a major public health problem in Thailand due to the emergence of multidrug resistance *Plasmodium falciparum*. Malaria infection caused by *P. falciparum* can cause coma, especially cerebral malaria and lead to death. Understanding genetic diversity of parasites is essential for developing effective drugs and vaccines for malaria control. The objective of this study was to investigate the genetic diversity pattern of merozoite surface protein 1 (*PfMSP-1*) and merozoite surface protein 2 (*PfMSP-2*) genes in a total of 50 *P. falciparum* isolates collected from Mae Sot district, Tak province, Thailand during 2009 to 2010. The polymorphisms of *PfMSP-1* and *PfMSP-2* were investigated by polymerase chain reaction (PCR). Both individual gene and their combination patterns showed marked genetic diversity. These two polymorphic genes could be used as molecular markers to detect multiple clone infections and differentiate recrudescence from re-infection in *P. falciparum* isolates in Thailand.

Key Words *Plasmodium falciparum*, Merozoite Surface Protein (MSP), genetic polymorphisms

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนเมอร์โรซอยท์เซอร์เฟสโปรตีนของเชื้อ มาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม ในพื้นที่อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก

จิราภรณ์ คัยทรัพย์¹, กานต์ชนก เกษประทุม¹, ปุณณณชัย ทัดติยพงศ์¹, เกศรา ณ บางช้าง¹

¹ศูนย์ความเป็นเลิศทางการวิจัย คันทวี และพัฒนยาแห่งประเทศไทย

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต) ปทุมธานี ประเทศไทย

บทคัดย่อ

มาลาเรียเป็นหนึ่งในโรคที่ก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสาธารณสุขของประเทศไทย การติดเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมอาจก่อให้เกิดอาการรุนแรง โดยเฉพาะภาวะมาลาเรียขึ้นสมอง และอาจทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ นอกจากนี้ปัญหาคrucialในการควบคุมโรคมาลาเรียคือปัญหาเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัมดื้อต่อยาต้านมาลาเรียหลายชนิด (multidrug resistance) เนื่องจากเชื้อมาลาเรียฟัลซิพารัมสายพันธุ์ในประเทศไทยได้พัฒนาชีววิทยาของเซลล์ในระดับโมเลกุลให้ลดการตอบสนองต่อยาต้านมาลาเรียหลาย ๆ ชนิดที่มีใช้ในการรักษา ทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อมาลาเรียสูง ดังนั้นการเข้าใจถึงพันธุกรรมประชากรของเชื้อมาลาเรียจึงมีประโยชน์ในการควบคุมโรค ทำให้ทราบถึงขอบเขตความหลากหลายทางพันธุกรรม และการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยา ซึ่งมีความสำคัญต่อการพัฒนาที่มีประสิทธิภาพรวมทั้งการนำไปใช้เป็นองค์ความรู้พื้นฐานในการพัฒนาวัคซีน วัตถุประสงค์ของงานศึกษาวิจัยนี้จัดทำขึ้นเพื่อศึกษารูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน MSP-1 และ MSP-2 ของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม จากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยมาลาเรียจำนวน 50 ราย ในพื้นที่อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก พ.ศ. 2552 - 2553 โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ผลการศึกษาพบว่า ยีน MSP-1 และ MSP-2 มีความหลากหลายของรูปแบบทางพันธุกรรมสูง นอกจากนี้เมื่อรวมรูปแบบทางพันธุกรรมของยีน MSP-1 และ MSP-2 เข้าด้วยกัน ทำให้สามารถจำแนกรูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมได้มากขึ้น ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายของรูปแบบทางพันธุกรรมของยีน MSP-1 และ MSP-2 จึงสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์การติดเชื้อหลายสายพันธุ์ในเวลาเดียวกันและการจำแนกความแตกต่างของการติดเชื้อซ้ำ และการติดเชื้อใหม่ได้

คำสำคัญ: *Plasmodium falciparum*, Merozoite Surface Protein (MSP), genetic polymorphisms

Introduction

Malaria is one of the most important public health problems in several tropical countries including Thailand. Infection with *Plasmodium falciparum* can cause severe morbidity and mortality. In Thailand, malaria disease is endemic throughout the country, with the highest incidence reported from Tak Province (Na-Bangchang and Congpuong 2007). In Mae Sot district of Tak Province, the prevalence of *P. falciparum* and *Plasmodium vivax* infection is approximately equal. Molecular genotyping of genetic markers of antimalarial drug resistance plays an important role as a tool for monitoring the trend of antimalarial drugs resistance. To accurately confirm *P. falciparum* drug resistance, recrudescence and re-infection must initially be discriminated. Merozoite surface protein-1 (MSP-1) of *P. falciparum* is a major surface protein with an approximate molecular size of 190 kDa. MSP-1 exerts a key role in erythrocyte invasion by the merozoite (Holder and Blackman 1994). It is a target of human immune responses (Woehlbier et al. 2006) and a hopeful candidate for a blood stage subunit vaccine (Holder et al. 1999). MSP-2 of *P. falciparum* is another coming candidate antigen for subunit malaria vaccine (Lawrence et al., 2000). The aim of the study was to investigate the genetic diversity of *PfMSP-1* and *PfMSP-2* genes in blood samples collected from 50 patients with uncomplicated *P. falciparum* malaria in Mae Sot district of Thailand.

Methods

Study sites and sample collection

A total of 50 blood samples (1 ml each) were collected from patients attending the malaria clinics in Mae Sot district, Tak province during 2009 to 2010. Approval of the study protocol was obtained from the Ethics Committees of Mae Sot General Hospital, Tak province, Thailand. Two millilitres of blood samples were collected by venipuncture prior to treatment with standard regimens for *P. falciparum* and collected into

ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) collecting tubes. Giemsa-stained thin and thick blood smears were prepared and examined microscopically for *P. falciparum* parasites.

Extraction of parasite genomic DNA

Parasite genomic DNA was extracted from whole blood using Chelex extraction method and used as template for PCR amplification.

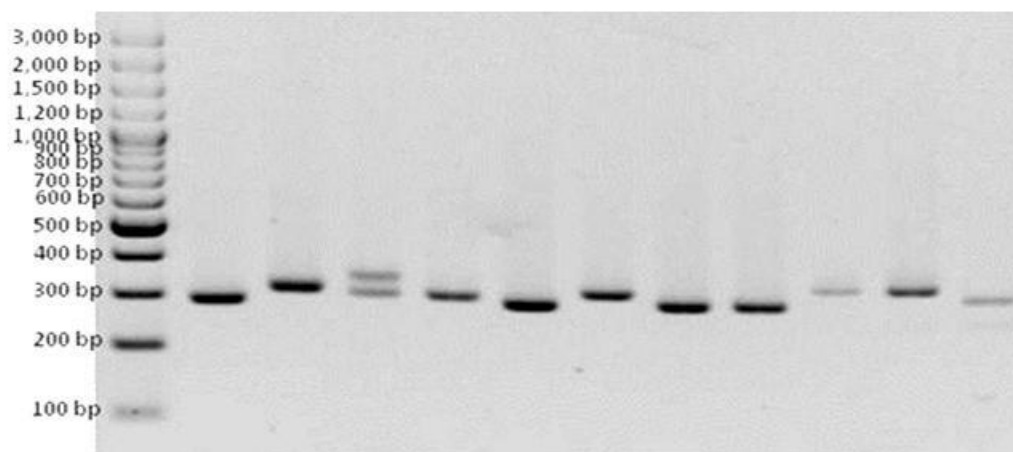
Amplification of *PfMSP-1* and *PfMSP-2*

P. falciparum genotyping was carried out using PCR technique. In the reaction, primer pairs corresponding to the conserved sequences spanning the polymorphic regions composed of forward-5'GAAGATGCAGT ATTGACAGG3' and reverse-5'GAGTTCT TTAATAGTGAACAAG3' for MSP-1 and forward-5'GAGTTCTTTAATAGTGAACA AG3' and reverse-5'CCTGTACCTTTATT CTCTGG3' for MSP-2 (Wooden et al. 1993). The reaction volume was 20 µl containing 1 µM of each of primer, 0.5 U of Taq polymerase, 1x of buffer with KCl (Fermentas, Canada), 2.5 mM of MgCl₂ (Fermentas, Canada), 0.5 mM of dNTP, and DNA template. PCR was performed under 1 cycle of 5 min at 94°C, then 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 50°C, 1 min at 72°C, and final extension at 72°C for 5 min of amplification condition. PCR products were analysed on a 2% agarose gel containing ethidium bromide. The variation in size of the amplified products was observed.

Results

Out of fifty samples, 46 (92%) and 39 (78%) samples were successfully amplified for *PfMSP-1* and *PfMSP-2*, respectively (Figure 1). Both *P. falciparum* genes were highly polymorphic, of which 15 *PfMSP-1* genotypes and 16 *PfMSP-2* genotypes were detected. The dominant polymorphism size detected for *PfMSP-1* and *PfMSP-2* were 310 and 650 bp, respectively. Nine (20%) and three (8%) samples showed multiple clone infections for *PfMSP-1* and *PfMSP-2*, respectively (Table 1).

A



B

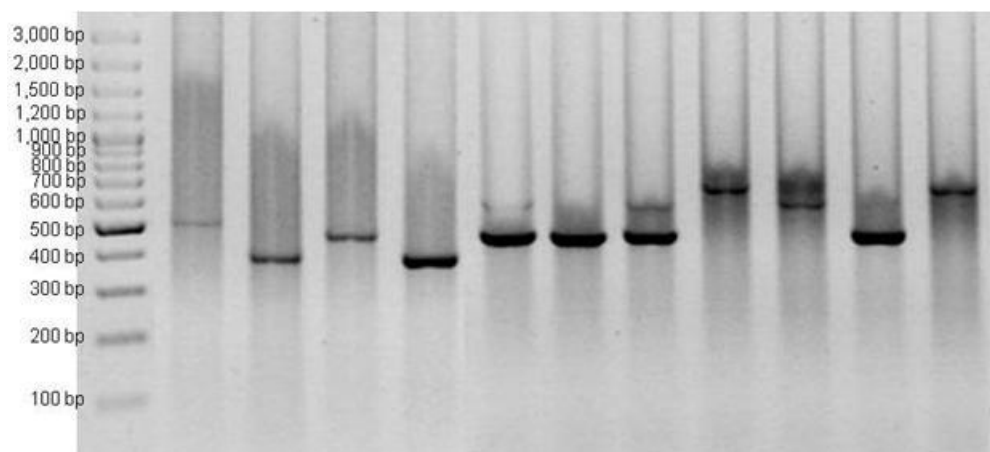


Figure 1 Gel photographs of polymerase chain reaction amplified products of *PfMSP-1* (A) and *PfMSP-2* (B)

Table 1 Summary of polymorphism sizes of *PfMSP-1* and *PfMSP-2* in 50 *P. falciparum* isolates collected from Mae Sot district.

<i>PfMSP-1</i> (n = 46)		<i>PfMSP-2</i> (n = 39)	
polymorphism size (bp)	n	polymorphism size (bp)	N
280	1	450	2
285	1	480	2
290	4	490	2
300	12	500	4
310	14	510	5
315	2	520	1
320	1	590	3
325	1	600	3
330	1	610	1
300/400	1	630	1
310/360	2	650	6
315/370	1	660	1
320/360	3	690	3
325/360	1	700	2
330/380	1	500/520	2
		520/530	1
Total polymorphisms	15		16

Combination of *PfMSP-1* and *PfMSP-2* polymorphisms

The combination of *PfMSP-1* and *PfMSP-2* polymorphism sizes showed higher level of diversity than each individual gene alone. Thirty-two patterns of *PfMSP-1/PfMSP-2* were found (Table 2). The dominant combination was 310/650. A total of seven (18%) samples showed multiple clone infections (Table 2).

Discussion

Several malarial proteins have been proposed as vaccine candidate antigens, but MSP-1 is the most popular (Genton et al. 2003, Reed et al. 2009). Results of the phase 1–2b clinical trial of a MSP-2 based vaccine showed that one allelic type included in the vaccine may be more effective against the parasites (Genton et al.

2002). *P. falciparum* MSP-2, apical membrane antigen-1 (AMA-1) and circumsporozoite protein (CSP) are also under investigation as candidate antigens for the development of malaria vaccine (Collins et al. 1994, Stoute et al. 1997).

The polymorphisms of *PfMSP-1* and *PfMSP-2* of *P. falciparum* isolates have been investigated in isolates collected from several malaria endemic areas (Kang et al. 2010, Khaminsou et al. 2011, Londono-Renteria et al. 2012, Mayengue et al. 2011, Mwingira et al. 2011). All showed the highly polymorphic patterns of these two genes. High level of *PfMSP-1* and *PfMSP-2* polymorphisms and multiple clonal infections were reported in three malaria endemic regions of Lao PDR (Khaminsou et al. 2011). Similarly, sequence analysis of *PfMSP-1* block 2 in *P. falciparum* isolates collected from Myanmar demonstrated

Table 2 Polymorphism sizes of various combination patterns of *PfMSP-1* and *PfMSP-2* observed in 50 *P. falciparum* isolates collected from Mae Sot

<i>PfMSP-1/PfMSP-2</i>				<i>PfMSP-1/PfMSP-2</i>			
Pattern	2 (bp)		<i>n</i>	Pattern	(bp)		<i>N</i>
1	280	700	1	17	310	510	2
2	290	510	1	18	310	590	1
3	290	530	1	19	310	600	2
4	290	590	1	20	310	610	1
5	290	650	2	21	310	650	3
6	300	450	1	22	310	660	1
7	300	480	1	23	310	690	1
8	300	490	2	24	315	500	1
9	300	500	1	25	315	650	1
10	300	510	1	26	310/360	500	1
11	300	590	1	27	310/360	520/530	1
12	300	600	1	28	320/360	500	1
13	300	690	2	29	320/360	500/520	1
14	300	700	1	30	320/360	510	1
15	310	450	1	31	325/360	500/520	1
16	310	480	1	32	330/380	520	1

14 different genotypes (5 for K1 type and 9 for MAD20 type) and *PfMSP-2* block 3 found 22 genotypes (7 for FC27 type and 15 for 3D7 type) (Kang et al. 2010). A recent report from Republic Congo revealed high polymorphisms and multiple clones of *P. falciparum* isolates (Mayengue et al. 2011). Moreover, isolates collected from Malawi, Tanzania, Uganda, Burkina Faso and São Tomé exhibited highly polymorphic and low allele frequencies of *PfMSP-1*, *PfMSP-2* and *glurp*, with a total of 17 *PfMSP-1* genotypes, 116 *PfMSP-2* genotypes and 14 *glurp* genotypes (Mwingira et al. 2011). In contrast, relatively low level of genetic diversity was found in the isolates collected from Haiti (9 *PfMSP-1* genotypes) (Londono-Renteria et al. 2012). Results of the present study confirm the genetic variation of *PfMSP-1* and *PfMSP-2* genes of *P. falciparum* isolates collected from Mae Sot district, the

endemic area of Thailand with highest malaria incidence. Moreover, the combination of *PfMSP-1/PfMSP-2* was relatively more polymorphic, and thus appropriate for the detection of multiple clone infection. The low efficacy of vaccine candidate antigens observed in various clinical trials would be due to the highly variable genetic polymorphisms of *PfMSP-1* and *PfMSP-2* in *P. falciparum* isolates.

Conclusions

PfMSP-1 and *PfMSP-2*, as well as the combination patterns of *PfMSP-1/PfMSP-2* showed marked genetic diversity. The combination of these two polymorphic genes could be used as molecular markers to detect multiple clone infections and differentiate recrudescence from re-infection in *P. falciparum* isolates

in Thailand. This information is useful for treatment and control program of malaria in Thailand.

References

- Collins WE, Pye D, Crewter PE, Vandenberg KL, Galland GG, Sulzer AJ, et al. Protective immunity induced in squirrel monkeys with recombinant apical membrane antigen-1 of *P. fragile*. *Am J Trop Med Hyg.* 1994; 51: 711-9.
- Genton B, Al-Yaman F, Betuela I, Anders RF, Saul A, Baea K, et al. Safety and immunogenicity of a three-component blood-stage malaria vaccine (MSP1, MSP2, RESA) against *Plasmodium falciparum* in Papua New Guinean children. *Vaccine.* 2003; 22:30-41.
- Genton B, Betuela I, Felger I, Al-Yaman F, Anders AF, Saul A, et al. A recombinant blood stage vaccine reduced *P. falciparum* density and exerts selective pressure on parasite population in Phase 1-2b trial in Papua New Guinea. *J Infect Dis.* 2002; 85: 820-7.
- Holder AA, Blackman MJ. What is the function of MSP-1 on the malaria merozoite. *Parasitol Today.* 1994; 10:182-184.
- Holder AA, Guevara Patiño JA, Uthaipibull C, Syed SE, Ling IT, Scott-Finnigan T, et al. Merozoite surface protein 1, immune evasion, and vaccines against asexual blood stage malaria. *Parassitologia.* 1999; 41:409-414.
- Kang JM, Moon SU, Kim JY, Cho SH, Lin K, Sohn WM, et al. Genetic polymorphism of merozoite surface protein-1 and merozoite surface protein-2 in *Plasmodium falciparum* field isolates from Myanmar. *Malar J.* 2010;9:131.
- Khaminsou N, Kritpetcharat O, Daduang J, Charerntanyarak L, Kritpetcharat P. Genetic analysis of the merozoite surface protein-1 block 2 allelic types in *Plasmodium falciparum* clinical isolates from Lao PDR. *Malar J.* 2011;10(1):371.
- Lawrence G, Cheng QQ, Reed C, Taylor D, Stowers A, Cloonan N, et al. Effect of vaccination with 3 recombinant asexual-stage malaria antigens on initial growth rates of *Plasmodium falciparum* in nonimmune volunteers. *Vaccine.* 2000; 18:1925-1931.
- Londono-Renteria B, Eisele TP, Keating J, Bennett A, Krogstad DJ. Genetic diversity in the merozoite surface protein 1 and 2 genes of *Plasmodium falciparum* from the Artibonite Valley of Haiti. *Acta Trop.* 2012;121(1):6-12.
- Mayengue PI, Ndounga M, Malonga FV, Bitemo M, Ntoumi F. Genetic polymorphism of merozoite surface protein-1 and merozoite surface protein-2 in *Plasmodium falciparum* isolates from Brazzaville, Republic of Congo. *Malar J.* 2011;10:276.
- Mwingira F, Nkwengulila G, Schoepflin S, Sumari D, Beck HP, Snounou G, et al. *Plasmodium falciparum* msp1, msp2 and glurp allele frequency and diversity in sub-Saharan Africa. *Malar J.* 2011;10:79.
- Na-Bangchang K, Congpuong K. Current malaria status and distribution of drug resistance in East and Southeast Asia with special focus to Thailand. *Tohoku J Exp Med.* 2007;211: 99-113.
- Reed ZH, Kieny MP, Engers H, Friede M, Chang S, Longacre S, et al. Comparison of immunogenicity of five MSP1-based malaria vaccine candidate antigens in rabbits. *Vaccine.* 2009; 27:1651-1660.
- Stoute JA, Slaoui M, Heppner DG, Momin P, Kester KE, Desmons P, et al. A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. *New Eng J Med.* 1997; 336: 86-91.
- Woehlbier U, Epp C, Kauth CW, Lutz R, Long CA, Coulibaly B, et al. Analysis of antibodies directed against merozoite surface protein 1 of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun.* 2006; 74:1313-1322.
- Wooden J, Kyes S, Sibley CH. PCR and strain identification in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today.* 1993; 9:303-305.

RESEARCH ARTICLE

Preliminary Investigation of *In vitro* and *In vivo* Antimalarial Activity of the Ethanolic Extract of *Garcinia mangostana* Linn. (Mangosteen)

Ratchanu Bunyong¹, Vithoon Viyanant¹, Wanna Chaijoenkul¹, Kesara Na –Bangchang¹

¹Thailand Center of Excellence on Drug Discovery and Development (TCEDD), Thammasat

Abstract

Garcinia mangostana Linn., commonly known as mangosteen, is a tropical fruit tree belonging to the family Clusiaceae (Guttiferae). Several parts of this plant have been used for traditional medicine, especially pericarp of mangosteen. The aim of this study was to evaluate antimalarial activity of the crude ethanolic extract of pericarp of *Garcinia mangostana* Linn. The finger print of the crude ethanolic extract and content of the marker compound. The α -mangosteen (32.9%) was analyzed by HPLC. Antimalarial activity of the crude ethanolic extract was evaluated *in vitro* against 3D7 (chloroquine-sensitive) and K1 (chloroquine resistant) *Plasmodium falciparum* clones. The crude ethanolic extract of pericarp of *Garcinia mangostana* Linn. exhibited moderate antimalarial activity with IC₅₀ values of 10.94 and 7.54 μ g/ml against 3D7 and K1 clones, respectively. It exhibited promising antimalarial activity with safety profile in acute and subacute toxicity tests in mice. The crude ethanolic extract of pericarp of *Garcinia mangostana* Linn. at the dose of 250 mg/kg produced maximal activity.

Key Words *Garcinia mangostana* Linn, pericarp mangosteen, *Plasmodium falciparum*, antimalarial activity

การศึกษาเบื้องต้นสารสกัดจากเปลือกมังคุดด้วยเอทานอลต่อฤทธิ์การต้านเชื้อ มาลาเรียในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง

รัชบุ บุญยงค์¹, วิฑูรย์ ไวยนันท์¹, วรรณ ชัยเจริญกุล¹, เกศรา ณ บางช้าง¹

¹ศูนย์ความเป็นเลิศทางด้านการวิจัย คั่นคว่ำ และพัฒนยาแห่งประเทศไทย
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต) ปทุมธานี ประเทศไทย

บทคัดย่อ

Garcinia mangostana Linn. เป็นที่รู้จักกันในชื่อมังคุด เป็นผลไม้เขตร้อนอยู่ในแฟมิลี Clusiaceae (Guttiferae) ส่วนต่างๆของมังคุดสามารถใช้เป็นยาสมุนไพรโดยเฉพาะอย่างยิ่งเปลือกมังคุด เป้าหมายของการวิจัยนี้ คือทดสอบสารสกัดจากเปลือกมังคุดด้วยเอทานอลต่อฤทธิ์การต้านเชื้อมาลาเรีย finger print ของสารสกัดจากเปลือกมังคุดด้วยเอทานอลและส่วนประกอบถูกวิเคราะห์โดยใช้ α -mangosteen เป็น marker ซึ่งมี 32.9% ด้วยวิธี HPLC ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียของสารสกัดจากเปลือกมังคุดด้วยเอทานอลกับเชื้อมาลาเรียชนิดพีลชีพาร์มสายพันธุ์ 3D7 และ K1 ในหลอดทดลองพบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกมังคุดด้วยเอทานอลที่สามารถยับยั้งเชื้อมาลาเรีย 50% เท่ากับ 10.94 และ 7.54 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมตามลำดับ การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันและกึ่งเฉียบพลันในหนูถีบจักร การ ทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อมาลาเรียของสารสกัดจากเปลือกมังคุดด้วยเอทานอล พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อมาลาเรียที่ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในระดับปานกลาง

คำสำคัญ: *Garcinia mangostana* Linn, เปลือกมังคุด, เชื้อมาลาเรียชนิดพีลชีพาร์ม, ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย

Introduction

Malaria is a mosquito-borne infectious disease which is an important public health problem in tropical and subtropical regions of the world. Major problem which limits the control of the disease is the emergence and spread of multidrug resistant *Plasmodium falciparum*. Research and development for new promising antimalarials from different sources including natural products is urgently needed.

Garcinia mangostana Linn., commonly known as mangosteen, is a tropical fruit tree belonging to the family Clusiaceae (Guttiferae). The fruit pericarp has long been used in traditional medicine for treatment of abdominal pain, diarrhea, dysentery, infected wound, suppuration, chronic ulcer catarrh, cystitis, eczema, fever, intestinal ailments, pruritis and other skin infection (Mahabusarakam *et al.*, 1987; Martin, 1980). Several biological and pharmacological activities of several compounds isolated from mangosteen pericarp which its crude extracts have been extensively investigated (Chen *et al.*, 1996). In the present study, we investigated preliminarily the *in vitro* and *in vivo* antimalarial activity of the crude ethanolic extract of the pericarp of *G. mangostana* Linn.

Materials and methods

Plants materials and preparation of crude extracts

Mangosteen fruits were collected from market on September. Mangosteen fruits will rinsed thoroughly with tap water. The pericarps were separated, cut into small pieces, oven dried at 45 °C, and then ground into powder with pestle and mortar. Extraction was carried out by macerating the powder plant materials (100 g) in flasks containing 500 ml of 95% ethanol at room temperature (25-30 °C) for 7 days. The extraction solvent was separated and filtered through Whatman no.1 filter paper, evaporated under reduced pressure by rotary evaporation. The crude ethanolic extract of mangosteen's pericarp was weighed and stored at -20 °C until used. The finger print of the crude extract and

content of the marker compound α -mangosteen was analysed by HPLC. The yields of crude extract was about 10.6% (w/w), of which 32.9% (w/w) were α -mangosteen.

Assessment of antimalarial activity in vitro

3D7 (chloroquine sensitive) and K1 (chloroquine resistant) *Plasmodium falciparum* clones were cultivated and maintained in O+ human erythrocytes suspended in RPMI 1640 culture medium (at 37 °C under a gas mixture of 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂) according to the method described by Trager and Jensen (Trager and Jensen, 1976). Parasite suspension was treated with 5% sorbitol to obtain the ring stage of *P. falciparum* (Lambros and Vanderberg, 1979).

The crude ethanolic extract of *G. mangostana* Linn. (pericarp) was screened for antimalarial activity against 3D7 and K1 *P. falciparum* clones using SYBR Green I based assay (Bennett *et al.*, 2004). The assay was performed using parasite suspension with 2% parasitaemia and 1% haematocrit. Fifty percent inhibitory concentration (IC₅₀) values were determined by dose effect analysis (CalcuSyn™ Software). The antimalarial dihydroartemisinin was used as a positive control drug.

Assessment of antimalarial activity in vivo

Animals: Swiss mice (5-7 weeks of age, weighing 25-30 g) of either sex were obtained from National Laboratory Animal Centre, Thailand. Animal experiments were carried out in accordance with the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health publication number 85-23). The animal was housed under standard conditions and fed with a stock diet and water *ad libitum*.

Toxicity tests: All mice were refrained from water and food 2 h before oral administration of each dose of the crude extract. For acute toxicity test, crude extract at a single dose of 5,000 mg/kg body weight was given orally by intragastric gavage to six mice (3 males, 3

females). For subacute toxicity test, the extract at the dose of 1,000 mg/kg body weight was given orally by intragastric gavage to six mice (3 males, 3 females) for 14 days. General behavior or any sign of toxicity including vital signs and body weight were recorded over a period of 24 h for up to 14 days (Twaij *et al.*, 1983).

Antimalarial activity testing: ANKA strain *P. berghei* (obtained from The National Science and Technology Development Agency, Thailand: NSTDA) was used to assess *in vivo* antimalarial activity of the crude ethanolic extract of pericarp of *G. mangostana* Linn. using a 4-day suppressive test (Peters *et al.*, 1975). The rodent malaria parasites were maintained by serial blood passage in mice and parasite blood stage was store at -196 °C in a liquid nitrogen tank until use.

The infected blood was collected from each donor mouse by cardiac puncture and diluted with 0.9% NaCl. *P. berghei* infected erythrocytes in a saline suspension (0.2 ml) at the density of 1×10^7 erythrocyte parasites were injected by intraperitoneal route to 30 mice (15 males and 15 females). Mice were allocated to five groups (3 males and 3 females for each group) mice to receive intraperitoneal injection of the extract at the dose of 500, or 250, or 100 mg/kg for 4 days. The vehicle control group received Tween 80, whereas the positive control group received oral chloroquine diphosphate at the dose of 10 mg/kg/day for

4 days. Blood samples were collected from the tail of each mouse daily for 4 days, stained with 10% Giemsa in pH 7.2 phosphate buffer and examined microscopically for assessment of parasitaemia. The mean parasitaemia on day 4 of treatment in each group was used to calculate the % chemosuppression for each dose using the formula: $[(A-B)/A] \times 100$, where A is the mean parasitaemia in the negative control and B is the parasitaemia in the test group. The antimalarial activity of the crude extract was determined from % reduction of parasitaemia in the tested groups compared with untreated infected mice. Survival time in days was also recorded.

Results

Antimalarial activity of the crude extract in vitro

The IC_{50} of *G. mangostana* Linn. against 3D7 and K1 *P. falciparum* clones *in vitro* were 11.12 µg/ml (moderate activity) and 7.54 µg/ml (high activity), respectively.

Toxicity test

Swiss mice administered the crude extract at a single dose of 5,000 mg/kg (acute toxicity test) or 1,000 mg/kg for 14 days (subacute toxicity test) showed no sign of toxicity during the observation period of 14 days.

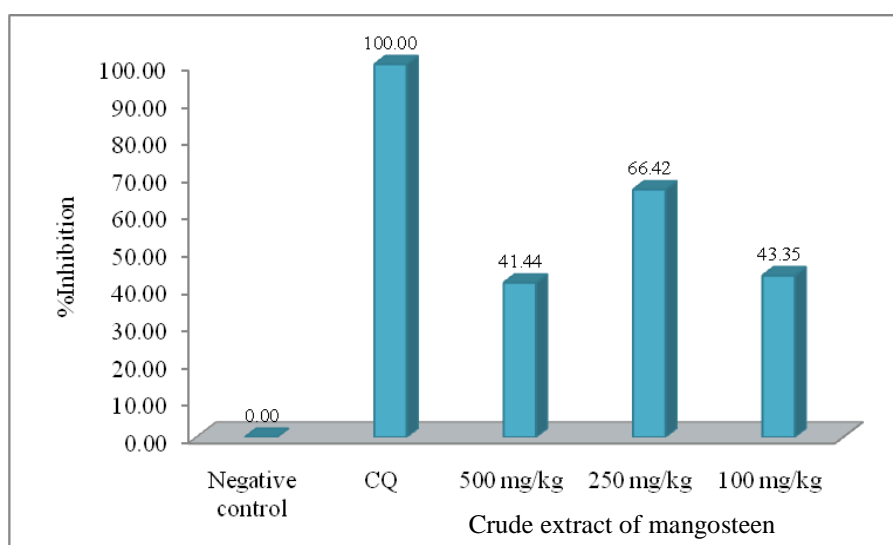


Figure 1 Percent inhibition of parasitemia in mice each group

Antimalarial activity *in vivo*

Inhibition of parasitaemia (%) and parasitaemia (%) following a 4-day dose of 500, 250 and 100 mg/kg were 41.44 vs 3.3 %, 66.42 vs 1.89 %, and 43.35 vs 3.19 %, respectively (Figure 1). Complete inhibition of parasitaemia (100% inhibition, 0% parasitaemia) was observed in the group treated with chloroquine. No significant inhibition of parasitaemia was observed in mice treated with Tween-80. Parasite density in the untreated control group was 5.64%.

Discussion and Conclusion

The crude ethanolic extract of the pericarp of *G. mangostana* Linn. exhibited moderate and high *in vitro* antimalarial activity against CQ-sensitive (3D7) and CQ-resistant (K1) *P. falciparum* clones, respectively. Several xanthenes isolated from *G. mangostana* Linn. have shown antimalarial activity *in vitro* against *Plasmodium falciparum*. β -mangostin and α -mangostin exhibited a comparable IC_{50}

value (7 and 5.1 μ M, respectively). In the other hand, Mahabusarakam *et al.* found that α -mangostin exhibited an IC_{50} value of 17 μ M against *P. falciparum* (Mahabusarakam *et al.*, 2006). Its *in vivo* antimalarial activity was moderate. The results for *in vivo* antimalarial activity do not necessarily correlate with those for *in vitro* antimalarial activity as reported by Gessler *et al.* (Gessler *et al.*, 1995). The crude ethanolic extract was well tolerated for both in the acute and subacute toxicity tests. The study is underway to assess the optimal dose of the crude ethanolic extract with potent antimalarial activity (100% inhibition) and condition experiments.

Acknowledgements

The study was supported by Office of the Higher Education Commission (RG and NRU Projects), Ministry of Education of Thailand, the National Research University Project of Thailand (NRU), and the National Science and Technology Development Agency (NSTDA).

References

- Bennett T, Paguio M, Gligorijevic B *et al.* Novel, rapid, and inexpensive cell based qualification of antimalarial drug efficacy. *Antimicrob Agent Chemother* 2004; 48: 1807-10.
- Chen S, Wan M, Loh B. Active constituents against HIV-1 protease from *Garcinia mangostana*. *Planta Med* 62: 381-382 1996; 62: 381-2.
- Gessler M, Tanner M, Chollet J, Nkunya M, Heinrich M. Tanzanian medicinal plants used traditionally for the treatment of malaria: *In vivo* antimalarial and *in vitro* cytotoxic activities. *Phytother Res* 1995; 9: 504-8.
- Lambros C, Vanderberg J. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stage in culture. *J Parasitol* 1979; 65: 418-20.
- Mahabusarakam W, Kuaha K, Wilairat P, Taylor W. Prenylated xanthenes as potential antiplasmodial substances. *Planta Med* 2006; 72: 912-6.
- Mahabusarakam W, Wiriyachitra P, Taylor W. Chemical constituents of *Garcinia mangostana*. *J Nat Prod* 1987; 50: 474-8.
- Martin F. Durian and mangosteen. *Tropical and subtropical fruits* 1980; 407-14.
- Peters W, Portus J, Robinson B. The chemotherapy of rodent malaria, XXII The value of drug-resistant strains of *P. berghei* in screening for blood schizontocidal activity. *Ann Trop Med Parasitol* 1975; 69: 155-71.
- Trager W, Jensen J. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976; 193: 673-5.
- Twaij H, Kery A, Khazraji N. Some pharmacological, toxicological and phytochemical investigations on *Centaurea phyllocephala*. *J Ethnopharmacol* 1983; 9: 299-3214.

RESEARCH ARTICLE

Effect of *Phyllanthus amarus* Aqueous Extract on Human CYP3A4 Activity in HepG2 Cells**Kridsada Anuntawuttikul¹, Sureerut Porntadavity², Pornpen Pramyothin¹, Somsong Lawanprasert¹**¹*Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Thailand*²*Department of Clinical Chemistry, Faculty of Medical Technology, Mahidol University, Thailand***Abstract**

Phyllanthus amarus Schum. & Thonn. has been used in traditional medicine for treatment of diverse conditions. Various pharmacological effects of its extracts have been reported such as hepatoprotective, antioxidant, anti-inflammatory, antiviral and anticarcinogenic activities. However, safety data regarding herb-drug interaction of this plant is still marginally reported. Drug interaction issue is one of the major concerns in drug utilization since it may cause therapeutic failure or serious adverse reaction of co-administered medicines. The purpose of this study was to investigate effect of *P. amarus* aqueous extract on human cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) activity in hepatoma HepG2 cells. Cytotoxicity of *P. amarus* aqueous extract was determined by MTT assay. The result showed that the extract reduced percent cell viability of HepG2 cells with IC₅₀ values of 3.69, 1.76 and 1.24 mg/ml for the incubation periods of 24, 48 and 72 hours, respectively. The extract at concentration of 0.5 mg/ml significantly increased CYP3A4 activity in a time-dependent manner. As compared to the control, CYP3A4 activity was enhanced by 1.64, 2.07 and 2.43 fold following incubation with the extract for 24, 48 and 72 hours, respectively. The inductive effect of the extract found in this study provides an information of herb-drug interaction potential, thus further study in vivo is suggested.

Key Words cytochrome P450 3A4, HepG2 cells, Herb-drug interaction, *Phyllanthus amarus*

ผลของสารสกัดลูกใต้ใบด้วยน้ำต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 3 เอ 4 ของมนุษย์ในเซลล์เพาะเลี้ยง HepG2

กฤษดา อนันตวุฒิกุล¹, สุรวิรัตน์ พรธาดาวิทย, พรเพ็ญ เปรมโยธิน¹, สมทรง ลาวัญย์ประเสริฐ¹

¹ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย

²ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศไทย

บทคัดย่อ

ลูกใต้ใบเป็นสมุนไพรที่มีการใช้ในการแพทย์แผนโบราณในการรักษาภาวะต่างๆอย่างแพร่หลาย มีรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดลูกใต้ใบ ได้แก่ ฤทธิ์ป้องกันความเป็นพิษต่อตับ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านไวรัส และฤทธิ์ต้านการก่อมะเร็ง เป็นต้น อย่างไรก็ตามข้อมูลความปลอดภัยของลูกใต้ใบที่เกี่ยวข้องกับอันตรกิริยาระหว่างสมุนไพรกับยายังมีจำกัด การเกิดอันตรกิริยาระหว่างยามีความสำคัญเนื่องจากอาจมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการรักษาของยาลดลง หรือเกิดอาการไม่พึงประสงค์ขึ้นได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดลูกใต้ใบด้วยน้ำต่อสมรรถนะของเอนไซม์ ไซโตโครมพี 450 3 เอ 4 (CYP3A4) ของมนุษย์ ในเซลล์เพาะเลี้ยงเฮปจี 2 จากการศึกษาความเป็นพิษโดย MTT assay พบว่าสารสกัดลดการมีชีวิตรอดของเซลล์ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.69, 1.76 และ 1.24 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อบ่มเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ จากการศึกษาผลต่อสมรรถนะเอนไซม์ CYP3A4 พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีผลเพิ่มสมรรถนะของเอนไซม์ CYP3A4 ในลักษณะที่ขึ้นกับเวลา โดยเพิ่มสมรรถนะเป็น 1.64, 2.07 และ 2.43 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม หลังจากการบ่มเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ ผลเหินยวนำของสารสกัดในการศึกษานี้บ่งชี้ถึงแนวโน้มในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสมุนไพรกับยา จึงควรทำการศึกษาแบบในกายต่อไป

คำสำคัญ: ไซโตโครมพี 450 3 เอ 4, เซลล์เพาะเลี้ยงเฮปจี 2, อันตรกิริยาระหว่างสมุนไพรกับยาลูกใต้ใบ

Introduction

Drug interaction is one of the major concerns in drug utilization since it can either affect therapeutic efficacy or safety of concomitant medicines particularly of those with narrow therapeutic index. One of the most common mechanisms of drug interaction is the interfering with drug metabolizing enzymes especially with CYP3A4, which is responsible for the metabolism of approximately 60% of clinically used medicines (Chen and Raymond 2006). As a result, the potentials of CYP3A4 induction or inhibition are required to be investigated in the research and development process. *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. (Euphorbiaceae), also known as “Luk Tai Bai”, has been traditionally used as the herbal medicines for various conditions particularly for the treatment of jaundice and other symptoms of liver diseases. Several pharmacological effects of its extracts have been previously reported including hepatoprotective (Wongnawa et al. 2006, Pramyothin et al. 2007), antioxidant (Wongnawa et al. 2006), anti-inflammatory (Kassuya et al. 2003), antiviral (Notka et al. 2004) and anticarcinogenic (Rajeshkumar et al. 2002) activities.

Previous studies demonstrated the inhibitory effect of *P. amarus* extracts on various CYPs including CYP3A4 (Kumar and Kuttan 2006, Appiah-Opong et al. 2008, Taesotikul et al. 2011). Inductive effect of this plant extract has not yet been reported. Recent studies have shown the ability of some flavonoids, lignans and tannins, which can also be classified as polyphenols, in the activation of pregnane X receptor (PXR) and constitutive androstane receptor (CAR), the commonly known transcription factors involved in CYP3A4 gene expression (Jacobs et al. 2005, Kluth et al. 2007, Dong et al. 2010, Yao et al. 2010). It has been found that *P. amarus* extracts are composed of various components, including numerous kinds of polyphenolic compounds, which may have different effects on CYP3A4 activity and gene expression. Thus, the overall outcome can be either inhibition, induction or no significant change according to the

combination of their effects on CYP3A4 which cannot be simply predicted. Therefore, this study aimed to determine the effect of *P. amarus* aqueous extract on CYP3A4 activity using HepG2, the human liver carcinoma, cells.

Materials and methods

Plant Material

The aqueous extract of *P. amarus* was kindly provided by Assoc. Prof. Dr. Pornpen Pramyothin, Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University. The preparation procedure of *P. amarus* aqueous extract and the determination of its hepatoprotective activity were previously described (Pramyothin et al. 2007).

Cell culture

HepG2 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagles medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

MTT assay

MTT assay was performed to determine the cytotoxicity of *P. amarus* aqueous extract on HepG2 cells so as to obtain the optimal concentration for subsequent experiments. Cells were cultured in 96-well plates and treated with various concentrations of *P. amarus* aqueous extract (0.001-5 mg/ml) for 24, 48 and 72 hours. After treatment, cells were incubated with medium containing 0.5 mg/ml MTT at 37°C for 2 hours. The remaining formazan crystal was dissolved in DMSO and the optical density at 570 nm was measured using a microplate reader (DTX 800 multimode detector, Beckman Coulter, USA). Three independent experiments were performed in triplicates of each. Median inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated by plotting log of concentrations of *P. amarus* aqueous extract versus the corresponding probit unit of the percent inhibition.

Percentage of cell viability was calculated by using the following equation.

$$\% \text{ cell viability} = \frac{\text{Test compound treated values}}{\text{Control (untreated) values}} \times 100$$

Determination of CYP3A4 activity in HepG2 cells

CYP3A4 activity was determined using P450-Glo™ CYP3A4 Assay containing Luciferin IPA (Promega, USA). In brief, HepG2 cells were cultured in 24-well plates and treated with *P. amarus* aqueous extract (0.05, 0.1 and 0.5 mg/ml) for 24, 48 and 72 hours. After treatment, cells were incubated with the medium containing 3 µM Luciferin IPA at 37°C for 2 hours. Then, 100 µl of medium from each well was transferred to a 96-well opaque white plate and mixed with 100 µl of Luciferin Detection Reagent at room temperature. Luminescence was measured using a microplate reader (DTX 800 multimode detector, Beckman Coulter, USA). Background subtracted luminescence values were normalized to cell number by dividing the P450-Glo™ Assay values by the CellTiter-Glo® Assay (Promega, USA) values. Dexamethasone was used as the positive control for CYP3A4 induction. Three independent experiments were performed in triplicates of each.

Statistical analysis

Results were expressed as mean ± S.E.M. Statistical analysis was performed using the SPSS version 16.0 for windows software. Mean difference among groups in MTT assay and between the control and treatment groups in CYP3A4 activity assay were examined using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test and Student's independent t-test, respectively. *P*-value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

P. amarus aqueous extract exhibited significant cytotoxicity on HepG2 cells at concentrations of 1, 2.5 and 5 mg/ml in a time- and concentration-dependent manner (Figure 1). The extract caused the reduction of cell viability with IC₅₀ values of 3.69, 1.76 and 1.24 mg/ml for the incubation times of 24, 48 and 72 hours, respectively (Figure 2, 3 and 4).

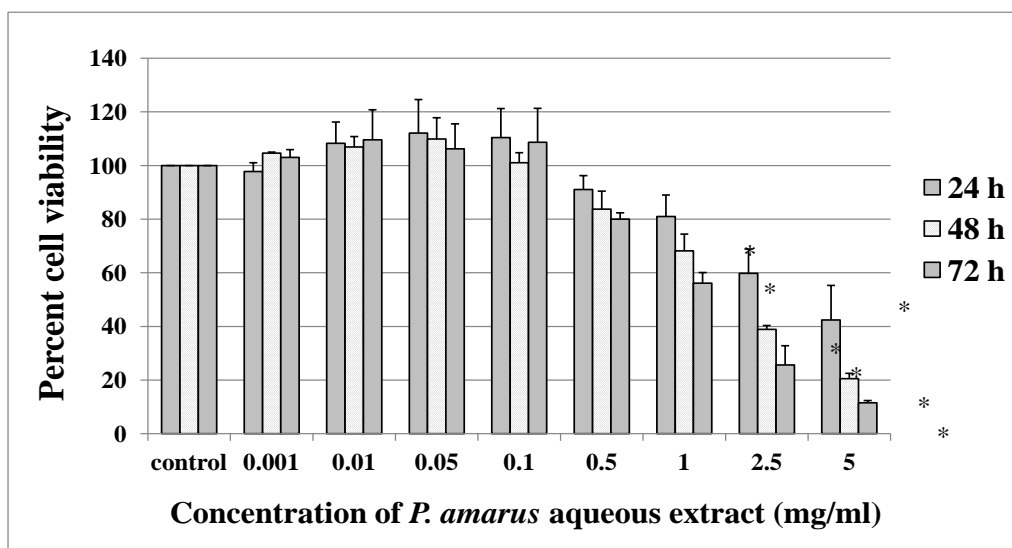


Figure 1 Effect of *P. amarus* aqueous extract on HepG2 cell viability as determined by MTT assay after 24, 48 and 72 hours of incubation. Data are expressed as mean ± S.E.M. (n=3). * Significant difference from the control (*P* < 0.05)

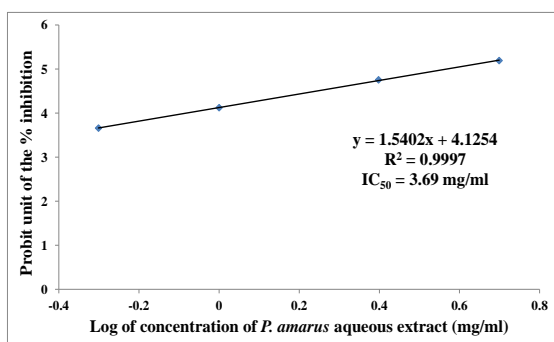


Figure 2 Cytotoxicity of *P. amarus* aqueous extract on HepG2 cells after 24 hours of incubation

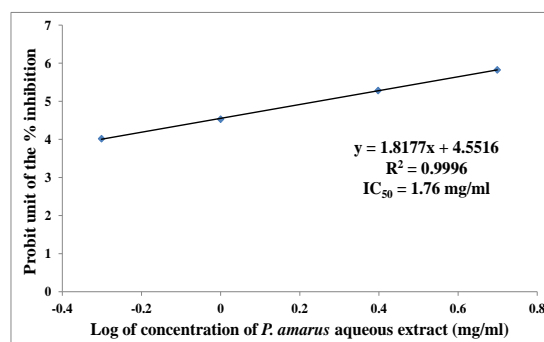


Figure 3 Cytotoxicity of *P. amarus* aqueous extract on HepG2 cells after 48 hours of incubation

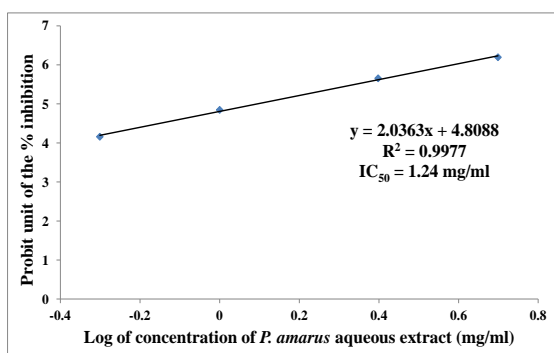


Figure 4 Cytotoxicity of *P. amarus* aqueous extract on HepG2 cells after 72 hours of incubation

Effects of *P. amarus* aqueous extract and dexamethasone on CYP3A4 activity are shown in Figure 5. Dexamethasone (50 μ M) markedly increased CYP3A4 activity by approximately 2.33, 2.56 and 2.46 fold after incubation for 24, 48 and 72 hours, respectively. *P. amarus* aqueous extract at the concentration of 0.5 mg/ml increased CYP3A4 activity by 1.64, 2.07 and 2.43 fold as compared to the control following incubation for 24, 48 and 72 hours, respectively, while the lower concentrations of the extract did not show significant induction.

Discussion

In this study, effect of *P. amarus* aqueous extract on CYP3A4 activity was examined in HepG2 cells. The concentration of the extract used (0.05-0.5 mg/ml) did not significantly affect cell viability as determined by MTT assay. It was found that the extract at concentration of 0.5 mg/ml significantly increased CYP3A4 activity in a time-dependent manner. Previously, several phytochemical compounds have been reported to possess CYP3A4 induction potential. The results from gene reporter assay studies compounds have demonstrated that some

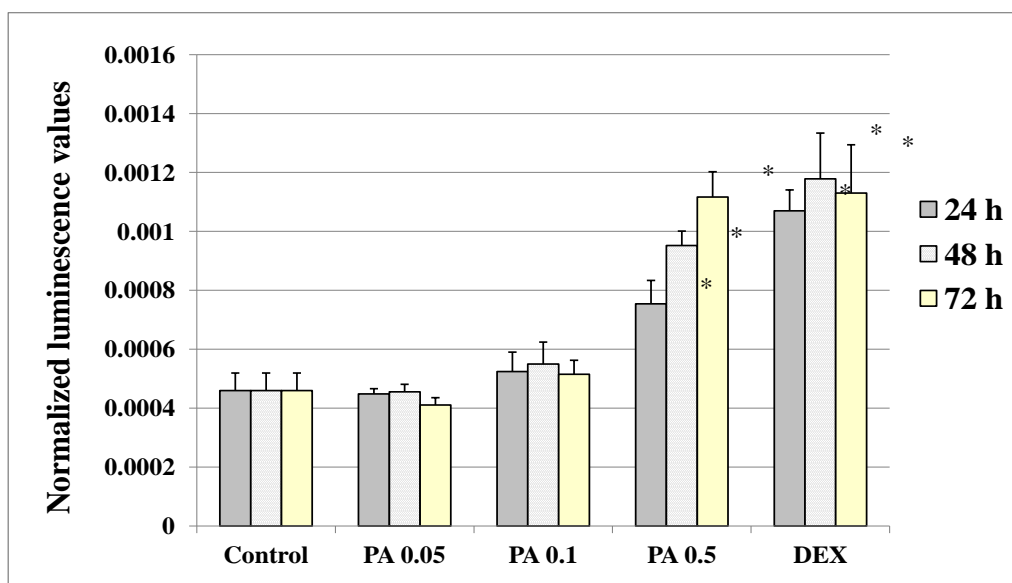


Figure 5 Effect of *P. amarus* aqueous extract (0.05, 0.1 and 0.5 mg/ml) on CYP3A4 activity in HepG2 cells after 24, 48 and 72 hours of incubation (PA = *P. amarus* aqueous extract, DEX = 50 μ M dexamethasone). Data are expressed as mean \pm S.E.M. (n=3). * Significant difference from the control ($P < 0.05$)

polyphenolic capability to activate CYP3A4 promoter, PXR and CAR (Jacobs et al. 2005, Kluth et al. 2007, Dong et al. 2010, Yao et al. 2010). Among these reported compounds, quercetin, a flavonoid which is also presented in *P. amarus*, was found to enhance CYP3A4 promoter activity (Kluth et al. 2007). Previous reports described the possible mechanisms of various kinases including protein kinase A (PKA), protein kinase C (PKC), cyclin-dependent kinases (Cdks) and 70 kDa form of ribosomal protein S6 kinase (p70 S6K) in the repression of PXR-mediated CYP3A4 Expression (Pondugula et al. 2009, Dong et al. 2010). Some flavonoids were reported to activate PXR by inhibition of Cdks (Dong et al. 2010). Moreover, a number of hydrolysable tannins isolated from *P. amarus* were found to be potent inhibitors of protein kinases (Polya et al. 1995). These previous findings may partly explain the increase of CYP3A4 activity by *P. amarus* aqueous extract observed in this study. Further *in vivo* study should be conducted to confirm these *in vitro* findings

since the observed concentration that significantly induced CYP3A4 was rather high. On the other hand, the extract at lower concentrations might reveal its inductive effect when it is applied chronically.

Conclusion

This study demonstrated that *P. amarus* aqueous extract increased CYP3A4 activity *in vitro* using HepG2 cells. The inductive effect of the extract found in this study provides an information of herb-drug interaction potential, thus further study *in vivo* is suggested.

Acknowledgement

This study was partly supported by a grant from the Graduate School, Chulalongkorn University (C.U. GRADUATE SCHOOL THESIS GRANT).

References

- Appiah-Opong R, Commandeur JNM, Axson C, Vermeulen NPE. Interactions between cytochromes P450, glutathione S-transferases and Ghanaian medicinal plants. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46:3598-603.
- Chen J, Raymond K. The role of CYP3A4 and p-glycoprotein in food-drug and herb-drug interactions. *Aust Pharmacist.* 2006; 25(9):732-8.
- Dong H, Lin W, Wu J, Chen T. Flavonoids activate pregnane X receptor-mediated CYP3A4 gene expression by inhibiting cyclin-dependent kinases in HepG2 liver carcinoma cells. *BMC Biochem.* 2010; 11(23).
- Jacobs MN, Nolan GT, Hood SR. Lignans, bacteriocides and organochlorine compounds activate the human pregnane X receptor (PXR). *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005; 209:123-33.
- Kassuya CAL, Silvestre AA, Rehder VLG, Calixto JB. Anti-allodynic and anti-oedematogenic properties of the extract and lignans from *Phyllanthus amarus* in models of persistent inflammatory and neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* 2003; 478:145-53.
- Kluth D, Banning A, Paur I, Blomhoff R, Brigelius-Flohe R. Modulation of pregnane X receptor-and electrophile responsive element-mediated gene expression by dietary polyphenolic compounds. *Free Radic Biol Med.* 2007; 42:315-25.
- Kumar KBH, Kuttan R. Inhibition of drug metabolizing enzymes (cytochrome P450) *in vitro* as well as *in vivo* by *Phyllanthus amarus* SCHUM & THONN. *Biol Pharm Bull.* 2006; 29(7):1310-3.
- Notka F, Meier GR, Wagner R. Concerted inhibitory activities of *Phyllanthus amarus* on HIV replication *in vitro* and *ex vivo*. *Antiviral Res.* 2004; 64:93-102.
- Polya GM, Wang BH, Foo LY. Inhibition of signal-regulated protein kinases by plant-derived hydrolysable tannins. *Phytochemistry.* 1995; 38(2):307-14.
- Pondugula S, Dong H, Chen T. Phosphorylation and protein-protein interactions in PXR-mediated CYP3A repression. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2009; 5(8):861-73.
- Pramyothin P, Ngamtin C, Pongshompoo S, Chaichantipyuth C. Hepatoprotective activity of *Phyllanthus amarus* Schum. et. Thonn. extract in ethanol treated rats: *In vitro* and *in vivo* studies. *J Ethnopharmacol.* 2007; 114:169-73.
- Rajeshkumar NV, Joy KL, Kuttan G, Ramsewak RS, Nair MG, Kuttan R. Antitumour and anticarcinogenic activity of *Phyllanthus amarus* extract. *J Ethnopharmacol.* 2002; 81:17-22.
- Taesotikul T, Dumrongsakulchai W, Wattanachai N, Navinpipat V, Somanabandhu A, Tassaneeyakul W, et al. Inhibitory effects of *Phyllanthus amarus* and its major lignans on human microsomal cytochrome P450 activities: Evidence for CYP3A4 mechanism-based inhibition. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2011; 26(2):154-61.
- Wongnawa M, Thaina P, Bumrungwong N, Rattanapirun P, Nitiruangjaras A, Muso A, et al. The protective potential and possible mechanism of *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. aqueous extract on paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. *Songklanakarin J Sci Technol.* 2006; 28(3):551-61.
- Yao R, Yasuoka A, Kamei A, Kitagawa Y, Tateishi N, Tsuruoka N, et al. Dietary flavonoids activate the constitutive androstane receptor (CAR). *J Agric Food Chem.* 2010; 58:2168-73.

RESEARCH ARTICLE

Inhibition of Human CYP1A2 and CYP3A4 Activities by Thai Medicinal Plants with Promising Antimalarial Activity**Wiriaporn Sumsakul¹, Vithoon Viyanant¹, Wiratchanee Mahavorasirikul¹, Anurak Cheoymong¹, Wichitra Tassaneeyakul², Kesara Na-Bangchang¹**¹ Thailand Center of Excellence on Drug Discovery and Development (TCEDDD), Thammasat University, Pathumthani, Thailand² Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand**Abstract**

The constituents in medical plants or herbal formulations may interfere with human liver drug metabolizing enzyme particularly cytochrome P450s (CYPs). This interaction may result in toxicity when co-administered these plants with some certain drug that are metabolized by the same CYP isozyme. The aim of this study was to investigate the propensity to inhibit CYP1A2 and CYP3A4 mediated hepatic drug metabolism of the crude ethanolic extracts of the seven Thai medicinal plants/herbal formulation with promising antimalarial activities, *i.e.*, *Dioscorea membranacea* Pierre. (rhizome), *Dracaena loureiri* Gagnep (stem, bark), *Myristica fragrans* Houtt. (seed), *Plumbago indica* Linn. (root), *Garcinia mangostana* Linn. (pericarp), *Piper chaba* Hunt. (fruit), and Benjakul formulation 1(a mixture of parts of 5 plants), using human liver microsomes *in vitro*. The extract of *Dioscorea membranacea* Pierre exhibited the most potent inhibitory activities on CYP1A2 and CYP3A4 with IC₅₀ of 0.15 and 0.24 µg/ml, respectively. Results suggest that the potential for toxicity should be aware of for future development of *Dioscorea membranacea* Pierre as antimalarial drugs.

Key Words antimalarial drugs, Metabolism, Human liver microsome, Medicinal plants, CYP450 inhibition

การศึกษาการยับยั้งไซโตโครมพี 1เอ2 และ ไซโตโครมพี 3เอ4 ของมนุษย์ ด้วยสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อมาลาเรีย

วิริยาภรณ์ สุ่มสกุล¹, วิฑูรย์ ไวยนันท์¹, วิรัชณี มหาวรรตศิริกุล¹, อนุรักษ์ เชื้อมั่ง¹, วิจิตรา ทศนียกุล², เกศรา ณ บางช้าง¹

¹ศูนย์ความเป็นเลิศทางด้านการวิจัย ค้นคว้า และพัฒนายาแห่งประเทศไทย

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต) ปทุมธานี ประเทศไทย

²คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ

ส่วนประกอบที่สำคัญในยาสมุนไพร หรือตำรับยาสมุนไพรนั้น อาจมีผลต่อเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงยาในตับ เช่น ไซโตโครมพี 450 (CYPs) และอาจก่อให้เกิดความเป็นพิษหรือการรักษาล้มเหลวได้เมื่อใช้ร่วมกับยาอื่นๆ ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินแนวโน้มของสารสกัดสมุนไพร 7 ชนิดที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียในการยับยั้ง CYP1A2 และ 3A4 ซึ่งเป็นตัวกลางในการเปลี่ยนแปลงยาในตับ ได้แก่ หัวข้าวเย็นใต้ (เหง้า), จันทน์แดง (เปลือกของลำต้น), จันทน์เทศ (เมล็ด), เจตมูลเพลิงแดง (ราก), มังคุด (เปลือกของผล), ดีปลี (ผล), ตำหรับเบญจกุล (ประกอบด้วยสมุนไพร 5 ชนิด) โดยใช้ไมโครโซมจากตับของมนุษย์ในการทดลองในหลอดทดลอง จากการทดลองพบว่าสารสกัดจากหัวข้าวเย็นใต้มีฤทธิ์ในการยับยั้ง CYP1A2 และ 3A4 มากที่สุด ซึ่งค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเปลี่ยนแปลงยาของ CYP1A2 และ 3A4 ได้ 50% (IC₅₀) คือ 0.15 และ 0.24 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ จากการศึกษาครั้งนี้ได้เสนอแนะว่าควรพึงระวังความเป็นพิษที่จะเกิดจากการใช้สารสกัดจากหัวข้าวเย็นใต้ในการรักษาโรคมมาลาเรียเมื่อใช้ร่วมกับยาอื่นๆที่เปลี่ยนแปลงโดย CYP1A2 และ 3A4

คำสำคัญ: ยาต้านมาลาเรีย การเปลี่ยนแปลงยา ไมโครโซมของมนุษย์ พิษสมุนไพร, การยับยั้งไซโตโครมพี450

Introduction

The emergence and spread of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* has become major public-health problem in malaria control programs in most endemic regions of the world (Na-Bangchang and Congpuong 2007). Since antimalarial drug resistance compromises the effective treatment of the disease, there is necessary for ongoing drug discovery research that will provide effective and affordable antimalarial agents which are also simple to administer. Natural products including medicinal plants may offer cheap alternative treatment opportunities for malaria patients. The cytochrome P450 enzymes (CYP) represent a large family of proteins involved in the metabolism of drugs and other xenobiotics as well as endogenous compounds (Obach, 2000). It is possible that certain constituents in traditional plants or herbal preparations may interfere with this enzyme system. This metabolic drug interaction is important as it could lead to untoward or toxicity due to a significant increase of plasma drug concentration of the coadministered drugs that are metabolized by the same CYP isozyme.

In the present study, the propensity of seven candidate Thai medicinal plants/herbal formulation with promising antimalarial activities (Table 1) to interfere with CYP1A2 and CYP3A4 *in vitro*.

Materials and method

Plant materials

Plant materials (Table 1) were collected from different regions of Thailand and some were purchased from the city markets. Authentication of plant materials was carried out at the herbarium of the Department of Forestry, Bangkok, Thailand, where the herbarium vouchers have been kept. The extraction of all Thai herbal medicinal plants was performed by maceration method (Mahavorasirikul *et al.*, 2010). Stock solutions of the ethanolic extracts were prepared at the concentration of 1 mg/ml.

CYP1A2 and 3A4 inhibition

The activities of CYP1A2 and CYP3A4 were assessed through measurement of the formation of paracetamol from the substrate drug phenacetin (Lavhekar *et al.*, 2006), and formation of oxidized nifedipine from the substrate drug nifedipine (Patki *et al.*, 2003), respectively. The incubation reaction was performed in duplicate in a total volume of 0.5 ml of 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.4, 0.2 mg/ml human liver microsomes, specific probe (phenacetin or nifedipine), and 0.6 mM NADPH. The reaction was initiated by the addition of NADPH and incubated at

Table 1 Six medicinal plants and one herbal formulation under investigation

Plant/herbal formulation	Plant part used
<i>Piper chaba</i> Hunt.(PC)	Fruit
<i>Dioscorea membranacea</i> Pierre.(DM)	Rhizome
<i>Dracaena loureiri</i> Gagnep. (DL)	Stem, Bark
<i>Myristica fragrans</i> Houtt. (MF)	Seed
<i>Plumbago indica</i> Linn. (PL)	Root
<i>Garcinia mangostana</i> Linn. (GM)	Pericarp
Benjakul formulation 1 (BF)	A mixture of parts from 5 plants

37°C for 60 (phenacetin) or 40 (nifedipine) min with agitation. The reaction was stopped by the addition of 250 µl of cold acetonitrile, and 50 µl of caffeine (for CYP1A2 reaction) or diazepam (for CYP3A4 reaction) was added as an internal standard. The concentration of metabolite (paracetamol or oxidized nifedipine) was measured by HPLC with UV detection (Lavhekar et al., 2006; Patki et al., 2003).

To evaluate the effect of the crude extracts and selective inhibitors on the activities of CYP1A2, and CYP3A4 (α -naphthoflavone for CYP1A2, ketoconazole for CYP3A4), a fixed concentration of specific probe was incubated with a range of crude extracts concentrations (0–200 µg/ml). Metabolite formation was expressed as a percentage of control in the absence of inhibitor based on metabolite to internal standard peak height ratio. The IC₅₀ value (concentration which inhibits enzyme activity by 50%) was calculated using dose response analysis (CalcuSyn™ software, USA).

Results

The ethanolic extracts of *Piper chaba* Hunt., *Dioscorea membranacea* Pierre., *Dracaena loureiri* Gagnep., *Myristica fragrans* Houtt, *Plumbago indica* Linn., *Garcinia mangostana* Linn. and Benjakul formulation 1 inhibited CYP1A2 activity in a dose-dependent manner with IC₅₀ values ranging from 0.15–13.59 (µg/ml incubation: Figure 1). The extract of *Dioscorea membranacea* Pierre. exhibited the most potent inhibitory activity (IC₅₀ = 0.15 µg/ml) similarly to α -naphthoflavone (selective inhibitor of CYP1A2). The IC₅₀ values for their inhibitory activities on CYP3A4 were 0.24–29.74 (µg/ml incubation: Figure 1). The extract of *Dioscorea membranacea* Pierre. exhibited the most potent inhibitory activity (IC₅₀ = 0.24 µg/ml) similarly to ketoconazole (selective inhibitor of CYP3A4).

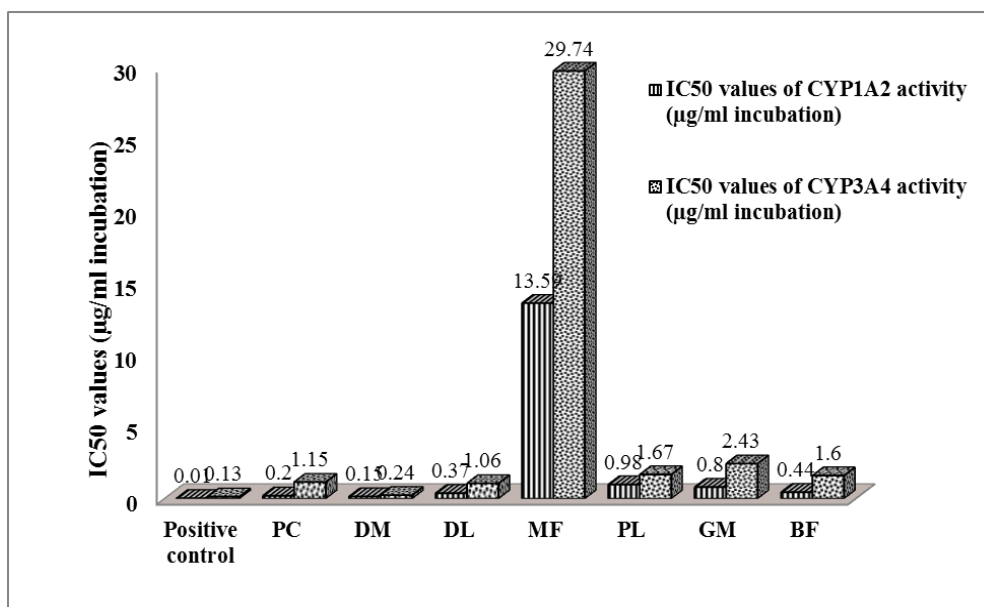


Figure 1 Inhibitory activities (represented by IC₅₀ values) of the ethanolic extracts of 6 medicinal plants and 1 herbal formulation on human CYP1A2 and CYP3A4 in comparison with selective inhibitors

PC = *Piper chaba* Hunt., DM = *Dioscorea membranacea* Pierre.,
DL = *Dracaena loureiri* Gagnep., MF = *Myristica fragrans* Houtt,
PI = *Plumbago indica* Linn., GM = *Garcinia mangostana* Linn. and
BF = Benjakul formulation 1

Discussion and Conclusion

Interactions between phytochemicals in herbal medicines and CYPs are now well recognized because of their potential clinical and toxicological implications. These phytochemicals could act as substrates, inhibitors or inducers of CYPs, which can lead to pharmacokinetic interactions with administered drugs metabolized by this CYPs system. Among the medicinal plants/herbal formulation under investigation, the ethanolic extracts of *Dioscorea membranacea* Pierre. exhibited the most potent inhibitory activity on CYP1A2 and CYP3A4. Concurrent administration of both medicinal plants

with drugs that are metabolized by CYP1A2 or CYP3A4 may result in untoward effects or toxicity from metabolic enzyme inhibition. Until further clinical investigation in healthy subjects are confirmed, the potential of these plants for use in treatment of malaria infection may be limited.

Acknowledgements

The study was supported by The Commission on Higher Education (RG and NRU Projects), Ministry of Education of Thailand and the Royal Golden Jubilee Program of the Thailand Research Fund (RGJ-TRF).

References

- Ji-Young Park. Chloramphenicol Is a Potent Inhibitor of Cytochrome P450 Isoforms CYP2C19 and CYP3A4 in Human Liver Microsomes. Antimicrobial agents and chemotherapy 2003; 3464–3469.
- Lavhekar S, Lohade A, Coutinho E, Iyer K. Estimation of microsomal CYP1A2 activity by high performance liquid chromatography. Indian J Pharmaceut Sci 2006; 68: 258-61.
- Lin JH, Lu AY. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. Clin Pharmacokinet 1998; 35: 361-90.
- Mahavorasirikul W, Viyanant V, Chaijaroenkul W, Itharat A, Na-Bangchang K. Cytotoxic activity of Thai medicinal plants against human cholangiocarcinoma, laryngeal and hepatocarcinoma cells in vitro. BMC Complement Altern Med. 2010;10:55.
- Na-Bangchang, K. Current malaria status and distribution of drug resistance in East and Southeast Asia with special focus to Thailand. Tohoku J Exp Med 2007; 211: 99-113.
- Obach RS. Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by constituents of St. John's Wort, an herbal preparation used in the treatment of depression. J Pharmacol Exp Ther 2000; 294: 88-95.
- Omura T. Forty years of cytochrome P450. Biochem Biophys Res Commun 1999; 266: 690-8.
- Patki KC, Von Moltke LL, Greenblatt DJ. In vitro metabolism of midazolam, triazolam, nifedipine, and testosterone by human liver microsomes and recombinant cytochromes p450: role of cyp3a4 and cyp3a5. Drug Metab Dispos 2003; 31: 938-44.
- Samuel A. High-throughput inhibition screening of major human cytochrome P450 enzymes using an in vitro cocktail and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2003;30:1459-1467.
- Tassaneeyakul W, Guo LQ, Fukuda K, Ohta T, Yamazoe Y. Inhibition selectivity of grapefruit juice components on human cytochromes P450. Arch Biochem Biophys 2000; 378: 356-63.

RESEARCH ARTICLE

Effect of Ethanolic Extract of *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk on CYP450 3A4 in Human Hepatoma HepG2 Cell**Kornrat Rattanawattanathorn¹, Sureerut Porntadavity², Chaiyo Chaichantipyuth³, Supatra Srichairat⁴**¹*Interdepartmental Program of Pharmacology, Graduate School, Chulalongkorn university, Thailand*²*Department of Clinical Chemistry, Faculty of Medical Technology, Mahidol university, Thailand*³*Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn university, Thailand*⁴*Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn university, Thailand***Abstract**

Pseuderanthemum palatiferum or Hoan-Ngoc is a herb used as traditional medicine in Vietnam and widely used also for treatment of many chronic diseases in Thailand. Thus, a potential interaction when concomitantly used with drugs is of great interest. The aim of this study was to investigate the cytotoxicity and CYP3A4 activity of ethanolic extract of *P. palatiferum* in HepG2 cell. HepG2 cells were exposed to various concentrations of extract for 24, 48 and 72 h. MTT assay was used in cytotoxicity test and CYP3A4 activity was determined by P450-Glo assay. MTT assay showed that the IC₅₀ of the extract at 24, 48 and 72 h were 320.63, 266.07 and 299.23 µg/ml, respectively. We found that the extract at all concentration (1-25 µg/ml) could not induce CYP3A4 activity of the HepG2 cell. In addition, there is insignificant difference of the CYP3A4 activities between the treated and the vehicle control group. In conclusion, the extract shows very low cytotoxic activity against HepG2 and no effect on CYP3A4 activity. Thus, this plant may be safely used with other therapeutic drugs which are CYP3A4 substrate.

Key Words CYP 3A4, HepG2 Cells, *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk

ผลของสิ่งสกัดเอทานอลของว่านพญาวันรกับไซโตโครมพี 450 3A4 ในเซลล์ตับมนุษย์เพาะเลี้ยง HepG2

กรรติน รัตนวัฒนา¹, สุริรัตน์ พรธาดาวิทย², ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ³, สุพัตรา ศรีไชยรัตน์⁴

¹ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย

²ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศไทย

³ภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย

⁴ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย

บทคัดย่อ

ว่านพญาวันหรือฮว่านจ็อก (*Pseuderanthemum palatiferum*) เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านของประเทศเวียดนามที่นิยมนำมาใช้ในการรักษาโรคต่างๆรวมทั้งในประเทศไทย การเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาและสมุนไพรนั้นเป็นสิ่งที่อันตรายและควรระวัง วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อศึกษาผลของสารสกัดว่านพญาวันต่อความเป็นพิษต่อเซลล์และสมรรถนะของเอนไซม์ CYP3A4 ในเซลล์เพาะเลี้ยง HepG2 โดยทำการทดสอบสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์จะทดสอบด้วยวิธี MTT และการทดสอบสมรรถนะของเอนไซม์ CYP3A4 จะทดสอบด้วยชุด P450-Glo assay จากการทดสอบ MTT พบว่า ค่า IC₅₀ มีค่าเท่ากับ 320.63, 266.07 และ 299.23 µg/ml ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ และสารสกัดที่ทุกระดับ ความเข้มข้น (1-25 µg/ml) ไม่มีผลเหนี่ยวนำสมรรถนะของเอนไซม์ CYP3A4 ในเซลล์เพาะเลี้ยง HepG2 โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญสมรรถนะของเอนไซม์ CYP3A4 ระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารสกัดและกลุ่ม ตัวทำละลาย ผลการทดลองสรุปว่า สารสกัดว่านพญาวันแทบจะไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง HepG2 และไม่มีผลต่อสมรรถนะของเอนไซม์ CYP3A4 โดยสารสกัดว่านพญาวันนั้นน่าจะมีความปลอดภัยเมื่อใช้ร่วมกับยาแผนปัจจุบันที่เป็นซับสเตรตของเอนไซม์ CYP3A4

คำสำคัญ: ยาต้านมาลาเรีย การเปลี่ยนแปลงยา ไมโครโซมของมนุษย์ พืชสมุนไพร การยับยั้งไซโตโครมพี450

Introduction

Herbal medicinal products are becoming popular in health care and are often administered in combination with prescribed drugs. The clinical importance of herb-drug interactions are a major safety concern of patients. Pharmacokinetic mechanism has been considered to be a major role of these interactions. *Pseuderanthemum palatiferum* or Hoan-Ngoc is a herb used in folk medicine in Vietnam and popularly used also in many chronic diseases such as hypertension, arthritis and diabetes in Thailand (Khonsung et al. 2011). Some phytochemical compounds found in its leaves were flavonoids including stigmasterol and kaempferol and phytosterol such as apigenin and β -sitosterol (Giang et al. 2003). The pharmacological activities of this herb previously demonstrated *in vitro* are antioxidant, antidiarrhea, and antibacterial (Vinh and Bang 2011, Dieu et al. 2006, Noppon et al. 2009).

Cytochrome P450 enzymes (CYP) have an essential role in drug metabolism in phase I which catalyze endogenous substances and xenobiotics. CYP convert drugs into more polar compounds which can easily excreted from body or be conjugated in phase II metabolism. CYP3A4 is the most abundance and plays the important role in drug metabolism since about 50% of therapeutic drugs are metabolized by CYP 3A4 (Hariparsad et al. 2004). Induction or inhibition of CYP may alter plasma concentration and drug response of co-administered medicine. Therefore, interactions between herbal medicinal products and therapeutic drugs are a major safety concern because herb may cause adverse drug reactions or change in therapeutic efficacy of concomitant medicine. The objective of this study was to determine effect of ethanolic extract of *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk on CYP450 3A4. In this study CYP3A4 activity was assessed *in vitro* models by using human hepatoma HepG2 cell line that constitutively express of CYP3A4.

Materials and Methods

Plant extract

P. palatiferum was obtained from Hoanngoc farm (Pathum Thani, Thailand). Their leaves were collected, cleaned and macerated with 95% ethanol for 7 days. The extract was filtered and evaporated by rotary evaporator and freeze dry until the extract was dry. The extract was kept in -20°C until used. The extract powder was dissolved with 0.5% DMSO.

Cells Culture

The human hepatoma (HepG2) cells were obtained from the American type Culture Collection. They were cultured in DMEM medium (GIBCO, USA) supplemented with 10% (v/v) FBS (GIBCO, USA), 200mM L-glutamine (GIBCO, USA), 10,000 units/ml penicillin and 10,000 μ g/ml streptomycin (GIBCO, USA) at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

Cytotoxicity effect of test compound

Cells viability was determined by MTT assay. MTT were converted to formazan in living cell by mitochondrial enzyme (Mohamed and Kadi 2009). Cells were seeded in 96-well plates. Each well contained 22,000 cells/well then incubated at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. After 24 h, cells were treated with 0-400 μ g/ml extract. After incubation period of 24, 48 and 72 h, medium was removed. Cell were washed with phosphate buffer saline then incubated with medium containing 5 mg/ml MTT solution for 1 h. Cells viability was measured by microplate reader (DTX 800 Beckman coulter, USA) at 570 nm.

Determination of CYP3A4 activity

CYP3A4 activity was determined by using P450-Glo assay (Promega, USA). Luciferin-IPA (luminogenic CYP3A4 substrate) was metabolized by CYP3A4 enzyme and luciferase into a luminescent compound. Briefly, cultured

cell into 24-well plates and treated with 0-25 $\mu\text{g/ml}$ extract for 24, 48 and 72 h. After incubation period, medium was removed. Cells were washed with phosphate buffer saline then incubated with 3 μM luciferin-IPA for 2 h. CYP3A4 activity were determined by using a luminometer (DTX 800 Beckman coulter, USA) and normalized with viable cell number. Dexamethasone (50 μM) and 0.5% DMSO were used as the positive control and vehicle control, respectively.

Statistical Analysis

All data were presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). The 50% inhibitory concentrations (IC_{50}) of the extract on HepG2 cell at various time points were analyzed using probit analysis. A statistical significant difference between treated and control groups was determined by one-way analysis of variance (ANOVA) and Student's t-test. P values <0.05 was considered to be statistically significant.

Results

The MTT assay showed that the concentrations of 0-100 $\mu\text{g/ml}$ extracts did not affect cell viability. Incubation with a high concentration of the extract (200 and 400 $\mu\text{g/ml}$), cell viability were significantly decreased (Fig 1). The IC_{50} values of the extracts at 24, 48 and 72 h. were 320.63, 266.07 and 299.23 $\mu\text{g/ml}$, respectively (Fig 2).

After treatment of HepG2 with dexamethasone, the result showed that dexamethasone significantly increased CYP3A4 activity 1.80, 2.24 and 2.06 fold at 24, 48 and 72 h, respectively compared to untreated control (Fig 3). The activity of CYP3A4 enzyme after incubation with the extract at 1-25 $\mu\text{g/ml}$ was not significant increased compared to vehicle control.

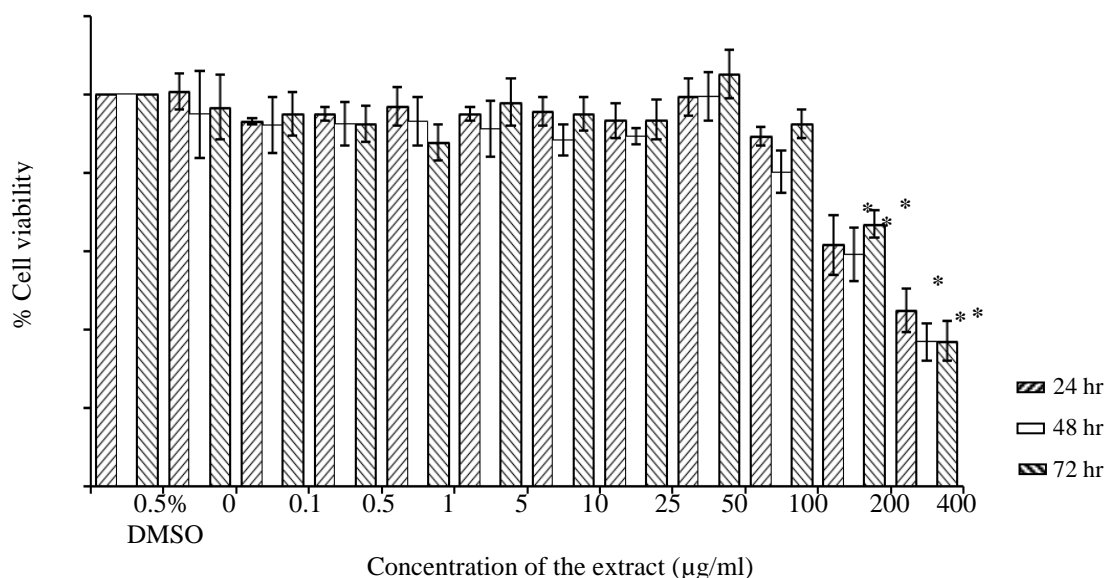


Figure 1 Effect of the ethanolic extract of *P. palatiferum* on HepG2 cells viability. * $p < 0.05$ when compared to the control at the same time point

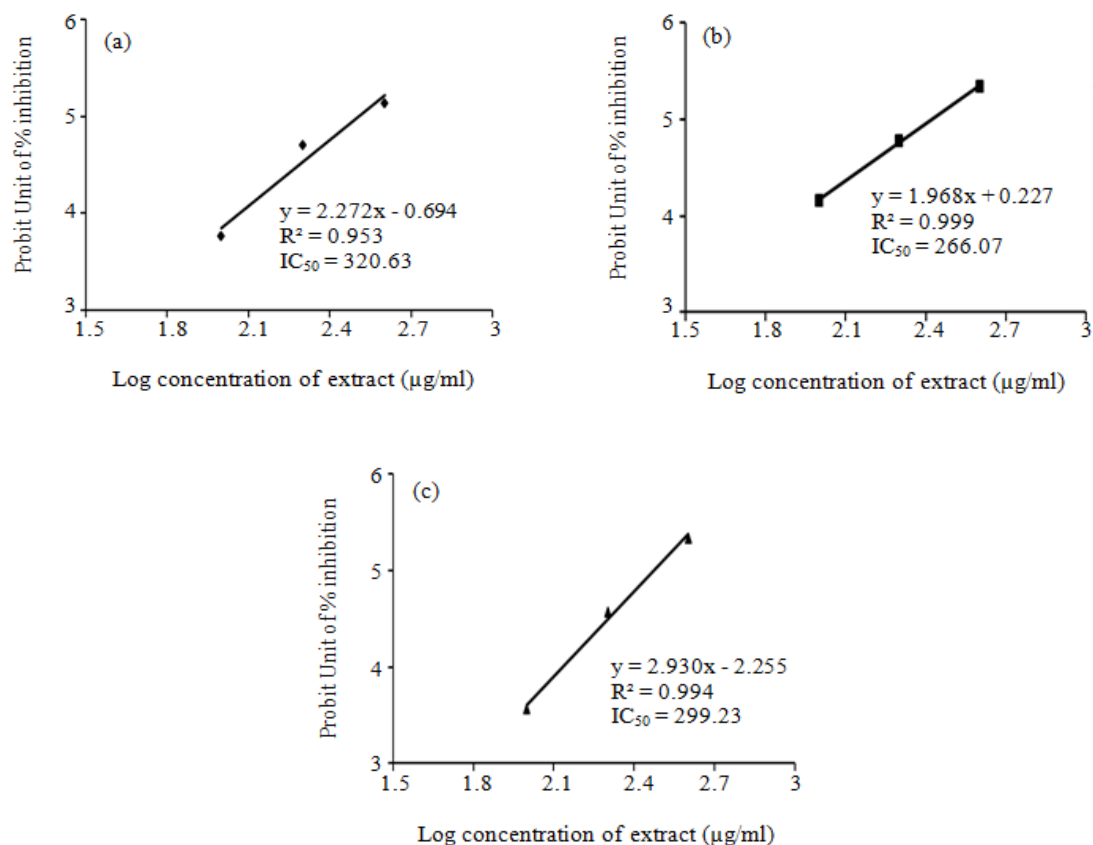


Figure 2 The IC_{50} values of the ethanolic extract of *P. palatiferum* on HepG2 cells. (a) 24 h (b) 48 h (c) 72 h

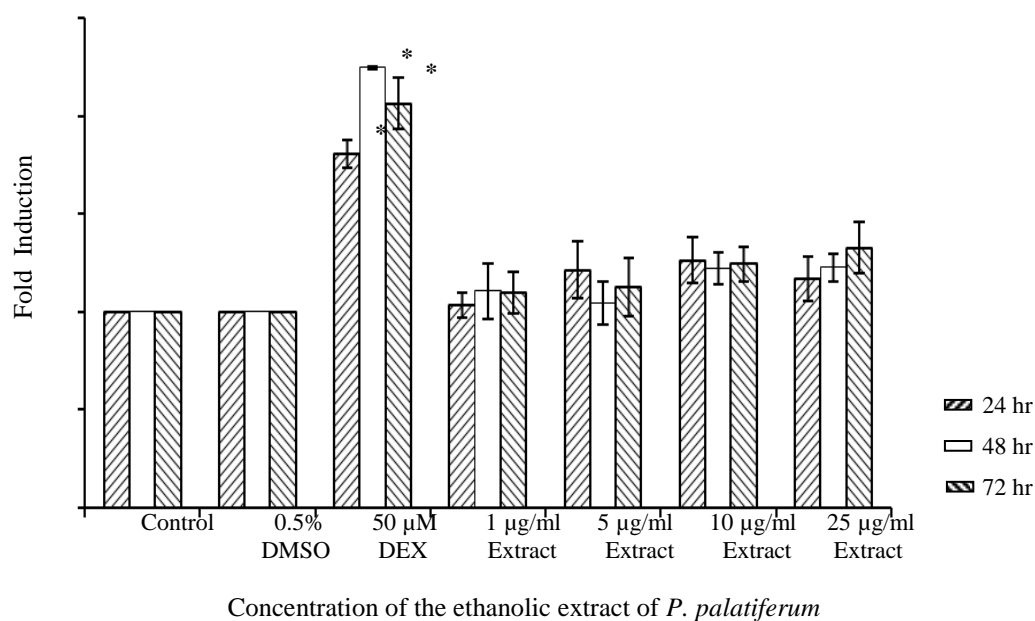


Figure 3 Effect of the ethanolic extract of *P. palatiferum* and Dexamethasone (DEX) on CYP3A4 activities in HepG2 cells. * $p < 0.05$ when compared to the control at the same time point

Discussion

In early stage of drug discovery, *in vitro* toxicity test and drug interaction by detection of CYP activity are very important to obtain rapid evaluation of test compound and reduce animal use. The HepG2 cell line is widely used in cytotoxicity experiments and drug metabolism. In the present study, the ethanolic extract of *P. palatiferum* (Nees) Radlk showed very low cytotoxic activity against HepG2. The IC₅₀ was found to be high and the concentrations of 0-100 µg/ml extract were non-toxic to cells. Based on the cytotoxicity result, the concentrations of extract ranging from 1-25 µg/ml were used in CYP3A4 activity experiment. In CYP 3A4 activities, treatment with dexamethasone, a CYP3A4 inducer, resulted in an induction of CYP3A4 activity when compared to untreated group, while CYP 3A4 activities of all concentrations of the extract tested were no significant difference when

compare to solvent treated group. However, the higher concentration and longer incubation of the extract in HepG2 cells as well as study in laboratory animals should be further done.

Conclusions

The ethanolic extract of *P. palatiferum* shown to be nontoxic to cells and did not significantly increase CYP3A4 activity. However, the expression of CYP3A4 mRNA and protein should be further investigated in order to confirm the results of CYP3A4 activity.

Acknowledgement

This project was partly supported by CU. Graduate School Thesis Grant. The author would like to thank Department of Clinical Chemistry, Faculty of Medical Technology, Mahidol University, Thailand for the use of facilities throughout this project.

References

- Dieu HK, Loc CB, Yamasaki S, Hirata Y. The Effects of *Pseuderanthemum palatiferum*, a New Medicinal Plant, on Growth Performances and Diarrhea of Piglets. JARQ. 40(2006): 85-91.
- Giang PM, Bao HV, Son PT. Phytochemical study on *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk., Acanthaceae. J Chem. 2003;41(2):115-8.
- Hariparsad N, Nallani S, Sane R, Buckley D, Buckley A, Desai P. Induction of CYP3A4 by Efavirenz in Primary Human Hepatocytes: Comparison with Rifampin and Phenobarbital. J. Clin. Pharmacol. 2004;44(11):1273-81.
- Khonsung R, Panthong A, Chiranthanut N, Intahphuak S. Hypotensive effect of the water extract of the leaves of *Pseuderanthemum palatiferum*. J Nat Med. 2011;65(3-4):551-8.
- Mohamed A, Kadi A. Sulforaphane induces CYP1A1 mRNA, protein, and catalytic activity levels via an AhR-dependent pathway in murine hepatoma Hepa 1c1c7 and human HepG2 cells. Cancer Lett. 2009;275(1):93-101.
- Noppon B, Angkititrakul S, Pocapanich N, Muangpurn W. Inhibitory and Bactericidal Effects of *Pseuderanthemum palatiferum* and *Piper betle* L. Leaves Extracts Against *Salmonella* species KKU. Vet. J. 2009;19(2):171-9.
- Vinh Nguyen Q, Bang Eun J. Antioxidant activity of solvent extracts from Vietnamese medicinal plants. J Med Plants Res. 2011;5(13):2798-811.

RESEARCH ARTICLE

Inhibitory Effects of Nomilin on the Cytochrome P450 3A4 Activity

Alisa Suk-aim¹, Nusara Piyapolrungrroj², Suree Jianmongkol¹

¹*Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Thailand*

²*Department of Biopharmacy, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Thailand*

Abstract

Inhibition of the cytochrome P450 especially CYP3A4 may result in clinically significant drug interactions and adverse reactions due to a change in metabolic clearance of the drug. Nomilin, a bitter taste limonoid found abundantly in citrus species, was investigated for its inhibition against recombinant human cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) activity. The enzyme activity was determined by the production of 6 β -hydroxytestosterone from testosterone, which was quantified by the high-performance liquid chromatography (HPLC) technique. Our results showed that nomilin inhibited CYP3A4 activity with the IC₅₀ value of 14.54 μ M. The inhibitory profile suggested the mixed type inhibition with the apparent K_i value of 4.832 μ M. It was possible that nomilin and natural product containing nomilin could interfere CYP3A4-mediated metabolisms, and potentially lead to food-drug interaction problems.

Key Words nomilin, cytochrome P450, CYP3A4, inhibition

ผลการยับยั้งของลิโมนินต่อสมรรถนะเอนไซม์ไซโตโครม พี450 3เอ4

อลิสา สุขเอม¹, นุศรา ปะทะพลรุ่งโรจน์², สุรีย์ เจียรณมังคล¹

¹ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

²ภาควิชาชีวเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม 73000

บทคัดย่อ

การยับยั้งเอนไซม์ไซโตโครม พี450 โดยเฉพาะไซโตโครม พี3เอ4 ส่งผลให้เกิดอันตรกิริยาที่มีความสำคัญทางคลินิกและอาการไม่พึงประสงค์ขึ้น เนื่องจากทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการกำจัดยา nomilin เป็นสารกลุ่มลิโมนอยด์ที่มีรสขม พบได้มากในพืชตระกูลส้ม ซึ่งในการศึกษานี้ได้ศึกษาผลการยับยั้งสมรรถนะเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ ไซโตโครม พี450 3เอ4 ของมนุษย์ โดยวัดสมรรถนะเอนไซม์จากการสร้าง 6 β -hydroxytestosterone จาก testosterone และวัดปริมาณ metabolite ที่เกิดขึ้น โดยใช้เทคนิค high-performance liquid chromatography (HPLC) ผลการทดลองพบว่า nomilin สามารถยับยั้งสมรรถนะเอนไซม์ CYP 3เอ4 ได้ โดยมีค่า IC₅₀ 14.54 μ M และ มีรูปแบบการยับยั้งแบบผสม (mixed type) โดยมีค่า apparent K_i 4.832 μ M จึงเป็นไปได้ว่า nomilin และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มี nomilin เป็นองค์ประกอบมีผลรบกวนการ เมแทบอลิซึมที่อาศัยเอนไซม์ CYP 3เอ4 และมีความเป็นไปได้ที่จะทำให้เกิดปัญหอันตรกิริยาระหว่างอาหารและยาได้

คำสำคัญ: nomilin, ไซโตโครม พี450, CYP 3เอ4, การยับยั้ง

Introduction

Cytochrome P450 (CYPs) are drug metabolizing enzymes that play an important role in the metabolism of various endogenous and exogenous substances including steroids, biogenic amines, alcohol, drugs and chemicals. Among the members of CYPs family, CYP3A4 is one of the major CYPs responsible for up to 55 % of the metabolized drugs (Ogu and Maxa 2000; Mukherjee et al. 2011). Alteration in CYPs activity either through induction or inhibition often causes uncertain outcomes and toxicities due to a shift in metabolic clearance and pharmacokinetic profiles of the compounds being CYPs substrates (Martin 2001).

Limonoids are highly oxygenated terpenoids compounds found abundantly in the plant families of Meliaceae and Rutaceae. The terpenoids have been reported a broad range of biological activities including insecticidal, antiviral, antioxidant, antifeedant and anticancer (Roy and Saraf 2005). Nomilin is a bitter taste limonoid found as a constituent in citrus species such as *Citrus grandis*, *Citrus limon*, *Citrus paradisi*, *Citrus sinensis* (Hasegawa and Herman 1985; Rouseff 1982; Girard and Mazza 1998). It has been reported that nomilin was able to inhibit HIV-1 replication (Battinelli et al. 2003), and HTLV-1 reverse transcriptase enzyme (Balestrieri et al. 2011). In addition, nomilin which was extracted from pomelo juice was able to inhibit CYP3A4 activity (นุศรา ปิยะพลรุ่งโรจน์ 2551).

In this study, we further investigated and characterized the inhibitory action of nomilin on the catalytic activity of CYP3A4, using the in vitro model of recombinant human c- DNA baculovirus expressed CYP3A4. The information from this study could be used for risk evaluation of the potential metabolic-based interaction related to consumption of nomilin and natural products containing nomilin. DNA baculovirus expressed CYP3A4. The information from this study could be used for risk evaluation of the potential metabolic-based interaction related to consumption of nomilin and natural products containing nomilin.

Materials and Methods

Chemicals

Nomilin (MW=514.6) was purchased from Chromadex (USA). Baculovirus expressed recombinant cDNA Cytochrome P450 3A4 including cytochrome b5 (Cytochrome P450 BACULOSOMES[®] Invitrogen, USA) and testosterone (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) and 6 β -hydroxytestosterone (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) were kindly provided by Assoc. Prof. Nusara Piyapolrungrroj, Ph.D. (Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Thailand). Glucose-6-Phosphate and Glucose-6-Phosphate dehydrogenase were purchased from Merck (Germany). Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) was obtained from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Magnesium Chloride, potassium Phosphate, and dipotassium Phosphate were purchased from Ajax Finechem (Sydney, Australia). Methanol (purity 99.8 %, chromatographic grade) was purchased from Burdick&Jackson (Morristown, NJ, USA).

Determination of the IC₅₀

The reaction mixture, containing CYP3A4 (20 pmol/ml), testosterone (200 μ M), and the test compound (2-150 μ M) in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.45), was pre-incubated at 37°C for 5 min. The reaction was started by addition of NADPH regenerating system (1.3 mM NADP, 3.3 mM glucose-6-phosphate, 0.4 U/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase, and 3.3 mM magnesium chloride). After the incubation period of 15 min at 37 °C, 100% ice-cold acetonitrile was added into the mixture to stop the reaction, followed by centrifugation at 15,000 rpm for 45 min. The supernatant was subjected to HPLC analysis for 6 β -hydroxytestosterone using a BDS Hypersil column (4.6 mm x 250 mm, 5 μ M). The total run time was 30 min under the condition of mobile phase methanol:water (55:45), flow rate 1 ml/min, UV detection at 254 nm. The

metabolite 6 β -hydroxytestosterone was detected at 7.4 min and quantified by comparison with a standard curve of 6 β -hydroxytestosterone (0.25 to 20 μ M).

Determination of the type inhibition and the K_i value

In this experiment, the inhibition of CYP3A4 was performed in the reaction mixtures containing testosterone (25, 50, 100, 200 μ M), nomilin (0, 5, 10, 20 μ M) and CYP3A4 (20 pmol/ml) at 37 °C. The reaction was started by addition of the NADPH regenerating system. After the 15 min incubation period, the reaction was terminated by 100% ice-cold acetonitrile, followed by centrifugation. The supernatant was subjected to HPLC analysis as described above.

Data analysis

The IC₅₀ value (the concentration of inhibitor causing a 50% reduction in CYP activity) was determined using Probit analysis in SPSS 16.0 software. The type of inhibition was initially estimated graphically from the Lineweaver-Burk plots between reciprocal of CYP3A4 activity

and reciprocal of testosterone concentrations. The apparent K_i value was estimated from the secondary plots of the slopes of Lineweaver-Burk plots against individual nomilin concentration.

Results

In this study, the catalytic action of CYP3A4 was determined by following the testosterone 6 β -hydroxylation for 15 min. In our experimental condition, the time course of the production of metabolite 6 β -hydroxytestosterone was in linearity up to 30 min. The presence of nomilin in the reaction mixture could suppress the CYP3A4 activity in concentration dependent manner. At 15 min incubation period, nomilin inhibited the CYP3A4 activity with an IC₅₀ value of 14.54 ± 2.77 μ M (Figure 1). The Lineweaver-Burk plots and the corresponding secondary plots for nomilin mediated-inhibition of CYP3A4 were shown in Figure 2 (A, B). Linear regression analysis of the kinetic data indicated that nomilin was a mixed type inhibitor of CYP3A4 with an apparent K_i value of 4.832 ± 0.317 μ M.

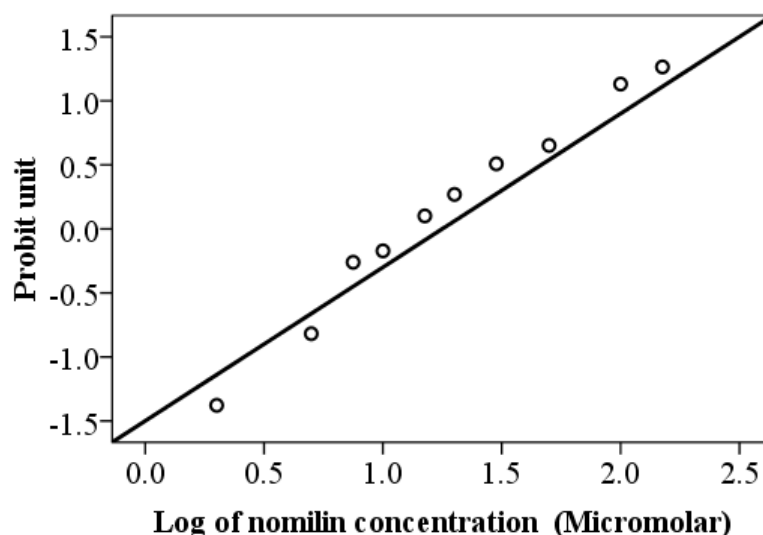


Figure 1 Inhibitory effect of nomilin on CYP3A4. (Each data point represented the mean of triplicate analysis)

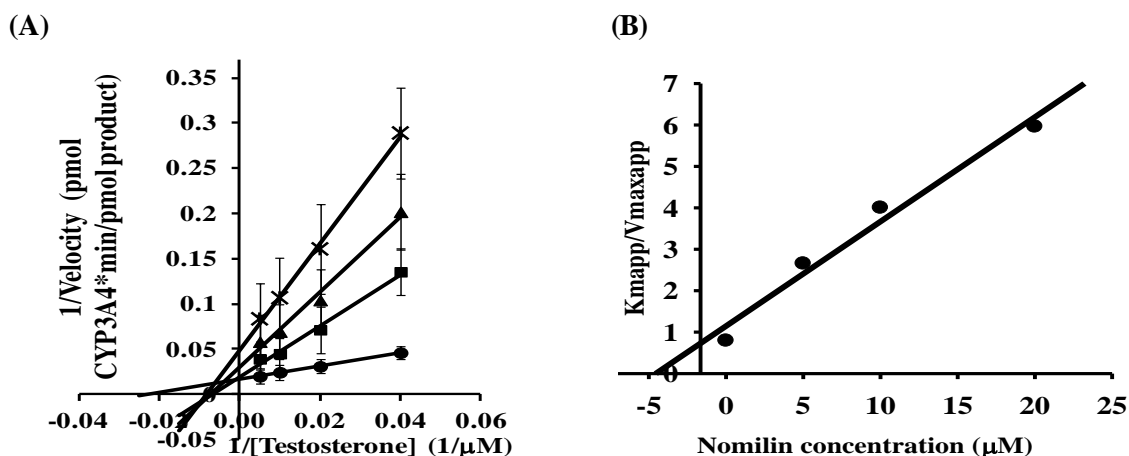


Figure 2 Lineweaver-Burk plots for the inhibition effects of nomilin on CYP3A4 (A) (●; 0 μ M, ■; 5 μ M, ▲; 10 μ M, X; 20 μ M) and the secondary plot of CYP3A4 activity using the slopes of the primary Lineweaver-Burk plots *versus* the concentrations of nomilin (B). Each point represents the average of duplicate determinations

Discussion and Conclusion

In this study, we investigated the inhibitory action of nomilin against CYP3A4 activity. The Lineweaver-Burk plots showed that the presence of nomilin in the CYP-mediated testosterone hydroxylation altered the intercepts on both X-axis (or $1/[S]$) and Y-axis (or $1/V$). The results indicated that nomilin apparently increased the K_m value of the testosterone-CYP3A4 complexes. Furthermore, nomilin decreased the maximal velocity (V_{max}) of the enzyme catalytic reaction. These nomilin-mediated changes in the values of K_m and V_{max} suggested that nomilin caused a mixed type inhibition of CYP3A4-mediated testosterone 6 β -hydroxylation. It was likely that nomilin could bind to either the free enzyme in competitive manner or the

substrate-bound enzyme in uncompetitive fashion. In addition, this compound was a relatively potent inhibitor of CYP3A4 activity since its IC_{50} and K_i values were in the micromolar range. It was possible that nomilin might be able to cause drug interaction problems related to a decrease in CYP3A4 activity. Therefore, caution should be exercised with respect to possible food-drug interactions when taken nomilin or natural products containing nomilin with CYP3A4 drug substrates.

Acknowledgements

This work was partially supported by the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand (AS638A), and Research and Development Institute, Silpakorn University.

References

- นุศรา ปิยะพลรุ่งโรจน์ . ผลของสารสกัดจากน้ำคั้น
จากผลพืชสกุลส้มต่อการทำงานของ
cytochrome P450 3A4 และ P-glycoprotein.
จุลสารสถาบันวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัย
ศิลปากร. 2551; 17(6):14-22.
- Balestrieri E, Pizzimenti F, Ferlazzo A,
Giofre S, Lannazzo D, Piperno A,
et al. Antiviral activity of seed extract
from Citrus bergamia towards human
retroviruses. Bioorg Med Chem. 2011;
19:2084-2089.
- Battineli L, Mengoni F, Lichtner M,
Mazzanti G, Saija A, Mastroianni C,
et al. Effect of limonin and nomilin on
HIV-1 replication on infected human
mononuclear cells. Planta Med. 2003;
69:910-913.
- Girard B, Mazza G. Function grape and
citrus products. In: Mazza G, editor.
Functional Foods. New York: Technomic
Publishing, 1998:139-191.
- Hasegawa S, Herman Z. Biosynthesis of
obacunone from nomilin in Citrus limon.
Phytochem. 1985; 24(2):1973-1974.
- Martin J. Cytochrome P450 drug interactions:
are they clinically relevant. Aust Presc.
2001; 24:10-12.
- Mukherjee PK, Ponnusankar S, Pandit
S, Hazam PK, Ahmmed M,
Mukherjee K. Botanicals as medicinal
food and their effects on drug
metabolizing enzymes. Food Chem
Toxicol. 2011; 49(12):3142-3153.
- Ogu CC, Maxa JL. Drug interactions due
to cytochrome P450. BUMC Proceedings.
2000; 13:421-423.
- Rouseff RL. Nomilin, a new bitter
component in grapefruit juice. J. Agric.
Food Chem. 1982; 30(3):504-507.

RESEARCH ARTICLE

Preliminary *in vitro* cytotoxicity of lipophilic extracts against HepG2 (hepatocellular carcinoma cell) and MCF-7 (breast cancer cell)**Kridsada Sirisabhabhorn¹, Pilaiwan Siripurkpong¹, Srunya Vajrodaya², Oumaporn Rungsuriyawiboon¹**¹*Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Thailand*²*Department of Botany, Faculty of Sciences, Kasetsart University, Thailand***Abstract**

This study is to investigate the anticancer activities of lipophilic extracts from underground part & inflorescences of *Acmella ciliata*, stem bark & leaves of *Aglaia odorata*, leaves of *Azadirachta indica* and stem bark of *Harrisonia perforata*. The lipophilic extracts were prepared from 50% chloroform-water extraction. *In vitro* cytotoxic effects of these extracts were determined on the human hepatocellular carcinoma HepG2 cells and breast cancer MCF-7 cells by MTT assay compared with a reference drug (5-fluorouracil, 5-FU). Chloroform extract of leaves of *A.odorata* exhibited the highest cytotoxic activity with IC₅₀ value of 72.97±6.67 µg/ml against HepG2 cells. The most active extract against MCF-7 cells was stem bark of *A.odorata*, with IC₅₀ value of 65.55±5.58 µg/ml. Both lipophilic extracts of *A.odorata* demonstrated potential anticancer properties because their IC₅₀ below 100 µg/ml. In contrast, the other lipophilic extracts produced only moderate cytotoxicity (100 < IC₅₀ < 1,000 µg/ml) when tested against HepG2 and MCF-7 cells. 5-FU showed cytotoxicity to HepG2 cells with IC₅₀ value of 80.42±1.67 µg/ml and to MCF-7 cells with IC₅₀ value of 119.97±5.10 µg/ml. Based on this study, the extracts from leaves and stem bark of *A.odorata* will be further investigated to identify their active compounds.

Key Words cytotoxicity, lipophilic extracts, 50% inhibitory concentration (IC₅₀)

การทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นของสารสกัดกึ่งหยาบในการต้านเซลล์มะเร็ง เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7)

กฤษฎา ศิริสภากรณ์¹, พิไลวรรณ ศิริพฤกษ์พงษ์¹, สรัญญา วัชรโรทัย², อุมพร รุ่งสุริยะวิบูลย์¹

¹ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ปทุมธานี

²ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการต้านมะเร็งของสารสกัดกึ่งหยาบจากส่วนใต้ดินและช่อดอกของผักคราดหัวแหวน (*Acmella ciliata*) เปลือกต้นและใบของประยงค์ (*Aglaia odorata*) ใบของสะเดาอินเดีย (*Azadirachta indica*) และเปลือกต้นของคนทา (*Harrisonia perforata*) ที่สกัดแยกด้วยสารละลายคลอโรฟอร์มความเข้มข้นร้อยละ 50 นำมาทดสอบหาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 และเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 เปรียบเทียบกับยามาตรฐาน 5-fluorouracil (5-FU) ในหลอดทดลอง ประเมินผลด้วยวิธี MTT ผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากส่วนใบของประยงค์ แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับมากที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 72.97 ± 6.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากเปลือกต้นประยงค์ แสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมมากที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 65.55 ± 5.58 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงว่าสารสกัดกึ่งหยาบทั้งสองชนิดมีศักยภาพในการต้านมะเร็งจากการที่มีค่า IC_{50} ต่ำกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในทางตรงกันข้ามสารสกัดกึ่งหยาบอื่นๆแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับและเซลล์มะเร็งเต้านมในระดับปานกลาง โดยมีค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 100-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยามาตรฐาน 5-FU แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 80.42 ± 1.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม มีค่า IC_{50} เท่ากับ 119.97 ± 5.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลอง สารสกัดกึ่งหยาบจากใบและเปลือกต้นของประยงค์จะถูกนำไปวิเคราะห์หาสารสำคัญต่อไป

คำสำคัญ: ความเป็นพิษต่อเซลล์ สารสกัดกึ่งหยาบ กรวยยังการเจริญเติบโตที่ 50 เปอร์เซ็นต์

Introduction

Cancer is becoming a significant health problem. It is the leading cause of death in Thailand. In particular, breast cancer is the second most common cancer in Thai women. The incidence of the whole country is 17.2/100,000/year (Martin and Cheirsilpa 2003), and in terms of the peak incidence, it is from the age of 35 years which is quite early when compared to other types of cancers. Breast cancer caused 411,000 deaths each year worldwide (Ferlay et al. 2004). In 2000, incidences of liver cancer in Thailand were reported to be very high, which has the highest incidence rate of 31.2/100,000 in males and 11.5/100,000 in females (Vatanasapt and Sriamporn 1999). Treatments for cancer can be extensive and expensive. For decades, drug candidates from herbal plants have been considered as potential therapeutic agents because they are generally safer, less toxic, and have fewer lethal side effects than chemically synthesized or semi-synthetic drugs. The diversity of medicinal plants in Thailand are interested to explore which choice of anticancer agents. The objectives in this study was focused on cytotoxic activity of lipophilic extracts from different parts of plants belonging to 3 families i.e. family Asteraceae (underground part, leaves and inflorescences of *Acmella ciliata*), family Meliaceae (leaves and stem bark of *Aglaia odorata* and *Azadirachta indica*) and family Simaroubaceae (stem bark of *Harrisonia perforata*) against on HepG2 cells and MCF-7 cells. Plant selection in this study was based on the literature research of traditional medicinal plant usage in Thai folk medicine, that there are only few studies on the cytotoxic activities.

Materials and Methods

Plants materials

The selected species and plant materials (see Table 1) were collected in Thailand during 2009-2011. They were identified by Associate Professor Dr. Srunya Vajrodaya, at the department of botany, faculty of sciences, Kasetsart University where the voucher specimens are deposited.

Preparation of plant extracts

Dried parts of plants were ground and extracted with methanol at room temperature for 7 days, filtered, and concentrated. The aqueous residue was extracted with CHCl_3 . The CHCl_3 fractions were evaporated to dryness by evaporator. The CHCl_3 extracts (lipophilic extracts) were dissolved in absolute methanol, filtered through a 0.22 μm cellulose nitrate membrane, then kept in aliquots and stored at -20°C until used.

Cancer cell culture

HepG2 cells were cultured in Eagle's Minimum Essential Medium with Alpha medium (MEM-alpha, Gibco® BRL., USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 0.1% penicillin- streptomycin (Pen/Strep) 1,000 units/ $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Gibco® BRL., USA). MCF-7 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco® BRL) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 0.1% penicillin- streptomycin (Pen/Strep) 1,000 units/ $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Gibco® BRL., USA). Cell cultures were maintained continuously in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO_2 at 37°C .

MTT colorimetric assay

The effects of each lipophilic extracts on cell viability was assessed using MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5 diphenyltetrazolium bromide; Sigma-Aldrich, USA) viability assay according to the methodology of Mosmann (1983). Ten thousand cells were seeded in 96-well microtiter plates and incubated overnight for cell attachment. Each extract solution and eight concentrations from 3.9 to 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ were prepared in 96-well microtiter plates. 100 μl of each extract concentration range from 3.9 to 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ was then added. Cells were treated for 48 h at 5% CO_2 , 37°C . After 48 h of incubation, the cells were inspected under an inverted microscope and 20 μl of MTT (5 mg/ml in PBS)

Table 1 Plant samples including their bioactive properties and main constituents

Families	Scientific names	Traditional medicine used	Bioactive properties	Main constituents
Asteraceae	<i>Acmella ciliata</i>	toothache, rheumatism and fever (Bunyapraphatsara and Choekhareunporn 1999; Farnsworth and Bunyapraphatsara 1992)	antimicrobial, antioxidant, antipyretic (Prachayasittikul et al. 2009)	isobutylamides, triterpenoids (Gokhale and Bhide 1945; Ramsewak et al. 1999)
Families	Scientific names	Traditional medicine used	Bioactive properties	Main constituents
Meliaceae	<i>Azadirachta indica</i>	malaria treatment, antifever (Biswas et al. 2002)	antimalarial, antibacterial	isoprenoids, azadirachtin (Biswas et al. 2002)
Meliaceae	<i>Aglaia odorata</i>	antifever (Sunilson et al. 2010)	antibacterial, antifungal (Piattelli et al. 1995)	aglains, rocaglamides (Brader et al. 1998)
Simaroubaceae	<i>Harrisonia perforata</i>	antidiarrhea and dysentery (Prayong et al. 2008)	antimalarial (Nguyen-Pouplin et al. 2007), antiinfective (Limsong et al. 2004)	quassinoids, limonoid (Tanaka et al. 1995)

was added to each well and incubated for 3 h. The final concentration of solvent was not exceeded to 1%. The medium was then gently aspirated and 100 µl of DMSO (Sigma-Aldrich, USA) was added to each well. Absorbance was determined at 570 nm using microplate reader (Varioscan Flash, Thermo, Finland). The absorbance revealed directly correlates to the variable cell number. Each extract was tested in nine replicates (n=9), using 5-fluorouracil (5-FU) as positive control. Treated cells were compared with control cells (no extracts or drug added or 100% cell survival). The percentage of cell viability in relation to control was determined by the following equation:

$$(\%) \text{ Cell viability} = \frac{\text{Absorbance at 570 nm of treated cells} \times 100}{\text{Absorbance at 570 nm of control cells}}$$

Data analysis

50% inhibitory concentrations (IC₅₀) values were evaluated by CalcuSyn™USA software and the IC₅₀ values were considered within 95% confidence interval. Data were expressed as mean ± standard derivation (SD).

Results and Discussion

In this study, four species belonging to three families of Thai plants i.e., *Acmella ciliata* (Asteraceae), *Azadirachta indica* (Meliaceae), *Aglaia odorata* (Meliaceae) and *Harrisonia perforata* (Simaroubaceae) were lipophilic extracted and compared for their cytotoxic effects against HepG2 and MCF-7 cells. These plants have been used by Thai people in treatment of different illness (see table 1). MTT assay was the technique utilized for cell survival determination. The cytotoxic activities of the lipophilic extracts were summarized in table 2.

Table 2 Cytotoxicity of 5-FU and 6 lipophilic extracts against HepG2 and MCF-7 cells following continuous 48 h exposure.

Plants	Family	IC ₅₀ (µg/ml)	
		HepG2	MCF-7
1. <i>Acmella ciliata</i> (underground part)	Asteraceae	192.21±16.98	164.39±10.70
2. <i>Acmella ciliata</i> (inflorescences)	Asteraceae	196.16±15.80	219.87±25.25
3. <i>Aglaia odorata</i> (stem bark)	Meliaceae	137.65±11.15	65.55±5.58
4. <i>Aglaia odorata</i> (leaves)	Meliaceae	72.97±6.67	115.01±8.08
5. <i>Azadirachta indica</i> (leaves)	Meliaceae	143.78±11.58	155.50±13.33
6. <i>Harrisonia perforata</i> (stem bark)	Simaroubaceae	212.02±28.79	119.85±13.56
5-fluorouracil (5-FU) (µg/ml)	-	80.42±1.67	119.97±5.10
5-fluorouracil (5-FU) (µM)	-	618.21±12.86	922.31±39.24

The data represent mean ± SD of three independent experiments (n=9)

In order to control the study of cytotoxic effect induced by the extracts, a reference drug (5-FU) was used as positive control for parallel comparison. The IC₅₀ values of 5-FU against HepG2 cells and MCF-7 cells were 618.21±12.86 µM and 922.31±39.24 µM respectively. 5-Fluorouracil induced cytotoxicity in HepG2 cells in the present study was similar previously reported by Mahavorasirikul study (IC₅₀ = 633.08±284.25 µM) (Mahavorasirikul et al. 2010). The cytotoxic effects were classified into 3 levels; potentially cytotoxicity (IC₅₀ < 100 µg/ml), moderated cytotoxicity (100 < IC₅₀ < 1,000 µg/ml) and inactive (IC₅₀ > 1,000 µg/ml) (Prayong et al. 2008). Based on this criteria, the extract from leaves of *A. odorata* was the most toxicity against HepG2 cells (IC₅₀ = 72.97±6.67 µg/ml) (table 2 and figure 1), whereas stem bark of *A. odorata* was the most cytotoxicity against MCF-7 cells (IC₅₀ = 65.55±5.58 µg/ml) (table 2 and figure 2). As showing high anticancer activity against both cancer cells, they are suitable for further investigation of the purification of bioactive compounds. There are many studies have been reported on bioactive properties of genus *Aglaia* belonging to family Meliaceae, but no cytotoxic activities against MCF-7 cells and HepG2 cells were reported for *A. odorata*. Moreover, many previous studies were also demonstrated anticancer or antitumor activities of *Aglaia odorata* (Cai et al. 2010; Lee et al. 1998; Ohse et al. 1996; Wu et al. 1997). Many constituents in this plant, presented as anticancer activities were reported such as dolabellane diterpenoids,

shown weakly cytotoxic effect on the human myeloid leukemia HL-60, hepatocellular carcinoma SMMC-7721, and lung cancer A-549 cells. Cyclopenta [b] benzofuran flavaglines, generally obtained from the genus *Aglaia* of the family Meliaceae, had the anticancer activity against tumor cell lines, P-388 lymphocytic leukemia both in vitro and in vivo (Lee et al. 1998; Ohse et al. 1996). Rocaglamide and scopoletin were previously isolated from *Aglaia odorata* has been reported to show activity against the KB (nasal pharyngeal carcinoma), HCT-8 (human colon carcinoma), RPMI-7951 (human melanoma), and TE-671 (human medulloblastoma) cancer cell lines (Wu et al. 1997).

In contrast, other plant extracts such as inflorescences and underground part of *A. ciliata*, leaves of *A. indica* and stem bark of *H. perforata* were shown IC₅₀ values over than 5-FU (IC₅₀ > 100 µg/ml) in both HepG2 cells and MCF-7 cells. Therefore, they were not truly interested in selecting for treatment of cancer. Under this toxicity study, most of plant extracts were found to be moderated cytotoxicity of 100 < IC₅₀ < 1,000 µg/ml, and no significantly difference in cytotoxicity between MCF-7 and HepG2 cells.

However, anticancer drug development from these lipophilic extracts are still needed more studies on the pathway and mode of action. In addition, the comparison of cytotoxic activity against cancer cells and normal cells must be shown.

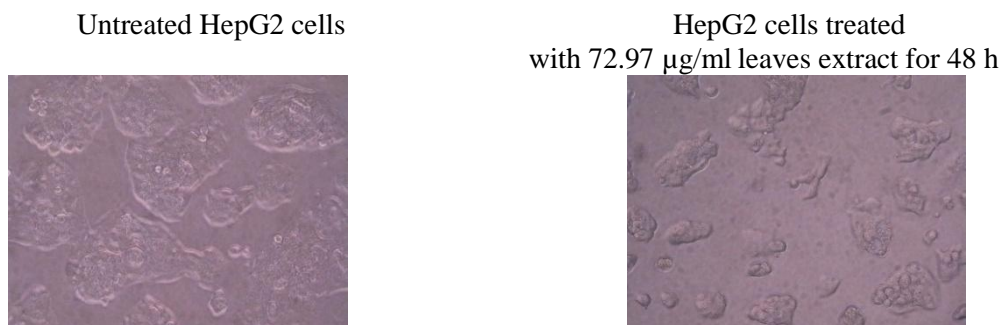


Figure 1 Effects of *A. odorata* leaves extract on morphology of HepG2 cell examined under microscopy. The morphology of untreated HepG2 cells; 100% cell growth (left) and HepG2 cells were treated with the leaves extract at 72.97 µg/ml for 48 h (right)

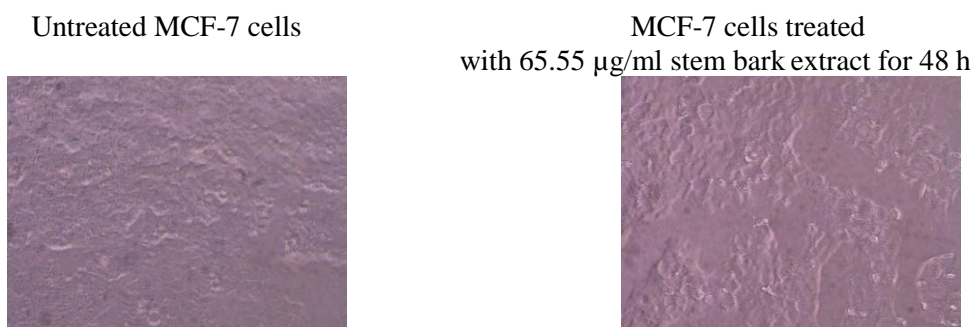


Figure 2 Effects of *A. odorata* stem bark extract on morphology of MCF-7 cell examined under microscopy. The morphology of untreated MCF-7 cells; 100% cell growth (left) and MCF-7 cells treated with the stem bark extract at 65.55 µg/ml for 48 h (right)

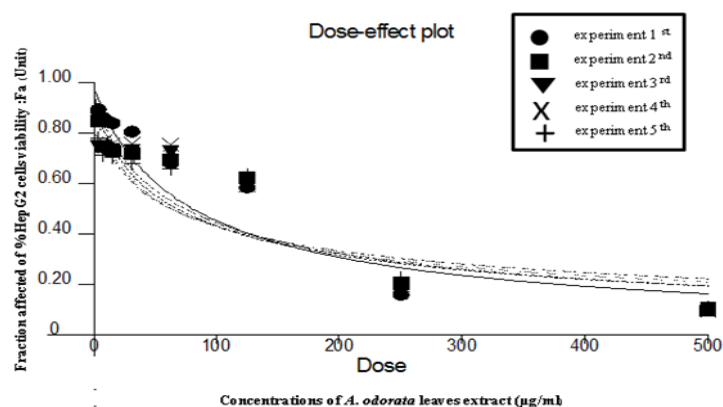


Figure 3 Dose-response curves of *A. odorata* leaves extract in HepG2 cells, 1st-5th experiments were demonstrated by CalcuSyn™USA software

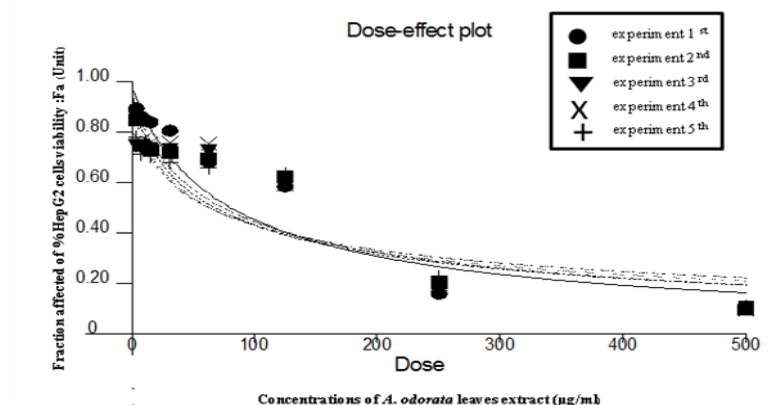


Figure 4 Dose-response curves of *A. odorata* leaves extract in HepG2 cells, 6th-9th experiments were demonstrated by CalcuSyn™USA software.

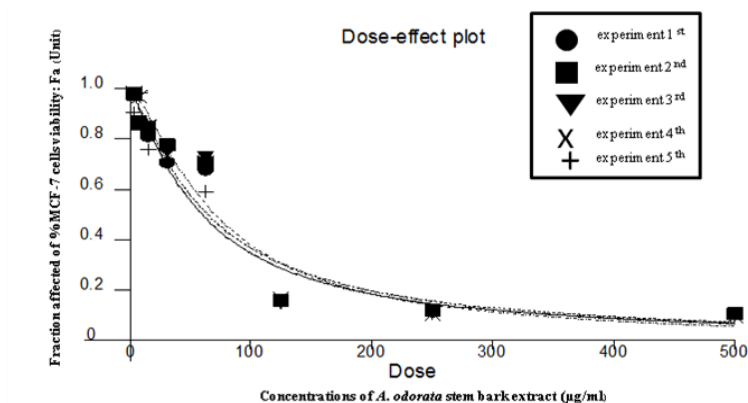


Figure 5 Dose-response curves of *A. odorata* stem bark extract in MCF-7 cells, 1st-5th experiments were demonstrated by CalcuSyn™USA software

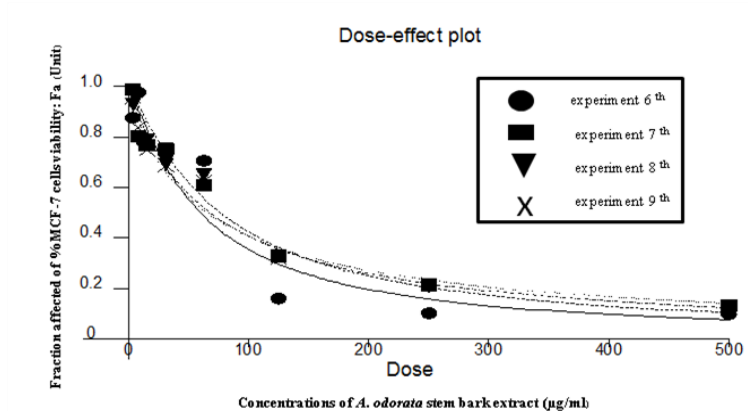


Figure 6 Dose-response curves of *A. odorata* stem bark extracts in MCF-7 cells, 6th-9th experiments were demonstrated by CalcuSyn™USA software

Conclusion

Results obtained from this study indicated that lipophilic extracts from leaves and stem barks of *A. odorata* or Pra-Yong exhibited promising cytotoxic activity against HepG2 and MCF-7 cells. Our findings suggest that these two parts of *A. odorata* extracts might be good candidates of anticancer against hepatocellular carcinoma and breast cancer cells. For the further studies, identification of their active compounds in these extracts should be determined.

References

- Biswas K, Chattopadhyay I, Banerjee RK, Bandyopadhyay U. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Current science*. 2002; 82(11): 1336-45.
- Brader G, Vajrodaya S, Greger H, Bacher M, Kalchhauser H. Bisamides, lignans, triterpenes, and insecticidal cyclopenta[b]benzofurans from *Aglaia* species. *J. Nat. Prod.* 1998; 61: 1482–90.
- Bunyaphrathasara N, Chokechareunporn O. Tradition medicinal plants. Prachachon: Bangkok, 1999.
- Cai X-H, Wang Y-Y, Zhao P-J, Li Y, Luo X-D. Dolabellane diterpenoids from *Aglaia odorata*. *Phytochemistry*. 2010; 71: 1020–4.
- Farnsworth NR, Bunyaphrathasara N. Thai medicinal plants recommended for primary health care system. Prachachon: Bangkok, 1992.
- Ferlay J, Bray F, Pisani P. GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC CancerBase No. 5. Version 2.0. Lyon: IARC Press; 2004. Available at: <http://www-dep.iarc.fr>. Accessed January 15, 2005.
- Gokhale VG, Bhide BV. Chemical investigation of *Spilanthes acmella*. *J. Ind. Chem. Soc.* 1945; 22: 250-2.
- Lee SK, Cui B, Mehta RR, Kinghorn AD, Pezzuto JM. Cytostatic mechanism and antitumor potential of novel ¹H-cyclopenta[b]benzofuran lignans isolated from *Aglaia elliptica*. *Chemico-Biol Interact.* 1998; 115: 215–28.
- Limsong J, Benjavongkulchai E, Kuvatanasuchai J. Inhibitory effect of some herbal extracts on adherence of *Streptococcus* mutants. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004; 92: 281-9.
- Mahavorasirikul W, Viyanant V, Chaijaroenkul W, Itharat A, Na-Bangchang K. Cytotoxic activity of Thai medicinal plants against human cholangiocarcinoma, laryngeal and hepatocarcinoma cells *in vitro*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2010; 10(55): 1-8.
- Martin N, Cheirsilpa A. Breast Chapter 11. Cancer in Thailand. 1995–1997. Ministry of Public Health, Bangkok. 2003; 3 :47– 8.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983; 65: 55–63.
- Nguyen-Pouplin J, Tran H, Phan T A, Dolecek C, Farrar J. Antimalarial and cytotoxic activities of ethnopharmacologically selected medicinal plants from South Vietnam. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007; 109: 417–27.
- Ohse T, Ohba S, Yamamoto T, Koyano T, Umezawa K. Cyclopentabenzofuran lignan protein synthesis inhibitors from *Aglaia odorata*. *J Nat Prod.* 1996; 59: 650–2.
- Piattelli M, Tringali C, Neri P, Rocco C. Stereochemistry and conformation of dolabellane diterpenes: an NMR and molecular mechanics study. *J. Nat. Prod.* 1995; 58: 697–704.

Acknowledgements

This work was supported by grant from the Thailand research fund (MRG5280123) and the National Research Council of Thailand. The authors wish to thank Professor. Dr. Kesara Na-Bangchang, Anurak Choeymang, MT., Miss Wiratchanee Mahavorasirikul, and Miss Mudtika fungkrajai for kindly helpful and advice.

- Prachayasittikul S, Suphamong S, Worachartcheewan A, Lawung R, Ruchirawat S. Bioactive Metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. Molecules. 2009; 14: 850-67.
- Prayong P, Barusrux S, Weerapreeyakul N. Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. Fitoterapia. 2008; 79: 598–601.
- Ramsewak RS, Erickson AJ, Nair MG. Bioactive *N*-isobutylamides from the flower buds of *Spilanthes acmella*. Phytochemistry. 1999: 729–32.
- Sunilson A J, Samuel J, Kalusalingam A, Chellappan D K, Gopinath R. Ethnomedical survey of plants used by the Orang Asli in Kampung Bawong, Perak, West Malaysia. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine. 2010; 6: 5.
- Tanaka T, Koike K, Mitsunaga K, Narita K, Takano S. Chromones from *Harrisonia perforata*. Phytochemistry. 1995; 40: 1787–90.
- Vatanasapt V, Sriamporn S. Liver cancer. Cancer in Thailand, 1992-1994, IARC Technical Report. 1999; 34(2): 45-8.
- Wu T-S, Liou M-J, Kuoh C-S, Teng C-M, Nagao T, Lee K-H. Cytotoxic and Antiplatelet Aggregation Principles from *Aglaia elliptifolia*. J. Nat. Prod. 1997; 60: 606-8.

RESEARCH ARTICLE

Effects of Genistein on Neointimal Changes after Balloon Injury of Carotid Artery in Ovariectomized Rats

Jirawan Mala¹, Sompol Sangaunrungsirikul², Pichet Sampatanukul³,
Wasan Udayachalerm²

¹ Inter- Program of Physiology, Graduate School, Chulalongkorn University, Thailand

² Department of Physiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Thailand

³ Department of Pathology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Thailand

Abstract

The aim of the present study was to investigate the effects of Genistein on neointimal changes after balloon injury of carotid artery in ovariectomized rats. Animals in this study were divided into 4 groups namely i) the sham operation group treated with dimethyl sulfoxide (DMSO) 100 μ l/day sc (n=8; Sham+DMSO) ii) the ovariectomized rats treated with DMSO 100 μ l/day subcutaneous (sc) (n=8; OVX+DMSO), iii) the ovariectomized rats treated with Genistein 0.25 mg/kg/day.sc (n=8; OVX+Genistein), and iv) the ovariectomized rats treated with 17 β -estradiol 0.2 μ g/kg/day.sc (n=8; OVX+E2). and iv Three groups of ovariectomized rats underwent balloon injury of left carotid artery and the other group underwent sham operation. Histology of the left carotid arteries were examined two weeks after the injury event. It showed that the intima area and the ratio of intima area to media area were significantly increased in the OVX+DMSO group compared with the Sham+DMSO group ($3167.78 \pm 562.75 \mu\text{m}^2$ and 1.36 ± 0.23 respectively). The intimal thickness and its ratio to media were significantly decreased in the OVX+Genistein group and the OVX+E2 group compared with the OVX+DMSO group ($1392.37 \pm 235.12 \mu\text{m}^2$, 0.6 ± 0.09 and $1298.00 \pm 152.02 \mu\text{m}^2$, 0.58 ± 0.07 respectively). The findings suggest that Genistein could inhibit neointimal changes from balloon injury of carotid artery in ovariectomized rats as similar to estrogenic administration.

Key Words genistein, neointimal change, balloon injury, ovariectomy

ผลของเจนนิสตินต่อการเปลี่ยนแปลงของชั้นอินทิมาในหลอดเลือดแดงคาโรติด ภายหลังการทำให้บาดเจ็บด้วยบอลูนในหนูแรทที่ถูกตัดรังไข่

จิรวรรณ มาลา¹, สมพล สงวนรังศิริกุล², พิเชฐ สัมปทานกุล³, วสันต์ อุทัยเฉลิม²

¹ สหศาสรีรวิทยา, บัณฑิตวิทยาลัย, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ประเทศไทย

² ภาควิชาสรีรวิทยา, คณะแพทยศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ประเทศไทย

³ ภาควิชาพยาธิวิทยา, คณะแพทยศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ประเทศไทย

บทคัดย่อ

จุดประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้คือ ศึกษาผลของเจนนิสตินต่อการเปลี่ยนแปลงของชั้นอินทิมาในหลอดเลือดแดงคาโรติดภายหลังการทำให้บาดเจ็บด้วยบอลูนในหนูแรทที่ถูกตัดรังไข่ สัตว์ทดลองในการศึกษานี้แบ่งเป็น 4 กลุ่มกลุ่มละ 8 ตัวคือ 1) กลุ่มหนูที่ได้รับการผ่าตัดแต่ไม่ได้ทำการผ่าตัดรังไข่ (sham operation) ได้รับ DMSO 100 ไมโครลิตรต่อวัน (Sham+DMSO) 2) กลุ่มหนูที่ถูกผ่าตัดรังไข่ 2 ข้างได้รับ DMSO 100 ไมโครลิตรต่อวัน (OVX+DMSO) 3) กลุ่มหนูที่ถูกผ่าตัดรังไข่ 2 ข้างได้รับเจนนิสติน 0.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน (OVX+Genistein) 4) กลุ่มหนูที่ถูกผ่าตัดรังไข่ 2 ข้างได้รับ 17- β estradiol (E2) 0.2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน (OVX+E2) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นถูกทำให้บาดเจ็บด้วยบอลูนในหลอดเลือดแดงคาโรติดข้างซ้าย เลี้ยงต่อเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการการุณยฆาต เก็บหลอดเลือดแดงคาโรติดข้างซ้ายเพื่อประเมินการเปลี่ยนแปลงของพื้นที่ในชั้นมีเดีย ชั้นอินทิมา ชั้นอินทิมาต่อชั้นมีเดีย ผลการทดลองพบว่า กลุ่ม OVX+DMSO มีการเพิ่มขึ้นของชั้นอินทิมา ชั้นอินทิมาต่อชั้นมีเดีย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม Sham+DMSO แต่ในกลุ่ม OVX+Genistein และกลุ่ม OVX+E2 ชั้นอินทิมา ชั้นอินทิมาต่อชั้นมีเดีย ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ กลุ่ม OVX+DMSO จากผลการทดลอง สรุปได้ว่า เจนนิสตินออกฤทธิ์คล้ายกับเอสโตรเจนขนาดต่ำในการยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของชั้นอินทิมาในหลอดเลือดแดงคาโรติดภายหลังการทำให้บาดเจ็บด้วยบอลูนในหนูแรทที่ถูกตัดรังไข่

คำสำคัญ: เจนนิสติน การเปลี่ยนแปลงของชั้นอินทิมา ททำให้บาดเจ็บด้วยบอลูน การตัดรังไข่

บทนำ

ผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน (menopause) มีอุบัติการณ์ของโรคหัวใจและหลอดเลือดสูงขึ้นเป็นผลจากการพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจน แต่การได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนยังเป็นที่โต้แย้งกันในแง่ของประโยชน์ทางคลินิกเนื่องจากเอสโตรเจนมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดสมอง มะเร็งเต้านมเพิ่มขึ้น (Anderson et al. 2004) ได้มีการพยายามนำเอาฮอร์โมนเอสโตรเจนมาศึกษาในสัตว์ทดลองโดยทำการตัดรังไข่ 2 ข้าง (Bilateral ovariectomy) เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนและสูญเสียการทำหน้าที่ของเอนโดทีเลียม (Endothelial dysfunction) ในหนูแรท (Khemapech 2003) บริหารเอสโตรเจนทดแทนในขนาดที่แตกต่างกันทางผิวหนัง (Estrogen replacement) และจำลองการเกิดหลอดเลือดแดงตีบในระยะแรกโดยการทำให้บาดเจ็บด้วยบอลลูนที่หลอดเลือดแดงคาโรติด (Rat carotid artery balloon injury model) จากการศึกษาพบว่า การให้เอสโตรเจนทดแทนมีผลทำให้ลดการหนาตัวของชั้นอินทิมาได้ (Neointimal formation) แต่อย่างไรก็ตามการให้เอสโตรเจนทดแทนขนาดสูงมีผลทำให้ระดับไขมันในเลือดสูงและยังมีผลต่อน้ำหนักมดลูกที่เพิ่มขึ้นอีกด้วย (Uterus hyperplasia) (Watanabe et al 2004).

พบอุบัติการณ์การเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดต่ำในเอเชีย จากการศึกษาพบว่าการบริโภคอาหารประเภทถั่ว และ ผลิตภัณฑ์ที่ทำจากถั่วสูง (Adlercreutz and Mazur 1997) ซึ่งเจนนิสตินเป็นสารประกอบหลักในกลุ่มไอโซฟลาโวน (Isoflavone) มีมากในถั่วเหลือง ซึ่งโครงสร้างคล้ายกับเอสโตรเจนสามารถ จับกับตัวต่อนับเอสโตรเจน (Estrogen receptors) ส่งผลทำให้ออกฤทธิ์ต่ออวัยวะเป้าหมายแต่ออกฤทธิ์อ่อนกว่า (weak action) (Kolonel 1988)

จุดประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้คือเพื่อ ศึกษาผลของเจนนิสตินต่อการเปลี่ยนแปลงของชั้น อินทิมาในหลอดเลือดแดงคาโรติดภายหลังการทำให้บาดเจ็บด้วยบอลลูนในหนูแรทที่ถูกตัดรังไข่เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนายาต่อไป

วิธีการทดลอง

การเตรียมสัตว์ทดลอง (Animal preparation)

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการทดลองนี้คือ หนูแรทเพศเมีย สายพันธุ์ Wistar อายุ 12 สัปดาห์ น้ำหนัก 240-270 กรัม จำนวน 32 ตัวจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ต.ศาลายา กิ่งอ.พุทธมณฑล จ.นครปฐม โดยให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป และน้ำสะอาดอย่างไม่จำกัดเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 25 องศาเซลเซียส และมีแสงสว่างวันละ 12 ชั่วโมง งานวิจัยนี้ได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่ใบรับรอง 17/54

ขั้นตอนการทดลอง (Experimental protocols)

แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 8 ตัว ดังนี้ คือ 1) กลุ่ม Sham operation ได้รับ Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma, USA) 100 ไมโครลิตรต่อวัน ฉีดทางผิวหนังทุกวัน (Sham+DMSO) 2) กลุ่มหนูที่ถูกผ่าตัดรังไข่ 2 ข้างได้รับ DMSO 100 ไมโครลิตรต่อวัน ฉีดทางผิวหนังทุกวัน (OVX+DMSO) 3) กลุ่มหนูที่ถูกผ่าตัดรังไข่ 2 ข้าง ได้รับ เจนนิสติน (Sigma, USA) 0.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ฉีดทางผิวหนังทุกวัน (OVX+Genistein) และ 4) กลุ่มหนูที่ถูกผ่าตัดรังไข่ 2 ข้าง ได้รับ $17-\beta$ estradiol (E2)

(Sigma, USA) 0.2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ฉีดทางผิวหนังทุกวัน (OVX+E2) จากนั้น 4 สัปดาห์ กลุ่มหนู 3 กลุ่มที่ถูกตัดรังไข่และได้รับสารต่างๆ ดังกล่าวถูกนำมาทำการผ่าตัดให้บาดเจ็บด้วยบอลลูน (balloon injury) ที่หลอดเลือดแดงคาโรติดข้างซ้าย (left carotid artery) ส่วนกลุ่ม Sham+DMSO ได้รับการผ่าตัดแต่ไม่ได้ทำให้บาดเจ็บด้วยบอลลูน (sham operation)

การผ่าตัดให้บาดเจ็บด้วยบอลลูน ที่หลอดเลือดแดงคาโรติด (Balloon injury of Carotid Artery)

ทำการผ่าตัดโดยเปิดถึง หลอดเลือดแดงคาโรติดข้างซ้าย (left common carotid artery) หลอดเลือดคาโรติดด้านนอก (external carotid artery) และหลอดเลือดคาโรติดด้านใน (internal carotid artery) ทำการคล้องด้วยไว้ เพื่อแยกหลอดเลือดต่างๆ และทำการ clamp ที่หลอดเลือด common carotid artery บริเวณใกล้กับหน้าอกส่วนบน และ clamp ที่ internal carotid artery ตรงบริเวณใกล้รอยแยก (bifurcation) สอด balloon catheter ขนาด 1 มิลลิเมตร ทาง external carotid artery ผ่านไปยัง common carotid artery ทำการขยาย balloon ด้วยเครื่อง automated balloon inflation device ที่ความดัน 1 บรรยากาศ (1 atm) ทำการดึงลาก 3 ครั้ง เพื่อให้ endothelial cell ถูกทำลาย จากนั้นค่อยๆ ดึง balloon catheter ออก และผูกด้วยที่ left external carotid artery ทำการเย็บปิด ทุกการผ่าตัดทำภายใต้สลับและวิธีปราศจากเชื้อ (Aseptic surgery) เลี้ยงหนูต่อเป็นเวลา 2 สัปดาห์จากนั้นทำให้ตายอย่างสงบด้วย Sodium pentobarbital ขนาด 120 มิลลิกรัม เกือบหลอดเลือดแดงคาโรติดข้างซ้าย เพื่อประเมิน histology (Tulis 2007, Watanabe et al. 2004)

ประเมิน histology ของการเปลี่ยนแปลงของชั้นอินทิมาในหลอดเลือดแดงคาโรติด ภายหลังการทำให้บาดเจ็บด้วยบอลลูน

การประเมิน histology ของการเปลี่ยนแปลงของชั้นอินทิมาในหลอดเลือดแดงคาโรติดภายหลังการทำให้บาดเจ็บด้วยบอลลูน โดยทำการ perfusion ด้วย phosphate buffer saline (PBS) และ fixation ด้วย 10% neutral solution formalin buffer ตัดส่วนของหลอดเลือดแดงคาโรติดข้างซ้ายประมาณ 1.5 เซนติเมตร และ embedded ใน paraffin ทำการตัด cross-section 3 ไมครอนแล้วย้อมด้วย Elastica van Gieson staining 5 section ต่อ 1 slide จากนั้นถ่ายภาพและประเมิน neointimal change ด้วย NIH image program (Image J) โดยโปรแกรมจะวิเคราะห์ pixel intensities values คำนวณเป็นพื้นที่ตามชั้นมีเดียและ อินทิมา โดยการเปลี่ยนแปลงของชั้นอินทิมา คือ อัตราส่วนระหว่างระหว่างพื้นที่ของชั้นอินทิมาส่วนด้วยพื้นที่ของชั้นมีเดีย (Intima/Media ratio) โดยคำนวณค่าเฉลี่ย 5 section ต่อ 1 การวิเคราะห์ (Ishibahshi et al. 2006)

Neointimal change =

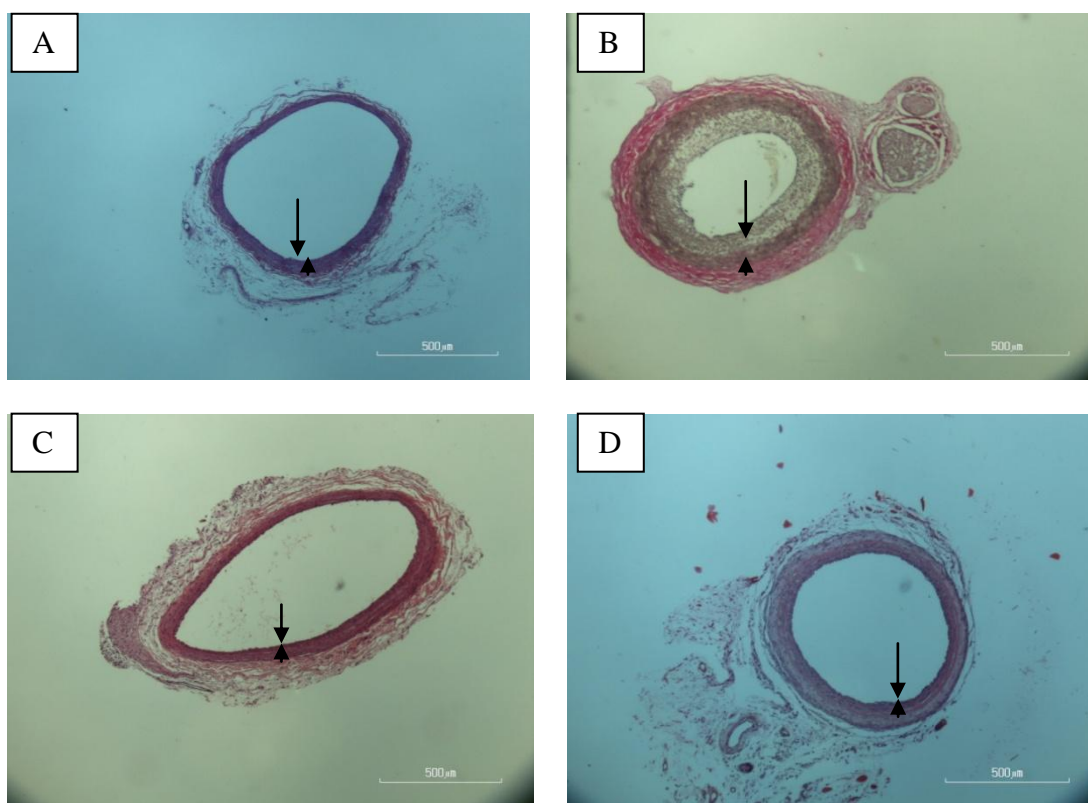
Intima area (μm^2) / Media area (μm^2)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลต่างๆ แสดงเป็น mean \pm SEM ทำการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม ด้วย one-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$) ด้วยโปรแกรม SPSS version 17.0

ผลการทดลอง

1. ผลของเจนนีสตินที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของชั้นอินทิมาในหลอดเลือดแดงคาโรติด ภายหลังการทำให้บาดเจ็บด้วยบอลลูน 2 สัปดาห์ในหนูแรทที่ถูกตัดรังไข่



Elastica van gieson staining, magnification x 4 (Bars: 500 µm)

รูปที่ 1 แสดง cross-section ของหลอดเลือดแดงคาโรติคข้างซ้ายภายหลังทำให้บาดเจ็บด้วยบอลูน 2

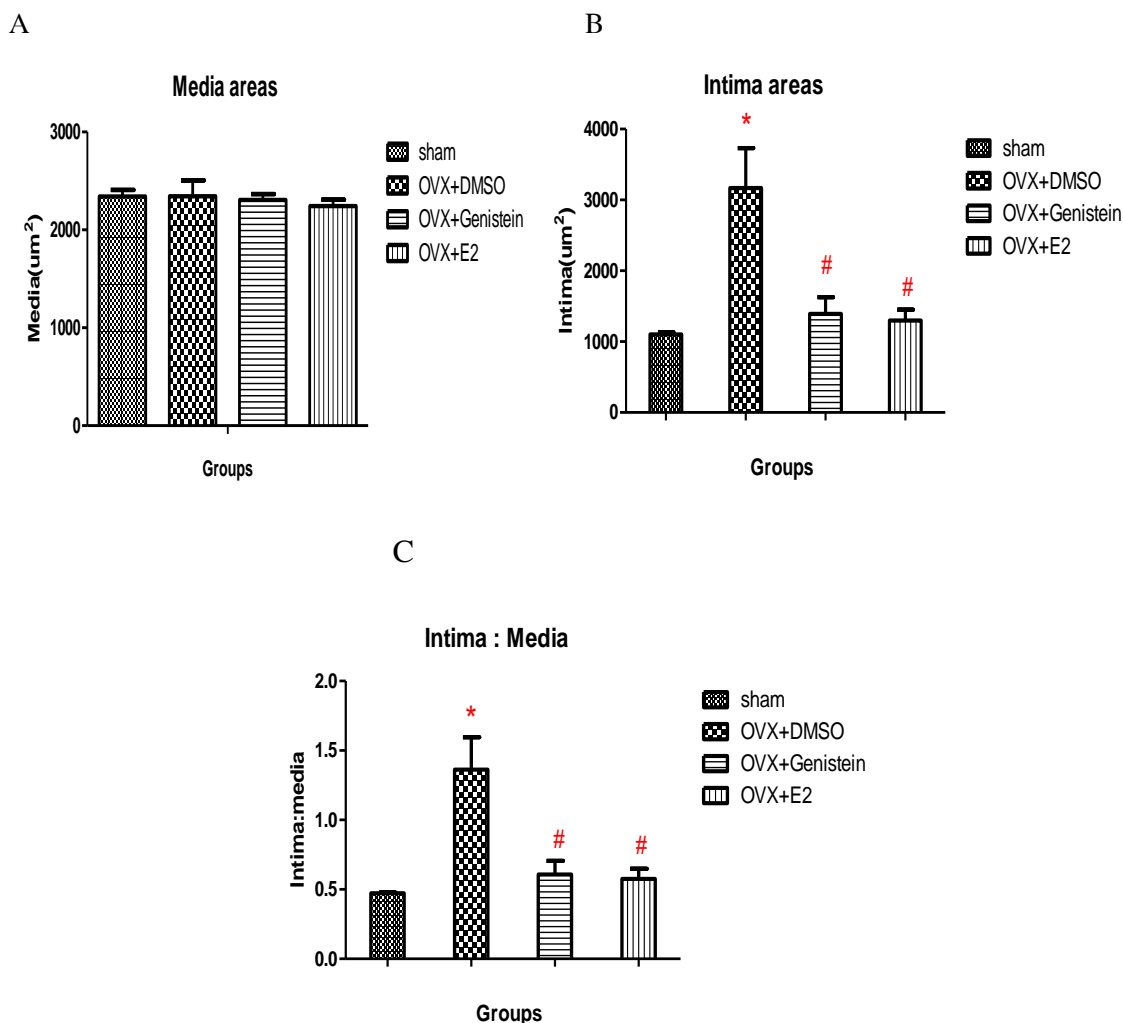
สัปดาห์ ↓ ลูกศรชี้ลงแสดงถึงชั้นอินทิมา ↑ หัวลูกศรชี้ขึ้นแสดงถึงชั้นมีเดีย

- (A) แสดงกลุ่ม sham operation และได้รับ DMSO 100 ไมโครลิตรต่อวัน (Sham+DMSO)
 (B) แสดงกลุ่มหนูที่ถูกผ่าตัดรังไข่ 2 ข้างและได้รับ DMSO 100 ไมโครลิตรต่อวัน (OVX+DMSO)
 (C) แสดงกลุ่มหนูที่ถูกผ่าตัดรังไข่ 2 ข้างและได้รับ เจนนิสทิน 0.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน (OVX+Genistein)
 (D) แสดงกลุ่มหนูที่ถูกผ่าตัดรังไข่ 2 ข้างและได้รับ 17-β estradiol (E2) 0.2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน (OVX+E2)

2. ผลการวิเคราะห์พื้นที่ของชั้นมีเดีย ชั้นอินทิมา และอินทิมาต่อมีเดีย

การประเมิน histology พบว่า พื้นที่ของชั้นมีเดียหลังทำให้บาดเจ็บด้วยบอลูนไม่มีความแตกต่างทางสถิติในทุกกลุ่ม (ดังในรูป 2 A) พื้นที่ของชั้นอินทิมาและอินทิมาต่อมีเดียพบว่า ในกลุ่มหนูที่ถูกผ่าตัดรังไข่และได้รับ DMSO (OVX+DMSO) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99.5 % ($3167.78 \pm 562.75 \mu\text{m}^2$, 1.36 ± 0.23 ตามลำดับ)

เมื่อเทียบกับกลุ่ม sham operation และได้รับ DMSO (sham+DMSO) แต่ในกลุ่มหนูที่ถูกตัดรังไข่ 2 ข้างและได้รับ เจนนิสทิน 0.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ต่อวัน (OVX+Genistein) และกลุ่มหนู ที่ถูกผ่าตัดรังไข่ 2 ข้างและกลุ่มหนูที่ถูกผ่าตัดรังไข่ 2 ข้าง และได้รับ 17-β estradiol (E2) 0.2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน (OVX+E2) พบว่า ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99.5% ($1392.37 \pm 235.12 \mu\text{m}^2$, 0.6 ± 0.09 และ



รูปที่ 2 แสดงการวิเคราะห์พื้นที่ของชั้นมีเดีย (A) ชั้นอินทิมา (B) และชั้นอินทิมาต่อมีเดีย (C) ภายหลังจากทำให้บาดเจ็บด้วยบอลลูน 2 สัปดาห์ ค่าแสดงเป็น mean \pm S.E.M. * $P < 0.005$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม sham operation และได้รับ DMSO(sham) # $P < 0.005$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ถูกผ่าตัดรังไข่ 2 ข้าง และได้รับ DMSO(OVX+DMSO)

1298.00 \pm 152.02 μm^2 , 0.58 \pm 0.07 ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ถูกผ่าตัดรังไข่ 2 ข้าง และได้รับ DMSO (OVX+DMSO) (ดังรูป 2B, 2C)

วิจารณ์

จากผลการทดลองพบว่า การให้เจ นิน สเตนขนาด 0.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ฉีด ทางผิวหนังสามวัน ยับยั้งการ เปลี่ยนแปลงของ ชั้นอินทิมา ภายหลังจากการทำให้บาดเจ็บ

ด้วยบอลลูนในหนูแรทที่ถูกตัดรังไข่ จาก การศึกษาของ Xing และ คณะ ในปี 2003 พบว่ามีการเพิ่มจำนวน Granulocyte และ Monocyte/macrophage ซึ่งกระตุ้นให้มีการ แสดงออกของ Adhesion molecules บนเอนโด ทีเลียม มีผลทำให้ Granulocyte และ Monocyte/macrophage ทำการ rolling และมีการ เกาะติดบนผิวของเอนโดทีเลียมซึ่งอาศัย การทำงานของ adhesion molecules ตามมา ด้วยการ migration ของ leukocyte ผ่านเข้าไป

ใน periadventitial และ adventitial ของหลอดเลือดแดงใน 1 วันแรกภายหลังจากเอนโดทีเลียสถูกทำให้บาดเจ็บด้วยบอลลูน (Xing et al. 2003) ส่วนกลไกการออกฤทธิ์ของเจนนิสตินยังไม่เป็นที่ทราบชัดเจน แต่จากการศึกษาใน *in vitro* พบว่า เจนนิสตินมีผลไปยับยั้งการแสดงออกของ vascular endothelial cell adhesion molecule และยังเป็นที่น่าสนใจว่า เจนนิสตินสามารถยับยั้งการแสดงออกของ CD62E และ CD106 ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α บน human umbilical vein endothelial cell ตำแหน่งของ monocyte adhesion อีกด้วย ซึ่งมีส่วนสำคัญในป้องกันการตอบสนองของเอนโดทีเลียสตรงตำแหน่งที่มีการอักเสบ (Weber et al. 1995 และ May et al. 1996)

เอกสารอ้างอิง (References)

- Adlercreutz H, Mazur W. Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann Med.* 1997;29(2):95-120.
- Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, Bassford T, Beresford SA, Black H, et al. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA.* 2004;291(14):1701-12.
- Ishibahshi T, Obayashi S, Sakamoto S, Aso T, Ishizaka M, Azuma H. Estrogen replacement effectively improves the accelerated intimal hyperplasia following balloon injury of carotid artery in the ovariectomized rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006;47(1):37-45.
- Khemapech S, Monsiri K, Patumraj S, Siriviriyakul P. Genistein replacement therapy for vasodilation disorder in bilateral ovariectomized rats. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2003;29(3-4):271-7.
- Kolonel LN. Variability in diet and its relation to risk in ethnic and migrant groups. *Basic Life Sci.* 1988; 43: 129-35.

อย่างไรก็ตามกลไกการออกฤทธิ์ที่แท้จริงของเจนนิสตินนั้นยังเป็นที่ค้นหาต่อไป

สรุป

เจนนิสตินสามารถป้องกันการเปลี่ยนแปลงของชั้นอินทิมาได้ซึ่งออกฤทธิ์คล้ายกับเอสโตรเจนขนาดต่ำ ในหลอดเลือดแดงคาโรติดภายหลังการทำให้บาดเจ็บด้วยบอลลูนในหนูแรทที่ถูกตัดรังไข่

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ทูน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- May MJ, Wheeler-Jones CP, Pearson JD. Effects of protein tyrosine kinase inhibitors on cytokine-induced adhesion molecule expression by human umbilical vein endothelial cells. *Br J Pharmacol* 1996; 118(7):1761-71.
- Tulis DA. Rat carotid artery balloon injury model. *Methods Mol Med.* 2007;139:1-30.
- Watanabe T, Miyahara Y, Akishita M, Nakaoka T, Yamashita N, Iijima K, et al. Inhibitory effect of low-dose estrogen on neointimal formation after balloon injury of rat carotid artery. *Eur J Pharmacol.* 2004;502(3):265-70.
- Weber C, Negrescu E, Erl W, Pietsch A, Frankenberger M, Ziegler-Heitbrock HW, et al. Inhibitors of protein tyrosine kinase suppress TNF-stimulated induction of endothelial cell adhesion molecules. *J Immunol* 1995;155(1):445-51.
- Xing D, Miller A, Novak L, Rocha R, Chen YF, Oparil S. Estradiol and progestins differentially modulate leukocyte infiltration after vascular injury. *Circulation.* 2004;109(2):234-41.

RESEARCH ARTICLE

Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Thai Medicinal Plants and Herbal Formulations**Artitaya Theingsusuk¹, Vithoon Viyanant¹, Wanna Chaijaroenkul¹, Kesara Na-Bangchang¹**¹*Thailand Center of Excellence on Drug Discovery and Development (TCEDDD), Thammasat University (Rangsit Campus), Pathumthani, Thailand***Abstract**

The emergence and spread of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* has become problematic in undermining malaria control programs in most endemic regions of the world. Discovery and development of new antimalarial drugs is urgently needed. Natural products are one of the important sources of promising antimalarial drugs. The aim of the present study was to investigate the antimalarial activities of fifteen medicinal plants/formulations used in Thai traditional medicine for treatment of various ailments. The antimalarial activity of each plant extract was assessed against chloroquine-resistant K1 and chloroquine-sensitive 3D7 *P. falciparum* clones using SYBR green-I-based assay. The extracts of five plants/formulation, *i.e.*, *Piper chaba* Hunt. (fruit), *Kaempferia galangal* Linn. (leaf), *Myristica fragrans* Houtt.(seed), *Garcinia mangostana* Linn.(pericarp), and Pra-Sa-Prao-Yhai formulation (a mixture of parts of 18 plants) exhibited potent antimalarial activities against 3D7 or K1 *P. falciparum* clone or both with IC₅₀ values of less than 10 µg/ml. Cytotoxicity of each extract against human renal epithelial (HRE) cell line was performed using MTT assay and the selectivity index (SI) was calculated. Results showed that all the plant extracts except *Garcinia mangostana* Linn. were highly selective for both *P. falciparum* clones with SI greater than 10. The ethanolic extract of *Piper chaba* Hunt. was both the most potent and selective candidate. All five plants/formulation will be further investigated for their active ingredients and molecular targets of action including their antimalarial activities in animal model.

Key Words *Plasmodium falciparum*, Thai medicinal plants, antimalarial activity, drug resistance

การศึกษาการออกฤทธิ์ต้านมาลาเรีย และความเป็นพิษต่อเซลล์ของสมุนไพรไทย

อาทิตยา เทียงสุสุข, วิฑูรย์ ไวยนันท์, วรรณ ชัยเจริญกุล, เกศรา ณ บางช้าง

ศูนย์ความเป็นเลิศทางด้านการวิจัย ค้นคว้าและพัฒนาฯ แห่งประเทศไทย มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
(ศูนย์รังสิต) ปทุมธานี

บทคัดย่อ

การปรากฏและแพร่กระจายของเชื้อมาลาเรียที่ดื้อต่อยาหลายชนิด รวมทั้งการลดประสิทธิภาพของยาอาร์ทีมิซินินและอนุพันธ์ ได้กลายเป็นปัญหาอย่างยิ่งต่อการควบคุมโรคมาลาเรีย ในแถบภูมิภาคที่มีการระบาดของโรคมากที่สุด การคิดค้นและพัฒนาต้านมาลาเรีย ชนิดใหม่จึงเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างเร่งด่วน ผลผลิตที่มาจากธรรมชาตินั้นเป็นหนึ่งในแหล่งกำเนิดที่สำคัญของยาที่มีแนวโน้มต้านมาลาเรีย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการมีฤทธิ์ต้านมาลาเรียจากพืชสมุนไพร 15 ชนิด/สูตร ที่ใช้ในแพทย์แผนไทยในการรักษาโรคต่างๆ การออกฤทธิ์ต้านมาลาเรียจากสารสกัดจากพืชแต่ละชนิด (ในเอธานอล) ประเมินฤทธิ์ต้านมาลาเรียต่อเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมสายพันธุ์ K1 และ 3D7 ด้วยวิธี SYBR Green I สารสกัดจากพืช 5 ชนิด/สูตร ได้แก่ ดีปลี เปราะหอม จันทน์เทศ มังคุด และตำรับประสะเปราะใหญ่ พบว่ามีฤทธิ์ต้านมาลาเรียที่มีศักยภาพต่อเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารัมสายพันธุ์ K1 หรือ 3D7 อย่างใดอย่างหนึ่งหรือทั้งสองอย่าง โดยมีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ร้อยละ 50 นั้นมีค่าน้อยกว่า 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากแต่ละชนิด ต่อเซลล์เยื่อบุผิวของไตที่ได้มาจากมนุษย์ โดยใช้วิธี MTT และนำผลการทดสอบนี้มาคำนวณหาค่า selectivity index (SI) ผลการศึกษาพบว่าสมุนไพรทั้งหมดยกเว้นสารสกัดจากมังคุดนั้นแสดงให้เห็นถึงการเลือกออกฤทธิ์ต่อเชื้อมาลาเรียสูง ในทั้งสองสายพันธุ์ โดยมีค่าดัชนี SI มากกว่า 10 สารสกัดจากดีปลีเหมาะสมที่จะได้รับเลือกเป็นยาต้านมาลาเรียตัวใหม่เนื่องจากคุณสมบัติการมีฤทธิ์ต้านมาลาเรียที่สูง การเลือกออกฤทธิ์ต่อเชื้อมาลาเรียและความปลอดภัยต่อเนื้อเยื่อมนุษย์ การศึกษาในกายภาพหน้าสมุนไพรทั้งห้าชนิดนี้จะถูกสำรวจการมีฤทธิ์ต้านมาลาเรียในสัตว์ทดลองและกลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุล

คำสำคัญ: *Plasmodium falciparum*, Thai medicinal plants, antimalarial activity, drug resistance

Introduction

Malaria is widespread in tropical and subtropical regions (Na-Bangchang and Congpuong, 2007). It continues to be an enormous global health challenge, with millions of new infections and deaths reported annually (Guantai and Chibale, 2011). The treatment and control of malaria is becoming increasingly difficult due to the emergence and spread of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* (White, 1998). Nevertheless, antimalarial chemotherapy remains the mainstay for malaria control in the absence of a suitable vaccine treatment. Several approaches have been applied for searching of new antimalarial drugs. Among these are investigation of antimalarial candidates from natural-product-derived compounds. The objective of the study was to search for new promising antimalarial drugs from Thai medicinal plants used for treatment of various ailments. A total of 15 Thai medicinal plants/formulations were investigated for their antimalarial and cytotoxic activities in human renal epithelial cell *in vitro*.

Materials and methods

Plant materials and preparation of plant crude extracts

Plant materials were collected from different regions of Thailand and some were purchased from the city markets. Authentication of the plant materials was performed at the herbarium of the Department of Forestry, Bangkok, Thailand, where the herbarium vouchers have been archived. A duplicate set of each plant material has been deposited in the herbarium of Southern Center of Thai Medicinal Plants, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkhla University, Songkhla, Thailand. The extraction of all Thai herbal medicinal plants was performed by maceration method (Mahavorasirikul *et al.*, 2010). Stock solutions of the ethanolic extracts were prepared at the concentration of 1 mg/ml. Table 1 summarizes the information of the investigated plant species, which includes botanical names, the plant parts used in the screening. Table 2 shows the composition of Pra-Sa-Prao-Yhai formulation.

Assessment of antimalarial activities in vitro

Plasmodium falciparum chloroquine-resistant (K1) and chloroquine-sensitive (3D7) clones were kindly provided by the Malaria Research Unit, Institute of Health Research, Chulalongkorn University, Thailand. CQ-sensitive and CQ-resistant clones of *P. falciparum* were maintained in continuous culture in O⁺ human erythrocytes suspended in RPMI 1640 culture medium (at 37°C under a gas mixture of 5% CO₂, 5% O₂, and 90% N₂) according to the standard method described by Trager and Jensen (Trager and Jensen, 1976). The level of parasitaemia in the culture was maintained between 2 and 10%. The parasite culture was treated with 5% sorbitol in order to obtain the ring stage of *P. falciparum* (Lambros and Vanderberg, 1979).

Antimalarial activity screening of ethanolic extracts of 15 medicinal plants/formulations was performed using 2% parasitaemia and 1% haematocrit. All assays were performed in 96-well microtiter plates using SYBR green-I-based assay (Bennett *et al.*, 2004, Smilkstein *et al.*, 2004). Each extract was initially screened for antimalarial activity against 3D7 and K1 *P. falciparum* clones at the concentration of 50 µg/ml. The potential candidates which resulted in parasite survival of less than 50% were further assessed for their IC₅₀ (concentration that inhibits parasite growth by 50%) values using dose response analysis (CalcuSynTM software, USA). The concentration range of the plant extracts used was 0.78-100 µg/ml. Chloroquine (0.002-0.257 µg/ml), artesunate (0.00015-0.01922 µg/ml) and mefloquine (0.00065-0.08295 µg/ml) were used as standard antimalarial drugs.

Assessment of cytotoxic activities in vitro

Normal human renal epithelial cell line (HRE) was purchased from PromoCell Co. Ltd. (PromoCell, Germany) and was cultured in renal epithelial cell growth medium 2 with SupplementPack (PromoCell, Germany). HRE was incubated at 37°C in 5% CO₂ atmosphere with 95% humidity, and was seeded in

Table 1.List of Thai medicinal plants/formulations

Family	Plant species	Plant part used
Zingiberaceae	<i>Amomum testaceum</i> Ridl.	Seed
Umbelliferae	<i>Angelica dahurica</i> Benth.	Root
Umbelliferae	<i>Angelica sinensis</i> (Oliv.) Diels	Rhizomes
Cruciferae	<i>Asclepias curassavica</i> Linn.	Flower
Umbelliferae	<i>Cuminum cyminum</i> Linn.	Seed
Guttiferae	<i>Garcinia mangostana</i> Linn.	Pericarp
Zingiberaceae	<i>Kaempferia galangal</i> Linn.	Leaves
Umbelliferae	<i>Ligusticum sinense</i> Oliv. cv. Chuanxiong	Rhizomes
Myristicaceae	<i>Myristica fragrans</i> Houtt.	Seed
Nelumbonaceae	<i>Nigella sativa</i> Linn.	Seed
Piperaceae	<i>Piper chaba</i> Hunt.	Fruits
-	Pra-Sa-Prao-Yhai Formulation	-
Smilacaceae	<i>Smilax corbularia</i> Kunth.	Rhizomes
Myrtaceae	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L.M. Perry	Flower
Zingiberaceae	<i>Zingiber ligulatum</i> Roxb.	Rhizomes

Table 2.Composition of Pra-Sa-Prao-Yhai formulation

Family	Plant species	Plant part used
Compositae	<i>Artemisia annua</i> Linn.	Rhizomes
Compositae	<i>Atractylodes lancea</i> (thung.) DC.	Rhizomes
Cruciferae	<i>Asclepias curassavica</i> Linn.	Flower
Dracaenaceae	<i>Dracaena loureiri</i> Gagnep.	Stem
Guttiferae	<i>Mammea siamensis</i> Kosterm	Flower
Guttiferae	<i>Mesua ferrea</i> Linn.	Flower
Myristicaceae	<i>Myristica fragrans</i> Houtt.	Seed
Myrtaceae	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L.M. Perry	Flower
Nelumbonaceae	<i>Nigella sativa</i> Linn.	Seed
Sapotadeae	<i>Mimusops elengi</i> Linn.	Flower
Umbelliferae	<i>Angelica dahurica</i> Benth.	Root
Umbelliferae	<i>Angelica sinensis</i> (Oliv.) Diels	Rhizomes
Umbelliferae	<i>Anethum graveolens</i> Linn.	Root
Umbelliferae	<i>Cuminum cyminum</i> Linn.	Seed
Umbelliferae	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. var. dulce Alef.	Seed
Umbelliferae	<i>Ligusticum sinense</i> Oliv. cv. Chuanxiong	Rhizomes
Zingiberaceae	<i>Amomum testaceum</i> Ridl.	Seed
Zingiberaceae	<i>Kaempferia galangal</i> Linn.	Leaves

a 96-well plate at a density of 10^4 cells/well in 100 μ l of culture medium. After 24 h incubation, cells were maintained with different concentrations of each plant extract (1.95-250 μ g/ml). The cytotoxicity of the plant extracts was determined using the colorimetric methylthiazolotetrazolium (MTT) assay (Mosmann, 1983). Absorbance was measured at 570 nm using a microplate reader (Varioscan Flash, Finland). Experiments were repeated three times for each extract (triplicate for each experiment). The selectivity index was determined by the ratio of the IC_{50} value on HRE cells to the IC_{50} value on 3D7 and K1 *P. falciparum* clone.

Results

Results from the initial screening demonstrated that the extracts of 9 out of 15 medicinal plants/herbal formulations showed promising activity against both K1 and 3D7 clones of *P. falciparum* with parasite survival of less than 50% at the

concentration of 50 μ g/ml (Figure 1). Among these, the 4 plants and 1 herbal formulation showed potent antimalarial activities with IC_{50} values of less than 10 μ g/ml for 3D7 or K1 *P. falciparum* or both (*Piper chaba* Hunt.: IC_{50} 4.1 vs 5.3 μ g/ml; *Myristica fragrans* Houtt.: IC_{50} 4.6 vs 5.4 μ g/ml; *Kaempferia galangal* Linn.: IC_{50} 4.7 vs 9.7 μ g/ml; *Garcinia mangostana* Linn.: IC_{50} 11.8 vs 3.6 μ g/ml; Pra-Sa-Prao-Yhai formulation Table 1: IC_{50} 9.1 vs 15.7 μ g/ml against 3D7 vs K1) (Figure1). All the medicinal plants/herbal formulations extracts except *Garcinia mangostana* Linn. showed satisfactory selective antimalarial activities against both clones with SI > 10 (Figure 2). The highest of antimalarial activities and selectivity was The ethanolic extract of *Piper chaba* Hunt. Exhibited the most potent and selective antimalarial activity with potency of 12.4%, 0.075%, and 0.014% of chloroquine, mefloquine and artesunate against K1 *P. falciparum* clone, respectively.

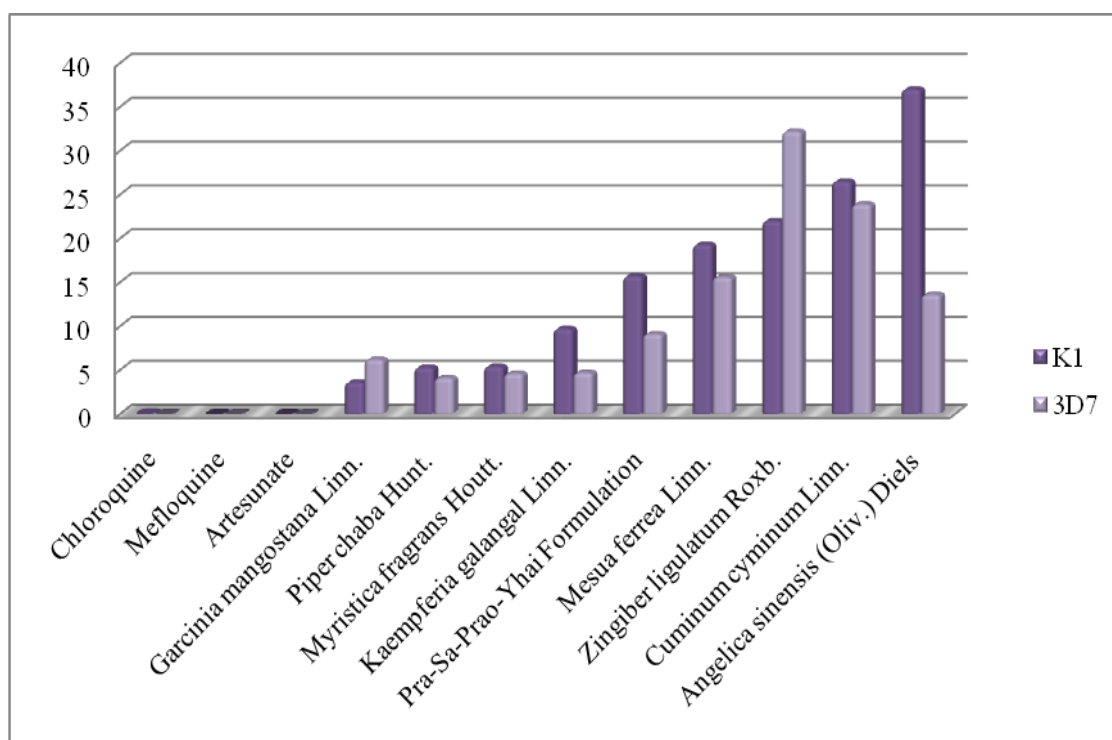


Figure1 Antimalarial activities (indicated by IC_{50} values) of 8 medicinal plants and 1 herbal formulation against *Plasmodium falciparum* (K1 and 3D7 clones)

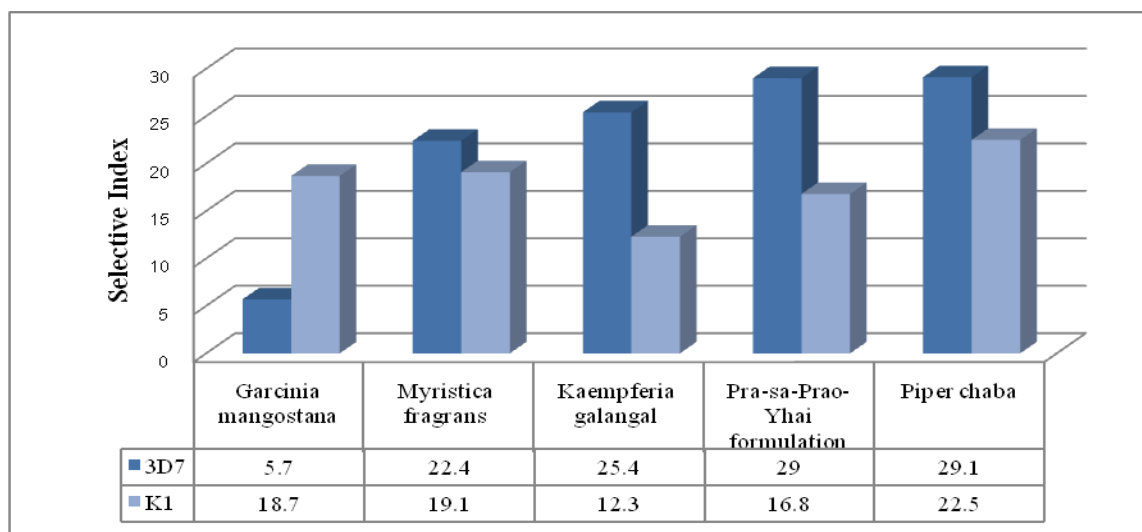


Figure2 Selective index of 4 medicinal plants and 1 herbal formulation against 3D7 and K1 *Plasmodium falciparum* clones.

Discussion

The five plants/formulation exhibited the most potent antimalarial activity with IC_{50} of less than 10 $\mu\text{g/ml}$ against CQ-resistant and CQ-sensitive *P. falciparum* clones or both. Based on the criteria for categorization of plant extracts with antimalarial activity (Rasoanaivo *et al.*, 2004), their activities were considered good to moderate. The IC_{50} values of Pra-Sa-Prao-Yhai formulation and *Garcinia mangostana* Linn. were less than 10 $\mu\text{g/ml}$ against K1 or 3D7 clone. The low selectivity index of the extract of *Garcinia mangostana* Linn. against 3D7 *P. falciparum* (SI = 5.7) indicates relatively high toxicity of the extract to human cells. Despite its selectivity for both clones, Pra-Sa-Prao-Yhai may be used only effectively against CQ-sensitive *P. falciparum* strains (IC_{50} in K1 > 10 $\mu\text{g/ml}$). The ethanolic extracts of *Piper chaba* Hunt., *Myristica fragrans* Houtt., and *Kaempferia galangal* Linn. showed good antimalarial activities and selective for both 3D7 and K1 *P. falciparum* clones. The ethanolic extract of *Piper chaba* Hunt. exhibited the most potent and selective antimalarial activity. Further investigations of the potential antimalarial candidates in animal model including molecular mechanisms of action of the isolated active moieties are underway.

Conclusion

Among the 15 Thai medicinal plants used for treatment of various ailments, the ethanolic extracts of 5 plants/formulation, i.e., *Piper chaba* Hunt. (fruit), *Kaempferia galangal* Linn. (leaves), *Myristica fragrans* Houtt. (seed), *Garcinia mangostana* Linn. (pericarp), and Pra-Sa-Prao-Yhai formulation (a mixture of parts of 18 plants) exhibited potent antimalarial activities against 3D7 or K1 *P. falciparum* clone or both with IC_{50} values of less than 10 $\mu\text{g/ml}$. All except *Garcinia mangostana* Linn. were highly selective for both *P. falciparum* clones with SI greater than 10. The ethanolic extract of *Piper chaba* Hunt. exhibited the most potent and selective antimalarial activity.

Acknowledgements

The study was supported by Office of the Higher Education Commission (RG and NRU Projects), Ministry of Education of Thailand. We thank Associate Professor Dr. Arunporn Itharat, Faculty of Medicine, Thammasat University for the support of plant materials.

References

- Bennett T, Paguio M, Gligorijevic B, Seudieu C, Kosar A, Davidson E, et al. Novel, rapid and inexpensive cell-based quantification of antimalarial drug efficacy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(5):1807-10.
- Guantai E, Chibale K. How can natural products serve as a viable source of lead compounds for the development of new/novel anti-malarials? *Malar J* 2011;10:S2.
- Lambros C, Vanderberg J. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol*. 1979;65:418-20.
- Mahavorasirikul W, Viyanant V, Chaijaroenkul W, Itharat A, Na-Bangchang K. Cytotoxic activity of Thai medicinal plants against human cholangiocarcinoma, laryngeal and hepatocarcinoma cells *in vitro*. *BMC Complement Altern Med*. 2010;10:55.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
- Na-Bangchang K, Congpuong K. Current malaria status and distribution of drug resistance in East and Southeast Asia with special focus to Thailand. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2007 Feb;211(2):99-113.
- Rasoanaivo P, Deharo E, Ratsimamanga-Urverg S, Frappier F. Guidelines for the Nonclinical Evaluation of the Efficacy of Traditional Antimalarials. *Traditional Medicinal Plants and Malaria*. Boca Raton London New York Washington, D.C.: CRC PRESS; 2004.
- Smilkstein M, Sriwilaijaroen N, Kelly J, Wilairat P, Riscoe M. Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;2004(48):1803-6.
- Trager W, Jensen J. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. 1976;193:673-5.
- White NJ. Drug resistance in malaria. *British Medical Bulletin*. 1998;54(3): 703-15.

RESEARCH ARTICLE

Effects of steam aerosolization on heat shock protein 70 expression in rats.

Duddao Chaidee¹, Udomlak Matsathit¹, Chantana Mekseepralard³, Piyanant Chonmaitree⁴, Piyanee Ratanachamnong⁵, Somkiat Wattanasirichaigoon⁶, Laddawal Phivthongngam²

¹*Biomedical Science Program, Graduated School, Srinakharinwirot University, Bangkok, 10110, Thailand*

²*Department of pharmacology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Bangkok, 10110, Thailand*

³*Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Bangkok, 10110, Thailand*

⁴*Department of Medicine, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Nakhon Nayok, 26120, Thailand*

⁵*Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand*

⁶*Department of Surgery, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Nakhon Nayok, 26120, Thailand*

Abstract

Heat shock proteins (HSPs) play an important role in cellular protection when exposed to stressors such as positive pressure ventilation, lipopolysaccharide, and elevated temperatures. The aim of this study was to investigate HSP70 expression in lungs of the rats treated with steam aerosolization. Male Sprague-Dawley rats were breathed under steam aerosolization for 30, 60, 90 and 120 minutes at 40°C and at 50°C for 30 minutes. After the experiments, the lungs were removed and analyzed for the expression of HSP70 by Western blot analysis. After 60 minutes of steam aerosolization at 40°C, there was an increase in HSP70 expression in rat's lungs compared with those of control group. Steam aerosolization at 40°C for 60 minutes was the optimal condition to induce expression of HSP70 in rats. No rat could tolerate to 50°C-steam aerosolization longer than 30 minutes. The present study showed that steam aerosolization induced an expression of HSP70 in lung tissues of the rats, which may confer protection against lung injury.

Key Words: Heat shock protein, HSP70, Steam aerosolization

บทคัดย่อ

Heat shock proteins (HSPs) มีบทบาทสำคัญในการปกป้องเซลล์เมื่อได้รับตัวกระตุ้นให้อยู่ในภาวะเครียด เช่น positive pressure ventilation, lipopolysaccharide และอุณหภูมิที่สูงขึ้น การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของ HSP70 ในปอดของหนูที่ได้รับไอละอองน้ำอุ่นทางการหายใจ หนูขาวเพศชายพันธุ์ Sprague-Dawley หายใจภายใต้ละอองไอน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 30, 60, 90 หรือ 120 นาที หรือที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 นาที ภายหลังการทดลองปอดถูกแยกออกมาเพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของ HSP70 โดยวิธีการ Western blot analysis การให้ไอละอองน้ำอุ่นที่ 40°C เป็นเวลา 60 นาที สามารถเพิ่มการแสดงออกของ HSP70 ในปอดของหนูอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม การให้ไอละอองน้ำอุ่น ที่ 40°C เป็นเวลา 60 นาที ทำให้เกิดการแสดงออกของ HSP70 ในหนูขาวได้สูงสุด หนูขาวไม่สามารถทนต่อละอองไอน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 50°C ได้นานกว่า 30 นาที การศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า ไอละอองน้ำอุ่นสามารถชักนำให้เกิดการแสดงออกของ HSP70 ในปอดของหนูขาวได้ ซึ่งอาจนำไปสู่การป้องกันการได้รับบาดเจ็บที่เนื้อเยื่อปอดได้

คำสำคัญ: Heat shock protein, HSP70, ละอองไอน้ำอุ่น

Introduction

Heat shock proteins (HSPs) are a group of stress proteins that maintain cell homeostasis against various forms of stress as an adaptive response. Various families of HSPs are classified by their molecular weights, e.g. HSP25, HSP32, HSP47, HSP60, HSP70, HSP90 and HSP110 [Kregel 2002]. Most of them play an important role to protect cells from many stressors such as hyperthermia, inflammation, cardiac ischemia, endotoxemia and oxidative stress [Kiang and George 1998, Hartl and Hayer-Hartl 2002] and can be induced by different kinds of non-thermal stressors and pharmacological agents, like temperature, heavy metals, hyperosmolarity, ischemia/reperfusion, sodium arsenite and glutamine [Jing et al. 2007, Wheeler and Wong 2007]. Several lines of evidences have demonstrated that induction of stress response confers against cytotoxic stimuli. Heat stress administered before sepsis has protected endothelial cells against endotoxin-mediated apoptosis [Chen et al. 2000], protected animal against ischemia/reperfusion injury [Tandara et al. 2006], sepsis-induced acute lung injury [Hagiwara et al. 2007] and decreased mortality rate [Kustanova et al. 2006].

The use of thermal water or steam is one of the oldest approaches as part of the treatment of respiratory tract disease [Olina et al. 2008]. The physiopathology and mechanisms of thermal water in the treatment of respiratory tract disease are not yet well clarified. It was interesting to investigate whether steam aerosolization resulted in increased expression of HSP70 in lung tissue of rats.

Materials and Methods

Animals and study designs

Male Sprague-Dawley rats (National Laboratory Animal Center of Salaya Campus, Mahidol University, Thailand) weighing 250-300 g, 8 weeks old were used in this study and approved by ethical committee, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Thailand. After a 2 week period of adaptation,

animals were randomly divided into two groups, control and steam groups. The rats in the steam group breathed with aerosolized steam in various time and temperature (at 40°C for 30, 60, 90, 120 min and at 50°C for 30 min). Blood pressure, mean arterial pressure, heart rate (non-invasive blood pressure measuring system LE5002, Barcelona, Spain) and core temperature of the body were measured before and after the experiments. At the end of the experiment, the rats were sacrificed and lungs were removed and washed in 0.9% normal saline, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C for Western blot analysis.

Lung homogenate preparation

Lung tissue was homogenized in lysis buffer containing 10 mM Tris, 5 mM EDTA, 2% Triton X-100, 0.2 mM Na₃VO₄, 1 mM phenylmethyl sulphonyl fluoride, and 10 µg/ml leupeptin and aprotinin for 10 seconds, sonicated for 90 seconds, and left on ice for 50 minutes. The homogenate was then centrifuged for 1 hour at 12,000 x g, 4°C and the supernatant fraction was transferred to a sterile tube and stored at -80°C until use.

Western Blot Analysis

An equal amount (50 µg protein) of lung homogenates prepared in 1x sample buffer were loaded and separated by 10 % polyacrylamide resolving gel using the sodium dodecyl sulfate (SDS) discontinuous buffer system described by Leammli (1970). After electrophoresis, the proteins on the gel were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane as described by Towbin *et al.* (1979), using BioRad immunoblotting tank, for 3 hours at 100 volts. When protein transfer was completed, the PVDF membrane was soaked in PBS containing 0.1 % Tween 20, 5 % skim milk, and 0.1% NaN₃ at 37°C overnight. After 3 washes with PBS containing 0.1 % Tween 20 for 5 minutes each, the membrane was incubated in a mixture of mouse anti-rat HSP 70 antibody (Sigma) diluted at 1:5,000 and mouse anti-β actin (Sigma) diluted at 1:10,000 at room temperature for one hour and then at 4°C for 16 hours. Then, the blot

was washed as described above with an additional wash of 15 minutes and reacted with a mixture of 1:8,000 dilution of rabbit anti-mouse IgG peroxidase conjugate (sigma) and 1:10,000 dilution of streptavidin peroxidase conjugate (Sigma), for one hour at room temperature. After washing of peroxidase conjugate, the protein bands on the membrane were detected using chemiluminescent substrate (Pierce Supersignal West Pico) by following the manufacturer's protocol and visualized by exposing Hyperfilm Thermo Scientific CL-XPosure autoradiograph film for an appropriate time. To determine HSP70 expression, the intensity of protein bands was analyzed by Gene Tool.

Statistical Analysis

All data were expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed by using Student's paired t-tests to compare within the group and one-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's test to compared between the groups. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Result

HSP70 expression

Western blot analysis revealed that steam aerosolization induced HSP70 expression in lung tissue of rats. At the temperature of 50°C, no rat could tolerate longer than 30 min. The Western blot and relative band density of lung tissues from rats treated with aerosolized steam at 40 °C for 30, 60, 90, 120 min were shown in Figure 1. The relative band density of HSP70/actin ratio was maximum at the condition of 40°C for 60 min of steam aerosolization and was significantly higher than those of 40°C 30 min and the control group (Figure 2).

Heart rate, blood pressure and temperature

Heart rate, blood pressure and core temperature of rat treated with thermal steam at 40°C for 60 min before and after the experiments were shown in Figure 3. Treatment with steam aerosolization at 40°C for 60 min had no effects on three vital signs.

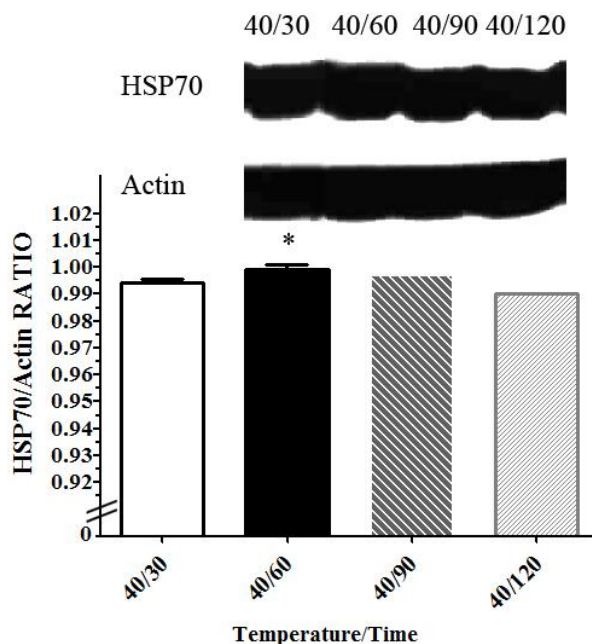


Figure 1 Heat shock protein 70 expression. (Above) Western blot of lung tissues from rats treated with steam aerosolization at 40°C for 30, 60, 90 and 120 min. (Below) A graphic representation of the band density ratio of HSP70 and actin.

* $P < 0.05$ vs 40°C, 30, 120 min

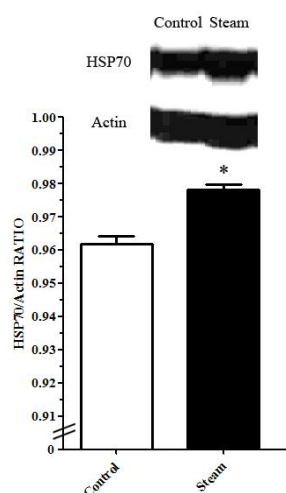


Figure 2 Heat shock protein 70 expression in the control and steam aerosolization groups at 40°C for 60 minutes. (Above) Western blot of lung tissues and (Below) a graphic representation of the band density ratio of HSP70 and actin.

* $P < 0.05$ vs control

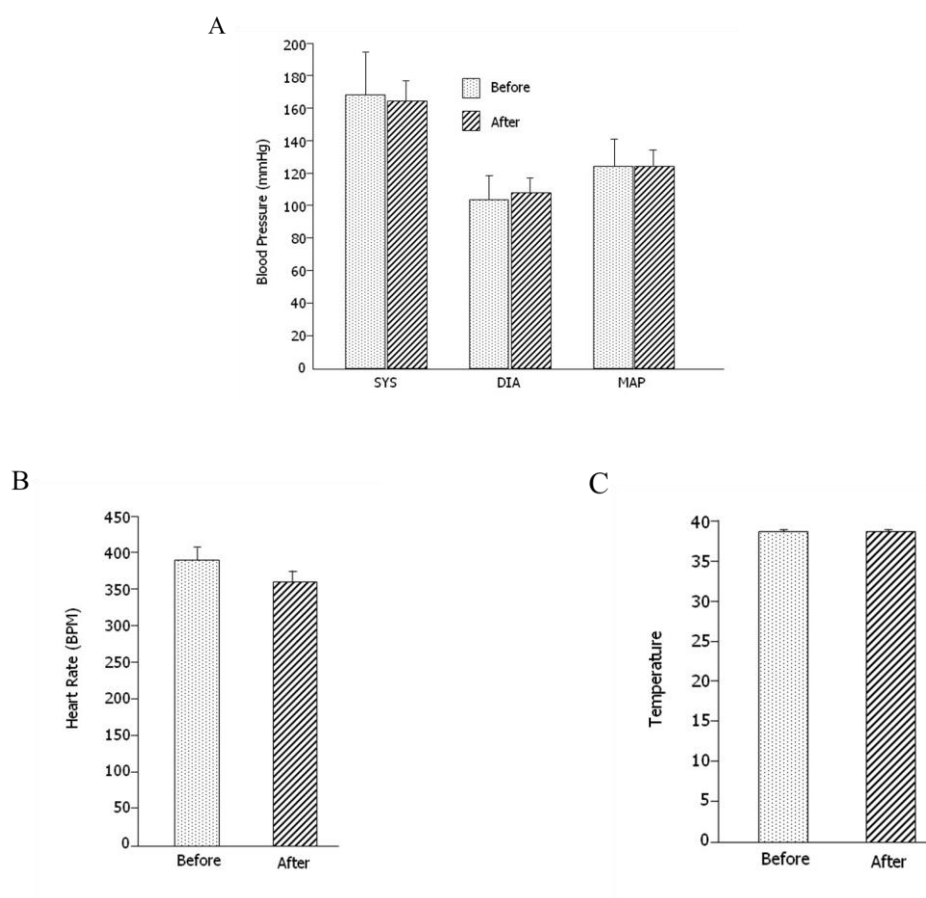


Figure 3 Blood pressure (A), heart rate (B), and core temperature (C) of the rats treated with thermal steam at 40°C for 60 min before and after the experiments. SYS: systolic blood pressure; DIA: diastolic blood pressure; MAP: mean arterial blood pressure

Discussion

Steam aerosolization was associated with the expression of HSP70. It was found that the thermal steam at the variety of temperatures and times induced a wide range of HSP70 expression. The optimal condition in this experiment was the temperature at 40°C for 60 min.

Among the members of HSPs, HSP70 families are the most temperature-sensitive, initially noted in cells following acute stress and played a role to help animals survive during severe heat stress [Kiang and George 1998, Wang et al. 2005]. In normal, non-stressed cells, HSP70 is not expressed or expressed at very low levels, but is extremely synthesized in response to different stressors, like hyperthermia and sepsis [Kregel 2002]. Whole body hyperthermia with the temperature of 41.5 °C for 20 min and 41 °C for 15-20 min in rats and mice, respectively lead to increased expression of HSP70 in lung [Pespeni et al. 2005]. Increased expression of pancreatic HSP70 was found after whole body hyperthermia at 42°C [Wagner et al. 1996]. In addition, microwave hyperthermia treatment in human skeletal muscle also increased HSP70 [Ogura et al. 2007]. HSP70 was up-regulated after 18 h of LPS exposure to rat lung pericytes [Edelman et al. 2007]. Moreover, HSP70 was also induced by high peak airway pressure ventilation in rat lungs [Vreugdenhil et al. 2003]. The similar changes were found in this study. After thermal steam aerosolization exposure, HSP70 expression in rat lungs was significantly higher than the control group. It was shown that steam aerosolization at 40°C for 60 min was an optimal condition and was considered to be appropriate to induce expression of HSP70. With this condition, heart rate, blood pressure and temperature of the rats were not affected. Adversely, the rats were stress,

exhaust after exposed to steam aerosolization longer than 60 min. At the temperature of 50°C, the rats were suffered and death within 30 min.

Several studies in animals and possibly humans have demonstrated that local heat preconditioning can induce protective responses in a restricted area of the body. HSP70 play a protective role against bleomycin-induced pulmonary injury, inflammation, fibrosis and dysfunction by inhibiting the expression of pro-inflammatory cytokines [Tanaka et al. 2010]. In rats heated at 42°C for 15 min, HSP70 was expressed in the serum and could reduce tissues injury caused by LPS [Hagiwara et al. 2007]. Warming the skin of pigs by raising the surface temperature to 43 °C for 2-3 hours before surgery could reduce rates of necrosis and apoptosis of skin flap [Harder et al. 2004]. Exogenous mammalian extracellular HSP70 could protect organisms from LPS-induced shock in rats, decrease mortality and restore homeostasis [Rozhkova et al. 2010]. In clinical situation, inhalation of thermal water has been used empirically in the treatment of chronic diseases of upper and lower respiratory tract. Therefore, HSP70 expression in lung by steam aerosolization found in this study may confer protective role during respiratory tract infection or sepsis.

In conclusion, the present study emphasized that thermal steam aerosolization induced HSP70 expression. This phenomenon may be applied to the clinical approach. The effects of steam aerosolization on various diseases like sepsis should be further investigated.

Acknowledgement

This work was supported by Srinakharinwirot University, Thailand.

References

- Chen HW, Hsu C, Lue SI, Yang RC. Attenuation of sepsis-induced apoptosis by heat shock pretreatment in rats. *Cell Stress Chaperones* 2000; 5: 188–195.
- Edelman DA, Jiang Y, Tyburski JG, Wilson RF, Steffes CP. Lipopolysaccharide up-regulates heat shock protein expression in rat lung pericytes. *J Surg Res* 2007; 140: 171–6.
- Hagiwara S, Iwasaka H, Matsumoto S, Noguchi T, Yoshioka H. Association between heat stress protein 70 induction and decreased pulmonary fibrosis in an animal model of acute lung injury. *Lung*. 2007; 185: 287–293.
- Harder Y, Contaldo C, Klenk J, Banic A, Jakob SM, Erni D. Improved skin flap survival after local heat preconditioning in pigs. *J Surg Res* 2004; 119: 100–105.
- Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol from nascent chain to folded protein. *Science*. 2002; 295: 1852–8.
- Jing L, Wu Q, Wang F. Glutamine induces heat-shock protein and protects against *Escherichia coli* lipopolysaccharide-induced vascular hyporeactivity in rats. *J Critical Care*. 2007; 11: 1–7.
- Kiang JG, George C. Heat Shock Protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther*. 1998; 80:183–201.
- Kregel KC. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol*. 2002; 92: 2177–2186.
- Kustanova GA, Murashev AN, Karpov VL, Margulis BA, Guzhova IV, Prokhorenko IR, et al. Exogenous heat shock protein 70 mediates sepsis manifestations and decreases the mortality rate in rats. *Cell Stress Chaperones* 2006; 11: 276–286.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5.
- Ogura Y, Naito H, Tsurukawa T, Ichinoseki-Sekine N, Saga N, Sugiura T. Microwave hyperthermia treatment increases heat shock proteins in human skeletal muscle. *Br J Sports Med* 2007; 41: 453–455.
- Olina M, Aluffi Valletti P, Pia F, Toso A, Borello G, Policarpo M, et al. Hydrological indications in the therapy of pharyngitis. *Recent Prog Med*. 2008; 99: 314–321.
- Pespeni M, Hodnett M, Pittet JF. In vivo stress preconditioning. *Methods*. 2005; 35: 158–164.
- Rozhkova E, Yurinskaya M, Zatsepina O, Garbuz D, Karpov V, Surkov S, et al. Exogenous mammalian extracellular HSP70 reduces endotoxin manifestations at the cellular and organism levels. *Ann N Y Acad Sci*. 2010; 1197: 94–107.
- Tanaka KI, Tanaka Y, Namba T, Azuma A, Mizushima T. Heat shock protein 70 protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Biochem Pharmacol* 2010; 80: 920–931.
- Tandara AA, Kloeters O, Kim I, Mogford JE, Mustoe TA. Age effect on HSP70: decreased resistance to ischemic and oxidative stress in HDF. *J Surg Res*. 2006; 132: 32–39.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350–4.
- Vreugdenhil HA, Haitisma JJ, Jansen KJ, Zijlstra J, Plotz FB, Dijk JE. Ventilator-induced heat shock protein 70 and cytokine mRNA expression in a model of lipopolysaccharide-induced lung inflammation. *Intensive Care Med* 2003; 29: 915–922.
- Wagner AC, Weber H, Jonas L, Nizze H, Strowski M, Fiedler F, et al. In vivo, increased expression of hyperthermia induces heat shock protein expression and protection against cerulein-induced pancreatitis in rat. *Gastroenterol*. 1996; 111: 1333–42.
- Wang JL, Ke DS, Lin MT. Heat shock pretreatment may protect against heatstroke-induced circulatory shock and cerebral ischemia by reducing oxidative stress and energy depletion. *Shock* 2005; 23: 161–67.
- Wheeler DS, Wong HR. Heat shock response and acute lung injury. *Free Radic Biol Med* 2007; 42: 1–14.

RESEARCH ARTICLE

Screening of Free Radical Scavenging, Antityrosinase and Antibacterial Activities from Extracts of *Lannea coromandelica* (Houtt.).**Napat Prabmeechai¹, Pimjai Saenjamla², Narin Chansri³**¹Graduate student, Master of Sciences program in Aesthetic Sciences and Health, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand²Clinical laboratory section, Srinagarind Hospital, Khon Kaen University, Khon Kean, Thailand.³Center for Research and Development of Herbal Health Products, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand**Abstract**

The aim of this study was to screen biological properties of water, 50% ethanol and 95% ethanol extract from bark and wood of *Lannea coromandelica* (Houtt.) Merr (Family: Anacardiaceae). Extracts were tested for total phenolic contents by Folin–Ciocalteu's reagent assay, free radical scavenging activity by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl scavenging methods, antityrosinase activity by enzymatic assay and antibacterial activity by broth dilution and agar plate diffusion method. The results showed that the phenolic content was correlated with the polarity of the solvent and part of the plant that low polar solvent had higher phenolic content than polar solvent and bark had higher phenolic content than wood. The highest total phenolic content was found in the 95% ethanol bark extract at 370.04 ± 11.04 mg GAE/g. The bark extracts with 95% ethanol and 50% ethanol exhibited high antioxidant activity which showed the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) at 285.64 ± 59.38 and 297.55 ± 36.14 μ g/ml, respectively. Among the extracts, the 95% ethanol extract from bark showed the best tyrosinase inhibition activity with the IC_{50} 222.75 ± 25.59 μ g/ml, although significantly lower than kojic acid. The 95% ethanol and 50% ethanol bark extract also showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Propionibacterium acnes* with minimal inhibition concentration (MIC) values 5, 5, 25 mg/ml, respectively. This study indicated that *Lannea coromandelica* bark extract by 95% ethanol had highest total phenolic content which resulted in the highest free radical scavenging, antityrosinase activities and antibacterial activities.

Key words: *Lannea coromandelica*, phenolic content, antioxidant, antityrosinase, antibacterial

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อคัดกรองคุณสมบัติทางชีวภาพของสารสกัดจากน้ำ , 50% เอทานอลและ 95% เอทานอล จากส่วนเปลือกและแก่นของต้นอด *Lannea coromandelica* (Houtt.) Merr สารสกัดที่ได้จะทำการทดสอบปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's reagent assayฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส ด้วยวิธี enzymatic assay และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี broth dilution และ agar diffusion ผลการศึกษา พบว่า ปริมาณฟีนอลิกสัมพันธ์กับความมีขี้ของตัวทำละลายและส่วนของพืชที่ศึกษา โดยเมื่อใช้ตัวทำละลายที่มีขี้ต่ำจะได้สารสกัดที่มีปริมาณฟีนอลิกสูงกว่าตัวทำละลายที่มีขี้สูงและ ส่วนของเปลือกจะมีปริมาณฟีนอลิกสูงกว่าส่วนของแก่น โดยปริมาณฟีนอลิกสูงสุดจะพบในสารสกัด จากส่วนของเปลือกด้วย 95% เอทานอลซึ่งมีปริมาณฟีนอลิก เท่ากับ 370.04 ± 11.04 mg GAE/g ส่วนของเปลือกที่สกัดด้วย 95% เอทานอล และ 50% เอทานอล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 285.64 ± 59.38 μ g/ml และ 297.55 ± 36.14 μ g/ml.,ตามลำดับ ในบรรดาสาร สกัด พบว่า สารสกัดส่วนของเปลือกด้วย 95% เอทานอล มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 222.75 ± 25.59 μ g/ml. แต่ยังมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสน้อยกว่ากรดโค จิควอย่างมีนัยสำคัญ . สารสกัดด้วย 95%เอทานอล และ 50% เอทานอลของเปลือก มีฤทธิ์ในการ ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Propionibacterium acnes* โดยมีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ เท่ากับ 5, 5 และ 25 mg/ml ตามลำดับ การศึกษานี้ พบว่า ส่วนของเปลือกต้นอดที่สารสกัดด้วย 95%เอทานอล มีปริมาณฟีนอลิกสูงสุดและมีผลทำให้สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ,ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส และต้านเชื้อแบคทีเรียได้

คำสำคัญ: ต้นอด, ปริมาณฟีนอลิก, ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น , ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส , ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

Introduction

Oxidative stress caused by free radicals may be related to aging and diseases, such as atherosclerosis, diabetes, cancers, and cirrhosis. Antioxidants are essential substances which possess the ability to protect the body from oxidative stress (Blokhina et al., 2003). Many of the natural phytochemical compound in plants have been found to exhibit antioxidant activity including carotenoids, thiols, vitamins, flavonoids and phenolics (Michalak, 2006). Moreover, many phenolic plants such as twig and root of mulberry (*Morus alba* L.)(Chang et al., 2010), fruiting bodies of mushroom (*Lentinus lepideus*) (Yoon et al., 2010) leave of jacktree (*Artocarpus heterophyllus* Lam.)(Loizzo et al., 2010), etc, have been found to be responsible for antityrosinase and antimicrobial activities. Therefore, many plants have been developed into pharmaceutical products according to these activities.

Lannea coromandelica (Houtt.) Merr or “Aod or Kook” in Thai belongs to the family Anacardiaceae. This plant is the perennial plant distributed in north and northeast Thailand. It has mostly been used in *traditional medicine* to treat elephantiasis, impotence, ulcers, vaginal troubles, halitosis, heart disease, dysentery, and gout (Islam et al., 2002). Previous studies on the bioactivities of the extract from *L. coromandelica* showed anti-inflammatory property (Singh and Singh, 1994), hypotensive activity in dogs and rats (Singh and Singh, 1996), and wound healing property (Sathish et al., 2010). However, most of the report did not show the correlation between the constituent of the extract and its activity. Moreover some bioactivity such as free radical scavenging activity, antityrosinase activity, and antimicrobial activity against some dermatological microorganisms which were useful for skin application have not been studied.

Therefore, the aim of this study was to screen the bioactivities of this plant that beneficial for dermatological application. The bark and wood of the plant was extracted by different solvents and total

phenolic content in the extracts was determined. Free radical scavenging activity, antityrosinase activity and antibacterial activity against *Streptococcus aureus* (*S. aureus*), *Pseudomonas aeruginosa* (*Ps. aeruginosa*) and *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) of the extracts were investigated. The data obtained would provide the possibility in developing the performance ingredient with anti-aging and/or antibacterial properties from this plant.

Methods

Plant materials

Stem of *L. coromandelica* were collected in March 2011 from Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Thailand.

Preparation of the extracts

The extracting solvents in this study were water, 50% ethanol and 95% ethanol. Fresh barks and wood of *L. coromandelica* were cut into small pieces, air dried and macerated in the solvent for 7 days at room temperature. The remaining pieces of the plant were removed from the fluid extract by filtration. For the extraction by 95% ethanol or 50% ethanol, the solvent was removed by evaporation using a rotary evaporator at 35° C and follow by lyophilization. For the water extraction, the water was removed by lyophilization. The dried extracts were kept in desiccators for further studies.

Determination of total phenolic content

Total phenolic contents of *L. coromandelica* extracts were determined by Folin–Ciocalteu reagent assay and expressed as gallic acid equivalents per gram (GAE/g) of the dried extracts. In brief, 80 µL aliquot of the extracts in 5% ethanol was added to 80 µL of 7.5% Na₂CO₃ solution. After 3 min, 100 µL of 2 M Folin–Ciocalteu reagent was added and the mixture was allowed to stand for 1 hr at 25°C. The absorbance was measured at 620 nm using spectrophotometer (UV-2802, Unico Co. Ltd., Shanghai, China). The absorbance of the blank, consisted of all reagents and solvents except the tested samples, was also measured. The total

phenolic contents were determined using the standard gallic acid calibration curve.

Determination of free radical scavenging activity

Free radical scavenging activity was measured by 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activity. In brief, 150 μ L of extract in 5% ethanol with different dilutions was added to 50 μ L of 1 mM DPPH. The mixtures were incubated for 30 min before the absorbance was measured at 540 nm. The DPPH scavenging ability was calculated as the concentration that inhibits the oxidation of DPPH for 50% (IC₅₀). Ascorbic acid was used as the positive control in this study.

Determination of antityrosinase activity

Antityrosinase activity was measured according to the ability of the extracts in inhibiting the transform of L-dopa into dopachrome which was the function of tyrosinase. The method was the same as previously reported by Hanamura et al. (2008) with slightly modification. In brief, 50 μ L of extract in 5% ethanol with different dilutions was added to 40 μ L of 2.5mM L-dopa in a 96-well microplate; then 40 μ L of tyrosinase (125 units/ml) was added into each well. The amount of dopachrome in the reactions mixture was measured after incubate the mixture at 37° C for 15 min based on the optical density at 420 nm. The inhibitory activity of the sample was expressed as the concentration that inhibited 50% of the enzyme activity (IC₅₀). Kojic acid was used as the control in this study.

Determination of antibacterial activity

All extract were tested for antibacterial activity against *S. aureus*, *Ps. aeruginosa* and *P. acnes*. The active plant extract were diluted to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution and the result were confirmed by determining the zone of inhibition by agar plat diffusion method. Gentamycin was used as the positive control in this study. For *S. aureus* and *Ps. aeruginosa*, the tested bacteria were removed aseptically with an inoculating loop and transferred to a test tube containing 4 mL of Mueller Hinton

nutrient broth in order to obtain the turbidity of the bacterial culture equal to equaled 0.5 McFarland (10⁸ cfu/mL) standards. The dilute extract concentration 0.625, 1.25, 2.5, 5, 25 and 50 mg/mL were added in to the culture and incubated for 37° C for 18 hours. For *P. acne* the method was the same as the above but Tryptic soy nutrient broth was used as the media and incubated condition was 37° C for 48 hours under anaerobic condition. The inhibitory efficacy of the extract was determined by observe the clarity of the media after incubation. For agar plate diffusion, three disks of Whatman's No.1 filter paper (6 mm in diameter) were impregnated with 50 μ L of extract concentration 25 mg /mL and place on the surface of agar plate which was already spread by the tested bacteria. The plate was incubated at 37° C for 18 hours for *S. aureus* and *Ps. aeruginosa* or 48 hours under anaerobic condition for *P. acne* and the diameter of clear zone around the disk was recorded.

Statistical analysis

Results were used ANOVA and Bonferroni test to analyze mean difference between groups. *P*-value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Total phenolic content

The yields of bark extract from *L. coromandelica* were much higher than that of wood extract revealed that the majority of the constituent was concentrated in the bark. In both bark and wood extracts, 50% ethanol was the most suitable extracting solvent in term of the ability to provide the high amount of the extracts because 50% ethanol extract exhibit the highest yield when compared to other solvents. However, the total phenolic contents were highest in the 95% ethanol extracts implied that phenolic solubility was correlated with the polarity of the solvent since phenolic content in low polar solvent (95% ethanol) extract of bark and wood were higher than that of higher polar solvent (50% ethanol and water). The result also show that total phenolic contents in bark was higher than that in wood in every solvent used (Table1).

Free radical scavenging activity.

The results indicated that the highest free radical scavenging activity of the extracts was found in 95% ethanol bark extract which has IC_{50} 285.64 ± 59.38 $\mu\text{g/ml}$. The bark extracts exhibited higher free radical scavenging activity than the wood extract and the 95% ethanol extract

exhibited higher free radical scavenging activity than 50% ethanol and water extracts, respectively. When compare with ascorbic acid which has IC_{50} 259.55 ± 28.55 $\mu\text{g/ml}$, the 95% ethanol and 50% ethanol bark extract were found to have comparable free radical scavenging activity (Figure1).

Table 1 Percentage of yield and total phenolic content of bark and wood extracts from *L. coromandelica* using different solvents.

Part of plant	Solvents	Yield (% w/w) ^a	Total phenolic content (GAE/g) ^b
Bark	Water	4.19	260.00 ± 9.28
	50% ethanol	5.26	284.32 ± 4.46
	95% ethanol	3.35	$370.04 \pm 11.04^*$
Wood	Water	1.09	$59.16 \pm 62.69^*$
	50% ethanol	1.61	$90.79 \pm 66.78^*$
	95% ethanol	0.50	$107.41 \pm 63.29^*$

^a Yield is calculated from weigh of dry extract x 100 per weigh of dry plant.

^b Data are represented as mean \pm standard deviation (n=9). * $P < 0.05$; compared with group.

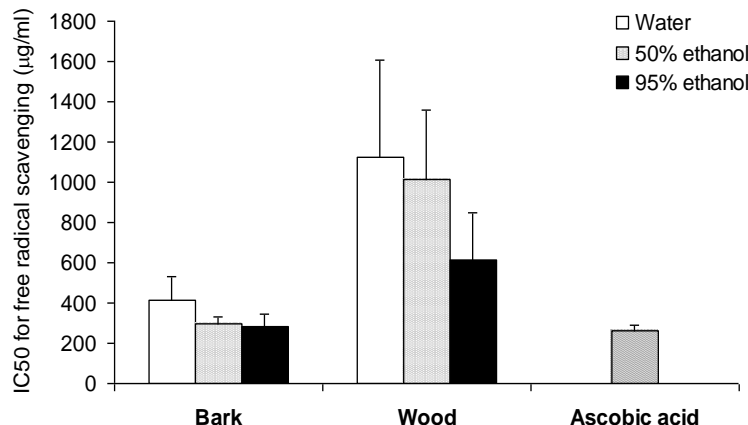


Figure1. IC_{50} for free radical scavenging activity of *L. coromandelica* bark and wood extract using different solvents. The results express as the concentration that inhibit the oxidation of DPPH for 50% (n=9).

Antityrosinase activity

The IC_{50} of the antityrosinase activity of the 95% ethanol bark extract at 222.75 ± 25.59 $\mu\text{g/ml}$ revealed that this extract has the highest activity followed by 50% ethanol bark extract, 95% ethanol wood extract and 50% ethanol bark extract (Figure 2). However, when compare with kojic acid ($IC_{50} = 27.86 \pm 0.78$ $\mu\text{g/ml}$, data

not show in figure 2), the antityrosinase activity of the extract was significantly lower than kojic acid. On the other hand water extract of both bark and wood were found to have very high IC_{50} (2295.58 ± 350.50 and 3187.70 ± 400.95 $\mu\text{g/ml}$, respectively) implied that the water extract was not able to inhibit enzyme tyrosinase activity.

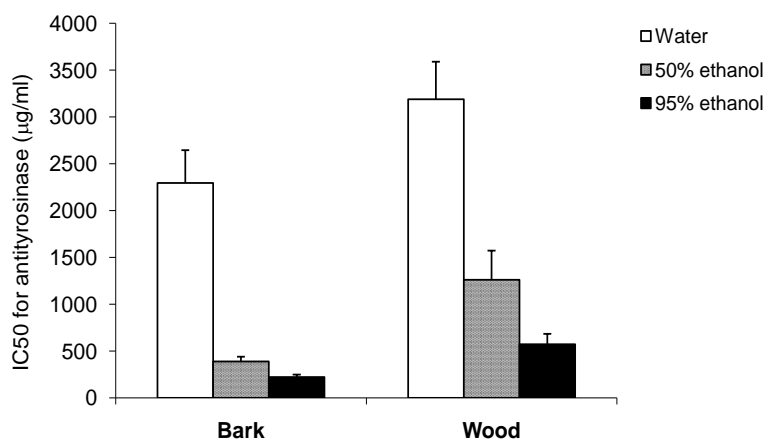


Figure 2. IC₅₀ values of antityrosinase activity of *L. coromandelica* bark and wood extract using different solvents (n=9).

Antibacterial activity

The antibacterial activity of *L. coromandelica* extract was evaluated against *S. aureus*, *Ps. aeruginosa* and *P. acnes* by broth dilution and agar diffusion methods. The water extracts of bark and wood of this plant were not active against any of the microorganisms because the highest concentration of the extract (50 mg/ml) failed to inhibit growth of bacteria. For bark extract, 50% ethanol and 96% ethanol has similar antibacterial activity against *S. aureus* and *Ps. aeruginosa* which was higher than the activity against *P.*

acnes. On the other hand, wood extracts by 50% ethanol and 95% ethanol showed a slightly antibacterial activity against *S. aureus* and no activity against *Ps. aeruginosa* and *P. acnes*. The MIC of all extracts are reported in Table 2. The 50% ethanol and 95% ethanol bark extracts were further evaluated to determine zone of inhibition. The result confirmed that 50% and 95% ethanol of bark extract had similar activity in inhibition of microorganism especially for the inhibition of *S. aureus* (Table3).

Table 2 Antibacterial activities of bark and wood using different solvents of *L. coromandelica* extracts against bacterial species tested by Broth dilution method

Bacterial species	Minimum inhibitory concentration (MIC) mg/ml.					
	Bark			Wood		
	Water	50%ethanol	95%ethanol	Water	50%ethanol	95%ethanol
<i>S. aureus</i>	> 50	5	5	> 50	25	25
<i>Ps. aeruginosa</i>	> 50	5	5	> 50	> 50	> 50
<i>P. acnes</i>	>50	25	25	> 50	> 50	> 50

Table 3 Antibacterial activity of 50% ethanol and 95% ethanol bark extracts of *L. coromandelica* (25 mg/ml) against bacterial species tested by agar disc diffusion method. Gentamicin (50 µg/ml) was used as the positive control.

Bacterial species	Zone of inhibition (mm)		
	50% ethanol bark	95% ethanol bark	Gentamicin
<i>S. aureus</i>	10,11	11,11	27,27
<i>Ps. aeruginosa</i>	8,8	8,9	27,28
<i>P. acnes</i>	8,8	8,8	21,21

Discussion

Many plant phenolics have been found to be responsible for several biological properties such as antioxidant, antityrosinase and antimicrobial activities (Chang et al., 2010; Okoro et al., 2010). Our results showed that phenolic compound is constituent of the extracts from *L. coromandelica* and resulted in bioactivity of the extracts. Some studies reported that phenolic compounds from different source or extracting solvents may have varying properties (Lim et al., 2009; Wannes et al., 2010). In our study, the majority of phenolic compound was located at the bark and the content was highest when using 95% ethanol as the extracting solvent while 50% ethanol and water has less ability to extract the phenolic. This should be because phenolic is the hydrophobic compound which has higher solubility in low polar solvent such as 95% ethanol than in water. This phenolic compound is responsible for free radical scavenging activity in dose dependent manner. The activity was highest in 95% ethanol bark extract which was related to the phenolic contents in the extract. Free radical scavenging activity of the extract was comparable to the ascorbic acid which was well known antioxidant. The extracts by 95% ethanol and 50% ethanol also exhibited antityrosinase activity in dose dependent manner while the water extract did not show this activity. However, antityrosinase activity was quite low when compared with kojic acid that used as the positive standard. Therefore the advantage of antityrosinase in this plant may be minor when compared with antioxidant activity.

For antibacterial activity, our result showed that 50% ethanol and 95% ethanol

bark extract inhibited the growth of bacteria whereas the water extracts or wood extracts were inactive. The result indicated that *L. coromandelica* extracts possess high antibacterial activity, against *S. aureus*, moderate activity against *Ps. aeruginosa* and low activity against *P. acnes*. The previous reports showed that *L. coromandelica* extract has antibacterial activity against *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *S. aureus* (Basuri et al., 2011), *Bacillus cereus*, *Proteus vulgaris*, *Aspergillus niger* (Sathish et al., 2010). Our result confirms the activity against *S. aureus* but did not show the satisfactory activity against *Ps. aeruginosa* and *P. acnes*.

The previous reports about *L. coromandelica* activity mostly show the antimicrobial activity, our study was the first to demonstrate that this plant also has prominent free radical scavenging activity and minor antityrosinase activity. For free radical scavenging activity which in according to the phenolic content reveals that phenolic is the major contributors to antioxidant activity which was also stated in the report by Shukla (2009). In the other hand, antityrosinase activity that did not correlate with the phenolic content suggests that other bioactive constituents in the extract should provide this activity.

Conclusion

According to this study, the extract from *L. coromandelica* bark by 95% ethanol exhibits the high phenolic content and has the potential as an antioxidant with minor antityrosinase activity. Thus, apart from antibacterial activity, this plant could be used in pharmaceutical application as a source of natural antioxidant for health benefits.

References

- Blokhina O, Virolainen E, K.V. F. Antioxidant, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a Review. *Annals of Botany* 2003; 91: 179-94.
- Chang LW, Juang LJ, Wang BS, Wang MY, Tai HM, Hung WJ, Chen YJ, Huang MH. Antioxidant and antityrosinase activity of mulberry (*Morus alba* L.) twigs and root bark. *Food Chem Toxicol* 2010; 49: 785-90.
- Hanamura T, Uchida E, Aoki H. Skin-Lightening Effect of a Polyphenol Extract from Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) Fruit on UV-induced Pigmentation. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 2008; 72: 3211-8.
- Islam T, Ito T, Sakasai M, Tahara S. Zoosporicidal Activity of Polyflavonoid Tannin Identified in *Lannea coromandelica*

- Stem Bark against Phytopathogenic Oomycete *Aphanomyces cochlioides*. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 6697-703.
- Lim TY, Lim YY, Yule CM. Evaluation of antioxidant, antibacterial and anti-tyrosinase activities of four *Macaranga* species. *Food Chemistry* 2009; 114: 594-9.
- Loizzo MR, Tundis R, Chandrika UG, Abeysekera AM, Menichini F, Frega NG. Antioxidant and Antibacterial Activities on Foodborne Pathogens of *Artocarpus heterophyllus* Lam. (Moraceae) Leaves Extracts. *Journal of Food Science* 2010; 75: 291-5.
- Michalak A. Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. *Polish J. of Environ. Stud.* 2006; 15: 523-30.
- Okoro IO, Auguster O, Asibor EO. Antioxidant and antimicrobial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Nigeria. *African Journal of Biotechnology* 2010; 9: 2989-93.
- Sathish R, Ahmed MH, Natarajan K, Lalitha G. Evaluation of wound healing and antimicrobial activity of *Lannea coromandelica* (Houtt) Merr. *Journal of Pharmacy Research* 2010; 3: 1225-8.
- Singh S, Singh GB. Anti-inflammatory Activity of *Lannea coromandelica* Bark Extract in Rats. *Phytotherapy Research* 1994; 8: 311-3.
- Singh S, Singh GB. Hypotensive Activity of *Lannea coromandelica* Bark Extract. *Phytotherapy Research* 1996; 10: 429-30.
- Wannes WA, Mhamdi B, Sriti J, Jemia MB, Ouchikh O, Hamdaoui G, Kchouk ME, Marzouk B. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food and Chemical Toxicology* 2010; 48 1362-70.
- Yoon KN, Alam N, Lee KR, Shin PG, Cheong JC, Yoo YB, Lee TS. Antioxidant and antityrosinase activities of various extracts from the fruiting bodies of *Lentinus lepideus*. *Molecules* 2010; 16: 2334-47.

RESEARCH ARTICLE

Effect of *Morus alba* L. Extract on Pain Associated with Osteoarthritis in Rats**Arada Khunakornvichaya², Sujinna Lekmeechai¹, Tasana Pitaksuteepong³,
Noppawan Phumala Morales¹, Warinkarn Hemstapat¹**¹Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand²Graduate Program in Toxicology, Multidisciplinary Unit, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand³Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand**Abstract**

Osteoarthritis (OA) is a common disorder of synovial joint. Knee pain is a predominant clinical symptom that causes disability especially in elderly. It is typically worse with weight bearing and activities resulting in the loss of patient's quality of life. The current medications used for OA such as steroids and NSAIDs cause serious side-effects. Therefore alternative medicines that offer a superior safety profile are required. *Morus alba* L. (Mulberry tree) has long been widely used in traditional Chinese medicines. It has been reported to have various pharmacological properties including antihyperglycemic, anti-oxidant and in particular anti-inflammatory effects. *M. alba* extract has been shown to suppress the production of inflammatory mediators including NO, PGE₂. Although a number of studies have reported the anti-inflammatory effects of *M. alba*, its potential for treating pain associated with OA has not been explored. Thus, this study was designed to investigate the efficacy of *M. alba* extract on pain-related behavior in rat model of OA. OA was induced in male Wistar rats by anterior cruciate ligament transection (ACLT). The pain-related behavior during OA development was determined up to 12 weeks post-OA induction by using hind limb weight bearing tester. *M. alba* extract significantly reduced OA-associated joint pain in similar manner as glucosamine. This study is the first to demonstrate that *M. alba* extract could attenuate pain associated with OA in rat model. However, further studies are required to determine the active components and the mechanism of action responsible for its effect.

Key Words Osteoarthritis, *Morus alba* L., anterior cruciate ligament transection, joint pain, glucosamine

ผลของสารสกัดต้นหม่อนต่ออาการปวดที่เกิดจากข้อเข่าเสื่อมในหนู

เอรดา คุณากรวิชัย^๒, สุจินณา เล็กมัยชัย^๑, ทศนา พิทักษ์สุธิพงษ์^๓, นพวรรณ ภู่มาลา มอราเลส^๑,
วรินกาญจน์ เหมสถาปัตย์^๑

^๑ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

^๒หลักสูตรพิษวิทยา หน่วยสหสาขาวิชา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

^๓ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

บทคัดย่อ

โรคข้อเสื่อมอักเสบ (Osteoarthritis, OA) เป็นโรคข้อที่พบได้บ่อยโดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณข้อต่อซินโนเวียล (Synovial joint) อาการแสดงที่เด่นชัดในผู้ป่วยเหล่านี้คืออาการปวดเข่าซึ่งเป็นอุปสรรคอย่างยิ่งต่อการเคลื่อนไหวโดยเฉพาะในผู้สูงอายุ การรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมในปัจจุบันนิยมใช้ยาในกลุ่มสเตียรอยด์และ ยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์เพื่อบรรเทาอาการปวด แต่ยากกลุ่มนี้มีผลข้างเคียงอย่างมาก ดังนั้นการศึกษาวิจัยเพื่อให้ได้ยาที่เป็นทางเลือกใหม่ซึ่งมีผลข้างเคียงน้อยกว่ายาที่มีใช้อยู่ในปัจจุบันจึงมีความจำเป็นอย่างมาก *Morus alba* L. หรือต้นหม่อนได้มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศจีน โดยนำมาเป็นส่วนประกอบในตำรับยาจีนโบราณมีการศึกษาพบว่าต้นหม่อนมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย เช่น ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งฤทธิ์ต้านการอักเสบ มีรายงานว่าสารสกัดจากต้นหม่อนสามารถลดการสร้างสารสื่อกลางของการอักเสบ (Inflammatory mediators) เช่น NO และ PGE₂ แม้ว่าจะมีหลายการศึกษาที่รายงานผลด้านการอักเสบของต้นหม่อน แต่ศักยภาพในการลดอาการปวดอันเนื่องมาจากโรคข้อเสื่อมอักเสบยังไม่มีการศึกษา ดังนั้นการวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดต้นหม่อนต่ออาการปวดที่เกิดจากข้อเข่าเสื่อมในหนูขาวเพศผู้ พันธุ์ Wistar ซึ่งชักนำให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อมโดยการตัดเส้นเอ็นที่มีชื่อว่า anterior cruciate ligament (ACL) จากนั้นติดตามประเมินอาการปวดที่เกิดจากการชักนำให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในหนูเป็นเวลา 12 สัปดาห์โดยใช้เครื่องมือที่วัดการลงน้ำหนักที่เท้าหลังของหนู ที่เรียกว่า hind limb weight bearing tester ผลการวิจัยนี้พบว่าสารสกัดจากต้นหม่อนมีฤทธิ์บรรเทาอาการปวดข้อเข่าได้ คล้ายคลึงกับกลูโคซามีน งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาครั้งแรกที่แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ของสารสกัดจากต้นหม่อนต่อการบรรเทาอาการปวดที่เกิดจากข้อเข่าเสื่อมในหนู อย่างไรก็ตามยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลการวิจัยนี้ และประเมินหาสารออกฤทธิ์สำคัญ รวมทั้งกลไกการออกฤทธิ์ของสารดังกล่าวที่มีผลในการลดปวด

คำสำคัญ: โรคข้อเข่าเสื่อม, ต้นหม่อน, ปวดข้อเข่า, กลูโคซามีน

Introduction

Osteoarthritis (OA) is a painful condition of chronic progressive degenerative joint disease, and is a leading cause of disability in elderly. It can affect any joint in the body. The most common affected joints include hands, feet, spine, and weight-bearing joints such as knees and hips. Since the current medicine used to treat OA possesses several adverse effects, an alternative medicine that provides pain-relieving effect as well as delays disease progression with superior safety profile for OA is needed.

The mulberry (*Morus alba* L.) tree (also known as white mulberry) has been widely used in traditional Chinese medicines. Methanolic extract of *M. alba* leaf has been shown to suppress the production of inflammatory mediators including NO, PGE₂ (Choi and Hwang, 2005). The active component isolated from water extract of dried root bark of *M. alba* have been shown to exhibit the anti-inflammatory effect (Chung et al., 2003). This anti-inflammatory property might be correlated with inhibition of the iNOS expression through down-regulation the binding activity of NF- κ B, a pivotal transcription factor that has been involved in the regulation of expression of numerous genes associated with inflammatory response (Roman-Blas and Jimenez, 2006), and significant inhibition of COX-2 activity. Although OA has traditionally been regarded as a non-inflammatory arthritis, inflammatory processes are believed to play a significant role in the progression of cartilage degeneration and joint damage in OA patients (Allen et al., 2010). The possible mechanisms that are responsible for the anti-inflammatory effects of *M. alba* extract has been identified (Chung et al., 2003, Choi and Hwang, 2005), however its potential for treating OA has not been explored. This study is therefore aimed to investigate the potential of stem *M. alba* extracts as a novel treatment for OA pain.

Materials and Methods

Animals

Five weeks old male wistar rats (140

- 160 g) were obtained from National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Thailand. Ethical approval of this study was obtained and approved by the Faculty of Science, Mahidol University Animal Care and Use Committee. Animal were housed in pair in a temperature-controlled room ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), maintained at humidity $60 \pm 10\%$, and a 12 h/12 h dark-light cycle. Standard laboratory rat food and water were supplied ad libitum. The OA was surgically induced by anterior cruciate ligament transection (ACLT) as previously described (Naito et al., 2010). Sham-operated rats were treated identically as ACLT rats except that transection of the ACL is omitted.

Investigation of the efficacy of *M. alba* extract in rat model of OA

M. alba ethanolic extract was prepared by maceration from Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Thailand.

Wistar rats were divided into four groups: 1. Sham group with vehicle (Sham + vehicle; n=7), 2. ACLT group with vehicle (ACLT + vehicle; n=10), 3. ACLT group with glucosamine sulfate (ACLT + glucosamine; n=6) and 4. ACLT group with *M. alba* extract (ACLT + *M. alba* extract; n=6). *M. alba* extract (280 mg/kg) and glucosamine sulfate (250 mg/kg) were dissolved in water.

All groups received test articles or vehicle (water) via oral gavage once a day for 7 consecutive weeks starting at week 5 post ACLT induction. Changes in hind paw weight-bearing distributions were assessed at the following time points: at 0 (baseline), 5, 6, 9 and 12 weeks post ACLT induction.

Assessment of Pain: Weight-bearing distribution test

The incapacitance meter (hind limb weight bearing tester) (Harvard Apparatus, Barcelona, Spain) was used to assess the pain-related behavior (knee joint pain). This technique measures the difference in weight bearing between the contralateral operated limb and the contralateral

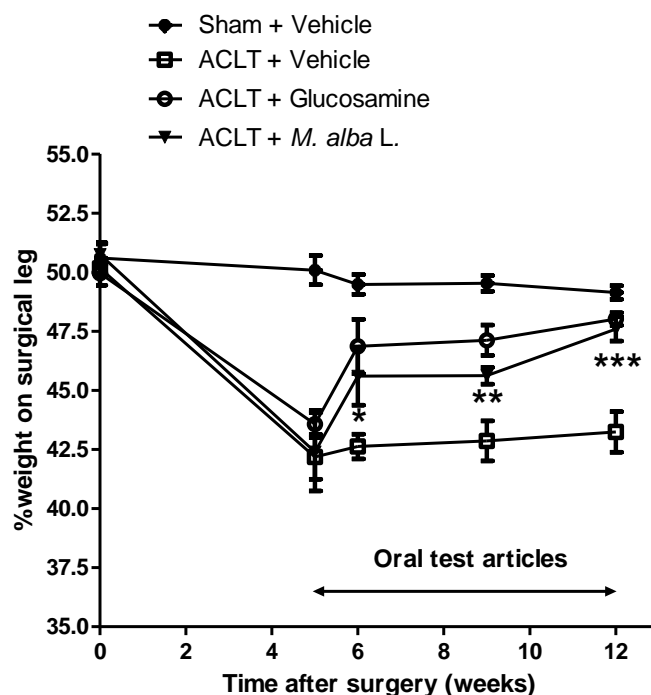


Figure 1 Effects of *M. alba* extract (280 mg/kg) and glucosamine (250 mg/kg) on the % weight bearing. *M. alba* extract and glucosamine were orally administered once a day for 7 consecutive weeks starting at week 5 following ACLT induction. Statistically significant differences were determined using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Newman-Keuls post hoc test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ vs ACLT + vehicle group)

non-operated limb. Changing of hind paw weight distribution between the operated and the contralateral non-operated limb were used as an index of knee joint pain in this study. The percentage of weight distributed on the operated limb was determined as previously described (Pomonis et al., 2005).

Statistical Analysis

All data were expressed as the mean and standard error of the mean (mean \pm SEM). Statistical significance was determined using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Newman-Keuls post hoc test. The p value was set at $p < 0.05$ for the significant different between groups.

Result and Discussion

As can be seen in Figure 1, a significant reduction in the percent weight-bearing on the surgical limb was observed

throughout the study period in ACLT group received vehicle, while sham-operated rats maintained the percent weight-bearing of approximately 50%. Oral administration of glucosamine (250 mg/kg) significantly reversed the percent weight-bearing at all test time points. Similar result was also noted in ACLT group received *M. alba* extract, in which the percent weight-bearing was higher than that of the ACLT group received vehicle at 6, 9 and 12 week post ACLT induction ($45.6 \pm 1.2\%$ vs $42.6 \pm 0.5\%$, * $p < 0.05$; $45.6 \pm 0.3\%$ vs $42.9 \pm 0.8\%$, ** $p < 0.01$; $47.6 \pm 0.5\%$ vs $44.0 \pm 0.8\%$, *** $p < 0.0001$, respectively).

Conclusion

To our knowledge, this is the first study to demonstrate that the ethanolic extract of *M. alba* at dose of 280 mg/kg significantly attenuate pain associated with OA in ACLT-induced rat model.

further studies are required to determine the active components and the mechanism of action responsible for its effect.

Acknowledgement

This work is supported in part by the grant from Center of Excellence on Environmental Health and Toxicology,

However, Science and Technology Postgraduate Education and Research Development Office (PERDO), Ministry of Education. The study is also financially supported by the Thailand Research Fund, grant# DBG5480013. The authors would like to thank Mrs. Piyanee Ratanachamnong for her technical assistance.

References

- Allen KD, Adams SB, Setton LA. Evaluating Intra-Articular Drug Delivery for the Treatment of Osteoarthritis in a Rat Model. *Tissue Eng Part B-Re.* 2010; 16(1):81-92.
- Choi EM, Hwang JK. Effects of Morus alba leaf extract on the production of nitric oxide, prostaglandin E2 and cytokines in RAW264.7 macrophages. *Fitoterapia.* 2005; 76(7-8):608-13.
- Chung KO, Kim BY, Lee MH, Kim YR, Chung HY, Park JH, et al. In-vitro and in-vivo anti-inflammatory effect of oxyresveratrol from Morus alba L. *J Pharm Pharmacol.* 2003; 55(12):1695-700.
- Naito K, Watari T, Furuhashi A, Yomogida S, Sakamoto K, Kurosawa H, et al. Evaluation of the effect of glucosamine on an experimental rat osteoarthritis model. *Life Sci.* 2010; 86(13-14):538-43.
- Pomonis JD, Boulet JM, Gottshall SL, Phillips S, Sellers R, Bunton T, et al. Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain. *Pain.* 2005; 114(3):339-46.
- Roman-Blas JA, Jimenez SA. NF-kappa B as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006; 14(9):839-48.

RESEARCH ARTICLE

Relationship between Methamphetamine Concentrations in Urine and Blood of Thai Methamphetamine Abusers

Rungtip Narapanyakul¹, Wichian Tungtananuwat², Patramon Yongpanich²,
Theerin Sinchai², Nantana Thong-ra-ar², Somsong Lawanprasert¹

¹Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

²Department of Toxicology, Institute of Forensic Medicine, Police General Hospital, The Royal Thai Police Headquarter, Bangkok 10330, Thailand

Abstract

Toxicological investigation is performed to help identification the cause and manner of unnatural death. Urine samples are used as evidences of methamphetamine (MA) abuse under the Narcotics Laws of Thailand, whereas blood samples are specimens for investigation of poisoning from drugs or illicit substances. MA use or toxicity is implicated as a direct/an antecedent cause of death or even a significant contributing factor. This study investigated the relationship between MA concentrations in urine and blood of Thai MA abusers. Urine and blood samples of 30 Thai MA abusers were quantified for MA using head space-solid phase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry technique. The results showed that MA concentrations in urine were far higher than the corresponding MA concentrations in blood. MA concentrations in urine and blood samples collected from 25 deceased were closely correlated with a correlation coefficient (r) of 0.93 ($p < 0.05$) with a linear regression equation of $y = 0.0009x + 6.066$. This relationship is preliminarily advantageous for estimation of MA concentration in urine from MA concentration in blood sample while urine sample is not available or vice versa.

Key Words methamphetamine, blood, urine

Address correspondence and reprint request to: Somsong Lawanprasert, Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

Email: lsomsong@chula.ac.th

ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะและเลือดของผู้เสพยาเมทแอมเฟตามีนชาวไทย

รุ่งทิพย์ นราปัญญกุล¹, วิเชียร ตั้งธนานุวัฒน์², ภัทรมณ ยงพานิช², อีรินทร์ สิ้นไชย²,
นันทนา ทองระอา², สมทรง ลาวัญย์ประเสริฐ¹

¹ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา ค ณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330 ประเทศไทย

²กลุ่มงานพิษวิทยา สถาบันนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ สำนักงานตำรวจแห่งชาติ กรุงเทพฯ 10330 ประเทศไทย

บทคัดย่อ

การตรวจพิสูจน์ทางพิษวิทยาจะช่วยระบุถึงสาเหตุการตาย และพฤติกรรมการตายในศพที่ตายผิดธรรมชาติ ตัวอย่างปัสสาวะถูกนำมาใช้เป็นวัตถุพยาน ในการตรวจพิสูจน์การเสพยาเมทแอมเฟตามีนตามกฎหมายที่เกี่ยวข้องกับยาเสพติดของประเทศไทย ในขณะที่ตัวอย่างเลือดเป็นตัวอย่างที่ใช้ตรวจพิสูจน์ ความเป็นพิษจากยาหรือสารที่ผิดกฎหมาย การเสพยาเมทแอมเฟตามีน หรือพิษที่เกิดจากเมทแอมเฟตามีน อาจเป็นสาเหตุการตายโดยตรง/สาเหตุก่อนการตาย หรือเป็นปัจจัยเกี่ยวข้องส่งเสริมที่สำคัญ การศึกษานี้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะและเลือดของศพผู้เสียชีวิต ชาวไทยที่เสพยาเมทแอมเฟตามีน โดยเก็บตัวอย่างปัสสาวะและตัวอย่างเลือดของศพ ผู้เสียชีวิต ชาวไทยที่เสพยาเมทแอมเฟตามีน จำนวน 30 ราย นำมาวิเคราะห์ปริมาณเมทแอมเฟตามีน ด้วยเทคนิคเฮดสเปซ-โซลิดเฟสไมโครเอกซ์แทรคชัน / แกสโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี ผลการศึกษาพบว่า ความเข้มข้นของเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะมีค่าสูงกว่าความเข้มข้นของเมทแอมเฟตามีนในเลือดมาก ความเข้มข้นของเมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างปัสสาวะและตัวอย่างเลือดจากศพจำนวน 25 ราย มีความสัมพันธ์กัน สูง โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.93 ($p < 0.05$) และมีสมการถดถอยเชิงเส้น $y = 0.0009x + 6.066$ ความสัมพันธ์ที่ได้นี้จะเป็นประโยชน์เบื้องต้นสำหรับการทำนายความเข้มข้นของเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะจากความเข้มข้นของเมทแอมเฟตามีนที่ ตรวจพบในตัวอย่างเลือดในกรณีที่ไม่สามารถเก็บตัวอย่างปัสสาวะได้หรือในทางกลับกันก็ได้

คำสำคัญ: เมทแอมเฟตามีน, เลือด, ปัสสาวะ

Introduction

Methamphetamine (MA), one of the amphetamine-type stimulations, is the most widespread drug of abuse in Thailand. According to the Notification of Narcotics Control Board B.E. 2543, its investigation is based on urine samples. Any persons with urine MA concentrations of ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ are accused as persons with illegal MA consumption under the Narcotics Act B.E. 2522. While MA concentrations in urine samples are used as evidences of MA abuser under the law, MA concentrations in blood samples represent MA physiological effects. Thus, blood samples are also collected for forensic investigation if drugs or illicit substances are suspected to be a cause of death. MA use or toxicity is implicated as either a direct/an antecedent cause of death or even a significant contributing factor. However, the study of MA-related fatalities of Thai MA abusers is limited (Sribanditmongkol P, Chokjamsai M, and Thampitak, 2000; Narongchai P, Narongchai S, and Thampituk, 2007).

Most studies were based on small case reports and the relationship between urine and blood MA concentrations were not shown in those previous studies. This study aimed to investigate the relationship between MA concentrations in urine and blood samples of Thai MA abusers and the correlation equation was constructed so as for predicting MA concentration in blood from urine samples or vice versa. The findings of this study may contribute beneficial information for postmortem MA investigation in the cases that either urine or blood sample is not available.

Materials and Methods

Chemicals and Reagents

Methamphetamine hydrochloride was from Lipomed (U.S.A.). Diphenhydramine hydrochloride was purchased from Sigma Chemical Ltd. (U.S.A). All other chemicals (methanol, sodium chloride, and sodium hydroxide) were analytical grade (Merck, Darmstadt, Germany).

Urine and blood samples

Urine and blood samples were collected from 30 Thai deceased who were sent to be performed autopsies at the Institute of Forensic Medicine during September-December 2011. Blood samples were collected from basal artery of the dead whose urine samples were positive of MA via strip screening test using Orange Test Methamphetamine Strip[®] (True line Med. Co. Ltd., Switzerland). Both urine and blood samples were stored at 4°C until analysis.

Sample Preparations

Blood samples: Two milliliters of blood sample was transferred to an extraction tube and then 2 ml of 5 M sodium hydroxide was added. The mixture was vortex-mixed before centrifugation at 14,000 rpm for 20 min. The supernatant was transferred to a 20 ml glass vial and 200 μl of diphenhydramine solution (20 $\mu\text{g/ml}$) as well as 0.5 g of sodium chloride were added. The glass vial was capped with aluminum cap before analysis.

Urine samples: One milliliter of urine sample was transferred to a 20 ml glass vial. Then, 200 μl of premixed solution of diphenhydramine in 1 M sodium hydroxide (1 $\mu\text{g/ml}$) was added. Then, 0.3 g of sodium chloride was added into the glass vial which was capped with aluminum cap before analysis.

Instrumentation

Headspace-Solid Phase Micro-extraction/Gas Chromatography-Mass Spectrometry (HS-SPME/GC-MS) consisted of GC/MS (QP-2010 plus Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with an AOC-5000 Auto injector. Samples were separated on a crossband 100% dimethyl polysiloxane 0.25 mm i.d. \times 0.5 μm thickness \times 30 m length Rtx-1MS column (Restex, U.S.A). SPME assembly with a replaceable extraction fiber coated with 100 μm polydimethylsiloxane (PDMS) Fused Silica/SS 57341-U (Supelco, Bellefonte, U.S.A).

Initial oven temperature of 100 °C was held for 5 min, then increased at the rate of 15°C/min to 150°C for 1 min, and finally increased to 250°C at 15°C/min for 3 min. The injection port and interface temperature were set at 240°C and 220°C, respectively. The split injection mode and helium carrier gas was used. MS detection was operated in selective ion monitoring method and characteristic ion for MA quantification was $m/z = 58$.

Statistical analysis

All results were expressed as mean \pm S.E. Relationship between urine and blood MA concentrations was tested by Pearson's correlation and simple linear regression using SPSS for Windows, version 16.0. A p -value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

A summary of demographic profile of the deceased is presented in Table 1. Urine and blood samples were mostly collected from male deceased (73%) whereas the remaining (27%) was female. Mean \pm S.E. of the age of all deceased was 29.96 ± 1.77 years (range 20-60 years). Majority of the subjects' cause of death was car-accident (34%). Urine MA concentrations of all deceased were higher than 1 $\mu\text{g/ml}$ (1,000 ng/ml). MA concentrations in urine were far higher than the corresponding MA concentrations in blood. To determine the correlation between MA concentrations in blood and in urine, the data of 25 from the total of 30 deceased were used because blood MA concentrations of 5 cases were lower than the limit of detection of the method used in this study. The results showed that MA concentrations in urine and blood samples were linear correlated with a correlation coefficient (r) of 0.93 (p -value < 0.05) and the linear regression equation was $y = 0.0009x + 6.066$ (Figure 1).

Discussion

The results showed that MA concentrations in urine were far higher than the corresponding MA concentrations in blood. This is consistent to a previous study of Lebish, Finkle and Brackett (1970). Actually, peak plasma MA concentration was shown to occur after 4 hours and 2.5 hours via intranasal administration and smoking, respectively (Hart et al., 2008, Perez-Reyes et al., 1991) and approximately 70% of MA dose was excreted in urine within 24 hours (Cruickshank and Dyer, 2009). In addition, MA could be detected in urine several days (7 days) after repeated MA doses (Oyler et al., 2002; Connell et al., 1958). In this study, if MA concentrations in blood were not the toxic level or the cause of death, urine sample collections which were performed after death, were not supposed to be performed at the time close to the time after MA use. Thus, MA concentrations in urines were found with higher concentrations than in blood samples. The reports regarding toxic/fatal MA concentrations in blood vary among studies. Toxic concentrations of blood MA were ranged from 0.2 - 5.0 mg/ml (200,000 ng/ml - 5,000,000 ng/ml) (Nagata, 1983; Winek, Wahba, and Winek Jr, 2001; Schulz and Schmoldt, 2003). Fatal blood MA concentrations were reported as > 10 mg/ml (10,000,000 ng/ml) (Nagata, 1983; Winek et al., 2001; Schulz and Schmoldt, 2003) or > 0.5 mg/L (500 ng/ml) (Logan, Fligner, and Haddix, 1998). These variations could be due to differences of route of administration, amount and purity of the substance, co-administrated drugs/substances, physiological condition of the individual, etc. (He et al., 1996; Logan et al., 1998; Matoba, 2001; Ago M, Ago K, and Ogata, 2006; Inoue et al., 2006). However, blood MA concentrations of all the subjects in this study (Mean \pm S.E. of blood MA concentrations = 34 ± 6 ng/ml) were lower than the reported toxic/fatal concentrations. Thus, MA exposures of the subjects in this study were possibly a contributing factor not the direct cause of death.

Table 1 Demographic profile of subjects

No.	Sex	Age (years)	Causes of death
1	M	24	Fall
2	M	31	Gunshot Wound
3	M	21	Electrocution
4	F	20	Hanging
5	M	31	Drowning
6	M	29	Accident
7	M	NA	Homicide
8	F	25	Accident
9	M	33	Gunshot Wound
10	M	33	Hanging
11	M	27	Accident
12	M	25	Unknown
13	M	NA	Unknown
14	M	26	Accident
15	M	33	Hanging
16	M	24	Accident
17	M	30	Accident
18	M	20	Gunshot Wound
19	M	25	Gunshot Wound
20	M	28	Accident
21	M	NA	Accident
22	F	24	Unknown
23	M	43	Accident
24	M	40	Unknown
25	M	40	Accident
26	F	22	Hanging
27	M	60	Unknown
28	F	35	Drowning
29	M	NA	Gunshot Wound
30	M	NA	Unknown
$\bar{X} \pm \text{S.E.}$		29.96 \pm 1.77	
Range		20-60	

M = male; F = female; NA = not available

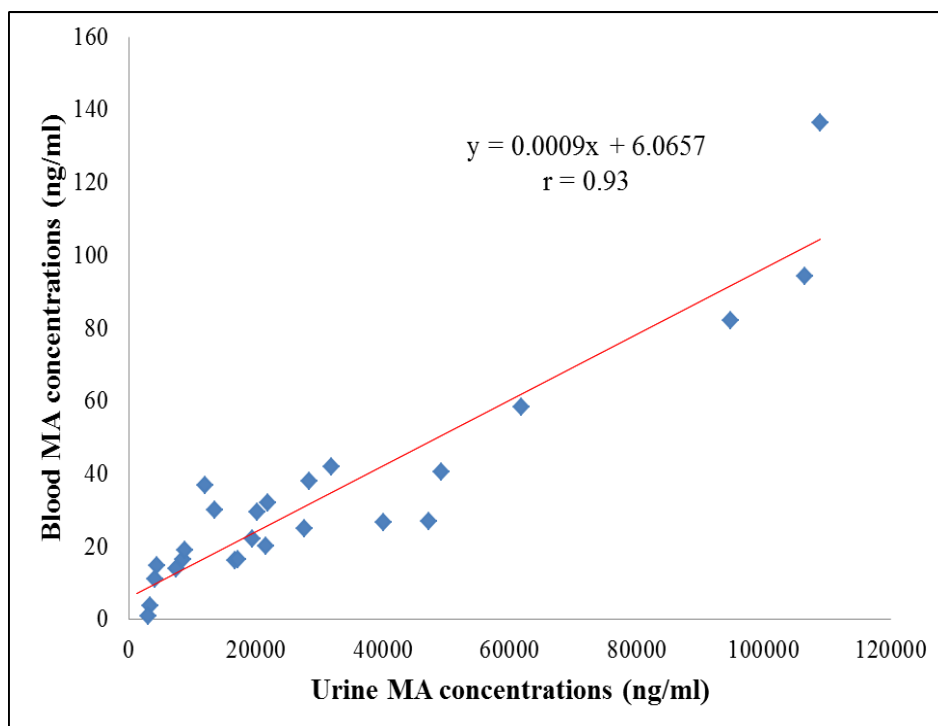


Figure 1 Relationship between urine and blood MA concentrations of Thai MA abusers (n = 25)

Conclusion

MA concentrations in urine and blood samples collected from 25 Thai deceased were closely correlated with a correlation coefficient of 0.93 ($p < 0.05$) with a linear regression equation of $y = 0.0009x + 6.066$. This relationship is preliminarily advantageous for prediction of MA concentration in urine from MA concentration in blood sample while urine sample is not available or vice versa.

Acknowledgement

The authors thank the Institute of Forensic Medicine, Police General Hospital, The Royal Thai Police for the laboratory facilities as well as the staff at the Institute of Forensic Medicine, Police General Hospital, The Royal Thai Police for their help on sample collections.

References

- Ago M, Ago K, Ogata M. Determination of methamphetamine in sudden death of a traffic accident inpatient by blood and hair analyses. *Leg Med.* 2006;8:235–9.
- Connell PH. *Amphetamine Psychosis*. London: Oxford University Press, 1958.
- Cruickshank CC, Dye KR. A review of the clinical pharmacology of methamphetamine. *Addiction.* 2009;104:1085–99.
- Hart CL, Gunderson EW, Perez A, Kirkpatrick MG, Thurmond A, Comer SD, et al. Acute physiological and behavioral effects of intranasal methamphetamine in humans. *Neuropsychopharmacology.* 2008;33:1847–55.
- He SY, Matoba R, Sodesaki K, Fujitani N, Ito Y. Morphological and morphometric investigation of cardiac lesions after chronic administration of methamphetamine in rats. *Jpn J Legal Med.* 1996;50:63–71.
- Inoue H, Ikeda N, Kudo K, Ishida T, Terada M, Matoba R. Methamphetamine-related sudden death with a concentration which was of a 'toxic level'. *Leg Med.* 2006;8:150–5.
- Lebish P, Finkle BS, Brackett Jr JW. Determination of amphetamine, methamphetamine, and related amines in blood and urine by gas chromatography with hydrogen flame ionization detector. *Clin Chem.* 1970;16(3):195–200.
- Logan BK, Fligner CL, Haddix T. Cause and manner of death in fatalities involving methamphetamine. *J Forensic Sci.* 1998;43:28–34.
- Matoba R. Cardiac lesions in methamphetamine abusers. *Jpn J Legal Med.* 2001;55:321–30 [in Japanese].
- Nagata T. Signification of methamphetamine concentration in body fluids and tissues. *Jpn J Legal Med.* 1983;37:513–8.
- Narongchai P, Narongchai S, Thampituk K. The incidence of drug abuse in unnatural deaths in northern Thailand. *J Med Assoc Thai.* 2007;90(1):137–42.
- Oyler JM, Cone EJ, Joseph Jr RE, Moolchan ET, Huestis MA. Duration of detectable methamphetamine and amphetamine excretion in urine after controlled oral administration of methamphetamine to humans. *Clin Chem.* 2002;48:1703–14.
- Perez-Reyes M, White WR, McDonald SA, Hicks RE, Jeffcoat AR, Hill JM, et al. Clinical effects of daily methamphetamine administration. *Clin Neuropharmacol.* 1991;14: 352–8.
- Schulz M, Schmoldt A. Therapeutic and toxic concentration of more than 800 drugs and other xenobiotics. *Pharmazie.* 2003;58:447–74.
- Sribanditmongkol P, Chokjamsai M, Thampitak S. Methamphetamine overdose and fatality : 2 cases report. *J Med Assoc Thai.* 2000;83(9):1120–3.
- Winek CL, Wahba WW, Winek Jr CL, Blazer TW. Drug and chemical blood-level data 2001. *Forensic Sci Int.* 2001;122:107–23.

RESEARCH ARTICLE

False Interpretation of Methamphetamine and Amphetamine Abuse in Thai Patients Receiving Selegiline

Nunthika Kaewpunya¹, Wichian Tungtanuwat², Akravudh Viriyavejakul³, Patramon Yongpanich², Nantana Thong-ra-ar², Somsong Lawanprasert¹

¹Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

²Institute of Forensic Medicine, Police General Hospital, Bangkok 10330, Thailand

³Prasat Neurological Institute, Department of Medical Services, Ministry of Public Health, Bangkok 10400, Thailand

Abstract

The purpose of this study was to determine methamphetamine (MA) and amphetamine (AM) concentrations in urine of Thai patients receiving selegiline in order to evaluate the incidence of false interpretation of MA and AM abuse in these patients. Urine samples were collected from eleven Thai patients (9 men and 2 women, 52-76 years old). They were outpatients of Prasat Neurological Institute and were prescribed selegiline for medical purpose. Urine samples were collected at 2, 4, 6, 8 and 20 hours after selegiline administration. To determine concentrations of MA and AM which are metabolites of selegiline, solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry (SPME-GC-MS) was employed. The results showed that both MA and AM concentrations found in the urines collected from 2 to 20 hours after selegiline administration were mostly more than 1,000 ng/ml, the concentration which is the cut-off value for positive interpretation of illicit MA abuser according to the regulation. However, the mean ratio of AM/MA in urine at 2-20 hours after selegiline administration was ranged from 0.63-0.91 which was higher than the ratio of AM/MA in urine of most MA abusers reported in other studies. MA and AM detected in urines of patients receiving therapeutic dose of selegiline can cause false interpretation of MA or AM abuse. Whether or not the ratio of AM/MA is preliminarily useful to differentiate patients receiving selegiline from MA abusers, is needed to be further explored.

Key Words Methamphetamine, Amphetamine, Selegiline

Address correspondence and reprint request to: Somsong Lawanprasert, Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

Email: lsomsong@chula.ac.th

การแปลผลผิดพลาดว่าเป็นผู้เสพยาเสพติดชนิดเมทแอมเฟตามีนและแอมเฟตามีน ในผู้ป่วยชาวไทยที่ได้รับยาซีลีจิน

นันทิกา แก้วปัญญา¹, วิเชียร ตั้งธนาคุณ², อัครวุฒิ วิริยเวชกุล³, ภัทรมณ ยงพานิช²,
นันทนา ทองระอา², สมทรง ลาวัญย์ประเสริฐ¹

¹ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กทม 10330
ประเทศไทย

²กลุ่มงานพิษวิทยา สถาบันนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ สำนักงานตำรวจแห่งชาติ กทม 10330
ประเทศไทย

³สถาบันประสาทวิทยา กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข กทม 10400 ประเทศไทย

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของ การศึกษานี้เพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของเมทแอมเฟตามีน (MA) และ
แอมเฟตามีน (AM) ในตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยชาวไทยที่ได้รับยาซีลีจินเพื่อใช้ในการประเมิน
อุบัติการณ์การของการแปลผลผิดพลาดว่าเป็นผู้เสพยาเสพติดชนิดเมทแอมเฟตามีนและแอมเฟตา
มินในผู้ป่วยเหล่านี้ ตัวอย่างปัสสาวะถูกเก็บจากผู้ป่วยชาวไทย 11 ราย (ชาย 9 ราย และ หญิง 2
ราย, 52-76 ปี) ซึ่งเป็นผู้ป่วยนอกของสถาบันประสาทวิทยาและได้รับยาซีลีจินในขนาดการรักษา
ตัวอย่างปัสสาวะถูกเก็บที่เวลา 2, 4, 6, 8 และ 20 ชั่วโมง หลังจากรับประทานยา ซีลีจิน
วิเคราะห์ความเข้มข้นของ MA และ AM ที่เป็นเมแทบอไลต์ของซีลีจิน ด้วยเครื่องมือ solid-phase
microextraction-gas chromatography-mass spectrometry (SPME-GC-MS) ผลการศึกษา
พบว่าความเข้มข้น ของเมทแอมเฟตามีนและแอมเฟตามีนในตัวอย่างปัสสาวะเก็บที่เวลา 2-20
ชั่วโมงหลังจากรับประทานยาซีลี จินโดยส่วนใหญ่มากกว่า 1000 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่า
ความเข้มข้นที่กฎหมายกำหนดเป็นจุดตัดสำหรับการแปลผลว่าเป็นบวมมีการเสพยาเสพติดชนิดเมท
แอมเฟตามีน อย่างไรก็ตามค่าเฉลี่ยอัตราส่วนของ AM/MA ในปัสสาวะที่เวลา 2-20 ชั่วโมง
หลังจากรับประทานยาซีลีจิน อยู่ในช่วงระหว่าง 0.63-0.91 ซึ่งสูงกว่าค่าอัตราส่วนของ AM/MA
ในปัสสาวะของผู้เสพยาเสพติดชนิดเมทแอมเฟตามีนเป็นส่วนใหญ่ที่รายงานมาก่อนใน การศึกษาอื่น
MA และ AM ที่ตรวจพบในปัสสาวะของผู้ป่วยที่ได้รับยาซีลีจินในขนาดรักษาเป็นสาเหตุให้เกิดการ
แปลผลผิดพลาดว่าเป็นผู้เสพยาเสพติดชนิด MA และ AM ได้ การพิจารณาความเป็นไปได้ใน ใช้
ค่าอัตราส่วนของ AM/MA เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการแยกผู้ป่วยที่ได้รับยาซีลีจิน ออกจากผู้เสพยา
เสพติดชนิดเมทแอมเฟตามีนนั้นจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไป

คำสำคัญ: เมทแอมเฟตามีน, แอมเฟตามีน, ซีลีจิน

Introduction

Selegiline, a selective irreversible monoamine oxidase B inhibitor, is widely used in the treatment of Parkinson's disease (Wessel and Szelényi 1992). Selegiline is metabolized rapidly in gastrointestinal tract and liver into desmethylselegiline, (R)-(-)-methamphetamine and (R)-(+)-amphetamine which are excreted in urine (Shin 1997).

Methamphetamine (MA) is classified as type I narcotic drug according to Thai regulation. Urine MA or derivatives of amphetamine (AM) concentration of ≥ 1000 ng/ml indicates the presence of these substances in the body. Thus, urine concentration of these substances of ≥ 1000 ng/ml is used as the cut-off value for positive interpretation of illicit abuser of MA or derivatives of AM according to the regulation. Since majority (30-50%) of MA exposure with a lesser amount (4-10%) of AM which is one of its metabolite are excreted in urine (Jirovsky et al. 1998, Moore 1999), both MA and AM are found in urine of MA abusers (Hasegawa et al. 1999).

As mentioned above, MA and AM are also found in urine of patients receiving selegiline. Thus, the presence of MA and AM in urine samples collected from dead bodies with unknown history/cause of death, may be interpreted as MA users even though they actually received selegiline therapy. This false positive interpretation of MA or AM abuse in patients receiving selegiline is practically concerned in forensic investigation. However, the incidence of false interpretation of MA or AM abuse in patients with selegiline therapy has not been reported.

The purpose of this study was to determine MA and AM concentrations in urine of Thai patients receiving selegiline so as to evaluate the incidence of false interpretation of MA and AM abuse in these patients. The ratio of AM/MA was also discussed based on the information reported by other studies in an attempt to differentiate patients receiving selegiline from MA abusers.

Materials and Methods

Materials

Amphetamine hydrochloride and methamphetamine hydrochloride were from Lipomed (U.S.A.). Diphenhydramine hydrochloride was purchased from Sigma Chemical Ltd. (U.S.A.). All other chemicals were analytical grade.

Methods

Subjects

Eleven Thai patients (9 men and 2 women, 52-76 years old) were outpatients of Prasat Neurological Institute, Department of Medical Services, Ministry of Public Health, Bangkok, Thailand. The study protocol was approved by the Prasat Neurological Institute ethical committee for the protection of the rights of human subjects (Approval # 54029, February 24, 2011). The patients were prescribed selegiline for medical purpose at the dosages of 2.5 or 5 mg twice daily. In all patients, urine collection was performed after at least 7 days of selegiline administration. Urine samples were collected at 2, 4, 6, 8 and 20 hours after selegiline administration.

Analytical procedure

One milliliter of urine sample was placed in a 20 ml vial and 300 μ l of a mixture (1:10 v/v) of diphenhydramine (4 mg/ml) and 200 mM KOH was added. After 3 g of sodium chloride was added, the vial was sealed with a silicone cap and an aluminum crimp seal. MA and AM in urine sample were then analyzed by solid-phase microextraction (SPME)-gas chromatography-mass spectrometry.

The gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS, QP-2010 plus Shimadzu, Kyoto, Japan) was equipped with a 30 m \times 0.25 mm (i.d.) column, Rtx-1MS (Restex, U.S.A.). The column oven was set at 100°C for 5 min and then programmed to increase from 100 to 150°C at 15°C/min for 1 min and finally increase to 250°C for 3 min. The injection port and interface temperature were set at 240°C

and 220°C, respectively. Splitless injection mode was used. Helium with flow rate of 1.53 ml/min was used as the carrier gas. Quantification of sample was done by the selective ion monitoring (SIM) method and selected characteristic ions for AM and MA were $m/z = 44$ and 58, respectively.

SPME assembly with a replaceable extraction fiber, coated with 100 μm polydimethylsiloxane, was purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA) with an AOC-5000 Auto injector. The samples were adsorption for 10 min and fiber were desorbed for 6 min.

Results

The age of eleven Thai patients (9 men and 2 women) in this study were between 52-76 years old. Four and seven patients were prescribed selegiline at the dosages of 2.5 mg and 5 mg twice daily, respectively (Table 1). At all time points of urine collection (2, 4, 6, 8 and 20 hours), AM was found in urines of all patients at the concentrations above 1000 ng/ml. Percentages of patients whose urines contained MA at the concentration above 1000 ng/ml were 90.1, 90.1, 100, 90.1 and 81.8 at the times of urine collection of 2, 4, 6, 8 and 20 hours, respectively. Ratio of AM/MA of urines collected at 2, 4, 6, 8 and 20 hours was in the range of 0.63-0.91 (Table 2).

Table 1 Patients demographic data

Patient No.	Age (years)	Sex	Dosage regimen of selegiline (mg/day)
1	68	male	2.5 mg \times 2
2	76	male	2.5 mg \times 2
3	58	female	2.5 mg \times 2
4	64	male	2.5 mg \times 2
5	59	male	5 mg \times 2
6	68	male	5 mg \times 2
7	55	male	5 mg \times 2
8	52	male	5 mg \times 2
9	68	male	5 mg \times 2
10	54	male	5 mg \times 2
11	69	female	5 mg \times 2

Table 2 Concentrations of MA, AM in urine of patients collected at various times after selegiline administration and the corresponding AM/MA ratio

Patient No.	Concentrations of MA and AM (ng/ml) in urine of patients collected at various times after selegiline administration and the corresponding AM/MA ratio														
	2 hr			4 hr			6 hr			8 hr			20 hr		
	MA	AM	AM/MA	MA	AM	AM/MA	MA	AM	AM/MA	MA	AM	AM/MA	MA	AM	AM/MA
1	1136.58	1115.13	0.98	1304.28	1128.50	0.87	1579.99	1151.96	0.73	2169.66	1292.62	0.60	1515.85	1092.99	0.72
2	1247.64	1147.20	0.92	1027.37	1075.75	1.05	2625.15	1422.61	0.54	1533.20	1476.31	0.96	1504.93	1854.50	1.23
3	1090.38	1043.81	0.96	1808.98	1312.66	0.73	2847.72	1495.87	0.53	3342.88	1591.73	0.48	1598.41	1181.88	0.74
4	1043.63	1043.38	1.00	1855.29	1227.14	0.66	1133.26	1051.29	0.93	1323.20	1164.52	0.88	819.10	1025.30	1.25
5	2348.58	1416.60	0.60	2011.36	1346.94	0.67	3163.46	1622.89	0.51	2749.60	1508.54	0.55	2716.62	1582.49	0.58
6	1153.97	2201.33	1.91	5119.15	3397.84	0.66	3074.41	2132.09	0.69	2511.50	2123.17	0.85	755.26	1149.64	1.52
7	3144.91	1153.05	0.37	2073.11	1036.35	0.50	3842.78	1328.87	0.35	726.98	1048.30	1.44	2143.04	1158.84	0.54
8	1882.38	1184.97	0.63	1430.47	1043.60	0.73	2014.99	1113.77	0.55	1218.74	1037.88	0.85	1662.07	1178.46	0.71
9	903.84	1034.15	1.14	1807.55	1060.88	0.59	1627.08	1047.02	0.64	1439.07	1029.96	0.72	1470.90	1060.23	0.72
10	2222.66	2466.33	1.11	993.58	1424.12	1.43	1432.11	1378.73	0.96	1462.03	1364.30	0.93	1935.08	1275.31	0.66
11	6171.15	2485.90	0.40	10582.11	4214.24	0.40	5854.35	3010.64	0.51	6809.67	3081.68	0.45	13509.34	5076.20	0.38
False positive (%) (≥1,000 ng/ml)	90.10	100.00		90.10	100.00		100.00	100.00		90.10	100.00		81.80	100.00	
Mean			0.91			0.75			0.63			0.79			0.82
SEM			0.13			0.09			0.06			0.09			0.11

Discussion

Results from this study showed that the concentrations of both MA and AM found in the urines collected from 2 to 20 hours after selegiline administration were mostly more than 1,000 ng/ml, the concentration which is the cut-off value for positive interpretation of illicit MA abuser according to the regulation. However, the mean ratio of AM/MA in urine at 2-20 hours after selegiline administration was ranged from 0.63-0.91 which was higher than the ratio of AM/MA in urines of most MA abusers reported by other studies (Kim et al. 2000; Hasegawa et al. 1999). This may be explained by the pharmacokinetic of the compounds that selegiline is metabolized to AM via two pathways. One pathway yields AM while the other yields MA which is further metabolized to AM (Shin 1997). Thus, higher AM/MA ratio is found in patients receiving selegiline. In contrast, in MA abusers, MA is excreted mainly unchanged in urine (30-50%) while smaller amount of AM (4-10%) is excreted in urine (Jirovsky et al. 1998; Moore 1999). Thus, smaller AM/MA ratio is found in MA users.

Several studies reported the ratio of AM/MA in urine of patients receiving selegiline and of MA abuser so as to use the ratio to distinguish patients receiving selegiline from MA abuser. They found that AM/MA ratios of patients receiving selegiline are higher than those of the MA abusers.

For example, AM/MA ratios in patients receiving selegiline were 0.30 (Meeker and Reynolds 1990), 0.46 (Kupiec and Chaturvedi 1999), 0.33 (Kim et al. 2000) and 0.40 (Fujita et al. 2008) whereas the ratio of AM/MA in urine of MA abuse is 0.20 (Kim et al. 2000). Hasegawa et al (1999) reported that the ratio of AM/MA in urines of healthy volunteers receiving selegiline increased from 0.24 to 0.67 from 2 to 48 h after selegiline administration while the ratio of AM/MA in most MA abusers was less than 0.24.

Unexpected amount of MA in urine at various times after selegiline administration found in some patients in this study (such as patient no 7, 10 etc.) could be explained by the factors that influence MA excretion such as pH of the urine. Urinary excretion of MA which is a tertiary amine can be changed by the pH of the urine (Cook et al. 1993; Kim et al. 2004).

Conclusion

MA and AM detected in urines of patients receiving therapeutic dose of selegiline can cause false positive interpretation of MA or AM abuse. Whether or not the ratio of AM/MA is preliminarily useful to differentiate patients receiving selegiline from MA abusers, is needed to be further explored.

References

- Cook CE, Jeffcoat AR, Hill JM, Pugh DE, Patetta PK, Sadler BM. et al. Pharmacokinetics of methamphetamine self-administered to human subjects by smoking S-(+)-methamphetamine hydrochloride. *Drug Metab Dispos.* 1993; 21:717-23.
- Fujita Y, Takahashi K, Takei M, Niitsu H, Aoki Y, Onodera M. Detection of *Levorotatory* Methamphetamine and *Levorotatory* Amphetamine in urine after ingestion of an overdose of selegiline. *Yakugaku Zasshi.* 2008; 128 (10):1507-1512. Japanese.
- Hasegawa M, Matsubara K, Fukushima, Maseda C, Uezono T and Kimura K. Stereoselective analyses of selegiline metabolites possible urinary markers for selegiline therapy. *Forensic Sci Int Genet.* 1999; 101:95-106.
- Jirovsky D, Lemr K, Sevcik J, Smysl B, and Stransky Z. Methamphetamine-properties and analytical methods of enantiomer determination. *Forensic Sci Int Genet.* 1998; 96:61-70.

- Kim I, Oyler JM, Moolchan ET, Cone EJ, Huestis MA. Urinary pharmacokinetics of methamphetamine and its metabolite, amphetamine following controlled oral administration to humans. *Ther Drug Monit*. 2004; 26:664–72.
- Kim EM, Chung HS, Lee KJ and Kim HJ. Determination of enantiomeric metabolites of *l*-deprenyl, *d*-methamphetamine, and racemic methamphetamine in urine by capillary electrophoresis: comparison of deprenyl use and methamphetamine use. *J Anal Toxicol*. 2000; 24 (4):238-244.
- Kupiec CT, Chaturvedi AK. Stereochemical determination of selegiline metabolites in postmortem biological specimens. *J Forensic Sci*. 1999; 44 (1):222–226.
- Meeker JE, Reynolds PC. Postmortem tissue methamphetamine concentrations following selegiline administration. *J Anal Toxicol*. 1990; 14:330-331.
- Moore K. Amphetamines/ sympathomimetic amines. In: Levine B, ed. *Principles of Forensic Toxicology*. Washington DC: AACC Press, 1999:265-284.
- Shin HS. Metabolism of selegiline in humans identification, excretion, and stereochemistry of urine metabolites. *Drug Metab Dispos*. 1997; 25 (6):657-662.
- Wessel K, Szelenyi I. Selegiline-an overview of its role in the treatment of Parkinson's disease. *J Clin Invest*. 1992; 70:459-462.

RESEARCH ARTICLE

Investigation of Antioxidant Activities and Hepatoprotective effect of Hoan Ngoc (*Pseuderanthemum Palatiferum*) against Hydrogen Peroxide - Induced Oxidative Damage in HepG2 Cells**Supaporn Udomsup¹, Suree Jianmongkol², Chaiyo Chaichantipyuth³, Supatra Srichairat¹**¹*Department of Veterinary Pharmacology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*²*Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*³*Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand***Abstract**

The purpose of this study was to investigate hepatoprotective and antioxidant activities of *Pseuderanthemum palatiferum* extract (PPE) against hydrogen peroxide (H₂O₂) – induced oxidative damage in HepG2 cells. The phytochemical analysis reported that PPE contained phenolic and flavonoid compounds. PPE exhibited lower antioxidant activities than ascorbic acid determined by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals (DPPH), ferric reducing antioxidant power (FRAP) and H₂O₂ scavenging assay. The hepatoprotective effect of PPE against H₂O₂–induced oxidative damage in HepG2 was investigated by measuring cell viability via MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay. Lipid peroxidation and cytotoxicity were determined by malondialdehyde (MDA) formations and lactate dehydrogenase (LDH) leakage, respectively. Reactive oxygen species (ROS) were detected by using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). After 24-h incubation with PPE (1, 5, 10, 25, 50 µg/mL) and H₂O₂ (100 µM) of HepG2 cells, the ROS levels of PPE group, especially 1, 5, 10 µg/mL, were not significantly lower than those of untreated group. The levels of cell viability (MTT assay) and cell damage detected by LDH and MDA contents of PPE treated groups were not significantly different from untreated group. These findings suggest that PPE exhibited low antioxidant and no hepatoprotective effects against H₂O₂–induced oxidative damage in HepG2 cells.

Key Words *Pseuderanthemum palatiferum*, hydrogen peroxide, oxidative stress, HepG2 cells

การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และปกป้องเซลล์ตับของว่านพญาวานต่อความเสียหายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในเซลล์ HepG2

สุภาภรณ์ อุดมทรัพย์¹, สุรีย์ เจียรณมิ่งคล², ชัยโย ชัยชาญทิพบุตร³, สุพัตรา ศรีไชยรัตน์¹

¹ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กทม. 10330 ประเทศไทย

²ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กทม. 10330 ประเทศไทย

³ภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กทม. 10330 ประเทศไทย

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากว่านพญาวานในการต้านออกซิเดชันและปกป้องเซลล์ตับที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเสียหายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วย hydrogen peroxide (H_2O_2) โดยศึกษาในเซลล์ HepG2 ร่วมกับการวิเคราะห์ส่วนประกอบของสารสกัด ผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากว่านพญาวานประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลและสารประกอบฟลาโวนอยด์ ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals (DPPH) assay, ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay และ H_2O_2 scavenging assay พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันน้อยกว่าวิตามินซี ผลการศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ตับ เมื่อให้สารสกัดที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 25 และ 50 $\mu g/mL$ ร่วมกับ H_2O_2 100 μM แก่เซลล์ HepG2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดอัตราการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay วัดปฏิกิริยา lipid peroxidation และความเป็นพิษต่อเซลล์โดยการวัดระดับ malondialdehyde (MDA) และ LDH (lactate dehydrogenase) ตามลำดับ รวมทั้งวัดปริมาณของ reactive oxygen species (ROS) ภายในเซลล์ โดยใช้สาร 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) พบว่าสารสกัดทุกความเข้มข้น โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 1, 5 และ 10 $\mu g/mL$ มีผลทำให้ระดับ ROS ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ (MTT assay) และระดับเอนไซม์ LDH รวมทั้งปฏิกิริยา lipid peroxidation ของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดและกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการทดลองดังกล่าวสรุปได้ว่าสารสกัดจากว่านพญาวานมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้น้อยมาก จึงไม่มีผลในการปกป้องเซลล์ตับที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันด้วย H_2O_2

คำสำคัญ: ว่านพญาวาน, ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์, ภาวะเครียดที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน, เซลล์ HepG2

บทนำ

Oxidative stress เป็นภาวะที่มี reactive oxygen species (ROS) มากเกินไป โดย ROS มีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหาย และการทำงานของเซลล์ผิดปกติ เนื่องจากไปทำลายโปรตีน ดีเอ็นเอ และ ทำให้เกิดปฏิกิริยา peroxidation ของไขมัน (lipid peroxidation) รวมทั้งกระตุ้นกระบวนการอักเสบ ผลดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเรื้อรังและโรคที่เกิดจากความเสื่อม ได้แก่ มะเร็ง เบาหวาน โรคใน ระบบหลอดเลือดและหัวใจ โรคเกี่ยวกับการเสื่อมสภาพของเซลล์ สมอง¹ รวมทั้งโรคที่เกิดขึ้นในตับ พบว่า ROS และ reactive nitrogen species (RNS) มีบทบาทสำคัญในการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคและพัฒนาการของโรค ดังกล่าว² ปัจจุบันเริ่มมีการใช้พืชสมุนไพรสำหรับต้านฤทธิ์ ROS ที่เกิดขึ้นกับเซลล์ โดยมีผลดักจับ ROS หรือกระตุ้นกระบวนการปกป้องภายในเซลล์ และที่ได้มีการพัฒนาเป็นยาแผนปัจจุบัน คือ silymarin ซึ่งมีสารประกอบฟลาโวนอยด์เป็นตัวยาสสำคัญ

ว่านพญาพาน (Pseuderanthemum palatiferum) เป็นพืชสมุนไพรที่มีถิ่นกำเนิดจากประเทศเวียดนาม อยู่ในวงศ์ Acanthaceae มีชื่อท้องถิ่นว่า ว่านลิง ต้นลิง ว่านเพชรพันล้าน และ ฮว่านง็อก (Hoan ngoc) ในประเทศเวียดนาม ได้มีการนำพืชชนิดนี้มาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคต่างๆ ได้แก่ โรคท้องเสีย โรคความดันโลหิตสูง ข้ออักเสบ หลอดลมอักเสบ โรคตับอักเสบ โรคกระเพาะอาหารเป็นแผล โรคลำไส้อักเสบ โรคไตอักเสบ บาดแผล ท้องผูก อาการปวดเมื่อย โรคเบาหวาน และโรคตาแดง เป็นต้น³ ประเทศไทยได้มีการนำว่านชนิดนี้มาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคต่างๆ เช่นกัน เช่น โรคกระเพาะอาหาร โรคเกี่ยวกับลำไส้ใหญ่ โรคตับอักเสบ คอพอก โรคไตอักเสบ และโรคเบาหวาน เป็นต้น⁴ สารสำคัญที่สามารถ

แยกได้จากใบของว่านพญาพาน ได้แก่ stigmasterol, β -sitosterol, triterpenoid saponin, kaempferol, salicylic acid, phytol, palmitic acid⁵, pseudogallic acid และสารอาหารต่างๆ ได้แก่ โปรตีน และกรดอะมิโน เช่น ไลซีน (lysine) เมไทโอนีน (methionine) ทรีโอนีน (threonine) และแร่ธาตุต่างๆ ได้แก่ แคลเซียม เหล็ก และทองแดง⁶

สรรพคุณของว่านพญาพานที่มีงานวิจัยอ้างอิง ได้แก่ ฤทธิ์ต้าน $H_2O_2^{\cdot}$ (hydrogen peroxide radical) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระในเม็ดเลือดแดงของคน ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Salmonella typhi* 158, *Shigella flexneri* และ *Escherichia coli* ฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida albicans* และ *Candida stellatoidea*⁷ ฤทธิ์ต้านอาการท้องเสียในลูกสุกร⁸ ฤทธิ์ต้านโรคเบาหวาน⁹ และฤทธิ์ลดระดับความดันโลหิต¹⁰ อย่างไรก็ตามยังขาดข้อมูลที่เป็นการศึกษาทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับ ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการต้านออกซิเดชัน และ ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ระดับที่เสียหายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันในเซลล์เพาะเลี้ยง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากว่านพญาพานในการลดอนุมูลอิสระและต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งมีผลปกป้องเซลล์ระดับที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเสียหายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วย hydrogen peroxide (H_2O_2) โดยศึกษาในเซลล์ HepG2 เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการป้องกัน และรักษาโรคตับอักเสบต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สารเคมี

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals (DPPH), tripyridyltriazine (TPTZ), MTT reagent (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl

tetrazolium bromide), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), pyruvic acid และ thiobarbituric acid (TBA) จาก Sigma (St. Louis, MO, USA) hydrogen peroxide (H_2O_2) และ trichloroacetic acid (TCA) จาก Merck (Darmstadt, Germany) เซลล์ HepG2 จาก ATCC (Manassas, VA, USA) โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.สุรวิทย์ วัฒนพิทยกุล Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin และ trypsin จาก Gibco (Grand Island, NY, USA)

การสกัดว่านพญาพาน

นำใบของว่านพญาพาน ที่มีอายุ 2 ปีขึ้นไป โดยซื้อจากสวน สมุนไพร ว่านจ๋อ จ. ปทุมธานี และมาผสมกับ 95% เอทานอล บดให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง homogenizer หมักทิ้งไว้ 7 วัน จากนั้น ระบายให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator และทำให้แห้งจนเป็นผงด้วยเครื่อง lyophilizer ละลายสารสกัดด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ

การตรวจสอบองค์ประกอบของสารสกัด

1. การหาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอล (Total phenolic compounds)

หาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลของสารสกัดโดยใช้ Folin-Ciocalteu reagent (FCR) ตามวิธีของ Slinkard และ Singleton (1977)¹¹ แสดงผลเป็น gallic acid equivalent (mg gallic acid/g dried extract)

2. การหาปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Total flavonoid compounds)

หาปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์โดยวิธี colorimetric method ของ Zhishen และคณะ (1999)¹² แสดงผลเป็น catechin equivalent (mg catechin/ g dried extract)

การศึกษากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

1. การวิเคราะห์ความสามารถของการดักจับอนุมูลอิสระด้วยสาร DPPH (Scavenging effect on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals (DPPH))

วิเคราะห์ ความสามารถ ในการดักจับอนุมูลอิสระของสารสกัดตามวิธีของ Blois (1958)¹³ คำนวณความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ ตามสูตรดังนี้

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = \left\{ \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100 \right\}$$

หมายเหตุ A คือ ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance)

2. การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ (Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay)

วิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ของสารวิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP assay ตามวิธีการของ Benzi และ Strains (1996)¹⁴ แสดงค่าเป็น EC1 (Equivalent Concentration 1) หรือค่าความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่ความสามารถในการรีดิวซ์ Fe(III)-TPTZ ได้เท่ากับ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM

3. การวิเคราะห์ความสามารถในการดักจับ

H_2O_2 (Hydrogen peroxide radical (H_2O_2) scavenging activity assay)

วิเคราะห์ความสามารถในการดักจับ H_2O_2 ของสารด้วยการ titration ตามวิธีของ Zhao และคณะ (2006)¹⁵ คำนวณความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ ตามสูตรดังนี้

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = \frac{V_0 - V_1}{V_0} \times 100$$

V_0 คือ ปริมาตรของ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ที่ใช้ในการไตเตรทของกลุ่มที่ไม่มีสารสกัด

การศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ของสารสกัดใน HepG2 cells

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ HepG2 cells

เพาะเลี้ยงเซลล์ HepG2 ใน Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มี 10% fetal bovine serum (FBS) และ penicillin (100 units/mL), streptomycin (100 $\mu\text{g/mL}$) ที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO_2 เปลี่ยน media ทุก 1-2 วัน และ subculture ที่ confluence 70-80% ทุก 4-5 วัน

2. การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี

MTT assay

วัดอัตราการมีชีวิต รอดของเซลล์โดยวิธี MTT assay ตามวิธีของ Hansen และคณะ (1989)¹⁶

2.1 การศึกษาความเป็นพิษของ H_2O_2 ต่อเซลล์ HepG2

เพาะเลี้ยงเซลล์ HepG2 ที่มีจำนวน 1.5×10^4 เซลล์/หลุม ใน 96-well plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมน้ำ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่ม

นาน 24 ชั่วโมง ดูด media ที่ จากนั้นเติมสารละลาย MTT (0.25 mg/mL) นาน 4 ชั่วโมง ดูด media ที่ ละลายผลึก formazan ด้วย 100 μL DMSO และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader (GDV model DV990BV6, Italy)

2.2 การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ HepG2

เพาะเลี้ยงเซลล์ HepG2 ที่มีจำนวน 1.5×10^4 เซลล์/หลุม ใน 96-well plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมน้ำสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นทดลองเช่นเดียวกับการศึกษาความเป็นพิษของ H_2O_2 ต่อเซลล์ HepG2

2.3 การศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ของสารสกัดเมื่อให้ร่วมกับ H_2O_2 ในเซลล์ HepG2

เพาะเลี้ยงเซลล์ HepG2 ที่มีจำนวน 1.5×10^4 เซลล์/หลุม ใน 96-well plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมน้ำสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับ H_2O_2 100 μM บ่มนาน 24 ชั่วโมง จากนั้น

ทดลองเช่นเดียวกับการศึกษาความเป็นพิษของ H_2O_2 ต่อเซลล์ HepG2

3. การวิเคราะห์หาปริมาณ reactive oxygen species (ROS) ในเซลล์

เพาะเลี้ยงเซลล์ HepG2 ที่มีจำนวน 5×10^5 เซลล์/หลุม ใน 6-well plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมน้ำสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับ H_2O_2 100 μM บ่มนาน 24 ชั่วโมง หาปริมาณ ROS ภายในเซลล์ ตามวิธี ของ Wu และ Cederbaum (2008)¹⁷ วัด fluorescence intensity ด้วยเครื่อง Perkin-Elmer 650-105 fluorescence spectrometer (Perkin Elmer LS50B, U.S.A.) ที่ความยาวคลื่น 490 nm (excitation) และ 525 nm (emission) และแสดงค่าเป็น Intensity/mg protein

4. การวิเคราะห์หา LDH

(Lactate dehydrogenase)

เพาะเลี้ยงเซลล์ HepG2 ที่มีจำนวน 5×10^5 เซลล์/หลุม ใน 6-well plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมน้ำสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับ H_2O_2 100 μM บ่มนาน 24 ชั่วโมง วิเคราะห์หาระดับ LDH ตามวิธีของ Wu และ Cederbaum (2008)¹⁷ วัด LDH activity (Δ Absorbance per min) ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Shimadzu model UV-160A, Japan) ที่ความยาวคลื่น 340 nm 35°C 1 นาที จากนั้นคำนวณหา Cytotoxicity index ตามสูตรดังนี้

$$\text{Cytotoxicity index} = \frac{\text{LDH medium} \times 100\%}{\text{LDH lysate+medium}}$$

5. การวิเคราะห์หาปฏิกิริยา lipid peroxidation

เพาะเลี้ยงเซลล์ HepG2 ที่มีจำนวน 5×10^5 เซลล์/หลุม ใน 6-well plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมน้ำสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับ H_2O_2 100 μM บ่มนาน 24 ชั่วโมง วัดระดับ malondialdehyde (MDA) ที่เป็นผลผลิตจาก

ปฏิกิริยา lipid peroxidation ตามวิธีของ Wu และ Cederbaum (2008)¹⁷ วัดค่าการดูดกลืนแสงของ thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 535 nm โดยใช้ค่า extinction coefficient เท่ากับ 1.56×10^5 M/cm ในการคำนวณ malondialdehyde equivalents (nmoles/mg protein)

การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติ

ข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย + ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (mean + S.E.M.) และทดสอบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มโดยใช้ ANOVA (One-way Analysis of Variance) และเปรียบเทียบด้วย Scheffe's test เพื่อหาความสำคัญทางสถิติ กำหนดระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

ผลการทดลอง (Results)

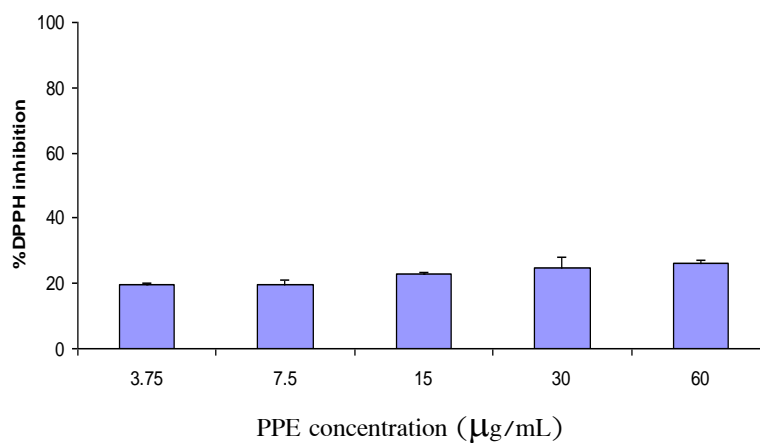
1. สารสกัดว่านพญาพาน

ในการสกัดใบของว่านพญาพานด้วยเอทานอล พบว่าได้ปริมาณของสารสกัด 123.49 g จากใบของว่านพญาพานทั้งหมด 5 kg คิดเป็น % yield เท่ากับ 2.47% มีปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอล เท่ากับ 205.00 ± 12.02 mg gallic acid/g dried extract และมีปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 117.09 ± 0.95 mg catechin/g dried extract

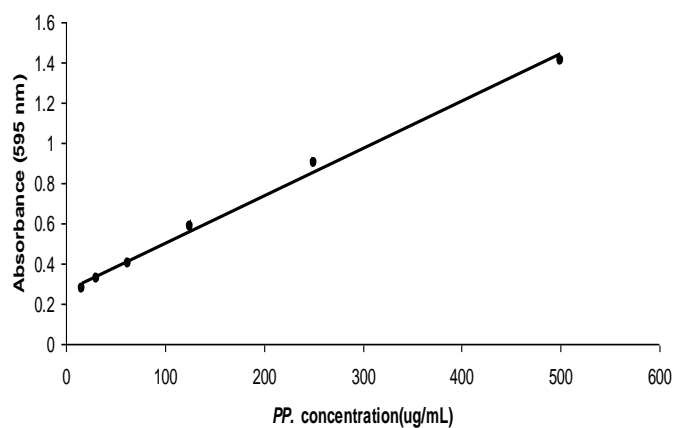
2. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

2.1 DPPH assay

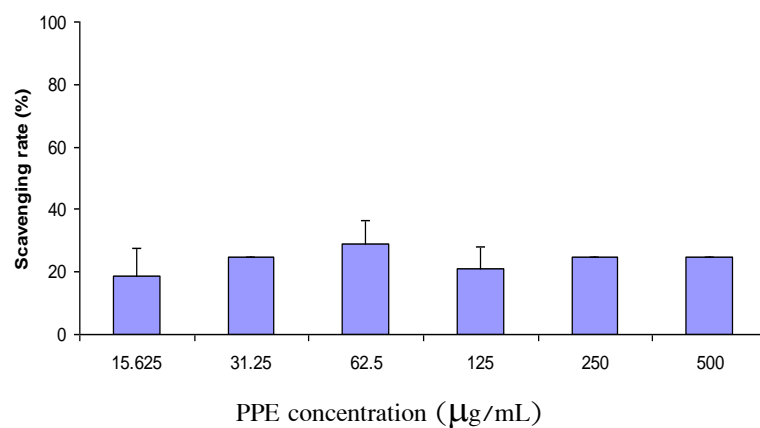
สารสกัดจากใบว่านพญาพานที่ความเข้มข้น $3.75 - 60 \mu g/ml$ สามารถยับยั้ง DPPH radical ได้ 19.58 - 25.94% โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไม่แปรไปตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 ความสามารถในการยับยั้ง DPPH radical ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 3.75–60 μg/mL



รูปที่ 2 ความสามารถในการรีดิวซ์ ferric tripyridyltriazine (Fe(III)-TPTZ) ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 15.625 – 500 μg/mL



รูปที่ 3 ความสามารถในการยับยั้ง H₂O₂ ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 15.625 – 50 μg/ml

2.2 FRAP assay

สารสกัดที่ความเข้มข้น 15.625 – 500 $\mu\text{g/mL}$ มีความสามารถในการรีดิวซ์แปรไปตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 2 เมื่อเปรียบเทียบค่า EC₁ ระหว่างสารสกัดและสารมาตรฐาน ascorbic acid พบว่า สารสกัดจากใบว่านพญาวานมีค่า EC₁ (7.42 mg/mL) มากกว่า ascorbic acid (0.61 mg/mL) 12.16 เท่า

2.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการดักจับ

H_2O_2

สารสกัดจากใบว่านพญาวานที่ความเข้มข้น 31.25 – 500 $\mu\text{g/mL}$ สามารถยับยั้ง H_2O_2 ได้ 20.83 – 29.17% โดยที่ความเข้มข้น 62.5 $\mu\text{g/mL}$ สามารถยับยั้ง H_2O_2 ได้สูงสุดคือ 29.17% ดังแสดงในรูปที่ 3

3. การศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ของสารสกัดใน HepG2 cells ด้วยวิธี MTT assay

3.1 การศึกษาความเป็นพิษของ H_2O_2 ต่อเซลล์ HepG2

เมื่อให้ H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 10 – 1000 μM แก่เซลล์ HepG2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อัตราการมีชีวิต รอดของเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (%control) มีค่าระหว่าง 13.42 – 86.8% โดย %control แปรผกผันกับความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่เพิ่มขึ้น H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 50 – 1000 μM ทำให้เซลล์มีอัตราการมีชีวิตรอดต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4 และที่ความเข้มข้น 100 μM มี %control เท่ากับ 65.1% ซึ่งจะใช้ในการทดลองต่อไป

3.2 การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ HepG2

สารสกัดที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 10, 25 และ 50 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่เตรียมได้ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 โดยมี %control ระหว่าง 97.46 – 102.30 % ดังนั้นจึงเลือกสารสกัดทุกความเข้มข้น (0.5 – 50 $\mu\text{g/mL}$) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.3 การศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ของสารสกัดเมื่อให้ร่วมกับ H_2O_2 ในเซลล์ HepG2

เมื่อให้สารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับ H_2O_2 แก่เซลล์ HepG2 พบว่า %control ของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 25 และ 50 $\mu\text{g/mL}$ มีค่าระหว่าง 58.64 – 70.54 % และแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด ดังแสดงในรูปที่ 5

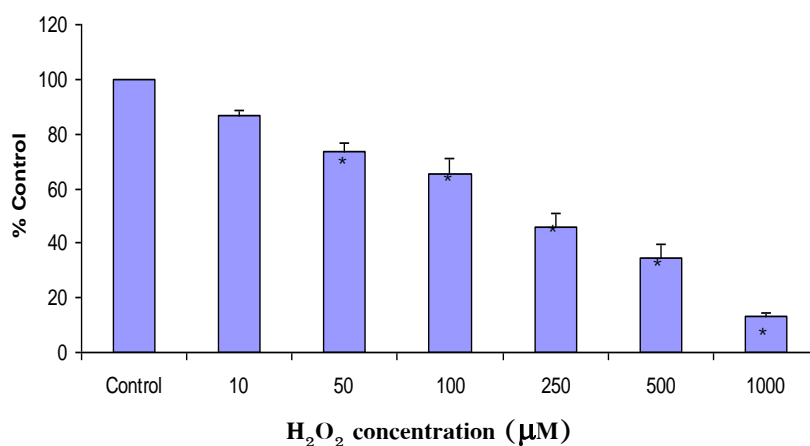
4. การวิเคราะห์หาปริมาณ reactive oxygen species (ROS) ในเซลล์

เมื่อให้สารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับ H_2O_2 แก่เซลล์ HepG2 กลุ่มที่ได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 25 และ 50 $\mu\text{g/mL}$ มีค่า fluorescence intensity/mg protein ระหว่าง 0.60 – 1.10 และมีค่าต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสารสกัดที่ความเข้มข้น 1, 5 และ 10 $\mu\text{g/mL}$ มีระดับ fluorescence intensity/mg protein ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมดังแสดงในรูปที่ 6

5. การวิเคราะห์หา LDH

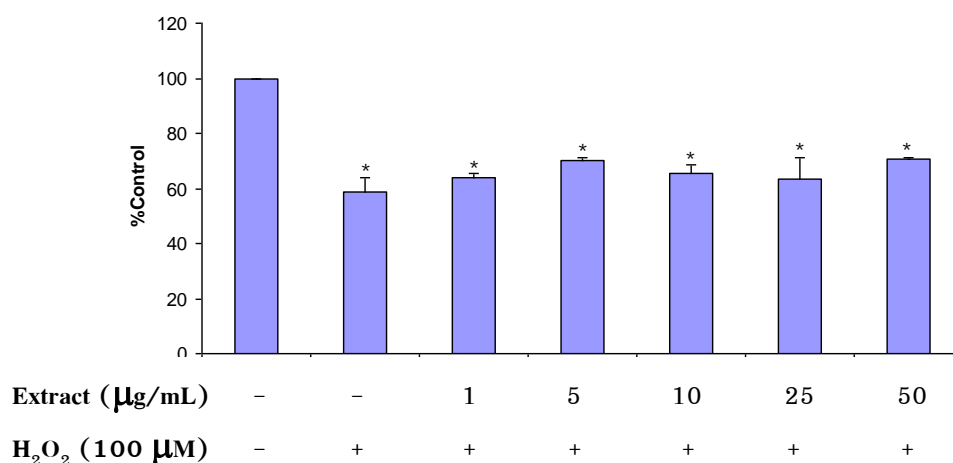
(Lactate dehydrogenase) leakage

จากการวิเคราะห์หาปริมาณ LDH (lactate dehydrogenase) leakage โดยการวัด LDH activity ($\Delta\text{Absorbance per min}$) ใน media และ cell lysate และนำมาคำนวณหาค่า cytotoxicity index พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดที่



รูปที่ 4 ผลของ H₂O₂ ที่ความเข้มข้น 10 – 1000 μM ต่อเซลล์ HepG2 (MTT test) ผลการทดลองแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย+ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean + S.E.M., n = 3)

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

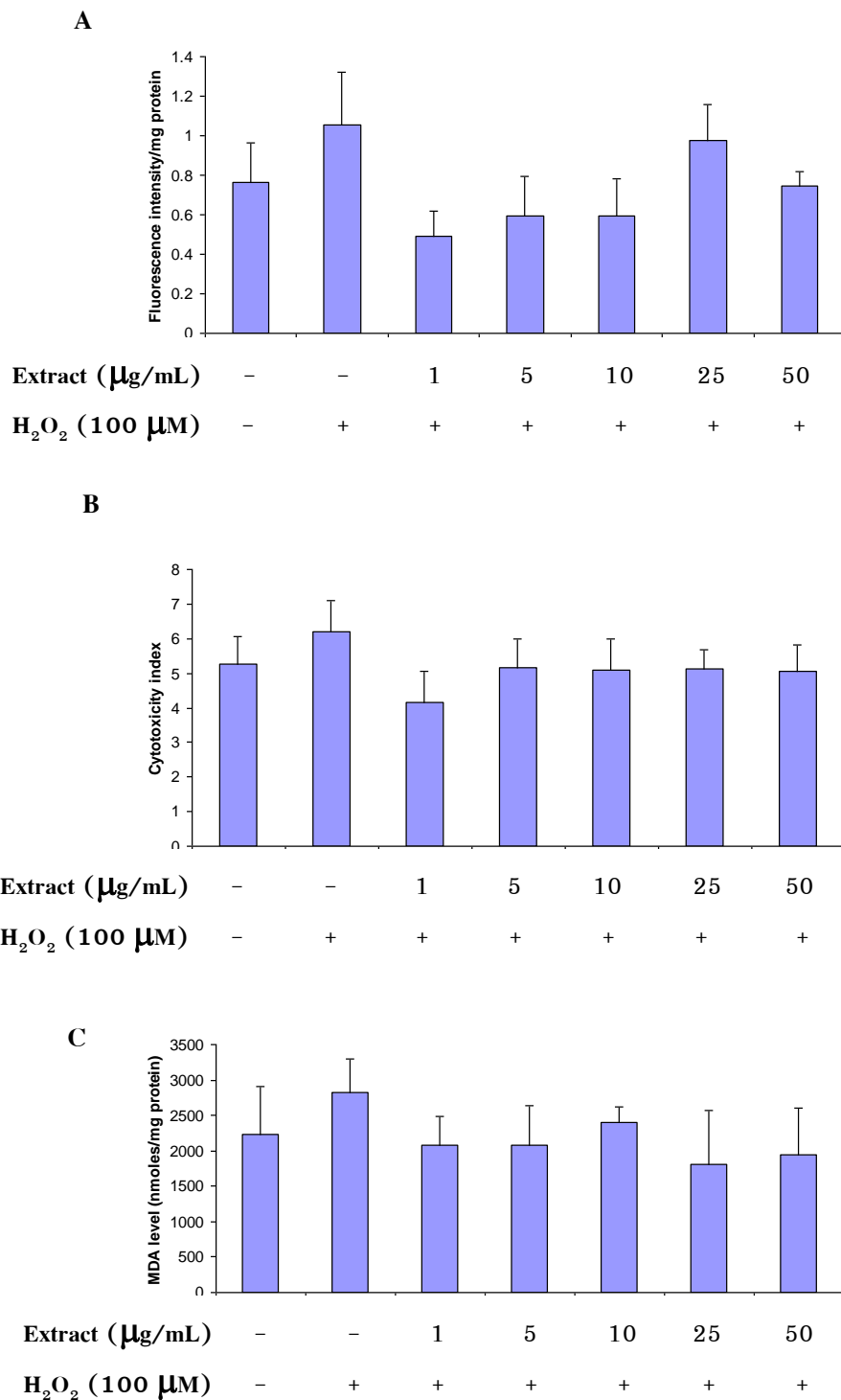


รูปที่ 5 ผลของสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 – 50 μg/mL เมื่อให้ร่วมกับ H₂O₂ ต่อเซลล์ HepG2 (MTT assay) ผลการทดลองแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย + ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean + S.E.M., n = 3) * แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ความเข้มข้น 1, 5, 10, 25 และ 50 μg/mL ร่วมกับ H₂O₂ 100 μM มี cytotoxicity index ระหว่าง 4.17 – 6.20 และมีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 μg/mL มี cytotoxicity index ต่ำที่สุด คือ 4.17 ดังแสดงในรูปที่ 6

6. การวิเคราะห์หาปฏิกิริยา lipid peroxidation

เมื่อให้สารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับ H₂O₂ แก่เซลล์ HepG2 กลุ่มที่ได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 25 และ 50 μg/mL มีปริมาณ malondialdehyde ระหว่าง 292.72–308.53 nmoles/mg protein และมีค่าต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 ผลของสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 – 50 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อให้ร่วมกับ H_2O_2 ต่อเซลล์ HepG2 (A) ระดับ ROS (B) ค่า cytotoxic index จากการวัด LDH leakage (C) ระดับ MDA ผลการทดลองแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย+ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean + S.E.M., n = 3)

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

อภิปรายและสรุปผลงานวิจัย

ภาวะ oxidative stress เป็นผลมาจากปริมาณ reactive oxygen species (ROS) ที่มากเกินไป มีความเกี่ยวข้องกับโรคต่างๆ รวมทั้งโรคตับ² เมื่อเซลล์ตับได้รับสารเคมีหรือสารพิษ จะเกิดการกระตุ้น kupffer cell, ไมโทคอนเดรีย, cytochrome P450 หรือ neutrophil ให้มีการสร้าง reactive oxygen species (ROS) มากขึ้น ส่งผลทำให้เซลล์ตับเกิดความเสียหายจากภาวะ oxidative stress เช่น ทำให้เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation, โปรตีนหรือดีเอ็นเอเสียหาย จนทำให้การทำงานของเซลล์ตับเปลี่ยนแปลงไป¹⁸ ดังนั้นการใช้สมุนไพรเพื่อช่วยลดปริมาณ ROS น่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรคตับ

สมุนไพรส่วนใหญ่ที่ระบุว่าจะสามารถปกป้องตับได้จะมีองค์ประกอบสำคัญเป็นสารประกอบฟีนอล และฟลาโวนอยด์ซึ่งสารดังกล่าวมีฤทธิ์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย ได้แก่ ต้านออกซิเดชัน ต้านไวรัส ต้านแบคทีเรีย ต้านการอักเสบ และต้านมะเร็ง^{19,20} จากผลการวิจัยครั้งนี้พบว่าสารสกัดจากใบว่านพญา วานร มีปริมาณสารประกอบฟีนอลเท่ากับ 205.00 ± 12.02 mg gallic acid/ g dried extract ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 117.09 ± 0.95 mg catechin/ g dried extract สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีของว่านพญาวานร พบว่ามี flavonoids, stigmasterol, β -sitosterol, triterpenoid saponin, kaempferol, apigenin, salicylic acid, phytol, palmitic acid⁵ จากผลการวิเคราะห์ความสามารถในการลดปริมาณอนุมูลอิสระของสารสกัดจากว่านพญาวานรในงานวิจัยครั้งนี้พบว่าสารสกัดสามารถต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ได้ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH และ FRAP assay สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ สมหมาย ปะติตังโช (2010)²¹ ที่

พบว่าสารสกัดใบแห้งของว่านพญาวานรในตัวทำละลาย hexane, dichloromethane, ethyl acetate, methanol และ ethanol มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH และ FRAP assay เช่นกัน ทั้งนี้ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอมและอิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระของสารสกัดฟลาโวนอยด์ที่มีกลุ่ม hydroxyl group ($-\text{OH}$) เป็นองค์ประกอบของ จึงทำหน้าที่ให้อนุมูลไฮโดรเจน (H^\bullet) หรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระได้โดยตรง ทำให้อนุมูลนั้นมีความเสถียรมากขึ้น

Hydrogen peroxide (H_2O_2) เป็นสารเคมีที่นิยมนำมาเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress ในเซลล์เพาะเลี้ยง ถึงแม้ H_2O_2 จัดเป็น ROS ในกลุ่มที่ไม่ใช้อนุมูล (nonradical oxygen derivatives) และไม่ทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์โดยตรง แต่สามารถทำปฏิกิริยากับ superoxide radical ($\text{O}_2^{\bullet-}$) โดยมี Fe^{2+} หรือ Cu^{2+} ช่วยเร่งปฏิกิริยาซึ่งทำให้เกิด hydroxyl radical (OH^\bullet) ซึ่งเป็นสารที่มีความไวสูงสุดในการทำปฏิกิริยากับชีวโมเลกุลอื่น²² เมื่อเซลล์ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress ด้วย H_2O_2 มีผลให้ชีวโมเลกุลเกิดความเสียหาย เช่น เกิดปฏิกิริยา peroxidation ของไขมัน และเกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนหรือดีเอ็นเอ เป็นต้น²³

เมื่อวัดความเป็นพิษของ H_2O_2 ต่อเซลล์ HepG2 โดยใช้วิธี MTT assay เพื่อวัดอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ และการทำงานของไมโทคอนเดรีย พบว่า อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (%control) ลดลงตามความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่เพิ่มขึ้น แสดงว่าในภาวะที่มี ROS ในปริมาณมากทำให้เกิดความเสียหายต่อการทำงานของไมโทคอนเดรีย จากผลการศึกษาเลือกใช้ H_2O_2 ที่ความเข้มข้น $100 \mu\text{M}$ ที่มี % control เท่ากับ 65.1% สำหรับใช้ในการ

เหนี่ยวนำเซลล์ให้เกิดภาวะ oxidative stress และดูผลที่เกิดขึ้นเมื่อให้ร่วมกับสารสกัดจากว่านพญาวัน

สารสกัดที่ความเข้มข้น 0.5 - 50 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่เตรียมได้ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 ดังนั้นจึงเลือกใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 1 - 50 $\mu\text{g/mL}$ จำนวน 5 ความเข้มข้นเพื่อการศึกษาต่อไป

ผลจากการศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ของสารสกัดเมื่อให้ร่วมกับ H_2O_2 ในเซลล์ HepG2 โดยใช้วิธี MTT assay สารสกัดทุกความเข้มข้นที่นำมาศึกษาไม่มีผลต่ออัตราการตายของเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด

จากการตรวจวัด ROS ที่อยู่ในภายในเซลล์พบว่า กลุ่มได้รับ สารสกัด ทุกความเข้มข้น มีระดับ fluorescence intensity ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด แต่ ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ การที่สารสกัดที่มีความเข้มข้น 1, 5 และ 10 $\mu\text{g/mL}$ มีผลทำให้ระดับ ROS ภายในเซลล์ต่ำกว่าสารสกัดที่มีความเข้มข้น สูงนั้นอาจเป็นผลมาจากปัญหา การดูดซึมของสารสกัด โดยสารสกัดที่ความเข้มข้นสูง มีโอกาสที่จะดูดซึมเข้าเซลล์ได้น้อยกว่าสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่ำ นอกจากนี้ยังมีรายงานก่อนหน้านี้ว่าสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่ความเข้มข้นสูงกลับสร้างความเสียหายแก่เซลล์ได้มากกว่าที่ความเข้มข้นต่ำ²⁴

เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณ LDH (Lactate dehydrogenase) โดยแสดงค่าในรูปของ cytotoxicity index พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดทุกความเข้มข้นมีค่า cytotoxicity index ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด และจากการวิเคราะห์หาปฏิกิริยา lipid peroxidation พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดทุกความเข้มข้นมีระดับ lipid peroxidation ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ การที่ผลของ LDH และ lipid peroxidation ของแต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกัน

อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่ยังไม่มากพอที่ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress จนรุนแรงมากพอให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ เนื่องจากระดับ LDH และปฏิกิริยา lipid peroxidation บ่งบอกถึงสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์²⁵ นอกจากนี้ยังมีกลไก ก่อต้านออกซิเดชันโดยอัตโนมัติของเซลล์ตัวเอง (autoregulation) ที่ควบคุมระดับ ROS ที่เกิดขึ้น²⁶ รวมทั้งความแปรปรวนของ NAD^+/NADH หรือ $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ และ lactate/pyruvate (redox state) ของเซลล์ที่ใช้ในการทดลองในแต่ละครั้ง และปริมาณของโลหะทรานสิชันที่มีอยู่ใน media^{27, 28} ตลอดจนอาจเกิดจากตัวสารสกัดเองที่สามารถดูดซึมเข้าเซลล์ได้นั้นไม่มากพอที่จะเห็นผลได้ชัดเจนในการปกป้องเซลล์

ผลการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำจากใบสดของว่านพญาวันด้วยวิธี ABTS และ DPPH พบว่าว่านพญาวันมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเช่นกัน แต่ไม่มีผลในการลดการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation เมื่อวัดระดับ MDA ในซีรัมของหนูทดลอง²⁹

จากผลการทดลองครั้งนี้สรุปได้ว่าสารสกัดจากว่านพญาวันมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้น้อยมาก จึงไม่มีผลในการปกป้องเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress ด้วย H_2O_2 ระดับ ROS ที่ลดลงภายในเซลล์นั้นยังมีกลไก อื่นๆที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ การยับยั้งโลหะทรานสิชัน, lipoxygenase และ phospholipase C หรือการกระตุ้นเอนไซม์ catalase เป็นต้น ในการทดลองครั้งต่อไปควร ปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่เหนี่ยวนำให้สูงขึ้น เพื่อให้เกิดผลของภาวะ oxidative stress ที่ชัดเจน และควรมีการศึกษาในสัตว์ทดลองเพื่อให้มีสภาพใกล้เคียงกับร่างกายมนุษย์และสัตว์เลี้ยงมากที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต และ รศ.ดร.สุรวิภา วัฒนพิทยกุล ที่ให้ความอนุเคราะห์เซลล์ HepG2

References

- Djordjevic VB. Free radicals in cell biology. *Int Rev Cytol* 2004; 237: 57–89.
- Morisco F, Vitaglione P, Amoroso D, et al. Foods and liver health. *Mol Aspects Med* 2008; 29: 144–150.
- Dieu HK, Loc CB, Yamasaki S, et al. The ethnobotanical and botanical study on *Pseuderanthemum palatiferum* as a new medicinal plant in the Mekong Delta of Vietnam. *Jap Agri Res Qua* 2005; 39: 191–6.
- ลำปาง ปาจิโร . สมุนไพรมาแรงหวานร้อยก . วารสารเทคโนโลยีชาวบ้าน 2003; 15: 32.
- Hung NV, Tuan LA, Chien NQ. Study on chemical constituents of *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. *TC khoa hoc va cong nghe* 2004 ; 42: 75-9.
- Oanh LT. Investigation of some biochemical characters of proteolytic activity of *Pseuderanthemum palatiferum*. *J Mater Med* 1999; 4: 13–7.
- Giang PM, Bao HV, Son PT. Study on anti-oxidative activities and preliminary investigation of antibacterial, antifungal of extracted fraction rich of flavonoides from leaves of *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. *TC khoa hoc va cong nghe* 2005; 9: 9-12.
- Dieu HK, Loc CB, Yamasaki S, et al. The effects of *Pseuderanthemum palatiferum*, a new medicinal plant, on growth performances and diarrhea of piglets. *Jap Agri Res Qua* 2006; 40: 85-91.
- Padee P, Nualkaew S, Talubmook C, et al. Hypoglycemic effect of a leaf extract of *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2010; 132: 491-6.
- Khonsung P, Panthong A, Chiranthanut A, et al. Hypotensive effect of the water extract of the leaves of *Pseuderanthemum palatiferum*. *J Nat Med* 2011; 65: 551–8.
- Slinkard K, Singleton VL. Total Phenol Analysis: Automation and comparison with manual methods. *Am J Enol Viticult* 1977; 28: 49-55.
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 1999; 64: 555–9.
- Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 1958; 181: 1199–200.
- Benzie IF, Strains JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239: 70–6.
- Zhao G-R, Xiang Z-J, Ye T-X, Yuan Y-J, Guo Z-X. Antioxidant activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*. *Food Chem* 2006; 99: 767–74.
- Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* 1989; 119: 203–10.
- Wu D, Cederbaum AI. Development and properties of HepG2 cells that constitutively express CYP2E1. *Methods Mol Biol* 2008; 447: 137-50.
- Maried P. Role of free radicals in liver diseases. *Hepato Int* 2009; 3: 526-36.
- Wattenberg LW. Inhibition of carcinogenesis by mimor dietary constituents. *Cancer Res* 1992; 52: 2085-91s.
- Torel J, Cillard J, Cillard P. Antioxidant activity of flavonoid and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry* 1986; 25: 383-5.
- สมหมาย ปะติตังโข. การต้านอนุมูลอิสระและการต้านการเติบโตของแบคทีเรียของสารสกัดพญาวานร. วารสาร มฉก.วิชาการ 2010; 27: 123–36.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals in biology and medicine. Midsomer Norton: Oxford University Press 1999.
- Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems, *FEBS Lett* 1991; 281: 9–19.
- Watjen W, Michels G, Steffan BR, et al. Low concentrations of flavonoids are protective in Rat H4IIE cells whereas high

- concentrations cause DNA damage and apoptosis. *J Nutr* 2004; 135: 525-31.
25. Decker T, Lohmann-Matthes ML. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods* 1988; 115: 61-9.
 26. Alia M, Mateos R, Ramos S, et al. Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense of a human hematoma cell line (HepG2). *Eur J Nutr*; 45: 19-28.
 27. Rueff J, Laires A, Borba H, et al. Genetic toxicology of flavonoids: the role of metabolic conditions in the induction of reverse mutation, SOS functions and sister-chromatid exchanges. *Mutagenesis* 1986; 1: 179-183.
 28. Yoshino M, Murakami K. Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization. *Anal Biochem* 1998; 257: 40-41.
 29. พฤกษชาติ ลิงห์สุวรรณ. การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากใบฮวานจ็อก . ผลงานวิชาการนักศึกษาระดับปริญญาตรี (บทคัดย่อ). คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2009.

RESEARCH ARTICLE

Hypocholesterolemic Effect of Sericin and Its Effect on Liver Protein Expression

Kanittaporn Trisat¹, Manote Sutheerawattananonda², Nanteetip Limpeanchob¹

¹*Department of Pharmacy Practice and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand*

²*Department of Food Technology, Suranaree University of Technology Nakhon Ratchasima 30000, Thailand*

Abstract

A cholesterol lowering effect of sericin was investigated both in vivo and in vitro. Rats were dosed with cholesterol with and without sericin for 17 days. The result shows that total serum cholesterol and non-HDL levels were reduced in rats fed high-cholesterol diet with all three tested doses of sericin (10, 100, and 1000 mg/kg/day). The expression of certain liver proteins isolated from rats supplemented with sericin was determined. This study suggests that hypocholesterolemic effect of sericin may be involved with down-regulation of microsomal triglyceride transfer protein (MTP), the protein involved in VLDL assembly and cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1), the protein removed cholesterol from the body by biosynthetic pathway producing bile acids.

Key Words hypocholesterolemic effect, MTP, CYP7A1, sericin, silk protein

Introduction

Hypercholesterolemia is strongly associated with atherosclerosis and cardiovascular diseases (CVD). Several reports suggested that various types of dietary proteins could decrease serum cholesterol levels (1-3). Most of the previous studies were focused on proteins isolated from regular diets, proteins from non-dietary diet such as silk protein may also have this particular effect. Sericin contributes 25-30% of the total silk cocoon weight. It has high serine content (30-33%). In the past decade, many biological activities of sericin have been reported. Our previous study suggests the cholesterol lowering effect of sericin and this effect is resulted from its inhibition of cholesterol absorption in intestinal cells and its reduction of cholesterol solubility in lipid micelles (4). However, the systemic effect associated with the regulation of hepatic cholesterol formation and clearance is unknown. The aim of the this study is to determine the cholesterol lowering effect of sericin in rats and the expression of certain proteins isolated from rat livers. These proteins include MTP and CYP7A1. These selected proteins play important roles in formation and clearance of cholesterol in the liver. Changes in the expression of these proteins may be explained the systemic effect of sericin as cholesterol lowering agent.

Methods

Animal experiment

Twenty five male Sprague-Dawley rats (200–250 g) were obtained from the National Laboratory Animal Centre, Mahidol University, Thailand. All animal experimental procedures were approved by the Animal Research Ethics Committee, Naresuan University, Thailand. The animals were fed a standard diet with high-cholesterol supplement (cholesterol, bile extract, and coconut oil at 1.5, 0.75 and 0.75 g/kg body weight/day, respectively). The percentage of cholesterol each animal received is approximately 2% of daily diet. The cholesterol mixtures were daily

administered with and without sericin solutions by gastric tube for 17 days. Fasting blood was collected at day 0 (baseline), 4, 8, 11, 14 and 17 from the tail vein to measure serum lipid levels. During the experimental period, body weight and food intake were regularly recorded.

Measurement of serum lipid levels

Serum total cholesterol, HDL and triglyceride levels were measured using commercial enzymatic assay kits (HUMAN GmbH, Germany). The procedures were conducted following the manufacturer protocol. The levels of non-HDL cholesterol were calculated by subtracting HDL levels from total cholesterol levels.

Protein expression analysis (Western blotting)

The expression of MTP and CYP7A1 were determined by western blotting. Livers were isolated from rats and microsomal fraction was prepared and measured protein concentration. Forty micrograms of microsomal protein were separated on SDS-polyacrylamide gel. Proteins were then transferred onto PVDF membrane. The membrane was blocked with PBS containing 5% skim milk at room temperature. Then, the membrane was incubated with specific antibodies against MTP and CYP7A1 overnight at 4°C and detected protein by horseradish peroxidase-labeled IgG antibody in PBS containing 2.5% skim milk at room temperature. The activity was assessed by using chemiluminescent substrate.

Results

Effect of sericin on serum lipids in high cholesterol-fed rats

Over the 17 day sampling period, there was a progressive increase in serum cholesterol in the high-cholesterol group (Figure 1). Clear differences between high-cholesterol and sericin treatment groups emerged by day 8 (Figure 1).

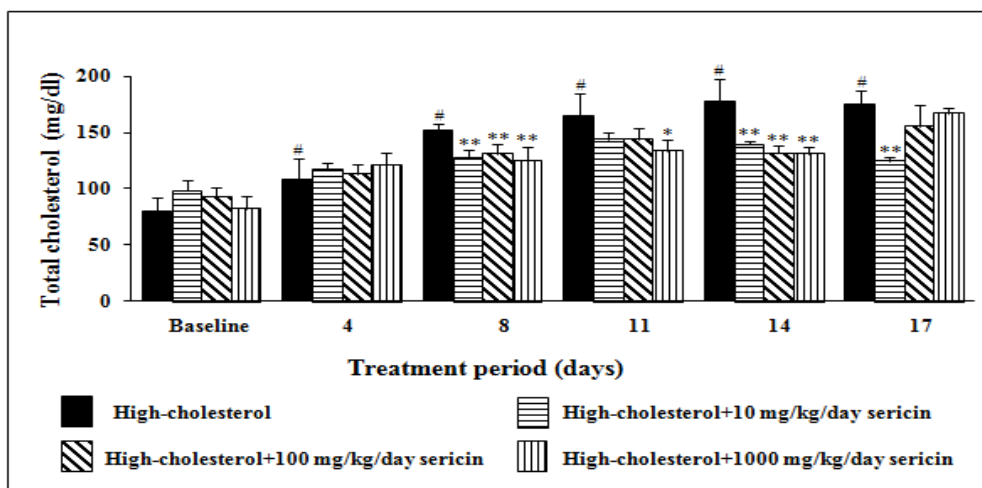


Figure 1 Serum total cholesterol in rats fed high-cholesterol diet. Rats were fed cholesterol (2%cholesterol of total daily diet) with and without sericin at 10, 100, and 1000 mg/kg/day for 17 days. The data represent mean \pm SD (#, $p \leq 0.05$ compared to baseline; *, $p \leq 0.05$, and **, $p \leq 0.01$, compared to high-cholesterol group, $n = 5$).

By day 14, the high-cholesterol group showed substantial serum cholesterol increases while sericin treatments at all studied doses inhibited partially but significantly such cholesterol enhancement. At the end of the experiment (day 17), significant reduction of serum total cholesterol was observed only in of sericin at 10 mg/Kg/day only. Table 1 shows lipid profile expressed as the differences for values at day 17 compared to day 0. Sericin at low dose (10 and 100 mg/kg/day) significantly inhibited the increase in total and non-HDL cholesterol levels. Unexpectedly, sericin at 1000 mg/kg/day showed no significant reduction. For HDL cholesterol, there was no consistent trend over the 17 days in any of the groups and no difference between the sericin and high-cholesterol rats. Serum TG levels were noticeable decreased due to 10 mg/kg/day sericin treatment. None of the cholesterol effects could be related to food intake since this remained constant during the 17 days.

Taken together, sericin supplement effectively decreased the enhancement of serum levels of total cholesterol and non-HDL cholesterol in rats fed high-cholesterol diet.

Effect of sericin on the expression of MTP and CYP7A1 in rat livers

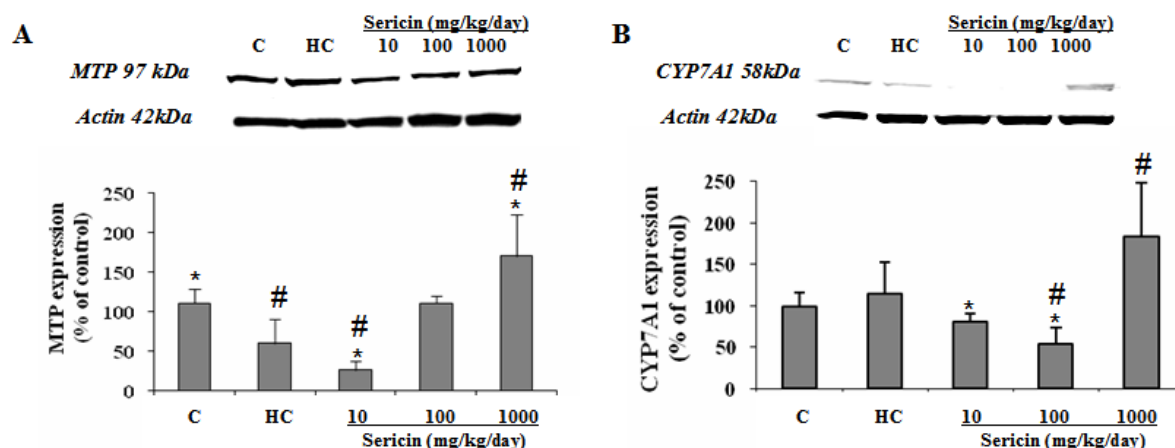
Maintenance on a 2% cholesterol diet for 2 wk significantly decreased the expression of hepatic MTP while it showed no affect on the expression of hepatic CYP7A1. Supplementation of sericin significantly lowered the expression of hepatic MTP and CYP7A1. Unexpectedly this effect was not observed with high concentrations of sericin. The expression of hepatic MTP was significantly lowest in 10 mg/kg/day sericin treated group while the expression of hepatic CYP7A1 was significantly lowest in 100 mg/kg/day sericin treated group.

Table 1 Changes of plasma lipid levels and amount of food intake after 17 days of treatment

Groups	Changes from day 0 (mg/dl)				Food intake (g/day/100g BW)
	Total cholesterol	HDL-C	Non-HDL-C	Triglyceride	
High cholesterol	94.74±24.00	-6.36±6.48	101.10±30.28	46.54±45.45	7.02±1.59
High cholesterol+ Sericin 10 mg/kg/day	26.45±9.07**	-11.77±4.88	38.22±4.58**	-0.94±16.44	6.94±0.36
High cholesterol+ Sericin 100 mg/kg/day	62.57±13.57*	-2.34±7.01	64.91±10.69*	73.27±42.20	8.65±1.46
High cholesterol+ Sericin 1000 mg/kg/day	85.54±13.15	-12.01±5.84	97.55±9.50	97.87±16.61	8.29±0.35

Values are expressed as mean ± SD (n = 5)

Significantly different from high cholesterol group (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$)

**Figure 2** Expression of MTP (A) and CYP7A1 (B) in rat liver. Rats were fed cholesterol (2% cholesterol of total daily diet) with and without sericin at 10, 100, and 1000 mg/kg/day for 17 days. The data represent mean ± SD; #, $p \leq 0.05$ compared to control group; *, $p \leq 0.05$ compared to high-cholesterol group; n = 5). C, control group; HC, high-cholesterol group.

Discussions and Conclusion

Our data provide evidence that sericin suppresses serum total cholesterol and non-HDL cholesterol levels in animals fed supplemental cholesterol; about half of the augmentation accounted for by cholesterol feeding was reversed by sericin. Our previous study suggests the intestinal effects of sericin by inhibition of cholesterol absorption and by reduction of

cholesterol solubility in lipid micelles expected to occur in the intestinal tract (4). Since sericin is protease resistant, undigested sericin is expected to play a major role on its cholesterol lowering effect. However, the systemic effect of sericin could not be resulted out. There is a strong positive correlation between serum cholesterol concentration and dietary methionine concentration or methionine: glycine ratio (5).

Our sericin contains 0.04% w/w methionine and 13.5% w/w glycine which makes its ratio to about 0.003 which is far lower than several of dietary proteins. Therefore, small amount of absorbed sericin may exhibit systemic effect. The present study suggests the hepatic effect of sericin by down-regulation of MTP and CYP7A1 expression although this effect was observed only with low concentration of sericin. However, this might be indirect effect or the consequence of cholesterol lowering activity through the intestinal effects of sericin. Nevertheless, there are many liver proteins regulating cholesterol formation and clearance that are interesting to be further investigated.

References

1. Nagaoka S, Futamura Y, Miwa K, Awano T, Yamauchi K, Kanamaru Y, et al. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk beta-lactoglobulin. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;281(1):11-7.
2. Zhang X, Beynen AC. Influence of dietary fish proteins on plasma and liver cholesterol concentrations in rats. *Br J Nutr* 1993;69(3):767-77.
3. Zhong F, Liu J, Ma J, Shoemaker CF. Preparation of hypocholesterol peptides from soy protein and their hypocholesterolemic effect in mice. *Food Res Int* 2007;40(6):661-7.
4. Limpeanchob N, Trisat K, Duangjai A, Tiyafoonchai W, Pongcharoen S, Sutheerawattananonda M. Sericin Reduces serum cholesterol in rats and cholesterol uptake into Caco-2 Cells. *J Agric Food Chem* 2010;58(23):12519-22.
5. Morita T, Oh-hashi A, Takei K, Ikai M, Kasaoka S, Kiriya S. Cholesterol-lowering effects of soybean, potato and rice proteins depend on their low methionine contents in rats fed a cholesterol-free purified diet. *J Nutr* 1997;127(3):470-7.
6. Metzger BT., Barnes DM , Reed JD. Insoluble fraction of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) protein possessing cholesterol-binding properties that reduce micelle cholesterol solubility and uptake by Caco-2 cells. *J Agric Food Chem* 2007;55(15):6032-8.

Acknowledgements

This study was financially supported by Thailand Research Fund and the graduate program by the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC).

RESEARCH ARTICLE

Effect of Iron on LPS Induced Free Radical Production in Microglia cells

Samaphorn Maneethep¹, Ronald E. Morales Vargas², Yupin Sanvarinda¹, Noppawan Phumala Morales¹

¹Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Thailand

²Department of Medical Entomology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Thailand

Abstract

Abnormal iron accumulation in central nervous system (CNS) has been accepted to play roles in several neurodegenerative diseases. Iron may catalyze free radical reactions in CNS, however, the mechanism has not been clearly defined. Microglia activation may be a source of free radical production. Therefore, we investigated the intracellular reactive oxygen species (ROS) production in microglia (High Aggressive Proliferating Immortalized (HAPI)) cells after lipopolysaccharide (LPS) stimulation. The cells were cultured in normal medium (free phenol-red Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplement with 2.5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS)) or iron overloaded condition (normal medium loaded with 10 μ M Fe₂SO₄) for 3 days before experiment. Intracellular ROS production was monitored by an oxidant-sensing fluorescence probe, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) and cell viability was determined by MTT assay. The results demonstrated that LPS activated intracellular ROS production and decreased cell viability in concentration dependent manner. Significant enhanced production of ROS, in corresponding with decreased cell viability, was detected in microglia cells cultured under iron overloaded condition. In conclusion, the microglia cells were more susceptible to LPS activation in iron overloaded condition that may implicate in pathogenesis of neurodegenerative diseases. Furthermore, the cellular and molecular mechanisms need to be clarified.

Key Words iron overload, microglia, reactive oxygen species

ผลของเหล็กต่อการสร้างอนุมูลอิสระของไมโครเกลียเซลล์ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปพอลิแซคคาไรด์

สมาพร มณีเทพ¹, โรนัลด์ อี มอราเลส วาร์กัส², ยุพิน สังวรินทะ¹, นพวรรณ ภู่มาลา มอราเลส¹

¹ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

²ภาควิชาเภสัชวิทยาการแพทย์ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

บทคัดย่อ

ความผิดปกติของการสะสมเหล็กในระบบประสาทส่วนกลาง (CNS) ได้รับการยอมรับว่าเป็นส่วนสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคที่เกิดจากการเสื่อมของสมอง (neurodegenerative diseases) เพราะเหล็กเป็นตัวกระตุ้นปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระในระบบประสาทส่วนกลาง อย่างไรก็ตามกลไกของปฏิกิริยานี้ยังไม่ชัดเจนนัก การกระตุ้นเซลล์ไมโครเกลีย (microglia) อาจเป็นแหล่งกำเนิดของอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในสมอง ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์อนุมูลอิสระที่เกิดภายในเซลล์ของไมโครเกลียโดยใช้ High Aggressive Proliferating Immortalized (HAPI) เซลล์และกระตุ้นด้วยไลโปพอลิแซคคาไรด์ (LPS) เซลล์จะถูกเพาะเลี้ยงในอาหารคือ free phenol-red Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ที่เพิ่ม fetal bovine serum (FBS) 2.5 เปอร์เซ็นต์ หรือในอาหารที่เติมเหล็กในรูปของเฟอร์รัสซัลเฟต (Fe_2SO_4) ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 3 วันก่อนที่ จะทำการทดลอง อนุมูลอิสระภายในเซลล์ตรวจวัดโดยใช้ fluorescent probe ได้แก่ 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) และตรวจวัดความสามารถของเซลล์ในการมีชีวิตอยู่และเจริญเติบโตต่อไปได้ (cell viability) โดยใช้วิธี MTT จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไลโปพอลิแซคคาไรด์สามารถกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระและยังลดความสามารถของเซลล์ในการมีชีวิตอยู่และเจริญเติบโตต่อไปได้โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไลโปพอลิแซคคาไรด์ที่ใช้ นอกจากนี้ในการเพาะเลี้ยงที่มีสภาวะเหล็กเกินพบว่าเซลล์จะสร้างอนุมูลอิสระได้สูงและมีความสามารถในการมีชีวิตอยู่และเจริญเติบโตต่อไปได้ต่ำกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ โดยสรุปไมโครเกลียเซลล์มีความไวในการตอบสนองต่อการถูกกระตุ้นด้วยไลโปพอลิแซคคาไรด์ภายใต้สภาวะเหล็กเกิน กระบวนการนี้อาจมีความเกี่ยวข้องกับการก่อให้เกิดโรคที่เกิดจากการเสื่อมของสมอง กลไกของปฏิกิริยานี้ในระดับของเซลล์และโมเลกุลยังต้องมีการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมต่อไป

คำสำคัญ: สภาวะเหล็กเกิน, ไมโครเกลีย, อนุมูลอิสระ

Introduction

Iron is essential for life because it is a key element for electron transport that requires for functioning of proteins involved in oxidative energy production, oxygen transport and mitochondrial respiration (Hershko et al. 2005). When excess, iron catalyzes reactive oxygen species (ROS) via Fenton reaction by catalyzing the conversion of superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) (Peng et al. 2009). Neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), Huntington's disease, Hallerorden-Spatz syndrome (HSS), amyotrophic lateral sclerosis (ALS), multiple sclerosis and aceruloplasminemia have been linked with abnormally high levels of iron in the brain (Whitnall and Richardson 2006). However, the mechanism related to enhanced free radical production has not been demonstrated.

Microglia represent the innate immune system in the brain and thus are the first line of defense against invading pathogens and serve as specialized sensors for brain tissue injury. After a pathological stimulus, microglia cells produced nitric oxide, ROS and others factors that involved in neurodegenerative condition (Heneka et al. 2010). To date, the relationship between abnormal iron accumulation and microglia functions has not been elucidated. We postulate that iron accumulation in CNS may modify the response of microglia to the stimulus, and hence enhance the production of ROS.

Several molecules have been speculated as the inducer of microglia activation from in vivo and in vitro systems. Among such molecules, lipopolysaccharide (LPS) has been widely used for study due to its reproducible action and easy handling (Nakajima et al. 2003). Therefore, we investigated the intracellular ROS production in microglia cells under iron overloaded culture condition by using LPS as a stimulus. The generation of intracellular ROS was detected by fluorescence techniques using oxidant-sensing fluorescence probe-

2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA). DCFH-DA converts into the polar derivative DCFH that is nonfluorescence but switches to highly fluorescence DCF when it is oxidized by intracellular ROS. Our results may partly explain the mechanism underlying pathogenesis of neurodegenerative diseases (Rastogi et al. 2010).

Materials and Methods

Cell culture

High Aggressive Proliferating Immortalized (HAPI) cells were cultured on a 96 well plate at a density 1×10^4 cells/well in free phenol-red Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplement with 2.5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS).

Iron overloading and LPS activation

For iron overload condition, HAPI cells were cultured in the medium loading with $10 \mu M$ of Fe_2SO_4 for 3 days. For normal condition, HAPI cells were cultured in normal medium for 3 days. After incubation period, fresh medium was replaced and the cells were incubated with 0, 10, 100, 1000 ng/ml of LPS for 17 h before ROS detection.

Fluorescence and MTT assay

After incubation with LPS for 17 h, LPS containing medium was removed and replaced with DCFH-DA in free phenol-red DMEM without FBS. After 30 min, the cells were washed with PBS and maintained in free phenol-red DMEM without FBS and then analyzed immediately by using microplate reader (Bio-Tek Instruments, USA). Following the ROS detection, MTT assay was performed for measurement of cell viability (Mosmann 1983). Intracellular ROS production was demonstrated as ratio of fluorescence to cell viability (Trayner et al. 1995).

Statistical analysis

Data analysis and statistics were performed at 0.05 significance level using GraphPad Prism 5.0 software (San Diego, USA). The statistical significance of differences between experimental groups was calculated by one-way analysis of variance test.

Results

The viability of microglia cells cultured under normal and iron overloaded condition with various concentrations of LPS is shown in Figure 1a. Without LPS stimulation, there was no significantly different in cell viability in normal and iron overloaded condition. However, iron overload enhanced cell death in the present

of LPS. The cell viability was 64% in iron overload comparing with 87% in normal condition when LPS was 10 ng/ml. The effect of iron was stronger and significantly different in cell viability in normal and iron overloaded condition in LPS concentrations 100 and 1000 ng/ml.

The ratio of the DCF fluorescence to the MTT absorbance was taken as the extent of intracellular ROS generation normalized to the absorbance of cell viability. The results were represented as fold of control (Figure 1b). Consistency with cell viability, activated microglia cells produced significantly higher intracellular ROS in iron overloaded condition. Moreover, the effect was clearly demonstrated in higher LPS concentration.

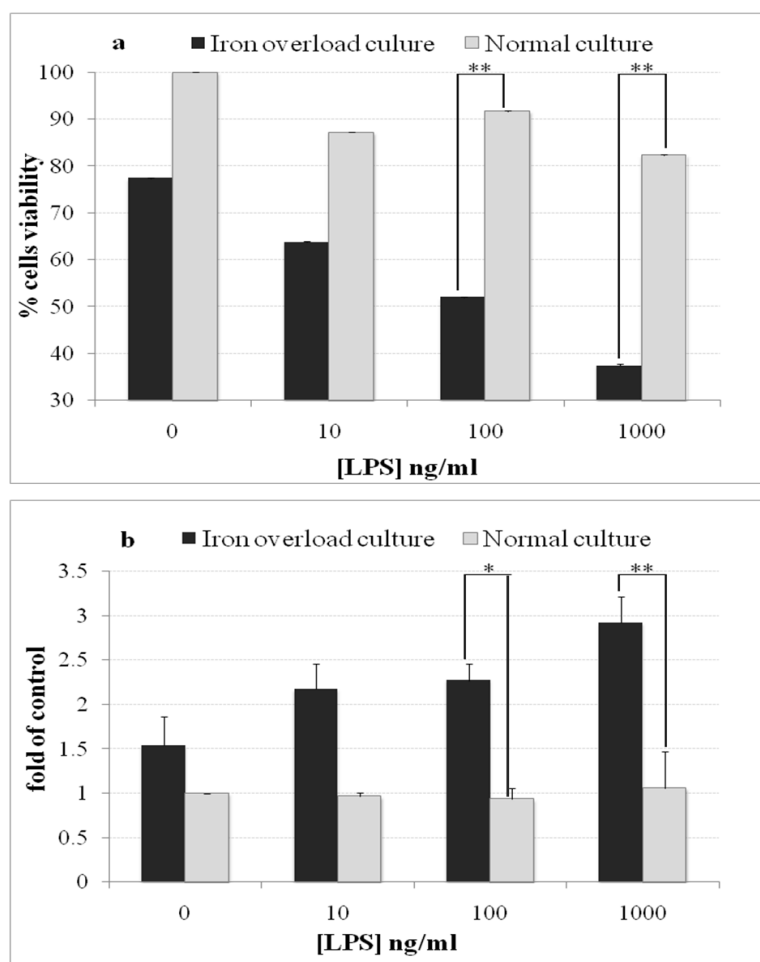


Figure 1

Cell viability (MTT assay, (a)) and ROS production (b) of microglia cells after incubation with LPS concentration 10-100 ng/ml for 17 hr. Microglia cells were cultured under iron overloaded (■) and normal condition (□) for 3 days before experiment. The values were expressed as means \pm SEM of 4 individual experiments. * P value < 0.05 ; ** P value < 0.01

Discussion

LPS activates microglia from a resting state to an activated state that release several compounds such as proinflammatory cytokines, ROS and nitric oxide and eventually lead to neuronal death. ROS can act as signal for the activation of microglia, indicating that neurons are not healthy and easy to injured (Machado et al. 2011). According to our results, iron overloaded microglia showed higher susceptibility to LPS activation. We hypothesized that iron accumulation in CNS may modify the response of microglia to the stimulus and thus, enhance the production of ROS. The molecular mechanism related to iron overload need to be investigated.

Conclusion

Our results clearly showed that microglia cells culture under iron overloaded condition were susceptible to LPS stimulation. Increased intracellular ROS production may accelerate oxidative damage of microglia and result in abnormal microglia functions. In this study, roles of iron on cellular and molecular response of microglia cells have not been investigated.

Acknowledgements

This project was supported by the Office of the Higher Education Commission and Mahidol University under the National Research Universities Initiative.

References

- Heneka MT, Rodríguez JJ, Verkhratsky A. Neuroglia in neurodegeneration. *Brain research review*. 2010;63 (1-2):189–211.
- Hershko C, Link G, Konijn AM, Cabantchik ZI. Objectives and Mechanism of Iron Chelation Therapy. *N.Y. Acad. Sci.* 2005;1054:124–135.
- Machado A, Herrera A. J, Venero J. L, Santiago M, Pablos de R. M, Villarán R. F, et al. Inflammatory Animal Model for Parkinson's Disease: The Intranigral Injection of LPS Induced the Inflammatory Process along with the Selective Degeneration of Nigrostriatal Dopaminergic Neurons. *ISRN Neurol*; 2011, 16p.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
- Nakajima K, Kohsaka S, Tohyama Y, Kurihara T. Activation of microglia with lipopolysaccharide leads to the prolonged decrease of conventional protein kinase C activity. *Molecular Brain Research*. 2003;110(1): 92–9
- Peng G, Stevenson FF, Oo ML, Andersen JK. Iron-enhanced paraquat-mediated dopaminergic cell death due to increased oxidative stress as a consequence of microglial activation. *Free Radical Biology & Medicine*. 2009;46(2):312-320.
- Trayner I.D, Rayner A.P, Freeman G.E, Farzaneh F. Quantitative multiwell myeloid differentiation assay using dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) or dihydrorhodamine 123 (H₂R123). *J.Immunol Methods*. 1995;186(2):275-285.
- Whitnall M, Richardson DR. Iron: A New Target for Pharmacological Intervention in Neurodegenerative Diseases. *Semin Pediatr Neurol* . 2006;13(3):186-197.
- Rastogi RP, Singh SP, Hader DP, Sinha RP. Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidant-sensing probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010;397(3) :603–607.

RESEARCH ARTICLE

Effect of Water Extract from *Piper nigrum* on Macrophage J774A.1 Cells

Nakuntwalai Wisidsri¹, Naowarat Suthamanartpong², Usa Suwannasual³, Wacharee Limpanasithikul⁴

¹Interdepartmental Program of Pharmacology, Graduate School, Chulalongkorn University, Thailand

²Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Thailand

³Department of Medical Science, Faculty of Science, Rangsit University, Thailand

⁴Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Thailand

Abstract

This study aimed to investigate the effect of water extract from *Piper nigrum* seeds on phagocytic activity of macrophages. Phagocytosis of mouse macrophages J774A.1 cells was determined by zymosan-NBT reduction assay. The water extract of *P. nigrum* promoted phagocytic activity of J774A.1 cells in a concentration dependent fashion at the concentrations of 1.56-50 µg/ml. Effect of the water extract of *P. nigrum* on nitric oxide (NO) which is one of the free radicals involve in oxygen dependent mechanism for killing pathogen during phagocytosis was also evaluated by using Griess reagent. The extract augmented NO production in J774A.1 cells, in a concentration dependent fashion. It also up regulated the mRNA expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), which is the enzyme responsible for NO generation in activated macrophages. The results from this study suggest that the water extract of *Piper nigrum* seeds is able to boost phagocytic activity of macrophages.

Key Words *Piper nigrum*, immunomodulation, macrophage, phagocytosis

ฤทธิ์ของสารสกัดน้ำจากพริกไทยดำต่อเซลล์แมคโครฟาจ

ณกันต์วัลย์ วิศิษฐ์ศรี¹, เนาวรัตน์ สุธัมมธารพงษ์², อรุษา สุวรรณสรจ³, วชิรี ลิ้มปณิธิกุล⁴

¹สหสาขาเภสัชวิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

²ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

³ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี 12000

⁴ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาฤทธิ์ของสารสกัดน้ำของเม็ดพริกไทยดำต่อการทำงานของเซลล์แมคโครฟาจ ได้แก่ กระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) ซึ่งทดสอบโดยวิธี zymosan-NBT reduction ผลการทดลองพบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1.56-50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีฤทธิ์กระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจให้เกิดกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมเพิ่มขึ้นแปรผันตามขนาดของสารสกัด และทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระชนิดหนึ่งที่ถูกสร้างขึ้นระหว่างกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมโดยอาศัยออกซิเจน ใช้ทำลายสิ่งแปลกปลอมที่ถูกเก็บกินเข้าไปในฟาโกโซม (phagosome) โดยใช้ Griess reagent พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์เพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ แปรผันตามขนาดของสารสกัดเช่นเดียวกัน นอกจากนั้นสารสกัดยังมีฤทธิ์กระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตไนตริกออกไซด์ให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอีกด้วย ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้ำของเม็ดพริกไทยดำ สามารถกระตุ้นกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์แมคโครฟาจได้

คำสำคัญ: *Piper nigrum*, immunomodulation, macrophage, phagocytosis

Introduction

Macrophages are important cells in the immune system which play several essential roles both in innate and adaptive immune response against pathogens, cancer cells and foreign particles. They are major tissue phagocytes which have phagocytic ability to engulf and destroy foreign particles or pathogens. Macrophages can recognize pathogens by varieties of pattern recognition receptors (PRRs) on their cell surface and engulf the pathogens into phagosome vesicles. These phagosomes can fuse with lysosomes become to phagolysosomes which are vesicles for destroying the engulfed pathogens by oxygen-dependent and oxygen-independent mechanisms.

Toxic free radicals such as reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) play key roles in the oxygen-dependent killing mechanism. Macrophages also function as antigen presenting cells (APCs) to activate T helper cells. They are ones of effector cells for eliminating pathogens by humoral as well as cell-mediated immune responses generated by both B and T lymphocyte activation (Flannagan et al. 2009, Murray and Wynn 2011). Activation of macrophage functions can be benefit for protection against infection and cancer.

Piper nigrum (*P. nigrum*) is one of the most widely used not only as spice dietaries but also as medicinal herb. Several phytochemicals of this plant are identified and studied such as lignans, neolignans, terpenes, alkaloids and amides (Ahmad N et al. 2011). Various pharmacological activities as well as immunomodulatory effects of the plant have been reported. There are controversial evidences about the effect of *P. nigrum* extract and many constituents of the plant on macrophage functions. Both anti-inflammatory and immunostimulatory activities have been suggested. This study intended to investigate immunomodulatory effects of water extract of *P. nigrum* fruits on macrophage J774A.1 cells.

Materials and Methods

Plant extract

Grounded *Piper nigrum* seeds were heated in 60°C distilled water for 2 h. The solution was filtered through a 5 µ filter paper and lyophilized. The lyophilized powder was stored in closed container at -20°C until used. The powder was dissolved in deionized water as the stock solution. This stock solution was diluted to various concentrations in incomplete DMEM for treating cells.

Cells

The murine macrophage J774A.1 cells were obtained from American Type Culture Collection (ATCC). The cells were maintained in DMEM containing 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin and incubated at 37°C in 5% CO₂ / 95% air.

Determination of NO production

J774A.1 cells, at 4×10^5 cell/ml, were treated with 1.56-100 µg/ml of the water extract of *P. nigrum* at 37°C for 24 h. The amount of NO in the supernatant generated by the treated cells was determined by using Griess reagent assay (Amano and Noda 1995) for nitrite determination. NO content as nitrite concentration was calculated from a standard curve prepared from standard sodium nitrite solutions. Incomplete DMEM and 100 ng/ml of lipopolysaccharide (LPS) were used as the negative and the positive controls, respectively.

Determination of macrophage phagocytosis

The phagocytic activity was determined by using zymosan-nitroblue tetrazolium (NBT) reduction assay (Manosroi et al. 2003). J774A.1 cells, at 4×10^5 cell/ml, were treated with 1.56-100 µg/ml of the water extract of *P. nigrum* at 37°C for 24 h. The treated cells were washed twice with DMEM and then treated with 600 µg/ml and 800 µg/ml zymosan at

37°C for 1 h. The cells were washed with methanol for three times and lysed by 2M KOH solution and DMSO solution. The amount of formazan product from NBT reduction in phagolysosome was measured at 570 nm. The effect of the water extract on phagocytic activity of J774A.1 was compared to the solvent control as the percentage of phagocytic stimulation.

Determination of iNOS mRNA expression

J774A.1 cells, at 4×10^5 cell/ml, were treated with 12.5-50 µg/ml of the water extract of *P. nigrum* at 37°C for 24 h. Total RNA was isolated from the treated cells and then reversed to cDNA. The cDNA was used as the template to amplified mRNA of iNOS with suitable primers. The PCR products were run on 1.5% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide solution, and determined their densities by gel documentation.

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm standard error of means (S.E.M) from at least three independent experiments. Statistical significance of difference of the data was analyzed by One-way ANOVA with Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) post hoc test. $p < 0.05$ was regarded as statistically significant.

Results

Effect of *Piper nigrum* water extract on macrophage phagocytosis

The amount of the formazan product from NBT reduction was used as the indicator of phagocytotic activity of macrophages. The water extract of *P. nigrum* significantly promoted zymosan phagocytosis of J774A.1 cells, in a concentration dependent manner. However its stimulatory effect was decreased at 100 µg/ml (Figure1).

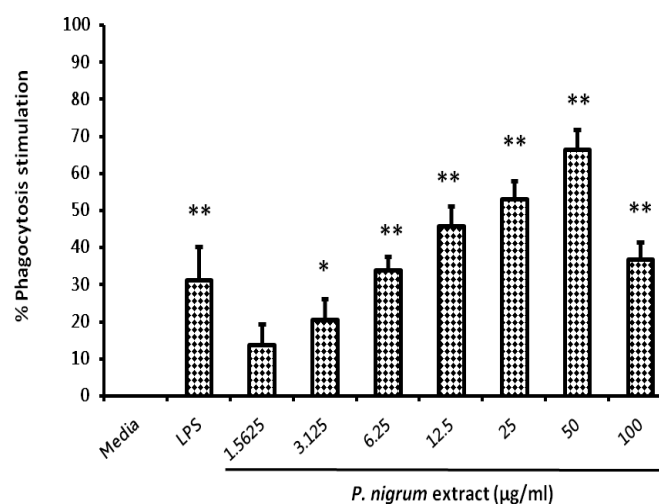


Figure 1

Effect of *P. nigrum* water extract on phagocytic activity in macrophage J774A.1 cells. Cells were treated with 1.56-100 µg/ml of *P. nigrum* water extract or LPS 100 ng/ml for 24 h. The phagocytic activity of the treated cells was evaluated by zymosan-NBT reduction assay. The percentage of phagocytosis stimulation of *P. nigrum* water extract was compared to the solvent control. Data are expressed as mean \pm S.E.M from 4 independent experiments (n=4). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to untreated control.

Effect of *Piper nigrum* water extract on NO production

NO plays role in phagocytosis by killing microorganism in phagolysosome in oxygen-dependent pathway. The extract at 3.125-100 µg/ml significantly enhanced NO production in macrophage J744.1A cells, in a concentration dependent manner (Figure 2).

Effect of *Piper nigrum* water extract on iNOS mRNA expression

The effect of the water extract of *P. nigrum* on iNOS enzyme which catalyzes NO production in activated macrophages was also evaluated. The water extract of *P. nigrum*, at all concentration used in this study (12.5-50 µg/ml), significantly induced the mRNA expression of iNOS (Figure 3).

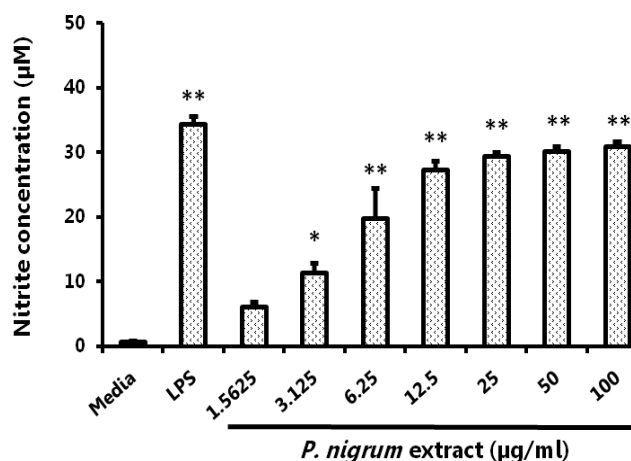


Figure 2 Effect of *P. nigrum* water extract on NO production. J774A.1. Cells were treated with 1.56-100 µg/ml of *P. nigrum* water extract or LPS 100 ng/ml for 24 h. The amount of NO in the supernatant was determined using Griess reagent for nitrite determination. The concentration of nitrite in each condition was calculated from sodium nitrite standard curve. Data are expressed as mean \pm S.E.M from 3 independent experiments (n=3). * p <0.05, ** p <0.01 compared to untreated control.

Discussion

Both innate and adaptive immune responses can be initiated by macrophage activation. After recognizing pathogens by pattern recognition receptors, macrophages become activated cells with high phagocytic activity and high ability to generate several cytokines and other immune mediators. Phagocytosis by activated macrophages can initiate the innate immune response. Parts of the ingested pathogens become antigenic peptides which are presented to T lymphocytes by MHC class II molecules on macrophages. Activated macrophages are also main effector cells for eliminating pathogens in Th1-mediated immunity as well as antibody mediated

immune response (Fujiwara and Kobayashi 2005, Medzhitov 2007). The present study showed that the water extract of *P. nigrum* fruits showed *in vitro* stimulatory effect on phagocytic activity of mouse macrophages J774A.1 cells. It also activated the generation of NO which play role in destroying pathogen in phagosome by oxygen-dependent pathway. The expression of iNOS which catalyzes NO production in activated macrophages was also up regulated by the extract. The results in this study contradict to some previous reports which suggested that *P. nigrum* fruits extract inhibited macrophage activation (Bae et al 2010). It is possible that the water extract in this study which prepared by heating at 60°C may contain different active constituents from the extracts in those previous reports.

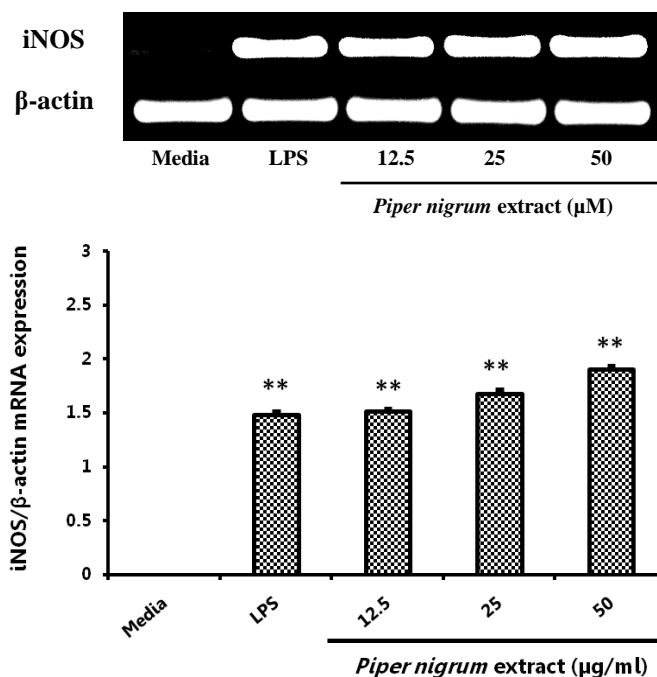


Figure 3 Effect of *P. nigrum* water extraction on iNOS mRNA expression J774A.1 cells. Cells were treated with 12.5-50 $\mu\text{g/ml}$ of *P. nigrum* water extract or LPS 100 ng/ml for 24 h. The mRNA expression of iNOS was determined by RT-PCR. The PCR products were detected by agarose gel electrophoresis and gel documentation. The data are expressed as mean \pm S.E.M from 3 independent experiment (n=3). ** $p < 0.01$ compared to untreated control.

Conclusion

This study demonstrated that water extract of *Piper nigrum* increase phagocytosis and NO production in macrophages. Much more *in vitro* and *in vivo* studies are required to evaluate the immunostimulatory effects of the extract not only on macrophages but also on other immune cells.

References

- Ahmad N, Fazal H., Abbasi BH., Farooq S., Ali M., Khan MA. Biological role of *Piper nigrum* L. (Black pepper): A Review. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2011;1-10.
- Amano F, Noda T. Improved detection of nitric oxide radical (NO.) production in an activated macrophage culture with a radical scavenger, carboxy PTIO and Griess reagent. FEBS Lett. 1995;368(3): 425-8.
- Bae GS, Kim MS., Jung WS., Seo SW., Yun SW., Kim SG., Park RK., et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by piperine. Eur J Pharmacol. 2010;642(1-3):154-62.
- Flannagan RS, Cosio G, Grinstein S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. Nat Rev Microbiol. 2009;7(5):355-66.
- Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 2005;4(3):281-6.
- Manosroi A, Saraphanchotiwithaya, A., Manosroi, J. Immunomodulatory activities of *Clausena excavata* Burm. f. wood extracts. J Ethnopharmacol. 2003;89(1): 155-60.
- Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. Nature. 2007;18;449(7164):819-26.
- Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. Nat Rev Immunol. 2011;11(11): 723-37.

RESEARCH ARTICLE

Quantitative Analysis Method for Determination of α -mangostin in Mangosteen rind Extract

Anurak Cheoymang^{1,2}, Kesara Na-Bangchang¹

¹Thailand Center of Excellence in Drug Discovery and Development (TCEDDD), Thammasat University (Rangsit Campus), Pathumthani 12121, Thailand

²Graduated Program in biomedical sciences, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University (Rangsit Campus), Pathumthani 12121, Thailand

Abstract

Mangosteen (*Garcinia mangostana*) is a tropical evergreen tree originated in Southeast Asia and used for centuries as a folk medicine. A major active component is α -mangostin, has been used in Thai traditional medicine, food supplements and herbal cosmetic preparations. α -Mangostin is used as a marker quantitative analysis and standardization of the raw materials and preparation from this plant. The aims of this study were to develop and validate a reverse-phase high performance liquid chromatographic (HPLC) method for quality of α -mangostin from mangosteen rind extract. Chromatographic separation was carried out on a Hypersil[®] Gold C-18 column (4.6 x 250 mm, 5 μ m) at room temperature. The a gradient mobile phase consisting of 55-85% acetonitrile running through the column at a flow rate of 1.0 ml/min. The wavelength was set at 256 nm. The method was validated for linearity, precision, accuracy and limit of quantitation (LOQ). Calibration curves were linear ($r^2 > 0.9999$) in the ranges 5–200 μ g/ml. The limit of quantification was 0.10 μ g/ml. The precision of the method based on within-day repeatability and reproducibility (day-to-day variation) was below 2% (% coefficient of variations: % CV). Good accuracy was observed for both the intra-day or inter-day assays. The mean recoveries were 100.69%. The method was applied successfully to the determined of α -mangostin for analytical research and routine quality assessment of mangosteen rind extract and products.

Key Words α -mangostin, mangosteen, *Garcinia mangostana*, method validation, quality control

Address correspondence and reprint request to: Kesara Na-Bangchang, Thailand Center of Excellence in Drug Discovery and Development (TCEDDD), Thammasat University (Rangsit Campus), Pathumthani, 12121, Thailand.

Email: kesaratmu@yahoo.com

การสอบเทียบมาตรฐานวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอลฟาแมงโกสตินด้วยโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

อนุรักษ์ เชื้อมั่ง^{1,2}, เกศรา ณ บางช้าง¹

¹ศูนย์ความเป็นเลิศทางการวิจัย ค้นคว้า และพัฒนายาแห่งประเทศไทย

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต) ปทุมธานี 12121

²โครงการบัณฑิตศึกษา คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต) ปทุมธานี 12121

บทคัดย่อ

มังคุดเป็นผลไม้ที่นิยมบริโภคอย่างแพร่หลาย และนำมาใช้เป็นสมุนไพรรักษาโรค เปลือกมังคุดมีสารสำคัญหลัก คือ แอลฟา-แมงโกสติน ในปัจจุบันนำสารสกัดจากเปลือกมังคุดมาผลิตเป็นอาหารเสริม รวมถึงเครื่องสำอางและยาแผนไทย ดังนั้นจึงต้องควบคุมคุณภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุด โดยการกำหนดปริมาณแอลฟา-แมงโกสตินจากสารสกัด วัตถุประสงค์การวิจัยเพื่อการสอบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอลฟา-แมงโกสตินด้วยโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพื่อควบคุมคุณภาพสารสกัดจากเปลือกมังคุด การแยกโครมาโตแกรมอาศัยคอลัมน์ Hypersil® Gold C-18 (5 ไมโครเมตร, 4.6 x 250 มิลลิเมตร) ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ อะซิโตนไตรล์ 55-85 % v/v ในน้ำ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร/นาที ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 5-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีค่า สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็น 0.9999 และมีค่าต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้ (LOQ) เท่ากับ 0.10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร การทดสอบความแม่นยำภายในวันเดียว และ ระหว่างวัน (CV) น้อยกว่า 2 % และมีค่าความถูกต้องสูง ค่าเฉลี่ยการกลับคืน (recovery) เท่ากับ 100.69 % วิธีวิเคราะห์ปริมาณแอลฟา-แมงโกสตินด้วยโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง มีความเหมาะสมในควบคุมคุณภาพสารสกัดจากเปลือกมังคุด สำหรับงานวิจัยและผลิตภัณฑ์จากสารสกัดมังคุด

คำสำคัญ: แอลฟา-แมงโกสติน, การสอบเทียบมาตรฐานวิธีวิเคราะห์, การควบคุมคุณภาพ

Introduction

Mangosteen (*Garcinia mangostana*) is a tropical evergreen tree originated in Southeast Asia and used for centuries as a folk medicine. The rind it has been used worldwide as traditional medicine for anti-inflammatory (Gopalakrishnan et al., 1980), (Moongkarndi et al., 2004), antibacterial (Iinuma et al., 1996), (Suksamrarn et al., 2003), and anticancer effects (Matsumoto et al., 2003). Recently, the consumption of mangosteen products has increased as a dietary supplement in the United States, because of their potent antioxidant properties (Jung et al., 2006), (Chomnawang et al., 2007). Several studies have reported that xanthenes particularly α -mangostin, which is a major xanthone, Xanthenes, are highly biologically active, possess anti-inflammatory properties such as COX inhibition, and have cardiovascular protective effects (Nakatani et al., 2002). It is popularly applied to cosmetic and pharmaceutical products. However, there is limited information for quality and quantity determination of α -mangostin in mangosteen extract. So analytical methods play an important role in the quality control of its raw materials and products. From previous report, the quantitative analytical methods of α -mangostin by gas chromatography (GC) (Jefferson, Stacey and Scheinmann, 1971) and LC-MS/MS (Ji et al., 2007). However, these methods need expensive equipment, long time consuming and complicate procedures for the preparation of sample and standard solutions.

The aims of this study were to develop and validate HPLC method for quantitative analysis of α -mangostin content in the mangosteen fruit rind extracts according to International Conference on Harmonization (ICH) of note for guidance on validation of analytical procedures (ICH, 1996).

Materials and Methods

Chemicals and Reagents

α -Mangostin (Figure 1) was obtained from ChromaDex Inc. (Santa Ana, CA). All organic solvents (HPLC grade) were purchased from Fison Scientific Equipment (Bishop Meadow Road, Lough borough, U.K.). Ultrapure analytical grade Type I water ($r>18\text{M } \Omega/\text{cm}$) was produced by a Milli-Q PlusTM water system (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). The other chemicals and solvents used in this experiment were analytical grade which were purchased from Lab scan Asia (Thailand).

Preparation of standards and calibration standard solution

The standard stock solutions of α -mangostin were prepared by dissolving their accurately weighted compounds in methanol to give the solution a final concentration of 1,000 $\mu\text{g/ml}$, and stored at -20°C until use. These solutions were then serially diluted with methanol to provide calibration standard solutions of 5, 10, 25, 50, 100, and 200 $\mu\text{g/ml}$.

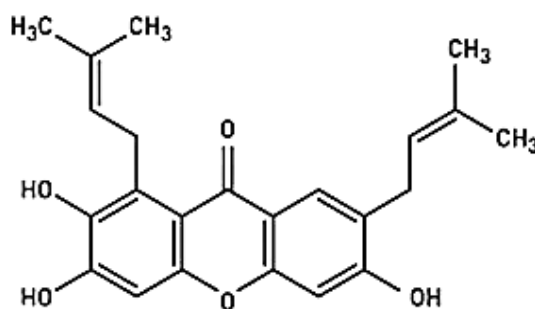


Figure 1 Chemical structure of α -mangostin

Preparation of plant materials

The mangosteens were purchased from two local markets in Bangkok, Thailand. The fruit rinds were cut into small pieces and dried in a hot oven at 50 °C. The sample was extracted by 95 % ethanol. Each extract was filtered through a Whatman no. 1 filter paper. The filtrate was concentrated under reduced pressure at 50 °C using a rotary vacuum evaporator.

Each dried extract (10 mg) was accurately weighed and transferred to a 10 ml volumetric flask. Methanol was added to volume (1,000 µg/ml) and diluted with methanol to a final concentration of 250 µg/ml. Prior to analysis, the solutions were filtered through 0.45 µm membrane filters.

Instrumentation and chromatographic condition

The method was developed on a chromatographic system consisting of the elution solvent delivery (Spectra System P4000 Quaternary Solvent Delivery/Controller: Thermo Fisher Scientific, CA, USA), equipped with solvent degasser (SpectraSystem SCM1000 Solvent Degasser : Thermo Fisher Scientific, CA, USA), an auto sampler (SpectraSystem AS3500 :Thermo Fisher Scientific, CA, USA) and a UV detector (SpectraSystem UV/Vis3000: Thermo Fisher Scientific, CA, USA). The wave length was set at 254 nm. The separation was carried out on a reversed-phase column (Thermo Hypersil Gold C18, 250 mm×2.1mm i.d., 5 µm: Thermo Scientific, CA, USA). The elution solvent consisted water (A) and acetonitrile (B). The gradient mode was as follows: 55 % to 85% B for 0-30 min; constant at 85 % B for 30-35 min; 85 % to 55% B for 36-36 min, constant at 55 % B for 36-40 min. The chromatographic analysis was operated at 25°C. The samples or standard solutions were injected onto the column 20 µl at flow rate of 1.0 ml/min.

Method Validation

1. Linearity and Calibration curve

Linearity and standard curve were determined by using α -mangostin standard solution 5, 10, 25, 50, 100, and 200 µg/ml

2. Accuracy and precision

Intra- and inter-day precision and accuracy were evaluated at 3 levels of standard α -mangostin concentrations 10, 100, and 150 µg/ml. Intra- and inter-day assay precision were determined as relative standard deviation (RSD), and intra and inter-day assay accuracies were expressed as percentages of theoretical concentration

3. Recovery

Three level differences of standard α -mangostin concentrations were spiked in dried mangosteen rind extract sample with known contents of α -mangostin, and the samples were processed according to the final concentration of standards to be as 10, 100, and 150 µg/ml. The three injections for each concentration were done per day over three different days.

4. Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantitation (LOQ)

The limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) was determined by diluting standard solutions with methanol and was then analyzed with the HPLC system. LOD and LOQ were based on 3 times and 10 times of signal-to-noise ratio, respectively.

Results

The chromatographic condition was developed for the quantification of α -mangostin in *G. mangostana* fruit rind extracts. The chromatograms of standard α -mangostin (Figure 2a) were free from any interference peak, with good resolution and sharp peaks. Mangosteen rind extracts showed α -mangostin peak with the other peaks (Figure 2a). The retention times of α -mangostin was 10.71 min. The method was validated for its linearity, precision, accuracy, LOD, and LOQ. The standard curves for α -mangostin was within the concentration range standard curves for the analytical range of 5 - 200 µg/ml. The calibration ranges yielded linear relationships with correlation coefficients (r^2 0.9999). The linear regression equation obtained from the mean of the six calibration curves was $y = 2653x - 1884$.

The LOD and LOQ were found to be 0.05 and 0.10 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The results showed acceptable precision of the method based on within-day repeatability and reproducibility (Inter-day variation) was below 2% (% coefficient of variations: %CV) and Good accuracy was observed for both the intra-day or inter-day assays were expressed as the mean deviation from the theoretical values varied between -1.09

and 2.29%, 1.26 and 3.06%, respectively (Table 1). The recovery of α -mangostin at the concentrations of 10, 100, and 150 $\mu\text{g/ml}$ were 103.15, 98.03 and 100.88 %.

The method has been applied to the determined of α -mangostin in the ethanolic extracts of *G. mangostana* fruit rind. The contents of Sample A and Sample B were 12.69 ± 0.08 and $15.02 \pm 0.11\%$ w/w.

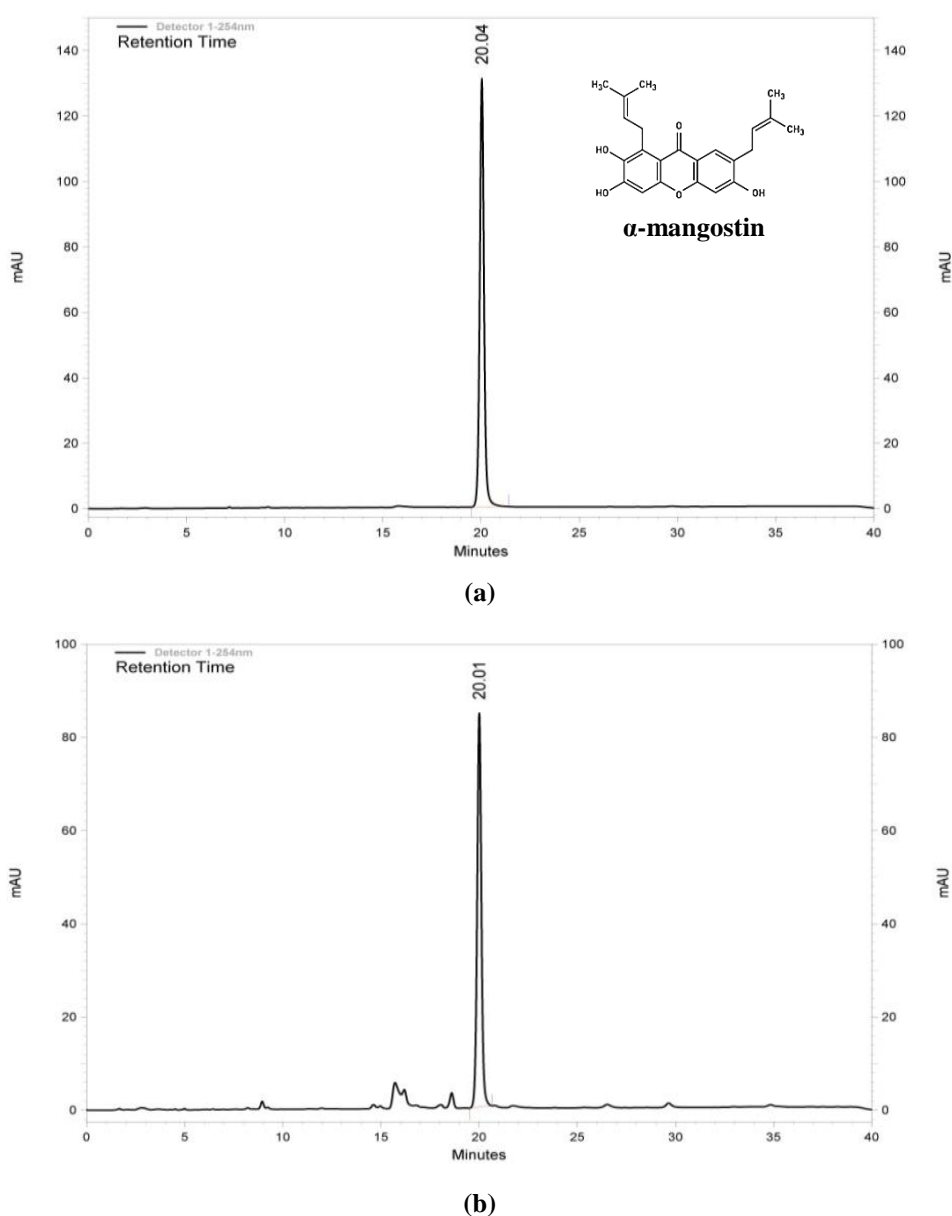


Figure 2 Chromatograms of (a) standard α -mangostin (b) mangosteen rind extract. The retention times for α -mangostin is 20.0 min.

Table 1 Inter-day (between day) and intra-day (within day) validation of α -mangostin concentrations

Concentration (ng/ml)	Intra-day (n = 6)			Inter-day (n = 6)		
	mean \pm SD; ng/ml	Precision % CV	Accuracy (% DMV)	mean \pm SD; ng/ml	precision % CV	Accuracy (% DMV)
10	9.24 \pm 2.76	1.44	2.29	9.19 \pm 3.14	0.89	3.06
100	97.67 \pm 5.48	0.56	-2.33	98.90 \pm 3.44	0.76	-1.09
150	148.79 \pm 0.51	1.05	-1.09	147.87 \pm 0.60	1.25	1.26

% CV: coefficient of variation; % DMV: deviation of mean value from the theoretical value

Discussion

HPLC method for the quantification of α -mangostin in *G. mangostana* had been reported that RP-HPLC method with gradient solvent system comprising 0.1 % v/v orthophosphoric acid : acetonitrile (Pothitirat and Gritsanapan, 2009). Another report RP-HPLC method with isocratic solvent system comprising 0.2% formic acid : acetonitrile 30:70, v/v (Yodhnu et al., 2009). In our work, we used a C18 column with gradient solvent system comprising water:acetonitrile which offers advantages over isocratic solvent system for separation a wide range of compounds with high resolution and a simple mobile phase.

References

- Chomnawang MT, Surassmo S, Nukoolkarn VS, Gritsanapan W. Effect of *Garcinia mangostana* on inflammation caused by *Propionibacterium acnes*. *Fitoterapia* 2007; 78: 401-8.
- Gopalakrishnan C, Shankaranarayanan D, Kameswaran L, Nazimudeen SK. Effect of mangostin, a xanthone from *Garcinia mangostana* Linn. in immunopathological & inflammatory reactions. *Indian J Exp Biol* 1980; 18: 843-6.
- Iinuma M, Tosa H, Tanaka T, Asai F, Kobayashi Y, Shimano R, Miyauchi K. Antibacterial activity of xanthones from guttiferaceous plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Pharm Pharmacol* 1996; 48: 861-5.
- International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of
- Ji X, Avula B, Khan IA. Quantitative and qualitative determination of six xanthones in *Garcinia mangostana* L. by LC-PDA and LC-ESI-MS. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 43: 1270-6.
- Jung HA, Su BN, Keller WJ, Mehta RG, Kinghorn AD. Antioxidant xanthones from the pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen). *J Agric Food Chem* 2006; 54: 2077-82.
- Matsumoto K, Akao Y, Kobayashi E, Ohguchi K, Ito T, Tanaka T, Iinuma M et al. Induction of apoptosis by xanthones from mangosteen in human leukemia cell lines. *J Nat Prod* 2003; 66: 1124-7.

Conclusion

The HPLC method method for determination of α -mangostin is simplicity, good linearity, high precision and accuracy. The method developed should be useful for analytical research and quality control of raw materials of *G. mangostana* fruit rind and its extract.

Acknowledgements

This investigation received financial support from The Commission on Higher Education, Ministry of Education of Thailand and The National Research University Project (NRU) of Thailand, Office of Higher Education Commission.

- Moongkarndi P, Kosem N, Kaslungka S, Luanratana O, Pongpan N, Neungton N. Antiproliferation, antioxidation and induction of apoptosis by *Garcinia mangostana* (mangosteen) on SKBR3 human breast cancer cell line. *J Ethnopharmacol* 2004; 90: 161-6.
- Nakatani K, Nakahata N, Arakawa T, Yasuda H, Ohizumi Y. Inhibition of cyclooxygenase and prostaglandin E2 synthesis by gamma-mangostin, a xanthone derivative in mangosteen, in C6 rat glioma cells. *Biochem Pharmacol* 2002; 63: 73-9.
- Pothitirat W. and Gritsanapan W. HPLC Quantitative Analysis Method for the Determination of α -Mangostin in Mangosteen Fruit Rind Extract. *Thai Journal of Agricultural Science* 2009, 42(1): 7-12
- Suksamrarn S, Suwannapoch N, Phakhodee W, Thanuhiranlert J, Ratananukul P, Chimnoi N, Suksamrarn A. Antimycobacterial activity of prenylated xanthenes from the fruits of *Garcinia mangostana*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2003; 51: 857-9.
- Yodhnu S, Sirikatitham A, Wattanapiromsakul C. Validation of LC for the determination of alpha-mangostin in mangosteen peel extract: a tool for quality assessment of *Garcinia mangostana* L. *J Chromatogr Sci* 2009; 47: 185-9.

RESEARCH ARTICLE

Association of HLA Genotypes and Co-trimoxazole-induced Stevens-Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis in Thai Patients**Thachanan Kongpan^{1,5}, Sirimas Kanjanawart^{1,5}, Usanee Khunakornsiri², Prarinya Konyoung², Pansu Chumworathayi³, Somsak Tiamkao⁴, and Wichittra Tassaneeyakul^{1,5}**

¹Department of Pharmacology, ²Pharmacy Unit, Udon Thani Hospital, Thailand, ³Pharmacy Unit, ⁴Department of Medicine, ⁵Research and Diagnostic Center for Emerging Infectious Diseases, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

Abstract

Stevens-Johnson syndrome (SJS) and toxic epidermal necrolysis (TEN) are rare but severe cutaneous adverse drug reactions. Co-trimoxazole has been reported as the most common culprit drug of SJS or TEN in Thailand. This study aimed to investigate the relationship between HLA alleles and co-trimoxazole-induced SJS or TEN in Thai patients. Ten co-trimoxazole-induced SJS or TEN patients were recruited in the study. HLA genotyping were determined by sequence specific oligonucleotide (SSO) technique. Compare to the frequency of HLA alleles reported in the general Thai subjects, the frequencies of *HLA-A*11*, *HLA-B*13*, *HLA-B*07*, *HLA-C*06*, *HLA-C*07* and *HLA-DRB1*07* were apparently higher in co-trimoxazole-induced SJS or TEN patients. Of these 10 patients, 4 (40.0%) patients carried the *HLA-DRB1*07* while only 47 out of 400 (11.8%) of the general Thai subjects carried this allele. The risk of co-trimoxazole-induced SJS or TEN was significantly higher in the patients with *HLA-DRB1*07* with an odds ratio (OR) of 5.01 [95.0% CI 1.36–18.40, $P < 0.05$]. Since the number of patients in this study is small, further study is required to confirm that the *HLA-DRB1*07* is really a valid genetic marker for the screening of Thai individuals at risk of co-trimoxazole-induced life-threatening SJS and TEN.

Key Words co-trimoxazole, Stevens-Johnson syndrome (SJS), toxic epidermal necrolysis (TEN), human leukocyte antigen (HLA)

Address correspondence and reprint request to: Wichittra Tassaneeyakul, Department of Pharmacology, and Research and Diagnostic Center for Emerging Infectious Disease, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

Email: wichitt@kku.ac.th

ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมของยีน HLA กับกลุ่มอาการ Stevens-Johnson syndrome และ toxic epidermal necrolysis ที่เกิดจากยา co-trimoxazole ในผู้ป่วยชาวไทย

ธัชณัน กองพันธ์^{1,5}, ศิริมาศ กาญจนวาศ^{1,5}, อุษณีย์ คุณากรศิริ², ปริญญา คนยัง², พันธุ์ ชุมวรฐายี³, สมศักดิ์ เทียมเก่า⁴ และ วิจิตรา ทศนียกุล^{1,5}

¹ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น , ²ฝ่ายเภสัชกรรม โรงพยาบาลอุดรธานี, ³ฝ่ายเภสัชกรรม โรงพยาบาลศรีนครินทร์, ⁴คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น , ⁵ศูนย์วิจัยและบริการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจใหม่ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 40002

บทคัดย่อ

กลุ่มอาการ Stevens-Johnson syndrome (SJS) และ toxic epidermal necrolysis (TEN) เป็นกลุ่มอาการแพ้ยาทางผิวหนังที่มีอุบัติการณ์การเกิดต่ำ แต่มีอัตราการรุนแรง สำหรับประเทศไทยมีรายงานว่า ยา co-trimoxazole เป็นยาซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเกิดกลุ่มอาการ SJS และ TEN การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมของยีน HLA กับกลุ่มอาการ SJS และ TEN เนื่องจากการใช้ยา co-trimoxazole ในผู้ป่วยชาวไทย ผู้ป่วยที่มีอาการแพ้ยาชนิด SJS หรือ TEN จำนวน 10 ราย เข้าร่วมการศึกษา โดยศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน HLA ด้วยเทคนิค sequence specific oligonucleotide (SSO) เพื่อเปรียบเทียบกับข้อมูล HLA แอลลีลของคนไทยสุขภาพดีในฐานะข้อมูล ผลการศึกษาพบว่า ยีน HLA-A*11, HLA-B*13, HLA-B*07, HLA-C*06, HLA-C*07 และ HLA-DRB1*07 มีความถี่สูงในผู้ป่วยแพ้ยาชนิด SJS และ TEN และผู้ป่วย 4 ใน 10 ราย (40%) มียีน HLA-DRB1*07 ขณะที่คนไทยสุขภาพดีพบยีนนี้เพียง 47 ใน 400 ราย (11.75%) นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยที่มียีน HLA-DRB1*07 มีอัตราเสี่ยง (Odds ratio) ที่จะเกิดการแพ้ยาชนิด SJS หรือ TEN จากการใช้ยา co-trimoxazole สูงถึง 5.01 เท่า เมื่อเทียบกับผู้ที่ไม่มียีนนี้ (95% ของช่วงความเชื่อมั่นเท่ากับ 1.36-18.40, $P < 0.05$) อย่างไรก็ตาม จำนวนผู้ป่วยแพ้ยาชนิด SJS หรือ TEN ที่เข้าร่วมการศึกษาในครั้งนี้ยังมีจำนวนน้อย เพื่อยืนยันผลว่ายีน HLA-DRB1*07 สามารถที่จะนำมาเป็นตัวบ่งชี้ที่ดีสำหรับการทำนายความเสี่ยงในการเกิดการแพ้ยาชนิด SJS และ TEN ที่เกิดจากการใช้ยา co-trimoxazole ในผู้ป่วยชาวไทยได้หรือไม่ จำเป็นจะต้องมีการศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมในผู้ป่วยจำนวนที่มากขึ้น

คำสำคัญ: co-trimoxazole, Stevens-Johnson syndrome (SJS), toxic epidermal necrolysis (TEN), human leukocyte antigen (HLA)

Introduction

Stevens Johnson syndrome (SJS) and toxic epidermal necrolysis (TEN) are two most common severe cutaneous adverse reactions (SCAR). SJS is characterized by small blisters arising on purple macules, with skin detachment below 10% of the body surface area (BSA), whereas in TEN skin detachment spread over more than 30% of the BSA (Roujeau and Stern 1994). These SCAR have often been linked to drug exposure (Leenutaphong et al. 1993). Several drugs are known to associate with SCAR. Data from spontaneous reports in Thailand during 1983–2006 revealed that co-trimoxazole was the most common culprit drug for SJS and TEN in Thai population (ศูนย์เฝ้าระวังความปลอดภัยด้านผลิตภัณฑ์สุขภาพ กระทรวงสาธารณสุข 2551). Co-trimoxazole is also reported to be the most common culprit drug for SJS or TEN in the Srinagarind Hospital, Khon Kaen, Thailand, during 1995–2008 (Jantararoungtong et al. 2009).

Although the pathogenesis of SCAR is not fully understood but genetic factors are suggested to play importance roles (Gueant et al. 2008). A recent study in France revealed that the sulfonamide-related cases of TEN were significantly higher in the patients with *HLA-B*12* and also tended to link with the *HLA-A*29* and *HLA-DR*7* (Roujeau et al. 1987). Moreover, the positive association between sulfonamide-related cases of SJS or TEN and *HLA-B*59* was seen in Japanese and Korean patients (Shirato et al. 1997). The issue of ethnicity has been raised for the association between *HLA-B*1502* and carbamazepine-induced SJS or TEN (Chung et al. 2004) as well as for the association between the *HLA-B*5701* and abacavir hypersensitivity (Mallal et al. 2002). The aim of this study is, therefore, to determine the association of HLA genotypes and co-trimoxazole-induced SJS or TEN in Thai patients.

Materials and Methods

Patients

Patients admitted to local hospitals with the diagnosis of co-trimoxazole-induced SJS or TEN in Thailand from 1982 to 2010 were identified by their medical records. The diagnosis of SJS and TEN was confirmed by either a dermatologist or an internist based on the cutaneous lesions of the patients according to Roujeau. (Roujeau 2005). Among the subjects identified, 10 patients agreed to participate in this study. In the enrolled cases, co-trimoxazole was identified as the culprit drug if the symptoms had occurred within the first 3 months of exposure and resolved upon withdrawal of this drug.

HLA genotypes data of 400 general north-eastern Thai subjects from the Allele Frequency Net Database (www.allelefrequencies.net) were used as the control group. The study protocol was approved by the Khon Kaen Ethics Committee for Human Research, Khon Kaen University, Thailand (HE 510837).

Genomic DNA preparation

Ten milliliters of venous blood were collected in a tube coated with EDTA. Leukocytes were separated by centrifugation at 2,500 rpm for 15 min. Genomic DNA was isolated from leukocytes using a QIAamp DNA Blood mini kit (QIAGEN GmbH, Germany).

HLA genotyping

The actual HLA alleles of each patient were determined using sequence specific oligonucleotide (SSO) technique.

Statistical analysis

Fisher's exact test was used to analyze the association between co-trimoxazole-induced SJS or TEN and HLA alleles. P-values < 0.05 was considered statistically significant.

Results

A total of 10 co-trimoxazole-induced SJS or TEN patients were recruited in this study. The patients

included 4 cases of SJS and 6 cases of TEN. The mean age of the patients was 37.80 ± 21.79 years. The indications of co-trimoxazole prescribed for these patients included treatments of HIV (30%) and other bacterial infections (70%). The median time from the first day of drug exposure to the onset of SCAR was 1 days, ranging from 1-66 days. The median length of hospitalization for treatment of SCAR was 7 days, ranging from 3-20 days and median cost of medical treatment was 23,728 bahts. The demographic characteristics of the patients are summarized in Table 1.

HLA genotyping data showed that 4 out of 10 (40%) co-trimoxazole-induced SJS or TEN patients carried HLA-DRB1*07 allele, whereas only 47 out of 400 (11.75%) of general Thai subjects carried this allele. The risk of co-trimoxazole-induced SJS or TEN was significantly higher in the patients with HLA-DRB1*07 when compared with those who did not carry this allele with an OR of 5.01 [95% confidence interval (CI) 1.36–18.40, $P < 0.05$] (Table 2). In addition, the risk of co-trimoxazole-induced SJS or TEN in patients who carried HLA-A*11, HLA-B*13, HLA-B*07, HLA-C*06 or HLA-C*07 appeared to be higher, although statistically not significant (Table 2).

Table 1 Demographic characteristics of co-trimoxazole-induced SJS or TEN patients

Characteristics	SJS (%)	TEN (%)	Total (%)
Number of patients	4 (40)	6 (60)	10 (100)
Gender			
Male	1 (25)	3 (50)	4 (40)
Female	3 (75)	3 (50)	6 (60)
Mean age \pm SD, years	45.25 ± 29.20	32.83 ± 16.39	37.80 ± 21.79
Indications for co-trimoxazole			
<i>Opportunistic infections in HIV patients</i>	1 (25)	2 (33.34)	3 (30)
<i>Other bacterial infections</i>	3 (75)	4 (66.66)	7 (70)
Median exposure time [range], days	1.0 [1-2]	1.5 [1-66]	1.0 [1-66]
Median duration of hospital stay [range], days	6.5 [3-7]	13 [5-20]	7 [3-20]
Median cost of medical treatment [range], bahts	10,179.00 [10,179]	28,795.50 [6,958-100,000]	23,728.00 [6,958-100,000]

Discussion and Conclusion

Consistent with the previous report in European population (Roujeau et al. 1987), the association between HLA-DRB1*07 and co-trimoxazole-induced SJS or TEN in Thai patients was statistically significant. While the association between HLA-A*11, HLA-B*13, HLA-B*07, HLA-C*06 or HLA-C*07 and co-trimoxazole-induced SJS or TEN in Thai patients were not statistically significant,

however, the risk of co-trimoxazole-induced SJS or TEN in patients who carried these alleles appeared to be higher. This effect may arise from the limited number of subjects.

The human major histocompatibility complex (MHC) contains the genes for human leukocyte antigen (HLA) class I and class II, also known as MHC-I and MHC-II. The MHC gene family is located on chromosome 6 in a region of high linkage disequilibrium.

Table 2 The association of individual HLA allele with co-trimoxazole-induced SJS or TEN

HLA allele	Co-trimoxazole-induced SJS or TEN (n=10)	General Thai subjects (n=400)	Odds ratio [95% CI]
A*11	7 (70%)	186 (46.50%)	2.68 [0.68 - 10.53]
B*13	4 (40%)	74 (18.50%)	2.94 [0.81 - 10.67]
B*07	2 (20%)	30 (7.50%)	3.08 [0.63 - 15.17]
C*06	2 (20%)	26 (6.50%)	3.60 [0.73 - 17.81]
C*07	8 (80%)	198 (49.50%)	4.08 [0.86 - 19.46]
DRB1*07	4 (40%)	47 (11.75%)	5.01 [1.36 - 18.40]*

*Significant after adjusting for multiple comparisons (P -value < 0.05)

The HLA class I complex consists of three genes, HLA-A, -B and -C; the HLA class II complex consists of the HLA-DR, -DP and -DQ genes (Horton et al. 2004). The HLA genes, particularly HLA-B, are some of the most polymorphic in the human genome with over 5000 HLA-I and -II alleles listed in the IMGT/HLA database (Robinson et al. 2009).

HLA molecules encoded by the HLA genes play a important role in the immune system. They bind endogenous and exogenous peptides which result from the breakdown of self-cells or foreign proteins, and subsequently present these bound peptide antigens to T cells to initiate their antigen-specific responses. HLA class I molecules present peptides derived from proteins broken down inside cells, while HLA class II molecules present antigens encountered outside of cells. The main structural difference between the HLA class I and II molecules lies in the peptide binding groove, which determines peptide binding specificities (Hulsmeyer et al. 2004).

Recently, the strong association between certain HLA-B alleles with SCAR induced by carbamazepine and allopurinol have been demonstrated in several populations. This strong association suggests that the specific HLA-B molecule is not just a genetic marker, but that it also

plays an important role in the pathogenesis of these SCAR. HLA molecules present endogenous or processed exogenous antigens to CD8+ cytotoxic T cells, thereby eliciting an adaptive immune response. HLA restriction has been shown to be required for the activation of drug-specific T cells by the culprit drug. The T cell receptor (TCR) of the effector T cell is thought to recognize the drug-peptide complex bound by the specific HLA molecule on the antigen-presenting cell, resulting in the release of immune mediators, and leading to robust adaptive immune reactions in SCAR. (Chung et al. 2007).

There are two hypotheses to explain how TCR/drug-peptide/HLA interact. The Hapten hypothesis proposes a specific drug/metabolite may act as a hapten and bind to proteins or MHC-bound peptides, which then are recognized by T lymphocytes for HLA restricted T cell activation. The “p-i concept” (direct pharmacological interaction of drugs with immune receptors) suggests that drugs can bind directly and non-covalently to a matching TCR, together with MHC molecules (Pichler et al. 2006). Thus, both hypotheses suggest that SCAR involve the interaction of specific MHC molecule, TCR, and drug-modified antigen.

The results from the present study show that certain alleles of HLA, particularly HLA-DRB1*07 allele statistically significant associated with cotrimoxazole-induced SJS or TEN in studied population. This study suggests that HLA-DRB1*07 may play important role in cotrimoxazole-induced SJS or TEN. Further studies in larger population is needed to confirm the validity of HLA-DRB1*07 as a genetic marker for screening Thai individuals who may be at risk of cotrimoxazole-induced life-threatening SJS and TEN.

References

- Roujeau JC, Stern RS. Severe adverse cutaneous reactions to drugs. *N Engl J Med*. 1994;331(19):1272-85.
- Leenutaphong V, Sivayathorn A, Suthipinittharm P, Sunthonpalin P. Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Thailand. *Int J Dermatol*. 1993;32(6):428-31.
- ศูนย์เฝ้าระวังความปลอดภัยด้านผลิตภัณฑ์สุขภาพ กระทรวงสาธารณสุข . สรุปรายงานอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาประจำปี พ .ศ. 2549. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา; 2551.
- Jantararoungtong T, Tiamkao S, Vanaprasath S, Choonhakarn C, Auvichayapat N, Tassaneeyakul W. Stevens-Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis in Srinagarind Hospital: A Retrospective Study of Causative Drugs and Clinical Outcome. *Thai J Pharmacol*. 2009;31(1):41-4.
- Gueant JL, Gueant-Rodriguez RM, reverse-transcriptase inhibitor abacavir. *Lancet*. 2002;359(9308):727-32.
- Roujeau JC. Clinical heterogeneity of drug hypersensitivity. *Toxicology*. 2005;209(2):123-9.
- Shirato S, Kagaya F, Suzuki Y, Joukou S. Stevens-Johnson syndrome induced by methazolamide treatment. *Arch Ophthalmol*. 1997;115(4):550-3.
- Chung WH, Hung SI, Hong HS, Hsieh MS, Yang LC, Ho HC, et al. Medical genetics: a marker for Stevens-Johnson syndrome. *Nature* 2004;428:486.
- Mallal S, Nolan D, Witt C, Masel G, Martin AM, Moore C, et al. Association between presence of HLA-B*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. *Lancet*. 2002;359(9308):727-32.
- Roujeau JC. Clinical heterogeneity of drug hypersensitivity. *Toxicology*. 2005;209(2):123-9.
- Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK, et al. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet*. 2004;5(12):889-99.
- Robinson J, Waller MJ, Fail SC, McWilliam H, Lopez R, Parham P, et al. The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(Database issue):D1013-7.
- Hulsmeyer M, Fiorillo MT, Bettosini F, Sorrentino R, Saenger W, Ziegler A, et al. Dual, HLA-B27 subtype-dependent conformation of a self-peptide. *J Exp Med*. 2004;199(2):271-81.
- Chung WH, Hung SI, Chen YT. Human leukocyte antigens and drug hypersensitivity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007;7(4):317-23.
- Pichler WJ, Beeler A, Keller M, Lerch M, Posadas S, Schmid D, et al. Pharmacological interaction of drugs with immune receptors: the p-i concept. *Allergol Int*. 2006;55(1):17-25.

Acknowledgement

This work was supported by the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission. The authors are thankful to Prof. Yukifumi Nawa, faculty of Medicine, Khon Kaen University for revising this manuscript.

RESEARCH ARTICLE

Effects of Rhinacanthin-N on Efflux Drug Transporters in Caco-2 cells

Ratjika Wongwanakul¹, Nontima Vardhanabhuti², Suree Jianmongkol³

¹Graduate Program in Pharmacology, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

²Department of Pharmaceutics and Industrial Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

³Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Abstract

Rhinacanthin-N is a bioactive naphthoquinone compound with a therapeutic potential as an anticancer agent. The purpose of this study was to determine the influence of this compound on the multidrug resistant efflux transporters in particular P-gp and MRP2, using the in vitro model of the Caco-2 cells. The activities of P-gp and MRP2 were determined by following the retention of its specific fluorescent probes (calcein and CDCF) in the uptake assays. Our results showed that rhinacanthin-N was able to interfere the activities of P-gp and MRP2. The inhibitory effect against P-gp was relatively weak and could be reversed at high concentration. By contrast, the inhibitory effect of this compound was more potent toward the function of MRP2. It was likely that the molecular structure of rhinacanthin-N was more compatible for its interaction with MRP2 than P-gp.

Key Words rhinacanthin-N, P-glycoprotein, MRP2, Caco-2 cells

ผลของไรนาแคนทินเอนต่อตัวขับยาออกนอกเซลล์ในเซลล์คาโค-2

รัตน์จิภา วงศ์วานกุล¹, นนทิมา วรรณนะภูติ², สุรีย์ เจียรณมงคล³

¹ภาควิชาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

²ภาควิชาเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม, คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

³ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา, คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ไรนาแคนทินเอนเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มแนฟโทควิโนน ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ศึกษา ผลของไรนาแคนทินเอนต่อตัวขับยาออกนอกเซลล์ที่ทำให้เกิดภาวะการดื้อยา โดยเฉพาะ พี-ไกลโคโปรตีน (P-gp) และ มัลติดริกรีซีสแทนซ์โปรตีน 2 (MRP2) โดยใช้เซลล์คาโค-2เป็นแบบจำลองในการศึกษา ทั้งนี้จะวัดการทำงานของตัวขับยาออกทั้งสองชนิดโดยวัดค่าการเรืองแสงของ calcein (P-gp) และ CDCF (MRP2) ที่สะสมในเซลล์ จากผลการทดลองพบว่าไรนาแคนทินเอนมีผลยับยั้งการทำงานของ P-gp ได้ค่อนข้างต่ำ และจะไม่พบผลดังกล่าวเมื่อความเข้มข้นของสารอยู่ในระดับสูง ในขณะที่สารไรนาแคนทินเอนมีผลยับยั้งการทำงานของ MRP2 ได้มากกว่า P-gp อย่างชัดเจน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะโครงสร้างทางโมเลกุลของไรนาแคนทินเอนที่ทำให้สารนี้สามารถจับ MRP2 ได้ดีกว่า P-gp

คำสำคัญ: ไรนาแคนทินเอน, พี-ไกลโคโปรตีน, มัลติดริกรีซีสแทนซ์โปรตีน 2, เซลล์คาโค-2

Introduction

Rhinacanthus nasutus Kurz. has been known in Thai traditional medicine for treatment of various diseases including eczema, pulmonary tuberculosis, herpes, hepatitis and cancer (Siripong et al., 2006). Rhinacanthin-N is one of the main bioactive naphthoquinone esters found in the leaves and roots of this plant. This compound has been demonstrated its potential therapeutic value as an anticancer agent with the intrinsic activities including cytotoxicity, antiproliferative, antitumor, pro-apoptotic activities (Kongkathip et al., 2004, Siripong et al., 2006). It is likely that rhinacanthin-N may be in part accounted for the anticancer effect of *R. nasutus* Kurz.

Multidrug resistance is one major problem that can lead to therapeutic failure in cancer treatment. It has been known that certain cancer cells highly express drug efflux transporters in particular the ATP-binding cassette transporters (ABC- transporters) to reduce the accumulation of intracellular cytotoxic drug (Fletcher et al. 2010). Consequently, those cancer cells become resistant to chemotherapy. Examples of the ABC efflux transporters include the *ABCB1* (P-glycoprotein; P-gp), the *ABCC2* (multidrug resistance-associated protein 2; MRP2), the *ABCG2* (breast cancer resistance protein; BCRP).

In addition to the cancer cells, these efflux transporters can be found in various normal tissues such as in the epithelium or endothelium of intestine, liver, kidney and blood brain barrier. The presence of these transporters takes part in restricting chemicals to penetrate into the organ system and also promoting substrates extrusion (Glavinas et al., 2004; Leslie et al., 2005; Takano et al., 2006)

The substrates of these ABC transporters are diverse in chemical structure. Several drug groups and plant-derived compounds including anticancer drugs (e.g., vinblastine, doxorubicin), NSAIDs (e.g., indomethacin heptyl ester), calcium channel blocker (e.g., verapamil), lignans (e.g., eudesmin, diphyllin, deoxyschizandrin), piperine, capsaicin are known to interact with P-gp either as being substrates or inhibitors (Lim et al., 2007; Marchetti et al., 2007; Yoo et al., 2007; Sharom 2008; Zrieki et al., 2008). In addition, some of these compounds are reported to contain intrinsic inhibitory action on the MRP2, as well (Morris and Zhang 2006). To our knowledge, there are no reports of the interaction between rhinacanthin-N and the ABC efflux transporters in particular P-gp and MRP2.

Thus, the present study was to determine whether rhinacanthin-N could inhibit the function of P-gp and MRP2 transporters, using the in vitro model of caco-2 cells.

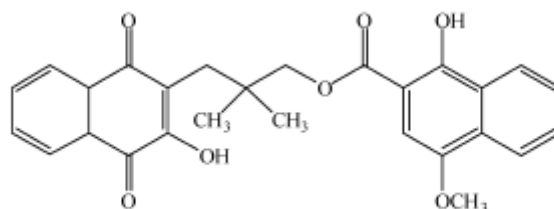


Figure 1 Chemical structure of rhinacanthin-N

Materials and Methods

Materials

Rhinacanthin-N isolated from *R. nasutus* Kurz. roots was kindly provided by Dr. Pongpun Siripong, National Cancer Institute, Bangkok, Thailand. Other chemicals including verapamil, probenecid, calcein acetoxymethyl ester (calcein-AM), diacetate ester of 5(6)-carboxy-2', 7'-dichlorofluorescein (CDCFDA), Hank's balanced salt solution (HBSS), Bradford reagent were purchased from Sigma chemical company (St. Louis, MO, USA).

Cell cultures

The Caco-2 cells (ATCC, Rockville, MD, USA), passage 54 to 68, were maintained in complete medium (DMEM supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 1% non-essential amino acid, 1% penicillin-streptomycin, and 2mM L-glutamine) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. Cells were subcultured at 70% confluency. For the uptake study, the cells were seeded on a 24 well-plate at a density of 13,000 cells/cm², and were grown for 21 days.

Uptake study

The Caco-2 cells were pretreated with the test compound for 30 minutes, followed by addition of either a P-gp substrate calcein-AM (0.4 µM) or a MRP2 substrate CDCFDA (5 µM). After the incubation period of 30 minutes, the cells were washed and lysed with 0.1% Triton X-100. The fluorescent intensity of calcein or CDCF was determined with the microplate reader at an excitation wavelength and an emission wavelength of 485nm and 535 nm, respectively. The amounts of proteins in each sample were determined with Bradford reagent in order to normalize the total protein in each experiment.

Statistical analysis

The results were calculated and expressed as the percentage of the calcein or CDCF retention/mg protein in relative to those of the control group in each experiment (100%). Data were expressed as the mean ± SEM obtained from at least three separated experiments. The effects of rhinacanthin-N were statistically analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's post hoc test for multiple comparisons. Paired T-test was also used for comparison between the control and positive control groups. Significance was considered at $P < 0.05$.

Results

In our culture condition, the expression of active P-gp and MRP2 in the Caco-2 cells after cultured for 21 days post seeding was at the appreciable level. The presence of verapamil (a known P-gp inhibitor) and probenecid (a known MRP2 inhibitor) increased intracellular accumulation of calcein and CDCF by 1.69, and 2.09 folds, respectively (Fig 2, 3). Rhinacanthin-N at the concentration up to 10 µM slightly increased calcein retention in the Caco-2 cells. The maximum inhibitory effect of this compound against P-gp activity was approximately 1.28 fold. Surprisingly, the effect of this compound on P-gp activity was unnoticeable when its concentration increased to 100 µM (Fig 2).

Rhinacanthin-N was able to increase the intracellular CDCF retention, suggesting its inhibitory action against MRP2 activity in the Caco-2 cells. The inhibition was apparently concentration-dependent and reached its saturated maximal level (approximately 1.8 fold in relative to those of the control). In addition, rhinacanthin-N could elicit its maximal inhibitory effect against MRP2 at the concentration of 0.625 µM (Fig 3).

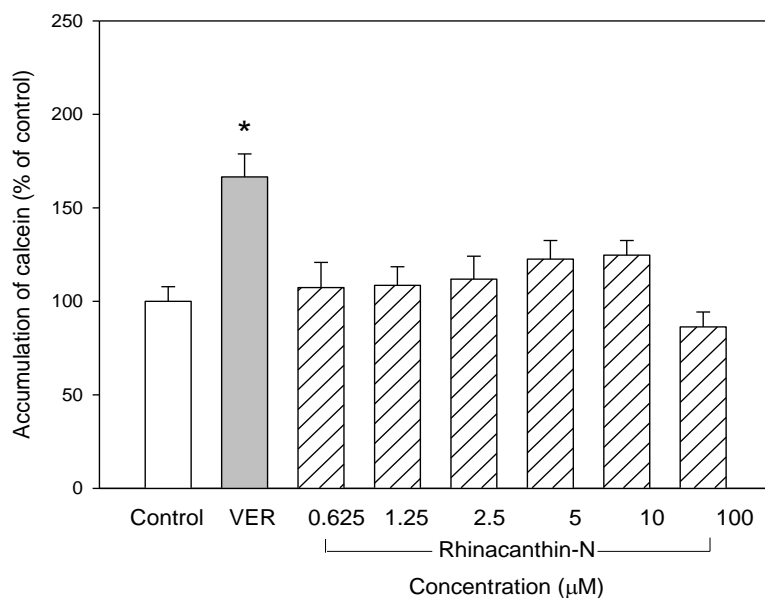


Figure 2 Effect of rhinacanthin-N on P-gp function in the Caco-2 cells. In this experiment, verapamil (VER), a known P-gp inhibitor, at the concentration of 100 μM was used as the positive control. The calcein accumulation was expressed as the percentage of control. Values represented the mean ± SEM (n=3-6). * $P < 0.05$ compared with control.

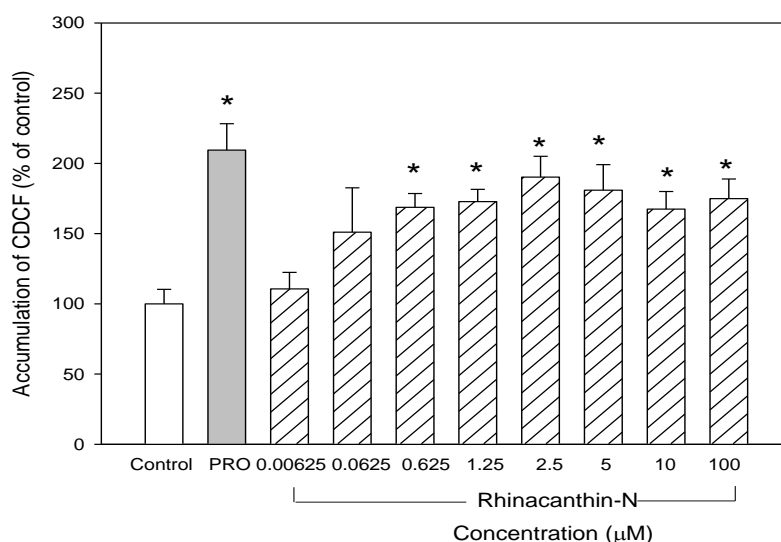


Figure 3 Effect of rhinacanthin-N on MRP2 function in the Caco-2 cells. In this experiment, probenecid (PRO), a known MRP2 inhibitor, at the concentration of 500 μM was used as the positive control. The CDCF accumulation was expressed as the percentage of control. Values represented the mean ± SEM (n=3-6). * $P < 0.05$ compared with control.

Discussion and Conclusion

We demonstrated that rhinacanthin-N was able to inhibit the function of P-gp and MRP2 efflux pumps. Its inhibitory action against P-gp activity was weak and could be reversed at the high concentration. By contrast, the inhibitory effect of rhinacanthin-N was more potent toward MRP2 than toward P-gp activities. The maximum inhibition could be observed at the concentration as low as 0.0625 μ M. Upon increasing the concentration, the inhibition against MRP2 was saturated. It was likely that the molecular structure of rhinacanthin-N was more compatible for its interaction with MRP2 than P-gp. Highly lipophilicity and aromaticity are important structures for binding with both P-gp and MRP2 (Matsson et al., 2009). Certainly, the ligand binding sites of P-gp and MRP2 are differences, which affects the pump specificity.

References

- Fletcher JL, Haber M, Henderson MJ, Norris MD. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nat Rev Cancer*. 2010;10:147-156.
- Glavinas H, Krajcsi P, Cserepes J, Sarkadi B. The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. *Curr Drug Deliv*. 2004;1(1):27-42.
- Hirono S, Nakagome I, Imai R, Maeda K, Kusuhara H, Sugiyama Y. Estimation of the three-dimensional pharmacophore of ligand for rat multidrug-resistance-associated protein 2 using ligand-based drug design techniques. *Pharm Res*. 2005;22(2):260-269.
- Kongkathip N, Luangkamin S, Kongkathip B, Sangma C, Grigg R, Kongsaree P, et al. Synthesis of novel rhinacanthins and related anticancer naphthoquinone esters. *J Med Chem*. 2004;47:4427-4438.
- Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;204:216-237.
- Lim S, Grassi J, Akhmedjanova V, Debiton E, Balansard G, Beliveau R, et al. Reversal of p-glycoprotein-mediated drug efflux by eudesmin from *Haplophyllum perforatum* and cytotoxicity pattern versus diphyllin, podophyllotoxin and etoposide. *Planta Med*. 2007;73(15):1563-7.
- Marchetti S, Mazzanti R, Beijnen JH, Schellens JHM. Concise review: Clinical relevance of drug-drug and herb-drug interactions mediated by the ABC transporters ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Oncologist*. 2007;12:927-941.
- Matsson P, Pedersen JM, Norinder U, Bergström CAS, Artursson P. Identification of novel specific and general inhibitors of the three major human ATP-binding cassette transporters P-gp, BCRP and MRP2 among registered drugs. *Pharm Res*. 2009;26(8):1816-1831.
- Morris ME, Zhang S. Flavonoid-drug interactions: Effects of flavonoids on ABC transporters. *Life Sci*. 2006;78(18):2116-2130.
- Sharom FJ. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics*. 2008;9(1):105-127.
- Siripong P, Kanokmedakul K, Piyaviriyagul S, Yahuafai J, Chanpai R, Ruchirawat S, et al. Antiproliferative naphthoquinone esters from *Rhinacanthus nasutus* Kurz. roots on various cancer cells. *J Trad Med*. 2006;23:166-172.

It was proposed that the primary binding sites of rat MRP2 contained the two hydrophobic sites and the two electrostatically positive sites (Hirono et al., 2005). Considering that the structure of rhinacanthin-N has two hydrophobic regions with hydrogen acceptors and donors (Fig 1), this compound could be favorably accommodated by the primary binding sites of MRP2 more than by those of P-gp. Our findings also suggested that rhinacanthin-N might be able to affect the clearance of MRP2 drug substrates.

Acknowledgement

This work (AS638A) was partially supported by the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand.

- Siripong P, Yahuafai J, Shimizu K, Ichikawa K, Yonezawa S, Asai T, et al. Induction of apoptosis in tumor cells by three Naphthoquinone esters isolated from Thai medicinal plant: *Rhinacanthus nasutus* Kurz. Biol Pharm Bull. 2006;29:2070-2076.
- Takano M, Yumoto R, Murakami T. Expression and function of efflux drug transporters in the intestine. Pharmacol ther. 2006;109:137-161
- Yoo HH, Lee M, Lee MW, Lim SY, Shin J, Kim DH. Effects of Schisandra lignans on P-glycoprotein-mediated drug efflux in human intestinal caco-2. Planta Med. 2007;73(5):444-50.
- Zrieki A, Farinotti R, Buyse M. Cyclooxygenase inhibitors down regulate P-glycoprotein in human colorectal Caco-2 cell line. Pharm Res. 2008;25(9):1991-2001.

RESEARCH ARTICLE

Urinary Excretion of Flavonoids after Ingestion of Guava Juice

Lalita Chomphen¹, Paveena Yamanont¹, Nuntavan Bunyapraphatsara², Noppawan Phumala Morales¹

¹Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

²Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Abstract

The urinary excretion of flavonoids after ingestion of guava juice was determined by an LC-MS/MS method. After overnight fasting, a healthy male volunteer was given a glass of 180 ml of guava juice. Urine samples were collected during 0-6, 6-12 and 12 -24 hours after ingestion. Solid-phase extraction was performed on an OasisTM HLB cartridge (>95% recovery). The chromatographic system was carried out using Hypersil BDS C18 column (250×4.6 mm I.D., 5 µm). The gradient mobile phase composed of 0.1% formic acid in acetonitrile and water, and flow rate was 0.2 ml/min. To determine flavonoids metabolites, β-glucuronidase and aryl sulfatase were used to hydrolyze urine samples before extraction. The results demonstrated that only conjugated metabolites of quercetin, luteolin and kaempferol were excreted in the urine during first 12 hours after ingestion. Quercetin was excreted as glucuronide and sulfate conjugate, accounting for 477 and 760 µg of free quercetin, respectively, while luteolin and kaempferol were excreted only as sulfate metabolites and accounting for 354 and 215 µg of free respective flavonoids. On the basis of these results, urinary excretion of flavonoids may provide a database for further study on bioavailability and health benefits derived from adequate ingestion of guava juice.

Key Words LC-MS/MS, flavonoid, Guava

การขับสารฟลาโวนอยด์ทางปัสสาวะหลังจากรับประทานน้ำฝรั่ง

ลลิตา ชมเพ็ญ¹, ปวีณา ยามานนท์¹, นันทวัน บุญยะประภัศร์², นพวรรณ ภู่มาลา มอราเลส¹

¹ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

²ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ ศึกษาการขับสารฟลาโวนอยด์ทางปัสสาวะหลังจากรับประทานน้ำฝรั่งและตรวจวัดโดยวิธี LC-MS/MS อาสาสมัครสุขภาพดีเพศชายจะได้รับประทานน้ำฝรั่งปริมาณ 180 มิลลิลิตรหลังจากที่อดอาหารข้ามคืน ตัวอย่างปัสสาวะเก็บเป็นช่วงเวลา 0-6, 6-12 และ 12-24 ชั่วโมง หลังจาก รับประทานน้ำฝรั่ง ในการเตรียมตัวอย่างใช้เทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (Solid-phase extraction) โดย OasisTM HLB cartridge ในระบบโครมาโตกราฟีใช้คอลัมน์ Hypersil BDS C18 ในการแยกสาร อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย formic acid ร้อยละ 0.1 ใน acetonitrile และน้ำ ใช้อัตราการไหล 0.2 ไมโครลิตรต่อนาที สำหรับการการตรวจวัดปริมาณเมตาบอไลต์ของสารฟลาโวนอยด์ ตัวอย่างจะนำมาผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสโดยเอนไซม์ β -glucuronidase และ aryl sulfatase ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าระหว่างช่วง 12 ชั่วโมง หลังจากรับประทานน้ำฝรั่งไปแล้ว พบสาร quercetin, luteolin และ kaempferol ถูกขับออกมาในรูปที่เชื่อมต่อกับ glucuronic acid และ sulfate สาร quercetin ที่ขับออกมาจะอยู่ในรูปของ glucuronide และ sulfate ปริมาณ 447 และ 760 ไมโครกรัมตามลำดับ สำหรับ luteolin และ kaempferol จะขับออกมาเฉพาะในรูปของ sulfate มีปริมาณ 354 และ 215 ไมโครกรัมตามลำดับ จากผลการทดลองนี้การขับสารฟลาโวนอยด์ทางปัสสาวะสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลสำหรับการศึกษาดูเกี่ยวกับชีวสมมูลและประโยชน์ทางสุขภาพที่ได้มาจากการบริโภคน้ำฝรั่ง

คำสำคัญ: LC-MS/MS, สารฟลาโวนอยด์, ฝรั่ง

Introduction

Flavonoids are part of a family of naturally occurring polyphenolic compounds characterized by a common benzo- γ -pyrone structure (Garcia and Castillo 2008). The common flavonoids in fruit are kaempferol, myricetin, apigenin, luteolin, hesperitin, naringenin, and quercetin. Flavonoids exhibit anti-cancer (Block 1992), anti-viral (Selway 1986) and anti-inflammatory activity (Middleton et al. 2000). Epidemiological studies have indicated that increasing fruit consumption, especially fruits that are rich in antioxidant compounds, such as flavonoids and dietary fibers, reduces the risk of non-communicable diseases such as cardiovascular disease, cancer and mental health problems due to their protective properties against oxidative damage caused by harmful free radicals produced internally or from the environment (Erlund 2004). Despite high content of flavonoids in diet, it is not necessary that they are active within the body. The factors may due to lower intrinsic activity, poor intestinal absorption, or rapidly metabolism and elimination. Therefore, the knowledge of the bioavailability of flavonoids is thus essential for evaluating their health effects.

This study is aimed to analyze flavonoids content that could be recovered in urine after ingestion of high flavonoids diet, particularly Thai fruits. Guava (fa-rang) is one of the most favorite fruits in Thailand. There are several varieties of guava such as Kim chu and Pan see thong. Guava fruit has benefit to decrease in serum total cholesterol, triglycerides and blood pressures and increase in high-density lipoprotein cholesterol in hypertension patients (Singh et al. 1992). From previous research (Kongkachuichai et al. 2010), guava (Pan see thong) has total flavonoids contain 8,926.69-mg/100 g edible portion and the most abundant of flavonoids is quercetin (3,455.62-mg/100 g edible portion).

Our research, the technique of LC-MS/MS was developed to identify various flavonoids including kaempferol, myricetin, apigenin, luteolin, hesperitin,

naringenin, and quercetin. We expected that analyzing of flavonoids content in urine could reflex the metabolism pathway and the total intestinal absorption of flavonoids. The results may provide useful information for section of Thai fruits as food source of flavonoids.

Materials and Methods

Subjects

This study was carried out in healthy volunteer male/female, age ranges 20-45 year old. All subjects have body mass index between 18-25. They are non-alcohol drinkers, non-smokers and free from any medications at least one week before the study. The study protocol is approved by Ethical Committee on Human Rights of Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University.

Fruit samples

Guava (Pan see thong) was obtained from Simummuang market in Pathumthani. It was washed several times with tap water to ensure that all contaminations were removed and the sample was rinsed again with deionized water. The juice was extracted by Fruits juicer (Moulinex JU2000, France). A glass of guava juice (180 ml) was served to volunteers without any addition. Yield of guava juice was 60 ml/100 g edible portion.

Study design

Volunteers were an overnight fasting and urine sample was collected during 24 hours before day of study. At the appointed date, servings of guava juice 180 ml will be given to subject following with 200 mL water. Beverages containing alcohol and caffeine are prohibited during the test period. Urine samples were collected at interval 0-6, 6-12, 12-24 hours in plastic bottle containing 70 mg of ascorbic acid per 100 ml of urine. After filtration urine will be stored at -20°C until the analysis. Subject had lunch and dinner, which not contain fruits and vegetables at 4 and 12 after ingestion of juice.

Urine sample preparation

The volume of urine samples were measured and then centrifuged at 3500 rpm to remove the precipitate. Ten milliliter of each sample was collected for freeze drying (Pirani 501, Thermo electron corporation, USA). Powder was re-dissolved in 3 ml of 0.5 M phosphoric acid before performed extraction on solid phase using OasisTM HLB cartridge (30 mg; Milford, MA, USA). The sample was eluted with 3 ml of methanol and then evaporated at 37°C in speed vacuum concentrator (SAVANT Model SC210A, Thermo electron corporation, USA). The residue was reconstituted with 200 µl of mobile phase and 10 µl was injected to liquid chromatographic system to determine content of flavonoids.

Quantitative analysis of flavonoids in urine by LC-MS/MS

This system was carried out using Hypersil BDS C18 column (250 × 4.6 mm I.D., 5 µm) (Thermo scientific, USA). The mobile phase composed of 0.1% formic acid in water (A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (B). Separations were effected by a gradient using a flow rate 0.2 ml/min as follow: elution starting with 70% A, 5-10 min; 60% A, 15-17 min; 50% A, 19 min; 60% A, 25-45 min; 70% A. Column eluent was directed into a ESI/ion trap mass spectrometer (Agilent 1100 series, Germany). Mass were run in positive ion mode solution using a capillary voltage of 25 eV and capillary temperature 350°C. Absorbance was recorded by PDA (Bruker esquire HCT series, Germany) at wavelength of 200-400 nm.

Quantitative analysis metabolites of flavonoids in urine

Conjugated metabolites of flavonoids, glucuronic acid and sulfate conjugates, were determined in the urine after hydrolyzing by β-glucuronidase (type B-I) and aryl sulfatase (3507 90 90), respectively, at 37°C for 16 hr. After hydrolysis the urine samples were performed as the above described procedure.

Calibration curve

A calibration curve was constructed in urine by adding the standard flavonoids (kaempferol, myricetin, apigenin, luteolin, hesperitin, naringenin, and quercetin) into urine and then performed the extraction as the above described procedure. Calibration of the all compounds gave a linear signal ($r^2 > 0.991$) over rang of 1-100 ng. The lower limit of quantification was approximately 5 ng in urine.

Results

After an overnight fasting, there was no detectable amount of flavonoids and their metabolites recovered in urine (data not showed). After guava juice ingestion, quercetin ($m/z = 303$, $RT = 28.7$ min), luteolin ($m/z = 287$, $RT = 27.8$ min) and kaempferol ($m/z = 287$, $RT = 33.7$ min) were found in the urine. The structure of flavonoids was confirmed by product mass using $m/z = 257, 258$ and 241 for quercetin, luteolin and kaempferol, respectively. Our results demonstrated that flavonoids excreted in the urine as conjugated metabolites (Figure 1 and 2). There was no free flavonoid found in urine. Glucuronic conjugated quercetin was about 128 and 349 µg recovered during first and second 6 hours after juice ingestion, respectively. Total amount of its sulfate conjugated was 403 and 357 µg found during 0-6 and 6-12 hours after ingestion. Luteolin and kaempferol were excreted in urine only as sulfate conjugated metabolites. Their total amounts were 354 and 215 µg, respectively at only the first 6 hours after ingestion. There was no flavonoids excretion in urine after 12 hour of ingestion.

Discussion

Naturally, flavonoids from fruits occur mainly as glycoside. Flavonoid glycosides are absorbed by two pathways, first flavonoids glycoside themselves pass though sodium dependent glucose transporter 1 or they are hydrolyzed by lactase phlorizin hydrolase before absorption.

In enterocytes, flavonoids glycoside can be hydrolyzed by β -glucosidase enzyme to aglycone. Flavonoids aglycone then future undergo phase II metabolism to form methylate, glucuronide and sulfate derivatives (Prasain and Barnes 2007). Metabolites of flavonoids may follow 2 pathways of excretion, via the biliary or the urinary.

Our study demonstrated that all of flavonoids were excreted as conjugated metabolites, mainly sulfate metabolites. The total contents of quercetin, luteolin and kaempferol recovered in urinary excretion were 1237, 354 and 215 μ g, respectively, suggesting that the high amount of flavonoids were absorbed into circulation. Further study related to the benefit of dietary flavonoids will be evaluated.

Conclusion

On the basis of these results, flavonoid in urinary excretion provide a database for further study on bioavailability and health benefits derived from adequate ingestion of guava juice.

Acknowledgements

This study is supported by a Research Grant (No RDG5320050) from Thailand Research Fund (TRF).

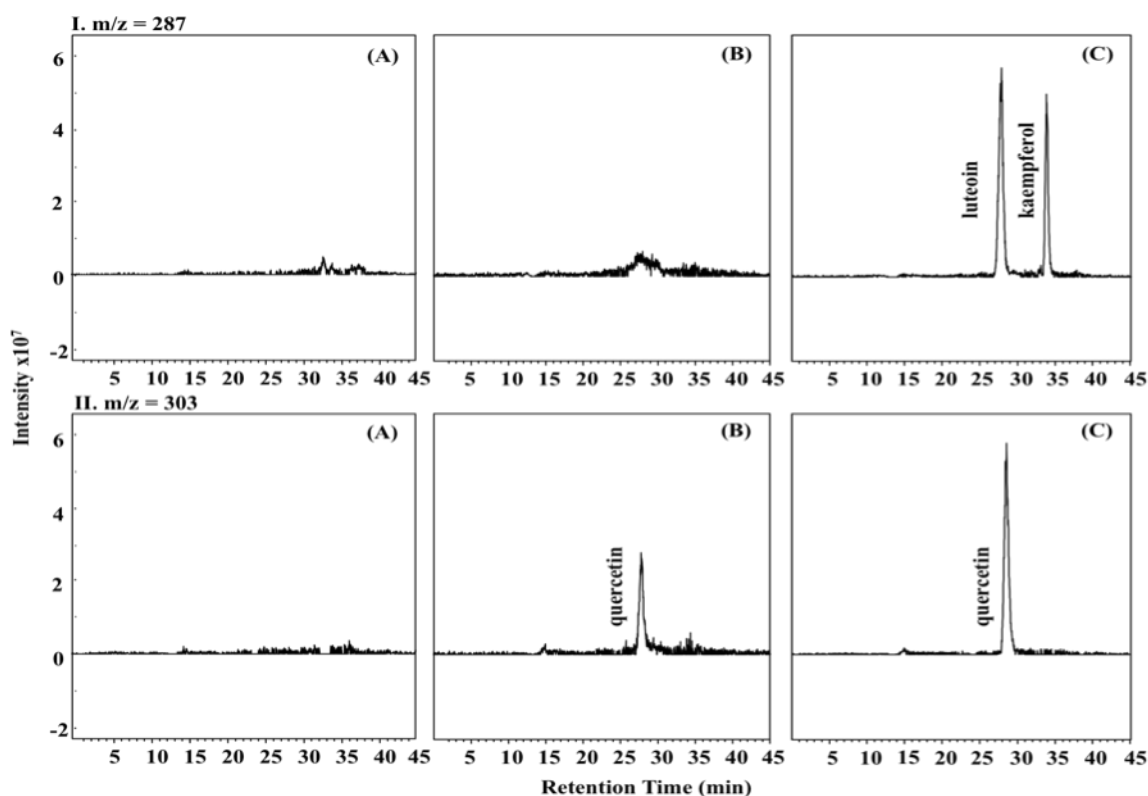


Figure 1 LC-MS/MS chromatograms of flavonoid in urine at I. $m/z=287$ (luteolin and kaempferol) and II. $m/z=303$ (quercetin) without enzyme hydrolysis (A), after hydrolyzed with β -glucuronidase (B) and after hydrolyzed with aryl sulfatase (C). The chromatograms obtained from a volunteer 6 hours after ingestion guava juice.

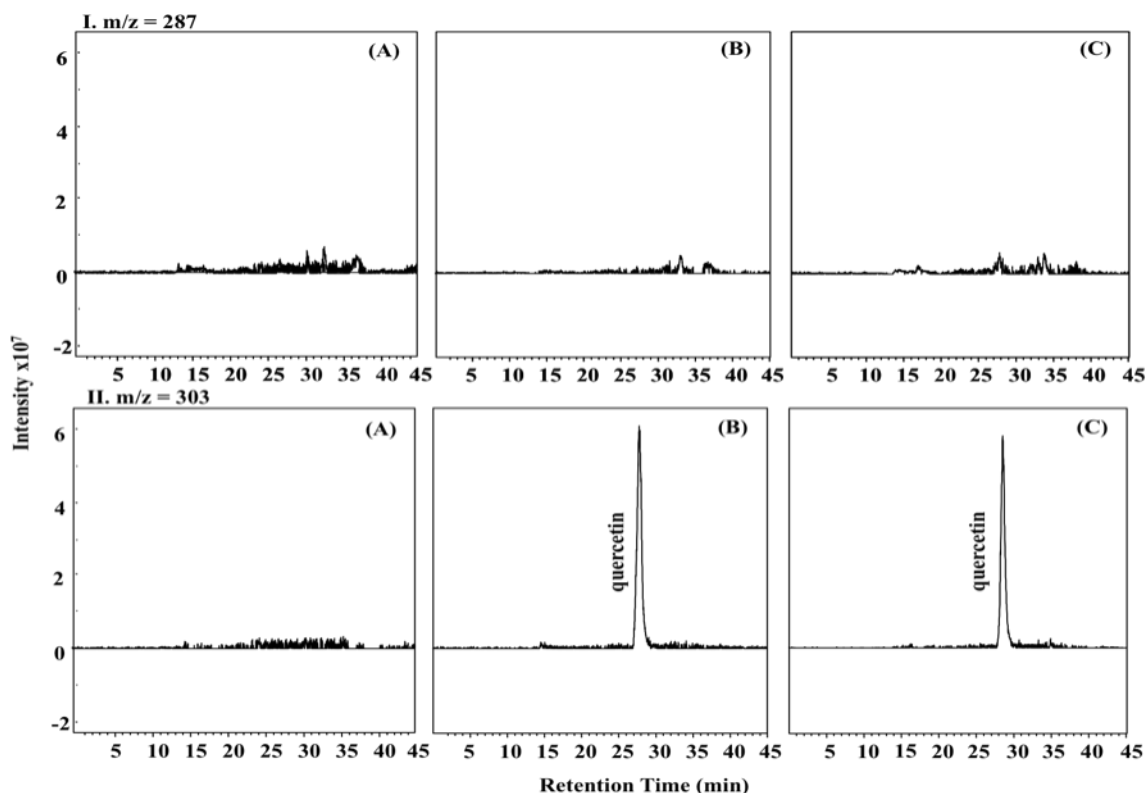


Figure 2 LC-MS/MS chromatograms of flavonoid in urine at I. $m/z=287$ (luteolin and kaempferol) and II. $m/z=303$ (quercetin) without enzyme hydrolysis (A), after hydrolyzed with β -glucuronidase (B) and after hydrolyzed with aryl sulfatase (C). The chromatograms obtained from a volunteer 12 hours after ingestion guava juice.

References

- Block G. The data support a role for antioxidants in reducing cancer risk. *Nutr Rev.* 1992; 50(7):207-213.
- Erlund I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutr Res.* 2004; 24(10):851-874.
- Garcia B, Castillo J. Update on Uses and Properties of Citrus Flavonoids: New Findings in Anticancer, Cardiovascular, and Anti-inflammatory Activity. *J Agric Food Chem.* 2008; 56(15):6185-6205.
- Kongkachuichai R, Charoersiri R, Sungpuag P. Carotenoid, flavonoid profiles and dietary fiber contents of fruits commonly consumed in Thailand. *J Food Sci and Nutr.* 2010; 61(5):536-548.
- Middleton E, Kandaswami J, Theoharides C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.* 2000; 52(4):673-651.
- Prasain JK, Barnes S. Metabolism and bioavailability of flavonoids in chemoprevention: current analytical strategies and future prospectus. *Mol Pharm.* 2007; 4(6): 846-864.
- Selway J. W. Antiviral activity of flavones and flavanones. *Prog Clin Biol Res.* 1986; 213:521-536.
- Singh Ram B, Rastogi Shanti S, Singh Reema, Niaz Mohammad A. Effects of guava intake on serum total and high-density lipoprotein cholesterol levels and on systemic blood pressure. *J of Cardio.* 1992; 70(15):1287-1291.

RESEARCH ARTICLE

Anti-nociceptive Effects of Standardized Extract of *Centella asiatica* ECa 233 in Tail flick Test

Pataweekorn Ketkomol¹, Pasarapa Towiwat², Boonyong Tantisira^{2,3}, Mayuree H. Tantisira^{2,4}

¹Interdepartmental Program of Pharmacology, Chulalongkorn University, Bangkok 10330 Thailand

²Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330 Thailand

³Present Address: Faculty of Pharmacy, Silapakorn University, Nakornpathom 73000 Thailand

⁴Present Address: Faculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University, Chonburi 20131 Thailand

Abstract

The purpose of this study was to evaluate anti-nociceptive effect of Standardized Extract of *Centella asiatica* ECa 233 (ECa 233) at various doses in male ICR mice. The Tail flick latencies (cut-off 4 sec) were determined in experimental animals prior to the administration of 0.9% normal saline solution (NSS; 10 ml/kg, i.p.), morphine (MO; 10 mg/kg, i.p.), 0.5% carboxymethylcellulose (CMC; 10 ml/kg, p.o.), or various doses of ECa 233 (10, 30, 60, 100 and 300 mg/kg, p.o.) and were subsequently determined at 15, 30, 45, 60, 90, 120 and 240 min after the administration of the test compounds. The percentage of maximum possible effect (%MPE) was calculated and used in the determination of the area of analgesia (%MPE-min). It was found that morphine significantly ($p < 0.001$) increased Tail flick latency producing an area of analgesia of 15461.03 ± 942.02 %MPE-min compared with that of normal saline solution (NSS), -59.89 ± 633.29 %MPE-min. Furthermore, in comparison to vehicle, 0.5% CMC, orally given ECa 233 apparently exhibited analgesic activity in a dose-dependent manner and significant increased of Tail flick latency were observed at the dose of 100 and 300 mg/kg with %MPE-min of 4147.36 ± 840.82 %MPE-min. ($p < 0.05$) and 6334.49 ± 1650.82 %MPE-min. ($p < 0.001$), respectively. The results obtained clearly demonstrated central analgesic activity of ECa 233 at the spinal levels. Further studies are required to delineate the underlying mechanisms.

Key Words Anti-nociception, Standardized extract of *Centella asiatica* ECa 233, Tail flick test

ฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 โดยวิธี Tail flick

ปฐวีณกร เกษโกมล¹, ภัสราภา โตวิวัฒน์², บุญยงค์ ตันตสิระ^{2,3}, มยุรี ตันตสิระ^{2,4}

¹ สหสาขาเภสัชวิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

² ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

³ ที่อยู่ปัจจุบัน: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม 73000

⁴ ที่อยู่ปัจจุบัน: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ในขนาดต่างๆ ในหนูเมาส์ สายพันธุ์ ICR เพศผู้ บันทึกระยะเวลาที่หนูเมาส์ทนต่อความร้อนได้โดยไม่กระดกหางหนี (Tail flick latencies) ในแต่ละครั้ง โดยให้เวลาสูงสุด (cut-off time) ไม่เกิน 4 วินาที ก่อนให้น้ำเกลือ 0.9% มอร์ฟีน คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (0.5%) หรือ อีซีเอ 233 ในขนาด 10, 30, 60, 100 และ 300 มก./กก. โดยการป้อนทางปาก บันทึกเวลาที่หนูสามารถทนต่อความร้อนได้โดยไม่กระดกหางหนี ที่เวลา 15, 30, 45, 60, 90, 120 และ 240 นาที หลังให้สารทดสอบ นำค่าที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์สูงสุดที่หนูสามารถทนต่อความร้อนได้ (%MPE) และคำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟระหว่าง %MPE กับเวลา (area of analgesia) พบว่า มอร์ฟีนมีฤทธิ์ระงับปวดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งได้รับน้ำเกลือ โดยมีค่า area of analgesia เท่ากับ 15461.03 ± 942.02 %MPE-min และ -59.89 ± 633.29 %MPE-min ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังพบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำกระสายยา อีซีเอ 233 แสดงฤทธิ์ระงับปวดในลักษณะที่มีความสัมพันธ์กับขนาดยา และออกฤทธิ์ระงับปวดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติใน ขนาด 100 และ 300 มก./กก. ซึ่งมีค่า area of analgesia เท่ากับ 4147.36 ± 840.82 %MPE-min ($p < 0.05$) และ 6334.49 ± 1650.82 %MPE-min ($p < 0.001$) ตามลำดับ ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นโดยชัดเจนว่า อีซีเอ 233 มีฤทธิ์ระงับปวดต่อระบบประสาทส่วนกลางที่ระดับไขสันหลัง และควรมีการศึกษาต่อไปถึงกลไกการออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้อง

คำสำคัญ: ฤทธิ์ระงับปวด, สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233, Tail flick test

Introduction

Pain are common problems exerting impact on lifestyles and health of human being. Many analgesics including acetaminophen and indomethacin, nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), are available for treatments of these symptoms, albeit, on the expense of various adverse effects especially when being used for long term treatment (Jongchanapong et al. 2010). Therefore, new analgesics with improving safety profiles or lacking of adverse effects including those derived from plants are extensively evaluated (Jongchanapong et al. 2010). Our attention is accordingly focused on the investigation of the efficacy of standardized extract of *Centella asiatica* ECa 233 (ECa 233).

Centella asiatica (L.) Urban (Umbelliferae) is a medicinal herb that has long been used in Asia. Its major constituents are mainly triterpenoids including asiaticoside, madecassoside, asiatic and madecassic acids (Jamil et al. 2007). Previous studies have shown anti-nociceptive activity of the crude extracts of *C.asiatica* in mice (Somchit et al. 2004). Furthermore studies suggested that triterpenoids, bioactive constituents of the crude extract of *C.asiatica*, could be responsible for the anti-nociceptive activities observed (Inamdar et al. 1996). Though, *C.asiatica* is one of the most extensively-studied plant, a great variation of compositions and characteristics of the test substances sometimes led to incomparable results and difficulty in further development to clinical application (Brinkhaus et al. 2000).

To avoid such problems, ECa 233 with well-defined characteristics has been established and subjected to extensive pharmacological and safety evaluation (Tantisira 2011). ECa 233 is defined as a white to off-white powder of *C.asiatica* extract containing not less than 80% of triterpenoids with the madecassoside/ asiaticoside ratio between $1.50 \pm 0.05:1$ (Tantisira 2008). Orally given ECa 233 has shown benefit in improving learning and memory deficit, acceleration of wound

healing and gastro-protective effect in experimental animals (Kam-eg et al. 2009, Wannarat et al. 2009, Tantisira et al. 2010, Yoomuang et al. 2010). In addition, ECa 233 demonstrated a favorable safety profile in both acute and sub-chronic toxicity testing (Chivapat et al. 2011). Further investigation in human subjects with mild aphthous ulcers showed that oral paste containing ECa 233 significantly reduced ulcer size and shortened time to achieve complete healing. Interestingly, pain score as well as inflammation associated with the ulcers were significantly reduced (Ruengprasertkit et al. 2010). We therefore, considered to investigate further on analgesic effects of ECa 233 in animal mode of Tail flick test.

Materials and Methods

Animals

Male ICR mice weighing 18-25 g from the National Laboratory Animal Centre, Mahidol University, Salaya, Nakornprathom, Thailand were used in the study. The animals were housed in the animal facility of the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University under standard conditions of temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), 50-60% of humidity and 12 hr/12 hr light/dark cycles. Food and water were given adlibitum. They were acclimatized for one week prior to the experiments. The experimental protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

Preparation of the test compound

ECa 233 contain not less than 80% of triterpenoids with madecassosid and asiaticoside ratio between $1.50 \pm 0.05:1$ was prepared by Associate Professor Ekarin Saifah, Ph.D and collaborates at the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. It was suspended in 0.5% carboxymethylcellulose (0.5%CMC) and fed to the animals by gavage tubing.

Drugs and chemicals

Morphine sulphate (MO) was dissolved in 0.9% sodium chloride solution (NSS). All chemicals reagents were obtained from Sigma Chemicals, Dorset, England.

Tail flick test

These studies employed the Tail flick assay described by D'Amour and Smith in 1941. Male ICR mice (N=10 per group) were placed in individual Plexiglas restrainers with an opening to allow the tail to protrude. Each tail rested in a shallow groove housing a light sensitive sensor. A beam of radiant heat (24 V, high amperage 150-watt light bulb situated 8 cm above the tail) was aimed at the mid of a dorsal portion of the distal part of the mouse's tail that has been blackened by the length of 1 cm by a black ink marking pen. The device (Harvard Tail flick Analgesia meter) automatically recorded the latency between the onset of the light beam stimulus and the response to heat. The maximum duration of each test was set at 4.0 sec to minimize the potential for thermal injury.

The stimulus intensity was set so that the baseline Tail flick latencies were approximately 1.0-1.5 sec, and the intensity remained constant throughout the experiment. Animals failing to respond within 1.5 sec were excluded from testing. On the day of testing, all animals were tested for 3 pre-drug Tail flick baselines conducted at 10-15 min intervals. The average score of the last two trials served as the baseline measure for each animal.

Immediately after the third baseline trial of the Tail flick test, vehicle (NSS; 10 ml/kg) i.p. morphine sulphate (MO; 10 mg/kg) i.p. or 0.5% CMC and various doses of ECa 233 (10, 30, 60, 100, 300 mg/kg) p.o. were administered. Tail flick latencies were recorded at 15, 30, 45, 60, 90, 120 and 240 min after the administration of the test compound. The time-course of the Tail flick latency was expressed as the mean percentage of maximum possible effect (%MPE) according to the following formula:

The area of analgesia for the Tail flick assays was derived by computing the area under the corresponding 0-240 min time-course-%MPE curves; areas were calculated using the trapezoidal rule.

$$\%MPE = \frac{(\text{post-drug latency}) - (\text{predrug latency})}{(\text{cut-off time}) - (\text{predrug latency})} \times 100$$

where the cut-off time was set at 4 sec.

Analysis of Data

The results are expressed as means \pm standard error of the mean (S.E.M.) Differences in mean values between groups were analyzed by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a post-hoc Tukey HSD test (SPSS version 18.0 for windows). $P < 0.05$ was considered as statistical significance.

Results

Analgesic activity of morphine

In comparison to NSS, significant ($p < 0.001$) analgesic activity of intraperitoneally given MO, assessed from

Tail flick latency during the period of 240 min following drug administration, was observed from 15 to 120 min (Figure 1). Area of analgesia was found to be -59.89 ± 633.29 and 15461.03 ± 942.02 %MPE-min. in mice receiving vehicle (NSS; 10 ml/kg) and morphine (MO; 10 mg/kg), respectively (Figure 3).

Analgesic activity of ECa 233

As shown in Figure 2, orally administered standardized extract of ECa 233 (10, 30, 60, 100 and 300 mg/kg) tended to exhibit analgesic activity, seen as an increase of Tail flick latency, in a dose dependent manner. In comparison to

0.5%CMC which is a vehicle serving as a negative control, significant analgesic effect of ECa 233 was noted at the doses of 100 ($p<0.05$) and 300 ($p<0.001$) mg/kg produced area of analgesia of 4147.36 ± 840.82 and 6334.49 ± 1650.82 %MPE-min, respectively. Apparently, analgesic activity of ECa 233 was relatively weaker than that of MO (Figure 3). However, it should be noted that onset of analgesic activity of ECa 233 in all tested doses, except that of ECa 233 at the dose of 300 mg/kg, was delayed than that of intraperitoneally given MO. Analgesic activity of ECa 233 at the dose of 300 mg/kg was rapidly noted at the same time as did MO (15 min after the administration of the test compound). However, longer duration of analgesic activity (15-240 min) than that of MO (15-120 min) was demonstrated by ECa 233 at the dose of 300 mg/kg (Figure 2).

Discussion and Conclusion

The present study demonstrated the anti-nociceptive effects of ECa 233 using acute pain model of Tail flick test in mice which is mostly sensitive to spinal reflex, a central analgesic activity at the level of spinal cord (Vogel 2002, Harris et al. 1969). In agreement with previous report, morphine, a narcotic analgesic drug exhibited significant analgesic effect in the Tail flick test (Malhotra et al. 1997). Increase of K^+ conductance and/or decreasing Ca^{2+} conductance have been proposed to underlie an increase of Tail flick latency by morphine (Malhotra et al. 1997, Verma et al. 1997).

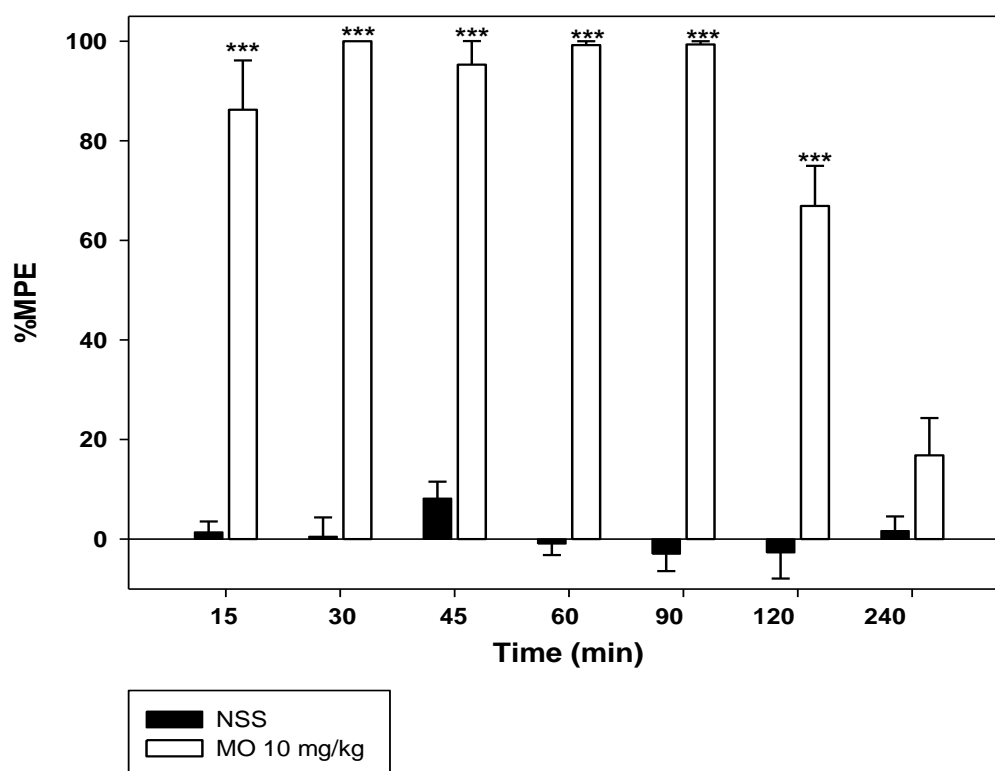


Figure 1

Individual time courses of the response (%MPE versus time (min)) after intraperitoneal administration of normal saline solution (NSS; 10 mg/kg) and morphine sulphate (MO; 10 mg/kg).

Results are expressed as means \pm SEM, N=10 for all groups.

*** $p<0.001$ significantly different compared to NSS

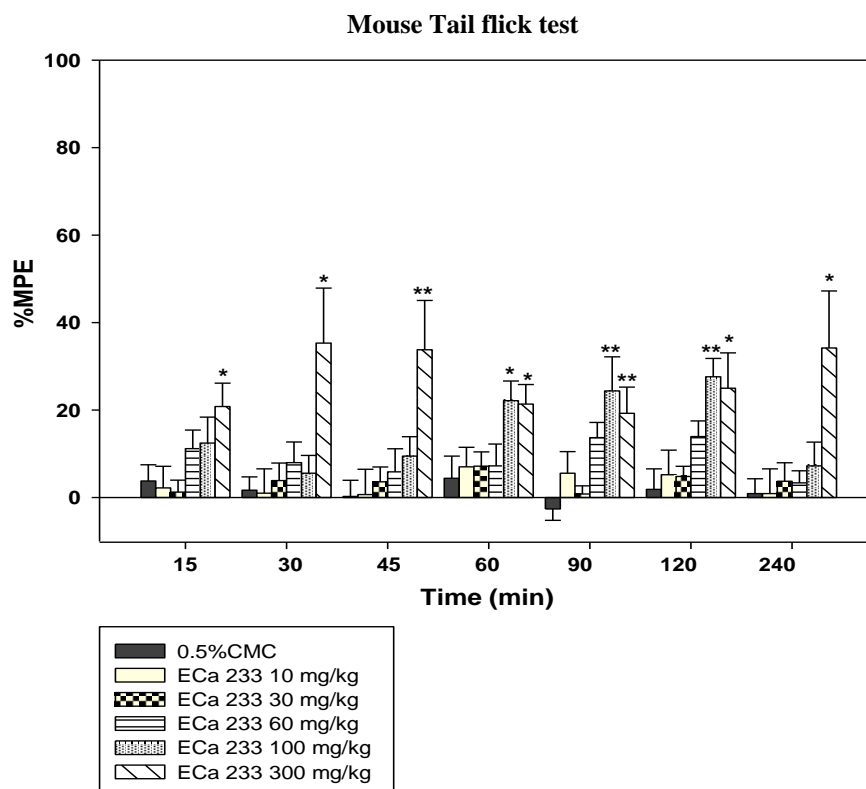


Figure 2

Area of analgesia (%MPE-min) from 0-240 minutes after oral administration of 0.5% carboxymethylcellulose (0.5%CMC; 10 ml/kg) and ECa 233 at various doses (10, 30, 60, 100 and 300 mg/kg) respectively in mice.

Results are expressed as means \pm SEM, N=10 for all groups.

* $p < 0.05$ significantly different compared to CMC

** $p < 0.01$ significantly different compared to CMC

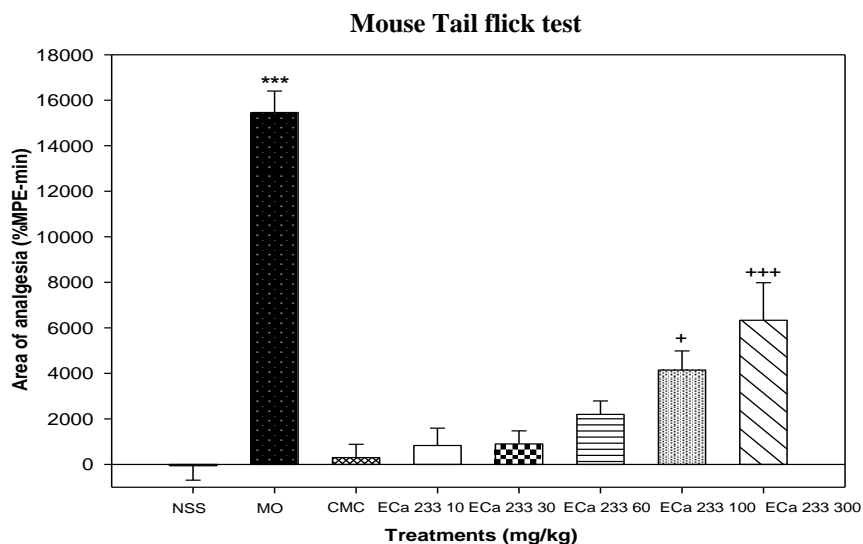


Figure 3

Area of analgesia (%MPE-min) from 0-240 minutes after administration of normal saline solution (NSS; 10 mg/kg, i.p.), morphine sulphate (MO; 10 mg/kg, i.p.), 0.5% carboxymethylcellulose (0.5%CMC; 10 ml/kg, p.o.) and various doses of ECa 233 (10, 30, 60, 100 and 300 mg/kg, p.o.) respectively in mice.

Results are expressed as means \pm SEM, N=10 for all groups.

+ $p < 0.05$ significantly different compared to CMC

++ $p < 0.001$ significantly different compared to CMC

*** $p < 0.001$ significantly different compared to NSS

Anti-nociceptive effect of *C. asiatica* in response to noxious thermal stimulation has been previously reported in the hot-plate tests in mice, another animal model sensitive to central analgesic activity (Somchit et al. 2004). Additionally, application of oral paste containing ECa 233 significantly reduced pain score of mouth ulcers in humans (Ruengprasertkit et al. 2010). In line with these findings, the present study demonstrated significant analgesic activity of ECa 233 in Tail flick test. Based on the results obtained, a cerebral analgesic activity at the spinal level of ECa 233 is suggestive. Though, anti-nociceptive effect of ECa 233 have been proposed to associate with high content of triterpenoids such as asiaticoside and madecassoside (Yadava and Kumar 1999), however, no attempt has been made to clarify the significance of each individual.

As morphine is generally recognized as a strong centrally acting analgesic (Harris et al. 1969), it is not surprising to observe comparatively less potent analgesic activity of ECa 233.

References

- Brinkhaus B, Lindner M, Schuppan D, Hahn EG. Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant *Centella asiatica*. *Phytomedicine*. 2000; 7:427-448.
- Chivapat S, Chavalittumrong P, Tantisira MH. Acute and sub-chronic toxicity studies of a standardized extract of *Centella asiatica* ECa 233. *Thai J Pharm Sci*. 2011; 35:55-64.
- D'Amour FE, Smith DL. A method for determining loss of pain sensation. *J Pharm Exp Ther*. 1941; 72(1):74-79.
- Harris LS, Dewey WL, Howes JF, Kennedy JS, Pars H. Narcotic-antagonist an analgesics: Interactions with cholinergic systems. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1969; 169(1):17-22.
- Inamdar PK, Yeole RD, Ghogare AB, De Souza NJ. Determination of biologically active constituents in *Centella asiatica*. *J Chromatography A*. 1996; 742:127-130.
- Jamil S, Nizami Q, Salam M. *Centella asiatica* (Linn.) Urban review. *Natural Product Radiance*. 2007; 6(2):158-170.
- Jongchanapong A, Singharachai C, Palanuvej C, Ruangrunsi N, Towiwat P. Antipyretic and Anti-inflammatory effects of Ben-Cha-Lo-Ka-Wi-Chian remedy. *J Health Res*. 2010; 24:15-22.
- 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 induced by induced by an intracerebroventricular injection of β -amyloid peptide in mice. *Thai J Pharmacol*. 2009; 31:79-82.
- Malhotra RS, Khanna N, Patni SK, Sharma KK. Antinociceptive activity of potassium channel openers and morphine: A common mechanism of action. *Indian Journal of Pharmacol*. 1997; 29:57.
- Mark A, Chancy MD. Review Article: Side effects of intrathecal and epidural opioids. *Canadian Journal of anaesthesia*. 1995; 42:891-903.
- Ruengprasertkit C, Hongprasong N, Tantisira B, Tantisira MH. Preliminary study of effects of a standardized extract of *Centella asiatica* ECa 233 on minor aphthous ulcers. *CU Dent J*. 2010; 33:131-142.

However, in consideration to addiction and strong depression of respiration that may consequently result from high dose of morphine in relation to longer duration of analgesic activity and the very favorable safety profiles of ECa 233 (Mark and Chancy 1995, Chivapat et al. 2011). It is worthwhile to investigate further on the analgesic effect of ECa 233 emphasizing on the active constituent responsible for the analgesic effect observed as well as its underlying mechanisms.

Acknowledgement

We would like to thank Associate Professor Ekarin Saifah, Ph.D and collaborates for their generous supply of ECa 233, Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for the laboratory facilities and the Graduate School of Chulalongkorn University for financial support of the present study.

- Somchit MN, Sulaiman MR, Zuraini A, Samsuddin L, Somchit N, Israf DA, et al. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of *Centella asiatica*. *Indian J Pharmacol*. 2004; 36:377-380.
- Tantisira, MH. Bioactive standardized extract of *Centella asiatica* ECa 233. Proceeding of the 8th NRCT-JSPS Joint Seminar; 2008 December 3-4; Bangkok. Thailand; 2008. p. 25.
- Tantisira MH, Tantisira B, Patarapanich C, Suttisri R, Luangcholatan S, Mingmalairak S, et al. 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. *Thai J Pharmacol*. 2010; 32(2):22-33.
- Tantisira MH. Standardized Extract of *Centella asiatica* ECa 233: Success & Failure. Proceeding of the 33rd Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand Meeting; 2011 March 17-19; Hat Yai, Songkhla. Thailand; 2011. p. 40.
- Verma V, Mediratta P, Sharma KK. Interaction of mu and kappa agonists with calcium channel blockers in experimental pain models. *Indian J Pharmacol*. 1997; 29:45.
- Vogel HG, editor. *Drug Discovery and Evaluation*. 2nd ed. New York: Springer; 2002. p. 694-696.
- Wannarat K, Tantisira MH, Tantisira B. Wound Healing Effects of a Standardized Extract of *Centella asiatica* ECa 233 on Burn Wound in Rats. *Thai J Pharmacol*. 2009; 31(1):120-123.
- Yadava RN, Kumar S. A novel isoflavone glycoside from the leaves of *O' S.indicus*. *Fitoterapia*. 1999; 70(2):127-129.
- Yoomuang P, Suthisri R, Tantisira B, Tantisira MH. Pilot studies on gastro-protective effect of a standardized extract of *Centella asiatica* ECa 233 in rats. Proceeding of the 9th NRCT-JSPS Joint Seminar; 2010 December 8-9; Bangkok. Thailand; 2010. p. 249.

RESEARCH ARTICLE

Effects of the Standardized Extract of *Centella asiatica* ECa233 on KCN-Inhibited Mitochondrial Respiration in Mouse Brain

Nattanan Losuwannarak¹, Boonyong Tantisira^{1,2}, Mayuree H. Tantisira³, Ratchanee Rodsiri¹

¹Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

²Present address: Faculty of Pharmacy, Silapakorn University, Nakornpathom 73000, Thailand

³Present address: Faculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand

Abstract

Inhibition of mitochondrial cytochrome *c* oxidase by β -amyloid peptide had been reported to be the first circumstance in neuron in which led to respiration of mitochondria defects. This study aimed to investigate the effects of ECa233 on the respiration of isolated mouse brain mitochondria in which cytochrome *c* oxidase was inhibited by potassium cyanide (KCN). IC₅₀ concentration of KCN found in this study was 0.3 mg/ml. Firstly, we determined the effects of ECa233 on the respiration of mitochondria by incubating the mitochondria with 5 concentrations of ECa233 (10, 25, 50, 75 and 100 mg/ml). The results showed no toxic effect of ECa233 on the oxygen consumption rate of mitochondria. After that, the effects of ECa233 on the mitochondrial function were examined by incubating the mitochondria with KCN followed by different concentrations (10, 25, 50, 75 and 100 mg/ml) of ECa233. The data showed no improvement on the KCN-induced depression of oxygen consumption rate of mitochondria. The results indicated that ECa233 did not recover neuron via cytochrome *c* oxidase. It is suggested that further studies on ECa233 mechanism is needed.

Key Words standardized extract of *Centella asiatica* ECa233, cytochrome *c* oxidase, brain mitochondria, oxygen consumption

ผลของสารสกัดบัวบกมาตรฐาน อีซีเอ 233 ต่อกระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรียในสมองหนูเมาส์ที่ถูกยับยั้งด้วย KCN

ณัฐนันท์ โล่สุวรรณรักษ์¹, บุญยงค์ ตันติสิระ^{1,2}, มยุรี ตันติสิระ³, รัชณี รอดศิริ¹

¹ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

²ที่อยู่ปัจจุบัน: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม 73000

³ที่อยู่ปัจจุบัน: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131

บทคัดย่อ

จากรายงานที่กล่าวว่า กลไกการเกิดโรคอัลไซเมอร์เริ่มต้นจากความบกพร่องในการทำงานของไมโทคอนเดรียโดยเชื่อว่าเกิดจากการที่ cytochrome c oxidase ถูกยับยั้งโดยเบตาอะมัยลอยด์ การทดลองนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบัวบกมาตรฐานอีซีเอ233 (ECa233) ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียซึ่ง cytochrome c oxidase ถูกยับยั้ง โดยแยกไมโทคอนเดรียจากสมองส่วนหน้าของหนูเมาส์มาวัดอัตราการใช้ออกซิเจนและคำนวณเป็นค่า RCI ใช้ potassium cyanide (KCN) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งจำเพาะต่อ cytochrome c oxidase จากการศึกษาพบว่า KCN มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.3 มก./มล. เมื่อทดสอบผลของ ECa233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียโดยการใส่ ECa233 ความเข้มข้นต่างๆ (10, 25, 50, 75 และ 100 มก./มล.ใน DMSO) ลงในไมโทคอนเดรีย พบว่า ECa233 ไม่มีผลต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย ส่วนการทดสอบผลของ ECa233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียที่ถูกยับยั้งด้วย KCN พบว่า ECa233 ทุกความเข้มข้น (10, 25, 50, 75 และ 100 มก./มล.ใน DMSO) ไม่สามารถช่วยเพิ่มอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียที่ถูกยับยั้งด้วย KCN ได้ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ากลไกการช่วยฟื้นฟูเซลล์ประสาทของ ECa233 ไม่ผ่านการช่วยแก้ไขการทำงานของ cytochrome c oxidase ดังนั้น อาจต้องมีการศึกษากลไกการทำงานของ ECa233 ผ่านกระบวนการอื่นๆ ของเซลล์ต่อไป

คำสำคัญ: standardized extract of *Centella asiatica* ECa233, cytochrome c oxidase, brain mitochondria, oxygen consumption

Introduction

Centella asiatica (Linn.) is used in Ayurvedic medicine for dementia (Kumar and Gupta 2002). Previous studies showed that the standardized extract of *Centella asiatica* ECa233 improved memory deficits in mice models of stroke (Sukvichai et al. 2011) and Alzheimer's disease induced by β -amyloid i.c.v. injection (Kam-Eg et al. 2009). In addition, both studies demonstrated that ECa233 significantly reduced hippocampal cell loss. This was partly due to the antioxidant effect of ECa233.

The inhibition of mitochondrial cytochrome c oxidase by β -amyloid was proposed as early target site of β -amyloid toxicity in Alzheimer's disease (Canevari et al. 1999, Cardoso et al. 2001). As ECa233 mechanism of action was not observed, the involvement of ECa233 in function loss of mitochondrial cytochrome c oxidase *in vitro* was investigated in the present study. KCN was used to selectively inhibit mitochondrial cytochrome c oxidase.

Materials and Methods

Male ICR mice weighing 25-30 g (National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Nakornpathom) were used. Mice were kept in a constant 12/12 h light/dark cycle and 25 ± 2 °C room temperature. Food and water were available ad libitum. All experimental procedure was approved by Local Ethic Committee. The standardized extract of *Centella asiatica* ECa233 was prepared by Associate Professor Dr. Ekarin Saifah, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University. ECa233 used in this experiment was suspended in DMSO to 5 concentrations; 10, 25, 50, 75 and 100 mg/ml. The mitochondrial isolation method was modified from Thoopmongkon and Rodsiri (2011). Briefly, mouse was sacrificed by decapitation. Brain was rapidly removed and cerebrum was dissected. Two cerebrums were pooled in 10 ml isolation medium (250 mM sucrose, 10 mM Tris, 2 mM EDTA and BSA 1 mg/ml, pH7.4) and then homogenized thoroughly.

Mice brain homogenate was centrifuged at 2,000g for 3 minutes at 4 °C. The supernatant was collected and added 10 μ l of 0.02% digitonin and then centrifuged at 2,000g for 3 minutes and 12,000g for 10 minutes. Pellet was collected and resuspended in 10 ml isolation medium and then centrifuged at 12,000g for 10 minutes. The pellet was washed and resuspended in 2 ml incubation medium (225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 10 mM Tris, 5 mM KCl and 10 mM KH₂PO₄, pH 7.4). Protein concentrations were determined using Lowry method (Lowry et al. 1951). Mitochondrial oxygen consumption was measured using Gilson oxygraph apparatus. To determine the IC₅₀ of KCN, mitochondria suspension, medium and chemicals were added to Gilson temperature (37 °C)-controlled chamber as follows; 1,700- μ l of incubation medium, 200- μ l of mitochondria suspension, 10- μ l of 5 mM glutamate and malate (substrates of the mitochondrial electron transport chain), either 10- μ l of KCN at varied concentrations or deionized water as control and 2- μ l of ADP+Pi to initiate the mitochondrial oxidative phosphorylation reaction. The concentration of oxygen in the chamber was measured using a Clark oxygen electrode and recorded using Gilson N2 recorder. The effect of ECa233 on mitochondrial oxygen consumption was investigated. Mitochondria suspension, medium and chemicals were added to the chamber as follows; 1,700- μ l of incubation medium, 200- μ l of mitochondria suspension, 10- μ l of 5 mM glutamate and malate, 10- μ l of ECa233 at varied concentrations or DMSO as control and 2- μ l of ADP+Pi. To determine the protective effect of ECa233 on mitochondrial cytochrome c oxidase inhibition, mitochondria suspension, medium and chemicals were added to the chamber as follows; 1,700- μ l of incubation medium, 200- μ l of mitochondria suspension, 10- μ l of 5 mM glutamate and malate, 10- μ l of 5 mM

glutamate and malate, 10- μ l of ECa233 at varied concentrations or DMSO as control and 2- μ l of ADP+Pi. To determine the protective effect of ECa233 on mitochondrial cytochrome c oxidase inhibition, mitochondria suspension, medium and chemicals were added to the chamber as follows; 1,700- μ l of incubation medium, 200- μ l of mitochondria suspension, 10- μ l of 5 mM glutamate and malate, 10- μ l of KCN at IC50 concentrations, 10- μ l of ECa233 at varied concentrations or DMSO as control and 2- μ l of ADP+Pi. Data was calculated as natom O/min/mg protein. The respiratory control index (RCI) was used to evaluate the function of mitochondria suspension as the mitochondria suspension which had the RCI less than 4 was excluded from the experiment. Data was presented as mean \pm SEM. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc test was used for statistical comparison and $P < 0.05$ was considered as significant difference.

Results

To determine the IC50 of KCN, mice brain

mitochondria were incubated with 6 concentrations of KCN (0.01, 0.1, 0.3, 0.5, 1 and 10 mg/ml). The IC50 of KCN in this experiment was 0.3 mg/ml or 3 μ g in reaction chamber (Figure 1). This concentration of KCN was used for further investigation.

The effect of ECa233 on mitochondrial oxygen consumption was examined using 6 concentrations of ECa233 (1, 10, 25, 50, 75 and 100 mg/ml). DMSO slightly decreased oxygen consumption rate when compared to normal. The data showed that no concentrations of ECa233 could reduce rate of oxygen consumption of mitochondrial state 3 and state 4 respiration (Table 1).

The protective effect of ECa233 on KCN-inhibited mitochondrial respiration was examined by incubating mitochondria with KCN and 5 concentrations of ECa233 (10, 25, 50, 75 and 100 mg/ml). When compared to control (KCN-treated) mitochondria, 10 and 25 mg/ml ECa233 partially improved the oxygen consumption of mitochondria. However, none of ECa233 concentrations significantly recovered the state 3 oxygen consumption rate of mitochondria.

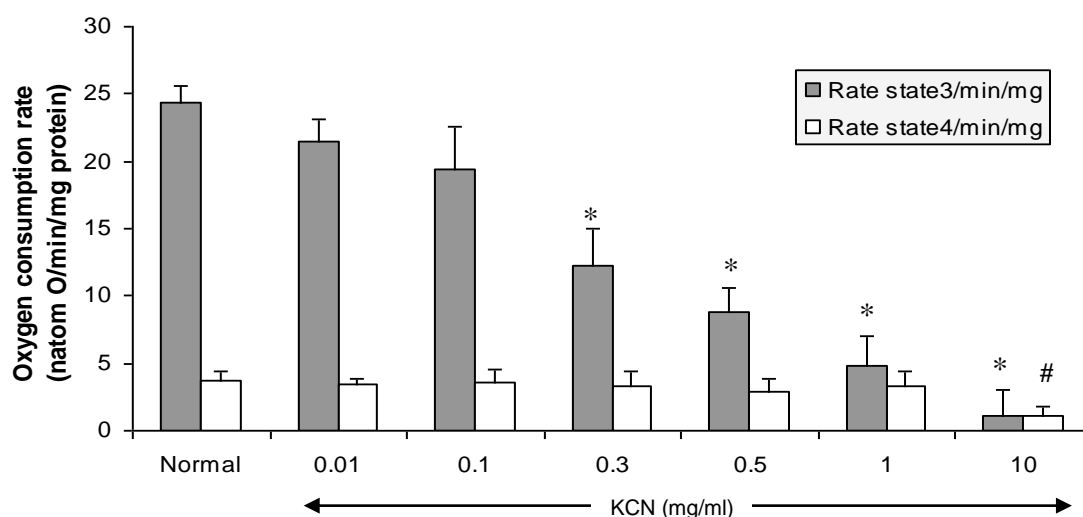


Figure 1 KCN showed concentration-dependent toxicity on state 3 oxygen consumption rate. Results were showed as mean \pm SEM, $n = 5$ (* denoted significantly different of state 3 respiration compared to normal group with $P < 0.05$, # denoted significantly different of state 4 respiration compared to normal group with $P < 0.05$)

Table 1 Oxygen consumption rates and RCI of ECa233 treated groups compared to normal and DMSO (ECa233 vehicle) treated mitochondria. Results were showed as mean \pm SEM, n = 5

Groups	ECa233 concentrations (mg/ml)	Oxygen consumption rate of state 3 respiration (natoms O/ml/min)	Oxygen consumption rate of state 4 respiration (natoms O/ml/min)	RCI
Normal	-	30.97 \pm 2.18	5.80 \pm 0.35	5.33 \pm 0.17
DMSO	-	21.38 \pm 3.61	4.43 \pm 0.58	4.90 \pm 0.60
ECa233	1	23.88 \pm 2.36	4.10 \pm 0.50	5.96 \pm 0.58
	10	26.02 \pm 2.53	4.24 \pm 0.44	6.16 \pm 0.33
	25	24.12 \pm 3.32	3.96 \pm 0.37	6.08 \pm 0.74
	50	23.80 \pm 3.74	4.98 \pm 0.64	4.72 \pm 0.29
	75	24.54 \pm 2.63	4.92 \pm 0.43	4.98 \pm 0.30
	100	22.36 \pm 2.85	4.68 \pm 0.49	4.82 \pm 0.37

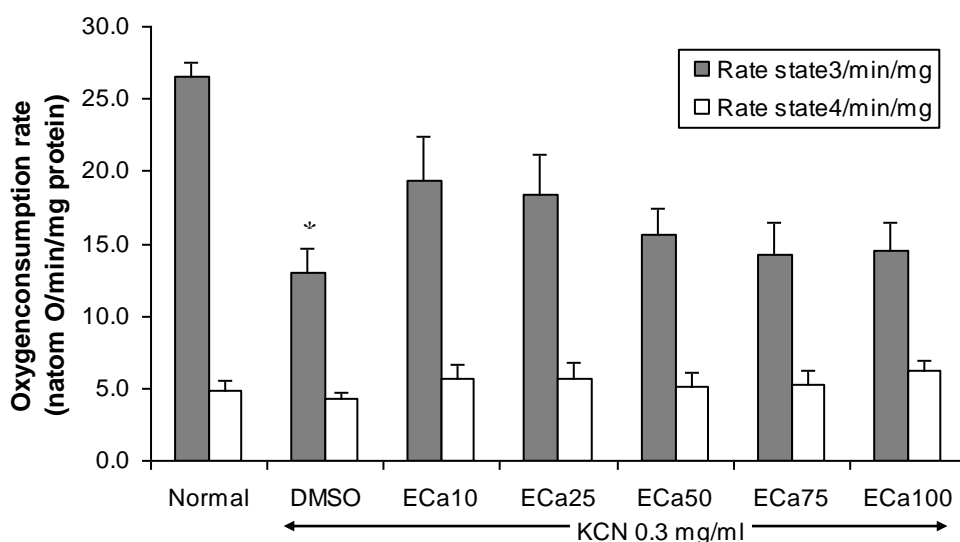


Figure 2 Oxygen consumption rates of ECa233 treated groups compared to control group. Results were showed as mean \pm SEM, n = 5 (* denoted significantly different compared to normal (DMSO-treated mitochondria) with $P < 0.05$).

Discussion

The present study demonstrated effects of ECa233 on mitochondrial function which was defected by the specific cytochrome c oxidase inhibitor, KCN. The toxic effect of KCN was concentration-dependent. The IC₅₀ of KCN was varied due to the experimental protocol. IC₅₀ found in this study was 0.3 mg/ml, equaled to 3 μ g in 2 ml chamber (Leavesley et al. 2008, Nadanaciva et al. 2007).

Previous studies reported that ECa233 had no toxic effect in rat after subchronic oral treatment of 10, 100 and 1,000 mg/kg body weight/day ECa233 were given. (ตันติสิระและคณะ 2549). In this study, ECa233 did not induce or inhibit function of normal mitochondria, even the highest concentration (100 mg/ml in DMSO) was given. The result indicated that ECa233 had no toxic effect on brain mitochondrial function. This could add on the ECa233 safety profile.

The data obtained from the last experiment showed that ECa233 did not recover the impaired function of mitochondria inhibited by KCN. Under this experimental setup, ECa233 was exposed to isolated brain mitochondria in the chamber to promote mitochondrial function without intracellular environment (Sousa et al. 2003). The results indicated that neuronal protective mechanisms of ECa233 did not directly interact with cytochrome c oxidase or mitochondria. Thus the further studies probably aim to discover effects of ECa233 on other cellular signaling pathway.

References

- มยุรี ตันติสิระ, ปราณี ขวลิตรำรง, ทรงพล ชีวะพัฒน์.
การศึกษาความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัด
บัวบกมาตรฐาน. รายงาน. 2549.
- Canevari L, Clark JB, Bates TE. β -amyloid fragment 25-35 selectively decreases complex IV activity in isolated mitochondria. FEBS Lett. 1999;457(1):131-4.
- Cardoso SM, Santos S, Swerdlow RH, Oliveira CR. Functional mitochondria are required for amyloid β -mediated neurotoxicity. FASEB J. 2001;15(8):1439-41.
- Kam-eg A, Tantisira B, Tantisira MH. Preliminary study on effects of a standardized extract of *Centella asiatica*, ECa233, on deficit of learning and memory induced by an intracerebroventricular injection of β -amyloid peptide in mice. Thai J Pharmacol. 2009;31(1):79-82.
- Kumar MHV, Gupta YK. Effect of different extracts of *Centella asiatica* on cognition and markers of oxidative stress in rats. J Ethnopharmacol. 2002;79(2):253-60.
- Leavesley HB, Li L, PRAbhakaran K, Borowitz JL, Isom GE. Interaction of cyanide and nitric oxide with cytochrome c oxidase: Implications for acute cyanide toxicity. Toxicol Sci. 2008;101(1):101-11.

Conclusion

Though standardized extract of *Centella asiatica* ECa233 is not toxic to the function of mitochondria, it is not able to recover the impaired mitochondrial function blocked by KCN. Hence, ECa233 may work through other cell protecting pathways.

Acknowledgement

The financial support in this study is from the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund).

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193(1):265-75.
- Nadanaciva S, Bernal A, Aggeler R, Capaldi R, Will Y. Target identification of drug induced mitochondrial toxicity using immunocapture based OXPHOS activity assays. Toxicol In Vitro. 2007;21(5):902-11.
- Sousa SC, Maciel EN, Vercesi AE, Castilho RF. Ca^{2+} -induced oxidative stress in brain mitochondria treated with the respiratory chain inhibitor rotenone. FEBS Lett. 2003;543(1-3):179-83.
- Sukvichai Y, Tantisira B, Tantisira MH, Rodsiri R. Effects of standardized extract of *Centella asiatica* ECa233 on learning and memory in normal and transient cerebral ischemic in mice. (Theses). Bangkok (Bkk): Chulalongkorn Univ, 2010.
- Thoopmongkon A and Rodsiri R. Effects of the standardized extract of *Centella asiatica* ECa233 on the respiration of mitochondria isolated from rat brain. Thai J Pharmacol. 2011;33:51-4.

RESEARCH ARTICLE

Efficacy of Bromelain in Rat Model of Anterior Cruciate Ligament Transection -Induced Osteoarthritis

Sujinna Lekmeechai¹, Arada Khunakornvichaya², Piyanee Ratanachamnong¹, Yupin Sanvarinda¹, Warinkarn Hemstapat¹

¹Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Thailand

²Graduate Program in Toxicology, Multidisciplinary Unit, Faculty of Science, Mahidol University, Thailand

Abstract

Osteoarthritis (OA) is the most prevalent form of joint disease and is a leading cause of joint dysfunction and disability in the elderly. Currently, there are no gold standard treatments for OA. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are widely used in patients with OA aiming at relieving pain and restoring the joint function. However, a number of undesirable effects have been reported following a long term use of NSAIDs. Hence, there is still a tremendous need to identify novel agents for the treatment of OA with superior safety profile. The aim of this study was to investigate the efficacy of bromelain, an enzyme obtained from pineapple on pain-related behavior in the anterior cruciate ligament transection (ACLT) rat model of OA. OA was surgically induced in the right knee joint by anterior cruciate ligament transection in male Wistar rat. A number of beneficial properties of bromelain have been reported including promoting chondrocyte survival, anti-inflammatory and analgesic effects. The pain-related behavior during OA development was accessed up to 15 weeks post-OA induction using hind limb weight bearing tester. From week 5 post-OA induction, the hind paw weight distribution appeared stabilized and significantly different from the control group. Interestingly, bromelain demonstrated the ability to significantly attenuate the OA-associated joint pain in similar manner as glucosamine. Thus, present results suggest that bromelain might be useful as alternative or adjuvant treatment for patients who suffering from OA pain. However, the mechanism in which bromelain exerts its antinociceptive effect remains to be investigated.

Key Words Osteoarthritis, Bromelain, anterior cruciate ligament transection (ACLT), rat, pain

การทดสอบฤทธิ์ของโบรมีเลนในการลดความเจ็บปวดของโรคข้อเข่าเสื่อมโดยการตัดเอ็นไขว้หน้าข้อเข่าในหนูทดลอง

สุจินดา เล็กมีชัย¹, เอรดา คุณากรวิชัย², ปิยานี รัตนชำนาญ¹, ยุพิน สว่างรินทร์¹ และ วริญ กาญจน์ เหมสถาปัตย์¹

¹ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

²หลักสูตรพิษวิทยา หน่วยสหสาขาวิชา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

บทคัดย่อ

โรคข้อเสื่อม (Osteoarthritis, OA) เป็นโรคข้อที่พบได้บ่อยในผู้สูงอายุ ซึ่งโรคนี้มีผลกระทบอย่างยิ่งต่อการทำกิจกรรมประจำวันของผู้ป่วยนำมาซึ่ง คุณภาพชีวิตที่ลดลง ในปัจจุบันยังไม่มียาที่ประสิทธิภาพที่ดีพอในการบรรเทาอาการปวด หรือชะลออาการของโรคได้ ยาที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันมีวัตถุประสงค์ที่มุ่งเน้นเพื่อบรรเทาความเจ็บปวด โดยแพทย์ นิยมสั่งจ่ายยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ ซึ่งมีผลก่อให้เกิดอาการข้างเคียงที่รุนแรงหากใช้ต่อเนื่องในระยะเวลาอันยาวนาน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษาวิจัยเพื่อให้ได้ ยาที่มีประสิทธิภาพในการ บรรเทาอาการเจ็บปวดเนื่องจาก โรคข้อเสื่อม ซึ่งมีผลข้างเคียง น้อยที่สุด ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ของโบรมีเลนในการบรรเทาความเจ็บปวดจากโรคข้อเข่าเสื่อมในหนูทดลอง ซึ่งถูกชักนำให้เกิดข้อเข่าเสื่อมโดยการตัดเอ็นที่มีชื่อว่า anterior cruciate ligament (ACLT) ความเจ็บปวดที่เกิดขึ้นจากการชักนำให้เกิดข้อเข่าเสื่อมจะถูกประเมินโดยใช้เครื่องมือที่วัดการลงน้ำหนักที่เท้าหลังของหนูที่เรียกว่า hind limb weight bearing tester เป็นเวลา 15 สัปดาห์ จากผลการวิจัยพบว่าอาการ ปวดเนื่องจาก ข้อเข่าเสื่อมพัฒนาเต็มที่ในสัปดาห์ที่ 5 หลังการผ่าตัด นอกจากนี้ยังพบว่าโบรมีเลน มีฤทธิ์บรรเทาอาการ ปวดเข่าในหนูทดลองที่เป็นข้อเข่าเสื่อมได้อย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับกลูโคซามีน จากผลการวิจัยนี้ โบรมีเลนอาจสามารถนำไปใช้เป็นอาหารเสริมเพื่อบรรเทาอาการปวดในผู้ป่วยที่มีอาการของข้อเสื่อมได้เมื่อใช้อย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามผลการทดลองนี้ยังต้องการการยืนยัน เพื่อศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ของโบรมีเลน

คำสำคัญ: โรคข้อเข่าเสื่อม, โบรมีเลน, การตัดเอ็นไขว้หน้าข้อเข่า, กลูโคซามีน, ความเจ็บปวด

Introduction

Osteoarthritis (OA) is a joint degenerative disease (Goldring and Goldring 2007). It has traditionally been believed as non-inflammatory arthritis. However, several lines of recent evidence suggest that inflammation plays a pivotal role in the progression of cartilage degeneration and joint damage in OA patients (Goldring 2000; Allen et al. 2010). Since there is no available Disease Modifying Osteoarthritis Drugs (DMOADs), the current pharmacological treatment for OA aims at reducing symptomatic pain and increasing joint function in order to improve the patient's quality of life (Zhang et al 2008). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and acetaminophen are commonly prescribed for the treatment of OA pain (Sarzi-Puttini et al. 2005). However, long-term treatment of NSAIDs exhibits serious adverse effects such as gastrointestinal ulceration and bleeding as well as platelet dysfunction (Ding 2002). Additionally, glucosamine sulfate has been reported to attenuate OA pain and delay disease progression. Nevertheless, effectiveness and mechanism of glucosamine remain unclear (Zhang et al 2008). Therefore, it is an urgent need to identify an alternative medicine that offer a superior safety profile, which provide pain-relieving effects as well as prolong disease progression.

Bromelain is an enzyme mixture obtained from the stem and fruit of pineapple (*Ananas comosus*) (Bhattacharyya 2008). The efficacy of bromelain for the treatment of OA-associated pain has long been investigated, in which bromelain demonstrated chondroprotective effect and inhibiting the production of cartilage degradation mediators in canine chondrocytes (Siengdee et al. 2010). However, the efficacy of bromelain as alternative or adjuvant treatment for OA is still controversial (Brien 2004). Therefore, further investigations are required to determine the effectiveness of bromelain for OA therapy.

This present study aims to investigate the efficacy of bromelain on pain-related behavior relative to glucosamine in anterior cruciate ligament transection (ACLT)-induced OA rat model.

Materials and Methods

Materials

Bromelain crude extract was purchased from MP Biomedical LLC. (Solon, OH, USA). D-glucosamine sulfate 2NaCl was obtained from Taizhou City Fengrun Biochemical Co., LTD (Taizhou, China).

Animals

Five weeks old male Wistar rats (140-160 g) were obtained from National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Thailand. Animal ethics approval has been obtained from the Faculty of Science, Mahidol University Animal Care and Use Committee. Animal were housed in pair in a temperature-controlled room ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$), maintained at humidity $60\pm 10\%$, and a 12 h/12 h dark-light cycle. Standard laboratory rat food and water were supplied ad libitum. Animals were allowed to acclimatize for one week prior to ACLT induction. OA was surgically induced as previously described (Hayami et al. 2006; Naito et al. 2010; Wen et al. 2010). ACL on the right knee was transected with surgical blade; while the left knee was left untreated. Sham-operated rats were treated identically as ACLT rats except that transection of the ACL is omitted.

Experimental designs

Experimental group I: Determination of time course development of OA pain in rat model of ACLT-induced OA

Rats were divided into three groups: 1. Control group (Naive; $n=6$), 2. Sham-operated group (Sham; $n=7$) and 3. ACLT group (ACLT; $n=6$). The time course development of OA pain was assessed up to 15 weeks post ACLT induction.

Changes in hind paw weight-bearing distributions were assessed at the following time points: at 1, 3, 6, 9, 12 and 15 week post ACLT induction.

Experimental group II: Investigation of the efficacy of bromelain in rat model of ACLT-induced OA

Rats were divided into four groups: 1. Control group with saline (naïve + saline; n=6), 2. ACLT group with saline (ACLT + Saline; n=6), 3. ACLT group with glucosamine sulfate (ACLT + glucosamine; n=6) and 4. ACLT group with bromelain (ACLT + bromelain; n=6). Bromelain (150 mg/kg) and glucosamine sulfate (250 mg/kg) were dissolved in sterile saline. All groups received test articles or vehicle (saline) via oral gavage once daily without fasting for 10 consecutive weeks. Changes in hind paw weight-bearing distributions were assessed at the following time points: at 0 (baseline), 5, 6, 9, 12 and 15 weeks post ACLT induction.

Assessment of nociception: Weight-bearing distribution test

Assessment of pain-related behavior (knee joint pain) was performed using Incapacitance meter (hind limb weight bearing tester). This technique measures the difference in weight bearing between the operated limb and the contralateral non-operated limb. Changes in hind paw weight distribution between the operated and the contralateral non-operated limb were used as an index of joint pain in the OA rats. The percent weight distribution on the operated limb was determined as previously described (Pomonis et al. 2005).

Statistical Analysis

All data were expressed as the mean and standard error of the mean (mean \pm SEM). Statistical significance was determined using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Newman-Keuls post hoc test. The P value was set at $P < 0.05$ for the significant different between groups.

%Weight on the operated limb

$$= \frac{[\text{weight on operated limb}] \times 100}{[\text{weight on operated limb} + \text{weight on contralateral non-operated limb}]}$$

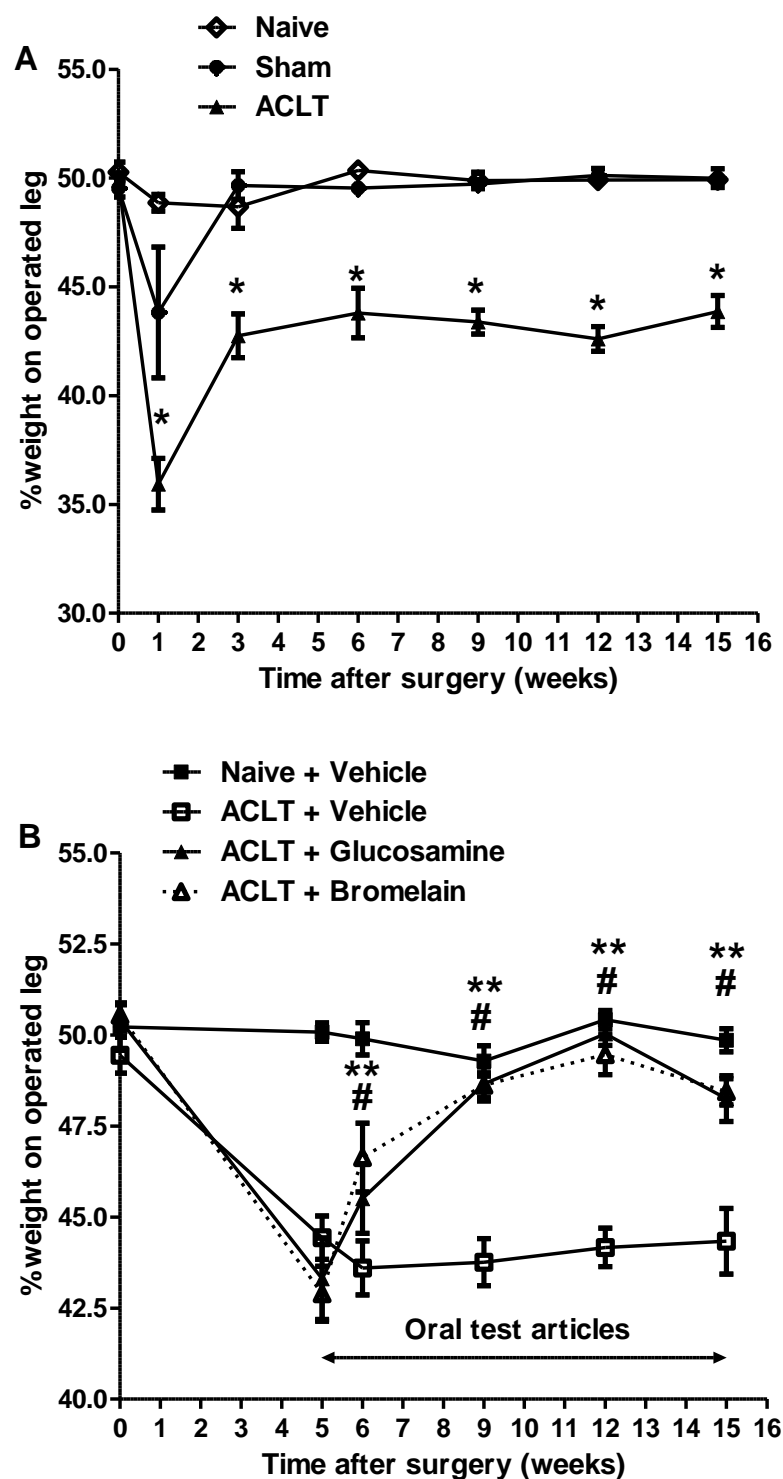
Results

The time course development of OA-associated pain induced by ACLT was observed for 15 weeks post OA induction. A significant change ($P < 0.05$) in the percent weight bearing distribution was observed at all test time points, which was more pronounced in ACLT group on week one post-ACLT induction as compared to naïve and sham groups (Figure 1A). Following five weeks post-ACLT induction, the percent weight bearing distribution appears stabilized and significantly different ($P < 0.05$) from the naïve and sham groups, in which the OA pain was fully developed. Interestingly, bromelain (150 mg/kg) significantly attenuated ($P < 0.05$) change in the percent weight bearing distribution at all test time points when compared with ACLT + vehicle group (Figure 1B). Similar result was observed in ACLT- group received

glucosamine (250 mg/kg) which was used as a positive control in this study.

Discussion

In the present study, for the first time to our knowledge, the analgesic effect of bromelain was evaluated in the rat model of osteoarthritis. Consistent with previous clinical studies (Walker et al. 2002; Brein et al. 2006), showing that bromelain attenuated knee joint pain in the OA patients, the present results also demonstrated that once-daily oral administration of bromelain at a dose of 150 mg/kg exhibited its analgesic activity. Moreover, our results are consistent with Wen and colleagues (2010) (Wen et al. 2010) which showed that oral administration of glucosamine sulfate (250 mg/kg) could attenuate pain related behavior in rat model of ACLT-induced OA.

**Figure 1**

(A) The development of ACLT-induced joint pain. (B) Effects of bromelain (150 mg/kg) and glucosamine (250 mg/kg) on the development of ACLT-induced joint pain. Bromelain and glucosamine were orally administered once a day for 10 consecutive weeks starting at week 5 following ACLT induction. Statistically significant differences were determined using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Newman-Keuls post hoc test. $P < 0.05$ was considered as significant. * = ACLT versus Naïve and sham group; ** = ACLT + glucosamine or # = ACLT + bromelain versus ACLT + vehicle.

Conclusion

In summary, the present results suggested that bromelain might be useful as alternative or adjuvant treatment for patients who suffering from OA pain. However, additional studies are required to confirm its efficacy. Moreover, its mechanism of action in which bromelain exerts its analgesic effect remains to be investigated.

References

- Allen KD, Adams SB, Setton LA. Evaluating Intra-Articular Drug Delivery for the Treatment of Osteoarthritis in a Rat Model. *Tissue Engineering Part B-Reviews*. 2010; 16(1): 81-92.
- Bhattacharyya BK. Bromelain : An Overview. *Natural Product Radiance*. 2008; 7(4): 359-63.
- Brein S, Walker AF, Middleton R, Prescott P, Bundy R. Bromelain as an adjunctive treatment for moderate-to-severe osteoarthritis of the knee: a randomized placebo-controlled pilot study. *Q J Med*. 2006; 99: 841-850.
- Brein S, Walker A, Stephen M, Middleton H, Middleton D. Bromelain as a Treatment for Osteoarthritis: a Review of Clinical Studies. *CAM*. 2004; 1(3): 251-257.
- Ding C. Do NSAIDs Affect the Progression of Osteoarthritis?. *Inflammation*. 2002; 26(3): 139 - 42.
- Goldring MB. Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines. *Curr Rheumatol Rep*. 2000; 2(6): 459-65.
- Goldring MB, Goldring SR. Osteoarthritis. *J Cell Physiol*. 2007; 213(3): 626-34.
- Hayami T, Pickarski M, Zhuo Y, Wesolowski GA, Rodan GA, Duong LT. Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. *Bone*. 2006; 38(2): 234-43.
- Naito K, Watari T, Furuhashi A, Yomogida S, Sakamoto K, Kurosawa H, et al. Evaluation of the effect of glucosamine on an experimental rat osteoarthritis model. *Life Sci*. 2010; 86(13-14): 538-43.
- Pomonis JD, Boulet JM, Gottshall SL, Phillips S, Sellers R, Bunton T, et al. Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain. *Pain*. 2005; 114(3): 339-46.
- Sarzi-Puttini P, Cimmino MA, Scarpa R, Caporali R, Parazzini F, Zaninelli A, et al. Osteoarthritis: an overview of the disease and its treatment strategies. *Semin Arthritis Rheum*. 2005; 35: 1-10.
- Siengdee P, Nganvongpanit K, Pothacharoen P, Chomdej S, Mekchay S, Ong-Chai S. Effects of bromelain on cellular characteristics and expression of selected genes in canine in vitro chondrocyte culture. *Vet Med (Praha)*. 2010; 55(11): 551-60.
- Walker AF, Bundy R, Hicks SM, Middleton RW. Bromelain reduces mild acute knee pain and improves well-being in a dose-dependent fashion in an open study of otherwise healthy adults. *Phytomedicine*. 2002; 9(8): 681-6.
- Wen ZH, Tang CC, Chang YC, Huang SY, Hsieh SP, Lee CH, et al. Glucosamine sulfate reduces experimental osteoarthritis and nociception in rats: association with changes of mitogen-activated protein kinase in chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010; 18(9): 1192-202.
- Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, Abramson S, Altman RD, Arden N, et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008; 16(2): 137-62.

Acknowledgement

This study was financially supported by The New Researcher Grant, Mahidol University. Ms. Sujinna Lekmeechai was supported by Development and Promotion of Science and Technology talents Project.

REVIEWS

Allium sativum Linn.

Puongtip Kunanusorn

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University

Abstract

Garlic (*Allium sativum*) has been used as a medicinal agent since ancient Egypt. There are extensive studies on its properties and pharmacological activities. The major bioactive constituents of garlic are sulfur compounds which consist of water soluble sulfur compounds and oil-soluble sulfur compounds. Several studies have supported the chemopreventive and chemotherapeutic activities of garlic in various types of cancers by which the possible mechanisms of action include the enhancement of the activity of enzymes that depress the activation of carcinogens, the inhibition of reactive oxygen species formation, the induction of cell cycle arrest and apoptosis, and the inhibition of migration and invasion of cancer cells. In terms of garlic's effects on the prevention and treatment of cardiovascular diseases, the *in vitro* studies of lipid-lowering effect of garlic showed that bioactive constituents of garlic inhibit enzymes involved in cholesterol and fatty acid synthesis. In clinical trials, there are both supportive and negative results of lipid-lowering effect of garlic. The results from a systematic review that confirms this effect demonstrated the average drop in total cholesterol was 24.8 mg/dL (9.9%), LDL 15.3 mg/dL (11.4%), and triglycerides 38 mg/dL (9.9%). Another systematic review and meta-analysis study found that garlic significantly reduces total cholesterol and triglyceride but does not significantly decrease LDL-cholesterol nor increase HDL-cholesterol. Garlic has anti-platelet activity and could lower blood pressure. There are many clinical trials that confirm blood pressure-lowering effect of garlic. Systematic review and meta-analysis found that garlic reduces systolic blood pressure at a mean of 4.6 ± 2.8 mm Hg when compared to the control groups ($p = 0.001$), whereas in the hypertensive patients, it reduces systolic and diastolic blood pressure at a mean of 8.4 ± 2.8 mm Hg ($p < 0.001$) and 7.3 ± 1.5 mm Hg ($p < 0.001$), respectively. Another study also confirmed that garlic reduces systolic and diastolic blood pressure by 16.3 mm Hg and 9.3 mm Hg in patients with elevated systolic blood pressure. In addition, a trial involving patients who had garlic as an adjunct treatment to existing antihypertensive but uncontrolled hypertension, garlic could reduce systolic blood pressure at a mean of 10.2 ± 4.3 mm Hg ($p = 0.03$). This trial indicates that garlic has additive effect to current antihypertensives in lowering blood pressure in patients with treated but uncontrolled hypertension. It has been found that garlic exerts antioxidant effect by scavenging superoxide ions, reducing lipid peroxide formation, increasing glutathione in the cells, and enhancing the activities of enzymes glutathione disulphide reductase and superoxide dismutase. Other activities of garlic include antibacterial, antifungal, antimalarial, and antiviral activities, and also immunomodulatory effects. It has been found in a clinical trial that garlic may be effective in preventing common cold. In conclusion, the results from these studies are supportive to the claimed effects of garlic and may lead to drug development for the prevention and treatment of several diseases, especially the cardiovascular diseases and cancers.

กระเทียม (*Allium sativum* Linn.)

พวงทิพย์ คุณานุสรณ์

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ

กระเทียม (*Allium sativum*) ถูกนำมาใช้เป็นยาตั้งแต่ยุคอียิปต์โบราณ มีการศึกษาและวิจัยอย่างมากมายถึงคุณสมบัติและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของกระเทียม สารหลักที่เป็นสารสำคัญที่สามารถออกฤทธิ์คือ สารประกอบของซัลเฟอร์ ซึ่งประกอบด้วยชนิดที่ละลายในน้ำ และชนิดที่ละลายในไขมัน มีการศึกษามากมายสนับสนุนว่ากระเทียมมีฤทธิ์ในการป้องกันและรักษาโรคมาเร็งได้หลายชนิด โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ที่เป็นไปได้ ได้แก่ การกระตุ้นเอนไซม์ไปลดการกระตุ้นสารก่อมาเร็ง การยับยั้งการสร้าง reactive oxygen species การกระตุ้นให้เซลล์หยุดอยู่ใน cell cycle การกระตุ้นให้เกิด apoptosis และยับยั้งการเกิด migration และ invasion ของเซลล์มาเร็ง สำหรับฤทธิ์ป้องกันและรักษาโรคหัวใจและหลอดเลือดของกระเทียม ผลจากการศึกษาฤทธิ์ลดระดับไขมันในเลือดในหลอดทดลองแสดงว่าสารสำคัญของกระเทียมสามารถยับยั้งเอนไซม์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ cholesterol และ fatty acid ในการศึกษาทางคลินิก ผลการศึกษามีทั้งยืนยันและปฏิเสธฤทธิ์ลดระดับไขมันในเลือดของกระเทียม โดยผลจากการศึกษาแบบ systematic review ที่ยืนยันฤทธิ์นี้แสดงค่าเฉลี่ยในการลด total cholesterol ได้ 24.8 มิลลิกรัม/เดซิลิตร (9.9%) ลด LDL-cholesterol ได้ 15.3 มิลลิกรัม/เดซิลิตร (11.4%) และลด triglyceride ได้ 38 มิลลิกรัม/เดซิลิตร (9.9%) อีกการศึกษาแบบ systematic review และ meta-analysis พบว่ากระเทียมมีฤทธิ์ลดระดับ total cholesterol และ triglyceride ได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่มีผลลด LDL-cholesterol หรือเพิ่ม HDL-cholesterol อย่างมีนัยสำคัญ กระเทียมมีฤทธิ์ต้านเกร็ดเลือดและสามารถลดความดันโลหิต มีการศึกษาทางคลินิกมากมายที่ยืนยัน ฤทธิ์ลดความดันโลหิตของกระเทียม จากการวิจัยแบบ systematic review และ meta-analysis พบว่ากระเทียมลด systolic blood pressure ได้เฉลี่ย 4.6 ± 2.8 มิลลิเมตรปรอทเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p = 0.001$) ในขณะที่ผู้ป่วยที่มีความดันโลหิตสูง กระเทียมลด systolic และ diastolic blood pressure ได้เฉลี่ย 8.4 ± 2.8 มิลลิเมตรปรอท ($p < 0.001$) และ 7.3 ± 1.5 มิลลิเมตรปรอท ($p < 0.001$) ตามลำดับ อีกการศึกษาหนึ่งก็ยืนยันว่าในผู้ป่วยที่มี systolic blood pressure สูง กระเทียมสามารถลด systolic blood pressure ได้ 16.3 มิลลิเมตรปรอท และ diastolic blood pressure ได้ 9.3 มิลลิเมตรปรอท นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในผู้ป่วยที่ได้รับกระเทียมเพิ่มเติมจากการรักษาด้วยยาลดความดันโลหิตสูงที่ผู้ป่วยได้รับอยู่แต่ควบคุมความดันโลหิตสูงไม่ได้ พบว่ากระเทียมสามารถลด systolic blood pressure ได้โดยเฉลี่ย 10.2 ± 4.3 มิลลิเมตรปรอท ($p = 0.03$) ซึ่งชี้ให้เห็นว่ากระเทียมเสริมฤทธิ์ยาลดความดันโลหิตสูงอื่นๆ ในผู้ป่วยที่ไม่สามารถควบคุมภาวะความดันโลหิตสูงด้วยยาที่ใช้ อยู่ ในส่วนของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่ากระเทียมออกฤทธิ์โดยโดยการกำจัด superoxide ions ลดการสร้าง lipid peroxide เพิ่มระดับ GSH ภายในเซลล์ และการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ glutathione disulphide reductase และ superoxide dismutase ฤทธิ์อื่นๆ ของกระเทียมประกอบด้วยฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย เชื้อรา เชื้อมาลาเรีย และเชื้อไวรัส รวมทั้งมี immunomodulatory effects ด้วย มีการศึกษาทางคลินิกพบว่ากระเทียมอาจมีประสิทธิผลในการป้องกันโรคหวัดได้ โดยสรุป ผลจากการศึกษาเหล่านี้สนับสนุนสรรพคุณของกระเทียม และอาจนำไปสู่การพัฒนาไปเป็นยาเพื่อใช้ในการป้องกันและรักษาโรคต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่มีการกล่าวอ้างสรรพคุณอย่างกว้างขวาง ได้แก่ โรคหัวใจและหลอดเลือด และโรคมาเร็ง

บทนำ

กระเทียมมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Allium sativum* Linn. อยู่ในวงศ์ Alliaceae มีชื่อท้องถิ่นแตกต่างกันออกไป เช่น กระเทียม (ภาคกลาง) หอมเทียม (ภาคเหนือ และภาคใต้) และหอมขาว (ภาคอีสาน) เป็นต้น

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกระเทียม กระเทียมเป็นพืชล้มลุกที่มีหัวอยู่ใต้ดิน แต่ละหัวประกอบด้วยกลีบเรียงซ้อนกันประมาณ 4-15 กลีบ บางพันธุ์จะมีเพียงกลีบเดียว เรียกว่า “กระเทียมโทน” แต่ละกลีบมีกาบเป็นเยื่อบางๆ สีขาวอมชมพูหุ้มอยู่โดยรอบ กระเทียมมีรากไม่ยาวนัก ใบมีลักษณะยาว แคบ แบน และกลวงปลายใบแหลม โคนมีใบหุ้มซ้อนกัน ดอกสีขาวออกเป็นช่อติดเป็นกระจุกที่ปลายก้านช่อ กระเทียมมีกลิ่นหอมฉุน รสชาติเผ็ดร้อน¹

กระเทียมถูกนำมาใช้เป็นยาตั้งแต่ยุคอียิปต์โบราณเพื่อใช้ในการรักษาโรคหัวใจ โรคกระษัย และอาการปวด ศีรษะ มีการใช้กระเทียมในการรักษาแบบพื้นบ้านในอีกหลายประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน อินเดีย และจีน² กระเทียมเป็นส่วนผสมที่สำคัญในตำรับยาสมุนไพรพื้นบ้านต่างๆ มากมาย มีการกล่าวอ้างถึงสรรพคุณของกระเทียมอย่างกว้างขวาง ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์กระเทียมหลากหลายรูปแบบวางขายในท้องตลาด สำหรับเป็นทางเลือกหนึ่งของผู้ป่วย เพื่อใช้ในการรักษาโรคต่าง ๆ มีการศึกษาและวิจัยเพื่อค้นหาสารสำคัญที่เป็นสารออกฤทธิ์ในเชิงชีวภาพของกระเทียม (bioactive constituents of garlic) รวมทั้งมีการศึกษาและวิจัย อย่าง มากมายทั้งในหลอดทดลอง ในสัตว์ทดลอง และการศึกษาทางคลินิกเพื่อแสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติและฤทธิ์ ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจต่างๆ ของกระเทียม ผลจากการศึกษาและวิจัยเหล่านี้มีประโยชน์ในการยืนยันสรรพคุณของกระเทียม และอาจนำไปสู่การพัฒนาไปเป็นยาเพื่อใช้ในการป้องกันและรักษา

โรคต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่มีการกล่าวอ้างสรรพคุณอย่างกว้างขวาง ได้แก่ โรคหัวใจ และหลอดเลือด และโรคกระษัย

ส่วนประกอบของกระเทียม

กระเทียมสดประกอบด้วยส่วนที่เป็นน้ำ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน เส้นใย ไขมัน สารประกอบของซัลเฟอร์ (sulfur compounds) 33 ชนิด กรดอะมิโน 17 ชนิด เจอร์มาเนียม (germanium) 14 ไมโครกรัม/100 กรัม แคลเซียม 50-90 ไมโครกรัม/100 กรัม ทองแดง 0.02-0.03 ไมโครกรัม/100 กรัม เหล็ก 2.8-3.9 ไมโครกรัม/100 กรัม โพแทสเซียม 100-200 ไมโครกรัม/100 กรัม แมกนีเซียม 43-77 ไมโครกรัม/100 กรัม โครเมียม 0.3-0.5 มิลลิกรัม/100 กรัม แมงกานีส 0.2-0.6 มิลลิกรัม/100 กรัม โบรอน 0.3-0.6 มิลลิกรัม/100 กรัม แบเรียม 0.2-1.0 มิลลิกรัม/100 กรัม อะลูมิเนียม 0.5-1.0 มิลลิกรัม/100 กรัม โซเดียม 10-22 มิลลิกรัม/100 กรัม ฟอสฟอรัส 390-460 มิลลิกรัม/100 กรัม สังกะสี 1.8-3.1 มิลลิกรัม/100 กรัม เซเลเนียม (selenium) 15-35 ไมโครกรัม/100 กรัม ไอโอดีน 0.25 มิลลิกรัม/100 กรัม ไรโบฟลาวิน (riboflavin) 0.08 มิลลิกรัม/100 กรัม วิตามินซี 5 มิลลิกรัม/100 กรัม กรดนิโคตินิก 0.5 มิลลิกรัม/100 กรัม เรตินอล (retinal) 15 ไมโครกรัม/100 กรัม พลังงาน 39-140 แคลอรี/100 กรัมของน้ำหนักกระเทียมสด³⁻⁴

Aged garlic extract (AGE) เป็นสารสกัดจากกระเทียม ที่มีวางขายอย่างแพร่หลาย ได้จากการสกัดกระเทียมสด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน AGE ประกอบด้วยสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทั้งชนิดที่ละลายในน้ำ ได้แก่ S-allyl-cysteine (SAC) และ S-allylmercaptocysteine

(SAMC) และชนิดที่ละลายในไขมัน (ยกเว้น alliin ซึ่งไม่คงตัว) ได้แก่ diallyl sulfide (DAS), diallyl disulfide (DADS) เป็นต้น นอกจากนี้ก็ยังประกอบด้วยสารกลุ่ม flavonoids, saponins และสารอื่นๆ⁵

สารสำคัญที่สามารถออกฤทธิ์ในเชิงชีวภาพของกระเทียม (Bioactive constituents of garlic)⁶⁻⁸

สารหลักที่เป็นสารสำคัญที่สามารถออกฤทธิ์คือ สารประกอบของอัลลิซิน โดยชนิดหลักที่พบมากในกระเทียม คือ γ -glutamyl-S-allyl-L-cysteines และ S-allyl-L-cysteine sulfoxides (alliin) เมื่อนำหัวกระเทียมสดมาเก็บไว้เป็นเวลานาน จะเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพตามธรรมชาติ (natural aging bioconversion) ทำให้เกิดการเปลี่ยน γ -glutamyl-S-allyl-L-cysteines โดยอาศัย เอนไซม์ γ -glutamyl Transpeptidase ได้เป็น organosulfur compounds ชนิดที่ละลายในน้ำ เป็นส่วนใหญ่ เช่น SAC และ SAMC เป็นต้น (รูปที่ 1-2)

เมื่อทำให้เกิดการฉีกขาดของเซลล์ เช่น การนำหัวกระเทียมสดมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ บด หรือแม้แต่การ เคี้ยว จะเกิดกระบวนการสร้าง organosulfur compounds ชนิดที่ละลายในไขมัน โดย alliin จะถูกเปลี่ยนอย่างรวดเร็วเป็น allyl thiosulfates ซึ่งชนิดหลักคือ diallyl thiosulfate (หรือ alliin) โดยอาศัยเอนไซม์ alliinase เนื่องจาก alliin เป็นสารที่ไม่คงตัว จะสลายตัวอย่างรวดเร็วได้เป็นสารชนิดต่างๆ ที่มีกลิ่นฉุนได้แก่ DAS, DADS, diallyl trisulfide (DATS) และ ajoene ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารประกอบหลักของส่วนที่เป็นน้ำมันหอมระเหย (volatile oil) ของกระเทียม

นอกเหนือจากกลุ่มที่เป็นสารประกอบ

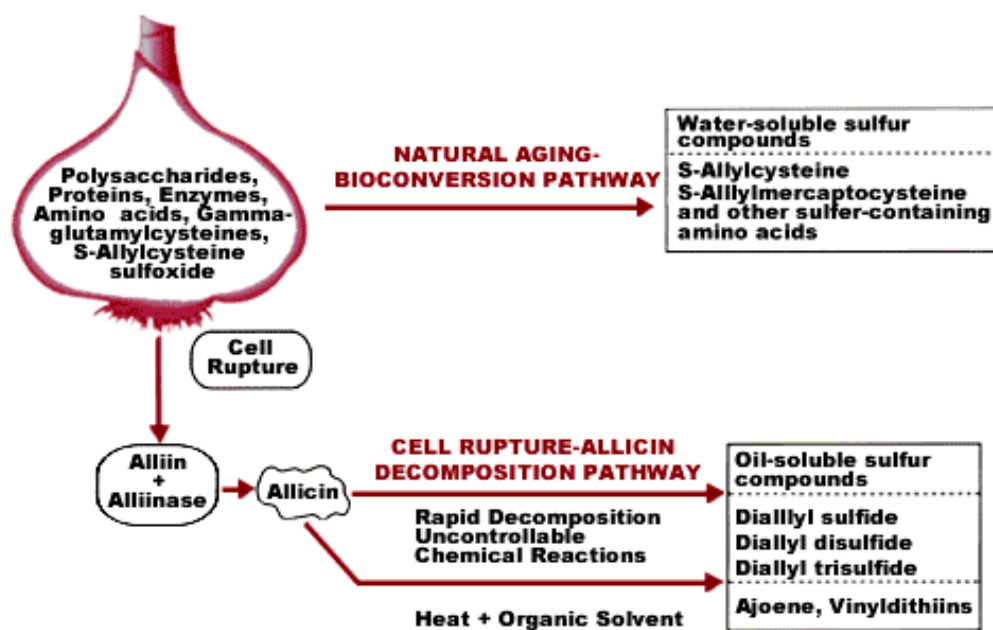
ของอัลลิซิน มีรายงานว่าสารออกฤทธิ์สำคัญอื่นๆ ของกระเทียมคือกลุ่ม steroid saponins เช่น eruboside-B และ β -chlorogenin รวมทั้ง allixin และ organo-selenium compounds ซึ่งอาจทำงานเสริมฤทธิ์กับสารสำคัญหลักคือ organosulfur compounds

ฤทธิ์ป้องกันและรักษาโรคมะเร็ง

มีการศึกษาวิจัยมากมายเพื่อแสดงและยืนยันฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่างๆ ของกระเทียมและสารสำคัญในกระเทียมที่ออกฤทธิ์ในเชิงชีวภาพ รวมทั้งการศึกษาเพื่อหากลไกการออกฤทธิ์ ซึ่งประกอบด้วยการศึกษาในหลอดทดลอง การศึกษาในสัตว์ทดลอง ตลอดจนการศึกษาทางคลินิก ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สำคัญที่มีการศึกษา ได้แก่ ฤทธิ์ป้องกันและรักษาโรคมะเร็ง ฤทธิ์ป้องกันและรักษาโรคหัวใจและหลอดเลือด ซึ่งประกอบด้วยฤทธิ์ลดระดับไขมันในเลือด ฤทธิ์ต้านเกร็ดเลือด ฤทธิ์ลดความดันโลหิต ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์อื่นๆ

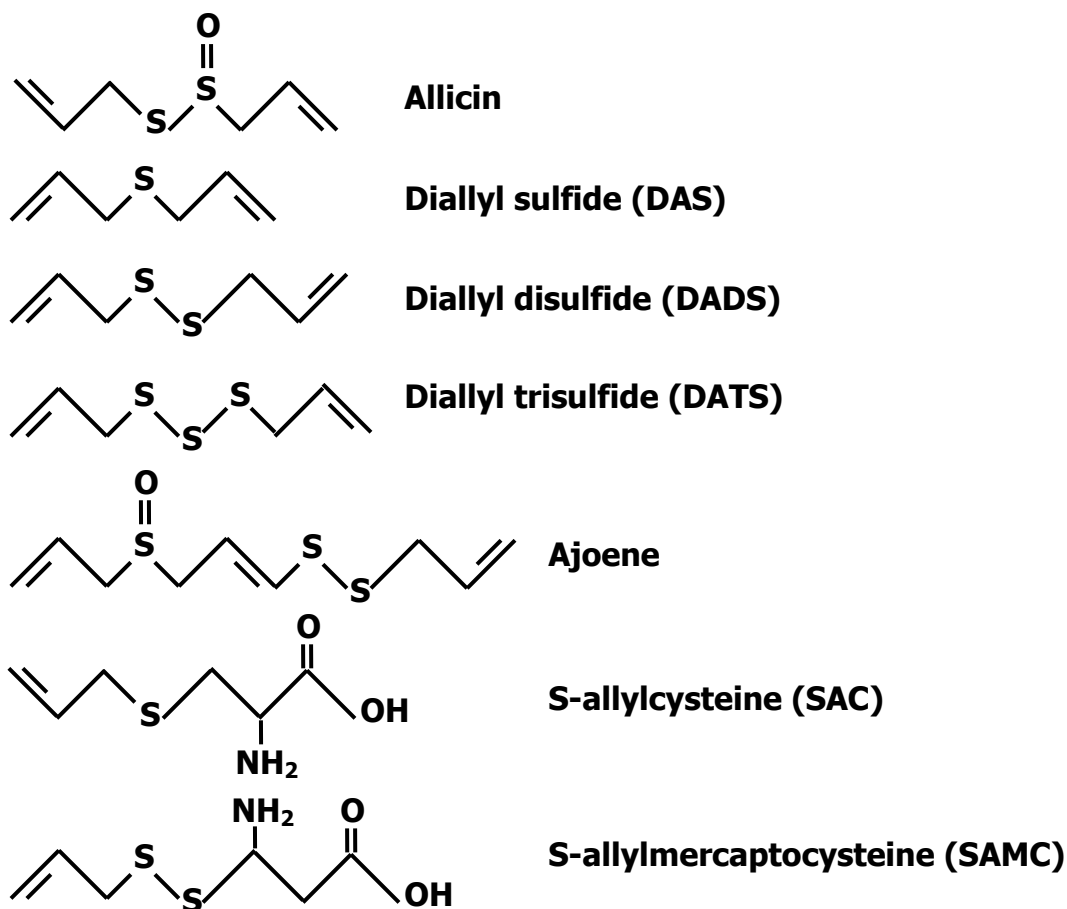
1. ฤทธิ์ป้องกันและรักษาโรคมะเร็ง

การศึกษามากมายสนับสนุนว่ากระเทียมมีฤทธิ์ในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็งได้หลายชนิด โดยพบว่าสารกลุ่ม allyl sulfides เช่น DAS, DADS และ DATS รวมทั้ง ajoene สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งได้ทั้งในหลอดทดลอง และในสัตว์ทดลองที่เหนี่ยวนำโดยสารเคมีให้เกิดก้อนมะเร็ง (tumors) มีรายงานจากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่า DADS สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมของสุนัข (neoplastic canine mammary tumor cells) และของคน (human breast cancer cells) โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ที่เป็นไปได้ ได้แก่ การกระตุ้นเอนไซม์ไปลดการกระตุ้นสารก่อมะเร็ง (carcinogens) การยับยั้งการสร้าง reactive oxygen species (ROS) การกระตุ้นทำให้



จาก <http://www.healthfellow.com/367/aged-garlic-extract/>

รูปที่ 1 กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของกระเทียม



รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญที่สามารถออกฤทธิ์ในเชิงชีวภาพของกระเทียม

เซลล์มะเร็งหยุดอยู่ใน cell cycle และทำให้เกิด apoptosis⁹⁻¹¹ DADS ยังช่วยเร่งการเกิด apoptosis ของเซลล์มะเร็งตับของหนู (human HepG2 hepatoma cells)¹² และของเซลล์มะเร็งเม็ดโลหิตขาวของหนู (human leukemia HL-60 cells)¹³ ตลอดจนยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (proliferation) ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของหนู (human colon tumor cells) โดยรบกวนกระบวนการใน cell cycle¹⁴⁻¹⁵ อีกการศึกษาในหลอดทดลองพบว่า DADS กระตุ้นให้เกิด apoptosis ของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (prostate cancer cells) ของหนู ทั้งชนิดที่อาศัยแอนโดรเจน (androgen)¹⁶ และไม่อาศัยแอนโดรเจน¹⁷ ส่วนการศึกษาในหนูขาวยืนยันว่า DADS ยังสามารถป้องกันการเกิดโรคมะเร็งต่อมลูกหมากได้ด้วย¹⁸ นอกจากนี้ ทั้ง DADS และ DAS ยังสามารถกระตุ้นให้เกิด apoptosis ของเซลล์มะเร็งปอดของหนูคือ non small cell lung cancer cells¹⁹ และเฉพาะ DADS ที่มีผลต่อ A549 lung carcinoma cells²⁰ การศึกษาในหนูถีบจักรยังพบว่า DAS มีฤทธิ์ป้องกันการเกิดโรคมะเร็งผิวหนังได้ด้วย²¹ มีการศึกษาในหลอดทดลองพบว่า DATS มีผลยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของหนู (human colon tumor cells) โดยยับยั้งการเกิด tubulin polymerization และกระตุ้นกระบวนการ cell cycle-dependent induction of apoptosis ส่วนการศึกษาในหนูถีบจักร พบว่าสามารถลดขนาดของก้อนมะเร็งลำไส้ใหญ่ของหนูซึ่งทำการปลูกถ่ายที่บริเวณใต้รักแร้ของหนูได้ถึง 70% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม²² DATS ยังมีผลต่อ BGC823 cells ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารของหนู (human gastric cancer cells) โดยทำให้เซลล์หยุดอยู่ในระยะ G1/S ของ cell cycle²³ นอกจากนี้ยังมีรายงานเมื่อเร็วๆ นี้พบว่า ทั้ง DAS, DADS และ DATS ยังสามารถยับยั้งการเกิด migration และ invasion ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ในหนู (human colon

cancer colo 205 cells) โดยผ่านการยับยั้งกระบวนการ expressions ของ matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), MMP-7 และ MMP-9 ซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนาเป็น antimetastatic drugs ต่อไปในอนาคต²⁴ DADS ยังสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ histone deacetylase และกระตุ้นการเกิด histone hyperacetylation ทั้งใน *in vitro* และ *in vivo*²⁵ สำหรับฤทธิ์ของ ajoene มีรายงานพบว่าสามารถยับยั้งการเกิดโรคมะเร็งผิวหนังที่เหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นในหนูถีบจักรโดยใช้ 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate²⁶ และพบว่า ajoene ทำให้เกิด apoptosis ของเซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู (murine melanoma B16F10 cells) (โดยการกระตุ้นเอนไซม์ caspase-3)²⁷ และทำให้เกิด apoptosis ของเซลล์มะเร็งเม็ดโลหิตขาวของหนู (human leukemia HL-60 cells) (โดยอาศัย ROS modulated apoptosis และการกระตุ้น nuclear factor kappaB)²⁸⁻²⁹

สำหรับสารกลุ่ม organosulfur compounds ชนิดที่ละลายในน้ำ มีรายงานว่า SAMC สามารถกระตุ้นให้เกิด apoptosis ของ SW-480 และ HT-29 cells ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของหนู (human colon cancer cells) ได้ดีกว่า SAC มาก โดยกลไกการออกฤทธิ์ประกอบด้วย การเพิ่ม caspase-3-like-activity การเหนี่ยวนำให้เกิดการทำงานของเอนไซม์ jun kinase และการลดปริมาณ glutathione³⁰ รวมทั้งอาจเกี่ยวข้องกับ microtubule depolymerization และ c-Jun NH₂-terminal kinase 1 activation³¹

2. ฤทธิ์ป้องกันและรักษาโรคหัวใจและหลอดเลือด

2.1 ฤทธิ์ลดระดับไขมันในเลือด

มีการศึกษาในหลอดทดลองที่แสดงว่า สารสำคัญของกระเทียม สามารถยับยั้งเอนไซม์หลายชนิด ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์

cholesterol และ fatty acid มีรายงานว่า alliin, SAC และ DADS สามารถยับยั้งการทำงานของ HMG-CoA reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่เป็น rate-limiting step ในการสังเคราะห์ cholesterol³²⁻³³ ซึ่งฤทธิ์นี้จะเหมือนกับยาลด cholesterol ในกลุ่ม statins จากผลการศึกษาของ Liu และ Yeh ในปีค.ศ. 2001 พบว่า SAC ยังสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ fatty acid โดยออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ fatty acid synthase ซึ่งส่งผลให้ระดับ triglyceride (TG) ใน cultured rat hepatocytes ลดลง³⁴ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า SAC, alliin, DADS และ DATS สามารถยับยั้งเอนไซม์ squalene monooxygenase ซึ่งเป็น rate-limiting step อีกขั้นตอนหนึ่งในการสังเคราะห์ cholesterol ได้อีกด้วย³⁵ มีการศึกษาที่นำเสนออีกกลไกในการยับยั้งการสังเคราะห์ cholesterol ของกระเทียม โดยอาจมีความเป็นไปได้ว่าสารออกฤทธิ์ที่สำคัญของกระเทียมที่มี allyl-disulfide หรือ allyl-sulfhydryl group มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ sterol 4 α -methyl oxidase ส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของ lanosterol และ dimethylzymosterol ซึ่งอาจไปกระตุ้นให้เกิดการสลายตัวของเอนไซม์ HMG-CoA reductase โดยผ่าน Insig-mediated pathway³⁶ มีรายงานว่าสารสำคัญชนิดที่ละลายในน้ำ เช่น SAC มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic) น้อยกว่าและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสังเคราะห์ cholesterol มากกว่าสารสำคัญชนิดที่ละลายในไขมัน เช่น DAS อย่างไรก็ตามพบว่าการยับยั้งการสังเคราะห์ cholesterol เกิดขึ้นได้ดีที่สุดโดย AGE ซึ่งประกอบด้วยสารสำคัญทั้งสองกลุ่ม³⁷

ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา มีการศึกษาทางคลินิกมากมายรวมทั้งการศึกษาแบบ systematic review และ meta-analysis ของกระเทียมในรูปแบบต่างๆ ที่มีวางขายอยู่ในท้องตลาด เพื่อแสดงฤทธิ์ลดระดับไขมันในเลือด ซึ่งผลการศึกษาที่มีทั้งยืนยัน และปฏิเสธฤทธิ์นี้ของ

กระเทียม Alder และคณะ (2003) รายงานผลการศึกษาแบบ systematic review ว่ามีเพียง 6 การศึกษาจากทั้งหมด 10 การศึกษาที่พบว่ากระเทียมมีประสิทธิภาพในการลดระดับไขมันในเลือด โดยมีค่าเฉลี่ยในการลดระดับ total cholesterol (TC) ได้ 24.8 มิลลิกรัม/เดซิลิตร (9.9%) ลดระดับ LDL-cholesterol ได้ 15.3 มิลลิกรัม/เดซิลิตร (11.4%) และลดระดับ TG ได้ 38 มิลลิกรัม/เดซิลิตร (9.9%) อย่างไรก็ตามการศึกษาเหล่านี้ยังมีข้อด้อยหลายด้าน เช่น มีระยะเวลาการศึกษาสั้นเกินไป และไม่มีการควบคุมอาหาร เป็นต้น จึงยังไม่สามารถสรุปได้อย่างแน่ชัดถึงฤทธิ์ลดระดับไขมันในเลือดของกระเทียม³⁸ Khoo และ Aziz (2009) ทำการวิเคราะห์แบบ meta-analysis ของ การศึกษาที่ทำแบบ randomized controlled trials มีระยะเวลาการศึกษาอยู่ในช่วง 11 ถึง 24 สัปดาห์ จากทั้งหมด 13 การศึกษา จำนวนผู้เข้าร่วมในการศึกษา 1056 คน เพื่อดูผลของกระเทียมต่อระดับ cholesterol ทั้งในอาสาสมัครสุขภาพดี และผู้ป่วยที่มีระดับ cholesterol ในเลือดสูง ในภาพรวมพบว่ากระเทียมมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม (placebo control) ในการลดระดับ TC, LDL-cholesterol, TG หรือ apolipoprotein B รวมทั้งไม่มีความแตกต่างในการเพิ่มระดับ HDL-cholesterol โดยสรุป การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า กระเทียมไม่มีผลต่อระดับ cholesterol ในเลือด³⁹ Reinhart และคณะ (2009) ทำการวิจัยแบบ systematic review และ meta-analysis ของการศึกษาที่ทำแบบ randomized placebo-controlled trials เพื่อดูผลของกระเทียมต่อระดับ cholesterol และ TG รวมทั้งยังมีการวิเคราะห์ข้อมูลกลุ่มย่อยอีกหลายกลุ่ม (subgroup analyses) เช่น การแยกกลุ่มที่มีระยะเวลาการศึกษาอยู่ในช่วงน้อยกว่าหรือเท่ากับ 12 สัปดาห์ และ กลุ่มที่มีระยะเวลา

การศึกษาอยู่ในช่วงมากกว่าหรือเท่ากับ 12 สัปดาห์ การแยกกลุ่มวิเคราะห์ข้อมูล โดยขึ้นกับ ชนิดของกระเทียมที่รับประทานว่าเป็นกระเทียม ผง (garlic powder) น้ำมันกระเทียม (garlic oil) หรือ AGE และการแยกกลุ่มวิเคราะห์ ข้อมูลโดยระดับค่าเฉลี่ยของ TC และ TG เมื่อ เริ่มต้นศึกษา รวมทั้งการแยกกลุ่มวิเคราะห์ ข้อมูลของผู้ป่วยที่จำกัดอาหารไขมัน และกลุ่ม ที่ได้รับคำแนะนำในการรับประทานอาหารไขมัน เป็นต้น ผลการศึกษาจากทั้งหมด 29 การศึกษา พบว่ากระเทียมมีฤทธิ์ลดระดับ TC (- 0.19; 95 % CI - 0.33, - 0.06 มิลลิโมล/ลิตร) และ TG (- 0.11; 95 % CI - 0.19, - 0.06 มิลลิโมล /ลิตร) ได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่สามารถลดระดับ LDL-cholesterol หรือเพิ่มระดับ HDL-cholesterol อย่างมีนัยสำคัญ จาก การวิเคราะห์ข้อมูลกลุ่มย่อย พบข้อมูลที่น่าสนใจ คือ กระเทียมมีฤทธิ์ลดระดับ TC ได้ โดยลดได้ ดีกว่าในผู้ป่วยที่มีระดับ TG เมื่อเริ่มต้นศึกษาอยู่ในระดับสูง และรับประทานกระเทียมผงตั้งแต่ 12 สัปดาห์ขึ้นไปโดยไม่ต้องควบคุมอาหารไขมัน หรือได้รับคำแนะนำในการควบคุมอาหาร⁴⁰

2.2 ฤทธิ์ต้านเกร็ดเลือด

มีรายงานว่ากระเทียมและสารสำคัญใน กระเทียม เช่น allicin, DATS และ ajoene สามารถยับยั้ง platelet aggregation โดยพบว่า การออกฤทธิ์ของ DATS อาศัยการยับยั้ง Ca^{2+} mobilization ภายในเซลล์ ในขณะที่ ajoene มี ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase-1 ส่งผลให้ เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์ thromboxane A_2 ⁴¹⁻⁴⁴

2.3 ฤทธิ์ลดความดันโลหิต

ฤทธิ์ลดความดันโลหิตของกระเทียม สัมพันธ์กับคุณสมบัติในการกระตุ้นให้มีการสร้าง hydrogen sulphide⁴⁵ และ nitric oxide รวมทั้ง

การยับยั้งการทำงานของ angiotensin-converting enzyme (ACE) ส่งผลทำให้หลอดเลือดคลายตัว และลดความดันโลหิตในที่สุด⁴⁶⁻⁴⁹

ความดันโลหิตสูงเป็นปัจจัยสำคัญที่นำไปสู่การเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular diseases) มีรายงานว่า การลด systolic blood pressure (SBP) และ diastolic blood pressure (DBP) ลง 4-5 และ 2-3 มิลลิเมตรปรอท ตามลำดับ สามารถลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดได้ 8-20%⁵⁰⁻⁵¹ มีการศึกษาทางคลินิกมากมายที่ยืนยันฤทธิ์ลดความดันโลหิตของกระเทียม⁵²⁻⁵⁴ จากการวิจัยแบบ systematic review และ meta-analysis จากทั้งหมด 29 การศึกษาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1995- 2007 มี 11 การศึกษาที่เป็น การศึกษาแบบ randomized placebo-controlled trials โดยชนิดของกระเทียมที่รับประทานใน 9 การศึกษาคือกระเทียมผง (600-900 มิลลิกรัม /วัน) อีก 2 การศึกษาใช้น้ำมันกระเทียม หรือ AGE และมีระยะเวลาการศึกษาอยู่ในช่วง 12 ถึง 23 สัปดาห์ ผลการศึกษาจาก 10 การศึกษาพบว่ากระเทียมลด SBP ได้เฉลี่ย 4.6 ± 2.8 มิลลิเมตรปรอท เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p = 0.001$) ในขณะที่เมื่อพิจารณาผลในผู้ป่วยที่มีความดันโลหิตสูง กระเทียมลด SBP ได้เฉลี่ย 8.4 ± 2.8 มิลลิเมตรปรอท (จาก 4 การศึกษา, $p < 0.001$) และลด DBP ได้เฉลี่ย 7.3 ± 1.5 มิลลิเมตรปรอท (จาก 3 การศึกษา, $p < 0.001$) การศึกษานี้ในภาพรวมแสดงให้เห็นว่ากระเทียมมีฤทธิ์ในการลดความดันโลหิตในผู้ป่วยที่มีความดันโลหิตสูง⁵⁵ ซึ่งการศึกษาแบบ meta-analyses อีกการศึกษาหนึ่งก็ยืนยันว่าในผู้ป่วยที่มี SBP สูง กระเทียมสามารถลด SBP ได้ 16.3 มิลลิเมตรปรอท (95% CI 6.2 to 26.5) และ DBP ได้ 9.3 มิลลิเมตรปรอท (95% CI 5.3 to 13.3) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มี SBP สูงเช่นกัน⁵⁶ อีกการศึกษา

แบบ double-blind parallel randomised placebo-controlled trial ที่ศึกษาในผู้ป่วย 50 รายที่ได้รับการรักษาด้วยยาลดความดันโลหิตสูง (antihypertensives) แต่ควบคุมความดันโลหิตไม่ได้ในช่วง 12 เดือนที่ผ่านมา โดยกลุ่มที่ได้รับกระเทียม (ประกอบด้วย AGE 960 มิลลิกรัม และ SAC 2.4 มิลลิกรัม ซึ่งเทียบเท่ากับกระเทียมสด 2.5 กรัม) เพิ่มเติมจากการรักษาด้วยยาลดความดันโลหิตสูงที่ผู้ป่วยได้รับอยู่เป็นเวลา 12 สัปดาห์ สามารถลด SBP ได้โดยเฉลี่ย 10.2 ± 4.3 มิลลิเมตรปรอท ($p = 0.03$) ซึ่งชี้ให้เห็นว่า AGE มีประสิทธิผลเทียบเท่ากับยาลดความดันโลหิตสูงอื่นๆ ที่ใช้ในปัจจุบันในการลดความดันโลหิตในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาแต่ไม่สามารถควบคุมความดันโลหิตสูง⁵⁷ โดยเทียบกับรายงานที่ว่ายากลุ่ม beta-blockers ลด SBP ได้ 5 มิลลิเมตรปรอท ยากลุ่ม angiotension converting enzyme inhibitors (ACEI) ลดได้ 8 มิลลิเมตรปรอท⁵⁸ และยากลุ่ม angiotensin II type 1 receptor antagonists ลด DBP ได้ 10.3 มิลลิเมตรปรอท⁵⁹

2.4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การเกิดปฏิกิริยา oxidation ของ LDL มีบทบาทสำคัญที่นำไปสู่การพัฒนาไปเป็น atherosclerotic heart disease มีการศึกษาฤทธิ์ของ AGE ในการต้านอนุมูลอิสระที่ส่งผลต่อต้านการเกิด oxidized LDL พบว่า AGE ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดย superoxide scavenging และลดการสร้าง lipid peroxide ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วย Cu^{2+} โดย AGE จับกับ Cu^{2+} (chelation of Cu^{2+})⁶⁰ ผลการศึกษานี้ยืนยันคุณสมบัติของ AGE และ SAC ในการลด oxidative stress ภายในเซลล์⁶¹⁻⁶² นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าทั้ง AGE และ SAC ยังสามารถป้องกัน endothelial cells ไม่ให้เกิดการบาดเจ็บจากการกระตุ้นด้วย oxidized LDL โดยป้องกันการลดลงของระดับ glutathione (GSH) ภายใน

เซลล์ และลดการเกิด oxidative stress ภายในเซลล์ โดย SAC ยังมีฤทธิ์ยับยั้ง H_2O_2 - หรือ TNF- α -induced NF- κ B activation อีกด้วย⁶³ ข้อมูลนี้ยืนยันผลการศึกษาที่พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ AGE อาจมีกลไกผ่านการเพิ่มระดับ GSH ภายในเซลล์ และการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ glutathione disulphide reductase และ superoxide dismutase⁶⁴

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของกระเทียมช่วยยืนยันประโยชน์ ในการลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด โรคหลอดเลือดสมอง (cerebrovascular diseases) ตลอดจนโรคเมเร็งต์อัลไซเมอร์ Alzheimer's disease และ aging เป็นต้น

3. ฤทธิ์อื่นๆ

มีรายงานว่า allicin มีผลต่อทั้ง gram negative bacteria⁶⁵ และ gram positive bacteria ส่วนใหญ่ ซึ่งรวมถึง methicillin resistant *Staphylococcus aureus*,⁶⁶⁻⁶⁷ *Pseudomonas aeruginosa*,⁶⁷ group B streptococci⁶⁸ และ oral streptococci⁶⁹ โดยเมื่อเร็วๆ นี้พบว่า allicin สามารถยับยั้ง hemolytic activity จาก pneumolysin ซึ่งเป็น virulence factor ที่สำคัญของ *Streptococcus pneumoniae*⁷⁰ นอกจากนี้กระเทียมยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida albicans*⁷¹ ต้านเชื้อมาลาเรีย⁷² รวมทั้งมี immunomodulatory effects⁷³⁻⁷⁶ พบว่า กระเทียมสกัดและสารสำคัญต่างๆ เช่น ajoene, allicin, allyl methyl thiosulfinate และ methyl allyl thiosulfinate มีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสหลายชนิด ได้แก่ herpes simplex virus type 1-2, parainfluenza virus type 3, vaccinia virus, vesicular stomatitis virus และ human rhinovirus type 2⁷⁷ สำหรับการศึกษาดังกล่าวในการป้องกันและรักษาโรคหวัด (common cold) ในอาสาสมัครจำนวน 146 ราย ที่รับประทานกระเทียม (มี allicin 180 มิลลิกรัม) เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่ากระเทียมอาจมีประสิทธิผลในการป้องกันโรคหวัดได้ โดย

อาสาสมัครกลุ่มที่รับประทานกระเทียมเกิดโรคหัวใจ 24 ราย ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับประทานกระเทียมเกิด 65 ราย ($p < 0.001$)⁷⁸

สรุป

มีการศึกษามากมายสนับสนุนว่ากระเทียมมีฤทธิ์ในการป้องกันและรักษาโรคหัวใจได้หลายชนิด สำหรับฤทธิ์ป้องกันและรักษาโรคหัวใจและหลอดเลือดของกระเทียมพบว่าสารสำคัญของกระเทียมสามารถยับยั้งเอนไซม์ต่าง ๆ ในขั้นตอนของการสังเคราะห์ cholesterol และ fatty acid โดยผลการศึกษา

ทางคลินิก มีทั้งยืนยันฤทธิ์ลดระดับไขมันในเลือด และปฏิเสธฤทธิ์นี้ของกระเทียม กระเทียมมีฤทธิ์ต้านเกร็ดเลือด ลดความดันโลหิต และต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์อื่นๆ เช่น ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย เชื้อรา เชื้อมาลาเรีย และเชื้อไวรัส รวมทั้งมี immunomodulatory effects ผลจากการศึกษาและวิจัยเหล่านี้มีประโยชน์ในการยืนยันสรรพคุณของกระเทียม และอาจนำไปสู่การพัฒนาไปเป็นยาเพื่อใช้ในการป้องกันและรักษาโรคต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่มีการกล่าวอ้างสรรพคุณอยู่ กว้างขวาง ได้แก่ โรคหัวใจและหลอดเลือด และโรคหัวใจ

เอกสารอ้างอิง

1. นันทวัน บุญยะประภัศร , อรุณ ชัยเจริญพร . สมุนไพร..ไม่แพ้บ้าน (1). กรุงเทพฯ: บริษัทประชาชน จำกัด, 2539.
2. Block E. The chemistry of garlic and onions. *Sci Am* 1985;252:94-9.
3. Augusti KT. Therapeutic values of onion (*Allium cepa* L.) and garlic (*Allium sativum* L.). *Ind J Exp Biol* 1996;34:634-40.
4. Abdullah TH, Kandil O, Elkadi A, et al. Garlic revisited: therapeutic for the major diseases of our time. *J Nat Med Assoc* 1988;80:439-45.
5. Amagase H. Intake of garlic and its components 1998:4. Nutritional and Health Benefits of Garlic as a Supplement Conference Newport Beach, CA. (abstract)
6. Amagase H. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *J Nutr* 2006;136:716S-725S.
7. Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, et al. Intake of garlic and its bioactive components. *J Nutr* 2001;131(3s):955S-62S.
8. Wu XJ, Kassie F, Mersch-Sundermann V. Induction of apoptosis in tumor cells by naturally occurring sulfur-containing compounds. *Mutat Res* 2005;589:81-102.
9. Sundaram SG, Milner JA. Impact of organosulfur components in garlic on canine mammary tumor cells in culture. *Cancer Lett* 1993;74:85-90.
10. Nakagawa H, Tsuta K, Kiuchi K, et al. Growth inhibitory effects of diallyl disulfide on human breast cancer cell lines. *Carcinogenesis* 2001;22:891-7.
11. Tsubura A, Lai YC, Kuwata M, et al. Anticancer effects of garlic and garlic-derived compounds for breast cancer control. *Anticancer Agents Med Chem* 2011;11(3):249-53.
12. Wen J, Zhang Y, Chen X, et al. Enhancement of diallyl disulfide-induced apoptosis by inhibitors of MAPKs in human HepG2 hepatoma cells. *Biochem Pharmacol* 2004;68:323-31.
13. Kwon KB, Yoo SJ, Ryu DG, et al. Induction of apoptosis by diallyl disulfide through activation of caspase-3 in human leukemia HL-60 cells. *Biochem Pharmacol* 2002;63(1):41-7.
14. Druesne N, Pagniez A, Mayeur C, et al. Diallyl disulfide (DADS) increases histone acetylation and p21(waf1/cip1) expression in human colon tumor cell lines. *Carcinogenesis* 2004;25(7):1227-36.
15. Robert V, Mouille B, Mayeur C, et al. Effects of the garlic compound diallyl disulfide on the metabolism, adherence and cell cycle of HT-29 colon carcinoma cells: evidence of sensitive and resistant subpopulations. *Carcinogenesis* 2001;22:1155-61.
16. Gunadharini DN, Arunkumar A, Krishnamoorthy G, et al. Antiproliferative effect of diallyl disulfide (DADS) on prostatic cancer cell line (LNCaP). *Cell Biochem Func* 2005;23:1-6.
17. Arunkumar A, Vijayababu MR, Kanagaraj P, et al. Growth suppressing effect of garlic compound diallyl disulfide on prostate

- cancer cell line (PC-3) *in vitro*. *Biol Pharm Bull* 2005;28:740-3.
18. Arunkumar A, Vijayababu MR, Venkataraman P, et al. Chemoprevention of rat prostate carcinogenesis by diallyl disulfide, an organosulfur compound of garlic. *Biol Pharm Bull* 2006;29(2):375-9.
 19. Hong YS, Ham YA, Choi JH, et al. Effects of allyl sulfur compounds and garlic extract on the expression of Bcl-2, Bax, and p53 in non small cell lung cancer cell lines. *Exp Mol Med* 2000;32:127-34.
 20. Wu XJ, Kassie F, Mersch-Sundermann V. The role of reactive oxygen species (ROS) production on diallyl disulfide (DADS) induced apoptosis and cell cycle arrest in human A549 lung carcinoma cells. *Mutat Res* 2005;579:115-24.
 21. Singh A, Shukla Y. Antitumour activity of diallyl sulfide on polycyclic aromatic hydrocarbon induced mouse skin carcinogenesis. *Cancer Lett* 1998;131:209-14.
 22. Hosono T, Fukao T, Ogihara J, et al. Diallyl trisulfide suppresses the proliferation and induces apoptosis of human colon cancer cells through oxidative modification of beta-tubulin. *J Biol Chem* 2005;280(50):41487-93.
 23. Li Y, Lu YY. Isolation of diallyl trisulfide inducible differentially expressed genes in human gastric cancer cells by modified cDNA representational difference analysis. *DNA Cell Biol* 2002;21:771-80.
 24. Lai KC, Hsu SC, Kuo CL, et al. Diallyl sulfide, diallyl disulfide, and diallyl trisulfide inhibit migration and invasion in human colon cancer colo 205 cells through the inhibition of matrix metalloproteinase-2, -7, and -9 expressions. *Environ Toxicol* 2011 Jun 21. doi: 10.1002/tox.20737.
 25. Druesne-Pecollo N, Latino-Martel P. Modulation of histone acetylation by garlic sulfur compounds. *Anticancer Agents Med Chem* 2011;11(3):254-9.
 26. Nishikawa T, Yamada N, Hattori A, et al. Inhibition by ajoene of skin-tumour promotion in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002;66:2221-3.
 27. Ledezma E, Apitz-Castro R, Cardier J. Apoptotic and antiadhesion effect of ajoene, a garlic derived compound, on the murine melanoma B16F10 cells: possible role of caspase-3 and the alpha(4)beta(1) integrin. *Cancer Lett* 2004;206:35-41.
 28. Antlsperger DS, Dirsch VM, Ferreira D, et al. Ajoene-induced cell death in human promyeloleukemic cells does not require JNK but is amplified by the inhibition of ERK. *Oncogene* 2003;22:582-9.
 29. Dirsch DM, Gerbes AL, Vollmar AM. Ajoene, a compound of garlic, induces apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by generation of reactive oxygen species and activation of nuclear factor kappaB. *Mol Pharmacol* 1998;53:402-7.
 30. Shirin H, Pinto JT, Kawabata Y, et al. Antiproliferative effects of S-allylmercaptocysteine on colon cancer cells when tested alone or in combination with sulindac sulfide. *Cancer Res* 2001;61:725-31.
 31. Xiao D, Pinto JT, Soh JW, et al. Induction of apoptosis by the garlic-derived compound S-allylmercaptocysteine (SAMC) is associated with microtubule depolymerization and c-Jun NH₂-terminal kinase 1 activation. *Cancer Res* 2003;63:6825-37.
 32. Gebhardt R, Beck H. Differential inhibitory effects of garlic-derived organosulfur compounds on cholesterol biosynthesis in primary rat hepatocyte cultures. *Lipids* 1996;31:1269-76.
 33. Liu L, Yeh YY. S-alk(en)yl cysteines of garlic inhibit cholesterol synthesis by deactivating HMG-CoA reductase in cultured rat hepatocytes. *J Nutr* 2002;132(6):1129-34.
 34. Liu L, Yeh YY. Water-soluble organosulfur compounds of garlic inhibit fatty acid and triglyceride syntheses in cultured rat hepatocytes. *Lipids* 2001;36(4):395-400.
 35. Gupta N, Porter TD. Garlic and garlic derived compounds inhibit human squalene monooxygenase. *J Nutr* 2001;131:1662-7.
 36. Singh DK, Porter TD. Inhibition of sterol 4 α -methyl oxidase is the principal mechanism by which garlic decreases cholesterol synthesis. *J Nutr* 2006;136:759S-64S.
 37. Yeh YY, Liu L. Cholesterol-lowering effects of garlic extracts and organosulfur compounds: human and animal studies. *J Nutr* 2001;131:989S-93S.
 38. Alder R, Lookinland S, Berry JA, et al. A systematic review of the effectiveness of garlic as an anti-hyperlipidemic agent. *J Am Acad Nurse Pract* 2003;15(3):120-9.
 39. Khoo YS, Aziz Z. Garlic supplementation and serum cholesterol: a meta-analysis. *J Clin Pharm Ther* 2009;34(2):133-45.
 40. Reinhart KM, Talati R, White CM, et al. The impact of garlic on lipid parameters: a systematic review and meta-analysis. *Nutr Res Rev* 2009;22(1):39-48.

41. Srivastava KC, Tyagi OD, Effects of a garlic-derived principle (ajoene) on aggregation and arachidonic acid metabolism in human blood platelets. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1993;49(2):587-95.
42. Briggs WH, Xiao H, Parkin KL, et al. Differential inhibition of human platelet aggregation by selected allium thiosulfates. *J Agric Food Chem* 2000;48:5731-5.
43. Qi R, Liao F, Inoue K, et al. Inhibition by diallyl trisulfide, a garlic component, of intracellular Ca²⁺ mobilization without affecting inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃) formation in activated platelets. *Biochem Pharmacol* 2000;60:1475-83.
44. Teranishi K, Apitz-Castro R, Robson SC, et al. Inhibition of baboon platelet aggregation in vitro and in vivo by the garlic derivative, ajoene. *Xenotransplantation* 2003;10:374-9.
45. Benavides GA, Squadrito GL, Mills RW, et al. Hydrogen sulphide mediates the vasoactivity of garlic. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(46):17977-82.
46. Al-Qattan KK, Thomson M, Al-Mutawa'a S, et al. Nitric oxide mediates the blood-pressure lowering effect of garlic in the rat two-kidney, one-clip model of hypertension. *J Nutr* 2006; 136(3 Suppl):774S-6S.
47. Sharifi AM, Darabi R, Akbarloo N. Investigation of antihypertensive mechanism of garlic in 2K1C hypertensive rat. *J Ethnopharmacol* 2003;86(2-3):219-24.
48. Kim-Park S, Ku DD. Garlic elicits a nitric oxide-dependent relaxation and inhibits hypoxic pulmonary vasoconstriction in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000;27:780-6.
49. Ku DD, Abdel-Razek TT, Dai J, et al. Garlic and its active metabolite allicin produce endothelium- and nitric oxide-dependent relaxation in rat pulmonary arteries. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002;29(1-2):84-91.
50. 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(19):2560-72.
51. McInnes GT. Lowering blood pressure for cardiovascular risk reduction. *J Hypertens* 2005;Suppl 23(1):S3-8.
52. Turner B, Molgaard C, Marckmann P. Effect of garlic (*Allium sativum*) powder tablets on serum lipids, blood pressure and arterial stiffness in normo-lipidaemic volunteers: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Br J Nutr* 2004;92(4):701-6.
53. Rahman K, Lowe GM: Garlic and cardiovascular disease: A critical review. *J Nutr* 2006; 136(3):736S-40.
54. Pittler MH, Ernst E. Clinical effectiveness of garlic (*Allium sativum*). *Mol Nutr Food Res* 2007;51(11):1382-5.
55. Ried K, Frank OR, Stocks NP, et al. Effect of garlic on blood pressure: A systematic review and meta-analysis. *BMC Cardiovascular Disorders* 2008; 8:13.
56. Reinhart KM, Coleman CI, Teevan C, et al. Effects of garlic on blood pressure in patients with and without systolic hypertension: a meta-analysis. *Ann Pharmacother* 2008;42(12):1766-71.
57. Ried K, Frank OR, Stocks NP. Aged garlic extract lowers blood pressure in patients with treated but uncontrolled hypertension: a randomised controlled trial. *Maturitas* 2010;67(2):144-50.
58. Morgan TO, Anderson AI, MacInnis RJ. ACE inhibitors, beta-blockers, calcium blockers, and diuretics for the control of systolic hypertension. *Am J Hypertens* 2001;14(3):241-7.
59. Baguet JP, Legallier B, Auquier P, et al. Updated meta-analytical approach to the efficacy of antihypertensive drugs in reducing blood pressure. *Clin Drug Investig* 2007;27(11):735-53.
60. Dillon SA, Burmi RS, Lowe GM, et al. Antioxidant properties of aged garlic extract: an in vitro study incorporating human low density protein. *Life Sci* 2003;72:1583-94.
61. Ide N, Lau BH. Aged garlic extract attenuates intracellular oxidative stress. *Phytomedicine (Jena)* 1999;6:125-31.
62. Ide N, Lau BH. S-allylcysteine attenuates oxidative stress in endothelial cells. *Drug Dev Ind Pharm* 1999;25:619-24.
63. Ide N, Lau BHS. Garlic compounds minimise intracellular oxidative stress and inhibit nuclear factor-kB activation. *J Nutr* 2001;131:1020S-6S.
64. Geng Z, Lau BHS. Aged garlic extract modulates glutathione redox cycle and superoxide dismutase activity in vascular endothelial cells. *Phytother Res* 1997;11:54-6.
65. Fujisawa H, Watanabe K, Suma K, et al. Antibacterial potential of garlic-derived allicin and its cancellation by sulfhydryl compounds. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009;73(9):1948-55.

66. Cutler RR, Wilson P. Antibacterial activity of a new, stable, aqueous extract of allicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Br J Biomed Sci* 2004;61:71-4.
67. Cai Y, Wang R, Pei F, et al. Antibacterial activity of allicin alone and in combination with beta-lactams against *Staphylococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antibiot* 2007;60:335-8.
68. Cutler RR, Odent M, Hajj-Ahmad H, et al. *In vitro* activity of an aqueous allicin extract and a novel allicin topical gel formulation against Lancefield group B streptococci. *J Antimicrob Chemother* 2009;63:151-4.
69. Bakri IM, Douglas CW. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. *Arch Oral Biol* 2005;50:645-51.
70. Arzanloua M, Bohloolib S, Jannatic E, et al. Allicin from garlic neutralizes the hemolytic activity of intra- and extra-cellular pneumolysin O *in vitro*. *Toxicon* 2011;57(4):540-5.
71. Lemar KM, Turner MP, Lloyd D. Garlic (*Allium sativum*) as an anti-Candida agent: a comparison of the efficacy of fresh garlic and freeze-dried extracts. *J Appl Microbiol* 2002;93:398-405.
72. Coppi A, Cabinian M, Mirelman D, et al. Antimalarial activity of allicin, a biologically active compound from garlic cloves. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:1731-1737.
73. Lang A, Lahav M, Sakhnini E, et al. Allicin inhibits spontaneous and TNF-alpha induced secretion of proinflammatory cytokines and chemokines from intestinal epithelial cells. *Clin Nutr* 2004;23(5):1199-208.
74. Lamm DL, Riggs DR. Enhanced immunocompetence by garlic: role in bladder cancer and other malignancies. *J Nutr* 2001;131(3s):1067S-70S.
75. Salman H, Bergman M, Bessler H, et al. Effect of a garlic derivative (alliin) on peripheral blood cell immune responses. *Int J Immunopharmacol* 1999;21:589-97.
76. Romano EL, Montano RF, Brito B, et al. Effects of ajoene on lymphocyte and macrophage membrane dependent functions. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1997;19:15-36.
77. Weber ND, Andersen DO, North JA, et al. *In vitro* virucidal effects of *Allium sativum* (garlic) extract and compounds. *Planta Med* 1992;58(5):417-23.
78. Lissiman E, Bhasale AL, Cohen M. Garlic for the common cold. *Cochrane Database Syst Rev* 2009 Jul 8;(3):CD006206.

REVIEWS

Holy basil, Sacred basil

Nuttatakarn Jiruntanat

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University

Abstract

Ocimum sanctum Linn., known in Thailand as “Kapraw”, is a valuable plant which is widely used as food spice and herbal medicine in many Asian countries including Thailand. In Thailand, it is used for the treatment of gastrointestinal disorders such as flatulence, abdominal discomfort, dyspepsia and nausea. It is also useful for, fever, cough, asthma, urticaria and some skin diseases. Its leaves, seed, root or whole plant are used for these purposes. To date, several phytochemical and pharmacological properties of *O. sanctum* have been reported. Most of these studies have been done by using aqueous, ethanol, methanol extracts of its leaves or fixed oil from its seeds. Although there are very few clinical trials evaluating its efficacy in human, but the diversity of pharmacological activities of *O. sanctum*, including anti-ulcerogenic, gastroprotective, antioxidant, anti-inflammatory, analgesic, antidiabetic, antilipidemic, immunoregulatory, anticancer, and radioprotective effects obtained from animal and in cell culture or tissues lend support to its use in alternative medicine and are promising for its development as modern medicine.

กะเพรา (Holy basil, Sacred basil)

ณัฐกานต์ จิรัณัฐ

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ

กะเพรา (*Ocimum sanctum* Linn.) เป็นพืชที่ทรงคุณค่า โดยมีการใช้ประกอบอาหารและเป็นยาสมุนไพรในหลายประเทศในเอเชีย รวมทั้งประเทศไทย กะเพราถูกนำไปใช้สำหรับรักษาโรคของระบบทางเดินอาหาร เช่น ท้องอืด ท้องเฟ้อ แน่นท้อง จุกเสียด ปวดท้อง และคลื่นไส้ นอกจากนี้ยังใช้สำหรับลดไข้ ไอ หอบหืด ลมพิษ และโรคผิวหนังบางชนิดได้ โดยจะใช้ส่วนของใบ เมล็ด ราก หรือทั้งต้นเพื่อจุดประสงค์ที่กล่าวมา ปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาพิษฤทธิและคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของกะเพรามากมาย ซึ่งการศึกษาส่วนใหญ่ใช้สารสกัดน้ำ ethanol หรือ methanol ของใบกะเพรา หรือน้ำมันเมล็ดกะเพรา แม้ว่าจะมีการศึกษาทางคลินิกซึ่งประเมินประสิทธิผลของกะเพราในมนุษย์อยู่น้อยมาก แต่คุณสมบัติทางเภสัชวิทยาที่หลากหลายของกะเพรา ได้แก่ ฤทธิ์ต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหารและปกป้องกระเพาะอาหาร ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ระงับปวด ต้านเบาหวาน ลดไขมันในเลือด ปรับระบบภูมิคุ้มกัน ต้านมะเร็ง และป้องกันอันตรายจากรังสีที่ได้จากการศึกษาในสัตว์ทดลองหรือเซลล์เนื้อเยื่อต่างๆ จะช่วยสนับสนุนการนำกะเพราไปใช้ในการแพทย์ทางเลือกและใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาเป็นยาแผนปัจจุบันได้ในอนาคต

บทนำ

กะเพรา^{1,2} เป็นพืชไม้ล้มลุก อยู่ในวงศ์ Labiatae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ocimum sanctum* Linn. และชื่อวิทยาศาสตร์พ้องว่า *Ocimum tenuiflorum* Linn ชื่ออื่นๆ ได้แก่ กะเพราขาว กะเพราแดง (ภาคกลาง) กอมก้อ กอมก้อดง (เชียงใหม่) ห่อแก้วชู ห่อตุปูลู (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) อิมคิมหล่า (เงี้ยว-แม่ฮ่องสอน)¹⁻ กะเพราเป็นไม้ต้นเล็ก ๆ สูงประมาณ 1-3 ม. ลำต้นและกิ่งอ่อนมีขน เมื่อแก่เกลี้ยง โคนต้นแข็ง กิ่งเป็นสี่เหลี่ยม ใบเดี่ยวเรียงตรงข้ามเป็นคู่ๆ รูปใบหอกแกมรี กว้าง 2.5-4.5 ซม. ยาว 5-10 ซม. ปลายใบแหลม โคนใบสอบ ขอบใบจักเป็นฟันเลื่อยหรือจักมน เฉพาะบริเวณโคนใบจะเรียบ มีขนละเอียดปกคลุมหรือมีขนประปราย ก้านใบเล็ก ยาว 2-4.5 ซม. มีขนดอกออกเป็นช่อที่ยอดและที่ปลายกิ่ง ดอกเป็นช่อตั้งขึ้นไปเป็นชั้นๆ คล้ายฉัตร ช่อดอกแบบกระจะหรือกระจะซ้อน ยาว 10-15 ซม. แกนกลางช่อมีขนนุ่ม รั้วประดับรูปไข่ ปลายเรียวแหลม ไม่มีก้าน ก้านดอกสั้นมาก กลีบเลี้ยงรูประฆังเชื่อมติดกันเป็นหลอดยาว 15.2 มม. ผลแห้งมีรูปรีขนาดเล็ก 4 ผลอยู่ด้วยกัน^{1,3,4} กะเพราที่มีก้านใบมีสีแดงหรือสีแดงม่วงแดงอมกลุโคส ดอกสีชมพูม่วง ลำต้นสีแดง ลักษณะคล้ายใบสาระแน เรียกว่ากะเพราแดง ส่วนชนิดที่มีต้นและกิ่งอ่อนเป็นสีเขียว ใบมีสีเขียวอ่อน ดอกสีขาว เรียกว่ากะเพราขาว กะเพราทั้งสองชนิดนี้ใช้ใบประกอบในการปรุงเป็นอาหาร โดยกะเพราแดงมีรสเผ็ดร้อนแรงกว่ากะเพราขาวมาก^{2,3}

ส่วนที่ใช้

ใบ เมล็ด ราก หรือทั้งต้น

สรรพคุณ¹⁻⁵

ใบ ใช้เป็นยาขับลม ขับผายลม แก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ อาการจุกเสียดในท้อง ปวดท้อง และบำรุงธาตุ นอกจากนี้ยังช่วยขับเหงื่อ ขับเสมหะ รวมทั้งรักษาโรคผิวหนังและกลากเกลื้อนได้

เมล็ด ใช้พอกบริเวณตาเมื่อมีผงหรือฝุ่นละอองเข้าตา ผงหรือฝุ่นก็จะหลุดออกมาได้

ราก แก้โรคธาตุพิการ แก้จุกเสียดท้องอืด ท้องเฟ้อ แก้ไข้ แก้ลมพิษ ขับเหงื่อ รวมทั้งแก้หืด ไอ และสะอึก

ตามตำราการแพทย์แผนไทย กะเพราใช้เป็นสมุนไพรหลักในยาตำรับที่ชื่อ “ประสะกะเพรา” โดยใช้แก้ท้องขึ้น ท้องเฟ้อ ปวดท้องคลื่นไส้ อาเจียน นอกจากนี้ยังมีการนำมาแกงเลียงใบกะเพรารับประทานหลังคลอดเพื่อช่วยขับน้ำนม ในชาวใต้ใช้ใบเป็นยาขับน้ำนมเช่นเดียวกัน

องค์ประกอบทางเคมี

กะเพรา มีสารอาหารต่างๆ ทั้งคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน รวมทั้งมีวิตามินเอและฟอสฟอรัส ค่อนข้างมาก และยังมีเกลือแร่และวิตามินอื่นๆ^{1,5} นอกจากนี้ยังพบว่าในกะเพราและน้ำมันหอมระเหยจากใบกะเพรามีสารประกอบหลายชนิดซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา สารประกอบที่สำคัญที่สุดคือ eugenol^{6,7} และยังพบสารประกอบกลุ่ม phenolic compounds อื่นๆ ได้แก่ cirsilineol⁷, isothymusin⁷, isothymonin⁷, rosmarinic acid^{7,8} ส่วนสารกลุ่ม flavonoids ที่สำคัญ ได้แก่ orientin⁹ และ vicenin⁹ นอกจากนี้ยังพบสารอื่นๆ อีก เช่น ursolic acid, apigenin, apigenin-7-O-glucuronide, luteolin, luteolin-7-O-glucuronide และ molludistin¹⁰

การศึกษาทางเภสัชวิทยา

1.1 ฤทธิ์ต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร และปกป้องกระเพาะอาหาร

ฤทธิ์ต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหารและปกป้องกระเพาะอาหารเป็นฤทธิ์ที่สำคัญของกะเพรา โดยมีรายงานว่าสารสกัดกะเพรามีผลลดการเกิดแผลในกระเพาะอาหารของหนูขาวที่ผ่านการทำ pylorus ligation และของหนูขาวที่ได้รับ aspirin ร่วมกับการทำ pylorus ligation โดยฤทธิ์ต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหารเกิดจากการยับยั้งการหลั่งกรดและเพิ่มการสร้างสารเยื่อเมือก (mucous) ในกระเพาะอาหาร¹¹ ต่อมา มีรายงานว่า fixed oil จากกะเพรา มีฤทธิ์ต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหารในสัตว์ทดลองที่เหนียวน้ำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารด้วย aspirin, indomethacin, ethanol, histamine, reserpine, serotonin หรือความเครียด โดยออกฤทธิ์ลดการหลั่งกรดและยังมีฤทธิ์ลดการอักเสบจากการยับยั้งเอนไซม์ lipooxygenase (LOX)¹² ในอีกการศึกษาหนึ่งพบว่า สารสกัด ethanol จากใบกะเพราในขนาด 100 มก./กก. ที่ป้อนให้หนูขาวทางปาก สามารถต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหารที่เหนียวน้ำด้วย cold restraint, aspirin, ethanol หรือ pylorus ligation ได้ถึง 65.07, 63.49, 53.87 และ 62.06% ตามลำดับ รวมทั้งยังยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหารของหนูตะเภาที่เกิดจาก histamine ได้ถึง 61.76% นอกจากนี้ สารสกัดดังกล่าวยังมีฤทธิ์สมานแผลเรื้อรังในกระเพาะอาหารที่เหนียวน้ำด้วย acetic acid ได้ภายใน 20 วันหลังได้รับสารสกัดอีกด้วย รวมทั้งยังสามารถลดปริมาณกรด (free acidity) ความเป็นกรด (total acidity) และ peptic activity ได้ถึง 72.58, 58.63, 57.6% ตามลำดับ และเพิ่มการหลั่ง mucin ถึง 34.61% โดยฤทธิ์ต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหารและสมานแผลของสารสกัดนี้ น่าจะเกิดจากฤทธิ์

ปกป้องเยื่อในกระเพาะอาหารมากกว่าการยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร¹³

ในอีกการศึกษาหนึ่ง ที่ใช้สารสกัด methanol จากใบกะเพราที่มี eugenol 5% ป้อนทางปากให้สัตว์ทดลองในขนาด 50-200 มก./กก. วันละ 2 ครั้งเป็นเวลา 5 วัน พบว่าสารสกัดกะเพรา มีฤทธิ์ป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหารที่เหนียวน้ำด้วย cold restraint ได้ในขนาด 100 มก./กก. สามารถป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหารที่เหนียวน้ำด้วย ethanol และ pylorus ligation ได้ แต่ไม่มีประสิทธิภาพในการป้องกันแผลในกระเพาะอาหาร ที่เกิดจาก aspirin สารสกัดในขนาดเดียวกันนี้ มีฤทธิ์สมานแผลที่เหนียวน้ำด้วย acetic acid ได้ภายใน 5 และ 10 วันหลังได้รับสารสกัด ฤทธิ์เหล่านี้เกิดจากกลไกในการลด offensive factors ได้แก่ การยับยั้งการหลั่ง acid-pepsin และการเกิด lipid peroxidation ในขณะที่ช่วยเพิ่ม gastric defensive factors ได้แก่ การหลั่ง mucin, cellular mucus และยืดอายุของ mucosal cells และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แต่ไม่ได้เหนียวน้ำการเพิ่มจำนวนของ mucosal cells¹⁴

สารสกัด hydroalcohol จากใบกะเพราในขนาด 100 และ 120 มก./กก. มีฤทธิ์ป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหารที่เหนียวน้ำด้วย ethanol และ pylorus ligation ได้ และสามารถยับยั้งการเกิดแผลในลำไส้ส่วนต้น (duodenum) ของหนูตะเภาที่เหนียวน้ำด้วย histamine นอกจากนี้ยังพบว่า มีการลดลงของระดับ malondialdehyde (MDA) ในหนูขาวที่ทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารด้วย ethanol และในหนูตะเภา ที่ทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารด้วย histamine ในขณะที่มีการเพิ่มขึ้นของระดับ superoxide dismutase (SOD) ในหนูขาวที่ทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารด้วย pylorus ligation และในหนูตะเภา ที่ทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารด้วย histamine โดยฤทธิ์ป้องกันการเกิดแผลในทางเดินอาหารของสารสกัดใบกะเพรานี้

คาดว่าเกิดจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ¹⁵

1.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

มีผู้สนใจทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกะเพราเป็นจำนวนมาก จากการทดสอบด้วย chemiluminescence method, cytochrome C reduction และ deoxyribose oxidation methods พบว่า สารสกัดกะเพรา มีฤทธิ์เก็บกินอนุมูลอิสระ (free radical scavenging activity) peroxy, superoxide และ hydroxyl ได้¹⁶ มีรายงานการศึกษาว่า essential oil จากกะเพรา มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่อทำการทดสอบด้วย hypoxanthine/xanthine oxidase assay และ DPPH assays⁶ อีกการศึกษาหนึ่งป้อนสาร สกัดกะเพราให้หนูถีบจักรเพศผู้ในขนาด 0.5 ก./กก. เป็นระยะเวลา 15 วัน มีผลเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย ได้แก่ SOD และ catalase (CAT)¹⁷ ต่อมา มีรายงานว่า สารสกัดกะเพรา มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง superoxide anions ในหลอดทดลอง และยับยั้งการสร้าง lipid peroxides ในเม็ดเลือดขาวได้ นอกจากนี้เมื่อนำสารสกัดกะเพราในขนาด 500 มก./กก. มาป้อนให้กับหนูขาวที่เป็นเบาหวาน พบว่าสามารถยับยั้งการสร้าง lipid peroxides ทั้งยังทำให้ระดับ reduced glutathione (GSH) สูงขึ้นใกล้เคียงกับระดับปกติอีกด้วย¹⁸ สารสำคัญในกะเพราที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี ได้แก่ eugenol^{6,7}, cirsilinoleol⁷, isothymusin⁷, isothymonin⁷, rosmarinic acid^{7,8}, orientin⁹ และ vicenin⁹ ทั้งนี้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกะเพราถือเป็นฤทธิ์ที่สำคัญและมีบทบาทเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่นๆของกะเพรา ได้แก่ ป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร¹⁵ เร่งการสมานแผล^{19,20} ป้องกันการเกิดมะเร็ง²¹ และการแพร่กระจายของมะเร็ง²² รวมทั้งฤทธิ์ปกป้องอวัยวะภายใน (เช่น ตับ^{23,24} ตา^{25,26} ระบบประสาท²⁷⁻²⁹ หัวใจและหลอดเลือด³⁰⁻³⁴)

และป้องกันอันตรายจากรังสี³⁵⁻³⁹

1.3 ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

สารสกัด methanol และสารสกัดแวนตะกอนในน้ำของกะเพรา มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง ดังจะเห็นได้จากฤทธิ์ยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูขาวที่เหนี่ยวนำด้วย carrageenan และลดการสร้าง granuloma และ exudates ที่เหนี่ยวนำด้วย croton oil ตามลำดับ ซึ่งฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดทั้งสองชนิดในขนาด 500 มก./กก. เทียบเท่ากับฤทธิ์ของ sodium salicylate ในขนาด 300 มก./กก. นอกจากนี้สารสกัดทั้งสองชนิดยังมีฤทธิ์ระงับปวดจากการทดลองที่ใช้ hotplate ในหนูถีบจักร ลดไข้จากการทดลองที่เหนี่ยวนำให้เกิดไข้ด้วย typhoid-paratyphoid A/B vaccine และระงับอาการท้องเดินที่เหนี่ยวนำให้ท้องเดินด้วย castor oil⁴⁰

มีรายงานว่า fixed oil จากกะเพรา มีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยสามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูขาวที่เหนี่ยวนำด้วย carrageenan, arachidonic acid, leukotriene B₄, prostaglandin E₂, histamine, serotonin, และ hyaluronic acid⁴¹ ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า fixed oil มีฤทธิ์ยับยั้งเมแทบอลิซึมของ arachidonic acid โดยอาจมีผลยับยั้งเอนไซม์ของทั้ง COX และ LOX pathways^{41,42} สารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านการอักเสบน่าจะเป็น linolenic acid ที่อยู่ใน fixed oil ของกะเพรา³ นอกจากนี้ fixed oil จากกะเพรายังมีฤทธิ์ยับยั้งอาการท้องเดินที่เหนี่ยวนำด้วย castor oil อีกด้วย⁴¹

มีการศึกษาหนึ่งพบว่า สารสกัดจากใบและต้นของกะเพรา มีสารอยู่หลายชนิดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ eugenol, cirsilinoleol, cirsimaritin, isothymusin, isothymonin, apigenin และ rosmarinic acid โดยเมื่อทำการ

ทดสอบซึ่งใช้สารเหล่านี้ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครโมล พบว่า eugenol, apigenin, rosmarinic acid, cirsimaritin, cirsilinoleol, และ isothymonin มีฤทธิ์ยับยั้ง COX-1 ได้ 97, 65, 58, 50, 37 และ 37% ตามลำดับ ในขณะที่ eugenol, cirsilinoleol, cirsimaritin, apigenin และ rosmarinic acid มีฤทธิ์ยับยั้ง COX-2 ได้ดีกว่า COX-1 เล็กน้อย⁷

ต่อมาเมื่อมีการศึกษาที่รายงานว่าน้ำมัน (fixed oil) จากกะเพราสามารถลดการรั่วของโปรตีนและสีย้อมใน peritoneal fluid ของหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีการอักเสบในช่องท้องได้ นอกจากนี้ในการทดลองที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบในช่องอก (pleurisy) ของหนูขาวด้วย carrageenan พบว่า fixed oil ของกะเพราสามารถยับยั้ง migration ของเม็ดเลือดขาวชนิด leucocytes เข้าไปใน pleural exudates ได้ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า fixed oil สามารถลดการซึมผ่านหลอดเลือด และ migration ของ leucocytes หลังเกิดการอักเสบได้⁵ ในอีกการศึกษาหนึ่งซึ่งใช้ fixed oil จากสมุนไพรชนิดต่างๆ พบว่า fixed oil จากกะเพราซึ่งมีปริมาณ alpha-linolenic acid สูง มีฤทธิ์ต้านการบวมของอุ้งเท้าหนูขาวที่เหนี่ยวนำด้วย carrageenan, leukotriene และ arachidonic acid ดีกว่า fixed oil จากสมุนไพรอื่นที่มีปริมาณ alpha-linolenic acid ต่ำ โดย fixed oil จากกะเพราจะมีฤทธิ์ยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูที่เหนี่ยวนำด้วย leukotriene มากที่สุด⁴³

1.4 ฤทธิ์ระงับปวด

สารสกัดเมทานอลและสารสกัดแวนตะกอนในน้ำของกะเพรา มีฤทธิ์ระงับปวดในการทดลอง hotplate ในหนูถีบจักร⁴⁰ ต่อมาเมื่อมีรายงานว่าสารสกัด ethanol จากใบกะเพรา มีฤทธิ์ระงับปวด เมื่อฉีดเข้าทางช่องท้องในขนาด 50 และ 100 มก./กก. และป้อนทางปากในขนาด 50,

100 และ 200 มก./กก. สามารถลดจำนวนครั้งของการบิดตัวในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเจ็บปวดด้วย acetic acid ได้ (acetic acid induced writhing response) อีกทั้งเมื่อให้สารสกัดดังกล่าวโดยการฉีดเข้าทางช่องท้อง ยังสามารถเพิ่ม tail withdrawal latency ในหนูถีบจักรได้ นอกจากนี้ naloxone (ยาต้านโอปิออยด์) และ DSP-4 (ยาลดระดับ noradrenaline ในสมอง) สามารถลดฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดในการทดลองทั้ง 2 ชนิด ในขณะที่ยา parachlorophenylalanine (ยาลดการสังเคราะห์ serotonin) สามารถเสริมฤทธิ์กับสารสกัดในการทดลอง tail flick ได้ ผลการทดลองเหล่านี้แสดงว่า สารสกัดกะเพรา มีฤทธิ์ระงับปวดโดยมีกลไกการออกฤทธิ์ผ่านสารสื่อกลางประสาทหลายชนิดทั้งภายในและภายนอกสมอง⁴⁴

1.5 ฤทธิ์ต้านเบาหวาน

สารสกัด ethanol จากใบกะเพราและสารสกัดน้ำจากใบกะเพราที่ให้โดยการป้อนทางปาก สามารถลดระดับกลูโคสในเลือดของหนูขาวปกติ⁴⁵⁻⁴⁷ และของหนูขาวที่มีระดับกลูโคสในเลือดสูงจากการป้อนกลูโคส⁴⁵ และหนูขาวที่เหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย

streptozotocin^{45,46} หรือ alloxan^{47,48} โดยสารสกัด ethanol จากใบกะเพรามีฤทธิ์ 91.55 และ 70.43% ของยา tolbutamide ในหนูขาวปกติ และหนูขาวที่เป็นเบาหวานตามลำดับ⁴⁵

การศึกษาต่อมาพบว่า สารสกัด ethanol จากใบกะเพราในขนาด 200 มก./กก. เป็นเวลา 30 วัน มีผลลดระดับกลูโคสในเลือดของหนูที่เป็นเบาหวานจากการเหนี่ยวนำด้วย streptozotocin ได้ประมาณ 9.06 และ 26.4% ในวันที่ 15 และ 30 ของการทดลอง นอกจากนี้พบว่าสารสกัดนี้มีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ hexokinase, glucokinase และ phosphor-

Fructokinase ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตในหนูที่เป็นเบาหวาน อย่างไรก็ตาม สารสกัดนี้ไม่มีผลต่อระดับ glycogen ในเนื้อเยื่อ ตับ และกล้ามเนื้อลายของหนูที่เป็นเบาหวาน⁴⁹ ถึงกระนั้นก็ตาม ในอีกการศึกษาหนึ่งพบว่า สารสกัด ethanol จากใบกะเพราที่ให้แก่หนูขาวที่เหนียวน้ำให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin ช่วยลดระดับกลูโคสและ glycosylated haemoglobin ในเลือด ในขณะที่เดียวกันก็เพิ่มระดับของ glycogen, haemoglobin และโปรตีนในหนูเบาหวาน นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดนี้ช่วยให้การทำงานของเอนไซม์ hexokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase และ glycogen synthetase ซึ่งลดลง กลับมีระดับเพิ่มสูงขึ้นจนใกล้เคียงระดับปกติ ในขณะที่ทำให้การทำงานของ lactate dehydrogenase, fructose-1,6-bisphosphatase, glucose-6-phosphatase และ glycogen phosphorylase ที่สูงขึ้นในหนูเบาหวานกลับลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้พบว่าการทำงานของอินซูลินกับ receptor ในหนูเบาหวานจะลดลงอย่างมากในหนูที่รับสารสกัด⁵⁰ ในการศึกษาต่อมาพบว่าสารสกัด ethanol และส่วนสกัด 5 ชนิด (water, butanol, ethylacetate, chloroform และ hexane fractions) จากใบกะเพราที่มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลินจาก perfused rat pancreas, isolated rat islets และ clonal rat beta-cell line⁵¹ ในการศึกษาสารสกัดน้ำจากใบกะเพราที่ให้ 200 มก./กก./วัน เป็นเวลา 30 วันในหนูขาวที่ได้รับ บอาหารผสมฟรุกโตส 66% ช่วยลดระดับกลูโคสในเลือดได้อย่างมีนัย 2.สำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่มีผลป้องกันภาวะ TG และอินซูลินในเลือดสูงได้⁵² มีรายงานว่าสารสกัดกะเพราในขนาด 500 มก./กก. เมื่อนำมาป้อนให้กับหนูขาวที่เป็นเบาหวาน พบว่าไม่เพียงแต่จะช่วยลดระดับกลูโคสในเลือดเท่านั้น ยังช่วยฟื้นฟูการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ และทำ

ให้ระดับ glutathione (GSH) สูงขึ้นใกล้เคียงกับระดับปกติอีกด้วย ซึ่งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดังกล่าวจะเป็นประโยชน์ในการป้องกันภาวะแทรกซ้อนของเบาหวานได้¹⁸ ในอีกการศึกษาหนึ่งพบว่า การให้อาหารผสมฟรุกโตสแก่หนูขาวเป็นเวลา 60 วัน จะทำให้น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น ระดับกลูโคสในเลือดสูง อินซูลินในเลือดสูง TG ในเลือดสูง และเกิดภาวะดื้ออินซูลิน ซึ่งสารสกัดน้ำจากกะเพราทั้งต้นช่วยลดผลดังกล่าวและสามารถป้องกันการเกิดภาวะดื้ออินซูลินที่เหนียวน้ำด้วยฟรุกโตสในหนูขาวได้⁵³

มีรายงานว่าผงใบกะเพราที่ให้กับหนูปกติและหนูที่เป็นเบาหวานเป็นเวลา 1 เดือน ช่วยลดระดับ fasting blood glucose, uronic acid, total amino acids, TC, TG, phospholipids และ total lipids ในเลือด นอกจากนี้ ยังลดระดับ TC และ TG ที่ตับ ลด total lipids ที่ตับและไต ส่วนที่หัวใจมีการลดลงของ TC และ phospholipids⁵⁴ การศึกษาต่อมาพบว่าผงใบกะเพราในขนาด 200 มก./กก./วัน ที่ให้แก่หนูขาวที่เป็นเบาหวานที่เหนียวน้ำด้วย alloxan ช่วยลดระดับกลูโคสในเลือดของหนูได้ แต่ไม่สามารถป้องกันการเกิดต้อกระจก (cataract) ในวันที่ 75, 100 และ 115 วัน หลังจากเหนียวน้ำให้หนูเป็นเบาหวานด้วย alloxan⁵⁵ อย่างไรก็ตาม ในอีกการศึกษาหนึ่งพบว่าน้ำมันเมล็ดกะเพราในขนาด 0.8 ก./กก./วัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ที่ไม่มีผลลดระดับกลูโคสในเลือดของกระต่ายที่เป็นเบาหวานซึ่งเหนียวน้ำด้วย alloxan⁵⁶

1.6 ฤทธิ์ลดไขมัน (Antilipidemic effect)

การให้ใบสดของกะเพราขนาด 1 และ 2 กรัมผสมในอาหาร 100 กรัม นาน 4 สัปดาห์ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของ lipid profile ในกระต่ายปกติ คือทำให้ระดับ TC, TG, phospholipid และ LDL-cholesterol ในซีรัมลดลง ในขณะที่เพิ่มระดับ HDL-cholesterol

และปริมาณรวมของ sterol ในอุจจาระ⁵⁷ จากการศึกษาพบว่า การให้ผงใบกะเพรานั้น 1 เดือนช่วยลดระดับ TC, TG, phospholipids และไขมันรวมในเลือด นอกจากนี้มีผลลด TC และ TG ที่ตับ ไขมันรวมที่ตับและไต รวมทั้งลดระดับ TC และ phospholipids ที่หัวใจในหนูที่เป็นเบาหวาน⁵⁴ มีการศึกษาหนึ่งพบว่า การให้น้ำมันจากเมล็ดกะเพราในขนาด 0.8 ก./กก./วัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ช่วยลดระดับ cholesterol, TG และ LDL- และ VLDL-cholesterol ในซีรัมของกระต่ายที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารที่มี cholesterol (100 มก./กก./วัน) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับน้ำมันจากเมล็ดกะเพรา⁵⁶ ในอีกการศึกษาหนึ่งทำโดยเลี้ยงหนูขาวด้วยอาหารที่มี cholesterol สูงเป็นเวลา 7 สัปดาห์ โดย 3 สัปดาห์สุดท้าย ให้ได้น้ำมันจากใบกะเพราแก่หนูขาว วันละครั้งด้วย พบว่าน้ำมันใบกะเพราที่มี eugenol และ methyl eugenol เป็นสารประกอบหลักมีผลลดระดับไขมัน, lactate dehydrogenase และ creatine kinase ในซีรัม รวมทั้งลด atherogenic index โดยไม่มีผลลดระดับเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) และ alkaline phosphatase (ALP) ที่ตับในหนูขาวที่ได้รับอาหารที่มี cholesterol สูง⁵⁸ ส่วน อีกการศึกษาหนึ่งซึ่งให้ใบกะเพราสดในขนาด 2 กรัม / วันแก่กระต่ายสุขภาพดีเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าทำให้ระดับ homocysteine, TC, TG, LDL- และ, VLDL-cholesterol ในซีรัมลดต่ำลง ในขณะที่ระดับ HDL-cholesterol เพิ่มขึ้น⁵⁹ ในการศึกษา fixed oil จากกะเพราในหนูขาวเพศผู้ 4 กลุ่มคือ กลุ่มปกติ กลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารไขมันสูง กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับ fixed oil จากกะเพรา กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับ simvastatin พบว่า เมื่อให้ fixed oil จากกะเพราในช่วง 3 สัปดาห์สุดท้าย มีผลยับยั้งการเพิ่มขึ้นของ TC, TG,

LDL-cholesterol, และ atherogenic index แต่ไม่มีผลต่อ HDL-cholesterol นอกจากนี้ fixed oil จากกะเพรายังมีผลยับยั้งการเพิ่มขึ้นของ cholesterol และ TG ที่ตับ แต่ไม่มีผลต่อระดับไขมันทั้งสองชนิดในอุจจาระ Fixed oil ยังทำให้การเพิ่มขึ้นของ lactate dehydrogenase และ creatinine kinase-MB กลับลดลงสู่ระดับปกติ แต่ไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของระดับ ALT, AST, และ ALP จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า fixed oil จากกะเพรามีฤทธิ์ลดไขมัน ต้านการแข็งตัวของหลอดเลือด และปกป้องหัวใจจากภาวะไขมันในเลือดสูง โดยคาดว่าสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ คือ linolenic acid และ linoleic acid ที่อยู่ในน้ำมัน⁶⁰

1.7 ฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน

กะเพรามีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน⁶¹ มีการศึกษาสารสกัด methanol และส่วนสกัดน้ำจากใบกะเพราต่อการควบคุมระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายโดยใช้ *Salmonella typhosa* และ sheep erythrocytes พบว่าสารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบ humoral immunologic response ดังจะเห็นได้จากการเพิ่มขึ้นของ antibody titre ในทั้ง Widal และ sheep erythrocyte agglutination tests รวมทั้งแบบ cellular immunologic response ดังเห็นได้จาก E-rosette formation และ lymphocytosis⁶² การศึกษาที่ทำให้หนูเครียดโดยการจำกัดการเคลื่อนไหว (restraint stress) พบว่า น้ำมันเมล็ดกะเพรามีฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันทั้งแบบ humoral-mediated immune (HMI) และ cell-mediated immune (CMI) มีฤทธิ์ป้องกันการลดลงของ anti-SRBC antibody titre (ซึ่งเป็น HMI responses) รวมทั้งป้องกันการลดลงของ foot pad thickness และ percentage LMI (% LMI) (ซึ่งเป็น CMI responses) ทั้งนี้ฤทธิ์ดังกล่าวของน้ำมันเมล็ดกะเพราจะเพิ่มขึ้นถ้าให้ร่วมกับ diazepam ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม benzodiazepines

(BDZ) ในขณะที่จะถูกยับยั้งได้ด้วย flumazenil ซึ่งเป็นยาต้าน BZD⁶³ สารสกัดน้ำจากใบกะเพรา ในอีกการศึกษาหนึ่งสามารถลด total bacterial count (TBC) แต่เพิ่ม neutrophil และ lymphocyte counts ร่วมไปกับการเพิ่มขึ้นของ phagocytic activity และ phagocytic index นอกจากนี้ มี การ เพิ่มขึ้น ปริมาณของ ไลโซโซม (lysosome) ของ polymorphonuclear cells (PMNs) ในน้ำนมของวัว ที่ได้รับสารสกัดนี้ 64 จากการทดลองในหนูตะเภา ยาต้านวัณโรค (isoniazid, rifampicin และ pyrazinamide) จะทำให้เกิดความเป็นพิษต่อตับ (เอนไซม์ตับเพิ่มสูงขึ้น) และกดภูมิคุ้มกัน (phagocytic % [P%], phagocytic Index และ chemotactic index ลดลง) เมื่อให้สารสกัดกะเพรา แก่หนูตะเภา 2 ชั่วโมงก่อนให้ยาต้านวัณโรค ดังกล่าวสามารถลด การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ตับและเพิ่ม P% แสดงว่าสารสกัดกะเพรา มีฤทธิ์ปกป้องตับและป้องกันการกดภูมิคุ้มกันจากยาต้านวัณโรคได้ 65 ในอีก การศึกษาหนึ่งซึ่งทดลองโดยให้ lindane (สารที่มี immunotoxicity และ oxidative activity) แก่ หนูขาว แล้ววัด hemagglutination titer ต่อ sheep red blood cells (SRBC) (บ่งถึง HMI) และ foot pad thickness (เพื่อประเมิน delayed type hypersensitivity) พบว่าสาร lindane มีผล ลด anti-SRBC antibody titer และ foot pad thickness เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม น้ำมันจาก เมล็ดกะเพราเพิ่ม anti-SRBC antibody titer แต่ไม่มีผลต่อ foot pad thickness เมื่อเทียบกับ กลุ่มที่ได้รับ lindane อย่างเดียว นอกจากนี้ น้ำมันจากเมล็ดกะเพรา สามารถลด oxidative stress (การเพิ่มขึ้นของระดับ MDA และการ ลดลงของระดับ GSH) ของ lindane ได้⁶⁶

1.8 ฤทธิ์ต้านมะเร็งและการแพร่กระจายของ มะเร็ง

การศึกษาใน liver microsomes ของหนู

ขาว ursolic acid ซึ่งสกัดจากกะเพรา มีฤทธิ์ ป้องกันการเกิด lipid peroxidation ที่เหนี่ยวนำ ด้วย ascorbic acid, carbon tetrachloride ADP/Iron⁶⁷ ใบกะเพรา มีฤทธิ์ต้านการเกิด มะเร็งโดยการเหนี่ยวนำให้เกิด squamous cell carcinomas ในกระเพาะอาหารของหนูถีบจักร ด้วยการป้อน benzo[a]pyrene (B[a]P) และการ เหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งตับในหนูขาวโดยการป้อน 3'-methyl-4-dimethylamino-a-zobenzene (3'MeDAB) ได้⁶⁸ การทาสารสกัดเอทานอล จากใบกะเพราบนผิวหนังเป็นเวลา 15 วัน สามารถลดการเกิดมะเร็งผิวหนังชนิด papilloma ในหนูถีบจักร โดยมีผลทำให้ในผิวหนังมีระดับ GSH เพิ่มขึ้นถึง 2 เท่า และ glutathione S-transferase (GST) activity สูงขึ้นถึง 25% ซึ่ง แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ⁶⁹ การ สารสกัด ethanol จากใบกะเพราในขนาด 400 และ 800 มก./กก./วัน เป็นเวลา 15 วันแก่หนู ถีบจักร ทำให้เพิ่ม activity ของ cytochrome P (CYP)-450, CYP B5, aryl hydrocarbon hydroxylase และ GST ในตับซึ่งมีบทบาทสำคัญ ในการขจัดสารก่อมะเร็งและสารก่อกลายพันธุ์ (mutagens) นอกจากนี้ยังทำให้มีการเพิ่มขึ้น ของ GST ภายนอกตับ และของระดับ GSH ในเนื้อเยื่อ ของตับ ปอด และกระเพาะอาหาร การทดลองนี้แสดงว่าสาร สกัดมีฤทธิ์ป้องกัน สาร ก่อมะเร็งและสารก่อกลายพันธุ์ได้⁷⁰ เมื่อนำเซลล์ ตับที่เลี้ยงไว้มาใส่สารสกัดกะเพราที่ 0-500 มกค. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงใส่ dimethylbenz[a]- anthracene (DMBA) เป็น เวลา 18 ชั่วโมง เมื่อนำเซลล์ไปแยกเอา DNA ออกมาทำการวิเคราะห์ พบว่าสารสกัด ทำให้ ระดับของ DMBA-DNA adducts ลดลงอย่างมี นัยสำคัญโดยไม่ ทำให้เซลล์ตาย การศึกษานี้ แสดงว่าสารสกัดใบกะเพราสามารถยับยั้งการ เกิดมะเร็งได้โดยยับยั้ง metabolic activation ของสารก่อมะเร็ง⁷¹ ในการศึกษาฤทธิ์ต้านการ

เกิดมะเร็งชนิด papillomas ที่เหนี่ยวนำด้วย 7,12-DMBA ในหนูแฮมเตอร์ พบว่าการให้สารสกัดน้ำจากใบกะเพราโดยการป้อนทางปาก ให้ผลดีกว่าการให้สารสกัด ethanol โดยการรับประทาน และการพอกกะเพราสด⁷² ในการศึกษาฤทธิ์ป้องกันการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร โดยป้อน N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) ให้หนูขาว 2 ครั้ง เว้นระยะห่างครั้งละ 2 สัปดาห์ พบว่า สารสกัดเอธานอลจากใบกะเพราในขนาด 300 มก./กก. โดยการป้อนทางปากสัปดาห์ละ 3 ครั้ง เป็นเวลา 26 สัปดาห์ สามารถต้านการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารที่เหนี่ยวนำด้วย MNNG ได้⁷³

สารสกัด ethanol จากใบกะเพรามีฤทธิ์ต้านการเกิดมะเร็งผิวหนังที่เหนี่ยวนำด้วย 3-methylcholanthrene (MCA), 7,12-DMBA และ aflatoxin B1 (AFB1) ในหนูถีบจักร โดยกลไกการต้านการเกิดมะเร็ง ของสารสกัดนี้ น่าจะเกิดจาก (1) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (2) การเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ใน phase I และ phase II metabolism และ / หรือ (3) การยับยั้ง proliferation ของเซลล์มะเร็ง⁷⁴ สารสกัด ethanol จากกะเพราเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis โดยผ่าน mitochondria caspase dependent pathway ในเซลล์มะเร็งชนิด A549 ในขณะที่ สารสกัด นี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ เซลล์มะเร็งปอด (Lewis lung carcinoma) ที่ปลูกถ่ายเข้าไปในหนูถีบจักร C57BL/6 ได้ แสดงว่าสารสกัดมีฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดและอาจใช้เป็นทางเลือกในการป้องกันมะเร็งได้⁷⁵ สารสกัดเอธานอลจากกะเพรามีฤทธิ์ต้านการแพร่กระจายของมะเร็ง โดยมีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งปอด (Lewis lung carcinoma cells) และยับยั้ง cell adhesion และ invasion โดยผ่านการยับยั้งการทำงานของ (activity) ของ matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) และการ

เพิ่มขึ้นของเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) และ glutathione peroxidase (GSH-Px)²²

1.9 ฤทธิ์ปกป้องอันตรายจากรังสี

(Radioprotective activity)

ฤทธิ์ปกป้องอันตรายจากรังสี ของสารสกัดใบกะเพรามีรายงานครั้งแรกเมื่อปี 1995 ซึ่งทำการทดลองโดยฉายรังสีหนูถีบจักรทั้งตัว ด้วย 11 Gy (LD100/30) of ⁶⁰Co gamma radiation) พบว่าการให้สารสกัดใบกะเพราสามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของหนูถีบจักรเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัดก่อนการฉายรังสี³⁵ และช่วยป้องกันความเสียหายของโครโมโซมของเซลล์ไขกระดูกหนูถีบจักรได้อีกด้วย⁷⁶ ต่อมาจามีรายงานว่าการใช้สารสกัดจากใบกะเพรา ร่วมกับสารป้องกันรังสี WR-2721 ที่ได้จากการสังเคราะห์ ให้ผลในการปกป้องเซลล์ไขกระดูกได้สูงกว่าการให้สารสกัดใบกะเพราหรือ WR-2721 อย่างเดียว และลดความเป็นพิษจากขนาดสูงของ WR-2721 ได้ ซึ่งแสดงว่าการใช้ร่วมกัน อาจจะช่วยเสริมฤทธิ์ในการปกป้องอันตรายจากรังสีในคนได้ดียิ่งขึ้น⁷⁷ อีกการศึกษาหนึ่งพบว่า สาร flavonoids orientin และ vicenin ที่สกัดจากใบกะเพรา มีได้ดีกว่าสารป้องกันรังสีที่ได้จากสังเคราะห์⁷⁸ ฤทธิ์ปกป้องอันตรายจากรังสี คาดว่าเกิดผ่านกลไกต้านอนุมูลอิสระของสาร flavonoids ทั้งสองชนิดนี้⁷⁸⁻⁸¹ Polysaccharides ที่สกัดจากกะเพราสามารถป้องกันอันตรายของเซลล์มะเร็งหนูถีบจักรจากรังสีแกมมา โดยอาศัยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่นเดียวกัน⁸² การให้ สารสกัดน้ำจากกะเพราแก่หนูถีบจักรก่อนได้รับรังสี ¹³¹iodine ในขนาดสูง พบว่าการให้สารสกัดกะเพราทำให้ระดับ GSH ที่ตับลดลงน้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด และยังสามารถป้องกันการทำลายของต่อมน้ำลายของหนูถีบจักรได้⁸³

1.10ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

การศึกษาเบื้องต้นของสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบที่ก่อโรคในคน พบว่าสารสกัดจากกะเพรามีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย แม้จะมีขอบเขตการออกฤทธิ์ค่อนข้างแคบ⁸⁴ การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี agar diffusion method พบว่าสารสกัดน้ำและสารสกัด ethanol จากกะเพรามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่ม enteric pathogens โดยสารสกัดน้ำจากกะเพรามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Klebsiella*, *E. coli*, *Proteus* และ *Staphylococcus aureus* ได้มากกว่าสารสกัด ethanol ในขณะที่สารสกัด ethanol ออกฤทธิ์ต่อเชื้อ *Vibrio cholerae* ได้⁸⁵ สารสกัด ethanol จากใบกะเพรามีฤทธิ์ต้านเชื้อ beta-lactamase producing และ methicillin-resistant *S. aureus* รวมทั้ง methicillin-sensitive *S. aureus*⁸⁶ อีกการศึกษาหนึ่งรายงานว่า สารสกัดกะเพรามีฤทธิ์ต้านเชื้อ multidrug resistant *Neisseria gonorrhoeae*⁸⁷ ซึ่งต่อมาพบว่าสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ คือ eugenol ในสารสกัดนี้⁸⁸ ส่วนการศึกษาหนึ่งรายงานว่า fixed oil จากกะเพรามีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus*, *Bacillus pumilus* และ *Pseudomonas aeruginosa* โดยออกฤทธิ์ได้ดีที่สุดต่อเชื้อ *S. aureus* ทั้งนี้คาดว่า linolenic acid ซึ่งมีปริมาณสูงใน fixed oil เป็นตัวออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย⁸⁹ นอกจากนี้ สารสกัด ethanol จากกะเพรามีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* และ *Enterococcus faecalis* ที่ก่อโรคของทางเดินปัสสาวะได้⁹⁰

1.11ฤทธิ์ antifertility และ

antispermatogenicity

สารสกัดกะเพรามีฤทธิ์ antifertility⁹¹⁻⁹³ โดยพบว่าสารสกัดน้ำจากใบกะเพรามีฤทธิ์ antifertility เมื่อทำการศึกษาในหนูขาวเพศเมียที่ตั้งท้องระยะแรก อย่างไรก็ตามสารสกัดน้ำจาก

ใบกะเพรา ไม่มี teratogenicity⁹¹ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารสกัดกะเพรามี antispermatogenic effect^{94,95} โดยเมื่อให้ สารสกัด benzene จากใบกะเพราในขนาด 250 มก./กก. น้ำหนักตัวแก่หนูขาวเพศผู้ นาน 46 วัน มีผลลดจำนวน การเคลื่อนไหวและ ความเร็วของการเคลื่อนไหวไปข้างหน้าของอสุจิ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดดังกล่าวมีผลเพิ่มเปอร์เซ็นต์ของ อสุจิที่ผิดปกติใน caudal epididymal fluid ในขณะที่ลดปริมาณของฟรุกโตสใน caudal plasma ที่อยู่ใน epididymis และ seminal vesicles ซึ่งฤทธิ์ต่ออสุจินี้ น่าจะเป็นผลมาจากฤทธิ์ลดฮอร์โมนแอนโดรเจนของกะเพรา อย่างไรก็ตาม ฤทธิ์ต้าน อสุจินี้เป็นแบบชั่วคราวเท่านั้น เนื่องจาก ทุกตัววัดสามารถกลับสู่ปกติ 2 สัปดาห์ภายหลัง หยุดให้ สารสกัดกะเพรา⁹⁵

2. การศึกษาความเป็นพิษ

2.1 การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน

ในการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัด ethanol จากกะเพราในหนูถีบจักร พบว่า ขนาดที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่ง (LD₅₀) เมื่อให้สารสกัดโดยการป้อนทางปากและโดยการฉีดเข้าช่องท้อง มีค่า 4,505 มก./กก. และ 3,241 มก./กก. ตามลำดับ⁹⁶ อีกการศึกษาหนึ่งซึ่งทำการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดน้ำและสารสกัด ethanol จากใบกะเพราโดยการป้อนทางปากให้สัตว์ทดลอง พบว่าสารสกัดน้ำในขนาด 5,000 มก./กก. ไม่ทำให้เกิดอาการแสดงของความเป็นพิษเฉียบพลันใดๆและไม่ทำให้สัตว์ทดลองตาย ส่วนสารสกัด ethanol เมื่อให้ในขนาด 4,000 มก./กก. พบว่าสัตว์ทดลองทนได้ดี แต่ตาย 80% ทั้งนี้ค่า LD₅₀ ของสารสกัดน้ำและของสารสกัด ethanol จากใบกะเพราเมื่อให้ทางปากเท่ากับ 6,200 มก./กก. และ 4,600 มก./กก.ตามลำดับ³⁵ การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของน้ำมันจากเมล็ดกะเพราที่ให้โดยการฉีดเข้าทางช่องท้องแก่หนูถีบจักร พบว่า

ขนาดของน้ำมันจากเมล็ดกะเพราที่สัตว์ทดลองทนได้ดีคือ 30 มล./กก. ในขณะที่ขนาดที่ทำให้สัตว์ทดลองตายหมดคือ 55 มล./กก. ทั้งนี้ น้ำมันจากเมล็ดกะเพราจะมีค่า LD₅₀ ในการฉีดเข้าช่องท้องเท่ากับ 42.5 มล./กก.⁹⁷

2.2 การศึกษาความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลัน (Subacute toxicity study)

เมื่อนำ fixed oil จากเมล็ดกะเพราเข้าช่องท้องของหนูขาวในขนาด 3 มล./กก./วัน เป็นเวลา 14 วัน ไม่ก่อให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ หรือพฤติกรรมผิดปกติใดๆ รวมทั้งไม่พบความผิดปกติของน้ำหนักตัว reflex และอวัยวะภายในของหนูขาว⁹⁷

3. การศึกษาทางคลินิก (Clinical trials)

3.1 การศึกษาผลลดระดับกลูโคสในเลือดของกะเพราในผู้ป่วยโรคเบาหวาน

การศึกษาแบบ randomized, placebo-controlled, crossover, single blind trial ในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 พบว่า ใบกะเพราสามารถลดระดับ กลูโคสหลังอดอาหาร และกลูโคสหลังรับประทานอาหารได้ 17.6 และ 7.3% ตามลำดับ แต่ระดับกลูโคสในปัสสาวะของกลุ่มที่ได้รับใบกะเพราและได้รับใบหลอก (placebo leaves) ไม่มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ในช่วงที่ให้ใบกะเพรามีการลดลงของระดับ cholesterol ในเลือดเล็กน้อย⁹⁸

3.2 การศึกษาผลลดภาวะวิตกกังวลและอาการที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาแบบ controlled programmed trial ในผู้ป่วยโรควิตกกังวล (generalized

anxiety disorder) จำนวน 35 คน (ผู้ชาย 21 คน ผู้หญิง 14 คน โดยมีอายุเฉลี่ย 38.4 ปี) โดยการให้สารสกัดใบกะเพราขนาด 500 มก./แคปซูล วันละ 2 ครั้งหลังอาหาร นาน 60 วัน ทำการตรวจประเมินอาการทางคลินิกและใช้แบบสอบถามมาตรฐาน (standard questionnaires based on different psychological rating scale) ในวันที่ 0, 30 และ 60 พบว่าสารสกัดใบกะเพราช่วยลดอาการของโรค วิตกกังวลและอาการที่เกี่ยวข้องได้แก่ เครียดและซึมเศร้าได้⁹⁹

3.3 การศึกษาผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน

จากการศึกษาทางคลินิก ของกะเพรา ต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบ double-blinded randomized controlled cross-over trial ในอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 24 คน โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ได้รับสารสกัด ethanol จากใบกะเพราขนาด 300 มก. และกลุ่มที่ได้รับยาหลอกในขณะท้องว่าง โดยประเมินผลต่อระดับ T-helper (Th) 1 and Th2 cytokines (interferon- γ [IFN- γ] และ interleukin-4 [IL-4]) ใน blood culture supernatants ที่กระตุ้นด้วย lipopolysaccharide และ phytohaemagglutinin รวมทั้งตัววัดอื่นๆ ได้แก่ Th and T-cytotoxic cells, B-cells และ NK-cells โดยใช้วิธีการ flow cytometry ผลการศึกษาพบว่าอาสาสมัครที่ได้รับสารสกัด ethanol จากใบกะเพราเป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีการเพิ่มขึ้นของระดับ IFN- γ และ IL-4 รวมทั้งเปอร์เซ็นต์ของ T-helper cells และ NK-cells โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาหลอก จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันของสารสกัดจากใบกะเพราในอาสาสมัครสุขภาพดี¹⁰⁰

เอกสารอ้างอิง

1. นันทวัน บุญยะประภัสสร และ อรุณช โชคชัยเจริญพร. กะเพรา. ใน: สมุนไพร ไม้พื้นบ้าน . เล่ม 1 . หน้า 147-154. กรุงเทพฯ : บริษัท ประชาชน จำกัด , 2539.
2. เสี่ยม พงษ์บุญรอด . กะเพรา. ใน: ไม้เทศเมืองไทย สรรพคุณของยาเทศและยาไทย . หน้า 37. กรุงเทพฯ : โวพิทพกรูธ, 2522.
3. เพียว ะ หมื่อนวงษ์ญาติ . กะเพรา. ใน: สมุนไพร ก้าวใหม่ . แก้ไขปรับปรุงใหม่จากตำราวิทยาศาสตร์ สมุนไพร . หน้า 71-72. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : บริษัท ที พี.พรินท์ จำกัด, 2537.
4. ก่องกานดา ชยามฤต . *Ocimum tenuiflorum* L. ใน: สมุนไพรไทย ตอนที่ 6. หน้า 115-116. กรุงเทพฯ : บริษัท ไดมอนด์ พรินต์ จำกัด, 2540.
5. บุชา สมร่าง, เสาวนีย์ กุลสมบุรณ์, อัญชลี จุฑะพุทธิ, วิชาใจดี, ปาริณกุล ตั้งสุขฤทัย (บรรณาธิการ). ผักพื้นบ้านต้านโรค เล่ม 1. หน้า 16-17. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด , 2553.
6. Trevisan MT, Vasconcelos Silva MG, Pfundstein B, Spiegelhalter B, Owen RW. Characterization of the volatile pattern and antioxidant capacity of essential oils from different species of the genus *Ocimum*. J Agric Food Chem 2006;54(12):4378-82.
7. Kelm MA, Nair MG, Strasburg GM, DeWitt DL. Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory phenolic compounds from *Ocimum sanctum* Linn. Phytomedicine 2000;7(1):7-13.
8. Hakkim FL, Shankar CG, Girija S. Chemical composition and antioxidant property of holy basil (*Ocimum sanctum* L.) leaves, stems, and inflorescence and their in vitro callus cultures. J Agric Food Chem 2007;55(22):9109-17.
9. Uma Devi P, Ganasoundari A, Vrinda B, Srinivasan KK, Unnikrishnan MK. Radiation protection by the ocimum flavonoids orientin and vicenin: mechanisms of action. Radiat Res 2000;154(4):455-60.
10. Pandey G, Madhyri S. Pharmacological activities of *Ocimum sanctum* (Tulsi): A review. Int J Pharm Sci 2010; 5(1): 61-6.
11. Mandal S, Das DN, De K, Ray K, Roy G, Chaudhuri SB, Sahana CC, Chowdhuri MK. *Ocimum sanctum* Linn--a study on gastric ulceration and gastric secretion in rats. Indian J Physiol Pharmacol 1993;37(1):91-2.
12. Singh S, Majumdar DK. Evaluation of the gastric antiulcer activity of fixed oil of *Ocimum sanctum* (Holy Basil). J Ethnopharmacol 1999;65(1):13-9.
13. Dharmani P, Kuchibhotla VK, Maurya R, Srivastava S, Sharma S, Palit G. Evaluation of anti-ulcerogenic and ulcer-healing properties of *Ocimum sanctum* Linn. J Ethnopharmacol 2004;93(2-3):197-206.
14. Goel RK, Sairam K, Dorababu M, Prabha T, Rao ChV. Effect of standardized extract of *Ocimum sanctum* Linn. on gastric mucosal offensive and defensive factors. Indian J Exp Biol 2005;43(8):715-21.
15. Kath RK, Gupta RK. Antioxidant activity of hydroalcoholic leaf extract of *Ocimum sanctum* in animal models of peptic ulcer. Indian J Physiol Pharmacol 2006;50(4):391-6.
16. Maulik G, Maulik N, Bhandari V, Kagan VE, Pakrashi S, Das DK. Evaluation of antioxidant effectiveness of a few herbal plants. Free Radic Res. 1997;27(2):221-8.
17. Panda S, Kar A. *Ocimum sanctum* leaf extract in the regulation of thyroid function in the male mouse. Pharmacol Res 1998;38(2):107-10.
18. Chandra A, Mahdi AA, Singh RK, Mahdi F, Chander R. Effect of Indian herbal hypoglycemic agents on antioxidant capacity and trace elements content in diabetic rats. J Med Food 2008;11(3):506-12.
19. Shetty S, Udupa S, Udupa L, Somayaji N. Wound healing activity of *Ocimum sanctum* Linn with supportive role of antioxidant enzymes. Indian J Physiol Pharmacol 2006;50(2):163-8.
20. Shetty S, Udupa S, Udupa L. Evaluation of Antioxidant and Wound Healing Effects of Alcoholic and Aqueous Extract of *Ocimum sanctum* Linn in Rats. Evid Based Complement Alternat Med 2008;5(1):95-101.
21. Prakash J, Gupta SK. Chemopreventive activity of *Ocimum sanctum* seed oil. J Ethnopharmacol 2000;72(1-2):29-34.
22. Kim SC, Magesh V, Jeong SJ, Lee HJ, Ahn KS, Lee HJ, Lee EO, Kim SH, Lee MH, Kim JH, Kim SH. Ethanol extract of *Ocimum sanctum* exerts anti-metastatic activity through inactivation of matrix metalloproteinase-9 and enhancement of anti-oxidant enzymes. Food Chem Toxicol 2010;48(6):1478-82.
23. Ubaid RS, Anantrao KM, Jaju JB, Mateenuddin M. Effect of *Ocimum sanctum* (OS) leaf extract on hepatotoxicity induced by antitubercular drugs in rats. Indian J Physiol Pharmacol 2003;47(4):465-70.

24. Adhvaryu MR, Reddy N, Parabia MH. Effects of four Indian medicinal herbs on Isoniazid-, Rifampicin- and Pyrazinamide-induced hepatic injury and immunosuppression in guinea pigs. *World J Gastroenterol* 2007;13(23):3199-205.
25. Gupta SK, Srivastava S, Trivedi D, Joshi S, Halder N. *Ocimum sanctum* modulates selenite-induced cataractogenic changes and prevents rat lens opacification. *Curr Eye Res* 2005;30(7):583-91.
26. Halder N, Joshi S, Nag TC, Tandon R, Gupta SK. *Ocimum sanctum* extracts attenuate hydrogen peroxide induced cytotoxic ultrastructural changes in human lens epithelial cells. *Phytother Res* 2009;23(12):1734-7.
27. Yanpallewar SU, Rai S, Kumar M, Acharya SB. Evaluation of antioxidant and neuroprotective effect of *Ocimum sanctum* on transient cerebral ischemia and long-term cerebral hypoperfusion. *Pharmacol Biochem Behav* 2004;79(1):155-64.
28. Samson J, Sheeladevi R, Ravindran R. Oxidative stress in brain and antioxidant activity of *Ocimum sanctum* in noise exposure. *Neurotoxicology* 2007;28(3):679-85.
29. Muthuraman A, Diwan V, Jaggi AS, Singh N, Singh D. Ameliorative effects of *Ocimum sanctum* in sciatic nerve transection-induced neuropathy in rats. *J Ethnopharmacol* 2008;120(1):56-62.
30. Sharma M, Kishore K, Gupta SK, Joshi S, Arya DS. Cardioprotective potential of *Ocimum sanctum* in isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Mol Cell Biochem* 2001;225(1-):75-83.
31. Sood S, Narang D, Dinda AK, Maulik SK. Chronic oral administration of *Ocimum sanctum* Linn. augments cardiac endogenous antioxidants and prevents isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats. *J Pharm Pharmacol* 2005;57(1):127-33.
32. Jyoti S, Satendra S, Sushma S, Anjana T, Shashi S. Antistressor activity of *Ocimum sanctum* (Tulsi) against experimentally induced oxidative stress in rabbits. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2007;29(6):411-6.
33. Panda VS, N SR. Evaluation of cardioprotective activity of Ginkgo biloba and *Ocimum sanctum* in rodents. *Altern Med Rev* 2009;14(2):161-71.
34. Suanarunsawat T, Devakul Na Ayutthaya W, Songsak T, Thirawarapan S, Pongshompoo S. Antioxidant Activity and Lipid-Lowering Effect of Essential Oils Extracted from *Ocimum sanctum* L. Leaves in Rats Fed with a High Cholesterol Diet. *J Clin Biochem Nutr* 2010;46(1):52-9.
35. Devi PU, Ganasoundari A. Modulation of glutathione and antioxidant enzymes by *Ocimum sanctum* and its role in protection against radiation injury. *Indian J Exp Biol* 1999;37(3):262-8.
36. Uma Devi P. Radioprotective, anticarcinogenic and antioxidant properties of the Indian holy basil, *Ocimum sanctum* (Tulasi). *Indian J Exp Biol* 2001;39(3):185-90.
37. Vrinda B, Uma Devi P. Radiation protection of human lymphocyte chromosomes in vitro by orientin and vicienin. *Mutat Res* 2001;498(1-2):39-46.
38. Subramanian M, Chintalwar GJ, Chattopadhyay S. Antioxidant and radioprotective properties of an *Ocimum sanctum* polysaccharide. *Redox Rep* 2005;10(5):257-64.
39. Bhartiya US, Raut YS, Joseph LJ. Protective effect of *Ocimum sanctum* L after high-dose ¹³¹Iodine exposure in mice: an in vivo study. *Indian J Exp Biol* 2006;44(8):647-52.
40. Godhwani S, Godhwani JL, Vyas DS. *Ocimum sanctum*: an experimental study evaluating its anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity in animals. *J Ethnopharmacol* 1987;21(2):153-63.
41. Singh S, Majumdar DK, Rehan HM. Evaluation of anti-inflammatory potential of fixed oil of *Ocimum sanctum* (Holybasil) and its possible mechanism of action. *J Ethnopharmacol* 1996;54(1):19-26.
42. Singh S, Majumdar DK. Evaluation of antiinflammatory activity of fatty acids of *Ocimum sanctum* fixed oil. *Indian J Exp Biol* 1997;35(4):380-3.
43. Singh S, Majumdar DK. Effect of *Ocimum sanctum* fixed oil on vascular permeability and leucocytes migration. *Indian J Exp Biol* 1999;37(11):1136-8.
44. Khanna N, Bhatia J. Antinociceptive action of *Ocimum sanctum* (Tulsi) in mice: possible mechanisms involved. *J Ethnopharmacol* 2003;88(2-3):293-6.
45. Chattopadhyay RR. Hypoglycemic effect of *Ocimum sanctum* leaf extract in normal and streptozotocin diabetic rats. *Indian J Exp Biol* 1993;31(11):891-3.
46. Chattopadhyay RR. A comparative evaluation of some blood sugar lowering agents of plant origin. *J Ethnopharmacol* 1999;67(3):367-72.
47. Vats V, Grover JK, Rathi SS. Evaluation of anti-hyperglycemic and hypoglycemic effect of *Trigonella foenum-graecum* Linn, *Ocimum sanctum* Linn and *Pterocarpus*

- marsupium Linn in normal and alloxanized diabetic rats. J Ethnopharmacol 2002;79(1):95-100.
48. Kar A, Choudhary BK, Bandyopadhyay NG. Comparative evaluation of hypoglycaemic activity of some Indian medicinal plants in alloxan diabetic rats. J Ethnopharmacol 2003;84(1):105-8.
49. Vats V, Yadav SP, Grover JK. Ethanolic extract of *Ocimum sanctum* leaves partially attenuates streptozotocin-induced alterations in glycogen content and carbohydrate metabolism in rats. J Ethnopharmacol 2004;90(1):155-60.
50. Narendhirakannan RT, Subramanian S, Kandaswamy M. Biochemical evaluation of antidiabetogenic properties of some commonly used Indian plants on streptozotocin-induced diabetes in experimental rats. Clin Exp Pharmacol Physiol 2006;33(12):1150-7.
51. Hannan JM, Marenah L, Ali L, Rokeya B, Flatt PR, Abdel-Wahab YH. *Ocimum sanctum* leaf extracts stimulate insulin secretion from perfused pancreas, isolated islets and clonal pancreatic beta-cells. J Endocrinol 2006;189(1):127-36.
52. Grover JK, Vats V, Yadav SS. Pterocarpus marsupium extract (Vijayasar) prevented the alteration in metabolic patterns induced in the normal rat by feeding an adequate diet containing fructose as sole carbohydrate. Diabetes Obes Metab 2005;7(4):414-20.
53. Reddy SS, Karuna R, Baskar R, Saralakumari D. Prevention of insulin resistance by ingesting aqueous extract of *Ocimum sanctum* to fructose-fed rats. Horm Metab Res 2008;40(1):44-9.
54. Rai V, Iyer U, Mani UV. Effect of Tulasi (*Ocimum sanctum*) leaf powder supplementation on blood sugar levels, serum lipids and tissue lipids in diabetic rats. Plant Foods Hum Nutr 1997;50(1):9-16.
55. Vats V, Yadav SP, Biswas NR, Grover JK. Anti-cataract activity of *Pterocarpus marsupium* bark and *Trigonella foenum-graecum* seeds extract in alloxan diabetic rats. J Ethnopharmacol 2004;93(2-3):289-94.
56. Gupta S, Mediratta PK, Singh S, Sharma KK, Shukla R. Antidiabetic, antihypercholesterolaemic and antioxidant effect of *Ocimum sanctum* (Linn) seed oil. Indian J Exp Biol 2006;44(4):300-4.
57. Sarkar A, Lavania SC, Pandey DN, Pant MC. Changes in the blood lipid profile after administration of *Ocimum sanctum* (Tulsi) leaves in the normal albino rabbits. Indian J Physiol Pharmacol 1994;38(4):311-2.
58. Suanarunsawat T, Devakul Na Ayutthaya W, Songsak T, Thirawarapan S, Pongshompoo S. Antioxidant activity and lipid-lowering effect of essential oils extracted from *Ocimum sanctum* L. leaves in rats fed with a high cholesterol diet. J Clin Biochem Nutr 2010;46(1):52-9.
59. Dahiya K, Sethi J, Dhankhar R, Singh V, Singh SB, Yadav M, Sood S, Sachdeva A. Effect of *Ocimum sanctum* on homocysteine levels and lipid profile in healthy rabbits. Arch Physiol Biochem 2011;117(1):8-11.
60. Suanarunsawat T, Boonnak T, Na Ayutthaya WD, Thirawarapan S. Anti-hyperlipidemic and cardioprotective effects of *Ocimum sanctum* L. fixed oil in rats fed a high fat diet. J Basic Clin Physiol Pharmacol 2010;21(4):387-400.
61. Mediratta PK, Dewan V, Bhattacharya SK, Gupta VS, Maiti PC, Sen P. Effect of *Ocimum sanctum* Linn. on humoral immune responses. Indian J Med Res 1988;87:384-6.
62. Godhwani S, Godhwani JL, Vyas DS. *Ocimum sanctum*--a preliminary study evaluating its immunoregulatory profile in albino rats. J Ethnopharmacol 1988;24(2-3):193-8.
63. Mediratta PK, Sharma KK, Singh S. Evaluation of immunomodulatory potential of *Ocimum sanctum* seed oil and its possible mechanism of action. J Ethnopharmacol 2002;80(1):15-20.
64. Mukherjee R, Dash PK, Ram GC. Immunotherapeutic potential of *Ocimum sanctum* (L) in bovine subclinical mastitis. Res Vet Sci 2005;79(1):37-43.
65. Adhvaryu MR, Reddy N, Parabia MH. Effects of four Indian medicinal herbs on Isoniazid-, Rifampicin- and Pyrazinamide-induced hepatic injury and immunosuppression in guinea pigs. World J Gastroenterol 2007;13(23):3199-205.
66. Mediratta PK, Tanwar K, Reeta KH, Mathur R, Benerjee BD, Singh S, Sharma KK. Attenuation of the effect of lindane on immune responses and oxidative stress by *Ocimum sanctum* seed oil (OSSO) in rats. Indian J Physiol Pharmacol 2008;52(2):171-7.
67. Balanehru S, Nagarajan B. Protective effect of oleanolic acid and ursolic acid against lipid peroxidation. Biochem Int 1991;24(5):981-90.
68. Aruna K, Sivaramakrishnan VM. Anticarcinogenic effects of some Indian

- plant products. Food Chem Toxicol 1992;30(11):953-6.
69. Prashar R, Kumar A, Banerjee S, Rao AR. Chemopreventive action by an extract from *Ocimum sanctum* on mouse skin papillomagenesis and its enhancement of skin glutathione S-transferase activity and acid soluble sulfhydryl level. Anticancer Drugs 1994;5(5):567-72.
 70. Banerjee S, Prashar R, Kumar A, Rao AR. Modulatory influence of alcoholic extract of *Ocimum* leaves on carcinogen-metabolizing enzyme activities and reduced glutathione levels in mouse. Nutr Cancer 1996;25(2):205-17.
 71. Prashar R, Kumar A, Hewer A, Cole KJ, Davis W, Phillips DH. Inhibition by an extract of *Ocimum sanctum* of DNA-binding activity of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in rat hepatocytes *in vitro*. Cancer Lett 1998;128(2):155-60.
 72. Karthikeyan K, Ravichandran P, Govindasamy S. Chemopreventive effect of *Ocimum sanctum* on DMBA-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. Oral Oncol 1999;35(1):112-9.
 73. Manikandan P, Vidjaya Letchoumy P, Prathiba D, Nagini S. Proliferation, angiogenesis and apoptosis-associated proteins are molecular targets for chemoprevention of MNNG-induced gastric carcinogenesis by ethanolic *Ocimum sanctum* leaf extract. Singapore Med J 2007;48(7):645-51.
 74. Rastogi S, Shukla Y, Paul BN, Chowdhuri DK, Khanna SK, Das M. Protective effect of *Ocimum sanctum* on 3-methylcholanthrene, 7,12-dimethylbenz(a)anthracene and aflatoxin B1 induced skin tumorigenesis in mice. Toxicol Appl Pharmacol 2007;224(3):228-40.
 75. Magesh V, Lee JC, Ahn KS, Lee HJ, Lee HJ, Lee EO, Shim BS, Jung HJ, Kim JS, Kim DK, Choi SH, Ahn KS, Kim SH. *Ocimum sanctum* induces apoptosis in A549 lung cancer cells and suppresses the *in vivo* growth of Lewis lung carcinoma cells. Phytother Res 2009;23(10):1385-91.
 76. Ganasoundari A, Devi PU, Rao MN. Protection against radiation-induced chromosome damage in mouse bone marrow by *Ocimum sanctum*. Mutat Res 1997;373(2):271-6.
 77. Ganasoundari A, Devi PU, Rao BS. Enhancement of bone marrow radioprotection and reduction of WR-2721 toxicity by *Ocimum sanctum*. Mutat Res 1998;397(2):303-12.
 78. Devi PU, Bisht KS, Vinitha M. A comparative study of radioprotection by *Ocimum flavonoids* and synthetic aminothiols protectors in the mouse. Br J Radiol 1998;71(847):782-4.
 79. Uma Devi P, Ganasoundari A, Rao BS, Srinivasan KK. In vivo radioprotection by ocimum flavonoids: survival of mice. Radiat Res 1999;151(1):74-8.
 80. Uma Devi P, Ganasoundari A, Vrinda B, Srinivasan KK, Unnikrishnan MK. Radiation protection by the ocimum flavonoids orientin and vicenin: mechanisms of action. Radiat Res 2000;154(4):455-60.
 81. Vrinda B, Uma Devi P. Radiation protection of human lymphocyte chromosomes *in vitro* by orientin and vicenin. Mutat Res 2001;498(1-2):39-46.
 82. Subramanian M, Chintalwar GJ, Chattopadhyay S. Antioxidant and radioprotective properties of an *Ocimum sanctum* polysaccharide. Redox Rep 2005;10(5):257-264.
 83. Bhartiya US, Raut YS, Joseph LJ. Protective effect of *Ocimum sanctum* L after high-dose ¹³¹Iodine exposure in mice: an *in vivo* study. Indian J Exp Biol 2006;44(8):647-52.
 84. Phadke SA, Kulkarni SD. Screening of *in vitro* antibacterial activity of *Terminalia chebula*, *Eclipta alba* and *Ocimum sanctum*. Indian J Med Sci 1989;43(5):113-7.
 85. Geeta, Vasudevan DM, Kedlaya R, Deepa S, Ballal M. Activity of *Ocimum sanctum* (the traditional Indian medicinal plant) against the enteric pathogens. Indian J Med Sci 2001;55(8):434-8, 472.
 86. Aqil F, Khan MS, Owais M, Ahmad I. Effect of certain bioactive plant extracts on clinical isolates of beta-lactamase producing methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. J Basic Microbiol 2005;45(2):106-14.
 87. Shokeen P, Ray K, Bala M, Tandon V. Preliminary studies on activity of *Ocimum sanctum*, *Drynaria quercifolia*, and *Annona squamosa* against *Neisseria gonorrhoeae*. Sex Transm Dis 2005;32(2):106-11.
 88. Shokeen P, Bala M, Singh M, Tandon V. *In vitro* activity of eugenol, an active component from *Ocimum sanctum*, against multiresistant and susceptible strains of *Neisseria gonorrhoeae*. Int J Antimicrob Agents 2008;32(2):174-9.
 89. Singh S, Malhotra M, Majumdar DK. Antibacterial activity of *Ocimum sanctum* L. fixed oil. Indian J Exp Biol 2005;43(9):835-7.
 90. Sharma A, Chandraker S, Patel VK, Ramteke P. Antibacterial activity of

- medicinal plants against pathogens causing complicated urinary tract infections. Indian J Pharm Sci 2009;71(2):136-9.
91. Vohora SB, Garg SK, Chaudhury RR. Antifertility screening of plants. 3. Effect of six indigenous plants on early pregnancy in albino rats. Indian J Med Res 1969;57(5):893-9.
 92. Batta SK, Santhakumari G. The antifertility effect of *Ocimum sanctum* and *hibiscus rosa sinensis*. Indian J Med Res 1971;59(5):777-81.
 93. Kasinathan S, Ramakrishnan S, Basu SL. Antifertility effect of *Ocimum sanctum* L. Indian J Exp Biol 1972;10(1):23-25.
 94. Seth SD, Johri N, Sundaram KR. Antispermato-genic effect of *Ocimum sanctum*. Indian J Exp Biol 1981;19(10):975-6.
 95. Ahmed M, Ahamed RN, Aladakatti RH, Ghosesawar MG. Reversible anti-fertility effect of benzene extract of *Ocimum sanctum* leaves on sperm parameters and fructose content in rats. J Basic Clin Physiol Pharmacol 2002;13(1):51-9.
 96. Bhargava KP, Singh N. Anti-stress activity of *Ocimum sanctum* Linn. Indian J Med Res 1981;73:443-51.
 97. Singh S, Majumdar DK. Toxicological studies of fixed oil of *Ocimum sanctum* Linn. (Tulsi). New Botanist 1994;21:139-46.
 98. Agrawal P, Rai V, Singh RB. Randomized placebo-controlled, single blind trial of holy basil leaves in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. Int J Clin Pharmacol Ther 1996;34(9):406-9.
 99. Bhattacharyya D, Sur TK, Jana U, Debnath PK. Controlled programmed trial of *Ocimum sanctum* leaf on generalized anxiety disorders. Nepal Med Coll J 2008;10(3):176-9.
 100. Mondal S, Varma S, Bamola VD, Naik SN, Mirdha BR, Padhi MM, Mehta N, Mahapatra SC. Double-blinded randomized controlled trial for immunomodulatory effects of Tulsi (*Ocimum sanctum* Linn.) leaf extract on healthy volunteers. J Ethnopharmacol 2011;136(3):452-6.

Instruction for Authors

Thai Journal of Pharmacology

วารสารไทยเภสัชวิทยา (Thai Journal of Pharmacology) เป็นวารสารทางวิชาการระดับชาติ ที่มี impact factor และอยู่ในฐานข้อมูลของศูนย์ดัชนีการอ้างอิงวารสารไทย (Thai citation index) กองบรรณาธิการวารสารยินดีรับผลงานทางวิชาการในสาขาเภสัชวิทยาและสาขาอื่นที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ งานวิจัย (Research article), Short communication, รายงานผู้ป่วย (Case report), จดหมายถึงบรรณาธิการ (Letter to editor), บทความปริทรรศน์ (Reviews), และ New drugs profile เพื่อตีพิมพ์และเผยแพร่ในวารสาร โดยผลงานวิชาการที่ส่งมา ต้องไม่ได้รับการเผยแพร่ที่ไหนมาก่อนและผู้นิพนธ์จะต้องไม่ส่งบทความเพื่อไปตีพิมพ์ในวารสารฉบับอื่นในเวลาเดียวกัน เพื่อความสะดวกในการพิจารณาจึงขอแนะแนวทางการเตรียมต้นฉบับและการส่งต้นฉบับดังนี้

คำแนะนำสำหรับการเขียนต้นฉบับ

1. การส่งต้นฉบับ ต้องส่งเป็นไฟล์ Microsoft word เวอร์ชัน 97-2003 และ ไฟล์ PDF อย่างละ 1 ชุด
2. การเขียนต้นฉบับ (Manuscript) สามารถเขียนเป็นภาษาอังกฤษหรือภาษาไทยก็ได้ แต่บทคัดย่อ (Abstract) ต้องมีทั้งภาษาอังกฤษและภาษาไทย
3. การพิมพ์ต้นฉบับ (Manuscript) ภาษาอังกฤษใช้ตัวอักษร Times New Roman ขนาด 10 ภาษาไทยใช้ตัวอักษร EuroasiaUPC ขนาด 16 เอกสารอ้างอิงไม่เกิน 45 เรื่อง
4. รูปภาพและตารางประกอบ (Figures and tables) ควรเป็นภาพที่ชัดเจน รูปภาพทุกรูปต้องมีหมายเลขและเขียนเรียงตามลำดับ พร้อมทั้งมีคำบรรยายใต้ภาพ โดยใช้ชื่อรูปภาพเป็น “Figure 1” ส่วนการเขียนหมายเลขตารางใช้เลขอารบิกและให้เรียงตามลำดับที่ของตารางอย่างต่อเนื่องจาก 1 ,2 ,3 ,
5. ชื่อเรื่อง ควรสั้นแต่ได้ใจความ ใช้อักษรใหญ่ capital letter ในตัวหน้าทุกคำ เน้นประโยคด้วยตัวหนา (Bold) ตัวอย่างเช่น

The Study of *UGT1A1* Polymorphism in Neonate at Songkhla Hospital

งานวิจัย (Research article)

1. หน้าชื่อเรื่อง (Title page) ควรมีชื่อเรื่องและชื่อผู้นิพนธ์ โดยชื่อผู้นิพนธ์เป็นภาษาอังกฤษ ใช้ตัวเต็ม ชื่อ สกุล โดยไม่มีคำนำหน้าหรือต่อท้าย ให้ใส่ตัวเลขยกกำลังท้ายนามสกุล เพื่อระบุถึงสถานที่ทำงาน ตัวอย่างเช่น
Peerapon Sornying¹, Sopen Chunuan², Wandee Udomuksorn¹
¹Medical Science Program, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Thailand
²Laboratory of Chemistry, Chulabhorn Research Institute, Thailand.
³Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University.
ส่วนด้านล่างของหน้าให้ระบุผู้รับผิดชอบบทความ (correspondence) พร้อม E-mail และสถานที่ทำงาน
2. บทคัดย่อ (Abstract) ภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ต้องระบุถึงความสำคัญของเรื่อง วัตถุประสงค์ วิธีการศึกษา ผลการศึกษา และบทสรุป ความยาวไม่เกิน 250 คำ เป็น single paragraph และระบุคำสำคัญของเรื่อง (Keywords) จำนวนไม่เกิน 5 คำ
3. บทนำ (Introduction) ควรระบุความสำคัญของที่มาและปัญหาของงานวิจัย ภูมิหลังของงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสมมติฐานที่นำไปสู่เหตุผลของการวิจัยและวัตถุประสงค์ของการวิจัย
4. วัสดุและวิธีการ (Materials and Methods) อธิบายรายละเอียดของวิธีการศึกษาและแบบจำลองการศึกษาที่ชัดเจนและสมบูรณ์ ถ้าวิธีการศึกษามีผู้เผยแพร่มาก่อนควรมีการอ้างอิง มีการระบุถึงรายละเอียดของโปรแกรมสถิติวิเคราะห์และความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ใช้
5. ผลการทดลอง (Results) บรรยายผลการศึกษารายงาน พร้อมเสนอข้อมูลในรูปแบบ ตารางหรือภาพประกอบ

6. **วิจารณ์ (Discussion)** ควรเชื่อมโยงกับผลการศึกษว่าสอดคล้องกับสมมุติฐาน หรือแตกต่างไปจากผลงานวิจัยที่ผู้รายงานไว้ก่อนหรือไม่อย่างไรและด้วยเหตุผลใด โดยมีพื้นฐานการอ้างอิงที่เชื่อถือได้
7. **สรุป (Conclusion)** ควรสรุปผลที่ได้รับจากการศึกษาวิจัยว่าเป็นไปตามวัตถุประสงค์หรือไม่ พร้อมให้ข้อเสนอแนะหรือระบุอุปสรรคและแผนงานวิจัยที่จะดำเนินการต่อไป
8. **กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)** เป็นการแสดงความขอบคุณแก่แหล่งทุนและผู้ช่วยในงานวิจัย
9. **การอ้างอิง (References)** มีรูปแบบดังนี้

- 1) การอ้างอิงในส่วนเนื้อหา ตาราง และรูปภาพต่างๆ ต้องระบุ แบบนาม-ปี (author-date in-text citation) โดยชื่อผู้วิจัยและปีที่พิมพ์ของเอกสาร ไว้ข้างหลังข้อความที่ต้องการอ้าง ถ้ากรณีมีผู้วิจัยตั้งแต่ 1-2 คนให้ระบุชื่อผู้วิจัยทั้งหมด แต่ถ้ามีผู้วิจัยมากกว่า 3 คน ให้ระบุเฉพาะผู้วิจัยคนแรกและตามด้วยคณะผู้วิจัย

ตัวอย่าง Morgan 2001 , Jones and Miller 2008, Hatano et al. 2009

- 2) **ไม่ควรใช้บทคัดย่อ (Abstracts)** เป็นเอกสารอ้างอิง โดยถ้าเป็นเอกสาร (papers) ที่ได้รับการยอมรับแล้ว แต่รอการตีพิมพ์ ควรระบุด้วยคำว่า "in press" หรือ "forthcoming" ส่วนเอกสารต้นฉบับ (manuscripts) ที่ไม่ได้ตีพิมพ์แม้บรรณาธิการจะรับไว้พิจารณาก็ตาม ก็ควรเขียนระบุด้วยคำว่า "unpublished observations"
- 3) **การเขียนเอกสารอ้างอิงท้ายบทความ** การอ้างอิงวารสารท้ายบทความให้ใช้แบบ The Vancouver style

3.1) ผู้เขียนเป็นบุคคล (Author(s))

Format: Author (s). Article Title. Journal Title. Date of Publication;Volume(Issue):Page.

*หมายเหตุ การเขียนชื่อวารสารให้ใช้ชื่อย่อตามมาตรฐานสากลที่อยู่ใน Pubmed

ตัวอย่าง Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. N Engl J Med. 2002;347(4):284-7.

กรณีมีผู้เขียนเกิน 6 คน ให้ใส่รายชื่อของผู้เขียน 6 คนแรก แล้วตามด้วยคำว่า et al.

ตัวอย่าง Rose ME, Huerbin MB, Melick J, Marion DW, Palmer AM, Schiding JK, et al. Regulation of interstitial excitatory amino acid concentrations after cortical contusion injury. Brain Res. 2002;935(1-2):40-6.

การอ้างอิงวารสารภาษาไทย

รูปแบบ: ชื่อ นามสกุลของผู้เขียน . ชื่อเรื่อง. ชื่อของวารสาร. ปีที่พิมพ์;ฉบับที่พิมพ์(เล่มที่):เลขหน้าแรก-หน้าสุดท้ายของเรื่อง.

ตัวอย่าง ลำปาง ปาซิโร. สมุนไพรมาแรงฮานังจอก. วารสารเทคโนโลยีชาวบ้าน 2003; 15: 32.

3.2) ผู้เขียนเป็นหน่วยงาน (Organisation as author)

ตัวอย่าง The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. Med J Aust. 1996;164:282-4.

3.3) กรณีที่ไม่มีชื่อผู้เขียน (No author given)

ตัวอย่าง 1 21st century heart solution may have a sting in the tail. BMJ. 2002;325(7357): 184.

ตัวอย่าง 2 Cancer in South Africa [editorial]. S Afr Med J. 1994; 84:15. ถ้าเป็นภาษาไทยควรใช้
ในวงเล็บว่า [บทบรรณาธิการ]

3.4) กรณีที่เป็นฉบับเสริมของปีที่พิมพ์ (Volume with supplement)

ตัวอย่าง Geraud G, Spierings EL, Keywood C. Tolerability and safety of frovatriptan with short- and long-term use for treatment of migraine and in comparison with sumatriptan. Headache. 2002;42 Suppl 2:S93-9.

3.5) หนังสือ

3.5.1) ผู้เขียนหนังสือ (Personal author(s))

ตัวอย่าง Colson JH, Armour WJ. Sports injuries and their treatment. 2nd ed. London: St. Paul, 1986.

3.5.2) หนังสือที่มีผู้เขียนเป็นหน่วยงาน

ตัวอย่าง 1 Advanced Life Support Group. Acute medical emergencies: the practical approach. London: BMJ Books; 2001.

ตัวอย่าง 2 สมาคมทำหมันแห่งประเทศไทย. คู่มือการให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการวางแผนครอบครัว. กรุงเทพฯ: สมาคม; 2533.

3.5.3) บทย่อยในหนังสือ (Chapter in a book)

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

3.5.4) บางส่วนของวิทยานิพนธ์ (Parts of Dissertations and Theses)

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

บทความปริทรรศน์ (Reviews)

บทความปริทรรศน์ (Reviews) ใช้รูปแบบการเขียนเหมือนนิพนธ์ต้นฉบับ

Short communication

Short communication ควรเป็นองค์ความรู้ใหม่ ความยาวไม่เกิน 2 หน้ากระดาษ A4 อาจจะมีรูปภาพและตารางรวมกันไม่เกิน 2 รูป

การส่งต้นฉบับ (Manuscript submission)

การส่งผลงานทางวิชาการให้ส่งถึงบรรณาธิการวารสารสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย (Thai Journal of Pharmacology) ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ 114 ถนนสุขุมวิท 23 แขวงคลองเตยเหนือ เขตวัฒนา กรุงเทพฯ 10110 ประเทศไทย หรือ E-mail: laddawal@gmail.com ผลงานทางวิชาการทุกฉบับจะได้รับการประเมินโดยผู้ทรงคุณวุฒิ (peer-review journal) เพื่อประเมินคุณภาพความเหมาะสมก่อนการตีพิมพ์ ในกรณีที่ผลการประเมินระบุให้ต้องปรับปรุงหรือแก้ไข ผู้นิพนธ์จะต้องดำเนินการให้แล้วเสร็จภายในระยะเวลาที่กำหนด นับจากวันที่ได้รับการประเมินบทความ

ลิขสิทธิ์ (Copyright)

ผลงานทางวิชาการทุกฉบับถือเป็นลิขสิทธิ์ของสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย (The Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand)

รายนามคณะกรรมการที่ปรึกษาและบริหารสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย
วาระประจำปี พ.ศ. 2553-2554

คณะกรรมการที่ปรึกษา

ภก.พลตรี สุนันท์ โรจนวิภาต
รศ.น.สพ.ดานิส ทวีதியานนท์
รศ.พญ.สุนนา ชมพูทวีป
รศ.ภก.ดร.ชัยชาญ แสงดี
รศ.พลตรี ดร.บพิตร กลางกลัยา

คณะกรรมการบริหาร

นายกสมาคม
ผู้รั้งตำแหน่งนายกสมาคม
อุปนายก
เลขาธิการ
ฝ่ายวิชาการ
เหรัญญิก
ปฎิคม
นายทะเบียน
บรรณาธิการวารสาร
กรรมการกลาง

รศ.ภญ.ดร.มยุรี ตันตีสิริระ
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 จูทะพุทธิ
รศ.นพ.อดิศักดิ์ วงศ์จรศิลป์

