

ฤทธิ์ปกป้องเซลล์ตับและต้านออกซิเดชันของว่านพญาจันทร์ (*Pseuderanthemum palatiferum*)
ต่อความเสียหายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในเซลล์ HepG2

นางสาวสุภาภรณ์ อุดมทรัพย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยาทางสัตวแพทยศาสตร์ ภาควิชาเภสัชวิทยา

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

HEPATOPROTECTIVE AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF HOAN NGOC
(*PSEUDERANTHEMUM PALATIFERUM*) AGAINST HYDROGEN PEROXIDE - INDUCED
OXIDATIVE DAMAGE IN HEPG2 CELLS

Miss Supaporn Udomsup

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Pharmacology

Department of Veterinary Pharmacology

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ฤทธิ์ปกป้องเซลล์ตับและต้านออกซิเดชันของว่านปญาวานร (*Pseuderanthemum palatiferum*) ต่อความเสียหายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในเซลล์ HepG2

โดย

นางสาว สุภาภรณ์ อุดมทรัพย์

สาขาวิชา

เภสัชวิทยาทางสัตวแพทยศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ เกษัชกรหญิง ดร. สุพัตรา ศรีไชยรัตน์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกษัชกรหญิง ดร. สุรีย์ เจียรณมงคล

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. มงคล เตชะกำพูน)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. ศิรินทร หยิบไชคอนันต์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ เกษัชกรหญิง ดร. สุพัตรา ศรีไชยรัตน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกษัชกรหญิง ดร. สุรีย์ เจียรณมงคล)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ร้อยโทหญิง สัตวแพทย์หญิง เนาวรัตน์ สุธัฒนาถพงษ์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ เกษัชกรหญิง ดร. สุวรา วัฒนพิทยกุล)

สุภาภรณ์ อุดมทรัพย์ : ฤทธิ์ปกป้องเซลล์ตับและต้านออกซิเดชันของว่านพญาวานร (*Pseuderanthemum palatiferum*) ต่อความเสียหายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในเซลล์ HepG2. (HEPATOPROTECTIVE AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF HOAN NGOC (*PSEUDERANTHEMUM PALATIFERUM*) AGAINST HYDROGEN PEROXIDE-INDUCED OXIDATIVE DAMAGE IN HEPG2 CELLS) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ภญ.ดร.สุภัทรา ศรีไชยรัตน์, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ.ภญ.ดร.สุรีย์ เจียรณ์มงคล, 86 หน้า

วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากว่านพญาวานรในการต้านออกซิเดชันและปกป้องเซลล์ตับที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเสียหายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วย hydrogen peroxide (H_2O_2) โดยศึกษาในเซลล์ HepG2 ร่วมกับการวิเคราะห์ส่วนประกอบของสารสกัด ผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากว่านพญาวานรประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลและสารประกอบฟลาโวนอยด์ 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 $\mu\text{g/mL}$ ร่วมกับ H_2O_2 100 μM แก่เซลล์ HepG2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยวิธี 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) และวัดระดับของ glutathione (GSH) พบว่าสารสกัดทุกความเข้มข้น โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 1, 5 และ 10 $\mu\text{g/mL}$ มีผลทำให้ระดับ ROS ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ (MTT assay) และระดับเอนไซม์ LDH รวมทั้งปฏิกิริยา lipid peroxidation และระดับ GSH ของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดและกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการทดลองดังกล่าวสรุปได้ว่าสารสกัดจากว่านพญาวานรมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้น้อยมาก จึงไม่มีผลในการปกป้องเซลล์ตับที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันด้วย H_2O_2

ภาควิชา เภสัชวิทยา..... ลายมือชื่ออนิสิต.....
 สาขาวิชา เภสัชวิทยาทางสัตวแพทยศาสตร์..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ปีการศึกษา 2554..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5275573231 : MAJOR VETERINARY PHARMACOLOGY

KEYWORDS : *PSEUDERANTHEMUM PALATIFERUM* / ANTIOXIDANT / HYDROGEN PEROXIDE / OXIDATIVE DAMAGE / HEPG2 CELLS

SUPAPORN UDOMSUP : HEPATOPROTECTIVE AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF HOAN NGOC (*PSEUDERANTHEMUM PALATIFERUM*) AGAINST HYDROGEN PEROXIDE - INDUCED OXIDATIVE DAMAGE IN HEPG2 CELLS. ADVISOR : ASSOC. PROF. SUPATRA SRICHAIRAT, Dr.rer.nat, CO-ADVISOR : ASST. PROF. SUREE JIANMONGKOL, Ph.D., 86 pp.

The purpose of this study was to investigate hepatoprotective and antioxidant activities of *Pseuderanthemum palatiferum* extract (PPE) against hydrogen peroxide (H_2O_2) – 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 H_2O_2 scavenging assay. The hepatoprotective effect of PPE against H_2O_2 – 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), and glutathione (GSH) levels were also estimated. After 24-h incubation with PPE (1, 5, 10, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$) and H_2O_2 (100 μM) of HepG2 cells, the ROS levels of PPE group, especially 1, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$, were not significantly lower than those of untreated group. The levels of cell viability (MTT assay) and cell damage detected by LDH, MDA as well as the GSH 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 H_2O_2 –induced oxidative damage in HepG2 cells.

Department : Veterinary Pharmacology..... Student's Signature

Field of Study : Veterinary Pharmacology Advisor's Signature

Academic Year : 2011..... Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ เกษ์ชกรหญิง ดร. สุพัตรา ศรีไชยรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกษ์ชกรหญิง ดร. สุรีย์ เจียรณมงคล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้ความเมตตา ช่วยเหลือและให้คำปรึกษาชี้แนะแนวทางในการทำวิจัยและเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. ศรินทร หยิบโชค อนันต์, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ร้อยโทหญิง สัตวแพทย์หญิง เนาวรัตน์ สุทธิมนภาพงษ์ และรองศาสตราจารย์ เกษ์ชกรหญิง ดร. สุวรา วัฒนพิทยกุล คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และโครงร่างวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่กรุณาใช้เวลาและให้คำแนะนำต่างๆ ซึ่งทำให้งานวิทยานิพนธ์นี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ เกษ์ชกร ดร. ชัยโย ชัยชาญพิพยุท ๓, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. สนธยา เตียวศิริทรัพย์, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ทนง อัสวภาญจน์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. นารีรัตน์ วิเศษกุล ที่ให้ความเมตตา ช่วยเหลือและให้คำปรึกษาชี้แนะแนวทางในการทำวิจัย

ขอขอบคุณบุคลากรประจำภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นิสิตประจำภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นิสิตประจำภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ นางสาวสุจินต์ ศิริสวัสดิ์ และนางสาวอลิสา สุขเอม ที่ให้ความรู้และอำนวยความสะดวกและความช่วยเหลือทางด้านเทคนิคต่างๆ

ขอขอบคุณคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการเอื้อเพื่อสถานที่สำหรับการวิจัย และขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยสำหรับทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฏ
 บทที่	
1. บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 สมมติฐานการวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
1.5 ขอบเขตของการวิจัย.....	4
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 ว่านพญาวานร.....	5
2.2 Reactive oxygen species และภาวะเครียดออกซิเดชัน.....	9
2.3 กลไกต่อต้านภาวะเครียดออกซิเดชันของร่างกาย.....	19
2.4 การใช้สารเคมีเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันในการศึกษาผลของ ยาในเซลล์ HepG2.....	27
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....	28
3.1 วัสดุและอุปกรณ์.....	28
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย.....	30
3.2.1 การสกัดว่านพญาวานร.....	30
3.2.2 การตรวจสอบองค์ประกอบของสารสกัดจากว่านพญาวานร.....	30

บทที่	หน้า
3.2.2.1 การหาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอล.....	30
3.2.2.2 การหาปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์.....	30
3.2.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด.....	32
3.2.3.1 วิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals (DPPH) assay.....	32
3.2.3.2 วิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay.....	32
3.2.3.3 วิธี Hydrogen peroxide radical scavenging activity assay.....	33
3.2.4 การศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ของสารสกัดใน HepG2 cells.....	34
3.2.4.1 วิธี MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay.....	35
3.2.4.1.1 การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ H ₂ O ₂ ที่ใช้ในการทดลอง.....	35
3.2.4.1.2 การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารสกัดเพื่อใช้ในการทดลอง.....	36
3.2.4.1.3 การศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ของสารสกัดเมื่อให้ร่วมกับ H ₂ O ₂ ...	37
3.2.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ reactive oxygen species (ROS) ในเซลล์.....	38
3.2.4.3 การวิเคราะห์หา LDH (Lactate dehydrogenase) leakage.....	39
3.2.4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณ glutathione.....	40
3.2.4.5 การวิเคราะห์หาปฏิกิริยา lipid peroxidation.....	41
3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	42
4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	43
4.1 ผลการสกัดว่านพญาวานร.....	43
4.2 ผลการตรวจสอบองค์ประกอบของสารสกัดจากว่านพญาวานร.....	43
4.2.1 ผลการหาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอล.....	43
4.2.2 ผลการหาปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์.....	44
4.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด.....	46
4.3.1 วิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals (DPPH) assay.....	46
4.3.2 วิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay.....	48
4.3.3 วิธี Hydrogen peroxide radical scavenging activity assay.....	50
4.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ของสารสกัดใน HepG2 cells.....	52

บทที่	ณ หน้า
4.4.1 วิธี MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay.....	52
4.4.1.1 ผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ H ₂ O ₂ ที่ใช้ในการทดลอง.....	52
4.4.1.2 ผลการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารสกัดเพื่อใช้ในการทดลอง.....	53
4.4.1.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ของสารสกัดเมื่อให้ร่วมกับ H ₂ O ₂	54
4.4.2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ reactive oxygen species (ROS) ในเซลล์.....	55
4.4.3 ผลการวิเคราะห์หา LDH (Lactate dehydrogenase) leakage.....	56
4.4.4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ glutathione.....	57
4.4.5 ผลการวิเคราะห์หาปฏิกิริยา lipid peroxidation.....	58
5. อภิปราย และสรุปผลการวิจัย.....	59
รายการอ้างอิง.....	67
ภาคผนวก	83
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	86

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	Oxygen radicals และ Nonradical oxygen derivatives.....	10
2	ประเภทและแหล่งของสารประกอบฟลาโวนอยด์.....	25
3	ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอล (Total phenolic compounds) ในสารสกัด จากว่านพญาวานร.....	43
4	ปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Total flavonoid compounds) ใน สารสกัดจากว่านพญาวานร.....	44
5	สรุปผลการตรวจสอบคุณสมบัติของสารสกัด.....	45
6	ผลของสารสกัดต่อเซลล์ HepG2 (MTT test).....	53

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ว่านพญาวานร (<i>Pseuderanthemum palatiferum</i>).....	6
2	ปฏิกิริยา lipid peroxidation.....	16
3	ขั้นตอนการเกิด 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) และ 2,6-diamino-4-hydroxy- 5-formamidopyrimidine (FapyGua).....	17
4	Glutathione redox cycle.....	21
5	โครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบฟลาโวนอยด์แต่ละกลุ่ม.....	24
6	กราฟมาตรฐานของสาร gallic acid.....	44
7	กราฟมาตรฐานของสาร catechin.....	45
8	ความสามารถในการยับยั้ง DPPH radical ของสารสกัด.....	46
9	ความสามารถในการยับยั้ง DPPH radical ของ ascorbic acid.....	47
10	ความสามารถในการรีดิวซ์ ferric tripyridyltriazine (Fe(III)-TPTZ) ของสารสกัด.....	48
11	ความสามารถ ในการรีดิวซ์ ferric tripyridyltriazine (Fe(III)-TPTZ) ของ FeSO ₄	49
12	ความสามารถ ในการรีดิวซ์ ferric tripyridyltriazine (Fe(III)-TPTZ) ของ ascorbic acid.....	49
13	ความสามารถในการยับยั้ง H ₂ O ₂ ของสารสกัด.....	50
14	ความสามารถในการยับยั้ง H ₂ O ₂ ของ ascorbic acid.....	51
15	ผลของ H ₂ O ₂ ต่อเซลล์ HepG2 (MTT test).....	52
16	ผลของสารสกัดเมื่อให้ร่วมกับ H ₂ O ₂ ต่อเซลล์ HepG2 (MTT test).....	54
17	ค่า fluorescence intensity/mg protein ของเซลล์ HepG2 เมื่อได้รับสารสกัดร่วมกับ H ₂ O ₂	55
18	ค่า cytotoxicity index ของเซลล์ HepG2 เมื่อได้รับสารสกัดร่วมกับ H ₂ O ₂	56
19	ปริมาณ glutathione ของเซลล์ HepG2 เมื่อได้รับสารสกัดร่วมกับ H ₂ O ₂	57
20	ปริมาณ malondialdehyde ของเซลล์ HepG2 เมื่อได้รับสารสกัดร่วมกับ H ₂ O ₂	58
21	โครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟลาโวนอยด์.....	60
22	โครงสร้างโมเลกุลของ kaempferol และ apigenin.....	62

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ROS	reactive oxygen species
RNS	reactive nitrogen species
HepG2	human hepatocellular liver carcinoma cell line
L-NAME	NG-nitro-L-arginine methyl ester
HDL	high density lipoprotein
TC	total cholesterol
TG	triglycerides
LDL	low density lipoprotein
BUN	blood urea nitrogen
ALP	alkaline phosphatase
$O_2^{\cdot -}$	superoxide ion radical
OH^{\cdot}	hydroxyl radical
ROO^{\cdot}	peroxyl radical
RO^{\cdot}	alkoxyl radical
NO^{\cdot}	nitric oxide radical
$O_2^{\cdot \cdot}$	oxygen (bi-radical)
H_2O_2	hydrogen peroxide
ROOH	organic peroxide
HOCL	hypochlorous acid
O_3	ozone
HCOR	aldehydes
1O_2	singlet oxygen
ONOOH	peroxynitrite
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form)
NADP	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

SOD	superoxide dismutase
PUFA	polyunsaturated fatty acids
L [•]	lipid radical
LOO [•]	lipid peroxy radical
LOOH	lipid hydroperoxide
LH	lipid molecule
α -TO [•]	α -tocopherol phenoxyl radical
8-OHdG	8-hydroxy-2'-deoxyguanosine
FapyGua	2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine
MRC	mitochondrial respiratory chain
CYP2E1	cytochrome P450 2E1
HNE	trans-4-hydroxy-2-nonenal
MDA	malondialdehyde
ATP	adenosine triphosphate
GPX	glutathione peroxidase
GSH	glutathione
GSSG	glutathione disulfide
LMWA	low-molecular-weight antioxidant
RS [•]	thiol radicals
α -tocopherol [•]	α -tocopherol radical
CCl ₄	carbon tetrachloride
<i>t</i> -BHP	<i>tert</i> -butyl hydroperoxide
LDH	lactate dehydrogenase
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ตับเป็นอวัยวะที่มีบทบาทสำคัญในการกำจัดยาหรือสารเคมีที่เป็นพิษ และไวต่อการเกิดพิษ ปัจจุบันมียามากกว่า 900 ชนิดที่พบว่าเป็นพิษต่อตับ และเป็นสาเหตุสำคัญทำให้ตับเสียสภาพอย่างฉับพลัน โดยมีหลายกลไกที่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของตับ เช่น การทำงานของไมโทคอนเดรียที่เปลี่ยนแปลงไป การกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ตับ เช่น CYP2E1 การกระตุ้น kupffer cell และ neutrophil โดยกลไกดังกล่าวเกี่ยวข้องกับโมเลกุลที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบซึ่งมีความไวในการทำปฏิกิริยากับสารอื่น (reactive oxygen species, ROS) (Jaeschke et al., 2002)

Oxidative stress คือภาวะที่มี ROS มากเกินไป โดย ROS มีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหายและการทำงานของเซลล์ผิดปกติ เนื่องจากไปทำลายโปรตีน ดีเอ็นเอ และทำให้เกิดปฏิกิริยา peroxidation ของไขมัน รวมทั้งกระตุ้นกระบวนการอักเสบ (Browning and Horton, 2004) ซึ่งผลดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเรื้อรังและโรคที่เกิดจากความเสื่อม ได้แก่ มะเร็ง เบาหวาน โรคในระบบหลอดเลือดและหัวใจ โรคเกี่ยวกับการเสื่อมสภาพของเซลล์สมอง (Djordjevic, 2004; Willcox et al., 2004; Valko et al., 2006) รวมทั้งโรคที่เกิดขึ้นในตับ เช่น hepatocellular carcinoma, viral hepatitis, alcoholic hepatitis และ non-alcoholic steatosis พบว่า ROS และ reactive nitrogen species (RNS) มีบทบาทสำคัญในการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคและพัฒนาการของโรคตับดังกล่าว (Loguercio and Federico, 2003; Nagata et al., 2007; Morisco et al., 2008)

หลักการรักษาโรคตับโดยทั่วไป คือ กำจัดสาเหตุเบื้องต้น รักษาแบบประคับประคอง (supportive treatment) รักษาตามอาการ (symptomatic treatment) และป้องกันการลุกลามของโรค อย่างไรก็ตามการรักษาในปัจจุบันพบว่ายังมีข้อจำกัดและให้ผลไม่เต็มที่ รวมทั้งยาแผนปัจจุบันมีผลข้างเคียงสูง โดยเฉพาะกลุ่ม glucocorticoid ซึ่งเป็นยาที่ใช้บรรเทาอาการอักเสบ พบว่าการใช้ยาในขนาดที่สูงหรือเป็นเวลานานจะมีผลลดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน การทำงานของไตผิดปกติ ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์เยื่อเมือก รวมทั้งมีผลทำให้ค่าเอนไซม์ตับสูงขึ้น (Plumb, 2002) นอกจากนี้ยังต้องคอยปรับขนาดของยาให้เหมาะสม

ปัจจุบันมีการใช้พืชสมุนไพรกันอย่างกว้างขวางในรูปแบบของอาหารเสริมสุขภาพ และยาพื้นบ้านสำหรับต้านฤทธิ์ ROS ที่เกิดขึ้นกับเซลล์ โดยมีผลดักจับ ROS หรือกระตุ้นกระบวนการปกป้องภายในเซลล์ และได้มีการศึกษาหาสารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมาใช้ป้องกันและรักษาโรคตับเป็นจำนวนมากเพื่อเป็นทางเลือกในการรักษา ยาที่ได้มีการพัฒนาเป็นยาแผนปัจจุบัน คือ silymarin ซึ่งมีสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้จากเมล็ดพืชที่เรียกว่า milk thistle และมีถิ่นกำเนิดมาจากเมดิเตอร์เรเนียน (Laekeman et al., 2003) ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีการกล่าวถึง สมุนไพรว่านพญาวัน (*Pseuderanthemum palatiferum*) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่มีถิ่นกำเนิดจากเวียดนามที่สามารถเพาะปลูก ดูแล และหาภายในประเทศไทย จากข้อมูลการใช้สมุนไพรของเวียดนามได้ระบุว่ามีการนำพืชชนิดนี้มาใช้ในการรักษาและป้องกันโรคตับอักเสบและโรคมะเร็งตับในมนุษย์ (Dieu et al., 2005) และจากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าใบของว่านพญาวันมีความสามารถในการต้าน H_2O_2 (hydrogen peroxide radical) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระในเม็ดเลือดแดงของคน (Giang et al., 2005) อย่างไรก็ตามยังขาดข้อมูลที่เป็นการศึกษาทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการต้านออกซิเดชัน และยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ตับที่เสียหายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันในเซลล์เพาะเลี้ยง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากว่านพญาวันในการต้านออกซิเดชัน ซึ่งมีผลปกป้องเซลล์ตับที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเสียหายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วย hydrogen peroxide (H_2O_2) โดยศึกษาในเซลล์ HepG2 เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการป้องกันและรักษาโรคตับในมนุษย์และสุนัขต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากว่านพญาวันในการปกป้องเซลล์ตับ และต้านออกซิเดชัน
2. เพื่อศึกษากลไกของสารสกัดจากว่านพญาวันในการปกป้องเซลล์ตับ และต้านออกซิเดชัน

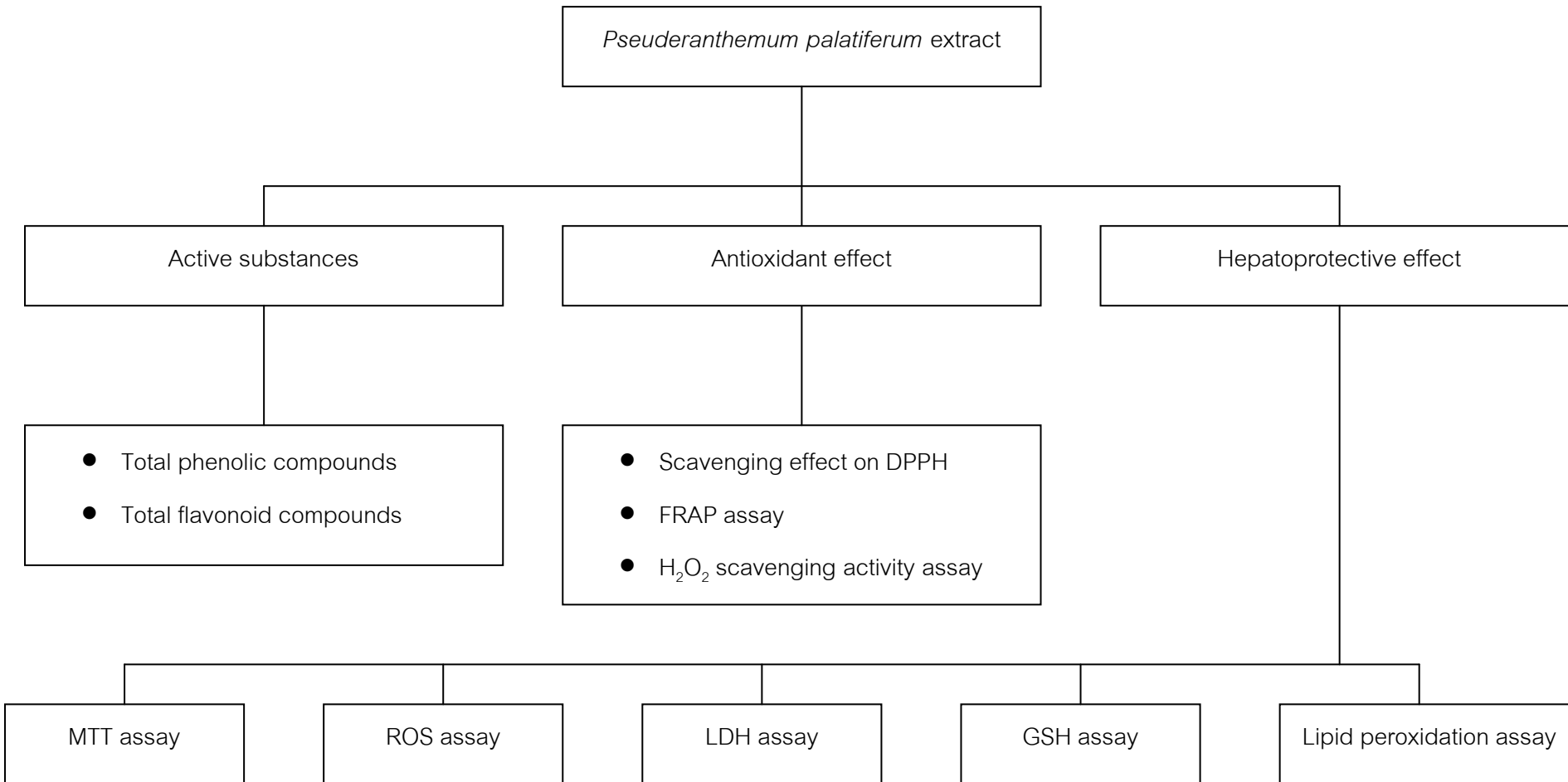
สมมติฐานการวิจัย

สารสกัดจากว่านพญาวันมีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยผ่านกลไกในการช่วยลดปริมาณ ROS จึงมีฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ตับ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

ทราบผลและกลไกของสารสกัดจากว่านพญาวานรในการต้านออกซิเดชันและปกป้องเซลล์ HepG2 ที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress ด้วย H_2O_2 เพื่อใช้เป็นแนวทางในการศึกษาในสัตว์ทดลอง และนำไปใช้ในการรักษาและป้องกันโรคตับในมนุษย์และสัตว์ต่อไปในอนาคต

ขอบเขตของการวิจัย



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ว่านพญาวานร (*Pseuderanthemum palatiferum*)

ว่านพญาวานรมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. อยู่ในวงศ์ Acanthaceae มีชื่อท้องถิ่นว่า ว่านลิง ต้นลิง ว่านเพชรพันล้าน และ ฮว่านง็อก (Hoan ngoc) เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก สูง 1-2 เมตร ลำต้นผิวเรียบสีเขียว ใบเดี่ยวเรียงตรงข้าม มีสีเขียว ใบอ่อน ลักษณะใบคล้ายรูปหอก กว้าง 3.5-5 ซม. ยาว 12-17 ซม. ก้านใบ (petioles) ยาว 1-2.5 ซม. มีจำนวน 700-1000 ใบต่อต้น (Dieu et al., 2005) ดังภาพที่ 1 ขยายพันธุ์ง่ายด้วยการตัดยอดปักชำลงดิน (วงศ์สถิต ฉั่วสกุล และ อรัญญา ศรีบุศราคม, 2008)

ว่านพญาวานร เป็นพืชสมุนไพรที่มีถิ่นกำเนิดจากประเทศเวียดนาม ค้นพบเมื่อประมาณปี ค.ศ. 1990 ในป่า Cuc Phuong ทางตอนเหนือของเวียดนาม ในประเทศเวียดนามได้มีการนำพืชชนิดนี้มาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคต่างๆ ได้แก่ โรคท้องเสีย โรคความดันโลหิตสูง ข้ออักเสบ หลอดลมอักเสบ โรคตับอักเสบ โรคกระเพาะอาหารเป็นแผล โรคลำไส้อักเสบ โรคไตอักเสบ บาดแผล ท้องผูก อาการปวดเมื่อย โรคเบาหวาน และโรคตาแดง เป็นต้น ส่วนสำคัญที่ใช้ คือ ใบสด ซึ่งส่วนใหญ่ใช้ในการรักษามากกว่าป้องกันโรค ปริมาณใบที่ใช้ในการป้องกันโรค คือ 3-6 ใบ และปริมาณใบที่ใช้ในการรักษาโรค คือ 7-9 ใบ นอกจากนี้ยังมีการนำมาใช้ในการรักษาและป้องกันโรคในสัตว์ เช่น โรคท้องเสียในสุกร โรคท้องเสียเป็นเลือดในสุนัข บาดแผลและโรคอหิวาต์ในไก่ ซึ่งส่วนใหญ่ใช้ในการรักษามากกว่าป้องกันโรคเช่นเดียวกัน โดยใช้ 1-3 ใบต่อวัน เป็นเวลา 2-3 วัน (Dieu et al., 2005) ในประเทศไทยมีการนำว่านพญาวานรมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคต่างๆ เช่นกัน ได้แก่ โรคกระเพาะอาหาร โรคเกี่ยวกับลำไส้ใหญ่ โรคตับอักเสบ คอพอก โรคไตอักเสบ ปวดเมื่อย โรคตาแดง โรคความดันโลหิตสูง และโรคเบาหวาน (ลำปาง ปาชีโร, 2003)

1.1 องค์ประกอบทางเคมีของว่านพญาวานร

สารสำคัญที่สามารถแยกได้จากใบของว่านพญาวานร ได้แก่ stigmasterol, β -sitosterol, flavonoids, triterpenoid saponin, kaempferol, apigenin, salicylic acid, phytol, palmitic acid (Hung et al., 2004), pseuderantin และสารอาหารต่างๆ ได้แก่ โปรตีน และกรดอะมิโน เช่น ไลซีน (lysine) เมทไธโอนีน (methionine) ทรีโอนีน (threonine) และแร่ธาตุต่างๆ ได้แก่ แคลเซียม เหล็ก และทองแดง (Oanh, 1999) องค์ประกอบทางเคมีที่พบในรากของว่านพญาวานร ได้แก่ สารกลุ่ม lignan ชนิดใหม่คือ palatiferin A และ palatiferin B, สารกลุ่ม triterpenes ได้แก่

epifriedelanol, lupeol, lupenone, betulin, pomolic acid และ สารกลุ่ม dipeptide asperglaucide (Mai et al., 2011)



ภาพที่ 1 *Pseuderanthemum palatiferum*

ปัจจุบันได้มีการกล่าวอ้างถึงประโยชน์ขององค์ประกอบทางเคมีบางชนิดของสารสกัดจากว่านพญาวานร เช่น stigmasterol เป็นสารกลุ่ม sterol ชนิดไม่อิ่มตัวที่ได้จากพืช พบมากในเมล็ดถั่วเหลือง, calabar bean, rapeseed และผัก จากงานวิจัยพบว่าสามารถป้องกันมะเร็ง ลดระดับโคเลสเตอรอล ยับยั้งการอักเสบ ต้านออกซิเดชัน และลดระดับน้ำตาล (Gabay et al., 2010; Panda et al., 2009) β -sitosterol เป็นสารกลุ่ม sterol ที่ได้จากพืช เช่น อะโวคาโด เมล็ดฟักทอง เมล็ด ถั่วเหลือง น้ำมันข้าวโพด จากงานวิจัยพบว่าสามารถลดระดับโคเลสเตอรอล (Matsuoka et al., 2008) kaempferol เป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์กลุ่ม flavonol พบมากในชา บร็อคโคลี่ องุ่น แอปเปิ้ล จากงานวิจัยพบว่ามีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายประการ เช่น ต้านออกซิเดชัน ต้านอักเสบ ต้านจุลชีพ ต้านมะเร็ง ต้านเบาหวาน ต้านกระดูกพรุน คลายเครียด บรรเทาอาการปวด และ ต้านภูมิแพ้ (Calderon-Montano et al., 2011) เป็นต้น

1.2 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของว่านพญาวานร

1. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

สารสกัดจากใบว่านพญาวานรมีฤทธิ์ต้าน $H_2O_2^{\cdot}$ (hydrogen peroxide radical) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระในเม็ดเลือดแดงของคน (Giang et al., 2005)

สารสกัดใบแห้งของว่านพญาวานรในตัวทำละลาย hexane, dichloromethane, ethyl acetate, methanol และ ethanol มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH และ FRAP assay โดยพบว่าสารสกัดหยาบใน ethanol มีความสามารถในการยับยั้ง DPPH สูงสุด ($IC_{50} = 656.27$ ppm) รองลงมาได้แก่ ethyl acetate, methanol, hexane และ dichloromethane ($IC_{50} = 768.66, 917.07, 1468.46$ และ 12520 ppm ตามลำดับ) ผลของ FRAP assay พบว่าสารสกัดทั้งหมดมีความสามารถในการรีดิวซ์ และความสามารถดังกล่าวแปรไปตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น โดยสารสกัดใน dichloromethane และ ethyl acetate มีความสามารถในการรีดิวซ์สูงสุด รองลงมา ได้แก่ สารสกัดในเมทานอล ส่วนสารสกัดใน ethanol และ hexane มีความสามารถดังกล่าวเล็กน้อย (สมหมาย ประดิษฐ์, 2010)

2. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

สารสกัดจากใบว่านพญาวานรส่วน ethyl acetate และ n-butanol fraction มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 10 ชนิด โดยใช้วิธี standard disc diffusion โดยส่วน ethyl acetate fraction มีฤทธิ์แรงต่อ *Salmonella typhi* 158, *Shigella flexneri* และ *Escherichia coli* (Giang et al., 2005)

สารสกัดใบแห้งของว่านพญาวานรในตัวทำละลาย dichloromethane และ methanol มีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของ *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. และ *Citrobacter* spp. ได้ดี

ส่วนสารสกัดใน ethanol มีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของ *Klebsiella* spp. และ *Citrobacter* spp. ได้ดี (สมหมาย ปะติตั้งไข, 2010)

3. ฤทธิ์ต้านเชื้อรา

สารสกัดจากใบว่านพญาวานรส่วน ethyl acetate และ n-butanol fraction มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา 2 ชนิด ได้แก่ *Candida albicans* และ *Candida stellatoidea* (Giang et al., 2005)

4. ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง

สารสกัดสดจากว่านพญาวานรมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง โดยมีค่า LC_{50} ของสารสกัดต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Hela cells) คือ $0.9 \mu\text{g/mL}$ และไม่มีผลต่อเซลล์ไตของลิง (MK cells) (เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ และคณะ, 2009)

5. ฤทธิ์ลดระดับความดันโลหิตและอัตราการเต้นของหัวใจ

จากการศึกษาของ Khonsung และคณะ (2011) เมื่อให้สารสกัดใบสดของว่านพญาวานรซึ่งสกัดด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 5 – 25 mg/kg เข้าทางเส้นเลือดแก่หนูปกติ และหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความดันโลหิตสูงด้วย NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) พบว่า สารสกัดมีผลทำให้ระดับความดันโลหิตและอัตราการเต้นของหัวใจในหนูทั้งสองกลุ่มลดลง

6. ฤทธิ์ต้านเบาหวาน

จากการศึกษาของ Padee และคณะ (2010) เมื่อให้สารสกัดจากใบของว่านพญาวานรซึ่งสกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 250, 500 และ 1000 mg/kg ทางการกินแก่หนูทดลอง วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 14 วัน พบว่า สารสกัดทุกความเข้มข้นสามารถลดระดับกลูโคสและเพิ่มระดับอินซูลินได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มทดลอง และสารสกัดที่ความเข้มข้น 250 mg/kg มีประสิทธิภาพดีที่สุด โดยเมื่อเทียบกับ glibenclamide จะมีระดับกลูโคสแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดมีผลในการเพิ่ม high density lipoprotein (HDL) และลด total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low density lipoprotein (LDL), blood urea nitrogen (BUN) และ alkaline phosphatase (ALP) ในหนูที่เป็นเบาหวานอีกด้วย

7. ฤทธิ์ต่อสัตว์

จากการศึกษาของ Dieu และคณะ (2006) เมื่อให้สารสกัดใบสด หรือผงที่ได้จากใบของว่านพญาวานรที่ความเข้มข้นต่างๆ แก่ลูกสุกรขุนและลูกสุกรหย่านมทางการกินทุกวัน เป็นระยะเวลา 1 – 30 วัน พบว่า สารสกัดมีผลช่วยให้อัตราการเจริญเติบโตของลูกสุกรดีขึ้น และมีอาการท้องเสียและอัตราการตายลดลง เมื่อให้เป็นระยะเวลา 30 วันจะมีประสิทธิภาพมากกว่า 7 วัน และที่ความเข้มข้น 0.2 g/kg/วัน มีประสิทธิภาพมากกว่า 0.1 g/kg/วัน โดยประสิทธิภาพของสารสกัดใบสด และผงที่ได้จากใบนั้นไม่แตกต่างกัน

จากการศึกษาของ Dieu และ Hoa (2003) เมื่อให้สารสกัดผงจากใบว่านพญาวานรที่ความเข้มข้น 1 g/kg ทางการกินทุกวัน วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 3 วัน แก่ลูกสุกรที่ท้องเสีย พบว่าสารสกัดมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับยา Coli-norgent (ประกอบด้วย colistine sulfate 125,000,000 UI, norfloxacin 2,000 mg, gentamycin sulfate 1,000 mg, trimethoprim 1,000 mg และ excipient q.s 100g) ที่ความเข้มข้น 0.1 g/kg และ cotrimaxazol (ประกอบด้วย trimethoprim 160mg และ sulfamethoxazol 800 mg) ที่ความเข้มข้น 0.1 g/kg

นอกจากนี้มีการศึกษาความเป็นพิษใน Vero cells (African green monkey kidney) พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.78 - 50 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่เตรียมได้ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทดลอง และการศึกษาในหนูทดลอง พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 500, 1000, 1500 และ 2000 mg/mL ไม่มีความเป็นพิษเฉียบพลัน และสารสกัดที่ความเข้มข้น 250, 500 และ 1000 mg/mL ไม่มีความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลัน (พีริวิชญ์ พาตี และคณะ, 2009)

2. Reactive oxygen species (ROS) และภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress)

2.1 Reactive oxygen species (ROS)

Reactive oxygen species (ROS) คือ อะตอมหรือ โมเลกุลที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบและมีความไวในการทำปฏิกิริยาต่อสารอื่น โดยทั่วไป pro-oxidant จะหมายถึง ROS ประกอบด้วย 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มที่เป็นอนุมูล (radicals) และกลุ่มที่ไม่ใช่อนุมูล (nonradical) โดยกลุ่มที่เป็นอนุมูลจะมีอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่ (unpaired electron) อย่างน้อย 1 ตัวอยู่ที่ชั้นนอกสุด ทำให้มีความไวในการทำปฏิกิริยาต่อสารอื่น โดยการให้หรือรับอิเล็กตรอนจากสารอื่นเพื่อให้ตัวมันเองเสถียร สัญลักษณ์ทางเคมีของอนุมูล คือ อิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่ของอนุมูล ซึ่งแสดงด้วยจุดด้านบนของสัญลักษณ์ทางเคมี เช่น อนุมูล R^{\bullet} กลุ่มนี้ประกอบด้วย superoxide ion radical ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hydroxyl radical (OH^{\bullet}), peroxy radical (ROO^{\bullet}), alkoxy radical (RO^{\bullet}), nitric oxide radical (NO^{\bullet}) และ oxygen (bi-radical) ($\text{O}_2^{\bullet\bullet}$) ส่วนกลุ่มที่ไม่ใช่อนุมูล ได้แก่ hydrogen peroxide (H_2O_2), organic peroxide (ROOH), hypochlorous acid (HOCl), ozone (O_3), aldehydes (HCOR), singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) และ peroxyxynitrite (ONOOH) ดังตารางที่ 1 (Kohen and Nyska, 2002)

ตารางที่ 1 Oxygen radicals และ Nonradical oxygen derivatives (Kohen and Nyska, 2002)

Oxygen radicals	Nonradical oxygen derivatives
Superoxide ion radical ($O_2^{\cdot -}$)	Hydrogen peroxide (H_2O_2)
Hydroxyl radical (OH^{\cdot})	Organic peroxide (ROOH)
Peroxyl radical (ROO^{\cdot})	Hypochlorous acid (HOCL)
Alkoxy radical (RO^{\cdot})	Ozone (O_3)
Nitric oxide radical (NO^{\cdot})	Aldehydes (HCOR)
Oxygen (bi-radical) ($O_2^{\cdot \cdot}$)	Singlet oxygen (1O_2)
	Peroxynitrite (ONOOH)

สาเหตุการเกิด ROS ได้แก่

1. แหล่งภายนอกร่างกาย

1.1 รังสี

เมื่อเซลล์ได้รับรังสีแกมมา (γ -irradiation) จะทำให้เกิดการสร้าง ROS จากกระบวนการ ionization ของน้ำ และเมื่อเซลล์ได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ตทั้ง UV-C, UV-B และ UV-A จะทำให้เกิดการสร้าง ROS ได้แก่ singlet oxygen (1O_2), hydrogen peroxide (H_2O_2) และ superoxide ion radical ($O_2^{\cdot -}$) นอกจากนี้รังสี UV ทำให้โมเลกุลของ hydrogen peroxide (H_2O_2) แตกเป็น hydroxyl radical (OH^{\cdot}) (Kohen and Nyska, 2002)

1.2 อาหาร

ส่วนประกอบของอาหารบางชนิดจะถูกออกซิไดซ์กลายเป็น oxidant หลายชนิด ได้แก่ aldehydes (HCOR), peroxides, oxidized fatty acid และ transition metals (Ames, 1986) โดยอาหารที่ถูกออกซิไดส์ดังกล่าวจะไปยังระบบทางเดินอาหาร ทำให้เกิดความเสียหายแก่เยื่อทางอาหาร (Srigiridhar et al., 2001)

1.3 ยา

ยาบางตัวเป็นแหล่งกำเนิด ROS ที่สำคัญ ได้แก่ ยาต้านมะเร็ง เช่น bleomycin และ adriamycin ทั้งนี้มีกลไกการออกฤทธิ์ที่ทำให้เกิดการสร้าง ROS นอกจากนี้ยาแก้ปวดกลุ่ม narcotic drug และยาดมสลบ ก็ทำให้เกิด ROS เช่นกัน (Chinev et al., 1998)

1.4 มลพิษ

มลพิษ เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ คาร์บอนมอนอกไซด์ หรือควันจากโรงงานอุตสาหกรรม เป็นแหล่งรวมอนุพันธ์ของไนตริกออกไซด์ (NO derivatives) ซึ่งเป็นแหล่งของ ROS ที่ทำให้เกิดความเสียหายแก่สิ่งมีชีวิตโดยการสัมผัสโดยตรงหรือสูดดมเข้าสู่ปอด (Koren, 1995; Victoria, 1994)

1.5 สิ่งแปลกปลอม (xenobiotics)

สิ่งแปลกปลอม ได้แก่ สารพิษ ยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช และสารเคมีบางชนิด เช่น mustard gas (Elsayed, 1992; Wormser et al., 2000) ก็เป็นแหล่ง ROS ที่เกิดขึ้นจากผลพลอยได้ (by-product) จากกระบวนการเมตาบอลิซึม

1.6 จุลชีพ

จุลชีพ เช่น แบคทีเรีย ไวรัส ทำให้มีการเกิด ROS จากเซลล์ที่มาทำลาย ได้แก่ phagocyte และ neutrophils (Kohen and Nyska, 2002)

1.7 โอโซน (Ozone, O₃)

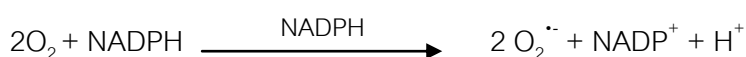
โอโซนจัดเป็น ROS ที่ไม่ใช่ออนุมูล แต่ก็สามารถทำลายปอด เนื่องจากเป็นสารออกซิไดซ์แรงสูง (Rao and Davis, 2001)

2. แหล่งจากภายในร่างกาย

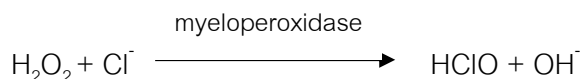
แหล่งจากภายในร่างกายเป็นแหล่งที่มีความสำคัญมากกว่าแหล่งจากภายนอก เนื่องจากเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นต่อเนื่องตลอดชีวิตของสิ่งมีชีวิต (Kohen, 1999)

2.1 เซลล์

เซลล์ที่เป็นแหล่งสร้าง ROS ได้แก่ neutrophils, eosinophils, mononuclear cells (monocytes), basophils และ lymphocytes ซึ่งจะทำให้เกิด ROS ในระหว่างกระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอม เซลล์เม็ดเลือดขาวดังกล่าวจะมีการใช้โมเลกุลของออกซิเจน (O₂) เป็นจำนวนมาก ทำให้เกิดอนุมูล superoxide ion radical (O₂^{•-}) โดยอาศัยเอนไซม์ NADPH oxidase (Forman and Torres, 2001) ดังสมการ



นอกจากนี้เอนไซม์ myeloperoxidase ใน neutrophils ก็สามารถทำให้เกิด hypochlorous acid (HClO) จากการทำปฏิกิริยาระหว่าง hydrogen peroxide (H₂O₂) และคลอไรด์ (Cl⁻) โดย HClO เป็นสารที่สามารถทำลายจุลชีพได้ (Rodrigues et al., 2002; Hawkins et al., 2001) ดังสมการ



2.2 เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการสร้าง ROS โดยตรง

มีบางเอนไซม์บางชนิดที่ทำหน้าที่ในการสร้าง ROS โดยตรง เช่น nitric oxide synthase ซึ่งทำให้เกิด nitric oxide (Shaul, 2002)

2.3 เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการสร้าง ROS ทางอ้อม

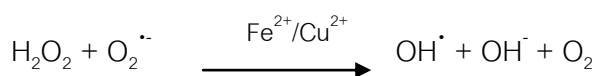
เอนไซม์ส่วนใหญ่จะทำให้เกิด ROS ซึ่งเป็นผลพลอยได้ (by - product) จากการทำงาน เช่น xanthine oxidase ซึ่งมีผลทำให้เกิด superoxide ion radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (Canas, 1999)

2.3 กระบวนการหายใจโดยไมโตคอนเดรีย (mitochondria respiration)

ไมโตคอนเดรียเป็นออร์แกเนลล์สำคัญที่มีการสร้าง ROS เกิดขึ้น ในกระบวนการหายใจ โดยไมโตคอนเดรีย (mitochondria respiration) บางครั้งอาจจะมีการรั่วของ ROS จากไมโตคอนเดรีย (Ames et al., 1995) นอกจากนี้ไมโตคอนเดรียยังสร้าง ROS มากขึ้นเมื่อเซลล์มีความเสื่อมหรือแก่ (aging cell) เนื่องจากการทำงานที่ผิดปกติและเยื่อหุ้มเซลล์ที่เสียหายของไมโตคอนเดรีย (Brunk and Terman, 2002)

2.4 โลหะทรานสิชัน (transition metal)

โลหะทรานสิชัน (transition metal) ที่มีอยู่ในร่างกาย ได้แก่ เหล็ก (Fe^{2+}) และทองแดง (Cu^{2+}) มีบทบาทสำคัญในปฏิกิริยา Fenton reaction (Fenton, 1894) ซึ่งทำให้เกิด hydroxyl radical (OH^{\cdot}) จากปฏิกิริยาระหว่าง hydrogen peroxide (H_2O_2) และ superoxide ion radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ดังสมการ



2.5 ความผิดปกติของร่างกาย และโรคต่างๆ

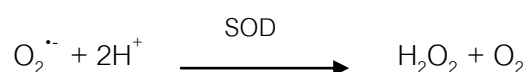
พยาธิสภาพและโรคต่างๆเป็นแหล่งในการสร้าง ROS อย่างต่อเนื่อง (Baud and Ardaillou, 1986; Gutteridge, 1993; Levy, 1996) มีงานวิจัยมากมายที่พบว่า ROS เกี่ยวข้องกับโรคต่างๆ เช่น โรคหัวใจและโรคในระบบหลอดเลือด (Najemnik et al., 1999; Aikawa, 2001) โรคตับ (Loguercio and Federico, 2003; Nagata et al., 2007; Morisco et al., 2008) โรคมะเร็ง (Gottschling et al., 2001; Nyska et al., 2001) โรคของระบบทางเดินอาหาร (Blau et al., 2000) และโรคเกี่ยวกับการเสื่อมสภาพของเซลล์สมอง (Jenner, 1993; Halliwell,

2001) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการสร้าง ROS มากขึ้นในโรคที่เกิดจากความผิดปกติของโลหะหนักในร่างกาย (metal disorders) (Kohen and Gati, 2000)

ตัวอย่าง ROS ที่สำคัญ ได้แก่

1. Superoxide ion radical ($O_2^{\cdot-} / HO_2^{\cdot}$)

Superoxide ion radical มี 2 รูปแบบ ได้แก่ $O_2^{\cdot-}$ ในสภาวะ $pK_a = 4.8$ และ hydroperoxyl (HO_2^{\cdot}) ในสภาวะที่มี PH ต่ำ (Halliwell and Gutteridge, 1999; Bielski and Cabelli, 1995) ภายใต้ PH ปกติในร่างกายจะอยู่ในรูปแบบของ $O_2^{\cdot-}$ อนุมูลนี้จะไม่ทำลายเซลล์โดยตรง แต่สามารถทำปฏิกิริยากับ hydrogen peroxide (H_2O_2) ได้เป็น hydroxyl radical (OH^{\cdot}) ซึ่งเป็นสารที่มีความไวในการทำปฏิกิริยากับชีวโมเลกุลอื่นสูงสุด โดยมี Fe^{2+} หรือ Cu^{2+} เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Fenton, 1894) นอกจากนี้สิ่งมีชีวิตสามารถสร้าง H_2O_2 จาก $O_2^{\cdot-}$ ได้โดยตรงจากปฏิกิริยา dismutation โดยเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) (Bielski et al., 1985) ดังสมการ



2. Hydroxyl radical (OH^{\cdot})

Hydroxyl radical (OH^{\cdot}) เป็นสารที่มีความไวสูงสุดในการทำปฏิกิริยากับชีวโมเลกุลอื่น (Bielski and Cabelli, 1995; Halliwell and Gutteridge, 1999) โดยสามารถทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ เช่น ดีเอ็นเอ โปรตีน ไขมัน กรดอะมิโน น้ำตาล และเหล็ก ที่อยู่รอบข้างได้ทันที อนุมูลนี้สร้างจาก hydrogen peroxide (H_2O_2) ในปฏิกิริยา Fenton reaction โดยโลหะทรานสิชันจะเข้าทำลายพันธะระหว่างออกซิเจนของ H_2O_2 ได้เป็น OH^{\cdot} (Fenton, 1894)

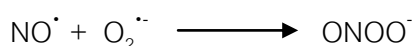
3. Hydrogen peroxide (H_2O_2)

Hydrogen peroxide (H_2O_2) จัดเป็น ROS ในกลุ่มที่ไม่ใช่อนุมูล (nonradical oxygen derivatives) แต่มีความสามารถในการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ง่าย โดยทั่วไปสิ่งมีชีวิตสามารถสร้าง H_2O_2 จาก superoxide ion ($O_2^{\cdot-}$) ได้โดยตรงจากปฏิกิริยา dismutation โดยเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) (Bielski et al., 1985) H_2O_2 สามารถทำปฏิกิริยากับ $O_2^{\cdot-}$ โดยมี Fe^{2+} หรือ

Cu^{2+} ช่วยเร่งปฏิกิริยา และได้ hydroxyl radical ($\text{OH}\cdot$) เรียกปฏิกิริยานี้ว่า ปฏิกิริยา Fenton (Fenton reaction) (Fenton, 1894) นอกจากนี้ H_2O_2 ยังสามารถทำปฏิกิริยากับคลอไรด์ไอออน (Cl^-) โดยอาศัยเอนไซม์ myeloperoxidase ใน neutrophil ได้ผลิตภัณฑ์คือ hypochlorous acid ($\text{HOCl}\cdot$) ซึ่งเป็นอนุมูลที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ได้ (Hawkins et al., 2001)

4. Nitric oxide radical ($\text{NO}\cdot$)

Nitric oxide radical ($\text{NO}\cdot$) เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ L-arginine โดยอาศัยเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) อนุมูลนี้สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลหรือสารอื่นได้ เช่น ทำปฏิกิริยากับ hydrogen peroxide (H_2O_2) และ hypochlorous acid ($\text{HOCl}\cdot$) ได้เป็นอนุพันธ์ต่างๆ เช่น N_2O_3 , NO_2^- และ NO_3^- ปฏิกิริยาที่สำคัญของอนุมูลนี้คือ ทำปฏิกิริยากับ superoxide ion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ได้เป็น peroxynitrite (ONOO^-) ดังสมการ โดยปฏิกิริยาดังกล่าวช่วยรักษาสมดุลระหว่าง superoxide ion และ ROS ชนิดอื่นๆ (Czapski and Goldstein, 1995)



เมื่อ ONOO^- ได้รับ H^+ จะอยู่ในรูปของ ONOOH ซึ่งเป็นสารออกซิไดส์ที่สามารถทำให้โมเลกุลอื่น เช่น ดีเอ็นเอ โปรตีน เกิดความเสียหายได้ (Beckman and Koppenol, 1996)

2.2 ความเสียหายที่เกิดจากภาวะ oxidative stress

Redox reaction หรือ ปฏิกิริยา oxidation – reduction เป็นปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นทั่วไปในร่างกาย โดยปฏิกิริยา oxidation หมายถึง ปฏิกิริยาที่โมเลกุล หรืออะตอมมีการสูญเสียอิเล็กตรอน และปฏิกิริยา reduction หมายถึง ปฏิกิริยาที่โมเลกุล หรืออะตอมได้รับอิเล็กตรอน โดยเรียกตัวที่ให้อิเล็กตรอนว่า reducing agent หรือ reductant และเรียกตัวรับอิเล็กตรอนว่า oxidizing agent หรือ oxidant โดยในทางชีววิทยาจะเรียก reductant ว่า antioxidant (สารต้านออกซิเดชัน) และเรียก oxidant ว่า pro-oxidant (Prior and Cao, 1999)

ในร่างกายของสิ่งมีชีวิตตามปกติจะมีการควบคุมสมดุลระหว่าง oxidant และ reductant ในสภาวะที่ร่างกายมีปริมาณ oxidant มากกว่า reductant จะเกิดภาวะ oxidative stress ซึ่งทำให้เกิดความเสียหาย (oxidative damage) ตามมา (Kohen and Nyska, 2002) โดย oxidant ซึ่งในที่นี้หมายถึง reactive oxygen species (ROS) จะเข้าทำปฏิกิริยากับชีวโมเลกุลต่างๆที่สำคัญ ได้แก่ ไขมัน ดีเอ็นเอ และโปรตีน ทำให้เกิดความเสียหายตามมา ดังนี้

1. ปฏิกิริยา peroxidation ของไขมัน (lipid peroxidation)

Reactive oxygen species (ROS) ที่เกิดขึ้นจะเข้าจับและทำลายสารชีวโมเลกุลอย่างฉับพลัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งโมเลกุลของไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acids, PUFA) เนื่องจากมีกลุ่ม bis-allylic methylene group ซึ่งมีพลังงานพันธะระหว่างไฮโดรเจนและคาร์บอนต่ำ ทำให้สูญเสียไฮโดรเจนอะตอมแก่ ROS ได้ง่าย (Davies et al., 1981) ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ initiation, propagation และ termination

1.1 Initiation

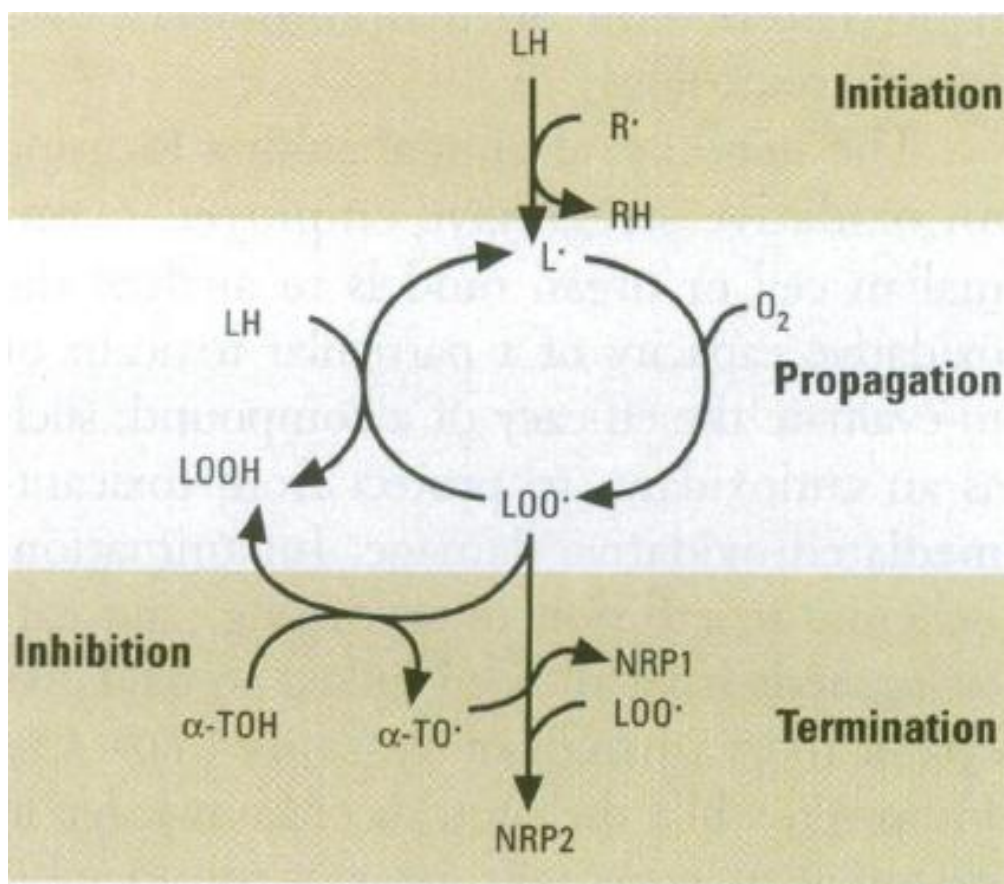
เป็นขั้นแรกที่อนุมูลถูกสร้างขึ้น โดยการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง singlet oxygen (1O_2), superoxide ion ($O_2^{\cdot-}$) หรือ hydroxyl radical (OH^{\cdot}) และไขมัน หรือเกิดจากโลหะทรานสิชันเข้าไปทำลาย hydroperoxides ของไขมัน โดยกรณีแรกจะมีการสูญเสียไฮโดรเจนอะตอมของ methylene carbon (LH) ของไขมัน กลายเป็น lipid radical (L^{\cdot})

1.2 Propagation

เป็นขั้นตอนที่อนุมูลทำปฏิกิริยาเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลตัวอื่น ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวจะเกิดขึ้นต่อกันไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยจะมีการเติมโมเลกุลของออกซิเจน (O_2) อย่างรวดเร็วที่ lipid radical (L^{\cdot}) เกิดเป็น lipid peroxy radical (LOO^{\cdot}) (Howard, 1972) โดย peroxy radical สามารถรับไฮโดรเจนอะตอมจากโมเลกุลอื่นๆ เช่น ดีเอ็นเอ โปรตีน รวมทั้งไขมัน (LH) ทำให้เกิด lipid hydroperoxide ($LOOH$) และเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อไปเรื่อยๆ ดังภาพที่ 2

1.3 Termination

เป็นขั้นตอนหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูล โดยการรวมตัวกันของอนุมูล 2 โมเลกุล ได้เป็นสารที่มีความเสถียร หรือเป็นขั้นตอนที่มีสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) เช่น α -tocopherol เป็นตัวให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่ lipid peroxy radical (LOO^{\cdot}) ทำให้เกิด lipid hydroperoxide ($LOOH$) และ α -tocopherol phenoxyl radical (α -TO $^{\cdot}$) (Burton and Ingold, 1986)

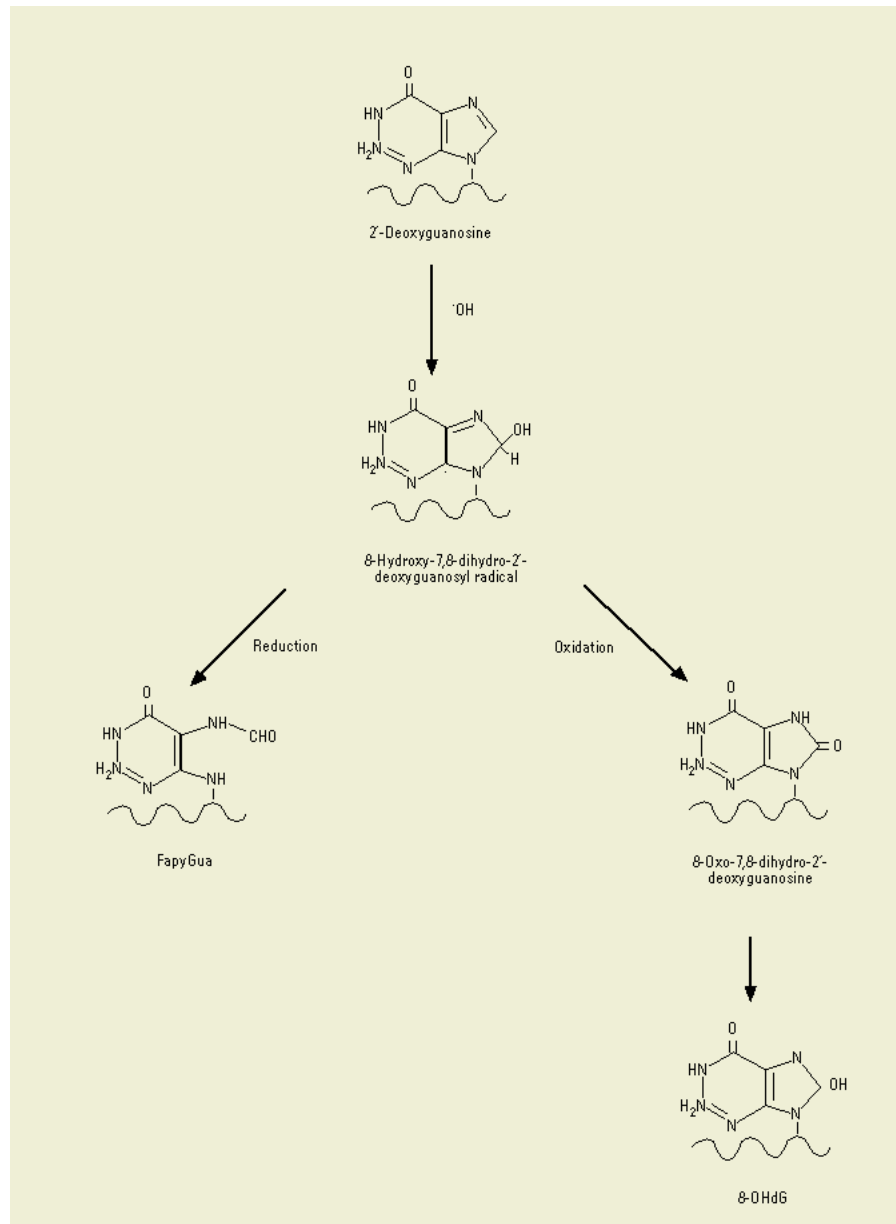


ภาพที่ 2 ปฏิกริยา lipid peroxidation (Kelly et al., 1998)

2. ดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอเป็นเป้าหมายสำคัญที่เกิดความเสียหายได้ง่ายจากภาวะ oxidative stress โดยอนุมูลสำคัญที่เกี่ยวข้อง คือ hydroxyl radical (OH·) ซึ่งส่วนใหญ่จะทำปฏิกริยากับ nitrogenous base และ sugar-phosphate backbone (Buxton et al., 1988) ส่วน hydrogen peroxide (H₂O₂) และ peroxy radical (ROO·) จะไม่ทำปฏิกริยาโดยตรงกับดีเอ็นเอ โดยเมื่อ OH· ทำปฏิกริยากับ nitrogenous base จะมีตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) คือ 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) และ 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FapyGua) (Jaffe, 1976) ซึ่งมีขั้นตอนการเกิดดัง ภาพที่ 3 นอกจากนี้ OH· สามารถทำปฏิกริยากับ sugar-phosphate backbone ทำให้เบสสามารถหลุดออกไปได้ โดยมีตัวบ่งชี้ทางชีวภาพคือ เบสที่อยู่ในปัสสาวะและ deoxyribose fragment และเมื่อ OH· เข้าทำปฏิกริยากับคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของ sugar-phosphate backbone จะทำให้เกิดปฏิกริยาออกซิเดชันของน้ำตาล

ส่งผลให้เกิดการแตกสลายของสายดีเอ็นเอทั้ง single strand และ complimentary strand ซึ่งอาจทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) หรือเซลล์ตาย (Friedberg et al., 1995)



ภาพที่ 3 ขั้นตอนการเกิด 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) และ 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FapyGua) (Cadet et al., 1995)

3. ไพรอติน

ไพรอตินเป็นเป้าหมายที่ ROS สามารถทำปฏิกิริยาได้ โดยอนุมูลสำคัญที่เกี่ยวข้อง คือ hydroxyl radical (OH^\cdot), alkoxy radical (RO^\cdot) และ nitrogen-reactive radicals ส่วน hydrogen peroxide (H_2O_2) และ superoxide ion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) โดยปกติจะมีผลน้อยมากต่อไพรอติน ผลที่ตามมาหลังจาก ROS ทำปฏิกิริยากับไพรอติน ได้แก่ เกิดปฏิกิริยา peroxidation กรดอะมิโนเสียหาย โครงสร้างเปลี่ยนไป และเกิดการแตกสลายของไพรอติน ซึ่งทำให้ไพรอตินสูญเสียการทำงาน เช่น การสร้างพลังงานผิดปกติ การสูญเสียการทำงานของเอนไซม์ โดยปฏิกิริยาออกซิเดชันของไพรอตินที่เกิดขึ้นทำให้เกิดสาร aldehydes, keto compounds และ carbonyls สำหรับตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) เมื่อไพรอตินถูกทำลายจาก ROS คือ 3-nitrotyrosine ซึ่งเกิดจาก ONOO^\cdot และ nitrogen reactive radicals ทำปฏิกิริยากับ tyrosine และเมื่อ OH^\cdot ทำปฏิกิริยากับไพรอตินจะทำให้เกิดสารต่างๆ เช่น hydroxyproline, glutamyl และ semialdehyde เป็นต้น (Davis, 1987; Grune et al., 1997; Halliwell and Gutteridge, 1999; Levine and Stadtman, 2001)

2.3 บทบาทของ Reactive oxygen species (ROS) ต่อโรคตับ

จากการศึกษาพบว่า reactive oxygen species (ROS) และ reactive nitrogen species (RNS) มีบทบาทสำคัญในการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคและพัฒนาการของโรคตับหลายชนิด เช่น hepatocellular carcinoma, viral hepatitis, alcoholic hepatitis และ non-alcoholic steatosis (Loguercio and Federico, 2003; Nagata et al., 2007; Morisco et al., 2008) โดยทั่วไปโรคตับจะมีการสร้าง ROS มากขึ้น ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากความผิดปกติของกระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรีย (mitochondrial respiratory chain, MRC) การกระตุ้นเอนไซม์ CYP2E1, kupffer cell และ neutrophils (Jaeschke et al., 2002) ปริมาณของโลหะทรานสิชันที่เปลี่ยนแปลง ปริมาณของสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ที่ลดลง หรือการเปลี่ยนแปลง xanthine dehydrogenase ไปเป็น xanthine oxidase (Defeng et al., 2003) โดย ROS ที่เกิดขึ้นจะเข้าจับและทำลายสารชีวโมเลกุลต่างๆ ได้แก่ ไขมัน ไพรอติน ดีเอ็นเอ โดยปฏิกิริยา lipid peroxidation ของ phospholipids จะทำให้เกิดผลผลิต เช่น สารกลุ่มอัลดีไฮด์ (trans-4-hydroxy-2-nonenal (HNE) และ malondialdehyde (MDA)) สารดังกล่าวรวมทั้ง ROS จะเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress และทำให้เซลล์ตาย โดยมี ATP, NADPH และ glutathione ลดลง รวมทั้งทำให้ ดีเอ็นเอและไพรอตินเสียหาย และมีผลไปกระตุ้นกระบวนการอักเสบโดยการสร้างไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้อง เช่น tumor necrosis factor alpha ($\text{TNF-}\alpha$) และ interleukin (IL-8) (Browning and Horton, 2004) นอกจากนี้ยังมีผลไปกระตุ้น hepatic stellate cell (HSC) ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ

การเก็บสะสมวิตามินเอ และการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ (cell proliferation) ส่งผลให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และมี extracellular matrix มากขึ้น ปัจจุบันเชื่อว่า HSC เป็นปัจจัยหลักที่ทำให้เกิด liver fibrosis (Friedman, 2008; Novo and Parola, 2008; Maried, 2009) นอกจากนี้ ROS ที่เกิดขึ้นยังมีส่วนทำให้เกิดการสะสมไขมันที่ตับ (fatty liver) อีกด้วย (Reddy and Rao, 2006)

สาเหตุของโรคตับในมนุษย์และสัตว์

สาเหตุการเกิดโรคตับในมนุษย์ก็มีหลายสาเหตุได้เช่นกัน เช่น การอักเสบของเซลล์ตับ ทางเดินน้ำดีอุดตัน การสะสมของโคเลสเตอรอลหรือไตรกลีเซอไรด์ ระบบไหลเวียนโลหิตผิดปกติ และเกิดจากยาหรือสารเคมี โรคตับที่พบบ่อยได้แก่ โรคตับที่เกิดจากแอลกอฮอล์ ไวรัสตับอักเสบบี โรคตับที่เกิดจากยา โรคตับที่เกิดจากการสะสมของไตรกลีเซอไรด์ (non-alcoholic fatty liver disease) โรคตับที่มีการสะสมเหล็กเป็นจำนวนมาก (hemochromatosis) มะเร็งตับ และโรคตับที่เกิดจากอุดตันของทางเดินน้ำดี (Muriel, 2009)

โรคตับในสัตว์เกิดได้จากหลายสาเหตุ ยกตัวอย่าง เช่น โรคตับอักเสบเรื้อรัง (chronic active hepatitis; CAH, chronic canine inflammatory hepatic disease) เป็นโรคที่มีการอักเสบของตับอย่างต่อเนื่องแบบเรื้อรัง และอาจมีพัฒนาการของโรคกลายเป็นโรคมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) ได้ (Eriksson et al., 1986) พบบ่อยในสุนัขตัวเมียที่มีอายุเฉลี่ย 6 ปี เกิดขึ้นได้หลายสายพันธุ์และพบมากในสายพันธุ์ Bedlington terrier, Doberman pinscher, Cocker spaniel, Labrador retriever, Skye terrier และ West Highland white terrier สาเหตุของโรคไม่ทราบแน่ชัด คาดว่าอาจเกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี Adenovirus 1, โรคเลปโตสไปโรซิส (Leptospirosis), ภาวะแพ้ภูมิคุ้มกันร่างกายของตัวเอง (autoimmune disease), โรคทางพันธุกรรมที่ทำให้การสะสมของธาตุทองแดงผิดปกติในเซลล์ตับ (copper storage disease) และ ความเป็นพิษจากยา (Watson, 2002)

3. กลไกต่อต้านภาวะ oxidative stress ของร่างกาย

ร่างกายมีกลไกต่อต้านภาวะ oxidative stress ได้แก่ กลไกในการซ่อมแซม เช่น กระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอ (Atamna et al., 2000; Dizdaroglu et al., 2002) กลไกในการป้องกันการเกิด ROS (Kohen, 1999; Kohen and Kati, 2000) เช่น การเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ xanthine oxidase และกลไกทางกายภาพ เช่น วิตามินอี (tocopherol) ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แข็งแรงมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีกลไกของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant defense) ได้แก่ กลุ่มเอนไซม์ที่ช่วยลดปริมาณ ROS ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase และสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ได้แก่ uric acid, glutathione,

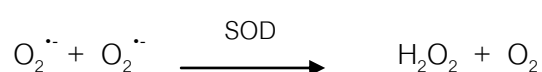
tocopherol, carotenes, ascorbic acid และสารประกอบฟลาโวนอยด์ (flavonoid compounds) (Kohen and Nyska, 2002)

ตัวอย่างสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ที่สำคัญ ได้แก่

1. กลุ่มเอนไซม์ที่ช่วยลดปริมาณ ROS

1.1 Superoxide dismutase (SOD)

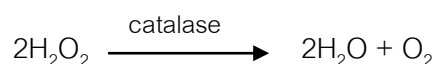
Superoxide dismutase (SOD) เป็นเอนไซม์ที่สามารถดักจับ superoxide ion ($O_2^{\cdot-}$) ได้โดยอาศัยปฏิกิริยา dismutation reaction ดังสมการ



เอนไซม์ชนิดนี้มี 3 isoform ได้แก่ copper/zinc SOD (Cu/Zn-SOD), manganese SOD (Mn-SOD) และ extracellular SOD (EC-SOD) (Fridovich, 1995) เอนไซม์ Cu/Zn-SOD จะประกอบด้วย copper และ zinc prosthetic group พบในไซโตพลาสซึม เอนไซม์ Mn-SOD จะประกอบด้วย manganese prosthetic group พบในไมโทคอนเดรีย (Halliwell and Gutteridge, 1999) ส่วนเอนไซม์ EC-SOD จะประกอบด้วย copper และ zinc prosthetic group โดยจะไปจับกับ plasma membrane และ heparin-containing elements ของ extracellular matrix (Karlsson and Marklund, 1989)

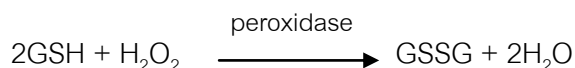
1.2 Catalase

Catalase เป็นเอนไซม์ที่พบมากใน peroxisomes ซึ่งเป็นแหล่งที่มี hydrogen peroxide (H_2O_2) เป็นจำนวนมาก นอกจากนั้นยังพบในไมโทคอนเดรียและไซโตพลาสซึม เอนไซม์นี้สามารถกำจัด H_2O_2 ได้เมื่อมีปริมาณของเอนไซม์มาก ดังสมการ



1.3 Glutathione peroxidase (GPX)

Glutathione peroxidase (GPX) เป็นเอนไซม์ที่สามารถกำจัด hydrogen peroxide (H_2O_2) ได้ถึงแม้มีปริมาณของเอนไซม์น้อย (Chance and Boveris, 1979; Halliwell and Gutteridge, 1999) อย่างไรก็ตามในการกำจัด H_2O_2 1 โมเลกุล ต้องใช้ glutathione (GSH) ถึง 2 โมเลกุล ดังสมการ

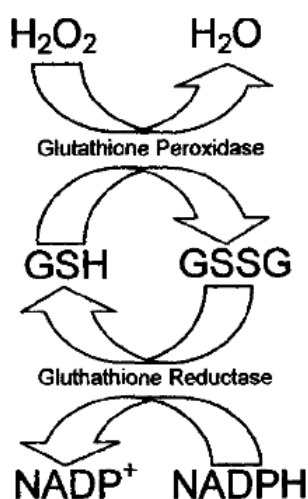


2. สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low-molecular-weight antioxidant, SMWA)

สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจัดเป็นสารต้านออกซิเดชันที่มีความสำคัญ เนื่องจากมีโมเลกุลเล็ก สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปใกล้กับเป้าหมายในการทำลายของ ROS ได้ และสามารถป้องกันความเสียหายจาก ROS ได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม (Kohen, 1999; Kohen and Gati, 2000) การป้องกันทางตรง ได้แก่ การให้อิเล็กตรอนแก่ ROS โดยตรง และการป้องกันทางอ้อม เช่น จับกับโลหะทรานสิชันที่เป็นตัวเร่งในปฏิกิริยา Haber-Weiss reaction (Haber and Weiss, 1934; Samuni et al., 1983)

2.1 Glutathione

Glutathione เป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ประกอบด้วย tripeptide ที่มีกลุ่ม thiol เป็นองค์ประกอบ มี 2 รูปแบบ คือ glutamic acid-cysteine-glycine (GSH; reduced form) และ glutathione disulfide (GSSG; oxidized form) ในสิ่งมีชีวิตโดยทั่วไปจะมี glutathione ที่อยู่ในรูปของ reduced form มากกว่า 90% และมี oxidized form น้อยกว่า 10% ทั้งนี้ glutathione จัดเป็น cofactor ของเอนไซม์ glutathione peroxidase ในการกำจัด hydrogen peroxide (H_2O_2) โดยทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน และได้ GSSG ทั้งนี้ GSSG สามารถกลับไปเป็น GSH ได้โดยอาศัยเอนไซม์ glutathione reductase และ NADPH ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 Glutathione redox cycle (Miller, 2008)

นอกจากนี้ glutathione ยังสามารถเข้าจับกับโลหะทรานสิชันที่เป็นตัวเร่งในปฏิกิริยา Haber-Weiss reaction และสามารถทำปฏิกิริยากับ ROS อื่นๆ ได้แก่ hydroxyl radical (OH^{\cdot}), peroxy radical (ROO^{\cdot}), alkoxy radical (RO^{\cdot}), hypochlorous acid (HClO) และ singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) (Gul et al., 2000; Halliwell and Gutteridge, 1999)

2.2 Uric acid

Uric acid เป็น waste product ของเซลล์ที่ได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ hypoxanthine และ xanthine โดยอาศัยเอนไซม์ xanthine oxidase และ dehydrogenase มนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นๆขาดเอนไซม์ urate oxidase ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน uric acid ไปเป็น allantoin ดังนั้นจึงทำให้มีการสะสม urate ในกระแสเลือด หากมีปริมาณมากจะไปสะสมที่ข้อต่อทำให้เกิด gout ได้ แต่ในสภาพปกติ uric acid จะทำปฏิกิริยากับ hydroxyl radicals (OH^{\cdot}) ได้เป็น urate radical ที่เสถียรและสามารถเปลี่ยนกลับไปเป็น urate ได้ด้วย ascorbic acid นอกจากนี้ uric acid ยังสามารถทำปฏิกิริยากับ peroxy radical (ROO^{\cdot}), singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), ozone (O_3), nitric oxide radical (NO^{\cdot}) และ nitrogen oxygen radicals และสามารถเข้าจับกับโลหะทรานสิชันในปฏิกิริยา redox cycling (Ames et al., 1981; Becker, 1993)

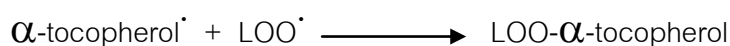
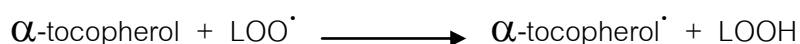
2.3 วิตามินซี (Ascorbic acid)

วิตามินซี (Ascorbic acid) เป็นวิตามินที่ละลายในน้ำ มีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันที่สามารถกำจัด superoxide radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (Nishikimi, 1975; Halliwell, 1990) และสามารถทำปฏิกิริยากับ ROS ชนิดอื่นๆ เช่น singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), hypochlorous acid (HClO) และ thiol radicals (RS^{\cdot}) (Anaber and Neta, 1967; Halliwell, 1990) นอกจากนี้วิตามินซียังสามารถทำงานเสริมฤทธิ์กับสารต้านออกซิเดชันชนิดอื่น เช่น α -tocopherol โดยเปลี่ยน α -tocopherol radical (α -tocopherol $^{\cdot}$) ให้กลับไปเป็น α -tocopherol ในรูปของ reduced form เมื่อวิตามินซีให้อิเล็กตรอนแก่ ROS แล้วจะกลายเป็น dehydroascorbic acid ซึ่งมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเล็กน้อย และสามารถกลับไปเป็น ascorbic acid ได้โดย GSH-dependent reductase (Sharma and Buettner, 1993) อย่างไรก็ตามการทำงานของ ascorbic acid ภายใต้ภาวะที่มีปริมาณของ ferric ion มาก จะทำให้เกิด hydroxyl radical (OH^{\cdot}) จากปฏิกิริยา Udenfriend reaction (Podmore et al., 1998; Halliwell and Gutteridge, 1999; Paolini et al., 1999)

2.4 วิตามินอี (Tocopherol)

วิตามินอี (Tocopherol) เป็นวิตามินที่ละลายในไขมัน มีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน มี 2 กลุ่มใหญ่ คือ tocopherols และ tocotrienols แต่ละกลุ่มสามารถแบ่งได้อีก 4

ชนิด ได้แก่ อัลฟา (α -) เบต้า (β -) แกมมา (γ -) และเดลต้า (δ -) โดย α -tocopherol จะมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงสุดในอนุพันธ์ของวิตามินอี หน้าที่สำคัญของวิตามินอี คือยับยั้งปฏิกิริยา lipid peroxidation ของ polyunsaturated fatty acid โดยวิตามินอีจะเข้าทำปฏิกิริยากับ LOO^\cdot ได้เป็น α -tocopherol $^\cdot$ ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูล peroxy (LOO^\cdot) ตัวอื่นทำให้ได้สารที่มีความเสถียร ($\text{LOO-}\alpha$ -tocopherol) (Burton et al., 1983; Burton and Ingold, 1986; Kagan et al., 1990; Bjorneboe et al., 1990) ดังสมการ



นอกจากนี้วิตามินอีสามารถดักจับ ROS ชนิดต่างๆ เช่น singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), hydroxyl radical (OH^\cdot), superoxide radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peroxy radical (ROO^\cdot) และ alkoxy radical (RO^\cdot) (Burton et al., 1986)

2.5 สารประกอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoid compounds)

สารประกอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoid compounds) หมายถึง สารที่ประกอบด้วยสารประกอบฟีนอล 2 ชนิดขึ้นไป หรือ สารที่ประกอบด้วย aromatic ring ตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป สามารถพบได้ในผลไม้ ผัก ธัญพืช เปลือกไม้ ราก ดอกไม้ ชา และไวน์ คุณสมบัติสำคัญ คือ ต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติต้านการอักเสบ ต้านภูมิแพ้ ต้านไวรัส และต้านมะเร็ง (Middleton, 1998) สารประกอบฟลาโวนอยด์แบ่งเป็น 4 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ flavones, flavanones, catechins และ anthocyanins โดยกลุ่ม flavones จะมีพันธะคู่บริเวณตรงกลางของ aromatic ring ตัวอย่าง เช่น quercetin ซึ่งมักพบในหัวหอม แอปเปิ้ล บร็อคโคลี่ และเบอรรี่ กลุ่ม flavanones จะพบในผลไม้ตระกูลส้ม (citrus) ตัวอย่าง เช่น narigin กลุ่ม catechins จะพบในชาเขียว ชาดำ และไวน์แดง ส่วนกลุ่ม anthocyanins จะพบในสตรอเบอรรี่ และเบอรรี่ชนิดอื่นๆ องุ่น ไวน์ และชา ดังตารางที่ 2 โดยแต่ละกลุ่มมีโครงสร้างโมเลกุลแตกต่างกัน ดังภาพที่ 5

ปัจจุบันเริ่มมีการนำสารประกอบฟลาโวนอยด์มาใช้เป็นสารต้านออกซิเดชันมากขึ้นเพื่อลดภาวะ oxidative stress โดยกลไกที่สำคัญของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่

1. ทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรง เนื่องจากสารประกอบฟลาโวนอยด์มีกลุ่ม hydroxyl group (-OH) เป็นองค์ประกอบ จึงทำหน้าที่ให้อนุมูลไฮโดรเจน (H^\cdot) หรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระได้โดยตรง ทำให้อนุมูลนั้นมีความเสถียรมากขึ้น ดังสมการ



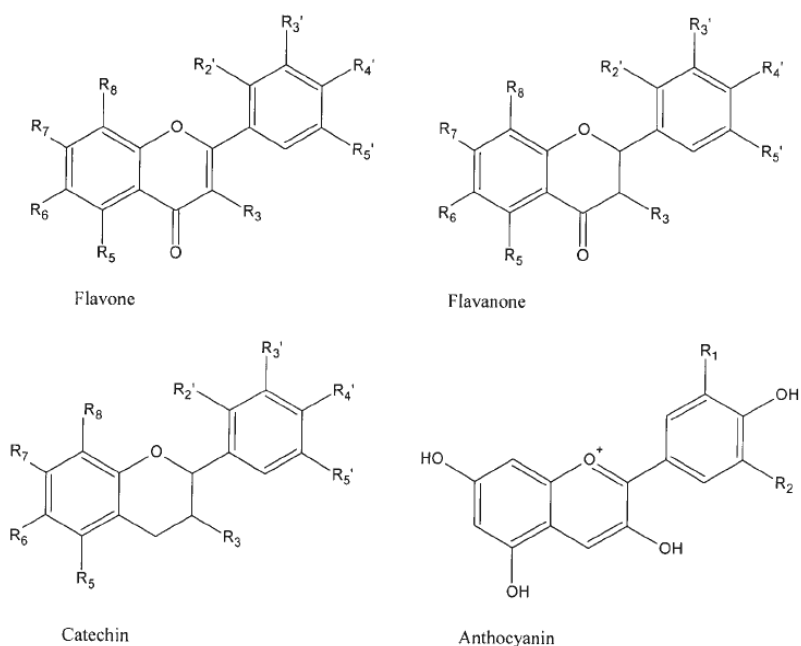
ROS ที่สารประกอบฟลาโวนอยด์สามารถดักจับได้แก่ superoxides (O_2^\cdot) และ peroxynitrite (ONOOH) ตัวอย่างเช่น epicatechin และ rutin (Hanasaki et al., 1994)

2. รบกวนการทำงานของเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase ซึ่งทำหน้าที่สร้าง nitric oxide ตัวอย่าง เช่น quercetin (Shoskes, 1998) หรือทำปฏิกิริยาโดยตรงกับ nitric oxide และ peroxynitrite ที่ทำให้เกิด lipid peroxidation (Shutenko et al., 1999) ตัวอย่าง เช่น silybin (Dehmlow et al., 1996)

3. ยับยั้งเอนไซม์ xanthine oxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิด superoxide radical (O_2^\cdot) ตัวอย่าง เช่น quercetin, silybin (Lio et al., 1986; Chang et al., 1993; Shoskes, 1998) และ luteolin (3,4,5,7-tetrahydroxyflavone) (Cos et al., 1998)

4. ลดการสะสมของเม็ดเลือดขาวบริเวณผนังหลอดเลือด (Friesenecker et al., 1994) และสารประกอบฟลาโวนอยด์บางชนิดสามารถยับยั้ง degranulation ของ neutrophils ได้ (Ferrandiz et al., 1996)

5. จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ตัวอย่าง เช่น quercetin (Sorata et al., 1984)



ภาพที่ 5 โครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบฟลาโวนอยด์แต่ละกลุ่ม (Nijveldt et al., 2001)

ตารางที่ 2 ประเภทและแหล่งของสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Nijveldt et al., 2001)

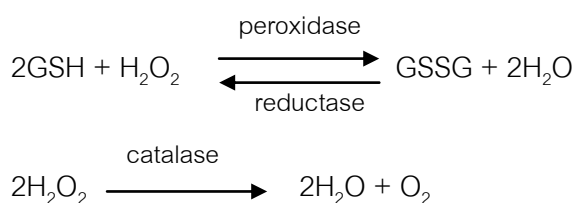
Group	Compound	Food sources
Flavones	Apigenin	Apple skins
	Chrysin	Berries
	Kaempferol	Broccoli
	Luteolin	Celery
	Myricetin	Fruit peels
	Rutin	Cranberries
	Sibelin	Grapes
	Quercetin	Lettuce Olives Onions Parsley
Flavanones	Fisetin	Citrus fruit
	Hesperetin	Citrus peel
	Narigin	
	Naringenin	
	Taxifolin	
Catechins	Catechin	Red wine
	Epicatechin	Tea
	Epigallocatechin gallate	
Anthocyanins	Cyanidin	Berries
	Delphinidin	Cherries
	Malvidin	Grapes
	Pelargonidin	Raspberries
	Peonidin	Red grapes
	Petunidin	Red wine
		Strawberries Tea Fruit peels with dark pigments

4. การใช้สารเคมีเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress ในการศึกษาผลของยาในเซลล์ HepG2

ปัจจุบันมีการนำ cell line มาใช้แทน primary cell culture มากขึ้นในการศึกษาผลของยาหรือสารในการปกป้องเซลล์ตับจากภาวะ oxidative stress เนื่องจากสะดวกในการเก็บรักษาและการให้ยา ยกตัวอย่าง เช่น HepG2 (hepatocellular carcinoma) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น continuous cell line ที่ยังไม่สูญเสียคุณสมบัติในการควบคุมการเจริญเติบโต มีลักษณะรูปร่างและคุณสมบัติทางชีวเคมีคล้ายกับเซลล์ตับปกติ โดยสามารถหลั่งสารต่างๆออกมาได้เหมือนกับเซลล์ตับทั่วไป เช่น albumin, transferrin, fibrinogen, alpha 2-macroglobulin และ plasminogen (Knowles and Aden, 1983) และมี antioxidant defense system เหมือนกับเซลล์ตับปกติ (Narayanan et al., 2001; Alia et al., 2006; Lima et al., 2006)

ในการศึกษาผลของยาที่ใช้ในการรักษาและป้องกันโรคตับเพื่อลดปริมาณอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นจำเป็นต้องมีการเหนี่ยวนำเซลล์ตับให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันด้วยสารชนิดต่างๆ เช่น hydrogen peroxide (H_2O_2), carbon tetrachloride (CCl_4), เอทานอล และ *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP) เป็นต้น

Hydrogen peroxide (H_2O_2) จัดเป็นสารเคมีที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาทั้งภายในและภายนอกร่างกาย ถึงแม้ H_2O_2 จัดเป็น ROS ในกลุ่มที่ไม่ใช่อนุมูล (nonradical oxygen derivatives) แต่มีความสามารถในการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ง่าย โดย H_2O_2 สามารถทำปฏิกิริยากับ superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$) โดยมี Fe^{2+} หรือ Cu^{2+} ช่วยเร่งปฏิกิริยาซึ่งทำให้เกิด hydroxyl radical (OH^{\cdot}) ร่างกายมีกลไกที่อาศัยการทำงานของเอนไซม์ในการปกป้องเซลล์ต่อ H_2O_2 คือ glutathione redox cycle และ catalase (Bai et al., 1999) โดยการเปลี่ยน H_2O_2 ให้เป็น H_2O ดังสมการ



ในภาวะที่ภายในเซลล์มีปริมาณ H_2O_2 เป็นจำนวนมากมีผลทำให้สารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการปกป้องเซลล์ ได้แก่ glutathione, ATP และ NADPH ลดลง และที่สำคัญก็คือ OH^{\cdot} ที่เกิดจาก H_2O_2 จะทำให้เกิดความเสียหายต่อชีวโมเลกุล ได้แก่ ดีเอ็นเอ เช่น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเบส หรือทำให้สายดีเอ็นเอแตก ทำให้เกิดปฏิกิริยา peroxidation ของไขมันและ

ส่งผลต่อโปรตีนในร่างกาย เช่น ทำให้เกิดการแตกสลาย หรือเกิดการเสียสภาพ (Halliwell et al., 2000) โดยที่ H_2O_2 ในปริมาณน้อยจะทำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis ในขณะที่ H_2O_2 ในปริมาณสูงจะทำให้เซลล์ตายแบบ necrosis (Lennon et al., 1991; Hampton and Orrenius, 1997)

Carbon tetrachloride (CCl_4) เป็นของเหลวไม่มีสีแต่มีกลิ่น ใช้เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ ในอดีตนิยมใช้เป็นสารดับเพลิงและเป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารทำความเย็นและสารทำความ สะอาด นอกจากนี้มีการนำมาใช้เพื่อศึกษาถึง กลไกต่อต้านออกซิเดชันจากภายในเซลล์ตัวเอง (autoregulation) และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรชนิดต่างๆ (Krithika et al, 2009; Zeashan et al., 2009) เนื่องจากมีฤทธิ์เป็นพิษต่อตับ โดยที่ CCl_4 จะเปลี่ยนเป็น CCl_3 โดย เอนไซม์ตับ (cytochrome P-450) ซึ่ง CCl_3 นั้นเป็นอนุมูลอิสระที่ทำให้เซลล์ตับได้รับความเสียหาย (Recknagel et al., 1977) นอกจากนี้ยังทำให้มีระดับของ glutathione ลดลงด้วย (Lee et al., 2003)

เอทานอล หรือ เอทิลแอลกอฮอล์ เป็นของเหลว ไม่มีสี มีกลิ่นฉุน ติดไฟง่าย เมื่อร่างกาย ได้รับแอลกอฮอล์จะถูกเมตาบอลิซึมโดยตับ เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องได้แก่ alcohol dehydrogenase, microsomal ethanol oxidation system (MEOS) และ catalase ซึ่งในแต่ละกระบวนการนั้นจะมีการสร้างอนุมูลอิสระ ในกรณีที่เซลล์ตับได้รับ แอลกอฮอล์ปริมาณมาก จะไปกระตุ้นการทำงานของ cytochrome P450 (2E1, 1A2 และ 3A4 isoforms) ซึ่งทำให้เกิดอนุมูลอิสระเป็นจำนวนมาก ส่งผลให้เซลล์ตับเสียหาย เช่น เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation มีการหลั่ง LDH และมีปริมาณของ เอนไซม์ alanine transaminase (ALT) และ aspartate transaminase (AST) สูงขึ้น (Subir and Vasudevana, 2007; Reddy et al., 2008)

tert-butyl hydroperoxide (*t*-BHP) เป็นสาร organic peroxide มีลักษณะเป็นของเหลว ไร้สี เป็นสารอันตราย เมื่อร่างกายได้รับ *t*-BHP จะถูกเมตาบอลิซึมโดยตับ ซึ่งทำให้เกิดอนุมูล อิสระที่ทำให้เซลล์ตับเกิดความเสียหาย เช่น เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation มีการหลั่ง LDH และดีเอ็นเอเสียหาย (Rush et al., 1985; Tseng et al., 1997)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. ใบว่านพญาวานร ซึ่งได้จากสวนว่านพญาวานร จ.ปทุมธานี
2. เซลล์ทดสอบ : HepG2 (Human hepatocellular liver carcinoma cell line) (ATCC, U.S.A.)
ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.สุวรา วัฒนพิทยกุล
3. สารเคมี
 - Aluminium chloride (AlCl_3) (Merck, Germany)
 - Ammonium molybdate (M & B, England)
 - Ascorbic acid (Carlo Erba, Italy)
 - Bovine serum albumin (BSA) (Fisher, U.S.A.)
 - Bradford reagent (Sigma, U.S.A.)
 - Butylated hydroxytoluene (BHT) (Sigma, U.S.A.)
 - Catechin (Sigma, U.S.A.)
 - 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Sigma, U.S.A.)
 - Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, U.S.A.)
 - 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals (DPPH) (Sigma, U.S.A.)
 - 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (Sigma, U.S.A.)
 - Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, U.S.A.)
 - Ethanol
 - Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Sigma, U.S.A.)
 - Ferric chloride (FeCl_3) (Fluka, Switzerland)
 - Ferric sulfate (FeSO_4) (M & B, England)
 - Fetal bovine serum (FBS) (Gibco, U.S.A.)
 - Folin-Ciocalteu reagent (Fluka, Switzerland)
 - Gallic acid (Fluka, Switzerland)
 - Glutathione reductase (Sigma, U.S.A.)
 - Hydrochloric acid (Merck, Germany)

- Hydrogen peroxide (H_2O_2) (Merck, Germany)
- MTT reagent (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Bio basic, U.S.A.)
- NADH (Calbiochem, Germany)
- NADPH (Calbiochem, Germany)
- Penicillin-streptomycin (Gibco, U.S.A.)
- Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) (Merck, Germany)
- Potassium iodide (KI) (Carlo Erba, Italy)
- Pyruvic acid (Sigma, U.S.A.)
- Reduced glutathione (Sigma, U.S.A.)
- Sodium bicarbonate (Merck, Germany)
- Sodium carbonate (Na_2CO_3) (Carlo Erba, Italy)
- Sodium hydroxide (NaOH) (Merck, Germany)
- Sodium nitrite ($NaNO_2$) (Sigma, U.S.A.)
- Sodium phosphate (Na_2HPO_4) (NaH_2PO_4) (Merck, Germany)
- Sodium thiosulfate ($Na_2S_2O_3$) (Merck, Germany)
- Sulfuric acid (H_2SO_4) (Carlo Erba, Italy)
- Thiobarbituric acid (TBA) (Sigma, U.S.A.)
- Trichloroacetic acid (TCA) (Merck, Germany)
- Tripyridyltriazine (TPTZ) (Sigma, U.S.A.)
- Trypan blue (Sigma, U.S.A.)
- Trypsin (Gibco, U.S.A.)

4. อุปกรณ์

- Analytical balance (Sartorius, Germany)
- Carbon dioxide incubator (Jouan IGO150CELLlife)
- Cell culture dish diameter 60 mm (Nunc, Denmark)
- Cell culture flask 25 cm^2 , 75 cm^2 (Nunc, Denmark)
- Centrifuge (Hettich zentrifugen universal 16R, Netherlands)
- Conical tubes 15 mL, 50 mL (Corning, Mexico)
- Cryotube (Nunc, Denmark)

- Fluorospectrophotometer (Perkin Elmer LS50B, U.S.A.)
- Inverted microscope (Olympus IX70 Culture microscope, U.S.A.)
- Laminar air flow hood (Heal Force HFsafe-1200 safety cabinet)
- Lyophilizer (Labconco, U.S.A.)
- Microliter pipette (1-100 μ l), (100-1000 μ l) (Biopette, Germany)
- Microplate reader (GDV model DV990BV6)
- PH meter (Hanna PH211, Italy)
- Rotary evaporator (Buchi rotavapor RE 120, Switzerland)
- Spectrophotometer (Shimadzu model UV-160A, Japan)
- Syringe membrane filter (Corning, Mexico)
- Ultrasonic Cell Disruptor (Sonics & Materials Vibra cell, U.S.A.)
- Vortex mixer (Vortex – Genie2, U.S.A.)
- 6-well plates (Corning, Mexico)
- 96-well plates (Corning, Mexico)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสกัดว่านพญาพานร

นำใบของว่านพญาพานร ที่มีอายุ 2 ปีขึ้นไป มาผสมกับ 95% เอทานอล บั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง homogenizer หมักทิ้งไว้ 7 วัน จากนั้นระเหยให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator และทำให้แห้งจนเป็นผงด้วยเครื่อง lyophilizer ละลายสารสกัดด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ

2. การตรวจสอบองค์ประกอบของสารสกัด

2.1 การหาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอล (Total phenolic compounds)

วิธีนี้เป็นการวัดปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลที่มีอยู่ในสารสกัด โดยอาศัยหลักการคือสารประกอบฟีนอลจะทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent (phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents) ทำให้ได้สารประกอบ tungsten & molybdenum blue ที่มีสีน้ำเงิน (Singleton and Rossi, 1965)

วิธีการทดลองครั้งนี้ดัดแปลงจากวิธีของ Slinkard และ Singleton (1977) ดังนี้

2.1.1 เติมสารสกัดความเข้มข้น 1 mg/ml 20 μ L และน้ำกลั่น 1.58 mL ในหลอดทดลอง

2.1.2 เติม Folin-Ciocalteu reagent 100 μL เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 4 นาที

2.1.3 เติมสารละลาย sodium carbonate (Na_2CO_3) (200 mg/mL) 300 μL เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่ 40°C 30 นาที

2.1.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer

2.1.5 คำนวณโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid แสดงค่าเป็น gallic acid equivalent (mg gallic acid/g ของน้ำหนักรสสกัด)

2.2 การหาปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Total flavonoid compounds)

วิธีนี้เป็นการวัดปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่มีอยู่ในสารสกัด โดยอาศัยหลักการ คือ สารประกอบฟลาโวนอยด์ประเภท flavones และ flavonols จะทำปฏิกิริยากับ aluminium chloride (AlCl_3) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีส้มแดง (Mabry et al., 1970)

วิธีการทดลองครั้งนี้ดัดแปลงจากวิธีของ Zhishen และคณะ (1999) ดังนี้

2.2.1 เติมสารสกัดความเข้มข้น 1 mg/ml 0.25 mL และน้ำกลั่น 1 mL ในหลอดทดลอง

2.2.2 เติมสารละลาย sodium nitrite (NaNO_2) (15%) 0.075 mL ทิ้งไว้ 6 นาที

2.2.3 เติมสารละลาย aluminium chloride (AlCl_3) (10%) 0.075 mL ทิ้งไว้ 6 นาที

2.2.4 เติมสารละลาย sodium hydroxide (NaOH) (4%) 1 mL ตามด้วยน้ำที่เพื่อให้มีปริมาตรสุดท้าย 2.5 mL เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 15 นาที

2.2.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer

2.2.6 คำนวณโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ catechin แสดงค่าเป็น catechin equivalent (mg catechin/g ของน้ำหนักรสสกัด)

3. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

3.1 การวิเคราะห์ความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระด้วยสาร DPPH (Scavenging effect on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals (DPPH))

วิธีนี้เป็นการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด โดยอาศัยหลักการ คือ สารทดสอบจะให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่สาร DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียรและมีสีม่วง ทำให้ได้สาร DPPH:H ซึ่งมีสีเหลือง (Blois et al., 1958)

วิธีการทดลอง ทำตามวิธีของ Blois (1958) ดังนี้

3.1.1 ผสมสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่างๆ 1 mL และสารละลาย DPPH (0.2 mM ในเอทานอล) 1 mL จากนั้นทิ้งไว้ในที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

3.1.2 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer

3.1.3 คำนวณความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ ตามสูตรดังนี้

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

หมายเหตุ A คือ ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance)

3.1.4 ทำ dose-response curve เพื่อหาค่าความเข้มข้นที่สามารถลดจำนวนของ DPPH ได้ 50% (IC₅₀) โดยมี ascorbic acid เป็นสารมาตรฐาน

3.2 การวิเคราะห์หาความสามารถในการรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ (Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay)

วิธีนี้เป็นการวัดความสามารถของสารสกัดในการรีดิวซ์ โดยอาศัยหลักการ คือ สารทดสอบจะให้อิเล็กตรอนแก่สารประกอบ ferric tripyridyltriazine (Fe(III)-TPTZ) ซึ่งเป็นสารไม่มีสี ทำให้ได้สารประกอบ ferrous tripyridyltriazine (Fe(II)-TPTZ) ที่มีสีม่วงน้ำเงิน (Benzie and Strain, 1996)

วิธีการทดลอง ทำตามวิธีของ Benzie และ Strains (1996) ดังนี้

3.2.1 ละลายสารสกัดในเอทานอลให้มีความเข้มข้นต่างๆ

3.2.2 ผสมสารสกัด 0.2 mL กับ FRAP reagent (ประกอบด้วยสารละลาย 10 mM tripyridyltriazine (TPTZ) ใน 40 mM HCL 2.5 mL, 20 mM FeCl₃ 2.5 mL และ 0.3 M acetate buffer 25 mL) 1.8 mL

3.2.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้ ascorbic acid เป็น positive control แสดงค่าเป็น EC_1 (Equivalent concentration 1)

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

วิธีนี้เป็นการวัดความสามารถของสารสกัดในการยับยั้ง H_2O_2 โดยอาศัยหลักการคือ H_2O_2 จะทำปฏิกิริยากับ potassium iodide (KI) โดยมี sulfuric acid (H_2SO_4) และ ammonium molybdate เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้ได้ iodine ซึ่งสามารถไตเตรทได้ด้วยสารละลายของ thiosulfate

วิธีการทดลอง ทำตามวิธีของ Zhao และคณะ (2006) ดังนี้

3.3.1 ผสม 0.1 mM hydrogen peroxide (H_2O_2) 1 mL และสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่างๆ 1 mL

3.3.2 เติม ammonium molybdate (3%) 100 μ L ตามด้วย 2 M sulfuric acid (H_2SO_4) 10 mL และ 1.8 M potassium iodide (KI) 7 mL

3.3.3 นำสารละลายที่ได้มาไตเตรทด้วย sodium thiosulfate ($Na_2S_2O_3$) จนกระทั่งสีเหลืองของสารละลายหายไป

3.3.4 คำนวณความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ ตามสูตรดังนี้

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

หมายเหตุ V_0 คือ ปริมาตรของ $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ในการไตเตรทของสารควบคุมที่ไม่มีสารสกัด และ V_1 คือ ปริมาตรของ $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ในการไตเตรทของสารสกัด

3.3.5 ทำ dose-response curve เพื่อหาค่าความเข้มข้นที่สามารถดักจับ H_2O_2 ได้ 50% (IC_{50}) โดยมี ascorbic acid เป็นสารมาตรฐาน

4. การศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ของสารสกัดใน HepG2 cells

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 μ g/mL) ที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ เปลี่ยน media ทุก 1-2 วัน และ subculture ที่ confluence 70-80% ทุก 4-5 วัน

วิธีการ subculture เซลล์

1. ดูด media เก่าออก
2. ล้างด้วย phosphate buffered saline (PBS) 5-10 mL เชียงให้ทั่วพื้นผิว flask แล้วดูดทิ้ง
3. เติม 0.25% trypsin-EDTA 5 mL จากนั้น incubate 10 นาที และตรวจสอบการหลุดของเซลล์อย่างสมบูรณ์ภายใต้กล้อง
4. เติม media 5 mL เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ trypsin จากนั้นดูดรวมกันใน conical tube ขนาด 50 mL และดูดสารละลายขึ้นลงเพื่อให้ได้เซลล์เดี่ยว
5. ดูดสารละลาย 20 μ L ผสมกับ trypan blue 20 μ L เพื่อนับจำนวนเซลล์โดยใช้ hemacytometer
6. ปั่นสารละลายที่เหลือด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 1000 rpm 25°C นาน 5 นาที
7. เท supernatant ทิ้ง
8. ดูด media ใส่ใน tube ที่มี cell ตกตะกอนอยู่ และดูดสารละลายขึ้นลงเพื่อให้ได้เซลล์เดี่ยว
9. ดูด cell suspension ใส่ใน flask หรือ dish ที่มี media อยู่เพื่อทำการเพาะเลี้ยงหรือทดลองต่อไป

4.1 การทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

MTT assay เป็นวิธีการวัดความอยู่รอดของเซลล์ และการทำงานของไมโทคอนเดรีย โดยเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่จะใช้เอนไซม์ succinate dehydrogenase ใน mitochondria เพื่อรีดิวซ์สาร MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) ซึ่งมีสีเหลืองให้กลายเป็นผลึก formazan ซึ่งมีสีม่วงน้ำเงิน (Hansen et al., 1989)

4.1.1 การศึกษาความเป็นพิษของ H₂O₂ ต่อเซลล์ HepG2 เพื่อหาความเข้มข้นของ H₂O₂ ที่ใช้ในการทดลอง

วิธีการทดลองครั้งนี้ดัดแปลงจากวิธีของ Yang และคณะ (1999) ดังนี้

4.1.1.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ HepG2 ที่มีจำนวน 1.5×10^4 เซลล์/หลุม ใน 96-well plate ภายใต้สภาวะมาตรฐาน (คาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 °C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม (กลุ่มเซลล์ที่มี media อย่างเดียว), กลุ่มทดลอง (กลุ่มเซลล์ที่ได้รับ H₂O₂ ที่ความเข้มข้นต่างๆ) และกลุ่ม blank (กลุ่มที่มี media อย่างเดียว) โดยในแต่ละการทดลอง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (triplication)

4.1.1.2 เติม H₂O₂ ความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 250, 500 และ 1000 μ M จากนั้น incubate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.1.1.3 ดูด media ที่จกนั้นเติมสารละลาย MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) ความเข้มข้น 0.25 mg/mL จากนั้น incubate 4 ชั่วโมง เพื่อให้เกิด formazan crystals

4.1.1.4 ดูด media ที่จกนั้นละลาย formazan crystals ที่เกิดขึ้นด้วย 100 μ L DMSO และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader

4.1.1.5 คำนวณหาค่าอัตราการรอดของเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (% control) ตามสมการ ดังนี้

$$\% \text{ Control} = \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}} \times 100$$

หมายเหตุ A คือ ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance)

4.1.1.6 เลือกความเข้มข้นของ H₂O₂ ที่เหมาะสมเพื่อทำการศึกษาต่อไป

4.1.2 การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ HepG2 เพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการทดลอง

4.1.2.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ HepG2 ที่มีจำนวน 1.5×10^4 เซลล์/หลุม ใน 96-well plate ภายใต้สภาวะมาตรฐาน (คาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 °C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม (กลุ่มเซลล์ที่ได้รับ 0.5%DMSO), กลุ่มทดลอง (กลุ่มเซลล์ที่ได้รับสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่างๆ) และกลุ่ม blank (กลุ่มที่มี media อย่างเดียว) โดยในแต่ละการทดลอง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (triplication)

4.1.2.2 เติมสารสกัดความเข้มข้น 0.5 , 1, 5, 10, 25, 50 µg/mL จากนั้น incubate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.1.2.3 ดูด media ที่จกนั้นเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 0.25 mg/mL จากนั้น incubate 4 ชั่วโมง เพื่อให้เกิด formazan crystals

4.1.2.4 ดูด media ที่จกนั้นละลาย formazan crystals ที่เกิดขึ้นด้วย 100 µL DMSO และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader คำนวณหาค่า % control ตามสมการ ดังนี้

$$\% \text{ Control} = \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}} \times 100$$

หมายเหตุ A คือ ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance)

4.1.2.6 เลือความเข้มข้นของสารสกัดจากความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เพื่อทำการศึกษาต่อไป

4.1.3 การศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ของสารสกัดเมื่อให้ร่วมกับ H₂O₂ ในเซลล์ HepG2

4.1.3.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ HepG2 ที่มีจำนวน 1.5×10^4 เซลล์/หลุม ใน 96-well plate ภายใต้สภาวะมาตรฐาน (คาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 °C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 8 กลุ่ม ได้แก่

กลุ่มที่ 1 (กลุ่มควบคุม) : กลุ่มเซลล์ที่ได้รับ 0.5% DMSO

กลุ่มที่ 2 (กลุ่มควบคุม) : กลุ่มเซลล์ที่ได้รับ 0.5% DMSO และ H₂O₂ (100 μ M)

กลุ่มที่ 3 (กลุ่มควบคุม) : กลุ่มเซลล์ที่ได้รับ H₂O₂ อย่างเดียว

กลุ่มที่ 4-8 (กลุ่มทดลอง) : กลุ่มเซลล์ที่ได้รับ H₂O₂ ร่วมกับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ 5 ความเข้มข้น

กลุ่มที่ 9 (กลุ่ม blank) : กลุ่มที่มี media อย่างเดียว

โดยในแต่ละการทดลอง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (triplication)

4.1.3.2 เติมสารสกัดความเข้มข้น 1, 5, 10, 25, 50 μ g/mL และ H₂O₂ (100 μ M) จากนั้น incubate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.1.3.3 ดูด media ที่ จากนั้นเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 0.25 mg/mL จากนั้น incubate เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อให้เกิด formazan crystals

4.1.3.4 ดูด media ที่ จากนั้นละลาย formazan crystals ที่เกิดขึ้นด้วย 100 μ l DMSO และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader

4.1.3.5 คำนวณหาค่า % control ตามสมการ ดังนี้

$$\% \text{ Control} = \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}} \times 100$$

หมายเหตุ A คือ ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance)

4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ reactive oxygen species (ROS) ในเซลล์

วิธีนี้เป็นวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณ reactive oxygen species (ROS) ในเซลล์ โดยใช้สาร 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) ที่สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และถูกย่อยโดยเอนไซม์ esterase ที่มีอยู่ในเซลล์ กลายเป็น 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH) ซึ่งเป็นสารไม่เรืองแสง และทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับ reactive oxygen species (ROS) ทำให้ได้สารเรืองแสง 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) ดังนั้น fluorescence intensity ที่ได้จะบ่งบอกถึงปริมาณ ROS ภายในเซลล์โดยตรง (Lebel, 1992)

วิธีการทดลองครั้งนี้ทำตามวิธีของ Wu และ Cederbaum (2008) ดังนี้

4.2.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ HepG2 ที่มีจำนวน 5×10^5 เซลล์/หลุม ใน 6-well plate ภายใต้สภาวะมาตรฐาน (คาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 °C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.2.2 เติมสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่างๆ และ H_2O_2 (100 μ M) จากนั้น incubate เป็นเวลา 24 ชม.

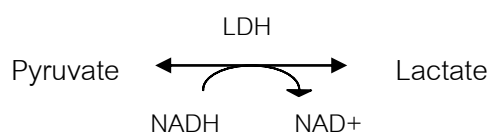
4.2.3 ก่อนครบเวลา incubate 30 นาที เติม 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในหลุม 2 μ g/mL จากนั้น incubate 30 นาที

4.2.4 ทำให้เซลล์หลุดด้วย 0.25% trypsin-EDTA และ resuspend เซลล์ ด้วย PBS 3 mL โดยหลีกเลี่ยงการถูกแสง

4.2.5 วัด fluorescence intensity ทันทีโดยใช้เครื่อง Perkin-Elmer 650-105 fluorescence spectrometer ที่ความยาวคลื่น 490 nm (excitation) และ 525 nm (emission) และแสดงค่าเป็น Intensity/mg protein

4.3 การวิเคราะห์หา LDH (Lactate dehydrogenase) leakage

วิธีนี้เป็นการวัดระดับ LDH (Lactate dehydrogenase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ พบมากในหัวใจ ตับ ไต กล้ามเนื้อลาย สมอง เซลล์เม็ดเลือด และปอด มักใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงความเสียหายของเนื้อเยื่อ โดยเมื่อเซลล์ตายจะปล่อย LDH ออกมา ทำให้มีระดับ LDH สูงขึ้นในกระแสเลือด โดย LDH ที่ปล่อยออกมาจะไปเปลี่ยน pyruvate ให้เป็น lactate พร้อมกับการเกิดปฏิกิริยา oxidation ของ NADH ที่ถูกรีดิวซ์ไปเป็น NAD (Welder and Acosta, 1994) ดังสมการ



วิธีการทดลองครั้งนี้ทำตามวิธีของ Wu และ Cederbaum (2008) ดังนี้

4.3.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ HepG2 ที่มีจำนวน 5×10^5 เซลล์/หลุม ใน 6-well plate ภายใต้สภาวะมาตรฐาน (คาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 °C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.3.2 เติมสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่างๆและ H_2O_2 (100 μM) จากนั้น incubate เป็นเวลา 24 ชม.

4.3.3 เมื่อครบเวลา incubate แยกส่วน medium และ cell ออกจากกัน

4.3.4 ทำให้เซลล์หลุดด้วย 0.25% trypsin-EDTA และ resuspend เซลล์ด้วย PBS 0.5 mL จากนั้นนำไป sonicate 5 วินาทีในถังน้ำแข็งด้วยเครื่อง sonicator (duty cycle 40 %)

4.3.5 ผสม medium หรือ cell lysate 50 μL ด้วยสารละลายทดสอบ LDH 950 μL (สารละลายทดสอบ LDH ประกอบด้วย A. 50 mM KH_2PO_4 , pH. 7.3, B. NADH, 4.1 mg/mL ในสารละลาย A, C. pyruvic acid, 2.1 mg/mL ในสารละลาย A; สารละลายทดสอบ LDH 100 mL: สารละลาย A 94 mL, สารละลาย B 3 mL, สารละลาย C 3 mL)

4.3.6 วัด LDH activity (Δ Absorbance per min) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 340 nm 35°C 1 นาที จากนั้นคำนวณหาค่า cytotoxicity index ตามสูตรดังนี้

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

4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณ Glutathione

วิธีนี้เป็นารวัดปริมาณของ glutathione โดยอาศัยหลักการ คือ hydrogen peroxide (H_2O_2) จะทำปฏิกิริยากับ glutathione (GSH; reduced form) โดยอาศัยเอนไซม์ glutathione peroxidase ได้ผลิตภัณฑ์ คือ glutathione disulfide (GSSG; oxidized form) ซึ่งสามารถกลับไปเป็น GSH ได้โดยอาศัยเอนไซม์ glutathione reductase และ NADPH (Tietze, 1969; Baker et al., 1990)

วิธีการทดลองครั้งนี้ทำตามวิธีของ Wu และ Cederbaum (2008) ดังนี้

4.4.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ HepG2 ที่มีจำนวน 5×10^5 เซลล์/หลุม ใน 6-well plate ภายใต้สภาวะมาตรฐาน (คาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 °C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.4.2 เติมสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่างๆและ H_2O_2 (100 μM) จากนั้น incubate เป็นเวลา 24 ชม.

4.4.3 เก็บและขูดเซลล์ใน PBS 0.5 mL และเติม TCA (10%) 0.5 mL จากนั้น vortex ให้เข้ากัน

4.4.4 นำสารละลายที่ได้มาปั่นที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm 5 นาที นำส่วน supernatant มาตรวจ

4.4.5 เติม buffer A 900 μL , buffer B 100 μL และ supernatant 50 μL ใน cuvette ขนาด 1 mL จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 412 nm 2 นาที แสดงค่าเป็น $\mu M/mg$ protein โดยเปรียบเทียบกับ standard curve (buffer A ประกอบด้วย 0.1 M sodium phosphate, pH 7.4, 5 μM EDTA, 0.6 mM 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 0.2 mM NADPH, pH 7.5 และ buffer B ประกอบด้วย 10 U/mL glutathione reductase ใน 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.5)

4.4.6 เตรียม standard curve ของ reduced glutathione (0-100 μM) ใน 5% TCA จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงตามขั้นตอน 4.4.5

4.5 การวิเคราะห์หา lipid peroxidation

วิธีนี้เป็นการวัดปฏิกิริยา lipid peroxidation โดยอาศัยหลักการคือ reactive oxygen species (ROS) จะเข้าจับและทำลายสารชีวโมเลกุลอย่างจับพลัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งโมเลกุลของไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acids, PUFA) ทำให้เกิดกระบวนการ lipid peroxidation ของ phospholipids และเกิดสารกลุ่มอัลดีไฮด์ เช่น malondialdehyde (MDA) โดย MDA จะทำปฏิกิริยากับ thiobarbituric acid (TBA) เกิดเป็นสารมีสีเรียกว่า thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) (Ohkawa et al., 1979)

วิธีการทดลองครั้งนี้ทำตามวิธีของ Wu และ Cederbaum (2008) ดังนี้

4.5.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ HepG2 ที่มีจำนวน 5×10^5 เซลล์/หลุม ใน 6-well plate ภายใต้สภาวะมาตรฐาน (คาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 °C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.5.2 เติมสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่างๆและ H_2O_2 (100 μ M) จากนั้น incubate เป็นเวลา 24 ชม.

4.5.3 ทำให้เซลล์หลุดด้วย 0.25% trypsin-EDTA และ resuspend เซลล์ ด้วย PBS (มี 0.1 mM butylated hydroxytoluene (BHT)) 1 mL จากนั้นนำไป sonicate 10 วินาทีในถังน้ำแข็งด้วยเครื่อง sonicator (duty cycle 40 %) จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดโปรตีน

4.5.4 ผสม lysate protein (0.5 mg) 0.5 mL ด้วยสารละลาย trichloroacetic acid-thiobarbituric acid-HCL ที่มี 0.1 mM BHT 0.5 mL จากนั้นทำให้ร้อนด้วย water bath ที่มีอุณหภูมิ 100°C นาน 1 ชั่วโมง (สารละลาย trichloroacetic acid-thiobarbituric acid-HCl ที่มี 0.1 mM BHT ประกอบด้วย 15% w/v trichloroacetic acid, 0.375 % w/v thiobarbituric acid, 0.25 N hydrochloric acid, 0.1 mM butylated hydroxytoluene)

4.5.5 นำสารละลายที่ได้มาปั่น ที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm 10 นาที นำส่วน supernatant มาตรวจค่าการดูดกลืนแสงของ 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)

*ในการทดลองข้อ 2-5 มีการแบ่งกลุ่มการทดลอง ดังนี้

กลุ่มที่ 1 (กลุ่มควบคุม) : กลุ่มเซลล์ที่ได้รับ 0.5% DMSO อย่างเดียว

กลุ่มที่ 2 (กลุ่มควบคุม) : กลุ่มเซลล์ที่ได้รับ 0.5% DMSO และ H_2O_2 (100 μM)

กลุ่มที่ 3-7 (กลุ่มทดลอง) : กลุ่มเซลล์ที่ได้รับ H_2O_2 (100 μM) ร่วมกับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ 5 ความเข้มข้น

โดยในแต่ละการทดลอง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (triplication)

5. การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติ

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

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองที่ 1 การตรวจสอบองค์ประกอบของสารสกัด

1.1 การสกัดว่านพญาวานร

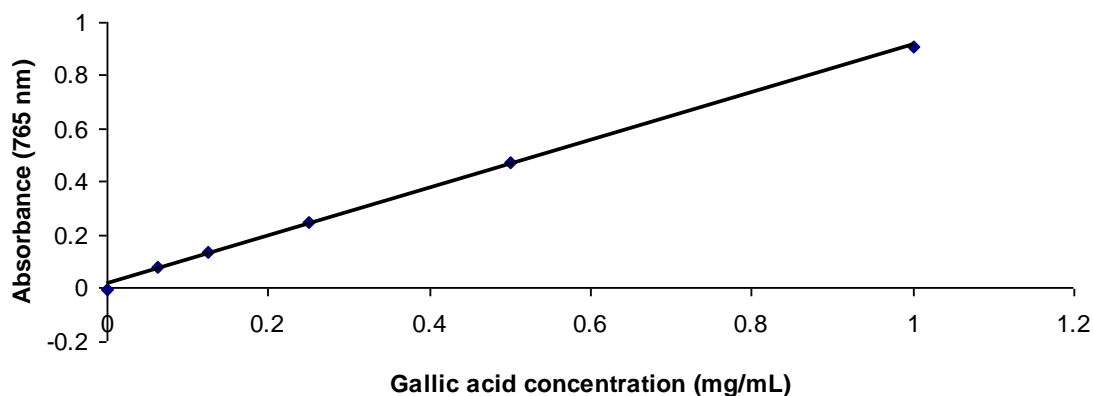
ในการสกัดใบของว่านพญาวานรด้วยเอทานอล จากนั้นระเหยให้แห้งและทำให้เป็นผง พบว่าได้ปริมาณของสารสกัด 123.49 g จากใบของว่านพญาวานรทั้งหมด 5 kg คิดเป็น % yield เท่ากับ 2.47 %

1.2 การหาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอล (Total phenolic compounds)

จากการหาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอล (Total phenolic compounds) โดยใช้ Folin-Ciocalteu reagent พบว่า สารสกัดจากใบว่านพญาวานรมีปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอล เท่ากับ 205.00 ± 12.02 mg gallic acid/g dried extract ดังตารางที่ 3 โดยใช้สมการ $y = 0.9x + 0.0175$ จากกราฟมาตรฐานของ gallic acid ($R^2 = 0.9991$) ดังภาพที่ 6

ตารางที่ 3 ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอล (Total phenolic compounds) ในสารสกัดจากว่านพญาวานร

ครั้งที่	ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอล (mg gallic acid/ g dried extract)
1	215.00
2	208.33
3	191.67
ค่าเฉลี่ย	205.00
S.D.	12.02



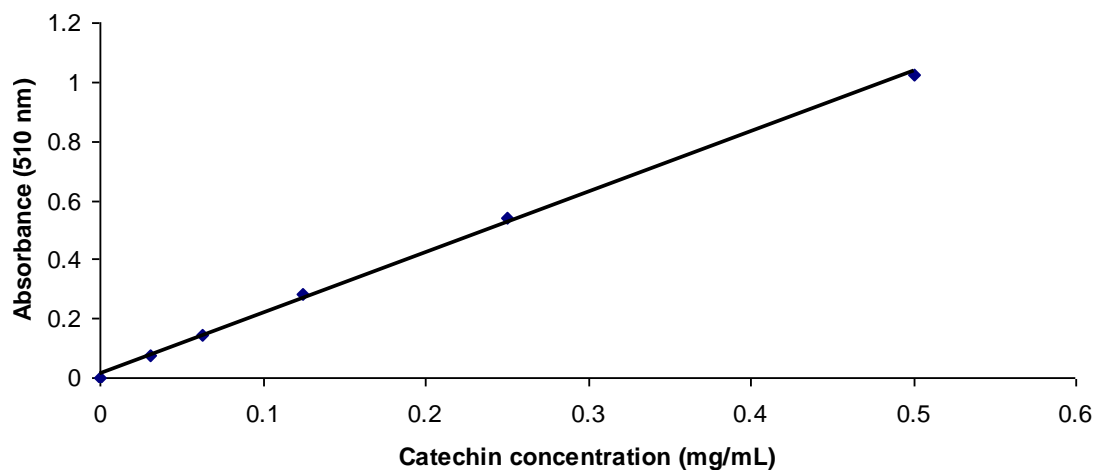
ภาพที่ 6 กราฟมาตรฐานของสาร gallic acid ในช่วงความเข้มข้น 0 - 1 mg/mL

1.3 การหาปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Total flavonoid compounds)

จากการตรวจหา ปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Total flavonoid compounds) โดยใช้วิธี aluminium chloride method พบว่า สารสกัดจากใบว่านพญาวานรมี ปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 117.09 ± 0.95 mg catechin/g dried extract ดังตารางที่ 4 โดยใช้สมการ $y = 2.0438x + 0.0147$ จากกราฟมาตรฐานของ catechin ($R^2 = 0.9989$) ดังภาพที่ 7

ตารางที่ 4 ปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Total flavonoid compounds) ในสารสกัดจากว่านพญาวานร

ครั้งที่	ปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ (mg catechin/ g dried extract)
1	117.09
2	117.09
3	116.11
ค่าเฉลี่ย	117.09
S.D.	0.95



ภาพที่ 7 กราฟมาตรฐานของสาร catechin ในช่วงความเข้มข้น 0 - 0.5 mg/mL

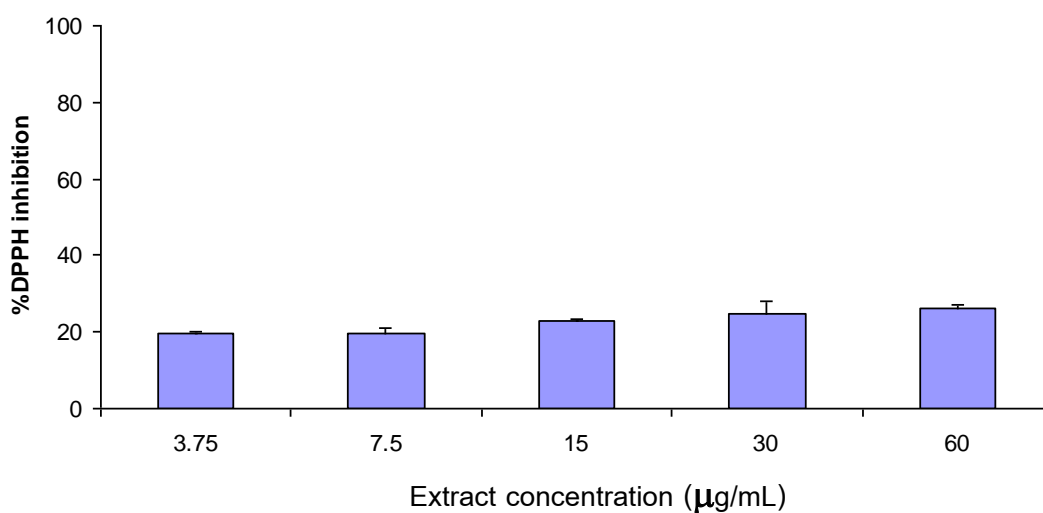
ตารางที่ 5 สรุปผลการตรวจสอบคุณสมบัติของสารสกัด

การทดลอง	ผล
% yield	2.47 %
Total phenolic compounds	205.00 ± 12.02 mg gallic acid/g dried extract
Total flavonoid compounds	117.09 ± 0.95 mg catechin/g dried extract

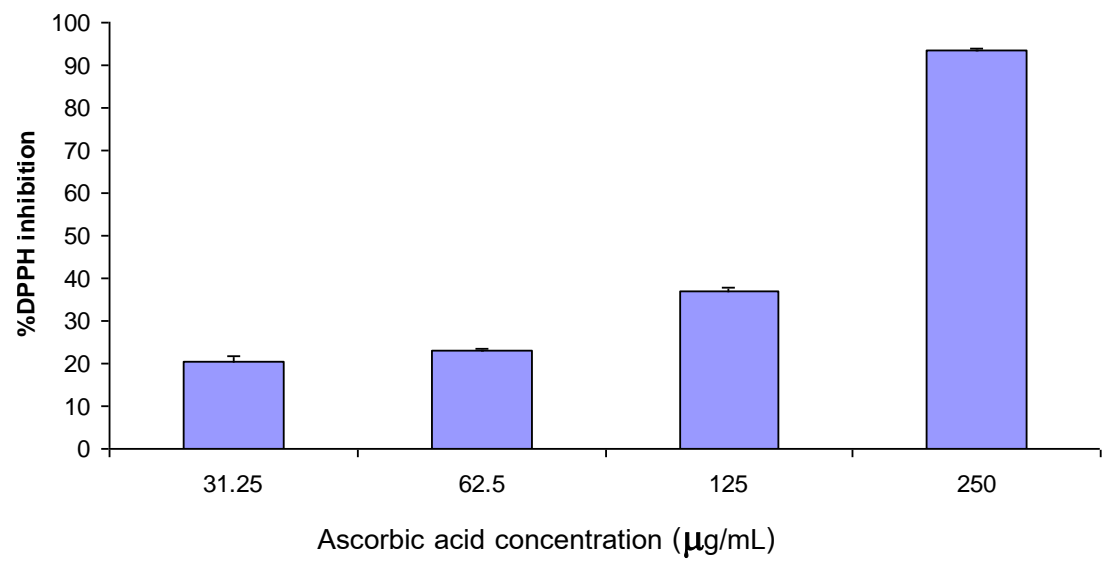
ผลการทดลองที่ 2 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

2.1 การวิเคราะห์ความสามารถ ในการดักจับอนุมูลอิสระด้วยสาร DPPH (Scavenging effect on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals (DPPH))

จากการทดสอบ ความสามารถของสารสกัดในการดักจับอนุมูลอิสระด้วยสาร DPPH พบว่า สารสกัดจากใบว่านพญาวานรที่ความเข้มข้น 3.75 – 60 $\mu\text{g/mL}$ สามารถยับยั้ง DPPH radical ได้ 19.58 – 25.94% โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งแปรไปตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้นได้น้อยมาก ดังภาพที่ 8 และจากการทดสอบความสามารถในการยับยั้ง DPPH radical ของสารมาตรฐาน ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 31.25 – 250 $\mu\text{g/mL}$ พบว่าสามารถยับยั้ง DPPH radical ได้ 20.27 – 93.60% ($\text{IC}_{50} = 163.70 \mu\text{g/mL}$) ดังภาพที่ 9



ภาพที่ 8 ความสามารถในการยับยั้ง DPPH radical ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 3.75– 60 $\mu\text{g/mL}$

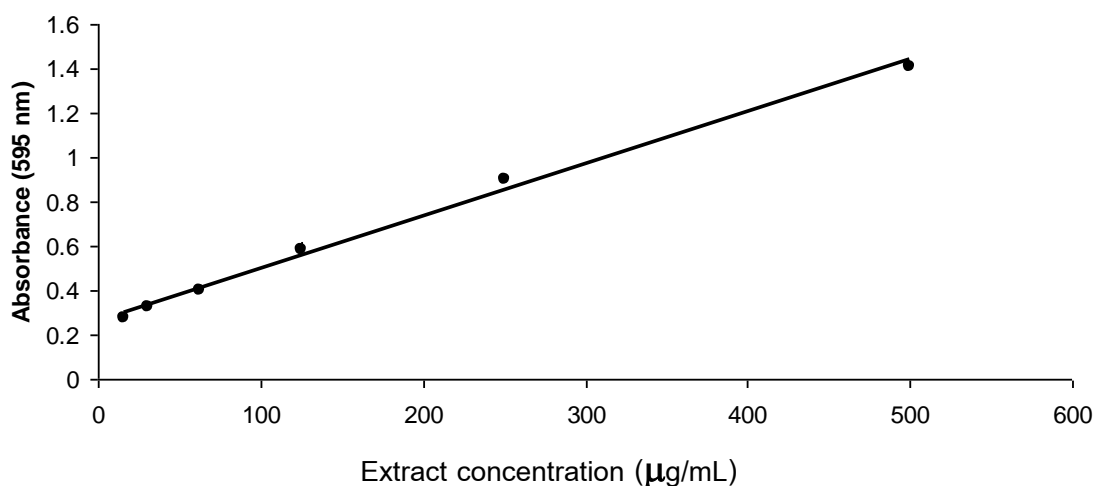


ภาพที่ 9 ความสามารถในการยับยั้ง DPPH radical ของ ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 31.25-250 µg/ml

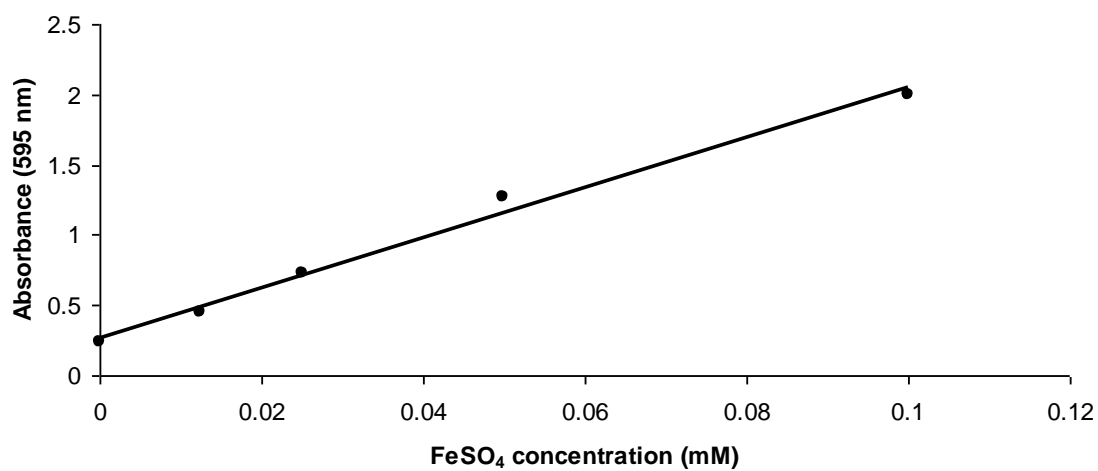
2. การวิเคราะห์หาความสามารถในการรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ (Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay)

จากการวิเคราะห์หาความสามารถ ของสารสกัด ในการรีดิวซ์ ferric tripyridyltriazine (Fe(III)-TPTZ) ให้เป็นสารประกอบ ferrous tripyridyltriazine (Fe(II)-TPTZ) พบว่า สารสกัดที่ความเข้มข้น 15.625 – 500 $\mu\text{g/mL}$ มีความสามารถในการรีดิวซ์แปรไปตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น และเมื่อคำนวณหาค่า EC_{10} (Equivalent Concentration 1) หรือ ค่าความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชันที่มีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe(III)-TPTZ ได้เท่ากับ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM พบว่า สารสกัดจากใบว่านพญาวานรมีค่า EC_{10} เท่ากับ 7.42 mg/mL จากสมการ $y = 0.0024x + 0.2639$ ($R^2 = 0.9951$) ดังภาพที่ 10 โดยเทียบจากสมการของ FeSO_4 $y = 17.807x + 0.2688$ ($R^2 = 0.9907$) ดังภาพที่ 11 และสารมาตรฐาน ascorbic acid มีค่า EC_{10} เท่ากับ 0.61 mg/mL จากสมการ $y = 5.1509x + 0.257$ ($R^2 = 0.999$) ดังภาพที่ 12

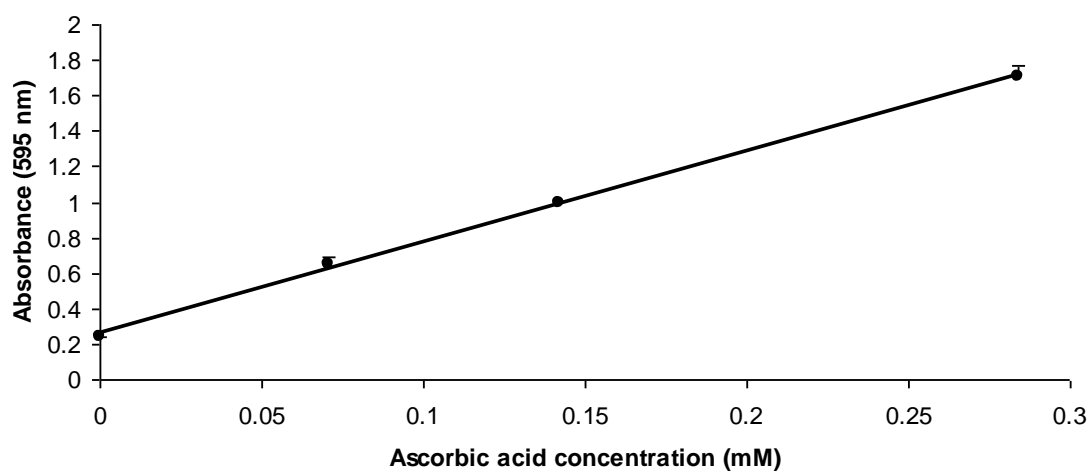
เมื่อเปรียบเทียบค่า EC_{10} ของสารสกัดและ ascorbic acid พบว่าสารสกัดมีค่า EC_{10} มากกว่า ascorbic acid 12.16 เท่า



ภาพที่ 10 ความสามารถในการรีดิวซ์ ferric tripyridyltriazine (Fe(III)-TPTZ) ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 15.625 – 500 $\mu\text{g/mL}$



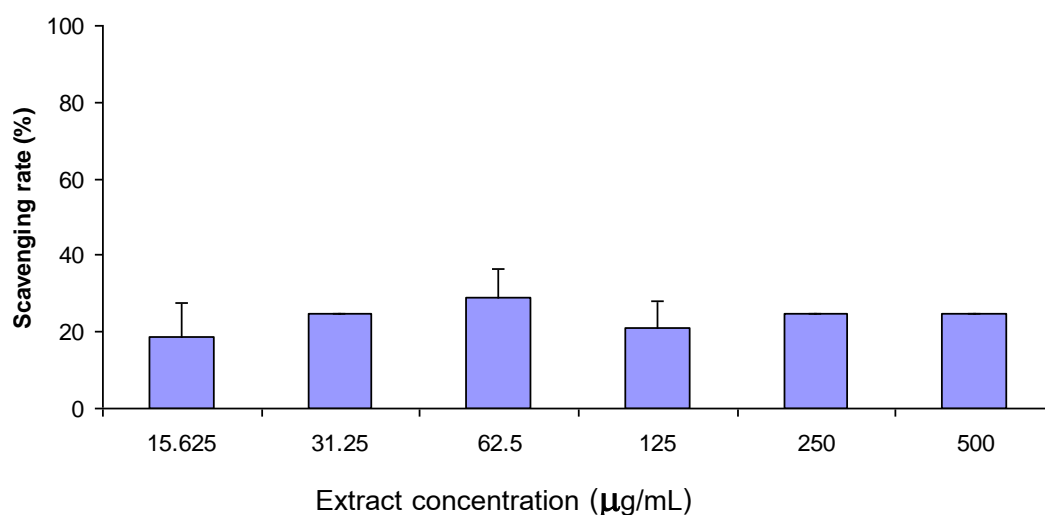
ภาพที่ 11 ความสามารถในการรีดิวซ์ ferric tripyridyltriazine (Fe(III)-TPTZ) ของ FeSO₄ ที่ความเข้มข้น (0 – 0.1 mM)



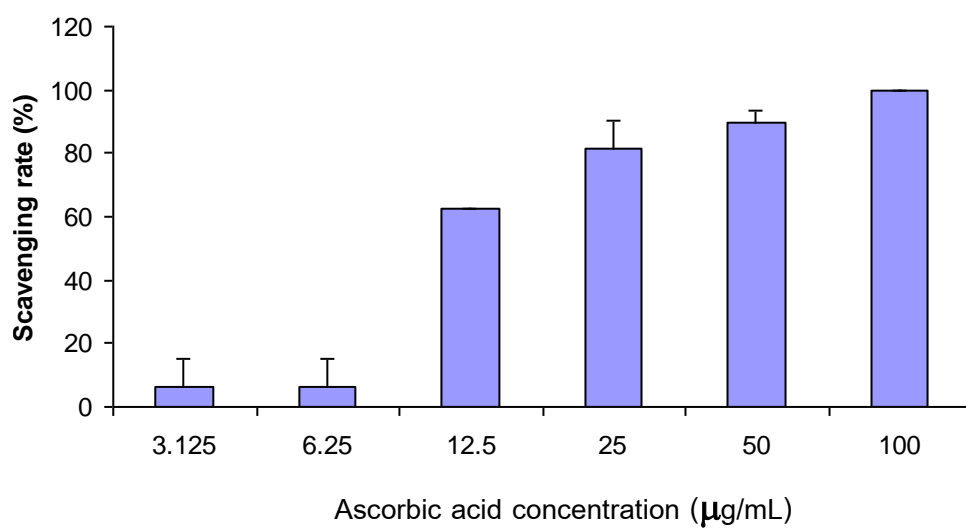
ภาพที่ 12 ความสามารถในการรีดิวซ์ ferric tripyridyltriazine (Fe(III)-TPTZ) ของ ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 0 – 0.2839 mM

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

จากการวิเคราะห์ความสามารถในการดักจับ H_2O_2 โดยนำสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ มาทำปฏิกิริยากับ potassium iodide (KI) โดยมี sulfuric acid (H_2SO_4) และ ammonium molybdate เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แล้วนำไปไตเตรทด้วยสารละลายของ thiosulfate พบว่า สารสกัดจากใบว่านพญาวานที่ความเข้มข้น 31.25 – 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ สามารถยับยั้ง H_2O_2 ได้ 20.83 – 29.17% โดยที่ความเข้มข้น 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ สามารถยับยั้ง H_2O_2 ได้สูงสุดคือ 29.17% ดังภาพที่ 13 และจากการทดสอบความสามารถในการยับยั้ง H_2O_2 ของสารมาตรฐาน ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 3.125 – 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ พบว่าสามารถยับยั้ง H_2O_2 ได้ 6.25 – 100% (IC_{50} เท่ากับ 13.72 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ดังภาพที่ 14



ภาพที่ 13 ความสามารถในการยับยั้ง H_2O_2 ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 15.625 – 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$



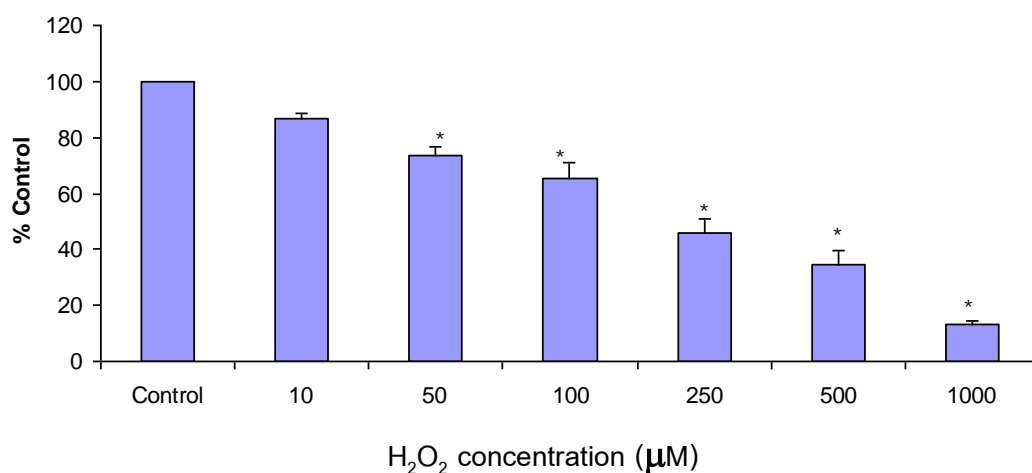
ภาพที่ 14 ความสามารถในการยับยั้ง H_2O_2 ของ ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 3.125 – 100 µg/mL

ผลการทดลองที่ 3 การศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ของสารสกัดใน HepG2 cells

3.1 การศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ของสารสกัดใน HepG2 cells โดยใช้วิธี MTT assay

3.1.1 การศึกษาความเป็นพิษของ H_2O_2 ต่อเซลล์ HepG2 โดยใช้วิธี MTT assay เพื่อหาความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่ใช้ในการทดลอง

จากการศึกษาความเป็นพิษของ H_2O_2 ต่อเซลล์ HepG2 โดยใช้วิธี MTT assay ซึ่งเป็นวิธีที่วัดจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่เท่านั้น พบว่าเมื่อให้ H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 10 – 1000 μM แก่เซลล์ HepG2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มี อัตราการรอดของเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (%control) ระหว่าง 13.42 – 86.8% โดย %control แปรผกผันกับความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่เพิ่มขึ้น และ H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 50 – 1000 μM มีค่าแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ดังภาพที่ 15 และที่ความเข้มข้น 100 μM มี %control เท่ากับ 65.1% ซึ่งจะใช้ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 15 ผลของ H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 10 – 1000 μM ต่อเซลล์ HepG2 (MTT test)

ผลการทดลองแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean \pm S.E.M., n = 3)

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

3.1.2 การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ HepG2 โดยใช้วิธี MTT assay เพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการทดลอง

จากการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อเซลล์ HepG2 โดยใช้วิธี MTT assay พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 10, 25 และ 50 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่เตรียมได้ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 โดยมี %control ระหว่าง 97.46 – 102.30 % ดังตารางที่ 6 ดังนั้นจึงเลือกสารสกัดมา 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 1, 5, 10, 25 และ 50 $\mu\text{g/mL}$ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

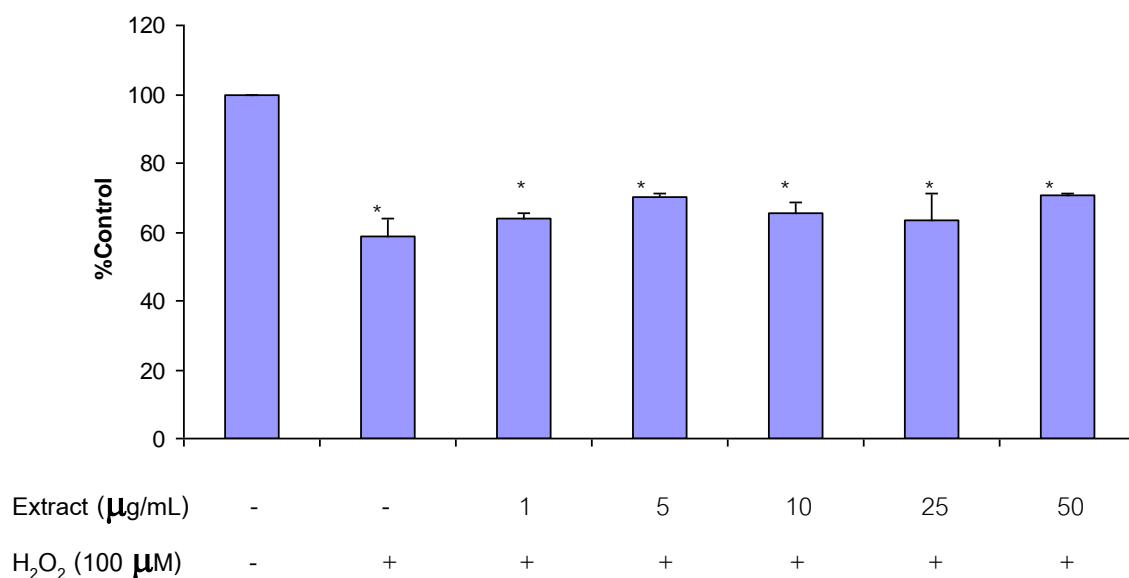
ตารางที่ 6 ผลของสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.5 – 50 $\mu\text{g/mL}$ ต่อเซลล์ HepG2 (MTT test)

Treatment	% control
Control (0.5% DMSO)	100
PP.extract 0.5 $\mu\text{g/mL}$	97.46 \pm 1.9
PP.extract 1 $\mu\text{g/mL}$	99.91 \pm 2.96
PP.extract 5 $\mu\text{g/mL}$	97.54 \pm 1.19
PP.extract 10 $\mu\text{g/mL}$	99.59 \pm 2.86
PP.extract 25 $\mu\text{g/mL}$	98.65 \pm 3.38
PP.extract 50 $\mu\text{g/mL}$	102.30 \pm 2.94

ผลการทดลองแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean \pm S.E.M., n = 3)

3.1.3 การศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ของสารสกัดเมื่อให้ร่วมกับ H_2O_2 ในเซลล์ HepG2 โดยใช้วิธี MTT assay

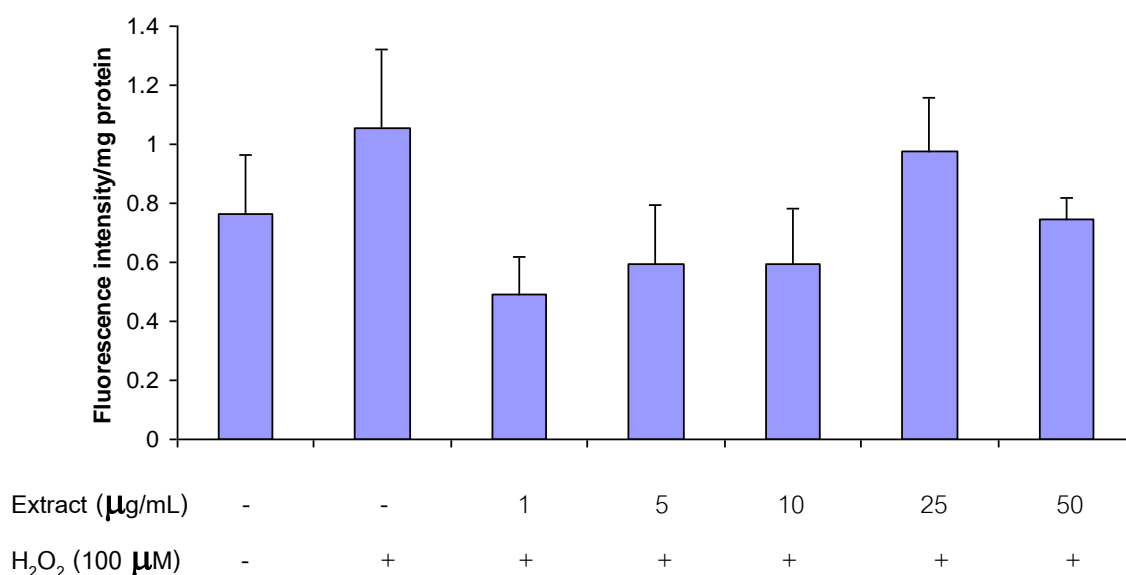
จากการศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ของสารสกัดเมื่อให้ร่วมกับ H_2O_2 ($100 \mu M$) ในเซลล์ HepG2 โดยใช้วิธี MTT assay พบว่า % control ของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 25 และ $50 \mu g/mL$ มีค่าระหว่าง 58.64 – 70.54 % และมีค่าแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด ดังภาพที่ 16



ภาพที่ 16 ผลของสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 – $50 \mu g/mL$ เมื่อให้ร่วมกับ H_2O_2 ต่อเซลล์ HepG2 (MTT test) ผลการทดลองแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean \pm S.E.M., $n = 3$) * แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ reactive oxygen species (ROS) ในเซลล์

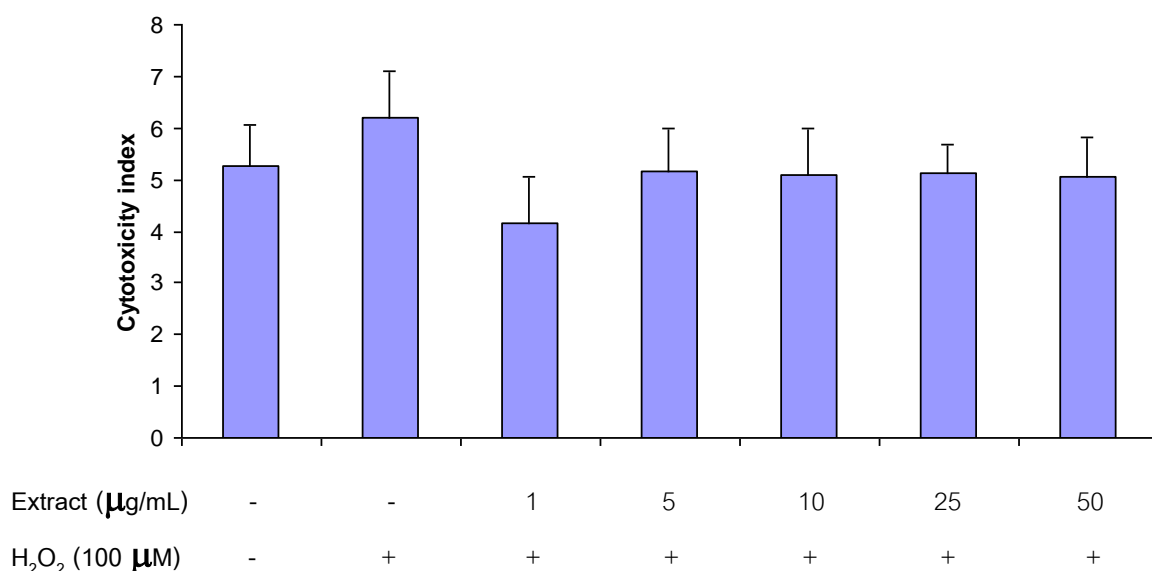
จากการวิเคราะห์หาปริมาณ reactive oxygen species (ROS) ในเซลล์ โดยใช้สาร 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) และวัดค่า fluorescence intensity ที่เกิดขึ้น พบว่าเมื่อให้สารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับ H_2O_2 (100 μM) แก่เซลล์ HepG2 สารสกัดที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 25 และ 50 $\mu g/mL$ มีค่า fluorescence intensity/mg protein ระหว่าง 0.60 – 1.10 และมีค่าต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสารสกัดที่ความเข้มข้น 1, 5 และ 10 $\mu g/mL$ มีระดับ fluorescence intensity/mg protein ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังภาพที่ 17



ภาพที่ 17 ค่า fluorescence intensity/mg protein ของเซลล์ HepG2 เมื่อได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 – 50 $\mu g/mL$ ร่วมกับ H_2O_2 ผลการทดลองแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean \pm S.E.M., n = 3)

3.3 การวิเคราะห์หา LDH (Lactate dehydrogenase) leakage

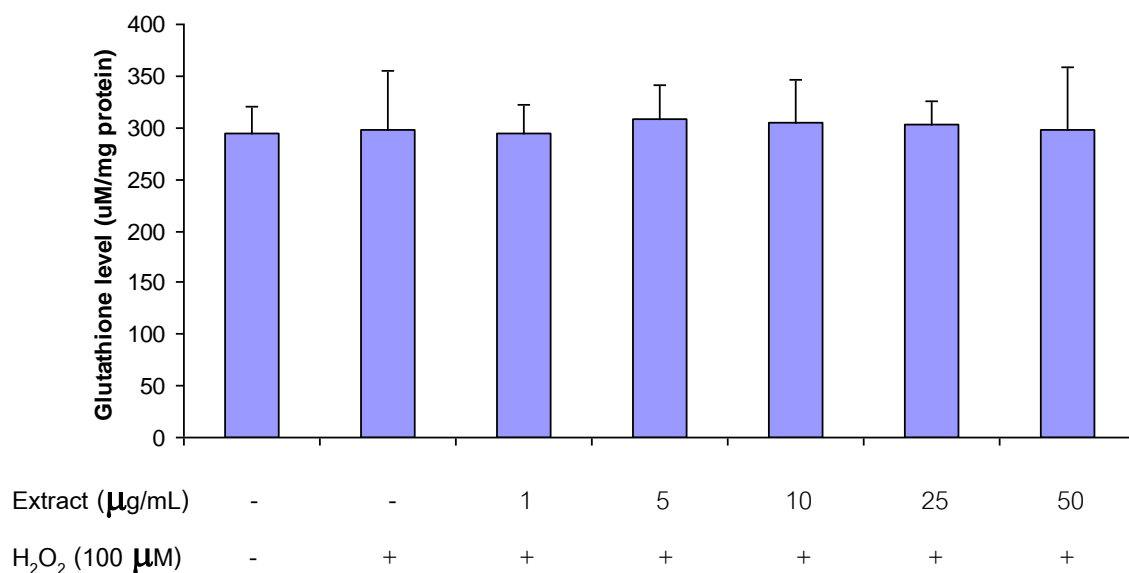
จากการวิเคราะห์หาปริมาณ LDH (Lactate dehydrogenase) leakage โดยการวัด LDH activity (Δ Absorbance per min) ใน media และ cell lysate และนำมาคำนวณหาค่า cytotoxicity index พบว่าเมื่อให้สารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับ H_2O_2 ($100 \mu M$) แก่เซลล์ HepG2 กลุ่มที่ได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 25 และ $50 \mu g/mL$ มี cytotoxicity index ระหว่าง 4.17 – 6.20 และมีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด แต่ไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสารสกัดที่ความเข้มข้น $1 \mu g/mL$ มี cytotoxicity index ต่ำที่สุด คือ 4.17 ดังภาพที่ 18



ภาพที่ 18 ค่า cytotoxicity index ของเซลล์ HepG2 เมื่อได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 – $50 \mu g/mL$ ร่วมกับ H_2O_2 ผลการทดลองแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean \pm S.E.M., n = 3)

3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณ Glutathione

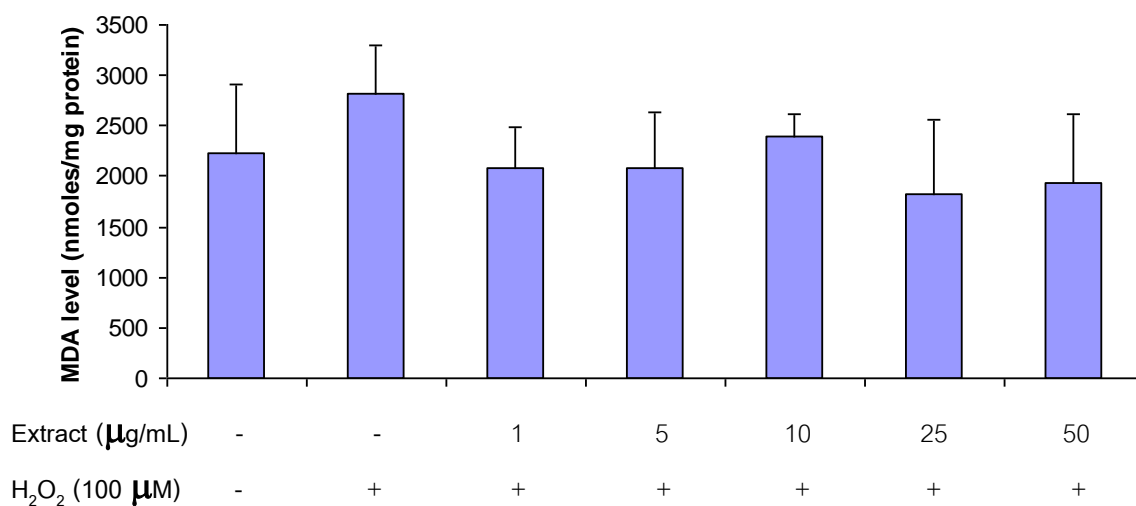
จากการวิเคราะห์หาปริมาณ glutathione โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานของ reduced glutathione (0-100 μM) พบว่าเมื่อให้ สารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับ H_2O_2 (100 μM) แก่เซลล์ HepG2 กลุ่มที่ได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 25 และ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ มีปริมาณ glutathione ไม่แตกต่างกัน โดยมีค่าระหว่าง 292.72 – 308.53 $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein และมีค่าไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด ดังภาพที่ 19



ภาพที่ 19 ปริมาณ glutathione ของเซลล์ HepG2 เมื่อได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 – 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ร่วมกับ H_2O_2 ผลการทดลองแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean \pm S.E.M., n = 3)

3.5 การวิเคราะห์หา lipid peroxidation

จากการวิเคราะห์หา lipid peroxidation โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของ thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) และนำมาคำนวณหาค่า malondialdehyde equivalents (nmoles/mg protein) พบว่าเมื่อให้สารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับ H_2O_2 ($100 \mu M$) แก่เซลล์ HepG2 กลุ่มที่ได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 25 และ $50 \mu g/mL$ มีปริมาณ malondialdehyde ระหว่าง 292.72 – 308.53 nmoles/mg protein และมีค่าต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังภาพที่ 20



ภาพที่ 20 ปริมาณ malondialdehyde ของเซลล์ HepG2 เมื่อได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 – $50 \mu g/mL$ ร่วมกับ H_2O_2 ผลการทดลองแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean \pm S.E.M., n = 3)

บทที่ 5

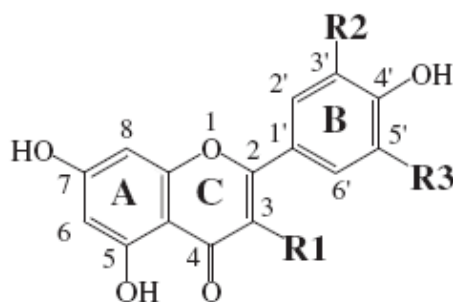
อภิปรายและสรุปผลงานวิจัย

ภาวะ oxidative stress เป็นผลมาจากปริมาณ reactive oxygen species (ROS) ที่มากเกินไป มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเรื้อรังและโรคที่เกิดจากความเสื่อม รวมทั้งโรคตับ เช่น hepatocellular carcinoma, viral hepatitis, alcoholic hepatitis และ non-alcoholic steatosis (Loguercio and Federico, 2003; Nagata et al., 2007; Morisco et al., 2008) เมื่อเซลล์ตับได้รับสารเคมีหรือสารพิษ จะเกิดการกระตุ้น kupffer cell, ไมโทคอนเดรีย, cytochrome P450 หรือ neutrophils ให้มีการสร้าง reactive oxygen species (ROS) มากขึ้น ส่งผลทำให้เซลล์ตับเกิดความเสียหายจากภาวะ oxidative stress เช่น ทำให้เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation, โปรตีนหรือดีเอ็นเอเสียหาย จนทำให้การทำงานของเซลล์ตับเปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้ ROS ยังมีผลไปกระตุ้น hepatic stellate cell (HSC) ทำให้เกิด liver fibrosis ตามมา (Friedman, 2008; Novo and Parola, 2008; Maried, 2009) ดังนั้นการใช้สมุนไพรเพื่อช่วยลดปริมาณ ROS น่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรคตับ (Dhiman et al., 2005)

ในอดีตทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทยได้มีการใช้สมุนไพรในการรักษาโรคมานานจนถึงปัจจุบัน อย่างไรก็ตามการใช้สมุนไพรในการรักษาโรคตับยังไม่เป็นที่ยอมรับมากนัก เนื่องจากยังขาดมาตรฐานทั่วไปของยาสมุนไพรและการระบุสารออกฤทธิ์ ขาดข้อมูลการใช้ทางคลินิก และขาดการศึกษาถึงความเป็นพิษของสมุนไพร (Thyagrajan et al., 2002) ปัจจุบันพืชสมุนไพรที่นิยมใช้ในการรักษาโรคตับ ได้แก่ พืชตระกูล *Phyllanthus*, *Silybum marianum* (milk thistle), glycyrrhizin (licorice root extract) และ Liv 52 (mixture of herbs) โดยเฉพาะ *Silybum marianum* เป็นสมุนไพรที่มีงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้ในการรักษาโรคตับค่อนข้างมาก โดยมีการใช้ในโรคตับที่เกิดจาก alcohol หรือสารพิษ ไวรัสตับอักเสบบีและเรื้อรัง โดยมีสารที่สำคัญ คือ silymarin ซึ่งประกอบด้วยสาร flavanolignans 3 ชนิด ได้แก่ silybin, silychristin และ silydianin (Luper, 1998) จากงานวิจัยพบว่า silymarin มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยลดการสร้างอนุมูลอิสระและ lipid peroxidation (Feher et al., 1990; Campos et al., 1989; Pietrangelo et al., 1995) โดยเมื่อทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านเซลล์มะเร็งในเซลล์ HepG2 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเสียหายด้วย H_2O_2 จากนั้นวัดปริมาณ ROS, metalloproteinases (MMP)-2,-9 และ อัตราการรอดของเซลล์ พบว่า 2,3-dehydrosilybin (DHS) ซึ่งเป็น oxidized form ของ silybin มีฤทธิ์ดังกล่าวมากกว่า silybin (Huber et al., 2008) นอกจากนี้ในสัตว์ทดลองพบว่า silymarin

สามารถลดความเสียหายของตับที่เกิดจาก acetaminophen, carbon tetrachloride, การฉายรังสี (radiation), phenylhydrazine, alcohol, cold ischemia และ *Amanita phalloides* (Jacobs et al., 2002) ปัจจุบันยังมีสมุนไพรอื่นๆ ที่มีการอ้างอิงว่าสามารถใช้ในการรักษาโรคตับเป็นจำนวนมาก รวมทั้งสมุนไพรว่านพญาพานที่เพิ่งมี การอ้างถึง เมื่อประมาณปี ค.ศ. 1990 ในประเทศเวียดนามก็มีรายงานการใช้ว่านดังกล่าวใน การรักษาและป้องกัน โรคตับอักเสบ (Dieu et al., 2005) ถึงแม้ว่าจากการศึกษา ที่ผ่านมาจะพบว่าใบของว่านพญาพานมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แต่ก็ยังขาดข้อมูลที่เป็นการศึกษาทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการต้านอนุมูลอิสระและต้านออกซิเดชันในเซลล์เพาะเลี้ยง

สมุนไพรส่วนใหญ่ที่ระบุว่าสามารถปกป้องตับได้จะมีองค์ประกอบสำคัญเป็นสารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์ ซึ่งสารดังกล่าวมีฤทธิ์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย ได้แก่ ต้านออกซิเดชัน ต้านไวรัส ต้านแบคทีเรีย ต้านการอักเสบ และต้านมะเร็ง (Torel et al., 1986; Wattenberg, 1992) ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของสารประกอบฟลาโวนอยด์ โครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟลาโวนอยด์ ได้แก่ O-heterocyclic ring (วงแหวน C) ที่เชื่อมกับ aromatic ring (วงแหวน A) และ C2 ของ heterocyclic ring (วงแหวน B) ดังภาพที่ 21 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟลาโวนอยด์ ขึ้นอยู่กับจำนวนและตำแหน่งของ hydroxyl group ตำแหน่งที่สำคัญที่ทำให้มีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันคือ ortho-dihydroxyl ที่ตำแหน่ง C3 และ C4 ของวงแหวน B นอกจากนี้ hydroxyl group ที่ตำแหน่ง C3 และพันธะคู่ที่ตำแหน่ง C2 และ C3 ที่เชื่อมกับ ketone group ของวงแหวน C ก็มีผลทำให้ประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันเพิ่มขึ้น (Rice-Evans et al., 1996; Brown et al., 1998)



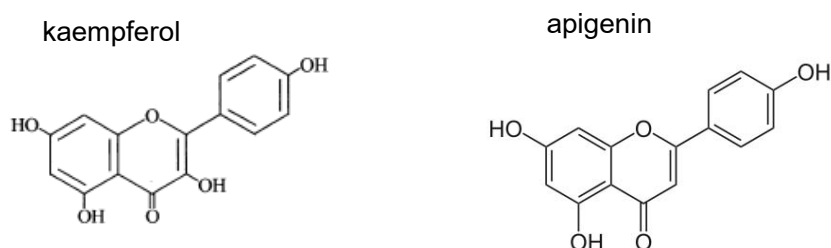
ภาพที่ 21 โครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Yokomizo and Moriwaki, 2006)

จากผลการวิจัยครั้งนี้พบว่าสารสกัดจากใบว่านพญาพานมีปริมาณ รวมของ สารประกอบฟีนอลเท่ากับ 205.00 ± 12.02 mg gallic acid/g dried extract ซึ่งมากกว่า การศึกษาของ จันทนา กาญจน์กมล) 2008) ที่พบว่า สารสกัดจากใบว่านพญาพานมีปริมาณ

ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอล ระหว่าง 24.13-489.81 mg/100g ใบสด โดยสารสกัดใบสดในเมทานอลมีปริมาณรวมของ สารประกอบฟีนอล มากที่สุด คือ 489.81 mg/100g ใบสด และสารสกัดใบแห้งในตัวทำละลายเอทานอลมี ปริมาณโดยรวมของ สารประกอบฟีนอล เท่ากับ 274.83 mg/100g ใบสด ผลดังกล่าวอาจเนื่องมาจากวิธีการสกัดสารที่แตกต่างกัน ทำให้ได้องค์ประกอบในปริมาณที่แตกต่างกัน ส่วนผลปริมาณรวมของ สารประกอบฟลาโวนอยด์ ในงานวิจัยครั้งนี้ เท่ากับ 117.09 ± 0.95 mg catechin/g dried extract สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีของว่านพญาวานร ที่พบว่ามี flavonoids, stigmasterol, β -sitosterol, triterpenoid saponin, kaempferol, apigenin, salicylic acid, phytol และ palmitic acid (Hung et al. ,2004)

สารต้านออกซิเดชันสามารถแบ่งออกได้ 2 กลุ่มตามกลไกในการป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิ (primary antioxidant) ที่มีกลไกในการดักจับอนุมูลอิสระโดยการให้อะตอมไฮโดรเจน (H^{\cdot}) หรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระได้โดยตรง ทำให้ออนุมูลนั้นมีความเสถียรมากขึ้น และ สารต้านอนุมูลอิสระทุติยภูมิ (secondary antioxidant) ที่มีกลไกไม่ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับอนุมูลอิสระ เช่น จับกับโลหะทรานสิชันที่เป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาออกซิเดชัน ดักจับออกซิเจน เปลี่ยน hydroperoxide ให้เป็นโมเลกุลที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ และดูดซับรังสียูวี เป็นต้น (Gordon, 2001) จากผลการวิเคราะห์ความสามารถในการ ลดปริมาณอนุมูลอิสระของสารสกัดจากว่านพญาวานรในงานวิจัยครั้งนี้ พบว่า สารสกัดสามารถต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH และ FRAP assay สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ สมหมาย ประติตั้งไข (2010) ที่พบว่าสารสกัดใบแห้งของว่านพญาวานรในตัวทำละลาย hexane, dichloromethane, ethyl acetate, methanol และ ethanol มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH และ FRAP assay เช่นกัน ทั้งนี้ผลของ DPPH และ FRAP assay ในงานวิจัยครั้งนี้ แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการให้อะตอมไฮโดรเจนอะตอมและอิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระของสารสกัด สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ของ Korkina และ Afanas'ev (1997) เกี่ยวกับกลไกในการต้านออกซิเดชันของสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่สามารถ ทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรง เนื่องจากสารประกอบฟลาโวนอยด์มี กลุ่ม hydroxyl group (-OH) เป็นองค์ประกอบ จึงทำหน้าที่ให้อะตอมไฮโดรเจน (H^{\cdot}) หรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระได้โดยตรง ทำให้ออนุมูลนั้นมีความเสถียรมากขึ้น โดยผลในการต้านออกซิเดชันดังกล่าว ของสารสกัดจากว่านพญาวานร น่าจะเป็นผลมาจากสารประกอบฟีนอลและ สารประกอบฟลาโวนอยด์ที่ทำให้มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชัน ซึ่งเมื่อพิจารณาจากองค์ประกอบของสารสกัดจากว่านพญาวานรที่ประกอบด้วย flavonoids กลุ่ม kaempferol จะพบว่าโครงสร้างที่ทำให้มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน คือ มีกลุ่ม hydroxyl ที่ตำแหน่ง

C4 ของวงแหวน B และที่ตำแหน่ง C3 ของวงแหวน C นอกจากนี้ยังมีพันธะคู่ที่ตำแหน่ง C2 และ C3 ที่เชื่อมกับ ketone group ของวงแหวน C ส่วนกลุ่ม apigenin มีโครงสร้างที่มีกลุ่ม hydroxyl ที่ตำแหน่ง C4 ของวงแหวน B และมีพันธะคู่ที่ตำแหน่ง C2 และ C3 ที่เชื่อมกับ ketone group ของวงแหวน C ดังภาพที่ 22



ภาพที่ 22 โครงสร้างโมเลกุลของ kaempferol และ apigenin (Brown et al., 1998)

Hydrogen peroxide (H_2O_2) จัดเป็นสารเคมีที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์เพาะเลี้ยง ถึงแม้ H_2O_2 จัดเป็น ROS ในกลุ่มที่ไม่ใช่อนุมูล (nonradical oxygen derivatives) และไม่ทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์โดยตรง แต่ H_2O_2 มีความสามารถในการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ง่าย โดย H_2O_2 สามารถทำปฏิกิริยากับ superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$) โดยมี Fe^{2+} หรือ Cu^{2+} ช่วยเร่งปฏิกิริยาซึ่งทำให้เกิด hydroxyl radical (OH^{\cdot}) ซึ่งเป็นสารที่มีความไวสูงสุดในการทำปฏิกิริยากับชีวโมเลกุลอื่น (Bielski and Cabelli, 1995; Halliwell and Gutteridge, 1999) เมื่อเซลล์ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันด้วย H_2O_2 มีผลให้ชีวโมเลกุลเกิดความเสียหาย เช่น เกิดปฏิกิริยา peroxidation ของไขมัน และเกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนหรือดีเอ็นเอ เป็นต้น (Halliwell and Aruoma, 1991; Yang et al., 1999; Halliwell et al., 2000)

จากผลการทดลองครั้งนี้เมื่อศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพิษของ H_2O_2 ต่อเซลล์ HepG2 โดยใช้วิธี MTT assay ซึ่งเป็นวิธีการวัดความอยู่รอดของเซลล์ และการทำงานของไมโทคอนเดรีย พบว่า อัตราการรอดของเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (%control) แปรผกผันกับความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าในภาวะที่มี ROS ปริมาณมากจะทำให้เกิดความเสียหายต่อการทำงานของไมโทคอนเดรีย (Varbiro et al., 2001) และความเสียหายนี้ขึ้นกับปริมาณของ H_2O_2 ด้วย พบว่า H_2O_2 ในปริมาณน้อยจะทำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis ในขณะที่ H_2O_2 ในปริมาณสูงจะทำให้เซลล์ตายแบบ necrosis (Lennon et al., 1991; Hampton and Orrenius, 1997) สำหรับความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่เลือกใช้ในการศึกษา

ต่อไปในครั้งนี้นี้คือ 100 μM ที่มี %control เท่ากับ 65.1% ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Yang และคณะ (1999) ที่ศึกษาฤทธิ์ในการปกป้องของ Ebselen ต่อเซลล์ HepG2 ที่ถูกทำให้เกิดความเสียหายด้วย H_2O_2 ซึ่งเลือกใช้ความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่มี %control ประมาณ 70%

การศึกษานี้ ได้ทดสอบ ความเป็นพิษของสารสกัดจากว่านพญาวานรที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อเซลล์ HepG2 โดยใช้วิธี MTT assay พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.5 - 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่เตรียมได้ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ทำการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากว่านพญาวานรใน Vero cells พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.78 - 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่เตรียมได้เช่นกัน ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ดังกล่าว (พีรวิชญ์ พาดี และคณะ, 2009) ดังนั้นจึงเลือกใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 1 - 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ จำนวน 5 ความเข้มข้นเพื่อทำการศึกษาต่อไป

จากผลการศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ของสารสกัดเมื่อให้ร่วมกับ H_2O_2 ในเซลล์ HepG2 โดยใช้วิธี MTT assay พบว่า % control ของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดทุกความเข้มข้น (1 - 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) มีค่าแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด ผลดังกล่าวอาจเนื่องมาจาก สารสกัดไม่มีผลปกป้องเซลล์ที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress หรืออาจเกิดจากความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่ไม่มากพอที่ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ที่ทำให้เห็นฤทธิ์ปกป้องเซลล์ของสารสกัดได้ โดยถึงแม้ว่าในการทดลองครั้งนี้จะเลือกใช้ความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่มี % control เท่ากับ 65.1% ใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Yang และคณะ (1999) แต่จากงานวิจัยของ Qi และคณะ (2010) ที่ศึกษาฤทธิ์ของ Senkyunolides ในการลดความเสียหายจากภาวะ oxidative stress ในเซลล์ HepG2 ที่เหนี่ยวนำด้วย H_2O_2 จะเลือกใช้ H_2O_2 1mM ที่ทำให้มี %control ประมาณ 37%

ถึงแม้ว่าจะมีงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของว่านพญาวานรบ้าง แต่ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับกลไกในการต้านอนุมูลอิสระดังกล่าว ในงานวิจัยครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาต่อถึงกลไกของว่านพญาวานรในการปกป้องเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันจาก H_2O_2 โดยทำการศึกษาในเซลล์ HepG2 โดยใช้สาร 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ reactive oxygen species (ROS) ในเซลล์ โดย DCFH-DA จะแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และเปลี่ยนแปลงกลายเป็น DCFH ซึ่งจะถูกออกซิไดส์ได้ง่ายโดย ROS ทำให้ได้ DCF ซึ่งเป็นสารเรืองแสง (Lebel, 1992) ดังนั้น fluorescence intensity ที่ได้จะบ่งบอกถึงปริมาณ ROS ภายในเซลล์โดยตรง จากผลการทดลองครั้งนี้ พบว่าเมื่อให้สารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับ H_2O_2 แก่เซลล์ HepG2 กลุ่มที่ได้รับสารสกัดทุกความเข้มข้น (1 - 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) มี

ระดับ fluorescence intensity ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ความเข้มข้น 1, 5 และ 10 $\mu\text{g/mL}$ มีระดับ ROS น้อยกว่าที่ความเข้มข้น 25 และ 50 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากปัญหาการดูดซึมของสารสกัด สารสกัดที่ความเข้มข้นสูงมีโอกาที่จะดูดซึมเข้าเซลล์ได้น้อยกว่าสารสกัดที่ความเข้มข้นต่ำ และจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่ความเข้มข้นสูง กลับสร้างความเสียหายแก่เซลล์ได้มากกว่าที่ความเข้มข้นต่ำ (Watjen et al., 2005) ดังนั้นว่านพญาวานรมีผลลดปริมาณ ROS ภายในเซลล์ได้บ้าง โดยผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลข้างต้นที่พบว่าสารสกัดจากว่านพญาวานสามารถลดอนุมูลอิสระได้เช่นกันเมื่อทดสอบภายนอกร่างกายด้วยสาร DPPH ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสามารถของสารสกัดในการให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่ DPPH ดังนั้นปริมาณ ROS ที่ลดลงอาจเกิดจากการที่สารสกัดให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่ ROS

จากการวิเคราะห์หาปริมาณ LDH (Lactate dehydrogenase) leakage โดยแสดงค่าในรูปของ cytotoxicity index พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดทุกความเข้มข้น (1 - 50 $\mu\text{g/mL}$) มีค่า cytotoxicity index ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากการวิเคราะห์หา lipid peroxidation โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของ thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) และนำมาคำนวณหาค่า malondialdehyde equivalents (nmoles/mg protein) พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดทุกความเข้มข้น (1 - 50 $\mu\text{g/mL}$) มีค่า MDA ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สาเหตุที่ทำให้ผลของ LDH และ lipid peroxidation ของแต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจาก

1.ความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ไม่รุนแรงมากพอให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ เนื่องจากระดับ LDH และปฏิกิริยา lipid peroxidation บ่งบอกถึงสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ (Decker and Lohmann-Matthes, 1988; Esterbauer et al., 1991)

2.กลไกต่อต้านออกซิเดชันจากภายในเซลล์ตัวเอง (autoregulation) ที่มีผลต่อ ROS ที่เกิดขึ้น (Morel et al., 1999)

3.วิธีการวัดครั้งนี้ไม่ไวพอที่จะวัดความเปลี่ยนแปลงของ ภาวะ oxidative stress ในระดับต่ำได้

4.ความแปรปรวนของ NAD^+/NADH หรือ $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ และ lactate/pyruvate (redox state) ของเซลล์ที่ใช้ในการทดลอง (Rueff et al., 1986)

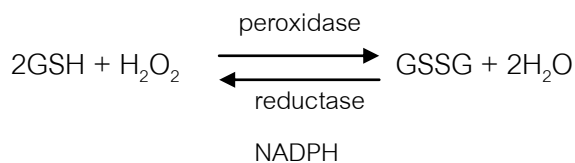
5.ปริมาณของโลหะ ทรานสิชัน ที่มีอยู่ใน media นั้นมีจำนวนน้อย เนื่องจาก โลหะ ทรานสิชันมีบทบาทสำคัญในปฏิกิริยา Fenton reaction ที่ทำให้เกิด hydroxyl radical (OH^\cdot) จาก

ปฏิกิริยาระหว่าง hydrogen peroxide (H_2O_2) และ superoxide ion radical ($O_2^{\cdot-}$) เมื่อมีปริมาณของโลหะทรานสิชันน้อย ก็จะมีผลให้เกิดปฏิกิริยาดังกล่าวลดลงด้วย ดังนั้นถึงแม้ว่ากลุ่มควบคุมจะมีปริมาณ ROS มากกว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัด แต่หากมีปริมาณโลหะทรานสิชันน้อยย่อมทำให้เกิดปฏิกิริยาน้อยตามไปด้วย และยังส่งผลให้ผลที่ตามมาได้แก่ การเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation และ LDH leakage ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับสารสกัด (Rueff et al., 1986; Yoshino and Murakami, 1998)

6. ปริมาณสารสกัดที่สามารถดูดซึมเข้าเซลล์ได้นั้นไม่มากพอที่จะสามารถปกป้องเซลล์ได้ ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับรูปแบบของสารสกัดที่เข้าสู่เซลล์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ที่อยู่ในรูปของ glycoside ซึ่งมีการดูดซึมเข้าเซลล์ไม่ดีเท่ากับรูปของ aglycone โดยจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสารประกอบฟลาโวนอยด์จำพวก glycosides จะถูกไฮโดรไลซิสให้อยู่ในรูปของ aglycone ก่อนที่จะเข้าสู่ระบบชีววิทยาของร่างกาย (biological system) (Williamson et al., 2000; Lee et al., 2005)

ทั้งนี้ผลของระดับ MDA นั้นสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำสกัดจากใบสดของว่านพญาวานรด้วยวิธี ABTS และ DPPH ที่พบว่าว่านพญาวานรมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเช่นกัน แต่ไม่มีผลในการลดปริมาณ MDA ในซีรัมของหนูทดลอง (พฤษชาติสิงห์สุวรรณ, 2009)

Glutathione เป็นสารต้านออกซิเดชันที่มีผลดักจับอนุมูลอิสระ จากการวิเคราะห์หาปริมาณ glutathione ในงานวิจัยครั้งนี้ พบว่าเมื่อให้สารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับ H_2O_2 แก่เซลล์ HepG2 กลุ่มที่ได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ กลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด และกลุ่มควบคุมมีปริมาณ glutathione ไม่แตกต่างกัน โดยผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ปกป้องเซลล์ของสารสกัดจากว่านพญาวานรไม่เกี่ยวข้องกับระดับ glutathione ในเซลล์ หรืออาจเกิดจากวิธีการวัดปริมาณ glutathione ในการทดลองครั้งนี้เป็นการวัดปริมาณ total glutathione ที่ไม่เฉพาะเจาะจงต่อ oxidized glutathione ดังนั้นในงานวิจัยครั้งต่อไปควร มีการวัดปริมาณของ glutathione peroxidase หรือ glutathione reductase ควบคู่กันไปด้วย เพื่อให้ได้ผลที่เฉพาะเจาะจงต่อ oxidized glutathione เนื่องจาก glutathione (GSH; reduced form) จะทำปฏิกิริยากับ hydrogen peroxide (H_2O_2) โดยอาศัยเอนไซม์ glutathione peroxidase ได้ผลิตภัณฑ์คือ glutathione disulfide (GSSG; oxidized form) ซึ่งสามารถกลับไปเป็น GSH ได้โดยอาศัยเอนไซม์ glutathione reductase และ NADPH (Tietze, 1969; Baker et al., 1990) ดังสมการ



นอกจากนี้การที่ระดับ glutathione ของแต่ละกลุ่ม ไม่แตกต่างกัน นั้นอาจเกิดจากความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่ไม่มากพอที่ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ glutathione ได้อย่างชัดเจน โดยจากงานวิจัยก่อนหน้าของ Zhao และคณะ (2006) พบว่าเมื่อเซลล์ HepG2 ได้รับ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นสูงถึง 1 mM ซึ่งมากกว่างานวิจัยครั้งนี้ 10 เท่า ร่วมกับ 15 μM hemin และ 1 mM NO_2^- ถึงจะมีระดับ glutathione แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$)

จากผลการทดลองครั้งนี้สรุปได้ว่าสารสกัดจากว่านพญาวานรมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้น้อยมาก จึงไม่มีผลในการปกป้องเซลล์ตับที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันด้วย H_2O_2 ทั้งนี้ควรมีการศึกษาถึงกลไกอื่นๆ ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากว่านพญาวานรเพิ่มเติม เช่น ยับยั้งโลหะทรานสิชัน กระตุ้นเอนไซม์ catalase และ ยับยั้งเอนไซม์ lipoygenase หรือ phospholipase C เป็นต้น และอาจปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของ H_2O_2 เพื่อให้เกิดผลของภาวะ oxidative stress ที่ชัดเจน นอกจากนี้ควรมีการศึกษาในสัตว์ทดลอง เพื่อให้มีสภาพใกล้เคียงกับร่างกายมนุษย์และสัตว์เลี้ยงมากที่สุด และสำหรับการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงครั้งต่อไปอาจออกแบบการทดลองโดยการให้สารสกัดนานกว่า 24 ชั่วโมงแก่เซลล์ที่ได้รับ H_2O_2

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- จันทนา กาญจน์กมล. 2008 (2551). การตรวจสอบความเป็นพิษและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากพญาวานร. รายงานการวิจัย. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา. 91.
- เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ อาดุลย์ จงรักษ์ นิคม จันทรมังกร และอนุพงษ์ ทิมอุบล . 2009 (2552). ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และต้านมะเร็งของสมุนไพรพญาวานร. (บทคัดย่อ). 35th Congress on Science and Technology of Thailand. ชลบุรี, ประเทศไทย, 15-17 ตุลาคม.
- พฤษชาติ สิงห์สุวรรณ. 2009 (2552). การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากใบฮว่านง็อก. ผลงานวิชาการนักศึกษาระดับปริญญาตรี (บทคัดย่อ). ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- พีรวิษณุ พาศิ สมศักดิ์ นวลแก้ว ชูศรี ตลับมูข และสุภาพร สกฤตใจตรง. 2009 (2552). ความเป็นพิษเฉียบพลันและกึ่งเฉียบพลันของสารสกัดใบพญาวานร. วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน . 5: 74-81.
- ลำปาง ปาชิโร. 2003 (2547). สมุนไพรมาแรงฮว่านง็อก. วารสารเทคโนโลยีชาวบ้าน. 15: 32.
- วงศ์สถิตย์ จั้วสกุล และ อรัญญา ศรีบุศราคัม. 2008 (2551). ฮว่านง็อก (Hoan-Ngoc) สมุนไพรในกระแส. จุลสารข้อมูลสมุนไพร. 25(3): 3-6.
- สมหมาย ปะติตั้งโ. 2000 (2553). การต้านอนุมูลอิสระและการต้านการเติบโตของแบคทีเรียของสารสกัดพญาวานร. วารสาร มจร.วิชาการ. 27: 123-136.

ภาษาอังกฤษ

- Aikawa, E., Nagai, T., Tanaka, M., Zou, Y., Ishihara, T., Takano, H., Hasegawa, H., Akazawa, H., Mizukami, M., Nagai, R. and Komuro, I. 2001. Reactive oxygen species in mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. Biochem. Biophys. Res. Commun. 289: 901–907.
- Alia, M., Mateos, R., Ramos, S., Lecumberri, E., Bravo, L. and Goya, L. 2006. Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense of a human hepatoma cell line (HepG2). Eur. J. Nutr. 45: 19–28.

- Ames, B.N., Cathcart, R., Schwiers, E. and Hochstein, P. 1981. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: A hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 6858–6862.
- Ames, B.N. 1986. Food constituents as a source of mutagens, carcinogens, and anticarcinogens. *Prog. Clin. Biol. Res.* 206: 3–32.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M. 1995. Mitochondrial decay in aging. *Biochim. Biophys. Acta.* 1271: 165–170.
- Anaber, M. and Neta, P. 1967. A compilation of specific biomolecular rate constants for the reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms, and hydroxyl radicals with inorganic and organic compounds in aqueous solution. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* 18: 495-523.
- Atamna, H., Cheung, I. and Ames, B.N. 2000. A method for detecting abasic sites in living cells: Age-dependent changes in base excision repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 686–691.
- Bai, J., Rodriguez, A.M., Melendez, J.A. and Cederbaum, A.I. 1999. Overexpression of catalase in cytosolic or mitochondrial compartment protects HepG2 cells against oxidative injury. *J. Biol. Chem.* 274: 26217–26224.
- Baker, M.A., Cerniglia, G.J. and Zaman, A. 1990. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal Biochem.* 190: 360-365.
- Baud, I. and Ardaillou, R. 1986. Reactive oxygen species: Production and role in the kidney. *Am. J. Physiol.* 251: F765–776.
- Becker, B.F. 1993. Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic. Biol. Med.* 14: 615–631.
- Beckman, J.S. and Koppenol, W.H. 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: The good, the bad and ugly. *Am. J. Physiol.* 271: C1424–1437.
- Benzie, I.F. and Strains, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239: 70–76.
- Bielski, B.H.J., Cabelli, B.H., Arudi, R.L. and Ross, A.B. 1985. Reactivity of $RO_2/O_2^{\cdot\cdot}$ radicals in aqueous solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data.* 14: 1041-1100.

- Bielski, B.H.J. and Cabelli, D.E. 1995. Superoxide and hydroxyl radical chemistry in aqueous solution. In: Active oxygen in chemistry. C.S. Foote, J.S. Valentine, A. Greenberg and J.F. Liebman (ed.). London: Chapman and Hall. 66–104.
- Bjorneboe, A., Bjorneboe, G.E. and Drevon, C.A. 1990. Absorption, transport and distribution of vitamin E. *J. Nutr.* 120: 233-242.
- Blau, S., Kohen, R., Bass, P. and Rubinstein, A. 2000. Relation between colonic inflammation severity and total low-molecular-weight antioxidant profile in experimental colitis. *Dig. Dis. Sci.* 45: 1180–1187.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature.* 181: 1199–1200.
- Brown, J.E., Khodr, H., Hider, R.C. and Rice-Evans, C.A. 1998. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu^{2+} ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem. J.* 330: 1173-1178.
- Browning, J.D. and Horton, J.D. 2004. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J. Clin. Invest.* 114: 147-152.
- Brunk, U.T. and Terman, A. 2002. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: Accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur. J. Biochem.* 269: 1996–2002.
- Burton, G.W., Joyce, A. and Ingold, K.U. 1983. Is vitamin E the only lipid soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Arch. Biochem. Biophys.* 221: 281-290.
- Burton, G.W. and Ingold, K.U. 1986. Vitamin E: application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. *Acc. Chem. Res.* 19: 194-201.
- Buxton, G.V., Greenstock, C.L., Helman, W.P. and Ross, A.B. 1988. Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals. *Phys. Chem. Ref. Data.* 17: 513-517.

- Cadet, J., Berger, M., Morin, B., Raoul, S. and Wagner, J.R. 1995. Oxidative damage to DNA. In: Analysis of free radicals in biological systems. A.E. Favier, J. Cadet, B. Kalyanaraman, M. Fontecave and J.L. Pierre (ed.). Boston, MA: Birkauser Verlag. 51-64.
- Calderon-Montano, J.M., Burgos-Moron, E., Perez-Guerrero, C. and Lopez-Lazaro, M. 2011. A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Rev. Med. Chem.* 11 (4): 298–344.
- Campos, R., Garrido, A., Guerra, R. and Valenzuela, A. 1998. Silybin dihemisuccinate protects against glutathione depletion and lipid peroxidation induced by acetaminophen on rat liver. *Planta. Med.* 55: 417–419.
- Canas, P.E. 1999. The role of xanthine oxidase and the effects of antioxidants in ischemia reperfusion cell injury. *Acta. Physiol. Pharmacol. Ther. Latinoam.* 49: 13–20.
- Chang, W.S, Lee, Y.J., Lu, F.J. and Chiang, H.C. 1993. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Res.* 13: 2165–2170.
- Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59: 527–605.
- Chinev, S., Bakalova, R., Kovacheva, S. and Ribarov, S.R. 1998. Lipid peroxidation in rat lung induced by neuroleptanalgesia and its components. *Eur. J. Anaesthesiol.* 15: 686–694.
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Poel, B.V., Pieters, L., Vlietinck, A.J. and Berghe, D.V. 1998. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.* 61: 71–76.
- Czapski, G. and Goldstein, S. 1995. The role of the reactions of NO with superoxide and oxygen in biological systems: A kinetic approach. *Free Radic. Biol. Med.* 19: 785–794.
- Davies, A.G., Griller, D., Ingold, K.U., Lindsay, D.A. and Walton, J.C. 1981. An electron spin resonance study of pentadienyl and related radicals: homolytic fission of cyclobut-2-enylmethyl radicals. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.* 11: 633-641.

- Davis, K.J. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J. Biol. Chem.* 262: 9895–9901.
- Decker, T. and Lohmann-Matthes, M.L. 1988. 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.* 115: 61–69.
- Defeng, W. and Cederbaum, A.I. 2003. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res. Health.* 27: 277-284.
- Dehmlow, C., Erhard, J. and de Groot, H. 1996. Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin. *Hepatology.* 23: 749–754.
- Dhiman, R.K. and Chawla, Y.K. 2005. Herbal medicines for liver diseases. *Dig. Dis. Sci.* 50: 1807–1812.
- Dieu, H.K. and Hoa, T.V. 2003. Efficiency of *Pseuderanthemum palatiferum* powder against diarrhea of piglets. Cantho: Cantho University. 1-6.
- Dieu, H.K., Loc, C.B., Yamasaki, S. and Hirata, Y. 2005. The ethnobotanical and botanical study on *Pseuderanthemum palatiferum* as a new medicinal plant in the Mekong Delta of Vietnam. *Jap. Agri. Res. Qua.* 39: 191-196.
- Dieu, H.K., Loc, C.B., Yamasaki, S. and Hirata, Y. 2006. The effects of *Pseuderanthemum palatiferum*, a new medicinal plant, on growth performances and diarrhea of piglets. *Jap. Agri. Res. Qua.* 40: 85-91.
- Djordjevic, V.B. 2004. Free radicals in cell biology. *Int. Rev. Cytol.* 237: 57–89.
- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M. and Rodriguez, H. 2002. Free radical induced damage to DNA: Mechanisms and measurement. *Free Radic. Biol. Med.* 32: 1102–1115.
- Elsayed, N.M., Omaye, S.T., Klain, G.J. and Korte, D.W.Jr. 1992. Free radical mediated lung response to the monofunctional sulfur mustard butyl 2-chloroethyl sulfide after subcutaneous injection. *Toxicology.* 72: 153–165.
- Eriksson, S., Carlson, J. and Velez, R. 1986. Risks of cirrhosis and primary liver cancer in alpha1-antitrypsin deficiency. *New Engl. J. Med.* 314: 736-739.

- Esterbauer, H., Schaur, R.J. and Zollner, H. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 11: 81–128.
- Fenton, H.J.H. 1894. The oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J. Chem. Soc. Proc.* 10: 157-158.
- Ferrandiz, M.L., Gil, B., Sanz, M.J., Ubeda, A., Erazo, S., González, E., Negrete, R., Pacheco, S., Payá, M. and Alcaraz, M.J. 1996. Effect of bakuchiol on leukocyte functions and some inflammatory responses in mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 48: 975–980.
- Feher, J., Lang, I., Nekam, K.J., Gergely, P. and Muzes, G. 1990. In vivo effect of free radical scavenger hepatoprotective agents on superoxide dismutase (SOD) activity in patients. *Tokai Exp. Clin. Med.* 15: 129–134.
- Forman, H.J. and Torres, M. 2001. Redox signaling in macrophages. *Mol. Aspects. Med.* 22: 189–216.
- Fridovich, I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 97–112.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C. and Siede, W. 1995. DNA repair and mutagenesis. Washington, DC: ASM Press.
- Friedman, S.L. 2008. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology.* 134: 1655-1669.
- Friesenecker, B., Tsai, A.G., Allegra, C. and Intaglietta, M. 1994. Oral administration of purified micronized flavonoid fraction suppresses leukocyte adhesion in ischemia-reperfusion injury: in vivo observations in the hamster skin fold. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 14: 50–55.
- Gabay, O., Sanchez, C., Salvat, C., Chevy, F., Breton, M., Nourissat, G., Wolf, C., Jacques, C. and Berenbaum, F. 2010. Stigmasterol: a phytosterol with potential anti-osteoarthritic properties. *Am. J. Clin. Nutr.* 18 (1): 106–116.

- Giang, P.M., Bao, H.V. and Son, P.T. 2005. 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. 9: 9-12.
- Gordon, M.H. 2001. The development of oxidative rancidity in foods. In: Antioxidants in food: Practical applications. J. Pokorny, N. Yanishlieva and M. Gordon (ed.). Florida: CRC Press LLC. 7-20.
- Gottschling, B.C., Maronpot, R.R., Hailey, J.R., Peddada, S., Moomaw, C.R., Klaunig, J.E. and Nyska, A. 2001. The role of oxidative stress in indium phosphide-induced lung carcinogenesis in rats. Toxicol. Sci. 64: 28–40.
- Grune, T., Reinhecker, T. and Davies, K.J.A. 1997. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. FASEB J. 11: 526–534.
- Gul, M., Kutay, F.Z., Temocin, S. and Hanninen, O. 2000. Cellular and clinical implications of glutathione. Indian J. Exp. Biol. 38: 625–634.
- Gutteridge, J.M. 1993. Free radicals in disease processes: A compilation of cause and consequence. Free Radic. Res. Commun. 19: 141–158.
- Haber, F. and Weiss, J. 1934. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. Proc. R. Soc. London. 147: 332–351.
- Halliwell, B. 1990. How to characterize a biological antioxidant. Free Radic. Res. Commun. 9: 1–32.
- Halliwell, B. and Aruoma, O.I. 1991. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. FEBS Lett. 281: 9–19.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed. Midsomer Norton: Oxford University Press.
- Halliwell, B., Clement, M.V. and Long, L.H. 2000. Hydrogen peroxide in the human body. FEBS Lett. 486: 10-13.
- Halliwell, B. 2001. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: Therapeutic implications for antioxidant treatment. Drugs Aging. 18: 685–716.
- Hampton, M. B. and Orrenius, S. 1997. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. FEBS Lett. 414: 552–556.

- Hanasaki, Y., Ogawa, S. and Fukui, S. 1994. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* 16: 845–850.
- Hansen, M.B., Nielsen, S.E. and Berg, K. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods.* 119: 203–210.
- Hawkins, C.L., Brown, B.E. and Davies, M.J. 2001. Hypochlorite-and hypochlorite-mediated radical formation and its role in cell lysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 395: 137-145.
- Howard, J.A. 1972. *Advances in Free Radical Chemistry*. New York: Academic Press.
- Huber, A., Thongphasuk, P., Erben, G., Lehmann, W.D., Tuma, S., Stremmel, W. and Chamulitrat, W. 2008. Significantly greater antioxidant anticancer activities of 2,3-dehydrosilybin than silybin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1780: 837–847.
- Hung, N.V., Tuan, L.A. and Chien, N.Q. 2004. Study on chemical constituents of *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. *TC khoa hoc va cong nghe.* 42: 75-79.
- Jacobs, B.P., Dennehy, C., Ramirej, G., Sapp, J., Lawrence, V.A. 2002. Milk thistle for the treatment of liver diseases: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Med.* 113: 506–515.
- Jaeschke, H., Gores, G.J., Cederbaum, A.I., Hinson, J.A., Pessayre, D. and Lemasters, J.J. 2002. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* 65: 166–176.
- Jaffe, B. 1976. *Crucibles: The story of chemistry from ancient alchemy to nuclear fission*, 4th ed. New York: Dover Publications.
- Jenner, P. 1993. Altered mitochondrial function, iron metabolism and glutathione levels in Parkinson's disease. *Acta. Neurol. Scand. Suppl.* 146: 6–13.
- Kagan, V.E., Bakalova, R.A., Serbinova, E.A. and Stoychev, E.S. 1990. Fluorescence measurements of incorporation and hydrolysis of tocopheryl esters in biomembranes. In: *Oxygen radicals in biological systems, Part B: Oxygen radicals and antioxidants*. L. Packer and A. Glazer (ed.). San Diego, CA: Academic Press. 355-367.

- Karlsson, K. and Marklund, S.L. 1989. Binding of human extracellular-superoxide dismutase C to cultured cell lines and to blood cells. *Lab. Invest.* 60: 659-666.
- Kelly, S.A., Havrilla, C.M., Brady, T.C., Abramo, K.H. and Levin, E.D. 1998. Oxidative stress in toxicology: Established mammalian and emerging piscine model systems. *Environ. Health Perspect.* 106 (7): 375-384.
- Khonsung, P., Panthong, A., Chiranthanut, A. and Intahphuak, S. 2011. Hypotensive effect of the water extract of the leaves of *Pseuderanthemum palatiferum*. *J. Nat. Med.* 65: 551-558.
- Knowles, B.B. and Aden, D.P. 1983. Human hepatoma derived cell line, process for preparation thereof, and uses therefore. *US Patent.* 4: 393.
- Kohen, R. 1999. Skin antioxidants: Their role in aging and in oxidative stress - new approaches for their evaluation. *Biomed. Pharmacother.* 53: 181-192.
- Kohen, R. and Gati, I. 2000. Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. *Toxicology.* 148: 149-157.
- Kohen, R. and Nyska, A. 2002. Invited review: Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.* 30: 620-650.
- Koren, H.S. 1995. Association between criteria air pollutants and asthma. *Environ. Health Perspect.* 103: 235-242.
- Korkina, L.G. and Afanas'ev, I.B. 1997. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv. Pharmacol.* 38: 151-163.
- Krithika, R., Mohankumar, R., Verma, R.J. and Shrivastav, P.S. 2009. Isolation, characterization and antioxidative effect of phyllanthin against CCl₄-induced toxicity in HepG2 cell line. *Chem. Biol. Interact.* 181: 351-358.
- Laekeman, G., De Coster, S. and De Meyer, K. 2003. St. Mary's Thistle: an overview. *J. Pharm. Belg.* 58: 28-31.
- Lebel, C.P., Ischiopoulos, H. and Bondy, S.C. 1992. Evaluation of the probe 29,79-dichlorofluorescein as indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 5: 227-231.

- Lee, T.Y., Wang, G.J., Chiu, J.H. and Lin, H.C. 2003. Long-term administration of *Salvia miltiorrhiza* ameliorates carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 11: 1561-1568.
- Lee, C.H., Yang, L., Xu, J.Z., Yeung, S.Y.V., Huang, Y. and Chen Z.Y. 2005. Relative antioxidant activity of soybean isoflavones and their glycosides. *Food Chem.* 90: 735–741.
- Lennon, S. V., Martin, S. J. and Cotter, T. G. 1991. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif.* 24: 203–214.
- Levine, R.L. and Stadtman, E.R. 2001. Oxidative modification of proteins during aging. *Exp. Gerontol.* 36: 1495–1502.
- Levy, J.H. 1996. The human inflammatory response. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 27: S31–37.
- Lima, C.F., Fernandes-Ferreira, M. and Pereira- Wilson, C. 2006. Phenolic compound protect HepG2 cells from oxidative damage: Relevance of glutathione levels. *Life Sci.* 79: 2056–2068.
- Lio, M., Ono, Y., Kai, S. and Fukumoto, M. 1986. Effects of flavonoids on xanthine oxidation as well as on cytochrome c reduction by milk xanthine oxidase. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo).* 32: 635–642.
- Loguercio, C. and Federico, A. 2003. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radical Biol. Med.* 34: 1–10.
- Luper, S. 1998. A review of plants used in the treatment of liver disease: Part 1. *Altern. Med. Rev.* 3: 410–421.
- Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B. 1970. The systematic identification of flavonoids. New York: Springer-Verlag.
- Mai, H.D.T., Minh, H.N.T., Pham, V.C., Bui, K.N., Nguyen, V.H. and Chau, V.M. 2011. Lignans and other constituents from the roots of the Vietnamese medicinal plant *Pseuderanthemum palatiferum*. *Planta. Med.* 77: 951–954.

- Matsuoka, K., Nakazawa, T., Nakamura, A., Honda, C., Endo, K. and Tsukada, M. 2008. Study of thermodynamic parameters for solubilization of plant sterol and stanol in bile salt micelles. *Chem. Phys. Lipids*. 154: 87-93.
- Maried, P. 2009. Role of free radicals in liver diseases. *Hepato. Int.* 3: 526-536.
- Middleton, E.J. 1998. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv. Exp. Med. Biol.* 439: 175–182.
- Miller, C.J. 2008. The role of protein kinase A in hypoxia-induced PC-12 cell death. (Doctoral Thesis). University of Louisville. 100.
- Morel, Y., Mermod, N. and Barouki, R. 1999. An autoregulatory loop controlling *CYP1A1* gene expression: Role of H₂O₂ and NFI. *Mol. Cell. Biol.* 19: 6825–6832.
- Morisco, F., Vitaglione, P., Amoruso, D., Russo, B., Fogliano, V. and Caporaso, N. 2008. Foods and liver health. *Mol. Aspects Med.* 29: 144–150.
- Muriel, P. 2009. Role of free radicals in liver diseases. *Hepatol. Int.* 3: 526-536.
- Nagata, K., Suzuki, H. and Sakaguchi, S. 2007. Common pathogenic mechanism in development progression of liver injury caused by non-alcoholic or alcoholic steatohepatitis. *J. Toxicol. Sci.* 32: 453–468.
- Najemnik, C., Sinzinger, H. and Kritz, H. 1999. Endothelial dysfunction, atherosclerosis and diabetes. *Acta. Med. Austriaca.* 26: 148–153.
- Narayanan, V.S., Fitch, C.A. and Levenson, C.W. 2001. Tumor suppressor protein p53 mRNA and subcellular localization are altered by changes in cellular copper in human HepG2 cells. *J. Nutr.* 131: 1427–1432.
- Nijveldt, R.J., Nood, E.V., van Hoorn, D.C., Boelens, P.G., van Norren, K. and van Leeuwen, P.A. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 74: 418–425.
- Nishikimi, M. 1975. Oxidation of ascorbic acid with superoxide anion generated by the xanthine-xanthine oxidase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63: 463-468.
- Novo, E. and Parola, M. 2008. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrog. Tissue Repair.* 13: 5-23.

- Nyska, A., Moomaw, C.R., Lomnitski, L. and Chan, P.C. 2001. Glutathione S-transferase pi expression in forestomach carcinogenesis process induced by gavage-administered 2,4-hexadienal in the F344 rat. *Arch. Toxicol.* 75: 618–624.
- Oanh, L.T. 1999. Investigation of some biochemical characters of proteolytic activity of *Pseuderanthemum palatiferum*. *J. Mater. Med.* 4(1): 13–17.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 351–358.
- Panda, S., Jafri, M., Kar, A. and Meheta, B.K. 2009. Thyroid inhibitory, antiperoxidative and hypoglycemic effects of stigmasterol isolated from *Butea monosperma*. *Fitoterapia.* 80 (2): 123–126.
- Padee, P., Nualkaew, S., Talubmook, C. and Sakuljaitrong, S. 2010. Hypoglycemic effect of a leaf extract of *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 132: 491–496.
- Paolini, M., Pozzetti, L., Pedulli, G.F., Marchesi, E., Cantelli-Forti, G. 1999. The nature of prooxidant activity of vitamin C. *Life Sci.* 64: PL273–278.
- Pietrangelo, A., Borrella, F., Casalgraudi, G. Montosi, G., Ceccarelli, D., Gallesi, D., Giovannini, F., Gasparetto, A. and Masini, A. 1995. Antioxidant activity of silibinin in vivo during long-term iron overload in rats. *Gastroenterology.* 109: 1941–1949.
- Podmore, I.D., Griffiths, H.R., Herbert, K.E., Mistry, N., Mistry, P. and Lunec, J. 1998. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature.* 392: 559.
- Plumb, D.C. 2002. *Veterinary drug handbook*. 4th ed. Iowa: Iowa State Press. 387-389.
- Prior, R.L. and Cao, G. 1999. *In vivo* total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods. *Free Radic. Biol.* 27: 1173-1181.
- Qi, H., Siu, S.O., Chen, Y., Han, Y., Chu, I.K., Tong, Y., Lau, A.S.Y. and Rong, J. 2010. Senkyunolides reduce hydrogen peroxide-induced oxidative damage in human liver HepG2 cells via induction of heme oxygenase-1. *Chem. Biol. Interact.* 183: 380–389.
- Rao, M.V. and Davis, K.R. 2001. The physiology of ozone induced cell death. *Planta.* 213: 682–690.

- Recknagel, R.O. and Glende, E.A.Jr. 1977. Lipid peroxidation : A specific form of cellular injury. In: Handbook of Physiology. D.H.K. Lee (ed.). Maryland: Williams and Wilkins. 591-601.
- Reddy, J. K. and Rao, M.S. 2006. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 290: 852-858.
- Reddy, B.S., Reddy, R.K.K., Reddy, B.P., Ramakrishna, S. and Diwan, P.V. 2008. Potential in vitro antioxidant and protective effects of *Soymida febrifuga* on ethanol induced oxidative damage in HepG2 cells. Food Chem. Toxicol. 46: 3429–3442.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radic. Biol. Med. 20: 933–956.
- Rodrigues, M.R., Rodriguez, D., Russo, M. and Campa, A. 2002. Macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 292: 869–873.
- Rueff, J., Laires, A., Borba, H., Chaveca, T., Gomes, M.I. and Halpern, M. 1986. Genetic toxicology of flavonoids: The role of metabolic conditions in the induction of reverse mutation, SOS functions and sister-chromatid exchanges. Mutagenesis. 1: 179-183.
- Rush, G. F., Gorski, J. R., Ripple, M. G., Sowinski, J., Bugelski, P. and Hewitt, W. R. 1985. Organic hydroperoxide-induced lipid peroxidation and cell death in isolated hepatocytes. Toxicol. Appl. Pharmacol. 78: 473—483.
- Samuni, A., Aronovitch, J., Godinger, D., Chevion, M. and Czapki, G. 1983. On the cytotoxicity of vitamin C and metal ions. A site-specific Fenton mechanism. Eur. J. Biochem. 137: 119–124.
- Sharma, M.K. and Buettner, G.R. 1993. Interaction of vitamin C and vitamin E during free radical stress in plasma: An ESR study. Free Radical Biol. Med. 14: 649-653.
- Shaul, P.W. 2002. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: Location, location, location. Annu. Rev. Physiol. 64: 749–774.

- Shoskes, D.A. 1998. Effect of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury: A new class of renoprotective agents. *Transplantation*. 66: 147–152.
- Shutenko, Z., Henry, Y., Pinard, E., Seylaz, J., Potier, P., Berthet, F., Girard, P. and Sercombe, R. 1999. Influence of the antioxidant quercetin in vivo on the level of nitric oxide determined by electron paramagnetic resonance in rat brain during global ischemia and reperfusion. *Biochem. Pharmacol.* 57:199–208.
- Singleton, V. and Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 144-158.
- Slinkard, K. and Singleton, V. L. 1977. Total Phenol Analysis: Automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Viticult.* 28: 49-55.
- Sorata, Y., Takahama, U. and Kimura, M. 1984. Protective effect of quercetin and rutin on photosensitized lysis of human erythrocytes in the presence of hematoporphyrin. *Biochim. Biophys. Acta.* 799: 313–317.
- Srigiridhar, K., Nair, K.M., Subramanian, R. and Singotamu, L. 2001. Oral repletion of iron induces free radical mediated alterations in the gastrointestinal tract of rat. *Mol. Cell Biochem.* 219: 91–98.
- Subir, K.D. and Vasudevana, D.M. 2007. Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sciences.* 81: 177–187.
- Thyagrajan, S.P., Jayaram, S., Gopalakrishnan, V., Han, R., Jayakumar, P. and Sripathi, M.S. 2002. Herbal medicines for liver diseases in India. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 17: S370–S376.
- Tietze, F. 1969. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27: 502-522.
- Torel, J., Cillard, J. and Cillard, P. 1986. Antioxidant activity of flavonoid and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry.* 25: 383-385.
- Tseng, T.H., Kao, E.S., Chu, H.Y., Chou, F.P., Linwu, H.W. and Wang, C.J. 1997. Hisbiscus protocatechuis acid protects against oxidative damage induced by tert-butyl hydroperoxide in rat primary hepatocytes. *Chem. Biol. Int.* 101: 137-148.

- Varbiro, G., Veres, B., Gallyas, J.R. and Sumegi, B. 2001. Direct effect of taxol on free radical formation and mitochondrial permeability transition. *Free Radic. Biol. Med.* 31: 548–558.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160: 1–40.
- Victoria, K. 1994. Review of the genotoxicity of nitrogen oxides. *Mutat. Res.* 317: 43–55.
- Watjen, W., Michels, G., Steffan, B.R., Niering, P., Chovolou, Y., Kampkotter, A., Tran-Thi, Q.H., Proksch, P. and Kahl, R. 2004. Low concentrations of flavonoids are protective in Rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. *J. Nutr.* 135: 525-531.
- Watson, P.J., Scott, L., Smith, N. and Marlin, D.J. 2002. The use of S-adenosylmethionine in cats and dogs with liver disease. In: *Proceedings of the 12th ECVIM-CA/ESVIM Congress*. Munich, Germany, September 19-21: 178.
- Wattenberg, L.W. 1992. Inhibition of carcinogenesis by mimor dietary constituents. *Cancer Res.* 52: 2085-2091s.
- Welder, A.A. and Acosta, D. 1994. Enzyme leakage as an indicator of cytotoxicity in culture cells. In: *In vitro toxicity indicators: Methods in toxicology*. C.A. Tyson and J.M. Franzier (ed.). New York: Academic press. 46–49.
- Willcox, J.K., Ash, S.L. and Catignani, G.L. 2004. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 44: 275–295.
- Williamson, G., Day, A.J., Plumb, G.W. and Couteau, D. 2000. Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates. *Biochem. Soc. Trans.* 28: 16–22.
- Wormser, U., Sintov, A., Brodsky, B. and Nyska, A. 2000. Topical iodine preparation as therapy against sulfur mustard-induced skin lesions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 169: 33–39.
- Wu, D. and Cederbaum, A.I. 2008. Development and properties of HepG2 cells that constitutively express CYP2E1. *Methods Mol. Biol.* 447: 137-150.

- Yang, C.H., Shen, H.N. and Ong, C.N. 1999. Protective effect of Ebselen against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and DNA damage in HepG2 Cells. *Biochem. Pharmacol.* 57: 273–279.
- Yokomizo, A. and Moriwaki, M. 2006. Effects of uptake of flavonoids on oxidative stress induced by hydrogen peroxide in human intestinal Caco-2 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70(6): 1317-1324.
- Yoshino, M. and Murakami, K. 1998. Interaction of iron with polyphenolic compounds: Application to antioxidant characterization. *Anal. Biochem.* 257: 40-44.
- Zeashan, H., Amresh, G., Singh, S. and Rao, C.V. 2009. Hepatoprotective and antioxidant activity of *Amaranthus spinosus* against CCl₄ induced toxicity. *J. Ethnopharmacol.* 125: 364-366.
- Zhao, G.-R., Xiang, Z.-J., Ye, T.-X., Yuan, Y.-J. and Guo, Z.-X.. 2006. Antioxidant activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*. *Food Chem.* 99: 767–774.
- Zhao, Y., Li, H., Gao, Z., Gong, Y. and Xu, H. 2006. Effects of flavonoids extracted from *Scutellaria baicalensis* Georgi on hemin-nitrite-H₂O₂ induced liver injury. *Eur. J. Pharmacol.* 536: 192-199.
- Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64: 555–559.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

การคำนวณหาค่า EC_1 (equivalent concentration 1)

Equivalent concentration 1 (EC_1) หมายถึง ความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชันที่มีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} -TPTZ ได้เท่ากับ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 mM

จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ($FeSO_4$)

สมการ $y = 17.807x + 0.2688$

เมื่อ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm

x คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน $FeSO_4$

เลือก $FeSO_4$ ที่ความเข้มข้น 0.05 mM เพื่อหาค่าการดูดกลืนแสง

แทนค่า $x = 0.05$ ในสมการ $y = 17.807(0.05) + 0.2688$

ได้ค่า $y = 1.1591$

จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารสกัด

สมการ $y = 0.0024x + 0.2639$

หาความเข้มข้นของสารสกัดที่มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.1591

แทนค่า $y = 1.1591$ ในสมการ $1.1591 = 0.0024x + 0.2639$

ได้ค่า $x = 373 \mu\text{g/mL}$

$FeSO_4$ 0.05 mM ให้ค่าการดูดกลืนแสงเทียบเท่ากับสารสกัด 373 $\mu\text{g/mL}$

ดังนั้น $FeSO_4$ 1 mM จะให้ค่าการดูดกลืนแสงเทียบเท่ากับสารสกัด $\frac{373 \times 1}{0.05} = 7,460 \mu\text{g/mL}$

จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ ascorbic acid

สมการ $y = 0.0292x + 0.2568$

หาความเข้มข้นของ ascorbic acid ที่มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.1591

แทนค่า $y = 1.1591$ ในสมการ $1.1591 = 0.0292x + 0.2568$

ได้ค่า $x = 30.9 \mu\text{g/mL}$

FeSO₄ 0.05 mM ให้ค่าการดูดกลืนแสงเทียบเท่ากับ ascorbic acid 30.9 μg/mL

ดังนั้น FeSO₄ 1 mM จะให้ค่าการดูดกลืนแสงเทียบเท่ากับ ascorbic acid $\frac{30.9}{0.05} \times 1 = 618$ μg/mL

ดังนั้น ascorbic acid มี reducing power มากกว่าสารสกัด $\frac{7,460}{618} = 12.07$ เท่า

618

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุภาภรณ์ อุดมทรัพย์ เกิดเมื่อวันที่ 27 ธันวาคม พ.ศ. 2523 ที่ จ.เชียงราย สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สัตวแพทยศาสตรบัณฑิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ในปี พ.ศ. 2548 หลังจากนั้นทำงานเป็นอาจารย์ที่มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย และลาเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชวิทยาทางสัตวแพทยศาสตร์ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2552