



# วิทยานิพนธ์

ผลของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจร  
ต่อความเครียดจากภาวะออกซิเดชันและการเปอร์ออกซิเดชัน  
ของไขมันในไก่เนื้อ

**THE EFFECTS OF CRUDE EXTRACTS FROM *CURCUMA*  
*LONGA* AND *ANDROGRAPHIS PANICULATA* ON  
OXIDATIVE STRESS AND LIPID PEROXIDATION  
IN BROILERS**

นางสาวฐานิดา ศรีหาวงศ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550



## ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (สัตววิทยาทางสัตว์)

ปริญญา

สัตววิทยาทางสัตว์

สัตววิทยา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ผลของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรต่อความเครียดจากภาวะออกซิเดชันและการเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในไก่เนื้อ

The Effects of Crude Extracts from *Curcuma longa* and *Andrographis paniculata* on Oxidative Stress and Lipid Peroxidation in Broilers

นามผู้วิจัย นางสาวฐานิดา ศรีawangค์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชนินทร์ ศิริวัฒนวานิช, Ph.D. )

กรรมการ

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์ หม่อมหลวงสุนทรานี ทองใหญ่, Dr.3<sup>eme</sup>Cycle )

กรรมการ

( รองศาสตราจารย์สุภาพร อิศริโยดม, D.Agr. )

หัวหน้าภาควิชา

( รองศาสตราจารย์อภัสสรา ชูเทศะ, Ph.D. )

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( รองศาสตราจารย์วินัย อากงหาญ, M.A. )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. ....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรต่อความเครียดจากภาวะออกซิเดชัน  
และการเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในไก่เนื้อ

The Effects of Crude Extracts from *Curcuma longa* and *Andrographis paniculata*  
on Oxidative Stress and Lipid Peroxidation in Broilers

โดย

นางสาวฐานิดา ศรีหาวงศ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สรีรวิทยาทางสัตว์)

พ.ศ. 2550

ฐานิดา ศรีหาวงศ์ 2550: ผลของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรต่อความเครียดจากภาวะออกซิเดชันและการเปอร็อกซิเดชันของไขมันในไก่เนื้อ ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (สัตววิทยาทางสัตว) สาขาสัตววิทยาทางสัตว ภาควิชาสัตววิทยา ปรธานกรรการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชนินทร์ ติรวฒนวนานิช, Ph.D. 103 หน้า

ปัญหาสำคัญในการเลี้ยงไก่เนื้อที่พบได้บ่อยคือ ความเครียด ซึ่งมีผลทำให้ร่างกายเสียสมดุลรีดอกซ์ทำให้เซลล์เกิดความเครียดจากภาวะออกซิเดชัน ดีเอ็นเอถูกทำลาย เกิดการเปอร็อกซิเดชันของไขมันและทำให้เซลล์ตาย หากสามารถควบคุมสมดุลรีดอกซ์ไว้ได้ ความเสียหายในกรณีดังกล่าวก็จะไม่เกิดขึ้น ดังนั้นจึงทำการศึกษาผลของสารสกัดหยาบสมุนไพรขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรต่อความเครียดจากภาวะออกซิเดชันและการเปอร็อกซิเดชันของไขมันในไก่เนื้อ โดยใช้ไก่อายุ 1 วัน จำนวน 200 ตัว แบ่งเป็น 4 กลุ่มได้รับอาหารแตกต่างกัน ดังนี้ N: อาหารควบคุม P: อาหารควบคุมเสริมด้วยเพรดนิโซโลน 3 ม.ก./อาหาร 1 ก.ก CP: อาหารควบคุมเสริมด้วยเพรดนิโซโลน 3 ม.ก./อาหาร 1 ก.ก.และผสมด้วยสมุนไพรขมิ้นชันระดับร้อยละ 0.05 ของอาหารและ AP: อาหารควบคุมเสริมด้วยเพรดนิโซโลน ปริมาณ 3 ม.ก./อาหาร 1 ก.ก.และผสมด้วยสมุนไพรฟ้าทะลายโจรระดับร้อยละ 0.1 ของอาหาร สุ่มคัดเลือกไก่กลุ่มละ 12 ตัว ที่อายุ 14 21 และ 28 วัน เก็บเลือดเพื่อ 1) ศึกษาาระดับของอัตราส่วนเซลล์เฮเทอโรฟิลล์ต่อลิมโฟไซต์ (H/L Ratio) สำหรับเป็นดัชนีบ่งชี้ความเครียด 2) วัดความสามารถรวมในการรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระ (TAC) โดยวิธีการรีดิวซ์เหล็กเฟอริก (FRAP) 3) วัดระดับของอัตราส่วนรีดิวซ์กลูตาไธโอนต่อออกซิไดซ์กลูตาไธโอน (GSH/GSSG Ratio) และ 4) ความเข้มข้นของมาลอนไดอัลดีไฮด์ (MDA) ซึ่งเป็นดัชนีบ่งชี้ความเครียดจากภาวะออกซิเดชันและการเปอร็อกซิเดชันของไขมัน

ผลการศึกษา H/L Ratio พบว่าไก่เนื้อที่อายุ 14 วัน กลุ่ม P มี H/L Ratio สูงกว่ากลุ่ม N อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < .05$ ) ผลการศึกษาค่า TAC พบว่าไก่เนื้อที่อายุ 14 วัน กลุ่ม AP มีค่า TAC สูงกว่ากลุ่ม N อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < .05$ ) และที่อายุ 28 วัน พบว่า กลุ่ม CP และ AP มีค่า TAC สูงกว่ากลุ่ม N และ P อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < .05$ ) ผลการศึกษา GSH/GSSG Ratio ที่อายุ 14 วันบ่งชี้ว่ากลุ่ม P มีค่าต่ำกว่า กลุ่ม AP, N และ CP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < .05$ ) ซึ่งที่อายุ 21 และ 28 วันความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจะพบใน กลุ่ม N และ CP เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม P ( $P < .05$ ) แต่ไม่พบในกลุ่ม AP เมื่อเปรียบเทียบค่า MDA ในพลาสมา พบว่าไก่เนื้อที่อายุ 14 และ 21 วัน กลุ่ม CP มีค่า MDA ต่ำกว่ากลุ่ม P อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < .05$ ) และ ที่อายุ 28 วัน กลุ่ม N, CP และ AP มีค่า MDA ต่ำกว่ากลุ่ม P อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < .05$ ) จากผลการทดลองพบว่าเพรดนิโซโลน สามารถชักนำให้เกิดความเครียด ซึ่งมีผลกระทบต่อความสามารถรวมในการรีดิวซ์ สารอนุมูลอิสระ ซึ่งมีส่วนสัมพันธ์กับระบบกลูตาไธโอนทำให้เกิดความเครียดจากภาวะออกซิเดชันและการเปอร็อกซิเดชันของไขมันในไก่เนื้อ ขณะที่สารสกัดหยาบสมุนไพรขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรมีบทบาทในการควบคุมสมดุลรีดอกซ์และการเกิดเปอร็อกซิเดชันของไขมันในไก่เนื้อที่อยู่ภายใต้สภาวะเครียดได้

Thanida Srihawong 2007: The Effects of Crude Extracts from *Curcuma longa* and *Andrographis paniculata* on Oxidative Stress and Lipid Peroxidation in Broilers. Master of Science (Animal Physiology), Major Field: Animal Physiology, Department of Physiology. Thesis Advisor: Assistant Professor Chanin Tirawattanawanich, Ph.D. 103 pages.

One of the crucial health problems of broilers reared under intensive farming system is stress, particularly the chronic one that affects cellular redox balance rendering the cells to oxidative stress, DNA damage, lipid peroxidation, and apoptosis. In attempt to reduce such damages and loss in poultry industry, a possible role of crude extracts of *Curcuma longa* and *Andrographis paniculata* in minimizing the oxidative stress and lipid peroxidation was examined. Two hundred day-old broiler chicks were divided into 4 groups receiving basal diet with 1 of the 4 different supplements; N: no supplement; P: 3 mg/kg prednisolone; CP: 3 mg/kg prednisolone and 0.05% *Curcuma longa*; AP: 3 mg/kg prednisolone and 0.1% *Andrographis paniculata*. At 14, 21 and 28 days of age, 12 broilers from each group were randomly selected for examinations of 1) heterophil to lymphocyte ratios as a stress index, 2) total antioxidant capacity (TAC), using ferric reducing ability of plasma, 3) reduced glutathione to oxidized glutathione (GSH/GSSG Ratios) and 4) plasma malondialdehyde (MDA) as the oxidative stress and lipid peroxidation index.

Result showed that the birds P group expressed a significantly higher stress level than those in N group ( $P < .05$ ) at 14 days of age, suggesting that 3 mg/kg prednisolone could successfully induce stress. Such effect however was not found in CP and AP group. This might suggest that the herb supplements could have beneficial effect in stress control in broilers. At day 14, the TAC of the birds in AP group was found higher than those in N group ( $P < .05$ ). The higher TAC was also detected at day 28 in CP group and AP group compared to N and P group ( $P < .05$ ). At day 14, the GSH/GSSG Ratios of the birds in P group was found lower than those in group AP, N and CP group ( $P < .05$ ) while at day 21 and 28, the significance was found when compared to N and CP group ( $P < .05$ ) but not AP group. When compared to plasma MDA of the birds in P group, the significance lower levels were found in CP group at days 14, 21 and 28 ( $P < .05$ ). Such significance was found as well extended to N and AP group at day 28 ( $P < .05$ ). It could be suggested that stress induced by prednisolone negatively affected the antioxidant capacity particularly that associated with glutathione antioxidant system thereby rendering broilers to oxidative stress and lipid peroxidation. From these finding, some potential roles of crude extracts of *Curcuma longa* and *Andrographis paniculata* in stress control and redox homeostasis in broilers could also be suggested.

---

Student's signature

---

Thesis Advisor's signature

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ทุกท่านที่กรุณาประสิทธิ์ประสาทวิชาการต่างๆ ให้แก่ข้าพเจ้า โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.ชรินทร์ ติรวัฒนวานิช ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำในระหว่างการดำเนินการวิจัยมาโดยตลอด รวมทั้งตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์สัตวแพทย์หญิง ดร.ม.ล.สุนทรานี ทองใหญ่ กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก รองศาสตราจารย์ ดร.สุภาพร อีสริโยคม กรรมการวิชาการ และ ดร.ธีราพร อนันตเศรษฐกุล ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัยที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. งามพ้อง คงคาทิพย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สารสกัดหายากจากสมุนไพรขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจร ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาบัณฑิตวิทยาลัย แห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ทุนสนับสนุนในการวิจัยและโรงฟักไข่หนองจอก จ. กรุงเทพฯ ที่ให้ความอนุเคราะห์ลูกไก่เนื้อ

ขอกราบขอบพระคุณ นายสุรชัย จารุเดชา ผู้อำนวยการกองกิจการนิสิต นายพรเทพ ราชรุจิทอง หัวหน้าฝ่ายบริการและสวัสดิการนิสิต นายสุริยา แก้วรอดฟ้า หัวหน้างานหอพัก และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้โอกาสข้าพเจ้าในการศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษา ตลอดจนเพื่อนร่วมงาน เพื่อนๆ นิสิตปริญญาโทและผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องแต่ไม่ได้เอ่ยนามทุกท่าน ที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจแก่ข้าพเจ้ามาโดยตลอด

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณครอบครัวข้าพเจ้า โดยเฉพาะคุณพ่อกริช และคุณแม่สุกนิจ ศรีหาวงศ์ ที่เป็นพลังและกำลังใจสำคัญที่สุดของชีวิต สุดท้ายนี้ คุณค่าและประโยชน์จากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ขอมอบแด่ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และที่สำคัญยิ่งวงการการเลี้ยงสัตว์ของประเทศไทย เพื่อเป็นแนวทางในการนำสมุนไพรไทยมาใช้ให้เกิดประโยชน์ในอนาคตต่อไป

ฐานิดา ศรีหาวงศ์

พฤษภาคม 2550

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	39
อุปกรณ์	39
วิธีการ	42
ผลและวิจารณ์	47
สรุปและข้อเสนอแนะ	60
สรุป	60
ข้อเสนอแนะ	61
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	62
ภาคผนวก	90
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	103

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ROS RNS และอนุมูลอิสระอื่นๆที่พบในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง	6
2	อัตราส่วนของเฮทเทอโรฟิลต่อลิพิด	48
3	ค่าความสามารถรวมของสารต้านอนุมูลอิสระในการรีดิวซ์เหล็กเฟอร์ริก	50
4	ความเข้มข้นของ tGSH GSH GSSG และ อัตราส่วนของ GSH/GSSG	51
5	ความเข้มข้นของมาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde)	55

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	วิธีการสร้างและการกำจัด reactive oxygen species (ROS)	5
2	ขบวนการฟาโกไซโตซิส และการสร้างและการสลายสารอนุมูลอิสระ	7
3	โครงสร้างของเอ็นไซม์ NADPH oxidase ในเซลล์นิวโทรฟิล	8
4	ปฏิกิริยาการเปลี่ยนซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน ไปเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยการทำงานของเอ็นไซม์ ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส	10
5	ปฏิกิริยาการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไปเป็นน้ำ โดยการทำงานของเอ็นไซม์คาตาเลส	11
6	ปฏิกิริยาการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไปเป็นน้ำโดยการทำงานของเอ็นไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส	11
7	บทบาทของวิตามินซีในการกำจัด ROS	12
8	การรักษาสมดุลของระบบกลูตาไธโอน	15
9	โครงสร้างของวิตามินอีและกลไกการให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่ lipid radical	16
10	โครงสร้างของ carotenoids ที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ	16
11	ปฏิกิริยาของไฮดรอกซิล เรดิคัลกับ กวานีน	18
12	บริเวณของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ถูกอนุมูลอิสระเข้าทำปฏิกิริยา	20
13	กลไกแสดงการเกิดกระบวนการเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน	22
14	โครงสร้าง MDA	22
15	โครงสร้าง HNE	22
16	วิธีการเกิดอนุมูลอิสระที่เป็นอันตรายต่อสารชีวโมเลกุลและการกำจัดอนุมูลอิสระ	24
17	ไขมันชั้น	25
18	โครงสร้างหลักของเคอร์คิวมินและอนุพันธ์ที่สกัดแยกได้จากไขมันชั้นและคุณสมบัติ	26
19	กลไกการกำจัดลิปิดเปอร์ออกไซด์ของเคอร์คิวมิน	29
20	ฟ้าทะลายโจร	32
21	โครงสร้างทางเคมีของฟ้าทะลายโจร	34

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
22	กลไกแสดงการทำปฏิกิริยาระหว่าง neoandrographolide และ superoxide	35
23	ปฏิกิริยาระหว่าง TPTZ กับ $Fe^{2+}$	44
24	ปฏิกิริยาการวิเคราะห์ GSH และ/หรือ GSSG ด้วยวิธี enzymatic recycling method	45
25	ปฏิกิริยาระหว่าง TBA และ MDA	46
26	กราฟแสดงความเข้มข้นของ tGSH GSH GSSG และ GSH/GSSG	56
27	กราฟแสดง H/L Ratios TAC GSH/GSSG และ MDA	57
28	เสนอกฎไกแสดงการตอบสนองของร่างกายต่อความเครียดจากภาวะออกซิเดชั่น โดยการชักนำด้วยเพรดนิโซโลน	58
29	เสนอกฎไกแสดงการตอบสนองของร่างกายต่อความเครียดจากภาวะออกซิเดชั่น เมื่อได้รับสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรร่วมกับเพรดนิโซโลน	59
<b>ภาพผนวกที่</b>		
1	ปฏิกิริยาระหว่าง TPTZ กับ $Fe^{2+}$	91
2	กราฟมาตรฐานแสดงความเข้มข้นของเหล็กเฟอริก	94
3	ปฏิกิริยาระหว่าง TBA และ MDA	94
4	กราฟมาตรฐานแสดงความเข้มข้น malondialdehyde (MDA)	97
5	ปฏิกิริยาการวิเคราะห์ GSH และ/หรือ GSSG ด้วยวิธี enzymatic recycling method	98
6	กราฟมาตรฐานแสดงความเข้มข้น tGSH	101
7	กราฟมาตรฐานแสดงความเข้มข้น GSSG	102

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

5-LO	=	5-lipoxygenase
BH <sub>4</sub>	=	Tetrahydrobiopterin
CAT	=	Catalase
Cu,Zn-SOD	=	Copper, Zinc superoxide dismutase
DTNB	=	5,5'-dithiosbis-(2-nitrobenzoic acid)
ECSOD	=	Extra Cellular Superoxide dismutase
eNOS	=	endothelium Nitric Oxide Synthetase
FAD	=	Flavin Adenine Dinucleotide
FMN	=	Flavin Mononucleotide
FRAP	=	Ferric reducing Ability of Plasma
GCS	=	Glutamyl cysteine synthetase
GPx	=	Glutathione peroxidase
GR	=	Glutathione reductase
GSH	=	Reduced glutathione
GSSG	=	Glutathione disulfide/Oxidized glutathione
GST	=	Glutathione-s-Transferase
GSH/GSSG	=	Reduced/Oxidized glutathione
H/L	=	Heterophil/Lymphocyte
HOCl	=	Hypochlorous acid
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	=	Hydrogen peroxide
iNOS	=	inducible Nitric Oxide Synthetase
LOOH	=	Lipid hydroperoxide
MnSOD	=	Manganese Superoxide dismutase
mRNA	=	messenger Ribonucleic acid
MDA	=	Malondialdehyde
NO	=	Nitric Oxide
NOS	=	Nitric Oxide Synthetase
nNOS	=	neuronal Nitric Oxide Synthetase

**คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)**

NADPH	=	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
$\text{NO}^+$	=	Nitrosonium cation
$\text{NO}^-$	=	Nitroxyl anion
$\text{ONOO}^-$	=	Peroxynitrite
$\text{O}_2^-$	=	Superoxide anion radical
$\cdot\text{OH}$	=	Hydroxyl radical
ROS	=	Reactive Oxygen Species
SOD	=	Super oxide dismutase
TPA	=	Tumor 4-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate
TBA	=	Thiobarbituric Acid
TBARS	=	Thiobarbituric acid reactive substrate
TPTZ	=	2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine
$\gamma$ -GCS	=	$\gamma$ -Glutamyl cysteine synthetase

# ผลของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรต่อความเครียดจากภาวะออกซิเดชันและการเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในไก่เนื้อ

## The Effects of Crude Extracts from *Curcuma longa* and *Andrographis paniculata* on Oxidative Stress and Lipid Peroxidation in Broilers

### คำนำ

ปัญหาสำคัญที่พบได้บ่อยในการเลี้ยงไก่เนื้อ คือ ความเครียด ซึ่งมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย เช่น อากาศร้อนชื้น การเลี้ยงอย่างหนาแน่นในระบบอุตสาหกรรม การเปลี่ยนแปลงฤดูกาล และการจัดการที่ไม่เหมาะสม เป็นต้น ร่างกายตอบสนองต่อภาวะความเครียด โดยหลั่งแคทีโคลามีน (อิพิเนฟรินและนอร์อิพิเนฟริน) ผ่านการทำงานของระบบ Sympathetic-Adrenal Medullary (SA) axis และหลั่งฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์ผ่านการทำงานของระบบ Hypothalamo-Pituitary-Adrenal (HPA) axis (Robert *et al.*, 2000) ฮอร์โมนเหล่านี้จัดเป็นฮอร์โมนความเครียดที่สำคัญที่กระตุ้นกระบวนการเมแทบอลิซึมของ คาร์โบไฮเดรต โปรตีนและไขมันในร่างกาย เพื่อให้ได้พลังงาน (Lin *et al.*, 2004) สำหรับตอบสนองต่อภาวะเครียด

ความเครียดกระตุ้นให้ร่างกายสร้างอนุมูลอิสระในระดับสูง (Dorge, 2002) ส่งผลให้ร่างกายเสียหายจากอนุมูลอิสระ (ความสมดุลระหว่างการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน) ทำให้เกิดความเครียดจากภาวะออกซิเดชัน (Sies, 1997) อนุมูลอิสระจะเข้าทำลายสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ ได้แก่ โปรตีน ดีเอ็นเอ และ ไขมัน (Dorge, 2002) เป็นเหตุให้เซลล์ทำหน้าที่ผิดปกติหรือเกิดการตายได้ (Buttke and Sandstorm, 1994) นอกจากนี้ การเสริมกลูโคคอร์ติคอยด์เป็นระยะเวลานานๆ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบว่าทำให้ไขมันเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน และ กดการทำงานของระบบเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ตับ (Ohtsuka *et al.*, 1998) เม็ดเลือดแดง (Orzechowski *et al.*, 2000) หัวใจและม้าม (Rajashree and Puvanakrishnan, 1998) กล้ามเนื้อและอวัยวะต่อมน้ำเหลือง (Pereira *et al.*, 1999) รวมทั้งกดการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันโรค (Regnier and Kelly, 1981) และเพิ่มค่าอัตราส่วนของเม็ดเลือดขาวชนิดเฮเทอโรฟิลต่อลิมโฟไซต์ (Heterophil/Lymphocyte, H/L ratio) ซึ่งเป็นดัชนีบ่งชี้ภาวะความเครียด (Gross and Siegel, 1983; Maxwell, 1993) ดังนั้นการรักษาสมาดุลรีดักชันจึงมีความสำคัญในการช่วยลดความเสียหายในระบบการเลี้ยงไก่เนื้อระดับอุตสาหกรรม การเสริมสารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ในอาหารสัตว์อาจช่วยลดความเครียดจากภาวะออกซิเดชันและการเปอร์ออกซิเดชันของไขมันได้

ขมิ้นชันมีสารเคอร์คิวมิน เป็นองค์ประกอบหลัก มีโครงสร้างเป็นสารกลุ่มฟีนอลิก ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (Masuda *et al.*, 2000) เช่น superoxide dismutase (SOD) catalase (CAT) และ glutathione peroxidase (GPx) ในตับหนู (Reddy and Lokesh, 1994a) และลดการเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในสมองหนู (Selvam *et al.*, 1995) ส่วนสมุนไพรฟ้าทะลายโจรมีโครงสร้างเป็นสารกลุ่มไดเทอร์ปีน แลคโตน เช่น neoandrographolide ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Kamdem *et al.*, 2002) ส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ SOD, CAT และ GPx และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ lipid peroxidase ในตับหนู (Trivedi and Rawal, 2001)

แม้จะมีข้อมูลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรดังกล่าวมาแล้ว แต่ยังมีข้อมูลการศึกษาในไก่เนื้อน้อยมาก ดังนั้นการศึกษานี้จึงทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรต่อความเครียดจากภาวะออกซิเดชันและการเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในไก่เนื้อ เพื่อหาแนวทางการใช้ประโยชน์ของสมุนไพรดังกล่าวในการเลี้ยงไก่เนื้อระดับอุตสาหกรรมต่อไป

## วัตถุประสงค์

1. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรต่ออัตราส่วนของเฮทเทอโรฟิลต่อลิมโฟไซต์
2. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรต่อความสามารถรวมในการรีดิวซ์สารต้านอนุมูลอิสระในพลาสมา
3. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรต่อระบบกลูตาไธโอนในเซลล์เม็ดเลือดแดง
4. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรต่อการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน

## การตรวจเอกสาร

### 1. อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระเป็นอะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอย่างน้อย 1 ตัวโคจรรอบนอกสุด อนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้เมื่อพันธะระหว่างอะตอมแตกออกและมีอิเล็กตรอนเดี่ยวคงเหลือ อิเล็กตรอนเดี่ยวนี้ทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียรต่ำและไวต่อการเกิดปฏิกิริยาสูงจึงทำปฏิกิริยากับโมเลกุลที่อยู่รอบๆ โดยดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลข้างเคียงเพื่อให้ตัวมันเสถียร โมเลกุลข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่ไม่เสถียร และเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไป เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (Fang *et al.*, 2002)

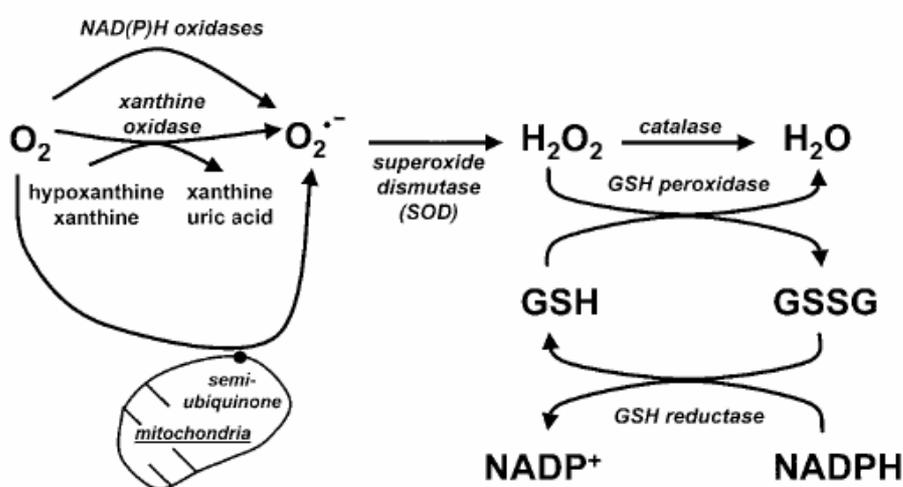
#### 1.1 อนุมูลอิสระและอนุพันธ์ของอนุมูลอิสระที่พบในสิ่งมีชีวิต

##### 1.1.1 อนุมูลอิสระที่มีออกซิเจนเป็นส่วนประกอบ (reactive oxygen species; ROS)

เริ่มต้นจากซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน (superoxide anion) เกิดจากการกระตุ้นของ เอนไซม์ NAD(P)H oxidase และ xanthine oxidase หรือ สารประกอบอื่นที่เป็นองค์ประกอบของระบบขนส่งอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรีย เช่น semi-ubiquinone (ภาพที่ 1) เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (superoxide dismutase, SOD) จะเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนจาก ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน ไปเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) (Deby and Goutier, 1990; Fridovich, 1995) และในเนื้อเยื่อเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส จะเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนจากซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนไปเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ singlet oxygen species ( $^1\Delta_gO_2$ ) ด้วย (Steinbeck *et al.*, 1993) ในสภาวะที่มี reduced transition metals เช่น เหล็กเฟอร์รัส (ferrous) หรือ คิวปรัส ไอออน (cuprous ions) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะถูกเปลี่ยนไปเป็นไฮดรอกซิลเรดิคัล (hydroxyl radical) (Chance *et al.*, 1979) นอกจากนี้ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อาจจะถูกเปลี่ยนไปเป็น น้ำ โดยเอนไซม์ คาทาเลส (catalase, CAT) หรือกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase, GPx) (ภาพที่ 1) ซึ่งในปฏิกิริยาของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส กลูตาไธโอน (glutathione, GSH) จะถูกออกซิไดซ์ไปเป็นกลูตาไธโอนไดซัลไฟด์ (glutathione disulfide) ซึ่งสามารถเปลี่ยนกลับมาเป็นกลูตาไธโอนโดยเอนไซม์กลูตาไธโอนรีดักเตส (glutathione reductase) โดยใช้ไนโคตินาไมด์ อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ ฟอสเฟต (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) จากกระบวนการ pentose phosphate pathway (ภาพที่ 1)

### 1.1.2 อนุมูลอิสระที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ (reactive nitrogen species; RNS)

ไนตริก ออกไซด์ เรดิคัล (nitric oxide radical, NO) ถูกสร้างขึ้นในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง โดยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดอะมิโนชนิด แอล-อาร์จินีน (L-arginine) ส่วนของ terminal guanido nitrogen atom (Palmer *et al.*, 1988) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดย เอนไซม์ไนตริกออกไซด์ ซินทีเทส (Nitric oxide synthetase, NOS) ในสถานะที่มีออกซิเจนและใช้โคแฟกเตอร์ดังต่อไปนี้ เช่น นิโคตินาไมด์ อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต, ฟลาวิน อะดีนีน ไดนิวคลีโอไทด์ (flavin adenine dinucleotide, FAD) ฟลาวิน โมโนนิวคลีโอไทด์ (flavin mononucleotide, FMN) ฮีม (heme), เตตระไฮโดรไบโอเพอเทริน (tetrahydrobiopterin, BH<sub>4</sub>) เอนไซม์ไนตริกออกไซด์ ซินทีเทส มีทั้งหมด 3 รูปแบบ คือ 1) neuronal Nitric Oxide Synthetase, nNOS พบในเนื้อเยื่อประสาท 2) inducible Nitric Oxide Synthetase, iNOS พบในเซลล์แมคโครฟาจ (macrophage) หลังการหลั่งสารไซโตไคน์ และ 3) endothelium Nitric Oxide Synthetase, eNOS พบในผนังเซลล์หลอดเลือด ซึ่งไนตริก ออกไซด์ เรดิคัล ที่เกิดขึ้นสามารถที่จะเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลอิสระที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบตัวอื่นๆได้ เช่น nitrosonium cation (NO<sup>+</sup>), nitroxyl anion (NO<sup>-</sup>) หรือ peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) (Stamler *et al.*, 1992)



ภาพที่ 1 วิธีการสร้างและการกำจัด reactive oxygen species (ROS)

ที่มา: Dorge (2002)

ตารางที่ 1 ROS, RNS และอนุมูลอิสระอื่นๆที่พบในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง (ดัดแปลงจาก steven and salem, 1997)

ชนิด	Radicals	Nonradicals
ROS	Superoxide, $O_2^{\cdot -}$	Hydrogen peroxide, $H_2O_2$
	Hydroxyl, $HO^{\cdot}$	Hypochlorous acid, $HOCl$
	Peroxyl, $RO_2^{\cdot}$	Ozone, $O_3$
	Alkoxy, $RO^{\cdot}$	Singlet oxygen, $^1\Delta gO_2$
	Hydroperoxyl, $HO_2^{\cdot}$	
RNS	Nitric oxide, $NO^{\cdot}$	Nitrous, $HNO_2$
	Nitrogen dioxide, $NO_2^{\cdot}$	Dinitrogen tetroxide, $N_2O_4$
		Dinitrogen trioxide, $N_2O_3$
		Peroxynitrite, $ONOO^{\cdot}$
		Peroxynitrous acid, $ONOOH$
		Nitronium cation, $NO_2^+$
		Alkyl peroxy nitrates, $ROONO$

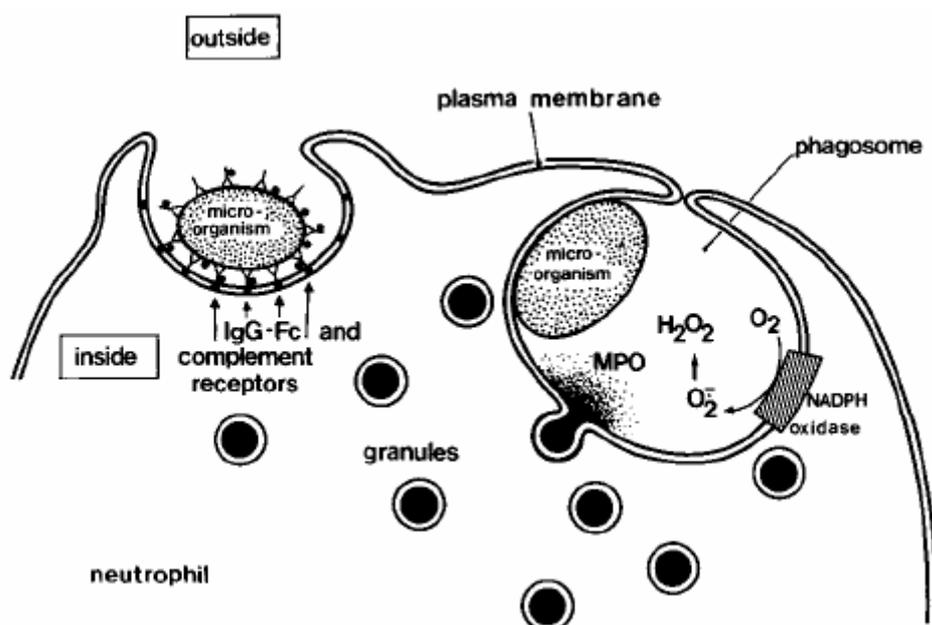
## 1.2 แหล่งของการสร้างอนุมูลอิสระ

### 1.2.1 กระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนผ่านลูกโซ่การหายใจในไมโทคอนเดรีย

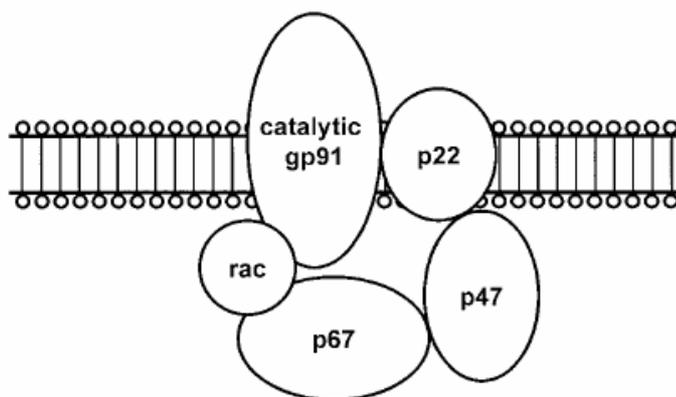
กระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนผ่านลูกโซ่การหายใจในไมโทคอนเดรียเป็นแหล่งที่สร้างอนุมูลอิสระที่มีออกซิเจนเป็นส่วนประกอบมากที่สุด โดยเริ่มต้นจากการเกิดซูปเปอร์ออกไซด์ แอนไอออนและ เปลี่ยนไปเป็น ไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ โดยการกระตุ้นของเอนไซม์ซูปเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส หรือโดยการกระตุ้นที่ผิดปกติของกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรีย ซึ่งจะเกิดขึ้นประมาณ 1-4 % ออกซิเจน ในกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจะถูกรีดิวซ์ไปเป็นอนุมูลอิสระที่มีออกซิเจนเป็นส่วนประกอบ ซึ่งบริเวณที่เกิด จะมี 2 ตำแหน่งคือ complex I (NADH Coenzyme Q reductase) และ complex II (ubiquinol cytochrome c reductase)

### 1.2.2 การออกซิเดชันของ NADPH โดยเอนไซม์ NADPH oxidase

เอนไซม์ NADPH oxidase (โครงสร้าง ดังแสดงใน ภาพที่ 3) พบกระจายทั่วไป ใน เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดฟาโกไซต์เช่น นิวโทรฟิล (neutrophil) อีโอซิโนฟิล (eosinophil) โมโนไซต์ (monocyte) และแมคโครฟาจ (macrophage) ซึ่งมีกลไกแบบไม่เฉพาะเจาะจง ในการต่อต้านเชื้อโรค เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา ยีสต์ และไมโครพลาสมา โดยการทำงานของเอนไซม์ NADPH oxidase นี้จะ กระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระชนิด ซุปเปอร์ออกไซด์ เรดิคัล (superoxide radical) ในระดับความเข้มข้นสูง จากนั้นจะเปลี่ยนไปเป็นอนุพันธ์อื่นๆ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และไฮเปอร์คลอรัส (hyperchlorous acid, HOCl) ยกตัวอย่างเช่น เมื่อเซลล์นิวโทรฟิล ฟาโกไซต์แบคทีเรีย โดยหุ้มแบคทีเรียไว้ ในแควิวโอล เอนไซม์ NADPH oxidase ที่เชื่อมหุ้มเซลล์ของแควิวโอล จะเร่งปฏิกิริยาการเกิด ซุปเปอร์ออกไซด์ เรดิคัล และเปลี่ยนไปเป็น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยการทำงานของเอนไซม์ ซุปเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส จากนั้น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จะถูกเปลี่ยนเป็นไฮเปอร์คลอรัส และไฮดรอกซิล เรดิคัล ซึ่งมีฤทธิ์มากขึ้นโดยปฏิกิริยา fenton reaction และการทำงานของเอนไซม์ myeloperoxidase ที่หลั่งมาจากแกรนูลของ นิวโทรฟิล ทั้งไฮดรอกซิล เรดิคัล และไฮเปอร์คลอรัส มีฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียโดยทำให้เซลล์แตก ดังนั้นเมื่อมีขบวนการฟาโกไซโตซิส เซลล์เม็ดเลือดขาว จะมีการใช้ออกซิเจนมาก เรียกว่า oxidative burst ซึ่งเป็นภาวะที่มีการใช้ออกซิเจนมากขึ้นเพื่อทำให้เกิดอนุมูลอิสระสำหรับกำจัดเชื้อโรคที่ได้รับจากภายนอก (เจริญศรี, 2536) ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แสดงขบวนการฟาโกไซโตซิส และการสร้างและการสลายสารอนุมูลอิสระ  
ที่มา: Roos (1991)



ภาพที่ 3 โครงสร้างของเอนไซม์ NADPH oxidase ในเซลล์นิวโทรฟิล

ที่มา: Dorge (2002)

### 1.2.3 การสร้าง ROS ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ โดยเอนไซม์ 5-lipoxygenase

เอนไซม์ 5-lipoxygenase (5-LO) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เหนี่ยวนำหรือกระตุ้นให้เกิดการสร้าง ROS ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (Bonizzi *et al.*, 2000) ซึ่ง เอนไซม์จะไปออกซิไดซ์กรดไขมันไม่อิ่มตัว ที่ตำแหน่งคาร์บอนที่จำเพาะทำให้เกิดอนุพันธ์ไขมันไฮโดรเปอร์ออกซี (hydroperoxy fatty acid) กับคอนจูเกต ไดอีน (conjugated diene) ชื่อของเอนไซม์จะจำเพาะต่อตำแหน่งที่ถูกออกซิไดซ์ เช่น 5-LO, 12-LO หรือ 15-LO ซึ่งตัวเลขจะใช้อ้างอิงถึงตำแหน่งของกรดอะเรคิไดนิก (arachidonic acid) ที่ถูกออกซิไดซ์ (Yamamoto, 1992) เป็นที่รู้ดีว่า 5-LO มีบทบาทในการสังเคราะห์ลิวโคไตรอีน (leukotrienes) A<sub>4</sub>, B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> และ E<sub>4</sub> ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการออกซิไดซ์โดยการทำงานของเอนไซม์ 5-LO พบในการเปลี่ยนแปลงสมดุลรีดอกซ์ และการเหนี่ยวนำวิถีส่งสัญญาณ (signal transduction) และการแสดงออกของยีน 5-LO เกี่ยวข้องกับการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยเซลล์ลิมโฟไซต์ หลังจากการจับที่ CD28 receptor (Los *et al.*, 1995) และตอบสนองต่อ interleukin-1β (Bonizzi *et al.*, 2000) การสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในการตอบสนองต่อการกระตุ้นของ CD28 จะลดลงโดยพบตัวยับยั้งที่จำเพาะเจาะจงต่อ 5-LO หรือ การเกิดเปอร์ออกไซด์เช่นกัน แต่ไม่ใช่ตัวยับยั้งของเอนไซม์ NADPH oxidase และ cyclooxygenase

#### 1.2.4 การสร้าง ROS โดย cyclooxygenase

เอนไซม์ cyclooxygenase-1 เกี่ยวข้องกับการสร้าง ROS ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นร่วมกับ TNF- $\alpha$ , interleukin-1, bacterial lipopolysaccharide หรือ tumor 4-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) (Feng *et al.*, 1995; Munroe *et al.* 1995)

#### 1.2.5 การออกซิเดชันของ Xanthine หรือ hypoxanthine โดยเอนไซม์ Xanthine oxidase

เอนไซม์ แชนทีน ออกซิเดส (Xanthine oxidase) จะกระตุ้นการสร้างซูเปอร์ออกไซด์ เรดิคัล โดยเปลี่ยนจากไฮโปแซนทีน (hypoxanthine) ไปเป็นแซนทีน (Xanthine) และแซนทีน ไปเป็นกรดยูริก ซึ่งเอนไซม์นี้เป็นอนุพันธ์ของเอนไซม์ แชนทีน ดีไฮโดรจีเนส (Xanthine dehydrogenase) ซึ่งในภาวะปกติเอนไซม์แซนทีน ออกซิเดส จะเป็นส่วนน้อยที่กระตุ้นให้ร่างกายสร้างอนุมูลอิสระ (Chance *et al.*, 1979) แต่อย่างไรก็ตาม อนุมูลอิสระที่ถูกสร้างขึ้นโดย เอนไซม์แซนทีน ออกซิเดส นั้นก็จะเป็นสาเหตุหลักที่นำไปสู่การเกิดความเครียดจากภาวะออกซิเดชันในสภาวะการเกิดโรค เช่น ischemia และ reperfusion (Dorge, 2002)

#### 1.2.6 การออกซิเดชันของ Monoamines เช่น dopamine

การเกิด ROS โดยการออกซิเดชันของ dopamine ในระบบประสาทส่วนกลางซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องในสภาวะที่เส้นประสาท dopaminergic neurons ถูกทำลายโดยเฉพาะการเกิดโรค Parkinson's disease (Dorge, 2002)

## 2. สารต้านอนุมูลอิสระ

เซลล์ประกอบไปด้วยเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ และโมเลกุลต้านอนุมูลอิสระ (Ames *et al.*, 1995; Yu, 1994) ซึ่งประกอบด้วย

2.1 เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น เอนไซม์ SOD ซึ่งเร่งปฏิกิริยา dismutation ของ  $O_2^{\cdot -}$  ไปเป็น  $H_2O_2$  และ CAT และ GPx ซึ่งเปลี่ยน  $H_2O_2$  ไปเป็น น้ำ

### 2.1.1 เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase, SOD)

เอนไซม์ SOD จำเป็นต่อทุกๆเซลล์ในร่างกายและมีความสำคัญในการป้องกันเซลล์จากการเกิดความเครียดจากภาวะออกซิเดชัน จากรายงานพบว่าเอนไซม์ SOD มี 3 ชนิดได้แก่ คอปเปอร์ซิงค์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (copper, zinc superoxide dismutase, Cu, Zn-SOD), แมงกานีส ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (MnSOD) และ เอ็กตราเซลล์ูลาร์ ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (SOD) ทั้ง 3 ชนิดจะมีลักษณะการทำงานที่เหมือนกันโดยเร่งปฏิกิริยาดิสมิวเทชัน (dismutation reaction) ของ ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน ดังภาพที่ 4 ไปเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Irfan *et al.*, 2006)



**ภาพที่ 4** ปฏิกิริยาการเปลี่ยนซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน ไปเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยการทำงานของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส

ก. เอนไซม์ Copper, Zinc superoxide dismutase (Cu, Zn-SOD) พบมากในไซโตซอล (Crapo *et al.*, 1980) มีโครงสร้างเป็น homodimeric protein (MWt, 32.5 kDa) และต้องการทั้งคอปเปอร์ และซิงค์ ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site) (Fridovich and Freeman, 1986) คอปเปอร์มีความจำเป็นสำหรับการเร่งปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ และ ซิงค์ทำหน้าที่รักษาโครงสร้างของโปรตีนให้มีสภาพคงที่ (Fridovich, 1975)

ข. เอนไซม์ Manganese SOD (MnSOD) โครงสร้างเป็น homotetrameric (MWt, 88 kDa) และต้องการแมงกานีสที่บริเวณเร่งปฏิกิริยา (Fridovich, 1975) มีความสำคัญในเซลล์ MnSOD มีส่วนร่วมประมาณ 10-15 % ของปริมาณ SODs ทั้งหมด พบในไมโทคอนเดรีย

ค. เอนไซม์ Extra Cellular superoxide dismutase (ECSOD) เป็นเอนไซม์ด้านอนุมูลอิสระที่มีโครงสร้างเป็นแบบ tetrameric glycoprotein (MWt, 135 kDa) และต้องการคอปเปอร์ และซิงค์สำหรับการทำงาน (Marklund, 1984) เป็นโปรตีนชนิดหลัง ประมาณ 90-99% ของ ECSOD โดยรวมพบในบริเวณ extracellular matrix (Marklund, 1984; Oury *et al.*, 1994) ECSOD จะถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยทั่วไปขึ้นอยู่กับระดับของ ECSOD mRNA ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการทำงานของมัน (Folz and Crapo, 1994)

### 2.1.2 คาตาเลส (Catalase, CAT)

เป็นเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ที่มีโครงสร้างเป็น homotetrameric protein (MWt., 240 kDa) (Fridovich and Freeman, 1986) ทำหน้าที่เปลี่ยน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเป็นน้ำ และ ออกซิเจน ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 ปฏิกริยาการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไปเป็นน้ำ โดยการทำงานของ เอนไซม์คาตาเลส

### 2.1.3 กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (Glutathione peroxidase, GPx)

กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส อยู่ในตระกูลของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระที่มี ซีลีเนียม เป็นองค์ประกอบ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่อยู่ภายในเซลล์ และนอกเซลล์ โดยทั่วไป กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส มีโครงสร้างเป็น tetrameric protein (MWt, 85 kDa) ต้องการ ซีลีเนียม 4 โมเลกุล จับเป็น seleno-cysteine ซึ่งเป็นบริเวณที่เร่งปฏิกิริยา กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส จะรีดิวซ์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเป็น น้ำ ดังภาพที่ 6 (Kinnula *et al.*, 1995) ปฏิกริยารีดักชันของออกซิไดซ์/ ไดซัลไฟด์ กลูตาไธโอน (GSSG) จะถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์กลูตาไธโอน รีดักเทส ตาม วิธีกลูตาไธโอน ดังภาพที่ 6 (Halliwell and Gutteridge, 1989) วิธีกลูตาไธโอน จะเกิดขึ้นเพื่อกลไก การป้องกันของเซลล์และการป้องกันการสูญเสีย หมู่ไทออลภายในเซลล์ (Heffner and Repine, 1989)



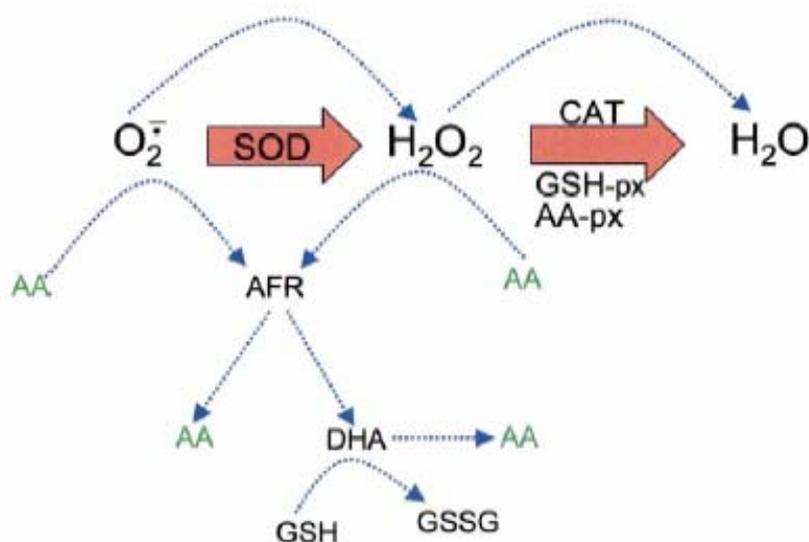
ภาพที่ 6 ปฏิกริยาการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไปเป็นน้ำโดยการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส

2.1.4 เอนไซม์ ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา reduction ของสารต้านอนุมูลอิสระในรูป ออกซิไดซ์ เช่น glutathione reductase, dehydroascorbate reductase หรือทำหน้าที่รักษา protein thiol เช่น thioredoxin reductase

## 2.2 โมเลกุลต้านอนุมูลอิสระ

2.2.1 โมเลกุลต้านอนุมูลอิสระที่ละลายได้ในน้ำ (Hydrophilic radical scavengers)  
เช่น ascorbic acid, uric acid และ glutathione (GSH)

ก. ascorbic acid หรือ Vitamin C จะอยู่ในเซลล์ สามารถจะเปลี่ยนรูปแบบเป็น oxidized (dehydro) ascorbic acid ได้ด้วยตัวเอง ซึ่งรูปแบบนี้มีความสำคัญในการทำปฏิกิริยากับ  $\alpha$ -tocopheroxyl เพื่อเปลี่ยนกลับมาเป็น  $\alpha$ -tocopherol



ภาพที่ 7 บทบาทของวิตามินซีในการกำจัด ROS

ที่มา: Oreste *et al.* (2002)

ข. กรดยูริก มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูง ในพลาสมา มีความเข้มข้นสูงถึง 10 เท่าของสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่นๆ ยกตัวอย่างเช่น วิตามินซี และวิตามินอี ซึ่งระดับของ uric acid จะอยู่ในช่วง 200-450  $\mu$ M (Ghiselli *et al.*, 2000) ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้สารอนุมูลอิสระอยู่ในสภาวะเสถียร (เช่น peroxy radical) โดยให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระก่อนที่จะเข้าทำลายสารชีวโมเลกุล (Simoyi *et al.*, 2002) ในไก่จะพบความเข้มข้นของกรดยูริกสูงซึ่งทำหน้าที่ในการป้องกันภาวะความเครียดจากภาวะออกซิเดชันและการเปอร้ออกซิเดชันของไขมัน ยับยั้งการทำลายของโปรตีนและกรดนิวคลีอิก (Ames *et al.*, 1981) โดยสารอนุมูลอิสระ ในร่างกาย

หากพบว่าความเข้มข้นของกรดยูริก ต่ำกว่าปกติ จะมีผลทำให้อัตราการเกิดโรคและการตายเพิ่มขึ้น (Klandorf *et al.*, 2001)

ค. กลูตาไธโอน (Glutathione, GSH) เป็นไตรเปปไทด์ (tripeptide) ที่ละลายน้ำได้ ประกอบด้วยกรดอะมิโน 3 ชนิด คือ กลูตามิก แอซิด (glutamic acid) ซีสเตอีน (cysteine) และ ไกลซีน (glycine) กลูตาไธโอน เป็นไธออลโมเลกุล (thiol molecule) ขนาดเล็กที่อยู่ภายในเซลล์ ในบางเนื้อเยื่อพบว่ามีค่าความเข้มข้นสูงถึงระดับมิลลิโมลาร์ กลูตาไธโอนมีคุณสมบัติเป็นตัวรีดิวซ์ (reducing agent) ที่มีความสำคัญในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งมีบทบาทในการกำจัดอนุมูลอิสระได้หลากหลายชนิดโดยเฉพาะ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยมีส่วนร่วมในการทำงานของเอนไซม์ กลูตาไธโอน-เอส-ทรานสเฟอเรส (glutathione-s-transferase, GST) และ กลูตาไธโอน เปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase, GPx) ซึ่งจะพบ กลูตาไธโอน ในเซลล์ของพืช สัตว์ เชื้อรา และพวกโพรคาริโอต บางชนิด (Anderson, 1998) นอกจากปฏิกิริยาการกำจัดอนุมูลอิสระแล้ว กลูตาไธโอน ยังมีบทบาทสำคัญในปฏิกิริยาอื่นๆ เช่น ระบบไกลออกซาลเลส (glyoxalase system) ปฏิกิริยารีดักชันของ ไรโบนิวคลีโอไทด์ (ribonucleotide) ไปเป็น ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ (deoxyribonucleotide) ควบคุมการแสดงออกของยีนและโปรตีน โดยปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงระหว่างหมู่ไธออล-ไดซัลไฟด์ (Mullineaux and Creissen, 1997)

กลูตาไธโอนภายในเซลล์จะอยู่ในรูปรีดิวซ์ (reduced form, GSH) หรือในรูป ออกซิไดซ์ (oxidized form, GSSG) การรักษาสมดุลระหว่างอัตราส่วนของ กลูตาไธโอนในรูปรีดิวซ์ ต่อรูปออกซิไดซ์ (GSH/GSSG ratio) เป็นสภาพเพื่อความอยู่รอดของเซลล์ ดังนั้นการรักษาความสมดุลของระบบนี้จึงมีความสำคัญ หากความเข้มข้นของกลูตาไธโอนในรูปรีดิวซ์ ในเซลล์ไม่เพียงพอ จะทำให้เกิดอัตราเสี่ยงต่อการเกิดความเครียดจากภาวะออกซิเดชัน (oxidative stress) ซึ่งเป็นสาเหตุให้เซลล์ได้รับความเสียหายจากภาวะออกซิเดชัน (oxidative damage) ซึ่งความไม่สมดุลของกลูตาไธโอน จะถูกพบในสภาวะการเกิดพยาธิสภาพของโรค ยกตัวอย่างเช่น มะเร็ง (cancer) neurodegenerative disorder, cystic fibrosis, CF, โรคเอดส์ (HIV) และความชราภาพ (aging) เป็นต้น (Danyelle, 2003)

#### 1) การสังเคราะห์กลูตาไธโอน

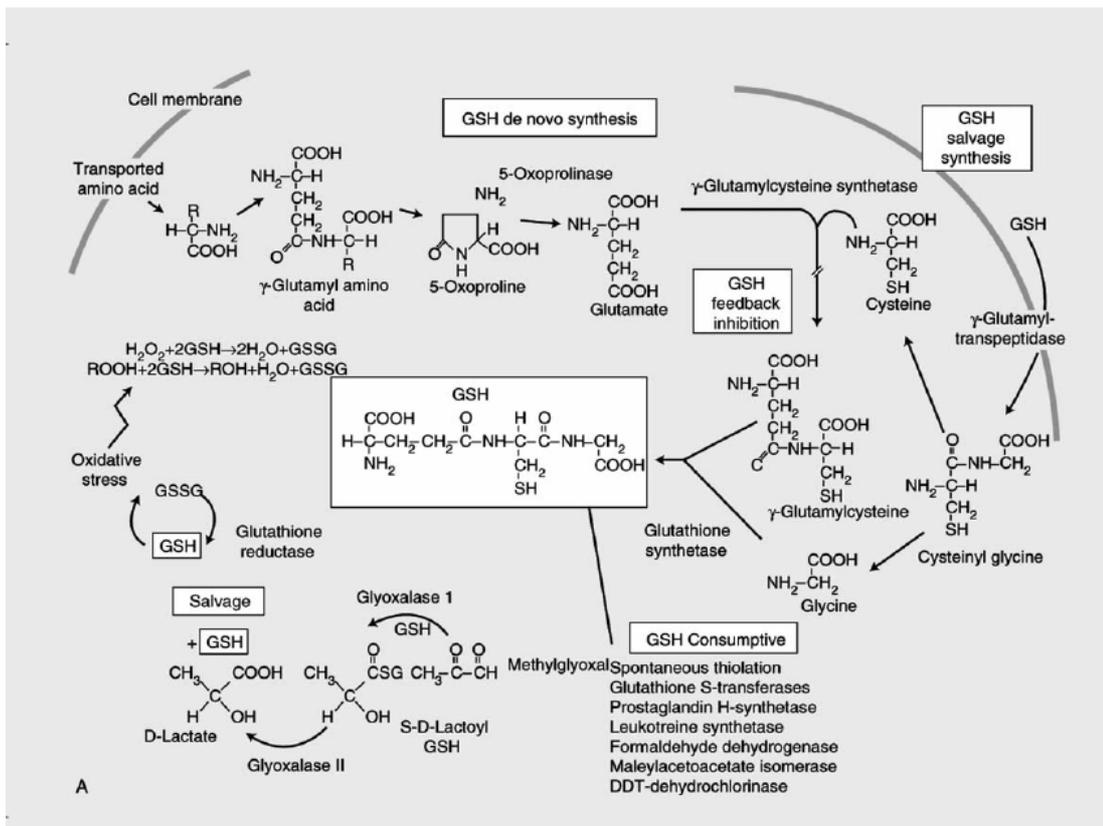
กลูตาไธโอน ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากกรดอะมิโน ไกลซีน, ซีสเตอีน (cysteine) และกลูตามิก แอซิด (glutamic acid) การสังเคราะห์กลูตาไธโอนต้องการเอนไซม์ 2 ชนิด คือ  $\gamma$ -glutamyl cysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS) และ GSH synthetase (Meister and Anderson, 1983) ดังภาพที่ 8  $\gamma$ -GCS

ประกอบด้วย เฮเทอโรไดเมอร์ (heterodimer) ของ catalytically active heavy subunit  $\gamma$ -GCS –HS (73 kDa) และ regulatory unit  $\gamma$ -GCS-LS (30 kDa) (Sierra-Rivera and Summar, 1996) การควบคุมของการทำงานเอนไซม์  $\gamma$ -GCS เป็นลักษณะที่มีความซับซ้อน ซึ่งการเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์  $\gamma$ -GCS นั้นจะแสดงออกต่อเมื่อมีการตอบสนองที่จำเพาะ ซึ่งการสังเคราะห์กลูตาไธโอนีนจะมีข้อจำกัดที่ระดับของกรดอะมิโนซิสเตอีน ซึ่งซิสเตอีนจะขนส่งเข้าสู่เซลล์ โดยจับกับโซเดียมไอออน และซิสเตอีน จะเข้าสู่เซลล์โดยไม่ต้องอาศัยตัวพา (Bannai *et al.*, 1984) สารอนุมูลอิสระ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ สารประกอบอิเล็กโตรฟิลิก (electrophilic compound) จะกระตุ้นการใช้ซิสเตอีน และกระตุ้นการแสดงออกของ เอนไซม์  $\gamma$ -GCS ซึ่งมีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์ GSH โดยเฉพาะกระบวนการฟอสโฟไรเลชัน ของ เอนไซม์  $\gamma$ -GCS นำไปสู่การยับยั้งการสังเคราะห์ GSH ซึ่งตัว GSH เองจะควบคุมการทำงานของเอนไซม์  $\gamma$ -GCS โดยกลไกการยับยั้งย้อนกลับ (feedback inhibition) ดังนั้นการขาดหายไปของ GSH จะเพิ่มการกระตุ้นอัตราการสังเคราะห์ GSH ด้วย

## 2) GSH redox cycle

สารอนุมูลอิสระ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และซูเปอร์ออกไซด์เรดิคัล เป็นต้น เป็นอันตรายต่อเซลล์ ดังนั้นร่างกายจึงมีระบบการสร้างและการกำจัดจะถูกควบคุมภายในเซลล์ โดยการทำงานของเอนไซม์ กลูตาไธโอน เปอร์ออกซิเดส ร่วมกับเอนไซม์คาทาเลส และซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส กลูตาไธโอน เปอร์ออกซิเดสจะกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ด้วยการทำงานของ GSH ซึ่งจะเป็นตัวให้อิเล็กตรอนในปฏิกิริยารีดักชัน ซึ่งจะได้กลูตาไธโอนีนในรูปออกซิดิซ ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของ GSH คือ glutathione disulfide (GSSG) ภายในเซลล์ GSSG จะเปลี่ยนกลับไปเป็น GSH โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ glutathione reductase (GR) โดยต้องการ NADPH (Danyelle, 2003) ดังภาพที่ 8

จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าอัตราส่วนของ GSH/GSSG มีบทบาทสำคัญในการควบคุมสถานะสมดุลรีดอกซ์ภายในเซลล์โดยรักษาสมดุลของไทออล/ไดซัลไฟด์ (thiol/disulfide) โดยปกติแล้วในเซลล์จะพบความเข้มข้นของ GSH ประมาณ 100 เท่าของ GSSG การเกิดออกซิเดชันของ GSH เพียงเล็กน้อยเท่านั้นก็จะทำให้อัตราส่วนเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัด และมีผลต่อสมดุลรีดอกซ์ภายในเซลล์ ยกตัวอย่างเช่น ถ้าอัตราส่วนของ GSH/GSSG เริ่มต้นที่ 100:1 และหลังจากทำให้ความเข้มข้นของ GSSG เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนของ GSH/ GSSG จะเป็น 49: 1 ในทางกลับกันจะมีความสามารถในการป้องกันเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว (Meister, 1992)

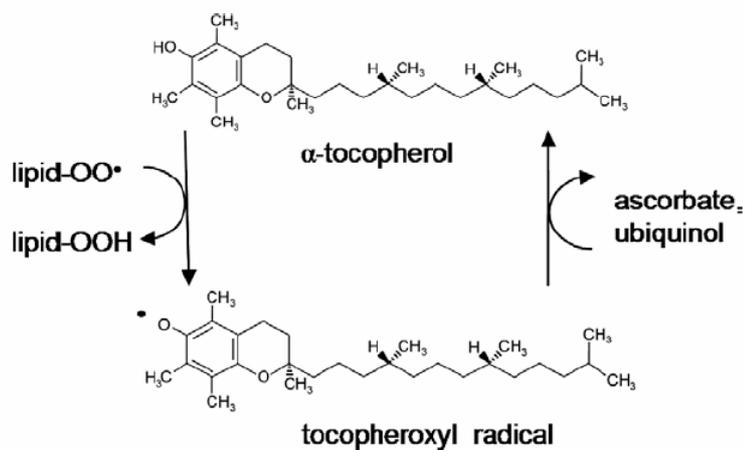


ภาพที่ 8 การรักษาสสมดุลของระบบกลูตาไธโอน

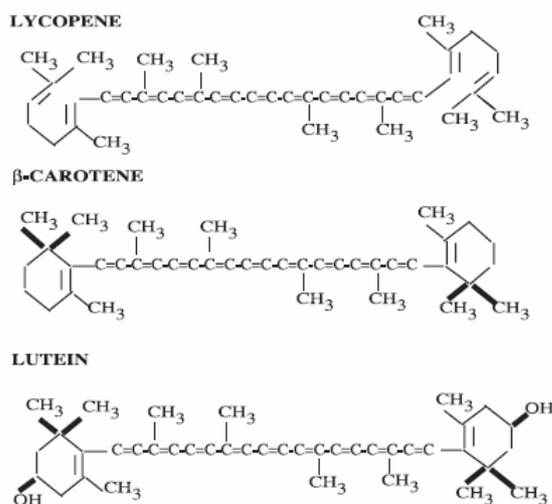
ที่มา: Danyelle (2003)

2.2.2 โมเลกุลต้านอนุมูลอิสระที่ละลายได้ในไขมัน (Lipophilic radical scavengers)

ก. Tocopherols (Vitamin E) ในร่างกายมี 4 รูปแบบ ได้แก่  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  tocopherol แต่ละรูปมีความสำคัญเนื่องจากมีคุณสมบัติต่อต้านภาวะออกซิเดชัน ได้ดีที่สุดคือ รูปแบบ  $\alpha$ -tocopherol โดยจะพบ  $\alpha$ -tocopherol นี้ในเยื่อหุ้มเซลล์ และใน plasma lipoprotein มีความสามารถที่จะจับกับอนุมูลอิสระได้ดีกว่า fatty acid โดยเฉพาะอย่างยิ่ง peroxy และ alkoxy radicals ที่เกิดระหว่างกระบวนการ lipid peroxidation และเมื่อจับกันแล้วจะเปลี่ยนรูปเป็น radical ใหม่คือ  $\alpha$ -tocopheroxyl ( $\alpha$ -tocopherol-O) ซึ่งไม่มีความไวต่อปฏิกิริยาเหมือน radical ตัวอื่นๆ และไม่ทำปฏิกิริยากับไขมันข้างเคียง  $\alpha$ -tocopheroxyl ที่เกิดขึ้นในเยื่อหุ้มเซลล์จะถูก reoxidized กลับมาเป็น  $\alpha$ -tocopherol ได้โดย dehydroascorbic acid เป็นตัวช่วยในปฏิกิริยา



ภาพที่ 9 โครงสร้างของวิตามินอีและกลไกการให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่ lipid radical  
ที่มา: Tucker and Townsend (2005)



ภาพที่ 10 โครงสร้างของ carotenoids ที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (lycopene, β-carotene, and lutein)

ที่มา: Cui *et al.* (2004)

ข. Carotenoids มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ได้เท่าเทียมกับ α-tocopherol นั่นคือสามารถแข่งทำปฏิกิริยากับ alkoxyyl และ peroxyyl radical แทนไขมันได้เช่นกัน ถึงแม้ว่าปริมาณของ carotene ในร่างกายจะน้อยกว่า α-tocopherol ถึง 50 เท่าก็ตาม

### 3. ความเครียดจากภาวะออกซิเดชัน (Oxidative stress)

การเกิดความเครียดจากภาวะออกซิเดชัน เป็นภาวะไม่ปกติของร่างกาย ซึ่งเป็นผลจากความไม่สมดุลของการสร้างและการกำจัดอนุมูลอิสระ (Halliwell and Gutteridge, 1989) การเพิ่มขึ้นของภาวะออกซิเดชัน (Oxidative stress) ที่มีการเสียสมดุลไปของสารชีวเคมีในร่างกาย ระหว่างภาวะที่ทำให้เกิดออกซิเดชัน และภาวะที่มีการต่อต้านออกซิเดชัน โดยอาจมีอนุมูลอิสระ เพิ่มขึ้น หรือสารต้านอนุมูลอิสระลดลงซึ่งส่งผลให้เกิดความเสียหายของสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบหลักของเซลล์ดังนี้

#### 3.1 ความเสียหายของดีเอ็นเอ (DNA Damage)

ROS เหนียวนาให้เกิดความเสียหายต่อ ดีเอ็นเอ ซึ่งประกอบด้วย การเปลี่ยนแปลงสายดีเอ็นเอ ลำดับเบส และนิวคลีโอไทด์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งลำดับเบสที่มีกวานโนซีน (guanosine) สูง (Burney, 1999) Oxidative modifications เหนียวนาการซ่อมแซมที่สมบูรณ์ ลักษณะการกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสและนิวคลีโอไทด์ ดีเอ็นเอ สายคู่จะกระตุ้นให้เกิดการซ่อมแซมดีเอ็นเอ

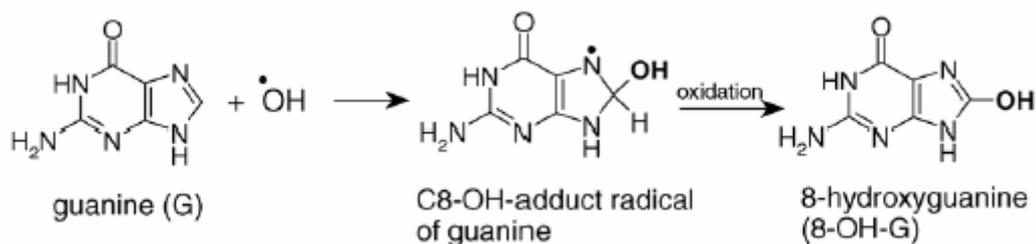
ความเสียหายของดีเอ็นเอ เกิดขึ้นโดยภาวะความเครียดจากภาวะออกซิเดชัน ซึ่งมีบทบาทต่อการเกิดโรคมะเร็ง และเป็นสาเหตุของกระบวนการชราภาพ (aging) (Kasai, 1997; Dizdaroglu, 1992; Guyton and Kensler, 1993; Feig *et al.*, 1994; Beckman and Ames, 1998) ในระบบทางชีววิทยา ดีเอ็นเอ ที่ได้รับความเสียหายจะถูกซ่อมแซมด้วยเอนไซม์ และเซลล์ก็ยังสามารถกลับมาทำหน้าที่ในภาวะปกติ อย่างไรก็ตามการซ่อมแซมที่ผิดพลาดของดีเอ็นเอที่ได้รับความเสียหายจะมีผลทำให้เกิดการ mutation เช่น การสลับลำดับเบส (base substitution) และการขาดหายของลำดับเบส (deletion) ซึ่งนำไปสู่การเกิดโรคมะเร็ง (Vineis *et al.*, 1999; Halliwell, 1998; Wang *et al.*, 1998; Poulsen *et al.*, 1998) ลำดับที่เฉพาะเจาะจงของ DNA damage มีบทบาทในการทำให้เกิดกระบวนการ mutation (matagenic processing)

ในปัจจุบันรายงานว่า ตำแหน่งของการเกิด DNA damage มีผลต่อการเกิด mutation ได้บ่อย (Hanrahan *et al.*, 1997) ดังนั้นการศึกษาลำดับเบสที่เฉพาะเจาะจงต่อการเกิด DNA damage จึงนำมาใช้ในการหาภาวะการเกิด DNA damage และมีประโยชน์ต่อการป้องกันการเกิดมะเร็ง

### 3.1.1 ตำแหน่งที่เฉพาะเจาะจงต่อการเกิด DNA damage โดยอนุมูลอิสระ

การเกิด DNA damage ส่วนหนึ่งภายในร่างกายเกิดขึ้นจากการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ (Marnett, 2000) ได้แก่ superoxide radical anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) และ hydroxyl radical (OH) และ non-radical oxidants เช่น hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), singlet oxygen ( $^1\Delta_gO_2$ ), nitric oxide (NO), lipid hydroperoxide (LOOH), alkoxy radical (RO $\cdot$ ), peroxy radical (OOH), nitrogen-centered, sulfate radical ( $SO_4^{\cdot-}$ ) และ metal-oxygen complexes ซึ่ง reactive species เหล่านี้มีความแตกต่างทาง redox potential (Neta *et al.*, 1988) และ redox potential ของอนุมูลอิสระแต่ละ species เหล่านี้ มีบทบาทที่สำคัญต่อลำดับที่เฉพาะเจาะจงต่อการเกิด DNA damage

ความสามารถในการเกิดออกซิเดชันของลำดับ DNA มีส่วนที่เกี่ยวข้องต่อการวิเคราะห์ลำดับที่เฉพาะเจาะจงของ DNA damage กวานีน (guanine) เป็นตำแหน่งที่มีการเกิดออกซิเดชันมากที่สุด ในเบสทั้ง 4 ตัว ของดีเอ็นเอ เพราะว่า oxidation potential ของ guanine (1.29 V) ต่ำกว่าเบสทั้ง 3 ตัวตามลำดับ คือ adenine (1.42 V) cytosine (1.6 V) และ thymine (1.7 V) (Burrows and Muller, 1998; Steenken and Jovanovic, 1997) การกระจายตัวของอิเล็กตรอนในปฏิกิริยาเคมีต่อเบสของ ดีเอ็นเอ เป็นปัจจัยสำคัญต่อการวิเคราะห์ความไวต่อการเกิดออกซิเดชัน



ภาพที่ 11 ปฏิกิริยาของไฮดรอกซิล เรดิคัลกับ กวานีน

ที่มา: Burrows and Muller (1998)

### 3.2 กระบวนการดัดแปลง โครงสร้างโปรตีน (Protein modification)

ออกซิเจน เรดิคัล และ ROS ตัวอื่นๆ เป็นสาเหตุทำให้เกิดกระบวนการดัดแปลงโปรตีน (Grune *et al.*, 1997) ซึ่งนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของโปรตีน คุณสมบัติทางเคมี หรือเพิ่ม

ความไวต่อการสลายของโปรตีน (proteolysis) (Davies *et al.*, 1987; Stadtman, 1993; Wolff *et al.*, 1986) จากการศึกษาพบว่า การสลายโปรตีน จะเพิ่มขึ้นหลังจากพบว่ามีการสร้างซูเปอร์ออกไซด์ หรือไฮโดรเจน เปอร็อกไซด์ (Davies and Goldberg, 1987) ซึ่งมีความเข้มข้น 20- 400  $\mu\text{M}$  นอกจากนี้ความเข้มข้นเป็นมิลลิโมลาร์อาจนำไปสู่การสะสมของโปรตีนในรูปออกซิไดซ์ ภายนอกเซลล์ (Grune *et al.*, 1997; Stadtman, 1993) ROS มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของการทำงานของเซลล์ได้โดยตรง การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในกระบวนการ post-tranlation ของโปรตีน ซึ่ง ROS จะไปออกซิไดซ์ กรดอะมิโนที่ตำแหน่งแขนงข้าง (side chain) และแกนโครงสร้างของโปรตีน (protein backbone) ซึ่งจะนำไปสู่ protein-protein cross-link และ โปรตีนแยกออกเป็นส่วนๆ ซึ่งมีผลต่อเนื่องทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนดังกล่าว การเสื่อมสภาพของโปรตีน ทำหน้าที่ที่ผิดปกติ ซึ่งนำไปสู่การทำงานที่ผิดปกติของออร์แกเนลล์ และ ทำให้เกิดการตายของเซลล์ได้ อนุพันธ์ของโปรตีนที่ถูกนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดถึงการเกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนจาก ROS มี 2 ชนิดคือ อนุพันธ์ โปรตีน คาร์บอนิล (protein carbonyl) และอนุพันธ์โปรตีน ไนโตรไทโรซีน (protein nitrotyrosine) การปรากฏของอนุพันธ์ โปรตีน คาร์บอนิล ในโปรตีน แสดงว่าเกิดการออกซิเดชันโปรตีนการทำลายด้วยอนุมูลอิสระ ซึ่งการเพิ่มขึ้นของโปรตีนคาร์บอนิล ในเนื้อเยื่อนั้นจะเกี่ยวข้องกับ การเกิดพยาธิสภาพ เช่น โรค rheumatoid arthritis, Alzheimer, respiratory distress syndrome, Parkinson's disease และ atherosclerosis

### 3.3 การเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน (Lipid peroxidation)

เยื่อหุ้มเซลล์มีส่วนประกอบของไขมันหลายชนิดที่มีความสำคัญในการรักษาสภาพการเป็นของไหล (membrane fluidity) ของเยื่อหุ้มเซลล์ ไขมันเหล่านี้มีประจุอยู่ด้วย ส่วน โมเลกุลที่ชอบน้ำ (hydrophilic) อยู่ด้านนอกของเซลล์ ส่วน โมเลกุลที่ชอบไขมัน (lipophilic) อยู่ตรงกลางระหว่างโมเลกุลที่ชอบน้ำ ภายในเยื่อหุ้มเซลล์มีโปรตีนซึ่งมีความสำคัญกับการดำรงชีวิตของเซลล์ โปรตีนเหล่านี้ทำหน้าที่ควบคุมการผ่านเข้าออกของไอออน ควบคุมสมดุลออสโมติก หรือทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณของเซลล์

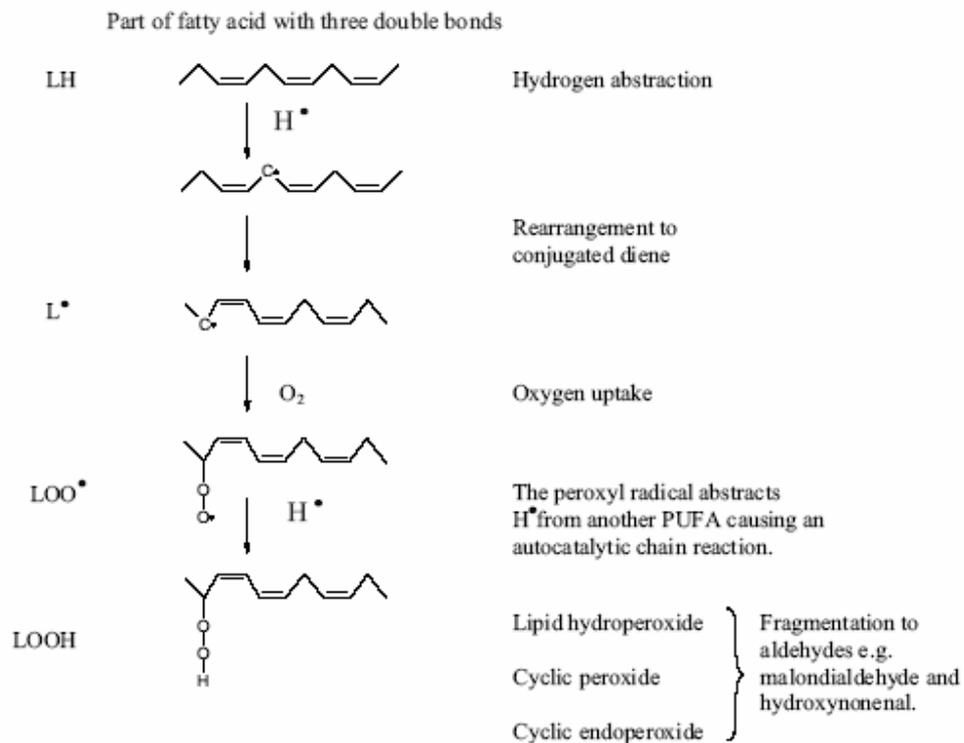
กรณีที่มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นบริเวณใกล้กับเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเป็น phospholipids และมีไขมัน เป็นส่วนประกอบอยู่ ไขมันในส่วนที่เป็นกรดไขมันสายยาวชนิดไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acids) เช่น arachidonic acids และ linolenic acid จะถูก reactive radical นั้นดึง hydrogen atom ออกมาจากกลุ่ม =CH- หนึ่งในกรดไขมันนั้น และทำให้กรดไขมันดังกล่าวเกิดเป็น carbon-centered radical จากนั้น carbon-centered radical จะรวมกับออกซิเจนแล้วเปลี่ยนเป็น peroxy radicals อยู่ใน



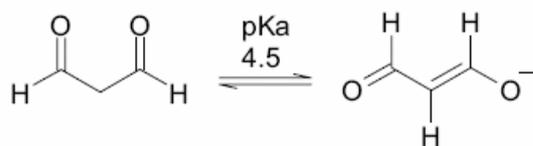


ข. ขั้นถ่ายทอด (propagation) ในขั้นตอนนี้ไขมันที่แปรสภาพเป็นอนุมูลอิสระ (lipid radical หรือ carbon-centered radical) ที่เกิดขึ้นจะไปทำปฏิกิริยากับออกซิเจน เกิดเป็นอนุมูลอิสระไขมันเปอร์ออกซิล (lipid peroxy radical,  $\text{LOO}^{\cdot}$ ) (ปฏิกิริยาที่ 4) จากนั้นอนุมูลอิสระไขมันเปอร์ออกซิลจะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลไขมันที่อยู่ข้างเคียง โดยดึงไฮโดรเจนอะตอมออกแล้วเกิดเป็นไขมันไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (lipid hydroperoxide,  $\text{LOOH}$ ) และอนุมูลอิสระไขมันที่ไม่คงตัว (ปฏิกิริยาที่ 5) ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาที่ 4 และ 5 ทำให้ปฏิกิริยาลูกโซ่ของ lipid peroxidation สามารถดำเนินต่อไปได้

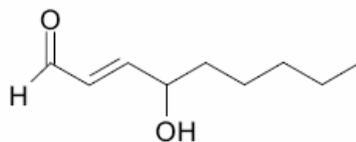
ค. ขั้นสิ้นสุด (termination reaction) ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ 2 แบบ คือการที่อนุมูลอิสระไขมันที่ไม่คงตัว 2 โมเลกุลมาจับกัน (ปฏิกิริยาที่ 6) หรือการที่อนุมูลอิสระไขมันที่ไม่คงตัวมาจับกับอนุมูลอิสระไขมันเปอร์ออกซิล (ปฏิกิริยาที่ 7) ทำให้เกิดเป็นโมเลกุลที่คงตัว ได้แก่ อีเทน (Ethane) หรือเพนเทน (Pentane) และไขมันอัลดีไฮด์ (lipid aldehyde)



ภาพที่ 13 กลไกแสดงการเกิดกระบวนการเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน  
 ที่มา: Bohnstedt (2005)



ภาพที่ 14 โครงสร้าง MDA  
 ที่มา: Bohnstedt (2005)



ภาพที่ 15 โครงสร้าง HNE  
 ที่มา: Bohnstedt (2005)

### 3.4 ROS ต่อโปรแกรมการตายของเซลล์ (program cell death)

#### 3.4.1 การเหนี่ยวนำการเกิด apoptosis โดย ROS

การเกิด apoptosis เป็นลักษณะพิเศษของโปรแกรมการตายของเซลล์ ที่เป็นลักษณะที่ขาดไม่ได้ ในการพัฒนาและรักษาสมดุลของหลายๆเซลล์ (Wyllie *et al.*, 1980) การเพิ่มขึ้นของการสร้าง ROS ภายในเซลล์พบได้บ่อยในการกระตุ้นให้เกิด apoptosis จากการรายงานพบว่า ROS สามารถเหนี่ยวนำเซลล์ตายโดยการเกิด apoptosis ในเซลล์หลายชนิด (Dumont *et al.*, 1999; Slater *et al.*, 1995) ซึ่งแสดงว่า ROS มีส่วนทำให้เซลล์ตาย แบบ apoptosis ซึ่งพบใน เซลล์ ที-ลิมโฟไซท์ (T-lymphocyte) ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis โดยการกระตุ้น CD95 โดยอาศัย ROS จากระบบขนส่งอิเล็กตรอนจากไมโทคอนเดรีย และการทำงานของ NF-kB (Dumont *et al.*, 1999)

#### 3.4.2 การเหนี่ยวนำการเกิด apoptosis โดย ไนตริกออกไซด์

จากรายงานการทดลอง และการเกิดพยาธิสภาพ พบว่าไนตริกออกไซด์ ทำให้เกิด apoptosis (Albina and Reichner, 1998; Brune *et al.*, 1997; De Groot *et al.*, 1997; Thippeswamy and Morris, 1997) โดยไนตริกออกไซด์ เกี่ยวข้องกับการลดลงของความเข้มข้นของ คาร์ดิโอไลปิน (cardiolipin) การทำงานที่ลดลงของไมโทคอนเดรีย และการปล่อยไซโตโครม ซี (cytochrom c) เข้าสู่ไซโตซอล (Umansky *et al.*, 2000; Ushmorov *et al.*, 1999) อย่างไรก็ตามเซลล์บางชนิด เช่น เซลล์ endothelium จาก microvasculature ด้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis โดยไนตริกออกไซด์ และความเข้มข้นของไนตริกออกไซด์จะได้รับการป้องกันการเกิด apoptosis ในเซลล์หลายชนิด โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ caspases (Cohen, 1997; Kim *et al.*, 1997) ซึ่งการเพิ่มขึ้นของกลูตาไธโอนจะเกี่ยวข้องกับการเพิ่มความต้านทานต่อไนตริกออกไซด์ ที่เป็นสื่อกระตุ้นทำให้เกิด apoptosis (Umansky *et al.*, 2000)

#### 3.4.3 การเหนี่ยวนำเซลล์ตายโดย TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  เหนี่ยวนำให้เซลล์ตายได้ในเซลล์หลายชนิดของ เซลล์ tumor และถูกใช้ เป็นแบบจำลองสำหรับศึกษากลไกในระดับโมเลกุลถึงสาเหตุทำให้เซลล์ตาย จากการทดลองใน cell line พบว่า TNF- $\alpha$  สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง ROS จากไมโทคอนเดรีย (Donnell *et al.*, 1995; Schulze *et al.*, 1992) ซึ่ง ROS ที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์นั้นขึ้นอยู่กับการส่งสัญญาณ และวิถีของ



#### 4. สมุนไพรขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.)

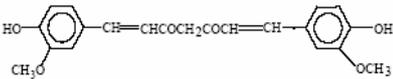
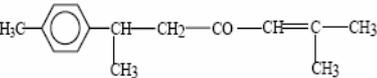
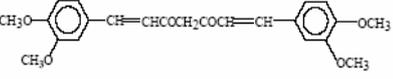
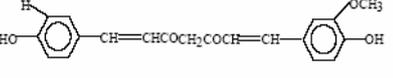
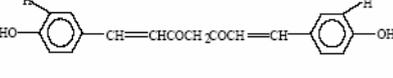
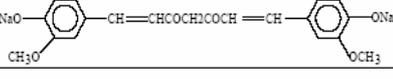


ภาพที่ 17 ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.)

ที่มา: สถาบันวิจัยสมุนไพร (2544)

ขมิ้นชัน มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ ว่า *Curcuma longa* Linn หรือ *Curcuma domestica* valeton (syn) อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae (พญาบัว, 2529) มีชื่อภาษาอังกฤษว่า turmeric มีชื่อภาษาไทยพื้นเมืองอื่นๆ ได้แก่ ขมิ้น (กลาง) ขมิ้นแกง ขมิ้นหยอก ขมิ้นหัว (เชียงใหม่) ขมิ้น หมิ้น (ภาคใต้) ตายอ (กะเหรี่ยง-กำแพงเพชร) สะยอ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) สามารถปลูกได้ทั่วไปในเขตร้อนหรืออบอุ่นในที่ชื้น ลักษณะทางพฤกษศาสตร์เป็นพืชไม้ล้มลุกสูง 50-70 ซม. มีลำต้นใต้ดินเป็นเหง้า เนื้อเหง้ามีสีเหลืองอมส้ม ใบออกเป็นรัศมีติดผิวดินเป็นใบเดี่ยวประกอบด้วยแผ่นใบขนาดเล็กถึงใหญ่ ผิวใบมักมีไขเคลือบ แผ่นใบรูปไข่ถึงรูปใบหอก กว้าง 8-10 ซม. ยาว 30-40 ซม. ก้านใบยาว 8-15 ซม. ดอกออกเป็นช่อ ก้านช่อดอกยาว 5-8 ซม. ใบประดับสีเขียวอ่อน หรือสีขาว รูปหอกเรียงซ้อนกันใบประดับ 1 ใบ มี 2 ดอก ใบประดับย่อยรูปขอบขนานยาว 3-3.5 ซม. ด้านนอกมีขน กลีบรองกลีบดอกเชื่อมติดกันเป็นรูปท่อ มีขน กลีบดอกสีขาว โคนเชื่อมติดกันเป็นท่อยาว ปลายแยกเป็น 3 ส่วน เกสรตัวผู้คล้ายกลีบดอก มีขน อับเรณูอยู่ใกล้ๆ ปลายท่อเกสรตัวเมียเล็ก ยาว ยอดเกสรตัวเมียรูปปากแตรเกลี้ยง รังไข่มี 3 ช่อง แต่ละช่องมีไข่อ่อน 2 ใบ (Holttum, 1950)

องค์ประกอบทางเคมีของเหง้าขมิ้นมีสารสำคัญ 2 ประเภท คือ เคอร์คูมินอยด์ (curcuminoids) และน้ำมันระเหย (turmeric oil) ซึ่ง เคอร์คูมินอยด์ เป็นสารสีเหลืองที่พบในรากขมิ้นชัน ประกอบด้วย สาร 3 ชนิด คือ เคอร์คิวมิน (Curcumin) ดีเมทอกซิล เคอร์คิวมิน (Demethoxyl Curcumin) บีสเมทอกซิล เคอร์คิวมิน (Bismethoxy curcumin) (อัมพวัน และมนัสนันท์, 2544)

Compounds	Chemical structure	Activity
Curcumin		anti-bacteria <i>Leishmania amazonensis</i> anti-HIV antioxidant anti-inflammatory anti-tumor
Ar-turmerone		snakebite
Methylcurcumin		<i>L. amazonensis</i>
Demethoxy curcumin		antioxidant
Bisdemethoxy curcumin		antioxidant
Sodium curcuminat		anti-inflammatory

**ภาพที่ 18** โครงสร้างหลักของเคอร์คิวมินและอนุพันธ์ที่สกัดแยกได้จากขมิ้นชันและคุณสมบัติ  
ที่มา: Roughley and Whiting (1973)

สารเคอร์คิวมิน เป็นสารหลักที่พบในขมิ้นชัน มีสีเหลือง ซึ่งได้จากรากของขมิ้นชัน โดยทั่วไป ชาวอินเดียนิยมนำมาสำหรับเป็นเครื่องเทศและแต่งสีในอาหาร สารสกัดเคอร์คิวมิน มีคุณสมบัติในการเป็นยา ที่หลากหลาย อาทิ เช่น ด้านมะเร็ง (Liu *et al.*, 1993; Rao *et al.*, 1993) ด้านการอักเสบ (Srimal and Dhawan, 1973; Mukhopadhyay *et al.*, 1982; Rao *et al.*, 1982) ด้านการติดเชื้อ (Srivastava and Srimal, 1985; Liu *et al.*, 1993; Rao *et al.*, 1993; Kakar and Roy, 1994; Osawa *et al.*, 1995; Sreejayan *et al.*, 1997) และด้านความเครียดจากภาวะออกซิเดชั่น (Mulky *et al.*, 1987; Nagabhusham and Bhide, 1992; Reddy and Lokesh, 1994a; Sugiyama *et al.*, 1996) เป็นต้น

#### 4.1 ลักษณะการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของเคอร์คิวมิน

ความเครียดจากภาวะออกซิเดชันมีบทบาทที่สำคัญในการทำให้เกิดพยาธิสภาพของโรคต่างๆ เช่น myocardial ischemia, cerebral ischemia-reperfusion injury, hemorrhage และ shock, neuronal cell injury, hypoxia และมะเร็ง เคอร์คิวมินมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงเมื่อเปรียบเทียบกับวิตามินซีและอี (Toda *et al.*, 1985) ซึ่งเคอร์คิวมินสามารถทำหน้าที่เป็นตัวกำจัดอนุมูลอิสระได้มากมายหลายชนิดเช่น superoxide anion radicals, hydroxyl radicals (Reddy and Lokesh, 1994b) และ nitrogen dioxide radicals (Unnikrishnan and Rao, 1995; Sreejayan and Rao, 1997) และยับยั้งการเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในเซลล์ตับหนู (Reddy and Lokesh, 1992; Sreejayan and Rao, 1994) เคอร์คิวมินป้องกันการได้รับความเสียหายจากภาวะออกซิเดชันของเซลล์ (LLC-PK<sub>1</sub>) โดยยับยั้งการสลายของไขมัน การเปอร์ออกซิเดชันของไขมันและการแตกของเซลล์ (Cohly *et al.*, 1998) จากรายงานการวิจัยพบว่า ไขมันชั้นมีสาร เคอร์คิวมินออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในตับหนู (Reddy and Lokesh, 1992) และการเสริมสารสกัดเคอร์คิวมินทำให้ลดการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในหนูที่เป็นโรค hepatic fibrosis (Akila *et al.*, 1998) ซึ่งจากการทดลองให้สารเคอร์คิวมินปริมาณ 1.6 mg/น้ำหนักตัว ทางปากในกระต่ายกลุ่มที่เป็นโรคหลอดเลือดแข็งตัว พบว่าสามารถลดความไวต่อการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของ low density lipoprotein (LDL) ในกระต่ายที่เป็นโรคหลอดเลือดแข็งตัว (Ramirez-Tortosa *et al.*, 1999) และสารสกัดจากไขมันชั้นระดับ 100 mg/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด เนื้อเยื่อหัวใจได้รับบาดเจ็บจากภาวะหัวใจขาดเลือดพบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดไขมันชั้น ระดับ 100 mg/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม สถานะของระบบต้านออกซิเดชันถูกฟื้นฟูให้อยู่สภาพปกติรวมทั้งมีผลในการลดความเครียดจากภาวะออกซิเดชันและยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในเนื้อเยื่อหัวใจด้วย (Mohanty *et al.*, 2004)

นอกจากนี้การทดลองให้สาร เคอร์คิวมินในกระต่ายทางปากปริมาณ 1.66 mg/ น้ำหนักตัว พบว่า สามารถลดความไวต่อการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์ตับ ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการป้องกันผลของระดับไขมัน และ โคลเลสเตอรอล (cholesterol) ในเลือดและตับสูง ระหว่างการพัฒนาของการเกิดโรคหลอดเลือดแข็งตัว (Mesa *et al.*, 2003) และการให้สารสกัดเคอร์คิวมิน ทางปาก มีผลทำให้ระดับของ glutathione เพิ่มขึ้น และเหนี่ยวนำให้การทำงานของเอนไซม์ glutathione peroxidase (GPx) และ glutathione S-transferase เพิ่มขึ้น ในหนู (Piper *et al.*, 1998)

Quiles *et al* (1998) ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดขมิ้นชันต่อการเกิด lipid peroxidation ของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย ในกระต่ายที่มีไขมันสะสมในเส้นเลือด ทำการทดลองโดยฉีดโคเลสเตอรอลทางเส้นเลือดของกระต่ายและให้สารสกัดขมิ้นชันที่ระดับแตกต่างกัน เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ พบว่าในกลุ่มที่มีการเสริมขมิ้นชันมีความเข้มข้นของ hydroperoxide ในระดับที่ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับเช่นเดียวกับการทดลองของ Jose *et al* (2002) ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดขมิ้นชันเพื่อลดการเกิดความเครียดจากภาวะออกซิเดชันในกระต่ายโดยการป้อนสารสกัดขมิ้นชันทางปากที่ระดับ 1.6 mg/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม พบว่ากระต่ายในกลุ่มที่เสริมสารสกัดขมิ้นชันมีความเข้มข้นของ lipid peroxide ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้เสริมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

#### 4.2 กลไกการต้านอนุมูลอิสระของเคอร์คูมินอยด์

โครงสร้างของสารกลุ่ม เคอร์คูมินอยด์ ที่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ คือ phenolic OH group และ methylene CH<sub>2</sub> group ที่ติดอยู่กับ Beta-diketone moiety มีบทบาทสำคัญในการกำจัดอนุมูลอิสระ (scavenging activity) โดยการให้ไฮโดรเจนอะตอมหรือให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ (Wright, 2002)

Masuda *et al* (2000) ได้ศึกษากลไกการต้านอนุมูลอิสระของเคอร์คิวมิน ซึ่งเป็นสารกลุ่ม Phenolic ในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันไม่อิ่มตัว พบว่าในการสิ้นสุดปฏิกิริยา เคอร์คิวมินในรูปของอนุมูลอิสระจะจับตัวกับอนุมูลอิสระไขมันเปอร์ออกไซด์

กลไกการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบ Phenolic ซึ่งจัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดที่ไม่ใช่เอนไซม์ มีดังนี้

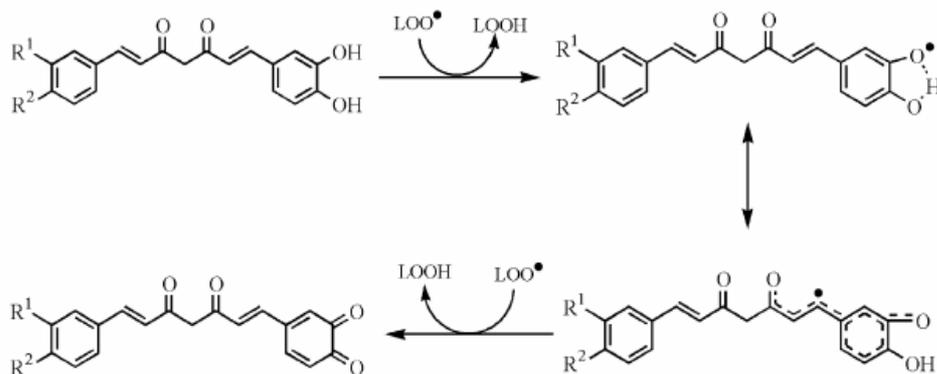


S คือ สารที่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน

AH คือ สารต้านออกซิเดชัน Phenolic (Phenolic antioxidant)

A<sup>·</sup> คือ สารต้านออกซิเดชันที่กลายเป็นอนุมูลอิสระ (Antioxidant radical)

ปฏิกิริยาขั้นที่ 1 สามารถผันกลับได้ และสารต้านออกซิเดชันที่กลายเป็นอนุมูลอิสระต้องทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระอีกตัวที่อยู่รอบๆ เช่น ไขมันไฮโดรเปอร์ออกไซด์ได้เป็นสารประกอบที่คงตัวเพื่อทำให้ปฏิกิริยาลิ้นสุด



ภาพที่ 19 กลไกการกำจัดลิปิดเปอร์ออกไซด์ของเคอร์คิวมิน

ที่มา: Qing *et al.* (2006)

#### 4.3 เกสัชจลนศาสตร์ของขมิ้นชัน

เคอร์คิวมินอยด์ เป็นสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำ การกินเข้าไปอาจไม่ได้ผล เนื่องจากดูดซึมได้น้อย จากการทดลองให้สารประกอบเคอร์คิวมินที่ใส่สารกัมมันตภาพรังสี พบว่า มีส่วนของกัมมันตรังสี เข้าสู่กระแสเลือดและอวัยวะต่างๆ แต่ไม่พบเคอร์คิวมินในรูปเดี่ยวๆ แสดงว่าเคอร์คิวมิน อาจถูกเปลี่ยนแปลงในรูปอื่นตอนที่ดูดซึมในลำไส้ (ประคองศิริ, 2546) จากการทดลองของ Hermann and Martin (1991) รายงานว่าเมื่อให้สารประกอบเคอร์คิวมินแก่หนูขาวทางการกิน พบว่า เคอร์คิวมิน ถูกขับถ่ายออกมาทางอุจจาระ 75 เปอร์เซ็นต์ และในน้ำดี 11 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ปัสสาวะพบเพียงปริมาณเล็กน้อย Pan *et al.* (1999) ได้รายงานว่าภายหลังการให้เคอร์คิวมิน 0.1 กรัม ต่อน้ำหนักตัว แก่หนูทดลองเป็นเวลา 1 ชั่วโมงจะพบปริมาณของเคอร์คิวมิน ในลำไส้เล็ก ม้าม ตับไต เท่ากับ 177 27 26 และ 7.5 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ รูปเมตาโบไลต์ (metabolite) ของเคอร์คิวมินส่วนใหญ่จะเป็น Glucuronide ของ Dihydrocurcumin, Tetrahydrocurcumin และ Hexahydrocurcumin มีส่วนน้อยที่เป็น Ferulic acid กลไกการเปลี่ยนเป็น Metabolite ของเคอร์คิวมิน โดยเมื่อเคอร์คิวมินเข้าสู่ร่างกายจะเกิดการ Transformation ได้ สองทาง คือการเกิดปฏิกิริยารีดักชัน โดย NADPH และ Glucuronidation โดยเอนไซม์  $\beta$ -glucosidase ได้เป็น Glucuronide ของ Dihydrocurcumin Tetrahydrocurcumin และ Hexahydrocurcumin ในพลาสมา

#### 4.4 หลักฐานความเป็นพิษและการทดสอบความเป็นพิษ

##### 4.4.1 การทดสอบความเป็นพิษ

เมื่อนิโคตินิกแอซิดเอทานอล (95%) ให้แก่หนูถีบจักรทางช่องท้อง พบว่าขนาดที่ทำให้หนูตายไปครึ่งหนึ่ง ( $LD_{50}$ ) คือ 3.98 ก./ก.ก. ส่วนการฉีดสารสกัดจากน้ำและปิโตรเลียมอีเทอร์เข้าทางช่องท้องหนูถีบจักร พบว่า  $LD_{50}$  มีค่า 430 ม.ก./ก.ก. และ 525 ม.ก./ก.ก. ตามลำดับ (Yegnanarayana *et al.*, 1976) เมื่อนิโคตินิกแอซิดจากเอทานอลและน้ำ (1:1) ให้แก่หนูถีบจักรทางช่องท้อง พบว่า  $LD_{50}$  มีค่าเท่ากับ 500 ม.ก./ก.ก. (Dhar *et al.*, 1968) เมื่อกินสารสกัดจากเอทานอล (95%) ให้หนูถีบจักรในขนาด 100 ม.ก./ก.ก./วัน ไม่มีผลต่อน้ำหนักตัว แต่มีผลต่อปอด หัวใจ เม็ดเลือดแดง และเม็ดเลือดขาวลดลง แต่ไม่มีผลต่ออสุจิ (Qureshi *et al.*, 1992) การศึกษาพิษกึ่งเรื้อรังในหนูถีบจักรและหนูขาว โดยให้ไขมัน 0.1 และ 5% ของสารสกัดเอทานอล (95%) โดยผสมให้หนูกิน เป็นเวลา 14 และ/หรือ 90 วัน พบว่าไขมันในขนาดสูง (5%) และในระยะเวลาที่นาน (90วัน) พบว่าน้ำหนักลด เป็นพิษต่อตับ มี necrosis ในหนูถีบจักรในขนาดน้อย 0.2 หรือ 1% เป็นเวลา 14 วันพบความเป็นพิษต่อตับในหนูถีบจักรมากกว่าหนูขาว ส่วนสารสกัดในขนาดที่ให้ไม่พบพิษ (Deshpande *et al.*, 1998) เมื่อผสมสารสกัดเอทานอล (95%) ให้แก่หนูขาวทั้งเพศผู้และ ลิงเพศผู้-เมีย ในขนาด 300 ม.ก./ก.ก. หนูตะเภาเพศผู้ขนาด 2.5 ก./ก.ก. และหนูขาวเพศผู้-เมีย ในขนาด 2.5 ก./ก.ก. ไม่ทำให้เกิดพิษ (Bhavani *et al.*, 1979) กรอกสารสกัดแอลกอฮอล์และน้ำ (1:1) ให้หนูถีบจักร ในขนาด 4 ม.ก./ก.ก. ไม่มีผลต่อการกินอาหาร การเพิ่มของน้ำหนัก หรือระบบประสาทส่วนกลาง (Miquel *et al.*, 1995) ผสม Oleoresin จากขมิ้นในอาหารให้แก่หนูในขนาด 60 296 1,551 ม.ก./ก.ก./วัน เป็นเวลา 102-109 วันพบว่าทำให้เกิด thyroid hyperplasia เกิดการเปลี่ยนแปลงของ epithelium ของกระเพาะปัสสาวะไต และ pericholangitis (Bill *et al.*, 1985) ไขมันไม่ก่อให้เกิดพิษเฉียบพลัน เมื่อให้หนูถีบจักรในขนาด 10 ก./ก.ก. ส่วนสารสกัดเอทานอลเมื่อให้หนูถีบจักรโดยการฉีดเข้าช่องท้อง ทางใต้ผิวหนัง หรือให้กิน มีค่า  $LD_{50}$  มากกว่า 15 ก./ก.ก. (โสภิต และคณะ, 1985) ส่วนการทดสอบพิษกึ่งเรื้อรัง โดยให้ขนาด 0.03 2.5 และ 5 ก./ก.ก./วัน แก่หนูขาว 96 ตัวเป็นเวลา 6 เดือน พบว่าหนูเพศผู้ที่ได้รับสาร(ไขมัน) 2.5 และ 5 ก./ก.ก./วัน กินอาหารได้น้อยลง และอัตราการเจริญเติบโตน้อยลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Sittisomwong, 1990) การทดสอบความเป็นพิษในหนูขาว พบว่าทั้งขมิ้นและ curcumin ในขนาดที่สูงกว่าที่ใช้ในคน 1.25-125 เท่า ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงในด้าน การเจริญเติบโต และระดับสารเคมีในเลือด (Sambainah *et al.*, 1982) การทดสอบพิษเฉียบพลันในหนูเมื่อให้ขนาดต่างๆ ไม่พบความผิดปกติต่อหนู (Ramprasad and Sirsi, 1957; Shankar *et al.*, 1980) เมื่อติดตามคนไข้ที่ทดลองทางคลินิก 30 ราย ไม่พบอาการผิดปกติ (Prucksunand *et al.*, 1986) เมื่อให้

Sodium curcuminates ในขนาด 500 ม.ล./ก.ก. ทางปาก ได้ผิวหนัง หรือช่องท้อง ไม่พบอันตราย แต่ถ้าฉีดเข้าหลอดเลือดจะเป็นพิษ ทำให้สัตว์ทดลองตายได้ ส่วนการให้ทดสอบพิษถึงเฉียบพลัน ไม่พบพิษ (Shankar *et al.*, 1980) การทดลองในคนทั้งชายและหญิง โดยให้รับประทานขมิ้นในขนาดวันละ 2.2 ก. ไม่ทำให้เกิดพิษ (Sharma *et al.*, 2001)

#### 4.4.2 ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์

ผลการทดสอบไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ใน *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 (Nagabhushan and Bhide, 1986; Shah and Netrawali, 1988; Nagabhushan *et al.*, 1988) ทั้งขมิ้นและเคอร์คิวมินไม่ก่อกลายพันธุ์เมื่อผสมในอาหารหนู 0.5 และ 0.015% ตามลำดับ (Vijayalaxmi, 1980; Abraham *et al.*, 1984)

#### 4.4.3 ทำให้ตัวอ่อนผิดปกติ

เมื่อใช้ส่วนรากผสมลงไปในการอาหาร (0.5 %) สารสกัดจากน้ำและสารสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์ในขนาด 200 ม.ก./ก.ก. ให้แก่หนูขาว หรือกระต่ายเพศเมีย ไม่พบฤทธิ์ teratogenic (Garg, 1974)

#### 4.4.4 พิษต่อตัวอ่อน

เมื่อให้หนูขาวเพศเมียกินสารสกัดเอทานอล (95%) สารสกัดจากน้ำและสารสกัดจากปิโตรเลียมอีเทอร์ ในขนาด 100 ม.ก./ก.ก. พบว่าเป็นพิษต่อตัวอ่อน (Garg, 1971) เมื่อให้หนูขาวเพศเมียกินสารสกัดจากน้ำและสารสกัดจากปิโตรเลียมอีเทอร์ ในขนาด 200 ม.ก./ก.ก. และ 100 ม.ก./ก.ก. ไม่พบพิษต่อตัวอ่อน (Garg, 1978)

#### 4.4.5 พิษต่อยีน

เมื่อกรอกผงขมิ้นให้แก่หนูถีบจักร ในขนาด 2.5 และ 7.55 ก./ก.ก. ไม่พบว่ามิพิษ (Abraham *et al.*, 1984)

## 5. สมุนไพรฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* Wall. Ex Ness)



ภาพที่ 20 ฟ้าทะลายโจร

ที่มา: ศูนย์วัฒนธรรม 75 จังหวัด (2548)

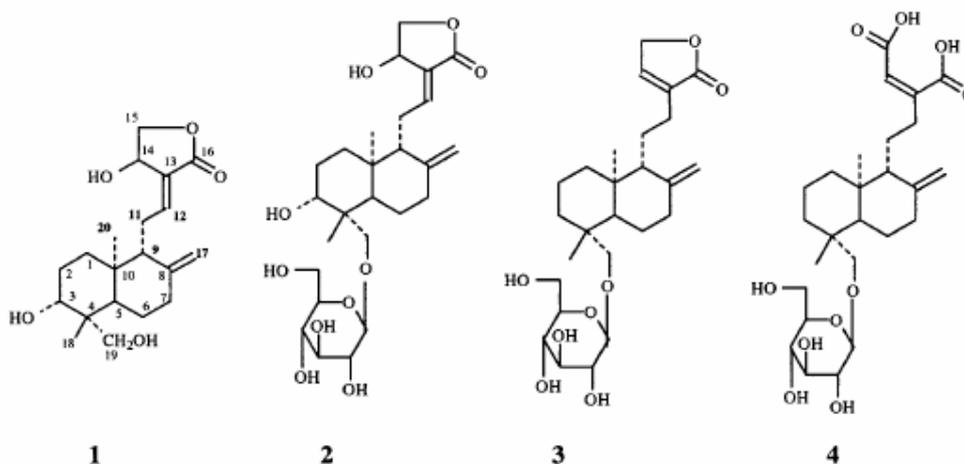
ฟ้าทะลายโจร มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Andrographis paniculata* Wall. ex Nees (เต็ม, 2523) วงศ์ Acanthaceae (เทอด และคณะ, 2545) มีชื่อสามัญหลายชื่อ ได้แก่ creat, kiryat, chiretta, manhatit และ kirat เป็นต้น (Jain and Robert, 1991) ในประเทศไทยมีชื่อเรียกที่แตกต่างกันตามท้องถิ่น เช่น น้ำลายพังพอน ฟ้าทะลายโจร (กรุงเทพฯ) หญ้าก้านงู (สงขลา) ฟ้าสะท้าน (พัทลุง) ฟ้าสาบ (พนัสนิคม) เขยตายายคลุม (โพธาราม) สามสิบดี (ร้อยเอ็ด) เมฆทะลาย (ยะลา) เป็นต้น (ดีพร้อม, 2540) ฟ้าทะลายโจร เป็นพืชที่ใช้เป็นยามานานแล้ว ในประเทศจีน อินเดีย และอินโดนีเซีย โดยเฉพาะประเทศจีนได้มีการค้นคว้าสรรพคุณต่างๆ การแพทย์จีนจัดยาฟ้าทะลายโจรไว้ในตำเนียบยาตำราหลวงใช้รักษาได้หลายโรค (ดีพร้อม, 2540) ประเทศไทยได้ใช้ฟ้าทะลายโจรรักษาโรคต่างๆเช่น แก้ไข้ทั่วไปๆ เช่น ไข้หวัด ไข้หวัดใหญ่ ระวังอาการอักเสบ แก้ไอ เจ็บคอ คออักเสบ ต่อมทอนซิลอักเสบ ขับเสมหะ รักษาโรคผิวหนัง ฝี แก่ติดเชื้อ ที่ทำให้ปวดท้อง ท้องเสีย บิด รักษากระเพาะอาหารอักเสบ และเป็นยาขมเจริญอาหาร (สุนทร, 2535) ฟ้าทะลายโจรเป็นพืชที่ปลูกได้ทุกพื้นที่ในแต่ละพื้นที่นั้นมีปริมาณสารออกฤทธิ์ไม่แน่นอนซึ่งแตกต่างกันขึ้นอยู่กับถิ่นที่ปลูก และฤดูกาลเก็บเกี่ยว (คณิต และชัยโย, 2534) ฟ้าทะลายโจรเป็นพืชล้มลุก (Annual Herb) สูง 30-90 ซม. ลำต้นสี่เหลี่ยม (sharply quadrangular) ใบเดี่ยวออกตรงข้าม เรียวยาว 2-6 ซม. กว้าง 1-3 ซม.ปลายใบแหลม(acute) ผิวใบสาก (glabrous)

ขอบใบเรียบ ก้านใบสั้น ดอกช่อ (inflorescence racemose) ยาว 10-30 เซนติเมตร ดอกแต่ละดอกมีขนาดเล็ก กลีบรองดอกเล็ก (bract small) ก้านดอกสั้น (peduncle short) กลีบเลี้ยงมีขนาดเล็กแยกเป็น 5 แฉก (calyx 5 partite) กลีบดอกมีลักษณะเป็นหลอดเรียวยาว 6 มิลลิเมตร (corolla tube narrow) ส่วนกลีบดอกที่แยกออกยาวกว่าตัวหลอดแบ่งเป็นสองส่วน กลีบดอกส่วนบนเป็นรูปไข่ (oblong) มีขนอ่อนปกคลุม สีขาว ส่วนกลีบล่าง กว้างกว่าปลายแยกเป็น 3 แฉก สีขาวและมีม่วงแต้ม (violet marking) (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2544) ใบเป็นใบเดี่ยว ออกตรงข้ามเป็นคู่ สีเขียวเข้ม รูปรีแกมขอบขนาน ปลายใบแหลม กว้าง 1-3 เซนติเมตร ยาว 1- 10 เซนติเมตร รากเป็นระบบรากฝอย (fibrous root system) รากส่วนใหญ่อยู่ในรัศมี 30 เซนติเมตรจากโคนต้น ผลและเมล็ด ผลคล้ายฝักค้อยติ่ง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร ยาว 2-3 เซนติเมตร สีเขียวภายในแบ่งเป็น 2 ช่อง เมื่อฝักแก่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล แตกออกตามความยาว และดีดเมล็ดออกมา เมล็ดเมื่อสุกแก่จะมีสีน้ำตาล หรือน้ำตาลดำ ขนาดเล็กกว่าเมล็ดฝักกวางตุ้งหนัก 1,000-1,200 เมล็ดต่อกรัม เมล็ดที่สมบูรณ์จะมีสีเขียวและไมลิว (นันทวัน, 2529; พเยาว์, 2529)

ฟ้าทะลายโจรมีสารเคมีที่สำคัญประกอบอยู่หลายประเภท แต่สารออกฤทธิ์ มี 2 ชนิด สารกลุ่มไดเทอร์พีน แลคโตน (diterpene lactone) ได้แก่ andrographolide, deoxyandrographolide, neoandrographolide ซึ่งในใบของฟ้าทะลายโจรมีองค์ประกอบอยู่ 7-10 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ก้าน และลำต้นแห้งมี 2-5 เปอร์เซ็นต์ ระยะที่ต้นเจริญเต็มที่ เริ่มออกดอก จนกระทั่งดอกบาน เมื่ออายุ 110-120 วัน เป็นระยะที่สารดังกล่าวรวมทั้งต้นมีปริมาณสูงถึง 12.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บต้นแห้งไปไว้นาน 1 ปี จะทำให้ปริมาณรวมของสารแลคโตนลดลงมากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ และสารกลุ่ม flavone ได้แก่ andrographin และ penniculin (กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร, 2533)

### 5.1 ลักษณะการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของฟ้าทะลายโจร

จากงานวิจัยพบว่าฟ้าทะลายโจรมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันโดยเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ SOD, CAT และ GPx และยับยั้งการทำงานของ lipid peroxidase ในตับหนู (Trivedi and Rawel, 2001) และจากการทดลองฉีดสาร diterpene จากฟ้าทะลายโจรเข้าภายในช่องท้องปริมาณ 100 mg/ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ในหนูที่ได้รับ carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) เป็นเวลา 7 วันมีผลทำให้เกิดการเพิ่มการป้องกันการเกิดออกซิเดชันของเซลล์และลดการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในเซลล์ตับ (Koul and Kapil, 1994)

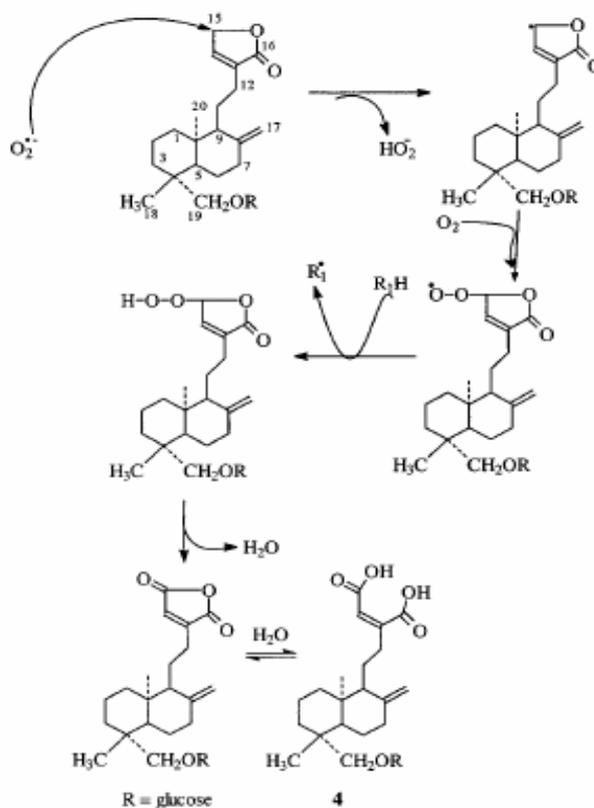


ภาพที่ 21 โครงสร้างทางเคมีของฟ้าทะลายโจร (1) Andrographolide, (2) andrographoside, (3) neoandrographolide, และ (4) neoandrographic diacid

ที่มา: Kamdem *et al.* (2002)

Wang *et al.* (1997) รายงานว่าฟ้าทะลายโจรมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยทำการเสริมฟ้าทะลายโจรในกระต่ายที่เป็นโรคหลอดเลือดแข็งตัวโดยให้อาหารที่มีระดับของโคเลสเตอรอลสูงๆพบว่า ฟ้าทะลายโจรมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน รักษาหน้าที่ของ endothelium cell และรักษาสมดุลของ nitric oxide /endothelin

Thamlikitkul *et al.* (1991) ได้ศึกษาการใช้สารสกัดจากฟ้าทะลายโจรในผู้ป่วยในอัตรา 6 กรัมต่อวัน เป็นเวลา 3 วัน สามารถลดอาการเจ็บคอได้ 80 - 90 เปอร์เซ็นต์ ของผู้ป่วยจำนวน 152 ราย ซึ่งได้ผลดีเท่ากับยาลดไข้ พาราเซตามอล ต่อมา Madav *et al.* (1996) ได้ศึกษาการใช้สารสกัด andrographolide ในการลดการอักเสบของข้อต่อในหนูขาวพบว่าขนาดของก้อนทุม granuloma ที่เหนี่ยวนำให้เกิดไว้ก่อนสามารถลดขนาดลงได้ และสารสกัดฟ้าทะลายโจรยังออกฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย (ธิดารัตน์, 2534; เทอด, 2545) ออกฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ในไก่กระตังอีกด้วย (เทอด, 2545; อริชญา และคณะ, 2548)



ภาพที่ 22 กลไกแสดงการทำปฏิกิริยาระหว่าง neoandrographolide และ superoxide  
ที่มา: Kamdem *et al.* (2002)

## 5.2 กลไกการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของฟ้าทะลายโจร

Neoandrographolide มีลักษณะการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่เหมือนกับสารต้านอนุมูลอิสระโดยทั่วไป (aromatic ring หรือ extensively conjugated double bond) โดยกลไกการต้านอนุมูลอิสระของ Neoandrographolide จะมีลักษณะที่พิเศษต่างจากสารต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่นมาก ซึ่งอาจเป็นกลไกที่น่าสนใจ จากโครงสร้างของ Neoandrographolide ที่เป็น simple  $\alpha,\beta$  unsaturated lactone กับ allytic hydrogen ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 12 (C-12) และ 15 (C-15) ซึ่งกำจัดอนุมูลอิสระโดยอาศัยกลไกการแตกตัวหรือการถูกดึงโปรตอนในปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Kamdem *et al.*, 2002)

Frimer *et al.* (1986) ได้อธิบายกลไกการกำจัด superoxide radical ของ Neoandrographolide (ภาพที่ 22) ไว้ว่ากลไกจะเริ่มต้นโดยโครงสร้างของ Neoandrographolide จะถูกดึงโปรตอนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 15 ได้เป็นโมเลกุลของ Neoandrographolide anion และ hydroperoxyl radical

(HO<sub>2</sub>) จากนั้นเป็นอนุมูลอิสระ (Neandrographolide radical หรือ carbon-centered radical) ที่เกิดขึ้น จะไปทำปฏิกิริยากับออกซิเจน 1 โมเลกุล เกิดเป็นอนุมูลอิสระเปอร์ออกไซด์ (peroxyl radical) จากนั้น อนุมูลอิสระเปอร์ออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของกลูโคส โดยดึงไฮโดรเจนอะตอมออกแล้ว เกิดเป็นเปอร์ออกไซด์ (peroxide) ซึ่งในกรณีนี้ Neoandrographolide peroxide จะถูกไฮโดรไลต์ ไป อยู่ในรูปของ unstable dicarboxyl ซึ่งถูกhydrate ไปเป็นสารประกอบที่ละลายในน้ำ (4) (Andrieux *et al.*, 1986)

### 5.3 เกสัชจลนศาสตร์ของฟ้าทะลายโจร

ในการศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์ของฟ้าทะลายโจรในหนูขาว โดยให้กินสารสกัดด้วย เอทานอล 60% ขนาด 20 ม.ก./นน.ตัว 1 กิโลกรัม พบว่า andrographolide ซึ่งเป็นสารสำคัญใน ฟ้าทะลายโจรจะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดอย่างรวดเร็วและเกือบสมบูรณ์ อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพ ของสารจะลดลงเป็น 4 เท่าเมื่อให้ขนาดยาสูง 10 เท่า andrographolide ประมาณ 55% จะจับกับโปรตีน ในพลาสมาและสามารถเข้าสู่เซลล์ได้ในปริมาณที่จำกัดเท่านั้น และการขับ andrographolide ออก ทางไตไม่ใช่ทางหลักในการขับสารออกจากร่างกาย และเมื่อศึกษาในอาสาสมัคร ให้รับประทานยา Kan Jang ซึ่งประกอบด้วยสารสกัดฟ้าทะลายโจร และ *Acanthopanax senticosus* 4 เม็ด ครั้งเดียว (มี andrographolide 20 ม.ก.) ระดับ andrographolide ในพลาสมาถึงระดับสูงสุดหลังจากกินยานาน 1.5-2 ชม. เท่ากับ 393 น.ก./มล. ค่าครึ่งชีวิต และค่าเฉลี่ยของเวลาที่ยาจะอยู่ในร่างกาย (mean residence times) เท่ากับ 6.6 และ 10 ชม. ตามลำดับ (Panossian *et al.*, 2000)

สาร andrographolide ที่ความเข้มข้น 20 100 และ 200 ไมโครโมลาร์ ในเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 และลำไส้เล็ก พบว่าความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ผ่านได้ดีที่สุด (จรัส และคณะ, 2546) การดูดซึม andrographolide ผ่านลำไส้ โดยศึกษาในเซลล์ intestinal epithelial Caco-2 monolayers พบว่าค่า permeability coefficient (P<sub>app</sub>) ของ andrographolide ขณะนำเข้า (uptake) ไม่ขึ้นกับความ เข้มข้นของสาร ขณะที่การส่งออก (efflux) จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร นอกจากนี้ค่า P<sub>app</sub> ใน การส่งออกจะลดลงเล็กน้อยเมื่อได้รับ verapamil และ quinidine (สารยับยั้ง P-glycoprotein) และ sodium azide (สารยับยั้งเมแทบอลิซึม) ขณะที่ไม่มีผลต่อการนำเข้า แสดงว่า andrographolide น่าจะ ดูดซึมผ่านลำไส้แบบ passive diffusion และ P-glycoprotein อาจจะมีเกี่ยวข้องกับกลไกการส่งออก (Kanchanapiboon *et al.*, 2005)

การศึกษาเมแทบอลิซึมของ andrographolide จากปัสสาวะ อุจจาระ และในลำไส้เล็กของหนูขาว จะได้สาร 6 ชนิด คือ 14-deoxy-12 (R)-sulfo andrographolide 3-sulfate, 14-deoxy-12 (S)-sulfo andrographolide 3-sulfate, 14-sulfo isoandrographolide 3-sulfate, 14-deoxy-11, 12-didehydroandrographolide, isoandrographolide และ 14-deoxyandrographolide (He *et al.*, 2003) และการศึกษาเมแทบอลิซึมของ andrographolide ในปัสสาวะคน จะได้สาร 4 ชนิด คือ andrographolide-3-O-sulfate, isoandrographolide-3-O-sulfate, 14-deoxyandrographolide-3-O-sulfate และ 14-deoxy-12-(cysteine-S-yl)-andrographolide-3-O-sulfate (Cui *et al.*, 2004)

#### 5.4 หลักฐานความเป็นพิษและการทดสอบความเป็นพิษ

##### 5.4.1 การทดสอบความเป็นพิษ

ให้หนูถีบจักรกินยาแวนตะกอนจากผงใบแห้งขนาด 2 ก./ก.ก. สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ขนาด 2.4 ก./ก.ก. และ andrographolide ขนาด 3 ก./ก.ก. (Sithisomwongse *et al.*, 1989) และสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50% ขนาด 15 ก./ก.ก. ไม่พบหนูตาย (Dhammaupahorn and Chaichantipyuth, 1989; Sithisomwongse *et al.*, 1989) ไม่พบพิษจากการให้สารสกัดจากใบ 20 ก. ด้วยน้ำ 600 ม.ล. ในหนู และขนาด 10 ม.ล./1 ก.ก. ในกระต่าย (Chantasutra and Limpapanichkul, 1989) สารสกัดน้ำจากใบและกิ่ง หรือสารสกัดน้ำ เมื่อนิดเข้าช่องท้องหนูถีบจักร ขนาดที่น้อยที่สุดที่ทำให้เป็นพิษคือ 0.5 ม.ล./ตัว (Feng *et al.*, 1962) ขนาดของสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50% ที่ทำให้หนูถีบจักรตายครั้งหนึ่งเมื่อให้ทางปากและนิดเข้าผิวหนัง มีขนาดมากกว่า 15 ก./ก.ก. และนิดเข้าช่องท้องมีขนาด 14.98 ก./ก.ก. (Sithisomwongse *et al.*, 1989) และขนาดของสารสกัดด้วยเมทานอล : น้ำ (1:1) ที่ทำให้หนูถีบจักรตายครั้งหนึ่งเมื่อนิดเข้าช่องท้องมีขนาดมากกว่า 1 ก./ก.ก. (Nakanishi, 1965)

การนิดสารสกัดซาโปนินเข้าช่องท้องหนูถีบจักรในขนาด 300 ม.ก./ก.ก. ทำให้สัตว์ทดลองเพ็ช หายใจเร็ว กล้ามเนื้ออ่อนแรง และการเปลี่ยนอริยาบถลดลง ในขนาด 1,000 ม.ก./ก.ก. หลังจากนิดได้ 8 นาที มีอาการชัก สิ้นและตาย สารสกัดด้วยน้ำในขนาด 300 ม.ก./ก.ก. มีอาการอ่อนเพลีย การหายใจเร็ว การรับรู้อ่อนลงและกล้ามเนื้ออ่อนแรง อาการคงอยู่ 24 ชม. ในขนาด 1,000 ม.ก. มีอาการคล้ายๆ กับขนาด 300 ม.ก. แต่ตายใน 24 ชม. สารสกัดด้วยอีเทอร์ 100 ม.ก./ก.ก. ทำให้การรับรู้ และระบบการเคลื่อนไหวลดลง กล้ามเนื้ออ่อนแรง และอาการคงอยู่ 1 ชม. ในขนาด 1,000 ม.ก. อาการเหมือนกันแต่ตายใน 45 นาที ผงสารสกัดอีเทอร์ในขนาด 300 ม.ก./ก.ก. ทำให้มีอาการอ่อนเพลีย

การเคลื่อนไหวกวและกล้ามเนื้ออ่อนแรง อาการจะคงอยู่ 2 ชม. เมื่อให้ขนาด 1,000 ม.ก. อาการอ่อนแรง และตายหลัง 24 ชม. สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ ขนาด 300 ม.ก./ก.ก. ทำให้มีอาการอ่อนเพลีย การเคลื่อนไหวกวลดลง กล้ามเนื้ออ่อนแรง และอาการคงอยู่ 24 ชม. ขนาด 1,000 ม.ก. 5 ชม. 5 นาทีหลังฉีด หนูจะมีอาการสั้นที่สุดในที่สุดก็ตาย ส่วนสารสกัดด้วยอีเทอร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ส่วนหนึ่งในขนาด 1,000 ม.ก./ก.ก. จะทำให้อ่อนเพลีย และตายใน 3 ชม. 30 นาที หลังได้ยา (Kintanar *et al.*, 1978)

การทดสอบพิษกึ่งเรื้อรัง ให้นุถิบจักรกินผงยาขนาด 200 และ 400 ม.ก./ก.ก. วันเว้นวัน นาน 4 สัปดาห์ หรือให้หนูขาวเพศผู้กินสารสกัดในขนาด 50 100 และ 150 ม.ก./ก.ก. วันเว้นวัน นาน 14 สัปดาห์ ไม่พบความผิดปกติใดๆ แต่หนูที่ได้รับขนาด 150 ม.ก./ก.ก. จะมีอัตราการเติบโตช้าลงเล็กน้อย (Dhammaupahorn and Chaichantipyuth, 1989) ให้นุถิบกินสารสกัดด้วยเอทานอล 70% ขนาด 1 ก./ก.ก. นาน 60 วัน ไม่พบพิษต่อระบบสืบพันธุ์เพศผู้ (Burgos *et al.*, 1997) และให้หนูขาวกินน้ำยาแขวนตะกอนจากฟ้าทะลายโจรขนาด 0.12 1.2 และ 2.4 ก./ก.ก./วัน นาน 6 เดือน ไม่พบพิษ (Sithisomwongse *et al.*, 1989)

#### 5.4.2 พิษต่อเซลล์

สารสกัดเมทานอลจากใบ ขนาด 5.3 และ 3.1 ม.ก./ม.ล. เป็นพิษต่อเซลล์ human epidermoid carcinoma of nasopharynx และ p388 lymphocytic leukemia ในหลอดทดลอง ตามลำดับ โดยมีสาร andrographolide เป็นสารออกฤทธิ์ในขนาด 1.5 และ 1 ม.ก./ม.ล. ตามลำดับ ส่วนสาร 14-deoxy-11, 12-didehydroandrographolide และ neoandrographolide ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ดังกล่าว (Siripong *et al.*, 1992) สารสกัดน้ำจากส่วนต้นเหนือพื้นดิน เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง MT-4 (Yao *et al.*, 1992) สารสกัดคลอโรฟอร์มจากใบ ความเข้มข้น 3.91 ม.ก./ม.ล. เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง MT-4 (Yamamoto *et al.*, 1997) และสารสกัดน้ำร้อนจากส่วนต้นเหนือดิน เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง Hep-2 ความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ 50 % เท่ากับ 295 ม.ก./ม.ล. (Ma *et al.*, 2002) ในขณะที่สารสกัดเมทานอลจากใบเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง MT-4 อย่างอ่อน และสารสกัดน้ำจากใบขนาด 20 ม.ก./ม.ล. ให้ผลไม่ชัดเจนในการแสดงฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง MT-4 (Otake *et al.*, 1995)

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

#### 1. อุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงไก่เนื้อ

1.1 กรงเลี้ยงไก่ โรงเรือนเลี้ยงไก่แบบเปิด ซึ่งมีลวดตาข่ายกันทำความสะอาดและฆ่าเชื้อตามหลักมาตรฐาน

1.2 ลูกไก่กระทงคละเพศอายุแรกเกิด

1.3 หลอดไฟฟ้า

1.4 อุปกรณ์ให้น้ำ

1.5 ถังใส่อาหารทดลองประจำกลุ่มทดลองแต่ละกลุ่ม

#### 2. สารสกัดยับยั้งสมุนไพรมันชัน (จ. กาญจนบุรี) ฟัทะลายโจรและอาหารทดลองพื้นฐาน

2.1 วิธีการสกัดสารสกัดยับยั้งสมุนไพรมันชัน ฟัทะลายโจร สกัดแบบร้อน โดยใช้ 95 % ethanol จากหน่วยปฏิบัติการวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและเคมีอินทรีย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ (ห้อง 210) ม.เกษตรศาสตร์ 50 ถ. พหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กทม. 10900 โทรศัพท์ 0-2942-8900 ต่อ 244 ต่อ 211

#### 3. สารเพรดนิโซโลน

#### 4. อุปกรณ์และสารเคมีในการเจาะเลือด

4.1 เข็มฉีดยาเบอร์ 23

4.2 กระบอกฉีดยาขนาด 5 ซีซี

4.3 เฮพาริน (Heparin)

## 5. อุปกรณ์และสารเคมีในการวัดค่าอัตราส่วนของเฮทเทอร์โอฟิลต่อลิมโฟไซท์

- 5.1 microscopic glass slide 22x30 มิลลิเมตร
- 5.2 spreader
- 5.3 สีย้อม Wright-Giemsa
- 5.4 กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (light microscope)

## 6. อุปกรณ์และสารเคมีในการวัดความสามารถรวมของสารต้านอนุมูลอิสระในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริกโดยวิธี Ferric reducing ability of plasma (FRAP) assay

- 6.1 Sodium acetate จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 6.2 TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 6.3 Hydrochloric acid (HCl)
- 6.4 Ferric chloride จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 6.5 Ferrous sulfate จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 6.6 Spectrophotometer

## 7. อุปกรณ์ และสารเคมีในการวิเคราะห์ระบบกลูตาไธโอน

- 7.1 เครื่อง Elisa reader
- 7.2 96 well plate
- 7.3 Eight multi-channel pipette
- 7.4 Metaphosphoric acid จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 7.5 Sodium phosphate จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 7.6 Ethylene Diamine Tetra Acetic acid-Na (EDTA -Na) จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

7.7 Oxidized glutathione (GSSG) จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

7.8 Triethanolamine จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

7.9 5,5'-dithiosbis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

7.10 NADPH จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

7.11 Glutathione reductase (GR) จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

7.12 2-vinylpyridine จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

## 8. อุปกรณ์และสารเคมีในการวัด Malondialdehyde วิธี Thiobarbituric Acid (TBA) assay

8.1 หลอดทดลองขนาด 15 ml

8.2 Auto pipette ขนาด 20 200 และ 1,000  $\mu$ l

8.3 vortex mixer

8.4 cuvette quatze

8.5 เครื่อง UV/VIS Spectrophotometer รุ่น Helios Alpha หมายเลขเครื่อง UVA 130623 จากบริษัท บางกอกไฮแล็บ จำกัด ประเทศไทย

8.6 Waterbath

8.7 2- thiobarbituric acid (TBA) จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

8.8 Trichloroacetic acid จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

8.9 Butylatehydroxytoluene (BHT) จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

8.10 n-butanol จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

8.11 pyridine จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

8.12 Hydrochloric acid (HCL)

8.13 น้ำกลั่นปราศจากไอออน (Deionized water)

## วิธีการ

### 1. สัตว์ทดลอง

การทดลองใช้ไก่เนื้อทางการค้า คณะเพศ อายุ 1 วัน จำนวน 200 ตัว แบ่งไก่ทดลองออกเป็น 4 กลุ่มกลุ่มละ 50 ตัว ในแต่ละกลุ่มไก่เนื้อจะได้รับการเลี้ยงดูในสภาพแวดล้อมเดียวกัน ได้รับอาหารแบบกินเต็มที่ (*ad libitum*) และมีน้ำสะอาดให้กินตลอดเวลา

### 2. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) แบ่งไก่ทดลองออกเป็น 4 กลุ่มกลุ่มละ 50 ตัว โดยแต่ละกลุ่มจะได้รับอาหารทดลอง ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1: สูตรอาหารควบคุม (N)

กลุ่มที่ 2 : สูตรอาหารควบคุมเสริมเพรดนิโซโลนปริมาณ 3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (P)

กลุ่มที่ 3: สูตรอาหารควบคุมเสริมเพรดนิโซโลนปริมาณ 3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร และสารสกัดหยาบสมุนไพรขมิ้นชันระดับ 0.05 % โดยน้ำหนัก (CP) (กิติมา และคณะ, 2548)

กลุ่มที่ 4: สูตรอาหารควบคุมเสริมเพรดนิโซโลนปริมาณ 3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร และสารสกัดหยาบสมุนไพรรักษาหัวใจ ระดับ 0.1% โดยน้ำหนัก (AP)

3. การให้อาหารและน้ำ ได้กินอย่างเต็มที่ตลอดเวลา (*ad libitum*)

4. การให้แสงให้แสง 24 ชั่วโมงต่อวัน

5. การจัดการด้านสภาพแวดล้อม เลี้ยงไว้ในสภาพอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมทั่วไป

6. การเก็บตัวอย่าง

เมื่อไก่อายุ 14 21 และ 28 วัน สุ่มเจาะเก็บเลือด จากเส้นเลือดดำใต้ปีก (wing vein) กลุ่มละ 12 ตัว โดยใช้หลอดเก็บเลือดที่เคลือบด้วยเฮพาริน เพื่อวัดค่าอัตราส่วนของเม็ดเลือดขาวชนิดเฮเทอโรฟิลต่อลิมโฟไซต์ และปั่นแยกพลาสมาแบ่งออกเป็น 2 ส่วน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์ความสามารถรวมในการรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์ MDA ส่วนของเม็ดเลือดแดงจะนำมาวิเคราะห์กลูตาไธโอน

7. วิธีการ

7.1 ศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรมิ้นชันและฟ้าทะลายโจร ต่ออัตราส่วนเม็ดเลือดขาวชนิดเฮเทอโรฟิลต่อลิมโฟไซต์ (H/L ratio)

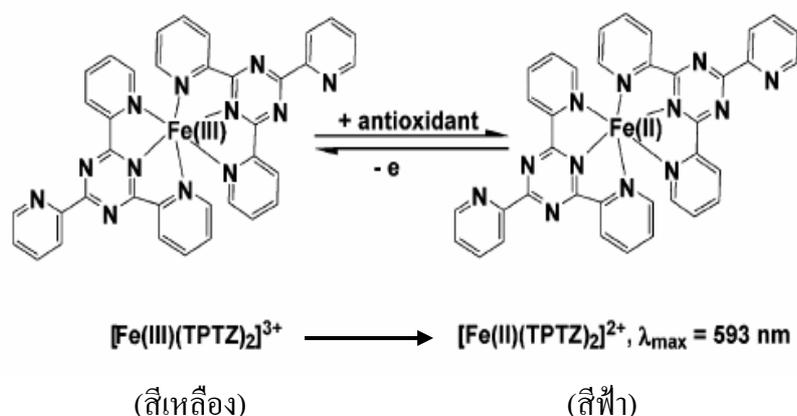
นำเลือดที่เก็บได้ มาเสมียร์ลงบนกระจกสไลด์ทำตัวอย่างละ 2 ซ้ำ (duplicated) ปล่อยให้แห้งในอากาศ 15-20 นาที จากนั้นทำการย้อมด้วยสี Wright-Giemsa และนำมาหาอัตราส่วนเม็ดเลือดโดยการนับแยกชนิดเม็ดเลือดอัตราส่วน 100 เซลล์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (Light microscope) ค่าสัดส่วนของเม็ดเลือดขาวชนิดชนิด เฮเทอโรฟิลต่อลิมโฟไซต์ คำนวณโดยใช้สูตร Gross and Siegel (1983) ดังนี้

$$\text{H/L ratio} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวชนิดเฮเทอโรฟิล}}{\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด ลิมโฟไซต์}}$$

7.2 ศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรขมิ้นชัน และฟ้าทะลายโจร ต่อความสามารถรวมของสารต้านอนุมูลอิสระในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริกในตัวอย่างพลาสมาโดยวิธี Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) assay

วัดค่าความสามารถรวมของสารต้านอนุมูลอิสระในพลาสมา (Total Antioxidant Capacity, TAC) ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ (duplicated) โดยวิธี Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) Assay (ดัดแปลงจากวิธีการของ Benzie and Strain (1996)) โดยใช้หลักการของสารต้านอนุมูลอิสระ ในพลาสมา สามารถรีดิวซ์ เฟอร์ริก ไอออน ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ไปเป็นเฟอร์รัส ไอออน ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ที่ pH ต่ำ โมเลกุล tripyridyl-triazine (TPTZ) ในปฏิกิริยาจะจับกับ เฟอร์รัส ไอออน ทำให้เกิดสีฟ้า (ดังภาพที่ 23) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm

คำนวณความเข้มข้นได้จากการเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของ  $\text{Fe}^{2+}$  ที่ทราบความเข้มข้นแล้ว (0-2,500  $\mu\text{mol/L}$ ) รายงานผลค่า TAC เป็นค่า  $\mu\text{mol/liter}$  (Benzie and Strain, 1996; Fernandez-Pachon *et al.*, 2005)



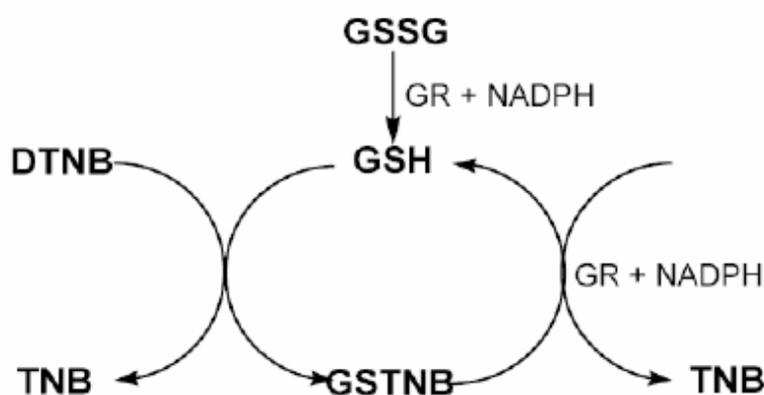
ภาพที่ 23 ปฏิกิริยาระหว่าง TPTZ กับ  $\text{Fe}^{2+}$

ที่มา: Fernandez-Pachon *et al.* (2005)

7.3 ศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรขมิ้นชัน และฟ้าทะลายโจร ต่อความเข้มข้นของ tGSH GSH GSSG และ GSH/GSSG ในตัวอย่างเม็ดเลือดแดง วิเคราะห์ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ (duplicated) โดยวิธี enzymatic recycling assay (ดัดแปลงวิธีการจาก Tietze, 1969; Baker *et al.*, 1990; Imam and Mehvar, 2006)

### 7.3.1 วิเคราะห์กลูตาไธโอนโดยรวม (Total Glutathione :tGSH)

tGSH ในตัวอย่าง จะทำการวัดโดยวิธี enzymatic recycling method โดยใช้ เอนไซม์กลูตาไธโอน รีดักเตส ( glutathione reductase) เพื่อหาความเข้มข้นของ tGSH ใน microtiter plate assay โดยอาศัยหลักการดังนี้ หมู่ sulhydryl ของ GSH จะทำปฏิกิริยากับ 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) และ ให้สี เหลืองของ 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) ซึ่งถูกวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ ความยาวคลื่น 405 nm อัตราการสร้าง TNB เป็นสัดส่วนโดยตรงต่อปฏิกิริยาการย้อนกลับ ซึ่งการย้อนกลับนี้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อความเข้มข้นของ tGSH การเกิดปฏิกิริยาแสดงดังภาพที่ 25



ภาพที่ 24 ปฏิกิริยาการวิเคราะห์ tGSH และ/หรือ GSSG ด้วยวิธี enzymatic recycling method

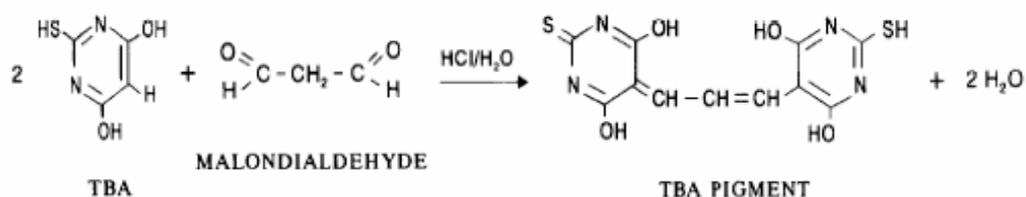
### 7.3.2 วิเคราะห์ ออกซิไดซ์กลูตาไธโอน (oxidized glutathione: GSSG)

การวัดความเข้มข้นของ GSSG ในตัวอย่างเม็ดเลือดแดง โดยวิธี enzymatic recycling assay ซึ่ง GSSG ที่จะวัดเกิดจากปฏิกิริยารีดักชัน ของ DTNB ไปเป็นรีดิวซ์กลูตาไธโอน ดังนั้นการวัดเฉพาะ GSSG จะต้องกำจัด GSH โดยเติม 2-vinylpyridine เพื่อไปกำจัด GSH ก่อนทำการวิเคราะห์โดยใช้วิธีการเดียวกับการวิเคราะห์ tGSH

คำนวณความเข้มข้นได้จากการเปรียบเทียบกับความเข้มข้นกับกราฟมาตรฐาน ความเข้มข้นของ GSSG รายงานผลเป็นค่า tGSH, GSSG และอัตราส่วนของ GSH/GSSG เพื่อเป็นดัชนี บ่งชี้ภาวะรีดอกซ์ภายในเซลล์เม็ดเลือดแดง

7.4 ศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรขมิ้นชัน และฟ้าทะลายโจรต่อการเปอร์ ออกซิเดชันของไขมันโดยวัด MDA ในตัวอย่าง Plasma ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ (duplicated) ด้วยวิธี Thiobarbituric Acid (TBA) assay

MDA เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน จะไปทำปฏิกิริยากับ TBA เกิดเป็น Thiobarbituric acid reactive substrate (TBARS) ให้สีชมพูแดง ซึ่งเป็นผลจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง TBA 2 โมเลกุล กับ MDA 1 โมเลกุล วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่นแสง 532 นาโนเมตร และ 573 นาโนเมตร และรายงานผลค่า MDA เป็น nmol/ml พลาสมา (Sinnhuber *et al.*, 1958)



ภาพที่ 25 ปฏิกิริยาระหว่าง TBA และ MDA  
ที่มา: Sinnhuber *et al.* (1958)

## 8. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ผลทางสถิติโดย ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่ม โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P < .05$ ) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS เวอร์ชัน 11.5

## ผลและวิจารณ์

### 1. ผลของสารสกัดหยาบสมุนไพรขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรต่อภาวะความเครียด

ค่า H/L เป็นดัชนีบ่งชี้สภาวะเครียด โดยจะมีค่าสูงขึ้นตามระดับของความเครียด การทดลองนี้ให้เพรดนิโซโลน เสริมในอาหารเพื่อชักนำให้เกิดสภาวะเครียดในร่างกายไก่ เพรดนิโซโลนซึ่งเป็นสารประเภท แคลตาบอลิก สเตอรอยด์ จัดอยู่ในกลุ่มของกลูโคคอร์ติคอยด์ (Wendy *et al.*, 2004) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่หลังภายใต้สภาวะเครียด ผลการศึกษา (ตารางที่ 2) พบว่าที่อายุ 14 วัน ไก่เนื้อในกลุ่มที่ได้รับเพรดนิโซโลน (P) มีค่าเฉลี่ยของ H/L สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับ (N) (คิดเป็น 265.22 % ของค่าเฉลี่ยกลุ่ม N) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ซึ่งเป็นไปในลักษณะเดียวกันกับเมื่อให้ฮอร์โมนในกลุ่มกลูโคคอร์ติคอยด์ เช่น คอติซอล หรือ คอร์ติโคสเตอรอน (Lin *et al.*, 2004) สาเหตุที่ H/L สูงขึ้นพบว่า เกี่ยวข้องกับการชักนำกระบวนการ apoptosis ของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ขณะกระตุ้นการขับเซลล์เฮเทอโรฟิลเข้าสู่กระแสเลือดเพิ่มมากขึ้น (Harmon, 1998) อย่างไรก็ตามความเครียดที่เพิ่มสูงกว่ากลุ่ม N นี้ไม่ได้เกิดขึ้นตลอดไป เห็นได้จากการศึกษาที่อายุ 21 และ 28 วัน ที่ไม่พบความแตกต่างของระดับ H/L จากการวิเคราะห์ทางสถิติ เป็นไปได้ว่าหลังจากให้เพรดนิโซโลนช่วงระยะเวลาหนึ่งอาจมีกลไกการปรับตัวเพื่อตอบสนองต่อระดับของเพรดนิโซโลนลดลงจึงทำให้ความเครียดที่เกิดขึ้นในการทดลองปรากฏในระยะแรกเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Carter *et al.*, (2004) พบว่าการได้รับความเครียดบ่อยครั้งจะทำให้ร่างกายเกิดการปรับตัว

สำหรับกลุ่มที่เสริมสารสกัดหยาบสมุนไพรขมิ้นชัน (CP) และฟ้าทะลายโจร (AP) ร่วมกับเพรดนิโซโลน แม้ว่าที่อายุ 14 วัน จะมีค่าเฉลี่ย H/L สูงกว่ากลุ่ม N เกือบเป็น 2 เท่า (คิดเป็น 191.30 % และ 178.226 % ของค่าเฉลี่ยกลุ่ม N ตามลำดับ) แต่ก็ไม่พบนัยสำคัญทางสถิติ เป็นไปได้ว่าอิทธิพลของเพรดนิโซโลนในทั้งสองกลุ่มนี้ถูกควบคุมด้วยสารสกัดหยาบสมุนไพรขมิ้นชัน และฟ้าทะลายโจรที่เสริมในอาหาร ทำให้ความเครียดลดลงมาอยู่ในช่วงปกติได้ จึงมีความเป็นไปได้ในการใช้สมุนไพรทั้งสองชนิดเพื่อควบคุมความเครียดในไก่เนื้อ

ความเครียดมีผลเกี่ยวข้องกับสุขภาพอย่างมาก ความเครียดที่ต่อเนื่องหรือเรื้อรังเป็นสาเหตุทำให้ไก่เนื้อมีอัตราการเจริญเติบโตช้า ภูมิคุ้มกันต่ำ อัตราการตายสูง ประสิทธิภาพการให้ผลผลิตต่ำ และส่งผลต่อคุณภาพซาก (Reece *et al.*, 1972; Cheveille, 1976; Van kampen, 1981; Donker, 1990; Cooper and Washburn, 1998) กลูโคคอร์ติคอยด์ในระดับปานกลางจะมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ แต่ถ้ามีระดับสูง จะทำให้เกิดการตายของเซลล์ (Nittoh *et al.*, 1998; Kirsch *et al.*, 1999) โดยกลไกที่แท้จริง

ของกลูโคคอร์ติคอยด์ ที่ทำให้เซลล์ตายนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด แต่มีรายงานวิจัยพบว่ากลูโคคอร์ติคอยด์ กระตุ้นให้เกิดการสร้าง Reactive oxygen species (ROS) (Landfield and Eldridge, 1994) และการสร้าง ROS จะเพิ่มสูงขึ้นตามระดับของความเครียดที่เพิ่มสูงขึ้นด้วย (Dorge, 2002) เป็นเหตุให้เซลล์ต่างๆ ได้รับความเสียหายและตายได้ (Buttke and Sandstorm, 1994)

การเสริมสารสกัดหยาดสมุนไพรขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรในอาหารไก่เนื้อเพื่อควบคุมสถานะเครียดจึงอาจช่วยลดความสูญเสียจากปัญหาดังกล่าว

## ตารางที่ 2 อัตราส่วนของเฮทเทอโรฟิลต่อลิมโฟไซท์

กลุ่มทดลอง	อัตราส่วนของเฮทเทอโรฟิลต่อลิมโฟไซท์		
	อายุ		
	14 วัน	21 วัน	28 วัน
N	0.23±0.02 <sup>b</sup>	0.41±0.07	0.58±0.06
P	0.61±0.10 <sup>a</sup>	0.48±0.09	0.70±0.14
CP	0.44±0.09 <sup>ab</sup>	0.47±0.06	0.67±0.09
AP	0.41±0.05 <sup>ab</sup>	0.54±0.07	0.62±0.06

ตัวเลขแสดงค่า mean±SEM, n=12

<sup>a,b</sup> แสดงนัยสำคัญทางสถิติที่ P<.05 เมื่อเปรียบเทียบคอลัมน์เดียวกัน

## 2. ผลของสารสกัดหยาดสมุนไพรขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรต่อความสามารถรวมของสารต้านอนุมูลอิสระในการรีดิวซ์เหล็กเฟอร์ริก

การตรวจวิเคราะห์ค่า FRAP เป็นการวัดความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในตัวอย่างพลาสมา (TAC) ซึ่งหากค่านี้ต่ำกว่าปกติ จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดปัญหาสุขภาพ จากผลการทดลอง (ตารางที่ 3) พบว่าที่อายุ 14 วัน ไก่กลุ่มที่ได้รับเพรดนิโซโลน (P, CP, AP) มีค่า TAC สูงกว่ากลุ่ม N อย่างเห็นได้ชัด โดยพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม N และ AP (P<.05)

โดยทั่วไปภาวะเครียดจะกระตุ้นให้ร่างกายมีการตอบสนองเพื่อรักษาภาวะสมดุลไว้ โดยส่วนที่เกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระในกระแสเลือดก็จะมีมากขึ้น เนื่องจากเมื่อร่างกายเกิดความเครียด จะกระตุ้นการสร้างสารอนุมูลอิสระโดยเฉพาะ ROS จะเพิ่มสูงขึ้นตามระดับของความเครียดที่เพิ่มสูงขึ้น (Dorge, 2002) เพื่อควบคุมอนุมูลอิสระเหล่านี้ไว้ไม่ให้สูงจนเป็นอันตรายต่อเซลล์ พบว่ามี การสร้างกรดยูริก (Lin *et al.*, 2004) และขับกลูตาไธโอน (GSH) ออกจากเซลล์ตับ (Lew *et al.*, 1985; Hirota *et al.*, 1989) เข้าสู่กระแสเลือดเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งกรดยูริกจัดว่าเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มี ประสิทธิภาพสูง ในมนุษย์และสัตว์ปีก (Becker, 1993; Hellsten *et al.*, 1997) ความเข้มข้นของ กรดยูริกในพลาสมา ไก่จะมีค่าเป็น 2 เท่าของมนุษย์ (Klandorf *et al.*, 1999) และ GSH จัดว่าเป็น สารต้านออกซิเดชันที่สำคัญในการกำจัด ROS หรือร่วมกับการทำงานของเอนไซม์ GPx เพื่อกำจัด อนุมูลอิสระ (Yang *et al.*, 1987) นอกจากการปรับตัวของร่างกายต่อภาวะเครียดแล้ว สารสกัดหยาบ สมุนไพรที่ได้รับเข้าสู่ร่างกายยังเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการกำจัดอนุมูลอิสระ และมีผลเพิ่มค่า TAC ได้เช่นกัน โดยเฉพาะสารสกัดหยาบสมุนไพรขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรซึ่งมี คุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเด่นชัด (Masuda *et al.*, 2000; Kamdem *et al.*, 2002)

จากผลการทดลองที่อายุ 14 วันเป็นไปได้ว่า ร่างกายตอบสนองต่อความเครียดให้มีการเพิ่ม ค่า TAC ขึ้นได้ในระดับหนึ่ง แต่ไม่มากพอที่จะทำให้เกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่พบว่าเมื่อประกอบกับสารสกัดหยาบสมุนไพรฟ้าทะลายโจร (AP) มีผลทำให้ค่า TAC เพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ต่อมาการศึกษาที่อายุ 21 วัน ไม่พบความแตกต่างของค่า TAC ระหว่าง กลุ่มทดลอง ซึ่งในช่วงอายุนี้ไก่ทุกกลุ่มมีระดับความเครียดเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 2) จึงอาจ บ่งชี้ได้ว่าในภาวะที่อิทธิพลของความเครียดหมดไป สารสกัดหยาบสมุนไพรฟ้าทะลายโจรเพียง อย่างเดียวก็ไม่มีผลให้ค่า TAC แตกต่างกัน

แต่เมื่อพิจารณาผลการศึกษาในระยะต่อมา ที่อายุ 28 วัน กลับพบว่า กลุ่มที่เสริมด้วยสารสกัด หยาบสมุนไพรขมิ้นชัน (CP) และฟ้าทะลายโจร (AP) มีค่า TAC สูงกว่ากลุ่มควบคุม (N) และกลุ่มที่ เสริมด้วยเพรดนิโซโลน (P) (ตารางที่ 3) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) อิทธิพลต่อค่า TAC นี้ น่าจะเป็นผลจากสารสกัดหยาบสมุนไพร เนื่องจากระดับความเครียดไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 2) สิ่งที น่าสนใจคือ เหตุใดอิทธิพลของสารสกัดหยาบสมุนไพรจึงแสดงออกหลังจากทำการเสริมในอาหาร แล้วเป็นช่วงเวลาหนึ่ง จากผลการศึกษาเป็นไปได้หรือไม่ที่การออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบ สมุนไพรทั้งสองชนิดขึ้นอยู่กับระดับของสารสกัดในร่างกายที่อาจสะสมจากการได้รับในอาหารทุก วัน จนถึงระยะเวลาหนึ่งที่สามารถออกฤทธิ์ได้ หรือเป็นไปได้หรือไม่ว่า ขบวนการตอบสนองของ ร่างกายต่อการกระตุ้นของสารสกัดหยาบสมุนไพรในการเพิ่มการสังเคราะห์ สารต้านอนุมูลอิสระ

ต้องใช้เวลาระยะหนึ่ง สำหรับการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ด้วยขนาดสมุนไพรที่ใช้ผสมในอาหาร ในการทดลองนี้ ทั้งไขมันชั้นและฟ้าทะลายโจรต้องใช้เวลามากกว่า 3 สัปดาห์ จึงจะให้ผลเพิ่มค่า TAC อย่างชัดเจน เพื่อตอบคำถามเหล่านี้ ควรต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมด้านเภสัชจลศาสตร์ของสมุนไพร ทั้งสองชนิดในไก่เนื้อต่อไป

ตารางที่ 3 ค่าความสามารถรวมของสารต้านอนุมูลอิสระในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริก

กลุ่มทดลอง	ค่าความสามารถรวมของสารต้านอนุมูลอิสระในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริก ( $\mu\text{mol/l}$ )		
	อายุ		
	14 วัน	21 วัน	28 วัน
N	1474.43 $\pm$ 67.04 <sup>b</sup>	1462.21 $\pm$ 73.79	1314.22 $\pm$ 60.65 <sup>b</sup>
P	1700.26 $\pm$ 103.14 <sup>ab</sup>	1540.96 $\pm$ 97.98	1282.63 $\pm$ 109.80 <sup>b</sup>
CP	1628.11 $\pm$ 52.88 <sup>ab</sup>	1439.22 $\pm$ 69.00	1755.61 $\pm$ 61.69 <sup>a</sup>
AP	1769.64 $\pm$ 92.50 <sup>a</sup>	1473.60 $\pm$ 87.57	1549.43 $\pm$ 80.32 <sup>a</sup>

ตัวเลขแสดงค่า mean $\pm$ SEM, n=12

<sup>a,b</sup> แสดงนัยสำคัญทางสถิติที่ P<.05 เมื่อเปรียบเทียบคอลัมน์เดียวกัน

### 3. ผลของสารสกัดหยาบสมุนไพรไขมันชั้นและฟ้าทะลายโจรต่อระบบกลูตาไธโอน

ระบบกลูตาไธโอนมีบทบาทสำคัญในกระบวนการต่อต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ความเข้มข้นของกลูตาไธโอนระดับสูงภายในเซลล์จะทำหน้าที่ป้องกันหรือกำจัดอนุมูลอิสระหลายชนิด (Meister, 1992) กลูตาไธโอนจะทำปฏิกิริยาโดยตรงกับอนุมูลอิสระในลักษณะเป็นโมเลกุลต้านอนุมูลอิสระ (Saez *et al.*, 1990; Winterbourn and Metodiewa, 1994) ซึ่งจะเป็นตัวให้อิเล็กตรอน ในปฏิกิริยารีดักชัน ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ GPx (Chance *et al.*, 1979) ผลผลิตที่ได้จากการทำงานของ GPx คือ GSSG ซึ่ง GSSG จะสามารถเปลี่ยนกลับไปเป็น GSH ได้ โดยการทำงานของเอนไซม์ GR ซึ่งในปฏิกิริยาต้องอาศัย NADPH เป็นตัวรีดิวซ์ ในเซลล์หลายชนิด เช่นเม็ดเลือดแดง และเซลล์ตับ เมื่อระดับของ GSSG ภายในเซลล์ มีความเข้มข้นสูงจะถูกขนส่งออกจากเซลล์ ในขณะที่เกิดภาวะความเครียดจากภาวะออกซิเดชัน ซึ่งเป็นกลไกการทำงานของการรักษาสมดุลหมู่โซลและไคซัลไฟด์ภายในเซลล์ (Prchal *et al.*, 1975; Akerboom *et al.*, 1982)

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของ tGSH GSH GSSG และอัตราส่วนของ GSH /GSSG

ผลของสารสกัดหยาบสมุนไพรขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรต่อระบบกลูตาไธโอน				
ค่า	กลุ่มทดลอง	อายุ (วัน)		
		14	21	28
กลูตาไธโอนโดยรวม	N	22.60±0.63 <sup>d</sup>	33.32±0.74 <sup>a</sup>	24.11±0.25 <sup>c</sup>
	P	33.96±1.21 <sup>b</sup>	17.00±1.11 <sup>c</sup>	17.84±0.27 <sup>d</sup>
	CP	29.64±1.31 <sup>c</sup>	33.93±0.32 <sup>a</sup>	39.32±0.44 <sup>a</sup>
	AP	43.60±1.09 <sup>a</sup>	23.73±0.58 <sup>b</sup>	33.90±0.59 <sup>b</sup>
รีดิวซ์กลูตาไธโอน	N	21.42±0.63 <sup>c</sup>	31.76±0.74 <sup>a</sup>	19.36±0.33 <sup>c</sup>
	P	30.38±1.12 <sup>b</sup>	12.59±1.11 <sup>d</sup>	13.73±0.27 <sup>d</sup>
	CP	27.39±1.28 <sup>b</sup>	28.50±0.39 <sup>b</sup>	32.18±0.56 <sup>a</sup>
	AP	41.84±1.11 <sup>a</sup>	18.12±0.62 <sup>c</sup>	26.93±0.69 <sup>b</sup>
ออกซิไดซ์กลูตาไธโอน	N	1.18±0.06 <sup>a</sup>	3.11±0.58 <sup>a</sup>	4.76±0.30 <sup>a</sup>
	P	3.58±0.24 <sup>d</sup>	4.40±0.21 <sup>b</sup>	4.11±0.11 <sup>a</sup>
	CP	2.25±0.12 <sup>c</sup>	5.44±0.30 <sup>c</sup>	7.14±0.38 <sup>b</sup>
	AP	1.72±0.06 <sup>b</sup>	5.61±0.24 <sup>c</sup>	6.97±0.20 <sup>b</sup>
รีดิวซ์ต่อออกซิไดซ์ กลูตาไธโอน	N	18.53±1.02 <sup>b</sup>	9.76±0.34 <sup>a</sup>	4.25±0.33 <sup>a</sup>
	P	8.84±0.68 <sup>d</sup>	2.93±0.30 <sup>c</sup>	3.37±0.13 <sup>b</sup>
	CP	12.41±0.75 <sup>c</sup>	5.40±0.34 <sup>b</sup>	4.66±0.32 <sup>a</sup>
	AP	24.76±1.34 <sup>a</sup>	3.31±0.22 <sup>c</sup>	3.91±0.18 <sup>ab</sup>

ตัวเลขแสดงค่า mean±SEM, n=10

<sup>a,b,c,d</sup> แสดงนัยสำคัญทางสถิติที่ P<.05 เมื่อเปรียบเทียบคอลัมน์เดียวกัน

อัตราส่วนของ GSH/GSSG ถูกนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดที่สำคัญของภาวะความเครียดจากภาวะออกซิเดชันในระดับเซลล์ ซึ่งจากหลายรายงานวิจัยพบว่าอัตราส่วนของ GSH /GSSG เป็นตัวบ่งชี้ความเครียดจากภาวะออกซิเดชันที่ดีมาก (Tarin, 1996; Tarin *et al.*, 1998; Avanzo *et al.*, 2001; Kaneko *et al.*, 2001) ภายใต้อาการเครียด ระดับของ GSH ภายในเซลล์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว

ดังนั้นอัตราส่วนของ GSH/GSSG จึงเป็นตัวบ่งชี้สภาวะที่ผิดปกติของรีดอกซ์ภายในเซลล์ และทำหน้าที่รักษาสมดุลรีดอกซ์ภายในเซลล์ด้วย (Imam and Mehvar, 2006)

จากผลการศึกษาการชักนำให้เกิดความเครียดด้วยเพรดนิโซโลนในระดับ 3 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักอาหาร 1 กิโลกรัมพบว่า ไก่เนื้อช่วงอายุ 14 วันกลุ่มที่เสริมด้วยเพรดนิโซโลน(P) มีค่า tGSH และGSH สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < .05$ ) (ตารางที่ 4) แสดงว่าภายใต้สภาวะความเครียดและการเกิดแคทาบอลิซึม ที่ถูกชักนำด้วยเพรดนิโซโลนอาจทำให้อนุมูลอิสระถูกผลิตเพิ่มมากขึ้น เป็นผลกระตุ้นให้เซลล์สังเคราะห์ GSH มากขึ้น ดังเช่นรายงานการศึกษาโดยให้ฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนในไก่เนื้อ พบว่า มีผลทำให้ร่างกายเกิดความเครียดจากภาวะออกซิเดชัน (Lin *et al.*, 2004) และเป็นสาเหตุของการเพิ่มขึ้นของ tGSH และ GSH ซึ่งการเพิ่มขึ้นนี้ เป็นกลไกการป้องกันเซลล์จากการเริ่มต้นเกิดความเครียดหรือการเกิดความเครียดที่เรื้อรัง (Pamela, 2005) นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการออกซิเดชันจาก GSH ไปเป็น GSSG เพิ่มสูงขึ้นซึ่งสอดคล้องกับการศึกษานี้โดยพบว่า ที่อายุ 14 และ 21 วัน ไก่เนื้อที่ได้รับเพรดนิโซโลน (P) มีค่า GSSG สูงกว่ากลุ่มควบคุม (N) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < .05$ ) (ตารางที่ 4) แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าค่า tGSH และ GSH ที่สูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในช่วงอายุ 14 วันนั้น กลับลดลงต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (N) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < .05$ ) ที่อายุ 21 และ 28 วัน (ตารางที่ 4) แสดงว่าไก่เนื้อที่อยู่ในสภาวะความเครียดจากภาวะออกซิเดชันเป็นระยะเวลาานานทำให้ระดับของ tGSH และ GSH ลดต่ำลงเนื่องจากภายในเซลล์จะมีการควบคุม สมดุลรีดอกซ์โดยการรักษาระดับของ GSH และ GSSG ให้อยู่ในภาวะที่สมดุล หากร่างกายเกิดความเครียดจากภาวะออกซิเดชันจะมีผลรบกวนต่อสมดุลรีดอกซ์ นี้โดย GSH จะทำหน้าที่กำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ GPx และเปลี่ยนไปเป็น GSSG สูงขึ้น หรือรวมกับอนุพันธ์ของอนุมูลอิสระชนิดอื่นๆ และถูกขนส่งออกนอกเซลล์ (Akerboom, 1990) ดังนั้นจึงทำให้ระดับของ GSH ภายในเซลล์ลดลงด้วย เช่นเดียวกับการศึกษานี้ ซึ่งพบว่าในกลุ่มที่เสริมด้วยเพรดนิโซโลน (P) ที่อายุ 21 และ 28 วัน มีระดับของ tGSH และ GSH ลดต่ำลงอย่างเห็นได้ชัด ส่วนในกลุ่มที่เสริมด้วยสารสกัดหยาบสมุนไพรขมิ้นชัน (CP) และ ฟัทะลายโจรนั้นกลับไม่ลดลงตามอิทธิพลของเพรดนิโซโลน ซึ่งแสดงว่าฤทธิ์ของสารสกัดหยาบสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดนั้น อาจช่วยในการกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นและรักษาสมดุลรีดอกซ์ภายในเซลล์ได้จึงทำให้ระดับ tGSH และ GSH ไม่ลดต่ำลงตามกลุ่มที่เสริมด้วยเพรดนิโซโลน (P)

จากรายงานวิจัย ความเครียดจากภาวะออกซิเดชัน จะทำให้อัตราส่วนระหว่าง GSH/ GSSG ลดลง (Schafer and Buettner, 2001) เช่นเดียวกับการศึกษานี้ พบว่าไก่เนื้อกลุ่มที่เสริมด้วยเพรดนิโซโลน (P) ที่อายุ 14, 21 และ 28 วัน มีอัตราส่วนของ GSH/ GSSG ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (N) อย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติ ( $P < .05$ ) ซึ่งแสดงว่าเพรดนิโซโลนในระดับ 3 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักอาหาร 1 กิโลกรัม สามารถชักนำให้ไก่เนื้อเกิดความเครียดจากภาวะออกซิเดชันได้

จากการศึกษานี้ พบว่า การเสริมสารสกัดหยาบสมุนไพรฟ้าทะลายโจรในอาหาร (AP) ทำให้มีค่า tGSH และ GSH สูงกว่ากลุ่มที่เสริมด้วย เพรดนิโซโลน (P) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < .05$ ) ที่อายุ 14 วัน ซึ่งการเพิ่มขึ้นนี้อาจเป็นผลมาจากสารสกัดหยาบสมุนไพรฟ้าทะลายโจรซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Kamdern *et al.*, 2002) ช่วยส่งเสริมการทำงานของ GSH โดยร่วมกันกำจัดอนุมูลอิสระ ทำให้ระดับของ tGSH และ GSH คงอยู่สูงในกลุ่มที่เสริมสารสกัดหยาบสมุนไพรฟ้าทะลายโจร และเมื่อพิจารณากระดับของ GSSG การทดลองนี้ปรากฏว่าในกลุ่มที่เสริมสารสกัดหยาบสมุนไพรฟ้าทะลายโจรทั้งไขมันชั้นและฟ้าทะลายโจร ต่ำกว่ากลุ่มที่เสริมด้วยเพรดนิโซโลนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < .05$ ) ซึ่งแสดงว่า สารสกัดหยาบสมุนไพรฟ้าทะลายโจร ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Masuda *et al.*, 2001; Kamdem *et al.*, 2002) ช่วยส่งเสริมการทำงานของ GSH ในการกำจัดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ทำให้การออกซิเดชันของ GSH ไปเป็น GSSG ลดลง จึงทำให้ค่า GSH/GSSG Ratio ในกลุ่มที่เสริมด้วยสารสกัดหยาบสมุนไพรฟ้าทะลายโจร สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้เสริมซึ่งจะเห็นได้ชัดเจนในกลุ่มที่เสริมด้วยสารสกัดหยาบสมุนไพรฟ้าทะลายโจรไขมันชั้นในทุกช่วงอายุการทดลอง ส่วนในกลุ่มที่เสริมด้วยสารสกัดหยาบสมุนไพรฟ้าทะลายโจรพบความแตกต่างที่อายุ 14 วันเท่านั้น อาจเป็นไปได้ว่าสารออกฤทธิ์ในสมุนไพรแต่ละชนิดมีกระบวนการทำงานที่แตกต่างกัน เป็นที่น่าสังเกตคือ สมุนไพรไขมันชั้นมีสารที่มีโครงสร้างในกลุ่มเคอร์คิวมิน ที่สามารถละลายได้ในไขมัน สามารถซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ดีกว่าสาร ไคเทอรี่ปีน แลคโตน ที่พบในสมุนไพรฟ้าทะลายโจร ความแตกต่างทางเภสัชจลศาสตร์นี้อาจมีอิทธิพลต่อการทำงานในระดับเซลล์อย่างมีนัยสำคัญซึ่งควรจะได้มีการศึกษาต่อไป

การศึกษานี้ยังพบว่า ค่า tGSH GSH และ GSH/GSSG Ratio มีค่าลดลงตามการเพิ่มขึ้นของอายุ ซึ่งจากรายงานวิจัยพบว่า การเพิ่มขึ้นของอายุจะทำให้ระดับของ GSH จะลดลงในเนื้อเยื่อสมองของสัตว์หลายชนิด (Yuanguai *et al.*, 2006, Chen *et al.*, 1989; Liu, 2002; Kim *et al.*, 2003) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Avanzo *et al.* (2001) ว่ามีการเพิ่มอัตราเมตาบอลิซึมในไก่เนื้อที่มากขึ้นทำให้ร่างกายสร้างอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งนำไปสู่การลดลงของ GSH ในเนื้อเยื่อตามอายุที่เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากในอายุที่เพิ่มมากขึ้นจะทำให้ GSH เกิดออกซิเดชันมากขึ้น และทำให้ระดับของ GSH ลดลงตามอายุที่เพิ่มมากขึ้น (Kamel, 2003) ในกรณีนี้ความเครียดที่เพิ่มสูงขึ้นตามอายุที่เพิ่มมากขึ้นจึงทำให้ระดับของ GSH ลดลงตามอายุที่เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ GSSG ยังเพิ่มสูงขึ้นในหนูตามอายุที่เพิ่มมากขึ้นด้วย ซึ่งการลดลงของระดับ GSH และการเพิ่มขึ้นของระดับ GSSG ซึ่งมีผลทำให้อัตราส่วนของ GSH/GSSG ลดลง ซึ่งภาวะนี้จะถูกนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้สภาวะสมดุลรีดอกซ์ภายในเซลล์ (Dringen *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2002; Samuele *et al.*, 2005)

#### 4. ผลของสารสกัดหยาบสมุนไพรขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรต่อการเปอร้ออกซิเดชันของไขมัน

การเปอร้ออกซิเดชันของไขมันเป็นสาเหตุมาจากความเครียดจากภาวะออกซิเดชันซึ่งเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระและไขมันซึ่งมีอนุมูลอิสระเข้าไปทำลายในส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เซลล์ได้รับความเสียหายและเกิดการตายได้ ซึ่งผลสุดท้ายที่ได้จากการเกิดกระบวนการเปอร้ออกซิเดชันนี้ จะได้สารพวกอัลดีไฮด์ เช่น MDA และ 4-HNE หรือ เรียกว่า Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) ซึ่งใช้บ่งชี้สถานะความเครียดจากภาวะออกซิเดชัน (Porter *et al.*, 1995; Halliwell, 1996)

ในการทดลองนี้ชักนำให้เกิดความเครียดจากภาวะออกซิเดชัน ด้วยการเสริมเพรดนิโซโลน ในระดับ 3 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักอาหาร 1 กิโลกรัม พบว่าไก่เนื้อที่ อายุ 14 และ 21 วันไก่กลุ่มที่เสริมด้วยเพรดนิโซโลน (P) มีแนวโน้มของการเกิดเปอร้ออกซิเดชันของไขมันสูงกว่ากลุ่มควบคุม (N) (ตารางที่ 5) โดยจะเห็นเด่นชัดในไก่เนื้อที่อายุ 28 วันพบว่าการเปอร้ออกซิเดชันของไขมันสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < .05$ ) ซึ่งแสดงว่า เพรดนิโซโลนระดับ 3 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักอาหาร 1 กิโลกรัม สามารถชักนำให้เกิดความเครียดจากภาวะออกซิเดชันได้ เนื่องจากเพรดนิโซโลนซึ่งเป็นสารกลุ่มเดียวกับสารกลุ่มกลูโคคอร์ติคอยด์ซึ่งออกฤทธิ์คล้ายกับฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนโดยกระตุ้นแคแทบอลิซึมและทำให้มีการสร้างอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น (Hidalgo, 1991) ส่งผลให้เกิดความเครียดจากภาวะออกซิเดชัน (Lin *et al.*, 2004) ซึ่งได้ผลเหมือนกับการศึกษาการเหนี่ยวนำการเกิดเปอร้ออกซิเดชันด้วยคอร์ติโคสเตอโรนระดับ 30 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักอาหาร 1 กิโลกรัม (Lin *et al.*, 2004) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Rajashree and Puvanakrishnan, 1998; Ohtsuka *et al.*, 1998; Pereira *et al.*, 1999; Orzechowski *et al.*, 2000) นอกจากนี้ในภาพรวมยังพบว่าค่า TBARS มีค่าสูงขึ้นตามอายุที่เพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Subathra *et al.* (2005)

ผลของการเสริมสารสกัดหยาบสมุนไพรขมิ้นชันในอาหารไก่เนื้อต่อการเปอร้ออกซิเดชันของไขมัน (ตารางที่ 5) พบว่า กลุ่มที่เสริมด้วยสารสกัดหยาบสมุนไพรขมิ้นชัน (CP) เกิดเปอร้ออกซิเดชันของไขมัน ต่ำกว่ากลุ่มที่เสริมด้วยเพรดนิโซโลนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < .05$ ) ในทุกช่วงอายุการศึกษา ขณะที่กลุ่มที่เสริมสารสกัดหยาบสมุนไพรฟ้าทะลายโจร (AP) เกิดเปอร้ออกซิเดชันของไขมัน ต่ำกว่ากลุ่มที่เสริมด้วยเพรดนิโซโลนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < .05$ ) ที่อายุ 28 วัน ผลการศึกษานี้อาจจะบ่งชี้ประโยชน์ของสารสกัดหยาบสมุนไพรทั้งสองชนิดในการป้องกันความเสียหายจากอนุมูลอิสระที่มีต่อเซลล์ โดยเฉพาะที่เยื่อหุ้มเซลล์

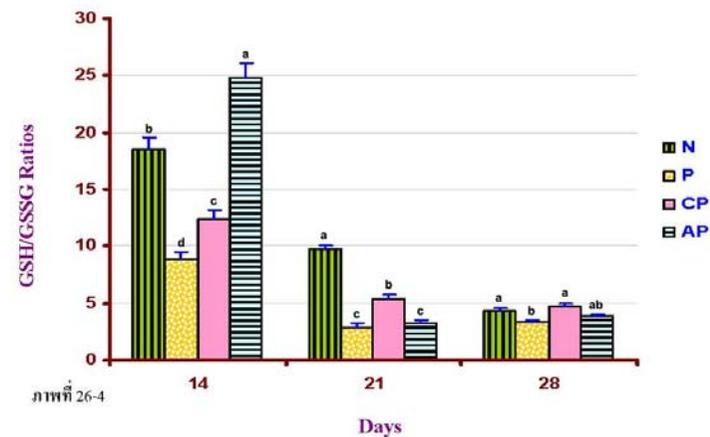
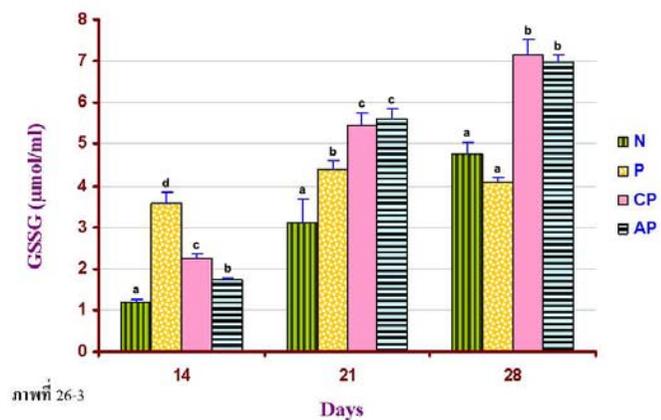
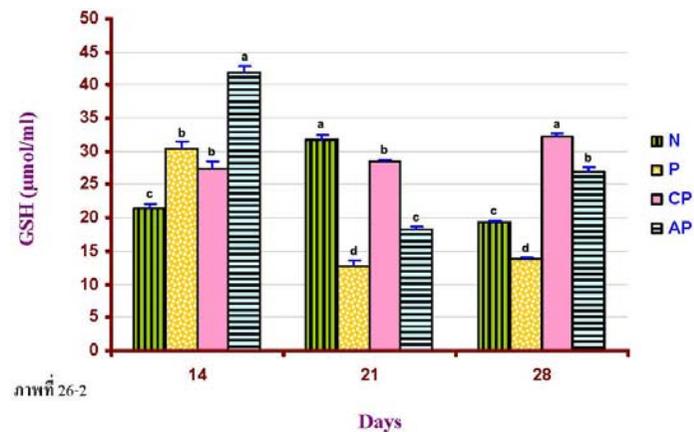
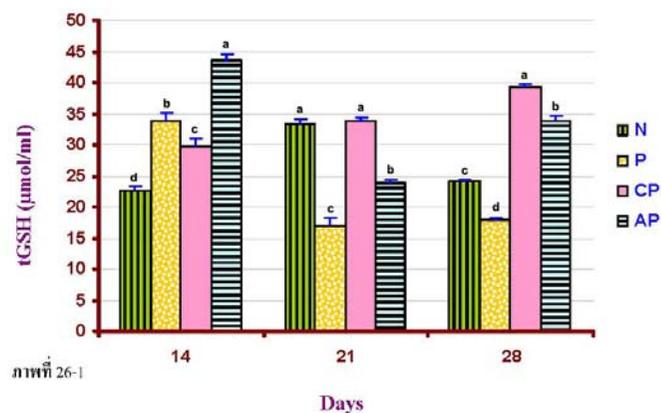
สมุนไพรขมิ้นชันมีสารออกฤทธิ์ในกลุ่มเคอร์คิวมิน ที่มีคุณสมบัติละลายในไขมัน (Sreejayan and Rao, 1994; Srinivas, 1992) จึงเป็นไปได้ว่าสารเคอร์คิวมินส่วนใหญ่อาจสะสมอยู่ในบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้มีบทบาทสำคัญในการป้องกันการทำลายของเยื่อหุ้มเซลล์จากกระบวนการเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน (Seeman, 1990) จึงแสดงผลชัดเจน และเร็วกว่าการออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบสมุนไพรฟ้าทะลายโจร (เริ่มเห็นผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $P<.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเพรดนิโลนที่อายุ 28 วัน ตามลำดับ) รายงานผลการศึกษาผลของเคอร์คิวมินอื่นๆ พบว่าเคอร์คิวมินป้องกันการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของไขมันใน microsomal, สมออง liposome (Tonnessen *et al.*, 1993) รวมทั้งยังช่วยลดระดับ lipid peroxide เพิ่มการทำงานของเอนไซม์ SOD, CAT และ GPx ในตับ (Reddy, 1992)

ตารางที่ 5 ความเข้มข้นของมาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde)

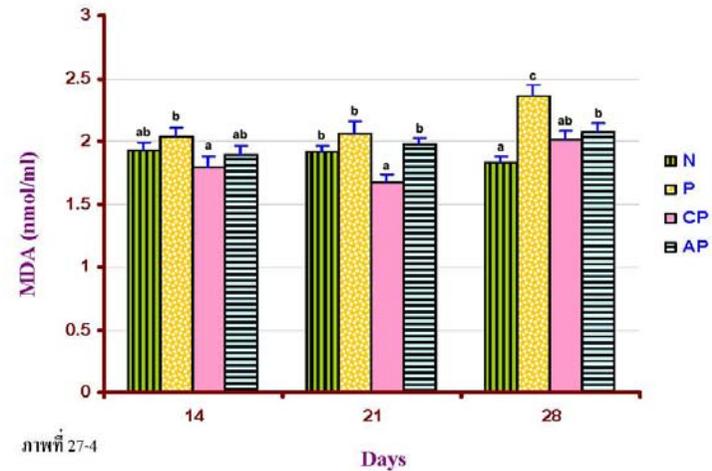
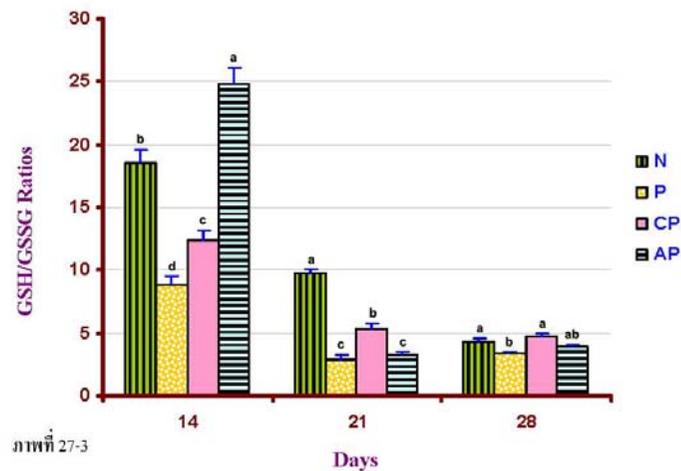
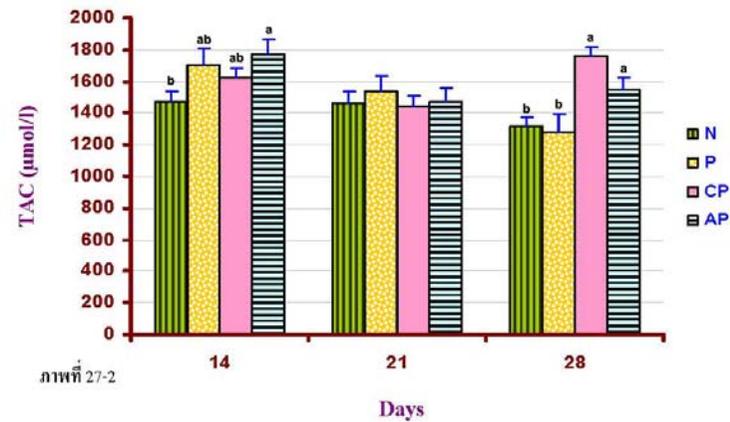
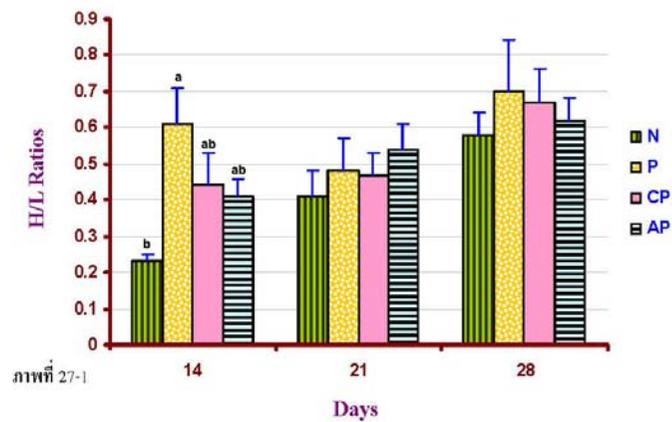
กลุ่มทดลอง	ความเข้มข้นของมาลอนไดอัลดีไฮด์ (nmol/ml)		
	อายุ (วัน)		
	14	21	28
N	1.93±0.06 <sup>ab</sup>	1.91±0.05 <sup>b</sup>	1.83±0.05 <sup>a</sup>
P	2.04±0.07 <sup>b</sup>	2.06±0.10 <sup>b</sup>	2.36±0.08 <sup>c</sup>
CP	1.79±0.09 <sup>a</sup>	1.68±0.05 <sup>a</sup>	2.01±0.08 <sup>ab</sup>
AP	1.89±0.07 <sup>ab</sup>	1.98±0.04 <sup>b</sup>	2.07±0.07 <sup>b</sup>

ตัวเลขแสดงค่า mean±SEM, n=12

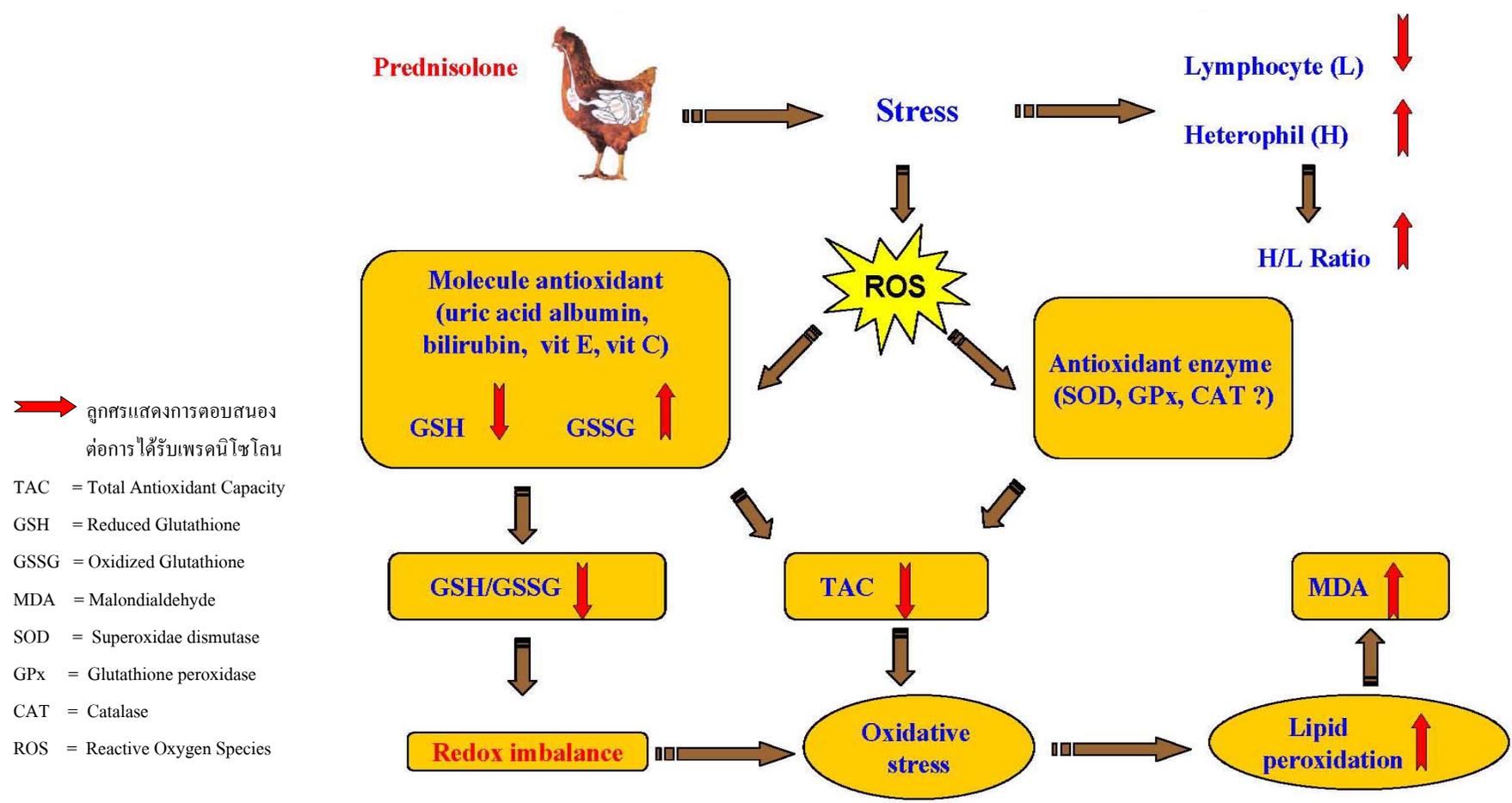
<sup>a,b,c</sup> แสดงนัยสำคัญทางสถิติที่  $P<.05$  เมื่อเปรียบเทียบคอลัมน์เดียวกัน



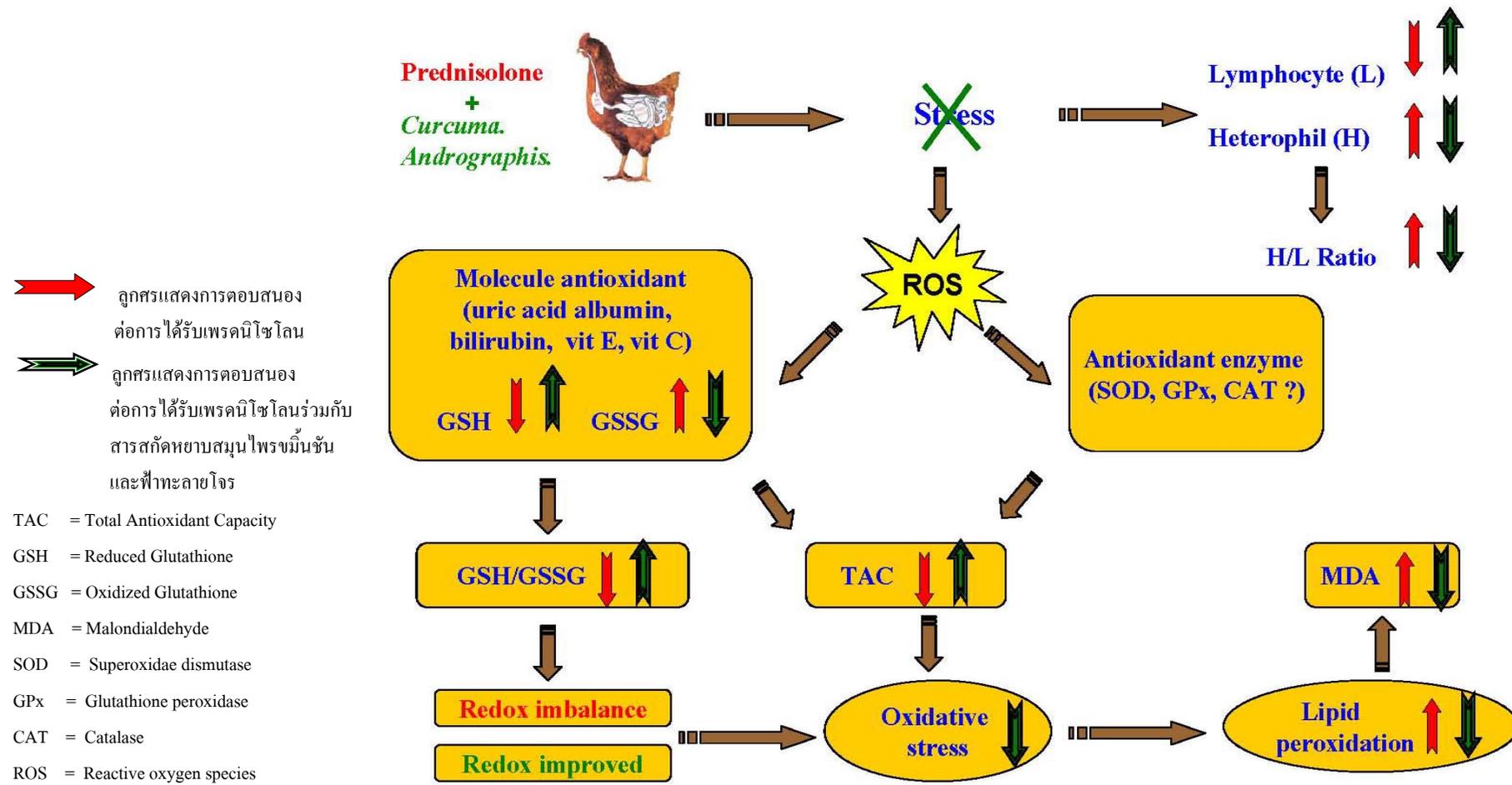
ภาพที่ 26 กราฟแสดงความเข้มข้นของ tGSH; 26-1, GSH; 26-2, GSSG; 26-3 และค่า GSH/GSSG ratios; 26-4 N: อาหารควบคุม; P: อาหารควบคุมเสริมเพรดนิโซโลน 3 ม.ก./กก.อาหาร; CP: อาหารควบคุมเสริมเพรดนิโซโลน 3 ม.ก.และสารสกัดยับยั้งสมุนไพรมิ้นชันระดับ 0.05 % โดยน้ำหนัก; AP: อาหารควบคุมเสริมเพรดนิโซโลน 3 ม.ก./กก.อาหารและสารสกัดยับยั้งสมุนไพรร้าทะลายโจรระดับ 0.1%โดยน้ำหนัก; <sup>a,b,c,d</sup> แสดงนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$



ภาพที่ 27 กราฟแสดงค่า H/L ratios; 27-1, TAC; 27-2, GSH/GSSG ratios; 27-3 MDA; 27-4 N: อาหารควบคุม; P: อาหารควบคุมเสริมเพรดนิโซโลน 3 ม.ก./กก.อาหาร; CP: อาหารควบคุมเสริมเพรดนิโซโลน 3 ม.ก.และสารสกัดหยาบสมุนไพรขมิ้นชันระดับ 0.05 % โดยน้ำหนัก; AP: อาหารควบคุมเสริมเพรดนิโซโลน 3 ม.ก./กก.อาหารและสารสกัดหยาบสมุนไพรฟ้าทะลายโจรระดับ 0.1%โดยน้ำหนัก; <sup>a,b,c,d</sup> แสดงนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < .05$



ภาพที่ 28 เสนอกลไกแสดงการตอบสนองของร่างกายต่อการเกิดความเครียดจากภาวะออกซิเดชั่นโดยการชักนำด้วยเพรดนิโซโลน



→ ลูกศรแสดงการตอบสนองต่อการได้รับเพรดนิโซโลน  
→ ลูกศรแสดงการตอบสนองต่อการได้รับเพรดนิโซโลนร่วมกับสารสกัดหยาดสมุนไพรขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจร

TAC = Total Antioxidant Capacity  
 GSH = Reduced Glutathione  
 GSSG = Oxidized Glutathione  
 MDA = Malondialdehyde  
 SOD = Superoxidase dismutase  
 GPx = Glutathione peroxidase  
 CAT = Catalase  
 ROS = Reactive oxygen species

ภาพที่ 29 เสนอกลไกแสดงการตอบสนองของร่างกายต่อการเกิดความเครียดจากภาวะออกซิเดชั่นเมื่อได้รับสารสกัดหยาดสมุนไพรขมิ้นชัน และฟ้าทะลายโจรร่วมกับเพรดนิโซโลน

## สรุปและข้อเสนอแนะ

### สรุป

1. เพรดนิโซโลนระดับ 3 มิลลิกรัมต่อกิโลอาหาร สามารถชักนำให้ไ้เนื้อเกิดความเครียดอย่างเห็นได้ชัดในช่วงอายุ 14 วัน ขณะที่ ช่วงอายุ 21 และ 28 วัน ไ้เนื้อเกิดการปรับตัวต่อระดับของเพรดนิโซโลน จึงทำให้ระดับของความเครียดไม่แตกต่างกันในทุกกลุ่มการทดลอง
2. การเสริมสารสกัดหยาบจากสมุนไพรขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรร่วมกับภาวะความเครียดสามารถช่วยควบคุมระดับความเครียดได้ซึ่งจะเห็นระดับความเครียดไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมตามรายงานผลการทดลอง
3. การเสริมสารสกัดหยาบจากสมุนไพรขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระออกฤทธิ์ในการส่งเสริมการทำงานของระบบต้านอนุมูลอิสระทำให้ค่า total antioxidant capacity สูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในไ้เนื้อช่วงอายุ 28 วัน
4. สารสกัดหยาบจากสมุนไพรขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรซึ่งออกฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระร่วมกับ GSH และส่งเสริมการทำงานของระบบกลูตาไธโอนทำให้อัตราส่วนระหว่าง GSH/GSSG Ratio ในไ้เนื้อที่ได้รับสารสกัดหยาบสมุนไพร สูงกว่ากลุ่มที่มีความเครียดแสดงว่าสมุนไพรสามารถช่วยในการรักษาสมดุลรีดอกซ์ภายในเซลล์ได้ดีกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสมุนไพร
5. สารสกัดหยาบจากสมุนไพรขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรช่วยลดความเครียดจากภาวะออกซิเดชัน และการเกิด lipid peroxidation ในไ้เนื้อโดยเพิ่มค่า total antioxidant capacity อัตราส่วนระหว่าง GSH/GSSG และลด malondialdehyde ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขบวนการ lipid peroxidation

## ข้อเสนอแนะ

### ประเด็นที่น่าศึกษาเพิ่มเติม

1. จากรายงานพบว่าความเครียดส่งผลให้ร่างกายสร้างกรดยูริกเพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะในสัตว์ปีก ซึ่งจากรายงานพบว่า กรดยูริกมีความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชั่นที่มีประสิทธิภาพสูง ซึ่งน่าจะมีความสัมพันธ์กับค่า total antioxidant capacity ที่เพิ่มมากขึ้นด้วย
2. การวัดความเข้มข้นของ ริดิซัลกลูตาไธโอนต่อ ออกซิไดซ์ กลูตาไธโอน (GSH/GSSG) ในตัวอย่างพลาสมา ซึ่งกลูตาไธโอนจัดได้ว่าเป็นสารต้านออกซิเดชั่นที่มีความสำคัญต่อภายในเซลล์มาก ซึ่งมีรายงานว่า ความเครียดจะกระตุ้นการจับของกลูตาไธโอนภายในเซลล์ออกสู่ภายนอกเซลล์ ซึ่งมีผลทำให้ระดับของกลูตาไธโอนในกระแสเลือดสูงขึ้น ซึ่งมีความสัมพันธ์กับค่า total antioxidant capacity ที่เพิ่มขึ้นด้วย
3. การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการต้านออกซิเดชั่น ได้แก่ เอนไซม์ superoxide dismutase, glutathione peroxidase และ catalase เป็นต้น ซึ่งน่าจะช่วยให้การประเมินค่าความเครียดจากภาวะออกซิเดชั่นได้ชัดเจนมากขึ้น เนื่องจากมีหลายรายงานวิจัยพบว่า ความเครียดมีผลทำให้การทำงานของเอนไซม์ต้านออกซิเดชั่นเพิ่มมากขึ้น
4. การศึกษาเภสัชจลศาสตร์ของสารสกัดหยาดสมุนไพรขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรในไก่เนื้อ
5. การศึกษาประโยชน์ในการต้านออกซิเดชั่น ของสารสกัดหยาดสมุนไพรขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจร ในด้านสุขภาพ ภูมิคุ้มกัน และความต้านทานโรคที่สำคัญ เพื่อได้ข้อมูลประโยชน์เป็นรูปธรรมที่ชัดเจนรวมถึงศึกษาการปลูก เก็บเกี่ยว และแปรรูป ที่ทำให้มีราคาถูกลง มีคุณภาพที่ดี และใช้ได้สะดวกในอุตสาหกรรมผลิตสัตว์ปีก

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 2533.

**คู่มือสมุนไพรเพื่อการสาธารณสุขพื้นฐาน.** กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.

กิตติมา จินดามงคล, สุภาพร อิศรโยคม, ชนินทร์ ตีรวัดนวานิช, งาม่อง คงคาทิพย์, ยุพามงคลสุข, วิไล สันติโสภาศรี และ บุญส่ง คงคาทิพย์. 2548. ผลของสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชันย่านพาโหม และบอระเพ็ด ต่อภาวะเครียดและระดับภูมิคุ้มกันโรคในไก่กระตัง, น.202-210. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

คณิต สุวรรณบริรักษ์ และ ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ. 2534. น้ำลายฟังพอน ฟ้าทะลายโจร. วารสารสมาคมสมุนไพรแห่งประเทศไทย 7(1): 3-9.

จรัส กาญจนไพบูลย์, นุศรา ปิยะพลรุ่งโรจน์, วุฒิชัย นุดกุล, ณัฐกานต์ ม่วงทิมฐ และ วีระวุธ ปิ่นทอง. 2546. Permeability of adrographolide across intestinal epithelium cells. ใน รายงานการประชุมวิชาการพันธมิตรร่วมมือ เพื่อการสร้างสุขภาพยุคใหม่ ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ.

ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ. 2540. สมุนไพรใช้ในกึ่ง: ลูกใต้ใบ พญาอ ฟ้าทะลายโจร, น. 117. อักษรสยามการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

เต็ม สมิตินันท์. 2523. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพื้นเมือง). น.379. กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ. 379 น.

เทอด เทศประทีป. 2545. การใช้สมุนไพรฟ้าทะลายโจรในการผลิตไก่เพื่อการส่งออก. กรุงเทพฯ : 35-50.

ธิดารัตน์ ปลื้มใจ. 2534. ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของฟ้าทะลายโจร. กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร, กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.

- เจริญศรี มังกรกาญจน์. 2536. ไปโอโตจิคัล อ็อกซิเดชัน. น. 299-301. ใน นิโบล เนื่องต้น  
บรรณาธิการ. **ชีวเคมี 1 คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล**. ธรรมสาร, กรุงเทพฯ.
- นันทวัน บุญประภัสร์. 2529. **ก้าวไปกับสมุนไพร**. ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์  
มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.
- ประคองศิริ บุญคง. 2546. บทความพื้นฟูวิชาการ ขมิ้นชัน สารพันประโยชน์. **วารสารองค์การ  
เภสัชกรรม 29 (1): 31-38**.
- เพชรวิทย์ เหมือนวงศ์ญาติ. 2529. **ตำราวิทยาศาสตร์สมุนไพร**. ศูนย์การพิมพ์พลายชัย, กรุงเทพฯ.
- สถาบันวิจัยสมุนไพร. 2544. **ฟ้าทะลายโจร**. กรมวิทยาศาสตร์ กระทรวงสาธารณสุข.
- สุนทรี สิงหนุต. 2535. **สรรพคุณสมุนไพร 200 ชนิด**. บริษัทคุณ 39 จำกัด, กรุงเทพฯ.
- โสภิต ธรรมอารี, จันทิมา ปโชติการ, มณฑิรา ตันต์เกตุ และ จันทนี อิทธิพานิชพงศ์. 1985.  
ฤทธิ์ของยาสมุนไพร 30 ชนิดที่มีสรรพคุณในการรักษาโรคท้องร่วงและบิดต่อการบีบตัว  
ของลำไส้เล็กหนูตะเภา. **จุฬาลงกรณ์เวชสาร 29(1): 39-51**.
- ศูนย์วัฒนธรรม 75 จังหวัด. 2548. แหล่งที่มา: <http://kanchanapisek.or.th/kp8/srt/srt701.html> ,  
26 สิงหาคม 2548.
- อริชญา นาคชานาญ, สุภาพร อีสริโยดม, ชนินทร์ ศิริวัฒนวานิช, งามพ่อง คงคาทิพย์ และ วิไล  
สันติโสภาศรี. 2548. ผลของสมุนไพรเฮอรับาที่อบ-มิทซ์® ต่อระดับค่าภูมิคุ้มกันโรคใน  
ไก่กระตัง. ใน **รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 43,  
1-4 กุมภาพันธ์ 2548**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- อัมพวัน อภิสิทธิ์กุล และ มนัสนันท์ บุญชู. 2544. การศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียจากผู้ป่วย  
ของสารน้ำมันขมิ้นและสารเคอร์คิวมิน ซึ่งสกัดได้จากขมิ้นชัน. ใน **รายงานวิจัยฉบับ  
สมบูรณ์สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่,  
เชียงใหม่.

- Abraham, S.K. and P.C. Kesavan. 1984. Genotoxicity of garlic, turmeric and asafoetida in mice. **Ibid.** 136 (1): 85-88.
- Adamson, D., B. Wildemann, M. Sasaki, J. Glass, J. McArthur, V. Christov, T. Dawson and V. Dawson. 1996. Immunologic NO synthase: elevation in severe AIDS dementia and induction by HIV-1 g. **Science** 274: 1917–1921.
- Akbarsha, M.A., B. Manivannan, K.S. Hamid and B. Vijayan. 1990. Antifertility effect of *Andrographis paniculata* (Nees) in male albino rat. **Indian J. Exp. Biol.** 28(5):421-426.
- Akbarsha, M.A. and P. Murugaian. 2000. Aspects of the male reproductive toxicity/male antifertility property of andrographolide in albino rats: effect on the testis and the cauda epididymidal spermatozoa. **Phytotherapy Res.** 14(6): 432-435.
- Akerboom, T.P.M., M. Bilzer and H. Sies. 1982. Competition between of glutathione disulfide (GSSG) and glutathione S-conjugate from perfused rat liver into bile. **FEBS Lett.** 140: 73-76.
- Akerboom, T.P. and H. Sies. 1990. Glutathione transport and its significance in oxidative stress. In: Vina, J. (Ed), **Glutathione: Metabolism and Physiological Functions**. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. pp: 45-55.
- Akila, G., V. Rajakrishnan, P. Viswannathan, K.N. Rajashekar and V.P. Menon. 1998. Effect of curcumin on lipid profile and lipid peroxidation status in experimental hepatic fibrosis. **Hepatology Research** 11: 147-157.
- Albina, J. and J. Reichner. 1998. Role of nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis. **Cancer. Metastasis. Rev.** 17: 39-53.

- Ames, B.N., R. Catheart, E. Schwiers and P. Hochstein. 1981. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical caused aging and cancer: A hypothesis. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 78: 6858-6862.
- Ames, B. N., L.S. Gold and W.C. Willett. 1995. The causes and prevention of cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 92: 5258-5265.
- Anderson, M.E. 1998. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. **Chem. Biol. Interact.** 111-2: 1-14.
- Andrieux, C.P., P. Hapiot and J.M. Saveant. 1986. Mechanism of superoxide ion disproportionation in aprotic solvents. **J. Am.Chem. Soc.** 109: 3768-3775.
- Avanzo, J.L., C.X. Mendonca, S.M. Pugine and M.C. Cesar. 2001. Effect of vitamin E and selenium on resistance to oxidative stress in chicken superficial pectoralis muscle. **Comp. Biochem. Physiol. Part C** 129: 163-173.
- Bannai, S., H.N. Christensen, J.V. Vadgama, J.C. Ellory, E. Englesberg and G.G. Guidotti. 1984. Amino acid transport systems. **Nature** 311: 308.
- Baker, M.A., G.J. Cerniglia and A. Zaman. 1990. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. **Anal. Biochem.** 190: 360-365 .
- Becker, B.F. 1993. Towards the physiological function of uric acid. **Free. Rad. Bio. Med.** 14: 615-631.
- Beckman, K.B. and B.N. Ames.1998. The free radical theory of aging matures. **Physiol. Rev.** 78: 547-581.

- Benzie, I.F.F. and J.J. Strain. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power” : The FRAP Assay. **Anal. Biochem.** 239: 70-76.
- Bhavani, S.T.N., N.V. Shantha, H.P. Ramesh, I.A.S. Murthy, V.S. Murthy. 1979. Toxicity studies on turmeric (*Curcuma longa*). Acute toxicity studies in rats, guinea pigs & monkeys. **Indian. J. Exp. Biol.** 18: 73-5.
- Bille, N., J.C. Larsen, E.V. Hanssen and G. Wurtzen. 1985. Subchronic oral toxicity of turmeric oleoresin in pigs. **Food. Chem. Toxicol.** 23(11): 967-973.
- Bohnstedt, K.C. 2005. Determination of biomarkers for lipid peroxidation and oxidative stress. **Doctoral thesis.** 91.
- Bonizzi, G., J. Piette, M.P. Merville and V. Bours. 2000. Cell type-specific role for reactive oxygen species in nuclear factor kB activation by interleukin-1. **Biochem. Pharmacol.** 59: 7–11.
- Brune, B., C. Gotz, U. Messmer, K. Sandau, M. Hirvonen and E. Lapetina. 1997. Superoxide formation and macrophage resistance to nitric oxide-mediated apoptosis. **J. Biol. Chem.** 272: 7253-7258.
- Burgos, R.A., E.E. Caballero, N.S. Sanchez, R.A. Schroeder, G.K. Wikman and J.L. Hancke. 1997. Testicular toxicity assessment of *Andrographis paniculata* dried extract in rats. **J. Ethnopharmacol.** 58(3): 219-224.
- Burney, S., J.C. Niles, P.C. Dedon and S.R. Tannenbaum. 1999. DNA damage in deoxynucleosides and oligonucleotides treated with peroxynitrite. **Chem. Res. Toxicol.** 12:513–520.
- Burrows, C.J and J.G. Muller. 1998. Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission. **Chem. Rev.** 98: 1109–1151.

- Buttke, T.M. and P.A. Sandstorm. 1994. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. **Immunology Today**. 15: 7–10.
- Carter, R.N., S.B. Pinnock and J. Herbert. 2004. Does the amygdale modulate adaptation to repeated stress? **Neuroscience**. 126(1): 9-19.
- Chance, B., H. Sies and A. Boveris. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol. Rev.** 59: 527-605.
- Chantasutra, V. and S. Limpapanichkul. 1989. Acute antiinflammatory activity of *Andrographis paniculata* Nees in rats. **The eight Conference**, Faculty of Pharmacy, Chulalongkorn University.
- Chen, T.S., Jr. Richie and C.A. Lang. 1989. The effect of aging on glutathione and cysteine levels in different regions of the mouse brain. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 190: 399-402.
- Cheveille, N.F. 1976. Environmental factors affecting the immune response of birds. **Avain Disease** 23: 308-313.
- Cohen, G. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. **Biochem. J.** 326: 1-16.
- Cohly, H.H., A. Taylor, M.F. Angel and A.K. Salahudeen. 1998. Effect of turmeric, turmerin and curcumin on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced renal epithelial (LLCPK1) cell injury. **Free. Rad. Bio. Med.** 24 (1): 49-54.
- Cooper, M.A. and K.W. Washburn. 1998. The relationships of body temperature to weight gain, feed consumption and feed utilization in broiler under heat stress. **Poult. Sci.** 48: 1993-1993.

- Crapo, J.D., B.E. Barry, H.A. Foscue and J. Shelburne. 1980. Structural and biochemical changes in rat lungs occurring during exposures to lethal and adaptive doses of oxygen. **Am. Rev. Respir. Dis.** 122: 123-143.
- Cui, L., F. Qiu, N. Wang and X. Yao. 2004. Four new andrographolide metabolites in human urine. **Chem.Pharm.Bull.** 52(6): 772-775.
- Cui, K., X. Luo, K.Xu, M.R.V. Murthy. 2004. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidant. **progress in neuro-psycho-pharmacology and biological psychiatry** 28 : 771-799.
- Danyelle, M., D. Kenneth, T.H. Tapiero. 2003. The importance of glutathione in human disease. **Biomed. Pharmacother.** 57: 145-155.
- Davies, K.J.A., M.E. Delsignore and S.W. Lin. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals.II. Modification of amino acids. **J.Biol. Chem.** 262: 9902-9907.
- Davies, K.J. and A. L. Goldberg. 1987. Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. **J. Biol. Chem.** 262: 8220-8226.
- Deby, C. and R. Goutier. 1990. New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. **Biochem. Pharmacol.** 39: 399-405.
- De Groot, C., S. Ruuls, J. Theeuwes, C. Dijkstra and P. Vandervalk. 1997. Immunocytochemical characterization of the expression of inducible and constitutive isoforms of nitric oxide synthase in demyelinating multiple sclerosis lesions. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 56: 10-20.

- Deshpande, S.S., V.S. Lalitha, A.D. Ingle, A.S. Raste, S.G. Gadre and G.B. Maru. 1998. Subchronic oral toxicity of turmeric and ethanolic turmeric extract in female mice and rats. **Toxicol. Lett.** 95(3): 183-193.
- Devos, K., V. Goossens, E. Boone, D. Vercammen, K. Vancompernelle, P. Vandenaabeele, G. Haegeman, W. Fiers, and J. Grooten. 1998. The 55-kDa tumor necrosis factor receptor induces clustering of mitochondria through its membrane-proximal region. **J. Biol. Chem.** 273: 9673-9680.
- Dhammapahorn, P., C. Chaichantipyuth. 1989. Acute and subchronic toxicity studies of *Andrographis paniculata* in rats and mice. **Abstr The 8th symposium**, Faculty of pharmacy, Chulalongkorn University Bangkok, Thailand, December.
- Dhar, M.L., M.M. Dhar, B.N. Dhawan, B.N. Mehrotra and C. Ray. 1968. Screening of Indian plants for biological activity: part I. **Indian. J. Exp. Biol.** 6: 232-247.
- Dizdaroglu, M. 1992. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. **Mutat. Res.** 275: 331-342.
- Donnell, V., S. Spycher and A. Azzi. 1995. Involvement of oxidants and oxidant-generating enzyme(s) in tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated apoptosis: role for lipoxygenase pathway but not mitochondrial respiratory chain. **Biochem. J.** 310: 133-141.
- Dringen, R. 2000. Metabolism and function of glutathione in brain. **progress in neurobiology.** 62: 649-671.
- Dringen, R., J.M. Gutterer and J. Hirrlinger. 2000. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. **Eur. J. Biochem.** 267: 4912-4916.

- Donker, R.A., M.G.B. Nieuwland and A. Zijpp and J.Van der. 1990. Heat stress influences on antibody production in chicken line selected for high and low immune responsiveness. **Poult. Sci.** 69: 599-607.
- Dorge, W. 2002. Free radicals in physiological control of cellular function. **Physiol. Rev.** 82 : 47-95.
- Dumont, A., S. Hehner, T. Hofmann, M. Ueffing, W. Droge and M. Schmitz. 1999. Hydrogen peroxide-induced apoptosis is CD95-independent, requires the release of mitochondria derived reactive oxygen species and the activation of NF-kB. **Oncogene** 18: 747-757.
- Fang, Y.Z., S. Yang and G. Wu. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition** 18: 872-879.
- Feig, D.I., T.M. Reid and L.A. Loeb. 1994. Reactive oxygen species in tumorigenesis. **Cancer Res.** 54 Suppl. 7: 1890–1894.
- Feng, P.C., L.J. Haynes, K.E .Magnus, J.R. Plimmer and H.S.A. Sherrat. 1962. Pharmacological screening of some west Indian medicinal plants. **J. Pharm. Pharmacol.** 14: 556-561.
- Feng, X., L.Y.G. Garcia, D .Hwang and C. Wilson. 1995. Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide. **J. Clin. Invest.** 95: 1669-1675.
- Fernandez –Pachon, M.S., D. Villano, A.M. Troncoso and M.C. Garcia Parrilla. 2005. Antioxidant capacity of plasma alter red wine intake in human volunteers. **J.Aгри.Food Chem.** 53: 5024-5029.
- Folz, R.J., and J.D. Crapo. 1994. Extracellular superoxide dismutase (SOD3): tissue specific expression, genomic characterization, and computer assisted sequence analysis of the human EC SOD gene. **Genomics** 22: 162-171.

- Fridovich, I. 1975. Superoxide dismutases. **Annu. Rev. Biochem.** 44: 147-159.
- Fridovich, I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annu. Rev. Biochem.** 64: 97-112.
- Fridovich, I. and B. Freeman. 1986. Antioxidant defenses in the lung. **Annu.Rev.Physiol.** 48: 693-702.
- Frimer, A., A. Tova, S.S. Aljadeff. 1986. Mechanism of the superoxide anion radical mediated oxidation of diarylamethanes. **J. Org. Chem.** 51: 2093-2098.
- Garg, S.K. 1971. Effect of *Curcuma longa* on fertility in female albino rats. **Bull P.G.I.** 5: 178.
- Garg, S.K. 1974. Effect of *Curcuma longa* (Rhizomes) on fertility in experimental animals. **Planta. Med.** 26: 225-227.
- Garg, S.K., V.S. Mathur, R.R. Chaudhury. 1978. Screening of Indian plants for antifertility activity. **Indian J. Exp. Biol.** 16: 1077-1079.
- Ghiselli A., M. Serafini., F. Natella and C. Scaccini. 2000. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. **Free. Rad. Bio. Med.** 29:1106-1114.
- Guyton, K.Z and T.W. Kensler. 1993. Oxidative mechanisms in carcinogenesis. **Br. Med. Bull.** 49: 523-544.
- Gross,W.B. and H.S. Siegel. 1983. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chicken. **Avian Dis.** 27: 972-979.

- Grune T., T. Reinheckel and K.J.A. Davies. 1997. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. **FASEB. J.** 11: 526-534.
- Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge. 1989. **Free radicals in biology and medicine**, 2 nd ed. Clarendon, Oxford, UK.
- Halliwell, B. 1996. Oxidative stress, nutrition and health experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. **Free Radical Res.** 25: 57-74.
- Halliwell, B. 1998. Can oxidative DNA damage be used as a biomarker of cancer risk in humans? Problems, resolutions and preliminary results from nutritional supplementation studies. **Free Radical Res.** 29: 469-486.
- Hanrahan, C.J., M.D. Bacolod, R.R. Vyas, T. Liu, N.E. Geacintov, E.L. Loechler and A.K. Basu. 1997. Sequence specific mutagenesis of the major (C) anti benzo[a]pyrene diol epoxide DNA adduct at a mutational hot spot in vitro and in *Escherichia coli* cells, **Chem. Res. Toxicol.** 10: 369-377.
- Harmon, B.G. 1998. Avian heterophils in inflammation and disease resistance. **Poul. Sci.** 77: 972-977.
- Heffner, J.E. and J.E. Repine. 1989. Pulmonary strategies of antioxidant defense. **Am. Rev. Respir. Dis.** 140: 531-554.
- Hennet T., C. Richter and E. Peterhans. 1993. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces superoxide anion generation in mitochondria of L929 cells. **Biochem. J.** 289: 587-592.
- Hellsten, Y., P.C. Tullson, E.A. Pichter and J. Bangsbo. 1997. Oxidation of urate in human skeletal muscle during exercise. **Free. Rad. Bio. Med.** 22: 169-174.

- Hermann, P.A. and A.W. Martin. 1991. Pharmacology of *curcuma longa*. *Planta Med.* 57: 1-6.
- He, X., J. Li, H. Gao, F. Qiu, X. Cui and X. Yao. 2003. Six new andrographolide metabolites in rats. **Chem. Pharm. Bull.** 51(5): 586-589.
- Hidalgo, J., T. Gasull, A. Garcia, A. Blaquez and A. Armario. 1991. Role of glucocorticoids and catecholamines on hepatic thiobarbituric acid reactants in basal and stress conditions in the rat. **Horm. Metab. RES.** 23(3): 104-109.
- Holtum, R.E. 1950. The Zingiberaceae of the Malay Peninsula. **Grad.Bull Singapore** 13: 1- 249.
- Hirota, M., M. Inoue, Y. Ando, K. Hirayama, Y. Morino, K. Sakamoto, K. Mori and M. Akagi. 1989. Inhibition of stress-induced gastric injury in the rat by glutathione. **Gastroenterology** 97: 853-859.
- Imam, H.S. and R. Mehvar. 2006. Rapid determination of reduced and oxidized glutathione levels using a new thiol-masking reagent and the enzymatic recycling method: application to the rat liver and bile sample. **Anal. Bio. Anal. Chem.** 385(1): 105-113.
- Irfan, R., S.K. Biswas and A. Kode. 2006. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway disease. **Eur. J. Pharm.** 533: 222-239.
- Jain, K. and D.A. Robert. 1991. Medical Plants of India. pp. 408. **Reference Publications**, Inc., USA.
- Jose, L., M. Quiles, D. Mesa, L. Cesar, Ramirez-Tortosa, M. Concepcion, M.B. Aguilera, G. Ángel and M. Carmen 2002. *Curcuma longa* Extract supplementation seduces oxidative stress and attenuates aortic fatty streak development in rabbits. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 22: 1225-1231.

- Kakar, S.S. and D. Roy. 1994. Curcumin inhibits TPA induced expression of c-fos, c-jun and c-myc protooncogenes messenger RNAs in mouse skin. **Cancer Lett.** 87: 85–89.
- Kamdern, R.E., S. Sang, C.T. Ho. 2002. Mechanism of superoxide scavenging activity of neoandrographolide a natural product from *andrographis paniculata* nees. **J.Agric. food. chem.** 50: 4662-4665.
- Kamel, Z.M. and F.W. Edens. 2003. Influence of selenium sources on age-related and mild heat stress related changes of blood and liver glutathione redox cycle in broiler chickens (*Gallus domesticus*). **Com. Biochem and Physiol.** Part B 136: 921-934.
- Kanchanapiboon, J., S. Nuanggam, S. Thanoo, N. Muangthim, W. Nutakul, T. Pinthong. 2005. Transport of andrographolide across the human intestinal Caco-2 monolayers. **Thai J. Pharm. Sci.** 29(suppl): 97.
- Kaneko, T., Y. Luchi and S. Kawachiya. 2001. Alteration of glutathione reductase expression in the female reproductive organs during the estrous cycle. **Biol. Reprod.** 65: 1410-1416.
- Kasai, H. 1997. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-20-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. **Mutat. Res.** 387: 147-163.
- Kintanar, Q.L. and F.E. Mercado-Sison. 1978. Pharmacological screening of Philippine plants using a multidimensional observation technique in mice. **The Philippine J. Sci.** 107(1-2): 71-94.
- Kim, Y., R. Talanian and T. Billiar. 1997. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. **J. Biol. Chem.** 272: 31138-31148.

- Kim, H.G., S.M. Hong, S.J. Kim, H.J. Park, H.I. Jung, Y.Y. Lee, J.S. Moon, H.W. Lim, E.H. Park and C.J. Lim. 2003. Age-related changes in the activity of antioxidant and redox enzymes in rats. **Mol. Cells.** 16: 278-284.
- Kinnula, V.L., J.D. Crapo and K.O. Raivio. 1995. Biology of disease: generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. **Lab. Invest.** 73: 3-19.
- Kirsch, A.H., A.A. Mahmood, J. Enders, L. Bohra, B. Bonish and K. Weber. 1999. Apoptosis of human Tcells: induction by glucocorticoids or surface receptor ligation in vitro and ex vivo. **J. Biol. Regul. Homeost. Agents** 13: 80-89.
- Klandorf, H., L.L. Probert and M. Iqbal. 1999. In the defense against hyperglycaemia: an avian strategy. **Worlds. Poult. Sci. J.** 55: 251-268.
- Klandorf, H., D.S. Rathore, X. Shi and M. Iqbal. 2001. Accelerated tissue aging and increased oxidative stress in broiler chickens fed allopurinol. **Comp. Biochem. and Physiol.** Part C 129: 93-104.
- Klebanoff, S., M. Vadas, J. Harlan, L. Sparks, J. Gamble, J. Agosti, and A. Waltersdorff. 1986. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. **J. Immunol.** 136: 4220-4225.
- Koul, I.B. and A. Kapil. 1994. Effect of diterpene from *andrographis paniculata* on antioxidant defense system and lipid peroxidation. **India. J. pharm.** 26: 296-300.
- Landfield, P.W. and J.C. Eldridge. 1994. The glucocorticoid hypothesis of age-related Hippocampal neurodegeneration: role of dysregulated intraneuronal calcium. **Ann N Y Acad. Sci.** 746: 308-321.
- Lew, H., S. Pyke and A. Quintanilha. 1985. Changes in the glutathione status of plasma, liver, and skeletal muscle following exhaustive exercise in rats. **FEBS Letter** 185: 262-266.

- Lin, A.M., C.F. Chen and L.T. Ho. 2002. Neuroprotective effect of intermittent hypoxia on iron induced oxidative injury in rat brain. **Exp. Neurol.** 176: 328-335.
- Lin, H., E. Decuyper and J. Buyse. 2004. Oxidative stress induced by corticosterone administration in broiler chickens: 1. Chronic exposure. **Comp Biochem Physiol Part B** 139: 737-744.
- Liu, J.Y., S.J. Lin and J.K. Lin. 1993. Inhibitory effects of curcumin on protein kinase C activity induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate in NIH 3T3 cells. **Carcinogenesis** 14: 857-861.
- Liu, R.M. 2002. Down-regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene expression in rat brain tissue during aging. **J. Neurosci. Res.** 68: 344-351.
- Los, M., H. Schenk, K. Hexe, P.A. Baeuerle, W. Droge and K. Schulzeosthoff. 1995. IL-2 gene expression and NF-kB activation through CD28 requires reactive oxygen production by 5-lipoxygenase. **Embo. J.** 14: 3731-3740.
- Ma, S.C., J. Du, P. Hay and P. But. 2002. Antiviral Chinese medicinal herbs against respiratory syncytial virus. **J. Ethnopharmacol.** 79: 205-211.
- Madav, S., S.K. Tandan, J. Lal and H.C. Tripathi. 1996. Anti-inflammatory activity of andrographolide. **Fitotherapia** 67: 452-458.
- Marklund, S.L. 1984. Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. **J. Clin. Invest.** 74: 1398-1403.
- Marnett, L.J. 2000. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis.** 21: 361-370.

- Masuda, T., H. Bando., T. Maekawa., Y. Takada and H. Yamaguchi. 2000. A novel radical terminated compound produced in the antioxidant process of curcumin against oxidation of fatty acid ester. **Tetrahedron Lett.** 41: 2157-2160.
- Maxwell, M.H. 1993. Avian blood leucocyte responses to stress. **World's Poul. Sci. J.** 49: 34-43.
- Meister, A. and M.E. Anderson. 1983. Glutathione. **Annu. Rev. Biochem.** 52: 711-760.
- Meister, A. 1992. On the antioxidant effects of ascorbic acid and glutathione. **Biochem. Pharmacol.** 44: 1905-1915.
- Melchior, J., S. Palm and G. Wikman. 1996. Controlled clinical study of standardized *Andrographis paniculata* extract in common cold-a pilot trial. **Phytomedicine** 3(4):315- 318.
- Mesa, M.D., M.C Aguilera, L. Cesar, M.C Ramirez-Tortosa, C.L Ramirez-Tortosa, J.L Quiles, L. Baro, E. Martinez-Victoria and A. Gil. 2003. Oral administration of a turmeric extract inhibits erythrocyte and liver microsomal membrane oxidation in rabbits fed with an atherogenic diet. **Nutrition.** 19:800-804.
- Miquel, J., M. Martinez and A. Diez. 1995. Effects of turmeric on blood and liver lipoperoxide levels of mice: lack of toxicity. **AGE (Chester Pa)** 18(4): 171-174.
- Mohanty, I., D.S. Arya, A. Dinda, S. Joshi, K.K Talwar and S.K. Gupta. 2004. Protective effect of *curcuma longa* on ischemia-reperfusion induced myocardial injuries and their mechanisms. **Life Sci.** 75: 1701-1711.
- Mukhopadhyay, A., N. Basu, N. Ghatak and P.K. Gujral. 1982. Anti-inflammatory and irritant activities of curcumin analogues in rats. **Agents Actions.** 12: 508-515.

- Mulky, N., A.J. Amonkar and S.V. Bhide. 1987. Antimutagenicity of curcumins and related compound: the structural requirements for the antimutagenicity of curcumins. **Indian Drugs**. 25: 91-95.
- Mullineaux, P. and G.P. Creissen. 1997. Glutathione reductase: regulation and role in oxidative stress. Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**.
- Munroe, D.G., E.Y. Wang, J.P. Macintyre, S.S.C. Tam, D.H.S. Lee, G.R. Taylor, L. Zhou, R.K. Plante, S.M.I. Kazmi, P.A. Baeuerle and C.Y. Lau. 1995. Novel intracellular signalling function of prostaglandin H synthase-1 in NF- $\kappa$ B activation. **J. Inflamm.** 45: 260-268.
- Nagabhusham, M. and S.V. Bhide. 1986. Nonmutagenicity of curcumin and its antimutagenic action versus chili and capsaicin. **Nutr. Cancer** 8(3): 201-210.
- Nagabhushan, M., J.U. Nair, A.J. Amonkar, A.V. D'Souza and S.V. Bhide. 1988. Curcumins as inhibitors of nitrosation in vitro. **Mutat. Res.** 202 (1): 163-169.
- Nagabhushan, M. and S.V. Bhide. 1992. Curcumin as an inhibitor of cancer. **J. Am. Coll. Nutr.** 11: 192-198.
- Nakanishi, K., S.I. Sasaki, A.K. Kiang. 1965. Phytochemical survey of Malaysian plants. Preliminary chemical and pharmacological screening. **Chem Pharm Bull** 13(7):882-90.
- Neta, P., R.E. Huie, A.B. Ross. 1988. Rate constants for reactions of inorganic radicals in aqueous solution. **J. Phys. Chem. Ref. Data** 17: 1027-1284.
- Nittoh, T., H. Fujimori, Y. Kozumi, K. Ishihara, S. Mue and K. Obuchi. 1998. Effects of glucocorticoids on apoptosis of infiltrated eosinophils and neutrophils in rats. **Eur. J. Pharmacol.** 354: 73-81.

- Ohtsuka, A., H. Kojima., T. Ohtani and K. Hayashi. 1998. Vitamin E reduces glucocorticoid-Induced oxidative stress in rat skeletal muscle. **J. nutrit. Sci. vita.** 44: 779-786.
- Oreste, A., C. Mario, D. Tullio, O. Arrigoni, M.C. De Tullio. 2002. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. **Bio.chem. Biophys. Acta.** 1569: 1-9.
- Orzechowski, O., P. Ostaszewski, A. Brodnicka, J. Wilczak, M. Jank, B. Balasinska, K Grzelkowska, T. Ploszaj, J. Olczak and A. Mrowczynska. 2000. Excess of glucocorticoids impairs wholebody antioxidant status in young rats. Relation to the effect of dexamethasone in soleus muscle and spleen. **Horm. Metab. Res.** 32: 174-180.
- Otake, T., H. Mori and M. Morimoto. 1995. Screening of Indonesian plant extracts for anti-human immunodeficiency virus- type 1(HIV-1) activity. **Phytother. Res.** 9(1):6-10.
- Osawa, T., Y. Sugiyama, M. Inayoshi and S. Kawakishi. 1995. Antioxidant activity of tetrahydro curcuminoids. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 1609-1612.
- Qureshi, S., A.H. Shah and A.M. Ageel. 1992. Toxicity studies on *Alpinia galanga* and *Curcuma longa*. **Planta. Med.** 58(2): 124-127.
- Oury, T.D., L.Y. Chang, S.L. Marklund, B.J. Day and J.D. Crapo. 1994. Immunocytochemical localization of extracellular superoxide dismutase in human lung. **Lab. Invest.** 70: 889-897.
- Pan, M.H., T.M. Huang and J.K. Lin. 1999. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. **Drug Meub.Disposit.** 27: 486-494.
- Panossian, A, A. Hovhannisyan, G. Mamikonyan. 2000. Pharmacokinetic and oral bioavailability of andrographolide from *Andrographis paniculata* fixed combination Kan Jan in rats and human. **Phytomedicine** 7(5):351-364.

- Palmer, R.M.J., D.D. Rees, D.S. Ashton and M. Oncaas. 1988. L-Arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium dependent relaxation. **Biochem Biophys. Res. Commun.** 153: 1251-1256.
- Pamela, M. 2005. The effects of stress and aging on glutathione metabolism. **Ageing Res. Rev.** 4: 288-314.
- Pereira, B., E.J. Bechara, J.R. Mendonca and R. Curi. 1999. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the lymphoid organs and skeletal muscles of rats treated with dexamethasone. **Cell. Biochem. Funct.** 17: 15-19.
- Piper, J.T., S.S. Singhal., M.S. Salameh., R.T. Torman., Y.C. Awasthi and S. Awasthi. 1998. Mechanisms of anticarcinogenic properties of curcumin: the effect of curcumin on glutathione linked detoxification enzymes in rat liver. **Int.J. Biochem. Cell Biol.** 30: 445-456.
- Porter, N.A., S.E. Caldwell and K.A. Mills. 1995. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. **Lipids** 30: 277-290.
- Poulsen, H.E., H. Prieme and S. Loft. 1998. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. **Eur. J. Cancer Prev.** 7: 9-16.
- Prchal, J., S.K. Srivastava and E. Beutler. 1975. Active transport of GSSG from reconstituted erythrocyte ghosts. **J. Amer. Soc. Hema.** 46: 111-117.
- Prucksunand, C., B. Indrasukhsri, M. Leethochawalit, N. Nilvises, A. Prijavudhi, S. Wimolwattnapun. 1986. Effect of the long turmeric (*Curcuma longa* Linn.) on healing of peptic ulcer; A preliminary report of 10 case study. **Thai J. Pharmacol.** 8(3): 139-151.

- Qing, Y.W., F.C. Wei , B. Zhou , L. Yang , L.L. Zhong. 2006. Inhibition of lipid peroxidation and protein oxidation in rat liver mitochondria by curcumin and its analogues. **Biochimica.Biophysica. Acta.** 1760: 70-77.
- Quiles, J.L., C. Aguilera, M. Mesa, M. Ramirez-Tortosa, L. Baro and A. Gil. 1998. An ethanolic aqueous extract of *Curcuma longa* decreases the susceptibility of liver microsomes and mitochondria to lipid peroxidation in atherosclerotic rabbits. **Biofactors.** 8(1-2): 51-57.
- Rajashree, S. and R. Puvanakrishnan. 1998. Dexamethasone induced alterations in enzymatic and nonenzymatic antioxidant status in heart and kidney of rats. **Mol. Cell. Biochem** 181: 77-85.
- Ramirez-Tortosa, M.C., M.D. Mesa, M.C. Aguilera, J.L. Quiles, L. Baro, C.L. Ramirez-Tortosa, E. Martinez-Victoria and A. Gil. 1999. Oral administration of a turmeric extract inhibits LDL oxidation and has hypocholesterolemic effects in rabbit with experimental atherosclerosis. **Atherosclerosis.** 147: 371-378.
- Ramprasad, G. and M. Sirsi. 1957. Observation on the pharmacology of *Curcuma longa*. **Indian. J. Physiol. Pharmacol.** 1: 136-143.
- Rao, T.S., N. Basu and H.H. Siddiqui. 1982. Anti-inflammatory activity of curcumin analogues. **Ind. J. Med. Res.** 75: 574-578.
- Rao, C.V., B. Simi and B.S. Reddy. 1993. Inhibition by dietary curcumin of azoxymethane-induced ornithine decarboxylase, tyrosine protein kinase, arachidonic acid metabolism and aberrant crypt foci formation in the rat colon. **Carcinogenesis.** 14: 2219-2225.
- Reddy, A.C. and B.R. Lokesh. 1992. Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes. **Mol. Cell Biochem.** 111(1-2): 117-124.

- Reddy, A.C. and B.R. Lokesh. 1994a. Effect of dietary turmeric on iron-induced lipid peroxidation in rat liver. **Food Chem. Toxicol.** 32: 279-283.
- Reddy, A.C. and B.R. Lokesh. 1994b. Studies on the inhibitory effects of curcumin and eugenol on the formation of reactive oxygen species and the oxidation of ferrous iron. **Mol. Cell. Biochem.** 137: 1-8.
- Reece, F.N., J.W. Deaton and L.F. Kubena. 1972. Effects of high temperature and humidity on heat prostration of broiler chickens. **Poult. Sci.** 51: 2021-2025.
- Regnier, J.A. and K.W. Kelly. 1981. Heat and cold stress suppresses in vivo and in vitro cellular immune responses of chickens. **Am. J. Vet. Res.** 42(2): 294-299.
- Robert, M. S., L.M. Romero and A.M. Munck. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses?" integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocr. Rev.** 21: 55-89.
- Roos, D. 1991. The involvement of oxygen radicals in microbicidal mechanisms of leukocytes and macrophages. **Klin Wochenschr** (69): 975-980.
- Roughley, P.J. and D.A. Whiting. 1973. Experiments in the biosynthesis of curcumin. **J. Chem. Soc.** 20: 2379-2388.
- Saez, G.T., W.H. Bannister and J.V. Bannister. 1990. Free radicals and thiol compounds the role of glutathione against free radical toxicity. pp.237-254. In: Vina, J. (Ed.), **Glutathione: Metabolism and Physiological Functions. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.**
- Sambainah, K., S. Ratankumar, V.S. Kamanna, M.N. Satyanarayana, M.V.L. Rao. 1982. Influence of turmeric and curcumin on growth, blood constituents and serum enzymes in rats. **J. Food Sci. Technol.** 19(5): 187-190.

- Samuele, A., A. Mangiagalli, M.T. Armentero, R. Fancellu, E. Bazzini, M. Vairetti, A. Ferrigno, P. Richelmi, G. Nappi and F. Blandini. 2005. Oxidative stress and proapoptotic conditions in a rodent model of Wilson's disease. **Biochim. Biophys. Acta.** 1741: 325-330.
- Schafer, F.Q. and G.R. Buettner. 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free. Radic. Biol. Med.** 30: 1191-1212.
- Schulze, O.K., A. Bakker, B. Vanhaesebroeck, R. Beyaert, W. Jacob and W. Fiers. 1992. Cytotoxic activity of tumor necrosis factor mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. **J. Biol. Chem.** 267: 5317-5323.
- Seeman, P. 1990. Membrane action of anaesthetic and tranquilizers. **Pharmacol. Rev.** 24 (4): 589-595.
- Selvam, R., L. Subramanian, R. Gayathri and N. Angayarkanni. 1995. The antioxidant activity of turmeric (*Curcuma longa*). **J Ethnopharmacol** 47: 59-67.
- Sierra-Rivera, E.D.M. and M.L. Summar. 1996. Assignment of the human gene (GLCLR) that encodes the regulatory subunit of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase to chromosome 1 p21. **Cytogenet. Cell Genet.** 72:252-254.
- Sies, H. 1997. Oxidative Stress: Oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology** 82: 291-295.
- Simoyi, M.F., K. Van Dyke and H. Klandorf. 2002. Manipulation of plasma uric acid in broiler chicks and its effect on leukocyte oxidative stress. **Am. J. Physiol. – Regulatory, Integrative and Comp. Physiol.** 282(3): R791-796.

- Sinnhuber, R.O., I.C. Yu and T.C. Yu. 1958. Characterization of the red pigment formed in the 2-thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity. **Food Res.** 23: 624-634.
- Siripong, P., B. Kongkathip, K. Preechanukool. 1992. Cytotoxic diterpenoid constituents from *Andrographis paniculata* Nees leaves. **Sci. Soc. Thailand** 18: 187-94.
- Sithisomwongse, N., J. Phengchata and S. Cheewapatana. 1989. Acute and chronic toxicity of *Andrographis paniculata* Nee. **Thai J. Pharm. Sci.** 14(2): 109-117.
- Sittisomwong, N., J. Phengchata and S. Cheewapatana. 1990. Acute and subchronic toxicity of turmeric. **Bull. Depart. Med. Sci.** 32(3): 101-11.
- Shankar, T.N.B., N.V. Shantha, H.P. Ramesh, I.A.S. Murthy and V.S. Murthy. 1980. Toxicity studies on turmeric (*Curcuma longa*): acute toxicity studies in rats, guinea pigs and monkeys. **Indian J. Exp. Biol.** 18(1): 73-75.
- Shah, R.G. and M.S. Netrawali. 1988. Evaluation of mutagenic activity of tumeric extract containing curcumin, before and after activation with mammalian cecal microbial extract or liver microsomal fraction, in the Ames *Salmonella* test. **Bull. Environ. Contam. Toxicol** 40(3): 350-357.
- Sharma, R.A, H.R. Mc Lelland, K.A. Hill. 2001. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral *Curcuma* extract in patients with colorectal cancer. **Clin. Cancer Res.** 7(7): 1894-1900.
- Slater, A., C. Stefan, I. Novel, D. Van den dobbelsteen and S. Orrenius. 1995. Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. **Toxicol Lett.** 82-83: 149-153.
- Stadtman, E.R. 1993. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. **Annu. Rev. Biochem.** 62: 797-821.

- Steenken, S. and S. Jovanovic. 1997. How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution. **J. Am. Chem. Soc.** 119: 617-618.
- Steven, L.B. and H. Salem. 1997. Oxidants, antioxidant and free radical. **Taylor & Francis.**
- Sreejayan, M.N. and M.N.A. Rao. 1994. Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation. **J. Pharm. Pharmacol.** 46 (12): 1013-1016.
- Sreejayan, N., M.N.A. Rao, K.I. Priyadarsini, T.P. Devasagayam. 1997. Inhibition of radiation induced lipid peroxidation by curcumin. **Int. J. Pharm.** 151: 127-130.
- Srinivas, L., V.K. Shalini and M. Shylaja. 1992. Turmerin water soluble antioxidant peptide from turmeric. **Arch. Biochem. Biophys.** 292: 617-623.
- Steinbeck, M.J., A.U. Khan and M.J. Karnovsky. 1993. Extracellular production of singlet oxygen by stimulated macrophages quantified using 9,10-diphenylanthracene and perylene in a polystyrene film. **J. Biol. Chem.** 268: 15649-15654.
- Stamler, J.S., D. Single and J. Loscalzo. 1992. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. **Scienc.** 258: 1898-1902.
- Srimal, R.C and B.N. Dhawan. 1973. Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non-steroidal anti-inflammatory agent. **J. Pharm. Pharmacol.** 25: 447-452.
- Srivastava, R and R.C. Srimal. 1985. Modification of certain inflammation-induced biochemical changes by curcumin. **Ind. J. Med. Res.** 81: 215-223.
- Sugiyama, Y., S. Kawakishi and T. Osawa. 1996. Involvement of the beta-diketone moiety in the antioxidative mechanism of tetrahydrocurcumin. **Biochem. Pharmacol.** 52: 519-525.

- Subathra, M., S. Shila, M.A. Devi, C. Panneerselvam. 2005. Emerging role of *Centella asiatica* in improving age related neurological antioxidant status. **Exp. Gerontol.** 40: 707-715.
- Tarin, J.J. 1996. Potential effects of age associated oxidative stress on mammalian oocytes/embryos. **Mol. Hum. Reprod.** 2: 717-726.
- Tarin, J.J., J. Ten., F.G. Vendrell and A. Cano. 1998. Dithiothreitol prevents age-associated decrease in oocyte/conceptus viability in vitro. **Mol. Hum. Reprod.** 13: 381-386.
- Tietze, F. 1969. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Application to mammalian blood and other tissues. **Anal. Biochem.** 27: 502-522.
- Thamlikitkul, V., S. Theerapong, P. Boonroj, W. Ekpalakorn, S. Taechaya, T. OrnChom Jan, S. Pradipasena and S. Timsard. 1991. Efficacy of *Andrographis paniculata*, Nees for pharyngotonsillitis in adult. **J. Med. Assoc. Thai.** 74 (10): 437-442.
- Thippeswamy, T. and R. Morris. 1997. Cyclic guanosine 3',5' monophosphate mediated neuroprotection by nitric oxide in dissociated cultures of rat dorsal root ganglion neurons. **Brain Res.** 774: 116-122.
- Toda, S., T. Miyase, H. Arichi, H. Tanizawa and Y. Takino. 1985. Natural antioxidants III. Antioxidative components isolated from rhizome of *Curcuma longa* L. **Chem. Pharm. Bull.** 33 (4): 1725-1728.
- Tonnesen, H.H., G. Smistaad, T. Agren, and J. Karlsen. 1993. Studies on curcumin and curcuminoids XXIII: Effect of curcumin on liposomal lipid peroxidation. **Int. J. Pharm.** 90: 221-228.

- Trivedi, N.P. and U.M. Rawal. 2001. Hepatoprotective and antioxidant property of *Andrographis paniculata* (Nees) in BHC induced liver damage in mice. **Indian J. Exp. Biol.** 39(1): 41- 46.
- Tucker, J.M. and D.M. Townsend. 2005. Alpha-tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease. **Biomed. Pharmacother.** 59: 380-387.
- Umansky, V., M. Rocha, R. Breitkreutz, S. Hehner, M. Bucur, N. Erbe, W. Droge, and A. Ushmorov. 2000. Glutathione is a factor of resistance of Jurkat leukemia cells to nitric oxide-mediated apoptosis. **J. Cell Biochem.** 78: 578-587.
- Unnikrishnan, M.K and M.N. Rao. 1995. Curcumin inhibits nitrogen dioxide induced oxidation of hemoglobin. **Mol. Cell Biochem.** 146 (1): 35-37.
- Ushmorov, A., F. Ratter, V. Lehmann, W. Droge, V. Schirmacher and V. Umansky. 1999. Nitric oxide-induced apoptosis in human leukemic lines requires mitochondrial lipid degradation and cytochrome *c* release. **Blood** 93: 2342-2352.
- Valko, M. 2007. Pathways of ROS formation, the lipid peroxidation process and the role of glutathione (GSH) and other antioxidants (Vitamin E, Vitamin C, lipoic acid) in the management of oxidative stress (equations are not balanced). **Int. J. Biochem. Cell. Biol.** 39: 44-84.
- Van Kampen, M. 1981. Water balance of colostomized and non-colostomized hens at different ambient temperature. **Br. Poult. Sci.** 22: 17-23.
- Vijayalaxmi. 1980. Genetic effects of turmeric and curcumin in mice and rats. **Mutat. Res.** 79 (2): 125-132.
- Vineis, P., N. Malats, M. Porta and F.X. Real. 1999. Human cancer, carcinogenic exposures and mutation spectra. **Mutat. Res.** 436: 185-194.

- Wang, H.W., H.Y. Zhao and S.Q. Xiang. 1997. Effect of *andrographis paniculata* component on nitric oxide, endothelin and lipid peroxidation in experimental atherosclerotic rabbits. **J. integra. Tradi. Western med.** 17(9): 547-549.
- Wang, D., D.A. Kreuzer and J.M. Essigmann. 1998. Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. **Mutat. Res.** 400: 99-115.
- Wendy, C.B. 2004. Prednisone/Prednisolone. [Online]. Available from: <http://www.veterinarypartner.com/Content.plx?P=A&A=622&S=2&SourceID=52>.
- Winterbourn, C.C and D. Metodiewa. 1994. The reactions of superoxide with reduced glutathione. **Arch. Biochem. Biophys.** 314: 284-290.
- Wright, J.S. 2002. Predicting the antioxidant activity of curcumin and curcuminoids. **J. Mol.Str. (Theochem).** 591: 207-217.
- Wolff, S.P., A. Garner and R.T. Dean. 1986. Free radicals, lipids and protein degradation. **Trends.Biochem. Sci.** 11: 27.
- Wyllie, A.H., J. Kerr, and A. Currie. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. **Int. Rev. Cytol.** 68: 251-306.
- Yamamoto, S. 1992. Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions. **Biochem. Biophys. Acta.** 1128: 117-131.
- Yamamoto, T., H. Takahashi, K. Sakai, T. Kowithayakorn, T. Koyano. 1997. Screening of Thai plants for anti-HIV-1 activity. **Natural Med.** 51(6): 541-546.
- Yang, J.G., J. Morrison-Plummer and R.F. Burk. 1987. Purification and quantitation of rat plasma selenoprotein distinct from glutathione peroxidase using monoclonal antibodies. **J. Biol. Chem.** 262: 13372-13375.

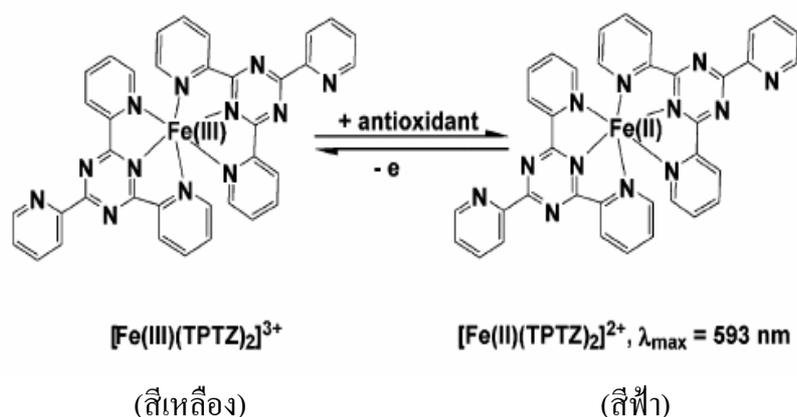
- Yao, X.J., M.A. Wainberg, M.A. Parniak. 1992. Mechanism of inhibition of HIV-1 infection in vitro by purified extract of *Prunella vulgaris*. **Virology** 187(1): 56-62.
- Yegnanarayana, R, A.P. Saraf and J.H. Balwani. 1976. Comparison of anti-inflammatory activity of various extracts of *Curcuma longa*. **Indian. J. Med. Res.** 64: 601.
- Yin, X.J., D.X. Liu and H. Wang. 1991. A study on the mutagenicity of 102 raw pharmaceuticals used in Chinese traditional medicine. **Mutat. Res.** 260(1): 73-82.
- Yu, B.P. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol. Rev.** 74: 139-162.
- Yuanguai, Z.B., M. Paul Carveya and L.C. Zaodung. 2006. Age related changes in glutathione and glutathione-related enzymes in rat brain. **Brain Res.** 1090 : 35-44.

ภาคผนวก

## 1. วิธีวัดความสามารถรวมของสารต้านอนุมูลอิสระในการรีดิวซ์เหล็กเฟอร์ริกในตัวอย่างพลาสมา โดยวิธี Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) assay

### หลักการ

การวัดค่าความสามารถรวมของสารต้านอนุมูลอิสระในพลาสมา โดยวิธี Ferric reducing Ability of Plasma (FRAP) Assay (ดัดแปลงจากวิธีการของ Benzie and Strain (1996)) โดยใช้หลักการของสารต้านอนุมูลอิสระ ในพลาสมา สามารถรีดิวซ์ เฟอร์ริก ไอออน ( ferric ion:  $Fe^{3+}$  ) ไปเป็นเฟอร์รัส ไอออน ( ferrous ion:  $Fe^{2+}$  ) ที่ pH ต่ำ โมเลกุล tripyridyl-triazine (TPTZ) ในปฏิกิริยาจะจับกับ เฟอร์รัส ไอออน ทำให้เกิดสีฟ้า วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm



### ภาพผนวกที่ 1 ปฏิกิริยาระหว่าง TPTZ กับ $Fe^{2+}$

ที่มา: Fernandez-Pachon *et al.* (2005)

คำนวณความเข้มข้นได้จากการเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของ  $Fe^{2+}$  ที่ทราบความเข้มข้นแล้ว (0-2,500  $\mu\text{mol/L}$ ) รายงานผลค่า total antioxidant capacity เป็นค่า  $\mu\text{mol/liter}$  (Iris F. F. Benzie และ J. J. Straint, 1996, Fernandez-Pachon *et al.*, 2005)

## อุปกรณ์

1. หลอดทดลองขนาด 15 ml
2. Autopipette ขนาด 20, 200 และ 1000 ul
3. microcentrifuge tube
4. cuvette พลาสติก
5. เครื่อง UV/VIS Spectrophotometer รุ่น Helios Alpha หมายเลขเครื่อง UVA 130623 จากบริษัท บางกอกไฮเล็บ จำกัด
6. waterbath

## สารเคมี

1. 2-4-6-tripyridyl-s-triazine จากบริษัท sigma
2. Ferric chloride hexahydrate ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) จากบริษัท sigma
3. Ferrous sulfate heptahydrate จากบริษัท sigma
4. Sodium acetate ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) จากบริษัท sigma
5. Hydrochloric acid (HCl)
6. Glacial acetic acid ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ )
7. Deionized water

## วิธีการ

### การเตรียมตัวอย่างพลาสมา

1. เก็บเลือดโดยใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด เช่น Heparin หรือ EDTA
- 2.ปั่นด้วยความเร็ว 1,000 g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C

3. ดูส่วนของเหลวสีเหลือง (ส่วนบน) โดยปราศจากการรบกวนของ white buffy layer
4. ถ้ายังไม่ทำการวิเคราะห์ เก็บไว้ที่  $-80^{\circ}\text{C}$

### การเตรียมสารเคมี

1. FRAP reagent (ใช้อัตราส่วน 1.1:1.2 :1.3 เท่ากับ 10:1:1)

1.1 300 mmol/liter acetate buffer pH 3.6 ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  3.1 g +  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$  16 ml + เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร)

1.2 10 mmol/liter TPTZ ใน 40 mmol/liter HCL

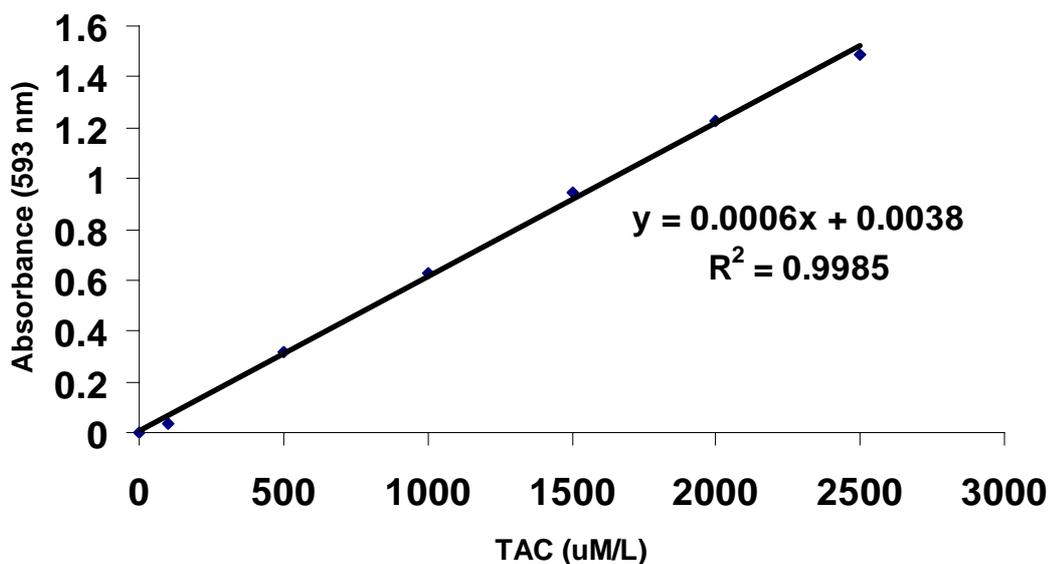
1.3 20 mmol/liter  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

### วิธีการทดลอง

1. ดูด FRAP reagent ปริมาตร 1800 ul ใส่ในหลอดขนาด 15 ml
2. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 180 ul
3. ดูดพลาสมาปริมาตร 60 ul (ในปฏิกิริยาตัวอย่างต้องมีความเข้มข้นเท่ากับ 1/34 )
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น ที่ 593 nm เทียบกับ standard ทุกๆ 15 วินาที นาน 10 นาที
5. นำค่า ที่ 4 นาที มาคำนวณหาความเข้มข้นเทียบกับ standard ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ที่ทราบความเข้มข้นแล้ว

### การรายงานผล

รายงานความสามารถรวมของสารต้านอนุมูลอิสระ เป็น  $\mu\text{mol/l}$

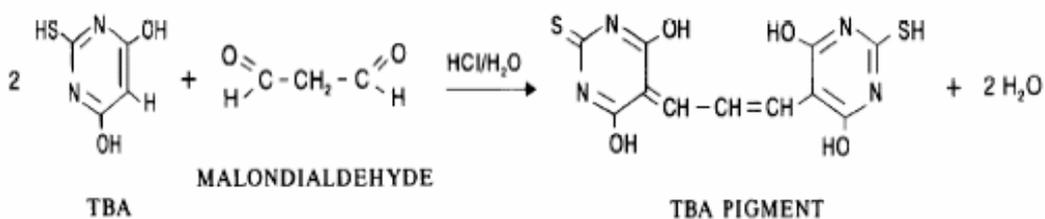


ภาพผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานแสดงความเข้มข้นของเหล็กเฟอร์ริก

## 2. การวิเคราะห์ Malondialdehyde (MDA) ด้วย วิธี Thiobarbituric Acid (TBA) assay

### หลักการ

MDA เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาการเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน จะไปทำปฏิกิริยากับ Thiobarbituric acid (TBA) เกิดเป็น Thiobarbituric acid reactive substrate (TBARS) ให้สีชมพูแดง ซึ่งเป็นผลจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง TBA 2 โมเลกุล กับ MDA 1 โมเลกุล วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 532 และ 572 นาโนเมตร และรายงานผลค่า MDA เป็น nmol/ml (Sinnhuber *et al.*, 1958)



ภาพผนวกที่ 3 ปฏิกิริยาระหว่าง TBA และ MDA

ที่มา: Sinnhuber *et al.* (1958)

## อุปกรณ์

1. หลอดทดลองขนาด 15 ml
2. Autopipette ขนาด 20, 200 และ 1,000 ul
3. vortex mixer
4. cuvette quatze
5. เครื่อง UV/VIS Spectrophotometer รุ่น Helios Alpha หมายเลขเครื่อง UVA 130623 จากบริษัท บางกอกไฮเล็บ จำกัด
6. waterbath

## สารเคมี

1. 2- thiobarbituric acid (TBA) จากบริษัท sigma
2. trichloroacetic acid จากบริษัท sigma
3. Butylatehydroxytoluene (BHT) จากบริษัท sigma
4. n-butanol
5. Hydrochloric acid (HCl)
6. pyridine
7. Deionized water

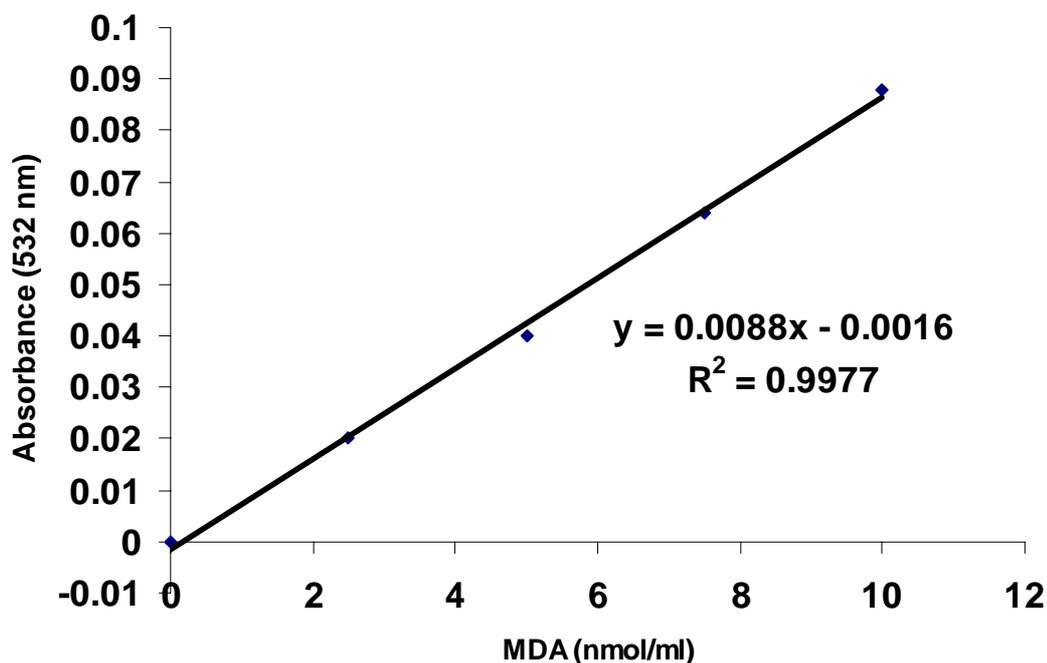
## วิธีการ

1. คุ้ด TBA (3.7 g/l in 0.25 mol/l HCl) ปริมาตร 500 ul ใส่หลอด centrifuge tube ขนาด 15 ml
2. เติม 15% trichloroacetic acid (in 0.25 mol/l HCl) ปริมาตร 1.5 ml

3. เติม 0.5 M BHT ปริมาตร 50  $\mu$ l
4. เติมตัวอย่าง plasma , standard, blank (deionized water) ปริมาตร 250  $\mu$ l ใส่ในแต่ละหลอด
5. ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer
6. ต้มที่อุณหภูมิ 95° C นาน 1 ชั่วโมง
7. ทำให้เย็นโดยแช่น้ำเย็น นาน 5 นาที
8. เติม n-butanol and pyridine (15:1 v/v) ปริมาตร 3 ml
9. นำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3500 rpm นาน 10 นาที
10. ดูดส่วนชั้นบนปริมาตร 2.5 ml ใส่ cuvette วัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 532 และ 572 นาโนเมตร

#### การรายงานผล

รายงานผลความเข้มข้นของเป็น Malondialdehyde เป็น nmol/ml

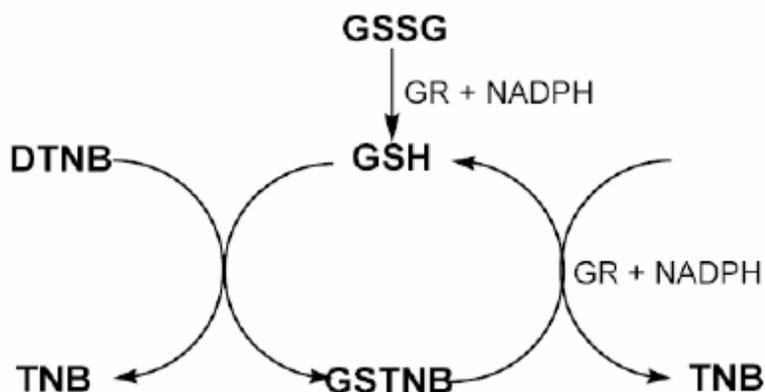


ภาพผนวกที่ 4 กราฟมาตรฐานแสดงความเข้มข้น malondialdehyde (MDA)

### 3. การวิเคราะห์ Glutathione โดยวิธี Enzymatic recycling Assay

#### หลักการวิเคราะห์ Total (reduced) Glutathione (GSH)

รีดิวซ์กลูตาไธโอนโดยรวมในตัวอย่าง จะทำการวัดโดยวิธี enzymatic recycling method โดยใช้ เอนไซม์กลูตาไธโอน รีดักเตส (glutathione reductase) เพื่อหาความเข้มข้นของ รีดิวซ์กลูตาไธโอนโดยรวมใน microtiter plate assay โดยอาศัยหลักการดังนี้ หมู่ sulhydryl ของ รีดิวซ์กลูตาไธโอนโดยรวม จะทำปฏิกิริยากับ 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) และ ให้สีเหลืองของ 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) ซึ่งถูกวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ ความยาวคลื่น 405 nm อัตราการสร้าง TNB เป็นสัดส่วนโดยตรงต่อปฏิกิริยาการย้อนกลับ ซึ่งการย้อนกลับนี้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อความเข้มข้นของ รีดิวซ์กลูตาไธโอนโดยรวมในตัวอย่าง ดังรูป



ภาพผนวกที่ 5 ปฏิบัติการวิเคราะห์ GSH และ/หรือ GSSG ด้วยวิธี enzymatic recycling method.

#### หลักการวิเคราะห์ ออกซิไดซ์กลูตาไธโอน (oxidized glutathione:GSSG)

การวัดความเข้มข้นของออกซิไดซ์กลูตาไธโอนในตัวอย่างเม็ดเลือดแดง โดยวิธี enzymatic recycling assay ซึ่งออกซิไดซ์กลูตาไธโอนที่จะวัดเกิดจากปฏิกิริยารีดักชัน ของ DTNB ไปเป็นรีดิวซ์กลูตาไธโอน ดังนั้นการวัดเฉพาะออกซิไดซ์กลูตาไธโอน จะต้องกำจัดรีดิวซ์กลูตาไธโอน โดยเติม 2-vinylpyridine เพื่อไปกำจัดรีดิวซ์กลูตาไธโอน ก่อนทำการวิเคราะห์โดยใช้วิธีการเดียวกันกับการวิเคราะห์รีดิวซ์กลูตาไธโอนโดยรวม

#### การรายงานผล

คำนวณความเข้มข้นได้จากการเปรียบเทียบกับความเข้มข้นกับ GSSG Standard รายงานผลเป็นค่ารีดิวซ์กลูตาไธโอนโดยรวม ออกซิไดซ์กลูตาไธโอน และอัตราส่วนของรีดิวซ์กลูตาไธโอนต่อออกซิไดซ์กลูตาไธโอน เพื่อเป็นดัชนีบ่งชี้ภาวะรีดออกซ์ภายในเซลล์เม็ดเลือดแดง

สารเคมี (สั่งซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา)

1. Metaphosphoric acid
2. Sodium phosphate

3. Ethylene Diamine Tetra Acetic acid-Na (EDTA –Na)
4. Oxidized glutathione (GSSG)
5. Triethanolamine
6. 5,5'-dithiosbis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)
7. NADPH
8. Glutathione reductase (GR)
9. 2-vinylpyridine

## อุปกรณ์

1. เครื่อง Elisa reader
2. 96 well plate
3. eight multi-channel pipette

## การเตรียม ตัวอย่างเม็ดเลือดแดง

1. เก็บเลือดโดยใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด เช่น Heparin หรือ EDTA
- 2.ปั่นด้วยความเร็ว 1,000 g (3,000 rpm) นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C
3. คัดส่วนของ พลาสมาและ buffy cote ที่มีส่วนของเม็ดเลือดแดง
4. เติมน้ำกลั่นไป 4 เท่าของปริมาตรตัวอย่าง
5. ปั่น 12,000 rpm นาน 15 นาที
6. คูดของเหลวส่วนบนในใส่หลอดไว้
7. เติม metaphosphoric acid ปริมาตร 1:1 mix ด้วย vortex mixer นาน 5 นาที
8. ปั่นที่ 2000 g อย่างน้อย 2 นาที
9. คูดส่วนใสด้านบนไว้เพื่อรอการวิเคราะห์
10. ถ้ายังไม่ทำการวิเคราะห์ เก็บไว้ที่ – 40 °C

## วิธีการทดลอง

### 1. วัด total glutathione (GSH)

1.1 คูดตัวอย่าง (ถูกเจือจางด้วย buffer 20 เท่า), standard และ blank ปริมาตรอย่างละ 1 ml ใส่ใน microtube (คูดตัวอย่างมา 50 ul เติม buffer ไป 950 ul)

- 1.2 เติม triethanolamine 50 ul เพื่อปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 ผสมด้วย vortex ทันที
- 1.3 คูณข้อ 2, Std. และ blank ปริมาตร 50 ul ลงใน 96 well plate ตามตาราง template plate ที่กำหนดไว้
- 1.4 เติม reagent mixing หลุมละ 100 ul ตั้งแต่หลุมแรก-หลุมสุดท้ายใช้เวลาภายใน 2 นาที
- 1.5 วัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 405 nm อ่านค่าทุกๆ 30 วินาทีจนถึง 15 นาที
- 1.6 นำค่าที่ 4 นาทีมาคำนวณความเข้มข้นเทียบกับ GSH standard ตามสูตร

## 2. วิธีการวัด GSSG

- 2.1 คูณตัวอย่าง (ถูกเจือจางด้วย buffer 20 เท่า), standard และ blank ปริมาตรอย่างละ 1 ml ใส่ใน microtube (คูณตัวอย่างมา 50 ul เติม buffer ไป 950 ul)
- 2.2 เติม triethanolamine 50 ul เพื่อปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 ผสมด้วย vortex ทันที
- 2.3 เติม 97% 2-vinylpyridine 10 ul ลงใน ข้อ 2, Std. และ blank เพื่อกำจัด GSH
- 2.4 ตั้งทิ้งไว้ นาน 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- 2.5 คูณข้อ 4 ปริมาตร 50 ul ลงใน 96 well plate ตามตาราง template plate ที่กำหนดไว้
- 2.6 เติม reagent mixing หลุมละ 100 ul ตั้งแต่หลุมแรก-หลุมสุดท้ายใช้เวลาภายใน 2 นาที
- 2.7 วัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 405 nm อ่านค่าทุกๆ 30 วินาทีจนถึง 10 นาที
- 2.8 นำค่าที่ 4 นาทีมาคำนวณความเข้มข้นเทียบกับ GSH standard ตามสูตร
- 2.9 นำความเข้มข้นมาหาร 2 จะได้ความเข้มข้นของ GSSG

## รายงานผลการทดลอง

คำนวณความเข้มข้นเทียบกับ standard curve

### สูตรคำนวณ

$$(\text{Total GSH}) \text{ or } (\text{GSSG}) = \frac{\{(\text{absorbance at 405 nm}) - (\text{y-intercept})\}}{\text{Slope} \times \text{sample dilution}}$$

### การรายงานผล

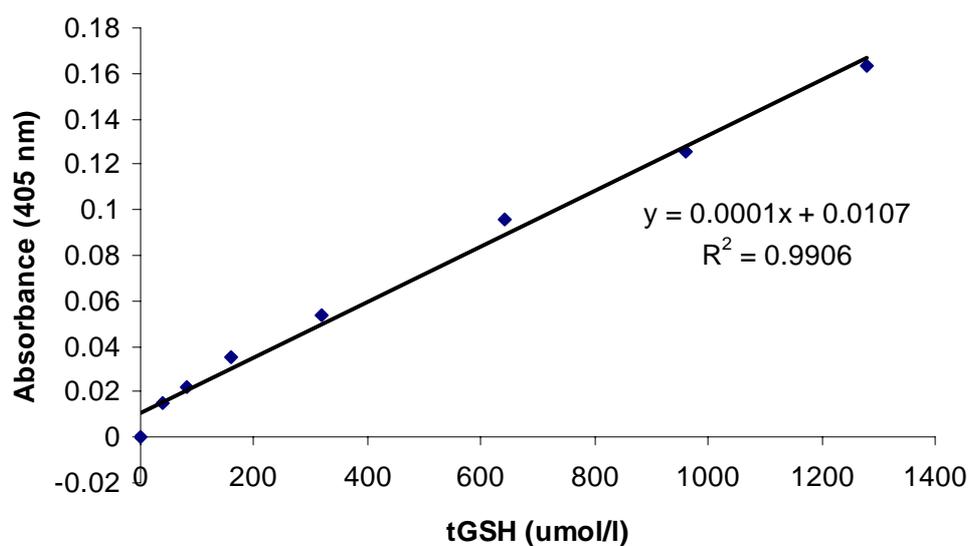
ค่าที่ได้จากการคำนวณตามสูตรข้างต้นจะนำมาหาค่าดังนี้

#### 1. GSH levels

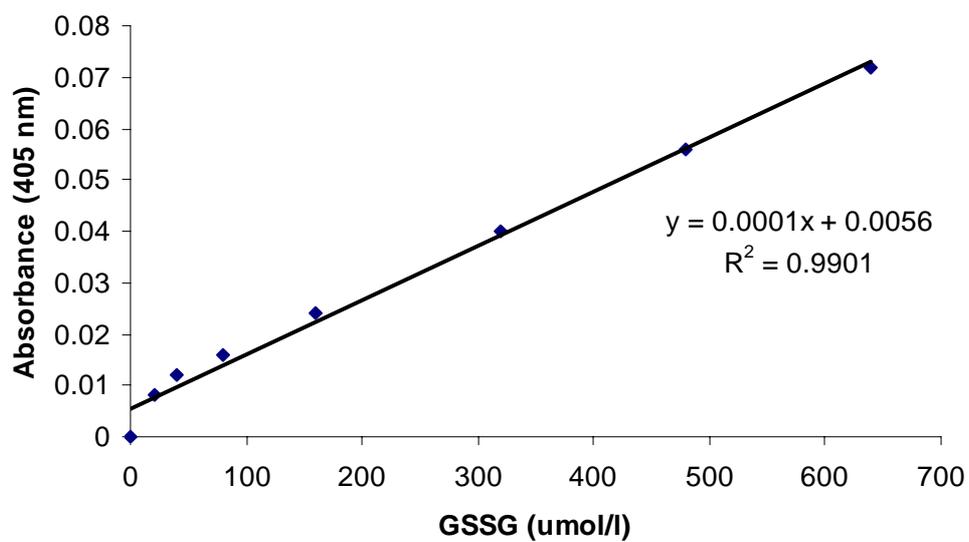
$$\text{GSH} = \text{Total GSH} - \text{GSSG}$$

#### 2. Redox index

หาค่า GSH:GSSG Ratios



ภาพผนวกที่ 6 กราฟมาตรฐานแสดงความเข้มข้นของ tGSH



ภาพผนวกที่ 7 กราฟมาตรฐานแสดงความเข้มข้นของ GSSG

## ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล

นางสาวฐานิดา ศรีawangค์

วัน เดือน ปี ที่เกิด

9 สิงหาคม พ.ศ. 2521

สถานที่เกิด

อำเภออุทุมพรพิสัย จังหวัดศรีสะเกษ

ประวัติการศึกษา

วท.บ. (เทคนิคการสัตวแพทย์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์