

ดังที่ทราบว่าการติดบุหรี่นั้นก่อให้เกิดโรคร้ายแรงต่างๆมากมายต่อสุขภาพ นับเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก รวมทั้งในประเทศไทย การติดบุหรี่เกิดเนื่องจากร่างกายได้รับสารนิโคติน ติดต่อกันเป็นเวลานาน ส่งผลให้เกิดภาวะเสพติดและทำให้เกิดอาการถอนยาเมื่อผู้ติดบุหรี่เลิกสูบบุหรี่ดอกขาวเป็นพืชสมุนไพรที่นำมาใช้รักษาอาการผิดปกติต่างๆ รวมทั้งการลดอาการอยากสูบบุหรี่ ซึ่งกลไกในการลดอาการอยากสูบบุหรี่ยังไม่ทราบแน่ชัด โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหน้าดอกขาวต่อการลดการติดนิโคตินในสัตว์ทดลอง โดยหนูขนาดเล็กที่ถูกทำให้ติดนิโคติน แต่ละกลุ่มจะได้รับสารสกัดหน้าดอกขาวในขนาดต่างๆ เพื่อศึกษาการแสดงออกทางพฤติกรรม ได้แก่ ยกขาหน้า ยกตัว ท้องกระตุก ปิดจมูก เกาหู เกาทำสุนัข ตัวสั่น และเกาตัว รวมทั้งศึกษาอาการวิตกกังวลจากการทดสอบ locomotor activity และการใช้ the elevated plus maze เปรียบเทียบกับหนูขนาดเล็กที่ได้รับ mecamylamine และหนูขนาดเล็กที่ได้รับน้ำเกลือซึ่งเป็นตัวแทนของหนูที่มีอาการขาดนิโคติน ผลการศึกษาพบว่า หลังจากหยุดให้นิโคติน 1 วัน หนูขนาดเล็กกลุ่มที่ขาดนิโคติน กลุ่มที่ได้รับ mecamylamine และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหน้าดอกขาวในขนาดต่างๆ แสดงจำนวนครั้งของอาการขาดนิโคตินไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ในขณะที่การเกาทำสุนัขและการเกาตัวลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อหนูขนาดเล็กได้รับ mecamylamine ติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน ผลการลดลงของการเกาทำสุนัขยังพบได้ในหนูขนาดเล็กกลุ่มที่ขาดนิโคติน 7 วัน แม้ว่าหนูขนาดเล็กที่ได้รับสารสกัดหน้าดอกขาวไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการแสดงอาการต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูขนาดเล็กกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ขาดนิโคติน แต่มีบางอาการ ได้แก่ การยกขาหน้า ซึ่งหนูขนาดเล็กที่ได้รับสารสกัดหน้าดอกขาวมีแนวโน้มที่เกิดขึ้นน้อยกว่าหนูขนาดเล็กกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ขาดนิโคติน จากการทดสอบ locomotor activity การได้รับสารสกัดหน้าดอกขาวมีแนวโน้มลดการวิ่งผ่านลงแต่ไม่ทำให้เกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัดหน้าดอกขาว ส่วนการศึกษาโดยใช้ the elevated plus maze พบว่า หนูขนาดเล็กกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหน้าดอกขาวขนาด 125 มิลลิกรัม/กิโลกรัม หลังจากหยุดให้นิโคติน 1 วัน มีการเคลื่อนไหวไปยังแขนที่ไม่มีผนังล้อมรอบน้อยกว่าหนูขนาดเล็กกลุ่มที่ขาด nicotine อย่างมีนัยสำคัญ จากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ของสารสกัดหน้าดอกขาวในการลดการแสดงบางอาการของการขาดนิโคติน ซึ่งการลดอาการดังกล่าวสัมพันธ์กับการลดการเคลื่อนไหวของสัตว์ทดลอง จึงเป็นไปได้ว่าส่วนหนึ่งของการลดอาการขาดนิโคตินในหนูขนาดเล็กอาจมาจากฤทธิ์ทำให้สงบลงของสารสกัดหน้าดอกขาว

หลังจากการศึกษาพฤติกรรม สมองหนูขนาดเล็กถูกนำไปศึกษากลไกของสารสกัดหน้าดอกขาวต่อ nicotinic และ muscarinic receptors ซึ่งมีการรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดอาการติด nicotine ในการลดอาการขาดนิโคตินในหนูขาว โดยทำการศึกษาการจับของสารสกัดหน้าดอกขาวในสมองของหนูขาวจากการแทนที่การจับของ [ $^3$ H]nicotine และ [ $^3$ H]scopolamine กับ nicotinic และ muscarinic receptors ตามลำดับ พบว่าสารสกัดหน้าดอกขาวสามารถจับทั้ง nicotinic และ muscarinic receptors (IC<sub>50</sub> ของการแทนที่การจับของ [ $^3$ H]nicotine และ [ $^3$ H]scopolamine กับ nicotinic และ muscarinic receptors เท่ากับ 3.48 และ 3.49 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) จากนั้นทำการศึกษาปริมาณของ nicotinic ( $\alpha_7$ ) และ muscarinic (M5) receptors ที่เปลี่ยนแปลงในสมองของหนูขนาดเล็กด้วยวิธีการ

immunoblotting พบว่าหนูขาวเล็กติดนิโคตินจะมีปริมาณแสดงออกของ  $\alpha_7$  nicotinic receptor และ M5 muscarinic receptor ในสมองเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม เมื่อหนูขาวเล็กในภาวะถอนยาได้รับสารสกัดหลอดดอกขาพบว่ามีสารสกัดหลอดดอกขาที่มีแนวโน้มที่จะลดปริมาณแสดงออกของ  $\alpha_7$  nicotinic receptor และ M5 muscarinic receptor ได้ในลักษณะ dose-dependent response เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่มีภาวะถอนยาและได้รับน้ำเกลือแทนสารสกัด ผลการศึกษาดังกล่าวแสดงว่าสารสกัดหลอดดอกขาอาจมีฤทธิ์ลดอาการขาด nicotine ส่วนหนึ่งจากการจับกับ  $\alpha_7$  nicotinic และ M5 muscarinic receptors

เนื่องจากตามตำราแผนโบราณมีการนำส่วนต่างๆของหลอดดอกขาไปใช้ในการรักษาโรคต่างๆที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันของร่างกาย เช่น การอักเสบ การติดเชื้อ โรคตับ และโรคหืด ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการศึกษาผลของสารสกัดหลอดดอกขาที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันของหนูขาว โดยจะดูผลของสารสกัดหลอดดอกขาต่อการสร้าง cytokine ชนิดต่างๆ ได้แก่ IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 และ IL-10 และผลของสารสกัดหลอดดอกขาต่อการสร้าง lymphocyte ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหลอดดอกขายับยั้งการหลั่ง IFN- $\gamma$  และ IL-2 โดยสัมพันธ์กับความเข้มข้น และสารสกัดหลอดดอกขายังมีผลกระตุ้น IL-10 โดยผลการกระตุ้นมีแนวโน้มลดลงเมื่อทดสอบด้วยสารสกัดความเข้มข้นสูงขึ้น สารสกัดหลอดดอกขามีผลยับยั้งการหลั่ง superoxide จาก mouse macrophage แต่เพิ่มการหลั่ง superoxide anion จาก THP-1 cells ส่วนการหลั่ง acid phosphatase จาก mouse macrophage และ human THP-1 cells พบว่าไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นถึงผลของสารสกัดหลอดดอกขาต่อความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ที่ตอบสนองต่อสารสกัดหลอดดอกขา มีผลต่อการสร้าง superoxide anion ภายใน phagocyte ให้แตกต่างกัน นอกจากนี้สารสกัดหลอดดอกขามีผลต่อการแบ่งตัวของ T lymphocyte ผ่านกลไกเดียวกันกับ phytohemagglutinin (PHA) และ concanavalin A (Con A) นอกจากนี้ยังมีผลต่อการแบ่งตัวของ B lymphocyte ทั้งแบบ T cell independent และ T cell dependent เช่นเดียวกัน lipopolysaccharide (LPS) และ pokeweed mitogen (PWM) ตามลำดับ ผลการศึกษานี้สามารถใช้เป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ส่วนหนึ่งในการพิสูจน์สรรพคุณของหลอดดอกขาที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันและฤทธิ์ต้านอักเสบ อันอาจนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาฤทธิ์การรักษาที่เกี่ยวข้องกับการทำงานระบบภูมิคุ้มกัน

เพื่อที่จะหาสารสำคัญที่มีอยู่ในสารสกัดหลอดดอกขาและมีส่วนเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ลดอาการขาดนิโคติน คณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาสารสำคัญในสารสกัดหลอดดอกขาโดยใช้ HPLC โดยสารสำคัญที่มีความสนใจ ได้แก่ luteolin เนื่องจากมีรายงานว่า luteolin เป็นสารจำพวก flavonoids ที่พบได้ทั่วไปในพืชสมุนไพรรวมทั้งหลอดดอกขา ระบบของ HPLC ที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วย Mithysil C-18 column (250 มิลลิเมตร  $\times$  4.6 มิลลิเมตร, particle size 5 ไมโครเมตร) โดยมี mobile phase ที่ประกอบด้วย acetonitrile และ phosphate buffer pH 3.5 อัตราการไหลของ mobile phase คือ 1.0 มิลลิลิตร/นาที โดย luteolin จะถูกตรวจวัดปริมาณที่ความยาวคลื่น 254 nm การตรวจสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์พบว่า %recovery ที่ได้จากสารละลาย luteolin มาตรฐานที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 6.25-100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $99.19 \pm 2.31$  ความเข้มข้นต่ำสุดของ luteolin ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (LOD) โดย HPLC เท่ากับ 0.78 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และความเข้มข้นต่ำสุดของ luteolin ที่สามารถใช้ในการหาปริมาณ

(LOQ) โดย HPLC เท่ากับ 2.37 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณ luteolin ในพลาสมาหนูขาวเล็กกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ติดนิโคติน และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหญาดอกขาว โดย HPLC พบว่าพลาสมาหนูขาวเล็กในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ติดนิโคติน จะตรวจไม่พบ luteolin ส่วนหนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหญาดอกขาวขนาด 125, 250 และ 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีระดับ luteolin ในพลาสมาเท่ากับ  $0.79 \pm 0.95$ ,  $3.62 \pm 0.41$  และ  $6.56 \pm 1.25$  มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหญาดอกขาวมี luteolin เป็นส่วนประกอบ และปริมาณ luteolin ในพลาสมาของหนูขาวขึ้นกับปริมาณสารสกัดหญาดอกขาวที่หนูขาวเล็กได้รับ

จากหลายการศึกษาได้แสดงให้เห็นว่า luteolin มีผลลดการอักเสบจากการยับยั้งการสร้าง cytokine รวมทั้ง luteolin มีผลในการกระตุ้นการทำงานของ nicotinic receptors และ muscarinic receptors ผลที่ได้จากโครงการวิจัยนี้สามารถนำไปอธิบายถึงฤทธิ์ในการลดอาการติดนิโคตินของสารสกัดหญาดอกขาวในสัตว์ทดลอง ซึ่งส่วนหนึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่ luteolin ออกฤทธิ์ผ่านการทำงานของ nicotinic receptors และ muscarinic receptors รวมทั้งการที่ luteolin มีความสามารถในการลดการสร้าง cytokine ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าของ luteolin ต่อการลดอาการติดนิโคตินในอนาคตจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ และอาจจะทำให้เห็นศักยภาพในการนำ luteolin มาพัฒนาเป็นยารักษาการติดบุหรี่ในอนาคต

It has been known that cigarette dependence causes many severe diseases, considering a major public health problem in the world including in Thailand. The dependency is due to a long term exposure to nicotine in the cigarette. The nicotine dependence results in undesirable withdrawal symptoms when a smoker wants to stop smoking. *Vernonia cineria* Less. is a Thai traditional plant which is used for treatment many diseases including smoking cessation. Although efficacy in treatment of nicotine dependence is acceptable, mechanism of action of *Vernonia cineria* in this aspect is unclear. Therefore, this research aims to study the effects of *Vernonia cinerea* Less. extract on nicotine dependence in animal. Mice were induced to be addicted to nicotine and then received various concentrations of *Vernonia cinerea* extract in order to observe abstinence signs, including rearing, body lifting, abdominal constrictions, nose scratching, ear scratching, dog shaking, body shaking and body scratching, and anxiety using locomotor activity test and the elevated plus maze compared with mice administered mecamlamine and saline. There was no significant difference in abstinence signs between each group after 1 day of nicotine withdrawal. Dog shaking and body scratching were significantly decreased in mice received mecamlamine for 7 days. Decrease in dog shaking was also found in nicotine withdrawal group. Mice received the extract exhibited trend of reduction in rearing without any significant differences compared with control and nicotine withdrawal groups. The extract produced a trend of reduced locomotor activity without any significances compared with mecamlamine and saline. In the elevated plus maze study, administration of 125 mg/kg of the extract after 1 day of nicotine withdrawal exhibited significantly less opened arm entry compared with administration of normal saline. The results indicate that reduction in nicotine abstinence symptoms is related to decrease in locomotor activity and depressant effect of the extracts might be involved with these observations.

After behavioral test cessation, mouse brains were used for studies of nicotinic and muscarinic receptors which had been found to be involved with nicotine dependence. Binding of *Vernonia cineria* extracts in mouse brains was determined using displacement assay of binding of [<sup>3</sup>H]nicotine and [<sup>3</sup>H]scopolamine to nicotinic and muscarinic receptors, respectively. *Vernonia cineria* extracts bound to nicotinic and muscarinic receptors (IC<sub>50</sub> of binding displacement of [<sup>3</sup>H]nicotine and [<sup>3</sup>H]scopolamine to nicotinic and muscarinic receptors = 3.48 and 3.49 µg/ml, respectively). Levels of nicotinic ( $\alpha_7$ ) and muscarinic (M5) receptors were studied in brains of mice using immunoblotting. The results showed that the levels of  $\alpha_7$  nicotinic receptors and M5 muscarinic receptors in a brain were increased in the nicotine dependent mice compared with a control group. In the withdrawal mice, the *Vernonia cinerea* Less. extracts trended to decrease the expressions of both  $\alpha_7$  nicotinic receptors and M5

muscarinic receptors in the brain in a dose-dependent response, comparing to the withdrawal group injected with normal saline. This study was the first to demonstrate that the *Vernonia cinerea* Less. extracts has an effect on  $\alpha_7$  nicotinic receptors and M5 muscarinic receptors in the brain of the nicotine addicted animal. *Vernonia cinerea* extracts may relieve nicotine withdrawal symptoms by partly binding to  $\alpha_7$  nicotinic and M5 muscarinic receptors.

According to folklore use of *Vernonia cinerea* in treatments of various immunological diseases such as inflammation, infection, liver disease and asthma. Therefore, the effects of *Vernonia cinerea* extracts on the mouse immune system were investigated. *Vernonia cinerea* extracts were examined on the production of four cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 and IL-10) and the proliferative response of mouse splenic lymphocytes. Result showed that *Vernonia cinerea* extracts inhibited release of IFN- $\gamma$  and IL-2 in dose-dependent manner, and increased secretion of IL-10 with trend of decrease when using higher concentrations of the extracts. Moreover, the extract decreased superoxide production by mouse macrophages, but increased production by human THP-1 cells without significant effects on acid phosphatase activity. These results suggest that *Vernonia cinerea* may induce species-specific phagocytic responses that may partially contribute to anti-inflammatory activity. The results from examination of mouse splenocyte proliferation in response to phytohemagglutinin (PHA) and concanavalin A (con A) as T cell mitogens, and lipopolysaccharide (LPS) and pokeweed mitogen (PWM) demonstrated that the extracts exerted a dual effect on T cell proliferation through the same mechanism as con A, but did not show a significant difference in the presence of PHA. The extracts inhibited B cell proliferation through a T cell independent pathway shared with LPS, but stimulated B cell proliferation through a T cell dependent mechanism shared with PWM. Our results confirmed the traditional applications of *Vernonia cinerea* on anti-inflammatory and immunomodulatory activity. Our results suggested a potential therapeutic application of this plant in the treatment of diseases associated with cytokine production and inflammation.

For determination of chemical constituent, which has effects on reduction of nicotine abstinence symptoms, in *Vernonia cinerea* extracts, a new HPLC method was developed for quantification of a nominated substance. Luteolin was selected for the HPLC analysis because it is a common flavonoids found in medicinal herbs. The HPLC system composed of Mithysil C-18 column (250 mm  $\times$  4.6 mm, particle size 5  $\mu$ m) using acetonitrile-phosphate buffer pH 3.5 as the mobile phase at a flow rate of 1.0 ml/min. Quantification in the HPLC was achieved with detection at 254 nm. Validation of accuracy of the HPLC method was performed using the range of 6.25–100  $\mu$ g/ml for standard luteolin solution, with mean recovery of  $99.19 \pm 2.31$ . The LOD of the HPLC method was 0.78  $\mu$ g/ml and the LOQ was 2.37  $\mu$ g/ml. Luteolin was identified and quantified in plasma of mice from control, nicotine withdrawal and *Vernonia cinerea*-received group. No luteolin was identified either control or nicotine

withdrawal group, whereas luteolin in the concentrations of  $0.79 \pm 0.95$ ,  $3.62 \pm 0.41$  and  $6.56 \pm 1.25$  mg/ml were found in the plasma of mice received 125, 250 and 500 mg/kg of *Vernonia cinerea* extracts, respectively. The results demonstrate that luteolin is a flavonoid component found in *Vernonia cinerea* extracts and levels of luteolin in mice plasma depend on concentration of obtained *Vernonia cinerea* extracts.

Several studies exhibit diminishing effects of luteolin in cytokine-induced inflammation and effects of luteolin in nicotinic and muscarinic receptor activation. Results from the research suggest that luteolin in *Vernonia cinerea* extracts may involve with reduction in nicotine withdrawal symptoms. Nicotinic and muscarinic activities and cytokine reducing effect of luteolin are considered to be possible mechanisms. Further studies in effects of luteolin on nicotine dependence would be an interesting issue in order to find out potential of luteolin for development of drug used for nicotine addiction in the future.