

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



E47355



PROTECTIVE EFFECT OF CURCUMIN AGAINST ADVERSE EFFECT
AFTER PRAZIQUENTEL TREATMENT IN
LIVER FLUKE-INFECTED HAMSTERS

MISS LAKHANAWAN CHAROENSUK

A THESIS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
KHON KAEN UNIVERSITY

2011



E47355



**PROTECTIVE EFFECT OF CURCUMIN AGAINST ADVERSE EFFECT
AFTER PRAZIQUENTEL TREATMENT IN
LIVER FLUKE-INFECTED HAMSTERS**



MISS LAKHANAWAN CHAROENSUK

A THESIS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

KHON KAEN UNIVERSITY

2011

**PROTECTIVE EFFECT OF CURCUMIN AGAINST ADVERSE EFFECT
AFTER PRAZIQUENTEL TREATMENT IN
LIVER FLUKE-INFECTED HAMSTERS**

MISS LAKHANAWAN CHAROENSUK

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN PARASITOLOGY
GRADUATE SCHOOL KHON KAEN UNIVERSITY**

2011



THESIS APPROVAL
KHON KAEN UNIVERSITY
FOR
MASTER OF SCIENCE
IN PARASITOLOGY

Thesis Title: Protective effect of curcumin against adverse effect after praziquantel treatment in liver fluke-infected hamsters

Author: Miss Lakhanawan Charoensuk

Thesis examination committee

Assoc. Prof. Dr. Supason	Wanichwecharungruang	Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Thewarach	Laha	Member
Assoc. Prof. Dr. Somchai	Pinlaor	Member
Asst. Prof. Dr. Wipaporn	Ruangjirachuporn	Member
Asst. Prof. Dr. Porntip	Pinlaor	Member

Thesis Advisors:

..... *Somchai Pinlaor* Advisor

(Assoc. Prof. Dr. Somchai Pinlaor)

..... *W. Ruangjirachuporn* Co-advisor

(Asst. Prof. Dr. Wipaporn Ruangjirachuporn)

..... *Porntip Pinlaor* Co-advisor

(Asst. Prof. Dr. Porntip Pinlaor)

..... *L. Manmart*

(Assoc. Prof. Dr. Lampang Manmart)

Dean, Graduate School

..... *Pisake Lumbiganon*

(Prof. Dr. Pisake Lumbiganon)

Dean, Faculty of Medicine

ลักขณาวัลย์ เจริญสุข. 2554.ฤทธิ์ป้องกันของเคอร์คูมินต่อผลข้างเคียงหลังจากรักษาด้วยยาพาราซิควอนเทลในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดพยาธิใบไม้ตับ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปรสิตวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: รศ.ดร. สมชาย ปิ่นละออ, ผศ.ดร. วิภากรณ์ เรืองจิระบุตร, ผศ.ดร. พรทิพย์ ปิ่นละออ

บทคัดย่อ

E47355

ยาพาราซิควอนเทลเหนี่ยวนำให้แอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับ (*Opisthorchis viverrini*) แพร่กระจายและเหนี่ยวนำเซลล์อักเสบภายหลังการรักษาในระยะเวลาสั้นๆ ส่งผลให้เกิดภาวะออกซิเดทีฟและไนเตรทีฟสเตรสตามมา เพื่อลดผลข้างเคียงดังกล่าวเราจึงให้สารเสริมเคอร์คูมินซึ่งมีฤทธิ์ต่อต้านการอักเสบ เป็นสารสกัดจากขมิ้นชัน ในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดพยาธิใบไม้ตับและรักษาด้วยยาพาราซิควอนเทล ที่เวลา 12 ชั่วโมงภายหลังการรักษา เคอร์คูมินสามารถลดเซลล์อักเสบชนิดีโอซิโนฟิลและเพิ่มโมโนนิวเคลียร์เซลล์ สัมพันธ์กับการแสดงออกในระดับยีนและโปรตีนของ nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) และ heme oxygenase-1 เคอร์คูมินยังเพิ่มการแสดงออกของยีนที่ควบคุมด้วย Nrf2 เกี่ยวข้องในภาวะเครียดประกอบด้วย (Kelch-like ECH-associated protein 1, NAD(P)H:quinine oxidoreductase 1, glutamate cysteine ligase, และกระตุ้น transcription factor 3 ยีนที่สร้างเอ็นไซม์ต่อต้านอนุมูลอิสระ (peroxiredoxin 3, peroxiredoxin 6, manganese superoxide dismutase และ catalase) นำไปสู่การเพิ่มระดับความสามารถในการต่อต้านสารอนุมูลอิสระ (ferric antioxidant capacity) ในพลาสมา ในทางตรงข้ามเคอร์คูมินสามารถลดระดับ 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine ในปัสสาวะ มาลอนไดอัลดีไฮด์ ไนเตรต/ไนไตร และการทำงานของเอ็นไซม์อะลานีนอะมิโนทรานสเฟอเรสในพลาสมาซึ่งเป็นตัวชี้วัดภาวะถูกทำลายของตับ การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้สัมพันธ์กับการยับยั้ง NF- κ B โมเลกุลที่เกี่ยวข้อง (COX-2 และ iNOS) และ proinflammatory cytokines (IL-1 β และ TNF- α) สรุป การให้เคอร์คูมินอาจจะมีประสิทธิภาพเป็นสารเคมีป้องกันรักษาภาวะออกซิเดทีฟและไนเตรทีฟสเตรสจากรักษาด้วยยาพาราซิควอนเทลในการติดพยาธิใบไม้ตับ โดยเหนี่ยวนำ Nrf2 และยับยั้ง NF- κ B ที่ควบคุมวิถีได้ Nrf2 อาจเป็นโมเลกุลเป้าหมายใหม่สำหรับการรักษาไม่เฉพาะในโรคติดเชื้อปรสิตแต่รวมถึงโรคอื่นๆที่เกิดจากกระบวนการอักเสบ

Lakhanawan Charoensuk. 2011. **Protective Effect of Curcumin Against Adverse Effect After Praziquantel Treatment in Liver Fluke-Infected Hamsters.** Master of Science Thesis in Parasitology, Graduate School, Khon Kaen University.

Thesis Advisors: Assoc. Prof. Dr. Somchai Pinlaor, Asst. Prof. Dr. Wipaporn Ruangjirachuporn, Asst. Prof. Dr. Porntip Pinlaor

ABSTRACT

E47355

Praziquantel induces dispersion of *Opisthorchis viverrini* antigens and recruits inflammatory cells after short-term treatment, resulting in increase oxidative and nitrative stress. To reduce this adverse effect, we supplemented with curcumin, a traditional antiinflammatory agent derived from turmeric (*Curcuma longa*), in *O. viverrini*-infected hamsters treated with praziquantel. At 12h after treatment, curcumin decreased eosinophil infiltration and increased mononuclear cell infiltration in parallel with nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase-1 expression at the transcriptional and protein levels. Curcumin also enhanced the expression of genes involved in the Nrf2-regulated stress pathway (Kelch-like ECH-associated protein 1, NAD(P)H:quinine oxidoreductase 1, glutamate cysteine ligase, and activating transcription factor 3, peroxiredoxin 3, peroxiredoxin 6, manganese superoxide dismutase, and catalase), leading to increased ferric antioxidant capacity in the plasma. In contrast, curcumin decreased the level of oxidative and nitrative stress markers such as urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, plasma levels of malondialdehyde and nitrate/nitrite, and activity of plasma alanine transaminase, a liver injury marker. This correlated with the suppression of nuclear factor-kappaB (NF- κ B) and related molecules (cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase) and pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α). In conclusion, curcumin may be an effective chemopreventive agent against oxidative and nitrative stress derived from praziquantel treatment during *O. viverrini* infection via induction of Nrf2 and suppression of NF- κ B-mediated pathways. Nrf2 may also be a novel therapeutic target for not only parasitic diseases but other types of inflammation-mediated diseases.

**Goodness Portion to the Present Thesis is Dedicated
for my Parents and to my supervisor, relatives and entire teaching staff**

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude to my advisor, Associate Professor Dr. Somchai Pinlaor for his kindness in providing a good opportunity to be his advisee. I am also appreciated for his valuable supervision, suggestions, supporting, encouragement, guidance and criticism through the course of my study.

I would like to express my greatest appreciation to my co-advisor, Assistant Professor Dr. Porntip Pinlaor and Assistant Professor Dr. Wipaporn Ruangjirachuporn for their valuable advices, suggestions and kindness useful comment. Appreciation is also expressed to Associate Professor Dr. Supason Wanichwecharungruang and Associate Professor Dr. Thewarach Laha for my thesis examination committee.

I would like to express my sincere thanks to Dr. Suksanti prakobwong, Miss Umawadee Laothong, Miss Nuttanan Hongsrichan and Miss Jarinya Khoontawad, for their helpful suggestions on experiment and laboratory working.

I also extend thank to Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center and The Invitation Research Fund from Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand for supporting the grant of my study and research foundation, respectively.

Finally, I would like to express my sincere gratitude and appreciation to my dear parents and my family for their encouragement and providing a change to study.

Lakhanawan Charoensuk

TABLE OF CONTENTS

	Page
ABSTRACT (IN THAI)	i
ABSTRACT (IN ENGLISH)	ii
DEDICATION	iii
ACKNOWLEDGEMENTS	iv
LIST OF TABLES	vii
LIST OF FIGURES	viii
LIST OF ABBREVIATIONS	ix
CHAPTER I INTRODUCTION	
1.1 Background	1
1.2 Research questions	3
1.3 Objectives of the study	3
1.4 Location of research conducting	3
1.5 Anticipated outcomes	3
CHAPTER II LITERATURE REVIEW	
2.1 <i>Opisthorchis viverrini</i>	4
2.2 Treatment of opisthorchiasis	9
2.3 Free radicals	12
2.4 Oxidative stress and nitrative stress	14
2.5 Nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2)	15
2.6 Antioxidants and antioxidant-related enzymes	19
2.7 Phase I and Phase II enzyme	21
2.8 Curcumin	21
2.9 Conceptual framework	32
CHAPTER III RESEARCH METHODOLOGY	
3.1 Parasites	34
3.2 Hamster infection	34
3.3 Animal and experimental design	34
3.4 Specimen collection and protocol of the study	36

TABLE OF CONTENTS (Cont.)

	Page
3.5 Administration of curcumin	38
3.6 Administration of praziquantel	38
3.7 Histopathological study	38
3.8 Immunohistochemical study	39
3.9 Determination of biochemical parameters	39
3.10 Gene expression study	42
3.11 Western blot analysis	44
3.12 Statistical analysis	50
CHAPTER IV RESULTS	
4.1 Effect of curcumin on inflammatory cell infiltration in <i>O. viverrini</i> -infected hamsters treated with praziquantel	51
4.2 Effect of curcumin on Nrf2 expression in <i>O. viverrini</i> -infected hamsters treated with praziquantel	54
4.3 Effect of curcumin on HO-1 expression in <i>O. viverrini</i> -infected hamsters treated with praziquantel	56
4.4 Curcumin up-regulation of Nrf2-regulated stress response genes	58
4.5 Effect of curcumin on the expression of antioxidant genes	59
4.6 Effect of curcumin on the expression of oxidant genes	60
4.7 Effect of curcumin on the expression of proinflammatory cytokines	62
4.8 Effect of curcumin on biochemical parameters in <i>O. viverrini</i> -Infected hamsters treated with praziquantel	63
CHAPTER V DISCUSSION	65
CHAPTER VI CONCLUSION	67
REFERENCES	68
APPENDICES	82
VITAE	96

LIST OF TABLES

		Page
Table 1	ROS in living organisms	13
Table 2	RNS in living organisms	14
Table 3	Sequence of the murine primers used for real time PCR	45
Table 4	Sequence of amplified fragment identities to rat, mouse and human nucleotides and amino acids	46
Table 5	Histopathology changes in <i>O. verrini</i> -infected hamsters treated with praziquantel and the effect of curcumin supplement	53

LIST OF FIGURES

	Page
Figure 1 Life cycle of <i>Opisthorchis viverrini</i>	5
Figure 2 Proposed mechanism responsible for activation of Nrf2-ARE signaling	17
Figure 3 Major curcuminoids in <i>Curcuma longa</i>	22
Figure 4 Biosynthetic pathway of curcumin in <i>Curcuma longa</i>	23
Figure 5 Conceptual framework of the study	33
Figure 6 The experimental design of animal model	35
Figure 7 Protocol of specimen collection and analysis	37
Figure 8 Schematic of 8-OH-dG determination by ACE TM EIA	40
Figure 9 Histopathological changes in <i>O. viverrini</i> -infected hamsters treated with praziquantel and the effect of a curcumin supplement	52
Figure 10 Expression of Nrf2 in <i>O. viverrini</i> -infected hamsters treated with praziquantel and the effect of curcumin supplement	55
Figure 11 Expression of HO-1 in <i>O. viverrini</i> -infected hamsters treated with praziquantel and the effect of curcumin supplement	57
Figure 12 mRNA levels of Nrf2-regulated stress response genes in <i>O. viverrini</i> -infected hamsters treated with praziquantel and the effect of curcumin supplement	58
Figure 13 mRNA levels of antioxidant genes in <i>O. viverrini</i> -infected hamsters treated with praziquantel and the effect of curcumin supplement	59
Figure 14 Expression levels of oxidant genes in <i>O. viverrini</i> -infected hamsters treated with praziquantel and the effect of curcumin supplement	61
Figure 15 mRNA levels of proinflammatory cytokines in <i>O. viverrini</i> -infected hamsters treated with praziquantel and the effect of curcumin supplement	62
Figure 16 Effect of curcumin on biochemical parameters in <i>O. viverrini</i> -infected hamsters treated with praziquantel	64

LIST OF ABBREVIATIONS

°C	degree Celsius
8-oxodG	8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine
μL	microliter
μm	micrometer
pg/mL	picogram per milliliter
ALT	alanine transaminase
ATF-3	activation transcription factor 3
CAT	catalase
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
COX-2	cyclooxygenase-2
EDTA	ethylenediaminetetraacetate
FRAP	ferric reducing antioxidant power
GCL	glutamate cysteine ligase
GSH	glutathione
HO-1	heme oxygenase-1
H ₂ O ₂	hydrogen peroxide
IL-1β	interleukin-1β
iNOS	inducible nitric oxide synthase
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
MDA	malondialdehyde
mg/kg	milligram per kilogram
mL	milliliter
mm	millimeter
M-MLV RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
mRNA	messenger ribonucleic acid
NF-κB	nuclear factor-kappaB
nm	nanometer

LIST OF ABBREVIATION (Cont.)

NO	nitric oxide
NOS	nitric oxide synthase
NO _x	nitrate/nitrite
NQO1	NADPH: quinone oxidoreductase-1
Nrf-2	nuclear erythroid 2-related factor 2
NSS	normal saline solution
¹ O ₂	singlet oxygen
³ O ₂	triplet-state molecular oxygen
O ₂ ^{•-}	superoxide anion
•OH	hydroxyl radical
ONOO ⁻	peroxynitrite
Prdx 3	peroxiredoxin 3
Prdx 6	peroxiredoxin 6
ROS	reactive oxygen species
RNS	reactive nitrogen species
rpm	round per minute
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
SOD	superoxide dismutase
TBA	thiobarbituric acid
TBARS	thiobarbituric acid-reactive substances
TNF- α	tumor necrosis factor- α