ANTIOXIDATIVE EFFECTS OF CRUDE WATER EXTRACT OF MANGOSTEEN IN HEALTHY VOLUNTEERS

VATCHARA TUNRUNGRUANGTAVEE 5437945 PYBS/M

M.Sc. (BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES)

THESIS ADVISORY COMMITEE : PRIMCHANIEN MOONGKARNDI, Dr.rer.nat. (IMMUNOLOGY), WICHIT SUTHAMMARAK M.D., Ph.D. (GENETICS)

ABSTRACT

Oxidative stress has been implicated in the progression of a number of neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease and Alzheimer's disease. Harmful effects of excessive free radicals causing biological damage is in terms of oxidative stress. Reactive oxygen species (ROS) or oxygen free radical are products of normal cellular metabolism and induce apoptosis and damage the protein, DNA, lipid membrane and other organ systems in the body. Biological markers of oxidative stress has many forms such as malondialdehyde (MDA) and hydroxyeicosatetraenoic acid (HETEs). In this study, two biomarkers; i.e., 4-hydroxynonenal (HNE) and dehydroepiandrosterone (DHEA) were of interest. HNE is a byproduct of lipid peroxidation, which is an indicator for oxidative stress. HNE can react with lysine or histidine in protein, and changes the function and structure of the protein. DHEA is a neurosteroid biological marker. Some reports presented that DHEA has also been found to have the ability to protect cells from oxidative damage to the hippocampus part of the brain. Recently, many medicinal plants have been widely used as antioxidants to protect against oxidative stress. Several studies of mangosteen extract have been shown to have several medicinal properties especially as antioxidant and anti-inflammatories in both human cell lines and animal models. Previous studies reported that mangosteen extract could decrease oxidative stress in scopolamine-treated mice and improve the animal's memory.

From the *in vitro* and *in vivo* results, the protective effect of crude water extract of mangosteen (CWM) was obtained as described. Then, the aim of this study was to evaluate the safety of CWM in healthy volunteers and also determine the markers involving oxidative stress during the time of taking CWM over 6 months.

CWM was prepared in a capsule dosage form. The powder of CWM was filled into capsules size No. 1 at 220 mg without filler. For the dose of 280 mg in capsules size No. 0, was adjusted to a weight of 300 mg with corn starch. In this study, we have attempted to determine the properties of CWM after preparation, which consisted of two parts. The first part, we checked the overall quality of CWM capsules on a weight variation test, disintegration test, loss on drying test, DPPH scavenging assay and biological activities on SK-N-SH cells (MTT, ROS). In the second part, the investigation on the safety and effects of CWM in healthy volunteers of clinical tried phase I study were determined from all aspects by the investigators of the whole project. From this study aspect, the antioxidant activity of CWM was assessed in 11 healthy human subjects after taking CWM for 168 days (6 months), whose weight was less either 55 kg or more than 55 kg, had taken a daily dose of CWM at 220 mg and 280 mg respectively. The effectiveness of CWM was evaluated on the changes of ROS in red blood cells (RBCs) by flow cytometry and biological markers; HNE in whole blood (WB) and RBCs by Dot Blot analysis and in the plasma of healthy humans using the ELISA technique.

In the quality control of the extract capsules, weight variation test, disintegration test and loss on drying met the criteria of the British Pharmacopoeia (BP) 2014. The antioxidant activity of CWM by DPPH assay showed the IC_{50} was less than 50 µg/ml and did not show significant change potency between 0 and 6 months of storage. The biological activities of CWM on SK-N-SH cells (MTT, ROS) showed very low cytotoxicity (IC_{50} was more than 100 µg/ml) in on MTT assay, whereas CWM still possessed antioxidant activity in ROS production at 100 and 200 µg/ml respectively. In a clinical trial, volunteers received a daily dose of CME at 220 mg and 280 mg, respectively, corresponding to their weights for 3 months, followed by double dose daily for the last 3 months. The results showed a significant increase in antioxidant capacity of RBCs and led to significantly decrease in HNE modification in whole blood and RBCs after taking CWM at 28, 84 and 168 days respectively and remained until 6 months after ingestion. However, CWM had no significant changes on DHEA levels in the plasma of healthy volunteers.

According to the obtained results, we concluded that the quality of CWM capsules met the standard criteria of BP. It was also safe for cells and in healthy volunteers. CWM capsules possessed antioxidant activity during the 6 months of the study. Therefore, it was supposed that CWM has the potential to reduce oxidative stress in patients with certain diseases in the future study.

KEY WORDS : WATER EXTRACT OF MANGOSTEEN / ANTIOXIDATION / REACTIVE OXYGEN SPECIE / 4-HYDROXYNONENAL / DEHYDROEPIANDROSTERONE

140 pages

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากชั้นน้ำของมังคุดในอาสาสมัครสุขภาพดี
ANTIOXIDATIVE EFFECTS OF CRUDE WATER EXTRACT OF MANGOSTEEN IN HEALTHY VOLUNTEERS.

วัชระ ตันรุ่งเรืองทวี 5437945 PYBS/M

วท.ม. (เภสัชศาสตร์ชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ปริ่มเฉนียน มุ่งการดี, Dr.rer.nat. (IMMUNOLOGY), วิชิต สุธรรมารักษ์ M.D., Ph.D. (GENETICS)

บทคัดย่อ

ความเครียดออกซิเดชันมีความเกี่ยวข้องในความก้าวหน้าของจำนวนของโรคเกี่ยวกับระบบประสาทเช่นโรคพาร์กินสันและโรคอัลไซเมอร์ ผลกระทบที่เป็นอันตรายจากที่มีอนุมูลอิสระมากเกินไปจะก่อให้เกิดความเสียหายทางชีวภาพ ในช่วงระยะเวลาของการเกิด reactive oxidative stress (ROS) หรือออกซิเจนอนุมูลอิสระซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของการเผาผลาญของเซลล์ปกติและเหนี่ยวนำให้เกิดการตายและความเสียหายของโปรตีน ดีเอ็นเอ เยื่อไขมันและระบบอวัยวะอื่น ๆ ในร่างกาย ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของความเครียดออกซิเดชัน มีอยู่ด้วยกันหลายตัว อย่างเช่น malondialdehyde (MDA) และ hydroxyeicosatetraenoic acid (HETEs) ในการศึกษานี้ สารบ่งชี้ทางชีวภาพ 2 ตัวอันได้แก่ 4 hydroxynonenal (HNE) และ dehydroepiandrosterone (DHEA) ซึ่งเป็นตัวที่เราสนในการศึกษา HNE เป็นผลพลอยได้จากการเกิด lipid peroxidation ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้สำหรับความเครียดออกซิเดชัน HNE สามารถทำปฏิกิริยากับไลซีนหรือฮิสติดีนโปรตีนและเปลี่ยนแปลงการทำงานและโครงสร้างของโปรตีน DHEA เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของ neurosteroid ซึ่งบางรายงานได้นำเสนอว่า DHEA มีความสามารถในการปกป้องเซลล์ในส่วนของ hippocampus ในสมอง จากการทำลายของอนุมูลอิสระ เมื่อเร็วๆ นี้ พืชสมุนไพรจำนวนมากได้ถูกนำมาใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระอย่างกว้างขวางเพื่อป้องกันความเครียดออกซิเดชัน หลายงานวิจัยของสารสกัดจากมังคุดพบว่า มีคุณสมบัติทางยาหลายอย่างโดยเฉพาะอย่างยิ่งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบทั้งในเซลล์ของมนุษย์และสัตว์ การศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่า สารสกัดจากเปลือกมังคุดสามารถลดความเครียดออกซิเดชัน ในหนูที่รับสาร scopolamine และเพิ่มหน่วยความจำของสัตว์

จากการทดลองในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง แสดงประสิทธิภาพในการป้องกันต่างๆของสารสกัดหยาบจากชั้นน้ำของมังคุด (CWM) ตามที่ได้อธิบายไว้ จุดมุ่งหมายของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อประเมินความปลอดภัยของ CWM ในอาสาสมัครสุขภาพดีและตรวจสอบตัวบ่งชี้ที่เกี่ยวข้องกับ oxidative stress ในร่างกายของอาสาสมัครภายในช่วงเวลา 24 สัปดาห์ของการรับสารสารสกัด CWM

สารสกัด CWM จะถูกเตรียมในรูปของยาแคปซูล ผงของ CWM จะถูกบรรจุลงในแคปซูลเบอร์หนึ่งปริมาณ 220 และ 280 มก. ในแคปซูลเบอร์ 0 โดยปรับน้ำหนักเป็น 300 มก. ด้วยแป้งข้าวโพด ในการศึกษาครั้งนี้เราได้ตรวจสอบคุณสมบัติของ CWM หลังการผลิต ซึ่งประกอบด้วยสองส่วน ในส่วนแรกเราได้ทำการตรวจสอบคุณภาพโดยรวมของสารสกัด CWM ในแคปซูล โดยทดสอบความแตกต่างของน้ำหนักเฉลี่ย การแตกตัว การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น การตรวจการต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH scavenging assay และฤทธิ์ทางชีวภาพต่อเซลล์ SK-N-SH (MTT, ROS) ส่วนที่สองการทดสอบความปลอดภัยและประสิทธิภาพของ CWM ในอาสาสมัครสุขภาพดีทางคลินิค ระยะที่1 ซึ่งเป็นงานในโครงการทั้งหมด ในส่วนของการศึกษานี้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ CWM ทำการประเมินจากอาสาสมัครสุขภาพดี 11 คนหลังการรับประทาน CWM เป็นเวลา 6 เดือน ซึ่งบุคคนที่มีน้ำหนักน้อยกว่า 55 กก. และมากกว่า 55 กก. จะรับประทานสารสกัด 1 ครั้งต่อวันในขนาด 220 และ 280 มก. ตามลำดับ ประสิทธิภาพของ CWM จะถูกประเมินการเปลี่ยนแปลงของค่า ROS ในเม็ดเลือดแดงโดยวิธี flow cytometry และตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ HNE ในเลือด และเม็ดเลือดแดงโดยวิธี Dot Blot และ DHEA ในพลาสมาด้วยเทคนิค ELISA

ในการควบคุมคุณภาพของสารสกัดแคปซูลโดยการทดสอบความแตกต่างของน้ำหนักเฉลี่ย การแตกตัว และ ปริมาณความชื้นซึ่งพบว่าอยู่ในเกณฑ์มาตราฐานของตำรับยาอังกฤษ (BP) 2014 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ CWM โดยวิธี DPPH scavenging assay ซึ่งแสดงค่า IC_{50} น้อยกว่า 50 ไมโครกรัม/มล. และไม่มีการเปลี่ยนแปลงของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระระหว่างการเก็บรักษาในเดือนแรกและเดือนที่หก ฤทธิ์ทางชีวภาพของ CWM ต่อ เซลล์ SK-N-SH (MTT, ROS) พบว่า IC_{50} มีค่ามากกว่า 100 ไมโครกรัม/มล. จาก MTT assay แสดงความไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อการผลิต ROS ในการทดลองทางคลินิก อาสาสมัครรับประทาน CWM ขนาด 220 และ 280 มก. ตามขนาดน้ำหนักที่กำหนด โดยรับประทานวันละครั้งเป็นเวลา 3 เดือน และได้ ปรับปริมาณสารเป็นสองเท่าต่อวันในช่วง 3 เดือนหลัง ผลการศึกษาพบการความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญและนำไปสู่การลดค่าHNEในเลือดและเม็ดเลือดแดงอย่างมีนัยสำคัญหลังจากการรับประทานสารสกัด CWM ในวันที่ 28, 84 และ 168 วัน ตามลำดับและยังคงอยู่จนถึงเดือนที่ 6 ของการบริโภค แต่ CWM ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ DHEA อย่างมีนัยสำคัญ

ตามผลการทดลองทั้งหมดนี้ สรุปได้ว่าคุณภาพของสารสกัด CWM ในแคปซูล อยู่ภายใต้มาตรฐานของ BP ที่มีความปลอดภัยต่อเซลล์และอาสาสมัครสุขภาพดี และยังคงมีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระที่ดีตลอดระยะเวลา 6 เดือนของการศึกษา ดังนั้นมีความเป็นไปได้ที่ CWM แคปซูลจะมีศักยภาพในการลดความเครียดออกซิเดชันในผู้ป่วยในโรคที่เกี่ยวข้อง
140 หน้า