ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E41091

ผลของเหง้าว่านชักมดลูกต่อสมรรถนะของเอนไซม์ทรานซามิเนส และสภาวะออกซิเดทีฟสเตรส ในกระต่ายที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูง

นางสาวอิรฆา ยนโยธิ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยา
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ท025586

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E41091

ผลของเหง้าว่านชักมดลูกต่อสมรรถนะของเอนไซม์พาราออกโซเนส และภาวะออกซิเดทีฟสเตรส ในกระต่ายที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูง

นางสาวจีรณา ยมโชติ

THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THAILAND
RESEARCH LIBRARY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยา
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4 9 7 6 5 6 1 2 3 3

EFFECTS OF *CURCUMA COMOSA* RHIZOME ON PARAOXONASE ACTIVITY AND OXIDATIVE STRESS IN RABBITS FED WITH HIGH-CHOLESTEROL DIET

Miss Cheerana Yomchot

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Pharmacology
Department of Pharmacology
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title	EFFECTS OF *CURCUMA COMOSA* RHIZOME ON PARAOXONASE ACTIVITY AND OXIDATIVE STRESS IN RABBITS FED WITH HIGH-CHOLESTEROL DIET
By	Miss Cheerana Yomchot
Field of Study	Pharmacology
Thesis Principal Advisor	Associate Professor Pol.Lt.Col. Somsong Lawanprasert, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Sureerut Porntadavity, Ph.D. Associate Professor Laddawal Phivthong-ngam, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

Pornpen Pramgoth ..... Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences
(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

Mayuree Tantisira ..... Chairperson
(Associate Professor Mayuree Tantisira, Ph.D.)

Pol. Lt. Col. Somsong Lawanprasert ..... Thesis Principal Advisor
(Associate Professor Pol.Lt.Col. Somsong Lawanprasert, Ph.D.)

Sureerut Porntadavity ..... Thesis Co-advisor
(Sureerut Porntadavity, Ph.D.)

Soontharee Tantrarongroj ..... External Member
(Associate Professor Soontharee Tantrarongroj, M.Sc)

Withaya Janthasoot ..... Member
(Assistant Professor Withaya Janthasoot, M.Sc. Pharmacology)

จีรณา ยมโชติ: ผลของเหง้าว่านชักมดลูกต่อสมรรถนะของเอนไซม์พาราออกโซเนส และภาวะออกซิเดทีฟสเตรสในกระต่ายที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูง. (EFFECTS OF *CURCUMA COMOSA* RHIZOME ON PARAOXONASE ACTIVITY AND OXIDATIVE STRESS IN RABBITS FED WITH HIGH-CHOLESTEROL DIET) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ.ดร.พ.ต.ท.หญิงสมทรง ลาวัณย์ประเสริฐ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ.ดร.สุรีรัตน์ พรธาดาวิทย์, รศ.ดร.ลัดดาวัลย์ ผิวทองงาม, 114 หน้า.

E41091

เอนไซม์พาราออกโซเนส (PONs) ประกอบด้วย PON1, PON2 และ PON3 ซึ่ง PON1 และ PON3 มีการสังเคราะห์ที่ตับและปล่อยออกสู่กระแสเลือดโดยจับอยู่กับ HDL ในขณะที่ PON2 พบได้ในเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ แต่ไม่พบใน HDL และ LDL เอนไซม์พาราออกโซเนสมีคุณสมบัติในการป้องกันการเกิดออกซิเดชันของไขมันชนิด LDL และ HDL ซึ่งน่าจะมีส่วนช่วยป้องกันการเกิดหลอดเลือดแดงแข็งตัว อย่างไรก็ตามสมรรถนะของเอนไซม์พาราออกโซเนสขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างได้แก่ ยาลดระดับไขมันในเลือด ว่านชักมดลูก (*Curcuma comosa* Roxb.) เป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae และเป็นพืชพื้นบ้านของไทย ตามตำราแพทย์แผนไทยนิยมใช้ในการรักษาอาการผิดปกติของมดลูก ปัจจุบันมีการศึกษาฤทธิ์ลดไขมันในเลือดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของว่านชักมดลูกกันอย่างกว้างขวาง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของว่านชักมดลูกต่อสมรรถนะของเอนไซม์พาราออกโซเนส รวมทั้งภาวะออกซิเดทีฟสเตรสในกระต่ายที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูง ในการศึกษานี้ใช้กระต่ายเพศผู้พันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ จำนวน 12 ตัว แบ่งกลุ่มโดยการสุ่มออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ตัว กระต่ายทั้ง 3 กลุ่มได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอล 1 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 1 เดือนหลังจากนั้นกระต่ายในกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 จะได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอล 0.5 เปอร์เซ็นต์อาหารที่มีคอเลสเตอรอล 0.5 เปอร์เซ็นต์พร้อมกับยาซิมวาสแททินขนาด 5 มิลลิกรัมต่อวัน และ อาหารที่มีคอเลสเตอรอล 0.5 เปอร์เซ็นต์พร้อมกับว่านชักมดลูกขนาด 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ตามลำดับ เป็นเวลา 3 เดือน เมื่อครบกำหนด 4 เดือนทำการเก็บตัวอย่างเลือดและหลอดเลือดแดงส่วนท้องของกระต่าย ทำการวิเคราะห์สมรรถนะของเอนไซม์พาราออกโซเนส พารามิเตอร์ของไขมัน และภาวะออกซิเดทีฟสเตรส ผลการทดลองพบว่า ว่านชักมดลูกมีผลลดระดับคอเลสเตอรอล และ LDL-C ในเลือดของกระต่ายเหมือนกับยาซิมวาสแททิน นอกจากนี้ว่านชักมดลูกมีผลเพิ่มภาวะออกซิเดทีฟสเตรสเช่นเดียวกับยาซิมวาสแททินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตามทั้งว่านชักมดลูกและยาซิมวาสแททิน ไม่มีผลต่อสมรรถนะของเอนไซม์พาราออกโซเนส ผลจากการศึกษานี้ให้ข้อมูลที่บ่งชี้ว่า การได้รับว่านชักมดลูกและยาซิมวาสแททินในระยะยาวมีผลลดระดับไขมันในเลือดแต่เพิ่มภาวะออกซิเดทีฟสเตรส โดยที่ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์พาราออกโซเนส

ภาควิชา เภสัชวิทยา ..... ลายมือชื่อนิสิต ..... จีรณา ยมโชติ .....

สาขาวิชา เภสัชวิทยา ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

ปีการศึกษา 2550 ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ..... สุรีรัตน์ พรธาดาวิทย์

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

4976561233 MAJOR: PHARMACOLOGY
KEYWORD: *CURCUMA COMOSA*/ PARAOXONASE/ OXIDATIVE STRESS/ SIMVASTATIN

CHEERANA YOMCHOT: EFFECTS OF *CURCUMA COMOSA* RHIZOME ON PARAOXONASE ACTIVITY AND OXIDATIVE STRESS IN RABBITS FED WITH HIGH-CHOLESTEROL DIET. THESIS PRINCIPAL ADVISOR: ASSOC. PROF. POL.LT. COL. SOMSONG LAWANPRASERT, Ph.D., THESIS COADVISOR: SUREERUT PORNTADAVITY, Ph.D., ASSOC. PROF. LADDAWAL PHIVTHONG-NGAM, Ph.D., 114 pp.

E 41091

The paraoxonases (PONs) family consists of three members, PON1, PON2, and PON3. PON1 and PON3 are expressed primarily in the liver and excreted in the blood by associated with high density lipoprotein (HDL) while PON2 expressed widely in a number of tissues and cells and undetectable in HDL and low density lipoprotein (LDL). PONs have been shown to reduce the oxidation of LDL and HDL, thus possibly protecting against atherosclerosis. Activity of PONs is modulated by various factors including hypolipidemic agents. *Curcuma comosa* Roxb. (Zingiberaceae) is an indigenous plant of Thailand and has been widely used in Thai traditional medicine for treatment of abnormal uterine symptoms. Recently, hypolipidemic effect and antioxidant effect of *C. comosa* were extensively investigated. The purpose of this study was to investigate effects of *C. comosa* on PONs activities and oxidative stress in rabbits fed with high-cholesterol diet. Twelve male New Zealand White (NZW) rabbits were randomly divided into three treatment groups of 4 rabbits each. All treatment groups were treated with 1.0% cholesterol for 1 month and subsequently treated with either 0.5% cholesterol or 0.5% cholesterol combined simvastatin at the dosage of 5 mg/day or 0.5% cholesterol combined *C. comosa* at the dosage of 400 mg/kg/day for 3 months. At 4 months after treatment, blood as well as abdominal aorta were collected from all rabbits for determination of lipid parameters, PONs activities and oxidative stress parameters. The results showed that *C. comosa* significantly decreased levels of total cholesterol and LDL similarly to simvastatin. In addition, *C. comosa* significantly increased oxidative stress similarly to simvastatin. We found that both *C. comosa* and simvastatin did not affect PONs activities. Thus, long term treatment of *C. comosa* exhibited hypolipidemic effect and increased oxidative stress similarly to simvastatin but did not affect PONs activities.

Department: Pharmacology
Field of Study: Pharmacology
Academic Year: 2007

Student's Signature: Cheerana Yomchot
Principal Advisor's Signature: Pol. Lt. Col. Somsong Lawanprasert
Co-advisor's Signature: Sureerut Porntadavity
Co-advisor's Signature: Laddawal Phivthong-ngam

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude and appreciation to my advisor, Associate Professor Pol. Lt. Col. Dr. Somsong Lawanprasert for her valuable advice and guidance, kindness, and encouragement during the course of experimental work, preparing and presentation of this thesis.

I would like to express my deepest and sincere appreciation to my co-adviser, Dr. Sureerut Porntadavity for her valuable helps, guidance, comments, and encouragement during the course of experimental work, preparing and presentation of this thesis.

I would like to express my deepest and sincere appreciation to my co-adviser, Associate Professor Dr. Laddawal Phivthong-ngam for her valuable helps, guidance and comments for the animal handling technique.

I also would like to thank Professor Dr. Apichart Suksamrarn for supplying the *C. comosa* rhizome. Thanks are also extended to the committee members, Associate Professor Dr. Mayuree Tantisira, Assistant Professor Withaya Janthasoot and Associate Professor Soontharee Tantrarongroj for their worth comments and suggestions.

I would like to express my deepest appreciation to Mr. Thinnakorn Permpongpaiboon for his kind assistance on the enzyme assay technique.

This study was supported by National Research Council of Thailand.

I wish to thank all staff members of Department of the Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, all staff members of the Department of Clinical Chemistry, Faculty of Medical Technology, Mahidol University, as well as all staff members of the Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University for providing laboratory facilities and helps.

Finally, I would like to thank my family and my friends for their love and encouragement.

CONTENTS

Page

ABSTRACT (THAI) iv

ABSTRACT (ENGLISH) v

ACKNOWLEDGEMENTS vi

CONTENTS vii

LIST OF TABLES ix

LIST OF FIGURES x

LIST OF ABBREVIATIONS xii

CHAPTER I. INTRODUCTION 1

Hypothesis 5

Study design and process 5

Anticipated benefits from the study 5

CHAPTER II. LITERATURE REVIEWS 6

CHAPTER III. MATERIALS AND METHODS 35

Experimental animals 35

Instruments 35

Chemicals 35

Methods 37

1. Preparation of *C. comosa* rhizome 37

2. Animal treatment 38

3. Samples collection 38

4. Clinical blood chemistry 39

5. Determination of total peroxide (TP) 39

6. Determination of total antioxidant status (TAS) 40

7. Determination of oxidative stress index (OSI) 41

8. Determination of serum PON1 activity 41

9. Preparation of cell lysate 43

10. Determination of protein assay 44

11. Determination of PON2 activity 44

Page

12. Determination of PON3 activity 45
13. Verification of the method 46
Statistical analysis 47
CHAPTER IV. RESULTS 48
1. Precision assay for determination of oxidative stress parameters and PON activities 48
2. Effects of *C. comosa* and simvastatin on lipid parameters 49
3. Effects of *C. comosa* and simvastatin on oxidative stress parameters 52
4. Effects of *C. comosa* and simvastatin on PON1 and PON3 activities 55
5. Effect of *C. comosa* and simvastatin on PON2 activity 56
CHAPTER V. DISCUSSION AND CONCLUSION 58
REFERENCES 63
APPENDICES 74
VITAE 114

LIST OF TABLES

Table		Page
1.	Specific enzymatic activities of the purified recombinant human PONs	15
2.	Evidence for human PON1 antiatherogenicity	18
3.	Definitions of potential muscle adverse experiences due to statins	28
4.	Precision of the assay for determination	48
5.	Lipid parameters at baseline of the 3 treatment groups	49
6.	Lipid parameters at baseline and 4 months of the 3 treatment groups	50
A1.	OCV precisions of the assay for determination of total peroxide	76
A2.	OCV precisions of the assay for determination of total antioxidant status	78
A3.	OCV precisions of the assay for determination of PON1 activity (using paraoxon as a substrate)	80
A4.	OCV precisions of the assay for determination of PON1 activity (using phenyl acetate as a substrate)	82
A5.	OCV precisions of the assay for determination of PON2 activity (using control serum)	84
A6.	OCV precisions of the assay for determination of PON2 activity (using rat vascular)	86
A7.	OCV precisions of the assay for determination of PON3 activity	87
C1.	Oxidative stress parameters of individual rabbit	94
C2.	Paraoxonase activities of individual rabbit	95
D1.	Lipid parameters at baseline of individual rabbit	97
D2.	Lipid parameters at 4 months of individual rabbit	98
D3.	Renal function at 4 months of individual rabbit	99
D4.	Liver function at 4 months of individual rabbit	100

LIST OF FIGURES

Figure **Page**

1. Mechanism of atherosclerosis 7
2. Pleiotropic effects of HDL in the vessel wall 10
3. Paraoxonases (PONs) family 11
4. Tissue distribution of the human PONs family 12
5. General structure of human serum paraoxonase1 (PON1) 13
6. Overall structure of PON1 14
7. Biological effects and modulation of PON1 17
8. PON1 and macrophage foam cell formation 19
9. Cholesterol biosynthetic pathway and its inhibition by statins 23
10. Mechanisms for anti-atherosclerosis of statins 24
11. The effects of statins on PONs 25
12. Chemical structure of the simvastatin 26
13. *Curcuma comosa* Roxb. plant and rhizome 30
14. Effects of *C. comosa* and simvastatin on lipid parameters at 4 months 51
15. Effect of *C. comosa* and simvastatin on lipid peroxide (TP) levels 52
16. Effect of *C. comosa* and simvastatin on total antioxidant status (TAS) levels 53
17. Effect of *C. comosa* and simvastatin on oxidative stress index (OSI) 54
18. Effects of *C. comosa* and simvastatin on PON1 and PON3 activities 55
19. Linearity of the assay for determination of protein concentration 56
20. Effect of *C. comosa* and simvastatin on PON2 activity at 4 months 57
A1. RCV precisions of the assay for determination of total peroxide (TP) 77
A2. RCV precisions of the assay for determination of total antioxidant status (TAS) 79
A3. RCV precisions of the assay for determination of PON1 activity (using paraoxon as a substrate) 81
A4. RCV precisions of the assay for determination of PON1 activity (using phenyl acetate as a substrate) 83
A5. RCV precisions of the assay for determination of PON2 activity (using control serum) 85

Figure **Page**

A6. RCV precisions of the assay for determination of PON2 activity (using rat vascular) 86
A7. RCV precisions of the assay for determination of PON3 activity 88
B1. Standard curve of total peroxide (TP) 90
B2. Standard curve of total antioxidant status (TAS) 91
B3. Standard curve of total protein assay 92

LIST OF ABBREVIATIONS

β	= beta
°C	= degree celcius
µg	= microgram
µl	= microlitre
µmol	= micromole
µM	= micromolar
α	= alpha
ABTS	= 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)
ACS	= acute coronary syndrome
Alk	= alkaline phosphatase
ALT	= alanine aminotransferase
ALP	= alkaline phosphates
AP-1	= activated protein-1
ARE	= arylesterase
AST	= aspatate aminotransferase
BHT	= butylated hydroxytoluene
BSA	= bovine serum albumin
BUN	= blood urea nitrogen
Ca^{2+}	= calcium ion
CAD	= coronary artery disease
CBVD	= cerebrovascular disease
CETP	= cholesterol ester transfer protein
CHD	= coronary heart disease
CK	= creatine kinase
cm	= centimeter
Cr	= creatinine
CVD	= cardiovascular diseases

CYP	= cytochrome P450
Cys	= cysteine
DB	= direct bilirubin
DBP	= diastolic blood pressure
DHC	= dihydrocoumarin
dL	= deciliter
EDTA	= ethylenediaminetetraacetic acid
e.g.	= example gratia
et al.	= et alii
g	= gram
g	= gravity
HDL	= high density lipoprotein
HDL-C	= high density lipoprotein-cholesterol
Hg	= mercury
hr	= hour
IHD	= ischemic heart disease
kDa	= kilo dalton
kg	= kilogram
L	= litre
LCAT	= lecithin-cholesterol acyltransferase
LDL	= low density lipoprotein
LDL-C	= low density lipoprotein-cholesterol
M	= molar
mEq	= milliequivalent
min	= minute
mg	= milligram
mg/kg	= milligram per kilogram body weight
mL	= millitre

mM	= millimolar
MM-LDL	= minimally modified low density lipoprotein
mmole	= millimole
MCV	= mean corpuscular volume
MCH	= mean corpuscular hemoglobin
MI	= myocardial infarction
MW	= molecular weight
NCEP	= National Cholesterol Education Program
nm	= nanometer
NZW	= New Zealand White
OCV	= Optimal Condition Variance
OSI	= oxidative stress index
Ox-LDL	= oxidized low density lipoprotein
Ox-MQ	= oxidized macrophage
PAD	= peripheral arterial disease
PBS	= phosphate buffer saline
pH	= potential of hydrogen
PLTP	= phospholipid transfer protein
PMA	= phorbol-12-myristate-13-acetate
PON1	= paraoxonase1
PON2	= paraoxonase2
PON3	= paraoxonase3
PONs	= paraoxonases
RBC	= red blood cell
RCV	= Routine Condition Variance
r.p.m.	= revolution per minute
SBP	= systolic blood pressure

SD	= standard deviation
sec	= second
SEM	= standard error of the mean
SGOT	= serum glutamic-pyruvic transaminase
SGPT	= serum glutamic-oxaloacetic transaminease
SH	= sulfhydryl
SOD	= superoxide dismutase
TAS	= total antioxidant status
TB	= total bilirubin
TC	= total cholesterol
TG	= triglyceride
THA	= 2,4,6-trihydroacetophenone
TP	= total peroxide
Tris	= tris (hydroxymethyl) aminomethane
U	= unit
ULN	= upper limit of normal
VLDL	= very low density lipoprotein
WHO	= World Health Organization