

บทที่ 1: บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata* L., *Senna alata* L.) เป็นพืชสมุนไพรของไทยชนิดหนึ่งที่น่าสนใจในสาขาระงับอนุมูลฐาน โดยถูกบรรจุเป็นยาสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติ มีการนำมาใช้รักษาอาการท้องผูก ปวดท้องและโรคผิวหนัง จากการศึกษาค้นคว้าพบว่าชุมเห็ดเทศให้ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา ต้านอนุมูลอิสระ ลดการอักเสบ ต้านการก่อกลายพันธุ์และลดน้ำตาลในเลือด ในชุมเห็ดเทศมีสารประกอบหลายชนิดเช่น phenolics (chrysaphanol, emodin, rhein, aloe-emodin และ kaempferol), fatty acids (palmitic, oleic, linoleic acids), terpenoids, anthraquinones และ flavonoids โดยที่สารประกอบสำคัญตัวหนึ่งคือ rhein (4, 5-dihydroxyanthraquinone-2-carboxylic acid) จะมีฤทธิ์ต้านมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งระบบประสาทส่วนกลาง มะเร็งลำไส้ใหญ่และมะเร็งปอด รวมทั้งสามารถยับยั้งการอักเสบโดยกีดกันการเกิด reactive oxygen species (ROS) อันเป็นผลจากการกระตุ้นเอนไซม์ NADPH-oxidases ทำให้ใช้เป็น antiatherosclerosis นอกจากนี้ rhein ยังยับยั้งการเกิด superoxide anion และ chemotaxis ประกอบกับการมีฤทธิ์เป็น antirheumatic effects โดยยังมีข้อมูลจำกัดที่เกี่ยวข้องกับกลไกต้านการอักเสบที่ผิวหนัง ซึ่งสาเหตุหนึ่งของการอักเสบก็เนื่องมาจากการเกิด reactive oxygen species (ROS) โดยเกี่ยวข้องกับเอ็นไซม์ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-oxidases (NOXs/DUOXs) โดยที่เอ็นไซม์ดังกล่าวถือได้ว่าเป็นจุดกำเนิดที่สำคัญตัวหนึ่งในการเกิด ROS แล้วส่งผลเกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดโรคหลายชนิดรวมทั้งการอักเสบที่ผิวหนัง การค้นคว้าเพื่อหาสมุนไพรที่มีสารสำคัญในการยับยั้งเอ็นไซม์ชนิดนี้ จะช่วยลดการเกิด ROS และลดการอักเสบของผิวหนังได้

เนื่องจากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากชุมเห็ดเทศค่อนข้างมีหลากหลายแต่ยังมีข้อมูลไม่มากนักที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ของ rhein anthraquinones ซึ่งเป็นสารประกอบสำคัญในชุมเห็ดเทศต่อกลไกต้านการอักเสบที่ผิวหนังโดยใช้เซลล์ keratinocytes (HaCaT cells) ผ่านการยับยั้งเอ็นไซม์ NADPH-oxidases และทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ rhein anthraquinones ซึ่งเป็นสารมาตรฐานกับสารสกัดจากชุมเห็ดเทศ ในการนี้คณะผู้วิจัยได้ให้ความสนใจที่จะทำการศึกษากลไกระดับเซลล์และโมเลกุลของ rhein anthraquinones เทียบกับสารสกัดจากชุมเห็ดเทศสำหรับต้านการอักเสบของผิวหนังผ่านการยับยั้งเอ็นไซม์ NADPH-oxidases ทำให้ลดการเกิด ROS ที่เป็นสาเหตุหนึ่งของการอักเสบ เพื่อเป็นแนวทางในการนำพืชสมุนไพรมาพัฒนาเป็นยาแผนปัจจุบันเพื่อรักษาและป้องกันโรคโดยการเพิ่มข้อมูลทางเภสัชศาสตร์

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

การวิจัยนี้มีความมุ่งหมายเพื่อศึกษากลไกต้านการอักเสบในเชิงเปรียบเทียบของ rhein anthraquinones ซึ่งเป็นสารมาตรฐานกับสารสกัดจากชุมเห็ดเทศใน HaCaT cells โดยการยับยั้งเอ็นไซม์ NADPH-oxidases ที่ทำให้เกิด ROS อันเป็นสาเหตุของการอักเสบที่ผิวหนัง เพื่อนำการศึกษานี้ไปเป็นแนวทางในการศึกษากลไกอื่นต่อไป

1.3 ขอบเขตการศึกษาของโครงการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการวิจัยเพื่อหาผลไกระดับเซลล์และโมเลกุลสำหรับต้านการอักเสบของ rhein anthraquinones ที่เป็นสารมาตรฐาน ซึ่งเป็นสารสำคัญของชุมเห็ดเทศในลักษณะเปรียบเทียบกับสารสกัดจากชุมเห็ดเทศ โดย

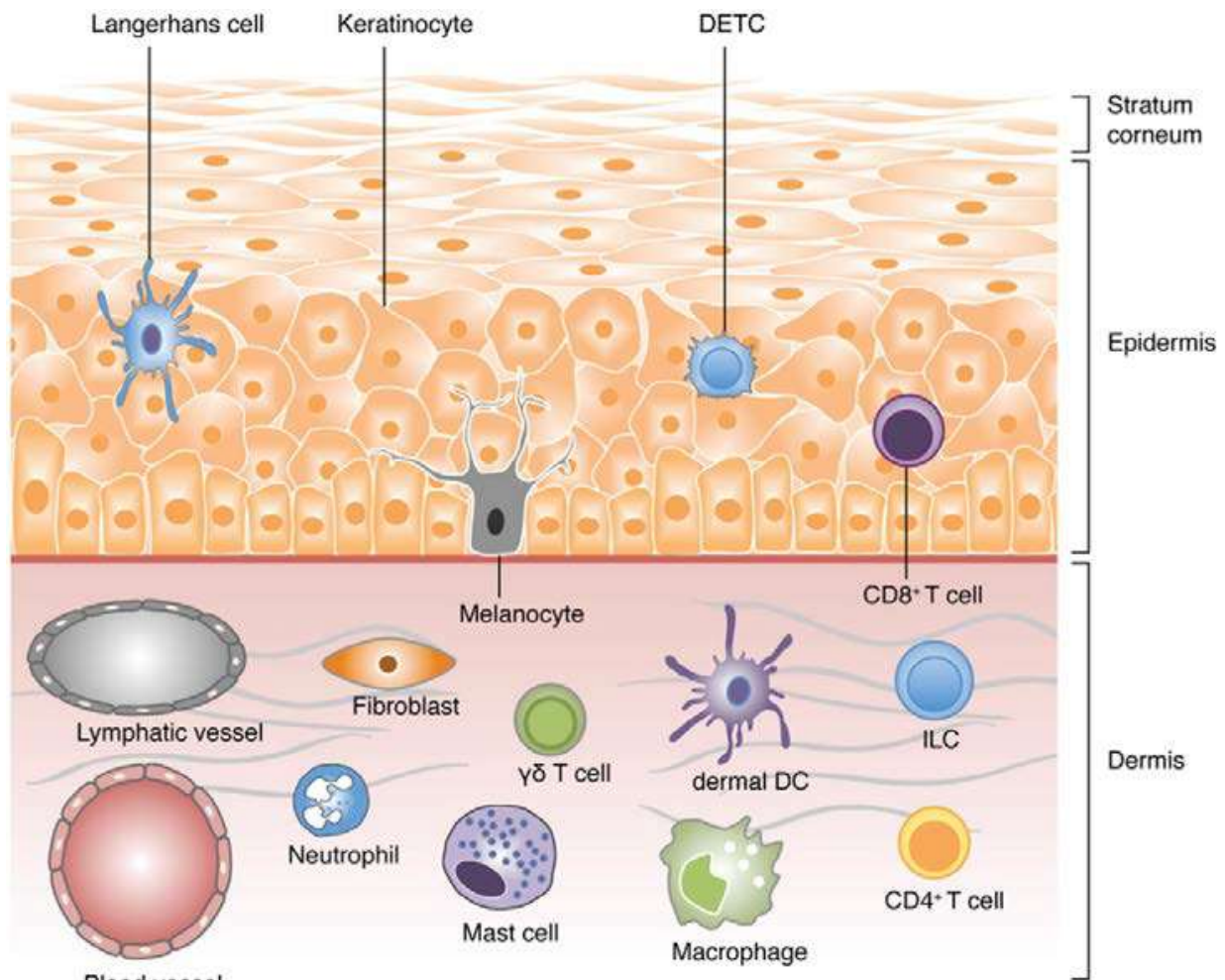
ทำการศึกษาในเซลล์ผิวหนังประเภท keratinocytes คือ HaCaT cells ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการยับยั้งเอนไซม์ NADPH-oxidases ทำให้ช่วยลดการเกิด ROS และลดการอักเสบที่ผิวหนังได้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

งานวิจัยนี้ได้เป็นส่วนหนึ่งในการทำวิทยานิพนธ์ของนักศึกษาปริญญาโท (ภม.) ซึ่งจะนำผลการศึกษาวางานนี้เผยแพร่ในรูปแบบการนำเสนอผลงาน poster presentation หรือ oral presentation ในระดับชาติหรือนานาชาติ รวมทั้งตีพิมพ์ผลงานวิจัยในระดับชาติและนานาชาติต่อไป

1.5 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata* L., *Senna alata* L.) เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งของไทยที่สามารถพบได้ทุกภาค มีการนำมาใช้ในสาธารณสุขมูลฐานและถูกบรรจุเป็นยาสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติในการรักษาอาการท้องผูก ปวดท้องและโรคผิวหนัง ในส่วนของใบจะมีสารจำพวก anthraquinone ทั้ง aglycone และ glycoside เช่น rhein, aloemodin, chrysophanol, glycosides ของ rhein, emodin, physcione และ sennosides A, B, C, D รวมทั้ง quinines, flavonoids และ sterols จากข้อมูลการศึกษาพบว่าชุมเห็ดเทศให้ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อราและไวรัส ลดการอักเสบ บรรเทาปวด ช่วยระบายท้อง ลดการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด ต้านอนุมูลอิสระ ลดน้ำตาลในเลือด ต้านการก่อกลายพันธุ์และต้านเนื้องอก นอกจากนี้ชุมเห็ดเทศยังนำมาใช้ในภาวะโลหิตจาง แก้อาการพิษ (antidote) โรคธาตุพิการ (dyspepsia) ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ลิวคีเมีย รักษาโรคจิตเสถียร รักษาปรสิตในลำไส้เล็ก ซิฟิลิส inguinal hernia และ blennorrhagia ในอินเดียได้ใช้พืชนี้เป็นยาพื้นบ้านรักษาหลอดลมอักเสบและหอบหืด มีการทำเป็นโลชั่นสมุนไพรสำหรับรักษาโรคผิวหนังต่างๆ เช่น กลาก เกาต์ แมลงกัดต่อย หิด เริม สิวและเรื้อนกวาง ในชุมเห็ดเทศมีสารสำคัญตัวหนึ่งคือ rhein (4, 5-dihydroxyanthraquinone-2-carboxylic acid) ซึ่งสามารถยับยั้งการอักเสบโดยลดการเกิด ROS ที่เกิดจากเอนไซม์ NADPH-oxidases ทำให้ใช้เป็น antiatherosclerosis agent และอาจมีประโยชน์ในการป้องกันการอุดตันและการอักเสบภายหลัง percutaneous transluminal coronary angioplasty นอกจากนี้ rhein ยังสามารถบรรเทาอาการตับอักเสบและป้องกันเซลล์ตับอ่อนที่บาดเจ็บ รวมทั้งยับยั้งการเกิด superoxide anion และ chemotaxis และมีฤทธิ์เป็น antirheumatic เนื่องจากร่างกายของมนุษย์จะถูกห่อหุ้มด้วยผิวหนัง ซึ่งถือเป็นพื้นที่ที่จะสัมผัสกับสิ่งต่างๆ (รูปที่ 1) ผิวหนังเป็นอวัยวะที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในร่างกายโดยคิดเป็นน้ำหนักประมาณ 16% ของน้ำหนักตัวมีเนื้อที่ทั้งหมดเกือบ 2 ตารางเมตร ผิวหนังทำหน้าที่ปกป้องอวัยวะใต้ชั้นผิวเป็นเกราะป้องกันอันตรายจากภายนอกไม่ให้เข้าสู่ร่างกายและป้องกันการสูญเสียของเหลวออกจากร่างกาย โครงสร้างของผิวหนังประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วน คือ ชั้นหนังกำพร้า (epidermis) เป็นชั้นที่อยู่บนสุดมีความหนาประมาณ 0.4-1.5 มิลลิเมตรไม่มีเส้นเลือดมาเลี้ยง องค์ประกอบมากกว่า 80% ของชั้นนี้คือ keratinocyte ถัดลงมาเป็นชั้นหนังแท้ (dermis) ในชั้นหนังแท้จะมีหลอดเลือดหลอดน้ำเหลืองและเส้นประสาทแทรกอยู่ ใต้ชั้นหนังแท้จะเป็นชั้นใต้ผิวหนัง (hypodermis หรือ subcutaneous tissues) ซึ่งประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่กันอย่างหลวมๆ และชั้นไขมันซึ่งจะมีจำนวนมากน้อยแตกต่างกันในแต่ละส่วนของร่างกาย



รูปที่ 1 โครงสร้างของผิวหนัง (Zhen et al., 2013)

ผิวหนังถือได้ว่าเป็นอวัยวะในการป้องกันเชื้อโรค reactive electrophiles และอนุมูลอิสระ การเกิดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระจะพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิต ผิวหนังนั้นมีความไวต่อภาวะที่มี ROS ทั้งนี้เนื่องจากผิวหนังเป็นบริเวณที่ประกอบไปด้วย polyunsaturated fatty acid (PUFA) การสร้างของ ROS อย่างไม่จำกัดจะส่งผลให้เกิดการทำลาย biomolecules และอาจเป็นสาเหตุให้เกิดภาวะดังต่อไปนี้ เช่น พิษจากแสง (phototoxicity) การแพ้แสง (photoallergy) พิษจากยา (drug toxicity) ความแก่ (aging) โรคทางระบบภูมิคุ้มกัน ณ ปัจจุบันพบว่า NADPH-oxidases ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำให้เพิ่ม ROS ได้เข้ามามีบทบาทในการก่อให้เกิดพยาธิสภาพของสภาวะต่างๆ มากมาย HaCaT cells ถือเป็นเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ชนิด keratinocyte ที่สามารถเปลี่ยนแปลงเซลล์ตัวเอง โดยไม่ได้เป็นเซลล์เนื้องอก ซึ่งจะพบเอนไซม์ NADPH-oxidases โดยเฉพาะ NOX1 ในเซลล์ชนิดนี้ จากการศึกษานี้ใน HaCaT skin keratinocyte cell line สามารถกระตุ้นให้เกิด ROS ในสภาวะที่ต้องอาศัยแคลเซียม โดยใช้ตัวกระตุ้น เช่น epidermal growth factor, Ca^{2+} -ionophore A23187, platelet-activating factor หรือ lysophosphatidic acid จากข้อมูลเร็ว ๆ นี้บ่งบอกว่า NOXs ใน HaCaT cells มีบทบาทในการกระตุ้นของ p38 ที่ถูกชักนำด้วย TGF β รวมทั้ง vascular endothelial growth factor และการหายของแผล สำหรับฤทธิ์ด้านการอักเสบที่ผิวหนังจาก rhein anthraquinones และสารสกัดจากชุมเห็ดเทศยังมีข้อมูลค่อนข้างจำกัด โดยเฉพาะกลไกการอักเสบผ่านการยับยั้ง ROS โดยยับยั้ง NOX1 การศึกษานี้มุ่งสนใจผลของ rhein anthraquinones ที่เป็นสารมาตรฐานที่มีต่อ HaCaT cells เพื่อดูกลไกระดับเซลล์และโมเลกุลสำหรับการอักเสบที่อาจสัมพันธ์กับการลด ROS จากการยับยั้ง NOX1 และเปรียบเทียบฤทธิ์กับสารสกัดจากชุมเห็ดเทศ โดยทำการ

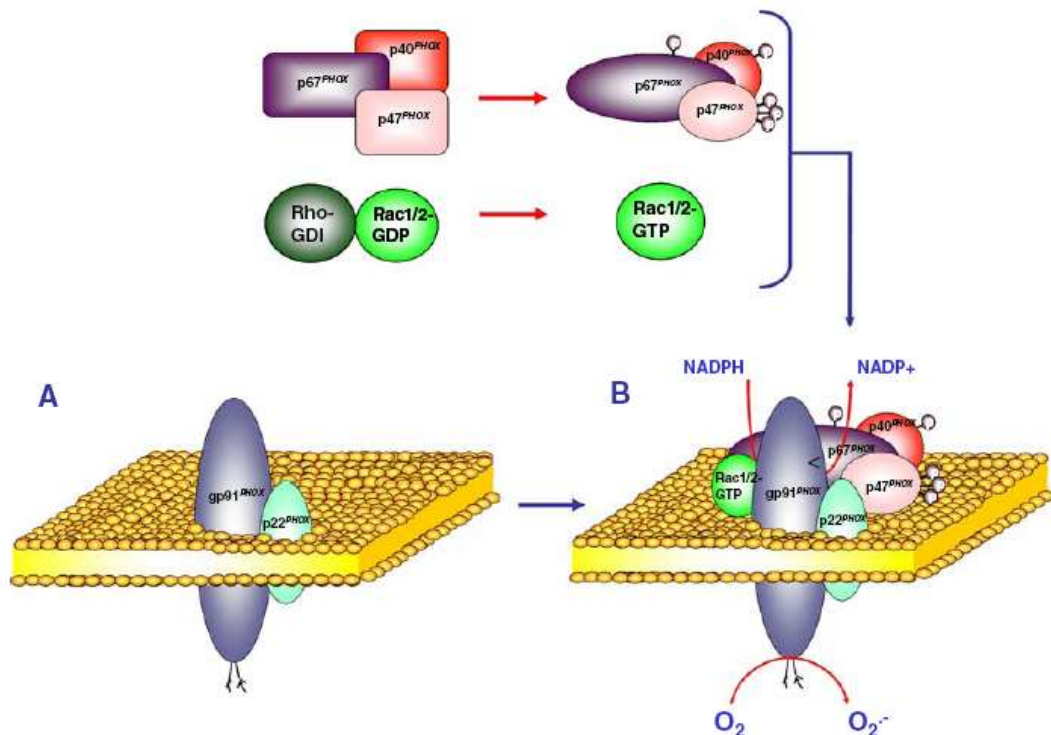
ยืนยันผลว่าน่าจะมีการเพิ่มขึ้นของ GSH และค่าที่ลดลงของ tumor necrosis factor alpha (TNF- α) และ interleukin-8 (IL-8) ถือได้ว่าเป็นแนวทางการศึกษาอีกต่อไปของสารสกัดจากชุมเห็ดเทศ (นุชนารถ กิจเจริญ, 2006; Trenam et al., 1992; Gawkrödger, 2002; Villasenor et al., 2002; Panichayupakaranant and Intaraksa, 2003; Roos et al., 2003; Chamulitrat et al., 2004; Geiszt and Leto, 2004; Ellmark et al., 2005; Ro and Dawson, 2005; Chamulitrat et al., 2007; Lans, 2007; Olarte, 2007; El-Benna et al., 2007, 2008; Fernand et al., 2008; Cooper et al., 2009; El-Benna et al., 2009; Gritsanapan and Mangmeesri, 2009; Raad et al., 2009; Ayo, 2010; Heo et al., 2010; Sule et al., 2010; Wuthi-udomlert et al., 2010; Fernand et al., 2011; Zhao et al., 2011); Singha et al., 2012

ROS เป็นโครงสร้างของโมเลกุลขนาดเล็กที่มีอายุค่อนข้างสั้น ซึ่งจะมีการสร้างอย่างต่อเนื่องในระดับที่ต่ำของการเกิดเมตาบอลิซึมที่ต้องใช้ออกซิเจน โดยที่ ROS ถือเป็นส่วนหนึ่งของการเกิดการอักเสบ ในจำนวนของ ROS พบว่า superoxide anion (O_2^-) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) จะเป็นตัวที่มีบทบาทโดดเด่น ROS สามารถกระทำกับไขมัน โปรตีนและกรดนิวคลีอิก การเกิด ROS เป็นจำนวนมากจะส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis หรือ necrosis การจะลดผลกระทบของ ROS ที่ผลิตออกมามากเกินไป อย่างเช่นที่ผิวหนังก็เนื่องด้วยกลไกของสารต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งเอนไซม์ที่ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant enzymes) เช่น superoxide dismutase (SOD) ที่ไปขจัดพิษของ O_2^- นอกจากนี้ก็มี catalase และ glutathione peroxidase (Gp_x) ที่จะใช้ reduced glutathione (GSH) ไปทำการเปลี่ยน H_2O_2 ให้กลายเป็นน้ำ แหล่งหนึ่งในการเพิ่ม ROS ก็คือการถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ NADPH oxidases (Roos et al., 2003 ; Chamulitrat et al., 2004; Geiszt and Leto, 2004; Ellmark et al., 2005; Chamulitrat et al., 2007; El-Benna et al., 2007, 2008; Cooper et al., 2009; El-Benna et al., 2009; Grange et al., 2009; Raad et al., 2009; Kim et al., 2010)

มีการศึกษาโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์ NADPH-oxidases มาเป็นเวลานานนับสิบปี โดยพบครั้งแรกใน phagocytes (polymorphonuclear neutrophils, eosinophils, monocytes และ macrophages) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับระบบการป้องกันของร่างกายต่อเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา โดยการผลิต ROS ผ่านการกระตุ้นเอนไซม์ NADPH-oxidases เอนไซม์ชนิดนี้เป็น multicomponent enzyme ซึ่งจะทำงานในสภาวะที่เซลล์ถูกกระตุ้น แต่ก็สามารถถูกกระตุ้นได้จากตัวกระตุ้นอื่นๆ สำหรับในสภาวะที่ถูกกระตุ้นจะทำให้เอนไซม์ NADPH-oxidase complex มีการลำเลียงอิเล็กตรอนจาก cytosolic NADPH ไปที่โมเลกุลของออกซิเจน (O_2) ทำให้เกิด O_2^- โดยที่ O_2^- เป็น precursor ของ ROS ตัวอื่นๆ เช่น H_2O_2 , hydroxyl radical ($OH^\cdot$) และ hypochlorous acid (HOCl) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการทำลายเชื้อแบคทีเรียและเชื้ออื่นๆ เอนไซม์ NADPH-oxidase (NOX_2) ของ phagocyte ประกอบด้วยโปรตีนมากมาย ซึ่งถูกแยกให้อยู่ในส่วนของเมมเบรนและไซโตซอล (cytosol) ในสภาวะที่เซลล์ไม่ได้ถูกกระตุ้น (resting cells) (รูปที่ 1) โดยมีองค์ประกอบดังนี้ คือ flavocytochrome b558 จะอยู่ที่เมมเบรน ซึ่งเป็น glycosylated 91-kDa protein subunit ($gp91^{phox}$; $phox$: phagocyte oxidase) จับกับ 22-kDa subunit ($p22^{phox}$) แบบ non-covalent ในอัตรา 1:1 สำหรับโปรตีนที่อยู่ในไซโตซอล คือ $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ และ $p40^{phox}$ ซึ่งกระทำกันแล้วรวมตัวเป็น complex กับ G-proteins, Rac1 (ใน monocytes) หรือ Rac2 (ใน neutrophils) ในสภาวะที่เซลล์ไม่ได้ถูกกระตุ้นองค์ประกอบของเอนไซม์ NADPH-oxidases จะอยู่เฉยๆ เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นองค์ประกอบที่อยู่ภายในไซโตซอลจะมีการเคลื่อนที่ไปที่เมมเบรนและมีการรวมตัวกับ flavocytochrome b558 กลายเป็นเอนไซม์ที่ใช้งานได้ กระบวนการดังกล่าวถูกควบคุมโดยปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีน (protein-protein interactions) และ phosphorylation ในส่วนของ $gp91^{phox}$ จะมีตำแหน่งที่จับสำหรับ flavin adenine dinucleotide (FAD), NADPH และ 2 hemes ทำให้เกิดการลำเลียงของอิเล็กตรอนได้ ในสภาวะที่เซลล์ไม่ได้ถูกกระตุ้นพบว่า Rac2 ซึ่งพบมากใน neutrophils ส่วน Rac1 จะพบมากใน monocytes ทั้ง

สองจะพบได้ใน cytosol ด้วยเช่นกัน แต่ไม่ได้เป็นส่วนหนึ่งของ cytosolic complex โดยที่ Rac2/Rac1 จะรวมกับ cytosolic guanosine diphosphate (GDP) และ rho-GDI (rho-GDP dissociation inhibitor)

เมื่อ neutrophils ถูกกระตุ้น จะเกิด exocytosis ของแกรนูล มีการเพิ่มของ cytochrome b558 จากการกระตุ้นจะส่งผลให้เกิด phosphorylation อย่างมากของ $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ และ $p40^{phox}$ ทำให้เกิดการเคลื่อนตัวของกลุ่มดังกล่าวมาที่เมมเบรนเพื่อมาจับกับ cytochrome b558 รวมทั้ง Rac2 (หรือ Rac1) จะเคลื่อนตัวมาที่พลาสมาเมมเบรนอย่างอิสระเช่นกันแล้วจับกับ $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p40^{phox}$ /cytochrome b558 complex



รูปที่ 2 The NADPH-oxidase complex (El-Benna et al., 2009)

NADPH-oxidases จะทำหน้าที่ส่งผ่านอิเล็กตรอนจาก cytoplasmic NADPH ไปยังโมเลกุลของออกซิเจนภายนอกเซลล์หรือภายใน phagosome ส่งผลให้เกิด O₂⁻ ซึ่งเป็นตัวที่ก่อให้เกิด ROS ที่จะมีผลในการเกิดการอักเสบ และการส่งผ่านอิเล็กตรอนจะเป็นกระบวนการที่มีหลายขั้นตอน โดยที่ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเป็นดังนี้

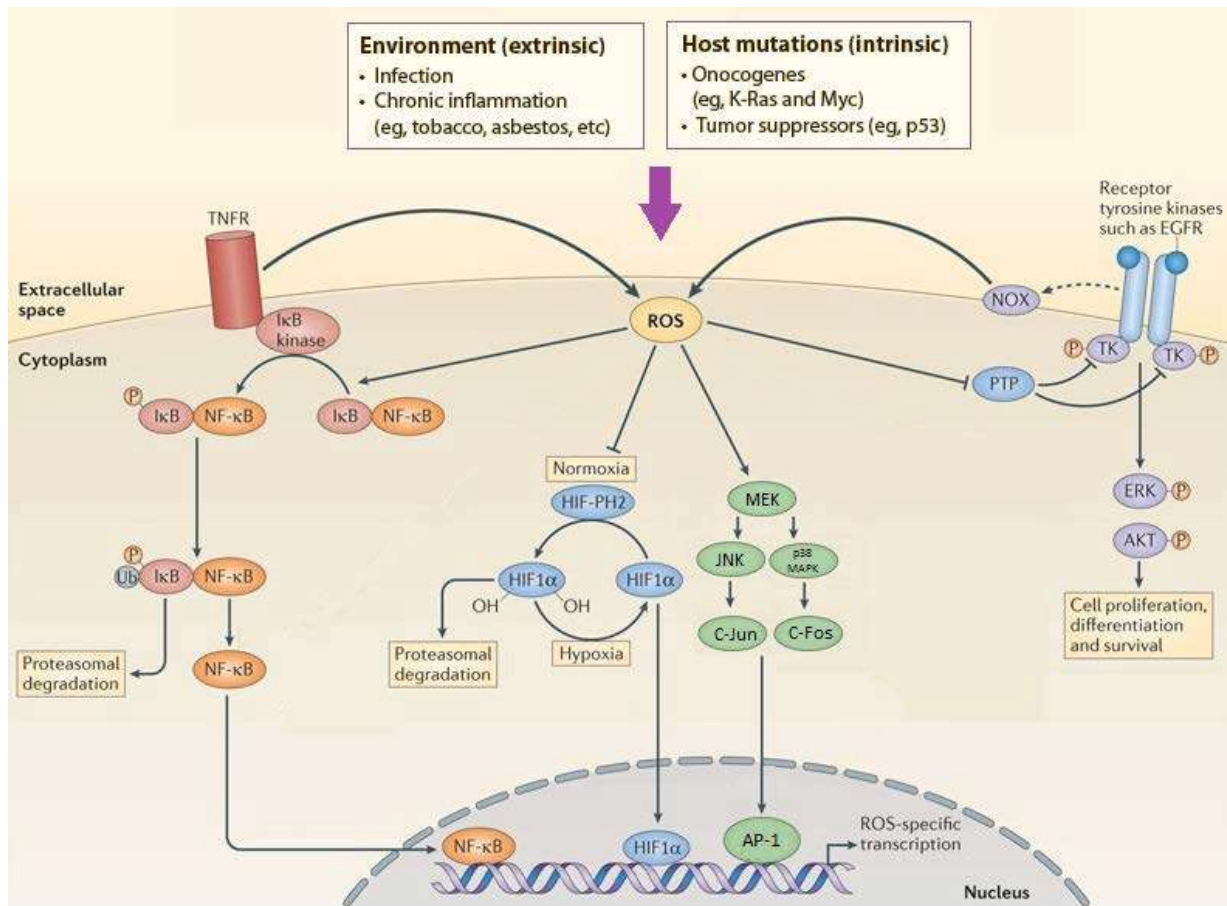


ณ ปัจจุบันพบว่า NOX genes มีบทบาทในการก่อให้เกิดพยาธิสภาพของสภาวะต่างๆ มากมาย รวมทั้งโรคหลายชนิด เช่น tumorigenity และโรคทางหลอดเลือดและหัวใจ HaCaT cells ถือเป็นเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ที่สามารถเปลี่ยนแปลงเซลล์ได้เอง โดยไม่ได้เป็นเซลล์เนื้อออก จะพบ NOX1 เป็นส่วนใหญ่ในเซลล์ชนิดนี้ จากการศึกษาใน HaCaT skin keratinocyte cell line สามารถกระตุ้นให้เกิด ROS ในสภาวะที่ต้ออาจตายแคลเซียม โดยใช้ตัวกระตุ้น เช่น epidermal growth factor, Ca²⁺-ionophore A23187, platelet-activating factor หรือ lysophosphatidic acid จากข้อมูลเรื่งๆ นี้บ่งบอกว่า NOX ใน HaCaT cells มีบทบาททางสรีรวิทยาในการกระตุ้นของ p38 ที่ถูกชักนำ

ด้วย TGFb รวมทั้ง vascular endothelial growth factor และการหายของแผล (Roos et al. 2003 ; Chamulitrat et al., 2004; Geiszt and Leto, 2004; Ellmark et al., 2005; El-Benna et al., 2007; Chamulitrat et al., 2007; El-Benna et al., 2008, 2009; Cooper et al., 2009; Grange et al., 2009; Raad et al., 2009; Kim et al., 2010;

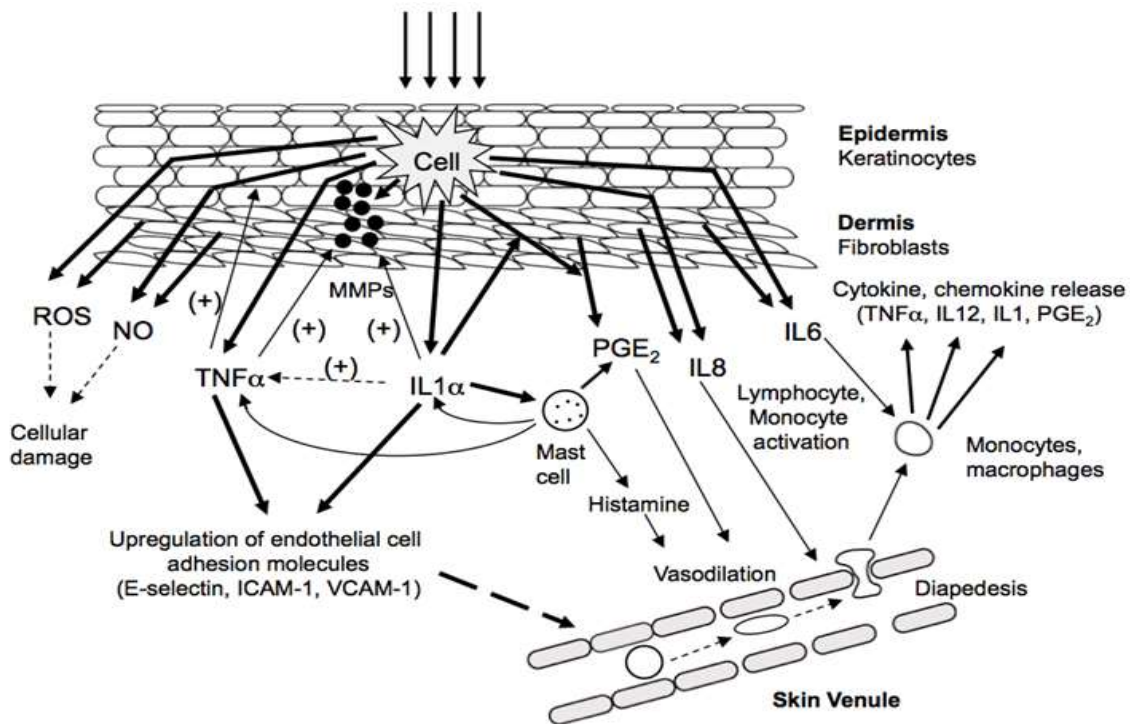
สำหรับสารต้านอนุมูลอิสระถือเป็นปราการเบื้องต้นในการต่อต้าน ROS โดยที่จะแบ่งได้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์และไม่เอนไซม์ ในส่วนที่เป็นเอนไซม์ ได้แก่ SOD catalase Gpx glutathione S-transferase และ thioredoxin สำหรับที่ไม่เอนไซม์ ได้แก่ GSH ascorbate urate α -tocopherol bilirubin และ lipoic acid พบว่าความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้จะขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่อยู่ของสาร โดยปกติแล้วสมดุลระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระและอนุมูลอิสระจะเพียงพอสำหรับป้องกันการทำลายซึ่งเป็นผลของการทำงานตามปกติของเซลล์ หากสมดุลนี้ถูกทำลายก็ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress และเป็นบ่อเกิดของพยาธิสภาพต่างๆ (Lans, 2007; Bowler and Crapo, 2002) ในการนี้ Reduced glutathione (GSH) จะทำหน้าที่เป็น scavenge ROS (Cowley and Linsdell, 2002)

การอักเสบ (inflammation) เป็นกระบวนการที่ร่างกายตอบสนองต่อสิ่งที่ทำให้เนื้อเยื่อของร่างกายได้รับบาดเจ็บ ซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยภายในและภายนอก ปัจจัยเหล่านี้จะทำให้มีการสร้างอนุมูลอิสระ (ROS) ซึ่งจะมีผลไปกระตุ้นการส่งสัญญาณภายในเซลล์ผ่านตัวส่งสัญญาณต่าง ๆ เช่น nuclear factor kappa B (NF- κ B), phosphatidylinositol-3-kinase (PI₃K/AKT), signal transducer and activator of transcription3 (STAT₃) ทำให้เกิดการอักเสบขึ้นมา ปัจจัยภายนอก ได้แก่ การติดเชื้อ การสัมผัสกับสารเคมี การขาดเลือด หรือ ขาดออกซิเจน ส่วนปัจจัยภายใน เช่น การกลายพันธุ์ของยีนทำให้เกิดเป็นเซลล์มะเร็ง ในกระบวนการอักเสบจะประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ที่ซับซ้อนโดยอาศัยการทำงานของเซลล์และเนื้อเยื่อหลายชนิด รวมทั้งสารเคมีซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการชักนำให้เกิดการอักเสบ เช่น ไซโตไคน์ (cytokine) เคโมไคน์ (chemokine) พรอสตาแกลนดิน (prostaglandins) และสารสื่อกลางการอักเสบอื่น ซึ่งสารเคมีตัวกลางเหล่านี้จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดและการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวมายังบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บทำให้เกิดอาการปวด บวม แดง ร้อน ซึ่งเป็นอาการที่บ่งบอกถึงการอักเสบ (Kamp and Shacter, 2011)



รูปที่ 3 กระบวนการเกิดการอักเสบ (Nathan and Cunningham-Bussel, 2011)

ไซโตไคน์ เป็นโมเลกุลที่เซลล์ใช้ติดต่อสื่อสารกันระหว่างเซลล์ สร้างจากเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์ต่างๆ ในร่างกายเพื่อตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้น ไซโตไคน์ออกฤทธิ์ต่อเซลล์เป้าหมายโดยจับกับตัวรับ (cytokine receptor) ที่อยู่บนผิวเซลล์นั้นๆ แล้วกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ เมื่อผิวหนังได้รับการกระตุ้นจากภายนอกเช่น รังสี การติดเชื้อ การสัมผัสกับสารเคมี จะทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (ROS) ซึ่งจะไปกระตุ้น keratinocytes ให้หลั่ง primary cytokine ได้แก่ tumor necrosis factor alpha (TNF- α) และ interleukin-1 (IL-1) ส่งผลทำให้ adhesion molecule (E-selectin, intercellular adhesion molecule (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)) เพิ่มขึ้นที่บริเวณ endothelial cell primary cytokine จะไปกระตุ้น keratinocytes ให้หลั่ง interleukin-6 (IL-6) และ IL-8 แล้วไปมีผลดึงดูดเม็ดเลือดขาว มายังบริเวณชั้นหนังกำพร้า จึงทำให้เกิดการอักเสบตามมา (Barker et al., 1991; Muller and Meineke, 2007; Portugal et al., 2007; Turner et al., 2014)



รูปที่ 4 กระบวนการอักเสบที่ผิวหนัง (Ravi and Piva, 2013)

เนื่องจากยังไม่พบรายงานกลไกด้านการอักเสบของ rhein anthraquinones ซึ่งเป็นสารสำคัญจากชุมเห็ดเทศในผิวหนังผ่านการยับยั้ง NADPH-oxidases (NOX1) ซึ่งจะสัมพันธ์กับ ROS และ GSH โดยที่การอักเสบจะเกี่ยวข้องกับ interleukin (IL)-8 ซึ่งเป็น inflammatory cytokine indicator ที่จะเพิ่มขึ้นในผิวหนังที่ได้รับการอักเสบ

การศึกษานี้มุ่งสนใจผลของ rhein anthraquinones ที่มีต่อ HaCaT cells เพื่อดูกลไกระดับเซลล์และโมเลกุลสำหรับต้านการอักเสบที่อาจสัมพันธ์กับการลด ROS ผ่านการยับยั้งเอนไซม์ NADPH-oxidases และเปรียบเทียบฤทธิ์กับสารสกัดจากชุมเห็ดเทศ โดยทำการยืนยันผลว่าน่าจะมีการเพิ่มขึ้นของ GSH และค่าที่ลดลงของ IL-8 พร้อมตรวจหาความสามารถในการยับยั้ง NOX1 ในระดับโมเลกุลจากการทำ Western Blot และ RT-PCR ถือได้ว่าเป็นการศึกษากลไกในเชิงลึกเพื่อให้ทราบว่าการต้านอักเสบของ rhein anthraquinones และสารสกัดจากชุมเห็ดเทศที่ผิวหนังอาจเกิดขึ้นได้ทางกลไกนี้และยังเป็นแนวทางการศึกษากลไกอื่นต่อไปของสารสกัดจากชุมเห็ดเทศ

จากการศึกษาทดลองของคณะผู้วิจัยในกลไกดังกล่าว พบว่าฤทธิ์ต้านการอักเสบของ rhein anthraquinone ที่เป็นสารมาตรฐานเทียบกับสารสกัดจากชุมเห็ดเทศนั้นสามารถดำเนินการวิจัยได้ในระดับเซลล์ ไม่สามารถทำการศึกษาดทดลองในระดับลึกถึงโมเลกุลได้ เนื่องจากทั้ง rhein anthraquinone และสารสกัดจากชุมเห็ดเทศไม่สามารถบ่มเลี้ยงใน HaCaT cells ได้ในระยะเวลาแบบข้ามคืน (over night) เพื่อให้มีการสร้างโปรตีน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงสามารถทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของ rhein anthraquinone ที่มีต่อ HaCaT cells และเปรียบเทียบฤทธิ์กับสารสกัดจากชุมเห็ดเทศผ่านการลดการเกิด ROS, TNF-α, IL-8 และเพิ่ม GSH บน HaCaT cells ซึ่งเป็นเซลล์ผิวหนังประเภท keratinocytes

1.6 คำสำคัญของโครงการวิจัย

คำสำคัญ (Keyword): *Cassia alata*, Rhein, ROS, GSH, TNF- α , IL-8, anti-inflammation, HaCaT cells

จากสมมติฐานที่ว่าสารสกัดจากพืชมีหลายกลไกที่เกี่ยวข้อง โดยกลไกหนึ่งที่น่าสนใจคือ การอักเสบผ่านทาง การเกิด ROS อันเป็นผลมาจากการถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ NADPH-oxidases ดังนั้นหากสารสำคัญจากชุมเห็ดเทศคือ rhein anthraquinones รวมทั้งสารสกัดจากชุมเห็ดเทศมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ NADPH-oxidases ก็จะมีผลให้ลด ROS เพิ่ม GSH และบรรเทาการอักเสบได้ทำให้ลด TNF- α และ IL-8

บทที่ 2 คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

DCF	2', 7'-dichlorofluorescein
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FAD	flavin adenine dinucleotide
GDP	guanosine diphosphate
Gp _x	glutathione peroxidase
GSH	reduced glutathione
H ₂ DCFDA	2', 7'-dichlorofluorescein diacetate
H ₂ O ₂	hydrogen peroxide
HOCl	hypochlorous acid
ICAM-1	intercellular adhesion molecule
IL-1	interleukin-1
IL-8	interleukin-8
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
NADPH-oxidases (NOXs)	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NF- κ B	nuclear factor kappa B
O ₂ ⁻	superoxide anion
OH [•]	hydroxyl radical
Phox	phagocyte oxidase
PI ₃ K/AKT	phosphatidylinositol-3-kinase
PUFA	polyunsaturated fatty acid
rho-GDI	rho-GDP dissociation inhibitor
ROS	reactive oxygen species
STAT ₃	signal transducer and activator of transcription3
SOD	superoxide dismutase
<i>t</i> -BHP	<i>tert</i> -butyl hydroperoxide
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
TGF β	transforming growth factor beta
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของ rhein anthraquinone ที่เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบกับสารสกัดจากชุมเห็ดเทศที่มีต่อ HaCaT skin keratinocyte cell line ซึ่งเป็นเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ที่สามารถเปลี่ยนแปลงเซลล์ตัวเองโดยไม่ได้เป็นเซลล์เนื้องอก ผ่านการลดการเกิด ROS, TNF- α , IL-8 และเพิ่ม GSH

3.2 สถานที่ทำวิจัย

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม

3.3 การเก็บรวบรวมข้อมูล

ทำการทดลองเลี้ยงเซลล์ใน 96-well plate หรือ 24-well plate โดยทำเป็น triplicate จำนวน n=3 ในแต่ละการทดลอง

3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1. การสกัดเอาสารสกัดจากชุมเห็ดเทศ

- เก็บใบชุมเห็ดเทศ นำมาล้างแล้วอบให้แห้งที่ 45 องศาเซลเซียส
- นำมาบดด้วยเครื่องบด
- ชั่งผงชุมเห็ดเทศ 20 กรัมแล้วสกัดด้วย 95% เอทานอลบนหม้ออังไอน้ำนาน 20 นาที
- นำมากรองเก็บสารสกัด และทำการสกัดอีก 2-3 รอบ
- ระเหยสารสกัดให้แห้งบนหม้ออังไอน้ำ
- เก็บสารสกัดที่ได้ที่ 4 องศาเซลเซียสและนำไปหาสัดส่วนของ rhein anthraquinone ในสกัดจากชุมเห็ดเทศโดย HPLC

2. การวัด cell viability ของ *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP) ด้วย MTT

การวัด cell viability เพื่อตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารทดสอบที่ใช้(*t*-BHP) ด้วย MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) โดยอาศัยหลักการเปลี่ยนสีของ MTT อันเนื่องมาจากการตรวจวัดสถานะ reduction ของไมโทคอนเดรียในเซลล์เมื่อ MTT ถูกรีดิวซ์ด้วย mitochondrial reductase จะทำให้สีของ MTT เปลี่ยนเป็นสีม่วงของ formazan ที่ไม่ละลายแล้วทำการละลายด้วย DMSO ดังนั้นปริมาณของสีม่วงที่เพิ่มขึ้นจะหมายถึงปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิต (Sohn et al., 2005; Hsu and Yen, 2007; Aviello et al., 2010)

ทำการศึกษาโดยเลี้ยง HaCaT cells ใน 96 well plate จำนวน 25,000 cells/well เป็นเวลา 48 ชั่วโมงให้ได้ subconfluence แล้วนำไปชักนำให้เกิด ROS โดยใช้ 1, 2, 3 และ 4 mM *t*-BHP 200 μ l แล้ว incubate เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นถูกแทนที่ด้วย MTT 100 μ l เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วจึงเติม DMSO 100 μ l และนำไปวัด microplate reader ที่ 550 nm (เปรียบเทียบผลกับ control: DMEM; HBSS without cells เป็น blank)

3. การหาสถานะและความเข้มข้นที่เหมาะสมของ *tert*-butyl hydroperoxide โดยการวัด intracellular ROS ด้วย DCFDA

การตรวจวัดการเกิด ROS ภายในเซลล์สามารถทำได้โดยใช้ DCFDA (H_2DCFDA) โดยอาศัยหลักการที่โมเลกุลของ H_2DCFDA (2', 7'-dichlorofluorescein diacetate) จะสามารถซึมผ่านได้อย่างอิสระในการเข้าสู่เซลล์ หลังจากนั้นจะถูกเปลี่ยนโดย oxidative substances ไปเป็น 2', 7'-dichlorofluorescein (DCF) ที่เรืองแสงได้ ดังนั้นจึงใช้การเรืองแสงของ DCF เป็นตัวบ่งบอกการเกิด ROS ภายในเซลล์ (Ferretti, 2003)

ทำการศึกษาโดยเลี้ยง HaCaT cells ใน 96 well plate จำนวน 25,000 cells/well เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้ได้ subconfluence แล้วนำไปชักนำให้เกิด ROS โดยใช้ 1, 2, 3 และ 4 mM *t*-BHP 200 μ l แล้ว incubate เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นถูกแทนที่ด้วย 20 μ M H_2DCFDA 100 μ l เป็นเวลา 30 นาทีแล้วนำไปวัด microplate reader ที่ 485/535 (เปรียบเทียบผลกับ control: DMEM; HBSS without cells เป็น blank)

4. การหาปริมาณของ Rhein ในสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ ด้วยวิธี HPLC

เตรียม rhein ที่ความเข้มข้น 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 และ 35 μ g/ml โดยการละลาย rhein ด้วย 60% methanol และปรับปริมาตรเป็น 10 ml และเตรียมสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศโดยการชั่งสารสกัด 0.1 g ละลายด้วย 60% methanol และปรับปริมาตรเป็น 10 ml หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

HPLC condition

- Column: C18 ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร
- Mobile phase: 70:30 (Methanol:0.5% acetic acid)
- Flow rate: 1ml/min
- Running time: 30 min
- Injection volume: 20 μ l
- Quantitative wavelength: 254 nm
- Standard solution: dissolved in 60% methanol
- Sample: dissolved in 60% methanol

หมายเหตุ : 2.5 μ g/ml = 8.79 μ M, 5 μ g/ml = 17.59 μ M, 10 μ g/ml = 35.18 μ M,
15 μ g/ml = 52.77 μ M, 20 μ g/ml = 70.36 μ M, 25 μ g/ml = 87.95 μ M, 35 μ g/ml = 123.13 μ M

5. การวัด cell viability ของ Rhein ด้วย MTT

ทำการศึกษาโดยเลี้ยง HaCaT cells ใน 96 well plate จำนวน 25,000 cells/well เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้ได้ subconfluence แล้ว incubate ด้วย 1, 25, 50, 75 และ 100 μ M rhein 200 μ l เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นถูกแทนที่ด้วย MTT 100 μ l เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วจึงเติม DMSO 100 μ l และนำไปวัด microplate reader ที่ 550 nm (เปรียบเทียบผลกับ control: DMEM; HBSS without cells เป็น blank)

6. การวัด cell viability ของ สารสกัดชุมเห็ดเทศ ด้วย MTT

ทำการศึกษาโดยเลี้ยง HaCaT cells ใน 96 well plate จำนวน 25,000 cells/well เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้ได้ subconfluence แล้ว incubate ด้วย สารสกัดชุมเห็ดเทศ 0.01, 0.05, 0.1 และ 0.3 %w/v ใน 0.1% DMSO 200 μ l

เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นถูกแทนที่ด้วย MTT 100 μ l เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วจึงเติม DMSO 100 μ l และนำไปวัด microplate reader ที่ 550 nm (เปรียบเทียบผลกับ control: DMEM; HBSS without cells เป็น blank)

7. การศึกษาผลของ Rhein ต่อ intracellular ROS ด้วย DCFDA

ทำการศึกษาโดยเลี้ยง HaCaT cells ใน 96 well plate จำนวน 25,000 cells/well เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้ได้ subconfluence แล้วนำไป incubate ด้วย 1, 25, 50 μ M rhein 200 μ l เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปชักนำให้เกิด ROS โดยใช้ 1 mM *t*-BHP 200 μ l เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ต่อจากนั้นถูกแทนที่ด้วย 20 μ M H₂DCFDA 100 μ l เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัด microplate reader ที่ 485/535 nm (เปรียบเทียบผลกับ control: DMEM; positive control: *t*-BHP; blank: HBSS without cells)

8. การศึกษาผลสารสกัดชุมเห็ดเทศต่อ intracellular ROS ด้วย DCFDA

ทำการศึกษาโดยเลี้ยง HaCaT cells ใน 96 well plate จำนวน 25,000 cells/well เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้ได้ subconfluence แล้วนำไป incubate ด้วย สารสกัดชุมเห็ดเทศ 0.01, 0.05, 0.1 และ 0.3 %w/v ใน 0.1%DMSO 200 μ l เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปชักนำให้เกิด ROS โดยใช้ 1 mM *t*-BHP 200 μ l เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ต่อจากนั้นถูกแทนที่ด้วย 20 μ M H₂DCFDA 100 μ l เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัด microplate reader ที่ 485/535 nm (เปรียบเทียบผลกับ control: DMEM; positive control: *t*-BHP; blank: HBSS without cells)

9. การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของ Rhein โดยวัดปริมาณ TNF- α และ IL-8 ด้วยวิธี ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

TNF- α และ IL-8 เป็นไซโตไคน์ที่พบได้ในการอักเสบซึ่งถูกผลิตมาจากเซลล์หลายชนิดได้แก่ monocytes/macrophages, T cells, neutrophils, fibroblasts, endothelial cells, keratinocytes, hepatocytes, astrocytes และ chondrocytes เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นจะหลั่ง pro-inflammatory cytokines เช่น TNF- α ออกมาก่อน ซึ่ง TNF- α จะมีผลกลับไปกระตุ้นเซลล์ให้หลั่งไซโตไคน์อื่นๆ เช่น IL-8 ออกมา IL-8 จะทำงานโดยการไปดึงดูด neutrophils ให้ไปยังตำแหน่งที่มีการอักเสบ (Barker et al., 1991; Muller and Meineke, 2007; Portugal et al., 2007)

ทำการศึกษาโดยเลี้ยง HaCaT cells ใน 24 well plate จำนวน 100,000 cells/well เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ให้ได้ subconfluence แล้วนำไป incubate ด้วย 1, 25 และ 50 μ M rhein 500 μ l เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปชักนำให้เกิด ROS โดยใช้ 1 mM *t*-BHP 500 μ l เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ต่อจากนั้นเก็บ supernatant ไว้ที่ -80°C เพื่อนำไปทดสอบกับ TNF- α และ IL-8 cytokine kit (ELISA) (เปรียบเทียบผลกับ control: DMEM และ positive control: *t*-BHP)

10. การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดชุมเห็ดเทศ โดยวัดปริมาณ TNF- α และ IL-8 ด้วยวิธี ELISA

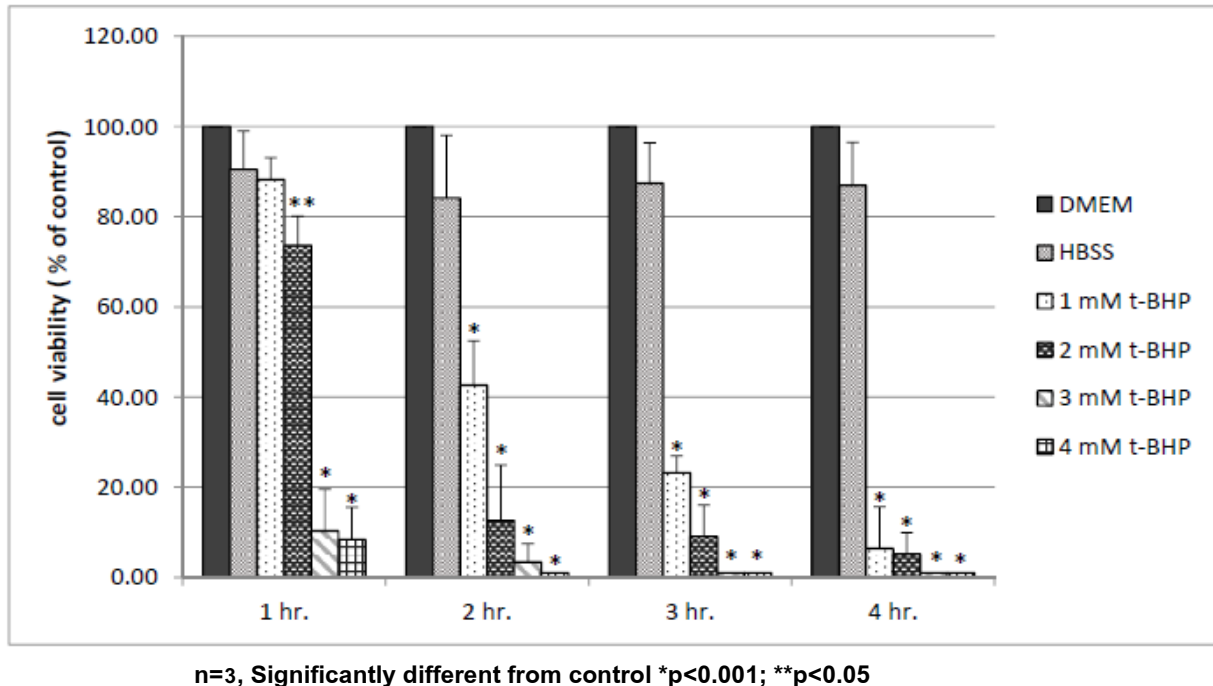
ทำการศึกษาโดยเลี้ยง HaCaT cells ใน 24 well plate จำนวน 100,000 cells/well เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ให้ได้ subconfluence แล้วนำไป incubate ด้วยสารสกัดชุมเห็ดเทศ 0.01 %w/v ใน 0.1%DMSO เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปชักนำให้เกิด ROS โดยใช้ 1 mM *t*-BHP 500 μ l เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ต่อจากนั้นเก็บ supernatant ไว้ที่ -80°C เพื่อนำไปทดสอบกับ TNF- α และ IL-8 ด้วย cytokine kit (ELISAs) (เปรียบเทียบผลกับ control: DMEM และ positive control: *t*-BHP)

3.5 การประมวลผลและการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองนำเสนอในรูป Mean $\pm$ SD โดยมีค่า n=3 โดยในแต่ละ n จะทำเป็น triplicate ค่าทางสถิติคำนวณโดย one-way ANOVA และมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 การวัด cell viability ของ *tert*-butyl hydroperoxide ด้วย MTT

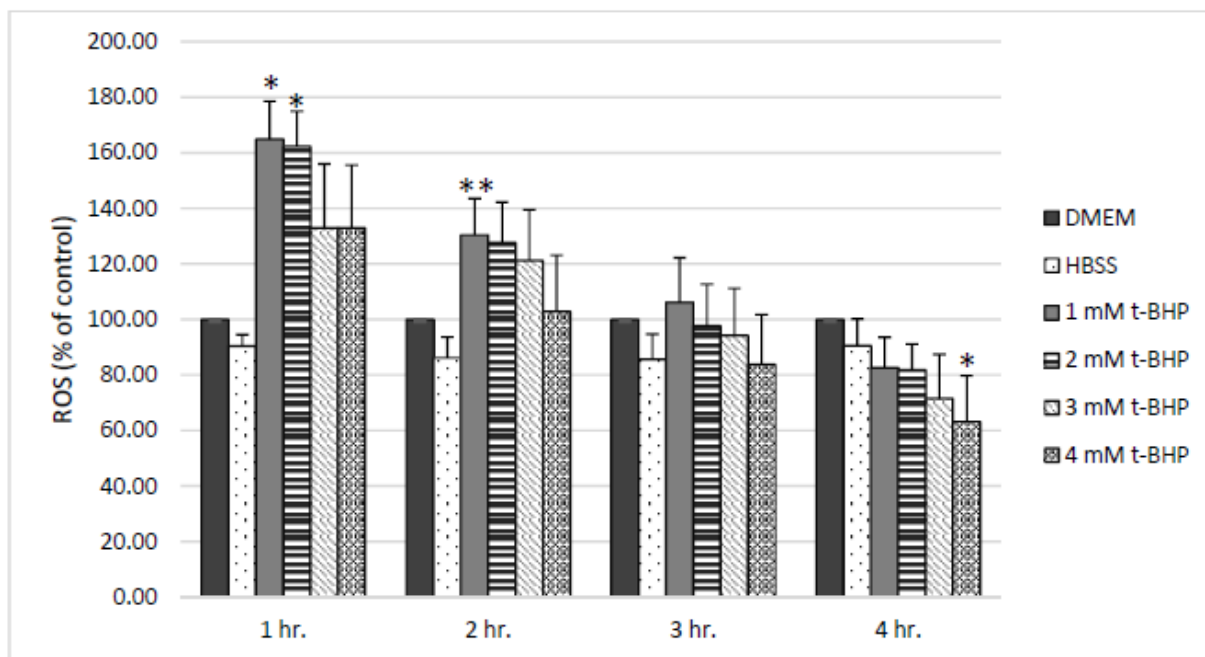


รูปที่ 5 แสดงผลของ *t*-BHP ในความเข้มข้น 1, 2, 3, และ 4 mM ต่อ cell viability ใน HaCaT cells เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง โดยใช้ MTT ใน HBSS โดยที่เซลล์จะถูกเลี้ยงใน 96-well plates และให้ DMEM เป็น control และ HBSS without cells เป็น blank หลังจากนั้นทำการวัด microplate reader (Universal Microplate Analyzer, model AOPUS1, Packard Bio-Science, CT, USA) ที่ 550 nm ข้อมูลถูกรวบรวมในรูป AFU (Arbitrary Fluorescence Units) แล้วเทียบออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ของ fluorescence signal (HBSS ใช้ละลาย *t*-BHP)

จากผลการศึกษาพบว่า การใช้ *t*-BHP ในความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 1, 2, 3 และ 4 mM โดยการ incubate ใน HaCaT cells เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง พบว่าในเวลา 1 ชั่วโมงและความเข้มข้น 1 mM *t*-BHP มีแนวโน้มของค่า cell viability >85% (88.18 ± 4.91) แสดงว่าในสภาพการทดลองดังกล่าวและความเข้มข้นของสารที่ใช้มีผลกระทบต่อเซลล์ค่อนข้างน้อยหรือเป็นพิษต่อเซลล์ค่อนข้างต่ำ แต่ในขณะที่ 2, 3 และ 4 mM *t*-BHP จะเป็นพิษต่อ HaCaT cells ในช่วงเวลาการ incubate ตั้งแต่ 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง รวมทั้ง 1 mM *t*-BHP ในเวลา > 1 ชั่วโมง ดังนั้นจากผลการทดลองจึงเลือกใช้ 1 mM *t*-BHP ในเวลา 1 ชั่วโมงมาใช้ในการศึกษาต่อไป

จากการทดลองเป็นการหา cell viability ของการหาความเข้มข้นและสภาวะที่เหมาะสมของ *t*-BHP ในการนำมาใช้เป็นสารชักนำให้เกิด ROS ใน HaCaT cells ซึ่งพบว่าความเข้มข้นและสภาวะที่เหมาะสมของ *t*-BHP ที่มีผลกระทบต่อเซลล์ค่อนข้างน้อยหรือเป็นพิษต่อเซลล์ค่อนข้างต่ำ คือ 1 mM *t*-BHP ในเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาต่อไป

4.2 การหาสภาวะและความเข้มข้นที่เหมาะสมของ *tert*-butyl hydroperoxide โดยการวัด intracellular ROS ด้วย DCFDA



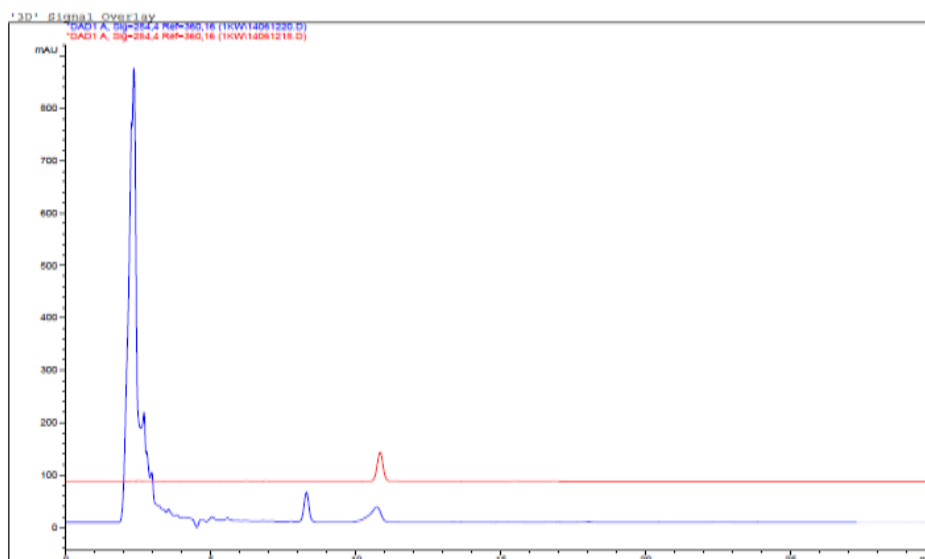
n=3, Significantly different from control *p<0.01; **p<0.05

รูปที่ 6 แสดงผลของ *t*-BHP ในความเข้มข้น 1, 2, 3 และ 4 mM ต่อการชักนำให้เกิด ROS ใน HaCaT cells เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง โดยใช้ 20 μ M H₂DCFDA ใน HBSS โดยที่เซลล์จะถูกเลี้ยงใน 96-well plates และให้ DMEM เป็น control และ HBSS without cells เป็น blank หลังจากนั้นทำการวัด microplate reader (Universal Microplate Analyzer, model AOPUS1, Packard Bio-Science, CT, USA) ที่ 485/535 nm ข้อมูลถูกรวบรวมในรูป AFU (Arbitrary Fluorescence Units) แล้วเทียบออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ของ fluorescence signal (HBSS ใช้ละลาย *t*-BHP)

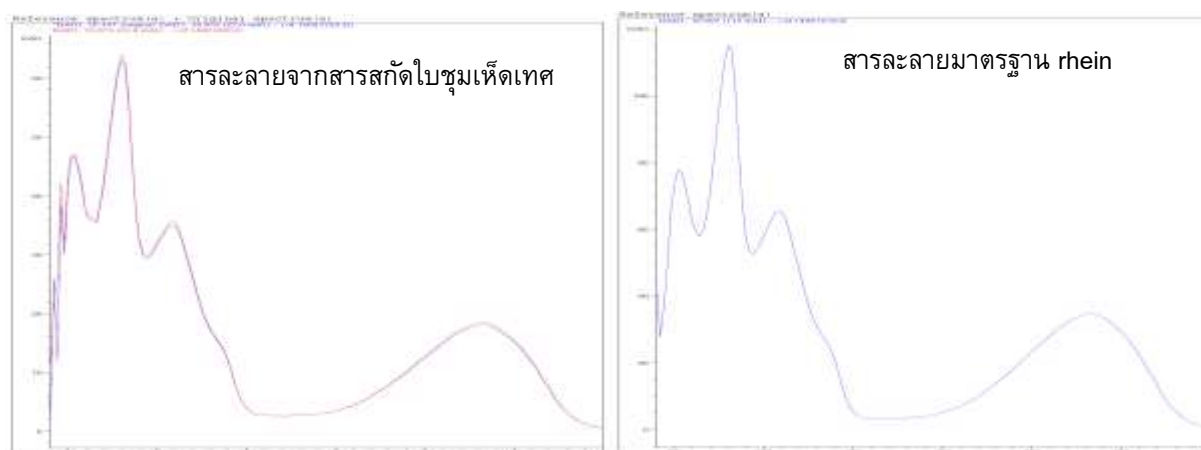
จากผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของ *t*-BHP ในการชักนำให้เกิด ROS ที่ความเข้มข้น 1, 2, 3 และ 4 mM โดยการ incubate ใน HaCaT cells เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ในเวลาที่ 1 ชั่วโมง และความเข้มข้น 1 mM *t*-BHP มีแนวโน้มของสภาวะที่เหมาะสมโดยให้ค่า intracellular ROS 161.42 ± 29.95 โดยที่ค่า cell viability >85% (88.18 ± 4.9) แสดงว่าในสภาพการทดลองดังกล่าวสามารถชักนำให้เกิด ROS ได้ดีและเป็นพิษต่อเซลล์ค่อนข้างน้อยดังนั้นจากการทดลองจึงเลือกใช้ 1 mM *t*-BHP ในเวลา 1 ชั่วโมงมาใช้ในการศึกษาต่อไป

จากการทดลองเป็นการหาความเข้มข้นและสภาวะที่เหมาะสมของ *t*-BHP ในการนำมาใช้เป็นสารชักนำให้เกิด ROS ใน HaCaT cells ที่มีผลกระทบต่อเซลล์ค่อนข้างน้อยหรือเป็นพิษต่อเซลล์ค่อนข้างต่ำ ซึ่งความเข้มข้นและสภาวะที่เหมาะสม คือ 1 mM *t*-BHP ในเวลา 1 ชั่วโมง

4.3 การหาปริมาณของ Rhein ในสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ ด้วยวิธี HPLC



รูปที่ 7 แสดงโครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน rhein 20 µg/mL เทียบกับโครมาโตแกรมของสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ

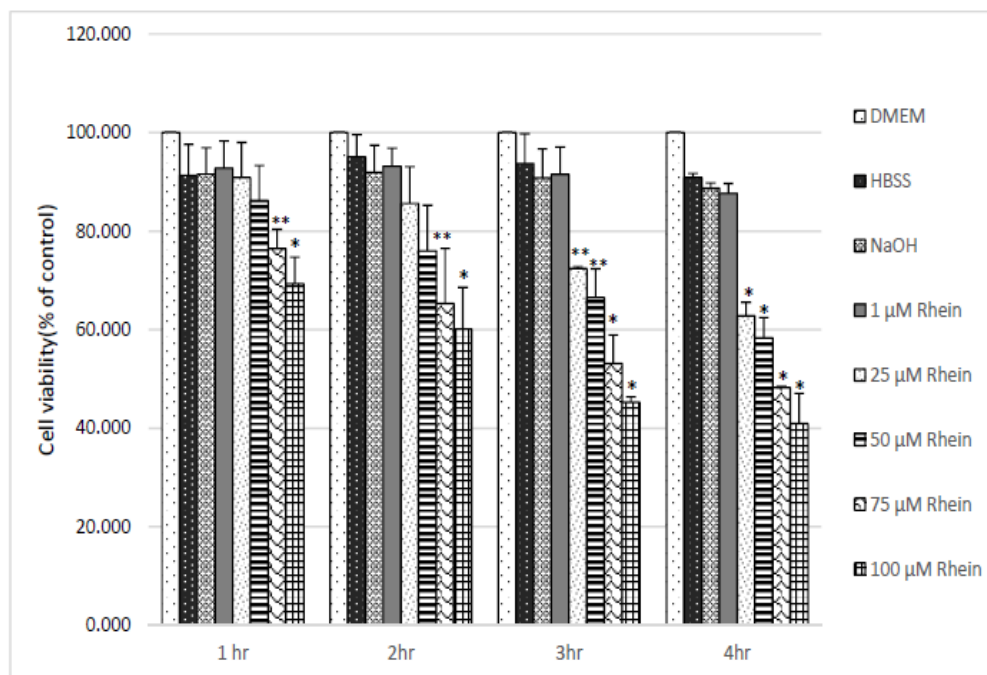


รูปที่ 8 แสดง UV spectrum ของพีคที่ 10.7 นาที จากสารละลายที่เตรียมจากสารสกัด และสารละลายมาตรฐาน rhein

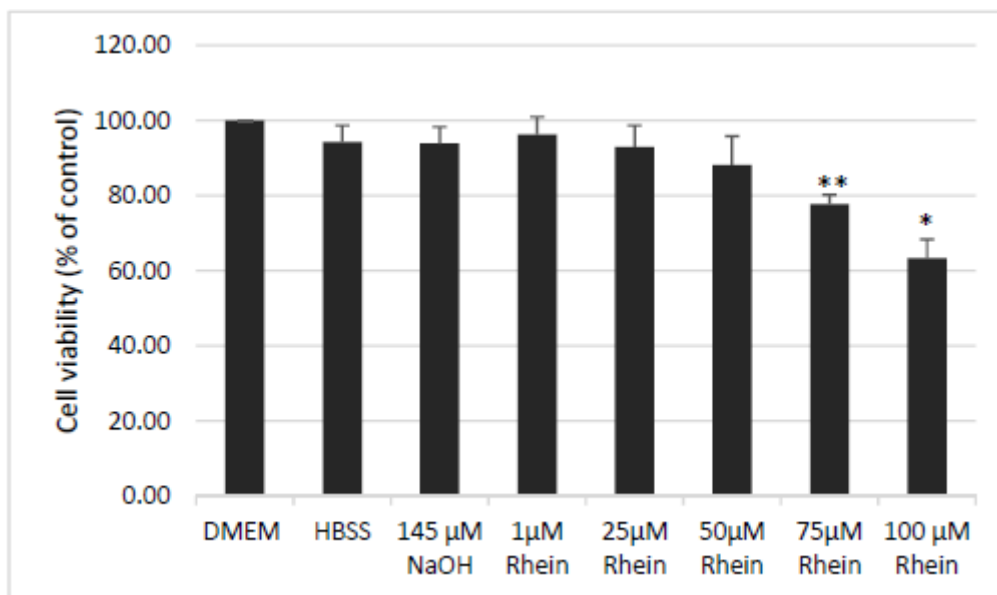
การหาปริมาณด้วย HPLC โดยใช้ Methanol:0.5% acetic acid (70:30) เป็น mobile phase ด้วยระบบ isocratic วัดการหาปริมาณจากการดูดกลืนแสงที่ 254 nm (รูปที่ 7) พบว่า rhein ถูกชะออกมาที่เวลา 10.7 นาที เปรียบเทียบ UV spectrum ของพีคที่ 10.7 นาที (รูปที่ 8) พบว่าเป็นสารชนิดเดียวกันทำการหาค่า linearity โดยการใช้พื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 2.5-35 µg/mL พบว่าได้สมการเส้นตรง $y=64.509X + 34.997$ โดยมีค่า $r^2=0.9981$ และได้ปริมาณ rhein ในสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ = 0.1225 ± 0.0001 %w/w รูปที่ 8 แสดงโครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน rhein 20 µg/mL เทียบกับโครมาโตแกรมของสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ

4.4 การวัด cell viability ของ Rhein ด้วย MTT

(9A)



(9B)

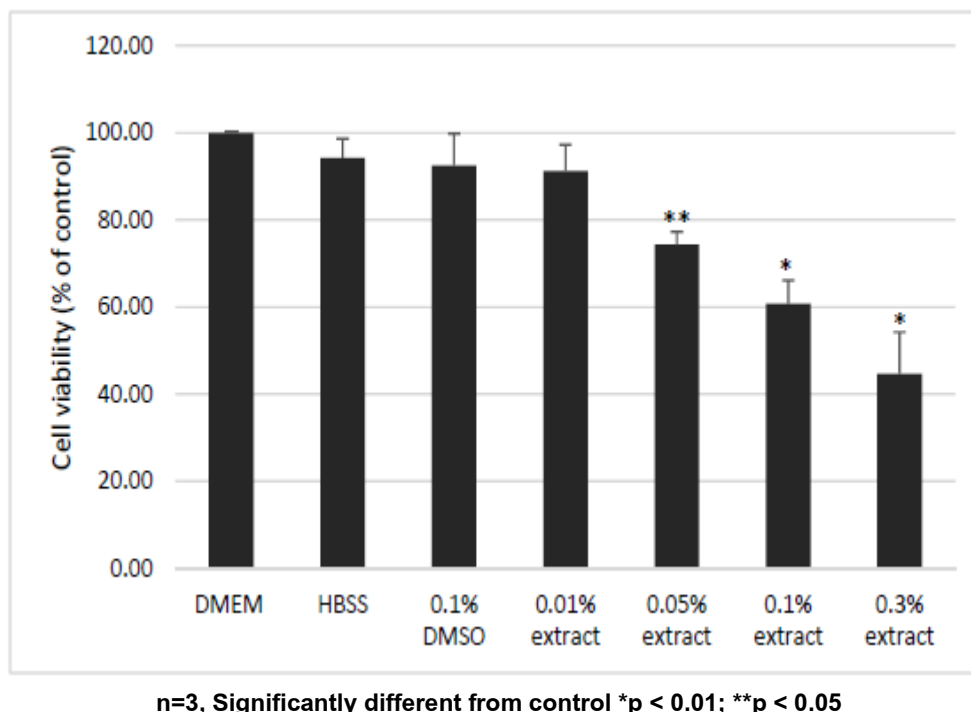


n=3, Significantly different from control *p<0.01; **p<0.05

รูปที่ 9A, 9B แสดงผลของค่า cell viability ของ rhein, DMEM, NaOH และ HBSS ใน incubation time เป็นเวลา 1, 2, 3, 4 ชม. (รูปที่ 9A) และค่าของ rhein ในความเข้มข้น 1, 25, 50, 75 และ 100 μM ต่อ cell viability ใน HaCaT cells เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (รูปที่ 9B) โดยใช้ MTT ใน HBSS โดยที่เซลล์จะถูกเลี้ยงใน 96-well plates และให้ DMEM เป็น control; HBSS without cells เป็น blank; NaOH ตัวทำลายของ rhein หลังจากนั้นทำการวัด microplate reader (Universal Microplate Analyzer, model AOPUS1, Packard Bio-Science, CT, USA) ที่ 550 nm ข้อมูลถูกรวบรวมในรูป AFU (Arbitrary Fluorescence Units) แล้วเทียบออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ของ fluorescence signal

จากผลการศึกษาพบว่า การใช้ rhein ในความเข้มข้น 1, 25, 50, 75 และ 100 μM โดยการ incubate ใน HaCaT cells เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่ความเข้มข้น 1, 25, 50 μM rhein มีแนวโน้มของค่า cell viability $>85\%$ (91.24 ± 4.67 ; 92.88 ± 5.76 ; 88.19 ± 7.64 ตามลำดับ) แสดงว่าในความเข้มข้นดังกล่าวมีผลกระทบต่อเซลล์ค่อนข้างน้อยหรือเป็นพิษต่อเซลล์ค่อนข้างต่ำจึงนำมาใช้ในการศึกษาต่อไป ทั้งนี้ในส่วน of HBSS และ NaOH จะมีผลต่อเซลล์ค่อนข้างน้อยเช่นกัน

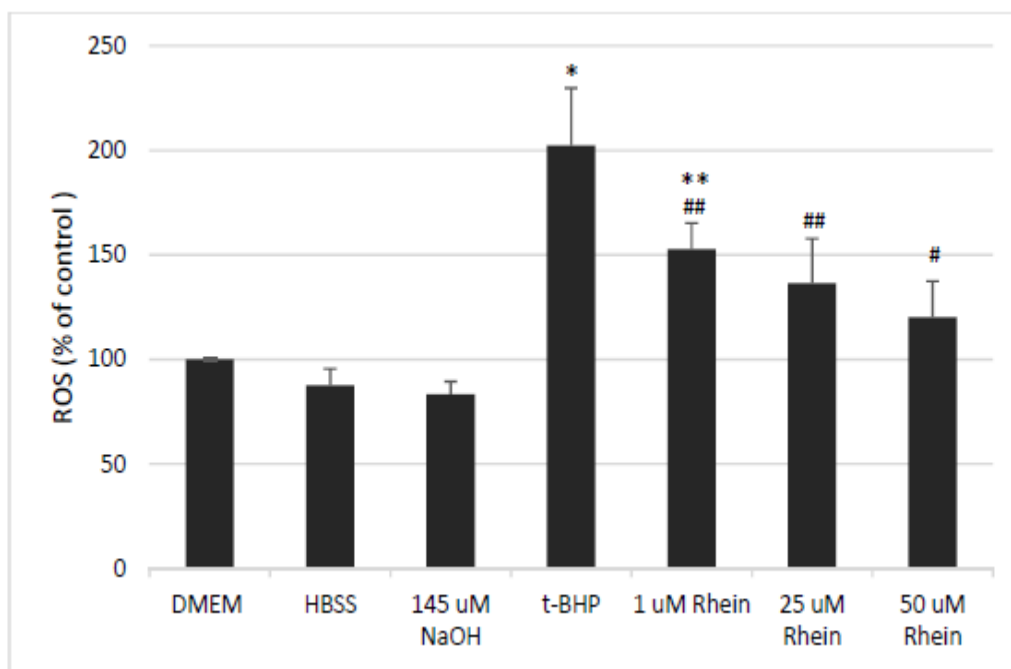
4.5 การวัด cell viability ของ สารสกัดชุมเห็ดเทศ ด้วย MTT



รูปที่ 10 แสดงผลของสารสกัดชุมเห็ดเทศ ความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1 และ 0.3 %w/v ต่อ cell viability ใน HaCaT cells เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้ MTT ใน HBSS โดยที่เซลล์จะถูกเลี้ยงใน 96-well plates และให้ DMEM เป็น control; HBSS without cells เป็น blank; DMSO ตัวทำละลายของ extract หลังจากนั้นทำการวัด microplate reader (Universal Microplate Analyzer, model AOPUS1, Packard Bio-Science, CT, USA) ที่ 550 nm ข้อมูลถูกรวบรวมในรูปแบบ AFU (Arbitrary Fluorescence Units) แล้วเทียบออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ของ fluorescence signal

จากผลการศึกษาพบว่า การใช้สารสกัดชุมเห็ดเทศในความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1 และ 0.3 %w/v โดยการ incubate ใน HaCaT cells เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่ความเข้มข้น 0.01%w/v มีแนวโน้มของค่า cell viability $>85\%$ (91.24 ± 6.00) แสดงว่าในความเข้มข้นดังกล่าวมีผลกระทบต่อเซลล์ค่อนข้างน้อยหรือเป็นพิษต่อเซลล์ค่อนข้างต่ำจึงนำมาใช้ในการศึกษาต่อไป

4.6 การศึกษาผลของ Rhein ต่อ intracellular ROS ด้วย DCFDA



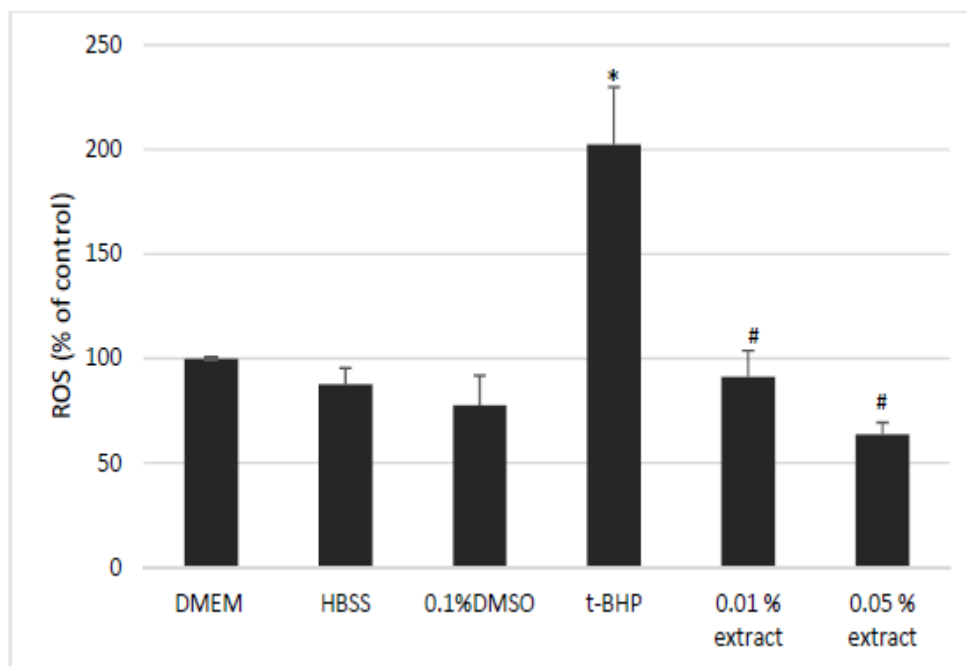
n=3, Significantly different from DMEM *p < 0.01; **p < 0.05

Significantly different from t-BHP #p < 0.01; ##p < 0.05

รูปที่ 11 แสดงผลของ intracellular ROS ของ rhein ในความเข้มข้น 1, 25, 50 μ M ใน HaCaT cells เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และถูกชักนำให้เกิด ROS ด้วย 1 mM t-BHP เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้ 20 μ M H₂DCFDA ใน HBSS หลังจากนั้นทำการวัด microplate reader (Universal Microplate Analyzer, model AOPUS1, Packard Bio-Science, CT, USA) ที่ 485/535 nm ข้อมูลถูกรวบรวมในรูป AFU (Arbitrary Fluorescence Units) แล้วเทียบออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ของ fluorescence signal เปรียบเทียบกับ control: DMEM; positive control: t-BHP ทำการ incubate DMEM 1 ชั่วโมง แล้วแทนที่ด้วย t-BHP 1 ชั่วโมง; blank: HBSS without cells; NaOH: ตัวทำละลายของ rhein

จากผลการศึกษาของ rhein ในการยับยั้ง ROS จากการชักนำด้วย 1 mM t-BHP เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่า rhein สามารถลดการเกิด ROS ได้แบบ concentration dependent ที่ความเข้มข้น 1, 25 และ 50 μ M rhein จะมีค่า ROS เป็น 152.73 ± 12.46 ; 136.54 ± 21.22 ; 120.11 ± 17.33 ตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับ t-BHP ที่มีค่า 202.38 ± 27.43 (#p < 0.01; ##p < 0.05) โดยที่ NaOH และ HBSS ไม่ส่งผลในการเพิ่ม ROS

4.7 การศึกษาผลสารสกัดชุมเห็ดเทศต่อ intracellular ROS ด้วย DCFDA



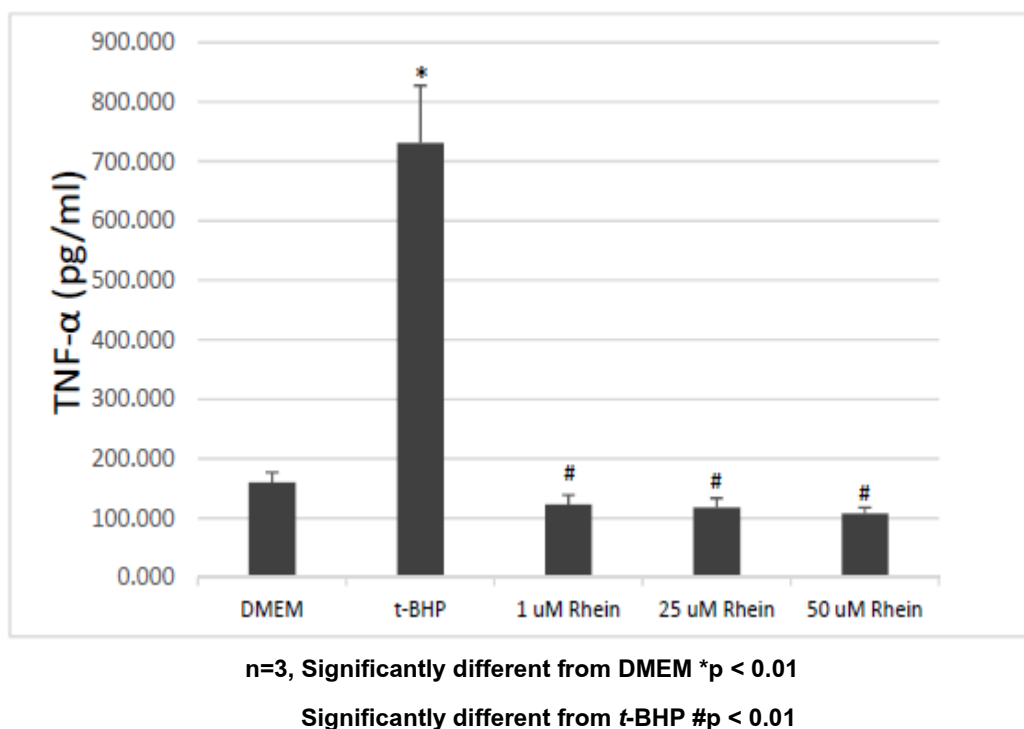
n=3, Significantly different from DMEM *p < 0.01; **p < 0.05

Significantly different from t-BHP #p < 0.01; ##p < 0.05

รูปที่ 12 แสดงผลของ intracellular ROS ของ สารสกัดชุมเห็ดเทศ 0.01 และ 0.05 %w/v ใน HaCaT cells เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และถูกชักนำให้เกิด ROS ด้วย 1 mM t-BHP เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้ 20 μ M H₂DCFDA ใน HBSS หลังจากนั้นทำการวัด microplate reader (Universal Microplate Analyzer, model AOPUS1, Packard Bio-Science, CT, USA) ที่ 485/535 nm ข้อมูลถูกรวบรวมในรูป AFU (Arbitrary Fluorescence Units) แล้วเทียบออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ของ fluorescence signal เปรียบเทียบผลกับ control: DMEM; positive control: t-BHP ทำการ incubate DMEM 1 ชั่วโมง แล้วแทนที่ด้วย t-BHP 1 ชั่วโมง; blank: HBSS without cells; DMSO: ตัวทำละลาย extract

จากผลการศึกษาของสารสกัดชุมเห็ดเทศในการยับยั้ง ROS จากการชักนำด้วย 1 mM t-BHP เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดชุมเห็ดเทศสามารถลดการเกิด ROS ได้แบบแปรตามความเข้มข้น ที่ความเข้มข้น 0.01 และ 0.05 %w/v จะมีค่า ROS เป็น 91.25 ± 12.56 ; 63.77 ± 5.61 ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับ t-BHP ที่มีค่า 202.38 ± 27.43 (#p < 0.01; ##p < 0.05) โดยที่ 0.1% DMSO และ HBSS ไม่ส่งผลในการเพิ่ม ROS

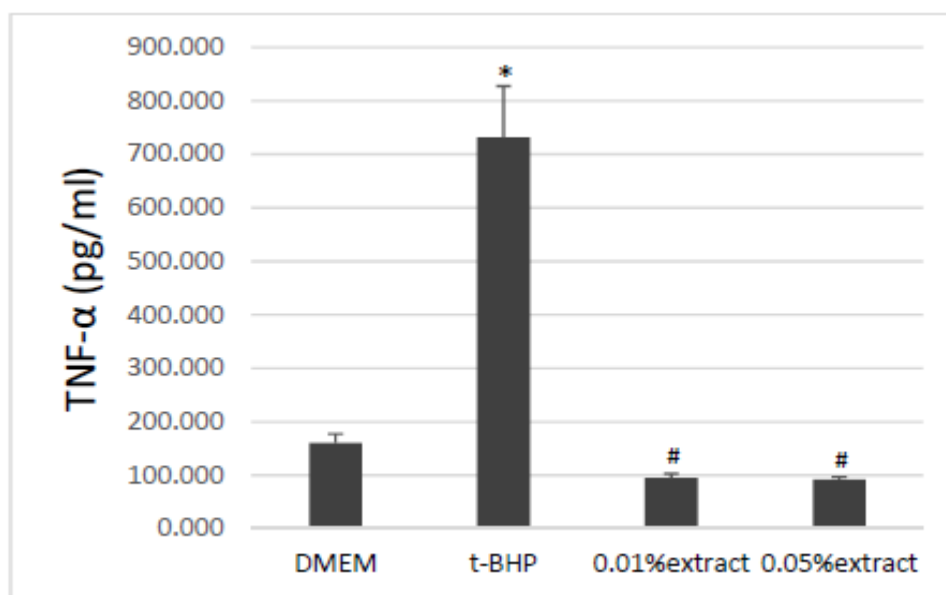
4.8 การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของ Rhein โดยวัดปริมาณ TNF- α ด้วยวิธี ELISA (enzyme-linkimmunosorbent assay)



รูปที่ 13 แสดงปริมาณ TNF- α ของ 1, 25 และ 50 μ M rhein ใน HaCaT cells เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และถูกชักนำให้เกิด ROS ด้วย 1 mM t-BHP เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการวัดปริมาณ TNF- α ด้วย ELISA Kit เปรียบเทียบผลกับ control: DMEM; positive control: t-BHP

จากผลการศึกษาของ rhein ต่อการลดลงในการผลิต TNF- α อันเป็นผลจากการชักนำด้วย 1 mM t-BHP เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่า rhein สามารถลดการสร้าง TNF- α ได้แบบ concentration dependent ที่ความเข้มข้น 1, 25 และ 50 μ M rhein จะมีปริมาณ TNF- α เป็น 123.50 ± 15.61 ; 118.39 ± 15.22 ; 108.10 ± 10.13 pg/ml ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับ t-BHP ที่มีปริมาณ TNF- α เป็น 731.44 ± 95.95 pg/ml ($p < 0.01$)

4.9 การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดชุมเห็ดเทศ โดยวัดปริมาณ TNF- α ด้วยวิธี ELISA (enzyme-linkimmunosorbent assay)



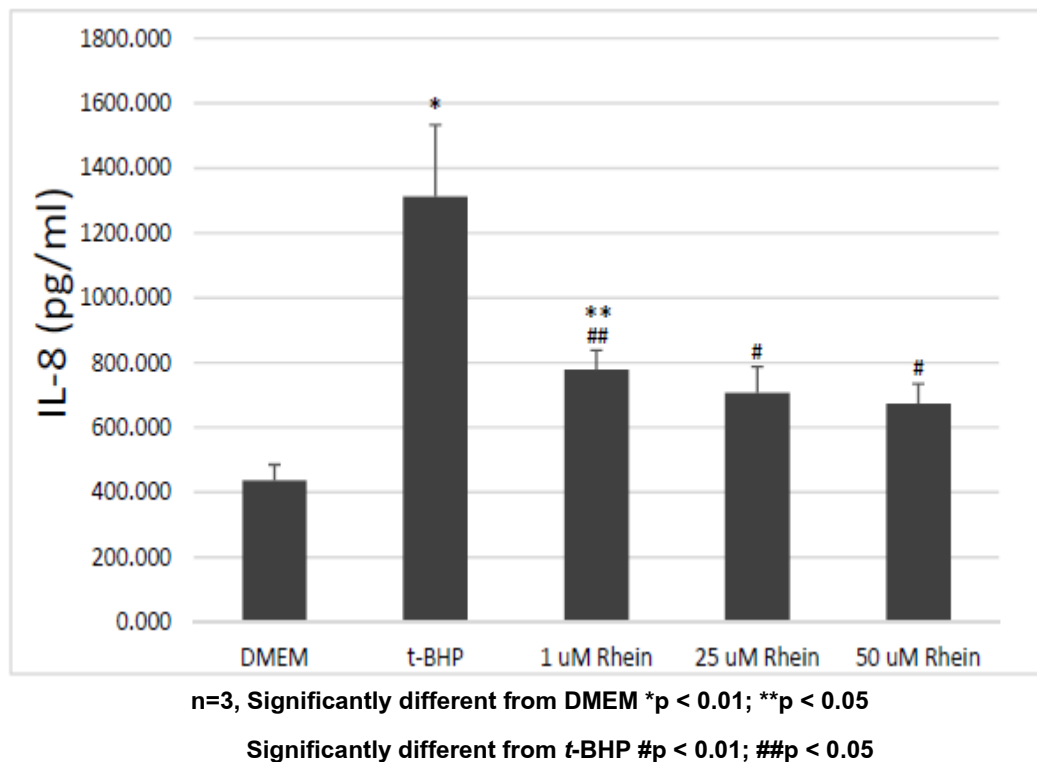
n=3, Significantly different from DMEM *p < 0.01

Significantly different from t-BHP #p < 0.01

รูปที่ 14 แสดงปริมาณ TNF- α ของสารสกัดชุมเห็ดเทศ 0.01 และ 0.05 %w/v ใน HaCaT cells เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และถูกชักนำให้เกิด ROS ด้วย 1 mM t-BHP เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการวัดปริมาณ TNF- α ด้วย ELISA Kit เปรียบเทียบผลกับ control: DMEM; positive control: t-BHP

จากผลการศึกษาของสารสกัดชุมเห็ดเทศในการลดการสร้าง TNF- α จากการชักนำด้วย 1 mM t-BHP เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดชุมเห็ดเทศที่ความเข้มข้น 0.01 และ 0.05 %w/v สามารถลดการสร้าง TNF- α ได้อย่างมีนัยสำคัญ จะมีปริมาณ TNF- α เป็น 94.64 ± 7.98 pg/ml และ 91.57 ± 4.89 pg/ml เมื่อเทียบกับ t-BHP ที่มีปริมาณ TNF- α เป็น 731.44 ± 95.95 pg/ml (p < 0.01)

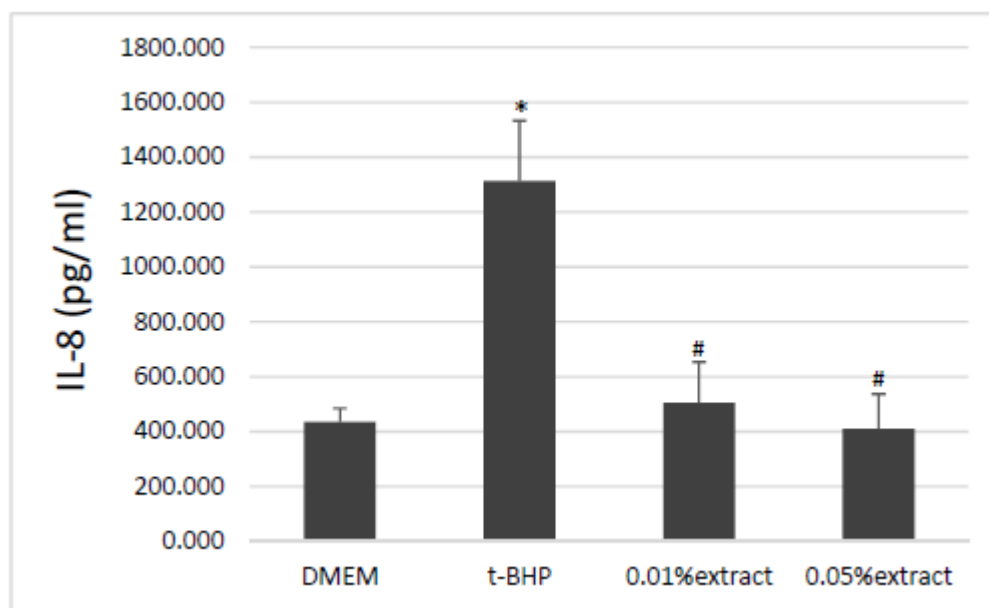
4.10 การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของ Rhein โดยวัดปริมาณ IL-8 ด้วยวิธี ELISA (enzyme-link immunosorbent assay)



รูปที่ 15 แสดงปริมาณ IL-8 ของ 1, 25 และ 50 μ M rhein ใน HaCaT cells เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และถูกชักนำให้เกิด ROS ด้วย 1 mM t-BHP เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการวัดปริมาณ IL-8 ด้วย ELISA Kit เปรียบเทียบผลกับ control: DMEM; positive control: t-BHP

จากผลการศึกษาของ rhein ในการลดการสร้าง IL-8 จากการชักนำด้วย 1 mM t-BHP เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่า rhein สามารถลดการสร้าง IL-8 ได้แบบ concentration dependent ที่ความเข้มข้น 1, 25 และ 50 μ M rhein จะมีปริมาณ IL-8 เป็น 777.58 ± 61.04 ; 706.73 ± 80.10 ; 673.12 ± 61.46 pg/ml ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับ t-BHP ที่มีปริมาณ IL-8 เป็น 1313.39 ± 219.61 pg/ml (#p < 0.01; ##p < 0.05)

4.11 การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดชุมเห็ดเทศ โดยวัดปริมาณ IL-8 ด้วยวิธี ELISA (enzyme-linkimmunosorbent assay)



n=3, Significantly different from DMEM *p < 0.01; **p < 0.05

Significantly different from t-BHP #p < 0.01; ##p < 0.05

รูปที่ 16 แสดงปริมาณ IL-8 ของสารสกัดชุมเห็ดเทศ 0.01 และ 0.05 %w/v ใน HaCaT cells เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และถูกชักนำให้เกิด ROS ด้วย 1 mM t-BHP เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการวัดปริมาณ IL-8 ด้วย ELISA Kit เปรียบเทียบกับ control: DMEM; positive control: t-BHP

จากผลการศึกษาของสารสกัดชุมเห็ดเทศในการลดการสร้าง IL-8 จากการชักนำด้วย 1 mM t-BHP เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดชุมเห็ดเทศที่ความเข้มข้น 0.01 และ 0.05 %w/v สามารถลดการสร้าง IL-8 ได้อย่างมีนัยสำคัญ จะมีปริมาณ IL-8 เป็น 504.99 ± 148.54 pg/ml และ 410.19 ± 126.92 pg/ml เมื่อเทียบกับ t-BHP ที่มีปริมาณ IL-8 เป็น 1313.39 ± 219.61 pg/ml (#p < 0.01; ##p < 0.05)

Rhein (4,5-dihydroxyanthraquinone-2-carboxylic acid) นั้น เป็น active metabolite ของ diacetylanthraquinone ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญอันหนึ่งในชุมเห็ดเทศ ที่ให้ฤทธิ์ลดการอักเสบได้ ซึ่งในการศึกษานี้ จะสนใจกลไกการลดอักเสบผ่านลดการเกิด ROS, TNF- α , IL-8 และเพิ่ม GSH จากผลการศึกษาพบว่าความเข้มข้นและสภาวะที่เหมาะสมของ t-BHP คือ 1 mM t-BHP ในเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งมีแนวโน้มของค่า cell viability >85% (88.18 ± 4.91) แสดงว่าในสภาพการทดลองดังกล่าวและความเข้มข้นของสารที่ใช้มีผลกระทบต่อเซลล์ค่อนข้างน้อยหรือเป็นพิษต่อเซลล์ค่อนข้างต่ำ โดยที่ t-BHP จะนำมาใช้เป็นสารชักนำให้เกิด ROS ใน HaCaT cells ซึ่งจะให้ค่าที่เหมาะสมของ intracellular ROS 161.42 ± 29.95 เมื่อเทียบกับความเข้มข้นและสภาวะอื่นๆ สำหรับความเข้มข้นและสภาวะที่เหมาะสมของ rhein คือ 1, 25, 50 μ M rhein ในเวลา 1 ชั่วโมง โดยมีค่า cell viability >85% (91.24 ± 4.67 ; 92.88 ± 5.76 ; 88.19 ± 7.64 ตามลำดับ) แสดงว่าในความเข้มข้นและสภาวะดังกล่าวเป็นพิษต่อเซลล์ค่อนข้างน้อย จึงสามารถนำมาใช้ในการศึกษาต่อไปได้ นอกจากนี้พบว่า rhein ที่เป็นสารมาตรฐานจะลดการเกิด ROS ได้แบบแปรตามความเข้มข้นที่ 1, 25, 50 μ M rhein โดยมีค่า ROS เป็น 152.73 ± 12.46 ; 136.54 ± 21.22 ; 120.11 ± 17.33 ตามลำดับอย่าง

มีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับ *t*-BHP ที่มีค่า 202.38 ± 27.43 ($\#p < 0.01$; $\#\#p < 0.05$) เนื่องจากในการศึกษานี้จะใช้ HaCaT cells ที่เป็นเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ชนิด keratinocytes ที่สามารถเปลี่ยนแปลงเซลล์ตัวเอง โดยไม่ได้เป็นเซลล์เนื้องอก จึงมีการชักนำเซลล์ให้เกิดสภาวะของการมี ROS จากการให้ 1 mM *t*-BHP นาน 1 ชั่วโมง ซึ่งในการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสำคัญในพืชสมุนไพรจะใช้สารเคมีในการทำให้เกิด oxidative stress กับเนื้อเยื่อ สารที่นิยมใช้ตัวหนึ่ง คือ *t*-BHP เป็นสารอินทรีย์พวก lipid hydroperoxide analog จะถูกใช้ในสถานะที่เป็น pro-oxidant สำหรับการประเมินกลไกที่เกี่ยวข้องกับ oxidative stress ในเซลล์และเนื้อเยื่อ โดยสารนี้จะถูกเปลี่ยนให้เป็น *t*-butoxyl และ methylradicals ส่งผลให้เกิด lipid oxidation มีการลดลงของสารต้านอนุมูลอิสระและทำลาย DNA (Kim, 2012; Jayashree et al., 2015) จากการทดลองคณะวิจัยจะดูความสามารถของ rhein ที่เป็นสารมาตรฐานในการลด ROS พบว่าจะทำให้ลด ROS แปรตามความเข้มข้นของ rhein ที่เพิ่มขึ้น (1, 25, 50 μ M rhein) แต่ในความเข้มข้นที่มากกว่า 50 μ M rhein (75, 100 μ M rhein) เซลล์จะเกิดการตายมากขึ้น แสดงถึงความสามารถของเซลล์ในการรองรับความเข้มข้นของ rhein จะอยู่ที่ 50 μ M หากใช้ความเข้มข้น 75, 100 μ M rhein มาทดสอบความสามารถในการลด ROS ผลที่ได้ก็อาจจะเกิดจากจำนวนเซลล์ที่มีการตายเป็นจำนวนมากแล้วทำให้ค่า ROS ลดลง สำหรับการศึกษาปริมาณของ rhein ในสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ พบว่า จะมีปริมาณ rhein ในสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ 0.1225 ± 0.0001 %w/w จึงได้นำค่าดังกล่าวมาใช้เทียบเพื่อศึกษาผลของ rhein ในสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศ กับ rhein ที่เป็นสารมาตรฐาน โดยที่พบว่าสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศในความเข้มข้นเฉพาะ 0.01 %w/v (เทียบเท่ากับ 0.43 μ M rhein) จะสามารถนำไปใช้ในการศึกษาต่อไปได้ เนื่องจากค่า cell viability $>85\%$ (91.24 ± 6.00) นั่นคือ ความเข้มข้นดังกล่าวมีความเป็นพิษต่อเซลล์ค่อนข้างต่ำ สำหรับในความเข้มข้นที่มากกว่า 0.01% (0.05, 0.1, 0.3%) จะพบการตายของเซลล์เป็นจำนวนมาก ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดจากชุมเห็ดเทศนั้นประกอบไปด้วยสารชนิดอื่นๆ ที่ไม่ใช่ rhein เพียงอย่างเดียว ที่อาจส่งผลต่อ cell viability ของเซลล์ได้ สำหรับผลการศึกษาของสารสกัดชุมเห็ดเทศในการยับยั้ง ROS จากการชักนำด้วย 1 mM *t*-BHP เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดชุมเห็ดเทศที่ความเข้มข้น 0.01 %w/v สามารถลดการเกิด ROS ได้อย่างมีนัยสำคัญ (91.25 ± 12.56) เมื่อเทียบกับ *t*-BHP (202.38 ± 27.43) ($\#p < 0.01$; $\#\#p < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ว่า emodin และ rhein จะยับยั้งการเกิด ROS รวมถึง O_2^- , H_2O_2 , IL-8, TNF- α จากการยับยั้งการย้ายของ monocytes ที่ถูกชักนำด้วย LIGHT โดยการยับยั้งการผลิต ROS (Heo et al., 2010) นอกจากนี้ rhein ยังช่วยลดความเป็นพิษและป้องกันผลของ acetaminophen ที่มีต่อดับและไตอันเนื่องมาจาก oxidative stress (Zhao et al., 2011) มีการวิจัยที่พบว่า rhein สามารถป้องกันการเกิด apoptosis จากการถูกชักนำด้วย H_2O_2 ใน HL-60 cells (Lin et al., 2003) และมีการศึกษาที่ชี้ว่า rhein สามารถป้องกันการเกิด apoptosis ของเบต้าเซลล์อันเนื่องมาจากถูกชักนำด้วยภาวะ hyperglycemia ด้วยกลไกการป้องกันอันหนึ่งคือ กดการเกิด ROS (Liu et al., 2013)

สำหรับความสามารถในการลดการอักเสบของทั้ง rhein ที่เป็นสารมาตรฐานและสารสกัดจากชุมเห็ดเทศ พบว่าผลของ rhein ในการลดการเกิด TNF- α และ IL-8 จะเป็นในลักษณะแปรตามความเข้มข้น โดยที่ 1, 25 และ 50 μ M rhein จะมีปริมาณ TNF- α เป็น 123.50 ± 15.61 ; 118.39 ± 15.22 ; 108.10 ± 10.13 pg/ml ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับ *t*-BHP ที่มีปริมาณ TNF- α เป็น 731.44 ± 95.95 pg/ml ($\#p < 0.01$) สำหรับ IL-8 ของ rhein ที่ความเข้มข้น 1, 25 และ 50 μ M จะลดลงเป็น 777.58 ± 61.04 ; 706.73 ± 80.10 ; 673.12 ± 61.46 pg/ml ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับ *t*-BHP ที่มีปริมาณ IL-8 เป็น 1313.39 ± 219.61 pg/ml ($\#p < 0.01$; $\#\#p < 0.05$) เมื่อเทียบกับสารสกัดชุมเห็ดเทศที่ความเข้มข้น 0.01 %w/v สามารถลดการสร้าง TNF- α (94.64 ± 7.98 pg/ml) ได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับ *t*-BHP ที่มีปริมาณ TNF- α เป็น 731.44 ± 95.95 pg/m ($\#p < 0.01$) ในทำนองเดียวกับ TNF- α พบว่า สารสกัดชุมเห็ดเทศที่ความเข้มข้นดังกล่าว จะลดการเกิด IL-8 (504.99 ± 148.54 pg/ml) ได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับ *t*-BHP ที่มีปริมาณ IL-8 เป็น 1313.39 ± 219.61 pg/m ($\#p < 0.01$) จากผลการทดลองดังกล่าวจะสอดคล้องกับบทบาทของ rhein ในการต้านการอักเสบที่เกิดจากไตได้รับบาดเจ็บจากผลของการติดเชื้อในกระแสโลหิต โดยที่ rhein สามารถยับยั้ง

การเกิด pro-inflammatry cytokines และลดการไปกระตุ้น NF- κ B (Yu et al., 2015) และ emodin และ rhein จะยับยั้งการเกิด ROS รวมถึง O_2^- , H_2O_2 , IL-8, TNF- α จากการยับยั้งการย้ายของ monocytes ที่ถูกชักนำด้วย LIGHT โดยการยับยั้งการผลิต ROS (Heo et al., 2010)

GSH ถือเป็นกลไกที่สำคัญในการต่อต้านการถูกทำลายจากอนุมูลอิสระในพยาธิสภาพต่างๆของการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา lipid peroxidation อันเนื่องมาจาก ROS ซึ่งเชื่อว่าเป็นสาเหตุสำคัญในการทำลายและเกิดการบาดเจ็บที่เซลล์เมมเบรน เนื่องจาก PUFA ของเซลล์เมมเบรนจะถูกทำให้แตกโดยกระบวนการที่ไปทำลายความสมบูรณ์แข็งแรงของเมมเบรน (Zhao et al., 2011) ในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่สามารถได้ผลของ GSH ณ ขณะนี้ เนื่องจากสถานะของการทดลองและวิธีการยังไม่เหมาะสม ประกอบกับเกิดปัญหาในการใช้งานของ microplate reader ณ ขณะนี้

สำหรับการหาผลของ rhein และสารสกัดจากชุมเห็ดเทศในการยับยั้ง NADPH-oxidases ซึ่งเป็นเอนไซม์ในการทำให้เกิด ROS ไม่สามารถดำเนินการทดลองให้เป็นไปตามวัตถุประสงค์ของการวิจัยได้ เนื่องจากหลังการใส่สารทดสอบ rhein anthraquinone และสารสกัดจากชุมเห็ด แล้วทำการบ่มใน CO_2 incubator เป็นเวลา 5, 18 และ 24 ชม. พบว่า HaCaT cells มีการตายเป็นจำนวนมาก ซึ่งในการศึกษาระดับโมเลกุลต้องใช้การบ่มเซลล์เป็นเวลานานเพื่อให้มีการสร้างโปรตีน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงสามารถดูฤทธิ์ต้านการอักเสบของ rhein anthraquinone ที่มีผลต่อ HaCaT cells และเปรียบเทียบฤทธิ์กับสารสกัดจากชุมเห็ดเทศผ่านการลดการเกิด ROS, TNF- α และ IL-8 บน HaCaT cells

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย/ข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาจะเห็นได้ว่า rhein ที่เป็นสารมาตรฐานและสารสกัดจากชุมเห็ดเทศมีแนวโน้มที่จะสามารถลดการอักเสบได้ โดยที่ค่า TNF- α และ IL-8 ลดลง อันเป็นผลจากการลดการเกิด ROS โดยที่สารสกัดจากชุมเห็ดเทศมีศักยภาพในการลด TNF- α และ IL-8 ได้ค่อนข้างดีกว่าเมื่อเทียบกับ rhein ที่เป็นสารมาตรฐาน ทั้งนี้ผลที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากสารชนิดอื่นในสารสกัดจากชุมเห็ดเทศที่นอกเหนือจาก rhein ที่ส่งผลต่อการเกิด ROS และลดการอักเสบ

5.2 ปัญหาและอุปสรรคในการดำเนินงานวิจัย

ขั้นตอนการทำวิจัยบางส่วนไม่สามารถทำได้ในระดับลึกถึงโมเลกุล เนื่องจากทั้ง rhein anthraquinone และสารสกัดจากชุมเห็ดเทศไม่สามารถบ่มใน HaCaT cells ได้ในระยะเวลาสั้นพอที่จะทำให้เซลล์สามารถสร้างโปรตีน โดยพบการตายของเซลล์เป็นจำนวนมากหลังบ่มเซลล์เป็นเวลานาน 5, 18, 24 ชม. ทั้งนี้ในการค้นหาข้อมูลเบื้องต้นจากการศึกษาของ Heo et al., 2010 และคณะ (Emodin and rhein inhibit LIGHT-induced monocytes migration by blocking of ROS production) เป็นการศึกษาเกี่ยวกับ NOX ที่สัมพันธ์กับ ROS โดยการใช้เซลล์ THP-1 (monocyte-like cell line) คณะผู้วิจัยได้ใช้ข้อมูลดังกล่าวมาเป็นแนวทางสำหรับการศึกษาในเซลล์ผิวหนัง HaCaT cells ซึ่งยังไม่มีข้อมูลในการใช้เซลล์นี้กับสารทดสอบของคณะผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาและคณะผู้วิจัยไม่เคยมีเซลล์นี้มาก่อน ดังนั้นการทำ pilot study อาจไม่สามารถดำเนินการได้ ทำให้การศึกษานี้จึงสามารถดูฤทธิ์ด้านการอักเสบของ rhein anthraquinone ที่มีต่อ HaCaT cells และเปรียบเทียบฤทธิ์กับสารสกัดจากชุมเห็ดเทศผ่านการลดการเกิด ROS, TNF- α และ IL-8 บน HaCaT cells ซึ่งเป็นเซลล์ผิวหนังประเภท keratinocytes

5.3 การอภิปรายผลงานวิจัย

จากการศึกษาทดลองของคณะผู้วิจัยในโครงการนี้สามารถดำเนินการในการศึกษากลไกของ rhein anthraquinone และสารสกัดจากชุมเห็ดเทศ ต่อการลดการอักเสบอันเป็นผลจากการถูกกระตุ้นให้เกิด ROS ผ่านการยับยั้ง NADPH-oxidases นั้น สามารถได้ผลการวิจัยในระดับหนึ่งที่จะเป็นแนวทางในการศึกษาต่อไปแม้ว่าจะไม่สามารถทำงานวิจัยได้ครบทั้งหมดตามเป้าหมาย นอกจากนี้ยังให้ประโยชน์กับนักศึกษาปริญญาโทในการคิด การทำงานและดำเนินการวิจัย การแก้ไขปัญหาและอุปสรรคต่างๆ ในขณะทำวิจัย

5.4 แนวทาง

จากการศึกษาทดลองในโครงการนี้ คณะผู้วิจัยคิดว่าสามารถนำไปศึกษาต่อในระดับโมเลกุลได้โดยอาจจะต้องเปลี่ยนเซลล์ผิวหนังที่ใช้ศึกษา

เอกสารอ้างอิง

- นุชนาฏ กิจเจริญ, 2006. อาหารสมุนไพราระบาย: ชนิดกระตุ้นลำไส้ใหญ่. Thai. Pharm. Health Sci. J. 1, 159-169.
- Aviello, G., Rowland, I., Gill, Cl., Acquaviva, AM., Capasso, F., McCann, M., 2010. Anti-proliferative effect of rhein, an anthraquinone isolated from Cassia species, on Caco-2 human adenocarcinoma cells. J. Cell. Mol. Med. 14, 2006-2014.
- Ayo, RG., 2010. Phytochemical constituents and bioactivities of the extracts of Cassia nigricans Vahl: a review. J. Med. Plants Res. 4, 1339-1348.
- Barker, JNWN., Mitra, RS., Griffiths, CEM., Dixit, VM., Nickoloff, BJ., 1991. Keratinocytes as initiators of inflammation. Lancet. 337, 211-214.
- Bowler, RP., Crapo, JD., 2002. Oxidative stress in airways: Is there a role for extracellular superoxide dismutase? Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 166, S38-S43.
- Chamulitrat, W., Stremmel, W., Kawahara, T., Rokutan, K., Fujii, H., Wingler, K., Schmidt, HHHW., Schmidt, R., 2004. A constitutive NADPH oxidases-like system containing gp91phox homologs in human keratinocytes. J. Invest. Dermatol. 122, 1000-1009.
- Chamulitrat, W., Huber, A., Riedel, H-D., Stremmel, W., 2007. Nox1 Induces Differentiation Resistance in Immortalized Human Keratinocytes Generating Cells that Express Simple Epithelial Keratins. J. Invest. Dermatol. 127, 2171-2183.
- Cowley, EA., Linsdell, P., 2002. Oxidants stress stimulates anion secretion from the human airway epithelial cell line Calu-3: implications for cystic fibrosis lung disease. J. Physiol. 543.1, 201-209.
- Cooper, KL., Liu, KJ., Hudson, LG., 2009. Enhanced ROS production and redox signaling with combined arsenite and UVA exposure: contributions of NADPH oxidase. Free. Radic. Biol. Med. 47, 381-388.
- Davoren, M., Shúilleabháin, SN., Hartl, MGJ., Sheehan, D., O'Brien, NM., O'Halloran, J., Van Pelt, FNAM., Mothersill, C., 2005. Assessing the potential of fish cell lines as tools for the cytotoxicity testing of estuarine sediment aqueous elutriates. Toxicol. in Vitro. 19, 421-431.
- El-Benna, J., Dang, PM-D., Gougerot-Pocidalo, M-A., 2007. Role of the NADPH oxidase systems NOX and DUOX in host defense and inflammation. Expert. Rev. Clin. Immunol. 3, 111-115.
- El-Benna, J., Dang, PM-D., Gougerot-Pocidalo, M-A., 2008. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. Semin. Immunopathol. 30, 279-289.
- El-Benna, J., Dang, PM-C., Gougerot-Pocidalo, M-A., Marie, J-C., Braut-Boucher, F., 2009. p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. Exp. Mol. Med. 41, 217-225.
- Ellmark, SHM., Dusting, GJ., Tang, FMN., Guzzo-Pernell, N., Drummond, GR., 2005. The Contribution of Nox4 to NADPH oxidase activity in mouse vascular smooth muscle. Cardiovasc. Res. 65, 495-504.
- Fernand, VE., Dinh, DT., Washington, SJ., Fakayode, SO., Losso, JN., Ravenswaay, ROV., Warner, IM., 2008. Determination of pharmacologically active compounds in root extracts of Cassia alata L. by use of high performance liquid chromatography. Talanta. 74, 896-902.

Fernand, VE., Losso, JN., Truax, RE., Villar, EE., Bwambok, DK., Fakayode, SO., Lowry, M., Warner, IM., 2011. Rhein inhibits angiogenesis and the viability of hormone-dependent and -independent cancer cells under normoxic or hypoxic conditions in vitro. *Chem. Biol. Interact.* 192, 220-232.

Ferretti, G., Bacchetti, T., Moroni, C., Vignini, A., Curatola, G., 2003. Copper-induced oxidative damage on astrocytes: protective effect exerted by human high density lipoproteins. *Biochimica. et Biophysica. Acta.* 1635, 48-54.

Kamp, DW., Shacter, E., Weitzman, SA., 2011. Chronic inflammation and cancer: the role of the mitochondria. *Oncology.* 25,: 400-410.

Kim, Y-S., Lee, S-J., Hwang, J-W., Kim, E-K., Kim, S-E., Kim, E-H., Moond, S-H., Jeon, B-T., Park, P-J., 2012. In vitro protective effects of *Thymus quinquecostatus* Celak extracts on t-BHP-induced cell damage through antioxidant activity. *Food. Chem. Toxicol.* 50, 4191-4198.

Lands, LC., Grey, VL., Grenier, C., 2002. Total plasma antioxidant capacity in cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 29, 81-87.

Gawkrodger, DJ., *Dermatology, An Illustrated Colour Text.* 3rd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2002.

Geiszt, M., Leto, TL., 2004. The Nox family of NAD(P)H oxidases: Host defense and beyond. *J. Biol. Chem.* 279, 51715-51718.

Grange, PA., Che´reau, C., Raingeaud, J., Nicco, C., Weill, B., Dupin, N., Batteux, F., 2009. Production of Superoxide Anions by Keratinocytes Initiates *P. acnes*-Induced Inflammation of the Skin. *PLoS. Pathog.* 5, 1-14.

Gritsanapan, W., Mangmeesri, P., 2009. Standardized *Senna alata* leaf extract. *J. Health. Res.* 23, 59-64.

Heo, SK., Yun, H-J., Noh, E-K., Park, S-D., 2010. Emodin and rhein inhibit LIGHT-induced monocytes migration by blocking of ROS production. *Vascul. Pharmacol.* 53, 28-37.

Hsu, C-L., Yen, G-C., 2007. Effect of capsaicin on induction of apoptosis and inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J. Agric. Food. Chem.* 55, 1730-1736.

Jayashree, GV., Kumar, KH., Krupashree, K., Rachitha, P., Khanum, F., 2015. LC–ESI–MS/MS analysis of *Asparagus racemosus* Willd. roots and its protective effects against t-BHP induced oxidative stress in rats. *Ind. Crops. Prod.* 78, 102-109.

Kamp, DW., Shacter, E., Weitzman, SA., 2011. Chronic inflammation and cancer: the role of the mitochondria. *Oncology.* 25, 400-410.

Lans, C., 2007. Comparison of plants used for skin and stomach problems in Trinidad and Tobago with Asian ethnomedicine. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 3, 1-12.

Lin, S., Fujii, M., Hou, D-X., 2003. Rhein induces apoptosis in HL-60 cells via reactive oxygen species-independent mitochondrial death pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* 41, 99-107.

Liu, J., Chen, Z., Zhang, Y., Zhang, M., Zhu, X., Fan, Y., Shi, S., Zen, K., Liu, Z., 2013. Rhein Protects Pancreatic b-Cells From Dynamin-Related Protein-1-Mediated Mitochondrial Fission and Cell Apoptosis Under Hyperglycemia. *Diabetes.* 62, 3927-3935.

Muller, K., Meineke, V., 2007. Radiation-induced alterations in cytokine production by skin cells. *Exp. Hematol.* 35, 96-104.

Nathan, C., Cunningham-Bussel, A., 2013. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 349-361.

Olarte, El., 2007. The don mariano marco memorial state university (DMMMSU)-potential antiangiogenic property of *Cassia alata* L. hexane extract on the embryonic blood vessels of duck, *anas domestica*. *Embryos.* 1, 1-13.

Panichayupakaranant, P., Intaraksa, N., 2003. Distribution of hydroxyanthracene derivatives in *Cassia alata* and the factors affecting the quality of the raw material. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 25, 497-502.

Portugal, M., Barak, V., Ginsburg, I., Kohen, R., 2007. Interplay among oxidants, antioxidants, and cytokines in skin disorders: Present status and future considerations. *Biomed. Pharmacother.* 61, 412-22.

Raad, H., Paclet, M-H., Boussetta, T., Kroviarski, Y., Morel, F., Quinn, MT., Gougerot-Pocidalo, M-A., Dang, PM-D., El-Benna, J., 2009. Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of gp91phox/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox, and p47phox. *FASEB. J.* 23, 1011-1022.

Ravi, R., Piva, TJ., The role of furin in the development of skin cancer. 2013.

Ro, BI., Dawson, TL., 2005. The role of sebaceous gland activity and scalp microfloral metabolism in the etiology of seborrheic dermatitis and dandruff. *J. Invest. Dermatol.* 10, 194-197.

Roos, D., Van Bruggen, R., Meischl, C., 2003. Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes. Infect.* 5, 1307-1315.

Singha, B., Nadkarni, JR., Vishwakarma, RA., Bharate, SB., Nivsarkar, M., Anandjiwalad, S., 2012. The hydroalcoholic extract of *Cassia alata* (Linn.) leaves and its major compound rhein exhibits antiallergic activity via mast cell stabilization and lipoxygenase inhibition. *J. Ethnopharmacol.* 141, 469-473.

Sohn, JH., Han, KL., Lee, SH., Hwang, JK., 2005. Protective effect of panduratin A against oxidative damage of tert-butylhydroperoxide in human HepG2 cells. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 1083-1086.

Sule, WF., Okonko, IO., Joseph, TA., Ojezele, MO., Nwanze, JC., All, JA., Adewale, OG., Ojezele, OJ., 2010. In vitro antifungal activity of *Senna alata* Linn. Crude leaf extract. *Res. J. Biol. Sci.* 5, 275-284.

Treenam, CW., Blake, DR., Morris, CJ., 1992. Skin inflammation: Reactive oxygen species and the role of iron. *J. Invest. Dermatol.* 99, 675-682.

Turner, MD., Nedjai, B., Hurst, T., Pennington, DJ., Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica. et Biophysica. Acta.* 1843, 2563-2582.

Wuthi-udomlert, M., Kupittayanant, P., Gritsanapan, W., 2010. In vitro evaluation of antifungal activity of anthraquinone derivatives of *Senna alata*. *J. Health. Res.* 24, 117-122.

Villasenor, IM., Canlas, AP., Pascua, MP., Sabando, MN., Soliven, LA., 2002. Bioactivity studies on *Cassia alata* Linn. Leaf extract. *Phytother. Res.* 16, S93-S96.

Yu, C., Qi, D., Sun, J-F., Li, P., Fanc, H-Y., 2015. Rhein prevents endotoxin-induced acute kidney injury by inhibiting NF- κ B activities. *Sci. Rep.* 1-16.

Zhao, Y-L., Zhou, G-D., Yang, H-B., Wang, J-B., Shan, L-M., Li, R-S., Xiao, X-H., 2011. Rhein protects against acetaminophen-induced hepatic and renal toxicity. *FCT.* 49, 1705-1710.

Zhen, CS., Evrard, M., Guan, NgL., 2013. Lights, camera, and action: vertebrate skin sets the stage for immune cell interaction with arthropod-vectored pathogens. *Front. Immunol.* 4, 1-7.

ภาคผนวก

ประวัตินักวิจัย

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

ภญ.อ.ดร. นุชจิรา พงศ์นิมิตประเสริฐ

Dr. Nushjira Pongnimitprasert

ภาควิชา เกษัตริศาสตร์และพืชวิทยา คณะ เกษัตริศาสตร์ ม.ศิลปากร นครปฐม

โทรศัพท์ 034-255800; 034-253440-4 ต่อ 24309 โทรสาร 034-255801

e-mail address: PONGNIMIT_N@su.ac.th, npnushjira@gmail.com

สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ : อนุมูลอิสระกับสารต้านอนุมูลอิสระ

ผลงานวิจัย : การศึกษาเบื้องต้นในการหากลไกต้านการอักเสบโดย capsaicin ผ่านทางNADPH-oxidase ในการทำให้เกิด ROS ใน fibroblast cell line.

Preliminary study of anti-inflammatory mechanism by capsaicin via NADPH oxidase-mediated generation of ROS in fibroblast cell line.

ประวัติผู้ร่วมวิจัย

ภก.รศ.ดร.ฉัตรชัย ฉันทไพศาล

Associate Professor Dr. Chatchai Chinpaisal

ภาควิชา เกษัตริศาสตร์และพืชวิทยา คณะ เกษัตริศาสตร์ ม.ศิลปากร นครปฐม

โทรศัพท์ 034-255800; 034-253440-4 ต่อ 24293 โทรสาร 034-255801

e-mail address: CHINPAISAL_C@su.ac.th

สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ : molecular biology

ผลงานวิจัย : Antioxidant activity of Areca catechu extracts in human hepatocarcinoma HepG2 cell lines.
Genetic history of Southeast Asian populations by ancient and modern human mitochondrial DNA analysis.

Genetic history of Southeast Asian populations as revealed by ancient and modern human mitochondrial DNA analysis.

ภญ.รศ.ดร.เพ็ญพรรณ เวชวิทย์กุล

Associate Professor Dr. Penpan Wetwitayaklung

ภาควิชา เกษัตริศาสตร์ คณะ เกษัตริศาสตร์ ม.ศิลปากร นครปฐม

โทรศัพท์ 034-255800; 034-253440-4 ต่อ 24303 โทรสาร 034-255801

e-mail address: WETWITAYAKLUNG_P@su.ac.th

สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ : เคมีวิเคราะห์ เกษัตริศาสตร์

ผลงานวิจัย : การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านจุลชีพของน้ำมันหอมระเหยจากแก่นกฤษณาที่สกัดด้วยวิธีคาร์บอนไดออกไซด์ในสภาวะของไหลยิ่งยวด

The chemical compositions and antimicrobial activity of essential oil of heartwood of *Aquilaria Crassna* obtained from carbon dioxide supercritical fluid extraction.

Chemical Constituents and Antimicrobial Activity of Essential Oil and Extracts of Heartwood of *Aquilaria crassna* Obtained from Water Distillation and Supercritical Fluid Carbon Dioxide Extraction
ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันและการยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ของสารสกัดลำพู

Antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibition of the extracts from *Sonneratia caseolaris*.

ภญ.ผศ.ดร.มัลย์ สติรพันธุ์

Assistant Professor Dr. Malai Satiraphan

ภาควิชา เกษศาเคมี คณะ เกษศาาสตร์ ม.ศิลปากร นครปฐม

โทรศัพท์ 034-255800; 034-253440-4 โทรสาร 034-255801

e-mail address: SATIRAPHAN_M@su.ac.th

สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ : สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช เกษศาเคมี เกษศาวิเคราะห์ เกษศาเวท เกษศาชีวภาพ

ผลงานวิจัย : การศึกษาโครงสร้างและการดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีของเพคตินที่สกัดได้จากเปลือกผลส้มโอ

Structural characterization and chemical modification of pectin extracted from pomelo (*Citrus maxima*) peel.

Preparation of pectin from fruit peel of *Citrus maxima*.