

บทคัดย่อ

ออกซิเรสเวอราทอรอล (2,4,3',5'-เตตราไฮดรอกซิสติลปิน) เป็นสารไฟโตอะเล็กซินที่พบในแก่นของต้นมะหาดในปริมาณสูง มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่าง และเป็นสารหลักในยาถ่ายพยาธิ “ปวกหาด” ของไทยซึ่งเป็นผงแห้งที่เตรียมจากการสกัดแก่นมะหาดด้วยน้ำเดือด ปัจจุบันสารนี้ใช้เป็นสารช่วยให้ผิวขาวในผลิตภัณฑ์บำรุงผิวหลายชนิด นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยในหลอดทดลองว่าสารนี้อาจป้องกันโรคอัลไซเมอร์ได้ แผนงานวิจัยนี้ประกอบด้วยโครงการวิจัย 2 โครงการ ซึ่งมีวัตถุประสงค์ตามลำดับดังนี้ (1) พัฒนาวิธีวิเคราะห์สำหรับใช้ตรวจวัดปริมาณสารออกซิเรสเวอราทอรอลในตัวอย่างพืชและผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้อง และ (2) ศึกษาออกซิเรสเวอราทอรอลในการป้องกันโรคอัลไซเมอร์หรือสมองเสื่อมในสัตว์ทดลอง

โครงการแรก เป็นการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกซิเรสเวอราทอรอลในตัวอย่างพืชและผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องโดยอาศัยหลักการของไอโซลา เริ่มจากการนำสารออกซิเรสเวอราทอรอล มาเชื่อมต่อกับโปรตีนแอลบูมินจากซีรัมของวัวด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 3 วิธี คือใช้ปฏิกิริยาเคมีที่แตกต่างกัน 3 ปฏิกิริยา ได้แก่ คาร์โบดิอิมิเดชัน เพอร์ออกซิเดตออกซิเดชัน และปฏิกิริยาแมนนิค ได้เป็นสารคอนจูเกตจำนวน 3 ชนิดที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นอิมมูโนเจนสำหรับกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในสัตว์ทดลอง เมื่อนำสารคอนจูเกตชนิดแรกซึ่งได้จากปฏิกิริยาคาร์โบดิอิมิเดชันไปฉีดให้สัตว์ทดลอง พบว่ามีการสร้างพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อออกซิเรสเวอราทอรอล เมื่อนำแอนติบอดีนี้ไปทดลองใช้วิเคราะห์ปริมาณสารออกซิเรสเวอราทอรอลในแก่นต้นมะหาดและปวกหาด โดยวิธีไอโซลาแบบแข่งขันทางอ้อม พบว่ามีความแม่นยำและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ซึ่งเป็นที่ยอมรับ แต่มีความไวต่ำกว่าวิธีวิเคราะห์แบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (เอชพีแอลซี) 1,000 เท่า ต่อมาได้นำสารคอนจูเกตทั้ง 3 ชนิดข้างต้นมาศึกษา นำสารแต่ละชนิดฉีดเข้าหนูทดลองเพื่อผลิตแอนติบอดีโดยวิธีไฮบริโดมา ได้มอโนโคลนอลแอนติบอดีหลายโคลนตามสารคอนจูเกตที่ใช้ จากการตรวจคัดคุณสมบัติต่างๆ พบว่าเฉพาะมอโนโคลนอลแอนติบอดีอันหนึ่งที่ได้จากสารคอนจูเกตจากปฏิกิริยาแมนนิคเท่านั้นที่มีความเหมาะสมที่จะนำมาศึกษาต่อ เมื่อนำแอนติบอดีนี้มาใช้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ไอโซลาแบบแข่งขันทางอ้อมสำหรับตรวจวัดปริมาณออกซิเรสเวอราทอรอลในแก่นต้นมะหาดและปวกหาด พบว่าวิธีนี้มีความแม่นยำและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ซึ่งเป็นที่ยอมรับ มีความไวในการตรวจวัดสูงกว่าวิธีเอชพีแอลซีถึง 16 เท่า มีความจำเพาะต่อออกซิเรสเวอราทอรอลค่อนข้างสูง เมื่อนำไปทดสอบ ไม่พบว่ามีปฏิกิริยาจับกับสารอื่นที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับออกซิเรสเวอราทอรอลทั้งสารในกลุ่มเฟลโวนอยด์และกลุ่มสติลปิน แต่พบที่สามารถจับกับเรสเวอราทอรอลในสัดส่วนร้อยละ 89.92 วิถีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้จึงมีข้อจำกัด คือใช้ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณออกซิเรสเวอราทอรอลเฉพาะในตัวอย่างที่ไม่มีเรสเวอราทอรอลปนอยู่ หรือมีเรสเวอราทอรอลปนอยู่ในปริมาณที่น้อยมาก อย่างไรก็ตามวิธีวิเคราะห์นี้อาจนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจติดตามการกระจายตัวของออกซิเรสเวอราทอรอลในอวัยวะภายในของสัตว์ทดลอง

โครงการที่สองเป็นการศึกษาฤทธิ์ของออกซิเรสเวอราทอรอลในสัตว์ทดลองในการป้องกันพิษของเบตาอะมิลลอยด์ซึ่งเป็นสารเพปไทด์ที่ก่อให้เกิดพยาธิสรีรวิทยาของโรคอัลไซเมอร์ โดยใช้แบบจำลองสมองกตมอร์ริส ใช้หนูไอซอร์เป็นสัตว์ทดลอง แบ่งออกเป็น 8 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว ประกอบด้วย กลุ่มปกติ กลุ่มควบคุมอีก 3 กลุ่มถัดไปได้รับสารออกซิเรสเวอราทอรอลทางปากในรูปยาแขวนตะกอนในน้ำ ขนาด 90, 180 และ 360

มก/กก ต่อวัน และอีก 3 กลุ่มสุดท้ายได้รับสารออกซิเรสเวอราทอรอลทางปากในรูปของระบบนำส่งยาที่เกิดไมโครอิมัลชันเอง (เอสเอ็มอีดีเอส) ขนาด 90, 180 และ 360 มก/กก ต่อวัน โดยให้ยา (ออกซิเรสเวอราทอรอล) เป็นเวลา 7 วัน จึงฉีดสารละลายอะมิโลยด์เบตา 25-35 เข้าทางโพรงสมองหนู แล้วให้ยาต่ออีก 7 วัน หลังจากนั้นฝึกหนูให้หาแท่นวัตถุที่ซ่อนอยู่ในน้ำเป็นเวลา 5 วัน แล้วทำการทดสอบ โดยบันทึกพฤติกรรมของหนูและเวลาในการค้นหาแท่นวัตถุ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง เก็บเนื้อเยื่อส่วนฮิปโปแคมปัสมาศึกษาปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน และตรวจดูการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ ผลการทดลองชี้ว่าหนูกลุ่มที่ได้รับออกซิเรสเวอราทอรอลที่อยู่ในรูปยาแขวนตะกอนในขนาด 360 มก/กก และหนูกลุ่มที่ได้รับออกซิเรสเวอราทอรอลที่อยู่ในสูตรตำรับเอสเอ็มอีดีเอสทุกขนาดใช้เวลาในการหาแท่นวัตถุน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$ – $P < 0.0001$) การตรวจเนื้อเยื่อฮิปโปแคมปัสของสัตว์ทดลองพบว่า กลุ่มที่ได้รับออกซิเรสเวอราทอรอลในสูตรตำรับทุกขนาด มีปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันลดลง (เหลือเป็นร้อยละ 64 – 74) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$ – $P < 0.05$) แต่กลุ่มที่ได้รับออกซิเรสเวอราทอรอลในรูปยาแขวนตะกอนทุกขนาด ปฏิกิริยานี้ไม่ลดลง เมื่อตรวจดูลักษณะเนื้อเยื่อในฮิปโปแคมปัสด้วยการย้อมสีส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าออกซิเรสเวอราทอรอลในรูปยาแขวนตะกอนขนาด 90 และ 180 มก/กก ไม่สามารถปกป้องเซลล์ประสาทจากพิษของเบตาอะมิโลยด์ได้ ส่วนในกลุ่มที่ได้รับออกซิเรสเวอราทอรอลในรูปยาแขวนตะกอนขนาด 360 มก/กก และในสูตรตำรับทุกขนาด สามารถลดการตายของเซลล์ลงได้อย่างได้อย่างมีนัยสำคัญเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.0001$) ผลการทดลองทั้งหมดชี้ให้เห็นว่าออกซิเรสเวอราทอรอลสามารถป้องกันพิษของเบตาอะมิโลยด์ได้ จึงมีศักยภาพที่จะนำมาพัฒนาเพื่อใช้ป้องกันโรคอัลไซเมอร์ และนอกจากนี้ยังแสดงว่าสูตรตำรับแบบเอสเอ็มอีดีเอสช่วยให้ออกซิเรสเวอราทอรอลออกฤทธิ์ได้สูงขึ้น ทั้งนี้คาดว่าเป็นผลจากการที่สูตรตำรับช่วยให้ออกซิเรสเวอราทอรอลมีชีวปริมาณมากขึ้นและสามารถซึมผ่านจากเลือดเข้าสู่สมองในปริมาณที่สูงขึ้น

Abstract

Oxyresveratrol (2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene), a phytoalexin found in large amounts in the heartwood of "Ma-haad" *Artocarpus lakoocha* Roxb. (Moraceae), is known to possess a wide range of biological activities. It is also the major component in the traditional Thai anthelmintic drug "Puag-haad", a dried aqueous extract prepared from the heartwood of this plant. Currently oxyresveratrol has been widely used as an active ingredient in several skin whitening products, due to its potent tyrosinase inhibitory activity. In addition, the compound has been recently reported to exhibit preventive activity against Alzheimer's disease *in vitro*. This research program consists of two separate but related projects with the following respective objectives: (1) Development of method(s) for analysis of oxyresveratrol content in plant materials and products and (2) Investigation of the protective activity of oxyresveratrol against Alzheimer's disease *in vivo*.

The first project was concerned with the development of method(s) for quantitative analysis of oxyresveratrol through the use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique. Three conjugation methods, including carbodiimidation, periodate oxidation and Mannich reaction were used to connect oxyresveratrol to bovine serum albumin, and thus yielded three types of conjugated products, which were employed as immunogens in subsequent studies. An attempt to prepare a polyclonal antibody from the carbodiimidation-derived immunogen was successful. The antibody was found to have high specificity to oxyresveratrol, and was used to develop an indirect competitive ELISA method for analysis of oxyresveratrol content in the heartwood of *A. lakoocha* and puag-haad. This method showed acceptable values of accuracy and precision. However, its sensitivity was about 1,000 times lower than that obtained by the high performance liquid chromatography (HPLC) method. Efforts to produce monoclonal antibodies from each of the three above-mentioned immunogens in mice were made by the hybridoma technique, and three types of monoclonal antibodies were obtained. However, only a certain antibody against the oxyresveratrol-BSA conjugate derived from the Mannich reaction had the properties suitable for further investigation. An indirect competitive ELISA method developed from this antibody was shown to have an acceptable accuracy and precision, with sensitivity 16-time higher than that of the HPLC technique. Primarily, this antibody appeared to not show cross-reactivity with any structurally similar polyphenolic compounds, including several flavonoids

and stilbenoids. However, a closer examination revealed that it possessed a 89.92% cross-reactivity with resveratrol. Thus, this newly developed analytical method, despite its several advantages, seems to have some limitation, as it can only be applied to the samples that contain no or only minute amounts of resveratrol. Nevertheless, the method could be used as a tool for monitoring the distribution of oxyresveratrol in the internal organs of experimental animals.

The second project aimed to investigate the ability of oxyresveratrol to protect experimental animals from the toxicity of β -amyloid, the peptide responsible for the pathophysiology of Alzheimer's disease. The Morris water maze model was used. The animals consist of 8 groups of 10 ICR male mice. The first group contained normal animals, and the second was the control. The animals in the next three groups received unformulated oxyresveratrol (in the form of suspension in water) orally once a day at the dose of 90, 180 and 360 mg/kg, respectively, for 7 days. The last three groups were given formulated oxyresveratrol (in the form of self-microemulsifying drug delivery system, SMEDDS) at the daily oral dose of 90, 180 and 360 mg/kg, respectively, in a similar manner. Then, neuronal damage was induced to the animals by intracerebroventricular injection with amyloid- β_{25-35} , and the oxyresveratrol feeding was continued for another 7 days. After 5 days of training (to locate the hidden platform), the animals were subjected to the probe test. The animal behaviors were observed, and the latency times were recorded. After sacrifice, the hippocampus were removed and analyzed for lipid peroxidation and histological changes. The results showed that 360 mg/kg unformulated oxyresveratrol, as well as oxyresveratrol in SMEDDS at all doses, showed significant preventive activity as compared with the untreated control ($p < 0.05$ - $p < 0.0001$). Regarding the lipid peroxidation in the hippocampus, oxyresveratrol in SMEDDS at all doses caused significant reduction of the oxidative reaction (down to 64 – 74 %) when compared with the treated control ($p < 0.01$ - $p < 0.005$), whereas the unformulated oxyresveratrol (at all doses) did not show observable effects. Examination of the hippocampus tissues revealed that unformulated oxyresveratrol at the 90 and 180 mg/kg could not protect the neurons from death caused by β -amyloid, but at a higher dose (360 mg/kg) it demonstrated significant neuroprotective activity as compared with the untreated control ($p < 0.0001$). Oxyresveratrol in SMEDDS at all doses could similarly prevent damage induced by the toxic peptide. All of these observations indicate the potential application of oxyresveratrol as a neuroprotectant against Alzheimer's disease. From the data in this study, it could be speculated that the SMEDDS formulation

could enhance the neuroprotective activity of oxyresveratrol by increasing the bioavailability and blood-brain-barrier permeability of the compound.