



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของสารสกัดต้นหม่อนต่อการอักเสบและการปวดที่เกิดจากข้อเข่าเสื่อมในหนู

โดย

ดร.วรินกาญจน์ เหมสถาปัติย์ และคณะ

กรกฎาคม พ.ศ. 2556

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของสารสกัดต้นหม่อนต่อการอักเสบและการปวดที่เกิดจากข้อเข่าเสื่อมในหนู

คณะผู้วิจัย

- | | |
|-----------------------------------|---|
| 1. ผศ. ดร.วรินกาญจน์ เหมสถาปัตย์ | ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 2. รศ. ดร.ทัศนาศรี พิทักษ์ศรีพงษ์ | ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร |

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ: ผลของสารสกัดต้นหม่อนต่อการอักเสบและการปวดที่เกิดจากข้อเข่าเสื่อมในหนู

(Effect of *Morus alba* L. extract on inflammation and pain associated with osteoarthritis in rats)

ชื่อหัวหน้าโครงการ: วรินกาญจน์ เหมสถาปัตย์, Ph.D.

Keywords: Osteoarthritis, *Morus alba* L., knee joint pain, anterior cruciate ligament transection, glucosamine

บทคัดย่อ

โรคข้อเสื่อมอักเสบ (Osteoarthritis, OA) เป็นโรคข้อที่พบได้บ่อยโดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณข้อต่อซินโนเวียล (Synovial joint) อาการแสดงที่เด่นชัดในผู้ป่วยเหล่านี้คืออาการปวดเข่าซึ่งเป็นอุปสรรคอย่างยิ่งต่อการเคลื่อนไหว โดยเฉพาะในผู้สูงอายุ การรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมในปัจจุบันนิยมใช้ยาในกลุ่มสเตียรอยด์และ ยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์เพื่อบรรเทาอาการปวด แต่ยาเหล่านี้มีผลข้างเคียงอย่างมาก ดังนั้นการศึกษาวิจัยเพื่อให้ได้ยาที่เป็นทางเลือกใหม่ซึ่งมีผลข้างเคียงน้อยกว่ายาที่มีใช้อยู่ในปัจจุบันจึงมีความจำเป็นอย่างมาก *Morus alba* L. หรือต้นหม่อนได้มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศจีน โดยนำมาเป็นส่วนประกอบในตำรับยาจีนโบราณ ในประเทศไทยมีการปลูกเพื่อใช้ใบในการเลี้ยงหนอนไหม มีการศึกษาพบว่าต้นหม่อนมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

แม้ว่าจะมีหลายการศึกษาที่รายงานผลต้านการอักเสบของต้นหม่อน แต่ศักยภาพในการลดอาการปวดและฤทธิ์ในการชะลอความเสื่อมของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนอันเนื่องมาจากโรคข้อเสื่อมอักเสบยังไม่มีการศึกษา ดังนั้นการวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากโคนต้นหม่อนต่ออาการปวดและฤทธิ์ในการชะลอความเสื่อมของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่เกิดจากข้อเข่าเสื่อม โดยการศึกษาเริ่มจากการเตรียมสารสกัดโคนต้นหม่อน และวิเคราะห์หาปริมาณสารออกซิเรเซอร์ราทรอลในสารสกัดโคนต้นหม่อนที่เตรียมได้ ก่อนนำไปศึกษาฤทธิ์ในการลดอาการปวดและชะลอความเสื่อมของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนอันเนื่องมาจากโรคข้อเสื่อม ในหนูขาวเพศผู้ พันธุ์ Wistar ซึ่งถูกชักนำให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อมโดยการตัดเส้นเอ็นที่มีชื่อว่า anterior cruciate ligament (ACL) และติดตามประเมินอาการปวดที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่องมือที่วัดการลงน้ำหนักที่เท้าหลังของหนู ที่เรียกว่า hind limb weight bearing tester นอกจากนี้ยังประเมินฤทธิ์ในการชะลอความเสื่อมของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนนั้นใช้วิธีการวิเคราะห์แบบ Mankin's grading ผลการวิจัยนี้พบว่า สารสกัดโคนต้นหม่อนที่เตรียมได้มีปริมาณออกซิเรเซอร์ราทรอล เท่ากับร้อยละ 17.86 ฤทธิ์บรรเทาอาการปวดในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดข้อเสื่อมได้เทียบเท่ากับกลูโคซามีน นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดนี้ยังมีฤทธิ์ในการชะลอความเสื่อมของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน ในการวิจัยนี้ยังศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากโคนต้นหม่อน โดยใช้วิธีการประเมินหลายวิธี จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดนี้แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในทุกวิธีการทดสอบที่ใช้ประเมิน

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาครั้งแรกที่แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ของสารสกัดจากโคนต้นหม่อนต่อการบรรเทาอาการปวดและชะลอความเสื่อมของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดข้อเสื่อม ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวนี้อาจจะเป็นผลมาจากการที่สารสกัดนี้มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ แต่อย่างไรก็ดียังคงมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปถึงกลไกของสารที่ออกฤทธิ์ในสารสกัดนี้

Abstract

Osteoarthritis (OA) is a common disorder of the synovial joint. Knee pain is a predominant clinical symptom that causes disability, especially in the elderly. It is typically worse with weight bearing and activities resulting in the loss of the patient's quality of life. The current medications used for OA, such as steroids and NSAIDs, cause serious side-effects. Therefore, alternative medicines that offer a superior safety profile are required. *Morus alba* L. (Mulberry tree) has long been widely used in traditional Chinese medicines. It has been reported to have various pharmacological properties including anti-inflammatory and anti-oxidant activities. Although a number of studies have reported the anti-inflammatory effects of *M. alba* L., its potential for treating pain associated with OA and the ability to delay the progression of the disease has not been explored. Thus, this study was designed to investigate whether *M. alba* L. stem extract can attenuate pain-related behavior and delay the progression of the disease in a rat model of OA. OA was induced in male Wistar rats by anterior cruciate ligament transection (ACLT). The pain-related behavior was determined using a hind limb weight bearing tester. The severity of the knee joints cartilage damage was determined using Mankin's scoring system. Moreover, the antioxidant capacities of the plant extract were also determined by using several *in vitro* antioxidant assay systems to determine whether the efficacy of this plant could be attributed due to its antioxidant effects. *M. alba* L. extract significantly attenuated joint pain in a dose-dependent manner and its effect at the highest dose appears to be comparable with glucosamine. An improvement in the Mankin score was observed in the group of rats that were treated with this extract, suggesting that this extract could delay the progression of the disease and may be used as a disease-modifying OA drug (DMOAD). In addition, the extract exhibited the positive scavenging activities in all the antioxidant assays, suggesting its antioxidant capacity.

This study is the first to demonstrate that *M. alba* L. extract can attenuate pain associated with OA and delay the progression of the disease in a rat model of OA. Based on this finding, it suggests that the anti-oxidative effect of *M. alba* L. stem extract may be involved and responsible for its effects. However, further study is required to fully define the precise mechanisms involved.

Executive Summary

โรคข้อเสื่อม (Osteoarthritis, OA) เป็นโรคข้อที่พบได้บ่อยโดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้สูงอายุ อาการแสดงที่เด่นชัดของโรคนี้ คือ การปวดตามข้อ โดยเฉพาะข้อที่ทำหน้าที่รับน้ำหนัก วิธีในการบรรเทาอาการปวดหรือการอักเสบมักจะใช้การรับประทานยา เช่น สเตอรอยด์ (steroids) หรือยาระงับปวด และต้านอักเสบที่ไม่ใช่กลุ่ม สเตอรอยด์ (Non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) ซึ่งยาในกลุ่มดังกล่าว เป็นยาที่มีผลข้างเคียงอย่างมาก ดังนั้นการศึกษาวิจัยเพื่อให้ได้ยาที่มีผลข้างเคียงน้อยจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า สารสกัดที่เตรียมได้จากส่วนต่างๆของต้นหม่อน (*Morus alba* L.) มีสารออกซีเรสเวอรัราทรอล (oxyresveratrol) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ดี แม้ว่าจะมีหลายการศึกษาที่รายงานผลต้านการอักเสบของสารสกัดจากต้นหม่อน แต่ศักยภาพในการลดอาการปวดอันและฤทธิ์ในการชะลอความเสื่อมของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนอันเนื่องมาจากโรคข้อเสื่อมอักเสบยังไม่มีการศึกษา นอกจากนี้ยังพบว่าสาร ออกซีเรสเวอรัราทรอล มีปริมาณมากในสารสกัดที่ได้จากส่วนที่เป็นกิ่งและโคนของต้นหม่อนเมื่อเทียบกับส่วนที่เป็นใบ ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่ต้องการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากโคนต้นหม่อนต่ออาการปวดและฤทธิ์ในการชะลอความเสื่อมของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่เกิดจากข้อเข่าเสื่อมในหนูทดลองซึ่งถูกชักนำให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อม

งานวิจัยนี้แบ่งเป็นสามส่วน โดยมีวัตถุประสงค์หลักดังนี้

1. เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกซีเรสเวอรัราทรอล ในสารสกัดโคนต้นหม่อนที่เตรียมได้
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากโคนต้นหม่อนที่เตรียมได้ ว่าสามารถลดอาการปวดและชะลอความเสื่อมของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนอันเนื่องมาจากโรคข้อเสื่อมในหนูได้หรือไม่
3. เพื่อทดสอบฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้จากต้นหม่อนที่เตรียมได้

การทดลองในส่วนที่ 1 การทดลองในส่วนแรกนี้เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณออกซีเรสเวอรัราทรอลจากการสกัดโคนต้นหม่อนที่เตรียมขึ้น ซึ่งผลที่ได้คือ ได้สารสกัดที่มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลเข้ม โดยมีปริมาณออกซีเรสเวอรัราทรอล เท่ากับร้อยละ 17.86

การทดลองในส่วนที่ 2 การทดลองในส่วนนี้จะเริ่มจากการสร้างแบบจำลองของโรคข้อเสื่อมในหนู โดยที่หนูถูกชักนำให้เป็นโรคข้อเสื่อมด้วยการตัดเส้นเอ็นที่เข่าที่มีชื่อว่า anterior cruciate ligament (ACL) หลังจากนั้นจะเป็นการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากโคนต้นหม่อนที่เตรียมได้จากการทดลองที่ 1 ว่าสามารถลดอาการปวดและชะลอความเสื่อมของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนอันเนื่องมาจากโรคข้อเสื่อมในหนูได้หรือไม่ ผลการศึกษาพบว่าการสร้างแบบจำลองโรคข้อเสื่อมในหนูสามารถทำได้ โดยพบว่าหนูมี

อาการปวดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Naïve and Sham group) ที่สัปดาห์ที่ 5 ภายหลังการชักทำให้เกิดข้อเข่าเสื่อม และนอกจากนี้ ระดับของอาการปวดจะเริ่มคงที่ในสัปดาห์ที่ 5 หลังการผ่าตัดและคงอยู่ในระดับนี้ตลอดการทดลอง ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับการทดลองในหนูที่ได้ตีพิมพ์ก่อนหน้านี้ (Wen et al., 2010) ผลการวิเคราะห์ทางจุลพยาธิวิทยาโดยวิธี Mankin's grading ให้ผลที่สอดคล้องกับผลการประเมินอาการปวดในหนูทดลองกลุ่มเดียวกัน โดยจะเห็นได้ว่าอาการปวดเกิดขึ้นในขณะที่มีการเสื่อมของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน อย่างไรก็ตาม อย่างไรก็ดี ในการศึกษาที่ไม่สามารถบอกได้ว่าเหตุการณ์ใดเกิดขึ้นก่อนกัน นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ยังได้ศึกษาผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนต่ออาการปวดโดยใช้แบบจำลองดังกล่าว จากผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากโคนต้นหม่อนมีฤทธิ์บรรเทาอาการปวดจากข้อเข่าเสื่อมในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดข้อเสื่อม ได้คล้ายคลึงกับกลูโคซามีน นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดนี้ยังมีฤทธิ์ในการชะลอความเสื่อมของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน

การทดลองในส่วนที่ 3 การทดลองในส่วนนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโคนต้นหม่อนและออกซีเรสเวอราทรอล ซึ่งเป็นสารสำคัญที่พบในสารสกัดนี้ โดยใช้วิธีการประเมินหลายวิธี เช่น DPPH radical scavenging, hydroxyl radical scavenging, nitric oxide radical scavenging, superoxide radical scavenging และ ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดโคนต้นหม่อนแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในทุกวิธีการทดสอบที่ใช้ประเมิน ดังนั้นอาจจะกล่าวได้ว่าสารสกัดโคนต้นหม่อนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้โดยอาศัยจากหลายกลไก โดยกลไกที่สำคัญคือ การกำจัดอนุมูลอิสระ (radical scavenging activity) และ ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยารีดักชัน (reducing activity)

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาครั้งแรกที่แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ของสารสกัดจากโคนต้นหม่อนต่อการบรรเทาอาการปวดและชะลอความเสื่อมของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดข้อเสื่อม ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวนี้อาจจะเป็นผลมาจากการที่สารสกัดนี้มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ แต่อย่างไรก็ดี ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปถึงกลไกของสารที่ออกฤทธิ์ในสารสกัดนี้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	i
สรุป (Executive Summary)	iii
สารบัญตาราง	vii
สารบัญรูป	viii
ตัวย่อที่ใช้ในงานวิจัย	x
เนื้อหาในงานวิจัย	
I บทนำ	1
II วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
III การทดลอง	
การทดลองส่วนที่ 1	
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
วิธีดำเนินการศึกษา	4
ผลการศึกษา	7
สรุปผลการศึกษาในส่วนที่ 1	10
การทดลองส่วนที่ 2:	
ส่วนที่ 2.1	
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	11
วิธีดำเนินการศึกษา	11
ผลการศึกษา	15
สรุปผลการศึกษาในส่วนที่ 2.1	18
ส่วนที่ 2.2	
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	19
วิธีดำเนินการศึกษา	19
ผลการศึกษา	20

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
สรุปผลการศึกษาในส่วนที่ 2.2	26
การทดลองส่วนที่ 3:	
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	27
วิธีดำเนินการศึกษา	27
ผลการศึกษา	31
สรุปผลการศึกษาในส่วนที่ 3	34
IV บรรณานุกรม (References)	35
ผลงานจากโครงการ (Output)	38

ภาคผนวก (Appendix)

เอกสารที่ 1 Effect of *Morus alba* L. Extract on pain associated with osteoarthritis in rats. Thai J Pharmacol, 2012; 34(1), 121-25.

เอกสารที่ 2 Evaluation of *in vitro* Antioxidant Activity of *Morus alba* L. Stem Extract. Abstract#F17. Proceeding of the 35th Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand Meeting 20-22 March 2013.

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 การให้คะแนนชั้นเนื้อในการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา	14
3.1 ปริมาณ Total phenolic content และ total flavonoid content ของสารสกัดจากโคนต้นหม่อน	31
3.2 ค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน สารสกัดโคนต้นหม่อน และ ออกซีเรสเวอราทรอล โดยใช้วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบต่างๆ	31
3.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโคนต้นหม่อน และ ออกซีเรสเวอราทรอล เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH radical ($DPPH^{\circ}$) scavenging, hydroxyl radical (HO°) scavenging, superoxide radical ($O_2^{\circ-}$) scavenging และ nitric oxide radical ($^{\circ}NO$) scavenging เทียบกับสารมาตรฐาน	34

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตของออกซีเรสเวอรัราทรอล ที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อเมทานอล 1 มิลลิลิตร	7
1.2 ^1H NMR spectrum of ออกซีเรสเวอรัราทรอล (2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene)	8
1.3 กราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของ ออกซีเรสเวอรัราทรอล ที่ความเข้มข้นในช่วง 0.0005 - 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า R^2 เท่ากับ 1.0000 และสมการที่ได้ คือ $y = 84,160,996.2682x - 21,353.4504$	9
2.1 Incapacitance tester (Hind paw weight bearing tester)	12
2.2 การเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักที่ขาหลังทั้งสองข้างของหนูปกติ (Naïve), ในหนูที่ได้รับการผ่าตัดโดยไม่ตัดเส้นเอ็น (Sham) และในหนูที่ผ่าตัดและชักนำให้เกิดอาการปวดเนื่องจากข้อเข่าเสื่อม โดยวิธีการตัดเส้นเอ็นที่มีชื่อเรียกว่า anterior cruciate ligament (anterior cruciate ligament transaction) (ACLT)	16
2.3 การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่ข้อเข่าของหนูปกติ (Naïve), หนูที่ได้รับการผ่าตัดโดยไม่ตัดเส้นเอ็น (Sham) และในหนูที่ผ่าตัดและชักนำให้เกิดอาการปวดเนื่องจากข้อเข่าเสื่อม	17
2.4 ผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนและกลูโคซามีนต่อการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักที่ทิ้งลงบนขาหลังในหนูที่ถูกชักนำให้เกิดอาการปวดเนื่องจากข้อเข่าเสื่อม	22
2.5 การเปลี่ยนแปลงของค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวของหนูทดลองในแต่ละกลุ่ม	23
2.6 ภาพตัวอย่างจากผลทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของข้อเข่าของหนูที่ถูกชักนำให้ข้อเข่าเสื่อมเป็นเวลา 12 สัปดาห์โดยการย้อมด้วย safranin-O/fast green	24
2.7 Mankin score ของเนื้อเยื่อข้อเข่าของหนูในกลุ่มที่ 1, 3 และ 6	25

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
3.1 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของ (A) trolox และ (B) สารสกัด โคนต้นหม่อน โดยวิธี DPPH radical scavenging	32
3.2 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของ (A) trolox และ (B) สารสกัด โคนต้นหม่อน โดยวิธี HO° scavenging activity (A) DPPH radical scavenging	32
3.3 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของ (A) trolox และ (B) สารสกัด โคนต้นหม่อน โดยวิธี O ₂ ^{•-} scavenging activity	32
3.4 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด โคนต้นหม่อน โดยวิธี °NO scavenging	33

ตัวย่อที่ใช้ในงานวิจัย

ACL	Anterior cruciate ligament
ACLT	Anterior cruciate ligament transection
AlCl ₃	Aluminum chloride
ANOVA	Analysis of variance
AUC	Area under the curve
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
DMOAD	Disease-modifying OA drug
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FC	Folin–Ciocalteu
FeSO ₄ ·7H ₂ O	Ferrous Sulfate Heptahydrate
FRAP	Ferric ion reducing antioxidant power
g	Gram
GA	Gallic acid
GAE	Gallic acid equivalents
g/kg	Gram per kilogram
H&E	Hematoxylin & Eosin
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
H ₃ PO ₄	Phosphoric acid
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IL-1β	Interleukin-1 beta
IL-6	Interleukin-6
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
kg	Kilogram
mg	Milligram
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMPs	Matrix metalloproteinases
<i>M. alba</i> L.	<i>Morus alba</i> Linn

ตัวย่อที่ใช้ในงานวิจัย (ต่อ)

NaCl	Sodium chloride
NaHCO ₃	Sodium hydrogen carbonate
NADPH	β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NBT	Nitro-blue tetrazolium
NBTH ^o	Tetrazoanyl radical
NED	Naphthylethylenediamine dihydrochloride
NaNO ₂	Sodium nitrite
nm	Nano meter
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
SNP	Sodium nitroprusside
NO ₂ ⁻	Nitrite ion
NO	Nitric oxide
NSAIDs	Non-steroidal anti-inflammatory drugs
OA	Osteoarthritis
HO ^o	Hydroxyl radical
O ₂ ^{o-}	Superoxide anion radical
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
QU	Quercetin
QUE	Quercetin equivalents
RAW 264.7	Mouse leukaemic monocyte macrophage cell line
SEM	Standard error of the mean
SOD	Superoxide dismutase
TBA	Thiobarbituric acid
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TCA	Trichloroacetic acid
TE	Trolox equivalent
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
TNB	5-thio-2-nitrobenzoic acid
TNF- α	Tumor necrosis factor - alpha

ตัวย่อที่ใช้ในงานวิจัย (ต่อ)

UV	Ultraviolet
wk	Week
°C	Degree Celsius
µl	Microliter

บทนำ

โรคข้อเสื่อม (Osteoarthritis, OA) เป็นโรคข้อที่พบได้บ่อยโดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้สูงอายุ อาการแสดงที่เด่นชัดในผู้ป่วยเหล่านี้คืออาการปวดตามข้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้อที่ทำหน้าที่รับน้ำหนัก ยกตัวอย่างเช่น ข้อเข่า ข้อบริเวณสะโพก เป็นต้น (Bove et al., 2009) ซึ่งอาการปวดนี้จะเพิ่มอุปสรรคอย่างยิ่งต่อการเคลื่อนไหวและการทำกิจวัตรประจำวันของผู้ป่วย ยาที่นิยมใช้ในปัจจุบันเพื่อบรรเทาอาการปวดข้อ ได้แก่ ยาในกลุ่มสเตียรอยด์ และยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ แต่เนื่องจากยาในกลุ่มนี้มีผลข้างเคียงอย่างมาก ดังนั้นการศึกษาวิจัยเพื่อให้ได้ยาที่เป็นทางเลือกใหม่ซึ่งมีผลข้างเคียงน้อยกว่ายาที่มีใช้อยู่ในปัจจุบันจึงมีความจำเป็นอย่างมาก

ถึงแม้ว่าโรคข้อเสื่อมจะถูกจัดอยู่ในโรคข้อที่ไม่มีอาการอักเสบ แต่การศึกษาจำนวนมากเชื่อว่ากระบวนการอักเสบน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องอย่างมากต่อการเสื่อมของกระดูกอ่อนที่บริเวณข้อในคนไข้ที่เป็นโรคข้อเสื่อม (Allen et al., 2010) สารสื่อกลางที่ทำให้เกิดการอักเสบ (pro-inflammatory mediators) จำนวนมากถูกสร้างขึ้นจากเซลล์เยื่อข้อ (synoviocytes) และเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocytes) ยกตัวอย่างเช่น prostaglandin E₂ (PGE₂), nitric oxide (NO) and สารไซโตไคน์ที่เรียกว่า proinflammatory cytokines ได้แก่ interleukin-1 beta (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) และ tumor necrosis factor- α (TNF- α) (Fernandes et al., 2002) มีการศึกษาพบว่า ในผู้ป่วยที่เป็นโรคข้อเสื่อม สารสื่อกลางที่ทำให้เกิดการอักเสบถูกกระตุ้นให้มีการสร้างมากขึ้นส่งผลทำให้เกิดภาวะไม่สมดุลระหว่างกระบวนการสร้างและกระบวนการทำลายของกระดูกอ่อน (Amin et al., 2000, Heinecke et al., 2010) โดยสารสื่อกลางเหล่านี้ไปมีผลทำให้มีการ up-regulate ของเอนไซม์ proteinases ซึ่งมีความสำคัญเกี่ยวข้องในการทำลายกระดูกอ่อนของข้อ คือ matrix metalloproteinases (MMPs) (Amin et al., 2000, Fernandes et al., 2002, Heinecke et al., 2010) นอกจากนี้ยังมีการรายงานที่ NO และ PGE₂ มีส่วนเกี่ยวข้องทำให้เกิดอาการปวดที่ข้อในผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม เนื่องจากสารเหล่านี้จะมีการสร้างมากขึ้นซึ่งส่งผลทำให้ตัวรับรู้เกี่ยวกับความเจ็บปวด (nociceptor) มีความไวต่อสิ่งเร้ามากกว่าปกติ (hyperalgesia) (Schaible et al., 2002, Moon et al., 2010)

ในประเทศจีน *Morus alba* L. หรือต้นหม่อนได้ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยนำมาเป็นส่วนประกอบในตำรายาจีนโบราณ มีการศึกษาพบว่าต้นหม่อนมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย เช่น ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งฤทธิ์ต้านการอักเสบ มีรายงานว่า สารสกัดจากต้นหม่อนสามารถลดการสร้างสารสื่อกลางของการอักเสบ (Inflammatory mediators) เช่น NO และ PGE₂ (Choi and Hwang, 2005) ผลจากการวิจัยที่ผ่านมา พบว่า ออกซิเรสเวอรัลทรอล

(oxyresveratrol) ซึ่งสกัดได้จากเปลือกกรากของต้นหม่อนมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ (Chung et al., 2003) แม้ว่าจะมีหลายการศึกษาที่รายงานผลด้านการอักเสบของต้นหม่อน แต่ศักยภาพในการลดอาการปวดและฤทธิ์ในการชะลอการเสื่อมของกระดูกอ่อนในโรคข้อเสื่อมอักเสบยังไม่มีการศึกษา นอกจากนี้ จากผลการวิจัยก่อนหน้านี้ ยังพบว่าสาร ออกซีเรสเวอรัราทรอล มีปริมาณมากในสารสกัดที่ได้จากส่วนที่เป็นกิ่งและลำต้นของต้นหม่อนเมื่อเทียบกับส่วนที่เป็นใบ (Thongsuk, 2007) ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากโคนต้นหม่อนในการลดอาการปวดและชะลอการเสื่อมของกระดูกอ่อนที่เกิดจากข้อเข่าเสื่อมในหนูทดลองซึ่งถูกชักนำให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อม โดยการตัดเส้นเอ็นที่มีชื่อว่า anterior cruciate ligament (ACL)

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อเตรียมสารสกัดโคนต้นหม่อนและวิเคราะห์หาปริมาณสารออกซิเรสเวอรัรราทรอลในสารสกัดที่เตรียมได้
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากโคนต้นหม่อนที่เตรียมได้ ว่าสามารถลดอาการปวดและชะลอความเสื่อมของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนอันเนื่องมาจากโรคข้อเสื่อมในหนูได้หรือไม่
3. เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้จากต้นหม่อนที่เตรียมได้

การทดลอง

การทดลองส่วนที่ 1: การเตรียมสารสกัดโคนต้นหม่อน และการวิเคราะห์หาปริมาณออกซีเรสเวอรัราทรอลด้วยวิธี HPLC

เพื่อเตรียมสารสกัดโคนต้นหม่อน และวิเคราะห์หาปริมาณสาร ออกซีเรสเวอรัราทรอลในสารสกัดโคนต้นหม่อนที่เตรียมได้

วิธีการดำเนินการศึกษา

ตัวอย่างพืช (Plant materials)

ตัวอย่างพืชที่ใช้เป็นโคนต้นหม่อน พันธุ์บุรีรัมย์ 60 อายุประมาณ 15 ปี ได้รับความอนุเคราะห์จากแปลงหม่อนของศูนย์หม่อนไหมแห่งชาติเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ จังหวัดตาก

การเตรียมสารสกัดโคนต้นหม่อน (Preparation of mulberry stem extract)

ทำการลอกเปลือกโคนต้นหม่อนชั้นนอกออกให้เหลือแต่เนื้อไม้ (สีเหลือง) จากนั้นหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ และนำไปอบในตู้อบ (Memmert®, Germany) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน จนแห้ง นำหม่อนที่อบแห้งแล้วมาบดให้เป็นผงโดยใช้เครื่องบดสมุนไพร ก่อนนำไปหมักสกัด (maceration) ด้วย 80% เอทานอล จำนวน 2 รอบ รอบแรก 2 วัน และรอบที่สอง 3 วัน นำน้ำยาส่วนใสที่เก็บได้ทั้ง 2 รอบ ไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 และนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator (Buchi B-171 Vacobox, Switzerland) และนำไประเหยแห้งต่อบน water bath จากนั้นนำสารสกัดมาบดจนเป็นผง

การคำนวณหาร้อยละของผลผลิต (Determination of percentage yield)

ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบ (crude extract) ที่ได้ และคำนวณหาร้อยละของผลผลิต (% yield) จากสมการ

$$\text{ร้อยละของผลผลิต} = \left(\frac{\text{น้ำหนักของสารสกัด}}{\text{น้ำหนักของพืชสด}} \right) \times 100$$

การสกัดแยกสารออกซีเรสเวอรัราทรอล (Isolation of oxyresveratrol)

การสกัดแยกออกซีเรสเวอรัราทรอลจากสารสกัดน้ำของแก่นปวกหาด (*Artocarpus lakoocha*) ทำโดยนำผงปวกหาดมาละลายด้วยเมทานอลปริมาณเล็กน้อย และผสมด้วย silica gel 60 (No.

7734, particle size 0.063 – 0.200 mm) และทำให้แห้งภายใต้ความดัน จากนั้นนำไปสกัดแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีชนิดเร็ว (quick column chromatography) และใช้ส่วนผสมของคลอโรฟอร์มและเมทานอลที่มี polarity gradient ที่ต่างกันเป็นตัวทำละลายในวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยส่วน (fraction) ที่ 1-2 ใช้คลอโรฟอร์มต่อเมทานอล 95:5 และส่วน (fraction) ที่ 3-25 ใช้คลอโรฟอร์มต่อเมทานอล 90:10 นำสารที่ผ่านคอลัมน์ออกมาแต่ละส่วน (fraction) มาศึกษารูปแบบของ fingerprint โดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) โดยใช้เมทานอลในคลอโรฟอร์มความเข้มข้นร้อยละ 15 โดยปริมาตร เป็นตัวทำละลายที่พัฒนาแถบ (developing solvent) นำส่วนที่มี fingerprint ที่คล้ายกันมารวมกัน และนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยวิธี gel filtration chromatography โดยใช้ Sephadex LH-20 และเมทานอล เก็บสารที่ผ่านคอลัมน์ส่วน (fraction) ละ 20 มิลลิลิตร ศึกษารูปแบบของ fingerprint โดยวิธี TLC อีกครั้ง fraction ที่แสดง spot เดียวภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จะนำมารวมกัน และระเหยให้แห้งภายใต้สุญญากาศ ก่อนนำไปพิสูจน์โครงสร้างด้วยวิธี Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectra

การวิเคราะห์หาออกซีเรสเวอรัราทรอลในสารสกัดโคนต้นหม่อนโดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Determination of oxyresveratrol in stem mulberry extract by High Pressure Liquid Chromatography)

สภาวะการทดลอง ดังนี้

- Mobile phase ที่ใช้คือ Acetonitrile: 0.05 M KH_2PO_4 , 1 : 3, pH 3
- อัตราการไหลของ mobile phase คือ 1 ml/min
- คอลัมน์ที่ใช้ คือ C-18 Reverse phase HPLC column (Gemini, 5 μm C18, 150 x 4.60 mm, Phenomenex, USA)
- อุณหภูมิของ column oven คือ 30 องศาเซลเซียส

การเตรียมกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของ ออกซีเรสเวอรัราทรอล

เตรียม stock standard โดยละลายออกซีเรสเวอรัราทรอล ในเอทานอลร้อยละ 80 โดยปริมาตรในความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.0005 - 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กรองสารละลายทั้งหมดด้วย 0.45 μm filter membrane ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

การวิเคราะห์ออกซีเรสเวอรัราทรอลในสารสกัดโคนต้นหม่อน

เตรียม stock solution ของสารสกัดโคนต้นหม่อน โดยละลายสารสกัดในเอทานอลร้อยละ 80 โดยปริมาตร ในความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารสกัดโคนต้นหม่อนให้มีความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กรองสารละลายทั้งหมดด้วย 0.45 μm filter membrane ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

ผลการศึกษา

ร้อยละของผลผลิต (Percentage yield)

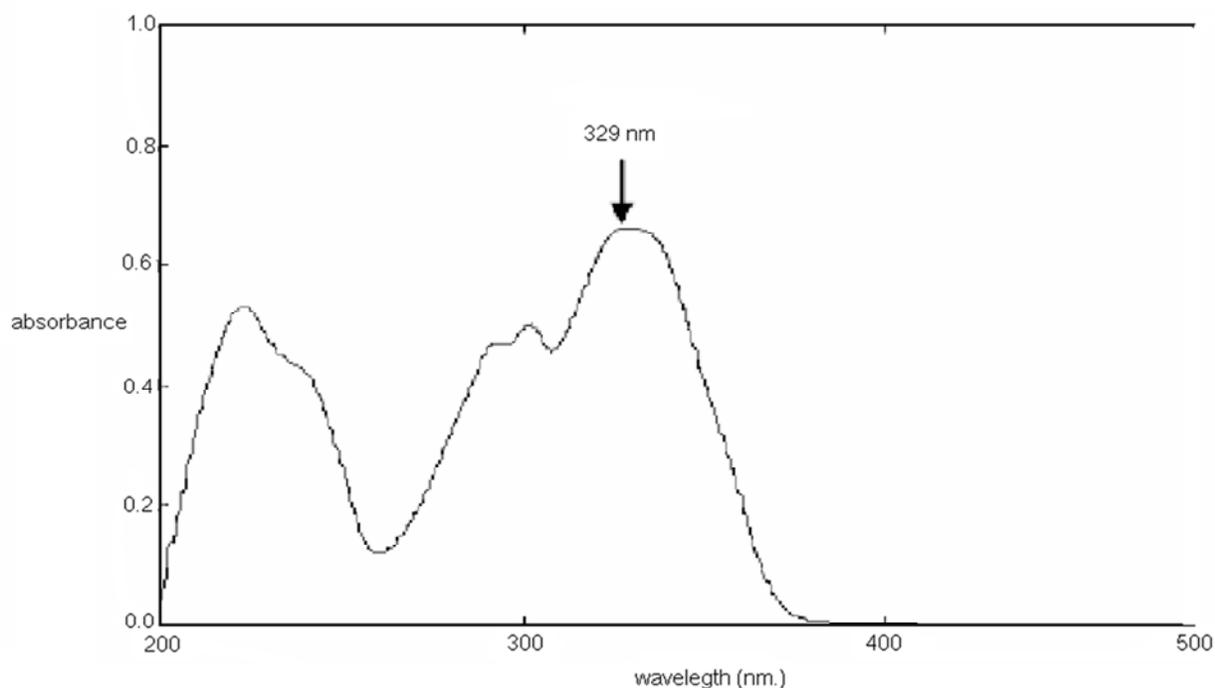
น้ำหนักของโคนหม่อนสด 3,700 กรัม

น้ำหนักของสารสกัด 190 กรัม

$$\begin{aligned} \text{ดังนั้น} \quad \text{Percentage yield} &= (190/3700) \times 100 \\ &= 5.13 \% \end{aligned}$$

การสกัดแยกสารออกซีเรสเวอรัราทรอล (Isolation of oxyresveratrol)

สารมาตรฐานออกซีเรสเวอรัราทรอล ที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้สกัดแยกจากผงปวกหาคัด ซึ่งเป็นส่วนที่ได้จากสารสกัดน้ำของแก่น *Artocarpus lakoocha* และนำมาแยกบริสุทธิ์ด้วย quick column chromatography ร่วมกับวิธีรังคเลขผิบบาง (Thin layer chromatography; TLC) จาก TLC นำ fraction ที่ 14 - 19 ซึ่งมี fingerprint ที่คล้ายกันมารวมกันซึ่งค่อนข้างมีสิ่งปนปลอมน้อยได้นำมารวมกัน และทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้ rotary evaporator และนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยวิธี gel filtration chromatography สารที่ได้มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน และ UV spectrum มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 329 นาโนเมตร (λ_{\max} 329 nm) รูปที่ 1.1

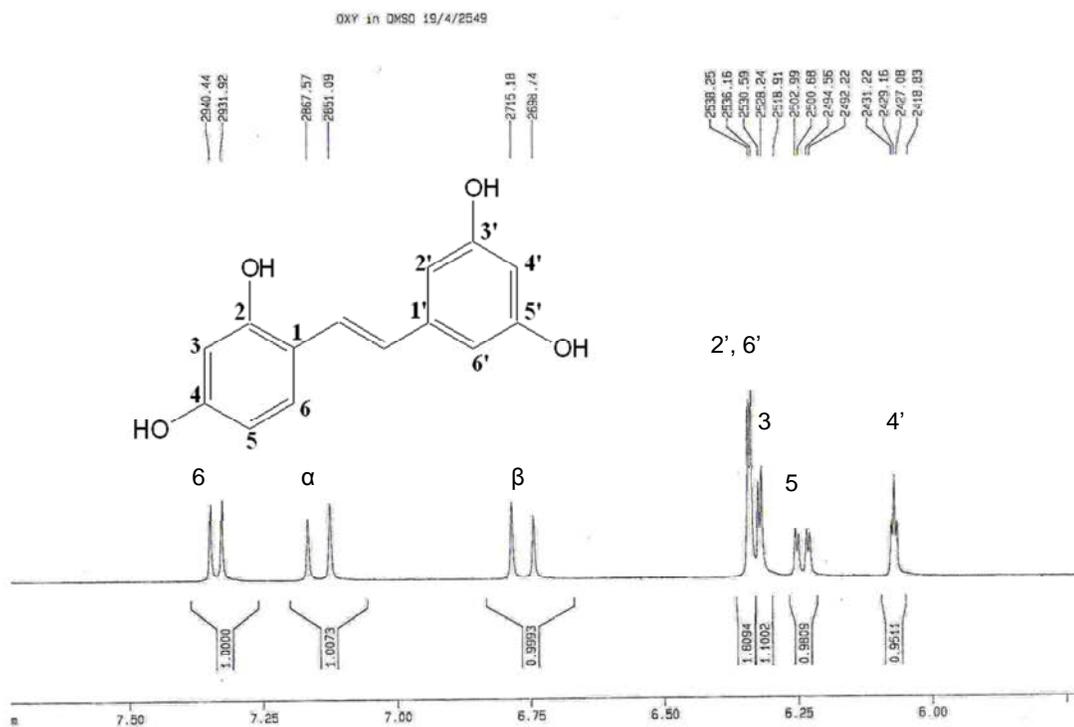


รูปที่ 1.1 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตของออกซีเรสเวอรัราทรอล ที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อเมทานอล 1 มิลลิลิตร

พิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมี

เมื่อสกัด ออกซีเรสเวอรัราทรอล จากปวกหาดได้สารบริสุทธิ์แล้ว นำสารที่ได้มาวิเคราะห์สูตรโครงสร้างทางเคมีด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance; NMR) ความถี่ 400 เมกะเฮิร์ตโดยใช้ deuterated dimethylsulfoxide เป็นตัวทำละลาย แสดงสัญญาณดังต่อไปนี้

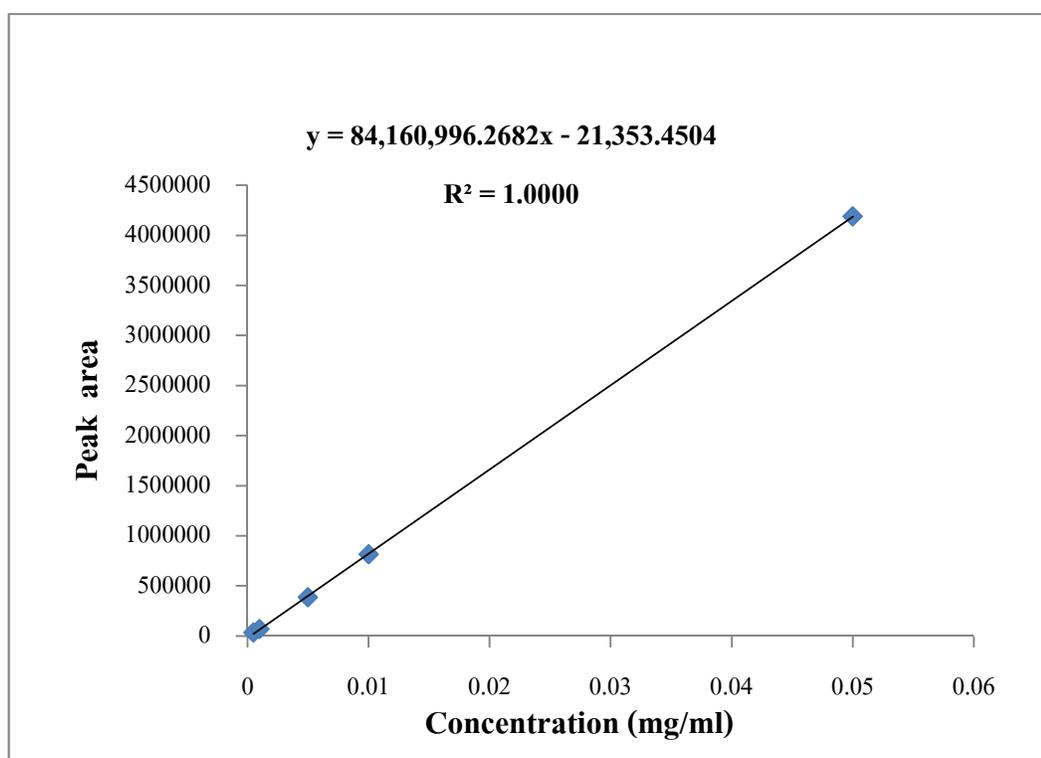
^1H NMR (400 MHz, DMSO): δ 6.07 (1H, t, H-4'), 6.24 (1H, dd, $J = 2.31, 2.34$ Hz, H-5), 6.32 (1H, d, $J = 2.35$ Hz, H-3), 6.34 (2H, d, $J = 2.09$ Hz, H-2' and H-6'), 6.77 (1H, d, $J = 16.44$ Hz, H- β), 7.15 (1H, d, $J = 16.48$ Hz, H- α), 7.34 (1H, d, $J = 8.52$ Hz, H-6) (รูปที่ 1.2) จาก ^1H NMR พบว่า โครงสร้างสอดคล้องกับ 2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene หรือ oxyresveratrol และสอดคล้องกับรายงานของ Sritularak (1998)



รูปที่ 1.2 ^1H NMR spectrum of ออกซีเรสเวอรัราทรอล (2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene)

**การวิเคราะห์หา ออกซีเรสเวอรัราทรอล ในสารสกัดโคนต้นหม่อนโดยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลว
สมรรถนะสูง (Determination of oxyresveratrol in stem mulberry extract by High Pressure Liquid
Chromatography)**

การทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของวิธีการวิเคราะห์หาออกซีเรสเวอรัราทรอล พบว่าได้
กราฟเส้นตรง โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, R^2) เท่ากับ 1 ดังแสดงในรูปที่
1.3 จากการวิเคราะห์หาปริมาณ ออกซีเรสเวอรัราทรอล ในสารสกัดจากโคนต้นหม่อน พบว่า สารสกัด
หม่อนมีปริมาณ ออกซีเรสเวอรัราทรอล เท่ากับ ร้อยละ 17.86



รูปที่ 1.3 กราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของ ออกซีเรสเวอรัราทรอล ที่ความเข้มข้นในช่วง 0.0005 -
0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า R^2 เท่ากับ 1.0000 และสมการที่ได้ คือ $y = 84,160,996.2682x - 21,353.4504$

สรุปผลการศึกษาใน ส่วนที่ 1

การดำเนินงานของโครงการในช่วง 6 เดือนแรก ได้ทำการเตรียมสารสกัดหยาบ (crude extract) จากโคนต้นหม่อนโดยวิธีการแช่หมัก (maceration) ด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 และได้ทำการแยกสารออกซีเรสเวอรัราทรอลจากปวกหาคเพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์หาปริมาณออกซีเรสเวอรัราทรอลในสารสกัดที่เตรียมขึ้น นอกจากนี้ยังได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณออกซีเรสเวอรัราทรอลจากการสกัดโคนต้นหม่อนที่เตรียมขึ้น และผลที่ได้คือ ได้สารสกัดที่มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลเข้ม โดยมีปริมาณออกซีเรสเวอรัราทรอล เท่ากับ ร้อยละ 17.86

การทดลองส่วนที่ 2

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดที่ได้จากโคนต้นหม่อนในการลดอาการปวดและชะลอการดำเนินของโรคข้อเสื่อมในหนู

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดที่ได้จากโคนต้นหม่อนที่เตรียมได้ ว่าสามารถลดอาการปวดและชะลอการดำเนินของโรคข้อเสื่อมในหนูได้หรือไม่

การทดลองในส่วนที่ 2 เป็นการศึกษาในสัตว์ทดลอง ซึ่งแบ่งการวิจัยออกเป็นสองส่วนย่อย ดังนี้
การทดลองส่วนที่ 2.1

การศึกษาการดำเนินของโรคข้อเสื่อมโดยการประเมินอาการปวดและพยาธิสภาพที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากการชักนำให้เกิดข้อเข่าเสื่อมในแบบจำลองหนู

วิธีการดำเนินการศึกษา

สัตว์ทดลอง

หนูขาว Wistar เพศผู้ อายุ 5 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 140-160 กรัม ถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มได้แก่

- กลุ่มที่ 1 Naïve (n=6)
- กลุ่มที่ 2 Sham (n=7)
- กลุ่มที่ 3 OA-15 weeks (n=12)
- กลุ่มที่ 4 OA-6 weeks (n = 6)

หนูกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้มีการกระทำใดๆ ส่วนหนูในกลุ่มที่ 2 - 4 เป็นกลุ่มที่ได้รับการผ่าตัดโดยที่หนูกลุ่มที่ 2 ได้รับการผ่าตัดเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 3 และ 4 ยกเว้นแต่เส้นเอ็นที่เรียกว่า anterior cruciate ligament (ACL) จะไม่ถูกตัดออก ในขณะที่หนูในกลุ่มที่ 3 และ 4 ได้รับการผ่าตัดและเส้นเอ็นชนิดนี้ถูกตัดออกเพื่อชักนำให้เกิดอาการปวดเนื่องจากข้อเข่าเสื่อม และการประเมินอาการปวดได้ทำการศึกษาเฉพาะในหนูกลุ่มที่ 1-3 ส่วนการประเมินพยาธิสภาพทำการศึกษาในหนูทั้ง 4 กลุ่ม โดยหนูในกลุ่มที่ 1-3 ได้รับการประเมินพยาธิสภาพหลังถูกเมตตาฆาต (euthanized) ในสัปดาห์ที่ 15 ส่วนหนูกลุ่มที่ 4 ได้รับการประเมินพยาธิสภาพหลังถูกเมตตาฆาตในสัปดาห์ที่ 6 โดยการประเมินอาการปวดและพยาธิสภาพได้ดำเนินการดังนี้

การประเมินอาการปวด

ก่อนการผ่าตัดเพื่อชักนำให้เกิดข้อเข่าเสื่อม หนูทุกตัวจะถูกวัดค่าพื้นฐาน (baseline) ของการลงน้ำหนักที่เท้าหลังของหนูทั้งสองข้างโดยเครื่องมือที่เรียกว่า hind limb weight bearing tester หรือ incapacitance tester (รูปที่ 2.1) หลังจากการวัดค่าพื้นฐาน หนูในกลุ่มที่ 2 - 3 จะได้รับการผ่าตัดดัดที่กล่าวข้างต้น หลังการผ่าตัดหนูทุกตัวในกลุ่มที่ 1-3 จะถูกวัดค่าการลงน้ำหนักที่ขาหลังทั้งสองข้าง ทั้งขาที่ไม่ได้รับการผ่าตัด (contralateral non-surgical leg) และขาข้างที่ได้รับการผ่าตัด (surgical leg) ในสัปดาห์ที่ 1, 3, 5, 6, 9, 12 และ 15 เพื่อศึกษาการดำเนินของโรคโดยดูจากการพัฒนาของอาการปวดที่วัดได้ในแต่ละครั้ง ค่าที่วัดได้จะถูกนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ดังสมการด้านล่างนี้ (Pomonis et al., 2005)

%Weight on the surgical leg

$$= \frac{[\text{weight on surgical leg}] \times 100}{[\text{weight on surgical leg} + \text{weight on contralateral non - surgical leg}]}$$

ค่าเปอร์เซ็นต์ที่ได้นี้จะนำมาใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงความปวดที่หนูได้รับหลังการชักนำให้เกิดข้อเข่าเสื่อม



รูปที่ 2.1 Incapacitance tester (Hind paw weight bearing tester)

การประเมินพยาธิสภาพของข้อเข่า

การประเมินพยาธิสภาพที่เปลี่ยนแปลงไปของข้อเข่าในหนูจะศึกษาภายหลังจากการวัดการพัฒนารูปของอาการปวดในหนูแต่ละกลุ่มสิ้นสุดลง คือสัปดาห์ที่ 15 (สำหรับกลุ่ม 1-3) และสัปดาห์ที่ 6 (สำหรับกลุ่มที่ 4) หลังจากนั้นหนูทุกตัวถูกเมตตามาด และข้อเข่าของข้างที่ถูกชักนำให้เกิดข้อเข่าเสื่อม (ข้างขวา) ถูกแยกออกและทำให้อยู่ในสภาวะคงที่ใน 10% neutral buffered formalin เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นข้อเข่าถูกนำไป decalcified เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ใน phosphate buffered saline ซึ่งมีส่วนประกอบของ 10% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) และปรับ pH ที่ 7.4 โดยหลังจากการ decalcification ข้อเข่าถูก embedded ใน paraffin และถูกตัดด้วยความหนา 4-5 μm และย้อมด้วย hematoxylin and eosin (H & E) และ safranin-O/fast green เพื่อศึกษาลักษณะ โดยทั่วไปของเนื้อเยื่อและความสมบูรณ์ของ matrix proteoglycans ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของกระดูกอ่อน ตามลำดับ (Brazz-Boils et al., 2011) ระดับความรุนแรงของการเสื่อมของข้อเข่าในหนูทดลองถูกประเมินในกระดูกส่วนที่เรียกว่า tibial plateaux ตามวิธีการวิเคราะห์แบบ Mankin's grading (Pearson et al., 2011) วิธีนี้ประเมินจากคุณลักษณะที่ประการของกระดูกอ่อน ซึ่งได้แก่ cartilage structure (0-6 คะแนน), abnormality of the chondrocyte (0-3 คะแนน), matrix staining (โดยใช้ safranin-O/fast green เพื่อประเมินความสมบูรณ์ของ proteoglycan (0-4 คะแนน) และ tidemark integrity (0-1 คะแนน) รายละเอียดแสดงในตารางที่ 2.1

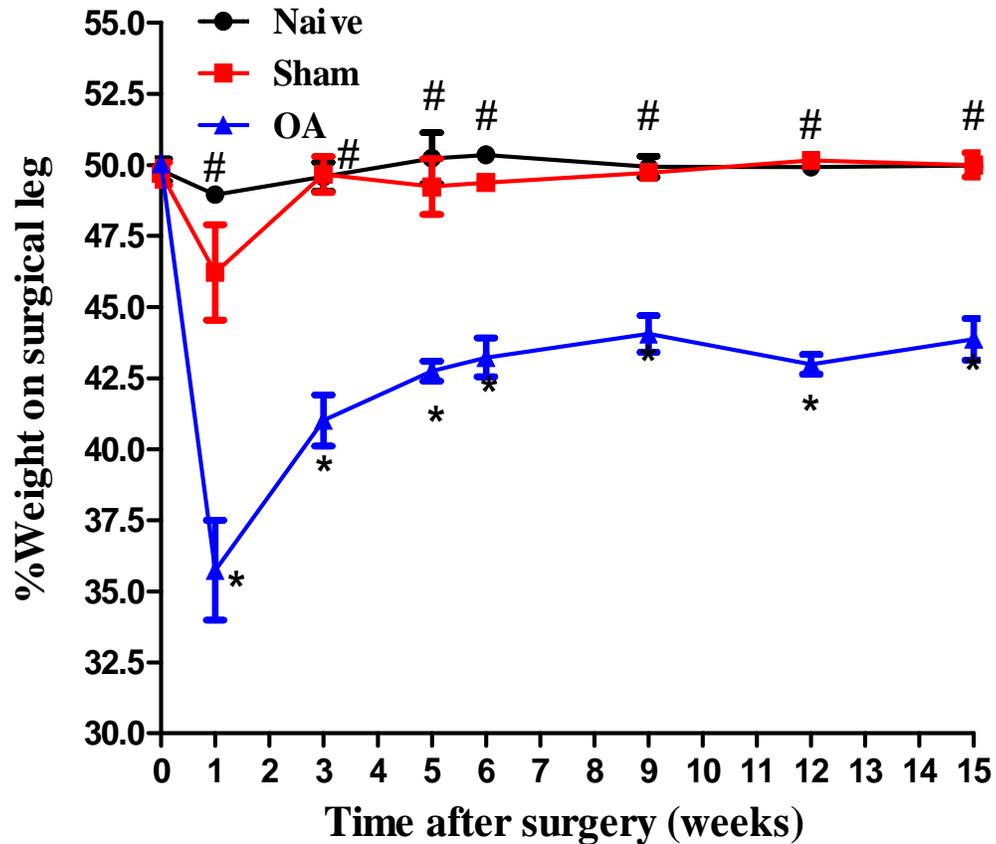
ตาราง 2.1 : การให้คะแนนชั้นเนื้อในการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา (Pearson et al., 2011)

Features	Score	Histologic features
Cartilage structure	0	Normal
	1	Surface irregularities
	2	Pannus and surface irregularities
	3	Clefts to transitional zone
	4	Clefts to radial zone
	5	Clefts to calcified zone
	6	Complete disorganisation
Abnormality of the chondrocytes	0	Normal
	1	Diffuse hypercellularity
	2	Cell clusters or cloning
	3	Hypocellularity
Matrix staining	0	Normal
	1	Slight reduction
	2	Moderate reduction
	3	Severe reduction
	4	No dye noted
Tidemark integrity	0	Intact
	1	Crossed by blood vessels

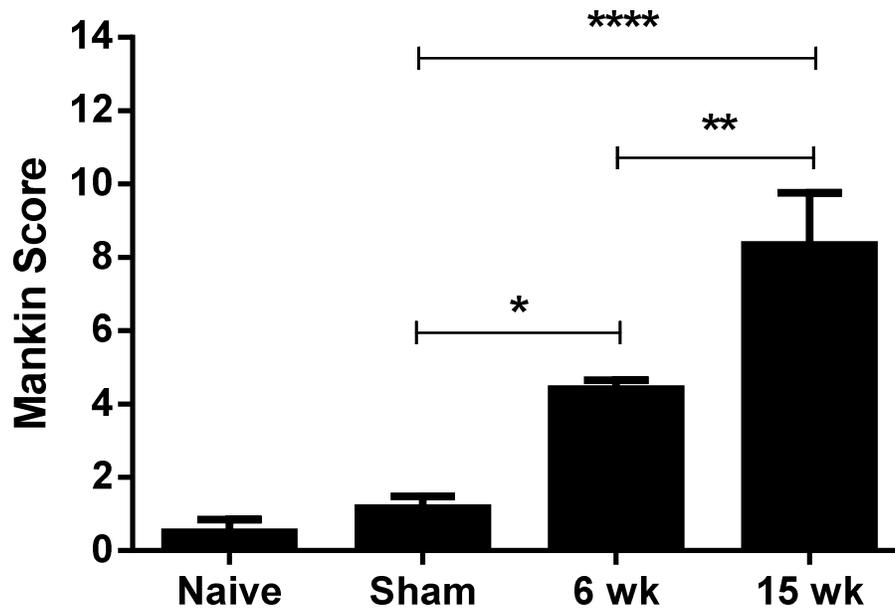
ผลการศึกษา

ค่าเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักที่ทิ้งลงบนขาหลังของหนูกลุ่มควบคุม Naïve (กลุ่มที่ 1) มีค่าคงที่ที่ระดับประมาณ 50% ตลอดการทดลอง แสดงว่ามีการลงน้ำหนักที่ขาหลัง 2 ข้างเท่าๆกัน ส่วนหลังการผ่าตัดค่าเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักที่ทิ้งลงบนขาหลังในหนูกลุ่มควบคุม sham (กลุ่มที่ 2) มีค่าลดลงเล็กน้อยในช่วงสัปดาห์แรกและกลับเข้าสู่ค่าปกติในสัปดาห์ที่สามและคงอยู่ในระดับปกติที่ประมาณ 50% ตลอดการทดลอง ผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าการผ่าตัดมีผลให้เกิดความเจ็บปวดในช่วง 1-2 สัปดาห์แรกหลังการผ่าตัด แต่หลังจากนั้น ค่าเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักที่ทิ้งลงบนขาหลังที่ได้จากกลุ่มควบคุม sham เริ่มคงที่อยู่ในระดับเดียวกับ Naïve และไม่มีมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญตลอดการทดลอง ส่วนหนูที่ถูกชักนำให้เกิดข้อเข่าเสื่อม (กลุ่มที่ 3, OA-15 weeks) ค่าเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักที่ทิ้งลงบนขาหลังมีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม 1 (Naïve) และ 2 (Sham) (รูปที่ 2.2) แสดงให้เห็นว่าการตัดเส้นเอ็น ACL มีผลให้เกิดความเจ็บปวด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงสัปดาห์แรกหลังการผ่าตัดจะเห็นได้ว่าหนูแสดงอาการปวดที่สุด โดยสามารถสังเกตได้จากค่าเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักที่ทิ้งลงบนขาหลังนั้นลดลงอย่างรวดเร็ว จากค่าที่ประมาณ $50.05 \pm 0.22\%$ เหลือที่ $35.74 \pm 1.76\%$ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ นอกจากนี้ยังพบว่าในสัปดาห์ที่ 5 หลังการผ่าตัด ค่าเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักที่ทิ้งลงบนขาข้างที่ปวดนั้นเริ่มคงที่ และคงอยู่ในระดับ 42.5 -45.0% จนถึงสัปดาห์ที่ 15

จากผลการศึกษาพยาธิสภาพที่เปลี่ยนแปลงไปของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนในกลุ่มของหนูที่ถูกชักนำให้เกิดข้อเข่าเสื่อม โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ตามแบบ Mankin's grading พบว่า Mankin score ในหนูกลุ่มที่ถูกชักนำให้เป็นข้อเข่าเสื่อมเป็นเวลา 6 สัปดาห์ (กลุ่มที่ 4, OA-6 weeks) และ 15 สัปดาห์ (กลุ่มที่ 3, OA-15 weeks) มีค่า 4.40 ± 0.24 และ 8.33 ± 1.43 ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้ มีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม sham (กลุ่มที่ 2, 1.17 ± 0.31) (รูปที่ 2.3) หากเปรียบเทียบค่า Mankin score ระหว่างกลุ่มควบคุม naïve และ sham พบว่า ค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่าอายุที่มากขึ้นของหนูและแผลอันเนื่องมาจากการผ่าตัดไม่ได้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน



รูปที่ 2.2 การเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักที่ขาหลังทั้งสองข้างของหนูปกติ (Naïve), ในหนูที่ได้รับการผ่าตัดโดยไม่ตัดเส้นเอ็น (Sham) และในหนูที่ผ่าตัดและชักนำให้เกิดอาการปวดเนื่องจากข้อเข่าเสื่อมโดยวิธีการตัดเส้นเอ็นที่มีชื่อเรียกว่า anterior cruciate ligament (anterior cruciate ligament transaction) (ACLT) (OA) ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (\pm SEM) ของตัวอย่างในแต่ละกลุ่มทดลอง ค่านี้สำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่ม sham เมื่อเทียบกับกลุ่ม OA และระหว่างกลุ่ม naïve เมื่อเทียบกับกลุ่ม OA แสดงโดยสัญลักษณ์ * และ # ตามลำดับ



รูปที่ 2.3 การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่ข้อเข่าของหนูปกติ (Naïve), หนูที่ได้รับการผ่าตัดโดยไม่ตัดเส้นเอ็น (Sham) และในหนูที่ผ่าตัดและชักนำให้เกิดอาการปวดเนื่องจากข้อเข่าเสื่อมโดยวิธีการตัดเส้นเอ็นที่มีชื่อเรียกว่า ACL (OA) โดยการประเมินพยาธิสภาพทำในสัปดาห์ที่ 15 (OA, 15 wk) ยกเว้นกลุ่ม OA, 6 wk ประเมินในสัปดาห์ที่ 6 หลังการผ่าตัด การประเมินใช้วิธี Mankin's grading โดยระดับความรุนแรงของการเสื่อมของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนสามารถวัดได้ตั้งแต่ 0 ถึง 14 ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (\pm SEM) ของตัวอย่างในแต่ละกลุ่มทดลอง โดยค่านี้สำคัญทางสถิติระหว่างของกลุ่ม sham เมื่อเทียบกับกลุ่ม OA, 6 wk และ OA, 15 wk แสดงโดยสัญลักษณ์ * ($p < 0.05$), **** ($p < 0.0001$) และระหว่างกลุ่ม OA, 6 wk และ OA, 15 wk แสดงโดย ** ($p < 0.01$)

สรุปผลการศึกษา

จากผลการทดลองนี้พบว่า การผ่าตัดเพื่อชักนำให้หนูเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม โดยตัดเส้นเอ็นที่มีชื่อเรียกว่า anterior cruciate ligament (ACL) สามารถชักนำให้หนูแสดงอาการปวดเมื่อยลงน้ำหนักที่ขาหลังอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่ม (naïve และ sham) และนอกจากนี้ ระดับของอาการปวดจะเริ่มคงที่ในสัปดาห์ที่ 5 หลังการผ่าตัดและคงอยู่ในระดับนี้ตลอดการทดลอง ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับการทดลองในหนูที่ได้ตีพิมพ์ก่อนหน้านี้ (Wen et al., 2010) ดังนั้นที่สัปดาห์ที่ 5 หลังการผ่าตัดจึงถูกใช้เป็นที่ตั้งต้นที่เริ่มมีการให้สารที่ต้องการทดสอบฤทธิ์ เพื่อให้แน่ใจว่าอาการปวดที่สังเกตเห็นไม่มีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงก่อนที่จะมีการให้สารที่ต้องการทดสอบ ซึ่งการทดสอบนี้มีขึ้นในส่วนของวัตถุประสงค์ข้อที่ 2.2

นอกจากนี้ในการทดลองนี้ยังพบว่าผลการวิเคราะห์ทางจุลพยาธิวิทยาโดยวิธี Mankin's grading ให้ผลที่สอดคล้องกับผลการประเมินอาการปวดในหนูทดลองกลุ่มเดียวกัน โดยจะเห็นได้ว่าอาการปวดเกิดขึ้นในขณะที่มีการเสื่อมของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่สามารถบอกได้ว่าเหตุการณ์ใดเกิดขึ้นก่อนกัน ทั้งนี้ยังเป็นที่ยังเป็นที่สังเกตได้ว่าอาการปวดจะเริ่มคงที่ที่สัปดาห์ที่ 5 หลังการผ่าตัดและคงอยู่ในระดับนี้ตลอดการทดลอง ในขณะที่การเสื่อมของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนยังคงดำเนินต่อไป

การทดลองส่วนที่ 2.2

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดโคนต้นหม่อนในแบบจำลองหนูในการลดอาการปวดและชะลอความเสื่อมของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดโคนต้นหม่อนในแบบจำลองหนูในการลดอาการปวดและชะลอความเสื่อมของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน

วิธีดำเนินการศึกษา

2.2.1 ศึกษาฤทธิ์บรรเทาปวดของสารสกัดโคนต้นหม่อนในแบบจำลองหนูหลังจากถูกชักนำให้เกิดข้อเข่าเสื่อม โดยศึกษาในหนูขาว Wistar เพศผู้ อายุ 5 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 140-160 กรัม หนูทั้งหมดถูกแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่

กลุ่มที่ 1- Sham + vehicle (n=7)

กลุ่มที่ 2- OA + vehicle (n=10)

กลุ่มที่ 3- OA + glucosamine sulfate (250 mg/kg) (n=6)

กลุ่มที่ 4- OA + *M.alba* stem extract (5.6 mg/kg) (n=6)

กลุ่มที่ 5- OA + *M.alba* stem extract (56 mg/kg) (n=6)

กลุ่มที่ 6- OA + *M.alba* stem extract (560 mg/kg) (n=6)

โดยหนูในกลุ่มที่ 1 เป็นหนูที่ได้รับการผ่าตัดโดยไม่มีการตัดเส้นเอ็น ACL ส่วนหนูกลุ่มที่ 2 – 6 ได้รับการผ่าตัดและตัดเส้นเอ็น ACL เพื่อชักนำให้เกิดข้อเข่าเสื่อม สำหรับตัวอย่างทดสอบถูกเตรียมขึ้นดังนี้ กลูโคซามีน ถูกทำให้ละลายโดยใช้น้ำ ส่วนผงของสารสกัดที่ได้จากโคนต้นหม่อนถูกนำมากระจายในน้ำ ซึ่งจะไดตัวอย่างทดสอบในรูปของสารแขวนตะกอน (suspension) หนูแต่ละตัวได้รับสารทดสอบดังนี้ น้ำ (vehicle), กลูโคซามีน ซัลเฟต (glucosamine sulfate) ขนาด 250 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม หรือ สารสกัดจากโคนต้นหม่อนในขนาด (5.6, 56 และ 560 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) โดยวิธีป้อนเข้าทางปาก (Oral gavage) ทุกวันเป็นเวลา 8 สัปดาห์อย่างต่อเนื่อง โดยเริ่มให้สารทดสอบครั้งแรกทันทีในสัปดาห์ที่ 5 โดยที่การบันทึกค่าเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักที่ทิ้งลงบนขาหลังทำที่สัปดาห์ที่ 5 ก่อนให้สารทดสอบ และสัปดาห์ที่ 6, 9 และ 12 ตามลำดับ จากนั้น หนูทุกตัวถูกเมตตามาต (euthanized) หลังจากการวัดค่าความเจ็บปวดครั้งสุดท้ายสิ้นสุดลง และข้อเข่าของข้างที่ถูกชักนำให้เกิดข้อเข่าเสื่อม (ข้างขวา) ถูกแยกออกเพื่อนำไปศึกษาต่อไปโดยใช้วิธีทางจุลพยาธิวิทยา (ข้อที่ 2.2.2)

2.2.2 การศึกษาฤทธิ์ในการชะลอความเสื่อมของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของสารสกัดโคนต้นหม่อนในแบบจำลองหนู

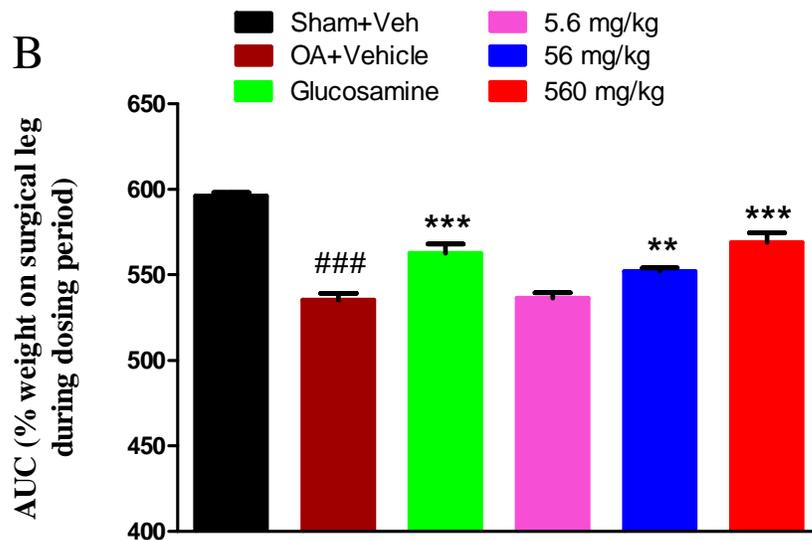
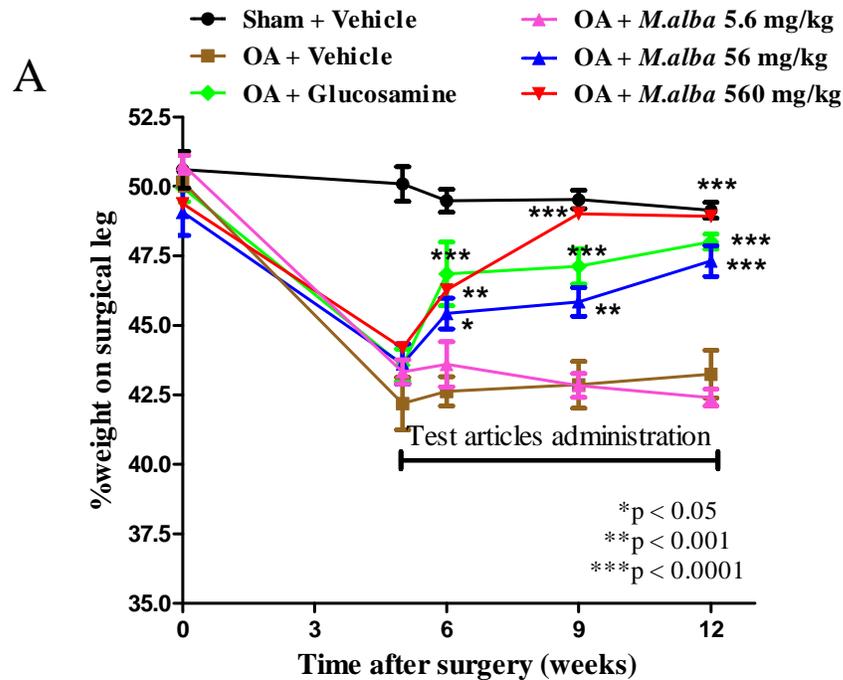
ในการทดลองนี้จะเป็นการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดโคนต้นหม่อนในการชะลอความรุนแรง (severity) ของพยาธิสภาพที่เปลี่ยนแปลงไปของโรคข้อเสื่อมหลังจากถูกชักนำเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ โดยสัตว์ทดลองที่ใช้เป็นกลุ่มเดียวกับที่ใช้ในการศึกษาในข้อที่ 2.2.1 คือกลุ่มที่ 1-3 และ 6 โดยในการศึกษานี้จะประเมินระดับความรุนแรงของการเสื่อมของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่ข้อเข่าของหนูที่ได้รับสารสกัดโคนต้นหม่อนที่ขนาด 560 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยจะเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 1 (sham + vehicle) และกลุ่มที่ 3 (OA + glucosamine sulfate) ที่ได้รับสารน้ำ และกลูโคซามีนที่ขนาด 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

ซึ่งการทดลองนี้เกิดขึ้นหลังจากการทดลองในข้อที่ 2.2.1 สิ้นสุดลง และหนูทุกตัวในกลุ่มดังกล่าวถูกเมตตาฆาต (euthanized) และข้อเข่าของข้างที่ถูกชักนำให้เกิดข้อเข่าเสื่อม (ข้างขวา) ถูกแยกออกเพื่อนำไปศึกษาต่อไปโดยใช้วิธีทางจุลพยาธิวิทยา ตามวิธีการวิเคราะห์แบบ Mankin's grading (Pearson et al., 2011) ดังที่กล่าวไปแล้วข้างต้น

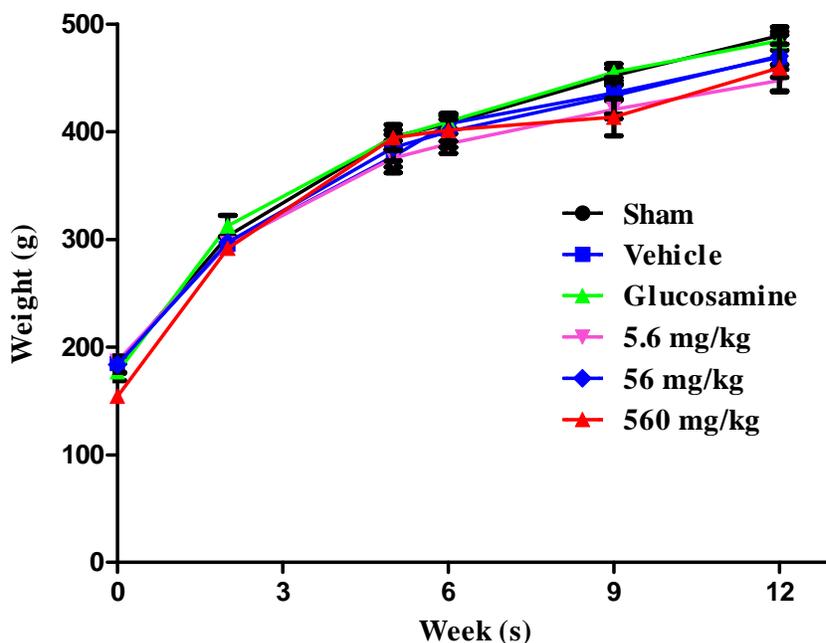
ผลการศึกษา

จากการทดลองเพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดที่ได้จากโคนต้นหม่อนที่ความเข้มข้นต่างๆกันโดยเปรียบเทียบกับกลูโคซามีนซึ่งเป็นสารในผลิตภัณฑ์ทางการค้าที่เป็นที่นิยมใช้ในการบรรเทาอาการปวดเนื่องมาจากโรคข้อเสื่อม ผลการทดลองพบว่า หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสารสกัดที่ได้จากโคนต้นหม่อนที่ขนาด 56 (กลุ่ม 5) และ 560 (กลุ่ม 6) มิลลิกรัม/กิโลกรัม สามารถบรรเทาอาการปวดได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับน้ำ (กลุ่ม 2, OA + vehicle) ซึ่งสามารถสังเกตได้จากค่าเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักที่ทิ้งลงบนขาหลังมีค่ามากกว่าของหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำอย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 6, 9 และ 12 (รูปที่ 2.4A) เมื่อนำผลที่ได้มานำเสนอเป็นค่าของพื้นที่ใต้กราฟ (Area Under the Curve; AUC) ของการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักที่ทิ้งลงบนขาหลังในหนู พบว่าสารสกัดโคนต้นหม่อนสามารถบรรเทาอาการปวดได้ โดยประสิทธิภาพขึ้นกับขนาดของสารสกัดที่ใช้ (รูปที่ 2.4B) นอกจากนี้ ผลการทดลองที่ได้นี้ยังให้ผลคล้ายคลึงกับผลที่ได้จากกลุ่มของหนูทดลองที่ได้รับกลูโคซามีนในขนาด 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยที่ค่า AUC ของการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักที่ทิ้งลงบนขาหลังในหนูมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในกลุ่มของหนูที่ได้รับสารสกัดที่ขนาด 56 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (กลุ่มที่ 5; 552.20 ± 2.02) และ 560 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (กลุ่มที่ 6; 569.00 ± 5.52) และในกลุ่มของหนูที่ได้รับกลูโคซามีน (กลุ่มที่ 3; 562.70 ± 5.32) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำ (กลุ่มที่ 2; 535.30 ± 4.01) จากผลการทดลองนี้ยังพบว่า ฤทธิ์บรรเทาปวดของสารสกัดที่ได้จากโคนต้นหม่อนที่ขนาด 560

มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับฤทธิ์บรรเทาปวดของกลูโคซามีน การวิจัยนี้ยังได้ศึกษาความปลอดภัยในการใช้สารสกัดโคนต้นหม่อน โดยการติดตามการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักร่างกายของหนูทดลองในแต่ละกลุ่ม จากผลการทดลองไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวของหนูทดลองในแต่ละกลุ่ม (รูปที่ 2.5)

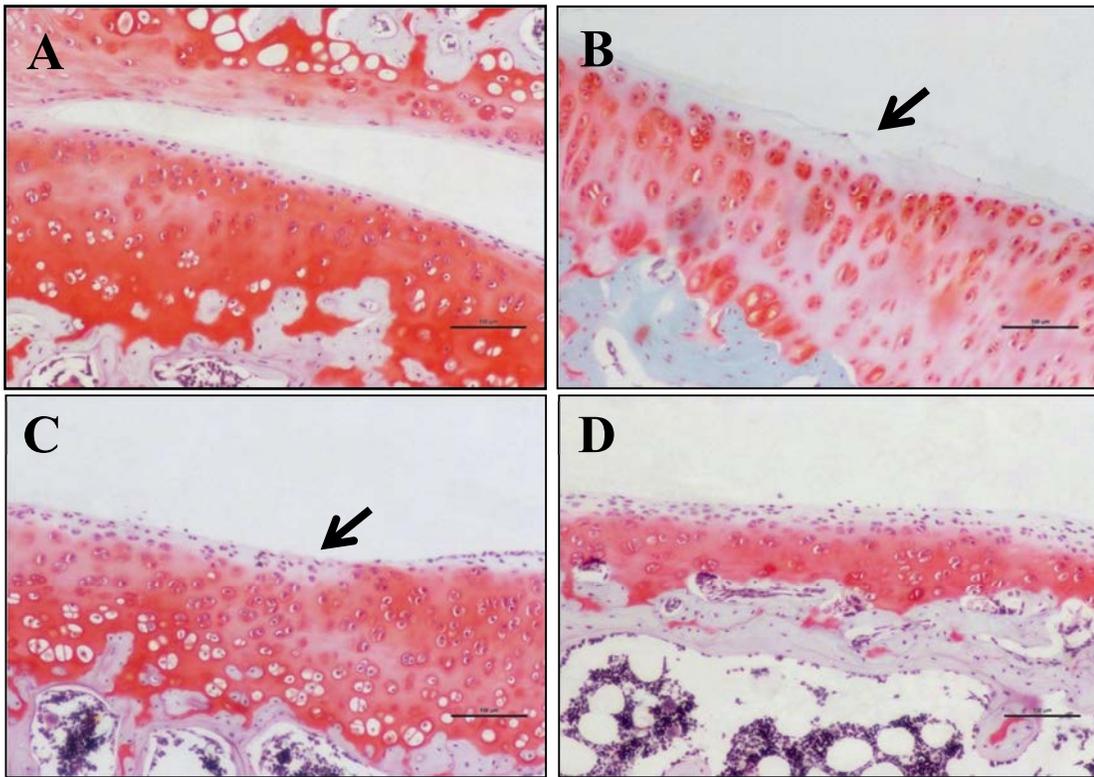


รูปที่ 2.4 A. ผลของสารสกัดโคนต้นหม่อนและกลูโคซามีนต่อการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักที่ทิ้งลงบนขาหลังในหนูที่ถูกชักนำให้เกิดอาการปวดเนื่องจากข้อเข่าเสื่อมโดยการตัดเส้นเอ็นที่มีชื่อเรียกว่า anterior cruciate ligament ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (\pm SEM) ของตัวอย่างในแต่ละกลุ่มทดลอง โดยแสดงผลเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักที่ทิ้งลงบนขาหลังในหนู (A) และ ค่าของพื้นที่ใต้กราฟของการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักที่ทิ้งลงบนขาหลัง (B) การทดสอบทางสถิติใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (one-way analysis of variance (ANOVA)) และวิธีของนิวแมนคูลส์ (Newman-Keuls post hoc test) โดยค่านัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มของสารสกัดที่ขนาดต่างๆเมื่อเทียบกับกลุ่ม OA + vehicle แสดงโดยสัญลักษณ์ * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.0001$) และค่านัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่ม sham + vehicle และ OA + vehicle แสดงโดยสัญลักษณ์ ### ($p < 0.05$)

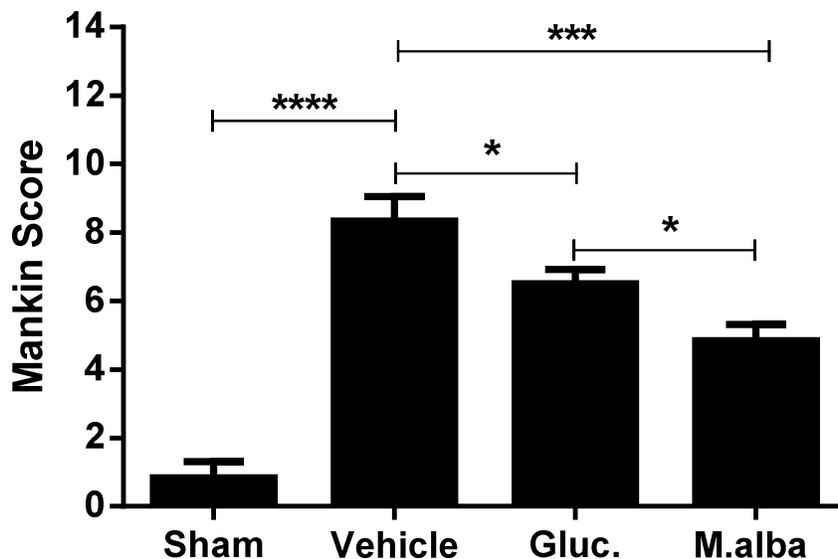


รูปที่ 2.5 การเปลี่ยนแปลงของค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวของหนูทดลองในแต่ละกลุ่ม

ผลทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของข้อเข่าของหนูที่ถูกชักนำให้ข้อเข่าเสื่อมเป็นเวลา 12 สัปดาห์โดยการย้อมด้วย safranin-O/fast green พบว่า ลักษณะของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่พบในกลุ่ม sham ที่ได้รับสารน้ำ (sham + vehicle group) มีลักษณะที่ปกติโดยสามารถสังเกตได้จากลักษณะของผิวเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนมีลักษณะเรียบและไม่มียอดึกขาด และนอกจากนี้ยังไม่พบการเจริญเติบโตหรือการแบ่งตัวที่ผิดปกติของเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) (รูปที่ 2.6A) เมื่อวิเคราะห์เนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของข้อเข่าที่ได้จากกลุ่ม OA ที่ได้รับน้ำ (กลุ่มที่ 2, OA + vehicle group) พบว่าเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนมีลักษณะผิดปกติ โดยที่เนื้อเยื่อผิวจะมีลักษณะไม่เรียบ (surface irregularities) และมีการฉีกขาด (fibrillation and fissures) การย้อมติดสีของ safranin-O/fast green น้อยลง จำนวนเซลล์ของกระดูกอ่อนลดน้อยลง (chondrocyte hypocellularity) ส่งผลให้เกิดการ cloning ของ chondrocytes เพื่อทดแทนเซลล์ที่เสียไป (รูปที่ 2.6B) ผลที่ได้นี้ได้นำไปวิเคราะห์โดยใช้วิธี Mankin's grading ซึ่งผลที่ได้พบว่าค่า Mankin score มีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มของ OA + vehicle group (กลุ่มที่ 2) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม sham + vehicle group (กลุ่มที่ 1) (8.33 ± 0.71 vs. 0.83 ± 0.48) (รูปที่ 2.7)



รูปที่ 2.6 ภาพตัวอย่างจากผลทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของข้อเข่าของหนูที่ถูกชักนำให้ข้อเข่าเสื่อมเป็นเวลา 12 สัปดาห์โดยการย้อมด้วย safranin-O/fast green (ขนาดปกติ x 200). (A) sham + vehicle group (B) OA + vehicle group; (C) OA + glucosamine sulfate (250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) group and (D) OA + *M.alba* (560 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) group



รูปที่ 2.7 Mankin score ของเนื้อเยื่อข้อเข่าของหนูในกลุ่มที่ 1 (sham + vehicle), 2 (OA + vehicle), 3 (OA + กลูโคซามีน) (250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) และ 6 (OA + สารสกัดจากโคนต้นหม่อน (560 มิลลิกรัม/กิโลกรัม)) ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (\pm SEM) ของตัวอย่างในแต่ละกลุ่มทดลอง การทดสอบทางสถิติใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (one-way analysis of variance (ANOVA)) และวิธีของนิวแมนคูลส์ (Newman-Keuls post hoc test) โดยค่านัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มแสดงโดยสัญลักษณ์ * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) และ *** ($p < 0.0001$)

สิ่งที่น่าสนใจก็คือระดับความรุนแรงของการเสื่อมของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนนั้นลดลงในกลุ่มของ OA + กลูโคซามีน และกลุ่ม OA + สารสกัดจากโคนต้นหม่อน (560 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) โดยสามารถสังเกตได้จากลักษณะผิวของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนที่เรียบขึ้นและลักษณะของเซลล์กระดูกอ่อนที่ค่อนข้างปกติ (รูปที่ 2.6 C และ D) ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับ Mankin score ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในหนูกลุ่ม OA + กลูโคซามีน (6.50 ± 0.43) และ OA + สารสกัดจากโคนต้นหม่อน (4.83 ± 0.48) เมื่อเทียบกับกลุ่ม OA + vehicle group (8.33 ± 0.71) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม OA ที่ได้รับกลูโคซามีน และ OA ที่ได้รับสารสกัดจากโคนต้นหม่อนจะพบว่า Mankin score มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 2.7)

สรุปผลการศึกษา

ผลการวิจัยนี้พบว่าสารสกัดจากโคนต้นหม่อนมีฤทธิ์บรรเทาอาการปวดจากข้อเข่าเสื่อมในหนูที่ถูกเหนียวทำให้เกิดข้อเสื่อมได้คล้ายคลึงกับกลูโคซามีน นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดนี้ยังมีฤทธิ์ในการชะลอความเสื่อมของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน โดยที่งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาครั้งแรกที่แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ของสารสกัดจากโคนต้นหม่อนในแบบจำลองหนูที่ถูกเหนียวทำให้เกิดข้อเข่าเสื่อม อย่างไรก็ตามยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสำคัญที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการบรรเทาปวด

การทดลองส่วนที่ 3

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโคนต้นหม่อน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้จากโคนต้นหม่อนที่เตรียมได้

วิธีดำเนินการศึกษา

3.1 Determination of total phenolic content

ตรวจหาปริมาณ Total phenolic content ของสารสกัดจากโคนต้นหม่อนโดยวิธี Folin-Ciocalteu (FC) (Chumark et al., 2008) โดยใช้ gallic acid (GA) เป็นสารมาตรฐาน วิธีทดสอบทำโดยผสมสารละลายของสารสกัดจากโคนต้นหม่อนที่ความเข้มข้นต่างๆ ใน 50% เมทานอล หรือ GA solution ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เข้ากับ FC reagent (10% v/v) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำส่วนผสมที่ได้ไป vortex และ incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 7.5% Na₂CO₃ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และนำไป incubate ต่ออีก 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณค่า Total phenolic content โดยการเทียบกับ standard curve ของ GA และแสดงผลเป็นไมโคร-โมลของ GA equivalents (GAE) ต่อน้ำหนักผงสารสกัดแห้ง 1 มิลลิกรัม ($\mu\text{mol GAE/mg}$ of dry extract) โดยในการวิเคราะห์นั้นเป็นการแยกทำการทดสอบจำนวน 3 ครั้ง (three independent experiment) โดยแต่ละครั้งจะทำการวัดซ้ำจำนวน 2 ครั้ง (duplicate)

3.2 Determination of total flavonoid content

การตรวจหาปริมาณ Total flavonoid content ของสารสกัดจากโคนต้นหม่อนโดยวิธี aluminium colorimetric โดยใช้ quercetin (QU) เป็นสารมาตรฐาน (Omoruyi et al., 2012) สารละลายของสารทดสอบและสารมาตรฐานเตรียมโดยการละลายใน 50% methanol วิธีทดสอบทำโดยผสมสารละลายของสารทดสอบปริมาตร 500 ไมโครลิตรเข้ากับ สารละลาย 2% aluminium chloride (AlCl₃) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นส่วนผสมนี้ถูกนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตรโดยใช้เครื่อง spectrophotometer นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณค่า Total flavonoid content โดยการเทียบกับ standard curve ของ QU และแสดงผลเป็นไมโครโมล ($\mu\text{mol QUE/mg}$ of dry extract) โดยใน

การวิเคราะห์นั้นเป็นการแยกทำการทดสอบจำนวน 3 ครั้ง (three independent experiment) โดยแต่ละครั้ง จะทำการวัดซ้ำจำนวน 2 ครั้ง (duplicate)

3.3 DPPH radical scavenging assay

ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากโคนต้นหม่อนและออกซีเรสเวอราทรอลโดยวิธี DPPH radical scavenging (Roche et al., 2005) โดยใช้ trolox เป็นสารมาตรฐาน สารละลายของสารสกัดจากโคนต้นหม่อน (0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร), ออกซีเรสเวอราทรอล (0.1 มิลลิโมลาร์) และ trolox (0.1 มิลลิโมลาร์) เตรียมโดยการละลายใน 100% methanol วิธีทดสอบทำโดยผสมสารละลาย DPPH 100 ไมโครลิตรเข้ากับ สารละลายของสารสกัดจากโคนต้นหม่อนในปริมาณที่แตกต่างกัน หรือผสมกับ trolox หรือ oxyresveratrol ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน โดยที่ให้มีปริมาตรสุดท้ายของส่วนผสมอยู่ที่ 1 มิลลิลิตร นำส่วนผสมที่ได้ไป incubated ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ (scavenging activity; SA) ของสารสกัดจากโคนต้นหม่อนและออกซีเรสเวอราทรอลสามารถคำนวณได้จากสมการ ดังนี้

$$SA (\%) = [A - B / A] \times 100\%$$

โดยที่ A เป็นค่าดูดกลืนแสงของ blank sample (vehicle);

B เป็นค่าดูดกลืนแสงของสารทดสอบ (สารสกัดจากโคนต้นหม่อน, ออกซีเรสเวอราทรอล หรือ trolox)

โดยที่เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH radical scavenging activity (%)) ถูก plotted กับความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบเพื่อใช้ในการหาค่า IC_{50}

3.4 Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay

ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกไอออนของสารสกัดจากโคนต้นหม่อนและออกซีเรสเวอราทรอลถูกประเมินโดยวิธี FRAP assay (Benzie and Strain, 1996) โดยใช้ ferrous sulfate เป็นสารมาตรฐาน วิธีทดสอบทำโดยผสม 100 ไมโครลิตร ของ FRAP reagent กับ 50 ไมโครลิตรของ ferrous sulfate solution ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$; standard) ที่ความเข้มข้นต่างๆ และผสมกับสารสกัดจากโคนต้นหม่อน หรือ ออกซีเรสเวอราทรอล จากนั้นนำส่วนผสมไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที และถูกนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตรโดยใช้เครื่อง spectrophotometer นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณค่า FRAP values

โดยการเทียบกับ standard curve ของ ferrous sulfate และแสดงผลเป็นไมโครโมลของ Fe (II) ต่อ น้ำหนักผงสารสกัดแห้ง 1 มิลลิกรัม โดยในการวิเคราะห์นั้นเป็นการแยกทำการทดสอบจำนวน 3 ครั้ง (three independent experiment) โดยแต่ละครั้งจะทำการวัดซ้ำจำนวน 2 ครั้ง (duplicate)

3.5 Scavenging of hydroxyl radical by deoxyribose method

Hydroxyl radical scavenging activity ของสารสกัดจากโคนต้นหม่อน และออกซิริเรสเวอราทรอล ถูกประเมินโดยใช้วิธี deoxyribose (Srinivasan et al., 2007) โดยใช้ trolox เป็นสารมาตรฐาน สารละลาย ของสารทดสอบและสารมาตรฐานเตรียมโดยการละลายใน 50% methanol วิธีทดสอบทำโดยผสม 100 ไมโครลิตร ของสารทดสอบเข้ากับ 900 ไมโครลิตร ของ reaction mixture solution ซึ่งประกอบไปด้วย deoxyribose (14 มิลลิโมลาร์, 200 ไมโครลิตร), ferrous sulphate (2.5 มิลลิโมลาร์, 100 ไมโครลิตร), normal saline (400 ไมโครลิตร) and hydrogen peroxide (4 มิลลิโมลาร์, 200 ไมโครลิตร) หลังจากนั้นนำ ส่วนผสมนี้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเติม 300 ไมโครลิตร ของ 1% thiobarbituric acid (TBA) solution ใน 50 มิลลิโมลาร์ NaOH และ 300 ไมโครลิตร ของ 2.8% trichloro acetic acid (TCA) นำส่วนผสมไปบ่มต่อใน water bath เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นก็ปล่อยให้ส่วนผสมเย็นลงที่ อุณหภูมิห้องก่อนนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตร โดยที่เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระถูก plotted กับ ความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบเพื่อใช้ในการหาค่า IC₅₀

3.6 Superoxide scavenging assay

ทดสอบฤทธิ์การจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ของสารสกัดจากโคนต้นหม่อน และออกซิริเรส เวอราทรอล ตามวิธีการที่ได้มีการกล่าวไว้แล้วในระเบียบวิธีของ Channbane et al., (2012) โดยอนุมูล ออิสระที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับ nitroblue tetrazolium (NBT) ซึ่งมีสีเหลือง ได้เป็น NBT-diformazn ซึ่งมี สีน้ำเงิน การทดสอบใช้ quercetine (QU) เป็นสารมาตรฐานและใช้ superoxide dismutase (SOD) เป็น positive control โดยสารทดสอบจะทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ (O₂⁻) ได้เป็นไฮโดรเจน เปอร็อกไซด์ (H₂O₂) และออกซิเจน (O₂) สารละลายของสารทดสอบและสารมาตรฐานเตรียมโดยการ ละลายใน 50% methanol วิธีทดสอบทำโดยผสม 100 ไมโครลิตร ของสารทดสอบเข้ากับ reaction mixture ซึ่งประกอบไปด้วย 100 ไมโครลิตร ของ 65 มิลลิโมลาร์ EDTA, 200 ไมโครลิตร ของ 40 ไมโครโมลาร์ riboflavine, 200 ไมโครลิตร ของ 960 ไมโครโมลาร์ nitroblue tetrazolium salt (NBT) และ 400 ไมโครลิตร ของ 50 มิลลิโมลาร์ phosphate buffer, pH 7.4 จากนั้น นำส่วนผสมที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 30 นาที และถูกนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตรทันที โดยที่เปอร์เซ็นต์การต้าน

อนุมูลอิสระ (superoxide radical scavenging activity (%)) ถูก plotted กับ ความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบเพื่อใช้ในการหาค่า IC_{50}

3.7 Nitric oxide scavenging assay

ทดสอบ Nitric oxide scavenging activity ของสารสกัดโคนต้นหม่อนและออกซีเรสเวอราทรอล ตามวิธีการที่มีการกล่าวไว้แล้วในระเบียบวิธีของ Omoruyi et al., (2012) โดยใช้ sodium nitrite ($NaNO_2$) เป็นสารมาตรฐาน สารละลายของสารทดสอบและสารมาตรฐานเตรียมโดยการละลายใน 50% methanol วิธีทดสอบทำโดยผสม 1 มิลลิลิตร ของ 10 มิลลิโมลาร์ sodium nitroprusside (SNP) ซึ่งถูกเตรียมขึ้นใหม่ เข้ากับ 250 ไมโครลิตร ของ phosphate buffer saline, pH 7.4 และ 250 ไมโครลิตร ของสารสกัดโคนต้นหม่อน หรือ ออกซีเรสเวอราทรอล ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน นำส่วนผสมที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเติม 500 ไมโครลิตร ของ 1% sulfanilamide ใน 2% phosphoric acid (H_3PO_4) และ บ่มต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลา เติม 500 ไมโครลิตร ของ 0.1% naphthylethylenediamine (NED) และ บ่มต่อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 546 นาโนเมตร ซึ่งจะพบว่าส่วนผสมที่ได้จะเปลี่ยนเป็นสีม่วง คำนวณหาปริมาณของ nitric oxide จากปริมาณ nitrite ions (NO_2^-) ที่ได้จาก sodium nitrite ($NaNO_2$) โดยที่เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ (nitric oxide radical scavenging activity (%)) ถูก plotted กับ ความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบเพื่อใช้ในการหาค่า IC_{50}

ผลการศึกษา

3.1 Determination of total phenolic and total flavonoid content

ปริมาณ total phenolic และ total flavonoid ของสารสกัดจากโคนต้นหม่อนได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.1 ตารางที่ 3.1: ปริมาณ Total phenolic content และ total flavonoid content ของสารสกัดจากโคนต้นหม่อน

Assays	Content
Total Phenolic Content ($\mu\text{mol GAE/mg extract}$)	34.87 ± 1.12
Total Flavonoid Content ($\mu\text{mol QUE/mg extract}$)	0.13 ± 0.00

ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (\pm SEM) ของตัวอย่างจากสามการทดลอง

3.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากโคนต้นหม่อน

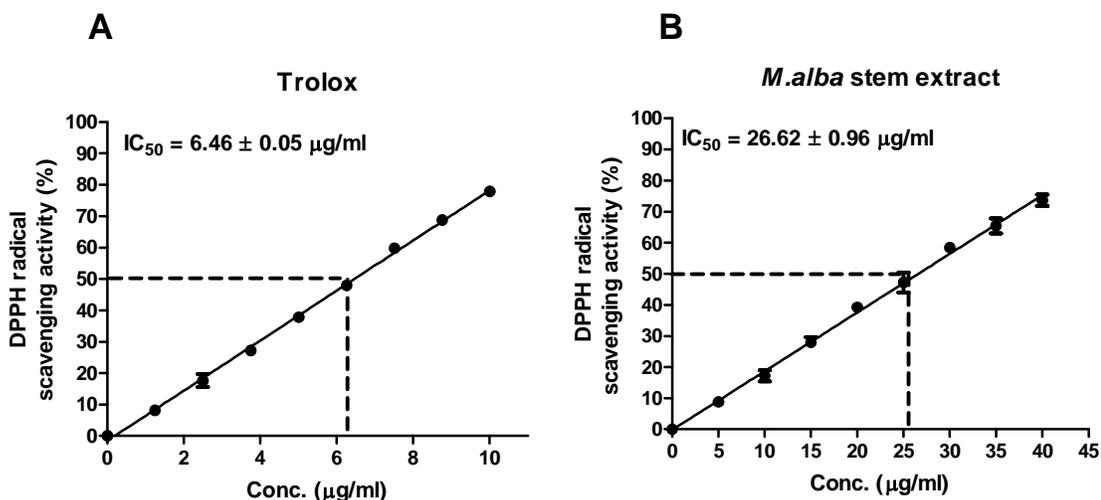
ในการศึกษานี้ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโคนต้นหม่อนโดยวิธีต่างๆ ดังนี้ DPPH radical, hydroxyl radical, nitric oxide radical, superoxide radical และ ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay ผลการศึกษาพบว่า สารมาตรฐาน (trolox และ quercetin) สารสกัดโคนต้นหม่อน และ ออกซีเรสเวอราทรอล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นตามขนาดที่ใช้ (dose-dependent) ในหลายวิธีการทดสอบ โดยค่า IC_{50} ได้สรุปไว้ในตารางที่ 3.2 และกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารที่ใช้ทดสอบโดยวิธีต่างๆ ได้แสดงในรูปที่ 3.1, 3.2, 3.3 และ 3.4

ตารางที่ 3.2 : ค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน สารสกัดโคนต้นหม่อน และ ออกซีเรสเวอราทรอล โดยใช้วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบต่างๆ

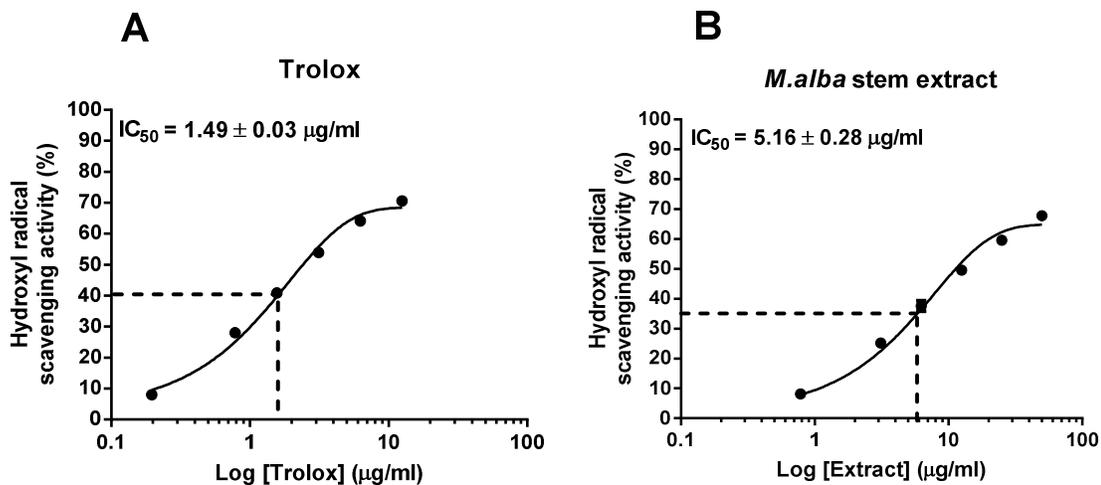
Scavenging assays	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)		
	Standard	Extract	Oxyresveratrol
^a DPPH ^o	6.46 ± 0.05	26.62 ± 0.96	13.50 ± 0.48
^a HO ^o	1.49 ± 0.03	5.16 ± 0.28	3.34 ± 0.16
^b O ₂ ^{o-}	132.00 ± 6.35	173.73 ± 12.66	N/A
^o NO	N/A	12.19 ± 1.03	8.06 ± 0.30

ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (\pm SEM) ของตัวอย่างจากสามการทดลอง

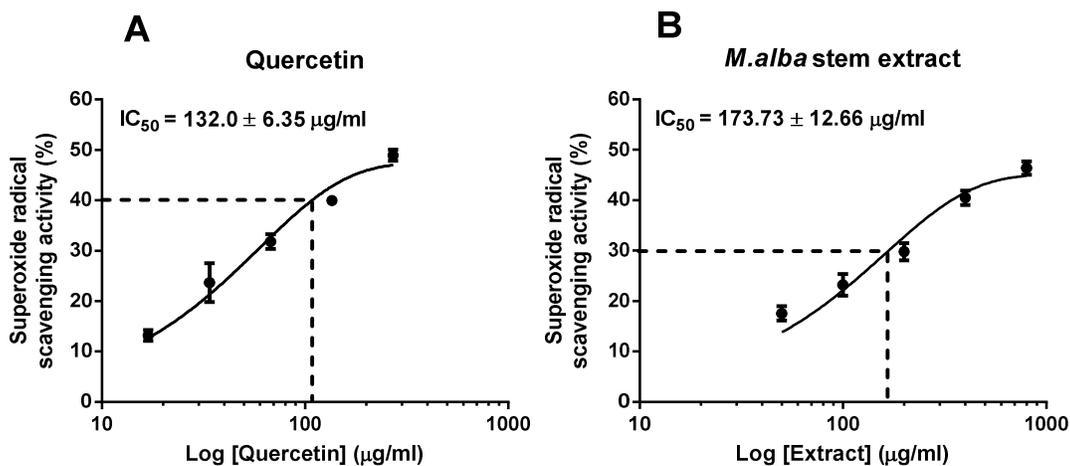
^a ใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน, ^b ใช้ Quercetine เป็นสารมาตรฐาน



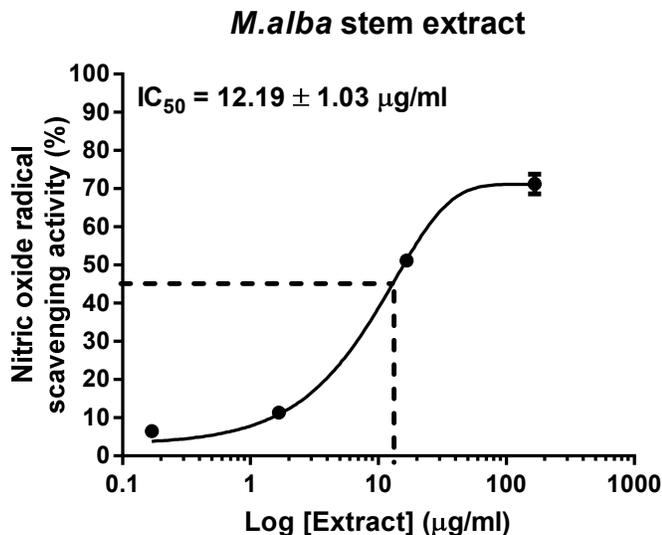
รูปที่ 3.1 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของ (A) trolox และ (B) สารสกัดโคนต้นหม่อนโดยวิธี DPPH radical scavenging



รูปที่ 3.2 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของ (A) trolox และ (B) สารสกัดโคนต้นหม่อนโดยวิธี HO° scavenging activity (A)



รูปที่ 3.3 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของ (A) trolox และ (B) สารสกัดโคนต้นหม่อนโดยวิธี O₂^{•-} scavenging activity



รูปที่ 3.4 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโคนต้นหม่อนโดยวิธี $^{\circ}\text{NO}$ scavenging activity

นอกจากนี้ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโคนต้นหม่อน เปรียบเทียบกับ ออกซีเรสเวอราทรอล ยังถูกสรุปไว้ในตารางที่ 3.3 โดยได้แสดงไว้ในหน่วยต่างๆกันขึ้นอยู่กับชนิดของสารมาตรฐานที่ใช้ในแต่ละการทดลองดังนี้ μmol trolox equivalent (TE)/mg dry extract สำหรับ DPPH $^{\circ}$ และ HO $^{\circ}$ scavenging assays ในหน่วยของ μmol quercetin equivalent (QUE)/mg dry extract สำหรับ O 2° -scavenging assay และในหน่วยของ μmol ascorbic acid equivalent (AAE)/mg dry extract สำหรับ FRAP assays สำหรับ $^{\circ}\text{NO}$ radical scavenging activity หน่วยที่ใช้จะแสดงเป็น nmol of scavenged $^{\circ}\text{NO}$ by 1 μg of test compound (ตารางที่ 3.3)

จากผลการทดลองพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากโคนต้นหม่อนและoxyresveratrol มีค่าเท่ากับ 0.98 ± 0.05 และ 2.04 ± 0.09 μmol TE/mg of test compound สำหรับ DPPH $^{\circ}$ scavenging assay และ 1.11 ± 0.08 และ 1.63 ± 0.03 μmol TE/mg of test compound สำหรับ HO $^{\circ}$ scavenging assays ตามลำดับ (ตารางที่ 3.3) นอกจากนี้ยังพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากโคนต้นหม่อนมีค่าเท่ากับ 1.13 ± 0.16 μmol QUE/mg dry extract แต่ไม่สามารถตรวจวัดค่าได้จาก oxyresveratrol เมื่อทดสอบโดย O 2° -scavenging assay (ตารางที่ 3.3) ใน FRAP assay reducing capacity ของสารสกัดจากโคนต้นหม่อน และoxyresveratrol มีค่าเท่ากับ 1.29 ± 0.15 and 4.27 ± 0.28 μmol AAE/mg of test compound นอกจากนี้ยังพบว่า nitric oxide radical scavenging activity ของสารสกัดจากโคนต้นหม่อน และoxyresveratrol มีค่าเท่ากับ 1.88 ± 0.36 and 2.23 ± 0.03 nmol of scavenged $^{\circ}\text{NO}$ by 1 μg of test compound ตามลำดับ

ตารางที่ 3.3:ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโคนต้นหม่อน และ ออกซีเรสเวอราทรอล เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH radical (DPPH[°]) scavenging, hydroxyl radical (HO[°]) scavenging, superoxide radical (O₂[°]) scavenging และ nitric oxide radical ([°]NO) scavenging เทียบกับสารมาตรฐาน

Scavenging Assays	Antioxidant capacities	
	Extract	Oxyresveratrol
DPPH [°] (μmol TE/mg of test compound)	0.98 ± 0.05	2.04 ± 0.09
HO [°] (μmol TE/mg of test compound)	1.11 ± 0.08	1.63 ± 0.03
O ₂ [°] (μmol QUE/mg of test compound)	1.13 ± 0.16	N/A
FRAP (μmol AAE/mg of test compound)	1.29 ± 0.15	4.27 ± 0.28
[°] NO (nmol of scavenged [°] NO/ μg of test compound)	1.88 ± 0.36	2.23 ± 0.03

ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (± SEM) ของตัวอย่างจากสามการทดลอง

สรุปผลการศึกษา

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองอื่นๆที่ผ่านมา (Chang et al., 2011, Khan et al., 2013) ซึ่งพบว่าสารสกัดจากส่วนต่างๆจากต้นหม่อน เช่น ใบ กิ่ง เปลือกกราก มีส่วนประกอบของ phenolic compounds ในการศึกษาพบว่า phenolic compounds ก็สามารถพบได้ในส่วนโคนของต้นหม่อน นอกจากนี้ ในการวิจัยนี้ยังศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากโคนต้นหม่อนและออกซีเรสเวอราทรอล ซึ่งเป็นสารสำคัญที่พบในสารสกัดนี้ โดยใช้วิธีการประเมินหลายวิธี เช่น DPPH radical scavenging, hydroxyl radical scavenging, nitric oxide radical scavenging, superoxide radical scavenging และ ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดโคนต้นหม่อนแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในทุกวิธีการทดสอบที่ใช้ประเมิน ดังนั้น อาจจะกล่าวได้ว่าสารสกัดโคนต้นหม่อนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้โดยอาศัยจากหลายกลไก โดยกลไกที่สำคัญคือ การกำจัดอนุมูลอิสระ (radical scavenging activity) และความสามารถในการเร่งปฏิกิริยารีดักชัน (reducing activity)

บรรณานุกรม

- Allen KD, Adams SB, Setton LA (2010) Evaluating Intra-Articular Drug Delivery for the Treatment of Osteoarthritis in a Rat Model. *Tissue Engineering Part B-Reviews* 16:81-92.
- Amin AR, Dave M, Attur M, Abramson SB (2000) COX-2, NO, and cartilage damage and repair. *Curr Rheumatol Rep* 2:447-453.
- Benzie IF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 239:70-76.
- Bove SE, Flatters SJL, Inglis JJ, Mantyh PW (2009) New advances in musculoskeletal pain. *Brain Res Rev* 60:187-201.
- Braza-Boils A, Alcaraz MJ, Ferrandiz ML (2011) Regulation of the inflammatory response by tin protoporphyrin IX in the rat anterior cruciate ligament transection model of osteoarthritis. *J Orthop Res* 29:1375-1382.
- Chaabane F, Boubaker J, Loussaif A, Neffati A, Kilani-Jaziri S, Ghedira K, Chekir-Ghedira L (2012) Antioxidant, genotoxic and antigenotoxic activities of daphne gnidium leaf extracts. *Bmc Complementary and Alternative Medicine* 12.
- Chang LW, Juang LJ, Wang BS, Wang MY, Tai HM, Hung WJ, Chen YJ, Huang MH (2011) Antioxidant and antityrosinase activity of mulberry (*Morus alba* L.) twigs and root bark. *Food Chem Toxicol* 49:785-790.
- Choi EM, Hwang JK (2005) Effects of *Morus alba* leaf extract on the production of nitric oxide, prostaglandin E2 and cytokines in RAW264.7 macrophages. *Fitoterapia* 76:608-613.
- Chumark P, Khunawat P, Sanvarinda Y, Phornchirasilp S, Morales NP, Phivthong-Ngam L, Ratanachamnong P, Srisawat S, Pongrapeeporn KU (2008) The in vitro and ex vivo antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. *J Ethnopharmacol* 116:439-446.
- Chung KO, Kim BY, Lee MH, Kim YR, Chung HY, Park JH, Moon JO (2003) In-vitro and in-vivo anti-inflammatory effect of oxyresveratrol from *Morus alba* L. *J Pharm Pharmacol* 55:1695-1700.
- Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP (2002) The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 39:237-246.

- Heinecke LF, Grzanna MW, Au AY, Mochal CA, Rashmir-Raven A, Frondoza CG (2010) Inhibition of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E-2 production in chondrocytes by avocado soybean unsaponifiables and epigallocatechin gallate. *Osteoarthritis Cartilage* 18:220-227.
- Khan MA, Rahman AA, Islam S, Khandokhar P, Parvin S, Islam MB, Hossain M, Rashid M, Sadik G, Nasrin S, Mollah MN, Alam AH (2013) A comparative study on the antioxidant activity of methanolic extracts from different parts of *Morus alba* L. (Moraceae). *BMC Res Notes* 6:24.
- Moon JS, Shim JC, Suh JS, Lee WC (2010) Radiographic predictability of cartilage damage in medial ankle osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res* 468:2188-2197.
- Omoruyi BE, Bradley G, Afolayan AJ (2012) Antioxidant and phytochemical properties of *Carpobrotus edulis* (L.) bolus leaf used for the management of common infections in HIV/AIDS patients in Eastern Cape Province. *BMC Complement Altern Med* 12:215.
- Pearson RG, Kurien T, Shu KS, Scammell BE (2011) Histopathology grading systems for characterisation of human knee osteoarthritis--reproducibility, variability, reliability, correlation, and validity. *Osteoarthritis Cartilage* 19:324-331.
- Pomonis JD, Boulet JM, Gottshall SL, Phillips S, Sellers R, Bunton T, Walker K (2005) Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain. *Pain* 114:339-346.
- Roche M, Dufour C, Mora N, Dangles O (2005) Antioxidant activity of olive phenols: mechanistic investigation and characterization of oxidation products by mass spectrometry. *Org Biomol Chem* 3:423-430.
- Schaible HG, Ebersberger A, Von Banchet GS (2002) Mechanisms of pain in arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 966:343-354.
- Srinivasan R, Chandrasekar MJ, Nanjan MJ, Suresh B (2007) Antioxidant activity of *Caesalpinia digyna* root. *J Ethnopharmacol* 113:284-291.
- Sritularak, B. (1998). Chemical constituents of *Artocarpus lakocha* and *A. gomezianus*. Master thesis, Chulalongkorn University, Bangkok.
- Thongsuk P (2007) In vitro and clinical study of mulberry extract for skin whitening product. In: *Cosmetic Sciences* vol. Master of Sciences Phitsanulok, Thailand: Naresuan University.
- Wen ZH, Tang CC, Chang YC, Huang SY, Hsieh SP, Lee CH, Huang GS, Ng HF, Neoh CA, Hsieh CS, Chen WF, Jean YH (2010) Glucosamine sulfate reduces experimental osteoarthritis and

nociception in rats: association with changes of mitogen-activated protein kinase in chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 18:1192-1202.

ผลงานจากโครงการ (Output)

เสนอผลงานระดับประเทศ

1. Arada Khunakornvichaya, Sujinna Lekmeechai, Tasana Pitaksuteepong, Noppawan Phumala Morales, **Warinkarn Hemstapat**. Effect of *Morus alba* L. Extract on pain associated with osteoarthritis in rats. Thai J Pharmacol, 2012; 34(1), 121-25.
2. Pham Phuong Phi, Noppawan Phumala Morales, Tasana Pitaksuteepong, **Warinkarn Hemstapat**. Evaluation of *in vitro* Antioxidant Activity of *Morus alba* L. Stem Extract. Abstract#F17. *Proceeding of the 35th Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand Meeting* 20-22 March 2013.
3. Two Master degree students were graduated from this project.
 - Mr. Arada Khunakonvichaya graduated with Master of Science (Toxicology) on 21st Jan, 2013
 - Mr. Pham Phuong Phi graduated with Master of Science (Pharmacology) on 20th May, 2013

ภาคผนวก

เอกสารที่ 1 Arada Khunakornvichaya, Sujinna Lekmeechai, Tasana Pitaksuteepong, Noppawan Phumala Morales, **Warinkarn Hemstapat**. Effect of *Morus alba* L. Extract on pain associated with osteoarthritis in rats. Thai J Pharmacol, 2012; 34(1), 121-25.

เอกสารที่ 2 Pham Phuong Phi, Noppawan Phumala Morales, Tasana Pitaksuteepong, **Warinkarn Hemstapat**. Evaluation of *in vitro* Antioxidant Activity of *Morus alba* L. Stem Extract. Abstract#F17. *Proceeding of the 35th Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand Meeting 20-22 March 2013*.

RESEARCH ARTICLE

Effect of *Morus alba* L. Extract on Pain Associated with Osteoarthritis in Rats**Arada Khunakornvichaya², Sujinna Lekmeechai¹, Tasana Pitaksuteepong³,
Noppawan Phumala Morales¹, Warinkarn Hemstapat¹**¹Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand²Graduate Program in Toxicology, Multidisciplinary Unit, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand³Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand**Abstract**

Osteoarthritis (OA) is a common disorder of synovial joint. Knee pain is a predominant clinical symptom that causes disability especially in elderly. It is typically worse with weight bearing and activities resulting in the loss of patient's quality of life. The current medications used for OA such as steroids and NSAIDs cause serious side-effects. Therefore alternative medicines that offer a superior safety profile are required. *Morus alba* L. (Mulberry tree) has long been widely used in traditional Chinese medicines. It has been reported to have various pharmacological properties including antihyperglycemic, anti-oxidant and in particular anti-inflammatory effects. *M. alba* extract has been shown to suppress the production of inflammatory mediators including NO, PGE₂. Although a number of studies have reported the anti-inflammatory effects of *M. alba*, its potential for treating pain associated with OA has not been explored. Thus, this study was designed to investigate the efficacy of *M. alba* extract on pain-related behavior in rat model of OA. OA was induced in male Wistar rats by anterior cruciate ligament transection (ACLT). The pain-related behavior during OA development was determined up to 12 weeks post-OA induction by using hind limb weight bearing tester. *M. alba* extract significantly reduced OA-associated joint pain in similar manner as glucosamine. This study is the first to demonstrate that *M. alba* extract could attenuate pain associated with OA in rat model. However, further studies are required to determine the active components and the mechanism of action responsible for its effect.

Key Words Osteoarthritis, *Morus alba* L., anterior cruciate ligament transection, joint pain, glucosamine

ผลของสารสกัดต้นหม่อนต่ออาการปวดที่เกิดจากข้อเข่าเสื่อมในหนู

เอรดา คุณากรวิชัย², สัจฉณา เล็กมีชัย¹, ทศนา พิทักษ์สุธีพงษ์³, นพวรรณ ภู่มาลา มอราเลส¹,
วรินกาญจน์ เหมสถาปัตยกรรม¹

¹ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

²หลักสูตรพิษวิทยา หน่วยสหสาขาวิชา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

³ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธนบุรี พิษณุโลก 65000

บทคัดย่อ

โรคข้อเสื่อมอักเสบ (Osteoarthritis, OA) เป็นโรคข้อที่พบได้บ่อยโดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณข้อต่อซินโนเวียล (Synovial joint) อาการแสดงที่เด่นชัดในผู้ป่วยเหล่านี้คืออาการปวดเข่าซึ่งเป็นอุปสรรคอย่างยิ่งต่อการเคลื่อนไหวโดยเฉพาะในผู้สูงอายุ การรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมในปัจจุบันนิยมใช้ยาในกลุ่มสเตียรอยด์และ ยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์เพื่อบรรเทาอาการปวด แต่ยากลุ่มนี้มีผลข้างเคียงอย่างมาก ดังนั้นการศึกษาวิจัยเพื่อให้ได้ยาที่เป็นทางเลือกใหม่ซึ่งมีผลข้างเคียงน้อยกว่ายาที่มีใช้อยู่ในปัจจุบันจึงมีความจำเป็นอย่างมาก *Morus alba* L. หรือต้นหม่อนได้มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศจีน โดยนำมาเป็นส่วนประกอบในตำรับยาจีนโบราณมีการศึกษาพบว่าต้นหม่อนมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย เช่น ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งฤทธิ์ต้านการอักเสบ มีรายงานว่าสารสกัดจากต้นหม่อนสามารถลดการสร้างสารสื่อกลางของการอักเสบ (Inflammatory mediators) เช่น NO และ PGE₂ แม้ว่าจะมีหลายการศึกษาที่รายงานผลด้านการอักเสบของต้นหม่อน แต่ศักยภาพในการลดอาการปวดอันเนื่องมาจากโรคข้อเสื่อมอักเสบยังไม่มีการศึกษา ดังนั้นการวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดต้นหม่อนต่ออาการปวดที่เกิดจากข้อเข่าเสื่อมในหนูขาวเพศผู้ พันธุ์ Wistar ซึ่งชักนำให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อมโดยการตัดเส้นเอ็นที่มีชื่อว่า anterior cruciate ligament (ACL) จากนั้นติดตามประเมินอาการปวดที่เกิดจากการชักนำให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในหนูเป็นเวลา 12 สัปดาห์โดยใช้เครื่องมือที่วัดการลงน้ำหนักที่เท้าหลังของหนู ที่เรียกว่า hind limb weight bearing tester ผลการวิจัยนี้พบว่าสารสกัดจากต้นหม่อนมีฤทธิ์บรรเทาอาการปวดข้อเข่าได้คล้ายคลึงกับกลูโคซามีน งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาครั้งแรกที่แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ของสารสกัดจากต้นหม่อนต่อการบรรเทาอาการปวดที่เกิดจากข้อเข่าเสื่อมในหนู อย่างไรก็ตามยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลการวิจัยนี้ และประเมินหาสารออกฤทธิ์สำคัญ รวมทั้งกลไกการออกฤทธิ์ของสารดังกล่าวที่มีผลในการลดปวด

คำสำคัญ: โรคข้อเข่าเสื่อม, ต้นหม่อน, ปวดข้อเข่า, กลูโคซามีน

Introduction

Osteoarthritis (OA) is a painful condition of chronic progressive degenerative joint disease, and is a leading cause of disability in elderly. It can affect any joint in the body. The most common affected joints include hands, feet, spine, and weight-bearing joints such as knees and hips. Since the current medicine used to treat OA possesses several adverse effects, an alternative medicine that provides pain-relieving effect as well as delays disease progression with superior safety profile for OA is needed.

The mulberry (*Morus alba* L.) tree (also known as white mulberry) has been widely used in traditional Chinese medicines. Methanolic extract of *M. alba* leaf has been shown to suppress the production of inflammatory mediators including NO, PGE₂ (Choi and Hwang, 2005). The active component isolated from water extract of dried root bark of *M. alba* have been shown to exhibit the anti-inflammatory effect (Chung et al., 2003). This anti-inflammatory property might be correlated with inhibition of the iNOS expression through down-regulation the binding activity of NF- κ B, a pivotal transcription factor that has been involved in the regulation of expression of numerous genes associated with inflammatory response (Roman-Blas and Jimenez, 2006), and significant inhibition of COX-2 activity. Although OA has traditionally been regarded as a non-inflammatory arthritis, inflammatory processes are believed to play a significant role in the progression of cartilage degeneration and joint damage in OA patients (Allen et al., 2010). The possible mechanisms that are responsible for the anti-inflammatory effects of *M. alba* extract has been identified (Chung et al., 2003, Choi and Hwang, 2005), however its potential for treating OA has not been explored. This study is therefore aimed to investigate the potential of stem *M. alba* extracts as a novel treatment for OA pain.

Materials and Methods

Animals

Five weeks old male wistar rats (140

- 160 g) were obtained from National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Thailand. Ethical approval of this study was obtained and approved by the Faculty of Science, Mahidol University Animal Care and Use Committee. Animal were housed in pair in a temperature-controlled room ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), maintained at humidity $60 \pm 10\%$, and a 12 h/12 h dark-light cycle. Standard laboratory rat food and water were supplied ad libitum. The OA was surgically induced by anterior cruciate ligament transection (ACLT) as previously described (Naito et al., 2010). Sham-operated rats were treated identically as ACLT rats except that transection of the ACL is omitted.

Investigation of the efficacy of *M. alba* extract in rat model of OA

M. alba ethanolic extract was prepared by maceration from Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Thailand.

Wistar rats were divided into four groups: 1. Sham group with vehicle (Sham + vehicle; n=7), 2. ACLT group with vehicle (ACLT + vehicle; n=10), 3. ACLT group with glucosamine sulfate (ACLT + glucosamine; n=6) and 4. ACLT group with *M. alba* extract (ACLT + *M. alba* extract; n=6). *M. alba* extract (280 mg/kg) and glucosamine sulfate (250 mg/kg) were dissolved in water.

All groups received test articles or vehicle (water) via oral gavage once a day for 7 consecutive weeks starting at week 5 post ACLT induction. Changes in hind paw weight-bearing distributions were assessed at the following time points: at 0 (baseline), 5, 6, 9 and 12 weeks post ACLT induction.

Assessment of Pain: Weight-bearing distribution test

The incapitance meter (hind limb weight bearing tester) (Harvard Apparatus, Barcelona, Spain) was used to assess the pain-related behavior (knee joint pain). This technique measures the difference in weight bearing between the contralateral operated limb and the contralateral

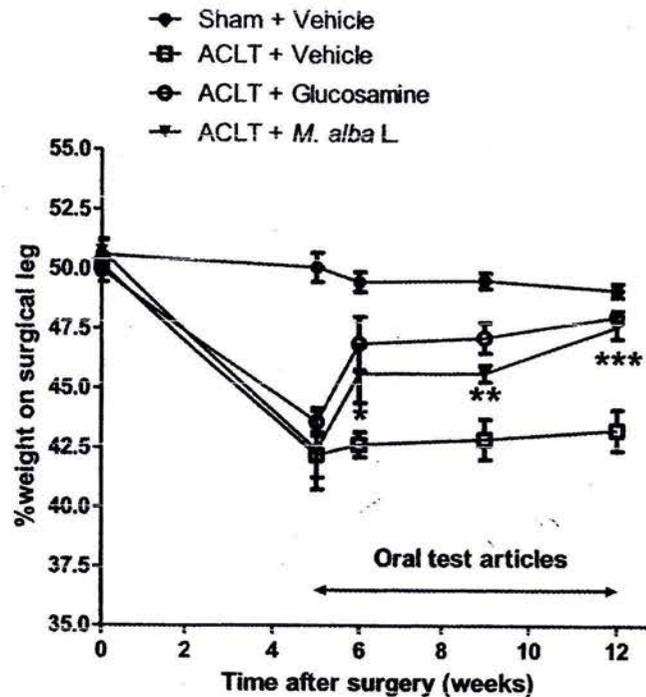


Figure 1 Effects of *M. alba* extract (280 mg/kg) and glucosamine (250 mg/kg) on the % weight bearing. *M. alba* extract and glucosamine were orally administered once a day for 7 consecutive weeks starting at week 5 following ACLT induction. Statistically significant differences were determined using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Newman-Keuls post hoc test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ vs ACLT + vehicle group)

non-operated limb. Changing of hind paw weight distribution between the operated and the contralateral non-operated limb were used as an index of knee joint pain in this study. The percentage of weight distributed on the operated limb was determined as previously described (Pomonis et al., 2005).

Statistical Analysis

All data were expressed as the mean and standard error of the mean (mean \pm SEM). Statistical significance was determined using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Newman-Keuls post hoc test. The p value was set at $p < 0.05$ for the significant different between groups.

Result and Discussion

As can be seen in Figure 1, a significant reduction in the percent weight-bearing on the surgical limb was observed

throughout the study period in ACLT group received vehicle, while sham-operated rats maintained the percent weight-bearing of approximately 50%. Oral administration of glucosamine (250 mg/kg) significantly reversed the percent weight-bearing at all test time points. Similar result was also noted in ACLT group received *M. alba* extract, in which the percent weight-bearing was higher than that of the ACLT group received vehicle at 6, 9 and 12 week post ACLT induction ($45.6 \pm 1.2\%$ vs $42.6 \pm 0.5\%$, * $p < 0.05$; $45.6 \pm 0.3\%$ vs $42.9 \pm 0.8\%$, ** $p < 0.01$; $47.6 \pm 0.5\%$ vs $44.0 \pm 0.8\%$, *** $p < 0.0001$, respectively).

Conclusion

To our knowledge, this is the first study to demonstrate that the ethanolic extract of *M. alba* at dose of 280 mg/kg significantly attenuate pain associated with OA in ACLT-induced rat model.

further studies are required to determine the active components and the mechanism of action responsible for its effect.

Acknowledgement

This work is supported in part by the grant from Center of Excellence on Environmental Health and Toxicology,

However, Science and Technology Postgraduate Education and Research Development Office (PERDO), Ministry of Education. The study is also financially supported by the Thailand Research Fund, grant# DBG5480013. The authors would like to thank Mrs. Piyanee Ratanachamnong for her technical assistance.

References

- Allen KD, Adams SB, Setton LA. Evaluating Intra-Articular Drug Delivery for the Treatment of Osteoarthritis in a Rat Model. *Tissue Eng Part B-Re.* 2010; 16(1):81-92.
- Choi EM, Hwang JK. Effects of Morus alba leaf extract on the production of nitric oxide, prostaglandin E2 and cytokines in RAW264.7 macrophages. *Fitoterapia.* 2005; 76(7-8):608-13.
- Chung KO, Kim BY, Lee MH, Kim YR, Chung HY, Park JH, et al. In-vitro and in-vivo anti-inflammatory effect of oxyresveratrol from Morus alba L. *J Pharm Pharmacol.* 2003; 55(12):1695-700.
- Naito K, Watari T, Furuhashi A, Yomogida S, Sakamoto K, Kurosawa H, et al. Evaluation of the effect of glucosamine on an experimental rat osteoarthritis model. *Life Sci.* 2010; 86(13-14):538-43.
- Pomonis JD, Boulet JM, Gottshall SL, Phillips S, Sellers R, Bunton T, et al. Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain. *Pain.* 2005; 114(3):339-46.
- Roman-Blas JA, Jimenez SA. NF-kappa B as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006; 14(9):839-48.

F17

Evaluation of *In Vitro* Antioxidant Activity of *Morus alba* L. Stem ExtractPham Phuong Phi¹*, Noppawan Phumala Morales¹, Tasana Pitaksuteepong², Warinkarn Hemstapat¹¹Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand; ²Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand
E-mail: warinkarn.hem@mahidol.ac.th**Abstract**

An imbalance level of oxidants in the body has been shown to cause many diseases, including cardiovascular and neurodegenerative diseases, diabetes, cancer and arthritis. Herbal plants are gaining attention as a source of antioxidants. *Morus alba* L., also known as white mulberry, has long been used in traditional folk medicine in many Asian countries, including China, Thailand and Vietnam. Although antioxidant activity of this plant has been investigated in a number of studies, none has been compared the antioxidant activity of various part of *M. alba* until recently. The antioxidant activity of stem, twig and leaf of *M. alba* has been compared by 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging assay and found that the activity of stem was shown to be the highest, followed by twig and leaf, respectively. Therefore, antioxidant activity of *M. alba* stem extract was further investigated using total phenolic content (TPC) assay, DPPH scavenging assay and FRAP assay. The data showed that the amount of total phenolics in the stem extract of *M. alba* was 34.8 ± 1.9 $\mu\text{mol GAE/mg}$ dried stem extract; trolox equivalent antioxidant capacity in DPPH scavenging assay was 0.98 ± 0.09 $\mu\text{mol trolox equivalent/mg}$ dried stem extract and ascorbic acid equivalent in FRAP assay was 1.3 ± 0.3 $\mu\text{mol/mg}$ extract. However, further experiments are needed to determine the potential antioxidant capacity of this stem extract as an alternative treatment for oxidative stress-related diseases.

Keywords: *Morus alba* L. stem extract, Oxidative stress, Antioxidant activity

Introduction

Oxidative stress is a condition occurring when there is an imbalance between the level of oxidants and the capacity of antioxidant defense system in the body. Oxidative stress has been implicated in several diseases, including cardiovascular and neurodegenerative diseases, diabetes, cancer and arthritis (1). Several studies have demonstrated health benefits of dietary intake of herbal plants containing high content of antioxidants. For instance, *M. alba*, a plant that contains several antioxidant active components, including phenolic acids, stilbenes, flavonoids and coumarins has long been used in traditional Chinese medicine. Several health benefits have been reported, including antihyperglycemic (2), hypolipidemic (3) and anti-inflammatory and analgesic (4). The antioxidant activity of different parts of *M. alba* such as leaves, fruits, root bark, and twigs has been widely investigated, however none has been compared the antioxidant activity of various part of *M. alba*. Until recently, the antioxidant activity of stem, twig and leaf of *M. alba* has been compared by DPPH scavenging assay (5,6). The activity of stem was shown to be the highest, followed by twig and leaf with the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) = 44.8 ± 0.01 , 214.3 ± 0.02 , and 365.4 ± 0.01 $\mu\text{g/mL}$, respectively (5,6). In addition, stem of *M. alba* was found to contain the highest amount of oxyresveratrol, a polyphenolic hydroxystilbene, compared to twig and leaf. Moreover, oxyresveratrol was also reported to be an effective scavenger for DPPH radical (IC_{50} = 6.9 ± 0.0 $\mu\text{g/mL}$) (5,6). Therefore, antioxidant activity of *M. alba* stem extract was further investigated for the antioxidant activity.

Since, a strong correlation between the level of phenolic content and antioxidant activity has been reported (7). The present study was designed to determine the antioxidant activity of methanolic extract of *M. alba* obtained from stem and to provide additional scientific data to support the valuable property of this plant for further development as a natural source of antioxidant. This study is the first to evaluate an *in vitro* antioxidant activity of methanolic *M. alba* stem extract.

Materials and Methods**Preparation of *M. alba* stem extract and purified oxyresveratrol**

Methanolic *M. alba* stem extract was prepared by maceration from Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Thailand. Gallic acids, trolox, DPPH were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Folin-Ciocalteu reagent and sodium carbonate were obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

Evaluation of the antioxidant capacity of the stem extract *in vitro*

Determination of total phenolic content (TPC): The total phenolic content of the stem extract was determined using the Folin-Ciocalteu (FC) method as previously described with slight modification (8). Briefly, 100 μL of prepared extract solution or a standard solution of Gallic acid in 50% methanol was mixed with 500 μL FC reagent (10% v/v). The mixture was carefully vortexed and incubated at room temperature for 2 min. Then 400 μL of 7.5% Na_2CO_3 solution was added and the mixture was further incubated for 60 min at room temperature. Absorbance was measured at 765 nm using a spectrophotometer (GBC Cintra 10e, Melbourne, Australia). Gallic acid (GA) equivalents value was calculated by using the standard regression curve and the result was expressed in μmol GAE/mg of dried stem extract.

DPPH radical scavenging assay: The radical scavenging activity (SA) of the *M. alba* stem extract on DPPH radical was assessed based on the method described previously by Roche et al. (9) with some modifications. Stock solutions of the stem extract and trolox (standard antioxidant) were prepared in 100% methanol and further diluted to 0.1 mg/mL and 0.1 mM, respectively. A fixed volume of 1 mM DPPH (100 μL) was mixed with varying volumes of the stem extract or different concentration of trolox to obtain a 1 mL of the reaction mixture. The mixture was then incubated at room temperature for 3 min, and the absorbance was assessed immediately at 515 nm using spectrophotometer. Percentage of DPPH radical scavenging activity (%SA) was calculated according to the following formula: $SA (\%) = [A - B / A] \times 100\%$ Where: A is absorbance of blank sample; B is absorbance of the sample (stem extract or trolox). The percentage of inhibition was plotted against the concentration of the extract and the IC_{50} was obtained. TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) values were calculated by using the standard regression curve and the result was expressed in μmol trolox equivalent/mg of dry stem extract.

Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay: The iron reducing capacity of the *M. alba* stem extract was evaluated using FRAP assay, which was performed according to the method by Benzie and Strain (10) with some modifications. One mL of FRAP reagent was mixed with 50 μL of various concentrations ferrous sulfate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ solution; positive control) or the stem extract solution. The mixture was then incubated at room temperature for 3 min and the absorbance at 593 nm was measured using spectrophotometer. The regression equation of standard was used to calculate the FRAP values (μmol Fe (II) per mg) of the dried stem extract.

Results and Discussion

The antioxidant activity of *M. alba* stem extract was evaluated using three assays. The data showed that the amount of total phenolics in the stem extract of *M. alba* was 34.8 ± 1.9 μmol GAE/mg dried stem extract. The remaining data are shown in Table 1 and 2. All data were conducted in triplicate and expressed as the mean \pm standard deviation.

The free radical scavenging activity of the extract and trolox increased dose-dependently, in which the IC_{50} value of the extract and trolox were 26.6 ± 1.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 6.5 ± 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively (Figure 1). Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) was 0.98 ± 0.1 μmol trolox equivalent/mg dry stem extract (Table 1). These results suggest that this stem extract has a hydrogen-donating activity to free radical.

In FRAP assay, the reducing capacity of the extract was also observed as indicated by FRAP value as 3.9 ± 0.5 μmol Fe (II) per mg of *M. alba* stem extract and 16.0 ± 0.3 μmol Fe (II) per mg of ascorbic acid.

These results suggest that this stem extract has a ferric reducing activity which can prevent the formation of the most harmful hydroxyl radical.

Table 1. DPPH scavenging activity.

	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Trolox equivalent ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ extract)
Stem Extract	26.6 ± 1.7	0.98 ± 0.1
Trolox	6.5 ± 0.1	N/A

Table 2. Ferric ion reducing antioxidant power.

	FRAP values (μmol Fe (II)/mg)	Ascorbic acid equivalent ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ extract)
Stem Extract	3.9 ± 0.5	1.3 ± 0.3
Ascorbic acid	16.0 ± 0.3	N/A

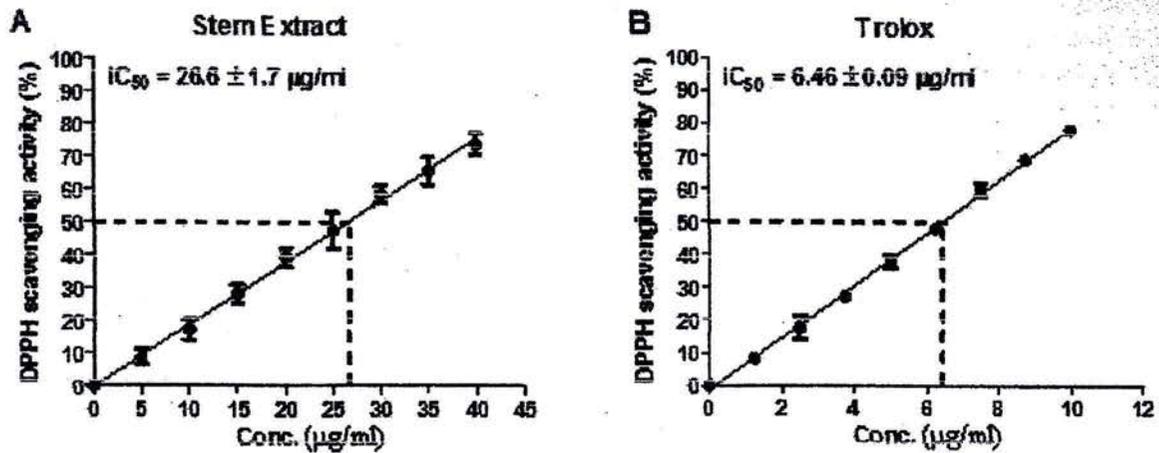


Figure 1. DPPH radical scavenging activity of *M. alba* stem extract (A) and trolox (B).

Conclusion

The present data showed that the methanolic stem extract of *M. alba* contains phenolic acid with a radical scavenging activity and iron reducing capacity. These activities may be due to its phenolic acid component, especially oxyresveratrol, which was reported to present at a high concentration in the stem of *M. alba* (6). However, further experiments are needed to determine the potential antioxidant capacity of this stem extract as an alternative treatment of oxidative stress-related diseases.

Acknowledgements

Mr. Pham Phuong Phi was supported by the Scholarships for International Graduate Students, Faculty of Science, Mahidol University and TRIG Project Vietnam. This research project is supported in part by Faculty of Science, Mahidol University. The study was also financially supported by the Thailand Research Fund, grant#DBG5480013. The authors would like to thank Ms. Nattaporn Soonthornsit for her technical assistance in the process of plant extraction.

References

1. Firuzi O, Miri R, Tavakkoli M, Saso L. Antioxidant therapy: current status and future prospects. *Curr Med Chem*. 2011; 18(25):3871-88.
2. Naowaboot J, Pannangpetch P, Kukongviriyapan V, Kongyingyoes B, Kukongviriyapan U. Antihyperglycemic, antioxidant and antiglycation activities of mulberry leaf extract in streptozotocin-induced chronic diabetic rats. *Plant Foods Hum Nutr*. 2009; 64(2):116-21
3. Yang X, Yang L, Zheng H. Hypolipidemic and antioxidant effects of mulberry (*Morus alba* L.) fruit in hyperlipidaemia rats. *Food Chem Toxicol*. 2010; 48(8-9):2374-9.
4. Zhang Z, Shi L. Anti-inflammatory and analgesic properties of cis-mulberroside A from *Ramulus mori*. *Fitoterapia*. 2010; 81(3):214-8.
5. Thongsuk P, Ingkaninan K, Kaewruang W, Wongareonwanakij S, Pitaksuteepong T, editors. Development of whitening lotion from mulberry extract. Proceedings of the Annual Meeting of the Queen Sirikit Institute of Sericulture; 2009. Bangkok, Thailand.
6. Thongsuk P. *In vitro* and clinical study of mulberry extract for skin whitening product. Phitsanulok, Thailand: Naresuan University; 2007.
7. Khan MA, Rahman AA, Islam S, Khandokhar P, Parvin S, Islam MB, et al. A comparative study on the antioxidant activity of methanolic extracts from different parts of *Morus alba* L. (Moraceae). *BMC Res Notes*. 2013; 6(1):24.
8. Chumark P, Khunawat P, Sanvarinda Y, Phornchirasilp S, Morales NP, Phivthong-Ngam L, et al. The *in vitro* and *ex vivo* antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. *J Ethnopharmacol*. 2008; 116(3):439-46.
9. Roche M, Dufour C, Mora N, Dangles O. Antioxidant activity of olive phenols: mechanistic investigation and characterization of oxidation products by mass spectrometry. *Org Biomol Chem*. 2005; 3(3):423-30.
10. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996; 239(1):70-6.