



สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
THE THAILAND RESEARCH FUND

รายงานการวิจัย

โครงการเรื่อง การศึกษาถึงความสัมพันธ์ของลักษณะโครงสร้าง
ของสารกลุ่มอะซีโตฟีโนนกับฤทธิ์ และกลไกการออกฤทธิ์
กระตุ้นการหลั่งน้ำดี และลดไขมันในเลือด

“Study of the structure-activity relationship of acetophenones
in stimulating bile secretion and lowering plasma lipids
and their mechanisms of action.”

คณะผู้ดำเนินการวิจัย

รศ. ดร. ภาวิณี ปิยะจตุรวัฒน์ (Pawinee Piyachaturawat)

รศ. ดร. ประหยัด โกมารทัต (Prayad Komaratat)

รศ. อาภรณ์ จันท์จารุณี (Aporn Chuncharunee)

รศ. ดร. อภิชาติ สุขสำราญ (Apichart Suksamran)

พฤษภาคม พ.ศ. 2543



สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
THE THAILAND RESEARCH FUND

รายงานการวิจัย

โครงการเรื่อง การศึกษาถึงความสัมพันธ์ของลักษณะโครงสร้าง
ของสารกลุ่มอะซีโตนฟีโนนกับฤทธิ์ และกลไกการออกฤทธิ์
กระตุ้นการหลั่งน้ำดี และลดไขมันในเลือด

“Study of the structure-activity relationship of acetophenones
in stimulating bile secretion and lowering plasma lipids
and their mechanisms of action.”

คณะผู้ดำเนินการวิจัย

รศ. ดร. ภาวิณี ปิยะจตุรวัฒน์ (Pawinee Piyachaturawat)

รศ. ดร. ประหยัด โกมารทัต (Prayad Komaratat)

รศ. อาภรณ์ จันท์จารุณี (Aporn Chuncharunee)

รศ. ดร. อภิชาติ สุขสำราญ (Apichart Suksamran)

พฤษจิกายน พ.ศ. 2543

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์
ทุนวิจัยองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นพื้นฐานต่อการพัฒนา

โครงการเรื่อง การศึกษาถึงความสัมพันธ์ของลักษณะโครงสร้างของ
สารกลุ่มอะซีโตฟีโนนกับฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์
กระตุ้นการหลั่งน้ำดีและลดไขมันในเลือด

“Study of the structure-activity relationship of acetophenones
in stimulating bile secretion and lowering plasma lipids
and their mechanisms of action.”

คณะผู้ดำเนินการวิจัย

1. รศ.ดร. ภาวิณี ปิยะจตุรวัฒน์ (Pawinee Piyachaturawat)
ภาควิชา สรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
2. รศ. ดร. ประหยัด โกมารทัต (Prayad Komaratat)
ภาควิชา ชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
3. รศ. อาภรณ์ จันท์จารุณี (Aporn Chuncharunee)
ภาควิชา กายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล
4. รศ.ดร.อภิชาติ สุขสำราญ (Apichart Suksamrarn)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
ประจำปี 2541-2543

กิตติกรรมประกาศ
(Acknowledgement)

**ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (The Thailand Research Fund)
ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย ประเภททุนองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นพื้นฐานต่อการพัฒนา
ประจำปี 2541–2543 ให้กับโครงการวิจัยนี้ สัญญาเลขที่ BRG/06/2541**

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของลักษณะโครงสร้างของสารกลุ่มอะซีโดฟีโนนกับฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดี และลดไขมันในเลือด เนื่องจากโครงสร้างของสารดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับสาร phloracetophenone (2,4,6-trihydroxyacetophenone, THA) ซึ่งมีฤทธิ์ดีเด่นในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดี จากการศึกษาโดยใช้อะนาล็อกซ์และอนุพันธ์ของสารอะซีโดฟีโนนทั้งหมด 21 ชนิด พบว่าสารกลุ่มไฮดรอกซีอะซีโดฟีโนนอะนาล็อกซ์มีฤทธิ์ดีเด่นในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดี จำนวนและตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซีในวงเบนซีน และคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกัลของสารดังกล่าวมีความสัมพันธ์โดยตรงกับอัตราการหลั่งน้ำดี ความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่หลั่งออกมา และดัชนีของการเกิดนิ่วในน้ำดี โดยสาร THA มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีได้ดีที่สุด มีค่า hydrophilicity สูงกว่าสารอื่นๆ ในขณะที่สาร 2,6-dihydroxyacetophenone (DHA) ซึ่งมีค่า hydrophilicity ต่ำ มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีได้ต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่าสาร THA และ DHA มีฤทธิ์ดีเด่นในการกระตุ้นการขับออกของเกลือน้ำดี และโคเลสเตอรอลตามลำดับ ส่งผลให้ระดับโคเลสเตอรอลในเลือดลดลงอย่างชัดเจน จากการศึกษากลไกการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีโดยใช้สาร 4-hydroxyacetophenone พบว่าสารนี้เมื่อเข้าสู่ตับจะถูกเปลี่ยนแปลงให้อยู่ในรูปของ glucuronide ซึ่งจะถูกขับทิ้งทางน้ำดีต่อไป การขับ metabolite นี้ออกมาในน้ำดีเป็นกลไกหลักที่สำคัญกลไกหนึ่งในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีของสารกลุ่มนี้ นอกเหนือจากการกระตุ้นการหลั่งของกรดน้ำดี

จากการศึกษาถึงฤทธิ์การลดไขมันในเลือดของสาร THA และ DHA โดยใช้หนูแฮมสเตอร์ที่เหนียว นำให้อยู่ในภาวะที่มีระดับโคเลสเตอรอลในเลือดสูง พบว่าทั้งสาร THA และ DHA ออกฤทธิ์ลดระดับของ VLDL และ LDL แต่ไม่มีผลต่อระดับของ HDL ในเลือด ไม่มีผลต่อปริมาณไขมันในตับ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าฤทธิ์ในการลดไขมันของสารทั้งสองไม่ได้เกิดจากการลดการสร้างไขมันในตับเข้าสู่กระแสเลือด และไม่เกี่ยวข้องกับการกักเก็บไขมันจากเลือดมาสะสมไว้ในตับ แต่อย่างไรก็ตามสาร THA และ DHA กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ cholesterol 7- α -hydroxylase ได้ถึง 6-7 เท่า ฤทธิ์ของสาร THA และ DHA ต่อการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวนี้พ้องจองกับฤทธิ์ของสารในการขับกรดน้ำดี และโคเลสเตอรอลออกมาในอุจจาระ จากผลดังกล่าวสรุปได้ว่าสาร THA และ DHA ออกฤทธิ์ลดระดับไขมันในเลือดโดยกระตุ้นการทำงานของ cholesterol 7- α -hydroxylase เร่งการเปลี่ยนไขมันจากรูปของโคเลสเตอรอลไปเป็นกรดน้ำดี และขับออกทางน้ำดี และอุจจาระต่อไป

จากการศึกษาถึงพิษเฉียบพลันของสาร THA โดยการป้อนหรือฉีดเข้าทางช่องท้องในสัตว์ทดลองชนิดต่างๆ ได้แก่ หนูถีบจักร หนูแรท และหนูแฮมสเตอร์ ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย พบว่าค่า LD₅₀ หรือ ขนาดของสารที่ทำให้สัตว์ทดลองตายไปครั้งหนึ่ง ซึ่งเป็นค่าที่ชี้บ่งขนาดความเป็นพิษของสารนั้น ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และเพศของสัตว์ทดลอง และวิธีการให้สาร ไม่ขึ้นอยู่กับอายุของสัตว์ทดลองที่ใช้ จากผลการทดลองในหนูแรท สามารถจัดสาร THA อยู่ในกลุ่มของสารที่ไม่มีพิษ โดยค่า LD₅₀ เมื่อป้อนสาร THA ให้ทางปากมีค่ามากกว่า 6 กรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม หนูแฮมสเตอร์และหนูถีบจักรมีความไวต่อการเกิดพิษจากสาร THA ได้มากกว่าหนูแรท ได้ทำการศึกษาถึงพิษถึงเฉียบพลันของสาร THA ในหนูถีบจักรตัวผู้ โดยป้อนสาร THA ให้ทางปากติดต่อกันเป็นเวลา 30 วัน พบว่าสาร THA ขนาดสูงเท่าที่เหนียวนำไปให้เซลล์ตับบริเวณรอบนอก (periportal area) เกิดการเปลี่ยนแปลง ค่าต่างๆทางชีวเคมีของเลือด เช่น เอนไซม์จากตับและค่าอื่นๆมีการเปลี่ยนแปลงโดยเพิ่มขึ้นบ้างเล็กน้อย

นอกเหนือจากนี้ยังได้ศึกษาถึงบทบาทของสาร THA ในการบรรเทาการคั่งของน้ำดีในตับในหนูแรทที่เหนียวทำให้เกิดการคั่งของน้ำดี พบว่าสาร THA ซึ่งออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งของน้ำดีได้ทันทีหลังจากฉีด สามารถช่วยลดการคั่งของน้ำดีในตับ และระดับของเอนไซม์ alkaline phosphatase ในเลือดของหนูกลุ่มที่เหนียวทำให้เกิดการคั่งของน้ำดีได้ แต่ไม่มีผลลดระดับ bilirubin

จากผลการวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่าสาร THA ซึ่งเป็นสารที่มีต้นกำเนิดมาจากธรรมชาติ จากवानชักมดลูก เป็นสารที่มีฤทธิ์ดีเด่นที่สุดในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดี ขับกรดน้ำดี และลดไขมันในเลือดโดยมีกลไกการทำงานอาจผ่านการขับของ osmotic active metabolite ในน้ำดี และกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ cholesterol 7- α -hydroxylase ในตับให้เปลี่ยน cholesterol ไปเป็นกรดน้ำดี และขับออกทางน้ำดีและอุจจาระ ซึ่งกลไกกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ นี้เป็นกลไกใหม่ที่น่าสนใจ ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการนำพืชสมุนไพรที่มีสาร THA ดังกล่าวไปพัฒนาเป็นยารักษาโรคตับบางชนิด ที่มีการคั่งของน้ำดีและลดไขมันในเลือดได้ต่อไป

Abstract

The purpose of this study is to investigate the relationship between the chemical structure of acetophenones and their activities, in stimulating bile secretion and lowering plasma lipids. The acetophenones used are structurally related to that of phloracetophenone (2,4,6-trihydroxy acetophenone, THA) which has been reported to effectively stimulate bile secretion. In the present study, twenty-one acetophenone analogs and derivatives were used. For the same number of substituents on the benzene ring, hydroxy acetophenone was found to induce a greater choleresis. The number and position of hydroxy substituents on the benzene nucleus and physicochemical properties of the compounds played important roles in determining choleric activity, biliary excretion of bile acids, and lithogenic index. Among the hydroxylated analogs, THA was identified as the most potent choleric compound whereas 2,6-dihydroxyacetophenone (DHA) which has less hydrophilicity induced low choleric activity. In addition to stimulate bile secretion, THA, and DHA also augmented excretory rates of bile acid and cholesterol, respectively, which both subsequently lower plasma cholesterol levels. The choleric mechanism of hydroxy analogs was investigated by using 4-hydroxy acetophenone. After being absorbed through the small intestine, the compound was transported into the liver and was biotransformed to 4-hydroxyacetophenone-4-*O*-glucuronide for excretion into bile. The excretion of this osmotic active metabolite into bile was suggested to be one of the choleric mechanisms, in addition to stimulate excretion of bile acids.

Plasma lipid lowering activities of THA and DHA were investigated in hypercholesterolemic male hamsters. Both THA and DHA decreased plasma VLDL and LDL-cholesterol but not HDL-cholesterol. They did not alter hepatic cholesterol content which indicated that they neither inhibited the hepatic secretion of lipid into circulation nor induced accumulation of lipid in the liver. However, they stimulated activity of cholesterol 7 α -hydroxylase in liver (6 to 7-fold). Corresponding to the increase in enzyme activity, they increased excretion of fecal bile acids and cholesterol. Therefore, it is suggested that THA and DHA reduced plasma cholesterol by stimulating hepatic conversion of cholesterol to bile acid for disposal via biliary excretion and feces.

Toxicity of THA was evaluated by using various animal species including mice, hamsters and rats of both sexes. LD₅₀ values for an acute toxicity of a single intragastric and intraperitoneal dose in mice, hamsters and rats were found to be dependent on routes of administration, species and sex of animals, but was not age dependent. Mice and hamsters were more sensitive to THA than rats. By oral route, the LD₅₀ values in adult male and female rats were higher than 6 g/kg BW, at which the compound can practically be classified as a non-toxic compound. Subacute toxicity of THA was further investigated in adult male mice by giving a daily sublethal dose for 30 consecutive days. It was found that THA, at high dose induced periportal hepatocyte degeneration. Plasma levels of liver enzymes, alanine and aspartate aminotransferases and other biochemical parameters including BUN, bilirubin, and hepatic triglyceride content, although slightly increased, remained within the normal range.

The possible therapeutic effect of THA treatment in ethinylestradiol(EE)-induced cholestatic animals was evaluated. An intraduodenal administration of THA immediately increased bile flow rate and reversed the elevated level of plasma alkaline phosphatase in the cholestatic rats to normal levels, but it did not affect the elevated bilirubin.

In conclusion, the results of the present study demonstrated that among acetophenone analogs and derivatives used, THA, aglucone of a naturally occurring compound from *Curcuma comosa* (family Zingiberaceae) is the most effective compound in stimulating bile secretion and lowering plasma lipid. Its mechanism of action is, at least, mediated through an excretion of osmotic active metabolite of the compound and an activation of hepatic cholesterol 7- α hydroxylase activity for conversion cholesterol into bile acids and excretion into bile and feces. This latter mechanism is of interest as a new strategy for lowering plasma lipid in hypercholesterolemic patients. The information gained from the present study provides basis for further development of plants containing this compound as a therapeutics agents for treatment cholestasis and hypercholesterolemic patients.

Keywords: bile, cholestasis, cholesterol, *Curcuma comosa*, phloracetophenone, toxicity,
2,4,6-trihydroxyacetophenone

สารบัญ

หัวข้อ	เนื้อเรื่อง	หน้า
	กิตติกรรมประกาศ	i
	บทคัดย่อ	v
	บทนำ	1
	วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	4
	วิธีวิจัยและอภิปรายผล	5
	ผลการวิจัย	
	1. การศึกษาถึงฤทธิ์ และกลไกการออกฤทธิ์กระตุ้นการ หลั่งน้ำดี	12
	2. การศึกษาถึงฤทธิ์ และกลไกการออกฤทธิ์ลดระดับไขมัน ในเลือด	29
	3. ศึกษาถึงความเป็นพิษของสาร phloracetophenone	43
	สรุปผลการวิจัย	53
	เอกสารอ้างอิง	58
	Output	60
	ภาคผนวก	63

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในปัจจุบันความเจริญก้าวหน้าในทางการแพทย์มีมาก ทำให้มนุษย์มีอายุที่ยืนยาวขึ้น ทำให้มีโอกาสร่วมกับปัจจัยเสี่ยงต่อโรค และอาการต่างๆที่เกิดจากความเสื่อม และการถดถอยของการทำงานของอวัยวะในระบบต่างๆทั่วร่างกายมากขึ้น เช่นภาวะของการเผาผลาญอาหารที่ลดลงเมื่อมีอายุมากขึ้น ทำให้มีระดับไขมันและ cholesterol ในเลือดสูงขึ้น เป็นต้น ภาวะไขมันในเลือดสูงนี้เป็นภาวะหนึ่งที่พบบ่อยในผู้สูงอายุ และเป็นสาเหตุสำคัญของการเจ็บป่วยและการเสียชีวิต การมีระดับของไขมันและ cholesterol ในเลือดสูง จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่างๆขึ้นภายในผนังหลอดเลือด มีการสะสมของไขมันในผนังหลอดเลือดมาก ทำให้ความยืดหยุ่นของหลอดเลือดเสียไป เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิด atherosclerosis ซึ่งอาจจะนำไปสู่การตีบตันของหลอดเลือด และการอุดตันของหลอดเลือดโดยไขมัน เมื่ออาการดังกล่าวเกิดขึ้นกับหลอดเลือดของอวัยวะใด จะทำให้เลือดที่ไปหล่อเลี้ยงยังอวัยวะเหล่านั้นไม่เพียงพอ ปัญหารุนแรงที่พบบ่อยคือการตีบตันของเส้นเลือดที่ไปยังกล้ามเนื้อหัวใจ เกิด coronary heart disease (CHD) ทำให้เนื้อเยื่อของหัวใจตาย การตีบตันของเส้นเลือดไปยังสมอง เมื่อเกิดขึ้นกับสมองบริเวณใดจะทำให้เซลล์ประสาทบริเวณนั้นเสียไป การควบคุมและสั่งการต่ออวัยวะต่างๆจะเสียไปด้วย เกิดอาการอัมพาตขึ้นซึ่งเป็นภาระต่อผู้ดูแล และนำไปสู่การสูญเสียทางเศรษฐกิจของชาติเป็นอย่างมาก

ในทางการแพทย์ได้มีความพยายามที่จะป้องกันปัญหาเหล่านั้น โดยให้ผู้ป่วยลดระดับไขมันในเลือดที่สูงขึ้นด้วยวิธีการต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งความพยายามในการลดระดับของ cholesterol ซึ่งอาจทำได้ด้วยการจำกัดชนิดของอาหารที่รับประทาน ให้ออกกำลังกายเพื่อเร่งการใช้ไขมัน และการใช้ยาลดไขมันในเลือดก็เป็นทางหนึ่งของการป้องกัน (O'Connor et.al. 1990) ถึงแม้ว่าอุบัติการณ์ของการเกิดไขมันอุดตันของหลอดเลือดในประเทศไทยจะพบไม่มากเท่ากับที่พบในประชากรของประเทศกลุ่มตะวันตกก็ตาม ในแต่ละปีประเทศไทย มีการใช้ยาในกลุ่มนี้คิดเป็นมูลค่ามหาศาล จากการรวบรวมข้อมูลของกระทรวงสาธารณสุข ในปี 2532 มีการนำเข้า และผลิตยาในกลุ่มที่ใช้ลดไขมันในเลือดคิดเป็นมูลค่าถึง 300 ล้านบาท

มีพืชสมุนไพรหลายชนิดที่มีรายงานว่ามีฤทธิ์ลดไขมันในเลือดได้ ได้แก่พืชกลุ่ม *Curcuma* species ของ family Zingiberaceae ในปี ค.ศ. 1956 และ 1957, Ramaprasad และ Siri ได้รายงานถึงฤทธิ์ของขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) ว่ามีฤทธิ์ในการกระตุ้นการหลั่งของน้ำดี และขับ cholesterol ออกทางน้ำดี สารที่ออกฤทธิ์ดังกล่าวคือ Curcumin ต่อมาได้มีรายงานว่า Curcumin สามารถลดระดับ cholesterol ในเลือดได้อีกด้วย (Dixit et al., 1988) ในประเทศอินเดียนิยมใช้ส่วนผสมของ *Curcuma* หลายๆชนิดมาเป็นยาลดไขมัน

เช่น Temoe Lawak Singer^R (RVG 08637) ซึ่งเป็นส่วนผสมของ *Curcuma aromatica*, *Curcuma amara* และ *Rhamni purshianae cortex* สามารถลดไขมันในเลือดได้ (Beynen, 1987) นอกจากนี้ยังมี *Curcuma* อื่นๆอีกที่สามารถลดไขมันในเลือดได้ เช่น *Curcuma xanthorrhiza* เป็นต้น (Ozaki, 1988; Yasni, 1993)

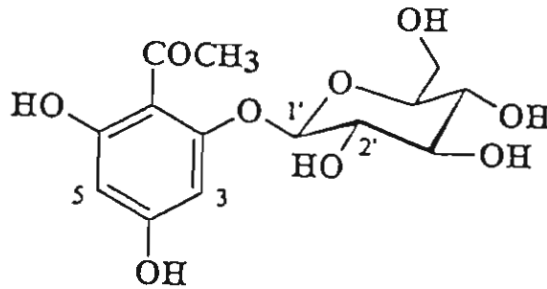
สำหรับประเทศไทย คณะของผู้วิจัยได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากว่านชักมดลูกของไทย (*Curcuma comosa*) ซึ่งเป็นพืชชนิดหนึ่งในกลุ่ม *Curcuma* พบว่าสารสกัดจากว่านนี้มีฤทธิ์ดีเด่นในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีจากตับ น้ำดีที่หลั่งออกมามีปริมาณของ cholesterol สูงกว่าปกติ และในขณะที่มีการขับ cholesterol ออกมาทางน้ำดีจะทำให้ระดับ cholesterol ในเลือดลดลง (Piyachaturawat et al., 1996a) ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวเป็นฤทธิ์ที่น่าสนใจและพบในสารสกัดที่ละลายได้ดีในตัวทำละลาย Ethyl acetate จากการนำสารสกัดนี้ไปศึกษาถึงฤทธิ์ในการลดระดับไขมันในเลือดพบว่าสารสกัดนั้นสามารถลดระดับ triglyceride และ cholesterol ในเลือดได้ (Piyachaturawat et al., 1996b) แต่เนื่องจากสารที่สกัดได้เป็น crude extract ประกอบด้วยสารเคมีมากมายหลายชนิดจึงทำให้เกิดอาการข้างเคียงอื่นๆได้ เช่น ตับมีขนาดโตขึ้น เป็นต้น (Piyachaturawat et al., 1996b) กลุ่มผู้วิจัยจึงได้สกัดแยกสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์สำคัญออกมาจากว่านชักมดลูกในว่านชนิดนี้ไม่พบสาร *Curcumin* เหมือน *Curcuma* อื่นๆแต่พบว่าในสารสกัดที่ละลายใน Ethyl acetate นี้มีสารเคมีที่ออกฤทธิ์ลดไขมันในเลือดได้เด่นตัวหนึ่งเป็น glucoside ของสารในกลุ่ม acetophenone คือ 4,6-dihydroxy-2-O-(β -D-glucopyranosyl) acetophenone (ดูรูปที่ 1) (Suksamram et al., 1996) ถึงแม้ว่าสาร aglucone ของ glucoside นี้คือ phloracetophenone (2,4,6-trihydroxy acetophenone) จะเป็นสารเคมีที่เคยพบแล้วในพืชอื่น และแมลงบางชนิด โดยมีรายงานว่าสาร Phloracetophenone นั้น มีฤทธิ์ดีเด่นในการลดอาการอักเสบ สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ enzyme prostaglandin synthase ได้แรงกว่ายา aspirin ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีใกล้เคียงกัน (Jurenka et al. 1989) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานของการพบสารดังกล่าวนี้ในว่านชักมดลูก (*C. comosa*) และฤทธิ์ต่อการหลั่งน้ำดีและลดไขมันมาก่อนเลย

เนื่องจากสาร glycoside ที่พบเป็น glucoside ของ 2,4,6-trihydroxy acetophenone ซึ่งอาจจะสลาย (hydrolysis) ได้โดยกรดและเบสที่เรียในทางเดินอาหาร ทำให้ได้ aglucone เป็น 2,4,6-trihydroxy acetophenone กลุ่มผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาถึงฤทธิ์เบื้องต้นของ glucoside และฤทธิ์ของ aglucone ต่อการกระตุ้นการหลั่งน้ำดี พบว่าสารทั้งสองมีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีได้เป็นอย่างดี (Suksamram et al. 1997) องค์ประกอบของน้ำดีที่ออกมาต่างจากที่ได้จากการกระตุ้นโดยสารสกัดจากพืช กล่าวคือมีปริมาณของกลีโกลินมาก, cholesterol ต่ำและมี lithogenic index ต่ำ ข้อมูลเหล่านี้เป็นข้อมูลใหม่ที่น่าสนใจ สมควรจะได้รับการศึกษาให้ลึกซึ้ง เนื่องจากสารกลุ่ม acetophenone นี้มี analogs หลายตัวที่น่าสนใจ และในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะโครงสร้างของสาร acetophenone กับการออกฤทธิ์กระตุ้นการ

หลังน้ำดีและการลดไขมันในเลือดเลย การศึกษาถึงเรื่องดังกล่าวจะนำไปสู่ความเข้าใจในการออกฤทธิ์ของสาร และคัดเลือกสารเพื่อพัฒนาเป็นยาได้ต่อไป ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาถึงความสัมพันธ์ของฤทธิ์และลักษณะโครงสร้างของ analogues ที่มี hydroxy group ที่ตำแหน่งต่างกันออกไป และ acetophenone ที่เปลี่ยนจาก keto group เป็น aldehydic และ carboxylic group

สารที่นำมาทำการศึกษาวิจัย ในโครงการนี้มีดังต่อไปนี้

- | | |
|--------------------------|--|
| สารหลัก คือ | 1). 2,4,6-Trihydroxyacetophenone (2,4,6-THA) |
| | 2). Acetophenone |
| Analogues คือ | 3). 2-Hydroxyacetophenone |
| | 4). 3-Hydroxyacetophenone |
| | 5). 4-Hydroxyacetophenone |
| | 6). 2,4-Dihydroxyacetophenone |
| | 7). 2,5-Dihydroxyacetophenone |
| | 8). 2,6-Dihydroxyacetophenone |
| | 9). 3,5-Dihydroxyacetophenone |
| | 10). 2,3,4-Trihydroxyacetophenone |
| | 11). 2-OH-4-OCH ₃ acetophenone |
| | 12). 3-OCH ₃ acetophenone |
| | 13). 2,6-(OCH ₃) ₂ acetophenone |
| | 14). 3,4-(OCH ₃) ₂ acetophenone |
| | 15). 2-Chloroacetophenone |
| | 16). 2,4-Dichloroacetophenone |
| | 17). 3,4-Dichloroacetophenone |
| สารอื่น | 18). 2,4,6-Trihydroxybenzoic acid |
| ที่มีโครงสร้างเกี่ยวข้อง | 19). 2,4,6-Trihydroxybenzaldehyde |
| | 20). O-Acetyl salicylic acid |
| | 21). Propiophenone |



รูปที่ 1 แสดงถึง 4, 6-Dihydroxy-2-O-(β -D-glucopyranosyl) acetophenone ที่ได้จากवानชักมดลูก

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

โครงการนี้เป็นการวิจัยเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีกำเนิดมาจากธรรมชาติ โดยเน้นถึงความสัมพันธ์ของโครงสร้างของสารในกลุ่ม acetophenones ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของสารที่ได้จากวานชักมดลูกกับการออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีและลดไขมันในเลือด และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารดังกล่าวกับความแรงของฤทธิ์ที่เกิดขึ้น การวิจัยประกอบด้วยข้อย่อยต่อไปนี้

- 1 ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่ม acetophenones กับฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งน้ำดี และองค์ประกอบของน้ำดี โดยจะใช้ analogs ต่างๆ ดังที่ได้กล่าวข้างต้นเปรียบเทียบกัน และเลือกสารกลุ่มที่มีฤทธิ์ดีเด่นในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีจำนวนหนึ่งไปทำการศึกษาต่อไปถึงฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์อย่างละเอียด
- 2 ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของสารในกลุ่มที่มีฤทธิ์ดีเด่นกับฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งน้ำดี การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของน้ำดี
- 3 ศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารดังกล่าวในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีว่ามีกลไกการออกฤทธิ์เป็นอย่างไร
- 4 ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของสารกับฤทธิ์การลดไขมันในเลือดโดยใช้สัตว์ทดลองที่เหนียวน้ำหนักให้มีระดับของไขมันในเลือดสูงกว่าปกติ
- 5 ศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารในการลดไขมันในเลือดว่ามีความสัมพันธ์กับฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งน้ำดีหรือไม่อย่างไร สารดังกล่าวมีฤทธิ์ต่อการสังเคราะห์ไขมัน การหลั่งไขมันจากตับ และกระบวนการ metabolism ของไขมันในร่างกายอย่างไร
- 6 ศึกษาถึงความเป็นพิษของสารที่ออกฤทธิ์ดีเด่นเหล่านั้น

วิธีวิจัย

ตอนที่ 1. การศึกษาถึงฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดี

เนื่องจากสาร acetophenone รวมถึงสาร analogs ที่จะใช้ในการศึกษาเป็นสารเคมีที่มีจำหน่าย ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงสามารถจะข้ามขั้นตอนการสกัดจากพืช และการสังเคราะห์ analogs ต่างๆไปได้เลย โดยจะได้นำสารบริสุทธิ์ที่มีจำหน่ายมาศึกษา

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยในห้องปฏิบัติการโดยใช้หนู Rat เพศผู้เป็นสัตว์ทดลอง มีขอบเขตของการวิจัยดังต่อไปนี้

1.1 การศึกษาถึงความสัมพันธ์ของลักษณะโครงสร้างของสาร acetophenones กับฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งน้ำดี (Structure-activity relationship of acetophenones and bile secretion)

การศึกษาถึงฤทธิ์ของสารต่อการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีโดยจะทำการศึกษาในหนู rat พันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 200-250 กรัม เป็นสัตว์ทดลองเลี้ยงด้วยอาหารหนูมาตรฐาน (Pokphand Animals Fed Co., Ltd., Bangkok) อุดอาหารหนู 1 คิน สลบด้วย Nembutal (35-50 mg/kg., i.p.) ทำ tracheostomy เพื่อช่วยในการหายใจ cannulate bile duct ด้วย polyethylene tube (PE) No. 10 เพื่อเก็บน้ำดี สอดท่อ PE No. 50 เข้า femoral vein เพื่อใช้ในการ infuse สารละลาย ทำการ infuse ด้วย normal saline เพื่อทดแทนการสูญเสีย น้ำของสัตว์ระหว่างการทดลอง อุณหภูมิของสัตว์ทดลองถูกควบคุมให้อยู่ที่ 37°C ด้วย rectal probe ต่อเข้ากับ temperature regulator โดยใช้ไฟส่องให้ความร้อนเหนือตัวสัตว์

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำดีที่ไหลออกมาจากท่อน้ำดีเป็นช่วงๆช่วงละ 30 นาที หลังจากเก็บน้ำดีในช่วงที่ 2 แล้วทำการฉีดสารละลายที่ต้องการจะทดสอบเข้าสู่โพรงลำไส้เล็กบริเวณ duodenum ทำการเก็บน้ำดีต่อไป 6-8 ช่วง สารที่ใช้ในการทดสอบจำนวน 21 ตัวนี้จะทำการละลายใน 10% DMSO ด้วยความเข้มข้นที่เหมาะสมขนาดหนึ่งเพื่อให้สัตว์ทดลอง(ขนาดประมาณ 50 mg/kg BW) ใช้สัตว์ทดลองกลุ่มละ 8-10 ตัว ทำการเปรียบเทียบอัตราการหลั่งน้ำดี (bile flow rate) ทั้งก่อนและหลังการฉีดสารแต่ละตัวที่ใช้ทดสอบ และจะได้เปรียบเทียบผลที่ได้กับสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุมที่ได้รับแค่ solvent ที่เวลาเดียวกันด้วย คำนวณหาฤทธิ์การกระตุ้นว่ามีความแรงเท่าใด เพิ่มอัตราการหลั่งน้ำดี (Bile flow rate) ได้มากน้อยเพียงใด onset และ duration เป็นอย่างไร นำน้ำดีที่ได้มาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเกลือน้ำดี (bile salt concentration) และความสามารถในการหลั่งเกลือน้ำดี (total output) ที่ออกมาในแต่ละช่วง ทำการวิเคราะห์เกลือน้ำดีด้วย enzymatic method โดยใช้ enzyme 3- α steroid dehydrogenase ด้วยวิธีของ Turnberg and Antony-Mote (1969)

1.2 ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของสาร acetophenones กับฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งน้ำดี และองค์ประกอบของน้ำดี (Dose response effect of acetophenones on biliary secretion and constituents)

เตรียมสัตว์ทดลองตามวิธีที่ได้กล่าวไว้ในข้างต้น (1.1) ฉีดสารละลาย acetophenone analogs ที่มีฤทธิ์ดีเด่นจากผลข้อ (1.1) ให้สารที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันฉีดเข้าสู่โพรงลำไส้เล็ก เปรียบเทียบผลการกระตุ้นการหลั่งน้ำดี และการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของน้ำดีหลังจากให้สารขนาดต่างๆกันประมาณ 5 ขนาด นำน้ำดีที่ได้มาศึกษาคำนวณ และวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำดี ดังต่อไปนี้

- คำนวณหาอัตราการหลั่งของน้ำดี (Bile flow rate)
- ทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเกลือน้ำดี (Bile salt concentration), ปริมาณของเกลือน้ำดีที่ออกมา (Total bile salt output)
- ทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นและปริมาณของ cholesterol ในน้ำดีโดยวิธี enzymatic method (Bolton et. al, 1980)
- ทำการวิเคราะห์ปริมาณ phospholipid (Ellefson and Caraway, 1976) โดยการสกัดและวัด ปริมาณของ inorganic phosphate ด้วย Fiske & Subbarow method (1925)
- นำค่าต่างเหล่านี้มาคำนวณหา lithogenic index ด้วยวิธีของ Carrey (1978)

เมื่อเสร็จสิ้นการทดลอง ทำการเก็บเลือด และแยก plasma เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อวิเคราะห์ปริมาณของ cholesterol และ triglyceride ที่มีอยู่ในพลาสมา และชั่งน้ำหนักตับ

1.3 ศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดี (Mechanism of action)

เนื่องจากองค์ประกอบหลักของน้ำดีคือ กรดน้ำดี ซึ่งจะมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดี โดยเป็นตัวให้แรง osmotic เพื่อดึงน้ำออกมา การออกฤทธิ์ของสารต่างๆที่กระตุ้นการหลั่งน้ำดีอาจจะเกิดจากไปกระตุ้นการขับเกลือน้ำดี หรือขับสารนั้น หรือ metabolite ของสารนั้น หรือทั้งสองอย่าง โดยสารที่ถูกขับออกมาจะดึงน้ำให้ตามออกมาเช่นเดียวกับเกลือน้ำดี ในการศึกษาวิจัยนี้จะได้ทำการวิเคราะห์น้ำดีที่หลั่งออกมาว่าเป็นอย่างไร มีส่วนที่ขึ้นกับเกลือน้ำดี (Bile acid dependent flow, BADF) และส่วนที่ไม่ขึ้นกับเกลือน้ำดี (Bile acid independent flow, BAIF)

ในการศึกษาส่วนนี้ ใช้สาร 4-monohydroxyacetophenone เป็นตัวแทน ทำการรวบรวมน้ำดีที่ได้จากการกระตุ้นด้วยสาร 4-monohydroxyacetophenone ในช่วง 2 ชั่วโมงมาเจือจางด้วย absolute ethanol 20 เท่า โดยปริมาตร หลังจากนั้นนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที ทิ้งข้ามคืน นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง

แบบละเอียดแยกโปรตีนที่ตกตะกอนออก จากนั้นนำไปประเหยด้วยตัวทำละลายโดยการกลั่นลดความดัน แล้วทำให้แห้งภายใต้สูญญากาศ นำสารที่ได้ไปละลายใน 5 ml 20% methanol แล้วแยกด้วย preparative-HPLC;

Column: Deta-Pak C¹⁸, 15µm, 40 x 100 mm,

Mobile phase: 5 : 95 ของ methanol : สารละลาย 5% acetic acid

Flow rate: 10 ml/min

Detector: 250 nm.

เก็บสารละลายช่วงเวลาที่ 6-8 ไปประเหยและตกผลึกในตัวทำละลาย ethanol-น้ำ ผลึกที่ได้นำไปหา

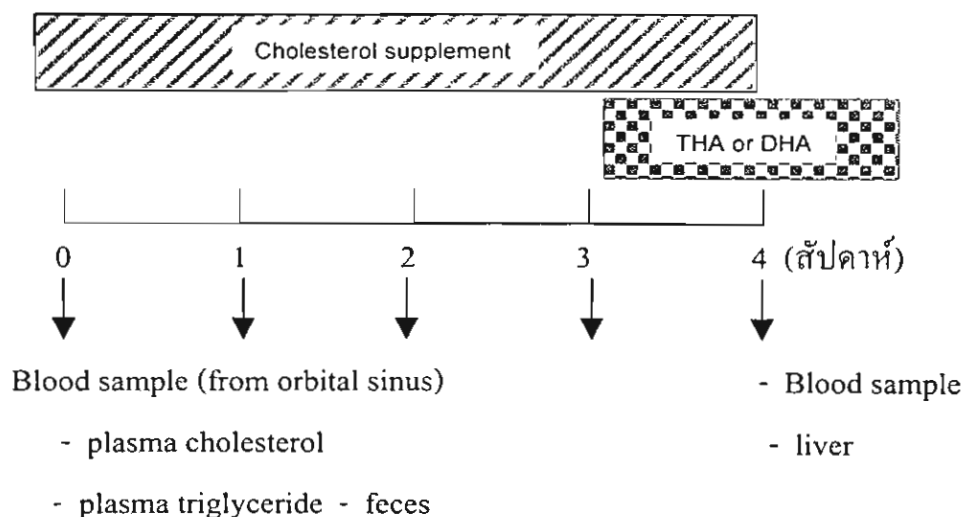
โครงสร้างทางเคมีด้วย ¹H NMR-spectroscopy

หลังจากที่ได้ metabolite ทำการศึกษาหาความสัมพันธ์ของ metabolite กับการหลั่งน้ำดี

ตอนที่ 2. การศึกษาถึงฤทธิ์ และกลไกการออกฤทธิ์ลดระดับไขมันในเลือด

การศึกษาในส่วนนี้ใช้ hamster เป็นสัตว์ทดลอง

2.1 การเหนี่ยวนำสัตว์ทดลองให้มีระดับ cholesterol ในเลือดสูงกว่าปกติ



แผนผัง แสดงการป้อน cholesterol เสริม การให้สารทดสอบและการเก็บตัวอย่างเลือด ตับ และอุจจาระ

การศึกษาในหัวข้อนี้ใช้ Hamster เพศผู้ โตเต็มวัย ขนาด 80-120 กรัม เป็นสัตว์ทดลองโดยทำการเหนี่ยวนำ Hamster ให้มีระดับไขมันในเลือดสูงกว่าปกติด้วยการป้อน cholesterol เสริม แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 3 กลุ่มหลักคือ กลุ่มควบคุมที่ใช้หนูปกติ กลุ่มควบคุมที่เสริมด้วย cholesterol และกลุ่มทดลองที่เสริมด้วย cholesterol พร้อมกับได้รับสารทดสอบขนาดต่างๆและระยะเวลาต่างๆตามรายละเอียดที่จะได้กล่าวต่อไป ทำการละลาย cholesterol (Sigma-Aldrich Chem. Co.) ในน้ำมันข้าวโพดแล้วป้อนให้กับสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ 2, 3 และ 4 ในขนาด 0.2% ของน้ำหนักตัว/ตัว ทุกวัน ส่วนในกลุ่มควบคุมกลุ่มแรกจะได้รับแต่น้ำมันข้าวโพดซึ่งใช้เป็นตัวละลาย cholesterol เท่านั้น ในขณะที่ทดลองจะเก็บตัวอย่างเลือดจากตา (orbital sinus) ของสัตว์ทดลองมาตรวจสอบหาระดับ cholesterol ที่เปลี่ยนแปลงทุกสัปดาห์ เมื่อระดับ cholesterol ในเลือดสูงเกิน 250-350 mg% จะนำสัตว์ทดลองดังกล่าวมาทดสอบฤทธิ์ของสาร 2,4,6-trihydroxy acetophenone (THA) และ 2,6-dihydroxyacetophenone (DHA) ต่อไป สารที่ใช้ทดสอบนั้นซื้อจากบริษัทที่มีจำหน่าย (Sigma-Aldrich Chem. Co.) และทำการละลายในตัวทำละลายซึ่งประกอบด้วย DMSO และ Corn Oil (1:10)

2.2 ศึกษาถึงการออกฤทธิ์ของสาร THA และ DHA ต่อการลดระดับไขมันที่สูงเกินปกติ

2.2.1 ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของสาร THA และ DHA กับการออกฤทธิ์

การทดสอบฤทธิ์ของสาร THA และ DHA ทำโดยการป้อนสารในขนาดต่างๆ (300-600 $\mu\text{mol/kg}$ วันละ 2 ครั้ง) เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนด นำสัตว์ทดลองมาเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อวิเคราะห์หาระดับ triglyceride และ cholesterol โดยใช้ enzymatic method (Allain et al. 1974; McGowan et al. 1983)

2.2.2 ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาของการให้สาร THA และ DHA กับฤทธิ์ที่เกิดขึ้น

จากหัวข้อการวิจัยที่ 2.2.1 จะเลือกขนาดของสารที่ออกฤทธิ์ได้เหมาะสม 1 ขนาดมาศึกษา จากการวิจัยโดยใช้ขนาด 400 $\mu\text{mol/kg}$ ป้อนให้กับสัตว์ทดลองวันละ 2 ครั้งเป็นเวลา 14 วันติดต่อกัน เก็บเลือดจาก orbital sinus มาวิเคราะห์หาระดับ plasma cholesterol และระดับ triglyceride ในวันที่ 3, 7 และ 10 เมื่อครบกำหนดการเลี้ยงในวันที่ 14 เก็บเลือดจาก abdominal aorta และตับเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณของ cholesterol และ triglyceride ต่อไป

2.3 ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสาร THA และ DHA ในการลดไขมัน

จากหัวข้อการวิจัยที่ 2.2.1 จะทำให้ได้ขนาดของสารและระยะเวลาที่สารออกฤทธิ์ลดไขมันได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในการศึกษาจะใช้สารเพียงขนาดเดียวมาศึกษากลไกการออกฤทธิ์คือขนาด 400 $\mu\text{mol/kg}$ BW เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นจึงนำเนื้อเยื่อต่างๆมาศึกษา

2.3.1 ฤทธิ์ต่อปริมาณไขมันในตับ

จากหัวข้อการวิจัย 2.2.2 นำตับมา homogenate และวิเคราะห์หาปริมาณของไขมันทั้งหมดที่มีอยู่ในตับ ได้แก่ปริมาณของ triglyceride และ cholesterol โดยในส่วนของ cholesterol จะได้แยกศึกษาถึงส่วนที่เป็น bound form และ free form ที่มีอยู่ในตับต่อไป เพื่อใช้เป็นแนวทางในการประเมิน activity ของ enzyme ที่เกี่ยวข้องกับการ metabolism ของ cholesterol ในตับ

2.3.2 ฤทธิ์ต่อปริมาณของ Lipoprotein ชนิดต่างๆในเลือด

นำเลือดจากสัตว์ทดลองกลุ่มต่างๆมาศึกษาหาปริมาณของ lipoprotein หลักที่มีอยู่ในเลือด ได้แก่ VLDL, LDL และ HDL โดยแยก plasma lipoprotein ด้วยวิธี sedimentation density gradient ultracentrifugation (Havel et al. 1955) หลังจากนั้นได้นำ fractions ต่างๆที่ได้มาวัดปริมาณของ cholesterol ใน fractions ด้วยวิธี enzymatic method (Allain et al. 1974)

2.3.3 ฤทธิ์ต่อ activity ของ enzyme cholesterol 7- α -hydroxylase

Enzyme cholesterol 7- α -hydroxylase ในตับเป็น enzyme ที่มีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยน cholesterol ไปเป็นกรดน้ำดี และขับออกทางน้ำดี การทำงานของ enzyme ตัวนี้จะเป็นตัวกำหนดควบคุมปฏิกิริยาดังกล่าว ในการวิเคราะห์นี้นำตับมาทำการ homogenize แล้วทำ homogenate ที่ได้ส่วนหนึ่งไปปั่นแยก microsome fraction ออกมาด้วย ultracentrifuge (100,000 x g, 60 นาที) และวิเคราะห์หา activity of cholesterol 7- α -hydroxylase ด้วยวิธีของ Prinan et al. (1986) และ Nimmannit and Porter (1980) โดยใช้สารรังสี (4- C^{14})- cholesterol เป็น substrate และวัด product ทำได้คือ 7- α -hydroxycholesterol โดยใช้ silica gel plate แยก scape band ของ cholesterol 7- α -hydroxycholesterol มาวัดสารรังสีโดยใช้ β -counter ขณะเดียวกันจะได้ทำการวัด endogenous cholesterol ใน microsome เพื่อเปรียบเทียบปริมาณของ substrate ในกลุ่มต่างๆกันด้วย

2.3.4 ฤทธิ์ต่อปริมาณของ cholesterol และกรดน้ำดีในอุจจาระ

จะได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณของ cholesterol และกรดน้ำดีในอุจจาระโดยทำการเก็บอุจจาระจากส่วนท้ายของทวารหนักในวันที่จะฆ่า จากนั้นนำอุจจาระไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50-60 °C (2 วัน) เมื่ออุจจาระแห้งสนิท (stable dried weight) นำมาสกัดแยกเพื่อวัดระดับ cholesterol และกรดน้ำดี

ตอนที่ 3. การศึกษาถึงความเป็นพิษของสาร acetophenones

จากผลการศึกษาวิจัยเมื่อพบสารที่มีฤทธิ์ดีเด่น จะได้นำสารเหล่านั้นมาทำการศึกษาต่อในแง่ของพิษวิทยา ศึกษาถึงอาการพิษที่อาจจะเกิดขึ้นได้อย่างเฉียบพลันจากการใช้สารในขนาดสูงครั้งเดียว หรือใช้สารในขนาดต่ำๆติดต่อกันเป็นเวลานานๆ เมื่อสารมีพิษต่ำจะได้ศึกษาถึงแนวทางในการบรรเทาอาการผิดปกติของตับ เช่นการล้างของน้ำดี เป็นต้น

3.1 การศึกษาพิษเฉียบพลัน (Acute toxicity)

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาถึงความเป็นพิษของ THA ทำการศึกษาวิจัยในหนูถีบจักร (adult & weanling) หนูแรท และหนูแฮมสเตอร์โคเค็มวัยทั้งในเพศผู้และเพศเมีย โดยก่อนทำการทดลองสัตว์ทดลองจะถูกงดอาหารก่อนเป็นเวลาประมาณ 12-14 ชั่วโมง สาร THA ที่ใช้ทดสอบละลายในตัวทำละลายซึ่งประกอบด้วย DMSO: EtOH: Distilled water ในอัตราส่วน 25:15:60

ในการศึกษาถึงพิษเฉียบพลันของสาร THA ทำการป้อนสารพิษให้ทางปาก (i.g.) หรือฉีดเข้าทางช่องท้อง (i.p.) ในขนาดต่างๆ ซึ่งอยู่ในพิสัยระหว่าง 0.1-6 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวของหนู หลังจากให้สาร THA แก่สัตว์ทดลองแล้วทำการสังเกตและบันทึกอาการ อาการแสดงของสัตว์ทดลองอย่างใกล้ชิดตลอดเวลา 3 ชั่วโมงแรก รวมถึงบันทึกจำนวนสัตว์ทดลองที่ตายและรอดชีวิตในแต่ละกลุ่ม หลังจากได้รับ THA ในขนาดต่างๆกัน นำมาคำนวณหาค่า LD₅₀ ตามวิธีของ Litchfield and Wilcoxon (1949) ค่า LD₅₀ เป็นขนาดของสารที่ทำให้สัตว์ทดลองตายไปครึ่งหนึ่ง เป็นค่าที่ชี้บ่งขนาดความเป็นพิษของสารเคมี ทำการหาค่า LD₅₀ ในสัตว์แต่ละชนิด เมื่อให้สารด้วยวิธีต่างๆกัน และแต่ละเพศของสัตว์ทดลอง นอกจากนั้นเมื่อครบเวลาการทดลอง 14 วัน นำเนื้อเยื่อของอวัยวะของสัตว์ทดลองที่ตายและรอดชีวิตหลังจากได้รับสาร THA มาตรวจดูทางพยาธิสภาพ (gross pathological changes) เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงต่างๆว่ามีหรือไม่

การทดลองในส่วนนี้ยังรวมถึงการหาสาเหตุการตายภายหลังได้รับสาร THA ในขนาดที่เป็นพิษ โดยใช้หนูแรทตัวผู้โคเค็มวัย ทำการสลบสัตว์ทดลองและเจาะคอใส่ท่อเพื่อช่วยในการหายใจ canulate เส้นเลือดแดงใหญ่ที่ขาพับเพื่อบันทึกการเปลี่ยนแปลงความดันเลือด (mABP) ภายหลังได้รับ THA ทำการบันทึก vital signs ต่างๆ ได้แก่ อัตราการหายใจ (RR) และ EKG เป็นต้น ด้วยเครื่อง MAC-LAB

3.2 การศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลัน (Subacute toxicity)

การศึกษาวิจัยพิษกึ่งเฉียบพลันของ THA ทำในหนูถีบจักรเพศผู้โตเต็มวัย ซึ่งมีน้ำหนักอยู่ระหว่าง 25-30 กรัม สัตว์ทดลองจะได้รับ THA ซึ่งละลายใน EtOH: Com oil ในอัตราส่วน 10:90 ป้อนให้ทางปาก (i.g.) แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม กลุ่มป้อนด้วยตัวละลาย และกลุ่มที่ป้อนด้วย THA ในขนาดต่างๆซึ่งอยู่ระหว่าง 37-300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวของหนู วันละ 1 ครั้งเป็นเวลา 30 วัน เมื่อครบกำหนดเวลาการทดลอง นำสัตว์ทดลองมาวางยาสลบเพื่อเก็บตัวอย่างเลือดและเนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆเพื่อนำมาใช้วิเคราะห์หาค่าต่างๆทางชีวเคมีของเลือด ส่วนเนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆ ได้แก่ ตับ ไต กระเพาะอาหาร ลำไส้ ตับอ่อน เป็นต้น จะได้ทำการตรวจสอบพยาธิสภาพของเนื้อเยื่ออวัยวะต่างๆ (Histopathology) ด้วย

3.3 การศึกษาถึงผลของสาร THA ต่อการคั่งของน้ำดีในหนูแรทที่เหนียวน้ำให้เกิดภาวะคั่งของน้ำดี

การทดลองในส่วนนี้ใช้หนูแรทเพศผู้โตเต็มวัย น้ำหนักประมาณ 200-250 กรัม 8-10 ตัวต่อกลุ่มการทดลอง แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็นกลุ่มต่างๆ ได้แก่ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ THA ในขนาดที่ต่ำ (50 mg/kg BW) และขนาดที่สูง (100 mg/kg BW) ขนาดเดียว ทางลำไส้เล็กส่วนต้น (i.d.) กลุ่มที่เหนียวน้ำให้เกิดภาวะการคั่งของน้ำดี (cholestasis) ด้วยสารเอthinylเอสตราไดโอด (Ethinylestradiol, EE) โดยฉีดเข้าทางใต้ผิวหนังเป็นเวลา 7 วัน ติดต่อกัน ร่วมกับการให้ THA ในขนาดที่ต่ำ และขนาดที่สูง ขนาดเดียวทางลำไส้เล็กส่วนต้น (i.d.) เมื่อครบกำหนดเวลาการทดลอง งดอาหารสัตว์ทดลองเป็นเวลาประมาณ 12-14 ชั่วโมงก่อนทำการทดลอง ฉีดยาสลบเข้าทางช่องท้องสัตว์ทดลอง และเจาะคอ เส้นเลือดแดงและดำที่ขาพับด้านซ้ายจะถูกเปิดออกเพื่อใช้เก็บตัวอย่างเลือดและให้สารน้ำชดเชยการสูญเสีย (0.9% NaCl) สัตว์ทดลองจะถูกเปิดหน้าท้องใส่ท่อ PE-10 ที่ common bile duct เพื่อเก็บตัวอย่างน้ำดี และนำมาวิเคราะห์หา bile flow rate เปรียบเทียบกันในกลุ่มหนูแรทที่ปกติและที่ถูกเหนียวน้ำให้เกิดการคั่งของน้ำดี สำหรับตัวอย่างเลือดจะนำมาวิเคราะห์หาระดับของเอนไซม์ alkaline phosphatase และ ระดับ bilirubin

ผลการวิจัย

ตอนที่ 1. การศึกษาถึงฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดี

1.1 การศึกษาถึงความสัมพันธ์ของลักษณะโครงสร้างของสาร acetophenones กับฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งน้ำดี (Structure-activity relationship of acetophenones and bile secretion)

ตารางที่ 1 และรูปที่ 2 ได้แสดงถึงอัตราการหลั่งน้ำดี (Bile flow rate, BFR) จากตับของหนู rat ซึ่งมีค่าปกติประมาณ 60-80 $\mu\text{l/kg. min}$ การฉีดสารอะซีโตฟีโนน (acetophenone) ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างหลักของกลุ่มในขนาด 50 mg/kg BW มีผลกระตุ้นการหลั่งน้ำดีได้น้อยมาก โดยอัตราการหลั่งน้ำดีเพิ่มขึ้นเป็น $116.5 \pm 2.3\%$ ที่ 30 นาทีหลังจากฉีดสารเมื่อเทียบกับอัตราการหลั่ง 100% ก่อนได้รับสาร ในทางตรงข้ามการให้ acetophenone analogs ที่ได้จากการแทนที่ H atom ของวงเบนซีนด้วยกลุ่ม hydroxy (OH) จำนวน 1 กลุ่มที่ตำแหน่งต่างๆกัน (monohydroxy acetophenone analogs) พบว่าสาร 3-mono และ 4-mono hydroxy acetophenones มีฤทธิ์ดีเด่นในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดี ทำให้ BFR ที่ 30 นาทีหลังจากได้รับสารเพิ่มขึ้นเป็น $196.34 \pm 3.4\%$ และ $196.24 \pm 2.5\%$ ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่ม OH ที่ตำแหน่ง 2 ออกฤทธิ์กระตุ้นได้ปานกลาง ไม่แรงเท่ากลุ่ม OH ที่ตำแหน่ง 3 และ 4

การเพิ่มจำนวนกลุ่ม OH ในวงเบนซีนของ acetophenone เป็น 2 และ 3 กลุ่มก็มีผลกระตุ้นการหลั่งน้ำดีให้เพิ่มขึ้นตามจำนวนกลุ่ม OH ที่เพิ่ม โดยมีข้อยกเว้นของ OH ที่ตำแหน่ง 2 และ 6 ซึ่งมีฤทธิ์การกระตุ้นต่ำ การแทนที่ H-atom ในวงเบนซีนด้วยสารอื่นๆ เช่น กลุ่ม methoxy และกลุ่ม chloro ไม่ว่าจะมียาจำนวนเท่าใด ส่วนแล้วแต่มีผลทำให้ฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งน้ำดี (BFR) ลดลงทั้งสิ้น การแทนที่ functional group คือกลุ่ม keto ด้วยกลุ่มอื่นๆ เช่น กลุ่ม aldehyde หรือ กลุ่ม carboxylic หรือเปลี่ยนเป็นกลุ่ม propiophenone ส่วนแล้วแต่มีผลทำให้ฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งน้ำดีลดลงทั้งสิ้น

ในรูปที่ 2 ได้เปรียบเทียบความสามารถของสารในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีต่อโมลของสารที่ให้ค่าที่แสดงในกราฟเป็นการคำนวณจากการเปลี่ยนแปลงอัตราการหลั่งของน้ำดีหลังจากที่ให้สารในขนาด 50 mg/kg BW เท่ากันทุกตัว พบว่าสารกลุ่ม hydroxy analogs เท่านั้นที่มีฤทธิ์ดีเด่นในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดี

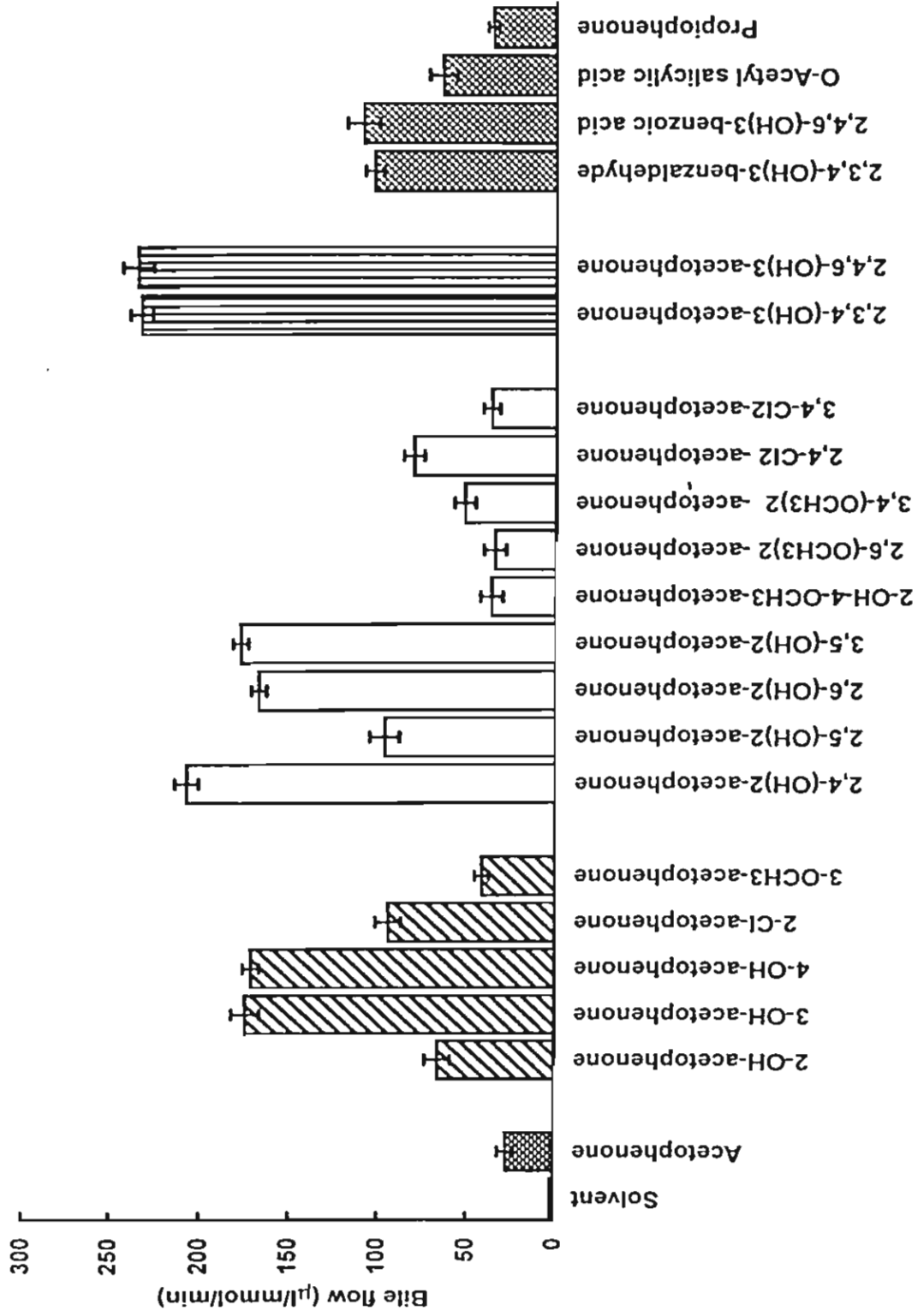
ตารางที่ 2 แสดงถึงความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่มีอยู่ในน้ำดี จะเห็นได้ว่าในบรรดาสาร acetophenone analogs ที่มีจำนวน OH เท่ากันนั้น สารใดที่ให้ฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีได้สูง จะทำให้น้ำดีที่ได้มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่า ความเข้มข้นของเกลือน้ำดียังขึ้นกับจำนวนกลุ่ม OH ที่มีอยู่ เช่น มี OH 3 กลุ่มให้น้ำดีที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีมากกว่าสารที่มี OH 2 กลุ่ม และ 1 กลุ่มตามลำดับ ทั้งนี้มีข้อยกเว้นของกลุ่ม OH ที่ตำแหน่ง 2 และ 6 ที่มีฤทธิ์กระตุ้นน้ำดีและเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเกลือน้ำดีปานกลาง

ตารางที่ 1 ผลของ acetophenone analogs และ derivatives ต่ออัตราการหลั่งของน้ำดีทั้งก่อนและหลังให้สารทดสอบ

Treatments	No. of animals	B.W. (g)	Bile flow rate (ml/kg.min)		% of control
			Before	After	
Solvent	10	224.8 ± 2.8	68.95 ± 1.0	70.35 ± 1.4	102.32 ± 1.9
Acetophenone	8	222.1 ± 2.7	69.70 ± 2.4	81.09 ± 3.9 [*]	116.51 ± 2.3 ^{**}
2-OH-acetophenone	8	230.5 ± 5.2	69.65 ± 2.4	93.95 ± 4.1 ^{**}	134.87 ± 3.5 ^{†*}
3-OH-acetophenone	8	222.7 ± 3.2	70.03 ± 1.4	137.73 ± 3.8 [*]	196.34 ± 3.4 [*]
4-OH-acetophenone	8	228.9 ± 4.4	65.25 ± 1.6	127.93 ± 2.8 [*]	196.24 ± 2.5 [*]
3-OCH ₃ -acetophenone	7	229.1 ± 1.0	70.58 ± 0.6	84.54 ± 1.5 ^{**}	119.79 ± 1.9 ^{**}
2-Cl-acetophenone	8	230.9 ± 2.1	69.60 ± 1.8	99.97 ± 3.0 ^{**}	143.86 ± 3.5 ^{**}
Propiophenone	5	234.6 ± 8.4	59.97 ± 4.2	64.71 ± 4.54 [*]	110.21 ± 2.5
O-acetylsalicylic acid	8	228.2 ± 2.9	66.29 ± 1.5	84.14 ± 2.0 ^{**}	127.24 ± 3.5 ^{**}
2,4-(OH) ₂ -acetophenone	8	230.3 ± 4.7	69.26 ± 1.1	143.87 ± 3.0 [*]	207.73 ± 2.3 ^{**}
2,5-(OH) ₂ -acetophenone	8	221.3 ± 1.8	72.67 ± 1.6	104.24 ± 3.7 ^{†*}	143.38 ± 3.5 ^{†*}
2,6-(OH) ₂ -acetophenone	9	229.4 ± 4.3	68.26 ± 1.6	122.90 ± 2.5 ^{†*}	179.90 ± 2.1 ^{†*}
3,5-(OH) ₂ -acetophenone	8	230.1 ± 2.4	68.42 ± 2.0	126.38 ± 2.6 ^{†*}	184.88 ± 3.1 ^{†*}
2-OH-4-OCH ₃ -acetophenone	7	220.9 ± 4.0	63.41 ± 2.3	74.93 ± 3.0	115.59 ± 2.7 [*]
2,6-(OCH ₃) ₂ -acetophenone	6	221.9 ± 3.4	63.56 ± 1.0	73.16 ± 1.7	115.00 ± 2.5 [*]
3,4-(OCH ₃) ₂ -acetophenone	6	226.4 ± 3.4	65.59 ± 2.5	79.97 ± 3.1 [*]	122.05 ± 2.4 [*]
2,4-Cl ₂ -acetophenone	8	220.3 ± 4.1	65.22 ± 1.0	86.37 ± 2.2 [*]	131.04 ± 2.6 [*]
3,4-Cl ₂ -acetophenone	7	223.6 ± 3.7	66.74 ± 2.0	76.51 ± 2.5 [*]	114.66 ± 1.8 [*]
2,3,4-(OH) ₃ -acetophenone	9	224.7 ± 3.7	71.38 ± 1.7	140.34 ± 2.4 [*]	195.79 ± 3.2 [*]
2,4,6-(OH) ₃ -acetophenone	8	220.8 ± 4.1	68.98 ± 1.4	136.31 ± 3.4 [*]	197.52 ± 2.1 [*]
2,3,4-(OH) ₃ -benzaldehyde	8	226.1 ± 3.8	65.01 ± 1.8	98.11 ± 2.9 ^{**}	151.19 ± 2.3 ^{**}
2,4,6-(OH) ₃ -benzoic acid	9	220.1 ± 3.5	65.00 ± 2.1	93.83 ± 3.8 ^{**}	144.32 ± 3.5 ^{**}

Values are means ± SEM.

^{*}P<0.05, ^{**}P<0.01 Significantly different from the solvent control at corresponding time.



รูปที่ 2 แสดงถึง choleretic activity ของสาร acetophenone analogs และ derivatives ที่มีได้จากการคำนวณ การเปลี่ยนแปลงอัตราการหลั่งน้ำดีต่อโมลของสาร

ตารางที่ 2 การออกฤทธิ์ของสาร acetophenone analogs และ derivatives ต่อความเข้มข้นและปริมาณของ
เกลือน้ำดีในน้ำดี

Treatments	No. of animals	Bile salt concentration (mM)		% of control	Bile salt output % of control
		Before	After		
Solvent	10	13.08 ± 0.8	12.67 ± 0.8	97.06 ± 1.6	99.15 ± 2.6
Acetophenone	8	13.22 ± 0.9	11.13 ± 0.7	84.53 ± 3.0 ^{**}	98.06 ± 3.8
2-OH-acetophenone	8	12.95 ± 1.1	9.83 ± 0.8 [*]	76.33 ± 2.1 [*]	102.51 ± 3.5 [*]
3-OH-acetophenone	8	12.35 ± 0.9	6.42 ± 0.5 ^{**}	51.89 ± 2.5 ^{**}	101.94 ± 4.8
4-OH-acetophenone	8	12.53 ± 0.6	7.22 ± 0.4 ^{**}	57.97 ± 1.4 ^{**}	113.88 ± 3.6 [*]
3-OCH ₃ -acetophenone	7	11.74 ± 0.3	9.63 ± 0.6 [*]	81.70 ± 2.9 ^{**}	97.64 ± 2.5
2-Cl-acetophenone	8	12.18 ± 0.4	8.64 ± 0.4 ^{**}	70.97 ± 1.9 ^{**}	102.02 ± 3.4
Propiophenone	5	11.10 ± 2.1	8.98 ± 1.6	82.84 ± 1.9 ^{**}	91.86 ± 7.2
O-acetyl salicylic acid	8	13.35 ± 0.9	11.57 ± 1.2 [*]	85.29 ± 3.9 [*]	108.16 ± 4.5
2,4-(OH) ₂ -acetophenone	8	12.52 ± 0.6	10.85 ± 0.7	86.30 ± 2.1 ^{**}	179.12 ± 4.4 ^{**}
2,5-(OH) ₂ -acetophenone	8	11.47 ± 0.3	12.29 ± 0.6	106.78 ± 3.2 [*]	152.28 ± 1.5 ^{**}
2,6-(OH) ₂ -acetophenone	9	12.21 ± 0.6	13.63 ± 0.7	114.78 ± 2.2 [*]	202.63 ± 3.1 [*]
3,5-(OH) ₂ -acetophenone	8	13.01 ± 0.9	10.27 ± 0.9 [*]	78.63 ± 2.1 ^{**}	145.39 ± 3.6 ^{**}
2-OH-4-OCH ₃ - acetophenone	7	12.99 ± 0.8	12.01 ± 0.7	92.81 ± 3.1	108.58 ± 2.9 [*]
2,6-(OCH ₃) ₂ -acetophenone	6	13.01 ± 0.8	11.94 ± 0.7	91.95 ± 1.2 [*]	105.75 ± 2.8
3,4-(OCH ₃) ₂ -acetophenone	6	12.02 ± 0.5	12.67 ± 0.5	105.55 ± 1.5 [*]	126.81 ± 1.9 [*]
2,4-Cl ₂ -acetophenone	8	12.22 ± 0.4	8.37 ± 0.3	68.95 ± 3.3 [*]	90.94 ± 3.6
3,4-Cl ₂ -acetophenone	7	12.26 ± 0.6	11.24 ± 0.8	91.34 ± 2.8	104.71 ± 3.5
2,3,4-(OH) ₃ -acetophenone	8	12.33 ± 0.5	36.20 ± 2.1 ^{**}	292.15 ± 6.3 ^{**}	580.20 ± 16.8 ^{**}
2,4,6-(OH) ₃ -acetophenone	8	11.88 ± 0.4	15.54 ± 0.5 [*]	131.17 ± 4.0 [*]	258.78 ± 6.9 [*]
2,3,4-(OH) ₃ -benzaldehyde	8	13.64 ± 0.4	37.71 ± 1.2 ^{**}	277.03 ± 4.9 ^{**}	418.62 ± 4.1 ^{**}
2,4,6-(OH) ₃ -benzoic acid	9	12.47 ± 0.4	8.90 ± 0.3 ^{**}	71.74 ± 2.5 ^{**}	106.35 ± 2.2

Values are means ± SEM.

^{*}P<0.05, ^{**}P<0.01 Significantly different from the solvent control at corresponding time.

ส่วนความเข้มข้นของ cholesterol (ตารางที่ 3) ในน้ำดีจะมีทิศทางตรงกันข้ามกับฤทธิ์ในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดี คือเมื่อ BFR สูง ความเข้มข้นของ cholesterol ในน้ำดีจะต่ำ อย่างไรก็ตามจำนวนของกลุ่ม OH ในวงเบนซีนไม่มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ cholesterol ในน้ำดี สิ่งที่น่าสนใจคือกลุ่ม OH ที่ตำแหน่ง 2 และ 6 มีผลทำให้ปริมาณ cholesterol หลั่งออกมาในน้ำดีสูง การแทนที่กลุ่ม OH ในวงเบนซีนของ acetophenone ด้วยกลุ่ม methoxy และ chloro ซึ่งให้ผล กระตุ้น BFR ได้ดำนั้น พบว่าไม่มีผลต่อความเข้มข้นของ cholesterol ในน้ำดี

จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า hydroxy analogs ของ acetophenone เป็นสารกลุ่มที่มีฤทธิ์ดีเด่นในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดี ฤทธิ์ดังกล่าวยังขึ้นอยู่กัจำนวนและตำแหน่งของกลุ่ม OH บน benzene nucleus โดยสารที่มีกลุ่ม OH ที่ตำแหน่งที่ 4 จะทำให้อัตราการหลั่งของน้ำดีสูง

ตารางที่ 3 การออกฤทธิ์ของสาร acetophenone analogs และ derivatives ต่อความเข้มข้นและปริมาณของ Cholesterol ในน้ำดี

Treatments	No. of animals	Cholesterol concentration (mM)		% of control	Cholesterol output
		Before	After		% of control
Solvent	10	0.51 ± 0.03	0.48 ± 0.02	96.69 ± 3.9	98.45 ± 3.3
Acetophenone	7	0.50 ± 0.05	0.62 ± 0.06 [*]	122.87 ± 3.6 ^{**}	147.19 ± 8.1 ^{**}
2-OH-acetophenone	7	0.52 ± 0.06	0.39 ± 0.05	74.01 ± 3.9 [*]	99.31 ± 4.2
3-OH-acetophenone	8	0.54 ± 0.04	0.16 ± 0.02 ^{†*}	29.76 ± 2.7 ^{†*}	58.29 ± 5.0 ^{†*}
4-OH-acetophenone	7	0.51 ± 0.05	0.12 ± 0.02 ^{†*}	24.24 ± 2.4 ^{†*}	47.58 ± 4.9 ^{†*}
3-OCH ₃ -acetophenone	6	0.52 ± 0.01	0.76 ± 0.03 ^{**}	145.30 ± 2.2 ^{**}	176.03 ± 2.3 ^{**}
2-Cl-acetophenone	6	0.50 ± 0.04	0.37 ± 0.05 [*]	73.12 ± 4.6 ^{**}	102.62 ± 6.1
O-acetylsalicylic acid	8	0.49 ± 0.04	0.45 ± 0.04	90.71 ± 3.0	114.96 ± 3.3 ^{**}
2,4-(OH) ₂ -acetophenone	7	0.53 ± 0.04	0.13 ± 0.02 ^{†*}	23.31 ± 2.7 ^{†*}	48.13 ± 5.7 ^{†*}
2,5-(OH) ₂ -acetophenone	7	0.46 ± 0.02	0.29 ± 0.02 ^{†*}	63.40 ± 5.4 ^{†*}	88.93 ± 6.1 ^{†*}
2,6-(OH) ₂ -acetophenone	7	0.48 ± 0.03	0.39 ± 0.03 [*]	80.89 ± 4.4 [*]	144.32 ± 6.7 [*]
3,5-(OH) ₂ -acetophenone	8	0.51 ± 0.04	0.25 ± 0.03 ^{†*}	48.51 ± 3.8 ^{†*}	89.23 ± 6.0 ^{†*}
2-OH-4-OCH ₃ -acetophenone	7	0.53 ± 0.04	0.47 ± 0.04	89.61 ± 3.6	105.08 ± 4.7
2,6-(OCH ₃) ₂ -acetophenone	6	0.54 ± 0.05	0.60 ± 0.06	111.49 ± 2.7 [*]	128.45 ± 5.4 [*]
3,4-(OCH ₃) ₂ -acetophenone	6	0.56 ± 0.03	0.52 ± 0.03	94.30 ± 3.7	115.17 ± 5.4 [*]
2,4-Cl ₂ -acetophenone	6	0.55 ± 0.02	0.42 ± 0.03	77.03 ± 4.4 [*]	100.08 ± 4.1
3,4-Cl ₂ -acetophenone	7	0.52 ± 0.03	0.53 ± 0.03	101.61 ± 2.7	116.37 ± 2.8 [*]
2,3,4-(OH) ₃ -acetophenone	9	0.53 ± 0.04	0.22 ± 0.02 [*]	42.08 ± 2.1 [*]	82.98 ± 4.5 [*]
2,4,6-(OH) ₃ -acetophenone	8	0.52 ± 0.04	0.22 ± 0.02 [*]	42.48 ± 3.6 [*]	86.22 ± 5.8
2,3,4-(OH) ₃ -benzaldehyde	8	0.56 ± 0.03	0.40 ± 0.02 [*]	71.74 ± 2.4 ^{**}	108.16 ± 3.5
2,4,6-(OH) ₃ -benzoic acid	9	0.50 ± 0.04	0.37 ± 0.04 [*]	73.92 ± 3.8 ^{**}	106.11 ± 4.4

Values are means ± SEM.

^{*}P<0.05, ^{**}P<0.01 Significantly different from the solvent control at corresponding time.

1.2 กลไกการออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดี

1.2.1 การศึกษาถึงฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งน้ำดีและองค์ประกอบของน้ำดีของ สาร

hydroxyacetophenones

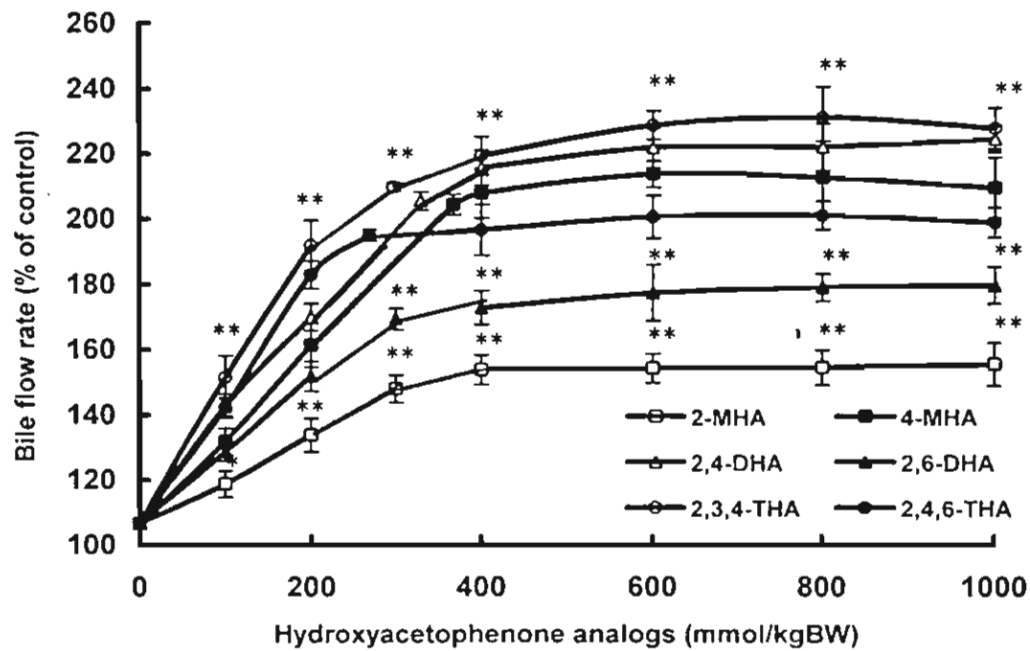
จากข้อมูลในตอนต้นที่ 1 สรุปได้ว่าสารกลุ่ม hydroxy acetophenone เป็นสารกลุ่มที่มีฤทธิ์ดีเด่นในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดี ในการวิจัยต่อไปจึงได้นำสารกลุ่มดังกล่าวมาศึกษาในรายละเอียดถึงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของสารและฤทธิ์ที่เกิดขึ้น จากการทดสอบสาร hydroxy acetophenone analogs 6 ชนิดต่อการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีพบว่า สารทั้ง 6 ชนิดทำให้อัตราการไหลของน้ำดีที่เพิ่มขึ้นตามปริมาณของสารที่ฉีด (Dose-related effect) ระหว่าง 100-600 ไมโครโมล ต่อ น.น. ตัว 1 ก.ก. ดังแสดงในรูปที่ 3 นอกจากนี้เมื่อได้คำนวณปริมาณของน้ำดีที่ออกมาต่อไมโครโมลของสารที่ฉีด (Choleretic activity) ปรากฏว่าฤทธิ์การกระตุ้นของ 2,4,6-THA > 2,3,4 - THA > 2,4 - DHA > 4 - MHA > 2,6 - DHA > 2 - MHA พบว่าสาร 2,4,6-trihydroxyacetophenone มีฤทธิ์การกระตุ้นอัตราการหลั่งน้ำดีได้ดีที่สุดคือ ประมาณ 233.5 μ l/mmol/min โดยคำนวณ จาก slope ของเส้นกราฟ

เมื่อวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเกลือน้ำดีในน้ำดีที่ได้จากการกระตุ้นโดยสารเหล่านั้น พบว่าเมื่อให้สาร 2-Mono, 4-Monohydroxy acetophenone ความเข้มข้นของเกลือน้ำดีมีค่าต่ำลงต่ำกว่าค่าก่อนได้รับสาร แต่สารอีก 3 ตัวได้แก่ 2,4-Di, 2,6-Di และ 2,4,6-trihydroxy acetophenone ซึ่งมีกลุ่ม OH เพิ่มขึ้นจะทำให้ความเข้มข้นของเกลือน้ำดีเพิ่มขึ้น แต่เนื่องจากสารกลุ่ม hydroxy acetophenone มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดี และความแรงของการออกฤทธิ์เพิ่มขึ้นตามขนาดของสารที่ให้ ดังนั้นในสาร hydroxy acetophenone ทั้ง 6 ตัวจะมีผลทำให้ปริมาณของเกลือน้ำดีที่ถูกขับออกเพิ่มขึ้นด้วย (bile acid output) โดยเฉพาะ 3 ตัวหลัง ได้แก่ 4-Mono, 2,4-Di และ 2,4,6-trihydroxyacetophenone ปริมาณของเกลือน้ำดีที่ออกมามีความสัมพันธ์กับขนาดของสารที่ให้

จากผลการศึกษาสรุปได้ว่าสาร hydroxy acetophenone ทั้ง 6 ชนิดกระตุ้นการหลั่งของน้ำดีโดยที่ผลกระตุ้นขึ้นอยู่กับปริมาณของสารที่ฉีด (Dose-dependence) นอกจากนั้นผลกระตุ้นการหลั่งของน้ำดีของสารทั้ง 6 ชนิดนี้ขึ้นอยู่กับจำนวนและตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซีบนวงเบนซีน โดยที่สารทดสอบที่มีหมู่ไฮดรอกซีบนวงเบนซีนในตำแหน่งที่ 4 จะกระตุ้นการหลั่งน้ำดีในปริมาณสูง ต่างจากสารทดสอบที่มีหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่ง 2 หรือ 2 และ 6 จะกระตุ้นการหลั่งของน้ำดีในระดับต่ำ - ปานกลาง ที่สำคัญสารที่ใช้ทดสอบ 2,4,6 - THA มีค่า choleretic activity สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารตัวอื่นที่ใช้ทดสอบ

เมื่อทำการศึกษาแนวโน้มของการเกิดตะกอนของนิ่วในน้ำดี พบว่าสารกลุ่ม hydroxy acetophenone analogs ได้แก่ 4-(OH) 2,4-(OH)₂ และ 2,4,6(OH)₃ ซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้นอัตราการหลั่งของน้ำดีสูง น้ำดีที่ได้จะมีค่า lithogenic index ลดต่ำลง ลดอัตราเสี่ยงในการเกิดนิ่ว ซึ่งเป็นฤทธิ์ที่ดีที่จะช่วยละลายนิ่วในน้ำดีได้

เมื่อวัดระดับ cholesterol ในเลือดหลังจากที่ให้สารกระตุ้นการหลั่งน้ำดี พบว่าสารที่มีฤทธิ์ดีเด่น 2 ตัวที่สามารถลดระดับไขมัน cholesterol ในเลือดได้เด่นชัดคือ 2,6 (OH)₂ และ 2,4,6(OH)₃ acetophenone analogs ซึ่งจะได้นำสารทั้งสองมาศึกษาต่อไปถึงฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ในการลดไขมันในเลือดต่อไป



รูปที่ 3 แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของสารกลุ่ม hydroxyacetophenone analogs กับอัตราการหลั่งน้ำดี

ค่าที่แสดงเป็น mean $\pm$ SEM จากสัตว์ทดลอง 10 ตัว

**p<0.001, เมื่อเทียบกับก่อนได้รับสาร

1.2.2 ความสัมพันธ์ระหว่าง choleretic activity และคุณสมบัติของการเป็นไฮโดรโฟบิกและไฮโดรฟิลิกของสารทดสอบ

การศึกษาในขั้นตอนนี้ ถึงคุณสมบัติการเป็น hydrophobic – hydrophilic ของสาร โดยหาได้จากการใช้เทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) ใช้ chloroform : MeOH (40:1) เป็น mobile phase หรือ solvent system ปรากฏว่าสารทดสอบที่มีหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่ง 2 หรือ 2 และ 6 มี hydrophobicity สูง ในขณะที่สารที่มีหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่งที่ 4 มีความเป็น hydrophilic สูงเมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างสารที่มีจำนวนหมู่ OH ในวงเบนซีนที่เท่ากัน และที่สำคัญ 2,4,6-THA ซึ่งมี hydrophilic มากที่สุดเมื่อเทียบกับสารที่ใช้ทดสอบทั้ง 6 ชนิด โดยลำดับค่าคุณสมบัติ hydrophilic ของสาร (R_f value ต่ำ) เรียงลำดับจากมากไปหาน้อยได้ดังนี้ 2,4,6-THA > 2,3,4, -THA > 2,4-DHA > 4-MHA > 2,6-DHA > 2-MHA ดังแสดงในตารางที่ 3 นอกจากนี้ยังพบอีกว่าสารที่มี hydrophilic มาก (R_f value ต่ำ) มีประสิทธิภาพในการกระตุ้น BFR ได้มาก ลำดับของ choleretic activity จากมากไปหาน้อยมีดังนี้ 2,4,6-THA > 2,3,4-THA > 2,4-DHA > 4-MHA > 2,6-DHA > 2-MHA

จากผลการข้างต้นนี้แสดงให้เห็นว่าทั้งจำนวนและตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซีบนวงเบนซีนของสารอะซีโตฟีโนนมีบทบาทสำคัญต่อความเป็น hydrophobic – hydrophilic ของสาร และความสามารถในการกระตุ้นการไหลของน้ำดีหรือ choleretic activity โดยที่ความเป็นไฮโดรโฟบิกมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับ choleretic activity ของสารที่ใช้ทดสอบ

ในการวิเคราะห์ผลจะยกเว้นผลที่ได้จาก 2,3,4 (OH)₃ acetophenone เนื่องจากสารดังกล่าวถูก oxidize ด้วยอากาศอย่างรวดเร็วทำให้เกิดสีดำ และรบกวนค่าการวิเคราะห์ต่างๆ จนไม่สามารถนำมาประเมินและเปรียบเทียบผลได้

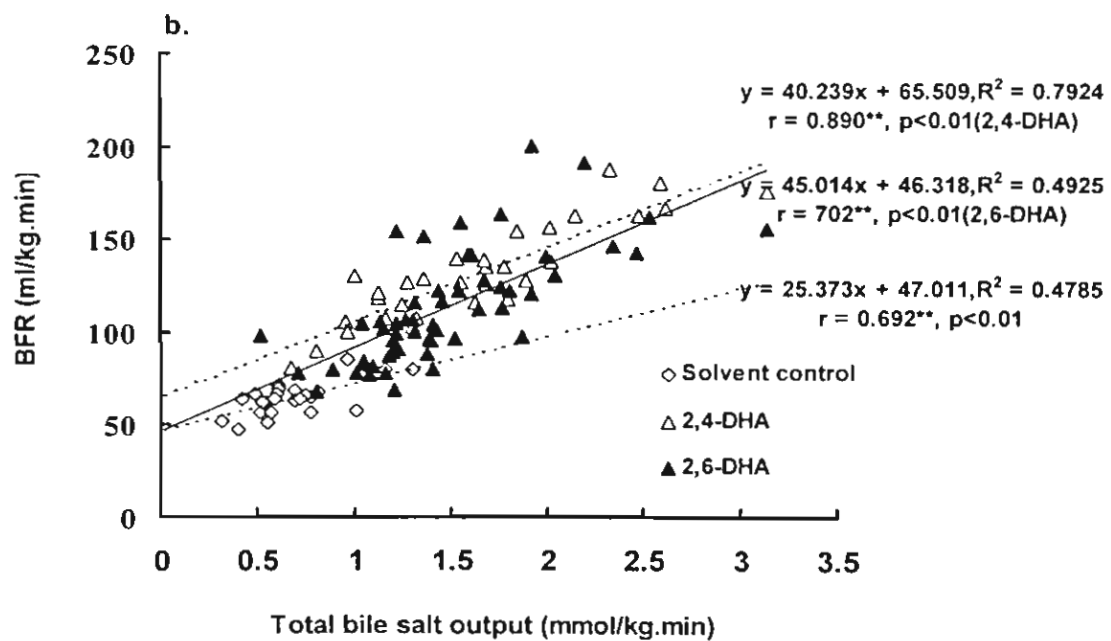
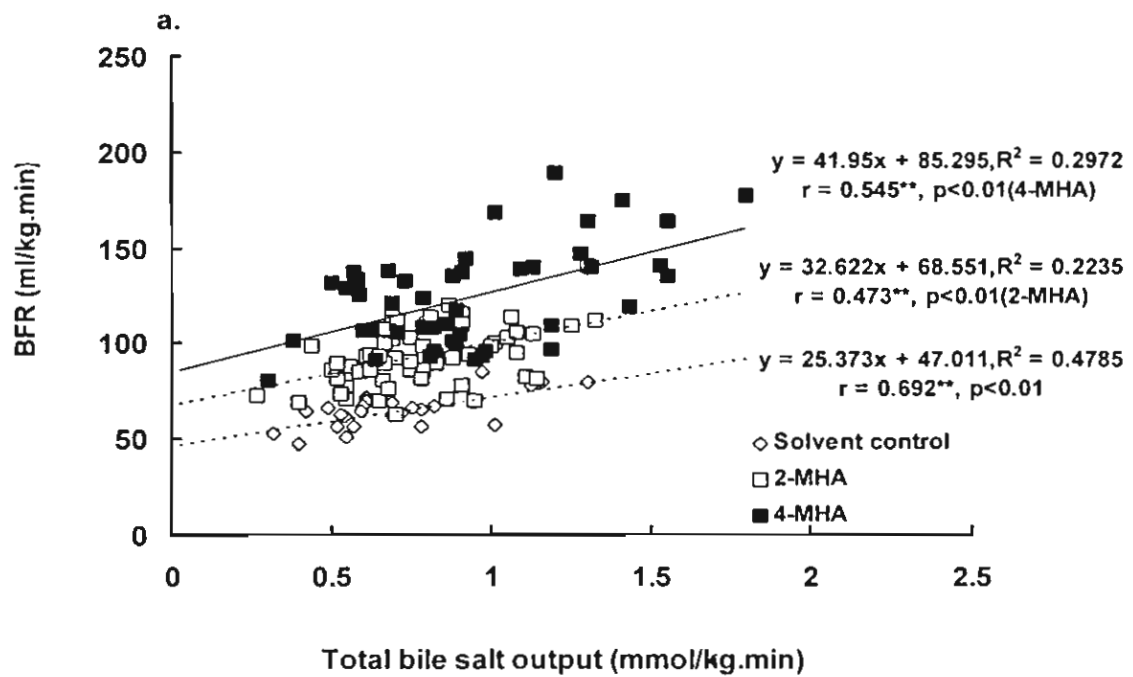
1.2.3 การวิเคราะห์สัดส่วนของน้ำดี (Bile acid dependent and independent flow fraction)

การหาความสัมพันธ์ระหว่าง BFR และ Bile acid output ของน้ำดีที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร hydroxyl analogs 6 ชนิด และนำมาสร้างกราฟระหว่างแกน x เป็น Bile acid output แกน y เป็น BFR จะได้จุดตัดบนแกน y ซึ่งจะเป็นค่าของ Bile acid-independent fraction (BAIF) และความชันของกราฟจะเป็นค่าของ Bile acid-dependent fraction (BADF) พบว่าสารทดสอบทั้ง 6 ชนิดชักนำให้ค่าทั้ง 2 ตัวแปรนี้เปลี่ยนแปลงแตกต่างกันออกไป

ผลการศึกษาพบว่าสารทดสอบ 4-MHA ชักนำให้ มีค่า BAIF เพิ่มขึ้นมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารทดสอบตัวอื่นๆ ยกเว้น 2,3,4 -THA ที่ชักนำให้ BAIF เพิ่มขึ้นมากผิดปกติหรือที่เรียกว่า “Hypercholeresis” สำหรับ 4-OH-acetophenone (4-MHA) ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซีตำแหน่งที่ 4 เพียง 1 หมู่ ถ้าเพิ่มจำนวนของหมู่ไฮดรอกซีบนวงเบนซีนจะทำให้ BAIF ลดต่ำลงตามจำนวนของหมู่ไฮดรอกซีที่เพิ่มขึ้น

ลำดับของ BAIF เรียงจากมากไปน้อยดังนี้ 4 -MHA (85 $\mu\text{l} / \text{kg. min}$) > 2,4 - DHA (65.5 $\mu\text{l} / \text{kg. min}$) > 2,4,6 THA (60 $\mu\text{l} / \text{kg. min}$) ในทางตรงกันข้ามสารทดสอบที่ไม่มีหมู่ไฮดรอกซีตำแหน่งที่ 4 คือ 2,6 - DHA จะกระตุ้น BFR โดยเพิ่มส่วนที่เป็น BADF ในขณะที่ BAIF ไม่เปลี่ยนแปลง แต่ถ้านำหมู่ไฮดรอกซีตำแหน่งที่ 6 ออกคือ สาร 2 - MHA ก็ทำให้ BAIF เพิ่มขึ้นเป็น 68.5 $\mu\text{l} / \text{kg. min}$ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ 2,4 - DHA (65.5 $\mu\text{l} / \text{kg. min}$) ดังแสดงในรูปที่ 4-5

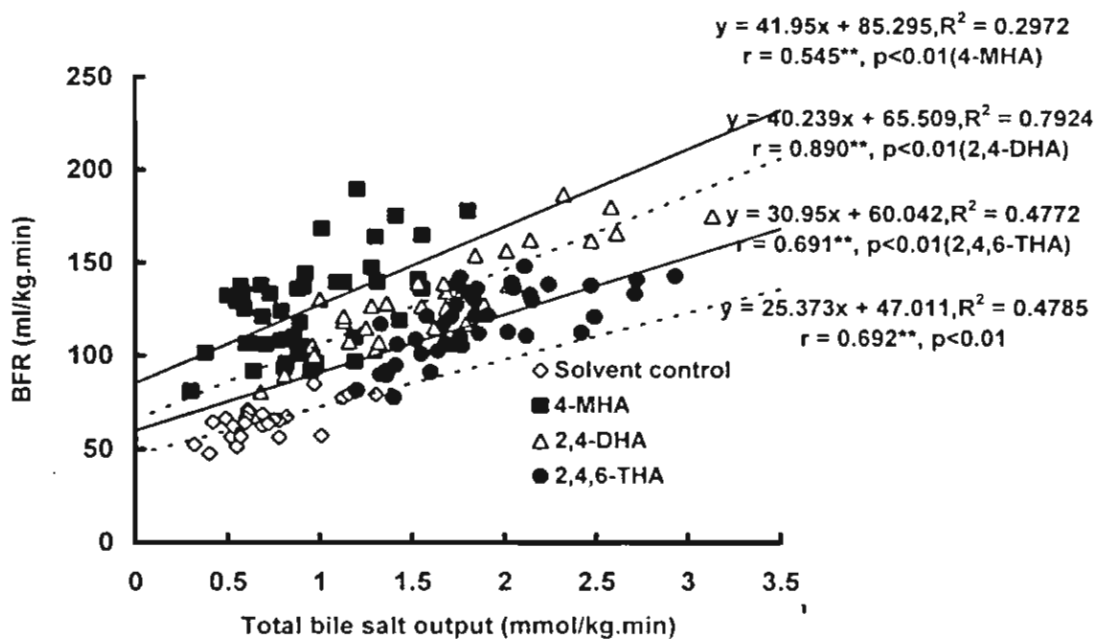
จากการศึกษาความชันของกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง 2 ตัวแปรนี้จะได้ค่า BADF ซึ่งเป็นค่าปริมาณของน้ำดีที่หลั่งออกมาต่อหนึ่งหน่วยไมโครโมลของเกลือน้ำดีนั้นแตกต่างกัน พบว่า 4 -MHA ชักนำให้มีการขับน้ำออกมา 42 $\mu\text{l} / \mu\text{mol}$ ของกรดน้ำดี ขณะที่ 2 -MHA มีการขับน้ำออกมา 32 $\mu\text{l} / \mu\text{mol}$ แสดงให้เห็นว่าหมู่ไฮดรอกซีตำแหน่งที่ 4 มีความสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลง BADF ด้วย และถ้าเพิ่มจำนวนของหมู่ไฮดรอกซีนวบนวบนขึ้น โดยเมื่อกระตุ้นด้วย 2,4 - DHA และ 2,4,6 - THA จะทำให้ค่า BADF ลดลงไปเป็น 42 และ 30 $\mu\text{l} / \mu\text{mol}$ ตามลำดับ ในทางตรงกันข้ามกับสารทดสอบที่ไม่มีหมู่ไฮดรอกซีตำแหน่งที่ 4 เมื่อกระตุ้นด้วย 2 -MHA และ 2,6 - DHA ค่า BADF จะเพิ่มขึ้นตามจำนวนของหมู่ไฮดรอกซีที่เพิ่มขึ้นโดยที่ BADF เพิ่มจาก 32 เป็น 45 $\mu\text{l} / \mu\text{mol}$ ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4-5 ซึ่งอาจจะแสดงถึงความแตกต่างของ bile acid species ที่ออกมาในน้ำดี



รูปที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของน้ำดีกับเกลือน้ำดีที่ขับออกมา

(A) เปรียบเทียบระหว่างสาร monohydroxy acetophenone (2 – MHA , 4 – MHA)

(B) เปรียบเทียบระหว่างสาร dihydroxy acetophenone (2,4 – DHA และ 2,6 – DHA)



รูปที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของน้ำดีกับเกลือน้ำดีที่ขับออกมาหลังจากได้รับ 2,4,6-trihydroxy acetophenone (2,4,6 – THA); 2,4-dihydroxy acetophenone (2,4 – DHA); และ 4-monohydroxy acetophenone (4 – MHA)

1.2.4 เมตาบอไลต์ในน้ำดีที่ถูกกระตุ้น

จากผลการศึกษาข้างต้นสรุปได้ว่าการหลั่งของน้ำดีโดยสารไฮดรอกซีอะซิโดฟีโนนขึ้นอยู่กับการเพิ่มจำนวนและตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซีบนวงเบนซีน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารทดสอบที่ใช้ 4-MHA ซึ่งทำให้ BAIF เพิ่มขึ้นสูงสุด ในการศึกษาต่อไปจึงใช้สารดังกล่าวมาศึกษาถึงสาเหตุที่ทำให้มี BAIF ออกมามาก

การศึกษาในขั้นตอนนี้ใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) นำน้ำดีที่ถูกกระตุ้นโดย 4-MHA สกัดโปรตีนออกโดยต้มกับ Ethanol 20 เท่า กรองผ่านกระดาษกรองแล้วระเหิดโดยเครื่อง evaporation หลังจากนั้นละลายกลับด้วย Methanol เพื่อฉีดเข้าระบบ HPLC ระบบ HPLC ที่ใช้เป็น Reversed-phase, column = μ Bondapak^R C18, 10 μ m, 3.9x300 mm, UV detector 280 nm และ Mobile phase เป็นระบบ gradient system ซึ่งใช้ 5 % acetic acid in water and methanol

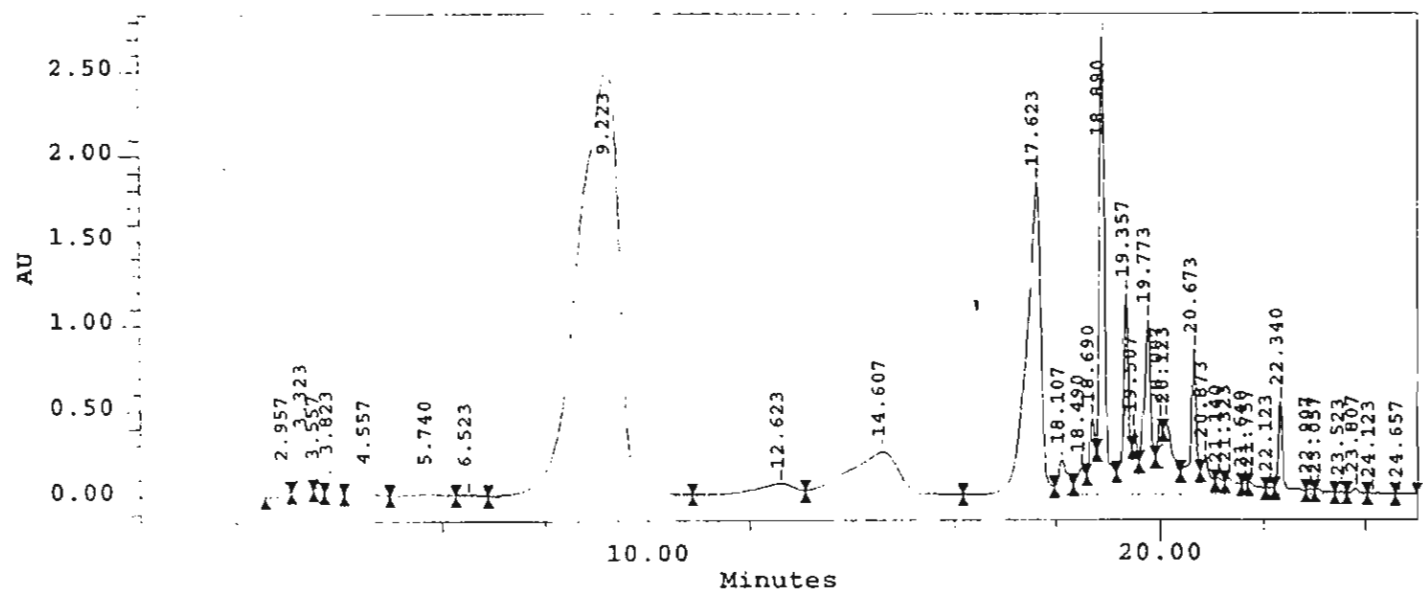
รูปที่ 6 แสดงภาพขององค์ประกอบทั้งหมดในน้ำดีที่ถูกกระตุ้นด้วย 4-MHA โดยใช้ gradient mobile phase system พบว่า Peak ที่ $T_r = 8-10$ min คาดว่าจะเป็นเมตาบอไลต์ของสาร 4-MHA ที่มีบทบาทในการทำให้ BFR เพิ่มขึ้น และ Peaks ที่ $T_r = 16-25$ min คาดว่าจะเป็นส่วนประกอบของน้ำดีที่มีสาร non-polar มากขึ้น อย่างเช่น Bile acid เป็นต้น

ได้ทำการเก็บรวบรวม Fraction ของเมตาบอไลต์ของสาร 4-MHA ที่ $T_r = 6-8$ min โดยใช้ Preparative-HPLC, column = Delta-Pak C18, 5 μ m, 40x100 mm, UV detection = 280 nm และ Mobile phase = 5 % acetic acid in water and methanol (95:5 %v/v), flow rate 10 ml/min, injection volume 5000 μ l หลังจากเก็บ Fraction แล้วนำสารที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์และศึกษาถึงรูปร่างของสารนี้โดยทำการตกผลึกโดยใช้ ethanol-water ได้ผลึกเป็นรูปเข็ม มีจุดหลอมเหลว (m.p.) ~ 273-275 °C และจากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของเมตาบอไลต์ตัวนี้โดย Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy พบว่า ¹H-NMR spectrum ถูกบันทึกและแปลความไว้ดังแสดงในรูปที่ 7 จากข้อมูลที่ได้เมตาบอไลต์มีสูตรโครงสร้างเป็น 4-hydroxyacetophenone-4-O-glucuronide, MW = 312.268 ดังแสดงในรูปที่ 8

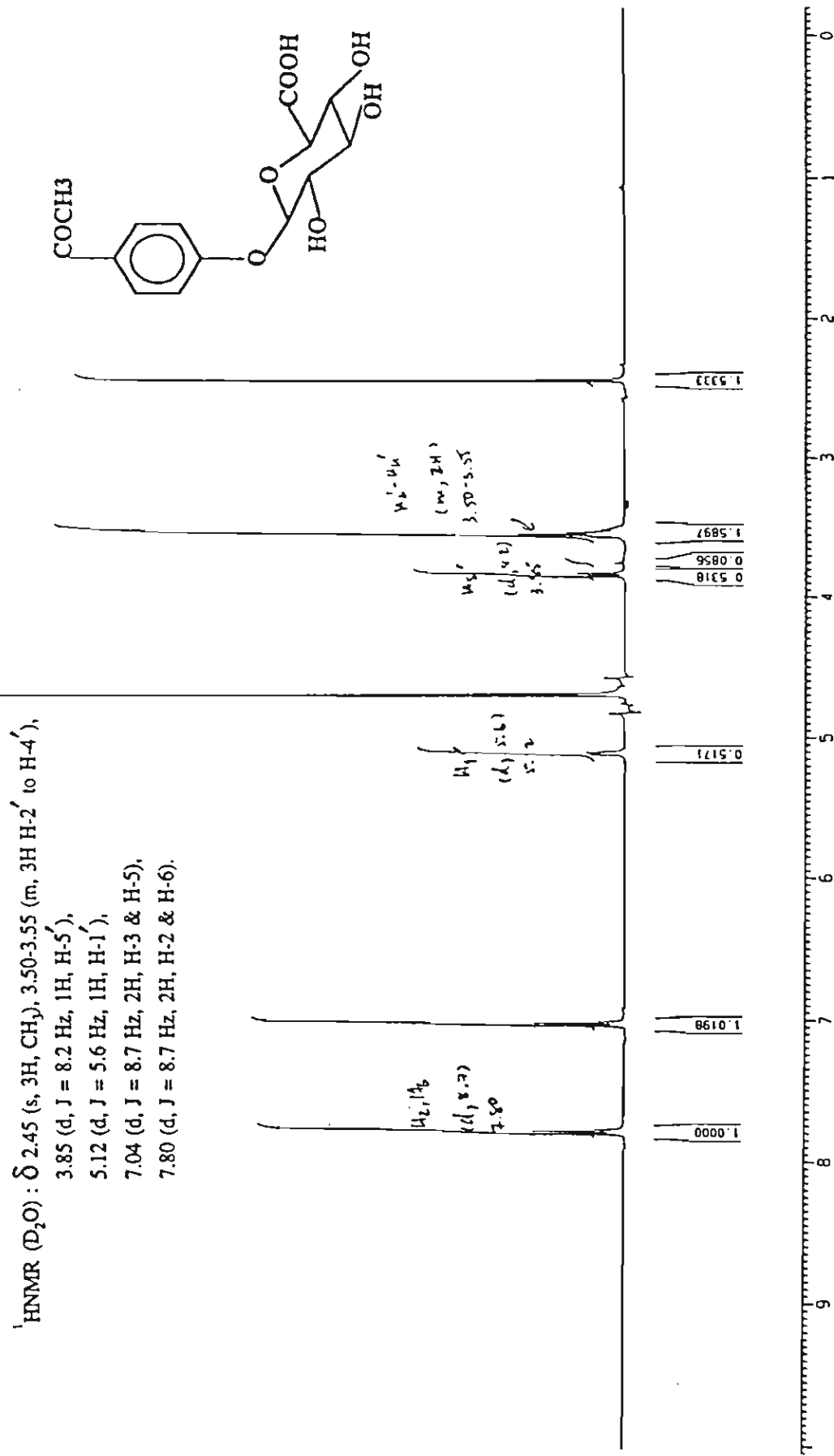
จากการวิเคราะห์หาปริมาณเมตาบอไลต์ของสาร 4-MHA ที่ออกมากับน้ำดีว่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณของสาร 4-hydroxyacetophenone-4-O-glucuronide ยังมีความสัมพันธ์กับ BFR ที่เพิ่มขึ้น ($R^2 = 0.681$, $r = 0.825^{**}$, $p < 0.01$) ดังแสดงในรูปที่ 9

จากการศึกษานี้สรุปได้ว่าฤทธิ์ 4-MHA กระตุ้นการหลั่งน้ำดีให้เพิ่มขึ้นนั้น (BAIF) ส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากปริมาณของเมตาบอไลต์ที่ออกมากับน้ำดีคือ 4-hydroxyacetophenone-4-O-glucuronide

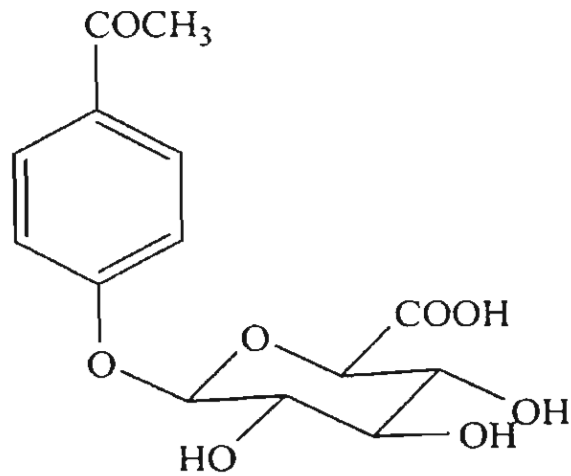
และเมื่อให้ 4-hydroxy acetophenone เข้าทางลำไส้เล็ก มีผลทำให้น้ำดีที่ได้ปรากฏ peak ที่ retention time ต่างออกไป ดังรูป 10 เมื่อเก็บรวบรวมสารจาก peak หลังจากให้สาร 4-hydroxy acetophenone แล้วนำไปพิสูจน์ลักษณะทางโครงสร้างทางเคมี พบว่าเป็นสาร 4-hydroxy acetophenone-glucuronide ดังรูปที่ 11 และเมื่อฉีด metabolite นี้เข้าไป พบว่าทำให้มีการหลั่งน้ำดีเป็นสัดส่วนตามปริมาณ metabolite ที่ฉีดให้



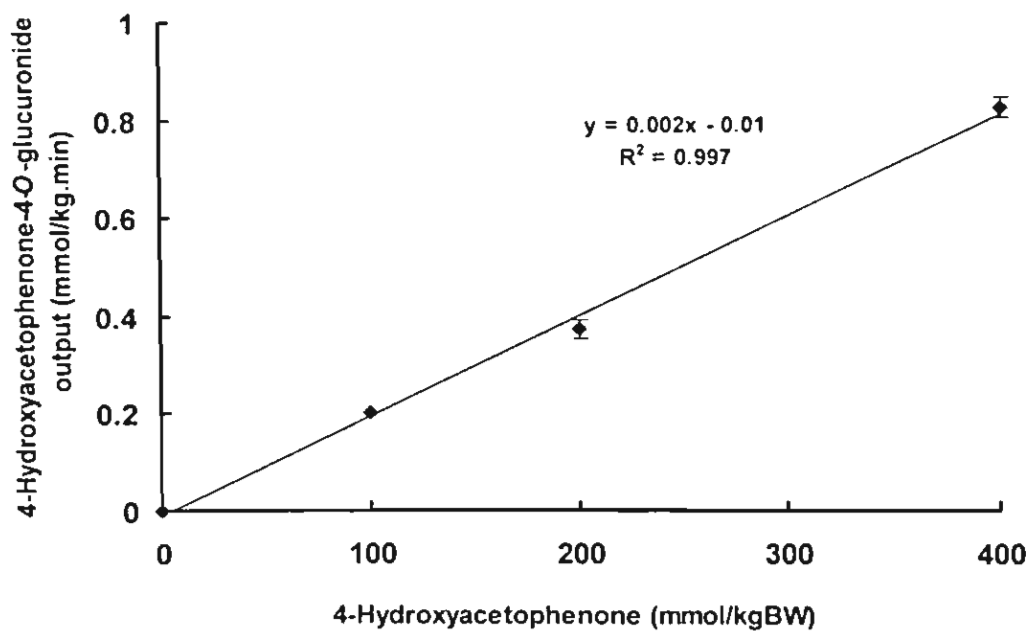
รูปที่ 6 แสดงโครมาโตแกรมของ metabolite ที่ได้จากน้ำดีหลังจากฉีดสาร 4-hydroxyacetophenone ให้แก่สัตว์ทดลอง โดยใช้ reverse-phase analytical HPLC และใช้ gradient mobile phase system Major peak of metabolite ที่ retention time 6-8 นาที เป็น metabolite ของ 4-hydroxyacetophenone ที่ peak หลังจากนั้น เป็น bile acids



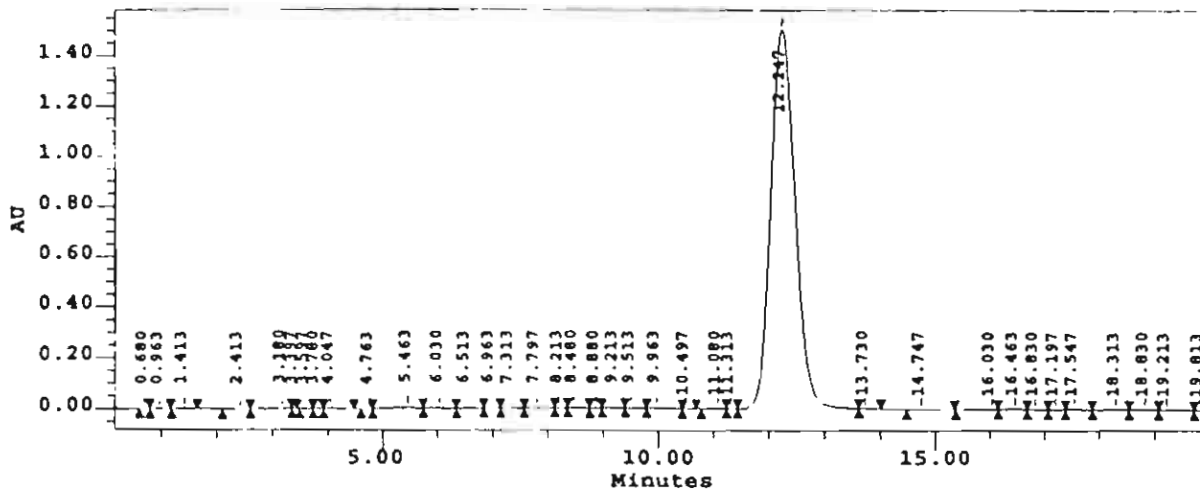
រូបភាព 7 ¹HMR Spectrum of 4-hydroxyacetophenone-glucuronide



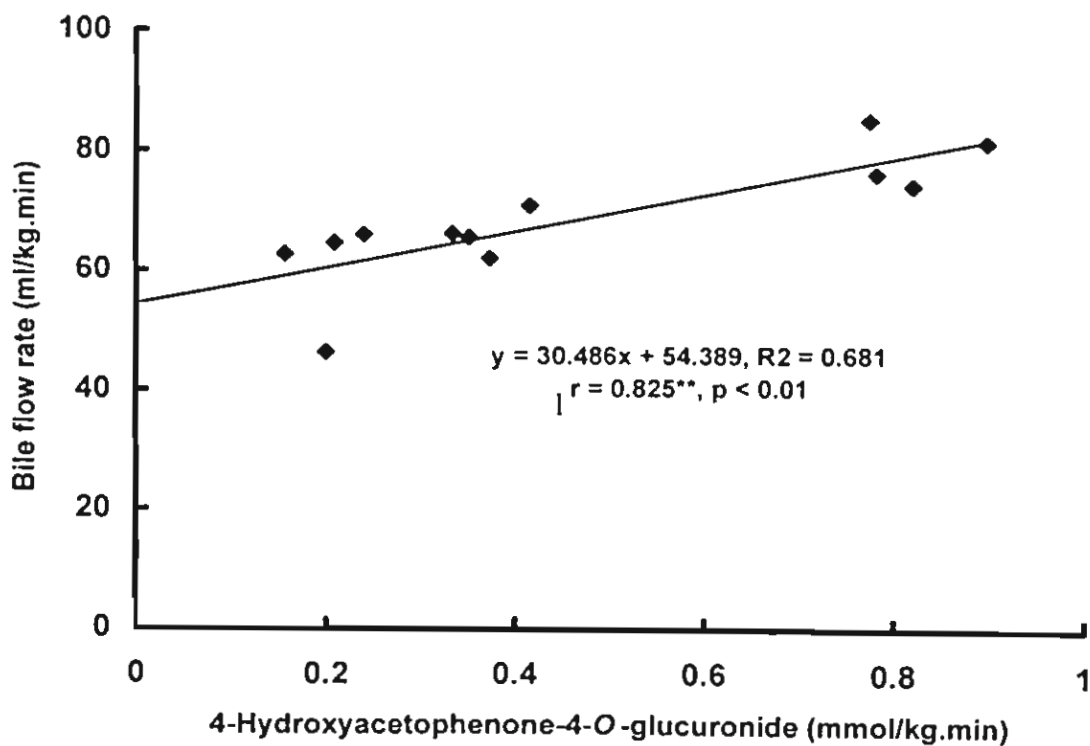
รูปที่ 8 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ 4-hydroxyacetophenone-4-O-glucuronide (MW=312.268)



รูปที่ 9 แสดงผลของ 4-hydroxyacetophenone ต่อการขับ 4-hydroxyacetophenone-4-O-glucuronide ทางน้ำดี



รูปที่ 10 แสดง retention time ของน้ำดี หลังจากฉีด 4-hydroxyacetophenone



รูปที่ 11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง 4-hydroxyacetophenone-4-O-glucuronide กับ อัตราการไหลของน้ำดี หลังจากกระตุ้นด้วย 4-hydroxyacetophenone

ตอนที่ 2. การศึกษาถึงฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ลดระดับไขมันในเลือด

2.1 การเหนี่ยวนำสัตว์ทดลองให้มีระดับไขมันในเลือดสูงกว่าปกติ

Hamster เป็นสัตว์ทดลองที่มีระบบการควบคุมระดับไขมันในร่างกายคล้ายคนมากสามารถจะทำให้เกิดสภาวะ cholesterol ในเลือดสูงได้ ดังรูปที่ 12 ได้ทำการป้อนสารละลาย cholesterol ในน้ำมันข้าวโพดในขนาด 0.2% ของน้ำหนักตัวทุกวันต่อเนื่องกัน และได้ติดตามการเปลี่ยนแปลงระดับ cholesterol ในเลือด พบว่าการให้ cholesterol แก่สัตว์ทดลอง ไม่ได้ทำให้น้ำหนักตัวสัตว์เปลี่ยนแปลงไปจากกลุ่มควบคุมเลย แต่ระดับ cholesterol ในเลือดของกลุ่มที่ได้รับการป้อน cholesterol จะค่อยๆเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการป้อน cholesterol เสริม โดยมีการเปลี่ยนแปลงระดับ cholesterol ในเลือดจาก 91.9 ± 3.6 mg% เมื่อเริ่มการทดลองไปเป็น 154.6 ± 6.1 , 263.3 ± 5.5 และ 324.4 ± 4.5 mg% หลังจากที่ได้รับ cholesterol ไปได้ 1, 2 และ 3 สัปดาห์ตามลำดับ ในขณะที่หนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำมันข้าวโพดอย่างเดียวมีระดับไขมันเพิ่มขึ้นเป็น 150.9 ± 4.7 mg% เมื่อครบ 3 สัปดาห์

2.2 ศึกษาถึงการออกฤทธิ์ของสาร THA และ DHA ในการลดไขมันในเลือด

2.2.1 ความสัมพันธ์ของขนาดของสารกับฤทธิ์ที่เกิด (Dose-response effect)

รูปที่ 13 แสดงถึงผลที่ได้จากการป้อน THA และ DHA ขนาดต่างๆเป็นเวลา 7 วัน ใน hamster กลุ่มควบคุมที่ให้อาหารปกติ และให้ com oil เป็นเวลา 7 วันทำให้มีระดับ plasma cholesterol และ triglyceride สูงจากปกติ โดยเพิ่มขึ้นมาอยู่ในระดับ 150.9 ± 4.7 และ 181.0 ± 6.6 mg% ตามลำดับ การให้ solvent ของสาร THA และ DHA ไม่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงใดๆ การเสริมด้วยการป้อน cholesterol จะทำให้ขนาดของตับใหญ่ขึ้นจากกลุ่มที่ให้อาหารปกติ ($p < 0.05$) เมื่อป้อน THA ขนาดต่างๆได้แก่ 300, 400 และ 600 μ mol/kg BW ควบคู่ไปกับการเลี้ยงด้วย cholesterol ทำให้ระดับของ plasma cholesterol และ triglyceride ลดลงตามขนาดของสาร โดย THA ขนาด 400 และ 600 μ mol/kg BW ลด plasma cholesterol ได้ 30 และ 40% ตามลำดับ และลดระดับ plasma triglyceride ได้ 30 และ 60% ตามลำดับ DHA ให้ฤทธิ์คล้ายกับ THA เพียงแต่ฤทธิ์จะต่ำกว่าฤทธิ์ของ THA เล็กน้อย

2.2.2 ความสัมพันธ์ของระยะเวลากับการออกฤทธิ์ (Time course effect)

รูปที่ 14 แสดงผลที่ได้จากการให้ THA และ DHA ขนาด 400 μ mol/kg BW ที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งระดับของไขมันในเลือดเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการให้สารในการทดลอง ในกลุ่มที่ได้รับ THA ระดับของ plasma cholesterol จะค่อยๆลดลงตามระยะเวลาที่ได้รับสาร โดยให้ฤทธิ์สูงสุด (maximum effect) ในวันที่ 10 คือระดับ plasma cholesterol อยู่ที่ $53.2 \pm 1.4\%$ และ $50.5 \pm 1.3\%$ of control ใน

วันที่ 10 และ 14 ของการให้สารตามลำดับฤทธิ์ของ THA ในการลดระดับ plasma triglyceride ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน โดยให้ฤทธิ์สูงสุดในวันที่ 10 ของการให้สาร และระดับของ plasma triglyceride อยู่ที่ 35.5 ± 2.6 และ $32.6 \pm 2.6\%$ of control ในวันที่ 10 และ 14 ตามลำดับ (รูปที่ 15 a) DHA มีฤทธิ์ในการลดระดับไขมันได้คล้ายกับ THA (รูปที่ 15 b)

2.3 ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสาร THA และ DHA ในการลดไขมัน

ได้ทำการศึกษากลไกการออกฤทธิ์บางอย่างของ THA และ DHA

2.3.1 ฤทธิ์ต่อปริมาณไขมันในตับ

ในรูปที่ 16 hamster ที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติจะมีปริมาณของ cholesterol ในตับ 2.3 ± 0.2 mg/g liver หรือมีอัตราส่วนของ free: bound cholesterol ประมาณ 2.4 ± 0.2 การป้อนเสริม cholesterol ให้กับสัตว์ทดลองทำให้ระดับมีขนาดใหญ่ขึ้นเล็กน้อยจาก 3.3 ± 0.1 ไปเป็น 3.6 ± 0.2 g/100 g BW แต่ปริมาณของ cholesterol ที่สะสมในตับเพิ่มขึ้นประมาณ 2-3 เท่า ปริมาณของ cholesterol ที่เพิ่มขึ้นอยู่ในรูปทั้ง free และ bound cholesterol อย่างไรก็ตามอัตราส่วนของ free : bound cholesterol ไม่เปลี่ยนแปลงมาก การให้ THA หรือ DHA ขนาด $400 \mu\text{mol/kg BW}$ วันละ 2 ครั้งติดต่อกัน 7 วัน ไม่มีผลต่อปริมาณของ cholesterol ในตับ จึงคาดว่าสารดังกล่าวไม่เกี่ยวข้องหรือมีผลกระตุ้นการทำงานของ ACAT enzyme แต่อย่างใด ซึ่ง enzyme นี้มีบทบาทในการเปลี่ยน free cholesterol ไปเป็น bound cholesterol สะสมไว้ในตับ ส่วนระดับ triglyceride ในตับจะเพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ได้รับการเสริมด้วย cholesterol อย่างไรก็ตามการให้ THA หรือ DHA ไม่มีผลทำให้ระดับ triglyceride ในตับเพิ่มขึ้น

2.3.2 ฤทธิ์ต่อปริมาณของ Lipoprotein ชนิดต่างๆ ในเลือด

ใน hamster ปกติจะมีระดับของ HDL cholesterol 96.3 ± 4.2 mg% เมื่อเทียบกับระดับ cholesterol ทั้งหมด 124.2 ± 4.3 mg% การป้อน cholesterol เสริมให้กับ hamster มีผลทำให้ระดับ cholesterol เพิ่มขึ้นเป็น 392.1 ± 19.6 mg% โดยปริมาณของ cholesterol ที่เพิ่มขึ้นเกือบทั้งหมดเป็นการเพิ่มระดับของ VLDL และ LDL ในขณะที่ระดับของ HDL ไม่เปลี่ยนแปลงเลย

การให้ THA และ DHA มีประสิทธิภาพอย่างเด่นชัดในการลดระดับ cholesterol และ triglyceride ในเลือด จากการวิเคราะห์ปริมาณของ lipoprotein ในเลือด ซึ่งเป็นตัวพาของไขมันเหล่านั้นพบว่าทั้ง THA และ DHA มีฤทธิ์ในการลด VLDL และ LDL เป็นหลัก โดยที่ระดับของ HDL ไม่เปลี่ยนแปลง (รูปที่ 17)

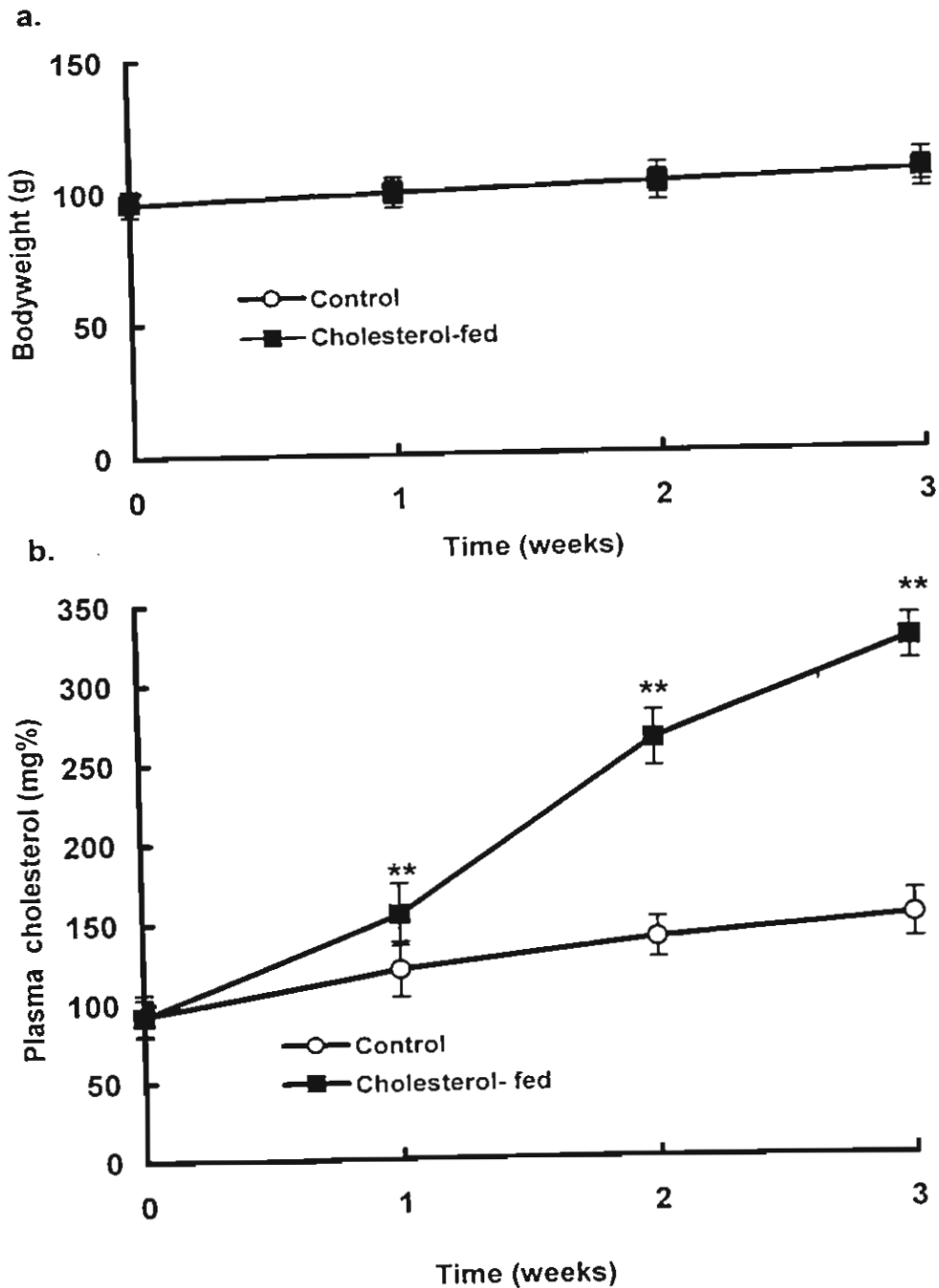
2.3.3 ฤทธิ์ต่อการทำงานของเอนไซม์ cholesterol 7 α -hydroxylase

จากการศึกษาฤทธิ์ของ THA และ DHA ต่อการทำงานของเอนไซม์ cholesterol 7 α -hydroxylase พบว่าทั้ง THA และ DHA มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ cholesterol 7 α -hydroxylase ได้ถึง 7

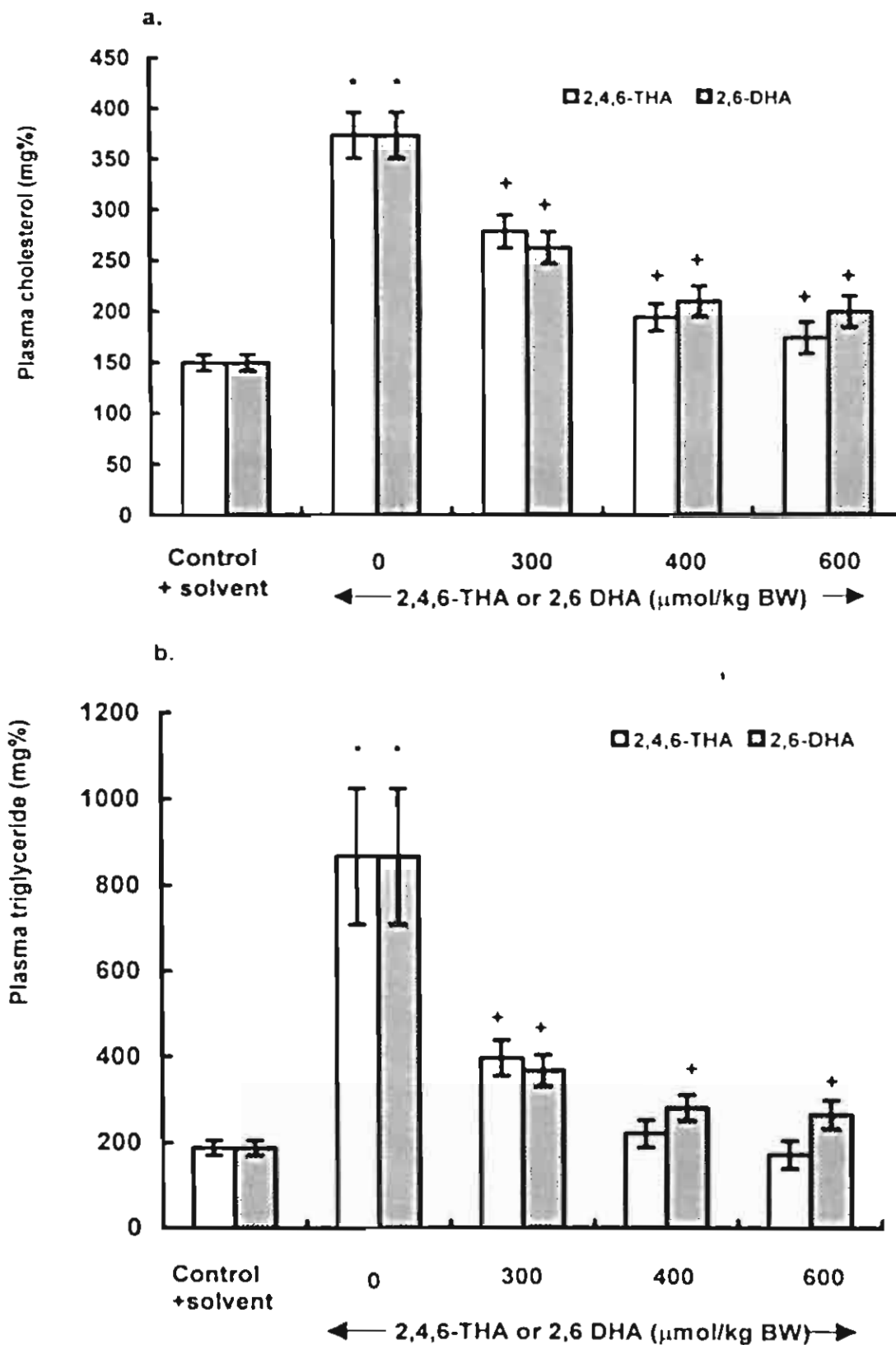
เท่า ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวมีบทบาทในการควบคุมการเปลี่ยน cholesterol ไปเป็น bile acid และขับออกทาง bile ซึ่งส่งผลให้รบกวน pool ต่างๆของ cholesterol ที่มีอยู่ในตับ แต่อย่างไรก็ตาม จากการศึกษา pool ต่างๆของ cholesterol ในตับไม่มีการเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ยังได้ทำการวัด endogenous cholesterol ในส่วนของ liver microsome พบว่าทั้งในกลุ่ม hamster ที่ได้รับและไม่ได้รับ THA และ DHA มีระดับไม่ต่างกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ปริมาณของโคเลสเตอรอลซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาไม่แตกต่างกัน ดังนั้นร่างกายจึงนำจะดึงไขมันจาก plasma มาใช้เพื่อเปลี่ยนให้เป็นกรดน้ำดีและขับออก จึงทำให้ระดับไขมันใน plasma ลดลง (รูปที่ 18)

2.3.4 ฤทธิ์ต่อปริมาณของ cholesterol และกรดน้ำดีในอุจจาระ

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณของไขมันในอุจจาระ (รูปที่ 19) ใน hamster ที่ได้รับอาหารปกติ พบว่ามี การขับออกของ cholesterol และ bile acid ทางอุจจาระค่อนข้างต่ำคือ ประมาณ 0.2 ± 0.0 mg/100 mg feces และ 2.9 ± 0.1 mmol/100 mg feces ตามลำดับ แต่เมื่อ hamster ได้รับการป้อนเสริมด้วย cholesterol จะทำให้มี ปริมาณ cholesterol และ bile acid ขับออกมาในอุจจาระเพิ่มขึ้นเป็น 1.4 ± 0.0 mg/100 mg feces และ 6.7 ± 0.4 mmol/100 mg feces ตามลำดับ ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับการที่พบว่า THA และ DHA มีผลต่อการกระตุ้น การทำงานของ enzyme cholesterol 7 α -hydroxylase ซึ่งจะเพิ่มการเปลี่ยนรูปของ cholesterol ไปเป็น bile acid และขับออกทางน้ำดีและอุจจาระ ตามลำดับ นอกจากนั้นการจับ bile acid ออกทางน้ำดียังส่งเสริมการ ขับออกของ cholesterol ทางน้ำดีอีกด้วย



รูปที่ 12 แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักและระดับ cholesterol ใน Hamster ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้มีระดับไขมันในเลือดสูงขึ้นด้วยการป้อน cholesterol ละลายในน้ำมันข้าวโพดในขนาด 0.2% ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมเป็นเวลา 14 วัน
 a. การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว b. การเปลี่ยนแปลงของระดับ cholesterol ในเลือด
 ค่าที่แสดงเป็น mean $\pm$ SEM จากสัตว์ทดลอง 10 ตัว
 * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารปกติ

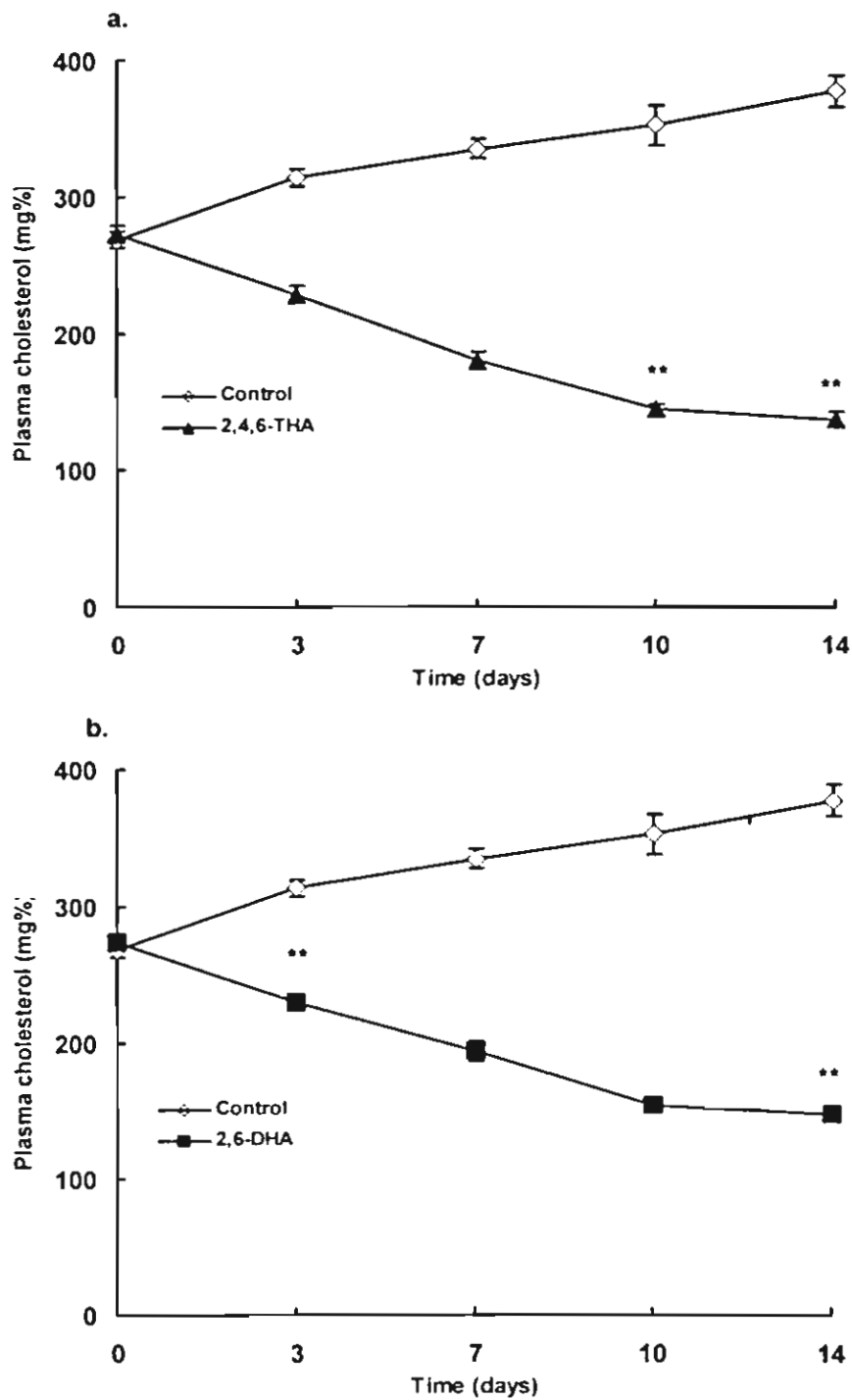


รูปที่ 13 แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของสาร 2,4,6-THA และ 2,6-DHA (300-600 $\mu\text{mol/kg BW}$) กับฤทธิ์การลดระดับ (a) cholesterol (b) triglyceride ในเลือดของ hypercholesterolaemic hamsters.

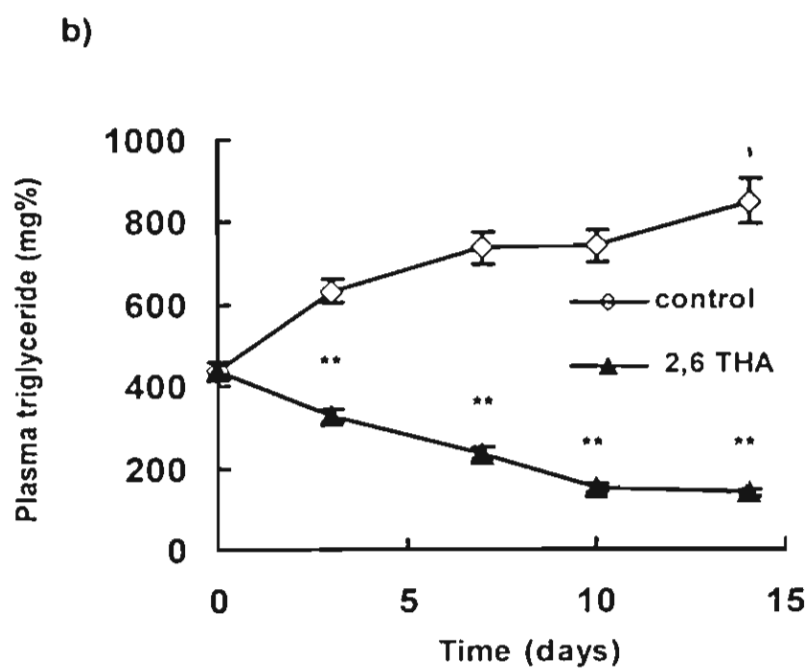
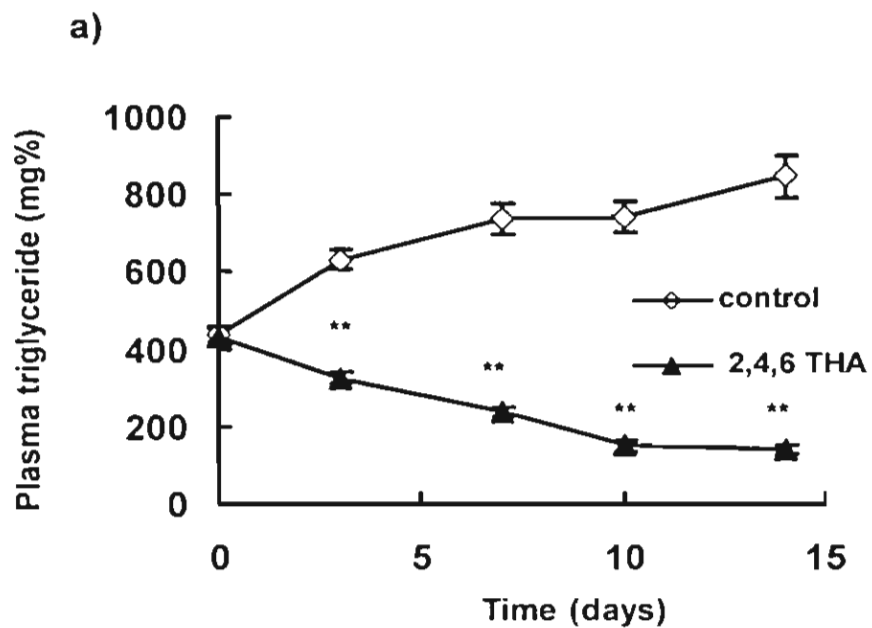
ค่าที่แสดงเป็น mean $\pm$ SEM จากสัตว์ทดลอง 10 ตัว

* $p < 0.05$, เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารปกติ

+ $p < 0.05$, เมื่อเทียบกับกลุ่มที่เลี้ยงด้วย cholesterol ที่ไม่ได้รับสาร

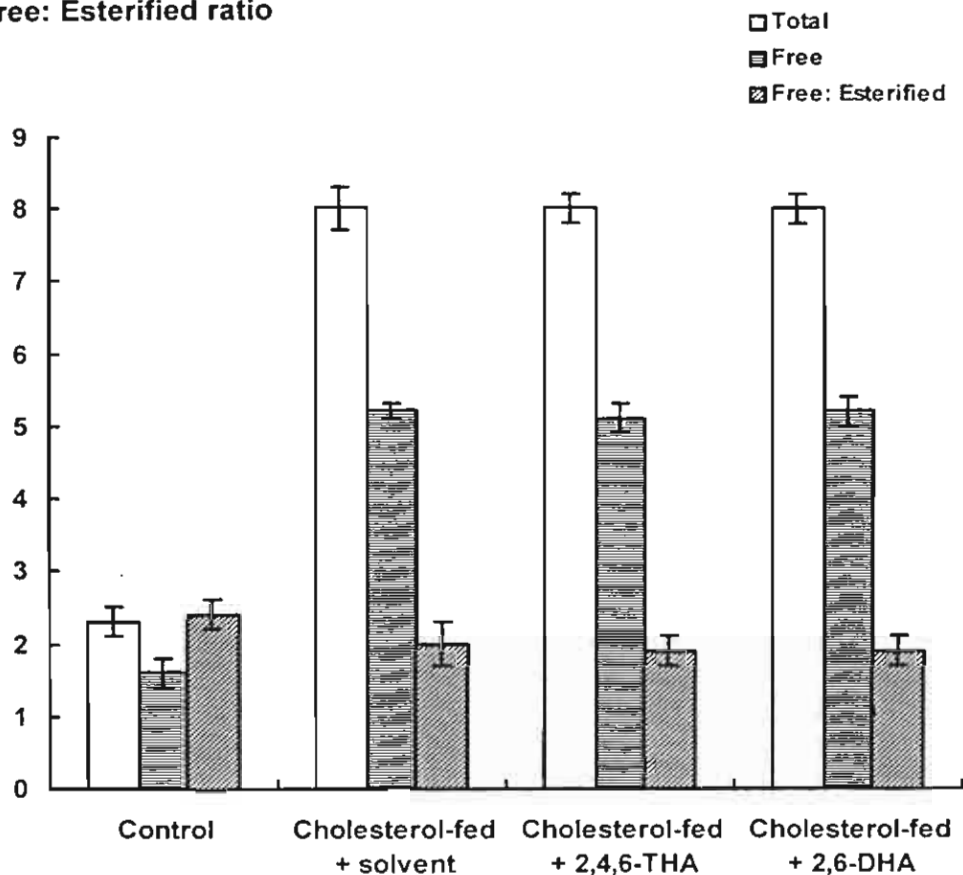


รูปที่ 14 แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาของการให้สาร (a) 2,4,6-THA และ (b) 2,6-DHA (300-600 $\mu\text{mol/kg BW}$) กับฤทธิ์การลดระดับ cholesterol ในเลือดของ hypercholesterolaemic hamsters. ค่าที่แสดงเป็น mean $\pm$ SEM จากสัตว์ทดลอง 10 ตัว
 ** $p < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่เลี้ยงด้วย cholesterol ที่ไม่ได้รับสาร

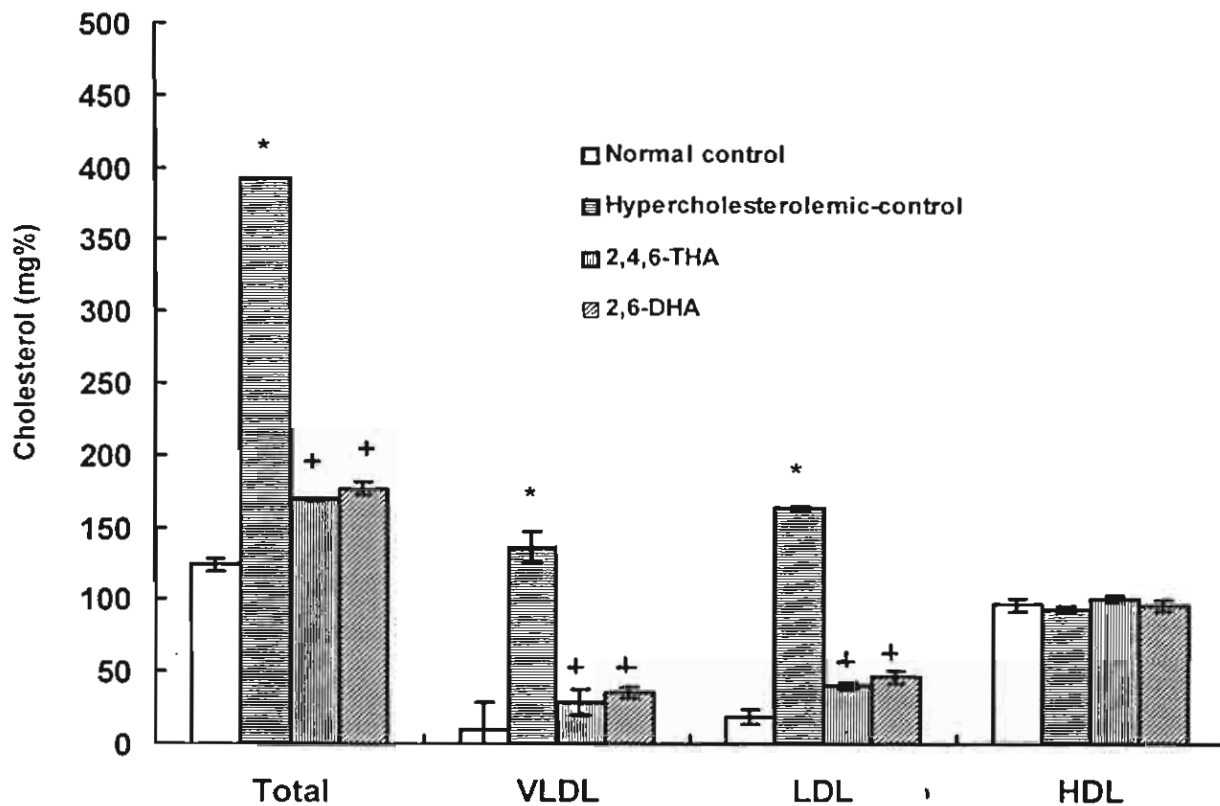


รูปที่ 15 แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาของการให้สาร (a) 2,4,6- THA และ (b) 2,6-DHA (300-600 $\mu\text{mol/kg BW}$) กับฤทธิ์การลดระดับ triglyceride ในเลือดของ hypercholesterolaemic hamsters ค่าที่แสดงเป็น mean $\pm$ SEM จากสัตว์ทดลอง 10 ตัว ** $p < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่เลี้ยงด้วย cholesterol ที่ไม่ได้รับสาร

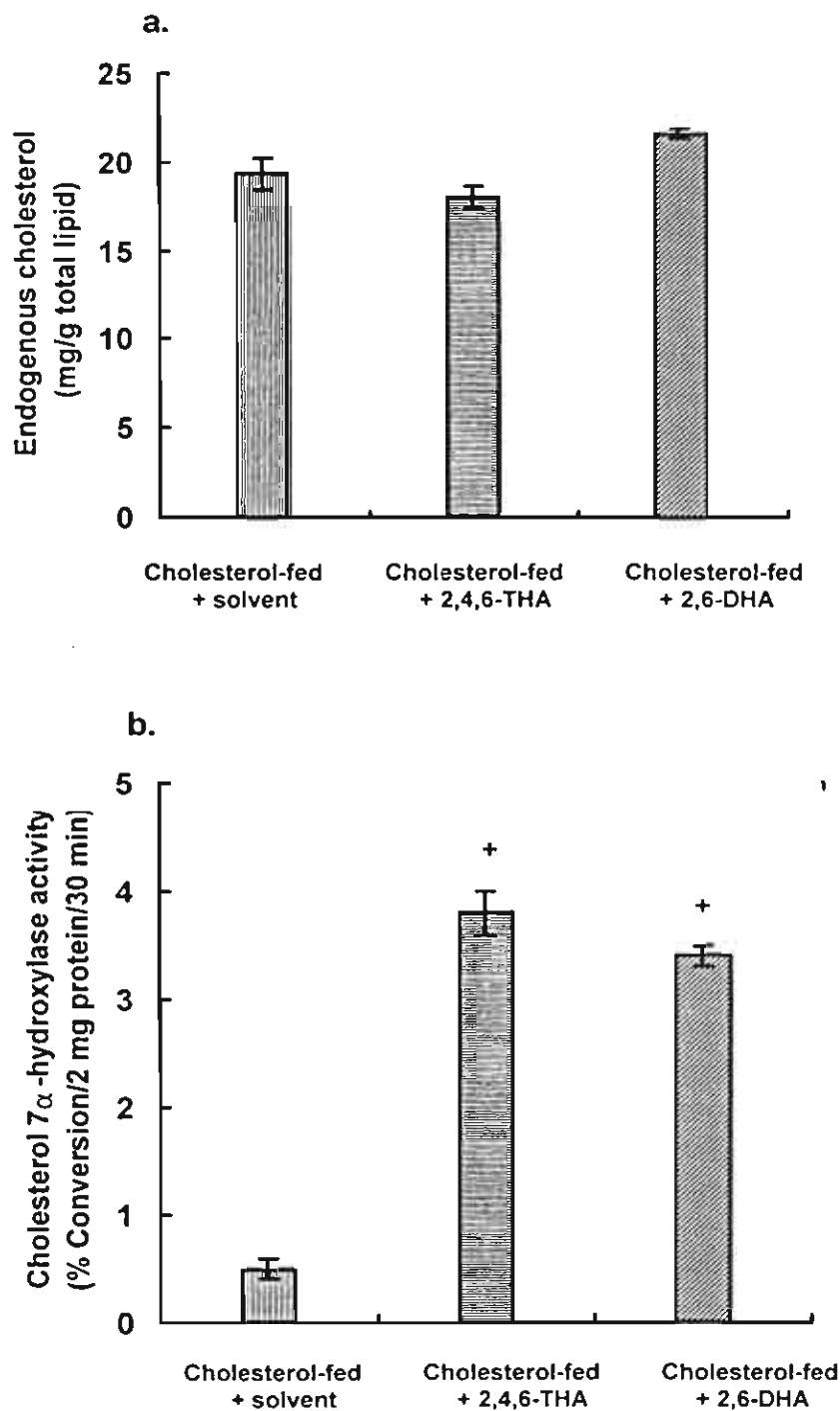
Liver cholesterol (mg/ g liver)
Free: Esterified ratio



รูปที่ 16 แสดงถึงบทบาทของสาร 2,4,6-THA และ 2,6-DHA ($400 \mu\text{mol/kg BW}$) ต่อปริมาณของ cholesterol ในตับโดยรวมและปริมาณของ cholesterol ในรูปอิสระ และรูป ester และอัตราส่วน ของ cholesterol ทั้งสองรูปนี้ในตับของ hamster ที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติ (control) และที่เลี้ยงด้วย cholesterol (cholesterol-fed) ค่าที่แสดงเป็น mean $\pm$ SEM จากสัตว์ทดลอง 10 ตัว



รูปที่ 17 แสดงถึงบทบาทของสาร 2,4,6-THA และ 2,6-DHA (400 μ mol/kg BW) ต่อระดับของ plasma cholesterol และ cholesterol ใน lipoprotein ชนิดต่างๆ ค่าที่แสดงเป็น mean $\pm$ SEM จากสัตว์ทดลอง 10 ตัว
 * $p < 0.05$, เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารปกติ
 + $p < 0.05$, เมื่อเทียบกับกลุ่มที่เลี้ยงด้วย cholesterol ที่ไม่ได้รับสาร



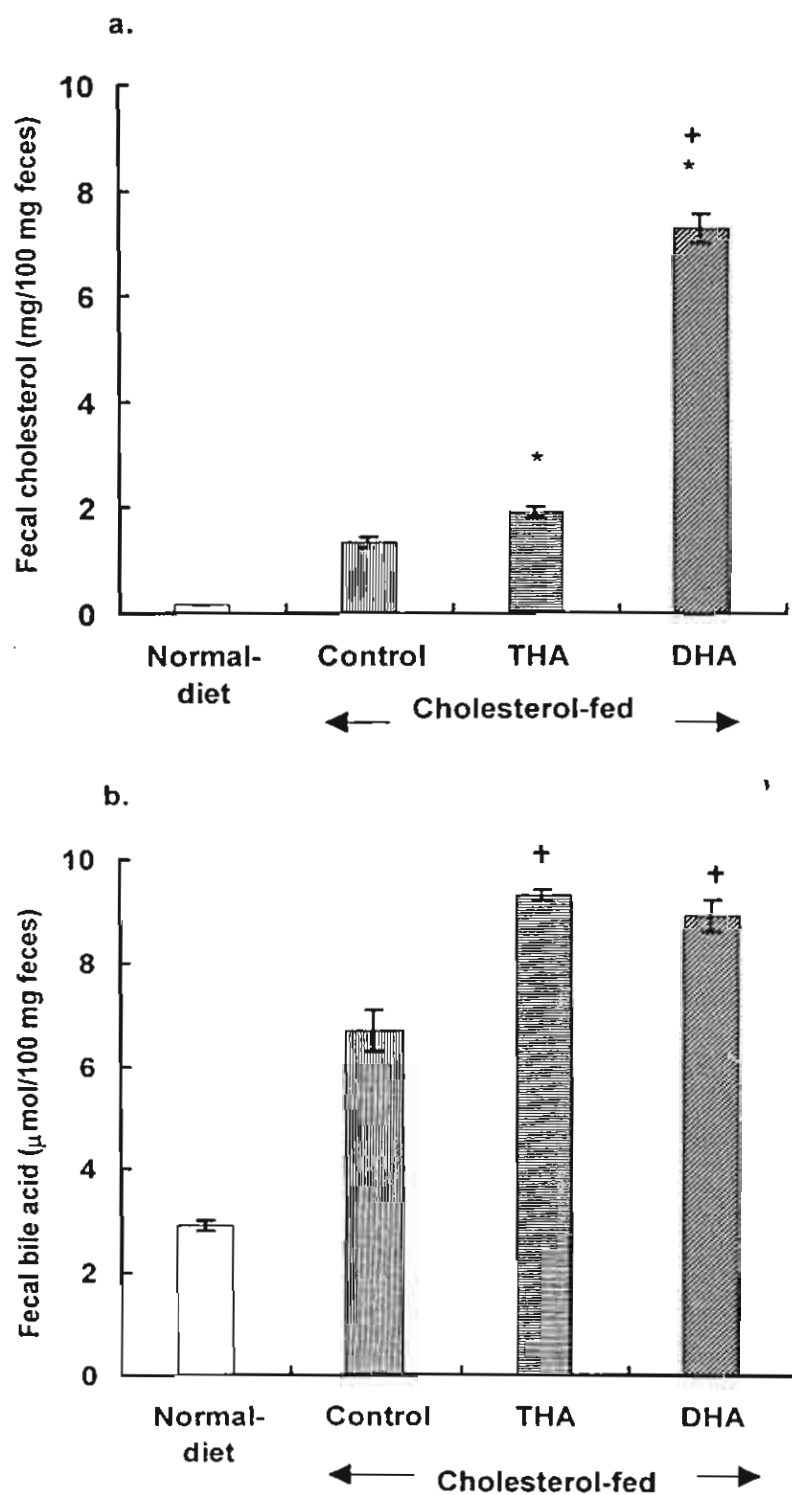
รูปที่ 18 แสดงถึงบทบาทของสาร 2,4,6-THA และ 2,6-DHA ($400 \mu\text{mol/kg BW}$) ต่อ

(a) ปริมาณของ cholesterol ใน microsome ของตับ hamster และ

(b) การทำงานของเอนไซม์ cholesterol 7 α -hydroxylase

ค่าที่แสดงเป็น mean $\pm$ SEM จากสัตว์ทดลอง 10 ตัว

+ $p < 0.05$, เมื่อเทียบกับกลุ่มที่เลี้ยงด้วย cholesterol ที่ไม่ได้รับสาร



รูปที่ 19 แสดงถึงบทบาทของสาร 2,4,6-THA และ 2,6-DHA (400 $\mu\text{mol/kg BW}$)
 ต่อการขับ (a) cholesterol และ (b) กรดน้ำดี ออกทางอุจจาระ
 ค่าที่แสดงเป็น mean $\pm$ SEM จากสัตว์ทดลอง 10 ตัว
 * $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร
 + $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสาร 2,4,6-THA

อภิปรายผล

การศึกษานี้ได้พบว่า สาร Phloracetophenone หรือ 2,4,6-trihydroxyacetophenone (THA) ที่มีกำเนิดมาจาก glucoside ของวานิลลาคือมีอยู่ในประเทศไทยนี้มีฤทธิ์ในการลดไขมันในเลือดได้เป็นอย่างดี โดยสารดังกล่าวจะลดได้ทั้งระดับของ triglyceride และ cholesterol ในเลือด เช่นเดียวกับสาร 2,6-dihydroxyacetophenone (DHA) ซึ่งเป็น analog ของ THA ก็มีฤทธิ์คล้ายกันแต่ว่าอ่อนกว่า

ในการศึกษาถึงการเมตาบอลิซึมของไขมันในร่างกายนั้นมีความยุ่งยากและซับซ้อนมาก การเลือกชนิดของสัตว์ทดลองมีความสำคัญต่อการศึกษเป็นอย่างยิ่ง ในโครงการวิจัยนี้ช่วงแรกได้ทำการศึกษาโดยใช้หนูแรท (Rat) เป็นสัตว์ทดลอง ซึ่งเป็นสัตว์ที่นิยมใช้กันทั่วไปในการวิจัย รวมถึงการใช้ในการศึกษาถึงเมตาบอลิซึมของไขมันด้วย ซึ่งมีรายงานปรากฏอยู่ในวารสารต่างประเทศเรื่อยมา จากผลการศึกษาพบว่าการเหนี่ยวนำหนูขาวให้มีระดับไขมันในเลือดสูงเป็นไปได้ยาก เนื่องจากในภาวะปกติหนูขาวจะมีระดับ activity ของเอนไซม์ cholesterol 7 α -hydroxylase ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับสัตว์บางชนิดเช่นแฮมเตอร์ (Horton et.al.,1995) ส่งผลให้หนูขาวมีการปรับตัวโดยผ่านกลไกในการเปลี่ยนรูป cholesterol ไปเป็น bile acid และขับทิ้งจากร่างกายได้อย่างรวดเร็ว ในการวิจัยนี้ในเบื้องต้นได้มีการเหนี่ยวนำหนูขาวให้มีระดับไขมันในเลือดสูงโดยให้อาหารที่เสริมด้วย 1.5% cholesterol และ 0.5% cholic acid เพื่อรบกวนกระบวนการเมตาบอลิซึมของไขมันในร่างกาย ซึ่งพบว่าวิธีการดังกล่าวสามารถทำให้ระดับไขมันในหนูขาวจะเพิ่มขึ้นได้ระดับหนึ่ง หลังจากนั้นจะเกิดภาวะของความเป็นพิษ ส่งผลให้เกิดการกั่งของไขมันในตับอย่างมาก ทำให้กลไกการควบคุมการเมตาบอลิซึมของไขมันในร่างกายเสียไป ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงได้เปลี่ยนไปเป็นใช้แฮมสเตอร์เป็นสัตว์ทดลอง มีรายงานมากมายถึงข้อดีของสัตว์ชนิดนี้ในการนำมาใช้เป็นแบบจำลองในการศึกษาถึงเมตาบอลิซึมของไขมัน เนื่องจากสัตว์ทดลองดังกล่าวมีระบบเมตาบอลิซึมของไขมันคล้ายกับมนุษย์ นอกจากนั้นแฮมสเตอร์ยังเป็นสัตว์ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไขมันในเลือดสูงได้หลังจากป้อน cholesterol เสริมเพียงอย่างเดียว (Gillies et.al.,1997; Hoffmann et.al.,1997) ได้มีรายงานว่า การป้อน cholesterol เสริมนอกจากจะเพิ่มระดับ cholesterol ในเลือดแล้ว ยังมีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ phosphatidate phosphohydrolase-1 (PAP-1) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในการควบคุมการสร้าง triglyceride เพิ่มขึ้นอีกด้วย (Sessions et.al.,1993) ทำให้การป้อน cholesterol เสริมให้แฮมเตอร์ส่งผลให้ระดับของ cholesterol และ triglyceride ในเลือดเพิ่มสูงขึ้นดังที่พบในการทดลองนี้

จากการศึกษาถึงฤทธิ์ของ THA และ DHA พบว่าสารดังกล่าวสามารถลดระดับ cholesterol และ triglyceride ในเลือดได้ โดยความแรงของฤทธิ์จะขึ้นอยู่กับขนาดและระยะเวลาของการให้สาร สาร THA ขนาด 400 ไมโครโมลต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมจะมีประสิทธิภาพในการลดระดับ cholesterol ในเลือดได้ประมาณ 48 เปอร์เซ็นต์ และไตรกลีเซอไรด์ 75 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งฤทธิ์สูงสุดในการลดไขมันในเลือดจะพบหลังจากได้รับสารต่อเนื่องไปเป็นเวลา 10 วัน

ในการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ของ THA และ DHA ในการลดระดับไขมันในเลือด จำเป็นต้องเข้าใจถึงกระบวนการเมตาบอลิซึมของไขมันเป็นอย่างดี ร่างกายมีกลไกในการควบคุมระดับไขมันให้อยู่ในภาวะปกติ โดยการควบคุมให้ปริมาณของไขมันที่ได้รับสมดุลกับปริมาณของไขมันที่ขับออกจากร่างกาย เพื่อไม่ให้เหลือค้างเกินความจำเป็นอันเป็นเหตุให้เกิดพยาธิสภาพมากมาย เช่น ภาวะหลอดเลือดอุดตัน (atherosclerosis) และหัวใจวาย (heart failure) ซึ่งเป็นหนึ่งในสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการตายของคนจำนวนมาก โดยปกติร่างกายได้รับไขมันจาก 2 แหล่งใหญ่คือ 80% มาจากการสังเคราะห์โดยตับ และลำไส้ ส่วนที่เหลือมาจากสารอาหารที่รับประทานเข้าไป ตับเป็นอวัยวะหลักในการสร้าง cholesterol ขึ้นจาก acetate โดยอาศัยเอนไซม์ hydroxymethylglutaryl Coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวสำคัญในการควบคุมระดับ cholesterol ในร่างกาย โดยเอนไซม์ดังกล่าวจะถูกกระตุ้นให้ทำงานเมื่อเซลล์ขาด cholesterol และจะหยุดเมื่อภายในเซลล์มี cholesterol มากพอเพียง นอกจากนี้การได้รับ cholesterol จากการรับประทานอาหารยังมีผลต่อการลดการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase อีกด้วย (Jackson et.al.,1990) ในเซลล์ตับ cholesterol จะอยู่ในรูปทั้ง free form และ bound form โดยจะมีเอนไซม์ acyl-CoA cholesterol acyltransferase (ACAT) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ควบคุมการเปลี่ยนรูปของ free cholesterol ให้เป็น bound cholesterol ได้มีรายงานถึงการป้อน cholesterol เสริมทำให้กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว (Jackson et.al.,1990; Ochoa et.al.,1990) ผลการรายงานดังกล่าวได้สอดคล้องกับผลการวิจัยนี้ที่พบว่าการป้อน cholesterol เสริมจะมีผลต่อการเพิ่มของระดับ cholesterol ในรูป free และ bound form เมื่อเทียบกับแฮมเตอร์ปกติซึ่งแสดงให้เห็นว่า การป้อน cholesterol เสริมจะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ACAT ทำให้มีการเปลี่ยนรูปของ free cholesterol ไปเป็น bound cholesterol และเก็บสะสมไว้ในตับ นอกจากนี้ยังพบว่าการลดระดับไขมันในเลือดซึ่งเป็นผลของ THA และ DHA ไม่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มการเก็บสะสมไขมันในตับ เนื่องจากการให้สาร THA และ DHA ไม่เปลี่ยนแปลงระดับของ cholesterol ในตับ ข้อมูลดังกล่าวยังชี้ให้เห็นว่า ผลของการลดระดับไขมันในเลือดของ สาร THA และ DHA ไม่เกี่ยวข้องกับการลดการสร้างของ cholesterol ในตับ หรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase แต่อย่างใด กล่าวคือถ้ากลไกการลดระดับของไขมันในเลือดของสาร THA และ DHA เกี่ยวข้องกับการลดการสร้างของ cholesterol ในตับจริง ควรพบว่าปริมาณของ cholesterol ในตับลดลงด้วย

จากคุณสมบัติของไขมันซึ่งไม่ละลายน้ำ ไขมันในเลือดจึงต้องรวมตัวกับพวก apoprotein ต่างๆ ก่อนจะเข้าสู่กระแสเลือดในรูปของ lipoprotein ไขมันจากตับเข้าสู่กระแสเลือดในรูปของ lipoprotein ที่มีความหนาแน่นต่ำคือ VLDL ซึ่งมี triglyceride เป็นองค์ประกอบหลักและมี cholesterol อยู่บ้าง ในกระแสเลือด VLDL จะถูกย่อยโดยเอนไซม์ lipoprotein lipase (LPL) ทำให้ได้กรดไขมันอิสระและกลีเซอรอลซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการที่เซลล์ต่างๆจะนำไปใช้เป็นพลังงานต่อไป ส่วนที่เหลือคือ IDL และ LDL การวิจัยหลายชิ้นได้ชี้ให้เห็นว่า การป้อน cholesterol เสริมทำให้เพิ่มระดับ lipoprotein ในรูป VLDL และ LDL (Jackson et.al.,1990; Fungwe et.al.,1990) อย่างไรก็ตาม lipoprotein ในรูป HDL ซึ่งมี

หน้าที่ในการเร่งการเคลื่อนย้ายของ cholesterol จากเนื้อเยื่อบนอกเข้าสู่ตับเพื่อทำลาย อาจจะถูกปรับเปลี่ยนไปหรือไม่เปลี่ยนแปลงก็ได้ จากการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าฤทธิ์ต่อการลดระดับของไขมันในเลือดของสาร THA และ DHA มีผลโดยตรงต่อการลดระดับของ VLDL และ LDL แต่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ HDL จากการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่า การลดระดับไขมันในเลือดไม่เกี่ยวข้องกับการลดการหลั่งของ lipoprotein ในรูป VLDL เนื่องจากไม่พบการคั่งของปริมาณ cholesterol และ triglyceride ในตับแต่อย่างใด

คณะวิจัยได้ทำการศึกษาหากลไกการลดระดับไขมันในเลือดต่อไปโดยมุ่งเน้นถึงการเร่งกระบวนการขับออกของ cholesterol โดยการวัดการทำงานของเอนไซม์ cholesterol 7 α -hydroxylase ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักที่มีบทบาทในการควบคุมการเปลี่ยน cholesterol ให้เป็น bile acid และขับออกทางน้ำดีและอุจจาระต่อไป ผลการวิจัยพบว่า ทั้ง DHA และ THA มีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ cholesterol 7 α -hydroxylase โดยที่ THA ให้ผลเด่นชัดกว่า ผลการวิจัยดังกล่าวยังสอดคล้องกับการหาปริมาณของ bile acid ในอุจจาระ ซึ่งพบว่าเมื่อได้รับสาร THA และ DHA จะส่งผลให้ระดับของ bile acid ในอุจจาระเพิ่มขึ้น จากข้อมูลดังกล่าวจะชี้ให้เห็นว่า การลดระดับไขมันในเลือดของสาร THA และ DHA เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ cholesterol 7 α -hydroxylase ทำให้ cholesterol เปลี่ยนไปเป็น bile acid และขับออกทางน้ำดี และอุจจาระ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการให้ THA และ DHA มีผลต่อการขับออกของ cholesterol ทางน้ำดีและอุจจาระต่อไป ซึ่งผลดังกล่าวจะพบใน DHA ได้ชัดเจนกว่า THA จากข้อมูลดังกล่าวจะชี้ให้เห็นว่า ทั้งสาร THA และ DHA มีผลต่อการลดระดับของไขมันในเลือดโดยการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ cholesterol 7 α -hydroxylase ทำให้เพิ่มการขับออกของ cholesterol จากร่างกาย

จากผลการวิจัยนี้สรุปได้ว่าสาร THA และ DHA มีฤทธิ์ดีเด่นในการลดระดับไขมันในเลือด น่าจะได้รับการพัฒนาไปเป็นยาลดไขมันในเลือดต่อไป โดยที่ THA จะให้ผลดีกว่าเนื่องจากเร่งการเปลี่ยนรูปของ cholesterol ไปเป็น bile acid ได้มากกว่า DHA ส่วนสาร DHA มีผลเด่นต่อการขับ cholesterol ออกมาทางน้ำดีเพิ่มขึ้น ในระยะยาวอาจจะเป็นผลเสียต่อร่างกาย เนื่องจากอาจทำให้เกิดการตกตะกอนของ cholesterol ในน้ำดี ซึ่งจะส่งเสริมอุบัติการณ์การเกิดนิ่วในถุงน้ำดีได้

ผลการวิจัยนี้มีประโยชน์ต่อการนำพืชสมุนไพรที่มีสาร THA ไปพัฒนาเป็นยาลดไขมันในเลือดได้ต่อไป

ตอนที่ 3. การศึกษาถึงความเป็นพิษของสาร phloracetophenone

3.1 การศึกษาพิษของสาร THA

ค่า LD_{50} ของ THA สรุปอยู่ในตารางที่ 4 คำนี้นับอยู่กับสายพันธุ์ วิธีการให้สาร THA และเพศของสัตว์ทดลองที่ใช้ แต่ไม่ขึ้นกับอายุของสัตว์ทดลองที่ใช้ จากผลการทดลองสามารถจัดสาร THA ให้อยู่ในกลุ่มของสารที่ไม่มีพิษต่อหนูแรทโดยเมื่อป้อนให้ทางปากค่า LD_{50} มากกว่า 6 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวของหนู หนูแรทมีความไวต่อการเกิดพิษของ THA ต่ำสุด ในขณะที่หนูแฮมเตอร์และหนูถีบจักรมีความไวต่อการเกิดพิษจาก THA ได้มากกว่าหนูแรท ค่า LD_{50} ในแฮมเตอร์และหนูถีบจักรเพศผู้โตเต็มวัย เมื่อให้ THA เข้าทางช่องท้องจะมีค่าเท่ากับ 338 และ 365 mg/kg BW ตามลำดับ หลังจากสัตว์ทดลองได้รับ THA ในขนาดที่เป็นพิษโดยการฉีดเข้าช่องท้อง สัตว์ทดลองจะแสดงอาการตื่นตัว มีอาการเดินเซ และชัก และจะตายจากภาวะการหายใจล้มเหลว

3.2 การศึกษาพิษถึงเฉียบพลันของ THA

จากผลการทดลองพบว่า THA ขนาดสูงเท่านั้น (150 mg/kg BW), ที่เหนี่ยวนำให้เซลล์ตับเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ชัดเจน เมื่อเซลล์ตับถูกทำลายจะมี vacuole เกิดขึ้นจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์ตับที่อยู่ในบริเวณรอบนอก (periportal area) และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับอาจจะขยายลุกลามไปสู่บริเวณส่วนกลาง (central area) ได้ (รูปที่ 20) นอกจากนี้ยังพบว่าค่าต่างๆ ทางชีวเคมีของเลือดมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้น แต่ไม่มากนัก ดังสรุปในตารางที่ 5 ค่า enzyme AST และ ALT ในเลือดจะสูงแตกต่างจากค่าปกติซึ่งจะสังเกตจากที่ได้รับ THA ในขนาด 150 mg/kg BW เป็นต้นไป ระดับของ Bilirubin, BUN และปริมาณของ triglyceride ในตับก็เช่นเดียวกัน จะสูงขึ้นเมื่อได้รับ THA ขนาด 150 mg/kg BW

3.3 การศึกษาถึงผลของสาร THA ต่อหน้าที่การขับทิ้งของตับในหนูแรทที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะการคั่งของน้ำดี

ในหนูแรทกลุ่มควบคุมมีค่า BFR อยู่ประมาณ 62.7 ± 0.2 ไมโครลิตรต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวของหนูต่อนาที (ค่าอยู่ในช่วง 62.3 ± 0.4 ถึง 69.6 ± 0.3 ไมโครลิตรต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวของหนูต่อนาที) ซึ่งค่า BFR นี้จะคงที่ตลอดเวลา 2 ชั่วโมง ที่เก็บตัวอย่างน้ำดี จากการทดลองพบว่า THA มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งของน้ำดีได้ทันที หลังจากฉีดให้ทางลำไส้เล็กส่วนต้น (i.d.) และออกฤทธิ์สูงสุดที่เวลา 15 นาที หลังจากฉีดค่า BFR เพิ่มขึ้น 218% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 21) ในกลุ่มหนูแรทที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะการคั่งของน้ำดี ค่า BFR จะอยู่ประมาณ 36.6 ± 0.2 ไมโครลิตรต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวของหนูต่อนาที หรือลดลงประมาณ 42% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 22) นอกจากนั้นยังพบว่า THA มีบทบาทในการเร่งการขับทิ้งของสารในตับ รวมถึงระดับของเอนไซม์ alkaline phosphatase (รูปที่ 23) ในเลือดของหนูกลุ่มที่เหนี่ยวนำให้เกิดการคั่งของน้ำดี แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า THA ไม่มีผลต่อระดับ bilirubin (รูปที่ 24)

ตารางที่ 4 แสดงค่า LD₅₀ ในหนูถีบจักรหนูแรทและหนูแฮมเตอร์ หลังจากได้รับสาร THA ในขนาดเดียว ทั้งทาง i.p. และ i.g.

Animals ^a	Mean BW(g)	Number of animals	Route	LD ₅₀ ^b (mg/kg BW)	Slope function	Onset of convulsion (min)	Survival time (min)
Mice (M weanling)	12.6±2.6	36	i.p.	370 (293.1-466.4)	1.262	5-25	40 min-3 days
Mice (F weanling)	11.5±2.3	30	i.p.	430 (313.4-589.9)	1.372	5-25	40 min-3 days
Mice (M adult)	26.5±4.9	48	i.p.	365 (328.8-405.1)	1.235	5-25	40 min-3 days
Mice (F adult)	25.1±4.9	20	i.p.	400 (371.7-430.4)	1.076	5-25	40 min-3 days
Hamsters (M adult)	110.0±6.4	48	i.p.	338 (299.1-381.9)	1.245	5-30	1-3h
Hamsters (F adult)	115.0±6.3	48	i.p.	371 (332.7-413.6)	1.251	5-30	1-3h
Rats (M adult)	182.0±8.4	20	i.p.	620 (591.6-649.8)	1.048	45-60	~3h
Rats (F adult)	175.0±7.3	30	i.p.	660 (622.6-699.6)	1.095	45-60	~3h
Mice (M adult)	26.5±4.2	48	i.g.	3200 (2380-4280)	1.339	30-60	1h-5days
Mice (F adult)	25.1±3.9	48	i.g.	3400 (2470-4670)	1.585	30-60	1h-5days
Hamsters (M adult)	110.0±6.1	48	i.g.	2950 (2590-3350)	1.203	45-60	1h-7days
Hamsters (F adult)	115.0±6.1	48	i.g.	3100 (2570-3720)	1.46	45-60	1h-7days
Rats (M adult)	182.0±8.3	48	i.g.	6000	0	>60	>14days
Rats (F adult)	175.0±7.7	48	i.g.	6000	0	>60	>14days

^aM and F are male and female animals, respectively.

^bCalculated by a method of Litchfield and Wilcoxon (196). Figures in parentheses are 95 % confidence limits.

^cTime range was recorded immediately after 2,4,6-trihydroxyacetophenone administration.

ตารางที่ 5 แสดงค่าชีวเคมีต่างๆ ในเลือดของหนูถีบจักร หลังการได้รับ THA ป้อนทางปากติดต่อกัน 30 วัน

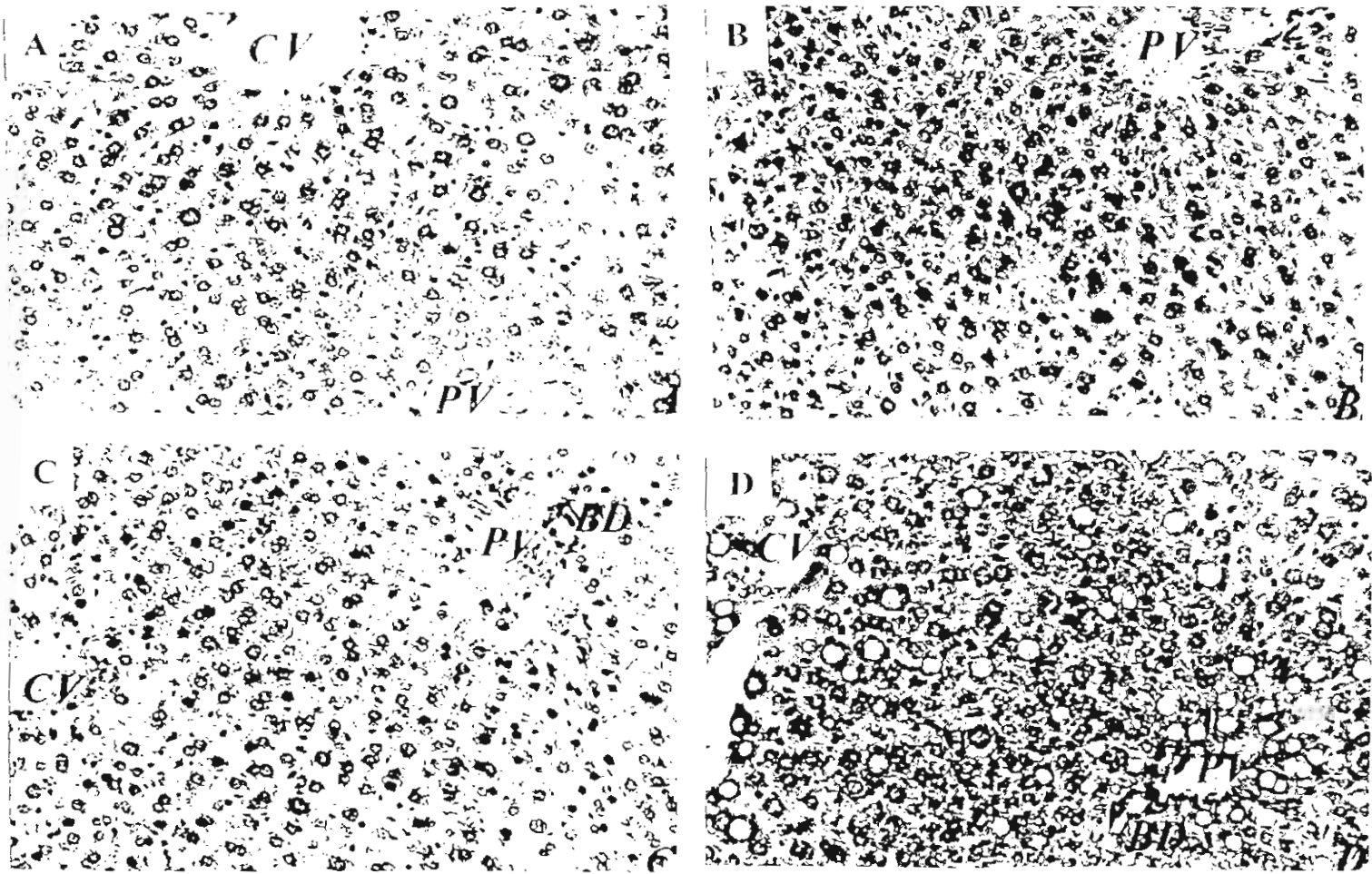
Parameters	Control	2,4,6-Trihydroxyacetophenone (mg/kgBW)			
		0	37.5	75	300
Body weight (g)	31.3±1.22	32.4±1.42	32.2±1.18	31.6±1.22	32.0±1.31
Liver weight (g/ 100 g BW)	4.8±0.04	4.9±0.04	4.9±0.04	4.8±0.02	4.9±0.08
ALT (IU/ml)	42.5±1.35	49.7±1.88	54.0±1.27	59.0±0.77	74.7±3.3*
AST (IU/ml)	74.2±2.44	87.8±2.43	91.4±1.79	98.1±1.08	120.3±4.24*
BUN (mg %)	7.5±0.17	8.3±0.13	9.6±0.07	10.6±0.16	11.2±0.16*
Total bilirubin (mg %)	0.9±0.02	0.9±0.02	1.2±0.01	1.2±0.01	1.4±0.01*
Liver triglyceride (mg/ g liver)	10.3±0.03	10.9±0.20	12.9±0.12	15.3±0.21*	15.8±0.35*
Liver glutathione (μmol/ g liver)	0.2±0.01	0.2±0.01	0.5±0.02*	0.4±0.02*	0.3±0.03*

2,4,6-Trihydroxyacetophenone was intragastrically administered once a day for 30 consecutive days.

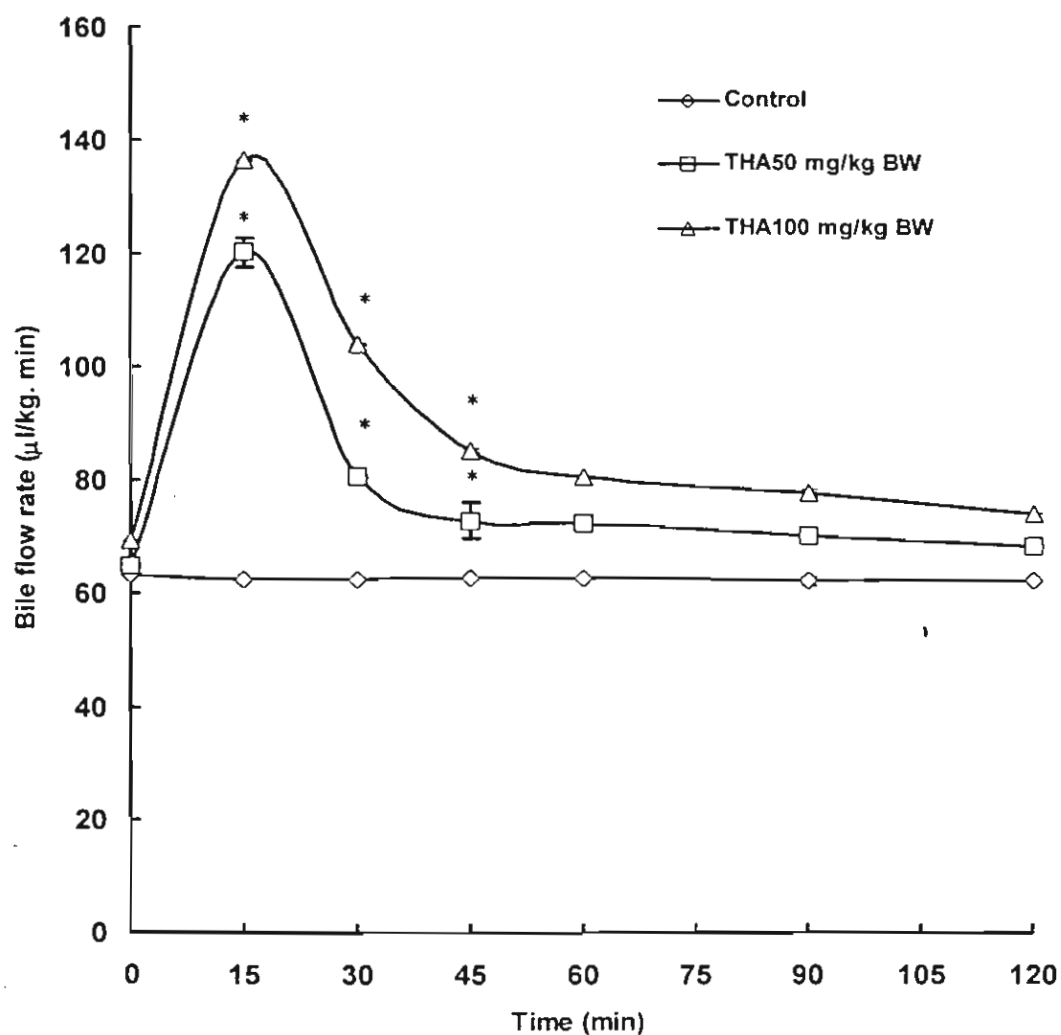
Values are means ± SEM from 8-10 animals.

*P < 0.05 significantly different from the normal control.

*P < 0.05 significantly different from the solvent control.



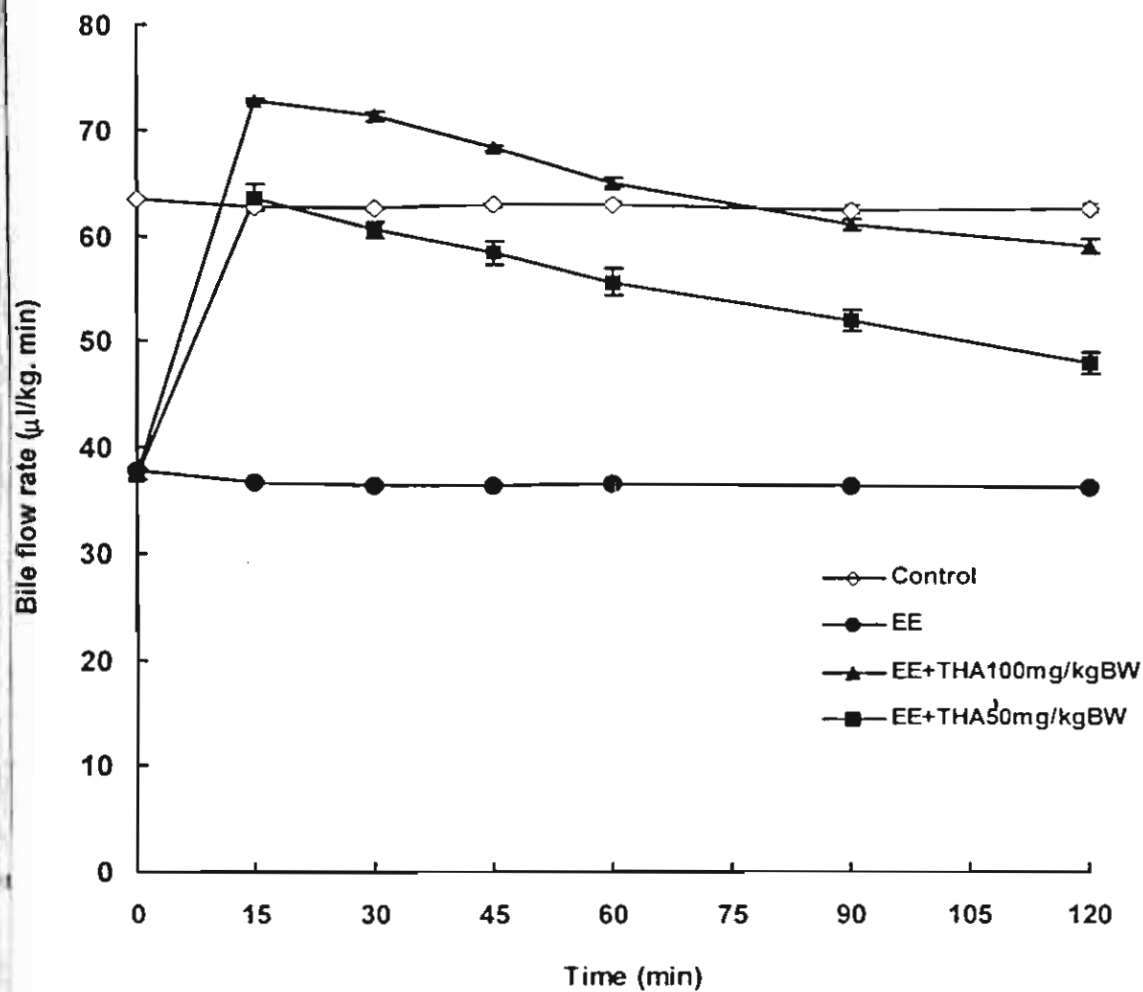
รูปที่ 20 แสดงภาพถ่ายเซลล์จากเยื่อหุ้มจอประสาทตา (A) และที่ให้สาร THA เปลี่ยนทางปากในขนาดต่ำ (B และ C) กลุ่มที่ให้ THA ขนาดต่ำ เซลล์ชั้นไม่มีมีการเปลี่ยนแปลง แต่ในบางกลุ่มที่ให้ THA ขนาดสูง (D) เซลล์ชั้นมีการเปลี่ยนแปลงบริเวณ periportal คุกคามไปสู่ บริเวณ central การเปลี่ยนแปลง vacuoles จำนวนมาก



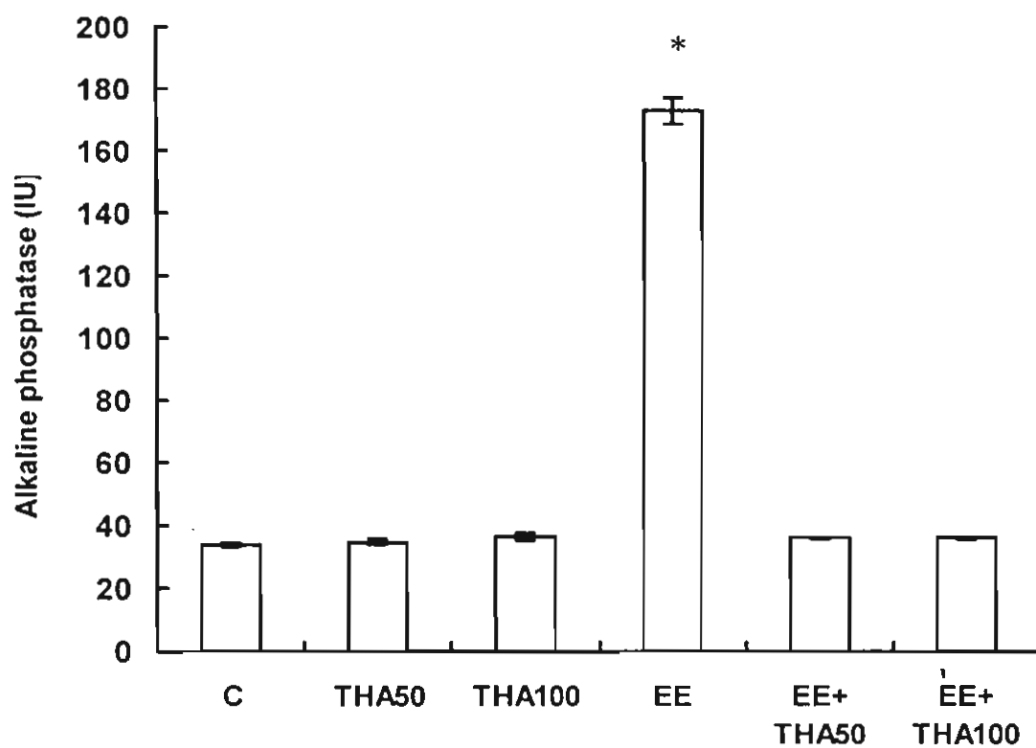
รูปที่ 21 แสดงอัตราการไหลของน้ำดีในหนูแรท หลังจากได้รับ THA ทาง i.d. ทั้งขนาดสูงและขนาดต่ำ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ค่าที่แสดงเป็น mean $\pm$ SEM

*p<0.05, เมื่อเทียบกับก่อนได้รับสาร



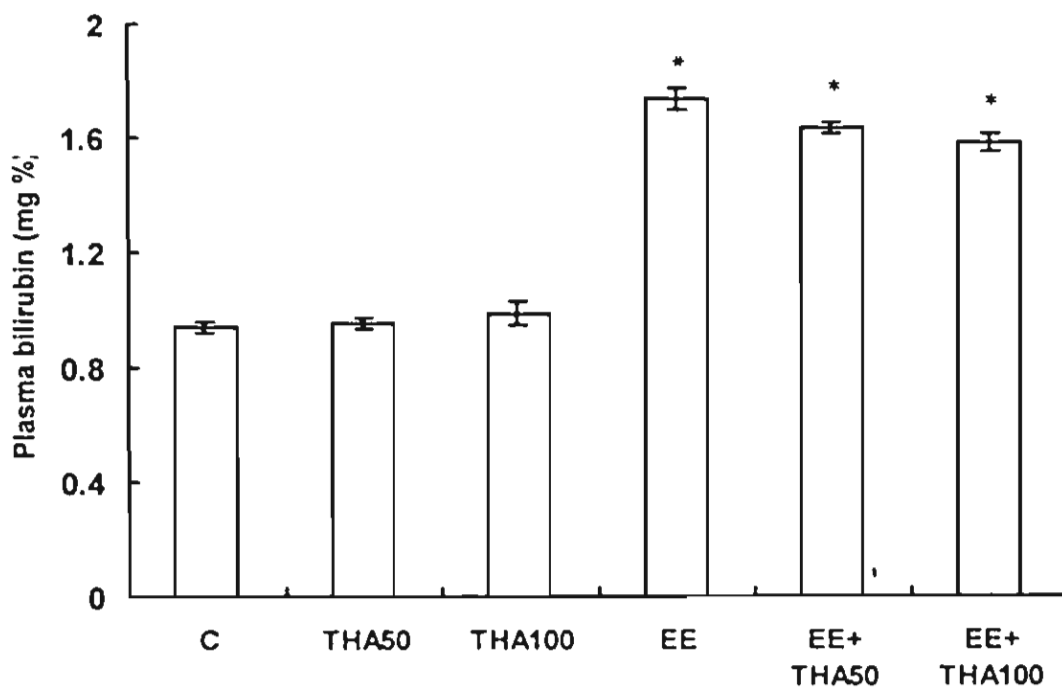
รูปที่ 22 แสดงค่าอัตราการไหลของน้ำดีในหนูแรทกลุ่มที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะการคั่งของน้ำดีด้วยสาร EE เปรียบเทียบกับกลุ่มที่เหนี่ยวนำและให้ THA ควบคุม ทาง i.g. ทั้งขนาดสูงและขนาดต่ำ



รูปที่ 23 แสดงระดับ Alkaline phosphatase ในหนูแรทหลังจากได้รับสาร THA i.d. ทั้งขนาดสูงและขนาดต่ำ เปรียบเทียบกับกลุ่มที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะการกั่งของน้ำดีด้วยสาร EE และให้สาร THA ควบคู่กันไปทาง i.g. (5 วัน)

ค่าที่แสดงเป็น mean $\pm$ SEM

* $p < 0.05$, เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 24 แสดงระดับ Bilirubin ในหนูแรทหลังจากได้รับสาร THA i.d. ทั้งขนาดสูงและขนาดต่ำ เปรียบเทียบกับกลุ่มที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะการคั่งของน้ำดีด้วยสาร EE และให้สาร THA ควบคู่กันไปทาง i.g. (5 วัน)

ค่าที่แสดงเป็น mean $\pm$ SEM

* $p < 0.05$, เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

อภิปรายผล

เนื่องจากมีรายงานถึงประสิทธิภาพของสารฟลออะซีโดฟิโนน (THA) ว่ามีฤทธิ์ดีเด่นในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดี และส่งผลให้ระดับ cholesterol ในเลือดลดต่ำลง สาร THA นี้จึงเป็นที่น่าสนใจ ในแง่ของการพัฒนาไปเป็นยารักษาอาการคั่งของน้ำดีในตับและยาลดไขมันในเลือดได้ต่อไป จึงมีความจำเป็นที่จะต้องตรวจสอบถึงความเป็นพิษของสาร THA

ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะศึกษาพิษของสาร THA ทั้งในแง่พิษเฉียบพลัน พิษกึ่งเฉียบพลันและผลต่อการขับทิ้งของตับ

การศึกษาพิษเฉียบพลันของ THA ได้ทำการวิจัยในสัตว์ทดลองซึ่งมีความแตกต่างกันทั้งในแง่ สายพันธุ์ อายุ เพศของสัตว์ทดลอง และวิธีการให้สาร THA ปัจจัยที่แตกต่างเหล่านี้ อาจส่งผลให้เกิดความแตกต่างของการเกิดพิษในสัตว์ทดลองได้ จากผลการทดลองสรุปได้ว่า พิษเฉียบพลันของ THA ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ เพศของสัตว์ทดลอง และวิธีการให้สาร THA อย่างไรก็ตามความเป็นพิษของ THA จะไม่ขึ้นกับอายุของสัตว์ทดลองที่ใช้ จากค่า LD_{50} THA สามารถจัดอยู่ในกลุ่มของสารที่ไม่มีพิษ ต่อหนูแรท เมื่อป้อน THA ให้ทางปาก (i.g.) ค่า LD_{50} มากกว่า 6 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวของหนู หนูแรทนั้นมีความไวต่อการเกิดพิษจาก THA ต่ำสุด ในขณะที่หนูแฮมเตอร์ และหนูถีบจักร มีความไวต่อการเกิดพิษ จาก THA ได้มากกว่าหนูแรท (ค่า LD_{50} ให้ทางปากในเพศผู้ เท่ากับ 2.95 และ 3.20 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวของหนูตามลำดับ) หลังจากที่ได้รับ THA ในขนาดที่ทำให้ตายโดยการฉีดเข้าช่องท้อง สัตว์ทดลองจะแสดงอาการตื่นตัว มีอาการเดินเซ ชัก และจะตายจากภาวะการหายใจล้มเหลว

อาการ และอาการแสดงของสัตว์ทดลองหลังจากได้รับ THA ทางปาก (i.g.) จะคล้ายกับหลังจากได้รับทางการฉีดเข้าช่องท้อง (i.p.) แต่ความรุนแรงในการเกิดไม่เท่ากัน เหตุผลน่าจะเกิดจากการดูดซึมของสาร ซึ่งมีความแตกต่างกัน โดยการให้ทาง i.p. สารจะถูกดูดซึมได้เร็วกว่าการให้ทาง i.g. นอกจากนั้นในบรรดาสัตว์ทดลองที่ใช้ หนูแฮมเตอร์และหนูถีบจักรมีความไวต่อการเกิดพิษจาก THA สูง (ค่า LD_{50} ต่ำทั้งในเพศผู้และเพศเมีย และทั้งสองวิธีทางที่ให้ THA (i.g. และ i.p.) อาจเนื่องจากหนูแฮมเตอร์และหนูถีบจักรมีความสามารถในการ detoxification น้อยกว่าหนูแรท

สำหรับการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันของ THA ทำในหนูถีบจักรตัวผู้ โดยป้อน THA (37-300 mg/kg BW) ให้ทางปาก (i.g.) วันละ 1 ครั้งเป็นเวลานานติดต่อกัน 30 วัน พบว่า THA ขนาดสูงเท่านั้น (150 mg/kg BW) ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ตับเกิดการเปลี่ยนแปลงได้อย่างชัดเจน เมื่อเซลล์ตับถูกทำลายจะมี vacuole เกิดขึ้นจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์ตับที่อยู่ในบริเวณรอบนอก (periportal area) และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับอาจจะขยายลุกลามไปสู่บริเวณส่วนกลาง (central area) ได้ นอกจากการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวแล้วยังพบว่าค่าต่างๆ ทางชีวเคมีของเลือด เช่น ค่า enzyme จากตับ AST และ ALT และค่าอื่นๆมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ถึงแม้ว่าจากผลการศึกษาพิษเฉียบพลันของสาร THA สามารถจัด THA มีเป็นสารที่มีพิษต่ำหรืออาจจะไม่มีพิษต่อหนูแรท แต่หลังจากศึกษาถึงพิษกึ่งเฉียบพลัน โดยให้สัตว์ทดลองได้รับ THA ติดต่อกันเป็นเวลานาน 30 วัน พบว่า THA สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ตับมีการเปลี่ยนแปลงบริเวณ

periportal area ได้ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวคาดว่าจะเกิดจากตัวสาร THA เอง ไม่ใช่เป็นผลจาก metabolite ของ THA เพราะบริเวณดังกล่าวที่พบมีการเปลี่ยนแปลงในเซลล์ตับเป็น zone1 ซึ่งเป็นบริเวณแรกของตับที่ได้สัมผัสกับสารต่างๆที่ได้รับเข้าไป (xenobiotics) และการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจาก THA จะเห็นได้ชัดเจน เมื่อได้รับ THA ในขนาดสูงเท่านั้น และการเปลี่ยนแปลงจากทางเดินอาหารสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของค่าทางชีวเคมีของเลือด เช่น ค่าเอนไซม์ AST และ ALT จะมีค่าสูงในกลุ่มที่ได้รับ THA ในขนาดสูง เป็นต้น คาดว่า THA ในขนาดที่ตับสามารถกำจัดออกได้ แต่ THA ในขนาดที่ไม่สามารถกำจัดได้หมด เกิดการสะสมและมีการทำลายบริเวณที่มีการสะสมอยู่มาก

นอกจากนั้นการศึกษาถึงผลของ THA ต่อหน้าที่การขับทิ้งของตับ โดยดูจากพารามิเตอร์ คือ อัตราการไหลของน้ำดี (BFR) เปรียบเทียบกันในหนูแรท กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ THA ในขนาดที่ต่ำ (50 mg/kg BW) และขนาดที่สูง (100 mg/kg BW) ขนาดเดียว ทางลำไส้เล็กส่วนต้น (i.d.) กลุ่มที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะการคั่งของน้ำดี (cholestasis) ด้วยสารเอทริลเอสตราไดออล (EE) ฉีดเข้าทางใต้ผิวหนังเป็นเวลาติดต่อกัน 5 วัน กลุ่มที่ให้ THA ในขนาดที่ต่ำ และขนาดที่สูง ขนาดเดียวทางลำไส้เล็กส่วนต้น (i.d.) ควบคู่ไปกับฉีด EE เข้าทางใต้ผิวหนัง 5 วัน พบว่า THA มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งของน้ำดีได้ทันทีหลังจากฉีดและออกฤทธิ์สูงสุดที่เวลา 15 นาที หลังจากฉีด (i.d.) ทั้งขนาดสูงและขนาดต่ำ แต่ THA ขนาดสูง (100 mg/kg BW) มีผลต่อ BFR มากกว่าขนาดต่ำ (50 mg/kg BW) โดยกระตุ้นให้มีการหลั่งน้ำดีเพิ่มมากขึ้น (200% of control) สาร THA สามารถถูกดูดซึมและออกฤทธิ์ได้ทันที THA ยังกระตุ้นให้มีการขับทิ้งของสารต่างๆที่เป็นผลจากการคั่งของน้ำดีในตับโดยช่วยลดการคั่งของน้ำดีในตับ รวมทั้งระดับเอนไซม์ alkaline phosphatase ในเลือดของหนูกลุ่มที่เหนี่ยวนำให้เกิดการคั่งของน้ำดี แต่การให้ THA เพียง 1 ครั้งไม่มีผลลดระดับ bilirubin ในสัตว์ทดลองดังกล่าว

อย่างไรก็ตามจากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า THA ในขนาดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและใช้ในระยะเวลาสั้นจะมีความปลอดภัย ซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนาเป็นยารักษาโรคตับบางโรคที่ใช้ระยะเวลาสั้นได้ต่อไป

สรุปผลการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของลักษณะโครงสร้างของสารกลุ่มอะซีโดฟีโนนกับฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดี และลดไขมันในเลือด เนื่องจากโครงสร้างของสารดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับสาร phloracetophenone (2,4,6-trihydroxyacetophenone) ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาล (aglycone) ของ glucoside 4,6-dihydroxy-2-O-(β -D-glucopyranosyl) acetophenone ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในว่านชักมดลูก (*Curcuma comosa* Roxb., family Zingiberaceae) และมีฤทธิ์ดีเด่นในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดี จากการศึกษาโดยใช้อะนาล็อกซ์และอนุพันธ์ของสารอะซีโดฟีโนนทั้งหมด 21 ชนิด ซึ่งได้จากการแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมของวงเบนซีนด้วยหมู่ต่างๆ รวมทั้งการแทนที่หมู่คีโตนด้วยกลุ่มอื่นๆ พบว่าสารกลุ่มไฮดรอกซีอะซีโดฟีโนนอะนาล็อกซ์มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีได้ดี จำนวนและตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซีในวงเบนซีนของสารดังกล่าวมีความสัมพันธ์โดยตรงกับอัตราการหลั่งน้ำดี และความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่หลั่งออกมา และดัชนีของการเกิดนิ่วในน้ำดี เมื่อไฮโดรเจนอะตอมของวงเบนซีนถูกแทนที่ด้วยหมู่คลอโรหรือหมู่เมทอกซี ทำให้ฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งน้ำดีลดลง ต่ำกว่าอะนาล็อกซ์ที่มีหมู่ไฮดรอกซี แต่สารเหล่านั้นสามารถขับโคเลสเตอรอลออกมาในน้ำดีได้มาก มีผลทำให้ดัชนีของการเกิดนิ่วในน้ำดีมีค่าสูง การแทนที่หมู่คีโตนด้วยหมู่อัลดีไฮด์หรือคาร์บอกซิกก็เช่นเดียวกัน ทำให้ฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีลดลง ต่ำกว่าสารที่มีหมู่คีโตน

จากการศึกษาถึงคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกัลของสารในกลุ่มไฮดรอกซีอะนาล็อกซ์ พบว่าฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งน้ำดีของสารขึ้นอยู่กับค่า hydrophilicity ของสาร โดยสาร 2,4,6-trihydroxyacetophenone (THA) มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีได้ดีที่สุด มีค่า hydrophilicity สูงกว่าสารอื่นๆ ในขณะที่สาร 2,6-dihydroxyacetophenone (DHA) ซึ่งมีค่า hydrophilicity ต่ำ มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งน้ำดีได้ต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่าสาร THA และ DHA มีฤทธิ์ดีเด่นในการกระตุ้นการขับออกของเกลือน้ำดี และโคเลสเตอรอลตามลำดับ ส่งผลให้ระดับโคเลสเตอรอลในเลือดลดลงอย่างชัดเจน จากการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของอะนาล็อกซ์บางตัว เช่น สาร 4-hydroxyacetophenone พบว่าหลังจากสารดูดซึมผ่านลำไส้เล็กแล้ว สารนี้จะเข้าสู่ตับ และถูกเปลี่ยนแปลงให้อยู่ในรูปของ 4-hydroxyacetophenone glucuronide ซึ่งจะถูกขับทิ้งออกทางน้ำดีต่อไป พบว่าปริมาณของ metabolite นี้ในน้ำดีมีความสัมพันธ์โดยตรงกับอัตราการหลั่งของน้ำดี ในส่วนที่ไม่ขึ้นกับกรดน้ำดี คาดว่าการขับ metabolite ของ acetophenone ออกมาในน้ำดีเป็นกลไกหลักที่สำคัญกลไกหนึ่งในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดีของสารกลุ่มนี้ นอกเหนือจากการกระตุ้นการหลั่งของกรดน้ำดี

จากการศึกษาถึงฤทธิ์ของ THA และ DHA ในการลดไขมันในเลือด โดยใช้หนูแฮมสเตอร์ที่เหนียวนำให้อยู่ในภาวะที่มีระดับโคเลสเตอรอลในเลือดสูง (300-350 mg %) เป็นสัตว์ทดลอง พบว่าการป้อนสาร THA และ DHA ในขนาด 300-600 ไมโครโมลต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมเป็นเวลา 7 วันติดต่อกัน สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในเลือดได้อย่างชัดเจน ความแรงของฤทธิ์จะขึ้นอยู่กับขนาดและระยะเวลาของการให้สาร โดยสาร THA ในขนาด 400 ไมโครโมลต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมจะมีประสิทธิ

ภาพในการลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดได้ประมาณ 48% และไตรกลีเซอไรด์ 75% ฤทธิ์สูงสุดในการลดไขมันในเลือดจะพบหลังจากได้รับสารไปเป็นเวลา 10 วัน สาร DHA มีฤทธิ์คล้ายกับ THA เพียงแต่ฤทธิ์จะต่ำกว่าเล็กน้อย จากการวิเคราะห์ปริมาณของโคเลสเตอรอลในไลโปโปรตีนหลักชนิดต่างๆที่มีอยู่ในเลือดพบว่าทั้ง THA และ DHA ออกฤทธิ์ลดระดับของ VLDL และ LDL ได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่มีผลต่อระดับของ HDL ในเลือด ไม่มีผลต่อปริมาณไขมันในตับ โดยปริมาณของไตรกลีเซอไรด์และโคเลสเตอรอลในตับทั้งในรูปอิสระและไม่อิสระไม่มีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งชี้ให้เห็นว่าฤทธิ์ของสารทั้งสองในการลดไขมันในเลือดไม่ได้เกิดจากการลดการสร้างไขมันในตับเข้าสู่กระแสเลือด และไม่เกี่ยวข้องกับการกักเก็บไขมันจากเลือดมาสะสมไว้ในตับ แต่อย่างไรก็ตามสาร THA และ DHA ออกฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ cholesterol 7- α -hydroxylase ได้ถึง 6-7 เท่า ซึ่งจะทำให้มีการเร่งการเปลี่ยนโคเลสเตอรอลให้เป็นกรดน้ำดีในตับและขับออกทางน้ำดีต่อไป ฤทธิ์ของ THA และ DHA ต่อการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวนี้พ้องกับฤทธิ์ของสารในการขับกรดน้ำดี และโคเลสเตอรอลออกมามากในอุจจาระ จากผลดังกล่าวอาจสรุปได้ว่าสาร THA และ DHA ออกฤทธิ์ลดระดับไขมันในเลือดโดยกระตุ้นการทำงานของ cholesterol 7- α -hydroxylase เร่งการเปลี่ยนไขมันจากรูปของโคเลสเตอรอลไปเป็นกรดน้ำดีและขับออกทางน้ำดี และอุจจาระต่อไป

จากข้อมูลข้างต้น สาร THA เป็นสารที่มีประสิทธิภาพดีเด่นในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดี ลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือด และมีศักยภาพที่จะพัฒนาไปเป็นยาลดไขมันในเลือดได้ต่อไป จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาถึงความเป็นพิษของสารนี้ จากการศึกษาถึงพิษเฉียบพลันของสาร THA โดยการป้อน THA หรือฉีดเข้าทางช่องท้องในสัตว์ทดลองชนิดต่างๆ ได้แก่ หนูถีบจักร หนูแรท และหนูแฮมสเตอร์ ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย พบว่าค่า LD₅₀ หรือ ขนาดของสารที่ทำให้สัตว์ทดลองตายไปครึ่งหนึ่ง ซึ่งเป็นค่าที่ชี้บ่งขนาดความเป็นพิษของสารนั้น มีค่าเป็น 365, 338 และ 620 mg/kg BW เมื่อให้โดยการฉีดเข้าช่องท้องแก่หนูถีบจักร แฮมสเตอร์ และหนูแรทตามลำดับ ค่า LD₅₀ นี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และเพศของสัตว์ทดลอง และวิธีการให้สาร ค่า LD₅₀ ของ THA นี้จะไม่ขึ้นอยู่กัอายุของสัตว์ทดลองที่ใช้ จากผลการทดลองที่ได้ในหนูแรท สามารถจัดสาร THA อยู่ในกลุ่มของสารที่ไม่มีพิษ ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อป้อนให้ทางปากมีค่า LD₅₀ มากกว่า 6 กรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม หนูแรทนับว่าเป็นสัตว์ที่มีความไวต่อการเกิดพิษจาก THA ต่ำสุด ในขณะที่หนูแฮมสเตอร์และหนูถีบจักรมีความไวต่อการเกิดพิษจาก THA ได้มากกว่าหนูแรท หลังจากสัตว์ทดลองได้รับ THA ในขนาดที่ทำให้ตายโดยการฉีดเข้าทางช่องท้อง สัตว์ทดลองจะแสดงอาการตื่นตัว มีอาการเดินเซ ชัก และจะตายจากภาวะการหายใจล้มเหลว ได้ทำการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันของ THA ในหนูถีบจักรตัวผู้ โดยป้อน THA (37-300 mg/kg BW) ให้ทางปากติดต่อกันเป็นเวลา 30 วัน พบว่า THA ขนาดสูงเท่านั้น (150 mg/kg BW) สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ตับเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยในเซลล์ตับบริเวณรอบนอก (periportal area) จะมี vacuole เกิดขึ้นจำนวนมาก และสาร THA ในขนาดสูงๆ ทำให้มีการทำลายเซลล์ตับขยายลุกลามออกไปสู่บริเวณส่วนกลาง (central area) ได้ โดยค่าต่างๆทางชีวเคมีของเลือด เช่น เอนไซม์จากตับและค่าอื่นๆมีการเปลี่ยนแปลงโดยเพิ่มขึ้นบ้างเล็กน้อย

นอกเหนือจากนี้ยังได้ศึกษาถึงบทบาทของ THA ในการบรรเทาการกั่งของน้ำดีในตับ ในหนูแรทที่เหนียวน้ำให้เกิดการกั่งของน้ำดีด้วยสารเอทรีนิลเอสตราไดออล (EE) พบว่า THA ซึ่งออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งของน้ำดีได้ทันทีหลังจากฉีดและออกฤทธิ์สูงสุดที่เวลา 15 นาทีหลังจากฉีด จะเร่งให้มีการขับทิ้งของสารจากตับ ช่วยลดการกั่งของน้ำดีในตับ และระดับของเอนไซม์ alkaline phosphatase ในเลือดของหนูกลุ่มที่เหนียวน้ำให้เกิดการกั่งของน้ำดี แต่การให้ THA เพียง 1 ครั้ง ไม่มีผลลดระดับ bilirubin อย่างไรก็ตามจากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า THA ในขนาดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมีความปลอดภัยในการใช้ ซึ่งอาจจะนำไปสู่การพัฒนาเป็นยารักษาโรคตับบางชนิดได้

จากผลการวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่าในบรรดาอะนาล็อกซ์และอนุพันธ์ต่างๆ สาร 2,4,6-trihydroxy acetophenone ซึ่งเป็นสารที่มีต้นกำเนิดมาจากธรรมชาติ จากवानชักมดลูก เป็นสารที่มีฤทธิ์ดีเด่นที่สุดในการกระตุ้นการหลั่งน้ำดี ขับกรดน้ำดี และลดไขมันในเลือดโดยมีกลไกการทำงานผ่านการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ cholesterol 7- α -hydroxylase ในตับให้เปลี่ยน cholesterol ไปเป็นกรดน้ำดี และขับออกทางน้ำดีและอุจจาระ ซึ่งกลไกนี้เป็นกลไกใหม่ที่น่าสนใจ นอกจากนี้ ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการนำพืชสมุนไพรที่มีสาร THA ดังกล่าวไปพัฒนาเป็นยารักษาโรคตับบางชนิด และลดไขมันในเลือดได้ต่อไป นอกจากนี้ความรู้จากการวิจัยจะเป็นแนวทางของ rational drug design ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาต่างๆ ตามฤทธิ์ที่ต้องการได้

Conclusion of the results

The purpose of this study is to investigate the relationship between the chemical structure of acetophenones and their activities, in stimulating bile secretion and lowering plasma lipids. The acetophenones used are structurally related to that of phloracetophenone (2,4,6-trihydroxy acetophenone, THA) which is the aglucone part of a glucoside, [4,6-dihydroxy-2-O-(β -D-glucopyranosyl) acetophenone]. It is a naturally occurring compound from *Curcuma comosa* (family Zingiberaceae), which has been reported to effectively stimulate bile secretion. In the present study, twenty-one acetophenone analogs and derivatives with different substituents on the benzene nucleus and on a functional keto group were used. It was found that for the same number of substituents on the benzene ring, hydroxy acetophenone analogues induced a greater choleresis. The number and position of hydroxy substituents on the benzene nucleus play an important role in determining choleric activity, biliary excretion of bile acid, and lithogenic index. Replacement of a hydroxy group with a methoxy or chloro group reduced the choleric efficacy of the compound. Likewise, replacement of the functional keto group with aldehydic or carboxylic group led to reduced the choleric efficacy of the compound.

Analysis on physico-chemical properties of the hydroxylated acetophenone analogs indicated that the choleric activities of the compounds were related to their hydrophilicity, as

inferred by thin-layer chromatography. Among the hydroxylated analogs, 2,4,6-trihydroxyacetophenone (THA) was identified as the most potent compound whereas 2,6-dihydroxyacetophenone (DHA) which has less hydrophilicity induced low choleretic activity. In addition to stimulating bile secretion, THA, and DHA also augmented excretory rates of bile acid and cholesterol, respectively, which both subsequently lower plasma cholesterol levels. The mechanism of an increase in bile secretion of an analog such as 4-hydroxyacetophenone (4-MHA) was investigated. After being absorbed through the intestine, the compound was transported into the liver and was biotransformed to 4-hydroxyacetophenone-4-*O*-glucuronide for excretion into bile. The excretion of this metabolite correlated linearly with the increment in bile flow. The choleretic effect of 4-MHA was suggested to be partly due to its osmotic effect of the conjugate-metabolite eliminated in bile. This mechanism may also account for choleretic activities of other hydroxyacetophenone analogs, particularly those that contain a hydroxyl group at 4-position.

Plasma lipid lowering activities of 2,4,6-trihydroxyacetophenone (THA) and 2,6-dihydroxyacetophenone (DHA) were investigated in hypercholesterolemic male hamsters (plasma cholesterol ~300-350 mg%). Intragastric administration of the compound (300-600 μ mol/kg) twice a day for 7 days to the hypercholesterolemic animals decreased both plasma cholesterol and triglyceride levels in a dose-related manner. THA at dose of 400 μ mol/kg reduced the cholesterol and triglyceride levels in plasma by 48% and 75%, respectively, with significant decreases in both plasma VLDL and LDL-cholesterol but not HDL-cholesterol. THA did not significantly alter hepatic cholesterol content in either free or bound pools but significantly increased fecal excretion of both bile acids and cholesterol. Corresponding to the increase in fecal bile acid excretion, THA stimulated activity of cholesterol 7 α -hydroxylase in liver (6 to 7-fold). DHA also has similar activity to that of THA but less effect. These findings suggest that THA and DHA reduced plasma cholesterol by stimulating hepatic conversion of cholesterol to bile acid for disposal via biliary excretion and feces.

It is apparent that THA is the most effective choleretic compound and has potential for development as a therapeutic agent. It is essential to evaluate its toxicity by using various animal species including mice, hamsters and rats of both sexes. LD₅₀ values for an acute toxicity of a single intraperitoneal dose in mice, hamsters and rats were 365, 338 and 620 mg/kg BW, respectively. LD₅₀ were higher for administration by i.g route. The toxicity was dependent on routes of administration, species and sex of animals, but was not age dependent. Mice and hamsters were more sensitive to THA than rats. By oral route, the LD₅₀ values in adult male and female rats were higher than 6 g/kg BW, at which the compound can practically be classified as a non-toxic compound. At lethal doses, the animals became excited and hypersensitive to noise, followed by convulsions and death with respiratory paralysis. Subacute toxicity of THA was further investigated in adult male mice by giving a daily sublethal dose (37-300 mg/kg BW, i.g.) for 30 consecutive days. It was found that THA, at high dose (150 mg/kg BW) induced periportal hepatocyte degeneration. Plasma levels of liver enzymes, alanine and aspartate aminotransferases and other biochemical parameters including BUN, bilirubin, and hepatic triglyceride content were slightly increased, yet, remained within the normal range.

The possible therapeutic effect of THA treatment in the ethinylestradiol (EE)-induced cholestasis was evaluated. Intraduodenal administration of THA at a dose of 50 or 100 mg/kg BW

immediately increased bile flow rate and reversed the elevated level of plasma alkaline phosphatase in EE-treated rats to normal levels, but it did not affect the elevated level of bilirubin. The results suggest that THA, only at high dose, induced subacute toxicities in mice and probably, those toxic effects are attributable to THA itself, not its metabolite. THA at a biologically active dose which is low in toxicity, fully reversed the increased plasma alkaline phosphatase in EE-induced cholestasis but it did not affect plasma bilirubin level.

In conclusion, the results of the present study demonstrated that among acetophenone analogs and derivatives used, 2,4,6-trihydroxy acetophenone (THA), a naturally occurring compound from *Curcuma comosa* (family Zingiberaceae) is the most effective compound in stimulating bile secretion and lowering plasma lipid. Its mechanism of action is, at least, mediated through an activation of hepatic cholesterol 7- α hydroxylase activity for conversion cholesterol into bile acids and excretion into bile and feces. This mechanism is of interest as a new strategy for lowering plasma lipid in hypercholesterolaemic patients. The information gained from the present study also provides a rational basis for the design and selection of candidate molecules with choleretic, litholytic or/and lipid lowering activities.

Keywords: *Curcuma comosa*, cholestasis, phloracetophenone, toxicity, acute toxicity, subacute toxicity

เอกสารอ้างอิง

- Beyen, A.C. (1987). Lowering of serum cholesterol by Temoe Lawak Singer, A *Curcuma* mixture. *Artery* 14: 190-197.
- Blane, G.F. (1987). Comparative toxicity and safety profile of fenofibrate and other fibric acid derivatives. *Am. J. Med.* 83: (suppl 5B) 21-25.
- Bolton C.H., Nicholls J.S. and Heaton K.W. (1980). Estimation of cholesterol in bile: assessment of an enzymatic method. *Clin Chem Acta* 105: 225-230
- Carry M.C. (1978). Critical tables for calculating the cholesterol saturation of mature bile. *J. Lipid. Res* 19: 945-955.
- Chard, G., Yousef, I.M. and Tuchweber, B. (1993). Influence of oral treatment with ursodeoxycholic and tauro-ursodeoxycholic acids on estrogen-induced cholestasis in rats: effects on bile formation and liver plasma membranes. *Liver* 13: 193-202.
- Dixit, V.P., Jain, P., and Joshi, S.C. (1988). Hypolipidemic effect of *Curcuma longa* L. and *Nardostachys jatamansi* DC. in triton-induced hyperlipidemic rats. *Ind. J. Physiol. Pharmacol*, 32: 299-304
- Ellefson R.D., Caraway W.T. Lipids and lipoproteins. *In: Fundamental of chemistry*. Edited by Tietz N.W., Philadelphia: W.B. Saunder 1976: 474-541.
- Fiske C.H. and Subbarow Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem*, 66: 375.
- Goodwin, C.D., Cooper, B.W. and Margolis, S. (1982) Rat liver cholesterol 7-hydroxylase. Modulation of enzyme activity by changes in phosphorylation state. *J. Biol. Chem.* 257: 4469-4472.
- Gordon T., Kannel W.B., Castelli, W.B. and Dawber T.R. (1981). Lipoproteins, cardiovascular disease and death. The Framingham study. *Arch Intern Med.* 141: 1128-31.
- Grundy, S.M. (1988). HMG-CoA reductase inhibitor for treatment of hypercholesterolemia. *New England J. Med.* 319: 24-33.
- Gurantz, D. and Hofmann, A.F. (1984). Influence of bile acid structure on bile flow and biliary lipid secretion in the hamster. *Am. J. Physiol.* 247: G736-G748.
- Hans Fromm (1989). Bile acid-Lipoprotein interactions: effect of ursodeoxycholic acid (Ursodiol). *Digest. Dis. Sci.* 34: 21s-23s.
- Jurenka, R.A., Neal, J.W., Howard, R.W., Oliver, J.E. and Blomquist, G.J. (1989). *In vitro* inhibition of prostaglandin H synthase by compounds from the exocrine secretions of lace bugs. *Compare Biochem. Physiol.* 93: 253-255.
- Jurgens, T.M., Frazier, E.G., Schaeffer, J.M., Jones, T.E., Zink, D.L., Borris, R.P., Nanakorn, W., Beck, H.T. and Balick, M. J. (1994). Novel nematocidal agents from *Curcuma comosa* J. *Nat. Prod.* 57: 230-235.
- Litchfield J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96: 99-113.
- Nielsen, L.B., Stender, S. and Kjeldsen, K. (1993). Effect of Lovastatin on cholesterol absorption in cholesterol-red rabbits. *Pharmacol. Toxicol* 72: 148-151.
- O'Connor, P., Feely, J. and Shepherd, J. (1990). Lipid lowering drugs. *British Med. J.* 300: 667-672.
- Osnga, T., Tanaka, N., Matsuzaki, Y. and Aikawa, T. (1989). Effect of Ursodeoxycholic acid in chronic hepatitis and primary biliary cirrhosis. *Digestive Diseases and Science* 34: 49s-51s
- Ozaki, Y. and Soedigdo, S. (1988). Cholagogic effect of Zingiber plants obtained from Indonesia. *Shoyakugaku Zasshi*, 42, 333-336.

- Piyachaturawat, P., Gansar, R. and Suksamrarn, A. (1996a). Choleretic effect of *Curcuma comosa* rhizome extracts in rats. *Int. J. Pharmacog.* 34: 174-178.
- Piyachaturawat, P., Teeratagolpissal, N., Toskulkao, C. and Suksamrarn, A. (1996b). Hypolipidemic effect of *Curcuma comosa* in mice. *Artery* 22 (4): 233-241.
- Podd, M., Ghezzi, C., Battezzati, P.M., Bertolini, E., Crosignani, A., Petroni, M.L. and Zuin, M. (1989). Effect of different doses of ursodeoxycholic acid in chronic liver disease. *Digest. Dis. Sci.* 34: 59s-65s
- Ramprasad, C. and Sirsi, M. (1956). Studies on Indian medicinal plants: *Curcuma longa* Linn: Effect of curcumin the essential oils of *C. longa* on bile secretion. *J. Sci. Ind. Res.* 15C: 262-265.
- Ramprasad, C. and Sirsi, M. (1957). *Curcuma longa* and bile secretion; quantitative changes in the bile constituents induced by sodium curcumin. *J. Sci. Ind. Res.*, 16C: 108-110.
- Rao, D.S., Sekhara N.C., Satyanarayana, M.N., and Srinivasan, M. (1970). Effect of curcumin on serum and liver cholesterol levels in the rat. *J. Nutrition*, 100: 1307-1316.
- Roda, A., Grigolo, B., Pellicciari, R. and Natalini, B. (1989). Structure-activity relationship studies on natural and synthetic bile acid analogs. *Digestive Diseases and Sciences.* 34: 243-355.
- Ruffy, J., Chancu, B., Bakir, R., Djian, F. and Goy-leoper, J. (1985). Comparative evaluation of the effects of ciprofibrate and fenofibrate on lipids, lipoproteins and apoproteins A & B. *Atherosclerosis* 54: 273-281.
- Schaefer E.J. and Levy, R.I. (1985) Pathogenesis and management of lipoprotein disorders. *New. Engl J. Med.* 312: 1300-10.
- Shepherd, J., Packard, C.J., Bicher, S., Lawrie, T.D.V. and Morgan, G. (1980). Cholestyramine promotes receptor mediated low density lipoprotein catabolism. *New Engl. J. Med.* 302: 1219-22
- Suksamrarn, A., Eiamong, S., Piyachaturawat, P. and Byrne, L.T. (1997). Phloracetophenone glucoside with choleretic activity from *Curcuma comosa*. *Phytochemistry* 45: 103-105.
- Swart, P., Van de Merwe, K.J., Swart, A.C. Todres, P.C. and Hofmeyr, J. S. (1992). Inhibition of Cytochrome P-450_{11B} by some naturally occurring acetophenones and plant extracts from the shrub *Salsola tuberculatifomis*. *Planta Med.* 59: 139-143.
- Synder, S. (1990). Comparison of cholesterol-lowering regimens. *AFP* 42: 761-768.
- Tavoloni, N. (1986) Bile acid structure and bile formation in the guinea pig. *Biochimica et. Biophysica Acta* 879: 186-201.
- Turnberg L.A. and Anthony - Mote A. (1969). The quantitative determination of bile salt in bile using thin layer chromatography and 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase. *Clin. Chem. Acta* 24: 253-259
- Yasni, S., Imaizumi, K., Nakamura, M., Aimoto, J. and Sugano, M. (1993). Effect of *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. and curcuminoids on the level of serum and liver lipids, serum apolipoprotein A-Z and lipogenic enzymes in rats. *Fd. Chem. Toxicol.* 31: 213-218.

Research Output

,

Research Output

1. ผลงานทางวิชาที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติที่ได้และจะได้จากโครงการวิจัยนี้

- (1) Piyachaturawat, P., Suwanampai, P., Komaratat, P., Chuncharunee A, Suksamram A. Effect of phloracetophenone on bile flow and biliary lipids in rats. *Hepatology Research* 1998;12: 198-206
- (2) Piyachaturawat P, Chaingam N, Komarat P, Chuncharunee A, Suksamram A. Choleretic activity of phloracetophenone in rats: Structure-function studies using acetophenone analogs. *European J. Pharmacology* 2000; 387(2):221-227.
- (3) Piyachaturawat P, Srivoraphan P, Komarat P, Chuncharunee A, Suksamram A. Effect of phloracetophenone on lipid metabolism in hypercholesterolemic hamsters. *Submitted to Journal "Atherosclerosis"*.
- (4) Piyachaturawat P, Tubtim C, Chuncharunee A, Komarat P, Suksamram A. Evaluation of the acute and subacute toxicity of a choleretic phloracetophenone. *In Preparation to submitted to Journal "Toxicol Letter"*.
- (5) Komaratat, P., Tanomchart, S., Piyachaturawat, P., Suksamram A. (1999) Hypolipidemic activity of 2,6-dihydroxyacetophenone in hamsters *In Preparation to submitted to Journal "Biochemical Pharmacology"*.

รวม 5 เรื่อง

2. หนังสือ

-

3. การจดทะเบียนสิทธิบัตร

-

4. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

(1) การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการนานาชาติในประเทศไทย

Tubtim C, Komarat P, Piyachaturawat P, Chuncharunee A, Suksamram A. Evaluation on toxicity of phloracetophenone. The Fourth Princess Chulabhorn International Science Congress. November 28-December 2, 1999; Bangkok, Thailand; Abstract No. P-191, pp251

(2) การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการนานาชาติในต่างประเทศไทย

Piyachaturawat P, Srivoraphan P, Komarat P, Chuncharunee A, Suksamrarn A. Reduction of plasma cholesterol by phloracetophenone in hypercholesterolemic hamsters. Experimental Biology 2000, San Diego, California, USA; Abstract No. 312.6, FASEB 14(4): A429,

(3) การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการในประเทศไทย

ได้นำผลงานไปบรรยายในงานประชุมวิชาการประจำปีของสรีรวิทยาสมาคมแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 27 เรื่อง "Effect of phloracetophenone on bile flow and biliary lipids in rats". เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2541 ณ สวนบัวธานีรีสอร์ท จังหวัดเชียงใหม่

(4) ร.ศ.ดร. ประหยัด โกมารทัต และนักศึกษาได้ร่วมประชุมและเสนอผลงานในการประชุมวิชาการ วทท24/วทท25 "Effect of 2,6-dihydroxyacetophenone on cholesterol metabolism in hamster". เดือนตุลาคม พ.ศ. 2542 จ.พิษณุโลก.

5. การนำผลการวิจัยไปใช้

เนื่องจากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนนี้ เป็นการศึกษาสารที่มีกำเนิดมาจากสมุนไพร ถึงแม้ว่าในการวิจัยจะไม่ได้นำพืชสมุนไพรมาใช้ก็ตาม การศึกษาถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารและคุณค่าอื่นๆ เป็นการสนับสนุน ส่งเสริมประโยชน์ของสมุนไพรไทยในทางอ้อม ส่งให้มีผลกระทบได้ทั้งในเชิงพาณิชย์ สังคม และวิชาการได้ เช่น เมื่อมีหน่วยงานของรัฐต้องการให้มีการส่งออกสมุนไพรไทยไปจำหน่ายยังต่างประเทศ และได้มองหาสมุนไพรไทยที่มี Scientific Research support พร้อมแล้วตามที่บริษัทต่างประเทศต้องการ จึงพบงานวิจัยที่ได้รับทุนสกวนี้ ที่มีพืชสมุนไพรเป็นต้นกำเนิดของสาร เป็น Scientific Research support ได้อย่างดี ปัจจุบันพืชสมุนไพรต้นนี้จึงอยู่ในโครงการที่กำลังศึกษาถึงพิษวิทยาของสารสกัดเพื่อนำไปพัฒนาต่อไป เมื่อการศึกษาเสร็จถูกล้าง และสามารถนำมาพัฒนาได้สำเร็จ จะส่งผลช่วยส่งเสริมในการส่งออกของพืช และลดการนำเข้าของยาจากต่างประเทศ การศึกษาเพื่อให้ได้ข้อมูลต่างๆทั้งในแง่ของวงวิชาการเภสัชวิทยา และ พิษวิทยา จะเป็นประโยชน์ต่อคนไทย สังคมไทย ด้วย

ในแง่ของวิชาการความรู้ต่างๆเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของลักษณะโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่ม hydroxy acetophenones ซึ่งมี analogs อยู่มากมาย ซึ่งพบได้ทั่วไปทั้งในพืช สัตว์ และ ในร่างกายคน กับฤทธิ์การกระตุ้นน้ำดีที่มีองค์ประกอบต่างๆ สามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาใหม่

6. การสร้างนักวิจัยใหม่

ก. ระดับปริญญาโท จำนวน 5 คน (ปีที่จบ และหัวข้อวิทยานิพนธ์)

1. พ.ศ. 2541 นส. นิจกานต์ ชัยงาม เรื่อง "Studies of the effect of acetophenone analogs on bile secretion in rats."
2. พ.ศ. 2542 นส. พรพิกุล ศรีวรพันธ์ เรื่อง "Studies on the effect of 2,4, 6-trihydroxy acetophenone on lipid metabolism in hypercholesterolemic hamsters."

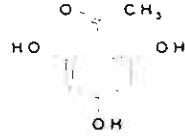
3. พ.ศ. 2543 นส. ศิริพร ถนอมชาติ เรื่อง “ Studies on the effect of 2,6-dihydroxy acetophenone on cholesterol metabolism in hyperlipidemic hamsters.”
4. พ.ศ. 2543 นส. ฉัตรสุดา ทับทิม เรื่อง “ Study of acute and subacute toxicity of 2,4,6-trihydroxy acetphenone and its effect on hepatic excretory function.”
5. พ.ศ. 2543 นส. ขวัญจิต ดันพิชัย เรื่อง “ Stimulatory effect
6. and mechanisms of acetophenones on bile secretion in rats.”

ข. นักวิจัย 2 คน คือ นาง เกษรา รักษ์พงษ์ศิริ และ นส. ฉัตรสุดา ทับทิม

7. ผลงานอื่น ๆ นอกเหนือจากทุน

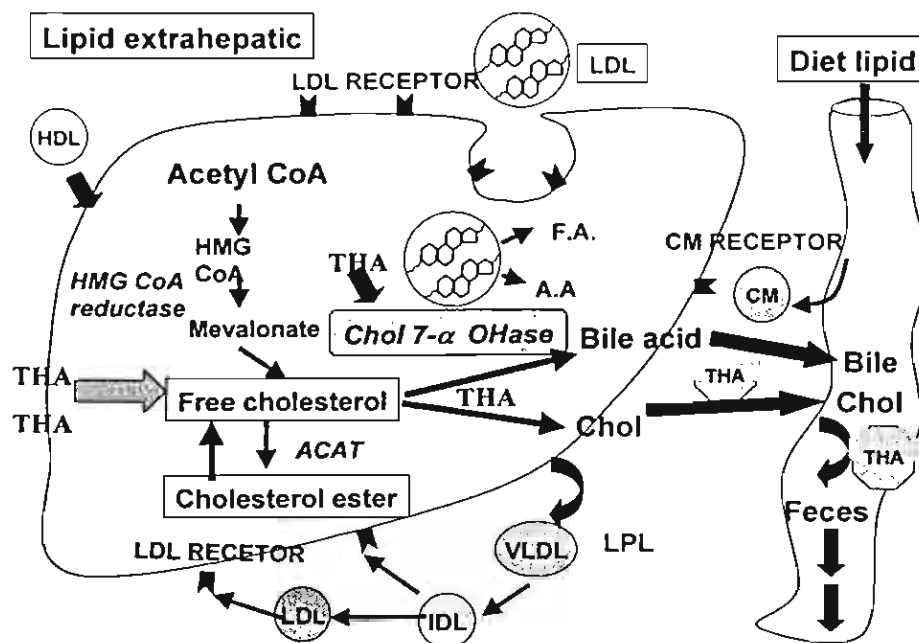
-วิทยากรบรรยายเรื่อง “แนวคิดในการพัฒนาสมุนไพรเป็นยารักษาโรค” ในการสัมมนาเรื่อง “สมุนไพรกับสตรีวัยทอง” โดยราชวิทยาลัยสูตินรีแพทย์แห่งประเทศไทยร่วมกับสถาบันการแพทย์แผนไทย ณ ห้องสยามมกุฎราชกุมาร อาคารเฉลิมพระบารมี 50 ปี 9 กรกฎาคม 2542

Chemical Structure of
Phloracetophenone (2,4,6-
trihydroxyacetophenone, THA)



Curcuma comosa Roxb.,
family Zingiberaceae

แผนผังแสดงฤทธิ์ของ THA ต่อการกระตุ้นการหลั่งน้ำดี และลดไขมันในเลือด



ภาคผนวก

Manuscript, submitted to “ Atherosclerosis”

ตั้งแต่ 4 สิงหาคม 2543

**Effect of phloracetophenone on lipid metabolism in
hypercholesterolemic hamsters**

**Pawinee Piyachaturawat^{a*}, Pornpikul Srivoraphan ^a, Prayad Komaratat^b
Aporn Chuncharunee^c, Apichart Suksamrarn^d**

*^a Department of Physiology, ^bDepartment of Biochemistry, Faculty of Science,
Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand*

*^cDepartment of Anatomy, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University,
Bangkok 10700, Thailand; ^dDepartment of Chemistry, Faculty of Science,
Ramkhamhaeng University, Bangkok 10240, Thailand*

*** Corresponding author:**

Pawinee Piyachaturawat, Ph.D.

Department of Physiology,

Faculty of Science, Mahidol University,

Rama VI Rd., Rajatevee,

Bangkok 10400, Thailand

Telephone and Fax: 66-2-2461375

E-mail: scppy@mahidol.ac.th

Abstract

The plasma cholesterol-lowering effect of phloracetophenone or 2,4,6-trihydroxyacetophenone (THA) which is the aglucone part of phloracetophenone glucoside from *Curcuma comosa* (family Zingiberaceae), was investigated in hypercholesterolemic male hamsters. The hypercholesterolemia in animals was induced by daily supplementary cholesterol (0.2% body weight). Intragastric administration of THA (300-600 $\mu\text{mol/kg}$) twice a day for 7 days to hypercholesterolemic animals decreased both plasma cholesterol and triglyceride levels in a dose-related manner. THA at dose of 400 $\mu\text{mol/kg}$ reduced the cholesterol and triglyceride levels in plasma by 48% and 74%, respectively, with decreases in both plasma VLDL and LDL-cholesterol but not HDL-cholesterol. THA did not significantly alter hepatic cholesterol content in either free or bound pools but significantly increased fecal excretion of both bile acids and cholesterol. Corresponding to the increase in fecal bile acid excretion, THA stimulated activity of cholesterol 7 α -hydroxylase activity in liver (7-fold). These findings suggest that THA reduced plasma cholesterol by stimulating hepatic conversion of cholesterol to bile acid for disposal via biliary secretion. This compound may have the potential for development as a therapeutic agent for lowering lipids in hypercholesterolemic patients.

Keywords: Bile acid; Cholesterol; Cholesterol 7 α -hydroxylase, *Curcuma comosa*; Hypercholesterolemia; Hypolipidemia

1. Introduction

Atherosclerotic vascular disease, particularly in coronary heart disease (CHD) is known to be one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide. A direct relationship between an elevated concentration of low density lipoprotein (LDL) cholesterol in plasma and development and progression of CHD has been reported [1,2], suggesting that a reduction of plasma LDL-cholesterol levels may be an important mean for preventing CHD development [2]. The liver plays a central role in regulating plasma lipoprotein and cholesterol concentrations. It is the only organ capable of excreting significant amounts of cholesterol which occurs either by direct excretion of cholesterol or by indirect excretion after conversion of cholesterol to bile acids. The conversion of cholesterol to bile acids is catalyzed by the enzyme hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase which is the first and rate-limiting step in the bile acid biosynthetic pathway [3,4]. Although the details of the control mechanisms of the synthesis of bile acid and the activity of cholesterol 7 α -hydroxylase are not clear yet, they are known to be under the negative feedback control of bile acids returning to the liver via the enterohepatic circulation [5,6]. For example, an absence of the enterohepatic circulation of bile acids in bile-diverted rats leads to activation of hepatic 7 α -hydroxylase activity and an increase the synthesis of bile acids. An intraduodenal administration of bile acids could prevent the effect [6]. Likewise, cholestyramine, a bile acid sequestrant, which binds bile acids in the intestinal lumen and limits their enterohepatic circulation increases cholesterol 7 α -hydroxylase activity and increases the synthesis of bile acid [7]. Therefore, any intervention that activates hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase activity and enterohepatic excretion of bile acids could be one of the potential pharmacologic strategies to reduce risk of CHD [8].

Phloracetophenone, (2,4,6-trihydroxyacetophenone) which is the aglucone part of a glucoside from *Curcuma comosa* (family Zingiberaceae) effectively stimulated bile secretion [9,10]. The secretion of bile was accompanied by an enhanced biliary excretion of bile acid and decreased plasma cholesterol [10,11]. However, at present, the mechanism by which phloracetophenone increased bile acid excretion and decreased plasma cholesterol are not known. It is possibly related to an increase in hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase activity as well as an activation of a

bile acid-dependent choleresis process. The present study was undertaken to investigate the effect and mechanism of phloracetophenone in lowering plasma cholesterol by using cholesterol-fed hamsters.

2. Materials and Methods

2.1. *Animals and Treatment*

Adult male golden hamsters weighing 100-130 g were obtained from the Animals Center, Faculty of Science, Mahidol University (Bangkok, Thailand). They were housed in a room with a 12 h-light-dark cycle, room temperature 29-32°C. They were given free access to a standard commercial diet (C.P. Pokaphand Co., Ltd., Bangkok, Thailand) and water *ad libitum*. Hamsters were divided into a control group which was allowed free access to a regular diet, and diet-induced hypercholesterolemic group. The latter was maintained on the same commercial diet, supplemented with a cholesterol suspension in corn oil (0.2 g% body weight/day). To follow the changes after cholesterol feeding with time, body weight and plasma cholesterol were determined weekly. The animals were used after 3 weeks when plasma cholesterol level was higher than 250 mg%. They were subjected to different treatments. A dose response study was conducted by intragastrical administration of different doses of THA from 100-600 $\mu\text{mol/kg}$ BW twice a day for 7 days. The compound was dissolved in 10% DMSO in corn oil and was given at 09.00 and 15.00 h. Time course study was conducted by giving an effective dose of the compound and the animals were sacrificed at varying periods after treatment (3-14 days). At the end of the experiment, the overnight-fasted animals were anaesthetised with ether. A blood sample was collected from the abdominal aorta and plasma was separated after centrifugation (3,000 $\times$ g for 15 min) and stored at -20°C for further analysis of lipids and lipoproteins. After blood sampling, the liver was immediately excised, weighed and stored at -20°C for further analysis of liver triglyceride and cholesterol contents and activity of cholesterol 7 α -hydroxylase. Feces was collected from the cecum for determination of excretory cholesterol and bile acid concentrations.

2.3. Analytical methods

Triglyceride and cholesterol concentrations in liver and plasma were analyzed using the colorimetric enzymatic method [12,13]. The lipoproteins in plasma were separated on a density gradient by preparative ultracentrifugation according to the method described by Havel [14]. After centrifugation, the gradient was fractionated and the cholesterol content of each fraction was determined.

2.4. Preparation of liver homogenate and microsome

The liver was homogenized in 4 volumes of an ice-cold medium containing 0.25 M sucrose, 1 mM EDTA and 10 mM Tris-HCl pH 8.0 using a glass-Teflon homogenizer. The liver homogenate was divided into two portions; 3 volumes of the homogenate for preparation of liver microsome and one volume for lipid extraction. The microsomal fraction was prepared according to the modified method of Hoeg et al [15]. The homogenate was centrifuged at 12,000 x g, 4°C, for 50 min to remove the larger cellular debris. The supernatant was filtered through 6 layers of gauze and the filtrate was recentrifuged at 100,000 x g, 4°C for 60 min to obtain the microsomal pellet. The pellet was resuspended in buffer containing 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0 for analysis of cholesterol 7 α -hydroxylase activity and endogenous cholesterol level. Total protein contents of liver microsome and homogenate were determined by the Lowry method [16]. The lipid content was extracted by the modified method of Bligh and Dyer [17].

2.5. Assay of cholesterol 7 α -hydroxylase activity.

Cholesterol 7 α -hydroxylase activity was measured by using [14 C] cholesterol as the substrate [18]. Conversion of exogenous [14 C] cholesterol into [14 C] 7 α -hydroxycholesterol was determined. They were separated by thin layer chromatography on silica-gel plates, after elution by a mixture of benzene/ethylacetate (2:3, V/V). The band corresponding to 7 α -hydroxycholesterol was scraped out and extracted 3 times with diethyl ether. The combined extract was dried and counted for radioactivity. Cholesterol 7 α -hydroxylase activity was

expressed as percent conversion of radioactivity from exogenous [^{14}C]-cholesterol to 7α -hydroxycholesterol by the microsomal enzyme.

2.6. *Determination of total, free and esterified cholesterol content in liver*

Cholesterol contents of liver homogenate and liver microsome were determined from their lipid extract in chloroform/methanol [3:1, V/V]. The organic solvent was evaporated to dryness under N_2 and the lipid residual was redissolved in isopropanol. The free and esterified cholesterol was determined using an enzymatic assay method [19].

2.7. *Fecal lipids*

Dried fecal samples were soaked overnight with phosphate buffer (0.67 M, pH 7.0). Then 5 ml of methanol was added, mixed and the samples were centrifuged. The pooled methanolic extract was evaporated by N_2 gas and the residue was extracted three times with petroleum ether. The pooled petroleum ether was measured for cholesterol content. The residue containing bile acid was dissolved with 50% ethanol and kept for further analysis of bile acids according to the method of Turnberg and Mote [20].

2.7. *Chemicals*

Phloracetophenone or 2,4,6-trihydroxyacetophenone (THA, Fig. 1), cholesterol, β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase, DL-dithiothreitol and 3α -hydroxysteroid dehydrogenase were purchased from the Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

[4- ^{14}C]-Cholesterol was purchased from Amersham Corporation (Illinois, USA) Enzymatic reagent kits for determination of total cholesterol, free cholesterol and triglyceride were purchased from Bio-Medical Laboratory (BM-Lab Ltd., Bangkok, Thailand) All other chemicals and solvents were of analytical grade.

2.9. Statistical analysis

All data are expressed as means $\pm$ SEM. The values obtained from different groups were compared using one-way ANOVA followed by the Student-Neuman Keuls test. Values of $P < 0.05$ were considered to indicate a statistically significant difference.

3. Results

Table 1 shows the results of THA treatment in hamsters supplemented with cholesterol. The body weight of cholesterol-fed animals was comparable to those of normal diet control either with or without solvent treatment. However, in contrast to the body weight, liver weights of the cholesterol-fed animals were substantially increased as compared to those of diet controls. The plasma lipid levels, both cholesterol and triglycerides progressively increased over the feeding period. Plasma cholesterol rose to approximately 300 mg % in 3 weeks and it continued to increase to 372.4 ± 22.6 mg % by the end of the 4th week. Plasma triglyceride was also markedly elevated, and reached 865.9 ± 158.2 mg % by the end of the 4th week. The dose-dependent decreases of both plasma cholesterol and triglyceride after THA treatment to hypercholesterolemic hamsters is shown in Table 1. THA at a dose of 400 μ mol/kgBW twice a day for 7 days markedly reduced plasma cholesterol and triglyceride to approximately 52% and 25% of the cholesterol-fed control, respectively. These reductions occurred, even in the presence of progressively rising plasma lipids in cholesterol-fed animals. A further increase in the dose of THA to 600 μ mol/kgBW caused a reduction of plasma lipids, bringing them close to control values.

The time course of THA treatment in lowering plasma lipid was assessed at a dose of 400 μ mol/kgBW twice a day for 14 days as this dose resulted in approximately 50% reduction at day 7. After THA treatment plasma cholesterol and triglyceride progressively decreased over the period of treatment. THA exerted an effect countering the rise of plasma lipid in cholesterol-fed animals. The maximum effect was attained on day 10 of THA treatment. A prolonged period of treatment to 14 days did not induce any further decrease of plasma lipids. It was probably due to the plasma lipid level having returned close to the normal control levels.

The lipoprotein profile was determined in both normal diet and cholesterol-fed animals. The cholesterol feeding resulted in a marked increase in plasma cholesterol as compared to normal diet control. The increase was found to occur in the amounts of cholesterol in the VLDL and LDL fractions, whereas cholesterol in the HDL fraction was not significantly changed. (Fig. 2). Treatment with THA 400 μ mol/kgBW twice a day for 7 days significantly reduced the elevated cholesterol in the VLDL and LDL fractions but had no significant effect on the HDL-cholesterol level.

Cholesterol feeding significantly increased liver weight and contents of both triglyceride and cholesterol (Fig.3). The hepatic triglyceride and cholesterol contents were significantly increased from 3.8 ± 0.3 and 2.3 ± 0.2 mg/g in normal diet control to 5.3 ± 0.3 and 8.0 ± 0.3 mg/g liver, respectively, in the cholesterol-fed animals. However, both free and esterified cholesterol contents were increased which led to a non-significant change into free to esterified cholesterol ratio. This result might indirectly indicate an increase in activity of enzyme Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT) which catalyzes the conversion of free to esterified cholesterol for storage. Treatment with THA at a dose of 400 μ mol/kg BW twice a day for 7 days did not significantly affect any parameters of lipids in liver, including triglyceride content and both free and esterified cholesterol. Total cholesterol content was maintained at 8.0 ± 0.2 mg/g liver.

Since THA has been reported to stimulate bile acid secretion, the activity of hepatic cholesterol 7- α hydroxylase (C7 α OHase) associated with the synthesis of bile acids, was measured. In Figure 4, it is evident that THA treatment had no significant effect on the amount of endogenous cholesterol in liver microsomes when compared to the cholesterol-fed control group. Despite the availability of similar content of endogenous cholesterol substrate, the activity of C7 α OHase in the THA-treated group was markedly higher than that in the cholesterol-fed control (7-fold increase). Corresponding to the increased C7 α OHase activity, fecal bile acid excretion which was significantly higher in cholesterol feeding as compared to the normal diet feeding, was further and significantly increased by THA treatment, as compared to the corresponding cholesterol-fed control. In addition to the fecal bile acid excretion, fecal cholesterol excretion showed a similar pattern of increased excretion following THA treatment (Fig.5).

4. Discussion

The therapeutic purpose of using lipid lowering agents, is to reduce plasma cholesterol levels when elevated above normal, and may be associated with a number of diseases, including coronary heart disease [1,2]. In the present study the lipid lowering activity of THA was evaluated in hypercholesterolemic hamsters, induced by supplementary feeding with cholesterol 0.2% BW. By 3 weeks of cholesterol feeding, plasma cholesterol was elevated to 250-350 mg % and plasma triglyceride was similarly elevated. The increase of plasma cholesterol was mostly observed in the VLDL and LDL fractions. These results were consistent with earlier reports showing that dietary cholesterol induced both hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia [21-23]. The hepatic lipid content was also increased in our animals. The increased plasma triglyceridemia has previously been reported to be associated with an increase in activity of hepatic phospholipid phosphohydrolase-1 (PAP-1) which is a key enzyme in regulating triacylglycerol synthesis [23]. The increase in total liver cholesterol content has been reported to be due to an increased ACAT activity, which resulted in a massive deposition of cholesteryl ester after a high influx of cholesterol into livers of cholesterol-fed animals [24]. In the present study, a marked increase in total hepatic cholesterol content in the cholesterol fed animals apparently occurred in both free and esterified forms, suggesting an increase of ACAT in our cholesterol-fed animals. In addition, an increasing load of dietary cholesterol has been reported to suppress the activity of HMG-CoA reductase which is the enzyme that catalyses the rate-limiting step in cholesterol synthesis [25].

In the present study, THA treatment of the hypercholesterolemic animals led to a significant fall in both plasma cholesterol and triglycerides, which showed dose-dependence. The compound selectively reduced the elevated level of cholesterol in VLDL and LDL fractions whereas cholesterol in HDL remained unchanged. In addition, total hepatic cholesterol content and ratio between free and esterified form were not affected. It is noted that THA markedly increased the activity of C7 α OHase activity in the liver. Corresponding to the increase of the C7 α OHase activity, the

excretion of fecal bile acids was essentially increased. Fecal cholesterol was also increased. Although the mechanism by which THA lowered plasma lipid was not clear, there were several possibilities which might involve. THA might interfere with synthesis of apo-B containing lipoprotein as the compound selectively decreased cholesterol in VLDL and LDL fractions. Both fractions contain apoprotein B-100 which is necessary for their secretion. An abnormality of this apoprotein synthesis appears to relate to a beta lipoproteinemia in which VLDL is not released from liver, causing an accumulation [26]. However, THA treatment did not alter the liver lipid content. It was unlikely that THA lowered plasma lipid by interfering with hepatic formation and secretion of VLDL by decreasing of apoprotein B-100 synthesis.

THA might have a direct effect on bile acid synthesis by activating C7 α OHase activity, enhancing the conversion of cholesterol to bile acid and thus increasing excretion into feces, as found in the present study. This is in agreement with our earlier study in which THA effectively activated a bile acid-dependent choleresis and subsequently, a lower plasma cholesterol [10,11]. Generally, in intact animals, most bile acids excreted into the small intestine are reabsorbed back along the entire intestine. Only a small amount of bile acids (less than 10 %) is excreted in feces and this portion will be replenished by hepatic synthesis from cholesterol. The returning of bile acid to the liver provides a feed back inhibition to the enzyme activity [27]. From this view, it is suggested that THA exerted its hypocholesterolemic action by increasing synthesis of bile acids and diversion into feces. The excretion of cholesterol into feces was followed that of bile acids. It is possible that the increased hepatic C7 α OHase activity, which promoted elimination of bile acids via feces, was indirectly resulted from the interference of THA with the enterohepatic circulation of bile acids. This could occur by inhibition of uptake of bile acids by either enterocytes or hepatocytes, or possibly via a non-systemic inhibition in the intestinal lumen. When considering the action of our compound that increased hepatic C7 α OHase activity, appears unlike cholestyramine and other bile acid sequestrants, which are anion exchange resins and mediate action by binding with bile acids, preventing their absorption in the intestinal lumen [7]. In contrast to the non-systemic action of cholestyramine, THA is a small compound which was rapidly and readily absorbed after intraduodenal administration. Its choleretic action reached a peak within 15-30 min and showed a dose-dependent effect [10]. In the present study, it was not clear

how and to what extent THA interfered with uptake of the returning bile acids, as a mean of providing the control of enzyme activity. A similar systemic choleretic action was also reported for some statins such as crilvastatin. In addition to inhibiting HMG-CoA-reductase activity, it has been reported to lower plasma cholesterol by diverting circulating lipids into bile by inducing a bile salt-dependent choleresis [28]. It remains possible that THA might alter bile acid metabolism and induce secretion of different bile acid species, which in turn, could interfere with enterohepatic circulation as reported for the case of ursodeoxycholic acid [29]. Currently, research on cellular membrane transporters for bile acids and lipid have been done to forward understanding of the mechanism responsible for their uptake and excretion from liver and intestinal cells. Recently, ATP binding cassette (ABC) transporters which are abundant in canalicular membranes in liver and associate in excretion of exogenous and endogenous multiple organic anions including bile acids [30], have also been reported to be involved in lipid transport and some lipid disorders [31,32]. Further study of the action of THA on the uptake, metabolism, excretion and interaction with bile acids transporter are necessary to clarify its mechanism of action.

The increased hepatic C7 α OHase activity and fecal bile acid excretion were also possibly related with an increase in hepatic LDL-receptors, which led to increase clearance of plasma VLDL and LDL. If it was the case, cholesterol taken up via the LDL receptor pathway might be directed into the pool for biliary excretion rather than into the pool for cholesterol esterification, as the hepatic cholesterol content was not changed by THA. However, since the LDL receptor number was not determined in the present study, it could not be ascertained whether LDL receptor number was up regulated or not. Further investigation of the regulation of hepatic LDL receptors by THA might tell us by means of which pathway the compound might exert its lipid lowering influence.

In conclusion, the present data showed that THA exerted hypocholesterolemic activity by an increase in C7 α OHase activity and fecal excretion of bile acids. These effects are especially interesting as it is primarily associated with LDL levels whereas HDL levels remained unchanged. The modulation of C7 α OHase activity with an increase of bile acid-dependent choleresis as well as a direct shunt of lipid from circulation into bile and fecal excretion might offer a new pharmacological strategy,

- and thus encourage development of the compound as a therapeutic agent for lowering lipid in patients with hyperlipidemia.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from The Thailand Research Fund (TRF-BRG 4180006) The authors thank Dr. KK. Shida Pang for criticism and suggestions.

References

- [1] Castelli WP, Anderson K, Wilson PW, Levy D. Lipids and risk of coronary heart disease: the Framingham Study. *Ann Epidemiol.* 1992;2:23-28.
- [2] Gould AL, Rossouw JE, Santanella NC, Heyse JF, Furberg CD. Cholesterol reduction yields clinical benefit: impact of statin trials. *Circulation* 1998;97:946-952.
- [3] Myant NB, Mitropoulos KA. Cholesterol 7 α -hydroxylase. *J Lipid Res* 1977;18:135-153.
- [4] Russell DW, Setchell KDR. Bile acid biosynthesis. *Biochemistry* 1992;31:4737-4748.
- [5] Spady DK, Cuthbert JA, Willard MN, Meidell RS. Feedback regulation of hepatic 7 α -hydroxylase expression by bile salt in the hamster. *J Biol Chem* 1996;271:1823-1831.
- [6] Heuman DM, Vlahcevic ZR, Bailey ML, Hylemon PB. Regulation of Bile acid synthesis II. Effect of Bile acid feeding on enzymes regulation hepatic cholesterol and bile acid synthesis in the rat. *Hepatology* 1988;8:892-897.
- [7] Sucking KE, Benson GM, Bond B, Gee A, Glen A, Haynes C, Jackson B. Cholesterol lowering and bile acid excretion in the hamster with cholestyramine treatment. *Atherosclerosis* 1991;89:183-190.
- [8] Horton JD, Cuthbert JA, Spady DK. Regulation of hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase expression by dietary Psyllium in the hamster. *J Clin Invest* 1994;93:2084-2092.

- [9] Suksamrarn A, Eiamong S, Piyachaturawat P, Byrne LT. A phloracetophenone glucoside with choleretic activity from *Curcuma comosa*. *Phytochemistry* 1997;45: 103-105.
- [10] Piyachaturawat P, Suwanampai P, Komaratat P, Chuncharunee A, Suksamrarn A. Effect of phloracetophenone on bile flow and biliary lipids in rats. *Hepatol Res* 1998;12:198-206.
- [11] Piyachaturawat, P., Chai-ngam, N., Chuncharunee, A., Komaratat, P., Suksamrarn, A. Choleretic activity of phloracetophenone in rats: Structure-function studies using acetophenone analogues. *Eur J Pharmacol.* 2000;37:221-227.
- [12] Allain CC, Poom LS, Chan CGS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974;20:470-475.
- [13] McGowan MW, Artiss JD, Strandbergh DR. A peroxidase coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin Chem* 1983;29:538-542.
- [14] Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum *J Clin Invest* 1955;34:1345-1353.
- [15] Hoeg JM, Demosky SJ, JR, Schaefer EJ, Starzl TE, Brewer HB, JR. Characterization of hepatic low density lipoprotein binding and cholesterol metabolism in normal and homozygous familial hypercholesterolemic subjects. *J Clin Invest* 1984;73:429-436.
- [16] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
- [17] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;57:911-917.
- [18] Princen HMG, Huijsmans CMG, Kuipers F, Vonk RJ, Kempen HJM. Ketoconazole blocks bile acid synthesis in hepatocyte monolayer cultures an in vivo in rat by inhibiting cholesterol 7 α -hydroxylase. *J Clin Invest* 1986; 78:1064-1071.
- [19] Wybenga DR, Pileggi VJ, Dirstine PH, Giorgio JD. Direct manual determination of serum total cholesterol with a single stable reagent. *Clin Chem.* 1970;16:980-984.

- [20] Turnberg LA, Mote AA. The quantitative determination of bile salt in bile using this layer chromatography and 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase. *Clin Chem Acta* 1969;24:253-259.
- [21] Hoffmann A, Schmalz M, Leineweber M. Cholesterol lowering action of HOE 402 in the normolipidemic and hypercholesterolemic Golden Syrian hamster. *Biochim Biophys Acta* 1996;1299:95-102.
- [22] Sessions VA, Salter AM. The effects of different dietary fats and cholesterol on serum lipoprotein concentrations in hamsters. *Biochim Biophys Acta* 1994;1211:207-214.
- [23] Fungwe TV, Cagen LM, Wilcox HG, Heimberg M. Effects of dietary cholesterol a hepatic metabolism of free fatty acid and secretion of VLDL in the hamster. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;200:1505-1511.
- [24] Ochoa B, Gee A, Jackson B, Suckling KE. Regulation of cholesterol ester metabolism in the hamster liver. *Biochim Biophys Acta* 1990;1044:133-138.
- [25] Jackson B, Gee AN, Martinez-Cayvela M, Suckling KE. The effects of feeding a saturated fat-rich diet on enzymes of cholesterol metabolism in the liver, intestine and aorta of the hamster. *Biochim Biophys Acta* 1990;1045:21-28.
- [26] Trautwein EA, Liang J, Hayes KC. Plasma lipoproteins, biliary lipids and bile acid profile differ in various strains of Syrian hamsters, *Mesocricetus Auratus*. *Comp Biochem Physiol* 1993;104A:829-835.
- [27] Stange EF, Scheibner J, Ditschnait H. Role of primary and secondary bile acids as feedback inhibitors of bile acid synthesis in the rat in vivo. *J Clin Invest* 1998;84:173-180.
- [28] Clerc T, Jomier M, Chautan M, Portugal H, Senft M, Pauli AM, Laruelle C, Morel O, Lafont H, Chanussot F. Mechanism of action in the liver of crivastatin, a new hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor. *Eur J Pharmacol* 1993;235:59-68.
- [29] Angelin B, Eusufzai S. Effect of Ursodeoxycholic acid on plasma lipids. *Scand J Gastroenterol* 1994;29:suppl 204:24-26.
- [30] Muller M, Jansen PLM. Molecular aspects of hepatobiliary transport. *Am J Physiol* 1997;272:G1285-G1303.
- [31] Rust S, Rosier M, Funke H, RealJ, Amoura Z, Piette JC, Deleuze JF, Brewer HB, Duverger N, Deneffe P, Assmann G. Tangier disease is caused by mutation

in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet* 1999;22:352-355.

[32] Young SG, Fielding CJ. The ABCs of cholesterol efflux. *Nat. Genet.* 1999; 22 :316-318.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Chemical structure of phloracetophenone (2,4,6-trihydroxyacetophenone)

Figure 2. Effect of THA treatment on cholesterol concentration of plasma lipoproteins in normal diet control and cholesterol-fed male hamsters with and without THA treatment. Animals received THA treatment at dose of 400 μ mol/kgBW, twice a day for 7 days.

*P < 0.05, significant difference from normal control.

[†]P < 0.05, significant difference from cholesterol-fed control.

Figure 3. Effect of THA treatment on cholesterol concentration of plasma lipoproteins in normal diet control, cholesterol-fed with and without THA treatment. Animals received THA treatment at dose of 400 μ mol/kgBW twice a day for 7 days.

*P < 0.05, significant difference from normal control.

[†]P < 0.05, significant difference from cholesterol-fed control.

Figure. 4. Effect of THA treatment on (a) endogenous cholesterol content and (b) activities of cholesterol 7 α -hydroxylase enzyme in liver microsomes. Animals received THA treatment at dose of 400 μ mol/kgBW twice a day for 7 days.

* P < 0.05, significant difference from cholesterol-fed control.

Figure. 5. Fecal excretion of bile acids (a) and cholesterol (b) in normal diet control, and cholesterol-fed with and without THA treatment. Animals received THA treatment at dose of 400 μ mol/kgBW twice a day for 7 days.

*P < 0.05, significant difference from normal-diet control.

[†]P < 0.05, significant difference from cholesterol-fed control.

Table 1

Effect of THA on body weight, liver weight, plasma cholesterol and triglyceride levels.

Parameters	Normal diet		Cholesterol-fed diet			
	Control ^a (Corn oil)	Control ^b (Corn oil + Solvent)	THA (μ mol/kg BW twice a day, 7 days)			
			0	300	400	600
Body weight (g)	87.8 $\pm$ 2.6	86.9 $\pm$ 3.6	87.0 $\pm$ 5.0	86.0 $\pm$ 2.5	88.1 $\pm$ 4.2	86.0 $\pm$ 4.9
Liver weight (g/100 g BW)	3.3 $\pm$ 0.1	3.3 $\pm$ 0.1	3.7 $\pm$ 0.2	3.7 $\pm$ 0.1	3.6 $\pm$ 0.2	3.9 $\pm$ 0.1
Plasma cholesterol (mg%)	150.9 $\pm$ 4.7	149.4 $\pm$ 7.7	372.4 $\pm$ 22.6**	277.4 $\pm$ 16.0**	193.4 $\pm$ 13.4**	173.2 $\pm$ 15.5**
(% of control)			(100%)	(74.5%)	(52%)	(46.5%)
Plasma triglyceride (mg%)	181.0 $\pm$ 6.6	187.3 $\pm$ 17.1	865.9 $\pm$ 158.2**	395.8 $\pm$ 41.5**	219.4 $\pm$ 32.0**	170.3 $\pm$ 32.7**
(% of control)			(100%)	(45%)	(25%)	(19.7%)

Values are means $\pm$ SEM obtained from 10 hamsters.

% of control represents the percentage of the value before treatment.

**P<0.001 significant difference from the normal control value.

++P<0.001 significant difference from cholesterol-fed control animals.

Control^a and Control^b are maintained with normal diet and were given corn oil and corn oil + solvent for THA, respectively.

Table 2.

Time course of THA treatment (400 $\mu\text{mol/kg BW}$) on plasma cholesterol and triglyceride levels.

Period of Treatment (days)	Plasma cholesterol			Plasma triglyceride		
	Control		THA	Control		THA
	mg%	% of control	mg% % of control	mg%	% of control	mg% % of control
0	268.6 $\pm$ 5.7	100.0 $\pm$ 0.0	273.0 $\pm$ 5.9 100.0 $\pm$ 0.0	437.7 $\pm$ 19.8	100.0 $\pm$ 0.0	432.2 $\pm$ 22.2 100.0 $\pm$ 0.0
3	313.7 $\pm$ 6.2	116.9 $\pm$ 1.1	228.3 $\pm$ 6.1** 83.9 $\pm$ 1.6**	632.2 $\pm$ 26.9	142.8 $\pm$ 3.8	325.1 $\pm$ 13.4** 75.8 $\pm$ 2.3**
7	335.1 $\pm$ 7.2	124.9 $\pm$ 2.1	180.2 $\pm$ 6.4** 66.0 $\pm$ 1.7**	738.6 $\pm$ 40.0	169.3 $\pm$ 7.1	238.2 $\pm$ 12.0** 55.9 $\pm$ 3.3**
10	352.9 $\pm$ 14.8	132.1 $\pm$ 6.5	144.8 $\pm$ 3.7** 53.2 $\pm$ 1.4**	744.3 $\pm$ 39.5	170.6 $\pm$ 6.8	151.1 $\pm$ 12.7** 35.5 $\pm$ 3.2**
14	377.7 $\pm$ 11.9	141.5 $\pm$ 6.1	137.8 $\pm$ 4.6** 50.5 $\pm$ 1.3**	849.9 $\pm$ 55.4	194.6 $\pm$ 10.3	142.7 $\pm$ 9.6** 33.6 $\pm$ 2.6**

Values are means $\pm$ SEM obtained from 10 hamsters.

** P < 0.001 significant difference from control at corresponding time.

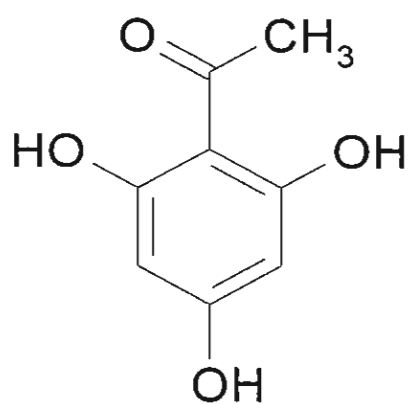


Figure 1.

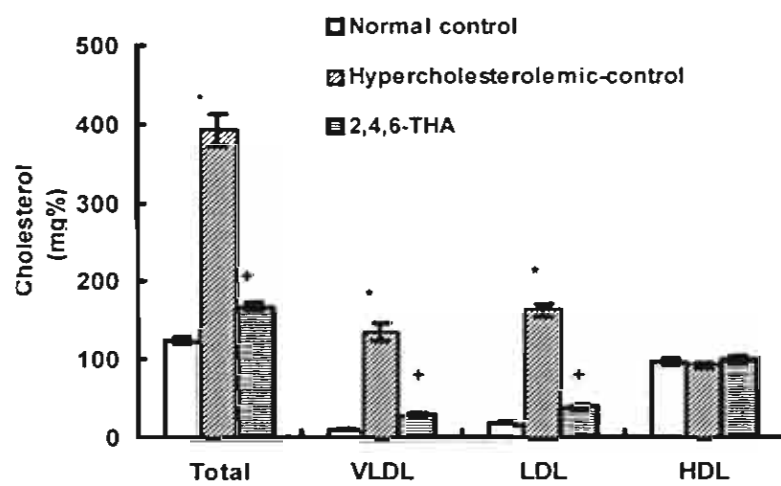


Figure 2.

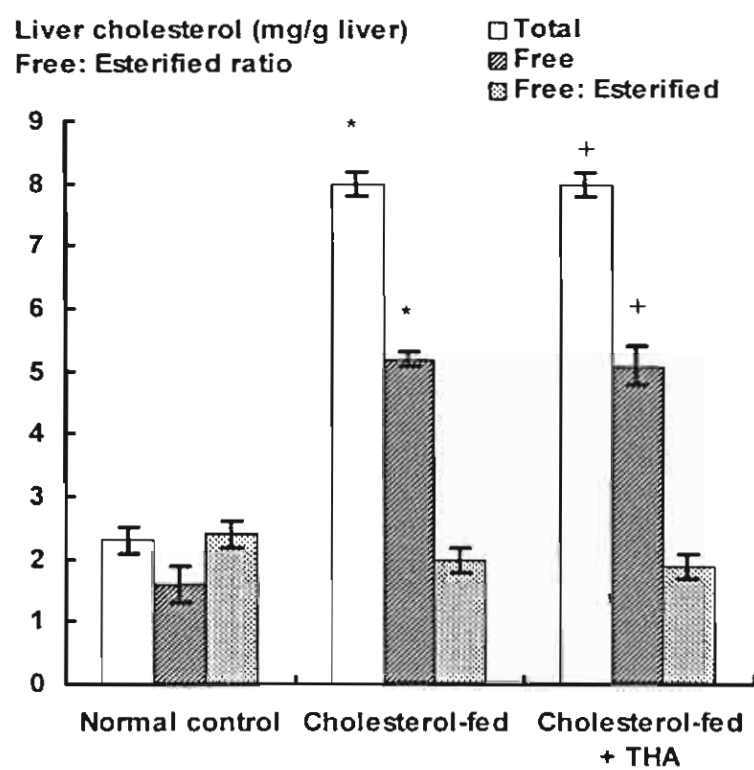


Figure 3.

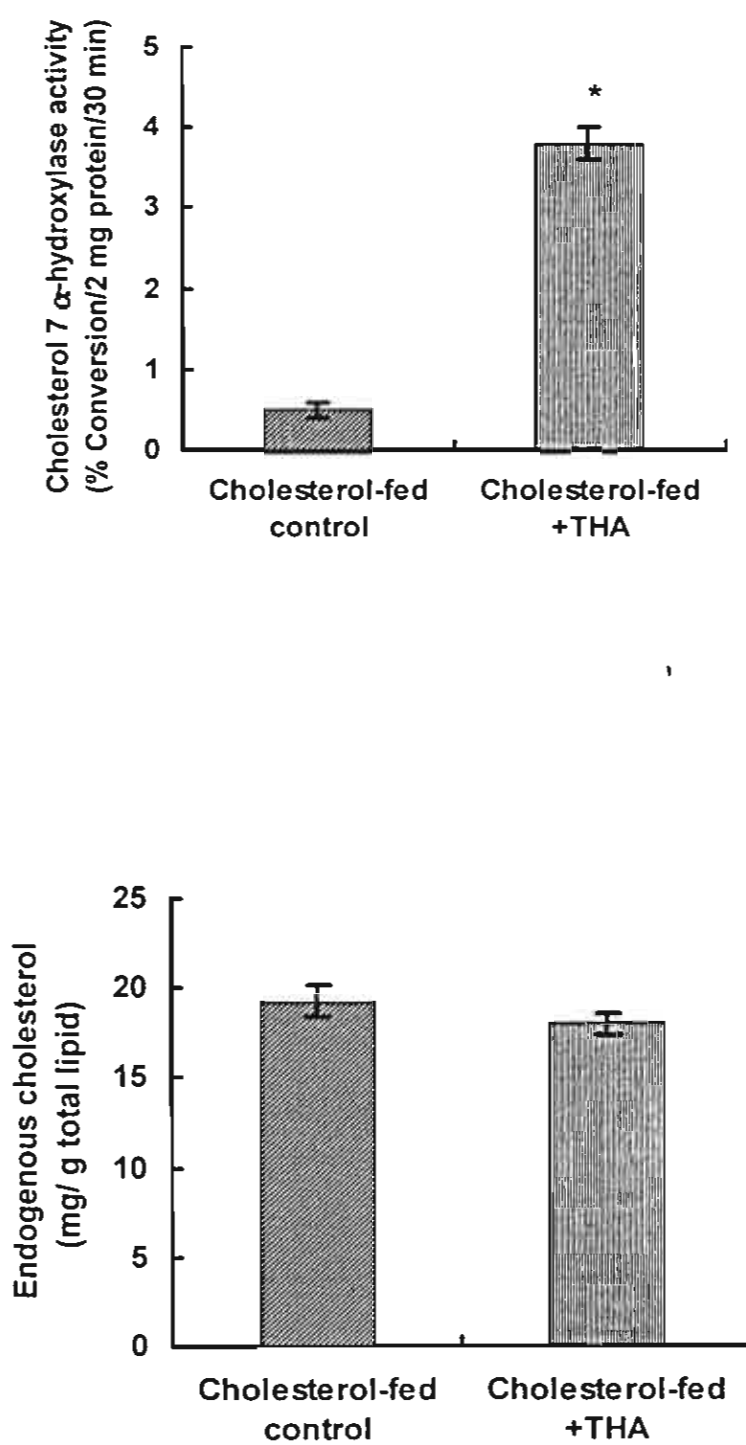


Figure 4.

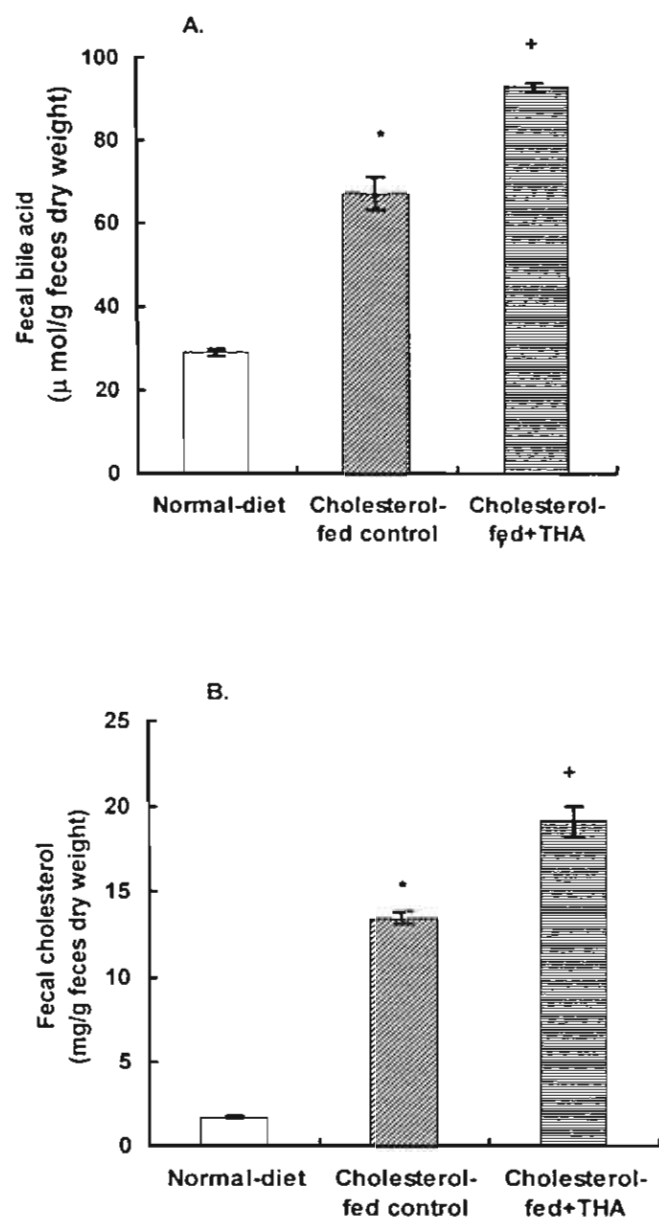


Figure 5