

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: DBG5080014

ชื่อโครงการ: การศึกษากลไกการปกป้องเซลล์ในเชิงลึกและความเป็นพิษของสารสกัดจาก *Sonneratia caseolaris* และการนำมาเตรียมในรูป polyelectrolyte complex scaffold

นักวิจัย และสถาบัน: ธวัชชัย แพชมัด ชุตินา ลิ้มมัทวาทิธี จุริย์ เจริญธีรบูรณ์ เพ็ญพรรณ เวชวิทยาคลัง คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร อ. เมือง จ. นครปฐม 73000

Email address: thawatchaienator@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 1 สิงหาคม 2550 – สิงหาคม 2555

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบส่วนต่างๆ ของลำพูได้แก่ เกสร ที่หุ้มดอก เนื้อผล เมล็ด รากอากาศ และ ใบ จากการทดสอบการจับอนุมูลอิสระด้วยวิธี ferric reducing antioxidant power assay (FRAP) พบว่าการวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นตรงของการทดสอบด้วย FRAP มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.9883-0.9959 โดยสารสกัดที่หุ้มดอกแสดงฤทธิ์ปานกลาง ขณะที่ค่า Gallic acid equivalent antioxidant capacity (GEAC) ของสารสกัดต่างๆ มีค่า 0.09-0.29 และความสัมพันธ์ระหว่างค่า GEAC และปริมาณรวมสารประกอบฟีนอลิกมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.6374 แสดงว่าฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน 63.74% มาจากสารประกอบฟีนอลิก สารสกัดของลำพูทำให้การอยู่รอดของเซลล์ลดลงเมื่อทดสอบโดยวิธี MTT assay โดยที่เซลล์เพาะเลี้ยง normal human skin fibroblast (NHSF) เป็นเซลล์ที่ไวต่อการเกิดพิษในลักษณะนี้มากที่สุด เมื่อเทียบกับเซลล์อื่นที่ใช้ในการทดสอบนี้ ที่ได้รับสารสกัดจากลำพู อย่างไรก็ตามไม่พบว่าสารสกัดแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ primary human fibroblast เมื่อทดสอบด้วยวิธี XTT โดยสารสกัดไม่ทำให้จำนวนเซลล์ลดลง อย่างไรก็ตามสารสกัดทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกไป อย่างไรก็ตาม เมื่อทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันในหนูขาวและหนูถีบจักรที่ได้รับสารสกัดโดยการรับประทาน พบว่าสารสกัดจากส่วนของ ใบ เมล็ด และ กลีบดอก ที่เตรียมโดยการหมักกับ methanol ไม่ทำให้สัตว์ทดลองตายหรือมีอาการผิดปกติจึงถือว่าสารสกัดเหล่านี้ไม่มีพิษ ผลการศึกษา cytotoxicity ด้วยวิธี LDH leakage assay และผลการศึกษาฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ HepG2 ของสารสกัดจากเมล็ดลำพูต่อพาราเซตามอลโดยวิธี MTT assay พบว่ามีผลสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกัน สารสกัดเมล็ดลำพู 30 $\mu\text{g/mL}$ มีฤทธิ์ต้านการเกิดอนุมูลอิสระในสภาวะปกติและสามารถต้านการเกิดอนุมูลอิสระจากความเป็นพิษของพาราเซตามอล พบว่าสารสกัดจากเมล็ดลำพูเพิ่ม glutathione และ catalase และลด superoxide dismutase และ CYP2E1 การลดการแสดงออกของ CYP2E1 น่าจะเป็นกลไกหนึ่งที่ทำให้ลดการเกิดการบาดเจ็บของเซลล์ HepG2 จากสภาวะปกติและสภาวะที่ได้รับสารพิษได้ จึงสรุปได้ว่าสารสกัดเมล็ดลำพูมีฤทธิ์ปกป้องตับโดยคุณสมบัติต้านสารอนุมูลอิสระ ระบบโครงสร้างความพรุนสูง 2 ระบบคือ chitosan-lactate (CL) และชนิดที่เกิดแรงระหว่างประจุบวกของ chitosan และประจุลบของ stearic คือระบบ chitosan-aluminum monostearate (CLA1st) ถูกเตรียมขึ้นโดยอาศัยเทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็งโดยใช้เครื่อง freeze dryer หลังจากนั้นนำมาประเมินคุณสมบัติต่างๆ คือวิเคราะห์ปฏิกิริยาระหว่างหมู่ฟังก์ชันโดยใช้เทคนิค FT-IR spectroscopy ศึกษาคุณสมบัติเชิงผลึกโดยใช้เทคนิค x-ray powder diffraction (XRPD) ศึกษาลักษณะโครงสร้างภายใต้

scanning electron microscope (SEM) ศึกษาคุณสมบัติเชิงความร้อนโดยใช้ thermogravimetry (TG) และ differential scanning calorimetry (DSC) ประเมินความแข็งแรงของโครงสร้างโดยใช้ texture analyzer ศึกษาความสามารถในการดูดซับน้ำและการกร่อนใน phosphate buffer pH 7.4 และศึกษาการยึดเกาะของเซลล์ HepG2 บนโครงสร้างความพรุนสูงทั้งที่ไม่บรรจุ และบรรจุสารสกัดจากเมล็ดลำพู ผลการศึกษาพบว่า IR spectra ของ CL และ CLA1st พบ peak ของ -C=O stretching ของ carboxylate salt form ที่บริเวณ $1580\text{-}1590\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งบ่งบอกถึงพันธะ ionic ทั้งระหว่าง amino group ของ chitosan กับ side chain molecules เช่น lactate และ stearate หรือเป็นของ aluminum monostearate (Alst) ที่ยังไม่เกิดการแตกตัว และหลังผ่านการให้ความร้อนขึ้นพบว่า IR spectra ที่บริเวณ $1580\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ มีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างชัดเจน โดยความร้อนขึ้นอาจทำให้เกิดพันธะ amide ขึ้นในระบบ หลังขึ้นรูปเป็นโครงสร้างความพรุนสูง พบว่าความเป็นผลึกของระบบลดลงอย่างมากเมื่อเทียบกับสารเดี่ยว ทั้งนี้ระบบ CLA1st มีความเป็นผลึกมากกว่า CL ลักษณะโครงสร้างที่พบจากภาพ SEM พบว่ามีลักษณะเป็นรูพรุนที่ต่อเนื่องสม่ำเสมอ และพบว่าระบบ CLA1st มีก้อนของ Alst เกาะกระจายอย่างสม่ำเสมออยู่บนผนังของโครงสร้าง ผลการศึกษาคุณสมบัติเชิงความร้อนโดย TG พบว่าหลังผ่านการขึ้นรูปเป็นโครงสร้างความพรุนสูงทำให้การสลายตัวโดยความร้อนเร็วขึ้นกว่าสารเดี่ยวเนื่องมาจากความเป็นผลึกที่ลดลง และพบว่าช่วงอุณหภูมิในการสลายตัวของระบบ CLA1st สูงกว่าระบบ CL เล็กน้อย แสดงถึงความคงตัวทางความร้อนที่ดีกว่า จากการทดสอบด้วย DSC พบ endothermic peak เล็กๆ ที่แสดงถึง stearic acid ปรากฏขึ้นใน thermogram ของ CLA1st ที่อุณหภูมิ 58°C และพบเด่นชัดขึ้นหลังผ่านการให้ความร้อนขึ้น การวิเคราะห์ความแข็งแรงของโครงสร้างโดย texture analyzer พบว่าระยะเวลาในการผสมมีผลต่อความแข็งแรง และเนื่องจากความไม่ชอบน้ำที่สูงกว่าของระบบ CLA1st จึงมีค่าการดูดซับน้ำและการกร่อนในตัวกลางรวมถึงการยึดเกาะของเซลล์บนโครงสร้างน้อยกว่าระบบ CL

คำสำคัญ: ลำพู กลไกการปกป้องเซลล์ ความเป็นพิษ โครงสร้างความพรุนสูง

Abstract

Project Code: DBG5080014

Project Title: การศึกษากลไกการปกป้องเซลล์ในเชิงลึกและความเป็นพิษของสารสกัดจาก *Sonneratia caseolaris* และการนำมาเตรียมในรูปแบบ polyelectrolyte complex scaffold

Investigators: Thawatchai Phaechamud, Chutima Limmatvapirat, Juree Charoenteeraboon, Penpan Wetwitayaklug; Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhon Pathom, Thailand 73000

Email address: thawatchaienator@gmail.com

Project Period: August สิงหาคม 2007 – August 2012

The antioxidant activity of crude methanol extracts from stamen, sepal, meat of fruit, seed, pneumatophore and leaf was evaluated using free radical scavenging, ferric reducing antioxidant power assay (FRAP). The linear regression analysis of FRAP assay indicated good correlation coefficient (r^2), 0.9883-0.9959. The sepal extract gave moderate antioxidant activity. Gallic acid equivalent antioxidant capacity (GEAC) values of these extracts were 0.09-0.29. The relationship between GEAC and total phenolic content could be confirmed by linear regression analysis which had a correlation coefficient (r^2) = 0.6374. This r^2 suggested that 63.74% of the reducing activity of extracts accessed from phenolic compounds. *In vitro* cytotoxicity testing of *Sonneratia caseolaris* extract was shown that these extracts decreased cell viability determining by MTT assay. Among those cells used in the study, cell line from normal human skin fibroblast (NHSF) was the most vulnerable cells for this toxic effect. The used extract was not toxic to primary human fibroblast determining with XTT assay but there was the cell morphological change. However, acute toxicity testing in rats and mice revealed that methanolic extracts from leaves, petals and seeds of *Sonneratia caseolaris* were classified as nontoxic. The results for cytotoxicity with LDH leakage assay for *Sonneratia caseolaris* methanolic seed extract to acetaminophen was corresponding to the result of hepatoprotective activity with MTT assay. The 30 $\mu\text{g/mL}$ extract inhibit the free radical in normal condition and acetaminophen inducing condition. This extract could increase glutathione and catalase but decrease superoxide dismutase and CYP2E1. The decrease in CYP2E1 expression should be one of mechanisms to decrease the HepG2 cell injury. Therefore *Sonneratia caseolaris* methanolic seed extract exhibited the hepatoprotection by antioxidative activity. Two chitosan sponges systems including chitosan-lactate (CL) and chitosan-aluminum monostearate (CLA1st) were fabricated by lyophilization technique using freeze dryer. Their physicochemical properties such as functional groups interaction, crystallinity and morphology were evaluated using FT-IR spectroscopy, x-ray powder diffraction (XRPD) and scanning electron microscope (SEM). Thermal behavior was investigated using thermogravimetry (TG) and differential scanning calorimetry (DSC). Structural strength was determined using texture analyzer. Water sorption and

erosion of the sponges were study in phosphate buffer pH 7.4. Cell attachment study was performed on the sponges with or without *Sonneratia caseolaris* seed methanolic extract. IR spectra of both CL and CLA₁st exhibited –C=O stretching of carboxylate salt form at 1580-1590 cm⁻¹ indicating ionic bonding between amino group of chitosan and side chain molecules such as lactate and stearate or that of aluminum monostearate (Al₁st) residue. After moist heat treatment, IR spectra in the ranges of 1580 -1700 cm⁻¹ was obviously changed. This indicated that moist heat treatment might cause amide bond creation in the system. Crystallinity of the system after fabrication as sponge was lower than that of the pure substances. However, CLA₁st exhibited more crystal pattern than that of CL. Morphology of the sponges under SEM exhibited porous structure with homogeneous and interconnecting pore. In CLA₁st, Al₁st clusters were uniformly distributed on the chitosan wall. Thermal behavior studied by TG indicated that thermal degradation of the sponges was found at lower temperature than that of the pure substances due to lowering of their crystallinity after fabrication. A degradation temperature range of the CLA₁st was slightly higher than that of CL indicated the higher thermal stability of CLA₁st. Small endothermic peak at 58°C that assigning to stearic acid was found in DSC thermogram of CLA₁st and this peak was found sharpen after moist heat treatment. Texture analysis revealed that mixing time had influence on structural strength of the CLA₁st sponge. Because of higher hydrophobicity of the CLA₁st, water sorption and erosion together with cell attachment were lower than that of CL system.

Key words: *Sonneratia caseolaris*, hepaoprotective mechanism, toxicity, scaffold